

第十章

DNA的生物合成

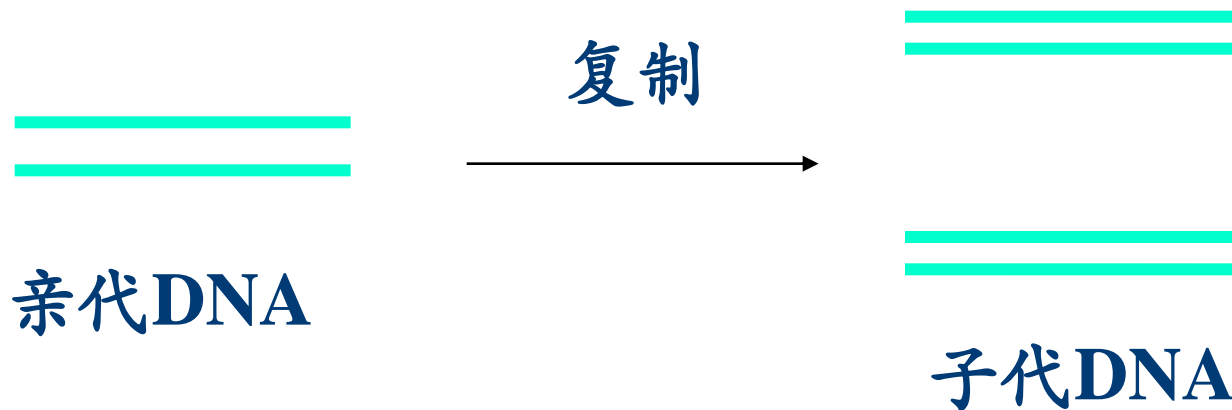
DNA Biosynthesis (Replication)

第一节

DNA的复制

DNA Replication

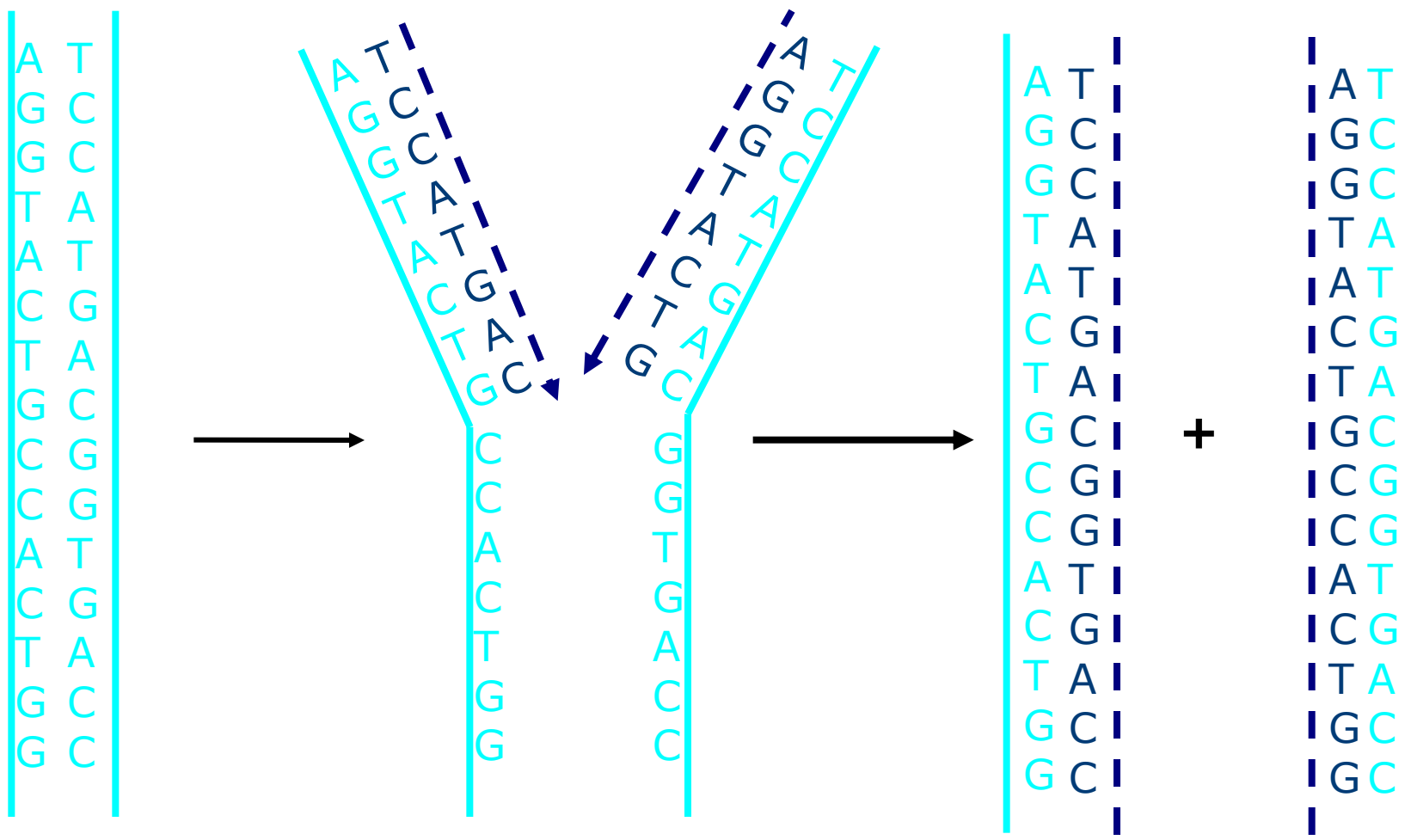
复制(replication) 是指遗传物质的传代，
以母链DNA为模板合成子链DNA的过程。



一、DNA复制的方式——半保留复制

■ 半保留复制的概念：

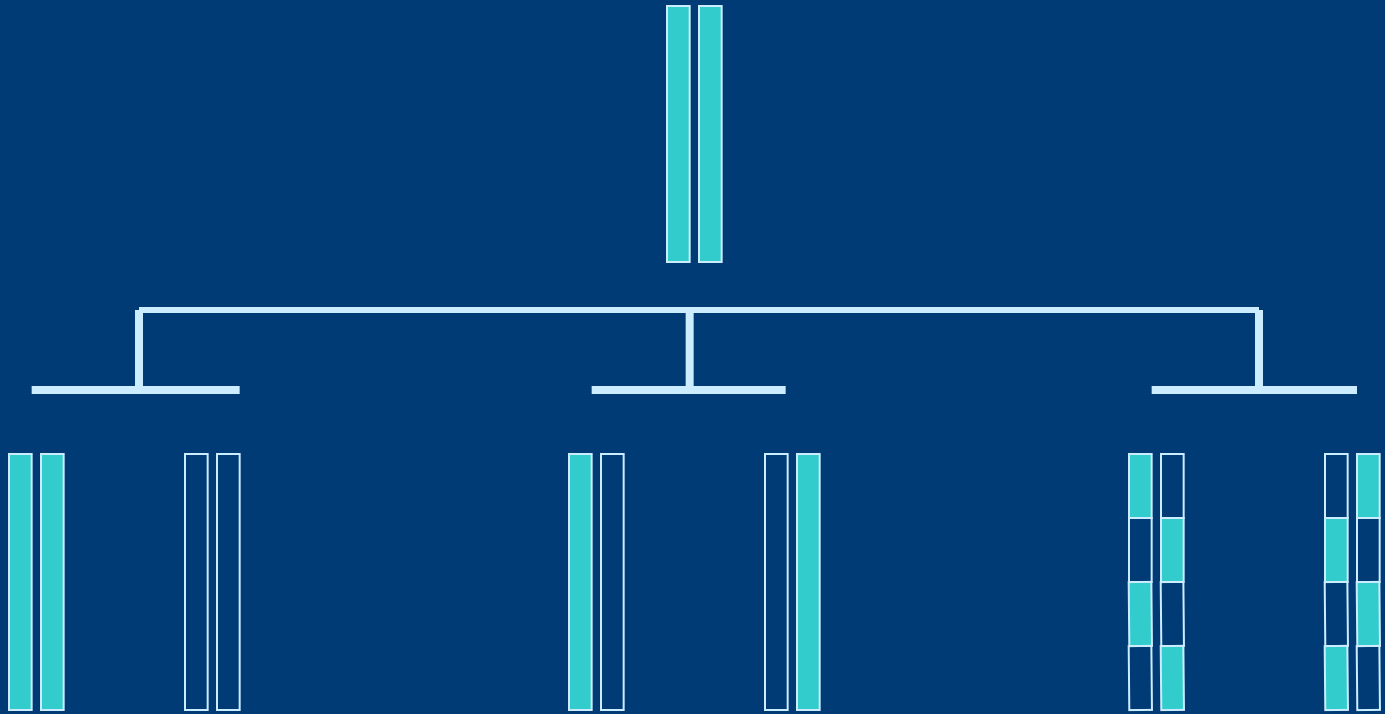
DNA合成时，以4种dNTP为原料，母链双链DNA解链为单链，并以各单链为模板（template），在DNA聚合酶作用下，按碱基互补原则（A-T、C-G）合成新的DNA链，新链与模板链互补，二者构成子代DNA。如此合成的子代细胞的DNA，一条单链为亲代模板，另一条为与之互补的新链，两个子细胞的DNA与亲代的相同，故称之为DNA的半保留复制（semiconservative replication）。



母链DNA

子代DNA

■ 子链继承母链遗传信息的几种可能方式：



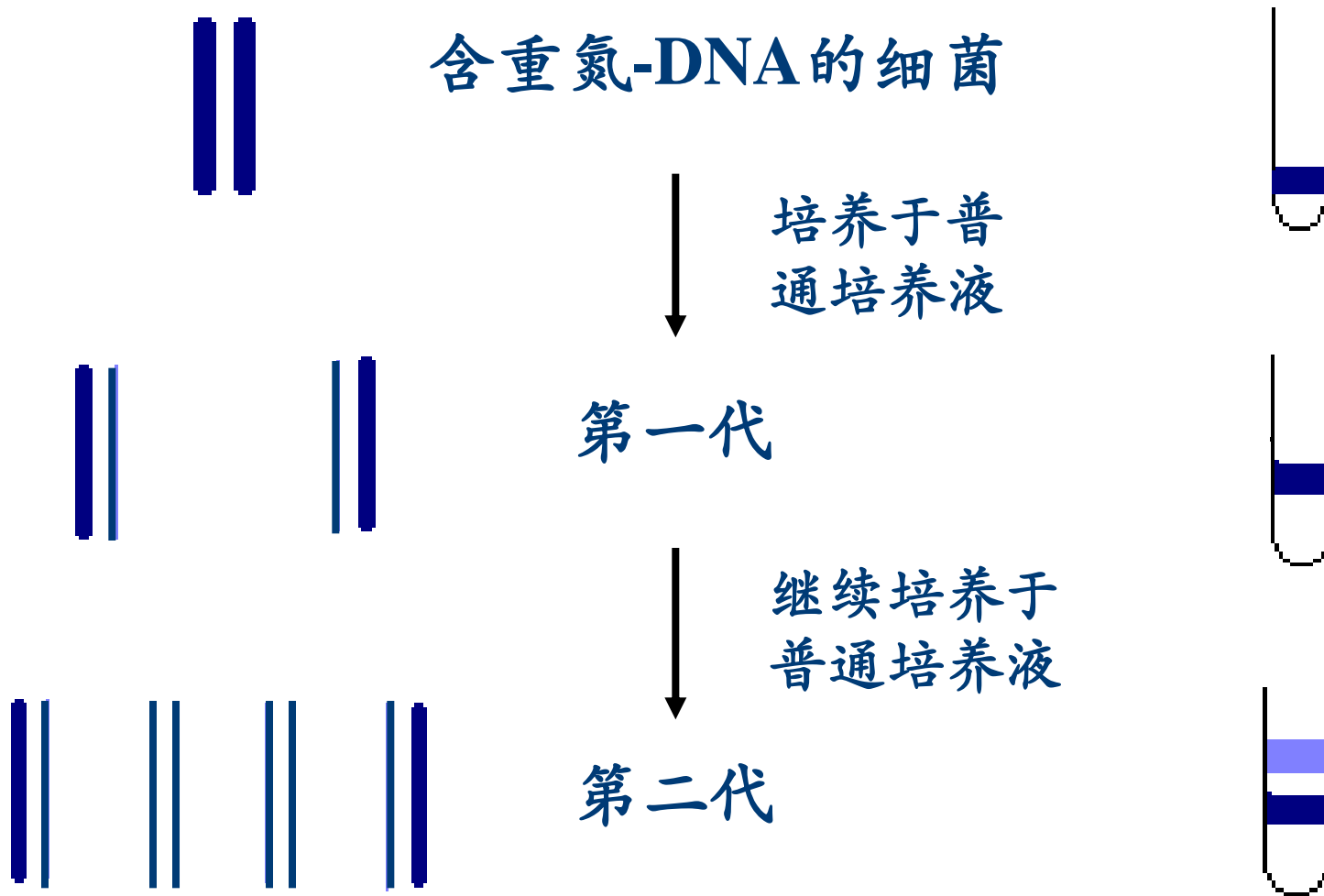
全保留式

半保留式

混合式

■ 密度梯度实验：

梯度离心结果



——实验结果支持半保留复制的设想。

■ 半保留复制的意义：

按半保留复制方式，子代DNA与亲代DNA的碱基序列一致，即子代保留了亲代的全部遗传信息，体现了遗传的保守性。

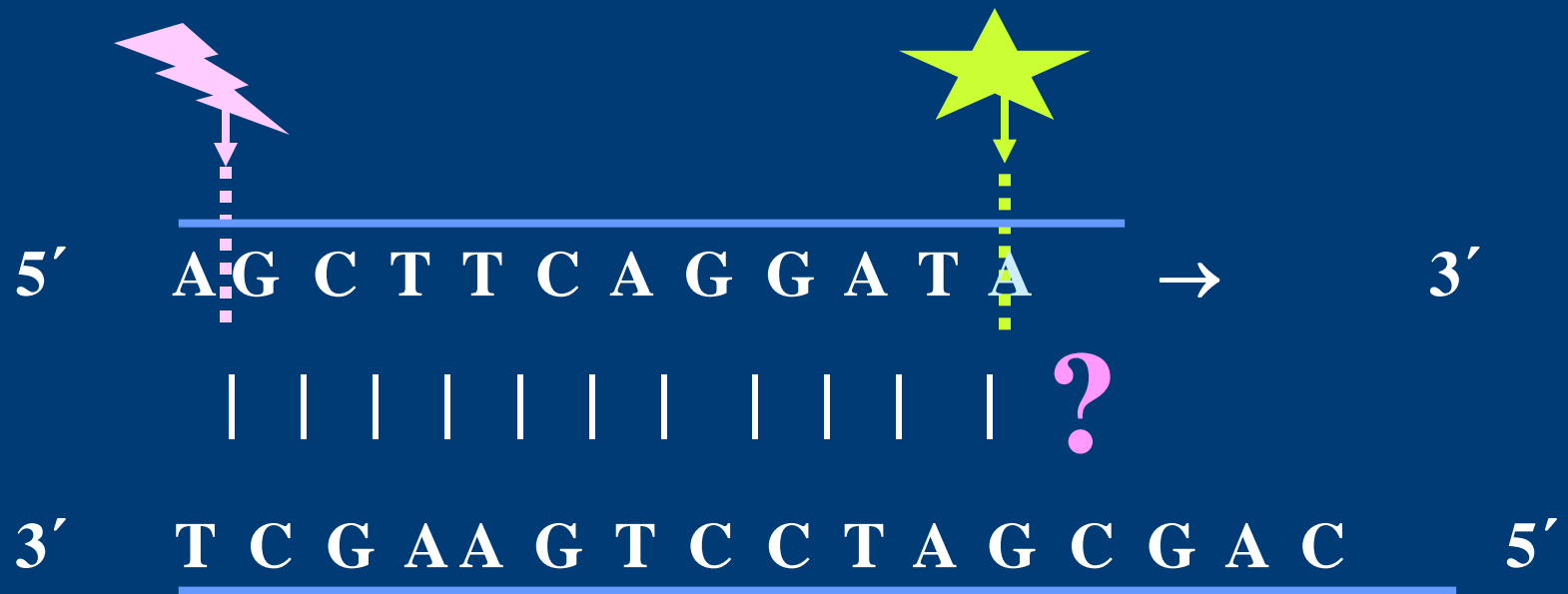
遗传的保守性，是物种稳定性的分子基础，但不是绝对的。

二、参与复制的酶类及蛋白质因子

(一) DNA聚合酶

- 全称：依赖DNA的DNA聚合酶 (DNA-dependent DNA polymerase)
- 简称：DNA-pol
- 活性：
 1. 5'→3' 的聚合活性
 2. 核酸外切酶活性

■ 核酸外切酶活性:



➤ 3' → 5' 外切酶活性:

能辨认错配的碱基对, 并将其水解。

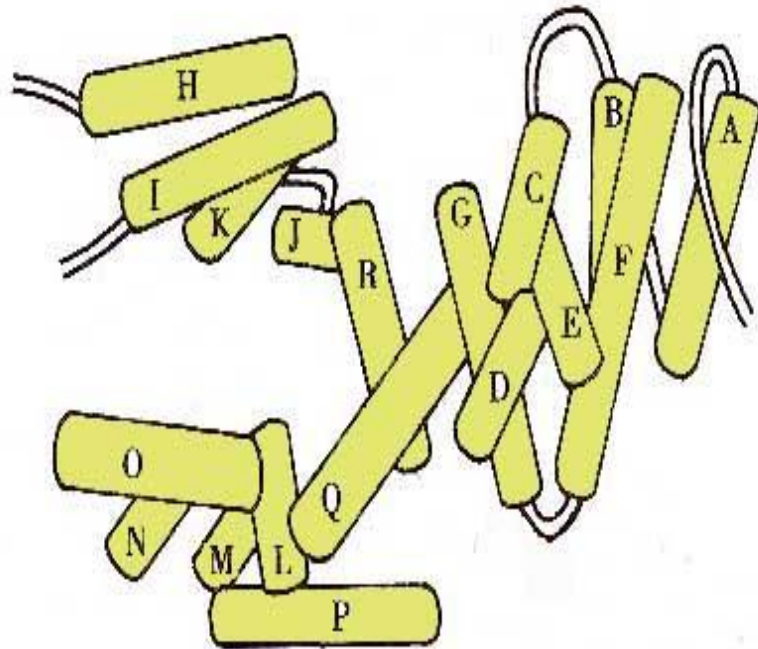
➤ 5' → 3' 外切酶活性:

能切除突变的 DNA 片段。

1.原核生物的DNA聚合酶分为三型

	DNA-pol I	DNA-pol II	DNA-pol III
分子量(kD)	109	120	250
组成	单肽链	?	多亚基不对称二聚体
分子数/细胞	400	?	20
5'→3'核酸外切酶活性	有	无	无
基因突变后的致死性	可能	不可能	可能

➤ **DNA-pol I**
(109kD)



■ **功能:**

对复制中的错误进行校读，对复制和修复中出现的空隙进行填补。

N 端

DNA-pol I

C 端



木瓜蛋白酶

小片段

323个氨基酸

5' → 3' 核酸外切酶活性

大片段/Klenow 片段

604个氨基酸

DNA 聚合酶活性

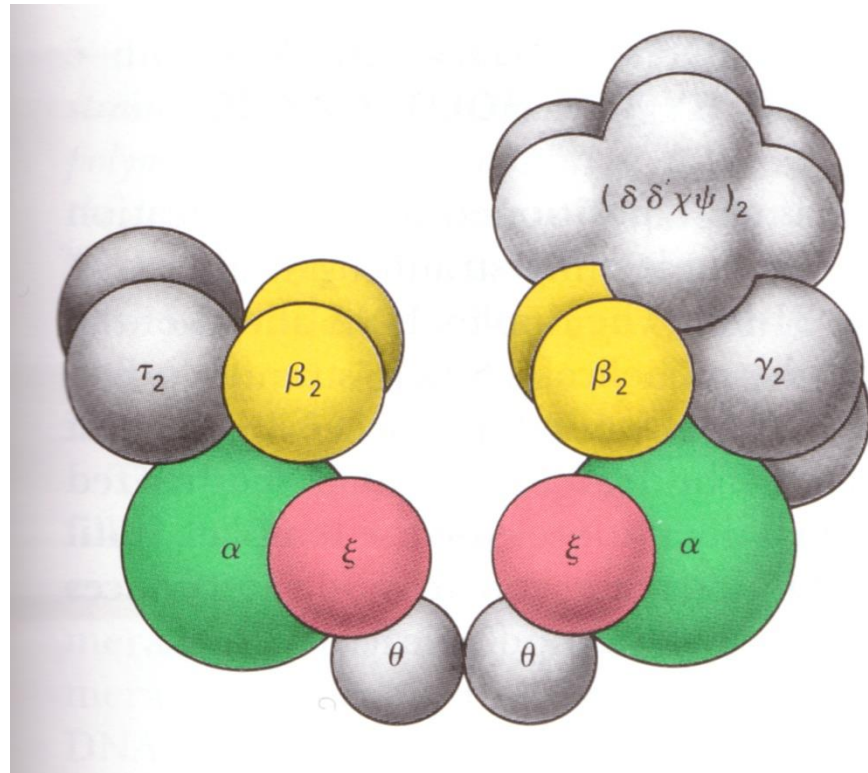
3' → 5' 核酸外切酶活性

- Klenow片段是实验室合成DNA，进行分子生物学研究中常用的工具酶。

➤ DNA-pol III
(250kD)

■ 功能:

是原核生物复制延长中真正起催化作用的酶。



2.真核细胞DNA聚合酶有五种

	α	β	γ	δ	ϵ
酶活性					
5' \rightarrow 3' 聚合酶	+	+	+	+	+
3' \rightarrow 5' 外切核酸酶	-	+	+	+	+
5' \rightarrow 3' 外切核酸酶	-	-	-	+	+
构成（亚基）	4	4	4	2	5
分子量（kD）	300	36~38	160~300	170	250
细胞内定位	细胞核	细胞核	线粒体	细胞核	细胞核
主要功能	引发	修复	复制	复制	修复

(二) 双链DNA解链、解旋酶类

- ✓解螺旋酶(helicase) ——利用ATP供能，作用于氢键，使DNA双链解开成为两条单链。
- ✓单链DNA结合蛋白(single stranded DNA binding protein, SSB) ——在复制中维持模板处于单链状态并保护单链的完整。

解链过程中正超螺旋的形成



- 拓扑异构酶作用特点:

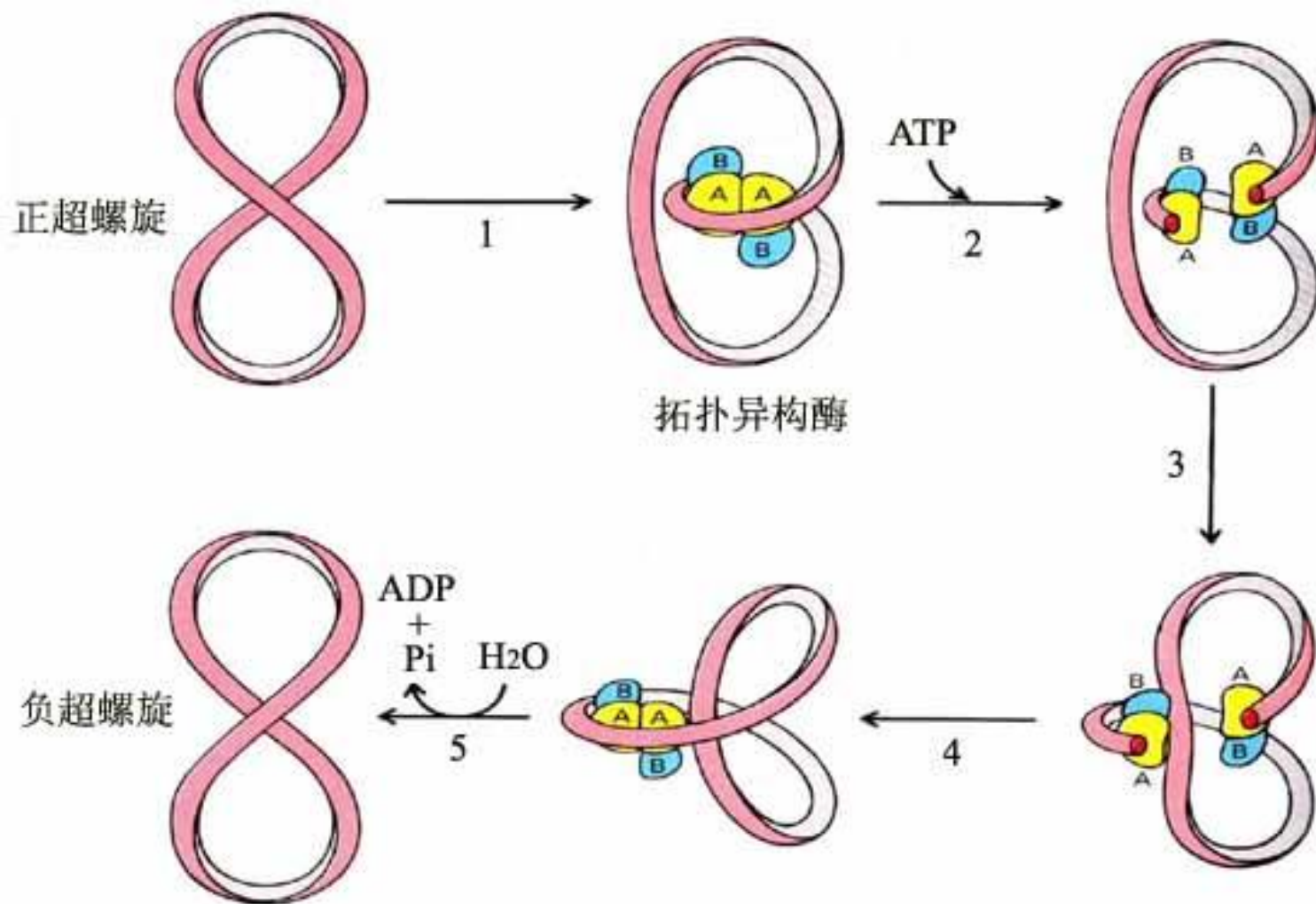
既能水解、又能连接磷酸二酯键。

- 拓扑异构酶分类:

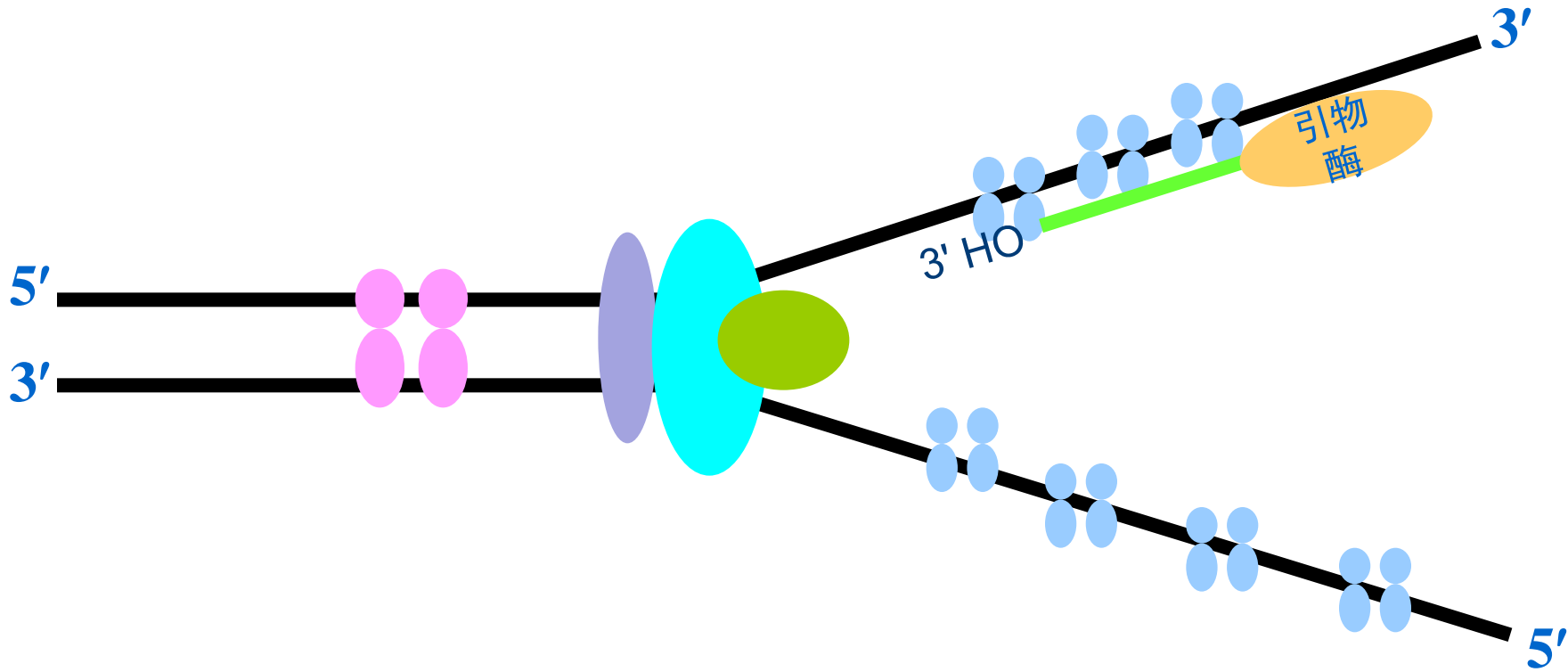
拓扑异构酶 I

拓扑异构酶 II

■ 拓扑酶的作用方式:



(三) 引物酶

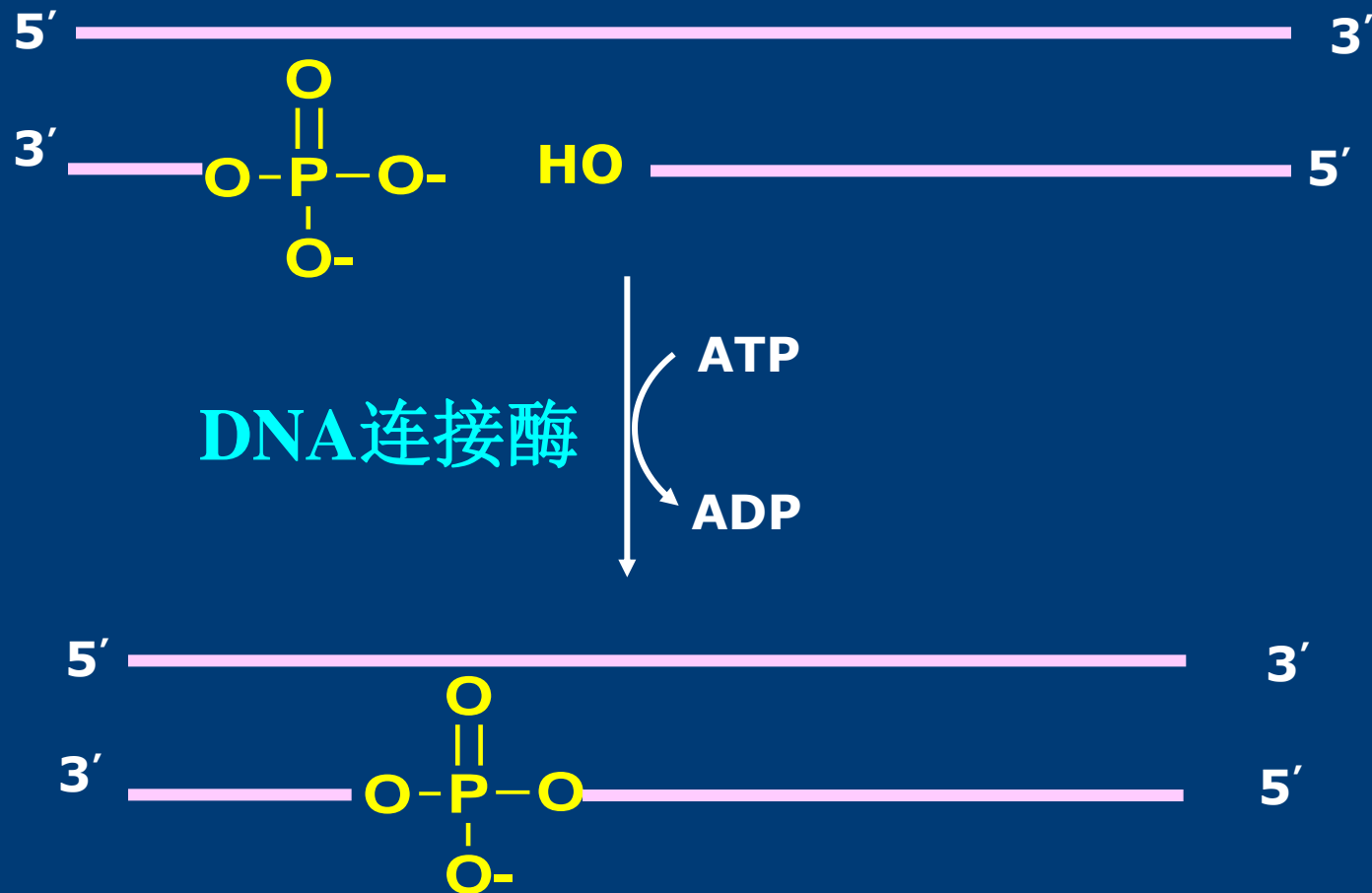


引物酶(primase) ——复制起始时催化生成RNA引物的酶。

（四）连接酶

连接DNA链3'-OH末端和相邻DNA链5'-P末端，使二者生成磷酸二酯键，从而把两段相邻的DNA链连接成一条完整的链。

■ DNA连接酶的作用:



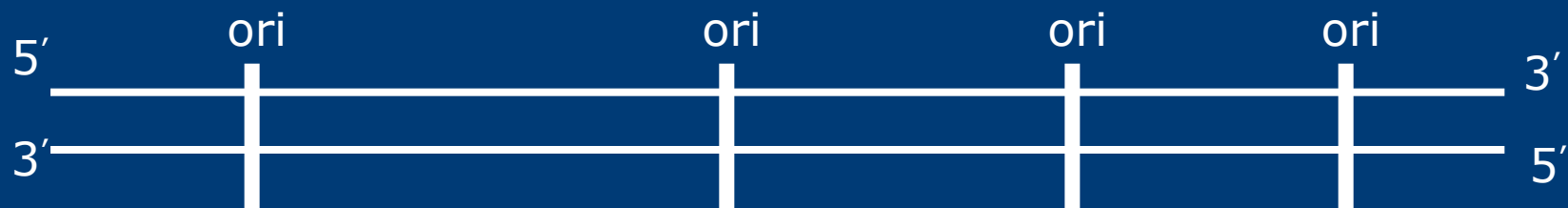
催化磷酸二酯键形成的酶

酶	底物	反应结果
连接酶	双链DNA中有缺口的单链片段	连接DNA片段为连续链
DNA pol	模板DNA+引物+dNTP	合成互补DNA链
RNA pol	模板DNA +NTP	合成RNA新链
引物酶	模板DNA +NTP	合成RNA引物
逆转录酶	模板RNA	合成cDNA
拓扑异构酶	复制时——超螺旋的DNA解旋	复制后——松弛态的DNA重新形成螺旋乃至超螺旋

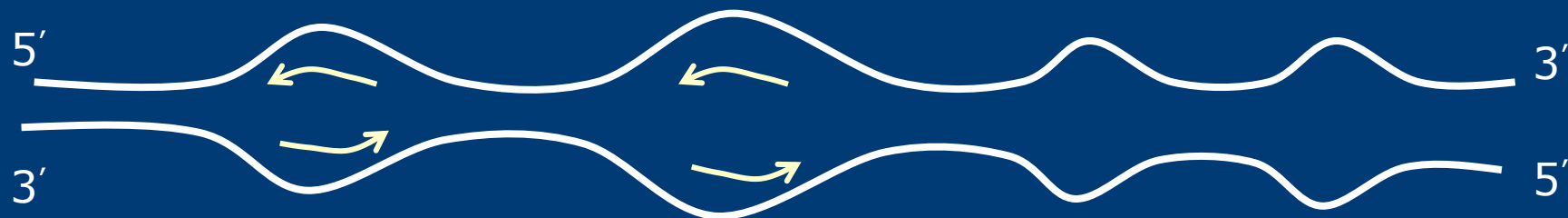
三、DNA复制过程

(一) 复制起始

- DNA解为单链，形成复制叉。
- 在解链的同时单链结合蛋白与打开的DNA单链结合，以稳定DNA单链。



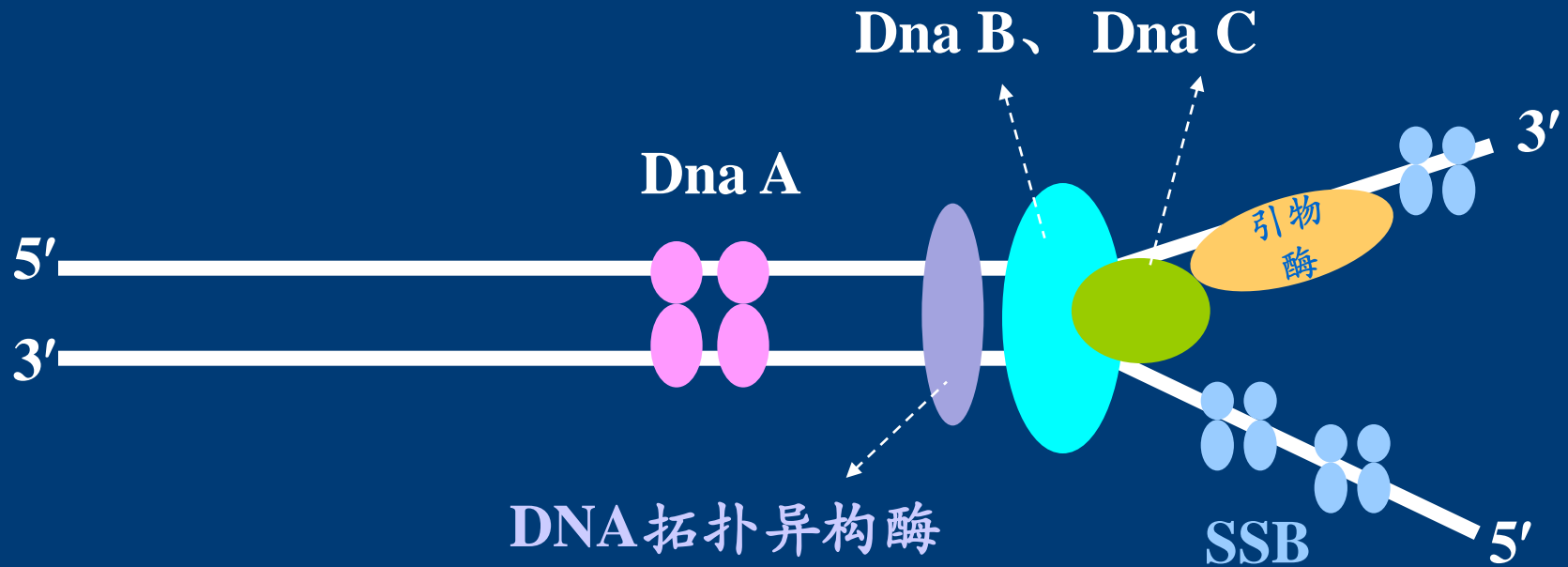
多复制子的复制



复制子

复制子是独立完成复制的功能单位

- 引发体



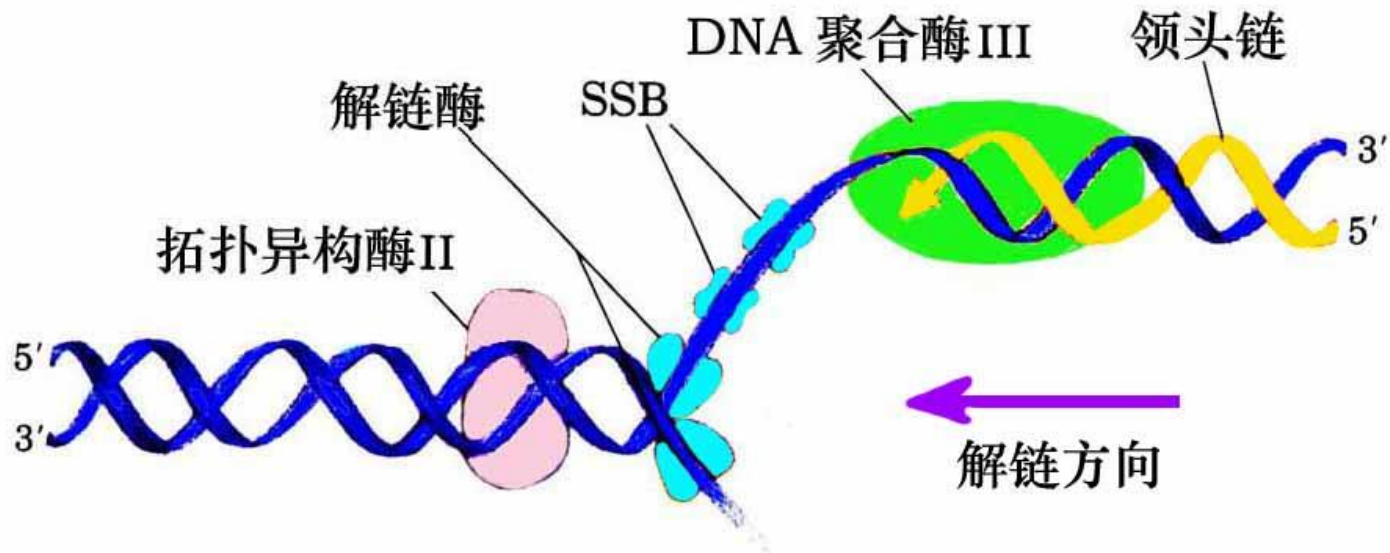
含有解螺旋酶、DnaC蛋白、引物酶和DNA复制起始区域的复合结构称为引发体。

(二) 复制的延长

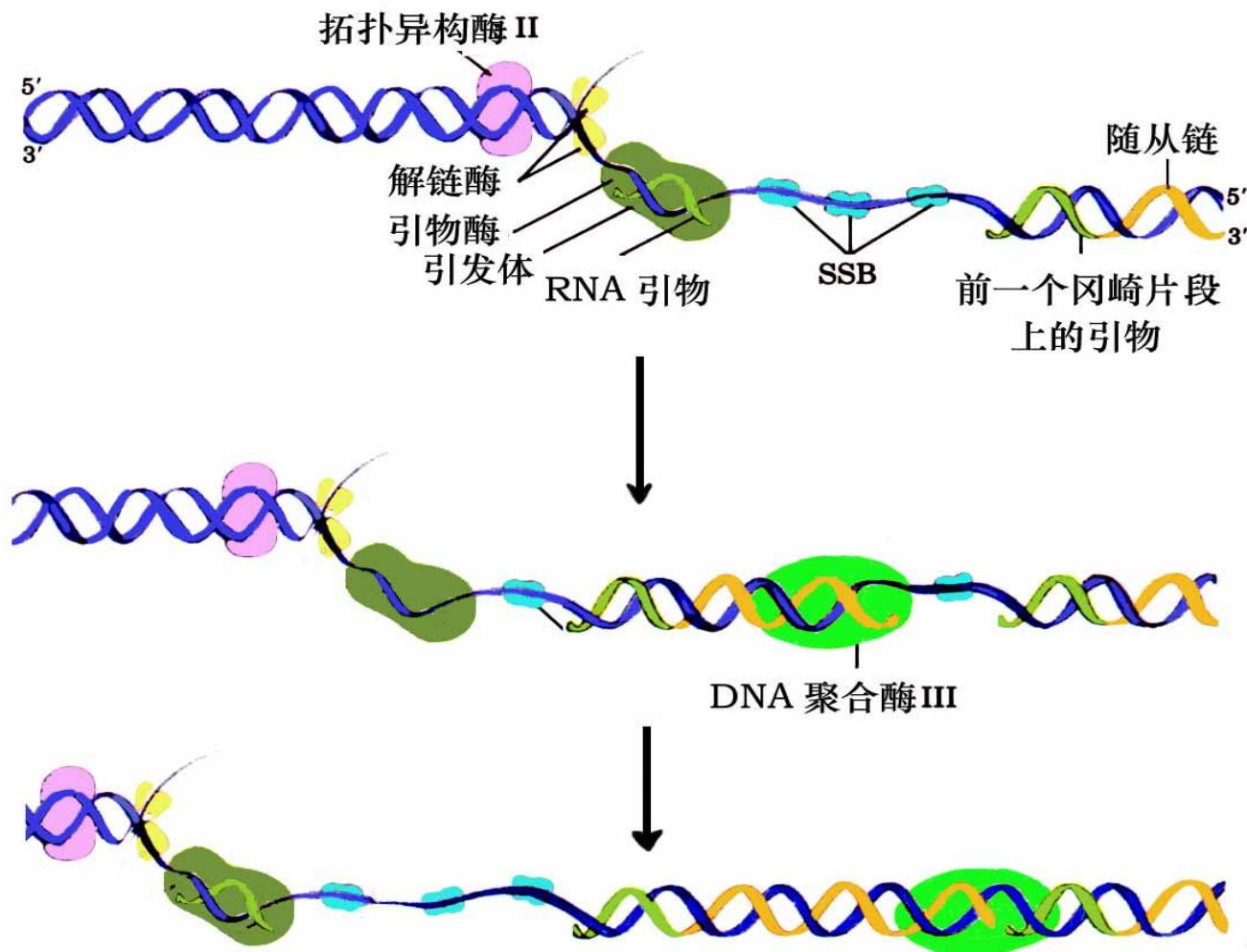
复制的延长指在DNA-pol催化下，dNTP以dNMP的方式逐个加入引物或延长中的子链上，其化学本质是磷酸二酯键的不断生成。

- 顺着解链方向生成的子链，复制是连续进行的，这股链称为领头链
- 另一股链因为复制的方向与解链方向相反，不能顺着解链方向连续延长，这股不连续复制的链称为随从链。复制中的不连续片段称为冈崎片段(okazaki fragment)
- 领头链连续复制而随从链不连续复制，就是复制的半不连续性

■ 领头链的合成:

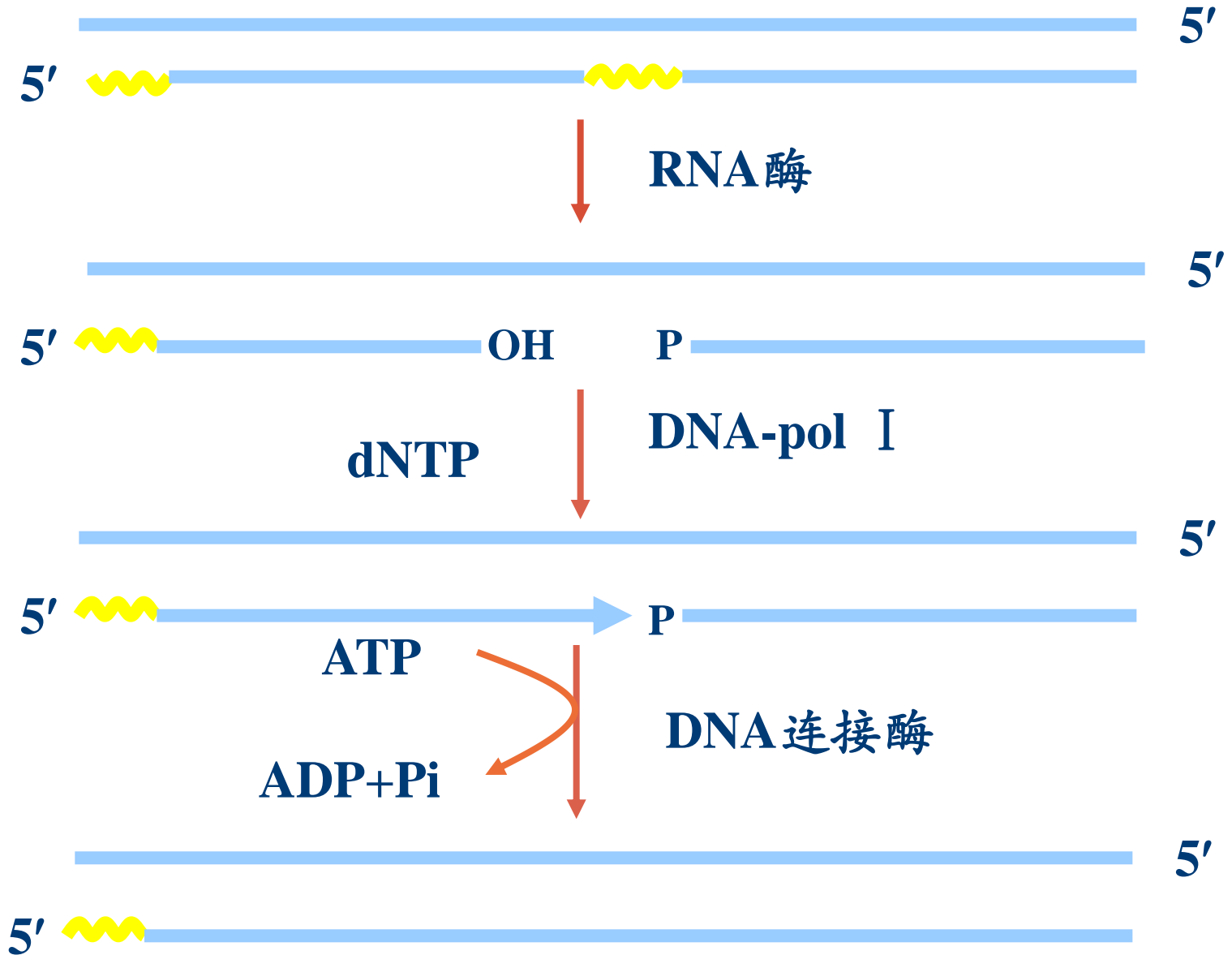


■ 随从链的合成



(三) 复制的终止

■ 随从链上不连续性片段的连接:



E.coli DNA复制过程所需要的酶和蛋白质

酶和蛋白质	作用
拓扑异构酶 I / II	松解超螺旋
解链酶	解双螺旋
单链结合蛋白	稳定已解开的单链
引物酶	合成RNA引物
DNA聚合酶III	DNA链的延伸
DNA聚合酶 I	弥补DNA空隙、水解引物及校读
DNA连接酶	连接DNA片段

第二节

DNA修复合成

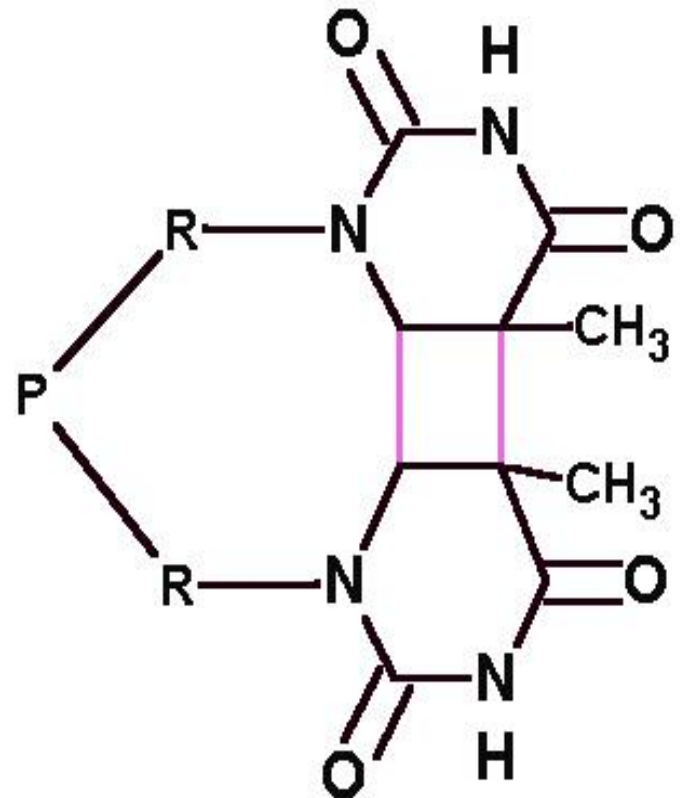
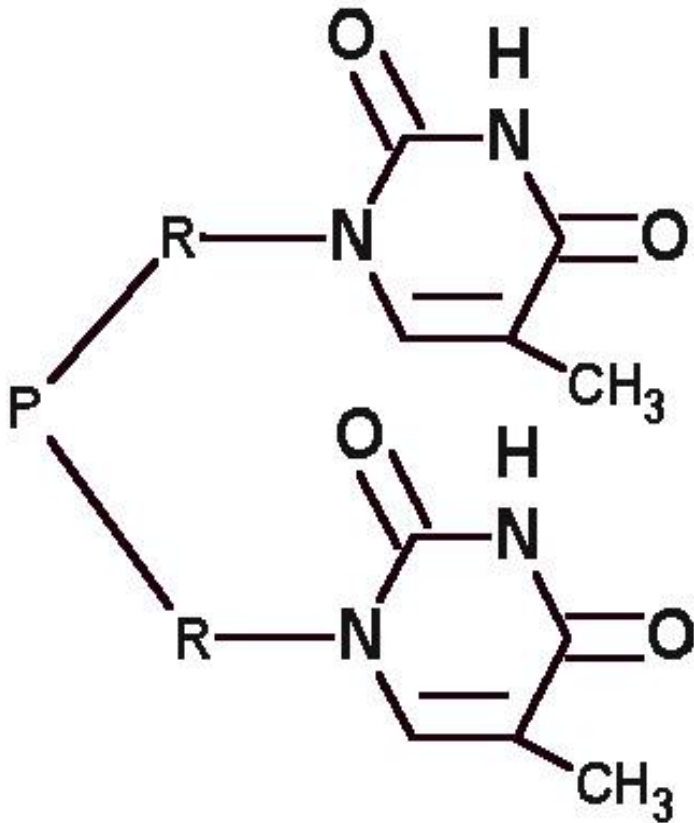
DNA Repair

- **DNA 突变具体指个别 dNMP 残基以至片段 DNA 在构成、复制或表型功能的异常变化，也称为 DNA 损伤(DNA damage)。**
- **从分子水平来看，突变就是 DNA 分子上碱基的改变。**

一、DNA损伤

(一) DNA损伤的因素

- 物理因素： 紫外线(ultra violet, UV)、 各种辐射



■ 化学因素:

常见的化学诱变剂

化合物类别	作用点	分子改变
碱基类似物 如: 5-BU	$A \rightarrow 5\text{-BU} \rightarrow G$	$\begin{array}{ccc} -A- & \longrightarrow & -G- \\ -T- & & -C- \end{array}$
羟胺类 (NH_2OH)	$T \rightarrow C$	$\begin{array}{ccc} -T- & & -C- \\ -A- & \longrightarrow & -G- \end{array}$
亚硝酸盐 (NO_2)	$C \rightarrow U$	$\begin{array}{ccc} -G- & & -A- \\ -C- & \longrightarrow & -T- \end{array}$
烷化剂 如: 氮芥类, Nitromins	$G \rightarrow {}^mG$	DNA 缺失G

(二) DNA损伤的形式与危害

- 错配 (mismatch)

- 缺失 (deletion)

- 插入 (insertion)

框移
(frame-shift)

- 重排 (rearrangement)

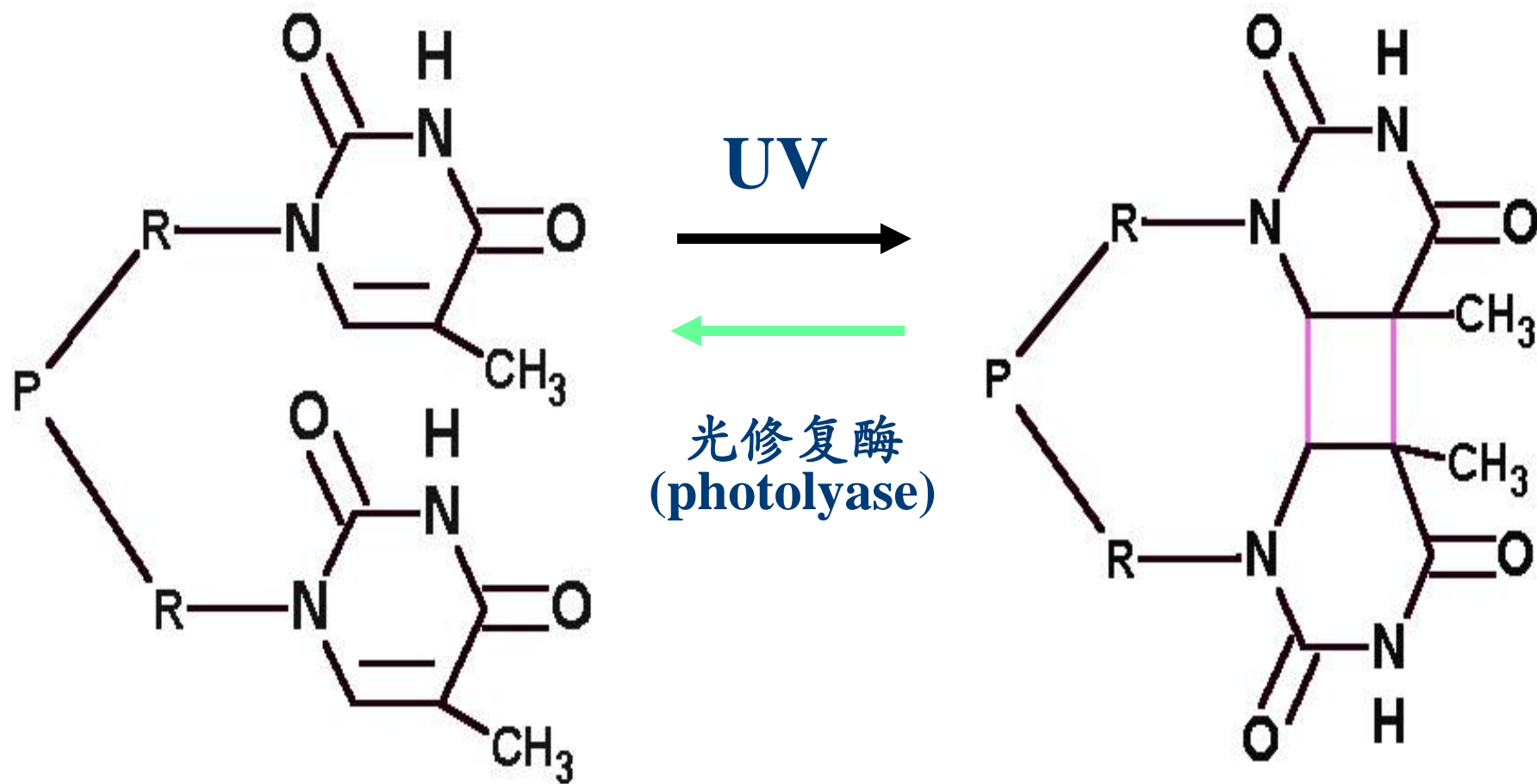
二、DNA损伤的修复

修复(repairing)是对已发生分子改变的补偿措施，使其回复为原有的天然状态。

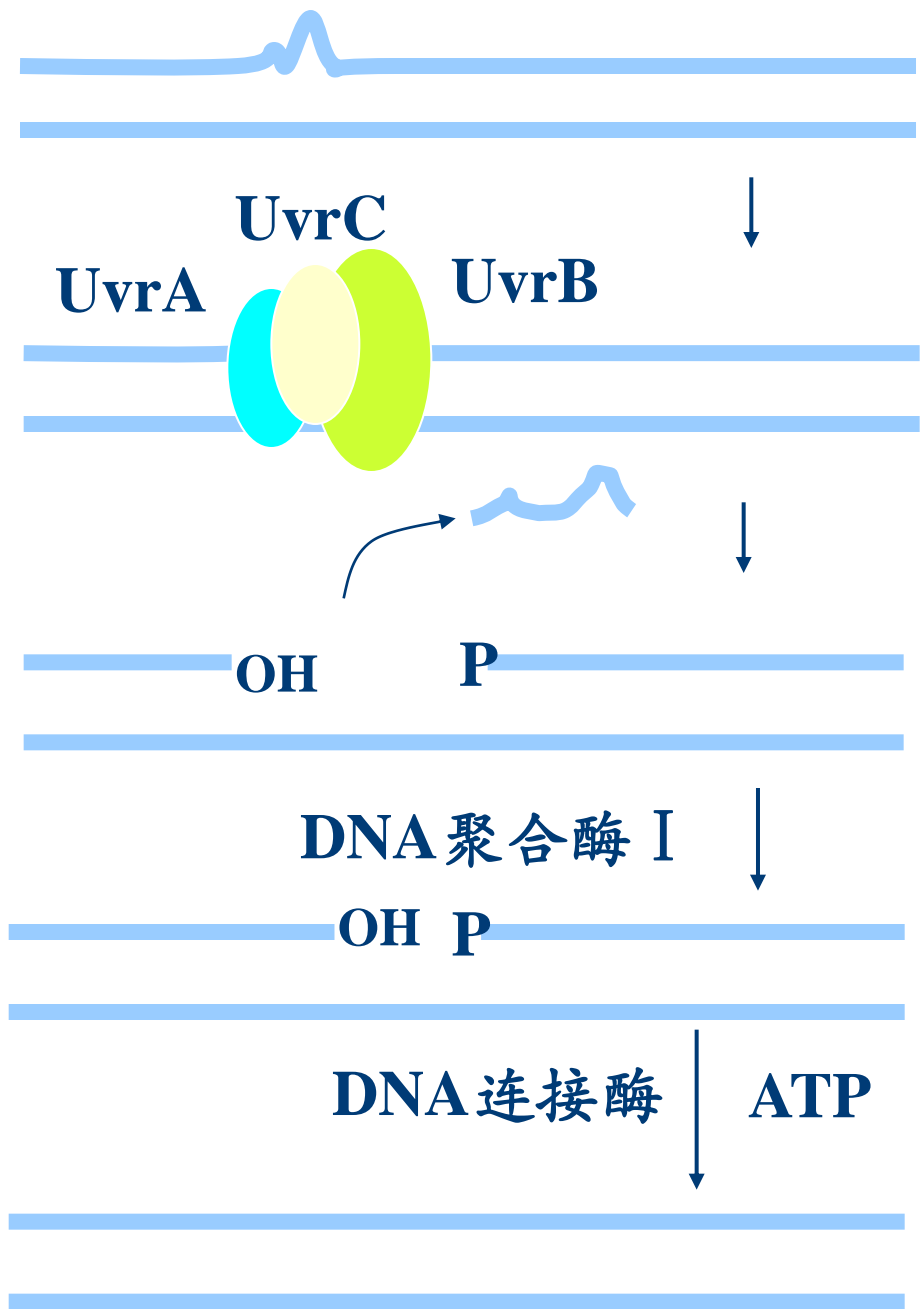
■ 修复的主要类型：

- 光修复(light repairing)
- 切除修复(excision repairing)
- 重组修复(recombination repairing)
- SOS修复

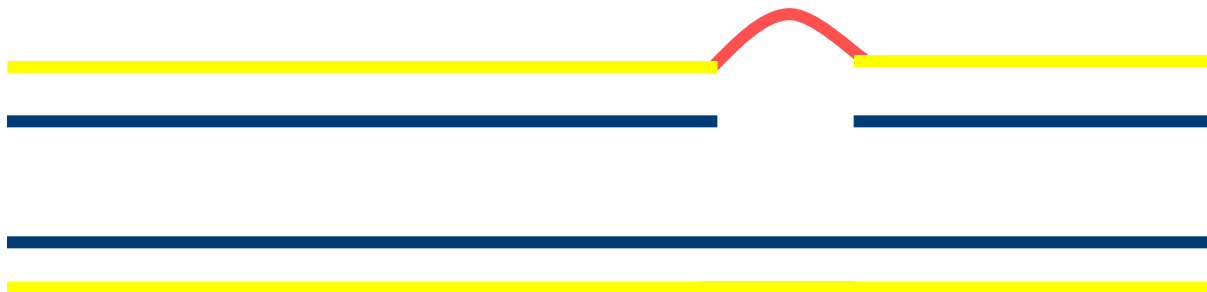
1.光修复系统利用酶简单地逆转DNA损伤



2.E.coli的 切除修复机制



3.重组修复



4.SOS修复

- 当DNA损伤广泛难以继续复制时，由此而诱发出的一系列复杂的反应。
- 在E. coli，各种与修复有关的基因，组成一个称为调节子(regulon)的网络式调控系统。
- 这种修复特异性低，对碱基的识别、选择能力差。通过SOS修复，复制如能继续，细胞是可存活的。然而DNA保留的错误较多，导致较广泛、长期的突变。

DNA修复系统缺陷导致的几种疾病

病名	敏感因素	病症可能导致的恶性病
着色性干皮病	UV	皮肤干燥，萎缩，角质化着色多发性色素瘤，皮肤癌
运动失调毛细血管扩张症	γ 射线	运动失调毛细血管扩张，免疫力下降淋巴瘤
Bloom综合征	烷化剂	光面部毛细血管扩张白血病，淋巴瘤
Cockayne综合征	UV	侏儒，视网膜萎缩，早衰，耳聋三体性染色体畸变
Fanconi贫血症	交联剂	发育不全，各类血细胞减少白血病

第三节

逆转录作用

Reverse Transcription

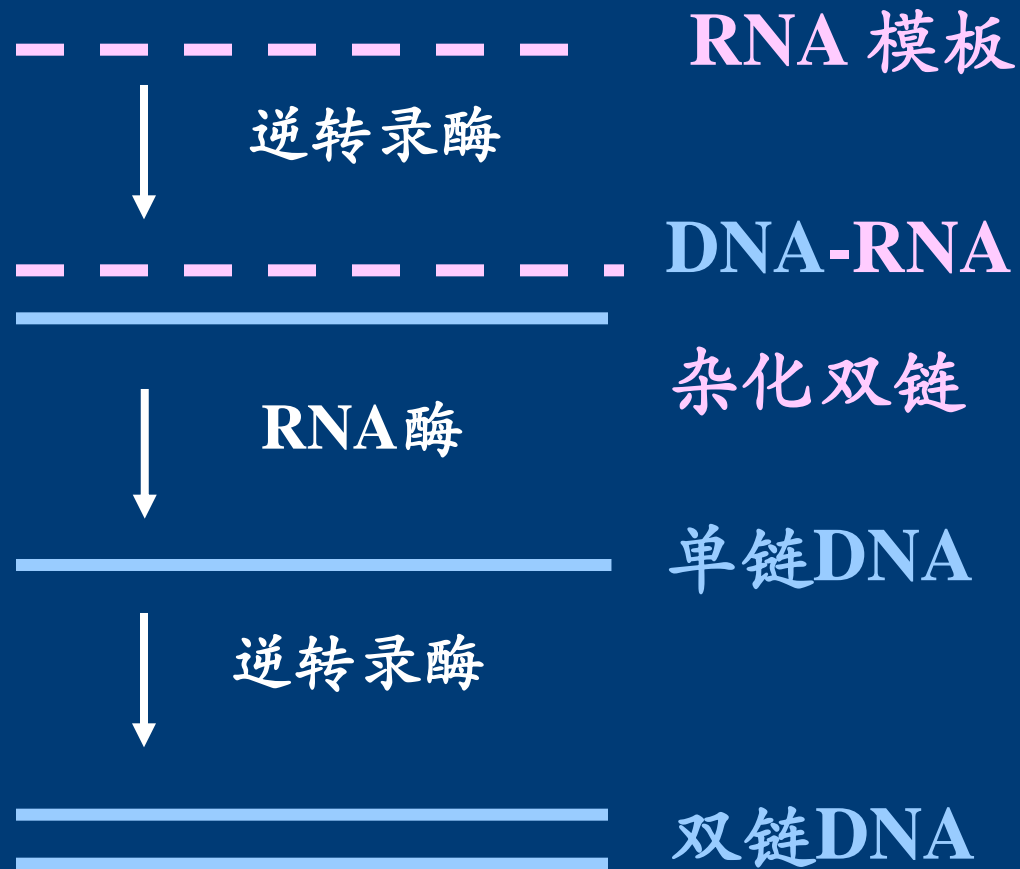
- 双链DNA是大多数生物的遗传物质。某些病毒的遗传物质是RNA。少数低等生物如M13噬菌体，它的感染型只含单链DNA。原核生物的质粒，真核生物的线粒体DNA，都是染色体外存在的DNA。这些非染色体基因组，采用特殊的方式进行复制。

一、逆转录作用与逆转录酶

- 逆转录(reverse transcription)
- 逆转录酶(reverse transcriptase)



■ 逆转录病毒细胞内的逆转录现象：

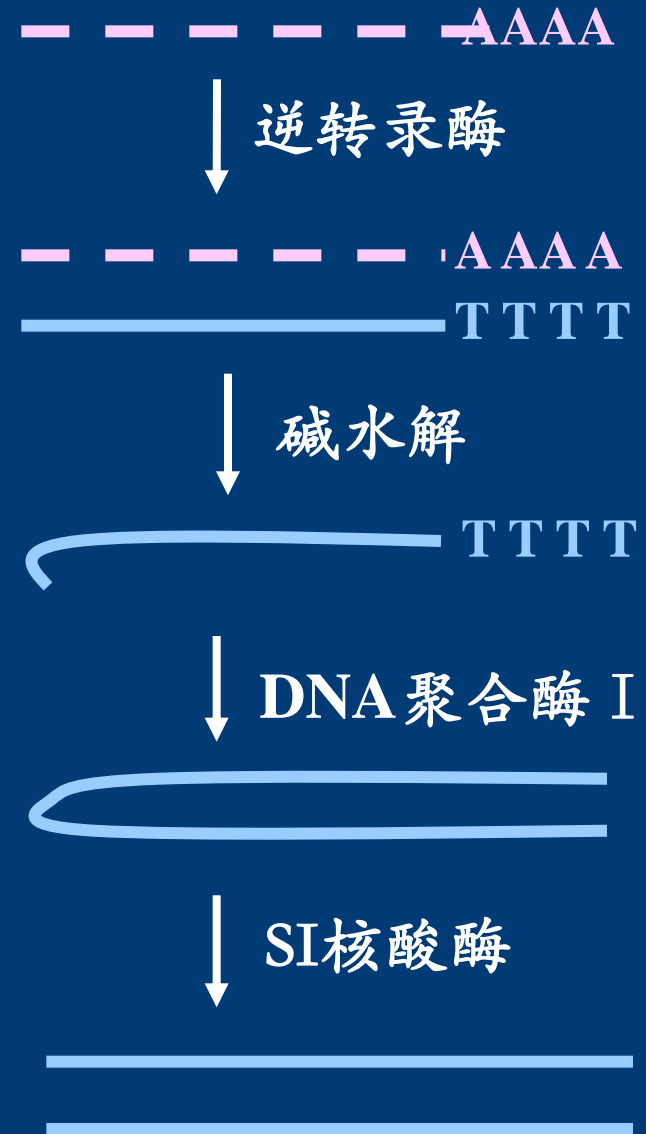


■ 试管内合成cDNA:

cDNA (complementary DNA)

以mRNA为模板，经逆转录合成的与mRNA碱基序列互补的DNA链。

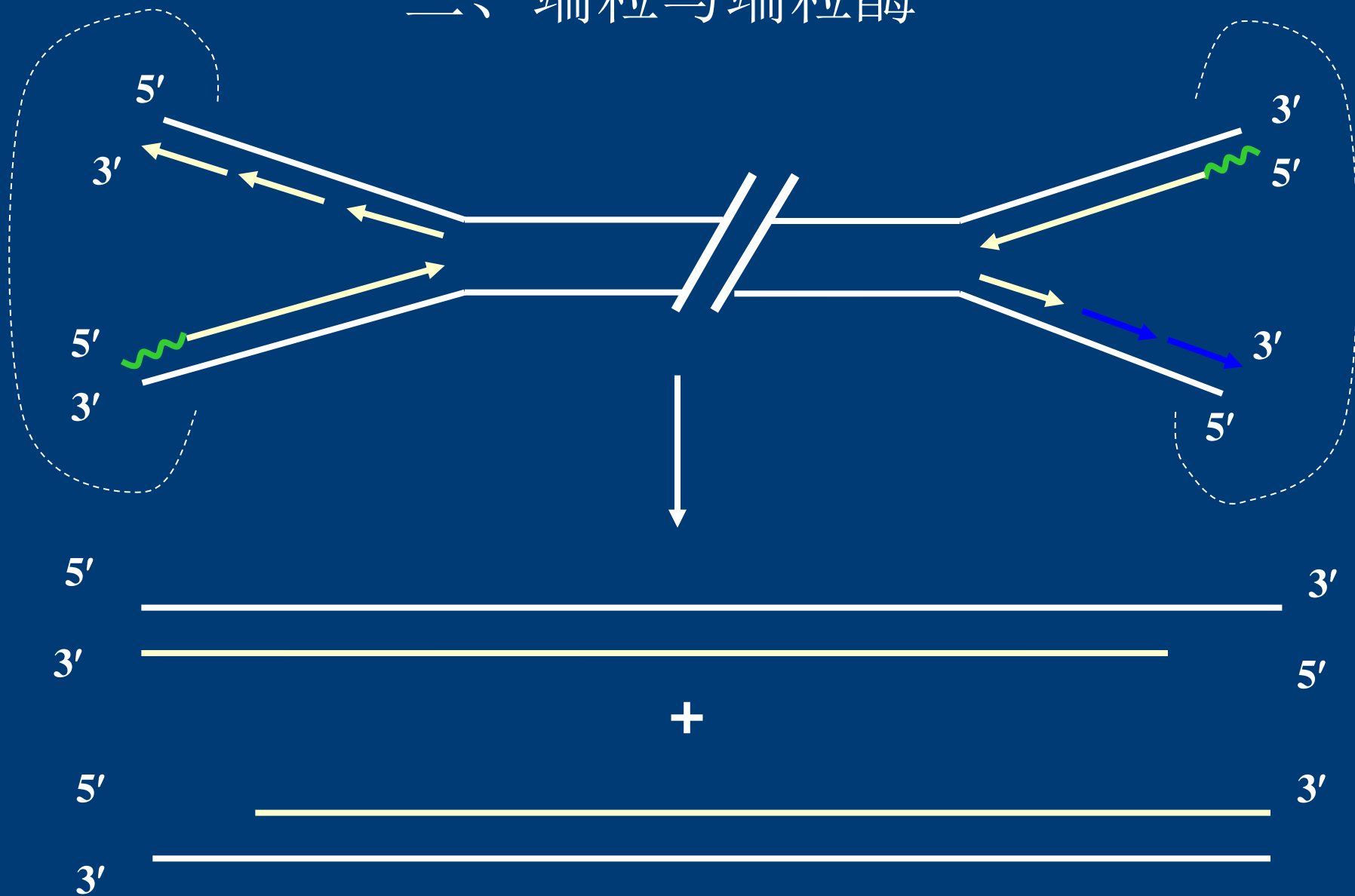
分子生物学研究可应用逆转录酶，作为获取基因工程目的基因的重要方法之一，此法称为cDNA法。



逆转录发现的意义

- 逆转录酶和逆转录现象，是分子生物学研究中的重大发现。
- 逆转录现象说明：至少在某些生物，RNA同样兼有遗传信息传代与表达功能。
- 对逆转录病毒的研究，拓宽了20世纪初已注意到的病毒致癌理论。

二、端粒与端粒酶



端粒(telomere)

指真核生物染色体线性DNA分子末端的结构

结构特点

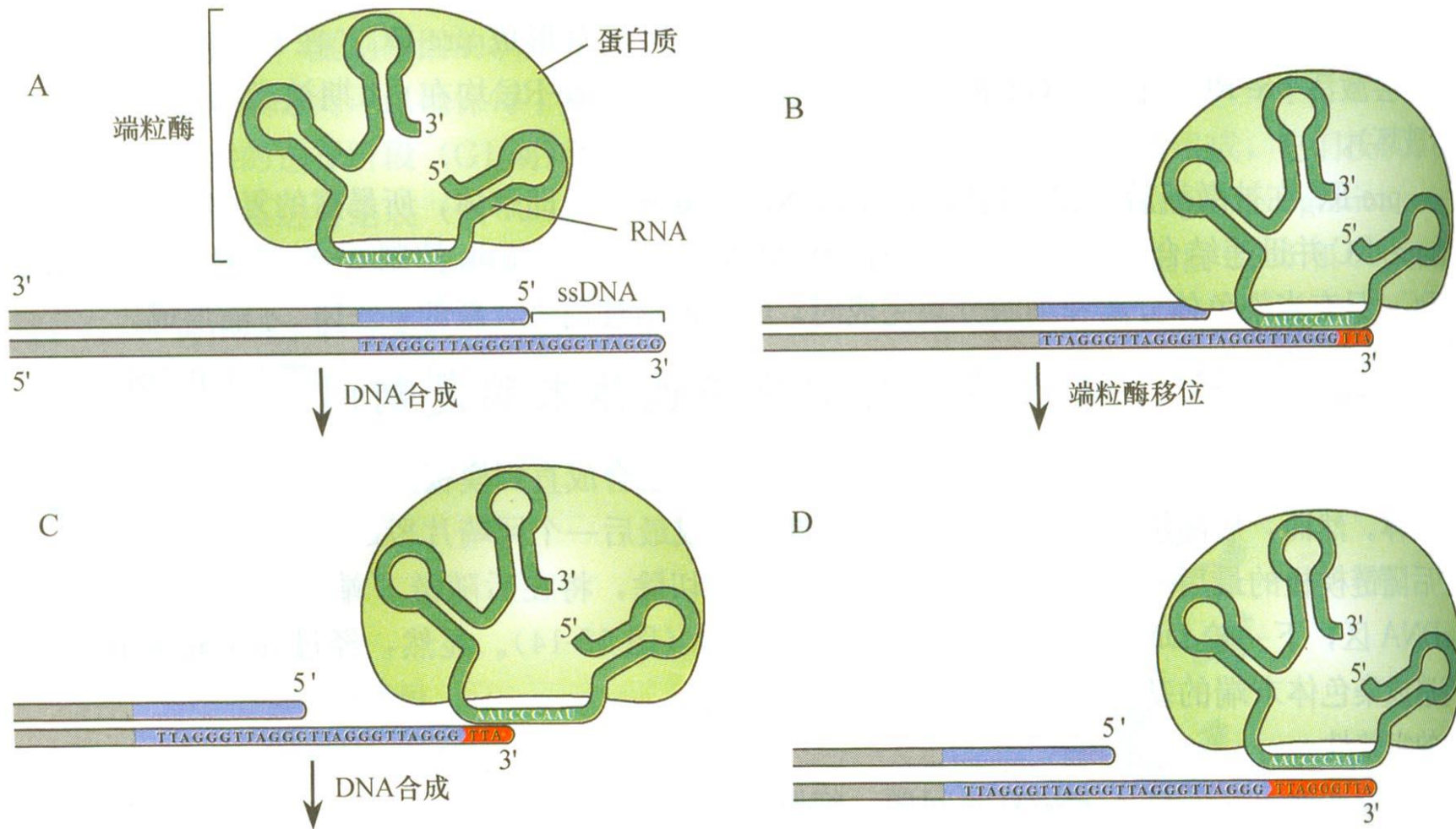
- 由末端DNA序列和蛋白质构成
- 末端DNA序列是多次重复的富含G、T碱基的短 序列

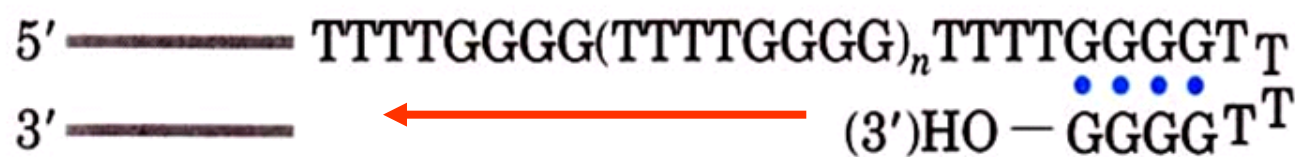
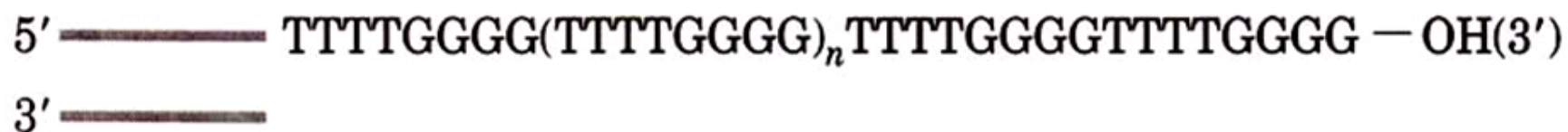


功能

- 维持染色体的稳定性
- 维持DNA复制的完整性

端粒酶催化作用的爬行模型





DNA聚合酶复制子链



进一步加工



目录

端粒酶的研究意义

作为细胞衰老的一个标志；

将端粒酶作为诊断某些肿瘤标志酶之一；

将端粒酶作为筛选肿瘤化疗药物的一种工具