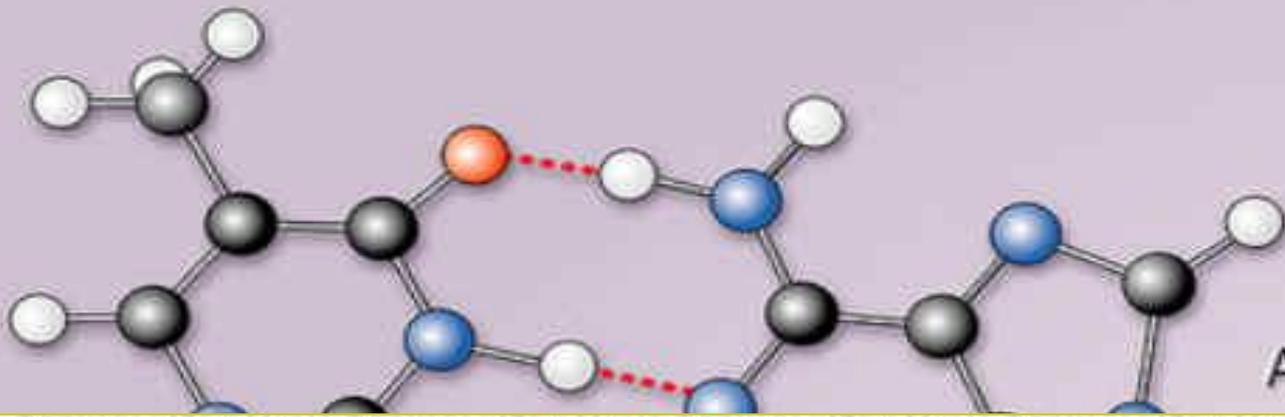


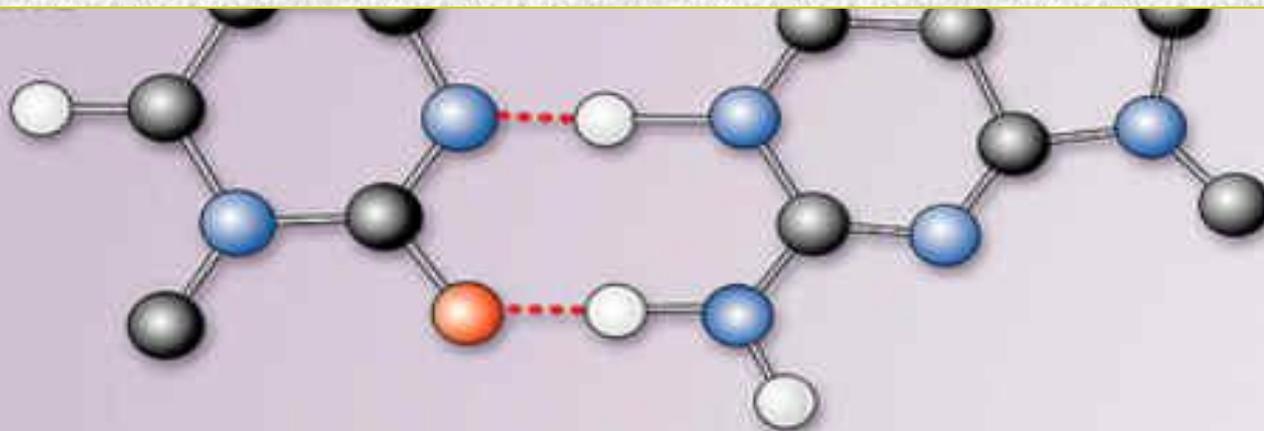
Thymine



Adenine

第15章 DNA的生物合成

C



Guanine

Base pairing

遗传的中心法则

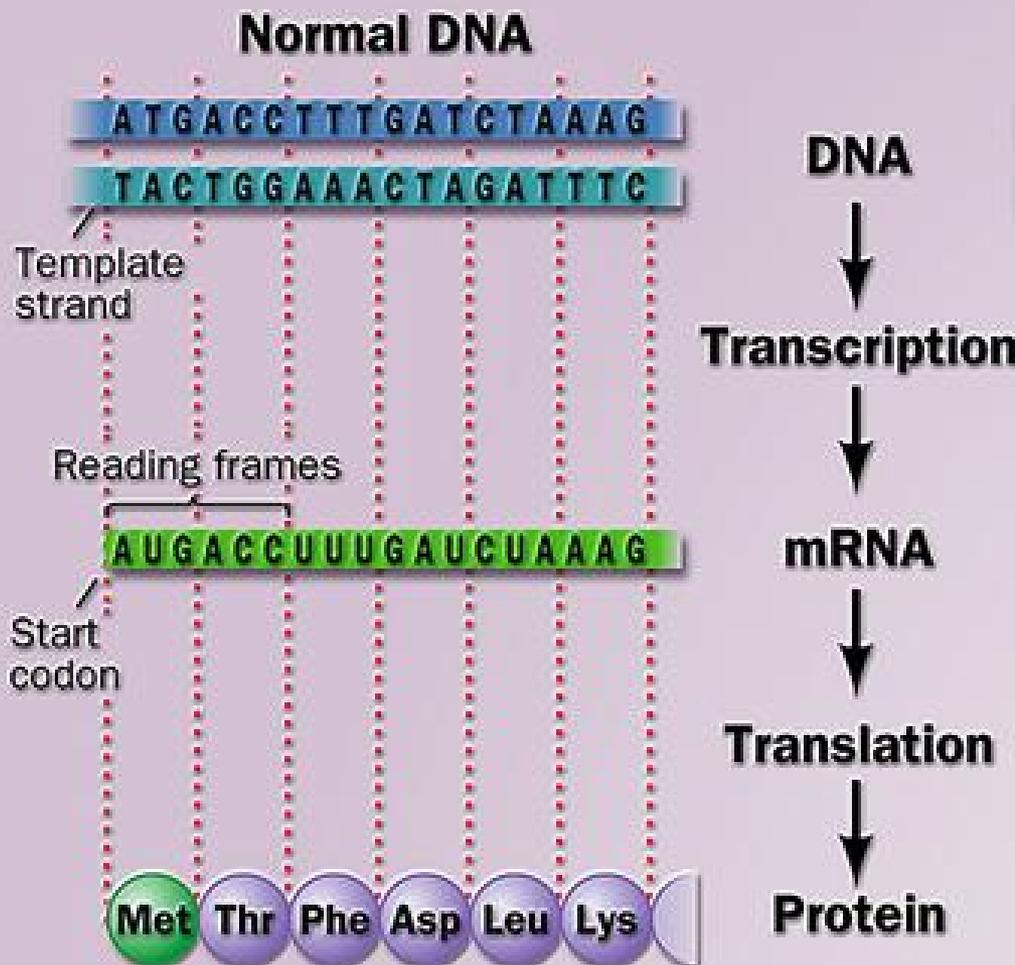
DNA是遗传物质，遗传的全部信息就贮存在DNA分子中四种核苷酸不同的排列，而构成的片段中。遗传学上的基因就是DNA分子上具有一定意义的片段。

作为遗传物质的载体，DNA具有下面的重要生物学功能：

- 1、复制：当细胞进行有丝分裂时，染色体一分为二，分别形成两个子细胞。以亲代的DNA为模板制造出子代DNA的复本，遗传信息完全传到子细胞DNA分子中，这个过程就是复制。
- 2、转录：以DNA为模板指导RNA的合成，于是遗传信息从DNA转抄到RNA分子上，这就是转录。
- 3、翻译：以RNA为模板指导蛋白质的合成过程，就是翻译。

信息流动

- 不含DNA的生物，RNA也可自我复制。有些病毒以自己的RNA为模板指导DNA的生物合成称为逆转录。



一、DNA的复制

二、DNA的损伤修复

三、DNA的突变

提要

不要盲目相信权威，哪怕他是诺贝尔奖得主，要有自己的自由思维。----- 教书感悟

一、DNA的复制

问题

- (一) **DNA**的半保留复制
- (二) **DNA**复制的起点和方式
- (三) **DNA**聚合反应有关的酶
- (四) **DNA**的半不连续复制
- (五) **DNA**复制的拓扑性质
- (六) **DNA**复制的过程
- (七) 真核生物**DNA**的复制

问题

细胞分裂，亲代的遗传物质要传给子细胞，因此**DNA**必须精确的复制出子代的**DNA**。
关键解决下面的问题：

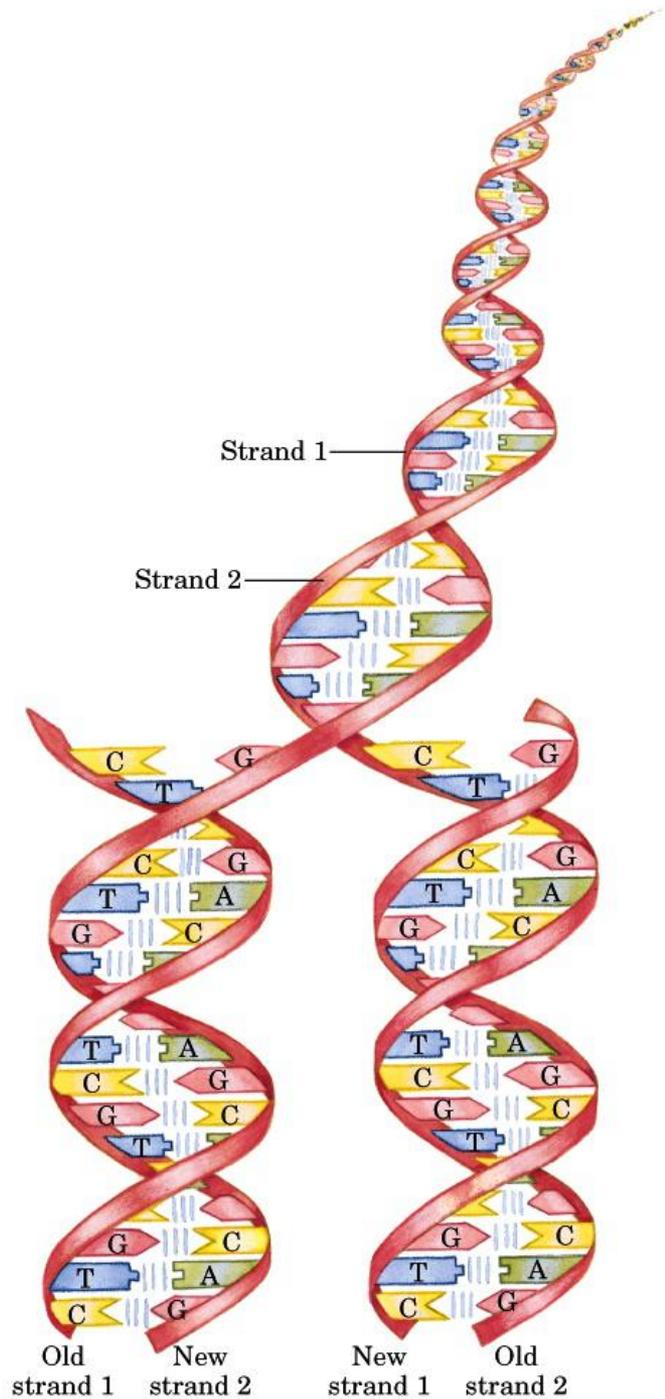
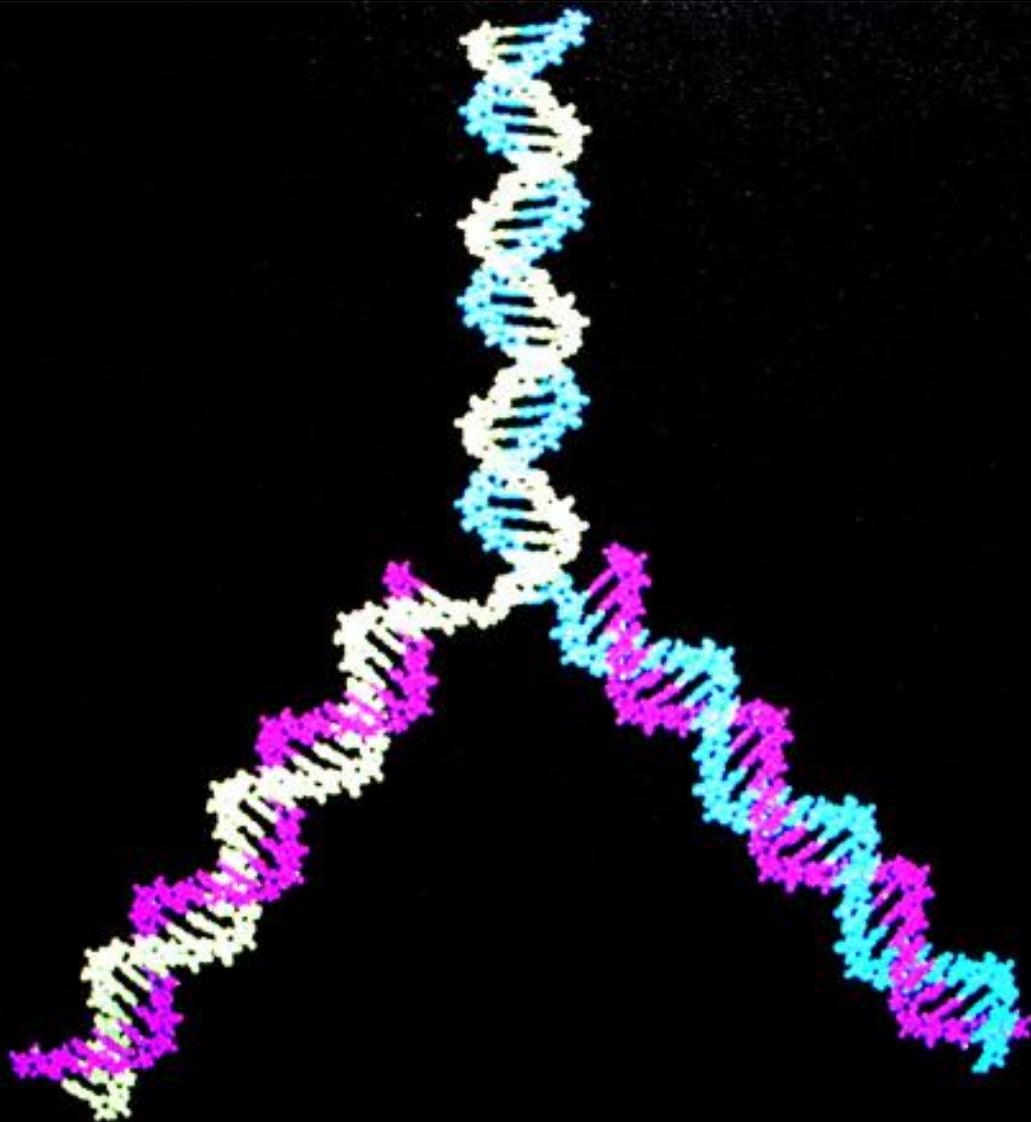
- 1、子代**DNA**如何获得亲代**DNA**全部信息。
- 2、复制是如何进行的。
- 3、生物体如何对**DNA**复制进行调控。

(一) DNA的半保留复制

- **半保留复制:**

根据**Watson—Crick**提出的**DNA**模型，**DNA**两条链反向平行，碱基互补的原则。分别以每一条单链为模板合成出另外一条互补新链的过程称为半保留复制。

DNA半保留复制



- 半保留复制的机理可以说明：
- 1、DNA在代谢上是稳定的，经过多次复制DNA仍保持完整性，出错率极低（ 10^{-9} — 10^{-10} ）。
- 2、这种稳定性和遗传的稳定性相一致。这种稳定性是相对的，在外界条件下DNA会发生突变和损伤，因此在复制过程中也会有变化，在样才能进化。

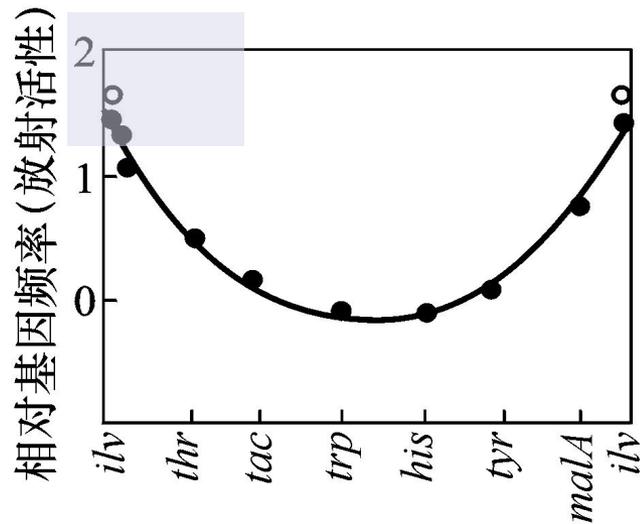
(二) DNA复制的起点和方式

- **复制单位：**
- 基因组能独立进行复制的单位为称为**复制单位**。
- 每个复制子都有控制复制的起始的起点和终点。复制在起始阶段实施受控制的，**一旦复制开始，就会使整个复制完成。**
- 1、起始位点和终止位点：复制是井然有序复杂的化学过程。它的起始点是特定还是任意的？

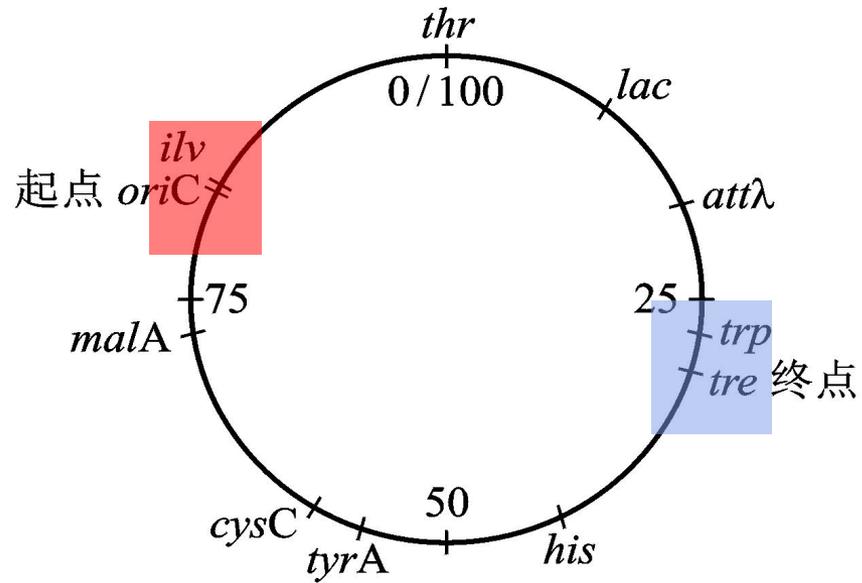
- 用遗传学和生物化学的研究方法对E.Coli的复制起始研究发现复制的起始点OriC位于ilv基因附近。以后的研究表明：**多数的生物DNA复制起始是相对固定有特定的起始位点和终点。**

- E.ColiDNA复制起始点和终止点的位置。

E.Coli的DNA是环状的，终止点在起始位点的对面位置 trp 附近。



A



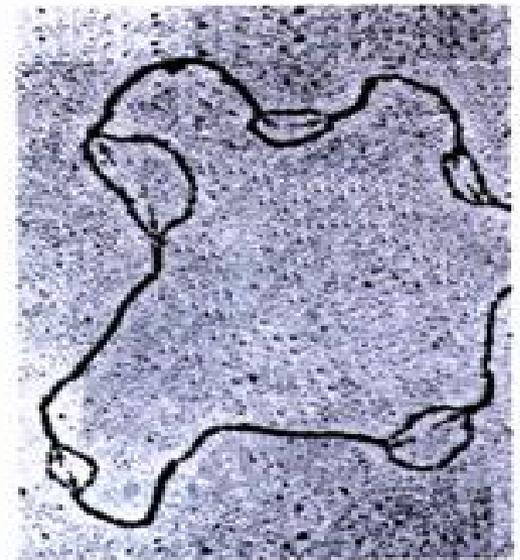
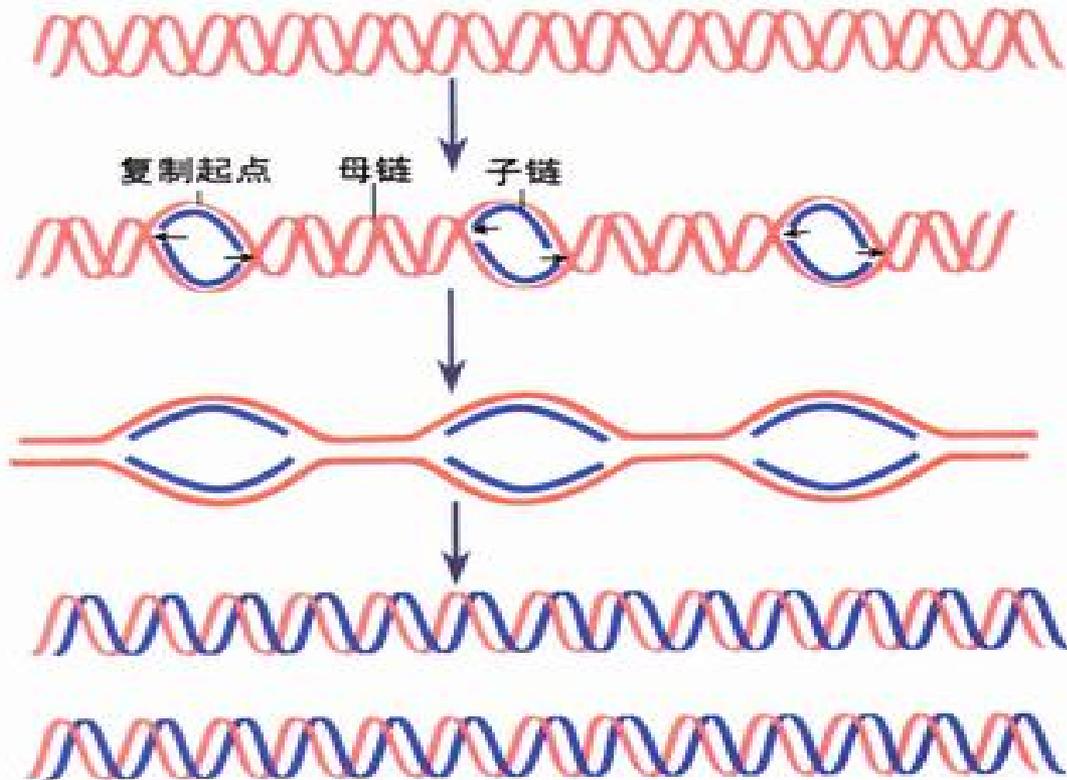
B

- **2、DNA复制的方式：**

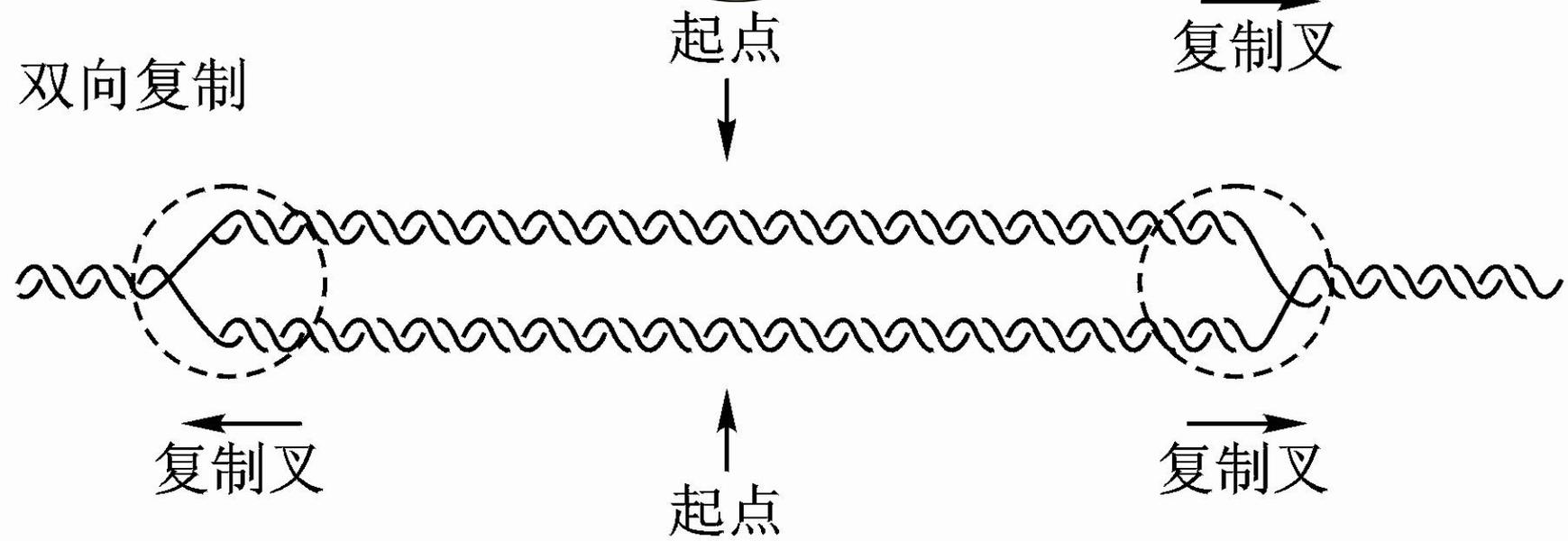
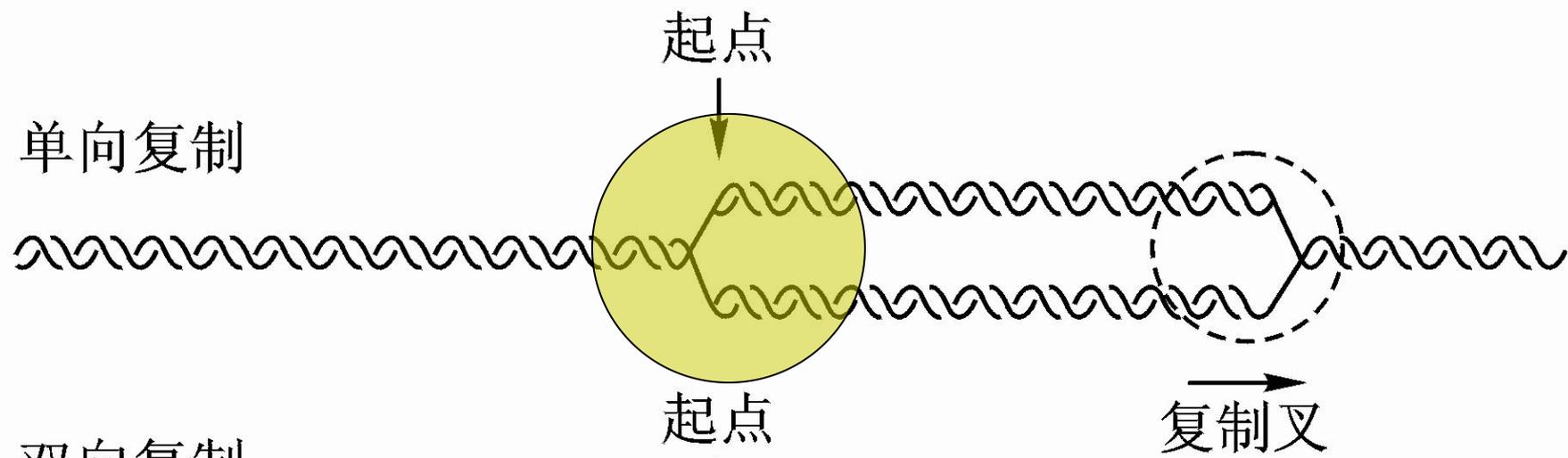
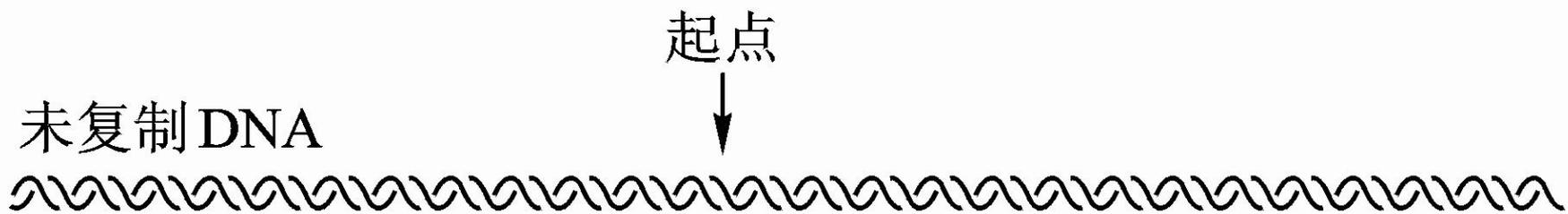
- 原核生物的染色体和质粒，真核生物的细胞器DNA都是环状双链分子。它们都在一个固定的起点开始复制，复制方向大多是双向的，即形成两个复制叉或生长点，分别向两侧进行复制；也有一些是单向的，只形成一个复制叉或生长点。

- 通常复制是对称的，两条链同时进行复制；有些则是不对称的，一条链复制后再进行另一条链的复制。
DNA在复制叉处两条链解开，各自合成其互补链，在电子显微镜下可以看到形如眼的结构，环状**DNA**的复制眼形成希腊字母 θ 形结构。
- 真核生物染色体**DNA**是线性双链分子，含有许多复制起点，因此是多复制单位（**multireplicon**）。

真核生物中真核生物染色体DNA是线性双链分子，
含有许多复制起点，因此是多复制单位



箭头示DNA在每一复制泡两端的复制方向



- 病毒DNA有多种多样，或是环状分子，或是线性分子，或是双链，或是单链。
- 每一个病毒基因组DNA分子是一个复制子，它们的复制方式也是多种多样的：双向的。或是单向的；对称的，或是不对称的。

(三) DNA聚合反应有关的酶

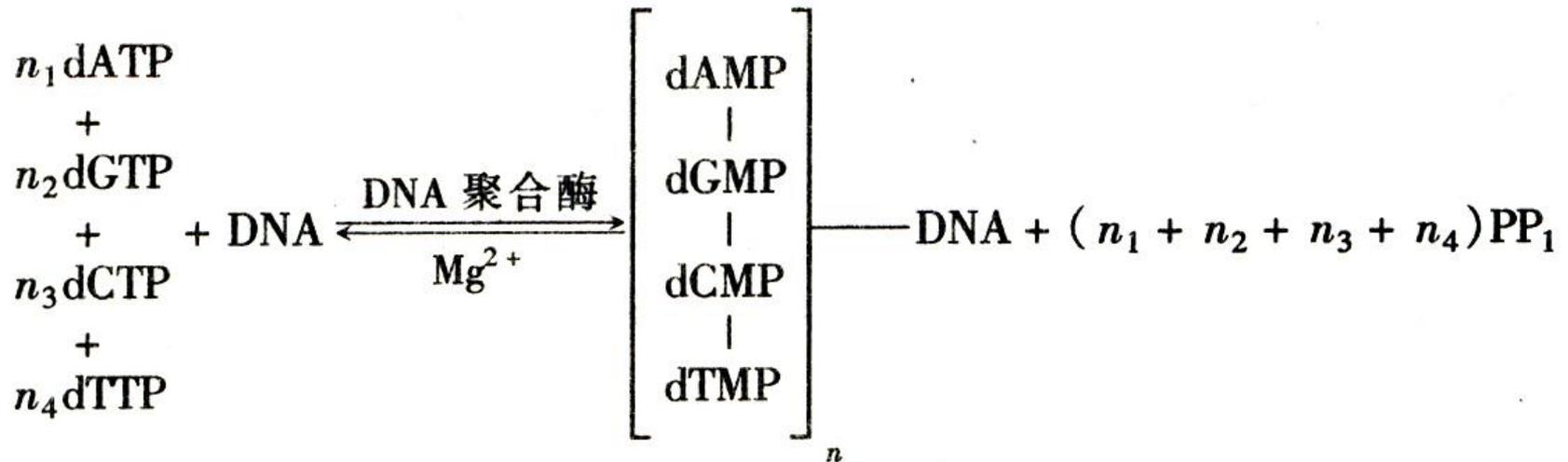
- **1、DNA聚合反应和聚合酶**
- **DNA聚合酶 I 最初是由A.Kornburg从E.Coli 提取出的。**
- **1969年De.Lucia和1970年Cairns分别发现并提取出了DNA聚合酶 II。**
- **1971年T.Kornburg又分离出了聚合酶III。以后又分别发现和提取出多种其它的DNA聚合酶**
1967年在几个不同的实验室分别发现和提取出DNA连接酶。

- 1) DNA聚合酶 (DNA polymerase) 的反应，
再有DNA为模板的情况下，体系中有Mg⁺存在，加入四种脱氧核苷三磷酸，在DNA聚合酶的催化下聚合到DNA模板分子的末端。
- 2) DNA聚合酶催化的产物实在模板DNA的指导下进行的。
- 与4种脱氧核苷三磷酸的浓度、比例、激酶的性质无关，而与模板的性质有关。

加入少量小牛胸腺DNA: 聚合的结果产物是小牛胸腺DNA。

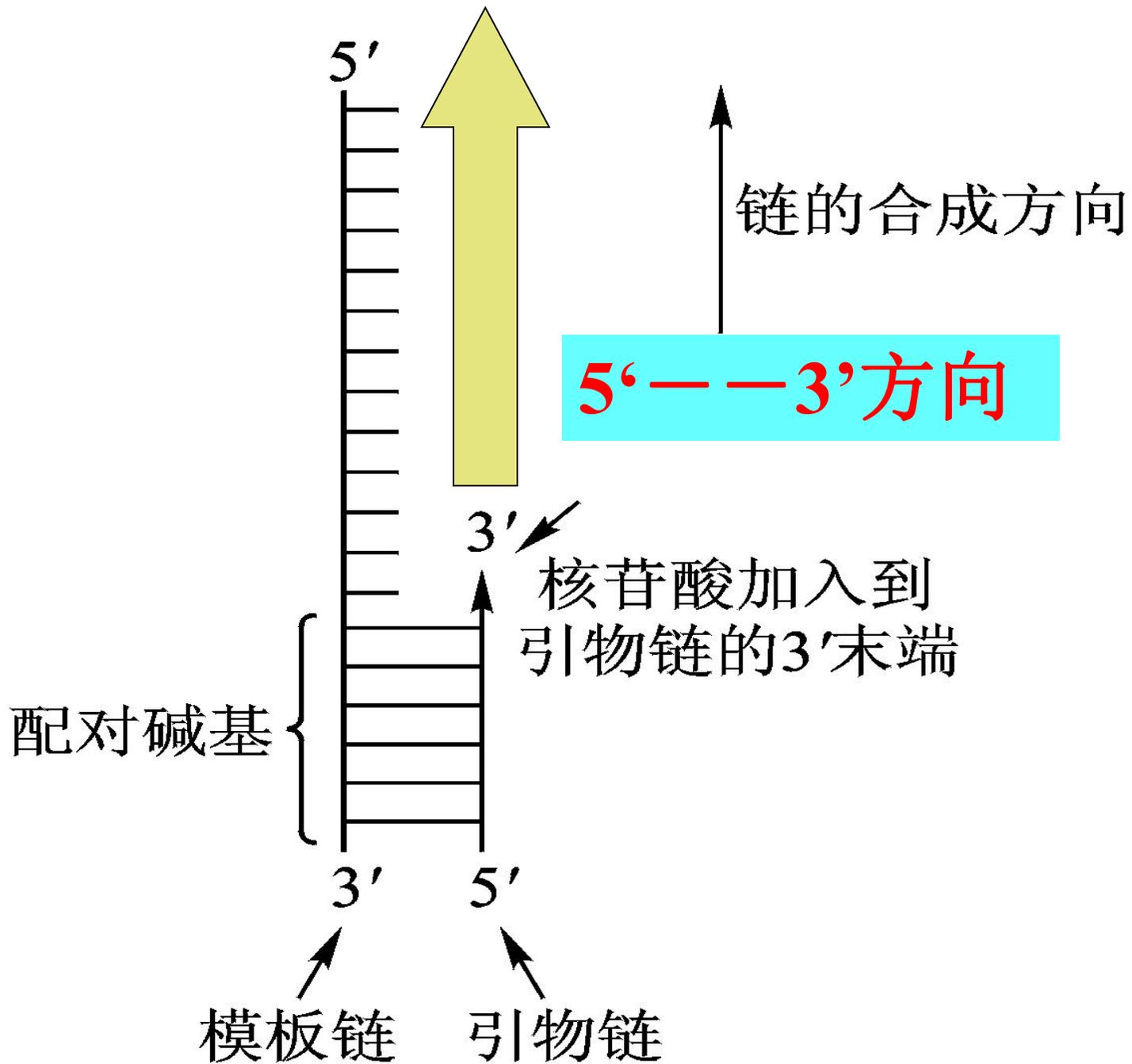
加入噬菌体T4的DNA: 合成的产物是噬菌体T4DNA;

加入人工合成的一段PolyAT为模板: 产物是ATAT的共聚物。

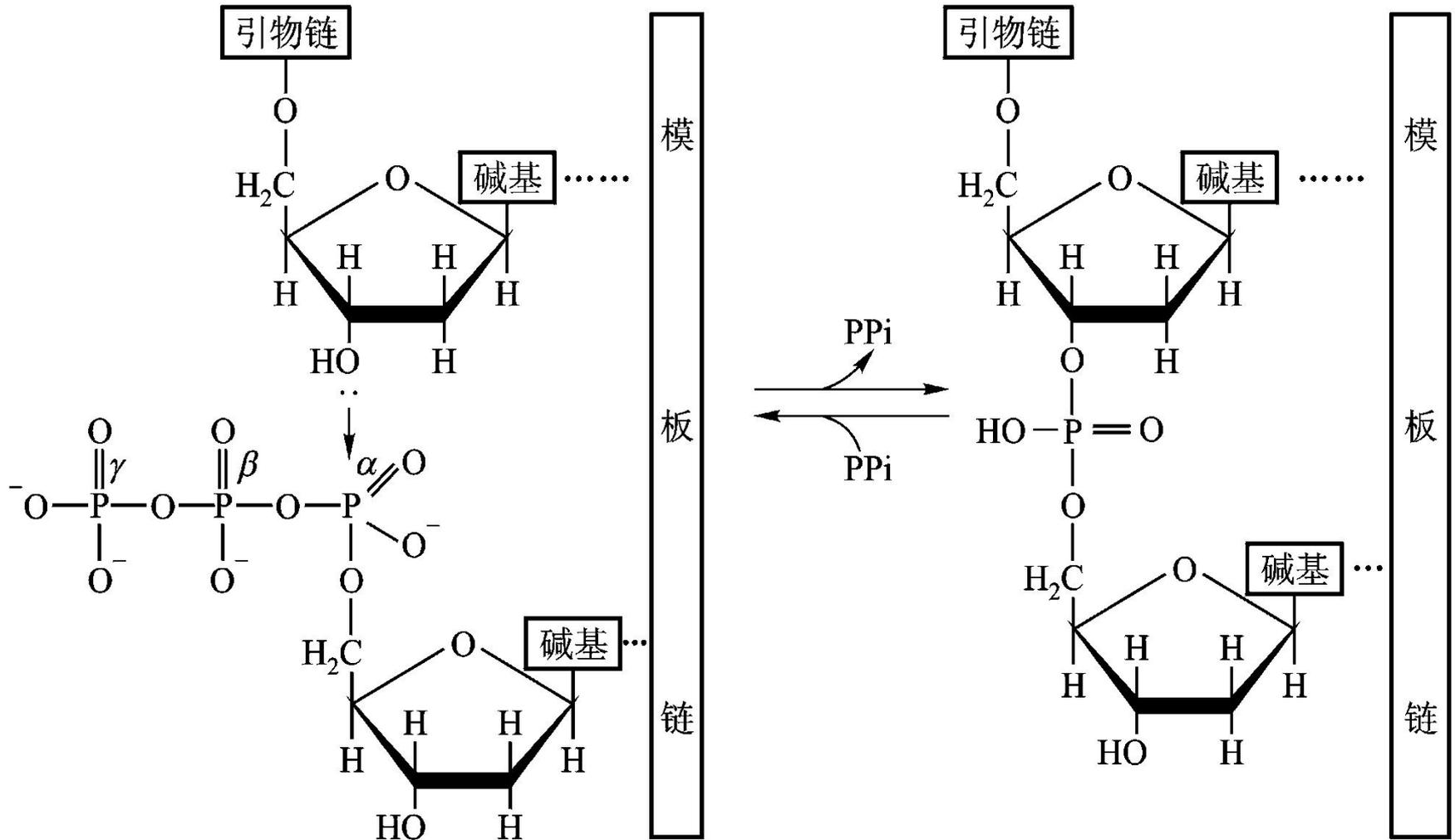


3) DNA的聚合必须要有引物参加

- 在实验中光有酶、底物以及**DNA**模板还不能发生聚合反应，必须要有引物参加。
- 或在**DNA**分子上有缺口才能反应。
- **DNA**聚合酶酶促反应是沿模板**3'—5'**方向。
- 新链合成的方向是**5'—3'**端。



按照模板碱基配对的原则5'—三磷酸末端
与引物3'端形成酯键。



- **2、E.Coli DNA聚合酶**

已发现并提取出的DNA聚合酶有5种分别为酶 I、II、III、IV和V。

- (1) DNA聚合酶 I (DNAPolymerase I)**

1956年A.Kornberg发现，并已得到纯化。

- **酶分子形态：**

Mt.109000，一条多肽链，大约有1000个AA残基，活性中心含有一个Zn原子，有一个巯基不是活性必须，有一链内二硫键。酶分子为椭球形，直径6.5nm是DNA直径的3倍。

- **基本作用方式:**

- ①底物必须有5'脱氧核苷三磷酸。

- ②向3'-OH末端添加单核苷酸，合成方向是5-3端，37° C, 1个酶分子聚合1000n/m。

- ③需要有3'-OH末端多核苷酸引物。

- **酶的核酸外切活性:**

- ①有3-5 外切酶活性

- ①有5-3外切酶活性

DNA聚合酶 I 是一个多功能的酶分子。它可以催化以下的反应：

- ①通过核苷酸聚合反应，使 **DNA链 5'—3'**方向延长（**DNA聚合酶活性**）；
- ②由**3'**端水解**DNA链**（**3'—5'**核酸外切酶活性）；
- ③由**5'**端水解**DNA链**（**5'—3'**核酸外切酶活性）；

最初认为酶的外切活性是由其它酶的污染引起，经过严格纯化，仍有这一活性，经进一步研究是酶分子固有的特性。

将DNA聚合酶用蛋白酶水解，得到两个片段。
大的一段68000，由聚合作用和3—5'外切作用；
小的片段35000只有5—3'外切作用。将两段混合，作用如初。说明是两个酶结合起来的。

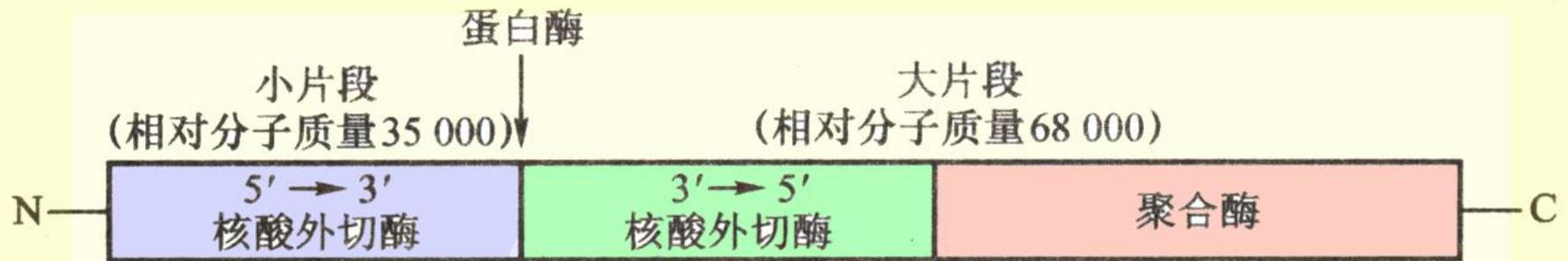


图 34 - 13 DNA 聚合酶 I 的酶切片段

● 2、DNA聚合酶 II、III

- 1969年Delucia和Cairns等人发现一变种大肠杆菌对紫外敏感，不含酶 I，推测DNA聚合酶 I 是属于修复酶。复制另有其酶。经过努力，提取出纯酶。
- 酶的分子形态：多亚基，Mt.120000，活性中心有一巯基。
- 作用方式：使DNA聚合，具有3'—5'外切，没有5'—3'外切活性。聚合速度2400np / m。

在一变种E.Coli中发现酶 II 活性极低，但仍能正常生长。说明酶 II 也不是复制酶。

(2) DNA聚合酶III

Kornberg. T和 Gefter. M在 1970年和 1971年先后分离出了另外一种聚合酶，称为 DNA聚合酶 III 。 DNA聚合酶III是由多个亚基组成的蛋白质，现在认为它是大肠杆菌细胞内真正负责从新合成DNA的复制酶（replicase）。

虽然每个大肠杆菌细胞只有10—20个DNA聚合酶III分子，然而它催化的合成速度达到了体内DNA合成的速度。DNA聚合酶III的许多性质都表明，它就是DNA的复制酶。

DNA聚合酶III结构

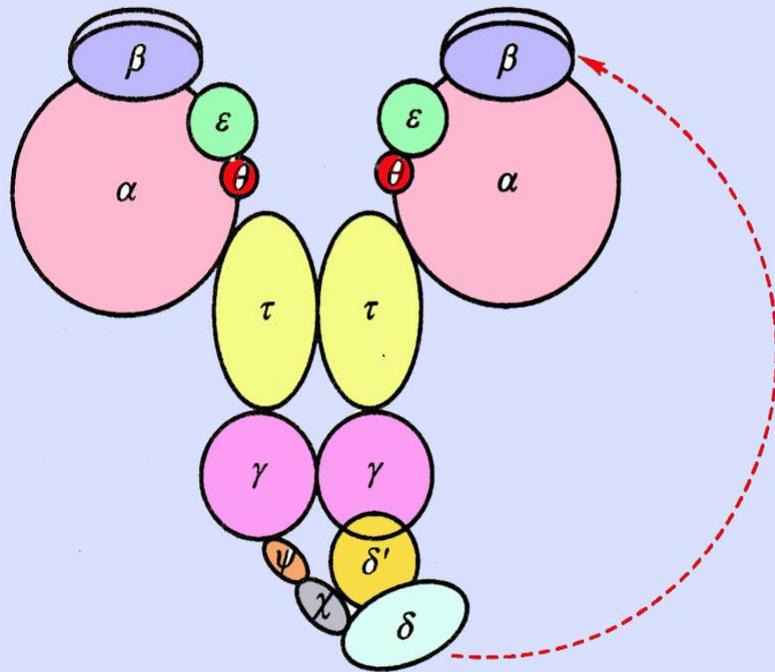


图 34 - 16 DNA 聚合酶III异二聚体的亚基结构示意图

在 γ 复合物帮助下, β 夹子夹住模板与引物双链并转移到核心酶上, 开始 DNA 复制

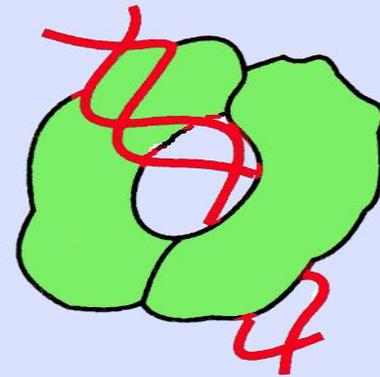


图 34 - 15 DNA 聚合酶 III
两个 β 亚基夹住 DNA

DNA聚合酶III为异二聚体, 它使 DNA解开的双链可以同时进行复制, β 亚基的功能犹如夹子、两个 β 亚基夹住DNA分子并可向前滑动, 使聚合酶在完成复制前不再脱离DNA,

- **3、DNA连接酶**

- DNA聚合酶只能催化多核苷链的延长反应，不能使键之间连接。环状DNA的复制表明，必定存在一种酶，**能催化链的两个末端之间形成共价连接。**
- 1967年不同实验室同时发现了 DNA连接酶（DNA Ligase）。这个酶催化双链DNA切口处的5'—磷酸基和3'—羟基之间生成**磷酸二酯键**。

DNA连接酶作用只是在双股DNA连中一条单链有缺口进行接合，不能将两条游离的DNA结合在一起。它在修复中起重要作用。

- 总结：
- 1) DNA Ligase修复DNA双链中单链缺口；
 - 2) 连接线状DNA为环状DNA（必须是粘性末端）；
 - 3) 在DNA复制时与聚合酶协同作用；
 - 4) 在DNA片段重组过程中进行连接。

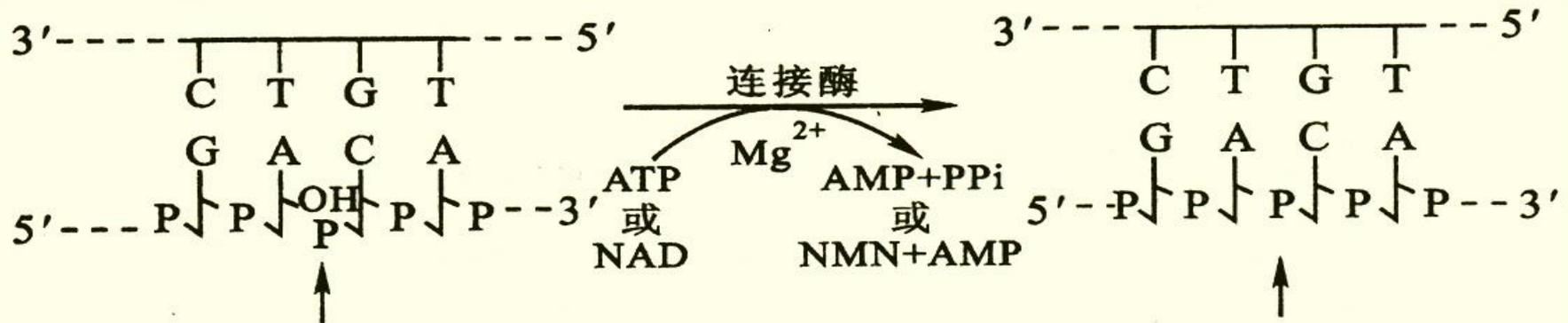


图 34 - 17 DNA 连接酶催化的反应

原核生物DNA聚合酶功能比较

DNA聚合酶 I：切除引物（**5'-3'**外切），填补切除引物后的缺口，直至仅剩切口（**5'-3'**聚合）；损伤修复；

DNA聚合酶 II：损伤修复（**5'-3'**聚合，也包括**3'-5'**外切）；

DNA聚合酶 III：复制（**5'-3'**聚合），校对（**3'-5'**外切）

DNA连接酶：连接DNA聚合酶 I 剩下的缺口（生成磷酸酯键）

(四) DNA的半不连续复制

问题的提出:

DNA的两条链都能作为模板，同时合成出两条新的互补链。根据双螺旋模型，DNA分子的两条链是反向平行的，**一条链的走向为5' ~ 3'，另一条链为3' ~ 5'。**而目前所有已知DNA聚合酶的合成方向都是**5' — 3'**。DNA在复制时两条链如何能够同时作为模板合成其互补链？

● 冈崎的发现：

1968年，日本学者冈崎等用 ^3H -脱氧胸苷标记噬菌体T4感染的E. Coli，然后通过碱性密度梯度离心法分离标记的DNA产物，发现短时间内首先合成的是较短的DNA片段，接着出现较大的分子，最初出现的DNA片段长度约为1000个核苷酸左右。用DNA连接酶变异的温度敏感株进行实验，在连接酶不起作用的温度下，便有大量DNA片段积累。

- 实验都说明在DNA复制过程中5'—3'方向的DNA合成实际上是首先合成较短DNA片段，然后连接起来成为大分子DNA。这些片段称为冈崎片段（Okazaki fragment）。
- 。因此，冈崎等提出了DNA的不连续复制模型，认为：DNA复制以一条链合成是以5—3方向进行的，另一条链至少是不连续的。DNA模板一条是3—5'，称为前导链，DNA合成是连续的，与复制叉方向相同；与复制叉方向相反进行的称为后随链，合成方向也是5—3'，先合成小片段然后再连接酶的作用下连成完整DNA大分子。

半不连续复制

DNA复制时，一条链是连续的，另一条链是不连续的，因此称为半不连续复制 (semidiscontinuous replicaton.)

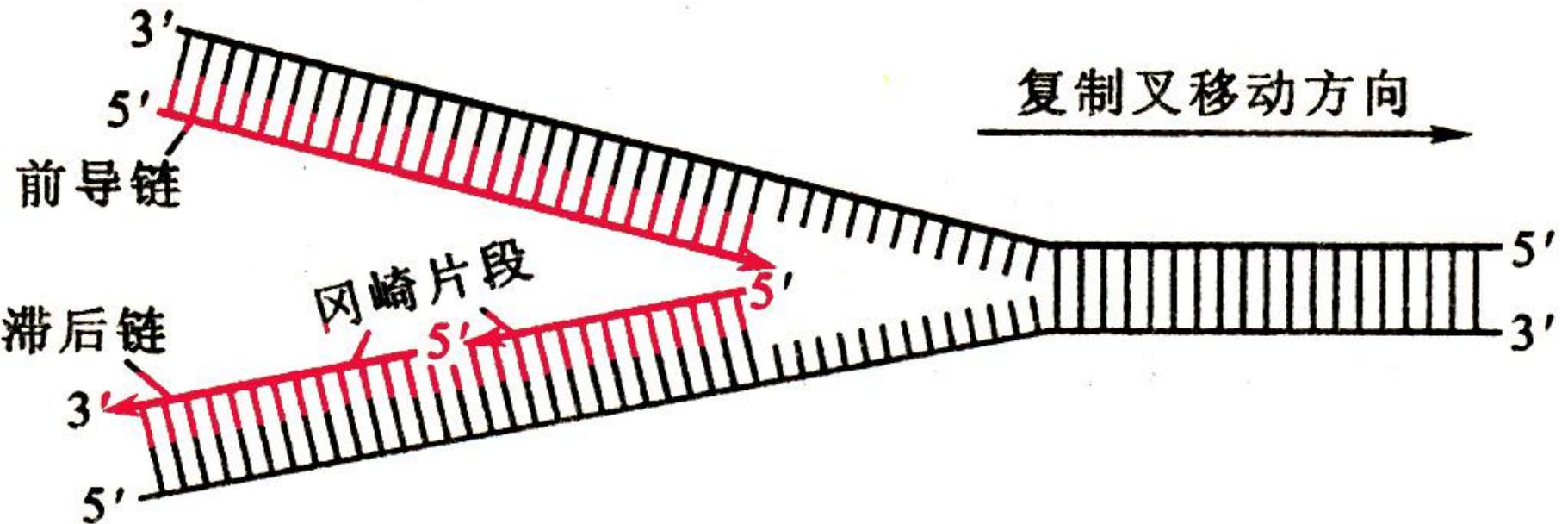


图 34 - 18 DNA 的一条链以不连续方式合成

(六) DNA复制的过程

- DNA的复制过程可分为三个阶段：起始、延伸和终止。
- 1、复制的起始
- 大肠杆菌的复制起点称为 *ori C*，由 245 个bp构成，其序列和控制元件在细菌复制起点中十分保守。关键序列在于两组短的重复：三个13 bp的序列和四个9 bp序列。

复制起始复合物

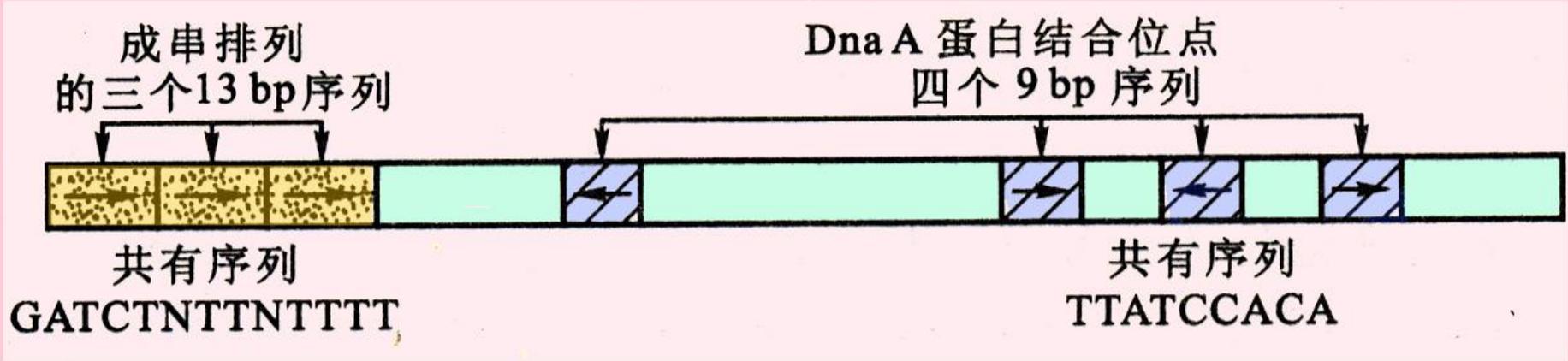


图 34 - 20 大肠杆菌复制起点成串排列的重复序列

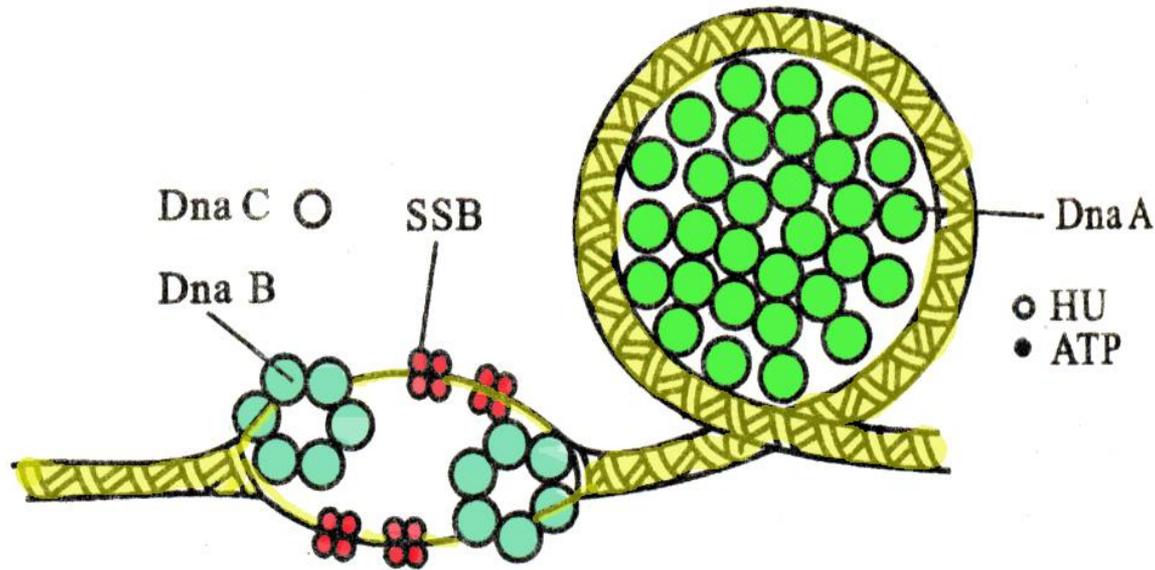


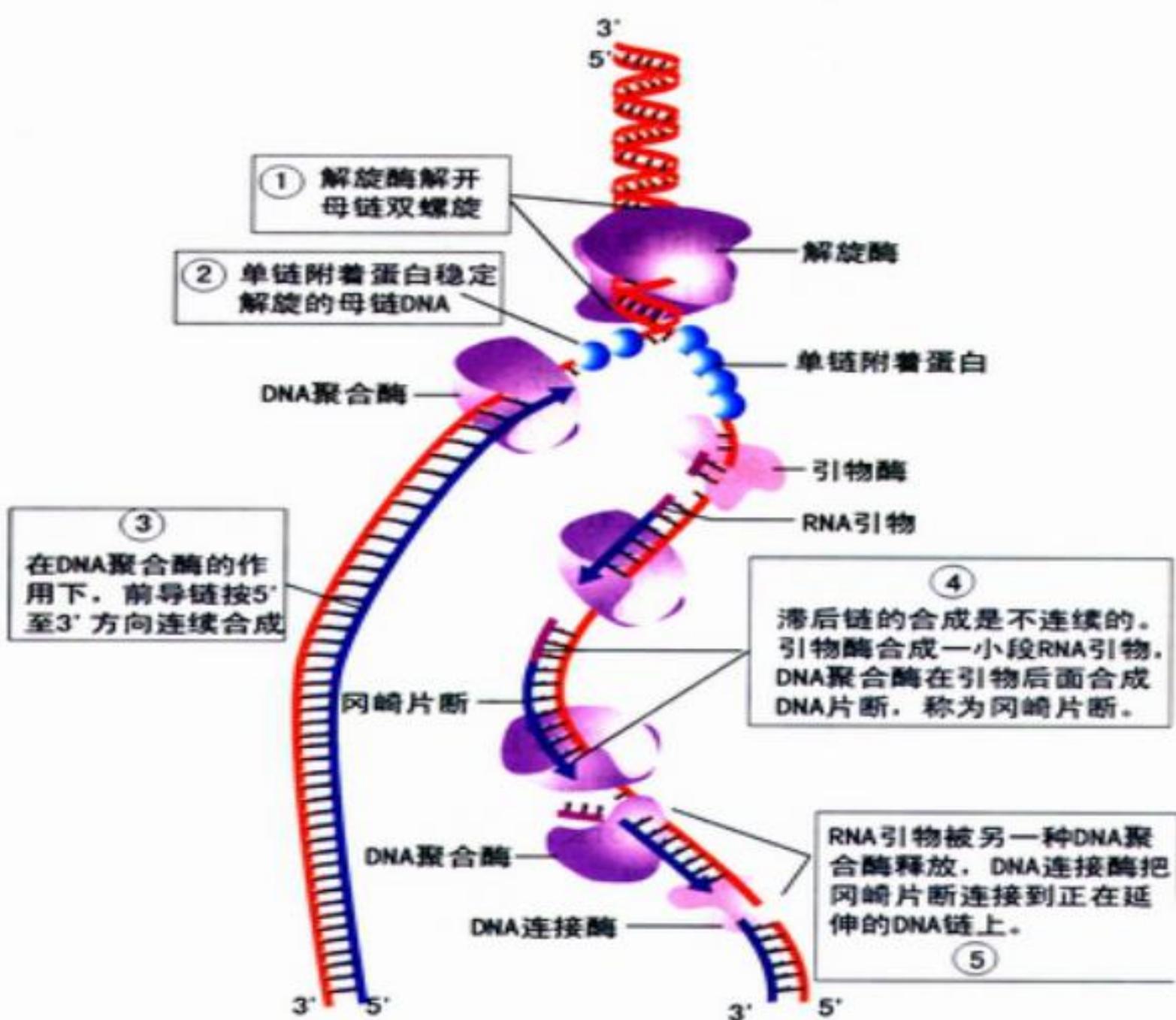
图 34 - 21 大肠杆菌复制起点在起始阶段的结构模型

•DNA复制的调节发生在起始阶段，一旦开始复制，如无意外受阻，就能一直进行到完成。

复制起始物形成后，将DNA双链分开，分开之处形成复制叉结构。

- **2、复制的延伸：**

复制起点解开后形成两个复制叉，即可进行双向复制。前导链开始合成后通常都一直继续下去。先由引物合成酶在起点处合成一段 **RNA** 引物。随后**DNA**聚合酶见即在引物上加入脱氧核糖核苷酸。前导链的合成与复制叉的移动保持同步。



① 解旋酶解开母链双螺旋

② 单链附着蛋白稳定解旋的母链DNA

③ 在DNA聚合酶的作用下，前导链按5'至3'方向连续合成

④ 滞后链的合成是不连续的。引物酶合成一小段RNA引物，DNA聚合酶在引物后面合成DNA片段，称为冈崎片段。

RNA引物被另一种DNA聚合酶释放，DNA连接酶把冈崎片段连接到正在延伸的DNA链上。

⑤

解旋酶

单链附着蛋白

DNA聚合酶

引物酶

RNA引物

冈崎片段

DNA聚合酶

DNA连接酶

3' 5'

3' 5'

- 滞后链的合成是分段进行的，需要不断合成冈崎片段的**RNA**引物，然后由**DNA**聚合酶III加入脱氧核糖核苷酸。滞后链合成的复杂性在于如何保持它与前导链合成的协调一致。由于**DNA**的两条互补链方向相反。合成冈崎片段需要**DNA**聚合酶III不断与模板脱开，然后在新的位置又与模板结合。

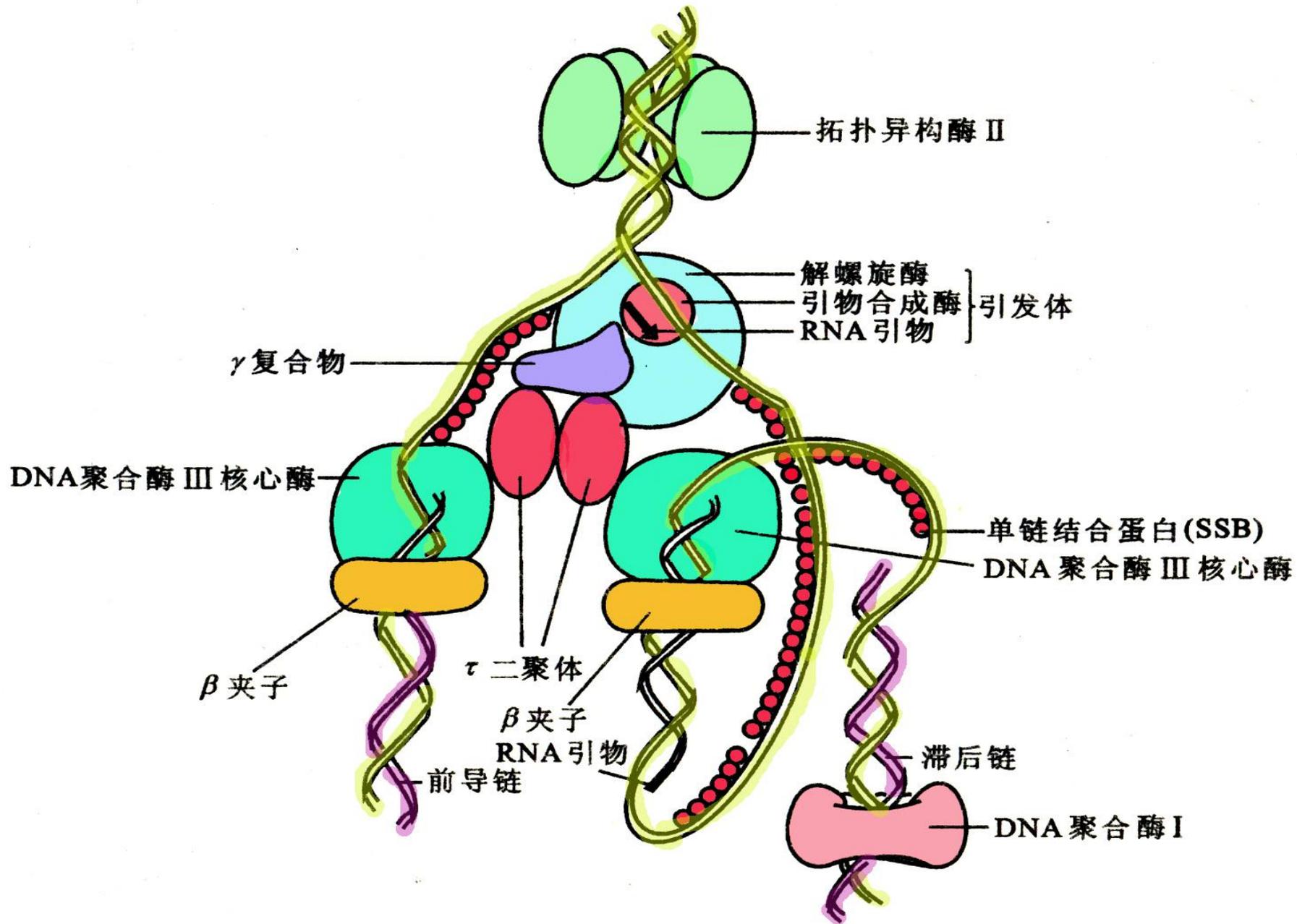
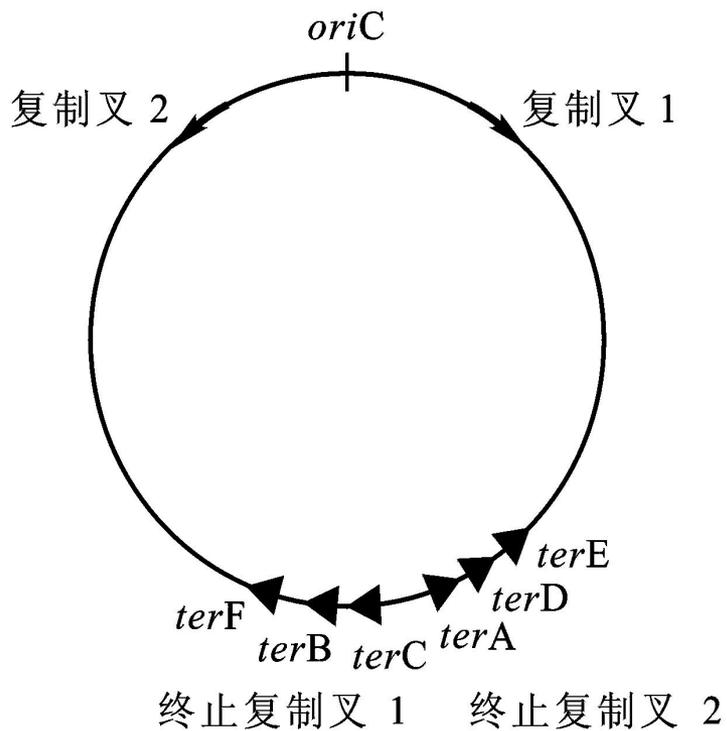


图 34 - 22 大肠杆菌复制体结构示意图

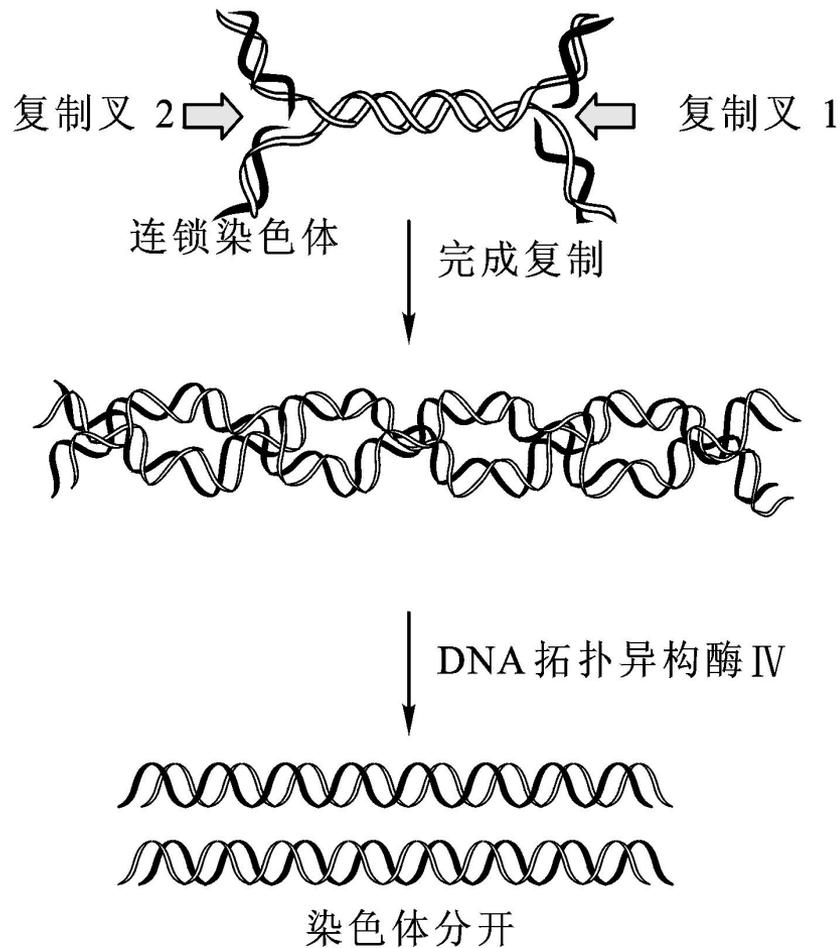
- **3、复制的终止**

- 两个复制叉向前推移，最后在终止区相遇并停止复制，该区含有多个约**22 bp**的终止子位点。。两个复制叉在终止区相遇而停止复制，复制体解体，其间大约仍有**50—100bp**未被复制。其后两条亲代链解开，通过修复方式填补空缺。此时两环状染色体互相缠绕，成为连锁体 。此连锁体在细胞分裂前必须解开，否则将导致细胞分裂失败，细胞可能因此死亡。大肠杆菌分开连锁环需要拓扑异构酶IV参与作用。

DNA复制终止



A



B

复制过程的总结

- 1、复制起始点的识别：复制有特点起始点，富含**AT**已被引发蛋白结合和解链。
- 2、**DNA**的解旋与解链：经拓扑异构酶及解旋酶作用解旋、解链，**SSB**结合，形成复制叉结构。
- 3、**RNA**引物形成：在**DNA**指导**RNA**聚合酶作用下合成一小段**RNA**引物。
- 4、**DNA**在引物上的延长：由**5-3'**方向连续合成先导链，与复制叉相反的是后随链，首先在引物上合成冈崎片段，然后由**DNA**聚合酶**1**切去引物，氨碱基配对原则补齐引物空缺。
- 5、**DNA**片段的连接：在连接酶作用下形成完整**DNA**。
- 6、复制终止：识别终止区，复制体解体，复制两链在拓扑异构酶作用下分开。完成复制。

二、DNA的损伤修复

(一) 直接修复

(二) 切除修复

(三) 重组修复

DNA是一个巨大的分子，在复制过程中可能产生碱基错配、**DNA**重组、病毒基因整合等生物因素的破坏，另外某些物理和化学因素如紫外、电离辐射、化学诱变剂等造成**DNA**结构或功能的丧失。导致生物发生突变或死亡。然而以细菌为例，**DNA**能受千次万次甚至几十万次的复制，而很少或不出现错误，这与细胞内**DNA**损伤修复机制有关。这是机体自我保护的功能，是生物进化的结果。目前已知的**DNA**修复有如下几种：

(一) 直接修复

- 紫外线照射可以使DNA分子中同一条链两相邻胸腺嘧啶碱基之间形成二聚体（TT）。这种二聚体是由两个胸腺嘧啶碱基以共价键联结成环丁烷的结构而形成的。影响了DNA的双螺旋结构，使其复制和转录功能均受到阻碍。光复活作用是一种高度专一的直接修复方式。它只作用于紫外线引起的DNA TT二聚体。**光复活酶**在生物界分布很广，从低等单细胞生物一直到鸟类都有，这种修复方式在植物中特别重要。而高等的哺乳类却没有。有其他修复机制所代替。

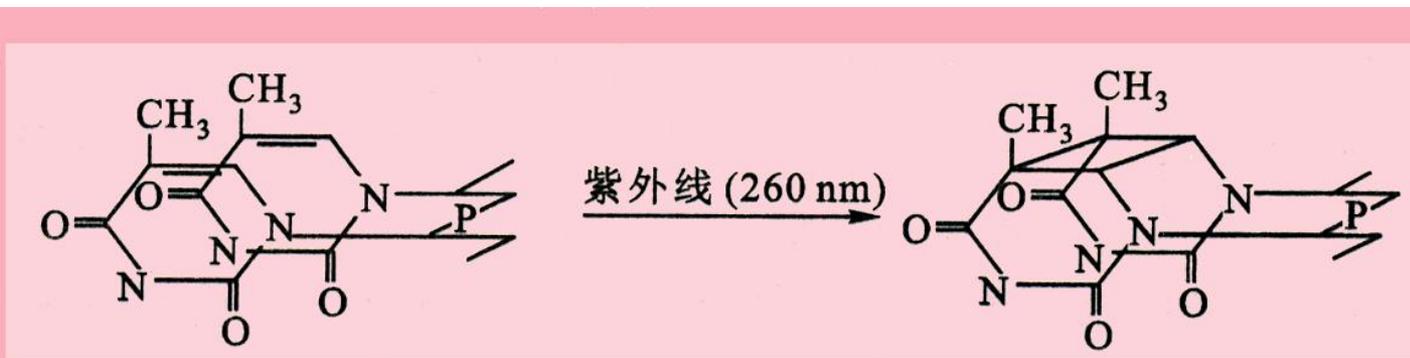
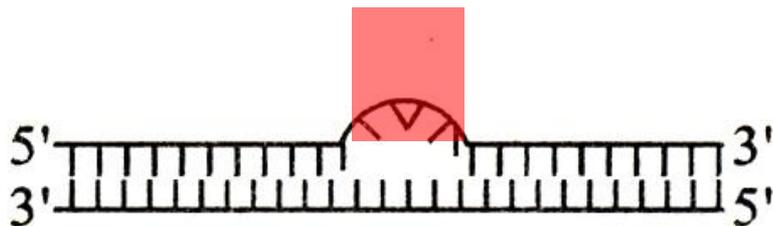
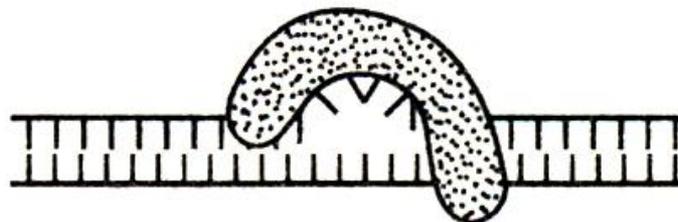


图 34 - 27 胸腺嘧啶二聚体的形成

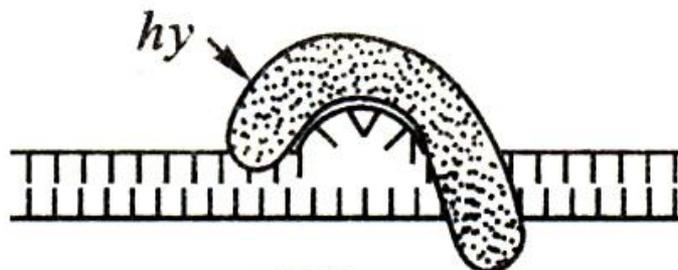
A. 形成嘧啶二聚体



B. 光复活酶结合于
损伤部位



C. 酶被可见光所激活



D. 修复后释放酶

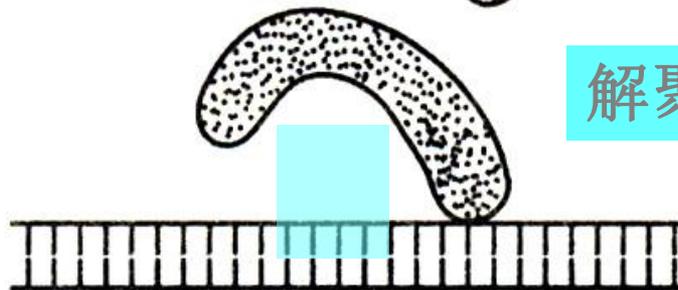


图 34 - 28 紫外线损伤的光复活过程

(二) 切除修复

- 切除修复，即是在一系列酶的作用下，将DNA分子中受损伤部分切除掉，并以完整的那一条链为模板，合成出切去的部分，然后使DNA恢复正常结构的过程。这是比较普遍的一种修复机制，它对多种损伤均能起修复作用。切除修复包括两个过程：一是由细胞内特异的酶找到DNA的损伤部位，切除含有损伤结构的核酸链；二是修复合成并连接。

- 切除酶可以识别许多种**DNA**损伤，包括紫外线引起的嘧啶二聚体和其他光反应产物，碱基的加合物，如 **DNA**暴露于烟雾中形成的苯并芘鸟嘌呤等。真核生物具有功能上类似的切除酶，但在亚基结构上相差较远。

- 由此可见，切除修复作用是一种普遍的功能，它并不局限于某种特殊原因造成的损伤，而能一般地识别**DNA**双螺旋结构的改变，对遭到破坏而呈现不正常结构的部分加以去除。细胞的这种功能，对于保护遗传物质**DNA**，使它不轻易被破坏，是有很大大意义的。失去这种修复功能的细菌突变株，即表现出容易被电离辐射和紫外线所杀死，同样，也提高了化学诱变剂的致死效应。

切除修复机理

有四步：

- 1、识别、特异性内切酶切开；
- 2、以另一链为模板合成
- 3、切去损伤链；
- 4、连接酶连接缺口。

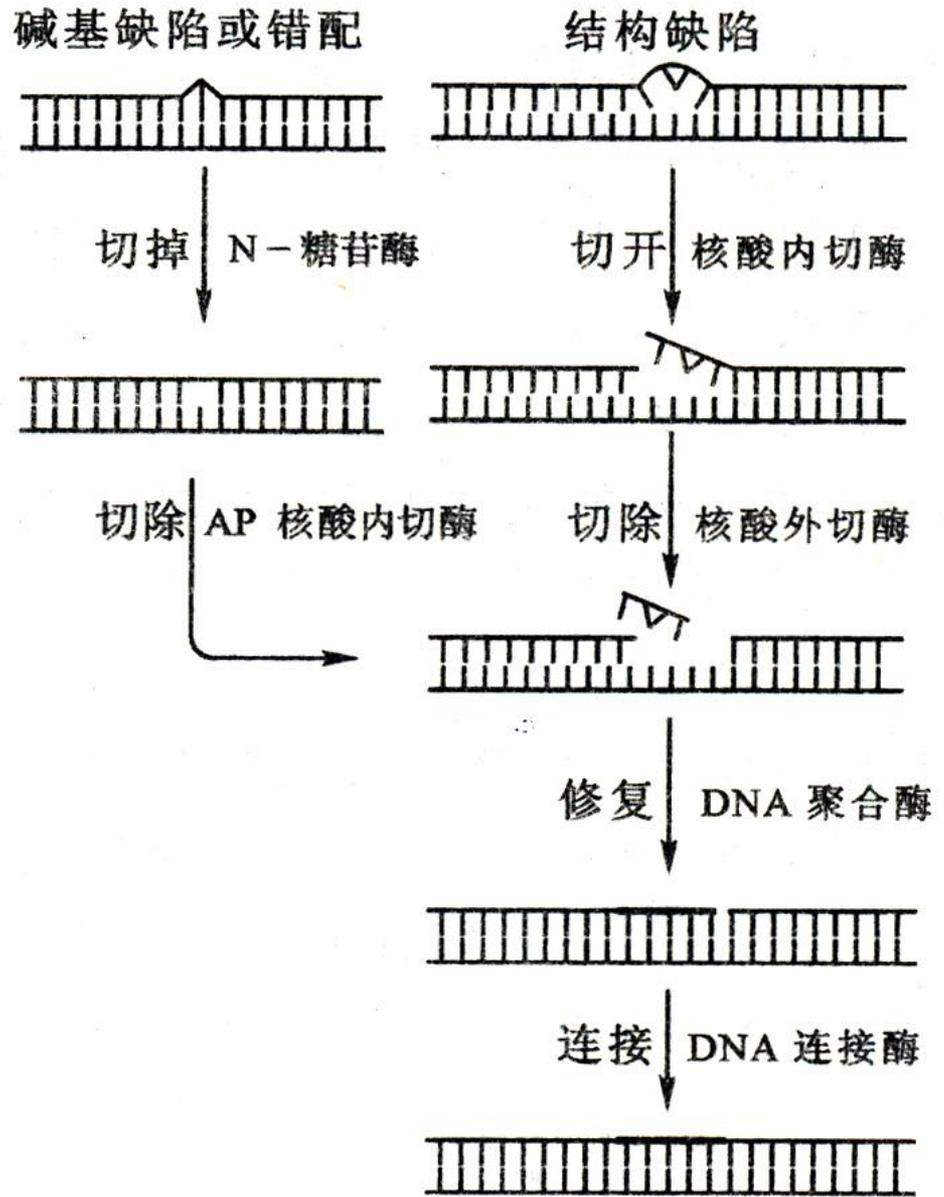


图 34 - 29 DNA 损伤的切除修复过程

(三) 重组修复

- 损伤的DNA仍然可以进行复制，但是复制酶系在损伤部位无法通过碱基配对合成子代DNA链，它就跳过损伤部位，在下一个冈崎片段的起始位置或前导链的相应位置上重新合成引物和DNA链，结果子代链在损伤相对应处留下缺口。这种遗传信息有缺损的子代DNA分子可通过遗传重组而加以弥补，即从同源DNA的母链上将相应核苷酸序列片段移至于子链缺口处，然后用再合成的序列来补上母链的空缺。此过程称为重组修复。

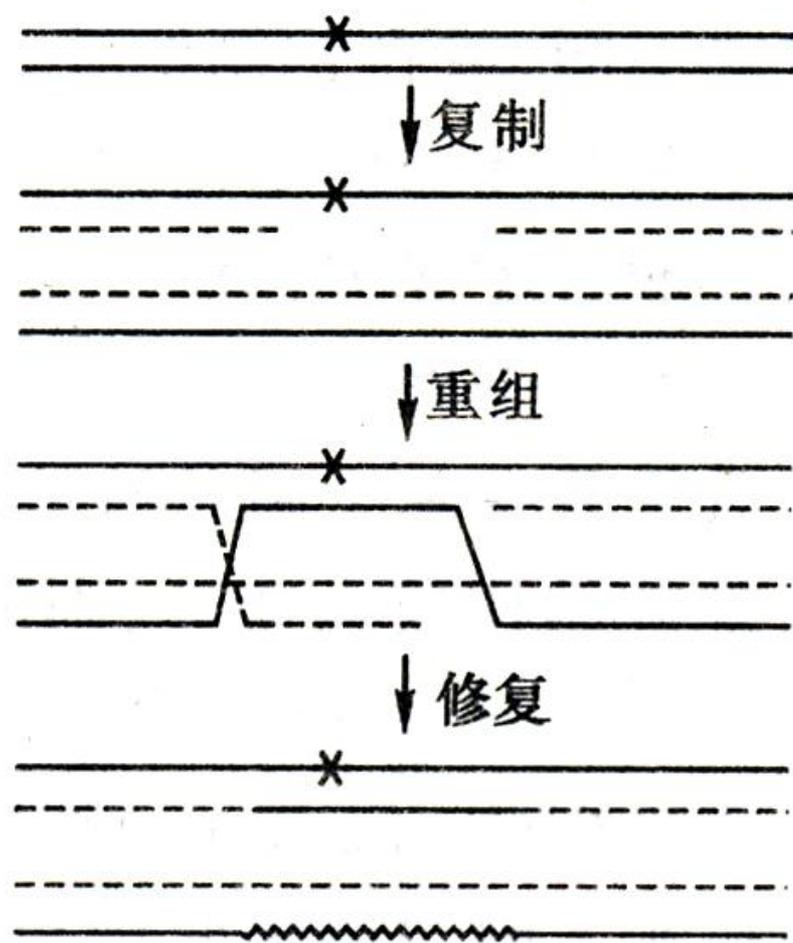
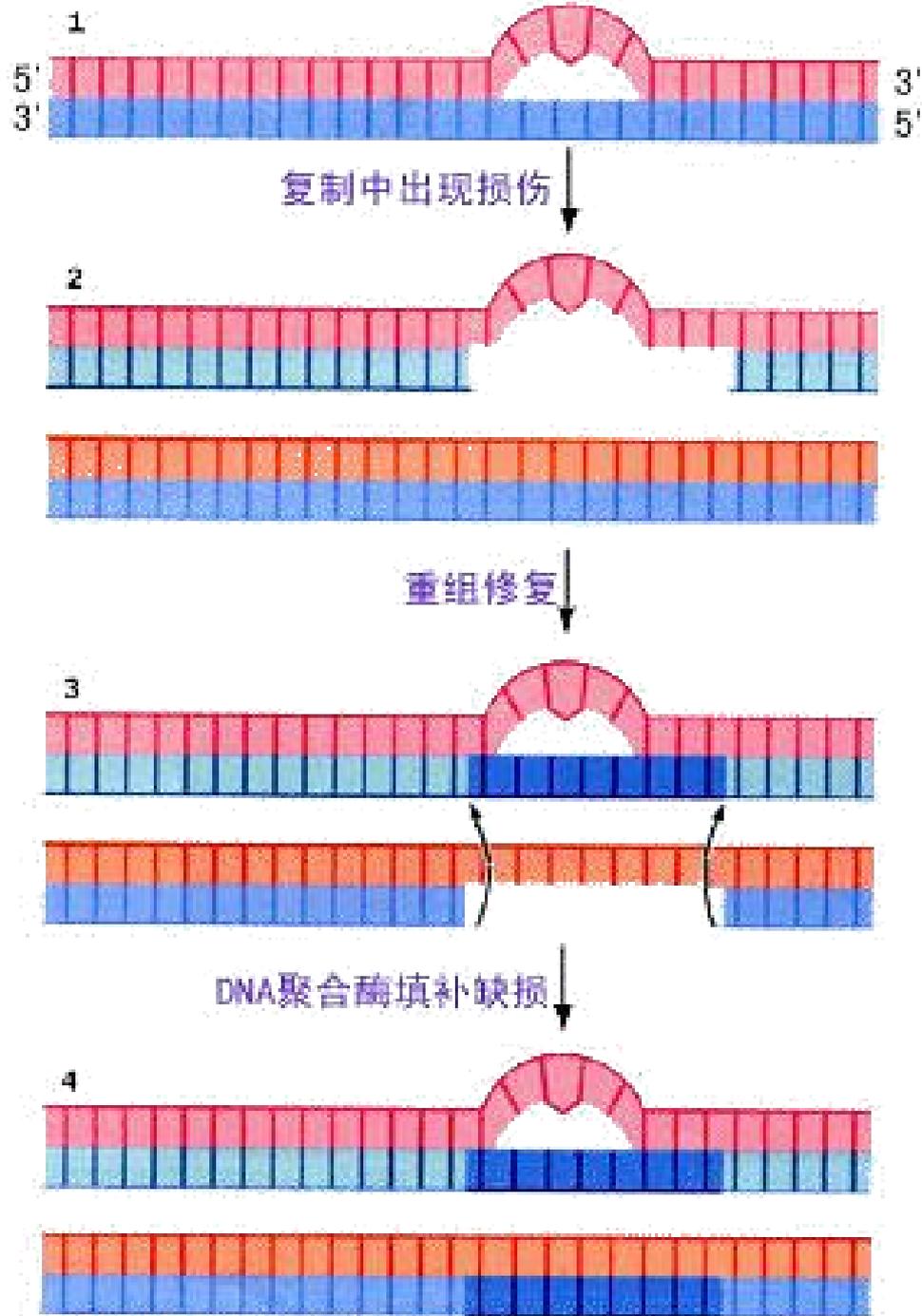


图 34 - 30 重组修复的过程
 × 表示 DNA 链受损伤的部位 虚线表示通过复制新合成的 DNA 链 锯齿线



三、DNA的突变

- (一) 突变的类型
- (二) 诱变剂的作用
- (三) 诱变剂和致癌剂的检测

（一）突变的类型

- 1、碱基的置换（**substitution**）又称为点突变。DNA上正常碱基被错误碱基取代。有两种类型
 - 1) 转换（**transition**）同种碱基之间的互换。
 - 2) 颠换（**transversion**）嘧啶和嘌呤之间的互换。
- 2、移码突变（**frameshift mutation**）由于插入或缺失碱基所造成的三联密码移框错误。

肽链



(1)

野生型



(2)

同义突变



(3)

错义突变



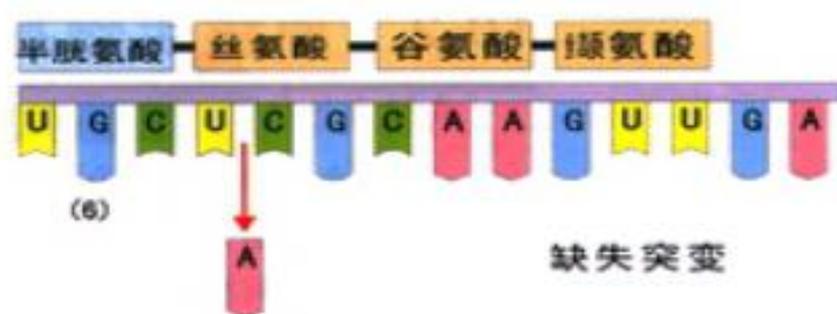
(4)

错义突变



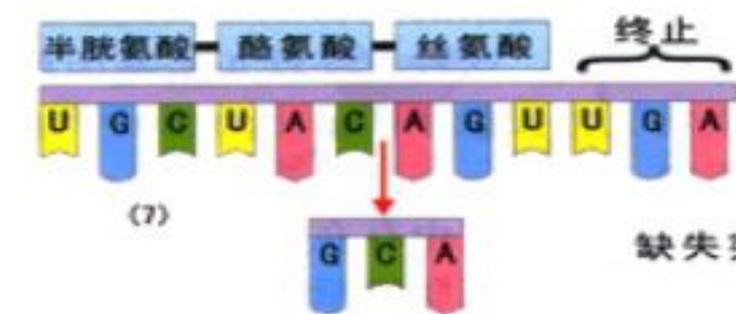
(5)

插入突变



(6)

缺失突变



(7)

缺失突变



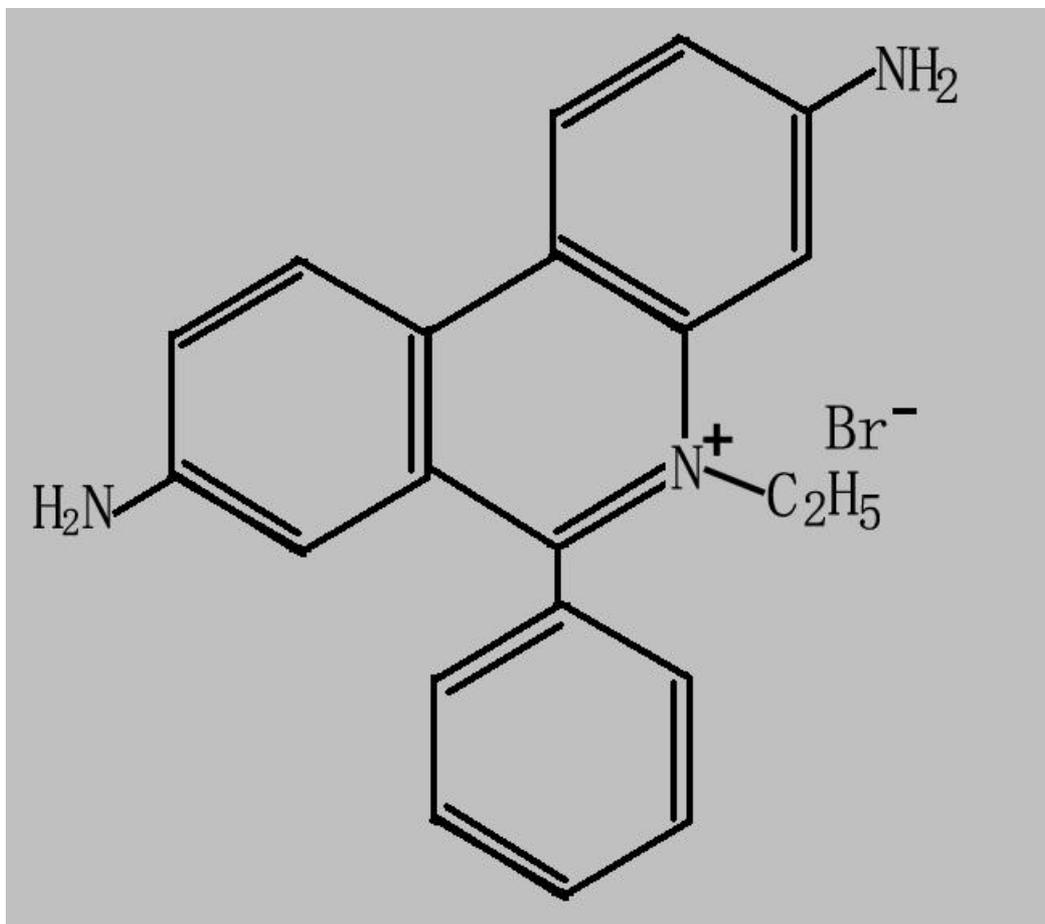
(8)

插入突变

(二) 诱变剂的作用及诱变剂

- 自发突变：在自然的条件下发生的突变
- 诱变作用：人工加入某些物理或化学诱变剂，使实验生物发生遗传突变的方法。
- 诱变剂：常见的诱变剂有以下几种
- 1) 碱基类似物：5-FU，5-BrU，可使AT转变为CG，AP（2-氨基嘌呤），可使AT转换为GC。
- 2) 碱基修饰物，通过羟胺化、烷化剂修饰改变碱基配对性质。
- 3) 嵌入染料。如吡啶类、溴化乙锭可以插入碱基之间引起移码突变。
- 4) 紫外线与电离辐射，形成二聚，或将DNA断裂等。

(三) 诱变剂和致癌剂的检测



提要