

# Полуконсервативный механизм репликации ДНК.

**Преподаватель:** старший преподаватель  
кафедры молекулярной биологии и генетики,  
PhD, Смекенов И.Т.

**Дисциплина:** Рекомбинация ДНК

*(Лекция 4)*

## Цель

Изучить полуконсервативный механизм репликации ДНК и модель репликации Корнберга для понимания ключевых принципов удвоения генетического материала.

## Задачи

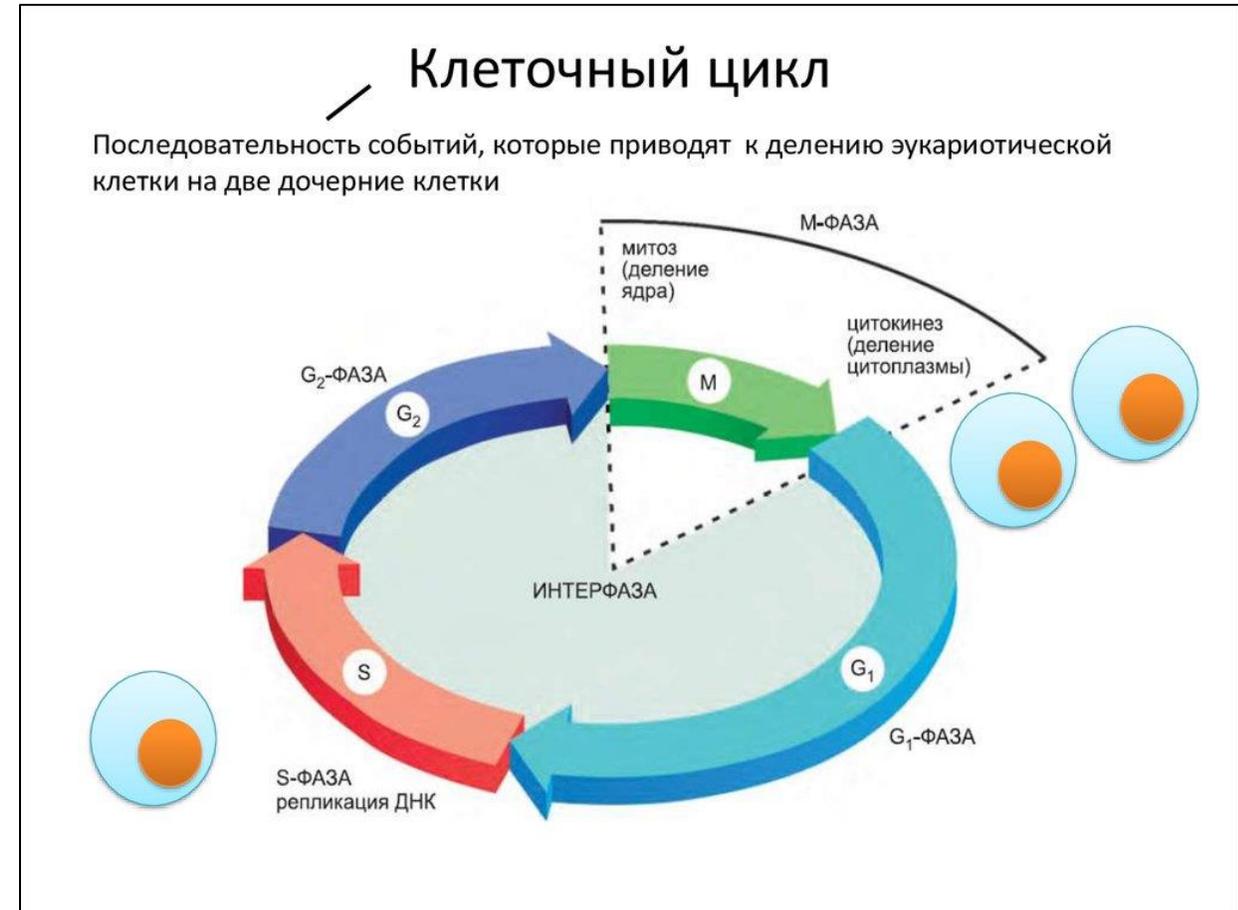
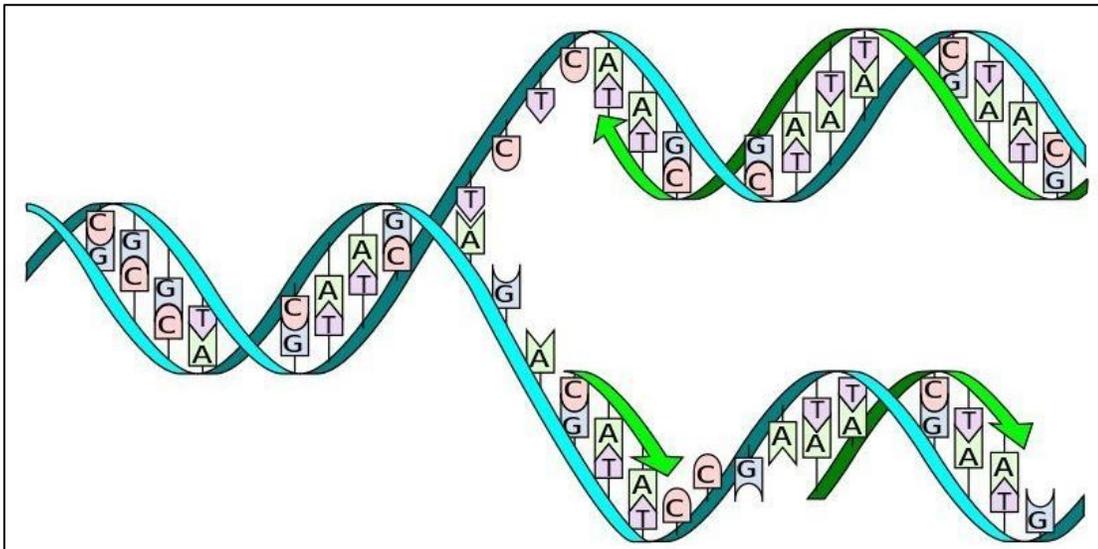
1. Описать полуконсервативный механизм репликации ДНК и его значение для сохранения генетической информации.
2. Рассмотреть модель репликации Корнберга, включая функции ключевых ферментов, таких как ДНК-полимераза.
3. Объяснить направление репликации и принципы работы ведущей и отстающей цепей.
4. Описать отправные точки (origins) репликации и их роль в инициации процесса.

**Ключевые слова:** полуконсервативная репликация, модель Корнберга, ДНК-полимераза, направление репликации, отправные точки, ведущая цепь, отстающая цепь

Живым организмам присуща уникальная способность к передаче генетической информации от поколения к поколению с сохранением своих наследственных свойств.

**Репликация ДНК** (редупликация, самоудвоение, копирование) - удвоение молекулы ДНК или комплементарный синтез ДНК на матрице ДНК.

Процесс переноса генетической информации (одной из форм биологической памяти) является определяющим и очень важным для развития и нормальной жизнедеятельности клеток организма.



# Открытия:

- В 1957 г. **М. Месельсон и Ф. Сталь** предложили гипотезу удвоения полу консервативным способом. Американский биохимик Артур Корнберг открыл фермент ДНК-полимеразу.
- В 1968 г. японский ученый **Р. Оказаки** доказал синтезирование новой цепи ДНК.
- Американские ученые **Ричардсон и Вейс** выяснили, что фермент «лигаза» соединяет отрезки молекул ДНК.



# Три модели репликации ДНК

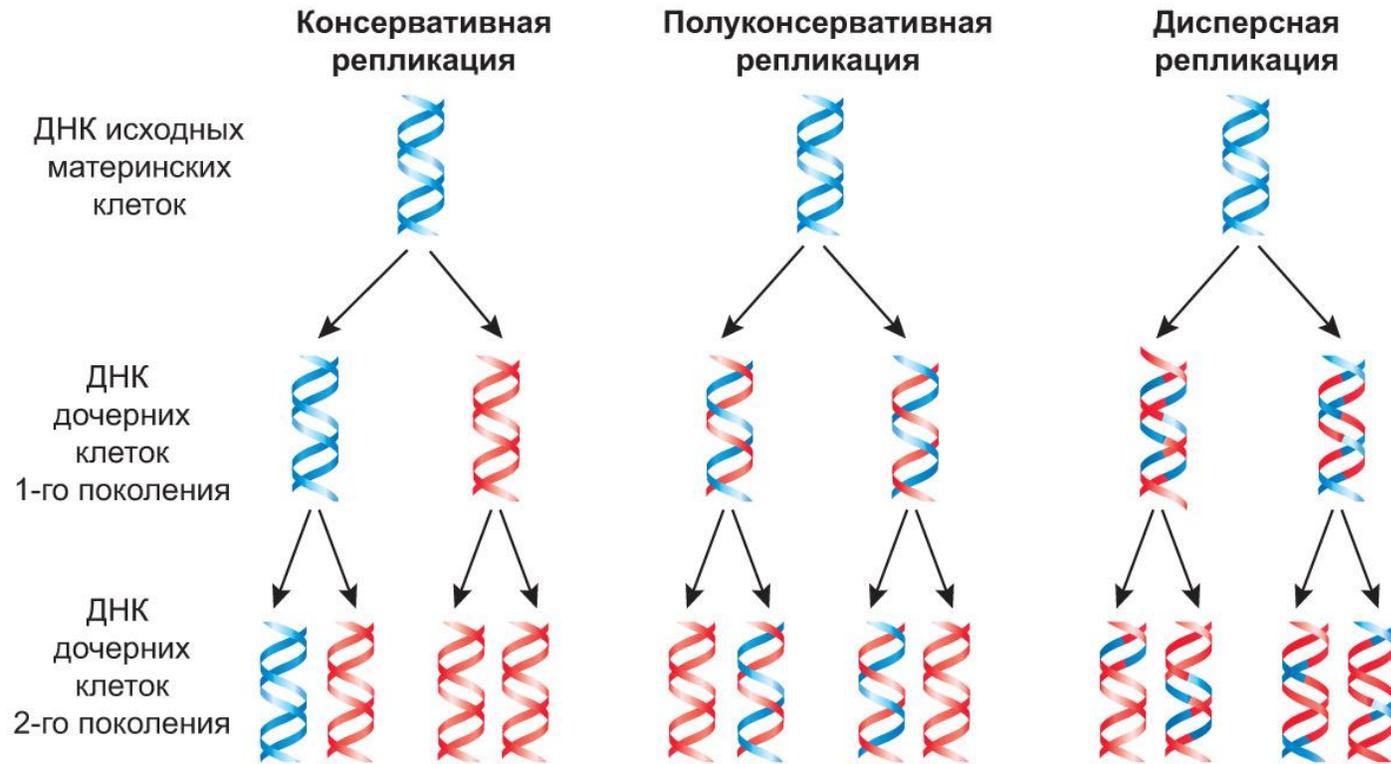


Рис. 16.2. Гипотезы о механизме репликации ДНК  
(исходные материнские цепи показаны синим цветом, дочерние – красным)

**Полуконсервативная репликация.** В этой модели две нити ДНК раскручиваются и отсоединяются друг от друга, далее каждая из них выступает в качестве матрицы для синтеза новой комплементарной нити. В результате чего получаются две молекулы ДНК, каждая из которых содержит одну исходную и одну новую цепи.

**Консервативная репликация.** В этой модели результатом репликации ДНК является одна молекула, содержащая обе исходных цепи ДНК (идентичная исходной молекуле ДНК), и вторая молекула, состоящая из двух новых цепей (которые являются точными копиями цепей исходной молекулы).

**Дисперсионная репликация.** В дисперсионной модели результатом репликации ДНК являются две молекулы ДНК, каждая из которых представляет собой смесь, или «гибрид» родительской и дочерней ДНК. В этой модели каждая отдельная нить подобна лоскутному одеялу и состоит из фрагментов исходной и новой ДНК.

# Эксперимент Мезельсона и Сталля

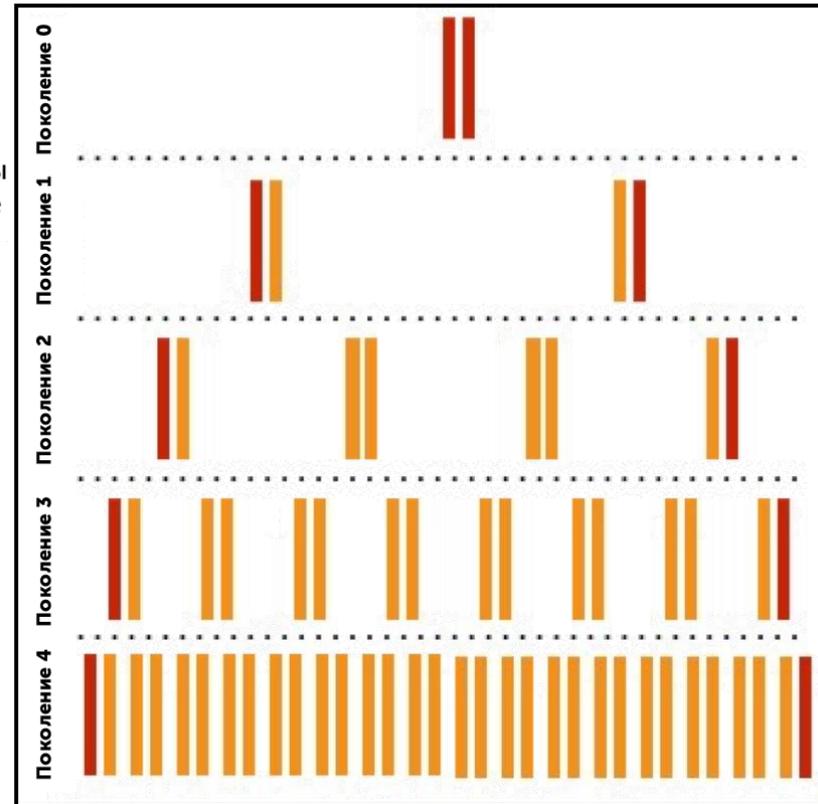
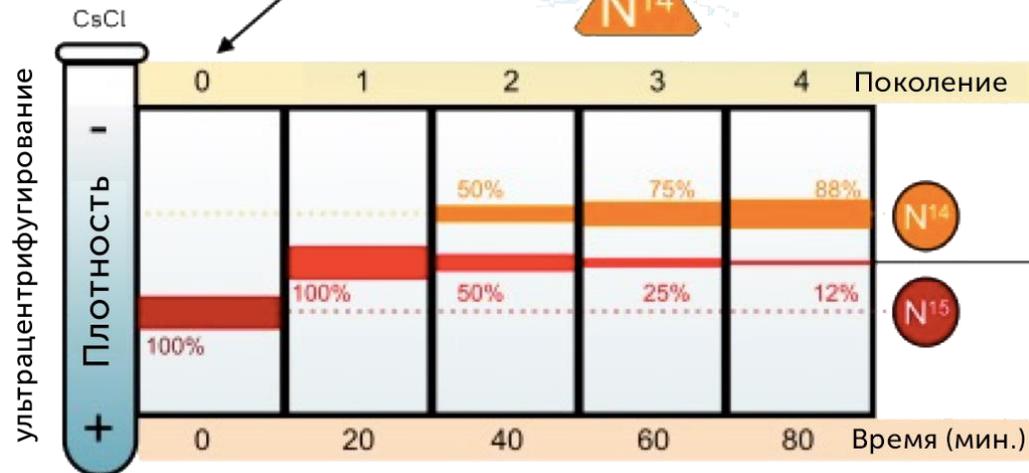
**Изотоп** - это просто вариант химического элемента, который отличается от других вариантов количеством нейтронов в ядре атома.

Вся ДНК изначально мечена изотопом  $^{15}\text{N}$



Образец ДНК бактерий, взятый до добавления среды с  $^{14}\text{N}$  (поколение 0)

Бактерии, наработанные на среде с  $^{15}\text{N}$ , перенесены в среду с  $^{14}\text{N}$  выращивание в течение 4х поколений



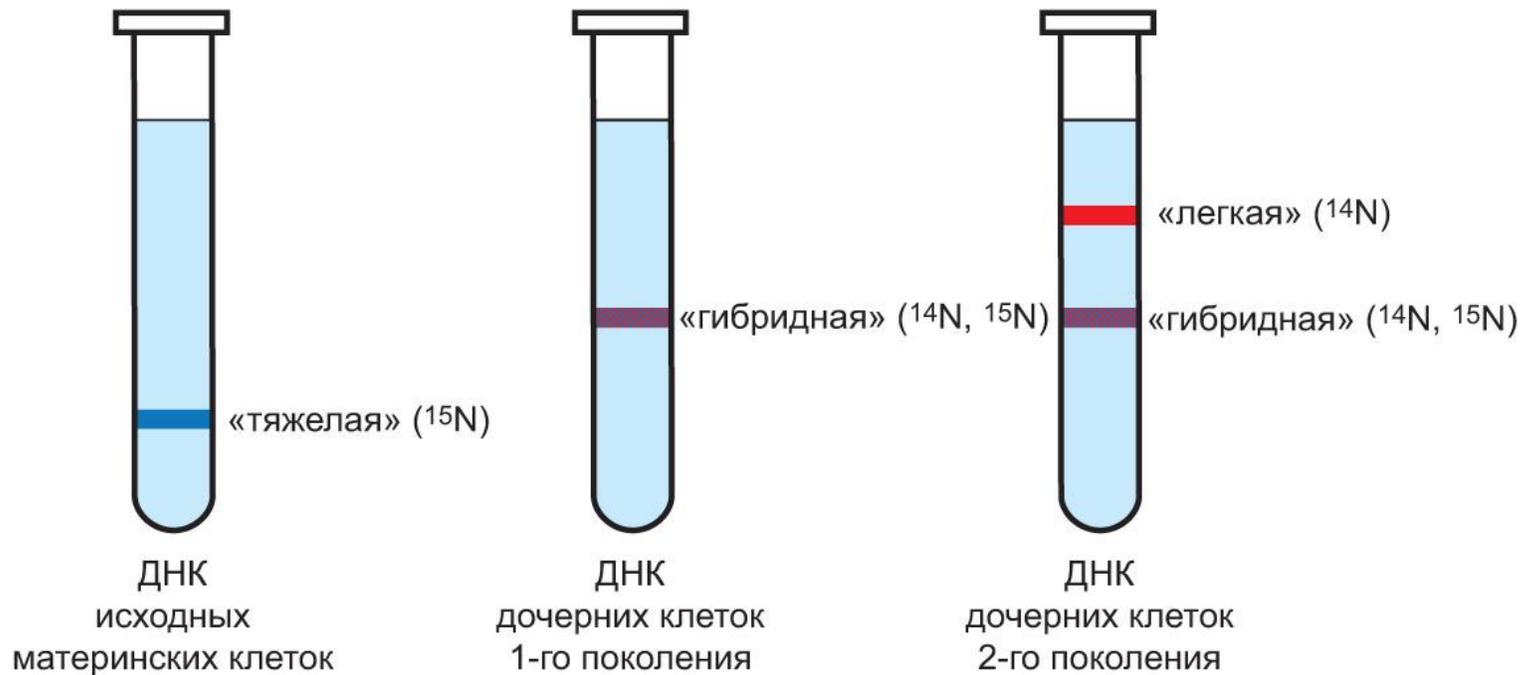


Рис. 16.3. Результаты центрифугирования ДНК в эксперименте М. Мезельсона и Ф. Сталя

Этот метод разделяет молекулы, такие как, например, ДНК, на фракции при помощи вращения их на высоких скоростях в присутствии других молекул, например, хлорида цезия.

## ВЫВОДЫ:

### Поколение 0

ДНК, выделенная из клеток в начале эксперимента, давала одну фракцию после центрифугирования.

### Поколение 1

ДНК, выделенная из бактерий первого поколения (после одного цикла репликации ДНК), также показывала одну фракцию при центрифугировании. Однако эта фракция располагалась уже выше, что указывало на промежуточную плотность между ДНК с тяжелым изотопом  $^{15}\text{N}$  и ДНК с легким изотопом  $^{14}\text{N}$ .

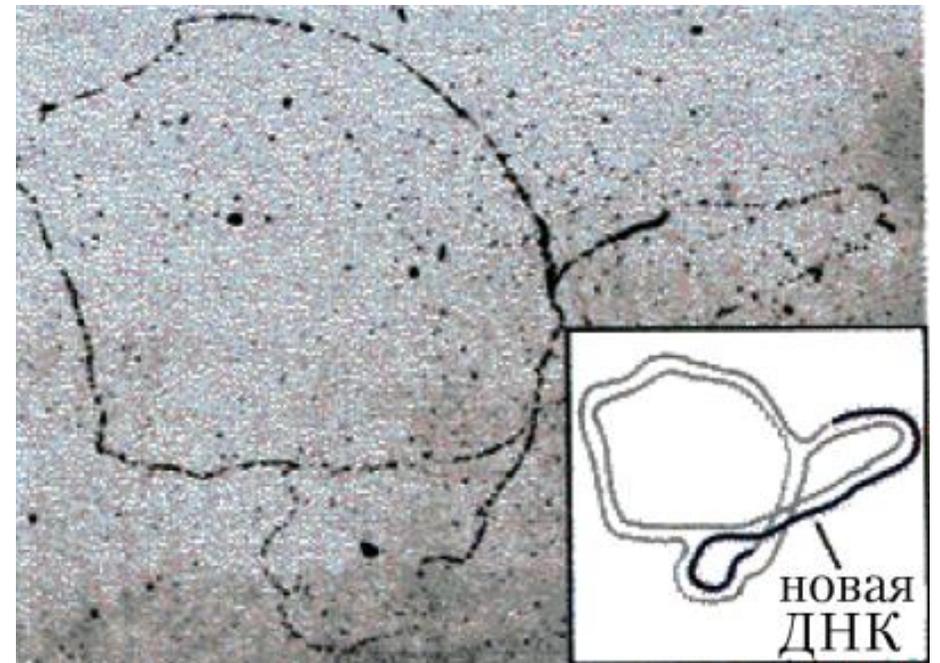
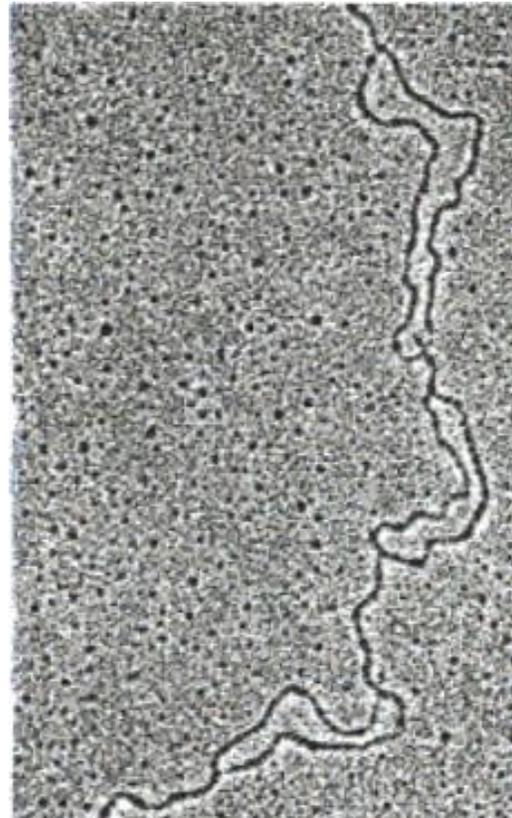
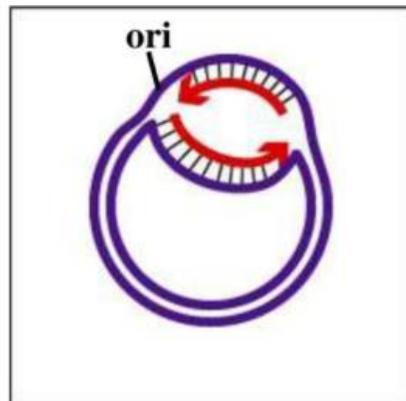
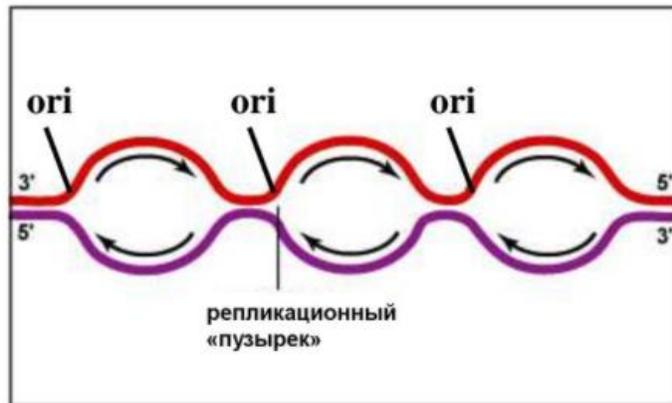
### Поколение 2

После того, как ДНК бактерий второго поколения была центрифугирована, она показала две фракции. Первая фракция находилась в той же позиции, что и промежуточная фракция из первого поколения, а вторая была выше (указывая на то, что ДНК отмечена только легким изотопом  $^{14}\text{N}$ ).

### Поколения 3 и 4

В полуконсервативной модели ожидается, что каждая гибридная молекула ДНК из второго поколения будет давать одну гибридную молекулу и одну легкую молекулу в третьем поколении, тогда как каждая легкая молекула ДНК будет давать при репликации только легкие молекулы.

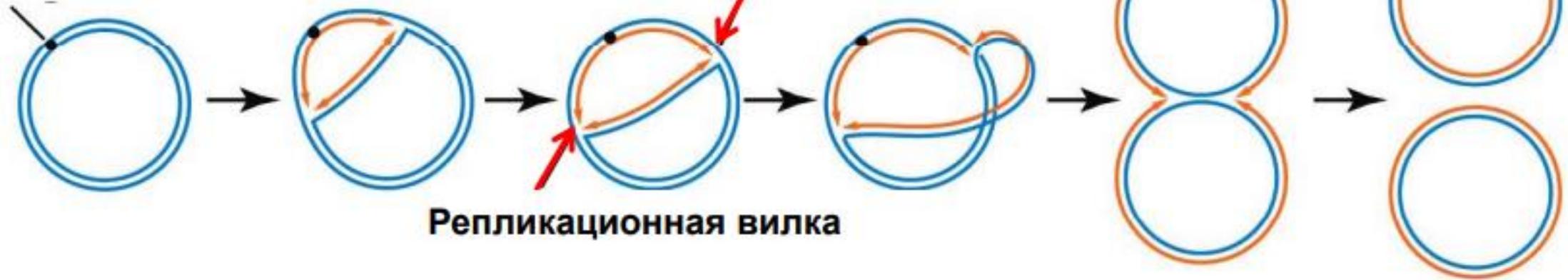
- Процесс репликации начинается в строго определенных участках молекулы ДНК — **точках начала репликации (Ori)**.
- Бактериальная хромосома, как правило, имеет **одну** такую точку.
- У ядерных организмов каждая молекула ДНК (хромосома) содержит **множество** точек начала репликации.



Origin-  
репликации

Репликационная вилка

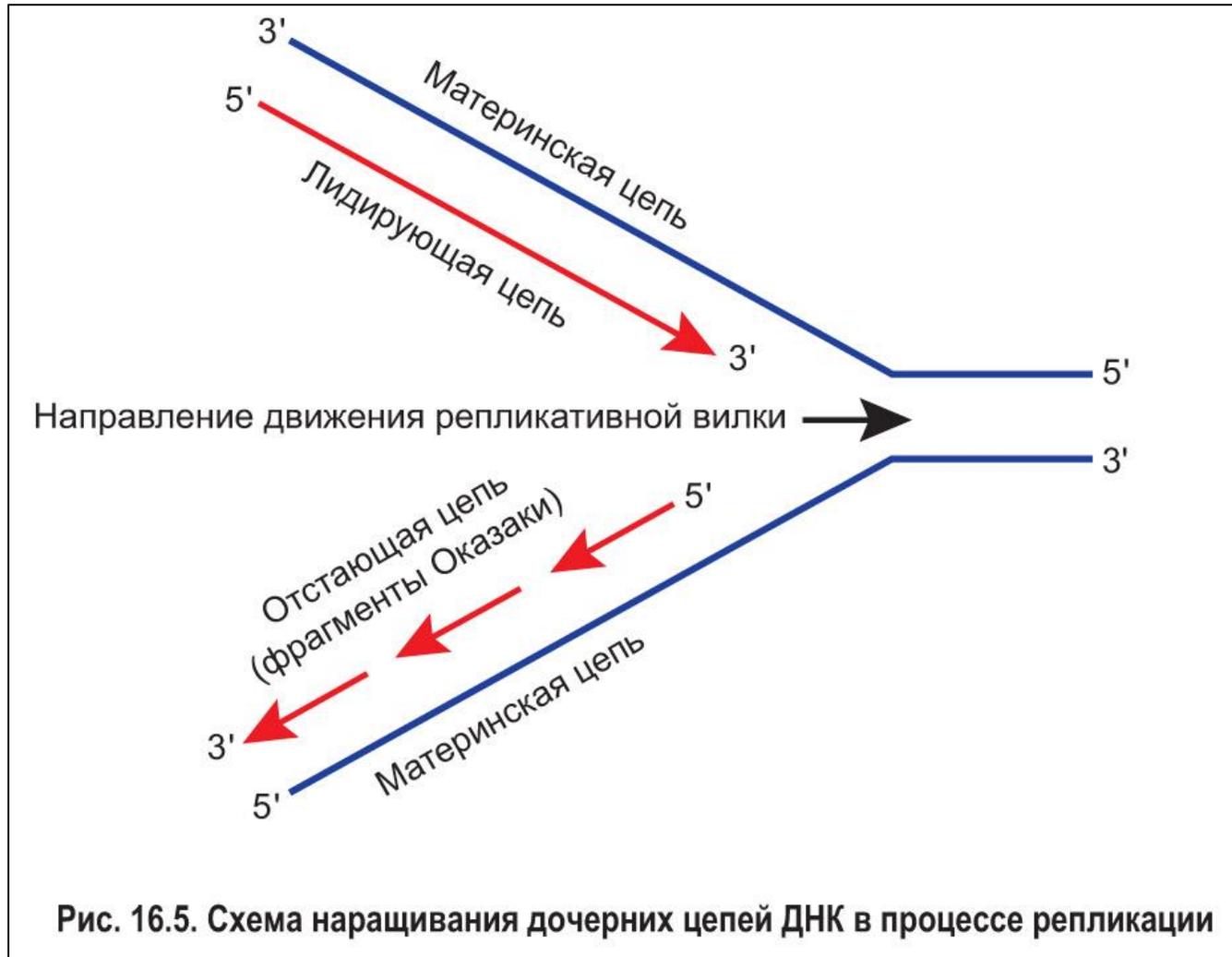
Репликационная вилка



## Число репликонов у различных организмов

Организм	Число репликонов	Средний размер репликона, тыс. п.н.
E.coli	1	4 200
Дрожжи	500	40
Дрозофила	3 500	40
Лягушка	15 000	200
Мышь	25 000	150
Бобы	35 000	300

# Процесс репликации ДНК подразделяют на три этапа



**1. Инициация** (запуск). Особые ферменты начинают раскручивать молекулу ДНК от точки начала репликации → *репликативная вилка*.

**2. Элонгация** (удлинение, наращивание дочерних цепей ДНК). Молекулы ДНК-полимеразы начинают двигаться вдоль материнских цепей, используя их в качестве матриц для построения новых дочерних цепей.

**3. Терминация** (остановка). Когда репликативная вилка достигает соседнего участка ДНК, на котором также осуществлялась репликация, ферменты завершают свою работу.

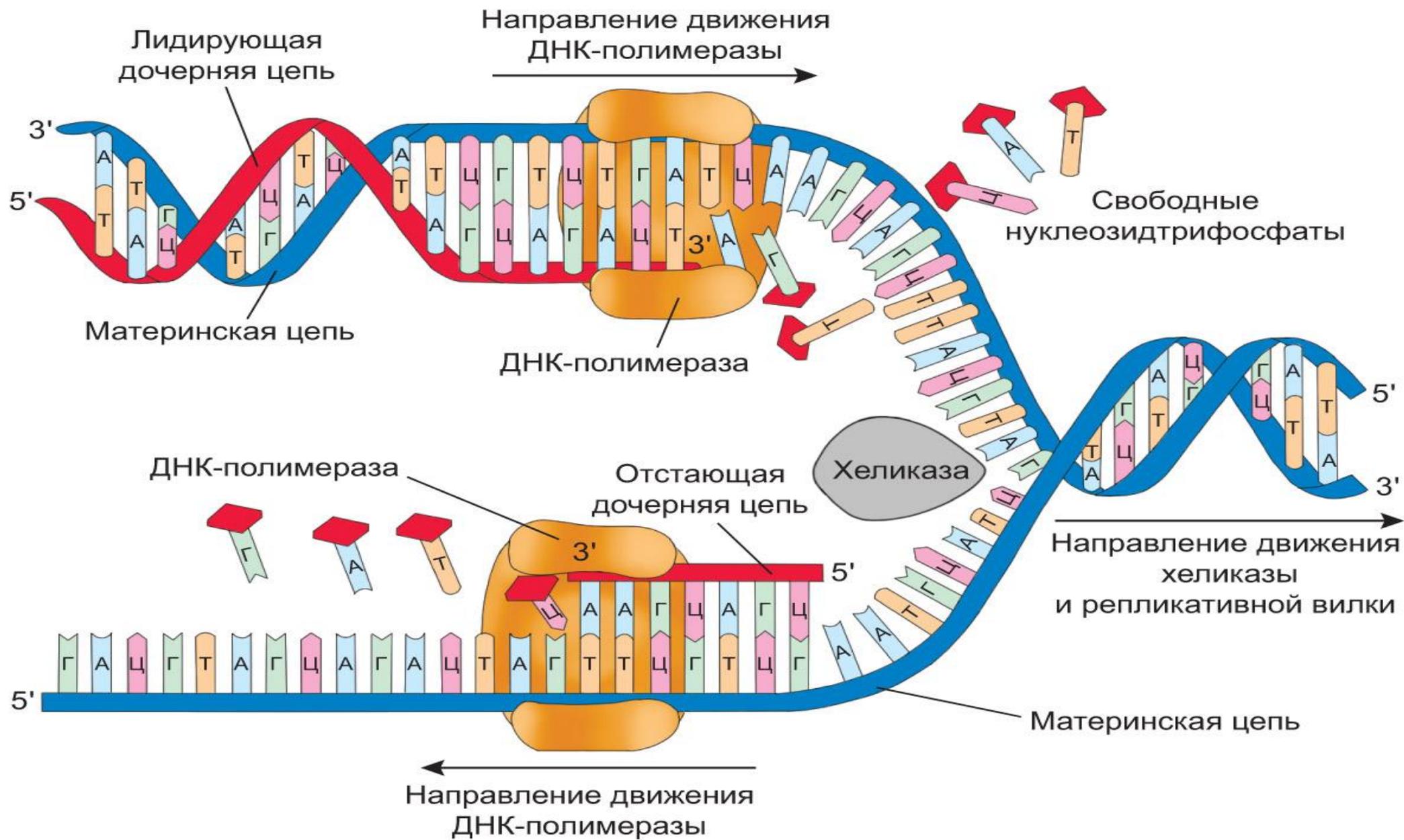
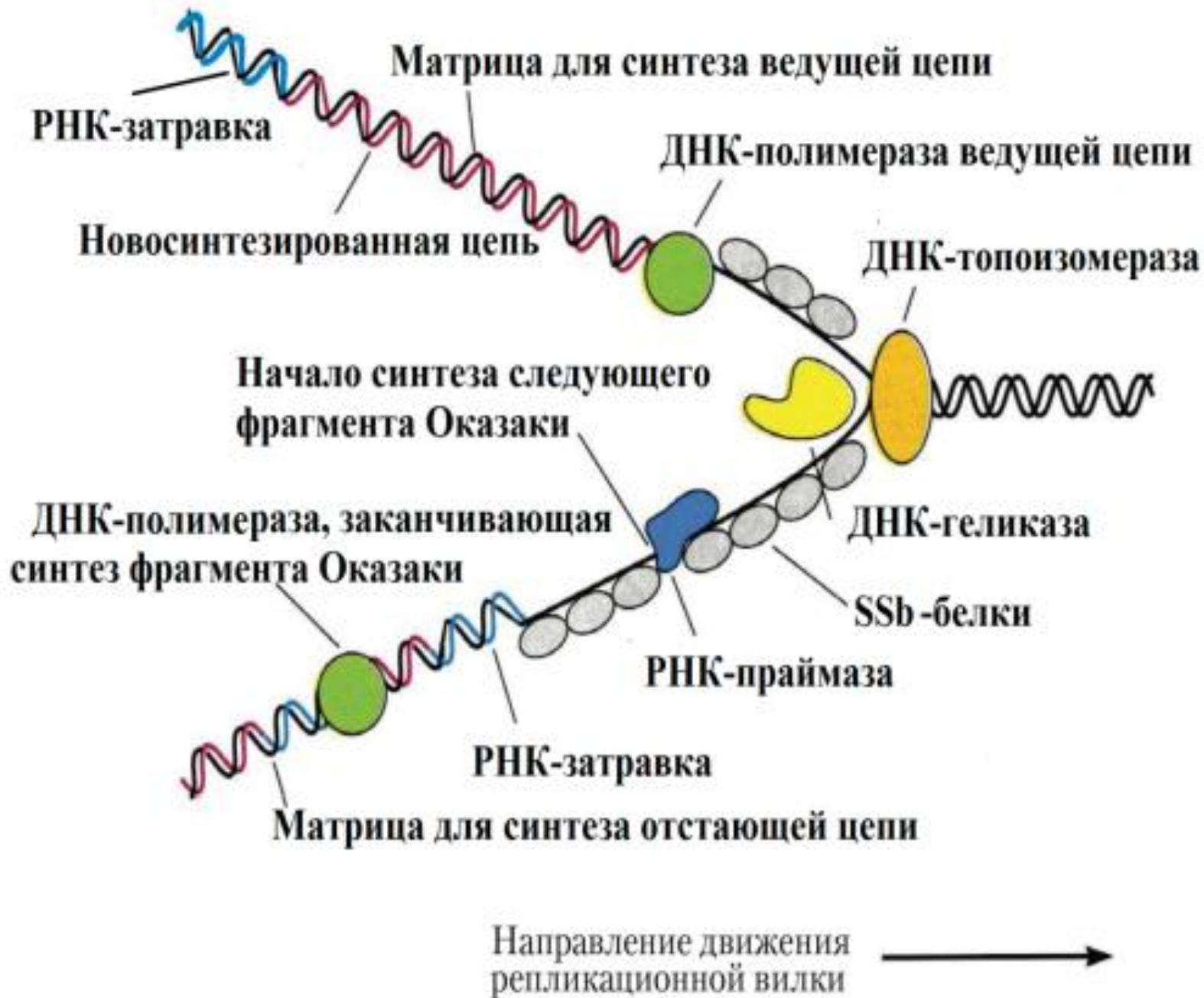


Рис. 16.4. Схема процесса репликации ДНК

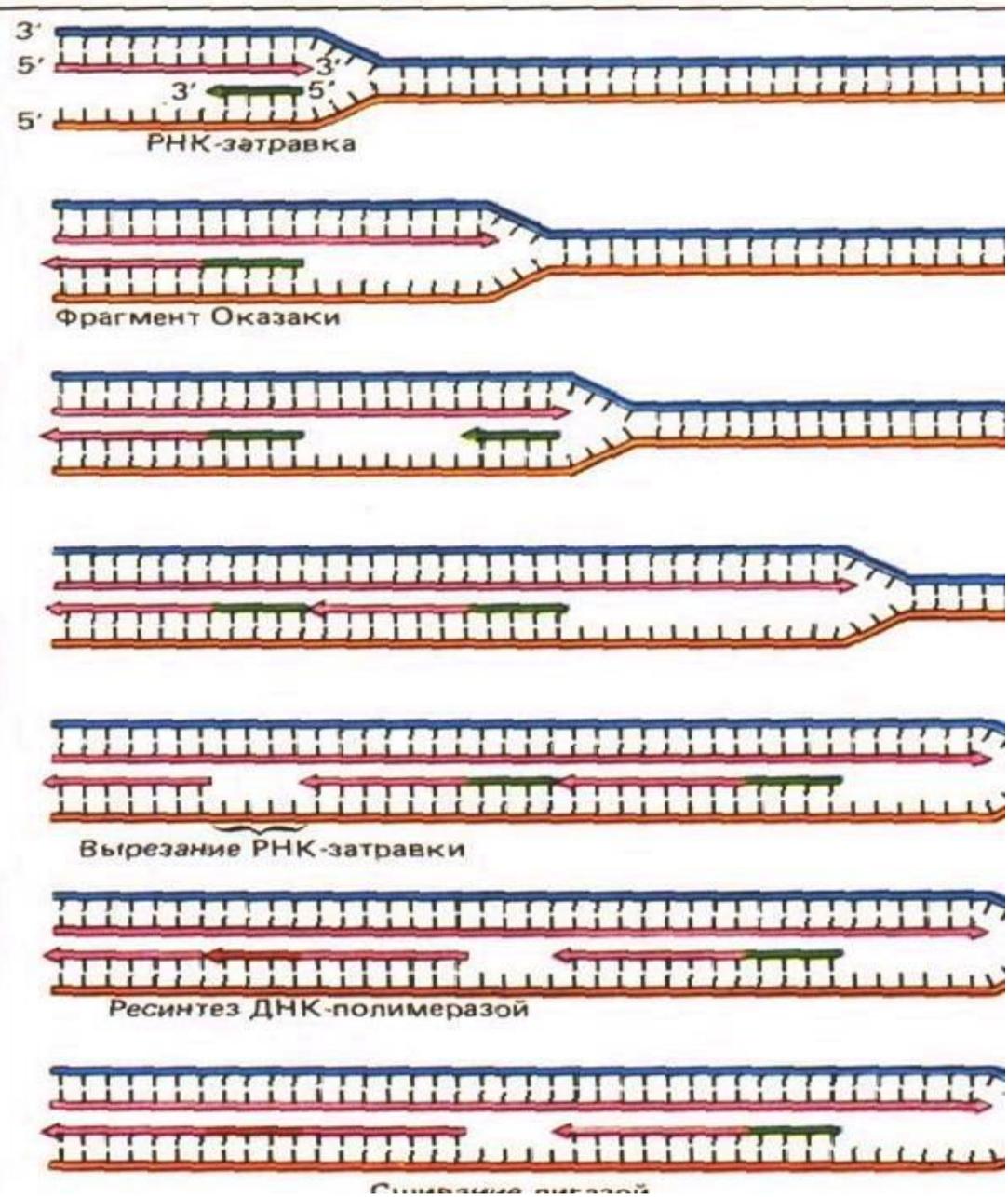


**Праймаза** создает РНК *праймер* или короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, комплементарный матрице, который формирует 3'-конец для работы ДНК-полимеразы. Типичный праймер имеет длину от 5-10 нуклеотидов.

У бактерии *E. coli*, ДНК-полимераза, которая осуществляет большую часть синтеза, является **ДНК-полимеразой III**.

**ДНК-полимераза I**, ещё одна участвующая в репликации полимераза, удаляет РНК-праймеры и заменяет их на ДНК.

Схема удвоения цепей ДНК по Р. Окадзаки



В 1957 г. с помощью ДНК-полимеразы А. Корнберг впервые осуществил синтез ДНК в лабораторных условиях, а в 1959 г. за открытие механизмов биосинтеза нуклеиновых кислот он совместно с биохимиком С. Очоа был удостоен Нобелевской премии.\*

Возможна также репликация отдельных фрагментов ДНК, которая называется амплификацией.

Для репликации ДНК необходимо наличие:

- 1) четырех видов дезоксирибонуклеозид-5-трифосфатов;
- 2) матрицы в виде двухцепочечной ДНК;
- 3) затравки (праймера);
- 4) ферментов и регуляторных факторов;
- 5) ионов металлов ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ).

Рост цепи ДНК происходит в направлении от 5' к 3' концу. Субстратами реакции является 3'-конечная ОН-группа дезоксирибозы растущей цепи и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Фермент, который катализирует эту реакцию - ДНК-зависимая ДНК-полимераза. Синтез ДНК с подобными механизмами осуществляется также при репарации повреждений и других процессах.

# Модель репликации Корнберга. Направление и отправные точки процесса репликации

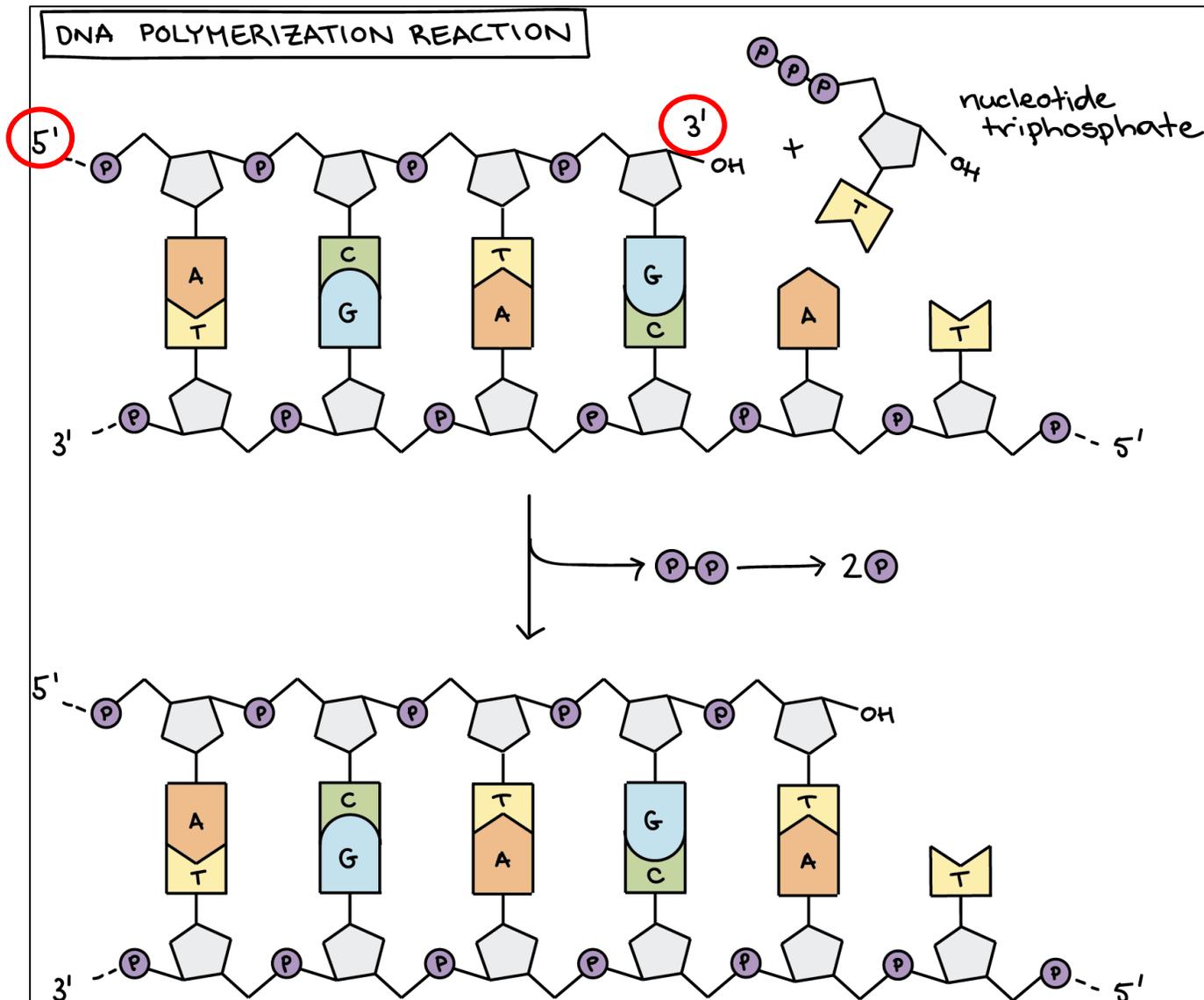
Лекция 6

## Артур Корнберг (1918–2007)

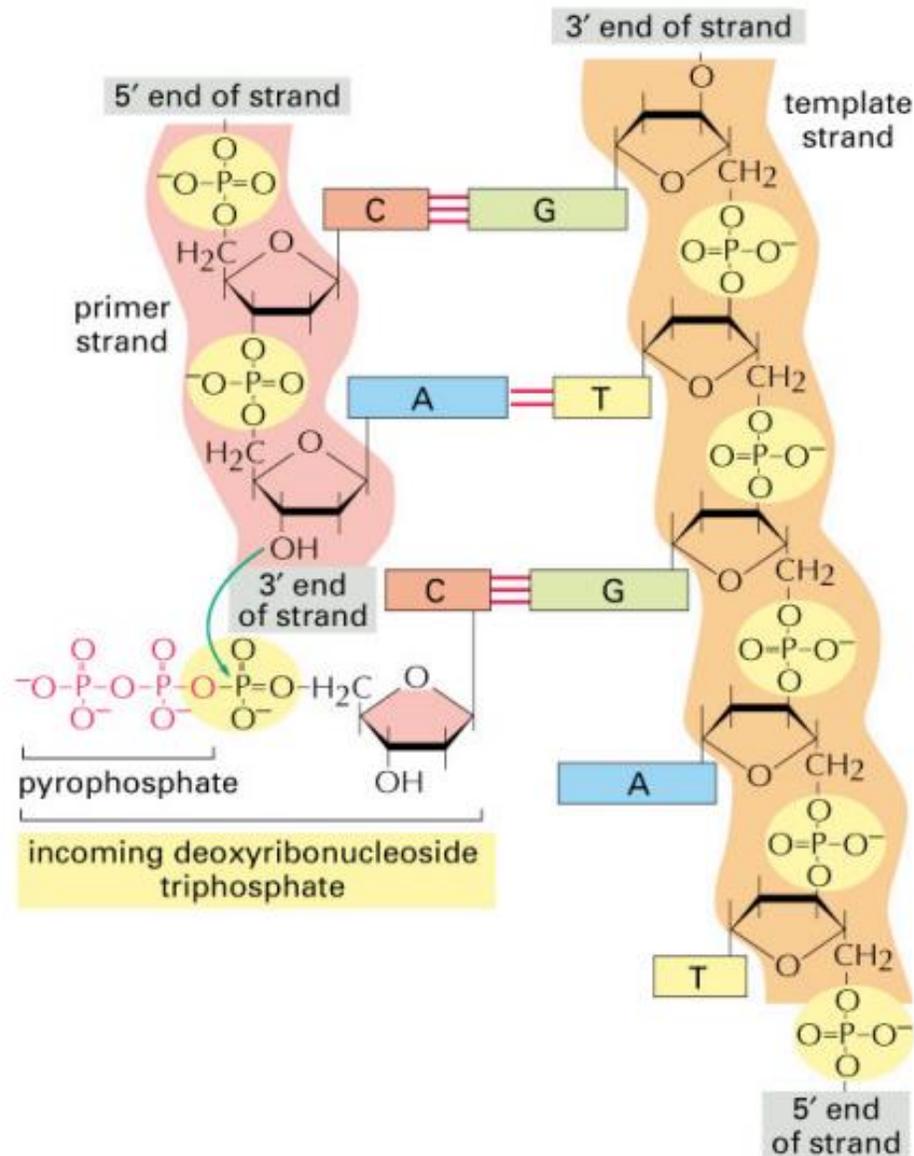


- *А. Корнберг* открыл фермент ДНК-полимеразу, который на расплетенных цепях, как на матрицах, синтезирует новые, комплементарные им цепи ДНК.

- Основная особенность данного фермента:



# Синтез происходит ТОЛЬКО в направлении 5'-3'

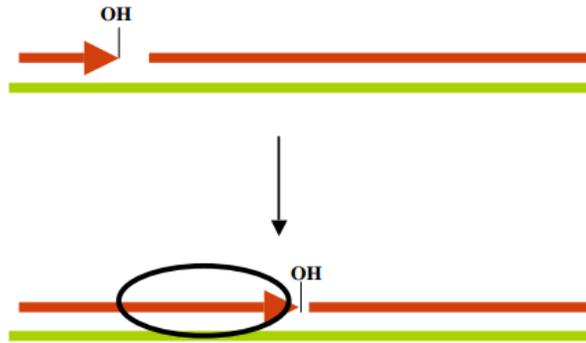


- односторонний шаблон
- дезоксирибонуклеотиды с 5' трифосфат (дНТФ)
- ионы магния
- отожженный праймер с 3'ОН





*E. coli* DNA polymerase I 5'-3' exo and 5'-3' pol activities allow "nick translation"



Замена пар оснований может быть полезна для восстановления ДНК или удаления праймеров РНК при репликации ДНК.

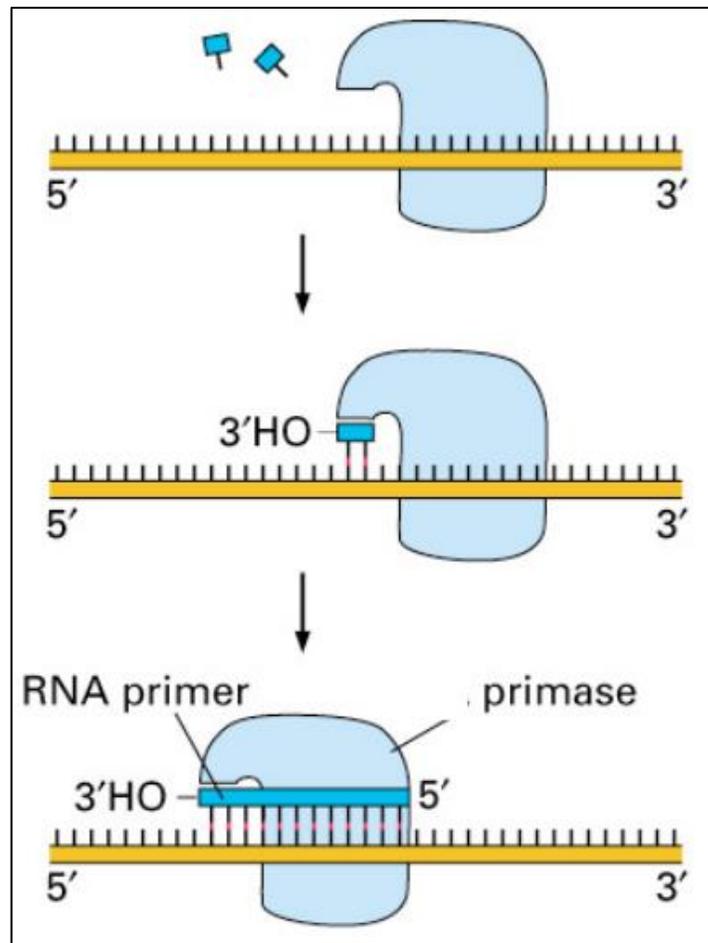
Comparison of DNA Polymerases of *E. coli*

	DNA polymerase		
	I	II	III
Structural gene*	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Subunits (number of different types)	1	≥4	≥10
$M_r$	103,000	88,000 <sup>†</sup>	830,000
3'→5' Exonuclease (proofreading)	Yes	Yes	Yes
5'→3' Exonuclease	Yes	No	No
Polymerization rate (nucleotides/sec)	16-20	40	250-1,000
Processivity (nucleotides added before polymerase dissociates)	3-200	1,500	≥500,000

## Направление движения репликативной вилки

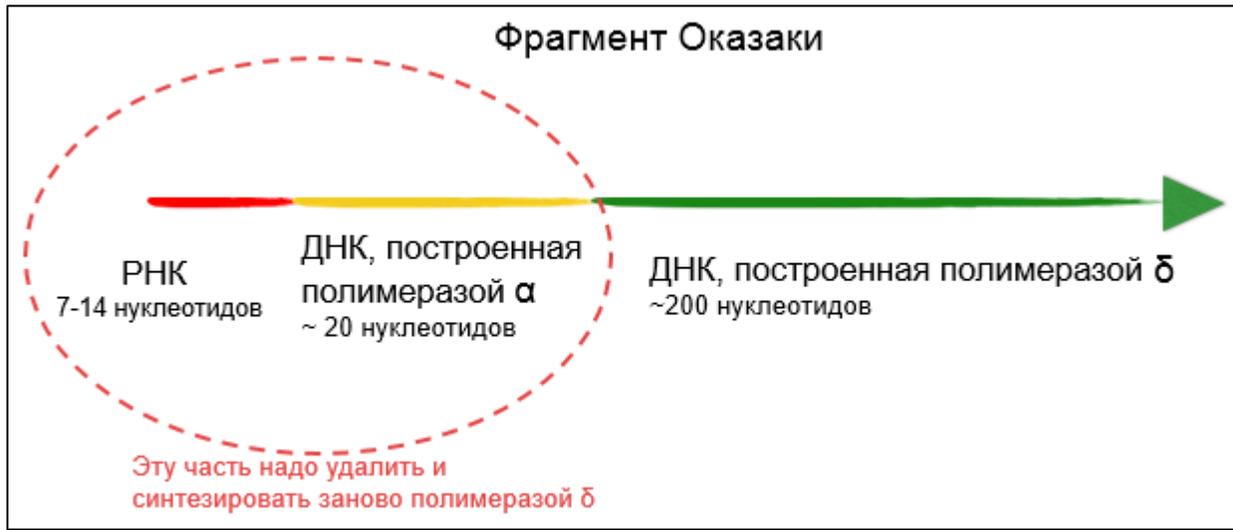


В ходе репликации достраивается 3'-конец цепи ДНК



РНК-полимеразы могут запускать цепи без праймера

Праймер РНК для репликации ДНК имеет длину 5-10 нуклеотидов: достаточно долго, чтобы оставаться парным, но не длиннее, чем необходимо (необходимо удалить позже).



**Структура фрагмента Оказаки.** В начале фрагмента есть часть, которая особенно нуждается в редактировании (ограничена пунктиром).

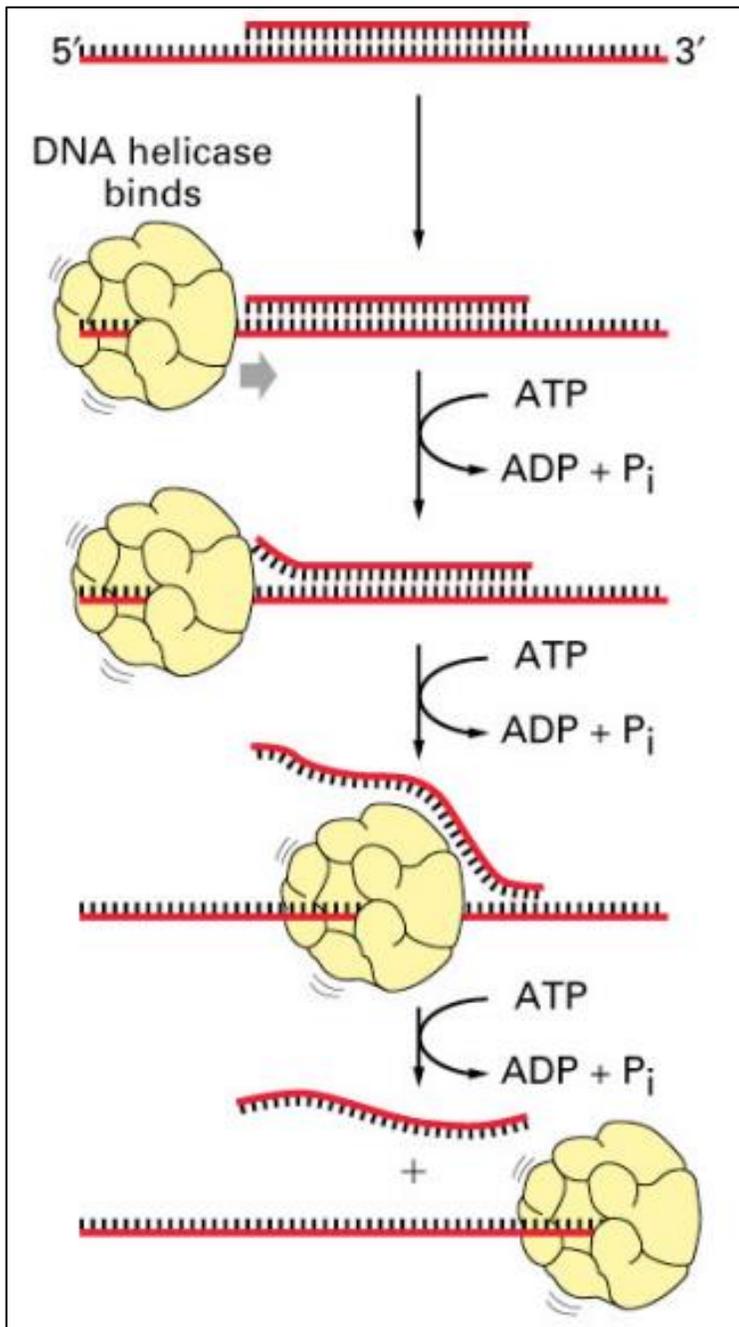
## Okazaki fragment synthesis in *E. coli*

RNA primer synthesis by DnaG



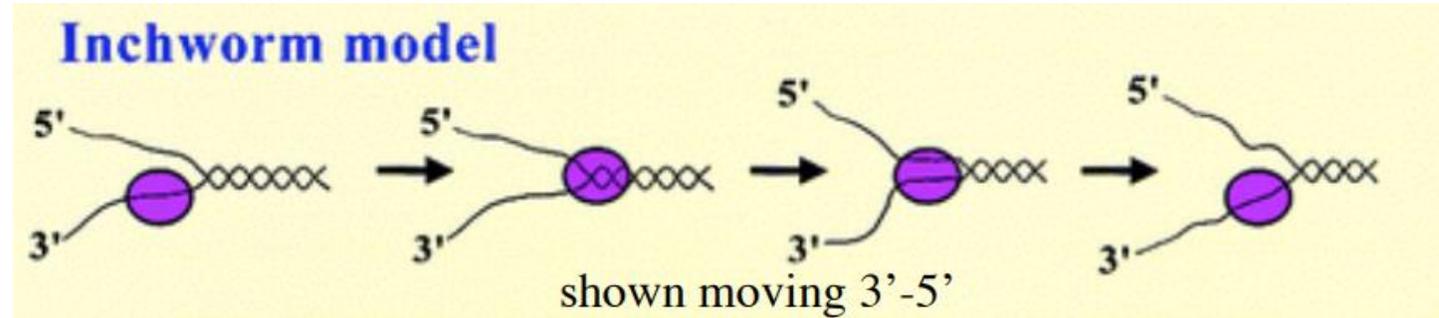
DNA synthesis from RNA primer by DNA pol III



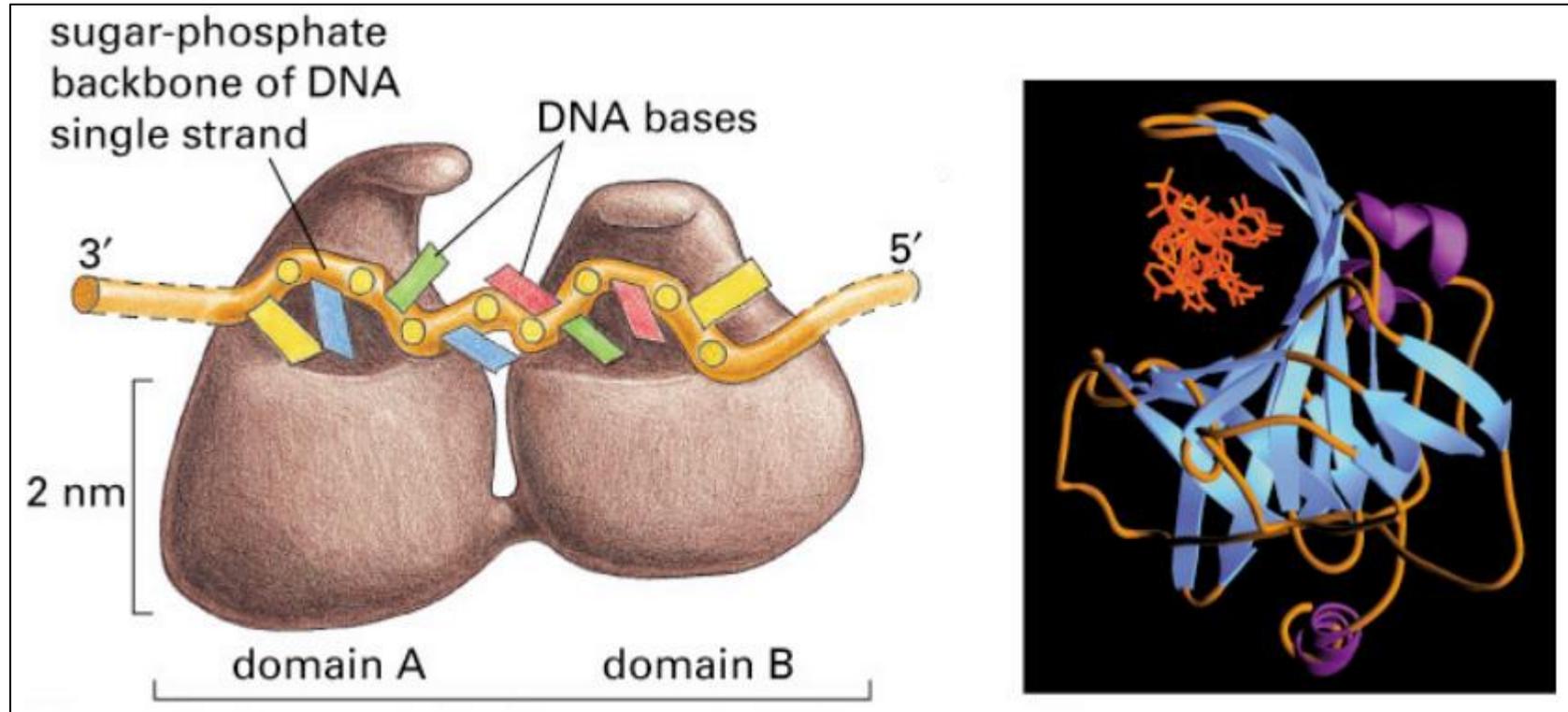


## ДНК-геликазы разделяют нити ДНК

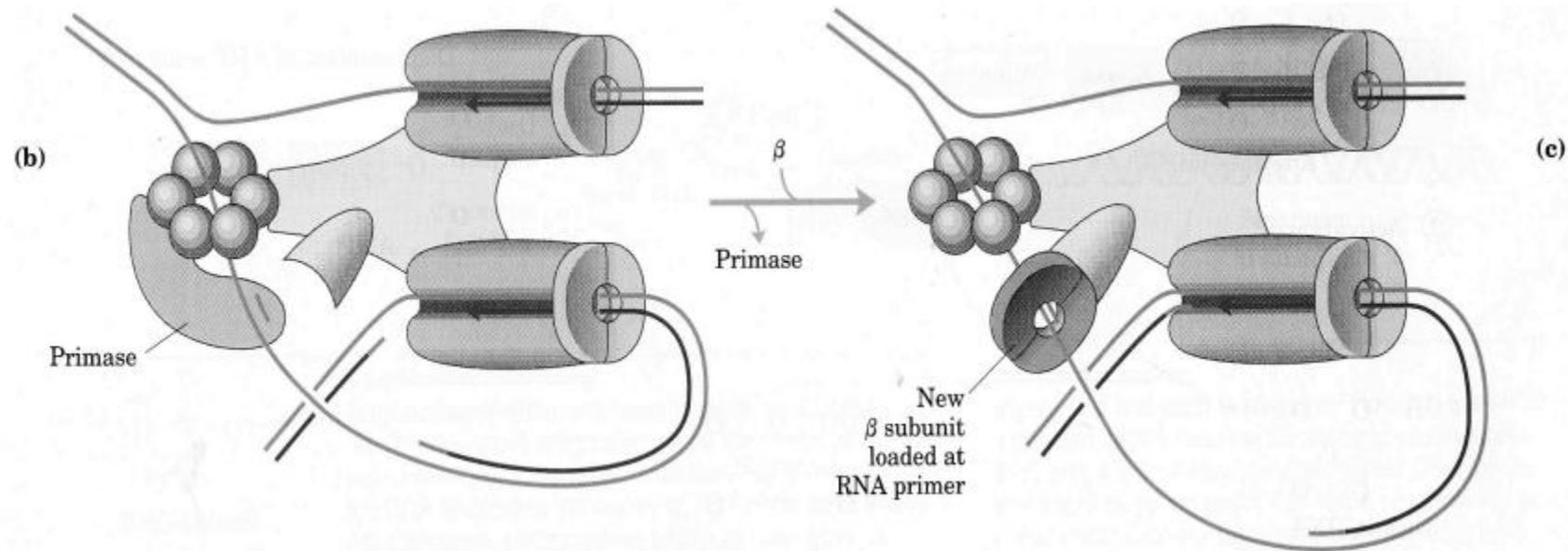
Геликаза репликационной вилки *E. coli* представляет собой гексамерный **DnaB**: 5'-3'-полярность

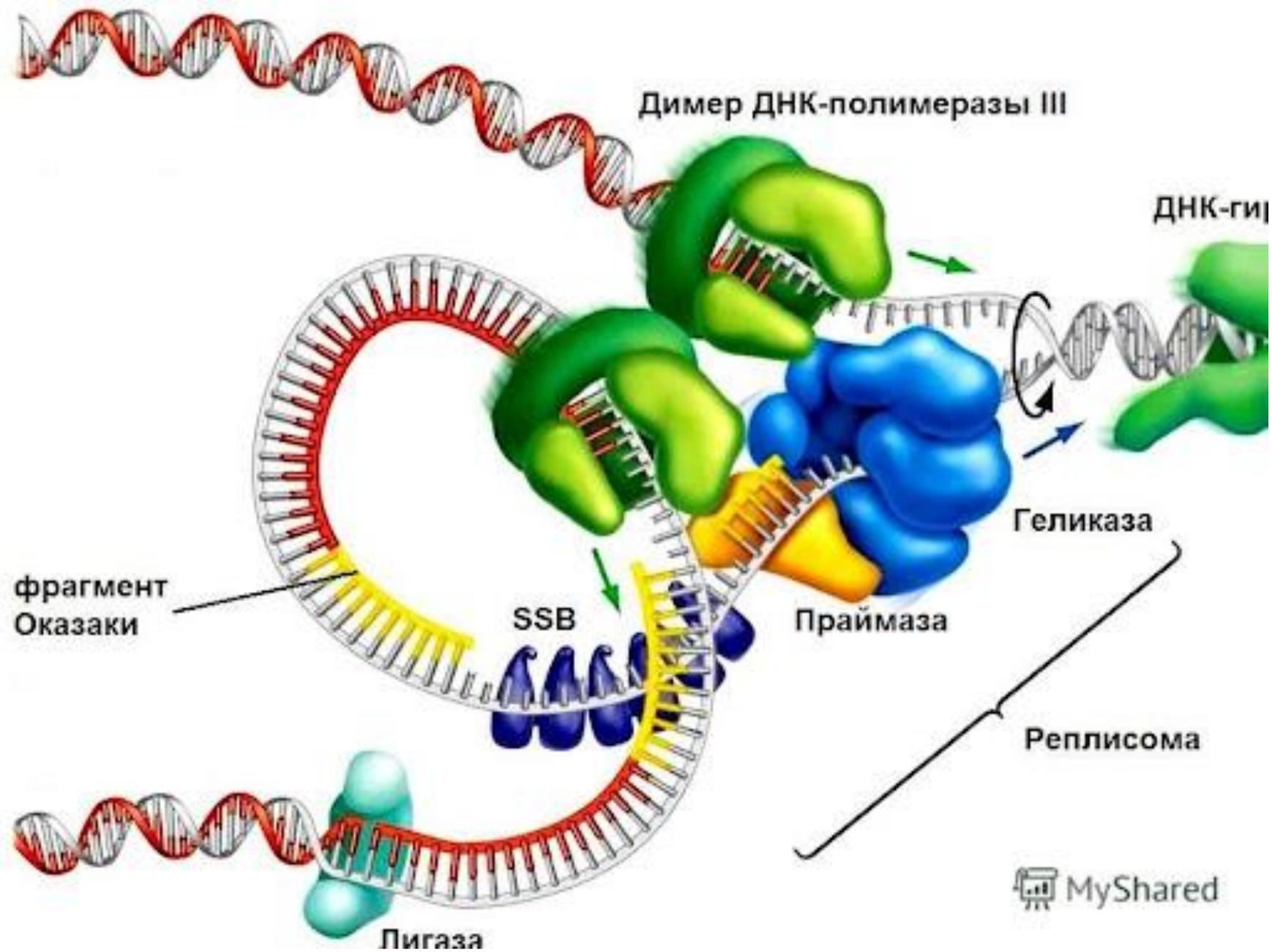


Одноцепочечный ДНК-связывающий белок *E. coli* (SSB)  
Эукариотическим эквивалентом является фактор репликации А (RF-A)



На вилке репликации существует координация факторов: физическое взаимодействие обеих полимераз, примазы отстающей цепи и загрузчика зажима, а также геликазы.





**a**

