

医学分子生物学

Medical Molecular Biology

主 编

张迺薇

副主编

童坦君



北京医科大学出版社

医学分子生物学

主 编 张迺蘅

副主编 童坦君

4X48130

编 委 (以姓氏笔划为序)

丁桂凤	马大龙	马康涛	于英心	王文清
王申五	王新娟	王 琰	王镜岩	方伟岗
冯树异	孙品伟	汤 健	杜国光	李平风
陈雅娴	吴希如	吴加金	吴鹤龄	陈清棠
陈诗书	陈慰峰	张迺蘅	张宗玉	周柔丽
周爱儒	贺福初	胡美浩	茹炳根	侯伟敏
贾弘提	徐家鸽	彭学敏	童坦君	董苍玉
蔡良婉				

北京医科大学出版社

YIXUE FENZI SHENGWUXUE

图书在版编目 (CIP) 数据

医学分子生物学/张迺衡主编. —北京: 北京医科大学出版社, 1999.9

ISBN 7-81034-944-9

I. 医… II. 张… III. 医药学: 分子生物学
IV. R318.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 46152 号

北京医科大学出版社出版发行
(100083 北京学院路 38 号 北京医科大学院内)

责任编辑: 孙品伟 安 林

责任校对: 齐 欣

责任印制: 郭桂兰

山东省莱芜市印刷厂印刷 新华书店经销

* * *

开本: 787×1092 1/16 印张: 74 字数: 1891 千字

1999 年 12 月第 1 版 1999 年 12 月山东第 1 次印刷 印数: 1—3100 册

定价: 158.00 元

前 言

分子生物学是生命科学中公认的一门带头学科，其理论与技术已在医学领域广泛应用。近年国内高等医药院校为本科生、研究生纷纷开设分子生物学有关课程。医学研究机构亦有类似讲座。但目前适合我国现状的系统性教材，为数尚少。教师、科研人员与本科生、研究生迫切需要系统的、综合性较强的医学分子生物学教材与参考书。本书即为满足这一需要而组织编写，主要介绍分子生物学的基础理论、技术原理及其在医学中的应用。在编写内容中基础理论与新进展并重，撰写时深入浅出，以期初学者与非专业人员能看懂，专业人员读后亦有收获。全书共 10 篇，45 章。1-4 篇介绍分子生物学基础知识，5-9 篇着重分子生物学与医学联系，第 10 篇介绍技术原理与信息处理。

本书由 40 余位专家共同执笔。各篇章的作者多为有关领域的资深学者，因而不少篇章不仅介绍了科学知识和研究进展，还贯穿了作者本人的心得体会。

医学分子生物学是分子生物学的一个重要分支，是从分子水平上研究人体在正常和疾病状态下生命活动及其规律的一门科学。它主要研究人体生物大分子和大分子体系的结构、功能、相互作用及其同疾病发生、发展的关系。所以，本书以医药院校各专业及普通高等院校生物系研究生，从事医学与生物科学教学与科研工作的教师、科研工作者为主要对象。由于医学分子生物学与生命学科的各分支息息相关，可见本书对生命学科的学生、学者都不失为了一本有价值的参考书。

本书力求反映医学分子生物学的研究成就，要求科学性、系统性、先进性和稳定性。每章列出亚目录以便查索，但编写加工时间短促，不当及错误之处在所难免，欢迎读者在使用过程中批评指正。本书编写及出版过程中得到北京医科大学及生化系同仁的大力支持，孙英同志负责大量编务组织工作及插图核对工作，在此谨致谢意。

张迺衡 童坦君

1999 年 1 月

目 次

第一篇 生物大分子及其相互作用	(1)
第一章 脱氧核糖核酸.....	(1)
第二章 核糖核酸	(31)
第三章 蛋白质	(70)
第四章 酶的结构与功能.....	(114)
第五章 生物大分子的相互作用.....	(138)
第二篇 细胞分子生物学基础	(167)
第六章 膜结构与物质转运.....	(167)
第七章 信号传导.....	(194)
第八章 线粒体.....	(218)
第九章 细胞核.....	(241)
第十章 细胞骨架与细胞运动.....	(260)
第十一章 细胞粘附分子与细胞外基质.....	(282)
第三篇 分子遗传学基础	(309)
第十二章 病毒的结构与复制.....	(309)
第十三章 原核生物基因组.....	(336)
第十四章 真核生物基因组.....	(347)
第十五章 遗传信息的复制.....	(359)
第十六章 遗传信息的转录.....	(395)
第十七章 遗传信息的翻译.....	(422)
第十八章 基因表达调控.....	(454)
第十九章 基因重组的分子机制.....	(493)
第二十章 DNA 损伤与修复.....	(518)
第四篇 生命起源与分子进化	(545)
第二十一章 生命起源.....	(545)
第二十二章 分子进化.....	(561)
第五篇 细胞增殖的分子机理	(577)
第二十三章 肽类生长因子.....	(577)
第二十四章 原癌基因与抑癌基因.....	(599)
第二十五章 细胞周期及其调控的分子机理.....	(644)
第六篇 分化、发育与衰老的分子生物学	(661)
第二十六章 个体发育与分化.....	(661)
第二十七章 衰老的分子机理.....	(679)
第七篇 神经、内分泌的分子生物学基础	(695)
第二十八章 脑功能的分子基础.....	(695)

目
录

第二十九章 神经信号传递的分子生物学基础	(716)
第三十章 内分泌的分子生物学	(735)
第八篇 免疫的分子基础	(775)
第三十一章 主要组织相容性复合体	(775)
第三十二章 B 细胞及免疫球蛋白	(790)
第三十三章 T 细胞及其受体	(807)
第三十四章 细胞因子	(830)
第三十五章 基因工程抗体	(851)
第九篇 临床医学的分子基础	(869)
第三十六章 肿瘤转移的分子生物学	(869)
第三十七章 心血管分子生物学的几个问题	(881)
第三十八章 神经疾病的分子基础	(894)
第三十九章 遗传病的分子基础	(913)
第四十章 基因诊断与基因治疗	(973)
第十篇 分子生物学技术及有关信息处理	(1003)
第四十一章 分子杂交术	(1003)
第四十二章 链反应技术	(1028)
第四十三章 基因工程	(1057)
第四十四章 蛋白质工程	(1102)
第四十五章 分子生物学研究中计算机与电子邮件的应用	(1138)



第一篇

生物大分子及其相互作用

第一章 脱氧核糖核酸

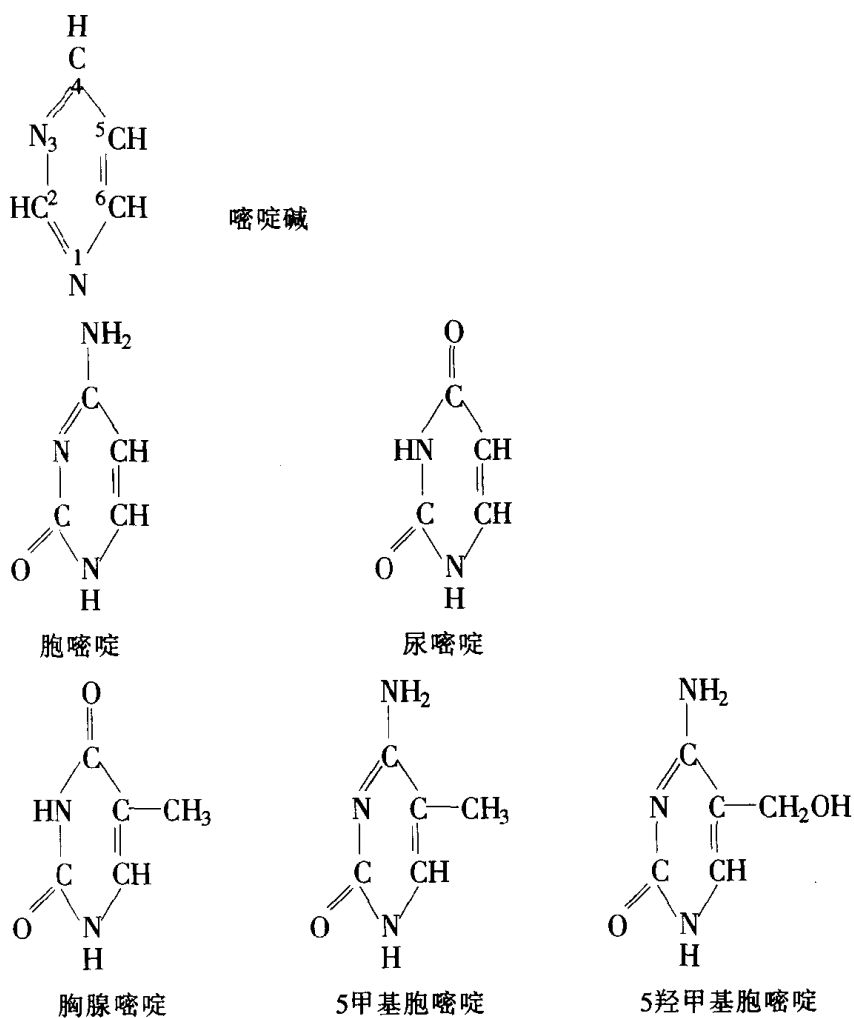
第一节 DNA 的基本组成成分	(2)
一、碱基	(2)
二、戊糖	(3)
三、核苷	(4)
四、核苷酸	(4)
第二节 DNA 的一级结构	(6)
一、DNA 的碱基组成	(6)
二、DNA 分子中脱氧核苷酸的连接方式	(7)
三、DNA 的一级结构特点	(7)
四、DNA 的一级结构分析	(9)
第三节 DNA 的二级结构	(13)
一、双螺旋结构特点	(13)
二、双螺旋结构的多态性	(14)
三、左手螺旋	(16)
四、异常 DNA 结构	(17)
第四节 DNA 的超螺旋	(22)
一、超螺旋	(22)
二、超螺旋的定量描述	(23)
三、超螺旋的能量	(24)
四、影响超螺旋结构的物质	(25)
第五节 DNA 的性质	(26)
第六节 生物体中的 DNA	(29)

第一节 DNA 的基本组成成分

核酸的基本构成单位是核苷酸。核酸又叫多聚核苷酸，由多个核苷酸连接而成。构成核酸的核苷酸有不同的种类，目前已发现数十种，但所有的核苷酸均由三种基本成份构成：碱基，戊糖和磷酸。

一、碱基

DNA 分子中的碱基均为含氮杂环化合物，分为两类：嘌呤碱 (purine) 和嘧啶碱 (pyrimidine)。嘌呤碱为合并的五员环和六员环，又分为腺嘌呤 (adenine, A) 和鸟嘌呤 (guanine, G)；嘧啶碱则分为胸腺嘧啶 (thymine, T) 和胞嘧啶 (cytosine, C)。碱基的命名有的源于其发现，如胸腺嘧啶即因分离于胸腺组织而得名。除了这四种碱基之外，DNA 中还有一些特别的碱基存在，它们绝大多数是四类碱基的衍生物，即在碱基的某些位置附加或取代某些基团。由于这些碱基在 DNA 中含量一般都很低，因此，把这些特别的碱基称为稀有碱基或修饰碱基，如 6-甲基嘌呤，5-甲基胞嘧啶及 5-羟基胞嘧啶等 (图 1-1)。一般来说，甲基嘌呤或甲基嘧啶等衍生物往往是核酸合成之后经过甲基化生成的，而这种甲基化，在某些情况下，可能起着保护 DNA 被限制性内切酶切割的作用。



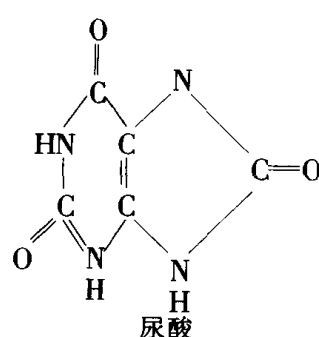
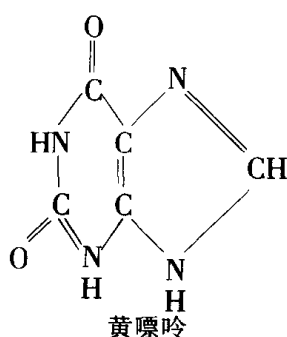
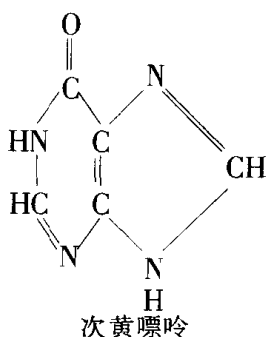
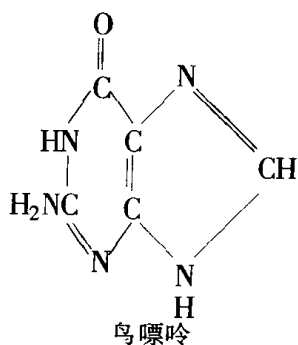
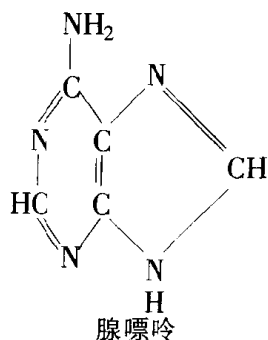
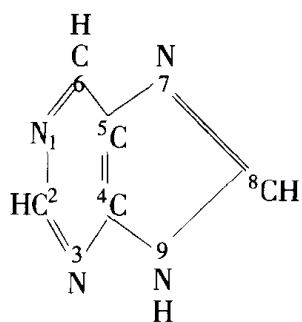
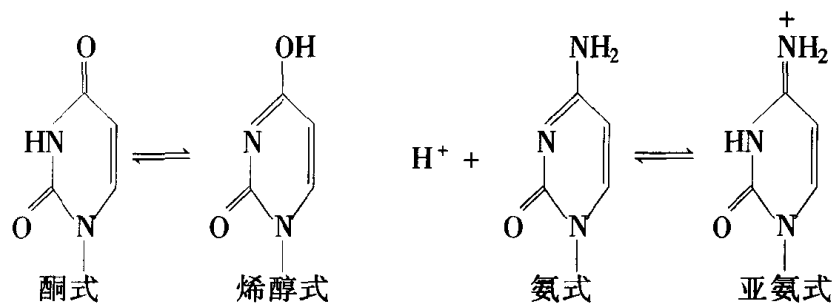


图 1-1 碱基的结构式

DNA 中碱基的酮基或氨基，均位于碱基氮原子的邻位，可以发生酮式 - 烯醇式或氨基 - 亚氨基之间的结构互变（如下所示），这种互变异构可引起 DNA 结构的变异，在基因突变和生物进化中具有重要作用。



二、戊糖

DNA 分子中的戊糖为 2-脱氧核糖，它以环状的呋喃糖形式出现。戊糖分子中碳原子的编号一般在其右上角要加一撇号，如 C3'，C5' 等，使之与碱基中的原子编号相区别。DNA 中的戊糖均为 β -D 构型（图 1-2），但其构象却有许多种。DNA 分子中戊糖的五元糖环不在一个平面，其中 C1' - O - C4' 这三个原子一般在一个平面上，而 C2' 和 C3' 偏离平面，这种偏离使戊糖具有不同的构象。若 C2' 或 C3' 偏离平面的方向与 C5' 同向则称为内型（endo）构象；若与 C5' 反向，则称为外型（exo）构象。DNA 分子中戊糖的构象以 C3' 或 C2' 的内型为

主 (图 1-3)。

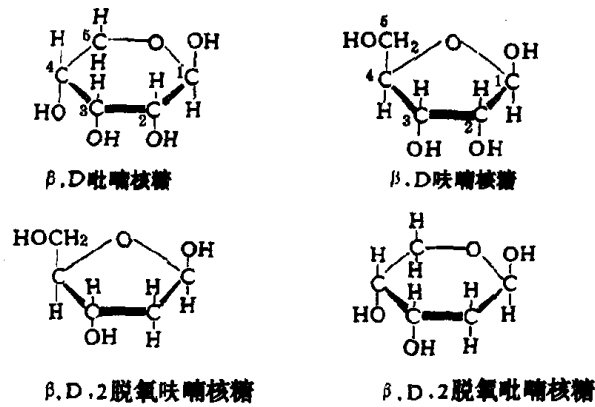


图 1-2 DNA 分子中戊糖的结构式

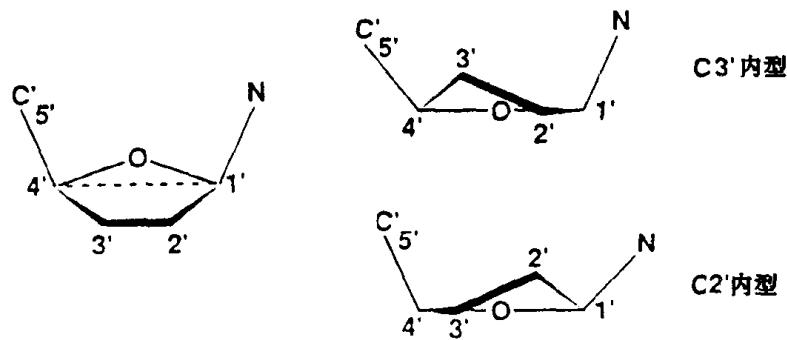


图 1-3 DNA 分子中戊糖的不同构象

三、核苷

核苷是核苷酸水解的中间产物，由戊糖分子中 C1' 上的羟基与嘧啶碱 N₁ 或嘌呤碱 N₉ 上的氢化合成水而形成的一类化合物。戊糖与碱基之间以 C1' - N 糖苷键相连。核苷具有顺式和反式两种构象，是由碱基绕 N - 糖苷键旋转而成。若嘌呤碱的嘧啶环或嘧啶碱的氧原子与戊糖的朝向相反为反式 (*anti*)，朝向相同则为顺式 (*syn*) (图 1-4)。

四、核苷酸

核苷酸是核酸的基本构成单位。核苷中戊糖分子 C5' 羟基与磷酸缩合成酯键就形成了核苷酸。构成 DNA 的核苷酸主要有四种：脱氧腺苷酸 (deoxyadenylic acid)；脱氧鸟苷酸 (deoxyguanylic acid)；脱氧胞苷酸 (deoxycytidylic acid) 和脱氧胸苷酸 (deoxythymidylic acid)。体内核苷酸除一磷酸核苷酸形式外，还有核苷的二磷酸酯和三磷酸酯形式。以脱氧腺苷酸为例，一磷酸腺苷 dAMP 中的磷酸可与另一分子磷酸以酸酐的方式缩合成二磷酸腺苷 (dADP)，再结合一分子磷酸则生成三磷酸腺苷 (dATP)。核苷酸分子中的磷酸还可与另一分子核苷酸中戊糖的游离羟基缩合形成二核苷酸，多次缩合则形成多核苷酸，即核酸。核苷酸还有环化的形式，它们主要是 3', 5' - 环化腺苷酸 (cAMP, adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate) 和 3', 5' - 环化鸟苷酸 (cGMP, guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate)，它们在细胞内代谢的调节和跨细胞膜信号传导中起着十分重要的作用 (图 1-5)。

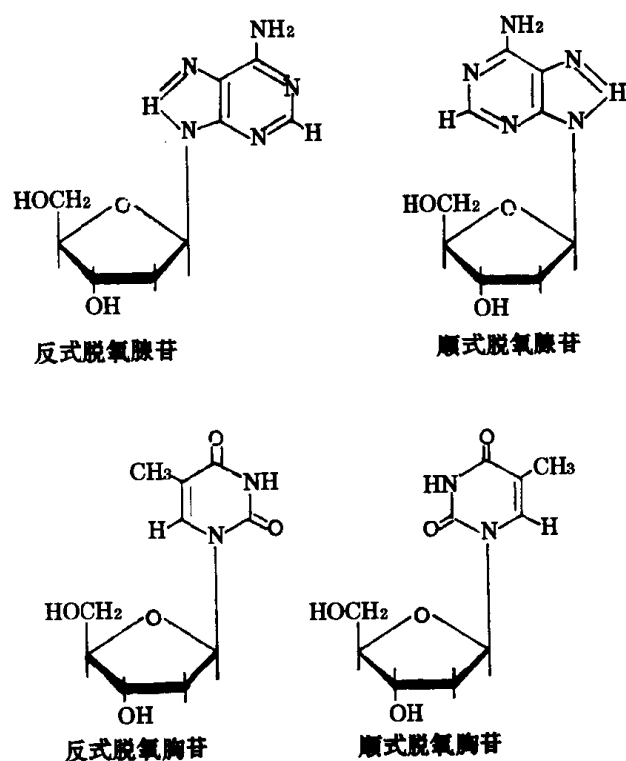


图 1-4 DNA 分子中戊糖与碱基的定位

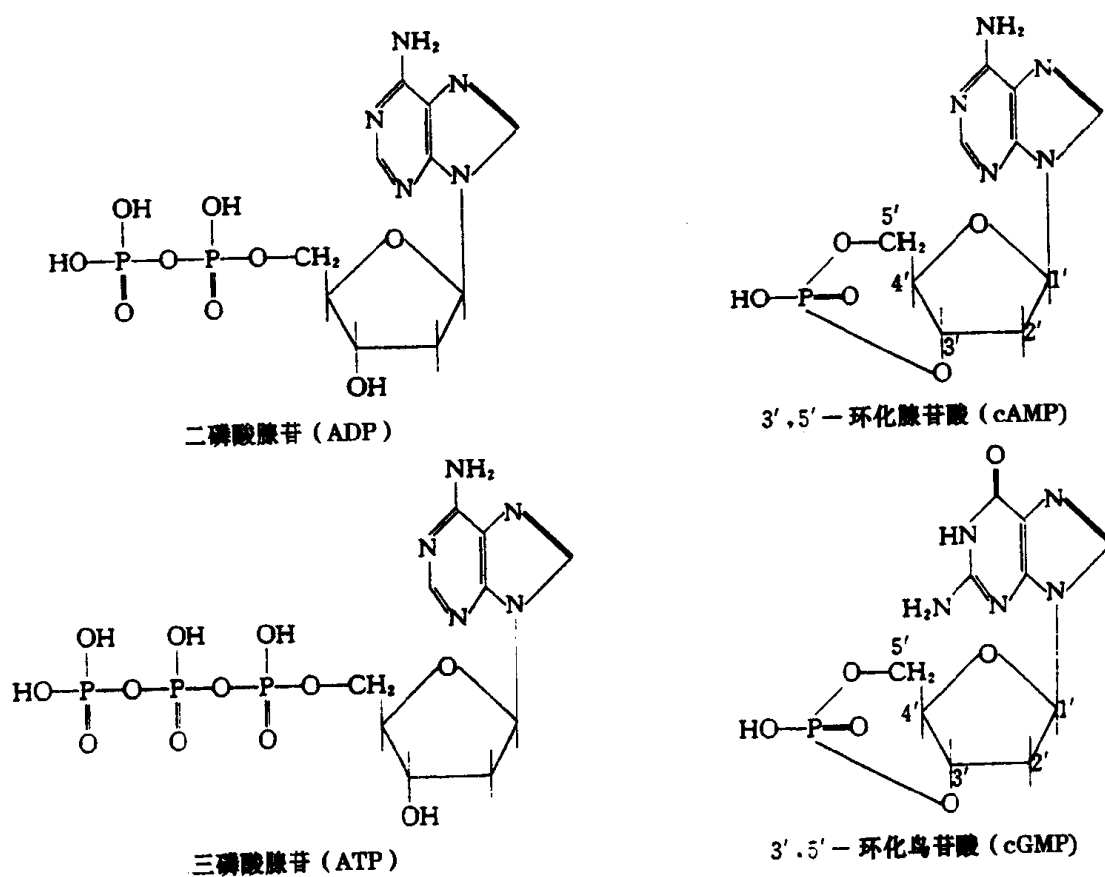


图 1-5 不同核苷酸的结构式

第二节 DNA 的一级结构

DNA 的结构与蛋白质相似，也可分为一级，二级和三级。一般而言，DNA 的一级结构是指 DNA 分子的核苷酸序列及其连接方式。

一、DNA 的碱基组成

上面已经提到，DNA 主要是由脱氧腺嘌呤核苷酸、脱氧鸟嘌呤核苷酸、脱氧胞嘧啶核苷酸及脱氧胸腺嘧啶核苷酸所组成。但是某些物种的 DNA 分子中也含有少量 5-甲基脱氧胞嘧啶核苷酸。这些脱氧核苷酸不同之处就在于所含含氮杂环碱基的不同。为了简便起见，一般在描述 DNA 的组成及结构时，只用其碱基的英文缩写，如 A、G、C、T 等。现将不同来源的一些 DNA 的脱氧核苷酸（以碱基英文缩写表达）组成列于表 1 中。从已分析的哺乳类动物 DNA 中，测得 G+C 含量约为 40%；这样，G 的克分子比应为 0.2，C 的也应为 0.2，而 A 的及 T 的自然也均为 0.3。由此，不难看出 DNA 中碱基总是以一个嘌呤碱与一个嘧啶碱配对存在于 DNA 分子中的。在表 1-1 中，只有两种大肠杆菌噬菌体是例外，这与其 DNA 分子是单链有关。

表 1-1 不同来源的 DNA 碱基组成

来 源	碱基克分子含量 (%)					$\frac{A}{T}$	$\frac{G}{C}$	G + C	$\frac{A+T}{G+C}$	$\frac{pur}{pyr}$
	A	G	C	T	5Mec					
产气荚膜杆菌	36.9	14.0	12.8	36.3	-	1.02	1.09	26.8	2.70	1.04
化脓性链球菌 1161	35.7	16.0	14.9	33.4	-	1.07	1.07	30.9	2.24	1.07
金黄色酿脓葡萄球菌 209	33.6	16.5	15.9	34.0	-	1.01	0.99	32.4	2.09	1.01
酿酒酵母	31.7	18.3	17.4	32.6	-	0.97	1.05	35.7	1.80	1.00
大肠杆菌	24.0	25.0	25.0	26.0	-	0.92	1.00	50.0	1.00	0.96
流产杆菌	21.0	29.0	28.9	21.1	-	1.00	1.00	57.9	0.73	1.00
粪产碱杆菌 440	16.5	33.9	32.8	16.8	-	0.98	1.03	66.7	0.50	1.02
草分支杆菌	16.3	33.8	33.5	16.5	-	0.99	1.01	67.3	0.49	1.00
藤黄八迭球菌	13.4	37.1	37.1	12.4	-	1.08	1.00	74.2	0.35	1.02
绿脓杆菌	16.8	33.0	34.0	16.2	-	1.04	0.97	67.0	0.49	0.99
大肠杆菌噬菌体 ϕ 1	24.4	19.9	21.7	34.1	-	0.72	0.92	41.6	1.41	0.79
大肠杆菌噬菌体 M13	23.3	21.1	19.8	35.8	-	0.65	1.07	40.9	1.44	0.80
杆菌噬体 S-1	30.7	20.6	20.2	28.5	-	1.08	1.02	40.8	1.45	1.05
麦 胚	27.3	22.7	16.8	27.1	6.0	1.01	1.00	45.5	1.19	1.00
玉 米	26.0	22.8	17.0	27.2	6.2	0.99	0.98	46.0	1.17	0.98
人 肝	30.3	19.5	19.9	30.3	-	1.00	0.98	39.4	1.53	0.99
人 脾	29.2	21.0	20.4	29.4	-	0.99	1.03	41.4	1.42	1.01
牛 脾	27.9	22.7	20.8	27.3	1.3	0.95	1.07	43.5	1.34	1.02
牛 肝	28.0	23.0	21.6	27.4	-	1.02	1.06	44.6	1.24	1.04
猪 肝	29.4	20.5	20.5	29.7	-	0.99	1.00	41.0	1.44	1.00
小鼠肝	29.2	21.7	19.7	29.4	-	0.99	1.10	41.4	1.42	1.04
大鼠肝	28.6	21.4	21.5	28.4	-	1.01	1.00	42.9	1.33	1.00
鸡 肝	30.3	22.0	19.7	28.0	-	1.08	1.12	41.7	1.40	1.10

注解：表中所收集的资料主要取自《生物化学手册》(Handbook of Biochemistry) 第二版。用此主要为表明不同物种间 DNA 组成的差异，而同一物种中不同器官及组织间，因资料出自不同测定者，故稍有差异。

比较不同种类生物体中 DNA 的碱基含量，不难发现一些异同。动物 DNA 中鸟嘌呤的与

胞嘧啶的克分子百分数之和大致集中在 39% 与 45% 之间，然而微生物 DNA 的则并非如此，而是分布在较大范围内。这种差异可以从 A + T/G + C 的比值中看出（表 1-1）。然而每一个物种的 DNA 都具有其特有的碱基组成。实际上，一种高等生物体的不同器官及组织中 DNA 的碱基都是完全相同的。换言之，每一个物种的 DNA 碱基组成都具有其特异之处，而同一物种的不同器官及组织的则是完全相同的。这些事实也可以从表 1-1 中 A + T/G + C 及 pur/pyr 等比值中得到证实。

二、DNA 分子中脱氧核苷酸的连接方式

DNA 是由许多脱氧核苷酸分子连接而成的。每个 DNA 分子的大小或所含的核苷酸数目是不一样的，其中短链脱氧多核苷酸又叫脱氧寡核苷酸（deoxyoligonucleotide）。尽管 DNA 分子之间存在差异，但 DNA 分子中的各个核苷酸之间的连接方式完全一样，都是通过前一个脱氧核苷酸的 3' 羟基与后一个分子的 5' 磷酸缩合生成 3', 5' 磷酸二酯键而彼此相连，在常见的 DNA 一级结构中，不存在 5' - 5' 或 3' - 3' 的核苷酸连接，DNA 的一级结构完全取决于其碱基的构成，即所谓的碱基序列（sequence）。因此，DNA 的一级结构即指其碱基序列。

由于 DNA 分子中脱氧核苷酸以一定方式相连，因此，每条 DNA 链具有两个不同的末端，戊糖 5' 位带有游离磷酸基的叫 5' 末端，3' 位带有游离羟基的叫 3' 末端，这样 DNA 分子也就具有了方向性，通常以 5' - 3' 方向为正向。DNA 一级结构的表示方法有多种，由繁至简如图所示（图 1-6）。

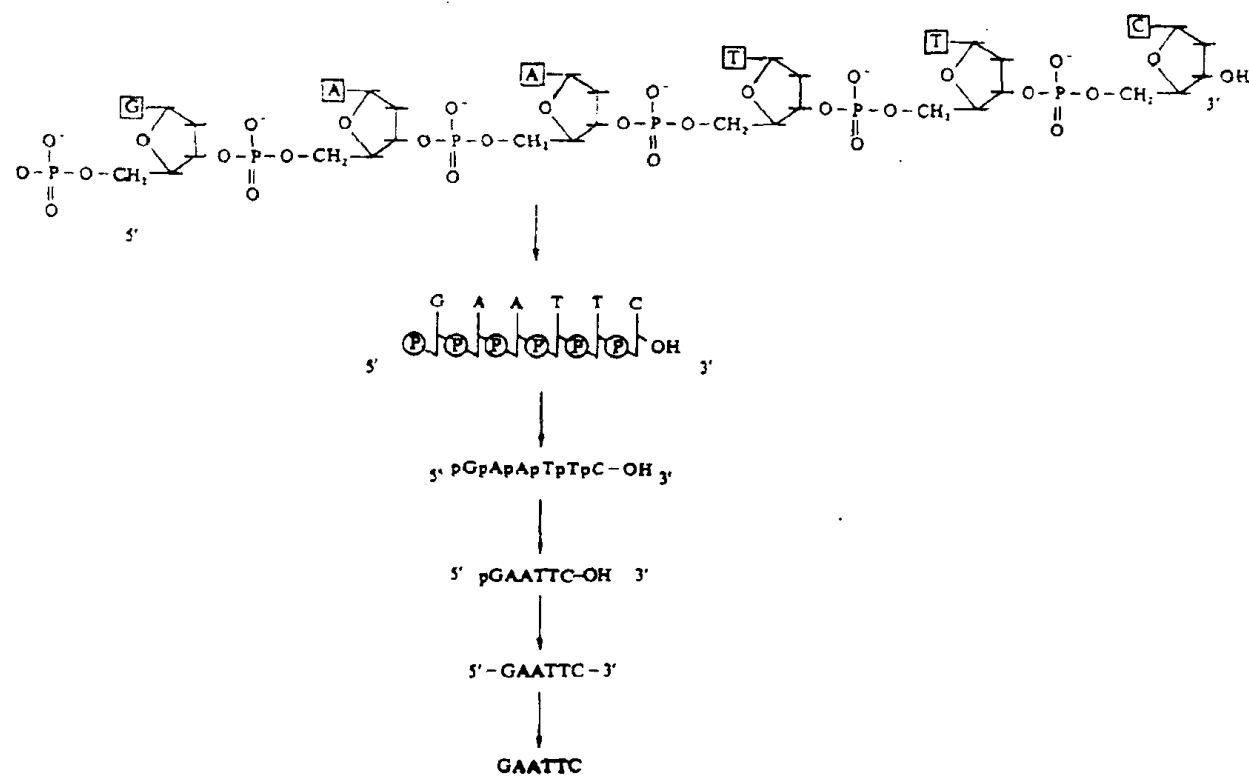


图 1-6 DNA 分子结构的表示方式

三、DNA 的一级结构特点

通过分析比较不同种类生物体中 DNA 的碱基序列发现，每一物种的 DNA 都具有其特有的碱基组成，同一物种的不同器官及组织的碱基组成完全一样，且不受年龄，生长状况及环

境因素的影响。另外，在真核细胞 DNA 中还发现某些核苷酸序列大量重复出现，这些核苷酸序列又叫重复序列，而在原核细胞基因组中几乎不存在。

重复序列的复性速度比一般序列快，它因此而被发现。核苷酸序列的重复次数越高，复性速度就越快。根据复性动力学，重复序列可分为两类：中度重复序列（moderately repetitive DNA）和高度重复序列 DNA（highly repetitive DNA）。中度重复序列 DNA 的拷贝数小于 10^6 ，以 100 至几千碱基对大小的 DNA 片段分布于单拷贝 DNA 大片段之间。某些中度重复序列 DNA 的特异产物为细胞所大量需要，如核蛋白体 RNA，转移 RNA 及组蛋白等。而大多数中度重复序列 DNA 虽然被转录，但所生成的 RNA 并无特殊功能。如 Alu 序列，是人类基因组中最多中度重复序列 DNA，含有 3 至 5 百万个拷贝；在猴，啮齿类，鸟类，两栖类动物，甚至粘液菌体内也都有其存在。

高度重复序列 DNA 由 10 个以下碱基组成，其拷贝数在 10^6 以上。由于其重复单位短小，有时又叫简单序列 DNA（simple sequence DNA）。这类序列几乎在所有高等真核细胞基因组中都存在，但其总量变化却很大。比如，哺乳类动物基因组中高度重复序列的含量不超过 10%，但在果蝇基因组中，其含量可达 50%。另外，高度重复序列与基因组 DNA 的浮力密度（ ρ ）往往存在一定的差异。DNA 的浮力密度（ ρ ）与其 G - C 含量存在如下关系： $\rho = 1.660 + 0.00098 (G - C\%) \text{ g/cm}^3$ 。

当不同 DNA 分子的 G - C 含量变化超过 5%，即可通过密度梯度离心将其区分开来。DNA 的浮力密度可以通过氯化铯密度梯度离心来测定，如果 DNA 分子之间存在浮力密度的差异将会沉降于不同位置。因此，经过密度梯度离心，高度重复序列 DNA 往往可以在基因组 DNA 的主带旁形成一条或多条小带，这取决于其 G - C 含量及其重复程度。高度重复序列 DNA 因而又叫随机 DNA 或卫星 DNA（satellite DNA）（图 1 - 7）。

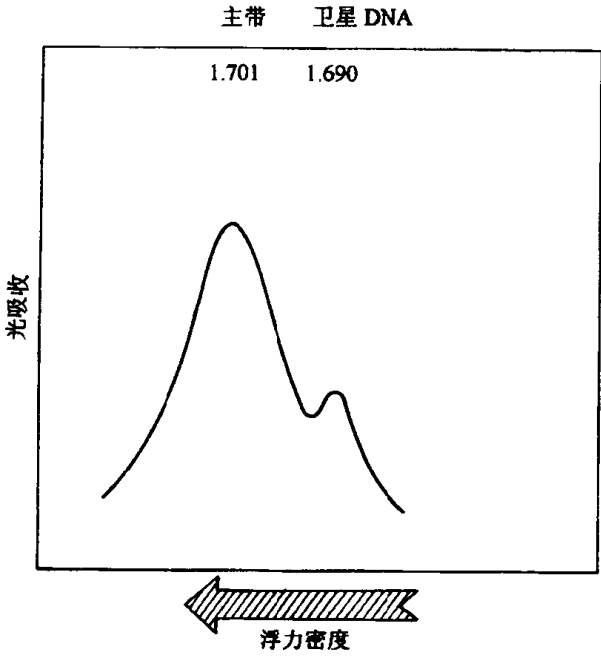


图 1 - 7 大鼠 DNA CsCl 密度梯度离心图谱

与其简单序列或致密结构相一致，卫星 DNA 在体内是不能转录的。原位杂交实验结果表明，卫星 DNA 定位于染色体异染色质区，与染色体着丝点相连，这表明其在染色体上可能存在一些结构上的功能。

除了上述两类重复序列，在原核及真核基因组中还发现不同组织特点的重复序列，如反转重复（inverted repeat），镜像重复（mirror repeat）及直接重复（direct repeat）。如图 1-8 所示，反转重复序列是由反方向互补的两个 DNA 片段组成，两个反转重复的序列又叫回文序列（palindrome sequence），在回文序列中，若按一定方向读两个反转重复序列的任何一条链，其碱基序列一样。此外，这两个反向重复的 DNA 序列不一定是邻接的，中间可以夹杂一些非重复的 DNA 序列，这样的序列又叫不完全对称反转重复序列（imperfect symmetrical inverted repeat sequence）。镜像重复序列由反方向完全相同的两个序列组成。与之类似，直接重复序列是由同一方向完全相同的两个序列组成，这是最为常见的重复序列形式。这三种重复序列都可引起 DNA 结构上的变异，形成一些特殊的 DNA 结构，如十字形结构，三链 DNA 及平行双链、四链 DNA 等。有关十字形结构及三链 DNA 的形成将在第三节中述及。

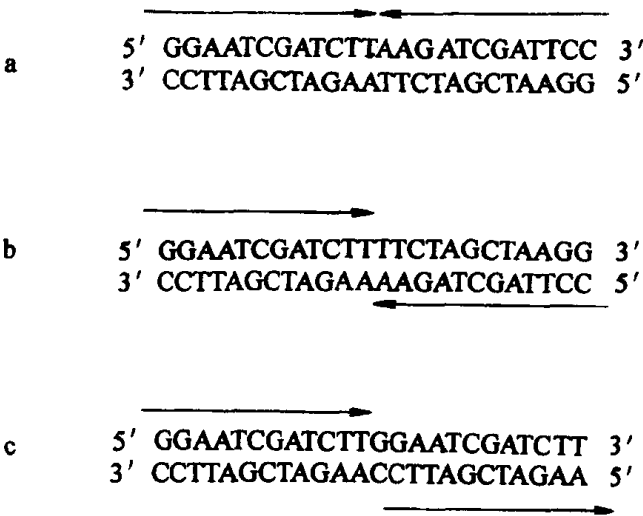


图 1-8 三种重复序列示意图

a. 反转重复 b. 镜像重复 c. 直接重复

四、DNA 的一级结构分析

对 DNA 一级结构进行分析测定的方法有多种，但从基本原理上讲，都是以双脱氧法和化学裂解法为基础。在这些方法中限制性内切酶的应用是不可缺少的。限制性内切酶首先将 DNA 切割成较短的片段，然后将各种片段在凝胶电泳中分离开，按限制性内切酶的作用位点在 DNA 分子或片段上相对排列位置作图，获得所谓物理图谱（physical mapping）。物理图谱不仅表明各种限制性片段在 DNA 上的排列顺序，同时也标明了各片段的大小。而后进行各片段的序列分析，最后拼凑所得结果，从而获得整个 DNA 分子的序列。

1. 双脱氧法（或链末端终止法）

此法首先于 1977 年由 F.Sanger 等建立，其实质是体外的 DNA 复制。即以待测 DNA 分子做模板，与之互补的一段寡聚核苷酸作为合成的引物，加入四种 dNTP 为原料，在 DNA 聚合酶的催化下合成新的 DNA 分子。

方法的第一步是准备单链 DNA 分子及与之互补的寡聚核苷酸引物，引物分子完全一样，以保证所有新合成的 DNA 分子起点都一样。同时反应体系中除四种 dNTP 外，再加入一定比例双脱氧核苷酸，如 ddTTP（其结构见图 1-9）。由于其脱氧核糖 3' 位不含羟基，它可以如正常 dNTP 一样随机而有效的加入新合成的多聚核苷酸链中，但却不能再生成新的 3', 5' 磷

酸二酯键而阻碍链的进一步延长，所以一旦 ddNTP 加入新合成的 DNA 链中，新链的合成即终止。

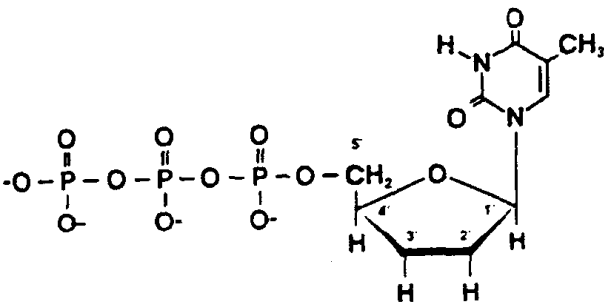


图 1-9 2', 3'-双脱氧胸腺嘧啶核苷酸 (ddTTP) 的结构式

以加入 ddATP 的反应体系为例，如果 ddATP 加入反应混合物中，则新链终止于模板链 T 所在的位置，新链的末端为 ddATP。但是并非所有新链都终止于此，正常 dATP 也可随机地加入这个位置使新链继续合成下去，其结果便产生了一组长短不同的新链，每条链的末端均为 ddATP。

新链的合成反应分四组同时进行，与如上所述加入 ddATP 组进行的反应一样，其余三组除加入四种正常 dNTP 做原料外，还分别加入 ddGTP，ddCTP 及 ddTTP，这样经过合成反应，就得到四组末端不同、长短各异的新链。

接下来进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，将不同长度的 DNA 链分离开来。若四种 dNTP 中的任何一种标记了少量的 α - P^{32} ，电泳后，经过放射自显影显示区带，就可直接读出 DNA 的核苷酸序列。如图 1-10 所示，图中泳动最远的为最小的 DNA 链，即合成第一个核苷酸的 DNA 链，图中显示为 C，则第一个合成的核苷酸为 C，依次类推，以下依次为 C，A，T...

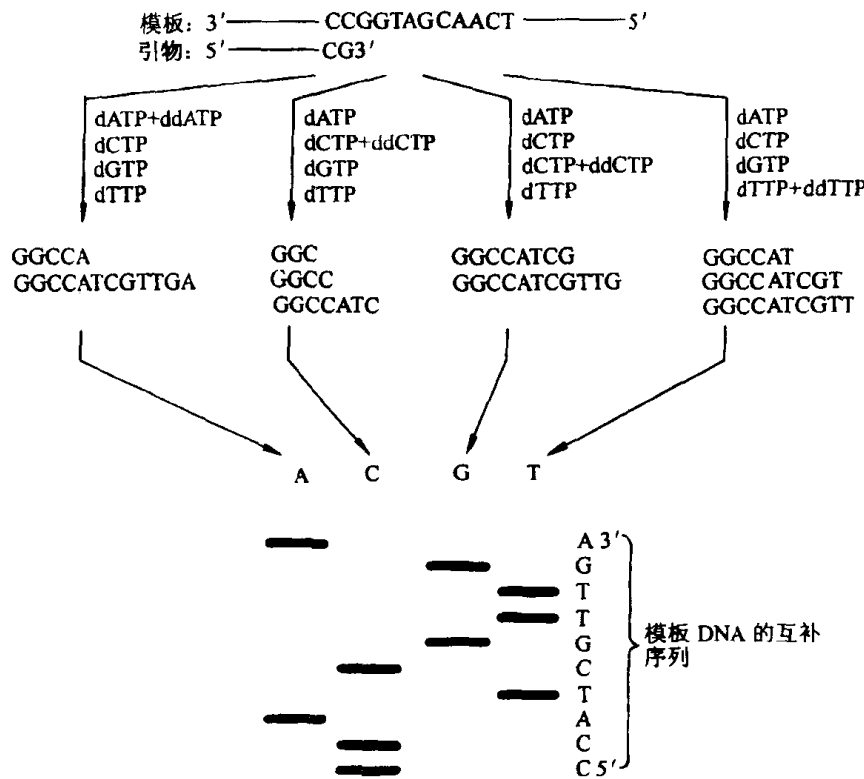


图 1-10 双脱氧法测定 DNA 片段的序列流程示意图

所以新合成链的核苷酸顺序是：5' - CCATCGTTGA - 3'，模板 DNA 链的顺序是：5' - TCAAC-GATGG - 3'。

2. 化学降解法

此法由 A. Maxam 及 W. Gilbert 于 1977 年提出。这个方法不需要任何酶，对单链和双链 DNA 都适用，不受 DNA 二级结构干扰，因而很快被广泛应用于各地实验室，80 年代初报道的 DNA 顺序结果大多为化学降解法测得。与前法不同的是以上的 A，T，C，G 组由化学试剂降解特定碱基产生，若将 DNA 分子的末端标记上放射性同位素，经过聚丙烯酰胺凝胶电泳，进行放射自显影，同样可以直接读出 DNA 的核苷酸顺序（图 1-11）。

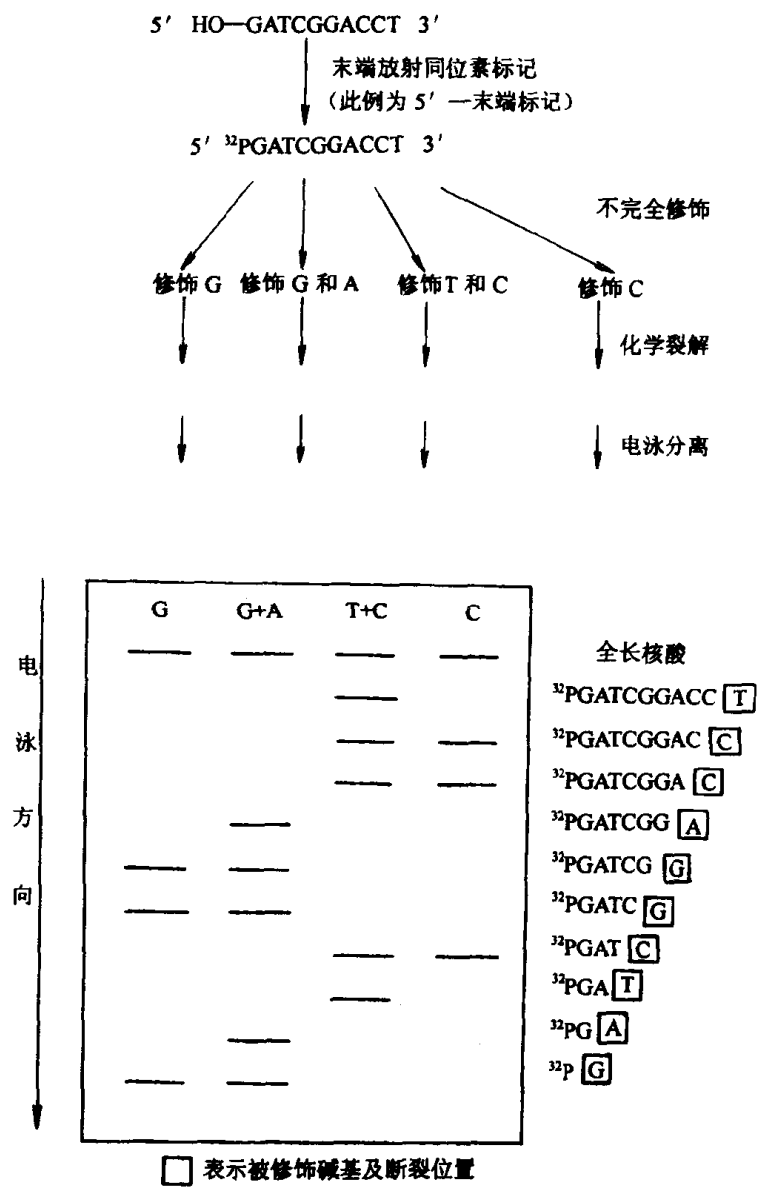


图 1-11 化学降解法测定 DNA 片段的序列流程示意图

例如 G 组可由硫酸二甲酯 (dimethyl sulfate) 甲基化后，经哌啶处理获得。鸟嘌呤残基 N7 位甲基化后的糖苷键在中性 pH 条件下加热很容易断裂，使 DNA 链骨架上戊糖残基不但失去嘌呤碱基，而且在碱性溶液中加热及经哌啶处理可使糖苷键断裂。相比之下，N3 位甲基化腺嘌呤的核苷酸在稀酸溶液中比鸟苷酸较为不稳定，此时若用稀酸处理，可使 A 及 G 两处的核苷酸都断裂而产生 A + G 组，若将平行电泳的 G 组与 A + G 组相比较，即能确定 A