

Chapter 3 Nucleic Acids Chemistry (8h)

【教学目的】

通过本章教学，使学生掌握核苷酸的结构、成分和连接键；核酸中核苷酸的连接方式；DNA 和 RNA 的结构。熟悉 RNA 的种类与功能；信使 RNA 和转运 RNA 的结构特点；核酸的理化性质以及 DNA 的变性、复性概念和特点。了解核酸的分布和功能；限制性内切酶的作用特点以及 DNA 结构的多样性。

【重点难点】

重点：核酸、核苷酸的概念；核酸一级结构的概念及其重要性；DNA 双螺旋结构；核酸的变性与复性；RNA 的结构与功能。

难点：碱基的化学结构；核苷酸的连接方式； T_m 及其影响因素；核酸的拓扑性质以及提取、分离和鉴定。

【教学内容】

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)”, 即今天我们所说的脱氧核糖核蛋白, 其中脱氧核糖核酸的含量为30%。
 - (2) 1889 年Altman等人又从酵母和动物的细胞核中得到了不含蛋白质的核酸, 并建议将“核质”改名为“核酸”, 因为已经认识到“核质”乃“核酸”与蛋白质的复合体。
 - (3) 1944年, O.T.Avery 等人通过细菌转化实验证明核酸是遗传物质。
- 目前,核酸的研究已成为生物学研究中最活跃的一个领域,是最重要的生物大分子。

第一节 核酸的重要性(Importance of Nucleic Acids)

They play very important role during organism living activate such as growth , development, reproducing, heredity and variation.

So it can also say that there is no life without nucleic Acids.

第二节 核酸的分类及其在细胞内的分布 (Classification and distribution of nucleic acid)

I. Classification of Nucleic Acids

Nucleic acids are grouped into two types nucleic acid :

ribonucleic acid (核糖核酸, RNA) and deoxyribonucleic acid (脱氧核糖核酸, DNA)

There are three types of RNA: Messenger RNA, mRNA

Ribosome RNA, rRNA

Transfer RNA, tRNA

一些次要类型的 RNA:

- ①hnRNA(核内不均一 RNA, mRNA 剪接前体);
- ②snRNA(核内小 RNA, 富含经修饰的尿嘧啶残基, 参与内含子的剪切及其加工过程);

- ③ iRNA (起始 RNA, 在 DNA 合成中作为滞后链合成引物的短 RNA 片段); scRNA (胞质内小 RNA,
 ④ 端粒酶 RNA;
 ⑤ 核酶(具有催化功能的RNA分子)等。

II. Distribution of Nucleic Acids

In eukaryotes, DNA mainly exists in nucleus (more than 98%);

In prokaryotes, DNA exists in nucleoid (拟核区). Every prokaryotic cell only contains one chromosome (染色质), which is double-strand circular DNA molecule.

In addition, It also contain plasmid DNA (质粒DNA)

Viruses consist nucleic acid (DNA or RNA) coated with protein.

RNA mainly exists in the cytosol (90%), the other 10% in nucleus.

III. Functions of nucleic acids:

1. DNA is main matter of heredity;

2. RNA takes part in the process of protein synthesis,

Messenger RNA, mRNA: 5% of total RNA, as template of protein synthesis.

Ribosome RNA, rRNA: 80%, combine with protein to form ribosome at which proteins are synthesized.

Transfer RNA, tRNA: 15%. Transfer activated amino acid during protein synthesis.

3. Diversity function of RNA.

第三节 核酸的组成成分 (Components of Nucleic Acids)

The composition of Nucleic acid

Nucleic acids are constitute of nucleotides(核苷酸);

Nucleotide can be degraded into nucleoside (核苷) and phosphate;

Nucleoside can be further degraded into base(碱基)and pentose (戊糖).

1. Pentose (ribose and deoxyribose)

In RNA, there are pentoses which are β -D-ribose

In DNA, there are pentoses which are β -D-2-deoxyribose.

2. Base(purines and pyrimidines)

There are two types of base. they are purines and pyrimidines.

Purines include Adenine(腺嘌呤), Guanine (鸟嘌呤)

pyrimidines include Cytosine(胞嘧啶), Thymine(胸腺嘧啶) and Uracil(尿嘧啶).

Both DNA and RNA have 4 bases.

DNA: A, G, C and T

RNA: A, G, C and U

There are also some rare base (modified base), they mainly exist in RNA.

3. Nucleosides (核苷)

the C1-atom of Ribose or deoxyribose is linked with N9-atom of purine or N1-atom of pyrimidine via C-N glycosylic bond (C-N糖苷键)(β -type)

4. Nucleotides (核苷酸)

A nucleotide is a phosphate ester of a nucleoside. It consists of a phosphate group joined to a

In DNA, the nucleotides have deoxyribose as the sugar and hence are called deoxynucleotides.
In RNA, the nucleotides called nucleotides.

Rare nucleotides (稀有核苷酸)

第四节 脱氧核糖核酸 (DNA)

I. Primary Structure of DNA

DNA的一级结构是组成DNA分子的脱氧核苷酸的连接方式和排列顺序。

DNA是由很多个dAMP、dGMP、dCMP和dTMP通过3',5'-磷酸二酯键连成的无分支双链线状或环状多核苷酸。

DNA分子中链骨架是固定不变的,脱氧核糖核苷酸的排列顺序实质上是碱基的排列顺序。

RNA分子与DNA分子的区别只在一个碱基, T vs U, 但就这点区别, RNA分子的化学性质比DNA活泼得多。

核酸链的简写式: 核酸分子的简写式可简明表示高度复杂的核酸分子。

简写式表示的是核酸分子的一级结构, 即核酸分子中的核苷酸(或碱基)排列顺序。

书写方式由5' → 3'端。

简写式: 5'pApCpTpTpGpApApCpG3' DNA

5'pApCpUpUpGpApApCpC3' RNA

简化为: 5'pACTTGAACG3' DNA

5'pACUUGAACG3'RNA

II. Secondary Structure of DNA——DNA double helix (DNA双螺旋结构)

1953年, Watson和Crick发现了DNA的双螺旋结构, 他们与Wilkins因此分享了1962年的诺贝尔医学奖。

插入故事: 1951年, 人们已经知道了脱氧核糖核酸(DNA)可能是遗传物质, 但是对于DNA的结构, 以及它如何在生命活动中发挥作用的机制还不甚了解。Franklin在法国学习的X射线衍射技术, 她成功地拍摄了DNA晶体的X射线衍射照片。此时, Watson和Crick也在剑桥大学卡文迪许实验室进行DNA结构的研究, Watson在美国本来是在微生物学家指导下从事噬菌体遗传学研究的, 他们希望通过噬菌体来搞清楚基因如何控制生物的遗传。派他出国学习并没有生硬地规定课题, 甚至他从一个国家的实验室到另一个国家的实验室也能得到导师的支持或谅解。当他听了Wilkins的学术报告, 看到DNA的X射线衍射图片后, 认定一旦搞清DNA的结构, 就能了解基因如何起作用。于是他不等批准, 就决定先斩后奏从丹麦去伦敦学习X射线衍射技术了。至于Crick, 他是个不拘小节又相当狂妄的聪明人, 不太受“老板”Bragg欢迎, 甚至一度有可能被炒鱿鱼。但是, 当因为学术问题引起的误会消除后, 老板照样关心他的工作, 在那篇划时代的论文写成后, Bragg认真修改并热情地写信向《Nature》推荐。这种现象在一个以学术为重的研究机构应该是正常的。人际关系对研究事业的干扰是轻微的。

Watson擅自选择, 后来和Crick一起在那里做出划时代贡献的研究机构, 在当时已经是一个闻名全球的单位——英国剑桥大学卡文迪许实验室。这个实验室创立于1874年, 麦克斯威尔、卢瑟福、玻尔等一批物理学大师都在这里工作过。创立至今, 先后造就了近30

位诺贝尔奖获得者。早在 20 世纪初,物理学家汤姆森领导这个实验室时,就形成了一个“Tea Break”习惯,每天上午和下午,都有一个聚在一起喝茶的时间,有时是海阔天空的议论,有时是为某个具体实验设计的争论,不分长幼,不论地位,彼此可以毫无顾忌地展开辩论和批评。在卡文迪许实验室里, Watson 遇到了物理学家 Crick, 又得到机会向 Wilkins、Franklin 等 X 射线衍射专家学习, 还有包括著名蛋白质结构专家的儿子在内一批科学家和他经常交换各种信息和意见, 又得到实验室主任 Bragg 等老一辈的指导和鼓励, 这些都是他取得成就的重要因素。而直接导致 Watson 集中精力从事 DNA 结构研究的契机, 则是他得到美国主管部门资助去参加在拿不勒斯召开的学术会议, 在那里他看到了 Wilkins 的 X 射线衍射图片。创新者必须破除迷信, 敢于向权威挑战。1953 年的 Watson 和 Crick 都是名不见经传的小人物, 37 岁的 Crick 连博士学位还没有得到。受到前人的影响, 他们原来按照 3 股螺旋的思路进行了很长时间的的工作, 可是既构建不出合理模型, 也遭到结晶学专家 Franklin 的强烈反对, 结果使工作陷于僵局。在发现正确的双股螺旋结构前 2 个月, 他们看到蛋白质结构权威 Pauling 一篇即将发表的关于 DNA 结构的论文, Pauling 错误地确定为 3 股螺旋。Watson 在认真考虑并向同事们请教后, 决然地否定了权威的结论。正是在否定权威之后, 他们加快了工作, 在不到两个月内终于取得了后来震惊世界的成果。

Wilkins 在 Franklin 不知情的情况下给他们看了那张照片。根据照片, 整日焦虑于 DNA 结构发现的 Watson 和 Crick 立即领悟到了现在已经成为众所周知的事实——两条以磷酸为骨架的链相互缠绕形成了双螺旋结构, 氢键把它们连结在一起。他们在 1953 年 5 月 25 日出版的英国《Nature》杂志上报告了这一发现。双螺旋结构显示出 DNA 分子在细胞分裂时能够自我复制, 完善地解释了生命体要繁衍后代, 物种要保持稳定, 细胞内必须有遗传属性和复制能力的机制。这是生物学的一座里程碑, 分子生物学时代的开端, 怎样评价其重要性都不过分。

(1) DNA 双螺旋结构的主要依据

- ① 1949-1951 年 Chatgaff 应用紫外分光光度法和纸层析等技术, 对不同来源的 DNA 进行碱基定量分析, 得出组成 DNA 四种碱基的比例关系。
- ② Wilkins 及其同事 Franklin 等用 X-射线衍射方法获得的 DNA 结构资料。
- ③ 用电位滴定法证明 DNA 的磷酸基可以滴定, 而嘌呤和嘧啶的 -NH、-CO 则不能滴定, 因此它们之间形成氢键。

(2) The character of DNA double helix structure

- ① 主链(backbone): 脱氧核糖和磷酸基通过酯键交连接成反向平行的两条主链, 它们绕一共同轴心向右盘旋形成双螺旋构型, 主链处于螺旋的外侧。
- ② 碱基对(base pair): 碱基位于螺旋的内侧, 它们以垂直于螺旋轴的取向。同一平面的碱基在二条主链间形成碱基对, A-T、G-C 间以氢键连接。
- ③ 结构参数: 螺旋直径 2nm; 螺旋周期包含 10bp; 螺距 3.4nm; 相邻碱基对平面的间距 0.34nm。
- ④ 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。双螺旋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。

(3) The factors of keeping the DNA double-helix stable (双螺旋结构的稳定因素)

DNA结构稳定的最主要因素是碱基堆积力。层层堆积的芳香族碱基上的 π 电子云交错形成了碱基堆积力, 使DNA双螺旋结构内部形成疏水核心而不存在游离的水分子, 有利于互补碱基间形成氢键。

双螺旋外侧带负电荷的磷酸基团同带正电荷的阳离子之间形成的离子键可减少双链间的静电斥力, 因而对DNA双螺旋结构也有一定的稳定作用。

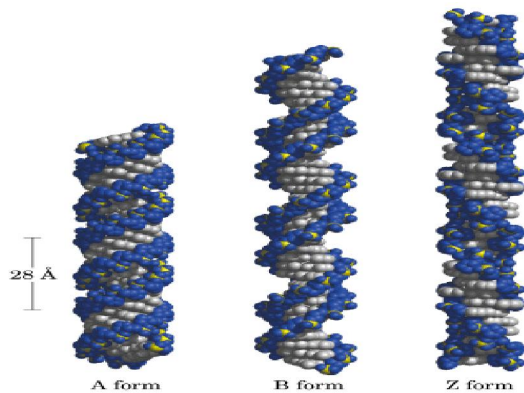
(4) Significance of DNA double-helix

- ①确立了核酸作为信息分子的结构基础;
- ②提出了碱基配对是核酸复制、遗传信息传递的基本方式;
- ③确定了核酸是遗传的物质基础, 为认识核酸与蛋白质的关系及其在生命中的作用奠定了基础。

(5) Polymorphism of DNA double-helix (DNA 双螺旋构象的多态性)

Watson and crick 所描述的DNA双螺旋构象现在称为B型DNA, 是以相对湿度为92% 时的DNA 钠盐纤维为对象研究得出的。

DNA还有其它构象类型。



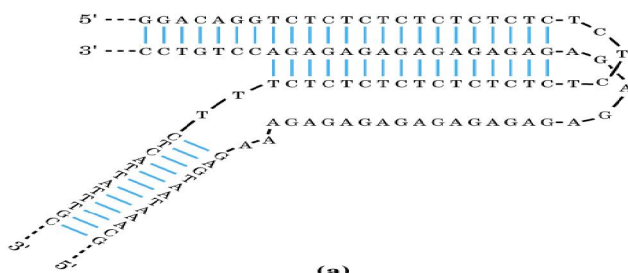
DNA二级结构的多态性的发现拓宽了人们的视野。

生物体中最为稳定的遗传物质也可以采用不同的姿态来实现其丰富多采的生物的奥妙。

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, 在低pH值条件下, 双链DNA拆开产生的多聚嘧啶链回折, 并嵌入剩下的双链DNA大沟中形成分子内的三链DNA。

(5) 三链DNA (H-DNA)

在三链 DNA中, 位于大沟中的多聚嘌呤链与双链DNA中的多聚嘌呤链成平行走向, 碱基按照Hoogsteen方式配对形成TAT, CGC三联体。



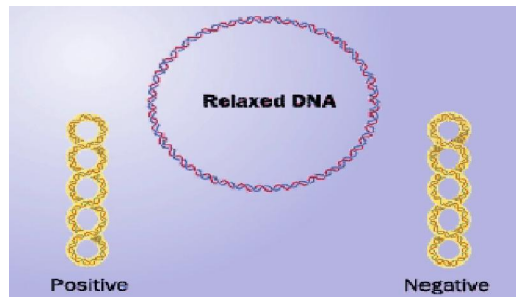
(a)

作用：与基因表达有关，第三股链可能阻碍一些调控蛋白或RNA聚合酶与DNA结合。

III. Tertiary structure of DNA——supercoil (DNA的三级结构——超螺旋)

Since DNA interact with other molecules such as proteins in cells, the DNA double helix wound further to form supercoil(超螺旋).

Positive and negative supercoiling (正超螺旋和负超螺旋) .



第五节 核糖核酸 (RNA)

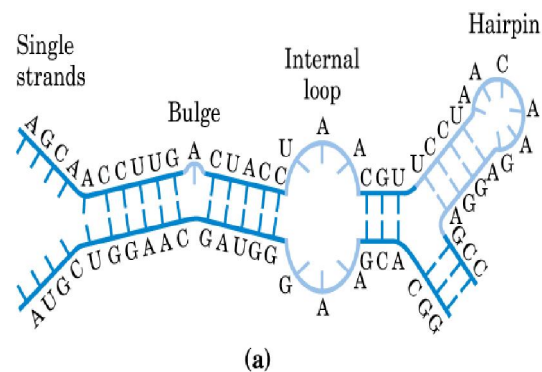
I. Primary Structure of RNA

Similar to the primary structure of DNA.

II. Secondary Structure of RNA 的构象

Despite being single-stranded, RNA molecules often exhibit a great deal of double-helical character.

This is because RNA chains frequently fold back on themselves to form basepaired segments between short stretches of complementary sequences.

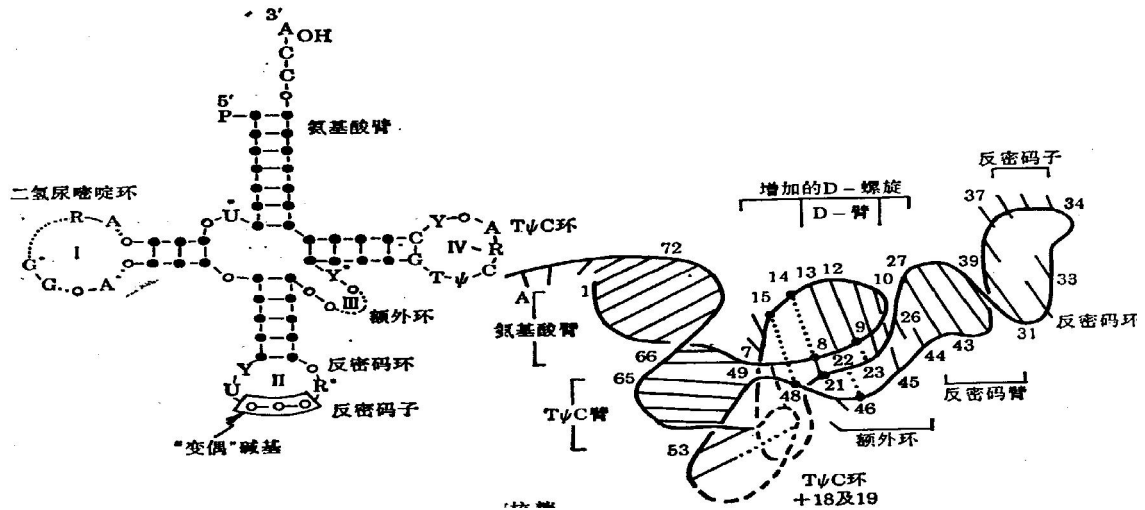


1. Transfer RNA

二级结构是三叶草形，三级结构为倒L形。

tRNA 的功能：

转运氨基酸、识别密码子、参与翻译起始、参与 DNA 的反转录、参与基因表达调控。



2. rRNA 的结构

	小亚基	大亚基			转录单位
原核	16	5	23		30
真核	18	5 (单独转录)	28	5.8	5 + 45

rRNA 的功能:

组成核糖体、催化肽键形成的转移酶活性存在于 23SrRNA 上、参与 tRNA 与 mRNA 的结合。

3. mRNA 的结构

原核: 多顺反子 (polycistronic mRNA)

真核: 单顺反子, 断裂基因 (splited gene)



(a) Monocistronic



(b) Polycistronic

真核 mRNA 的结构:

5' -帽子: m7G 5' -ppp5' -Nm (Nm) p-

3' 一端有一段约 30-300 核苷酸的 polyA。

第六节 核酸的性质 (Characters of Nucleic Acids)

一、一般性质 (General Characters)

1. 溶解性

DNA 和 RNA 都是极性分子, 所以都微溶于水而不溶于非极性的有机化合物常, 因此用有机溶剂 (如乙醇、异戊醇等) 来沉淀核酸。

溶解度在 pH4. 2 时最低, RNP 的溶解度在 pH 为 2—2. 5 时最低。

2. 酸碱解离

核苷酸与核酸中的磷酸具有酸性, 嘌呤和嘧啶 (尿嘌呤和胸腺嘧啶除外) 又具有弱碱性, 所以核苷酸和核酸属于两性电解质。

3. Hydrolysis of Nucleic Acids:

(1) Hydrolysis by Acid:

对酸的敏感性: 糖苷键 > 磷酸酯键 嘌呤糖苷键 > 嘧啶糖苷键

利用酸水解可以研究核酸的碱基组成

(2) Hydrolysis by Base:

RNA的磷酸酯键对碱敏感, 室温, $0.3 \sim 1 \text{ mol/L}$ KOH, 24h, 可将RNA完全水解。

DNA抗碱水解

生理意义: DNA更稳定, 遗传信息。RNA是DNA的信使, 完成任务后迅速降解。

二、核酸的紫外吸收(UV Absorption)

嘌呤和嘧啶碱基环上的许多原子参与共振, 都含有共轭双键, 所以有强烈的紫外光吸收性质。

核酸的最大吸收波长在 260nm 左右, 所以利用吸收光谱检测核酸时选用 260nm 的紫外光。

(1) 鉴定纯度

纯 DNA 的 A_{260}/A_{280} 应为 1.8 (1.65-1.85)

纯 RNA 的 A_{260}/A_{280} 应为 2.0。

若溶液中含有杂蛋白或苯酚, 则 A_{260}/A_{280} 比值明显降低。

(2) 含量计算

1 ABS 值相当于: 50ug/mL 双螺旋 DNA

或: 40ug/mL 单链 DNA (或 RNA)

或: 20ug/mL 寡核苷酸

(3) 判断 DNA 是否变性

在 DNA 的变性过程中, 摩尔磷吸光系数增大 (增色效应)

在 DNA 的复性过程中, 摩尔磷吸光系数减小 (减色效应)

增色效应 (hyperchromic effect) 是变性后 DNA 溶液的紫外吸收作用增强的效应。

变性后 DNA 在 260nm 下的紫外吸收光密度的观测值通常较变性前有明显增加。

三、核酸的沉降特征(Sedimentation Traits)

不同构象的核酸 (线形、环形、超螺旋), 密度和沉降速率不同, 用 Cs-Cl 密度梯度离心可以将不同构象 DNA、RNA 与蛋白质区分开来。

密度梯度超速离心研究核酸的构象:

RNA > DNA、变性 DNA > 双链 DNA > 蛋白质、变性程度越大, 浮力密度越大。

四、核酸的变性、复性及杂交 (Denaturation、Renaturation and Hybridization of Nucleic Acid)

1. DNA 的变性 (denaturation)

变性是 DNA 分子由稳定的双螺旋结构松解为无规则线性结构的现象。即维持双螺旋稳定性的氢键和疏水键的断裂。变性不涉及到其一级结构的改变。

变性导致 DNA 一些理化及生物学性质改变: 变性 DNA 溶液粘度降低: DNA 双螺旋是紧密的“刚性”结构, 变性后变成“柔软”而松散的无规则单股线性结构, DNA 粘度因此而明显下降。

热变性使 DNA 分子双链解开所需温度称为熔解温度 (melting temperature, 简写 T_m)。

热变性是在很狭的温度范围内突发的跃变过程，很像结晶达到熔点时的熔化现象，故名熔解温度。

与 T_m 变化有关的因素：

(1) DNA 的均一性

变性的 DNA 链各部分的氢键断裂所需能量较接近， T_m 值范围较窄，反之亦然。

样品 DNA 的组成是否均一：如样品中只含一种病毒 DNA， T_m 值范围较窄，若混杂其它 DNA，则 T_m 值范围较宽。原因也与 DNA 的碱基组成有关。

DNA 分子中碱基组成的均一性：如人工合成的只含有一种碱基对的多核苷酸片段，比天然 DNA 的 T_m 值范围窄。因它在变性时的氢键断裂几乎可“齐同”进行，故要求的变性温度更趋于一致。

(2) DNA 的 (G+C) 含量不同生物中 (G+C) 含量可从 20% ~ 80%。

T_m 值的高低取决于 DNA 分子中的 (G+C) 的含量。(G+C) 含量越高， T_m 值越高。

G-C 碱基对有 3 对氢键，A-T 碱基对有 2 对氢键，DNA 中 (G+C) 含量高能增强结构的稳定性，破坏 G-C 间氢键需比 A-T 氢键付出更多的能量，故 (G+C) 含量高的 DNA，其变性 T_m 也高。

(3) 一定离子强度下 (DNA 溶于 0.2mol/L NaCl)：

T_m 与 (G+C) 含量 (X) 的关系可用经验公式表示： $X\% (G+C) = 2.44 (T_m - 69.3)$

$$T_m = 69.3 + 0.41 (\%G+C)$$

2. DNA 的复性 (renaturation)

变性 DNA 在适当条件下，二条互补链全部或部分恢复到天然双螺旋结构的过程。

热变性 DNA 一般经缓慢冷却后即可复性，此过程称之为“退火” (annealing)。

一般认为比 T_m 低 25℃ 左右的温度是复性的最佳条件，越远离此温度，复性速度就越慢。在很低的温度 (如 4℃ 以下) 下，分子的热运动显著减弱互补链结合的机会自然大大减少。维持在 T_m 以下较高温度，更有利于复性。

复性时温度下降必须是一缓慢过程，若在超过 T_m 的温度下迅速冷却至低温 (如 4℃ 以下)，复性几乎是及不可能的，核酸实验中经常以此方式保持 DNA 的变性 (单链) 状态。

复性过程受很多因素的影响：

- ① 序列简单的 DNA 分子比复杂的分子复性要快。
- ② DNA 浓度越高，越易复性；
- ③ DNA 片段越大，复性越慢。
- ④ 具有重复序列的 DNA，复性快。
- ⑤ 来源相同的 DNA 复性快。

复性的反应速度用 $Cot_{1/2}$ 来衡量， C_0 为变性 DNA 复性时的初始浓度， t 为时间。 $Cot_{1/2}$ 表示复性一半的 Cot 值。

对于原核生物核酸分子， $Cot_{1/2}$ 可代表基因组的大小及基因组中核苷酸对的复杂程度。

真核基因组中因含有许多不同程度的重复序列 (repetitive sequence)，所得到的 Cot 曲线很复杂。

3. 核酸分子杂交 (Hybridization of Nucleic Acid)

分子杂交是应用核酸分子的变性和复性的性质,使两条来源不同的具有一定同源性(即具有碱基互补关系)的DNA单链分子或DNA单链分子与RNA分子经退火形成双链DNA分子或DNA-RNA异质双链分子(heteroduplex)的过程。

杂交双链可以在DNA与DNA链之间,也可在RNA与DNA链之间形成。

五、核酸的酶解及 DNA 的限制性内切酶 (Enzymatic Hydrolyses of Nucleic Acids and Restriction Endonucleasa)

非特异性水解磷酸二酯键的酶为磷酸二酯酶 (phosphodiesterase)

专一性水解核酸的磷酸二酯酶称为核酸酶

核酸酶的分类

按底物专一性分类: 核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 和 脱氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease, DNase)

按对底物作用的方式: 核酸内切酶 (endonuclease) 和 核酸外切酶 (exonuclease)

按磷酸二酯键断裂方式: 产生3' - 磷酸 或 5' - 磷酸

第七节 生物体内某些重要的核酸衍生物 (Ramification)

一、ATP、GTP、CTP、UTP

二、cAMP、cGMP

三、NAD⁺、NADP⁺、FMN、FAD

【思考题】

- 1、列表说明 DNA 和 RNA 在化学组成、分子结构和生物学功能方面的特点
- 2、DNA 双螺旋结构的特点是什么? 碱基配对规律在生命科学中有什么意义?
- 3、RNA 的主要类型及功能特点
- 4、简述核酸变性、复性过程以及影响 T_m 和复性速度的主要因素
- 5、简述 DAN 双螺旋结构的稳定因素
- 6、What is the role of ATP in living system?