



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА
КАФЕДРАСЫ

Молекулалық генетика

ДӘРІС 5. ДНҚ РЕПЛИКАЦИЯСЫНЫҢ ЖАРТЫЛАЙ КОНСЕРВАТИВТІ МЕХАНИЗМІ

Лектор: PhD, қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.

Жоспар

- **Репликацияның биологиялық мәні**
- **Биосинтездің матрицалық принципі**
- **ДНҚ репликациясының механизмі**
- **Репликацияның жартылай консервативті сипатының дәлелі**
- **Мезельсона-Сталь тәжірибесі**

Тірі ағзалардың көбеюі, тұқым қуалаушылық қасиеттерінің ұрпақтан ұрпаққа берілуі, ұрықтанған жұмыртқадан көп жасушалы организмнің дамуы ДНҚ молекулаларының өздігінен көбеюге қабілеттілігі арқасында жүзеге асады.

Молекулалық биология тілінде - дезоксирибонуклеин қышқылының (ДНҚ) өздігінен көбею процесі (синтезі) **репликация** деп аталады. Кейде синонимдік атау – **редупликация** термині де қолданылады. Нәтижесінде бір ДНҚ молекуласынан екі еселенуі нәтижесінде екі молекула – яғни бастапқы ДНҚ-ның екі дәл көшірмелері (латынша «репликацио» - қайталау) түзіледі.

Репликацияның биологиялық мәні - жасушалар мен ағзалардың бірқатар ұрпақтарында, сондай-ақ құрамында ДНҚ бар құрылымдардың (митохондриялар, пластидтер, кейбір вирустар) көбеюінде генетикалық ақпаратты сақтау және дәл (өзгеріссіз) беру. Сондықтан репликация эукариоттық жасушаларда ядроның бөлінуінен, бактерия жасушаларының бөлінуінен, вирустардың көбеюінен және т.б.алдында жүреді.

Репликация, сондай-ақ басқа да маңызды молекулалық-генетикалық процестер, транскрипция және трансляция, **биосинтездің матрицалық принципіне** және молекулалар арасындағы комплементарлы әрекеттесуге негізделген.

Биосинтездің матрицалық принципі

Матрицалық гипотезаның негізінде әртүрлі деңгейдегі тіршілік процестерінің мәнін ашатын, бұрыннан белгілі жалпы биологиялық принциптерді «*Omnis cellula ex cellula*» және «*Omnis nucleus ex nucleo*» толықтыратын Н.К. Кольцовпен тұжырымдалған жаңа принцип: «Әрбір молекула молекуладан» - «*Omnis molecula ex molecula*» жатыр.

Тұқым қуалаушылық молекулаларының көбеюінің матрицалық принципін алғаш рет Н.К. Кольцов 1927 жылы Ленинградта өткен зоологтар, анатомистер және гистологтардың III Бүкілодақтық конференциясында «Морфологияның физика-химиялық негіздері» баяндамасында баяндайды.

Конференция барысында Кольцов екі тұжырым ұсынады:

- 1) келесі ұрпақтың гені синтезделуі үшін алдыңғы ұрпақтың гені матрица ретінде пайдаланылады,*
- 2) матрицалық синтезді бастау үшін ашытқы (затравка) қажет.*

Бір қызығы, бұл идеялар кейіннен расталды.

Матрицалық гипотезаға сәйкес тұқым қуалаушылық молекулалары белоктық сипатта болады.

ДНҚ репликациясының механизмі

Репликация механизмі туралы ақпарат ДНҚ-ның өзінде жазылған: кейбір гендер ДНҚ мономерлерін – нуклеотидтерді синтездейтін ферменттерді кодтаса, басқалары – активтенген нуклеотидтердің полимерге қосылуын қамтамасыз ететін ферменттерді кодтайды.

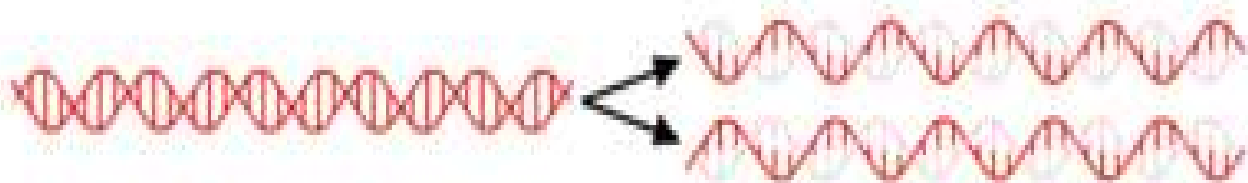
Репликация механизмін алғаш рет Дж.Уотсон мен Ф.Крик ұсынған. Олар ДНҚ тізбектерінің комплементарлығы бұл молекуланың өзін-өзі екі еселей алатынына нұсқайтындығын айтып, екі еселену үшін тізбектер арасындағы сутегтік байланыстарының үзіліп, әрқайсысы комплементарлы тізбектің синтезінде шаблон рөлін атқаратын тізбектердің бөлінуін қажет ететінін айтты.

Нәтижесінде бір қос тізбекті молекула негізінде бір-біріне ұқсас екі қос тізбекті молекулалар пайда болады және олардың әр қайсысының бір тізбегі бұрынғы ескі, ал екіншісі жаңадан синтезделген болып табылады.

ДНҚ репликациясының мұндай механизмі жартылай консервативті деп аталады.



Three postulated methods of DNA Replication



Semi-Conservative



Conservative*



Dispersive*



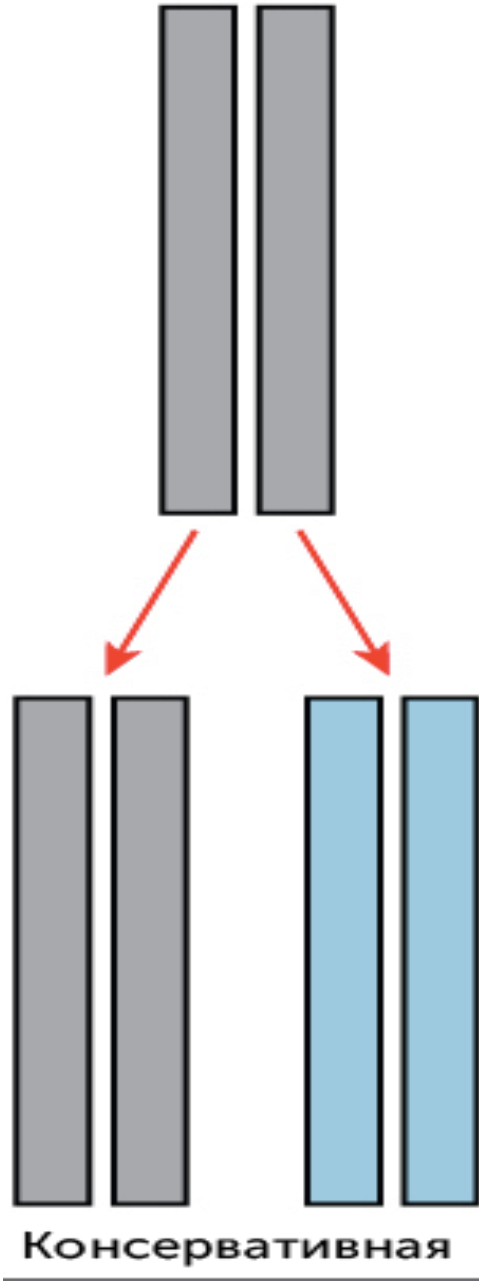
* not found to be biologically significant

Теория жүзінде репликацияның тағы екі жолын келтіруге болады. Олар: *Консервативті* репликация және *дисперсивті* репликация.

Бір қосспиральді ДНҚ молекуласының *консервативті* репликациясы кезінде бүтіндей бастапқы ДНҚ молекуласына ұқсас екі қосспиральді ДНҚ молекула түзіледі. Оның бірі жаңадан синтезделген екі тізбектен тұрса екінші молекула ата-аналық тізбектерден яғни алғашқы консервативті күйде болады

Жартылай консервативті синтез бір ескі және бір жаңа тізбекті қамтитын молекулалардың пайда болуына әкелуі керек.

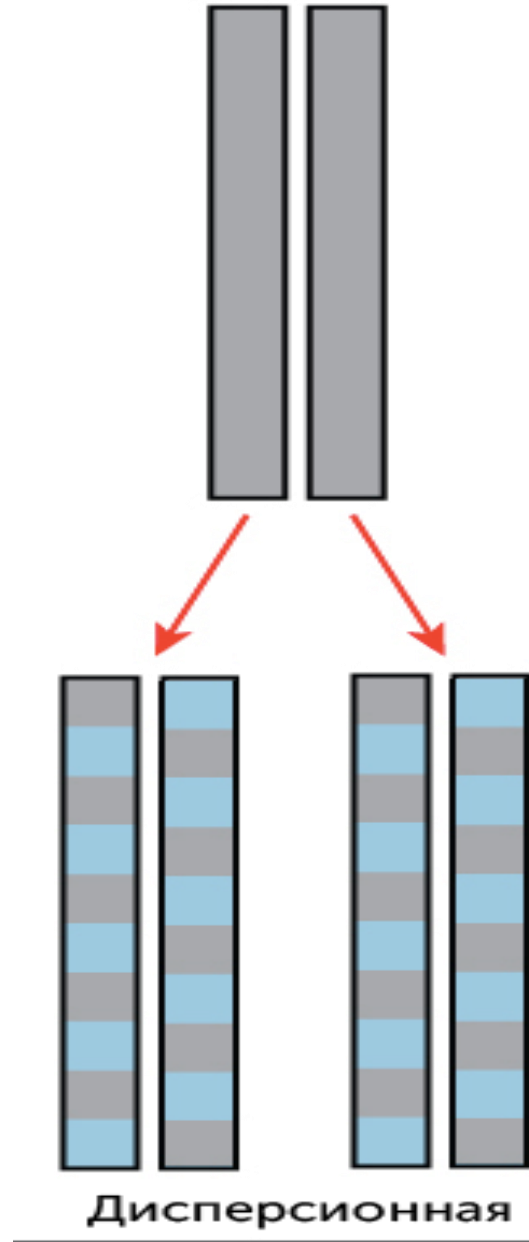
Дисперстік репликация моделі әрбір ДНҚ молекуласының әрбір тізбегі кезектесіп тұрған ескі және жаңа бөлімдерден тұратынын болжайды.



Консервативті репликация.

Ғалымдар бұл модельде ата-аналық ДНҚ мүлде бөлінбейді деп есептеді. Олар сондай-ақ бұл модельде ДНҚ-ның мүлдем жаңа және жеке көшірмесі қандай да бір жолмен ата-аналық жіптерді сақтай отырып қалыптасады дейді.

Дисперсивті репликация

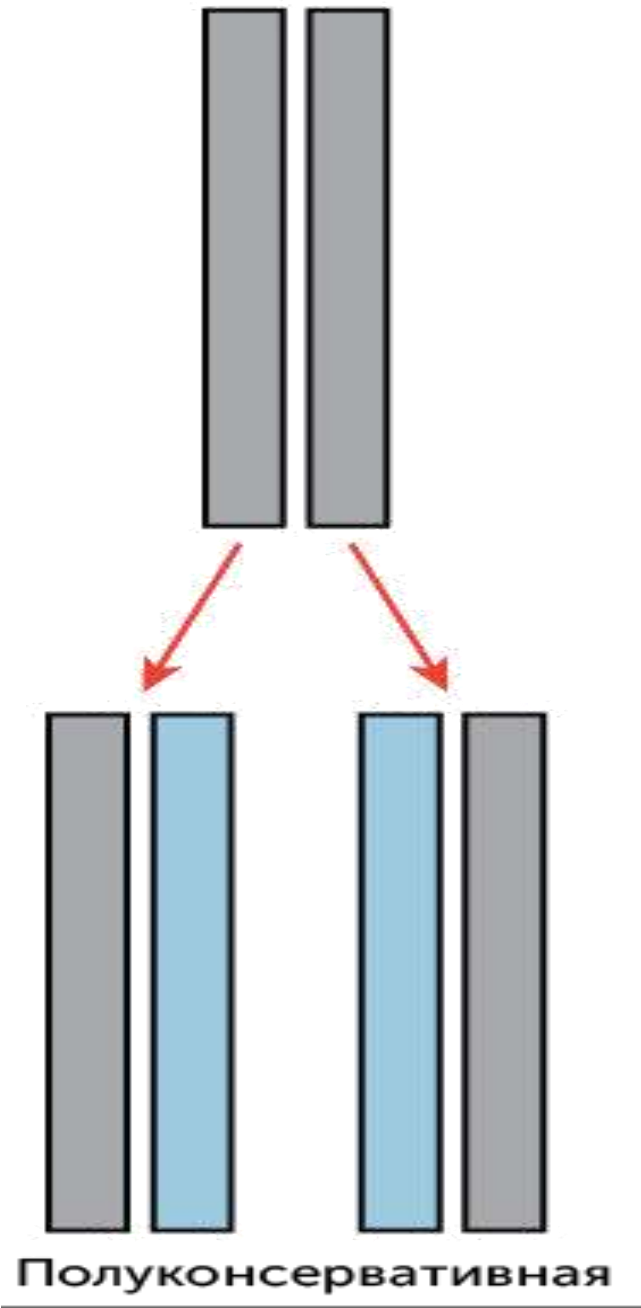


Дисперстік репликация гипотезасы ДНҚ-ны көшіру кезінде жасушаның ұзын дуплекстерді ширату мәселесін қалай шеше алатынын түсіндіру әрекеті ретінде пайда болды.

Бұл гипотезаға сәйкес, репликация кезінде ДНҚ-ның супер ширатылуын болдырмау үшін оған әрбір 5 нуклеотид қалдығынан кейін үзілістер енгізіледі. Олар молекуладан артық кернеу жойылғаннан кейін «тігіледі».

Нәтижесінде жаңа синтезделген тізбек ұзындығы 5 нуклеотид қалдығынан тұратын ескі және жаңа бөлімдерден тұрады. Ата-аналық тізбек үшін де солай. Бұл гипотезаны Макс Делбрюк ұсынған

Жартылай консервативті репликация



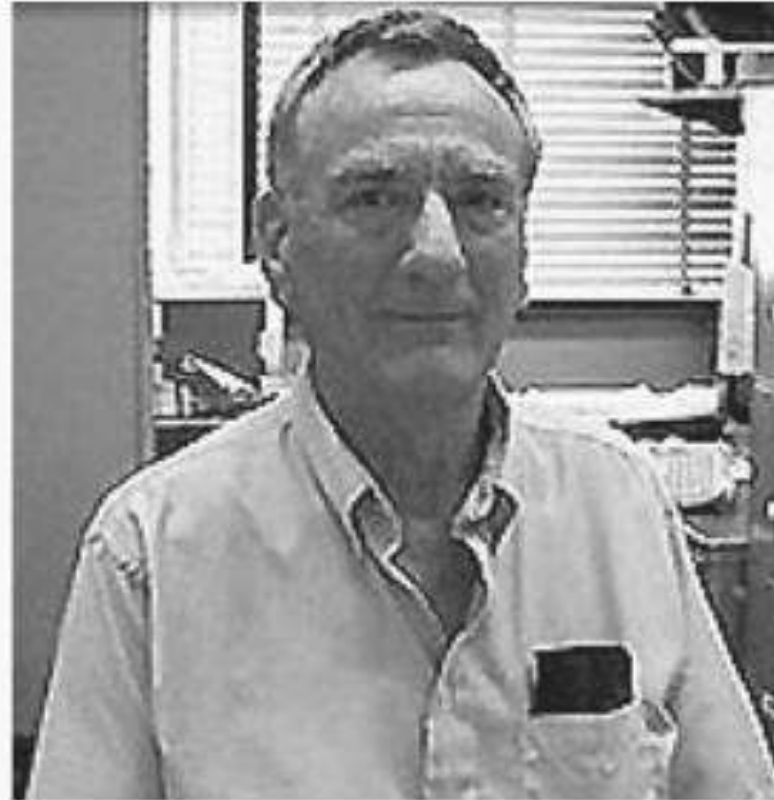
Бастапқы ДНҚ молекуласының екі тізбегі азотты негіздер арасындағы әлсіз сутектік байланыстардың үзілуіне байланысты алшақтайды. Олардың әрқайсысы жаңа ДНҚ тізбегінің түзілуіне шаблон қызметін атқарады, ал азотты негіздер арасында пайда болатын сутектік байланыстар молекуланың тұтастығын қалпына келтіре отырып, ескі және жаңа тізбектерді байланыстырады. Нәтижесінде әрбір жаңа жасуша бір ескі және бір жаңа тізбектен тұратын гибриді ДНҚ молекуласын алады.

Қазіргі уақытта бұл механизм Мэттью Месельсон мен Франклин Сталдың (1958) тәжірибелерінің арқасында дәлелденген.

Репликацияның жартылай консервативті сипатының дәлелі

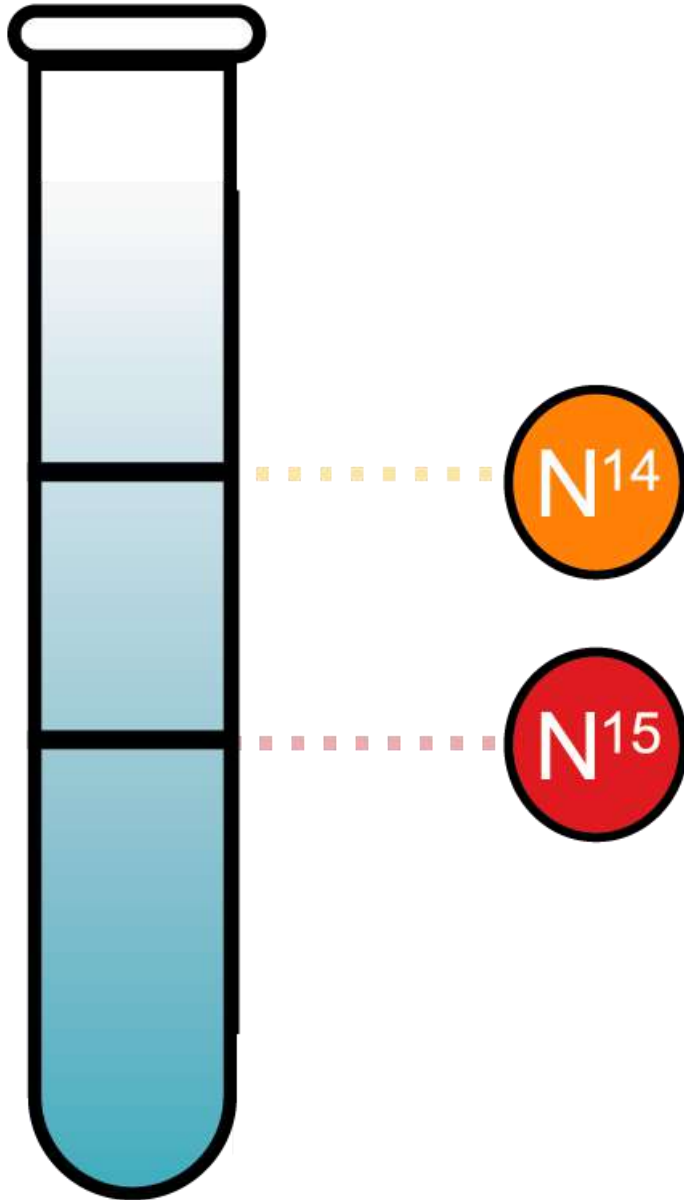


Метью Мезелсон



Франклин Сталь

+ ПЛОТНОСТЬ ↓

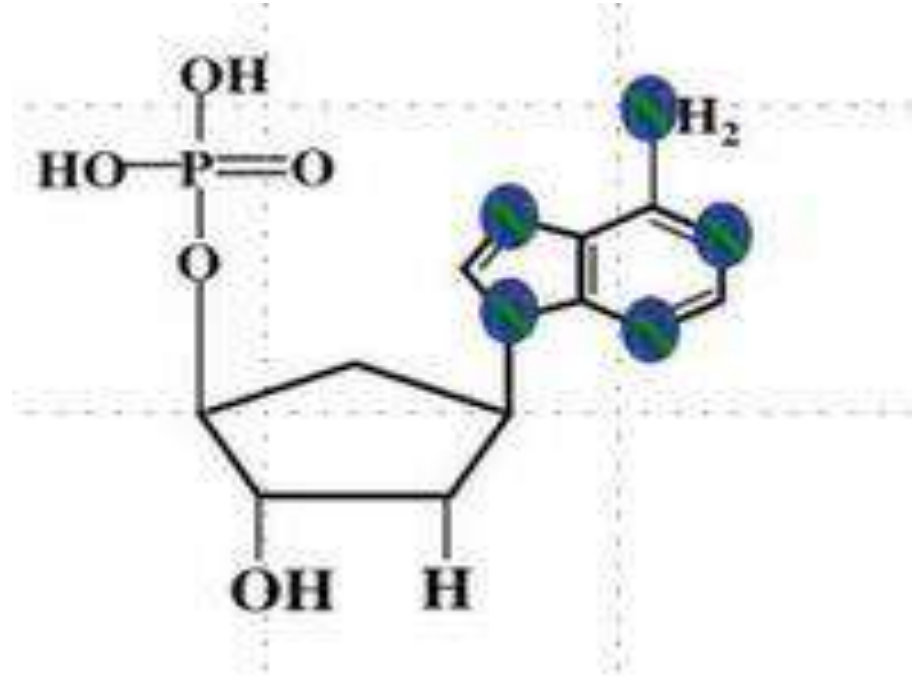


Мезельсона-Сталь эксперименті

- 1957 жылы Месельсон, Сталь және Джером Виноград макромолекулалардың (мысалы, ДНҚ) молекулалық массасын және меншікті көлемін зерттеудің жаңа әдісі - CsCl тығыздығы градиентінде ультрацентрифугалау туралы мақаласын жариялады
- Бұл әдіс ДНҚ молекулаларын олардың тығыздығына қарай бөлуге мүмкіндік береді: әрбір молекула ерітіндінің тығыздығы оның қалқымалы тығыздығымен сәйкес келетін градиент орнына тоқтайды.

Мезельсона-Сталь тәжірибесі

- нуклеотид құрамындағы азоттық негіз құрамына азот атомы кіретінің белгілі.
- Авторлар бұл әдісті құрамында ^{14}N және ^{15}N азот изотоптары бар ДНҚ молекулаларын бөлу үшін қолданды.
- Қалыпты азот ^{14}N 7 протон және 7 нейтроннан тұрады.
- ^{15}N бір нейтронға ауыр болу есебінен ауыр азот деп аталады. ^{15}N радиоактивті емес, тек ^{14}N -ден 1 атомдық масса бірлігіне ауыр.
- Ауыр изотопы бар ДНҚ молекулалары функционалды және екі еселене алады

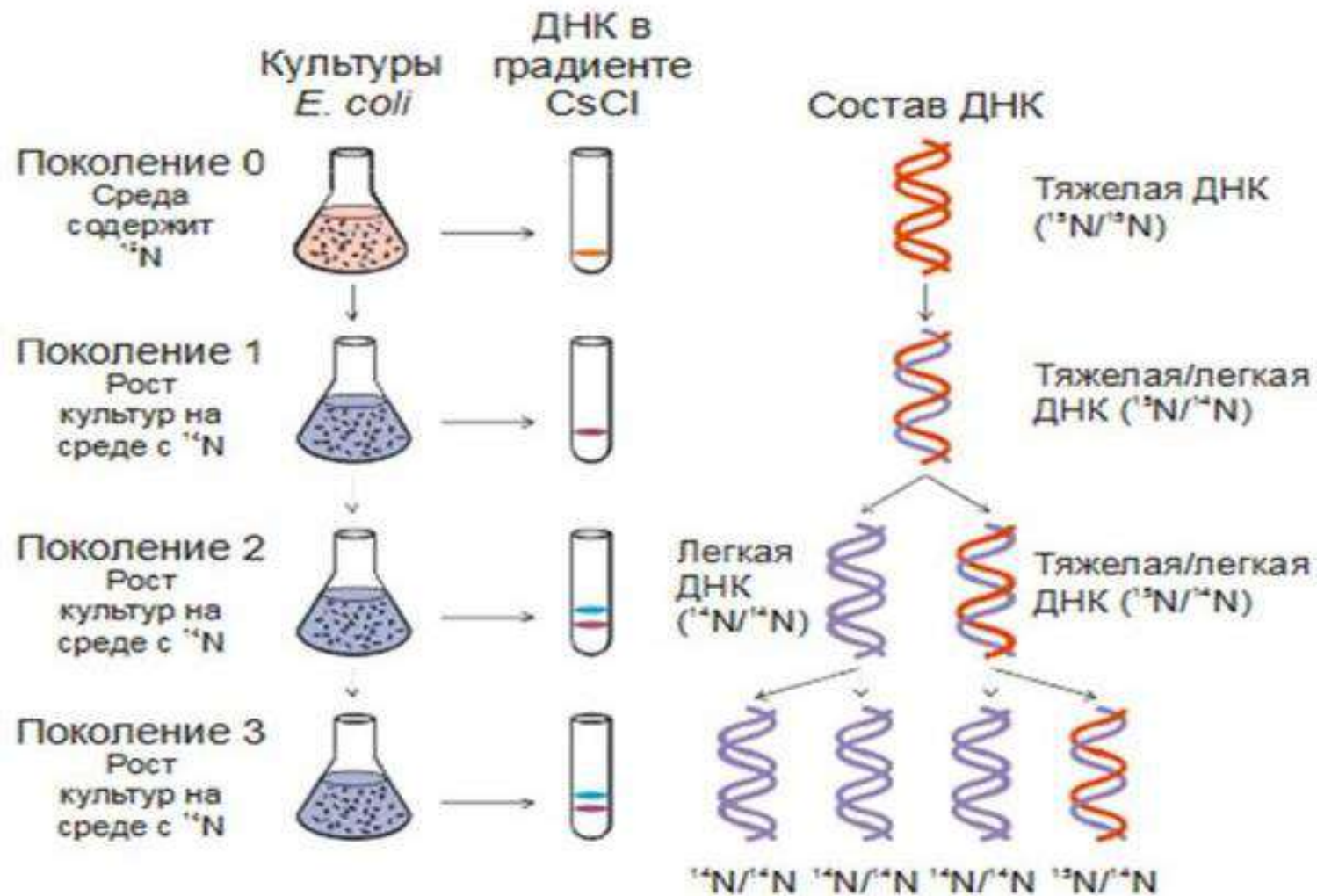


Тығыздық градиентінде центрифугалау



Бұл әдіс ДНК сияқты молекулаларды тығыздығы $1,7 \text{ г/см}^3$ цезий хлориді (CsCl) сияқты басқа молекулалардың қатысуымен жоғары жылдамдықпен айналдыру арқылы фракцияларға бөледі. CsCl молекулаларының тұнбаға түсуі нәтижесінде оның ерітіндісі түтіктің жоғарғы бөлігіндегі $1,65 \text{ г/см}^3$ -ден оның түбінде $1,8 \text{ г/см}^3$ -ге дейінгі тығыздық градиентіне ие болды. Осыған сәйкес, ДНК молекулалары қатаң белгіленген аймақта шоғырланған: түбінде, ортасында немесе пробирканың жоғарғы бөлігінде.

Тығыздық градиентінде центрифугалау тығыздықтағы өте аз айырмашылықтарды анықтауға мүмкіндік береді, мысалы, ауыр ^{15}N изотопымен таңбаланған ДНК мен жеңіл изотоп ^{14}N арасындағы. ^{15}N ортада өсірілген бактерия жасушаларының ДНК-сының тығыздығы $1,724 \text{ г/см}^3$ болса, ^{14}N ортада өсірілген жасушалардың ДНК-сының тығыздығы $1,710 \text{ г/см}^3$ болды.



- *E. coli* бактериялары бірнеше ұрпақ бойына (14 ұрпақ) құрамында ^{15}N азот изотопы бар ортада барлық ДНК-ға ^{15}N еніп, «ауыр» болу үшін өсірілді.
- Бұл жасушалар 0-ұрпақ ретінде алынды.
- Содан кейін жасушалар синхрондалып, жаңадан синтезделген ДНК жіптері «жеңіл» болу үшін «жеңіл» азот изотопы ^{14}N бар ортаға трансплантацияланды.
- Бірінші ұрпақтан бастап ДНК жеңіл изотопы (^{14}N) бар ортада өсірілген жасушалардан бөлініп, CsCl тығыздық градиентінде центрифугаланған.

Плотность ДНК

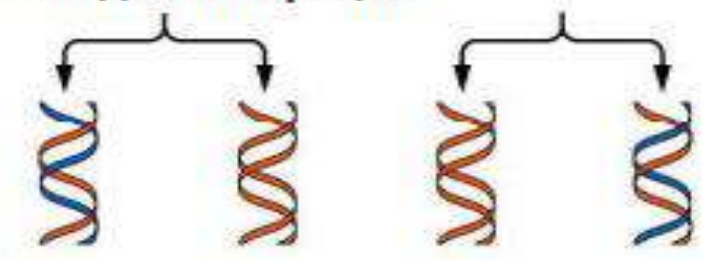
1 Бактерии *E. coli* выращивают на среде с ^{15}N несколько генераций



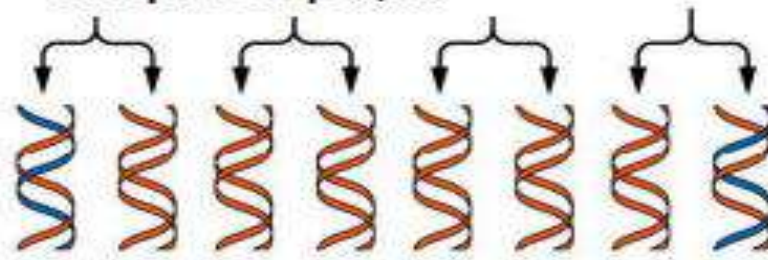
3 Клетки затем переносят в среду, содержащую ^{14}N азот на одну генерацию



5 На две генерации



7 На три генерации



2 ДНК экстрагируют и анализируют с помощью ультрацентрифугирования в CsCl

генерация 0

4 ДНК экстрагируют и анализируют

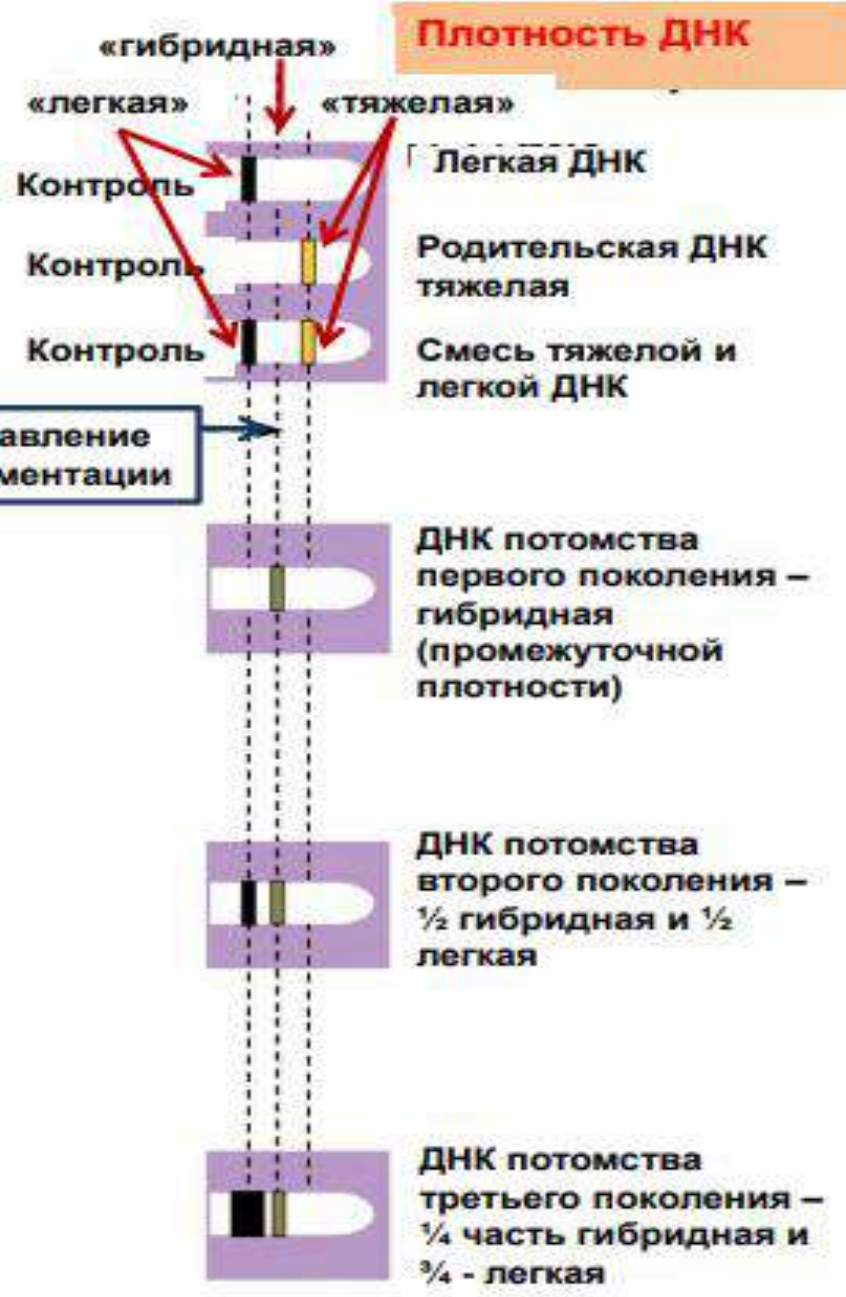
генерация 1

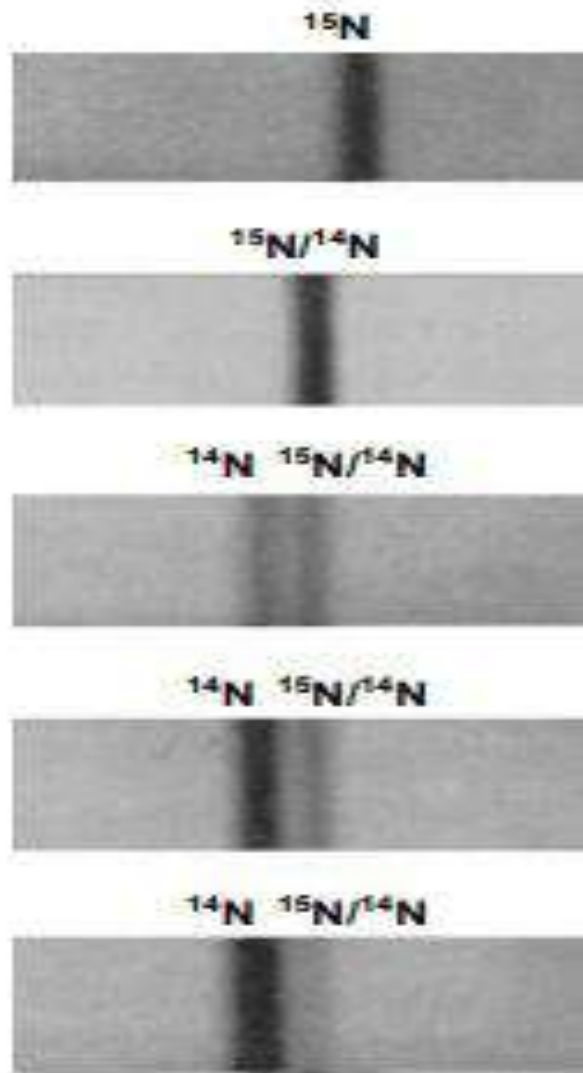
6 ДНК экстрагируют и анализируют

генерация 2

8 ДНК экстрагируют и анализируют

генерация 3





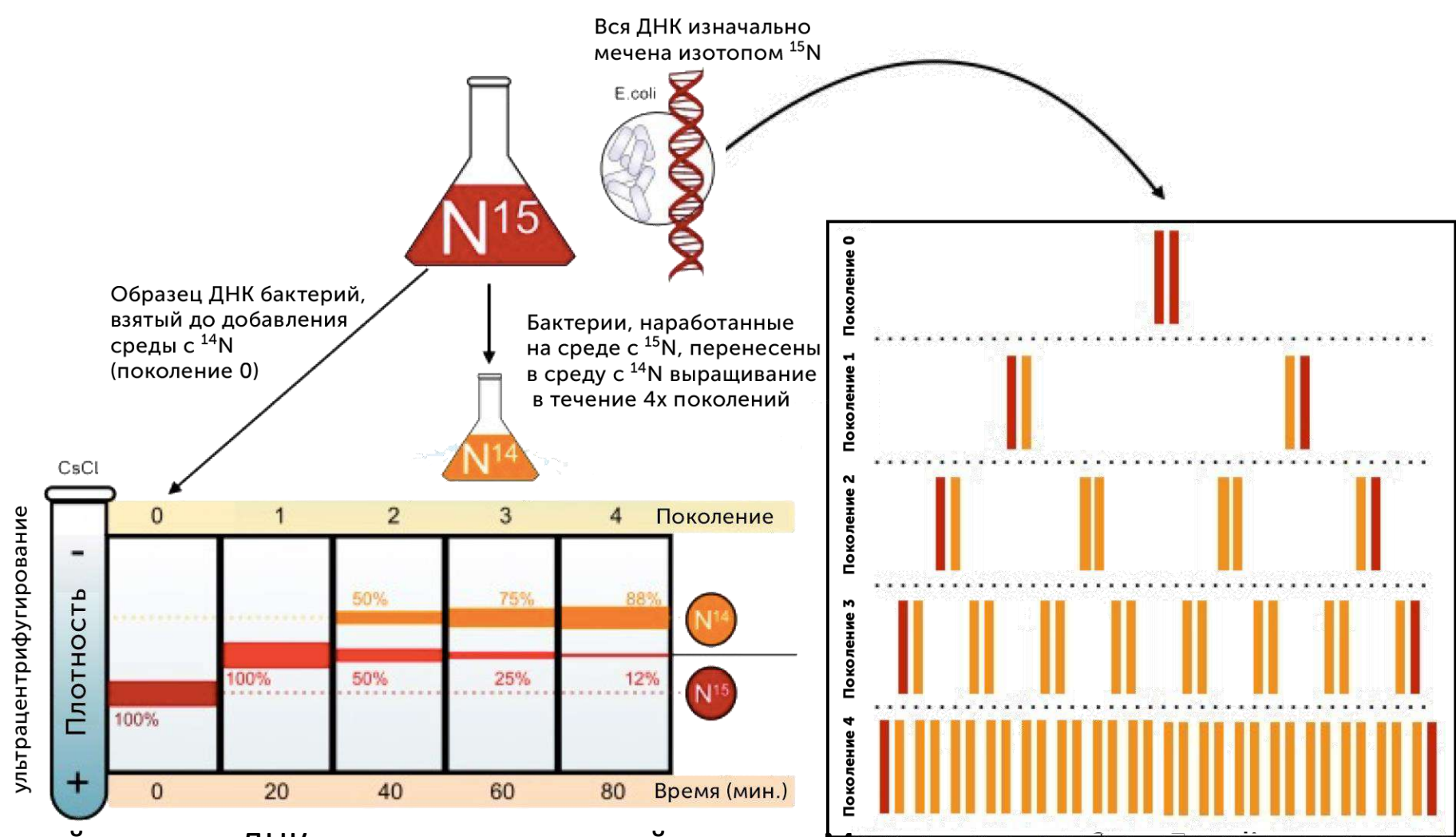
*0 генерация (жоғарыдан қараңыз). 100% ДНҚ N -15 пен таңбаланған.

* 1- генерация. 100% ДНҚ N -14 және N -15 тығыздығы арасындағы аралық жағдайда.

* 2- генерация. 50% ДНҚ N -14 және N -15 жолақтары арасындағы аралық жағдайда. Ал 50% ДНҚ N -14 тығыздығына ие болады

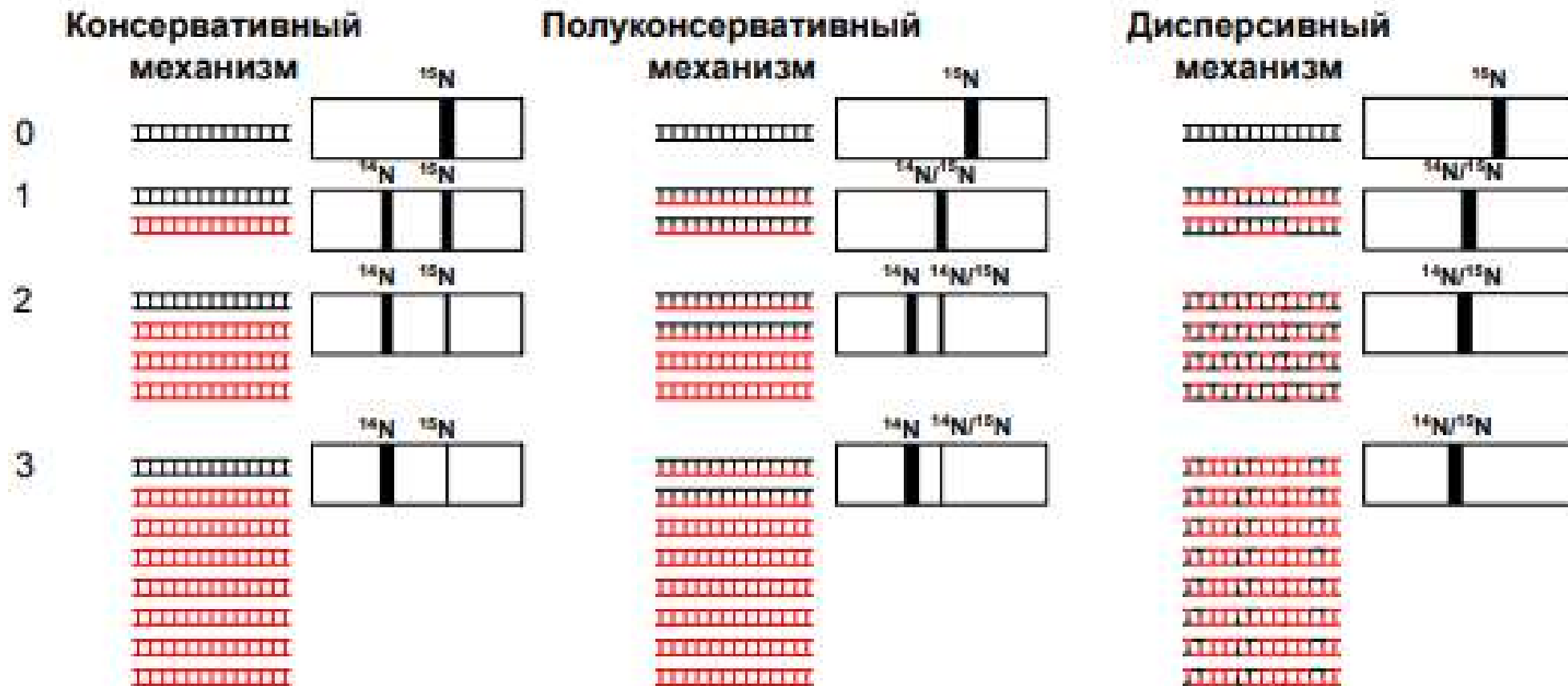
* 3-генерация. 25% ДНҚ N -14 және N -15 жолақтары арасындағы аралық жағдайда. Ал қалған 75% ДНҚ N -14 жолағында.

* 4- генерация. ДНҚ-ның тек 12% ғана N -14 және N -15 жолақтары арасында аралық күйде. Ал N -14 жолағында 88% ДНҚ.



Үлгілердің әрқайсысында ДНҚ тығыздығын анықтай отырып, Месельсон мен Стал *E. coli* культураны ^{15}N -ден ^{14}N ортасына көшіргеннен кейін бір ұрпақтың ДНҚ тығыздығы ^{15}N -ДНҚ және ^{14}N -ДНҚ арасында аралық болатынын анықтады. Екі ұрпақтан кейін бактерия жасушаларының жартысында азоттың жеңіл изотопы (^{14}N) бар ДНҚ, ал екінші жартысында алдыңғы ұрпақтағыдай аралық тығыздықтағы ДНҚ болды. ^{14}N ортада үш ұрпақтан кейін жасушалардың $\frac{3}{4}$ бөлігінде жеңіл ДНҚ болды, ал жасушалардың $\frac{1}{4}$ бөлігінде аралық тығыздықтағы ДНҚ сақталды. Осылайша, ұрпақтар саны мен ДНҚ тығыздығының таралуы арасындағы қатынас репликацияның жартылай консервативті түріне дәл сәйкес келді.

Что доказывает эксперимент Мезельсона-Сталя?



Полуконсервативный механизм репликации