

Chapter 10

DNA 的生物合成 DNA Biosynthesis

生化与分子生物学教研室

蚌埠医学院

Major Object

[教学时数] 5学时

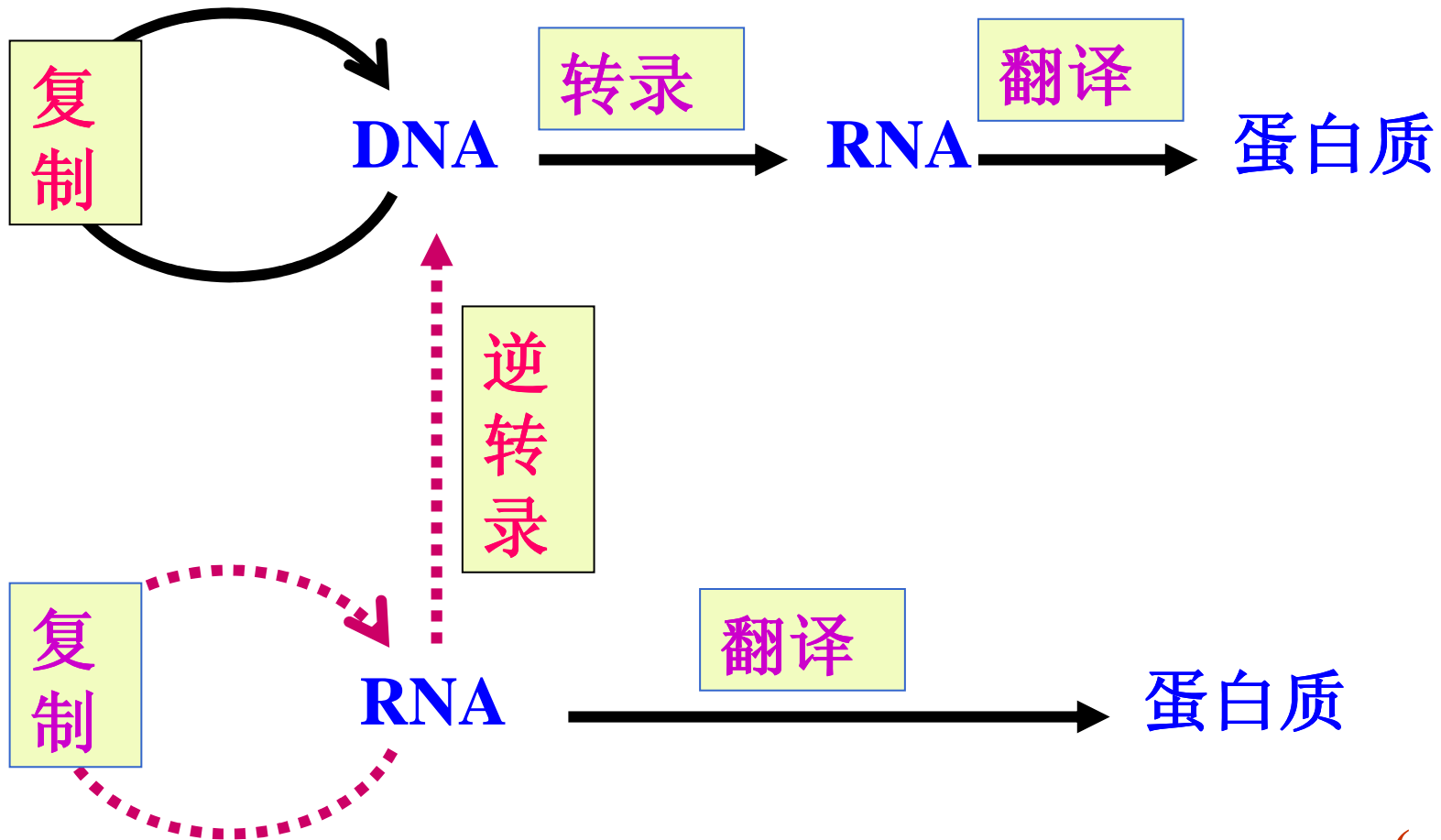
[掌握内容]: DNA半保留复制概念。参与原核生物DNA复制的模板, 底物, 酶类 (DNA聚合酶, 解螺旋酶, DNA拓扑异构酶, 引物酶及DNA连接酶) 及单链DNA结合蛋白, 复制的半不连续性和冈崎片段, 领头链和随从链。

[熟悉内容]: 复制叉、DNA生物合成过程。DNA损伤与修复, 逆转录现象和逆转录酶。

[了解内容]: 滚环复制, 半保留复制的实验依据。

[自学内容]: 真核生物的端粒和端粒酶。

遗传信息传递的中心法则及其扩充



基因 (gene) :

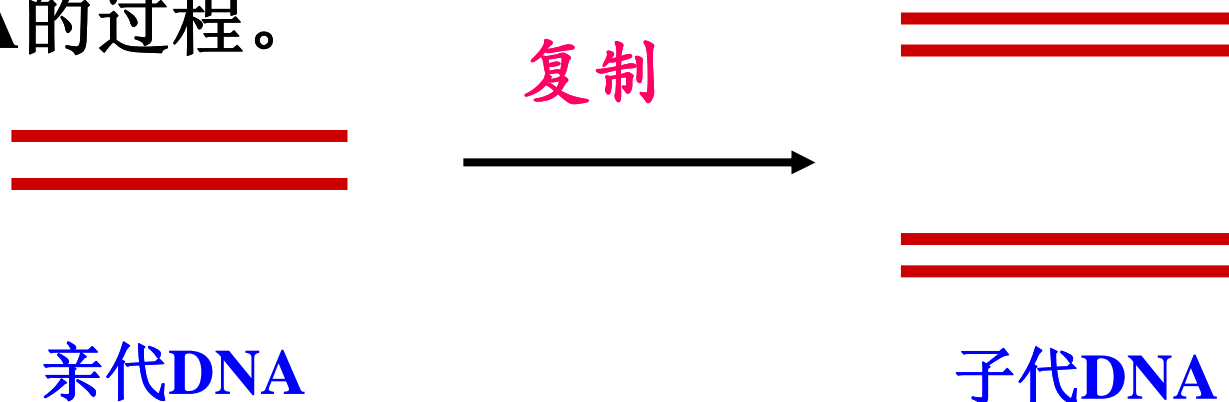
是指为生物活性产物编码的**DNA**功能片段，这些产物主要是**蛋白质**或是**各种RNA**。

基因表达 (gene expression) :

通过转录和翻译，将DNA分子上A、G、C、T四个符号所包含的信息，转变为蛋白质分子中20种氨基酸的信息。

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。



亲代DNA

子代DNA

(p215)

4

第一节 复制的基本规律

第二节 DNA复制的酶学和拓扑学变化

第三节 DNA的生物合成

第四节 逆转录和其他复制方式

第五节 DNA损伤（突变）与修复

第一节 复制的基本规律

(p218)

一、半保留复制的实验依据和意义

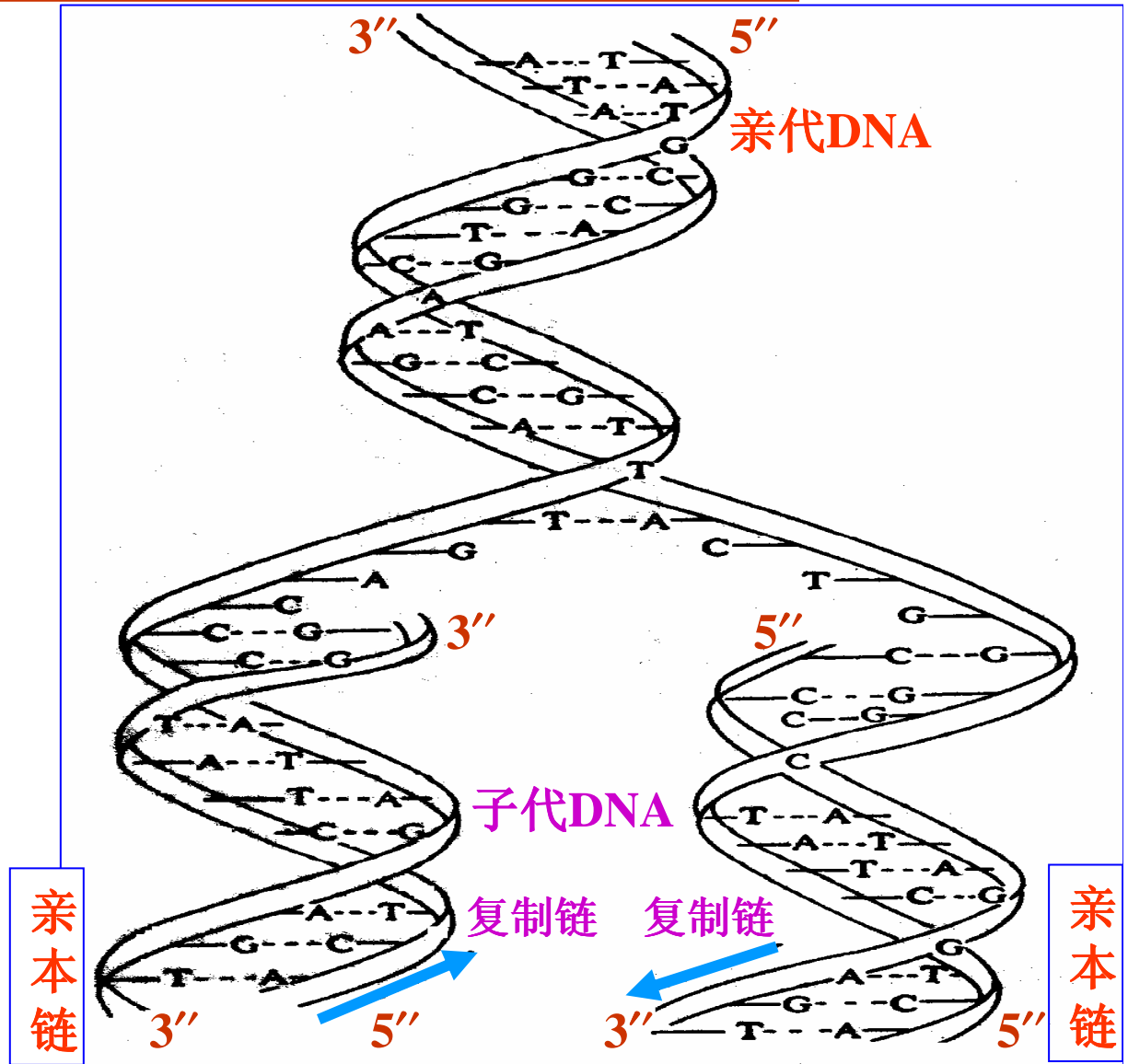
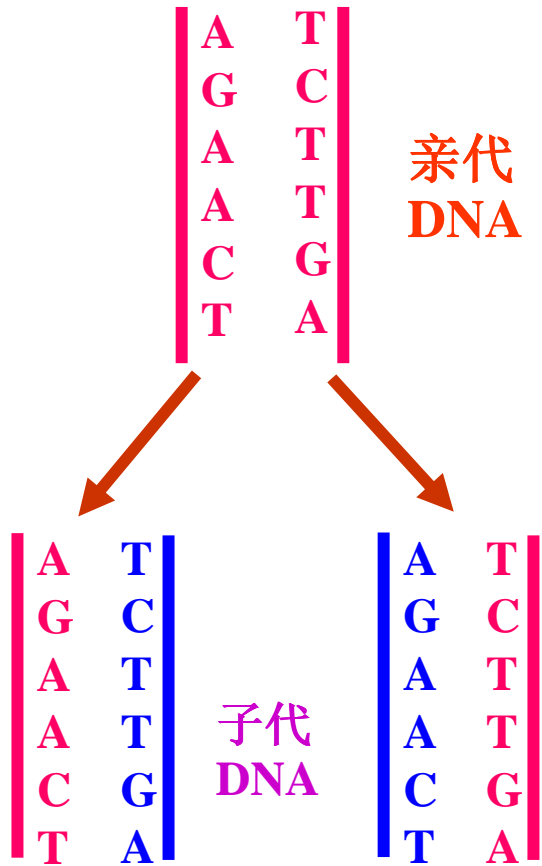
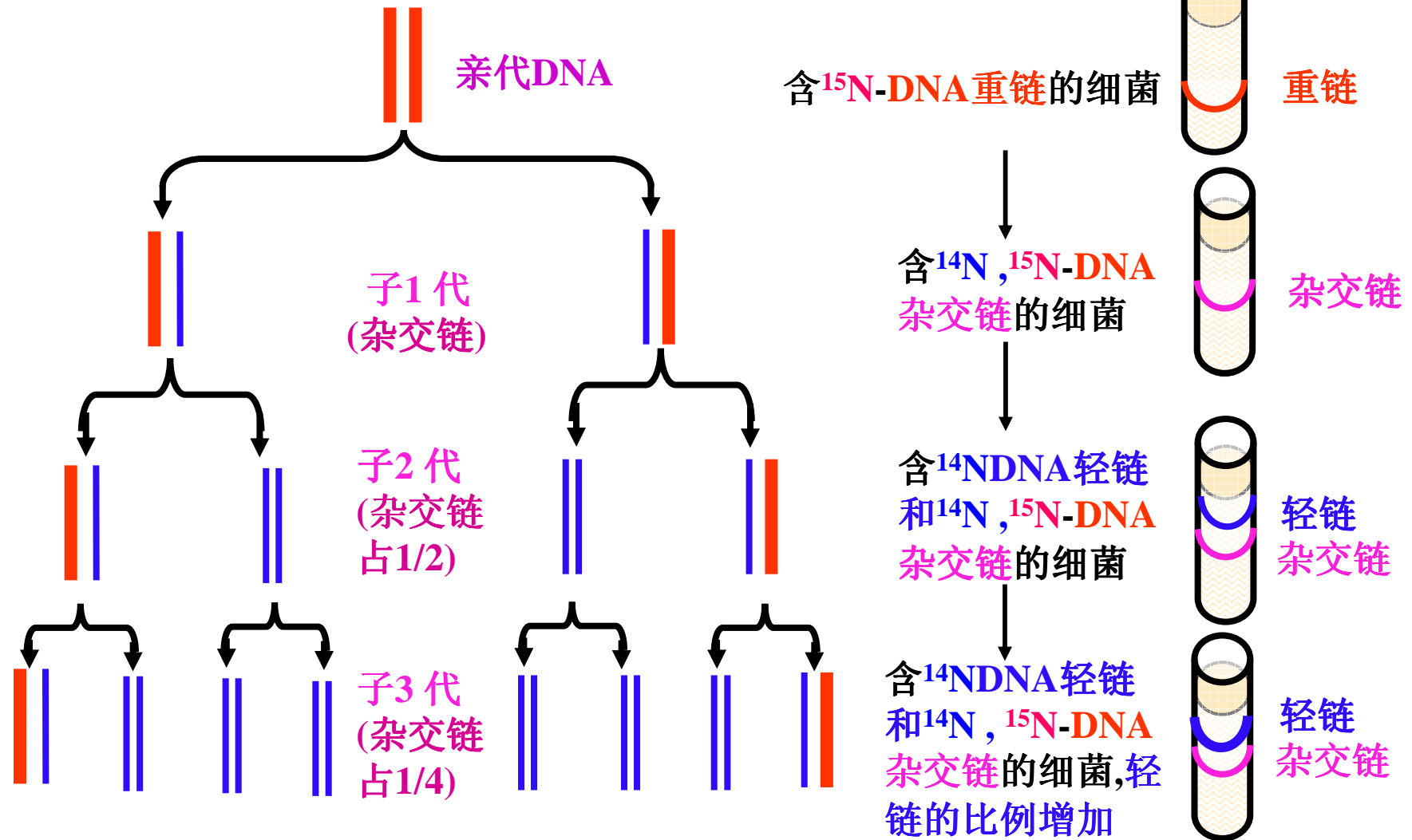
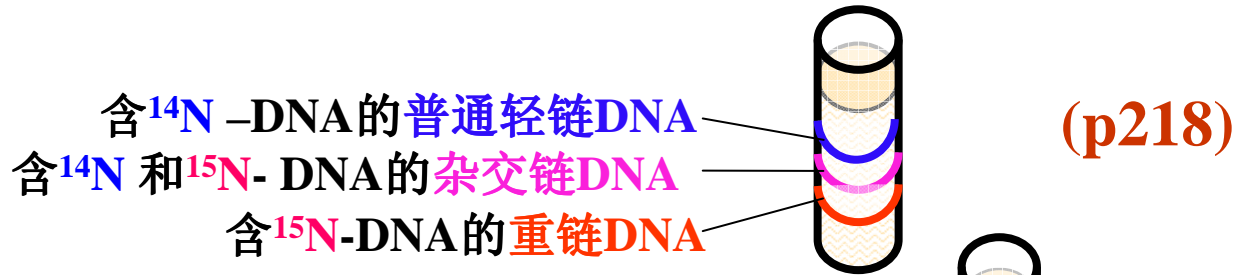


图10-1 DNA的半保留复制

1958年，Meselson和Stahl用实验证实了Watson和Crick的DNA双螺旋模型结构，验证了DNA半保留复制假说。他们将大肠杆菌培养在以 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 为唯一氮源的培养基中，繁殖15代后，分离出含 ^{15}N 标记DNA的细胞，再将细菌转移到 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ 的培养基中培养，随后在不同的时间处理细胞并取样，用CsCl密度梯度离心法分析DNA。由于含 ^{15}N 的DNA密度比 ^{14}N 的DNA大，故可形成含 ^{15}N 的“重”链DNA和含 ^{14}N 普通DNA的“轻”链两条区带。

(p217)

图10-2 DNA半保留复制的证据

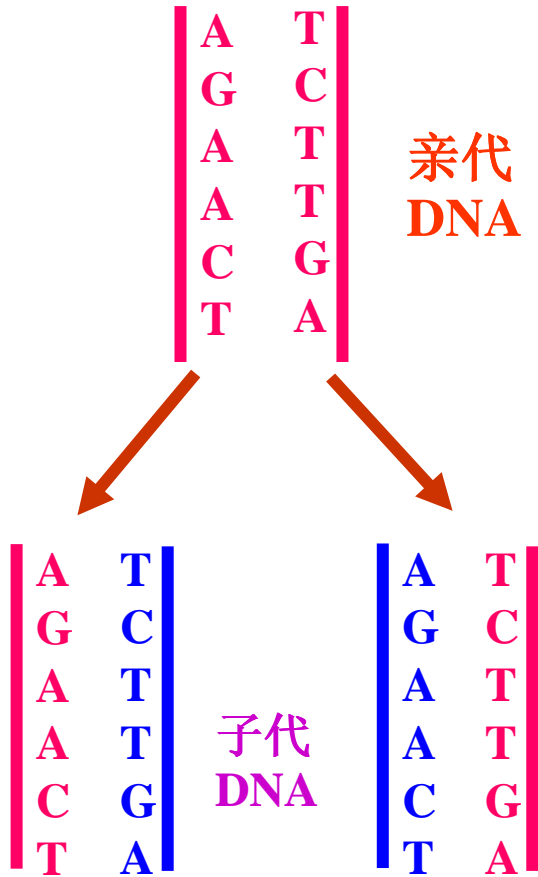


实验结果表明，复制后的子1代，其DNA只出现了1条位于 ^{14}N -DNA和 ^{15}N -DNA中间的区带，这说明该区带的DNA是由 ^{14}N -DNA和 ^{15}N -DNA杂交组成的，且密度正好位于两者之间；子1代再复制成子2代，后者出现两条区带：1条是 ^{14}N -DNA轻链，另1条是 ^{14}N -DNA和 ^{15}N -DNA杂交链；随着细菌培养的不断继续， ^{14}N -DNA分子逐渐增多，而 ^{15}N -DNA分子逐渐减少，含 ^{15}N 的DNA按1/4、1/8、1/16.....的比例逐渐被稀释掉。实验结果证明：DNA以半保留复制方式进行复制。

(p218) 9

半保留复制 (semiconservative replication):

DNA在复制时，亲代的双股DNA解开成单股链，各自作为模板，根据碱基配对的规律，分别合成新的互补链，即新合成的两个子代DNA分子与亲代DNA分子的碱基顺序完全相同。亲代DNA复制以后，子代的双股DNA链中，一股链来自亲代，另一股是新合成的互补链，DNA的这种复制方式称为半保留复制。



半保留复制的意义:

- 1、按半保留复制方式，子代DNA保留了亲代DNA的全部遗传信息，体现了遗传的保守性。
- 2、遗传的保守性，是物种稳定性的分子基础，遗传的保守性是相对的，存在着变异现象。

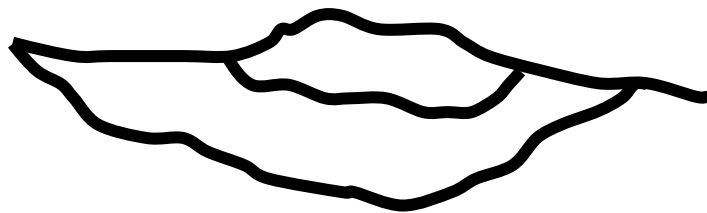
(p219)

二、双向复制

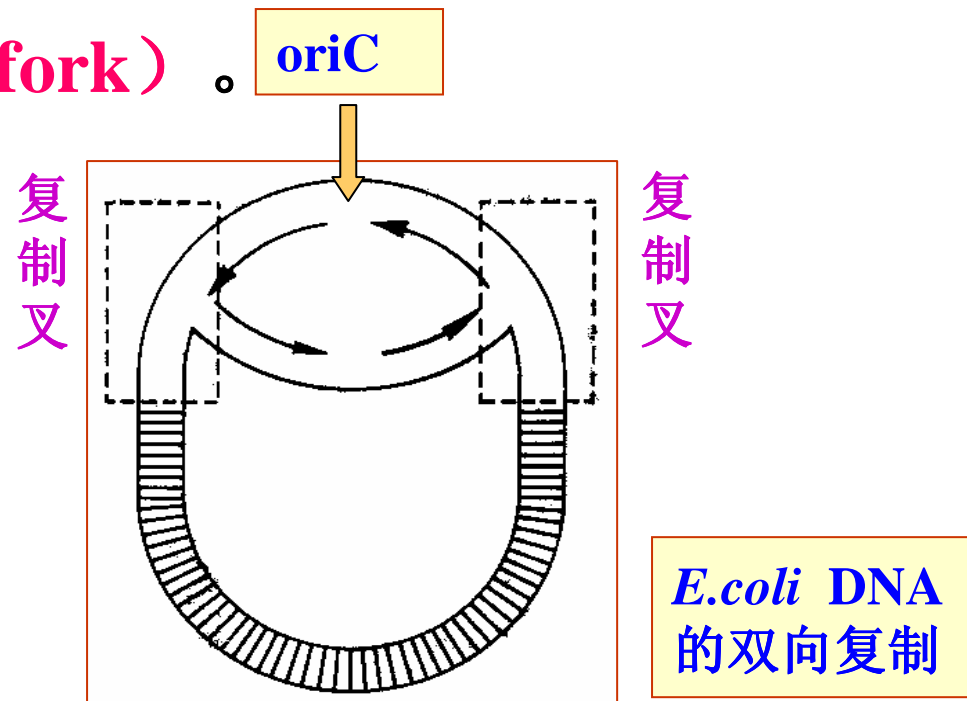
(p219)

某一物种拥有的全部遗传物质称为基因组。

***原核生物**基因组是环状DNA，只有**一个**固定的复制起始点（**origin**）。复制时，DNA双链解开，在两股单链上同时向两个方向进行复制，称为**双向复制**。在电子显微镜下看到两股链伸展成“Y”状结构，称为**复制叉**（**replication fork**）。



复制中的放射自显影图象



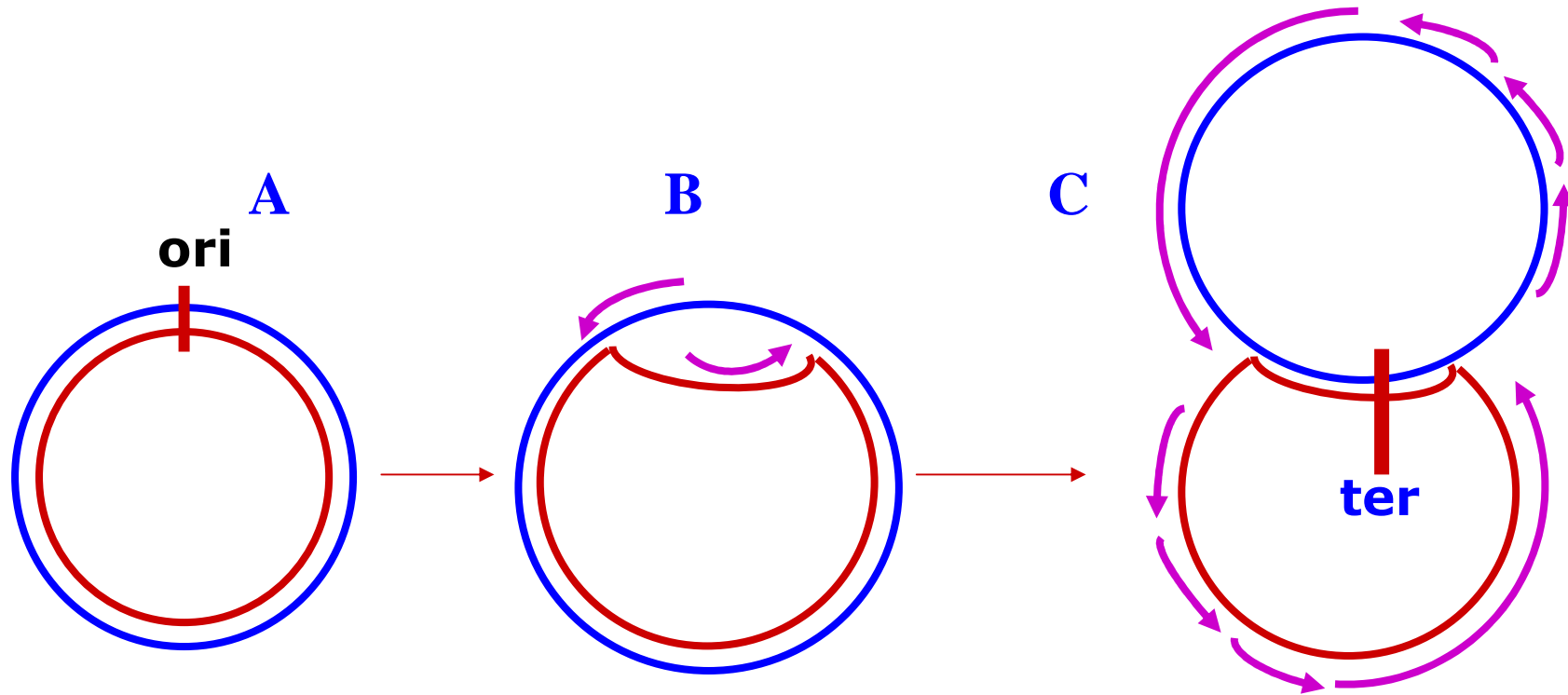
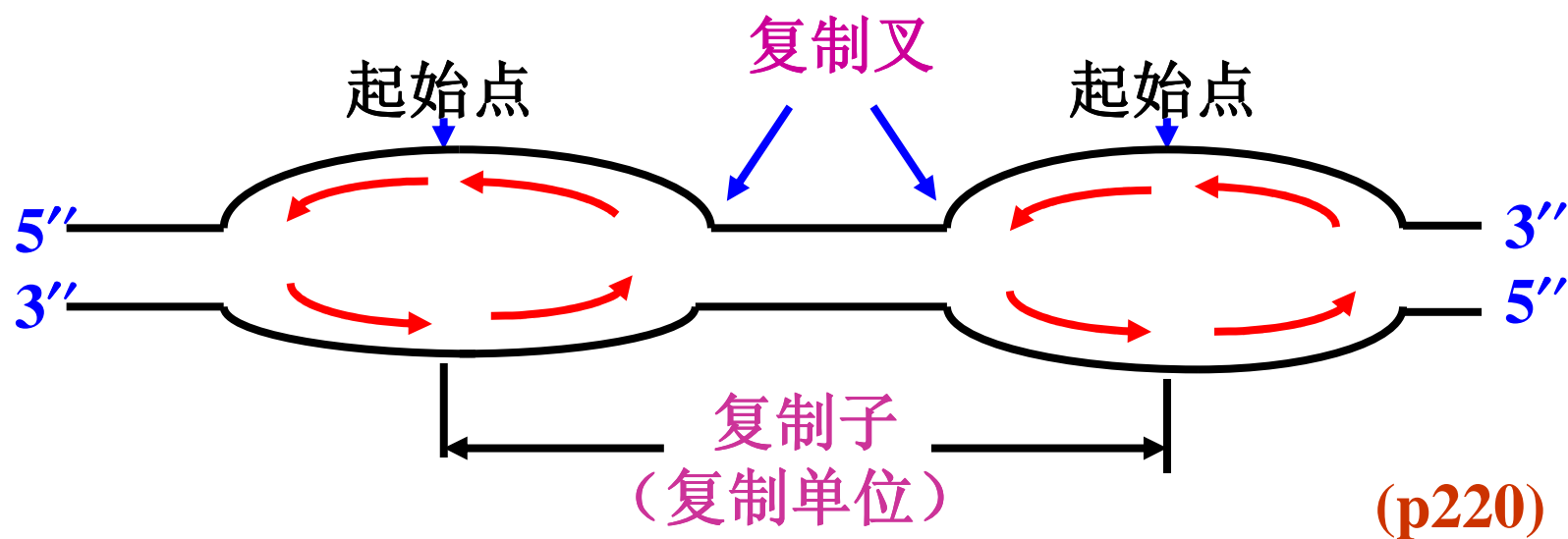


图10-4 原核生物DNA的双向复制

- A. 环状双链DNA及复制起始点
- B. 复制中的两个复制叉
- C. 复制接近终止点(termination, ter)

(p219)

*真核细胞染色体庞大、复杂，有**多个复制起始点**，同时形成多个复制单位，**两个相邻复制起始点之间的DNA片段**，称为一个**复制子 (replicon)**，复制子是独立完成复制的功能单位。高等生物有数以万计的复制子。原核生物是单复制子。



(p220)

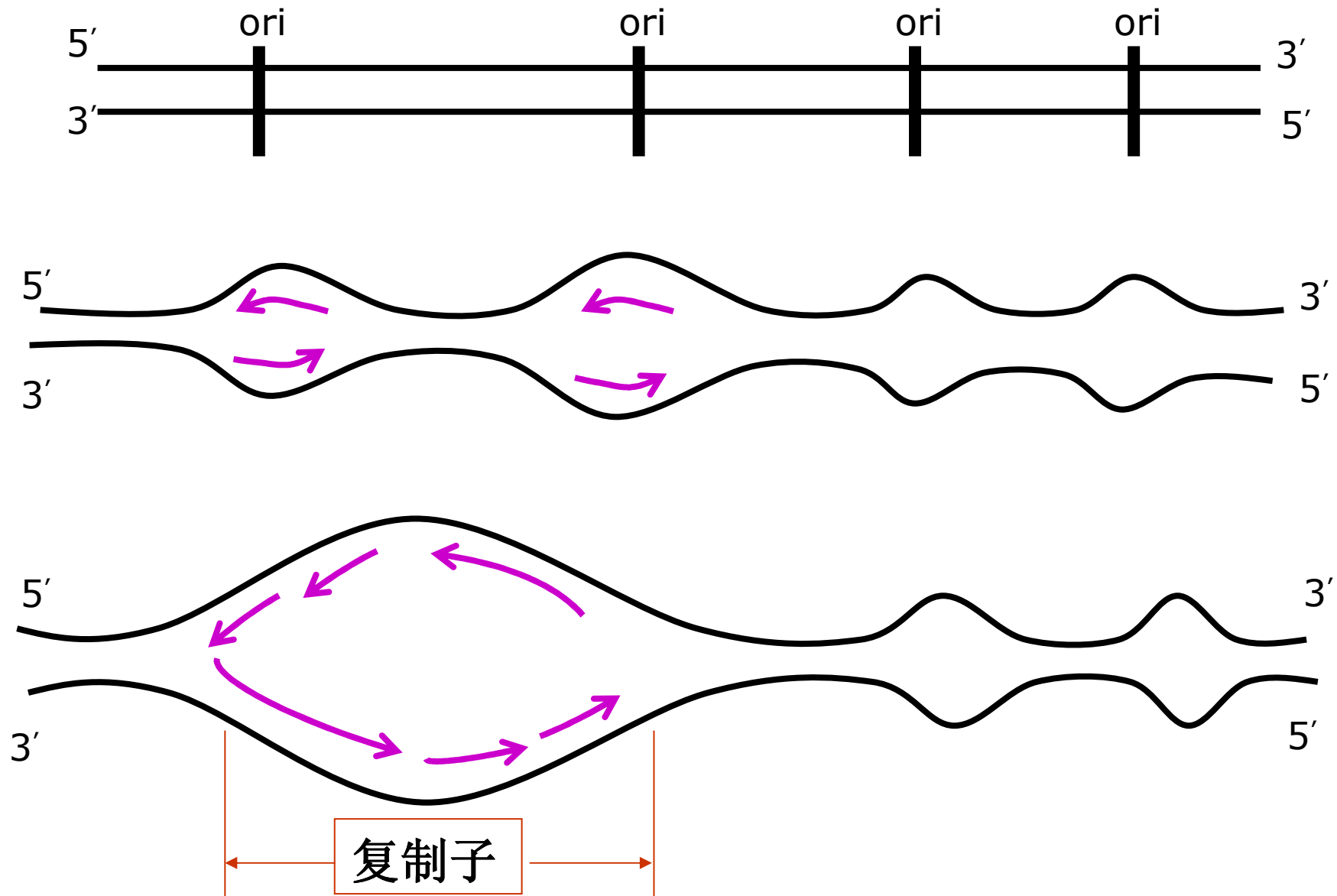
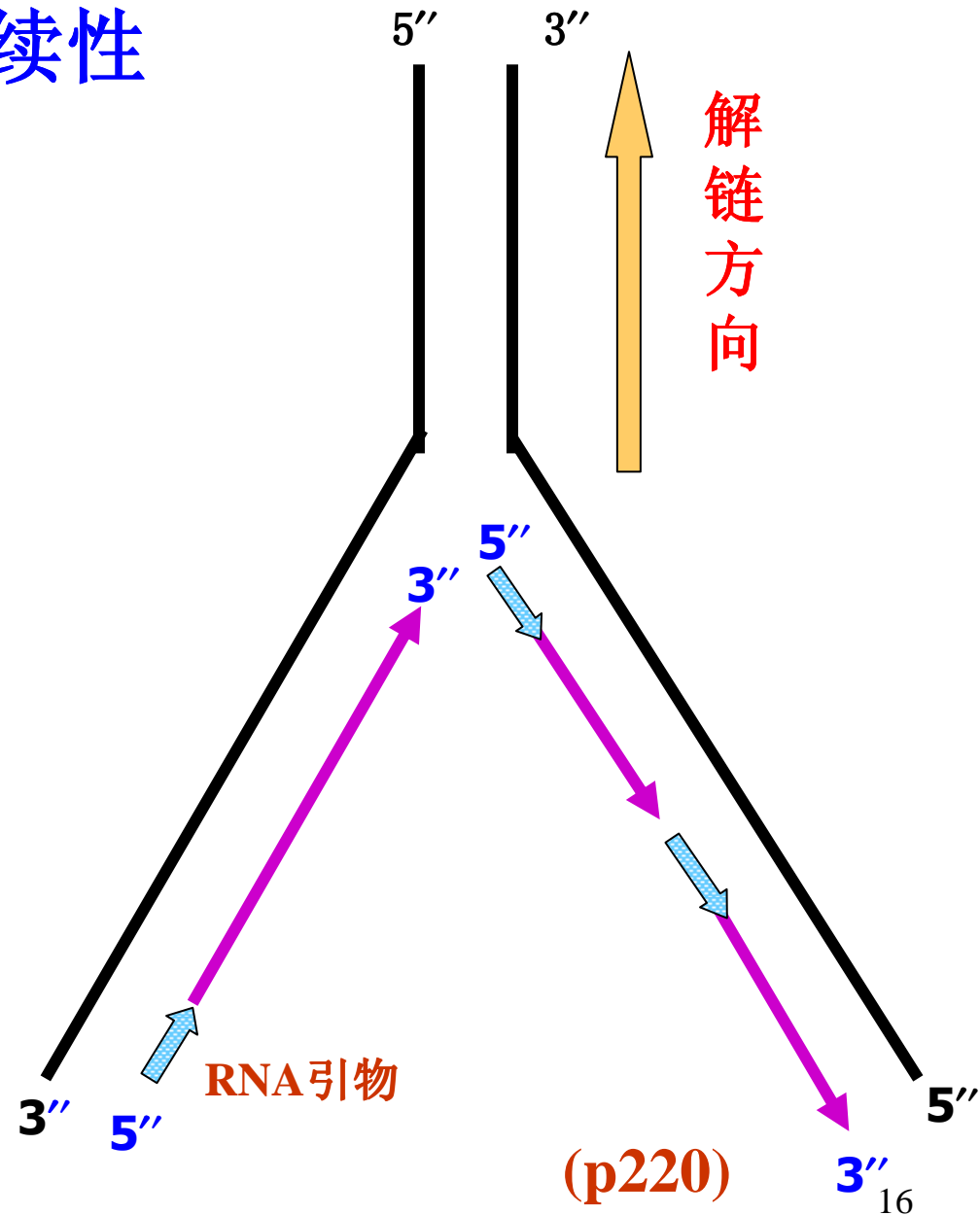


图10-5 真核生物的多复制子复制

三、复制的半不连续性

DNA双链的走向相反，而复制和引物合成方向总是从5''→3''延伸。因此在复制过程中，一条链连续合成，而另一条链不连续合成，这种复制方式称为半不连续复制。



顺着解链方向而生成的子链，复制连续进行，该股链称为领头链（leading strand）。

复制方向与解链方向相反，复制不连续进行的该股链称为随从链（lagging strand）。

随从链上不连续合成的DNA片段称为冈崎片段（Okazaki fragment）。

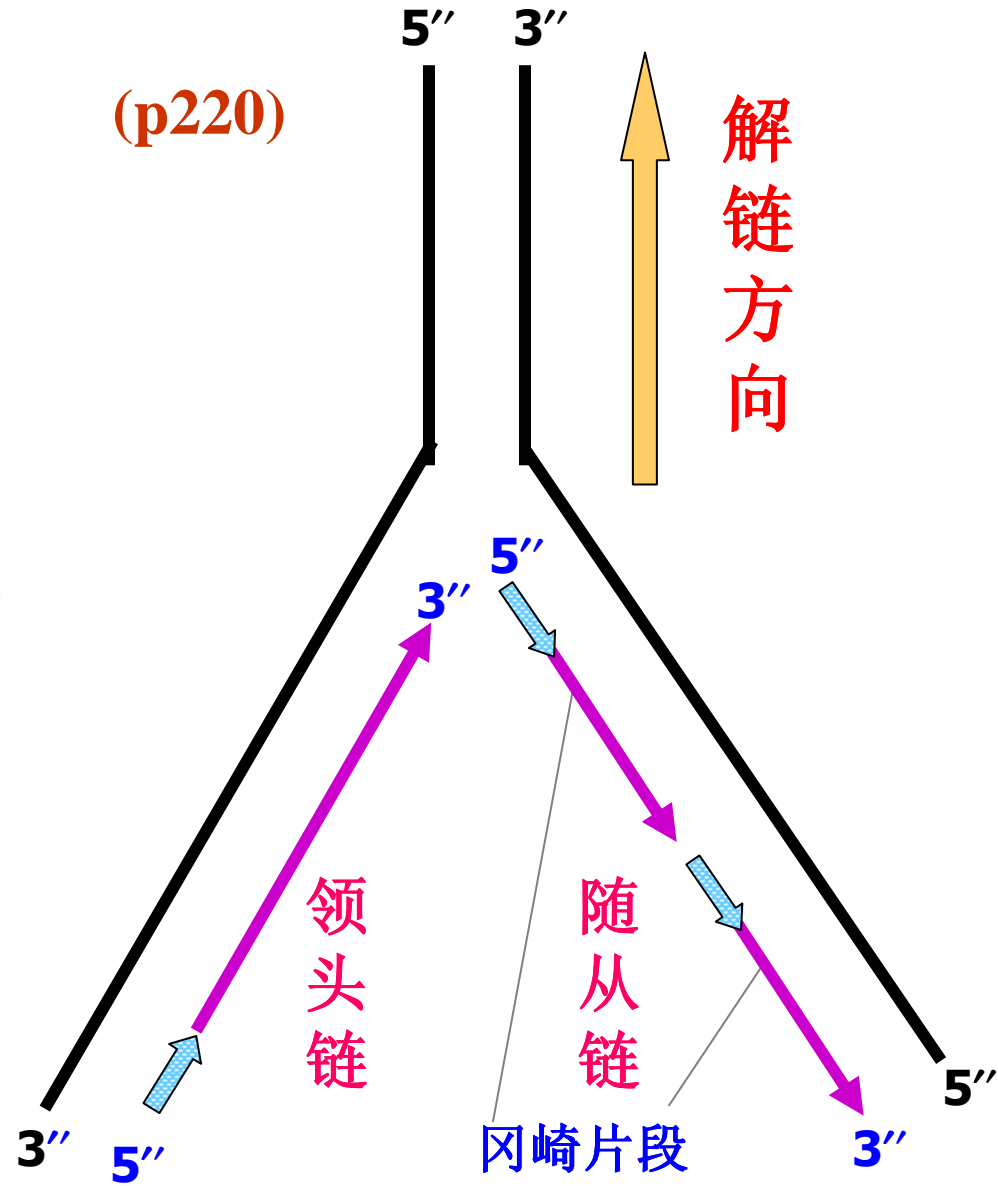


图10-6 DNA的半不连续复制

第二节 DNA复制的酶学和拓扑学变化

参与DNA复制的物质

- 底物：4种脱氧核糖核苷三磷酸
(**dNTP**: dATP、dGTP、
dCTP、dTTP)
- 聚合酶：依赖DNA的DNA聚合酶
- 模板：解开成单链的DNA母链
- 引物：小分子RNA寡核苷酸
- 其它：酶和蛋白质因子、供能物质、金属离子等。

(p221)

参与DNA复制的酶和蛋白因子:

1. 依赖DNA的DNA聚合酶(DNA-pol)
2. 解螺旋酶
3. DNA拓扑异构酶
4. 单链DNA结合蛋白
5. 引物酶及引发体
6. DNA连接酶

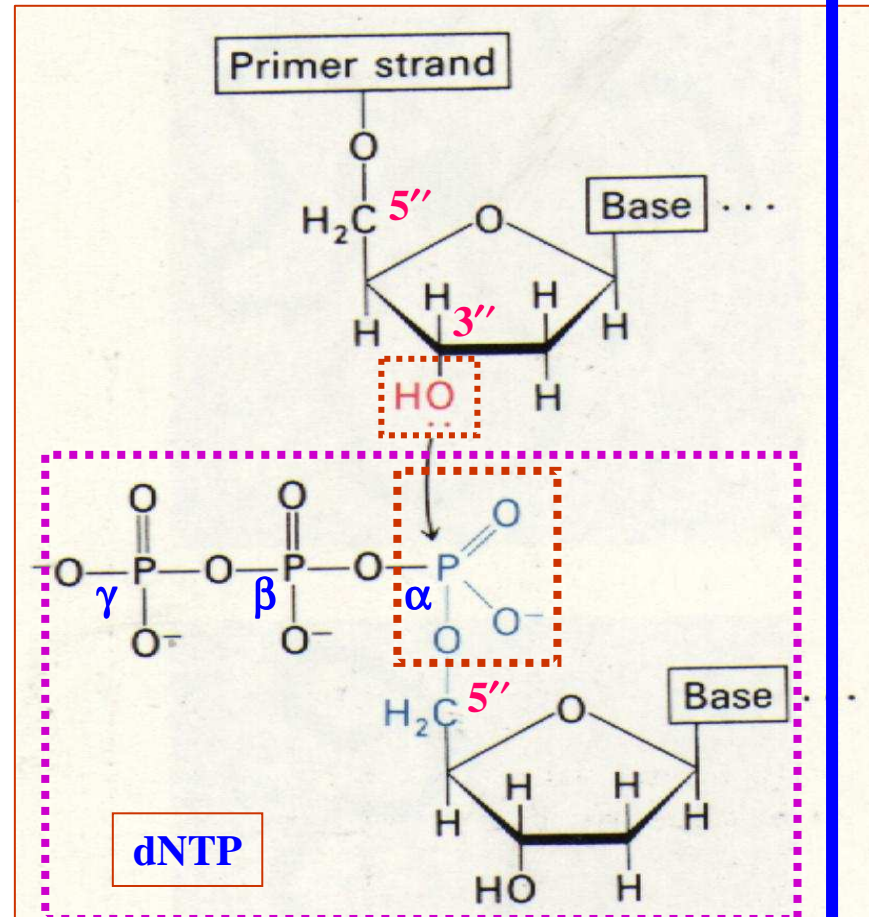
一、复制的化学反应



单链DNA
模板

• DNA聚合反应:

- * 以4种脱氧核苷三磷酸(dNTP)为底物催化合成DNA;
- * DNA新链生成需引物和模板;
- * 新链的延长只可沿5'→3'方向进行;



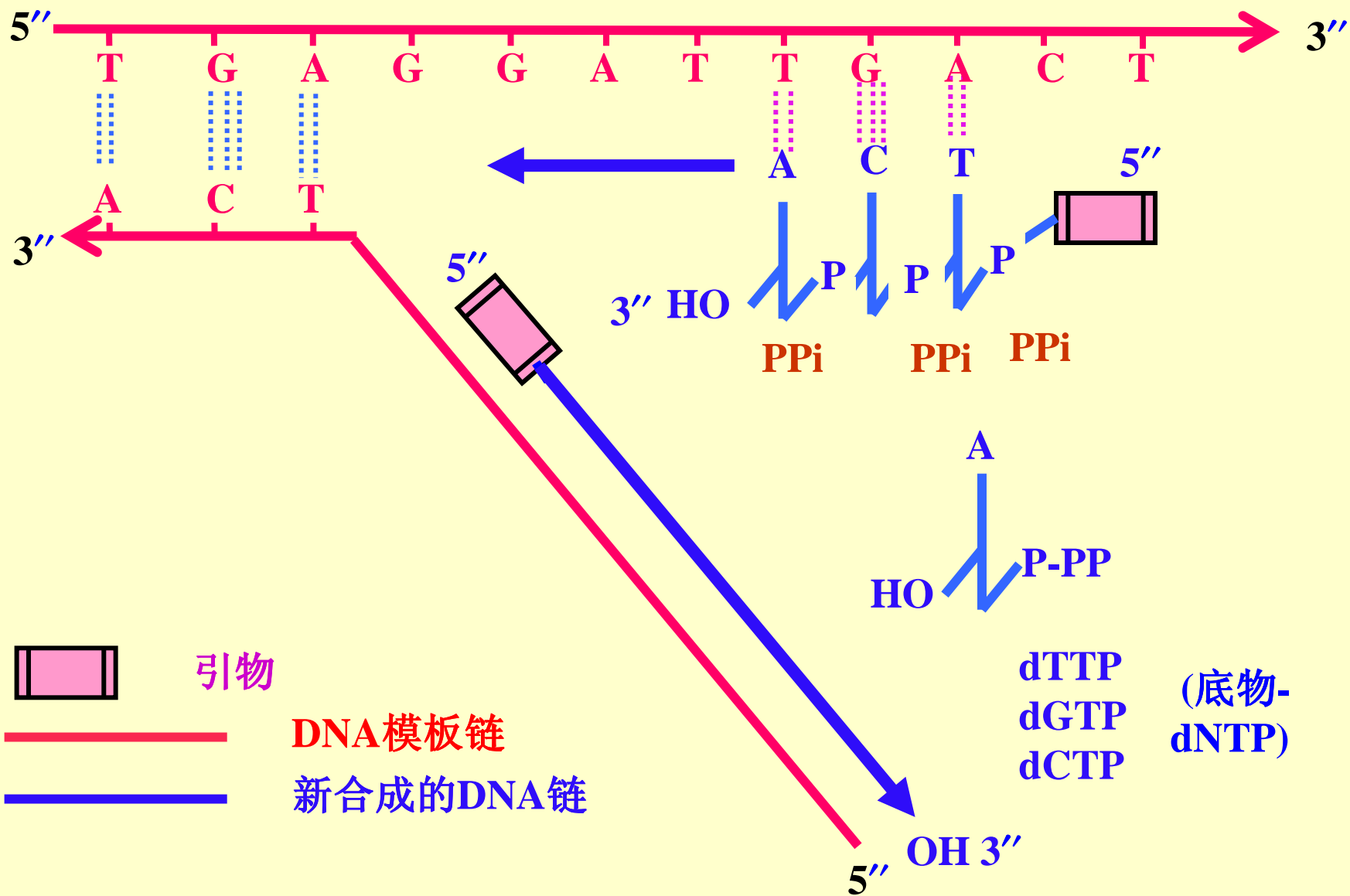


图10-7 DNA复制过程中dNMP的聚合

二、DNA聚合酶

(DNA聚合酶的全称为依赖DNA的DNA聚合酶，
DNA-dependent DNA polymerase , DDDP)

简称：DNA-pol

活性：1. 5'→3'的聚合活性

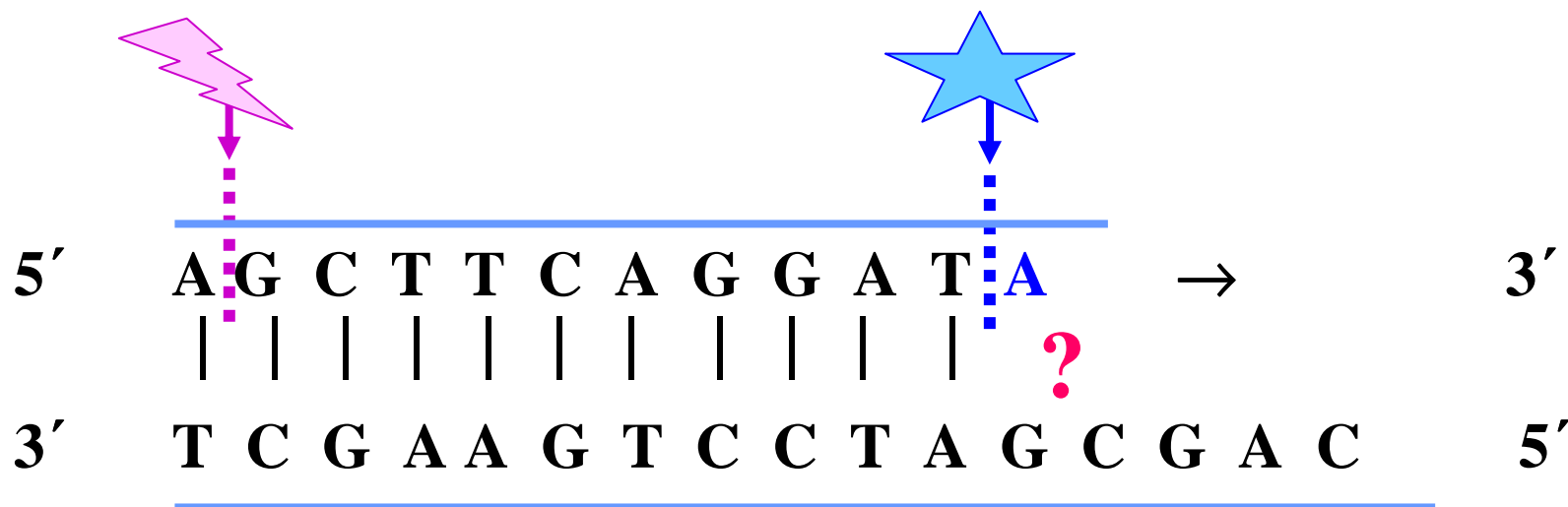
2. 核酸外切酶活性

• 聚合反应的特点：

- * 以4种脱氧核苷三磷酸(dNTP)为底物催化合成DNA；
- * DNA新链生成需引物和模板；
- * 新链的延长只可沿5'→3'方向进行；
- * 产物性质与模板相同。

(p221)

- 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。

(一) 原核生物的DNA聚合酶

DNA聚合酶 { DNA-pol I
DNA-pol II
DNA-pol III

原核生物的DNA聚合酶 (p222)

	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) :

大肠杆菌DNA

聚合酶 I 是单一多肽链的多功能酶，具有**3种酶活性**。

其聚合酶活性只能催化延长约**20个核苷酸**左右聚合。

作用：

校正复制错误，填补空隙，修复损伤。

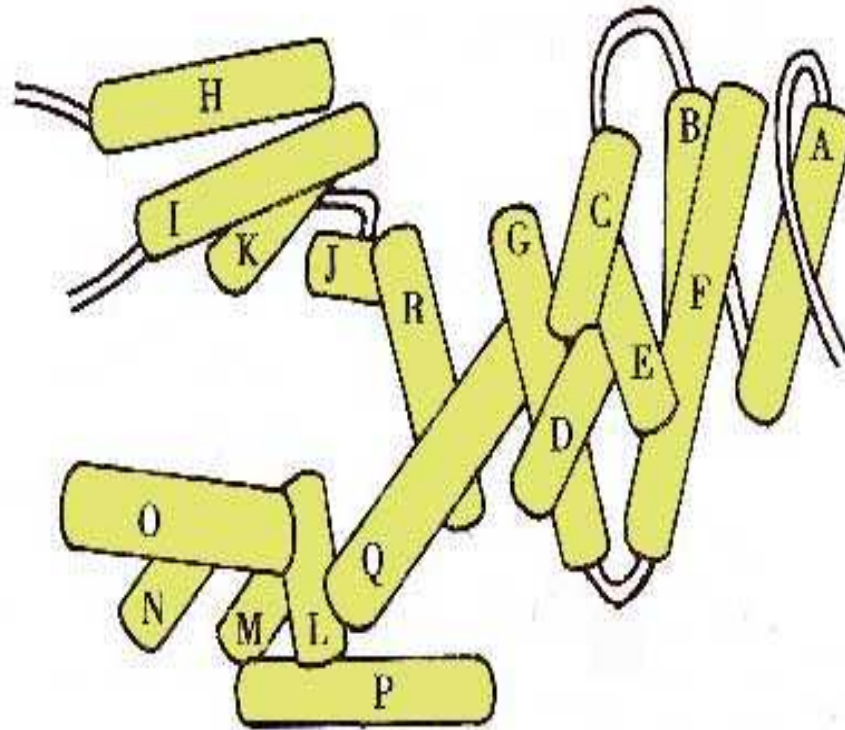


图10-8 *E.coli* DNA-pol I 的组成
(含18个 α -螺旋)

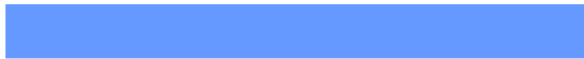
N 端

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，分子生物学研究中常用的工具酶。

(p223)

2. DNA-pol II (120kD)

含一条多肽链，但只在无pol I 及pol III的情况下才起作用，真正的功能尚不清楚。

催化活性 $\left\{ \begin{array}{l} 5' \rightarrow 3' \text{聚合酶活性} \\ 3' \rightarrow 5' \text{核酸外切酶活性} \end{array} \right.$

- DNA-pol II基因发生突变，细菌依然能存活。
- 它参与DNA损伤的应急状态修复。

3. DNA-pol III (250kD)

DNA pol III 每分钟可催化多至 10^5 个核苷酸聚合。

作用:

是原核生物复制延长中真正起催化作用的酶。

(p222)

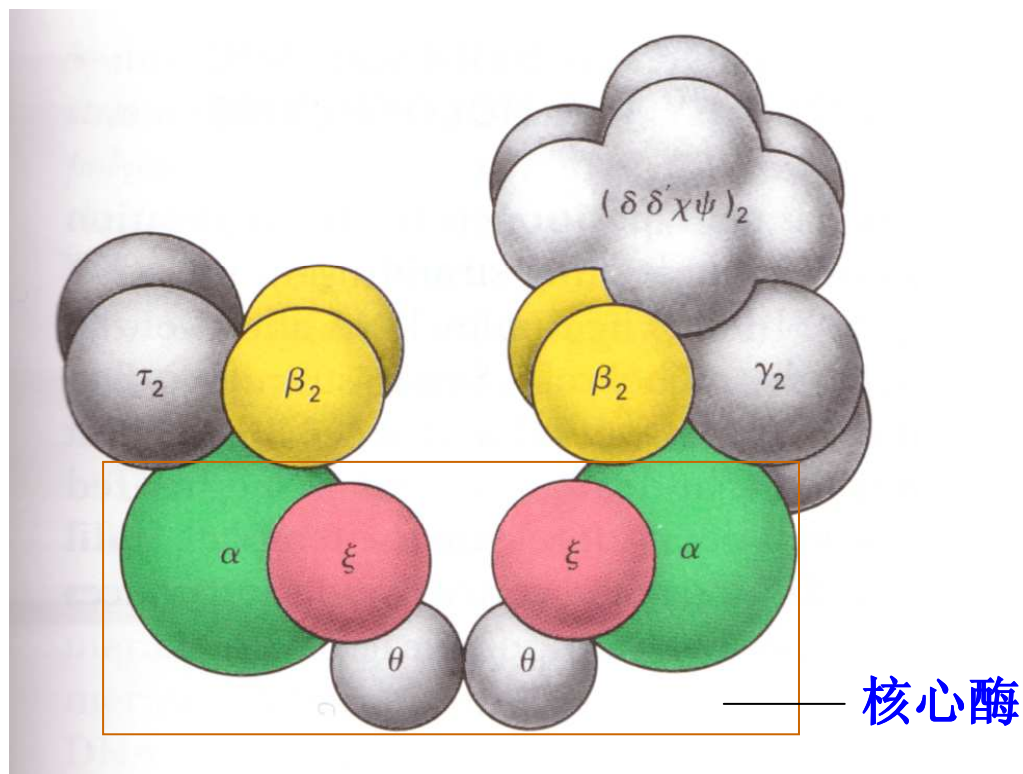


图10-8 *E.coli* DNA-pol III 的组成
(不对称二聚体)

(二) 真核生物的DNA聚合酶

- DNA-pol α 起始引发，引物酶活性。
- DNA-pol β 低保真度的复制。
- DNA-pol γ 参与线粒体DNA复制。
- DNA-pol δ 延长子链的主要酶，解螺旋酶活性。
- DNA-pol ϵ 在复制过程中起校读、修复和填补缺口的作用。

(p223)

真核生物的DNA聚合酶 (p223)

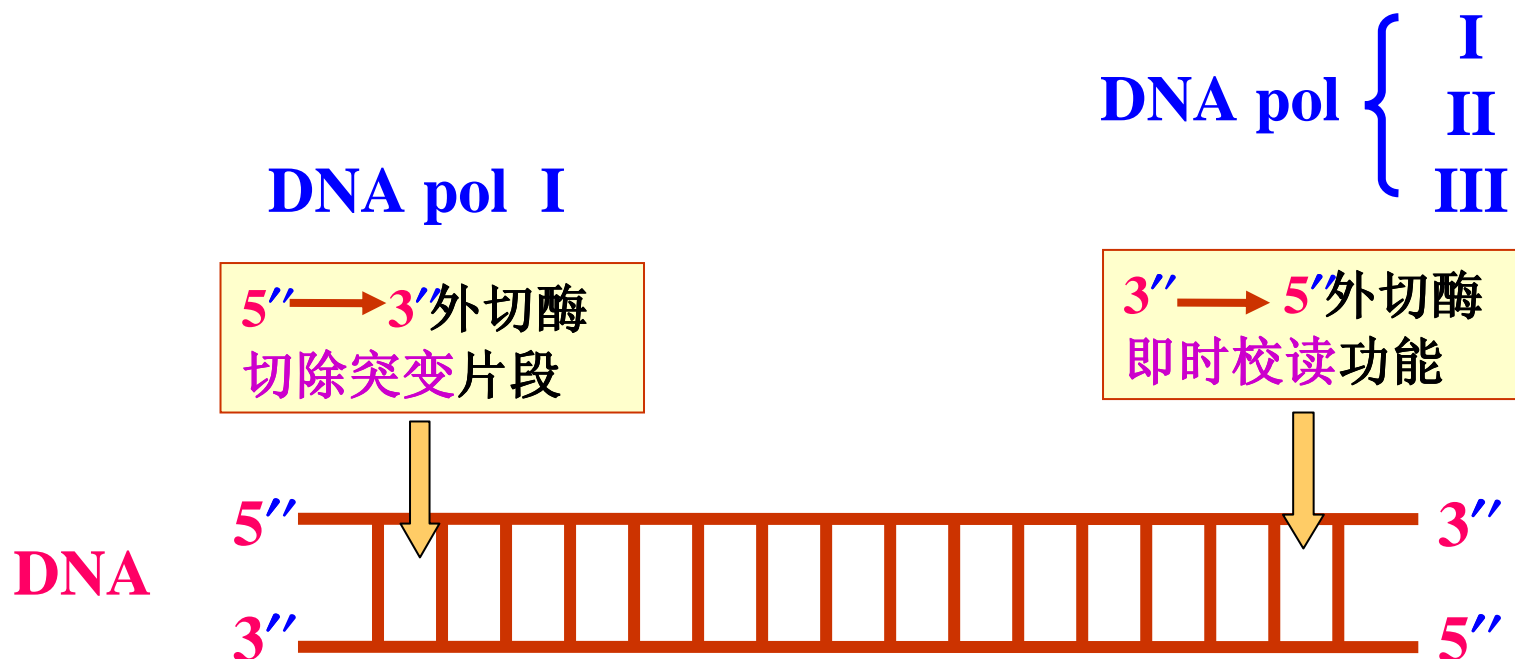
DNA-pol	α	β	γ	δ	ϵ
分子量 (kD)	16.5	4.0	14.0	12.5	25.5
5'→3'聚合活性	中	?	高	高	高
3'→5'核酸外切酶活性	-	-	+	+	+
功能	起始引物酶活性	低保真度的复制	线粒体DNA复制	延长子链的主要酶，解螺旋酶活性	填补引物空隙，切除修复，重组

三、复制保真性的酶学依据

(p223)

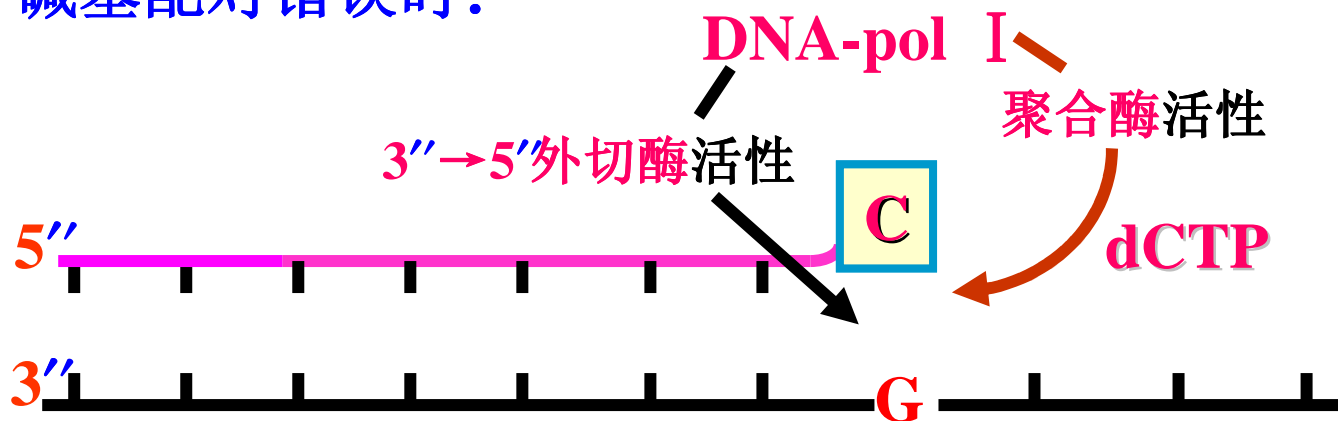
(一) 核酸外切酶活性和校读

核酸外切酶 (exonuclease) 包括 $5''\rightarrow 3''$ 外切酶和 $3''\rightarrow 5''$ 外切酶两类。



(二) 复制的保真性和碱基选择

1) 碱基配对错误时:



2) 碱基配对正确时:

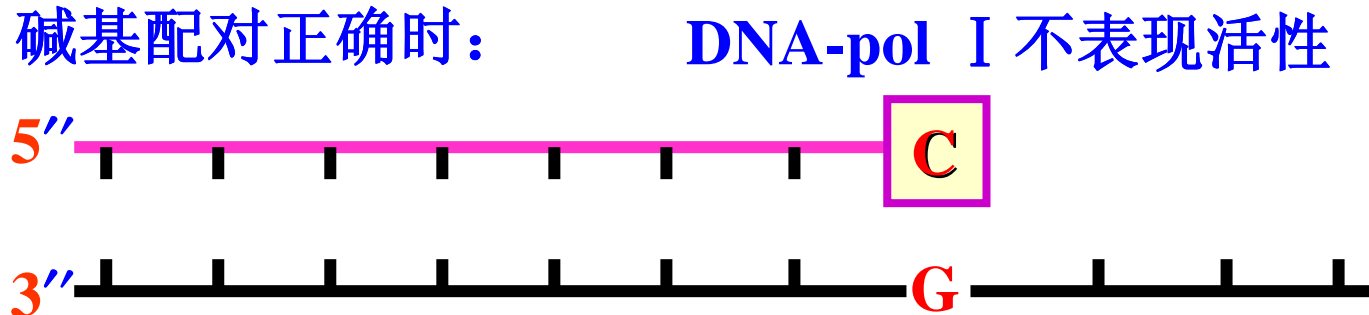


图10-9 DNA-pol I 的校读功能

(p224)

DNA复制的保真性至少依赖三种机理:

- 1) 遵守严格的**碱基配对**规律。
- 2) 聚合酶在复制延长中对**的碱基选择**功能。
- 3) 复制中出错时有**即时校读**的功能。

(p224)

四、复制中的解链和DNA分子拓扑学变化

- 复制需先解开DNA的超螺旋和双螺旋结构。
- 复制起始时，需要多种酶和蛋白因子共同解开和理顺DNA链，并维持DNA分子在一段时间内处于单链状态。
- 与解旋、解链有关的酶类及蛋白质主要有：
 - 1、解螺旋酶
 - 2、单链DNA结合蛋白
 - 3、引物酶
 - 4、DNA拓扑异构酶
- 与DNA复制起始有关的蛋白质统称Dna蛋白。(p225)₃₄

(一) 解螺旋酶、引物酶和单链DNA结合蛋白

表10-3 原核生物复制起始的相关蛋白质 (p225)

蛋白质 (基因)	通用名	功能
DnaA (dnaA)		辨认复制起始点
DnaB (dnaB)	解螺旋酶	解开DNA双链
DnaC (dnaC)		运送和协同DnaB
DnaG (dnaG)	引物酶	催化合成RNA引物
SSB	单链DNA 结合蛋白	稳定已解开的单链
拓扑异构酶		理顺DNA链

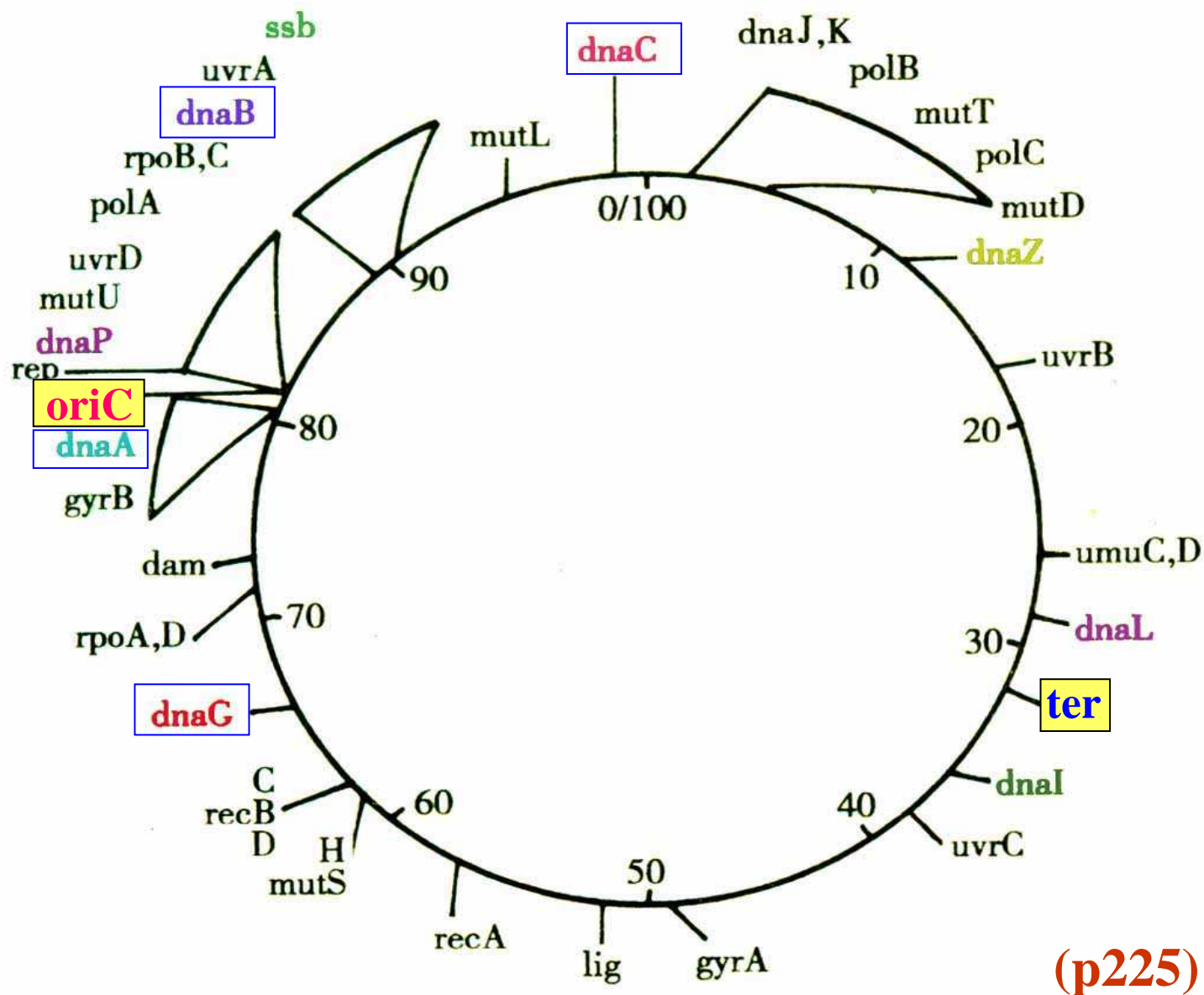


图10-11 *E. Coli* 基因图，示与复制有关的基因

1. 解螺旋酶（ helicase, 又称DnaB或rep蛋白）

作用： * 利用ATP供能，作用于氢键，使DNA双链解开成为两条单链。解链过程还需DnaA 和DnaC参与。

2. 引物酶（ primase, 又称DnaG ）

作用： * 复制起始时催化生成RNA引物。因DNA聚合酶没有催化两个游离dNTP聚合的能力，故DNA复制过程需合成RNA作为引物，它可提供3'-OH末端，在DNA pol 催化下逐一加入dNTP而延长DNA子链。

(p226)
37

3. 单链DNA结合蛋白 (single stranded DNA binding protein, SSB)

作用: * 在复制中维持模板处于单链状态并保护单链的完整。

(二) DNA拓扑异构酶

(DNA topoisomerase, 简称拓扑酶)

- **拓扑** —— 指物体或图像作弹性移位而又保持物体不变的性质。

- 拓扑异构酶的作用特点：
- 既能水解，又能连接磷酸二酯键。解超螺旋，克服复制过程中的打结、缠绕现象。
- 分类：拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II

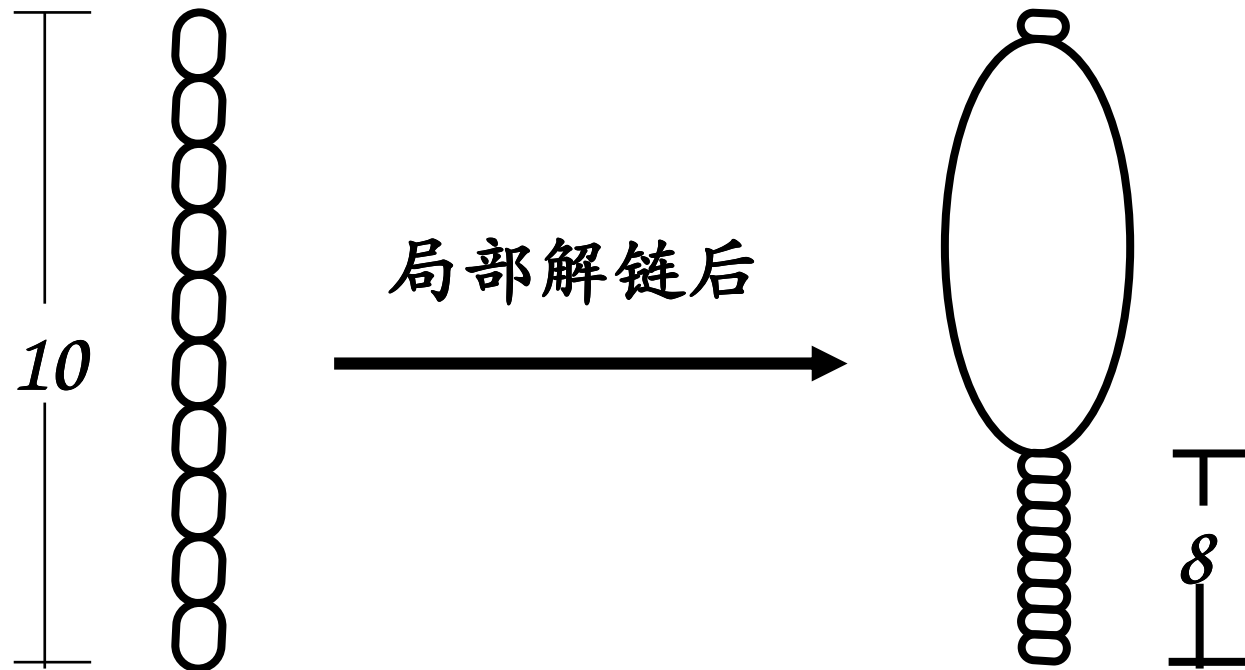


图10-12 复制过程中正超螺旋的形成



图10-12 复制过程中正超螺旋的形成

(p227)

1、拓扑异构酶 I

作用： * 切断DNA双链中的一股链，使DNA解链旋转不致打结，适当的时候又把切口封闭，使DNA变成松弛状态。反应不需ATP。

2、拓扑异构酶 II作用：（重要）

作用： * 切断DNA分子两股链，断端通过切口旋转使超螺旋松弛。

* 利用ATP供能，连接断端，DNA分子进入负超螺旋状态。

(p226)

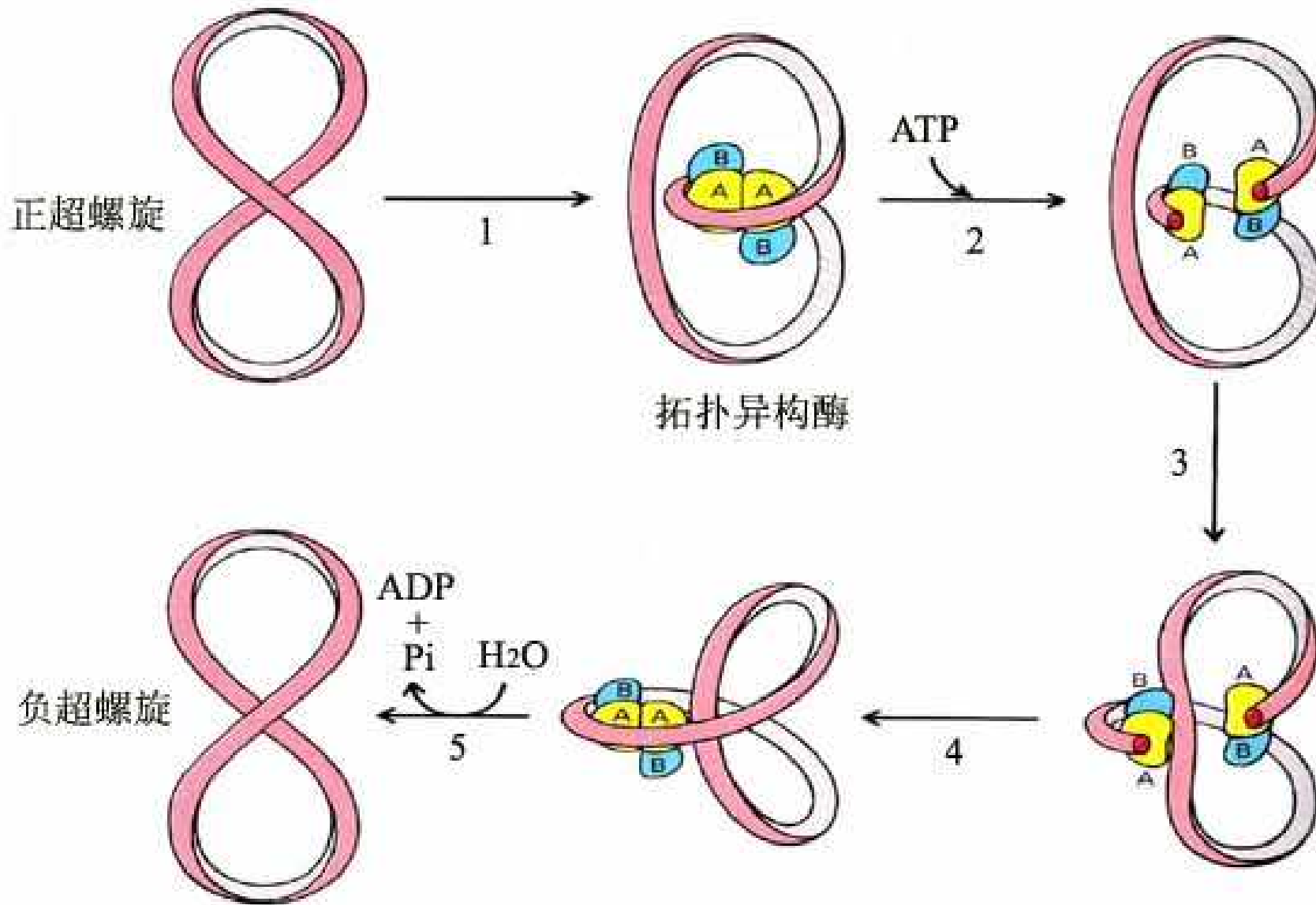


图10-13 拓扑异构酶的作用方式

(p227 2#)

五、DNA连接酶 (p227)

DNA连接酶 (DNA ligase) 连接3'-OH末端和5'-P末端，将双链DNA分子中单链DNA切口(无核苷酸空缺)通过磷酸二酯键连接起来。从而把两段相邻的DNA链连成完整的链。不能连接单独存在的DNA单链或RNA单链。

作用:

- * 在复制中起最后接合缺口的作用。
- * 在DNA修复、重组及剪接中也起缝合缺口作用。
- * 也是基因工程的重要工具酶之一。

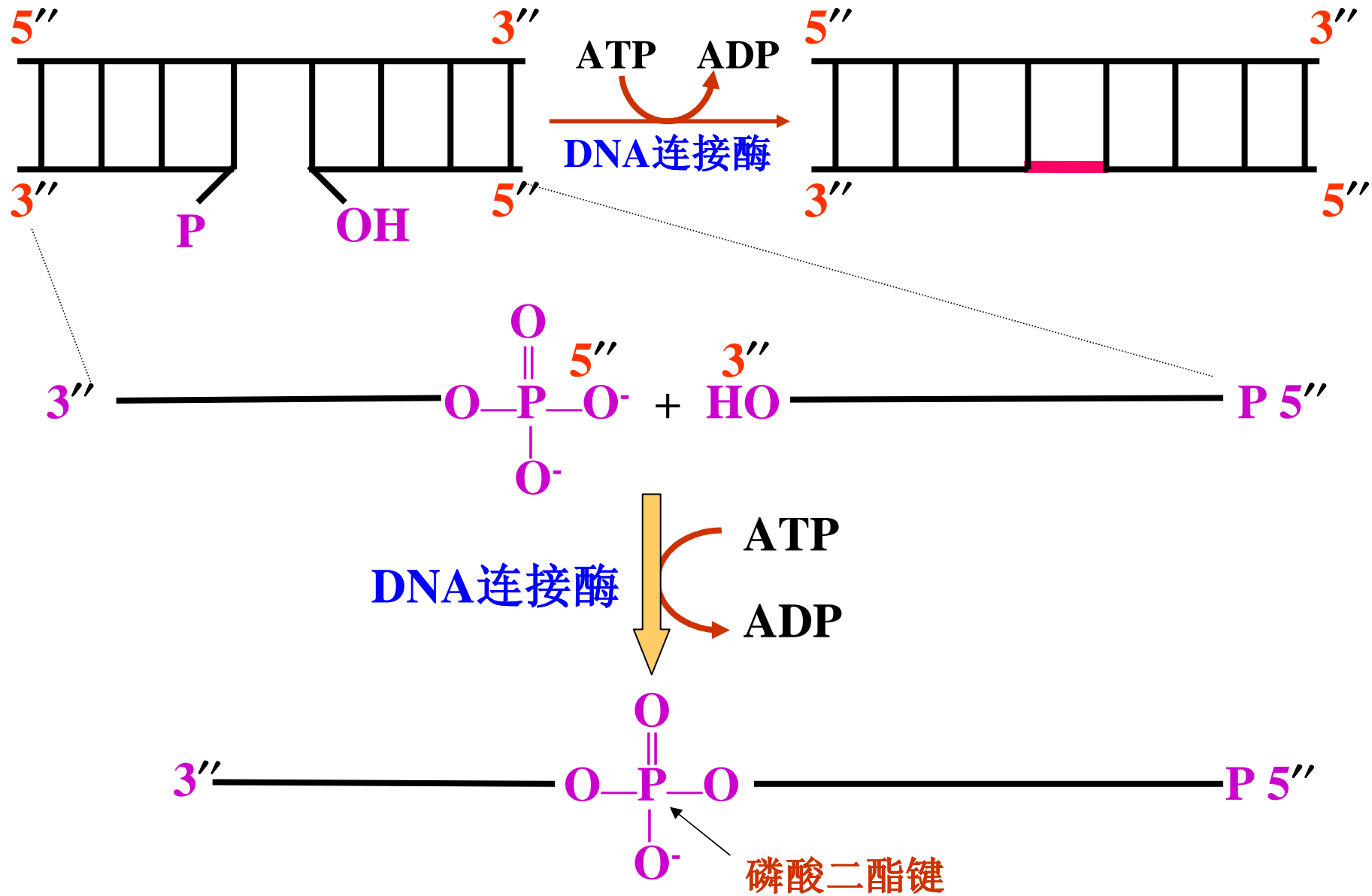


图10-14 DNA连接酶的作用

表10-4 三种酶催化生成磷酸二酯键的比较 (p228)

	提供核糖3'-OH	提供5'-P	结 果
DNA聚合酶	引物或延长 中的新链	游离dNTP 去PPi	(dNMP) _{n+1}
DNA连接酶	复制中不连续 的两条单链		不连续→连续链
拓扑酶	切断、整理后 的两链		改变拓扑状态

第三节 DNA生物合成过程

一、原核生物的DNA生物合成

研究原核生物的DNA复制，多以大肠杆菌为实验模型，以下以大肠杆菌为例，介绍DNA的复制过程。

- 复制的起始
- 复制的延长
- 复制的终止

(p228)

(一) 复制的起始

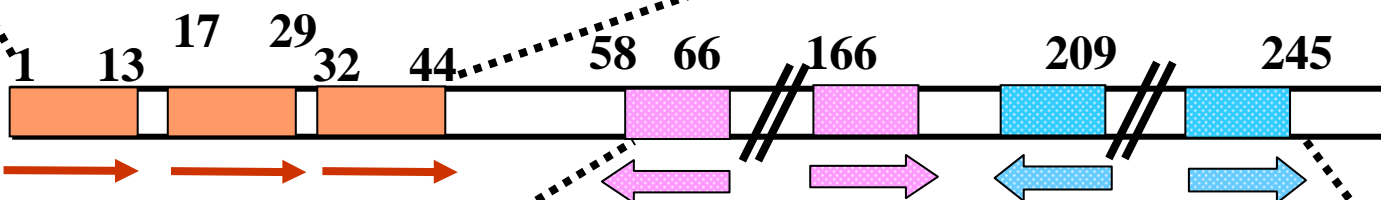
(p228)

- * DNA先要解成复制叉、解开成单链，提供模板。
- * 合成引物，提供3'-OH末端。

1、DNA解链

原核生物基因组只有一个固定的复制起始点，如*E.coli*从起始点oriC开始(oriC 跨度为245bp,含有3组串联重复序列和2组反向重复序列)。

1 13 17 29 32 44
GATCTNTTNTTT...GATCTNTTNTTAT ...GATCTCTTATTAG...



3 组串联重复序列

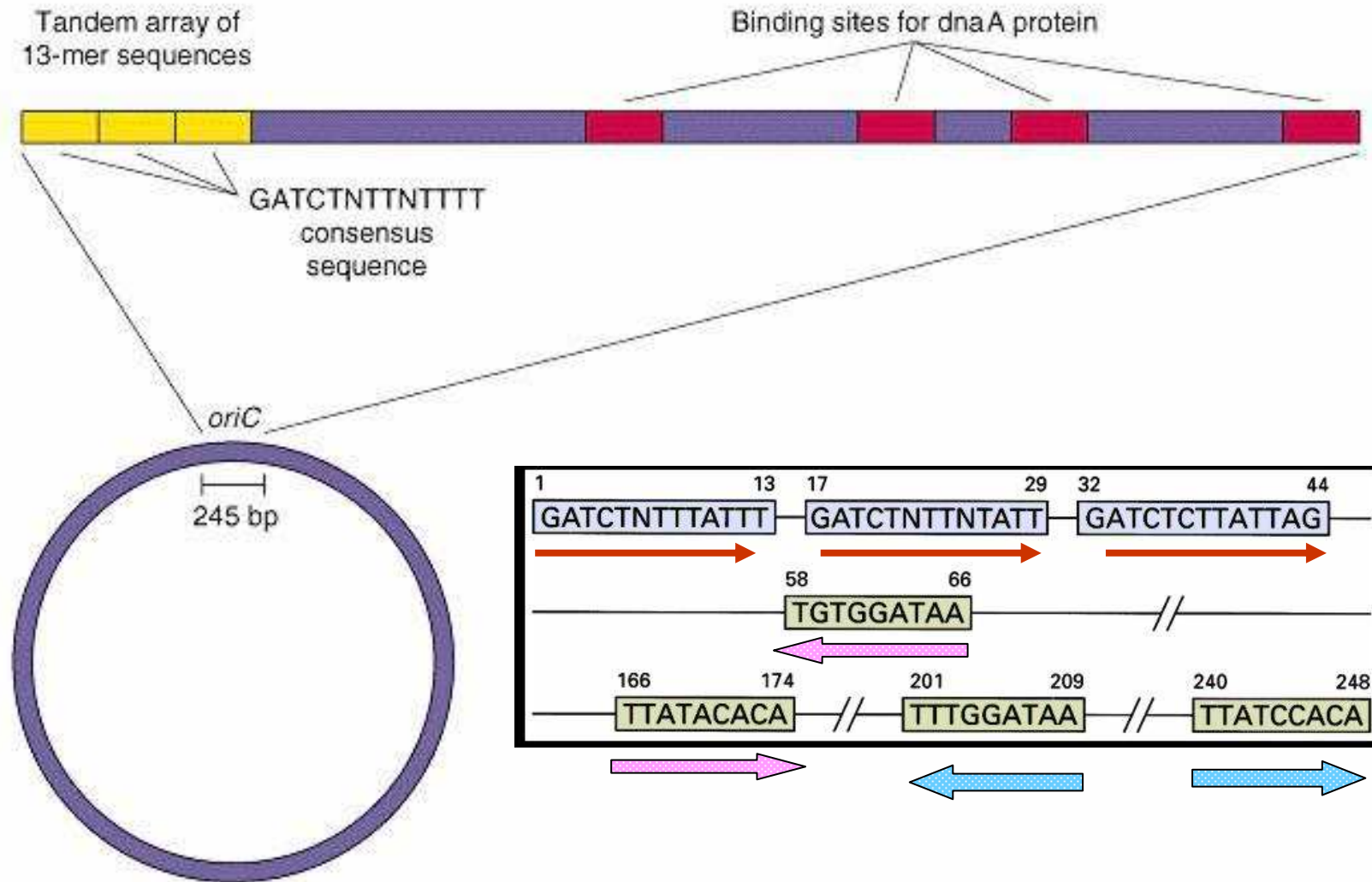
2 组反向重复序列

58 66 166 174 201 209 245
 ... TGTGGATTA -// - TTATACACA -// - TTTGGATAA -// - TTATCCACA

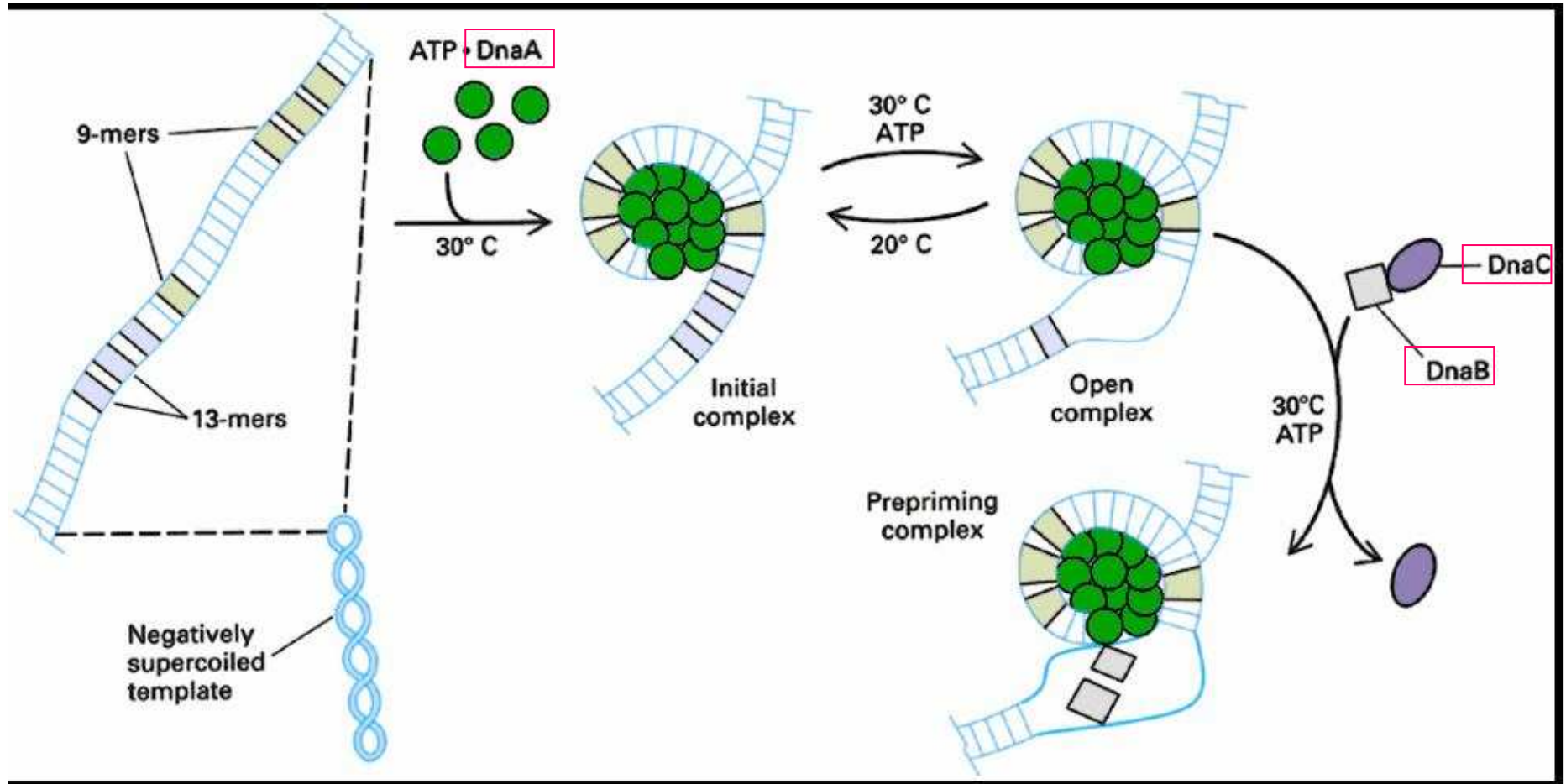
图10-15 原核生物(*E.coli*) 复制起始点oriC

(p228)₄₈

OriC in E. coli chromosomal DNA



Initiation of DNA replication in *E. coli*



(1) **Dna A**蛋白辨认并结合DNA模板起始部位

oriC。

(2) **DNA拓扑异构酶**催化超螺旋松解。

(3) **Dna B**(解螺旋酶)逐步置换**Dna A**蛋白，**Dna B**在**Dna C**协助下与打开的局部双链DNA结合成**复合物**进行解链。

(4) **SSB** (四聚体)与单链DNA结合,稳定DNA的单链状态。

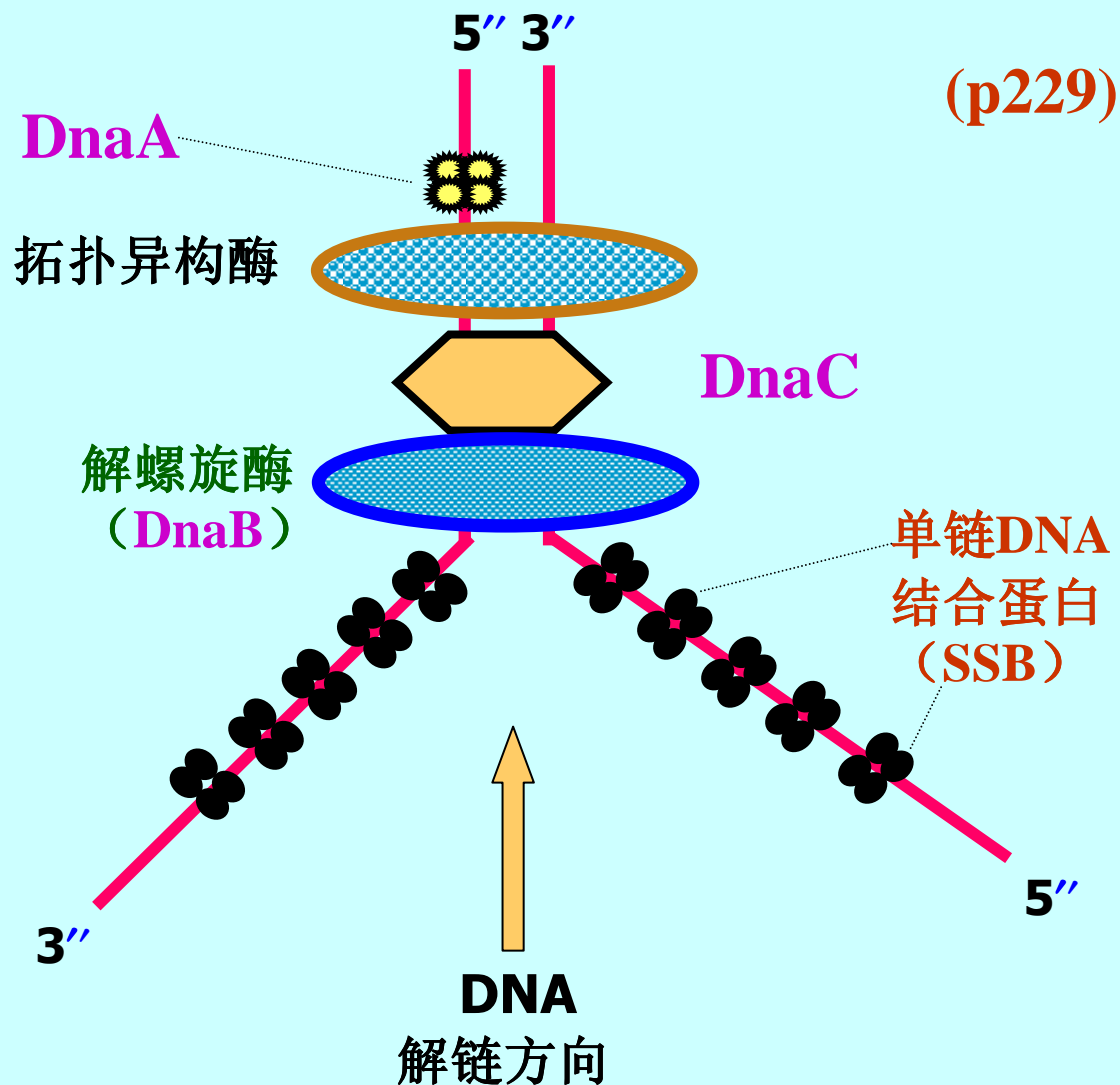
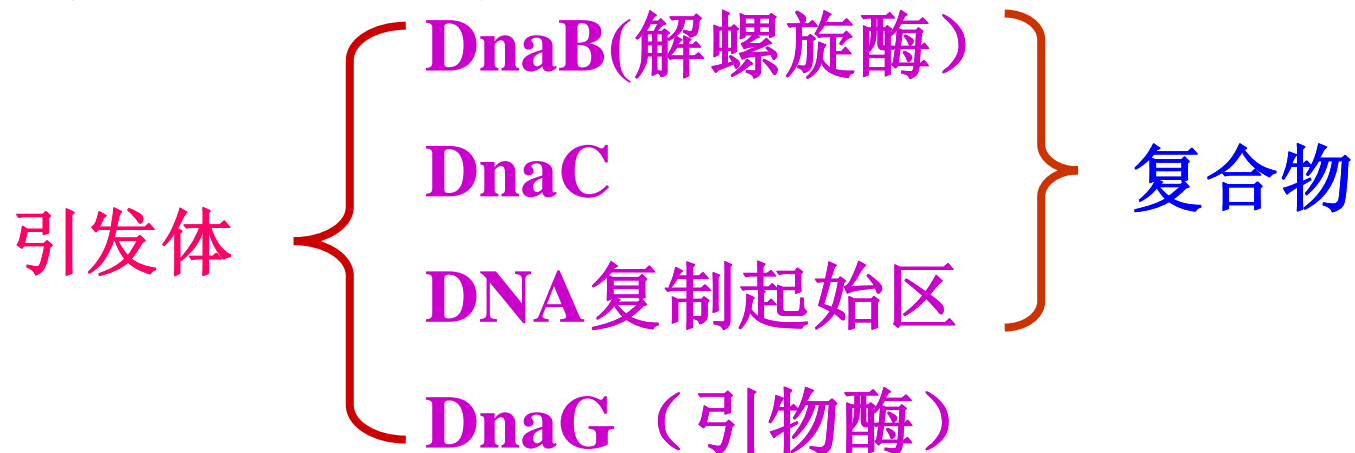
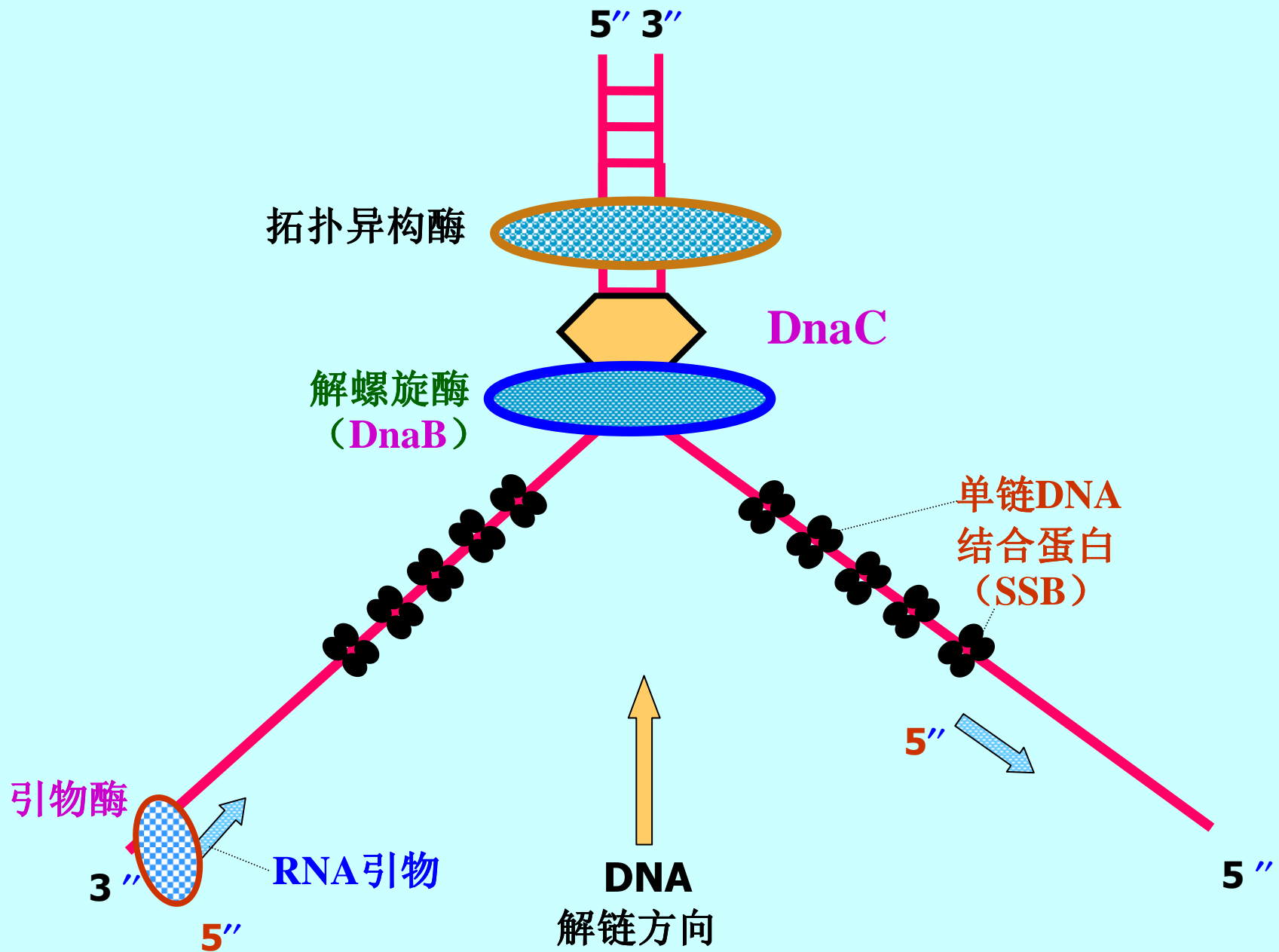


图10-16 复制起始，DNA双链解开

2、引发体和引物 复制过程需要引物（primer），引物是由引物酶（DnaG）催化合成的小分子RNA。DnaG进入上述复合物，形成引发体。然后以NTP为原料，按碱基互补原则（A-U、C-G、T-A）从5'→3'方向合成RNA引物（长约十几个或几十个核苷酸不等）。为DNA聚合酶提供了3'-末端-OH，引导DNA链合成。



(p229)



(p230)

53

图10-17 复制的起始阶段，RNA引物的合成

DNA
模板链 5''

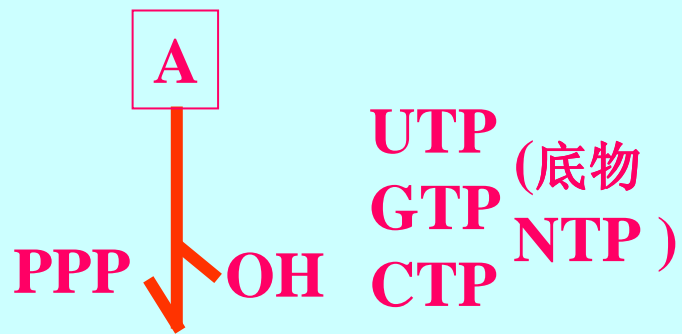
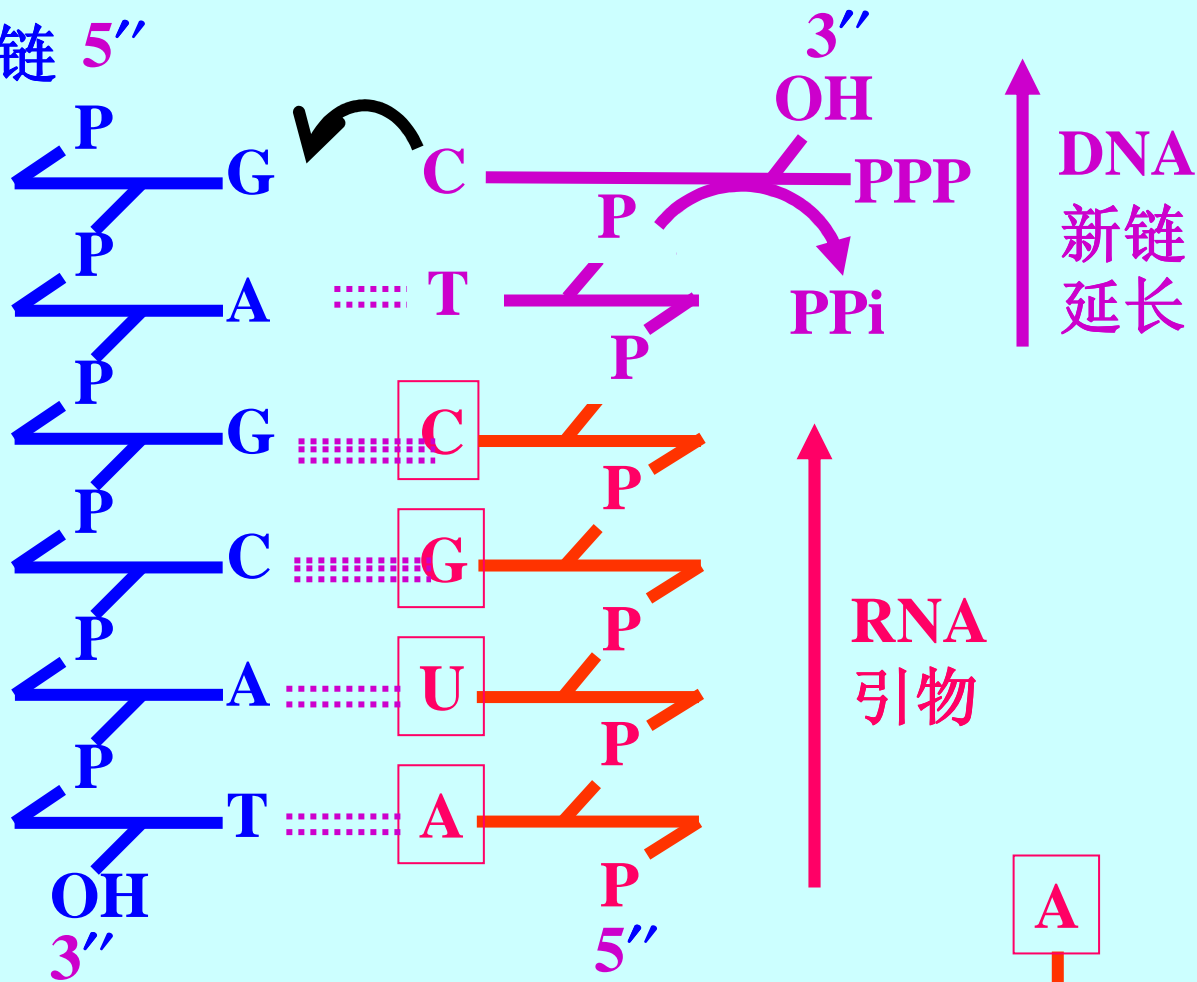


图10-17 RNA引物的合成

(p230)

(二) 复制的延长

复制的延长是在DNA-pol 的催化下以四种 **dNTP** 为原料，以 **dNMP** 的方式延长DNA新链，其反应本质是生成**磷酸二酯键**。原核生物催化延长反应的酶是**DNA-pol III**。大肠杆菌 (E.coli) 全套基因组DNA约3 000 Kb，合成速度2 500 bp/s ， 20分钟可繁殖一代。

新链的合成方向：**5''→3''**

(p230)

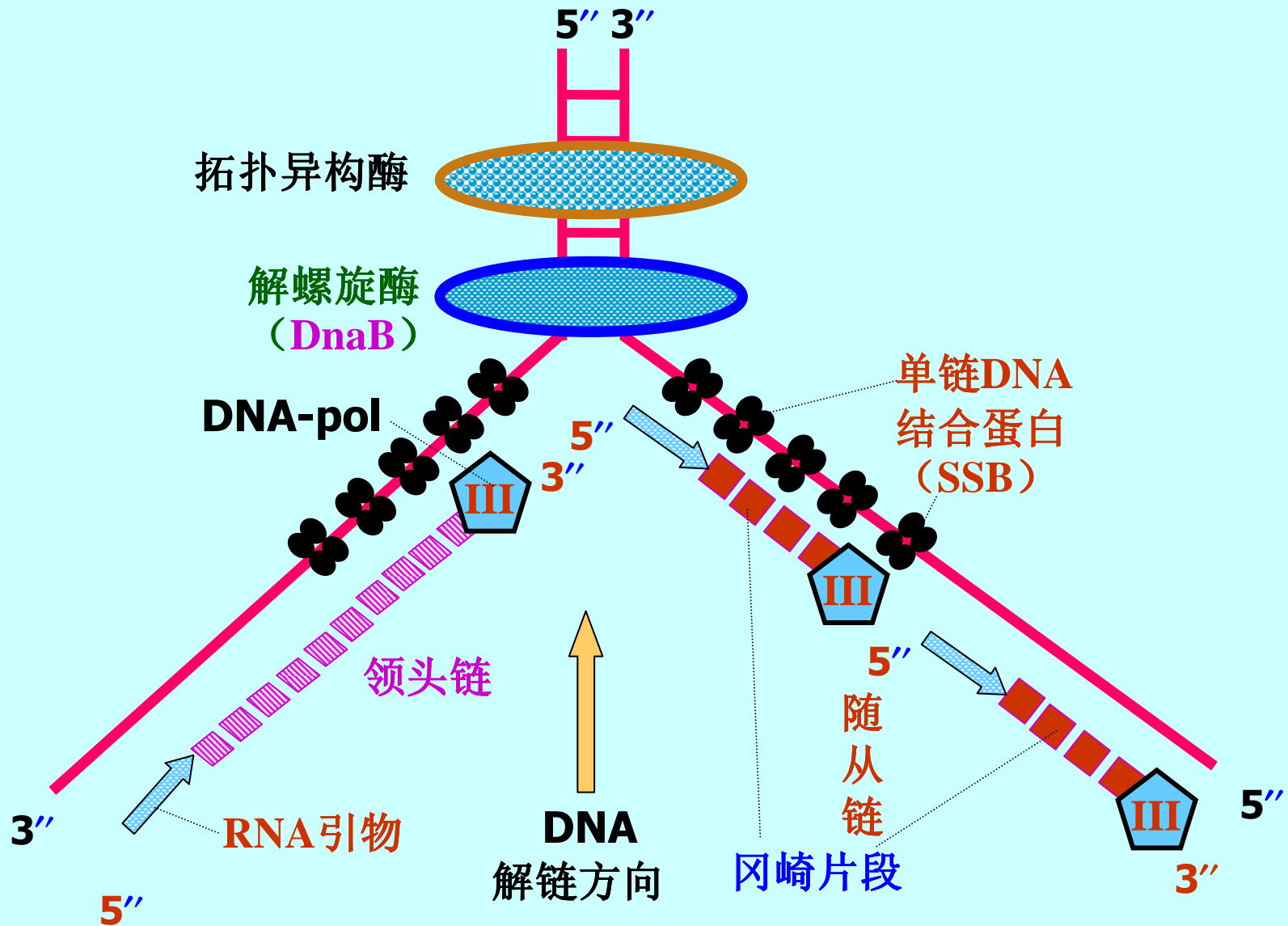


图10-18 复制的延长阶段

DNA双链的走向相反，而复制和引物合成方向总是从5'→3'延伸。因此在复制过程中，领头链连续合成，而另一条随从链不连续合成。

原核生物冈崎片段的大小1000~2000个核苷酸范围，每一个不连续复制的片段5'-端都带有一个RNA引物。片段复制完成后，RNA引物被切除，由DNA片段取代，故复制结束后，两股子链都是DNA。

(p230)

(三) 复制的终止

- 原核生物有一定的复制起始点和复制终止点。
- RNA酶水解RNA引物。
- DNA-pol I 催化冈崎片段延长，合成DNA取代RNA，填补随从链空缺。
- DNA连接酶连接DNA两个片段的缺口。

(p231)

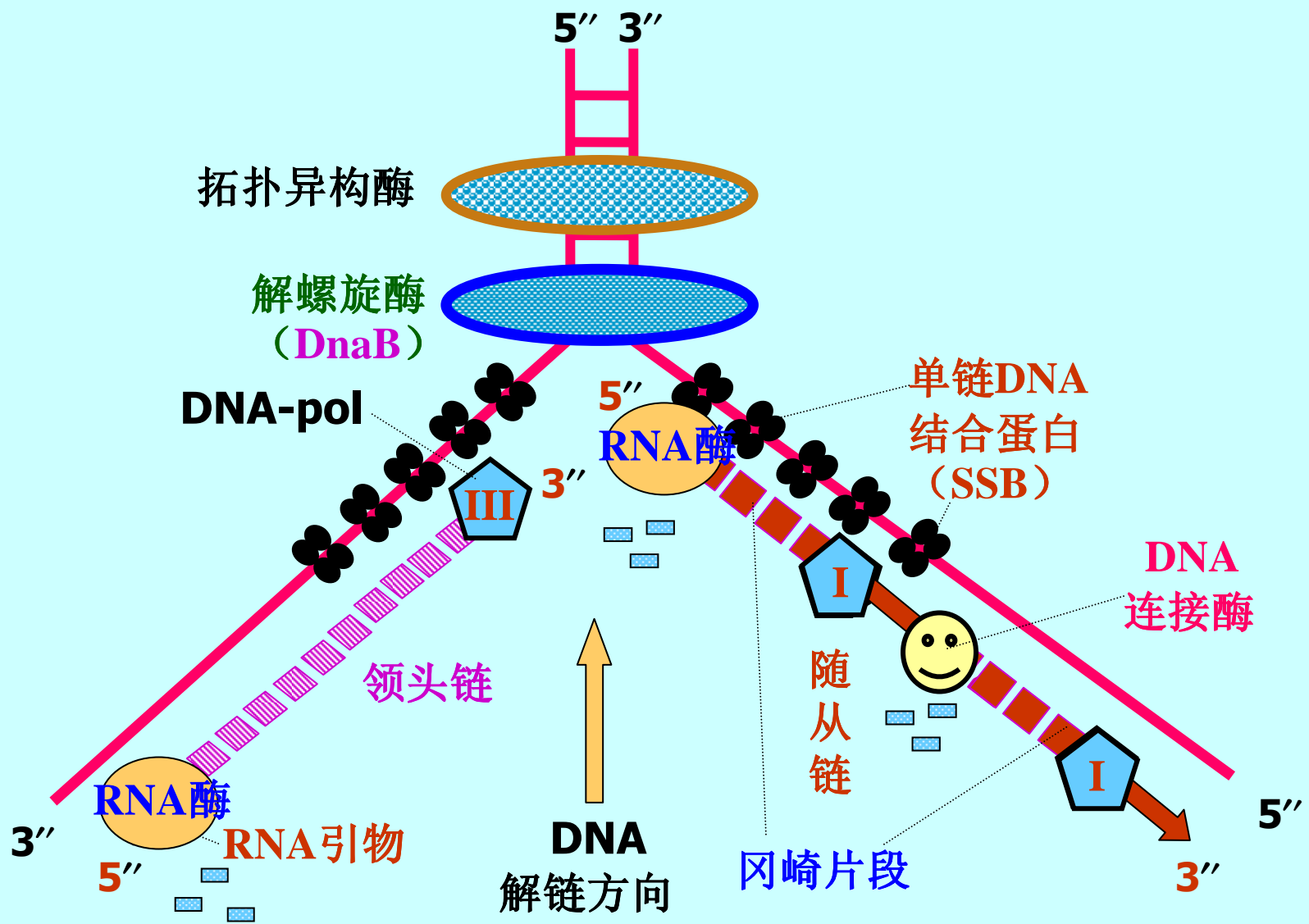


图10-19 复制的终止阶段

SONIC-PC
 该 PPT 文件由 Sonic PPT Creator 所创建，未注册版本会有水印及印刷痕
 若要去除水印及印刷痕，请访问官方网站购买一个许可：www.investintech.com

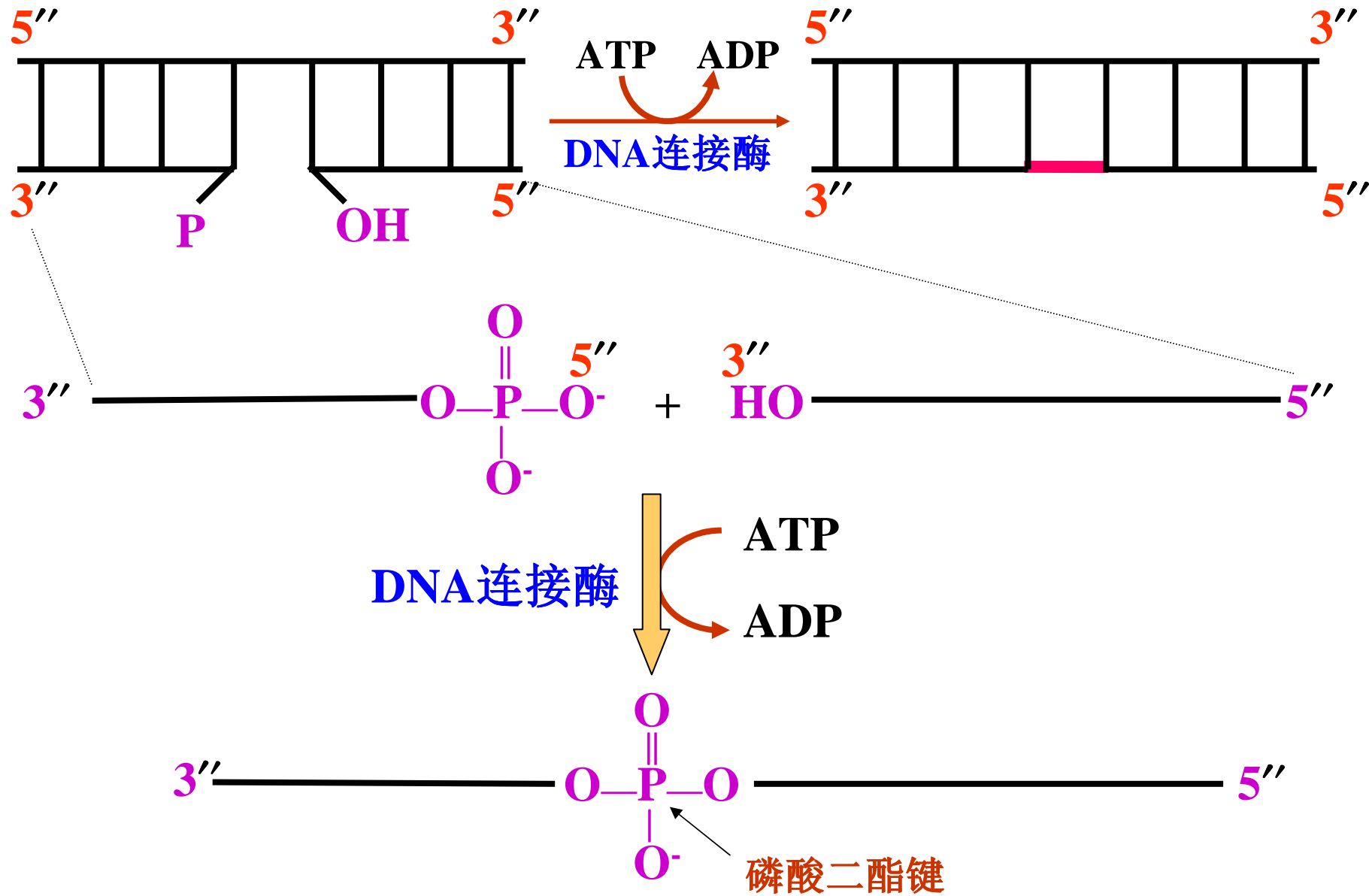
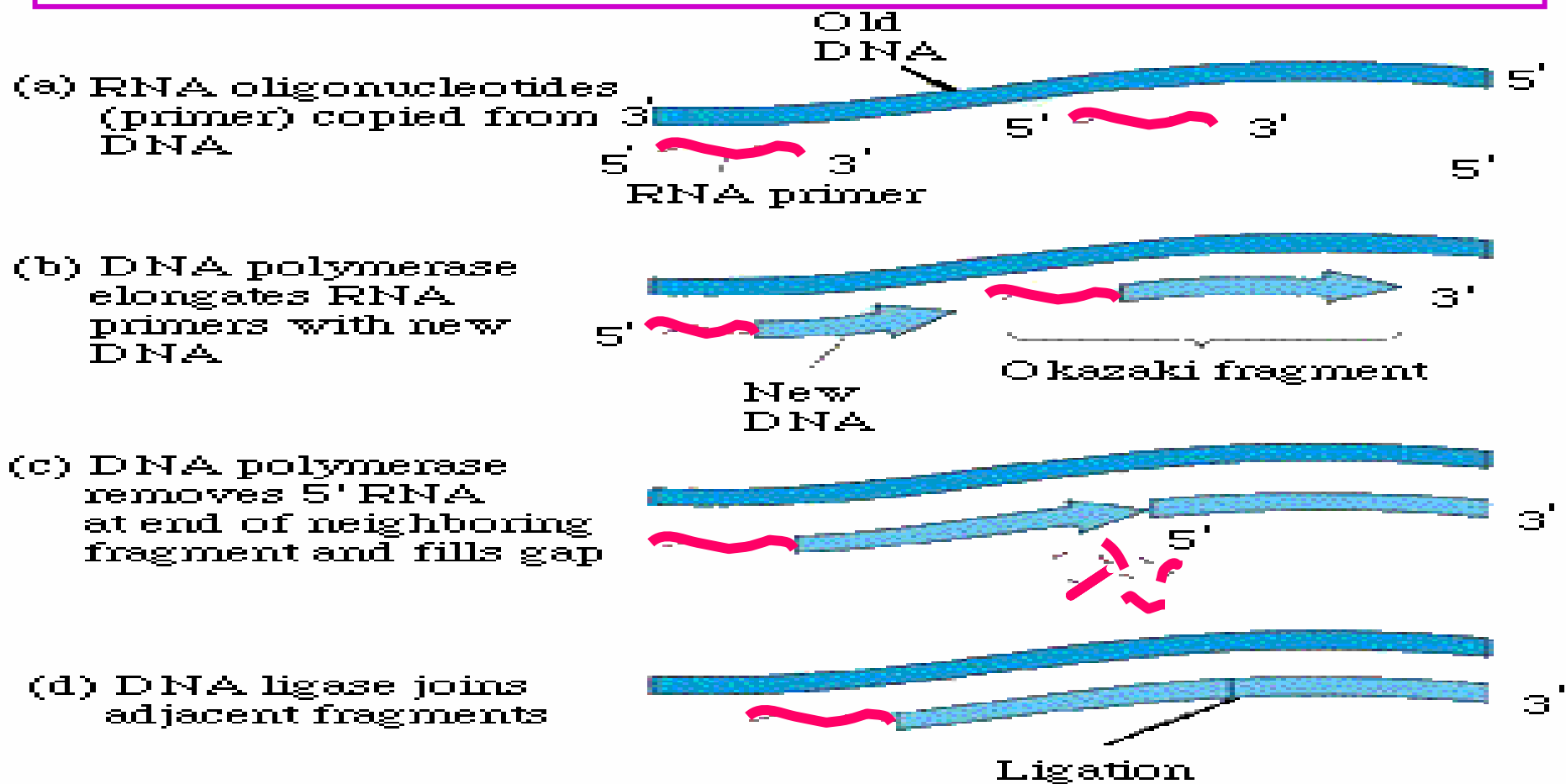
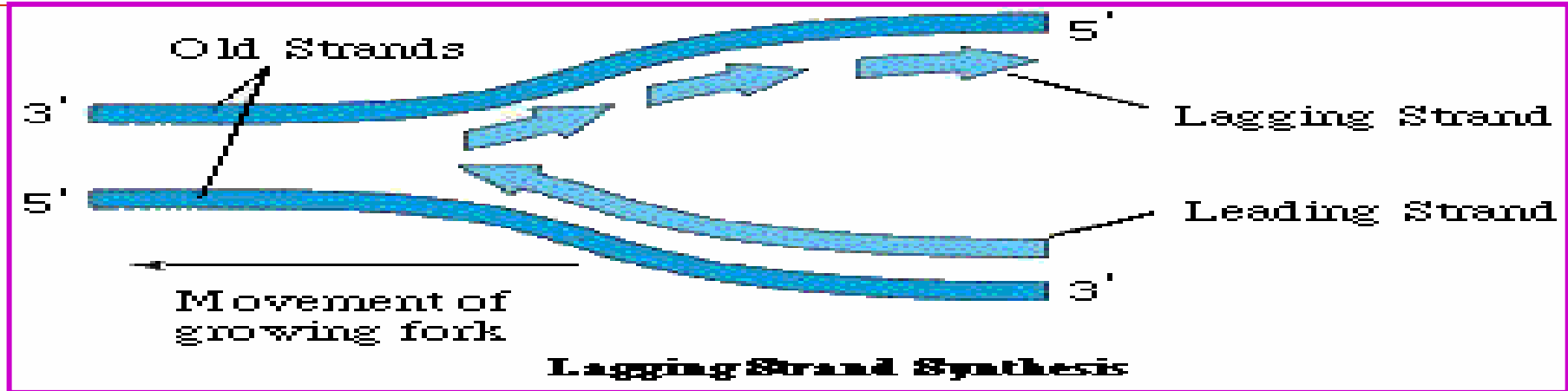


图10-14 DNA连接酶的作用



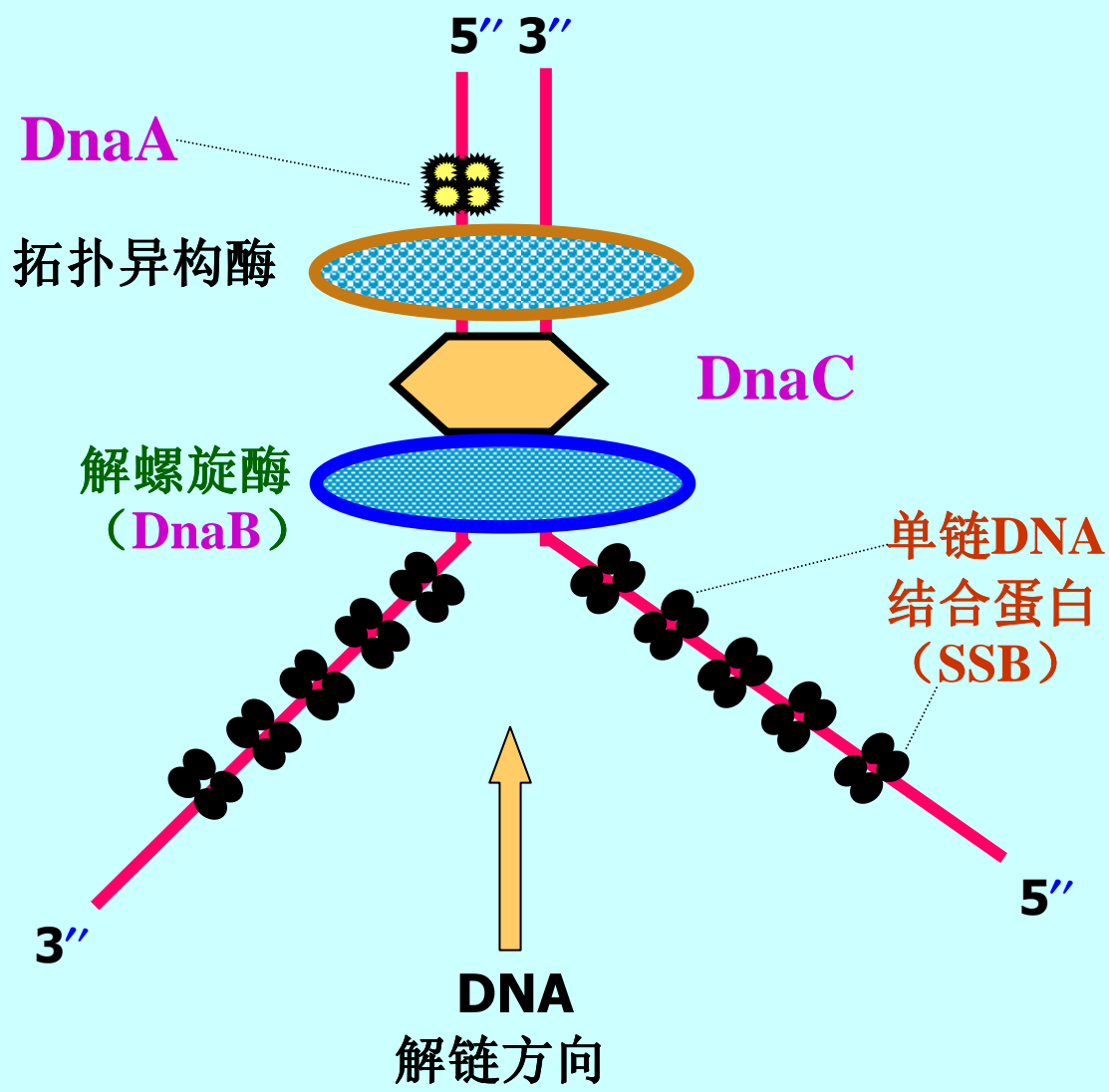
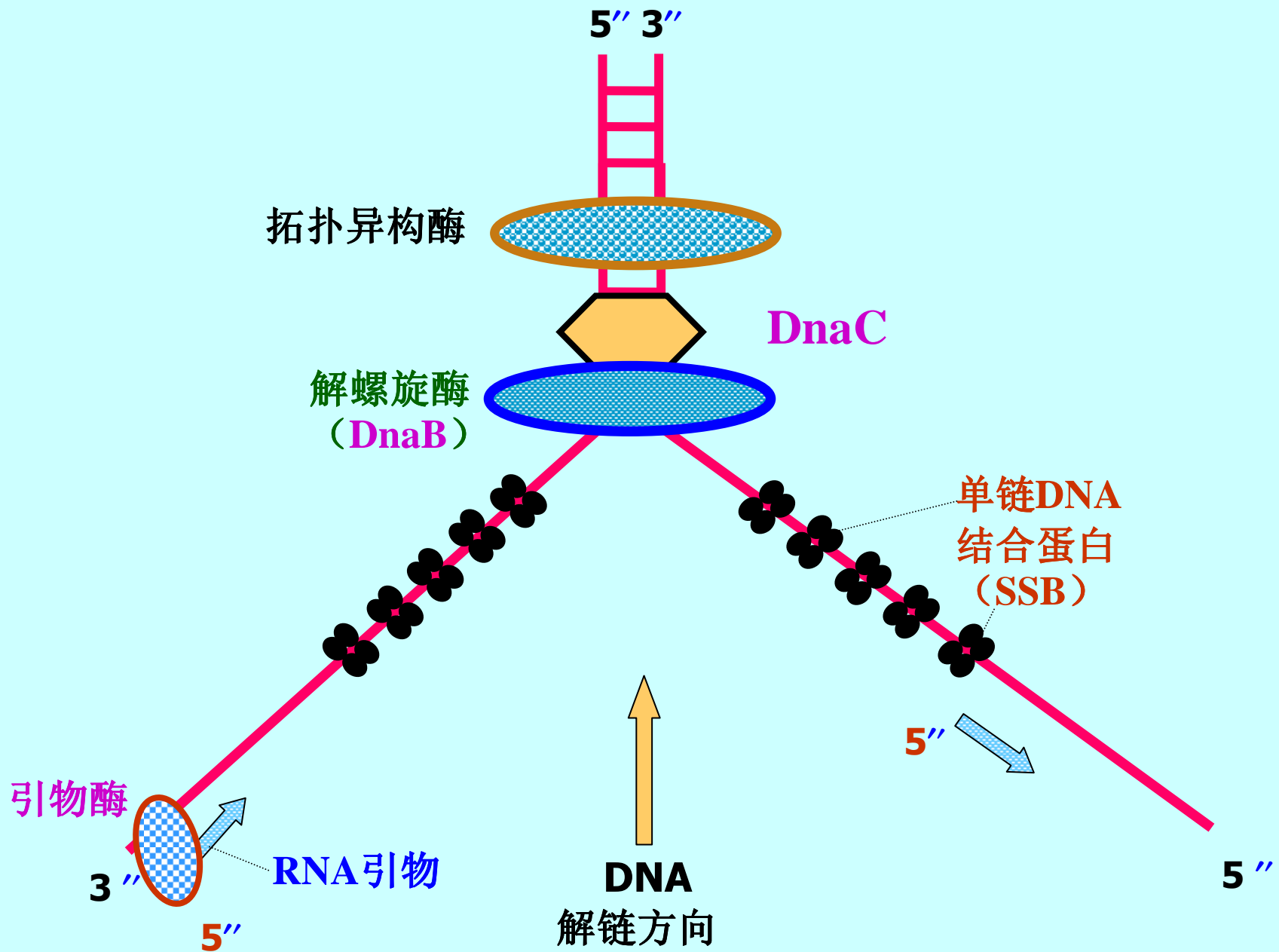


图10-16 复制起始，DNA双链解开



(p230)

63

图10-17 复制的起始阶段，RNA引物的合成

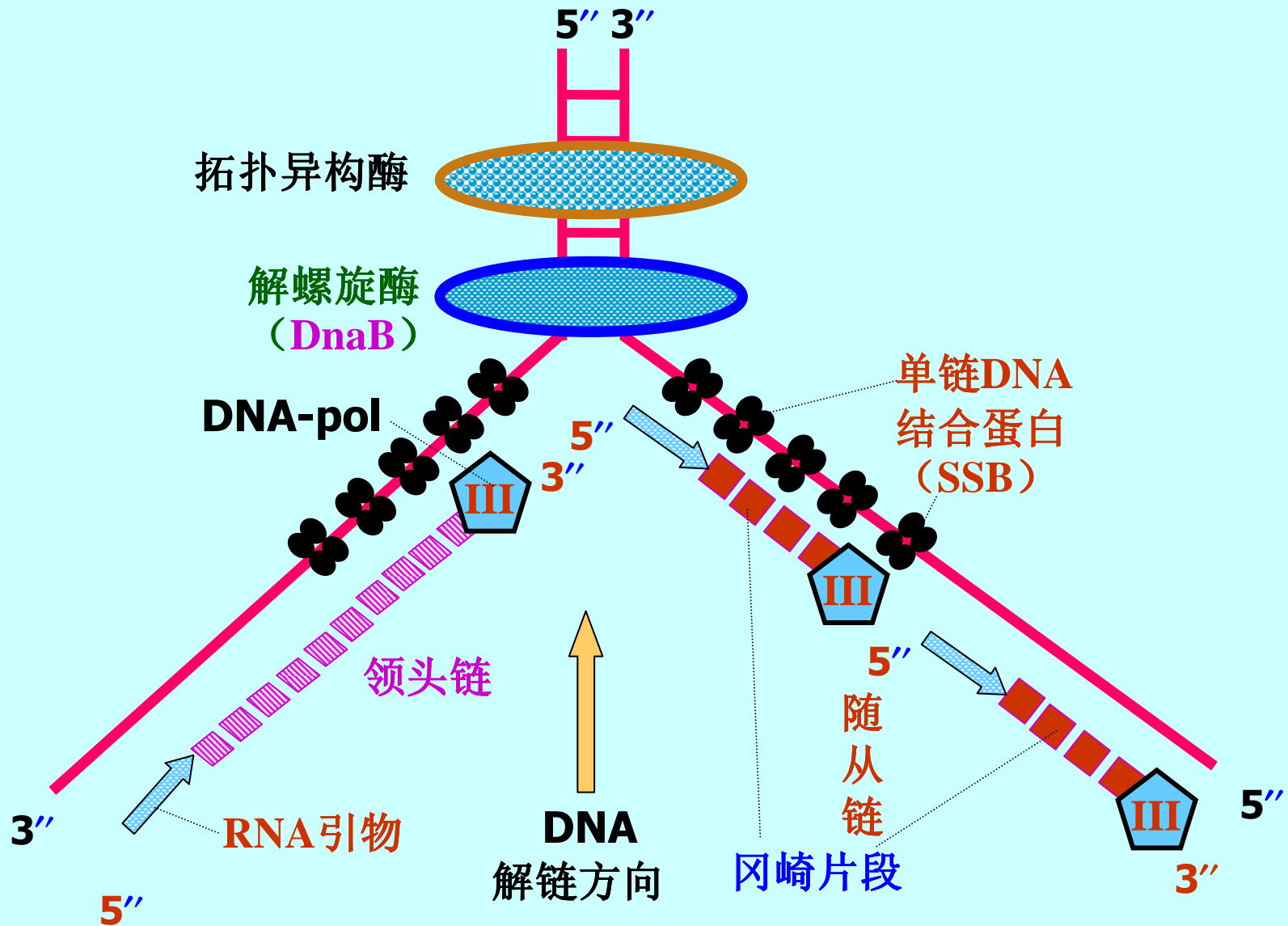


图10-18 复制的延长阶段

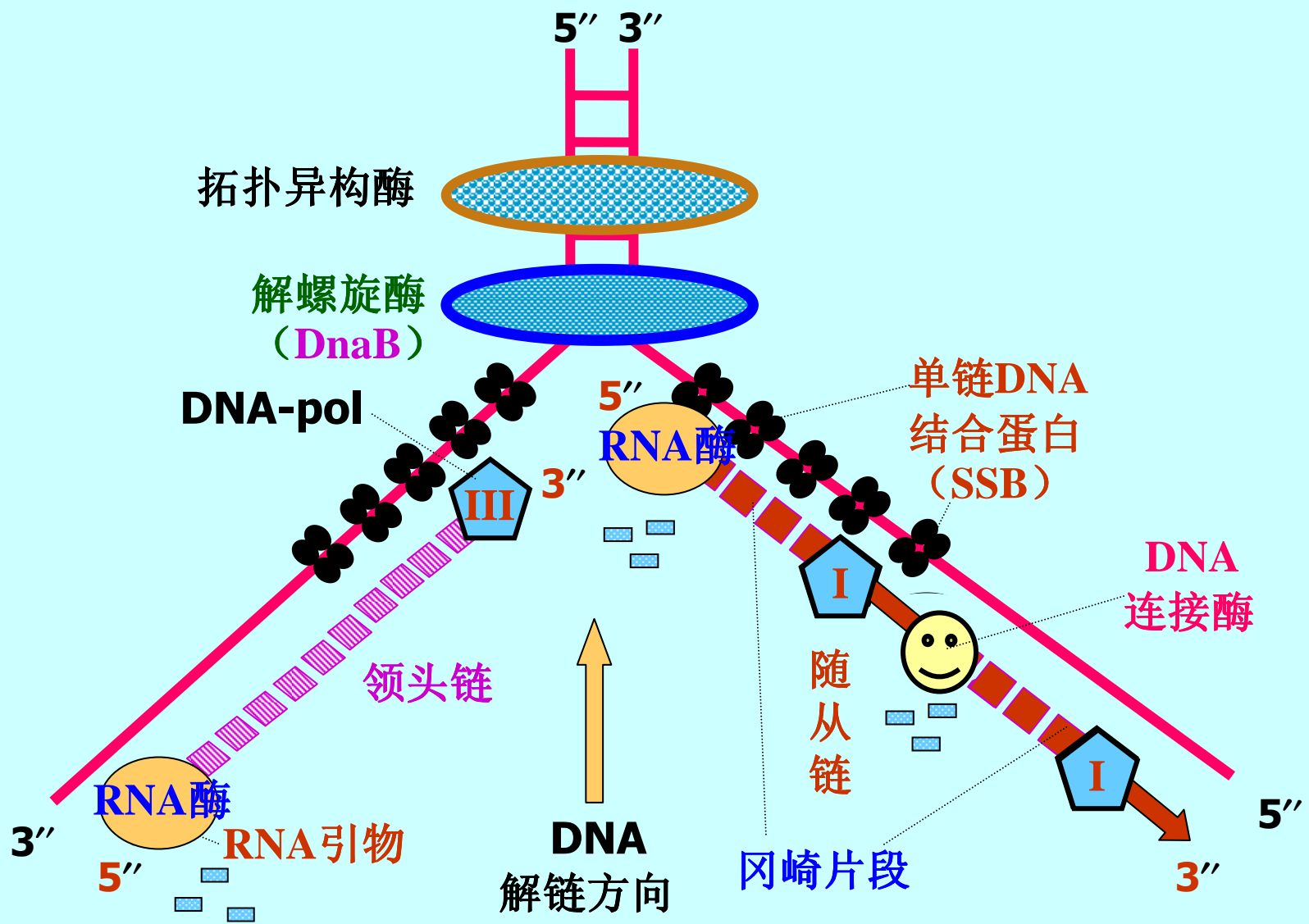
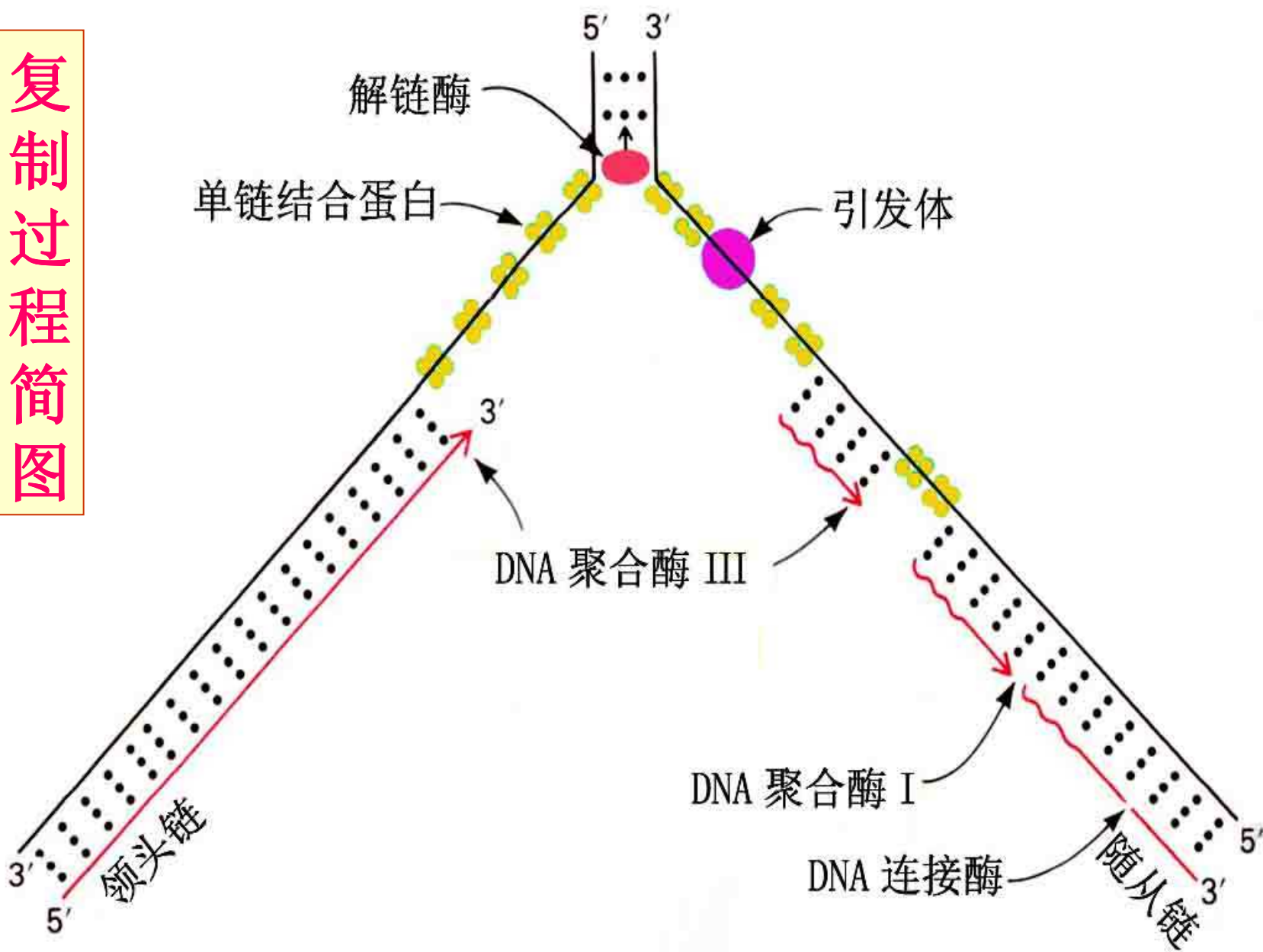


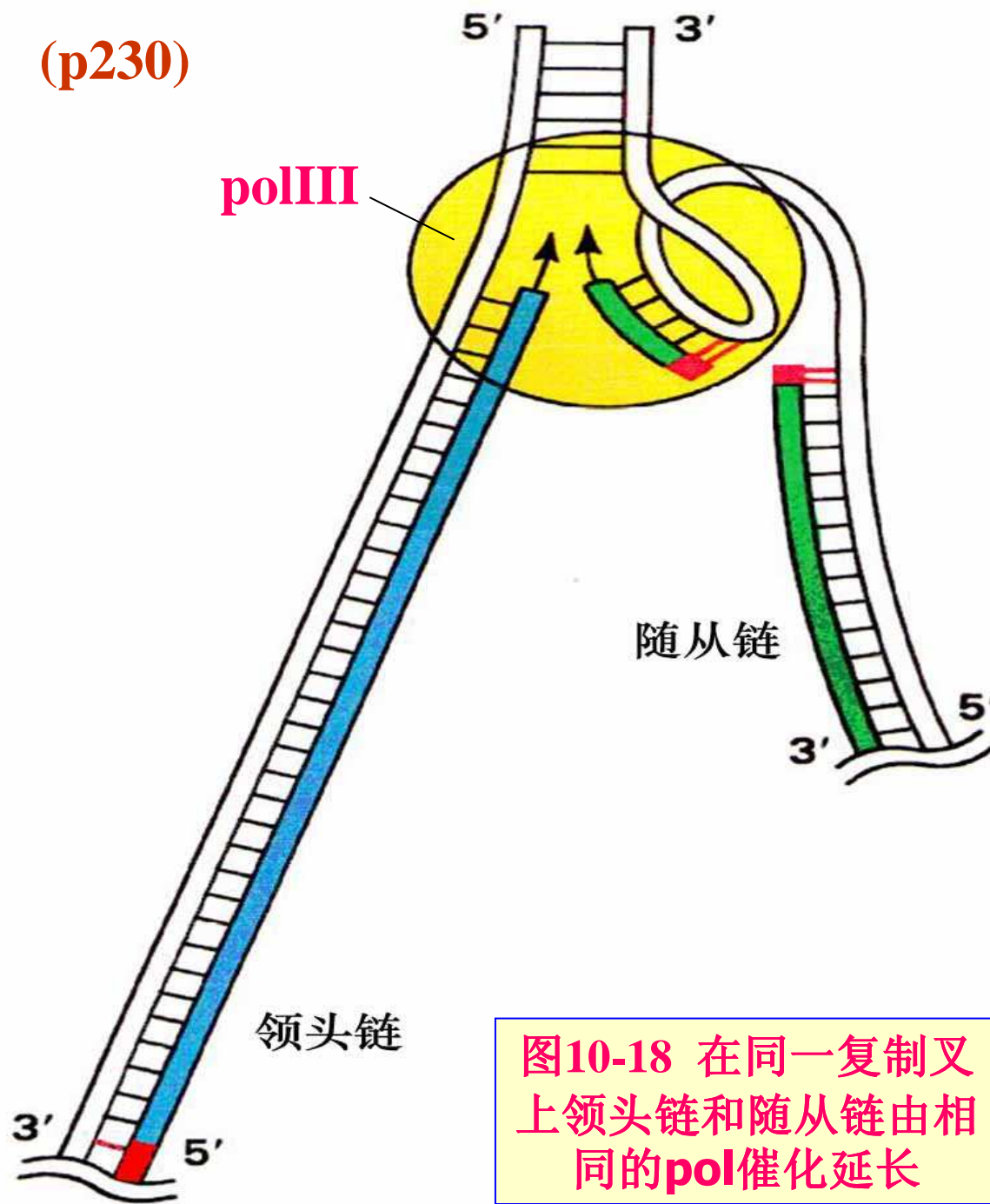
图10-19 复制的终止阶段

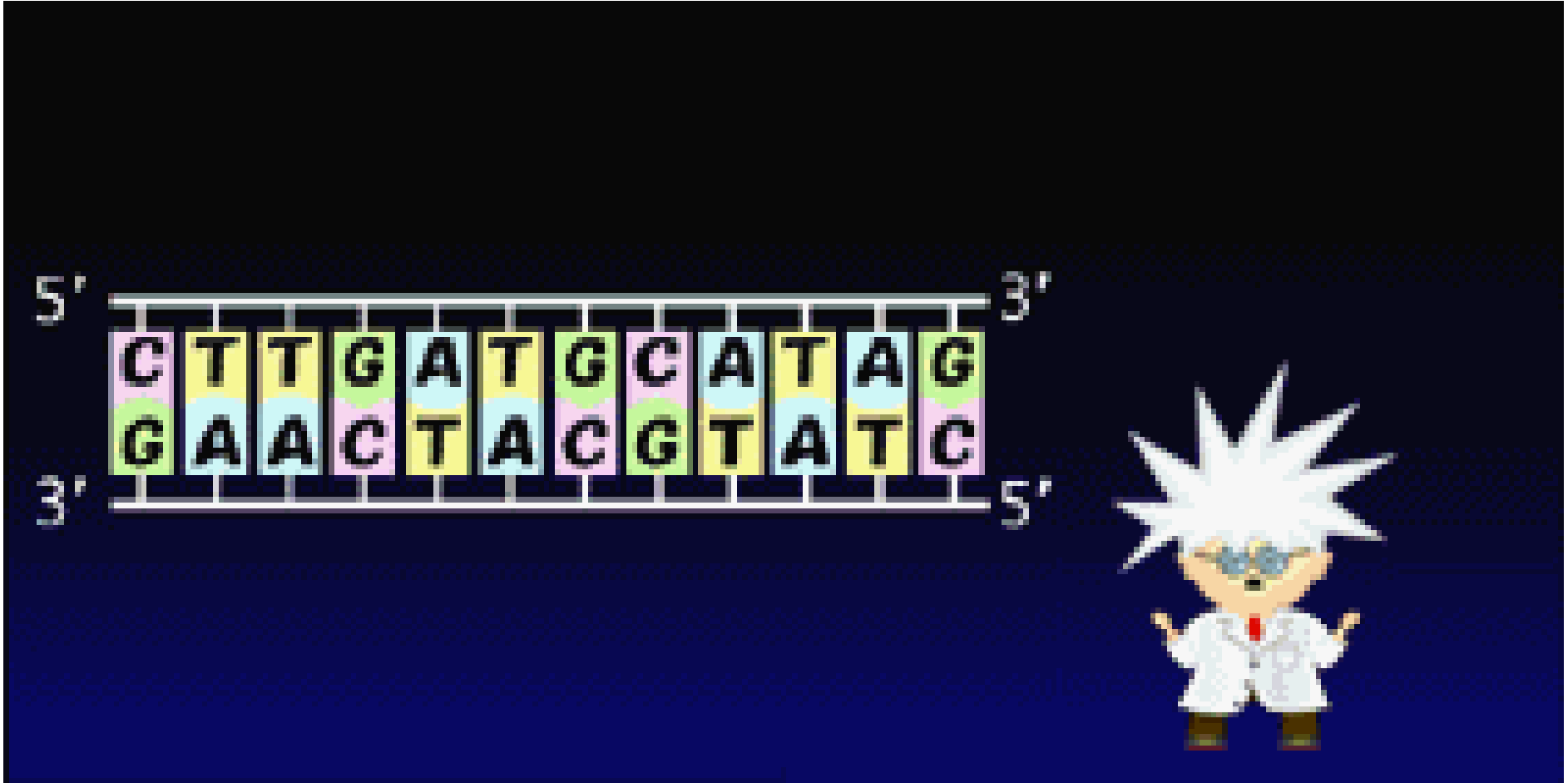
SONIC-PC
 该 PPT 文件由 Sonic PPT Creator 所创建，未注册版本会显示此水印
 若要去除此水印，请访问官方网站购买一个许可：www.investintech.com

复制过程简图



在同一复制叉上，领头链的复制先于随从链，但两链在同一DNA-polIII催化进行延长，因随从链的模板DNA可以或绕成环状，因而与领头链正在延长的区域对齐。





DNA 复制过程

DNA复制过程

起始阶段

- 解链(解螺旋酶等Dna蛋白) ATP
- 解旋(拓扑异构酶) ATP
- 稳定DNA单链(SSB)
- 合成RNA引物(引物酶)

5'' → 3''

延长阶段—合成DNA新链

- 领头链 (DNA-pol III)
- 随从链

5'' → 3''

终止阶段

- 切除RNA引物 (RNA酶)
- 冈崎片段延伸填补空缺 (DNA-pol I)
- 连接冈崎片段缺口 (DNA连接酶) ATP

5'' → 3''

(p225)

参与DNA复制的酶及蛋白质

(3#)

名称	功能
DnaA蛋白	辨认起始点
解螺旋酶 (DnaB蛋白)	解开DNA双链
DnaC蛋白	协助解螺旋酶
拓扑异构酶	克服解链中的打结缠绕, 理顺DNA
SSB	稳定解开的DNA单链
引物酶 (DnaG蛋白)	合成RNA引物
DNA聚合酶III	真正催化DNA复制的酶
RNA酶	切除引物
DNA聚合酶 I	即时校读, 延伸冈崎片段, 填补空隙
DNA连接酶	连接5'-P和3'-OH末端

二、真核生物的DNA生物合成

(p232)

研究真核生物的DNA复制，多采用病毒（如猿猴病毒SV40）感染培养的细胞和简单的真核生物，如酵母、爪蟾卵等为模型。真核生物在细胞分裂的合成期（S期）合成DNA。

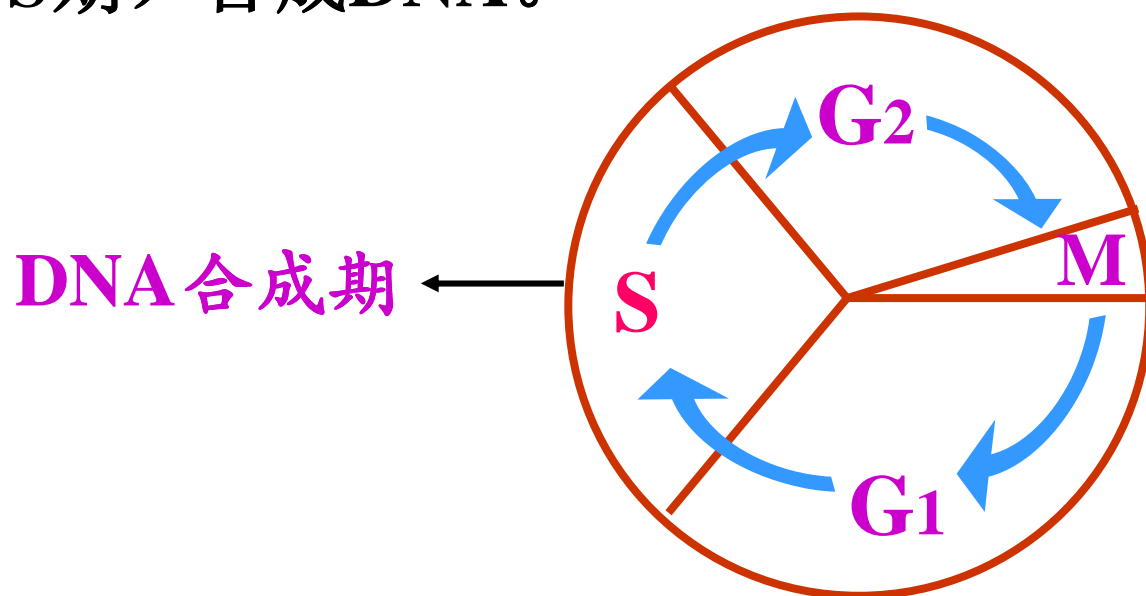


图10-20 哺乳动物的细胞周期

(一) 复制的起始

(p232)

真核生物DNA分布在许多染色体上，每个染色体上有上千个复制子，复制的起始点很多，但起始点较*E.coli*的oriC短。

真核生物复制的起始需DNA-pol α 和 δ 参与，DNA-pol α 有引物酶活性，具有合成引物的能力。此酶催化合成一小段RNA链后还可聚合4~5个寡聚脱氧核糖核苷酸，但DNA-pol α 无校正功能。同时，增殖细胞核抗原（PCNA）在复制起始和延长中起关键作用。此外，还需拓扑酶和复制因子（RF）。

(二) 复制的延长

(p233)

DNA-pol δ 兼有解螺旋酶活性，它既有持续合成DNA链的能力，又有校正功能。在**DNA-pol α** 催化引物合成后，**DNA-pol δ** 通过**PCNA**的协同作用，逐步取代**DNA-pol α** ，在引物的3'-OH基础上连续合成领头链和随从链（相当于原核**DNA-pol III**的功能）。

真核生物复制子复制完成后，也需除去引物。真核生物的引物中除RNA外还含有DNA片段，故除去引物同时需要RNA酶H1和MF-1（5'→3'核酸外切酶）。随从链多次合成的引物中包含有DNA片段。

真核生物以复制子为单位各自进行复制，故真核生物的引物和冈崎片段都较原核生物短，冈崎片段的长度大致与一个核小体所含DNA的量（135bp）或其若干倍相等。

真核生物DNA合成速度远比原核生物慢，约50 dNTP/s，但真核生物是多复制子，总体速度并不慢。

核小体的DNA与各种组蛋白如何分开，又如何组合还不完全清楚。

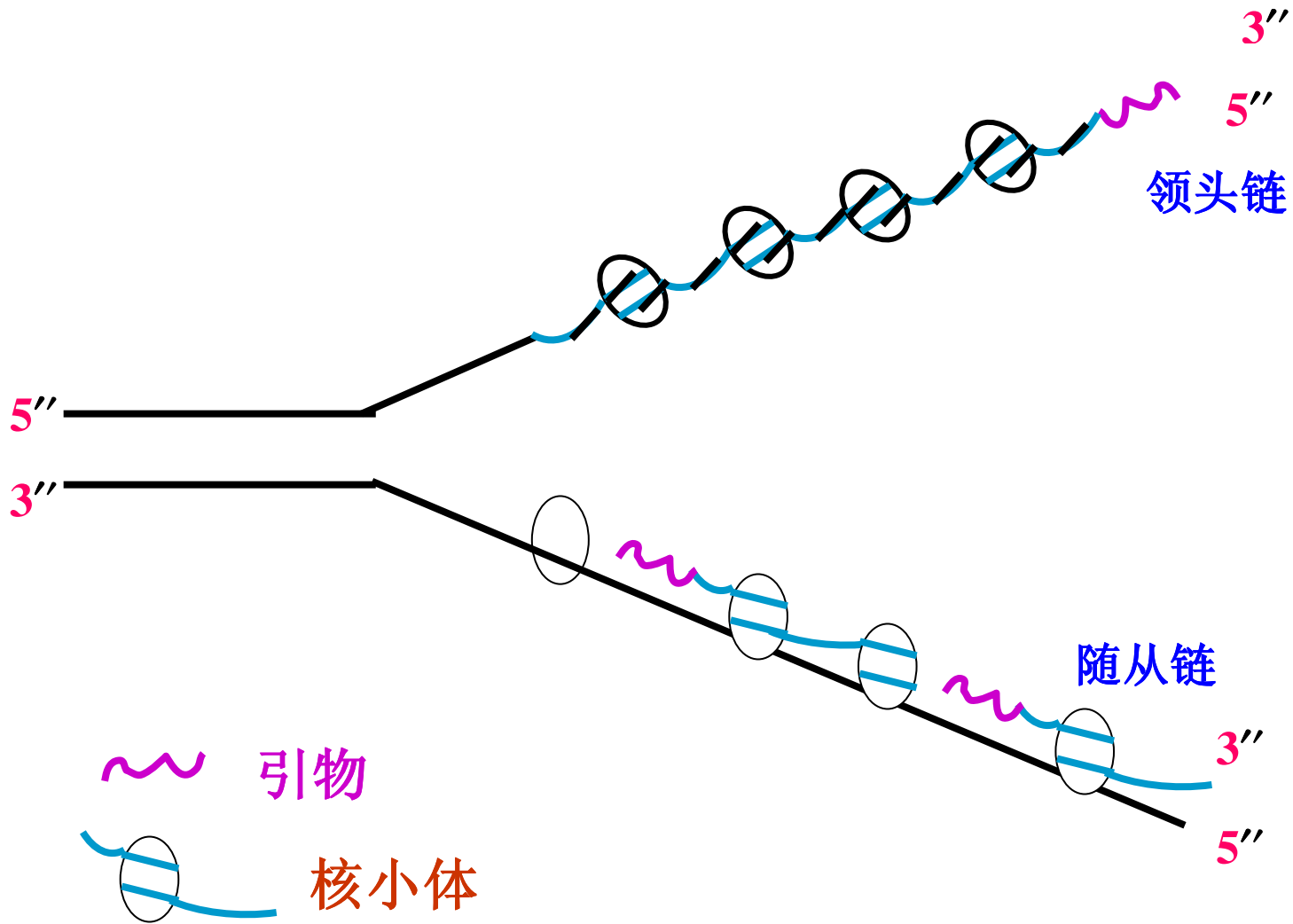


图10-21 真核生物复制叉的延长

(二) 复制终止和端粒酶

根据DNA“半保留复制”原理和冈崎的“半不连续复制”模型，在新复制的DNA链5'端留下一个缺口无法填补。剩下的DNA单链母链如果不填补成双链，就会被核内Daase降解，随着细胞的不断分裂，染色体末端进行性缩短。

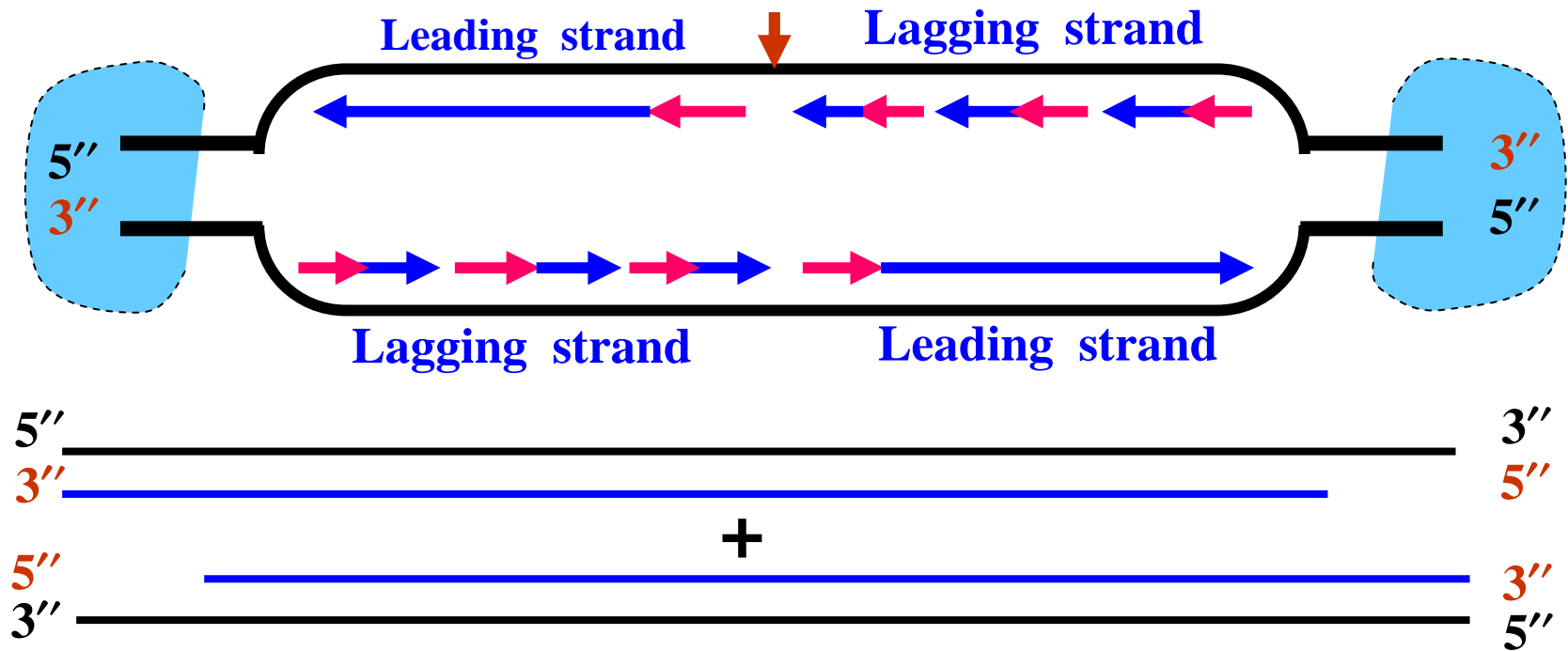


图10-22 线状DNA复制的末端

• 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:

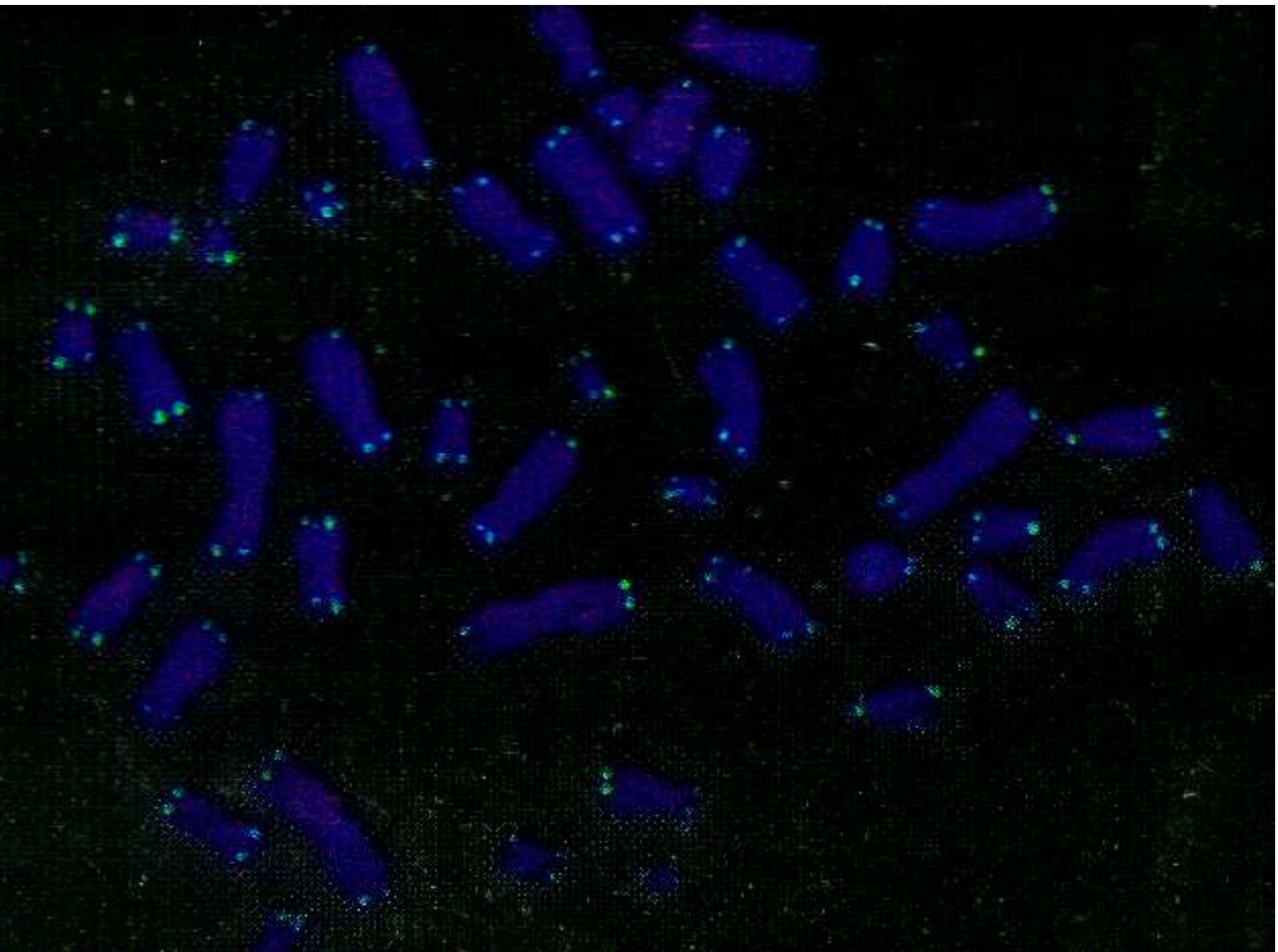
- * 由末端单链DNA序列和蛋白质构成。
- * 末端DNA序列是多次重复的富含G、C碱基的短序列。



功能: * 维持染色体的稳定性，为染色体末端提供可消耗的缓冲序列。

- * 维持DNA复制的完整性。
- * 对细胞有丝分裂进行调控。

(p234)



*人和脊椎动物为5'' (TTAGGG) n3'重复序列。不同生物的端粒长度不同，人类端粒序列范围在15Kb之内。

染色体末端端粒的延长由端粒酶催化合成。

端粒酶 (Telomerase) 是一种RNA-蛋白质复合体，是依赖于RNA的DNA聚合酶，人端粒酶的组成：

端粒酶RNA组分(TR) ——作为端粒合成的模板

端粒酶协同蛋白(TP1)

端粒酶逆转录酶(TERT, 又称端粒酶催化亚单位)

——催化端粒的合成

(p234)

Telomerase is a reverse transcriptase together with a template RNA

It is active in germ cells, not in somatic cells, and is activated in cancers



Telomerase model

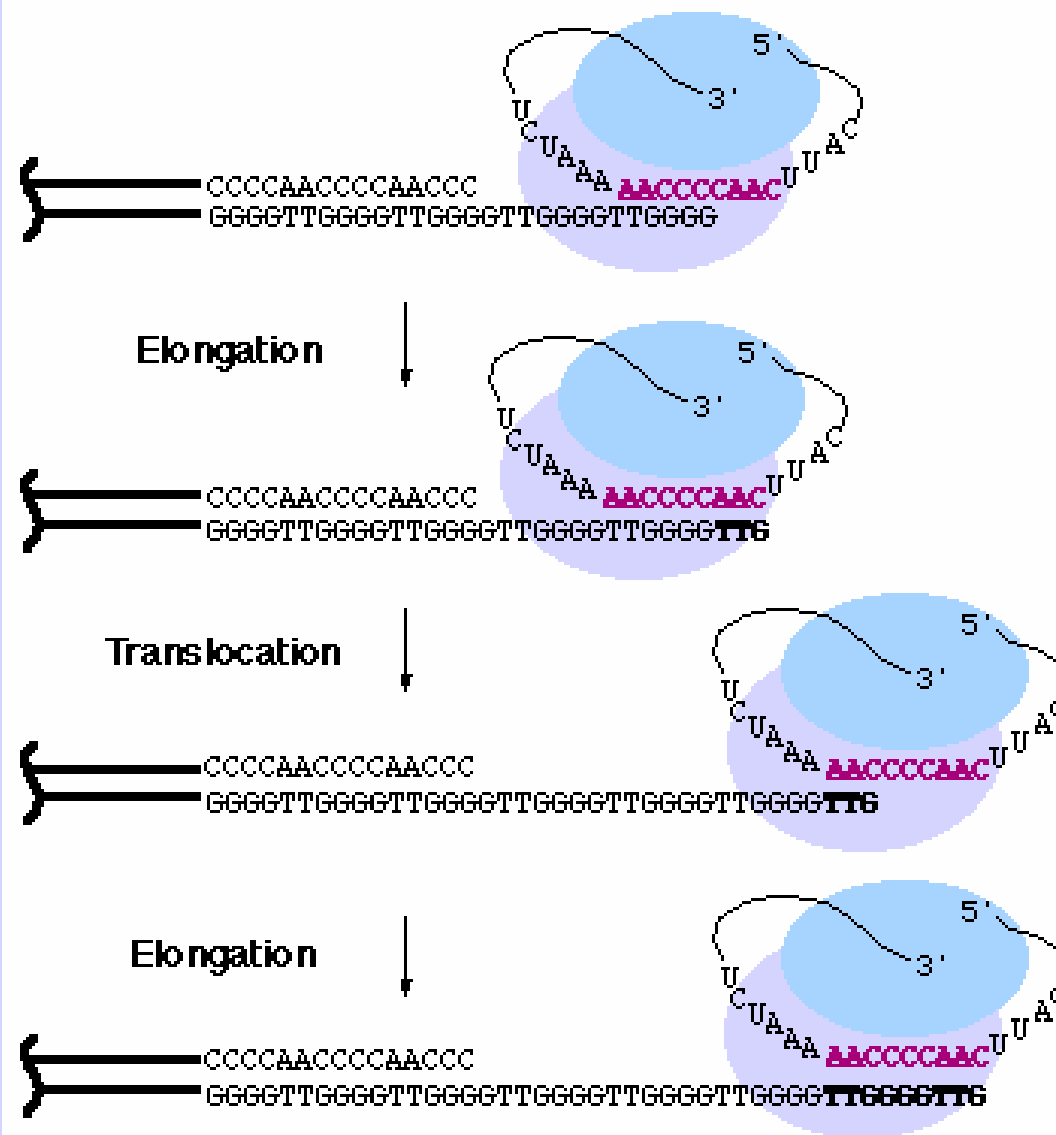
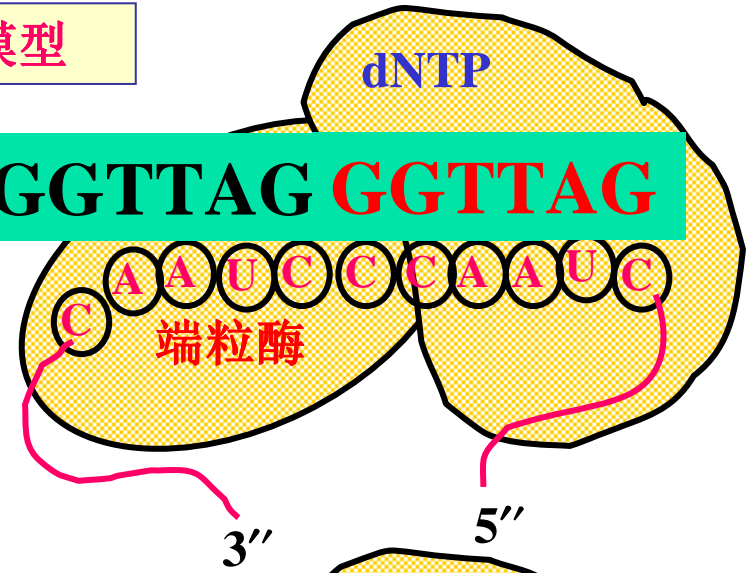


Figure modified & reproduced with permission from Carol Greider.

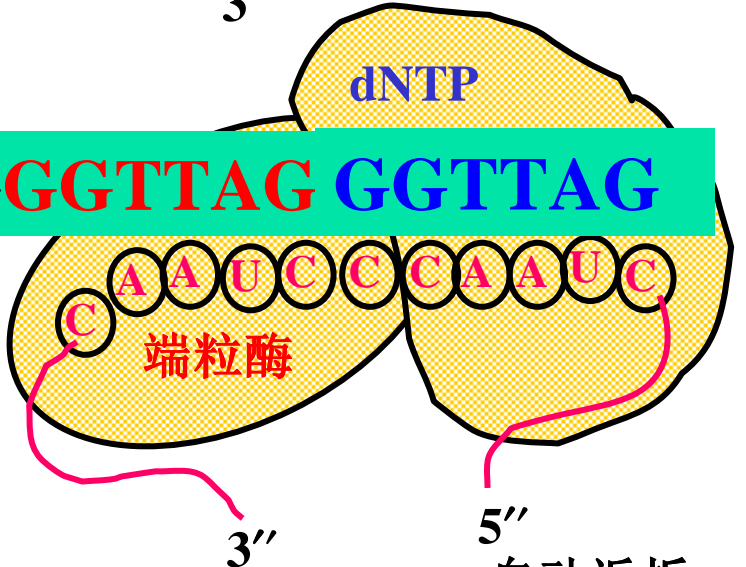
10-22 端粒酶催化端粒生成爬行模型

① 染色体DNA与端粒酶结合

染色体DNA



② 端粒酶催化端粒延伸

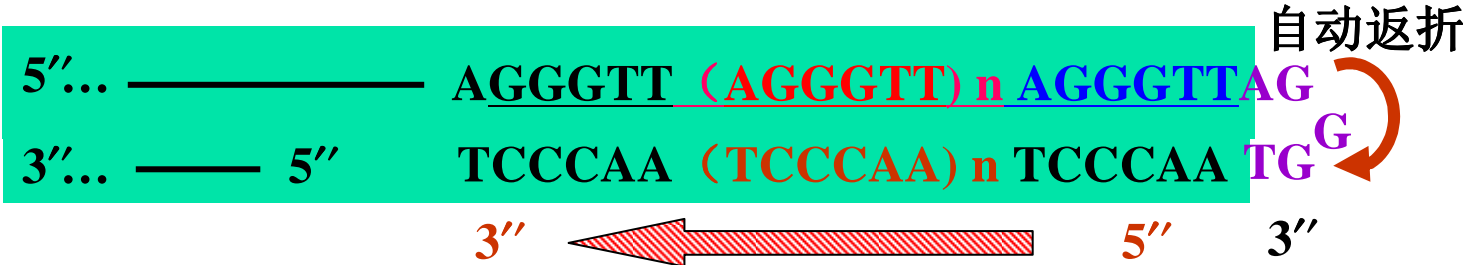


③ 染色体移位，端粒继续延伸

单链DNA聚合酶



10-22 端粒酶催化端粒生成爬行模型



DNA聚合酶
DNA连接酶



核酸酶

④端粒双链
DNA生成



第四节 逆转录和其他复制方式

某些病毒的遗传物质是RNA、少数低等生物感染型只含单链DNA、原核生物的质粒和真核生物的线粒体DNA等非染色体基因组DNA等采用其他的复制方式。

(p235)

一、逆转录病毒和逆转录酶

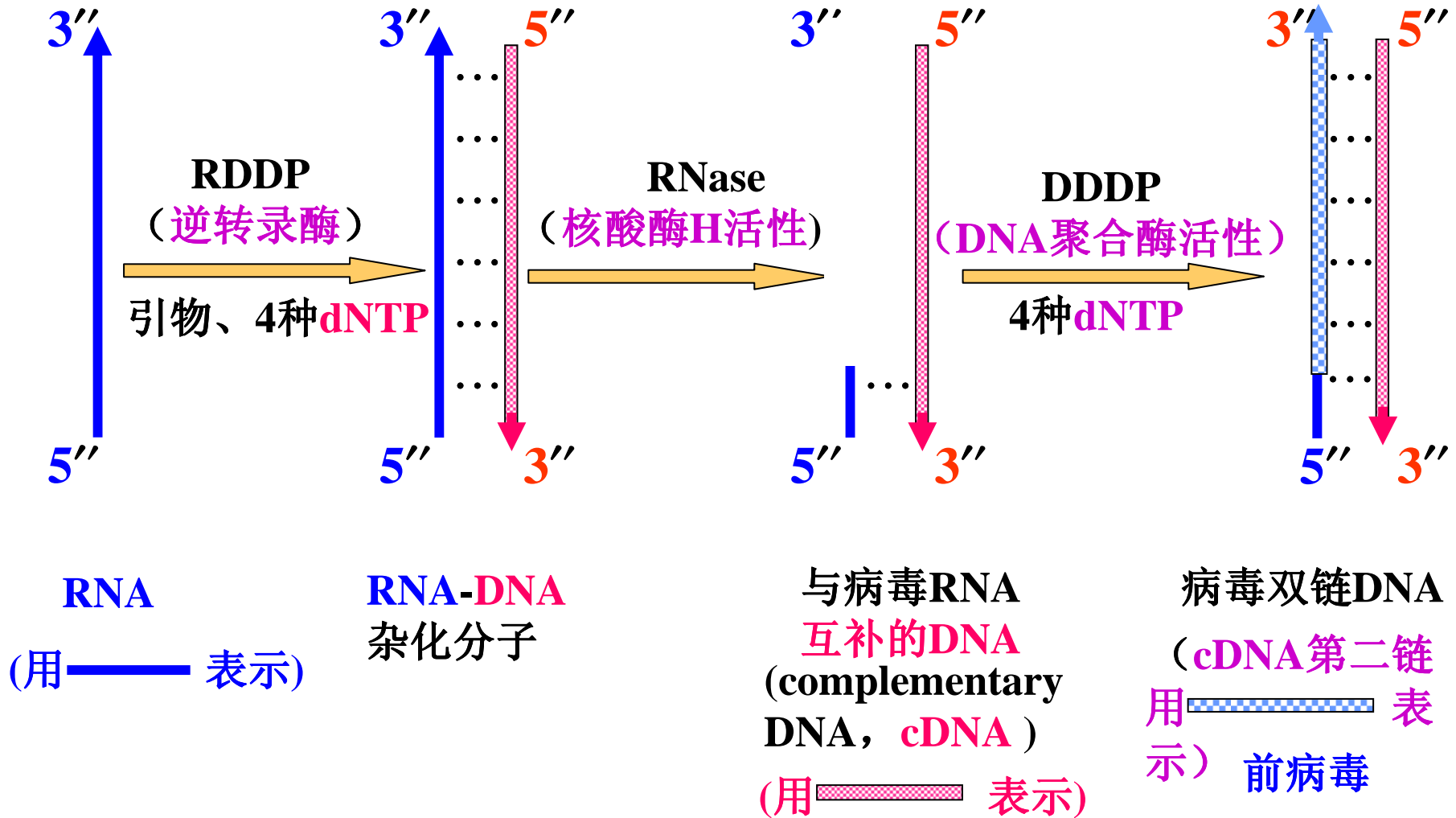
某些病毒的遗传物质是RNA。以RNA为模板，dNTP为原料，在逆转录酶的催化下合成DNA的过程称为逆转录作用（Reverse transcription），该病毒称为逆转录病毒，催化此过程的酶称为逆转录酶（Reverse transcriptase），逆转录酶是依赖RNA的DNA聚合酶。

逆转录酶是多功能酶：

- (1) RNA指导的DNA聚合酶活性（RDDP）
- (2) 核糖核酸酶H活性（RNase H）
- (3) DNA聚合酶活性（DDDP）

(p235)

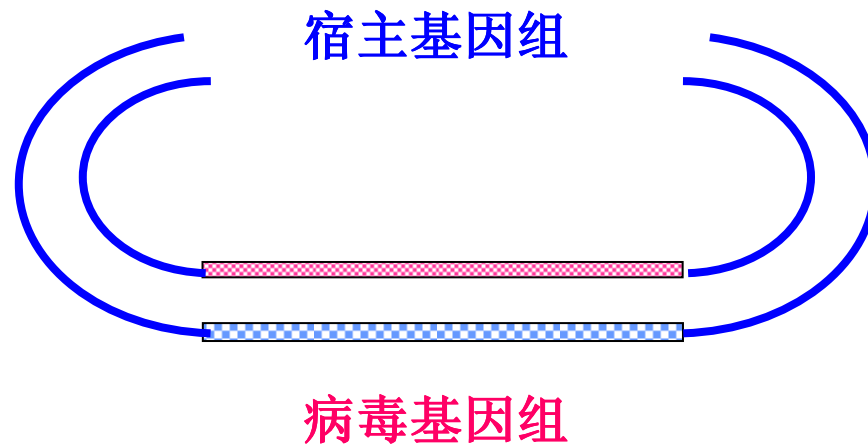
逆转录酶的作用:



(p236)

图10-24 逆转录病毒细胞内复制

RNA病毒在细胞内复制成双链DNA的前病毒（provirvs）。前病毒保留了RNA病毒的全部遗传信息，并可在细胞内独立繁殖。在某些情况下，前病毒还可将其基因组整合到宿主基因组中，并随宿主基因复制和表达。前病毒独立繁殖和整合，都可成为致病的病因。



4# (p236)

病毒基因组整合到宿主基因

二、逆转录研究的意义

逆转录酶和逆转录现象是分子生物学研究的重大发现。逆转录的信息流向（RNA → DNA）与转录过程（DNA → RNA）相反，是一种特殊的复制方式。20世纪70年代发现了逆转录酶，且从逆转录病毒中找到了癌基因。至今，癌基因仍是病毒学、肿瘤学和分子生物学的重大研究课题。现已知人类免疫缺陷病毒（HIV）、SARS病毒都是逆转录病毒。

分子生物学研究还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。

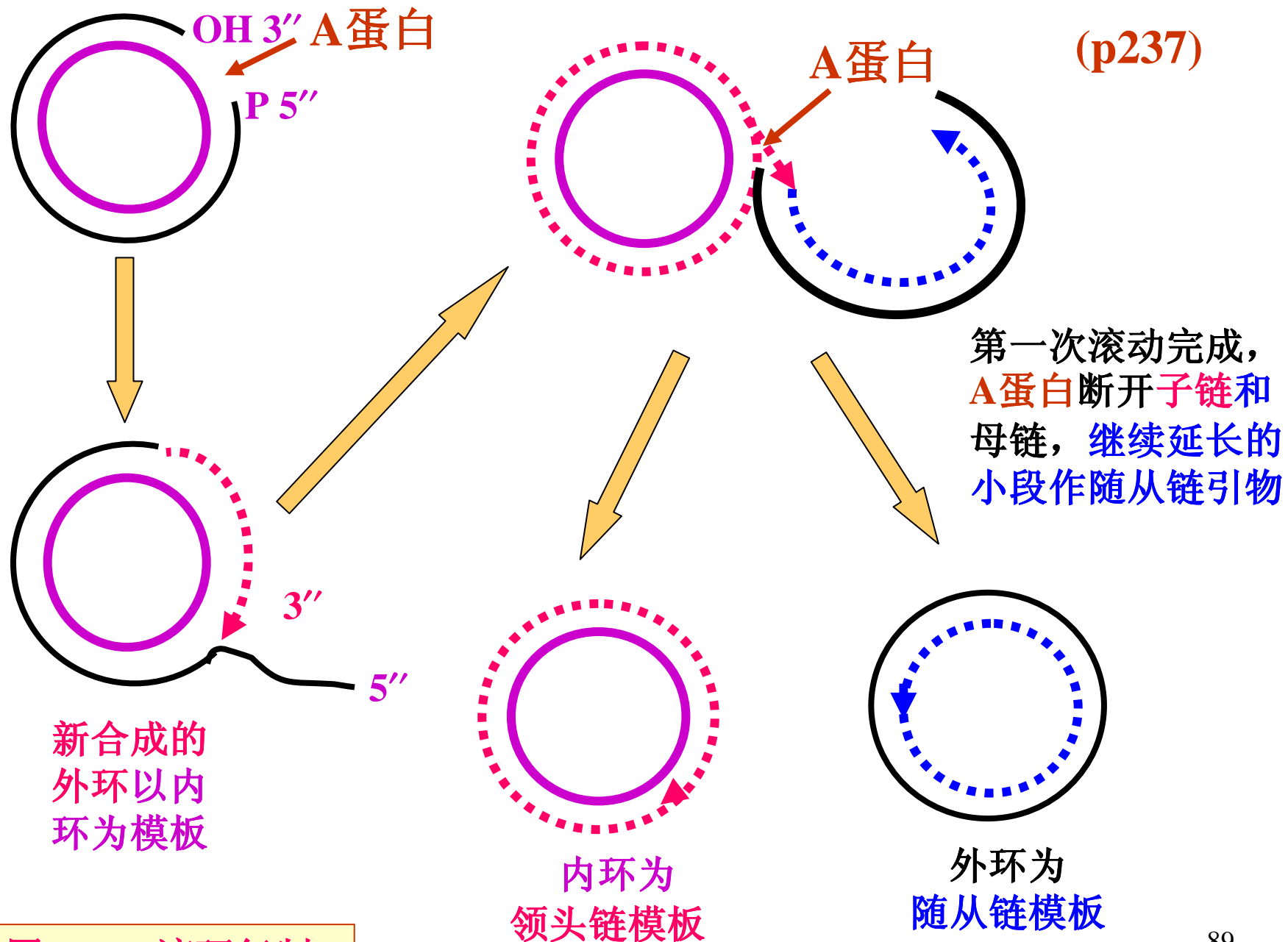
三、滚环复制和D环复制

(p236)

滚环复制是指一些简单的低等生物或染色体以外的DNA可经滚环复制形式进行复制，如 ϕ X174（复制型）。

- (1) 亲代环状双链DNA先打开一个缺口，5'端伸出环外。
- (2) 伸展出的**外环单链DNA**作为**随从链的模板**，新链从5''→3''方向进行复制，开环的外环也滚动成环，继续进行复制；
- (3) **未开环的另一股单链**作为**领头链的模板**，一边滚动一边进行连续复制。滚环复制**可能不需另外合成引物**。

D环复制是线粒体DNA的复制形式。



第五节 DNA损伤 (突变) 与修复

突变 (mutation) : (p238)

遗传物质的结构改变而引起的遗传信息改变，均可称为**突变**。

* 从分子水平来看，突变就是DNA分子上碱基的改变。

* 在复制过程中发生的DNA突变称为**DNA损伤** (DNA damage)。

一、突变的意义

(p238)

- (一) 突变是进化、分化的分子基础。
- (二) 只有基因型改变，而无可察觉表型改变的突变
(基因多态性：用于描述个体之间的基因型差别现象)。
- (三) 致死性的突变（利用此特性消灭有害病原体）。
- (四) 突变是某些疾病的发病基础。

二、引发突变的因素

(p238)

1、自发突变： 频率： 10^{-9}

2、诱变因素

物理

*紫外线照射

*电离辐射

化学

*5-溴尿嘧啶(5-BU)

*羟胺

*亚硝酸盐

*氮芥类

生物： 病毒等。

物理因素： 紫外线(ultra violet, UV)、各种辐射

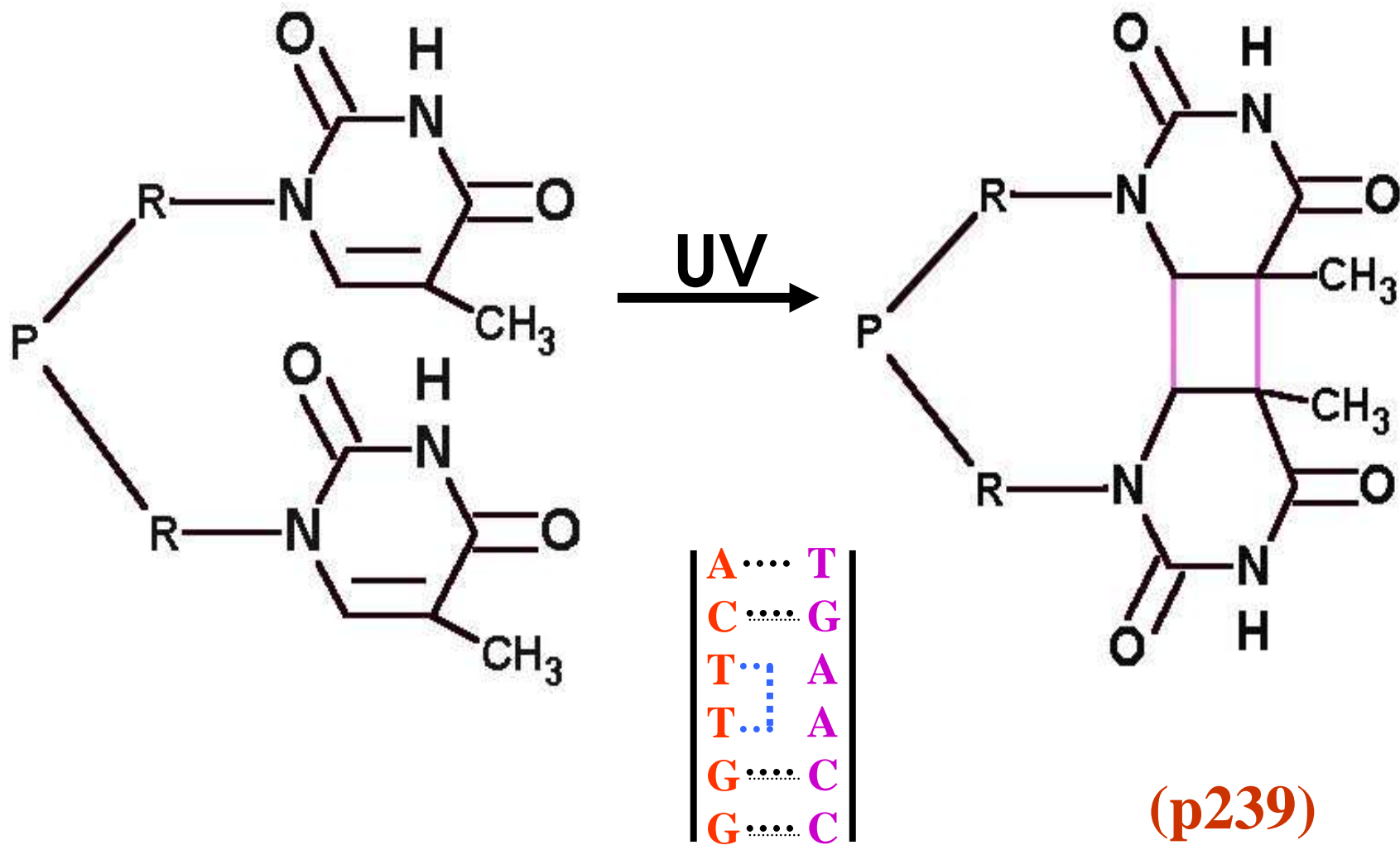


图10-27 嘧啶二聚体的形成

化学因素:

表10-6 常见的化学诱变剂 (p239)

类别	化合物举例
稠环方向烃	苯并芘, 二甲苯并蒽
硝基胺和芳香胺	二甲基硝基胺, N-甲基-4氨基偶氮苯
某些药物	烷化剂如氮芥, 环磷酰胺
变质食物	黄曲霉素B, 色素添加剂, 某些防腐剂
无机物	亚硝酸盐 (NO_2^-), 砷, 石棉

常见的化学诱变剂

(p239)

化合物类别	作用点	分子改变
碱基类似物 如：5-BU	$A \rightarrow 5-BU \rightarrow G$	$\begin{array}{ccc} -A- & \longrightarrow & -G- \\ -T- & & -C- \end{array}$
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



三、突变分子改变的类型

(p239)

- **错配 (mismatch)**
- **缺失 (deletion)**
- **插入 (insertion)**
- **重排 (rearrangement)**

(一) 错配 (点突变 point mutation) (p239)

一个碱基的变异。有转换同型碱基和颠换异型碱基。

点突变

- 转换：一种嘌呤换成另一种嘌呤或一种嘧啶换成另一种嘧啶。
- 颠换：嘌呤换成嘧啶或嘧啶换成嘌呤。

HbA β 肽链 N-val· his · leu · thr · pro · **glu** · glu-C
(146)

HbS β 肽链 N-val· his · leu · thr · pro · **val** · glu-C
(146)

正常成人
HbA β 基因

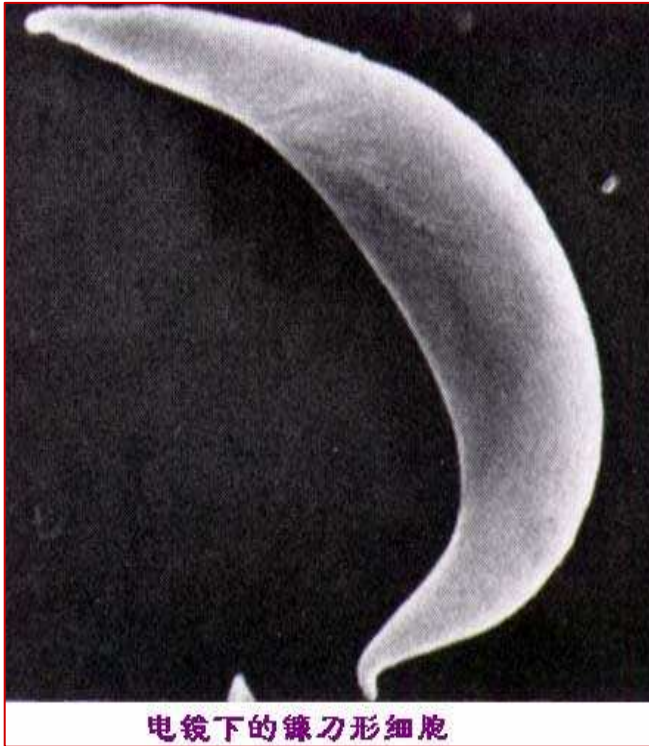


镰刀形红细胞
性贫血
HbS β 基因



(p240)

图10-28 镰刀形红细胞性贫血患者HbS与正常成人HbA比较
只是 β 肽链第6位氨基酸的变异（谷氨酸变成缬氨酸），基因上的改变仅是为第6号氨基酸编码的密码子上的一个点突变。



HbS 的红细胞

正常人红细胞

HbS与HbA红细胞形态

(二) 缺失、插入和框移突变

(p240)

- **缺失**: 一个碱基或一段核苷酸从DNA上消失。
- **插入**: 一个碱基或一段核苷酸插入到DNA大分子中。
- **框移突变**: 由于缺失和插入, 使三联体密码的阅读方式改变。但3个或3n个核苷酸插入或缺失不一定引起框移突变(frame-shift)。

mRNA

5' UCA**C**GACAUAAUG...3'
丝 精 组 蛋

缺失

5' UCAGACAUAAUG...3'
丝 天冬 异亮

(三) 重排

DNA分子内发生较大片段的交换，也称为重组。

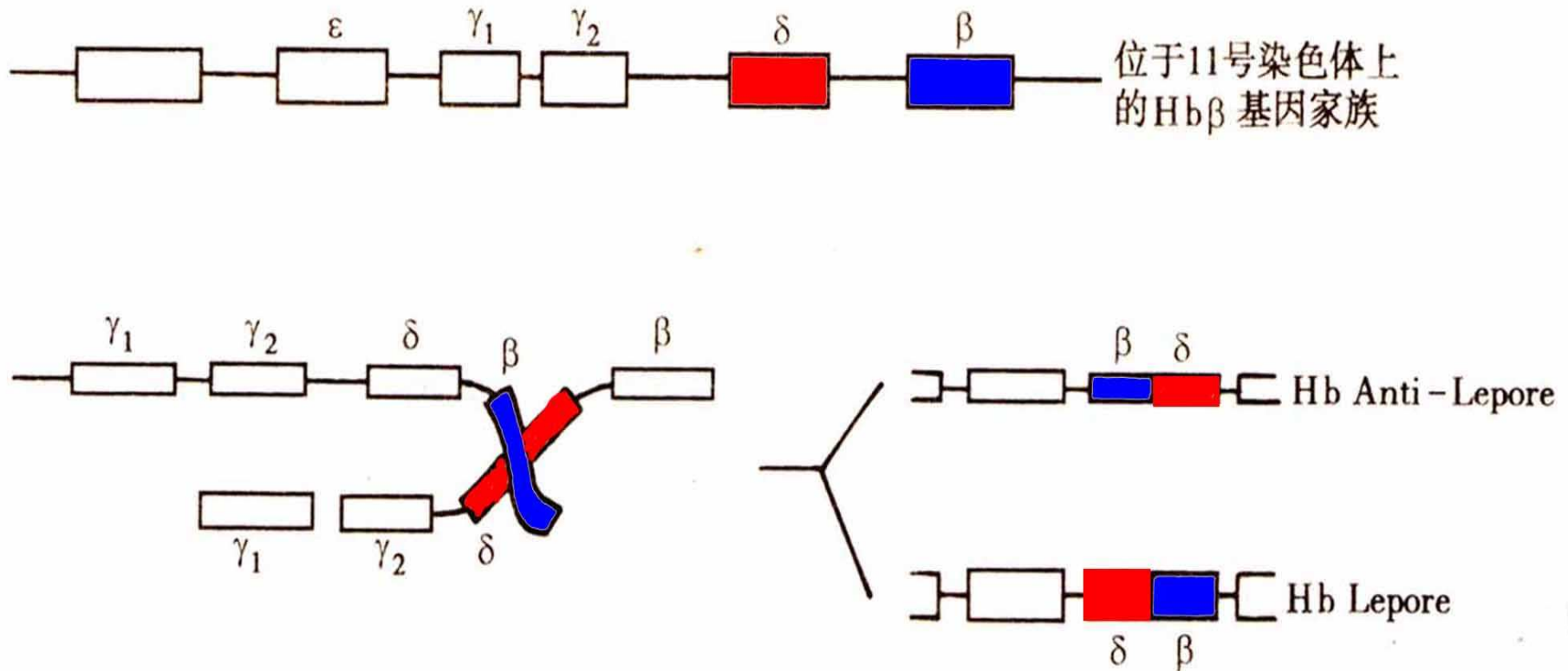


图10-31 由基因重排引起的两种地中海贫血基因型

(p241)

四、DNA损伤的修复

(p241)

- **修复**：对已发生分子改变的DNA进行补偿措施，使其回复为原有的天然状态。

**DNA损伤
修复的机制
(四种)**

(一) 光修复

(二) 切除修复

(三) 重组修复

(四) SOS修复

(一) 光修复

- 紫外线照射可引起核酸链上相邻的两个**胸腺嘧啶形成二聚体TT**。
- 光修复过程是通过**光修复酶**催化而完成的，需 300~600 nm 波长照射激活。

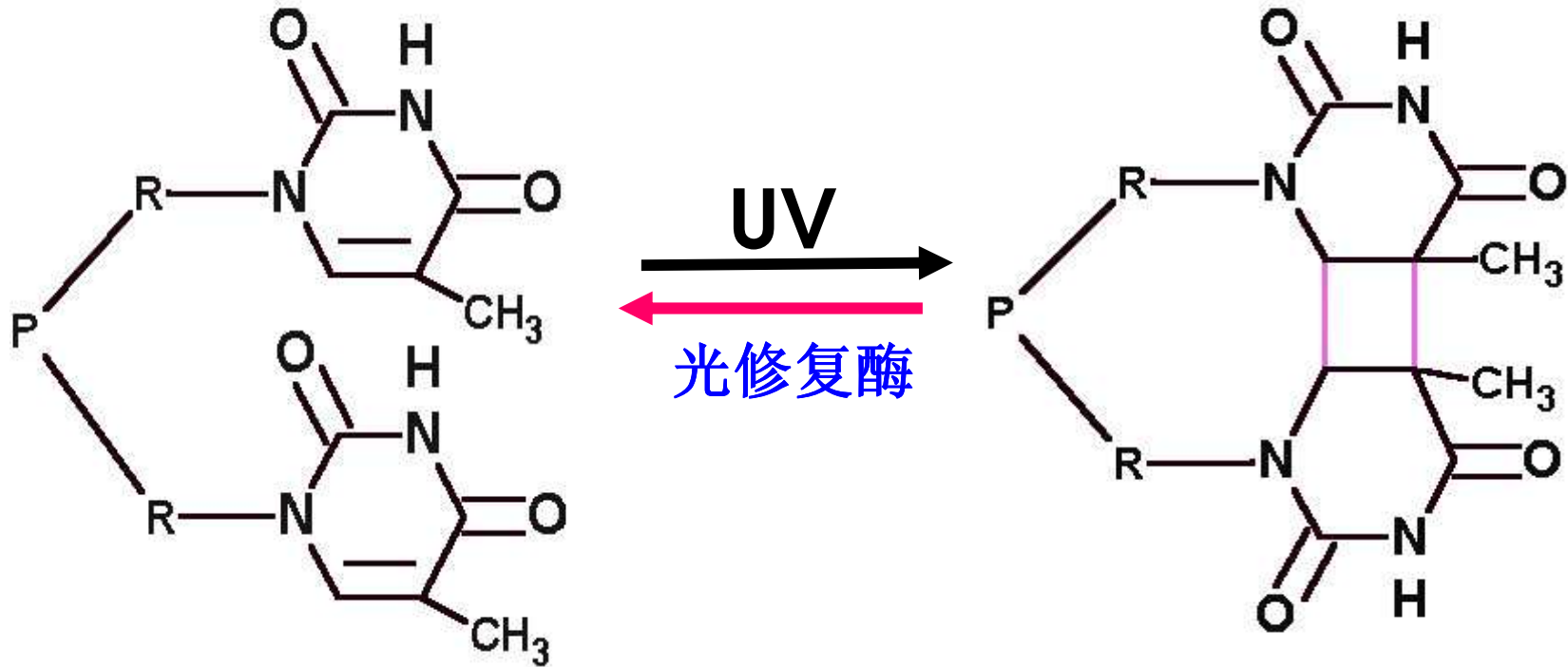


图10-27 嘧啶二聚体的形成与解聚

(p239)

(二) 切除修复 (excision repair) (p241)

1、**定义** 在有关酶和蛋白质的作用下，去除DNA链的损伤部分，用执行修复功能的DNA聚合酶催化dNTP聚合而填补缺口，最后用连接酶将修复过的链与无损伤的链两端连接起来。是细胞内最重要和有效的修复机制，主要由DNA-pol I 和连接酶完成。

原核生物参与
切除修复的酶
及蛋白质

UvrA 、 UvrB(辨认和结合DNA损伤部位)

UvrC(去除损伤链)

pol I (填补空隙)

DNA连接酶(连接缺口)

真核生物除去损伤链：**XP**蛋白

2、切除修复过程 (*E.coli*) :

(p241)

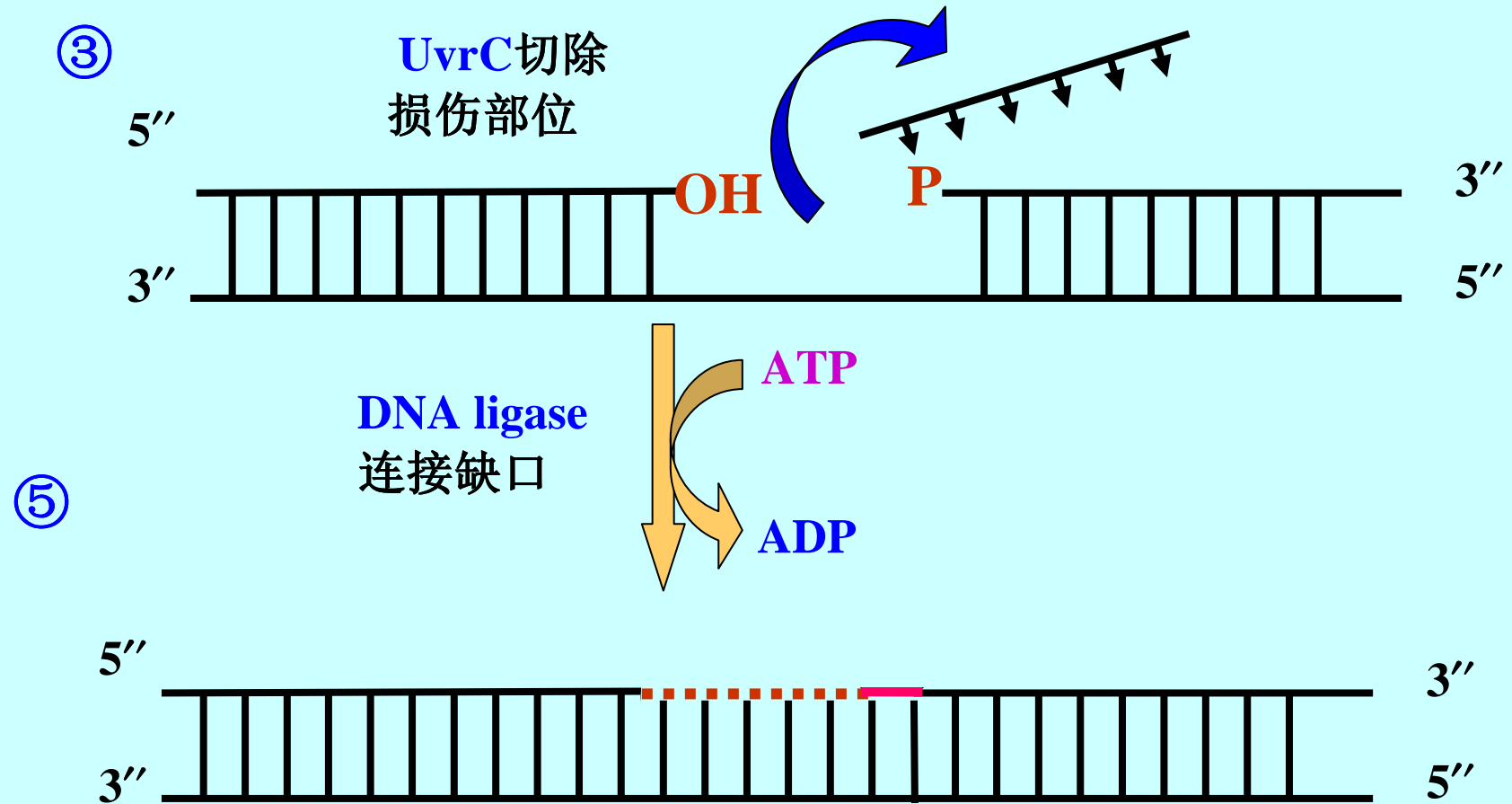


图10-32 *E.coli*切除修复方式

(三) 重组修复

(p242)

- 当DNA分子的损伤面较大时，来不及修复完善就进行复制，损伤部位因无模板指引，复制的新子链会出现缺口。
- 重组蛋白RecA将另一股健康的母链与缺口部分进行交换，以填补缺口。
- 健康的母链产生的缺口由pol I和连接酶复原。
- 原有的损伤仍存在，但随着多次复制，损伤的比例越占越少。

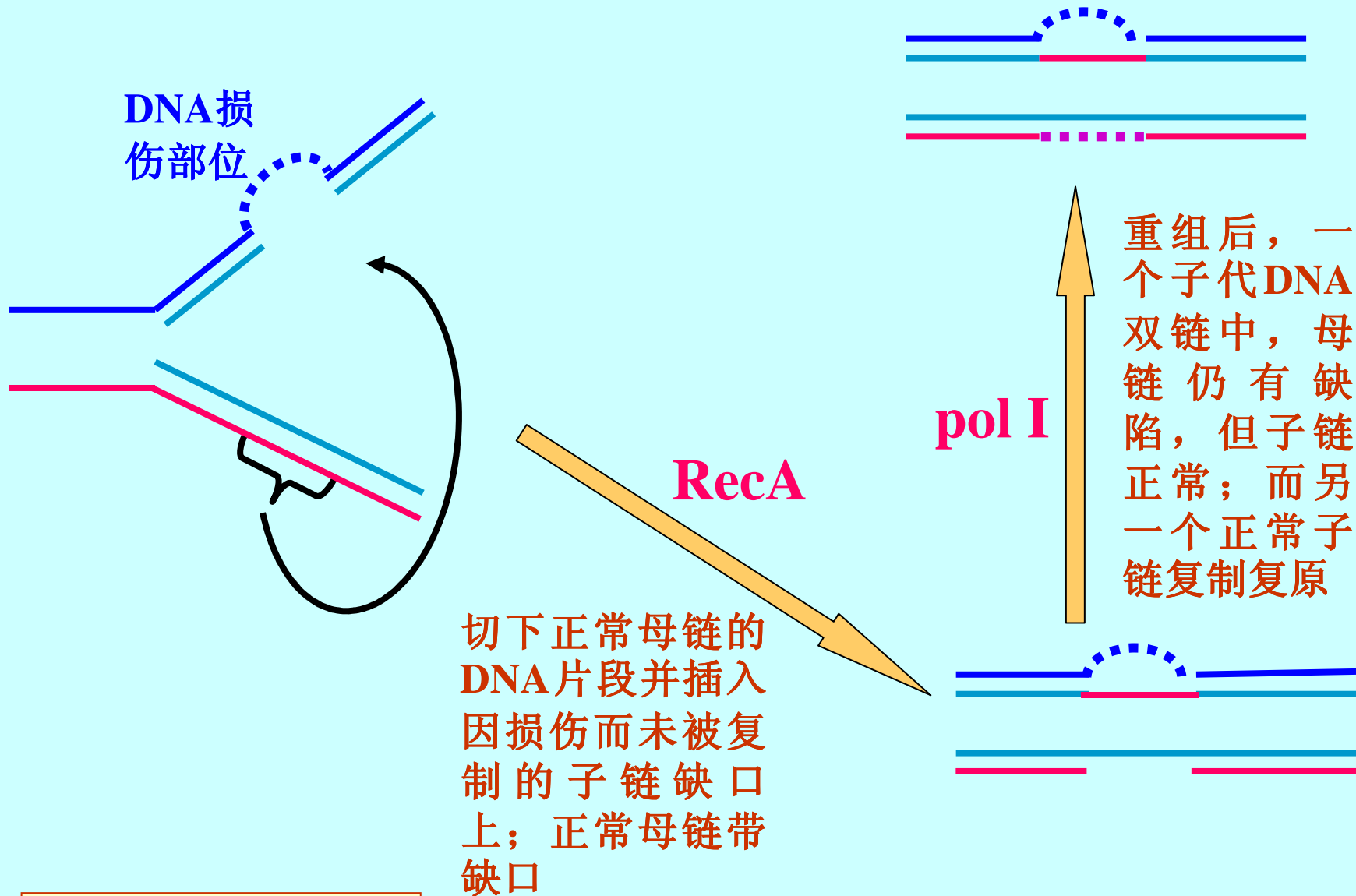


图10-33 重组修复

(p242)

（四）SOS修复

(p242)

- SOS是国际海难信号，在此用以表示应急性的复制方式。
- 除了需要复制、修复的酶系统外，还需重组蛋白RecA及调控蛋白LexA。
- 此修复系统对碱基的识别、选择能力差，是以牺牲复制的准确性而换取细胞的生存，使DNA保留的错误会较多，从而引起广泛、长期的突变。这是SOS修复的主要特点。

Key Points

1. 基因、基因表达、半保留复制、复制叉、复制子、半不连续复制、领头链、随从链、冈崎片段的定义。
2. 参与DNA复制的物质、酶和蛋白因子。
3. DNA复制的过程。
4. 复制保真性依赖的机理。
5. 原核生物DNA聚合酶种类及作用。
6. 逆转录定义，逆转录酶作用。
7. 突变及其诱变因素，突变分子改变的类型，损伤修复的机制。