

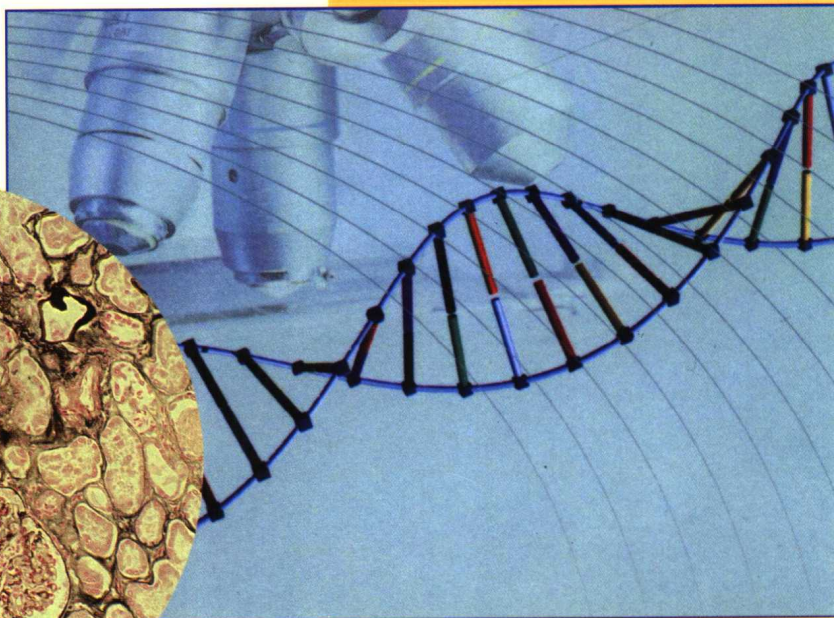
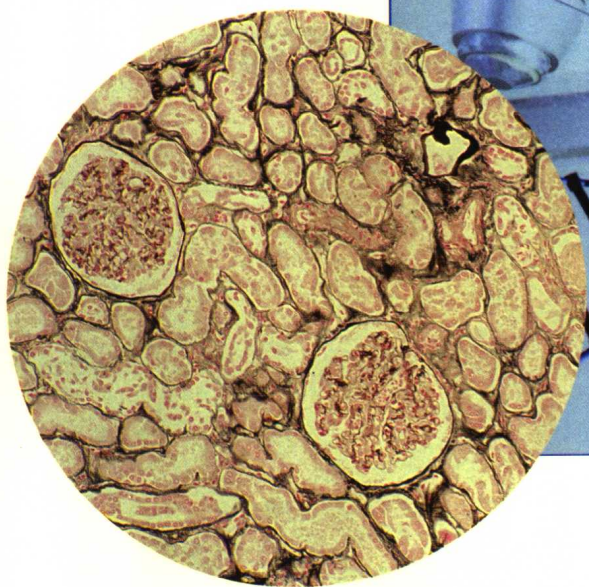


分子生物学实验原理与技术

FENZISHENGWUXUESHIYANYUANLIYUJISHU

姜 静 主 编

杨传平 主 审



33
2

东北林业大学出版社

Q7-33
J472

分子生物学实验原理与技术

姜 静 主编
杨传平 主审

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学实验原理与技术/姜静主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003. 3
ISBN 7-81076-437-3

I. 分... II. 姜... III. 分子生物学—实验—高等学校—教材 IV. Q7-33
中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 018929 号

责任编辑: 任丹婷

封面设计: 叶 方



NEFUP

分子生物学实验原理与技术

Fenzi Shengwuxue Shiyuan Yuanli Yu Jishu

姜 静 主 编

杨传平 主 审

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

地矿部黑龙江测绘印制中心印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 11.5 字数 264 千字

2003 年 3 月第 1 版 2003 年 3 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 7-81076-437-3

Q·98 定价: 20.00 元

序

随着生命科学的不断发展，分子生物学技术已渗入到生命科学的各个研究领域，因而分子生物学实验技术已成为生命科学及其相关学科在科学研究中不可缺少的部分。近年来，我国分子生物学实验技术取得了长足的发展，但与国际领先水平相比还存在一定的差距，要想在较短的时间内迎头赶上世界先进水平，高素质创新型人才的培养至关重要，高等学校肩负这一光荣艰巨的历史使命。为了适应分子生物学技术的发展，落实培养研究型创新人才的目标，姜静博士编写了《分子生物学实验原理与技术》这一教材。

该教材是编者在原有分子生物学实验讲义的基础上，参考了已出版的国内外分子生物学实验技术方面的优秀书籍，引用在本实验室做出重要贡献的研究生们的实验结果图片，有序地介绍了当前分子生物学研究中实用的一系列分子生物学实验的基本原理及技术。

该教材的独特之处在于：既有基础理论知识的详细叙述，又有每项技术原理的讲解和发展背景的简介，还有实验操作程序，使学生在掌握每项相关技术的同时，又能明确该项实验技术的基本原理，为今后学生独立完成教学与科研工作奠定了良好基础。

这本教材既适用于生物、农、林、医院校的本科学、研究生选用，又是该领域工作者的一本可读性较强的入门指导。



东北林业大学常务副校长
林木遗传育种学科带头人、博士生导师、教授

前 言

由于分子生物学技术本身不断发展并渗入到生物学的各大分支学科及医学、农、林、牧各分支领域。使得对分子生物学技术与理论的掌握已成为这些学科在新的高度和分子水平揭示生命奥秘的共同需求。

本教材是编者在多年的教学和科研中不断总结经验,同时参阅了大量文献和著作而编写的。该教材全面系统的介绍了分子生物学研究领域常用技术的基本原理和操作方案。全书共分 11 章,介绍了核酸的物理化学性质、核酸的分离提取与纯化、核酸的凝胶电泳技术、分子生物学实验中常用的核酸酶类、多聚酶链式反应技术、DNA 分子标记技术、核酸分子杂交、分子探针的标记、基因克隆的载体和差异表达基因的克隆方法。为了适合不同水平对象的需求,在编排上,循序渐进,由浅入深;在内容安排上,注重科学性、先进性、系统性和条理性,将基础理论知识贯穿于每项实验技术之中,系统、详细的介绍每项实验程序,对实验中应该注意的地方,实验过程中易出现的问题给予提示。

本教材适用于大专院校生物系及农、林、医院开设分子生物学实验作为教学用书,也可作为有关科研人员的参考书。

在本教材出版和编写过程中,得到了东北林业大学出版社冯琪主任的热情关心与支持,任丹婷责任编辑为本教材的编辑做了大量的工作,为本教材的出版付出了艰辛的劳动,在此,向她们表示由衷的谢意。

感谢东北林业大学林木遗传育种教研室的魏志刚博士、王玉成博士为教材提供的资料 and 照片,魏继承博士、王大海、吕艳芳、朱翔、冯昕、宋小双、李同华、武金华、常玉广、程贵兰、蔡智军等硕士研究生多次校阅了本教材的有关章节,及时的填补了疏漏,更正了错误,许雷、李慧玉、赵鑫、褚延广为本教材的图表处理作了大量的工作。在本教材出版之际,谨对他们的支持和帮助表示衷心的感谢。

虽然编者在编写本教材过程中,力求全面、完整的反映分子生物学研究方法的最新进展,但面对浩如烟海的文献资料,加上作者的水平有限,错漏之处在所难免,敬请专家和读者批评指正。

编著者

2003 年 3 月于哈尔滨

目 录

1 绪论	(1)
1.1 核酸的发现与早期的研究工作	(1)
1.2 DNA 结构的发现	(2)
1.3 分子生物学研究进展	(3)
1.4 化学与生物学的结合	(4)
2 核酸的物理化学性质	(6)
2.1 核酸在细胞中的存在状态和分布	(6)
2.2 核酸的物化性质	(7)
2.3 DNA 的变性与复性	(10)
3 核酸的分离、提取与纯化	(18)
3.1 核酸分离、纯化的原则	(18)
3.2 分离、提取核酸的主要步骤	(20)
3.3 DNA 的提取与纯化	(28)
3.4 RNA 的分离与纯化	(32)
4 核酸的凝胶电泳	(39)
4.1 电泳基本原理	(39)
4.2 影响泳动率的主要因素	(39)
4.3 核酸电泳的指示剂与染色剂	(43)
4.4 电泳装置	(46)
4.5 DNA 凝胶电泳	(46)
4.6 RNA 凝胶电泳	(53)
5 常用的核酸酶类	(55)
5.1 限制性核酸内切酶	(55)
5.2 DNA 和 RNA 连接酶	(71)
5.3 DNA 聚合酶	(73)
5.4 磷酸激酶和磷酸酶	(81)
5.5 核酸水解酶	(83)
6 多聚酶链式反应 (PCR) 技术	(90)
6.1 PCR 的基础知识	(90)
6.2 PCR 反应的成分和作用	(92)
6.3 耐热 DNA 聚合酶	(95)
6.4 防止污染	(96)
6.5 PCR 反应的忠实性	(96)

6.6	PCR 技术在分子生物学中的应用	(97)
7	DNA 标记技术	(104)
7.1	分子标记	(104)
7.2	理想的 DNA 标记的标准	(104)
7.3	DNA 标记的种类	(104)
8	核酸分子杂交	(119)
8.1	分子杂交概述	(119)
8.2	膜上印迹杂交	(120)
8.3	液相杂交技术	(132)
9	核酸分子探针的标记	(133)
9.1	概述	(133)
9.2	探针的标记方法	(137)
9.3	非放射性标记探针的检出	(140)
10	基因克隆的载体	(143)
10.1	质粒载体	(143)
10.2	噬菌体载体	(157)
10.3	柯斯质粒载体	(159)
10.4	酵母人工染色体载体	(160)
10.5	细菌人工染色体载体	(162)
11	差异表达基因的克隆方法	(163)
11.1	示差筛选	(163)
11.2	扣除杂交	(164)
11.3	mRNA 差别显示技术	(165)
11.4	代表性差示分析	(170)
11.5	抑制性扣除杂交	(172)
11.6	交互扣除 RNA 差别显示技术	(174)
	主要参考文献	(176)

1 绪 论

1.1 核酸的发现与早期的研究工作

1.1.1 核酸的发现

核酸的研究最早可以追溯到 19 世纪 60 年代,而叩响核酸奥秘大门之人则是一位年轻的瑞士科学家 Friedrich Miescher (1844 ~ 1895)。Miescher 出身于医学世家,他的父亲是瑞士巴塞尔的开业医生,早年他随父亲学医,后受其叔父(一位解剖学家)的影响,投身于细胞的组织化学研究,这在当时是一门新兴的边缘学科。1868 年他进入德国 Tübingen 大学学习有机化学,并在生物化学家 Hoppe-Seyler 的实验室里从事细胞化学组分的研究。要确定细胞的化学组分,首先要取得实验材料。从何处得到大量的细胞呢?作为医生的 Miescher 想到了绷带。绷带上有又脏又臭的浓液,看起来不大可能作为实验材料,但 Miescher 认为浓液中的白细胞是理想的实验材料,并且绷带来源丰富,很容易从当地外科诊所得。Miescher 用稀硫酸钠溶液洗涤绷带,分离细胞,再用稀碱抽提这些细胞,抽提液再加酸,于是他获得了一种物质,通过化学元素分析以及其他性质的测定,发现这些物质的磷含量很高(2.5%),与当时已知的含磷物质都不同。他认为这是一种新的特殊物质,遂命名为“核素”(nuclein),这时 Miescher 才 25 岁。

Miescher 于 1869 年秋天完成了这项工作。当他兴高采烈地把结果告诉他的导师 Hoppe-Seyler 时,导师却谨慎和怀疑地在 Miescher 离开后又重复进行了实验并验证了这项工作。于是, Miescher 的经典论文“浓细胞的化学研究”于 1871 年在 Hoppe-Seyler 主编的《医学化学研究》上发表。Miescher 的划时代的发现及 Hoppe-Seyler 对科学的严谨态度都是值得称道的。

1872 年 Miescher 被任命为 Basel 大学的生理学教授。他发现鲑鱼精子细胞中含有 90% 体积以上的核,于是他从鲑鱼精子的头部,先得到“核素”,继而又从“核素”中分离到一个碱性物质,他称之为鱼精子蛋白,除去这个碱性物质的核素含磷 9.5%,相当于纯的 DNA。他还发现分离后的核素不能透过羊皮纸滤膜,故他认为核素是高分子。Miescher 的这些结果发表于 1874 年。

Miescher 又扩展他的研究于蛙的精子、牛的精子,从不同材料提取核素。为了得到稳定的含磷比例,他把实验室移到低温下进行,由于他在冷室的艰苦工作使身体受到极大损害,使他患了肺结核,不幸于 51 岁时过早去世。

1.1.2 早期的研究工作

自 Miescher 发现核酸以后,核酸吸引了不少著名化学家的注意。他们对组成核酸的

成分很感兴趣,用各种方法分解核酸,并从中分离得到嘌呤碱、嘧啶碱、核糖、脱氧核糖等。其中贡献最大是德国的 Kossel、Levene 及其同事。Kossel 系统地研究了核酸的组成,确立了核酸的基本组成是核苷酸。Levene 等对核糖、2'-脱氧核糖核苷和核苷酸的鉴定做出了贡献,在诸多科学家中,Kossel 由于他在细胞核化学方面的杰出贡献,于 1910 年获诺贝尔奖。

1944 年 Avery 发现了细菌转化现象,首次用实验证明了遗传信息的物质基础是 DNA 而不是蛋白质,他把光滑性肺炎球菌的 DNA 与粗糙的肺炎球菌一起培养,结果观察到后者的形态向光滑性肺炎球菌转化。

1.2 DNA 结构的发现

所有的事实表明 DNA 的一级结构为线型聚核苷酸,各核苷酸通过 3', 5'-磷酸二酯键相互连接。聚核苷酸中只有磷酸二酯键的存在对于解释 DNA 对化学水解的稳定性十分重要,因为磷酸三酯和磷酸单酯(不包括焦磷酸)更不稳定。测得的 DNA 相对分子质量约为 1 000 000,意味着 DNA 单链含有约 3 000 个核苷酸。这个数值远大于酶分子,但能与 Staudinger 建立的天和合成高分子的大分子结构模型相符。但在 20 世纪中叶以前,人们对 DNA 一级结构的认识没能有更进一步的发展,这不只是因为没有掌握序列测定的关键方法,而且也没有特定位置切割 DNA 链的方法。因此当时所有注意力都转移到研究 DNA 的二级结构。

Gulland 研究了小牛胸腺 DNA 的粘度及流动双折射,推断在嘌呤-嘧啶的羟基及某些氨基间有氢键相连。他假定氢键存在于相邻链或单链的核苷酸中,但他在这些选择中束缚了自己的手脚。

Astbury 测定了 DNA 拉伸纤维 X 射线衍射,实验结果表明 DNA 具有有序的二级结构。令人遗憾的是,Astbury 回过头来研究蛋白质,Gulland 也因车祸于 1947 年过早去世。他们的工作对于后来的成功者至关重要,但也由于他们的假说都包含有一定的错误,在以后的五六年研究中起了某些阻碍作用。因此,Linus Pauling 试图建立 Astbury 式的 DNA 螺旋模型,即戊糖磷酸酯骨架居于中心而碱基朝外。Gulland 则错误地描述了杂环碱基胸腺嘧啶和鸟嘌呤的互变异构体,坚信他们以具有羟基的烯醇式而存在。真正的酮式结构的重要性直到 1952 年才被大家所认识。

Emin Chargaff 开始研究另一类序列很不相同的 DNA 结构,考察了不同 DNA 的组成,采用纸色谱新技术分离 DNA 水解产物,并通过第一台商业紫外光谱仪对它们的各种碱基的相对含量进行了定量测定。结果表明,尽管各种 DNA 的碱基组成有所不同,但腺嘌呤与胸腺嘧啶和鸟嘌呤与胞嘧啶的含量之比为 1:1。这意味着嘌呤(A+G)的量总是与嘧啶(C+T)的量相等。Chargaff 的结果使人们最终抛弃了四核苷酸假说,因为其要求 DNA 中各碱基比例相同。

1951 年 Francis Crick 和 Jim Watson Cambridge 的 Cavendish 实验室携手研究 DNA 结构。他们都相信 Pauling 和 Corey 建立的多肽的 α -螺旋模型也应该同样适应于 DNA。令人难以置信的是,他们没有尝试其他实验方法,而是采用别人发表和没有发表的工作来构造

各种模型,直至设计的模型能满足所有实验结果。

在 Watson Crick 双螺旋结构出现之前, London 的 King 学院获得了很好的 X 射线衍射结果。Maurice Wilkins 观察到湿度对保持 DNA 纤维结构的重要性,而 Rosalind Franklin 则利用 X 射线衍射发现在低湿度下的 A-型 DNA 在高湿度下会变成 B-型。因此, Franklin 认为这些现象需要磷酸酯基处于螺旋的外部而暴露于水中,同时也可以推断碱基处于螺旋的内部。

Watson 根据单元晶胞中核苷酸的数目认为存在双螺旋结构。Crick 则凭着自己的物理学知识认为 A-型衍射图中隐含有单斜 C^2 对称中心,因此必定存在对螺旋正常的局部双重对称轴,这是两条链取向相反的双链螺旋的特征。

至此, Watson 和 Crick 还需解决最后一个问题,即怎样使碱基在规整的结构中堆砌起来而构成螺旋中心。Watson 根据 Gulland 的有关 DNA 碱基间氢键连接的观点,确信问题的关键是控制碱基间氢键的形成规则。因此 Watson 用模型对碱基的烯醇互变异构形式进行了相似结构配对,但这一结构很快被 Crick 否定,因为它与 B-型 DNA 的对称性不符。同时自我配对也必须否定,因为它不能解释 Chargaff 的 1:1 碱基比例。

在听取了 Cavendish 与 Jerry Donohue 的建议后 Watson 开始考虑碱基的酮式结构,并将腺嘌呤与胸腺嘧啶配对、鸟嘌呤与胞嘧啶配对,他马上发现了一个相当简单的关系,即腺嘌呤-胸腺嘧啶之间形成两个氢键、鸟嘌呤-胞嘧啶之间形成两个或三个氢键。这种碱基配对形式的特征是在 A:T 和 G:C 碱基对中,戊糖与碱基相连的键的构型相对对称性实际上相同,亦即如果嘌呤总是与嘧啶配对,单链 DNA 中的一个不规则的碱基序列仍然可以在双链的中心进行有规则的配对而不至于失去对称性。

Chargaff 碱基组成“规则”直接揭示了 DNA 双螺旋结构的强制性。从上可以看出,因为一条链的碱基序列自动决定对方的序列, Crick 和 Watson 就能容易得到一条单链如何可以作为第二条互补碱基序列的模板。

DNA 核心结构问题被解决了,也就在 Rosalind Franklin 英年早逝 4 年之后的 1962 年, Crick、Watson 及 Wilkins 分享了科学殿堂的最高奖赏——诺贝尔化学奖。

1.3 分子生物学研究进展

通常将 Watson 和 Crick 于 1953 年 4 月在 Nature 杂志上发表的有关 DNA 双螺旋结构的论文归结为核酸研究经典时代的结束。在此以前,一些基本的发现都是由某个有才华的研究者在某一个很少有人涉足的领域实现的。双螺旋模型的出现的的确吸引了更为广泛的研究者关注核酸的重要性,这不是指结构本身而是由于这种模型所具有的生物学含义。同时很快发现了细胞中 DNA 的核苷酸碱基的不规则序列提供了该细胞行使作用时生物分子的多样性,其中起作用的关键因素是基因密码,通过它的 DNA 能翻译成蛋白质。

基因密码的解决要归功于美国 Marshall Nirenberg 和 Severo Ochoa 实验室的杰出工作。他们设计了无细胞系统用于酶法合成的多核苷酸翻译成多肽的实验,在 20 世纪 60 年代中期他们又建立了一些氨基酸的基因密码。事实上密码子的解明包含有不同实验室的许

多研究者对许多链的认识。其中一个重要的贡献者是纽约 Rechester 的 Alexander Doune, 他在 20 世纪 50 年代早期就推断引导细胞蛋白质合成的模板是 RNA 而不是 DNA, 而且指出也许 3 个核苷酸决定一个氨基酸。1961 年 Sydney Brenner 和 Leslie Barner 证实密码子是三联体而且不重叠。Cornell 大学的 Robert Holley 和 Cologne 的 Hans Zachau 分离和鉴定了 3 个转移 RNA “适应” 分子的序列, 每个分子携带 1 个单独的氨基酸随时准备与蛋白质结合, 同时也可识别含有从 DNA 拷贝过来的基因序列的信使 RNA (mRNA) 的三联体密码子。Gobind Khorana 化学合成了 64 个核糖三核苷酸二磷酸酯, 通过酶学与化学的结合, 合成了一系列具有重复二、三和四核苷酸序列的多核糖核苷酸, 它们被用来合成 mRNA 以鉴别密码子中的三联体。这方面的工作在 1968 年被授予诺贝尔医学奖, 由 Holley、Khorana 和 Nirenberg 分享。

20 世纪 50 ~ 60 年代的核酸研究主要集中在研究密码问题及确立 tRNA 和 mRNA 的生物作用。这在当时也是可以想像的, 因为 RNA 比 DNA 小且易于获得和纯化。很明显为了解决怎么构成基因这样一个基本问题, 即能用遗传方式而非化学方式确定 DNA 的单个遗传元素, 有必要采用特异的方法使 DNA 断裂成较小的片断。突破出现在 1968 年, 当时 Meselson 和 Yuan 从大肠杆菌中分离得到了限制酶。它是一种核酸酶, 能在 DNA 上识别特定序列并进行特异切割。大肠杆菌利用这种活性能使侵入的 DNA (如噬菌体 DNA) 断裂并使之失活。不久发现这种性质是细菌的普遍特性, 随后又得到了不同性质的其他限制性酶。但是直到 1973 年这种酶的重要性才变得明显。当时 Stanford 的 Chang 和 Cohen 及 California 的 Helling 和 Boyer 从两个不同的来源在试管中组建了携带基因信息的具有生物作用的 DNA。这种嵌合体是通过采用限制酶切割某来源的 DNA 而得到的能与载体 DNA 即质粒结合的片段, 产生的重组 DNA 能在大肠杆菌中进行自我复制和表达。

这一基因操作的杰出成就给生物学带来了革命, 不久就能从外源 DNA 中分割出单一基因, 并在其他细菌或有机体中进行放大, 同时还通过先合成 RNA 然后合成蛋白质去研究其表达。Cohen 和 Boyer 的研究工作揭开了现代分子生物学的序幕。

1.4 化学与生物学的结合

在 20 世纪 40 ~ 50 年代, 化学和生物学界限很清, 以致很少有人能同时涉足这两个领域, 有两个年轻的科学家则属例外, 他们在选定自己的职业时, 就在考虑用化学解决生物学问题的可能性。他们从不同的方向都对核酸领域产生了实质性的、持续的影响。

其中一个是 Frederick Sanger, 毕业于 Cambridge 生物化学系, 在 20 世纪 40 年代初开始测定胰岛素的蛋白质序列。在当时, 这项工作被认为是不可能的, 因为那时人们普遍认为蛋白质不是具有固定一级结构的可分离的片段。更让人惊奇的是, 他还继续开发 RNA 及 DNA 的序列测定方法。这些方法需要酶学与化学的巧妙结合, 而那个时代没有几个人认为能结合到一起。但他的工作结果使几年后 DNA 的序列测定成为一常规程序, 以至于现在测定人类整个基因序列。1958 年和 1980 年 Sanger 被两次授予诺贝尔奖, 足以证明他的工作所产生的影响。

另一位青年科学家 Gobind Khorana。坚信多核苷酸的化学合成对于研究从 DNA 到 RNA 再到蛋白质的信息传递过程非常重要。当他在 20 世纪 60 年代中期完成了基因密码工作后,得知 Holley 确定了丙氨酸 tRNA 的序列,于是他决定对确立 tRNA 基因的相应 DNA 双链进行全合成。同 Sanger 一样,他精心设计了核酸化学与酶学的结合而形成基因分析的一般方法,直到今天这一原理仍在使用。

令人啼笑皆非的是,即使到了 20 世纪 70 年代初期, Khorana 的基因合成仍被许多生物学者认为没有什么实际价值,而今天,合成基因被广泛用于蛋白质的生产。远不止于此的是,由 Khorana 第一个化学合成的单链 DNA 的短片段寡聚脱氧核糖核酸在 DNA 操作中已经成为极有价值的通用工具,它们在 DNA 合成中被用作引物,在基因检测及分离中用作探针,并在近几年用作潜在的基因治疗药物。

合成 DNA 的可能性也激发了对 DNA 结构的研究。在 20 世纪 70 年代初, X 射线晶体学技术得到了发展并被用来解决 A_pU 的结构问题,接着对酵母苯丙氨酸 tRNA 的全结构进行了解析,第一次能详细地看到双链间的互补碱基配对。A_pU 通过分子的尾-尾配对而形成双链,各链间能清晰表明 Watson - Crick 配对。tRNA 不仅显示 Watson - Crick 配对,同时也显示许多可交换的配对及碱基三联体。

1978 年合成 d (pATAT) 的结构被 Cambridge 的 Kennard 等解决,四聚体也形成一扩展的双链,但其构象实质上与序列相关,相邻的 dA 和 dT 残基间的夹角在 A - T 序列与 T - A 序列中完全不同。不久, Rich 发现合成的 d (CGCGCG) 采取一个意料之外的左手 Z - 构象,接着 Dickerson 发现了合成的十二聚体采取 B - DNA 螺旋, Kennard 发现八聚体采取 A - DNA 螺旋,这些都表明 DNA 并非是一种刚性棒状结构。很明显,随着 DNA 序列和外部环境的不同, DNA 能采取不同的构象。更重要的是, DNA 的构象区别(或形成的可能)可以通过其他的分子进行识别。因此,不久 DNA 也被用于研究其与癌基因和药物及蛋白质的结合。

这些引人注目的进展只有到了 20 世纪 70 年代后期和 20 世纪 80 年代初期在寡核苷酸合成方法也同样取得惊人进展后才能实现。早期基因合成的繁重的手工操作已被可靠的 DNA 自动合成装置所代替,这种装置在几个小时内就能合成 100 个碱基以上的序列。Khorana 的有关 DNA 重要性的预见已充分得到了证实。

2 核酸的物理化学性质

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；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。细胞质的各种 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 $10^{-12} \sim 10^{-15}$ 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）。

表 2.1 几种生物细胞核 DNA 的含量和染色体数目

DNA 来源	DNA 的含量 (10^{-12}) /g	染色体数目/条
大肠杆菌噬菌体 T ₂	0.000 2	
大肠杆菌	0.004 7	
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	2.35	20
人体	3.19	23
玉米	16.5	10
南美肺鱼	112.2	19

注：真核生物指单倍体基因组含量。

（引自《三链核酸的结构与生物化学》白春礼，1996）

通常 RNA 分子较小，相对分子质量约为 $2.5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ ，分离时较易得到完整的分子，其分子大小与生物进化无明显关系。DNA 含有生物体的全部基因（RNA 病毒除外），DNA 的分子长度一般随着生物由低级进化到高级而增大，相对分子质量约为 10^8

$\sim 10^{11}$ ，最小的病毒 DNA 有几千碱基对，细菌 DNA 有几百万碱基对。而高等动物、植物 DNA 可达几十亿碱基对。所以要提取、分离得到完整的 DNA 分子（特别是细胞染色体 DNA）非常困难，表 2.2 列出一些 DNA 分子的大小及长度。

DNA 分子能以线状或环状的形式存在。真核生物染色体 DNA 是双链线状，其细胞器 DNA 以及原核生物“染色体”DNA、质粒 DNA 等都是双链环状。多数生物体的 RNA 是单链线状，而且，不同类型的 RNA 还有不同的结构特点，如真核生物 mRNA 多数含有多聚腺嘌呤尾巴。至于病毒、类病毒所含的 DNA 和 RNA 分子则形式多样，有双链线状、双链环状、单链线状、单链环状等。线状双链 DNA 的末端可能是齐头的，也可能带有单链粘性末端。环状 DNA 也有单链环（如 Φ X174）、双链环，并有闭环、缺环等多种形式。在体内，环状 DNA 大多是以超螺旋形式存在的。

表 2.2 一些 DNA 分子的大小*

DNA 来源	相对分子质量	千碱基对/kb	长度/mm	备注
细菌质粒	$1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^8$	1.5 ~ 300	0.000 5 ~ 0.1	最小的双链 DNA 动物病毒
多瘤病毒	3.4×10^6	5.1	0.001 7	
动物线粒体	10^7	15 ~ 18	0.005	
植物叶绿体	10^8	120 ~ 200	0.04 ~ 0.067	
高等植物线粒体	$10^8 \sim 10^9$	105 ~ 2 400	0.003 5 ~ 0.08	17 条染色体 DNA 总和 4 条染色体 DNA 总和 23 条染色体 DNA 总和 10 条染色体 DNA 总和 19 条染色体 DNA 总和
大肠杆菌	2.67×10^9	4 000	1.36	
酵母菌	9×10^9	135 00	4.6	
果蝇	1.1×10^{11}	165 000	56	
人体	1.93×10^{12}	2.9×10^6	990	
玉米	1.0×10^{13}	15×10^6	5 000	
南美肺鱼	6.8×10^{13}	102×10^6	34 700	

* 1. 对于双链 DNA 分子，其相对分子质量、kb 数和长度之间，可按下式粗略计算：相对分子质量 10^6 相当于 1.5 kb，长约 0.5 μ m。

2. 人的染色体共有 23 对，单倍体 23 条，其中最小的相对分子质量为 2.3×10^9 ，48 000 kb，长 1.6 cm；最长的相对分子质量为 1.66×10^{11} ，249 000 kb，长约 8.3 cm。

（引自《三链核酸的结构与生物化学》白春礼，1996）

2.2 核酸的物化性质

DNA 具有严格的双螺旋结构，天然 DNA 分子长度可以达到几个厘米，而分子的直径只有 2 nm，这种细丝状的双螺旋结构赋予 DNA 一系列十分显著的物化特性，如极大的粘度、机械张力和剪切等物理因素很容易导致 DNA 降解，在稀盐溶液中加热变性时可发生螺旋到自由线团的转变。相反，RNA 分子较小，而且只有部分双螺旋结构区，所以 RNA 分子的粘度比 DNA 分子要小得多，且无定形，不像 DNA 分子那样呈纤维状。

DNA 的双螺旋结构，使 DNA 分子具有一定的刚性，在水溶液中仍然保持双螺旋结

构。但由于分子极为细长，其直径与长度之比可达到 $1:10^7$ ，所以天然 DNA 分子具有一定的柔性。根据物理化学研究，溶液中的 DNA 分子其行为介于刚性棒与柔性线团之间，是既具有一定刚性而又可以卷曲的线形分子。

2.2.1 核酸的紫外吸收

由于核酸分子中含有共轭双键结构的嘌呤和嘧啶碱基，所以核酸也具有强烈的紫外吸收性质，最大吸收值在 260 nm 处。蛋白质也具有紫外吸收性质，但其最大吸收值在 280 nm 处。利用这一性质，既可以估计核酸样品的纯度，也可进行核酸的定量测定，同时也能鉴别核酸样品中是否含有蛋白质杂质。

有时核酸溶液的紫外吸收以摩尔磷的吸光度来表示，摩尔磷即相当于摩尔核苷酸。据此先测定核酸溶液中的磷含量及紫外吸收值，然后求出摩尔磷吸光系数 $\epsilon(p)$ 。

$$\epsilon(p) = A/CL = 30.98 A/WL$$

式中：A——吸光值；

C——每升溶液中磷的摩尔数；

W——每升溶液中磷的重量；

L——比色杯内径的厚度。

这样，只要测定核酸溶液的磷含量和紫外吸收值，就可以求得它的 $\epsilon(p)$ 值。一般，DNA 的 $\epsilon(p)$ 值为 6 600，RNA 的 $\epsilon(p)$ 值为 7 700 ~ 7 800。

核酸分子的 $\epsilon(p)$ 值均较其所含核苷酸单体的 $\epsilon(p)$ 值的总和要低 40% ~ 45%。核酸在变性时， $\epsilon(p)$ 值会显著升高，此现象称为增色效应。在一定条件下，变性核酸又可复性，此时， $\epsilon(p)$ 值又回复至原来水平，这种现象叫减色效应。减色效应是由于在 DNA 双螺旋结构中堆集的碱基之间的电子相互作用，而降低了对紫外光的吸收。所以， $\epsilon(p)$ 值可作为核酸复性的指标。

2.2.2 核酸的粘度

高分子溶液比普通溶液的粘度要大得多，不规则线团分子比球形分子的粘度大，而线形分子的粘度更大。DNA 的长度与其直径之比可高达 10^7 ，这种细丝状的结构即使是极稀的溶液，也有极大的粘度。而 RNA 的粘度则要小得多。当核酸溶液因受热或在其他因素作用下发生螺旋向线团的转变时，粘度会明显降低。在特定 T_m 值时，双链 DNA 分子的粘度会急剧降低，所以可用粘度来监测 DNA 变性的程度。

2.2.3 核酸的沉降特性

溶液中的核酸在普通离心力场中不易沉降，必须在超速离心力场中才会沉降。超离心按原理可分为两大类：沉降速度超离心和沉降平衡超离心。这两种超离心可用于分析实验，测定核酸的相对分子质量、沉降系数 (S) 或浮密度 (ρ)，也可用于制备实验以纯化核酸样品。

核酸的沉降速度与核酸的相对分子质量、形状、离心力场的强度及介质的粘度有关。离心力场越大，介质粘度越小则沉降速度越快；核酸相对分子质量越小，形状越伸

展则沉降速度越慢,沉降系数相应也越小。而核酸的浮力密度与核酸的碱基组成、高级结构及溶液介质有关。含 GC 碱基对越多、结构越紧密的 DNA 浮密度越高,不同介质与核酸结合情况不同,会使其浮密度变化。

沉降速度超离心法主要用于:①分离不同种类的 RNA。一般地, S 值相差 4 以上的不同大小的 RNA 分子用蔗糖梯度离心可以得到很好的分离;②富集和纯化 mRNA;③分离 DNA 片段。大分子 DNA 经限制性内切酶切割后得到大小不同的 DNA 片段,也可用蔗糖梯度速度离心法分离。此外,该方法也可用于检测 DNA 复制过程中产生的冈崎片段。

CsCl 沉降平衡超离心法主要用于:①纯化 DNA,如从 DNA 制品中除去微量 RNA 和蛋白质、分离浮密度不同的 DNA 分子等。 Cs_2SO_4 沉降平衡离心法可用于分离浮密度不同的 RNA,如双链 RNA 和 DNA/RNA 杂交分子等。用碱性 CsCl 平衡超离心法可分离双链 RNA 的两条互补链。此外,通过结合荧光染料后,根据 DNA 分子的浮密度变化情况,可以分离共价闭环环状 DNA、开环 DNA 和线性 DNA 分子。②测定 DNA 中 GC 的含量,由于 G-C 碱基对比 A-T 碱基对的密度大(前者含有 3 个氢键),所以含 G-C 对多的 DNA,浮力密度大,含 G-C 对少的 DNA,浮力密度小。研究表明, G-C 的百分含量与 DNA 浮力密度之间呈正比关系。Rolle - Meselson 根据实验结果,得出如下公式:

$$\rho = 0.100 (\text{G} - \text{C}\%) + 1.658 (\text{g}/\text{cm}^3)$$

因此,用这个方法能迅速而准确地测定 DNA 的碱基成分,此法的分辨率可高达 1% ~ 2%。③鉴定溶液中核酸的构象,由于 RNA 分子只有局部的双螺旋结构,它的浮力密度要比双链 DNA 高,而双链 DNA 的浮力密度又比蛋白质的浮力密度高。此外,双链 DNA 受热变性后,解旋成为单链,密度增高,而单链 DNA 受热后,密度不变。因此可用浮力密度平衡超离心法来鉴定溶液中核酸的构象。

为了提高浮力密度平衡超离心法的分离效果,可设法增加或降低核酸分子的密度,这主要有两种方法:①DNA 与金属离子结合,使其密度增加,如 Ag^+ 、 Hg^{2+} 等;②DNA 与染料或抗生素结合,使其密度降低,如溴乙锭等。

2.2.4 核酸的酸碱性质

在多核苷酸链中,两个单核苷酸残基之间是通过带负电荷的磷酸二酯键连接起来的。当溶液的 pH 值高于 4 时,多核苷酸分子呈多阴离子状态。因此,可以把核酸看成是多元酸,具有较强的酸性。多阴离子状态的核酸可与金属离子结合成盐。一价阳离子如 Na^+ 、 K^+ ,两价阳离子如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 等都可与核酸形成盐。核酸盐的溶解度比游离酸的要大得多。多阴离子状态的核酸也能与碱性蛋白(如组蛋白)结合。病毒与细菌中的 DNA 常与精胺、亚精胺等多价阳离子胺类相结合,使 DNA 分子具有更大的稳定性与柔韧性。

由于碱基对之间氢键的性质与其解离状态有关,而碱基的解离状态又与 pH 值有关,所以溶液的 pH 值直接影响核酸双螺旋结构中碱基对之间氢键的稳定性。对 DNA 来说,碱基对在 pH 值 4.0 ~ 11.0 之间最稳定,超出此范围 DNA 分子就会变性。

此外,核酸分子中的 N-C 糖苷键对酸、碱相当敏感,通常可在强酸或强碱性条件

下, 发生不同程度和类型的降解反应。

2.3 DNA 的变性与复性

2.3.1 DNA 二级结构的稳定因素

在 DNA 分子中, 碱基与碱基间的相互作用有两类, 即碱基平面 (水平方向) 上的氢键和垂直于碱基平面方向的碱基堆积相互作用 (主要由 London 色散力和疏水效应所稳定的)。在非极性溶剂中, 碱基堆积是可以忽略的, 而在水中, 由于水分子结合位点的竞争, 碱基间的氢键将受到明显的抑制。

氢键在稳定核酸的二级结构中起着重要的作用。当一个氢原子与两个带高负电荷的原子 X 和 Y 接触时, 将形成 $X-H\cdots Y$ 型氢键, 其强度明显依赖于 X、H 和 Y 上的电荷。氢键的受体可以是带部分负电荷的原子, 也可以是带单位负电荷的原子。例如, 在水中, 一个水分子上的氢原子被相邻水分子上的氧原子外层电子吸引而形成氢键。生物分子中 N-H 键也具有偶极性, 氮可以作为氢键供体, 非水分子的 O-H 键中的氧也能作为供体, 而与相邻分子形成氢键时, 氮和氧也可以是受体。氢原子核和相邻成氢键基团的氧原子间距离约 0.27 nm, 这是 H-O 共价键键长的 2 倍, 因此氢键比共价键弱得多 (表 2.3)。水中氢键的键能约是 20.93 kJ/mol, 比共价键键能低得多。其他供体和受体原子间形成的氢键键能与水的相似。当供体、氢原子和受体 3 个原子位于一直线时, 形成的氢键强度最大。

碱基间的氢键相互作用是 $N-H\cdots N$ 和 $N-H\cdots O$ 类型。脱氧核糖-磷酸主链形成直径为 2nm 的螺旋, 螺旋各水平位置两条链上糖苷键之间可以容纳碱基对的距离均为 1.1 nm。由一个嘌呤和一个嘧啶组成的碱基对大小恰与这个空间相符。DNA 中 A-T 与 G-C 间特定的 Watson-Crick 碱基对相互可形成氢键的原子间距离与一般氢键的键长一致, 其中供体、氢原子和受体原子处于一条直线, 利于形成强的氢键。同时, 这种碱基配对也确保两条主链糖苷键之间的距离一致性。

表 2.3 共价键和氢键间的能量比较

键的类型		键长/nm	键能/ (kJ/mol)	键长增加 0.1 nm 需要的 能量/ (kJ/mol)
共价键	C—C	0.154 ± 0.002	347.8	13.60
	C—H	0.109 ± 0.002	413.5	15.06
氢键	$O-H\cdots O$	0.275 ± 0.002	12.6 ~ 25.1	0.42

(引自《三链核酸的结构与生物化学》白春礼, 1996)

氢键在本质上是由静电作用力引起的一种弱的次级键, 但在 DNA 分子中, 许多弱的氢键连续在一起的集合能量是十分大的, 它赋予 DNA 分子结构稳定性。与疏水作用相比, 氢键又有高度的方向性。基于上述特性, 氢键有助于 DNA 复制及信息传递过程