

原位检测技术

刘厚奇 主 编



第二军医大学出版社
Second Military Medical University Press

原位检测技术

王健 主编

 中国水利水电出版社
CHINA WATER & ELECTRICITY PRESS

原位检测技术

YUANWEIJIANCE JISHU

主 编 刘厚奇

副主编 冀凯宏 关新元 倪灿荣 向正华

编 者 (以姓氏笔画为序)

刘厚奇 (第二军医大学组织胚胎学教研室)

关新元 (香港大学医学院临床肿瘤学系)

向正华 (第二军医大学神经生物学教研室)

忤敏娟 (第二军医大学组织胚胎学教研室)

杨 玲 (第二军医大学组织胚胎学教研室)

胡凯猛 (第二军医大学组织胚胎学教研室)

倪灿荣 (第二军医大学附属长海医院病理科)

熊 俊 (第二军医大学组织胚胎学教研室)

冀凯宏 (第二军医大学组织胚胎学教研室)



第二军医

Second Military Medical University Press

内 容 提 要

本书详细讲述了核酸、抗原与抗体、标本制备、免疫酶化学、免疫荧光技术、计算机图像分析与阳性信号的定量观测、基因重组技术、核酸分子探针、原位杂交组织化学、荧光原位杂交技术、细胞凋亡检测等实验室常用操作技术的原理、方法和操作步骤。内容覆盖面广,图文并茂,适合医学院校研究生、基础医学科研工作者参考阅读。

图书在版编目(CIP)数据

原位检测技术/刘厚奇主编. —上海:第二军医大学出版社,2012.3

ISBN 978-7-5481-0264-9

I. ①原… II. ①刘… III. ①原位试验-免疫测定-高等学校-教材 IV. ①R446.62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 273861 号

出 版 人 陆小新
策划编辑 单晓巍
责任编辑 许 悦

原位检测技术

主 编 刘厚奇

第二军医大学出版社出版发行

<http://www.smmup.cn>

上海市翔殷路 800 号 邮政编码:200433

发行科电话/传真:021-65493093

全国各地新华书店经销

江阴市天源印刷有限公司印刷

开本:850×1168 1/16 印张:12 字数:297 千字

2012 年 3 月第 1 版 2012 年 3 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5481-0264-9/R·1060

定价:78.00 元

前 言

人体组织细胞内的物质分布是细胞形态和功能的基础,也反映出人体生理和病理的不同特征。原位检测技术就是利用某些物质,如抗体、酶、核酸分子探针、凝集素等,将某一分子从组织细胞内的众多生物分子中挑选出来,然后通过特异性酶反应显色或荧光显示等,测定其在组织细胞内的分布范围和聚集程度,以判断其在组织细胞内的生理效应和病理意义。

原位检测技术主要包括免疫组织化学技术和核酸杂交技术两个部分。免疫组织化学的主要原理是用标记的抗体(或抗原)与组织细胞内的相应抗原(或抗体)特异性结合,经过组织化学的显色反应之后,用普通显微镜、荧光显微镜或电子显微镜观察,从而对该抗体(或抗原)进行定性、定量检测。免疫组织化学主要是检测组织细胞内多肽、蛋白质及膜表面抗原和受体等大分子物质的存在和分布。这种方法特异性强,敏感性高,应用广泛,成为生物学和医学等众多学科的重要研究手段。核酸杂交技术是用已知碱基序列带上标记物(核酸分子探针)与组织细胞中待测的核酸按碱基配对的原则进行特异性结合,形成杂交体,通过标记物的显示,在普通显微镜、荧光显微镜或电子显微镜下观察目标 mRNA 或 DNA 的存在和定位。核酸杂交技术主要分染色体原位杂交和细胞原位杂交。前者是研究遗传基因、抗原基因、受体基因、癌基因等在染色体上的定位与表达;后者是研究细胞某种蛋白质的基因转录物 mRNA 在胞质内的定位与表达。核酸杂交技术有很高的敏感性及特异性,它是在免疫组织化学的基础上,进一步从分子水平探讨细胞内基因的表达以及细胞功能调节机制的方法,已成为细胞分子生物学和病理生理学研究的有效手段。

本书是在 2002 年出版《原位检测技术》的基础上进行修订的。编者结合了相关专业研究生和工作人员对该课程的建议和体会,在原位检测技术的基本理论、技术原理的基础上,重点添加了实验操作程序、试剂配制方法和疑难问题的处理;在理论内容上,删去了胶体金探针的制备技术和免疫电镜技术两章,增加了细胞凋亡检测相关知识。本次修订出版,力争以理论与实验技术相结合,实用为主,尽量兼顾技术方法的先进性和科学性。

本书编写得到第二军医大学出版社的大力支持。在此,我们表示衷心感谢。由于编者水平和时间有限,书中难免有一些不妥之处,敬请读者批评指正。

编 者

2011 年 10 月

目 录

第一章 核酸	1
第一节 核酸的发现及发展	1
第二节 核酸的化学组成	3
第三节 DNA 的结构和功能	4
第四节 染色质和染色体	9
第五节 基因组	16
第六节 RNA 的结构和功能	19
第二章 抗原与抗体	23
第一节 抗原	23
第二节 抗体	27
第三节 抗原与抗体的反应	29
第三章 标本的制备	32
第一节 组织和细胞的采集	32
第二节 组织和细胞的培养	33
第三节 组织和细胞的固定	36
第四节 涂胶载玻片的制备	38
第五节 组织切片技术	39
第六节 抗原的暴露和修复	41
第七节 染色体的制备	44
第四章 免疫酶化学	50
第一节 免疫酶化学的技术方法	50
第二节 亲和免疫组化技术	56
第三节 非特异性染色及消除方法	63
第四节 对照的设置及结果的判断	66
第五节 显色底物与衬染	70
第六节 抗体的购置、保存及应用	76
第五章 免疫荧光技术	80
第一节 免疫荧光技术的原理	80
第二节 荧光素	81
第三节 荧光素标记抗体的方法	83
第四节 免疫荧光染色方法	89

第五节	非特异性染色的消除方法	93
第六节	荧光显微镜及检测方法	94
第七节	染色标本的保存及封片介质的制备	98
第六章	计算机图像分析与阳性信号的量化观测	100
第一节	计算机生物图像分析的基本原理	100
第二节	计算机图像分析的实际应用	102
第七章	基因重组技术	105
第一节	核酸的变性与复性	105
第二节	工具酶	106
第三节	载体	109
第四节	DNA 重组技术	110
第八章	核酸分子探针	116
第一节	DNA 的缺口平移法	117
第二节	通过随机引物标记 DNA	120
第三节	体外转录方法标记 RNA 探针	122
第四节	寡核苷酸的标记方法	127
第五节	放射性标记探针的纯化	131
第九章	原位杂交组织化学	135
第一节	样本的制备	136
第二节	原位杂交组织化学操作程序	140
第十章	荧光原位杂交技术	166
第一节	概述	166
第二节	染色体荧光原位杂交技术	166
第三节	间期核荧光原位杂交技术	170
第四节	比较基因组杂交技术	173
第十一章	细胞凋亡检测	177
第一节	概述	177
第二节	细胞凋亡形态学检测	177
第三节	细胞凋亡的 DNA 梯形电泳图谱测定	178
第四节	凋亡细胞 DNA 含量的流式细胞仪分析	179
第五节	TUNEL 标记法	180
第六节	Annexin V/PI 双染色法	182

第一章 核 酸

核酸是存在于细胞内的一类大分子酸性物质,包括核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)和脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA),两者均是以单核苷酸为基本单位所组成的多聚核苷酸长链。DNA 是遗传信息的载体,主要位于细胞核和线粒体中,而 RNA 主要参与遗传信息的表达和表达调控,细胞核、核仁和细胞质中均有 RNA 存在。本章中将介绍核酸的发现及发展、核酸的化学组成、DNA 的结构和功能、染色质和染色体、基因组、RNA 的结构和功能。

第一节 核酸的发现及发展

核酸的发现已有近 150 年的历史,但人们对它真正有所认识不过是近 60 年的事。远在 1865 年,孟德尔(Gregor Mendel, 1822—1884)通过豌豆实验在《植物的杂交试验》一书的分离定律和自由组合定律中,提出生物性状的遗传是由遗传因子决定的。1869 年,瑞士外科医师米歇尔(Miesher F, 1844—1895)首先从脓细胞分离出细胞核,用碱抽提再加入酸,得到一种含氮和磷特别丰富的沉淀物质,当时称之为核素。1872 年,他又从鲑鱼的精子细胞核中发现了大量类似的酸性物质。随后,有人在多种组织细胞中也发现了这类物质的存在。因为这类物质都是从细胞核中提取出来的,而且都具有酸性,因此改称为核酸。1909 年,丹麦遗传学家约翰逊(Johansen W, 1859—1927)提出了基因(gene)的概念,代替孟德尔的遗传因子。1925 年,摩尔根证明基因是在染色体上呈直线排列的遗传单位。

20 世纪 20 年代,德国生理学家柯塞尔(Kossel A, 1853—1927)和他的学生琼斯(Johnes W, 1865—1935)、列文(Levene P A, 1896—1940)的研究结果,才明确了核酸的化学成分及其最简单的基本结构,证实它是由 4 种不同的碱基,即腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和胞嘧啶(C),以及核糖、磷酸等组成。其最简单的单体结构是碱基-核糖-磷酸构成的核苷酸。1929 年,核酸被确定有两种,一种是脱氧核糖核酸(DNA);另一种是核糖核酸(RNA)。核酸的相对分子质量(简称分子量)比较大,一般由几千到几十万个原子组成,相对分子质量可达 11 万至几百万以上,是一种生物大分子。

证明遗传物质是 DNA(有时是 RNA)的有 3 个经典实验,即细菌的转化实验、噬菌体感染实验和病毒重建实验。前两个实验证实 DNA 是遗传物质,后一个实验证实某些病毒的遗传物质是 RNA。这里介绍细菌的转化实验和噬菌体感染实验。

1928 年,生理学家格里菲斯(Griffith F, 1879—1941)在研究肺炎球菌时发现肺炎双球菌有两种类型:一种是 S 型双球菌,外包有荚膜,不能被白细胞吞噬,具有强烈毒性;另一种是 R 型双球菌,外无荚膜,容易被白细胞吞噬,没有毒性。格里菲斯取 R 型细菌少量,与大量已被高温杀死的有毒的 S 型细菌混在一起,注入小白鼠体内。此法常规应该没有问题,但出乎意料的是小白鼠全部死亡。在它们的血液发现了许多 S 型活细菌。那么,活的 S 型细菌是从哪里来的呢? 格里菲斯反复分析认为一定有一种什么物质,能够从死细胞中进入活细胞中,改变了活细胞的遗传性状,把它变成了有毒细菌。这种能转移的物质,格里菲斯把它叫做转化因子。细菌学家艾弗里(Avery O T, 1877—1955)认

为这一工作很有意义,并开始研究这种转化因子的化学成分。1944年,他从研究的结果中证明转化因子就是DNA,是它作为R型肺炎双球菌转化为S型肺炎双球菌的信息载体。但是这一重要的发现没有被当时的科学界所接受,主要原因是受到了错误假说的影响。以前科塞尔发现核酸时,列文等化学家曾错误地认为核酸是由4个含有不同碱基的核苷酸为基础的高分子化合物,其中4种碱基的含量为1:1:1:1。在这个错误假说的影响下,对艾弗里的新发现提出了种种责难,怀疑他的实验是不严格的,很可能是在做实验时带入了其他蛋白质,因而产生了与列文假说不符合的现象。艾弗里在大量舆论的压力下,也不敢坚持他的正确结论,采取了模棱两可的说法:“可能不是核酸自有的性质,而是由于微量的、别的某些附着于核酸上的其他物质引起了遗传信息的作用。”之后的研究中,美国生理学家德尔布克(Delbruck M, 1906—1981)发现噬菌体比细菌还小,只有DNA和外壳蛋白,构造简单、繁殖快,是研究基因自我复制的最好材料,于是组成噬菌体研究小组,开始选用大肠埃希菌和它的噬菌体研究基因复制的工作。1952年, Hershey A D和 Chase M报道的T₂噬菌体感染实验进一步证明了DNA是遗传物质的结果。他们用放射性核素分别标记蛋白质与DNA,得到两组含有不同标记的细菌,然后用T₂噬菌体分别去感染这两组标记细菌并收集子代噬菌体,这些噬菌体或被标记上。实验的第2步是用标记了的噬菌体去感染未标记的细菌,感染后培养10 min,用搅拌器剧烈搅拌使吸附在细胞表面上的噬菌体脱落下来,再离心分离,细胞在下面的沉淀中,而游离的噬菌体悬浮在上清液中。经放射性核素测定发现,用标记的噬菌体感染时,上清液中含量为80%,沉淀中含量为20%,这表明宿主细胞内很少有放射性核素标记,大多数的标记的噬菌体蛋白质附着在宿主细胞的外面——在感染噬菌体的外壳中,沉淀中的20%可能是由于少量的噬菌体经搅拌后仍吸附在细胞上所致;在用标记的噬菌体感染的细菌中,在沉淀中含有70%,上清液中仅有30%,表明在蛋白质外壳中很少有放射性核素,而大多数的放射性标记在宿主细胞内,上清中约30%的可能是由于还有少部分噬菌体尚未将DNA注入宿主就被搅拌下来了。这个实验表明:在感染时进入细菌的主要是DNA,而大多数蛋白质在细菌的外面,噬菌体将DNA注入细菌,释放出跟原来一样的噬菌体。可见在噬菌体的生活史上,只有DNA是连续物质,所以进一步证明了DNA是遗传物质。Hershey所处的时代和Avery有了明显的不同,这时许多研究者已开始注意到DNA。因此Hershey的结论很快就得到了大家的承认,并于1969年获得了诺贝尔奖。

1953年, Watson和Crick提出DNA的双螺旋结构模型,从此,核酸的研究成为了生命科学中最活跃的领域之一。由于核酸生物学功能的发展,进一步促进了核酸化学的发展。自20世纪50年代以来,用于核酸分析的各种先进技术不断地创造和使用,用于核酸的提取和分离方法的不断革新和完善,从而为研究核酸的结构和功能奠定了基础。核酸分子中各个核苷酸之间的连接方式已有所认识, DNA分子的双螺旋结构学说已经提出,有关核酸的代谢、核酸在遗传中以及在蛋白质生物合成中的作用机制,也都有了比较深入的认识。1968年, Nirenberg发现遗传密码;1975年, Temin和Baltimore发现逆转录酶;1981年, Gilbert和Sanger建立DNA测序方法;1985年, Mullis发明多聚酶链式反应(PCR)技术;1990年,美国启动人类基因组计划(HGP);1994年,中国人类基因组计划启动;2001年,美、英等国完成人类基因组计划基本框架。随着后基因组时代的到来,表观遗传研究异军突起,使得核酸的研究仍位于生命科学最前沿。

第二节 核酸的化学组成

组成核酸的元素有 C、H、O、N、P 等,其中 N 含量为 15%~16%,磷含量为 9%~10%。由于核酸分子的磷含量比较恒定,因此核酸定量测定的经典方法是以测定磷含量百分比来代表核酸量。

核酸经水解可得到核苷酸,核苷酸是核酸的基本单位,核酸就是由很多个单核苷酸聚合形成的多核苷酸。核苷酸可被水解产生核苷和磷酸,核苷还可进一步水解,产生戊糖和含氮碱。因此,核酸是由含氮碱、戊糖及磷酸三种成分组成。戊糖包括核糖与脱氧核糖,区别在于 2 位上有无氧原子(图 1-1)。磷酸连接在戊糖的 5 位碳上。含氮碱(简称碱基)是嘌呤碱(purine)与嘧啶碱(pyrimidine)的衍生物。RNA 和 DNA 含有的共同碱基成分是腺嘌呤(adenine, A)、鸟嘌呤(guanine, G)和胞嘧啶(cytosine, C)。两者的区别是 RNA 含有尿嘧啶(uracil, U),而 DNA 含有胸腺嘧啶(thymine, T)。它们的结构如图 1-2 所示。

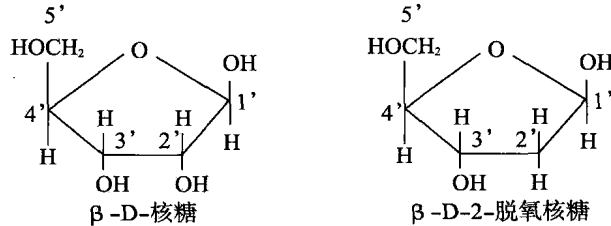


图 1-1 戊糖

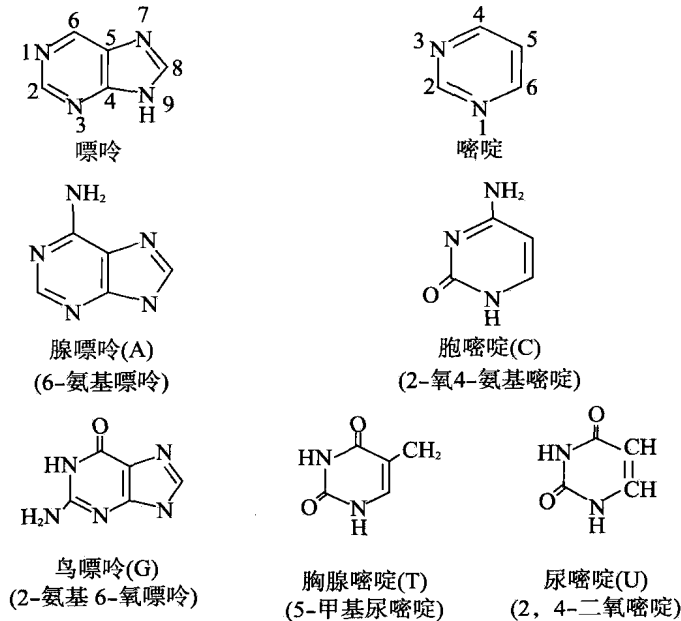


图 1-2 含氮碱基

有些核酸中含有修饰碱基(或称稀有碱基),这些碱基大多是在上述嘌呤或嘧啶碱不同部位甲基化(methylation)或进行其他的化学修饰而形成的衍生物。例如有些 DNA 分子中含有 5-甲基胞嘧啶(m5C),某些 RNA 分子中含有 1-甲基腺嘌呤(m1A)、2,2-二甲基鸟嘌呤(m2G)和 5,6-二氢尿嘧啶(DHU)等。

嘌呤碱和嘧啶碱一般多不易溶于水,对 250~280 nm 波长的紫外光有较强的吸收,对 260 nm 光波的吸收能力最大。由于碱基是核酸的基本组成成分,所有核酸(包括 DNA 和 RNA)的共同特点是对 260 nm 处的紫外光有最大的吸收值。

第三节 DNA 的结构和功能

自从 1953 年 Watson 和 Crick 发现 DNA 的双螺旋分子构象以来,随着 DNA 重组技术的建立和发展,以及人类基因组计划的完成和后基因组计划的实施,人们正在不断地揭开 DNA 的奥秘。

一、DNA 的结构

(一) DNA 的一级结构

DNA 是以 4 种脱氧核苷酸为基本单元组成的多聚核苷酸,脱氧核苷酸之间通过磷酸二酯键相连接。

1. 脱氧核糖核苷酸的组成

脱氧核苷酸由脱氧核糖、磷酸和碱基 3 种成分组成。脱氧核糖是在 2' 位没有羟基的五碳糖。碱基有两类:嘌呤和嘧啶。嘧啶又有两种:胸腺嘧啶(T)和胞嘧啶(C)。嘌呤也有两种:腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)。磷酸基团连接于脱氧核糖的 3' 位羟基或 5' 位羟基,碱基连接于脱氧核糖的 1' 位。DNA 分子中有 4 种脱氧核糖核苷酸:腺嘌呤脱氧核苷酸(dAMP)、鸟嘌呤脱氧核苷酸(dGMP)、胸腺嘧啶脱氧核苷酸(dTMP)和胞嘧啶脱氧核苷酸(dCMP)。4 种脱氧核苷酸的 3 种成分中脱氧核糖和磷酸是相同的,唯有碱基不同。

2. 脱氧核糖核苷酸的连接

DNA 分子构成的基本单元脱氧核苷酸通过 3',5'-磷酸二酯键相连接,多聚脱氧核苷酸的两端,一端(上)是脱氧核糖的 5' 碳原子的羟基端(磷酸),另一端(下)是脱氧核糖的 3' 碳原子的羟基端(磷酸),因此,多聚核苷酸有方向性。

3. DNA 的一级结构

DNA 的一级结构就是指 DNA 分子中脱氧核糖核苷酸的排列顺序及连接方式。一个单链 DNA 分子的大小以其构成的单核苷酸数量多少来表示。4 种核苷酸的组成差别仅在碱基,因此通常在称呼上以碱基代表单核苷酸,以 A、G、C 和 T 代表 4 种核苷酸。单链 DNA 分子的大小以碱基数量表示,双链 DNA 分子以碱基对(bp)数量表示,4 种脱氧核苷酸(碱基)在 DNA 分子中的排列顺序称 DNA 的一级结构。DNA 分子中的碱基排列顺序是 DNA 分子的重要属性,它以碱基排列顺序储存遗传信息,或者说以碱基排列顺序编码多肽、蛋白质或 RNA。

4. 线性 DNA 末端——端粒

端粒(telomere)是一段 DNA 序列和蛋白质形成的一种复合体,是真核细胞染色体末端所

特有的结构。端粒的 DNA 序列相当保守,其 DNA 一般由多个串联在一起的短寡聚核苷酸(5~8 bp)序列组成。表示形式为 $5'-(T_xG_y)_n/3'-(A_xC_y)_n$,其中 x, y 为碱基数,一般在 1~4 之间;碱基对成分因种属而异,例如人类和脊椎动物为 T_2G_3 ,纤毛原生物为 T_4G_4 ,四膜虫为 T_2G_4 ,酵母为 $TG(1\sim3)$; n 是短寡核苷酸序列的重复次数,可以多达数千。在不同的生物中变化较大,小鼠的端粒 DNA 达 1~50 kb,人类的端粒 DNA 为 5~15 kb。

端粒的功能如同它的序列一样相当保守,主要有:①保证线性 DNA 的完整复制:DNA 复制不能从头起始,需要有一个 RNA 引物来起始 DNA 的复制。这样对线状 DNA 来说,其末端就不能用细胞正常的 DNA 复制机制进行复制,随后链 3'末端作模板所合成的 RNA 引物被水解后,留下一个 3'末端凸出的缺口,无法完成复制。但是,由于染色体末端存在着端粒结构和细胞内存在的端粒酶,以上难题就迎刃而解了。②保护染色体末端:研究发现,没有端粒结构的染色体不稳定,可见端粒结构有稳定染色体的功能,它与特异结合蛋白结合形成复合物,保护染色体不受核酸酶水解和不发生染色体的异常重组。③决定细胞的寿命:胚系细胞含有端粒酶,可以重建与延长端粒 DNA;而体细胞不表达端粒酶,端粒 DNA 随着复制次数的增加而逐步缩短。细胞每分裂一次,其端粒 DNA 缩短 50~200 bp;缩短至 1~4 kb 时,细胞就停止分裂,而进入凋亡。因此端粒决定细胞的寿命。若能重建端粒,则可维持细胞永生分裂,该细胞即成为永生性细胞,如表达端粒酶较多的恶性肿瘤细胞。

(二) DNA 的双螺旋结构

Watson 和 Crick 根据 DNA 纤维 X 射线晶体衍射图及其他试验资料,提出了 DNA 为右手双螺旋结构的科学假设。随后的研究表明, Watson 和 Crick 提出的双螺旋分子构象是 DNA 分子最为常见的构象,通常称为 B 型 DNA(B-DNA)。但是,大量的研究资料证明, DNA 分子的结构不是固定不变的,在不同的环境因素,如平衡离子类型、离子强度、特异结合蛋白等的存在与否,以及 DNA 分子碱基的组成都可促使 DNA 分子形成不同的构象。因此,细胞的 DNA 分子事实上存在着不同的二级结构的动态变化。生物体内核酸结构的动态变化,正是其发挥生物学功能所必需的。

1. 右手双螺旋 DNA 结构

(1) B 型 DNA 结构(图 1-3): Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋模型科学假设的主要依据有两个方面:①DNA 的碱基组成分析;②DNA 纤维的 X 射线晶体衍射分析。1949—1953 年之间,Chargaff 等定量分析了来自不同生物的 DNA 碱基组成,发现任何生物来源的 DNA 分子中,腺嘌呤脱氧核苷酸残基(A)的数量等于胸腺嘧啶脱氧核苷酸残基(T)的数量,鸟嘌呤脱氧核苷酸残基(G)的数量等于胞嘧啶脱氧核苷酸残基(C)的数量,而且 $A+G=T+C$,但 $A+T$ 不必等于 $C+G$ 。1950—1953 年,蛋白质化学家 Pauling 首先获得了完美的 DNA X 射线衍射图数据,但他没有首先利用自己的试验数据提出正确的 DNA 结构模型而提出了错误的三股螺旋模型。Pauling 的 X 射线晶体衍射图上有两个周期性规律,分别每隔 0.34 nm 和 3.4 nm 出现 1 次。Watson 和 Crick 主要根据这两方面的实验资料和数据提出 DNA 结构的双螺旋模型,其要点如下:①两条右手螺旋的多核苷酸链环绕同一中心轴盘旋;②两条链是反平行的,即一条链是 5'端在上,3'端在下,另一条链是 3'端在上,5'端在下;③两条链的磷酸-核糖主链在外,碱基在内;④碱基平面相互平行叠加,与中心轴垂直,每个碱基平面距离为 0.34 nm;螺旋转一圈要 10 个碱基,螺旋距为 3.4 nm;⑤两条链相对的碱基存在 $A=T, C=G$ 的互补关系,彼此靠氢键相互作用;G/C 对之间有 3 个氢键,而 A/T 对之间仅有 2 个氢键;⑥在 DNA 双螺旋分子上交替存在着大沟和小

沟;⑦C 和 G 核苷酸中的糖苷键是反式构型,脱氧核糖的折叠是 C2' 在内。

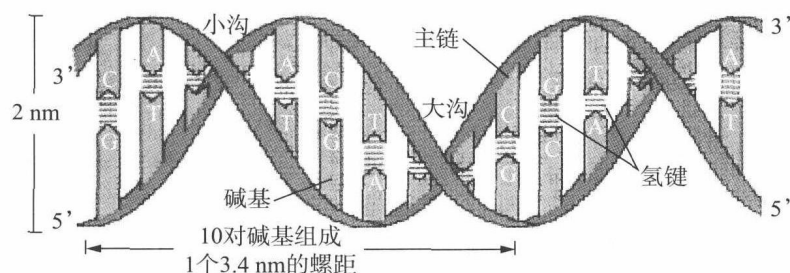


图 1-3 B 型双螺旋 DNA 的结构特征

(2) A 型 DNA 结构: 在不同的条件下, DNA 有不同的构象, 呈现结构的多态性, 有 A、B、C、D、E 和 Z 等多种构象。Watson 和 Crick 在分析 DNA 的双螺旋结构时, 就注意到存在 2 种构象状态 A 和 B, 他们认为 B 型 DNA 是含水更多的 DNA, 是具有主要生物学意义的构象, 因此很长一段时间里人们很少注意 B 型 DNA 以外的 DNA 构象的存在。

A 型 DNA 同 B 型 DNA 一样, 也是右手双螺旋结构, 具有共同的基本特征: ①两条链环绕同一中心轴盘旋; ②两条链反平行; ③两条链上的碱基以 A=T 和 C=G 互补配对, 并以氢键相互作用; ④C 和 G 的糖苷键也是反式构型。但 A 型和 B 型 DNA 也存在一些明显的差别: ①A 型 DNA 更紧密, 每个碱基平面距离为 0.256 nm, 每圈螺旋有 11 对碱基, 螺距为 2.8 nm; ②C 和 G 之间核苷酸中脱氧核糖的折叠不同, A 型 DNA 是 C3' 在内, B 型 DNA 是 C2' 在内; ③碱基的方向有微弱的差别, 导致大沟和小沟也有细微的不同。

2. 左手双螺旋 DNA 结构——Z 型 DNA 结构

1979 年 Wang 和 Rich 等在用 X 射线晶体衍射法分析人工合成的 DNA 小片段 d(CGCGCG) 的晶体时, 发现它是一个左手双螺旋结构, 称为 Z 型 DNA (Z-DNA)。同 A 和 B 型 DNA 一样, 它也由两条反平行的链组成, 两条链的碱基靠碱基间的氢键配对相互作用, 但同 A 和 B 型 DNA 不同的是螺旋旋转的方向相反, 呈左手螺旋。

Z-DNA 结构的主要特征: ①糖-磷酸主链的走向呈“之”字形, 分子呈左手螺旋构象; ②Z-DNA 较 B 型 DNA 细而“舒展”, 螺旋直径为 1.8 nm, 每个碱基平面的距离是 0.37 nm, 每一螺圈含 12 对碱基, 螺距为 4.5 nm; ③鸟嘌呤碱基绕糖苷键旋转呈顺式 (syn) 构型, 而胞嘧啶碱基仍和 B 型 DNA 相同, 是反式构型; Z-DNA 的糖环折叠是 C3' 在内, 而 B 型 DNA 是 C2' 在内; ④Z-DNA 仅有一条小沟, 且较深, 含有较高的负电荷密度。

(三) DNA 的超螺旋结构

DNA 一般都有一个封闭结构, 也就是说它没有游离末端, 如某些小病毒的基因组、细菌的染色体 DNA 和质粒, 都是环状 DNA。真核细胞基因组 DNA 虽然是线状的, 但由于分子巨大, 经反复盘绕折叠, 往往形成许多相当于环状的结构。这种封闭的环状结构使得 DNA 分子能形成超螺旋结构。

超螺旋 (supercoil), 简单地说就是螺旋的螺旋, 或者我们假定双螺旋存在一个中心轴, 这条中心轴再形成螺旋。超螺旋的形成不是一个随机过程, 而是在 DNA 双螺旋存在一种结构张力时才会形成。由于 DNA 双螺旋的盘绕过度或不足, 使 DNA 分子处于一种张力状态。在封闭环状 (closed circle) DNA 分子中这种张力不能释放出来, 就会形成超螺旋。哪怕是环状

DNA 分子中有一条链有缺口时就不能形成超螺旋,因为开链分子或有缺口的环状结构能将超螺旋形成时产生的张力释放出来。凡没有超螺旋结构的 DNA 分子,无论它是开链还是环状结构都称为松弛型。

超螺旋有两种不同的形式,中心轴的盘绕同双螺旋两条链盘绕的方向相反,也就是同解链方向相同的,称负超螺旋;反之,称正超螺旋。负超螺旋能让 DNA 分子通过调整双螺旋本身的结构来减少这种张力,一般是减少每个碱基对的旋转,即放松两股链彼此的盘绕,所以把具有负超螺旋的 DNA 叫盘绕不足(underwound)DNA。如果负超螺旋产生的张力足够大的话,可能破坏局部的碱基配对,而使双螺旋局部解链;而正超螺旋却使螺旋更加紧密,所以把正超螺旋叫过分盘绕(overwound)DNA。几乎所有天然 DNA 都是负超螺旋。最先在 SV₄₀ DNA 分子中发现存在负超螺旋结构,后来在细菌质粒、噬菌体等小型 DNA 分子中也发现其存在,大肠埃希菌染色体 DNA,乃至真核细胞染色体 DNA 都具有负超螺旋结构。

超螺旋可能有两方面的生物学意义:①超螺旋 DNA 比松弛型 DNA 更紧密,使 DNA 分子体积变得更小,得以包装在细胞内;②超螺旋能影响双螺旋的解链程度,因而影响 DNA 分子与其他分子,如酶、蛋白质分子的相互作用。

(四) DNA 的其他结构

1. DNA 的三股螺旋结构

DNA 三股螺旋概念是在 1957 年提出来的。当时有人在人工合成的右手螺旋多聚物 (U)_n(A)_n(U)_n 中观察到三股螺旋结构,这是 RNA 分子间的三股螺旋。此后有人研究证明, DNA 也能形成三股螺旋。如聚 dA 链首先与一条聚 dT 链互补形成双螺旋,然后,在高盐条件下,另一条 dT 链再同双螺旋形成三股螺旋结构。双螺旋结构通过 Watson-Crick 氢键稳定,而三股螺旋尚需通过 Hoogsteen 氢键稳定。至 1987 年,有人在一种质粒的酸性溶液中发现了分子内的三股螺旋 DNA,此种构型的 DNA 称为 H-DNA。分子内三段螺旋,是双螺旋 DNA 分子中一条链的某一节段,通过链的折叠与同一分子中 DNA 嘌呤嘧啶双螺旋(其中一条链只有嘌呤 A、G,另一条链只有嘧啶 C、T)节段结合而形成的。近年来,对于短的寡聚核苷酸与双螺旋 DNA 中的寡聚嘧啶、寡聚嘌呤序列结合进行了许多研究,合成的寡核苷酸与富含 AT 和 GC 碱基对节段的 DNA 形成一种分子间的三股螺旋 DNA,从而可在转录水平上阻止基因的转录。这就是所谓的反基因策略,或称反基因技术(有别于反义 RNA)。

2. 单链 DNA 结构

无论是染色体 DNA,还是质粒 DNA,或是病毒 DNA,绝大多数都以双股螺旋的构型存在。但也有极少数生物的 DNA 是单链环状的,主要是一些小分子的病毒 DNA,例如噬菌体 ϕ X174、噬菌体 M13 的 DNA 都是单链环状的。单链环状 DNA 噬菌体,当它们感染宿主细胞,进入宿主细胞后,即在宿主细胞内复制出一条互补链,形成双链环状 DNA,称复制型 DNA,从而再通过半保留复制机制进行复制,并转录出 RNA,合成噬菌体蛋白质。到感染后期,仅复制一条链形成单链环状 DNA 噬菌体的后代。

二、DNA 的功能

(一) DNA 的生物学特性

核酸是遗传的物质基础,除少数 RNA 病毒外, DNA 是绝大多数生物的遗传信息储存者,所以 DNA 在生物大分子中占居中心位置。这是 DNA 的第一个功能。DNA 以它的巨大分子

和千变万化的核苷酸序列以及神奇的结构储存生物的全部信息。

DNA 通过自我复制能将储存的遗传信息稳定地、忠实地从一代细胞传至下一代细胞。这是 DNA 的第二个功能。DNA 的双螺旋结构和碱基互补配对原则(氢键相互作用)是 DNA 复制,遗传信息从亲代细胞传至子代细胞的基础;众多的酶、蛋白质因子参与复制是 DNA 复制能忠实、稳定进行的保证。

遗传信息的表达是将 DNA 储存的遗传信息通过转录和翻译产生蛋白质。DNA 的核苷酸序列决定所有细胞内的 RNA 核苷酸和蛋白质的氨基酸序列,从而体现生物体的生命活动和生命现象。这是 DNA 的第三个功能。

生物的遗传性和变异性同时存在,以适应环境的变化。生物的遗传性是基因稳定性的表现,变异性是基因变异(基因突变)的表现,遗传和变异都是普遍存在的自然现象。在一定范围内的突变是生物产生新的遗传特性和新的生物物种所必需的,没有突变,就没有生物进化,生物界就不能前进,所以变异也可以说是 DNA 的一个功能。

(二) DNA 的复制

1. DNA 的半保留复制

Watson 和 Crick 在发现 DNA 双螺旋结构的同时,就曾设想 DNA 的复制以半保留方式进行。即亲代 DNA 双螺旋解开,每一条链均可作为模板,按碱基互补配对原则合成一条新的互补链,从而生成两个与原来 DNA 结构相同的子代 DNA 分子。每一子代 DNA 分子含有亲代 DNA 的一条“旧”的链和一条新生链。这种复制方式称为半保留复制(semiconservative replication)。它使亲代 DNA 所含的信息以极高的准确度传递给子代 DNA 分子。许多实验证实,不论原核生物还是真核生物,其 DNA 的复制均是半保留复制。

2. DNA 复制的半不连续性

DNA 是由两条方向相反的互补链组成,一条链是 $5' \rightarrow 3'$ 方向;另一条链是 $3' \rightarrow 5'$ 方向。两条链都能作为模板合成子代 DNA。但 DNA 聚合酶只能催化 $5' \rightarrow 3'$ 方向的新生链合成。以复制叉移动方向(双螺旋解旋方向)作标准,与复制叉移动方向相同,即以 $3' \rightarrow 5'$ 方向的模板链,其互补的新生链是从 $5' \rightarrow 3'$ 连续合成,这条模板链称为前导链(leading strand)。前导链的互补链称为随后链(lagging strand),它的方向是 $5' \rightarrow 3'$,其新生的互补链不能按 $3' \rightarrow 5'$ 方向连续合成,故只能按 $5' \rightarrow 3'$ 方向合成许多 100~2 000 bp 的冈崎片段(Okazaki fragment),再经连接酶等催化后形成一条连续的新生链。这种前导链连续复制,随后链不连续复制的方式称 DNA 复制的半不连续性(semidiscontinuity)。

3. DNA 复制的双向性

研究 DNA 复制的方向常用温度敏感性变异菌株并结合放射自显影技术。大肠埃希菌的一个温度敏感株在 42°C 时能使 DNA 在完成复制后不再开始新的复制过程,而在 25°C 时复制功能恢复。将此温度敏感株先在 42°C 培养一段时间后,再移入 25°C ,使其在同一时间开始复制,细菌同步生长。先将这种同步生长的突变株在含低比度 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 中生长几分钟,再移入高比度 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 中作脉冲标记。然后对菌体 DNA 作放射自显影分析。若复制是单向的,高比度与低比度的放射性分布应该邻近;若复制是双向的,高比度与低比度的放射性分布应该分离。实验表明,大多数 DNA 复制是双向的(bidirection);有些病毒(如腺病毒、 $\Phi 29$ 噬菌体等)及线粒体 DNA 的复制是单向进行的。

第四节 染色质和染色体

真核生物的遗传物质主要存在于细胞核内,因它能被碱性染料着色,而被称之为染色体。根据电镜分析,染色体是一种细微纤丝,而其生化成分包括 DNA、组蛋白(histone)、非组蛋白(nonhistone)以及少量 RNA。所以,染色体是核酸的主要所在地,两者的功能也密不可分。

染色质是一种动态结构,它在有丝分裂时浓缩组装形成染色体,在有丝分裂末期逐渐解旋,间期变成染色质。染色体和染色质的差异,只不过是同一物质在间期和分裂期的不同形态结构的表现。

一、染色质的主要成分为核蛋白

染色质的主要化学成分是核蛋白,由核酸和蛋白质组成。核酸包括 DNA 与 RNA;蛋白质又包括组蛋白和非组蛋白。

(一) DNA 为染色质的主要成分之一

DNA 是遗传信息的携带者,含量稳定。人类二倍体组含 7.0×10^{-8} g DNA,因双螺旋 DNA 为 3.14×10^{-13} g/ μm ,从比值可以看出人二倍体细胞核的 DNA 长为 1.74 μm 。

真核细胞中染色质的 DNA 中含有不同的核苷酸重复序列(repeated sequences)。这些重复的序列可分为 3 类:高度重复、中等重复和单拷贝序列。

(二) 组蛋白是最保守的蛋白质之一

组蛋白属单纯蛋白质,溶于水、稀酸和稀碱,呈碱性。大多数存在于真核细胞核中,含量恒定,这是组蛋白的一个明显特性。凝胶电泳可将真核细胞染色质组蛋白分离出 5 种(H_1 、 H_2A 、 H_2B 、 H_3 和 H_4);又可根据赖氨酸和精氨酸的相对含量划分成三大类:富赖氨酸、稍富赖氨酸和富精氨酸组蛋白。

富含赖氨酸组蛋白(H_1)最容易从染色质上除去。它比其他组蛋白大 2 倍。一般认为组蛋白 H_1 包含在染色体的高级结构中,因而其功能也不同于其他组蛋白,还能显示对机体和组织的特异性差异。组蛋白 H_2A 和 H_2B 在种间表现比较保守;2 种富精氨酸组蛋白 H_3 和 H_4 具较强凝结染色质的作用,使得变异和进化在组蛋白分子上严格受阻。这 4 种组蛋白都没有种属或组织器官的特异性,且基本不随细胞的代谢状态而变化。从亲缘很远的小牛和豌豆组蛋白 H_4 的氨基酸残基的比较中发现,两者均有 102 个氨基酸残基,只有 2 个氨基酸发生置换。说明组蛋白的大部分在进化过程中都保留下来。这种进化保守性在维持染色质结构和功能方面起重要作用。

组蛋白的结构作用,是把长的 DNA 分子组织成更致密的非活动形式。这主要有赖于组蛋白碱性氨基酸所带正电荷和 DNA 分子磷酸根所带负电荷之间的静电相互吸引力。而分子的非极性区域可以与其他组蛋白或染色质非组蛋白质发生作用。

(三) 数量少而种类多的非组蛋白

非组蛋白是组蛋白之外的一大类染色质蛋白的总称。数量较少而种类极多,用双向凝胶电泳法可获得 500 多种不同组分的非组蛋白。其中除了维持染色质结构和催化各种酶促反应的结构蛋白及酶蛋白外,尚有少量组织特异性的调节蛋白。

非组蛋白与核质结构关系密切的,是一类称作 HMG(high mobility group)的蛋白质。这

类蛋白质水溶性强,在聚丙烯酰胺凝胶上电泳,有较高的迁移率。在核质中发现 HMG_1 和 HMG_2 ,而且证明它们是与 H_1 结合在一起的;而在核体核心颗粒中发现有 HMG_{14} 和 HMG_{17} 存在,它们和 DNA 结合在一起,和基因活化有关。

关于非组蛋白磷酸化调节基因转录的机制,现有如下假设:①非组蛋白识别 DNA 特异位点,并与之结合;②非组蛋白与 DNA 结合后,与组蛋白接近,进而诱导了非组蛋白磷酸化;③非组蛋白因磷酸化而增加其所带的负电荷,增强了与带正电荷的组蛋白结合,减弱了组蛋白与 DNA 结合,磷酸化非组蛋白与组蛋白复合物从 DNA 上脱落;④RNA 聚合酶与裸露的 DNA 结合,开始转录。有一些实验证明,以上 4 个环节是存在的,但还有许多不清楚的地方,尚待进一步研究证实。

(四) 其他

核内尚有少量的脂类、水和矿物质等。动物细胞核内脂类含量较多,尤其是磷脂。核中脂类和蛋白质结合在一起组成脂蛋白,主要存在于核膜中。矿物质主要有钾、钙和镁。

二、染色质的超微结构及组装

核小体(nucleosome)是染色质和染色体超微结构的基本单位。染色质 DNA 在细胞核内是分几个等级进行压缩的。这种压缩的最初级结构就是核小体。由核小体再进一步构成更高级的结构,使 DNA 的长度进一步压缩。无论是核小体,还是染色质的各个高层次结构,都有不同的模型,对它们的超微结构都正在进行实验探讨。

(一) 核小体由组蛋白与 DNA 结合而成

核小体的核心由 4 种组蛋白构成,而 DNA 盘绕在这种核心的表面。构成核小体核心的 4 种组蛋白是 H_2A 、 H_2B 、 H_3 和 H_4 ,每种有 2 个分子,所以它是一个组蛋白的八聚体。应用电镜和 X 射线衍射技术对核质核心结晶进行了研究,认为核小体核心并不呈球形,而比较近似一个短的圆柱体,为 $11\text{ nm} \times 11\text{ nm} \times 5.7\text{ nm}$ 的粒子。也有人在前述核小体结构的基础上提出了核小体的最新模型。按此模型,4 种组蛋白的八聚体的组合形式是, H_3 和 H_1 各二分子集合成的四聚体在中间,由 H_2A 和 H_2B 形成的 2 个二聚体分别排在四聚体的两侧。缠绕组蛋白八聚体的 DNA 长度有 146 个核苷酸对,即只够缠绕八聚体组蛋白 1.75 圈左右。研究认为组蛋白 H_1 位于 DNA 超螺旋进出核小体区的一侧,即与 DNA 进出核小体的位点相接触;它是一种位于核小体之外的蛋白质,其功能与染色质的浓缩有关(图 1-4)。

现在也把包括有 H_1 在内的核小体称为染色小体(chromatosome),而把不包括 H_1 的核小体核心称为核小体核心颗粒(nucleosome core particle)。许多研究工作表明,在核小体中不仅有组蛋白和 DNA,而且有非组蛋白;与核小体结构关系密切的是 HMG 非组蛋白。

(二) 染色体的四级结构模型

核小体为染色体的基本结构单位,即染色体的一级结构。长约 60 nm 的 DNA 形成核小体后,被压缩成 5.5 nm 高的线圈,所以其

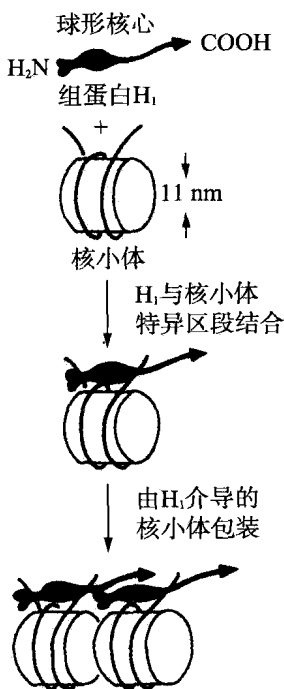


图 1-4