

第三章、DNA复制

第二节：DNA复制的过程 (起始、延伸、终止)

吴建新
华南师范大学

复制单位--复制子

复制起点到复制终点的DNA区段，是复制的单位。

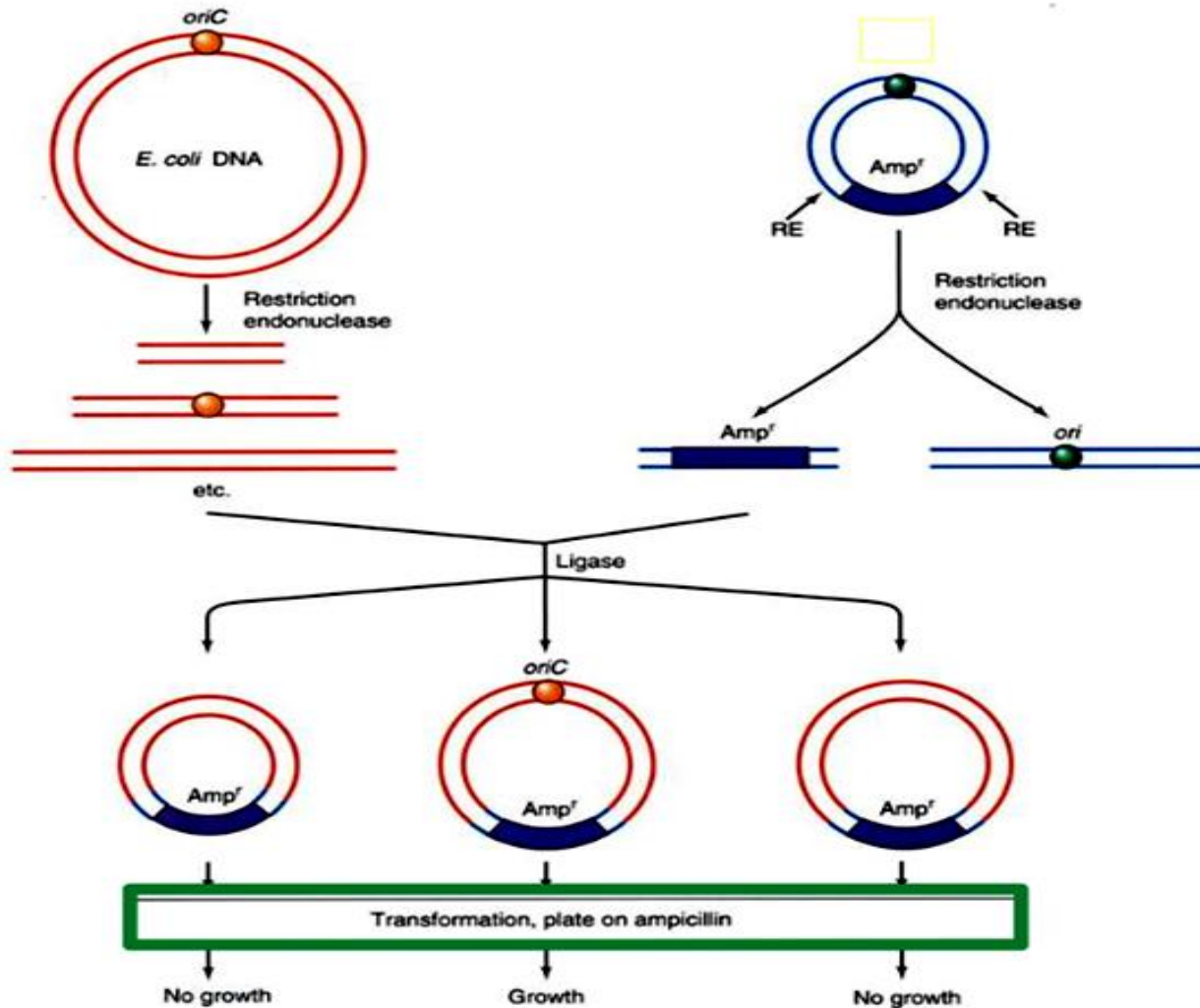
起始：DNA聚合酶、引物等在复制起点形成有活性的起始复合物

复制起点：DNA上的一个相对固定的位点，是复制起始的位置。只有拥有复制起点的DNA才能自我复制。

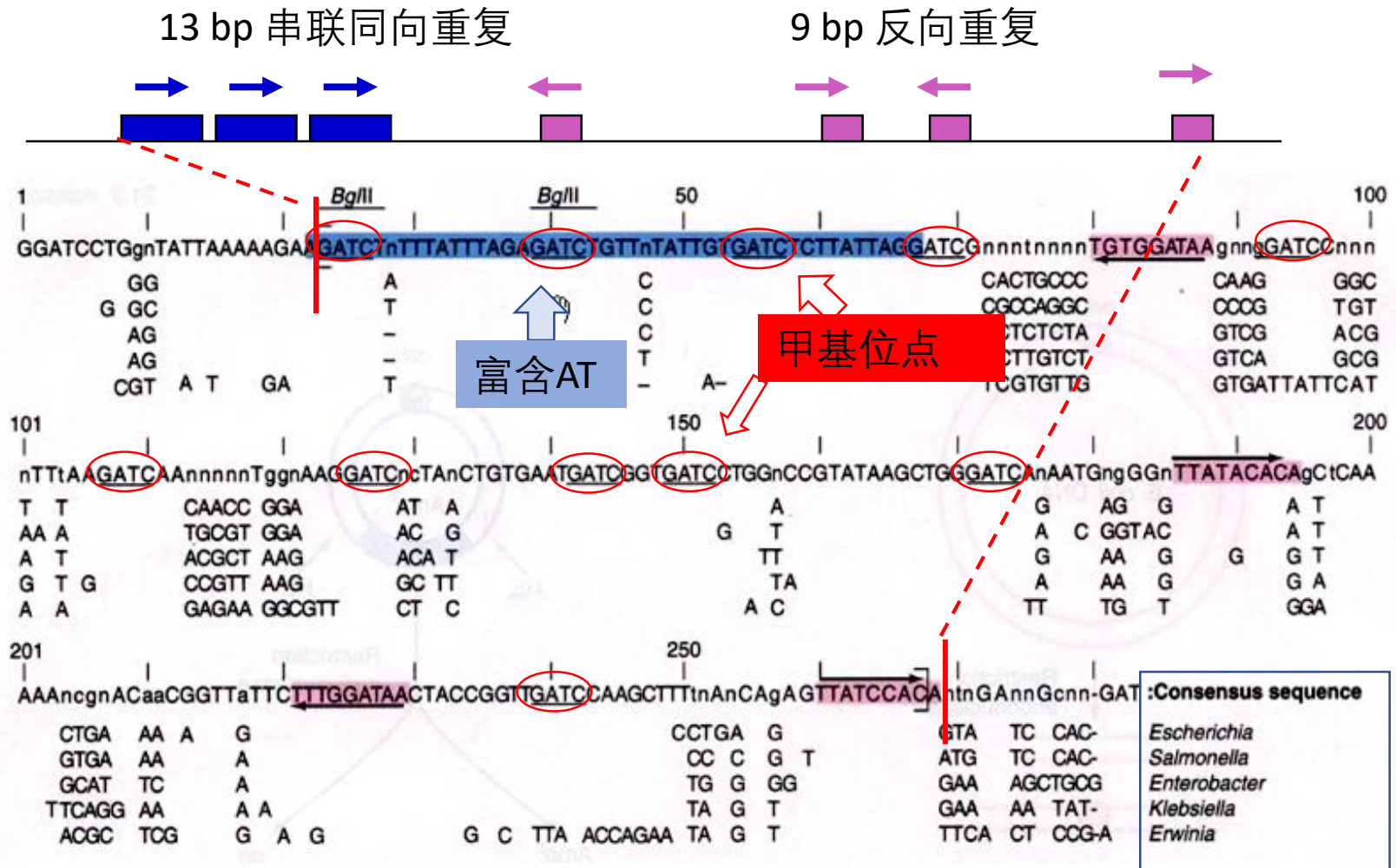
延伸：复制体形成、单脱氧核糖核苷酸的添加导致新链的延长

终止：子代双链分子的分离

2.1 复制起点的分离



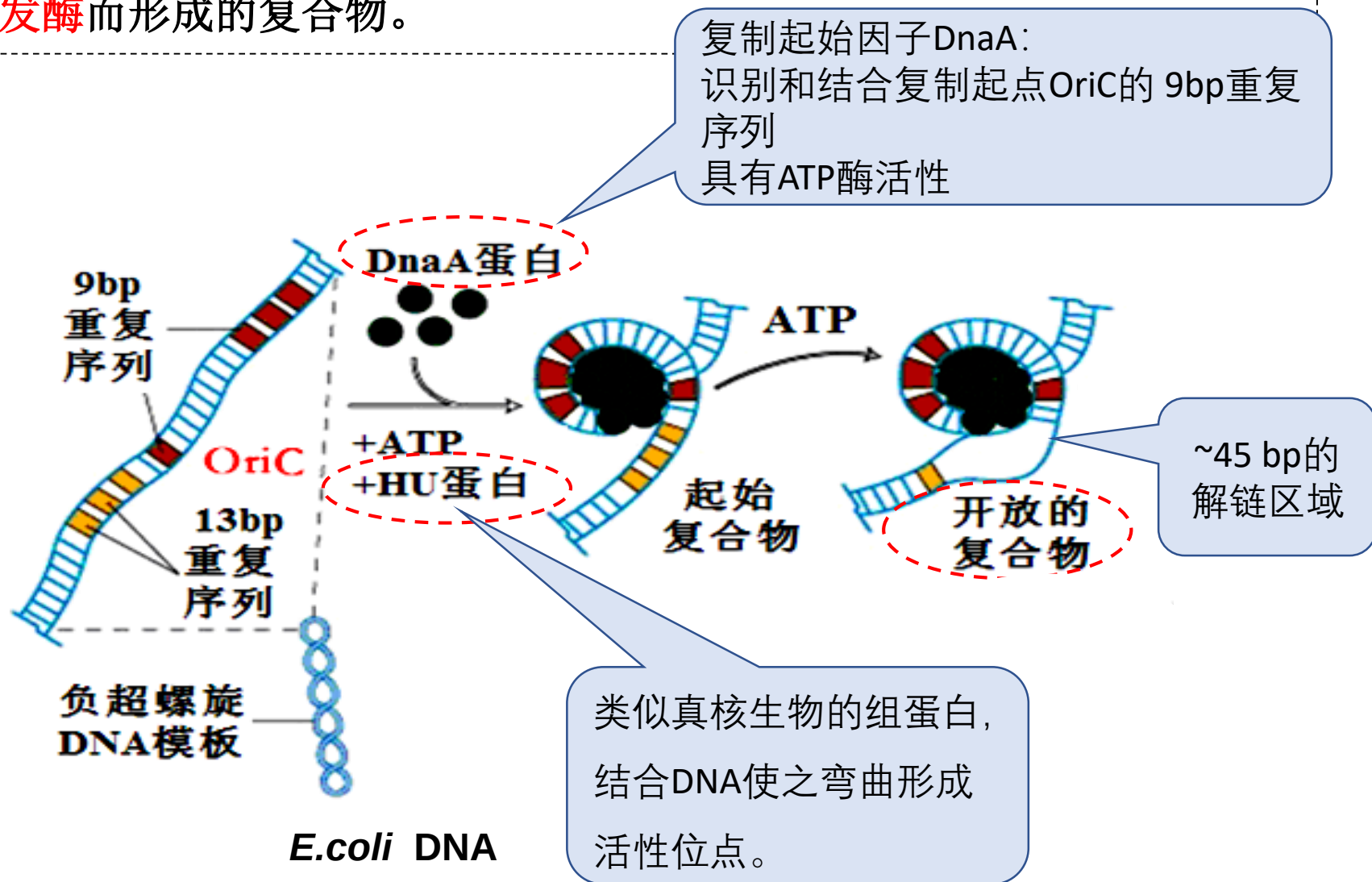
复制起点的序列和组织结构特征

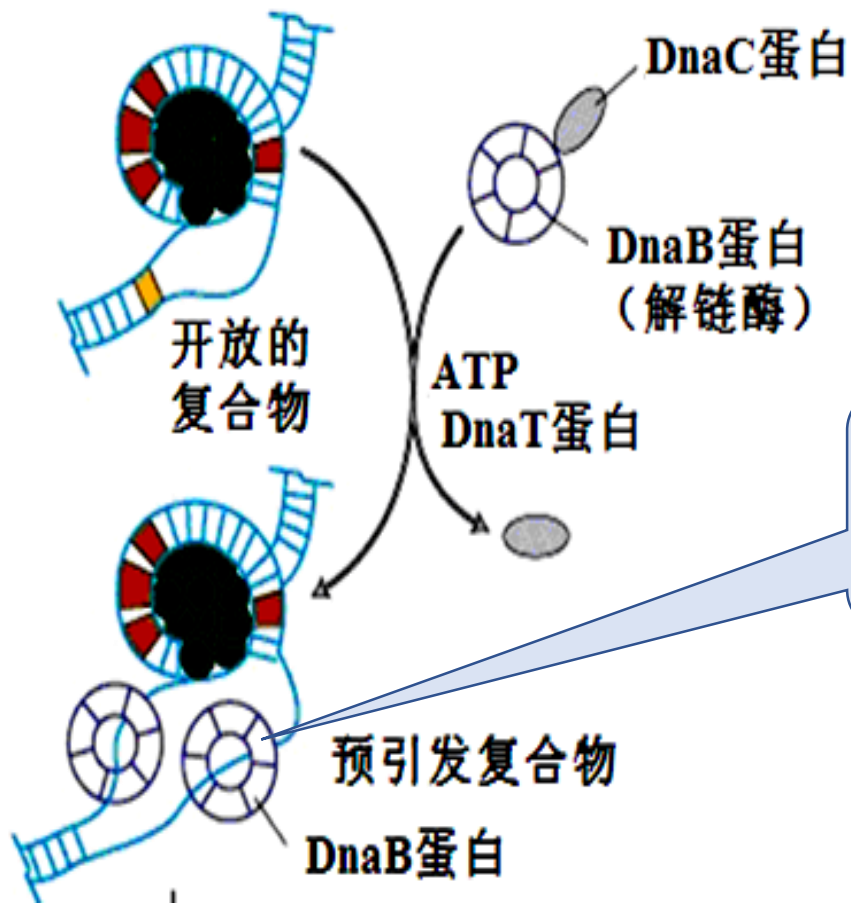


E. coli 的复制起点Ori C与其它细菌的复制起点的序列比较

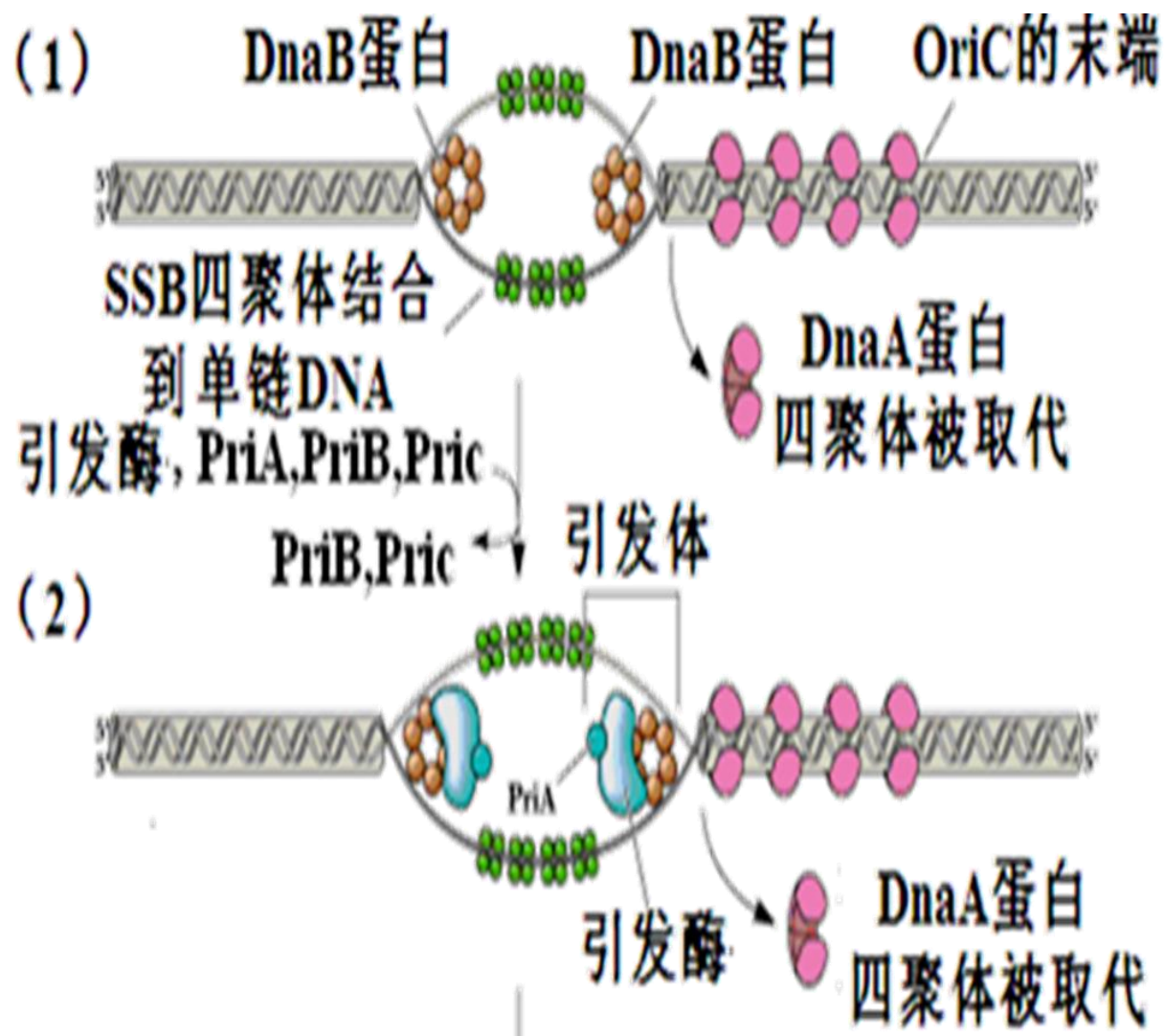
2.2复制起点组装

引发体：在复制起点由多种不同的相关蛋白组合成**引发前体**后**结合引发酶**而形成的复合物。

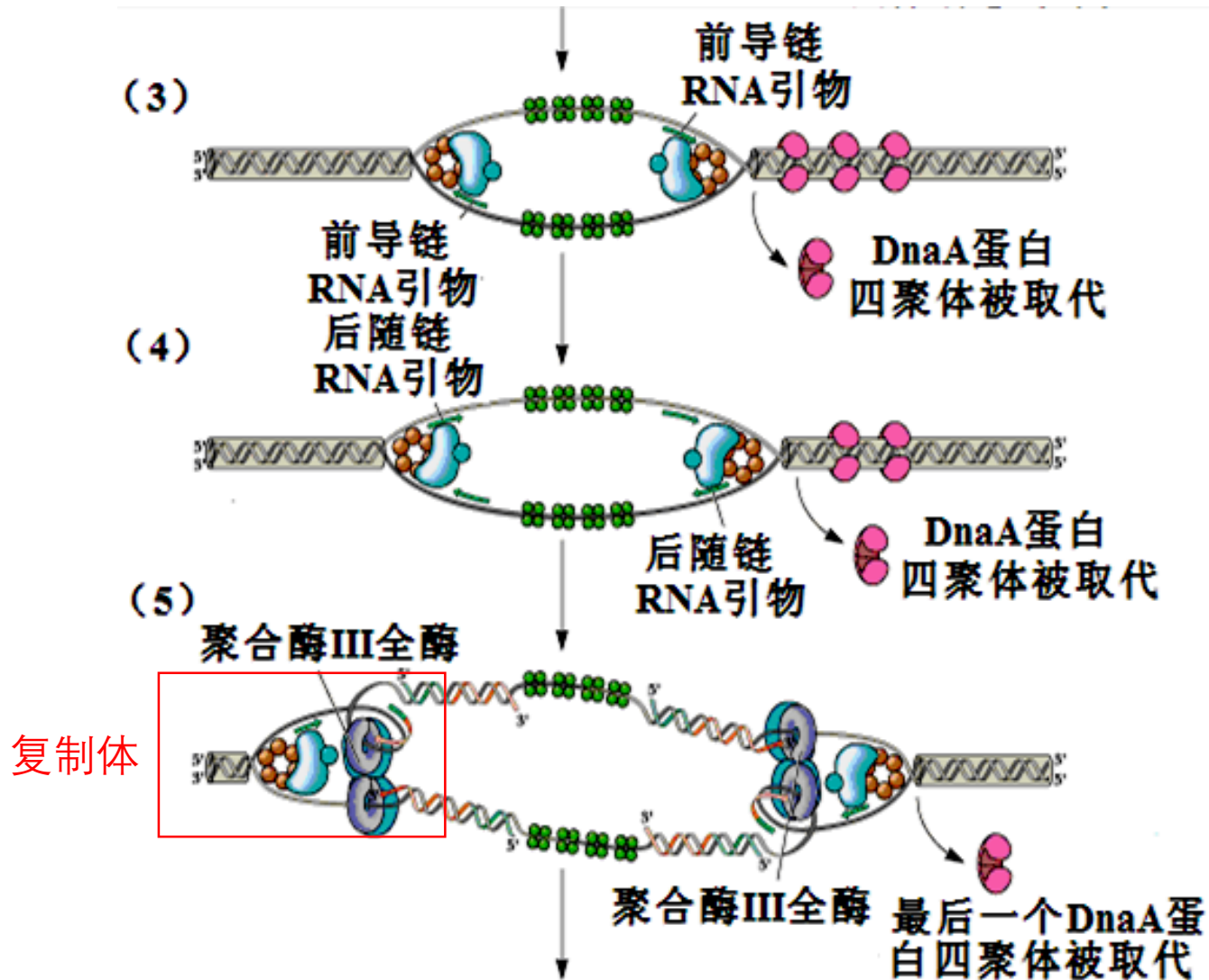




引发前体 Preprimosome



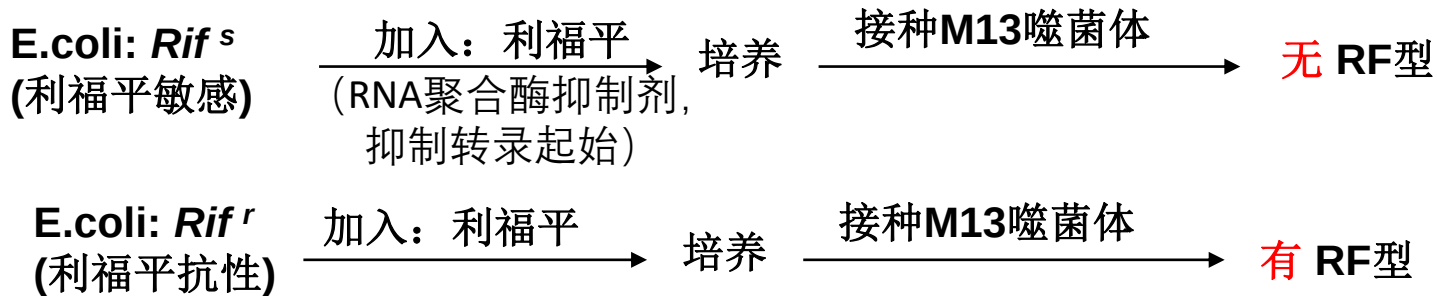
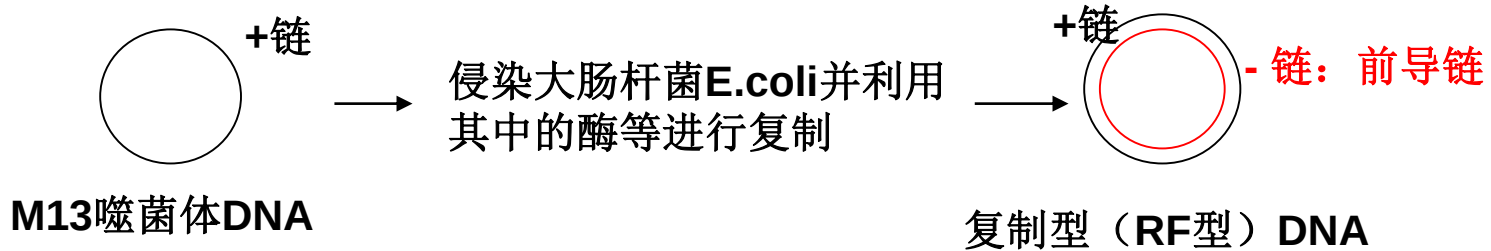
复制体的形成和新链的延伸



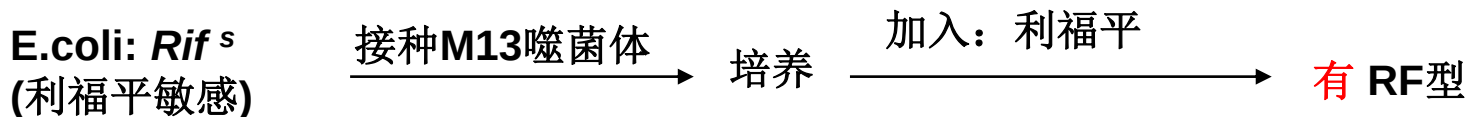
复制体：由含有DNA聚合酶及引发体，SSB，连接酶等组成的复合体

2.3 DNA复制的引物：RNA

实验1：前导链引物



(以上实验证实M13 DNA的复制需要RNA的合成)



(该实验证实当复制已经启动后, RNA分子合成与否不会影响复制的进行)

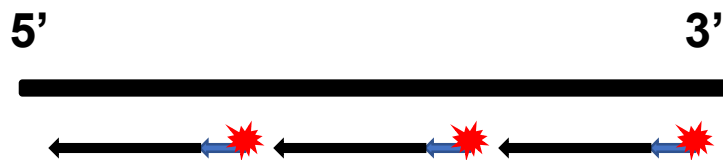
实验结论

- 前导链DNA合成需要RNA作为引物，且该RNA引物的合成由RNA聚合酶负责（利福平抑制RNA聚合酶）
- 一旦启动复制，RNA聚合酶对DNA复制没有影响

实验2: 冈崎片段的引物

E.coli 菌株	RNaseH
a, e	—
d, h	+

→ 用 ^{32}P 标记GTP



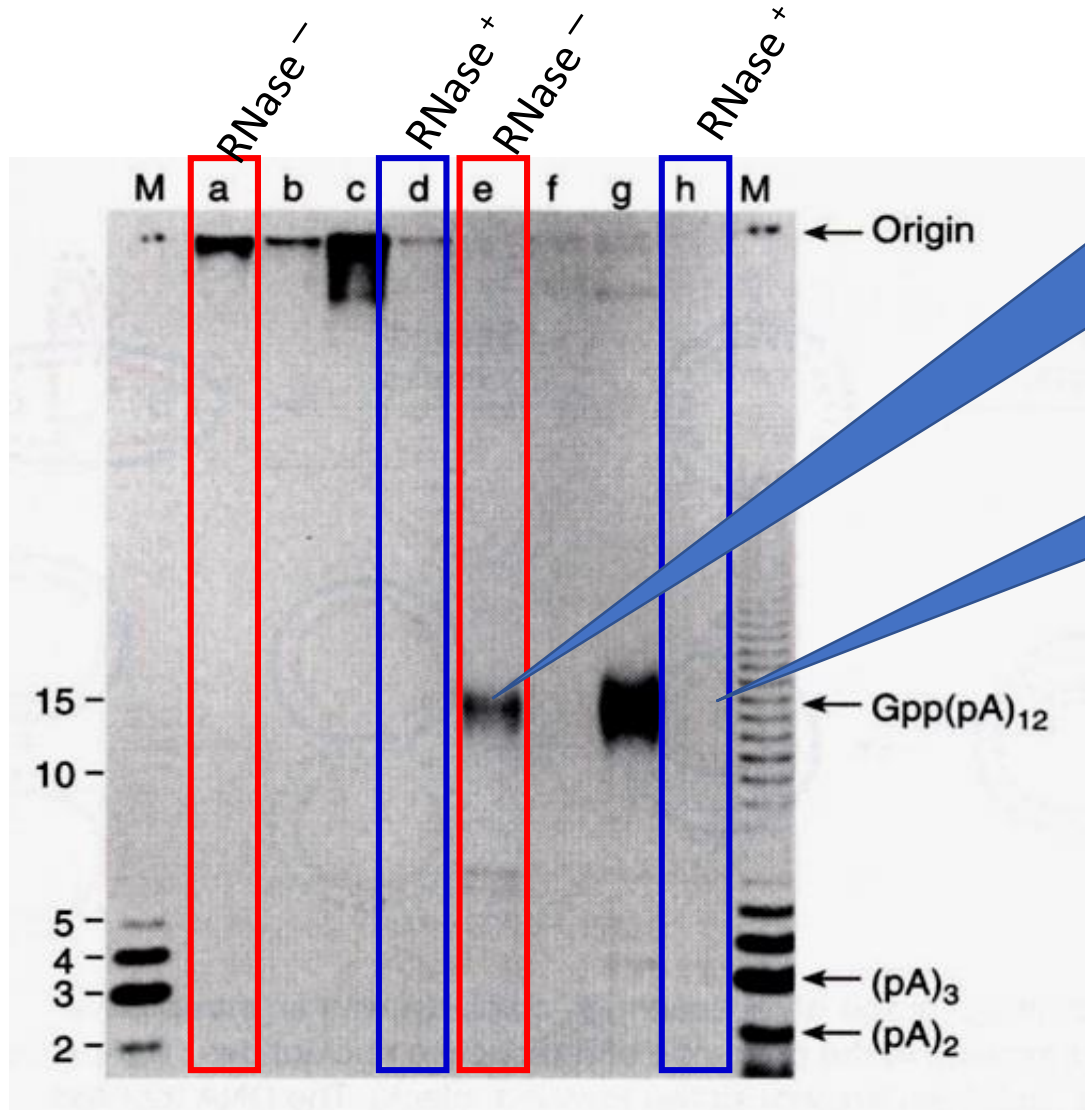
复制, 分离提取冈崎片段

DNase I 酶切

预期结果: 若引物和复制产物都是DNA, 那么DNase I 将对它们进行酶切降解, 对酶切产物进行电泳时不出现条带!

DNaseI
处理前

DNaseI
处理后



DNA被降解后尚存一些
10~12 bp的含有标记片段!

但是, 在RNaseH酶存在下,
这些片段消失, 表明它们是
是RNA, 即引物是RNA!

结论:

冈崎片段的引物——也是RNA!

进一步的研究证实：

- 后随链合成的引物：

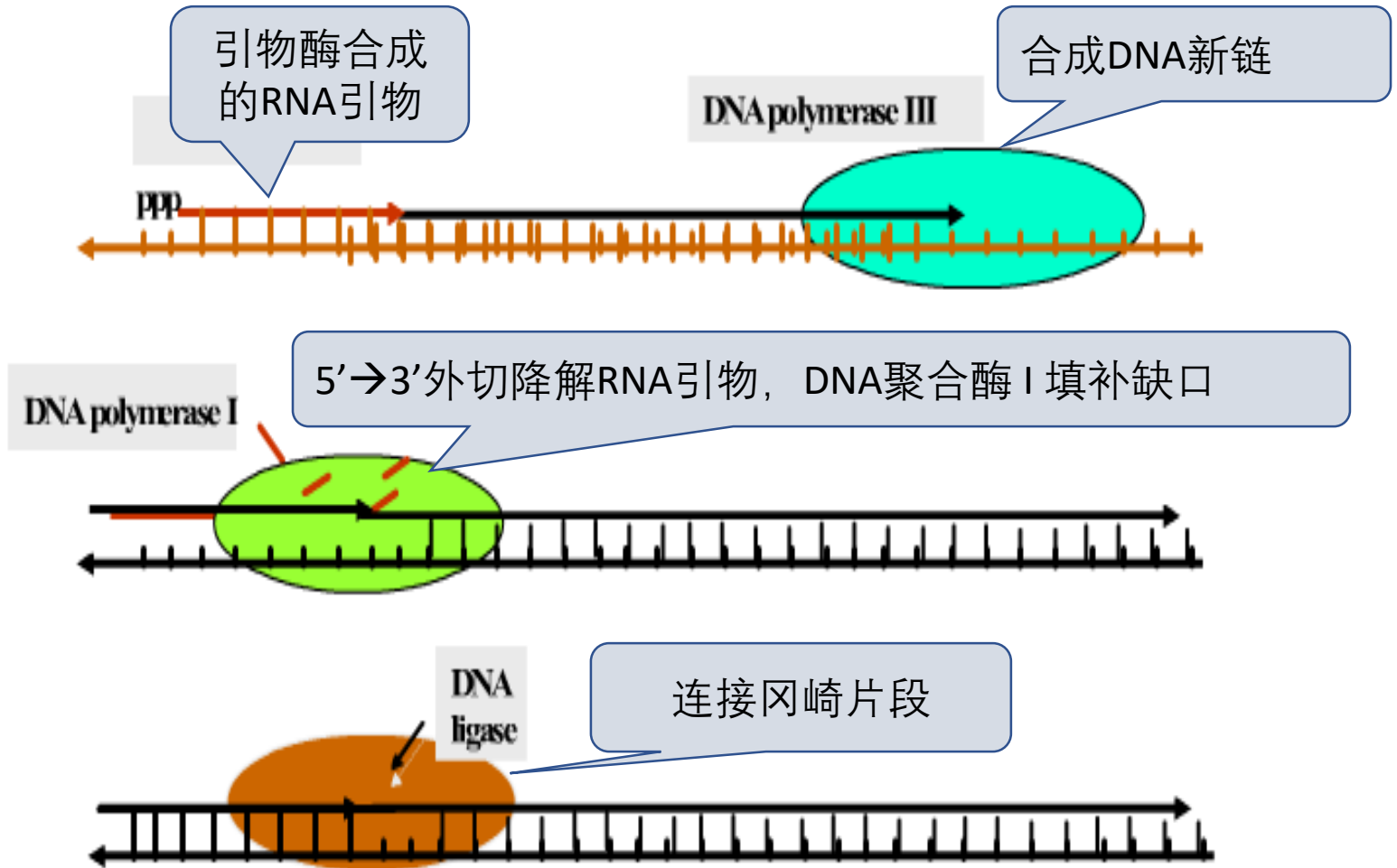
- 该RNA引物由**引物酶**合成（注意：前导链引物是RNA聚合酶合成的）
- 引物酶由 *dnaG* 基因编码，**对利福平有抗性**，不同于转录中的RNA聚合酶。
- 引物在完成冈崎片段合成后被降解；冈崎片段之间的缺口由DNA聚合酶 I 通过缺口平移的方式填补，并通过 DNA 连接酶连接成长的DNA片段。

DNA聚合酶 I $\xrightarrow{\text{枯草杆菌蛋白酶}}$ Klenow 大片段 + 小片段

5'→3' 的聚合功能；
低效率的3'→5'的外切功能

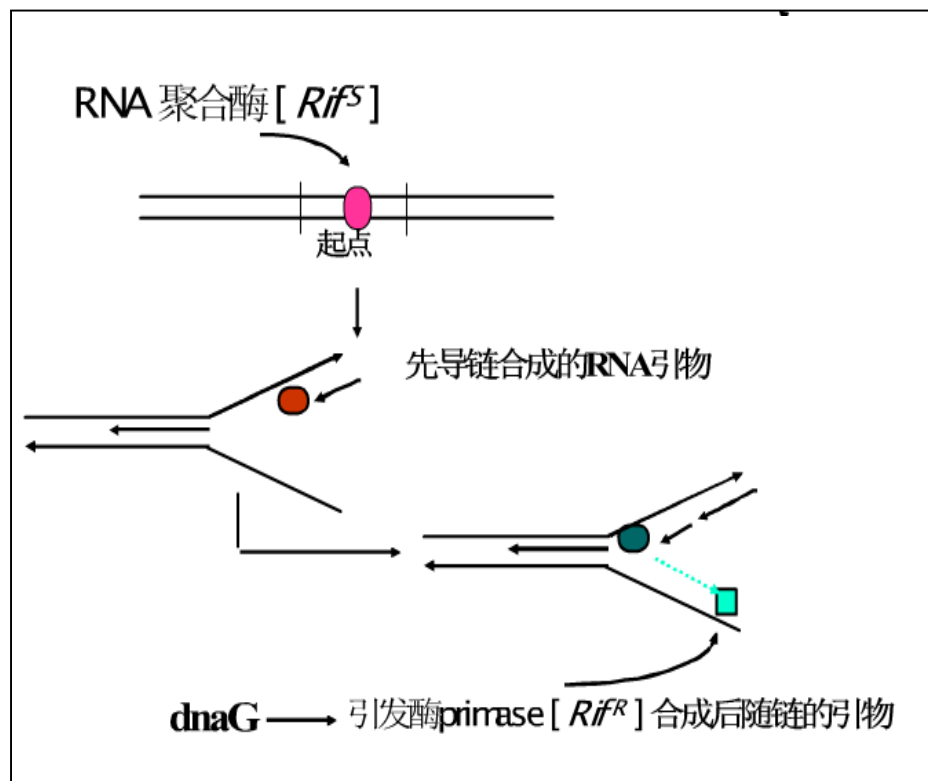
5'→3'的外切功能

引物的去除和冈崎片段的连接

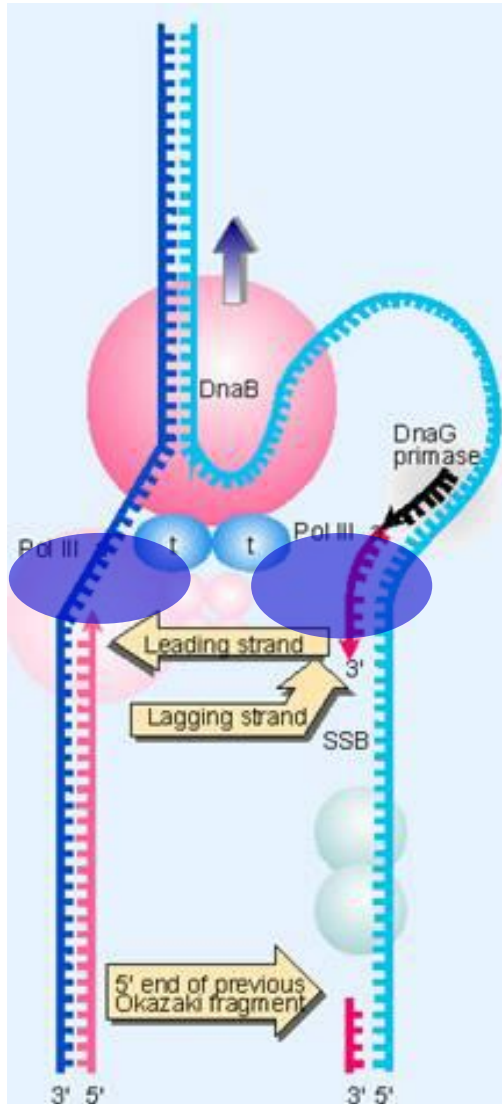


2.4 复制的转录激活

- DNA新链的合成需要RNA引物；
- 复制起始前，利用RNA聚合酶合成前导链的RNA引物
- 前导链DNA一旦开始合成，就不再需要RNA聚合酶；
- 随着前导链合成，后随链模板逐渐暴露，至1000~2000bp时开始利用引发酶合成冈崎片段的RNA引物，从而启动后随链的合成。



2.5 DNA复制的回环模型



- ◆ 每一个复制叉均含有一个 DNaseII 的二聚体，它可以同时催化前导链和后随链的复制。
- ◆ 后随链的模板DNA以倒退的方式从DNaseII中将模板DNA释放出来，新冈崎片段的DNA单链与前导链一样，以相同的方向完成复制。

3.6 DNA聚合酶

大肠杆菌种主要有 DNA聚合酶 I, II, III, IV, V

DNA聚合酶 I

- 不是DNA复制中起主要作用的聚合酶。
- 3' → 5'核酸外切酶活性：复制中的错配修复（从正在延伸的DNA新生链的3'端切除错配的核苷酸），保证DNA复制的准确性
- 5' → 3'核酸外切酶活性：切除冈崎片段5'端的引物，并聚合补齐缺口。

DNA聚合酶 II

- 活性很低，仅相当于聚合酶 I 的5%；也不是复制中主要的聚合酶。
- 在DNA修复中其作用。

DNA聚合酶 III

-  多亚基酶，其生物活性形式为二聚体
-  是DNA复制中的主导聚合酶；
-  活性高，合成速率：50000个核苷酸/min；是DNA聚合酶 I 的15倍，是DNA聚合酶 II的300倍。

DNA 聚合酶IV 和V

- 聚合酶IV：由dinB基因编码；
- 聚合酶V：有umuD'2C基因编码
- 主要在SOS类型的DNA修复中起作用。

真核生物的DNA聚合酶

- 已发现的有15种以上
- 哺乳动物中主要有5种： α ， β ， γ ， δ ， ϵ

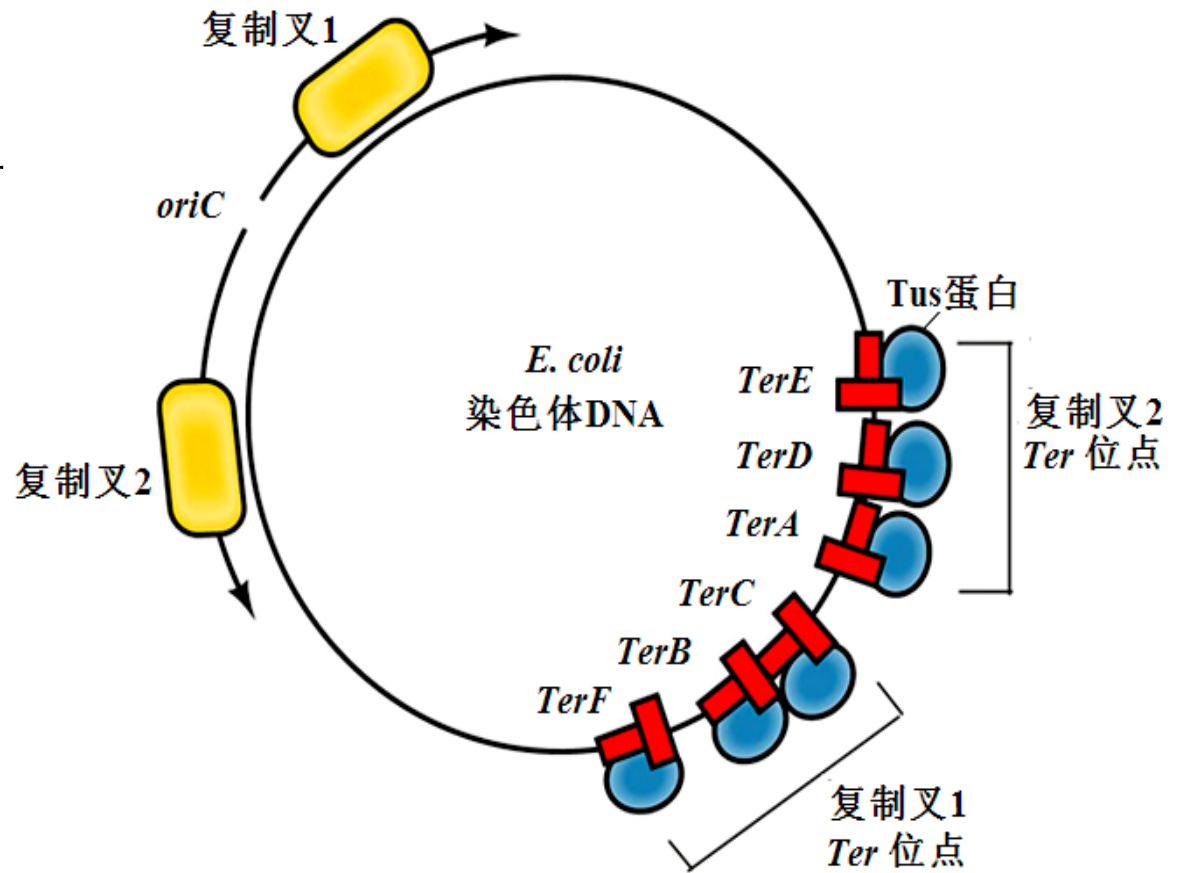
性质	DNA 聚合酶 α	DNA 聚合酶 β	DNA 聚合酶 γ	DNA 聚合酶 δ	DNA 聚合酶 ϵ
亚基数	4	1	2	2-3	≥ 1
在细胞内 分布	核内	核内	线粒体	核内	核内(?)
功能	DNA 引物合 成	损伤修 复	线粒体 DNA 复制	主要 DNA复 制酶	损伤修 复
3'→5'外 切	无	无	有	有	有
5'→3'外 切	无	无	无	无	无

DNA聚合酶的共同特点：

- 以dNTP为底物
- 需要Mg²⁺激活
- 必须有模板链和3'-OH末端的引物链
- 链的延伸方向均为 5' → 3'

3.7复制的终止

- 终止：Tus蛋白+终止子
☞ Tus蛋白识别终止子，并抑制DnaB(解旋酶)的活性而阻止复制叉前进



小结

参与DNA复制的关键蛋白

- Dna A: 辨认复制起始位点;
- Dna B: 解旋酶(Gyrase), 属于拓扑异构酶, 可松弛DNA超螺旋, 有利于DNA解链;
- Dna C: 辅助DnaB使其在起始点上结合并打开双链间的氢键;
- SSB: 单链结合蛋白, 在复制中维持模板处于单链状态;
- RNA聚合酶(RNA Polymerase): 负责合成前导链的RNA引物;
- dnaG: 引发酶 (Primase), 复制合成后随链的RNA引物;
- DNA聚合酶I (DNA Polymerase I):负责复制中的错配修复, 切除冈崎片段5'端的引物, 并聚合补齐缺口。
- DNA聚合酶III (DNA Polymerase III):DNA复制的聚合酶
- DNA连接酶 (DNA ligase) 连接DNA链3'-OH末端和相邻DNA链5'-P末端, 形成磷酸二酯键, 从而把两段相邻的DNA链连接成完整的链;
- Tus蛋白: 识别终止子, 并抑制DnaB(解旋酶)的活性而阻止复制叉前进。