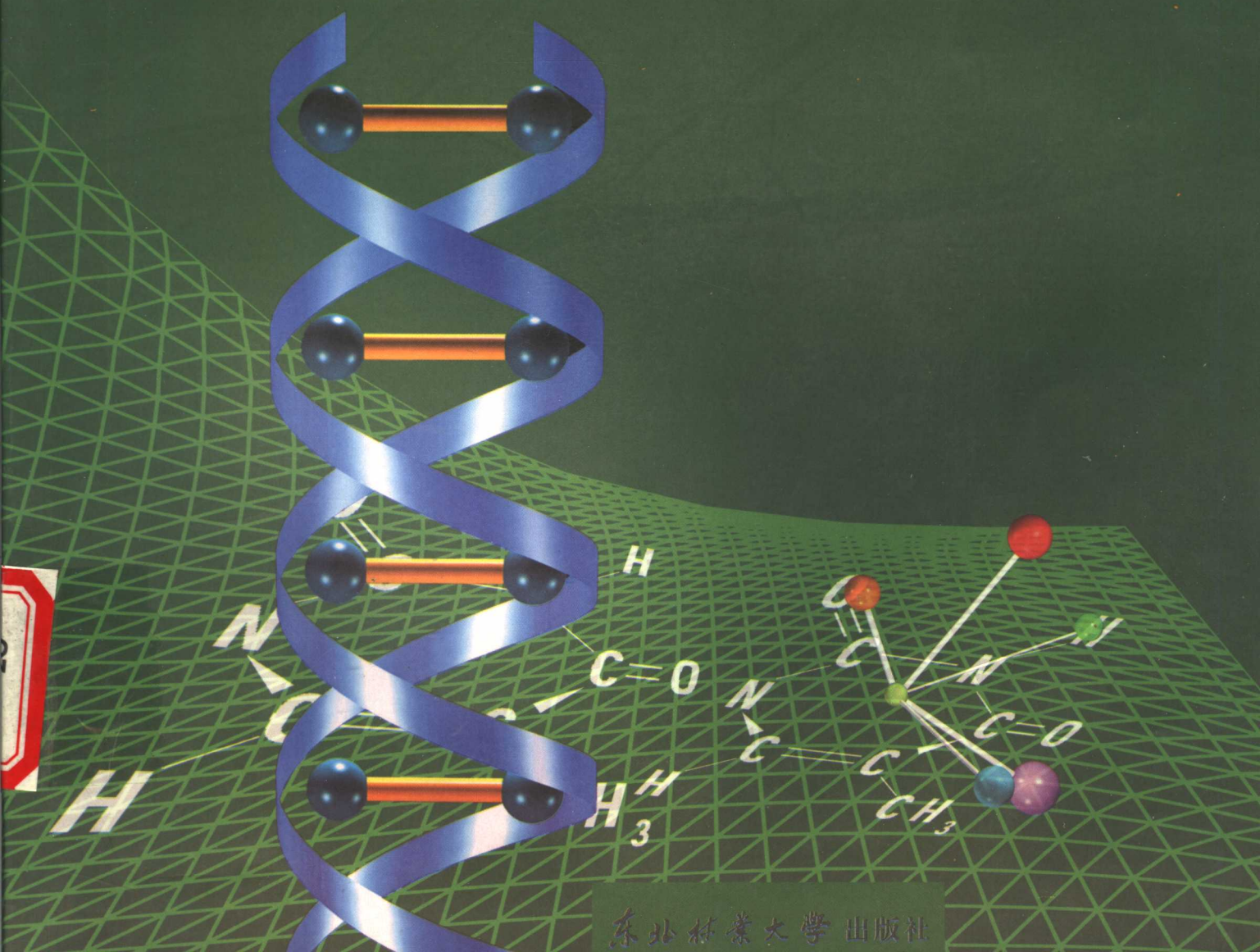


分子生物学

MOLECULAR BIOLOGY

主编 于英君 孙力



东北林业大学出版社

分子生物学

Molecular biology

主编 于英君 孙力

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学/于英君, 孙力主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003.12

ISBN 7-81076-523-X

I. 分... II. ①于... ②孙... III. 分子生物学 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 123629 号

责任编辑: 张红梅

封面设计: 彭 宇



NEFUP

分子生物学

Fenzi Shengwu Xue

主编 于英君 孙 力

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路26号)

黑龙江龙科印刷厂印装

开本880×1230 1/16 印张9.75 字数280千字

2003年12月第1版 2004年9月第2次印刷

ISBN 7-81076-523-X

Q·100 定价: 18.00元

《分子生物学》编委会

主 编	于英君	孙 力	
副主编	宋高臣	于 赫	郭丽新
编 委	于英君	于 赫	郭丽新
	孙 力	宋高臣	王蔓苏

前 言

分子生物学 (molecular biology) 是一门新兴的边缘学科。它的迅速发展及其在整个生命科学领域的广泛渗透和应用, 促使人们对生物学等生命科学的认识从细胞水平进入分子水平。在农业、畜牧、林业、微生物学等领域发展十分迅速, 如转基因动植物等。在医学领域, 为医学诊断、治疗及新的疫苗、新药物研制等开辟了新的途径, 使医学科学中原有的学科发生分化组合, 医学分子生物学等新的学科分支不断产生, 使医学科学发生了深刻的变革, 不认识到这一点就很难跟上科学发展的步伐。

本书分为上下两篇。上篇, 分子生物学基础理论, 包括分子生物学概念、核酸化学、端粒 DNA 与端粒酶、蛋白质的结构与功能、基因组与基因结构、基因表达与调控、基因工程技术、基因诊断与基因治疗和蛋白质组; 下篇, 分子生物学基本实验技术, 包括真核细胞基因组 DNA 的提取、质粒 DNA 的提取、凝胶电泳法检测 DNA、DNA 的限制性内切酶酶切技术、DNA 酶切片段的分离与回收技术、核酸探针标记、斑点杂交、核酸原位杂交、真核细胞总 RNA 的制备、Northern 印迹杂交技术和聚合酶链反应技术。本书是一部知识内容较新颖、实用性强的专著, 可作为医学、生物学等相关专业本科生、硕士研究生的教学用书和临床、科研人员的参考书。

于英君

2003 年 7 月

目 录

上篇 基础理论

第一章 分子生物学概念	(1)
第一节 历史上的基础研究	(1)
第二节 分子生物学概念的出现与形成	(3)
第二章 核酸化学	(5)
第一节 核酸的分子组成	(5)
第二节 核苷酸	(6)
第三节 核酸的分子结构	(7)
第四节 核酸理化性质与应用	(10)
第五节 DNA 分子结构的多态性	(12)
第三章 端粒 DNA 与端粒酶	(19)
第一节 概述	(19)
第二节 端粒 DNA	(19)
第三节 端粒酶	(20)
第四节 端粒结合蛋白与端粒长度的调节	(21)
第五节 端粒 DNA 及端粒酶 (活性) 与细胞衰老及肿瘤发生	(23)
第四章 蛋白质的结构与功能	(25)
第一节 蛋白质的分子组成	(25)
第二节 蛋白质的分子结构	(28)
第三节 蛋白质的性质与分类	(31)
第四节 几种重要的蛋白质类型	(33)
第五节 稳定蛋白质的作用力	(37)
第五章 基因组与基因结构	(39)
第一节 病毒基因组与基因结构	(39)
第二节 细菌类基因组与基因结构	(42)
第三节 真核生物基因组与基因结构	(44)
第六章 基因表达与调控	(50)
第一节 原核生物基因表达与调控	(50)
第二节 真核生物基因表达与调控	(54)
第三节 胰岛素基因表达过程	(71)
第七章 基因工程技术	(73)
第一节 概述	(73)

第二节 基本原理	(73)
第三节 应用	(77)
第八章 基因诊断与基因治疗	(78)
第一节 基因诊断	(78)
第二节 基因治疗	(81)
第九章 蛋白质组	(84)
第一节 蛋白质组概念的分析	(84)
第二节 蛋白质组学	(85)
第三节 功能蛋白质组学	(85)
第四节 研究蛋白质组的主要分离技术	(87)
第五节 蛋白质组研究的鉴定技术	(90)
第六节 蛋白质组学的主要研究内容及应用	(91)

下篇 基本实验技术

第十章 真核细胞基因组 DNA 的提取	(93)
第十一章 质粒 DNA 的提取	(96)
第一节 质粒 DNA 小量制备法	(96)
第二节 质粒 DNA 的大量制备	(99)
第十二章 凝胶电泳法检测 DNA	(102)
第一节 水平式琼脂糖凝胶电泳法	(102)
第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳法	(106)
第十三章 DNA 的限制性内切酶酶切技术	(111)
第十四章 DNA 酶切片段的分离与回收技术	(115)
第一节 玻璃棉离心法	(115)
第二节 低熔点琼脂糖挖块法	(117)
第十五章 核酸探针标记	(119)
第一节 放射性核素 ³² P 随机引物延伸标记方法	(119)
第二节 光敏生物素标记方法	(121)
第十六章 斑点杂交	(124)
第十七章 核酸原位杂交	(129)
第十八章 真核细胞总 RNA 的制备	(135)
第十九章 Northern 印迹杂交技术	(139)
第二十章 聚合酶链反应技术	(145)
第一节 经典 PCR 技术	(145)
第二节 逆转录 PCR 技术	(147)

上篇 基础理论

第一章 分子生物学概念

分子生物学 (molecular biology) 是一门新兴的边缘学科。从其发展的整个过程至今, 历经 100 余年, 经历了两个发展阶段, 即前分子生物学时期和分子生物学时期。即将进入后分子生物学时期, 现在我们正处在分子生物学时期。在本章我们将主要地介绍分子生物学形成过程中的重要历史事件, 据此来了解分子生物学形成的历史过程与概念。

第一节 历史上的基础研究

在此节中, 主要介绍核酸生物大分子的发现及其生物学功能研究方面的内容。

一、前分子生物学时期

从时间概念上看, 前分子生物学时期是指 1868 年至 1944 年, 即从 Miescher 发现核酸物质到 Avery 首次证实核酸是遗传物质。

(一) 核酸分子的首次发现

核酸 (nucleic acid) 是重要的生物大分子, 是一切生物的遗传物质, 担负着生命信息的贮存和传递的作用, 核酸的研究是分子生物学中最重要的研究领域。1868 年, 瑞士青年科学家 Miescher 在柏林大学研究细胞核化学工作中, 在外科绷带上脓细胞的细胞核中分离出一种有机物质, 它的高含磷量超出当时已经发现的任何有机化合物, 并有很强的酸性。由于该物质是从细胞核中分离出来的, 当时称之为核素 (nuclein), 即现在所称的核酸。它是历史上最早的核酸制品。

(二) 核酸分子碱基组成的研究

Leven 在 1920 年及 Chargaff 在 1943 年分别研究了不同来源的 DNA, 结果 Leven 提出 DNA 是由 A、G、C、T 四种核苷酸不断重复延伸而成。而 Chargaff 等用纸层析及紫外分光光度法研究的结果证明, 尽管不同生物的碱基组成不同, 但总是 $A = T$, $G = C$, 提示了 A-T, G-C 之间互补的概念。这一重要发现, 为以后的双螺旋结构模型提供了重要依据。

(三) 核酸分子的生物学作用研究

1. Griffith 的研究

1928 年, 英国内科医生 Griffith 做了一个遗传学方面的实验, 尽管他不是遗传学家, 也不关心遗传学问题, 但是通过他的工作, 第一次使人信服地证明了不同型肺炎球菌间转化作用的存在。

Griffith 利用肺炎球菌做感染实验, 在实验中发现: 当被杀死的有荚膜、光滑的 III 型肺炎球菌 (III S 型) 与无荚膜、不光滑即粗糙而未经处理的 II 型肺炎球菌 (II R 型) 一起注入小鼠体内。经过一段时间, 在小鼠体内可以找到新的有荚膜的、光滑的 III 型肺炎球菌 (图 1-1)。

据此, Griffith 指出这种变异肺炎球菌的出现, 是一种有转化作用的物质所引起的。Griffith 没有把灭活的 III S 细胞组分分成 Pr、DNA、糖等进行单因子转化实验, 但是他推测转化的“关键”与细菌的细胞壁有关, 并认为很可能是多糖。

随后十几年中, 细菌学家们重复了 Griffith 的实验。但是生物学家、遗传学家们并不知道 Griffith 的工作。

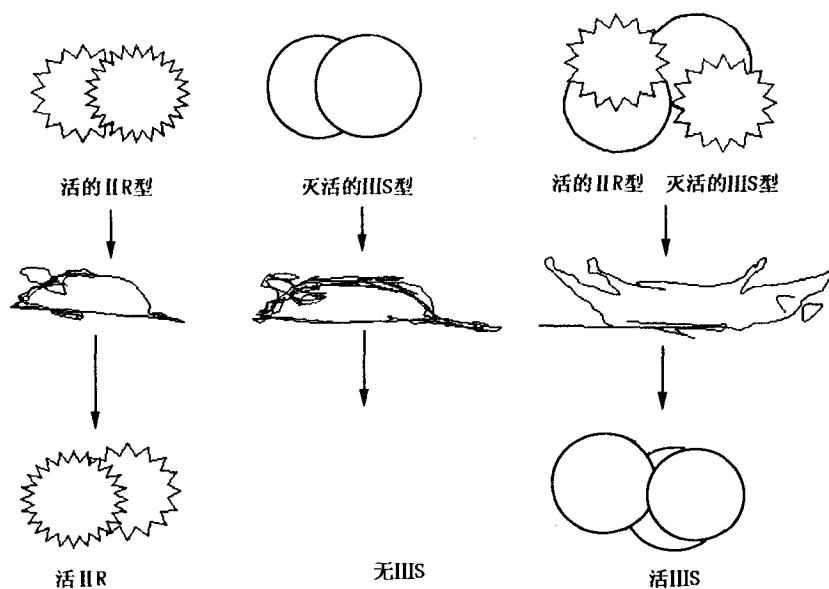


图 1-1 Griffith 实验的基本模型
II R 为无毒型 IIIS 为有毒型

2. Avery 的研究

O.T. Avery 等 1944 年重复了 Griffith 的工作，并发展了实验方法。Avery 没有用小鼠作为材料，而是把细菌直接接种在琼脂板上。

结果发现（图 1-2）：①活的 II R 型菌在琼脂板培养基上生长出 II R 型菌株。②加热杀死的 IIIS 型菌在培养基表面不产生 IIIS 型菌株。③但是活的 II R 型菌株与杀死的 IIIS 型菌株中提取的 DNA 混合培养，结果生长出 IIIS 型有毒菌株。

随后，Avery 进行了单因子分析。他用从 IIIS 型菌株中分别提取 RNA、Protein 和碳水化合物等物质，分别进行实验，都不能引起转化的作用。

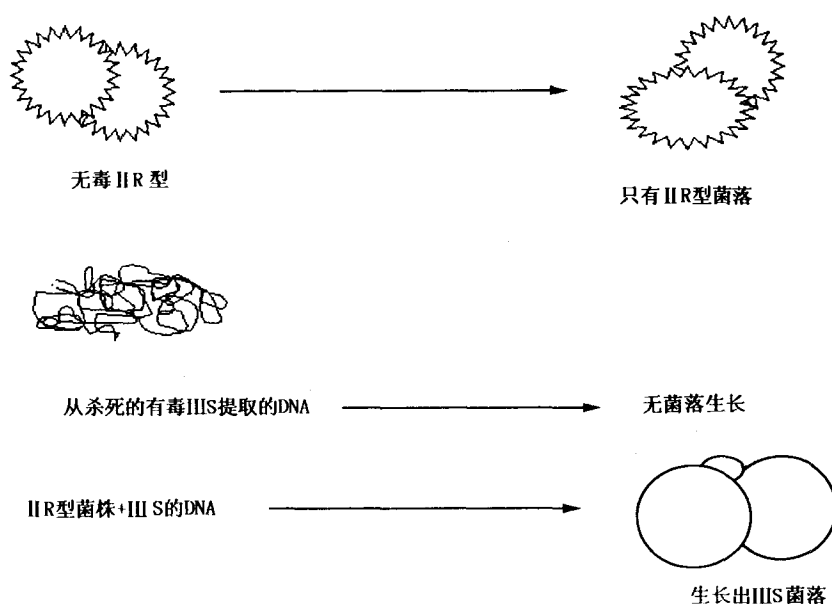


图 1-2 Avery 的实验模型

Avery 的这一实验,采用了提取的核酸来代替被杀死的ⅢS型肺炎球菌,得到转化作用的成功。它的实验在历史上首次承认核酸是遗传物质。某些人认为 Avery 的实验标志着分子生物学和分子遗传学的开始,有一位卓越的分子遗传学家尊称 Avery 为分子生物学的鼻祖。Avery 发现有活性的转化物质是 DNA 这一事实,博得了人们的广泛赞赏。

二、分子生物学时期

分子生物学时期是从 1953 年至今,即 Watson 和 Crick 对 DNA 分子双螺旋结构发表到目前为止。

James Watson 和 Francis Crick (1953) 根据前人工作的基础,总结了当时核酸中 DNA 的一些物理与化学上的结构分析结果,以及对 DNA 纤维 X 射线分析的结果,提出了 DNA 的双螺旋分子模型。他们这一杰出成就被认为是 20 世纪自然科学的重大突破之一,由此两人获得 1962 年诺贝尔化学奖。这一开创性的工作是核酸研究的一个重要里程碑,它揭开了现代分子生物学研究的序幕。Watson 与 Crick 提出这一模型后,很快又用它解释了 DNA 作为遗传物质的可能性与理论依据,确立了 DNA 就是基因的分子生物学概念,从而大大促进了核酸的研究和推动了它的分子生物学及大分子结构的研究。

J.D.Watson 和 F.H.C.Crick 关于“核酸的分子结构—脱氧核糖核酸的结构”一文发表于 1953 年 4 月 25 日《Nature》171 卷,第 737~738 页。主要内容:

“脱氧核糖核酸盐结构是含两条环绕同一根轴的螺旋链……

每条链都是由磷酸二酯基团通过 3', 5' - 键将 β -D 脱氧呋喃核糖残基连接而成……

两条链都是右手螺旋,但由于二重对称,两条链中的原子顺序走向相反(反向平行)……

碱基在螺旋内部,磷酸在外侧……

糖和与其相连的碱基接近垂直……

在每条链上每隔 0.34nm 就是一个残基……

在每一条链上该结构每隔 10 个碱基(3.4nm)就重复一次……

这种结构的新颖之处在于两条链靠嘌呤碱基和嘧啶碱基维系在一起……

嘌呤的第一位与嘧啶的第一位;嘌呤的第六位与嘧啶的第六位形成氢键……

以酮式(而不是烯醇式)构型, A 与 T; G 与 C 才能键合在一起……

实验发现它们各量之比非常接近 1……

依上述碱基键合(配对)设想,知道一条链的碱基顺序,则另一条链的碱基的顺序就自动确定了……

用核糖代替脱氧核糖建立这种结构也许不可能,因为核糖多出的氧原子将导致一个近的 Vander Waals 接触。……”

自 Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋模型后至今,这一学说经受了时间的考验,持怀疑态度的人几乎没有了。在这一认识的指导下,人们开展了数千万次有益的实验研究,从而进一步澄清了遗传信息可以编码、贮存、转录以及转译(翻译)和调节等工作方式。

第二节 分子生物学概念的出现与形成

一、分子生物学一词的出现

依 John Kendrew (1994) 主编的《分子生物学百科全书》中记载,第一个使用分子生物学一词的人是 Warren Weaver (1938)。他在写给洛克菲勒基金会的报告中讲到:在基金会给予支持的研究中,有一系列属于比较新的领域,可以称为分子生物学。此后,以分子生物学命名的研究机构和刊物相继出现。1956 年英国剑桥医学研究委员会生物系统分子研究单位改名为剑桥医学委员会分子生物学实验室;1959 年出现分子生物学杂志;1963 年出现“欧洲分子生物学组织”等国际性学术组织。

二、WHAT IS MOLECULAR BIOLOGY

什么是分子生物学？要回答此问题，就目前来讲，尚未有被广泛接受的定义。在 John Kendrew 主编的《分子生物学百科全书》中也无确切定义。不过，在这里我们来欣赏一下国内外科学家对分子生物学所下的定义或看法。

国外 Crick：“当别人问我所从事什么专业时，我不能一一告诉人家，我是化学家、结晶学家、分析化学家、有机化学家等，我只能回答我是分子生物学家。”

国内 郑集（1993）：“分子生物学这个名词的定义，目前还不明确，顾名思义，应当是指在分子水平上研究生命的科学，它的领域应包括生物化学、生物物理及一切其他在分子水平上研究生命现象的科学，……”黄熙泰（1993，南开大学）：“分子生物学就是现代生物学，是生物化学与遗传学、微生物学、细胞学、生物物理学等学科相结合的基础上发展起来的崭新的学科。它能从分子水平上了解各种生命现象的根本原因。”张有尚（1995，中国科学院上海生化所）：“作为一种边缘学科，它是从生物化学、生物物理、遗传学、微生物学等多种学科，经过相互杂交、相互渗透而生长出来的。”

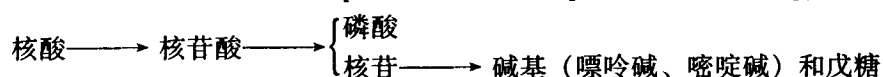
从上述各有关分子生物学概念来看，虽然不完全相同，但是几乎都承认其存在着多学科相互作用和在分子水平上研究生命现象与规律。因此，我们认为：分子生物学是多种学科相互交叉渗透并集中在分子水平上研究生命现象与规律的新兴学科。

第二章 核酸化学

第一节 核酸的分子组成

一、核酸的基本成分

核酸是高分子化合物。核酸经水解过程可首先得到核苷酸分子，核苷酸分子继而水解产生磷酸和核苷 (nucleoside)，核苷最终水解产物是戊糖 (pentose)、嘌呤碱 (purine) 和嘧啶碱 (pyrimidine) (图 2-1)。



核糖核酸 (RNA) 和脱氧核糖核酸 (DNA) 基本成分的异同，主要在戊糖和碱基上的差异。前者为核糖，后者为 D-2 脱氧核糖；碱基方面前者为尿嘧啶而后者则为胸腺嘧啶，其他相同 (表 2-1)。

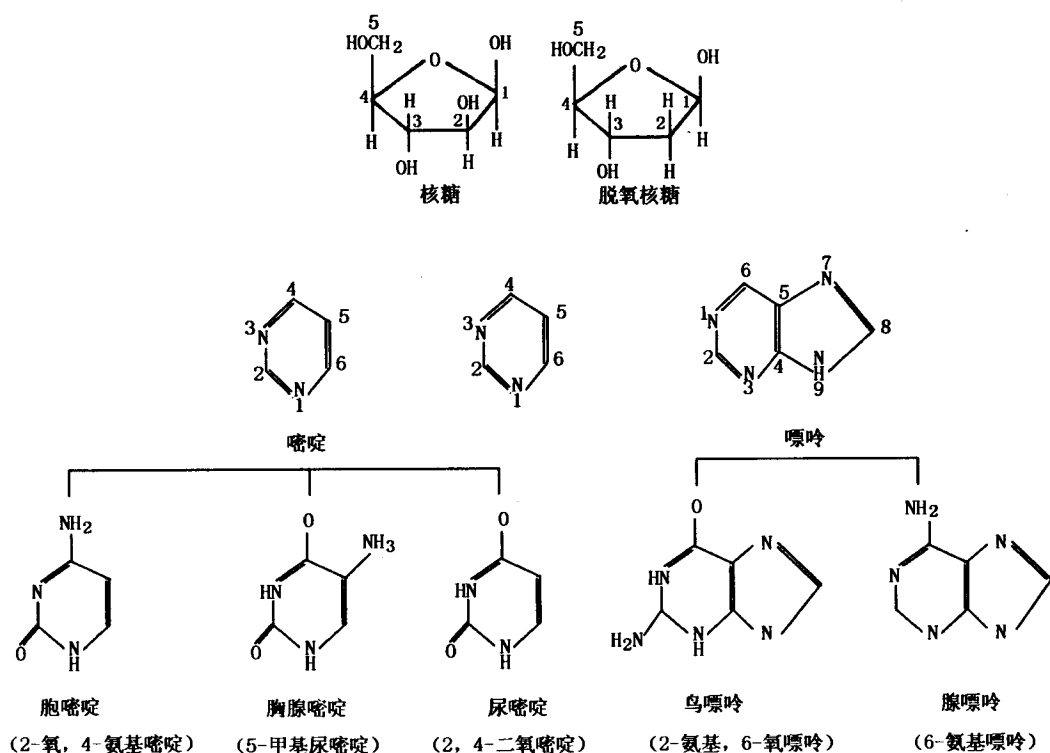


图 2-1 参与组成核酸的戊糖与主要碱基

表 2-1 核酸的基本成分

基本成分	核糖核酸 (RNA)	脱氧核糖核酸 (DNA)
磷酸	磷酸	磷酸
戊糖	D-核糖	D-2-脱氧核糖
嘌呤碱	腺嘌呤、鸟嘌呤	腺嘌呤、鸟嘌呤
嘧啶碱	胞嘧啶、尿嘧啶	胞嘧啶、胸腺嘧啶

二、稀有碱基

此外，有的核酸分子还含有少量的稀有碱基（rare base）成分，稀有碱基是指除 A、G、C、U、T 外的一些碱基，主要包括有二氢尿嘧啶（DHU）、假尿嘧啶（ ψ , pseudouridine）、甲基化的嘌呤（ ^mG 、 ^mA ）等（图 2-2）。

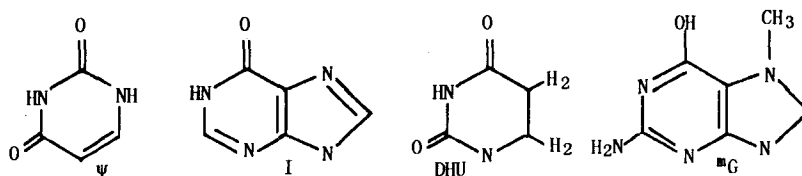


图 2-2 稀有碱基

DHU: 二氢尿嘧啶 ψ : 假尿嘧啶 I: 次黄嘌呤 ^mG : 7-甲基鸟嘌呤

目前，还发现有其他不同稀有碱基，此不赘述。

第二节 核苷酸

核苷酸是构成核酸的基本单位，它是核苷的磷酸酯。

一、核 苷

碱基与核糖缩合形成的化合物称为核糖核苷（ribonucleoside）。碱基与脱氧核糖缩合形成的化合物称为脱氧核糖核苷（deoxynucleoside），两者可通称为核苷。在核苷分子中，连接方式是嘌呤环上的 N-9 或嘧啶环上的 N-1 与糖的 C-1' 以糖苷键（glycosidic linkage）相连。

核苷的命名可根据其中碱基和戊糖的不同而定，如腺嘌呤与核糖缩合生成的核苷称为腺嘌呤核苷，简称腺苷（adenosine, A）。其他核糖核苷分别可简称为鸟苷（guanosine, G）、胞苷（cytidine, C）、尿苷（uridine, U）等。脱氧核糖与各种碱基形成的核苷分别称为脱氧腺苷（dA）、脱氧鸟苷（dG）、脱氧胞苷（dC）、脱氧胸苷（dT）等（图 2-3）。

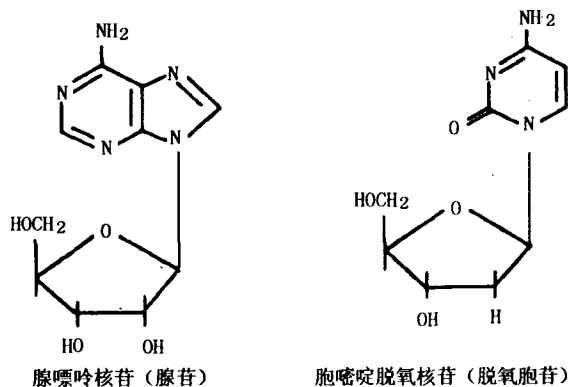


图 2-3 核苷的结构式

二、核苷酸

核苷与磷酸通过磷酸酯键结合即为核苷酸。其中包括核糖核苷酸（ribonucleotide）和脱氧核糖核苷酸（deoxynucleotide）。在糖环上的所有游离羟基（核糖的 c-2'、c-3'、c-5' 及脱氧核糖的 c-3'、c-5'）均能与磷酸发生酯化结合反应。生物体内的核苷酸多数是 5'-核苷酸（图 2-4）。

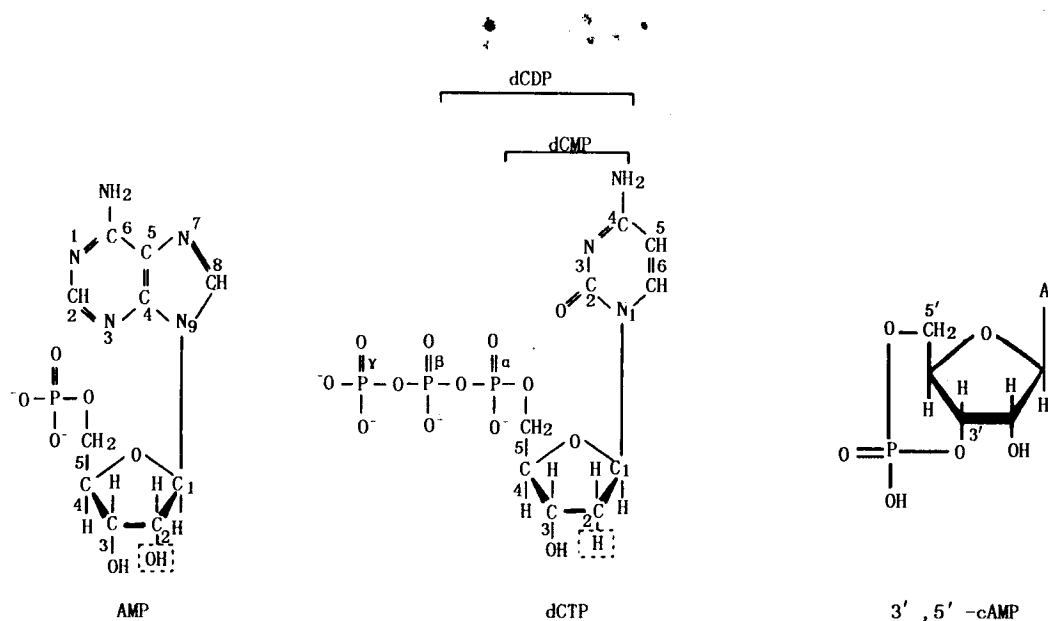


图 2-4 不同类型的核苷酸

核糖核苷酸包括腺苷一磷酸（AMP）、尿苷一磷酸（UMP）、鸟苷一磷酸（GMP）、胞苷一磷酸（CMP）等，它们是构成 RNA 的基本单位。

脱氧核糖核苷酸包括脱氧一磷酸腺苷（dAMP）、脱氧一磷酸鸟苷（dGMP）、脱氧一磷酸胞苷（dCMP）、脱氧一磷酸胸苷（dTMP）等，它们是构成 DNA 的基本单位。

此外，细胞内还有一些游离存在的多磷酸核苷酸，如二磷酸腺苷（adenosine diphosphate, ADP）、三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）、三磷酸鸟苷（guanosine triphosphate, GTP）等（表 2-2）。另外还有 3', 5'-环腺苷酸（cyclic adenosine monophosphate, cAMP）等，它们在代谢过程中有重要的功能。

表 2-2 常用核苷酸的简化符号

	一磷酸	二磷酸	三磷酸
腺 苷	AMP	ADP	ATP
鸟 苷	GMP	GDP	GTP
胞 苷	CMP	CDP	CTP
尿 苷	UMP	UDP	UTP
脱氧胸苷	dTMP	dTDP	dTTP

第三节 核酸的分子结构

DNA 和 RNA 的一级结构是指其中核苷酸的排列顺序，称为核苷酸序列。由于核苷酸之间的差异主要是碱基不同，因此也称为碱基序列。

四种脱氧核苷酸按照一定序列以磷酸二酯键相连形成的多聚核苷酸链称为 DNA。

这些脱氧核苷酸或核苷酸的连接具有严格的方向性，由前一个脱氧核苷酸或核苷酸的 3' - OH 与下一个核苷酸的 5' 位上的磷酸 - OH 间形成 3', 5' 磷酸二酯键，从而构成一个没有分支的线性大分子。它们的两个末端分别称为 5' 末端（游离磷酸基）和 3' 末端（游离羟基）。DNA 单链的结构及表示方式从繁到简，见图 2-5。需要强调的是按照规则，DNA 的书写应从 5' 到 3'。

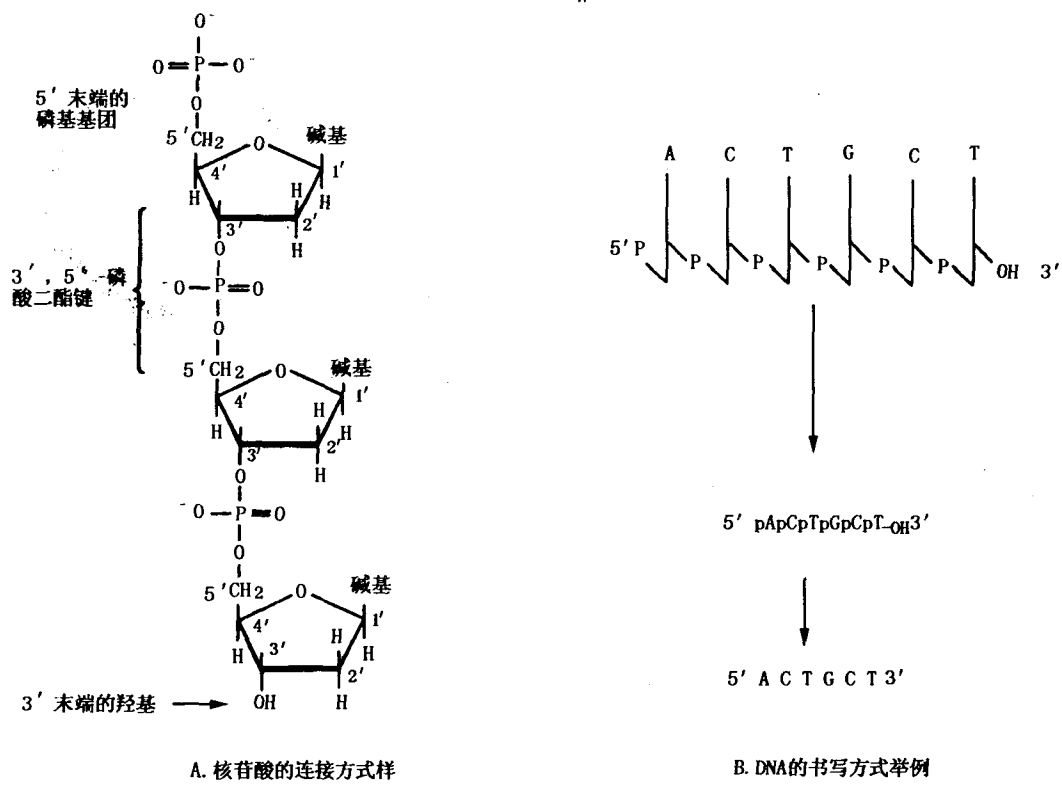


图 2-5 核酸单链的结构及表示方式从繁到简

一、DNA 分子结构

自然界 DNA 分子结构为双螺旋结构（分有 B 型和局部 Z-构型等螺旋结构）。

（一）DNA 分子结构特点（图 2-6）

- （1）双链反向平行。
- （2）碱基配对原则。

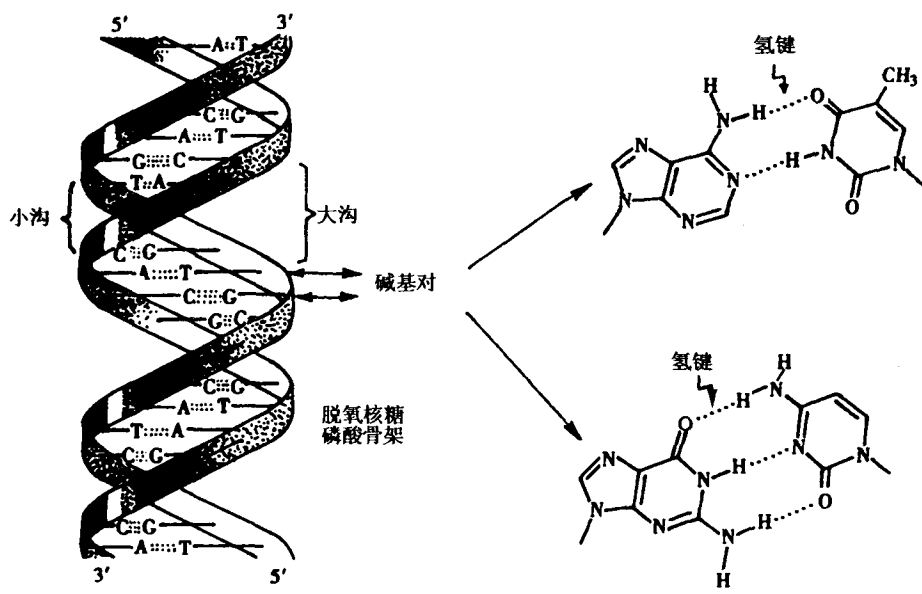


图 2-6 DNA 双螺旋结构示意图

- (3) 内侧、外侧和两垂直。
(4) 直径、碱基距离与碱基数/圈。

(二) DNA 双螺旋分子结构的多态性

DNA 的一级结构是指构成 DNA 分子的四种脱氧核苷酸连接及其排列顺序。

DNA 的二级结构就是 DNA 双螺旋结构。

DNA 二级结构分为两大类 (图 2-7): 一类是右手螺旋, 又分为 A、B、C、D、E 型; 另一类是局部左手螺旋, 即 Z-DNA。

1. 右手螺旋 DNA

该类 DNA 有五种成员, 最重要的差别是螺旋时每螺旋层碱基数目不同:

- A - DNA : 11 bp
- B - DNA : 10 bp
- C - DNA : 9.5 bp
- D - DNA : 7.5 bp
- E - DNA : 8 bp

天然状态下 DNA 大多数为 B-DNA。它是在不停地运动着的, 且二级结构稳定, 但又非绝对。在溶液中有部分氢键会断开, 造成这些部位结构多变。纯化时, 如用酒精沉淀, 那么 B-DNA 可以变成 C-DNA, 最后再变成 A-DNA。若温度改变或钠盐变成钾盐、铯盐, B-DNA 可以变成 A-DNA 或 C-DNA。

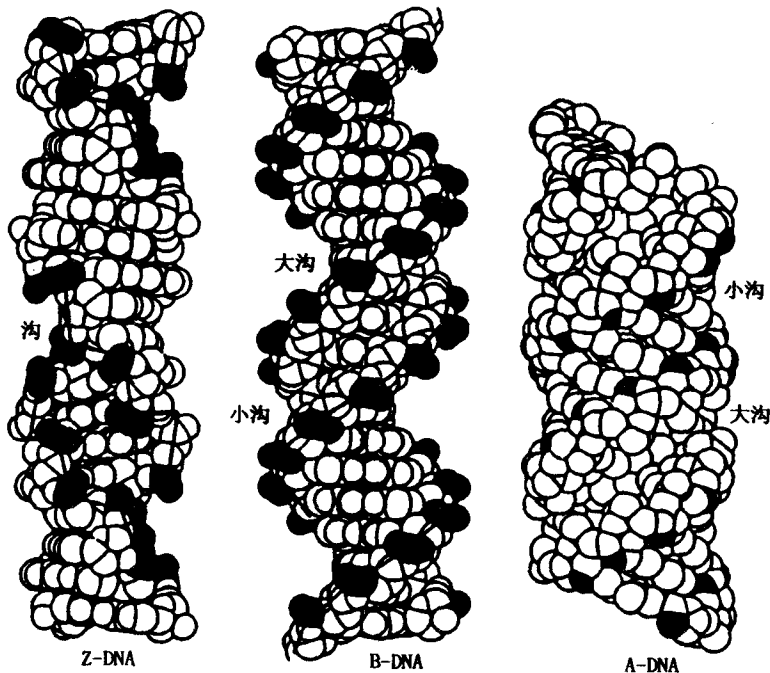


图 2-7 不同类型的 DNA 双螺旋结构

2. 局部左手螺旋 DNA

在高盐溶液 (4 mol/L) 中, B-DNA 有一部分可变成 Z-DNA。

Z-DNA 的主要特征有: ①左手螺旋, 每个螺旋层含 12bp; ②磷酸二酯键连接成锯齿状; ③碱基不像 B-DNA 那样位于双链中央, G 的第八个碳原子位于双链之外; ④Z-DNA 中几乎不存在易被蛋白质识别的沟。

B-DNA 中若局部变构为 Z-DNA 后活性明显降低, 与调节区相邻的转录区被 Z-DNA 抑制。

二、DNA 超螺旋

(一) 闭环 DNA

在自然条件下, DNA 通常以闭环形式存在, 即两条单链均为环状且相互连在一起。相互连接的数目称为连接数 (linking number, Lk)。此意指不仅每条互补链自身的 3' 端与 5' 端连接成环状, 而且两条互补链间相互缠绕。这样的分子中没有游离端, 两条链缠绕的数目即为双螺旋数, 称为连接数 (Lk)。

(二) 超螺旋

DNA 分子空间结构的一些特性均起因于 DNA 分子的环状限制, 如果 DNA 分子双螺旋先扭曲, 然后两末端相连, 则这种变形就被固定下来。这种被固定下来的变形称为超螺旋。

如果 DNA 扭曲方向与双螺旋方向相同, 这种扭曲发生在闭合前, 则形成的超螺旋定为正 (positive); 反之为负 (negative)。在真核生物染色体也是如此。

超螺旋的水平可以用连接数的变化 (ΔLk) 来衡量, ΔLk 即与松散时闭环分子 (Lk°) 相比发生的变化。这个定义为闭环前 DNA 分子扭曲 360° 的圈数。

刚刚从细胞分离出来的 DNA 分子通常是负的超螺旋, 约 6 圈超螺旋/100 圈双螺旋 (1 000bp), 表示为 $\Delta Lk/Lk^\circ = -0.06$ 。

第四节 核酸理化性质与应用

一、核酸的一般理化性质

核酸为多元酸, 具有较强的酸性。DNA 是线性高分子, 因此粘度较大, 而 RNA 分子远小于 DNA, 粘度也小的多。DNA 分子在机械力的作用下易发生断裂, 为基因组的提取带来一定困难。由于碱基成分的紫外吸收特征, DNA 和 RNA 溶液均具有 260nm 紫外吸收峰, 这是 DNA 和 RNA 定量最常用的方法。

二、DNA 的变性

在某些理化因素作用下, DNA 分子互补碱基对之间的氢键断裂 (但其一级结构核苷酸间共价键不断裂), 使 DNA 双螺旋结构松散, 变成单链, 即为 DNA 变性。

引起变性的因素: 加热、酸、碱、乙醇、丙酮、尿素、甲酰胺等。

监视 DNA 是否发生变性的一个最常用的指标是在紫外区 260 nm 波长处的吸光值 (A_{260}) 变化。

增色效应 (hyperchromic effect) 在稀盐溶液中加热 ($80 \sim 100^\circ\text{C}$) DNA 发生变性, DNA 的 A_{260} 光吸收增加, 并与解链程度有一定的比例关系。这种关系称为 DNA 的增色效应。

如果在连续加热 DNA 的过程中以温度对 A_{260} 的关系做图, 所得的曲线称为解链曲线 (图 2-8)。

从曲线中可以看出, DNA 的变性从开始解链到完全解链, 是在一个相当窄的温度内完成的, 在这一范围内, 紫外吸收值达到最大值的 50% 的温度称为解链温度, 由于这一现象和结晶的融解过程类似, 又称融解温度 (melting temperature, T_m)。

在 T_m 时, 核酸分子内 50% 的双链结构被解开。

T_m 与下列因素有关:

(1) DNA 的均一性: poly (T-A) 或 poly (G-C) 时 T_m 范围较小;

(2) G-C 含量: T_m 值与 G-C 含量成正比关系;

(3) 介质中离子浓度: 当离子浓度升高时, T_m 升高; 当离子浓度降低时, T_m 降低。DNA 的 T_m 值可根据其 G+C 含量计算, 计算公式为:

$$T_m = 69.3 + 0.41 (G + C) \%$$

小于 20bp 的寡核苷酸的计算公式为:

$$T_m = 4 + (G + C) + 2 (A + T)$$