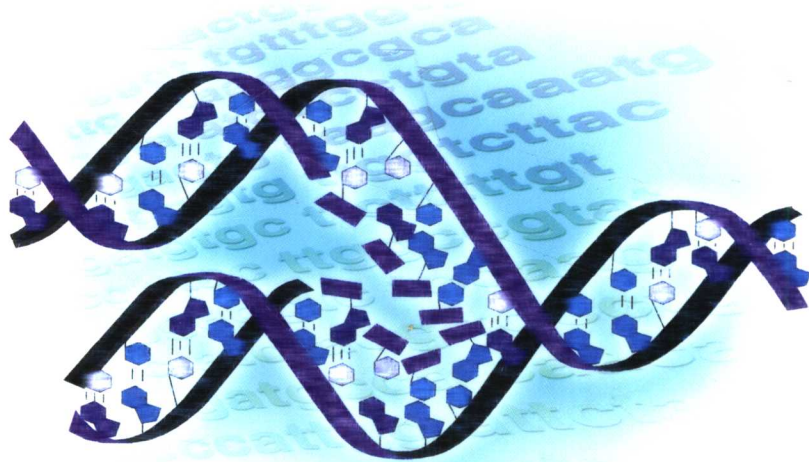


生物实验室系列

# 核酸分子 杂交技术

马文丽 郑文岭 主编 彭翼飞 副主编



Chemical Industry Press



化学工业出版社  
生物·医药出版分社

生物实验室系列

# 核酸分子杂交技术

马文丽 郑文岭 主编

彭翼飞 副主编



化学工业出版社  
生物·医药出版分社

·北京·

**图书在版编目 (CIP) 数据**

核酸分子杂交技术/马文丽, 郑文岭主编. —北京: 化学工业出版社, 2007. 7

(生物实验室系列)

ISBN 978-7-122-00409-3

I. 核… II. ①马…②郑… III. 核酸-分子杂交 IV. Q52

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 078983 号

---

责任编辑: 邵桂林 郎红旗

文字编辑: 李锦侠

责任校对: 宋 玮

装帧设计: 关 飞

---

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

720mm×1000mm 1/16 印张 12½ 字数 236 千字 2007 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 29.00 元

版权所有 违者必究

# 《核酸分子杂交技术》

## 编写人员

主 编 马文丽 郑文岭

副主编 彭翼飞

编写人员 (按姓氏笔画排列)

丁大鹏 (南方医科大学基因工程研究所)

马文丽 (南方医科大学基因工程研究所)

危 敏 (南方医科大学基因工程研究所)

刘 玥 (南方医科大学基因工程研究所)

孙朝晖 (南方医科大学基因工程研究所)

李 凌 (南方医科大学基因工程研究所)

李德良 (南方医科大学基因工程研究所)

张 宝 (南方医科大学基因工程研究所)

张亚莉 (南方医科大学基因工程研究所)

肖维威 (南方医科大学基因工程研究所)

周珏宇 (南方医科大学基因工程研究所)

郑文岭 (南方医科大学基因工程研究所)

赵海全 (南方医科大学基因工程研究所)

费 嘉 (暨南大学医学院)

莫小阳 (南方医科大学基因工程研究所)

郭秋野 (南方医科大学基因工程研究所)

彭翼飞 (南方医科大学基因工程研究所)

## 出版者的话

21世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20世纪后半叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为21世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如17世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973年 Cohn 和 Boyer 完成了DNA体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988年 Kary Mullis 发明的PCR技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化工出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

**在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。**其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

**在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。**一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新

技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

**本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。**一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

**谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学技术工作者致以崇高的敬意！**

**祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！**

化学工业出版社  
生物·医药出版分社

# 前 言

自 20 世纪 60 年代初出现液相核酸分子杂交技术以来,核酸杂交迅速成为最常用的分子生物学实验技术之一。它极大地促进了分子生物学的进展,同时也随着生物学尤其是分子生物学自 20 世纪中后期以来的飞速发展而不断地“花样翻新”,尽管其最根本的原理始终如一,即严格的碱基互补配对原则。

核酸杂交基本原理本身从根本上决定了该技术极其广泛的应用可能和应用前景。作为分子生物学实验技术中必不可少的一部分,核酸杂交技术早已渗入到临床实验室诊断的实践中,且更为普遍地应用于生命科学基础研究领域,尤其是 20 世纪 90 年代中期发展起来的基因芯片技术,已迅速成为现代生物学研究中最强有力的工具之一,而其基本原理,简单来说仍然是固相核酸杂交。

本书旨在全面而概要地介绍核酸杂交技术的基本原理、主要技术环节、主要核酸分子杂交类型的具体操作程序、基本应用及相关进展。适合初学者快速把握核酸杂交技术的基本原理,也可供有关研究人员参考。

全书共十章。第一章主要介绍核酸的分子结构与核酸分子杂交的基本原理,可谓基础中的基础;第二章至第四章是分别从不同的角度介绍核酸杂交概况,包括核酸杂交类型、核酸探针以及影响核酸杂交的各种因素,这些内容在后面各章中必要时会有更深入的介绍。第五章至第十章则是分别介绍目前主要的核酸杂交类型,包括斑点杂交、Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交、原位杂交、菌落原位杂交及 DNA 芯片技术。每章均较为全面地介绍相关杂交所涉及的原理、操作步骤、基本应用及相关进展。每章均附参考文献便于读者进一步追踪索引。

衷心感谢热忱编写本书的各位编委以及帮助本书出版的同仁。

由于我们水平有限,本书可能存在一些疏漏或欠妥之处,敬请各位读者批评、指正。

马文丽 郑文岭  
2007 年 4 月

# 目 录

<b>第一章 核酸的分子结构与分子杂交的基本原理</b> .....	1
第一节 发现核酸.....	1
第二节 核酸的分子结构.....	5
一、核苷酸的结构.....	5
二、DNA 的分子结构 .....	9
三、RNA 的分子结构.....	18
第三节 核酸分子杂交的基本原理及在医学中的应用 .....	21
一、DNA 的变性.....	23
二、DNA 的复性 .....	25
三、核酸杂交在医学中的应用简介 .....	27
参考文献 .....	27
<b>第二章 核酸分子杂交的类型</b> .....	28
第一节 固相核酸分子杂交类型 .....	28
一、菌落原位杂交 (colony in situ hybridization) .....	28
二、斑点杂交 (dot blot) .....	29
三、Southern 印迹杂交 (Southern blot) .....	30
四、Northern 印迹杂交 (Northern blot) .....	31
五、组织原位杂交 (tissue in situ hybridization) .....	32
六、固相夹心杂交 .....	35
七、其他固相杂交类型 .....	35
八、固相核酸杂交的几点说明 .....	36
第二节 液相核酸分子杂交类型 .....	36
一、吸附杂交 .....	36
二、发光液相杂交 .....	37
三、液相夹心杂交 .....	37
四、复性速率液相分子杂交 .....	38
参考文献 .....	38
<b>第三章 核酸探针的种类、标记及检测</b> .....	39
第一节 核酸探针的种类 .....	40
一、DNA 探针.....	40
二、cDNA 探针 .....	41



三、RNA 探针.....	41
四、寡核苷酸探针 .....	42
第二节 核酸探针的标记和检测 .....	43
一、放射性同位素核酸探针的标记和检测 .....	44
二、非放射性核酸探针的标记和检测 .....	47
参考文献 .....	49
<b>第四章 核酸分子杂交实验因素的优化 .....</b>	<b>50</b>
一、探针的选择 .....	50
二、探针的标记方法 .....	51
三、探针的浓度 .....	51
四、杂交率 .....	52
五、杂交最适温度 .....	52
六、杂交的严格性 .....	53
七、杂交反应时间 .....	54
八、杂交促进剂 .....	55
参考文献 .....	55
<b>第五章 斑点杂交 .....</b>	<b>56</b>
一、概述 .....	56
二、杂交方法 .....	57
三、斑点杂交的应用 .....	61
参考文献 .....	63
<b>第六章 Southern 印迹杂交 .....</b>	<b>64</b>
第一节 Southern 印迹杂交的基本原理 .....	64
一、DNA 从凝胶到膜上的转移方法 .....	64
二、Southern 杂交膜 .....	67
三、核酸探针的标记 .....	68
第二节 Southern 印迹法的基本过程 .....	70
一、DNA 样品的酶切和电泳 .....	70
二、准备用于转移的凝胶 .....	72
三、DNA 从琼脂糖凝胶转移到固相支持物 .....	73
四、探针标记 .....	74
五、杂交 .....	75
六、洗膜 .....	77
七、杂交结果的检测 .....	77
八、杂交膜的重复使用 .....	78
九、注意事项 .....	78

十、杂交严谨性 .....	80
第三节 Southern 杂交的应用进展 .....	81
参考文献 .....	85
<b>第七章 Northern 印迹杂交 .....</b>	<b>86</b>
第一节 Northern 印迹杂交的基本原理 .....	86
第二节 杂交方法 .....	88
一、RNA 电泳 .....	88
二、将变性 RNA 转移至尼龙膜 .....	92
三、杂交和结果检测 .....	96
四、杂交结果的分析 .....	100
第三节 Northern 杂交的应用与进展 .....	101
一、反向 Northern 杂交和 Northern 杂交筛选 mRNA 表达 .....	101
二、高通量反向 Northern 印迹杂交和 Northern 杂交 .....	102
参考文献 .....	105
<b>第八章 原位杂交 .....</b>	<b>106</b>
第一节 原位杂交组织化学技术的由来及发展 .....	106
第二节 原位杂交技术的基本方法 .....	108
一、玻片准备和组织固定 .....	109
二、样品的预处理 .....	110
三、预杂交 .....	110
四、杂交 .....	111
五、杂交后的清洗 .....	112
六、免疫学检测 .....	112
七、观察结果 .....	115
第三节 原位杂交的影响因素 .....	116
一、影响杂交的主要因素 .....	116
二、影响杂交的其他因素 .....	118
第四节 探针标记 .....	120
一、探针标记的直接法和间接法 .....	120
二、半抗原标记 .....	120
三、标记方法 .....	124
四、地高辛、生物素或荧光染料标记探针 .....	125
第五节 荧光原位杂交 .....	137
一、FISH 技术的发展史 .....	138
二、FISH 技术操作 .....	140
三、FISH 的应用 .....	146

四、FISH 技术的进展 .....	149
参考文献 .....	153
<b>第九章 菌落原位杂交 .....</b>	<b>154</b>
一、小量细菌克隆的原位杂交筛选 .....	155
二、中等量细菌克隆的原位杂交筛选菌落 .....	155
三、大量细菌克隆的原位杂交筛选 .....	157
四、菌落的裂解及 DNA 结合于滤膜 .....	158
五、与菌落的影印滤膜进行杂交 .....	159
参考文献 .....	160
<b>第十章 DNA 芯片技术 .....</b>	<b>162</b>
第一节 生物芯片与 DNA 芯片 .....	162
一、生物芯片与 DNA 芯片的概念 .....	163
二、DNA 芯片的主要类型 .....	164
第二节 DNA 芯片技术的基本原理与方法 .....	165
一、芯片的制备 .....	165
二、样品的准备 .....	169
三、分子杂交 .....	169
四、检测分析 .....	171
第三节 DNA 芯片技术的应用概况 .....	171
一、DNA 序列分析 .....	172
二、基因突变检测 .....	173
三、基因表达谱分析 .....	174
四、基因组研究 .....	174
五、基因诊断 .....	176
六、药物研究与开发 .....	176
七、其他领域 .....	177
参考文献 .....	177
<b>常用缓冲溶液的配制 .....</b>	<b>178</b>

## 核酸的分子结构与分子杂交的基本原理

核酸 (nucleic acid) 是以核苷酸为基本组成单位的重要的大分子化合物, 广泛存在于各类生物细胞中, “种瓜得瓜, 种豆得豆” 的遗传现象即源于核酸上所携带的遗传信息。核酸和蛋白质一样, 都是生命活动中的生物信息大分子, 具有复杂的结构和重要的功能。核酸的组成单位——核苷酸 (nucleotides) 是生物体各种生物化学成分代谢转换过程中的能量“货币”(如 ATP); 具有传递激素及其他细胞外刺激的化学信号能力的环化核苷酸 (如 cAMP), 也是生物体内重要的第二信使; 另外, 核苷酸还是一系列酶的辅助因子和代谢中间体。因此, 核酸及其组成单位在生物的个体发育、生长、繁殖、遗传和变异等生命过程中起着重要的作用。1953 年, Watson 和 Crick 建立了 DNA 分子双螺旋结构模型, 被认为是 20 世纪在自然科学中的重大突破之一, 它揭开了分子生物学研究的序幕, 尤其是 DNA 重组技术及 DNA 测序技术的出现, 使生命科学成为自然科学中最引人注目的领域。核酸的研究成果启动了分子生物学的突破性的进程, 从此生命现象和生命过程的研究开始全面进入分子水平。

### 第一节 发现核酸

核酸研究已有 100 多年的历史, 早在 19 世纪 60 年代, 孟德尔的同时代人瑞士化学家米歇尔 (Friedrich Miescher) 便发现细胞核含有一种以前不知道的含

磷丰富的酸性化合物，因存在于细胞核中而将它命名为“核质”（nuclein）。直到1889年，才有人成功地分离得到这种不含蛋白质的新物质，因为是从细胞核中分离出来的酸性物质，所以称为核酸。虽然后来的研究发现细胞质、线粒体、叶绿体、无核结构的细菌和没有细胞结构的病毒都含有核酸，但“核酸”这一名称仍然保留而沿用至今。到了20世纪初，生物化学家证明了植物和动物细胞中普遍存在核酸，并且证明了核酸含有4种不同的含氮碱基、一种五碳糖和磷酸。后来又发现，一个含氮碱基、一个糖和一个磷酸分子联结而成核酸的基本构件——核苷酸。而核酸分子就是由很多这样的核苷酸通过核糖之间的磷酸二酯键组成的，所以，核酸分子是一条长长的多核苷酸链。20世纪20年代，科学家们又证实了自然界存在两类不同的核酸，一类为核糖核酸（ribonucleic acid, RNA），另一类为脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid, DNA）。这两类核酸的化学组分几乎是相同的，主要区别在于：DNA上的核糖为脱氧核糖，比RNA的核糖少一个羟基；另外，RNA中的碱基中有尿嘧啶而无胸腺嘧啶，而DNA含胸腺嘧啶而无尿嘧啶，在分子结构上，尿嘧啶比胸腺嘧啶缺少一个甲基。就是这一点化学结构上的细微差异导致了DNA和RNA在生物功能上的重大区别。

人们最早发现DNA与RNA的功能不同是在20世纪20年代后期，当时首次发现DNA几乎全在染色体上，而RNA则在细胞核外，即在原生质之中。当时，摩尔根（Morgan）的研究已经表明基因寓于染色体之中，因此，此时假设DNA在遗传中具有重要作用看来不像是毫无根据的想像。但是，既然染色体中蛋白质比DNA多，仅有上述事实并不能断定基因是由DNA组成的。事实上，当时的大多数科学家都认为基因是由蛋白质组成的，而DNA只不过在遗传过程中发挥某些辅助的生理作用罢了。1944年，纽约洛克菲勒研究所的艾弗里（Avery）及其同事们首先直接证明了DNA是遗传物质。艾弗里的实验中，从正常供体细菌抽提出的纯品DNA加到灭活的受体细菌之中能使受体细菌的遗传性状转化为供体细菌型的，而这种受体细菌只有一个变异基因不同于供体细菌。由此可见，正常的供体细菌基因必然是以供体DNA分子的形式进入受体细菌，并在受体细菌中取代了它变异的同源基因。这说明，细菌DNA里含有细菌基因。然而，在1944年，这样的结论似乎过于急进，甚至艾弗里本人也难以接受，只是在利用最为精密的装置做了对照实验后才不得不相信。事实上，在当时多数生物化学家和遗传学家看来，艾弗里的对照实验显然还不是十分严格的。艾弗里的这个发现虽然广为流传，但在以后的8年中，并没有对有关遗传机制的理论产生多大的影响。直到1952年，赫尔希（A. D. Hershey）等用同位素标记法研究T2噬菌体的感染作用，即用同位素<sup>32</sup>P标记噬菌体的DNA，<sup>35</sup>S标记蛋白质，然后感染大肠杆菌。实验表明：噬菌体颗粒感染寄主细菌时，实际上只是噬菌体的DNA进入细菌，而噬菌体蛋白质却留在细菌外边，对于后来发生在细菌体内的噬菌体的复制并未发生任何作用。根据该实验，他们得出的结论是：指导合成子

代噬菌体的亲代噬菌体基因寓于它的 DNA 之中，遗传物质是 DNA 而不是蛋白质。这一结果最终对遗传学产生了直接和深远的影响。

1953 年沃森 (Watson) 和克里克 (Crick) 在总结前人工作的基础上提出了 DNA 双螺旋结构模型，被认为是 20 世纪在自然科学中的重大突破之一。模型的提出建立在对 DNA 下列 3 方面认识的基础上：①核酸化学研究中所获得的 DNA 化学组成及结构单元的知识，特别是 Chargaff 于 1950~1953 年发现的 DNA 化学组成的新事实，他提出了 A-T、G-C 之间互补配对的原则；②X 射线衍射技术对 DNA 结晶的研究中所获得的一些原子结构的最新参数；③遗传学研究所积累的有关遗传信息的生物学知识。综合这 3 方面尤其是前两方面的知识所创立的 DNA 双螺旋结构模型，不仅阐明了 DNA 分子的结构特征，而且预示了 DNA 作为执行生物遗传功能的分子准确传递遗传信息的方式，即半保留式复制。DNA 的半保留复制模式最终于 1958 年为梅塞尔森 (Meselson) 和斯塔尔 (Stahl) 的著名实验所证实。这一成果为研究核酸的结构和功能奠定了基础，也大大推动了分子生物学特别是分子遗传学的发生和发展，此后，对基因表达和调控等方面的研究也取得了长足的进步。

1973 年，加州大学 Herbert Boyer 教授和斯坦福大学 Stanley Cohen 教授共同创立了 DNA 重组技术，被认为是分子生物学的第二次革命。自此，人类开始有能力在基因水平改造生物，甚至按照拟定的蓝图创造新的生物体。DNA 重组技术改变了分子生物学的面貌，并导致了一个新的生物技术产业群的兴起。

DNA 重组技术的出现极大地推动了 DNA 和 RNA 的研究，其三大关键技术即 DNA 切割技术、分子克隆技术和快速测序的不断成熟，使人们可以通过 DNA 操作改造生物机体的性状特征、改造基因以致改造物种。DNA 研究带动 RNA 研究在理论上或技术上高潮迭起，许多传统观点被打破，核酸研究成为最活跃的研究领域之一。

1975 年 Sanger 发明的 DNA 测序 (DNA sequencing) 极大地推动了分子生物学的研究。由此而发展起来的大片段 DNA 序列快速测定技术成为核酸结构与功能研究中不可缺少的分析手段，其原理为 Sanger 建立的末端终止法，或者是 Maxam 和 Gilbert 建立的化学降解法 (1977 年)。但只有 Sanger 的方法最终成为高通量测序仪测序的主要原理，并在历时 13 年的著名的人类基因组计划中发挥了重要作用。近些年来新的更高通量的测序技术也在不断发展，应用新技术的更高通量的测序仪也已初步上市。

真核 DNA 绝大部分存在于细胞核中，而蛋白质合成则发生在细胞质内的核糖体上。因此，必定有另一类分子把遗传信息从核内带到细胞质中以指导蛋白质的合成，在 20 世纪 50~60 年代，RNA 研究迎来第一个高潮，科学家们不仅确认 RNA 就是执行这种功能的最合适的分子，而且破译了翻译出蛋白质的信使 RNA 上的遗传密码。20 世纪 80 年代 RNA 研究又出现了第二个高潮，取得了一系列生命科学研究领域最富挑战性的成果。1981 年 T. Cech 发现四膜虫 rRNA

前体能够通过自我拼接切除内含子，表明 RNA 也具有催化功能，这种具有自我催化功能的 RNA 又称为核酶（ribozyme）。这是对“酶一定是蛋白质”的传统观点的一次大的冲击，极大地促进了有关生命起源、生物进化等生物学中带根本性问题的进一步研究。1983 年 R. Simons 等以及 T. Mizuno 等分别发现了反义 RNA（antisense RNA），表明 RNA 还具有调节功能。1986 年 R. Benne 等发现锥虫线粒体 mRNA 的序列可以发生改变，称为 RNA 编辑（RNA editing），于是基因与其产物蛋白质的共线性关系也被打破。1986 年 W. Gilbert 提出“RNA 世界”的假说，这对“DNA 中心”的观点是一次有力的冲击。1987 年 R. Weiss 论述了核糖体移码，说明遗传信息的解码也是可以改变的。20 世纪末期出现的 RNA 干扰（siRNA）技术可以称为 RNA 研究的又一高潮，目前研究蛋白功能的最有效方法就是 RNA 干扰技术。

1985 年 Mullis 等发明了具有划时代意义的聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR），这是一种体外扩增 DNA 的酶促反应技术。PCR 技术的问世，极大地加速了 DNA 的克隆、鉴定及应用，因此在很短的时间内迅速进入生命科学、医学、遗传工程、法医学、考古学等各个领域，并显示出巨大的优越性。

Watson-Crick 模型创立 36 年后的 1989 年，一项新技术——扫描隧道显微镜（scanning tunneling microscopy, STM）使人类首次能直接观测到近似自然环境中的单个 DNA 分子的结构细节，观测数据的计算机处理图像能在原子级水平上精确度量出 DNA 分子的构型、旋转周期、大沟及小沟。这一成果是对 DNA 双螺旋结构模型真实性的最直接而可信的证明，此项技术无疑会对人类最终完全解开遗传之谜提供有力的帮助。

1990 年 10 月美国政府决定出资 30 亿美元，用 15 年时间（1991~2005 年）完成“人类基因组计划”（Human Genome Project, HGP），这是生物学有史以来最巨大和意义深远的一项科学工程。完成人类基因组 DNA 全序列测定的意义是十分明显的，人类对自己遗传信息的认识将有益于人类健康、医疗、制药、人口、环境等诸多方面，并且对生命科学也将有极大贡献。由于技术上的突破，计划进度一再提前，人的基因组框架图于 2001 年完成，两年后完成精细图，准确率远在 99.99% 以上，对人的基因组的覆盖率也达到了预期的 99%。自此，全球兴起了测定各种物种的基因组的热潮，不只是低等生物的 DNA 全序列陆续被测定，很多高等生物如灵长类的猩猩、猴子，不少哺乳动物如牛、猪、狗的基因组序列也已基本被测出。生命科学已经进入了后基因组时代。

在后基因组时代，科学家们的研究重心已从揭示基因组 DNA 的序列转移到在整体水平上对基因组功能的研究，这种转向的第一个标志就是产生了一门称为功能基因组学（functional genomics）的新学科。

随着自然科学的发展，核酸的研究越来越成为生物科学的核心，它带动了生物化学、分子生物学和分子遗传学乃至整个生命科学研究的发展。在此基础上发

展起来的核酸操作技术正在逐步地打开控制不同生物性状的生命之谜；同时，核酸的研究也使生物技术产业获得了空前规模的发展。据统计，信息技术对世界经济的贡献比例达到 18%，而生物技术对世界经济的推动作用将不亚于信息技术。

## 第二节 核酸的分子结构

核酸分子很大，但可在酸、碱和酶的催化下逐步降解，所以可以通过分离鉴定降解的中间产物和最终产物，来分析核酸的组成成分以及这些成分的相互关系。核酸在酶的作用下水解为核苷酸，核苷酸完全水解可释放出等量的含氮碱基、戊糖和磷酸。因此，核酸的基本组成单位是核苷酸，而核苷酸是由碱基、戊糖和磷酸 3 种成分连接而成的。DNA 的基本组成单位是脱氧核糖核苷酸，RNA 的基本组成单位是核糖核苷酸。

### 一、核苷酸的结构

单个核苷酸是由含氮的杂环化合物（称碱基）、戊糖和磷酸三部分构成的。

碱基（base）：构成核苷酸的碱基分为嘌呤（purine）和嘧啶（pyrimidine）两类。前者主要指腺嘌呤（adenine, A）和鸟嘌呤（guanine, G），DNA 和 RNA 中均含有这两种碱基，它们都是嘌呤的 2 位或 6 位碳原子上的氢被氨基或酮基取代而形成的。核酸中还含有一些修饰嘌呤碱（也称稀有嘌呤碱），如次黄嘌呤、N-6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤等。后者主要指胞嘧啶（cytosine, C）、胸腺嘧啶（thymine, T）和尿嘧啶（uracil, U），胞嘧啶存在于 DNA 和 RNA 中，胸腺嘧啶只存在于 DNA 中，尿嘧啶则只存在于 RNA 中，从结构上看，它们都是在嘧啶的 2 位碳原子上由酮基取代氢，在 4 位碳原子上由氨基或酮基取代氢而形成的。同样，核酸中也含有一些修饰（稀有）嘧啶碱，如 5-甲基胞嘧啶、4-硫尿嘧啶、二氢尿嘧啶等。这五种碱基的结构如图 1-1 所示。

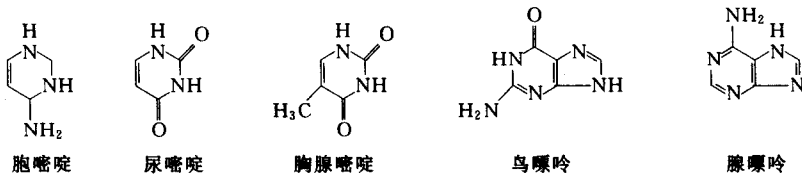


图 1-1 碱基的结构



嘌呤环上的 N-9 或嘧啶环上的 N-1 是构成核苷酸时与核糖（或脱氧核糖）形成糖苷键的位置。此外，核酸分子中还发现数十种修饰碱基，又称稀有碱基，它是指上述 5 种碱基环上的某一位置被一些化学基团（如甲基化、甲硫基化等）修饰后的衍生物。一般这些碱基在核酸中的含量稀少，在各种类型核酸中的分布也不均一。如 DNA 中的修饰碱基主要见于噬菌体 DNA，RNA 中以 tRNA 含修饰碱基最多。

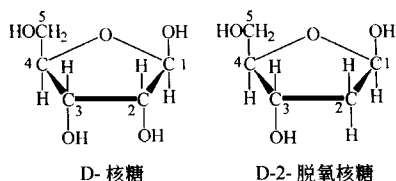


图 1-2 核糖的结构

核酸中含氮碱基均为无色固体，熔点高，大多在 200~300℃，在有机溶剂中溶解度很小，在水中溶解度也不大，一般溶于稀酸或稀碱。用 X 射线衍射分析法已证明了各种嘌呤和嘧啶的三度空间结构：嘧啶是平面分子，嘌呤也很接近平面，但稍有翘折。

(1) 戊糖 RNA 中的戊糖是 D-核糖，DNA 中的戊糖是 D-2-脱氧核糖。D-核糖的 C-2 所连的羟基脱去氧就是 D-2-脱氧核糖，二者的结构式如图 1-2 所示。

戊糖 C-1 所连的羟基是与碱基形成糖苷键的基团，糖苷键的连接都是  $\beta$ -构型。

(2) 磷酸 核酸是含磷的生物大分子，任何核酸都含有磷酸，所以核酸呈酸性，可与  $\text{Na}^+$ 、多胺、组蛋白结合。核酸中的磷酸参与形成 3',5'-磷酸二酯键，使核酸连成多核苷酸链。以上 3 种基本“元件”再进一步连接，碱基与戊糖以糖苷键形成核苷，核苷再与磷酸以磷酸酯键形成核苷酸，核苷酸是核酸的基本结构单位，相当于“部件”。

(3) 核苷 (nucleoside) 由 D-核糖或 D-2-脱氧核糖与嘌呤或嘧啶通过糖苷键连接组成的化合物，糖环上的 C-1' (糖环中的碳原子标号用 1', 2', ... 表示) 与嘧啶碱的 N-1 或与嘌呤碱的 N-9 相连接。所以糖与碱基之间的连键是 N—C 键，称为 N-糖苷键。糖环中 C-1' 是不对称碳原子，所以有  $\alpha$ -构型和  $\beta$ -构型两种。但核酸分子中的糖苷键均为  $\beta$ -糖苷键。应用 X 射线衍射分析证明，核苷

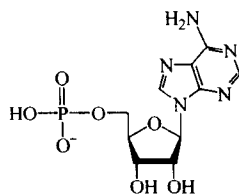


图 1-3 一磷酸腺苷的结构式

中的碱基与糖环平面互相垂直。核苷可以分成核糖核苷与脱氧核糖核苷两大类，主要核苷有 8 种。此外，核酸中含有多种稀有碱基，它们可与戊糖形成相应的稀有核苷，例如次黄嘌呤核苷、5-甲基胞苷等。此外，还有些稀有核苷是由正常碱基与 2'-O-甲基核糖结合而形成的，或由正常碱基以特殊方式与核糖连接所形成的。如假尿嘧啶核苷，它的核糖与尿嘧啶的 C-5 相连，为 C—C 糖苷键。RNA 中的稀有核苷大部分存在于 tRNA 中，而 DNA 中的稀有核苷主要是从噬菌体中分离得到的。