

目 录

序言	(ix)
第一章 核酸的化学组成	(1)
1.1 碱基	(1)
1.2 戊糖	(3)
1.3 核苷	(5)
1.4 核苷酸	(7)
1.5 核酸的修饰组分	(8)
1.6 核酸组分的分离纯化	(9)
参考文献	(10)
第二章 核酸的物化性质	(12)
2.1 核酸在细胞中的存在状态和分布	(12)
2.2 核酸的物化性质	(14)
2.2.1 核酸的紫外吸收	(14)
2.2.2 核酸的粘度	(15)
2.2.3 核酸的沉降特性	(16)
2.2.4 核酸的酸碱性质	(17)
2.3 DNA 的变性与复性	(18)
2.3.1 DNA 二级结构的稳定因素	(18)
2.3.2 变性	(24)
2.3.3 复性	(30)
2.3.4 核酸的杂交	(35)
参考文献	(36)
第三章 DNA 的结构	(37)
3.1 DNA 的一级结构	(38)
3.2 DNA 的二级结构	(44)
3.2.1 双螺旋模型的依据	(46)

3.2.2 双螺旋模型的主要特征	(47)
3.3 DNA 的三级结构	(52)
3.3.1 超螺旋	(53)
3.3.2 生物体内的超螺旋	(61)
参考文献	(69)
第四章 DNA 的变异结构	(71)
4.1 单链核酸的自组装结构	(72)
4.1.1 单链核酸内部的二级结构	(72)
4.1.2 单链螺旋	(74)
4.1.3 α -DNA	(75)
4.1.4 简单序列的自组装结构	(77)
4.2 DNA 双螺旋结构	(78)
4.2.1 Watson-Crick 双螺旋结构的构象变异	(78)
4.2.2 平行双螺旋 DNA(P-DNA)	(95)
4.3 DNA 的多链结构	(97)
4.3.1 G-四碱基体型四螺旋 DNA	(97)
4.3.2 含质子化 C 的四螺旋 DNA	(102)
4.3.3 四螺旋 DNA 可能的生物学意义	(102)
参考文献	(105)
第五章 三螺旋 DNA 的物化性质	(109)
5.1 历史背景	(109)
5.2 三螺旋 DNA 的形成	(111)
5.2.1 分子内三螺旋(H-DNA)	(112)
5.2.2 分子间三螺旋	(121)
5.2.3 平行三螺旋 DNA	(123)
5.3 三螺旋 DNA 的结构	(124)
5.3.1 三碱基体	(124)
5.3.2 Py-型三螺旋 DNA 的结构	(126)
5.3.3 Pu-型三螺旋 DNA 的结构	(131)
5.4 三螺旋 DNA 的热力学	(132)
参考文献	(137)
第六章 寡聚核酸的合成及其改性	(144)

6.1	核酸的化学合成	(145)
6.1.1	磷酸二酯合成法	(145)
6.1.2	磷酸三酯法	(146)
6.1.3	亚磷酸三酯法	(147)
6.1.4	固相自动合成法	(148)
6.1.5	化学合成 DNA 片段的分离和纯化	(149)
6.2	核酸的酶促合成	(152)
6.3	化学修饰的寡核苷酸	(155)
6.3.1	核糖基修饰	(156)
6.3.2	磷酸骨架的改性	(159)
6.3.3	寡聚核苷酸偶联物	(164)
6.3.4	碱基改性	(167)
6.4	寡聚核酸的应用	(168)
6.4.1	基因的合成	(168)
6.4.2	基因表达的调控系统	(169)
6.4.3	DNA 的序列分析	(169)
6.4.4	基因的分离	(170)
6.4.5	基因突变及蛋白质结构功能的研究	(171)
6.4.6	制备限制性内切酶识别序列的接头	(172)
6.4.7	人类基因病的诊断探针	(173)
	参考文献	(174)
第七章	三螺旋 DNA 与双螺旋 DNA 的识别与切割	(176)
7.1	双螺旋 DNA 的识别系统	(177)
7.1.1	DNA 结合蛋白质	(177)
7.1.2	DNA 小沟结合配基	(180)
7.1.3	寡聚核酸	(181)
7.2	双螺旋 DNA 的精确切割	(183)
7.2.1	限制性内切酶	(184)
7.2.2	DNA 断裂的小分子配基	(186)
7.2.3	序列特异性 DNA 断裂蛋白质	(190)
7.3	三螺旋 DNA 与双螺旋 DNA 的定点切割	(192)
7.3.1	Achilles 切割技术	(192)

7.3.2	ODN 定位三螺旋的形成与基因组 DNA 的切割...	(194)
7.3.3	RecA 酶介三螺旋的形成与基因组 DNA 的切割...	(198)
	参考文献.....	(199)
第八章	三螺旋 DNA 与反基因战略	(202)
8.1	基因的转录与表达	(203)
8.1.1	基因的复制	(204)
8.1.2	基因的转录	(208)
8.1.3	翻译	(211)
8.2	基因的调控	(213)
8.2.1	转录水平的调控	(214)
8.2.2	翻译水平的调控	(215)
8.2.3	生长和发育过程中的基因调控	(216)
8.3	寡聚核酸与基因调控	(217)
8.3.1	反义 RNA	(219)
8.3.2	反义 DNA	(221)
8.3.3	Ribozyme	(221)
8.3.4	反义技术的可能机理	(222)
8.3.5	反义技术的应用和难题	(224)
8.4	三螺旋 DNA 与反基因战略	(225)
8.4.1	反基因战略的原则	(226)
8.4.2	反基因战略的机理	(227)
8.4.3	涉及整胞的研究	(232)
8.4.4	反基因 ODN 作为药物的可能性	(233)
	参考文献.....	(236)
第九章	三螺旋 DNA 与基因重组	(240)
9.1	基因重组	(242)
9.1.1	同源重组	(242)
9.1.2	位点特异性基因重组	(256)
9.1.3	复制性重组——转座子	(261)
9.2	平行三螺旋 DNA 与同源重组	(263)
9.2.1	RecA 蛋白	(263)
9.2.2	RecBCD 蛋白	(266)

9.2.3	平行三螺旋 DNA	(268)
9.2.4	同源寻找导致 R-DNA 的形成	(271)
9.2.5	R-DNA 与减数分裂	(272)
9.2.6	R-DNA 与同源重组的起始专一性	(273)
参考文献.....		(276)
第十章 三链 DNA 新结构		(279)
10.1	新结构 DNA 的形成与性质	(280)
10.2	新结构 DNA 的有序性	(285)
10.3	新结构 DNA 形成的可能机理和结构	(288)
10.4	三链辫状结构的可能生物学意义.....	(292)
参考文献.....		(292)

第一章 核酸的化学组成

核酸是一种由很多单体组成的线性大分子，它的基本结构重复单元是核苷酸。核苷酸由碱基、戊糖和磷酸组成，其中碱基和戊糖的结合产物称为核苷。

核酸的戊糖有两类： β -D-核糖和 β -D-2'-脱氧核糖。根据核酸中所含糖的种类不同，可将核酸分成两大类：核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)。

RNA 主要由腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶四种碱基组成的核苷酸构成。DNA 主要由腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶及胸腺嘧啶四种碱基组成的脱氧核糖核酸构成。由此可见，从碱基组成来说，DNA 与 RNA 之间仅差一个碱基，即 DNA 中的胸腺嘧啶代替了 RNA 中的尿嘧啶。两类核酸的基本化学组成见表 1.1。

表 1.1 两类核酸的基本化学组成

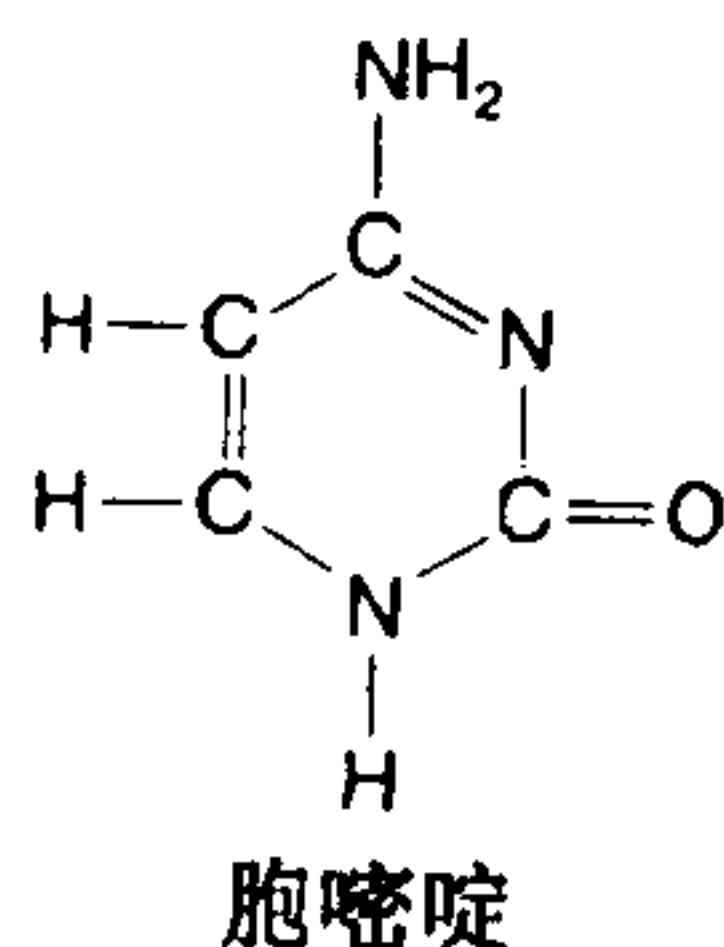
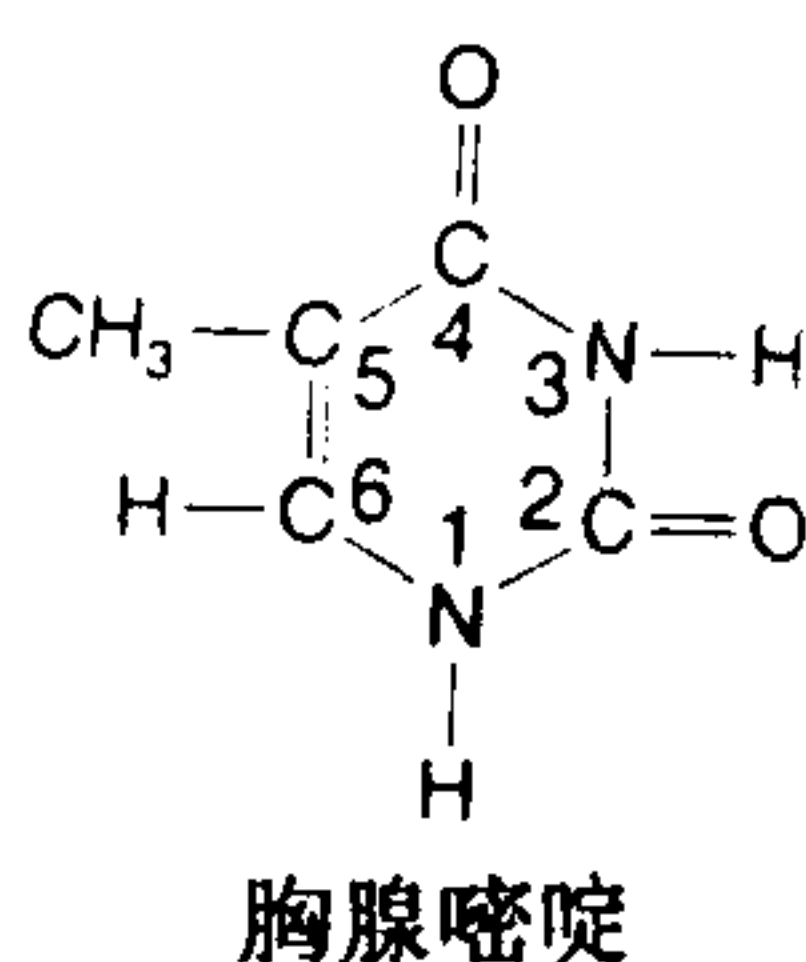
	DNA	RNA
嘌呤碱(purine bases)	腺嘌呤(adenine, A), 鸟嘌呤(guanine, G)	腺嘌呤、鸟嘌呤
嘧啶碱(pyrimidine bases)	胞嘧啶(cytosine, C), 胸腺嘧啶(thymine, T)	胞嘧啶、尿嘧啶(uracil, U)
戊糖	β -D-2'-脱氧核糖	β -D-核糖
酸	磷酸	磷酸

1.1 碱基

组成核酸的碱基主要有嘌呤和嘧啶衍生物，因此核酸中的碱基可分为两类：嘌呤碱和嘧啶碱。

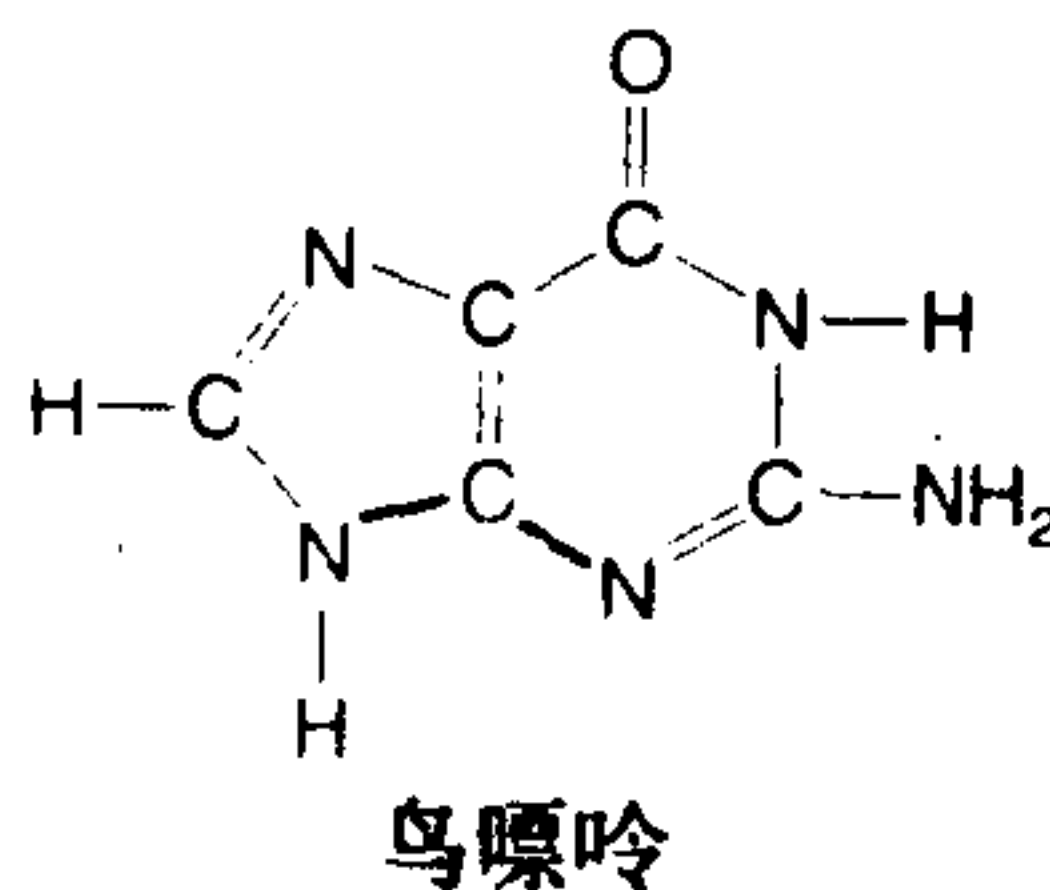
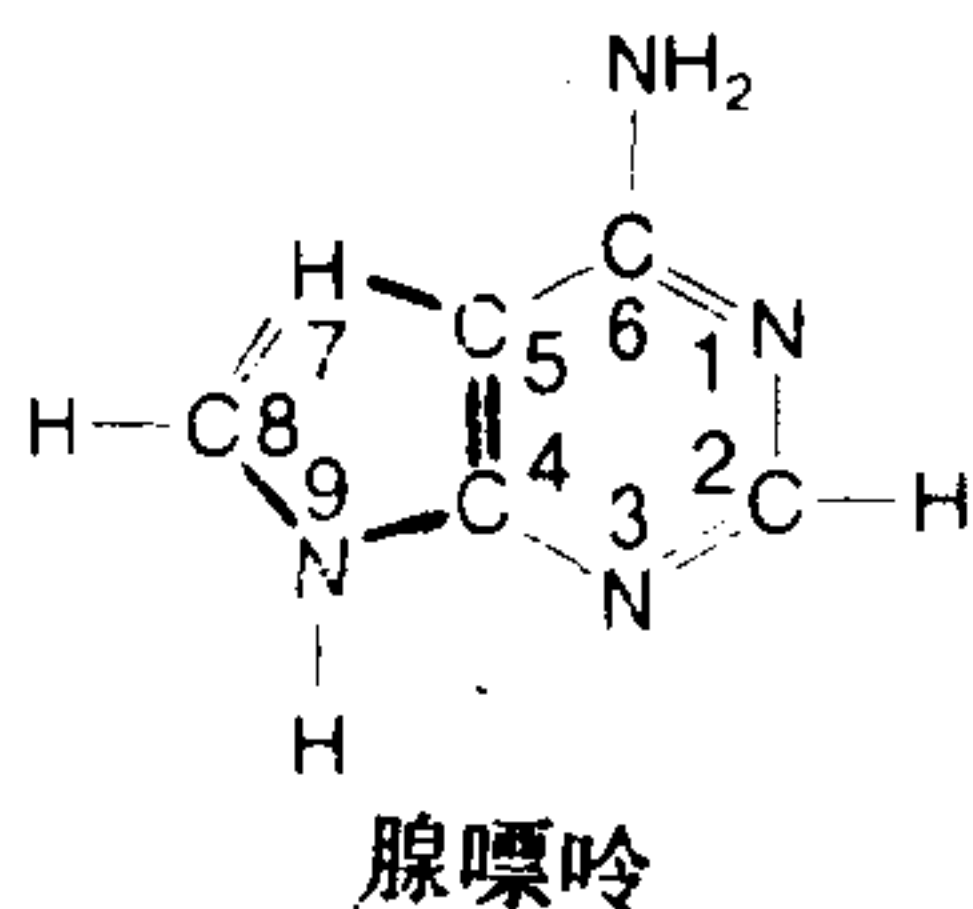
1. 嘧啶碱

嘧啶碱是嘧啶的衍生物,在核酸中常见的嘧啶碱有三类:胞嘧啶、尿嘧啶及胸腺嘧啶。其中胞嘧啶为 DNA 与 RNA 两类核酸所共有,胸腺嘧啶只含于 DNA 中,但某些 tRNA 中也发现有极少量的胸腺嘧啶核糖核苷酸。植物组织的 DNA 中还有相当数量的 5-甲基胞嘧啶。一些大肠杆菌的噬菌体核酸中,不含胞嘧啶,而由 5-羟甲基胞嘧啶所代替。



2. 嘌呤碱

两种核酸中均含有同样的嘌呤碱:腺嘌呤及鸟嘌呤。它们是由一个嘧啶环和一个咪唑环合成的嘌呤衍生物。天然存在的主要嘌呤碱还有次黄嘌呤(hypoxanthine)、黄嘌呤(xanthine)和尿酸(uric acid)。它们是嘌呤核苷酸类代谢的产物。



3. 稀有碱基

除了表 1.1 中所列的 5 类基本碱基外,天然核酸中还含有一些含量甚少的改性碱基,统称为稀有碱基。它们绝大多数是基本碱基的衍生物,即在碱基的某些位置上附加或取代掉某些基团。这些稀有碱基大部分具有抗生素活性,其中最重要的有阿糖核苷和用 β -D-阿拉伯糖代替 β -D-核糖的核苷等。稀有碱基的种类很多,目前在 RNA 和 DNA 中已检测到 60 多种核苷含有修饰碱基,其中大多数都是甲基化碱基。大分子核酸中的碱基甲基化过程发生于核酸大分子生物合成之后。它对核酸的生物学功能具有极其重要的意义,核酸中甲基化碱基的含量一般不超过碱基总量的 5%。但 tRNA 中甲基化碱基可高达 10%。表 1.2 为核酸中的一部分稀有碱基的名称。

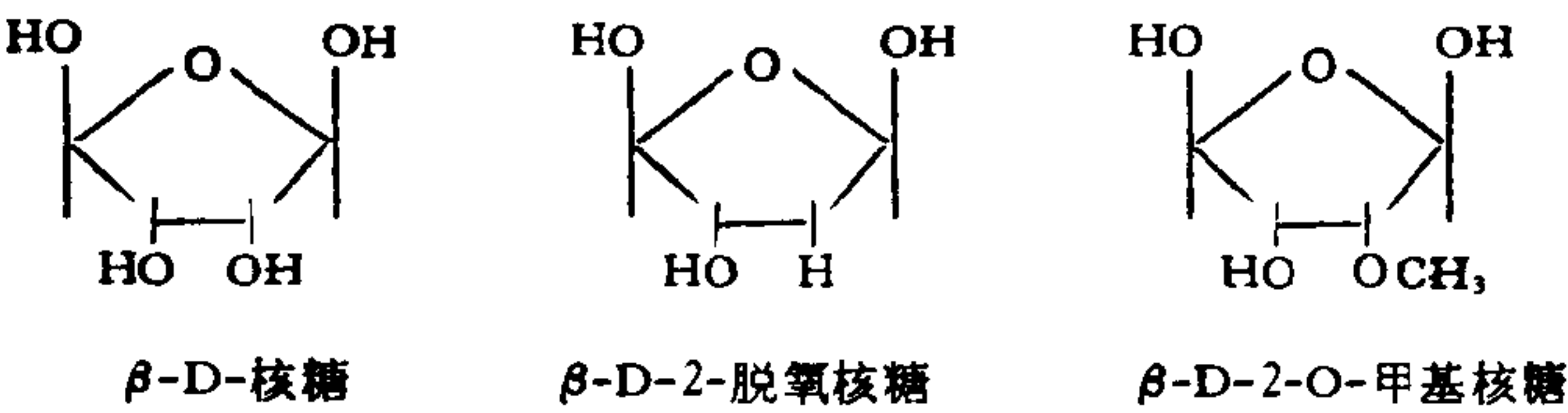
表 1.2 核酸中的主要稀有碱基

DNA	RNA
尿嘧啶(U)	1-甲基鸟嘌呤、1-甲基尿嘧啶(即胸腺嘧啶,T)、
5'-羟甲基尿嘧啶(hm ⁵ U)	N ² -甲基鸟嘌呤(m ² G)、1-甲基腺嘌呤(m ¹ A)、
5-甲基胞嘧啶(m ⁵ C)	2-甲基腺嘌呤(m ² A)、N ² ,N ² -二甲基鸟嘌呤(GMc)、
5-羟甲基胞嘧啶(hm ⁵ C)	N ⁶ -甲基腺嘌呤(m ⁶ A)、1-甲基次黄嘌呤(m ¹ I)、
N ⁶ -甲基腺嘌呤(m ⁶ A)	N ⁶ , N ⁶ -二甲基腺嘌呤(AMc)、N ⁶ -异戊烯基腺嘌呤(iA)、
	N ⁴ -乙酰基胞嘧啶(Ac ⁴ C)

1.2 戊糖

构成 RNA 链的戊糖是 D-核糖,DNA 链中的戊糖是 D-2-脱氧核糖。在某些 RNA 中发现有部分 D-2-O-甲基核糖。核酸中的 D-核糖和 D-2-脱氧核糖均为呋喃型环状结构。糖环中的 C1 是不对称碳原子,所以有 α -及 β -两种构型,但核酸分子中的糖苷键均为 β -糖苷键。在核酸中还发现有几个己糖,如 RNA 中的甘露糖、

半乳糖, DNA 中的葡萄糖、甘露糖等, 但这些己糖并不组成核酸的骨架, 而是与碱基的侧链相连接。



五元呋喃糖环通常是非共平面的, 可采用两类不同的折叠方式: 信封式(E)和扭转式(T)折叠, 前者是五元糖环上 4 个原子共平面, 另一个原子偏离平面 0.05 nm; 后者是五元糖环上 C1'-O-C4'三个原子共平面, 而 C2'和 C3'两个原子向平面相反的两侧方向偏离(图 1.1)。若 C2'或 C3'两个原子偏离平面的方向与 C5'原

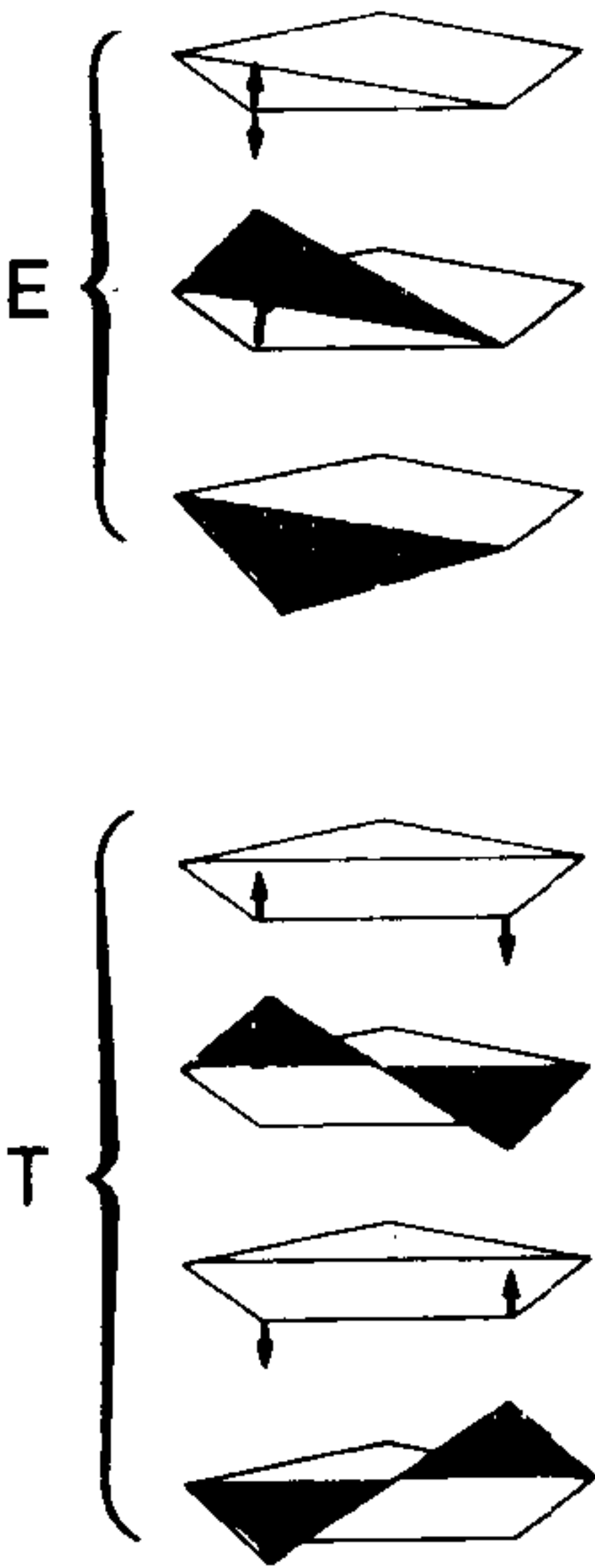


图 1.1 五元环折叠的两种方式:
信封式(E)和折叠式(T)。

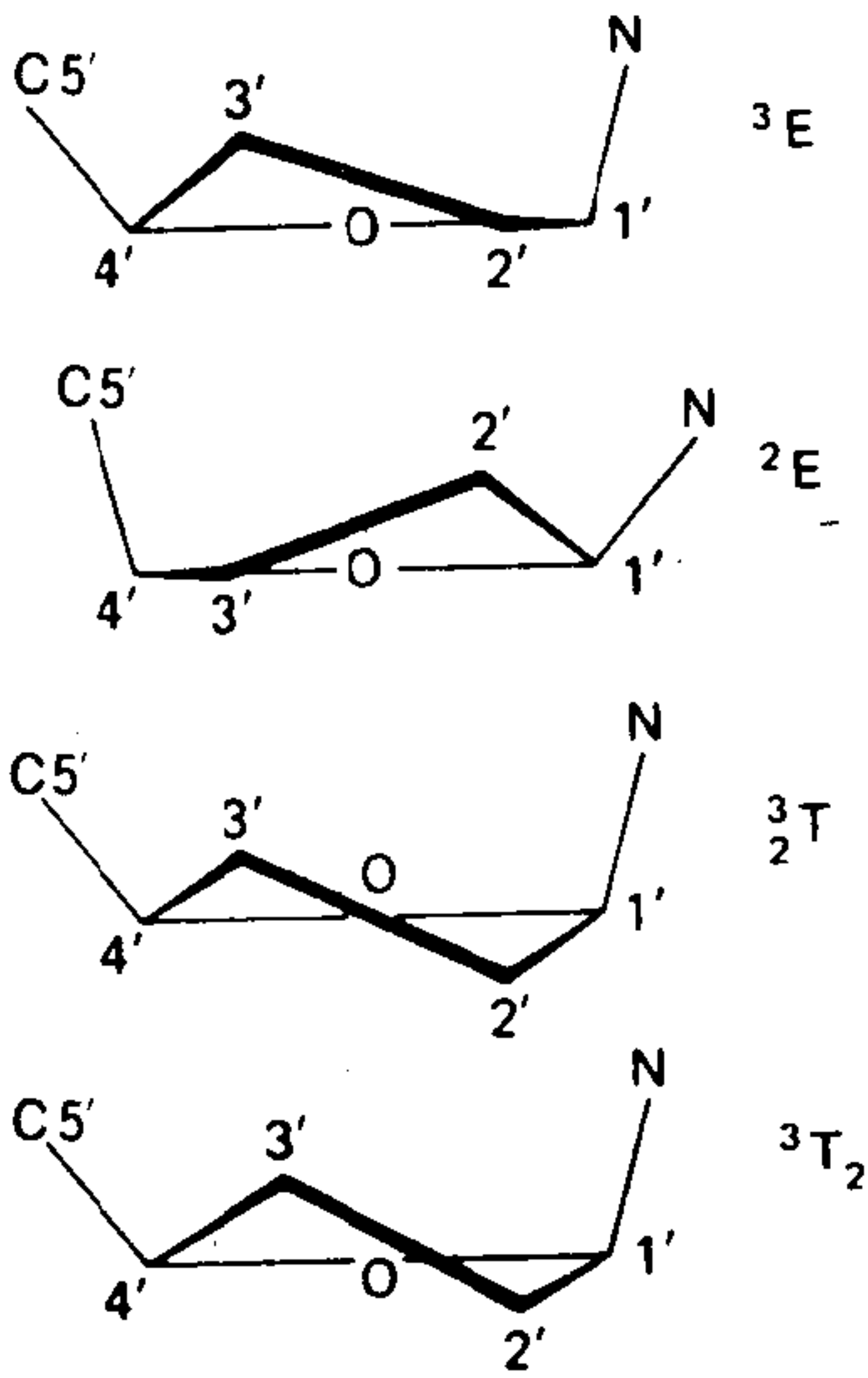
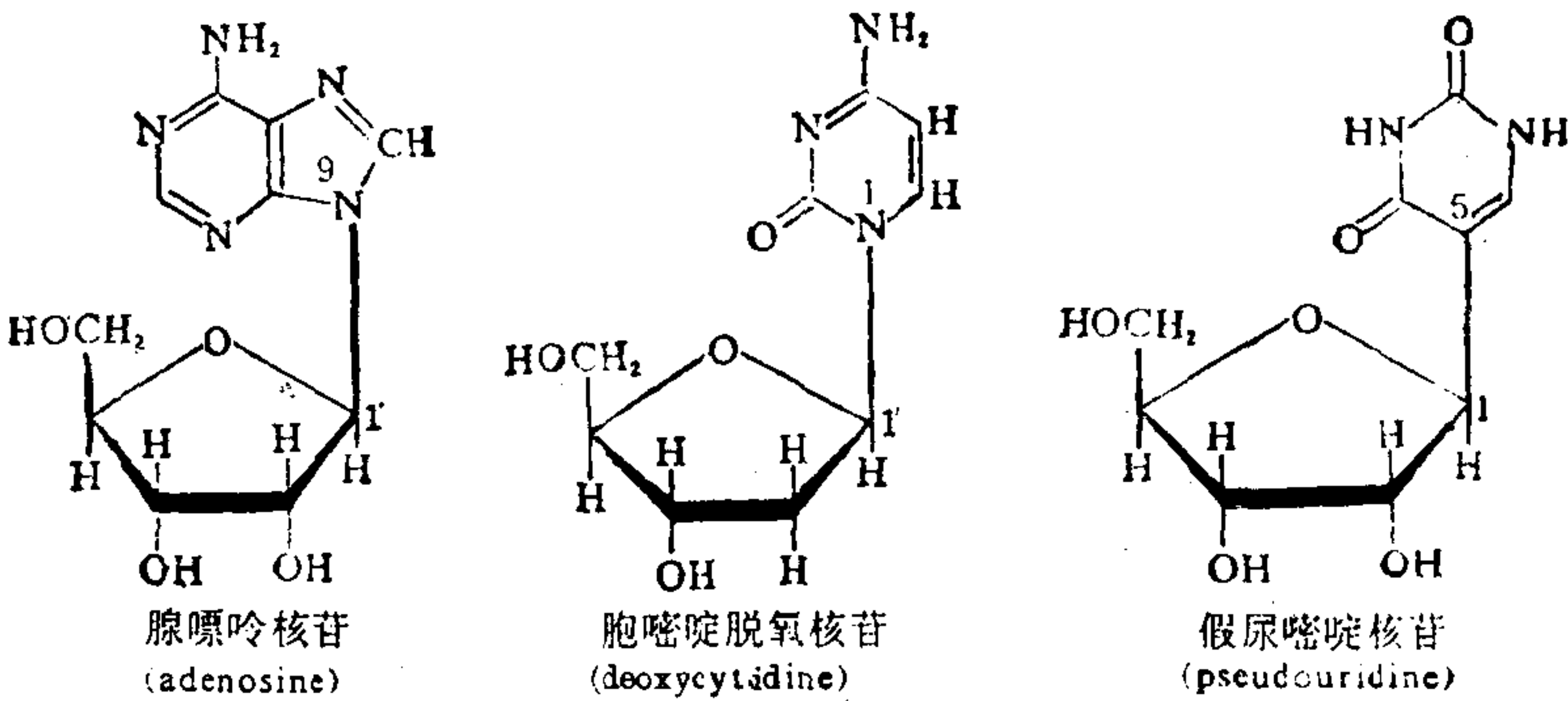


图 1.2 糖环折叠模式的定义。

子同向,则称为内式(endo)构象;反之,则称为外式(exo)构象。在信封式折叠中,内式构象偏离平面的原子顺序号写在字母E的左上方(如C2'-endo可简写为²E),外式构象中偏离平面的原子顺序号写在字母E的右下方(如C3'-exo可简写为E₃);而在扭转式中,将内式偏离的原子顺序号写在T的上方,外式偏离的原子顺序号写在T的下方,如果C2'和C3'原子偏离平面的距离相等,则把上、下标原子顺序号写在T的前边,若两者不等,则将偏离大的写在T的前边,反之写在T的后边。如图1.2所示。

1.3 核苷

核苷是一种糖苷,由戊糖和碱基缩合而成。糖与碱基之间以糖苷键相连接。糖的第一位碳原子(C1)与嘧啶碱的第一位氮原子(N1)或与嘌呤碱的第九位氮原子(N9)相连接。所以,糖与碱基之间的连接键是N—C键,一般称之为N-糖苷键。应用X射线衍射法已证明,核苷中的碱基与糖环平面互相垂直。



根据核苷中所含的戊糖不同,将核苷分为两大类:核糖核苷和脱氧核糖核苷。对核苷进行命名时,必须先冠以碱基的名称。例如腺嘌呤核苷,腺嘌呤脱氧核苷。表1.3为常见核苷的名称。

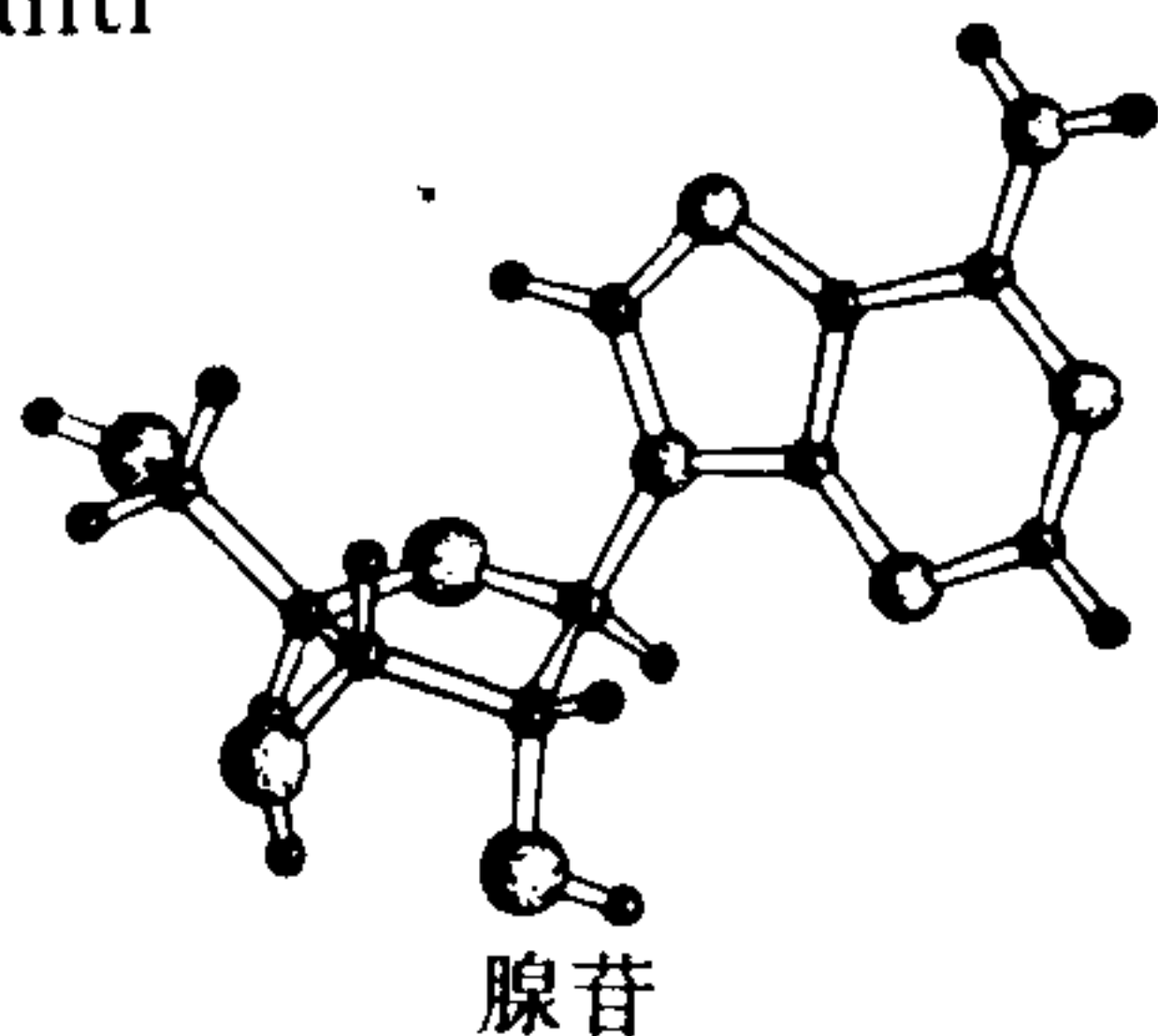
表 1.3 几种常见核苷

碱基	核糖核苷	脱氧核糖核苷
腺嘌呤	腺嘌呤核苷(adenosine, rA)	腺嘌呤脱氧核苷 (deoxyadenosine, dA)
鸟嘌呤	鸟嘌呤核苷(guanosine, rG)	鸟嘌呤脱氧核苷 (deoxyguanosine, dG)
胞嘧啶	胞嘧啶核苷(cytidine, rC)	胞嘧啶脱氧核苷 (deoxycytidine, dC)
尿嘧啶	尿嘧啶核苷(uridine, rU)	—
胸腺嘧啶	—	胸腺嘧啶脱氧核苷 (deoxythymidine, dT)

tRNA 中含有少量的假尿嘧啶核苷,它的结构很特殊,它的核糖不是与尿嘧啶的 N1 相连接,而是与嘧啶环的 C5 相连接,即形成 C—C 糖苷键。

相对于糖环,核苷中的碱基平面绕 N—C 糖苷键旋转就构成了核苷的顺式(syn)和反式(anti)构象(图 1.3)。顺式和反式构象

anti



syn

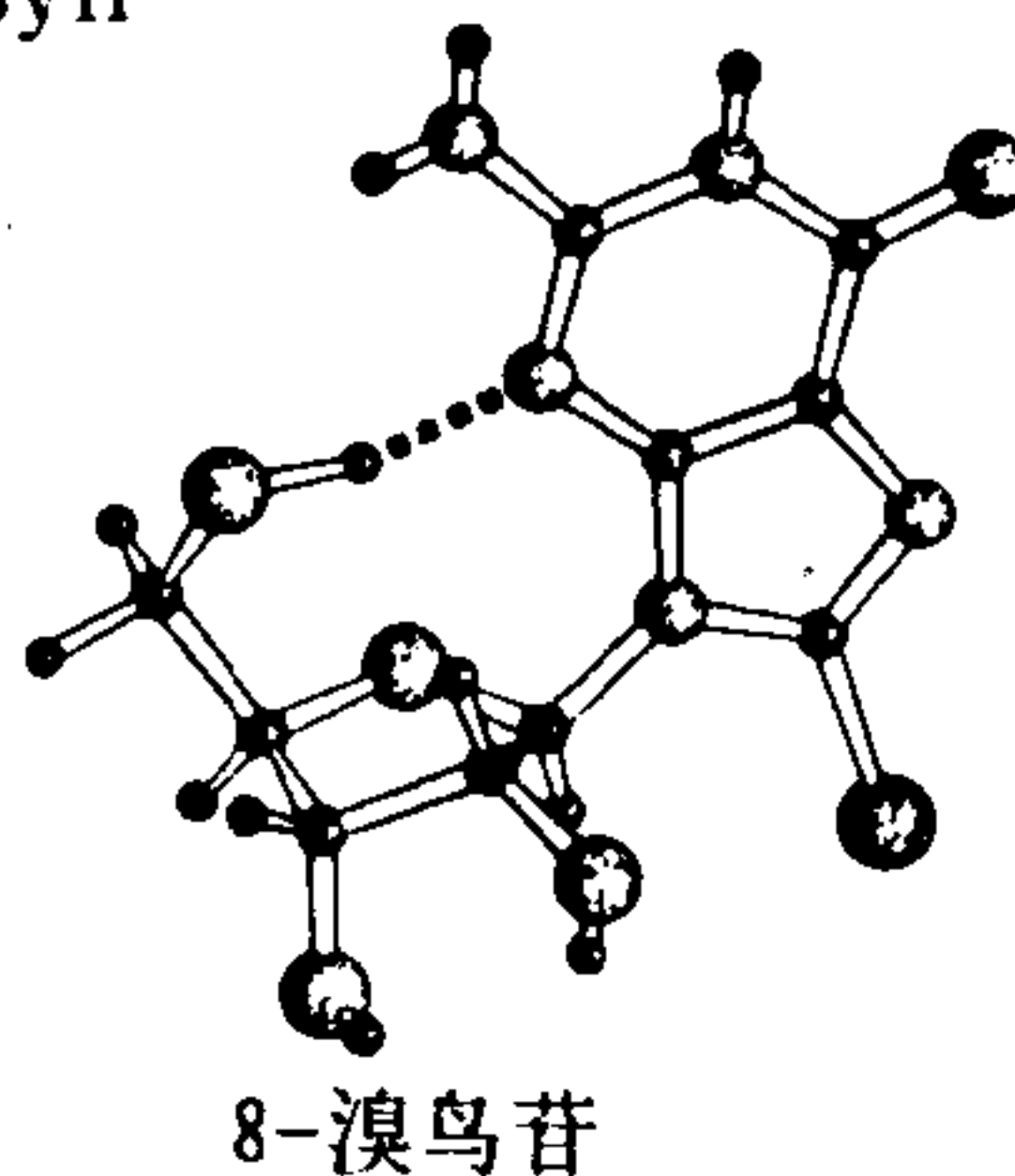


图 1.3 核苷的几何构象。

是碱基能采用的两种主要方向,可根据扭转角 χ 的大小来区分。嘧啶核苷酸和嘌呤核苷酸糖苷键的扭转角可分别简写为 $\chi(C2, N1, C1', O4')$ 和 $\chi(C4, N9, C1', O4')$,可采用俯视图($N9 \rightarrow C1'$ 和 $N1' \rightarrow C1'$)表示,见图 1.4。

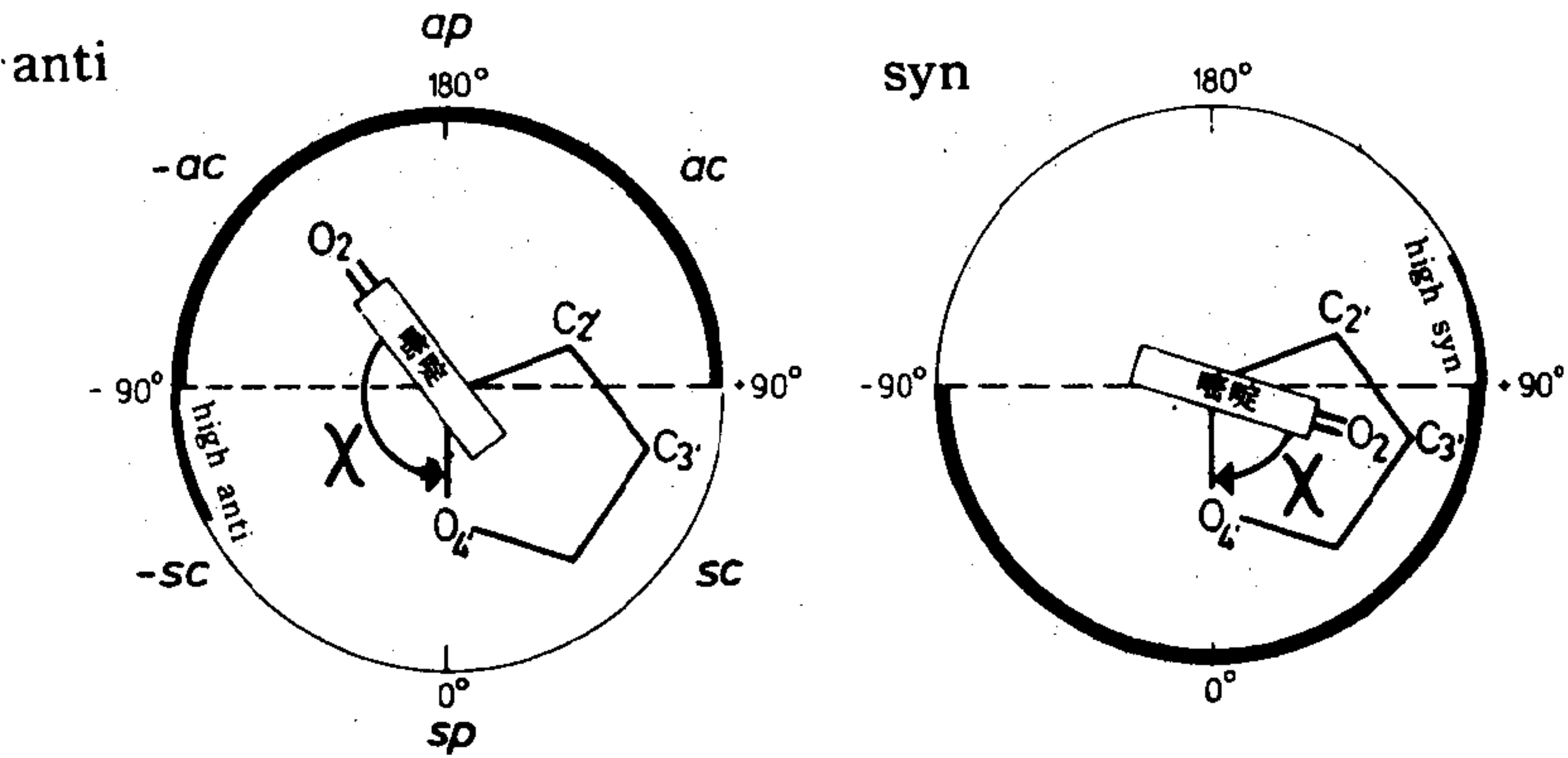


图 1.4 核苷顺、反构象示意图。

1.4 核苷酸

核苷中的戊糖羟基被磷酸酯化,就形成了核苷酸。因此,核苷酸是核苷的磷酸酯。根据核苷酸组成中的戊糖不同,将核苷酸分为两大类:核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸。

核糖核苷的糖环上有三个自由羟基,能形成不同的核苷酸:2'-核糖核苷酸,3'-核糖核苷酸及5'-核糖核苷酸。脱氧核苷的糖环上只有2个自由基,所以只能形成两种核苷酸:3'-脱氧核糖核苷酸及5'-脱氧核糖核苷酸。生物体内游离存在的多是5'-核苷酸。用碱水解RNA时可得到2'-及3'-核糖核苷酸的混合物。

1.5 核酸的修饰组分

核酸的基本组分包括磷酸、两种戊糖和五种碱基。1948年, Hotchkiss 在小牛胸腺 DNA 中检测到 5'-甲基胞嘧啶脱氧核苷, 这使人们认识到, 除了基本组分外, 核酸中还有一些特别的组分存在。经过 30 多年的研究, 到目前为止, 已在核酸中发现了近 80 种特别的组分。它们绝大多数是基本组分的衍生物, 即在碱基或核糖的某些位置上附加或取代掉某些基团。因此, 把这些特别的组分称为修饰组分。

各种修饰组分在生物体中的分布是不一致的。有的修饰组分普遍存在于各种生物体中, 如 5'-甲基脱氧胞苷存在于绝大多数生物体的 DNA 中; 有的修饰组分却只是少数生物体所独具, 如 N-(顺-4-羟异戊烯)-腺苷, 只在植物 tRNA 中存在。

不同种类的核酸分子在不同生物体中的被修饰程度也是不一致的。例如, 高等植物 DNA 中的修饰组分含量高达 10%, 而在果蝇 DNA 中却检测不到; 各种生物体的 tRNA 被修饰程度都较高, 而 5S-RNA 却几乎不含修饰组分。修饰组分在核酸中含量一般都很低, 只占总量的万分之几到百分之几。它们对核酸生物功能的影响是令科学家感兴趣的研究课题, 虽然目前还不能把某一修饰组分的存在与某一特定生物功能联系起来, 但对个别修饰组分的功能已有所了解。

含有修饰组分的核酸主链不变, 仍然由磷酸戊糖以 3', 5'-磷酸二酯键相连。修饰组分一般都是在 DNA 和 RNA 大分子合成以后才附加或取代上去的。在近 80 种修饰组分中绝大多数是修饰碱基, 少数是修饰核糖。还有极少数是糖苷键的连接部位异常。

1. 含有修饰碱基的核苷

目前在 RNA 和 DNA 中已检测到 60 多种核苷含有修饰碱基。比较简单的修饰是原有的嘌呤或嘧啶上的某个原子被甲基、甲

硫基、羟甲基等取代,或经脱氨、加氢等成为修饰碱基。有的修饰碱基结构比较复杂,如含有葡萄糖、氨基酸的碱基,以及那些母核不是一般碱基的类碱基组分。

2. 含有修饰核糖的核苷

目前只发现一种修饰核糖,即核糖 2'-OH 上的 H 原子被甲基取代,生成 β -D-2'-O-甲基核糖。DNA 中的脱氧核糖没有 2'-OH 基,因此,含有修饰核糖的核苷只存在于 RNA 中,其中有些是碱基和核糖同时被修饰。

3. 含有 C—C 糖苷键的核苷

这类修饰组分的结构与一般核苷不同之处在于碱基与核糖之间不是 N—C 糖苷键,而是 C—C 糖苷键。目前所知只有假尿嘧啶核苷及其衍生物属此。一般尿嘧啶核苷是尿嘧啶的 N1 原子与核苷的 C1' 原子相连,而假尿嘧啶核苷中是尿嘧啶的 C5 原子与核糖的 C 相连。

核酸中的修饰组分有的会影响到大分子的结构。例如,二氢尿嘧啶中 5—6 位饱和键有点折叠,这就影响了碱基之间的平行堆积,因而不能形成有序的螺旋结构。又如,含有 GC 的 DNA 片段当 C 的 5 位甲基化后,有利于 B-DNA 转变为 Z-DNA。此外,有些修饰组分与正常组分比较,其理化性质也有所改变,我们将在有关章节中论述。

1.6 核酸组分的分离纯化

核酸水解产生的 4 种基本碱基或核苷酸可用各种电泳或层析方法进行分离。如纸电泳、胶电泳、纸层析、离子交换层析、薄层层析、反相层析等。因修饰组分含量很低,分离鉴定时常采用同位素对核酸进行体内或体外标记。这个方法快速、敏捷且重复性好。应用适当的溶剂系统可以分离鉴定 20 多种 3'-核苷酸,16 种抗碱水

解的 N_mN_p 二核苷酸中的 14—15 种,约 20 种 5'-核苷酸或 40 余种核苷。

鉴定核苷水解产物分离图谱中各组分时,最常用而又最简便的方法是紫外吸收光谱法。核酸中的碱基,包括大部分已知的修饰组分,由于嘌呤和嘧啶碱基具有共轭双键,所有对 260 nm 附近的紫外光有强烈的吸收,因此,在紫外光照射下形成紫黑色的吸收斑,其中含有鸟嘌呤的组分在酸性条件下显示蓝色荧光,二氢尿嘧啶无紫外吸收。将核酸组分的标准样品和水解产物在同样条件下进行层析或电泳,然后在紫外灯下比较迁移情况,就能检出有关组分。修饰组分的纤维素双相薄层层析重复性非常好,因此,比较它们与 5 种常见组分的相对位置基本上就可以确定是何种修饰组分。当然,对于未知组分,须进行一系列物理、化学的结构和性质研究才能确定。

分离得到核酸水解后的各组分的溶液(如柱层析各部分收集液),则可用紫外光谱法鉴定。在不同 pH 条件下,各组分在紫外光区的最大吸收波长、最小吸收波长、最大吸收波长处的摩尔消光系数、吸收曲线形状以及几种波长吸收比值是各不相同的,对照文献就可鉴定各组分。一般说,游离碱基与其相对应的核苷紫外光谱比值相差很大,而对于同一碱基,其核苷、脱氧核苷、2'-O-甲基核苷、核苷酸、脱氧核苷酸之间的差异较小。

参 考 文 献

- [1] S. Davidson, *The Biochemistry of the Nucleic Acids*; Revised by R. L. P. Adams, et al., Academic Press, 1976.
- [2] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acids Structure*, Springer-Verlag, New York, 1983.
- [3] 曹凯鸣、李碧羽、彭泽国,核酸化学导论,复旦大学出版社,1991。
- [4] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), *Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and Their Constituents*, 1972, 25:1—4.
- [5] IUPAC-IUB Joint IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Abbreviations and Symbols for the Description of Conformations of Polynucleotides*

- Chains, *Eur. J. Biochem.* , 1983, 131: 9—15.
- [6] R. H. Hall, *The Modified Nucleoside in Nucleic Acids*, Columbia University Press, New York, 1971.
- [7] T. A. Trautner, *Methylation of DNA*, Springer-Verlag, Berlin, 1984.
- [8] H. Rogg, et al. , *An Improved Method for the Separation and Quantitation of the Modified Nucleoside of Transfer RNA*, *Nucl. Acids Res.* , 1976, 3: 285—295.

第二章 核酸的物化性质

2.1 核酸在细胞中的存在状态和分布

核酸是广泛存在的一类生物大分子,所有生物体均含有核酸。大多数核酸在细胞中是以与蛋白质结合的状态存在的,但是不同的核酸结合的蛋白质数量、成分和牢固程度有所不同,如真核生物中 DNA 与蛋白质牢固结合,形成核小体结构。真核生物的 DNA 主要存在于细胞核中,约有 5% 在线粒体、叶绿体等细胞器中。RNA 则 75% 左右存在于细胞质中,以核糖体中最多,约 15% 在细胞器中;约有 10% 在细胞核中,主要存在于核仁部位。原核生物 DNA 在核质区, RNA 分散在细胞质里。细胞质各种 RNA 中,以 rRNA 的数量最多, tRNA 其次, mRNA 最少。此外,以非细胞形式存在的病毒和噬菌体有的只含有 DNA,也有的只含有 RNA。

核酸在细胞中的含量很少,例如核 DNA,每个细胞中只有 10^{-12} — 10^{-15} g。不同物种细胞核中 DNA 的平均含量变动很大,但同一物种不同个体及个体的不同组织,其细胞核 DNA 的含量是恒定的。表 2.1 列出一些生物细胞中核 DNA 的含量和染色体

表 2.1 每个细胞或病毒中 DNA 的含量*

DNA 来源	DNA 量(10^{-12} g)	染色体数目
大肠杆菌噬菌体 T ₂	0.0002	—
大肠杆菌	0.0047	—
酵母菌	0.015	17
果蝇	0.18	4
爪蟾(蝌蚪)	22.2	18
小鸡	1.1	39
小鼠	2.53	20
人体	3.19	23
玉米	16.5	10
南美肺鱼	112.2	19

* 真核生物指单倍体基因组含量。