

第五章 核酸的结构与功能

(Chapter 5 Structure and Function of Nucleic Acid)

第一节 核酸的化学组成

第二节 核酸的分子结构

第三节 DNA 的理化性质及其应用

- 核酸是存在于细胞中的一类大分子酸性物质，包括核糖核酸（RNA）和脱氧核糖核酸（DNA）两大类。
- RNA 和 DNA 都是以单核苷酸为基本单位所组成的多核苷酸长链。
- RNA 主要参与遗传信息的表达，而 DNA 则是遗传信息的载体。

核酸化学研究史 (1)

1869 年 Miescher, 博士论文工作中测定淋巴细胞蛋白质组成时，发现了不溶于稀酸和盐溶液的沉淀物，并在所有细胞的核里都找到了此物质，故命名“核质 (Nuclein)”

1879 年 Kossel 经过 10 年的努力，搞清除核质中有四种不同的组成部分：A, T, C 和 G；

核酸化学研究史 (2)

1889 年，Altman 建议将“核质”改名为“核酸”，因为已经认识到“核质”乃是“核酸”与蛋白质的复合体。

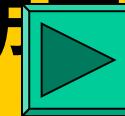
1909 年 Levene 发现酵母的核酸含有核糖

1930 年 Levene 发现动物细胞的核酸含有一种特殊的核糖——脱氧核糖，得出了一个概念：植物核酸含核糖，动物核酸含脱氧核糖。这个错误概念一直延续到 1938 年，这时方清楚 RNA 和 DNA 的区别。Levene 还提出了核酸的“磷酸—核糖（碱基）—磷酸”的骨架结构，解决了 DNA 分子的线性问题，还在 1935 年提出“四核苷酸”，认为这四种碱基的含量是一样的。

核酸化学研究史 (3)

1950 年 Chargaff, E 和 Hotchkiss, R.D. 采用纸层析法仔细分析了 DNA 的组成成分，得知 $[A]=[T]$ ， $[G]=[C]$ ， $[A+G]=[C+T]$

1953 年 Watson, Crick 根据 DNA 的 X 射线图谱的研究结果，提出了 DNA 的双螺旋模型 (Double helix)。几星期后提出了半保留式复制模型。



1957 年 Meselson & Stahl 用密度梯度超离心法，证实半保留复制假说。



核酸化学研究史 (4)

1958 年 Kornberg 得到高纯度的 DNA polymerase, 这种酶需要一个模板 DNA。

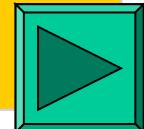
1960 年 Cairns 索性将复制中的细菌 DNA 的电镜照片拍了下来。

1970 年 发现第一个 DNA 限制性内切酶。

1972 年 DNA 重组技术的建立。

1978 年 双脱氧 DNA 测序法的建立。

1990 年 人类基因组计划实施。



核酸化学研究史 (5)

• rRNA

1. 早在本世纪 30 年代后期就发现细胞质和细胞核中都有核酸存在，但用 1924 年福尔根发明的染色法去染色，只能使细胞核中的核酸染色。但两种核酸在 260nm 的吸收非常相似。
2. 1941 年，细胞学家 J.Brachet 和 T.Caspersor 注意到细胞质中的核酸与蛋白质的合成有密切的关系。
3. 50 年代，有人用电子显微镜和物理化学手段发现大肠杆菌细胞质的 RNA 常常存在于蛋白质合成相关的颗粒中 (Φ20nm, 用 ^{35}S 进行脉冲式标记的实验证明该颗粒是蛋白质合成的所在地) ，简称核糖体。
4. 核糖体得到分离后，发现里面含 RNA，即称 rRNA。Watson 等发现 rRNA 的 $\text{G} \neq \text{C}$ ， $\text{A} \neq \text{U}$ ，断定是一单链分子。

核酸化学研究史 (6)

• mRNA

1. 1948 年有人报道，当噬菌体感染了细菌后会产生一种很不稳定的 RNA，而大多数是和核糖体结合在一起。
2. Brenner, Jacob 等人用 ^{13}C , ^{15}N 标记蛋白质，用 ^{32}P 标记核酸的方法证实了这是一种新的 RNA 分子，命名为信使 RNA，即 mRNA (m, messenger)。
3. 1961 年，Spielman 创造了分子杂交法，通过 ^{32}P -mRNA-DNA 杂交分子证明了 mRNA 的存在。

核酸化学研究史 (7)

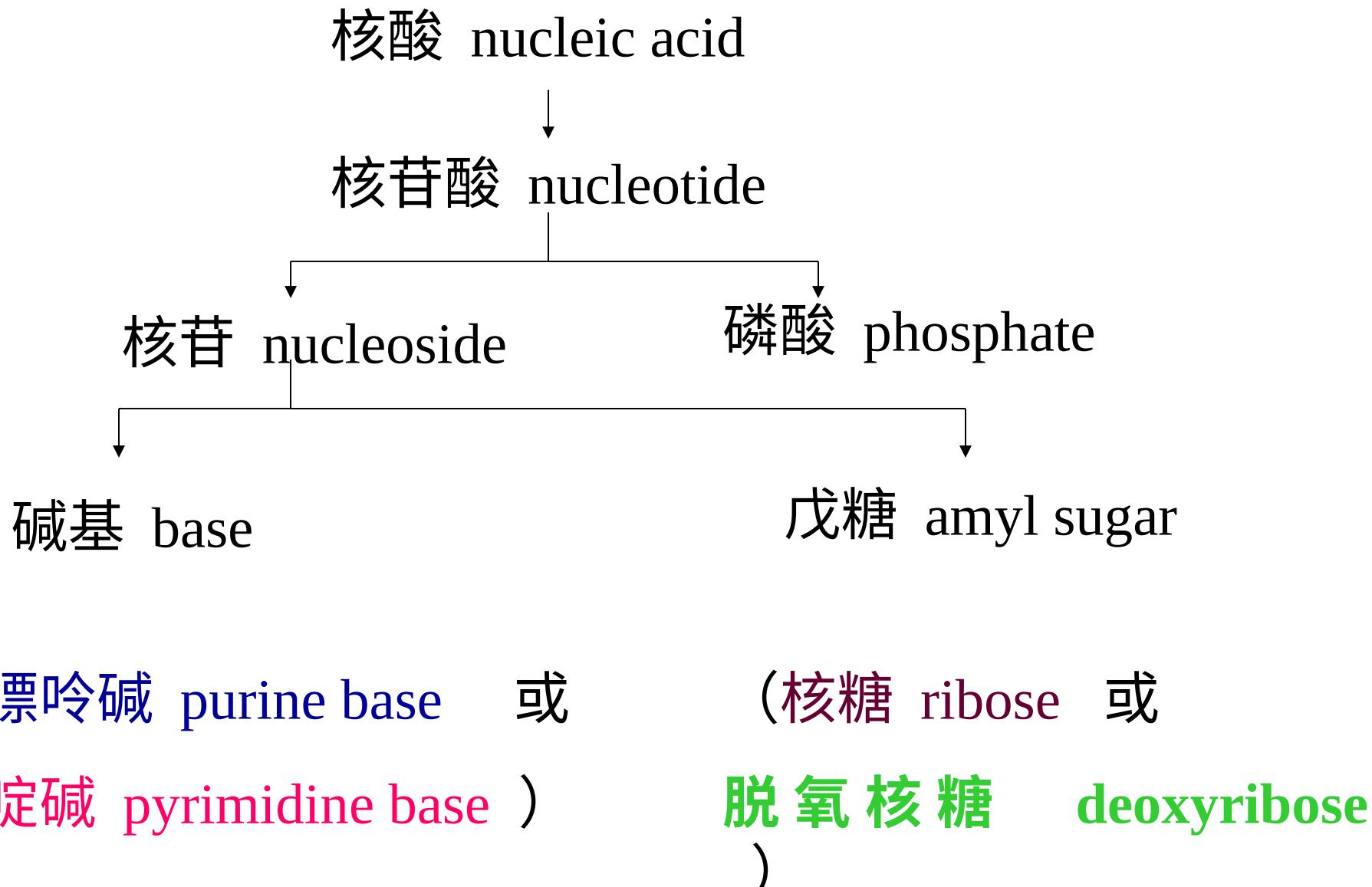
• tRNA

1. 1957 年 Hoagland, M.B. 发现一类稳定的 RNA 小分子, 不与核糖体结合, 因而不同于 mRNA 和 rRNA。
2. Crick, F. 比较了核酸和氨基酸的大小和形状后, 认为不可能在空间上互补, 因此他对核酸→蛋白质的信息传递作了以下预测: 1). 它是一种分子转换器, 使信息从核酸序列转换成氨基酸序列; 2). 这种分子很可能是核酸; 3). 它不论以何种方式进入蛋白质翻译系统的模板, 都必须与模板形成氢键 (即配对); 4). 有 20 种分子转换器, 每种氨基酸一个; 5). 每种氨基酸必定还有一个对应的酶, 催化与特定的分子转换器结合。
3. 1963 年, Ehrenstein 等人用实验证明了 Hoagland 发现的分子就是 Crick 预言的分子转换器, 即 tRNA。
4. 1965 年 Holley 经过 7 年努力测出酵母 Ala-tRNA 序列。

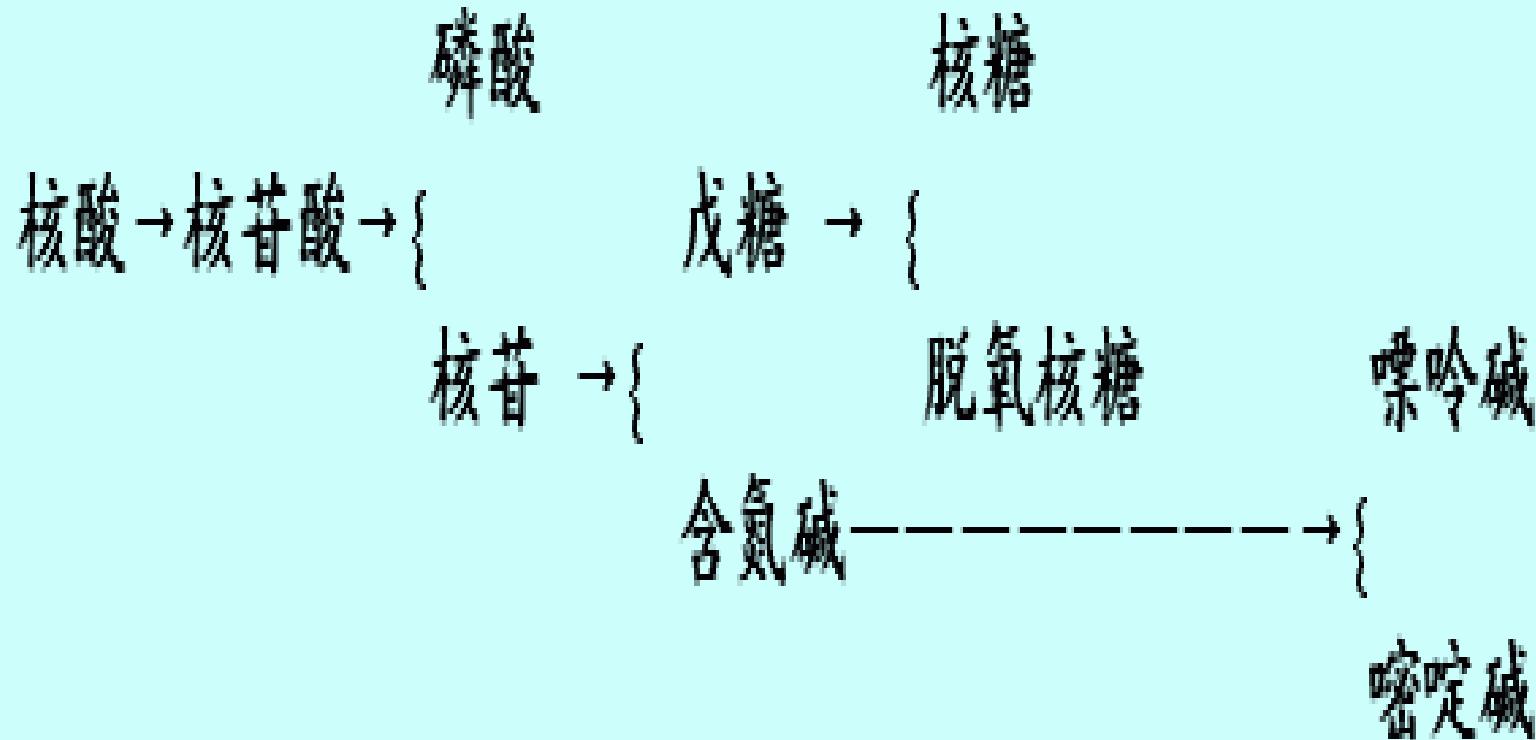
核酸化学研究史 (8) 遗传密码的破译

- 1953 年** Dounce 假设 DNA 通过 RNA 将信息传给蛋白质，RNA 上每三个核苷酸形成一个“空洞”，正好将一个个氨基酸装进去。该假说允许三联体的重叠。 **命中率 80 %**
- 1954 年** 物理学家 Gamow，与 Teller 等人联手，也提出三联体学说，并指出不可重复的特点。 **命中率 20 %**
- 1957 年** Crick 也提出了三联体的假说。他意识到要解决“天书”的“词法”和“句法”，必须要有一本标准词典，以便决定 64 种组合中的 44 种是无用的。即“简并密码”和“阅读框”
- 1961 年** Crick 在 Bencer, S 的突变实验的基础上，用重组法得到了 +++ 和 --- 型，发现读框和野生型一致，从而证明了三联体的假说。
- 1961 年** Nirenberg, Matthaei & Ochoa 用生物化学手段开始了密码测试，得到 20 种氨基酸的密码子的核酸成份。
- 1964 年** Khorana 合成了 U 和 G 交替的多聚核苷酸，所对应的合成肽为 VCVCVC，对照密码子的核酸成份可以最终决定。后来合成了 UUGUUUGUUG… 产生了 poly(L), poly(C) 和 poly(V)。
- 1964 年** Nirenberg 找到了更妙的突破口，合成三联体，它能与 tRNA 进行密码子—反密码子的碱基配对，从而影响肽链的合成。
- 1966 年** 遗传密码的破译工作基本结束，Crick 绘制了密码表，提出了摆动学说 (wobble concept)，及时收回了“同义词”不存在的假设。

第一节 核酸的化学组成

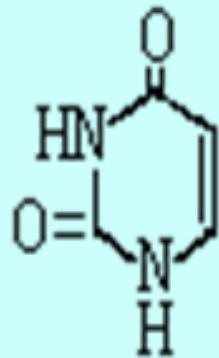
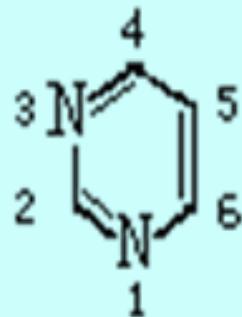


核酸的水解产物：

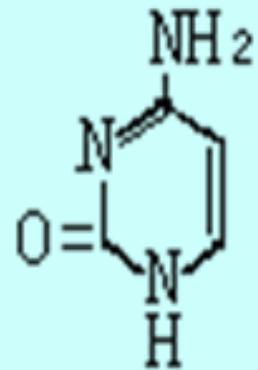


一. 核苷酸中的两类碱基

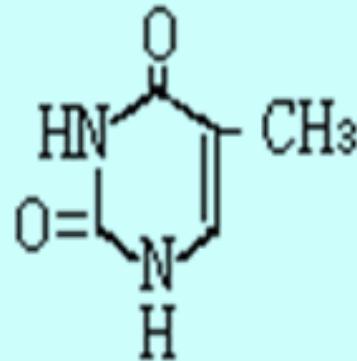
1. 嘧啶碱



U



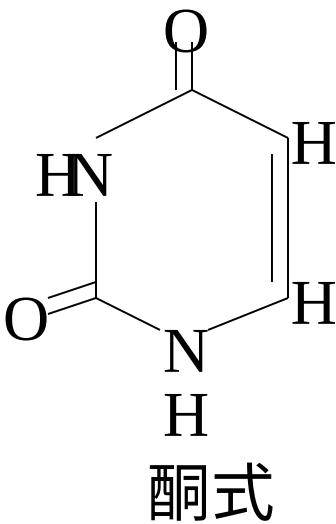
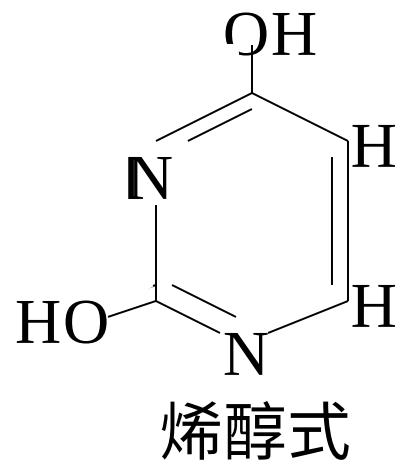
C



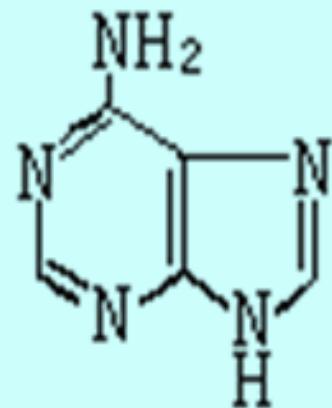
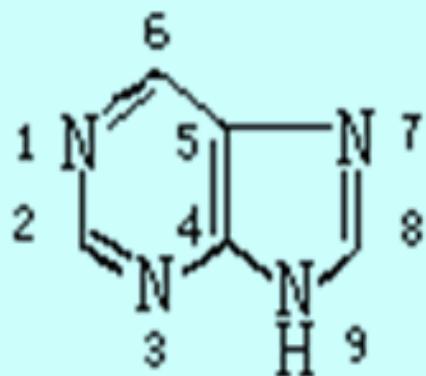
T

尿嘧啶 Uracil

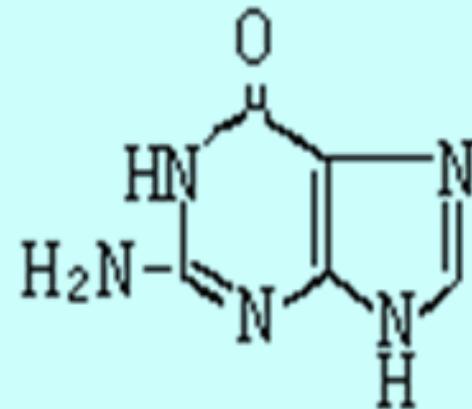
胞嘧啶 Cytosine 胸腺嘧啶 Thymine



2. 嘌呤碱



A



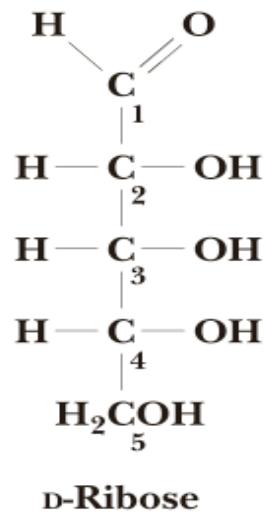
G

腺嘌呤 adenine

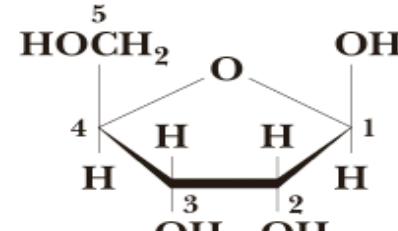
鸟嘌呤 guanine

二. 核糖和脱氧核糖

- Numbering scheme
- Effects of 2' position
 - Structural differences in polymer
 - Stability to hydrolysis
 - Influence function

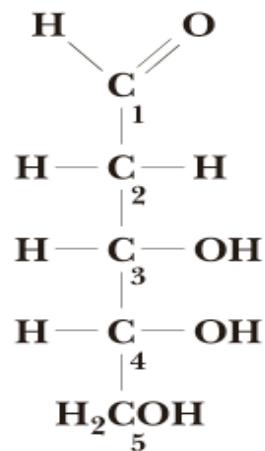


D-Ribose

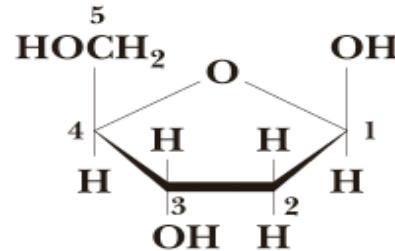


Furanose form of
D-Ribose

β -D-Ribofuranose

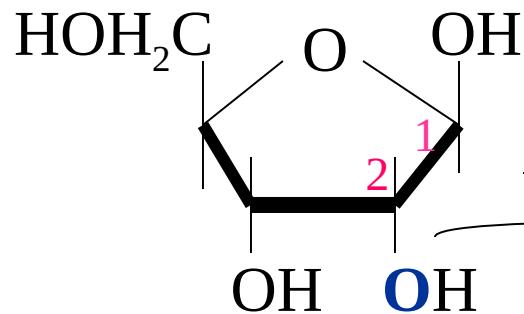


D-2-Deoxyribose

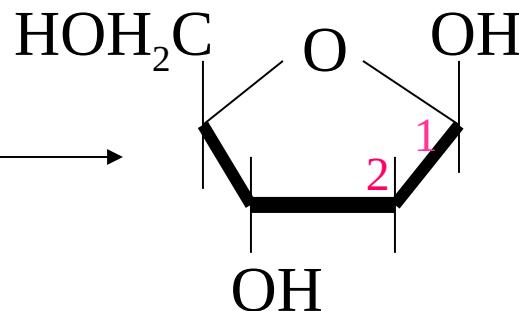


Furanose form of
D-2-Deoxyribose

β -D-2-Deoxyribofuranose



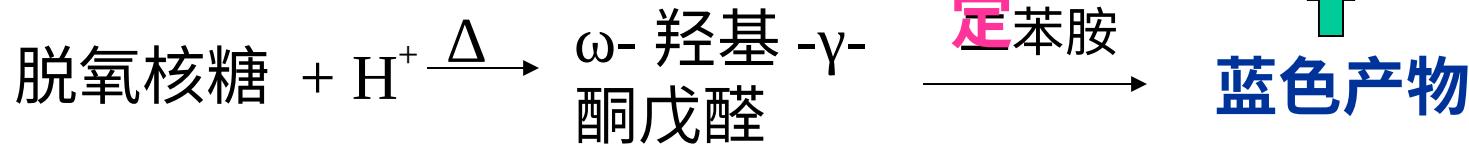
β-D-2-核糖



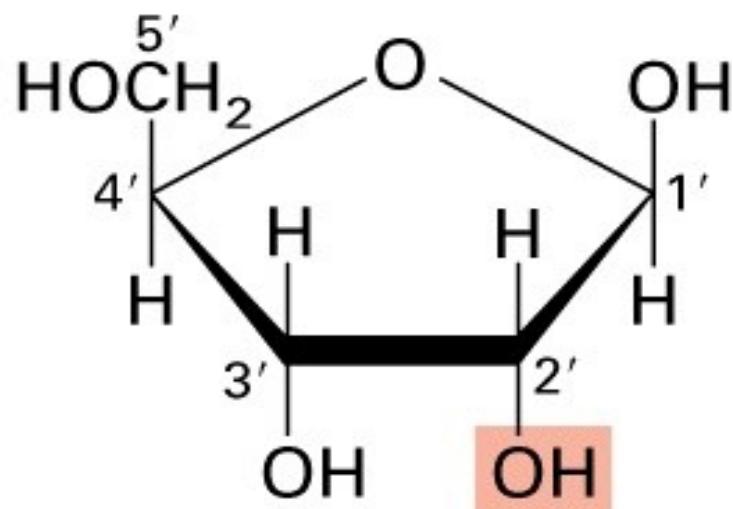
β-D-2-脱氧核糖



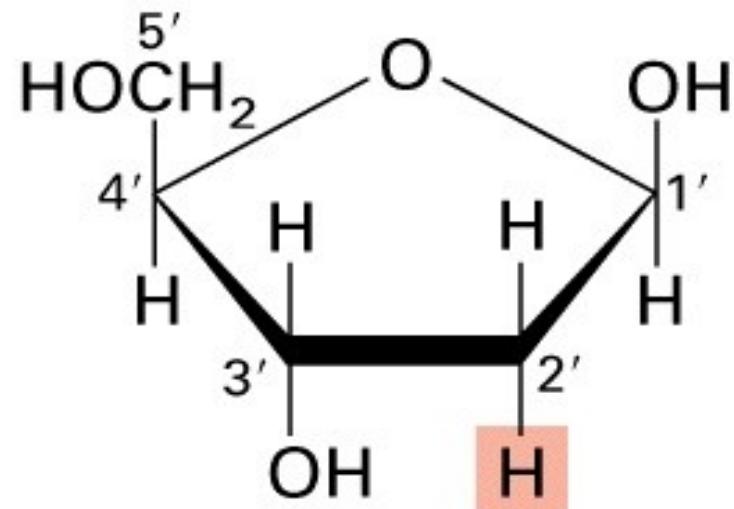
RNA 和 DNA 定性、定量测



RNA vs. DNA



Ribose



2-Deoxyribose

β-D- 核糖

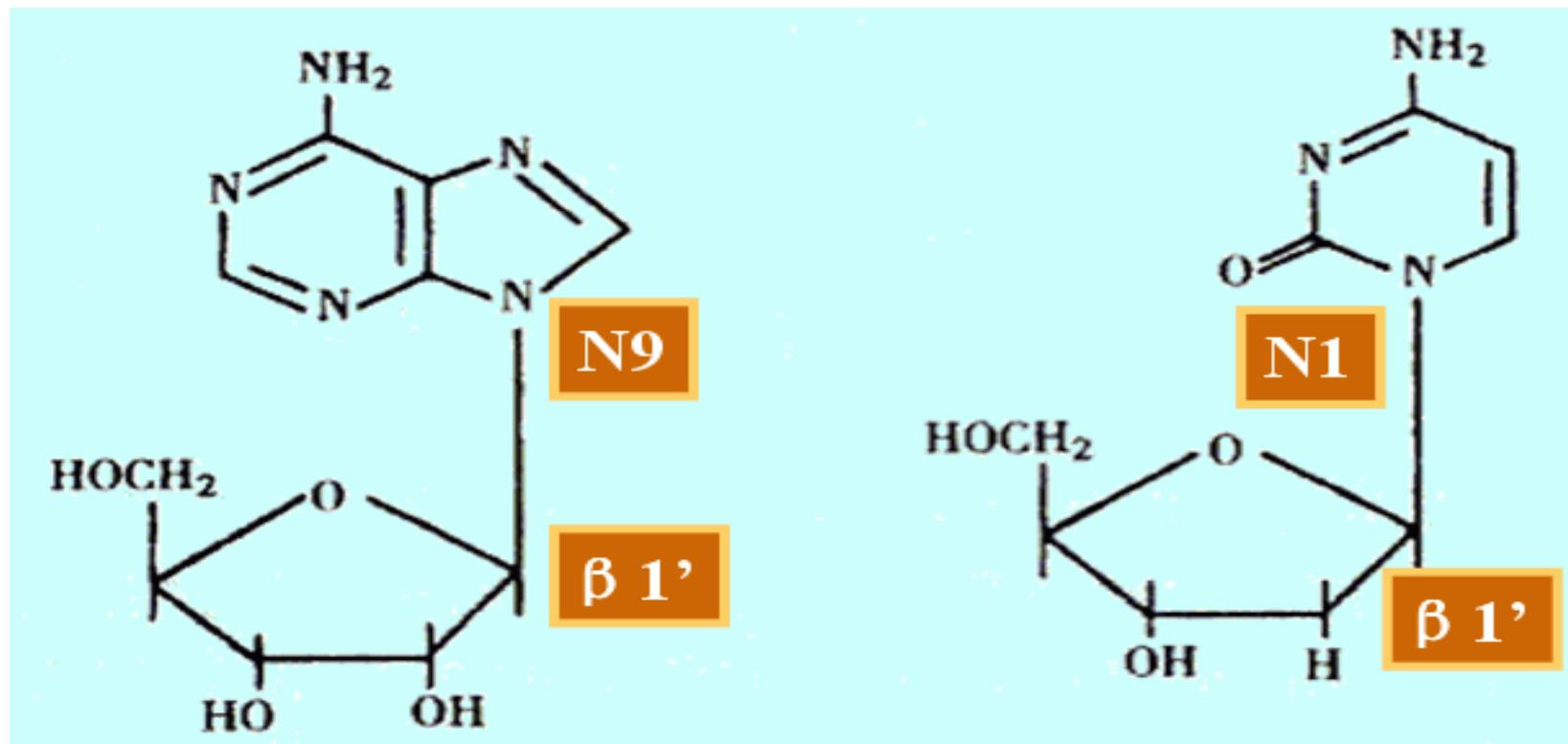
β-D-2- 脱氧核糖

三. 核苷

核苷是由戊糖与含氮碱基经脱水缩合而生成的化合物。

在大多数情况下，核苷是由核糖或脱氧核糖的 C1'
 β -羟基与嘧啶碱 N1 或嘌呤碱 N9 进行缩合，故生成的化
学键称为 β ,N 糖苷键。

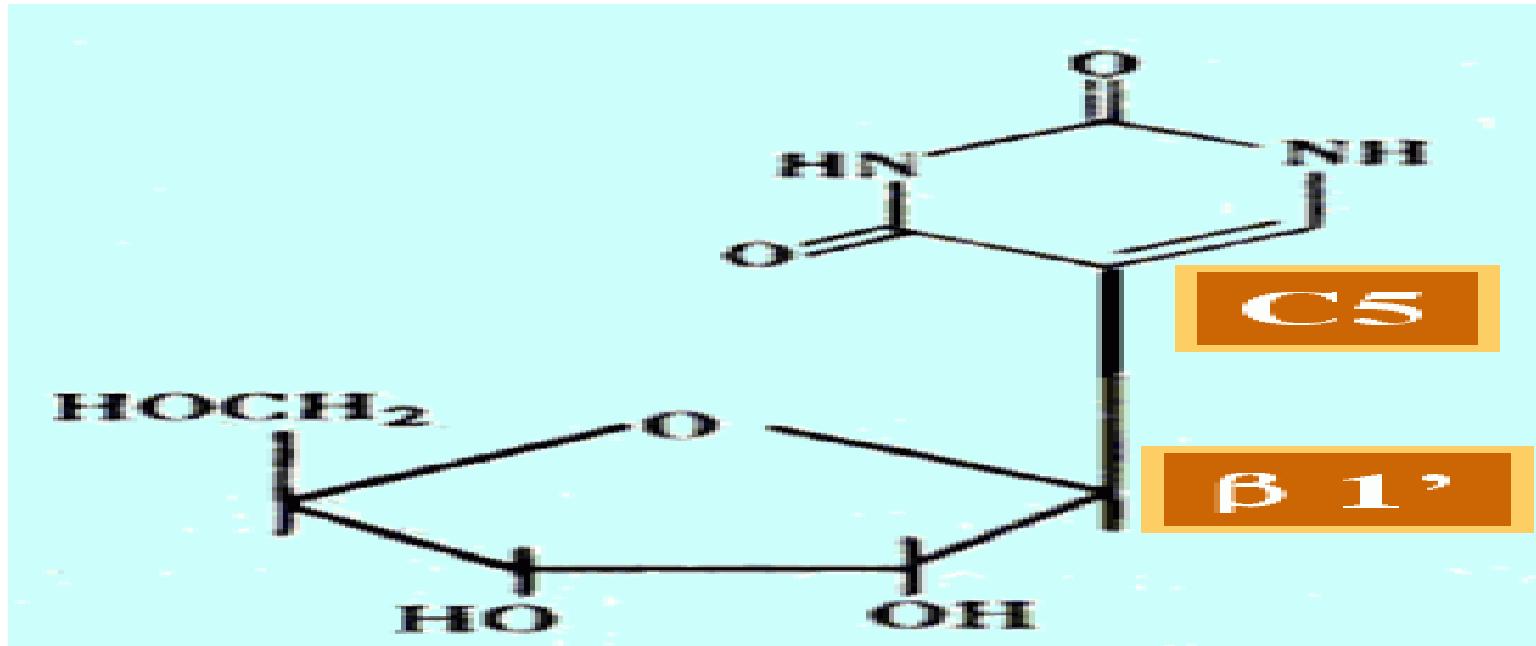
- Join base to pentose
- Glycosidic bond
- β -anomer
- Water soluble



腺苷 (AR)
 $\beta 1'$,N9- 糖苷键

脱氧胞苷 (dCR)
 $\beta 1'$,N1- 糖苷键

“稀有核苷”是由“稀有碱基”所生成的核苷：

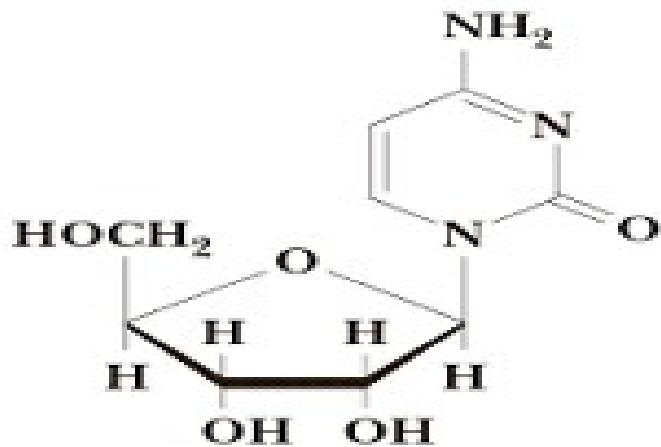


假尿苷
(Ψ)
β1',C5- 糖苷
键

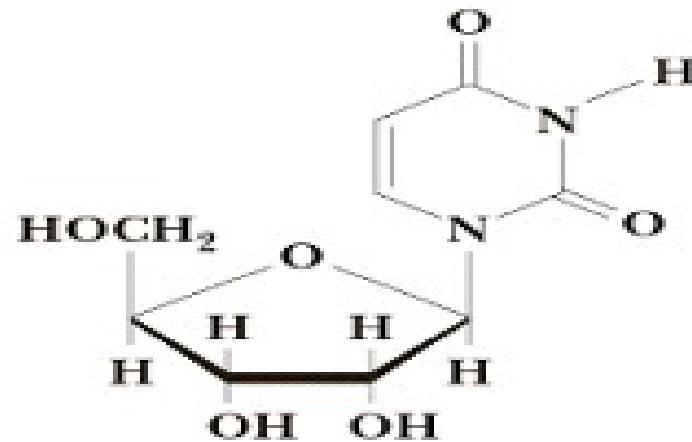
稀有碱基

- 嘌呤——次黄嘌呤、1-甲基次黄嘌呤、 N^2 、 N^{2-} 二甲基鸟嘌呤。
- 嘧啶——5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、二氢尿嘧啶、4-硫尿嘧啶
- 都是基本碱基的化学修饰型。
- tRNA 中含有较多的稀有碱基

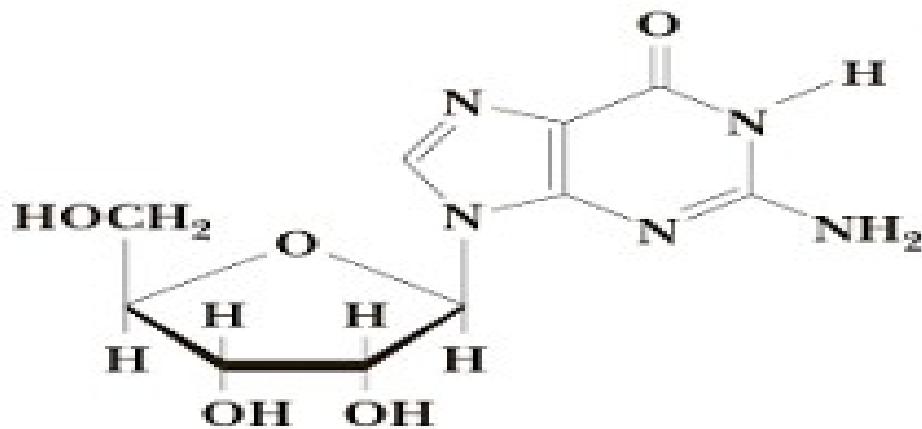
Ribonucleosides



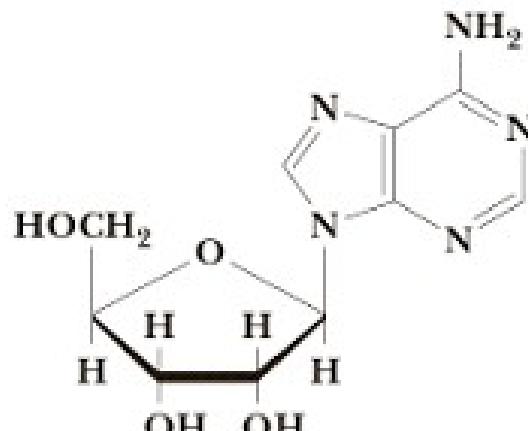
Cytidine



Uridine

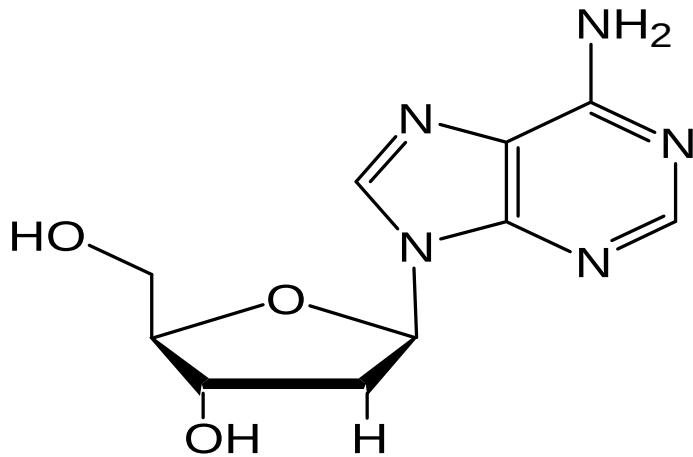


Guanosine

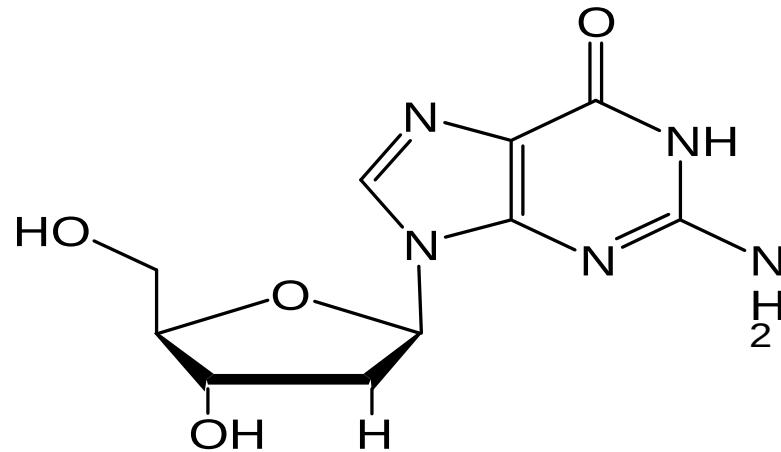


Adenosine

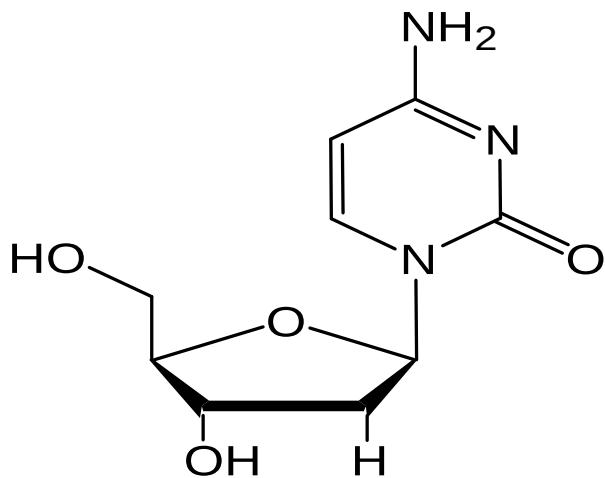
Deoxyribonucleosides



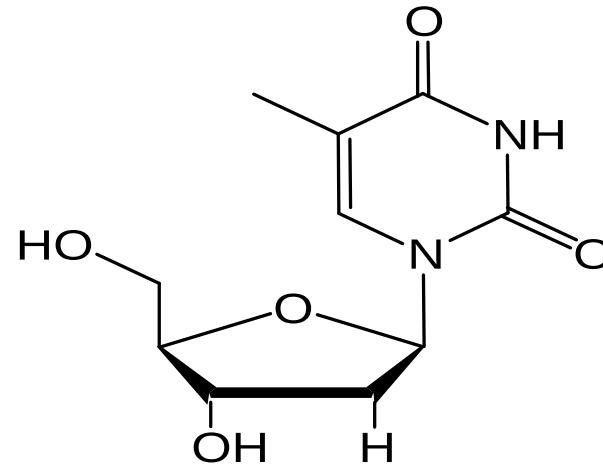
Deoxyadenosine



Deoxyguanosine

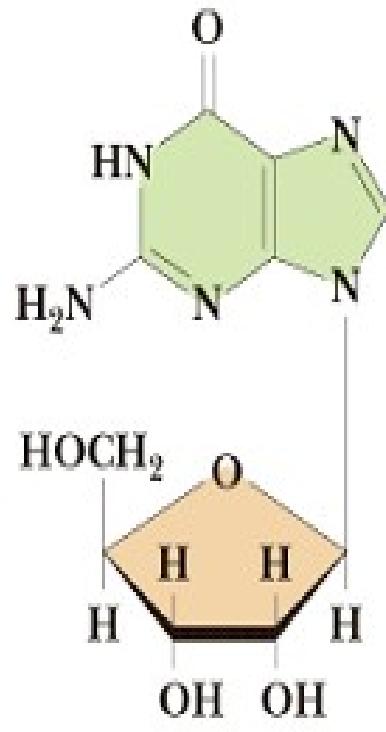


Deoxycytidine

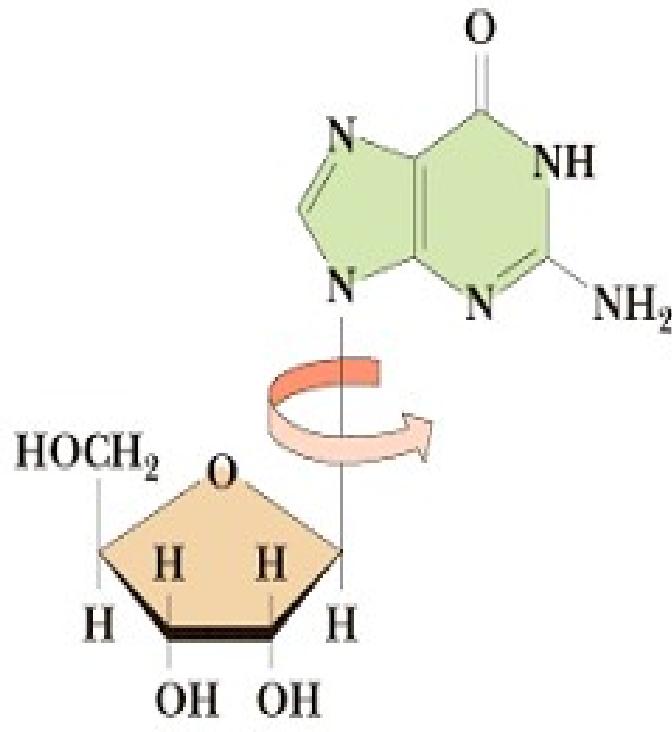


Deoxythymidine

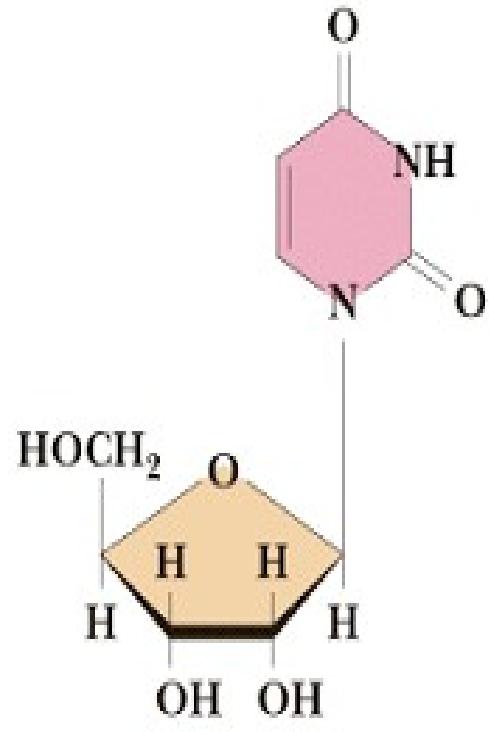
Nucleoside Conformations



syn Guanosine



anti Guanosine



anti Uridine

- Anti- or syn- conformations
- Base and pentose rings roughly perpendicular

四. 核苷酸及其结构与命名

核苷酸是由核苷与磷酸经脱水缩合后生成的磷酸

酯类化合物，包括核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸两大

类。由于与磷酸基缩合的位置不同而分别生成 2' - 核

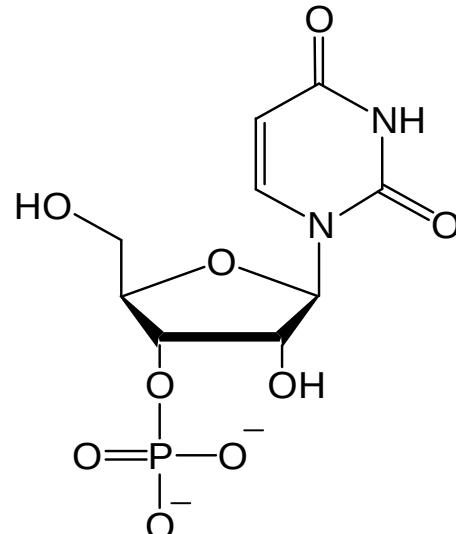
苷酸、3' - 核苷酸和 5' - 核苷酸。最常见者为 5' - 核苷酸

(5' 常被省略)。

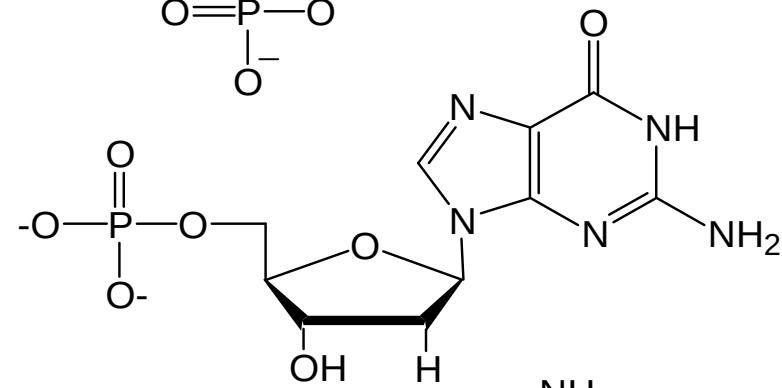
Nucleotides

- Addition of phosphate to make phosphate ester
- Position of phosphate important
- Uridine 3'-monophosphate;
- deoxyguanosine 5'-monophosphate;
- cytidine 5'-monophosphate

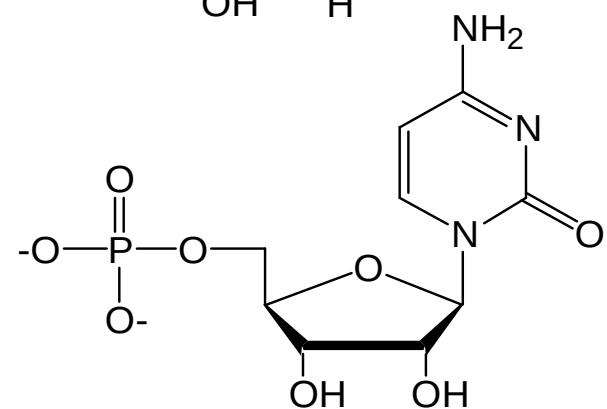
3'-UMP



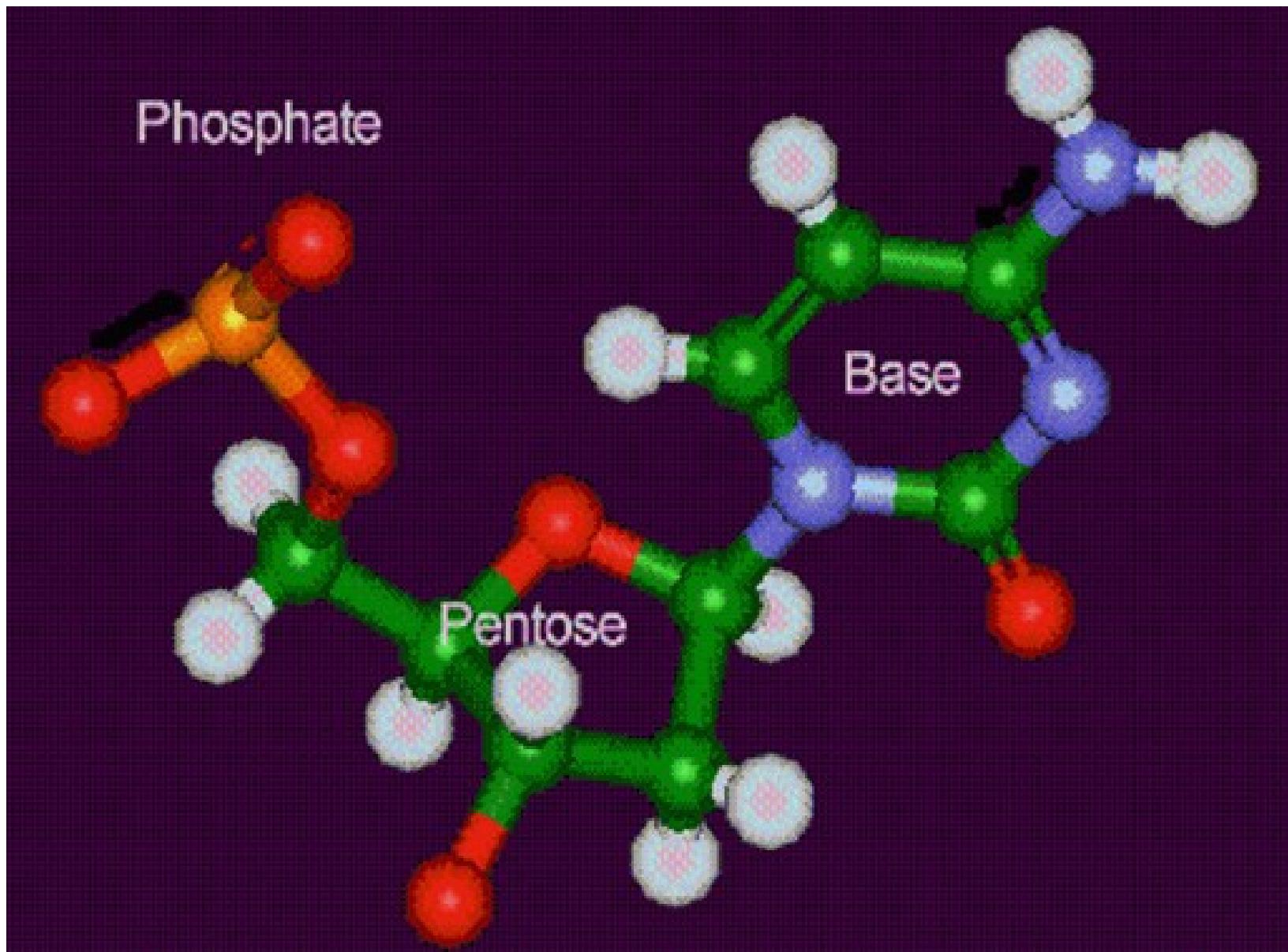
5'-dGMP
or dGMP



5'-CMP
or CMP



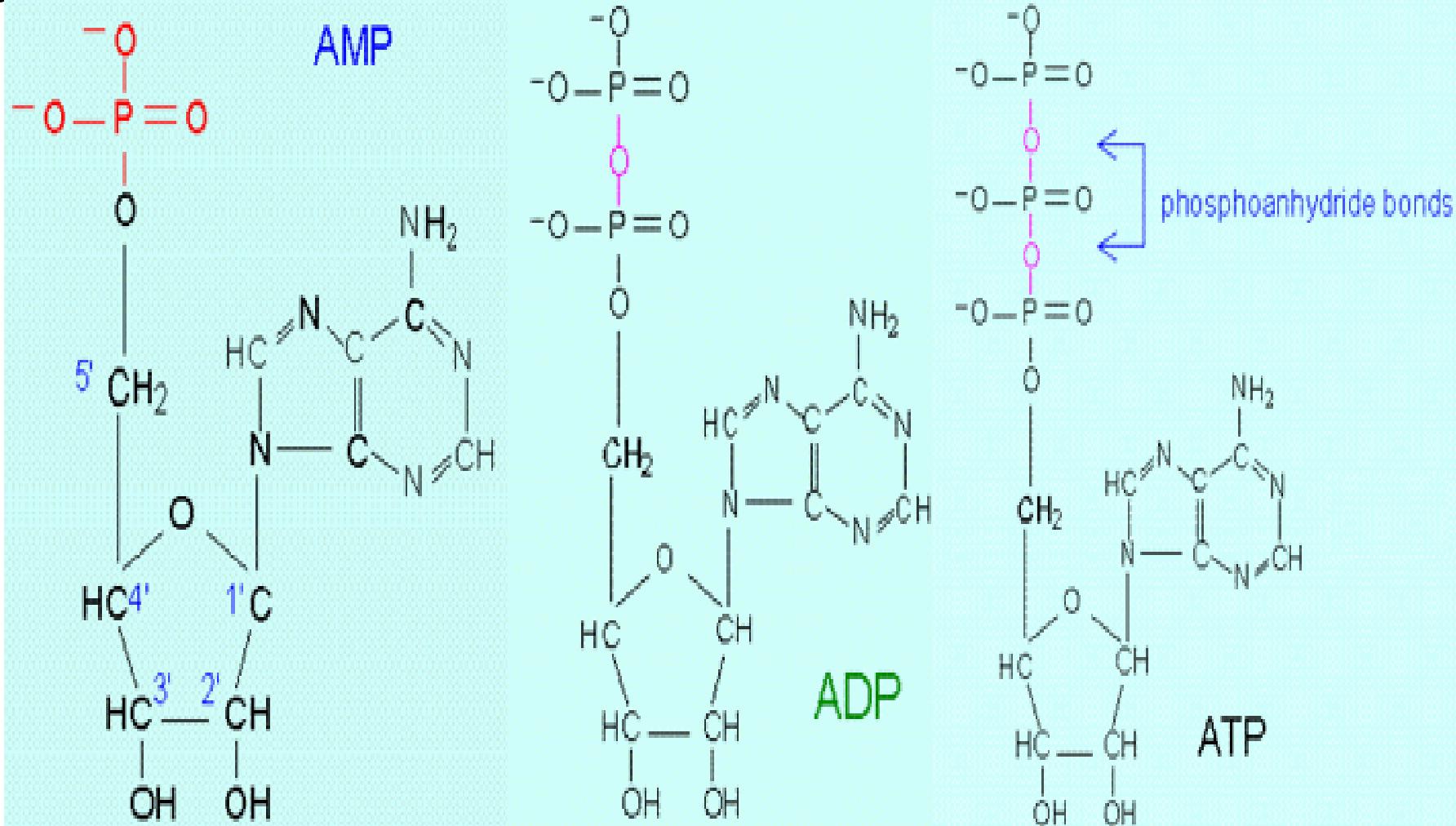
核苷酸的分子结构



5' - 核苷酸又可按其在 5' 位缩合的磷酸基的多少，

分

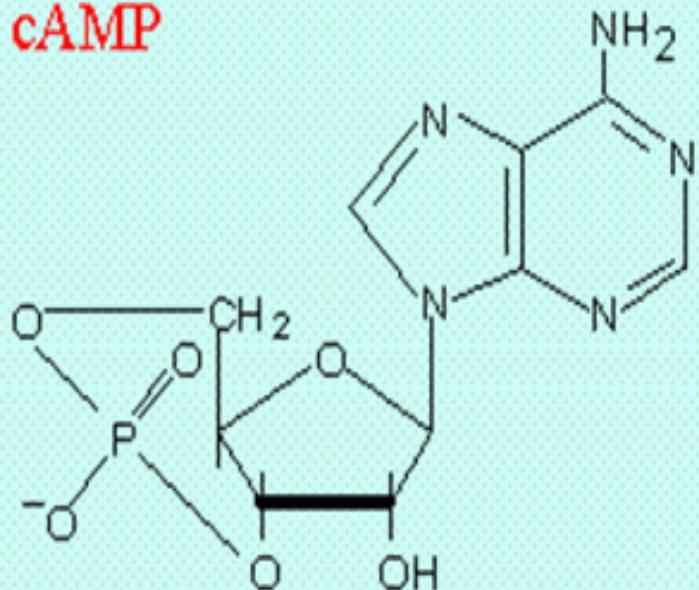
为一磷酸核苷（核苷酸）、二磷酸核苷和三磷酸核苷。



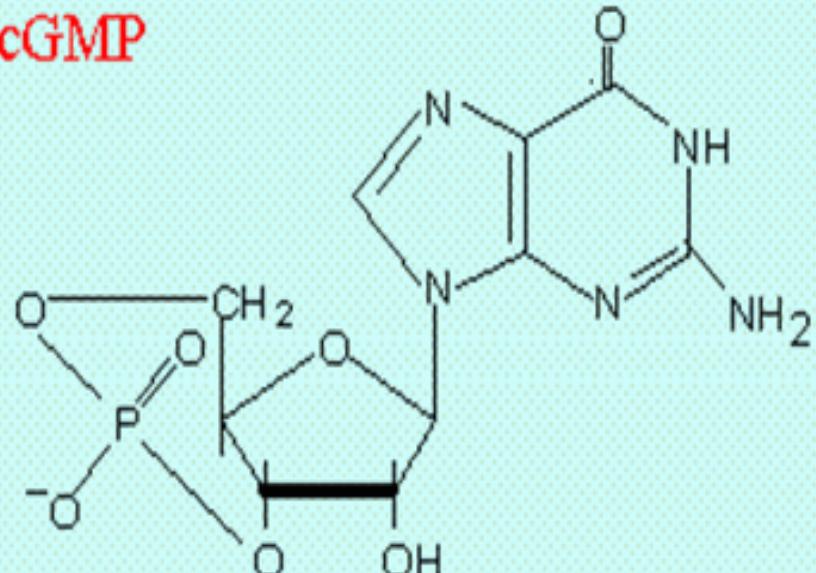
cAMP 和 cGMP

- cAMP(3',5' - 环腺嘌呤核苷一磷酸) 和 cGMP(3',5' - 环鸟嘌呤核苷一磷酸) 的主要功能是作为细胞之间传递信息的信使。
- cAMP 和 cGMP 的环状磷酯键是一个高能键。在 pH 7.4 条件下, cAMP 和 cGMP 的水解能约为 43.9 kJ /mol, 比 ATP 水解能高得多。

cAMP



cGMP



核苷酸的命名及缩写符号

Nomenclature

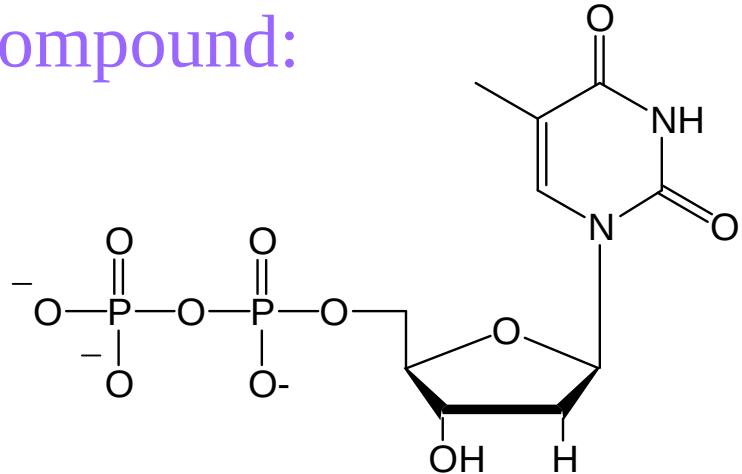
- Be able to go from abbreviation → structure
- Be able to go from structure → abbreviation

Name this compound:

Examples:

Draw 3'-dAMP

Draw GTP



Thymine 5' -diphosphate

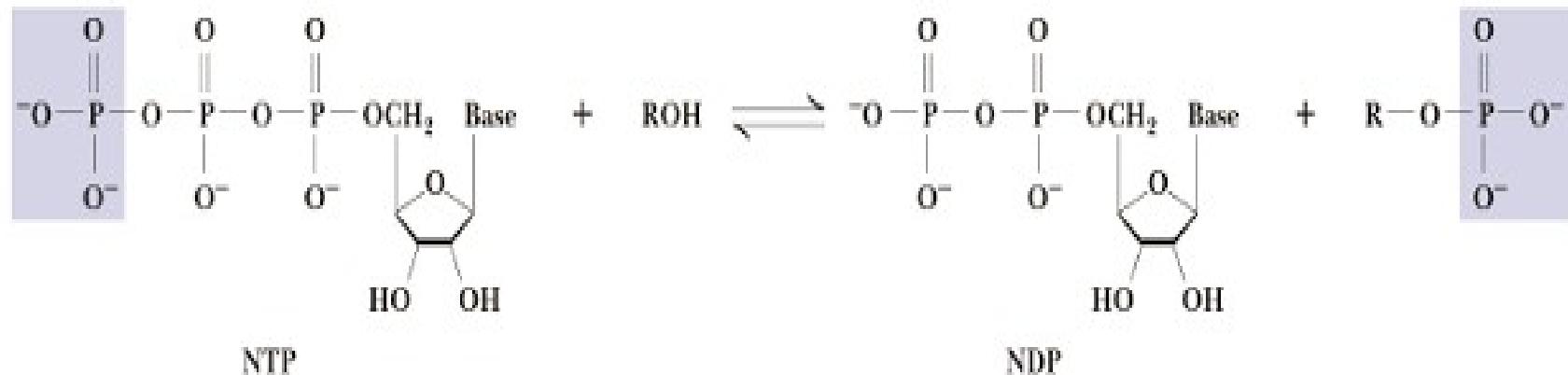
脱氧	碱基	磷酸基数目	磷酸
d	A	M	P
	G	D	
	T	T	
	C		
	U		

Nucleotide Functions

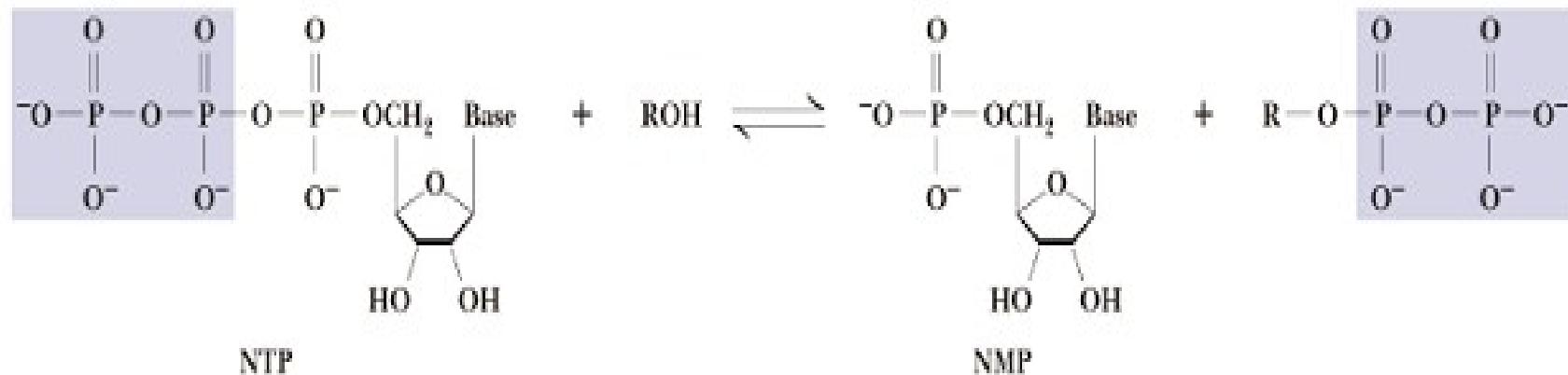
- Energy carriers (specific by base)
 - ATP—central energy carrier
 - GTP—Protein biosynthesis
 - CTP—Lipid biosynthesis
 - UTP—Carbohydrate metabolism
- Cyclic nucleotides are signaling molecules and metabolism regulators
- dNTP serves as nucleic acid building blocks

Energy: Phosphoryl Transfers

PHOSPHORYL GROUP TRANSFER:

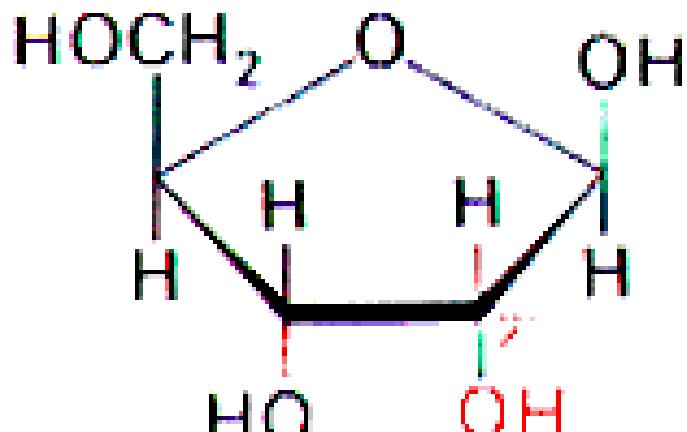


PYROPHOSPHORYL GROUP TRANSFER:

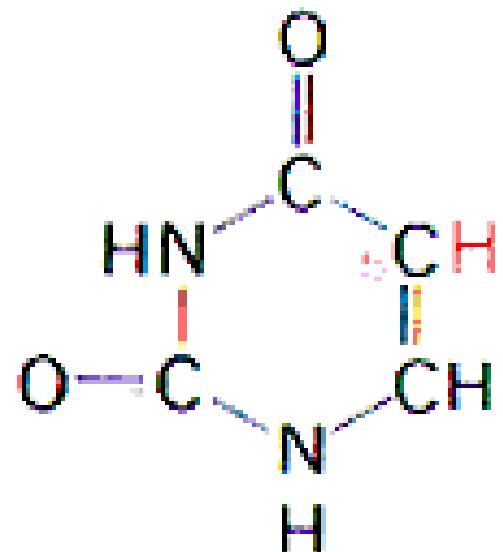


第二节 核酸的分子结构

How do DNA and RNA differ ?



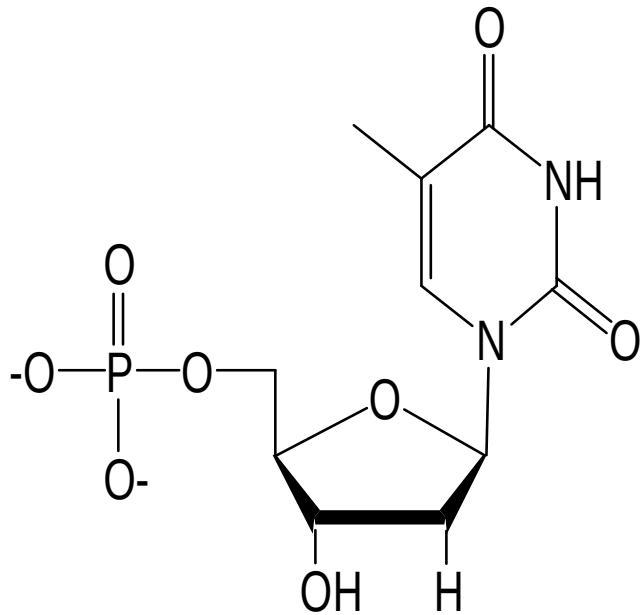
Ribose



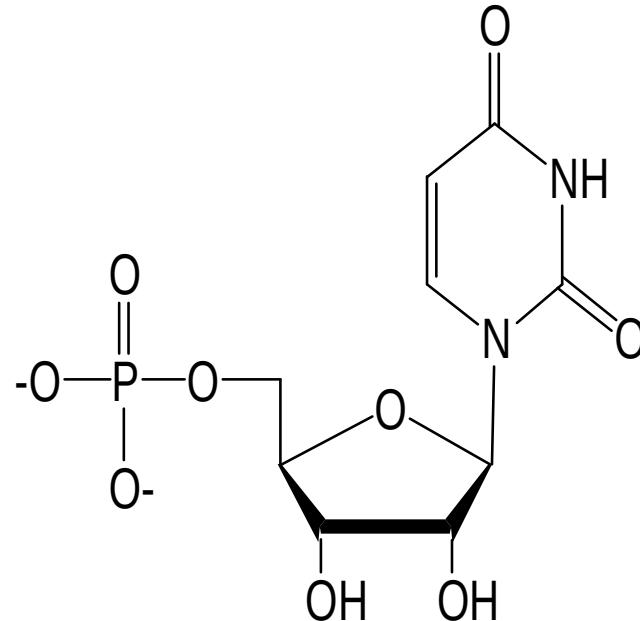
Uracil

Structural Differences

- DNA bases: A, T, G, C
 - No 2' hydroxyl group
- RNA bases: A, U, G, C
 - Has a 2' hydroxyl group



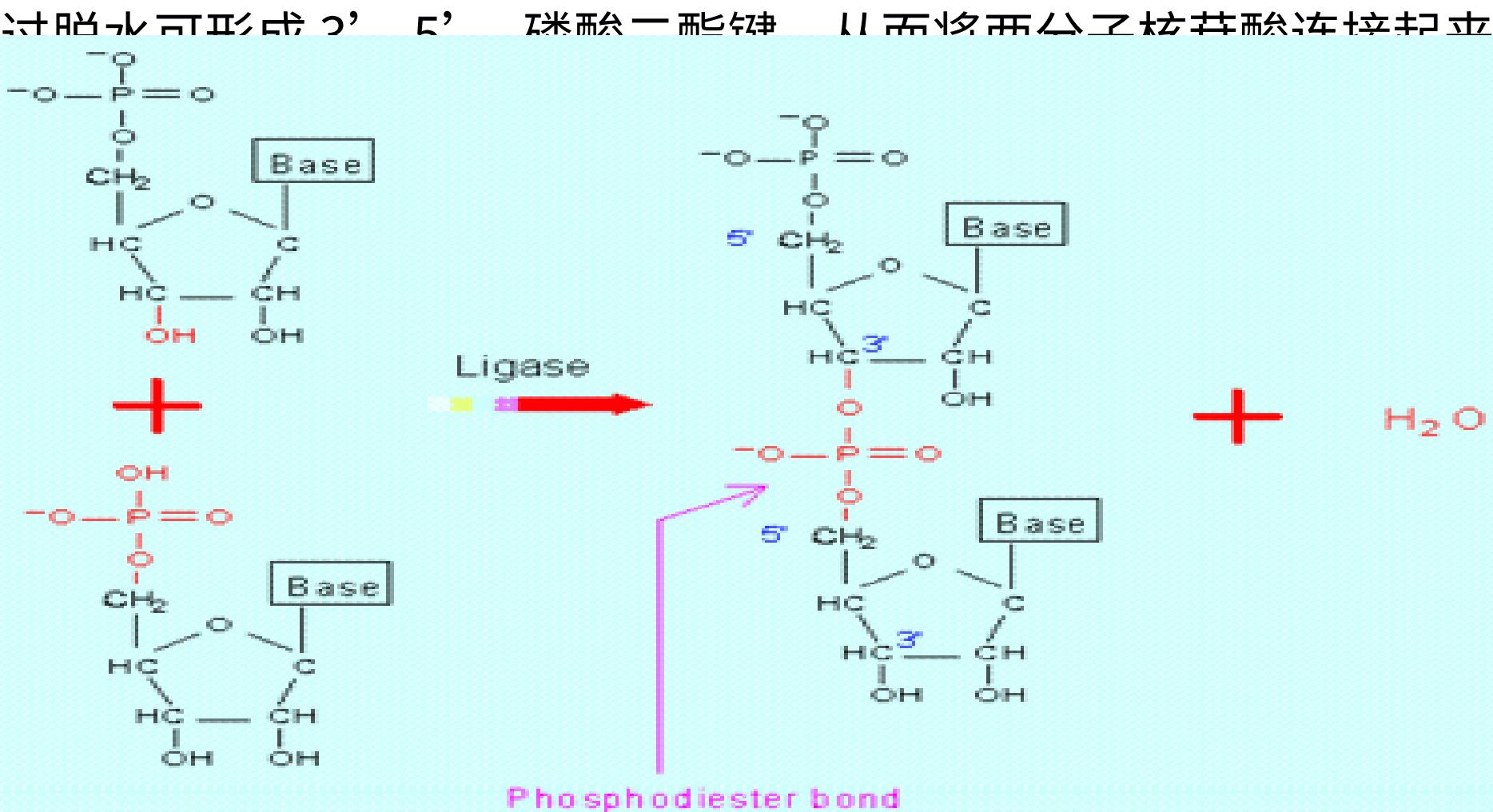
dTMP



UMP

一. 核酸的一级结构

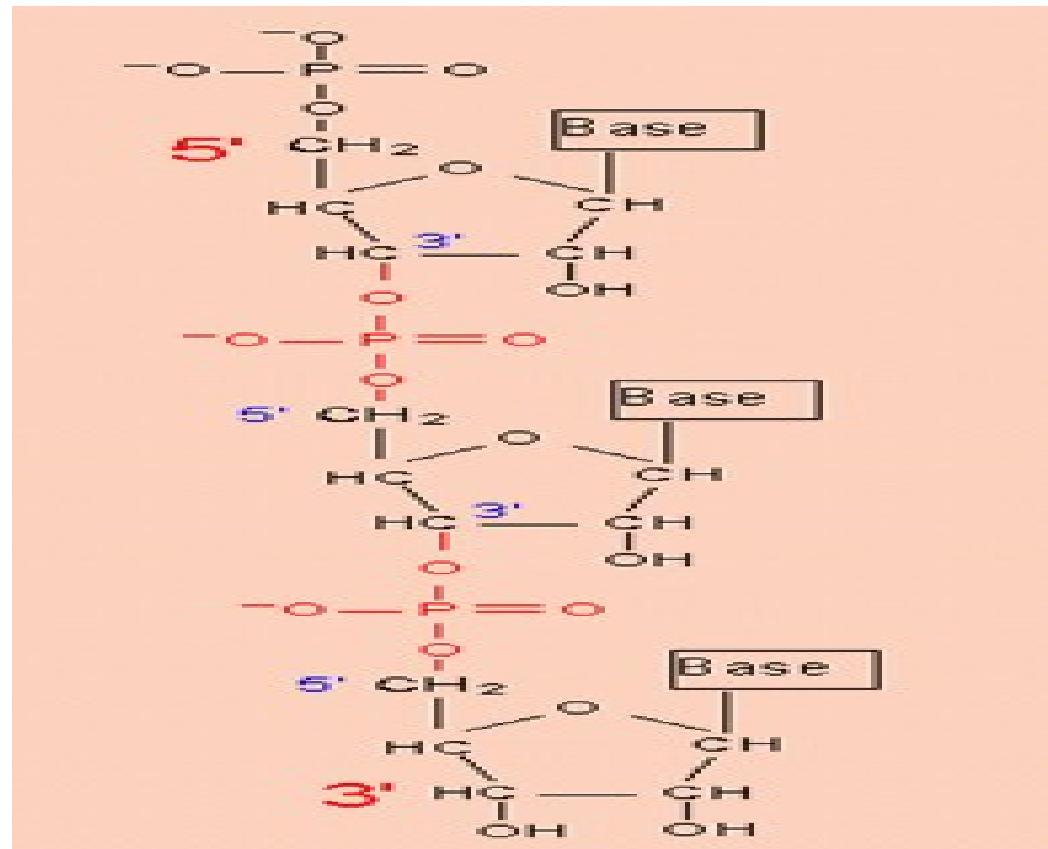
一分子的核苷酸的 3' - 位羟基与另一分子核苷酸的 5' - 位磷酸基团通

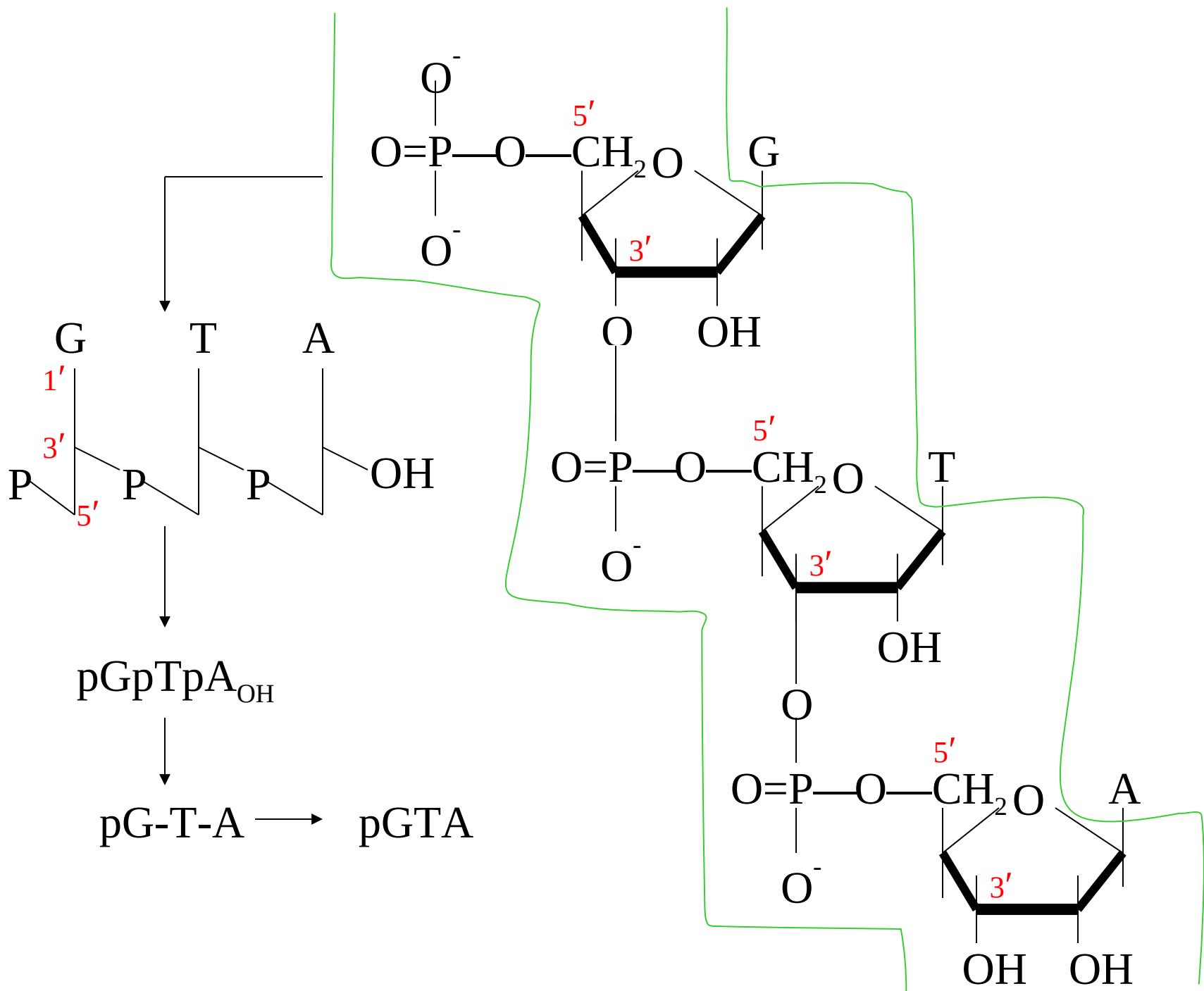


多核苷酸链：

- 核酸就是由许多核苷酸单位通过 3',5' - 磷酸二酯键连接起来形成的不含侧链的长链状化合物。
- 核酸具有**方向性**的长链状化合物，多核苷酸链的两端，一端称为 5' - 端，另一端称为 3' - 端。

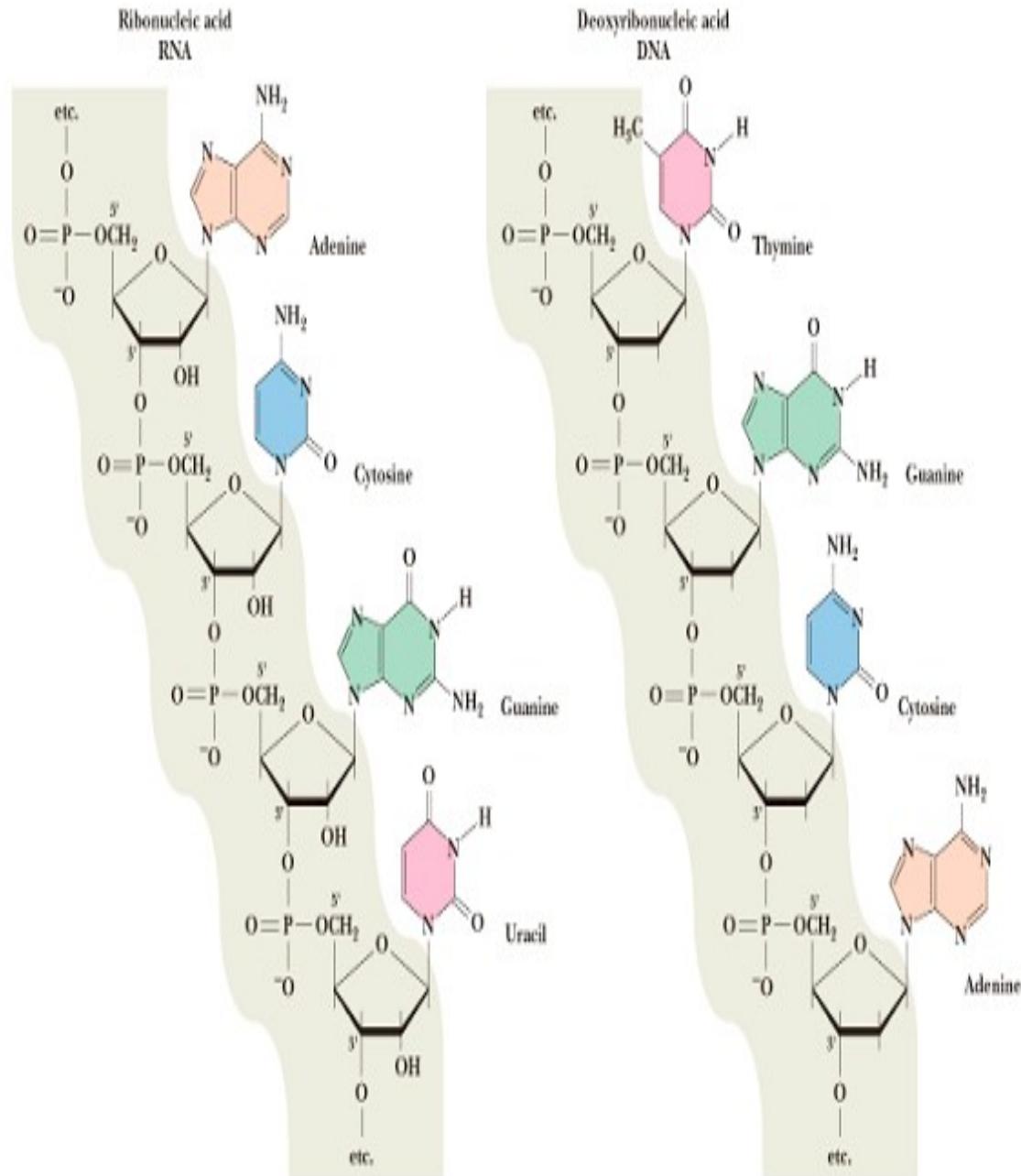
Phosphodiester Backbone



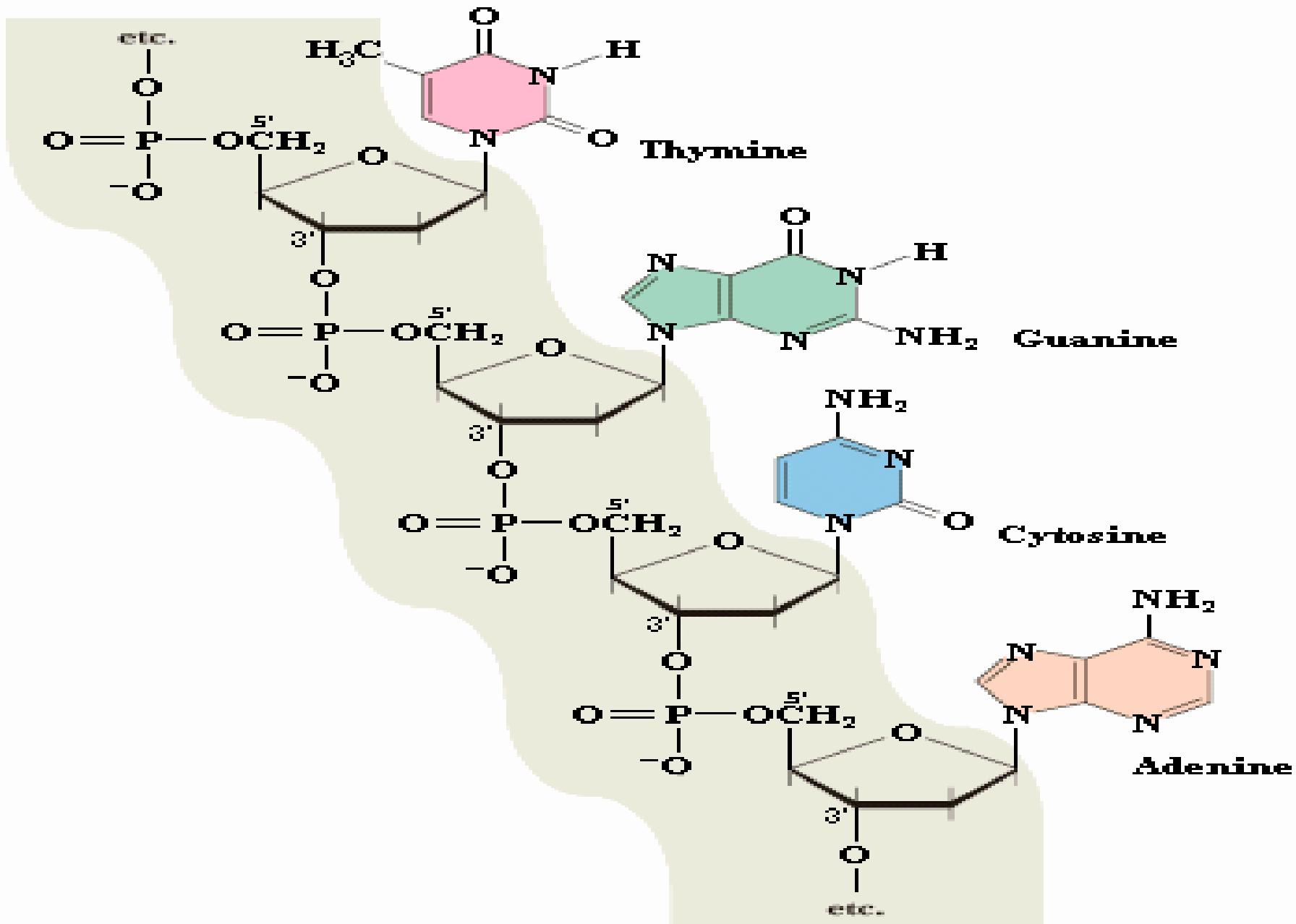


Nucleic Acids

- Ribonucleic acid (RNA)
- Deoxyribonucleic acid (DNA)
- 3' to 5' phosphate diester linkage
- Written 5' → 3'



**Deoxyribonucleic acid
DNA**



•DNA 分子主要由 dAMP 、 dGMP 、 dCMP 和 dTMP 四种脱

氧核糖核苷酸所组成。 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。

•RNA 分子主要由 AMP , GMP , CMP , UMP 四种核糖核苷

酸组成。 RNA 的一级结构就是指 RNA 分子中核糖核苷酸的排列顺序及连接方式。

•核酸一级结构的表示方法

二. DNA 的空间结构与功能

(一) DNA 的二级结构—双螺旋结构模型

1. DNA 双螺旋结构的研究背景

1950 ~ 1953 , Chargaff 研究小组对 DNA 的化学组成进行了研究, 发现:

- ① DNA 碱基组成有物种差异, 且物种亲缘关系越远, 差异越大;
- ② 相同物种, 不同组织器官中 DNA 碱基组成相同, 而且不因年龄、环境及营养而改变;
- ③ DNA 分子中四种碱基的摩尔百分比具有一定的规律性, 即 $A=T$ 、 $G=C$ 、 $A+G=T+C$ 。这一规律被称为 Chargaff 原则。

Chargaff's rules

- G=C

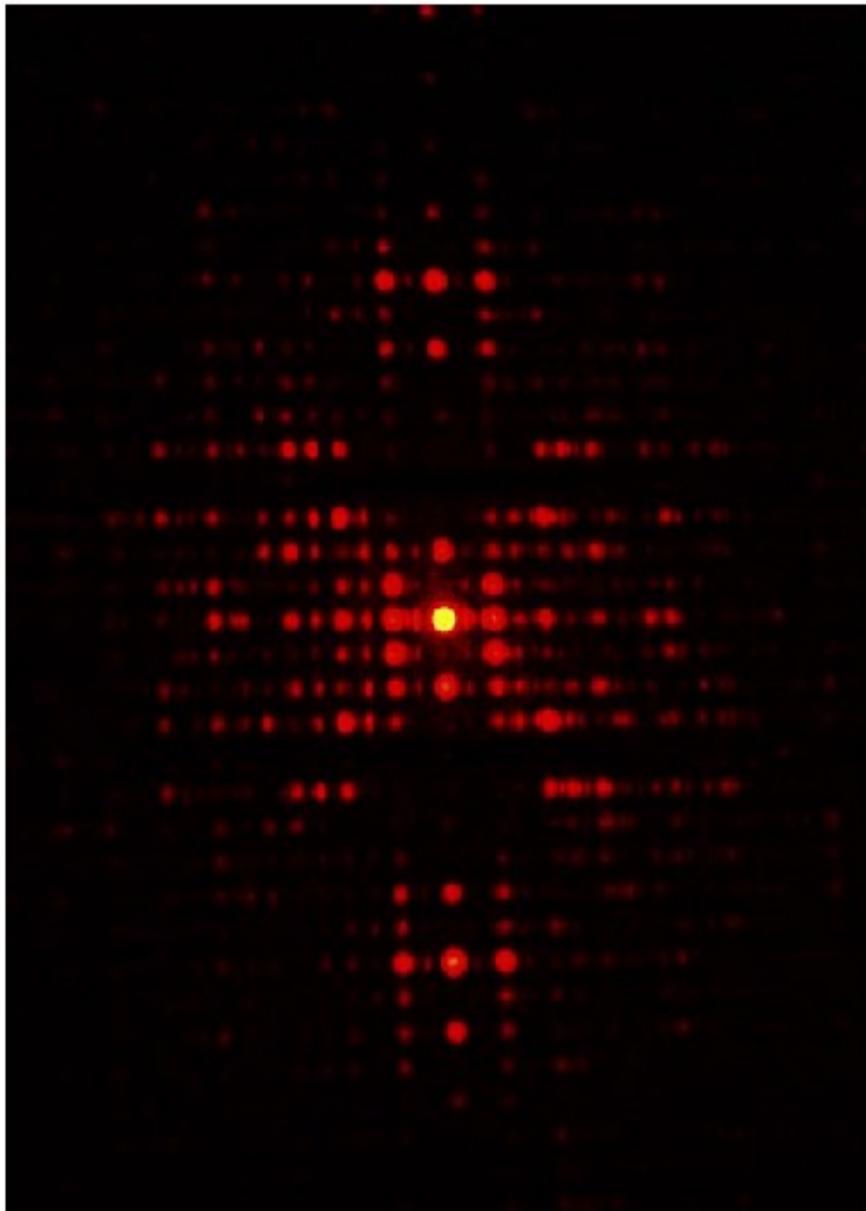
- A=T

2. 双螺旋结构的主要依据

(1) Wilkins 和 Franklin 发现不同来源的 DNA 纤维具有相似的 X 射线衍射图谱。1953 年由 Wilkins 研究小组完成的研究工作，发现了 DNA 晶体的 X 线衍射图谱中存在两种周期性反射，并证明 DNA 是一种螺旋构象。

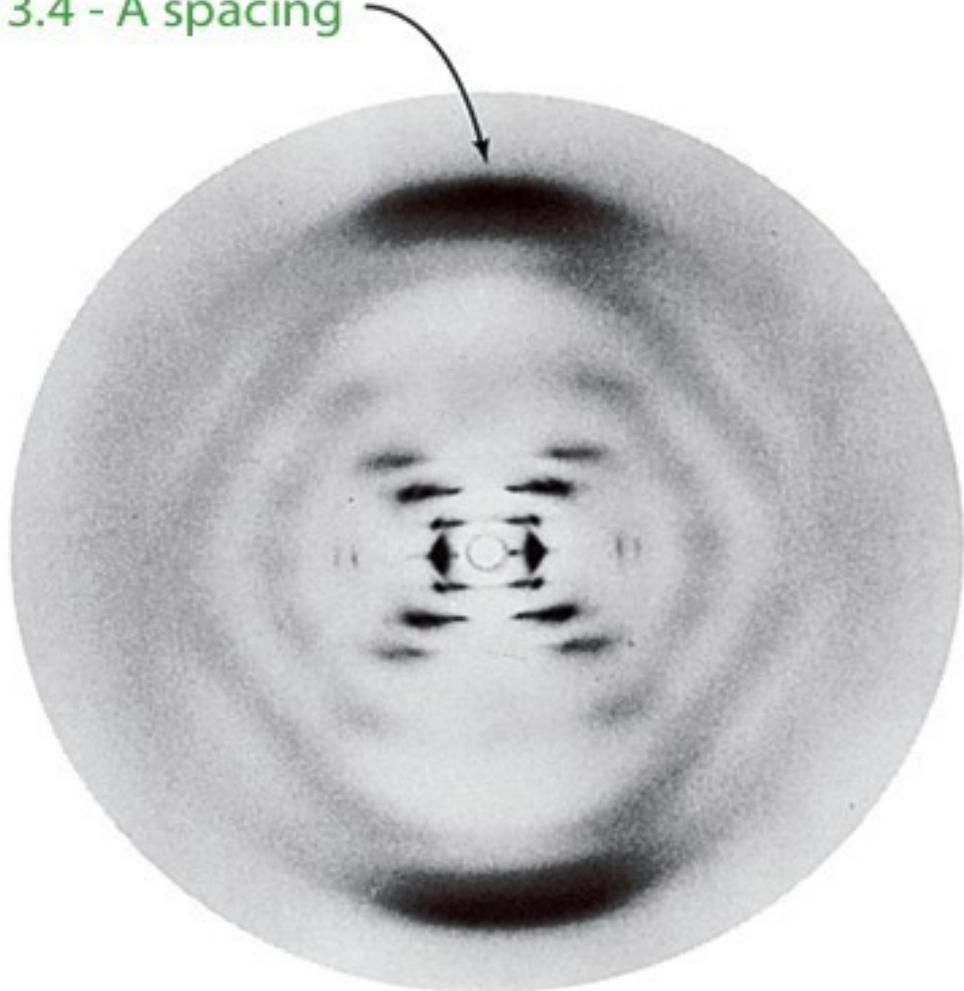
(2) Chargaff 发现 DNA 中 A 与 T、C 与 G 的数目相等。后 Pauling 和 Corey 发现 A 与 T 生成 2 个氢键、C 与 G 生成 3 个氢键。

(3) 电位滴定证明，嘌呤与嘧啶的可解离基团由氢键连接。



The diffraction pattern from the DNA optical transform slide shows the central cross pattern indicative of the helical arrangement of the strands of DNA. It also shows a missing 4th layer line which is the result of the two strands of the double helix being offset by $3/8$ of a period. The strongly diffracting phosphorus atoms create the diamonds. The satellites above and below the cross are attributed to the base pairs.

3.4 - Å spacing



Evidence for the Double Helix

1. Fiber Diffraction data:

- Helical geometry
- 3.4 \AA° spacing ($1\text{ \AA}^\circ = 10^{-10} \text{ m}$)
- 34 \AA° pitch

2. Structure of dCTP

3. Base Tautomerism

3. Chargaff rules

- $A=T$, $G=C$

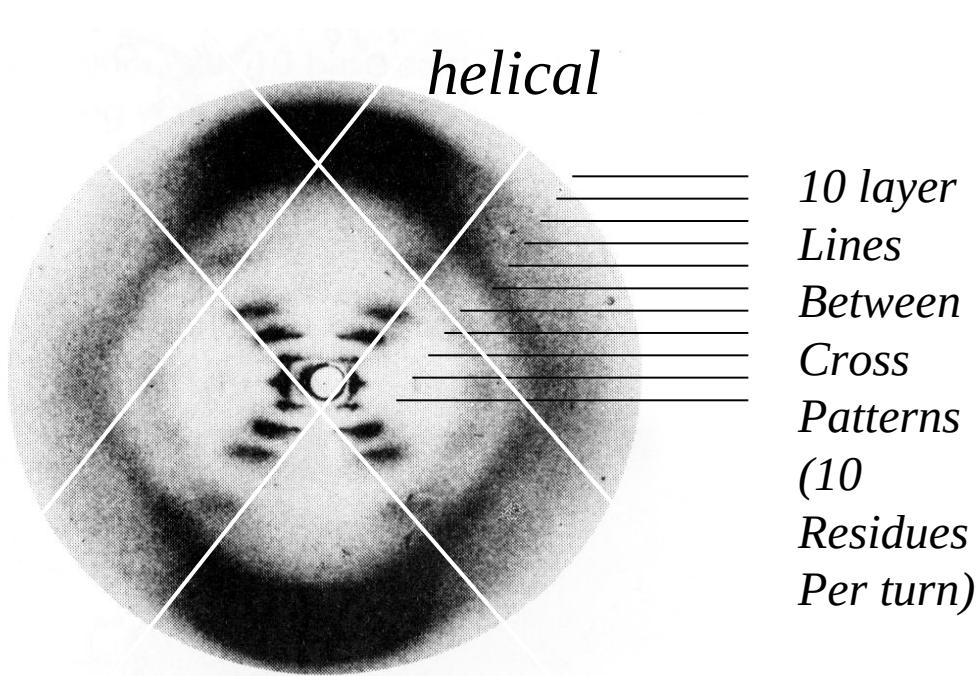


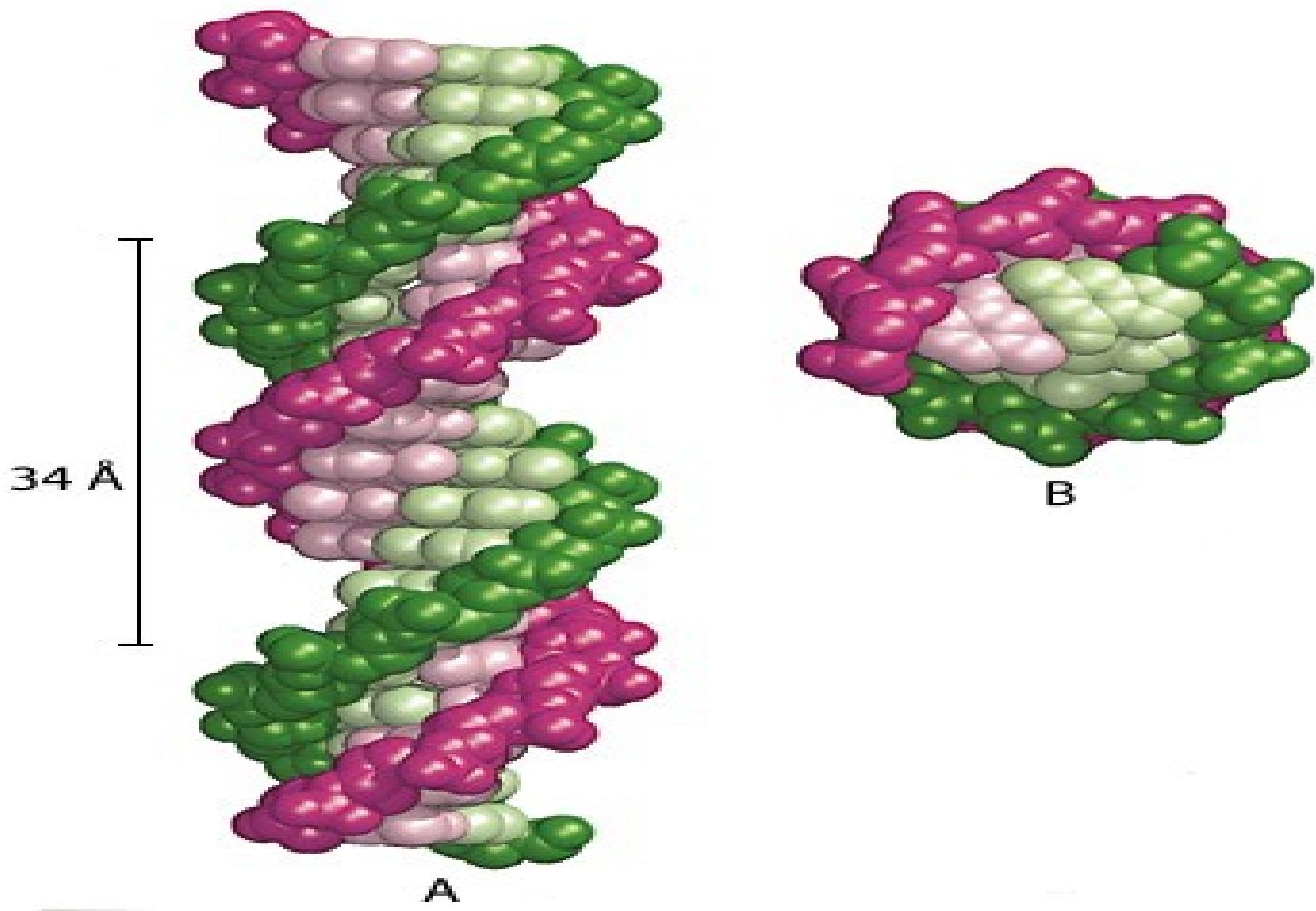
FIGURE 4.9

Evidence for the structure of DNA. This photograph, taken by Rosalind Franklin, shows the x-ray diffraction pattern produced by wet DNA fibers. It played a key role in the elucidation of DNA structure. The cross pattern indicates a helical structure, and the strong spots at top and bottom correspond to a helical rise of 0.34 nm. The layer line spacing is one-tenth of the distance from the center to either of these spots, showing that there are 10 base pairs per repeat.

Reprinted by permission from R. E. Franklin and R. Gosling, *Nature* (1953) 171:740; © 1953 MacMillan Magazines, Ltd.

1A

1953 James Watson and Francis Crick solve the structure of DNA



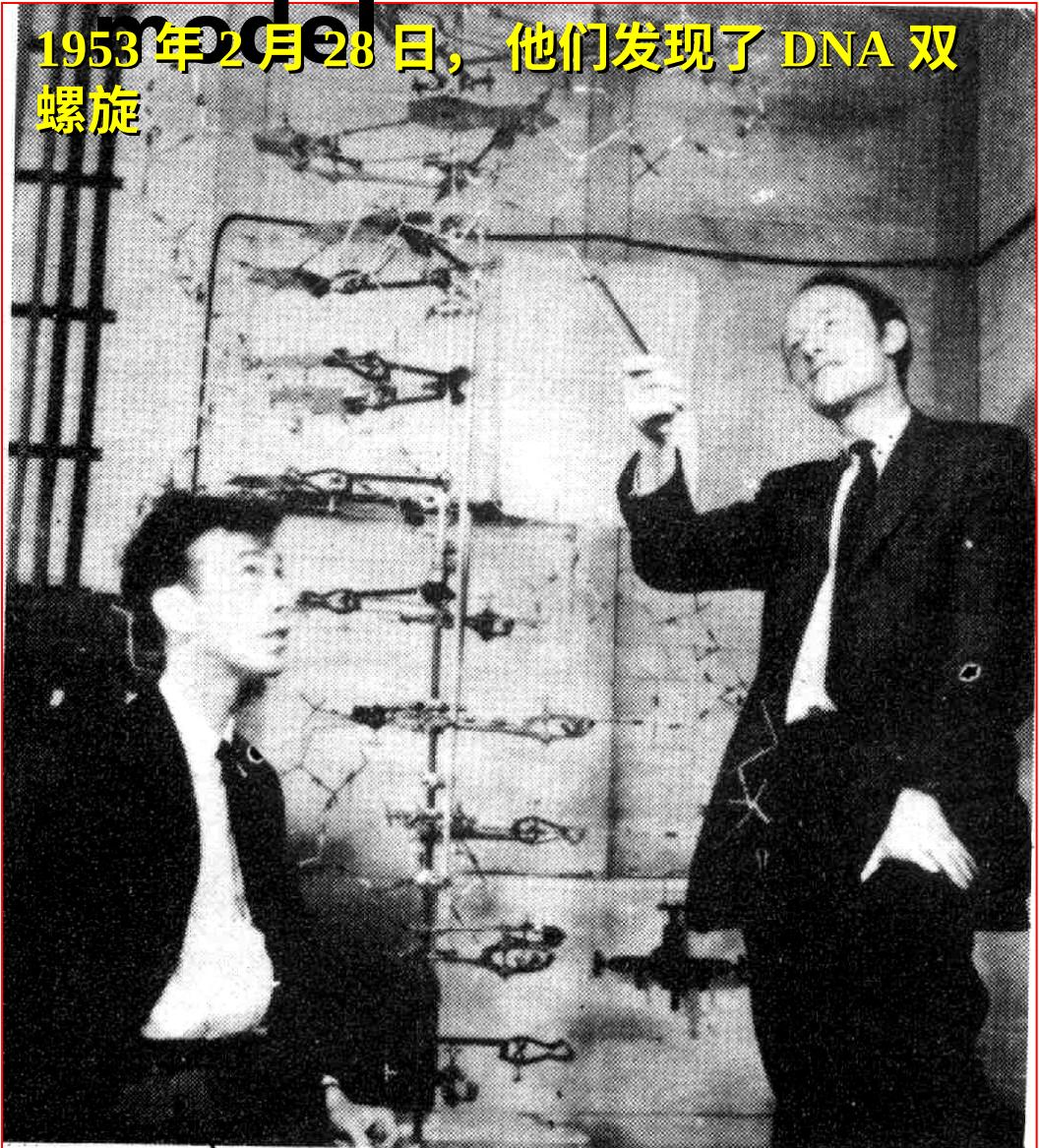
Watson, Crick and their double helix



James Dewey Watson, 1928-

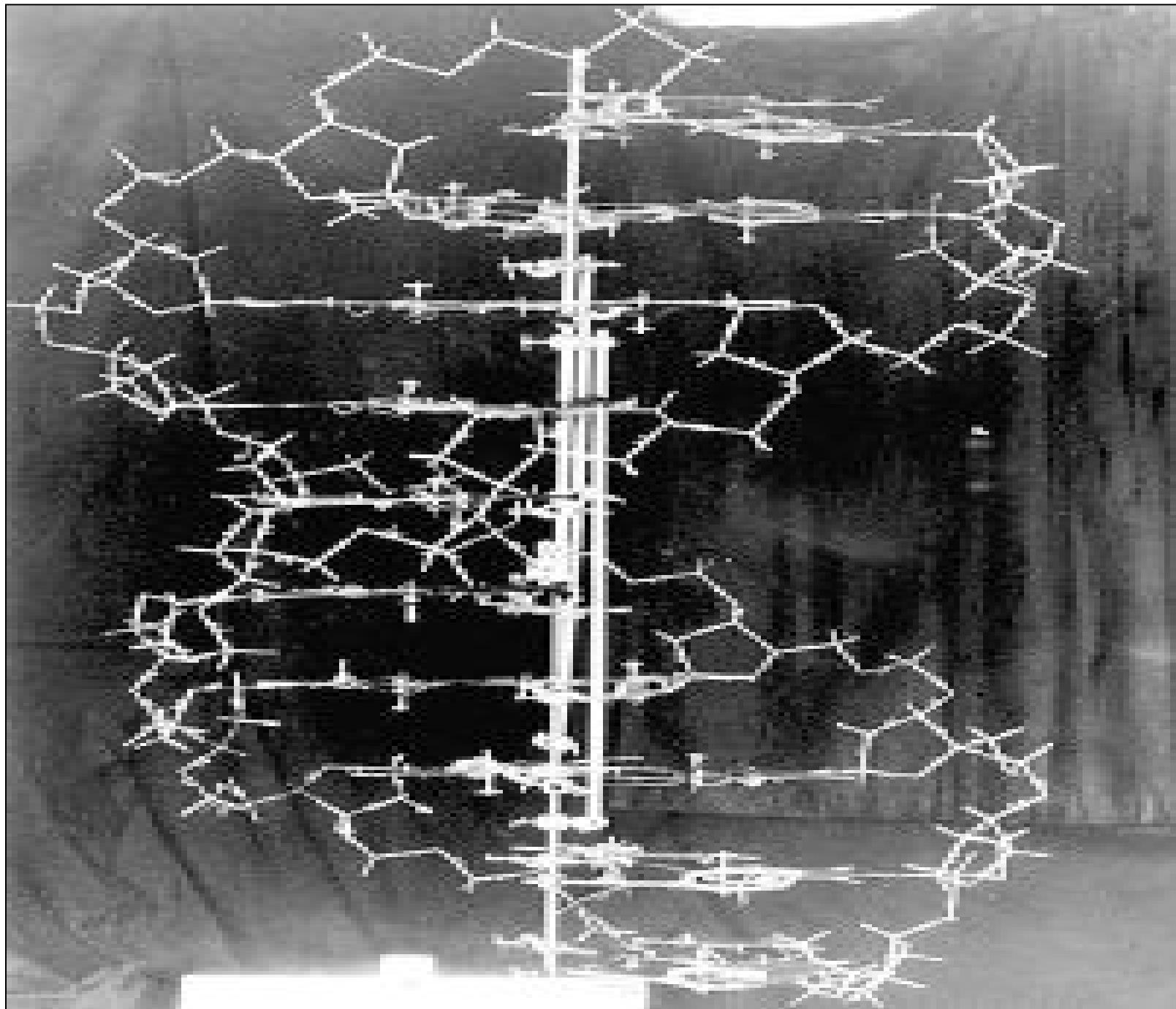


Francis Harry Compton Crick, 1916-2004



model

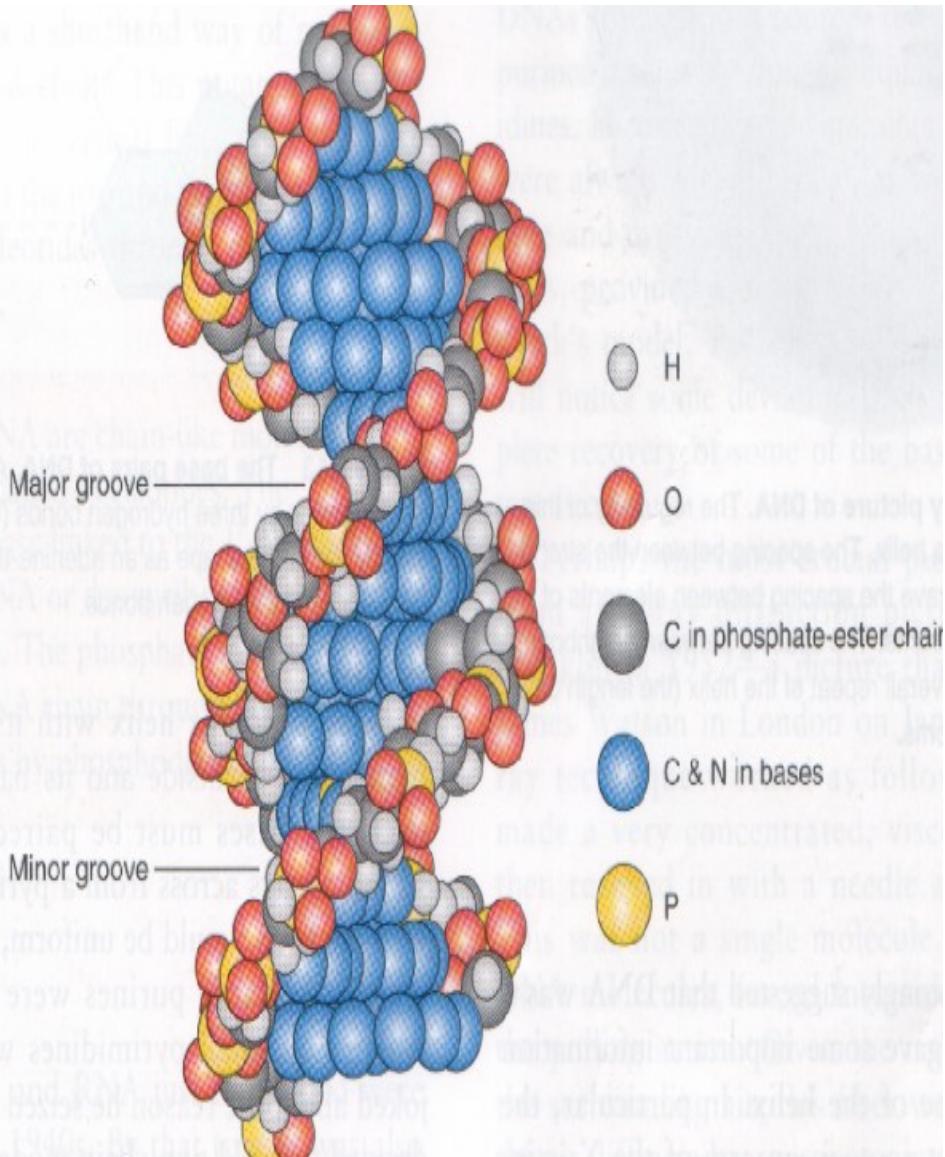
1953年2月28日, 他们发现了DNA双螺旋



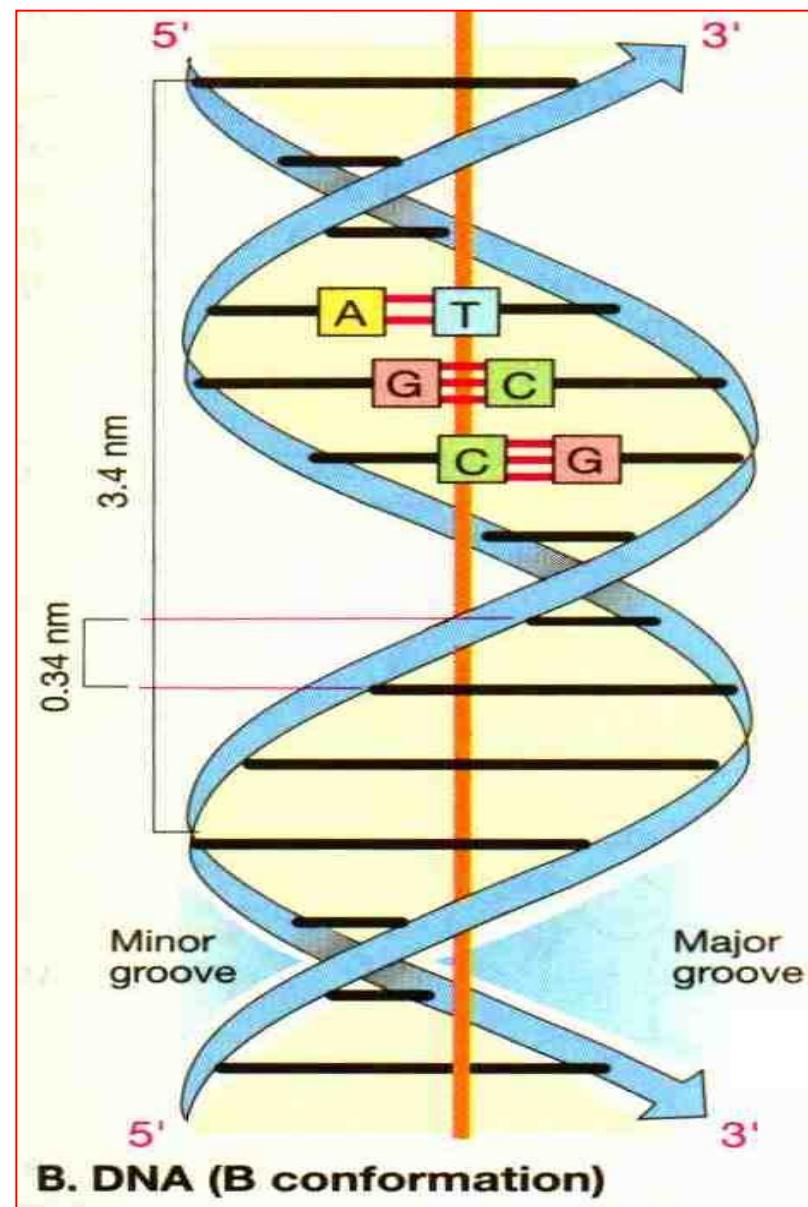
3. DNA 双螺旋结构模型的要点

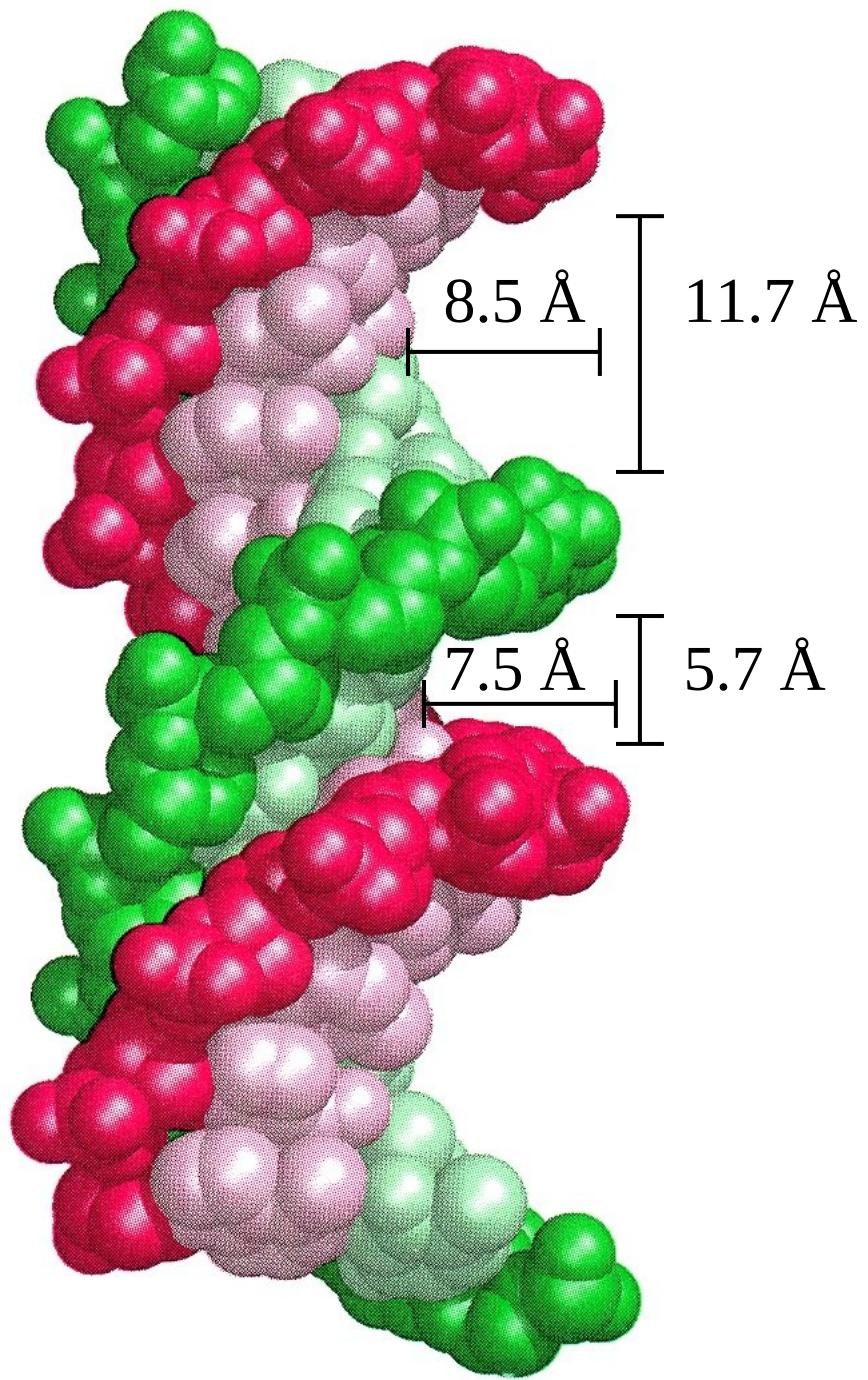
B 型双螺旋 DNA 的结构特点：

- (1) DNA 由 2 条反向平行的多核苷酸链构成的右手平行双螺旋。有大沟、小沟。
- (2) 主链位于螺旋外侧，碱基位于内侧；
- (3) 两条链间存在碱基互补：A 与 T 或 G 与 C 配对形成氢键，称为碱基互补原则（A 与 T 为两个氢键，G 与 C 为三个氢键）；
- (4) 螺旋的稳定因素为氢键和碱基堆砌力；
- (5) 螺旋的螺距为 3.4nm，直径为 2nm，相邻碱基对平面距离 0.34 nm，相差 36 度，10 个核苷酸 / 圈。
- (6) 有共同的螺旋轴，碱基朝内，氢键相连与轴垂直，戊糖平面垂直碱面。



Space Filling Model of B-DNA

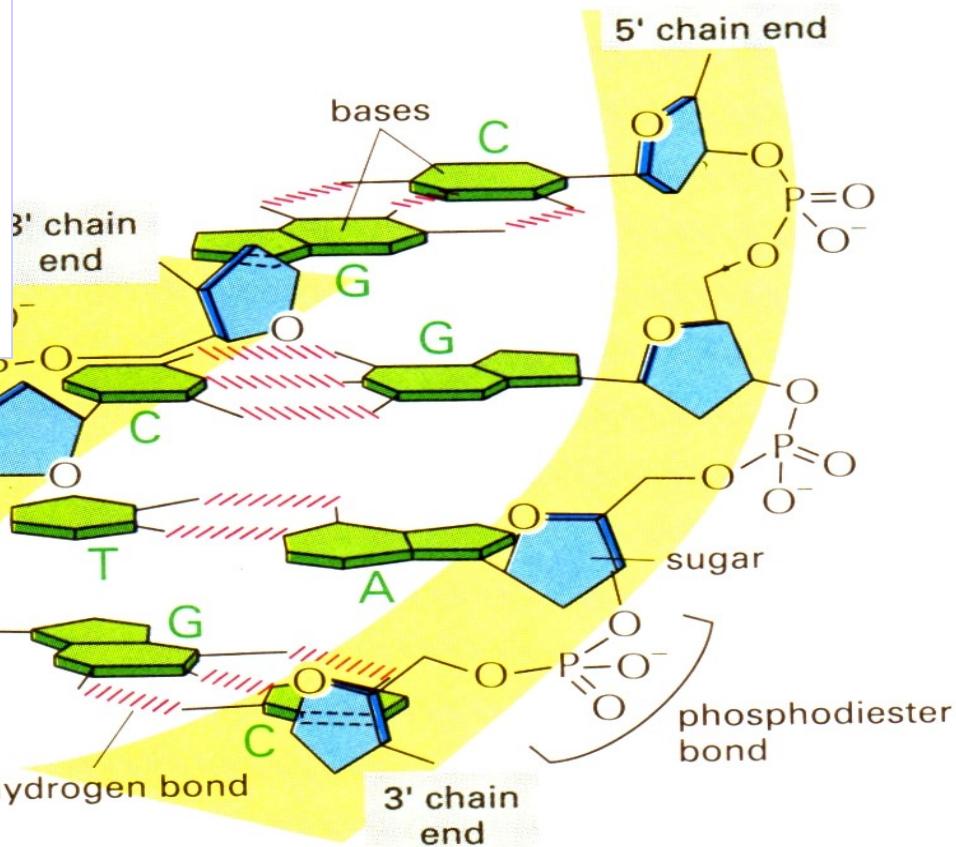
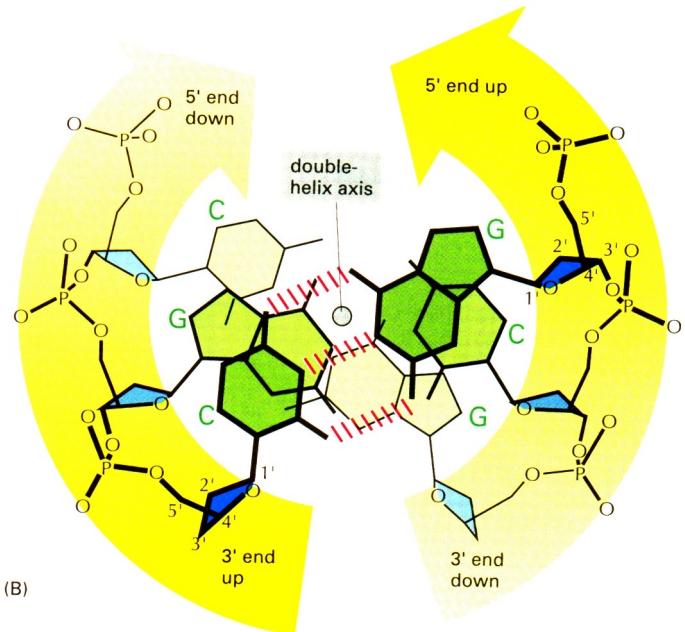




Major
Groove

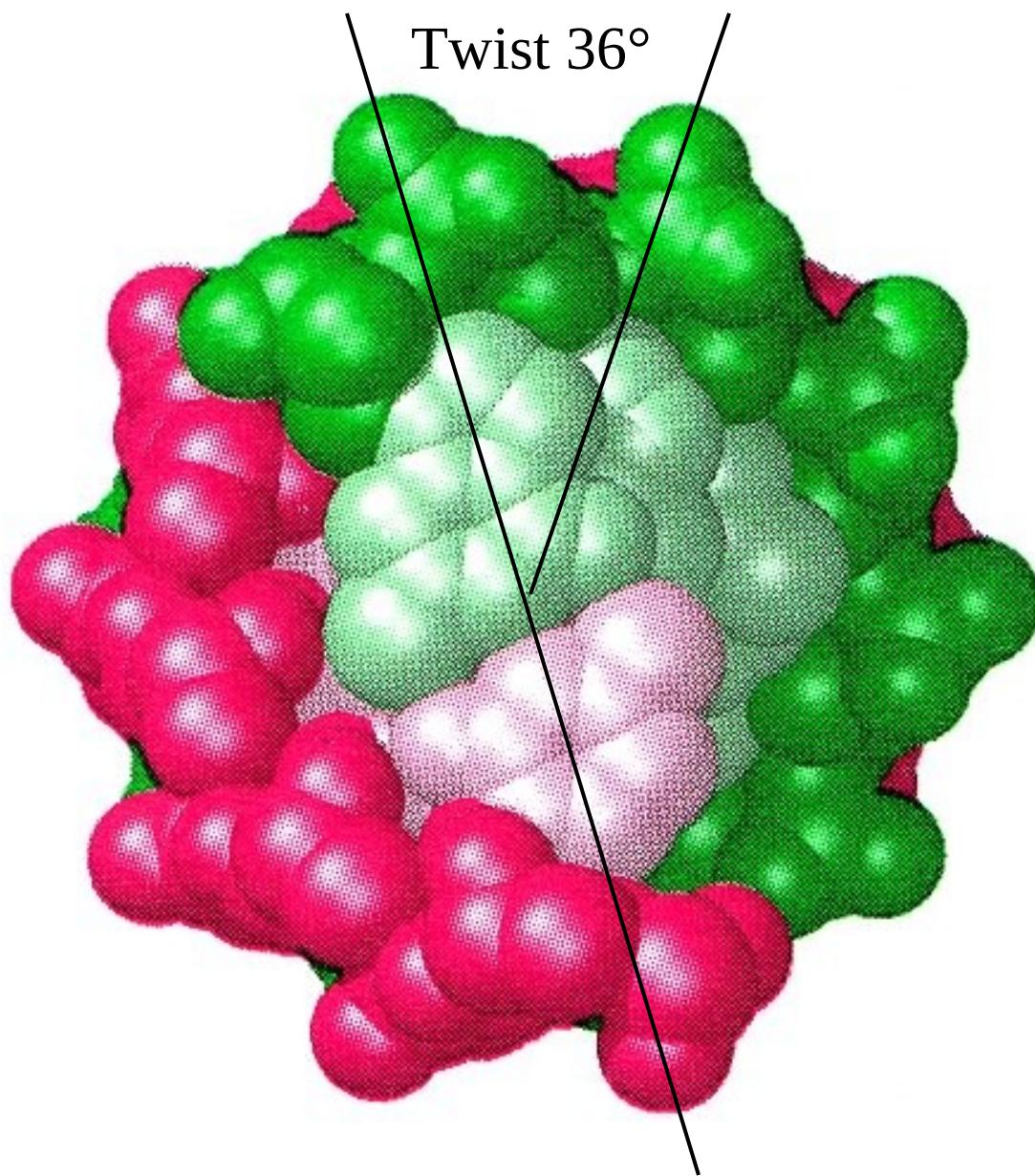
Minor
Groove

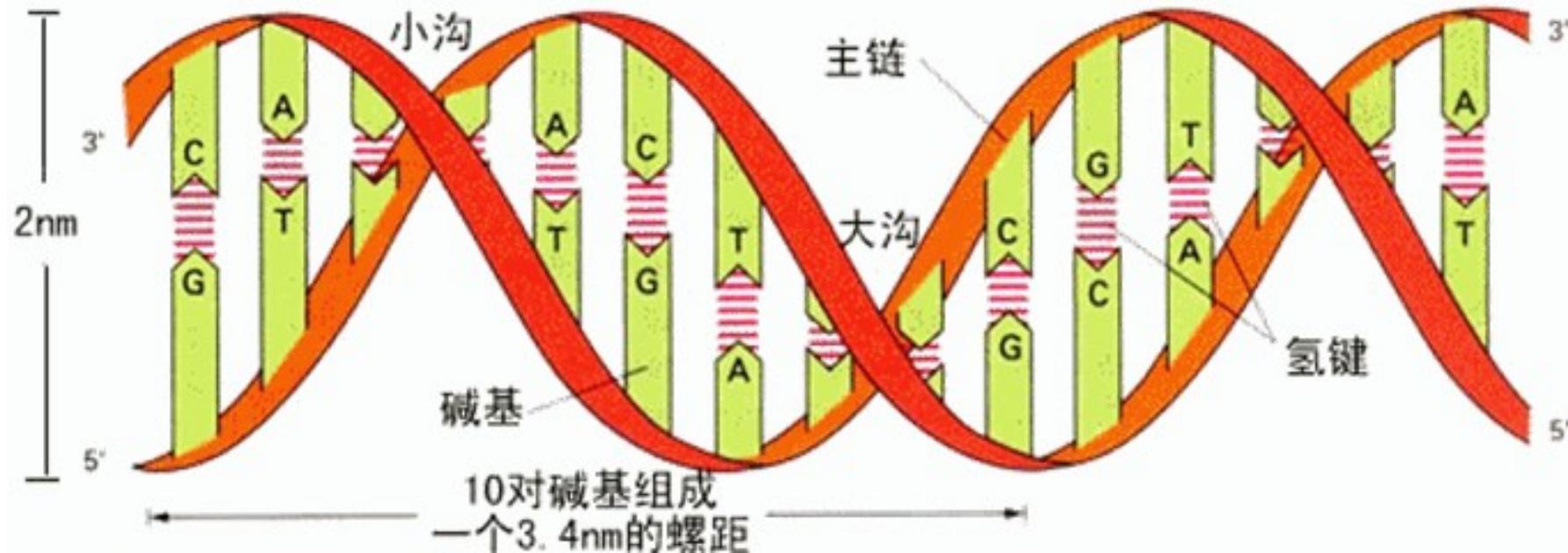
双螺旋分子中糖分子与纵轴平行，与碱基平面垂直



稳定双螺旋
结构的作用
力为氢键和
碱基堆积力
(即疏水作
用)

Twist 36°

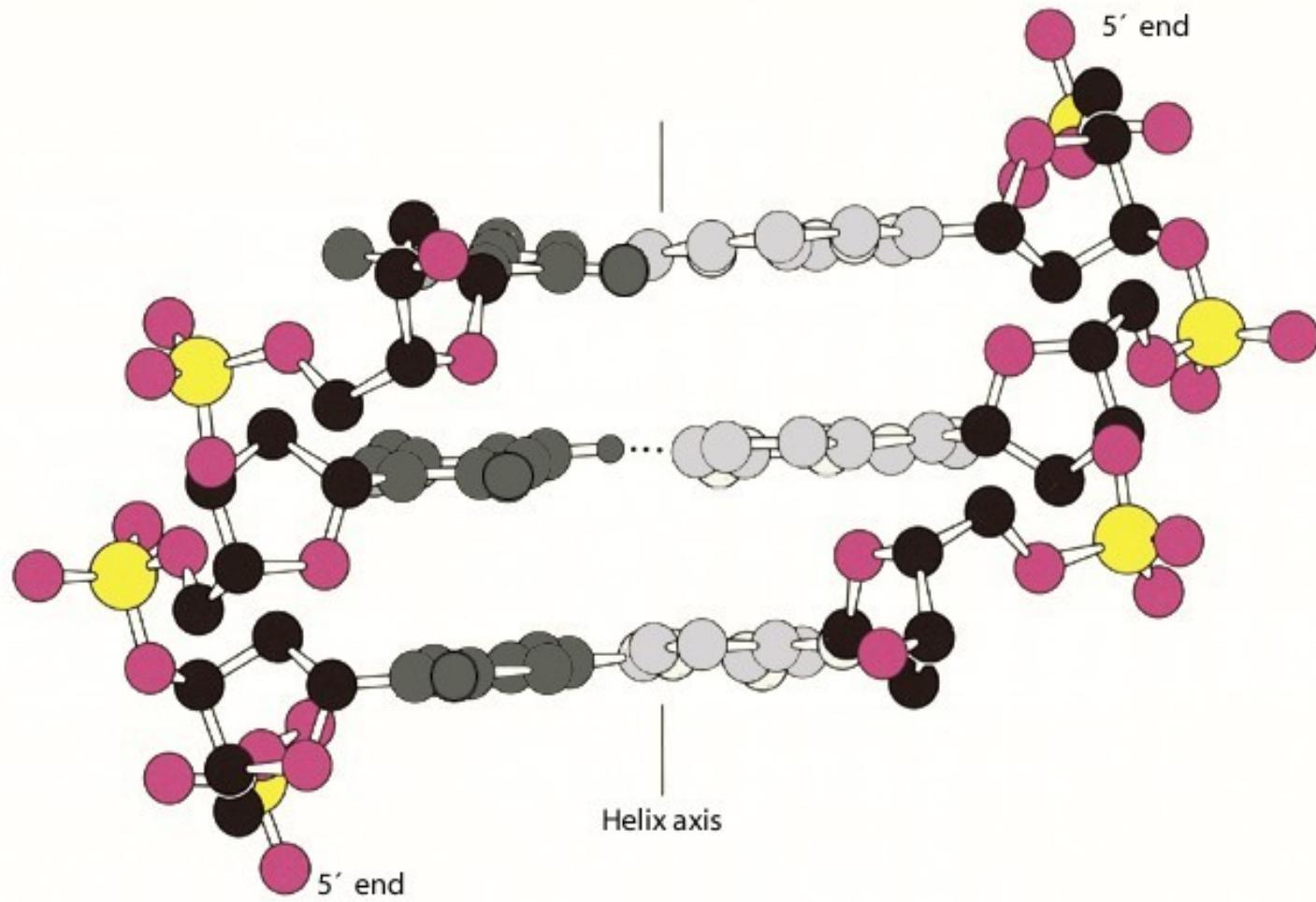




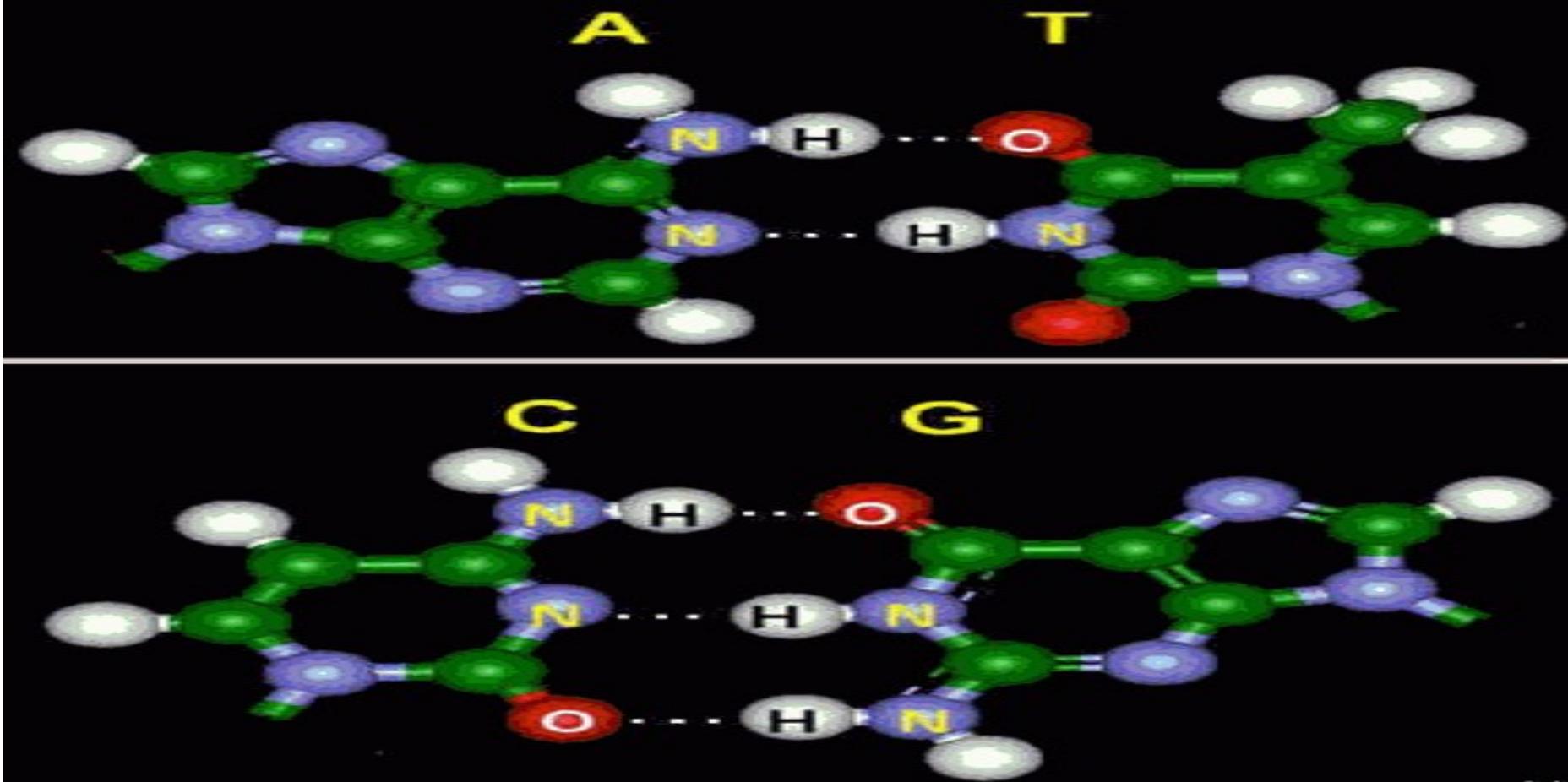
■大沟和小沟：大沟和小沟分别指双螺旋表面凹下去的较大沟槽和较小沟槽。小沟位于双螺旋的互补链之间，而大沟位于相毗邻的双股之间。这是由于连接于两条主链糖基上的配对碱基并非直接相对，从而使得在主链间沿螺旋形成空隙不等的大沟和小沟。在大沟和小沟内的碱基对中的 N 和 O 原子朝向分子表面。

Bases

- Bases inside, phosphates outside
- Bases are plane and hydrophobic
- Bases are stacked
- Bases are H-bonded to each other



碱基位于螺旋的内则，它们以垂直于螺旋轴的取向通过糖苷键与主链糖基相连；同一平面的碱基在二条主链间形成碱基对；配对碱基总是 A 与 T 和 G 与 C；碱基对以氢键维系，A 与 T 间形成两个氢键；DNA 结构中的碱基对与 Chatgaff 的发现正好相符。

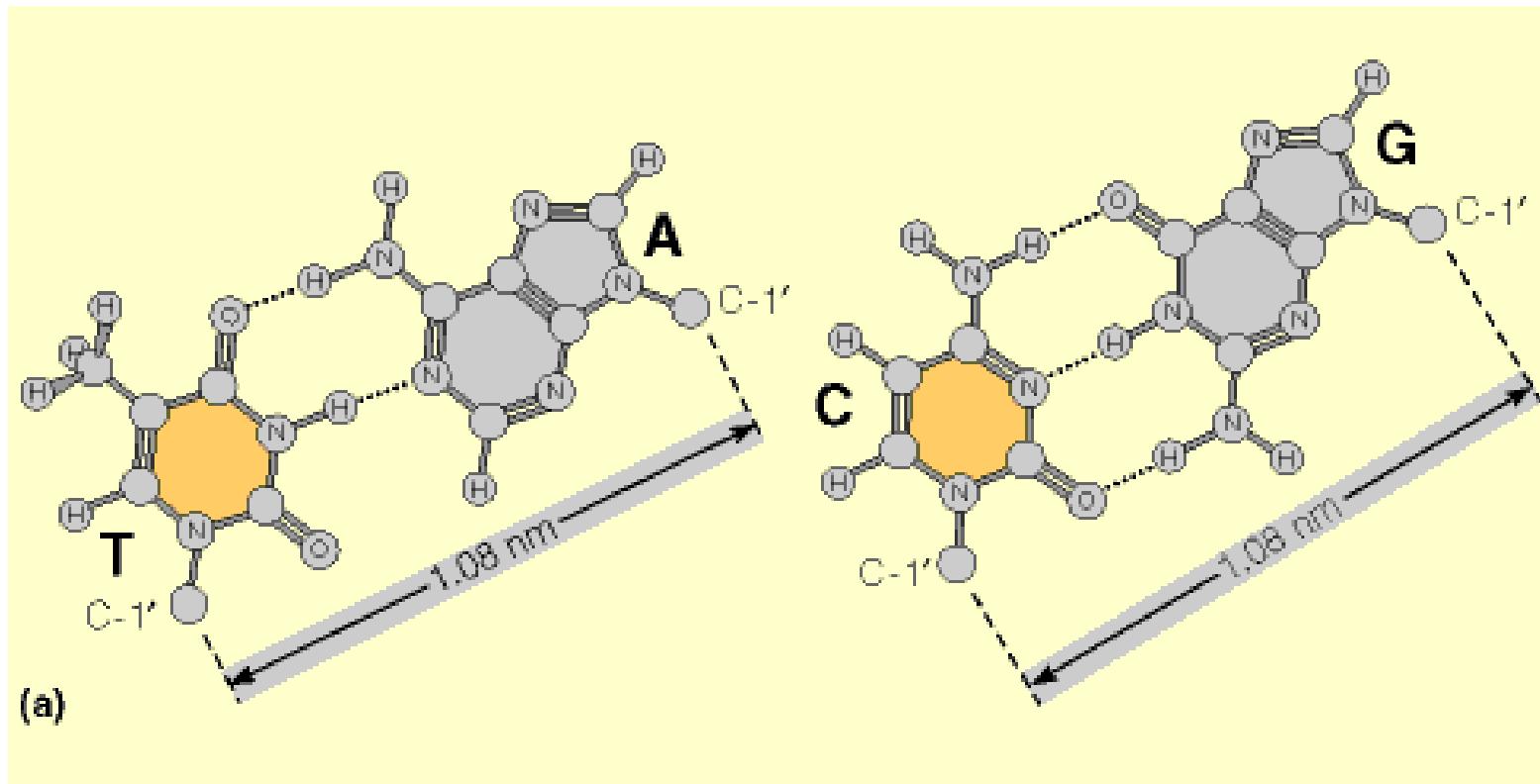


■从立体化学的角度看，只有嘌呤与嘧啶间配对才能满足螺旋对于碱基对空间的要求，而这二种碱基对的几何大小又十分相近，具备了形成氢键的适宜键长和键角条件。每对碱基处于各自自身的平面上，但螺旋周期内的各碱基对平面的取向均不同。碱基对具有二次旋转对称性的特征，即碱基旋转 180° 并不影响双螺旋的对称性。也就是说双螺旋结构在满足二条链碱基互补的前提下，DNA 的一级结构并不受限制。这一特征能很好的阐明 DNA 作为遗传信息载体在生物界的普遍意义。

Base-Pairing

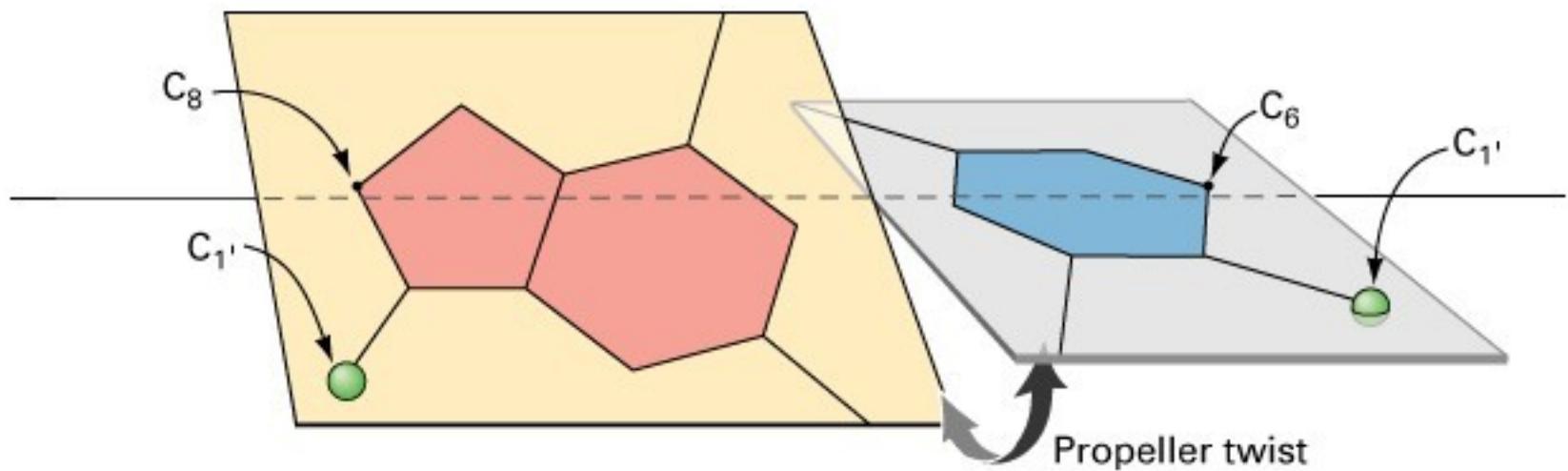
AT: 2 H-Bonds

GC: 3 H-Bonds

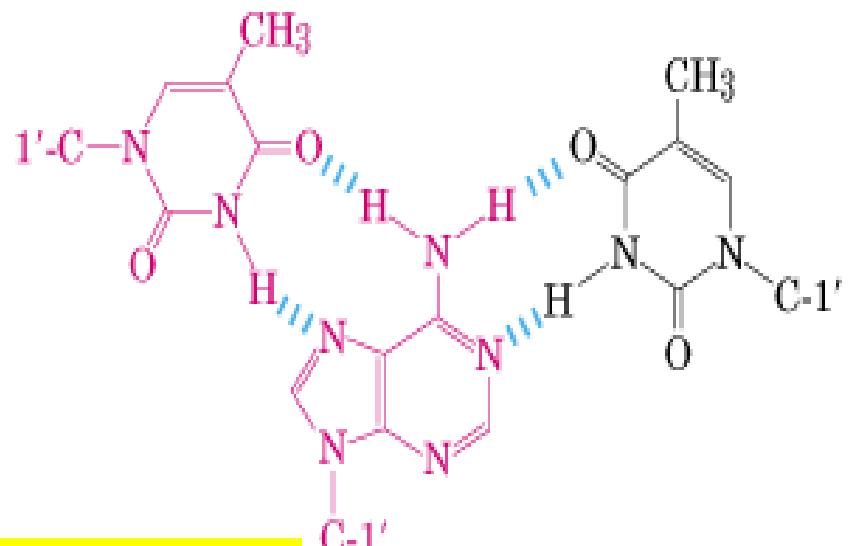


You should know how these bases interact with each other

Base pair tilt

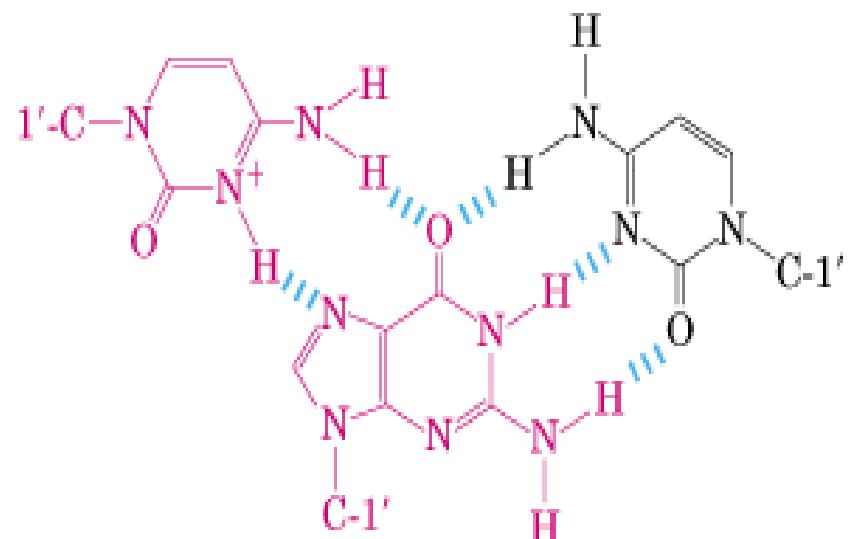


碱基间的氢键可以有不同形式



Hoogsteen

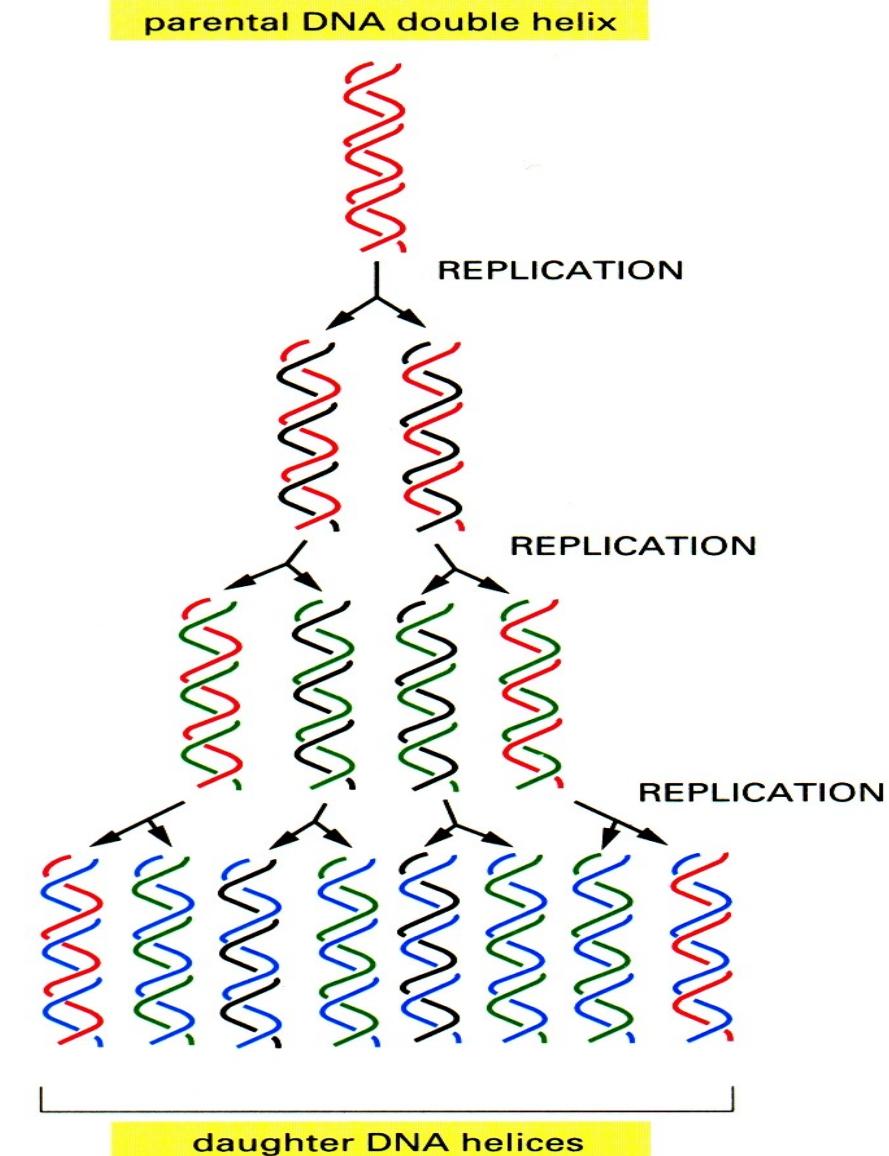
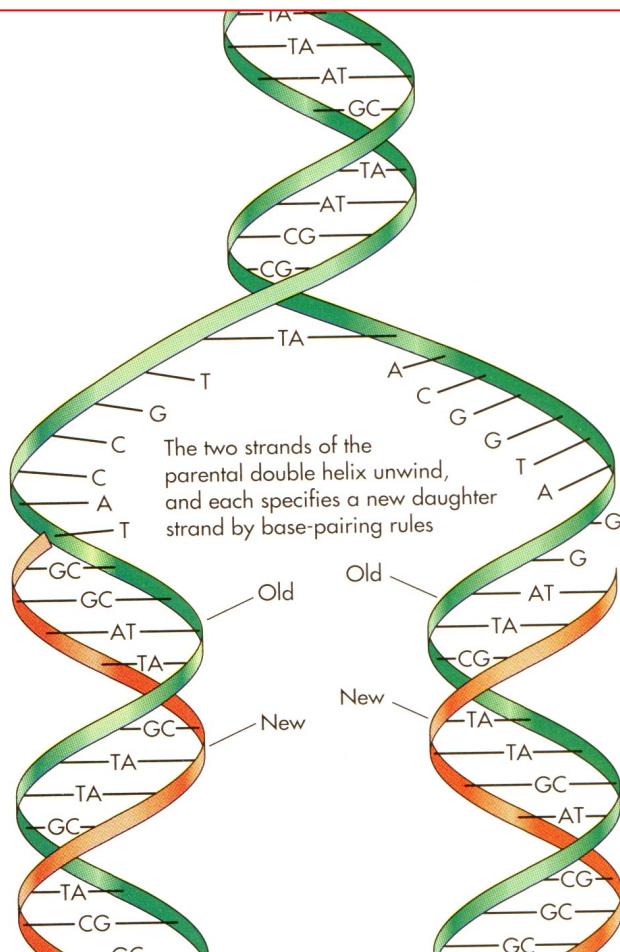
$T = A \cdot T$



Watson-Crick

$C \equiv G \cdot C^+$

碱基的配对使得双螺旋 DNA 分子在复制时以半保留的形式进行。



4. 双螺旋结构的稳定因素

(1) 疏水相互作用

疏水的嘌呤和嘧啶避开溶剂. 埋于螺旋内部.

(2) 氢键.

(3) 碱基堆积力 (base stacking force, 由芳香族碱基 π 电子间的相互作用引起的, 能形成疏水核心, 是稳定 DNA 最重要的因素; 此外, 诱导的偶极效应增强了堆积相互作用.

(4) 离子键 (减少双链间的静电斥力) 。

5. DNA 双螺旋的构象类型

B-DNA：92% 相对湿度，接近细胞内的 DNA 构象，与 Watson 和 Crick 提出的模型相似。

A-DNA：75% 相对湿度，与溶液中 DNA-RNA 杂交分子的构象相似，推测转录时发生 B→A。其碱基平面倾斜 20°，螺距与每一转碱基对数目都有变化。

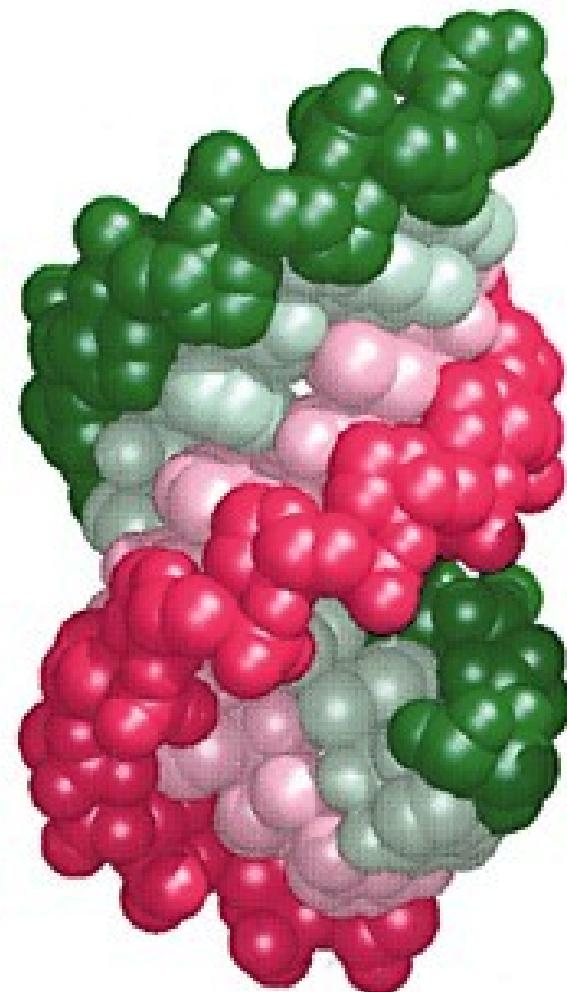
Z-DNA：主链呈锯齿型左向盘绕，直径约 1.8nm，螺距 4.5nm，每一转含 12 个 bp，只有小沟。B-DNA 与 Z-DNA 的相互转换可能和基因的调控有关。

C-DNA：44~46% 相对湿度，螺距 3.09nm，每转螺旋 9.33 个碱基对，碱基对倾斜 6°。可能是特定条件下 B-DNA 和 A-DNA 的转化中间物。

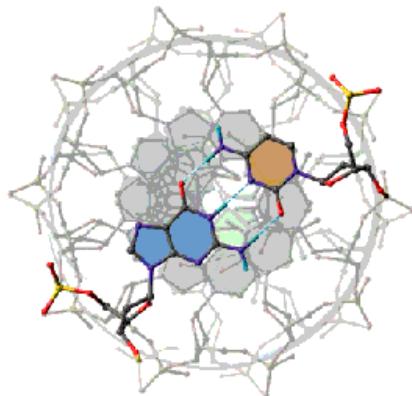
D-DNA：60% 相对湿度，DNA 中 A、T 序列交替的区域。每个螺旋含 8 个 bp，螺距 2.43nm，碱基平面倾斜 16°。

A-form of DNA

- The form taken on dehydration
- Shorter and fatter
- Double stranded RNA and DNA:RNA hybrids are in the A-form



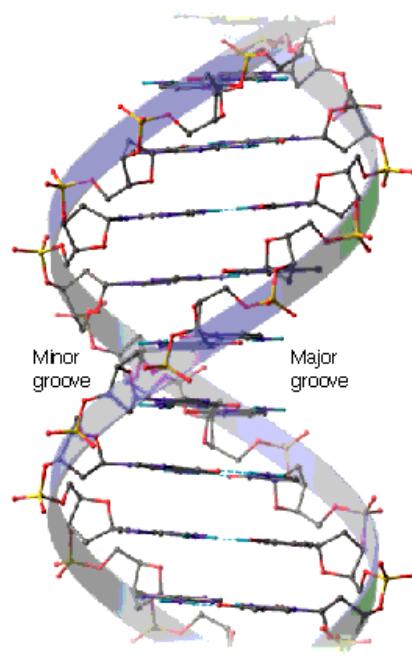
B- and A-DNA



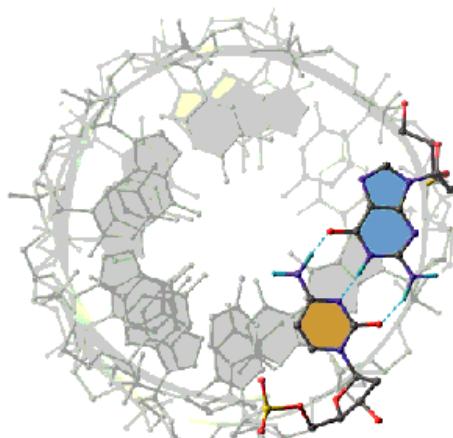
(a) B-DNA, end-on view

B-DNA

- 3.4 \AA/bp
- 23.5 \AA wide
- 10.4 bp/turn



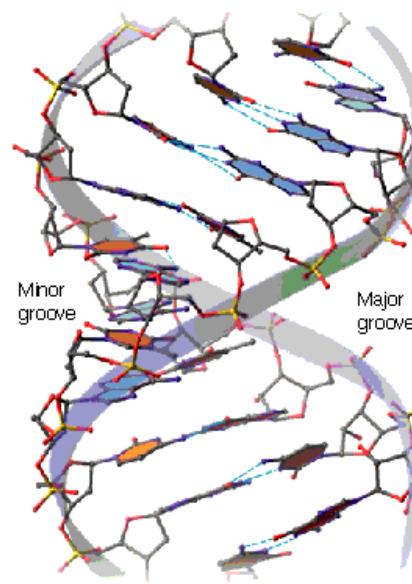
(b) B-DNA, side view



(c) A-DNA, end-on view

A-DNA

- 2.3 \AA/bp
- 25.5 \AA wide
- 11 bp/turn
- Base-pairs tilted about 19 degrees from axis of the helix.



(d) A-DNA, side view

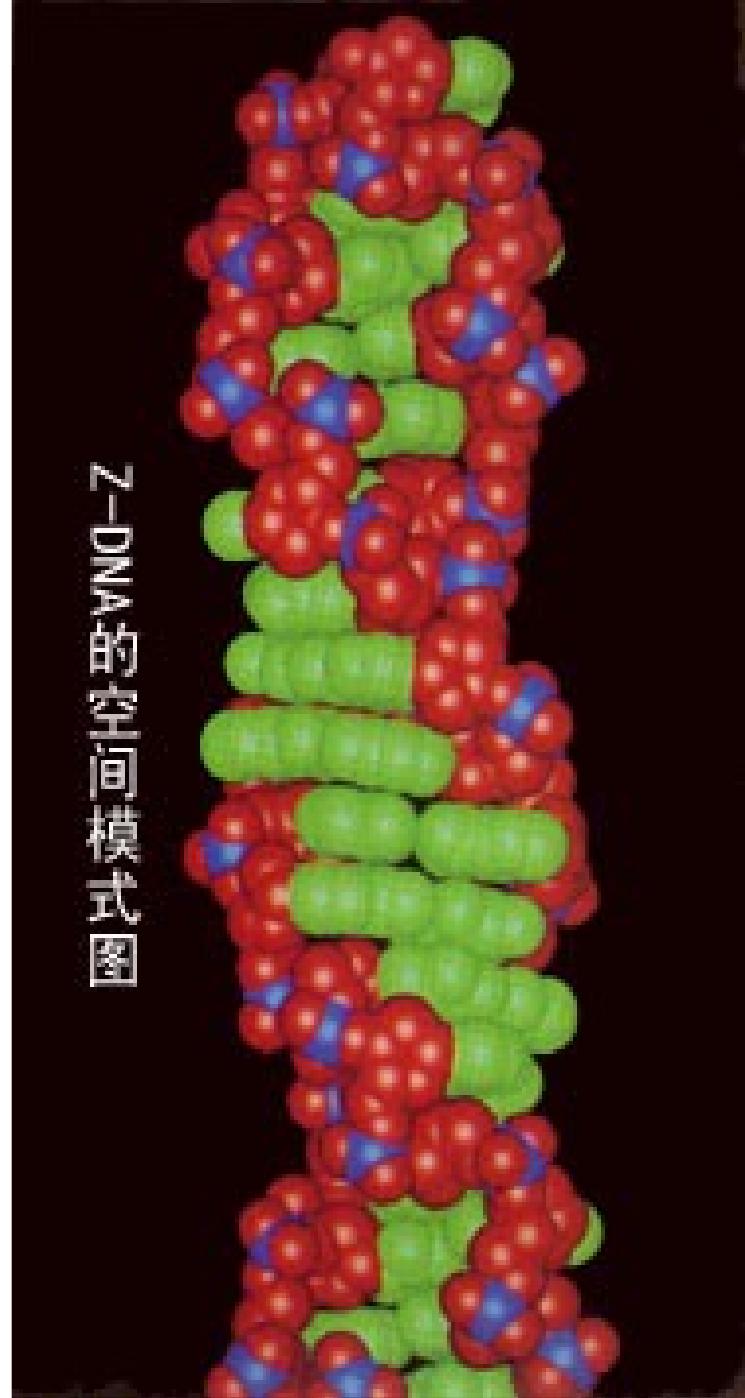
1979年，Wang 和 Rich 等人在研究人工合成的 CGCGCG 单晶的 X- 射线衍射图谱时分别发现这种六聚体的构象与上面讲到的完全不同。它是左手双螺旋，在主链中各个磷酸根呈锯齿状排列，尤如“之”字形一样，因此叫它 Z 构象（Zigzag）。

这一构象中的重复单位是二核苷酸而不是单核苷酸；而且 Z-DNA 只有一个螺旋沟，它相当于 B 构象中的小沟，它狭而深，大沟则不复存在。

轴心线在碱基对之外。

Z-form of DNA

- Also called left handed DNA
- More elongated
- Favored by certain nucleotide sequences
- May exist in localized regions



Z-DNA 这种结构是怎样生成的？这一结构在天然状态下存在吗？它有什么生物学意义？

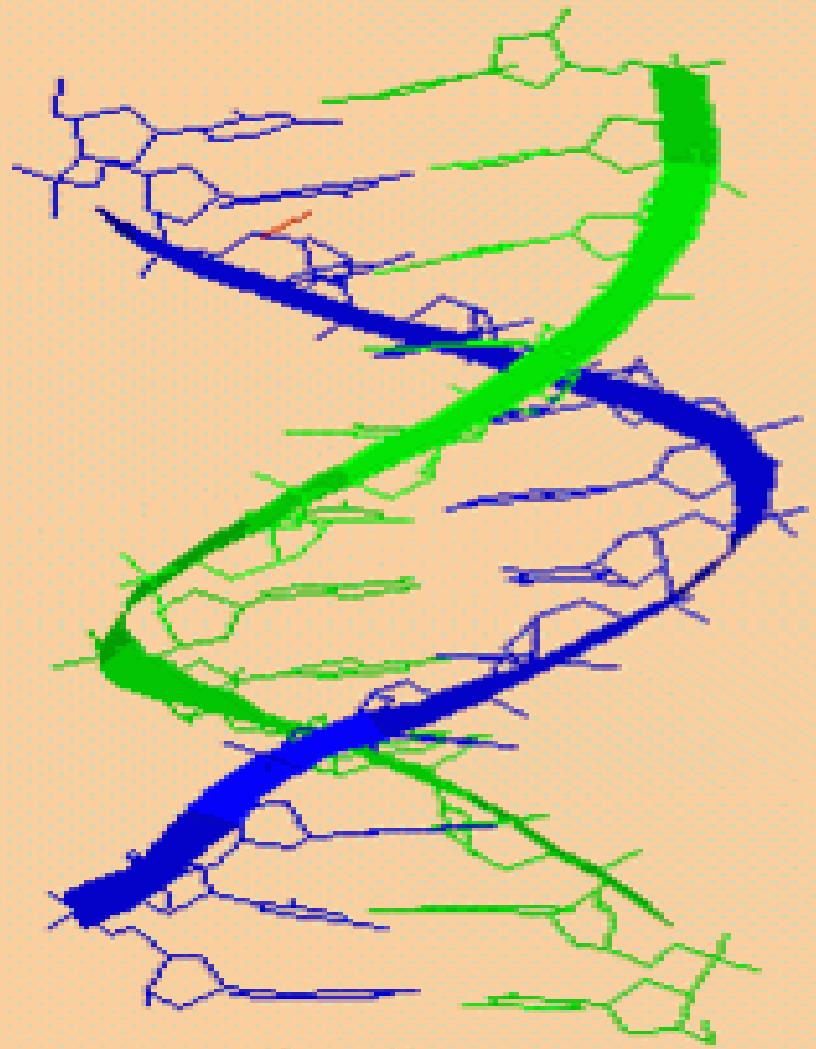
研究表明，Z-DNA 的形成是 DNA 单链上出现嘌呤与嘧啶交替排列所成的。比如 CGCGCGCG 或者 CACACACA。这种碱基排列方式会造成核苷酸的糖苷键的顺式和反式构象的交替存在。当碱基与糖构成反式结构时，它们之间离得远；而当它们成顺式时，就彼此接近。嘧啶糖苷键通常是反式的，而嘌呤糖苷酸键既可成顺式的也可成反式的。而在 Z-DNA 中，嘌呤碱是顺式的。这样，在 Z-DNA 中嘧啶的糖苷链离开小沟向外挑出，而嘌呤上的糖苷键则弯向小沟。嘌呤与嘧啶的交替排列就使得糖苷键也是顺式与反式交替排列，从而使 Z-DNA 主链呈锯齿状或“之”字形。

实验证明细胞 DNA 分子中确实存在有 Z-DNA 区。而且，细胞内有一些因素可以促使 B-DNA 转变为 Z-DNA。比如，胞嘧啶第五位碳原子的甲基化，在甲基周围形成局部的疏水区。这一区域扩伸到 B-DNA 的大沟中，使 B-DNA 不稳定而转变为 Z-DNA。这种 C5 甲基化现象在真核生物中是常见的。因此在生物 B 构象的 DNA 中某些区段具有 Z-DNA 构象是可能的。DNA 真是一个构象可变动态分子。

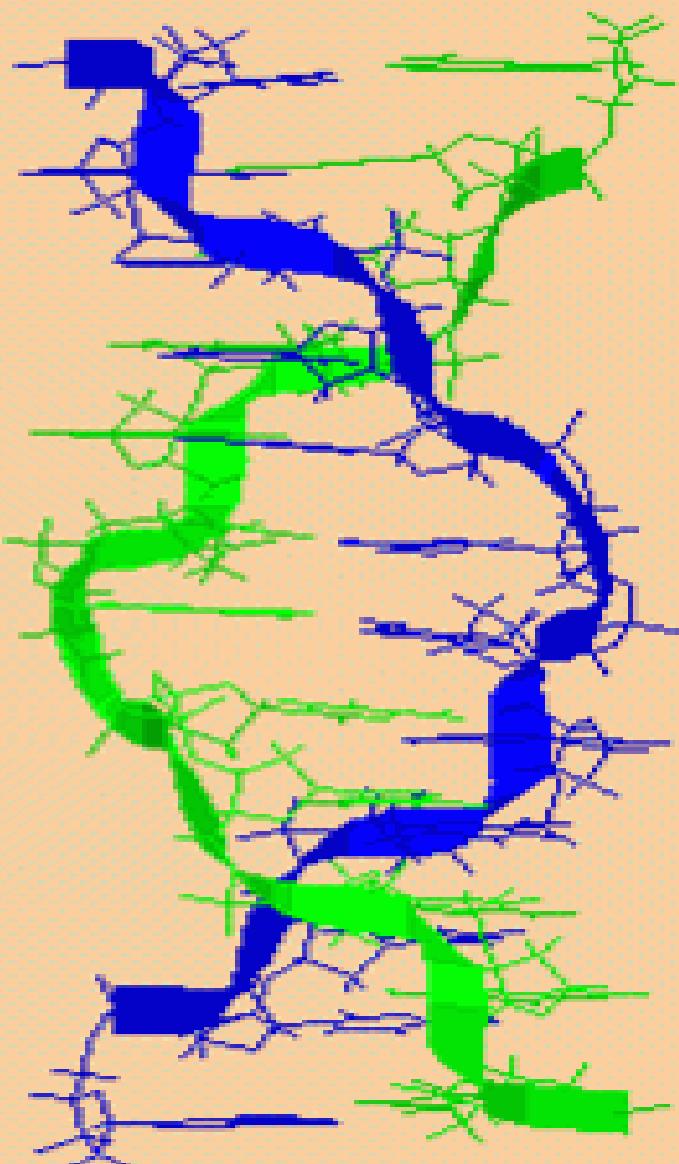
Z – DNA 有什么生物学意义呢？

- Z-DNA 的形成通常在热力学上是不利的。因为 Z-DNA 中带负电荷的磷酸根距离太近了，这会产物静电排斥。但是，DNA 链的局部不稳定区的存在就成为潜在的解链位点。DNA 解螺旋却是 DNA 复制和转录等过程中必要的环节，因此认为这一结构位点与基因调节有关。比如 SV 40 增强子区中就有这种结构，又如鼠类微小病毒 DNS 复制区起始点附近有 GC 交替排列序列。
- DNA 螺旋上沟的特征在其信息表达过程中起关键作用。调控蛋白都是通过其分子上特定的氨基酸侧链与 DNA 双螺旋沟中的碱基对一侧的氢原子供体或受体相互作用，形成氢键从而识别 DNA 上的遗传信息的。**大沟所带的遗传信息比小沟多**。沟的宽窄和深浅也直接影响到调控蛋白质对 DNA 信息的识别。Z-DNA 中大沟消失，小沟狭而深，使调控蛋白识别方式也发生变化。这些都暗示 Z-DNA 的存在不仅仅是由于 DNA 中出现嘌呤 - 喋嘧交替排列之结果，也一定是在漫漫的进化长河中对 DNA 序列与结构不断调整与筛选的结果，有其内在而深刻的含意，只是人们还未充分认识而已。
- B-DNA 活力高， A-DNA 有活力， Z-DNA 活性低？

目前已知 DNA 双螺旋结构，除 Z 型为左手双螺旋外，其余均为右手双螺旋。

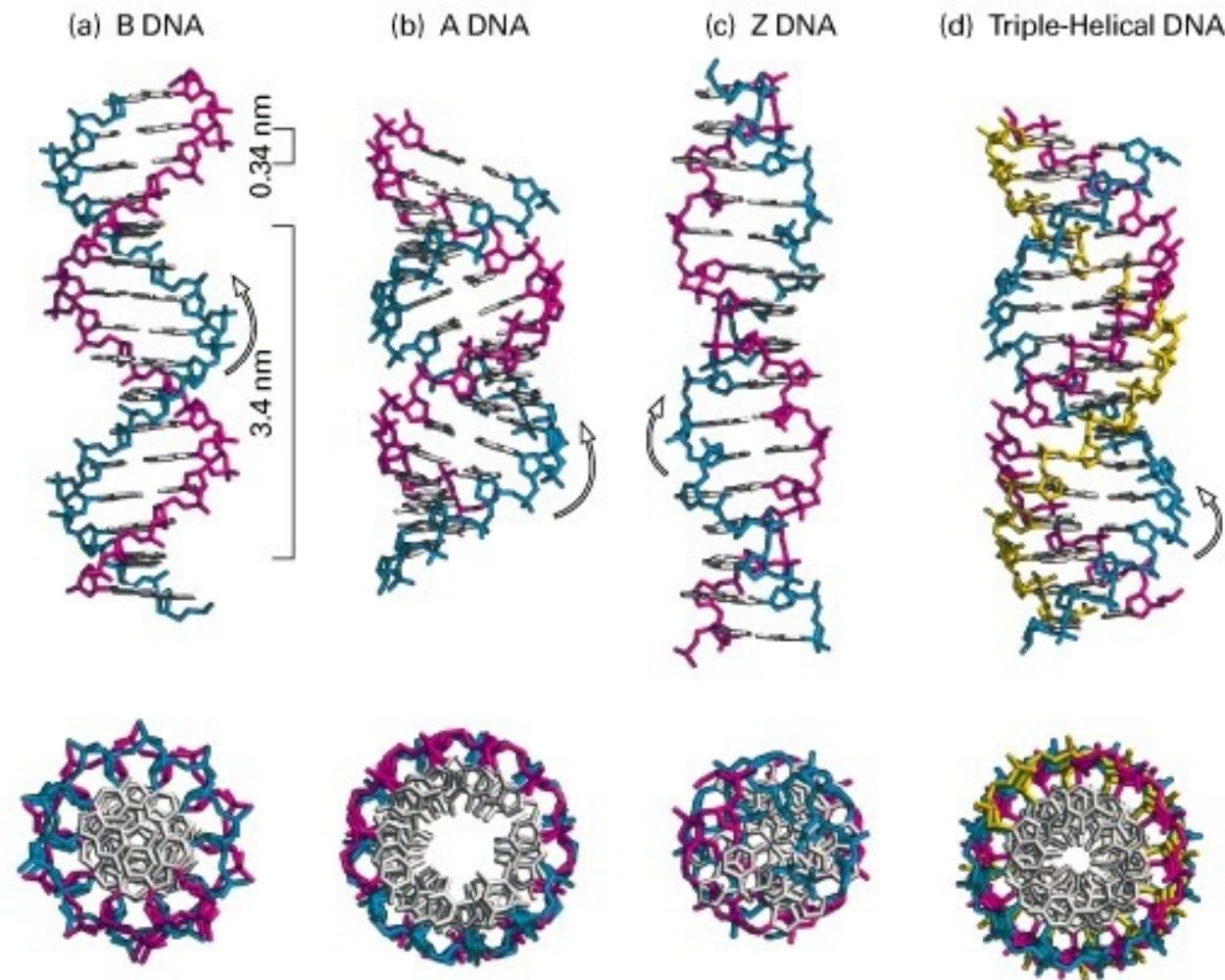


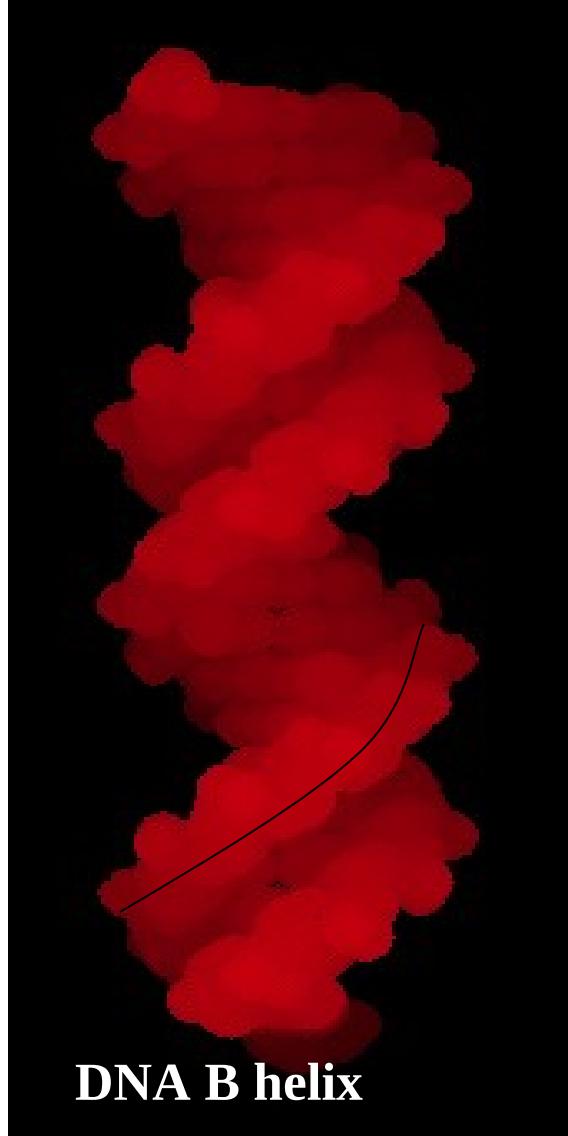
B Form



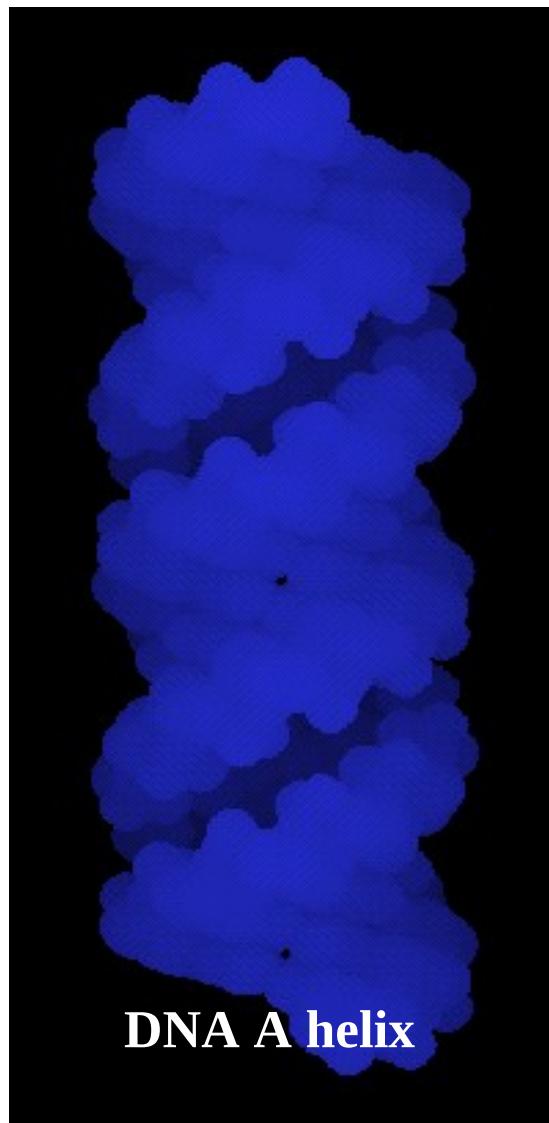
Z Form

Other DNA structures

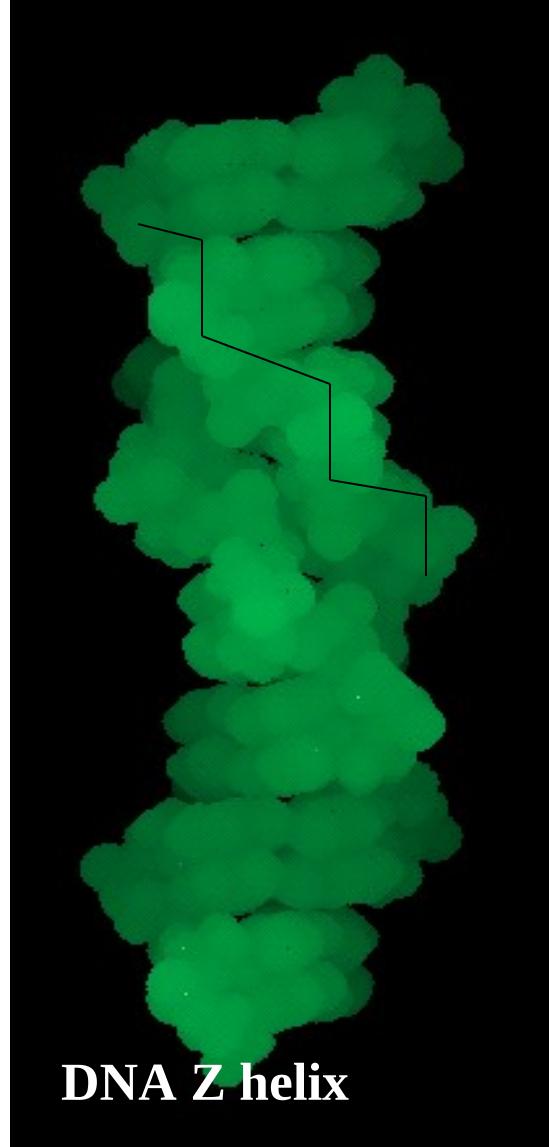




0°
10.5 residues/turn
diameter 20A
pitch 34A



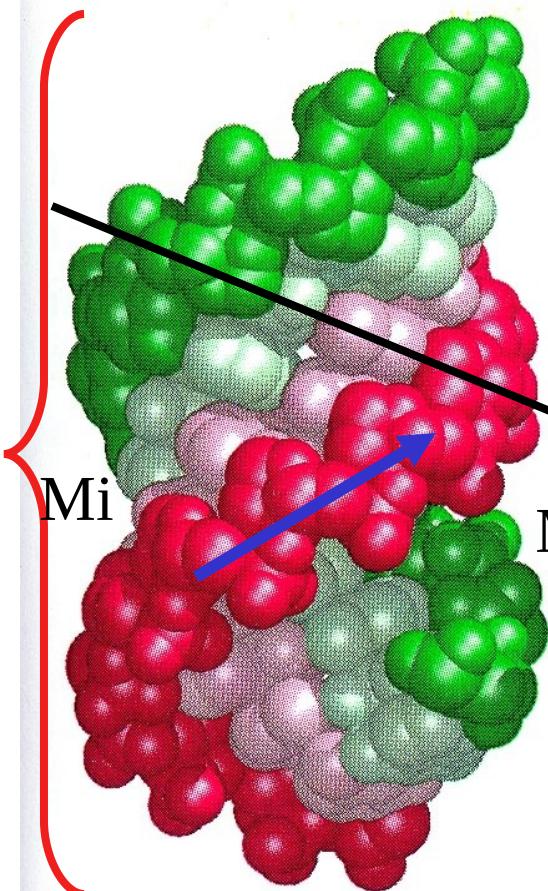
11 residues/turn
diameter 23A
pitch 28A



7°
12 residues/turn
diameter 18A
pitch 45A

A

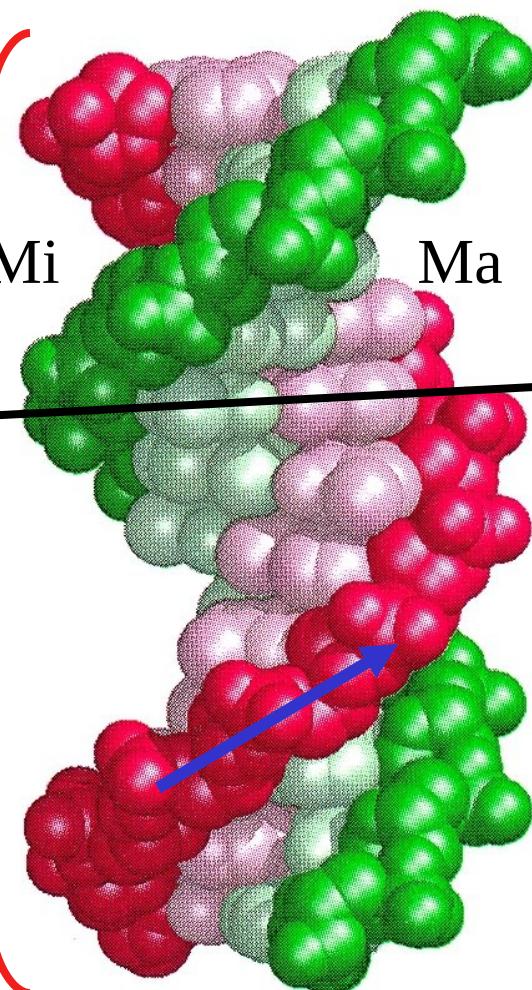
Pitch



B

Mi

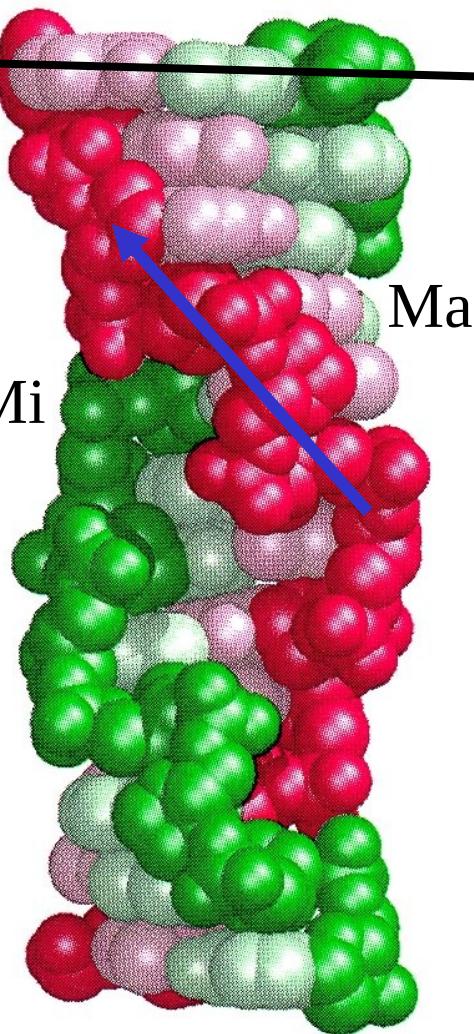
Ma



Z

Mi

Ma

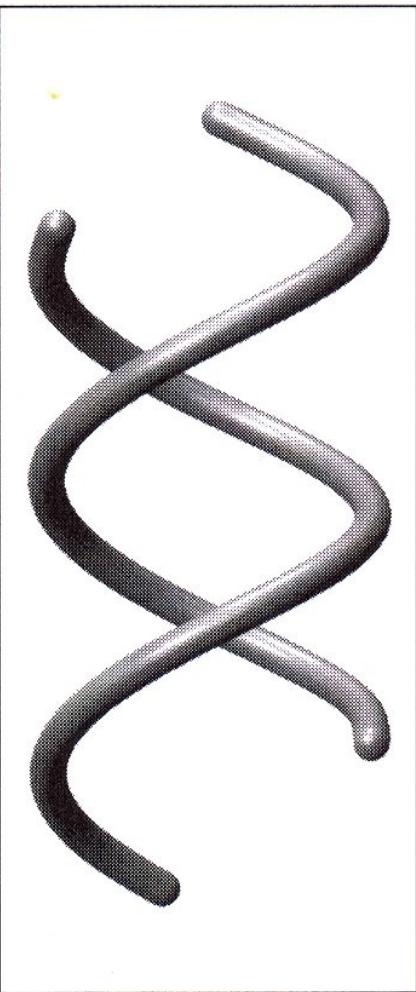


Base Inclination

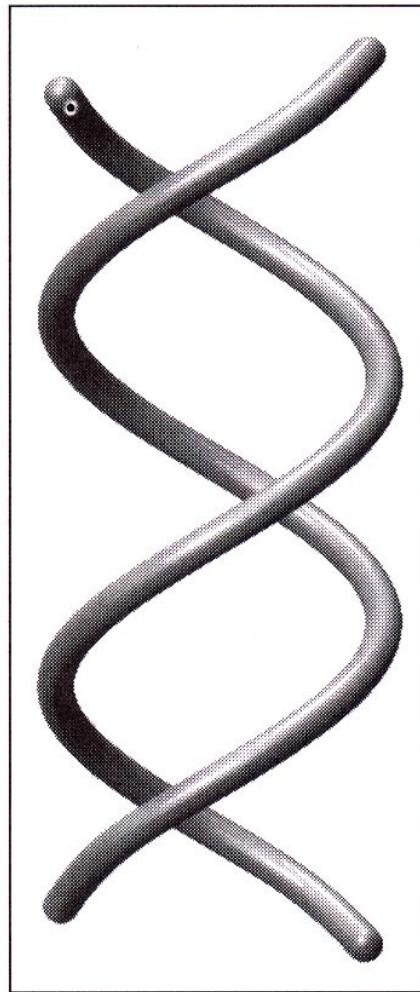
Handedness

Z-DNA Phosphate Backbone is Kinked

A



B



Z

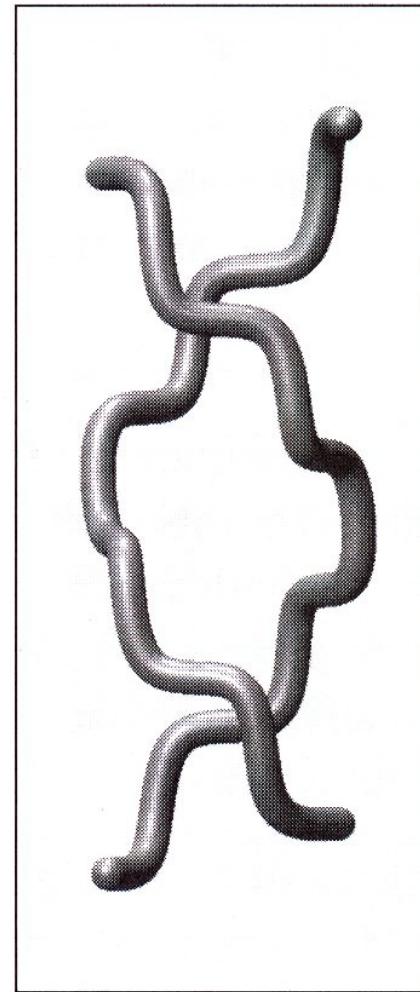


Table 4.1

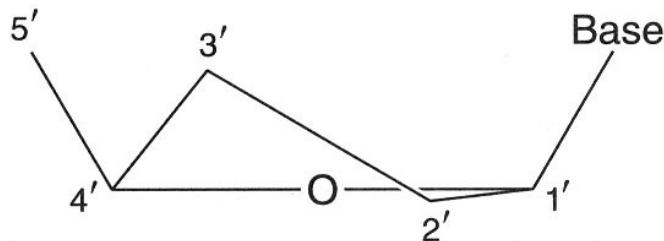
Average Structural Parameters for Various Helical Forms

	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Helix handedness	Right	Right	Left
bp/repeating unit	1	1	2
bp/turn	11	10	12
Helix twist, (°)	32.7	36.0	-10^a, -50^b
Rise/bp, (Å)	2.9	3.4	-3.9^a, -3.5^b
Helix pitch, (Å)	32	34	45
Base pair inclination, (°)	12	2.4	-6.2
P distance from helix axis, (Å)	9.5	9.4	6.2^a, 7.7^b
X displacement from bp to helix axis, Å	-4.1	0.8	3.0
Glycosidic bond orientation	anti C3'-endo	anti C2'-endo^e	anti^c, syn^d C2'-endo C3'-endo^d Convex
Sugar conformation			
Major groove depth width, (Å)	13.5	8.5	
Minor groove depth width, (Å)	2.7	11.7	
	2.8	7.5	9
	11.0	5.7	4

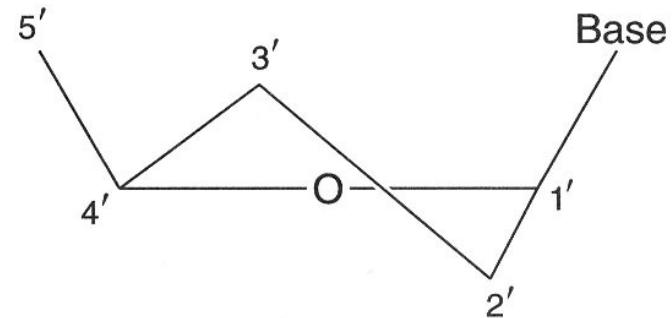
^aCpG step.^bGpC step.^ccytosine.^dguanine.^eThere is a range of conformations.

Sugar “Pucker” Conformations

A DNA

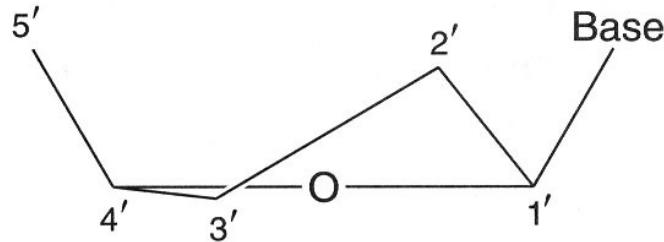


3'-endo

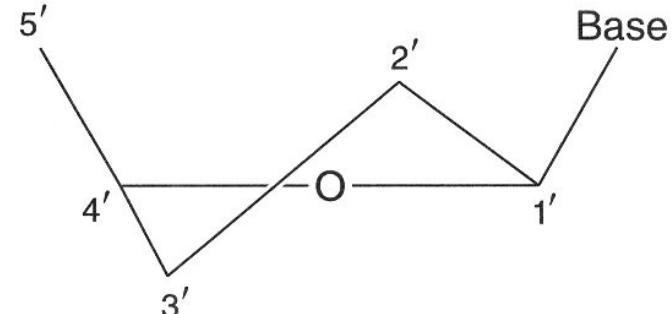


3'-endo, 2'-exo

B DNA

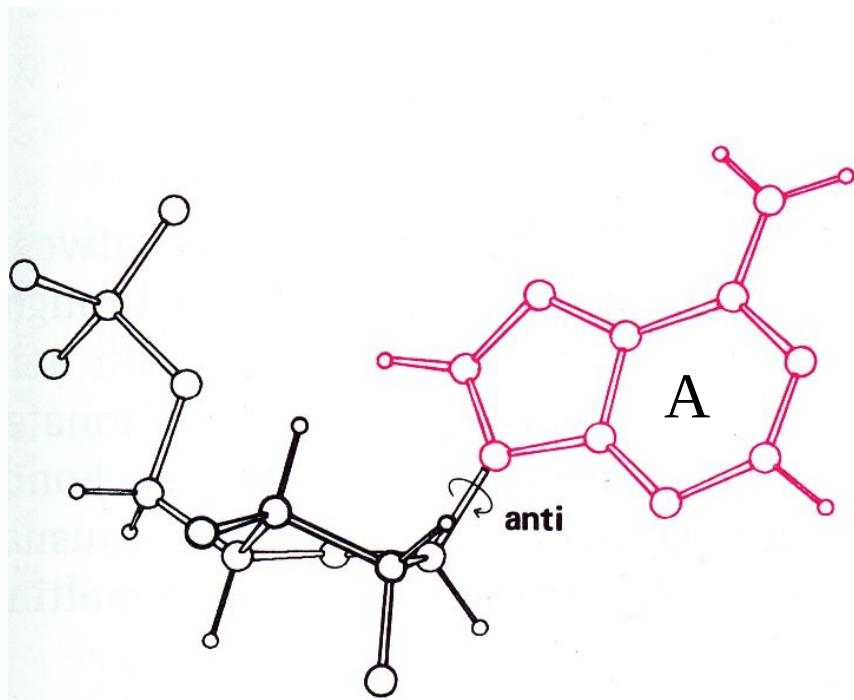


2'-endo

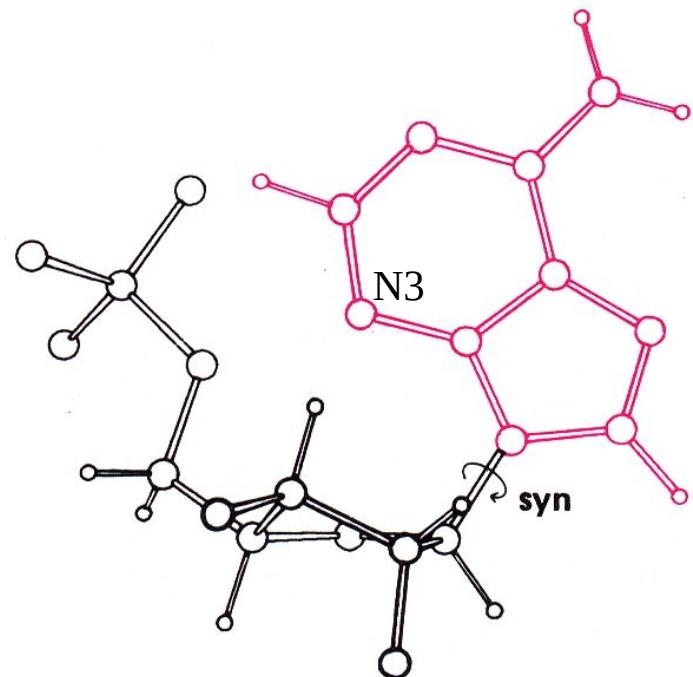


2'-endo, 3'-exo

Rotation About the N-Glycosidic Bond



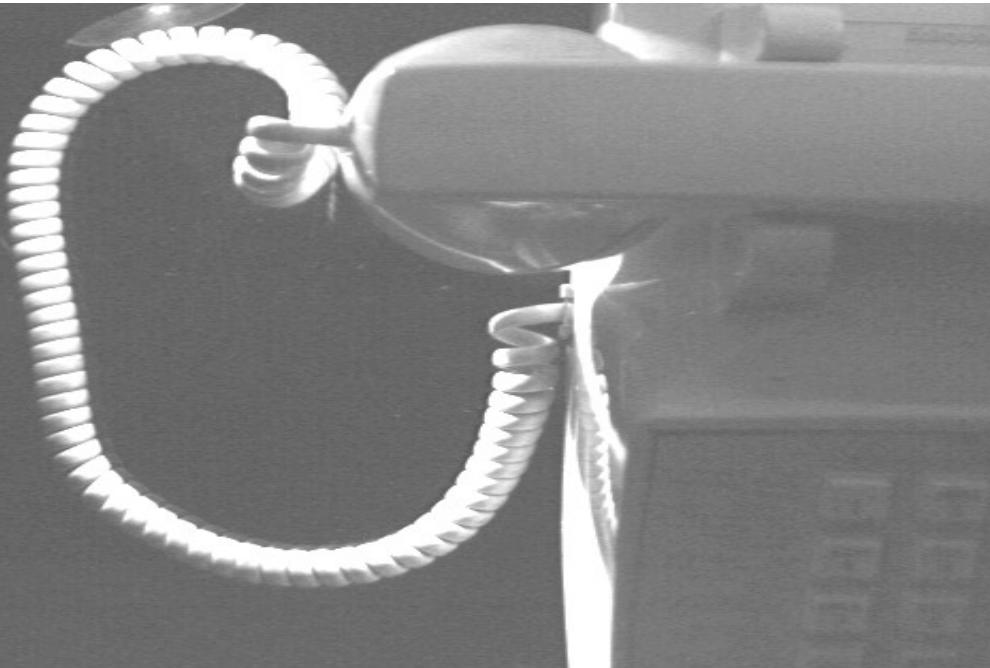
A,B DNA



Z DNA (G only)

(二) DNA 的三级结构

Telephone cord



relaxed



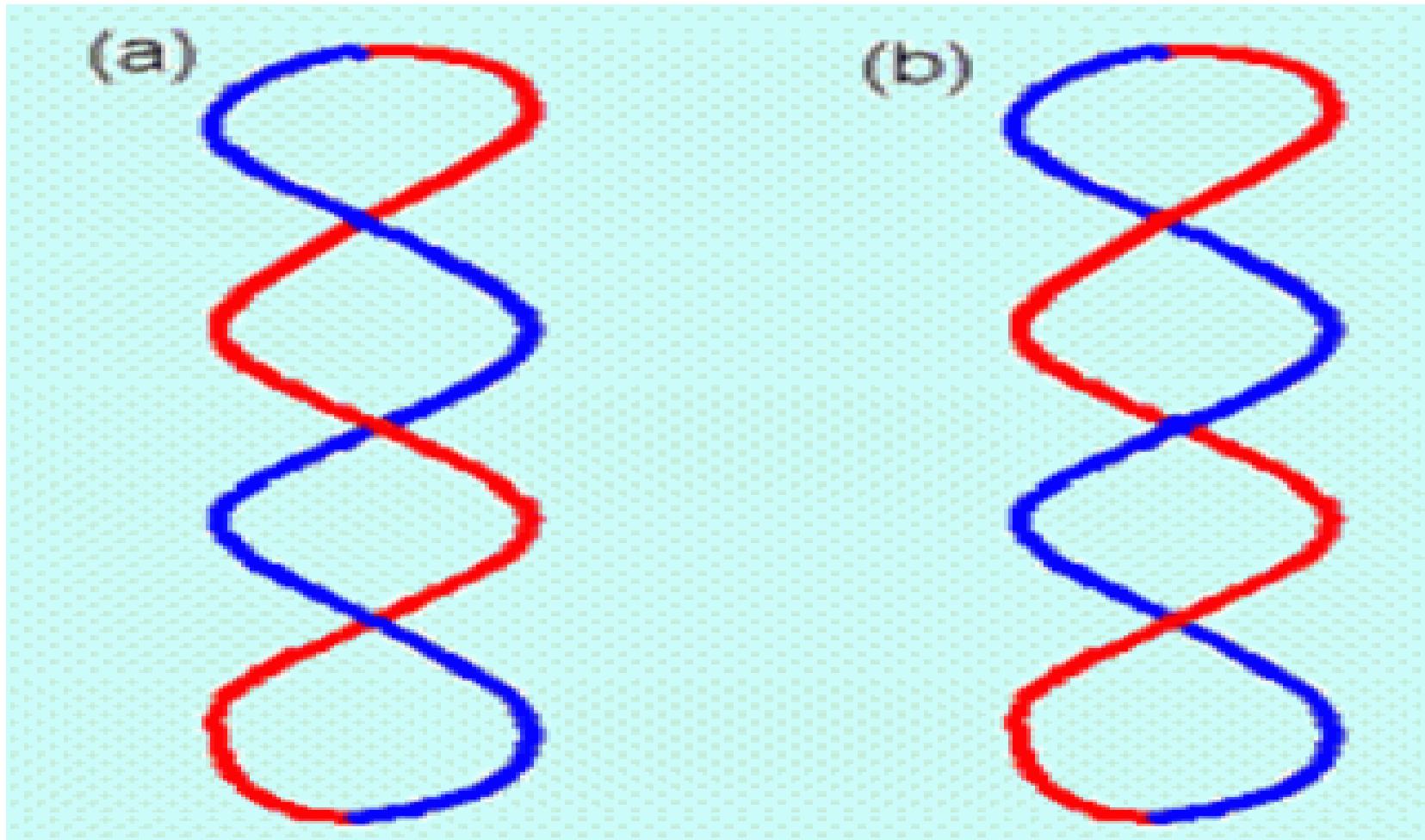
supercoiled

DNA Topology*

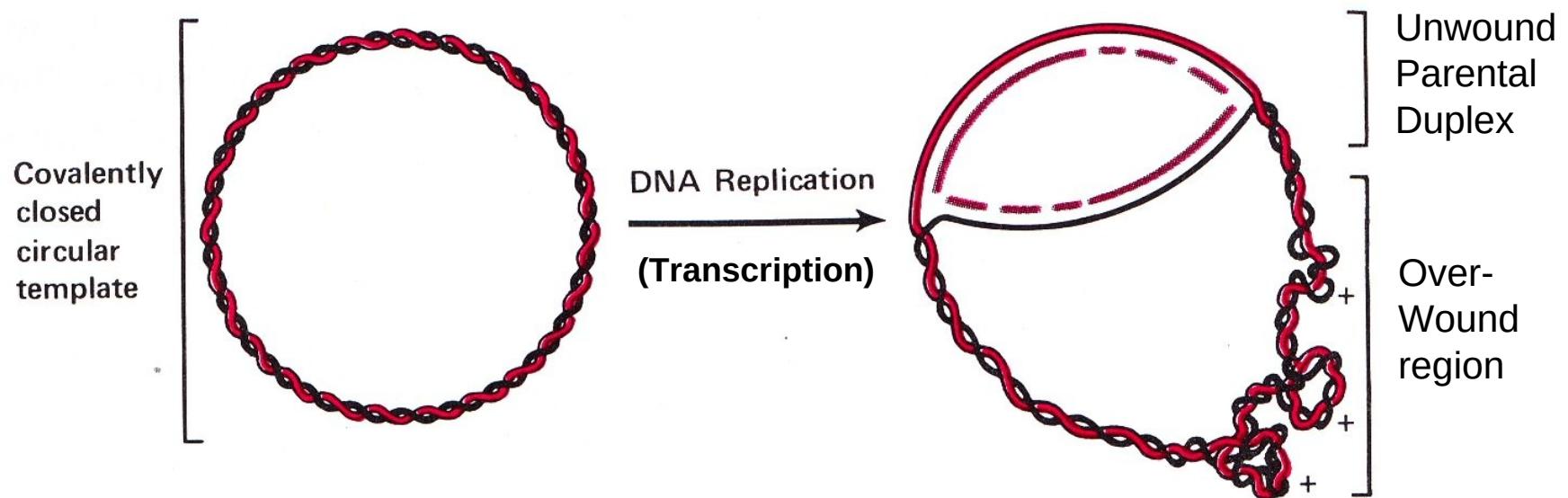
*Johannes' Favorite Subject
(Students' least favorite subject)

1. 原核生物 DNA 的三级结构 - 超螺旋

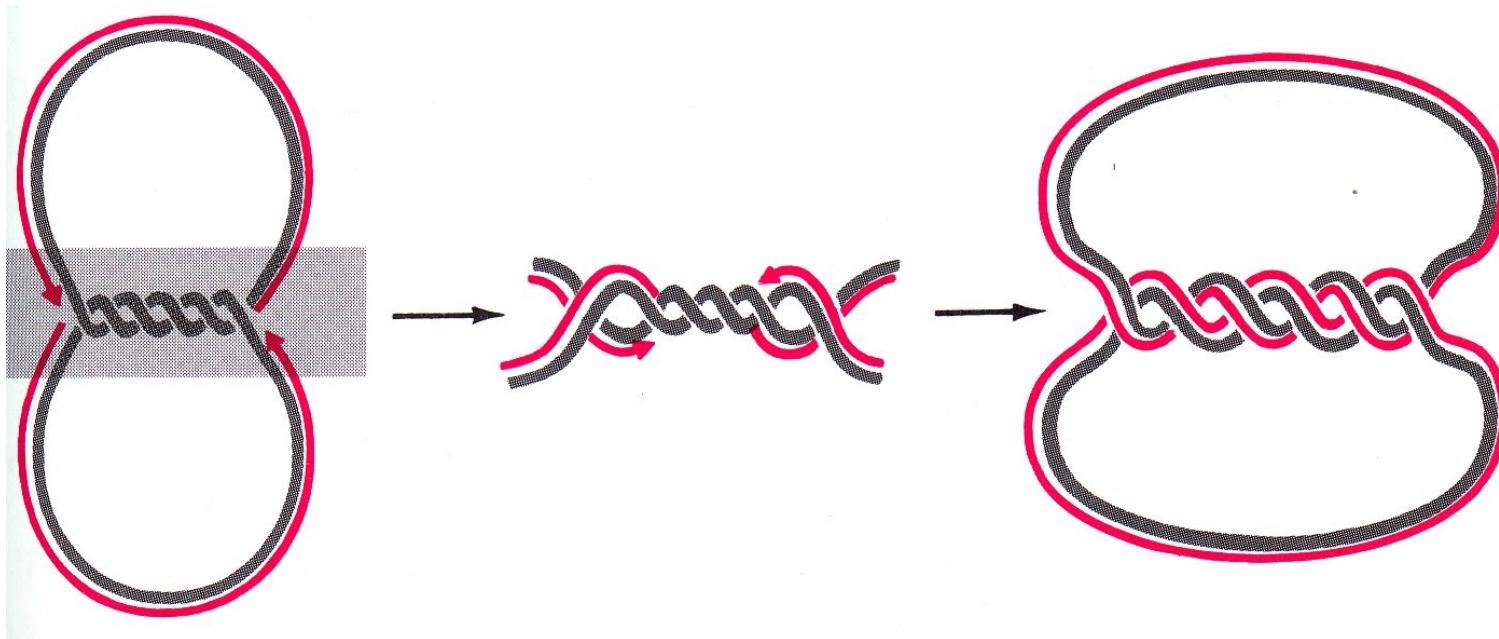
绝大多数原核生物的 DNA 都是共价封闭的环状双螺旋。如果再进一步盘绕则形成麻花状的超螺旋三级结构。



DNA Unwinding Causes Topological Problems



More Topological Problems



DNA 的超螺旋结构

- (1) DNA 超螺旋结构的发现;
- (2) DNA 超螺旋结构的形成;
- (3) DNA 超螺旋的生物学意义;
- (4) 拓扑异构酶的分类与作用

DNA 超螺旋结构的发现

超螺旋 DNA 最早是在 SV40 和多瘤病毒中发现的。人们使用电子显微镜可直接观察到超螺旋 DNA 的形象。

当 SV40 DNA 从被感染细胞分离出来时，它与组蛋白结合形成为核小体，每一分子约形成 24 个核小体。若使 DNA 与组蛋白分离，DNA 就成为超螺旋（图 1）。起初，人们认为超螺旋是一些小环形 DNA 的特点。后来发现它是几乎一切 DNA，无论是环状或线型 DNA 的共有的重要特征。

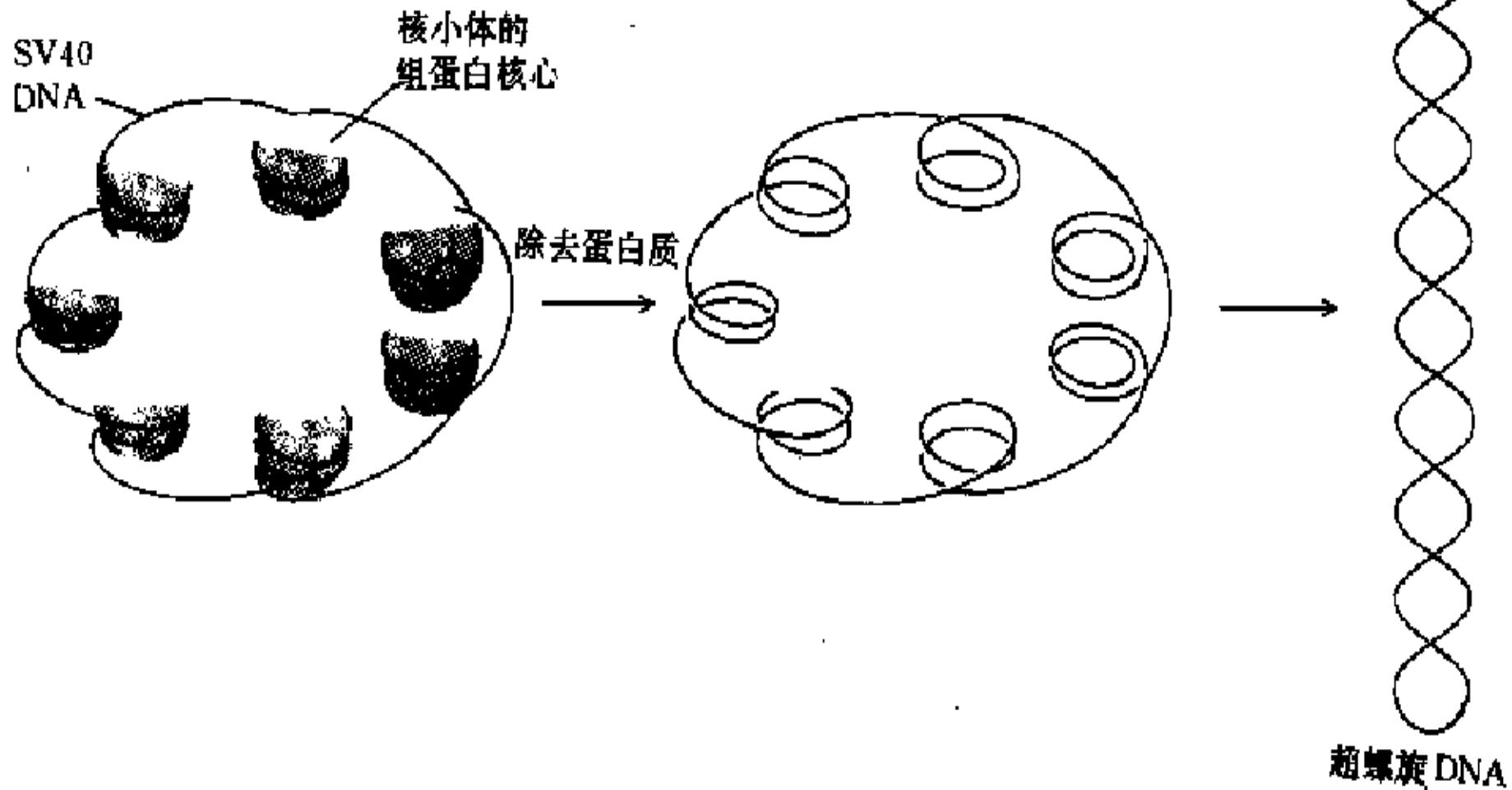
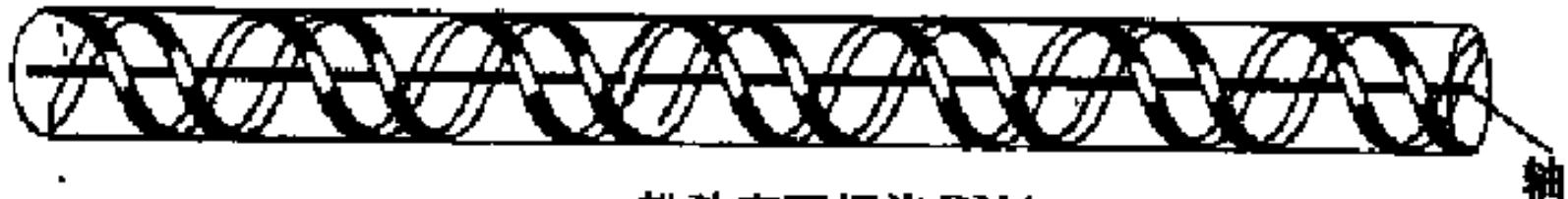
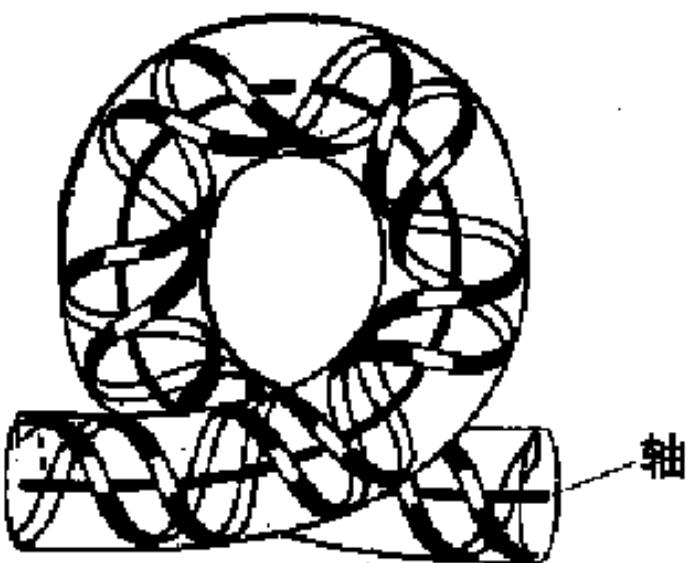


图 1

SV40 DNA 形态转变



松弛态双螺旋 DNA



双螺旋和超螺旋 DNA

DNA 超螺旋结构的形成

B-DNA 的多核苷酸链的空间结构是以一组构象参数为表征的，它规定 B-DNA 的每匝螺旋含 10bp（晶体中），这是一种松弛状态。它的轴成一直线。对松弛状态的环型 DNA 而言，轴处在同一平面中，故可以平放在平面上，但若 B-DNA 每匝的螺旋数通过一定的途径改变，它就可以形成超螺旋。

举例说明

一环型双股 DNA 共含 420bp，它应形成 42 匝螺旋。若切割其骨架中的任一磷酸二酯键，它就转变为含同数碱基对的线型 B-DNA。若使所形成的线型 DNA 的一端固定，另一端向左放松 6 圈，然后再使两端重新闭合。由于 B-DNA 是一种在热力学上稳定的结构，螺旋数的减少就使其转变为一种受力状态。分子所经受的张力可以按两种方式分布：一种方式是分子保留一单链区，其余部分仍保持 B-DNA 状态；另一种方式是形成超螺旋，超螺旋的形成使已放松的双螺旋分子的碱基对接近于 B-DNA 中的状态（图 2）。

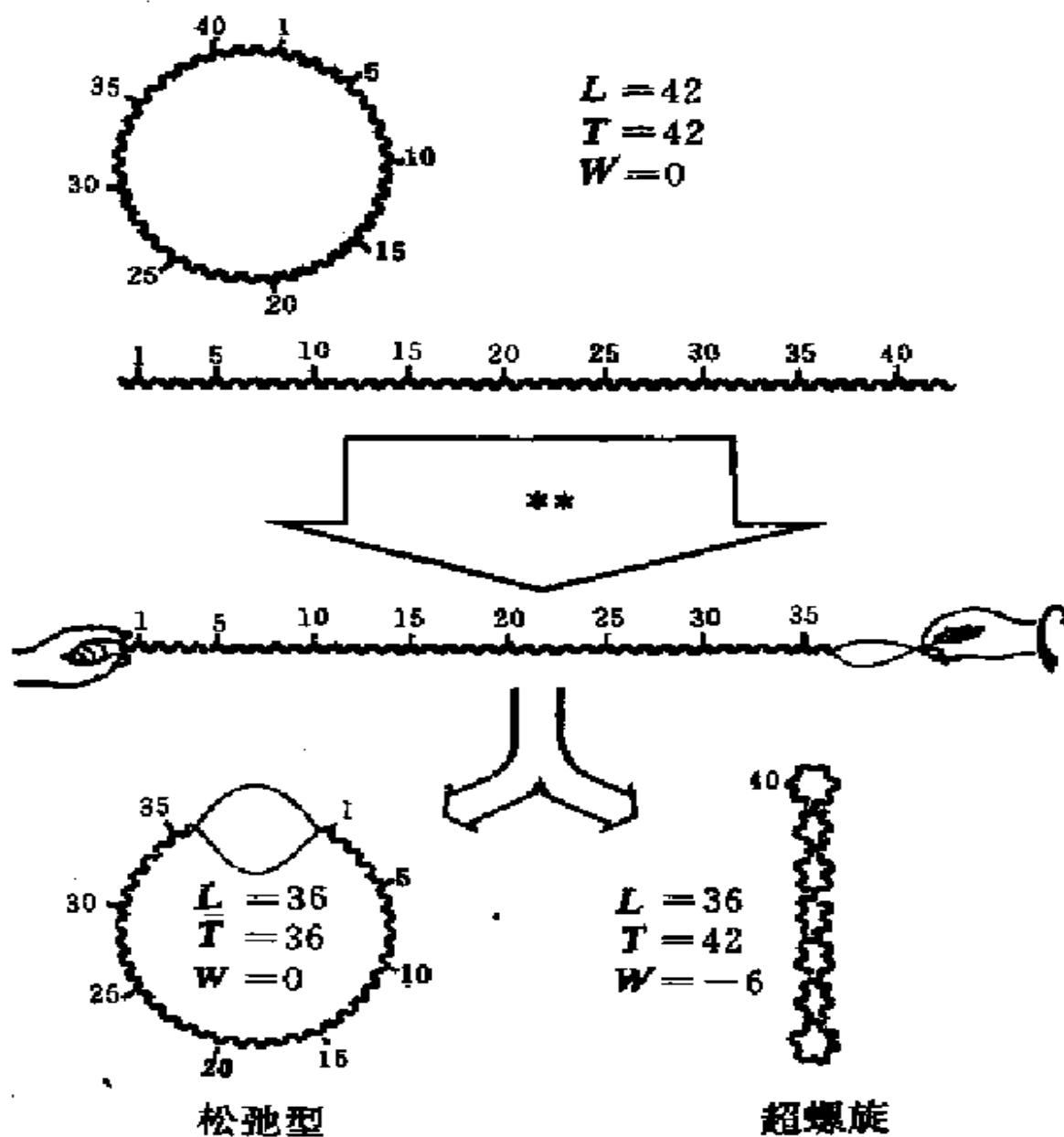
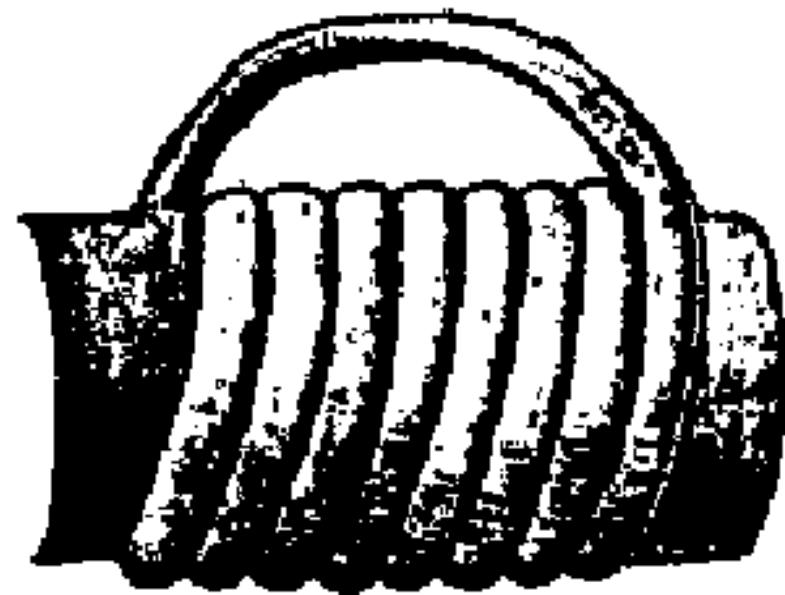


图 2 DNA 超螺旋的形成

* * 右手双螺旋放松 6 圈 $\Delta L = -6$ 。

超螺旋 DNA 可采取两种拓扑学上相当的形式。一种相当于双螺旋绕圆柱体旋转；另一种相当于双螺旋相互盘绕。超螺旋的这两种形式可以相互转变（图 3）。

(a) 螺旋管



(b) 相互盘绕



图 3 超螺旋 DNA 的两种拓扑形式

DNA 结构的上述变化可以用数学式来表述：

$$L = T + W$$

L 称为 DNA 的连接数，它是 DNA 的一股链绕另一股链盘绕的次数，它代表环型双螺旋 DNA 分子的拓扑特性。在不发生链的断裂时，它是一常数。例如，图 2 中 DNA 原来的 **L** 为 42，放松后为 36。在右手双螺旋中，**L** 规定为正。

T 称为盘绕数，它代表 DNA 的一股链绕双螺旋轴所做的完整的旋转数。对 B-DNA 而言，它等于 DNA 的碱基数除以 10（晶体中）。**W** 为超盘绕数，代表双螺旋轴在空间的转动数，**T** 和 **W** 是可变的。

现在，我们再回到图2，其中原来的环型DNA的 $L=42$ ， $T=42$ ，故 $W=0$ ，即不存在超螺旋。它螺旋轴处在同一平面中，分子处于松弛状态。在保留一单链区的DNA分子中， L 和 T 都为36，分子仍未形成超螺旋。在超螺旋DNA中， L 仍为36，若使 T 保持未松开前的42， W 就成-6，即成为超盘绕6次的负超螺旋。

超螺旋是 DNA 三级结构的一种普遍形式。双螺旋 DNA 的松开导致形成负超螺旋，而 DNA 的拧紧则导致形成正超螺旋。

天然的 DNA 都呈负超螺旋，但在体外可得正超螺旋。溴乙锭、放线菌素 D 等的分子都是扁平的，它们可以嵌入 DNA 的碱基对之间。溴乙锭分子的嵌入能使相邻碱基对的间隔增至 0.7 nm。对一个呈负超螺旋的环形 DNA 分子来说，溴乙锭的嵌入并没有改变连接数，但盘绕数减少，结果超螺旋数向相反方向改变。随着溴乙锭量的增加，负超螺旋 DNA 就转变为松弛态；溴乙锭的再进一步增加，DNA 就转变为正超螺旋（图 4）。

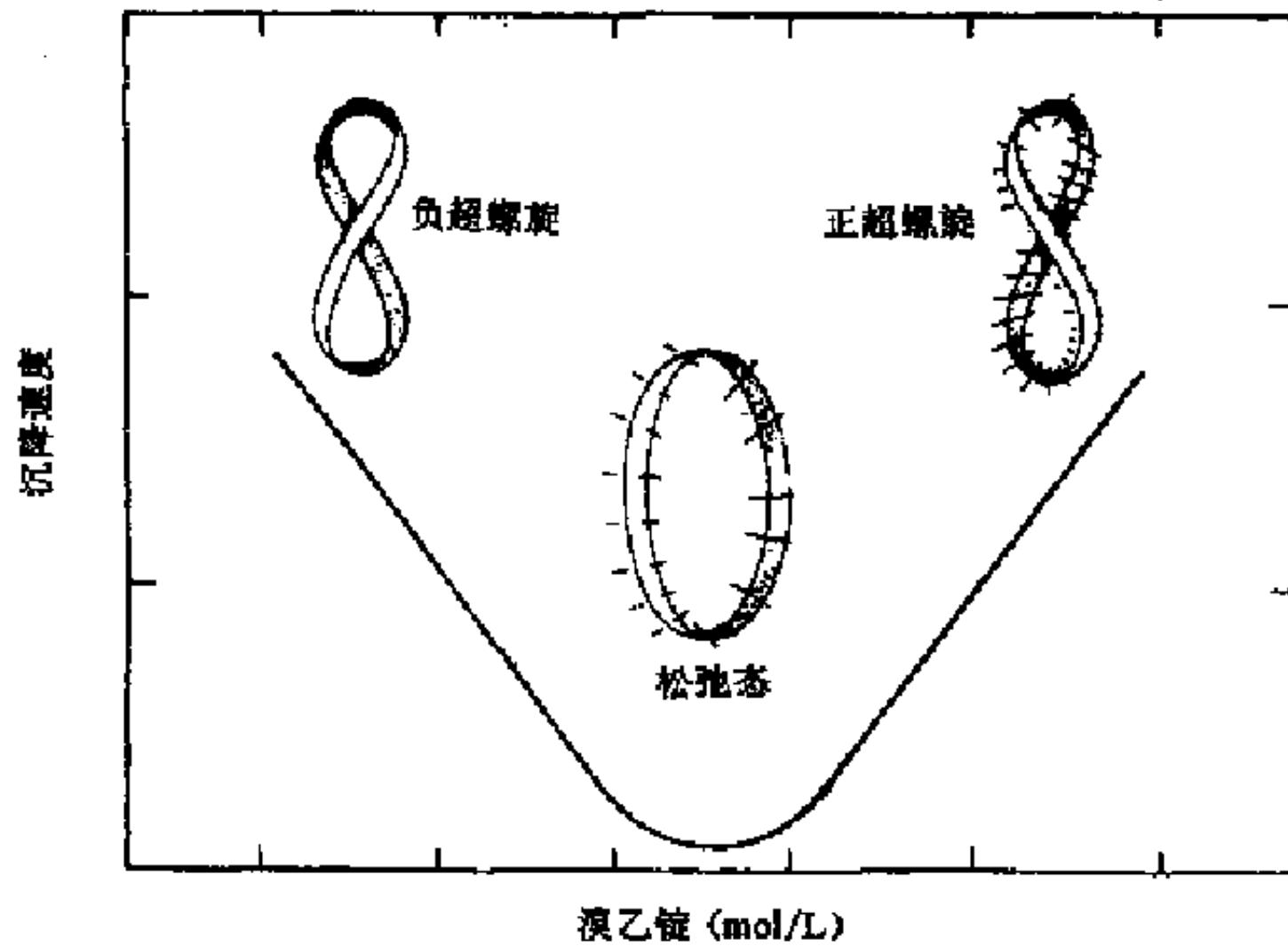


图 4 通过溴乙锭的嵌入, 环形 DNA 超螺旋状态的改变

环形 DNA 分子会由超螺旋化而变得更为致密，它们在超离心中的沉降速度和在凝胶电泳中的迁移速度都增加，故超螺旋 DNA 可通过这两种方法来检测和分离。现在，**琼脂糖凝胶电泳已成为检测 DNA 超螺旋程度的一种最直接的方法（图 5）**。它能够分离仅差一圈的超螺旋 DNA。

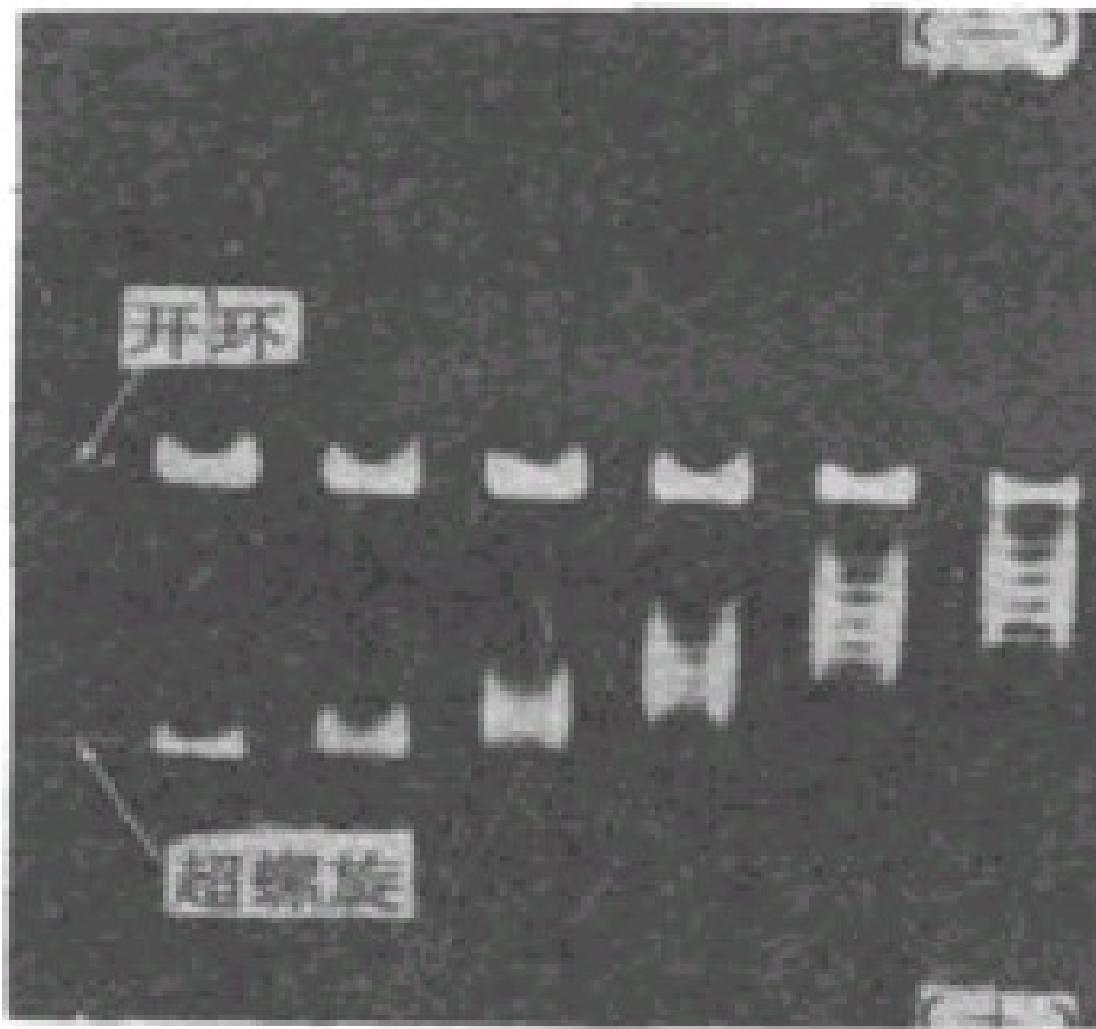


图 5 松弛的和超螺旋 DNA 的凝胶电泳

对一特定的 DNA 而言, L 是一定值, 但细胞内存在着一些可使 DNA 分子断裂和重新连接的酶, 故 L 会在一定范围内变化, DNA 的超螺旋结构常处于动态变化中 (图 6), 在这一过程中,

我们实际上关心的是连接数的改变及其对 T 和 W 的影响, 即

$$\Delta L = \Delta T + \Delta W$$

不过, 超螺旋对 DNA 的影响随其分子的长度而异。为了表达一定的超螺旋(W)对不同 DNA 分子的影响, 人们就引入超螺旋密度(superhelix density) σ 概念,

$$\sigma = \frac{\Delta L}{L}$$

$$\Delta L = L - L_0 \quad L_0 \text{ 为松弛态 DNA 的连接数}$$

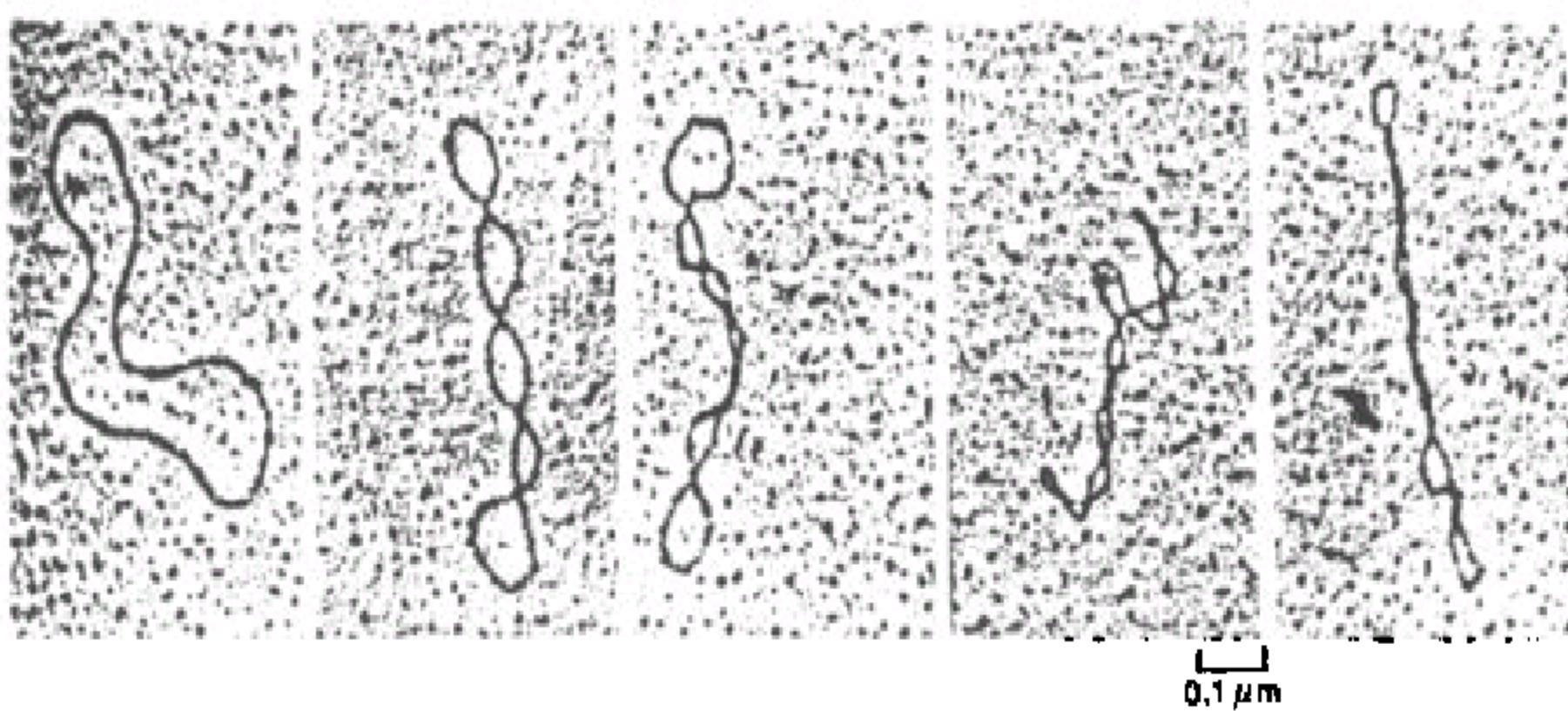


图 6 DNA 的电镜图(大肠杆菌的质粒二聚体)

当两个不同长度的 DNA 做比较时，
L 代表螺旋和超螺旋的总数，它与分
子的长度和其拓扑状态两者都有关系，
故情况比较复杂。如采用 σ ，由于它仅
与分子的拓扑张力有关，故而可直接
加以比较。现在，已测得从细胞和病
毒粒子分离到的 DNA 的超螺旋密度介
乎于 0.05 ~ 0.07 间，一般为 0.05。

超螺旋的生物学意义

在活体中，DNA 的结构不是一成不变的。DNA 的各种构象是互变的，是动态的。DNA 的这种结构变化对它的功能具有重要意义。而 DNA 超螺旋程度的改变介导了这种结构变化。B-DNA 是一种能热力学上稳定的结构，超螺旋的引入就提高了它的能量水平。负超螺旋的存在会影响 DNA 结构变化的平衡，具超螺旋的 DNA 能实现松弛态 DNA 所不能实现的结构转化。

已如前述，大多数 DNA 的超螺旋密度约为 -0.05，这相当于每 200bp 存在 1 负超螺旋。DNA 的超螺旋水平在活体中是重要的，但它并不是在整个 DNA 分子中都是均匀的。DNA 特定区域中超螺旋的增加有助于 DNA 的结构转化。DNA 结构变化之一就是使 DNA 双股链分开，或局部熔解。超螺旋所具有的多余的能量被用于碱基间氢键的断裂。DNA 中，10bp 的分离大约需 50241.6-209340J/mol，因此，DNA 所具有超螺旋水平仅是分离很少几个碱基对，但 DNA 的这种结构上的变化对复制、转录等的启动仍很重要。

DNA 结构变化中的一个极端例子是 B-DNA 向 Z-DNA 的转变，负超螺旋有利于形成 Z-DNA。B-DNA 转化成 Z-DNA 仅发生于特定的序列处，在连接处这种转化涉及到右手性双螺旋转变为左手性双螺旋，即 T 值改变 2。

超螺旋不仅使 DNA 形成高度致密的状态从而得以容纳于有限的空间中，在功能上也是重要的。它推动着结构的转化以满足功能上的需要。

拓扑异构酶的含义与作用

细胞内存在着一类能催化 DNA 拓扑异构体相互转化的酶，它们称为**拓扑异构酶**。它们能与 DNA 形成共价结合的**蛋白质 -DNA 中间体**，从而在其骨架的磷酸二酯键处造成暂时性的裂口，使 DNA 的多核苷酸链得以穿越，结果**改变了分子的拓扑状态**。在这一过程中，DNA 的连接数虽然改变了，但其核苷酸序列并无任何变化。拓扑异构酶还能使 DNA 发生连环化或脱连环化，打结或解结。

拓扑异构酶的分类

拓扑异构酶可以分为 I 型和 II 型两类
(表 1) I 型和 II 型拓扑异构酶的作用不同。I 型酶在 DNA 的一股链产生一切口，从而使另一股链得以穿越，而 II 型酶则在两股链上都产生一切口；其结果是：I 型酶使 DNA 的连接数每作用一次改变，而 II 型酶则使连接数每次改变 2。

Properties of Topoisomerases

Table 12-1
Properties of type I and type II topoisomerases

Property	Type I		Type II	
	<i>E. coli</i> ^a	Eukaryotic ^b	Gyrase	Eukaryotic
DNA strands cleaved	one	one	two	two
Subunit mass (kDa)	~100	~95	97, 90	~150
Subunits	monomer	monomer	A ₂ B ₂	homodimer
ATP requirement	no	no	yes	yes
Mg ²⁺ requirement	yes	no	yes	yes
DNA-dependent ATPase	no	no	yes	yes
Makes (−) supercoils	no	no	yes	no
Relaxes (−) supercoils	yes	yes	no ^c	yes
Relaxes (+) supercoils	no	yes	yes ^d	yes
Catenation, knotting	yes ^e	yes ^e	yes	yes

^a *E. coli* topo I and topo III.

^b Yeast TOP3 most likely encodes a type I enzyme with characteristics similar to those of the *E. coli* rather than the eukaryotic enzymes.

^c Yes in the absence of ATP.

^d By introduction of negative supercoils.

^e Requires a nick or gap in one strand of duplex.

表 1 拓扑异构酶的类别和特性

性 质	I型		II型	
	原核生物 ¹	真核生物 ²	原核生物	真核生物
被切割的 DNA 链	1	1	2	2
亚基分子量(kD)	100	95	97,90	150
亚基数	单体	单体	A ₂ B ₂	均二聚体
对 ATP 的需求	否	否	是	是
对 Mg ²⁺ 的需求	是	否	是	是
依赖于 DNA 的 ATP 酶	否	否	是	是
产生负超螺旋	否	否	是	否
松弛负超螺旋	是	是	否 ³	是
松弛正超螺旋	否	是	是 ⁴	是
连环,打结	是 ⁵	是 ⁵	是	是

1. 大肠杆菌 topo I 和 topo I_I; 2. 酵母 topo 3 很可能编码特性更近似大肠杆菌的 I 型酶; 3. 无 ATP 时能松弛负超螺旋;

4. 借助于引入负超螺旋; 5. 要求双股链之一具有一切口。

在细胞中，这两类酶的活力是严格调节的，拓扑异构酶 I 使 DNA 超螺旋化的作用为拓扑异构酶 II 使 DNA 松弛化的作用所抗衡，从而使 DNA 的超螺旋程度保持在适当的水平上。由于 DNA 的超螺旋程度深刻地影响着机体的活动，故能改变拓扑异构酶活力的突变常是致命的。

大肠杆菌拓扑异构酶 I

大小：分子量约 100 kD 的单一多肽链；

松弛活力的特点：（1）消除 DNA 的负超螺旋而不引起 DNA 发生其它改变；（2）DNA 的松弛是逐步进行的，磷酸二酯键的自由能通过形成共价的蛋白 -DNA 中间体而保存并用于链的重新连接，它不需要 ATP 或 NAD 这样的辅助因子。

松弛作用机制见图 7。

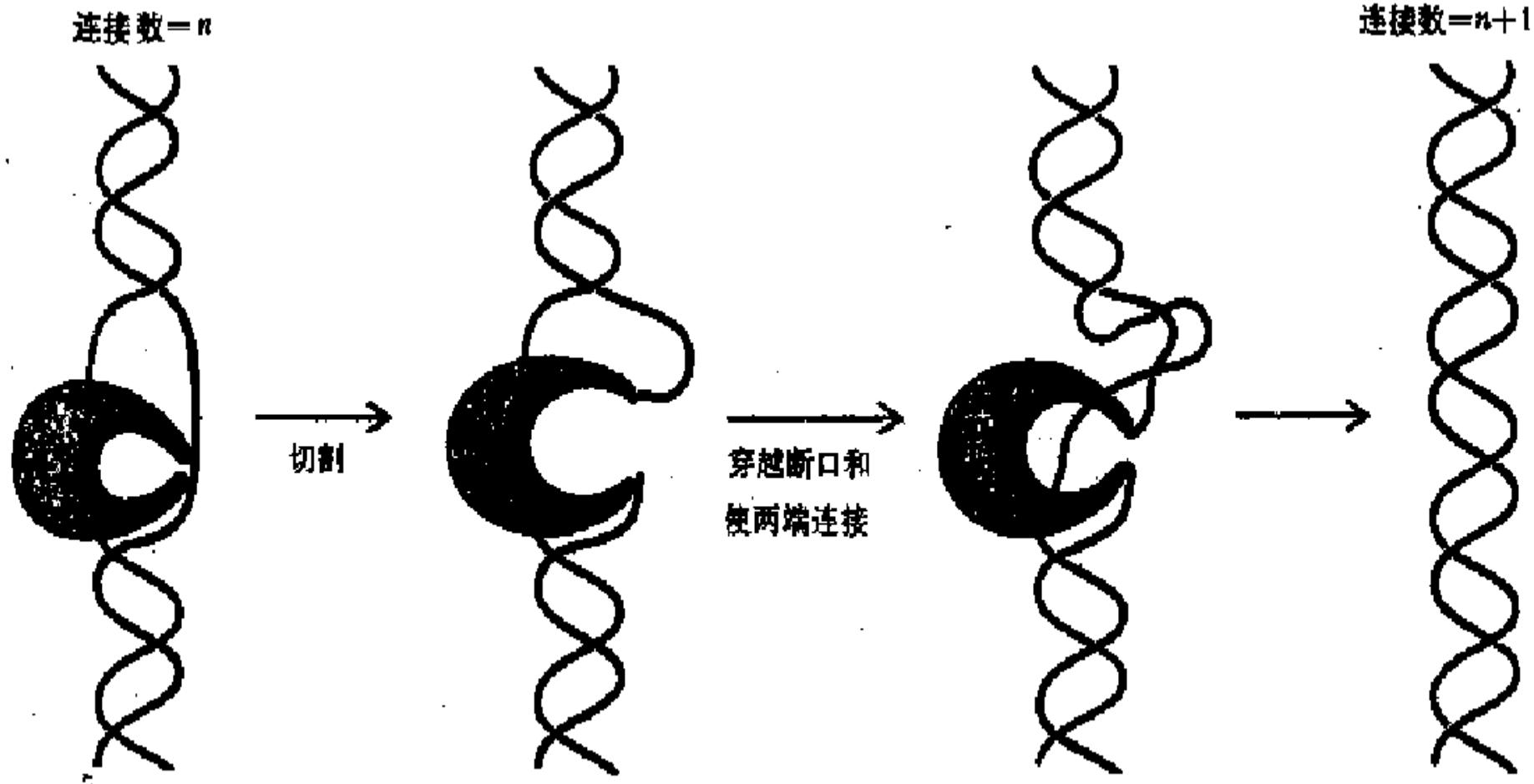
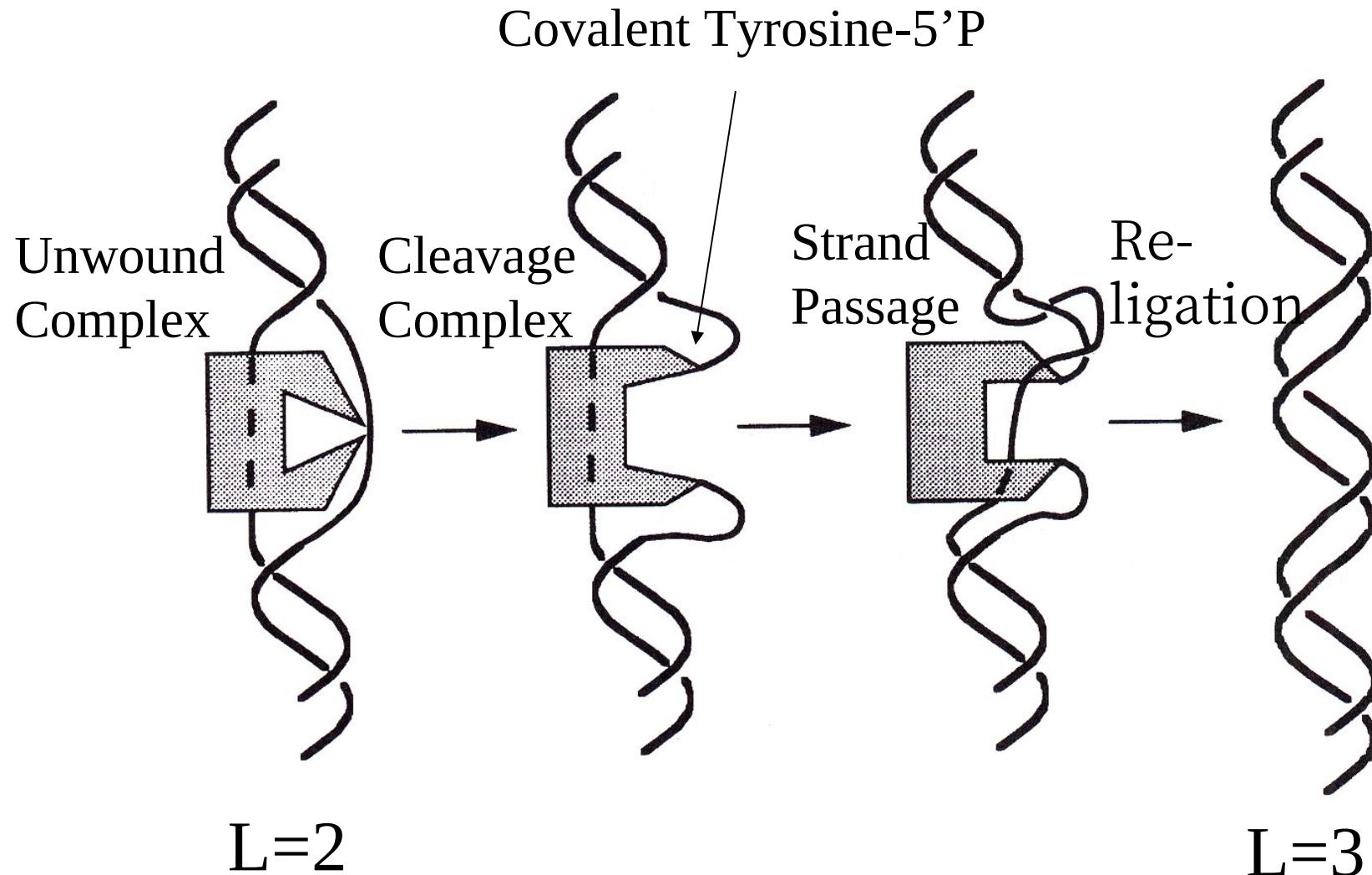


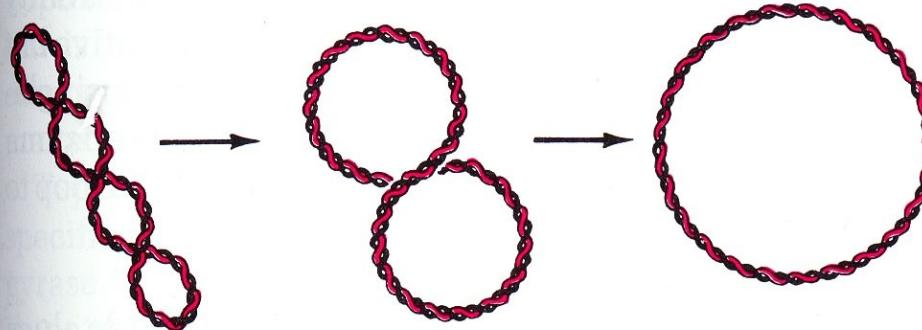
图 7

I型拓扑异构酶作用机理示意图

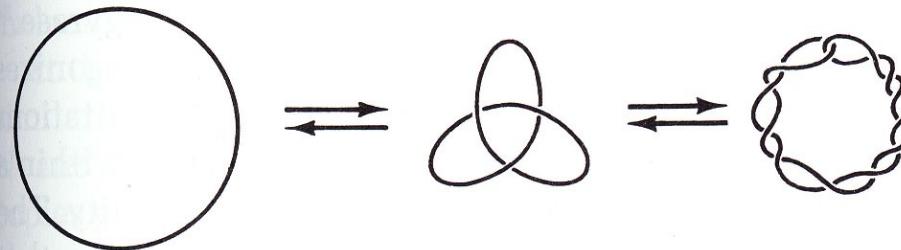
Strand Passage Model for Topo I



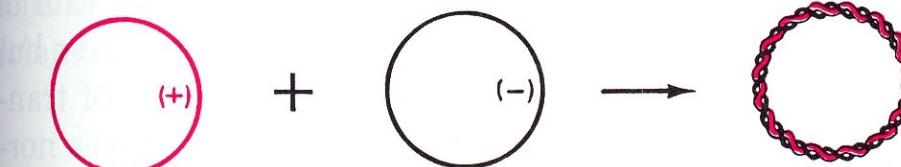
RELAXATION OF SUPERCOIL



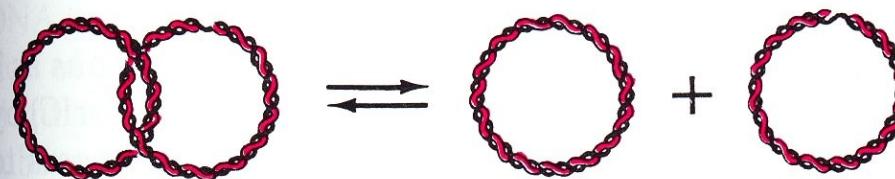
TOPOLOGICAL KNOTS



CIRCULAR DUPLEX



NICKED CATENANES



Topo I Reactions

松弛作用机制

(1) 拓扑异构酶 I 首先结合于 DNA，使该处的 DNA 熔解，随后与单链区形成酶—DNA 复合物；(2) 切割 DNA 双股中的一股，切割点的 5'-P 形成磷酰酷氨酸键；(3) DNA 的一股链穿越切割点；(4) 断裂的链重新连接，酶被释放。

大肠杆菌旋转酶

旋转酶有时也称大肠杆菌拓扑异构酶 II，它使松弛的双股环型 DNA 转化为负超螺旋 DNA。

旋转酶与拓扑异构酶 I 不同，拓扑异构酶 I 使 DNA 的连接数每次改变 1；而旋转酶则每次改变 2（图 8）。

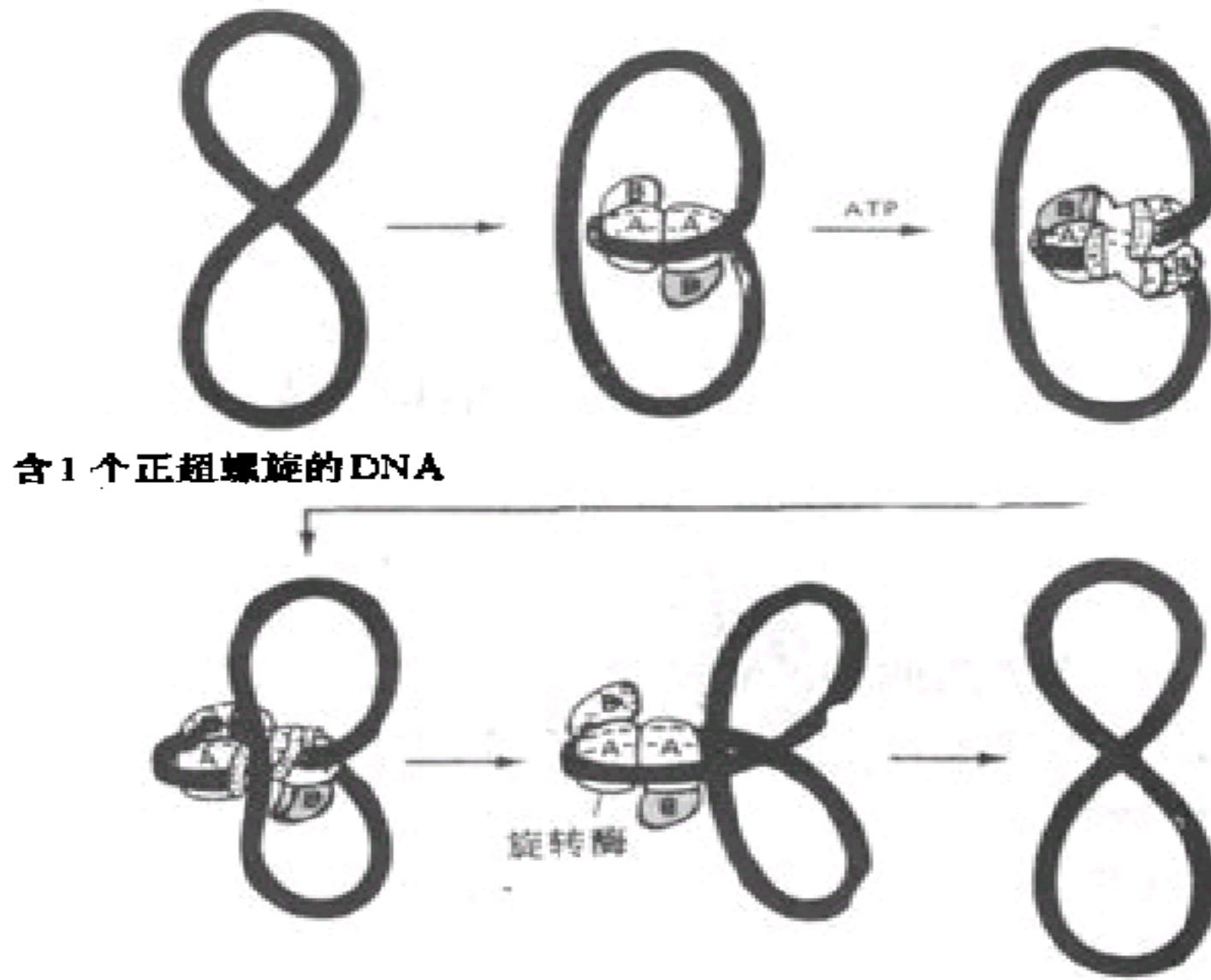
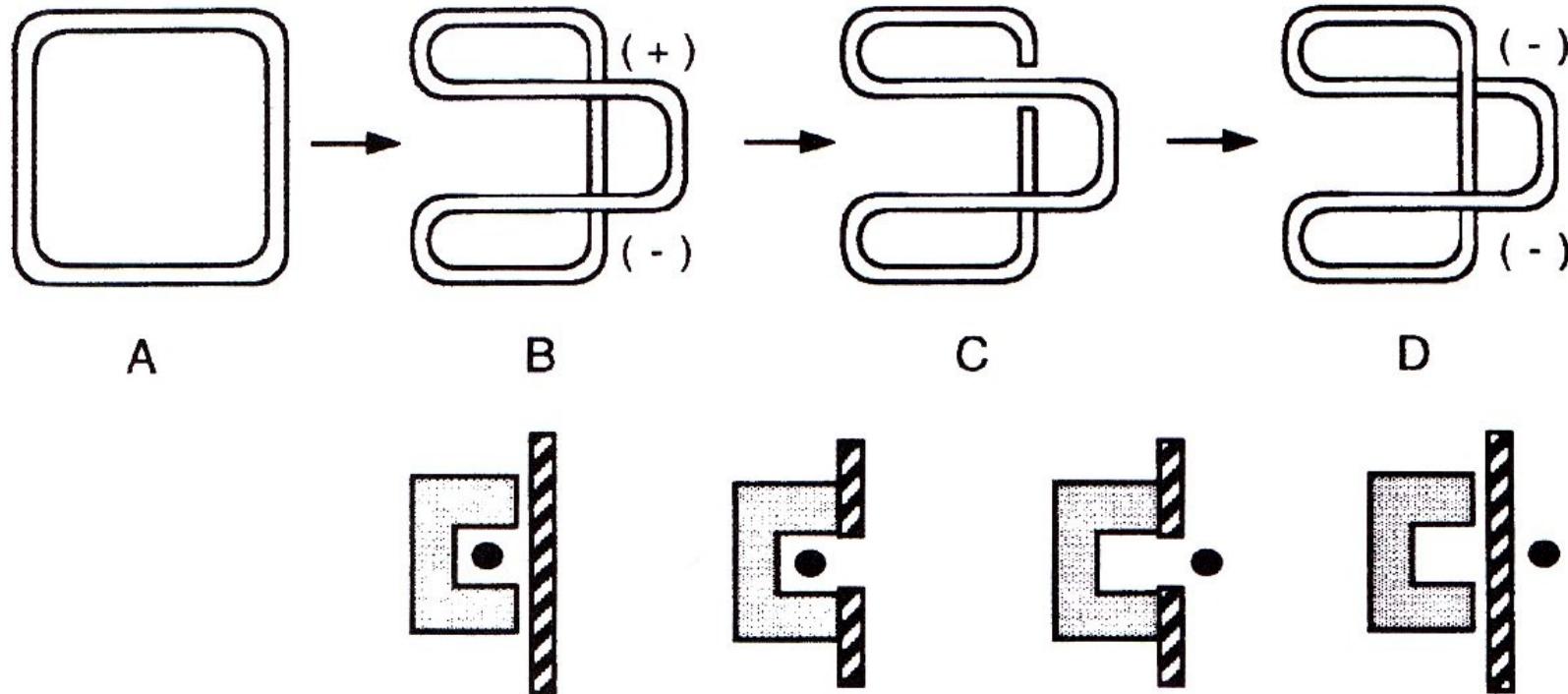
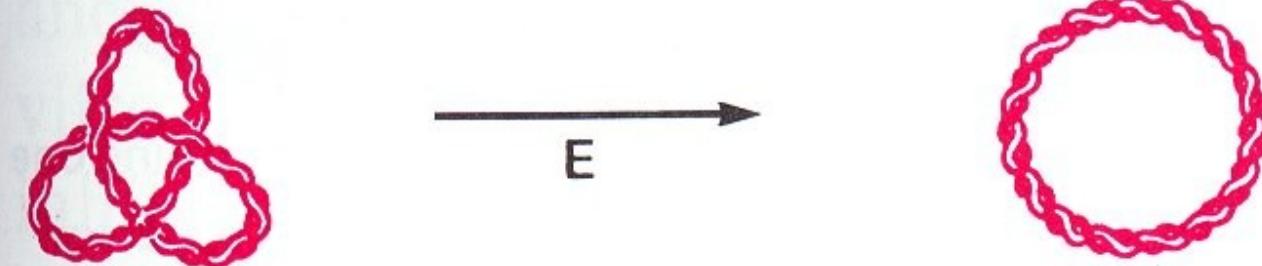
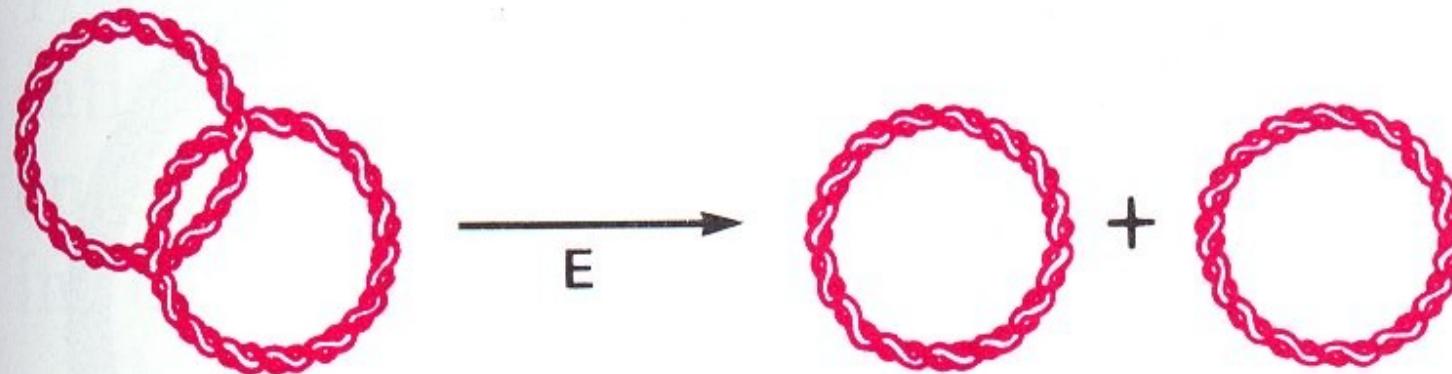
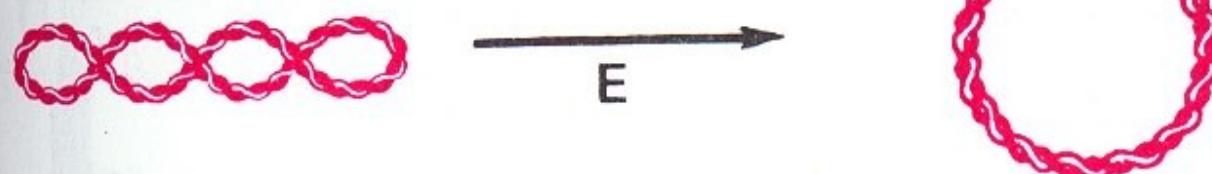
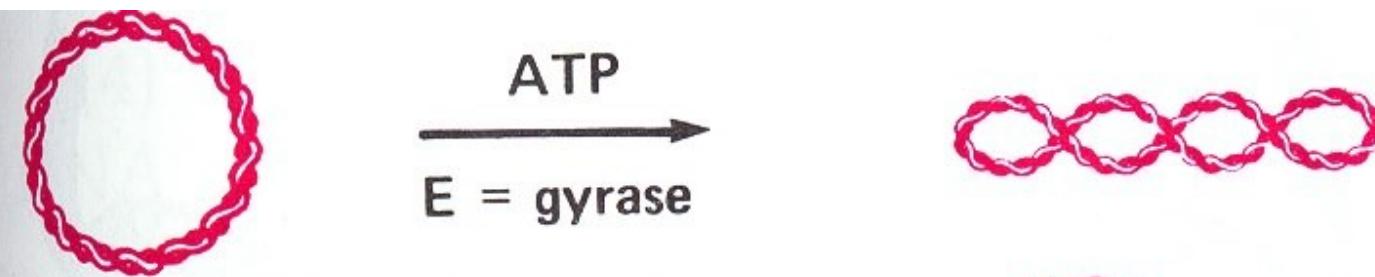


图 8 由旋转酶催化的 DNA 超螺旋化示意图

为了清晰起见,起始 DNA 用 1 个正超螺旋代表。

Model for Topo II Mechanism





Topo II Reactions

旋转酶使 DNA 超螺旋化的步骤为：

(1) 旋转酶结合于 DNA，并使长约 105 ~ 140bp 的片段按正方向包裹自身；(2) 在包裹片段的中心附近切割，每一断口的 5' 端与亚基 A 的 Tyr 122 共价结合；(3) 接近或位于包裹片段内的 DNA 区域，通过亚基 B 与 ATP 的结合而穿越断口；(4) 被切开的 DNA 链利用蛋白 -DNA 复合物所贮存的能量重新闭合；(5) DNA 的超螺旋化依赖于 ATP 的水解。旋转酶的亚基 B 具 ATP 酶活力。在无 ATP 存在时，旋转酶能使负超螺旋 DNA 松弛。

真核生物拓扑异构酶

真核生物拓扑异构酶 I 是质量约为 95 kD 的单体蛋白。虽然它所催化的反应一般与原核生物的酶相似，但它同样能使正、负超螺旋 DNA 松弛。松弛作用不依赖于 ATP，能发生于有 EDTA 存在的条件下， Mg^{2+} 能提高酶的活力。酶通过其特定 Tyr 与断口的 3'P 连接而形成中间体，这与原核生物酶形成于 5'P 端不同。

真核生物拓扑异构酶 II 型为 150 ~ 180kD 的均二聚体，能以同样的速率松弛正和负超螺旋 DNA；但与原核生物酶不同，不能产生负超螺旋。作用时，它需要 ATP 和 Mg^{2+} 。

原核和真核生物拓扑异构酶都参与 DNA 复制、转录和重组。

DNA 不寻常结构的类型

DNA 的不寻常结构是以一定的 DNA 序列为
基础的。例如，交替的嘧啶、嘌呤重复序列倾向
形成 Z-DNA，反向重复序列倾向形成十字形结
构，构成镜像重复的同型嘧啶 - 同型嘌呤序列可
能形成三链结构，而富含 G 的序列可能形成四链
结构等。这些结构的存在对 DNA 发挥其功能有
着重要意义。也有些不寻常结构是在生命过程中
形成于分子间的。

例如，当二条具互补序列的 RNA 与双链 DNA 的一股链配对时，另一股链就被游离成单链环，从而形成 **R 环**。转录过程中会出现 R 环。**D- 环**是由双链 DNA 与另一 DNA 链形成的。D- 环形成于哺乳类线粒体 DNA 的复制中，也是遗传重组中由大肠杆菌的 RecA 蛋白等所催化形成的。Holliday 结构是遗传重组中的重要中间体，它由 4 条 DNA 链组成（**图 9**）。两个 DNA 双螺旋的碱基可以通过连接部而匹配对并堆积。以上的分子间的不寻常结构是藉 DNA 间的同源序列形成的。

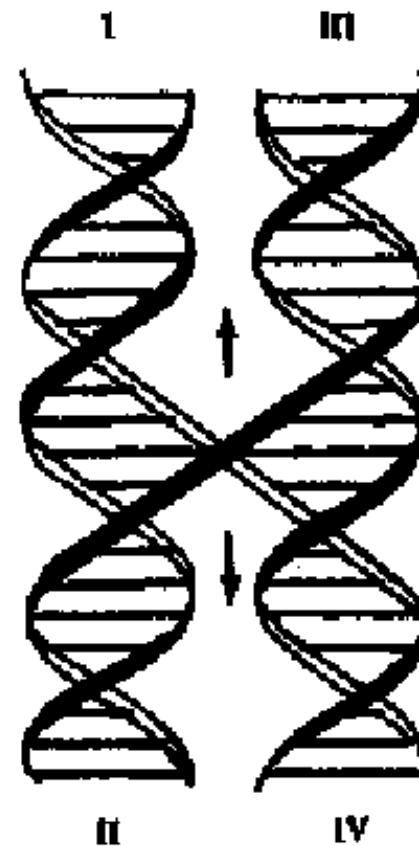
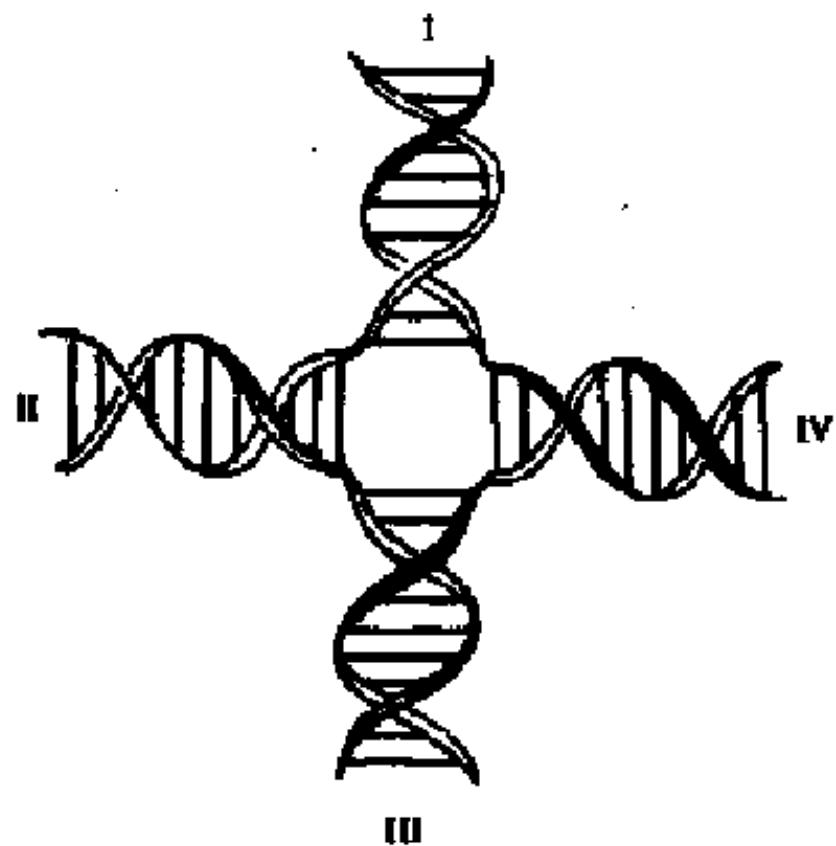


图 9 Holliday 结构

图的左方表示为平面构象,右方用两个平行螺旋表示,图中的箭头表示分支迁移。

DNA 的不寻常结构的能量水平常高于 B-DNA , 它的形成常藉 DNA 的负超螺旋来推动。如 DNA 的单链隙泡就是负超螺旋 DNA 张力的一种分布形式。

DNA 分子中最先发生变性的常是含较多 AT 的区域，若这些片段含反向重复序列，则这些区段的变性就可能形成十字形结构 (图 10) 。

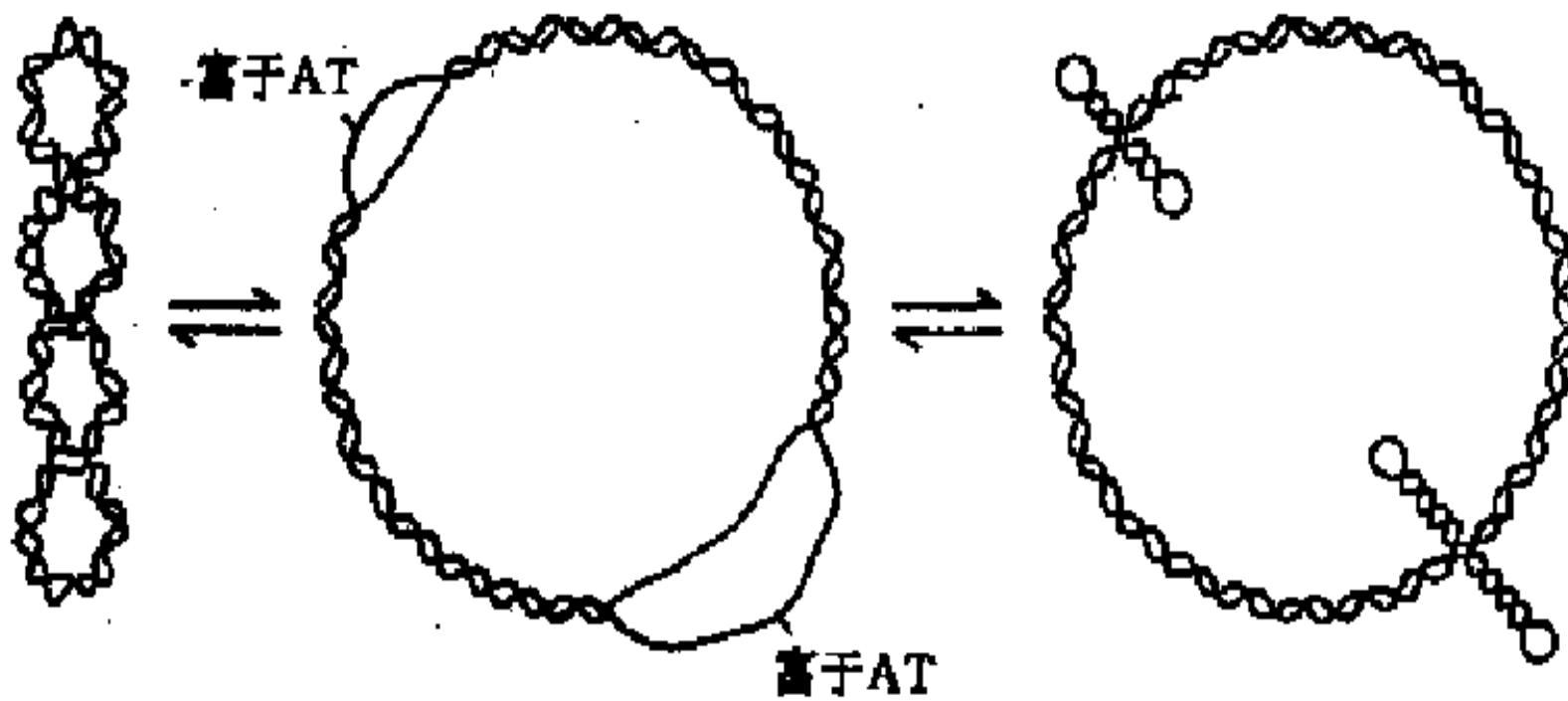


图 10 DNA 分子中十字形结构的形成

三链DNA 结构的形成

含 $(TC)_n$ 和 $(AG)_n$ 这样的同型嘧啶和同型嘌呤，并形成镜像重复的序列（图 11）。在低 pH 条件下能形成分子内的三链 DNA，它是由双链 DNA 拆开后产生的多聚嘧啶链回折并嵌入剩下的双链 DNA 的大沟中形成的（图 12）。

镜像重复



反向重复

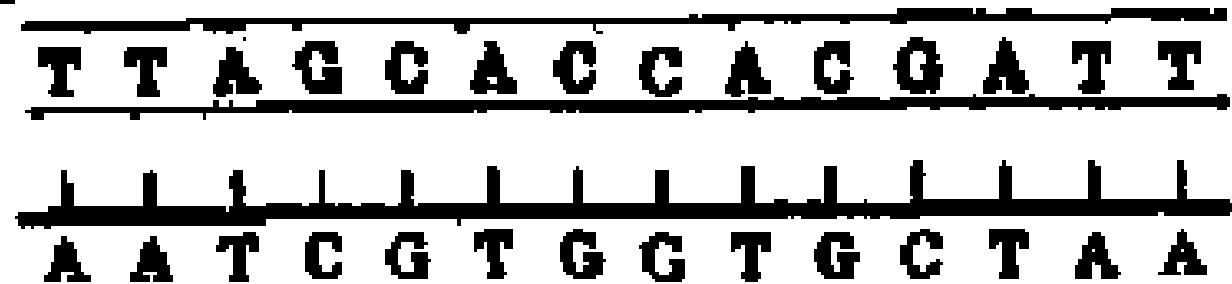


图 11

镜像重复和反向重复

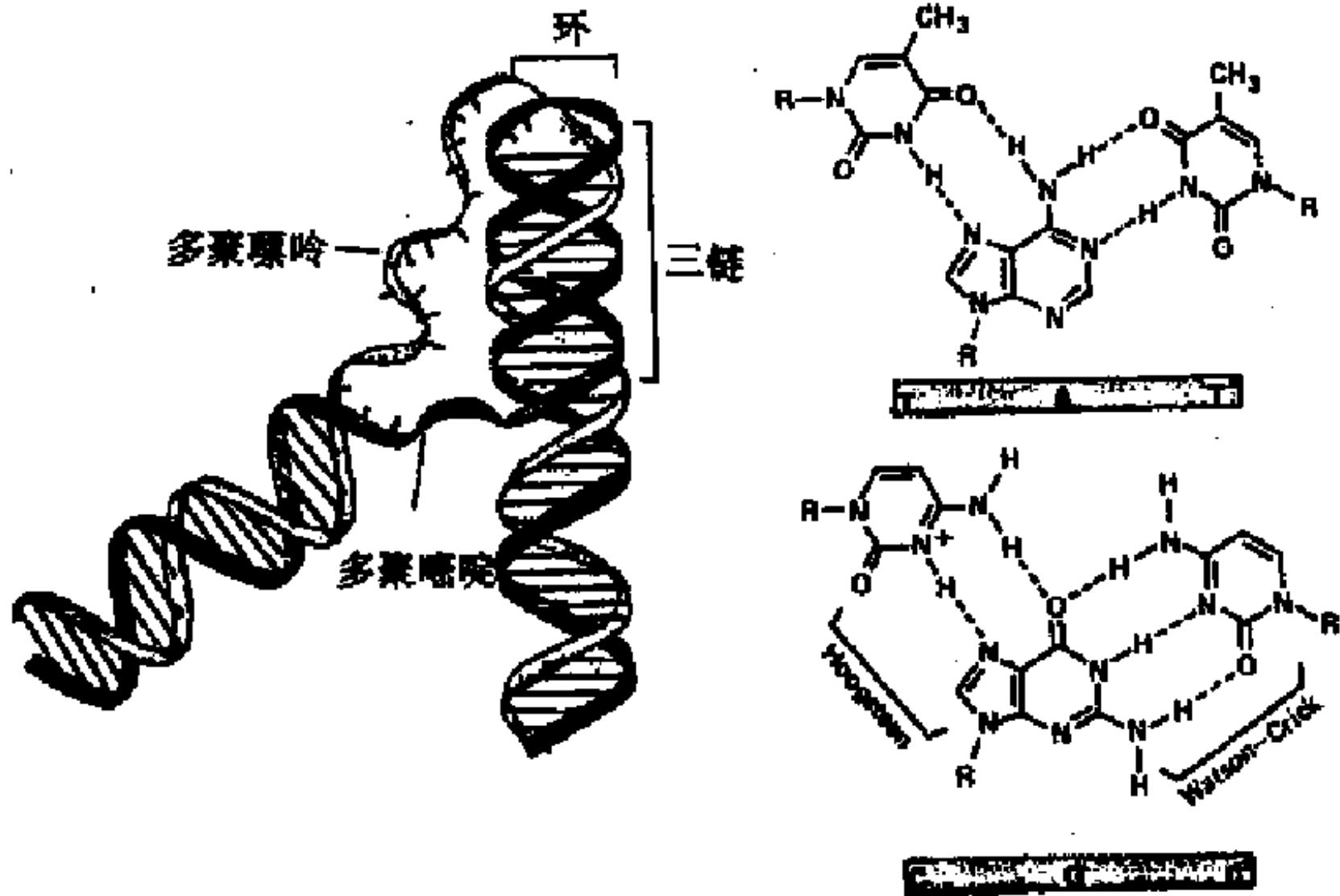


图 12 三链 DNA 的形成和 Hoogsteen 碱基配对

在三链 DNA 中，原来两股链的走向是反平行的，其碱基通过 Watson-Crick 方式配对，位于大沟中的多聚嘧啶链则与双链 DNA 中的多聚嘌呤链成平行走向，碱基则按 Hoogsteen 方式配对并形成 TAT，CGC 三联体。在后一配对方式中，多聚嘧啶链中的胞嘧啶残基必须先与 H^+ 结合（质子化）才能与鸟嘌呤配对。这也就是 H-DNA 命名的由来。

在形成三链 DNA 过程中游离出来的多聚嘌呤链则保持单链状态。故三链 DNA 对 S1 核酸酶的作用敏感。由于三链 DNA 含有镜像重复，故可形成两种异构体：一是多聚嘌呤链的 5' 部分成单链；另一是 3' 部分成单链（图 13）。

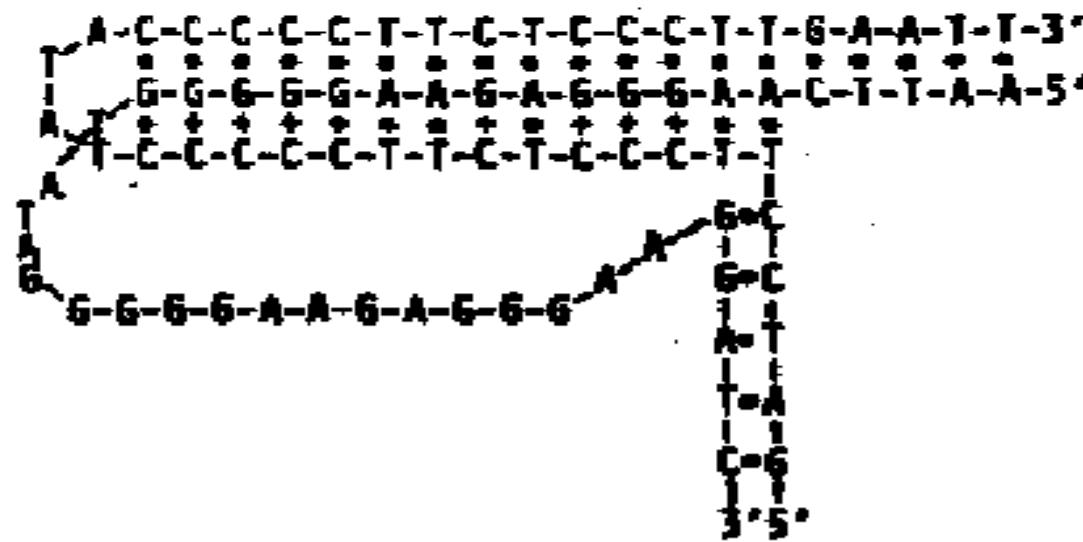
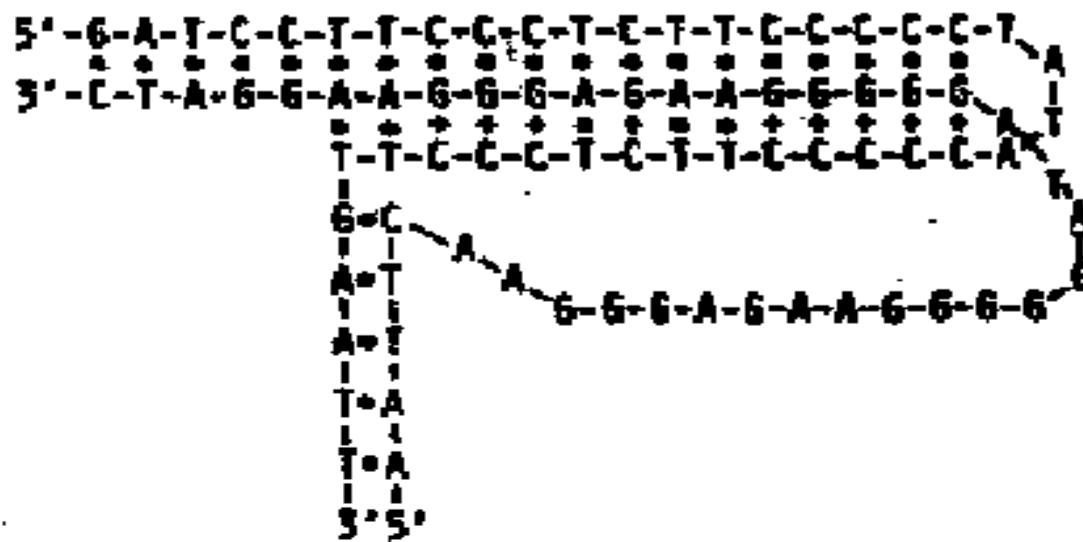


图 13 H-DNA 的两种异构体

三链 DNA 的形成也可由负超螺旋的改变驱动，随着负超螺旋的增加，即使在中性条件下 DNA 中 S1 核酸酶的超敏位点也能形成。

现在，已经在基因的调节区和染色体重组热点分离到能在离体条件下形成三链 DNA 的序列。这表明它们可能在基因表达中起作用。

端粒 DNA 的结构 - 四链 DNA

端粒是真核染色体的末端序列。端粒的生物学功能是保持染色体的稳定，它决定着细胞的寿命。线型 DNA 复制长期来存在的一个问题就是它的末端是如何复制的。DNA 的复制需要 RNA 引物，而引物随后被降解，其结果就使子代 DNA 的 5' 端逐步缩短，端粒 DNA 的结构及其复制的阐明为解决这一问题奠定了基础。

研究表明，端粒 DNA 序列和结构非常保守，它主要是由一段十分简单和串联重复的序列组成。例如，人和其它脊椎动物等的端粒重复单位为 AG GGTT，纤毛原生动物四膜虫的重复单位 GGGG TT 和 GGGGTTTT，面包酵母等的重复单位为 $G_{1\sim 3}T$ 和 $G_{1\sim 8}T$ 。他们的共同特点是富含 G，它们的长度可达几百到几千碱基对。

端粒 DNA 的序列具有一定的取向特征。在每一染色体末端，富含 G 的一股链由 5' 向 3'- 末端延伸，并突出于互补的富含 C 一股链 12 ~ 16 核苷酸（图 14）。染色体的末端与特定的蛋白质形成复合物。

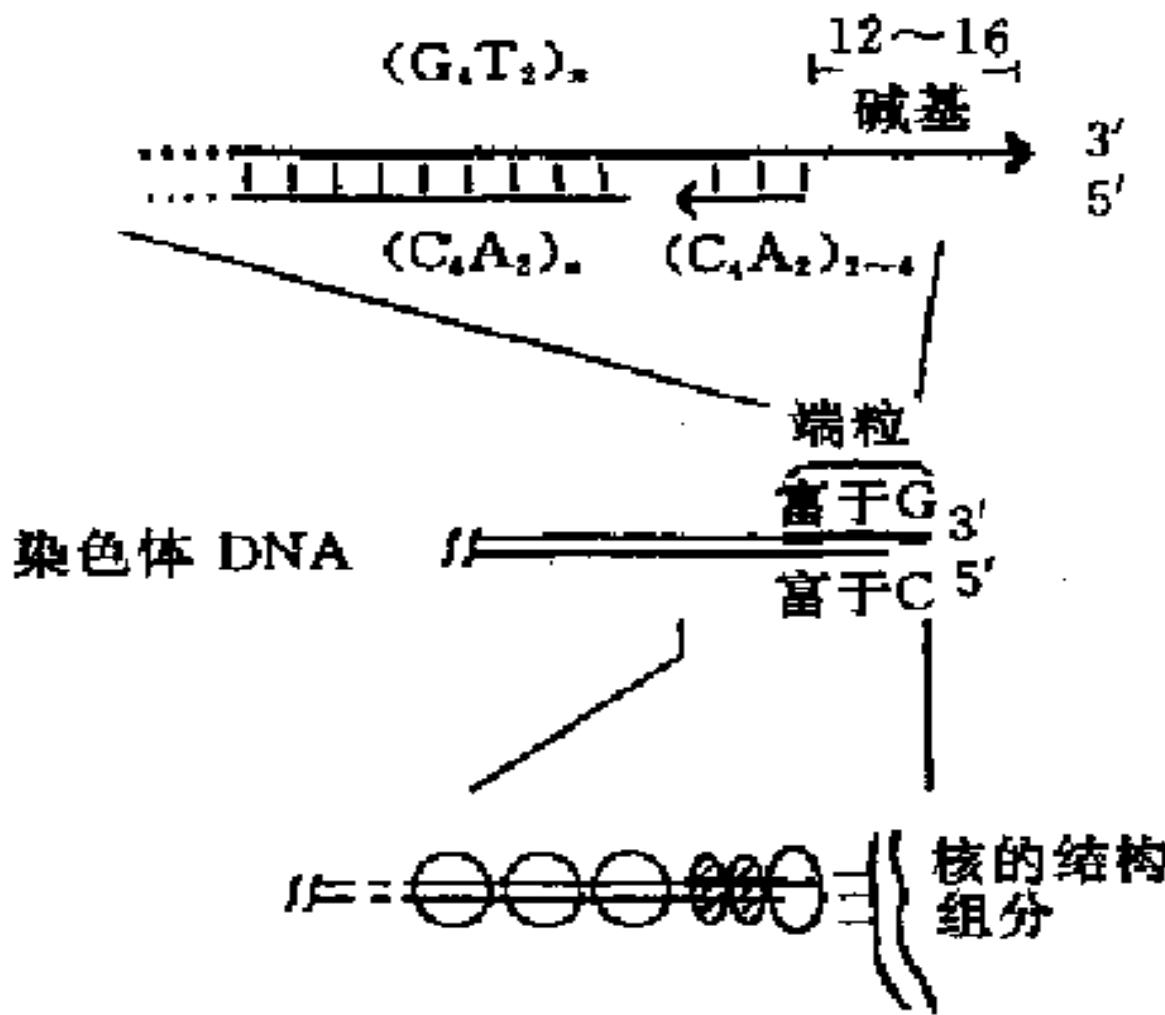


图 14 真核染色体的端粒
 图下部表示染色体末端的端粒蛋白(用空白
 和斜线标出的椭圆形)和核小体(空白圆圈)。

现已证实，端粒或类似端粒的寡聚核苷酸在实验室条件下能形成多种 G-G 碱基配对形式。例如，短的如端粒 DNA 3'-末端那样的 12 ~ 16 bp 突出序列能够形成回折结构（图 15 b），它们可能是通过碱基间的非标准配对形成的。较长的富含 G 的序列可能形成 G 的四链 DNA（图 15 c,d）。在这样的结构中，G 形成一种四联体，相互间通过 Hoogsteen 方式结合，并为 K^+ 或 Na^+ 所稳定。

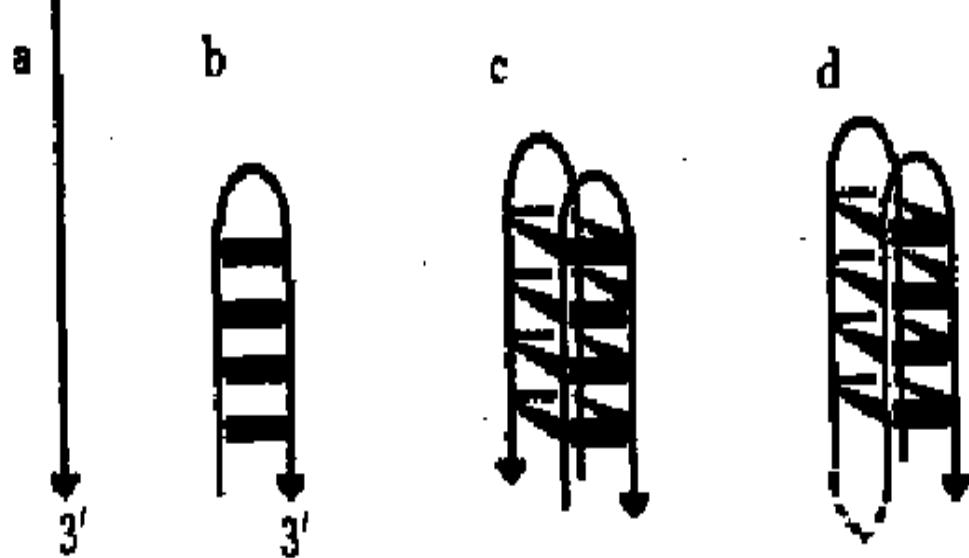
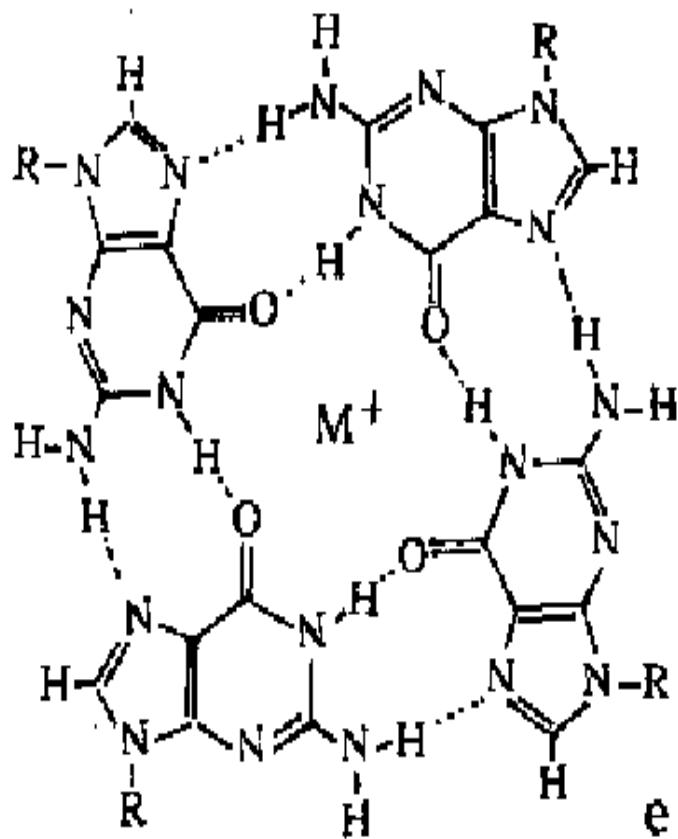
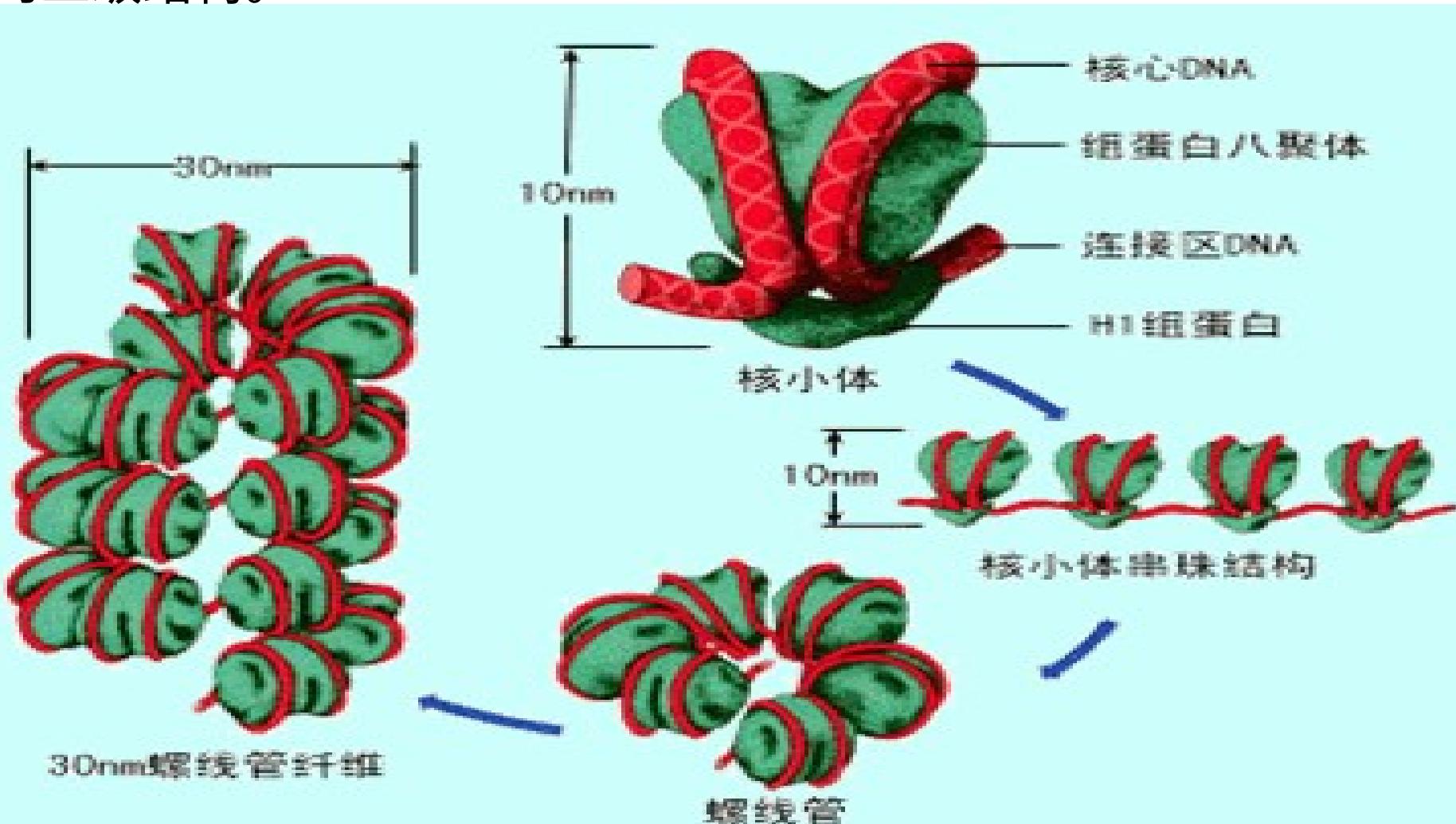


图 15 富含 G 的端粒序列形成的不寻常结构

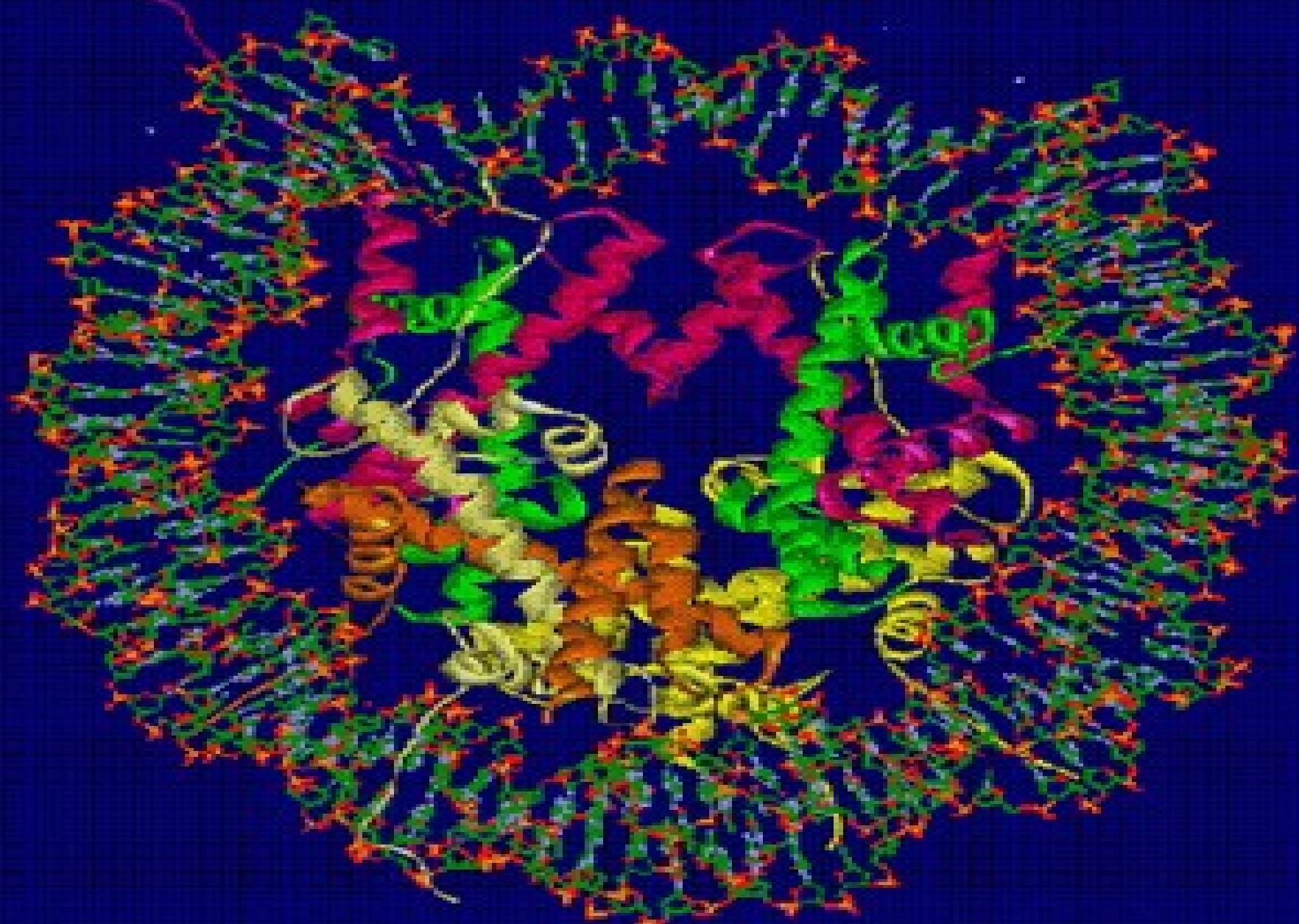
a 为单链形式; b 为回折形成的结构;c,d 为所形成的四链结构即G-四联体。

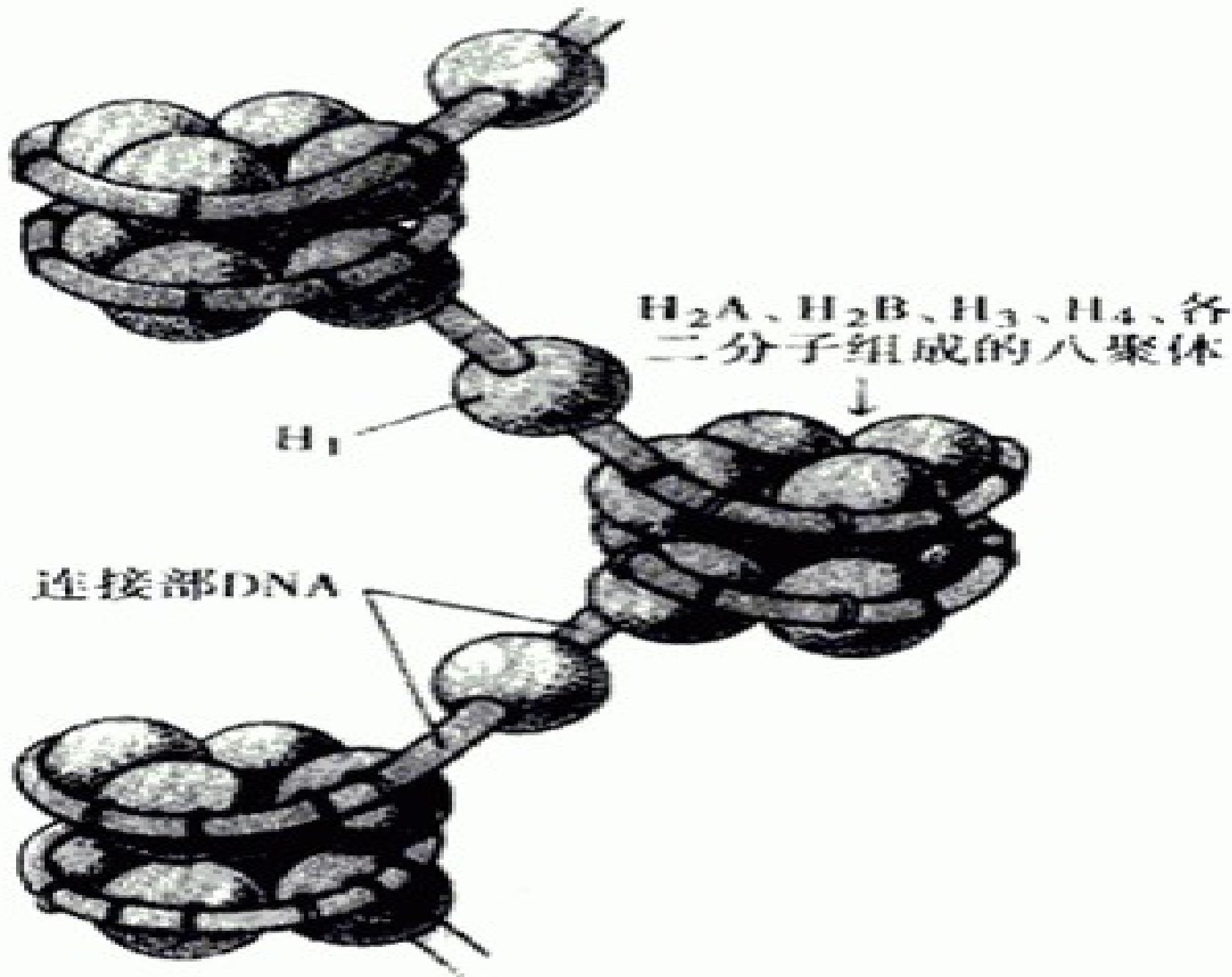
2. 真核生物中的核小体结构

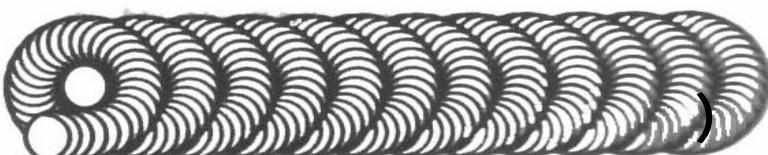
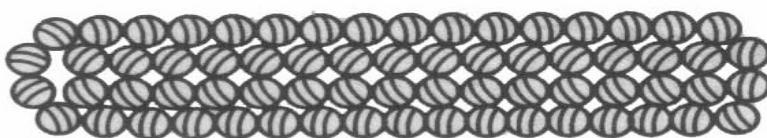
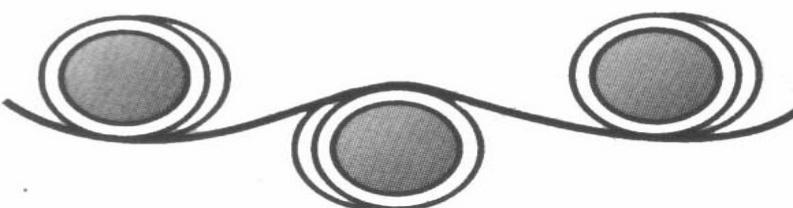
在真核生物中，双螺旋的 DNA 分子围绕一蛋白质八聚体进行盘绕，从而形成特殊的串珠状结构，称为核小体。核小体结构属于 DNA 的三级结构。



Nucleosome







DNA (2nm, 200bp)

核小体链 (11nm, 每个核小体 200bp)

纤丝 (30nm, 每圈 6 个核小体)

突环 (150nm, 每个突环大约 75000bp)

玫瑰花结 (300nm ,6 个突环)

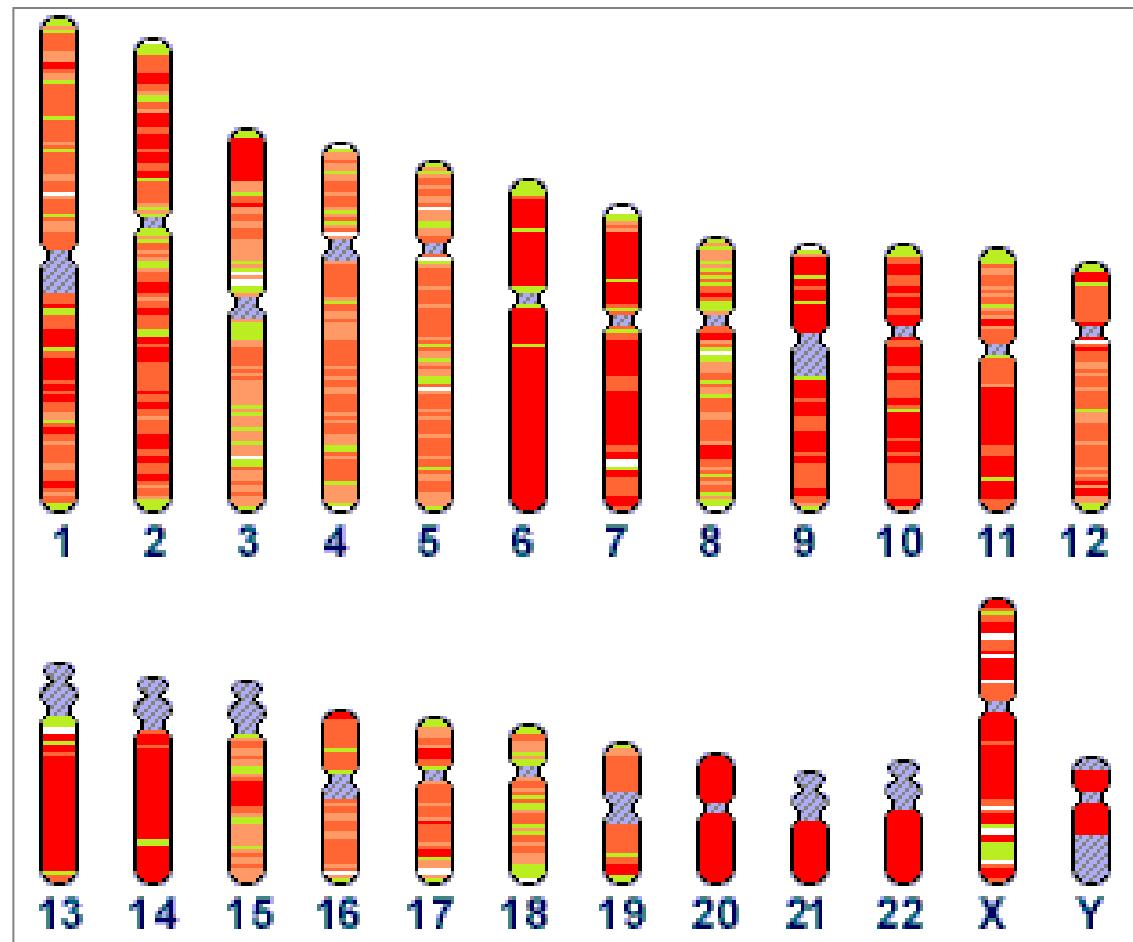
螺旋圈 (700nm, 每圈 30 个玫瑰花)

染色体

共计压缩 8400 倍

DNA & CHROMOSOMES

- ◆ 2m of DNA,
- ◆ all 3 billion letters in the DNA code,
- ◆ compacted into 46 chromosomes,
- ◆ and packed into a cell 0.0001cm across!



(三) DNA 的功能

- DNA 的基本功能是作为遗传信息的载体，为生物遗传信息复制以及基因信息的转录提供模板。
- DNA 分子中具有特定生物学功能的片段称为基因 (gene)。一个生物体的全部 DNA 序列称为基因组 (genome)。

基因组的大小与生物的复杂性有关，如病毒 SV40 的基因组大小为 5.1×10^3 bp，大肠杆菌为 5.7×10^6 bp，人为 3×10^9 bp。

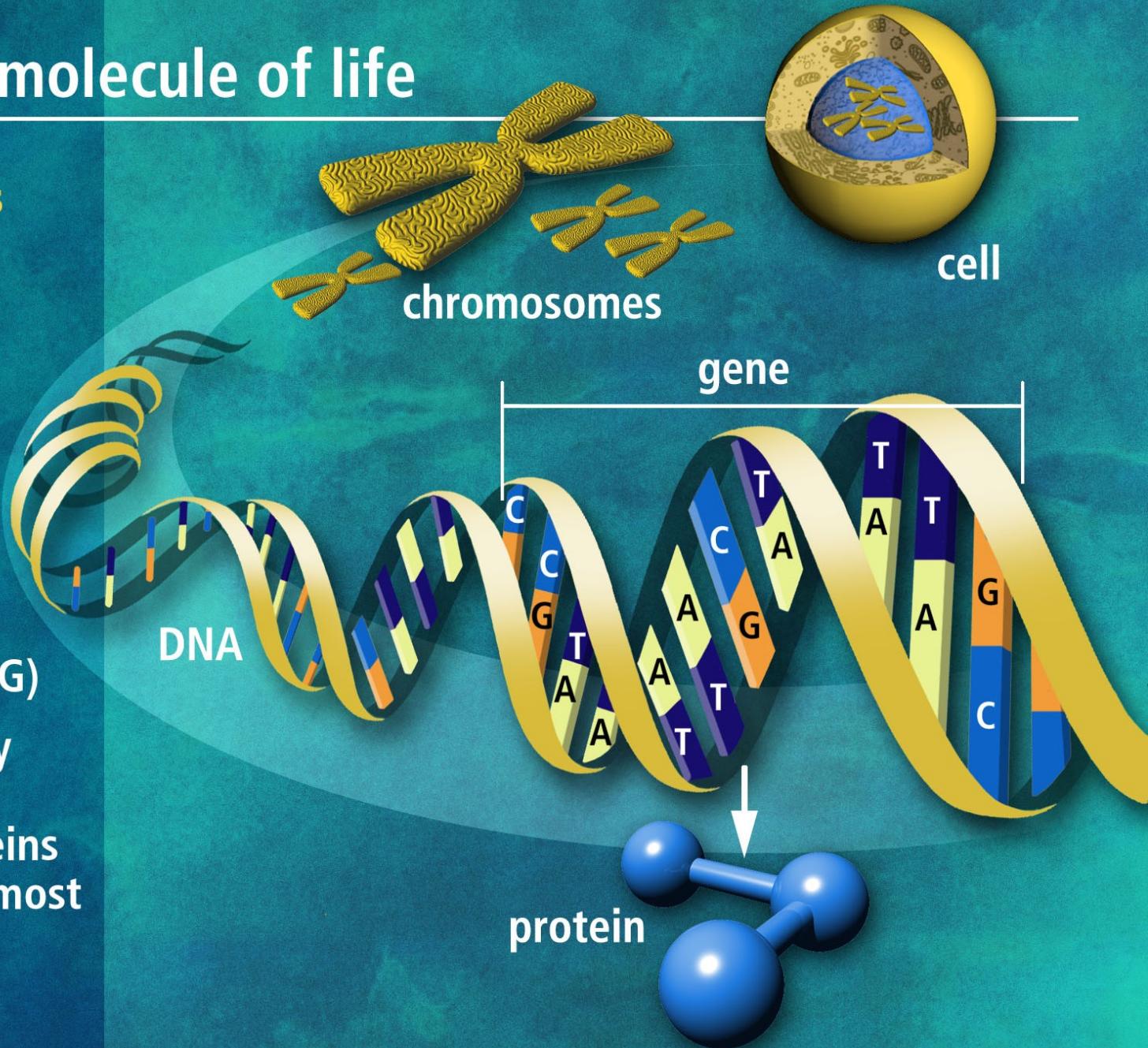
1928 Fred Griffith discovered transformation

DNA the molecule of life

Trillions of cells

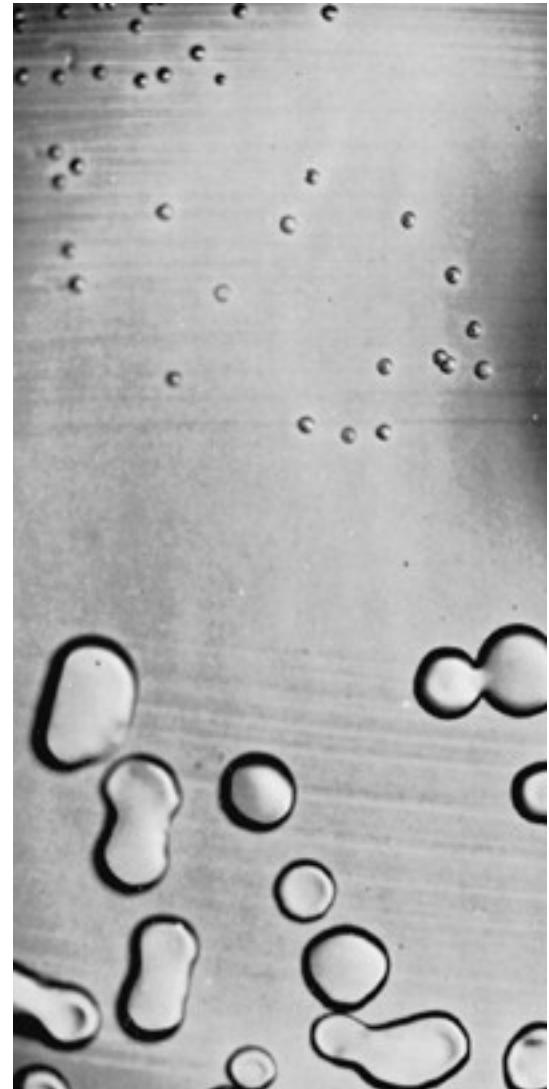
Each cell:

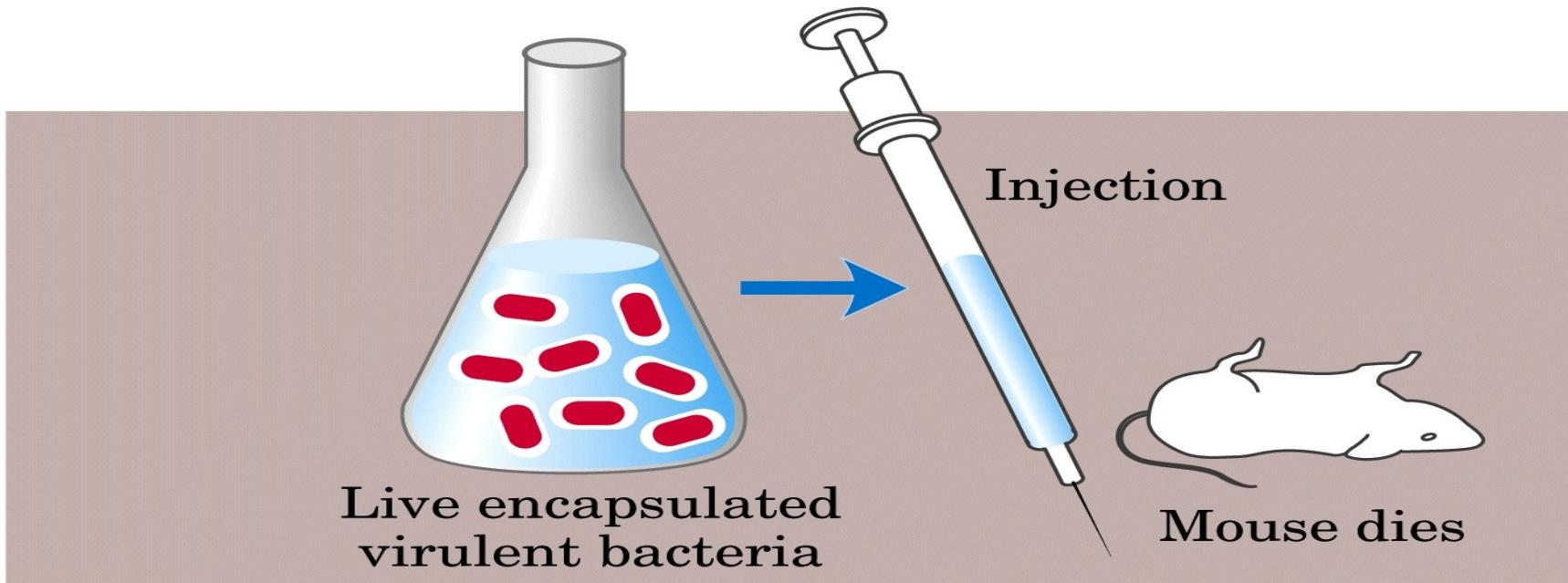
- 46 human chromosomes
- 2 meters of DNA
- 3 billion DNA subunits (the bases: A, T, C, G)
- Approximately 30,000 genes code for proteins that perform most life functions



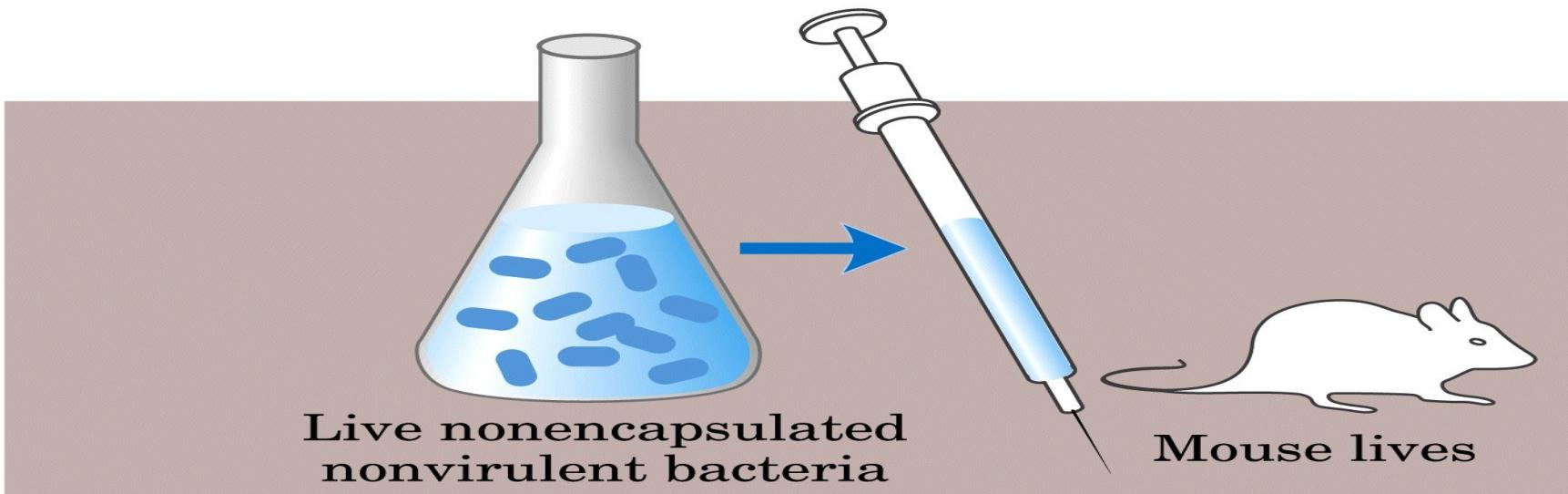
Transformation of pneumococci (肺炎双球菌)

- R-form (top) is not pathogenic
- S-form (bottom) is pathogenic
- R can be transformed to S by exposure to heat killed S

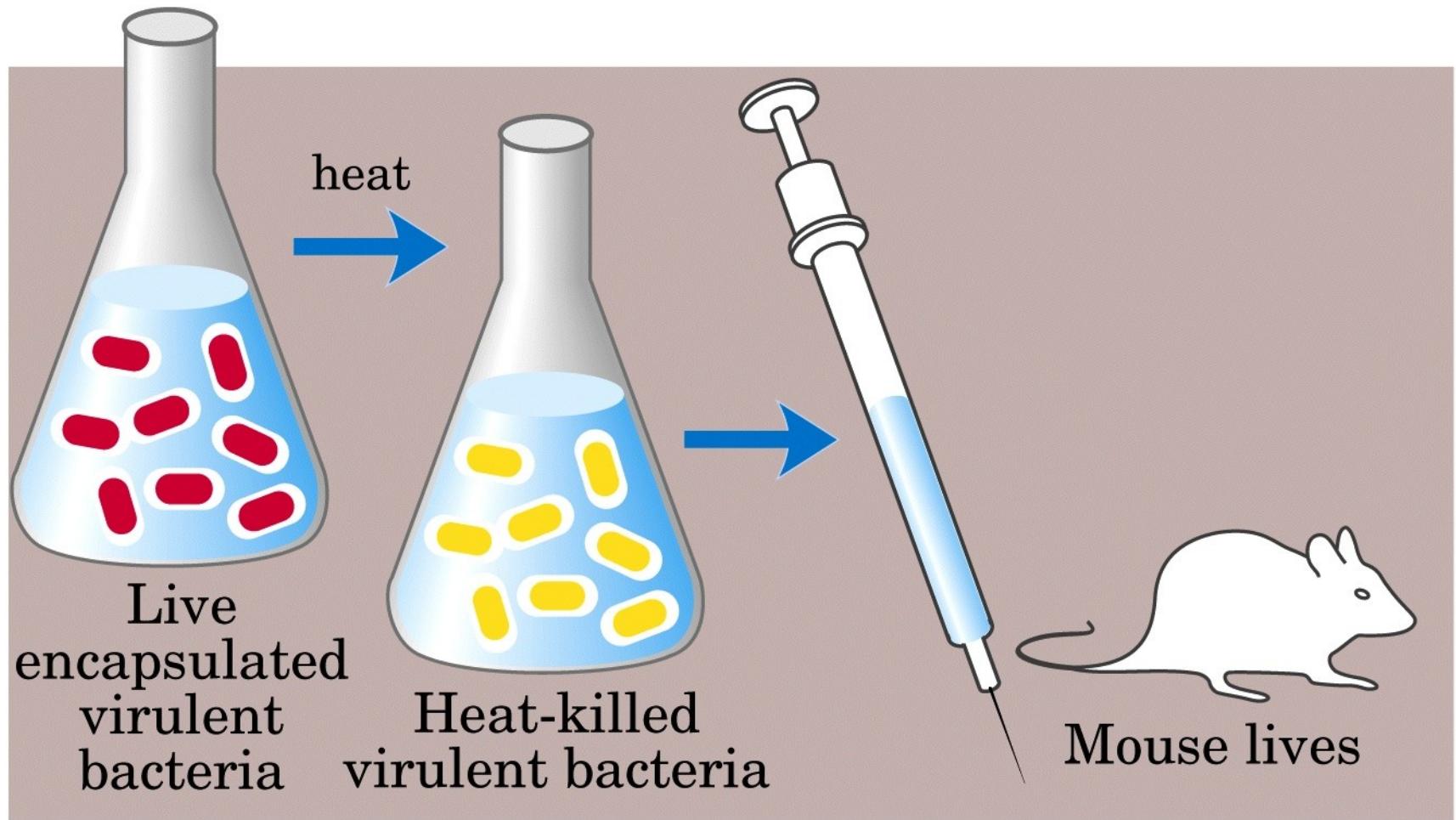




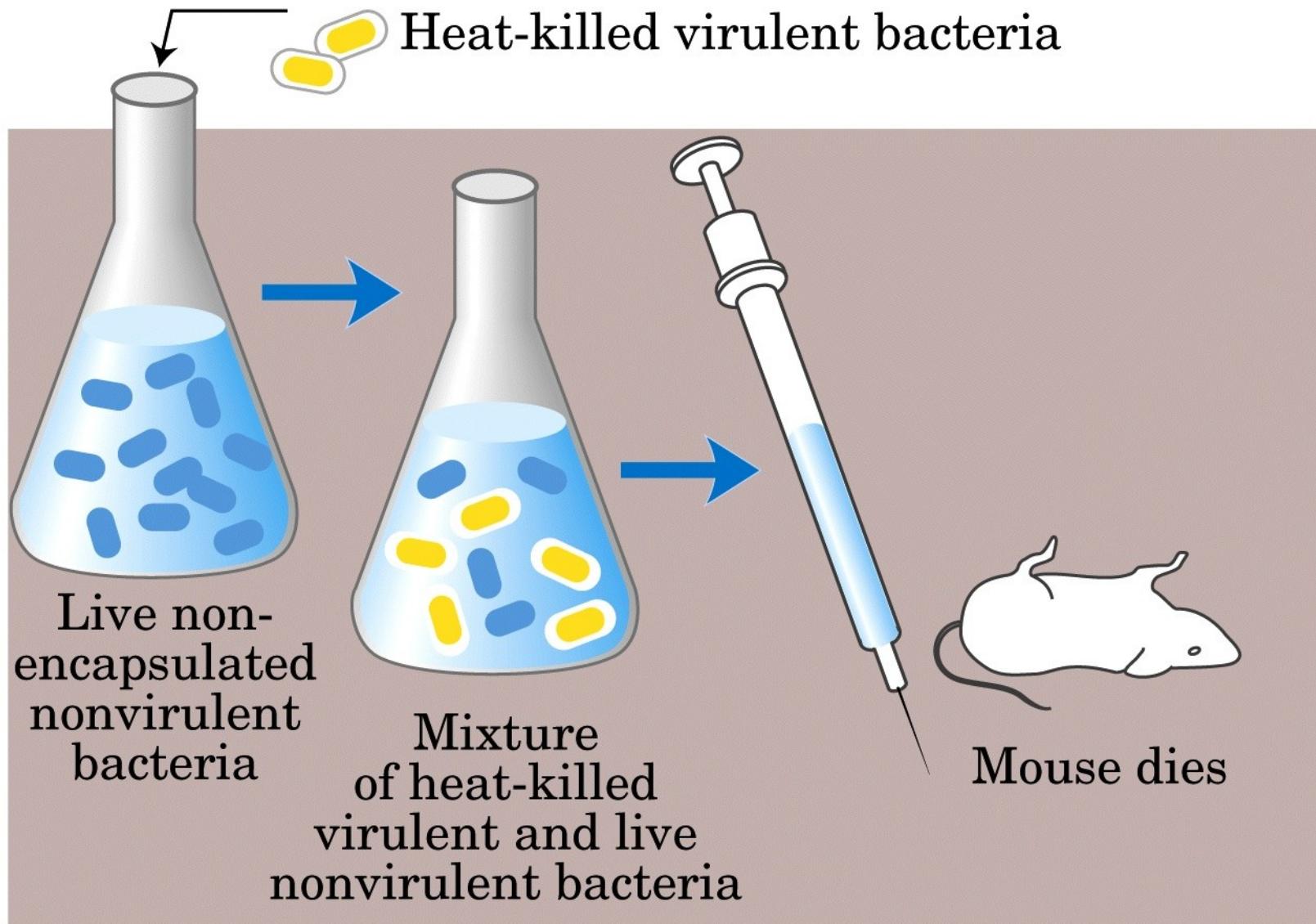
(a)



(b)



(c)



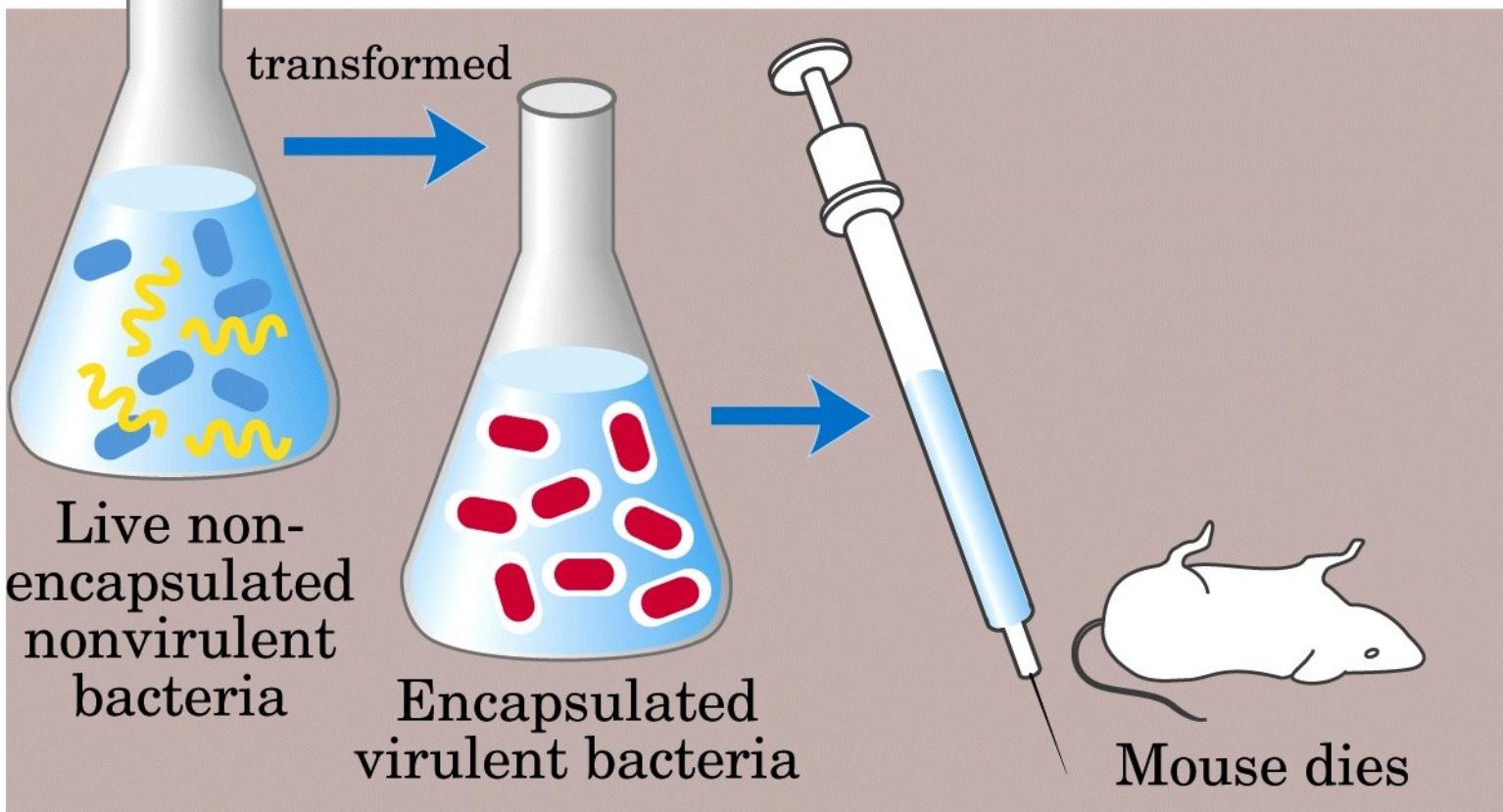
1944 Oswald Avery, Colin MacLeod and Maclyn McCarty isolated the transforming principle: DNA



Live nonvirulent bacteria



DNA isolated from heat-killed
virulent bacteria



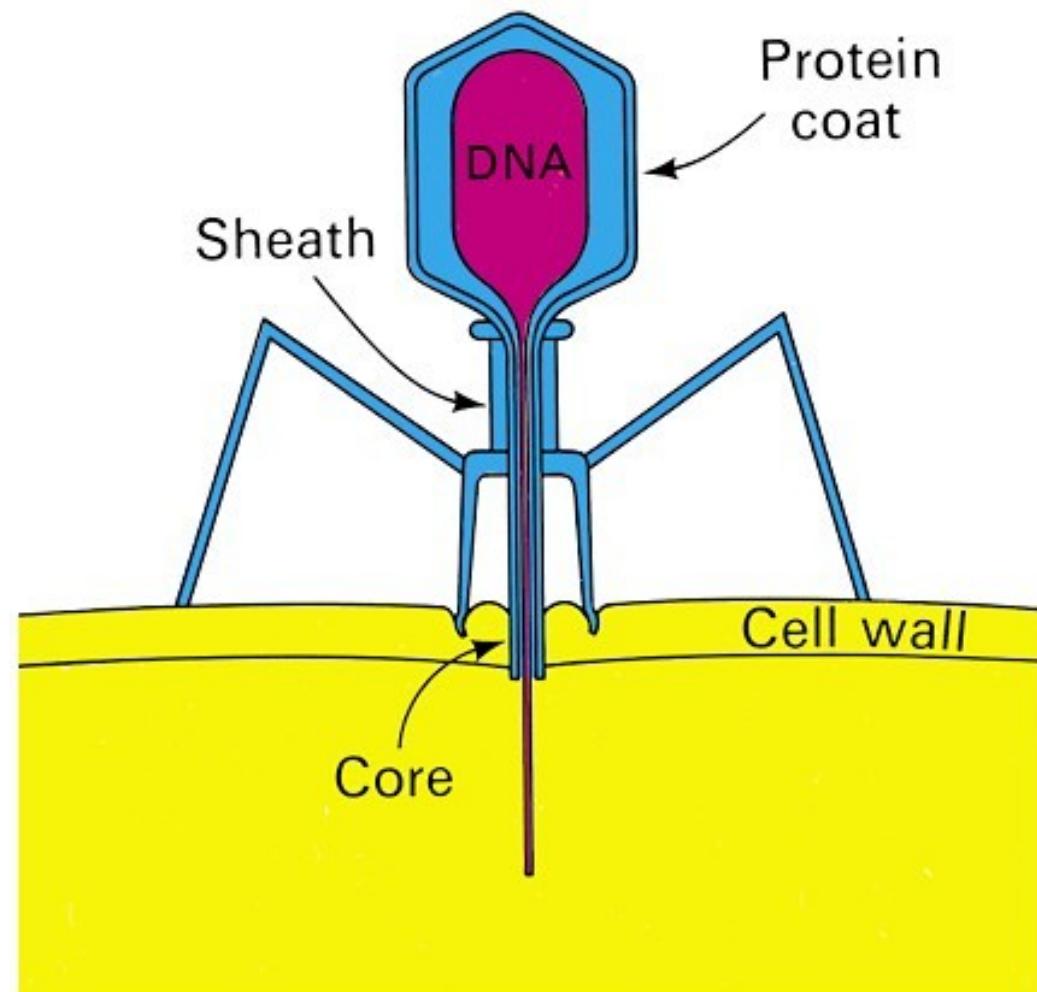
(e)

1952 Alfred Hershey
and Martha Chase
showed
that the genetic
element in phage is
DNA

The Hershey-Chase blender experiment

Phage DNA labeled with
 ^{32}P

Phage protein labeled
with ^{35}S

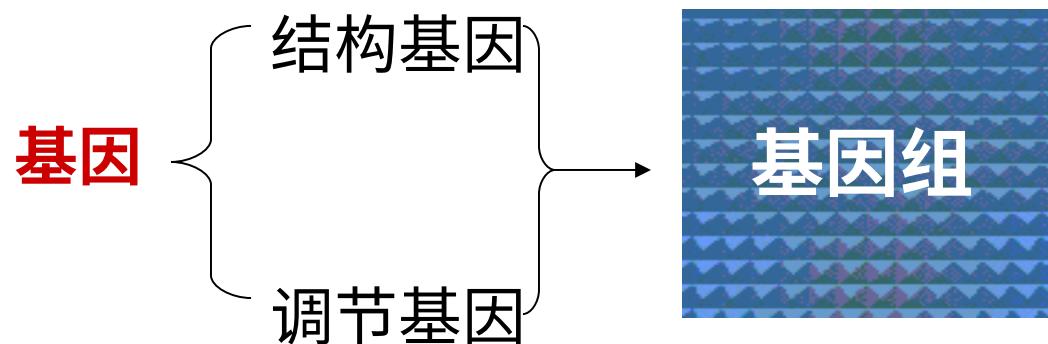


(四). DNA 与基因组织

1. DNA 与基因



基因是 DNA 片段的核苷酸序列， DNA 分子中最小的功能单位。



(1) 基因的分子定义

基因就是指 DNA 分子中含有特定遗传信息的核苷酸序列，是遗传物质的最小功能单位；是合成有功能的多肽链或 RNA 所必需的全部核酸序列（通常是 DNA 序列）。

故一个基因应包含不仅是编码蛋白质肽链或 RNA 的核酸序列，还包括为保证转录所必需的调控序列、5' 非翻译序列、内含子以及 3' 非翻译序列等所有的核酸序列。

(2) 基因的分类

- 第一类是编码蛋白质的基因，它具有转录和翻译功能，包括编码酶和结构蛋白的结构基因以及编码阻遏蛋白的调节基因
- 第二类是只有转录功能而没有翻译功能的基因，包括 tRNA 基因和 rRNA 基因

(3) 基因组 (genome)

- **基因组**：携带生物体全部遗传信息的核酸量。可以指一个细胞、一个个体、一个种群的全部遗传信息。
 - 原核：就是它的整个染色体。
 - 真核：一个物种单倍体染色体。
 - 不同生物体中具有不同的基因组大小
- **C 值**：指单倍体基因组中的 DNA 含量，一般进化程度越高的生物其 C 值越大。
- **C 值矛盾**
 - 在结构和功能相似的物种中，甚至在亲缘关系相近的物种中，C 值差异大。
 - 在不同进化阶元中，某些低等生物的 C 值比高等生物的 C 值还大。

2. 原核生物基因组的特点

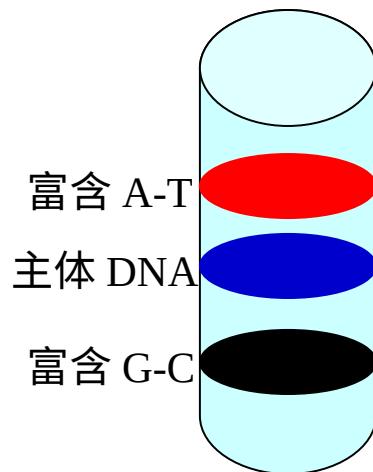
- (1). DNA 大部分为结构基因，每个基因出现频率低。
- (2). 功能相关基因串联在一起，并转录在同一 mRNA 中（多顺反子）。
- (3). 有基因重叠现象。



3. 真核生物基因组的特点

(1). 重复序列

- 单拷贝序列：在整个 DNA 中只出现一次或少数几次，主要为编码蛋白质的结构基因。
- 中度重复序列：在 DNA 中可重复几十次到几千次。
- 高度重复序列：可重复几百万次

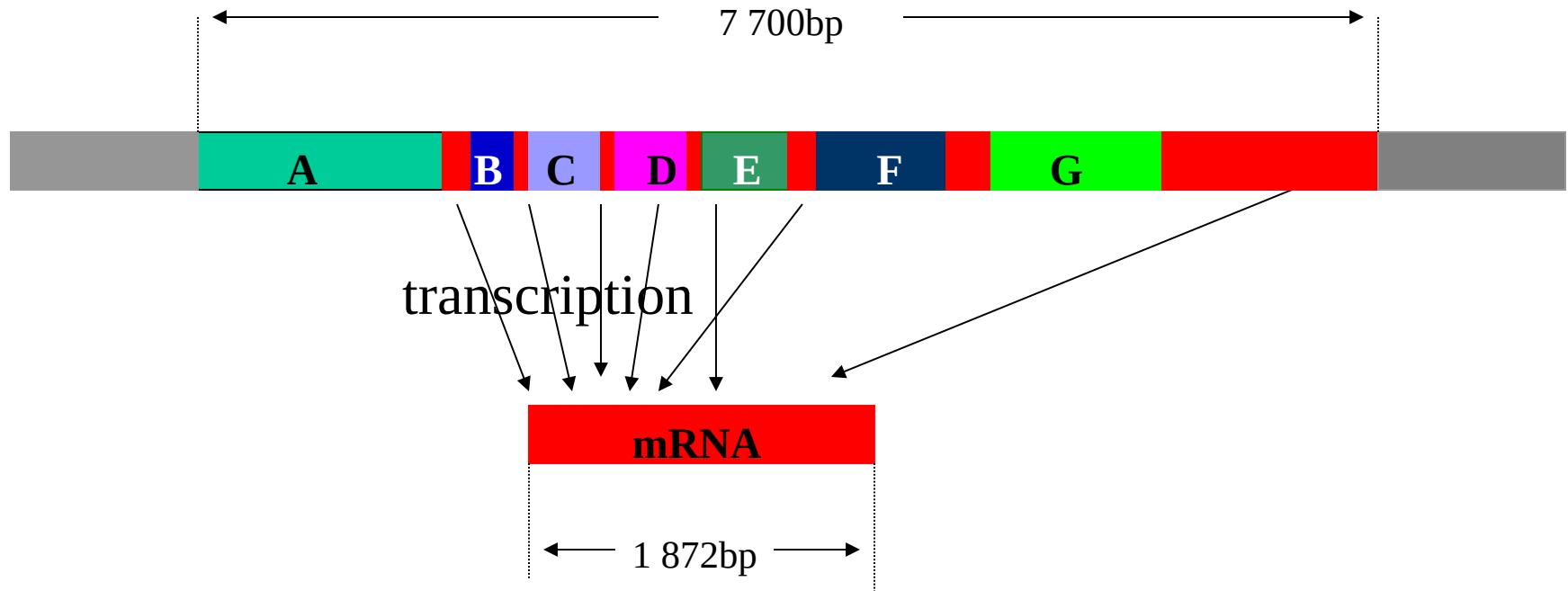


高度重复序列一般富含 A-T 或 G-C，富含 A-T 的在密度梯度离心时在离心管中形成的区带比主体 DNA 更靠近管口；富含 G-C 的更靠近管底，称为**卫星 DNA** (satellite DNA)

卫星 DNA (satellite DNA)

- 2-100bp
- 成串排列
- 着丝粒区和端粒区
- 人基因组中约占 5-6 %
- 根据长度
 - 小卫星 DNA : 15-70bp
 - 微卫星 DNA : 2-5bp
- 功能
 - 染色体稳定和分配
 - DNA 指纹

(2). 有断裂基因 由于基因中内含子的存在。



内含子 (intron) : 基因中不为多肽编码, 不在 mRNA 中出现。

外显子 (exons) : 为多肽编码的基因片段。

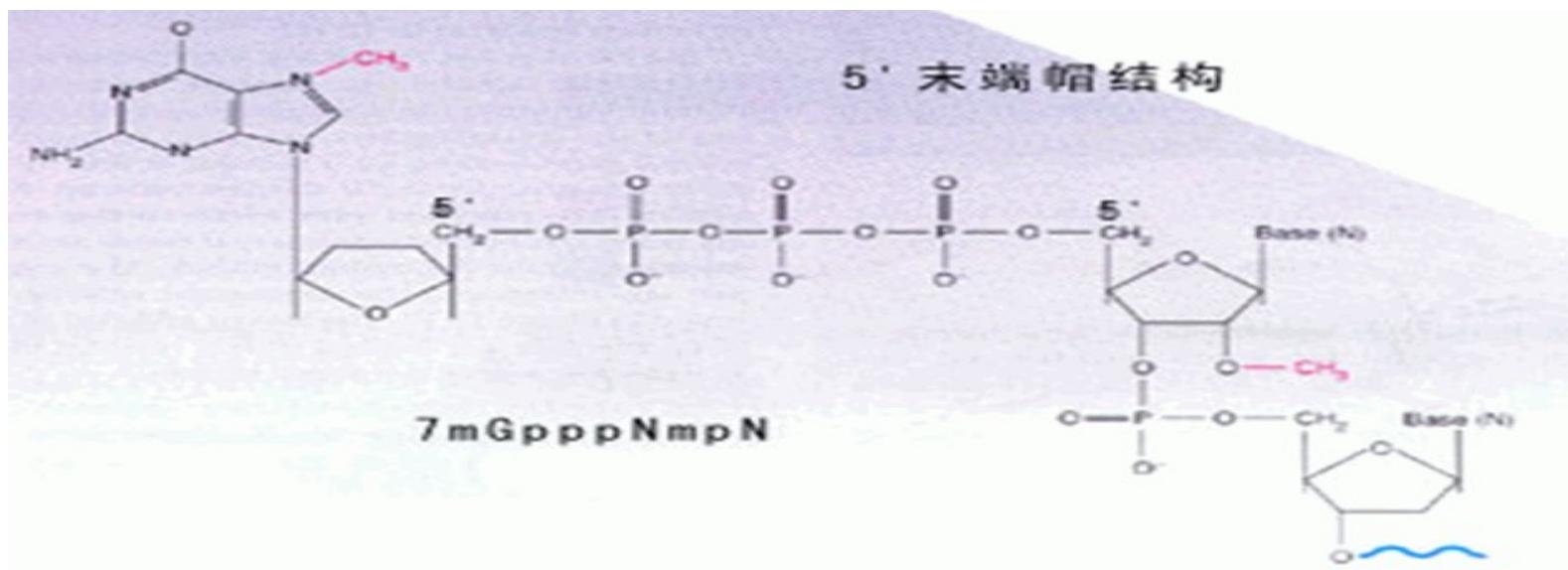
例外: 组蛋白基因 (histongene) 和干扰素基因 (interferon gene) 没有内含子。

三. RNA 的空间结构与功能

- RNA 通常以单链形式存在，但也可形成局部的双螺旋结构。
- RNA 分子的种类较多，分子大小变化较大，功能多样化。
- 主要的 RNA 种类有 rRNA、mRNA、tRNA、HnRNA、SnRNA、SnoRNA、ScRNA 等。

(一) mRNA 的结构与功能

- mRNA 可形成局部双螺旋结构的二级结构。mRNA 在真核生物中的初级产物称为 HnRNA。大多数真核成熟的 mRNA 分子具有典型的 5' - 端的 7- 甲基鸟苷三磷酸 (m7GTP) 帽子结构和 3' - 端的多聚腺苷酸 (polyA) 尾巴结构。
- 真核生物 mRNA 5' - 端帽子结构



5' Capping

- ❑ Very soon after RNA Pol II starts making a transcript, and before the RNA chain is more than 20-30 nt long, the 5'-end is chemically modified by the addition of a 7-methylguanosine (m7G) residue.
- ❑ This 5' modification is called a cap and the nucleotide is added to the new RNA transcript in the reverse orientation compared with the normal 3'-5' linkage, giving a 5'-5' triphosphate bridge. The reaction is carried out by an enzyme called guanyltransferase (鸟苷酸转移酶) and there can be subsequent methylations of the sugars on the first and second transcribed nucleotides, particularly in vertebrates. Cap0, Cap1 and Cap2.
- ❑ The cap structure forms a barrier to 5'-exonucleases and thus stabilizes the transcript, but the cap is also important in other reactions undergone by pre-mRNA and mRNA, such as splicing, nuclear transport and translation.

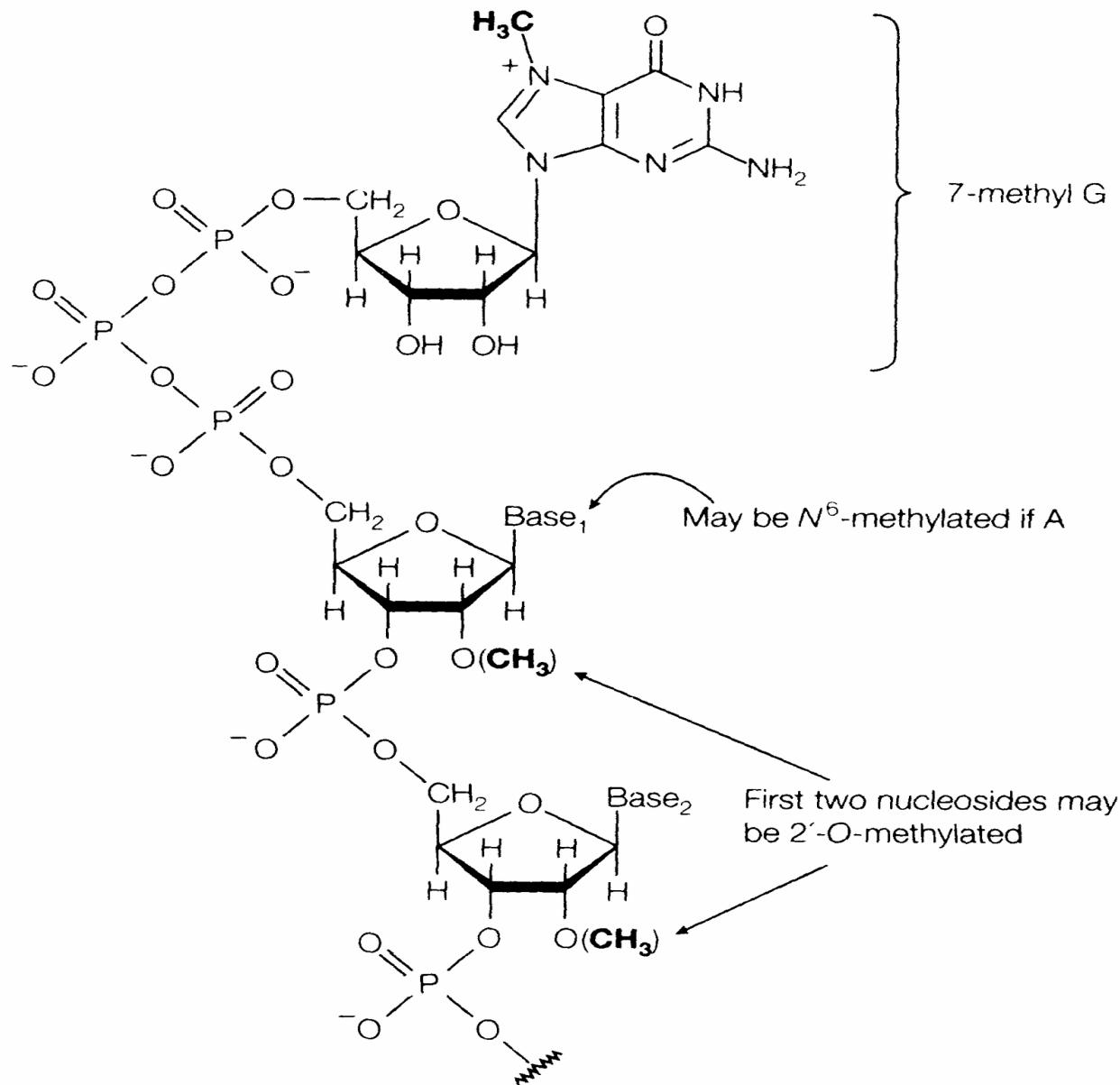
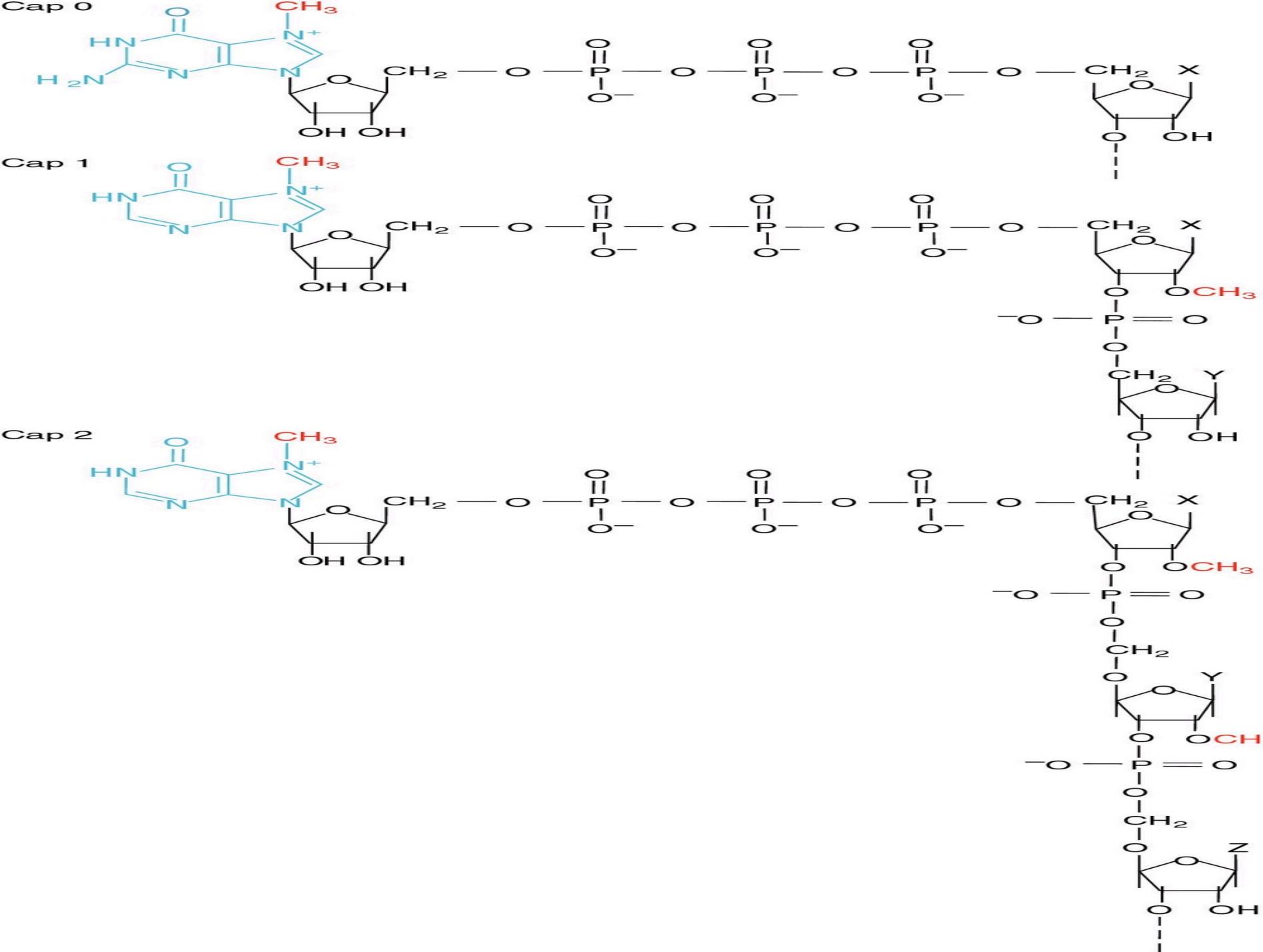
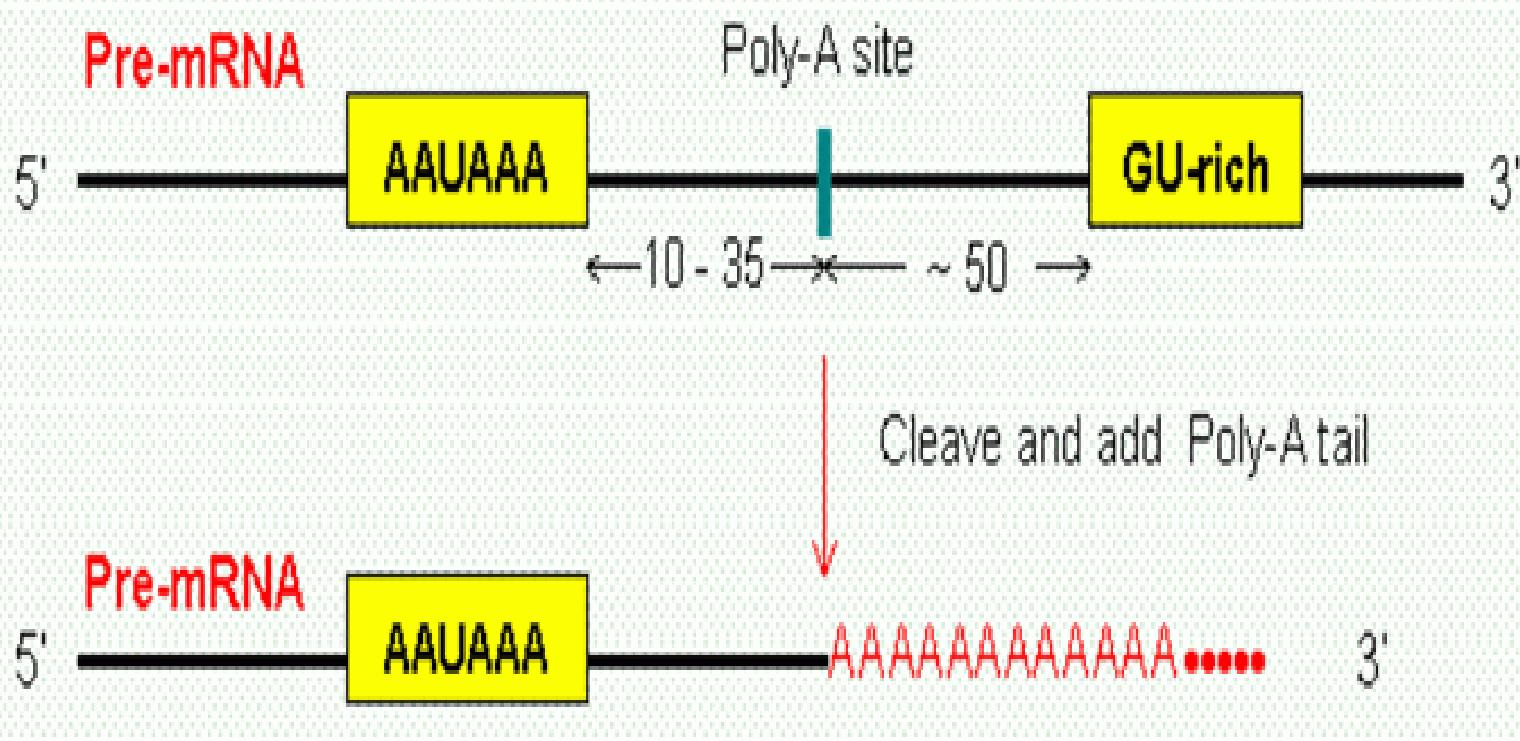


Fig. 1. The 5' cap structure of eukaryotic mRNA.



真核生物 mRNA 3' - 端的 polyA 结构



mRNA 分子中带有遗传密码，其功能是为蛋白质的合成提供模板。

mRNA 分子中每三个相邻的核苷酸组成一组，在蛋白质翻译合成时代表一个特定的氨基酸，这种核苷酸三联体称为遗传密码（codon）

(二) tRNA 的结构与功能

- tRNA 是分子最小，但含有稀有碱基最多的 RNA，其稀有碱基的含量可多达 20%。
- tRNA 是保守性最强的 RNA。
- tRNA 是单链核酸，但其分子中的某些局部也可形成双螺旋结构。

tRNA 分子具有以下特点：

分子量 25000 左右，大约由 70 – 90 个核苷酸组成，沉降 系数为 4S 左右；分子中含有较多的修饰成分；3'-末端都具有 CpCpAOH 的结构。

1. tRNA 的二级结构

tRNA 的二级结构由于局部双螺旋的形成而呈现“三叶草”形，故称为“三叶草”结构。

tRNA 的“三叶草”形结构包括：氨基酸臂、DHU 臂、反密码臂、可变臂和 T_ψC 臂五部分。

(1) 氨基酸接受区

包含有 tRNA 的 3' - 末端和 5' - 末端，3' - 末端的最后 3 个核苷酸残基都是 CCA，A 为核苷。氨基酸可与其成酯，该区在蛋白质合成中起携带氨基酸的作用。

(2) 反密码区

与氨基酸接受区相对的一般含有 7 个核苷酸残基的区域，其中正中的 3 个核苷酸残基称为反密码

(3) 二氢尿嘧啶区

该区含有二氢尿嘧啶。

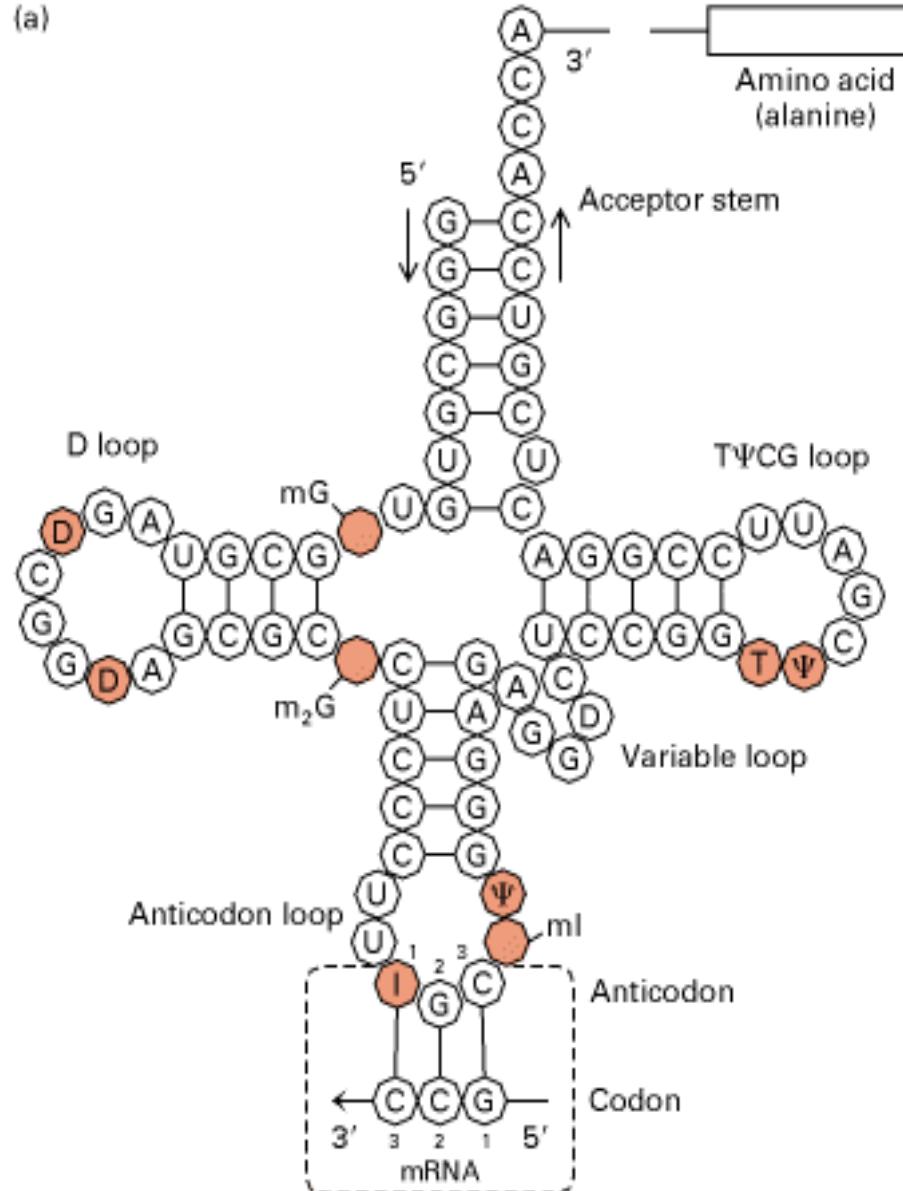
(4) T_ψC 区

该区与二氢尿嘧啶区相对，假尿嘧啶核苷—胸腺嘧啶核糖核苷环 (T_ψC) 由 7 个核苷酸组成，通过由 5 对碱基组成的双螺旋区 (T_ψC 臂) 与 tRNA 的其余部分相连。除个别例外，几乎所有 tRNA 在此环中都含有 T_ψC。

(5) 可变区

位于反密码区与 T_ψC 区之间，不同的 tRNA 该区变化较大。

(a)



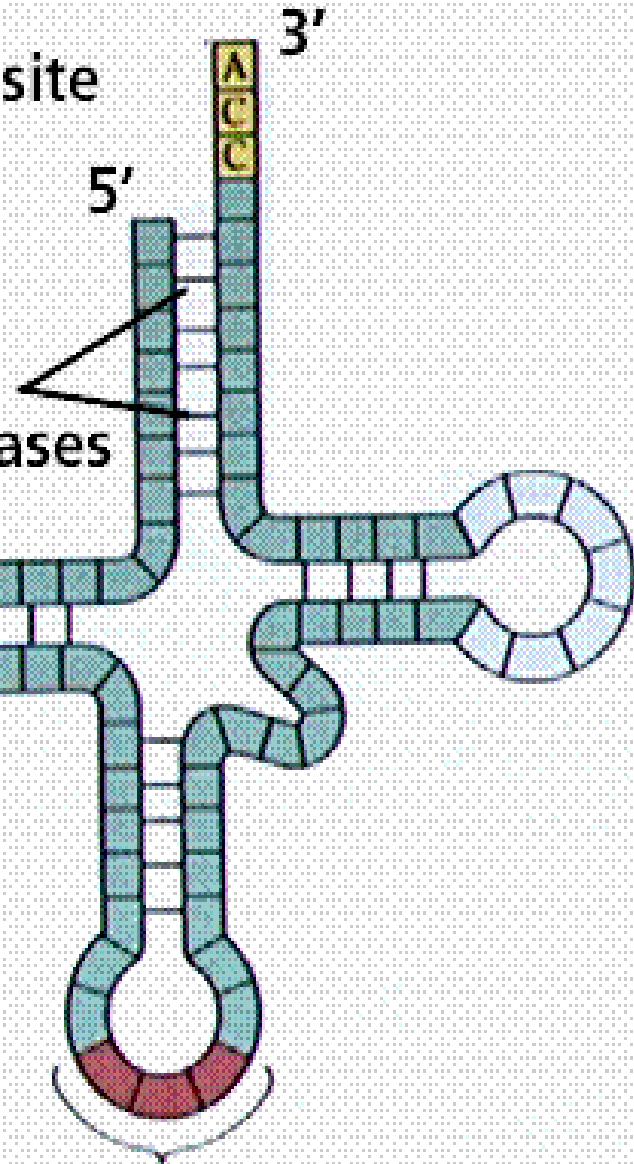
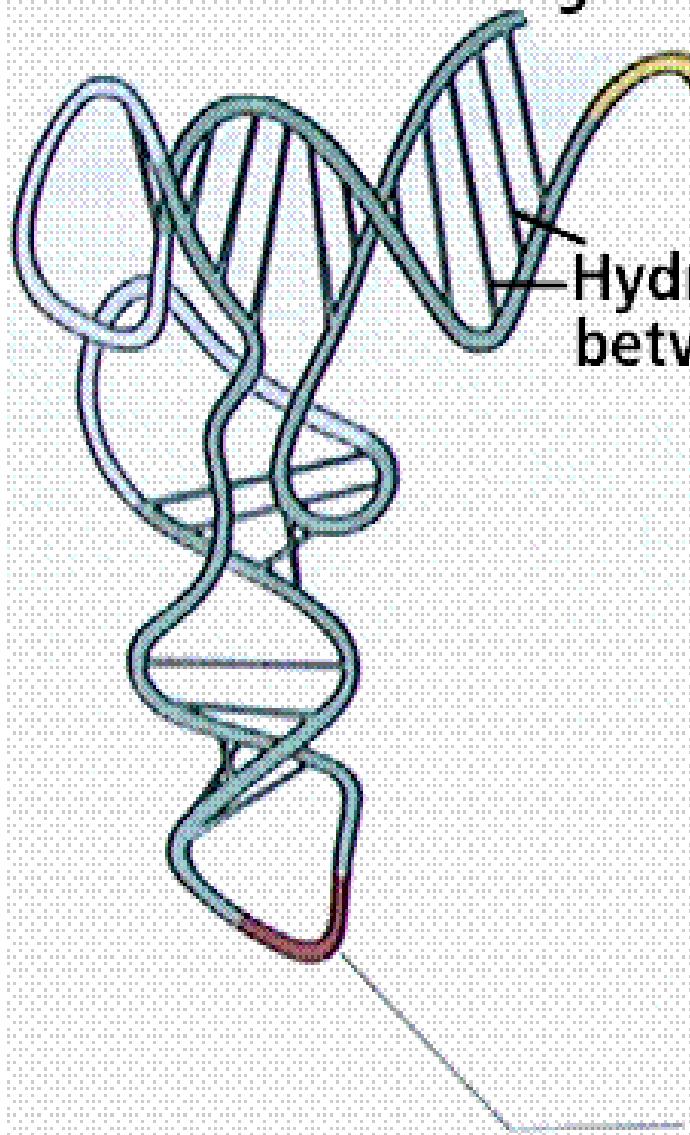
2. tRNA 的三级结构

- 在三叶草型二级结构的基础上，突环上未配对的碱基由于整个分子的扭曲而配成对，目前已知的 tRNA 的三级结构均为倒 L 型。

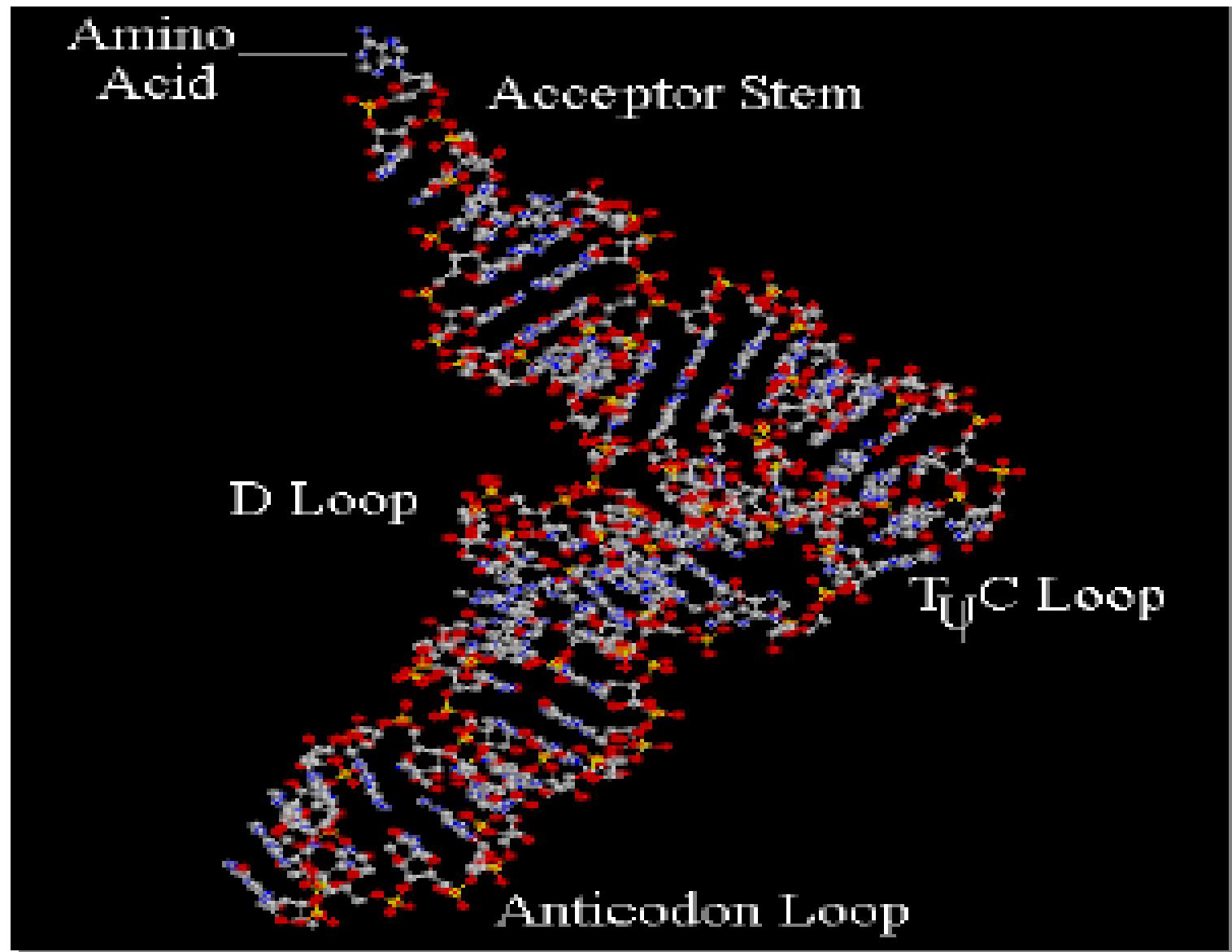
Amino acid attachment site

5'
3'

Hydrogen bonds between paired bases



Anticodon

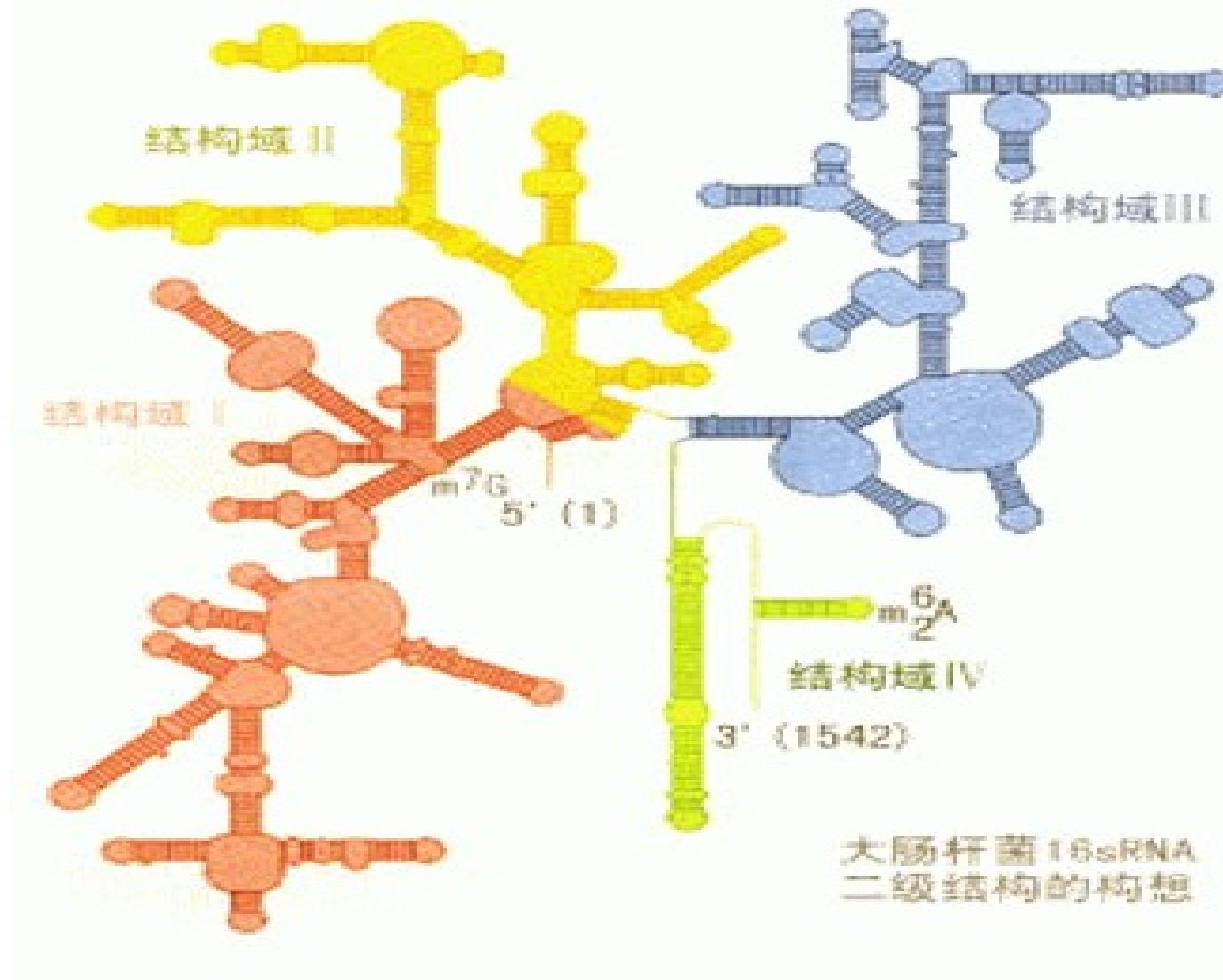


(三) rRNA 的结构与功能

- rRNA 是细胞中含量最多的 RNA，占总量的 80%。rRNA 与蛋白质一起构成核蛋白体，作为蛋白质生物合成的场所。
- 在原核生物中，rRNA 有三种：5S，16S，23S。其中，16S 的 rRNA 参与构成核蛋白体的小亚基，而 5S 和 23S 的 rRNA 参与构成核蛋白体大亚基。
- 在真核生物中，rRNA 有四种：5S，5.8S，18S，28S。其中，18S 的 rRNA 参与构成核蛋白体小亚基，其余的 rRNA 参与构成核蛋白体大亚基。

占细胞 RNA 总量的 80% , 与蛋白质 (40%) 共同组成核糖体。

原核生物	rRNA	真核生物	rRNA
核糖体 70S (30S 、 50S)	16S 、 5 S 、 23S	核糖体 80S (40S 、 60S)	18S 、 5S 、 5.8S 、 28S



大肠杆菌 16S rRNA 的二级结构

(四) snRNA 和 asRNA

snRNA 主要存于细胞核中，占细胞 RNA 总量的 0.1~1%，与蛋白质以 RNP（核糖核酸蛋白）的形式存在，在 hnRNA 和 rRNA 的加工、细胞分裂和分化、协助细胞内物质运输、构成染色质等方面有重要作用。

asRNA 可通过互补序列与特定的 mRNA 结合，抑制 mRNA 的翻译，还可抑制 DNA 的复制和转录。

(五) RNA 的其它功能

1981 年, Cech 发现 RNA 的催化活性, 提出核酶 (ribozyme)。

大部分核酶参加 RNA 的加工和成熟, 也有催化 C-N 键的合成。23S rRNA 具肽酰转移酶活性。

RNA 在 DNA 复制、转录、翻译中均有一定的调控作用, 与某些物质的运输与定位有关。

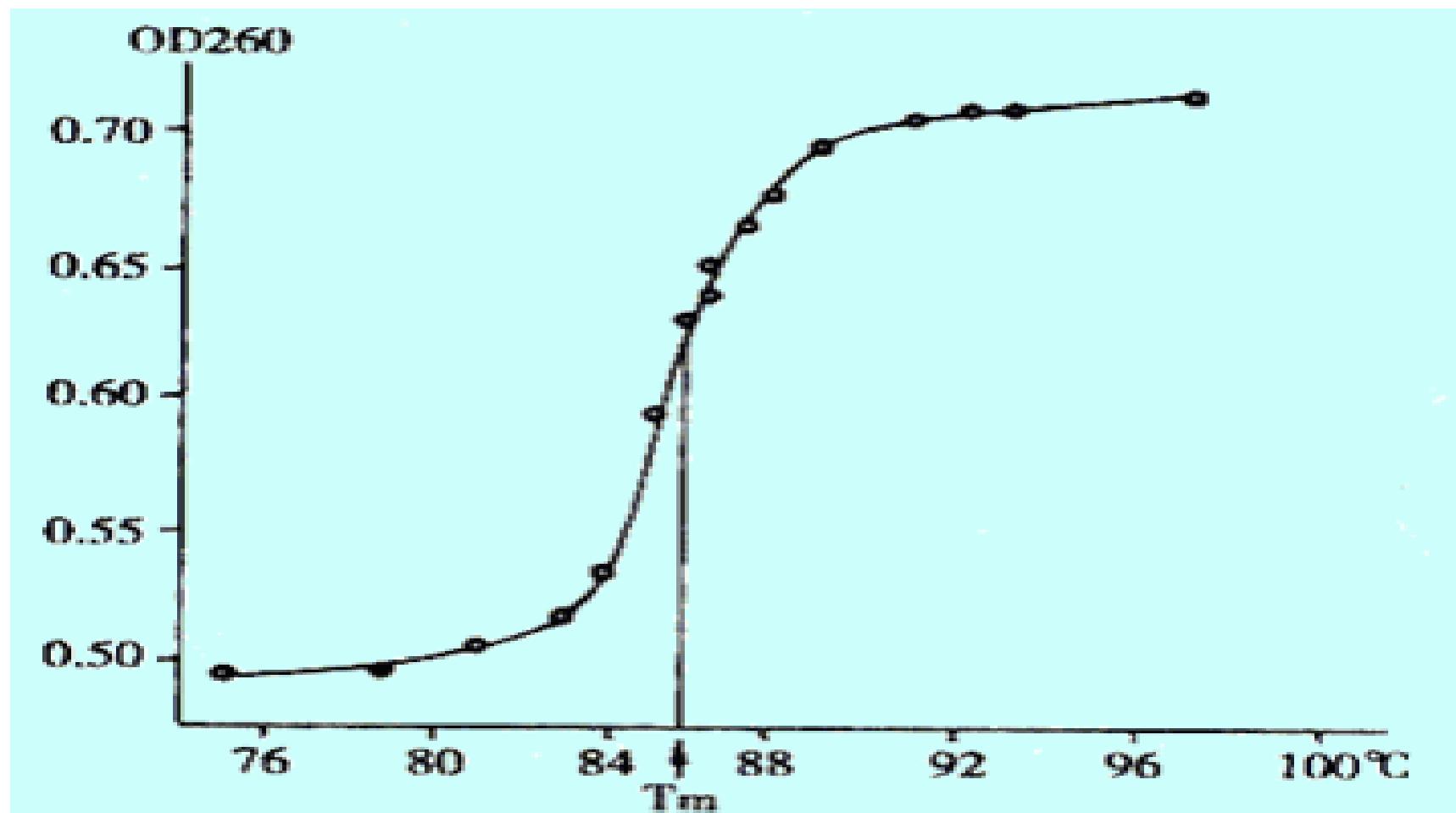
第三节 DNA 的理化性质及其应用

- 一. 核酸的一般理化性质
 - 核酸具有酸性；粘度大；能吸收紫外光，最大吸收峰为 260nm。

- 二. DNA 的变性
 - 在理化因素作用下，DNA 双螺旋的两条互补链松散而分开成为单链，从而导致 DNA 的理化性质及生物学性质发生改变，这种现象称为 DNA 的变性。引起 DNA 变性的因素主要有：
 - ①高温，②强酸强碱，③有机溶剂等。

 - DNA 变性后的性质改变：
 - ①增色效应：指 DNA 变性后对 260nm 紫外光的光吸收度增加的现象；
 - ②旋光性下降；
 - ③粘度降低；
 - ④生物学功能丧失或改变。

DNA 的变性温度：加热 DNA 溶液，使其对 260nm 紫外光的吸收度突然增加，达到其最大值一半时的温度，就是 DNA 的变性温度（融解温度， T_m ）。



影响 Tm 的因素：

(1) G-C 的相对含量

$$(G+C) \% = (Tm - 69.3) \times 2.44$$

(2) 介质离子强度低, Tm 低。

(3) 高 pH 下碱基广泛去质子而丧失形成氢键的能力。

(4) 变性剂如甲酰胺、尿素、甲醛等破坏氢键, 妨碍碱基堆积, 使 Tm 下降。

三. DNA 的复性与分子杂交

(一) DNA 的复性

将热变性后的 DNA 溶液缓慢冷却，在低于变性温度约 $25 \sim 30$ $^{\circ}\text{C}$ 的条件下保温一段时间（退火），则变性的两条单链 DNA 可以重新互补而形成原来的双螺旋结构并恢复原有的性质。

- 将变性 DNA 经退火处理，使其重新形成双螺旋结构的过程，称为 DNA 的复性。

影响复性速度的因素：

- (1) 单链片段浓度
- (2) 单链片段的大小
- (3) 片段内重复序列的多少
- (4) 溶液离子强度的大小
- (5) 溶液温度的高低 ($T - 25^{\circ}\text{C}$)

(二) 分子杂交

- 两条来源不同的单链核酸（DNA 或 RNA），只要它们有大致相同的互补碱基顺序，经退火处理即可复性，形成新的杂种双螺旋，这一现象称为核酸的分子杂交。
- 核酸杂交可以是 DNA-DNA，也可以是 DNA-RNA 杂交。
- 不同来源的，具有大致相同互补碱基顺序的核酸片段称为同源顺序。
- 利用核酸的分子杂交，可以确定或寻找不同物种中具有同源顺序的 DNA 或 RNA 片段。

探针：在核酸杂交分析过程中，常将已知顺序的核酸片段用放射性同位素或生物素进行标记。这种带有一定标记的已知顺序的 DNA 或 RNA 片段称为探针。

原位杂交技术：直接用探针与菌落或组织细胞中的核酸杂交，未改变核酸所在的位置。

点杂交：将核酸直接点在膜上，再与核酸杂交。

Southern 印迹法：将电泳分离后的 DNA 片段从凝胶转移到硝酸纤维素膜上，再进行杂交。

Northern 印迹法：将电泳分离后的 RNA 吸印到纤维素膜上再进行分子杂交。