

现代医学分子生物学

主 编 谷志远

副主编 赵亚力

人民军医出版社

现代医学分子生物学

XIANDAI YIXUE FENZI SHENGWUXUE

主 编 谷志远

副主编 赵亚力

编 者 (以姓氏笔画序)

王嘉玺 石法武 叶 平

叶棋浓 陈添弥 谷志远

陆应麟 苏国富 宋海静

李 琦 段聚宝 郝好杰

赵亚力 谈代明

绘 图 郝好杰 谭秋华

人民军医出版社

北 京

(京)新登字 128 号

图书在版编目(CIP)数据

现代医学分子生物学/谷志远主编.-北京:人民军医出版社,1998.9
ISBN 7-80020-841-9

I. 现… II. 谷… III. 医药学:分子生物学 IV. R392.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 14055 号

人民军医出版社出版

(北京市复兴路 22 号甲 3 号)

(邮政编码:100842 电话:68222916)

人民军医出版社激光照排中心排版

北京丰华印刷厂印刷

新华书店总店北京发行所发行

*

开本:787×1092mm 1/16·印张:29.75·字数:694 千字

1998 年 9 月第 1 版 1998 年 9 月(北京)第 1 次印刷

印数:0001~3000(平装) 0001~3000(精装)

定价:39.80 元(平装) 50.00 元(精装)

ISBN 7-80020-841-9/R·770

〔科技新书目:474—139⑨〕

(购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换)

内 容 提 要

本书分三篇,共二十七章。上篇为分子生物学基础理论,介绍了核酸结构、蛋白质的结构与功能、DNA 复制、基因转录、蛋白质生物合成、基因表达的调控、DNA 损伤和修复、基因工程等;中篇为分子生物学与临床医学,重点介绍了肿瘤、心血管病、遗传病、线粒体病等重大疾病发生发展机制的分子生物学基础,基因诊断、基因治疗的临床应用和应用前景等;下篇为医学分子生物学基本实验技术,详细介绍了现代医学分子生物学研究中的主要技术,所介绍的技术均系编者实验室实践过的,侧重叙述实践经验,具有可操作性及指导性。

本书既重视基础理论,又紧密联系临床实际,从基础理论知识和临床医学两个角度介绍医学分子生物学,是一部内容新颖的实用型专著,可作为医学、生物学博士研究生、硕士研究生、大学基础医学、遗传学、细胞学、免疫学等相关专业的教学用书和临床、科研人员的参考书。

责任编辑 姚 磊

目 录

上篇 分子生物学基础理论

第一章 核酸结构	(1)	第二节 转移 RNA 是转接器	(87)
第一节 核酸结构概述	(1)	第三节 核糖体的组织结构	(90)
第二节 DNA	(4)	第四节 蛋白质合成的各个阶段	(94)
第三节 RNA	(9)	第五节 细菌中的起始需要 30S 亚单	
第四节 核酸的变性、复性与杂交	(12)	位和辅助因子	(96)
第二章 蛋白质的结构与功能	(15)	第六节 一个特殊的起始 tRNA 起始	
第一节 蛋白质的组成	(15)	多肽链合成	(97)
第二节 蛋白质的结构	(17)	第七节 起始包含 mRNA 与 rRNA	
第三节 蛋白质分子结构和功能的		之间的碱基配对	(101)
关系	(21)	第八节 小亚单位移向真核 mRNA	
第三章 DNA 复制	(30)	上的起始位点	(102)
第一节 DNA 复制的基本规律	(30)	第九节 延伸因子 T 携带氨酰 tRNA	
第二节 DNA 复制所需的酶和蛋白质		进入 A 位点	(105)
.....	(33)	第十节 转位移动核糖体	(107)
第三节 DNA 复制的一般过程	(36)	第十一节 三个密码子终止蛋白质	
第四节 DNA 复制中的一些特殊问题		合成	(110)
.....	(40)	第十二节 核糖体有若干活性中心 ...	(112)
第四章 DNA 的损伤、修复与基因突变	(43)	第十三节 核糖体 RNA 在蛋白质	
第一节 DNA 的损伤	(43)	合成中的作用	(111)
第二节 DNA 的损伤修复	(51)	第七章 基因表达调控	(119)
第三节 DNA 结构损伤的主要检测		第一节 概述	(119)
技术	(55)	第二节 基因表达调控的基本原则	
第四节 基因突变	(57)	及相关蛋白	(121)
第五章 基因转录及转录后加工	(61)	第三节 原核基因表达调控	(128)
第一节 基因转录的基本特征	(61)	第四节 真核基因的表达调控	(139)
第二节 DNA 指导的 RNA 聚合酶	(62)	第八章 基因及基因组的结构	(159)
第三节 与转录有关的 DNA 结构	(63)	第一节 基因的概念	(159)
第四节 基因转录的过程	(66)	第二节 原核生物基因组的特点	(161)
第五节 基因转录后加工	(69)	第三节 真核生物基因组的特点	(162)
第六节 逆转录	(81)	第四节 人类基因组计划	(170)
第六章 蛋白质的生物合成	(84)	第九章 基因工程	(177)
第一节 遗传密码	(84)	第一节 基因工程工具酶	(178)

第二节 基因工程载体	(185)	第六节 重组体的筛选	(206)
第三节 目的基因的分离	(193)	第七节 克隆基因的表达	(213)
第四节 目的基因与载体的连接	(198)	第八节 基因工程技术在医学方面 的成就与展望	(217)
第五节 重组 DNA 分子导入受体 细胞	(204)		

中篇 分子生物学与临床医学

第十章 基因诊断	(223)	第四节 肿瘤转移调控基因	(312)
第一节 基因诊断概述	(223)	第十三章 心血管疾病的分子生物学	(322)
第二节 核酸分子杂交	(225)	第一节 心血管疾病发病的分子遗 传学机制	(322)
第三节 聚合酶链反应技术	(236)	第二节 心血管疾病的基因治疗	(339)
第四节 RFLP 和其它核酸扩增 技术	(246)	第十四章 遗传性疾病的分子生物学	(346)
第十一章 基因治疗	(251)	第一节 概述	(346)
第一节 外源基因导入方法	(252)	第二节 染色体病	(347)
第二节 包装细胞和靶细胞	(257)	第三节 单基因病	(354)
第三节 基因治疗策略	(261)	第四节 多基因病	(364)
第四节 基因治疗的临床研究	(273)	第十五章 线粒体 DNA 突变与人类疾病 及衰老	(371)
第五节 问题与展望	(278)	第一节 线粒体 DNA 及其突变	(371)
第十二章 肿瘤分子生物学	(283)	第二节 DNA 突变与疾病	(375)
第一节 肿瘤的一般生物学概念	(284)	第三节 线粒体 DNA 突变和衰老	(379)
第二节 癌基因	(284)		
第三节 肿瘤抑制基因	(303)		

下篇 基本实验技术

第十六章 真核细胞基因组 DNA 的提取	(387)	第一节 放射性核素 ³² P 随机引物 延伸标记方法	(415)
第十七章 质粒 DNA 的提取	(391)	第二节 光敏生物素标记方法	(417)
第一节 质粒 DNA 小量制备法	(391)	第二十二章 斑点杂交	(419)
第二节 质粒 DNA 的大量制备	(394)	第二十三章 核酸原位杂交	(424)
第十八章 凝胶电泳法检测 DNA	(397)	第二十四章 真核细胞总 RNA 的制备	(430)
第一节 水平式琼脂糖凝胶电泳法	(397)	第二十五章 Northern 印迹杂交技术	(431)
第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳法	(401)	第二十六章 聚合酶链反应技术	(440)
第十九章 DNA 的限制性内切酶酶切 技术	(406)	第一节 经典 PCR 技术	(440)
第二十章 DNA 酶切片段的分离与回 收技术	(411)	第二节 逆转录 PCR 技术	(442)
第一节 玻璃棉离心法	(411)	第二十七章 PCR-SSCP 分析技术	(445)
第二节 低熔点琼脂糖挖块法	(413)	第一节 放射性同位素 PCR-SSCP 法	(445)
第二十一章 核酸探针标记	(415)	第二节 PCR-SSCP 银染技术	(449)
		附录	(452)

上篇 分子生物学基础理论

第一章 核酸结构

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,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 从外科绷带上脓细胞的细胞核中分离出了一种有机物质,它的高含磷量超过任何当时已经发现的有机化合物,并有很强的酸性。由于该物质是从细胞核分离出来的,当时称之为核素(nuclein)。这即是最早的核酸制品。

1943年,Chargaff 等用纸层析及分光光度法研究不同来源的 DNA, 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。

1944年,由 Avery 等所完成的著名的肺炎球菌转化试验,证明了使肺炎球菌的遗传发生改变转化因子是 DNA, 而不是蛋白质。这一发现极大推动了对核酸结构与功能的研究。

1953年, Watson 和 Crick 根据前人工作的基础,以及 DNA 纤维 X 射线分析的结果,提出了 DNA 的双螺旋分子模型,这一杰出成就被认为是本世纪自然科学的重大突破之一,他们两人由此而获得了 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,揭开了现代分子生物学研究的序幕。

第一节 核酸结构概述

核酸是一种线性多聚体(linear polymer),基本结构单元是核苷酸(nucleotide)。核苷酸由碱基、戊糖和磷酸三部分构成(图 1-1)。根据所含戊糖种类不同,核酸可分为脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸

(RNA)。

一、碱基

碱基可分为两类,即嘌呤碱(purine)和

嘧啶碱(pyrimidine)。嘌呤碱主要有两种,即腺嘌呤(adenine A)和鸟嘌呤(guanine G),这两种嘌呤碱在DNA和RNA分子中都是相同的。核酸中的嘧啶碱主要有三种:胞嘧啶(cytanine C)、胸腺嘧啶(thymine T)、尿嘧啶(uracil U)。其中胞嘧啶是DNA和RNA共有的,胸腺嘧啶只存在于DNA中,尿嘧啶则存在于RNA中(图1-2)。

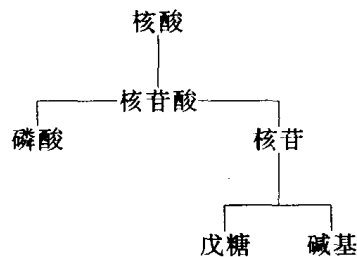


图 1-1 核苷酸的构成

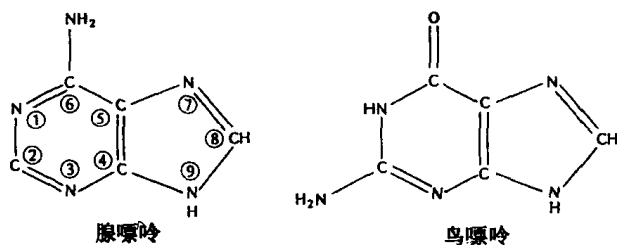
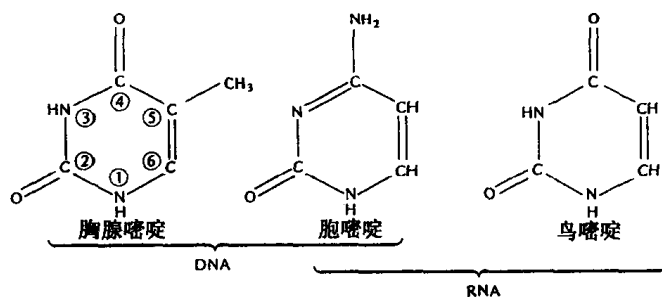


图 1-2 主要嘌呤和嘧啶的结构

二、戊糖

三、核 苷

DNA 所含的戊糖为脱氧核糖(deoxyribose),RNA 所含的戊糖为核糖(ribose,图1-3)。

核苷由碱基与核糖或脱氧核糖缩合而成。嘌呤类核苷是由嘌呤碱第九位氮原子与核糖的第一位碳原子形成糖苷键(N-C),嘧啶类核苷是由嘧啶碱第一位氮原子与核糖的第一位碳原子形成糖苷键。由于基本核糖是两种,因此核苷又可分为核糖核苷及脱氧核糖核苷(图1-4,表1-1)。

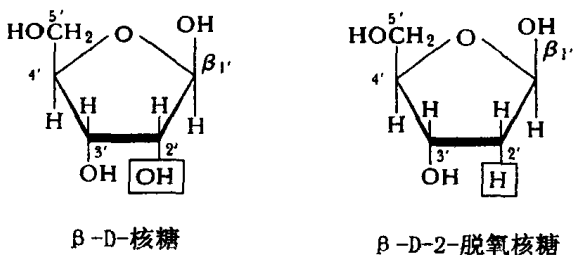


图 1-3 两种核糖的结构

四、核苷酸

核苷酸的戊糖羟基与磷酸形成酯键,即

成为核苷酸。最常见的酯化部位是在核糖或脱氧核糖的 5' 和 3' 位上。单核苷酸分子中的磷酸主要连接在 5' 位上,按照所加的磷酸数目,分别称为核苷一磷酸、核苷二磷酸和核苷三磷酸,其中一、二、三位磷酸分别标记为 α 、 β 、 γ (表 1-2,图 1-5)。

如为脱氧核苷酸,其命名方法和核苷酸的命名方法相同,在相应的核苷酸前面加上脱氧,或在缩写名词前面加上 d 字符。

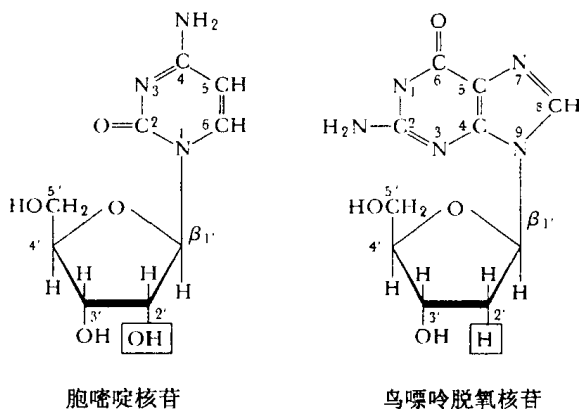


图 1-4 两种核苷的结构

表 1-1 各种常见核苷

碱基	核糖核苷	脱氧核糖核苷
腺嘌呤	腺嘌呤核苷(adenosine)	腺嘌呤脱氧核苷(deoxyadenosine)
鸟嘌呤	鸟嘌呤核苷(guanosine)	鸟嘌呤脱氧核苷(deoxyguanosine)
胞嘧啶	胞嘧啶核苷(cytidine)	胞嘧啶脱氧核苷(deoxycytidine)
尿嘧啶	尿嘧啶核苷(uridine)	—
胸腺嘧啶	—	胸腺嘧啶脱氧核苷(deoxythymidine)

表 1-2 常见的核苷酸

碱基	核糖核苷酸	脱氧核糖核苷酸
腺嘌呤	腺嘌呤核苷酸 (adenosine monophosphate, AMP)	腺嘌呤脱氧核苷酸 (deoxyadenosine monophosphate, dAMP)
鸟嘌呤	鸟嘌呤核苷酸 (guanosine monophosphate, GMP)	鸟嘌呤脱氧核苷酸 (deoxyguanosine monophosphate, dGMP)
胞嘧啶	胞嘧啶核苷酸 (cytidine monophosphate, CMP)	胞嘧啶脱氧核苷酸 (deoxycytidine monophosphate, dCMP)
尿嘧啶	尿嘧啶核苷酸 (uridine monophosphate, UMP)	—
胸腺嘧啶	—	胸腺嘧啶脱氧核苷酸 (deoxythymidine monophosphate, dTMP)

多核苷酸和脱氧多核苷酸就是 RNA 和 DNA,由许多个单核苷酸或脱氧单核苷酸借 3'~5'磷酸二酯键连接而成。图 1-6 表示多核苷酸和脱氧多核苷酸链的结构特征,注意 3'~5'磷酸二酯键链及不对称的两个末端,

既在上方末端有一个 5'端的磷酸基,另一端为未结合的 3'-OH 基,因此多核苷酸链(或脱氧多核苷酸链)的两端分别称为 5'端和 3'端,在书写或作图时习惯上将 5'端放在左侧(或上方),将 3'端放在右侧(或下方)。

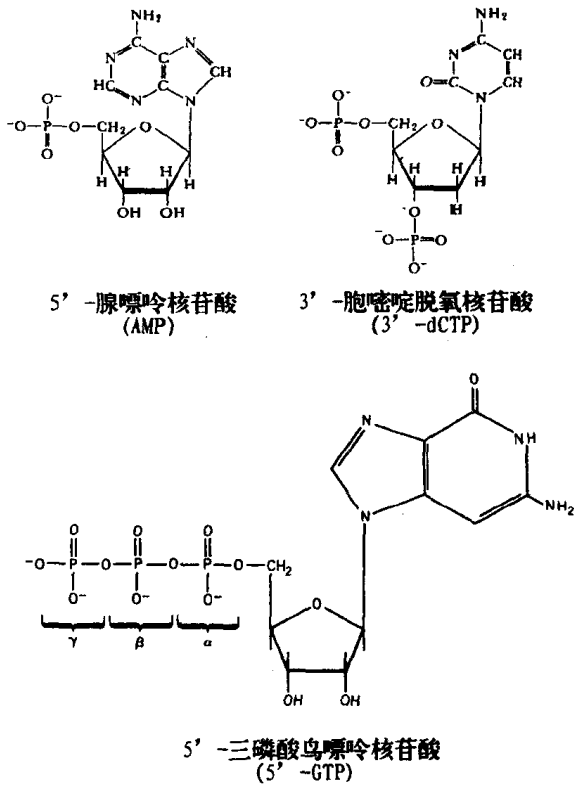


图 1-5 三种核苷酸的结构

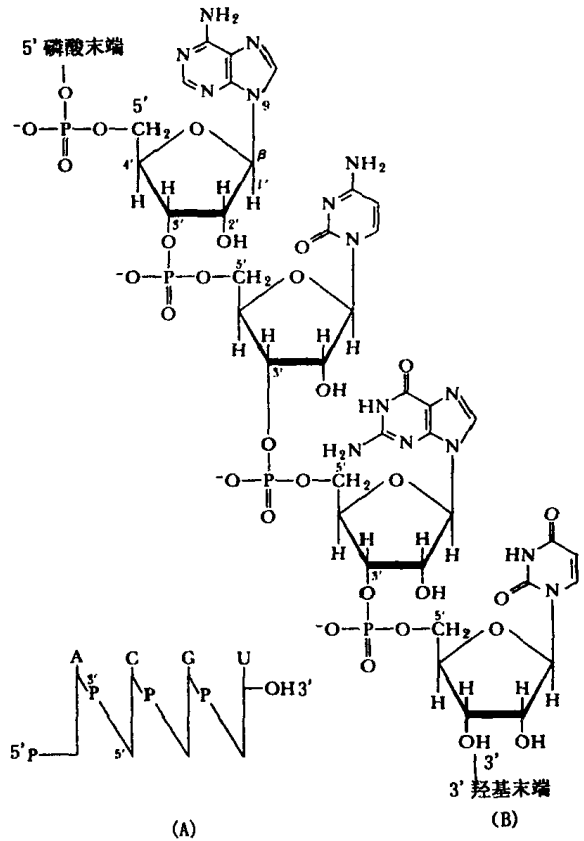


图 1-6 多核苷酸的分子结构
(A)为线条式 (B)为分子结构式。

第二节 DNA

一、DNA 的一级结构

DNA 的一级结构即指 DNA 分子中核苷酸的连接方式和排列顺序。因为各种 DNA 分子核糖和磷酸组成都是相同的, 所以用碱基顺序代表不同 DNA 分子的核苷酸顺序。DNA 是生物界的主要信息分子, 碱基的顺序就是信息所要表达的内容, 碱基顺序略有改变, 就可能引起遗传信息很大的改变, 可见顺序测定对于阐明 DNA 的结构和功能具有重

要的意义。

DNA 是由数目巨大的 4 种脱氧核糖核苷酸通过 3', 5' 磷酸二酯键聚合而成的直线形或环形分子。一般真核生物 DNA 是直线形, 而细菌和一些噬菌体 DNA 是环形分子。组成 DNA 的 4 种脱氧核苷酸可以任意排列, 因此可形成各种特异性的 DNA 片段。同时, DNA 分子十分巨大, 最小的 DNA 分子也包含了数千碱基对, 相对分子量在 10^6 以上, 表 1-3 举例显示一些生物的 DNA 分子碱基对数及基因组大小。

表 1-3 不同生物 DNA 分子大小

生 物	碱基对(kb)	总长度(μm)	形 状
病毒			
多瘤病毒	5.1	1.7	环 状
SV40	5.2	1.8	环 状
M13	6.2	1.9	环 状
ΦX174	5.4	1.8	环 状
Fd	6.4	1.9	线 状
P4	6.4	1.9	线 状
T7	35	1.2	线 状
λ	48.5	16	线 状
T2	156	55	线 状
细菌			
支原体	760	260	环 状
大肠杆菌	4 000	1 360	环 状
真核生物(单倍体)			
酵母	13 500	4 600	线状,分布于 7 个染色体上
果蝇	165 000	56 000	线状,分布于 4 个染色体上
人	2 900 000	990 000	线状,分布于 23 个染色体上
南美洲肺鱼	102 000 000	34 700 000	线状,分布于 19 个染色体上

DNA 一级结构的测定在过去是很困难的工作,因 DNA 分子太巨大了。但近十几年来由于特异的限制性内切酶的发现及可分辨一个核苷酸分子大小差别的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的发展,检测核苷酸序列的检测已成为分子生物学的常规检测方法。尤其是近年来应用的四种荧光标记方法全自动测序仪器的发展和应用,使测序工作更加快速和准确,也成为人类基因组计划实施的技术支持和保障。

二、DNA 的二级结构

DNA 二级结构指核酸的立体空间结构,即 Watson 和 Crick 建立的 DNA 双螺旋结构模型。

(一)DNA 双螺旋结构的提出

本世纪 40 年代证明了 DNA 是遗传的物质基础,与此同时,一些物理学家利用 X 射线衍射技术得知线性 DNA 分子不是规则的

存在,而可能呈螺旋结构。50 年代 Chargaff 等人将许多不同生物的 DNA 完全水解,然后对碱基成分进行分析。结果发现不同种生物,其碱基含量多少不一样。但不管什么种属生物,都有一个普遍规律,即 A 与 T 的含量总是相等,G 与 C 也总是相等,因此嘌呤碱基含量也必然等于嘧啶碱基含量。即 $A + G = C + T$,这一关系即为 Chargaff 原则,为以后碱基配对理论奠定了基础。

在前人工作的基础上,Watson 和 Crick 在 1953 年提出了著名的 DNA 双螺旋结构模型。这个模型不仅解释了当时所知道的 DNA 的一切理论性质,而且将结构与功能联系起来,大大推动了分子生物学的发展。

(二)DNA 双螺旋结构的特点

1. 双螺旋 X 射线衍射图的特征提示 DNA 分子的立体空间结构呈双螺旋结构,有两条多核苷酸链。由双螺旋 DNA 分子的示意结构图可见,两条螺旋带象征两条脱氧核糖核苷酸链,这两条核苷酸链反向平行,以一

定距离平行地围绕着同一个轴盘旋着,形成一个右旋的双螺旋体。那些横撑的棒象征一对对的由氢键结合的碱基,它们把两条链联结在一起。中间的垂线表示 DNA 分子的纤维轴(图 1-7)。

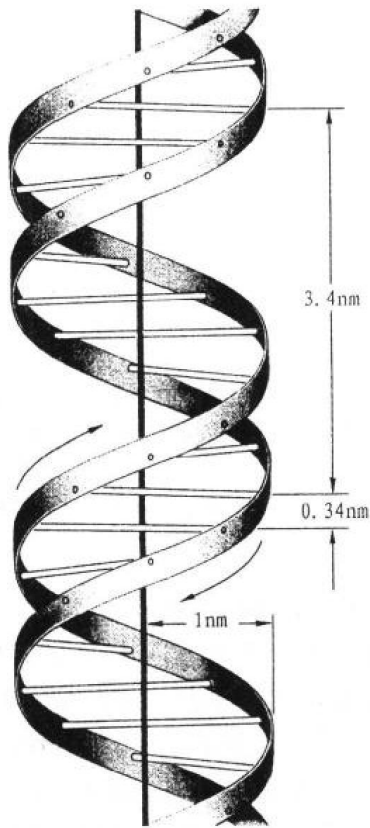


图 1-7 DNA 分子的双螺旋结构模型

2. 主链 两条多核苷酸链中的碱基排列在双螺旋内侧,磷酸和核糖排列在外侧,彼此通过 3'5'磷酸二酯键相连接,形成 DNA 分子的主链,碱基平面与纵轴垂直。

3. 碱基配对 两链相对应的核苷酸之间的碱基彼此相对,中间由氢键把它们连接起来。

DNA 双螺旋结构中碱基之间的配对不是随意的,总是腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)相配对,鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)相配对。在 DNA 分子中,一条链上有一个 G,另一条链上必定有一个 C 与它配对。同样,一条链上

有一个 A,另一条链上必定有一个 T 与它配对。

A 与 T 配对,形成 2 个氢键,G 与 C 相配对,形成三个氢键,所以 GC 之间的连接较为稳定。由于两条链上的碱基配对是互补的,这样,当一条核苷酸链上的碱基顺序固定下来时,按照碱基互补原则即可决定另一条链上的碱基排列顺序。碱基互补现象具有十分重要的生物学意义,因为它不仅与核酸结构有关,而且 DNA 的复制、转录及遗传信息的传递都与它有着密切的关系(图 1-8)。

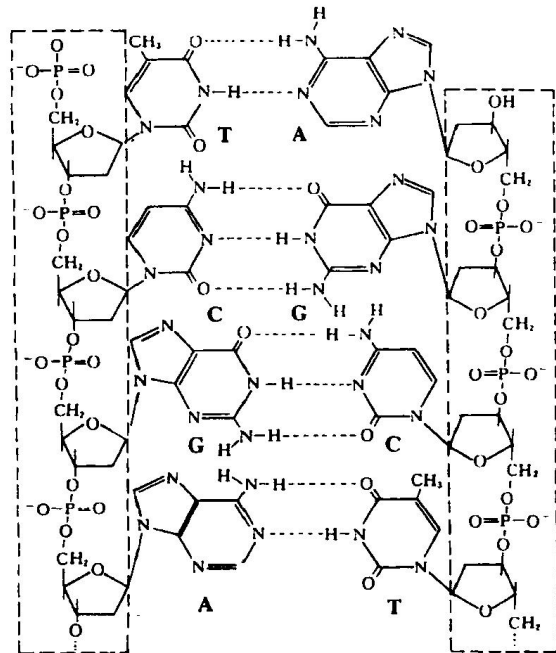


图 1-8 DNA 双链中的碱基配对方式

4. 结构尺寸和大小沟 DNA 双螺旋分子直径为 2nm,长度比直径大过千倍以上。它的螺距为 3.4nm,其中包括 10 对碱基,碱基与碱基距离 0.34nm,双螺旋结构还包括了大沟与小沟。螺旋外部有两个螺旋形凹槽,一条深宽的称大沟,一条浅窄的称为小沟,两条沟都是够大到使蛋白质分子能进入而与碱基相接触。

由于 DNA 分子是大分子,一个 DNA 分子中所包含的碱基是很多的,总在 100 个以

上,又因双螺旋结构对核苷酸的顺序没有任何限制,完全是随机排列的,因此,碱基排列的可能方式就在 4^{100} 以上,足见 DNA 分子中核苷酸排列顺序的变化是多种多样的。

上述 DNA 的双螺旋结构是溶液及生物机体中常见的形式(相对湿度为 92%),通称 B 型。当 B 型所处条件的湿度低于 75% 时,可转变为 A 型。A 型的碱基对不垂直于双螺旋的轴,倾斜约 20° ,螺距降为 2.8nm,每一螺旋含 11 个碱基对。其他如 C 型、D 型、E 型等双螺旋结构也有所不同。这些类型的 DNA 均为右手螺旋。

(三)左手螺旋

1929 年,Rich 又发现了左手螺旋结构,他们用人工合成的 DNA 片断进行 X 射线衍射分析,结果发现其中一个片段形成的是左手螺旋而不是正常的右手螺旋。左手螺旋结构的另一明显特征是,磷酸核糖形成的主链在螺旋中呈锯齿形(zigzag),所以取其英文单词第一个字母来命名。此外,Z-DNA 每个螺旋含 12 对碱基,而不是 B-DNA 的 10 对,Z-DNA 只有一条沟,而 B-DNA 有大、小二条沟(图 1-9)。

关于 Z-DNA 的研究,主要集中于两个方面:①Z-DNA 是否存在于天然状态的 DNA 分子中,经过科学界多种方法的证明,

现已普遍承认 Z-DNA 是存在于天然的 DNA 分子中;②Z-DNA 的生物功能是什么?有关这一问题目前正在研究和讨论之中。如用 Z-DNA 抗体结合方法能直接查到在增强子(enhancer)顺序中含有 Z-DNA,而增强子对基因的转录有明显的促进作用。其详细功能正在研究之中,现在还只能认为 Z-DNA 与基因的调控有关(表 1-4)。

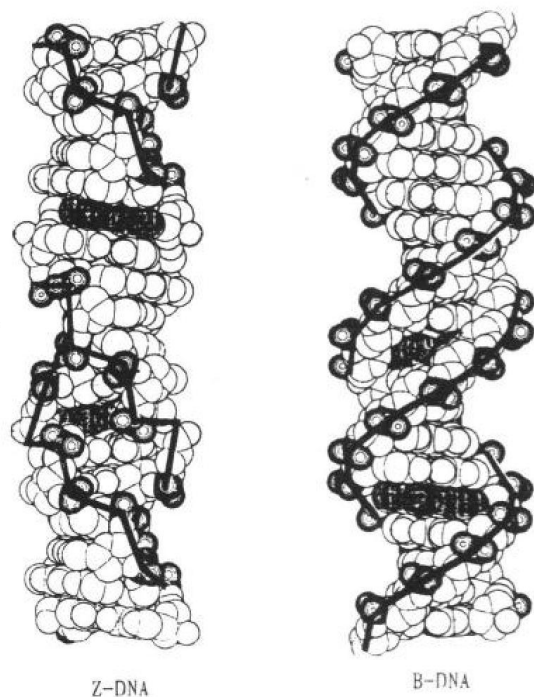


图 1-9 两种不同形式的 DNA

表 1-4 B-和 Z-DNA 的比较

	螺旋类型		
	A	B	Z
外形	粗短	适中	细长
每对碱基之距离	0.23nm	0.34nm	0.38nm
螺旋直径	2.55nm	2.37nm	1.84nm
螺旋方向	右手	右手	左手
糖苷键构型	反式	反式	G-T 反式 G 顺式
每匝螺旋碱基数目	11	10.4	12
螺距	2.46nm	3.32nm	4.56nm
碱基对与中心轴之倾角	19°	1°	9°
大沟	窄,很深	宽,深	平坦
小沟	很宽,浅	窄,很深	很窄,深

三、DNA 的三级结构

DNA 的三级结构是指双螺旋 DNA 链进一步扭曲盘旋,形成超螺旋结构。

(一)原核生物 DNA 的三级结构

原核生物 DNA 的三级结构大多为环状的。如果双链 DNA 中的一条链有一缺口,就形成开放环状 DNA (open circular DNA),这时 DNA 处在松弛状态。如果双链环状 DNA 无任何缺口,即以闭合环状 (closed circular) 形式存在,这时由于张力的关系, DNA 分子可进一步螺旋化。根据螺旋的方向,可分为正超螺旋 (positive supercoils) 和负超螺旋 (negative supercoils)。正超螺旋与右手螺旋方向一致,使双螺旋结构更为紧密,负螺旋作用相反。目前超螺旋仅见于经处理过的 DNA 分子上,细胞内自然的双链环状 DNA 都是以负超螺旋的形式存在 (图 1-10)。

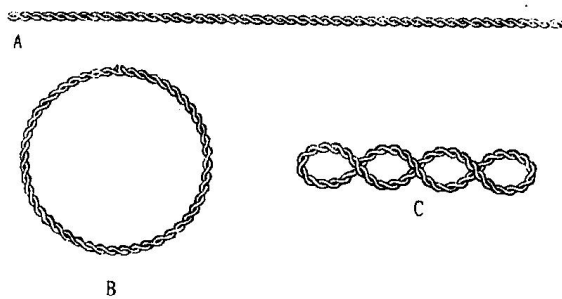


图 1-10 DNA 三级结构的模式图

- A. 直线型双螺旋结构 B. 开环型结构
C. 共价闭环超螺旋结构。

松弛状 DNA 和超螺旋 DNA 可以互相转变,这种转变需要拓扑异构酶 (topoisomerase) 催化,其作用机制是双螺旋中切开一条链,使链的末端沿着拧松超螺旋的方向旋转,超螺旋消除后,再将接头接合起来。

(二)真核生物细胞核中的 DNA 三级结构

真核生物细胞核中的 DNA 三级结构具

有一种超螺旋结构,1974 年在电镜下研究间期细胞核时发现“串珠状” (beads on a string) 结构,这些串珠就是作为染色质基本单位的核小体 (nucleosome),是由 DNA 双螺旋绕在组蛋白上形成,核小体的核心是由四种组蛋白 (H_2A 、 H_2B 、 H_3 、 H_4) 各两个分子构成的扁球状体, DNA 双螺旋在组蛋白八聚体分子的表面上盘绕约 2 圈,长度相当于 140 个碱基对,在相邻的两个核小体之间,由长约 60 个碱基对的 DNA 连接,称为连接线 (linker),在连接线部位结合有一个组蛋白 H_1 。所以,核小体为五种组蛋白及 200 个碱基对长的 DNA 螺旋化构成,长度为 10nm,比较 200 碱基对 ($0.34\text{nm} \times 200 = 68\text{nm}$) 的 68nm,长度已被压缩了 7 倍。

(三)真核生物细胞核中的 DNA 形成染色质的高级结构

人类细胞核平均直径为 $5\mu\text{m}$,细胞中 3×10^9 碱基对的 DNA 存在于 22 对常染色体和 X、Y 染色体中。如按每条染色体含 $1.5 \times$

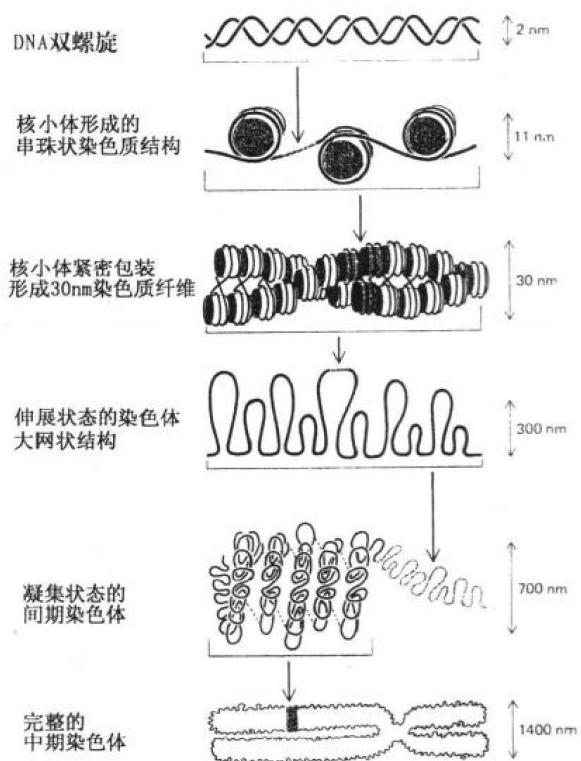


图 1-11 真核细胞中基因组 DNA 的组装模式

10^8 个碱基对的 DNA 线性分子,每个核小体 DNA 平均为 200bp 计算,应有 7.5×10^5 个核小体存在,其伸展长度约为 7mm,远非细胞核所能容纳。X 射线衍射确定核小体直径约为 11nm,在有关核蛋白的协同下组成以 6 个核小体为一周、直径 30nm 的紧密结构,即光镜下可见的染色质纤维。此时人类基因组已压缩到 1mm 的长度。在两栖类未成熟的卵母细胞间期核中,可在光镜下见到的一种灯刷状染色体(lampbrush chromosome)结

构,是在转录高度活跃的 DNA 与蛋白质形成的核蛋白复合体基础上构成的,灯刷染色体进一步形成大环状结构(looped domain)。通过结合在大环基部的蛋白质相互连接或基部直接连接在染色体的中轴上,每个环的长度约为 20~100kb,高度约为 300nm。含有这种环状结构的染色质 DNA 再进而盘旋成 700nm 的染色单体。经过一系列的组装,人类 DNA 可通过 2 000 个大环最终浓缩 30 万倍而组装在染色体中(图 1-11)。

第三节 RNA

RNA 与 DNA 成分上的主要区别为:RNA 含核糖,DNA 含脱氧核糖;RNA 含尿嘧啶,DNA 含胸腺嘧啶。其余的三种碱基:腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶是 RNA 和 DNA 共有的。

在结构方面,除一部分 RNA 病毒外,RNA 都是单链的。双螺旋只是局部的由单链回折形成。在 RNA 双螺旋中,碱基配对关系与 DNA 相似,不过以 U 代替 T,即 A—U 和 G—C 配对。

原核和真核细胞都含有三类基本的 RNA:①核糖体 RNA(ribosomal RNA, rRNA),约占细胞中 RNA 总量的 75%~80%,是核糖体的构造成分;②信使 RNA(messenger RNA, mRNA),约占细胞中 RNA 总量的 5%~10%,由于它们传递合成蛋白质的遗传信息,所以种类繁多;③转移 RNA(transfer RNA, tRNA),约占细胞中 RNA 总量的 10%~15%,共 50 种左右。

一、rRNA

核糖体是蛋白质合成装配的场所,它由 rRNA 和蛋白质组成。核糖体和 rRNA 一般都用沉降系数 S 表示大小,对于原核细胞和

真核细胞,其核糖体均由两个亚基构成。具体组成见表 1-5。

表 1-5 原核和真核细胞 rRNA 的若干性质

	核糖体	rRNA 的沉降系数(S)	相对分子质量	碱基数
原核(70S)	30	16	5.6×10^5	1 700
	50	23	1.1×10^6	3 300
		5	3.6×10^4	120
真核(80S)	40	18	6.5×10^5	2 000
		28	1.7×10^6	5 000
	60	5.8	5.0×10^4	150
		5	4.0×10^4	120

二、mRNA

mRNA 的分子大小变异非常大,小到几百个核苷酸,大到近 2 万个核苷酸,在不同的细胞及组织中,mRNA 的种类也大相径庭。mRNA 的结构在原核生物和真核生物中有很大的差别,作为蛋白质合成的模板,每一种多肽都有一种特定的 mRNA 负责编码,所以细胞内 mRNA 的种类很多。它们具有一些共同的结构特征(图 1-12)。

五、其他类型的 RNA

1. 核内不均一 RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA) 长度 200~3000 个碱基, 是 mRNA 的前体, 序列中间含有内含子序列, 经过剪切等处理后才能成熟为 mRNA, 大约仅 10% 的 hnRNA 能成熟为 mRNA, 然后转运至胞浆。

2. 小分子细胞核 RNA (small nuclear

RNA, snRNA) 真核细胞核内发现的一组小分子 RNA, 长度 300 个碱基以下, 主要参与 mRNA 的剪切加工。

3. 反意 RNA (antisense RNA) 为单链 RNA, 其碱基序列正好与有意义 mRNA (sense RNA) 互补, 从而可与 mRNA 配对结合形成双链, 最终抑制 mRNA 作为模板进行翻译, 为近年发现的一种基因表达调控机制。现已开始利用这一机制人工合成一些反意 mRNA 调节基因的表达, 用于基因治疗。

第四节 核酸的变性、复性与杂交

一、变 性

DNA 或 RNA, 其二级结构和三级结构受到物理化学因素的破坏而解体, 但其一级结构核苷酸间共价键并不断裂, 称为核酸的变性。引起核酸变性的因子有加热、酸、碱、乙醇、丙酮、尿素、甲酰胺等。

加热变性是分子生物学常用的方法。通常将 DNA 的稀盐酸溶液加热到 80~100°C 几分钟, 双螺旋结构即发生破坏, 氢键断裂, 两条链彼此分离, 形成无规线团, 这一变化称为螺旋—线团转变。随着 DNA 结构的改变, 发生一系列物理化学性质的改变: 260nm 处紫外吸收值升高, 比旋下降, 浮力密度升高, 酸碱滴定曲线改变等, 同时失去生物活性。在实验室中观察和测定核酸溶液对 260nm 吸光度的变化, 当 DNA 变性时, A_{260} 随着增高, 这种现象称为增色效应 (hyperchromic effect)。如果以温度为横坐标, 以 A_{260} 的相对值为纵坐标, 可作出融解曲线 (melting curve), A_{260} 值达到最大值的 1/2 时 (50% DNA 分子变性) 的温度称为溶解温度 (melt-

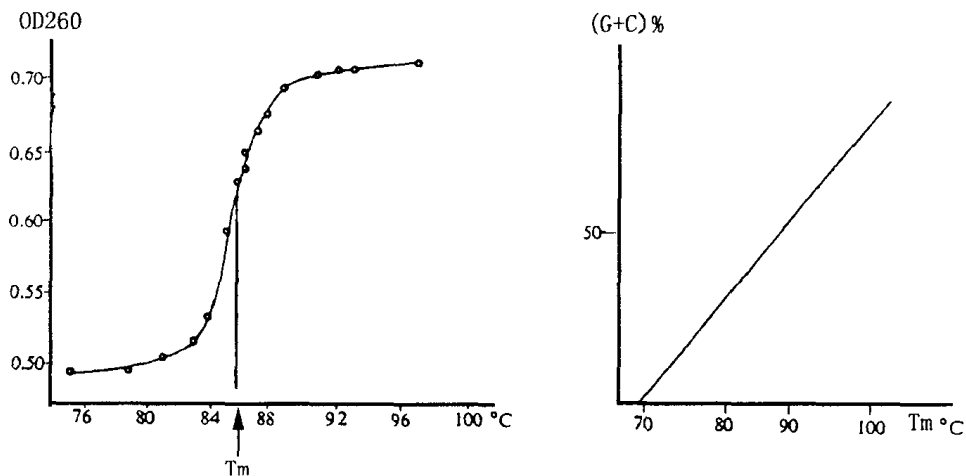
ing temperature), 简称为 T_m 。DNA T_m 一般在 70~85°C 之间 (图 1-15)。它与下列因素有关:

1. DNA 的均一性 如人工合成的 poly (A—T) 或 poly (G—C), 熔解过程发生在一较小的温度范围之内, 所以 T_m 值可作为衡量 DNA 样品均一性 (homogeneity) 的标准。

2. G—C 含量 T_m 值与 G—C 的含量有正比关系, G—C 对含量越多, T_m 越高, 这是因为 G—C 对之间有三个氢键, 所以含 G—C 对多的 DNA 分子更为稳定。

3. 介质中的离子强度 在离子强度较低的介质中, DNA 的溶解温度较低, 而且溶解温度的范围较宽。而在较高的离子强度时, DNA 的 T_m 值较高, 而且溶解过程发生在一个较小的温度范围之内。

RNA 的变性具有共同特性, 因 RNA 也具有螺旋—线团之间的转变。但是由于 RNA 仅有局部的双螺旋区, 所以这种转变不如 DNA 那样明显。变性曲线不那么陡, T_m 值较低。tRNA 具有较多的双螺旋区, 所以具有较高的 T_m 值。变性曲线也较陡。双链 RNA 变性几乎与 DNA 相同。

图 1-15 DNA 解链曲线(A) T_m 与(G+C)%的关系(B)

二、复性

变性 DNA 在适合的条件下,又可使两条彼此分开的链重新缔合(reassociation)按原来的碱基配对形成双螺旋结构,这一过程叫复性(renaturation)。复性过程又叫退火(annealing)。如将热变性的 DNA 分子加速冷却至低温,则大部分 DNA 分子不能复性。影响 DNA 复性速度的因素主要为 DNA 样品的性质,如简单序列的 DNA 要比顺序复杂的 DNA 复性快;DNA 浓度高,使分子之间碰撞机会增加,复性快;长的 DNA 分子运动慢,复性速度低,复性最快的 DNA 片段为基因组中的高度重复序列。

三、杂交

不同来源但具有同源性的两条 DNA 或 RNA 单链按碱基配对原则结合在一起,这一过程就是杂交(hybridization)。杂交是充分利用了核酸的变性和复性的特性,因此,可以在 DNA—DNA、DNA—RNA、RNA—RNA 之间进行,已成为分子生物学中重要的技术(详见实验技术篇)。

提 要

核酸分为脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)两大类,所有生物细胞都含有这两类核酸。病毒则不同,DNA 病毒只含 DNA,RNA 病毒只含 RNA。

核酸是线性多聚核苷酸,其基本单位是核苷酸。核苷酸又由碱基、戊糖(核糖和脱氧核糖)及磷酸所组成。

DNA 的一级结构指 DNA 分子中核苷酸的连接方式和排列顺序,两个核苷酸之间的连接为 3'-5'磷酸二酯键。

DNA 的二级结构指 Watson 和 Crick 提出的双螺旋的立体空间结构。特点为:DNA 由两条反向平行的核苷酸链组成,围绕中轴成右手双螺旋;碱基配对原则为 A 与 T 形成两个氢键,G 与 C 形成三个氢键。每对螺旋由 10 对碱基组成;双螺旋结构表面有两条螺旋型凹沟,一大一小,双螺旋直径为 2nm。两个碱基平面间 0.34nm;Watson-Crick 所阐明的是 B 型 DNA,此外还有 A 型 DNA 及左旋(Z-DNA)。它们在结构上有明显不同。

DNA 的三级结构指双螺旋 DNA 链进一步扭曲盘旋形成超螺旋结构。原核生物中