

全国高等院校“十三五”研究生规划教材

医学分子生物学 理论与研究技术

第3版

主 编 韩 梅



科学出版社

全国高等院校“十三五”研究生规划教材

医学分子生物学 理论与研究技术

第3版

主 编 韩 梅

副 主 编 董丽华

编者名单 (按姓氏拼音排序)

董丽华 高 媛 韩 梅 李芳芳

李菁菁 吕 品 苗穗兵 聂 磊

尚丹丹 史海水 宋 利 孙绍光

许丽辉 张 凡



科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书介绍分子生物学基础理论、医学分子生物学常用实验技术及其在科学研究中的应用,以及分子生物学发展较快的几个领域。主要内容有核酸的分子生物学概论、DNA 克隆技术、聚合酶链反应的原理及应用、基因表达调控与表观遗传学、蛋白质的结构分子生物学及翻译后修饰、细胞通讯与细胞信号转导、调控性非编码 RNA、基因修饰与基因治疗、细胞骨架与细胞运动、细胞外基质、组学与生物信息学。

本书可供医学研究人员、教师和学生阅读参考,并且能成为医学研究生和该领域的专业技术人员从事基础研究的重要参考书。

图书在版编目 (CIP) 数据

医学分子生物学理论与研究技术 / 韩梅主编. —3 版. —北京: 科学出版社, 2019.6

全国高等院校“十三五”研究生规划教材

ISBN 978-7-03-059590-4

I. ①医… II. ①韩… III. ①医学-分子生物学-研究 IV. ①R393

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 270108 号

责任编辑: 王 超 李国红 / 责任校对: 郭瑞芝

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

石家庄继文印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2019 年 6 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2019 年 6 月第一次印刷 印张: 20

字数: 499 000

定价: 75.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

分子生物学作为医学和生命科学的基础和前沿学科，在基础理论和应用技术研究方面发展迅猛，近 10 年又有许多重大进展和突破。分子生物学的新理论、新观点和新技术不断涌现，与不同学科的交叉更加密切。为了满足医学基础研究的需求，提升医学人才培养的能力和水平，编者撰写了《医学分子生物学理论与研究技术》（第 3 版）。

为了体现分子生物学学科知识的进展，符合医学生培养目标及提高教学与科研效果，第 3 版更新或新增了若干内容。首先，依据分子生物学基本理论知识体系的构成特点，对第 2 版的基因表达调控、蛋白质的分析、细胞信号传递、基因诊断与基因治疗等章节进行了重新编写，增加了表观遗传学、蛋白质翻译后修饰、细胞通信等新内容。其次，根据学科发展前沿和学科交叉新增了部分章节，如调控性非编码 RNA、细胞骨架与细胞运动、细胞外基质、组学与生物信息学等。

本书由主编拟定大纲、审阅和定稿，参编者均是长期从事教学和科研工作的教授和副教授，他们将各自在专项分子生物学技术方面所积累的丰富实践经验和对学科发展前沿的综述融汇归纳于书中。全书共分 11 章，包括核酸的分子生物学、DNA 克隆技术、聚合酶链反应的原理与应用、真核基因表达调控与表观遗传学、蛋白质的分子生物学与翻译后修饰、细胞通信与细胞信号转导、调控性非编码 RNA、基因修饰与基因治疗、细胞骨架与细胞运动、细胞外基质、组学与生物信息学。

我们期盼本书能为医学研究人员、教师和学生提供有价值的新知识，并且能成为医学研究生和该领域的专业技术人员从事基础研究的重要参考书。由于编者学术水平有限，加之该学科的快速的发展，书中肯定有诸多不足之处，敬请读者批评指正。

编 者

2018 年 5 月

目 录

第一章 核酸的分子生物学	1
第一节 脱氧核糖核酸	1
第二节 核糖核酸	6
第三节 DNA 的生物合成	8
第四节 RNA 的生物合成	15
第二章 DNA 克隆技术	21
第一节 基因克隆技术概论	21
第二节 基因克隆的基本物质体系	22
第三节 基因克隆的基本流程	29
第四节 基因克隆常用的实验方法与操作	39
第三章 聚合酶链反应的原理及应用	51
第一节 PCR 技术的原理及基本操作	51
第二节 PCR 体系中的各种组分	53
第三节 PCR 模板的制备	57
第四节 PCR 条件的优化	65
第五节 PCR 扩增产物的分析	69
第六节 PCR 衍生技术	71
第七节 PCR 技术的应用	79
第四章 真核基因表达调控与表观遗传学	81
第一节 真核基因表达调控	81
第二节 表观遗传学	91
第三节 基因表达调控及表观遗传学研究技术	102
第五章 蛋白质的分子生物学与翻译后修饰	115
第一节 蛋白质的基础知识	115
第二节 蛋白质的翻译	117
第三节 蛋白质翻译后修饰	121
第四节 蛋白质分析技术与方法	127
第六章 细胞通信与细胞信号转导	135
第一节 细胞通信的组成部分	135
第二节 细胞信号转导概述	137
第三节 主要信号转导通路	145
第七章 调控性非编码 RNA	164
第一节 miRNA	164
第二节 lncRNA	169
第三节 circRNA	173
第四节 ncRNA 的编码功能	179

第五节 ncRNA 研究技术	181
第八章 基因修饰与基因治疗	187
第一节 基因诊断	187
第二节 基因诊断的原理及方法	190
第三节 基因诊断的方法	194
第四节 基因诊断技术在临床的应用	204
第五节 基因治疗	206
第六节 基因修饰和基因编辑	213
第九章 细胞骨架与细胞运动	224
第一节 微管	224
第二节 微丝	237
第三节 中间丝	249
第四节 细胞运动	253
第五节 细胞骨架相关实验方法	257
第十章 细胞外基质	259
第一节 细胞外基质概论	259
第二节 细胞外基质的分类和结构特点	259
第三节 基膜的结构和功能	271
第四节 细胞外基质的生物学功能	273
第五节 细胞外基质的降解和更新	277
第六节 细胞外基质与疾病	278
第七节 细胞外基质研究常用技术	282
第十一章 组学与生物信息学	287
第一节 组学	287
第二节 生物信息学	303
参考文献	313

第一章 核酸的分子生物学

早在 1868 年，瑞士青年学者米歇尔 (F. Miescher) 就从伤口的脓血球中发现了一种酸性物质，并将其命名为“核素”。随后的研究证明，细胞中含有两种类型的核酸，即脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA)。1944 年艾弗里 (O.T. Avery) 等通过肺炎双球菌转化实验证明 DNA 是遗传物质基础，揭示了基因的本质。

20 世纪 50 年代蛋白质和核酸的结构研究取得重大突破，发现了蛋白质的 α -螺旋二级结构形式；完成了胰岛素的氨基酸序列分析。更重要的是，沃森 (J.D. Watson) 和克里克 (F.H. Crick) 于 1953 年提出了 DNA 双螺旋结构模型，为揭示遗传信息规律奠定了基础，是生物化学发展进入分子生物学时期的重要标志。

第一节 脱氧核糖核酸

脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 主要存在于细胞核和线粒体中，原核生物 DNA 是相对较小的环状分子。对于真核生物来说，细胞核中的染色体 DNA 为线性分子，是遗传信息的主要载体，又被称为基因组 DNA；而线粒体 DNA 则呈环状，主要包含线粒体功能相关的基因。DNA 在核酸酶作用下可水解成单核苷酸，单核苷酸可以进一步水解成碱基、磷酸和脱氧戊糖。组成 DNA 的碱基有 4 种，腺嘌呤 (adenine, Ade, A)、鸟嘌呤 (guanine, Gua, G)、胞嘧啶 (cytosine, Cyt, C) 和胸腺嘧啶 (thymine, Thy, T) (图 1-1)。单核苷酸的结构是在脱氧核糖的 C-5' 的羟基与一个磷酸缩合，构成磷酸酯键，在脱氧核糖的 C-1' 的羟基与嘌呤 N-9' 或嘧啶 N-1' 的氢缩合，构成 N—C 形式的糖苷键 (图 1-2)。



图 1-1 核酸中主要碱基的结构

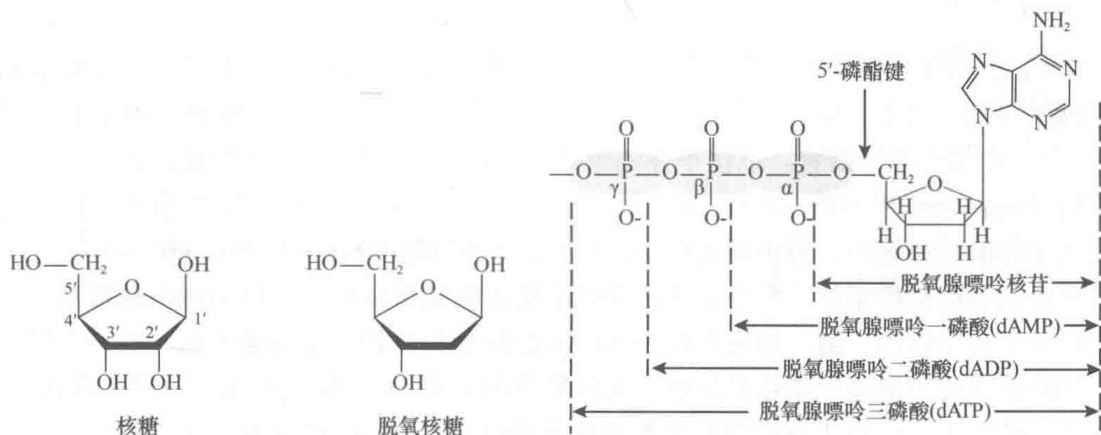


图 1-2 戊糖结构及核苷和核苷酸的结构通式

一、DNA 的分子结构

DNA 分子是两条反向平行、碱基互补的双链，其一级结构是核苷酸的排列顺序，简化的书写方式是碱基字母的排列。例如，AGGCAATTGA，其含义有：①一定是遵循 5'→3' 的方向；②只写出编码链。

DNA 分子的二级结构是双螺旋结构，其结构要点如下（图 1-3）：①DNA 分子的两条反向平行的多核苷酸链围绕同一中心轴形成右手双螺旋；②双螺旋的外侧是磷酸和脱氧核糖构成的骨架；③碱基存在于双螺旋的内部，两条多核苷酸链正是借碱基之间的氢键作用力相连，其中 A—T 之间存在 2 个氢键，C—G 之间存在 3 个氢键，A—T 和 C—G 称为互补碱基，DNA 的两条链称为互补链。DNA 的互补双链主要依靠两种力维系，除了碱基之间的氢键作用力以外，还有碱基之间平面的堆积力。DNA 双螺旋的稳定正是借助了这两种力。

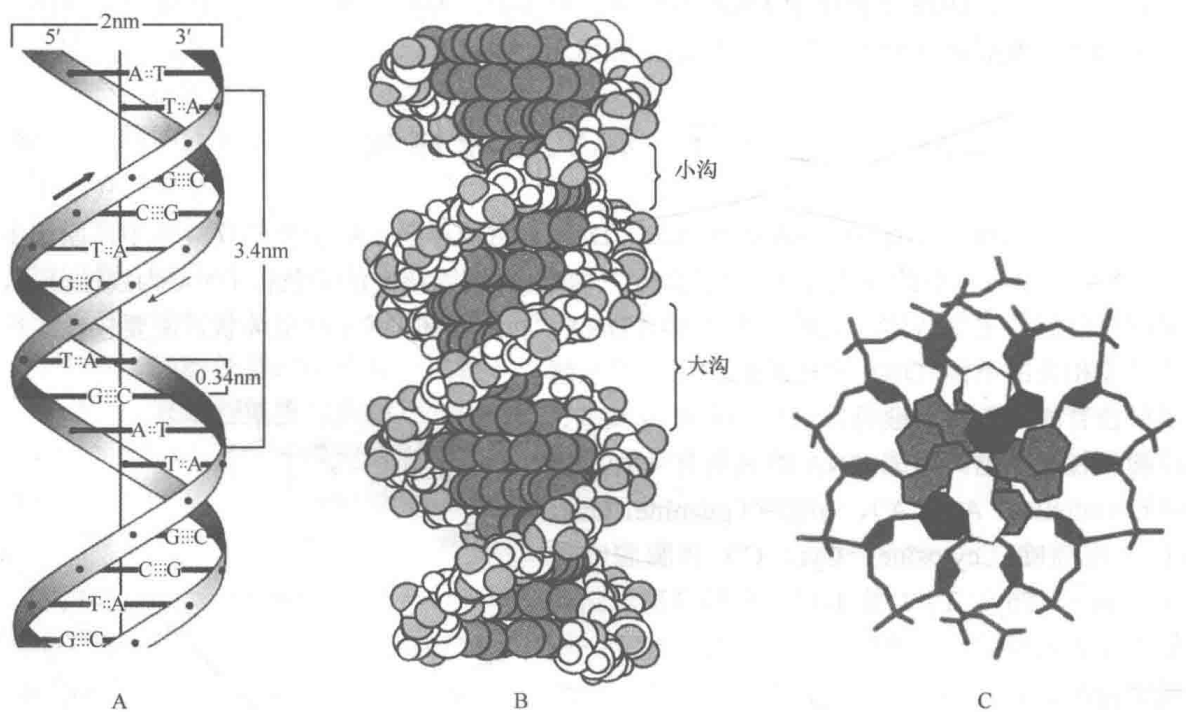


图 1-3 DNA 分子的双螺旋结构模型

A. B 型 DNA 主链走向；B. B 型 DNA 的空间实体模型；C. DNA 双螺旋中一单链的俯视图，碱基在内，10 个碱基为一个螺旋，戊糖与磷酸构成的主链在外侧

DNA 分子的三级结构是超螺旋结构，即在 DNA 双螺旋的二级结构上，再次螺旋就构成了三级结构。对于真核生物来说，DNA 的三级以上空间结构比较复杂（图 1-4）。首先 DNA 分子均与组蛋白结合，以核小体的形式串联存在。核小体是由组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 各两分子组成的八聚体，DNA（长约 147 bp）环绕八聚体，围成两圈左手超螺旋，形成核小体的核心颗粒，再由组蛋白 H1 与核小体两端的 DNA（长 20~60 bp）相连，这是染色质的基础结构单位，核小体中的 DNA 处在负超螺旋状态。核小体串珠链进一步卷曲，每 6 个核小体围一圈，形成直径为 30 nm 的螺旋筒结构，组成染色质纤维，在形成染色单体时，螺旋筒再进一步卷曲折叠。人体每个细胞中 46 个染色单体总长近 2 m 的 DNA 链，经压缩可有效储存于直径仅有几微米的细胞核中。DNA 和组蛋白构成的核小体是动

态变化的, 可以被重构的, 在核小体的变化中, 既有自发的变化, 也有一种大的蛋白质复合体即核小体重构复合体的参与, 因此, 在细胞中, 总有 DNA 的一些片段没有形成核小体结构, 这些区域 DNA 和一些基因表达调节蛋白, 在基因表达、复制和重组中起重要作用。

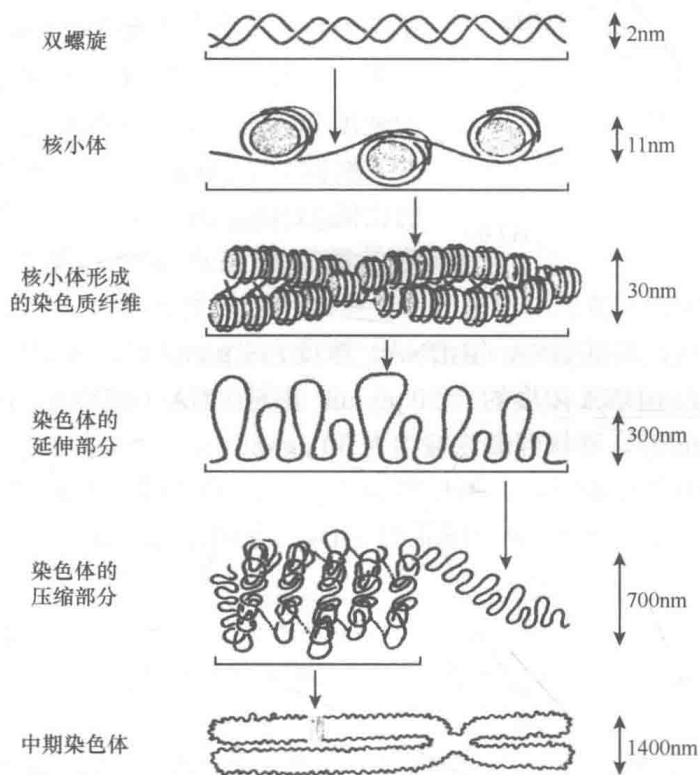


图 1-4 核小体与染色体的结构示意图

二、DNA 的理化性质和应用

(一) DNA 的一般性质

线性 DNA 分子长度可达几厘米, 直径很小, 仅有 2 nm, 其直径和长度之比可达 $1:10^7$, 所以线性 DNA 分子具备一定的柔性, 在溶液中可以卷曲存在。

1. 溶解度与黏度 DNA 是极性高分子聚合物, 微溶于水, 不溶于乙醇、乙醚、氯仿等有机溶剂, 其钠盐比分子形式易溶于水, 因此, 加碱促进溶解, 而加乙醇等有机溶剂可以沉淀 DNA。在加入乙醇后, 溶液中的 DNA 逐渐变成雪花状或细丝状, 离心后可以获得 DNA 沉淀。含有 DNA 的溶液, 存在一定的黏度, 浓度越大, 黏度越高, 分子越长, 黏度越高。

2. 酸碱性质 DNA 是两性电解质, 既有酸性的磷酸基团, 又有碱基上的碱性基团, 磷酸基团的解离具有较低的 pK_a 值 ($pK_a=1.5$), 所以, 当溶液的 pH 高于 4 时, 全部解离, 呈多阴离子状态。因此, 可以把 DNA 看成多元酸, 具有较强的酸性。多阴离子状态的 DNA 可以与溶液中的金属离子络合, Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 都可以和核酸成盐。在 pH8.0 左右的条件下电泳时, DNA 带负电, 向正极泳动。在溶液 pH4.0~11.0 时, DNA 分子比较稳

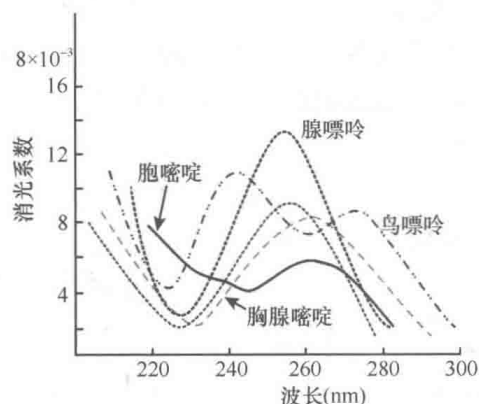


图 1-5 五种碱基的紫外吸收光谱 (pH7.0)

定, 超过这个范围, DNA 就要发生变性。

(二) 紫外吸收和应用

DNA 分子中的嘌呤碱和嘧啶碱都具有强烈的紫外吸收特性 (图 1-5), 所以 DNA 也具有强烈的紫外吸收, 其最大吸收峰在 260 nm, 根据 DNA 的紫外吸收特性, 可以对其定量、鉴别 DNA 样品的纯度和计算溶液中 DNA 的含量。

根据 DNA 样品在 260 nm 和 280 nm 的吸收值的比值 (OD_{260}/OD_{280}) 估算纯度, 比值为 1.8 时纯度较高。如果样品中污染有蛋白质或酚, 其

OD_{260}/OD_{280} 将明显低于 1.8。

对标准样品来说, 双链 DNA (dsDNA) 浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 时, 其 OD_{260} 是 0.02。

当 $OD_{260}=1$ 时, dsDNA 浓度约为 $50 \mu\text{g/ml}$, 单链 DNA (ssDNA) 浓度约为 $37 \mu\text{g/ml}$, RNA 浓度约为 $40 \mu\text{g/ml}$, 寡核苷酸浓度约为 $30 \mu\text{g/ml}$ 。

当 DNA 样品中含有蛋白质、酚或其他小分子污染物时, 会影响 DNA 吸光度的准确测定。一般情况下同时检测同一样品的 OD_{260} 、 OD_{280} 和 OD_{230} , 计算其比值来衡量样品的纯度。

经验值:

纯 DNA: $OD_{260}/OD_{280} \approx 1.8$ (比值 >1.9 , 表明有 RNA 污染; 比值 <1.6 , 表明有蛋白质、酚等污染)。

纯 RNA: $OD_{260}/OD_{280} = 2.0$ (比值 <1.7 , 表明有蛋白质或酚污染; 比值 >2.0 , 表明可能有异硫氰酸残存)。

若样品不纯, 则比值发生变化, 此时无法用分光光度法对核酸进行定量。

OD_{260} 值的变化也可以用于 DNA 的变性和复性的判断, 当 DNA 变性, 其 OD_{260} 值显著升高, 此现象称为增色效应, 变性的 DNA 可以复性, 这个时候其 OD_{260} 值又回到原来水平, 这一现象称为减色效应。减色效应是由于 DNA 双螺旋中堆积的碱基之间的电子相互作用, 减低了对紫外光的吸收。

(三) 核酸的变性、复性和应用

1. 变性 凡是能破坏碱基之间的氢键和碱基堆积力的因素, 均可以导致 DNA 互补双链的解开, 称为 DNA 的变性。单纯加热就可以导致 DNA 变性, 在溶液中添加尿素、甲酰胺等有机溶剂也可以导致 DNA 变性, 过高或过低的溶液的 pH 也可以导致 DNA 变性。 T_m 是衡量 DNA 热变性的一个指标, DNA 热变性的过程不是一种渐变, 而是一种跃变的过程。即变性作用不是随温度的升高徐徐发生, 而是在一个很狭窄的临界温度范围内突然引起并很快完成。通常把 OD_{260} 值达到最大值一半的温度, 称为 T_m , 即熔解温度 (melting temperature, T_m)。DNA 的 T_m 值一般在 $70 \sim 85^\circ\text{C}$ 。 T_m 值与 DNA 分子中的碱基种类有关, 当 GC 含量高时, T_m 较高 (图 1-6)。 T_m 值还受到介质中离子强度的影响, 在离子强度较低的介质中, DNA 的 T_m 较低。所以, DNA 样品不应保存在极稀的电解质溶液中, 一般在 1 mol/L 氯化钠溶液中保存比较稳定。

2. 复性 DNA 的变性是可逆的, 在适宜的条件下, 彼此分开的两条互补链可以重新恢复双螺旋结构。例如, 用加热的方法使 DNA 双链打开, 分子变性, 待溶液缓慢冷却后, 双螺旋结构可以重新形成, 这个过程称为复性或退火。若变性不彻底, 两条链没有完全分开, 则复性很快, 若变性完全, 两条链彻底分开, 则复性要经过两个阶段, 第一阶段是成核反应, 进行较慢, 第二阶段是拉链反应, 进行迅速 (图 1-7)。将热变性 DNA 骤然冷却至低温时, DNA 不会复性, 复性是需要缓慢降温的。最适宜的复性温度比 T_m 约低 25°C , 这个温度称为退火温度。若给予足够的时间, DNA 的碱基配对就有机会达到天然 DNA 的状态而完全复性。此外, 溶液的离子强度也影响复性, 两条带有同种电荷的 DNA 链会互相排斥, 因此, 在复性溶液中必须有一定浓度的盐以中和电荷, 一般而言, 盐浓度高时复性速度快。同一种 DNA, 其浓度越高, 互补碱基相碰撞的机会越多, 复性也就越快。变性 DNA 的片段越长复性越慢。

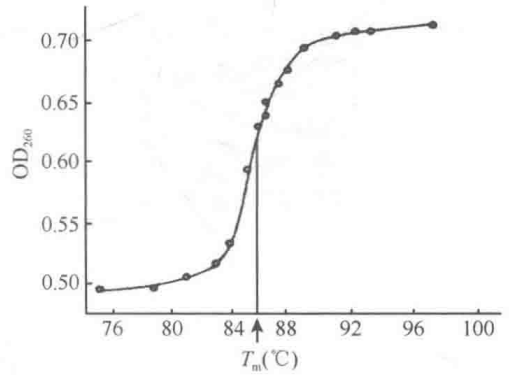
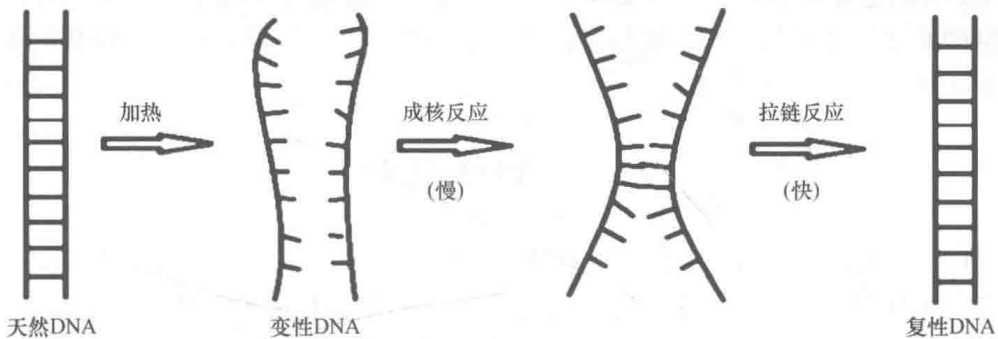
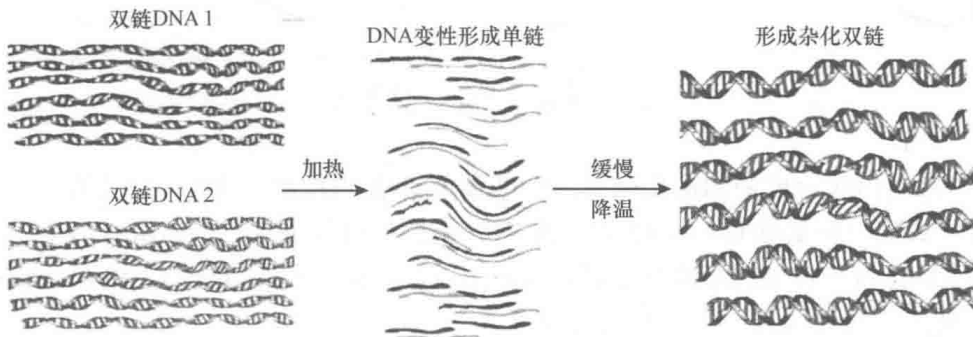
图 1-6 DNA 的熔解曲线和 T_m 值

图 1-7 双链 DNA 的变性与复性

3. 核酸分子杂交 将来源不同的 DNA 放在同一溶液中做变性处理, 再使其复性, 此时, 如果这些异源 DNA 之间在某些区域有相同的序列, 就会形成杂交 DNA 分子, 此即核酸分子杂交 (图 1-8)。DNA 与互补的 RNA 之间也会发生杂交。核酸杂交可以在液相和固相载体上进行。运用核酸分子杂交这一现象而发展起来的技术, 即分子杂交技术, 可以探测异源 DNA 的相似程度, 检验 DNA 的缺失或插入。该技术目前已用于多种遗传病的基因诊断、恶性肿瘤的基因分析、病原体的检测、基因的表达谱分析等。



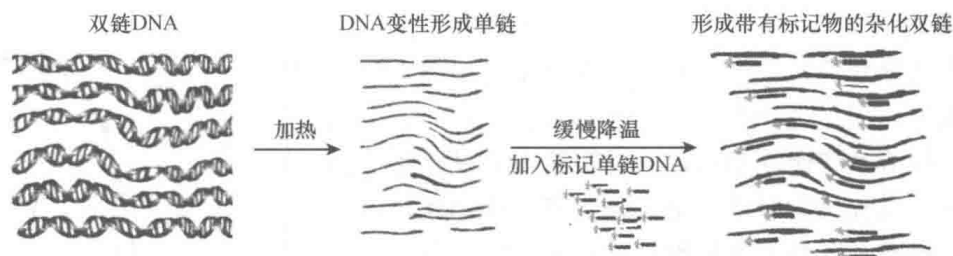


图 1-8 核酸分子杂交基本原理示意图

第二节 核糖核酸

核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 是 DNA 的转录产物, 通常以单链线性形式存在。与 DNA 相比, RNA 的种类、丰度、分子大小、结构及稳定性表现出了多样性, 这与它们的功能多样化密切相关。根据 RNA 的功能不同将其分为核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA)、转运 RNA (transfer RNA, tRNA)、信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 及非编码 RNA。RNA 可以水解成单核苷酸, 单核苷酸可以进一步水解成碱基、磷酸和戊糖。组成 RNA 的碱基有 4 种, 腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶 (图 1-1)。单核苷酸的结构是在核糖的 C-5' 的羟基与一个磷酸缩合, 构成磷酸酯键, 在核糖的 C-1' 的羟基与嘌呤 N-9' 或嘧啶 N-1' 的氢缩合, 构成 N—C 形式的糖苷键 (图 1-2)。

一、核糖体 RNA

rRNA 是细胞内含量最多的一类 RNA, 占整个 RNA 的 80% 以上, 也是 3 类 RNA 中分子量 (相对分子质量) 最大的一类 RNA, 在细胞内它不单独存在, 而是与多种蛋白质结合而形成核糖体, 其功能是作为蛋白质合成的场所, 实现蛋白质的合成。S 为大分子物质在超速离心沉降中的一个物理学单位, 可间接反映分子量的大小。原核生物 rRNA 分三类: 5S、16S 和 23S。真核生物的 rRNA 分四类: 5S、5.8S、18S 和 28S。原核生物和真核生物的核糖体均由大、小两种亚基组成。在人类基因组中, 四种 rRNA 基因中的三种 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因是串联在一起的, 每个基因被间隔区隔开, 5S rRNA 基因则是编码在另一条染色体上。核糖体 RNA 在各种生物中都有其特性, 因此可以从不同生物的 rRNA 的对比中得出关于生物进化历程的结论。在提取细胞总 RNA 时, 通过鉴定所提 RNA 中的 rRNA 是否完整来推断含量很少的 mRNA 的完整性。

二、转 运 RNA

tRNA 是蛋白质合成中的活化氨基酸的载体。tRNA 占细胞内 RNA 总量的 15%, 有 100 多种, 各可携带一种氨基酸。tRNA 是细胞内分子量相对较小的一类核酸, 由 74~95 个核苷酸构成, 尽管每一种 tRNA 都有特定的碱基组成和空间结构, 但它们无论在一级结构上, 还是在二级、三级结构上均有一些共同特点。

tRNA 中含有 10%~20% 的稀有碱基 (rare bases), 如甲基化的嘌呤 mG、mA, 双氢尿

嘧啶 (DHU)、假尿嘧啶核苷 (Ψ , pseudouridine) 等。在假尿嘧啶核苷中, 不是通常嘧啶环中 1' 位氮原子, 而是嘧啶环中的 5' 位碳原子与戊糖的 1' 位碳原子之间形成糖苷键。tRNA 分子内的核苷酸通过碱基互补配对形成多处局部双螺旋结构, 未成双螺旋的区带构成所谓的环和襻。所有 tRNA 均可呈现三叶草样 (clover leaf pattern) 二级结构 (图 1-9)。在此结构中, 从 5' 端起的第一个环是 DHU 环, 以含二氢尿嘧啶为特征; 第二个环为反密码子环, 其环中部的三个碱基可以与 mRNA 中的三联体密码子形成碱基互补配对, 构成反密码子 (anticodon), 在蛋白质合成中起解读密码子, 把正确的氨基酸引入合成位点的作用; 第三个环为 T Ψ C 环, 以含胸腺核苷和假尿嘧啶核苷为特征; 在反密码子环与 T Ψ C 环之间, 往往存在一个襻, 由数个乃至 20 余个核苷酸组成, 所有 tRNA 3' 端均有相同的 CCA—OH 结构, tRNA 所转运的氨基酸就连接在此末端上。tRNA 的共同三级结构均呈倒 “L” 形, 其中 3' 端含 CCA—OH 的氨基酸臂位于一端, 反密码子环位于另一端, DHU 环和 T Ψ C 环虽在二级结构上各处一方, 但在三级结构上却相互邻近 (图 1-10)。

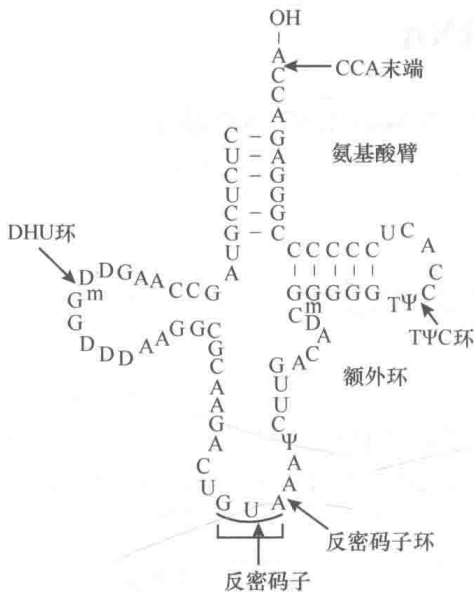


图 1-9 tRNA 的二级结构

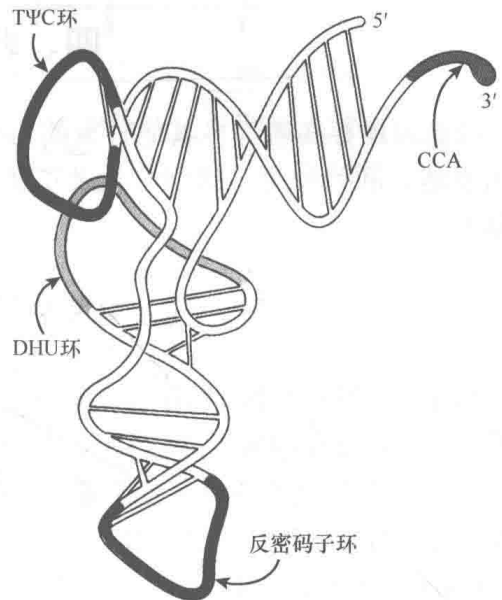


图 1-10 tRNA 的三级结构

三、信使 RNA

在细胞核内最初合成出来的是非均一核 RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA)。它是 mRNA 的初级转录产物。hnRNA 在细胞核内存在时间极短, 经过剪接成为成熟的 mRNA, 并依靠特殊的机制转移到细胞质, 成为蛋白质合成的直接模板。细胞内各种 mRNA 的丰度最小, 分子链的长短差异很大, 在细胞内更新的速度最快, 半衰期从几分钟到数小时不等。真核生物 mRNA 分子结构上有如下的特点 (图 1-11)。

1. 5'端特殊帽子结构 mRNA 分子的 5' 端都有一个甲基化的鸟嘌呤核苷酸-三磷酸核苷为起始结构, 即 m^7GpppN , 称为帽子结构。帽子结构可以与一类帽结合蛋白结合, 这种结合对维持 mRNA 的稳定性, 将 mRNA 从细胞核转移到细胞质, 以及与核糖体和翻译起始因子的结合密切相关。

2. 3'端多聚腺苷酸尾 大多数 mRNA 的 3'端有长 80~250 个多聚腺苷酸[poly (A)] 的结构, 在细胞内, poly (A) 与 poly (A) 结合蛋白结合, 维持 mRNA 的稳定性和调控翻译起始。

3. 开放阅读框架 每一个成熟的 mRNA 都有一个开放阅读框架, 即从 5'端第一个 AUG 开始, 到 3'端的终止密码子之间的区域, 在这个区域内, 每三个核苷酸代表一个密码子, 编码一个氨基酸。一条完整的 mRNA 包括 5'端非编码区、编码区、3'端非编码区。



图 1-11 真核生物 mRNA 结构示意图

四、非编码 RNA

细胞内还存在着许多其他种类的长链或小分子非编码 RNA, 这些非编码 RNA 在基因表达、胚胎发育、组织分化及疾病发生和发展过程中发挥重要作用 (详见本书第七章)。

五、RNA 的理化性质和应用

核酸中的糖苷键和磷酸酯键都能够被酸、碱和酶水解。在酸性条件下, DNA 比 RNA 易水解, 糖苷键比磷酸酯键易水解, 嘌呤碱的糖苷键比嘧啶碱的糖苷键易水解。DNA 在 pH 1.6 和 37℃ 的条件下即可完全除去嘌呤碱。相反, RNA 比 DNA 对碱更敏感, RNA 的磷酸酯键易被碱水解产生核苷酸。

RNA 可以在紫外波段有较强的吸收, 在中性条件下, RNA 的最大吸收峰在 260 nm, 利用这一性质, 可以计算纯化的 RNA 的纯度和含量。RNA 的纯度: OD_{260}/OD_{280} 应为 2。当 OD_{260} 为 1 时, 相当于溶液中含有 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA。

第三节 DNA 的生物合成

DNA 生物合成指在细胞内的 DNA 合成, 主要包括 DNA 指导的 DNA 合成 (即 DNA 复制)、DNA 修复合成 (DNA 损伤修复) 及 RNA 指导的 DNA 合成 (即反转录) 等。本节主要介绍 DNA 复制和反转录。

一、复制的共同特征

基因组 DNA 复制具备一些共同的特征。

(一) 具有固定的复制起始点

复制总是在 DNA 分子上的一个或多个位点开始的 (图 1-12, 图 1-13)。这种控制复制起始的位点称为复制起始点, 不同生物的复制起始点序列不尽相同。但是, 都含有短的重序列, 这些短的重序列可以被相关蛋白识别和结合。DNA 复制时, 亲代 DNA 分子在含有复制起始点(ori)的特定区域内打开双链, 以每条单链为模板, 复制生成两个子代双链 DNA 分子。

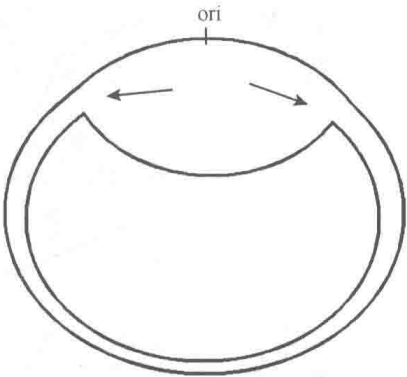


图 1-12 原核生物单复制起始点、复制泡和双向复制

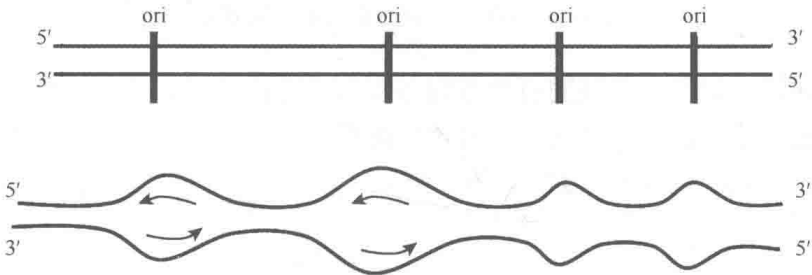


图 1-13 真核生物多复制起始点和双向复制

(二) 复制过程中形成复制泡和复制叉

亲代 DNA 在复制起始点解链后, 就形成一个复制泡, 即两个复制叉分别向相反的方向复制 (即双向复制)。除 DNA 聚合酶以外, 有多种蛋白质分子参与 DNA 复制, 完成诸如识别复制起始点、解开 DNA 双链结构、稳定暂时的 DNA 局部单链、合成 RNA 引物等功能。

(三) 复制的基本单位是复制子

当 DNA 复制从一个复制起始点开始后, 直至完成一个 DNA 分子的复制或一段 DNA 分子的复制才停止 DNA 合成。从一个复制起始点开始所复制的 DNA 分子或 DNA 片段是一个基本的复制单位, 称为复制子。

(四) 半保留复制的模式

DNA 复制时, 亲代 DNA 双链解开, 各自作为模板, 按碱基互补原则合成新的互补链, 新合成的 DNA 分子和亲代 DNA 是完全一样的。在子代 DNA 分子中一条单链来自亲代, 另一条单链是新合成的, 遗传信息以这种半保留复制的方式从亲代传递给子代 (图 1-14)。

(五) 半不连续复制的方式

DNA 双螺旋的两条链是反向平行的, 而 DNA 聚合酶催化新链合成都是沿 5'→3'方向延伸。因此, 在复制叉处, 一条新链沿 5'→3'方向, 随着复制叉方向连续合成, 这条新合

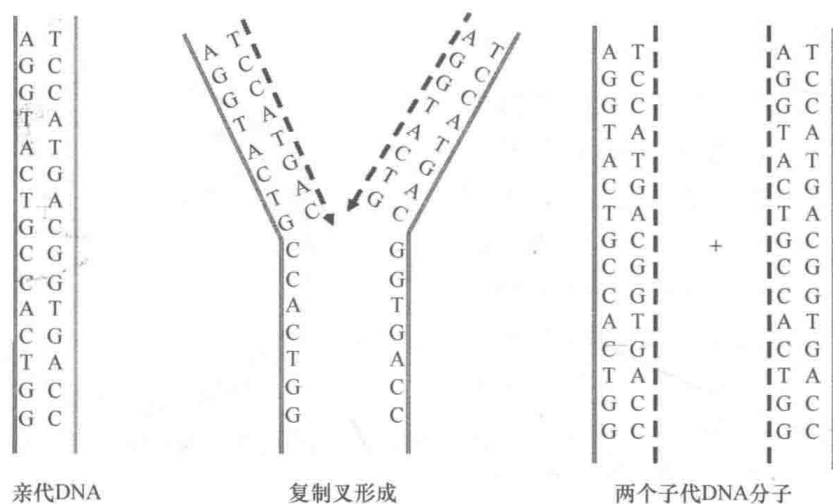


图 1-14 DNA 复制叉及其半保留复制

成的链称为前导链，而另一条链的合成方向与复制叉方向相反，不能连续合成，只能分成若干小片段分别合成，然后连接起来，故称后随链。后随链中的小片段称为冈崎片段。这种 DNA 复制方式称为半不连续复制（图 1-15）。

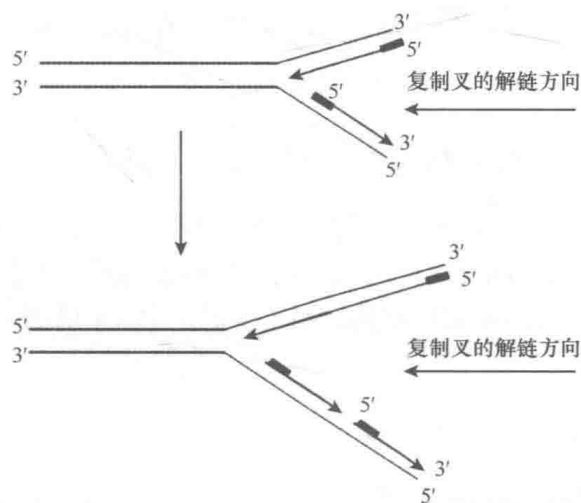


图 1-15 DNA 的半不连续复制

（六）复制起始点由多个短重复序列组成

复制起始点是指 DNA 复制所必需的一段特殊 DNA 序列。大肠杆菌的复制起始点含有 245 bp，由两种类型重复序列组成，一种是三个同向重复的 13 bp 序列，一种是反向重复出现四次的 9 bp 序列。酵母染色体含有多个复制起始点。人的基因组很可能含有 $10^4 \sim 10^5$ 个复制起始点。迄今，仍难以在分子水平阐明哺乳动物染色体的复制起始点特征。

（七）DNA 复制必须有引物

多数 DNA 复制使用 RNA 引物，这源于 DNA 聚合酶的独特催化特性，DNA 聚合酶并不能从头合成 DNA 链，必须由引物提供 3'-OH 端，通过加入核苷酸使之延伸，所以，DNA 分子合成时，首先要在模板对应位置合成一段 RNA 引物，然后 DNA 聚合酶利用 RNA 引物的 3'-OH 开始合成 DNA 链。

二、参与 DNA 复制的酶和相关蛋白质

(一) DNA 聚合酶

催化脱氧核糖核苷三磷酸聚合成 DNA 的酶称 DNA 聚合酶 (DNA polymerase, DNA pol), 因为该酶催化时必须依赖亲代 DNA 链做模板, 故称其为 DNA 依赖的 DNA pol。在大肠杆菌中至少存在五种 DNA pol, 其中主要的 DNA pol 功能如表 1-1 所示。

表 1-1 大肠杆菌 DNA 聚合酶的性质、功能

项别	DNA pol I	DNA pol II	DNA pol III
5'→3'聚合酶活性	+	+	+
3'→5'外切酶活性	+	+	+
5'→3'外切酶活性	+	-	-
功能	填补缺口 DNA 修复	填补缺口 DNA 修复	主要的复制酶

DNA pol III 是主要的复制酶, 它是多功能酶, 具有三种酶活性。5'→3'聚合酶活性促进 DNA 链合成, 3'→5'外切酶活性促进 DNA 链降解, 二者都作用于多核苷酸链的 3'端, 为 DNA 复制的精确性提供保障。DNA 正常复制时, 以 5'→3' 聚合酶活性为主。但是, 当 3'端添加的核苷酸发生错配时, 3'→5'外切酶活性发挥作用, 将错配碱基切除。之后, 5'→3' 聚合酶活性再次增强, DNA 链的合成得以继续。因此, DNA pol III 的 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性共同作用, 发挥即时校读功能, 消除错误配对, 校正正在合成的新链。

DNA pol I 是一个单体酶, 有三个酶促活性结构域, 从 N 端到 C 端依次是 5'→3'外切酶、3'→5'外切酶和 DNA 聚合酶活性结构域。其中, 5'→3'外切酶活性主要功能是去除 RNA 引物。在 DNA 损伤修复中, DNA pol I 对于填补缺口十分重要。枯草杆菌蛋白酶可以将 DNA pol I 水解为 N 端小片段和 C 端大片段, 其大片段 (分子量 76 000) 称作 Klenow 片段, 具有 3'→5'外切酶和 DNA 聚合酶活性。DNA pol I 具有一种特殊的功能, 在体外从 DNA 分子切口处开始复制, 即利用双链 DNA 分子单链上磷酸二酯键断裂产生的 3'-OH 作为引物开始合成。新的 DNA 片段将取代双链 DNA 中原有的同源链, 这条同源链被 DNA pol I 的 5'→3'外切酶活性逐一降解, 使新链合成过程中切口的位置沿着 DNA 链移动, 因此, 称该反应为切口平移 (nick translation)。切口平移常用于标记 DNA 片段。

(二) 引物酶

引物酶 (Dna G) 以 DNA 为模板, 合成一小段 RNA, 为 DNA 聚合酶提供 3'-OH 端。

(三) DNA 连接酶

DNA 连接酶的作用是催化 DNA 复制的最后一步, 即将 DNA 3'-OH 端和相邻的 DNA 的 5'-P 端相连接, 形成一个 3'→5'磷酸二酯键, 将缺口连接起来。实验证明 DNA 连接酶仅能连接两条双链中的一条链的切口 (图 1-16)。