



第三章 DNA复制

(DNA Replication)

第一节 基本概念

第二节 复制概况

第三节 DNA复制的酶学

第四节 DNA复制的半不连续性

第五节 原核生物DNA复制 (E.coli)

第六节 真核生物DNA复制





3.1 基本概念

DNA复制

亲代双链DNA分子在DNA聚合酶的作用下，分别以各单链 DNA分子为模板，聚合与自身碱基可以互补配对的游离的dNTP，合成出两条与亲代DNA分子完全相同的子代DNA分子的过程。

复制子 (Replicon)； 又称复制单位 或复制元，DNA中含有一定复制起点和复制终点的复制单位

A unit of the genome in which DNA contain a region from origin to terminator





- 复制体 (Replisome)

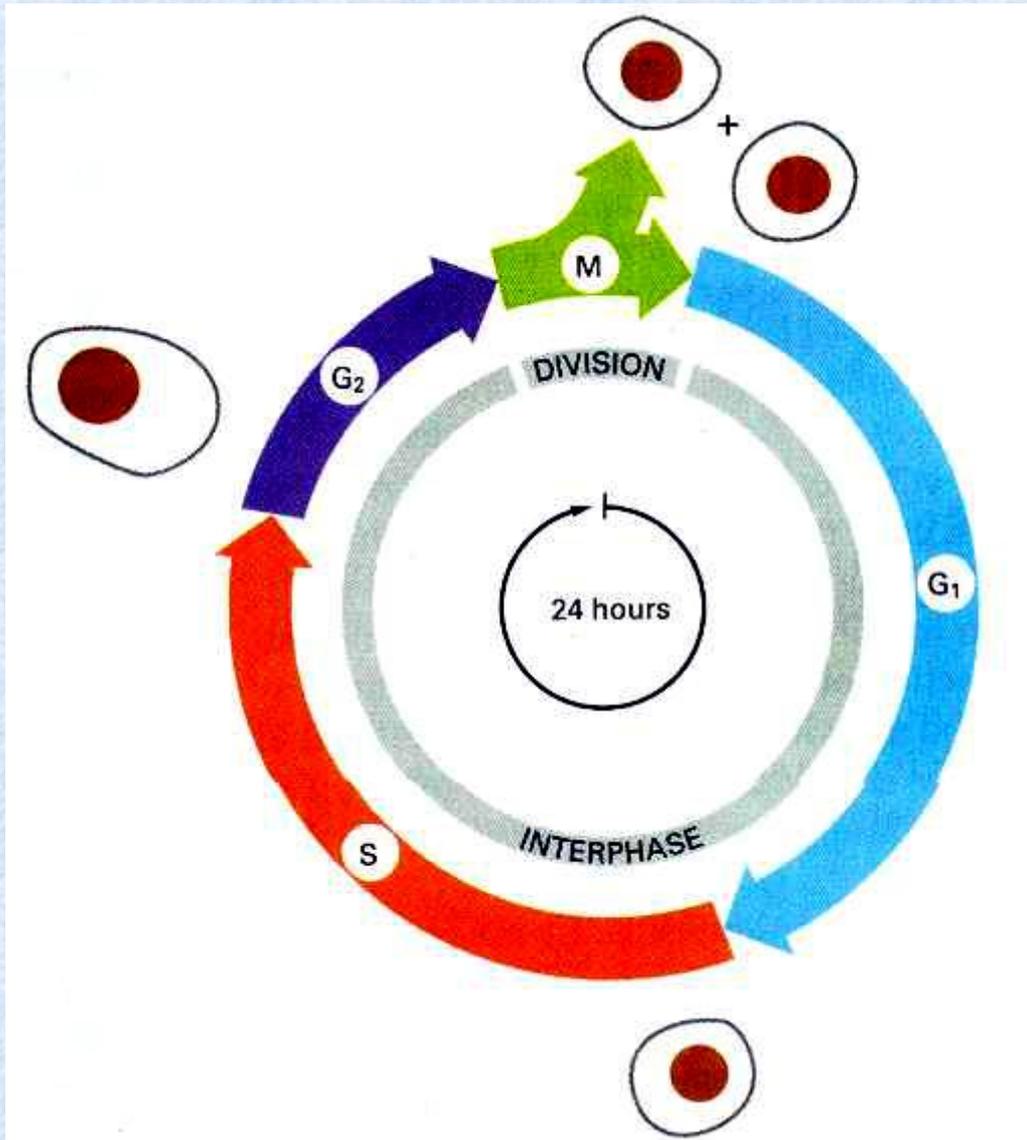
复制叉处的许多酶和蛋白组成的复合体，协同动作合成DNA

The multi protein (30±) structure that assembles at replicating fork to undertake synthesis of DNA





DNA 复制在细胞周期的S期



mammalian cell

500-5000 bp/min

E.coli 37 °C

0.5 h

10⁵ bp/min





3.2 复制概况

(Surveys of Replication)

一、DNA的半保留复制

(Semi-Conservation Replication)

概念：复制过程中各以双螺旋DNA的其中一条链为模板合成其互补链，新生的互补链与母链构成子代DNA分子

1958 Meselson-stahl 设计的CsCl超离心试验证实了

DNA复制的这一特性





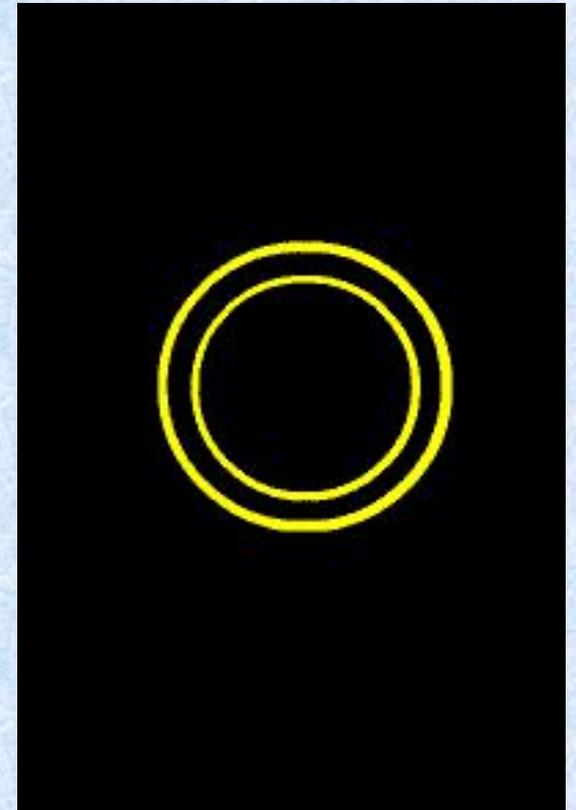
二、复制起点、方式和方向

1、复制起点（origin ori或o 复制原点）

复制开始处DNA分子的特定位置

原核生物（Prokaryote）：单复制起点

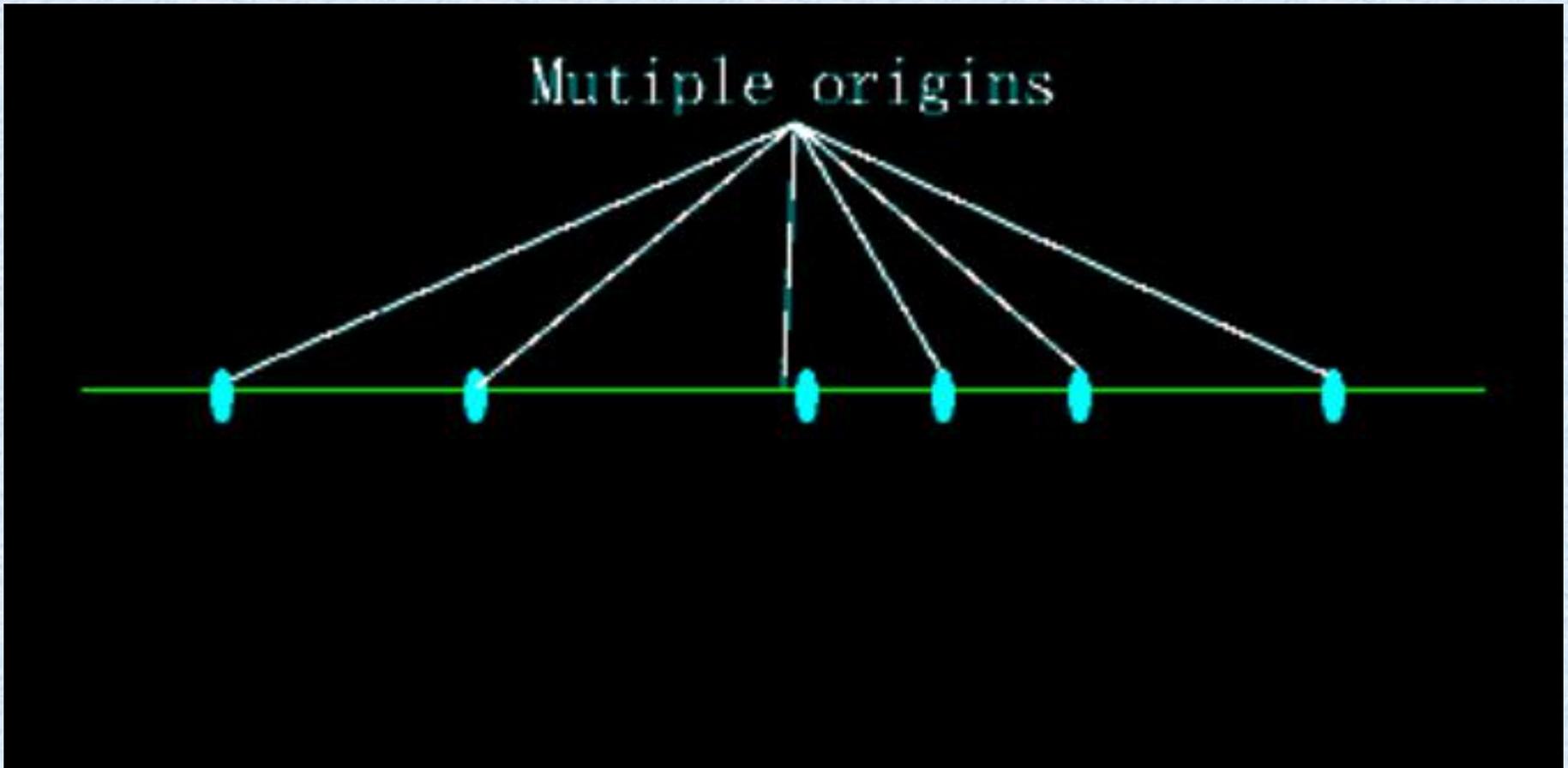
即——整个染色体只有一个复制单位

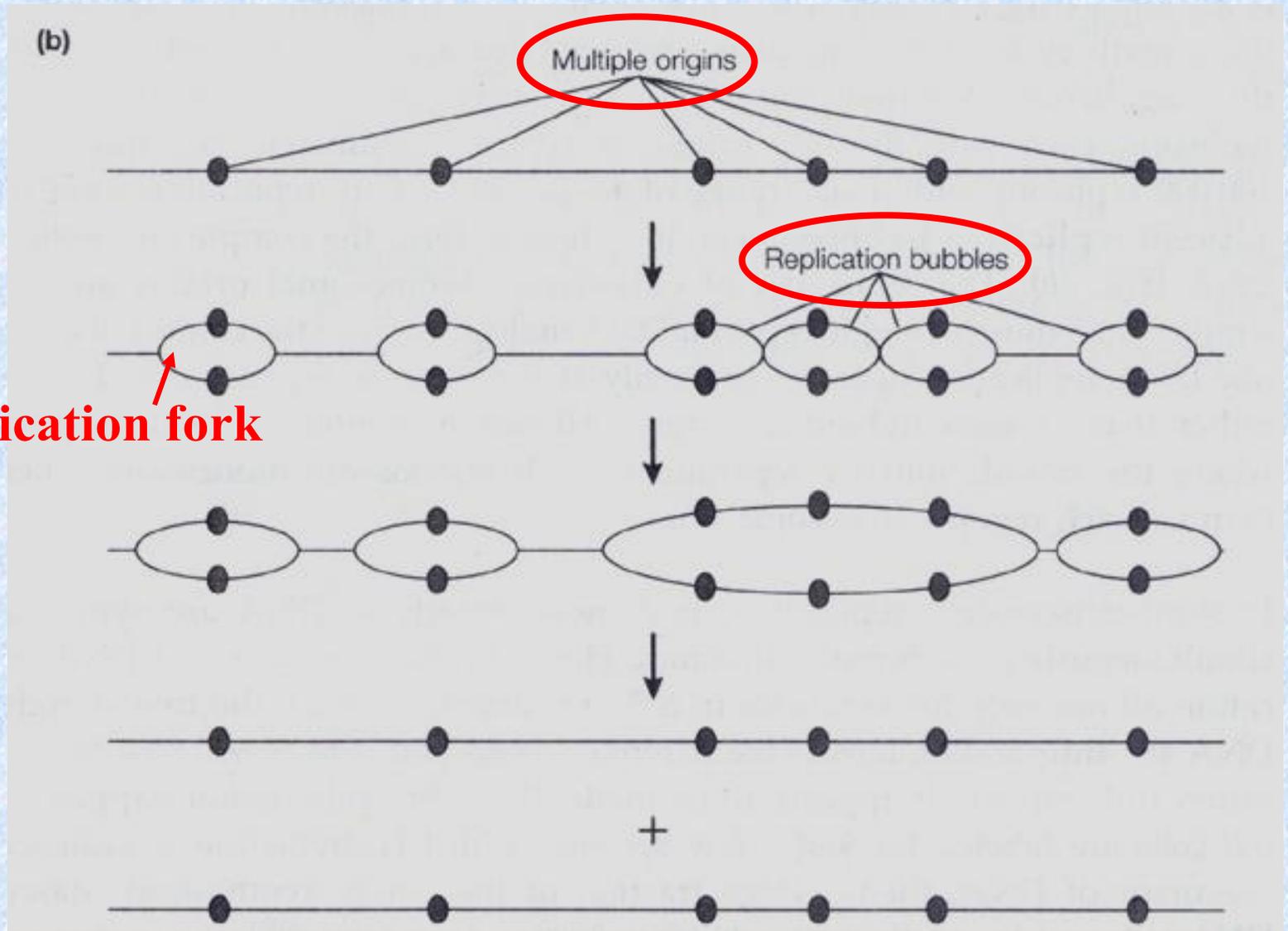




真核生物（Eukaryote）：多复制起点

即——一个genome中有多个复制单位





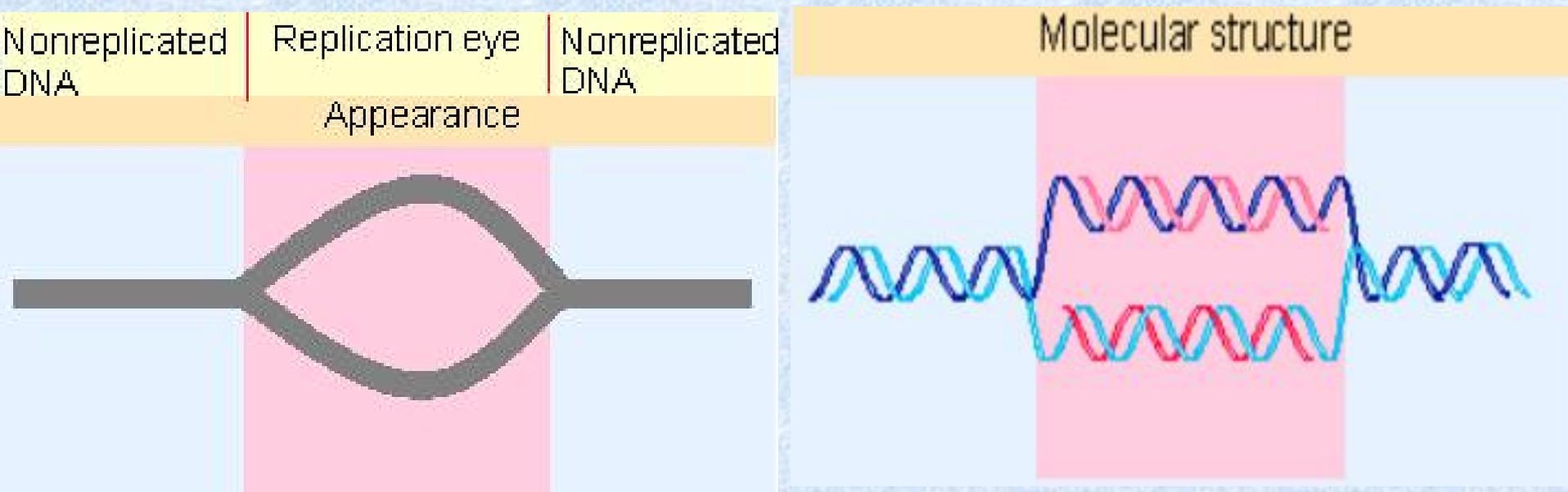
Replication fork



2、复制方向（复制过程的顺序性）

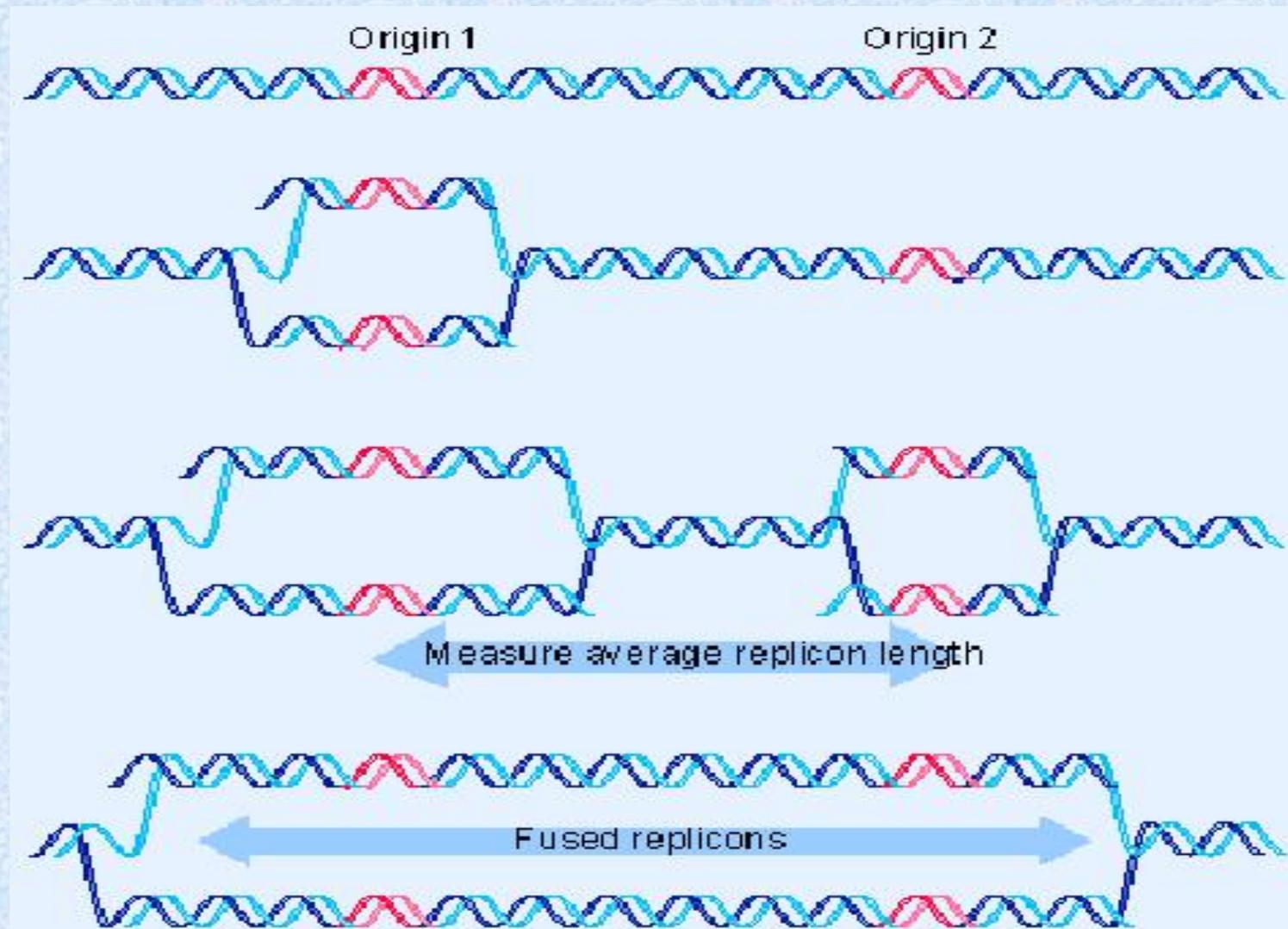
复制叉（Replication fork）：染色体中参与复制的活性区域，即复制正在发生的位点

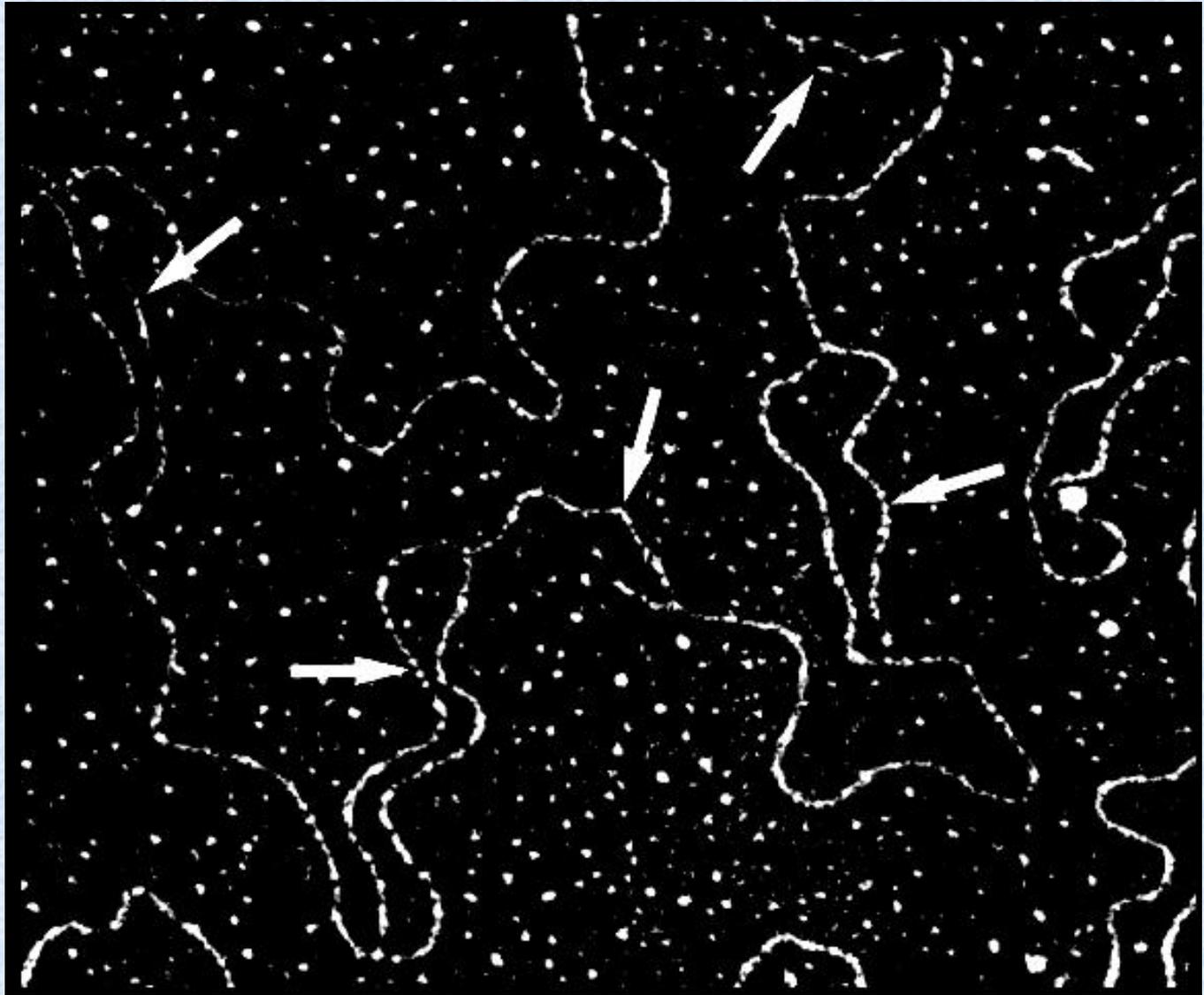
复制眼（replication eye）：电子显微镜下观察正在复制的DNA，复制的区域形如一只眼睛





真核生物的多复制子 多个复制眼





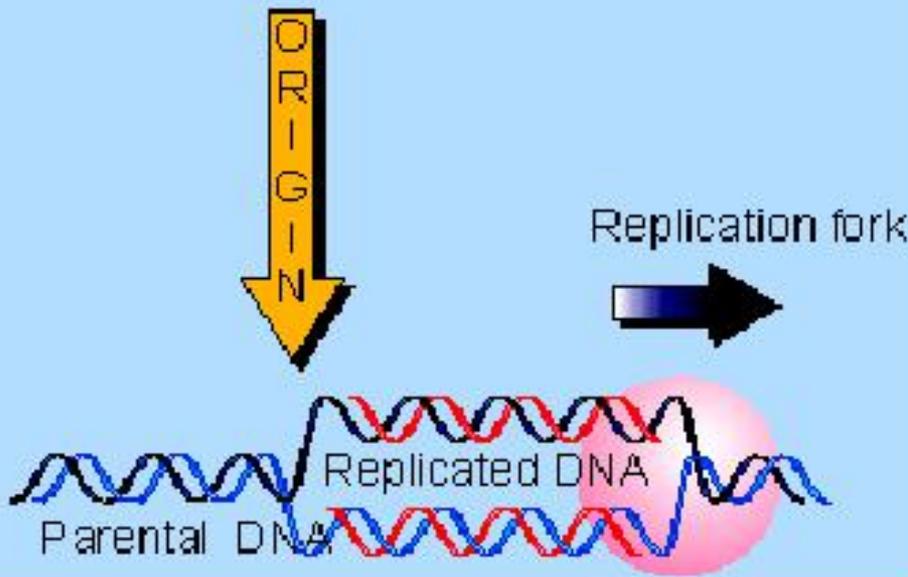


(1) 单双向复制取决于起点处有一个还是两个复制叉

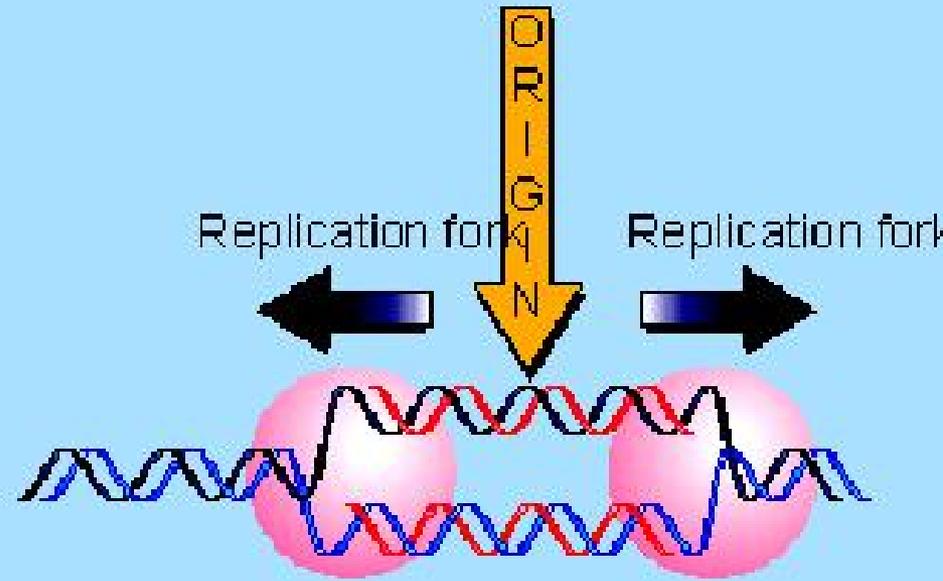
单向复制

双向复制

UNIDIRECTIONAL REPLICATION



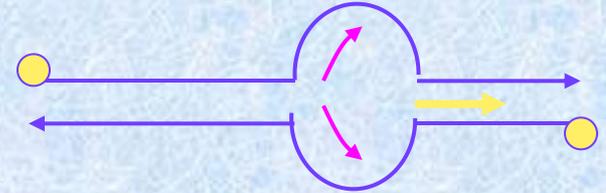
BIDIRECTIONAL REPLICATION



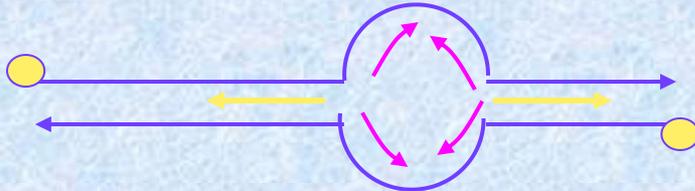
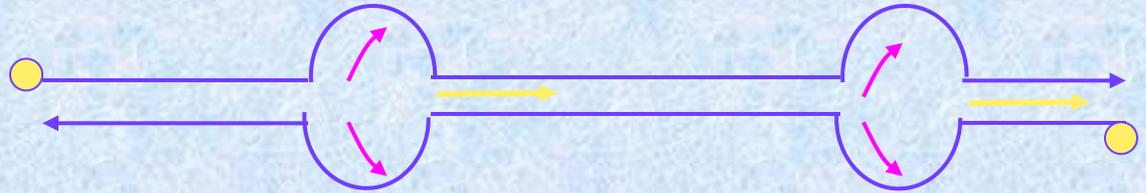


(2) 复制的多模式

单起点、单方向
(原核)



多起点、单方向
(真核)



单起点、双方向 (原核)



多起点、双方向 (真核)





3、复制方式

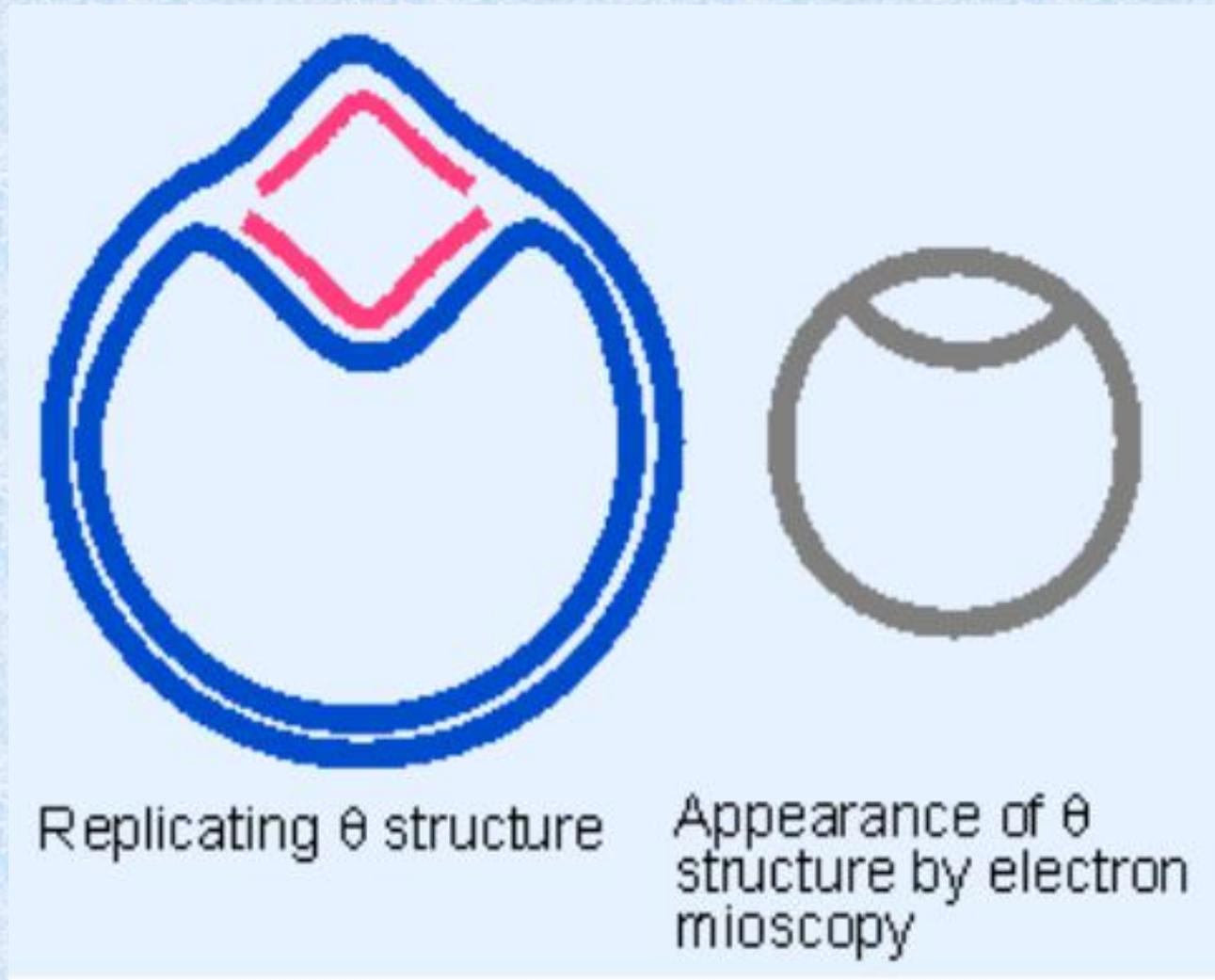
大多数以对称方式进行——即两条链同时复制
也有一定时期内DNA只复制一条链的情况

- (1) 从新起始或复制叉式
(**replication fork**)

比较形象的—— θ 复制

双链环状DNA的复制眼可以形成一种 θ 结构，形状像
希腊字母 θ ，因而叫....

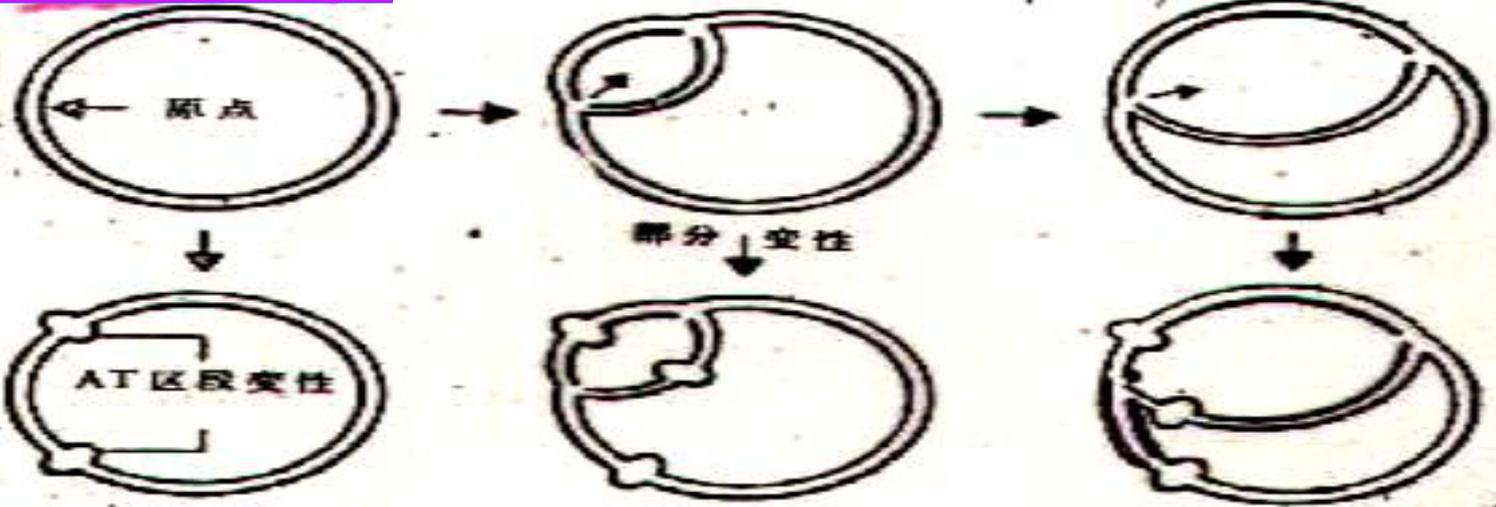




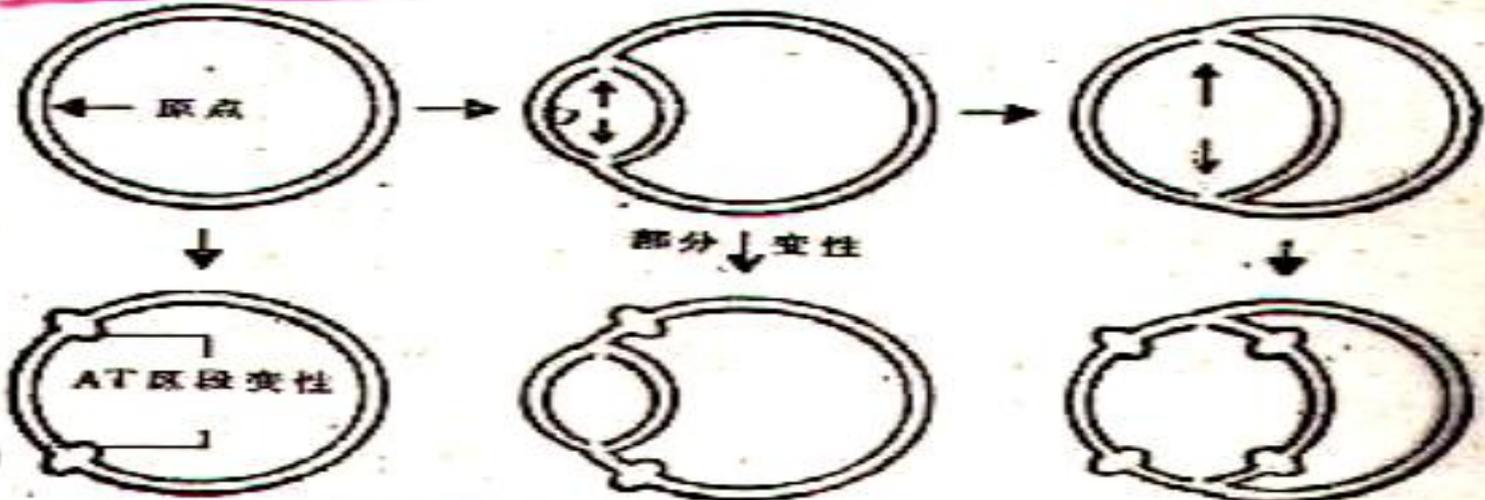


单、双向 θ 复制模式图

单向复制



双向复制

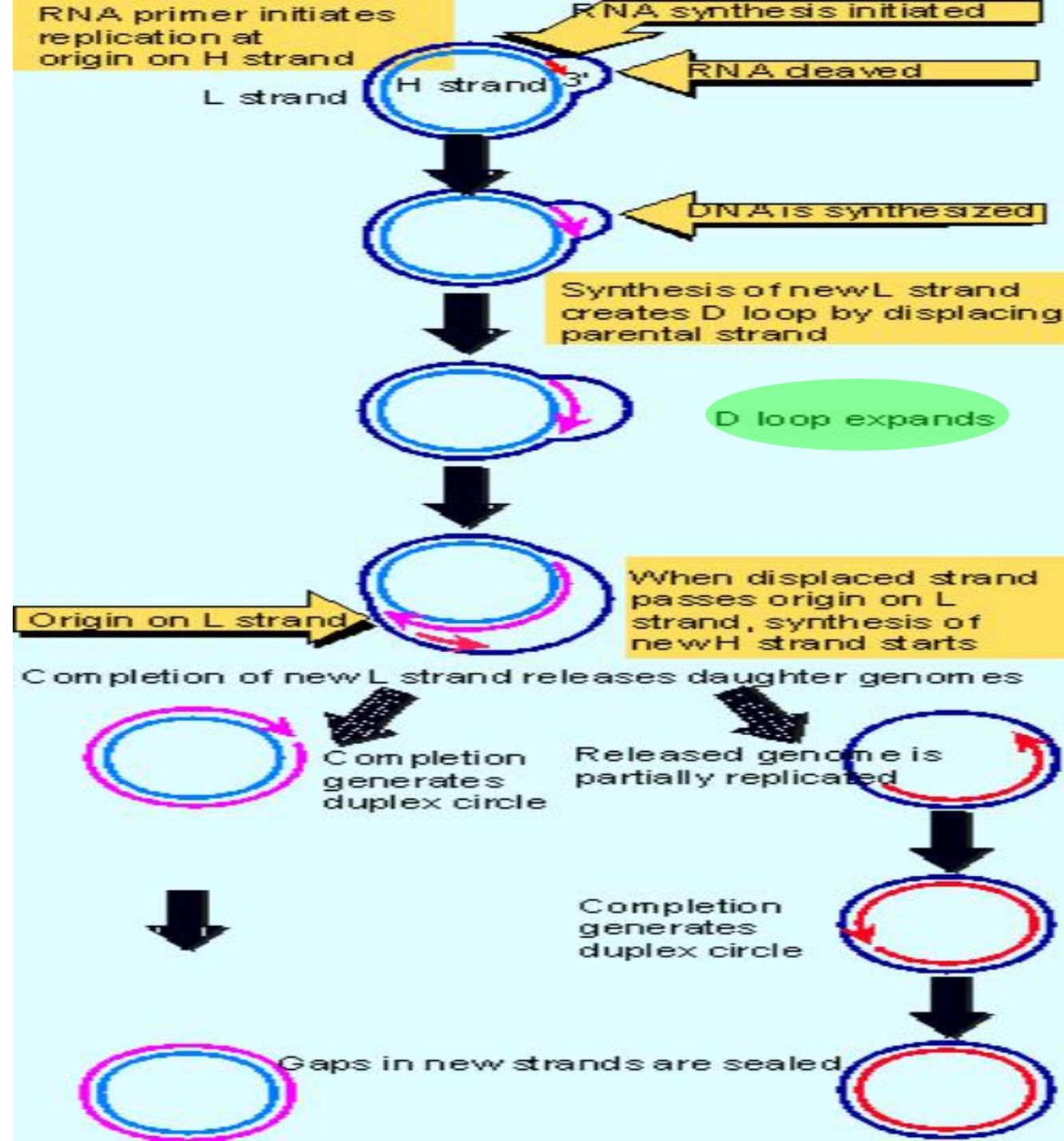


(2) 置换式

(*Displacement form*)

又称 *D* 环复制

线粒体和叶绿体
DNA的复制方式

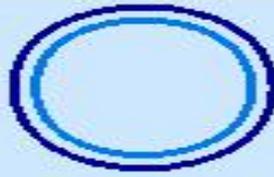


(3) 共价延伸方式 (covalence elongation) 或滚环式复制 (rolling circle replication)

由于复制时产生的滚环结构形状象 σ ，又称 σ 复制

病毒、细菌因子

Template is circular duplex DNA



Initiation occurs on one strand



Elongation of growing strand displaces old strand



After 1 revolution displaced strand reaches unit length



Continued elongation generates displaced strand of multiple unit lengths





3.3 DNA复制的酶学

(Enzymology of DNA Replication)

一、DNA聚合反应和聚合酶

1957 Arthur Kornberg 首次发现 DNAPol I

DNAPol II

DNAPol III (E. coli)

聚合反应:

底物——dNTP





二、三种DNA聚合酶的结构和功能 (P112)

表 3-1 大肠杆菌 DNA 聚合酶特性

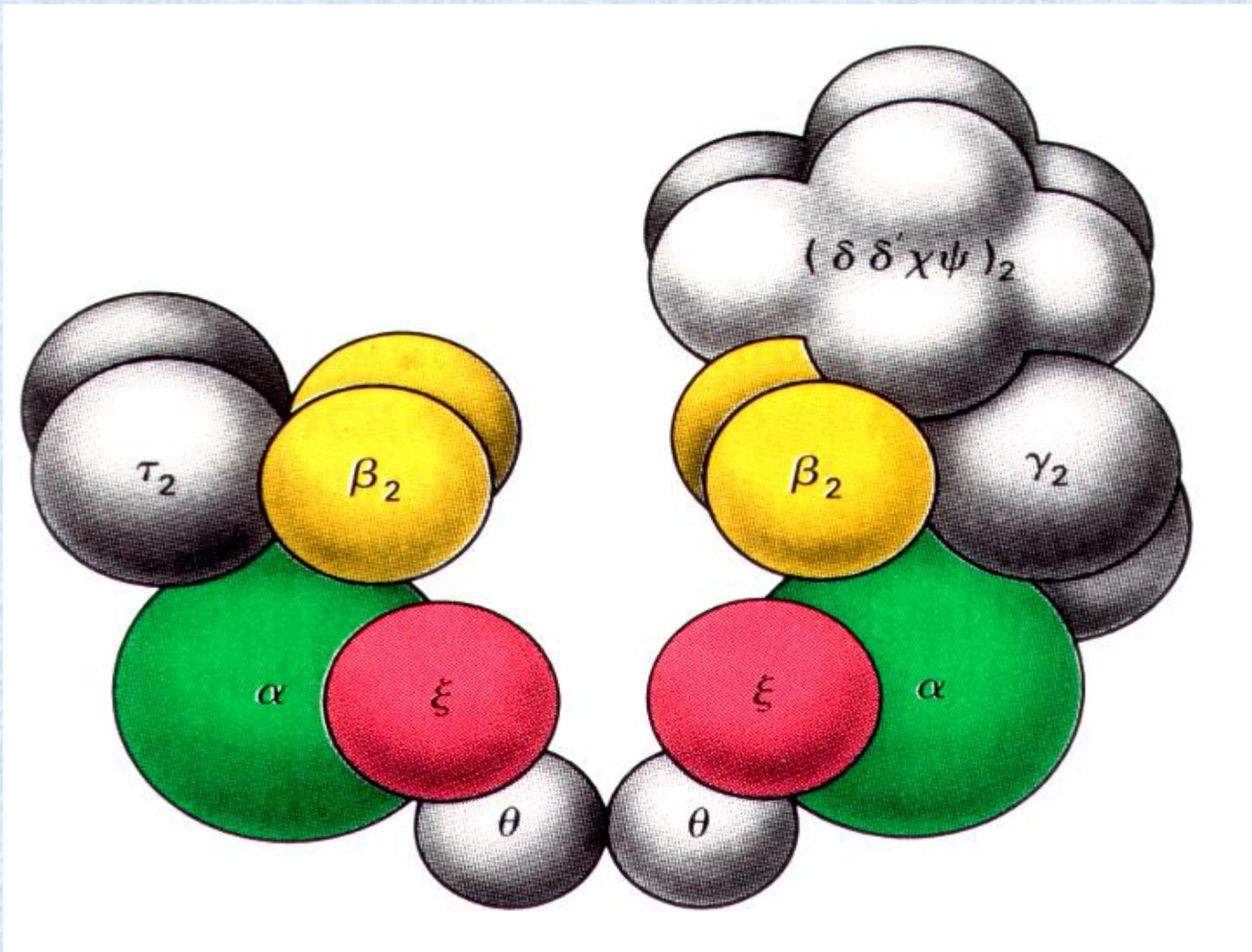
	DNA 聚合酶 I	DNA 聚合酶 I	DNA 聚合酶 III
<u>分子结构</u>	单链分子	单链分子	核心酶有 3 个亚基 全酶有 22 个亚基
分子量(KDa)	109	20	900
<u>分子数/细胞</u>	<u>400</u>	<u>100</u>	<u>10</u>
<u>5'→3'聚合酶活性</u>	+	+	+
<u>37℃时的转化率</u> (核苷酸数/酶分子·分)	~600	~30	<u>~9 000</u>
3'→5'外切核酸酶活性	+	+	+
5'→3'外切核酸酶活性	+	-	+
内切核酸酶活性	+	-	-
切刻转移活性	+	-	-
<u>对核苷三磷酸的亲合力</u>	<u>低</u>	<u>低</u>	<u>高</u>
高盐浓度抑制	-	-	+
SH 封闭剂抑制	-	+	+

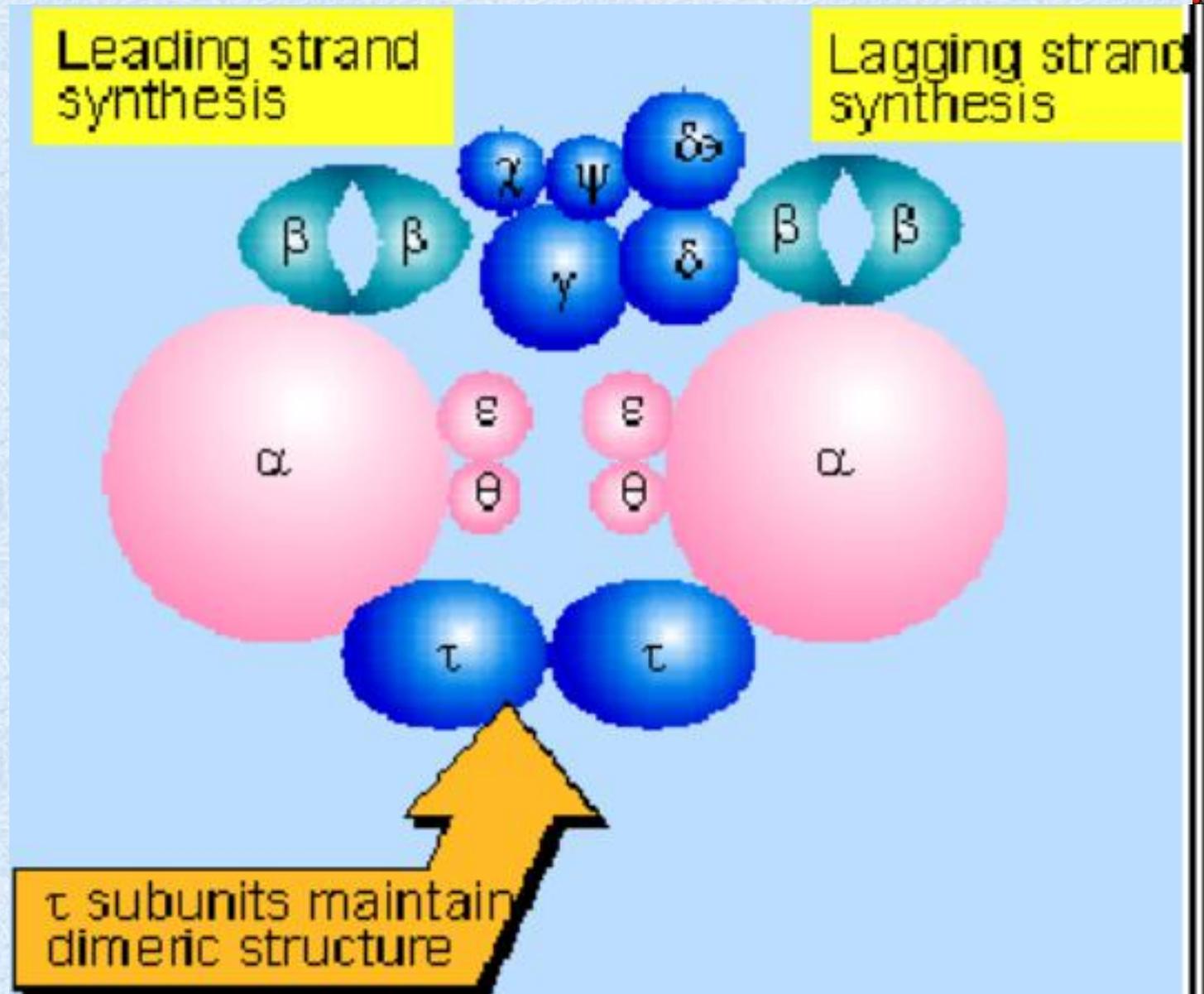


其中 DNAPol III 全酶有十种共22个亚基

表 3-2 DNA 聚合酶 III 全酶的亚基及亚聚集体

亚基	基因	质量(KDa)	功能及组成的亚聚集体	
α	<i>dnaE</i>	132	聚合酶 } 校对功能 } Pol III 核心 } 3'→5' 外切酶 } } 酶 165KDa } Pol III 核心酶相互连接(待证明) } } } 410KDa	
ϵ	<i>dnaQ</i>	27		
θ		10		
τ	<i>dnaZX</i>	71		将核心酶与模板结合, ATPase 活性
γ	<i>dnaZ(X)</i>	52	组成 γ 复合体	Pol III * 800KDa
δ		35	组成 γ 复合体, 又称因子 III; 过去误认为 <i>dnax</i> 产物	
δ		33	组成 γ 复合体	
χ		15	组成 γ 复合体	
ψ		12	组成 γ 复合体	
β	<i>dnaN</i>	37	使全酶具有进行性 β 二聚体 —— 滑动钳	







DNApolII和 DNApol III的主要特性和功能

1、 DNA聚合酶活性：两者都有

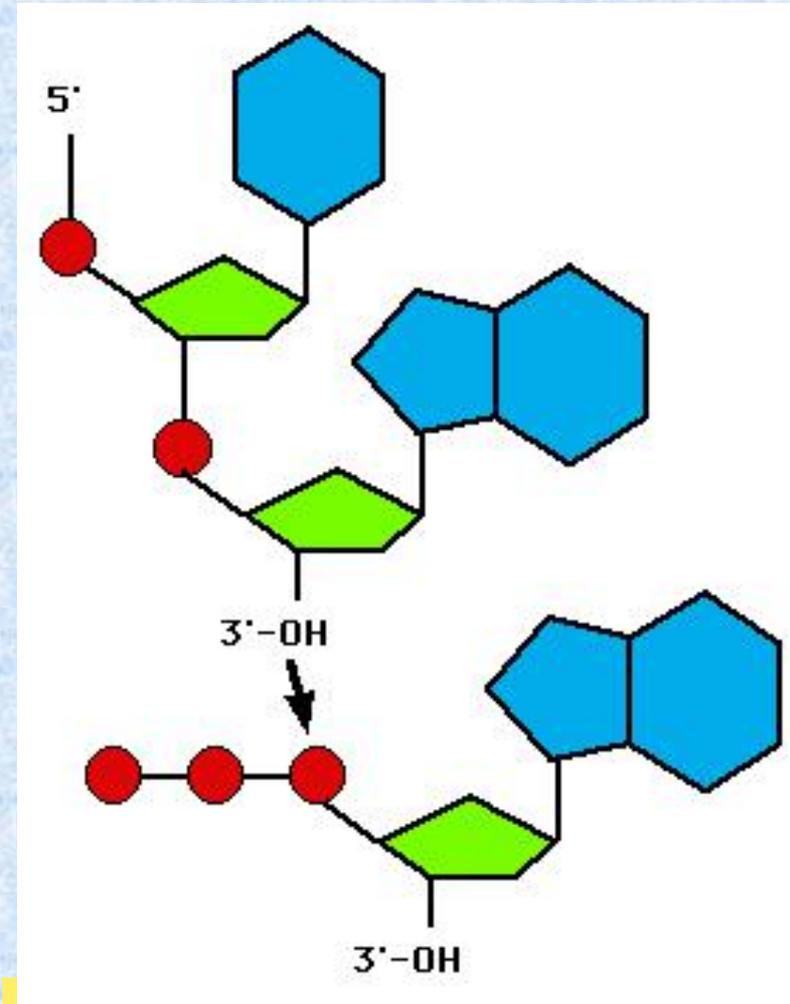
条件——模板、引物

DNApolII——主要用于DNA

的修复和RNA引物的替换

DNApol III——DNA链的延长

聚合方向： 5'—3'

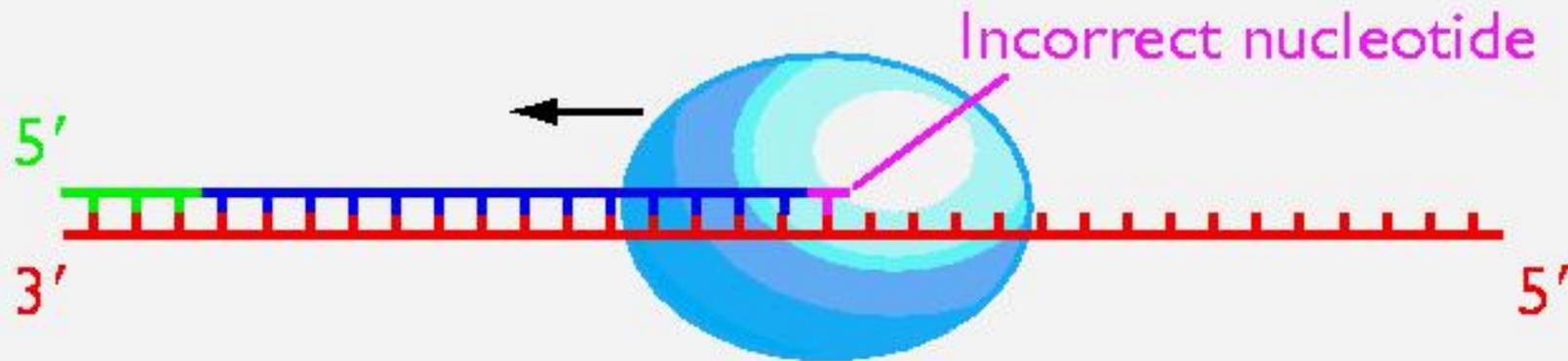




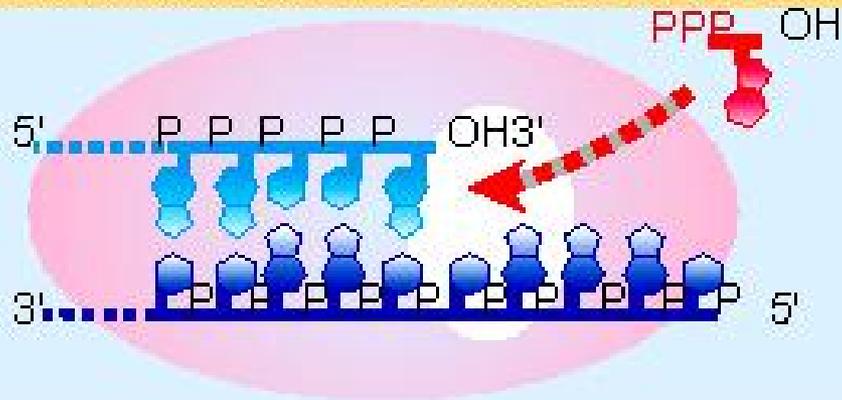
2、3'—5' 外切核酸酶活性

校对功能(proofreading)

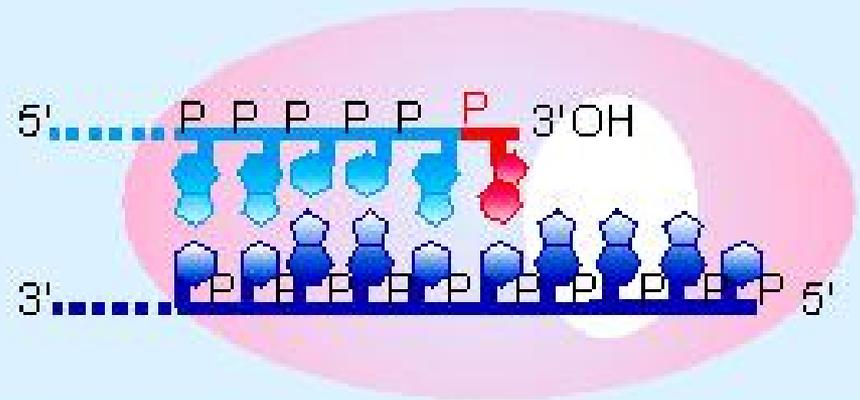
(B) 3'→5' exonuclease activity



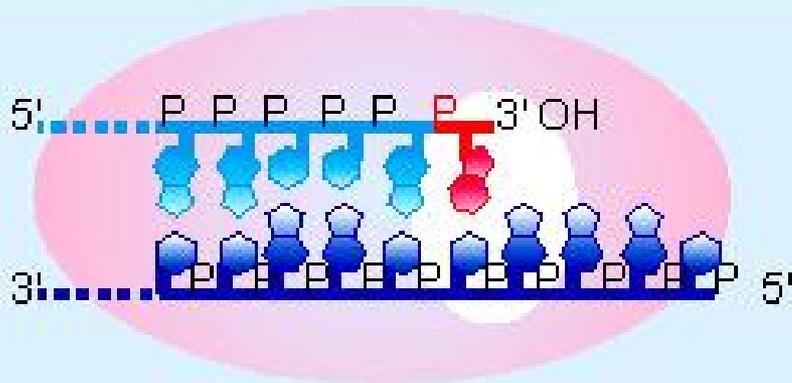
DNA polymerase has entry site available



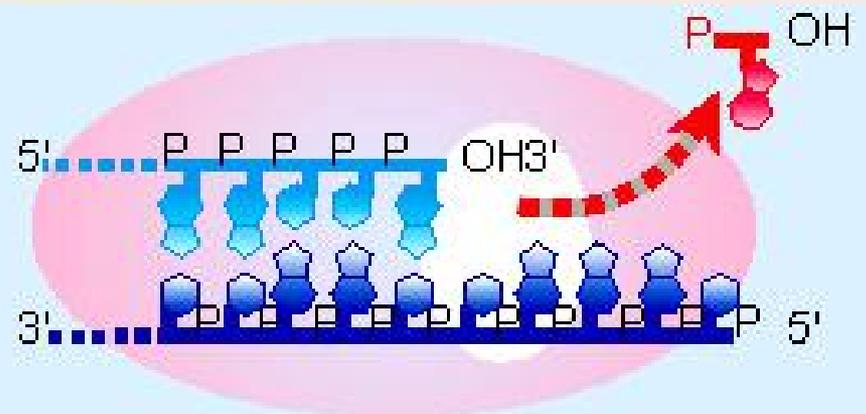
Enzyme advances 1 nucleotide



Nucleotide enters and forms bond



Mismatch causes removal of nucleotide; enzyme retreats 1 bp





3、5'—3'外切核酸酶活性

DNApolII的5'—3'外切活性有以下三个特点：

- ◆ 必须有5'—磷酸末端
- ◆ 被除去的核苷酸必须是已经配对的
- ◆ 被除去的可以是脱氧核糖核苷酸，也可以是核

糖

(C) 5'→3' exonuclease activity

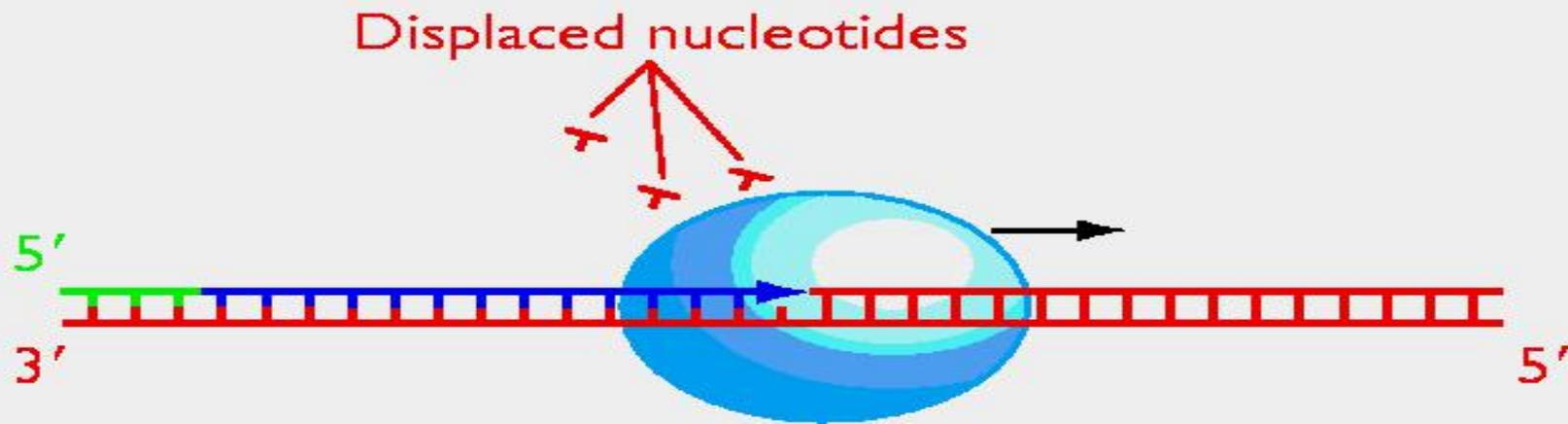


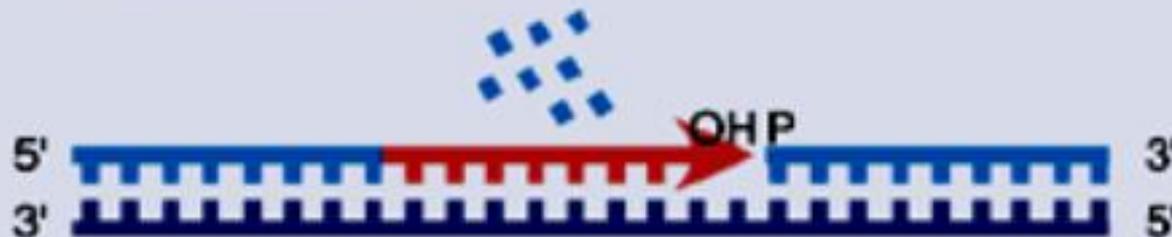
Figure 13.3 Nick translation replaces part of a pre-existing strand of duplex DNA with newly synthesized material.



Nick generates 3'-OH, 5'-P groups



DNA synthesis extends 3' end;
old strand is degraded





三、DNA连接酶（DNA Ligase）

所需条件：

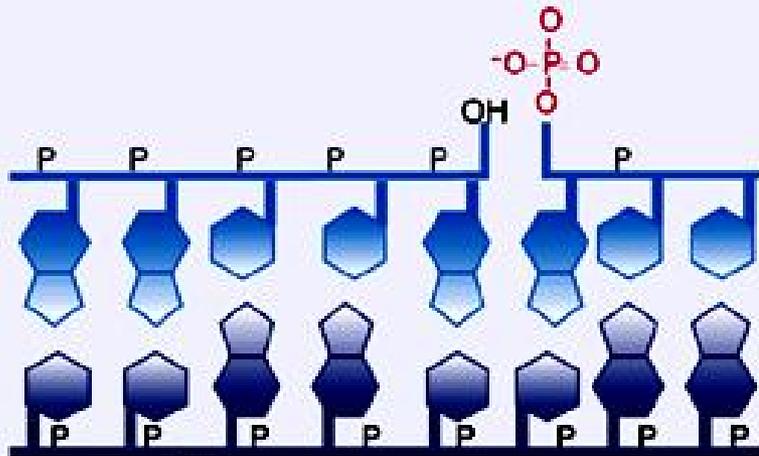
- a、切刻的 3'-OH 和 5'-P 相邻
- b、切刻各自碱基处于配对状态
- c、需要能量 原核（ATP、NAD）
真核（ATP）

用途：复制过程中，5'端RNA引物被置换后切刻的连接
修复、重组





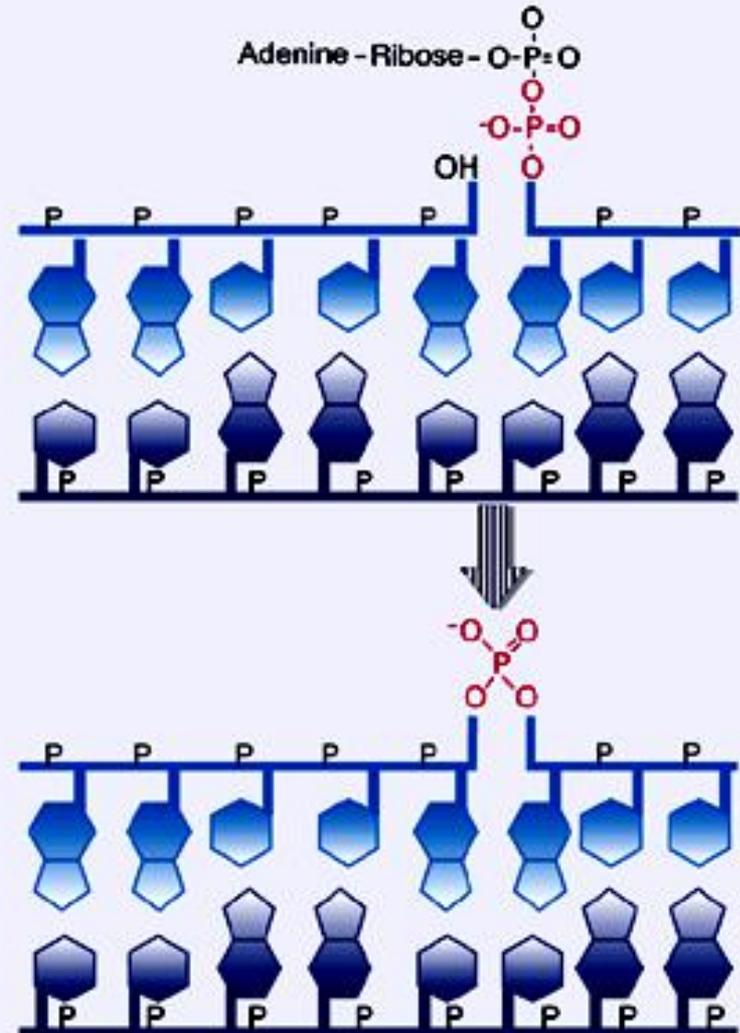
Figure 13.9 DNA ligase seals nicks between adjacent nucleotides by employing an enzyme-AMP intermediate.



Enzyme + ATP
or
Enzyme + NAD



Enzyme-AMP



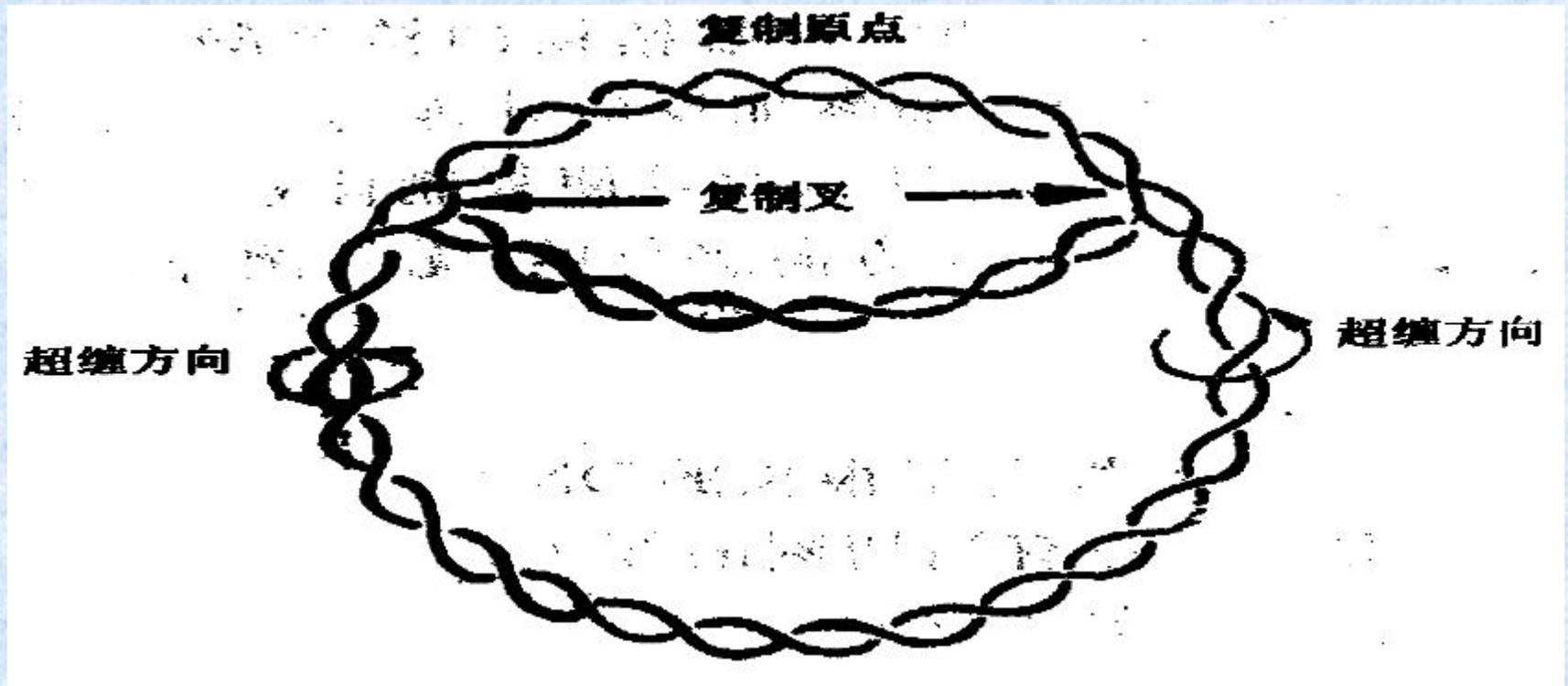


四、与DNA几何学性质相关的酶

1、解螺旋酶（helicase）：又称解旋酶

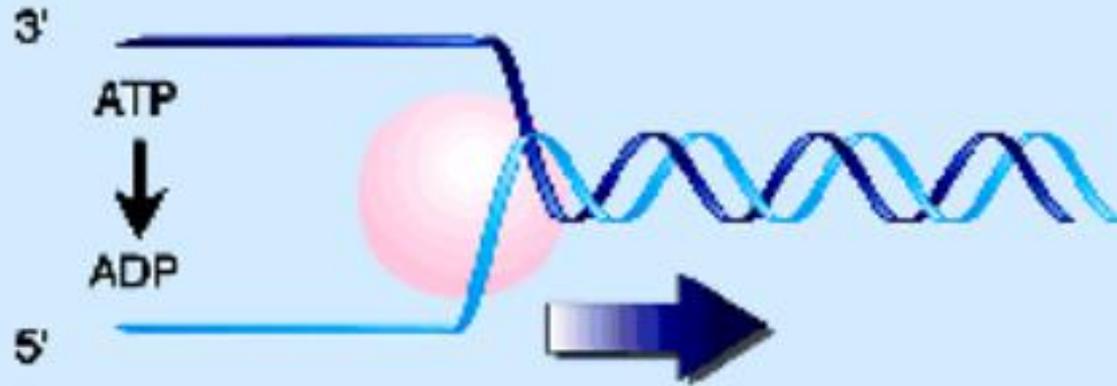
单链结合蛋白（SSB single-strand binding protein

2、DNA旋转酶：消除复制叉前进过程中产生的正超螺旋，产生负超螺旋

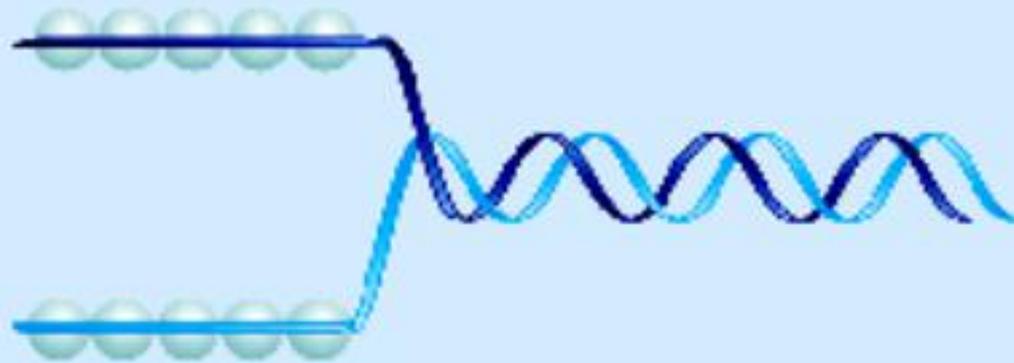


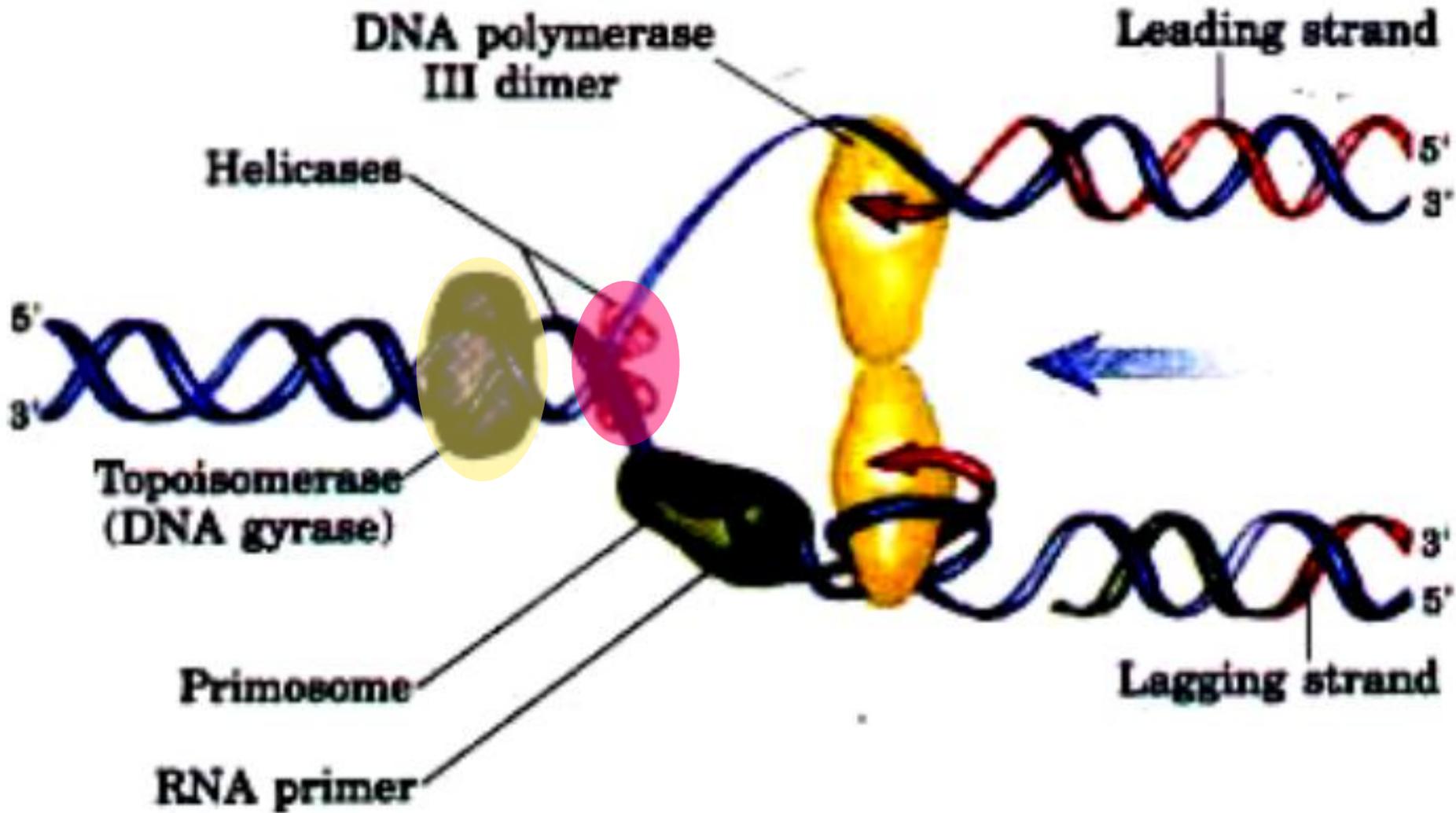


Helicase DnaB 5'-3' helicase (5'-3') 300 kD hexamer



SSB single-strand binding protein 74 kD tetramer ~60 /fork



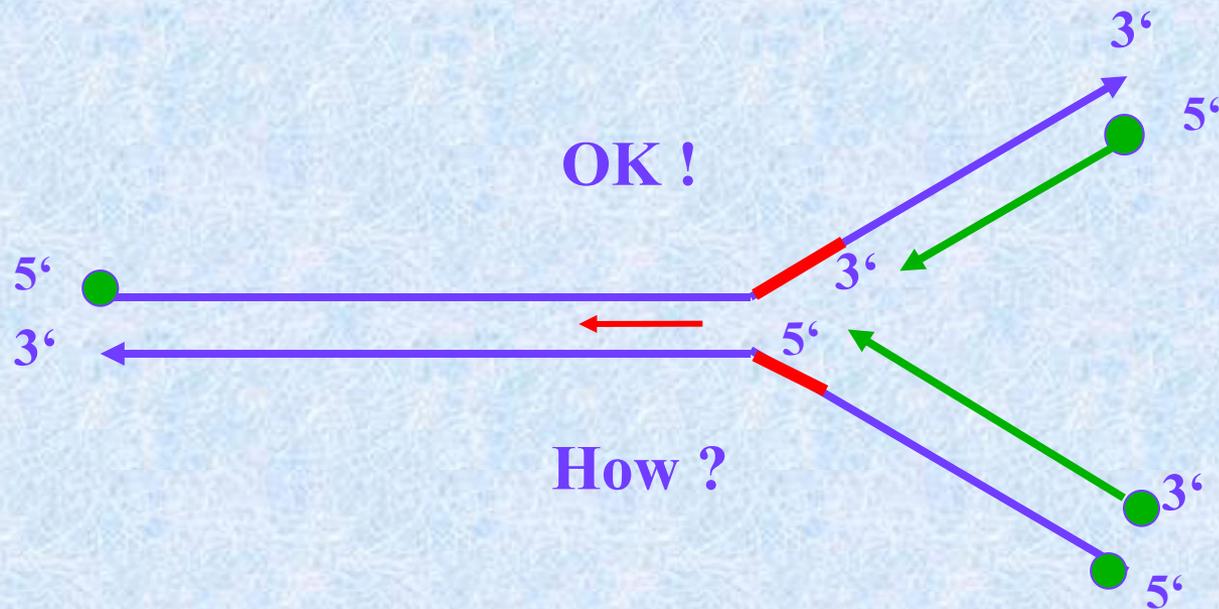




3.4 DNA复制的半不连续性

(Semi-Discontinuous Replication)

一、DNA复制的半不连续性



事实上没有发现DNA能按3'→5'合成的证据



先导链 (leading strand) : DNA复制时, 与复制叉向前移动的方向一致, 以3'→5'链为模板, 按5'→3'方向连续合成的一条链

先导链按 **dUMP** 片段连续复制

后随链 (lagging strand) :

后随链按 **Okazaki** 片段不连续复制

冈崎片段(Okazaki fragment): DNA复制不连续合成

链中形成的短DNA片段



原因——后随链的片段合成需要一个周期性的起始信号

二、引物 (Primer) 和引发酶 (Primase)

DNA polymerase 只能使DNA从引物的3'端延伸

DNA复制如何起始???

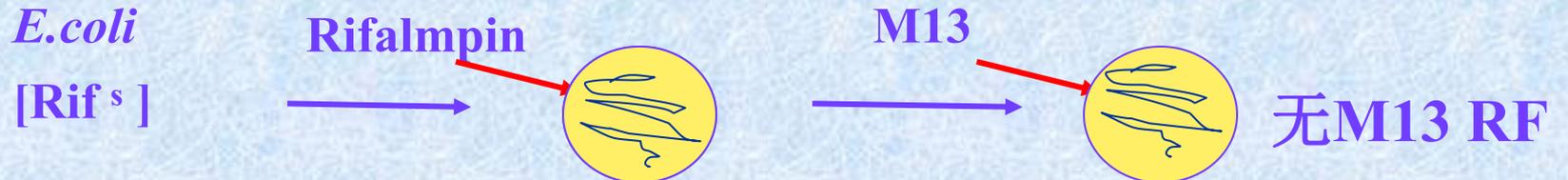
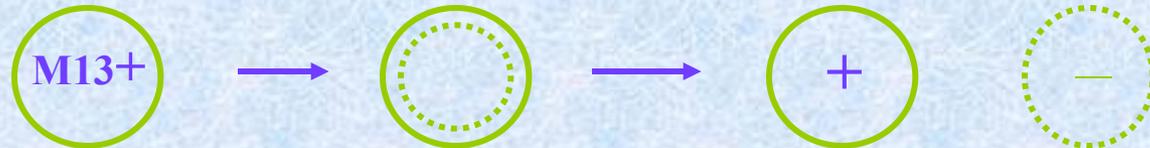
RNA可能提供了DNA复制的3'端

1、实验证据：M13 phage 的DNA复制显示出对转录抑制剂的敏感性





S.S. DNA virus RF



• Rifalmpin 是 *E. coli* RNA polymerase 的抑制剂



结论（Conclusion）：

M13 RF的形成需要 RNA polymerase 发动合成一段RNA分子作为引物（RNA提供复制的3'端）

RF启动后，Rifalmpin 的抑制无效





2、后续研究发现：

- ◆ 细菌中先导链的合成受Rifalmpin 的抑制
- ◆ 后随链的合成不受Rifalmpin限制

(1) 原因：

- ♪ 先导链的起始需要 RNAPol的转录激活
- ♪ 而后随链的起始由引发酶合成引物，而引发酶不受Rifalmpin的抑制



(2) DNA复制的转录激活

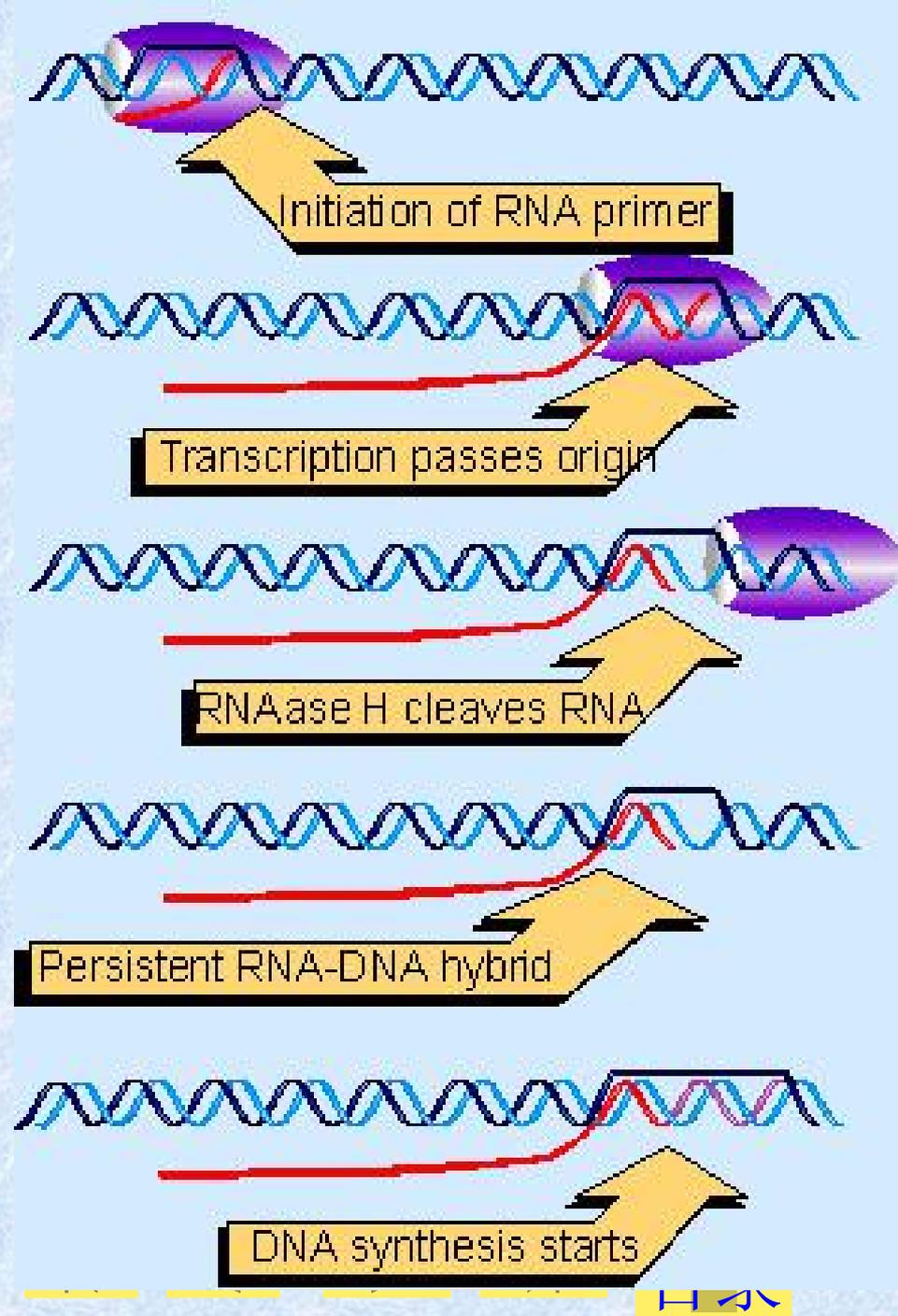
(transcriptional activation) :

DNA复制起始时通过RNAPolymerase的转录过程
而解开局部的双链

转录激活时产生的RNA能否作为引物目前尚未得出普遍结论



质粒 ColE1的DNA复制
起始引物RNA为RNA
聚合酶转录（经过剪切）
该RNA与起始区域DNA
紧密结合





3、总结：

(1) RNAPol (RNA polymerase) [Rif^S]

主要实现DNA复制的转录激活起始

(2) dnaG (primase) [Rif^R] 组装成引发体
完成对后随链（先导链）引物的合成

较先导链的启动落后一个Okazaki片断

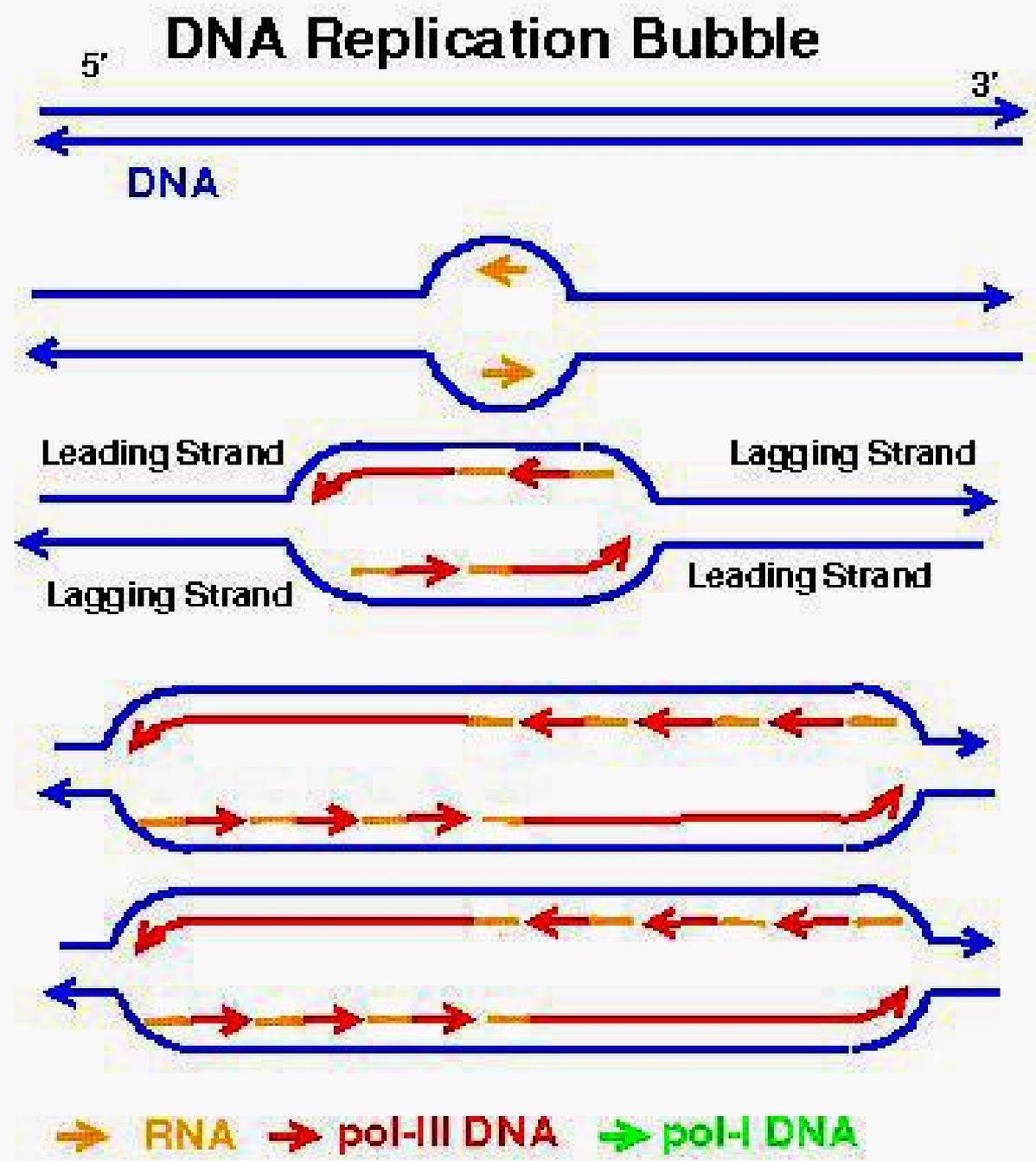
(3) 完成10 ± NtRNA引物合成后

DNApo III 进行DNA链的延伸

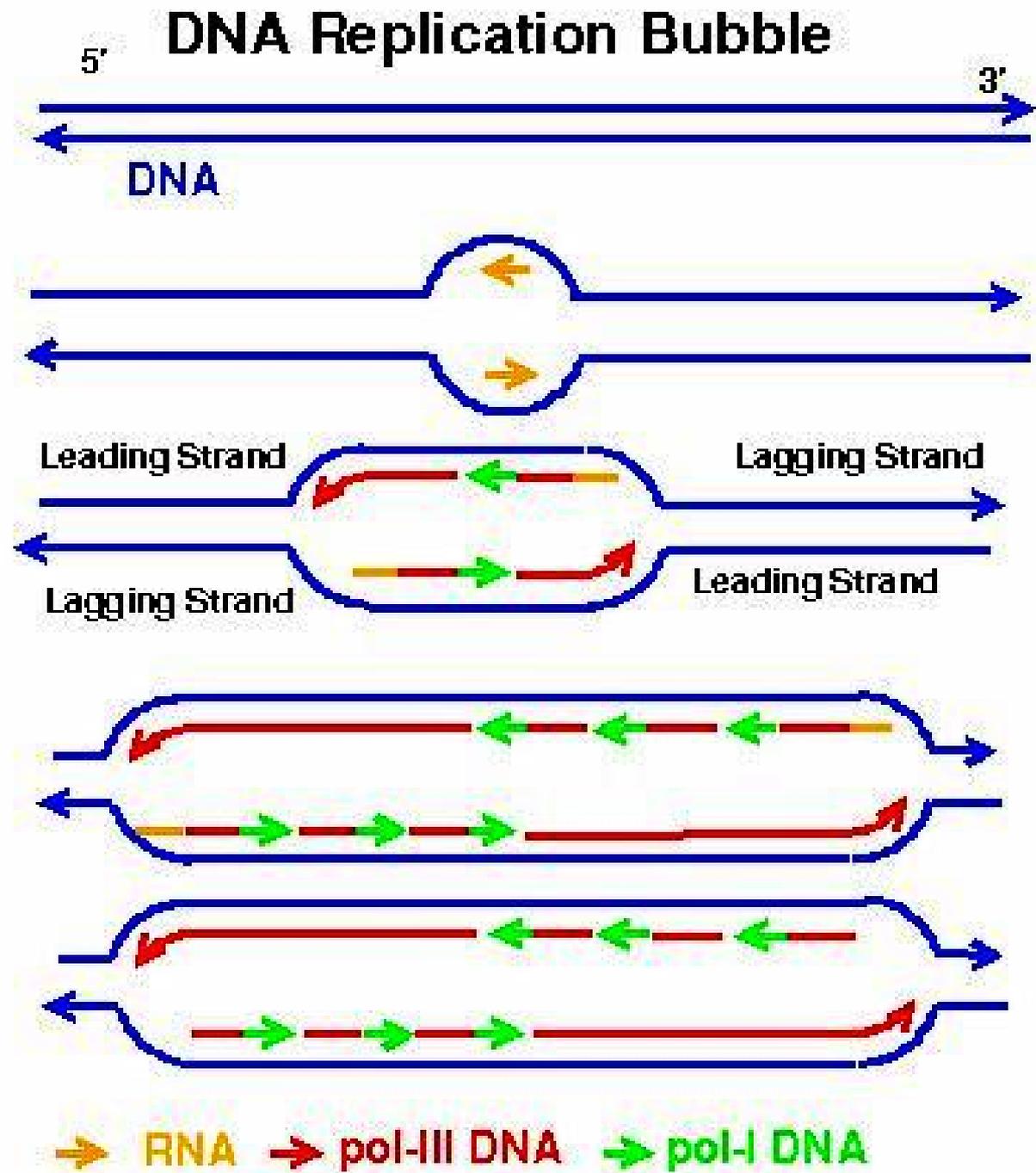
DNApol I Ligase



RNA primed
DNA replication



Removal of RNA primers and filling of gaps





复制叉如何诞生？

有机体选择RNA作为引物的可能原因

最终避免由于最初几个核苷酸的复制错误
导致的致死突变!!

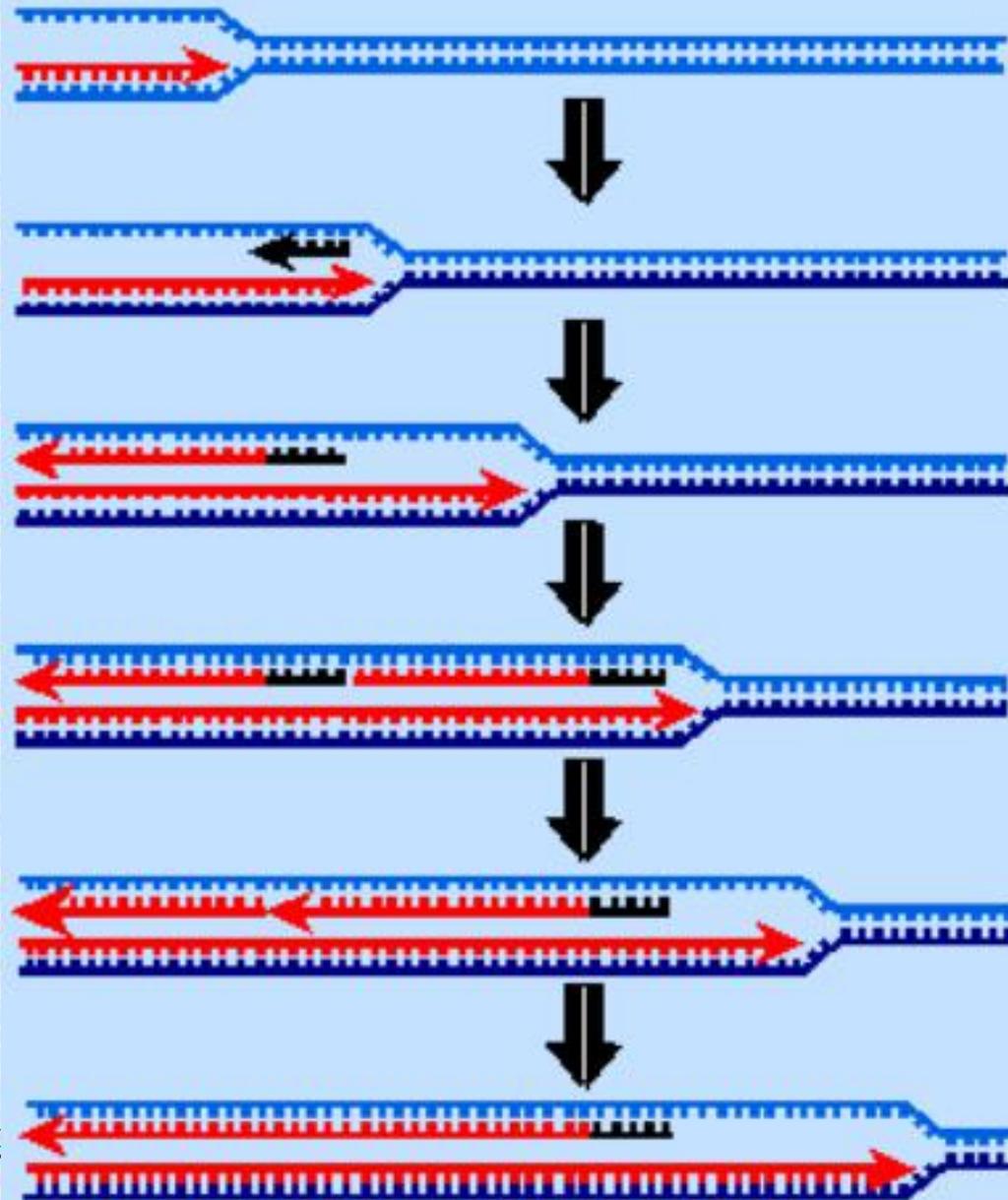


三、后随链的合成及前体片段的连接



后随链上所包含的事件？

共



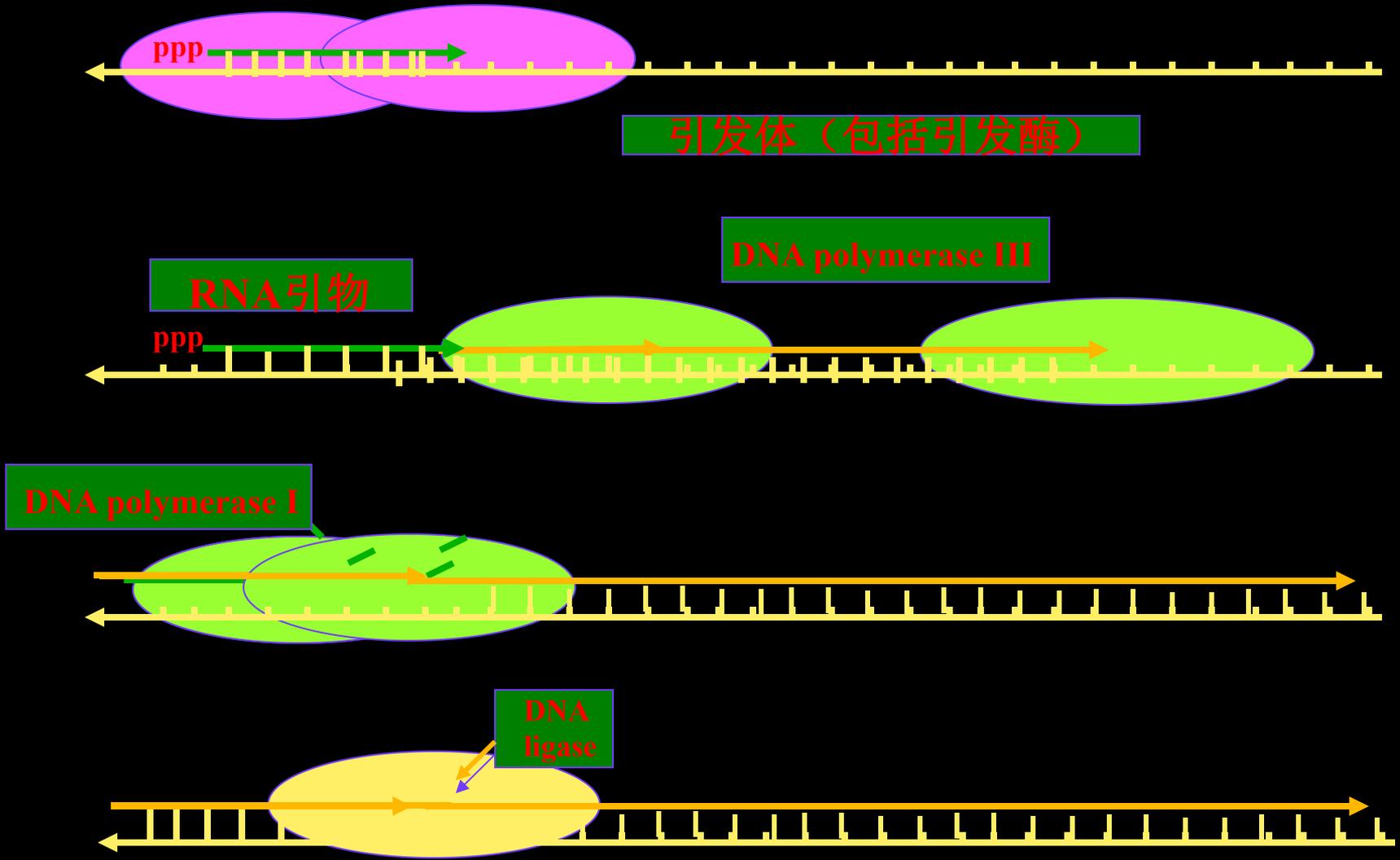
Primase synthesizes RNA

DNA polymerase III extends RNA primer into Okazaki fragment

Next Okazaki fragment is synthesized

DNA polymerase I uses nick translation to replace RNA primer with DNA

Ligase seals the nick





3.5 原核生物DNA复制

(DNA replication in Prokaryote)

一、DNA复制机构的研究

利用突变表型来考察基因的功能

但只能利用条件型突变

温度敏感突变体

材料: E.coli 或噬菌体





二、DNA复制的起始

起始方式:

a、从头起始 (denovo initiation) :

θ 复制、D环复制、线状DNA的复制

b、共价延伸 (covalent extesion)

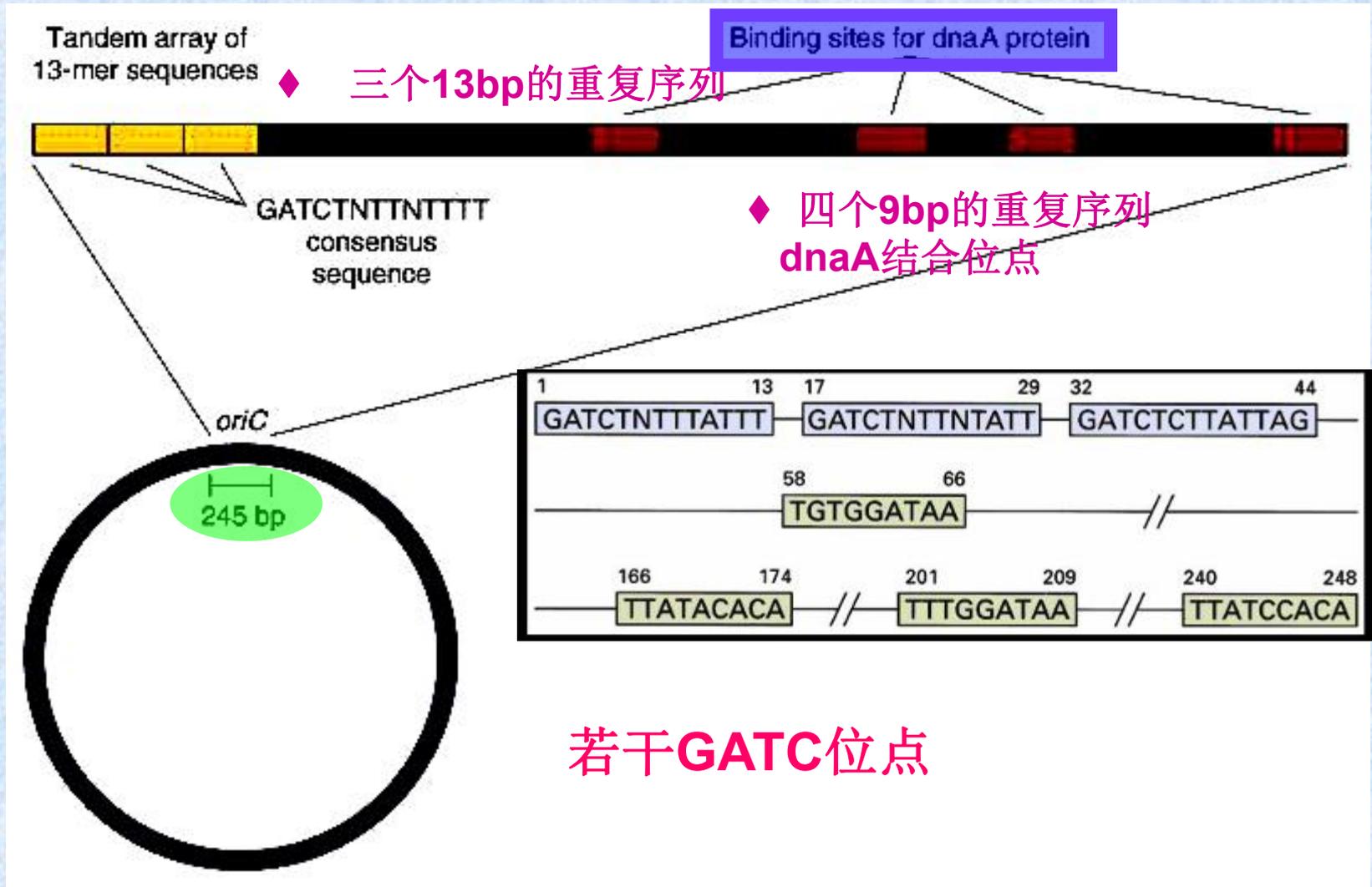
滚环复制





1、oriC与 E.coli 复制的起始（从头起始）

(1) OriC in E. coli chromosomal DNA





(2) 简单起始过程

a、涉及主要酶系：

**DnaA、RNAPol是必不可少的，此外涉及到
DnaB（解旋酶）、DnaC、Hu、Gyrase、
SSB、DnaG、TopI和 DNAPol III全酶**

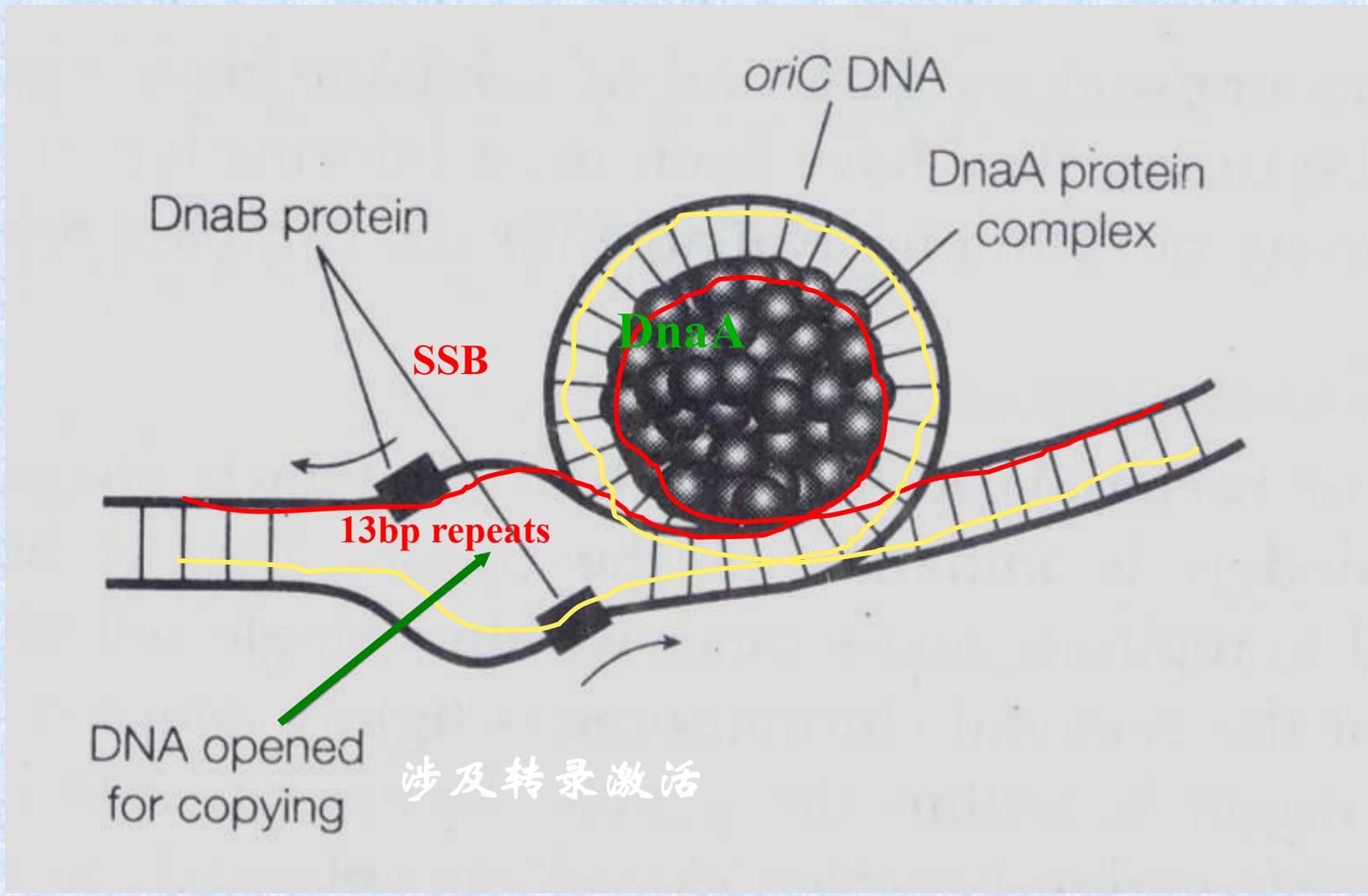




b、简单步骤:

- * 转录激活
- * DnaA 识别并结合复制起点，DnaB—DnaC六聚体与oriC 形成预引发体
- * DnaG加入形成引发体（oriC引发体），合成引物RNA
- * 引物合成后，DNApol 组装到引发的RNA上，完成复制体的组装







(3) E.coli细胞加倍时间与复制起始

加倍时间

37°C < 20min~10h

复制时间: 40min左右

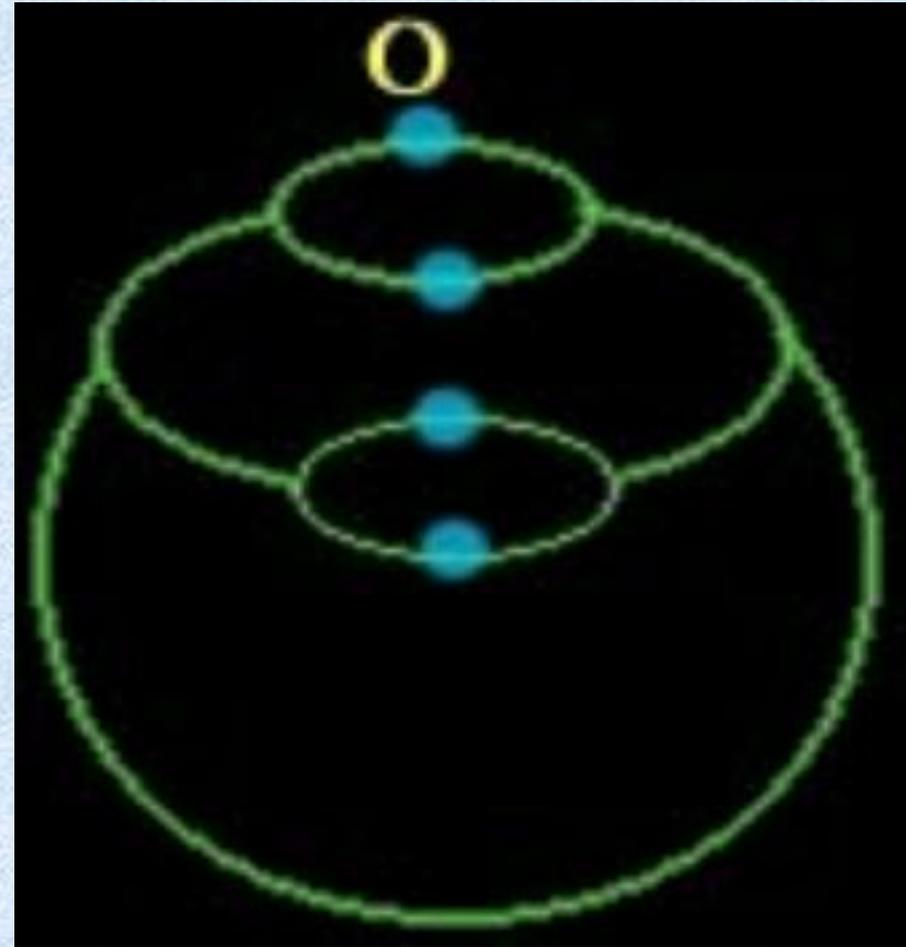
(850核苷酸 / 秒)

分裂过程中其它事件约需

20min (组分、隔膜)

因此——加倍时间少于60min

的细胞两轮复制有共用时间

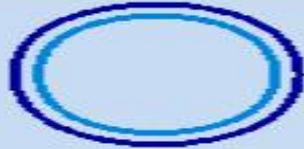




2、共价延伸方式 (covalence elongation)

ΦX174的若干正链的合成起始——滚环复制过程

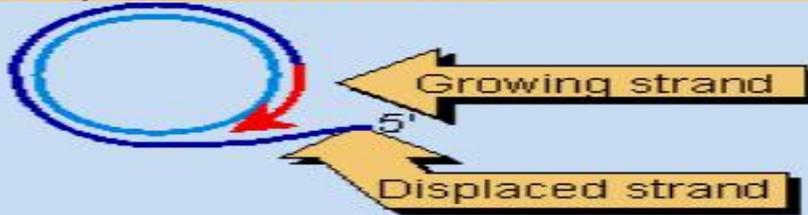
Template is circular duplex DNA



Initiation occurs on one strand



Elongation of growing strand displaces old strand



After 1 revolution displaced strand reaches unit length



Continued elongation generates displaced strand of multiple unit lengths





三、延伸过程

进入的标志：DNApol III把第一个核苷酸加到引物的3'-OH端

(一) 后随链合成的起始（前体片段的起始）

后随链的第一个冈崎片段起始于
先导链进入延伸之后

Φ x174 phage后随链的起始

(负链合成、不连续合成)





Φ_X 型引发体的组装以PriA识别引发体组装位点（primosome assembly site *pas*）开始，首先形成预引发体

其中——引发体组装位点唯一，但引发位点是不唯一的

Φ_X 型引发体或其部分组分可沿单链

DNA移动到每一个冈崎片段的起点

PriA提供引发体移动的动力



- 位于复制叉处的多酶复合体（引发体）必须快速从一个冈崎片段移到另一冈崎片段



- In lagging Strand 上多酶系统

必须完成多次反复的启动与扩展

E.coli 启动2000—4000次的冈崎片段复制



(二) Φ_{X174} DNA的复制

a、SS \rightarrow RFI

Φ_{X174} 型引发体起始后，由DNApolIII、I 和连接酶等协同合成（后随链的起始过程）

b、多拷贝 RFI 的合成

（滚环复制）

（先导链的合成过程、后随链合成）

c、后代单链（SS）DNA的合成

（DNA复制过程是上一过程的一部分 先导链）



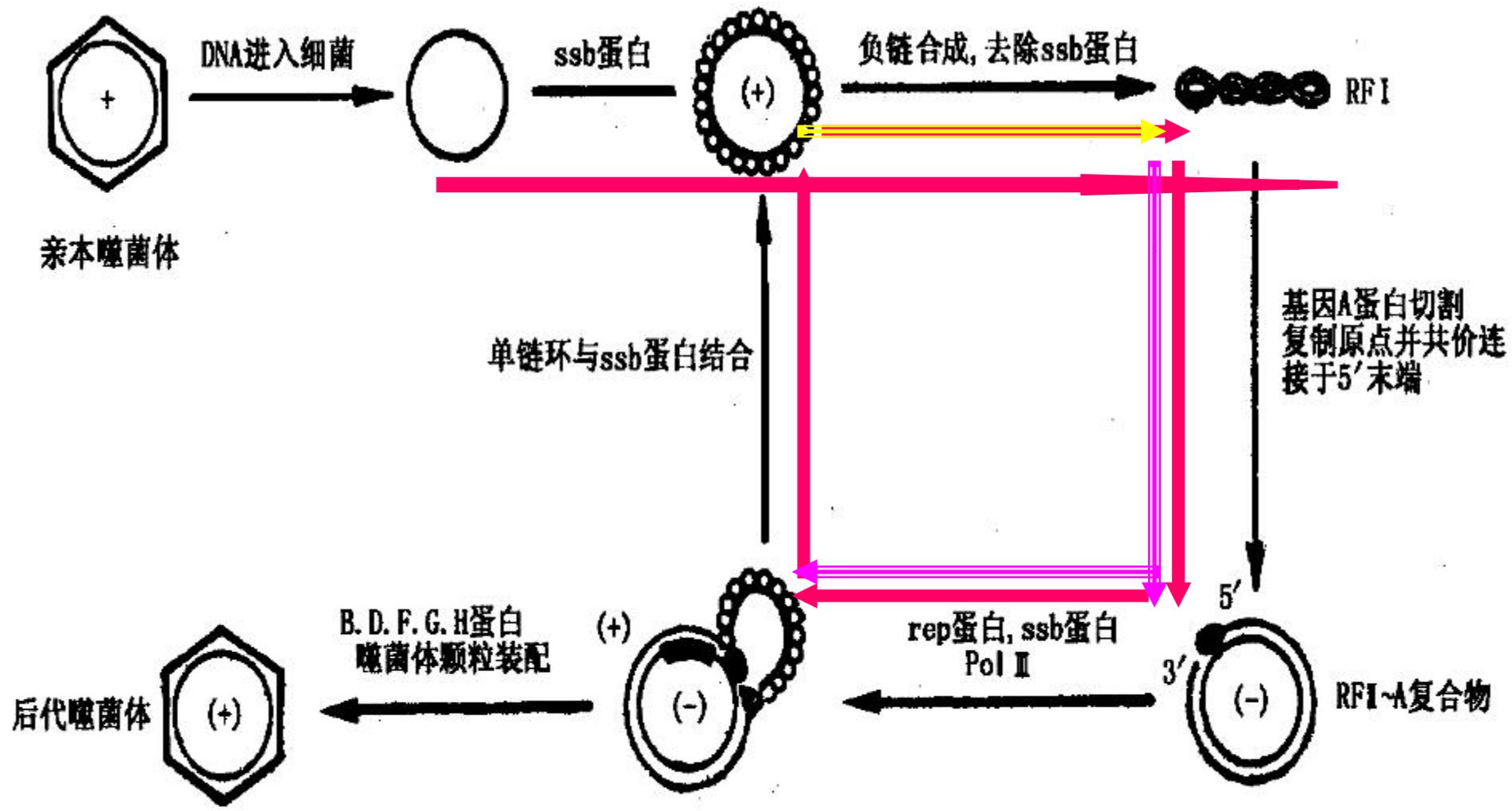


图 3-34 ϕ X174DNA 复制的阶段图解



A蛋白 (gpA) :

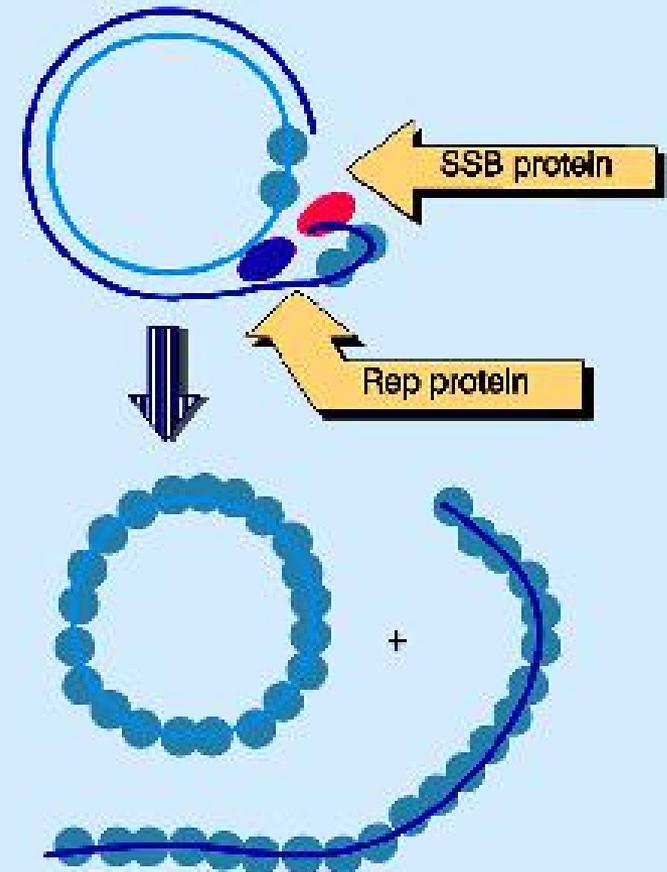
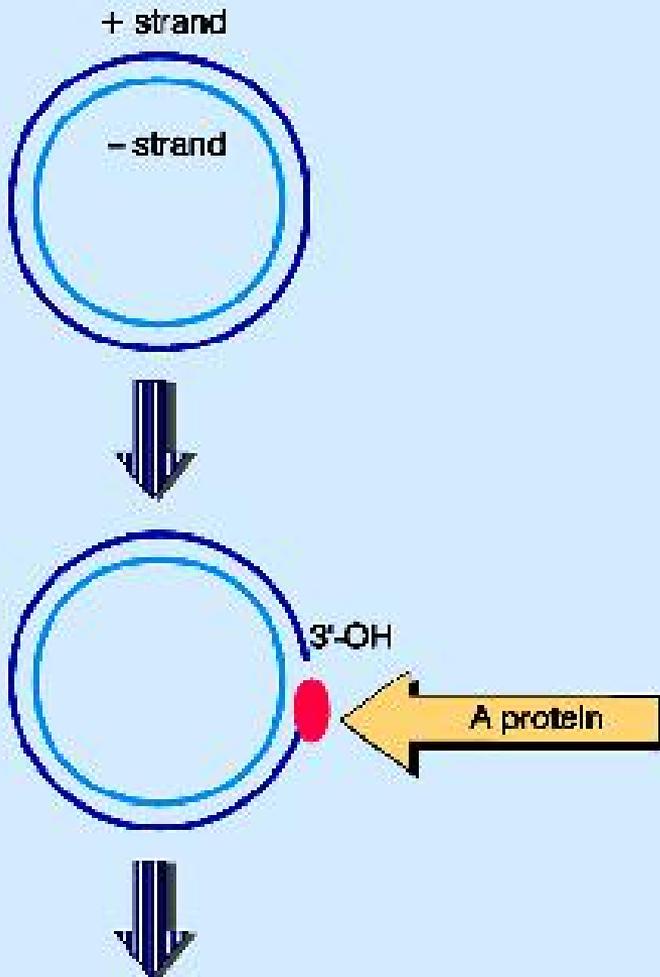
- ◆ **Φ X 174**基因A的产物
- ◆ 结合到 RF I DNA的复制原点的结合位点
(引发体的帮助)
- ◆ 诱导相邻的识别位点的熔解(负超螺旋、富含A/T)
- ◆ 其核酸内切酶活力切割 (+) 链的4305与4306碱基的酯键，并共价连接于5'端 (A)，另一端为自由的3'-OH (G)

Rep蛋白——解旋酶





Figure 13.10 ϕ X174 DNA can be separated into single strands by the combined effects of 3 functions: nicking with A protein, unwinding by Rep, and single-strand stabilization by SSB.



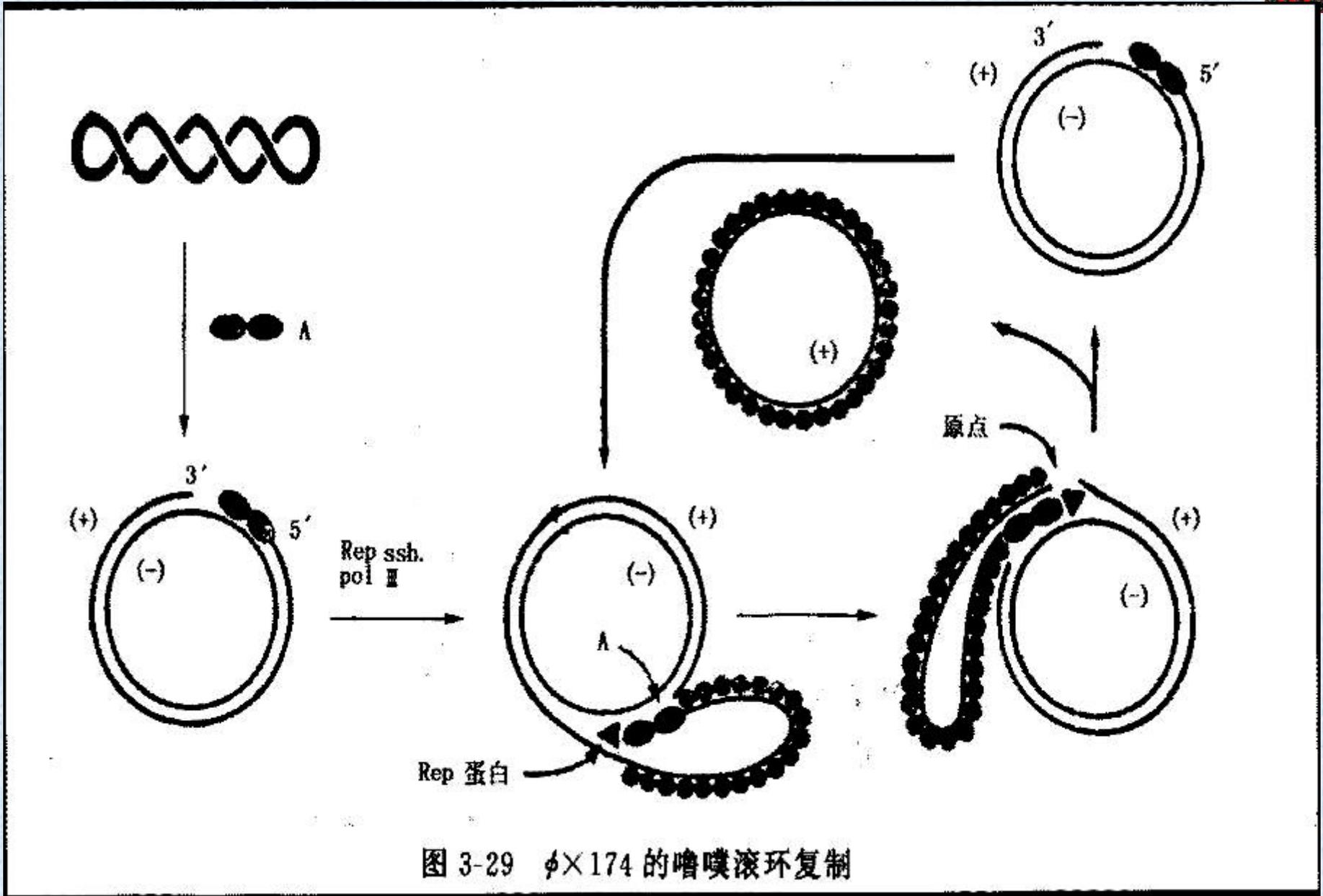
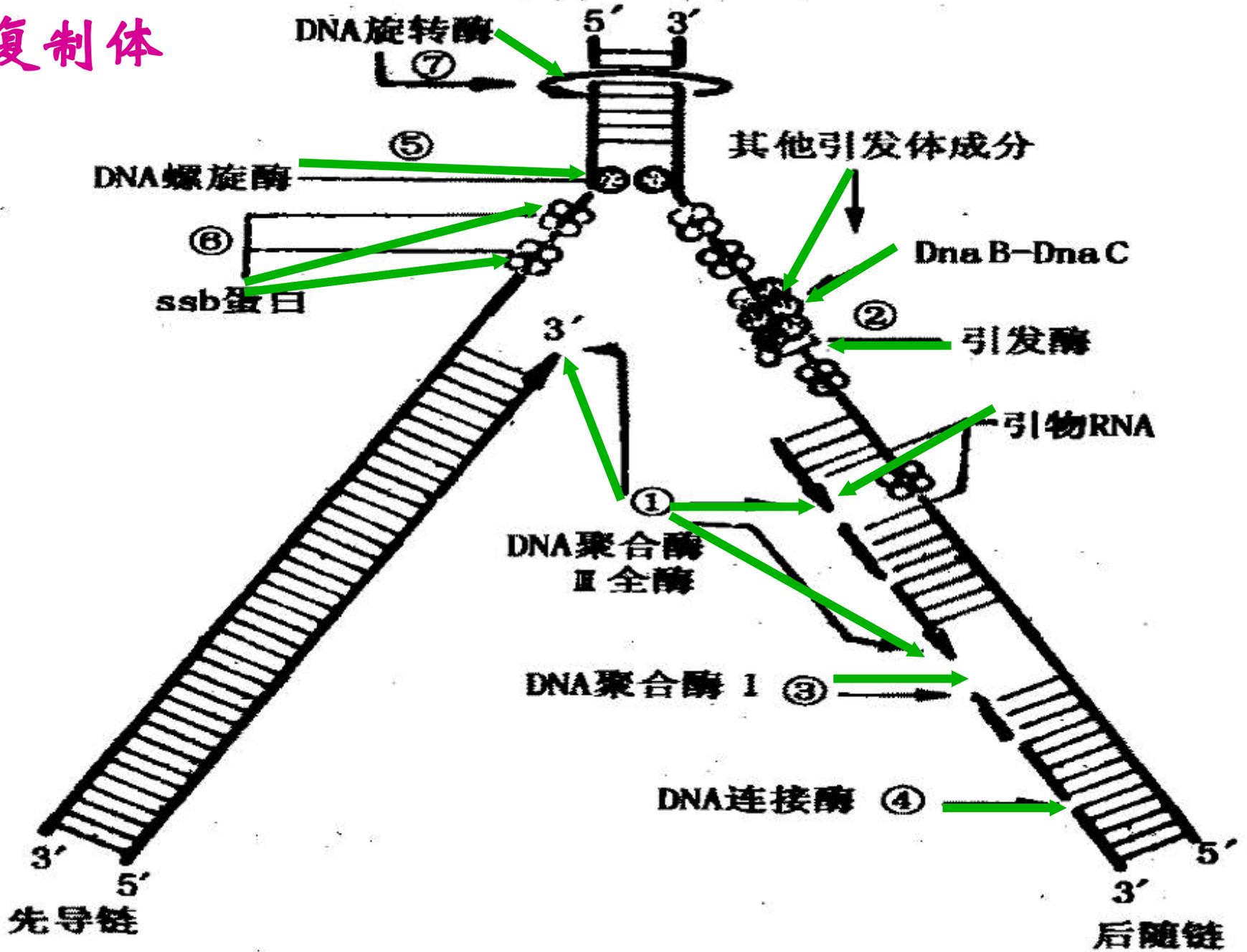


图 3-29 $\phi\times 174$ 的嗜噬滚环复制

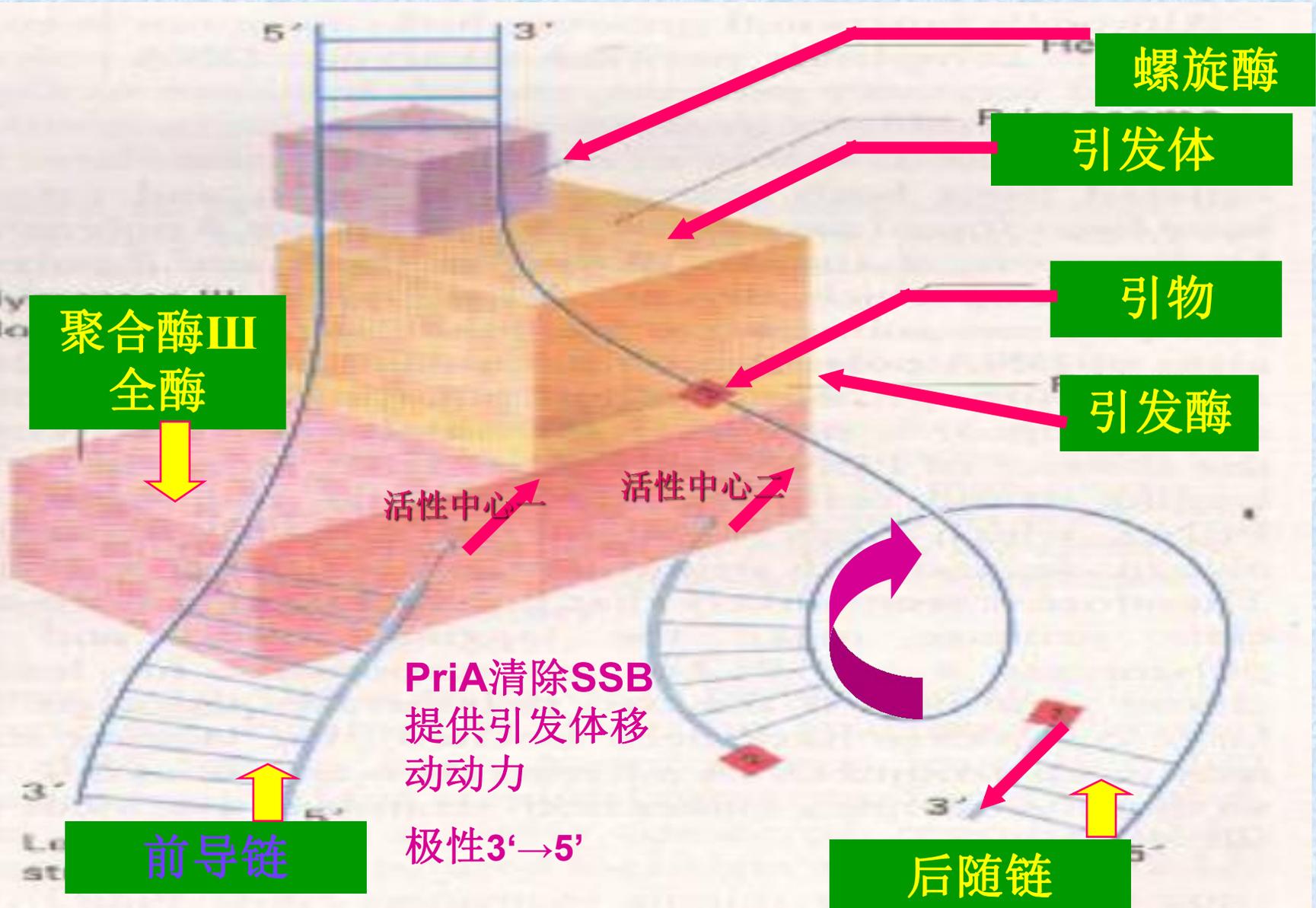
复制体





(三) 前导链和后随链的协同合成

复制叉处的复制体



聚合酶III全酶

螺旋酶

引发体

引物

引发酶

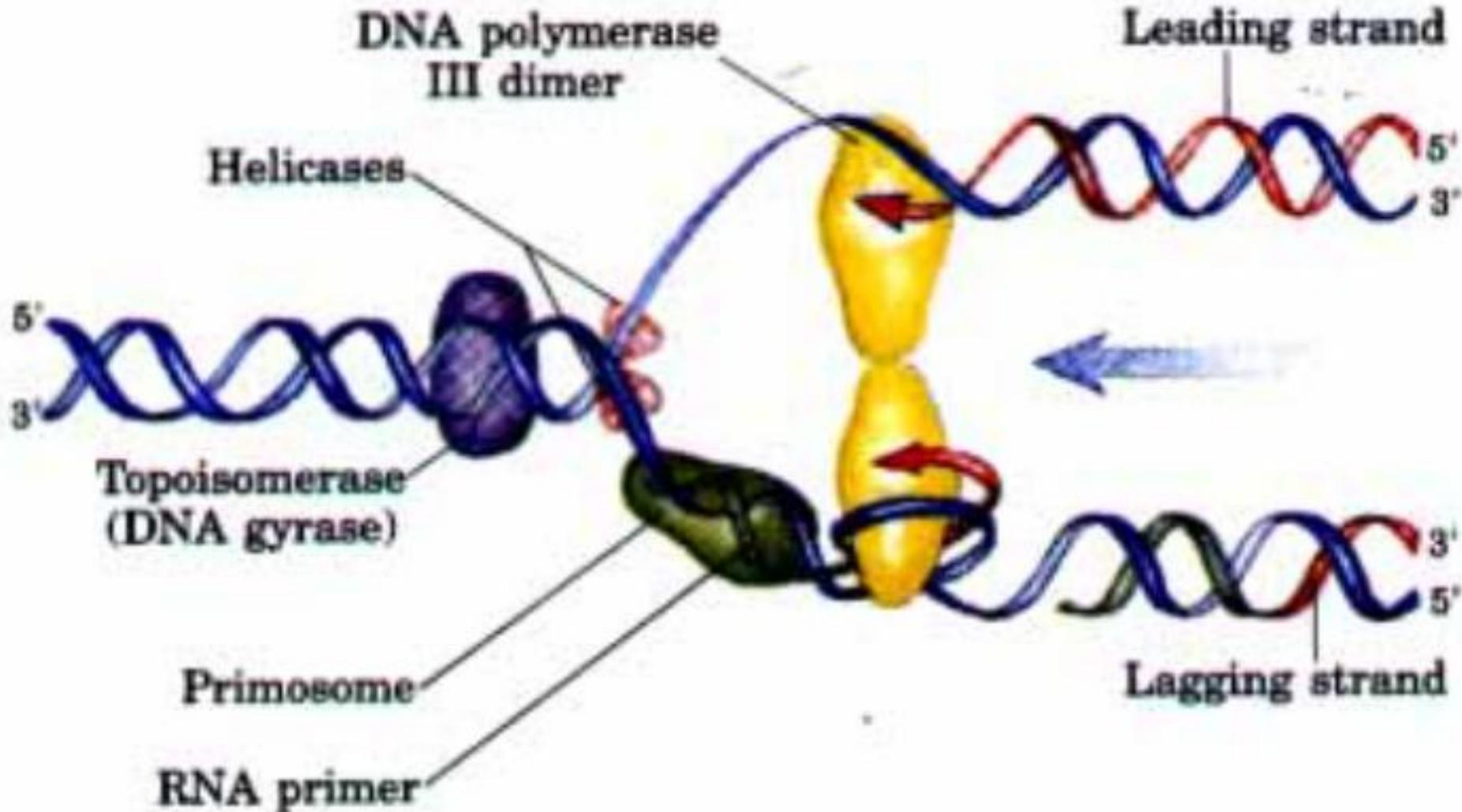
前导链

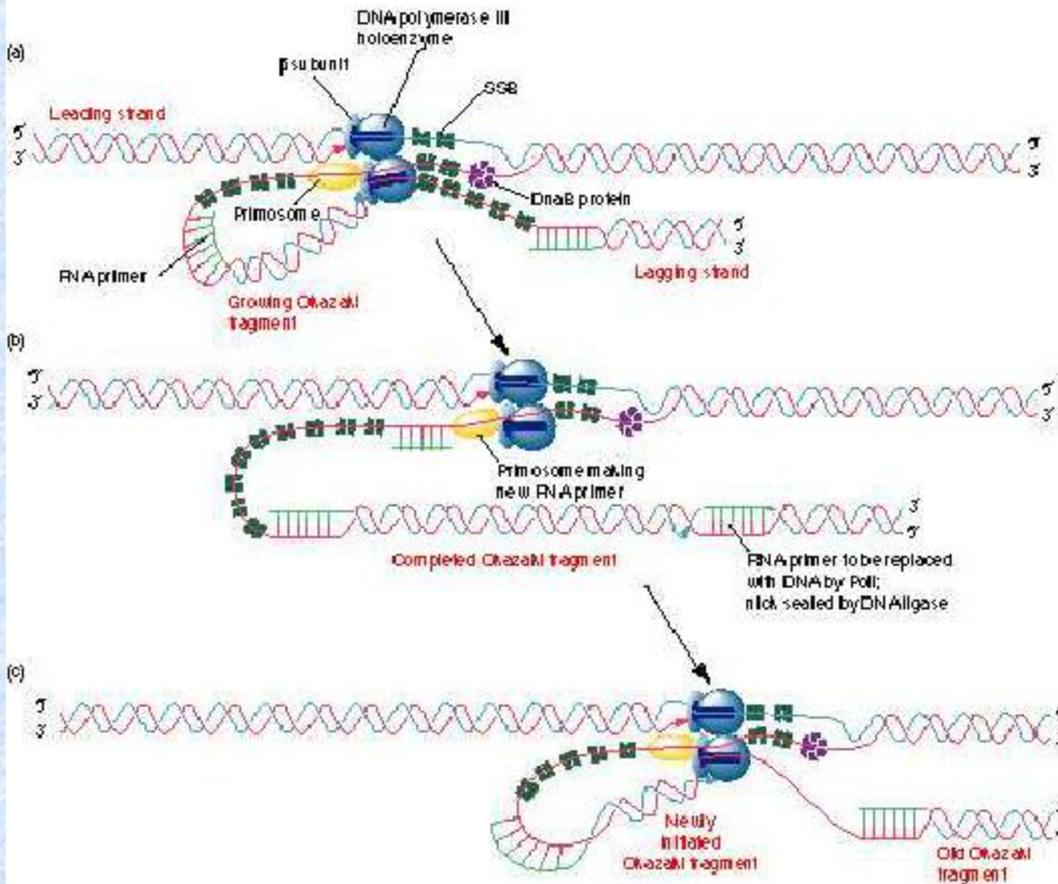
后随链

PriA清除SSB
提供引发体移动动力
极性3'→5'



一分子的 DNA pol III. 协同合成前导链和后随链





DNA Replication in bacteria (E. coli)

Guided Exploration 25

(press play to begin)

BACK PLAY NEXT
PAUSE REPLAY
1 of 6



四、复制终止

1、环形DNA复制的终止

a、终止序列

E.coli 有两个终止区域，分别结合专一性的终止蛋白

序列一：**terE** **terD** **terA**

序列二：**terF** **terB** **terC**

每个区域只对一个方向的复制叉起作用



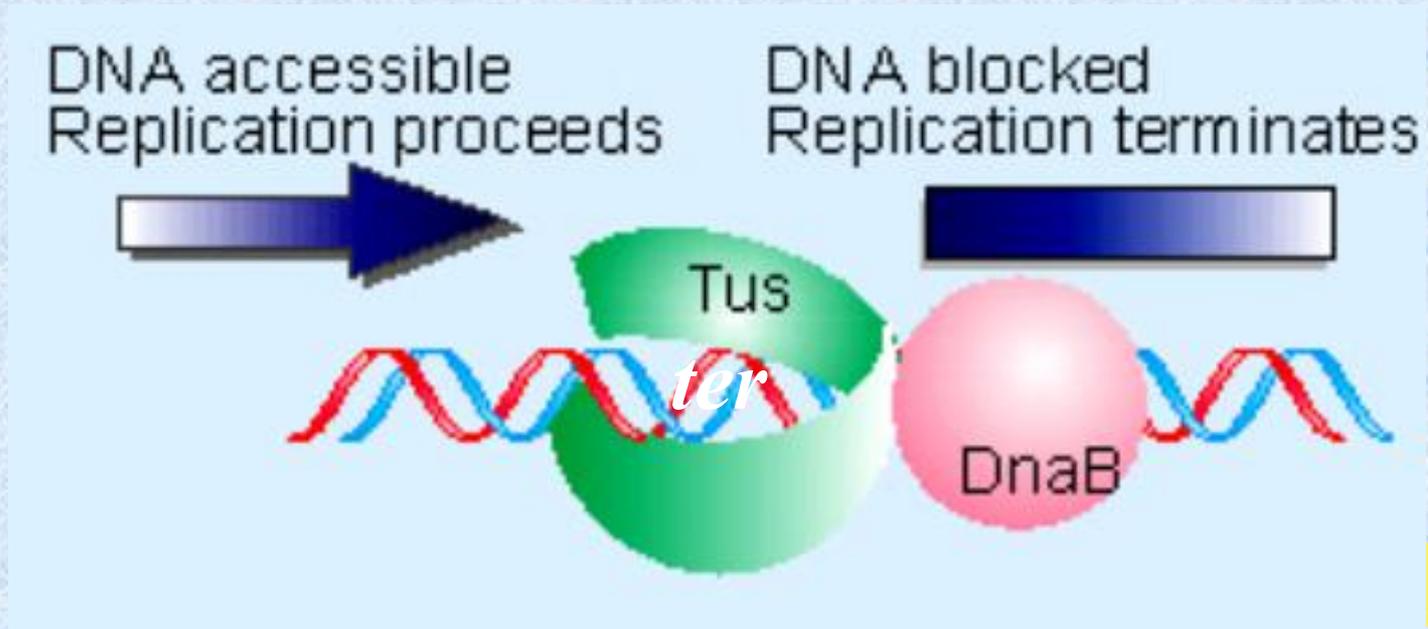
b、专一性终止蛋白

E.coli 中由 **tus gene** 编码

(terminus utilization substance)

通过抑制DNA螺旋酶而发挥终止作用

每次复制时只使用一个终止位点



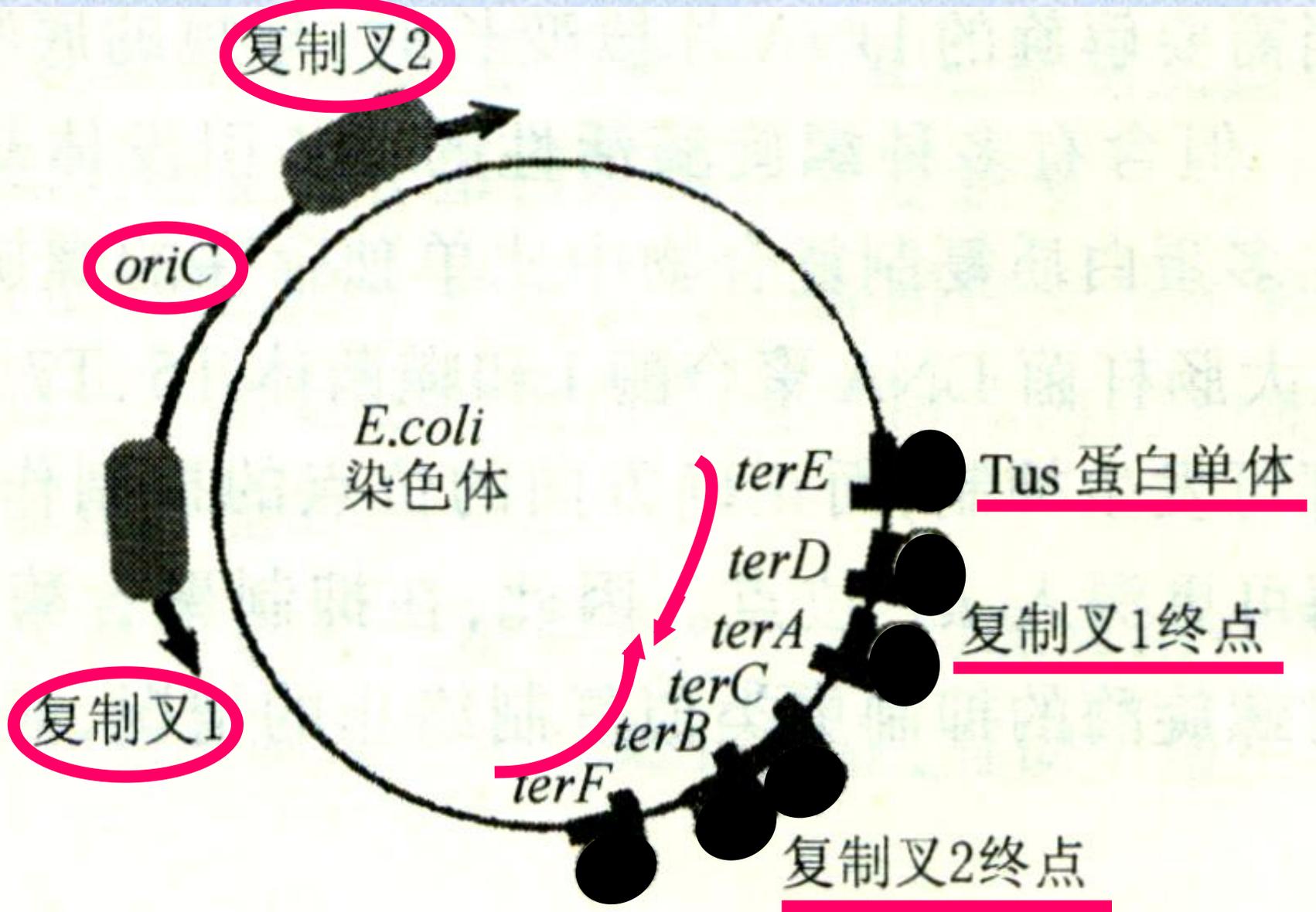
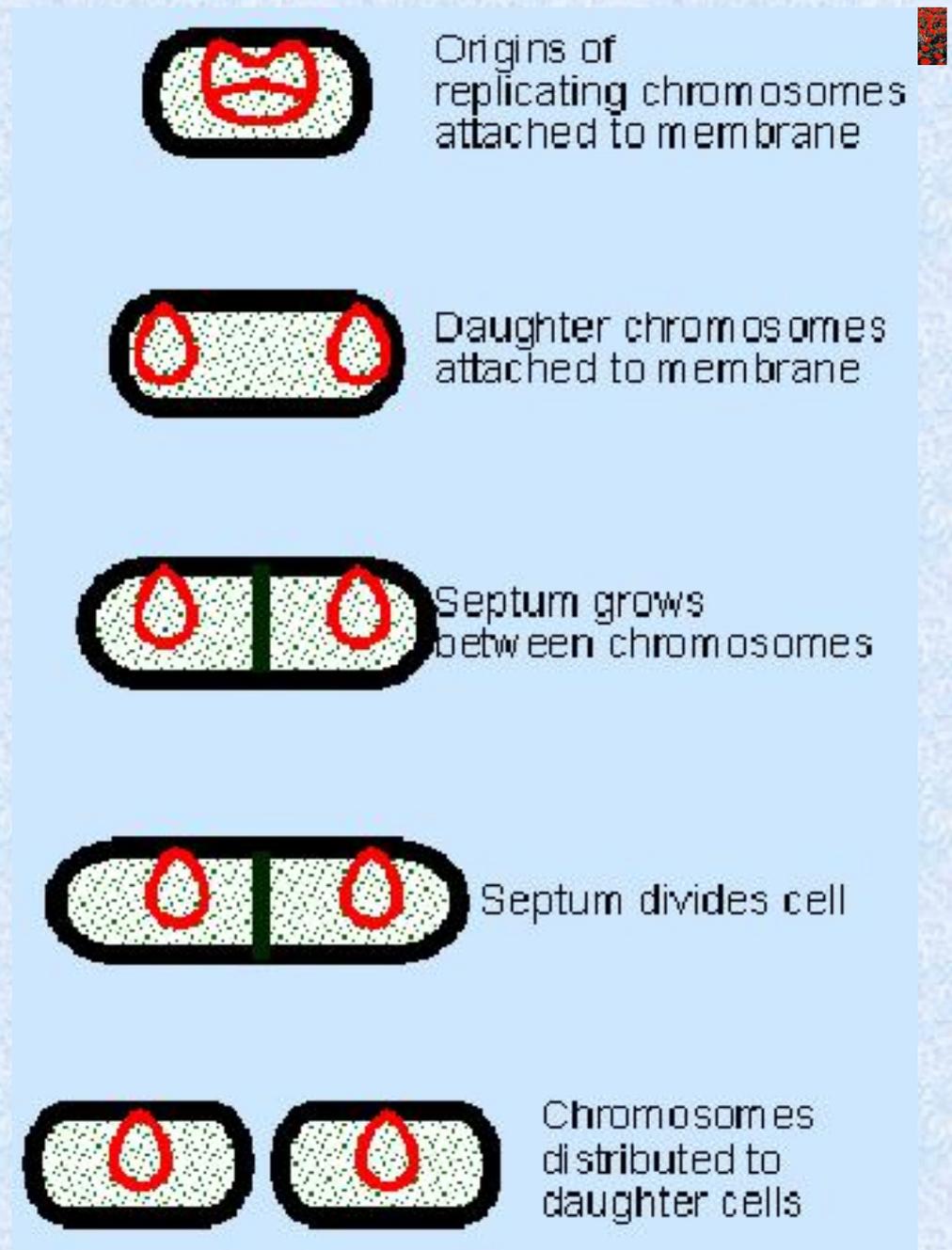
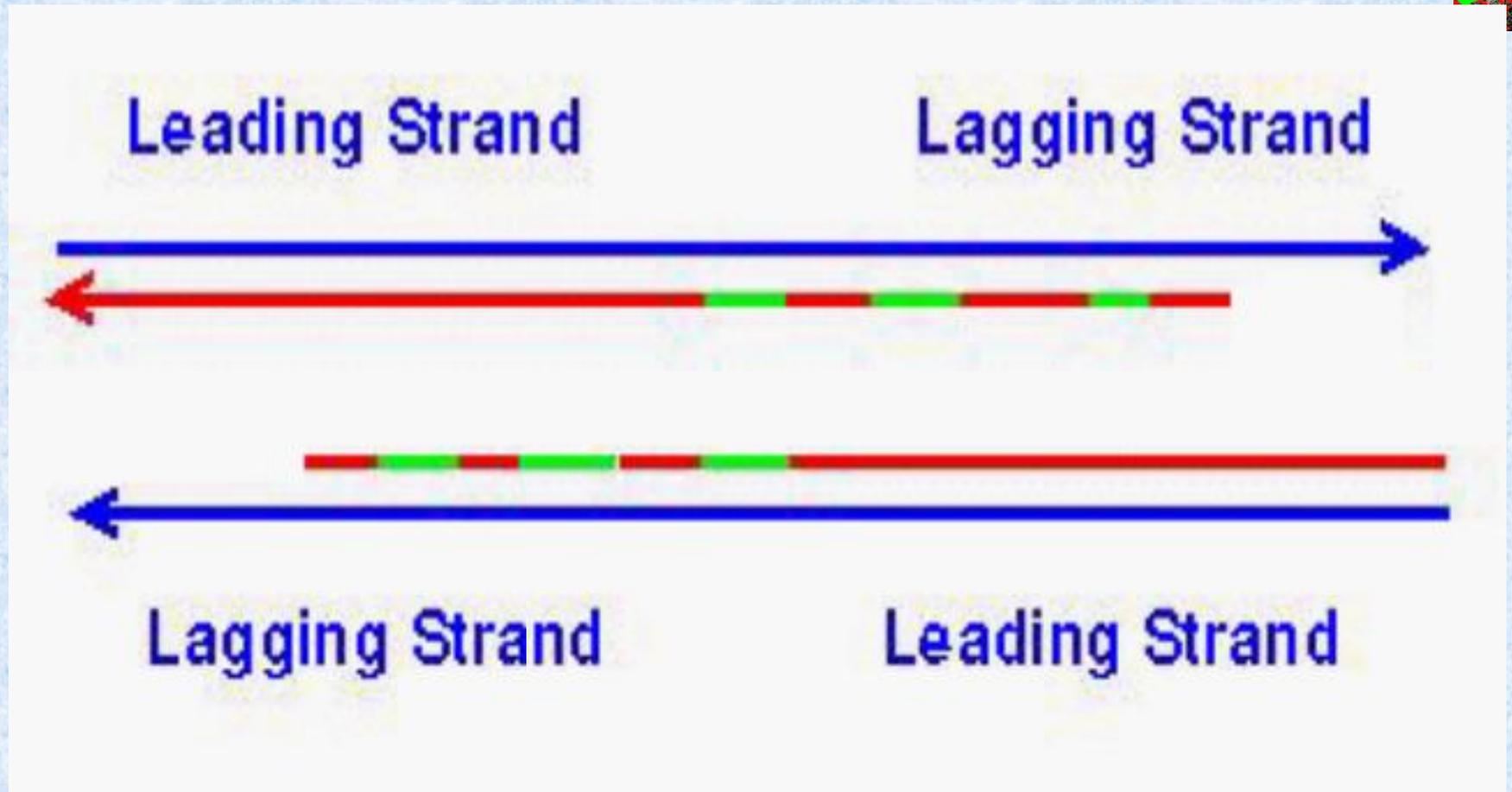


图 4-20 大肠杆菌复制终止区域的结构

2、细菌(E.coli)DNA每个细胞周期只复制一次





? 环状DNA复制是否存在这样的问题,为什么?



(1) 线状 DNA 的复制 5' 末端短缩的解决模式

a、从开始就采取环化的形式 —— λ 噬菌体

b、象 T7 噬菌体一样采取连环分子的形式

利用自身线性 DNA 末端的重复序列 ——

通过末端互补形成连环分子

c、最直接的办法 —— 引入蛋白质直接从末端起始复制

如 —— 腺病毒-2、phage Φ 29、脊髓灰质炎病毒

d、痘病病毒的末端由发夹结构连接

复制完成后错切连接



3.6. 真核生物DNA的复制 (DNA replication in Eukaryote)





1、复制概况

a、多个复制元（multiple replicon），双向复制

b、复制元相对较小(13-900kb),

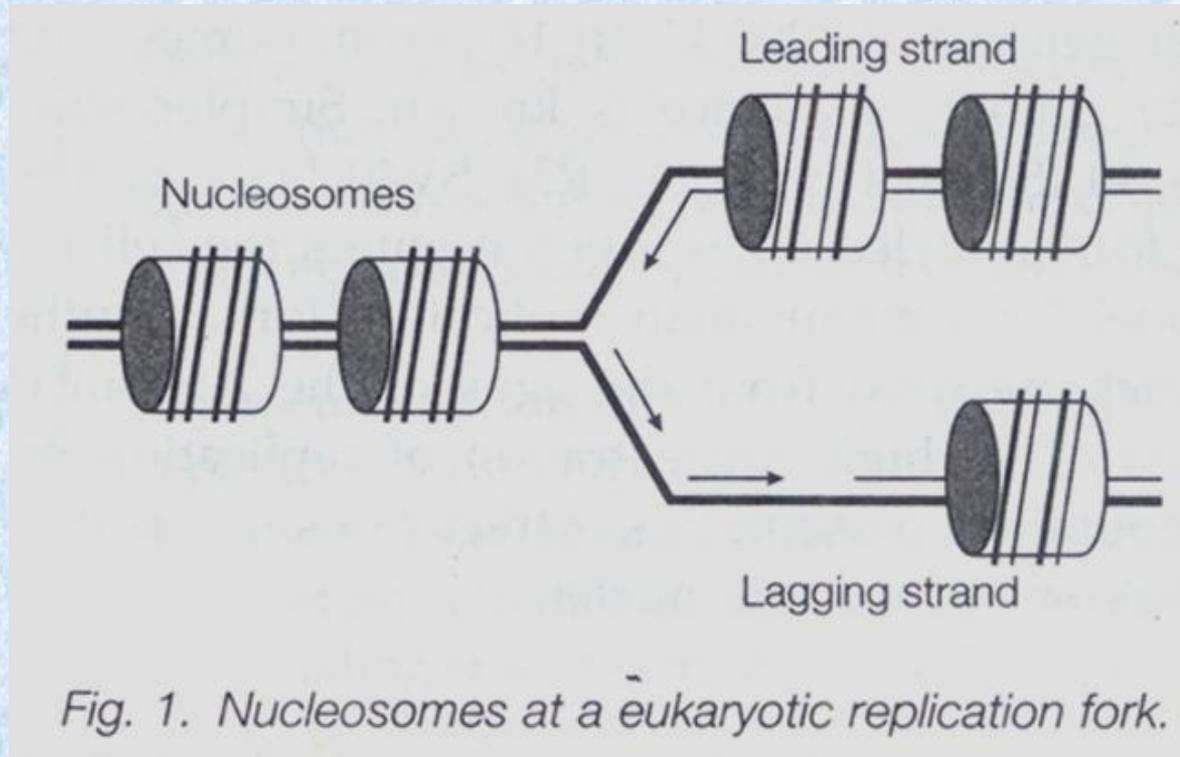
复制速度较慢,大约

500~5000bp/min

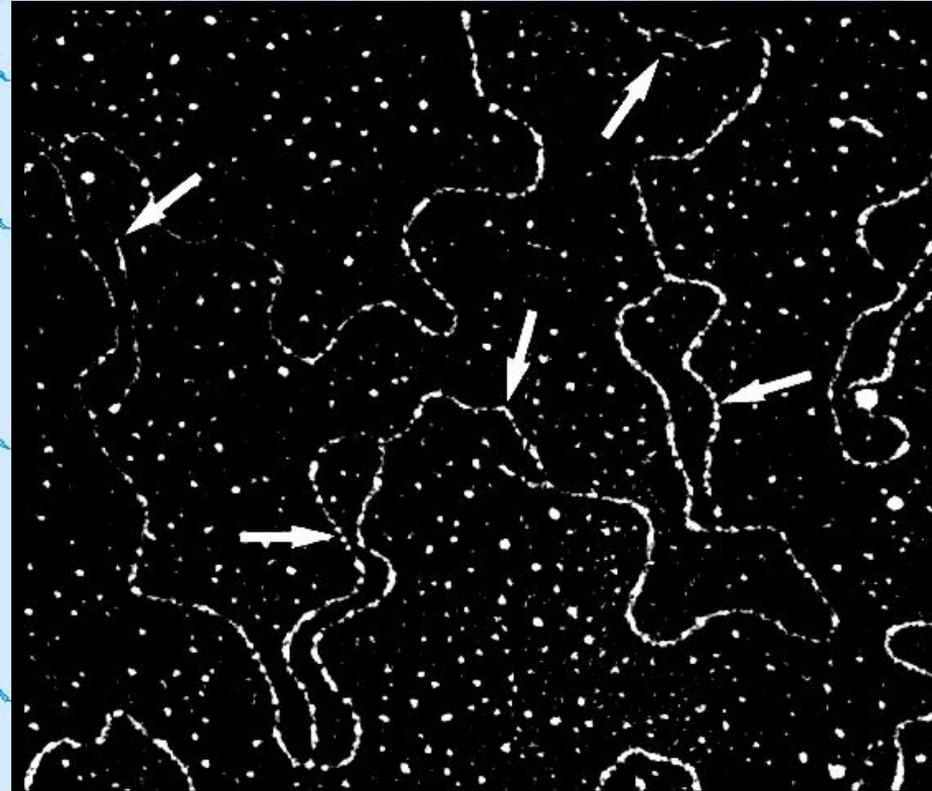
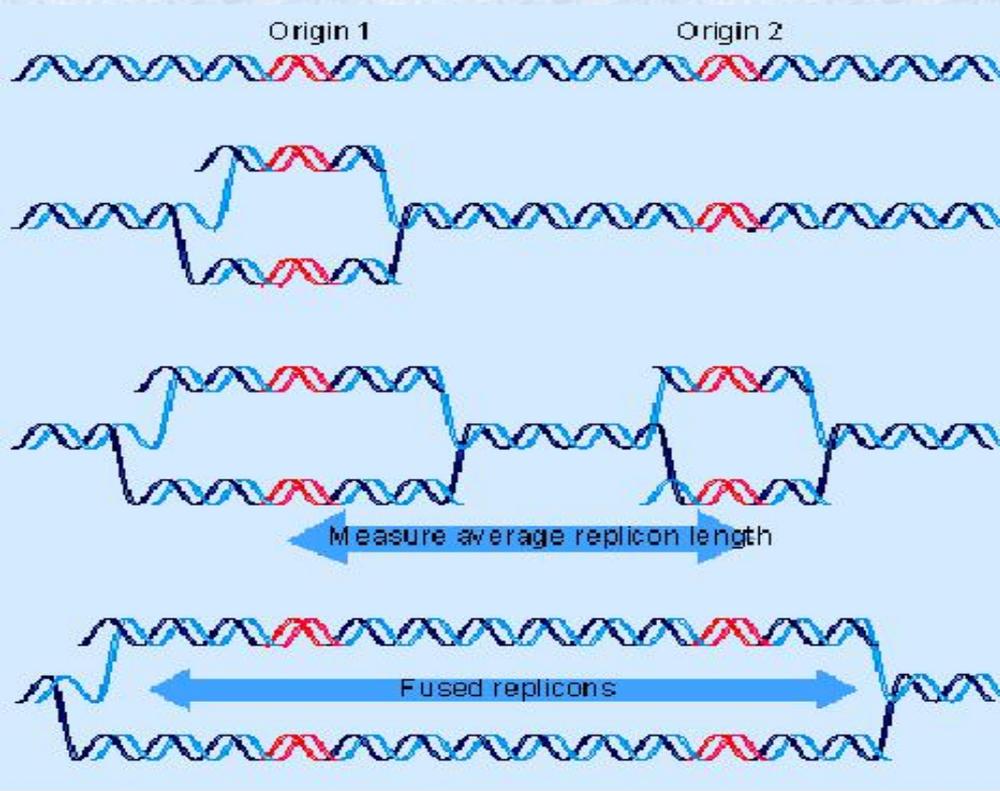
(3000bp/min)

冈崎片段100~200NT

c、复制终止通过复制叉的相遇而终止



multiple replicon



例；果蝇 5000 replicons 平均 40Kb（酵母）

哺乳动物 平均100Kb



2、真核生物的DNA聚合酶

α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 γ 五种

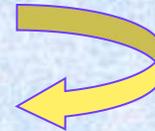
	α	β	δ	ϵ	γ
位置	核内	核内	核内	核内	线粒体
合成功能	与引发酶结合	修复	合成前导链	合成,修复后随链	复制
3'—5'校正活性	NO	NO	Yes	Yes	Yes

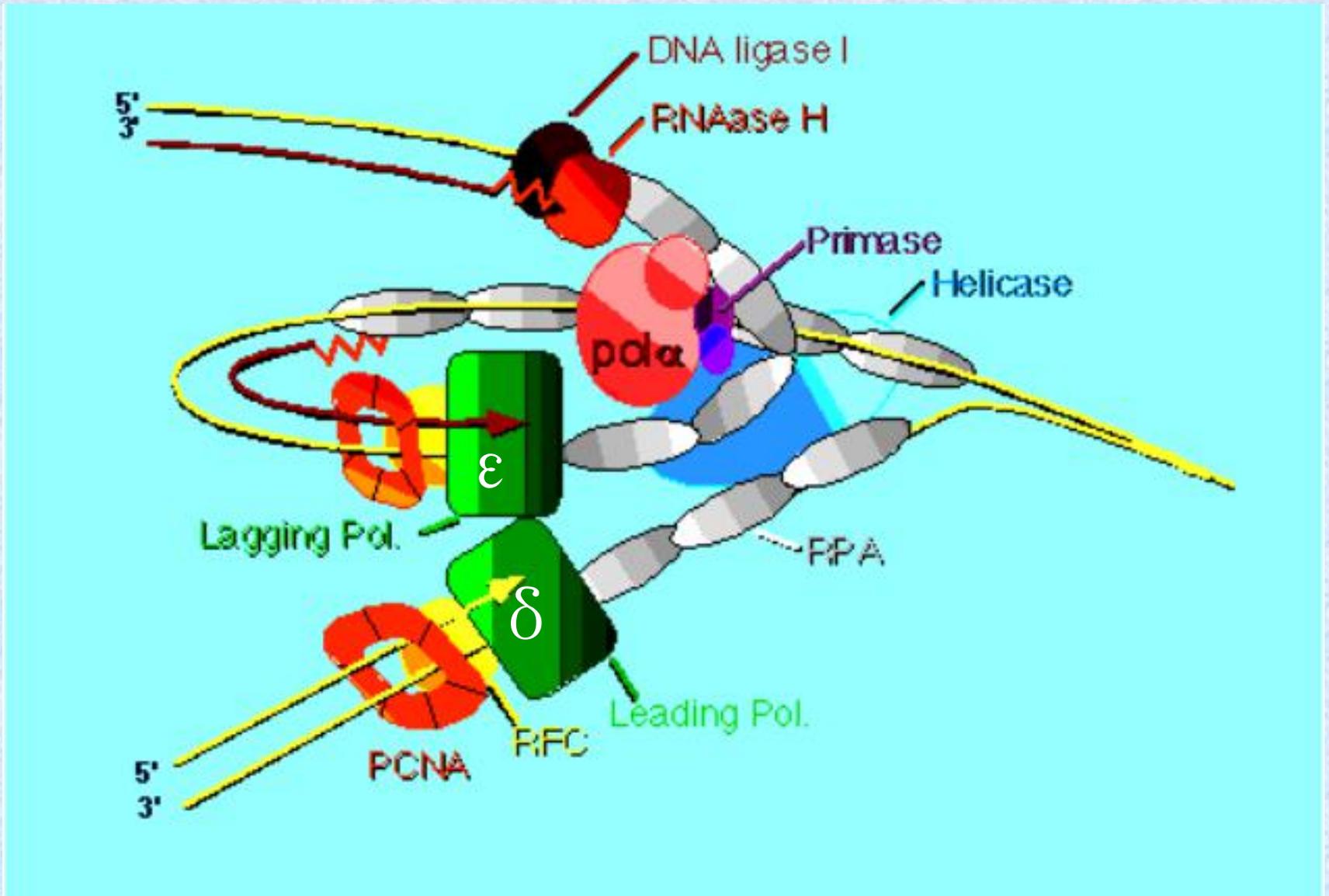


真核生物DNA复制的引发酶

- 引发酶（primase）： 50-60kd
- DNApol α + primase形成紧密的复合物
- 作用方式为阵发性的，每次作用拷贝6~15个核苷酸
- 既能利用rNTP，又能利用dNTP
- SV40体外DNA复制情况分析

6-9 Nt RNA as primer







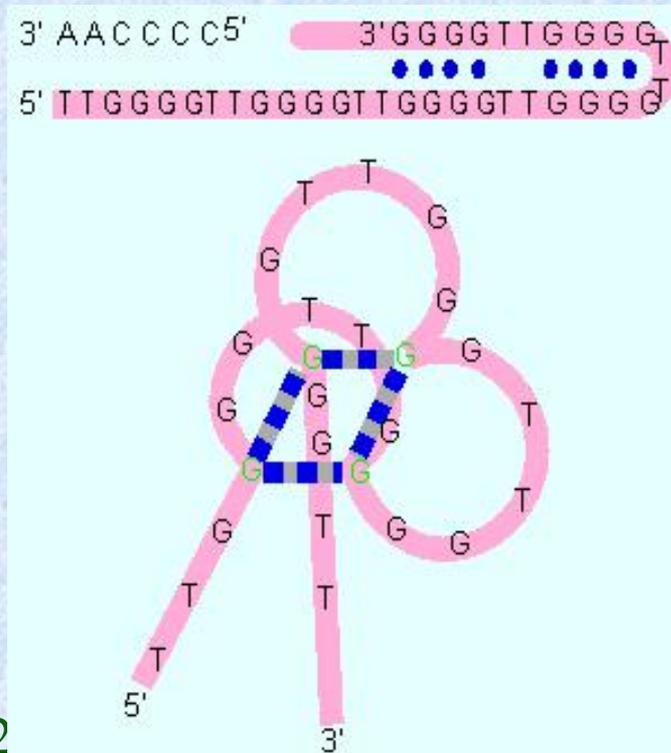
5、真核生物染色体 DNA 末端补齐模式

(1) 端粒 DNA (Telomer)

TTGGGG(T2G4)序列高度重复的末端

5' TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG 3' (富含 G 链)

3' AACCCC AACCCC AACCCC 5' (富含 C 链)





(2) 端粒酶 (Telomerase)

1985. Carol Greider & Blackburn, 1986. Gottchling

四膜虫 端粒酶 (telomerase) 将 T_2G_4 末端重复延伸

端粒酶———逆转录酶

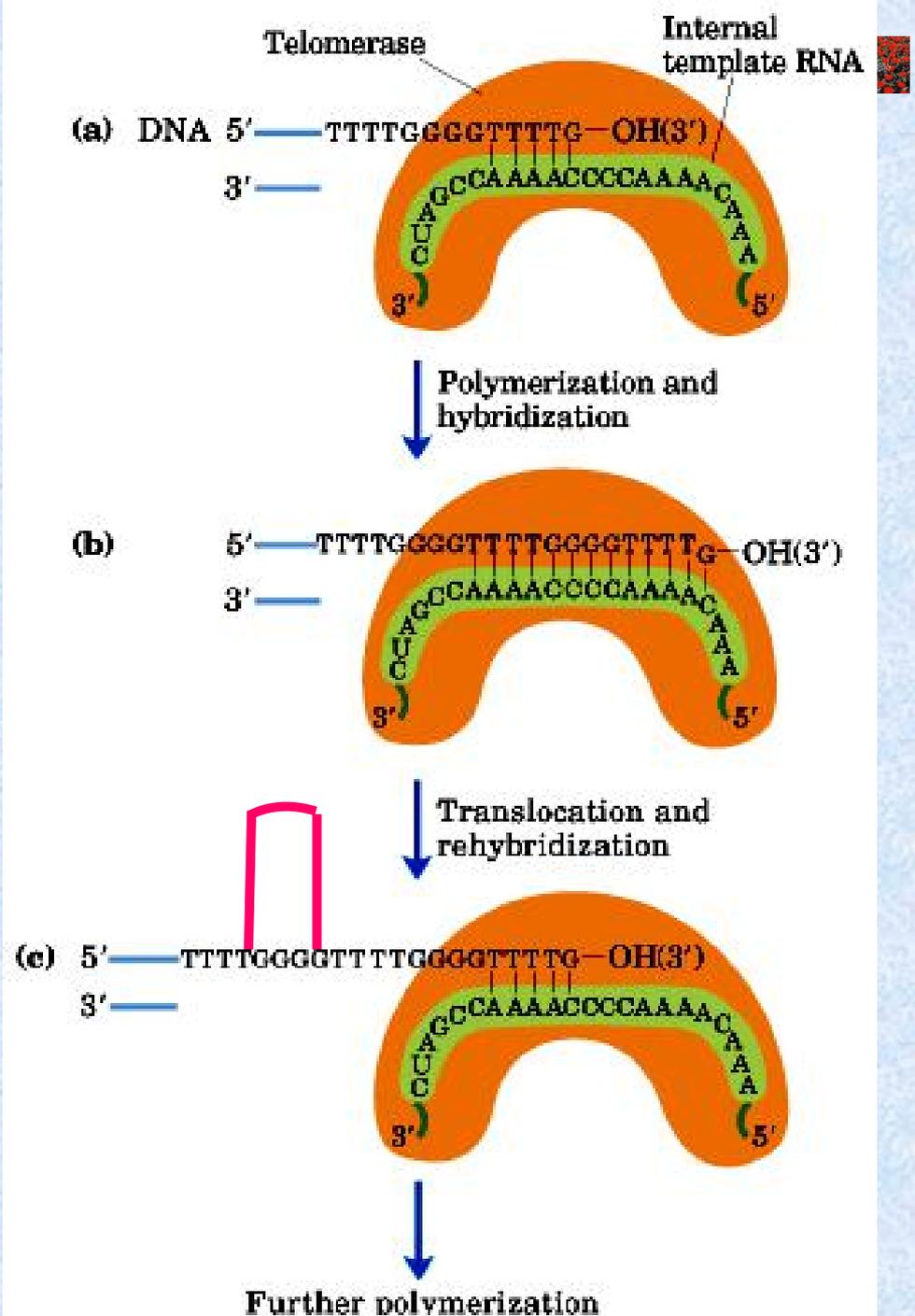
- a、核蛋白 (ribonucleoprotein RNP)
- b、含约长150NT的RNA，其中含 1~5 拷贝的 C_xA_y 重复序列，是合成端粒 T_2G_4 的模板
- c、延长的 $3'-T_2G_4$ 端 (一段cDNA) 作为 $5'$ -端DNA合成的模板

(3) 补齐过程

通过TG链的回折形成
发夹结构 (G·G氢键)

———尺蠖模型

→→实现端粒酶位置的
调整





G链 -T₂G₄-----TTGGGGG TTGGGGGTTGGGGGTTGGGGGTTGGGGG

C链--A₂C₄-----



G = G hoogsteen 氢键
三螺旋DNA

G链 -T₂G₄-----TTGGGGG tt g g g g t t g g
C链--A₂C₄----- AACCCCAA g g g g t t g g

or

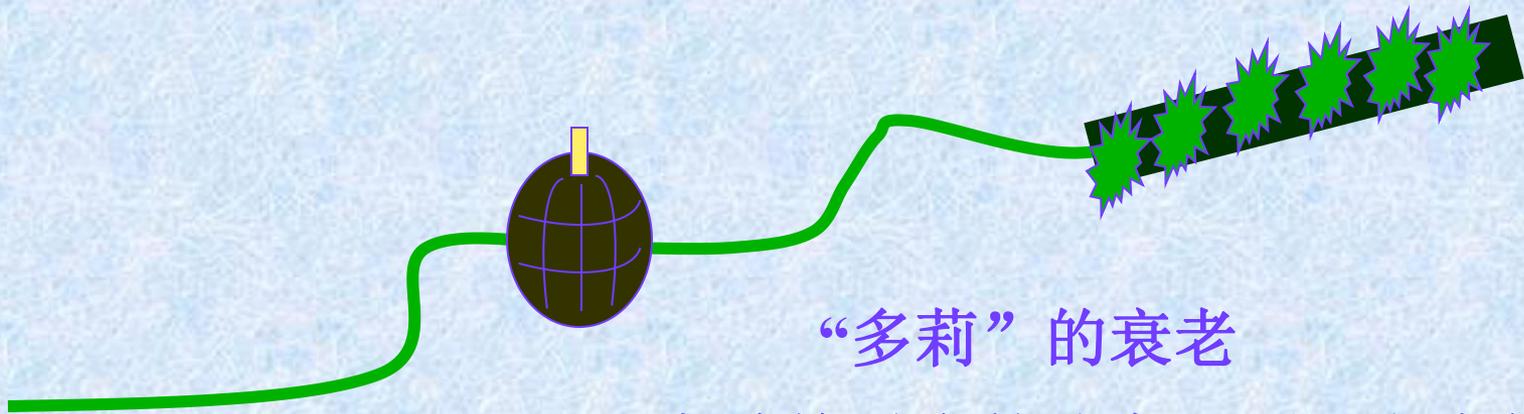
G链 -T₂G₄-----TTGGGGG TTGGGGGTTGGGGGTTGGGGGTTGGGGG

C链--A₂C₄----- DNA pol CCAACCC Primase CCAACCC





实验表明——人体细胞通过监测失去的端粒的重复数而计数细胞分裂次数，当端粒长度下降到**某一临界值**时，细胞终止分裂——衰老、死亡



“多莉”的衰老

研究端粒丢失的速率，预测人类的寿命

XX > XY why?

研究推测端粒酶与肿瘤的关系



4、真核生物复制过程中的核小体结构

- (1) 组蛋白的合成在细胞核中与DNA复制同步进行
- (2) 且组蛋白八聚体在DNA复制时并不离开亲本

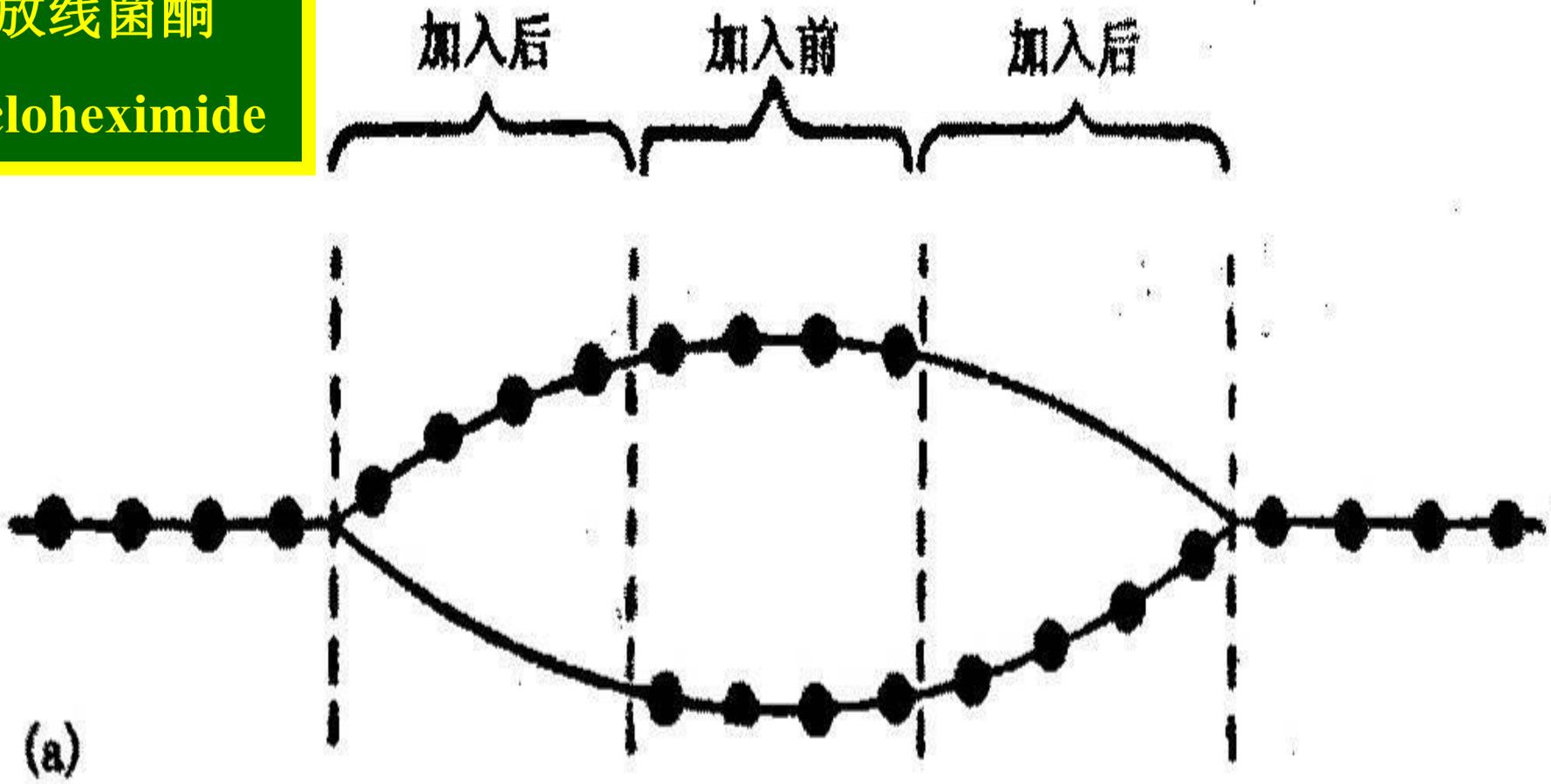
DNA链

蛋白质合成抑制剂实验 所证实



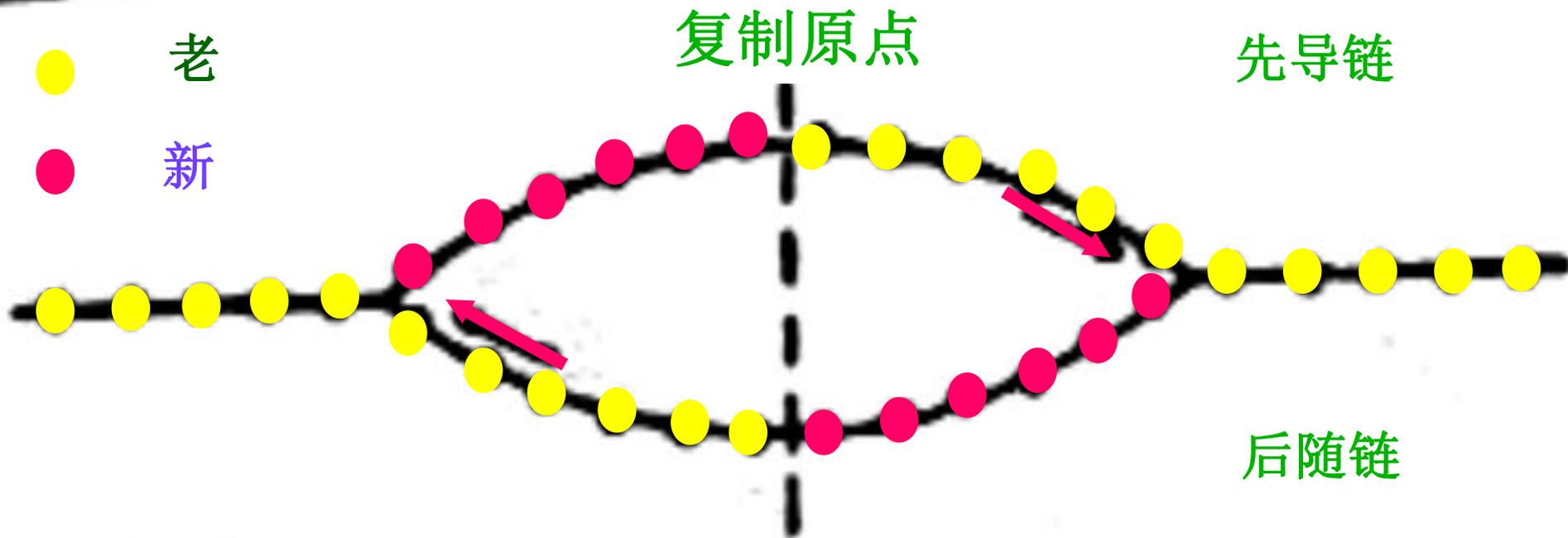


放线菌酮
cycloheximide





- (3) 组蛋白八聚体以全保留方式传给子代
- (4) 组蛋白八聚体与先导链结合



新老八聚体在子代链上的分布

原核生物和真核生物DNA复制的比较



a、复制子的大小 (Sizes of replicon) :

Yeast or fly 平均 40 kb
Mammals 平均 100 kb
Prokaryotic DNA: >1000 kb

b、冈崎片段(Okazaki fragments):

Prokaryotic DNA: 1000-2000 nt
Eukaryotic DNA: 100-200 nt

c、复制速度 (Rate of replication) :

Eukaryotic DNA: ca. 3,000bp/min (50/sec)
Prokaryotic DNA: 50,000bp/min (900/sec)





相同点:

1. Semi-conservative replication
2. Semi-discontinuous replication
3. DNA helicase, Ssb
4. RNA priming
5. 校正阅读 (Proofreading)

不同点:

1. 复制起点 (单、多)
2. 复制子 (大小、多少)
3. 复制起始的许多因子的控制 (复制周期的重叠与否)
4. 复制叉移动的速度 (900/50 nt/S)
5. 冈崎片段的大小
6. 端粒和端粒酶
7. DNA聚合酶 Polymerases