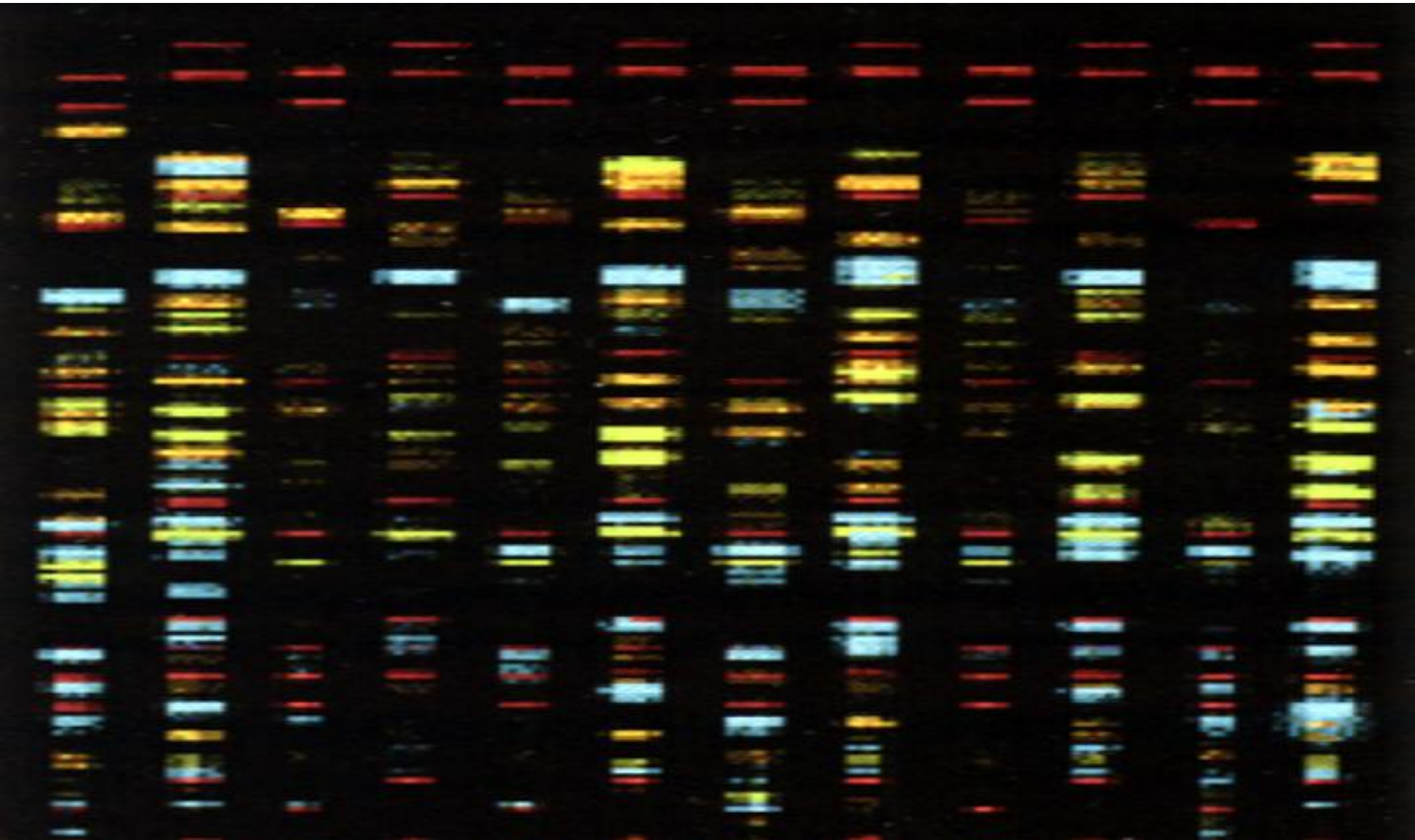
第七章　核酸化学



- 第一节　　核酸通论
- 第二节　　核酸的结构

第一节　核酸通论

核酸（nucleic acid）是重要的生物大分子，是生物化学与分子生物学研究的重要对象和领域。核酸有两类，即脱氧核糖核酸（deoxynucleic acid，DNA）和核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）。因此，最重要的生物大分子是DNA、RNA和蛋白质。由生物大分子和有关生物分子与无机分子或离子共同构成生物机体不同层次的结构；生物大分子之间以及与其他分子之间的相互作用决定了一切生命活动。

一、核酸的发现和研究简史

二、核酸的种类和分布

三、核酸的生物功能

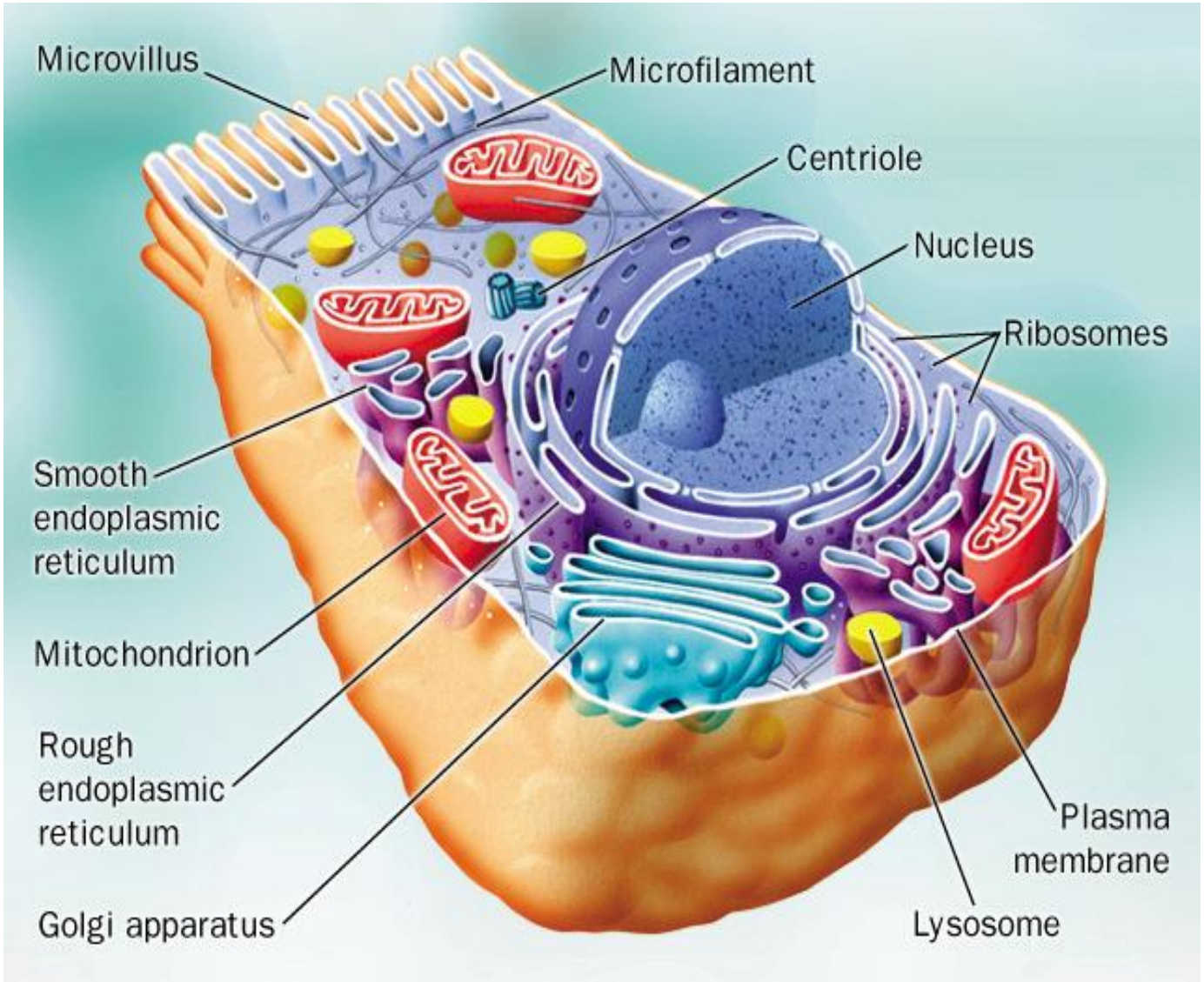
一、核酸的发现和研究简史

核酸的结构与功能比较复杂，分子很不稳定，它的研究开始最晚。然而对它的研究却改变了整个生命科学的面貌，并由此而诞生了分子生物学这一当今发展最迅速、最有活力的学科。

（一）核酸的发现

- （二）核酸的早期研究
- （三）DNA双螺旋结构模型的建立
- （四）生物技术的兴起
- （五）人类基因组计划开辟了生命科学的新纪元

细胞结构示意图


Microvillus
Microfilament
Centriole
Nucleus
Ribosomes
Smooth endoplasmic reticulum
Mitochondrion
Rough endoplasmic reticulum
Golgi apparatus
Plasma membrane
Lysosome

（一）核酸的发现

- 1868年瑞士青年科学家F. Miescher由脓细胞分离得到细胞核，并从中提取出一种含磷量很高的酸性化合物，称为核素。 1871年将原论文和证明与补充的论文一起发表在Med. chem. Unters. 上。Miescher被认为是细胞核化学的创始人和DNA的发现者。 1889年Altmann提取出了核酸，并提出用**核酸**来命名。嗣后，拉开对核酸研究的帷幕

（二）核酸的早期研究

- Miescher的发现曾给生物学家带来巨大希望。Hoppe－Seyler认为。核素“可能在细胞发育中发挥着极为重要的作用”。
- 1885年O. Hertwig提出：核素可能负责受精和传递遗传性状。
- 1895年E. B. Wilson推测：染色质与核素是同一种物质，可作为遗传的物质基础。

- 然而，随后核酸的化学研究却偏离了最初的正确方向。
- Kossel，1910年因其在核酸化学研究中的成就而授予他诺贝尔医学奖，在获奖后转而研究染色体蛋白质。
- Levene在鉴定核酸中的糖以及阐明核苷酸的化学键中作出了重要贡献，1912年他提出 “四核苷酸假说” 严重阻碍核酸研究达30年之久。当时还流行一种错误的看法，认为胸腺核酸代表动物核酸；酵母核酸代表植物核酸。

（三）DNA双螺旋结构模型的建立

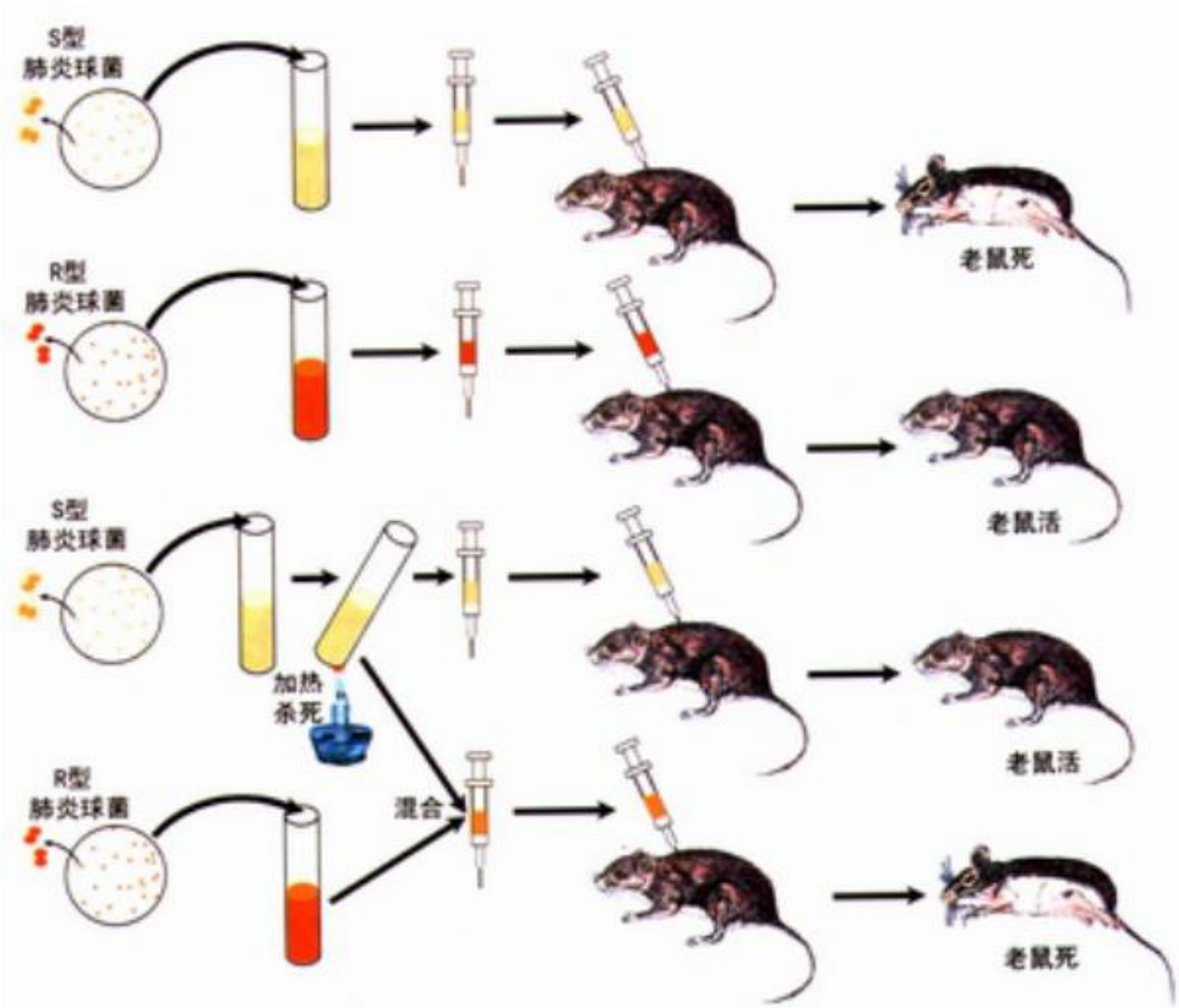
- **DNA双螺旋历史背景：**

20世纪上半叶，数理学科进一步渗人生物学，生物化学本身是一门交叉学科，也就成为数理学科与生物学之间的桥梁。数理学科的渗人不仅带来了新的理论和思想方法，而且引人了许多新的技术和实验方法。1953年J. D. Watson和 F. Crick提出 DNA双螺旋结构模型，就是在学科融合的背景下产生的。该模型的提出被认为是20世纪自然科学中最伟大的成就之一，它给生命科学带来深远的影响，并为分子生物学的发展奠定了基础。

细菌转化试验

1928年Griffish 发现无毒的肺炎双球菌RⅡ和加热杀死的有毒菌SⅢ混合注入小鼠体内可使小鼠致死。

- 1944年Avery深入研究了这一现象。这一著名实验证明了核酸是遗传物质


S型
肺炎球菌
老鼠死
R型
肺炎球菌
老鼠活
S型
肺炎球菌
加热
杀死
老鼠活
R型
肺炎球菌
混合
老鼠死

Franklin的DNA衍射图

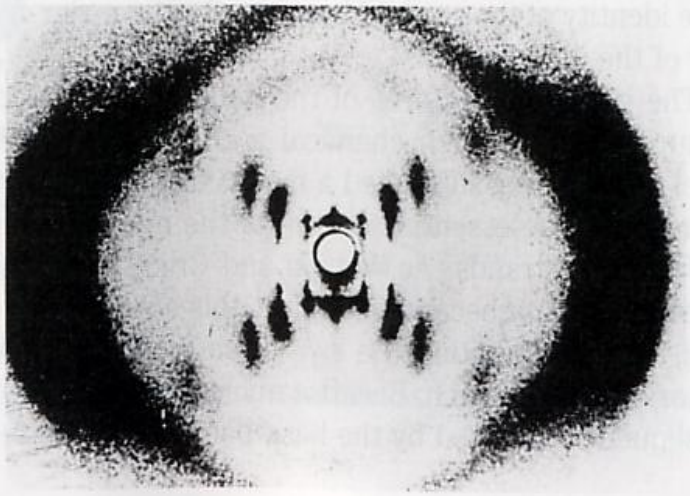
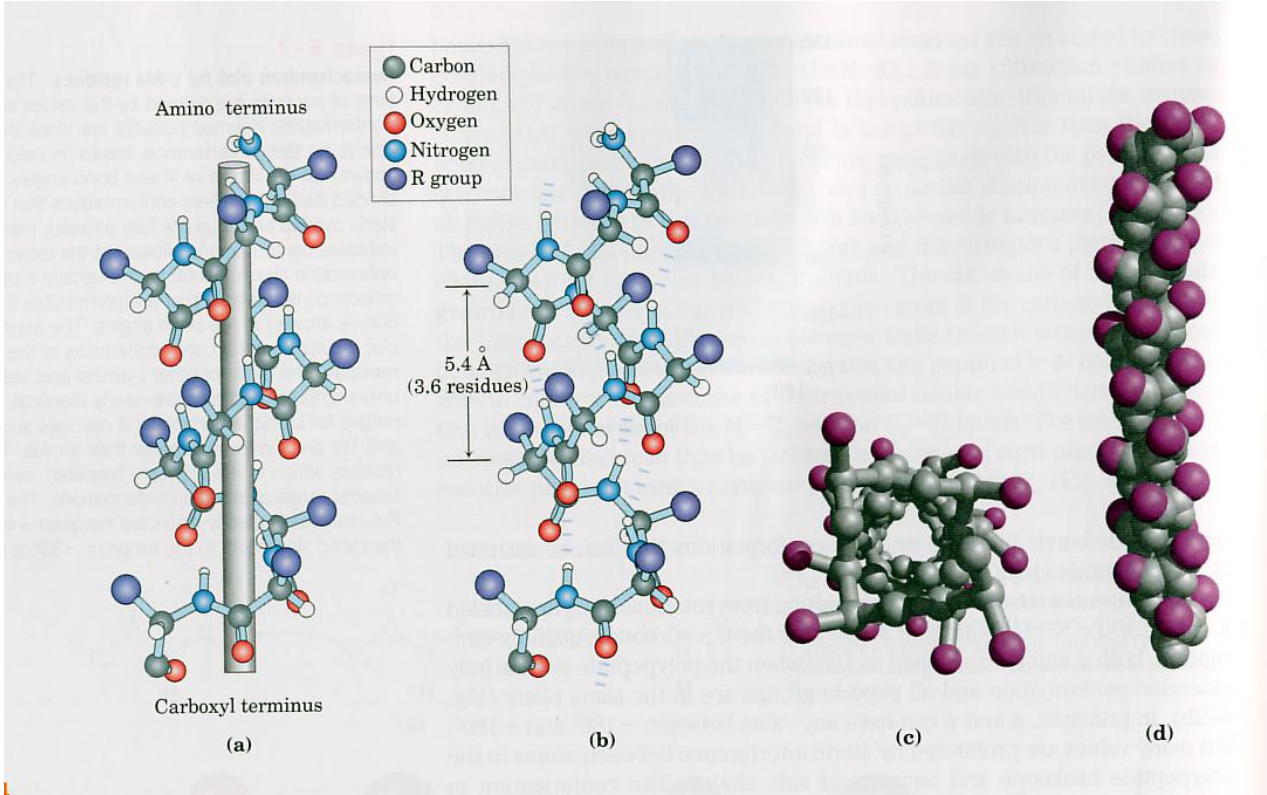
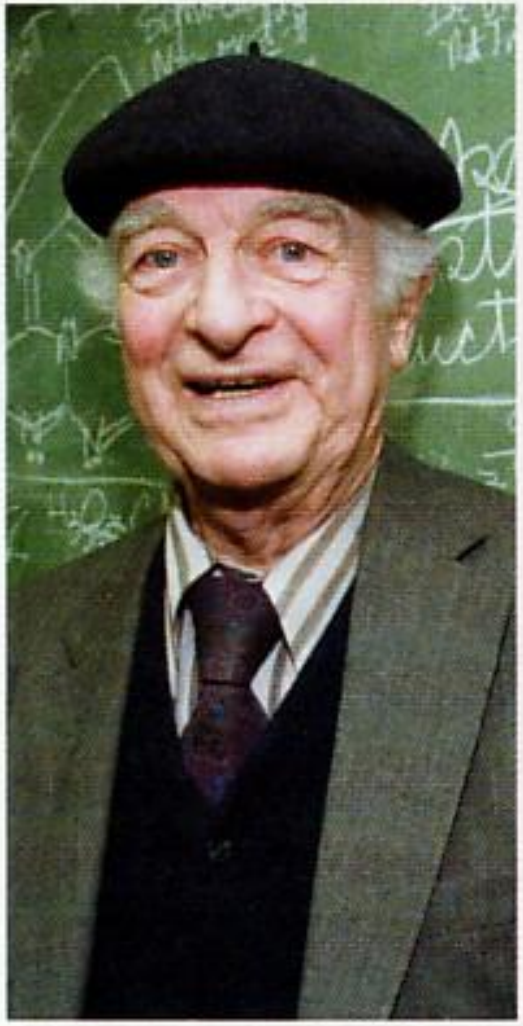


figure 10–14

X-ray diffraction pattern of DNA. The spots forming a cross in the center denote a helical structure. The heavy bands at the left and right arise from the recurring bases.

Linus.Pauling和
他的蛋白质α一螺旋结构





Linus Pauling
1901–1994

James Watson

Watson和Crick以及他们的DNA双螺旋模型

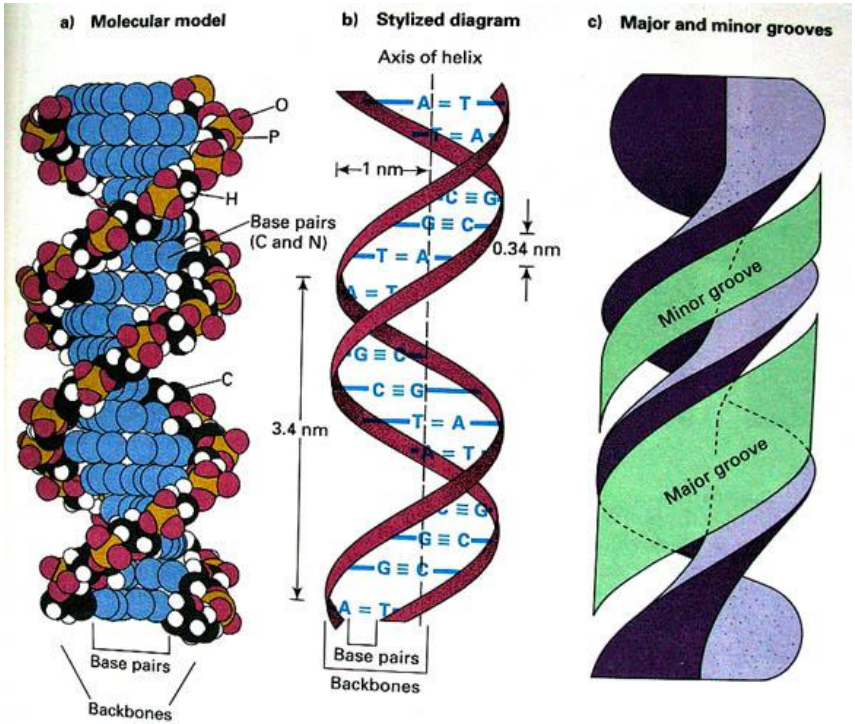
Francis Crick

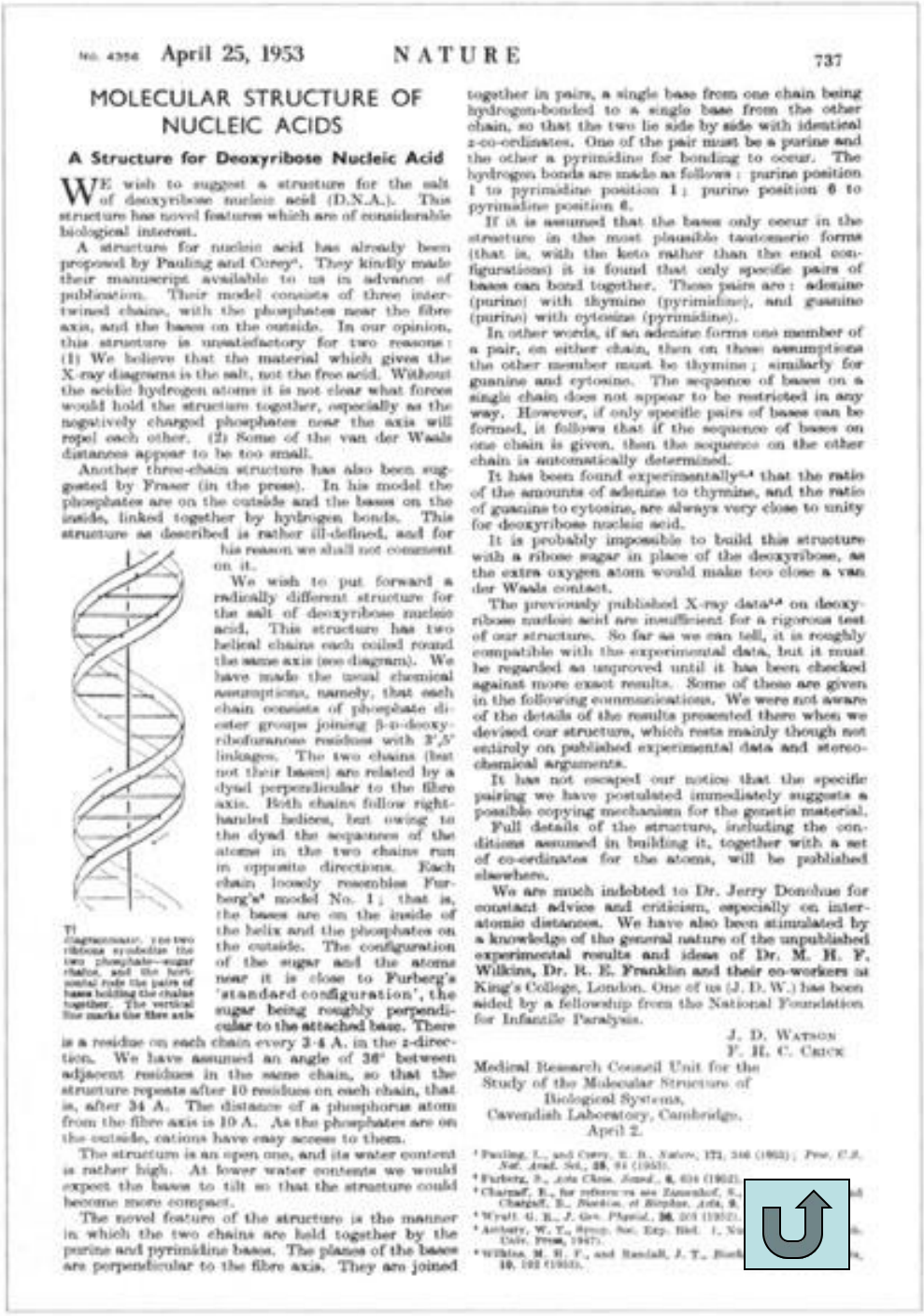
- Watson和Crick提出DNA双螺旋结构模型的主要依据是：
- 已知核酸的化学结构知识；E. Chargaff发现的DNA碱基组成规律；M. Wilkins和R. Franklin得到的 DNA X射线衍射结果。
- 此外，W. T. Astbury对DNA衍射图的研究以及L. Pauling提出蛋白质的a一螺旋结构也都有启发作用。
- DNA双螺旋结构模型的建立说明了基因的结构、信息和功能三者之间的关系，并推动了分子生物学的迅猛发展。

- 20世纪50年代许多实验室对DNA双螺旋结构模型进行验证。1956年A. Kornberg发现DNA聚合酶，可用以在体外复制DNA。1958年Crick总结了当时分子生物学的成果，提出了“中心法则”，即遗传信息从DNA传到RNA，再传到蛋白质，一旦传给蛋白质就不再转移。

Watson和Crick的论文

获1962年诺贝尔奖





No. 4356 April 25, 1953 NATURE 737

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey[1]. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining β-D-deoxyribofuranose residues with 3′,5′ linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's[2] model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There is a residue on each chain every 3·4 A. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 A. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 A. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally[5,4] that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data[5,6] on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at King's College, London. One of us (J. D. W.) has been aided by a fellowship from the National Foundation for Infantile Paralysis.

J. D. WATSON
F. H. C. CRICK

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge.

April 2.

[1] Pauling, L., and Corey, R. B., Nature, 171, 346 (1953); Proc. C.S. Nat. Acad. Sci., 39, 84 (1953).

[2] Furberg, S., Acta Chem. Scand., 6, 634 (1952).

[3] Chargaff, E., for references see Zamenhof, S., Chargaff, E., Biochim. et Biophys. Acta, 9.

[4] Wyatt, G. R., J. Gen. Physiol., 36, 201 (1952).

[5] Astbury, W. T., Symp. Soc. Exp. Biol. 1, Nucleic Acid, Cam. Univ. Press, 1947.

[6] Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., Biochim. et Biophys. Acta, 10, 192 (1953).

二、核酸的种类和分布

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。生物机体的遗传信息以密码形式编码在核酸分子上，表现为特定的核苷酸序列。DNA是主要的遗传物质，通过复制而将遗传信息由亲代传给子代。

（一）脱氧核糖核酸（DNA）

- 原核细胞中DNA集中在核区。
- 真核细胞中DNA分布在核内，组成染色体（染色质）占98%。**线粒体、叶绿体等细胞器也含有DNA占2%。**

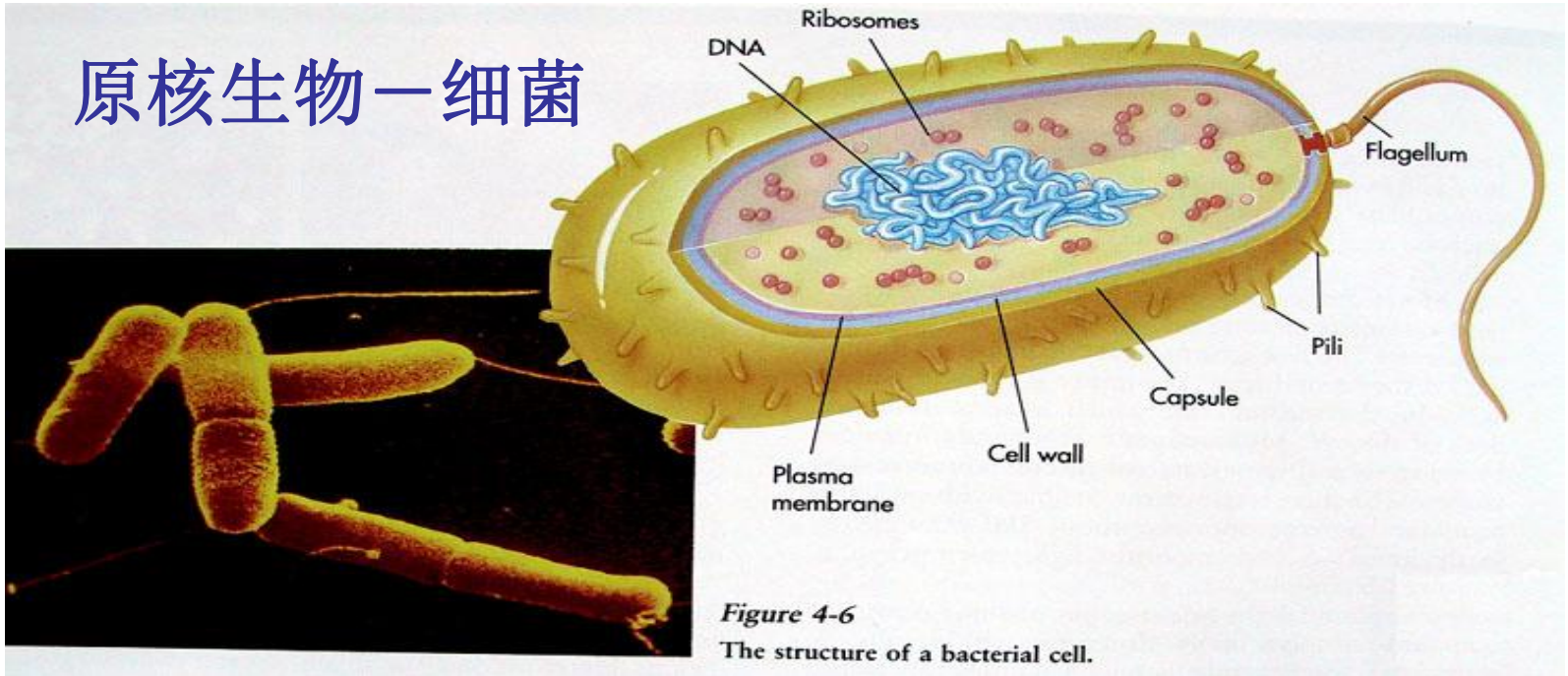
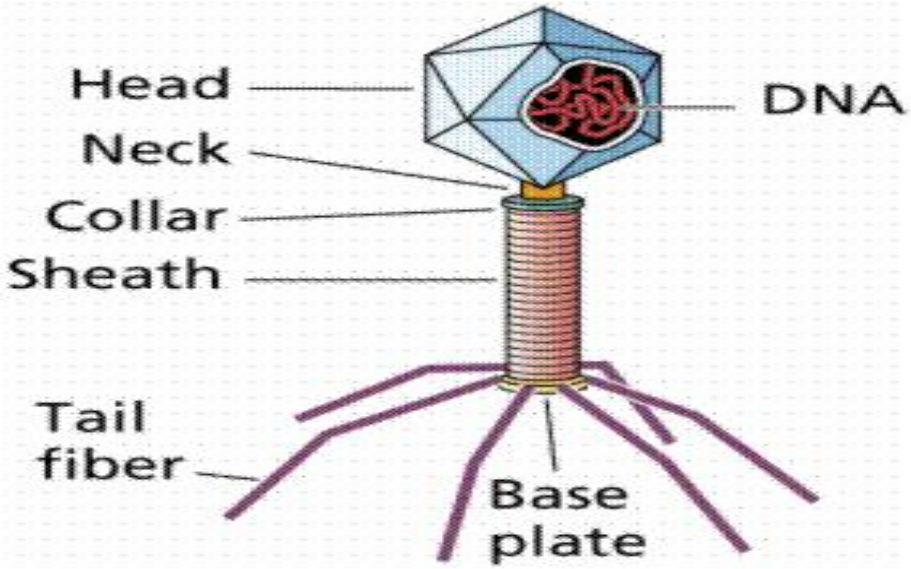


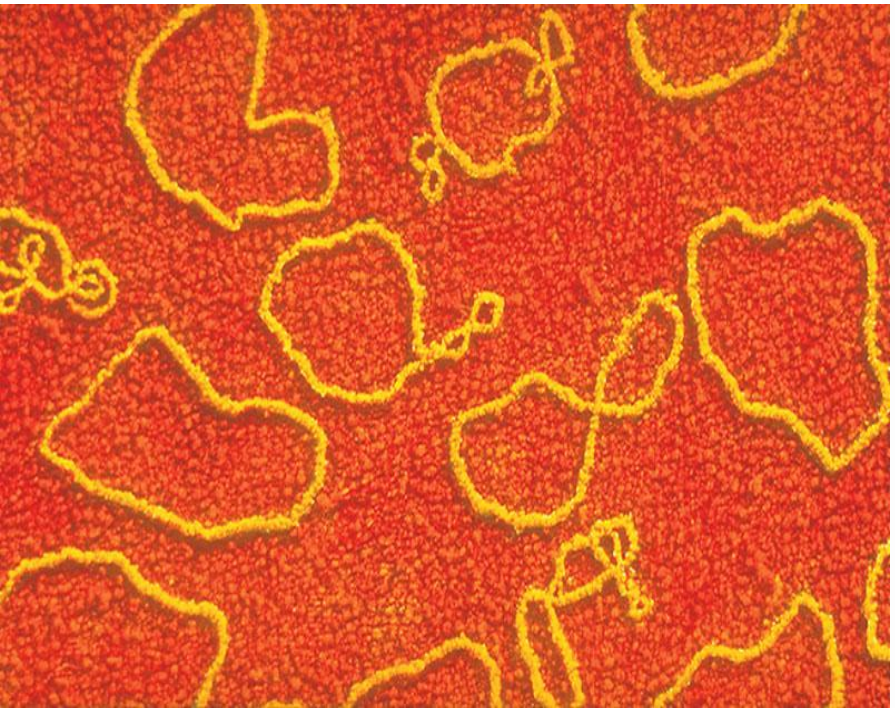
Figure 4-6
The structure of a bacterial cell.

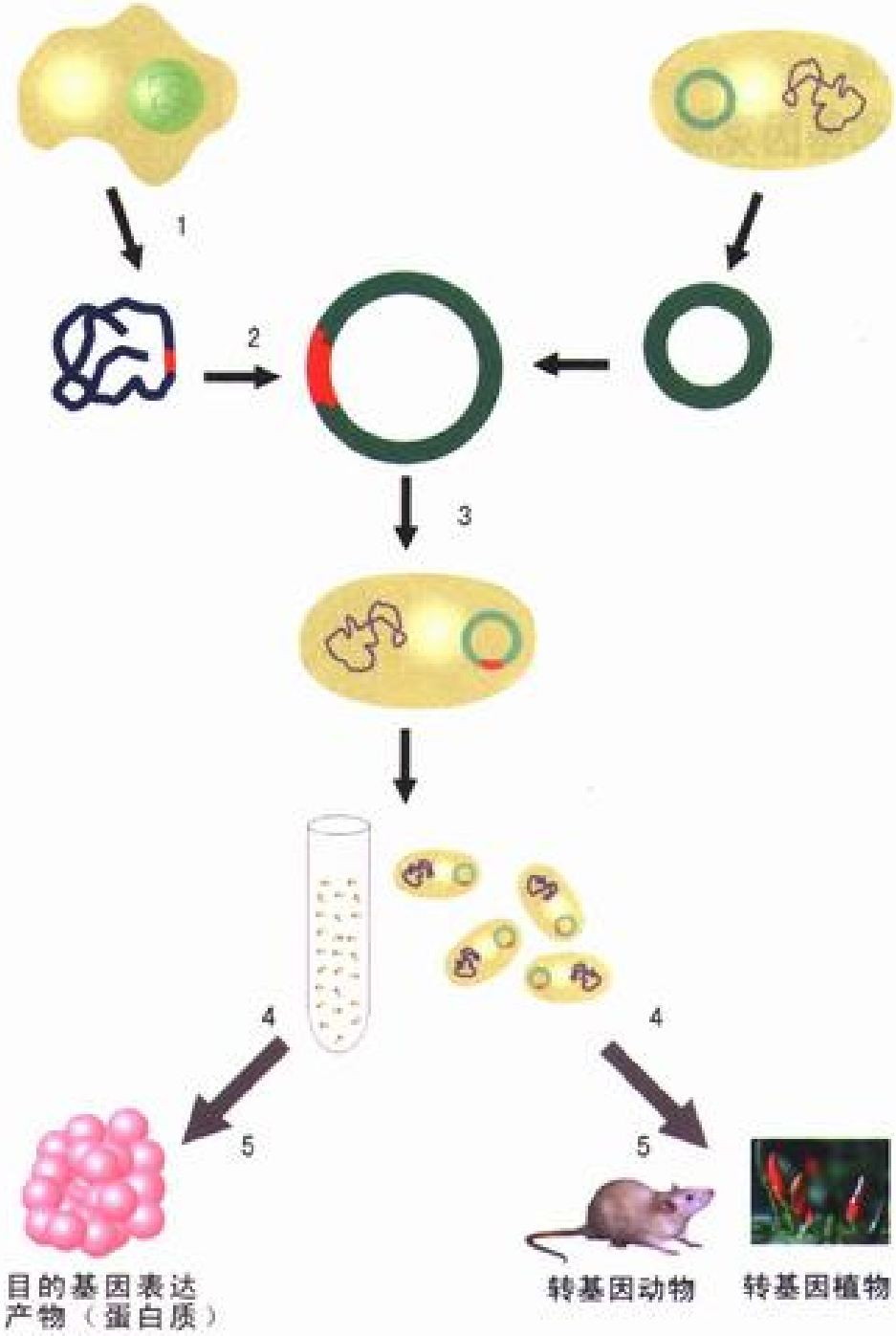
- 病毒或只含DNA，或只含RNA，从未发现两者兼有的病毒。原核生物染色体 DNA、质粒 DNA、真核生物细胞器 DNA都是环状双链 DNA（circular double－stranded DNA）。



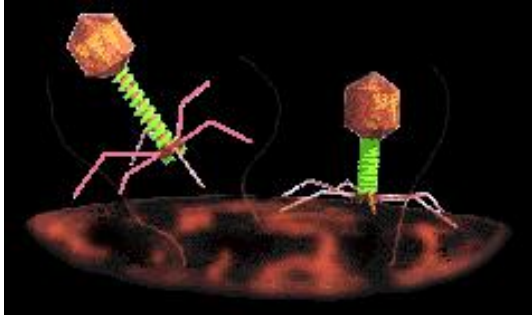
- 所谓质粒是指染色体外基因，它们能够自主复制，并给出附加的性状。真核生物染色体是线型双链 DNA（linear double－ stranded DNA），末端具有高度重复序列形成的端粒（telomere）结构。

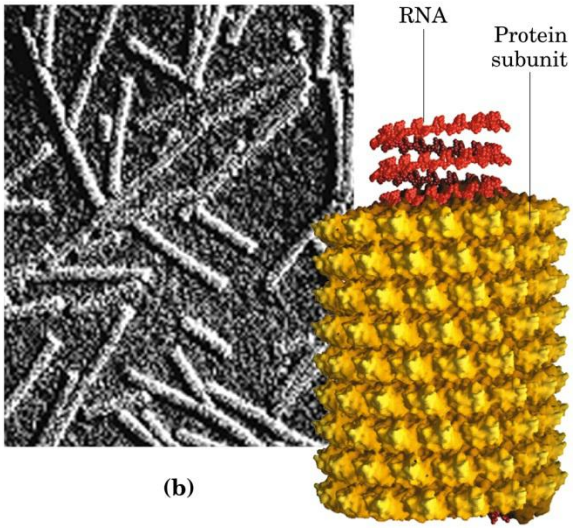
质粒的结构

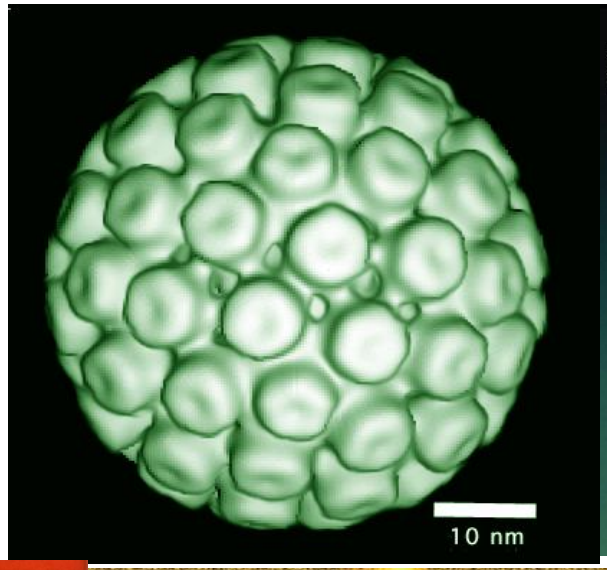


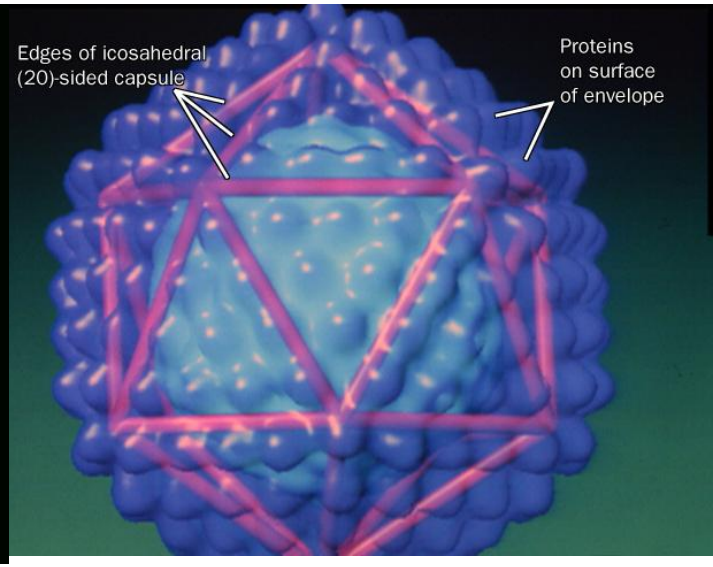


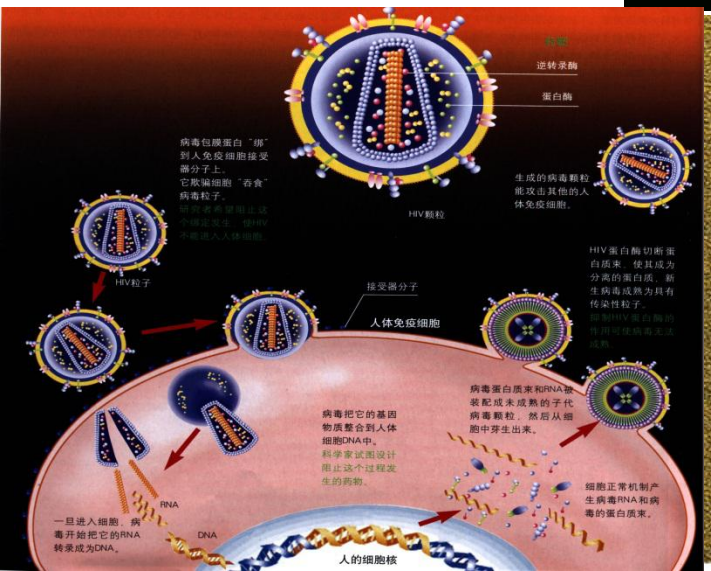
各种病毒

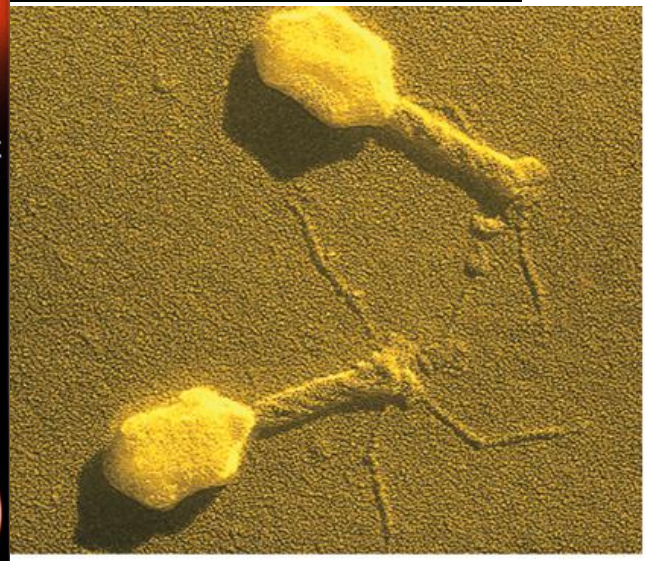


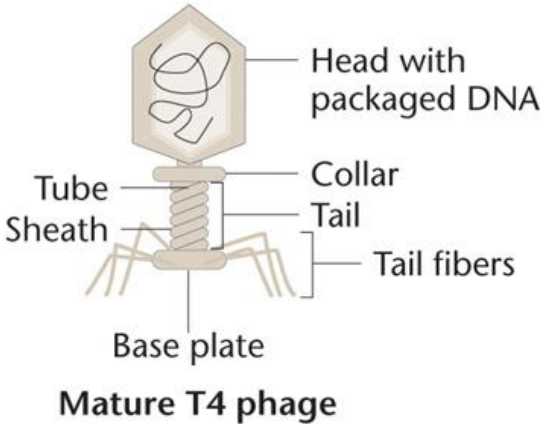

RNA
Protein subunit
(b)


10 nm


Edges of icosahedral (20)-sided capsule
Proteins on surface of envelope


外膜
逆转录酶
蛋白酶
病毒包膜蛋白“绑”到人免疫细胞接受器分子上。
它欺骗细胞“吞食”病毒粒子。
研究者希望阻止这个绑定发生，使HIV不能进入人体细胞。
HIV颗粒
生成的病毒颗粒能攻击其他的人体免疫细胞。
HIV粒子
接受器分子
人体免疫细胞
HIV蛋白酶切断蛋白质束，使其成为分离的蛋白质，新生病毒成熟为具有传染性粒子。
抑制HIV蛋白酶的作用可使病毒无法成熟。
病毒把它的基因物质整合到人体细胞DNA中。
科学家试图设计阻止这个过程发生的药物。
病毒蛋白质束和RNA被装配成未成熟的子代病毒颗粒，然后从细胞中芽生出来。
细胞正常机制产生病毒RNA和病毒的蛋白质束。
RNA
DNA
一旦进入细胞，病毒开始把它的RNA转录成为DNA。
人的细胞核




Head with packaged DNA
Collar
Tube
Tail
Sheath
Tail fibers
Base plate
Mature T4 phage

（二）核糖核酸（RNA）

- 参与合成蛋白质的核糖核酸（RNA）有三类：
- **1、转移RNA（tranfer RNA）占总RNA16%**
- **2、核糖体RNA（ribosomalRNA）占总RNA的80%**

  原核生物 5S、16S、23S 三种 rRNA

  真核生物 5S、18S、28S 三种 rRNA

  哺乳动物还有另一种5.85S rRNA

- **3、信使RNA（messengerRNA）占总RNA4－5%**
- 原核生物：一条mRNA链
- 真核生物：在mRNA分子的3‘端有一个PolyA结构，大约含有200个腺苷酸。5’端有一个帽子结构。

4、细胞中其他的RNA分子

20世纪80年代以来，陆续发现许多新的具有特殊功能的RNA，几乎涉及细胞功能的各个方面，这些RNA或是以大小来分类，如4．5 S RNA、5 S RNA等。在凝胶电泳中7 S位置分出两个RNA条带，分别称为 7SK RNA和7SL RNA。这些 RNA分子大小大致在 300个核苷酸左右或更小，常统称之为小RNA。或是以在细胞中的位置来分类，如核内小RNA（small nuclear RNA），核仁小RNA（small nucleoar RNA，），胞质小 RNA。已知功能的RNA也可以用功能来命名和分类，如反义 RNA（antisense RNA）、核酶（ribozyme）等。

5、病毒和亚病毒RNA

病毒和亚病毒RNA种类很多，结构也是多种多样。含有正链RNA的病毒，例如灰质炎病毒（po－liovirus）和噬菌体QS。含有负链 RNA的病毒，如狂犬病病毒（rabies virus）和马水泡性口炎病毒（vesicular－stomatitis virus）。含有双链 RNA的病毒，如呼肠孤病毒（reovirus）。

- 比病毒结构更简单的病原体称为亚病毒或类病毒 。

类病毒（viroid）是已知最小的致病RNA，不含蛋白质，如马铃薯纺锤形块茎类病毒（PSTV）和柑橘裂皮类病毒。类病毒RNA约含300个核苷酸可形成环状或棒状。

卫星病毒RNA更小，如烟草坏死病毒的卫星病毒，它能干扰病毒的复制，可以算是病毒的寄生物。

三、核酸的生物功能

20世纪40年代后才开始对核酸有了真正的认识。半个多世纪来核酸的研究成为生物化学的研究前沿，改变了生命科学的面貌，在理论和应用上得到飞速发展。

（一）DNA是主要的遗传物质

（二）RNA参与蛋白质的生物合成

（三）RNA的多样性

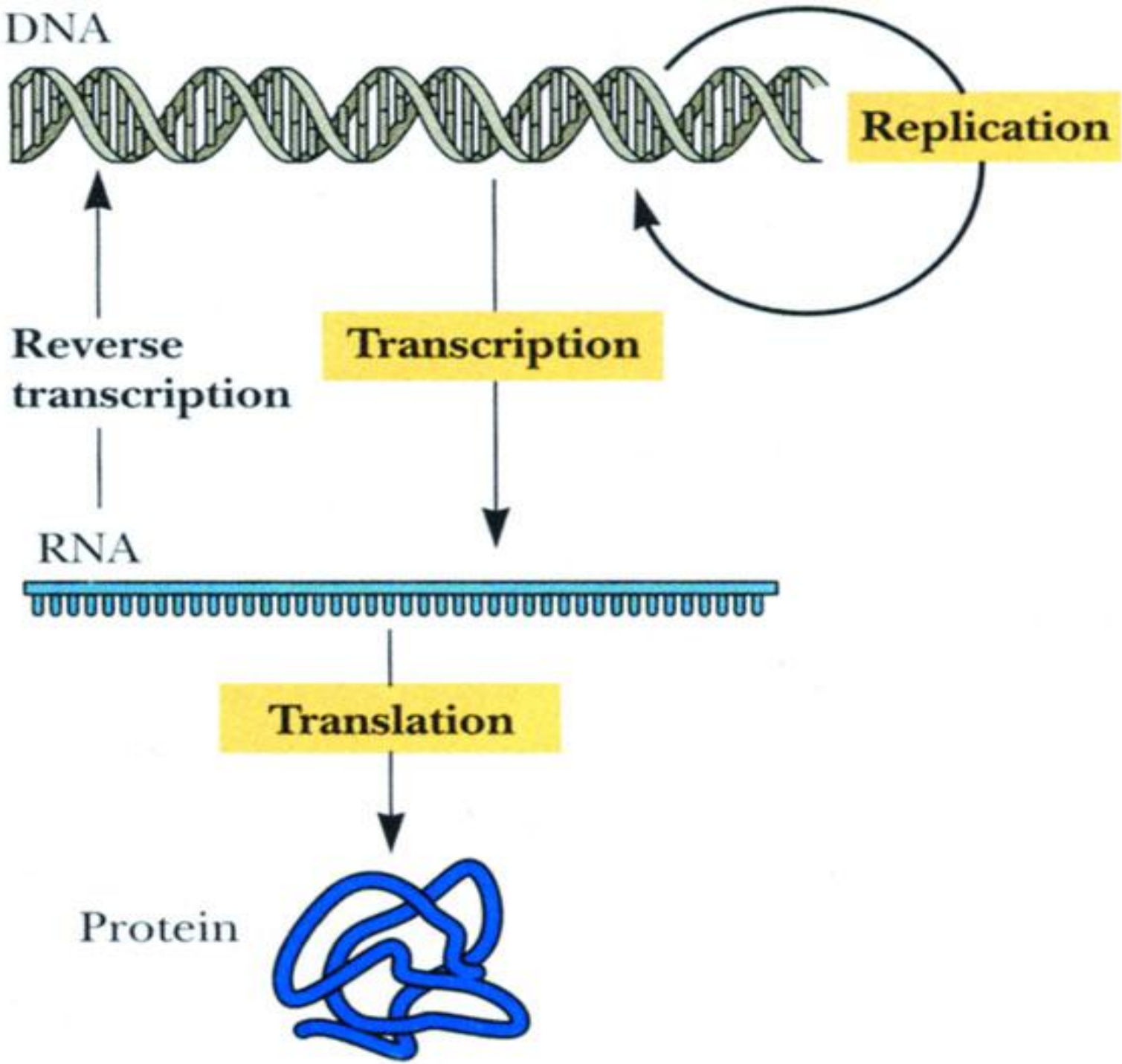
（一）DNA是主要的遗传物质

- DNA是遗传物质，是遗传信息的载体有实验证据证明：
- 1、DNA主要分布在染色体中，而染色体直接与遗传有关。
- 2、细胞和内的DNA是生殖细胞DNA的两倍，与染色体数目平行。
- 3、DNA在代谢上稳定，不受年龄、营养、环境等因素影响。
- 4、使DNA变化的因素多会引起遗传特性的改变。
- 直接的证据：
- 1、1944年Avery的细菌转化实验。
- 2、1952年Hershey用同位素标记的P和S噬菌体感染E.Coli实验。
- 基因是有功能的一段DNA片段。基因有三个基本属性：一是可通过复制，将遗传信息由亲代传递给子代；二是经转录对表型有一定的效应；三是可突变形成各种等位基因。

（二）RNA参与蛋白质的生物合成

- 早在20世纪40年代，T．Caspersson使用显微紫外分光光度法、J．Brachet使用组织化学法和J．N．Davidson等使用化学分析方法测定细胞的RNA。实验表明，为生长和分泌而旺盛进行蛋白质生物合成的细胞中”RNA含量特别丰富。这暗示RNA可能参与蛋白质的合成。
-

遗传中心法则

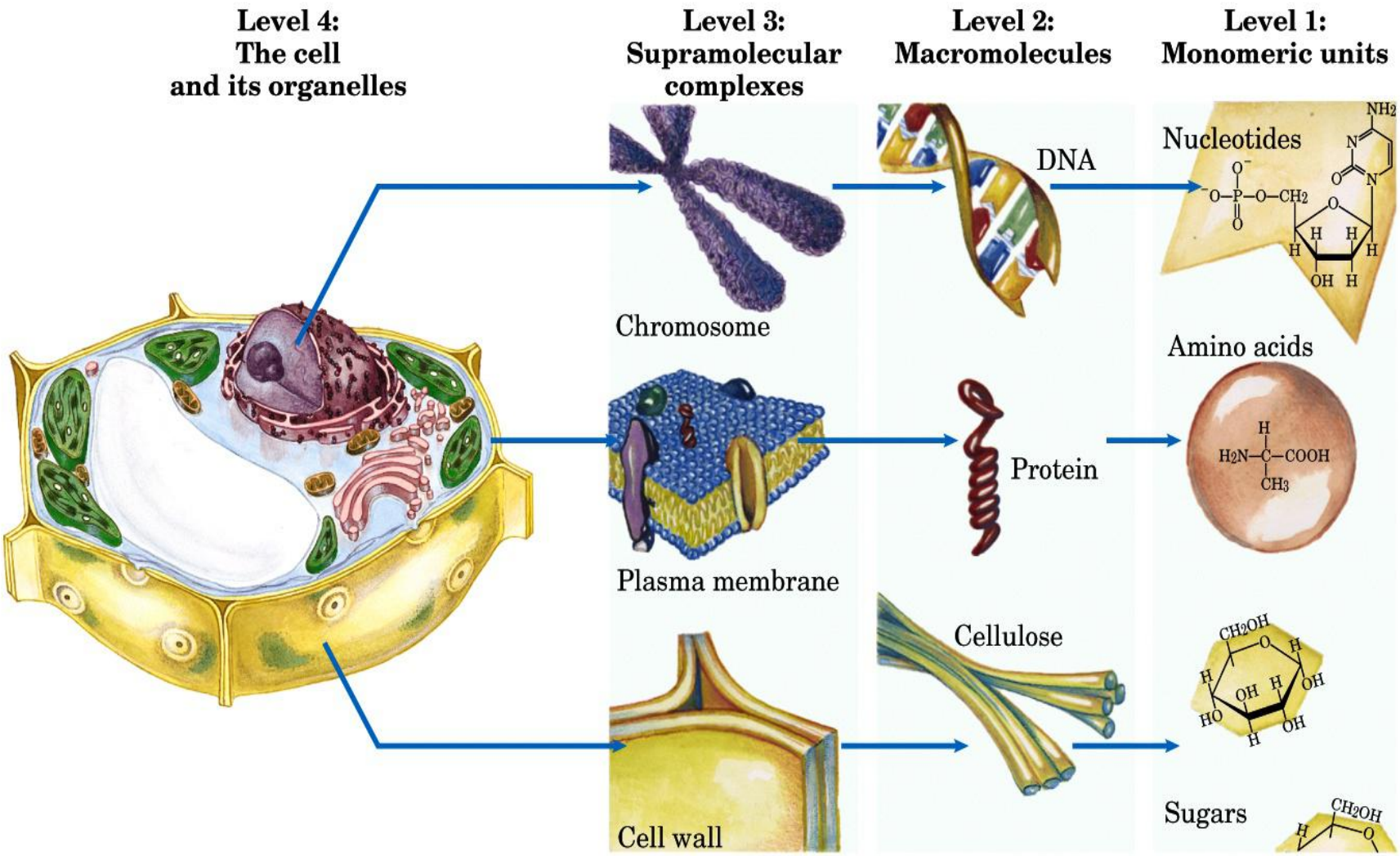

DNA
Replication
Reverse transcription
Transcription
RNA
Translation
Protein

（三） RNA的多样性

- 20世纪80年代RNA的研究揭示了RNA功能的多样性，它不仅仅是遗传信息由DNA到蛋白质的中间传递体，虽然这是它的核心功能。
- 归纳起来，RNA有 5类功能：
- ①控制蛋白质合成；
- ②作用于 RNA转录后加工与修饰；
- ③基因表达与细胞功能的调节；
- ④生物催化；
- ⑤遗传信息的加工与进化。病毒RNA是上述功能RNA的游离成分。

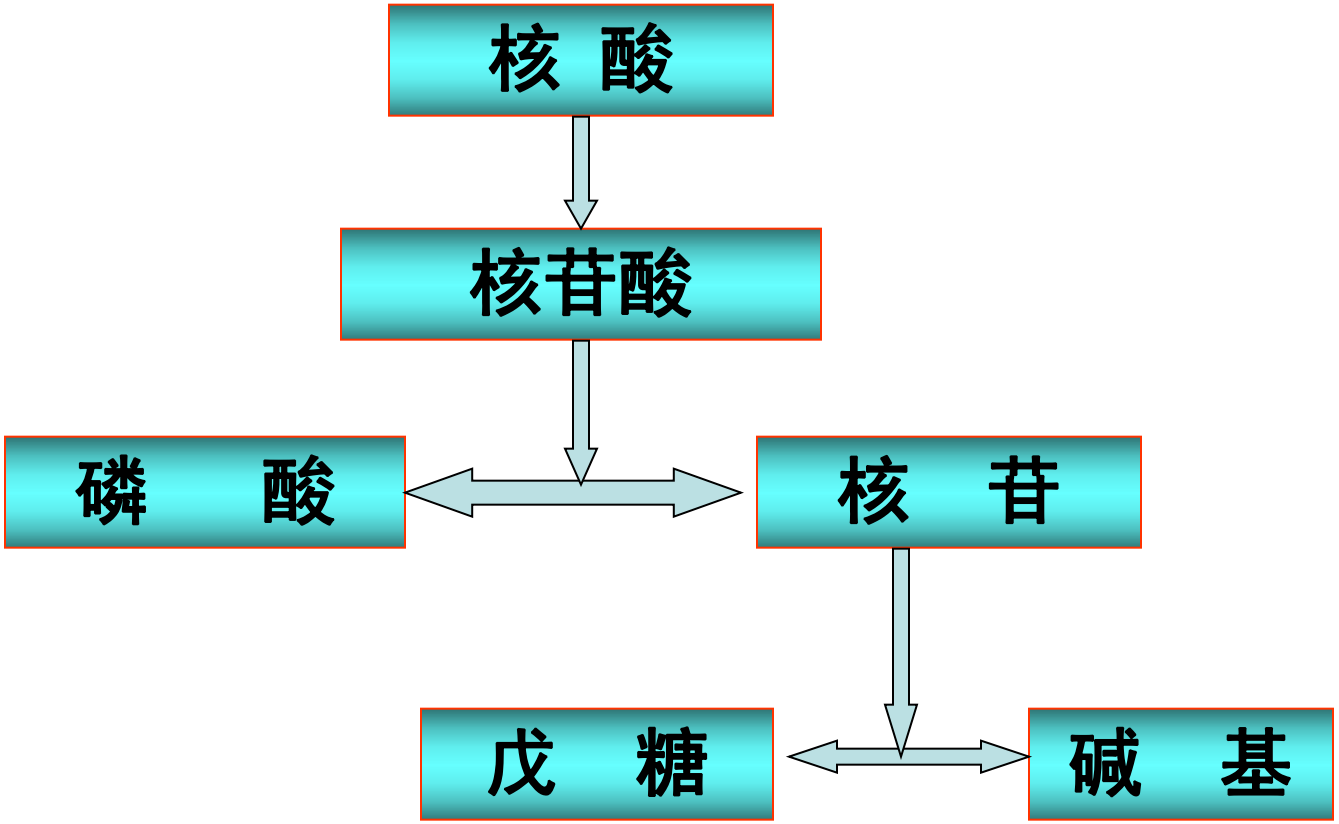
第 二 节　核 酸 的 结 构

细胞结构示意图

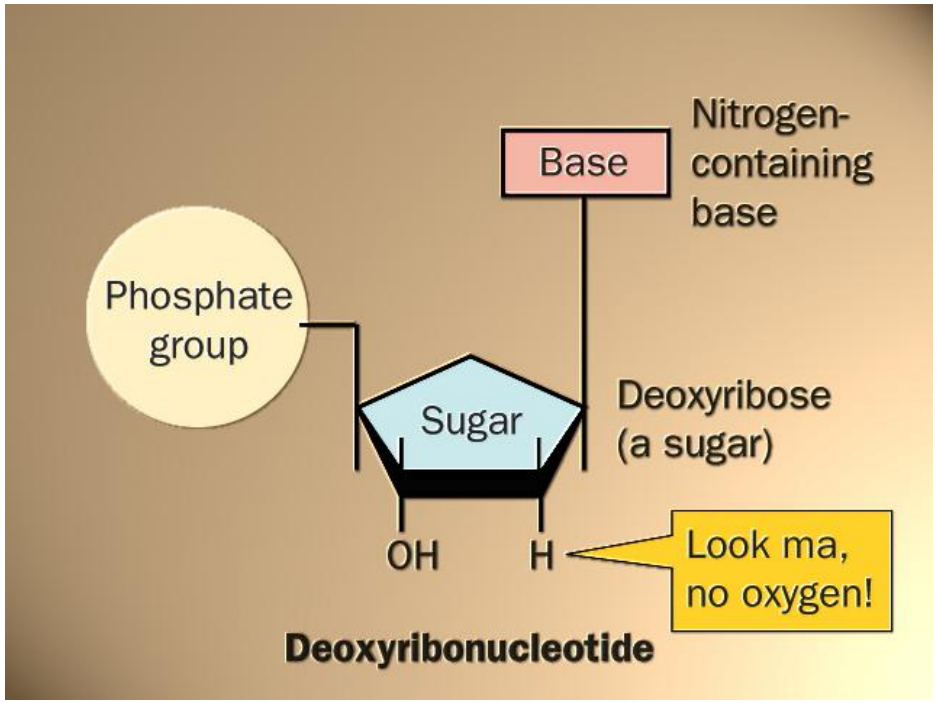

Level 4:
The cell
and its organelles
Level 3:
Supramolecular
complexes
Level 2:
Macromolecules
Level 1:
Monomeric units
Chromosome
DNA
Nucleotides
Amino acids
Plasma membrane
Protein
Cellulose
Cell wall
Sugars

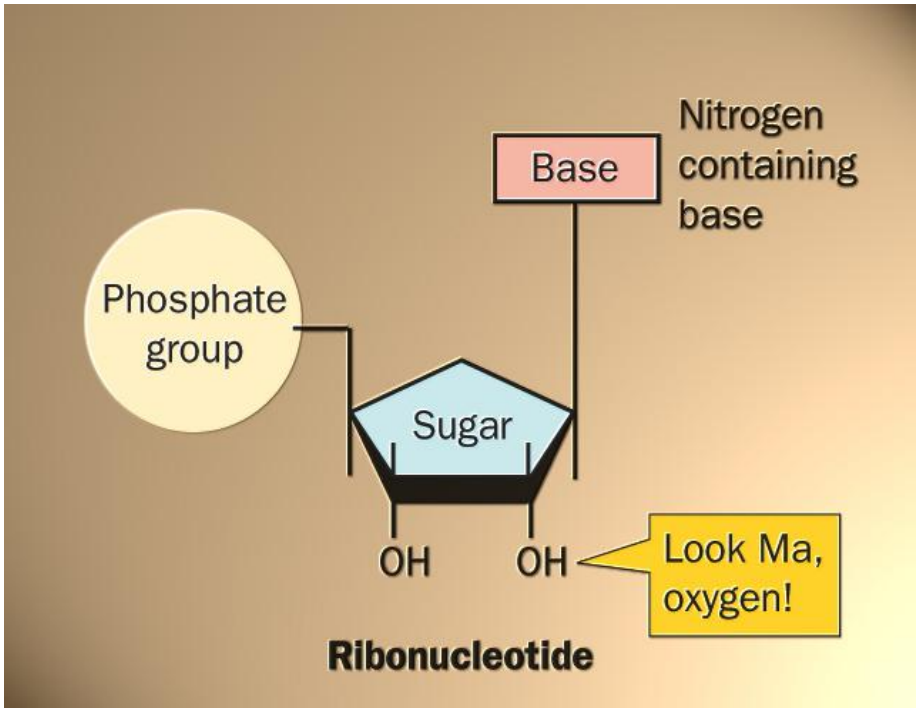
概　　论

- 核酸是多聚核苷酸的大分子它的基本构件是核苷酸。核酸进一步水解可得如下产物：



- 核酸中的戊糖有两类：D-核糖和D-2-脱氧核糖，根据所含核糖的不同，将核酸分为脱氧核糖核酸DNA和核糖核酸RNA。两类和酸所含的碱基略有差别。
- DNA含有：A、T、C、G 四种碱基
- RNA含有：A、U、C、G 四种碱基





一、核苷酸

二、核酸的共价结构

三、DNA的高级结构

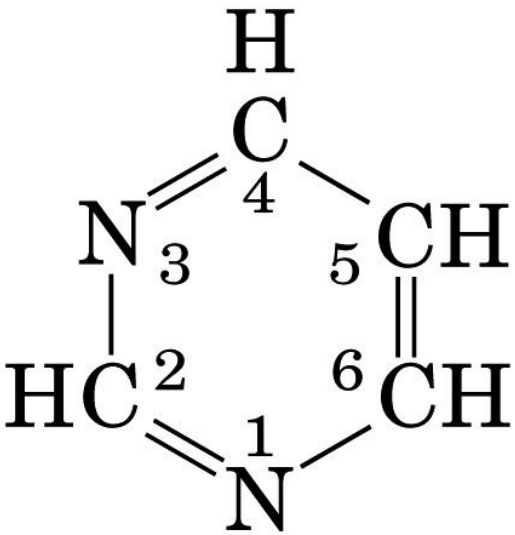
四、RNA的高级结构

一、核苷酸

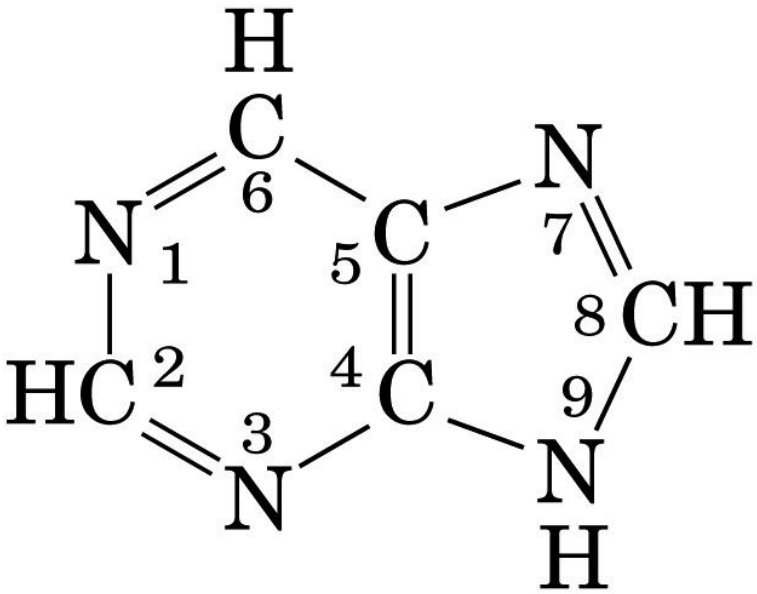
- （一）碱基
- （二）核苷
- （三）核苷酸

（一）碱基

- 核酸中的碱基有两类：**嘧啶碱和嘌呤碱**



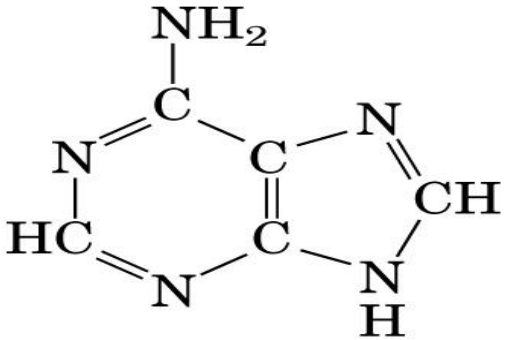
Pyrimidine



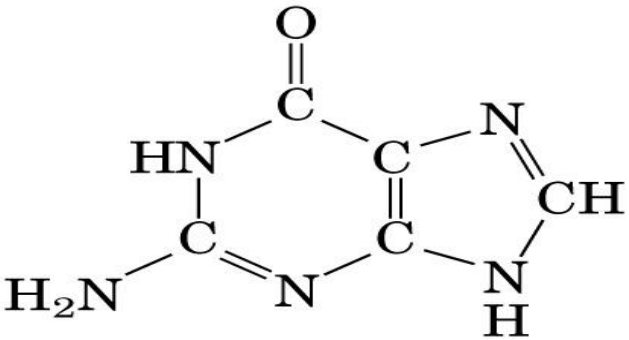
Purine

(b)

- 1、嘧啶碱：常见的有三类，胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶。
- 2、嘌呤碱：核酸中常见的有两类，腺嘌呤和鸟嘌呤

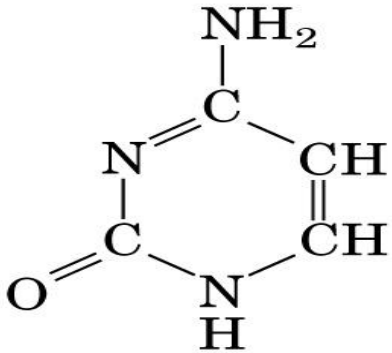


Adenine

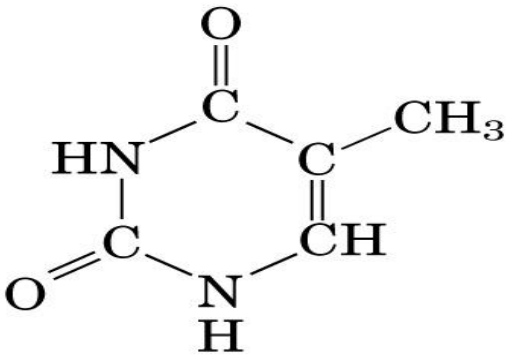


Guanine

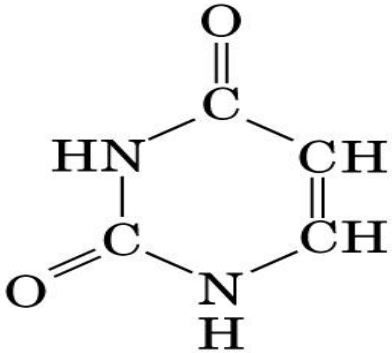
Purines



Cytosine



Thymine
(DNA)

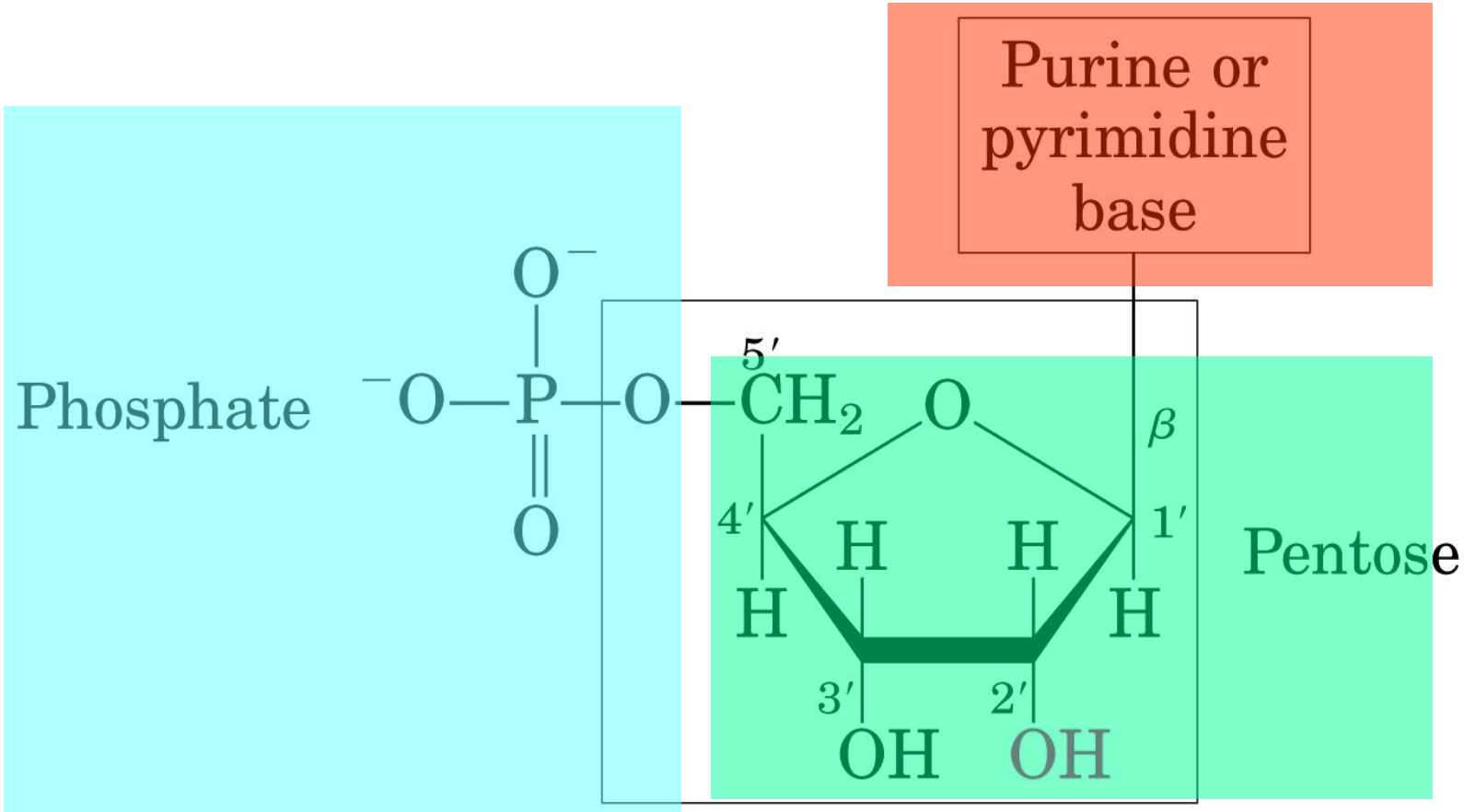


Uracil
(RNA)

Pyrimidines

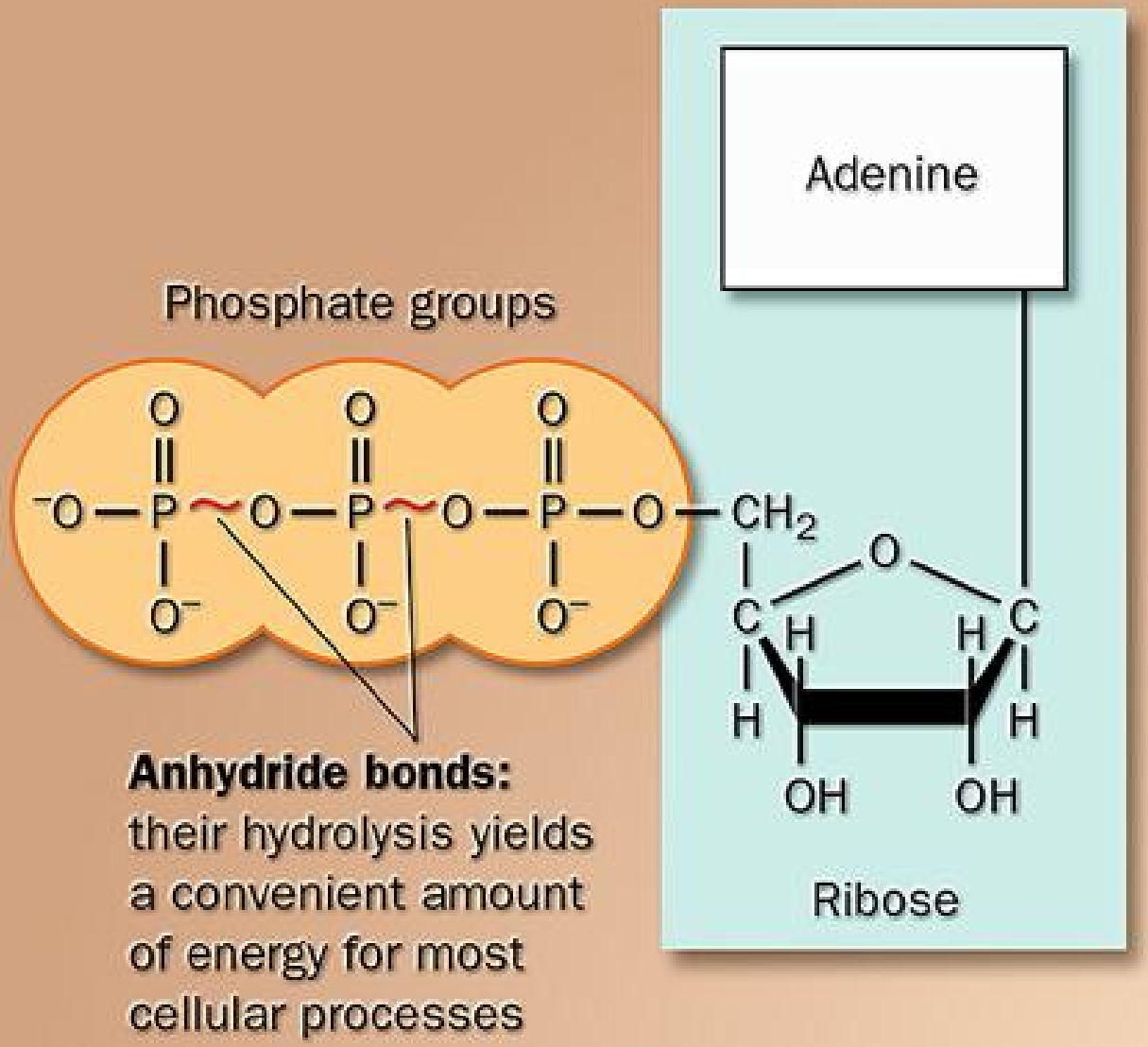
（二）核苷

- 核苷是碱基与戊糖以糖苷键缩合而成，糖的第一位碳原子和嘧啶碱基的N1或与嘌呤碱基的N9以β－糖苷键相连。



（三）核苷酸

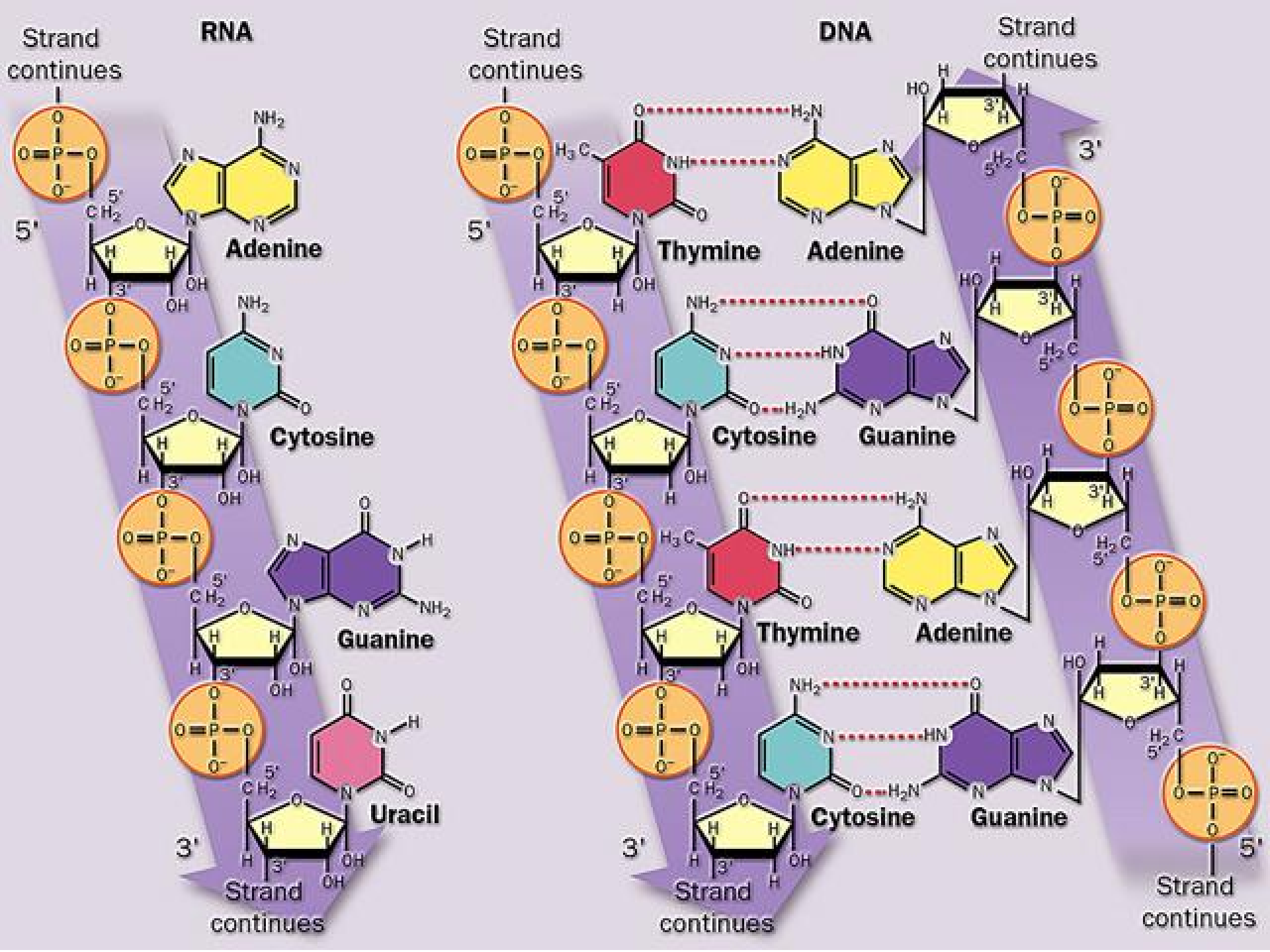
- 核苷中的戊糖羟基被磷酸酯化，形成核苷酸。也分为核苷酸和脱氧核苷酸两类。磷酸酯化一般发生在3位羟基和5位羟基上。
- 细胞内有游离的多磷酸核苷酸，最常见的是腺苷三磷酸(ATP)。



ATP as Energy Currency

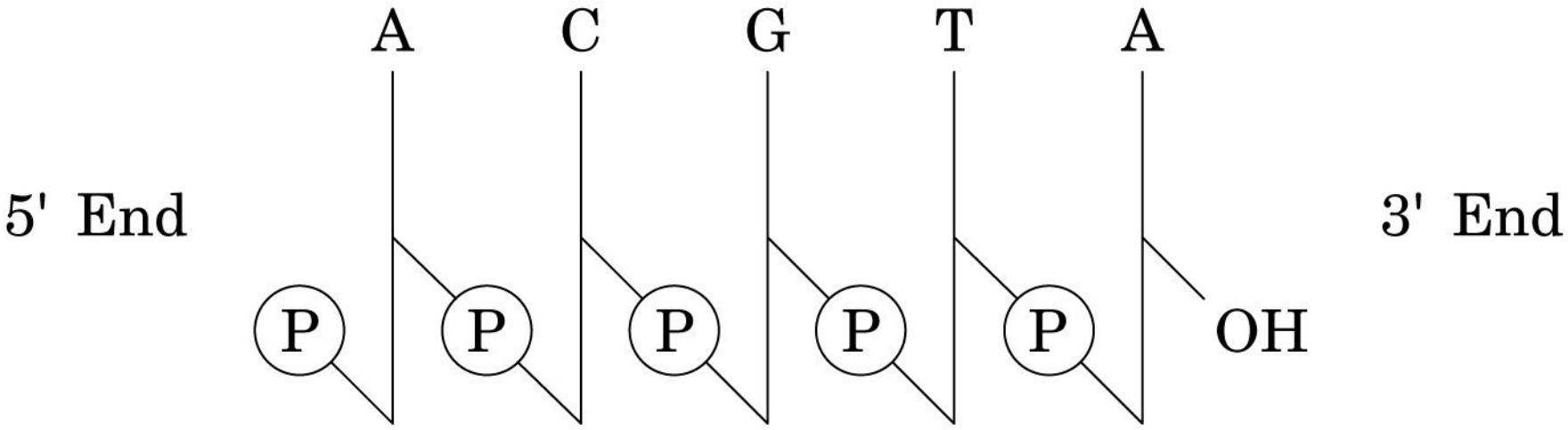
二、核酸的共价结构

- （一）核酸中核苷酸的连接方式
- （二）DNA的一级结构
- （三）RNA的一级结构


RNA
Strand continues
5'
3'
Adenine
Cytosine
Guanine
Uracil
Strand continues
DNA
Strand continues
Thymine
Adenine
Cytosine
Guanine
Thymine
Adenine
Cytosine
Guanine
Strand continues
Strand continues

（一）核酸中核苷酸的连接方式

- 核酸大分子中的核苷酸是以磷酸二酯键相连的聚合物。可以用下面的表示方法表示和酸的结构；
- 1、字母为碱基，2、竖线表示核糖，P为磷酸，3、左端为5‘端。右面为3’端。
- 4、磷酸二酯键为3，5－磷酸二酯键。
- 5、还可以有简化法表示，
- 5‘－pApCpGpTpA－3OH

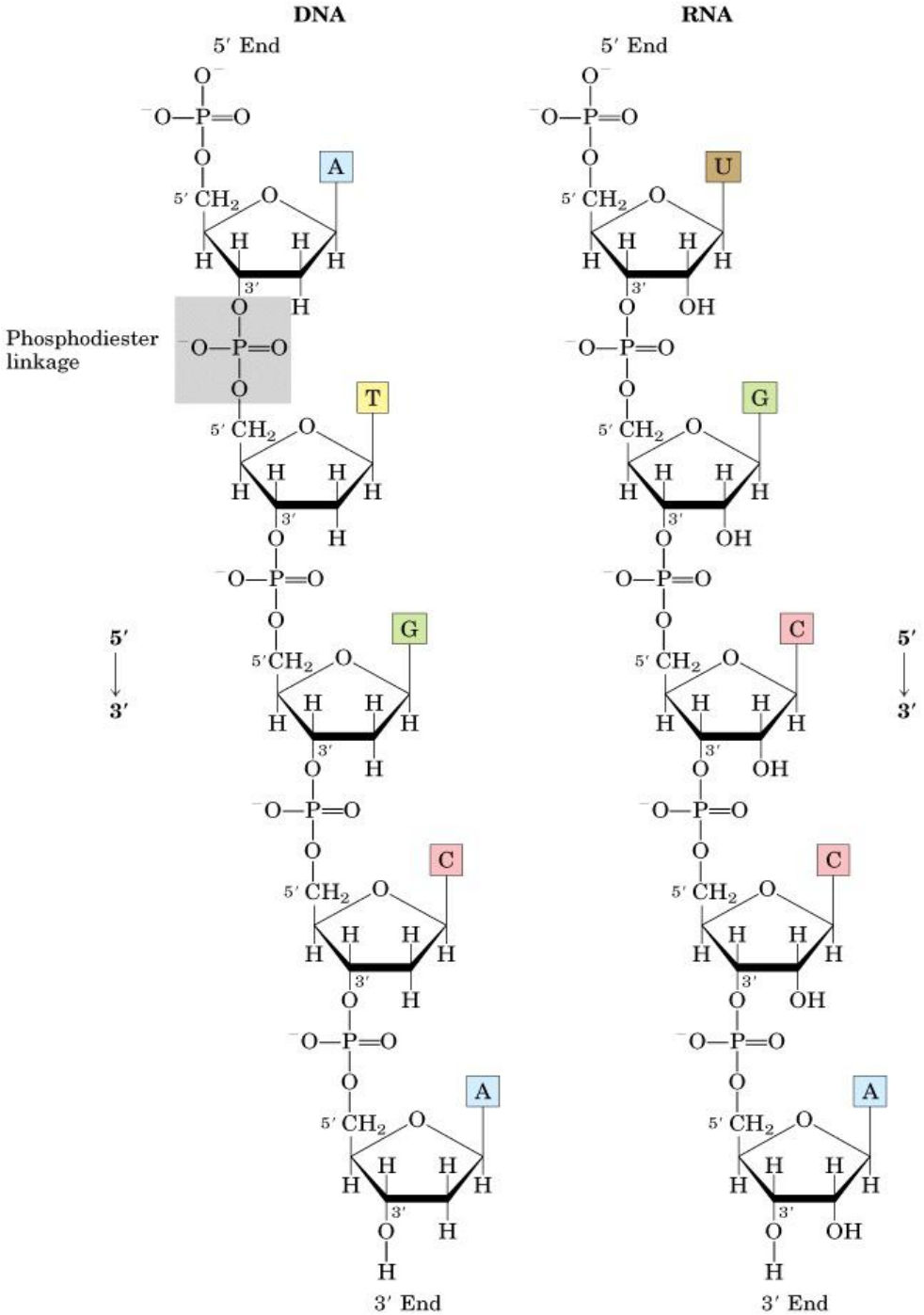


（二）DNA的一级结构

- DNA分子是一个由数量极其庞大的4种脱氧核糖核酸通过磷酸二酯键连接成的、没有侧枝的聚合物大分子。生物的遗传信息就在这个大分子上，目前人类已经将很多生物的DNA序列测定出来，并将基因组的序列搞清楚了。人类的基因组计划也已接近完成。基因在DNA分子上排列是很复杂的，目前也在研究中。

DNA与RNA的片段的一级结构

显示磷酸二酯键



（三）RNA的一级结构

- RNA也是无支链的线性多聚核糖核酸大分子，有四种核糖核苷酸以磷酸二酯键组成。RNA种类多，结构各异，大小不一。
- 1、tRNA 分子中含有较多的稀有碱基，大约有10－15％，分子量一般在25000左右，含有73－93个核苷酸，颗粒大小约为4S。3末端为CpCpAOH;5末端一般为pG或pC。
- 2、rRNA在原核生物和真核生物中有差别。原核生物有5S\16S\23S三种，真核生物有5S、18S、28S三种，哺乳动物多一种5.8 S rRNA。它们的作用是构成核糖体的骨架，与mRNA和tRNA作用，催化肽键形成，使蛋白质正确合成。

- 3、mRNA 原核生物mRNA是一个操纵子，产生多顺反子，一条mRNA上由多个编码区，5‘和3’端各有一段非翻译区。
- 真核生物mRNA都是单顺反子结构。一条mRNA的5‘端有帽子结构，3’端有PolyA，长度大约50－200个腺苷酸。

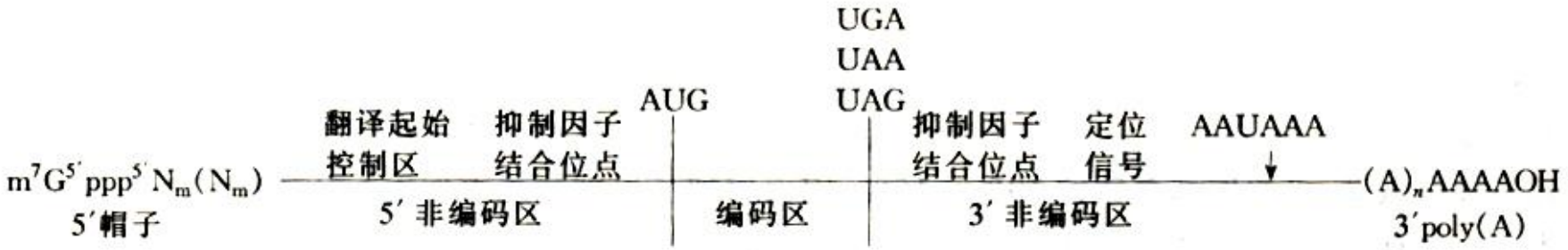


图 13－4　真核生物 mRNA 的共价结构

三、DNA的高级结构

- （一）DNA的碱基组成
- （二）DNA的二级结构
- （三）DNA的三级结构
- （四）DNA与蛋白质复合物的结构

（一）DNA的碱基组成规则

- 参与DNA的碱基有四种即：A、T、C、G，少数例外，如：麦芽中DNA的5－ 甲基胞嘧啶十分丰富。某些E.Coli中C几乎让5－羟甲基胞嘧啶所取代。枯草杆菌的DNA中T完全由U代替。

- 但绝大多数DNA碱基有如下规律（称为Chargaff规则）：
- 1、A=T，C=G。
- 2、含氨基的碱基等与含酮基的碱基：

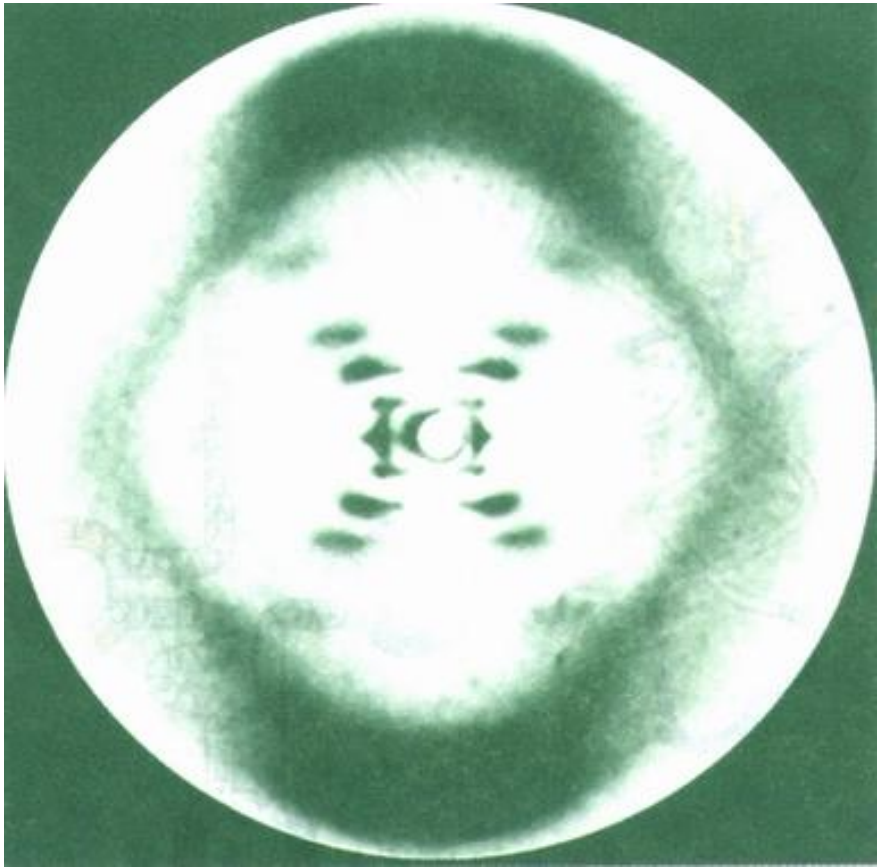
  A+C=T+G

- 3、DNA碱基组成具有种的特异性，没有组织器官的特异性。不同的种类DNA碱基组成不同,一个生物体内个组织器官中碱基组成及比例相同,并不受环境、营养、年龄的影响.

（二）DNA的二级结构

- X－ray晶体衍射技术是直接测定生物大分子的较好方法。早在1938年Astbueg就用X-ray的方法对DNA进行分析，方法正确，但样品不纯没有结果。50年代，Wilkins和Franklin也用X-ray对DNA进行分析，得到很清晰的衍射图。

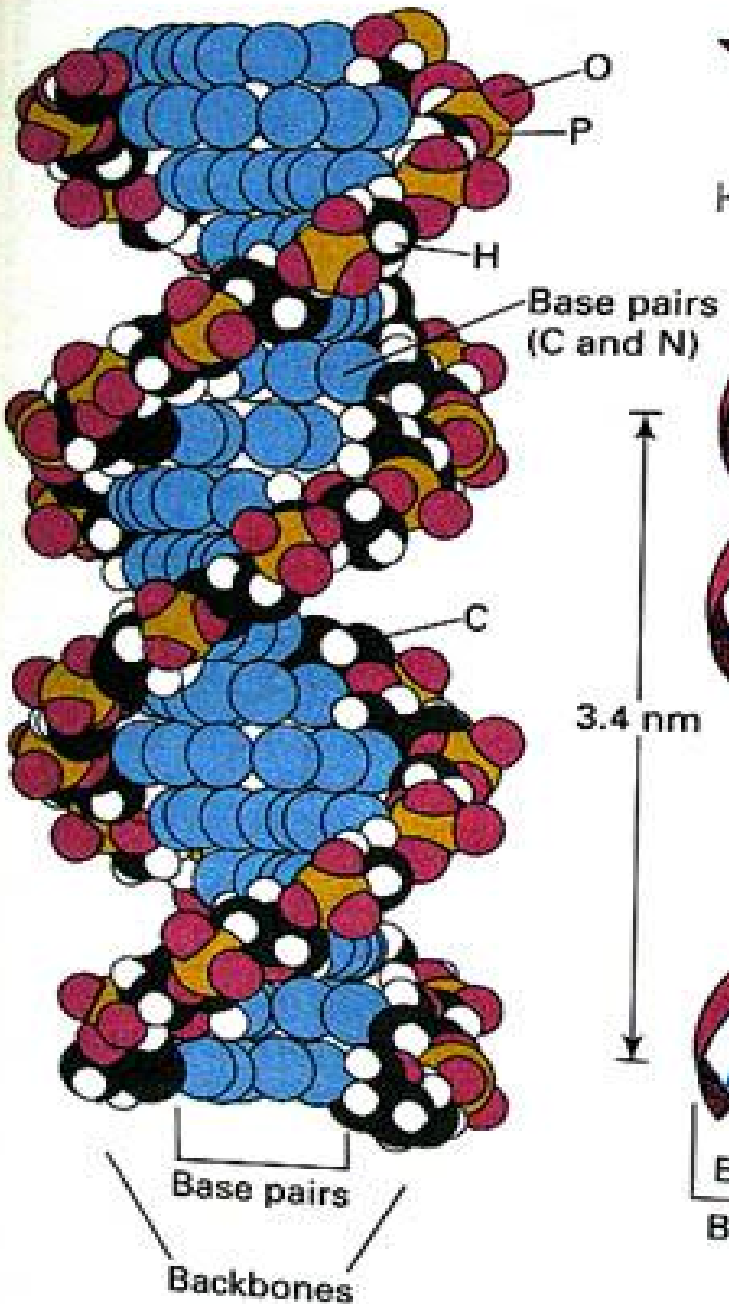
DNAX－ray衍射图

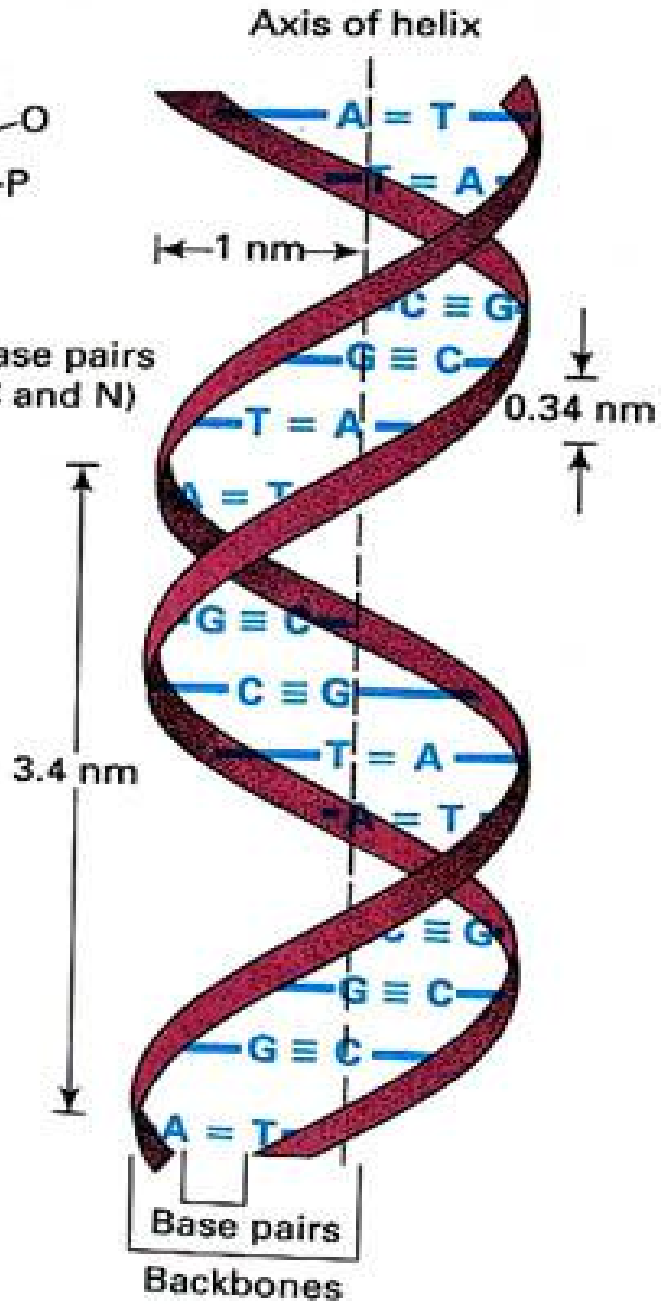


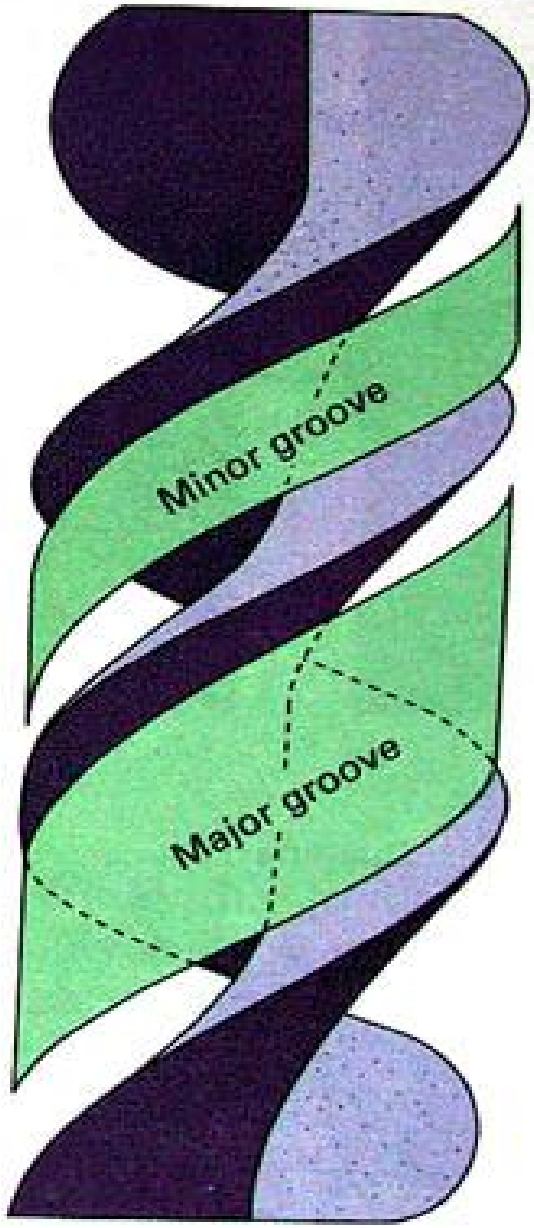
Maurice Wilkins

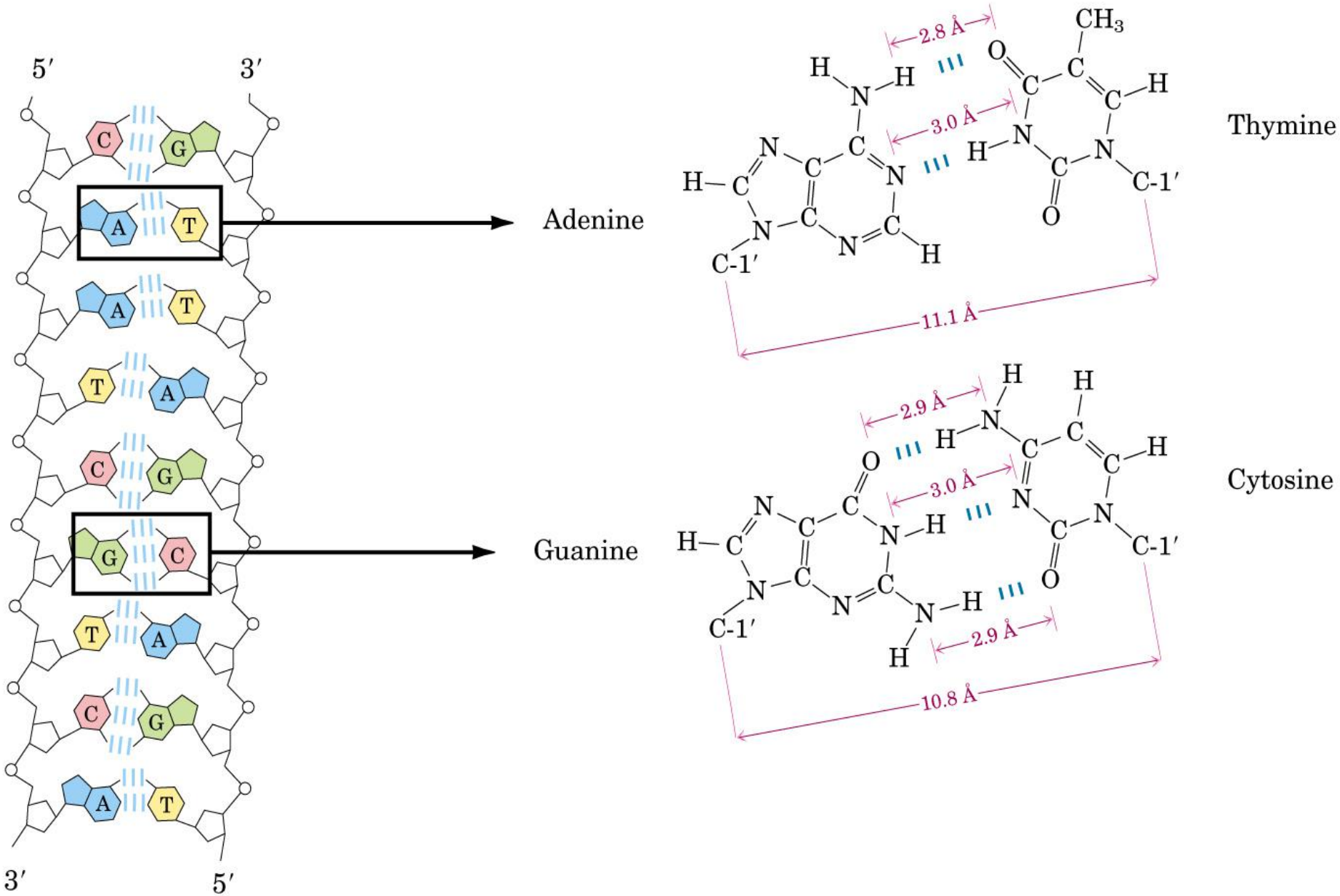
Rosalind Franklin
1920–1958

- Watson和Crick也在进行DNA的研究，在前人的基础上提出了DNA双螺旋结构模型。该模型的要点：
- 1、两条多核苷酸链反平行为同一轴心螺旋缠绕，均为右手螺旋。
- 2、碱基位于内侧，磷酸与戊糖在外侧，核苷酸以磷酸二酯键相连。两链形成大沟和小沟。
- 3、DNA直径为2nm　两个相邻碱基高度为0.34nm,两核苷酸形成的夹角为36度。旋转一周为10个核苷酸，上升3.4nm .
- 4、两链之间的碱基互相形成氢键A对T为两个双键，C对G有三个。
- 5、碱基排列依照碱基配对原则，另一条为互补链。


a) Molecular model
O
P
H
Base pairs
(C and N)
C
Base pairs
Backbones

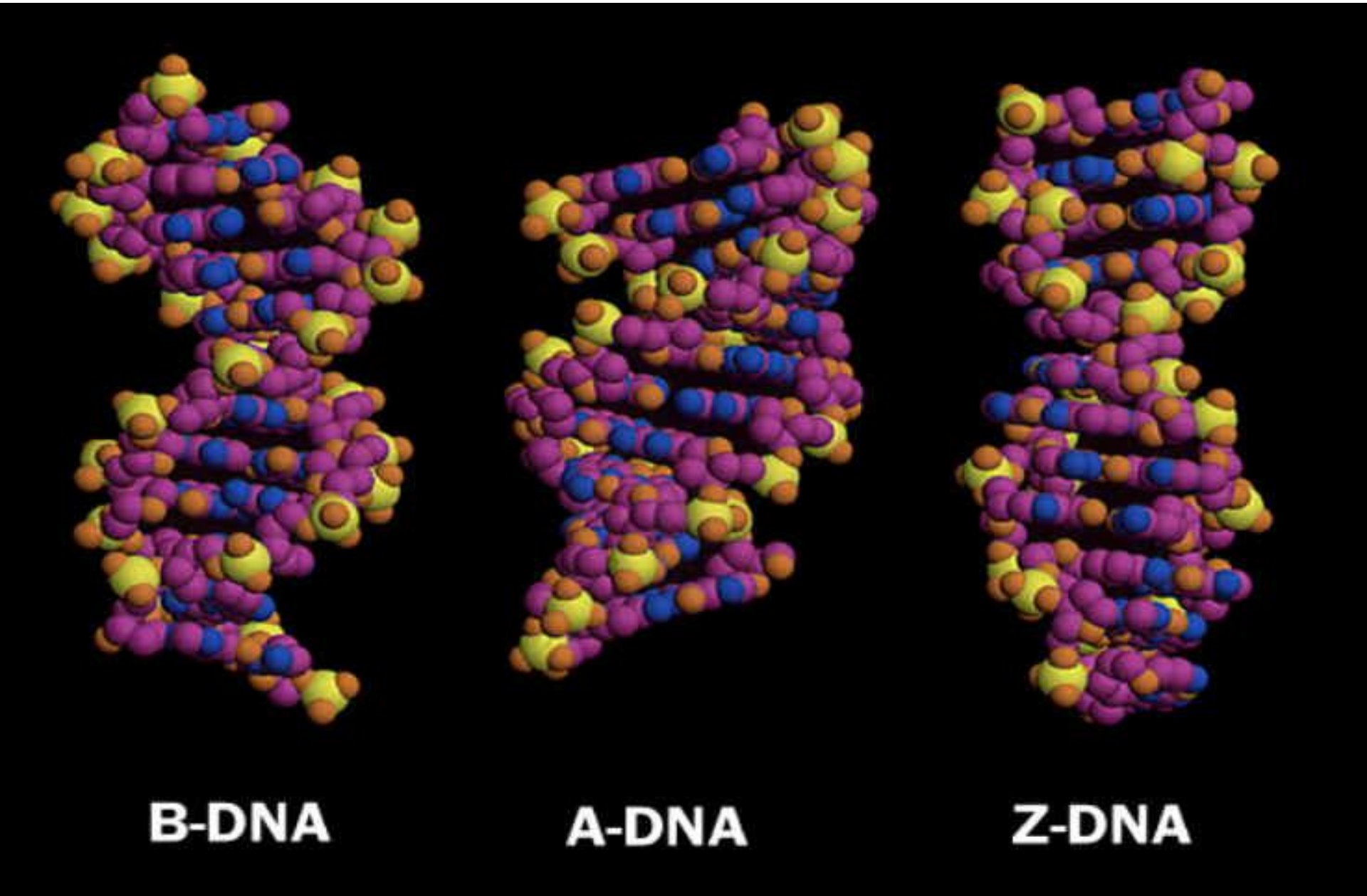

b) Stylized diagram
Axis of helix
A = T
T = A
1 nm
C ≡ G
G ≡ C
T = A
0.34 nm
G ≡ C
C ≡ G
T = A
3.4 nm
C ≡ G
G ≡ C
G ≡ C
A = T
Base pairs
Backbones


c) Major and minor grooves
Minor groove
Major groove


5′
3′
C
G
A
T
Adenine
Thymine
2.8 Å
3.0 Å
11.1 Å
CH3
C-1′
Guanine
Cytosine
2.9 Å
3.0 Å
2.9 Å
10.8 Å
3′
5′

- Dickerson对Watson和Crick双螺旋的补充：
- 1、两核苷酸的夹角范围为28－42度之间。
- 2、组成双螺旋的碱基分布并非在一个平面，而是有一定角度。
- A-DNA：在相对湿度为75％所获得的DNAX-ray分析得到。比B－型较短，宽。
- B-DNA：在相对湿度为92％测得。 Watson和Crick的双螺旋
- Z-DNA：左手螺旋结构，磷酸基在多核苷酸骨架上排列为Z－形，它可能与B－DNA互变，目前功能不清。

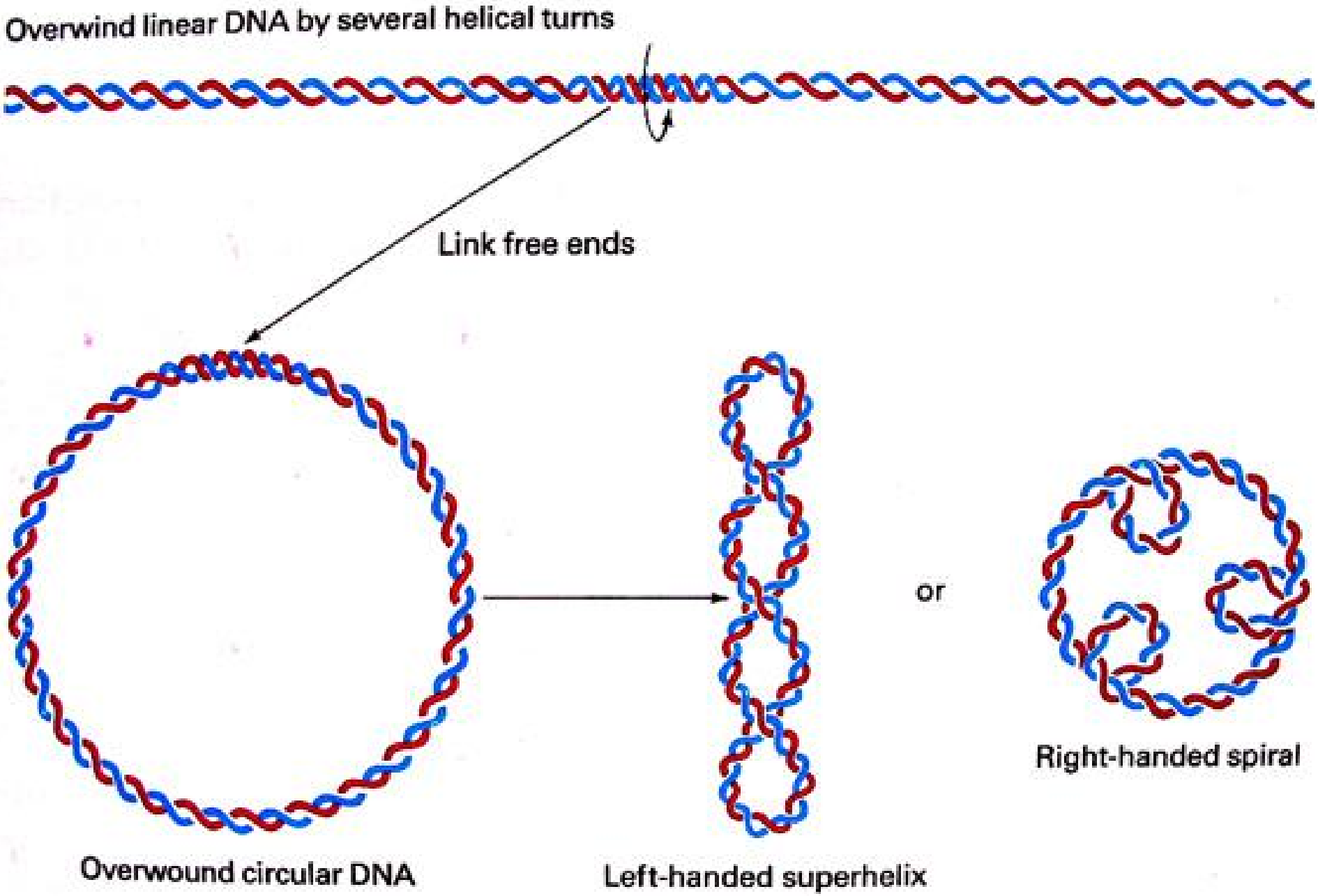
三种DNA结构模型



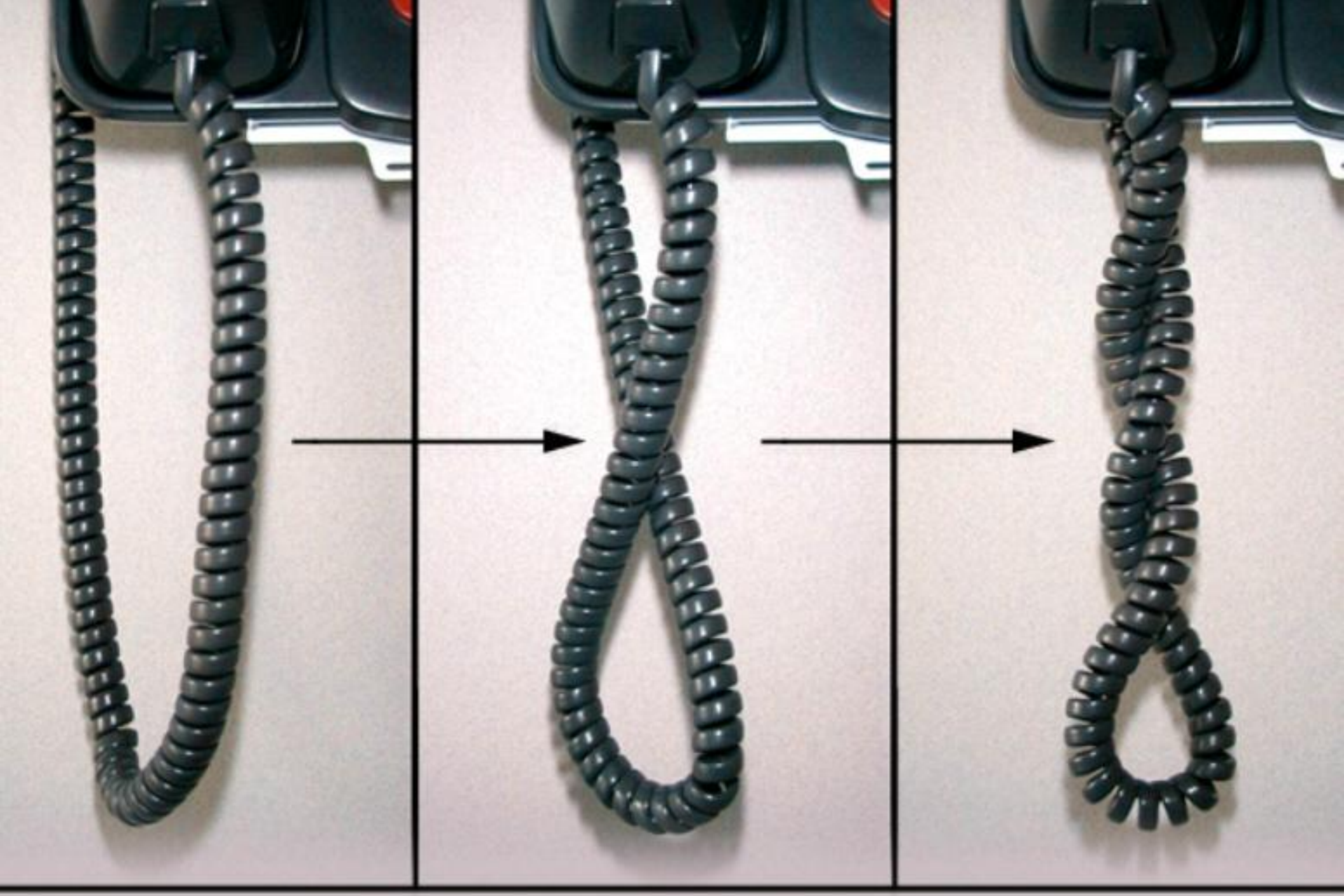
（三）DNA的三级结构

- DNA在二级结构的基础上可进一步扭曲和折叠，形成三级结构。三级结构是DNA的超螺旋结构，是双螺旋的螺旋体。应用数学的拓扑学理论研究DNA的超螺旋结构，认为环状DNA有一些重要的拓扑学性质。在拓扑异构酶的作用下，可以环状DNA与线性DNA之间互变。这对于DNA的复制、转录有十分重要的意义。

(b)



Positively supercoiled DNA



If you twist the reciever before you hang up....you induce supercoiling.

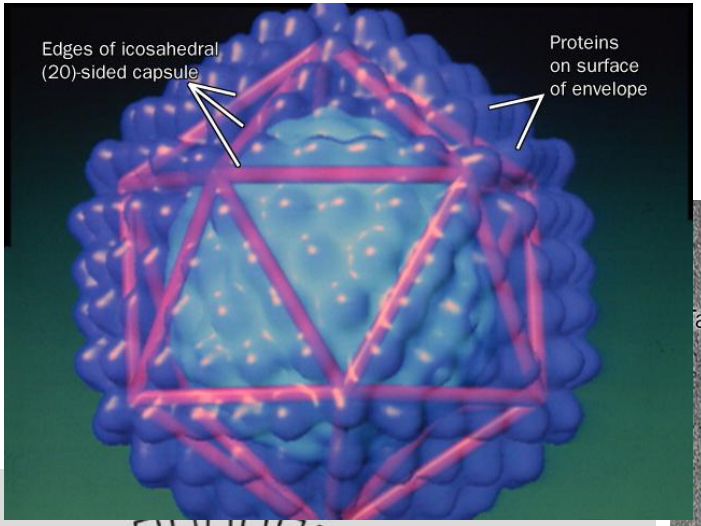
（四）DNA与蛋白质复合物的结构

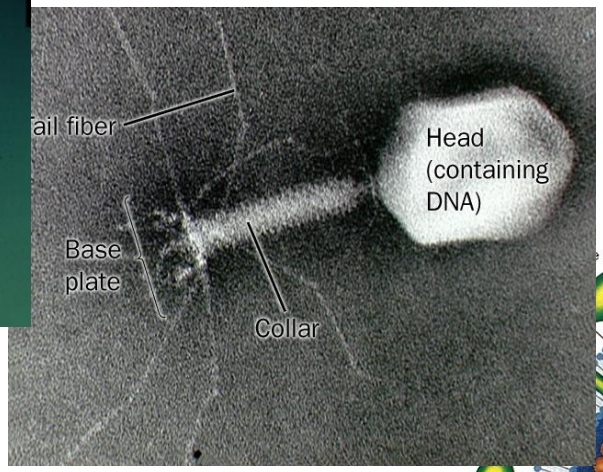
- 1、病毒
- 2、细菌的拟核
- 3、真核生物的染色体

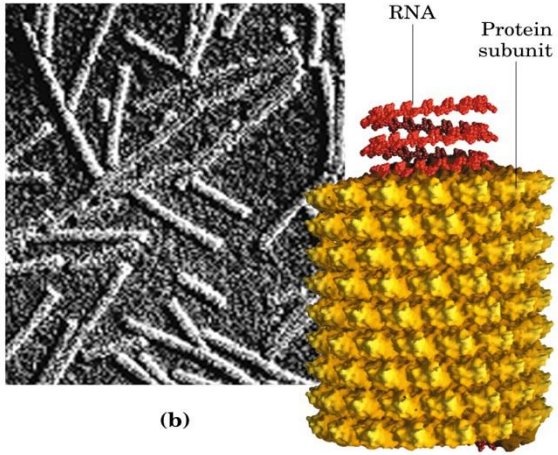
病　　毒

病毒基因组较小，通常只有几个至几十个基因。病毒颗粒（Virion）主要由核酸和蛋白质组成。有的病毒还含有脂质及糖类物质。在病毒颗粒中，核酸位于内部，蛋白质包裹着核酸，这层蛋白质外壳称为衣壳（capsid），衣壳由许多蛋白质亚基构成，称为原聚体（protom。。）。

病毒结构







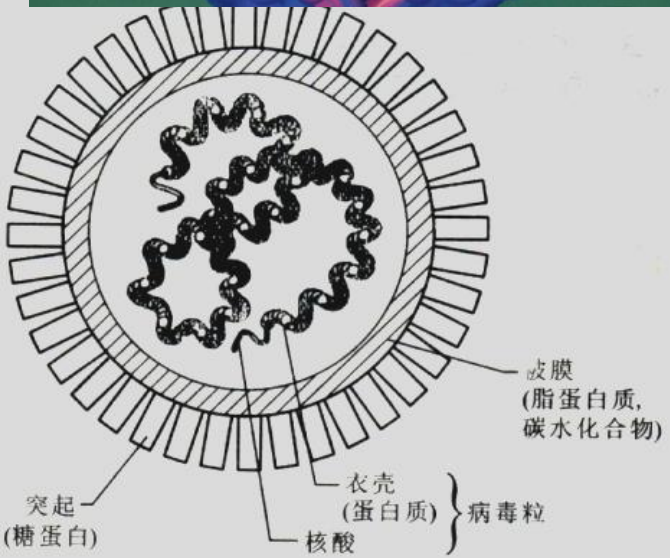
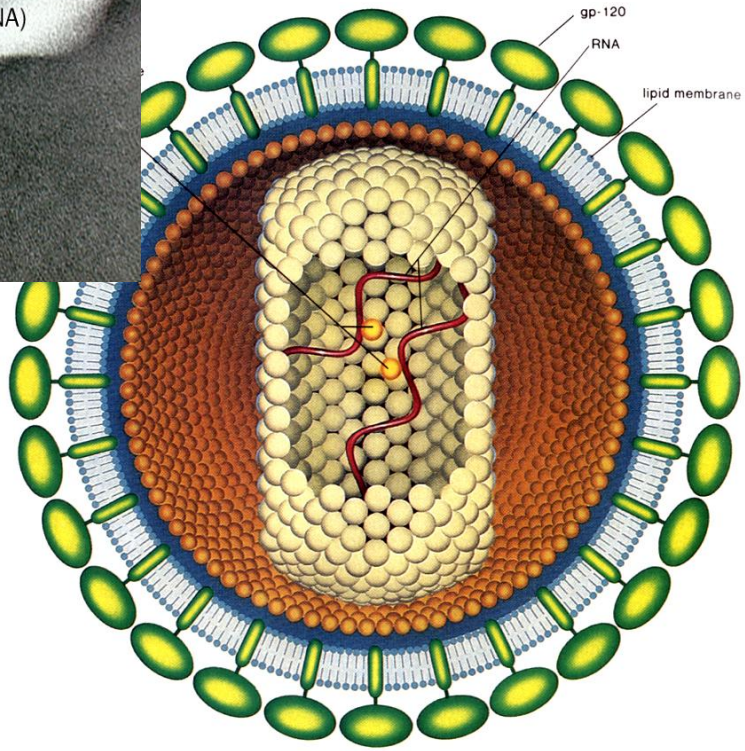


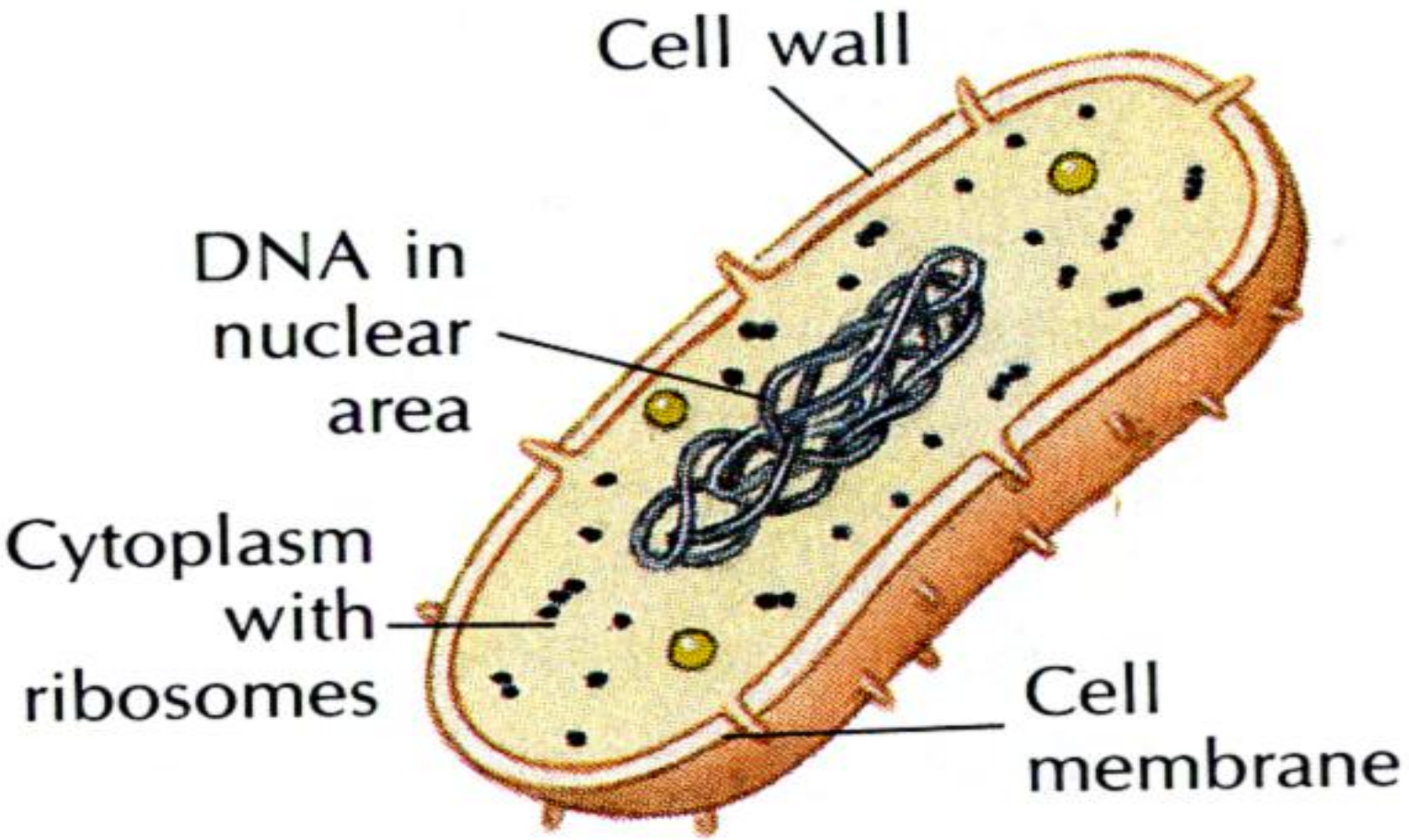
图 13－14　动物病毒切面模式图



细菌的拟核

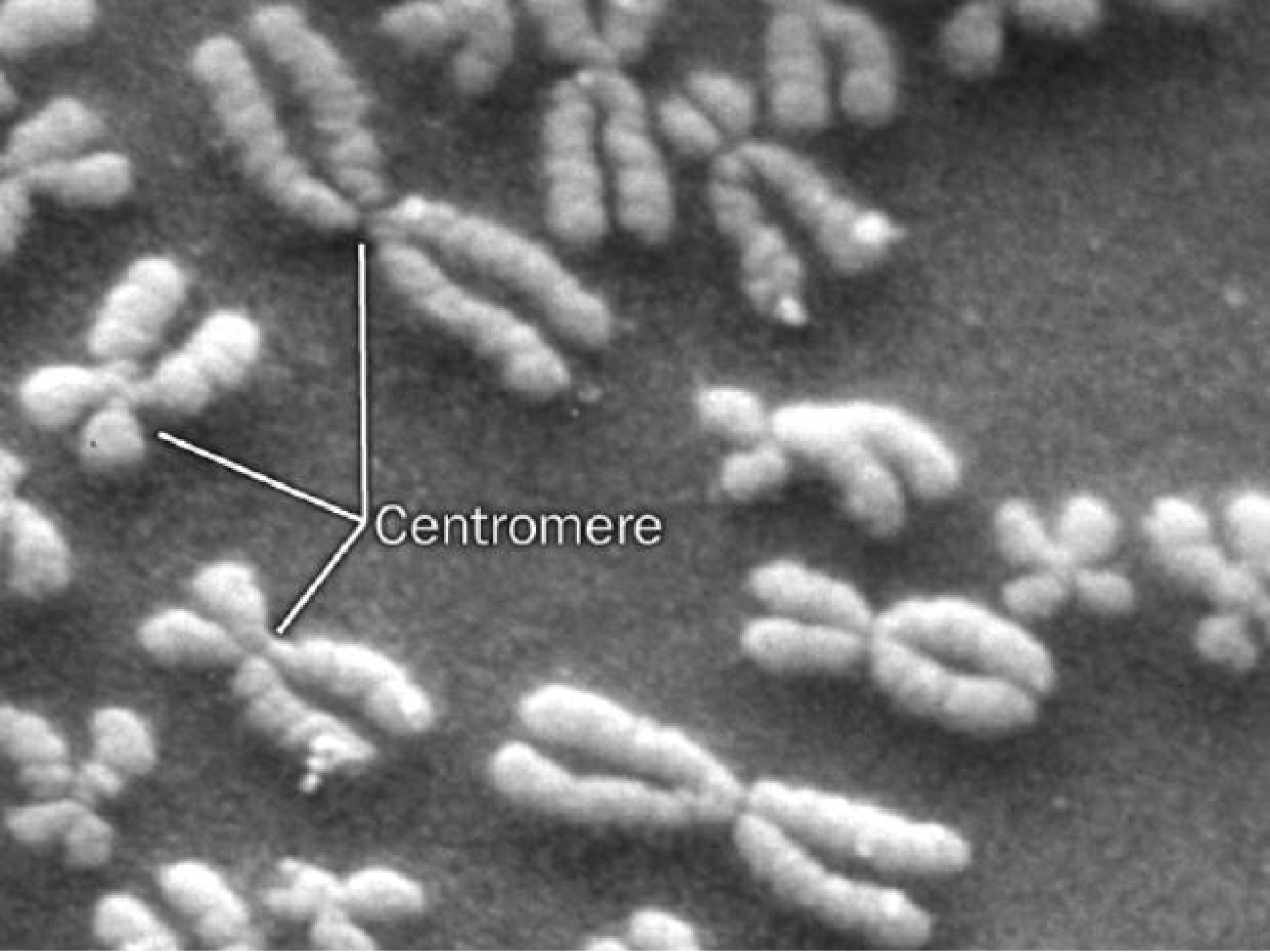
- 虽然细菌没有真核细胞的核结构，其遗传物质也不显示真核细胞染色体的形态特征，但细菌的染色体DNA并非完全散开的，它在细胞内紧密缠绕形成致密的小体，称为拟核（uncleoid）约占细胞体积的三分之一。

细菌的拟核

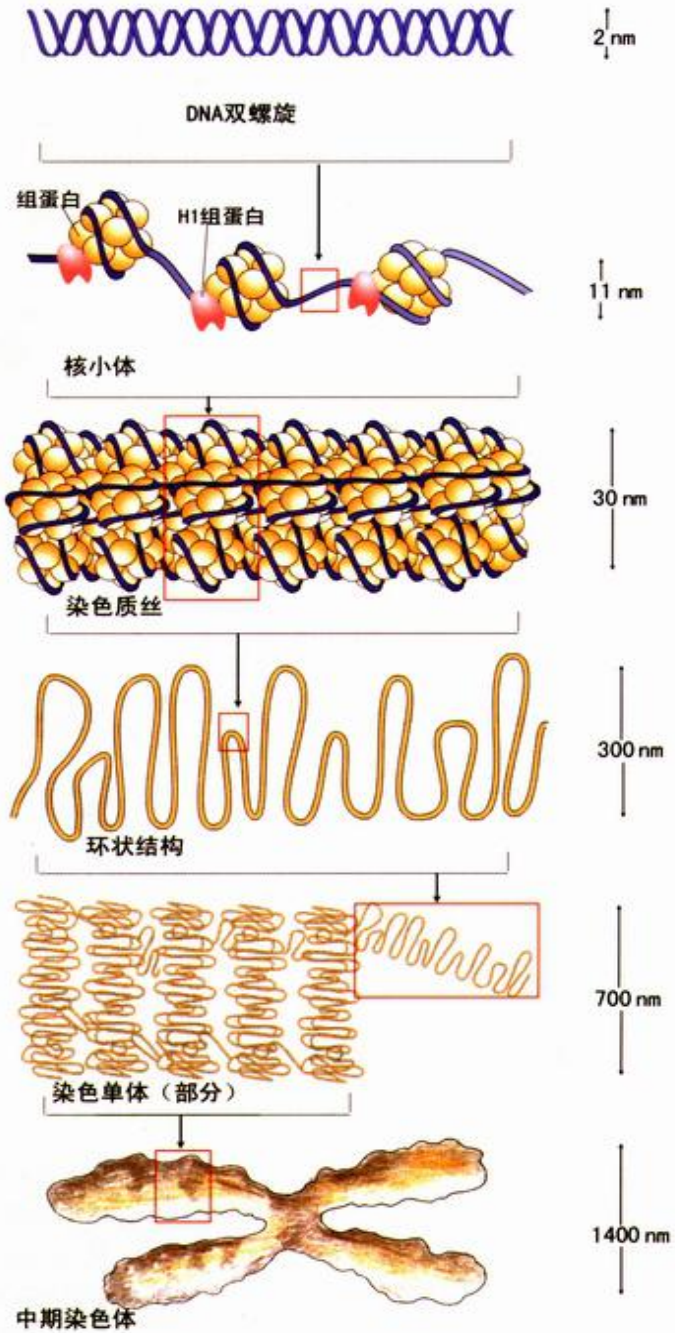

Cell wall
DNA in nuclear area
Cytoplasm with ribosomes
Cell membrane

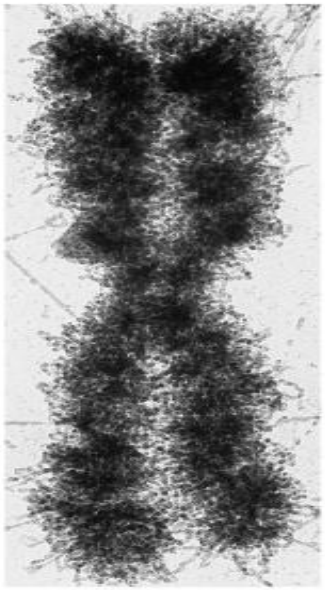
染色体

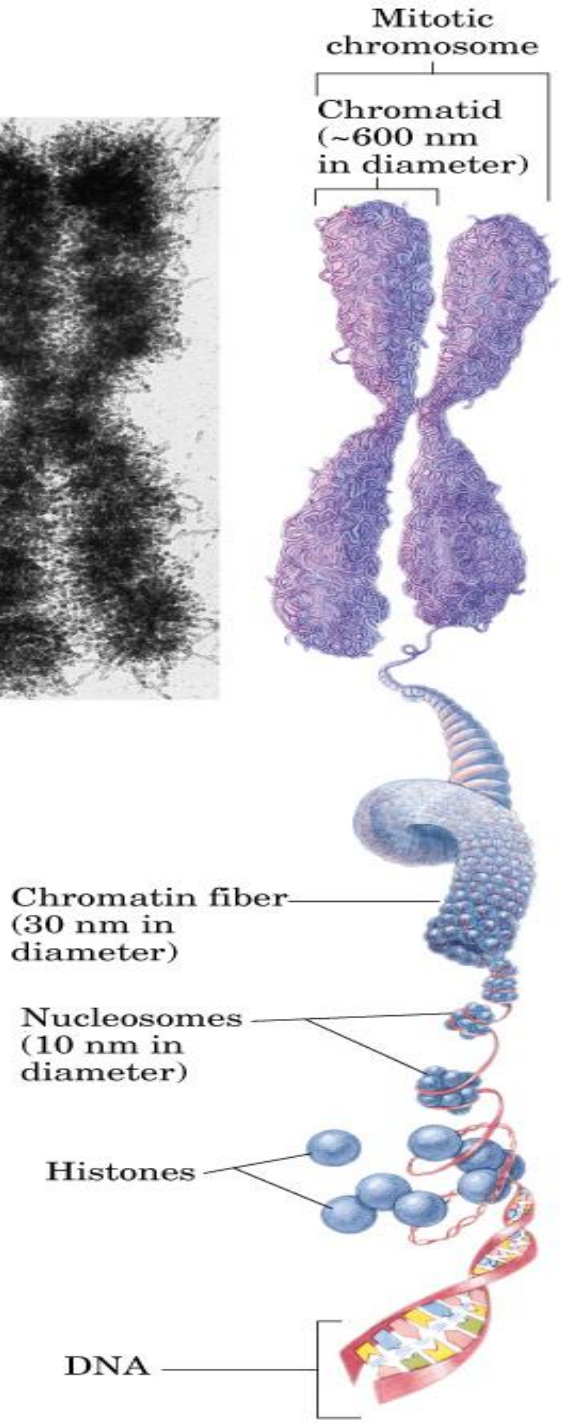
- 真核生物的染色体就复杂得多，它具有不同层次的组装结构，压缩比达 10 000。在细胞分裂间期，基因组以染色质形式存在。染色质分为常染色质和异染色成两种。在常染色质中 DNA 的压缩比为 1000～2 000，相对比较伸展主要为单拷贝基因和中等重复序列，是基因活跃表达区域，其表达受各种调节因子的调节。


Centromere

真核生物染色体结构


2 nm
DNA双螺旋
组蛋白
H1组蛋白
11 nm
核小体
30 nm
染色质丝
300 nm
环状结构
700 nm
染色单体（部分）
1400 nm
中期染色体




Mitotic chromosome
Chromatid (~600 nm in diameter)
Chromatin fiber (30 nm in diameter)
Nucleosomes (10 nm in diameter)
Histones
DNA

核小体结构

- 染色质的基本结构单位是核小体（nucleosome）。

按照Konberg的模型，核小体是由直径为110AX 55A的组蛋白核心和盘绕其上的 DNA所构成。核小体之间连接DNA的长度随不同核小体而略有不同，平均每个核小体重复单位约占 DNA 200 bp 。

过去一般认为蛋白质是结合于DNA的大沟之中。但是，自从1974年R．D．Kornbeng根据电镜观察和X射线衍射等资料，提出核小体的结构以后，上述结论已被否定。

核小体结构

核心由组蛋白H2A、H2B、H3和H4各2分子组成，所以是一个八聚体；DNA以左手螺旋在组蛋白核心上盘绕1．8圈，共146bp。

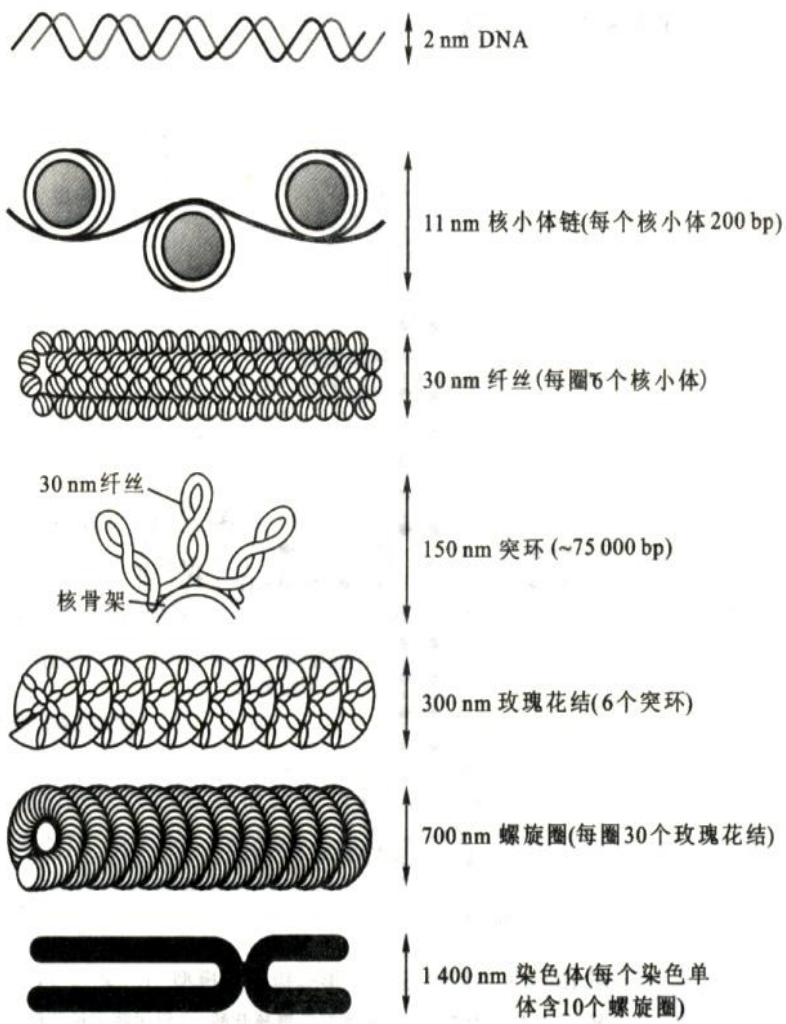


图 13－17　真核生物染色体 DNA 组装不同层次的结构

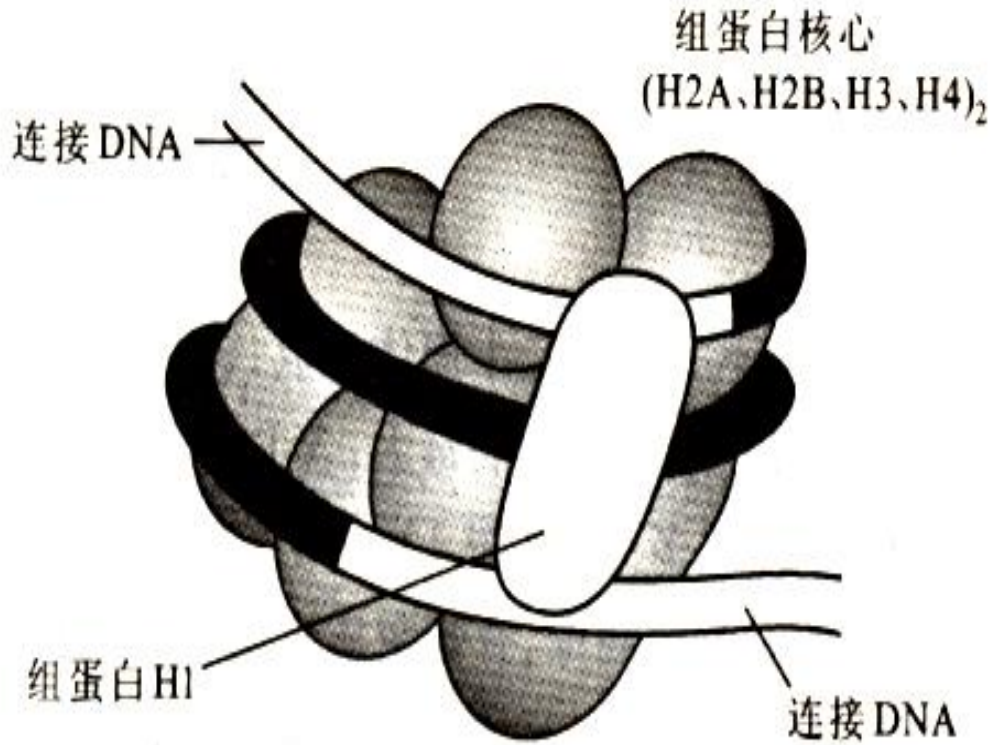


图 13－16　核小体的结构

四、RNA的高级结构

- （一）tRNA的高级结构
- （二）rRNA的高级结构
- （三）其他RNA的高级结构

（一）tRNA的高级结构

- tRNA的二级结构都呈三叶草形，双螺旋比例较高，因此tRNA 的二级结构十分稳定。有5个部分组成：
- **1、氨基酸臂（amino acid arm）：**有7对碱基，富含鸟嘌呤，末端为CCA，接受活化的氨基酸。
- **2、二氢尿嘧啶环（dihydrouracil loop）：**8－12个核苷酸组成，具有两个二氢尿嘧啶。
- **3、反密码环（anticodon loop）：**有7个核苷酸组成，环中部为反密码子，常有次黄嘌呤。
- **4、额外环（extra loop）：**有8－18个核苷酸，不同的tRNA有不同的额外环，可作为分类的依据。
- **5、假尿嘧啶环－胸腺嘧啶核糖核苷环（TΨC）：**有7个核苷酸组成，通过5对碱基与其他部分连接。所有的tRNA都含有此环。

- tRNA的三级结构
- 用得到的酵母苯丙氨酸tRNA晶体，经X-ray衍射分析证明tRNA三级结构是一个倒L型。

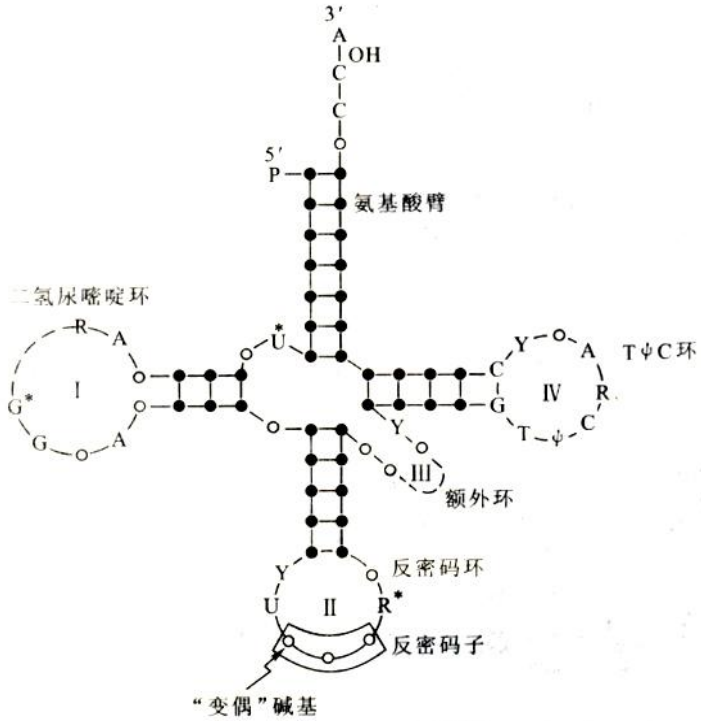


图 13－18　tRNA 三叶草形二级结构模型

图中 R:嘌呤核苷酸，Y:嘧啶核苷酸，T:胸腺嘧啶核糖核苷酸，ψ:假尿嘧啶核苷酸。带星号的表示可以被修饰的碱基，黑的圆点代表螺旋区的碱基，白色圈代表不互补的碱基

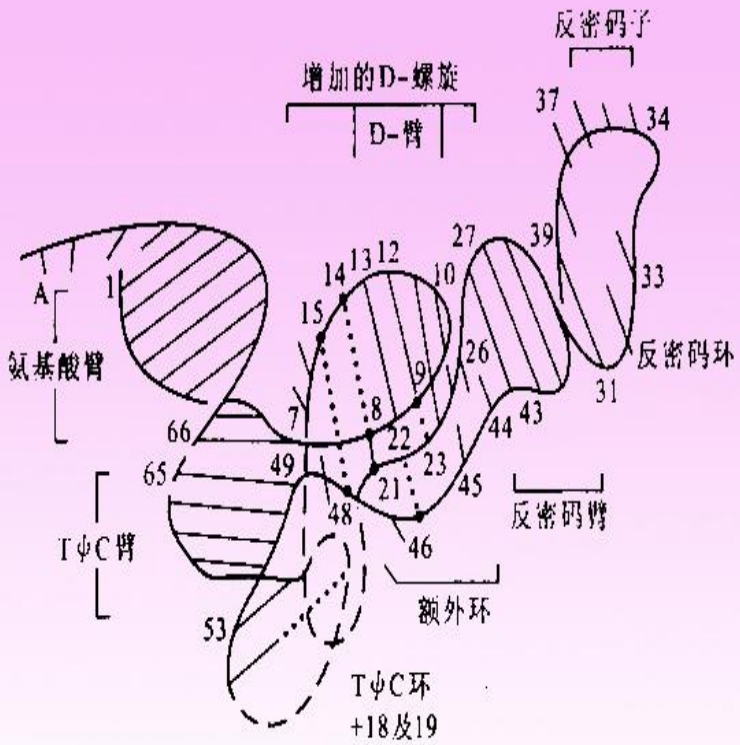
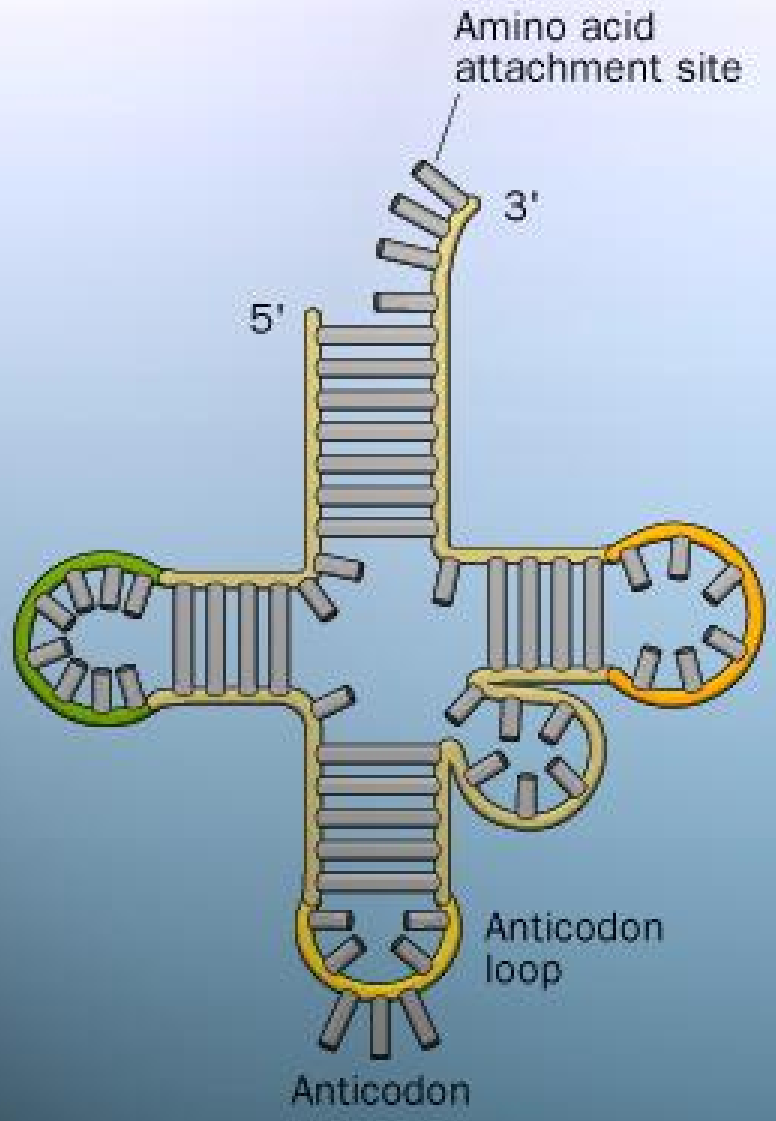
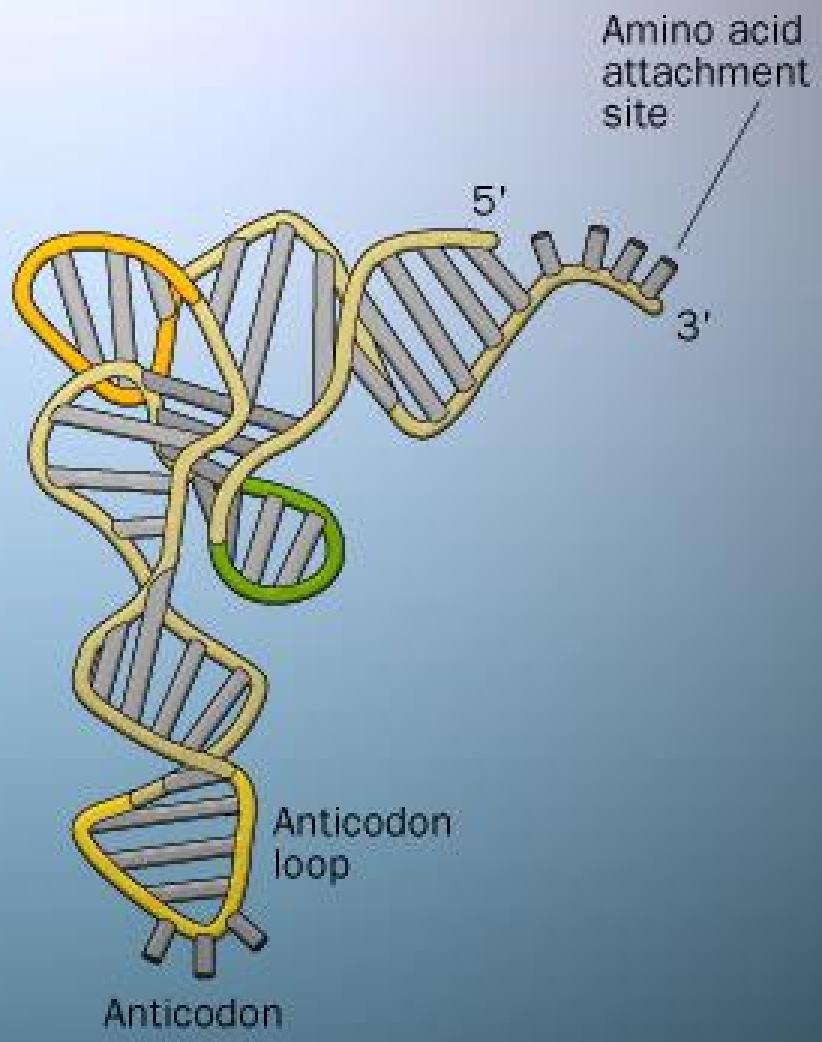


图 13－19　酵母苯丙氨酸 tRNA 的三级结构

tRNA ("cloverleaf" model)



tRNA (folded model)



（二）rRNA的高级结构

- 蛋白质生物合成是细胞代谢最复杂也是最核心的过程，其中涉及到200多种生物大分子参与作用。核糖体是蛋白质合成的工厂。按照传统的看法，rRNA是核糖体的骨架，蛋白质的肽键是由核糖体上的肽基转移酶（peptidyl transferase）催化下合成的。直到 90年代初，H.F .Noller等证明大肠杆菌 23 S rRNA能够催化肽键的形成，才证明核糖体是一种核酶，从而根本改变了传统的观点。核糖体催化肽键合成的是rRNA，蛋白质只是维持rRNA构象，起辅助的作用。

16SrRNA及5SRNA的结构

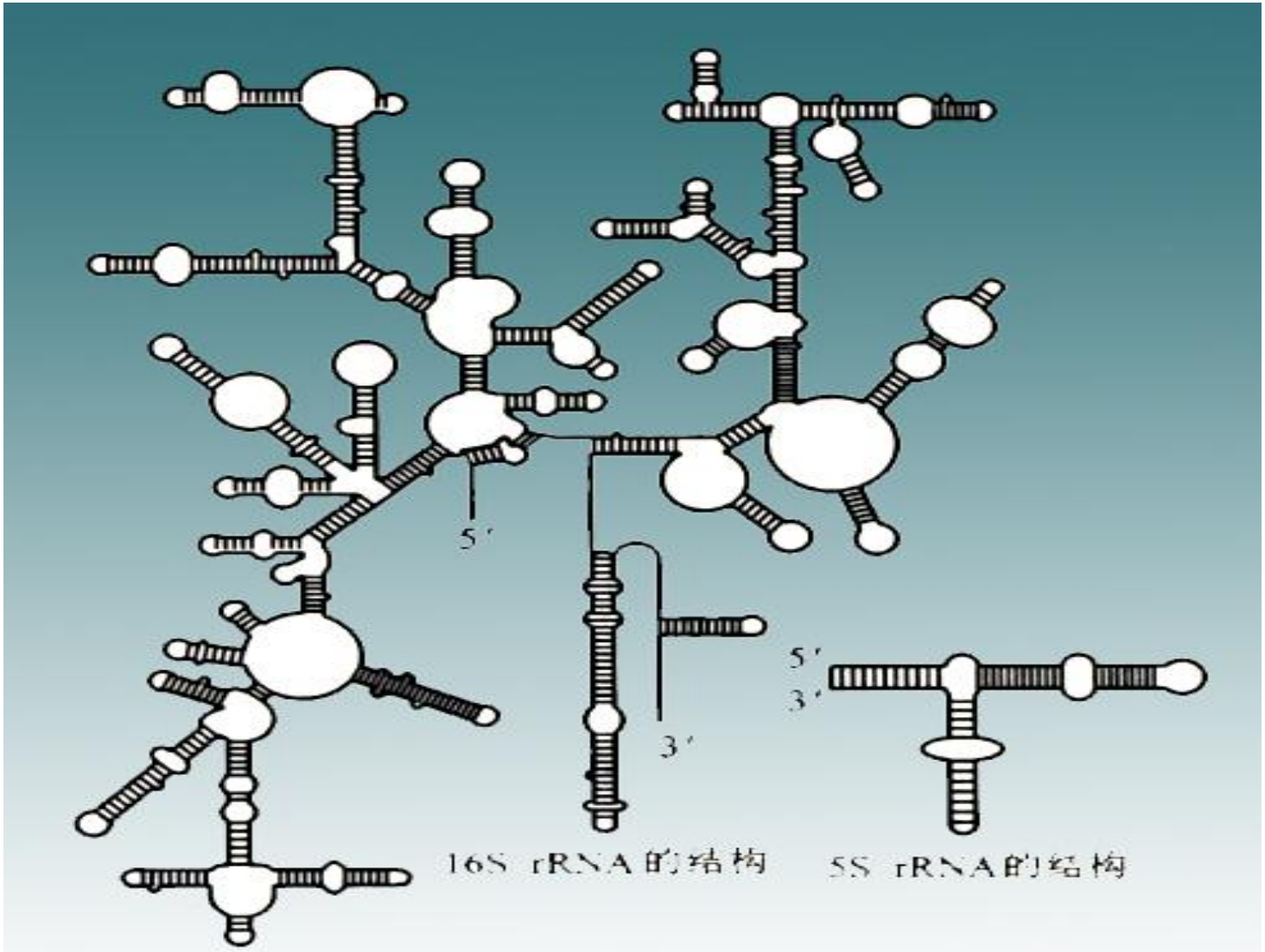
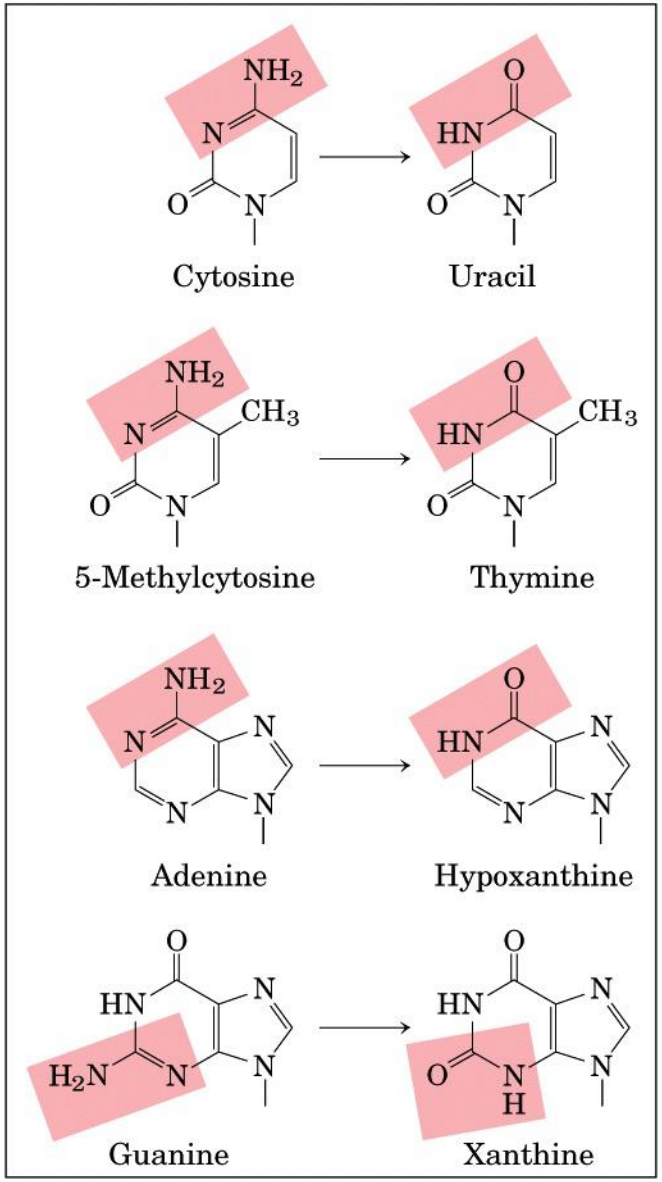
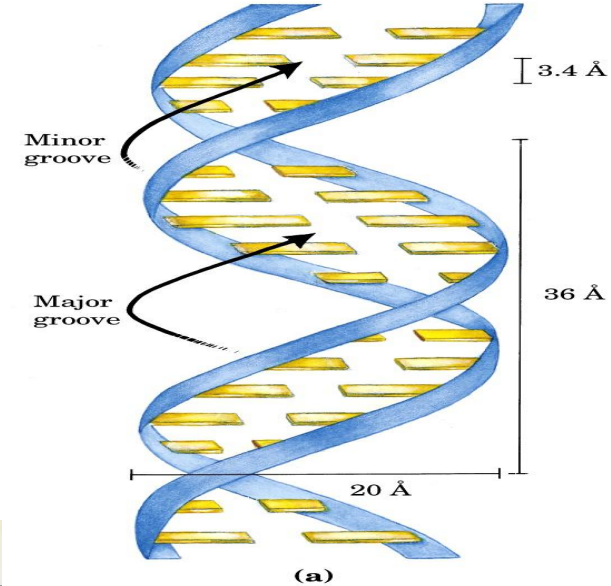


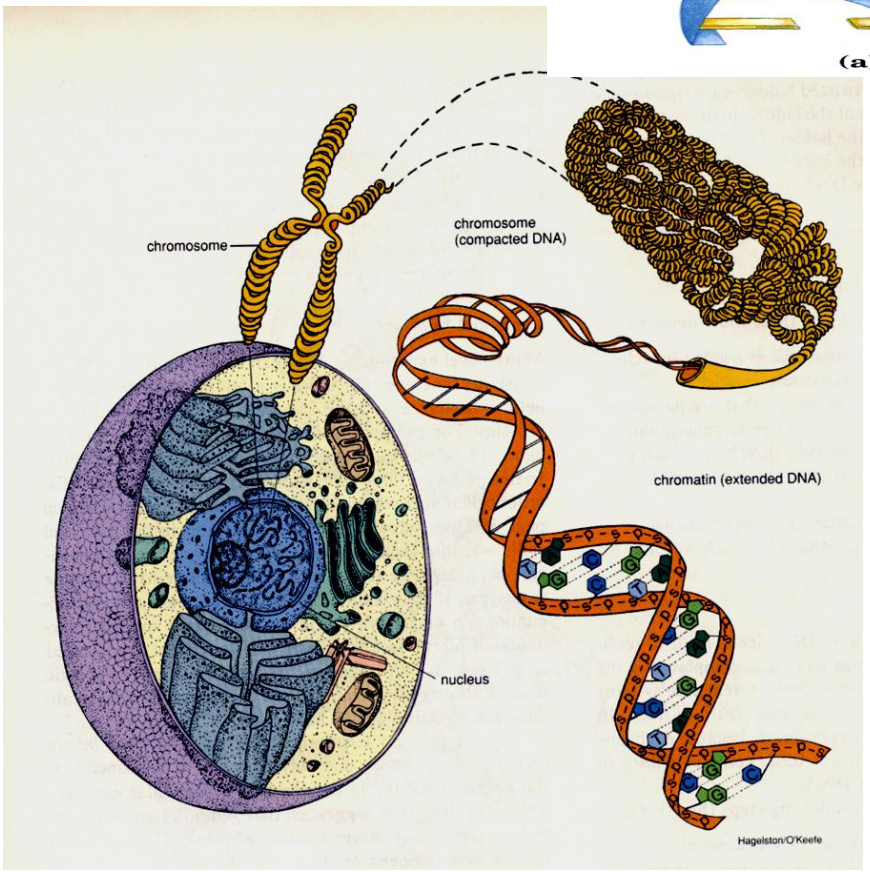
图 13—20 16S 和 5S rRNA 的结构

提要



Deamination
(a)





第 二节　　核酸的物化性质及研究方

一、核酸的酸碱性质

三、核酸的紫外吸收

四、核酸的变性、复性及杂交

五、核酸的分离、提纯和定量测定

六、核酸的超速离心

七、核酸的电泳

八、核酸的核苷酸序列测定

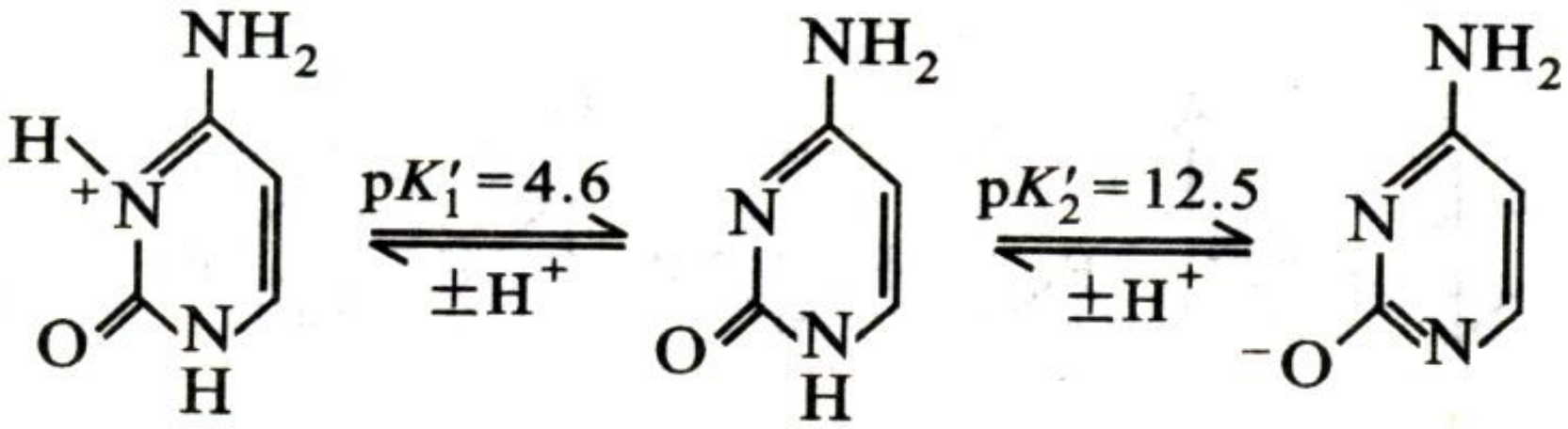
九、DNA聚合酶链反应

十、DNA的化学合成

一、核酸的性质

- 1、碱基的解离
- 2、核苷的解离
- 3、核苷酸的解离

- 核酸的碱基、核苷及核苷酸都能解离。
- 1、碱基的解离主要发生在杂环的N上和羰基上，可以给出质子和接受质子，因此碱基在溶液中，在正负粒子之间具有一定平衡。
- 2、核苷的解离：核苷上的碱基能解离，但会受到一定的影响。
- 3、核苷酸的解离：由于磷酸的存在，首先解离的基团是磷酸基团，其次才是其它基团的解离。



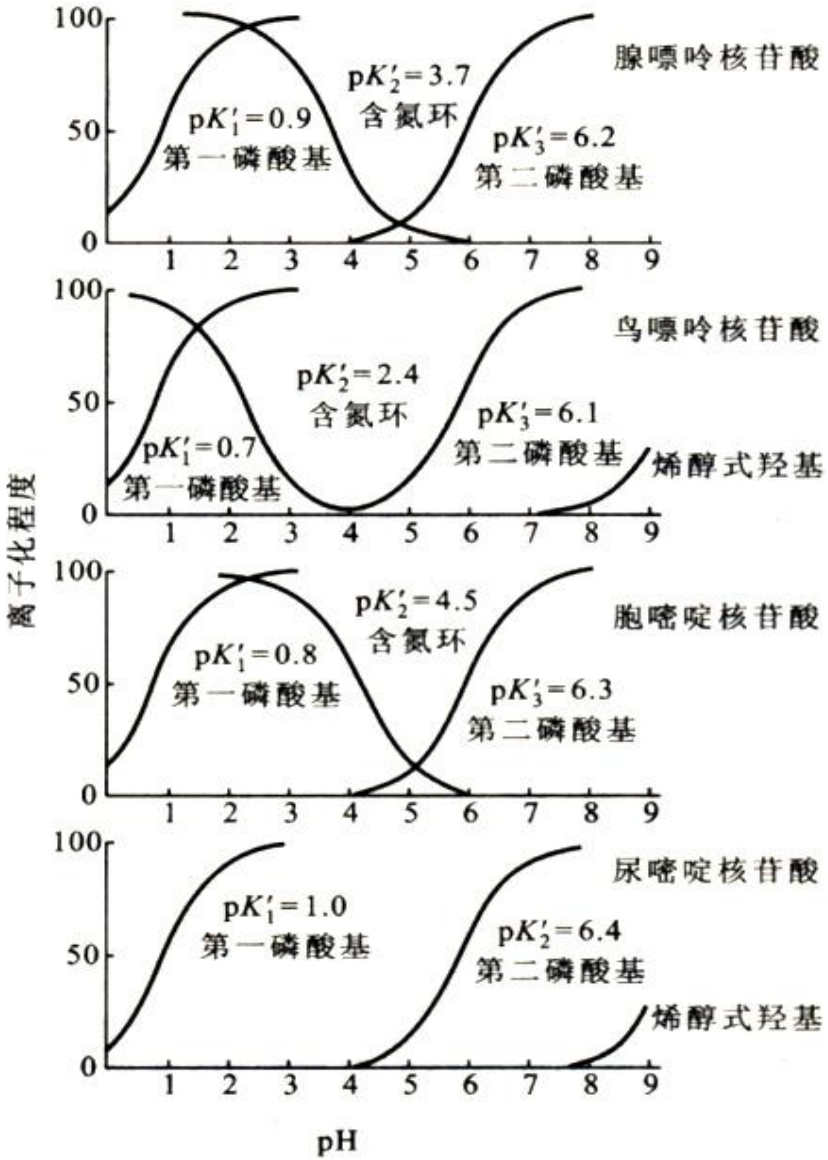


图 14－1　核苷酸的解离曲线

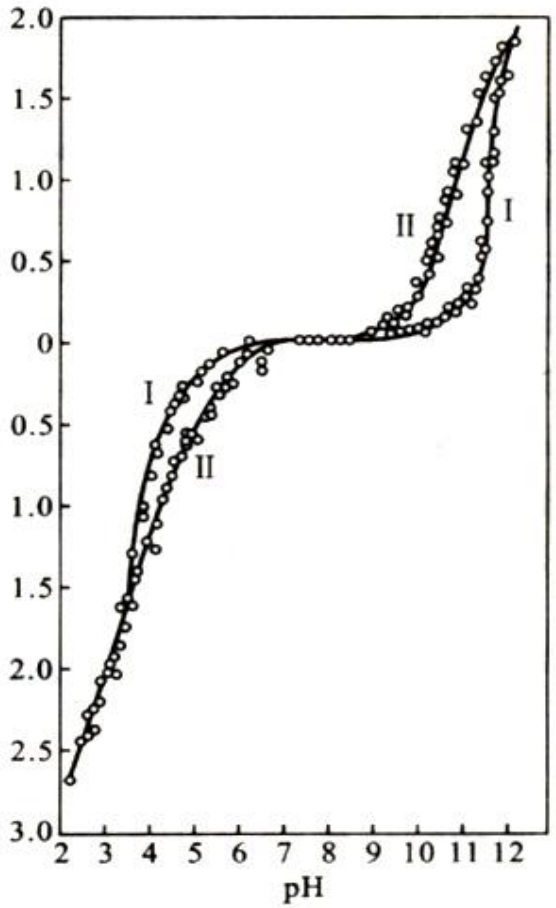


图 14－2　小牛胸腺 DNA 的滴定曲线

Ⅰ. 从 pH 6.9 用酸或碱正向滴定；Ⅱ. 从 pH 12 或 pH 2.5 分别用酸和碱反向滴定

二、核酸的紫外吸收

- 嘌呤碱与嘧啶碱具有共轭双键，使碱基、核苷核苷酸和核酸在240—290 nm的紫外波段有一强烈的吸收峰,最大吸收值在260nm附近。不同核苷酸有不同的吸收特性。所以可以用紫外分光光度计加以定量及定性测定。
- 定量测定： DNA纯品 OD_{260} / OD_{280}＝1.8
- RNA纯品 OD_{260} / OD_{280}＝2.0
- 通过紫外吸收值，测出P的克分子消光系数，定量测定核酸含量。根据公式： ε （P）＝OD / CL
- L—比色杯光径 ε （P）—克分子磷消光系数，C—每升中P的克原子数， C = 每升中P的重量W / P的克原子量（30.98）

- ε（P）＝30.98 / WL
- DNA ε（P）——6000 ~ 8000
- RNA ε（P）——7000 ~ 10000
- 核酸比核苷酸低20－60％
- 双链比单链低
- 增色效应：核酸在变形后 ε（P）值升高，这一现象称为增色效应。
- 减色效应：当变性的核酸恢复活性后，ε（P）值降低，称为减色效应。
- 原因：变性后内部基团暴露，共轭双键吸光加强。增色效应可作为鉴别核酸变性的指标。

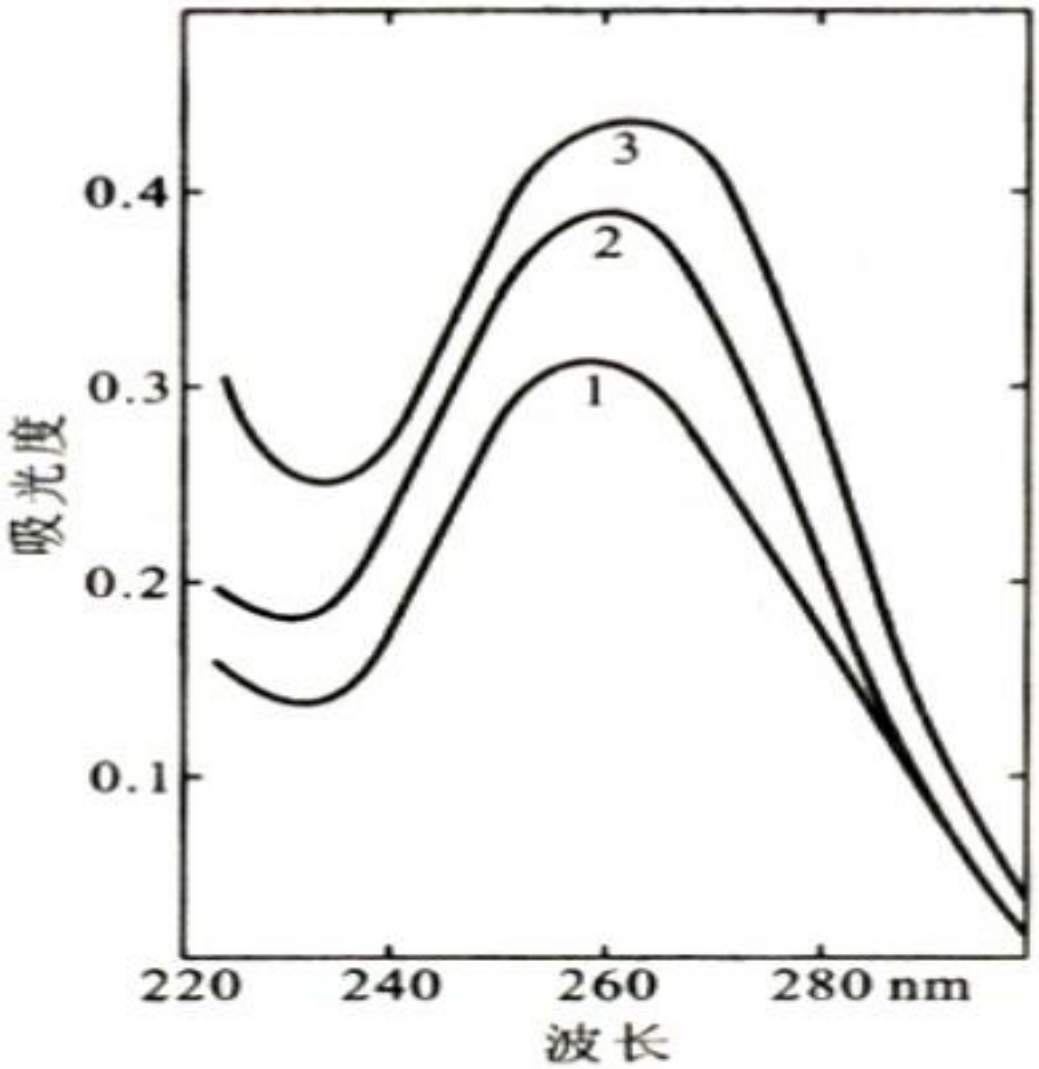


图 14－3　DNA 的紫外吸收光谱

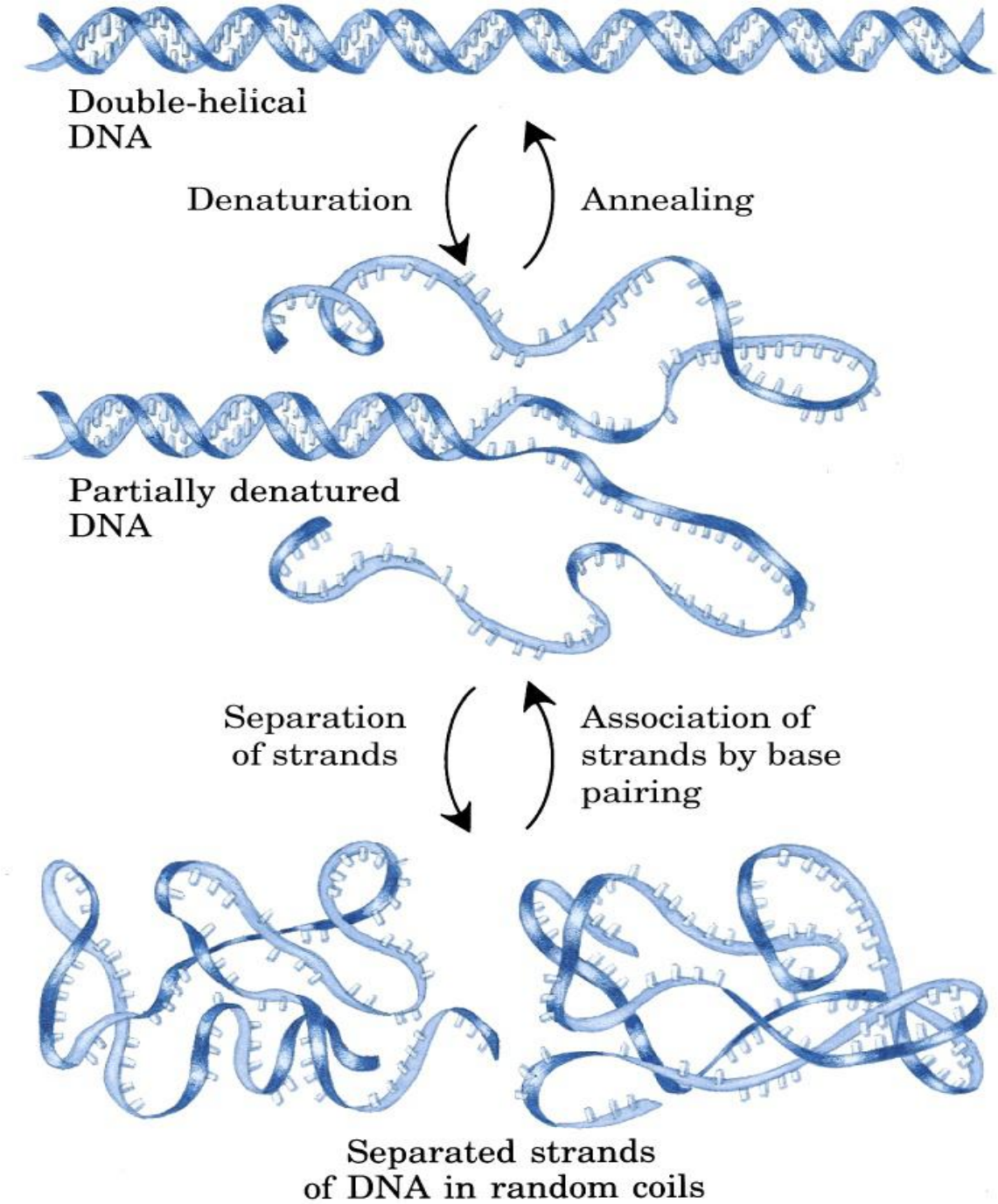
1．天然 DNA；2．变性 DNA；

3．核苷酸总吸光度值

三、核酸的变性、复性及杂交

- （一）变性
- （二）复性
- （三）核酸的杂交

DNA分子变性


Double-helical
DNA
Denaturation
Annealing
Partially denatured
DNA
Separation
of strands
Association of
strands by base
pairing
Separated strands
of DNA in random coils

（一）变性

- 变性（denatureation）是核酸的一个重要的性质，变性是指核酸双螺旋区的氢键断裂，变为无规则的单链，其物理化学性质改变。表现为：紫外吸收增高、粘度下降等。但不涉及到共价键的破坏。
- 变性因素：1、加热。2、酸碱、化学试剂如尿素、甲醛等。
- Tm值：将DNA稀盐溶液加热到80－100度时，双螺旋结构解链，成为无规则的线团。热变性使DNA的双螺旋结构失去一半时的温度成为该DNA的熔点或解链温度。
- DNA的变性一般是爆发式的，Tm值变化较窄。

- 影响DNA的Tm值的因素：
- 1、DNA的均一性。
- 2、C-G的含量
- 3、介质的离子强度。
- RNA的变性：RNA也具有局部的双螺旋区域，变性不如DNA明显。Tm值较低，变性曲线较缓。tRNA有较多的双螺旋区因此变形曲线较陡，Tm值较高。

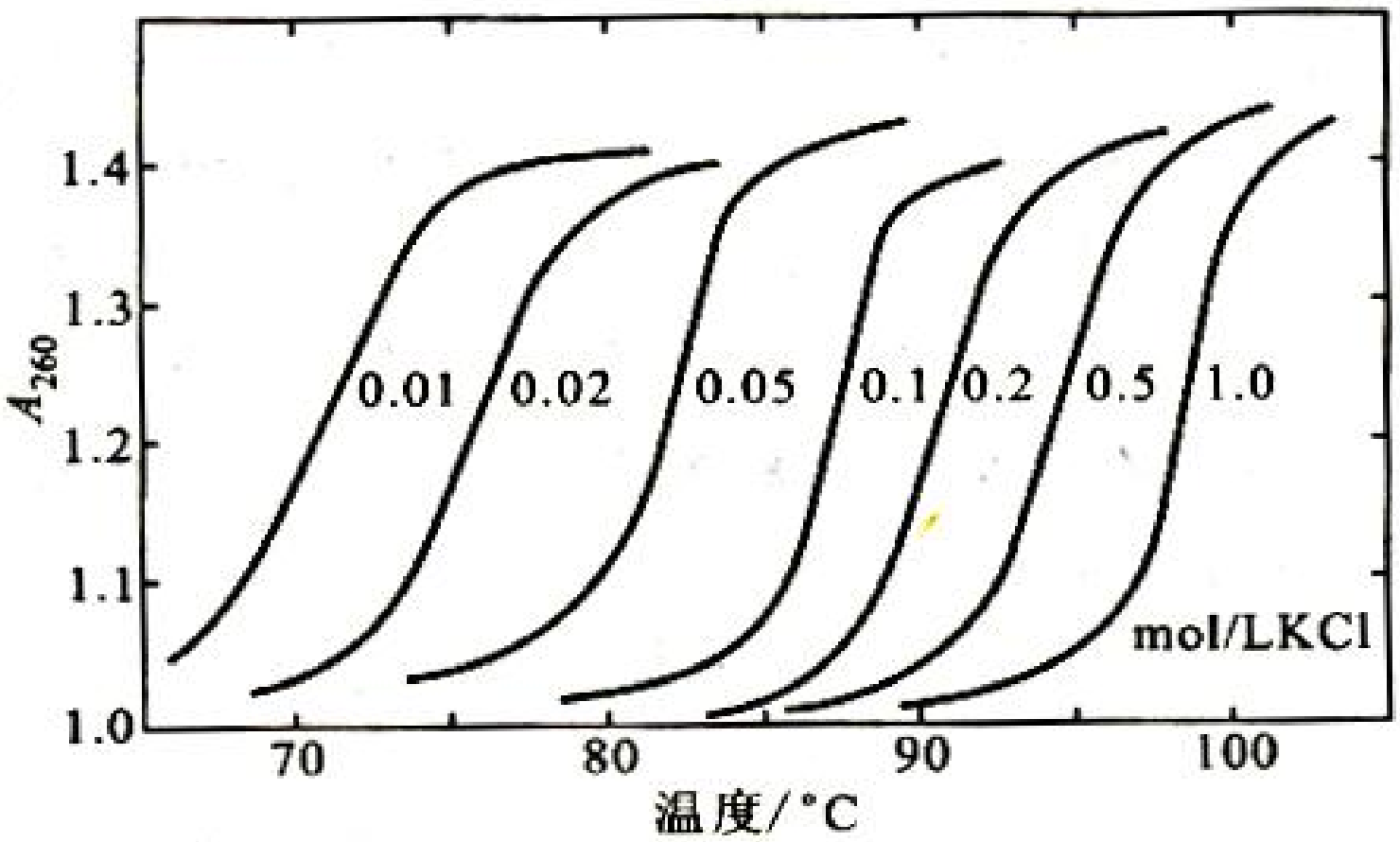


图 14－6　大肠杆菌 DNA 在不同 KCl 浓度下的熔解温度曲线

（二）复性

- 复性：变性DNA在适当条件下，两条分开的链彼此重新缔合成为双螺旋结构。
- 将热变性的DNA 骤然冷却时，DNA不可能复性、所以用同位素标记的双链DNA片段作为杂交的探针时，在沸水浴中加热数分钟后，要骤然在冰浴中冷却至低温，以防止复性。变性DNA在缓慢冷却时，可以复性，此过程称为退火（annealing），DNA的片段越大，复性越慢。DNA的浓度越大，复性越快。在一定条件下，复性反应的速度可以Cot1／2来衡量。Co为变性DNA复性时的初始浓度，以核苷酸的摩尔浓度表示／为时间，以秒表示，Cot1/2表示复性一半的Cot值。

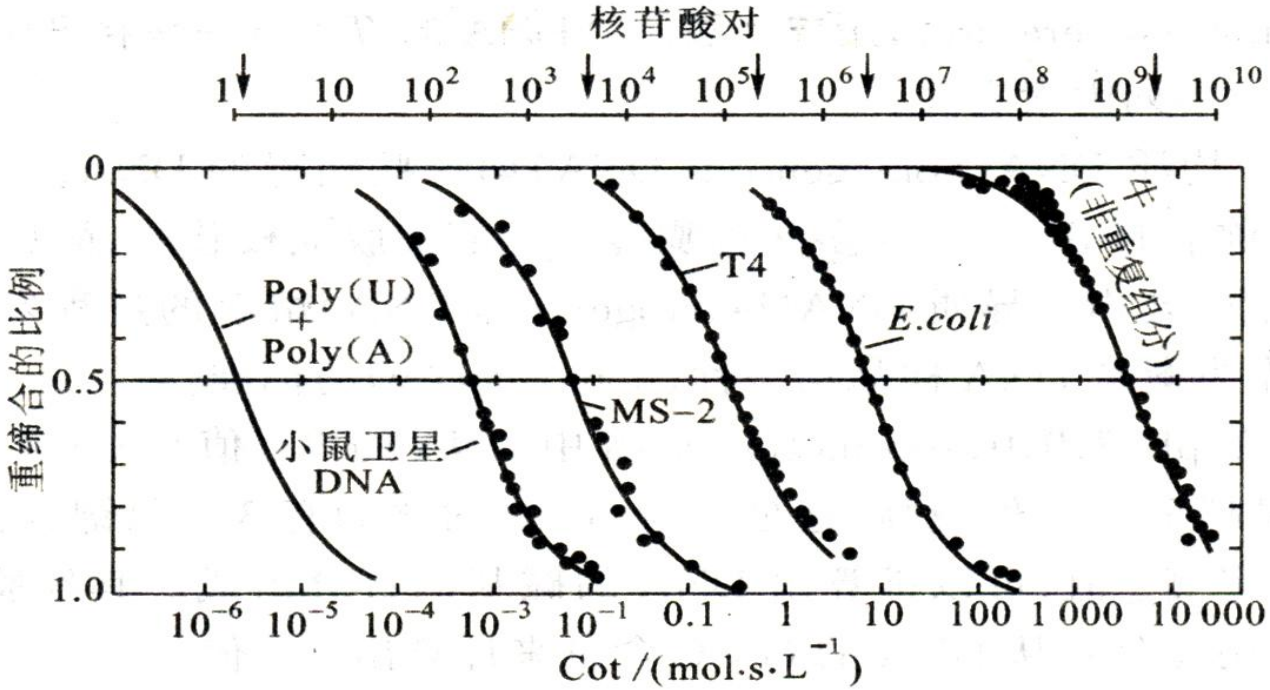


图 14－8　不同 DNA 的复性时间

- 复性的条件：
- 1、温度缓慢降低，骤冷不得恢复。
- 2、较短的片段恢复较快，反之较慢。
- 3、均一性比异质性好恢复。
- 4、浓度越大恢复越快。

（三）核酸的杂交

- 将不同来源的DNA放在试管里，经热变性后，慢慢冷却，让其复性。若这些异源DNA之间在某些区域有相同的序列，则复性时，会形成杂交DNA分子。DNA与互补的RNA之间也可以发生杂交。

分子杂交实验基本步骤

1、将DNA样品经限制性内切酶降解后，用琼脂糖凝胶电泳进行分离。

2、将胶浸泡在碱（NaOH）溶液中使DNA进行变性；

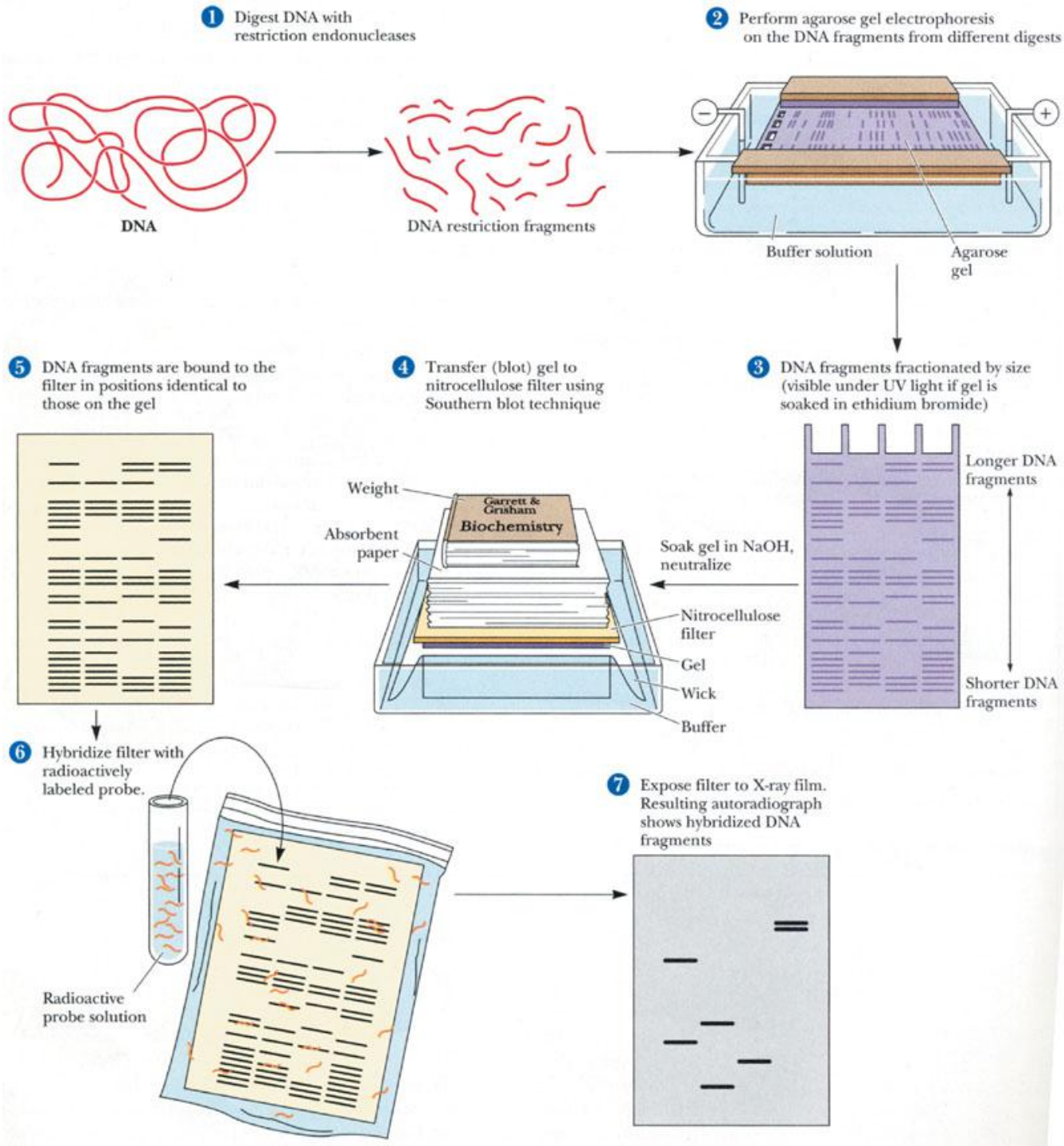
3、然后将变性DNA转移到硝酸纤维素膜上（硝酸纤维素膜只吸附变性DNA），

4、在80℃焙烤4～6 h，使DNA牢固地吸附在硝酸纤维素膜上。

5、与放射性同位素标记的变性DNA探针进行杂交。杂交须在较高的盐浓度及适当的温度(一般68℃)下进行数小时.然后洗涤，除去未杂交的标记物。

6、将硝酸纤维膜烘干后进行放射自显影。

分子杂交


1 Digest DNA with restriction endonucleases
2 Perform agarose gel electrophoresis on the DNA fragments from different digests
DNA
DNA restriction fragments
Buffer solution
Agarose gel
3 DNA fragments fractionated by size (visible under UV light if gel is soaked in ethidium bromide)
Longer DNA fragments
Shorter DNA fragments
Soak gel in NaOH, neutralize
4 Transfer (blot) gel to nitrocellulose filter using Southern blot technique
Weight
Absorbent paper
Garrett & Grisham
Biochemistry
Nitrocellulose filter
Gel
Wick
Buffer
5 DNA fragments are bound to the filter in positions identical to those on the gel
6 Hybridize filter with radioactively labeled probe.
Radioactive probe solution
7 Expose filter to X-ray film. Resulting autoradiograph shows hybridized DNA fragments

思考题