

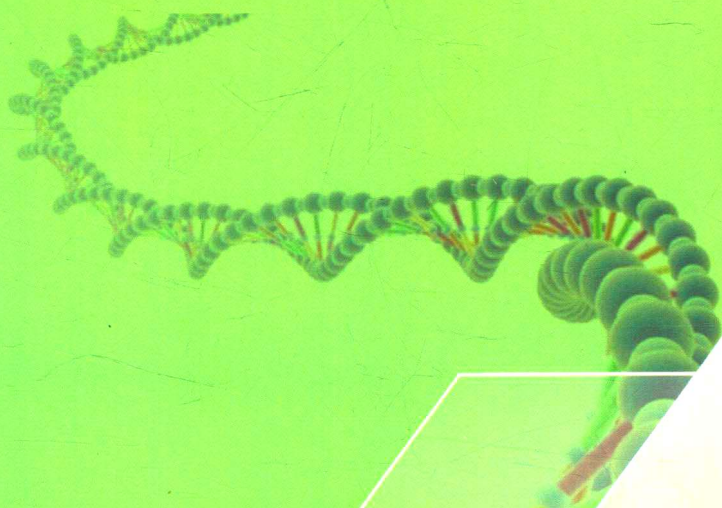
· 四川大学精品立项教材 ·

分子生物学检验技术

Fenzi shengwuxue jianyan jishu

主 编 汪 川

副主编 王国庆 贾天军 陈 勇 王德全



四川大学出版社

全国高等学校教材
供卫生检验与检疫专业用

分子生物学检验技术

Fenzi shengwuxue jianyan jishu

主 编 汪 川

副主编 王国庆 贾天军 陈 勇 王德全

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 芳 (山西医科大学)

王国庆 (四川大学)

王德全 (广东药学院)

邓仲良 (南华大学)

左浩江 (四川大学)

任淑萍 (吉林大学)

孙桂芹 (浙江中医药大学)

吴艳霞 (四川大学)

汪 川 (四川大学)

张效云 (河北北方学院)

陈 勇 (武汉科技大学)

金 波 (浙江中医药大学)

贾天军 (河北北方学院)

游 佳 (四川大学)

熊静远 (四川大学)



四川大学出版社

特约编辑:龚娇梅
责任编辑:朱辅华
责任校对:周 艳
封面设计:墨创文化
责任印制:王 炜

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学检验技术 / 汪川主编. —成都: 四川大学出版社, 2016. 3
ISBN 978-7-5614-9341-0

I. ①分… II. ①汪… III. ①分子生物学—医学检验
IV. ①R446. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 052869 号

书名 分子生物学检验技术

主 编	汪 川
出 版	四川大学出版社
地 址	成都市一环路南一段 24 号 (610065)
发 行	四川大学出版社
书 号	ISBN 978-7-5614-9341-0
印 刷	郫县犀浦印刷厂
成品尺寸	185 mm×260 mm
插 页	2
印 张	16.5
字 数	409 千字
版 次	2016 年 7 月第 1 版
印 次	2016 年 7 月第 1 次印刷
定 价	32.00 元

◆读者邮购本书,请与本社发行科联系。

电话:(028)85408408/(028)85401670/

(028)85408023 邮政编码:610065

◆本社图书如有印装质量问题,请
寄回出版社调换。

◆网址:<http://www.scupress.net>

版权所有◆侵权必究



20 世纪 70 年代以后, 分子生物学迅猛发展, 带动了检验技术的革新, 催生了一大批现代分子生物学检验技术。分子生物学检验技术是分子生物学在检验学科中的具体应用, 它采用分子生物学技术的原理和方法, 解决临床检验、卫生检验等方面的实际问题, 在疾病诊断、风险分析、传染病预防控制、环境因素检测等方面发挥着越来越重要的作用, 已成为当今疾病诊疗、疾病预防与控制领域技术人员需要具备的一项重要技能。

卫生检验与检疫是一门实践性很强的专业, 自 1974 年开办以来, 已为国家培养了大批检验与检疫领域的专业技术人才。随着分子生物学检验技术在现代疾病预防与控制领域的地位日益突出, 卫生检验与检疫专业学生学习各类现代化检验技术已势在必行。越来越多的大专院校为该专业学生开设了分子生物学检验技术相关课程, 然而目前还没有一套完全适合该专业的教材。因此, 编者编写这本专业教材供卫生检验与检疫专业的本、专科学生使用。该书同时可以作为医学检验技术、医学实验技术等医学技术类专业本、专科学生的教材, 以及检验与检疫领域技术人员的培训教材和专业参考书。

在编写过程中, 我们力求教材的实用性、权威性、先进性和启发性, 突出专业特色, 在内容的选择上紧跟卫生检验与检疫领域常用的现代检验技术, 既强调科学性、前沿性, 又突出实用性和针对性, 尽量贴近行业需要和岗位实际; 增加案例式编写, 强调理论联系实践, 引入典型案例, 以点带面, 使学生能够学以致用; 具有国际化特色,

除中英文名词对照索引外,还增加专业重要学术期刊、专业重要学术网站及信息资源数据库、分析软件等的介绍;强调教材的启发性,列出开放性实验设计思路的指导性意见,供学生自行设计实验,将学到的理论知识灵活应用于实际。

本书共十一章,第一章绪论主要介绍分子生物学及分子生物学检验的发展历史和趋势。第二章微生物基因组结构与特征介绍了核酸的结构与功能及原核生物、病毒、真核微生物基因组的基本知识。第三章微生物核酸样品制备,从微生物 DNA 和 RNA 样品制备两方面进行了阐述。第二章和第三章是第四至第九章所介绍的检验技术的基础。教材从第四章开始具体介绍各检验技术,第四章基于体外核酸扩增的快速检测技术介绍了 PCR 和环介导恒温扩增技术这两种最常用的快速检测技术;第五章基因分型、多态性分析与溯源技术介绍了包括核酸序列分析技术、细菌脉冲场凝胶电泳指纹图谱分型技术等在内的七种现代分型与病原体溯源技术;第六章介绍核酸分子杂交技术;第七章介绍基因芯片技术;第八章介绍流式荧光技术;第九章介绍微生物群落结构分析技术,包括 FISH 技术、变性凝胶电泳技术和 T-RFLP 技术。第十章生物信息学技术介绍了相关的生物信息数据库、核酸和蛋白质分析软件等,作为各检验技术必要的信息知识储备和补充。本书在理论部分之后还编写了一章分子生物学相关的实验指导,涉及四个方面,共十个实验,供各院校相关实验课程开设所需。本书后附有彩图、参考文献、相关中英文名词对照索引、专业重要学术网站、专业重要学术期刊,供读者查阅。

由于编者水平、时间和经验所限,书中错误和不当之处在所难免,诚望各学校老师、同学和广大读者提出宝贵意见,以便再版时修正和补充。

编 者

2015 年 12 月

目 录

第一章 绪 论	(1)
第二章 微生物基因组结构与特征	(5)
第一节 核酸的结构与功能	(5)
第二节 原核生物基因组	(12)
第三节 病毒基因组	(16)
第四节 真核微生物基因组	(20)
第三章 微生物核酸样品制备	(28)
第一节 微生物 DNA 样品的制备	(28)
第二节 微生物 RNA 样品的制备	(32)
第四章 基于体外核酸扩增的快速检测技术	(35)
第一节 PCR 技术	(35)
第二节 定量 PCR 技术	(44)
第三节 PCR 技术的应用与实践	(51)
第四节 环介导恒温扩增技术	(57)
第五章 基因分型、多态性分析与溯源技术	(63)
第一节 核酸序列分析技术	(64)
第二节 细菌脉冲场凝胶电泳指纹图谱分型技术	(84)
第三节 单链构象多态性检测技术	(96)
第四节 限制性片段长度多态性分析技术	(102)
第五节 扩增片段长度多态性技术	(107)
第六节 随机扩增多态性 DNA 分析技术	(114)
第七节 细菌基因组重复序列 PCR 技术	(119)
第六章 核酸分子杂交技术	(127)
第一节 核酸探针	(127)
第二节 核酸分子杂交的类型	(131)
第三节 核酸分子杂交技术的应用	(142)
第七章 基因芯片技术	(145)
第一节 基因芯片技术的基本原理	(146)
第二节 基因芯片技术的分类	(149)
第三节 基因芯片技术的技术路线	(151)

第四节 基因芯片技术的应用·····	(152)
第八章 流式荧光技术·····	(157)
第一节 流式细胞术的基本原理·····	(157)
第二节 流式细胞术液相芯片技术·····	(166)
第三节 流式细胞术的应用·····	(168)
第九章 微生物群落结构分析技术·····	(174)
第一节 FISH 技术·····	(174)
第二节 变性凝胶电泳技术·····	(180)
第三节 T-RFLP 技术·····	(186)
第十章 生物信息学技术·····	(191)
第一节 微生物基因组学·····	(191)
第二节 生物信息数据库·····	(193)
第三节 数据库检索与查询·····	(200)
第四节 核酸数据分析·····	(201)
第五节 蛋白质数据分析·····	(206)
第十一章 实验指导·····	(210)
实验一 核酸提取·····	(210)
实验二 PCR·····	(216)
实验三 细菌基因分型·····	(223)
实验四 微生物群落结构分析·····	(230)
参考文献·····	(238)
中英文名词对照索引·····	(244)
专业重要学术网站·····	(255)
专业重要学术期刊·····	(257)

第一章 绪 论

20 世纪 50 年代, 美国遗传学家 Watson 和英国物理学家 Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型, 标志着现代分子生物学 (molecular biology) 的兴起。经过半个多世纪的发展, 分子生物学已成为生命科学中最耀眼的明星, 引领着 21 世纪生命科学的发展。分子生物学检验技术 (analysis technique of molecular biology) 是分子生物学在检验学科中的具体应用, 其采用分子生物学技术的原理和方法, 解决临床检验、卫生检验等方面的实际问题, 在疾病诊断、风险分析、传染病预防与控制、环境因素检测等方面发挥着越来越重要的作用。

一、分子生物学发展历史

分子生物学是研究核酸、蛋白质等生物大分子的形态、结构特征及其重要性、规律性和相互关系的学科, 从分子水平理解生命活动, 主要对遗传信息的传递 (复制)、保持 (损伤和修复)、基因的表达 (转录和翻译) 与调控等进行研究。分子生物学的历史最早可追溯到 19 世纪 30 年代 Schleiden 和 Schwann 提出的“细胞学说”, 至今, 其发展历史大致可分为以下三个阶段。

(一) 准备和酝酿阶段

19 世纪中后期到 20 世纪 50 年代初是分子生物学的准备和酝酿阶段。这一阶段, 人类发现了遗传规律, 确定了蛋白质是生命的主要基础物质, 而 DNA 决定生物的遗传。这是对生命认识的重大突破, 为现代分子生物学的建立打下了基础。

1865 年, Mendel 发现并提出了遗传学分离定律和自由组合定律, 使人们对遗传性状有了理性认识; 1869 年, Miescher 发现了核素 (nuclein); 20 世纪 20~30 年代, 人们认识到自然界存在 DNA 和 RNA, 并阐明了核苷酸的组成; 1926 年, Sumner 证实酶的化学本质是蛋白质; 1944 年, Avery 等证明肺炎链球菌的转化因子是 DNA; 1948—1953 年, Chargaff 等用全新的色谱 (层析) 和电泳技术, 通过实验数据提出了 Chargaff 规则, 为对碱基配对的 DNA 结构的认识打下基础。

(二) 建立和发展阶段

20 世纪 50 年代初到 70 年代初是分子生物学的建立和发展阶段, 这一阶段以 DNA 双螺旋结构的证实为里程碑。1953 年, Watson Crick 首次在《自然》杂志上发表了一篇名为《核酸的分子结构——DNA 的一种可能结构》的论文。他们的论文被誉为“生物学的一个标志, 开创了新的时代”。在此基础上, Crick 进一步分析了 DNA 在生命活动中的功能和定位, 提出了著名的“中心法则”, 由此奠定了整个分子遗传学的基础。

Watson 和 Crick 对 DNA 结构的假设得到了英国物理学家 Wilkins 的认同, 因为 Wilkins 实验室通过 X 射线衍射技术“捕捉”到了 DNA 的结构。最终, Watson、Crick 和 Wilkins 共同提出了 DNA 双螺旋结构模型, 获得了 1962 年的诺贝尔生理学 and 医学奖。

此外, 这一阶段还有一些重要的科学成果, 促进了现代分子生物学的发展。1956 年, Kornberg 发现了 DNA 聚合酶; 1958 年, Meselson 等用同位素标记和超速离心分离实验为 DNA 半保留模型提出了证明; 同期, Weiss 和 Hurwitz 等发现依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶; 1959 年, Uchoa 第一次合成了核糖核酸, 实现了将基因内的遗传信息通过 RNA 翻译成蛋白质的过程; 同年, Kornberg 实现了试管内细菌细胞中 DNA 的复制; 1961 年, Hall 和 Spiege-Iman 用 RNA-DNA 杂交证明了 mRNA 与 DNA 序列互补, 逐步阐明 RNA 转录合成的机制; 1968 年, Okazaki 提出 DNA 不连续复制模型, 20 世纪 70 年代初, 获得了 DNA 拓扑异构酶; 1970 年, Temin 和 Baltimore 等同时发现了以 RNA 为模板合成 DNA 的反转录酶 (逆转录酶), 进一步补充和完善了遗传信息传递的中心法则。

在蛋白质结构与功能的研究上, 1953 年, Sanger 首次阐明了胰岛素的一级结构; 1958 年, Ingram 证明了正常红细胞的血红蛋白与镰刀形红细胞的血红蛋白之间的差异仅为肽链上一个氨基酸残基的差别; 1960 年, Kendrew 和 Perutz 利用 X 射线衍射技术解析了肌红蛋白和血红蛋白的三维结构; 1961 年, Jacob 和 Monod 提出并证实了细菌操纵子 (operon) 调节模式。1965 年, 我国科学家首次人工合成了具有生物活性的结晶牛胰岛素, 1973 年, 测定了其空间结构。

(三) 深入发展阶段

20 世纪 70 年代后期, 基因工程技术的出现, 标志着人类进入认识生命本质并开始改造生命的深入发展阶段。这一阶段出现了许多重要技术, 快速推动了分子生物学的发展。

1967—1971 年, 限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶相继被发现, 为体外基因工程的操作提供了可能; 1972 年, Berg 等首次在体外重组 DNA 成功; 1977 年, Sanger 和 Gilbert 分别发明了核酸测序方法, 获得了 1980 年的诺贝尔化学奖; 1989 年, Altman 在研究细菌 tRNA 的合成过程中, 发现 RNA 具有生物催化作用, 获得了当年的诺贝尔化学奖; 1989 年的诺贝尔化学奖还被颁发给了 Cech, 他提出用分子层次上的化学理论来解释 RNA 分子的自我催化机制; 1993 年的诺贝尔化学奖由发明了聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术的 Mullis 和提出全新的基因定位突变技术的 Smith 共同获得。

目前, 分子生物学的研究已拓展到人类基因组研究、单克隆抗体技术、基因表达调控机制、细胞信号传导等方面, 今后势必还会继续在生命科学、医学等领域发挥更重要的作用。

二、分子生物学检验发展历史

随着分子生物学的蓬勃发展, 20 世纪 70 年代末, 分子生物学与检验学科的融合催生了分子生物学检验这门新兴学科。分子生物学检验侧重于各种分子生物学技术在检验学中的应用, 其中最早得到应用的技术包括核酸杂交技术、PCR 技术、基因测序技术、

DNA 指纹图谱、生物芯片技术等。

核酸杂交 (molecular hybridization) 是指单链的核酸分子在合适的条件下, 与具有碱基互补序列的异源核酸分子形成新的双链核酸分子的过程。1978 年, 美籍华裔科学家 Yuet Wai Kan 等首先应用液相 DNA 分子杂交技术对 α 珠蛋白生成障碍性贫血 (α 地中海贫血) 进行产前诊断, 被认为是核酸杂交技术在检验医学中的首次应用。

1985 年, PCR 技术建立以后也迅速在检验领域得到了应用, 如在病毒的检测与诊断、病原细菌的快速检测与定量分析、病原真菌的鉴定、遗传病的基因诊断、肿瘤的早期诊断、群体遗传学、法医学等方面。PCR 技术现已发展出多种技术类型, 有反转录 PCR (逆转录 PCR)、实时荧光定量 PCR、多重 PCR、彩色 PCR、巢式 PCR 等, 可根据检验目的不同而分别选择。

基因测序技术也是较早应用于检验学的一种重要的分子生物学技术。第一代测序技术以 20 世纪 70 年代 Sanger 发明的双脱氧链终止法和 Gilbert 发明的化学降解法为代表。基于双脱氧链终止法的第一代测序仪出现于 20 世纪 80 年代末, 其将 DNA 测序带入自动化时代, 至今仍被使用。2005 年, 第一台以高通量、大规模并行为主要特征的第二代测序仪出现。最近几年, 基于单分子读取技术的第三代测序技术也逐渐成熟, 将测序技术推向一个全新的时代。现代测序技术为快速鉴定新发传染病病原体 and 病原体变异提供了可能。如在“非典型肺炎”暴发期间, 通过基因测序最终发现一种新型的 SARS 冠状病毒是引起“非典型肺炎”的病原体; 在流感暴发时, 测序技术可以准确地鉴定病毒的变异程度, 从而更精准地预防和控制疾病。

DNA 指纹图谱 (DNA fingerprint) 的概念最早是由英国遗传学家 Jeffreys 提出的。1984 年, Jeffreys 及其同事首次从人体中分离到小卫星 DNA, 并将其用作基因探针, 与人类基因组 DNA 酶切后得到的电泳条带进行杂交, 产生了由多条带组成的杂交图谱, 由于不同个体间图谱带型有明显差异, 像人的指纹一样, Jeffreys 将其称之为“DNA 指纹图谱”。1980 年, Bostein 和 White 建立了限制性片段长度多态性分析技术; 1984 年, Schwartz 等发明了脉冲场凝胶电泳技术; 1990 年, 随机扩增多态性 DNA 由 Williams 和加利福尼亚州的 Welsh 研究小组提出; 1992 年, 扩增片段长度多态性分析出现; 1993 年, Paran 等提出简单重复序列指纹图谱技术。这些指纹图谱技术在病原基因分型、追踪溯源等方面具有重要意义。目前, 新的指纹图谱分析技术还在不断地被开发、应用。

生物芯片的概念最早于 1991 年由 Fodor 等提出, 他发表在《科学》杂志上的论文中提出, 利用光敏化学合成技术结合半导体光刻技术, 可成功地在硅片表面原位合成多肽等生物大分子。此后, 多家公司开始开发各具特色的芯片, 如基因芯片、蛋白质芯片等。生物芯片能一次性针对大量生物分子进行检测, 通过设计不同的探针阵列, 使该技术具有多种用途, 如基因表达谱分析、突变检测、多态性分析、基因组文库作图及杂交测序等。

三、现代分子生物学检验技术的发展趋势

现代分子生物学检验技术越来越有向快速、灵敏、特异、准确、自动化发展的趋

势,新的检测仪器不断被发明,新技术不断涌现,新材料不断被开发、应用。

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)是一种以物理学原理为基础,通过扫描探针与样品表面原子相互作用而成像的新型表面分析仪器,其通过悬臂探针与待测样品之间的微弱相互作用力获得物质表面特征,再依据计算机重建物质表面形貌。Ohnesorge 等使用 AFM 对缓冲液中的芽胞杆菌进行观察;Scheuring 等使用 AFM 测定谷氨酸棒状杆菌 S 层的膜通道蛋白。另外,AFM 还可用于观察细菌表面与分子间作用力、细菌活体、细菌表面物理性质等。

激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)用透镜替代传统显微镜中的聚光器,透过照明针孔的光源(激光)经由分光镜反射至物镜,并聚焦于样品上;激发出的荧光经原来的入射光路直接反向回到分光镜,通过探测针孔时聚焦,聚焦后的光被光电倍增管探测收集,并将信号输送到计算机以显示图像。LSCM 比传统光学显微镜成像更清晰、分辨率更高,特别适合于活细胞成像、活体动态检测。LSCM 在微生物检验领域的应用也日益广泛,如用 LSCM 能非常直观地观察细菌生物膜的细微结构。

流式细胞仪(flow cytometer)是集激光技术、光电测量技术、计算机技术、流体力学以及细胞生物学为一体的现代仪器。以流式细胞仪为检测平台,利用微球体作为载体的流式荧光技术,具有高通量、高速度的特点,广泛应用于医学检验和卫生检验。如 Straub 等建立 6 重 PCR 与 11 重悬浮芯片检测 3 种病原菌;Dunbar 和 Jacobson 以 23S rDNA 为靶分子设计通用引物,结合流式荧光技术,检测大肠埃希菌(大肠杆菌)、沙门菌、李斯特菌等,检测灵敏度很高。流式荧光技术还可用于环境样本中的病原菌检测,用于病毒检测、遗传疾病筛查、T 细胞活性检测等。

DNA 条形码(DNA barcoding)技术是通过将一个标准基因片段的 DNA 序列进行分析从而进行物种鉴定的技术,目前已在物种鉴定和新物种发现中发挥了作用。

新型材料如纳米粒子的应用逐渐广泛。将纳米粒子与细菌识别物连接,再通过该复合体对细菌菌体的特异性识别及纳米粒子的荧光信号放大可实现细菌的检测;也可以同时应用磁性纳米粒子,将细菌先分离后检测。

现代分子生物学检验的另一个突出特点是日益完善的生物信息数据库、全球化的监测网络和各种基于计算机的分析、预测、模型模拟、演算工具软件的发展。美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)、欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute, EBI)、瑞士蛋白质序列数据库(Swiss-Prot Protein Sequence Database)、蛋白质信息资源数据库(Protein Information Resource, PIR)等提供了强大的生物信息资源。这些数据库上都配有方便的检索工具,并可在其上进行简单的分析。全球的监测网络脉冲网(PulseNet)使全球可同步监测传染病病原体,进行疾病流行前预报,使疾病预警成为可能。人们可通过软件模拟完成对基因、蛋白质等生物大分子的基本性质、结构功能域、抗原位点的预测和分析,如分析蛋白质疏水性可采用 ProtScale 程序,分析蛋白质跨膜区可采用 Tmbase 程序。这些现代化的技术手段为现代分子生物学检验学科快速发展创造了更多的有利条件。

(汪 川)

第二章 微生物基因组结构与特征

基因组 (genome) 是一个细胞或一种生物体的整套遗传物质, 包括编码序列和非编码序列。基因组也可指拥有自身遗传物质的细胞器基因组, 比如核基因组、线粒体基因组和叶绿体基因组。自然界中, 从简单的病毒到复杂的高等动、植物, 都有自己独特的基因组。基因组作为生物的遗传物质, 其化学本质是核酸。随着核酸测序技术的高速发展, 对生物个体全基因组进行测序和功能研究的基因组学也迅速发展壮大, 对生命科学和医学都产生了深远的影响。本书将在后续章节中详细介绍基因组学。

第一节 核酸的结构与功能

核酸是生物体内最基本的物质之一。根据化学组成不同, 核酸可分为脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 和核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA)。DNA 是储存、复制和传递遗传信息的主要物质。RNA 是所有生命体蛋白质合成不可或缺的部分, 也能作为部分病毒的遗传物质。核酸在生长、遗传、变异等一系列重大生命现象中起决定性的作用。

核酸的结构决定其理化性质和功能, 分子生物学检验技术大部分是基于核酸的, 所以牢固掌握核酸结构是学好后续课程的关键。

一、核酸的共同基础结构

核酸是以核苷酸为基本单位聚合而成的生物大分子。核苷酸由戊糖、碱基和磷酸组成。戊糖是核苷酸的骨架部分, 对维系核酸的结构和性质至关重要, 其结构简图如图 2-1 (1) 所示。戊糖的五个碳原子按国际惯例标号, 其中除 4 号碳以外都有一个重要的羟基。戊糖通过 1 号碳上的羟基 ($1'-OH$) 与碱基形成共价键, 即 C—N 糖苷键 [图 2-1 (2)]。组成核酸分子的碱基有五种: 腺嘌呤 (adenine, A)、鸟嘌呤 (guanine, G)、胸腺嘧啶 (thymine, T)、胞嘧啶 (cytosine, C) 和尿嘧啶 (uracil, U)。其中, 胸腺嘧啶一般只出现于 DNA, 而尿嘧啶只出现于 RNA。核苷酸的戊糖 2 号碳上如果有羟基, 则为核糖核苷酸, 是为 RNA 的基本单位; 若没有羟基, 则为脱氧核苷酸, 是 DNA 的基本单位。戊糖的 $3'-OH$ 和 $5'-OH$ 是核苷酸聚合形成核酸的核心官能团, 也因此以之描述核酸合成方向。如图 2-1 (2) 所示, 戊糖 $5'-OH$ 与磷酸基团通过脱水缩合反应形成磷酸酯键。核苷酸聚合反应是核苷酸的磷酸基团与前一个核苷酸的

3'-OH缩合；同理，其 3'-OH 与下一个核苷酸 5 号碳上的磷酸 (5'-P) 缩合。这样，核苷酸通过 3',5'-磷酸二酯键，从核酸的 5'-P 到 3'-OH 方向聚合而成核酸，如图 2-1 (3) 所示。

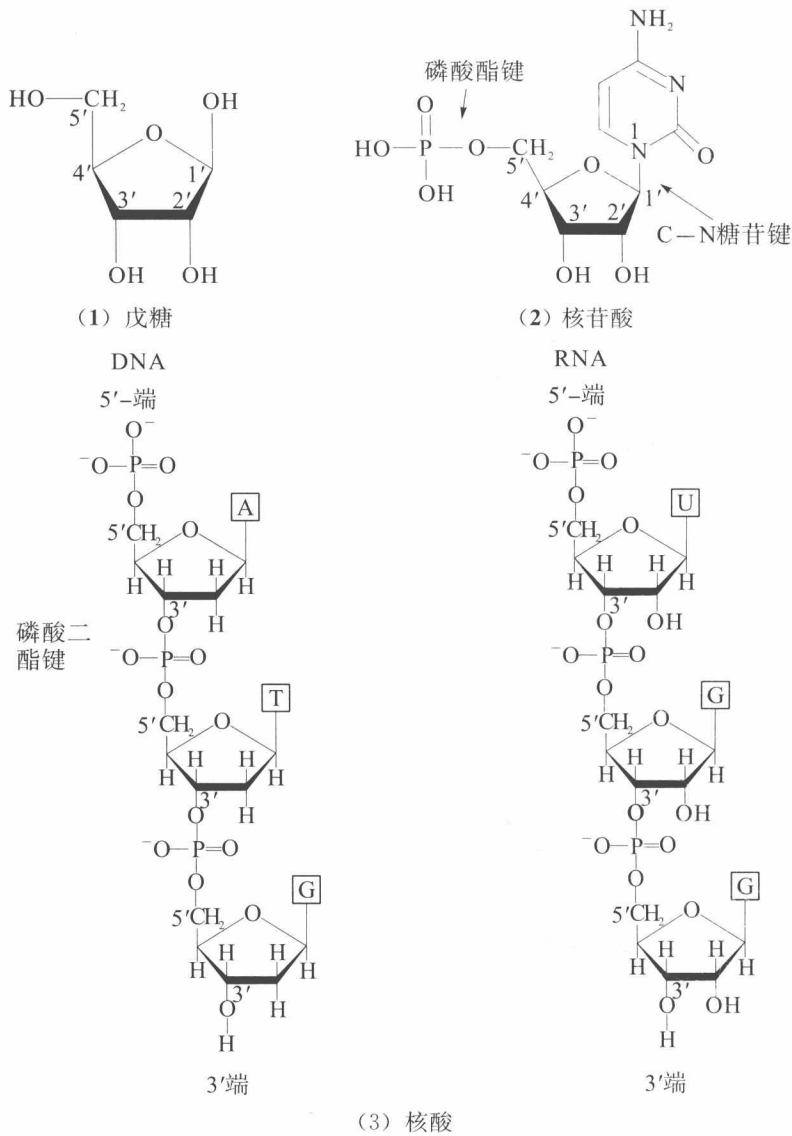


图 2-1 核酸的基本结构

(1) 戊糖；(2) 核苷酸：戊糖通过糖苷键与碱基连接，通过磷酸酯键与磷酸相连而构成核苷酸；
(3) 核酸：核苷酸通过磷酸二酯键相连成为核酸。

核酸的磷酸和戊糖交替排列，形成核酸大分子的骨架结构。磷酸基团具有强极性，在 pH 值为 7 时带负电荷，亲水性强；而核酸分子另一侧的碱基是疏水性的。这些极性分布是 DNA 双链结构、DNA-RNA 杂交，以及 DNA 复制、转录和基因表达调控等生物过程的重要物理基础。核酸大分子中碱基的排列顺序储存着生物的遗传信息，这是分子生物学检验技术的核心所在。比如，以 PCR 技术扩增 DNA 片段以获取核酸序列

信息；以基因克隆选择性表达特定的碱基序列信息；以 DNA 测序综合分析纷繁复杂的生物过程和信息，进行疾病溯源、种群分析、血缘鉴定等。因此，提取核酸时要防止因核酸降解而失去碱基序列信息。

DNA（单链）和 RNA 在结构上的区别主要有两点：碱基和戊糖的 2'-OH。DNA 和 RNA 在极性、自身大分子稳定性、对酸碱的稳定性和水溶性等方面的差异都取决于 2'-OH。例如，DNA 和 RNA 的磷酸二酯键在没有酶催化的条件下也会缓慢水解。在碱性条件下，受羟基基团的影响，RNA 的 2'-OH 会作为亲核体与磷酸基团作用，促进电子的重新分布，从而加速磷酸二酯键水解；而 DNA 因没有 2'-OH，相对更稳定，如图 2-2 所示。

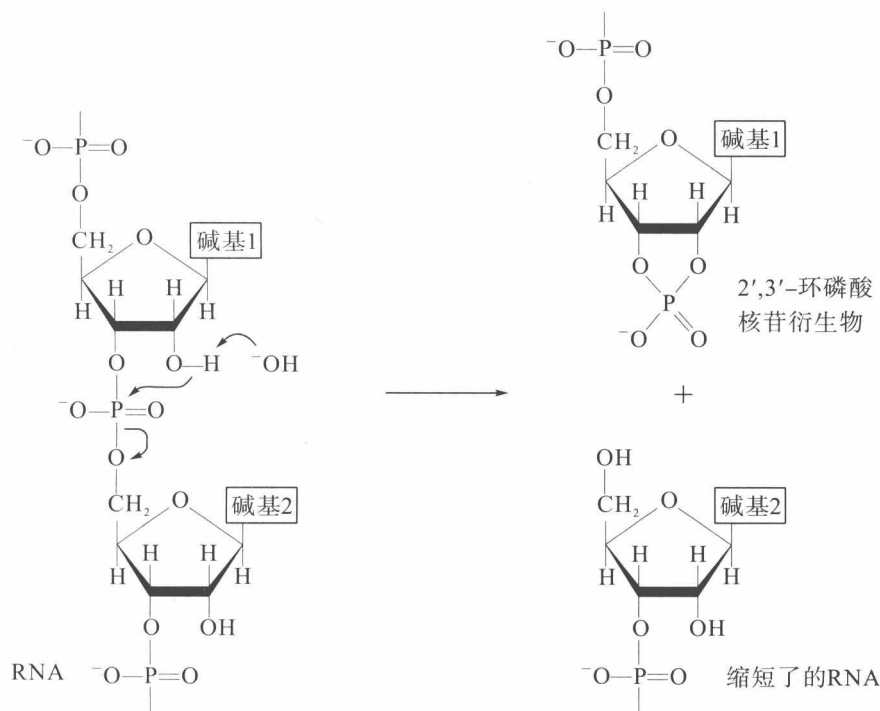


图 2-2 碱性条件下，RNA 的 2'-OH 加速磷酸二酯键水解

以上所述为核酸最常见的基本结构信息，但各个基本结构单元都有多元且重要的变体。DNA 和 RNA 都含有少量的稀有碱基（也称为修饰碱基），最常见的为碱基的甲基化，在生物体破坏异源 DNA 时能保护自身 DNA。RNA 中常常含有多种稀有碱基，比如 tRNA 中的双氢尿嘧啶和琉尿嘧啶。另外，碱基间也可相互转化，比如胞嘧啶（C）可以通过脱氨基作用转化为尿嘧啶（U）。单核苷酸可以有一个、两个或三个磷酸基团，内部也可脱水形成环核苷酸，在体内发挥重要的生物学功能，比如与能量代谢有关的三磷酸腺苷（ATP）和作为第二信使的环磷酸腺苷（cAMP）等。

二、DNA 的结构与功能

DNA 的结构分为一级结构、二级结构和高级结构。DNA 的一级结构指其碱基序

列；DNA 的二级结构为两条 DNA 单链通过碱基互补配对原则（A 与 T 配对，G 与 C 配对）形成的双螺旋结构；DNA 双螺旋结构进一步盘曲环绕，形成的更加复杂的结构为 DNA 的高级结构。

（一）DNA 的一级结构

DNA 的一级结构是指四种脱氧核苷酸（A、T、G、C）的连接和排列顺序，表示该 DNA 分子的化学组成。生物的绝大部分遗传信息都储存于 DNA 的一级结构。核苷酸的不同序列决定了生物的多样性，也是 DNA 的高级结构和生物功能的基础。因此，DNA 的一级结构是分子生物学检验分析的主要对象。生物的 DNA 碱基组成没有组织、器官特异性，也不受年龄、生长、营养和外界条件的影响。但是，生物的 DNA 碱基组成具有种属特异性，即不同物种有各自特异的碱基比例和组成。基于 DNA 的一级结构具有种属特异性，且基本不受环境因素的干扰，分子生物学检验可通过特定 DNA 的序列分析来对物种做出鉴定。

（二）DNA 的二级结构

DNA 的二级结构有两大主要特征：①碱基互补配对原则。两条单链 DNA 特定地在腺嘌呤和胸腺嘧啶之间形成两个氢键（ $A=T$ ），以及在鸟嘌呤和胞嘧啶之间形成三个氢键（ $G=C$ ），形成双螺旋结构。碱基上的氮、羰基和环侧的氨基是形成氢键的重要官能团。DNA 分子间的碱基互补配对构成遗传的物质基础，也赋予双链 DNA 碱基组成如下特点：①腺嘌呤（A）和胸腺嘧啶（T）的摩尔数相等，鸟嘌呤（G）和胞嘧啶（C）的摩尔数相等，因而，双链 DNA 中所含嘌呤数等于嘧啶数，即 $A + G = C + T$ 。②两条互补链反向平行。两条单链一般以右手螺旋方式围绕一个中心轴反向平行环绕，一条链走向为 $5' \rightarrow 3'$ ，另一条链走向为 $3' \rightarrow 5'$ ，如图 2-3 所示。螺旋的大沟和小沟相间，亲水的戊糖-磷酸骨架位于双螺旋外侧，而疏水的碱基位于双螺旋内侧，碱基平面与中轴垂直。DNA 双螺旋的直径为 2 nm，一圈螺旋约含 10 个碱基对，碱基平面间的轴向距离为 0.34 nm，每一螺旋的螺距为 3.4 nm。DNA 的二级结构分为两大类：一类是右手双螺旋，如 A-DNA、B-DNA、C-DNA、D-DNA 等；另一类是左手双螺旋，如 Z-DNA。Watson 和 Crick 所发现的双螺旋为 B 型的水结合型 DNA，即 B-DNA，在细胞中最为常见。也有的 DNA 为单链，但通常见于原核生物，如大肠埃希菌噬菌体 ϕ X174、M13 等。此外，就形态而言，有环形的 DNA，也有线形的 DNA。

碱基对间的氢键是维系 DNA 横向稳定的主要力量。碱基平面间的范德华作用力和色散力被称为碱基堆积力，是维系 DNA 纵向稳定的主要力量。将 DNA 的双链解开成单链是 DNA 复制、转录等过程的必要步骤，而打开 $G=C$ 的三个氢键比打开 $A=T$ 的两个氢键更费力，因此 DNA 序列中 GC 含量与该序列的生物学功能密切相关。就物种而言，有些物种的生存环境需要更高的 DNA 稳定性，其 GC 含量也可能因此相对更高，比如多数嗜热微生物的生长上限温度与其基因组中的 GC 含量呈正相关。在分子生物学检验中，提取 DNA、PCR 扩增 DNA 等，都需要破坏、重新形成 DNA 的双链结构（即最基本的 DNA 变性、复性），因此就要采用各种措施来破坏或恢复 DNA 双链间的氢键和碱基平面间的碱基堆积力。

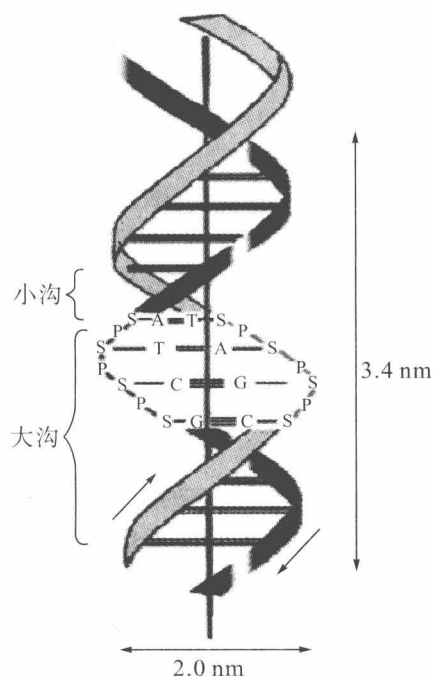


图 2-3 DNA 双螺旋结构

(三) DNA 的高级结构

最常见的 DNA 高级结构是超螺旋 (supercoil) 结构, 可分为正超螺旋和负超螺旋。螺旋方向与双螺旋同向, 使螺旋变紧, 称为正超螺旋; 如果是反向, 使螺旋变松, 则称为负超螺旋。负超螺旋是细胞内常见的 DNA 高级结构。绝大多数原核生物的 DNA 是环状闭合的 DNA 双螺旋分子, 这种双螺旋分子可再次螺旋化形成 DNA 的超螺旋结构。在真核生物中, DNA 与蛋白质结合, 以染色质的形式存在。构成染色质的基本单位是核小体, 其由核心和链接区组成, 核心由组蛋白八聚体和盘绕其上的 DNA 双链组成, 链接区含组蛋白 H1 和一小段 DNA 双链。核小体连成串珠状染色质细丝, 这些细丝螺旋化形成染色质纤维, 进一步卷曲、折叠形成染色质单体, 存储于细胞核。除染色体 DNA 外, 还有极少量结构不同的 DNA 存在于真核细胞的线粒体和叶绿体。

DNA 依据半保留复制原则进行复制: 当 DNA 双螺旋被解开时, 每一条链都可用作一个模板, 通过碱基互补的原则补齐另外一条链。这使 DNA 能在亲代和子代间保持遗传的稳定性, 储存决定物种所有蛋白质和 RNA 结构的全部遗传信息; 指导蛋白质合成; 控制新陈代谢过程和生长发育; 在特定条件下产生可遗传的变异和确定生物的个性。在分子生物学检验中, 分析物种的特异 DNA 序列, 鉴定物种, 判断血缘关系; 比较同一物种的 DNA 序列, 分析物种或基因的类型; 分析特定基因的序列, 进行遗传病诊断或风险预测等。

三、RNA 的结构与功能

RNA 种类很丰富, 存在于细胞质和细胞核中。RNA 在蛋白质合成、基因的表达与

调控中起重要作用,也是 RNA 病毒的遗传物质。RNA 主要有三种:以 DNA 为模板转录形成的信使 RNA (messenger RNA, mRNA),作为蛋白质合成系统中的核糖体的重要组分的核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA),以及在蛋白质合成中转运氨基酸的转运 RNA (transfer RNA, tRNA)。此外,细胞中还有许多种具有不同重要生物功能的小型 RNA,包括具有调控功能的微小非编码 RNA (microRNAs, miRNAs),一般只有 20~25 个核苷酸,可通过碱基互补配对的方式识别靶 mRNA,参与降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译;细胞核内的小分子 RNA (small nuclear RNA, snRNA),参与 mRNA 前体的剪接以及成熟 mRNA 由细胞核到细胞质的转运过程;核仁小分子 RNA (small nucleolar RNA, snoRNA),参与 rRNA 前体的加工和核糖体亚基的装配;反义 RNA (antisense RNA),与特异的 mRNA 配对,通过阻断 mRNA 翻译调节基因表达等。另外,有一些具有生物催化功能的 RNA 分子,称为核酶 (ribozyme),有的核酶能够切割 RNA 或 DNA,有些具有 RNA 连接酶、磷酸酶等的活性。

RNA 一般以单链形式存在,某些局部区域可自身回折进行碱基互补配对,主要为 A=U、G=C 配对,有时还可出现 G=U 配对,形成局部双螺旋,非互补区膨胀鼓出或形成环 (loop),总体形成发夹结构 (hairpin)。发夹结构是 RNA 最普通的二级结构。二级结构可进一步折叠形成具有生物活性的三级结构。RNA 和蛋白质形成的核蛋白复合物则被称为四级结构。本章将几种重要的 RNA 分述如下。

(一) mRNA

mRNA 存在于原核细胞和真核细胞的细胞质及真核细胞的细胞核和某些细胞器(如线粒体和叶绿体),携带遗传信息,在蛋白质合成时充当模板。原核生物的 mRNA 通常为多顺反子结构,即一个 mRNA 分子编码多个多肽链。这些多肽链对应的 DNA 片段则位于同一转录单元内,享用同一起点和终点,如图 2-4 (1) 所示。在 5'端和 3'端是调控翻译起始和终止的非编码区,中间是蛋白质的编码区,基因之间有与核糖体识别和结合相关的间隔序列。而真核生物的 mRNA 多为单顺反子结构,如图 2-4 (2) 所示。成熟的真核生物的 mRNA 一般由 5'端的⁷MeGppp 帽子结构、5'端非编码区、5'端编码区、3'端非编码区和 3'端聚腺苷酸 (Poly A) 尾巴构成。帽子结构可保护 mRNA 不被核酸外切酶水解,且能调控翻译的启动。线粒体中的 mRNA 通常无帽子结构。Poly A 尾巴长度随来源而变,且随 mRNA 的老化而变短,通常有 20~200 个腺嘌呤,其与 mRNA 稳定性及将 mRNA 从细胞核转到细胞质中有关。

通常 mRNA (单链) 分子自身回折将产生许多双链结构。原核生物的 mRNA 约有 65% 的核苷酸以双链结构的形式存在。真核生物的 mRNA 也具有丰富的二级结构。

除结构不同外,原核生物和真核生物的 mRNA 还具有以下不同的特点:原核生物的 mRNA 的转录与翻译一般是偶联的,真核生物的 mRNA 前体则需经转录后加工为成熟的 mRNA 与蛋白质结合生成信息体后才开始工作;原核生物的 mRNA 的半衰期很短,一般为几分钟,最长的只有数小时 (RNA 噬菌体中的 RNA 除外),真核生物的 mRNA 的半衰期较长,如胚胎中的 mRNA 半衰期可达数日。