

第二章 核酸的化学

核酸的性质与 研究方法



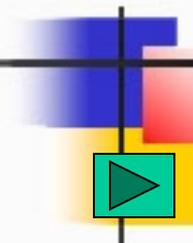
第二章 核酸的化学



§ 4 核酸的理化性质



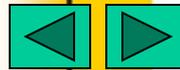
§ 5 核酸的分离纯化、测定 及研究方法



§ 2.6 核酸的理化性质



核酸的性质是由其结构决定的。核酸的结构特点是分子大, 有一些可解离的基团, 具有共轭双键等. 这些特点决定了核酸及其组分核苷酸性质的基础. 下面介绍几种重要的性质:



§ 2.6 核酸的理化性质



一、物理性质

1、性状：

RNA及其组分核苷酸、核苷、嘌呤碱、嘧啶碱的纯品都呈白色粉末或结晶；

DNA则为疏松石棉一样的纤维状固体。

2、粘性：核酸的水溶液粘度很大，

粘度DNA大于RNA。

核酸变性后，粘度下降。



§ 4 核酸的理化性质



3、溶解性： RNA和DNA都是极性的化合物，一般说来，这些化合物都微溶于水，不溶于乙醇、乙醚、氯仿等有机溶剂。它们的钠盐易溶于水。 DNA和RNA在生物细胞内都与蛋白质结合成核蛋白。DNA核蛋白与RNA核蛋白的溶解度受溶液的**盐浓度**的影响而不同。DNA蛋白在低浓度的盐溶液中随盐浓度的增加而增加；而RNA蛋白在盐溶液中其溶解度受盐浓度的影响较小。



§ 4 核酸的理化性质

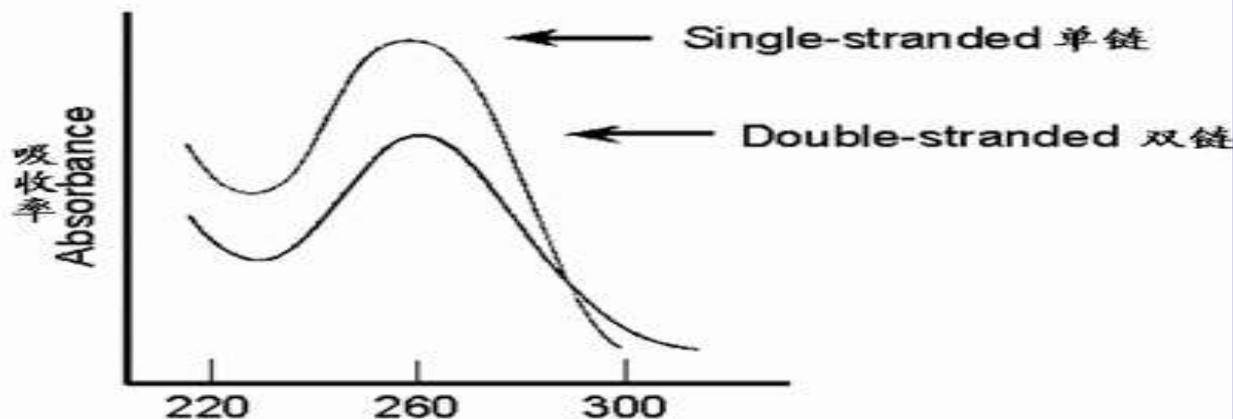


二、核酸的紫外吸收性质：

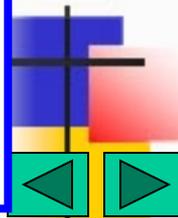
核酸分子中含有嘌呤碱和嘧啶碱，因而具有紫外吸收的性质，在260nm处核酸紫外吸收最强。核酸紫外吸收是核酸定量测定的基础。

核酸的紫外吸收

- hyperchromicity 增色效应



当双链DNA变性“融化”为单链DNA时，260nm的紫外吸收值增加
The absorbance at 260 nm of a DNA solution increases when the double helix is melted into single strands.



OD₂₆₀的应用

1. DNA或RNA的定量

OD₂₆₀=1.0相当于

50 μg/ml双链DNA

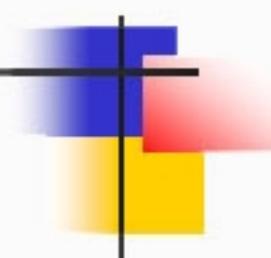
40μg/ml单链DNA（或RNA）

20μg/ml寡核苷酸

2.判断核酸样品的纯度

DNA纯品: OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.8

RNA纯品: OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 2.0



§ 4 核酸的理化性质



三、核酸结构的稳定性

核酸的结构相当稳定, 其主要原因有:

1、碱基对间的氢键

在DNA双螺旋和RNA的双螺旋区, 碱基对的大小使其在螺旋内的距离很适合于形成氢键。

2、碱基堆积

碱基堆积力对维持核酸的空间结构起主要作用。

3、环境中的正离子



§ 4 核酸的理化性质



四、核酸的两性电离与等电点

核酸的磷酸基具有酸性，碱基具有碱性，因此，核酸具有**两性电离的性质**。但核酸中磷酸基的酸性大于碱基的碱性，其等电点偏酸性。DNA的pI约为4~5，RNA的pI约为2.0~2.5，**在pH7~8电泳时泳向正极**。



§ 4 核酸的理化性质

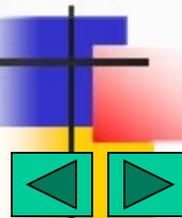


五、DNA的变性、复性与分子杂交

DNA双螺旋结构模型，不仅与其生物功能有密切关系，还能解释DNA的重要特性变性与复性，这对于深入了解DNA分子结构与功能的关系又有重要意义。

(一) DNA变性(denaturation)

1、**DNA变性的概念**：指DNA分子中的双螺旋结构解链为无规则线性结构的现象。



§ 4 核酸的理化性质



- 2、DNA变性的本质：维持双螺旋稳定性的氢键断裂，碱基间的堆积力遭到破坏，但不涉及到其一级结构的改变。
- 3、导致DNA变性的因素：凡能破坏双螺旋稳定性的因素，如加热、极端的pH、有机试剂甲醇、乙醇、尿素及甲酰胺等，均可引起核酸分子变性。



§ 4 核酸的理化性质



核酸的变性

◆ 变性

- 核酸双螺旋区因加热、酸、碱和低离子强度的影响，碱基对折离，双链解开，称为变性。
- 变性不涉及共价键的断裂。
- 磷酸二酯键断裂则为降解。

◆ 变性温度一般在80-100摄氏度

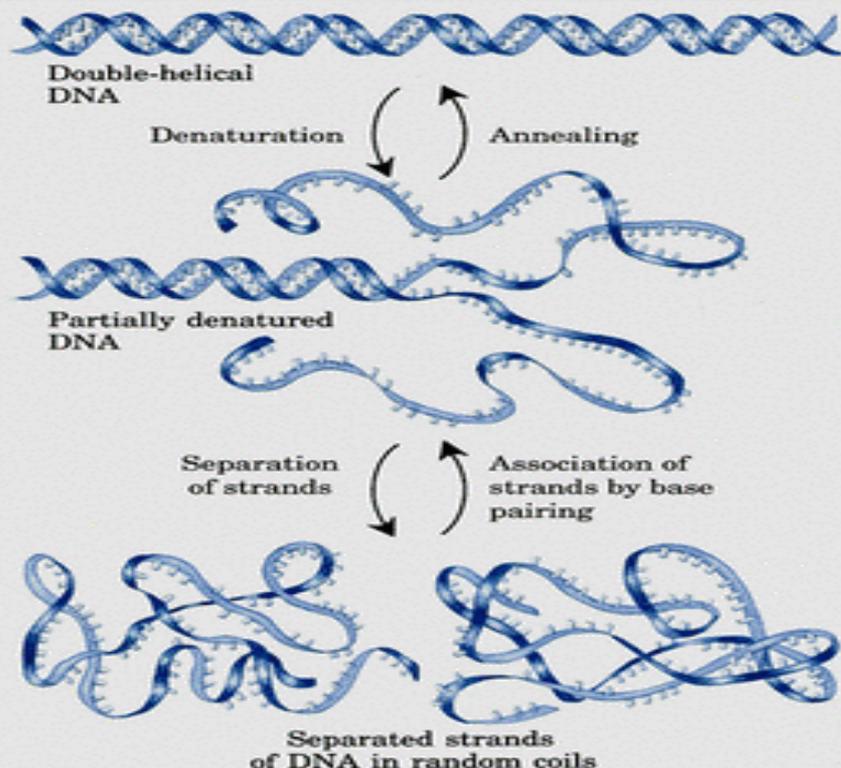
◆ 熔点 (T_m)

- DNA双螺旋结构发生一半变性时的温度

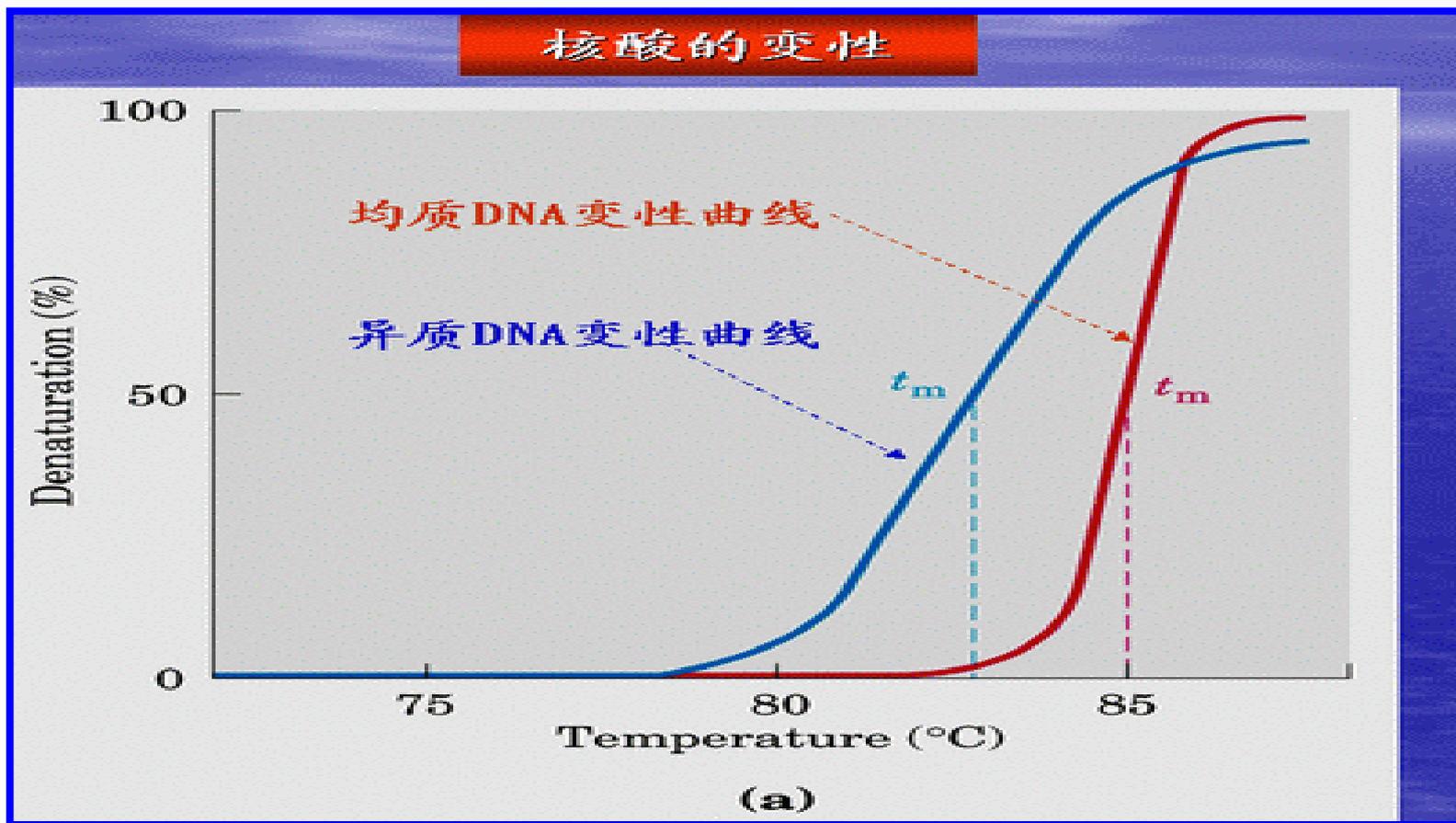
◆ 均质DNA (polydGC、polydAT、病毒DNA) 变性温度范围小，异质DNA变性温度范围大

◆ GC含量越高，熔点越高

- $GC\% = (T_m - 69.3) \times 2.44$



§ 4 核酸的理化性质



§ 4 核酸的理化性质



4、变性DNA的特征：

(1) 溶液粘度降低：DNA双螺旋是紧密的刚性结构，变性后转化成柔软而松散的无规则单股线性结构，因此粘度明显下降。

(2) 旋光性发生变化：变性后整个DNA分子的对称性及分子构型改变，使DNA溶液的旋光性发生变化。

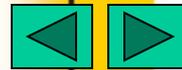


§ 4 核酸的理化性质



(3) 紫外吸收增强

增色效应 (hyperchromic effect): 指DNA变性后其紫外吸收明显增强的效应。DNA分子中碱基间电子的相互作用使DNA分子具有吸收260nm波长紫外光的特性。在DNA双螺旋结构中碱基藏入内侧，变性时DNA双螺旋解开，于是碱基外露，碱基中电子的相互作用更有利于紫外吸收，故而产生增色效应。 ψ



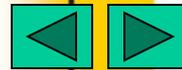
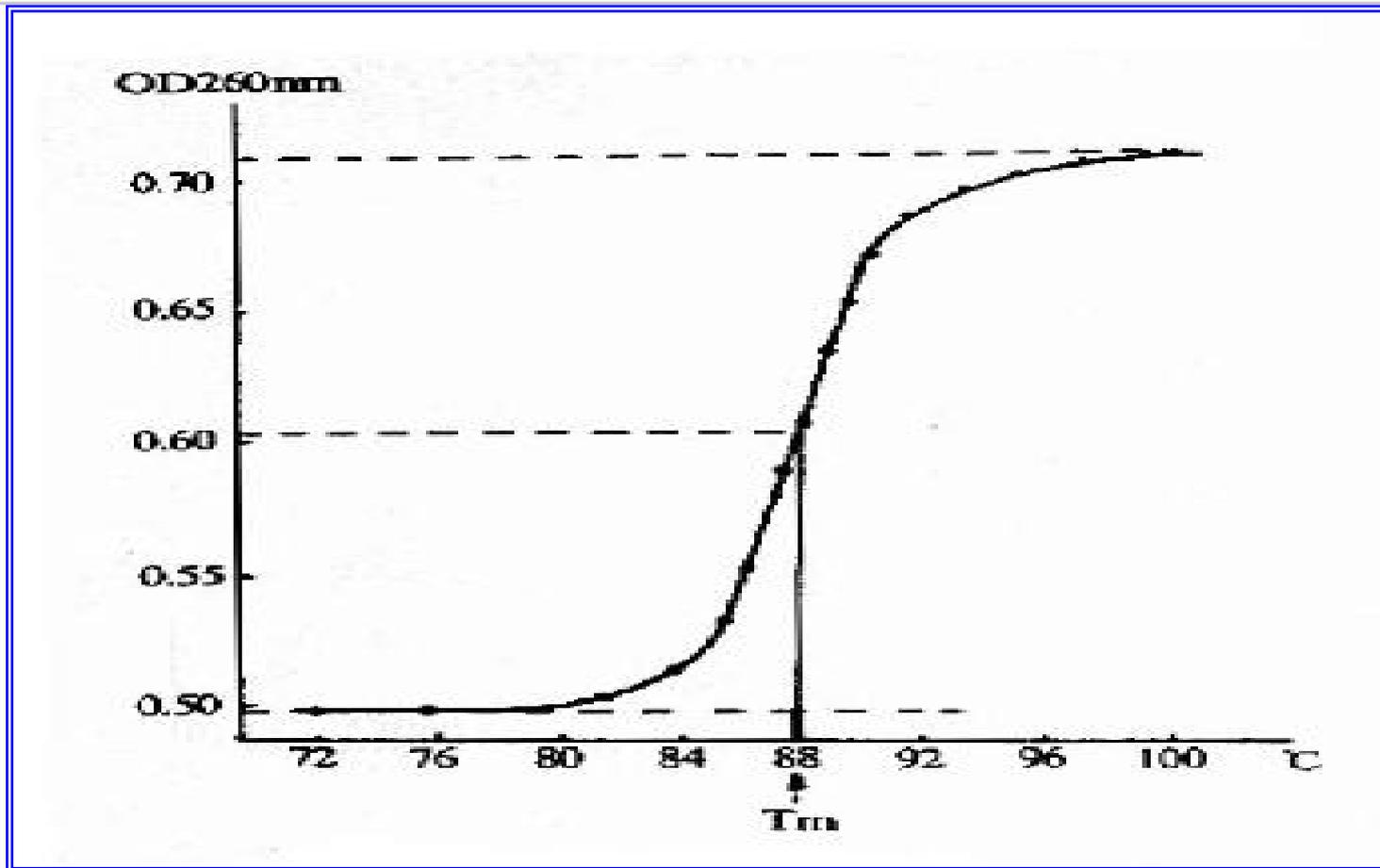
§ 4 核酸的理化性质



可见，DNA变性是在一个很窄的温度范围内发生的。通常将核酸加热变性过程中，紫外光吸收值达到最大值的50%时的温度称为核酸的解链温度，由于这一现象和结晶的融解相类似，又称**融解温度** (T_m , melting temperature)。在 T_m 时，核酸分子内50%的双螺旋结构被破坏。特定核酸分子的 T_m 值与其G+C所占总碱基数的百分比成正相关，两者的关系可表示为： ψ



§ 4 核酸的理化性质



§ 4 核酸的理化性质



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

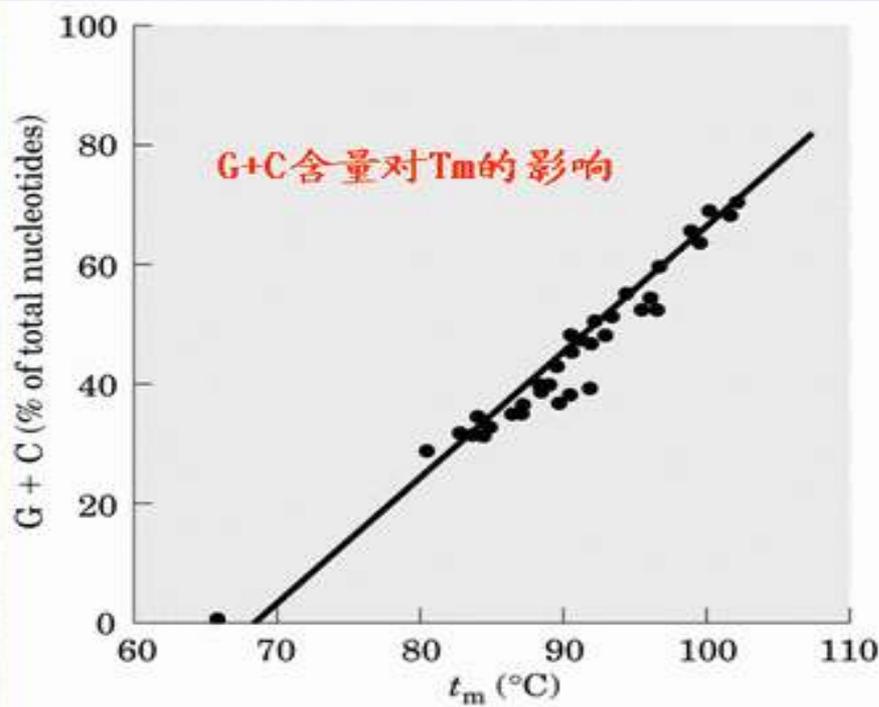
一定条件下(相对较短的核酸分子), T_m 值大小还与**核酸分子的长度**有关, 核酸分子越长, T_m 值越大; 另外, **溶液的离子强度**较低时, T_m 值较低, 融点范围也较宽, 反之亦然, 因此DNA制剂不应保存在离子强度过低的溶液中。



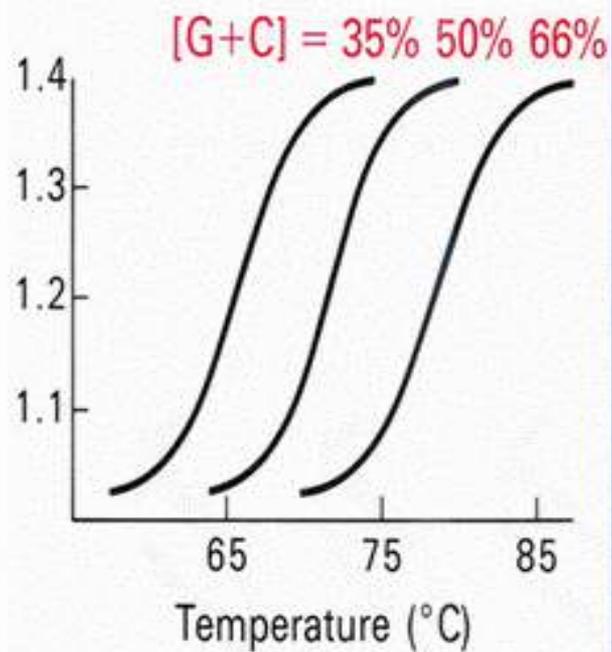
§ 4 核酸的理化性质



核酸的变性



(b)



§ 4 核酸的理化性质

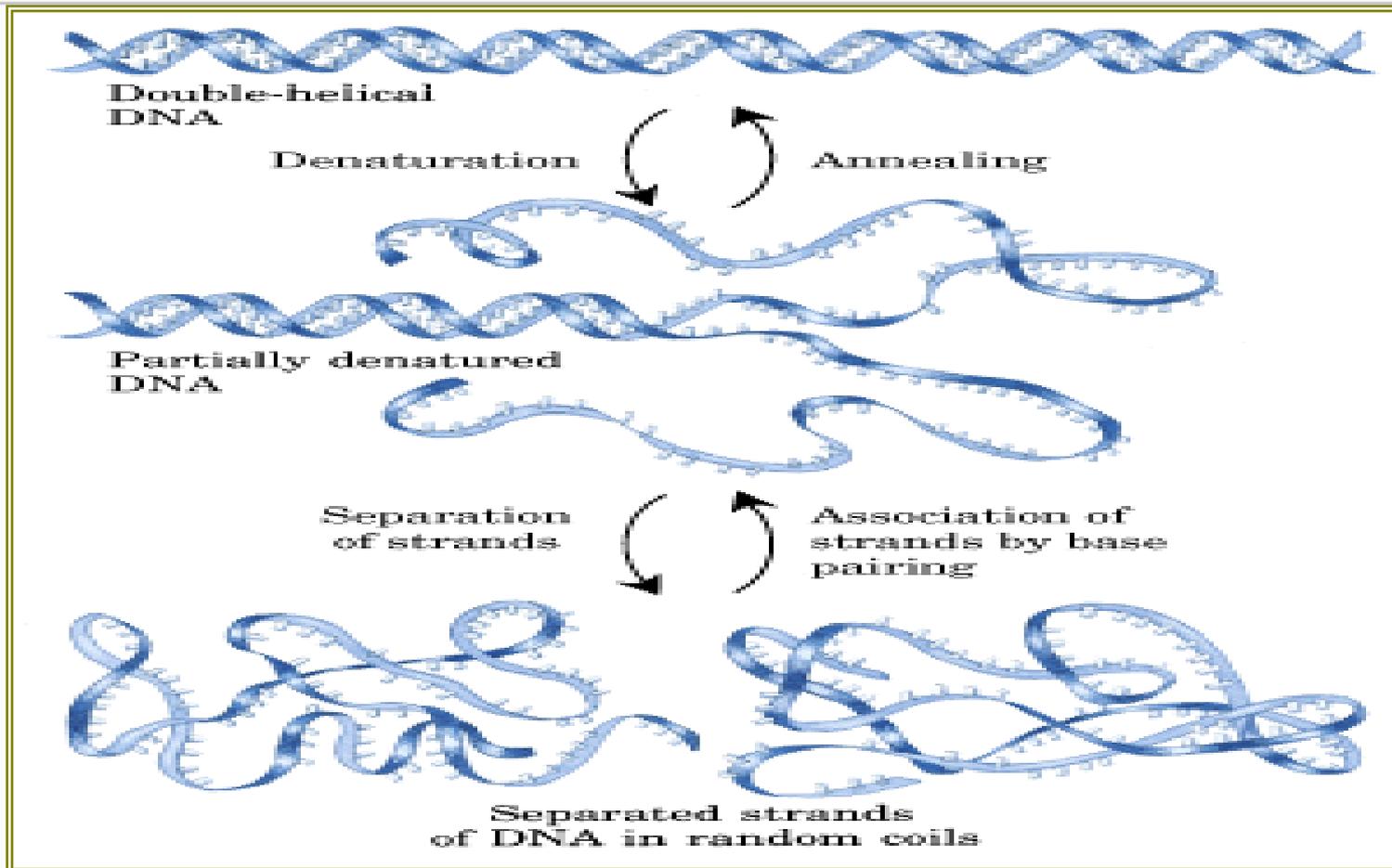


(二) DNA的热变性与复性(renaturation)

指经加热变性的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现象，它是变性的一种逆转过程。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)。这一术语也用以描述杂交核酸分子的形成(见后)。



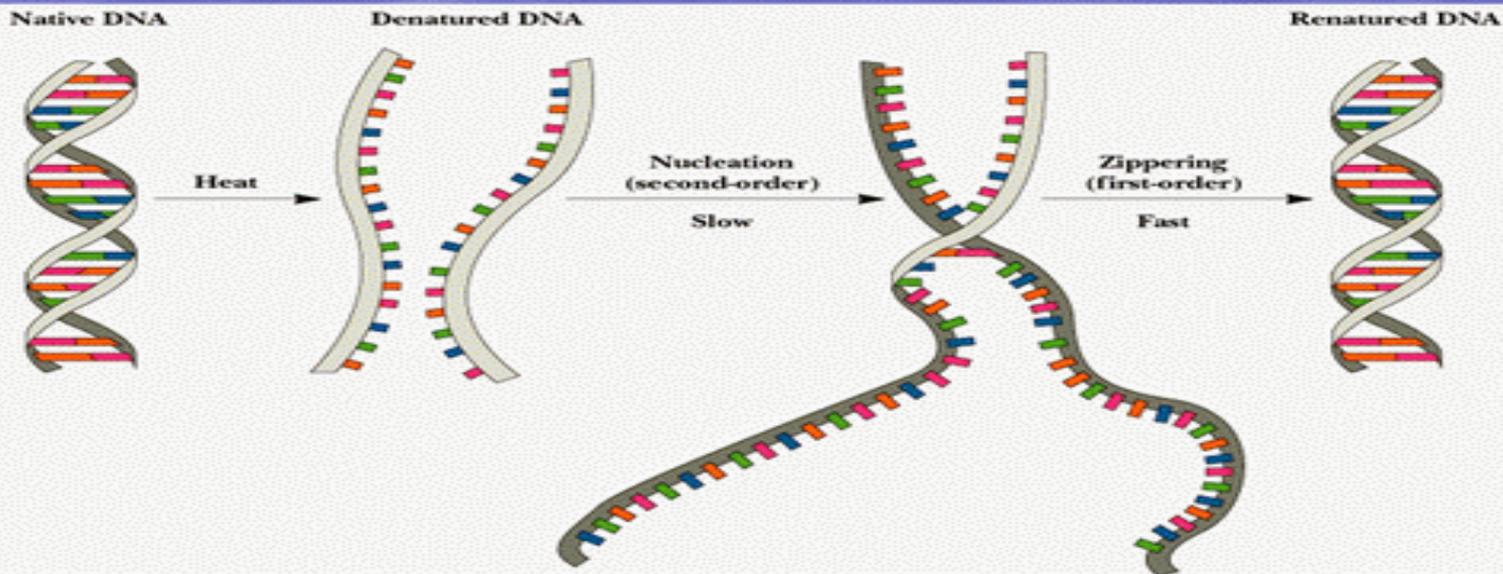
§ 4 核酸的理化性质



§ 4 核酸的理化性质



核酸的复性



- ◆ 去除变性条件后，核酸的两条互补链又恢复双螺旋结构，称为复性或退火。复性温度一般低于变性温度20度，即 $T_a = T_m - 20$ 。
- ◆ 复性动力学可用于测定核酸组分的复杂性。 $C_0t_{1/2} = 1/K$ ，K与复杂性有关。
- ◆ 复性要求缓慢降温，快速降温DNA不复性，依然为不规则线团。



§ 4 核酸的理化性质



DNA的复性不仅受温度影响，还受DNA自身特性等其它因素的影响：

1、温度和时间：

一般认为比 T_m 低 25°C 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。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°C 以下)，复性几乎是不可能的，核酸实验中经常以此方式保持DNA的变性(单链)状态。这说明降温时间太短以及温差大均不利于复性。



§ 4 核酸的理化性质



2、DNA浓度：

溶液中DNA分子越多，相互碰撞结合的机会越大，有利于复性。

3、DNA顺序的复杂性：

➤ 简单顺序的DNA分子，如多聚(A)和多聚(U)这二种单链序列复性时，互补碱基的配对较易实现。而顺序复杂的序列要实现互补，则困难得多。



§ 4 核酸的理化性质



- DNA的变性和复性原理，现已在医学和生命科学上得到广泛的应用。如核酸杂交与探针技术，聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术等。



§ 4 核酸的理化性质



(三) 分子杂交: (hybridization)

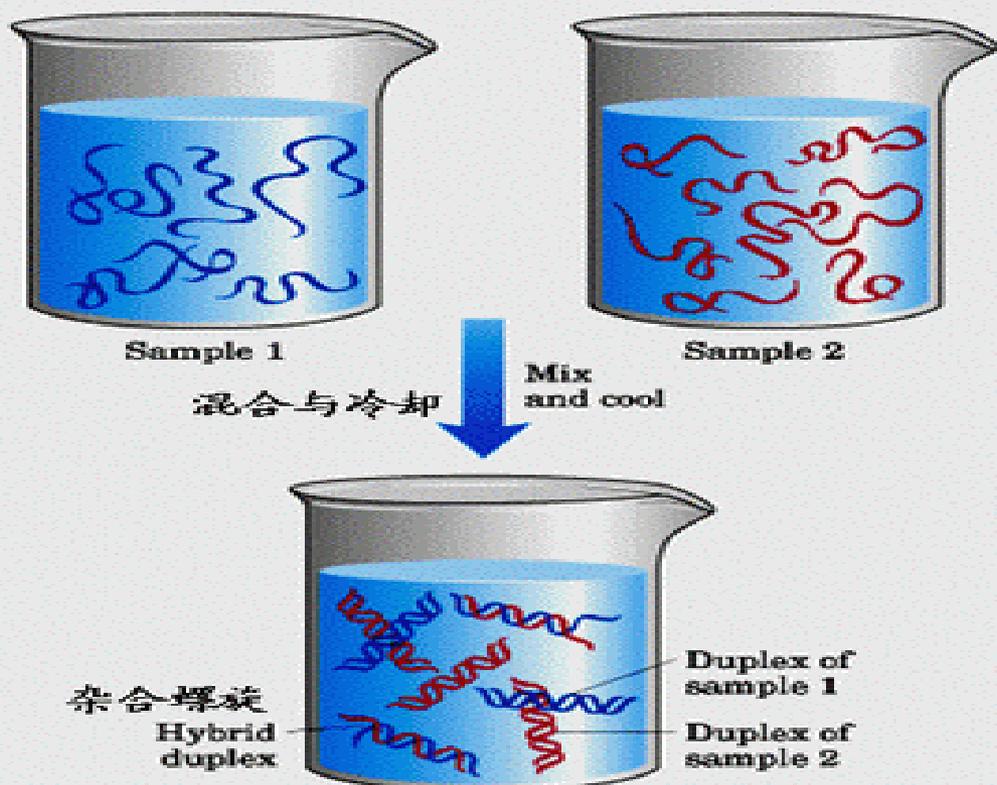
➤ 不同来源的核酸变性后，合并在一处进行复性，这时，只要这些核酸分子的核苷酸序列含有可以形成碱基互补配对的片段，复性也会发生于不同来源的核酸链之间，即形成所谓的**杂化双链** (heteroduplex)，这个过程称为**杂交** (hybridization)。



§ 4 核酸的理化性质



核酸的杂交



核酸探针检测同源DNA限制片段。

◆ Southern印渍法 (Southern blot) 用标记

(hybridization)。

◆ 不同种类核酸形成双链，称为杂交



§ 4 核酸的理化性质



- 杂交可以发生于DNA与DNA之间，也可以发生于RNA与RNA之间和DNA与RNA之间。

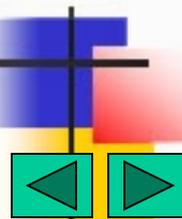
例如，一段天然的DNA和这段DNA的缺失突变体（假定这种突变是DNA分子中部丢失了若干碱基对）一起杂交，电子显微镜下可以看到杂化双链中部鼓起小泡。测定小泡位置和长度，可确定缺失突变发生的部位和缺失的多少。



§ 4 核酸的理化性质



- 核酸杂交技术是目前研究核酸结构、功能常用手段之一，不仅可用来检验核酸的缺失、插入，还可用来考察不同生物种类在核酸分子中的共同序列和不同序列以确定它们在进化中的关系，其主要应用如下图所示：



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/745321343231011233>