

PCR 技术在临床 医学中的应用

周薇薇 刘云庆 陈振栋 杜斌 隋洪 主编



黑龙江教育出版社

《PCR 技术在临床医学中的应用》编委会名单

主 编

周薇薇 刘云庆 陈振栋 杜 斌 隋 洪

副 主 编

(按姓氏笔划为序)

马 鑫	于海滨	王 丽	毛大军
叶 菲	孙晓鹏	李淑芝	陈淑华
陈耀国	杨立业	徐丽萍	徐善芝
颜丽囡			

编 委

(按姓氏笔划为序)

王 勇	王建业	王建新	王哲光
王晓红	朱 焱	李满库	周奎臣
周娜娜	徐玲芳	梁宪红	隋秀芝
魏世光			

前 言

PCR 即聚合酶链反应,是一种体外经 DNA 多聚酶催化,由特异性引物介导的选择性扩增特定 DNA 或 RNA 片段的实验室方法。自 1984 年由美国 PE 公司人类遗传研究部 Mullis 发明 PCR 以来,PCR 技术以惊人的速度在生命科学各领域迅速发展起来,并广泛应用于工业、农业、药学、医学等领域。PCR 扩增仪的发明,把 PCR 检测自动化变为可能。因 PCR 技术的简单、快速、并具有高度的特异性和敏感性,克服了现有的核酸技术的繁琐、高消耗和周期长的不足,故为科技工作者所接受。特别是在医学领域,PCR 技术更有其独特的应用价值,可为疾病的早期诊断、治疗及预防提供可靠的科学依据。由于 PCR 技术是近几年发展起来的新兴科学技术,国内有关 PCR 技术在临床医学方面的参考书很少。为此,我们查阅了近几年国内外有关 PCR 技术应用方面的资料,以及根据我们实验室开展 PCR 技术的经验,编写了《PCR 技术在临床医学中的应用》一书。本书各章节内容按病原体简介、与传统测定法比较、PCR 测定方法、方法评价、注意事项、临床意义及治疗等编写,着重于 PCR 技术在实验室及临床的实用性,把最新实用的方法介绍给读者。

编 者

1996 年 12 月于佳木斯

目 录

第一篇 基础知识	1
第一章 核酸的基础知识	1
第一节 概 述	1
第二节 核酸的化学组成	2
第三节 核酸的结构	5
第四节 核酸的性质及有关研究方法	11
第二章 生物的 G+C MOL%测定	18
第一节 浮力密度梯度离心法	18
第二节 热变性温度法	19
第三节 高效液相色谱(HPLC)法	19
第四节 DNA 溴化反应	20
第五节 脱嘌呤反应	20
第六节 pH 3.0 时的吸收比率(E_{260}/E_{280})	21
第七节 UV 吸收测定 DNA 碱基成分和浓度	22
第八节 其他方法	22
第三章 生物间 DNA 同源性测定	23
第一节 复性和杂交的动力学	23
第二节 复性速率法	24
第三节 固相杂交法	24
第四章 核酸的体外扩增技术	26
第一节 转录依赖的扩增系统	26
第二节 3SR 系统	26
第三节 连接酶链反应	27
第五章 PCR 反应的原理及种类	29
第一节 PCR 反应的基本原理	29
第二节 聚合酶链反应的种类	32
第六章 PCR 样品的制备	35
第一节 从全血细胞中快速提取 DNA	35
第二节 从血清中快速提取 DNA	36
第三节 从痰标本中提取 DNA	36
第四节 从尿标本中提取 DNA	37
第五节 从临床拭子标本中提取 DNA	37
第六节 从体液标本中提取 DNA	38
第七节 从组织标本中提取 DNA	39

第八节 从绒毛、羊水标本中提取 DNA	39
第九节 从细菌培养物中提取 DNA	40
第十节 从法医学标本中提取 DNA	41
第七章 PCR 扩增产物的检测分析	43
第一节 琼脂糖凝胶电泳法	43
第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳法	45
第三节 限制性内切酶分析法	46
第四节 核酸探针杂交鉴定	47
第五节 单链构型多态性分析法	49
第六节 酶免疫分析法	51
第七节 PCR 污染的处理	53
第二篇 临床应用	55
第八章 性传播疾病(STD)PCR 检测	55
第一节 淋病奈瑟氏菌的 PCR 检测	56
第二节 沙眼衣原体的 PCR 检测	58
第三节 解脲脲原体的 PCR 检测	60
第四节 人乳头瘤病毒的 PCR 检测	61
第五节 梅毒螺旋体的 PCR 检测	64
第六节 单纯疱疹病毒的 PCR 检测	67
第七节 巨细胞病毒的 PCR 检测	70
第八节 人类免疫缺陷病毒的 PCR 检测	73
第九节 性传播疾病多重 PCR 检测	78
第九章 病毒性肝炎的 PCR 检测	80
第一节 甲型肝炎病毒的 PCR 检测	81
第二节 乙型肝炎病毒的 PCR 检测	84
第三节 丙型肝炎病毒的 PCR 检测	87
第四节 丁型肝炎病毒的 PCR 检测	90
第五节 戊型肝炎病毒的 PCR 检测	92
第十章 呼吸道疾病病原体的 PCR 检测	95
第一节 结核杆菌 PCR 检测	95
第二节 肺炎支原体 PCR 检测	97
第三节 肺炎衣原体 PCR 检测	99
第四节 军团菌 PCR 检测	101
第五节 EB 病毒 PCR 检测	104
第十一章 常见寄生虫疾病病原体的 PCR 检测	107
第一节 弓形体 PCR 检测	107
第二节 恶性疟原虫 PCR 检测	110

第三节	间日疟原虫 PCR 检测	113
第四节	卡氏肺孢子虫 PCR 检测	114
第五节	隐孢子虫 PCR 检测	117
第六节	阿米巴原虫 PCR 检测	119
第七节	利什曼原虫 PCR 检测	123
第八节	蓝氏贾第鞭毛虫 PCR 检测	125
第九节	锥虫 PCR 检测	128
第十节	旋毛线虫 PCR 检测	131
第十二章	常见肿瘤基因标志的 PCR 检测	134
第一节	肿瘤概论	134
第二节	常见肿瘤 <i>ras</i> 癌基因突变 PCR 检测	146
第三节	胰腺癌 PCR 检测	150
第四节	p53 基因突变的 PCR 检测	154
第五节	APC 基因突变 PCR 检测	158
第六节	<i>C-erbB2</i> 基因扩增的 PCR 检测	160
第七节	DNA 聚合酶 β 基因突变	163
第八节	乳腺癌在腋下淋巴结中的微转移 PCR 测定	165
第十三章	造血系统恶性肿瘤基因标志的 PCR 检测	168
第一节	白血病概述	168
第二节	急性髓细胞白血病 AML1-MTG8 融合基因 PCR 检测	170
第三节	急性早幼粒细胞白血病 RARa/PML 和 PML/RARa 融合基因 mRNA PCR 检测	173
第四节	慢性粒细胞白血病 <i>bcr/abl</i> 融合基因 mRNA PCR 检测	176
第五节	急性淋巴细胞性白血病 E2A/PBX1 融合 mRNA PCR 检测	180
第六节	急性淋巴细胞白血病 T 细胞受体基因重排 PCR 检测	182
第七节	B 淋巴细胞白血病免疫球蛋白重链基因重排 PCR 检测	185
第八节	白血病患者体内的多药耐药基因表达 PCR 检测	187
第十四章	遗传病基因的 PCR 检测	191
第一节	地中海贫血的 PCR 检测	192
第二节	苯丙酮尿症 PCR 检测	196
第三节	血友病 PCR 检测	200
第四节	脆性 X 综合征 PCR 检测	204
第五节	DMD/BMD 进行性肌营养不良症 PCR 检测	208
第六节	G-6-PD 缺乏 PCR 检测	212
第七节	视网膜包裹素变性视紫红质基因 PCR 检测	214
第八节	视网膜母细胞瘤基因 PCR 检测	217
第九节	性别发育异常 SRY 基因 PCR 检测	219
第十节	镰状细胞性贫血 PCR 检测	221

第十五章 消化道疾病病原体的 PCR 检测.....	224
第一节 产不耐热肠毒(LT)大肠杆菌 PCR 检测.....	224
第二节 产耐热肠毒素大肠杆菌的 PCR 检测.....	226
第三节 痢疾志贺氏菌 PCR 检测.....	227
第四节 沙门杆菌属 PCR 检测.....	231
第五节 霍乱弧菌 PCR 检测.....	232
第六节 副溶血弧菌 PCR 检测.....	233
第七节 空肠弯曲菌 PCR 检测.....	234
第八节 用 PCR 检测幽门螺杆菌.....	235
第九节 轮状病毒 PCR 检测.....	238
第十节 耶尔森菌 PCR 检测.....	240
第十一节 婴幼儿腹泻腺病毒 PCR 检测.....	241
附录一 PCR 常用试剂配制.....	244
附录二 分子生物学常用名词解释.....	250
附录三 PCR 相关技术名词解释.....	254
附录四 PCR 技术常用数据.....	257

第一篇 基础知识

第一章 核酸的基础知识

第一节 概述

核酸和蛋白质是两大类重要的生物大分子，它们是生命现象的物质基础。研究证明，核酸是生物遗传信息的载体，它决定生物体的发育方向，在生物的生长、繁殖、遗传和变异等生命过程中发挥着主导作用，是分子生物学研究的重要内容。核酸的最早发现者是 F. Miescher，他于 1896 年从脓细胞中提取到一种富含磷元素的酸性物质，被命名为“核质”(Nuclein)，核酸(Nuclein acids)这一名词在 20 年后才被正式启用。1944 年 Avery 及其同事通过细菌转化这一著名实验，确立了核酸是遗传物质的重要地位，从此，人们对遗传物质的注意力逐渐从蛋白质转移到了核酸。

核酸研究中另一个划时代的工作是 Watson 和 Crick 于 1953 年创立的 DNA 双螺旋结构模型。模型的提出建立在人们对 DNA 下列三方面认识的基础上：①核酸化学研究中所获得的 DNA 化学组成及结构单元的认识，特别是 Chargaff 于 1950 年~1953 年发现的 DNA 化学组成的新事实，即 DNA 中四种碱基的比例关系为 $A/T=G/C=1$ ；② X 线衍射技术对 DNA 结晶的研究中所获得的一些原子结构的最新参数；③遗传学研究所积累的有关遗传信息的生物学属性的知识。综合这三方面的知识所创立的 DNA 双螺旋结构模型，不仅阐明了 DNA 分子的结构特征，而且提出了 DNA 作为执行生物遗传功能的分子，从亲代到子代的 DNA 复制过程中，遗传信息的传递方式及高度保真性，从此核酸的研究受到前所未有的重视。

三十多年来，核酸研究的进展日新月异，其影响之大，几乎涉及生命科学的各个领域，现代分子生物学的发展对生命本质的认识进入了一个崭新的天地。双螺旋结构创始人之一 Crick 于 1958 年提出了分子中心法则(Central dogma)，揭示了核酸与蛋白质间的内在关系，以及 RNA 作为遗传信息传递者的生物学功能，并提出了信息在复制、传递及表达过程中的一般规律，即 DNA → RNA → 蛋白质。1975 年 Sanger 等建立了快速测定核苷酸序列的新方法，从而大大推动了核酸一级结构的研究，随之核酸的人工合成也取得了很大的进展。70 年代初建立的基因重组技术是生命科学发展史上又一重大突破，并由此而产生了基因工程这一门崭新的学科。近 20 年间，基因工程技术不仅在揭示生命的奥秘、推动分子生物学与分子遗传学的发展方面发挥了重要作用，而且在工业、农业、医学、药学等领域创造了巨大的财富。1985 年由美国 PE 公司遗传部科学家 Mullis 发明的核酸体外扩增技术——聚合酶链反应(PCR)问世，很快在全球范围引起巨大反响，并以惊人的速度在生命科学诸多领域广泛应用。核酸——这个生命现象的物质基础，经过百余年的研究和认识，终于占据了

生物学研究领域的主要地位。

第二节 核酸的化学组成

一、核酸的基础组成成分

对各种组织细胞中核酸制剂的元素分析表明,它们均含有 C、H、O、N、P 和少量的 S 等元素。核酸是由若干核苷酸组成的大分子,所以核酸又称多核苷酸,核酸水解产生多种核苷酸,核苷酸再水解可产生核苷和磷酸,核苷进一步水解产生含氮碱基和戊糖。

(一)碱基(Base) 构成核苷酸的碱基成分分为嘌呤(Purine)和嘧啶(Pyrimidine)两类,前者主要指腺嘌呤(Adenine, A)和鸟嘌呤(Guanine, G), DNA 和 RNA 中均含有这二种碱基,后者主要指胞嘧啶(Cytosine, C), 胸腺嘧啶(Thymine, T)和尿嘧啶(Uracil, U), 胞嘧啶存在于 DNA 和 RNA 中, 胸腺嘧啶只存在于 DNA 中, 尿嘧啶只存在于 RNA 中, 这五种碱基的结构式如下(图 1-1-1)。嘌呤环上的 N-9 或嘧啶环上的 N-1 是构成核苷酸时与核糖(或脱氧核糖)形成糖苷键的位置。

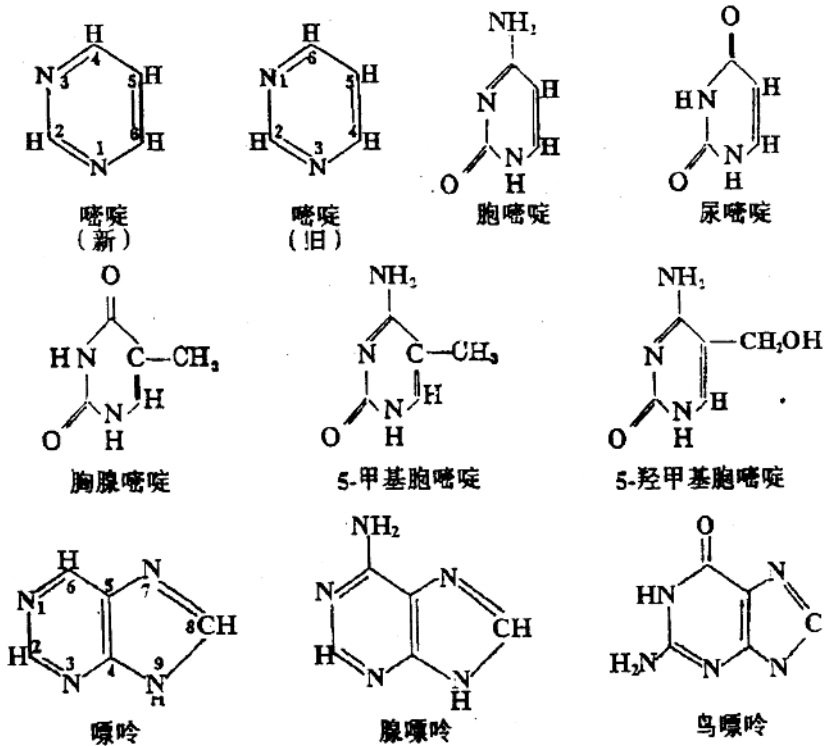


图 1-1-1 五种碱基的结构式

此外,核酸分子中还发现数十种修饰碱基,它是上述五种碱基环上的某一位置被一些化学集团(如甲基化、甲硫基化等)修饰后的衍生物,一般这些碱基在核酸中的含量稀少,在各种类型核酸中的分布也不均一。

(二)戊糖 RNA 中的戊糖是 D-核糖, DNA 中的戊糖是 D-2-脱氧核糖。D-核糖的 C-2 所连接的羟基脱去氧就是 D-2-脱氧核糖,二者的结构式如下(图 1-1-2)。戊糖 C-1 所连的羟基是与碱基形成戊糖苷键的基团,糖苷键的连接都是 β -构型。

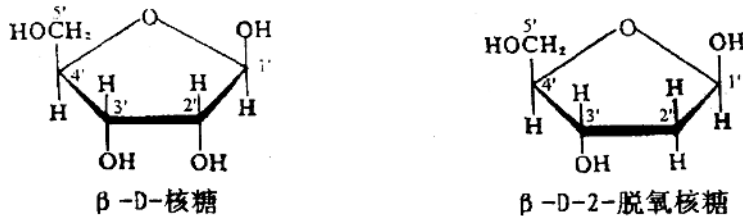


图 1-1-2 戊糖的结构式

(三)磷酸 每个核苷酸含有一个磷原子,以磷酸残基的形式与戊糖结合成磷酸二酯。当磷酸生成单酯或二酯后,酸性增强。

二、核酸的构件分子——单核苷酸

(一)核苷 核苷由戊糖和碱基脱水缩合而成,并以糖苷键相连接。糖环上的 C_1 与嘧啶碱上的 N_1 或嘌呤碱上的 N_9 相连接,形成 N-C 糖苷键。

核苷可分为核糖核苷和脱氧核糖核苷两大类,核糖与碱基缩合形成的化合物则称为脱氧核糖核苷。核酸中的主要核苷有八种。下图是腺苷和脱氧胞苷的结构式(图 1-1-3)。

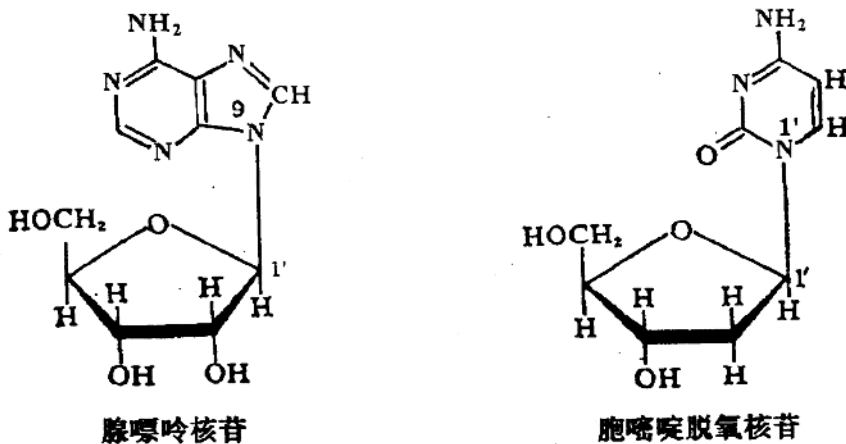


图 1-1-3 两种不同的核苷的结构

核苷没有还原性,核苷中 N-C 糖苷键对碱较稳定,而对酸不稳定,易被水解。各种核苷被酸水解的程度不同,脱氧核苷酸较核糖核苷易水解,嘌呤核苷较嘧啶核苷易被水解,利用这一性质可将两类核苷相区别。

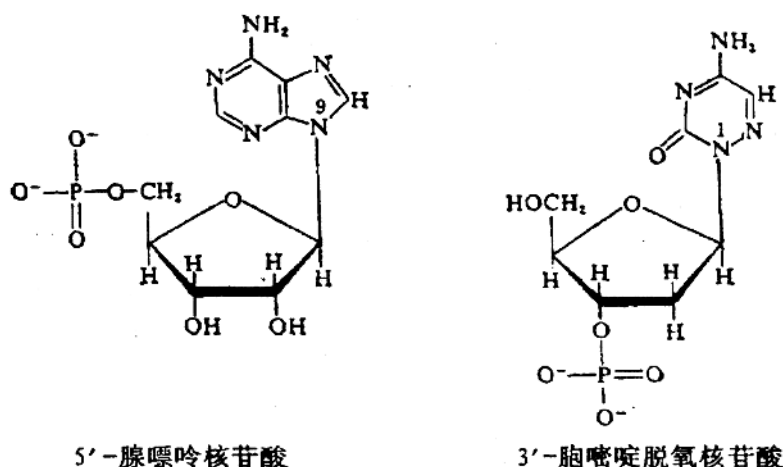


图 1-1-4 两种核苷酸的结构

表 1-1-1 核酸的主要化学成分

	碱基	戊糖	核苷	核苷酸
脱氧核糖核酸	adenine(A)	deoxyribose(dRib)	adenosine(AR)	deoxyadenosine mophosphate
	腺嘌呤	2-脱氧-D-核糖	腺苷	脱氧腺苷酸(dAMP)
	guanine(G)		guanosine(GR)	deoxyguanosine mophosphate
	鸟嘌呤		鸟苷	脱氧鸟苷酸(dGMP)
	cytosine(C)		cytidine(CR)	deoxycytidine mophosphate
DNA	胞嘧啶		胞苷	脱氧胞苷酸(dCMP)
	thymine(T)		thymidine(TR)	deoxythymidine mophosphate
	胸腺嘧啶		胸苷	脱氧胸苷酸(dTMP)
核糖核酸	adenine(A)	ribose(Rib)	adenosine(AR)	adenosine mophosphate
	腺嘌呤	D-核糖	腺苷	腺苷酸(AMP)
	guanine(G)		guanosine(GR)	guanosine mophosphate
	鸟嘌呤		鸟苷	鸟苷酸(GMP)
	cytosine(C)		cytidine(CR)	cytidine mophosphate
RNA	胞嘧啶		胞苷	胞苷酸(CMP)
	uracil(U)		uridine(UR)	uridine mophosphate
	尿嘧啶		尿苷	尿苷酸(UMP)

(二)核苷酸 核苷酸是核苷的磷酸酯,由核苷中戊糖上的羟基与磷酸的缩合而成。核苷与磷酸结合后,磷酸残基上仍存在两个可游离的羟基,呈酸性,故称为核苷酸。核苷酸亦分为核糖核酸及脱氧核糖核苷酸两大类。核糖核苷的磷酸酯称为核糖核苷酸(或核苷酸),

是组成 RNA 的基本单位；脱氧核糖核苷的磷酸酯则称为脱氧核糖核苷酸(或脱氧核苷酸)，是组成 DNA 的基本单位。这两类核苷酸因所含碱基不同又可分为多种，而每种核苷酸又因其磷酸酯键位置不同而具有几种异构体。核糖核苷的糖环中在 2'、3'、5'位上都有一个自由羟基，能各自与磷酸缩合并通过酯键相连，形成三种异构体，分别称为 2'-核苷酸、3'-核苷酸和 5'-核苷酸。脱氧核苷酸糖环中只在 3'、5'位各有一个自由羟基，因此只能形成两种异构体，分别称为 3'-脱氧核糖核苷酸或 5'-脱氧核糖核苷酸。生物体内存在的游离核苷酸多是 5'-核苷酸及 5'-脱氧核苷酸。图 1-1-4 是两种核苷酸的代表式。当然核酸分子中的核苷酸都以残基形式存在，但在细胞内含有多种游离的核苷酸，其中包括一磷酸核苷、二磷酸核苷和三磷酸核苷，各种核苷三磷酸是合成 RNA 的前体，而各种脱氧核苷三磷酸则是合成 DNA 的前体。

核酸分子中的主要化学成分小结于表 1-1-1 中。

第三节 核酸的结构

一、核苷酸的连接

(一) 3',5'-磷酸二酯键 核酸是由众多核苷酸聚合而形成的多聚核苷酸(Polynucleotide)，相邻二个核苷酸之间的连接键即 3',5'-磷酸二酯键。这种连接可理解为核苷酸糖基上的 3'位羟基与相邻 5'核苷酸的磷酸残基之间，以及核苷酸糖基上的 5'位羟基与相邻 3'核苷酸的磷酸残基之间形成的二个酯键，多个核苷酸残基以这种方式连接而成的链式分子就是核酸。无论是 DNA 还是 RNA，其基本结构都是如此，故又称 DNA 链或 RNA 链。

寡核苷酸(Oligonucleotide) 这是与核酸有关的文献中常出现的一个术语，一般是指二至十个核苷酸残基以磷酸二酯键连接而成的线性多核苷酸片段。但在使用这一术语时，对核苷酸残基的数目并无严格规定，在不少文献中，把含有三十甚至更多个核苷酸残基的多核苷酸分子也称作寡核苷酸。寡核苷酸目前已可由仪器自动合成，它可作为 DNA 合成的引物(Primer)、基因探针(Probe)等，在现代分子生物学研究中具有广泛的用途。

(二) 核酸链的简写式 核酸分子的简写式是为了更简单明了的叙述高度复杂的核酸分子而使用的一些简单表示式。它所表示的主要内容是核酸链中的核苷酸。下面介绍二种常用的简写式。

字符式 书写一条多核苷酸链时，用英文大写字母缩写符号代表碱基，用小写英文字母 p 代表磷酸残基。核酸分子中的糖基、糖苷键和酯键等均省略不写，将碱基和磷酸相间排列即可。因省略了糖基，故不再注解“脱氧”与否，凡简写式中出现 T 就视为 DNA 链，出现 U 则视为 RNA 链。以 5'和 3'链的末端及方向，分别置于简写式的左右二端。下面是分别代表 DNA 链和 RNA 链片段的二个简写式：

5'pApCpTpTpApApCpG 3' DNA

5'pApCpUpUpApApCpG 3' RNA

此式可进一步简化为：

5'pACTTGAACG 3'

5'pACUUGAACG 3'

上述简写式的 5'-末端均含有一个磷酸残基(与糖基的 C-5'位上的羟基相连), 3'-末端含有一个自由羟基(与糖基的 C-3'位相连)。若 5'端不写 p 则表示 5'-末端为自由羟基, 双链 DNA 分子的简写式多采用省略了磷酸残基的写法, 在上述简式的基础上再增加一条互补链 (Complementary stand)即可, 链间的配对碱基用短纵线相连或省略, 错配(mismatch)碱基对错行书写在互补链的上下两边, 如下所示:

5'GGA ATC TCAT3'

5'CCT TAG AGTA3'

5'GGA ATC TCAT3'

5'CCT TAC AGTA3' (含 G/C 错配)

线条式 在字符书写基础上, 以垂线(位于碱基之下)和斜线(位于垂线与 p 之间)分别表示糖基和磷酸酯链, 如图所示(图 1-1-5):



图 1-1-5 核酸分子(片段)的简写式

上式中, 斜线与垂线中部的交点为糖基的 C-3'位, 斜线与垂线下端的交点为糖基的 C-5'位, 这一书写式也可用于表示双链片段。

因此, 从上面我们不难看出, 简写式表示的中心含义就是核酸分子的一级结构, 即核酸分子中的核苷酸(或碱基)排列顺序。

二、DNA 分子结构

(一)DNA 的碱基组成

绝大多数天然 DNA 分子中含有 A、G、C 和 T 四种碱基。化学分析表明, 各种生物来源的 DNA 的碱基有下列规律:

1. 所有 DNA 分子中 A 与 T 的摩尔数相等, 即 $A=T$; G 与 C 的摩尔数相等, 即 $G=C$ 。因此, 嘌呤碱的总含量等于嘧啶碱的总含量, 即 $A+G=C+T$ 。
2. 不同种的 DNA, 碱基组成及排列顺序不同, 这表明 DNA 的碱基组成具有种属的异性。
3. 同种生物体的不同组织及器官内, DNA 具有相同的碱基组成及排列顺序, 这表明 DNA 的碱基组成及顺序没有组织及器官的特异性。
4. 年龄、营养状态及环境的变化(非致突变因素的变化)不影响 DNA 的碱基组成和排列顺序。

这些规律的发现,提示了 A 与 T、G 与 C 之间碱基互补的可能性,为 DNA 双螺旋结构模型的建立提供了重要的根据,并为通过测定碱基含量和核酸分子杂交,比较生物种的遗传同源性奠定了基础。

(二)DNA 的一级结构

DNA 的一级结构是指 DNA 分子中核苷酸的排列顺序, DNA 顺序(或序列)是这一概念的简称。由于核苷酸之间的差异仅仅是碱基的不同,故又可称为碱基序列。由于脱氧核糖核苷酸中 C_2 上不含羟基, C_1 又与碱基相连接,所以唯一可能形成的键是 3',5'-磷酸二酯键。因此, DNA 没有侧链而呈线性分子,并且通常人们采用固定方式的线条或文字进行表示。

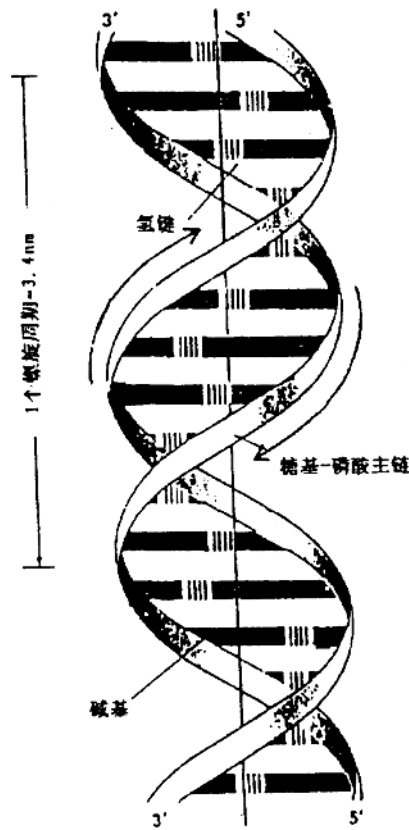


图 1-1-6 DNA 双螺旋结构模型

(三)DNA 的二级结构

DNA 的二级结构是指 DNA 的双螺旋结构。1953 年 Wastson 和 Crick 在总结前人工作的基础上,研究并提出了著名的双螺旋结构模型。该模型的建立,揭开了分子生物学研究的序幕,也为分子遗传学的研究奠定了基础。DNA 双螺旋机构的基本要点是:

1. DNA 分子由两条反向平行的多核苷酸所组成, 它们以一个共同的轴为中心, 盘绕成右手双螺旋结构(图 1-1-6)。

2. 碱基位于双螺旋的内侧, 两条多核苷酸链通过碱基之间的氢键相连接, 碱基对的平面与螺旋纵轴相垂直。相邻碱基对平面的距离为 0.34nm, 相邻碱基的螺旋角度为 36° , 双螺旋的每一转有 10 对核苷酸, 故每圈高度为 3.4nm, 双螺旋的平均直径为 2nm。

3. 碱基对有一定的规律性, 其中一条链上的嘌呤必须与另一条链上的嘧啶碱相配对, 即两条链上的 A 与 T 结合, 其距离才正好与双螺旋的直径相吻合, 否则均不能形成双螺旋结构。

根据对碱基构象研究的结果, 确定 A 与 T 配对形成两个氢键; G 与 C 配对则形成三个氢键(图 1-1-7), 故 G 与 C 间的连接更稳定。显然, G 与 C 含量高的 DNA 分子耐受变性因素(如加热变性或碱变性)的能力较强。这种 A-T、G-C 间的配对规律, 称之为碱基互补原则。两个配对碱基彼此为互补碱基, 同一 DNA 分子的两条多核苷酸单链彼此为互补链。因此, 按照碱基互补原则, 当一条链的核苷酸顺序确定以后, 则另一条链必定具有与其互补的碱基序列。就目前所知, 除某些噬菌体(如 ϕ_{x174} 和 M13 等)的 DNA 为单链分子外, 绝大多数天然 DNA 具有双螺旋结构。

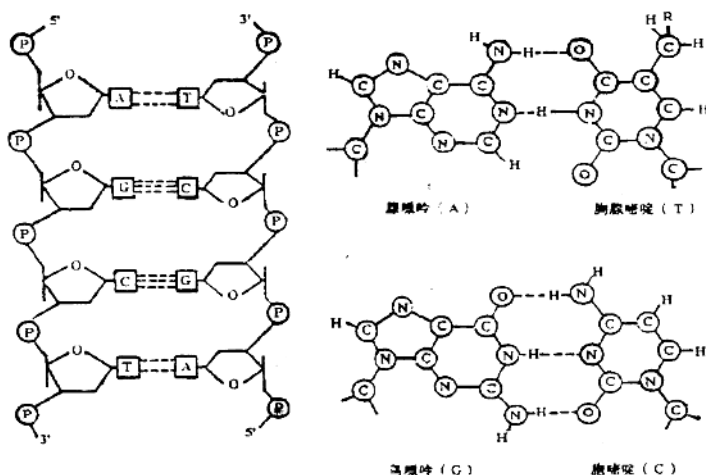


图 1-1-7 两条多核苷酸链的并联及其 A-T、G-C 配对

以上所讨论的是经典的 DNA 双螺旋结构模型, 其结构特征属 B 型右手螺旋(简称 B-DNA), 它是最接近天然 DNA 处于溶液状态的结构形式, 也是目前了解得最深入的 DNA 结构之一。

B-DNA 双螺旋结构模型最重要的成就是引出了碱基互补配对规律, 具有重要的生物学意义。它是 DNA 复制、转录和反转录的分子基础, 关系到生物遗传信息的传递与表达, 在这个基础上所创立的许多核酸的实验技术和方法, 在生命科学研究中发挥了重要的作用。

DNA 二级结构除右手螺旋的 B-DNA 外还有其他构型, 研究较多的 Z 型左手螺旋结构

(简称 Z-DNA)就是代表之一。Z-DNA 是 1979 年 Rich 从人工合成的 d(CG CG CG) 序列 DNA 结晶的 X 射线衍射研究中获得的结果。Z-DNA 与 B-DNA 的主要差别在于 Z-DNA 呈左手螺旋, 且主链上 P 原子的走向不象 B-DNA 那样是连续的连线, 而是呈锯齿状(Zigzag), Z-DNA 由此也存在着差异(见表 1-1-2)。DNA 人工合成技术的发展使我们能对任意顺序的 DNA 片段进行结构分析, 从此项研究中获得的结果, 丰富了人们对 DNA 结构的认识。许多研究除证实 DNA 分子存在着 B 型、Z 型等不同构型的二级结构外, 还说明了 DNA 一级结构对其二级结构具有影响的事实, 重复的 CG 序列所形成的左手螺旋就是一个典型的例子, 尽管这种作用不能与蛋白质分子结构中的同一命题相提并论, 但它无疑是值得重视的因素。

表 1-1-2 B-DNA 与 Z-DNA 的比较

比较内容	B-DNA	Z-DNA
螺旋手性	右旋	左旋
螺旋周期的核苷酸数目	10	12
螺旋直径	20	18Å
碱基平面的间距	3.4Å	3.7Å
螺距	34Å	45Å
相邻碱基对间的转角	36Å	60Å
轴心与碱基的关系	穿过碱基对	不穿过碱基对

(四)DNA 的三级结构 DNA 的三级结构是指 DNA 双螺旋的扭曲构象。现已发现, 线粒体、叶绿体、细菌质粒及某些疾病的 DNA 的双螺旋分子可以形成闭合环状, 它们能在二级结构的基础上进一步扭曲成闭环状或开环状及麻花状超螺旋等形式的三级结构(图 1-1-8)。天然 DNA 分子很大, 大肠杆菌染色体 DNA 由 4×10^6 碱基对(bp)组成, 长度 1.4×10^6 nm, 人的染色体 DNA 为 2.9×10^9 bp, 长度为 9.9×10^8 nm, 就长度直径之比而言, DNA 是一种极不对称的分子, 真核细胞染色体 DNA 的结构极为复杂, 双螺旋 DNA 先盘绕在组蛋白的小球上, 形成核小体。核小体上盘绕形成更高层次的结构, 许多核小体由 DNA 连成念珠状结构的染色质细丝, 由染色质细丝进一步盘绕形成更高层次的结构(图 1-1-8)。

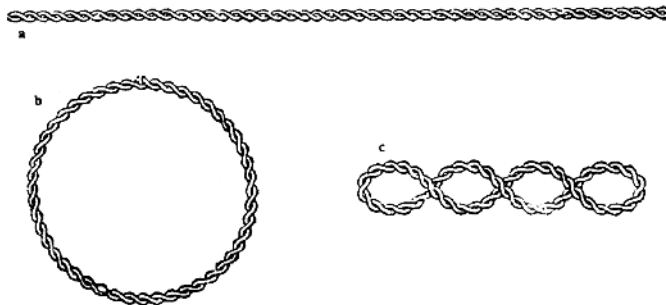


图 1-1-8 DNA 的二、三级结构

二、RNA 的分子结构

组成 RNA 的基本单位是 AMP、GMP、CMP 和 UMP。RNA 通常以单形式存在。RNA 的分子一般比 DNA 小得多，由数十个至数千个核苷酸通过 3',5'-磷酸二酯键相连接。尽管 RNA 分子中核糖环上 C_{2'}上有一个羟基，但并不形成 2',5'-磷酸二酯键。用牛脾磷酸二酯酶降解天然 RNA 时，降解产物中只有 3'-核苷酸，而无 2'-核苷酸。

生物体内 RNA 一般都是在以 DNA 为模板合成的某些 RNA 病毒中，RNA 复制酶也催化以 RNA 为模板的 RNA 合成。天然 RNA 并不象 DNA 那样都是双螺旋结构，而是单链线形分子。只有局部地区为双螺旋结构。这些双链结构是由于 RNA 单链分子通过自身弯曲回折，导致链内互补碱基相迁，由氢键结合而成的。而不能配对的区域则形成突环，被排斥在双螺旋结构之外，呈发卡状结构，RNA 中的双螺旋结构为 A-DNA 类型的结构。A-DNA 也是为两条反向平行的多核苷的链，也为右手螺旋，但与 B-DNA 相比，其螺体较宽而短，碱基对与中心轴倾角为 19°。

无论动物、植物还是微生物，它们的细胞中都含有三类主要的 RNA(即 rRNA，mRNA 和 tRNA)，它们均通过 DNA 转录合成，并分别在蛋白质生物合成中发挥不同的作用。

(一)rRNA 及其特点

rRNA(Ribosomal RNA，rRNA)核糖体核糖核酸在细胞内含量最多，约占 RNA 总量的 80%以上。rRNA 不能单独执行功能，它能与多种蛋白质结合成核糖核蛋白体，而核糖核蛋白体在蛋白质生物合成中起“装配机”的作用。

rRNA 的分子量较大，代谢稳定，结构相当复杂。原核生物的 rRNA 分三类：即 5SrRNA、16S rRNA 和 23S rRNA。真核生物的 rRNA 分为四类：即 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA。这里的 S 为大分子物质在超速离心时的沉降系数单位，其数值为 10⁻³s。现在已经对某些原核生物及真核生物的 rRNA 进行测序分析，并通过核酸的分子杂交，证明细菌的 rRNA 与线粒体及叶绿体之间具有同源性。进而为深入研究这些细胞器的来源提供了条件。原核生物的核蛋白体均由大小两种亚基组成，表 1-1-3 列出了 rRNA 的种类及其在亚基上的分布。

表 1-1-3 核糖蛋白体包含的 rRNA 和蛋白质

来 源	亚 基	rRNA 种类	蛋白质种类
真核生物	大 60S	5S, 5.8S, 28S	36~50
	小 40S	18S	30~32
原核生物	大 50S	5S, 23S	34
	小 30S	16S	21

(二)tRNA 及其特点

tRNA(Transfer RNA，tRNA)转运核糖核酸，它的分子量较小，都在 23 000~28 000 道尔顿之间，由 70 个~90 个核苷酸所组成。tRNA 在蛋白质生物合成的起始、DNA 反转录合成及其他代谢调节中起重要作用。细胞内 tRNA 的种类很多，每一种氨基酸都有其相应的一种或几种 tRNA。许多 tRNA 的一级结构早被阐明，对 tRNA 的二、三级结构也已较清楚。tRNA 结构的共同特点是：

1. 分子中具有较多的稀有碱基；