

第四节 RNA的结构

北京化工大学
王炳武

RNA的种类

* 细胞质

- * rRNA

- * tRNA

- * mRNA

* 细胞核

- * 迁移性 (hnRNA)

- * 非迁移性：染色质RNA

细胞器

- 线粒体RNA

- 叶绿体RNA

北京化工大学
王炳武

一、RNA的一级结构

- RNA的一级结构指的是多核苷酸链中核糖核苷酸的排列顺序，即多核苷酸链中碱基的排列顺序。

北京化工大学
王炳武

1、tRNA

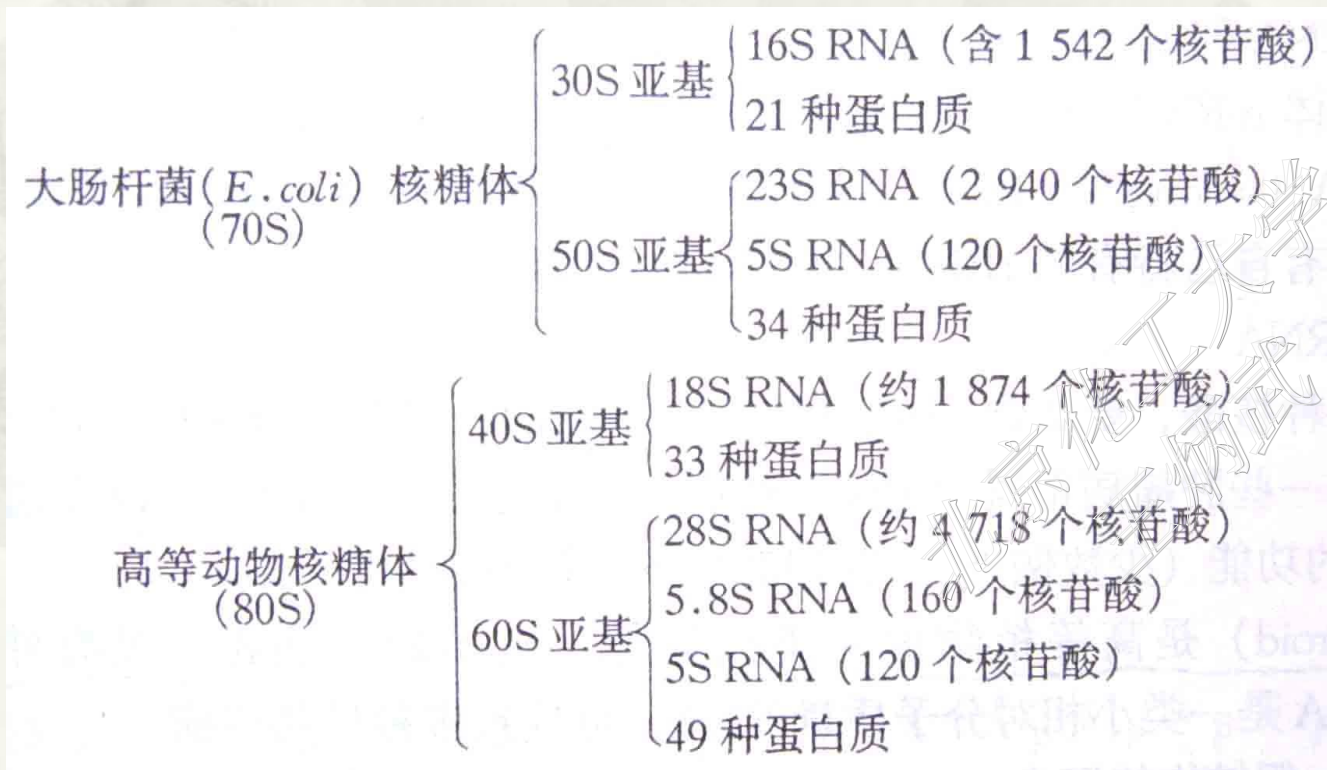
- * 作用：将氨基酸转移到核糖体-mRNA复合物的相应位置，用于蛋白质的合成
- * 相对分子质量最小（70~90个核苷酸残基，分子量2~3万）
- * 占细胞RNA总量的15%
- * 一种氨基酸有一种以上的tRNA

北京化工大学
王炳武

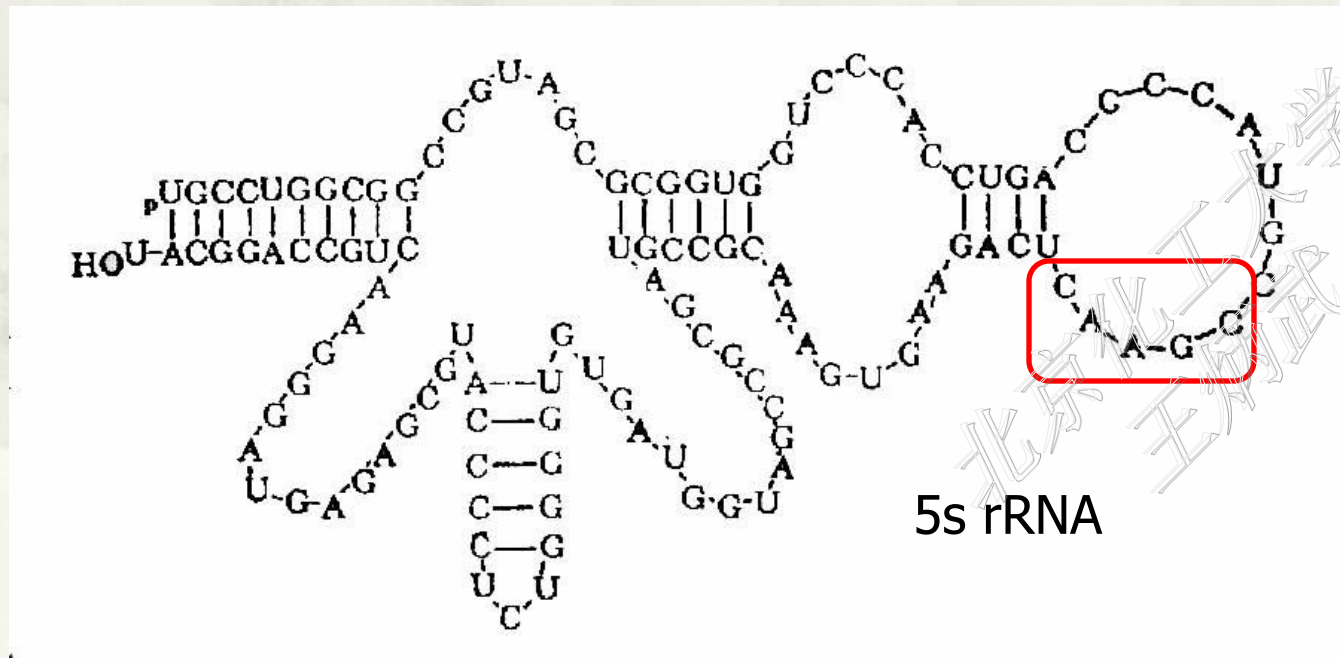
- * ①5'-末端总是磷酸化，而且常是pG，3'-末端最后三个氨基酸顺序相同，总是CCA_{OH}；
- * ②含有较多的稀有碱基（每分子含7~15个），最常见的是甲基化的碱基。

2、rRNA

- * 分子量最大 (10^6) ; 占RNA总量的80%
- * 主要存在于核糖体



- * 5s rRNA（真核生物为5.8s rRNA）上有与tRNA互补配对、相互识别和结合的核苷酸序列；
- * 16s rRNA含有与mRNA互相识别的核苷酸序列；



3、 mRNA

- * 转录DNA上的遗传信息并指导蛋白质的合成;
- * 寿命最短, 占RNA总量的3~5%

北京化工大学
王炳武

真核生物mRNA的结构特点

5'端有甲基化的鸟苷酸（“帽”结构）

3'端有多聚腺苷酸（poly A，“尾”结构）。



5' cap的功能: {

- 协助mRNA与核糖体的结合。
- 保护mRNA 5'端免受核酸外切酶的降解。

3' poly(A)的功能: {

- 与mRNA由细胞核向细胞质的转移有关。
- 保护mRNA 3'端免受核酸外切酶的降解。

二、RNA的高级结构

- * RNA的单链可以弯曲折叠，使得互补的碱基序列能够按照A-U、G-C进行碱基配对，在链的**局部形成双链结构**。
- * 在双螺旋区内不能参加配对的碱基仍以单链存在，形成突环（loop）。

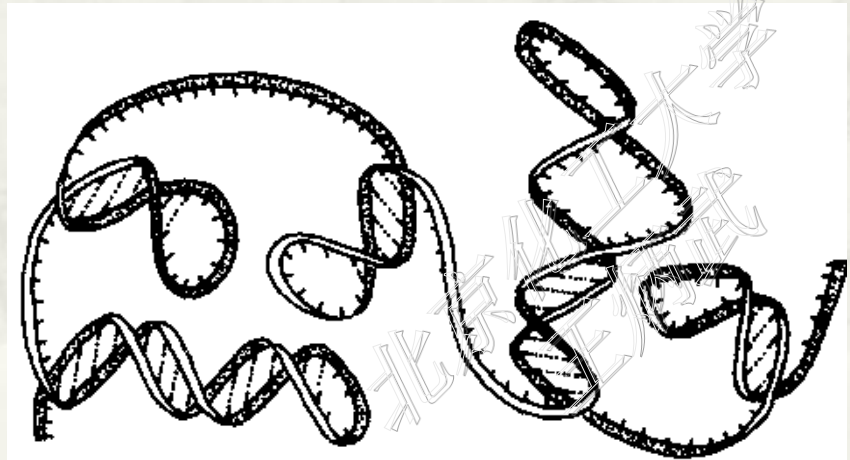
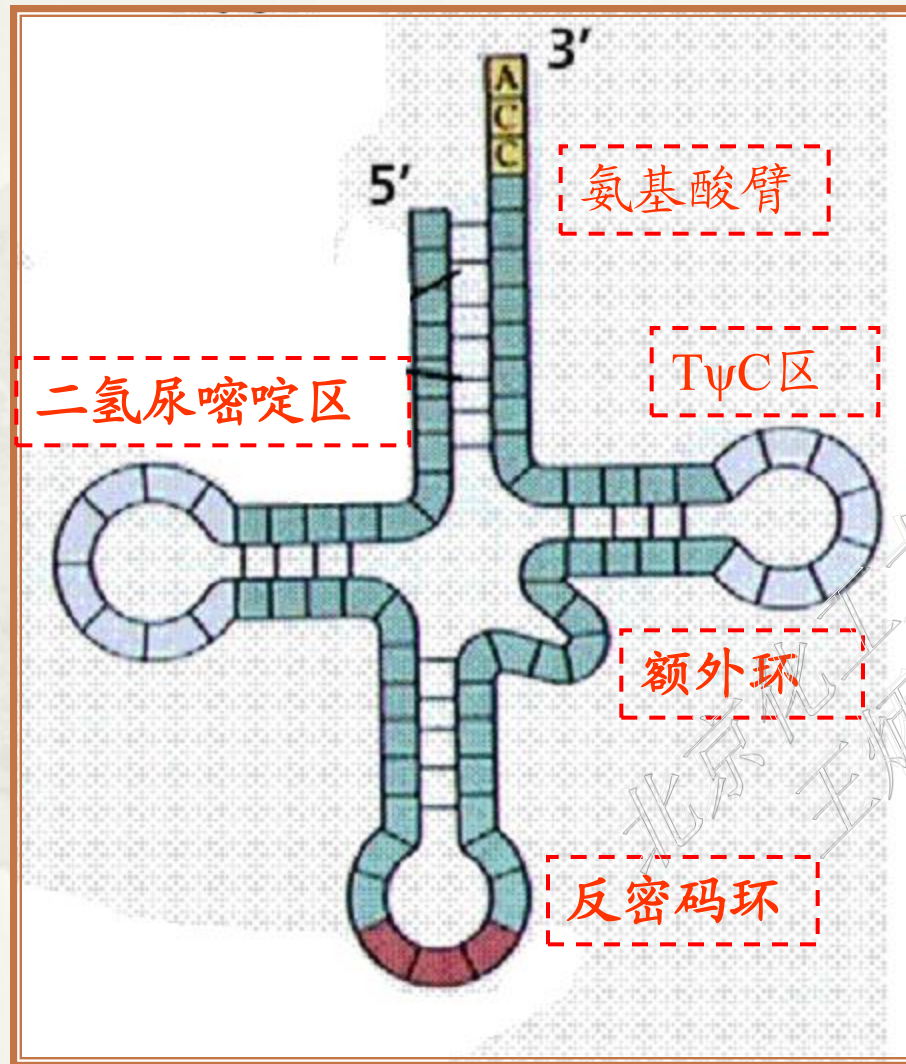


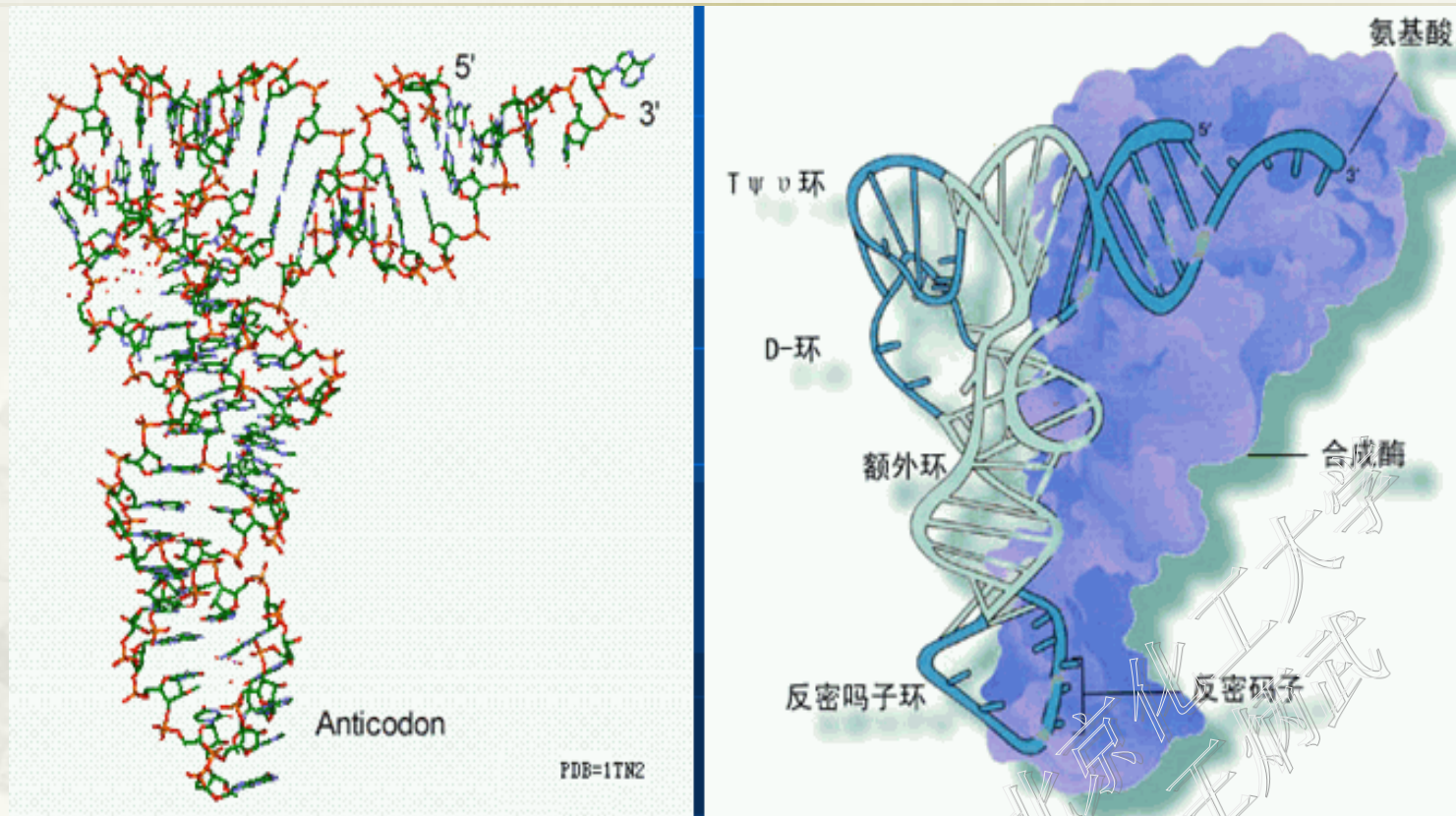
图 2-16 RNA 的二级结构

表示在一条多核苷酸链中有好几个由氢键连接起来的双螺旋区

tRNA的二级结构：三叶草模型



tRNA的三级结构：倒写的字母L



- * 所用的tRNA折叠后形成大小及三维构象相似的三级结构，有利于携带不同氨基酸的不同tRNA进入核糖体相同的部位进行肽链的合成。

三、其他RNA

- * 前体RNA

- * 核不均一RNA(hnRNA): mRNA的前体, 在核内加工成熟后进入细胞质。

- * 核内小RNA (snRNA)

- * 始终存在于核内, 可识别、加工RNA;

- * 反义RNA (asRNA)

- * 可与mRNA部分或全部序列互补;
 - * 抑制DNA转录; 抑制mRNA翻译 (基因沉默) 。

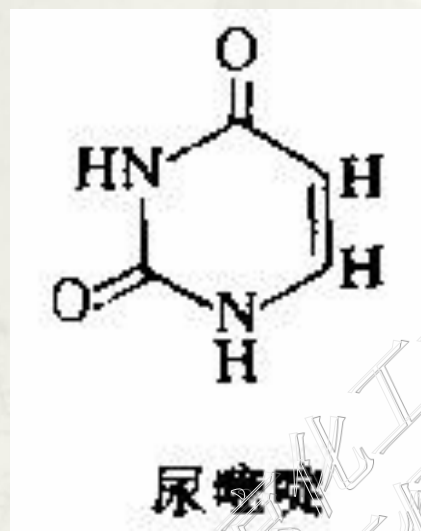
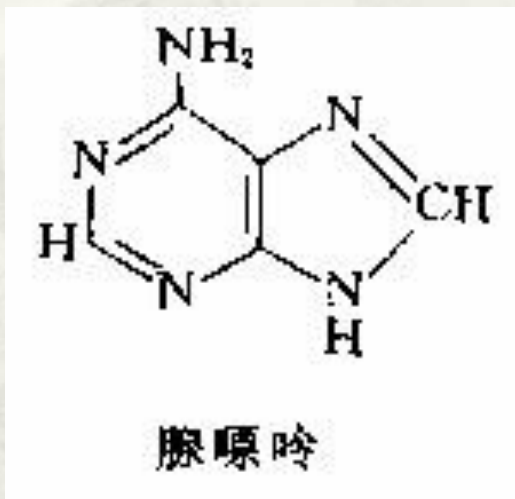
第五节 核酸的理化性质 与分离、分析

北京化工大学
王炳武

一、物理化学性质

* 1、两性解离

* 两性电解质，通常表现为酸性



2、紫外吸收

- * 260nm
- * 增色效应
- * 减色效应

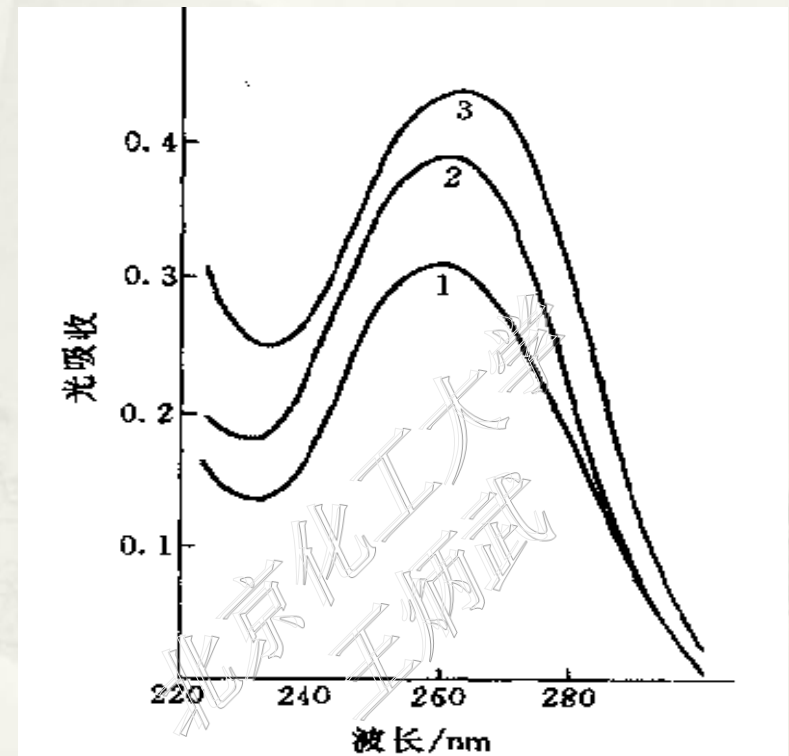


图 2-21 DNA 的紫外吸收光谱

1. 天然 DNA; 2. 变性 DNA;

3. 核苷酸总吸收值

3、核酸的变性与复性

- * 变性：双螺旋区域氢键断裂，空间结构破坏，形成单链无规则线条状态，粘度下降，生物学功能改变
- * 降解：磷酸二酯键的断裂

- * 增色效应和溶解温度 T_m
 - * DNA的溶解温度 $85\sim 90^{\circ}\text{C}$

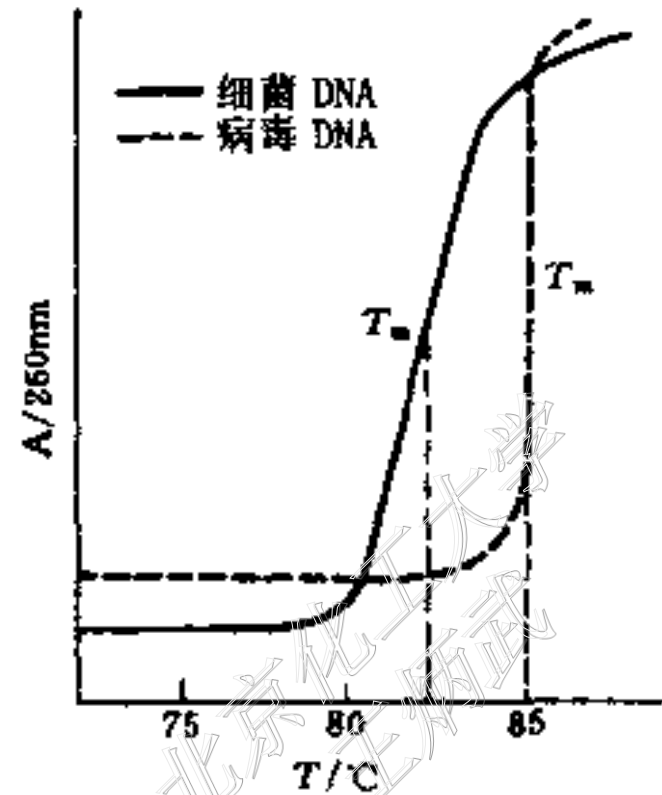


图 2-22 DNA 的熔点

影响 T_m 的因素

- * G-C碱基对的含量

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

- * 溶液的离子强度

- * pH

- * 变性剂

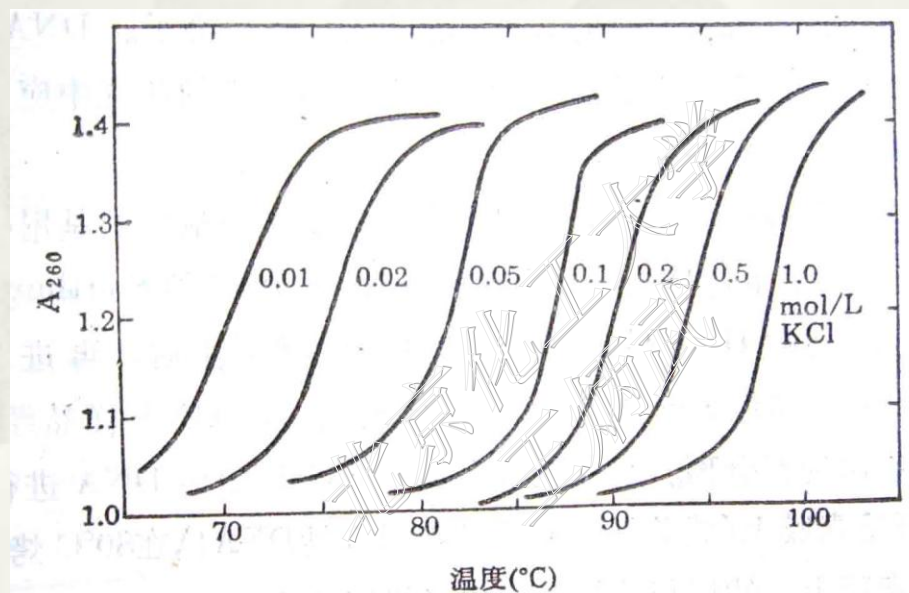


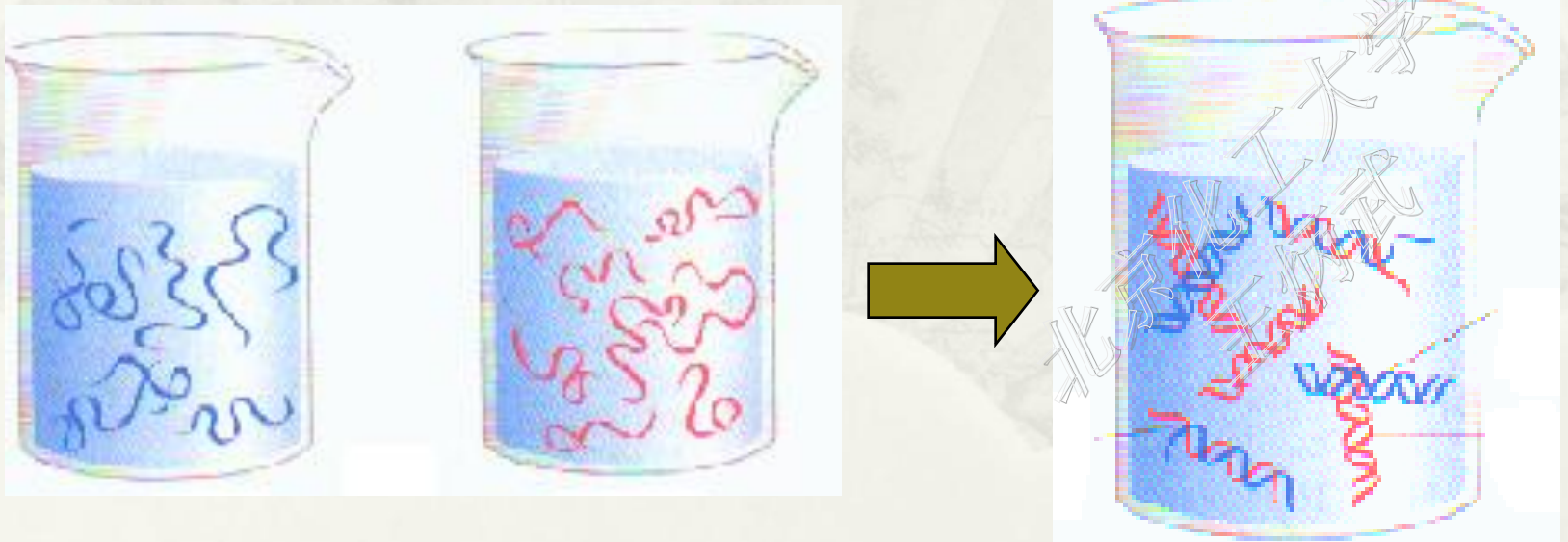
图 5-21 大肠杆菌 DNA 在不同浓度 KCl 中的熔解

核酸的复性

- * 变性核酸的互补单链在适当条件下重新结合形成双螺旋的过程，又称退火
- * 影响因素
 - * 浓度
 - * 链的长度
 - * 重复序列数目
 - * 一定的离子强度
 - * 适宜的复性温度

复性的应用：分子杂交

- * 不同来源但是具序列互补性的两条DNA或DNA与RNA或两条RNA通过碱基配对原则结合在一起的过程。



二、核酸分离的基本原则

- * 防止核酸酶降解

- * EDTA

- * 防止化学因素降解

- * 强酸、强碱

- * 防止物理因素降解

- * 高温、剧烈搅拌

北京化工大学
王炳武

实验：DNA和RNA的分离

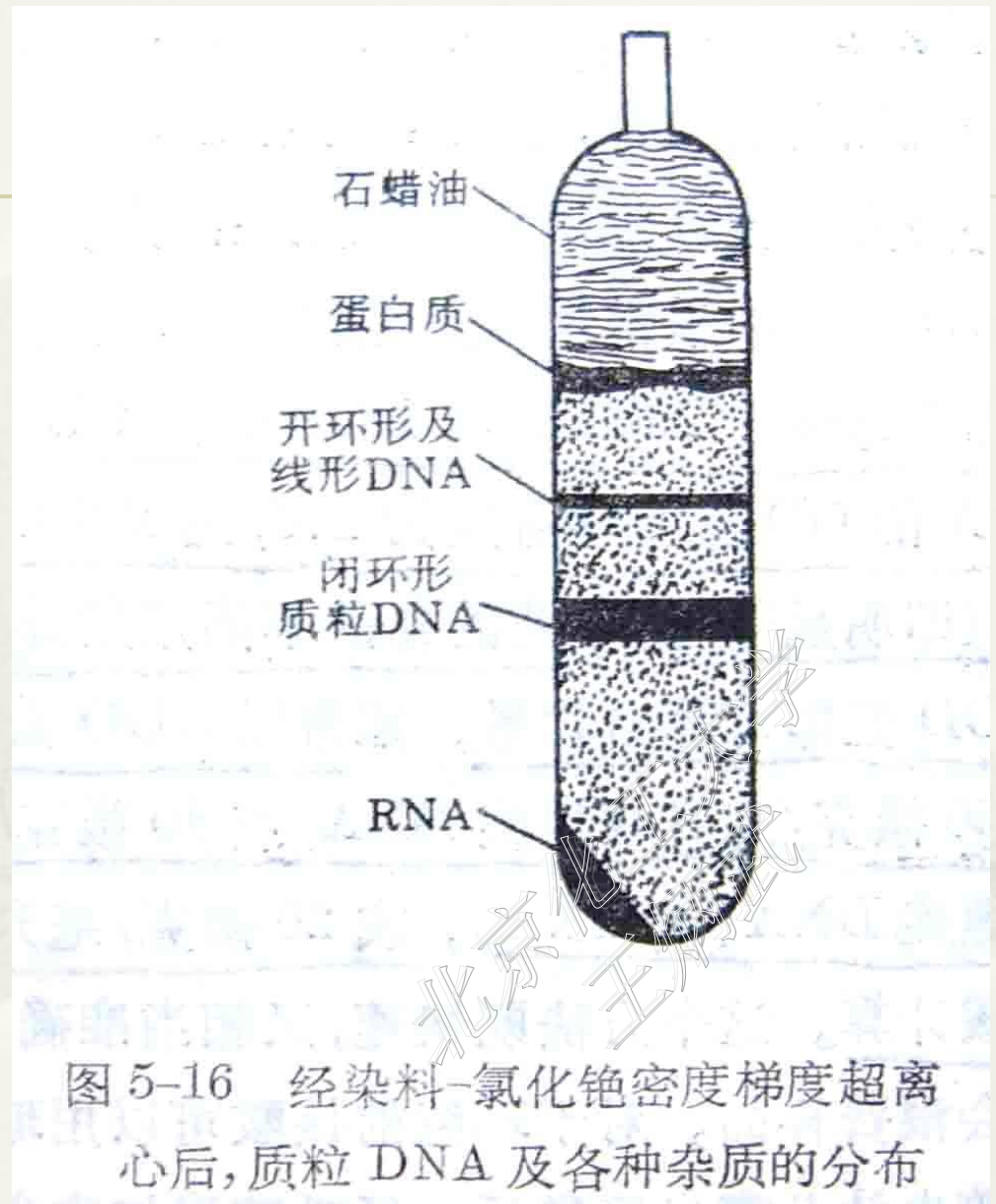
原理 在浓氯化钠(1—2mol/L)溶液中,脱氧核糖核蛋白的溶解度很大,核糖核蛋白的溶解度很小。在稀氯化钠(0.14 mol/L)溶液中,脱氧核糖核蛋白的溶解度很小,核糖核蛋白的溶解度很大。因此,可利用不同浓度的氯化钠溶液,将脱氧核糖核蛋白和核糖核蛋白从样品中分别抽提出来。

将抽提得的核蛋白用SDS(十二烷基硫酸钠)处理,DNA(或RNA)即与蛋白质分开,可用氯仿-异戊醇将蛋白质沉淀除去,而DNA则溶解于溶液中。向溶液中加入适量乙醇,DNA即析出。

为了防止DNA(或RNA)酶解,提取时加入EDTA(ethylenediamine tetracetic acid,乙二胺四乙酸)①。

1、沉降

- * 超速离心法
- * 65000rpm 6hr
- * 紫外照射



2、凝胶电泳

- * 琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶

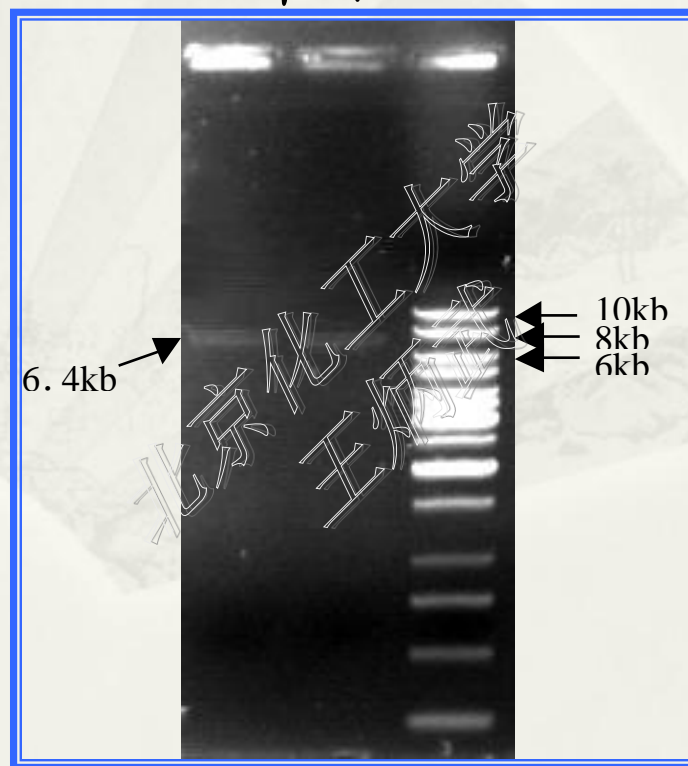
- * 影响因素

- * 构象：超螺旋DNA > 线性DNA > 开环DNA

- * 与分子量对数成反比

- * 与胶浓度成反比

- * 电场强度



三、核酸序列分析

- * 双脱氧链终止法（末端终止法）
- * 化学断裂法

北京化工大学
王炳武

1、末端中止法测序

- * 将待测DNA加热变性成为单链，作为合成的模板；
- * 加入与模板5'-端互补的短链作为引物，**引物的5'-端用 ^{32}P 同位素标记**；
- * 将样品分为四份，加入四种dNTPs三磷酸核苷的混合物、DNA聚合酶
- * **分别加入ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP** 做反应中止剂；
- * 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离DNA片段
- * **放射自显影、读序**

2、化学裂解法

- 单链DNA末端放射性标记
- 分别进行化学裂解
 - 硫酸二甲酯裂解G
 - 甲酸裂解G、A
 - 胍裂解C、T
 - 胍和氯化钠裂解C
- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离DNA片段
- 放射自显影，读序

本章总结

- * 核酸的基本组成及连接方式
- * 核酸的一级结构与测定
- * 核酸的高级结构
- * 核酸的变性与复性

北京化工大学
王炳武

需要掌握的单词

- * nucleic acid
- * ribonucleic acid
- * deoxy-
- * nucleotide
- * nucleoside
- * base
- * base pair(bp)
- * ribonuclease(RNase)
- * deoxy-(DNase)
- * denaturation
- * renaturation

北京化工大学
王炳武

练习题

- * tRNA分子中结合氨基酸的部位是____，识别密码子的部位是____。
- DNA的复性速度与____、____以及DNA片断大小有关。
- 稳定DNA双螺旋结构的主要力是____，此外还包括____和____。

北京化工大学
王炳武

判断题

- * 若双链DNA中的一条链碱基顺序为：
pCpTpGpGpApC 则另一条链的碱基顺序为：
pGpApCpCpTpG

选择题

- * 下列关于RNA的说明哪项是**错误**的 ()
- * A、 rRNA是核糖体的重要组分，后者是蛋白质合成的场所
- * B、 mRNA是蛋白质合成的模板，是遗传信息的载体
- * C、 tRNA是三种主要RNA分子中最小的一类
- * D、 只有mRNA存在于细胞液中

北京化工大学
王炳武

选择题

- * 热变性的DNA具有下列哪种特征?
- * A 核苷酸间的磷酸二酯键断裂
- * B 形成三股螺旋
- * C 260nm处的光吸收下降
- * D GC对的含量直接影响 T_m 值

北京化工大学
王炳武

选择题

- * 在下列哪种情况下，互补的两条DNA单链将结合成双链DNA ()
- * A、变性 B、加聚合酶
- * C、退火 D、加连接酶

北京化工大学
王炳武

判断题

- * 脱氧核糖核酸被降解为脱氧核糖核苷酸后，溶液具有更强的紫外吸收。
- * 热变性的双链DNA在260nm处的光吸收值比天然态的DNA有较高的增加。
- * 组成DNA双螺旋的两条链的碱基组成是相同的，但两条链的走向相反。
- * 不同来源的两条DNA单链在一定条件下能进行杂交的分子基础是两条链有着相同的碱基排列顺序。

选择题

- * DNA变性的特征是 ()
- * A、在260nm处光吸收显著下降
- * B、热变性的温度随分子中鸟嘌呤和胞嘧啶含量而定
- * C、变性必然伴随着DNA分子共价键的断裂
- * D、变性是一种渐进的过程，没有明显分界线

北京化工大学
王炳武

作业题

- * 如果E. coli染色体DNA的75%用于编码2000种蛋白质，假定每种蛋白质平均分子量为60000，求该染色体DNA的长度是多少？分子量大约是多少？
- * 已知三个碱基编码一个氨基酸
- * 氨基酸残基平均分子量为120，**脱氧核苷酸对**残基平均分子量为640

北京化工大學
王炳武

完毕!

北京化工大学
王炳武