

## ➤ 基因重组交换的分子机制

变异是生物进化的重要因素之一

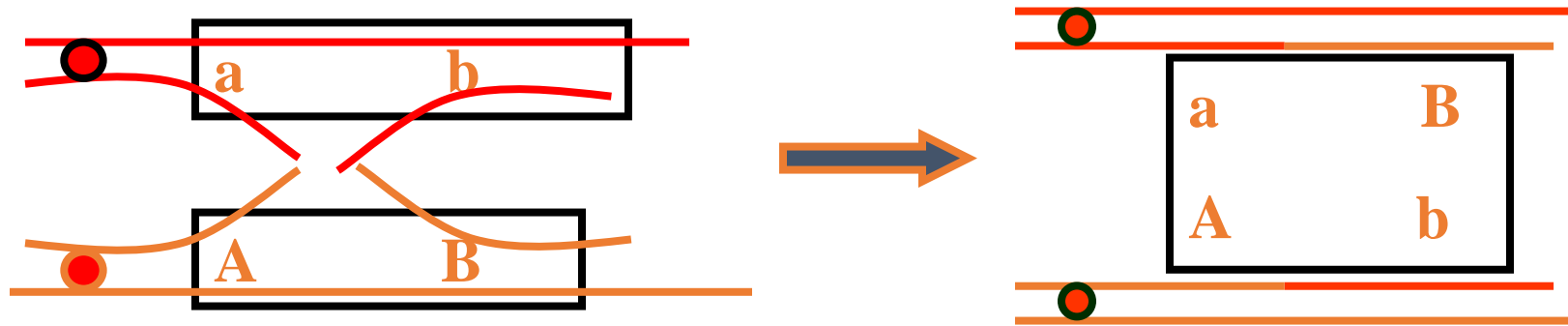
自然界的DNA分子均是重组体, 减数分裂过程中发生同源重组, 使得后代具有不同的特征, 进化出更好的对环境的适应机制

DNA双链断裂, 重组修复

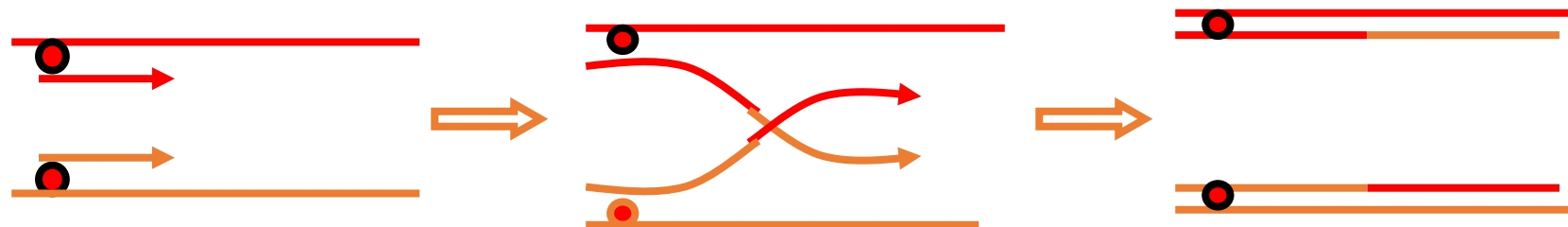
非同源末端链接	Non-homologous end joining (NHEJ)
同源重组	Homologous recombination (HR)

# 同源重组的假说

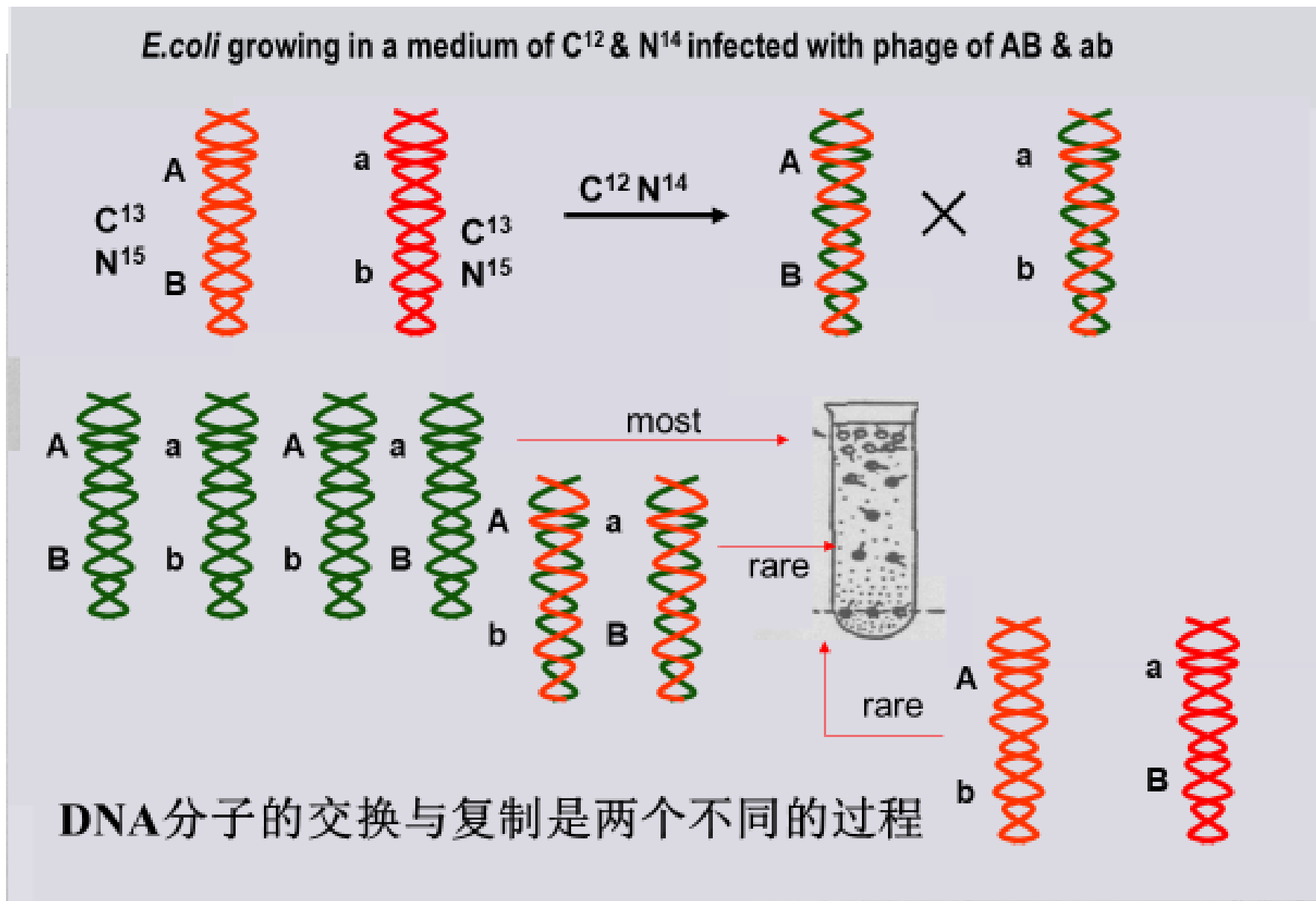
Breakage—rejoining (1937 Darlington)



copy-choice (1931 Belling)



# Meselson Weigle 噬菌体转导实验证实染色体断裂-错接模型



# 1930 Winkler 发现子囊菌孢子中的基因转换现象

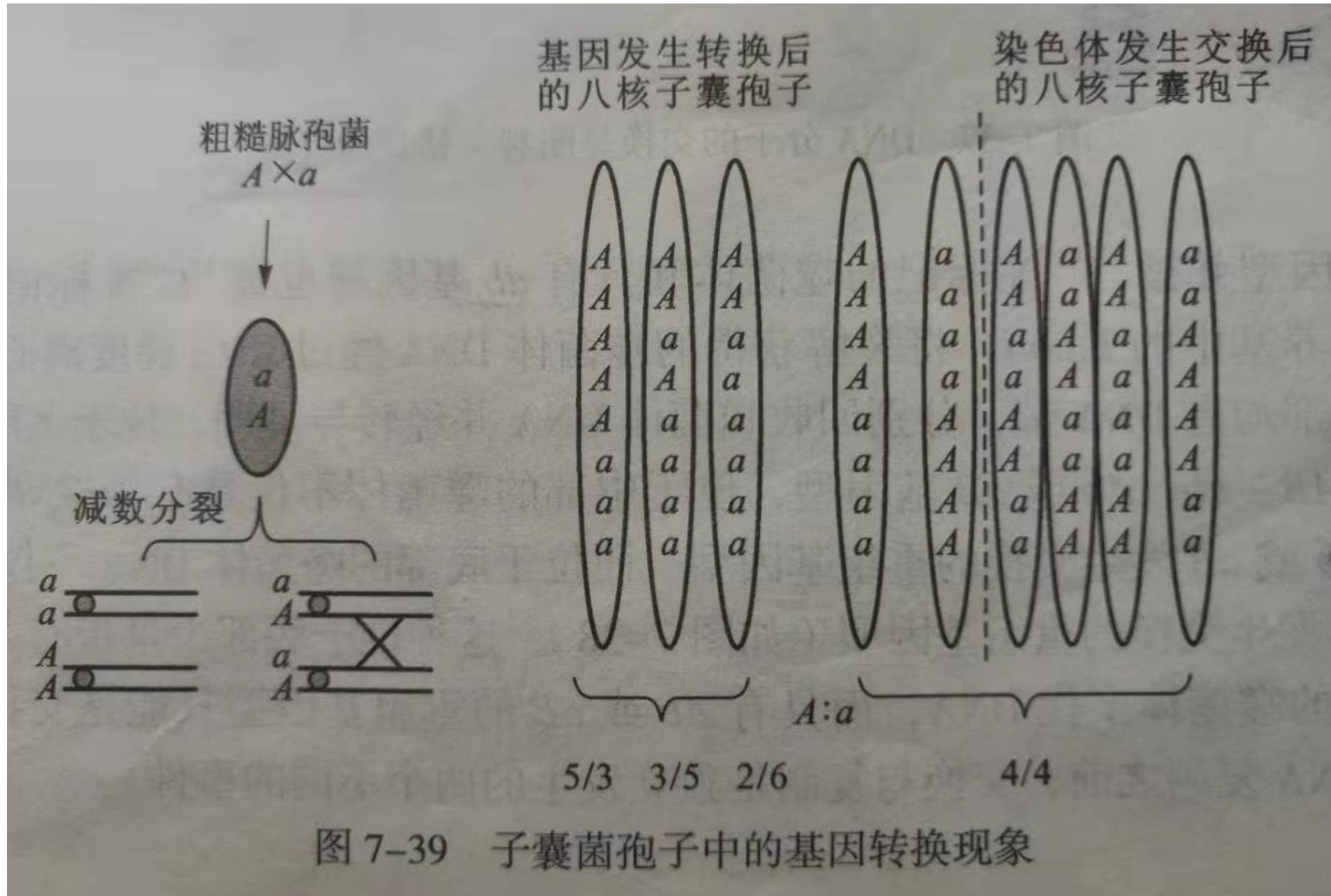


图 7-39 子囊菌孢子中的基因转换现象

基因转换	(Gene conversion)	染色体上的部分基因被同源染色体上的等位基因替换	双交叉
基因交换	(Gene crossover)	染色体的部分区段与同源染色体的另一部分连接	单交叉

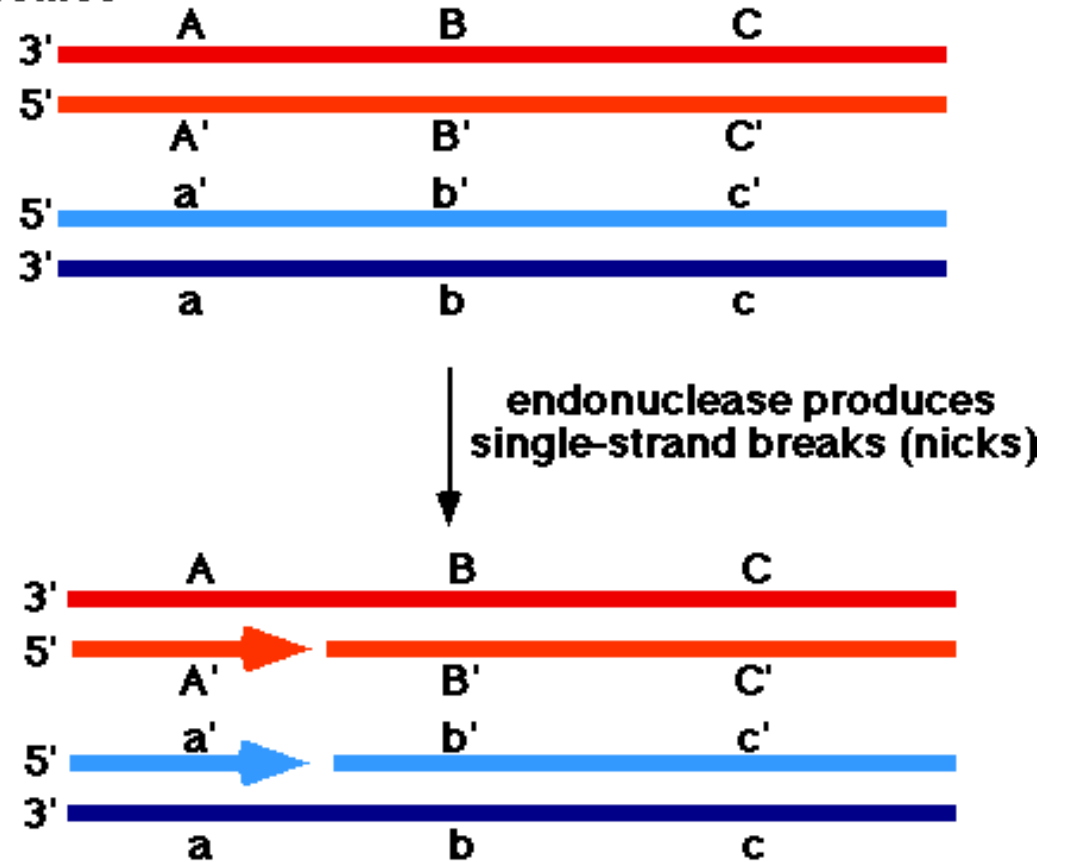
# 同源重组的分子机制 (6个步骤)

该模型由Robin Holliday 1964年提出  
Holliday 中间体模型

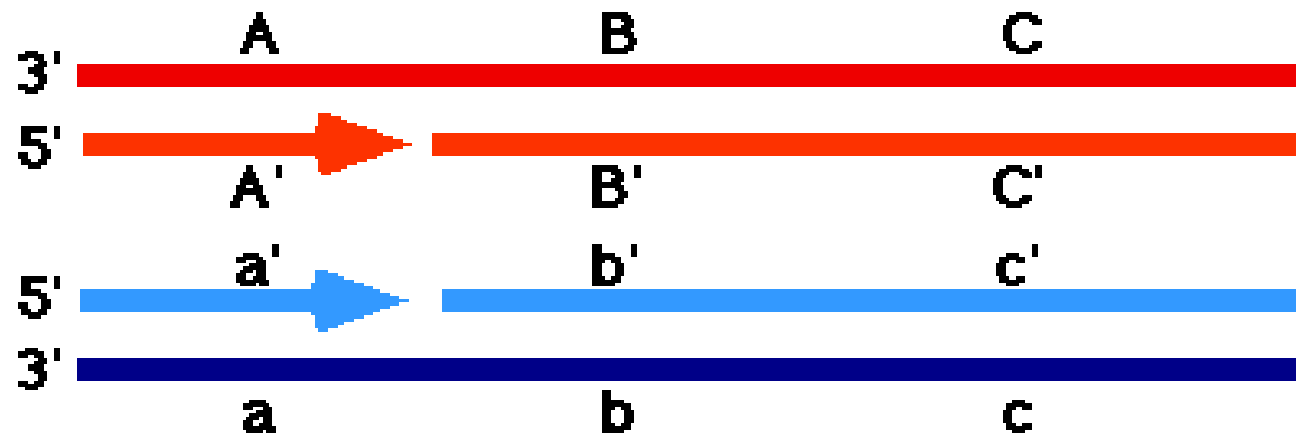
## 1) 同源DNA分子联会。

至少100个碱基对以上的序列完全相同或几乎完全相同

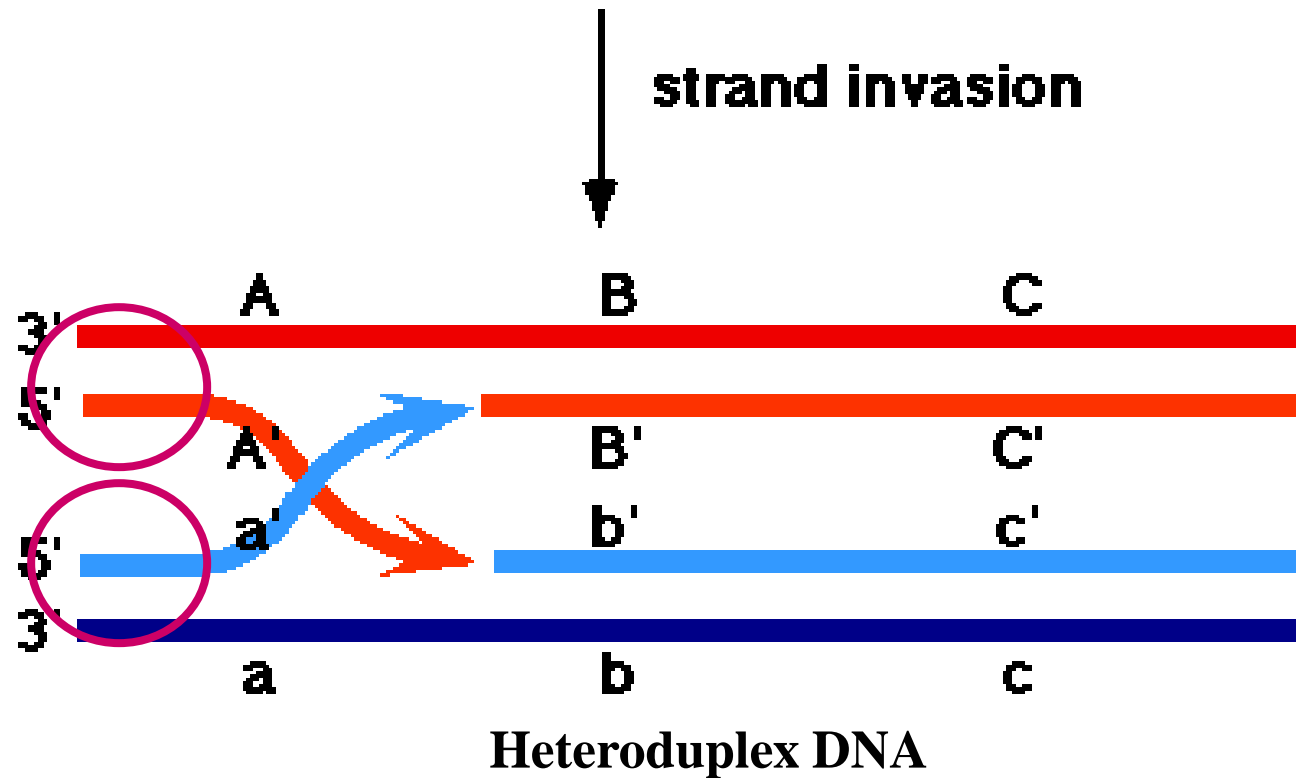
homologous  
chromosomes



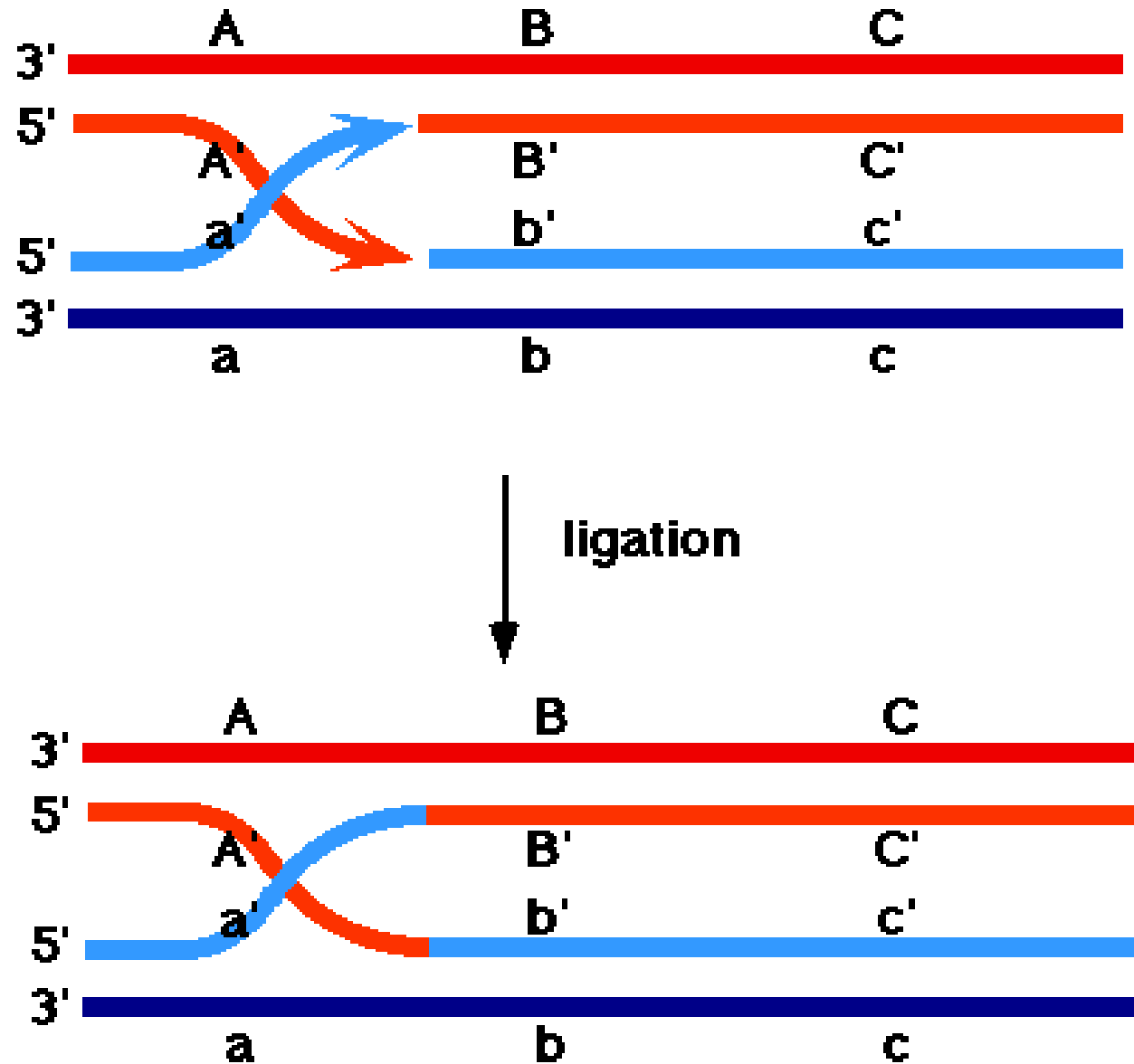
2) DNA 断裂产生  
单链DNA区域



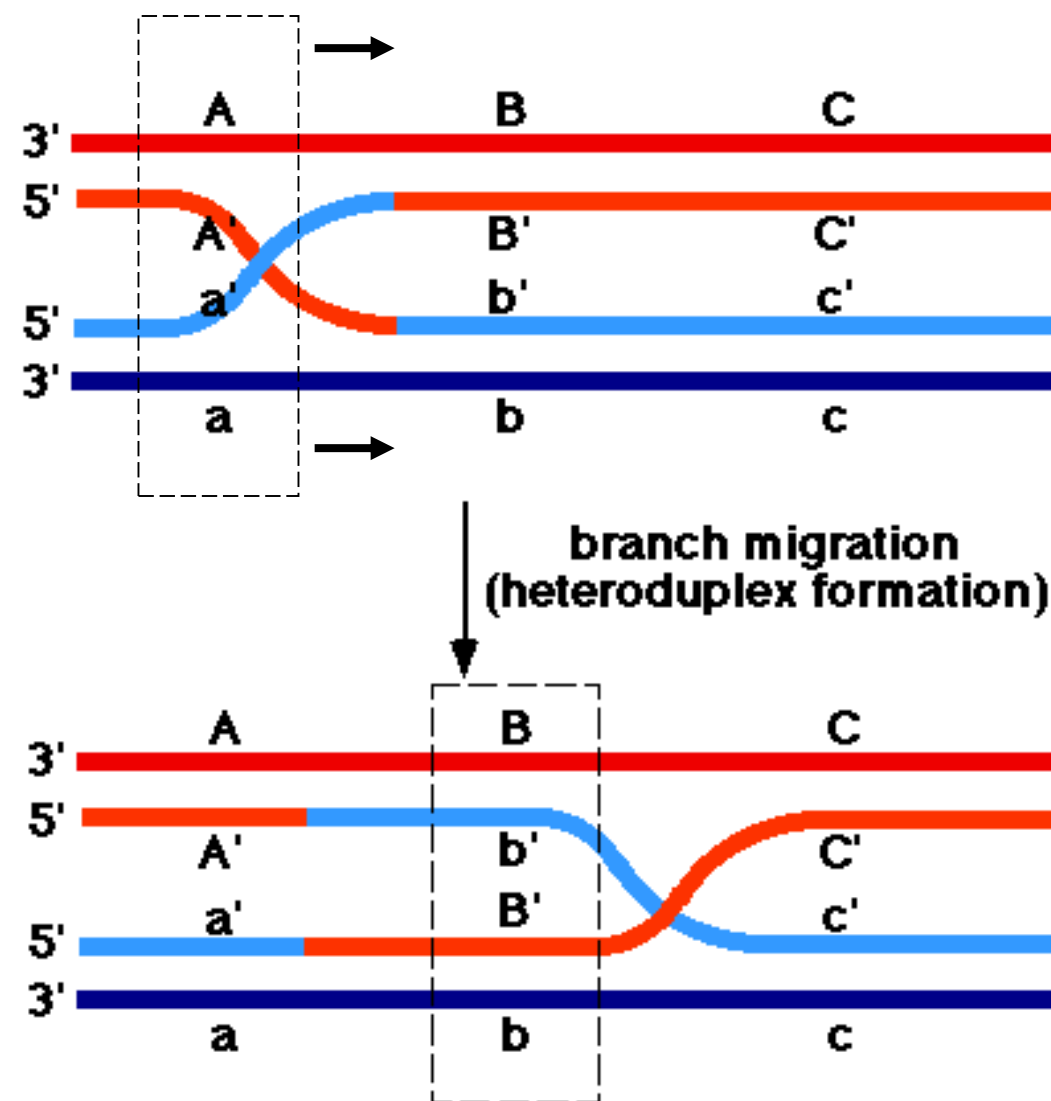
3) 单链DNA末端入侵  
同源序列，形成碱基  
互补的片段起始区  
重组体融合



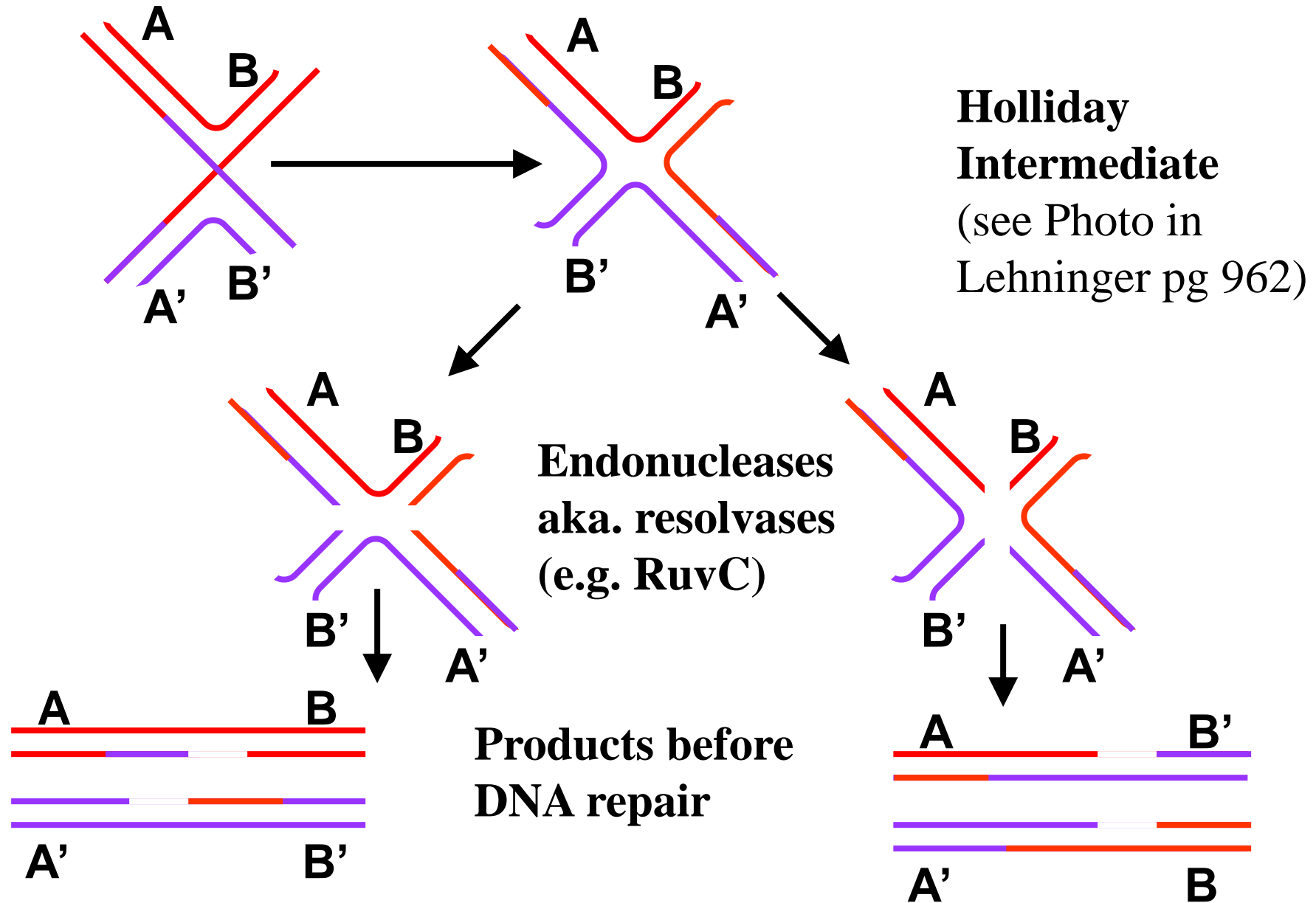
4) 链入侵后两个DNA分子相互交叉的DNA联系在一起，这个交叉结构称为Holliday联结体。



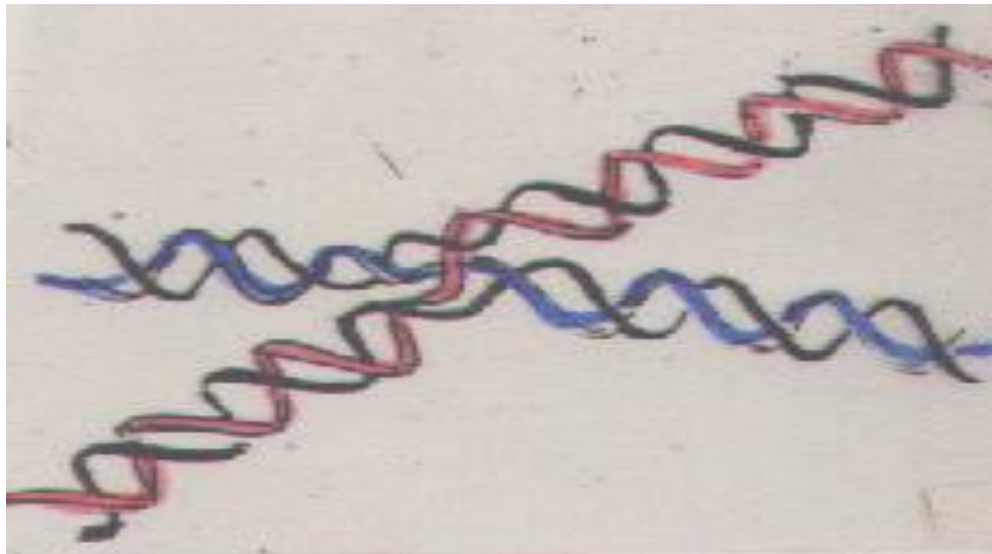
5) 交叉移动伴随着配对碱基的断开和重新形成，该过程称为分支移动 (branch migration)



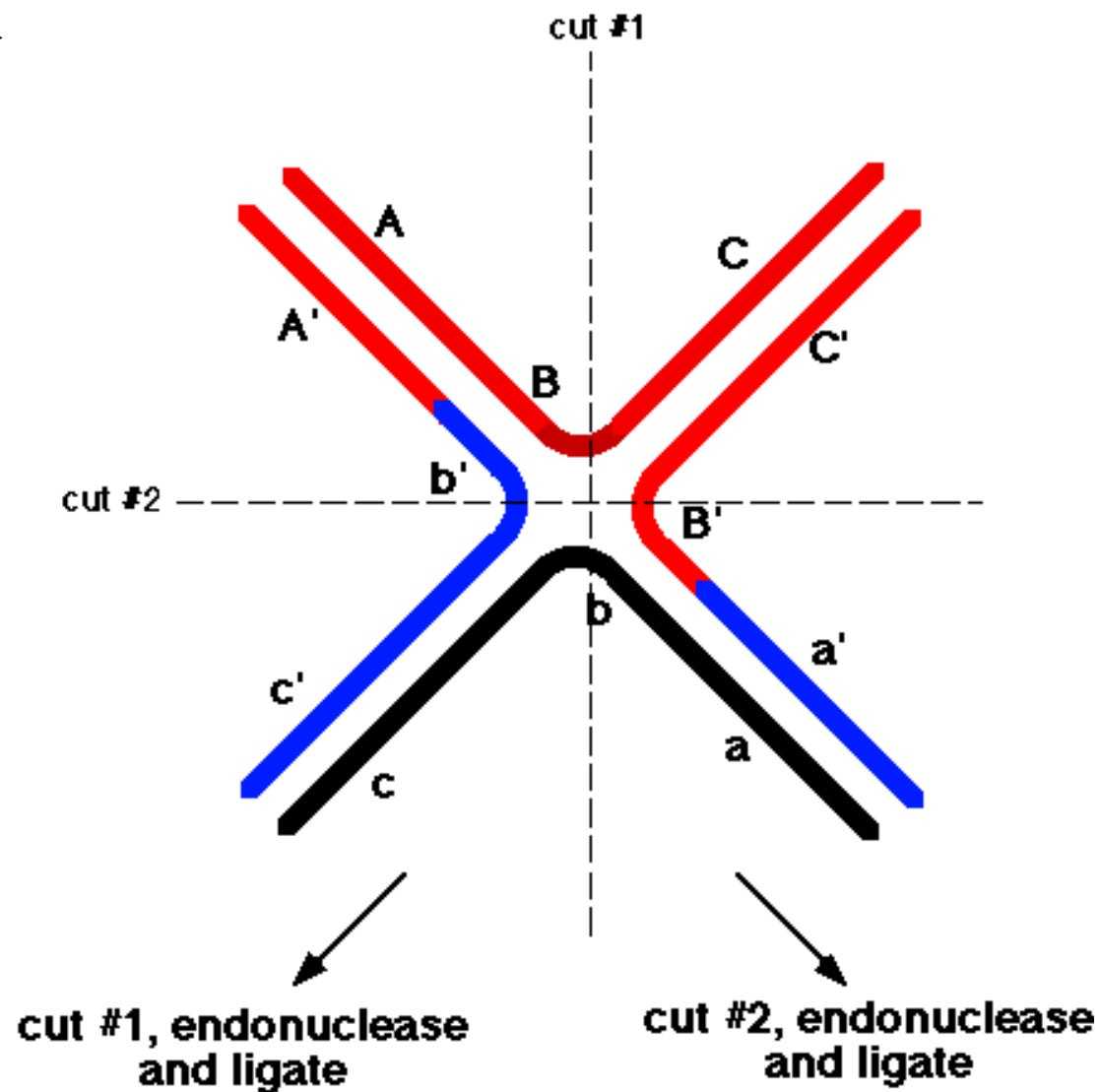
# Holliday intermediates



# Holliday Intermediate

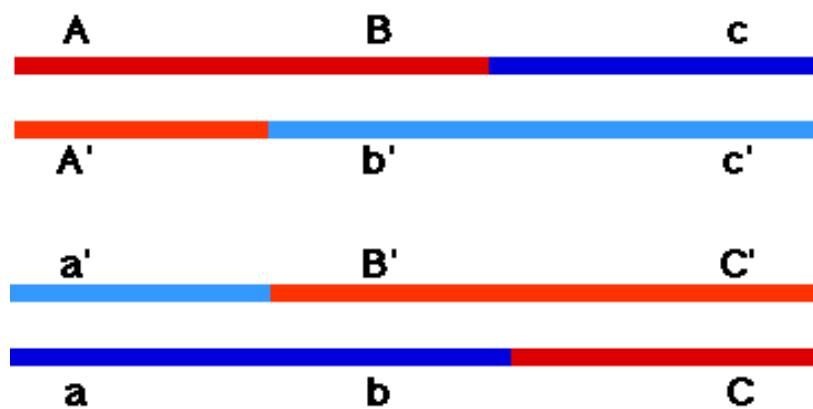


6) Holliday联结体的剪切。Holliday联结体的剪切将DNA拆分为两个分子，过程为拆分（拆分酶 resolvase），拆分方式决定DNA交换成都



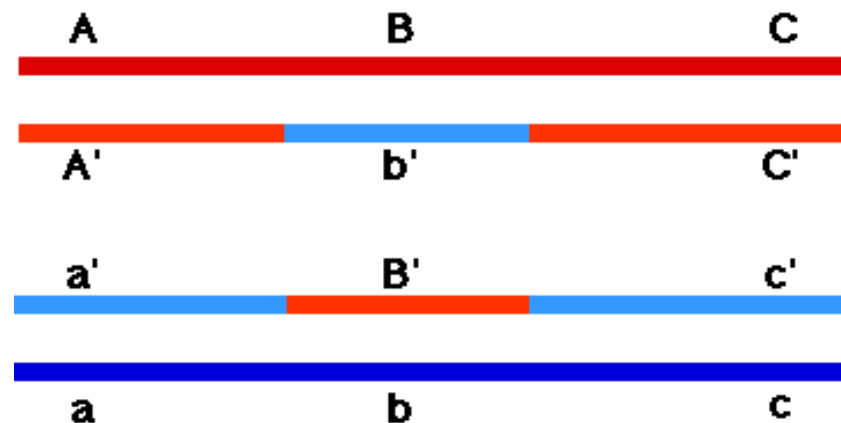
# Holliday 联结体拆分方式决定DNA 交换程度

cut #1, endonuclease and ligate



heteroduplexes and recombinants

cut #2, endonuclease and ligate

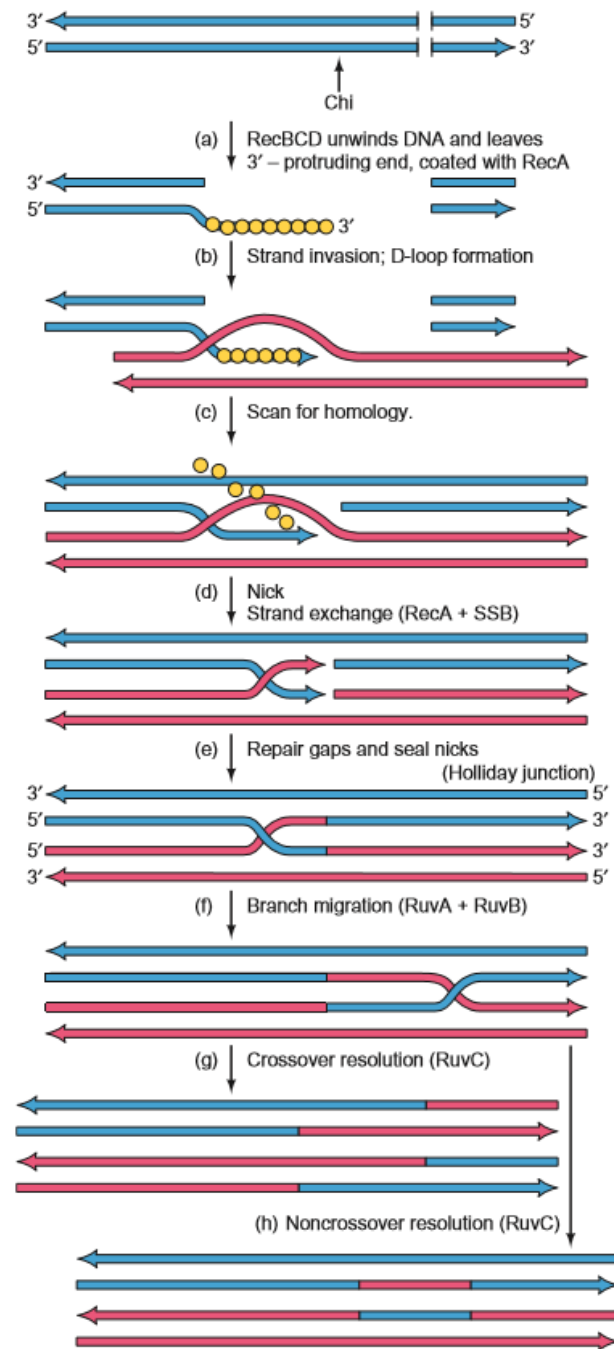
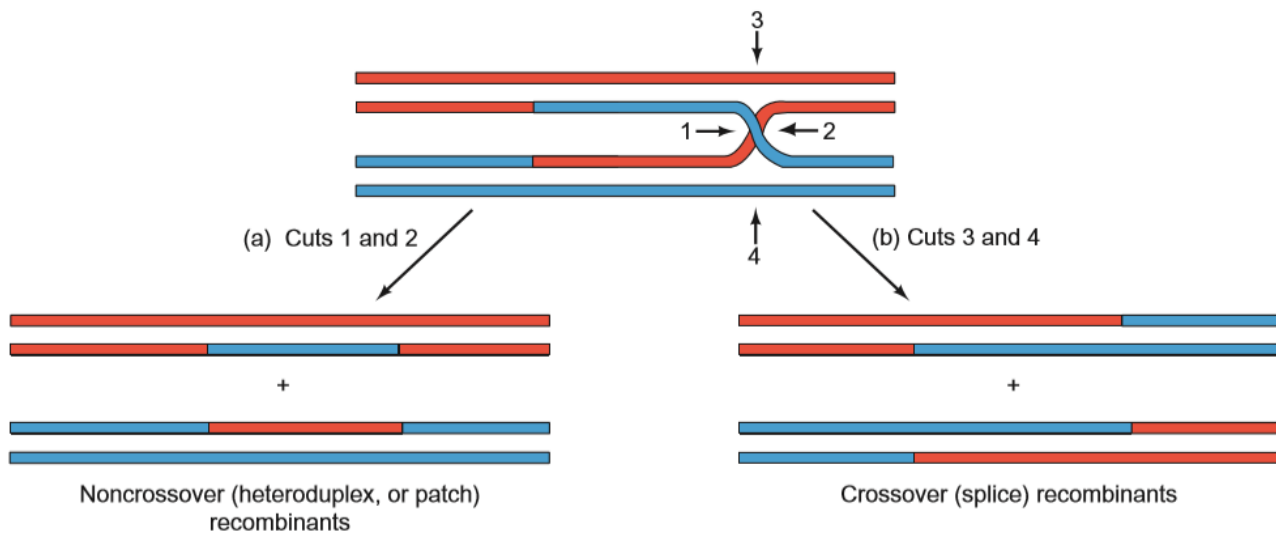


heteroduplexes but no recombinants

Termed "patch recombinants"

# 大肠杆菌中同源重组 RecBCD 途径

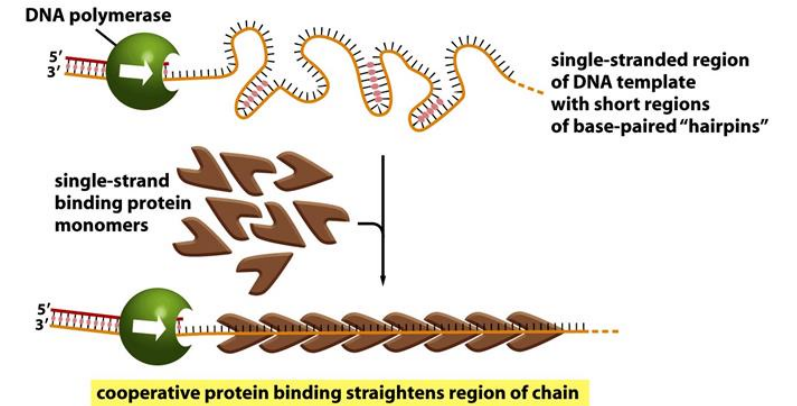
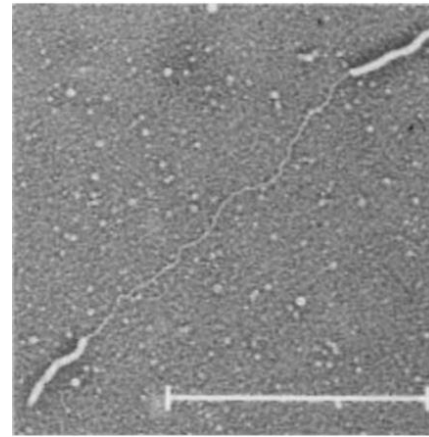
双链断裂末端形成 Chi 位点 RecBCD GCTGGTGG 3' 序列酶切  
 单链入侵 扫描同源序列 RecA  
 链置换 RecA SSB  
 缺口修复 (Holliday junction)  
 交叉移动 (RuvA RuvB)  
 解交叉 (RuvC)



# 重要蛋白

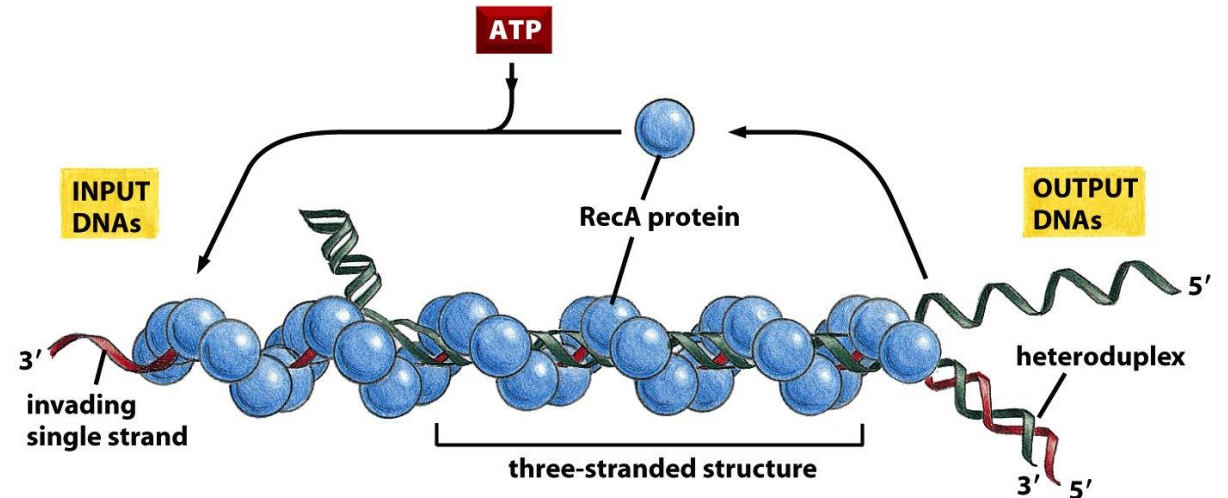
## RecA 重组酶 38-39KD DNA损伤诱导

- 1) 结合单链DNA  
单链结合蛋白SSB阻止二级结构对RecA 影响
- 2) 联会
- 3) 链置换 单链侵入同源双链配对, 同源重组



**Table 22.1 Requirements for D-loop Formation**

Duplex DNA	Reaction components	D-loops formed (%)
P22 phage	Complete	100
	-RecA	<1
	-ATP	<1
	-ATP + GTP	<1
	-ATP + UTP	<1
	-ATP + ATP <sub>γ</sub> S	<1
M13 phage	Complete	100
	-RecA	1
	-ATP	1
	-ATP + GTP	2



# RecBCD 蛋白复合体 $3 \times 10^5$

RecA需要单链DNA 从何而来, RecBCD和Chi 可以提供

## Chi sites

5'-GCTGGTGGGTT\*G\*CCT-3'

RecBCD 具有DNA 解旋酶和内切酶活性

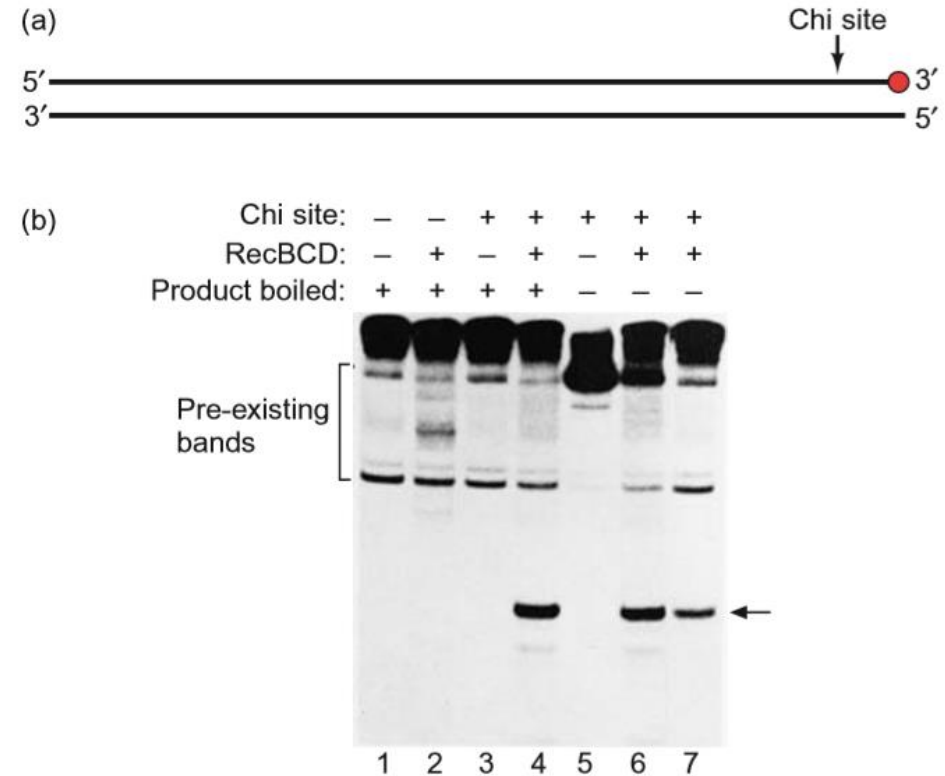


Figure 22.7 Chi-specific nicking of DNA by RecBCD. (a) Substrate

# RuvA 和 RuvB

RuvA 和 RuvB 具有 DNA 解旋酶活性催化 Holliday junction 交叉移动

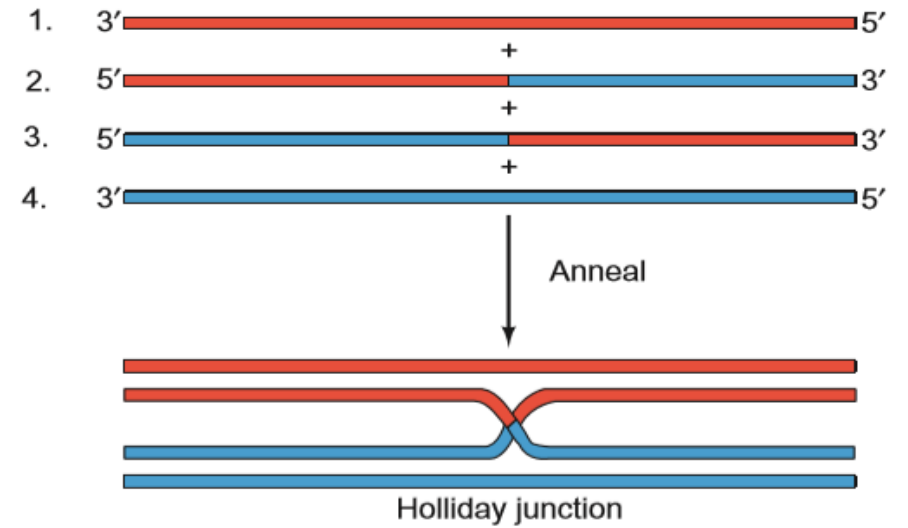
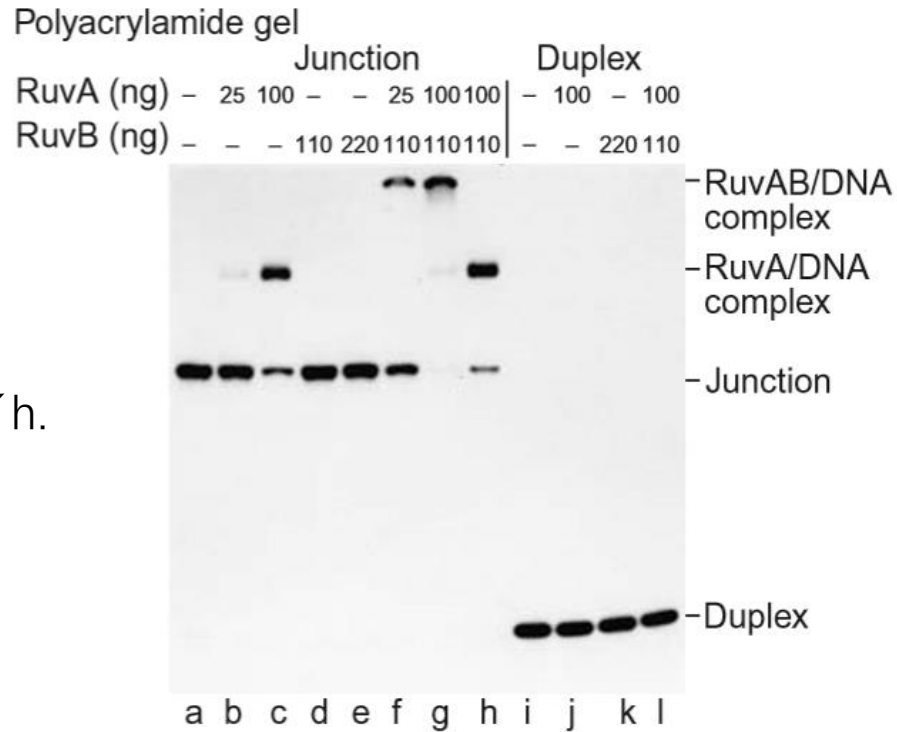


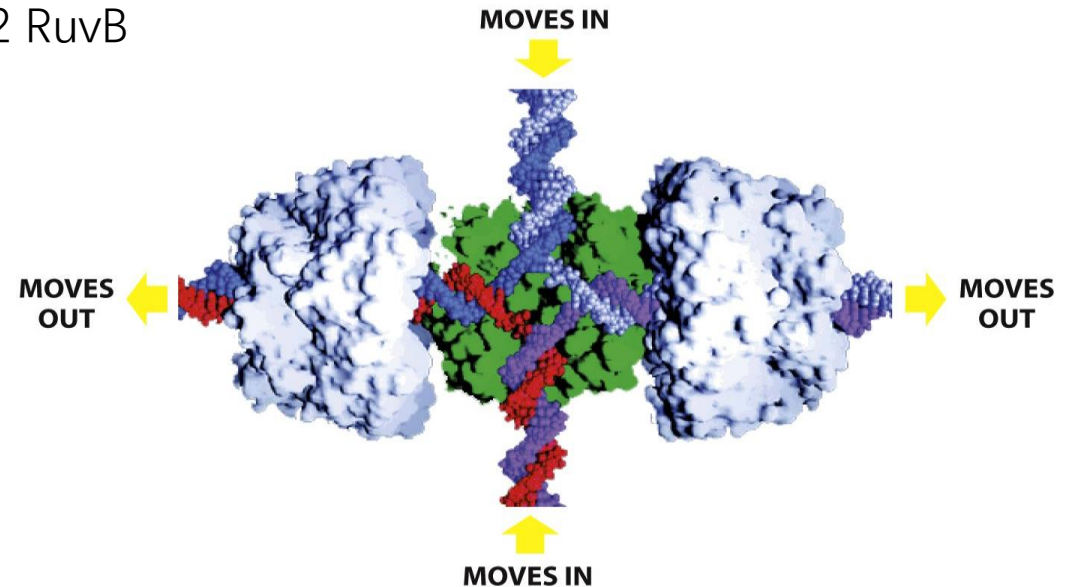
Figure 22.9 Forming a synthetic Holliday junction. Oligonucleotic



ATPγS 除了h.

Figure 22.10 Detecting a RuvA-RuvB-Holliday junction comp

4 RuvA  
2 RuvB

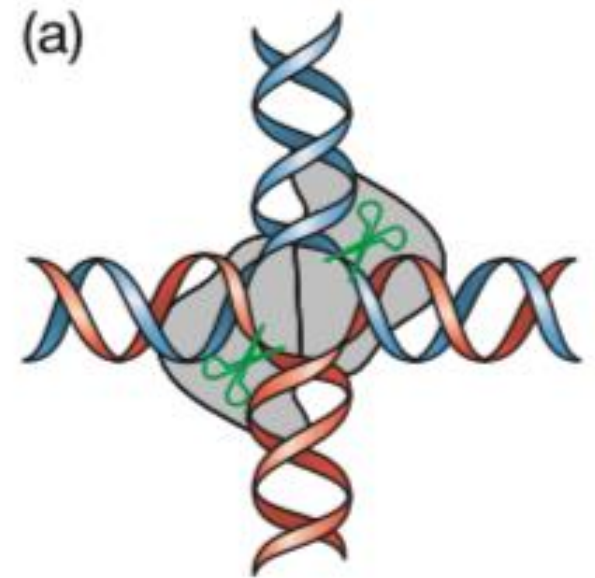
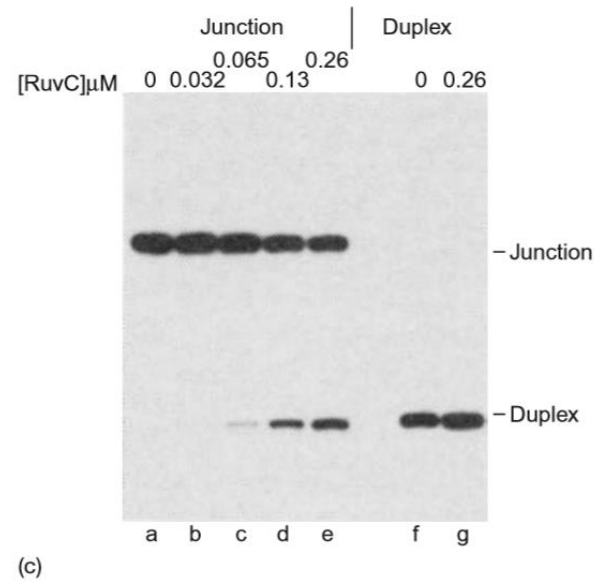
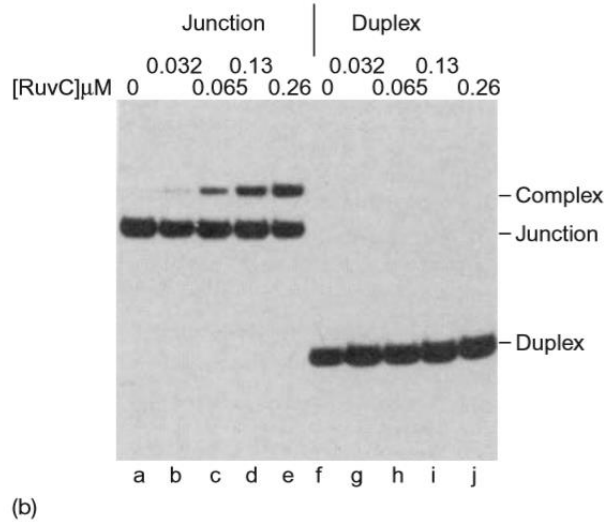
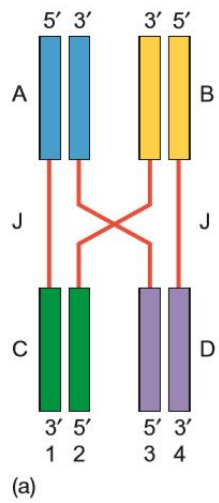


# RuvC 能解开Holliday 中间体

合成 Holliday junction

RuvC 非作用结合  
低温、缺Mg

RuvC 作用



# 真核生物减数分裂中同源重组修复 (酵母)

No Chi

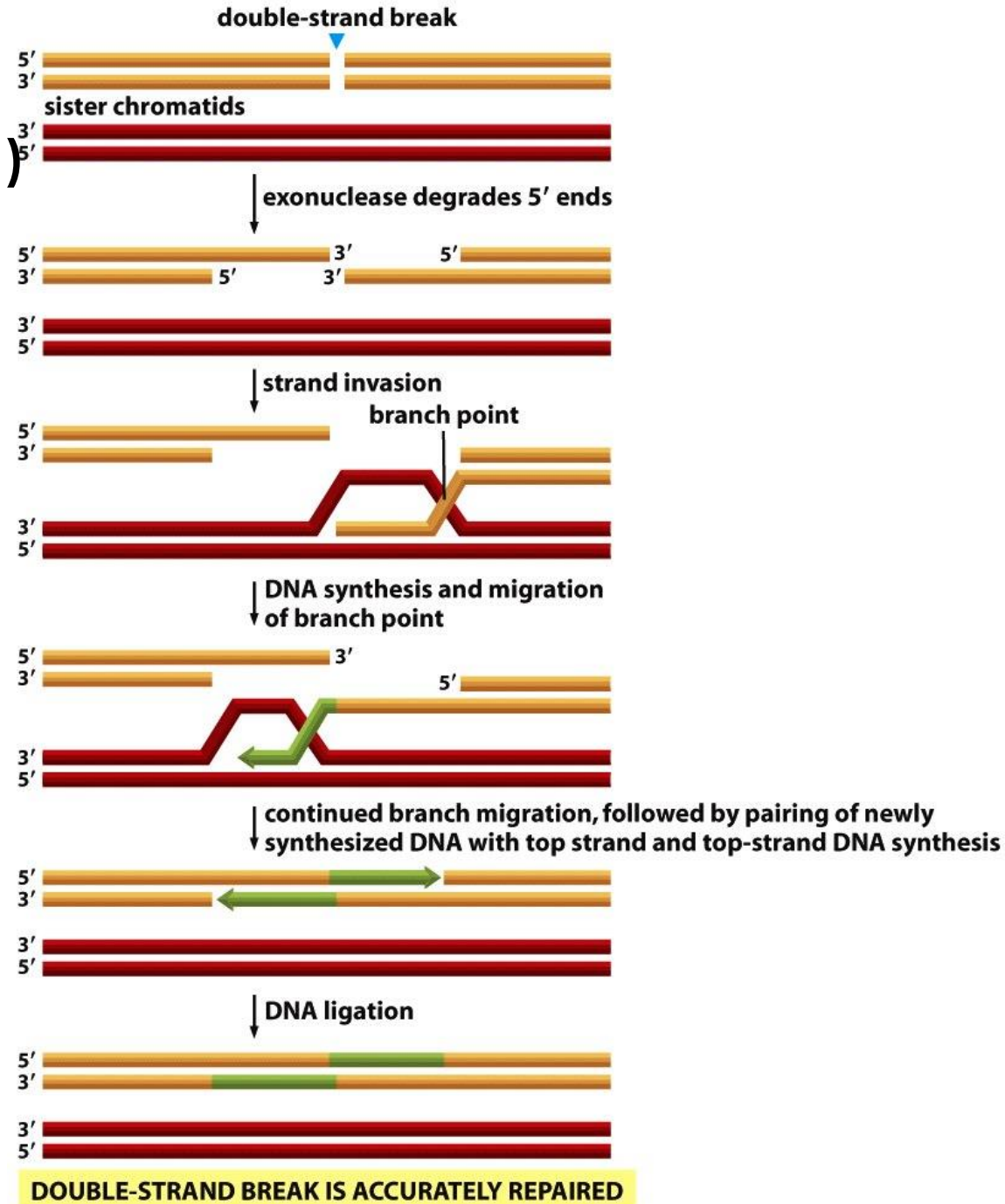
双链断裂? SPO11 (酵母)

单链尾巴

5'→3' 核酸外切酶 作用切口5'-末端, 产生3'-尾巴

RPA Rad51蛋白  
与SSB和RecA 为同源蛋白

其余类似



## 酵母中DNA双链断裂

1989 Szostak

Arg4基因的转换频率从5'-3'明显递减 (9.6%-0.4%) 原因, 重组交换位点发生在其启动子区域

以包含Arg4 15kb构建载体, 转化酵母, 诱导完成减数分裂, 在孢子形成不同时间提取DNA, 发现断裂位点

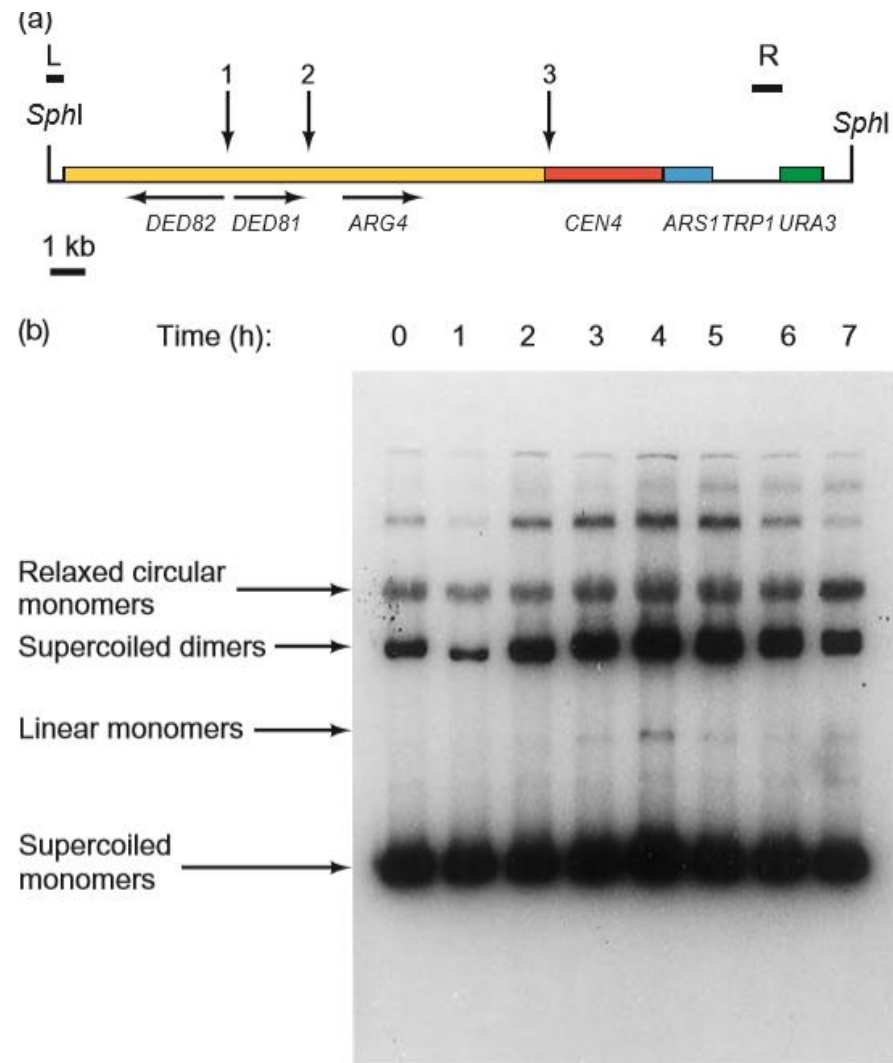
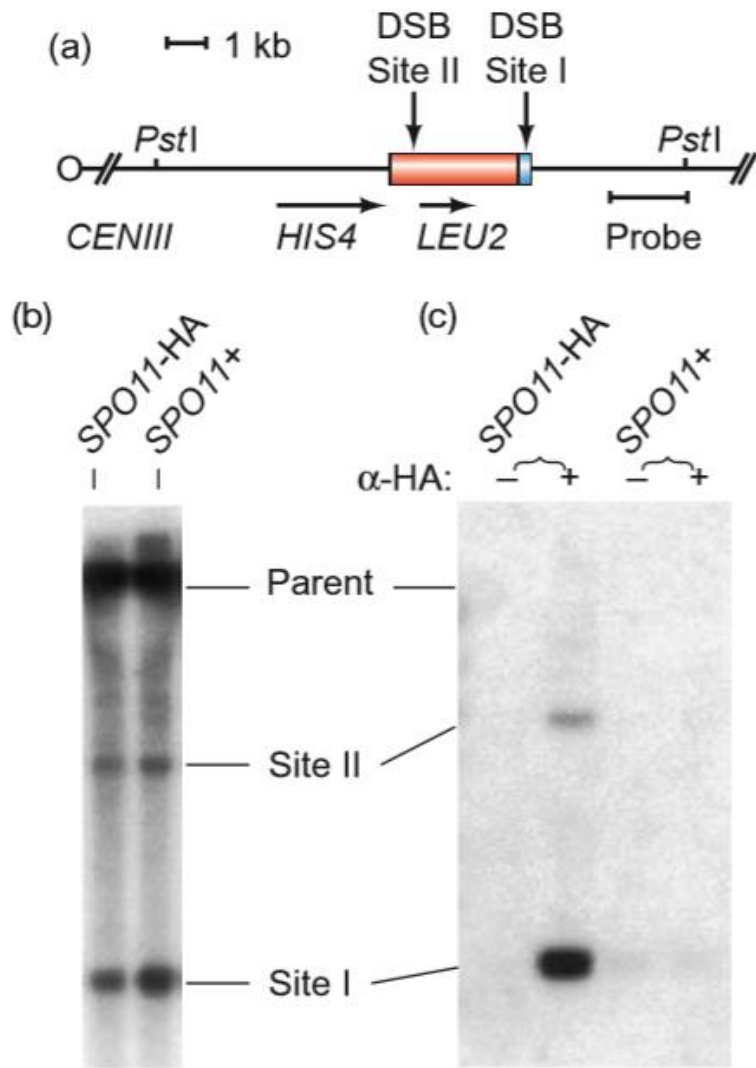


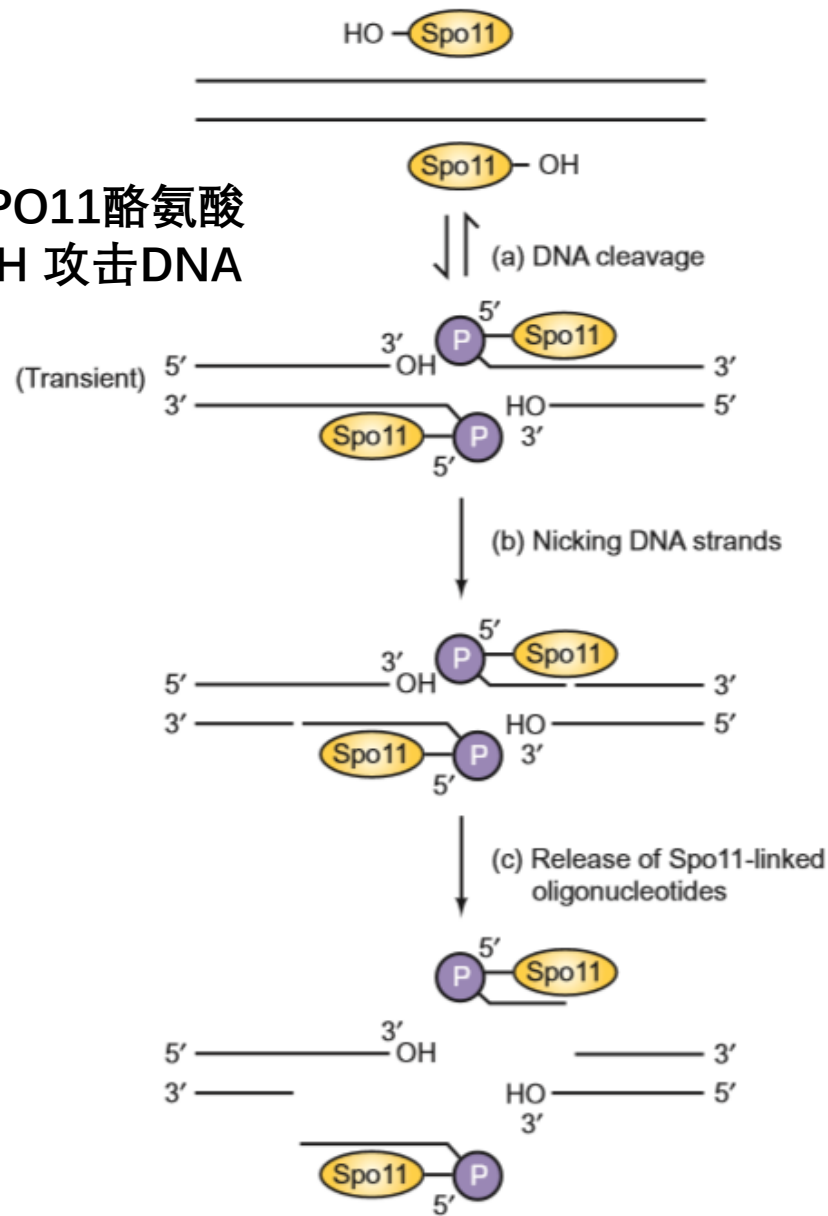
Figure 22.18 Detecting a double-stranded DNA break in a plasmid

# 1995 Keeney Kleckner 发现酵母中DNA 酶 SPO11



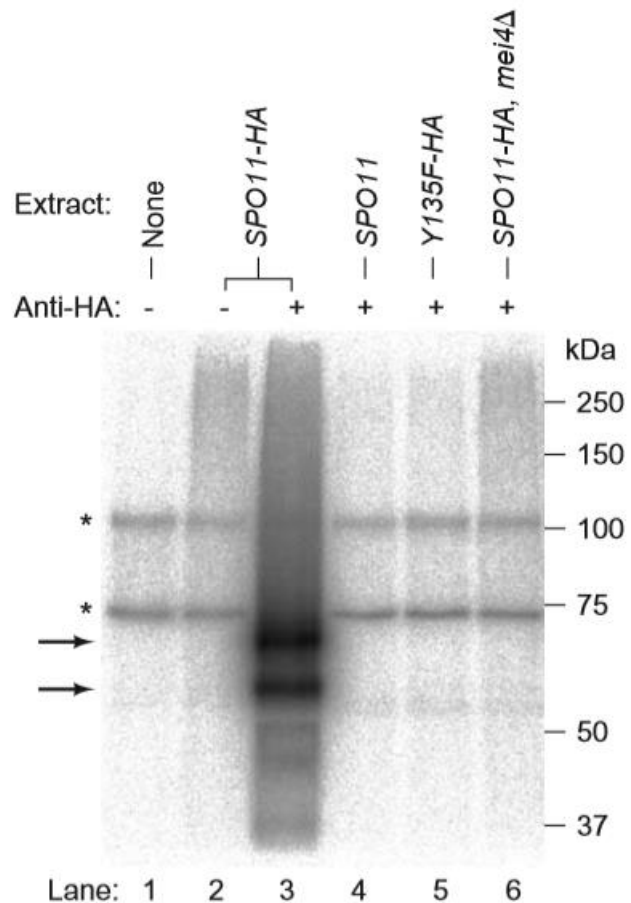
Association of Spo11 with DSB fragments. (i)

SPO11酪氨酸  
OH 攻击DNA



# Spo11介导的双链DNA断裂

Spo11 共价连接双链DNA断裂的末端  
两个 Spo11 协同作用相近的位置  
转酯反应， Spo11与寡核苷酸离开。



!1 Evidence for Spo11-linked oligonucleotides.

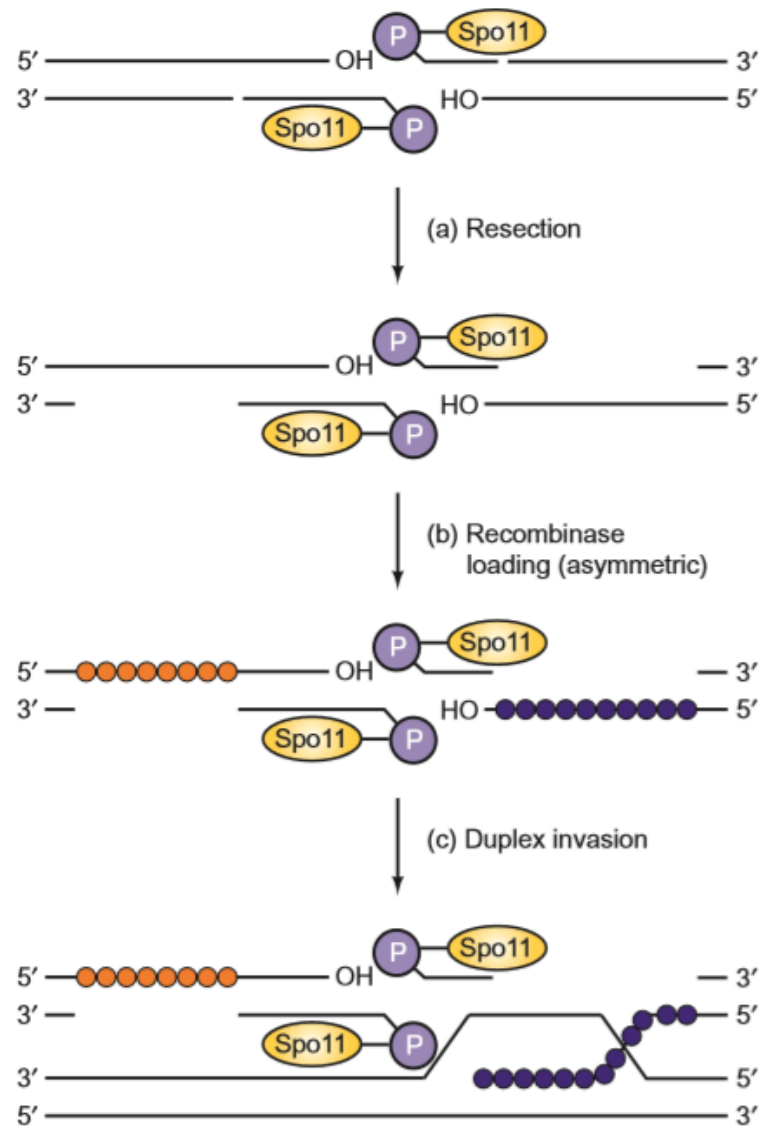
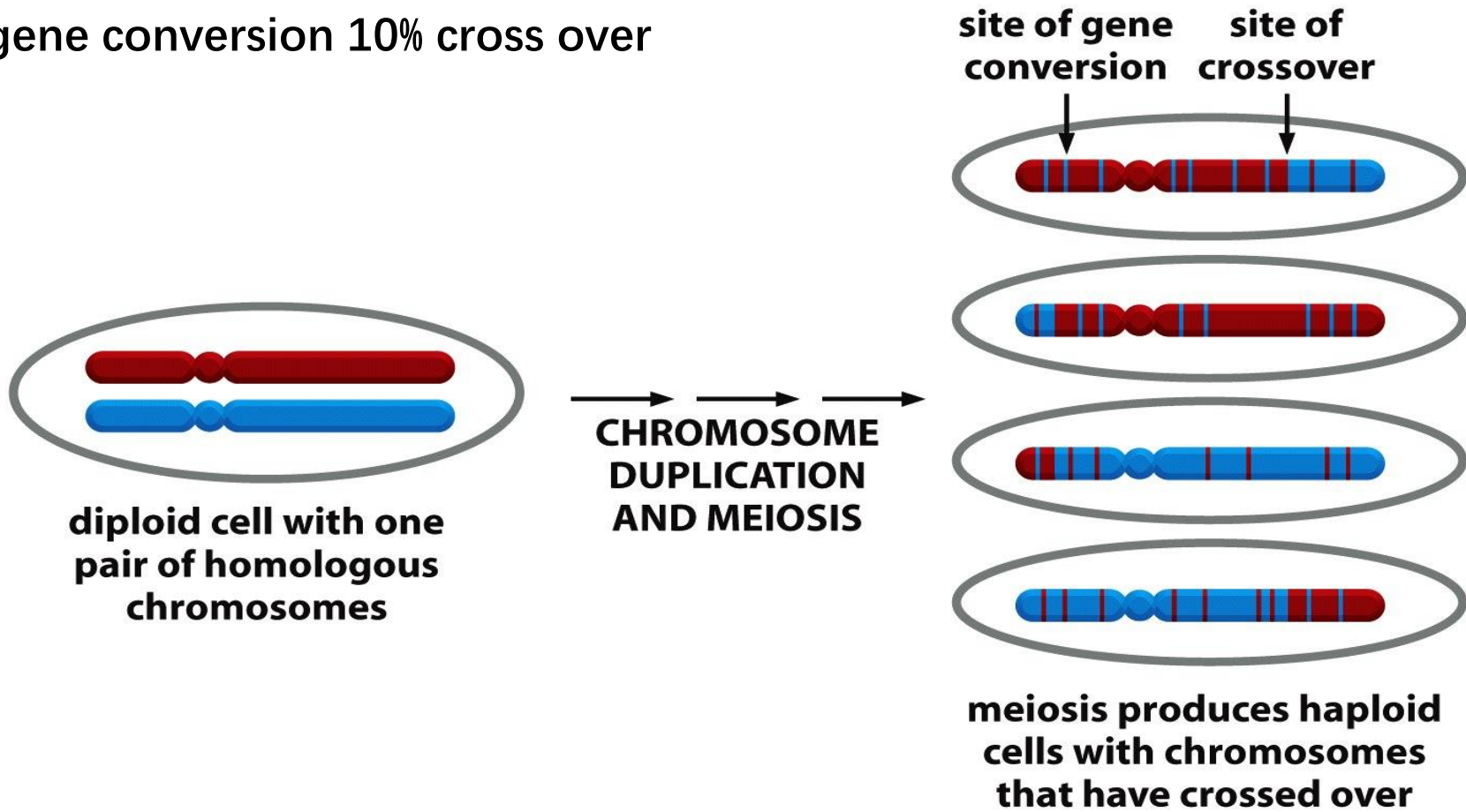


Figure 22.23 A model for DSB end resection prior to release of Spo11-oligonucleotides. (a) Resection occurs on both strands,

非对称酶切，一侧单链3'较长

# 同源重组修复产物

90% gene conversion 10% cross over



# 阻止重复序列同源重组导致基因组不稳定的机理

