

# 泸州医学院

## 生物化学与分子生物学精品课程

### 第十章 DNA的生物合成(复制)

制作：何涛 审校：李洪

(2009年4月)

#### 一、内容提示：

本章主要介绍 DNA 生物合成的主要方式——复制的概念，参与复制的酶及各种因子的作用，复制的基本过程等内容。并对与复制密切相关的 DNA 损伤与修复作相应的介绍，此外还涉及 DNA 合成的另一种方式——逆转录作用。

#### (一) DNA 复制的概念：

DNA 的复制 (DNA replication) 是 DNA 作为遗传物质的基本特征之一。复制是以亲代的 DNA 为模板，按照碱基配对规律，合成子代 DNA 的过程。子代 DNA 与亲代 DNA 的核苷酸顺序完全相同，由此将亲代的遗传信息准确地传递给子代 DNA。

DNA 复制的方式为半保留复制 (semi-conservative replication)，即以亲代 DNA 的每一条链为模板，合成两个完全相同的双链子代 DNA，每个子代 DNA 分子中的一条链来自亲代 DNA，而另一条链是新合成的。

#### (二) DNA 复制的条件：

DNA 复制的原料为四种脱氧核糖核苷酸(dNTP)，复制需要以 DNA 单链为模板，小片段的 RNA 为引物。参与复制的主要酶类及因子有：① DNA 聚合酶(DNA-dependent DNA polymerase, DDDP)——这类酶以四种 dNTP 为底物，以 DNA 单链为模板催化合成 DNA 新链；② 引物酶 (primase)——在模板的复制起始部位催化互补碱基的聚合，合成短片段 RNA 引物，为一特殊的 RNA 聚合酶；③ DNA 连接酶 (DNA ligase)——催化 DNA 互补双链上单链缺口两端的 3'-OH 与 5'-P 以 3',5'-磷酸二酯键相连，其作用需 ATP 供能；④ 解螺旋酶 (helicase)——在有 ATP 存在时，可使双链 DNA 间的氢键局部断裂，解开成为单链，每解开一对碱基需 2 分子 ATP，这样隐藏于双链内部的碱基即可暴露，作为复制模板；⑤ DNA 拓扑异构酶 (DNA topoisomerase)——调整(引入或消除)DNA 超螺旋，克服解链中的打结现象；⑥ 单链 DNA 结合蛋白(single stranded DNA binding protein, SSB)——结合于已解开的 DNA 单链上，保持模板的单链状态，并可防止核酸酶对 DNA 的水解作用；⑦ 其他蛋白因子。

由于 DNA 链的合成方向只能从 5'→3'端进行，且 DNA 双链模板为反向平行，所以复制时一条链的合成是连续的，称为领头链 (leading strand)，而另一条链的合成是不连续的，称为随从链 (lagging strand)。在合成随从链时，首先合成的一些 DNA 片段称为冈崎片段 (Okazaki fragment)。

#### (三) DNA 复制的过程：

原核生物 DNA 复制的过程大致可分为以下几个阶段：① 复制的起始——在解链酶、DNA 拓扑异构酶的作用下，DNA 解链解旋，并由 SSB 结合于已解开的单链上形成复制叉；由一系列的引发前体蛋

# 泸州医学院

## 生物化学与分子生物学精品课程

白质因子与引物酶构成引发体，结合于 DNA 模板的复制起始点，在引物酶催化下合成 RNA 引物。② 复制的延长——在 RNA 引物 3'-OH 末端，由 DNA 聚合酶 III 催化四种 dNTP 在模板链上按碱基互补原则从 5'→3' 方向聚合成新生链。③ 复制的终止——由 RNase 水解去除引物，DNA 聚合酶 I 填补缺口，最后由连接酶连接片段。真核生物 DNA 复制的同时，同步合成染色体蛋白，复制完成后随即组装成染色体。

真核生物 DNA 复制的起始过程大致与原核生物类似，但引物的合成是由 DNA 聚合酶  $\alpha$  催化，生成 RNA-DNA 杂合引物。复制延长阶段则是由 DNA 聚合酶  $\epsilon$  催化领头链合成，而由 DNA 聚合酶  $\delta$  催化随从链的合成，并需增殖细胞核抗原(PCNA)参与。复制的终止阶段需由 RNase H 和核酸内切酶 FEN I 水解去除 RNA-DNA 引物，再由 DNA 连接酶连接冈崎片段；端粒的重建则需端粒酶复合体参与，经爬行方式延伸缺失的序列，再与蛋白质结合形成端粒。

一些低等生物，如质粒的环状双链 DNA，则采用滚环复制的方式。即环状 DNA 双链外环先开一缺口，双环反时针方向滚动，外环 5'-端向外伸展暴露内环，在伸展的单链上进行不连续复制，在未开环的单链上进行连续复制，合成两个相同的环状子代双链，在复制过程中不需 RNA 引物。线粒体 DNA 和复制则通常采取 D 环复制的方式。

#### (四) DNA 的损伤与修复：

某些物理因素(紫外线、电离辐射)、化学因素(亚硝酸盐、烷化剂、碱基类似物)或生物因素(病毒)可以导致 DNA 分子结构和功能的改变，称为 DNA 的损伤。其类型有：形成嘧啶二聚体，碱基的脱落、替代、脱氨基等。DNA 损伤若不能完全修复，则可引起突变的发生，突变的实质为 DNA 分子中碱基的改变，它可分为点突变（转换、颠换、缺失、插入）和复突变（缺失、插入、倒位、移位、重排）等不同类型。但在通常情况下生物体能够通过多种方式使损伤 DNA 得到修复，以维持 DNA 遗传的稳定性。DNA 损伤的修复包括直接修复(光修复)、切除修复、重组修复、SOS 修复等多种方式。光修复是在可见光照射细胞后，激活光复活酶（photolyase）使嘧啶二聚体解聚而复原。切除修复是人体细胞修复 DNA 的重要方式，它是在一系列酶的作用下，将 DNA 分子中的受损部位切除，并以完整的那一条链为模板，指导合成切去的部分，使 DNA 恢复正常结构的过程。重组修复和 SOS 修复是在前两种修复方式被阻断或 DNA 复制速度快于修复速度时所进行的，具有差错倾向，称为有差错倾向性修复。修复过程的障碍与癌症等疾病的发生有关。如一种称为着色性干皮病的遗传性疾病，就是因为特异的核酸内切酶的缺乏，使皮肤细胞受紫外线照射后，DNA 损伤不能修复，突变积累而导致高皮肤癌发生率。此外，一些化学致癌剂也是通过诱发 SOS 修复后，引起长期广泛突变而致肿瘤的发生。

#### (五) 逆转录的概念：

DNA 复制是 DNA 生物合成的主要方式，除此以外，还可以 RNA 为模板合成 DNA，这一过程称为逆转录（reverse transcription），催化此反应的酶称为逆转录酶（reverse transcriptase）。在逆转录酶的作用下，以 RNA 单链为模板，先合成一条 RNA-DNA 杂交链，随即切除 RNA 链，再以互补的 DNA 单链为模板合成 DNA 双链。这种方式主要存在于逆转录病毒中。

# 泸州医学院

## 生物化学与分子生物学精品课程

### 二、重点解析:

本章的重点是要求掌握 DNA 半保留复制的概念、DNA 复制的特点及条件、DNA 复制的基本过程及错误的修正。

#### (一) DNA 复制的特点:

##### 1. 半保留性:

DNA 是由两条互补的多核苷酸链构成,一条链上的核苷酸排列顺序可由另一条链上的核苷酸排列顺序决定。因此, Watson 和 Crick 在提出 DNA 的双螺旋模型之初,就推测在复制过程中, DNA 两条链碱基间氢键断裂,双螺旋分开,然后以每条链为模板,合成新的互补链,新形成的两个子代 DNA 分子的碱基顺序完全一样,每个子代 DNA 中都保留有一条亲代的链,即称之为半保留复制。它是 DNA 复制的重要特征,通过这种复制方式,使亲代的遗传信息能稳定地代代相传。此模式已由 M. Meselson 和 F.W. Stahl 通过同位素示踪实验得到证实。

##### 2. 半不连续性:

DNA 在复制时,以解开的两条 DNA 亲链为模板分别合成子链 DNA,由于两条链的走向相反,而 DNA 链延长的方向只能是  $5' \rightarrow 3'$ ,所以,以  $3' \rightarrow 5'$  模板链为模板的子链 DNA( $5' \rightarrow 3'$ )只需一段引物便能沿着亲链的解链方向连续进行合成,开始合成子链比另一条子链为先,故称为领头链。而另一条子链由于是以  $5' \rightarrow 3'$  方向的亲链为模板,故只能待亲链解开一段后,向解链相反方向合成。因而需要在分段合成引物的基础上,非连续合成,形成冈崎片段;在开始合成的时间上较领头链稍后,故称为随从链,这一现象就是复制的半不连续性。

##### 3. 有特定的起始点:

DNA 复制时,是在特定的部位起始复制过程,这些部位通常具有一些特殊的核苷酸排列顺序,故被称为复制子 (replicon)。复制子在原核生物中通常只有一个,而在真核生物中则有多个。

##### 4. 双向复制:

[www.med126.com](http://www.med126.com)

DNA 在复制时,局部 DNA 解链形成“眼”状的结构,其两端形成两个对映的复制叉 (replication fork),并不断向 DNA 分子的两端延伸,且方向相反,这一现象就是 DNA 的双向复制 (bidirectional replication)。

#### (二) DNA 聚合酶:

##### 1. DNA 聚合酶的种类、作用特点和功能:

在 DNA 复制系统中, DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 是参与复制最重要的酶,此酶需以 DNA 作为模板,故称为 DNA 依赖的 DNA 聚合酶 (DDDP)。

在原核及真核生物中均存在若干种不同的 DDDP,但所有 DDDP 的作用特点基本相似:① 需有  $3' \rightarrow 5'$  方向的单链 DNA 为模板;② 以 RNA 引物  $3'-OH$  末端为起始点合成 DNA 新链;③ 合成新链的方

# 泸州医学院

## 生物化学与分子生物学精品课程

向为  $5' \rightarrow 3'$ ；④ 每加入一分子与模板配对的 dNTP，释放一分子的焦磷酸，同时形成一个磷酸二酯键；⑤ 通常为一种多功能酶，即除了  $5' \rightarrow 3'$  聚合酶活性外，还具有  $5' \rightarrow 3'$  核酸外切酶或/和  $3' \rightarrow 5'$  核酸外切酶活性，因而该酶既可以参与 DNA 的复制，又可以参与 DNA 损伤的修复。

在原核生物中，DNA 聚合酶有 I、II、III 三种。其中 DNA 聚合酶 III 主要参与完成复制过程，DNA 聚合酶 I 主要参与 DNA 的修复与校正，并在复制过程中去除引物，填补缺口。真核生物中的 DNA 聚合酶则有  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  五种，其中  $\alpha$  是催化 RNA-DNA 引物合成的酶， $\epsilon$  和  $\delta$  是主要的复制酶，分别催化领头链及随从链的合成， $\epsilon$  还在修复损伤 DNA 时起作用， $\gamma$  参与线粒体 DNA 的复制。

### 2. DNA 聚合酶的复制保真性：

由于 DNA 聚合酶对模板的依赖性，使子链与母链能准确配对，从而保证了遗传信息能稳定地延续传代，这就是复制的保真性 (fidelity)。它是通过以下几种作用实现的：① DNA 聚合酶对碱基严格的选择能力，能选择与母链正确配对的碱基进入子链相应的位置；② DNA 聚合酶的  $3' \rightarrow 5'$  核酸外切酶活性，当发现进入子链的碱基发生错误时，可及时切除更换，以保证复制的精确度；③ 复制后的进一步校正修复。通过以上三个环节，可使 DNA 复制时碱基的错配频率(变异率)极低 (在大肠杆菌中  $<10^{-9} \sim 10^{-10}$ )。

### (三) DNA 的核苷酸切除修复：

核苷酸切除修复 (excision repairing) 是修复 DNA 的最为普遍的方式，对多种损伤均起修复作用，其特点是将损伤部位切除，然后以正确配对、完好的核苷酸来代替，其过程复杂，有多种酶与基因参与，基本过程可分为：识别、切除、修补和连接。

在大肠杆菌中，特异的核酸内切酶(由 UvrA、UvrB、UvrC 三种亚基组成)，能识别包括嘧啶二聚体在内的“大型”损伤引起的 DNA 螺旋扭曲，并在损伤部位的两侧各产生一个切口，切下一段寡核苷酸，然后在 DNA 聚合酶 I 作用下，以完整的互补链为模板催化合成小片断 DNA，修补已切除的空缺，最后在 DNA 连接酶的作用下将新合成的片段和原来的 DNA 断链处连接起来，完成修复。

在真核生物中，DNA 的核苷酸切除修复系统由 XP 相关基因的表达产物组成。其中 XPF 和 XPG 具有核酸内切酶活性，可分别切割受损 DNA 片段的  $5'$  侧和  $3'$  侧，产生的空缺由 DNA 聚合酶  $\epsilon$  催化填补，最后由 DNA 连接酶进行连接。

## 三、知识扩展：

### (一) 原核 DNA 复制的基本过程：

由于 DNA 复制系统组成复杂，复制过程比较抽象，有些细节至今仍未完全明了，故学习时在记忆和掌握上有一定困难，注意在学习过程中抓住 DNA 复制的方式、特点及参与的主要酶与蛋白质因子的作用等内容，然后在此基础上理解复制的基本过程，特别注意以下几个特殊的环节：

#### 1. 解链解旋：

# 泸州医学院

## 生物化学与分子生物学精品课程

复制中首先要解决的问题是如何才能打开 DNA 双链，以形成单链模板，这一过程需在解链解旋酶类的作用下才能完成。首先依靠解链酶沿模板 DNA 双链移动，随着其向前移动而分开模板双链，该过程需水解 ATP 来驱动。当解链酶工作时，其解链作用使复制叉前方的模板双链以与双螺旋相同的右手方向缠绕，而复制叉前长长的双螺旋不能很容易地旋转以补偿这种缠绕力，这样每解开一个完整的螺旋就要被迫形成一个正超螺旋，并可能出现打结现象，阻挠复制的进行。此时由 DNA 拓扑异构酶释放超螺旋，克服缠绕打结现象。这些酶在复制叉前打断 DNA，使 DNA 在断裂处旋转，然后再封闭 DNA，该酶所催化的一个断裂、旋转和封闭的循环消除一个正超螺旋。

DNA 拓扑异构酶(topoisomerase)有 I、II 两型，其中 topo I 在 DNA 双链中的一条上引入缺口，并可同时牵引另一条链通过缺口，然后使断端重新连接，其作用不需 ATP；topo II 在 DNA 双链上同时引入断裂缺口，然后允许一个完整区域的双螺旋穿过缺口，尔后两链重新封闭保持 DNA 分子的完整，该酶需从 ATP(GTP)得到能量催化其反应。随着解链酶的向前移动，解开的双链又可以自然闭合，这就需要 SSB 结合于解开的单链上，在两链之间形成障碍以保持其单链状态，这种在解链过程中形成的叉状物称为复制叉。

### 2. 引发：

DNA 解链时，由引物酶催化合成 RNA 引物(10~40bp)，该酶具有在聚合反应中掺入 dNTP 和 NTP 的能力，但引物酶组装引物时对 NTP 比 dNTP 具有更强的亲和力，故引物通常为 RNA。引物的合成还需引发前体蛋白质的参与，其中 DnaA 蛋白识别模板上的起始点，并与此点结合，然后其它引发前体蛋白因子才结合于此点，并组装形成引发前体，其中 DnaB 蛋白可致模板的二、三级结构改变，改变后的结构才与引物酶 (DnaG) 结合，形成引发体，并由引物酶催化合成与模板互补的 RNA 引物。

### 3. 聚合：

DNA 聚合酶 III 从引物 3'-OH 末端开始按模板要求逐个添加核苷酸，使新生链逐渐延长。引物合成后聚合反应是在复制叉两侧以 5'→3' 方向进行，因而核苷酸的添加在一条链上与解链方向相同，而在另一条链上则相反。

[www.med126.com](http://www.med126.com)

### 4. 复制的完成：

引物一旦完成其功能，被 DNA 聚合酶 I 或特殊的核酸酶水解除去，由于随从链是分段合成的，存在多个引物，故需由 DNA 聚合酶 I 催化延长冈崎片段以填补引物留下的空缺，但在添加的最后一个核苷酸的 3'-OH 与下一片段的 5'-P 间仍留下一个缺口，就由 DNA 连接酶来封闭，形成完整 DNA 双链。

### (二) DNA 复制的原理与基因工程、DNA 测序和 PCR：

DNA 半保留复制方式的发现为分子生物学、分子遗传学的开创奠定了基础，其基本原理已成为基因工程、DNA 碱基序列测定及 PCR 三大分子生物学技术的重要理论基础。

基因工程是利用各种载体进行 DNA 片段(基因)的转移和重组，使该 DNA 片段在适当的宿主细胞(如大肠杆菌)中大量复制即基因扩增，通过这种方法可获得大量的目的基因片段以应用于基因的结构

# 泸州医学院

## 生物化学与分子生物学精品课程

与功能的研究，这种基因的扩增方法属于细胞内复制。

DNA 碱基序列测定是研究基因结构与功能关系、基因表达调控的前提和基础，70 年代以来在这一领域取得了突破性的成就，使得快速、准确分析 DNA 一级结构成为可能。该项技术的关键环节之一就是通过基因工程的方法获得一定量的待测 DNA 单链，以此为模板，通过模板-引物杂交、引物延长复制出待测 DNA 的互补链，在此过程中，应用核苷酸链终止剂，可在特定的位置终止复制，从而产生长短不一的核苷酸链，再作进一步分析。由此可见，DNA 碱基序列测定采用了细胞外的 DNA 复制方法，和细胞内复制相比，该系统更为简单，不需要解链解旋等步骤。

80 年代诞生的 PCR 技术更是一种在体外模拟自然 DNA 复制的 DNA 片段快速扩增技术，该技术以一段双链 DNA 为模板，利用一对引物及耐热 DNA 聚合酶的催化，通过约 30 次变性-杂交-引物延长的循环反应过程，可将特异的 DNA 片段扩增数百万倍，这是一种快速、简便、高效的 DNA 体外扩增技术，也属于一种细胞外 DNA 复制，比基因工程更简便，因而其普及的速率是基因工程无法比拟的。

[www.med126.com](http://www.med126.com)