

Введение в генетическую инженерию: процесс репликации ДНК



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

Дисциплина: Рекомбинация ДНК

(Лекция 2)

ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Познакомить студентов с основными принципами и механизмами репликации ДНК как ключевого процесса, лежащего в основе генетической инженерии, и показать, как понимание репликации используется при клонировании генов, создании векторов и других биотехнологических приложениях.

ЗАДАЧИ

- ✓ Рассмотреть структуру ДНК и её роль в хранении и передаче генетической информации.
- ✓ Изучить этапы и ферменты, участвующие в репликации ДНК.
- ✓ Объяснить различия между репликацией у прокариот и эукариот.
- ✓ Показать значение точности репликации для стабильности генома.
- ✓ Связать процесс репликации с методами генетической инженерии — ПЦР, клонирование, синтез плазмидных векторов.

Ключевые термины

ДНК, репликация, полимеразы, праймаза, хеликаза, лидирующая цепь, отстающая цепь, фрагменты Оказаки, репликационная вилка, полуконсервативный механизм, ПЦР, модель Корнберга, ДНК-полимераза, направление репликации, отправные точки, ведущая цепь, отстающая цепь

- ✓ **Репликация ДНК** — это процесс удвоения молекулы ДНК, обеспечивающий передачу генетической информации дочерним клеткам.
- ✓ **Механизм репликации** является полуконсервативным: каждая новая двойная спираль состоит из одной старой и одной новой цепи.
- ✓ Репликация начинается в определённой точке — **origin of replication** — и происходит в двух направлениях.
- ✓ В процессе участвуют **ключевые ферменты**: ДНК-хеликаза (раскручивает двойную спираль), ДНК-полимераза III (синтезирует новую цепь), праймаза (синтезирует РНК-праймер), лигаза (соединяет фрагменты Оказаки).
- ✓ На **лидирующей цепи** синтез идёт непрерывно, а на отстающей цепи — прерывисто, короткими фрагментами.
- ✓ Репликация у прокариот происходит в цитоплазме и имеет одну точку начала, у эукариот — множество точек начала на каждой хромосоме.
- ✓ Ошибки при репликации могут приводить к мутациям, но системы репарации ДНК исправляют большинство из них.
- ✓ В генетической инженерии принципы репликации используются при конструировании плазмид, амплификации ДНК (ПЦР) и клонировании генов.



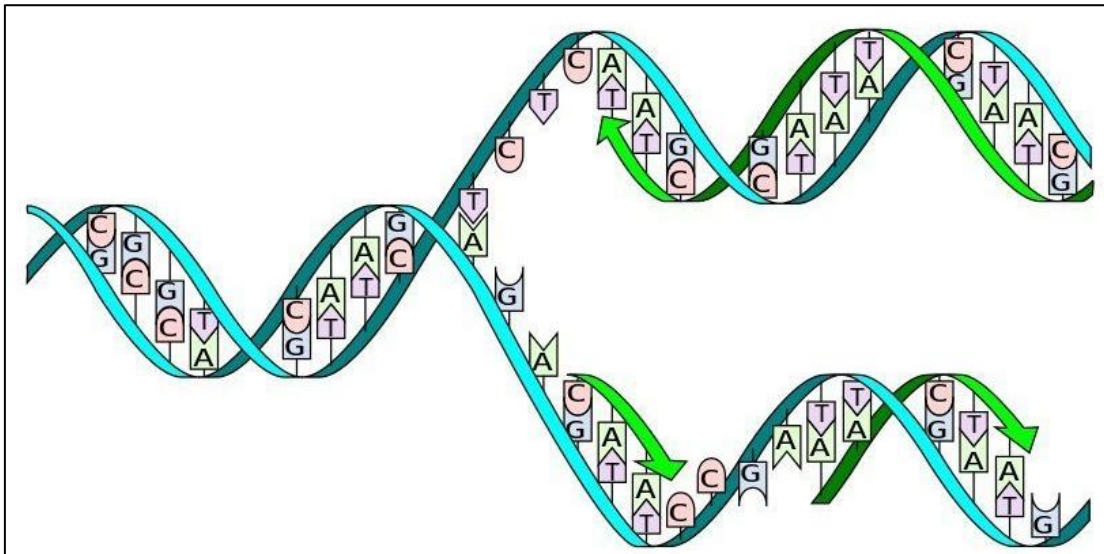
ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1) Что такое репликация ДНК и в чём заключается её биологическое значение?
- 2) В чём состоит полуконсервативный характер репликации?
- 3) Какие ферменты участвуют в процессе репликации и каковы их функции?
- 4) Чем отличается синтез лидирующей и отстающей цепей?
- 5) Как происходит репликация у прокариот и эукариот?
- 6) Какие механизмы обеспечивают точность копирования ДНК?
- 7) Как знание механизма репликации используется в генетической инженерии (например, при ПЦР или клонировании)?

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

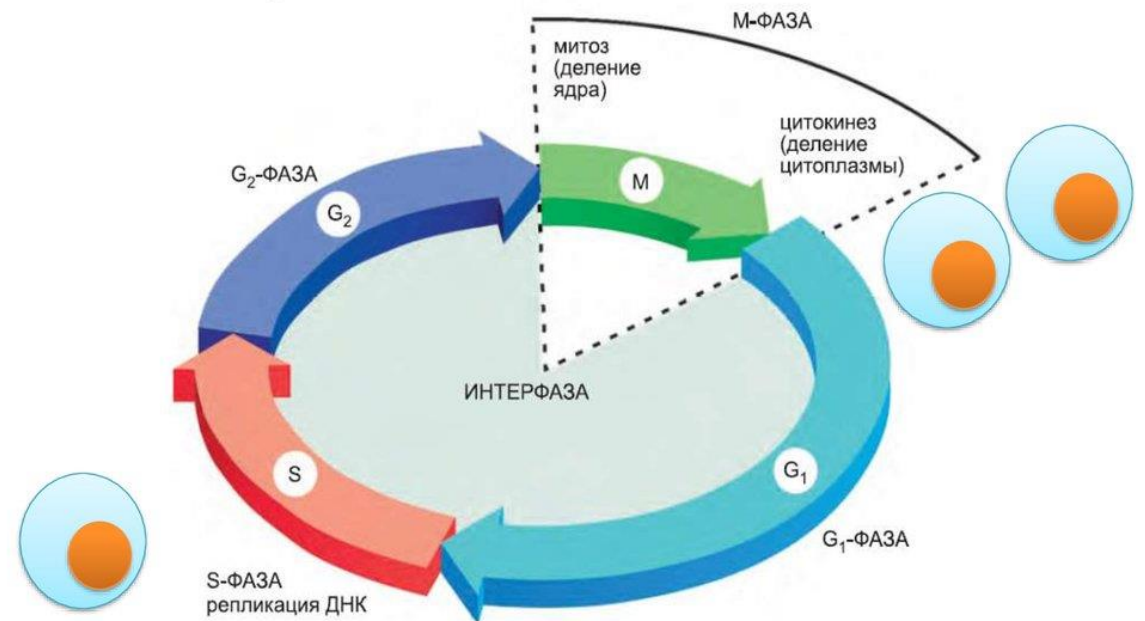
Репликация ДНК (редупликация, самоудвоение, копирование) - удвоение молекулы ДНК или комплементарный синтез ДНК на матрице ДНК.

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



Клеточный цикл

Последовательность событий, которые приводят к делению эукариотической клетки на две дочерние клетки



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

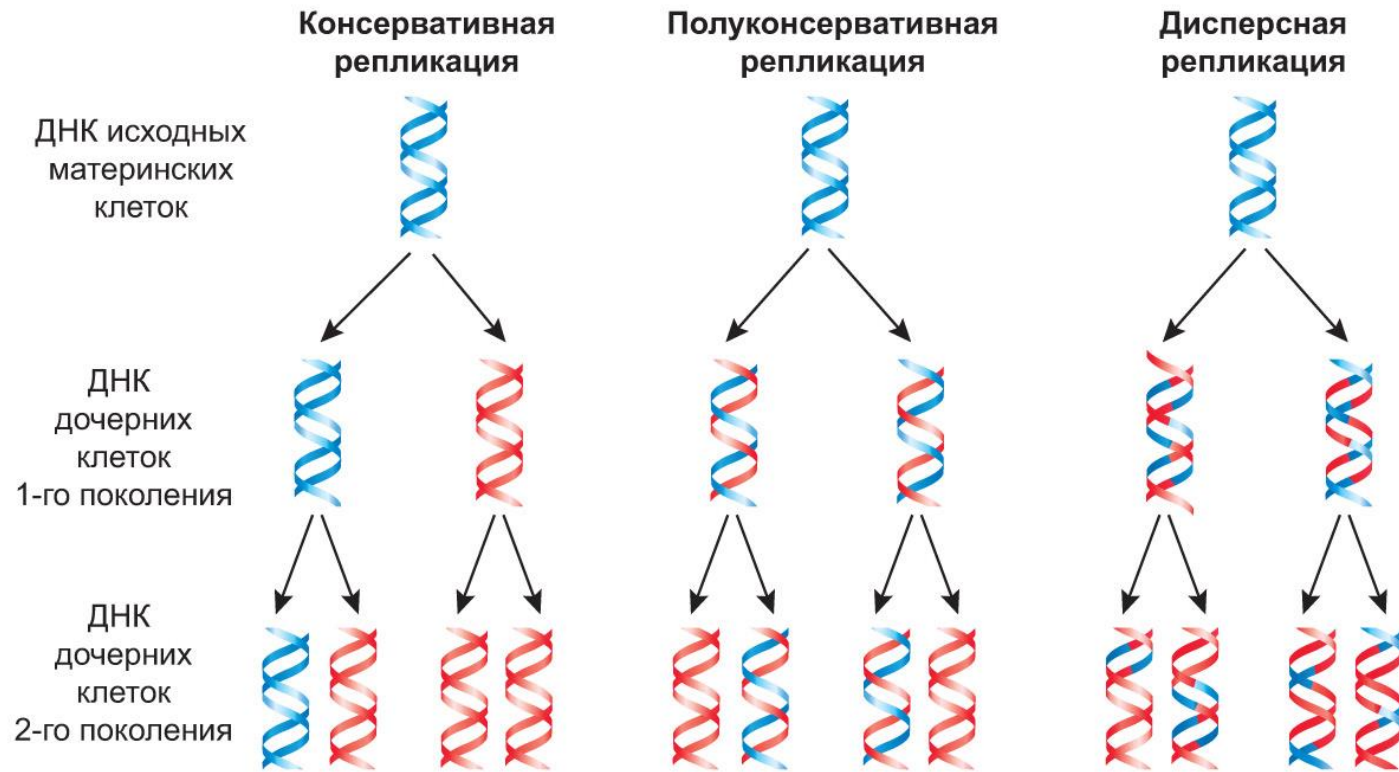


Рис. 16.2. Гипотезы о механизме репликации ДНК
(исходные материнские цепи показаны синим цветом, дочерние – красным)

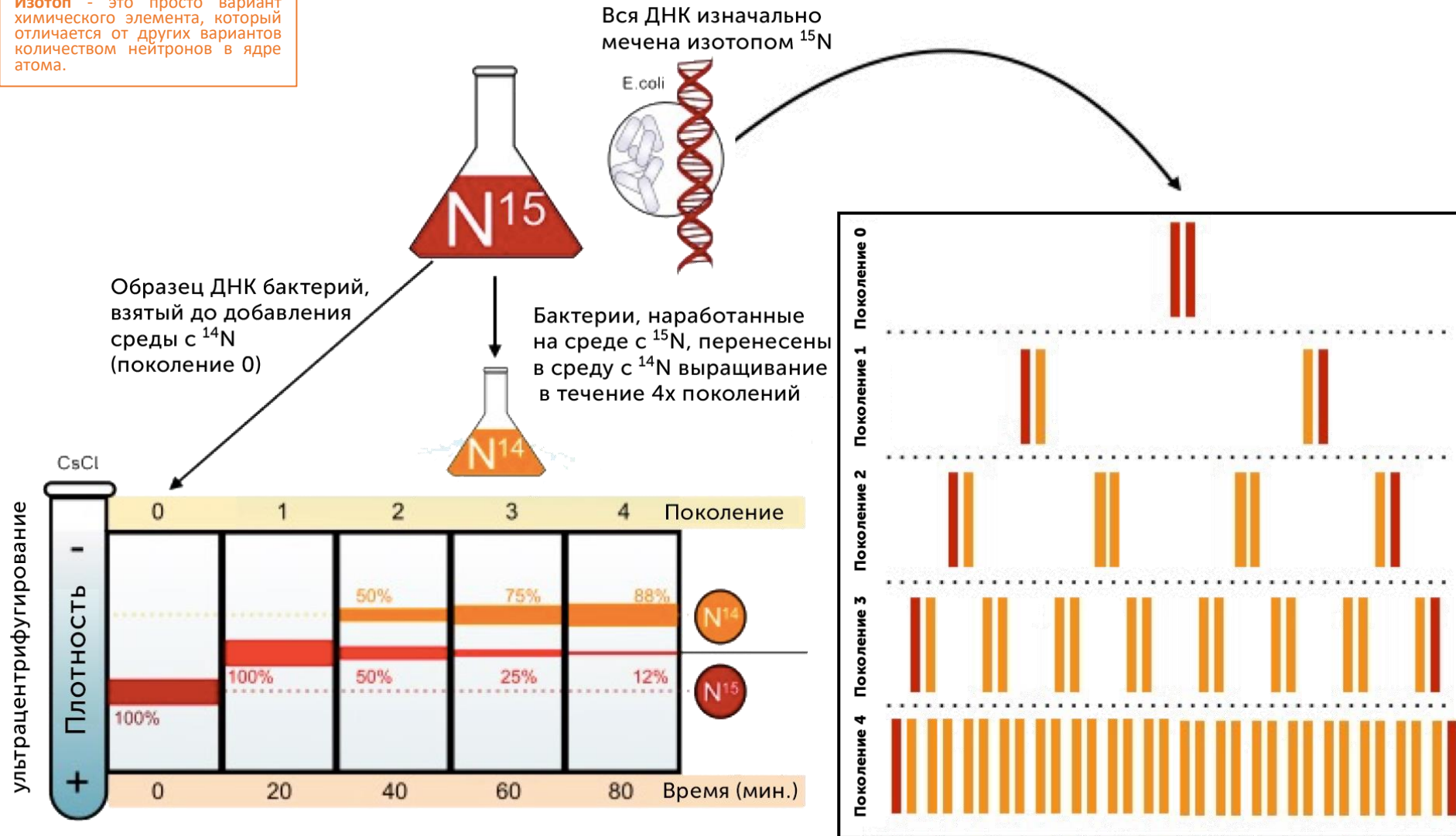
Полуконсервативная репликация. В этой модели две нити ДНК раскручиваются и отсоединяются друг от друга, далее каждая из них выступает в качестве матрицы для синтеза новой комплементарной нити. В результате чего получаются две молекулы ДНК, каждая из которых содержит одну исходную и одну новую цепь.

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 Сталя

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



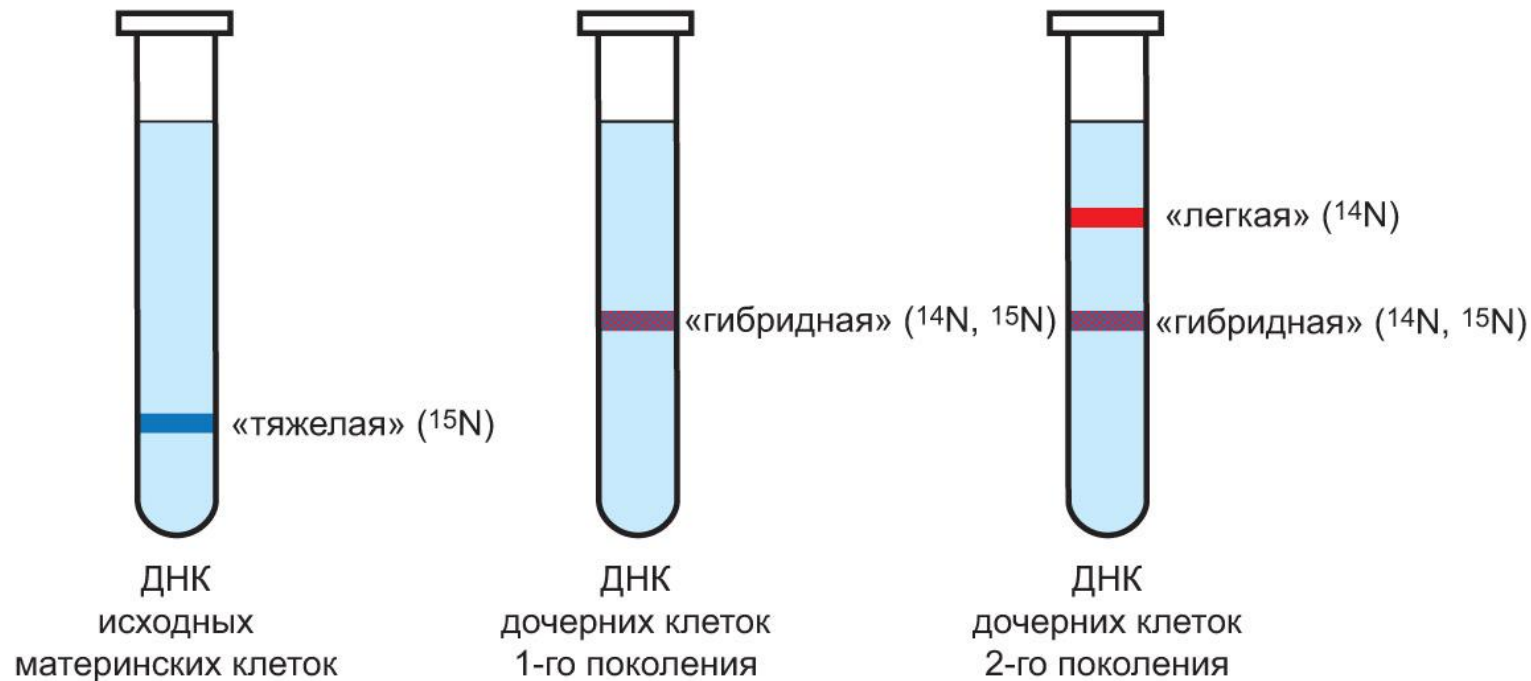


Рис. 16.3. Результаты центрифугирования ДНК в эксперименте М. Мезельсона и Ф. Сталя

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}N и ДНК с легким изотопом ^{14}N .

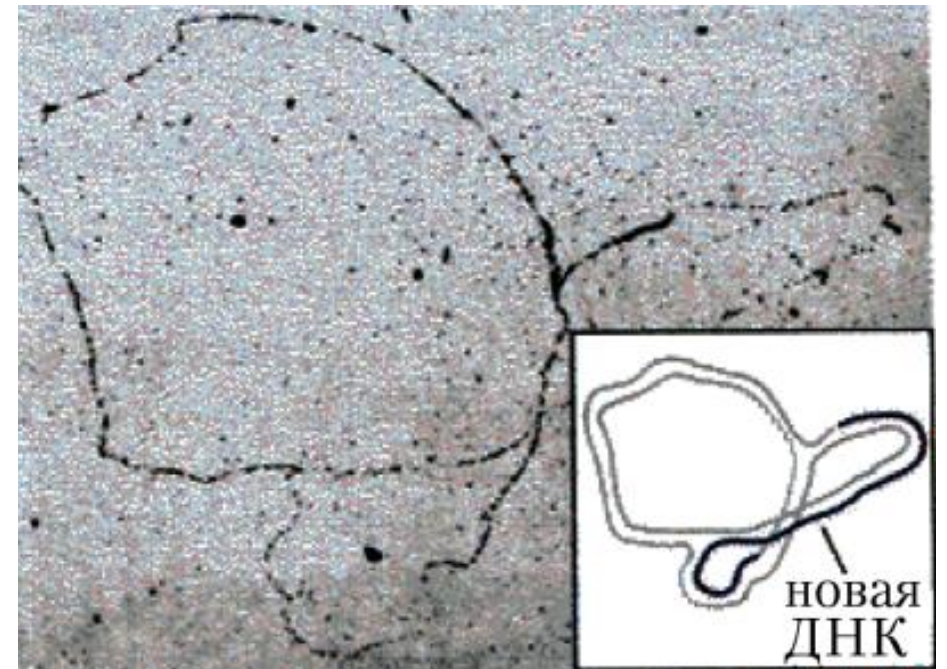
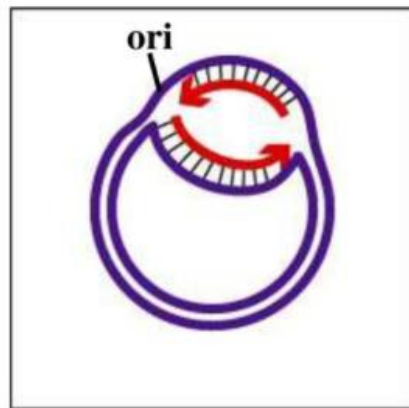
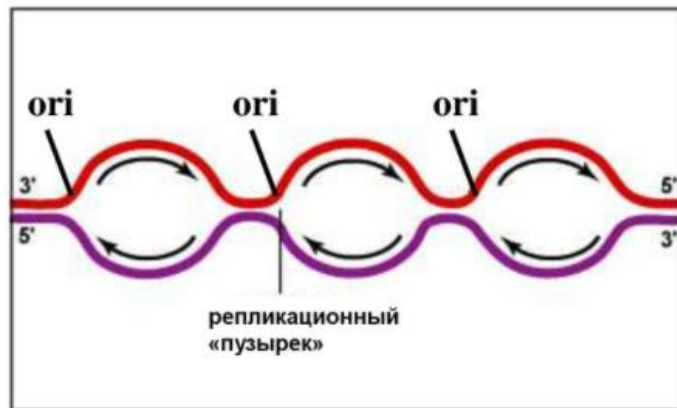
Поколение 2

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}N).

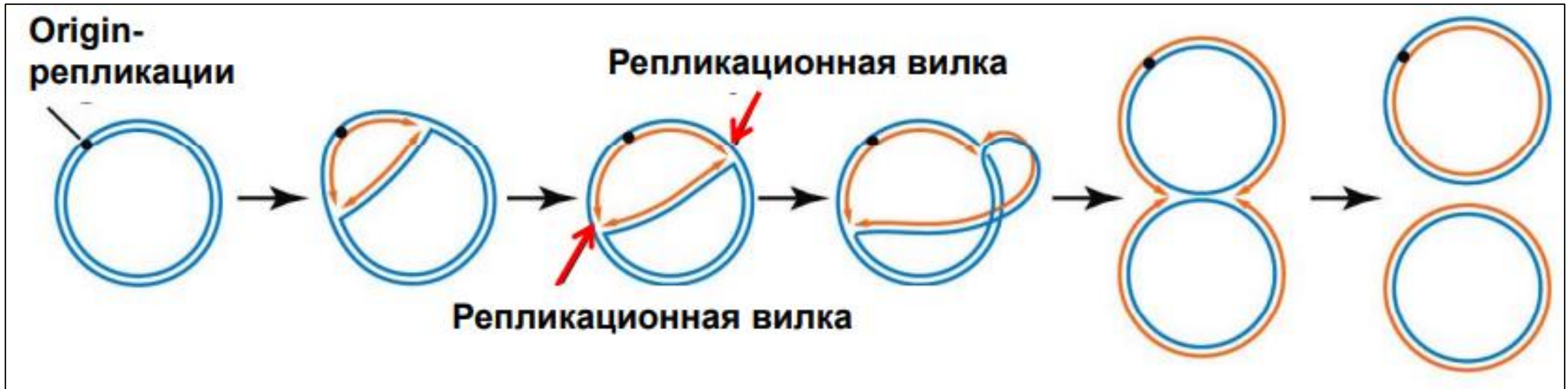
Поколения 3 и 4

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.



Репликационная вилка — это структура, которая образуется при раскручивании двойной спирали ДНК в процессе её копирования. Она представляет собой Y-образную область, где происходит разделение двух цепей матричной ДНК и синтез новых комплементарных цепей.



θ (тета)-форма репликации у бактерий

- У бактерий (например, *Escherichia coli*) ДНК имеет **кольцевую** структуру, и репликация начинается в **одной точке** — **oriC (origin of replication)**.
- После начала синтеза формируется **две репликационные вилки**, которые движутся в **противоположных направлениях** по кольцу ДНК.

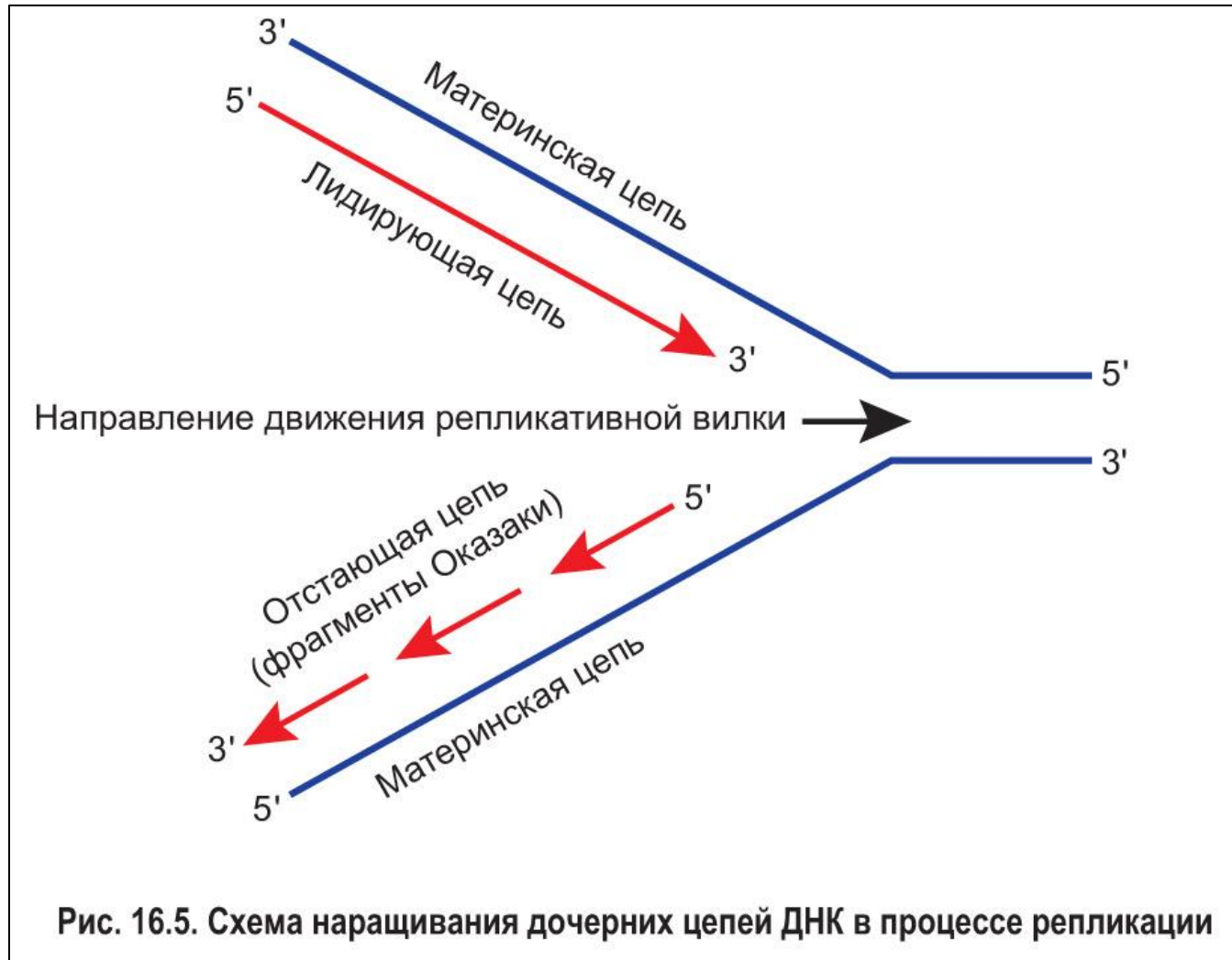
Этапы θ-репликации:

1. В точке oriC ДНК **раскручивается**, образуя **локальную пузырьковую структуру** — **репликационный пузырь**.
2. По обе стороны пузыря формируются **репликационные вилки**, движущиеся навстречу друг другу.
3. По мере продвижения вилок синтезируются две новые цепи ДНК — **на каждой половине кольца**.
4. Когда вилки встречаются, синтез завершается, и образуются **две кольцевые молекулы ДНК**, каждая из которых содержит одну старую и одну новую цепь.
5. Конечное состояние напоминает букву **θ (тета)**, что и дало название механизму.

Число репликонов у различных организмов

Организм	Число репликонов	Средний размер репликона, тыс. п.н.
E.coli	1	4 200
Дрожжи	500	40
Дрозифила	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.

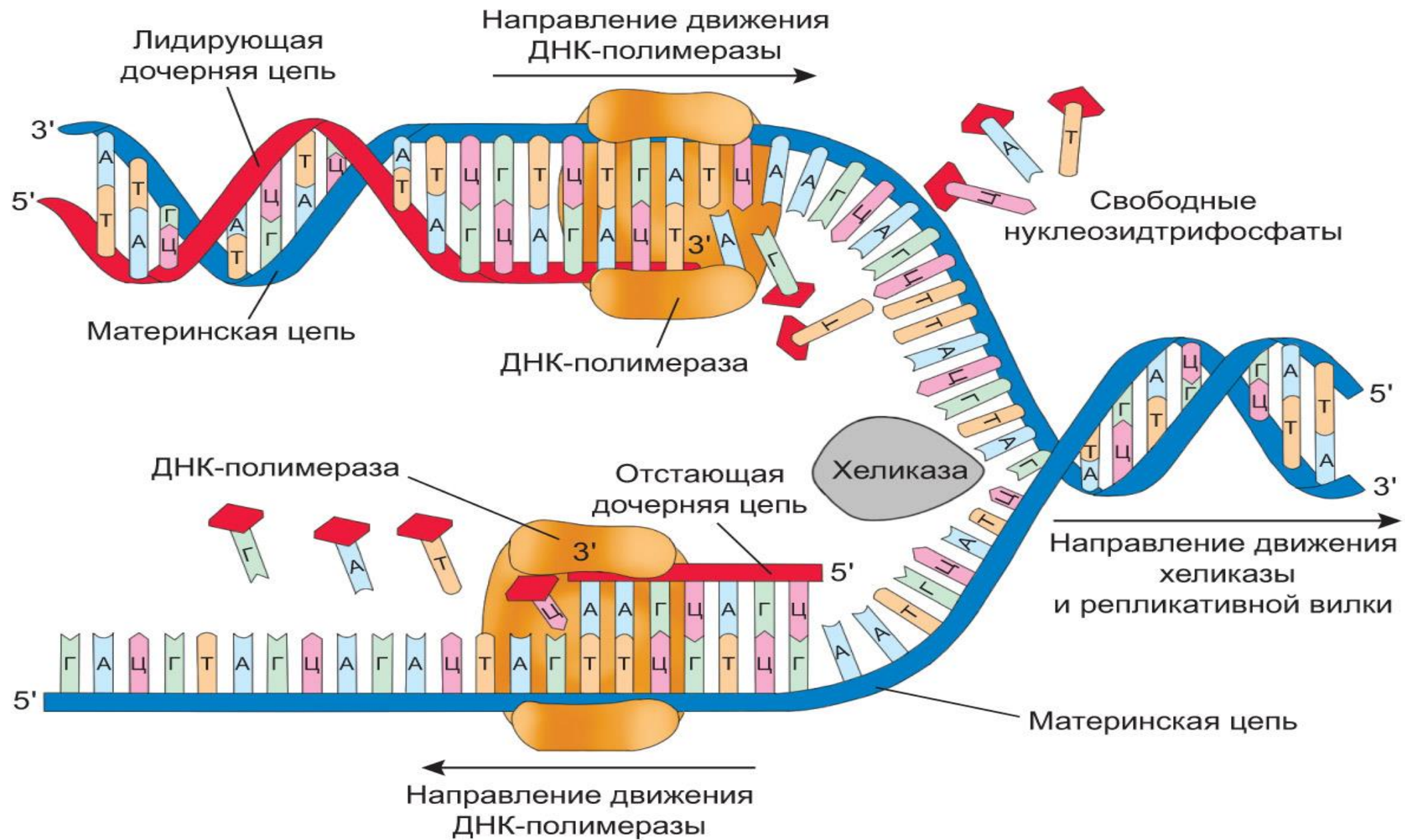
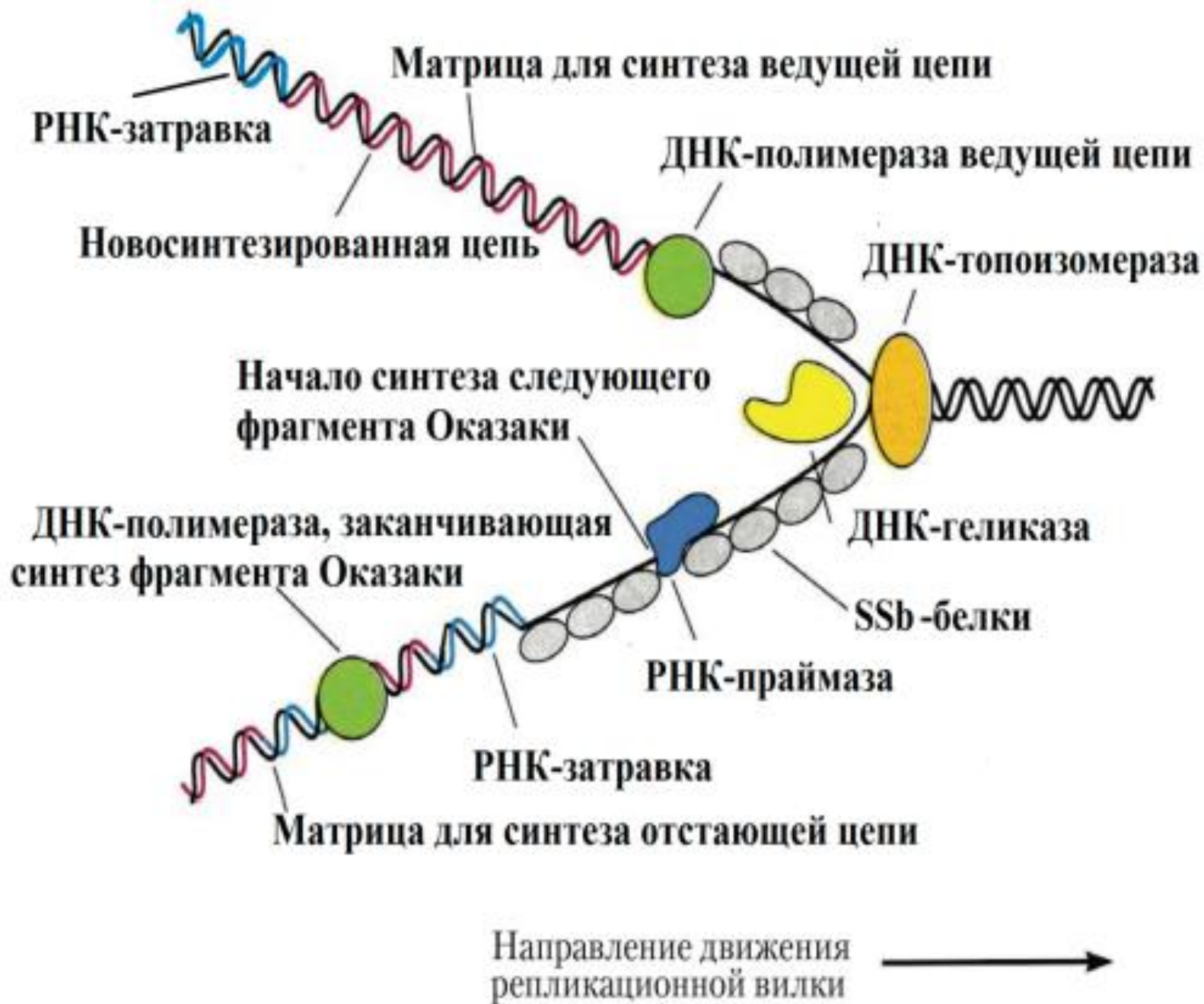


Рис. 16.4. Схема процесса репликации ДНК

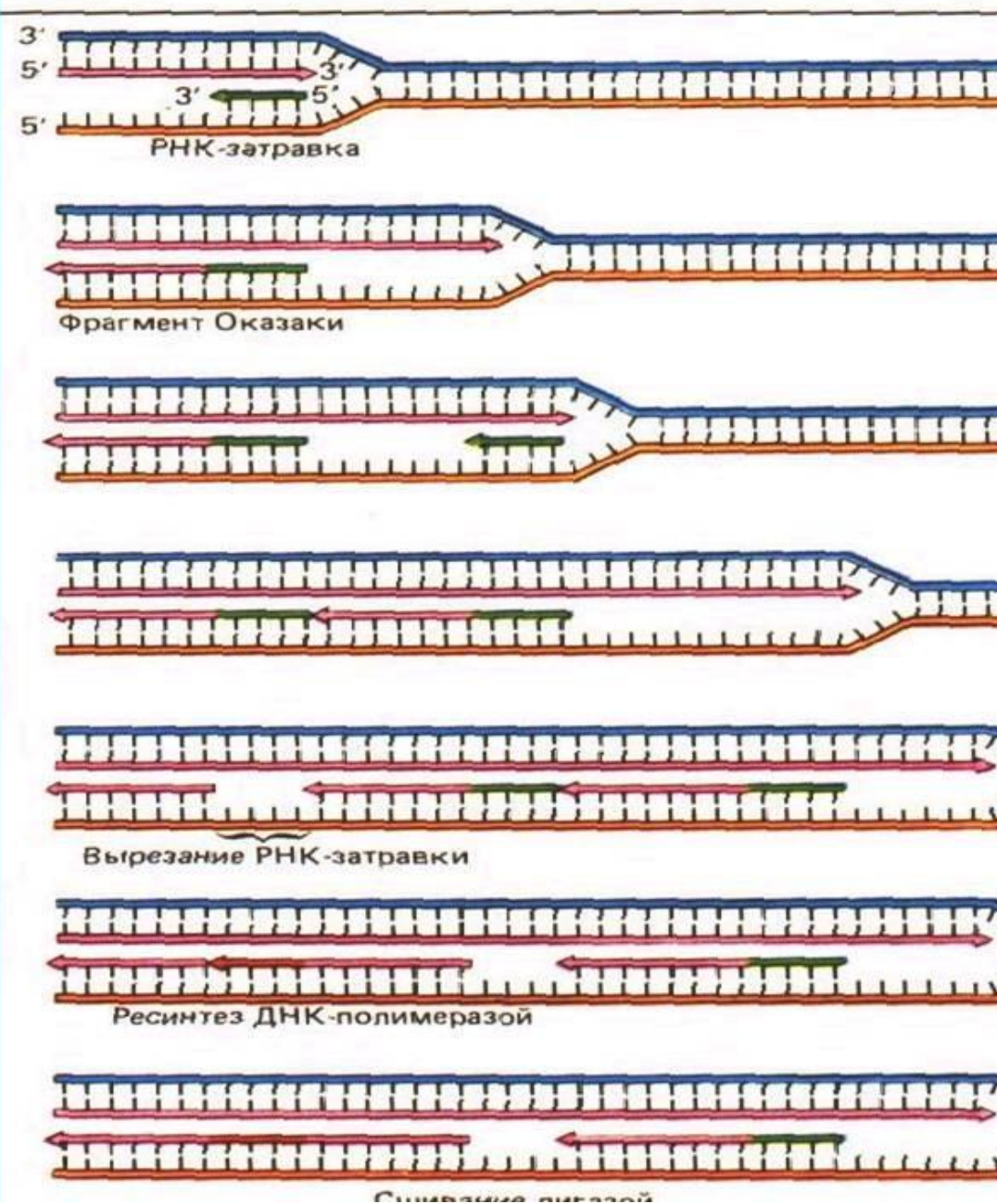


Праймаза создает РНК *праймер* или короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, комплементарный матрице, который формирует 3'-конец для работы ДНК-полимеразы. Типичный праймер имеет длину от 5-10 нуклеотидов.

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+}).

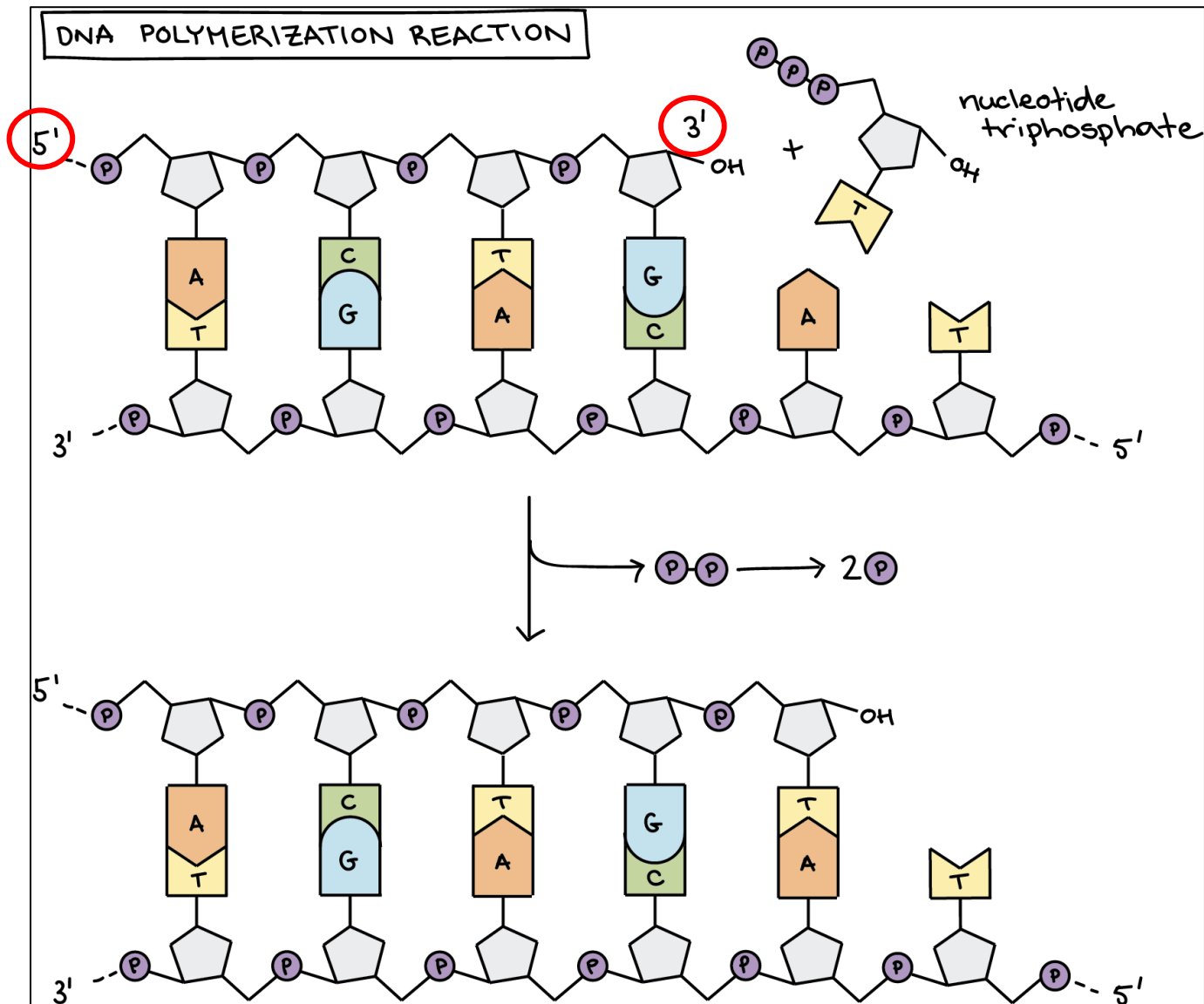
Рост цепи ДНК происходит в направлении от 5' к 3' концу. Субстратами реакции является 3'-конечная ОН-группа дезоксирибозы растущей цепи и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Фермент, который катализирует эту реакцию - ДНК-зависимая ДНК-полимераза. Синтез ДНК с подобными механизмами осуществляется также при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

Артур Корнберг (1918–2007)

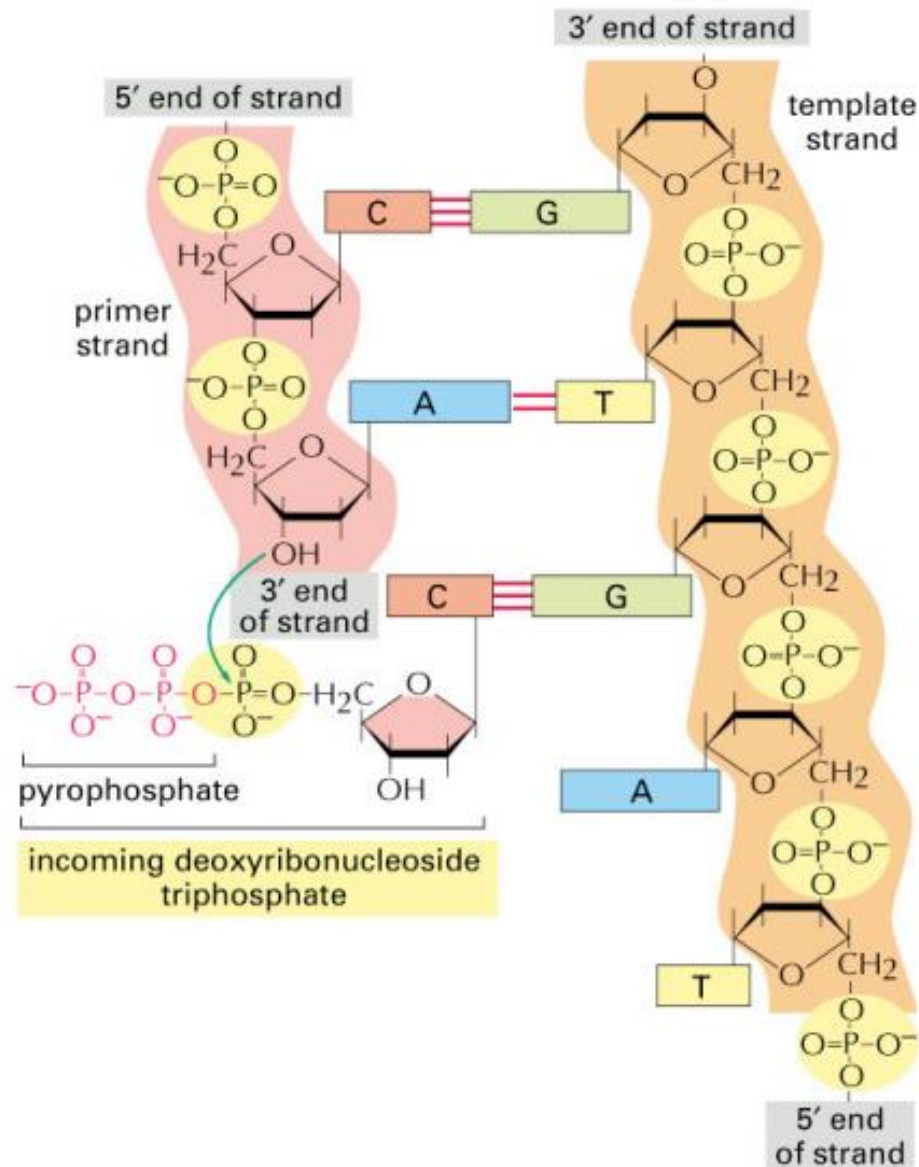


- *А. Корнберг* открыл фермент ДНК-полимеразу, который на расплетенных цепях, как на матрицах, синтезирует новые, комплементарные им цепи ДНК.

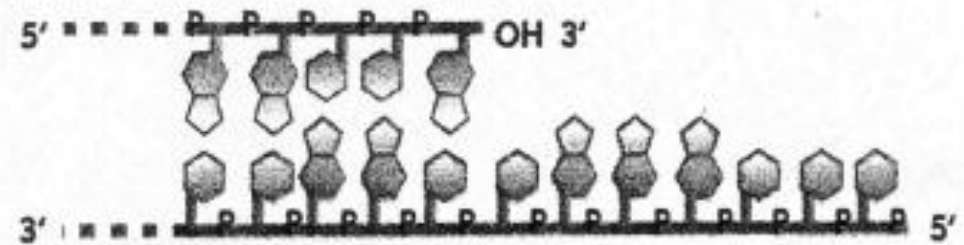
- Основная особенность данного фермента:



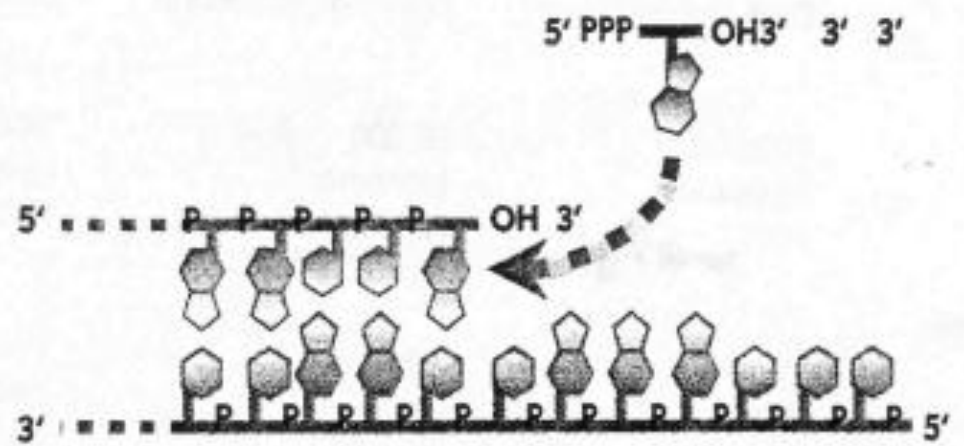
Синтез происходит ТОЛЬКО в направлении 5'-3'



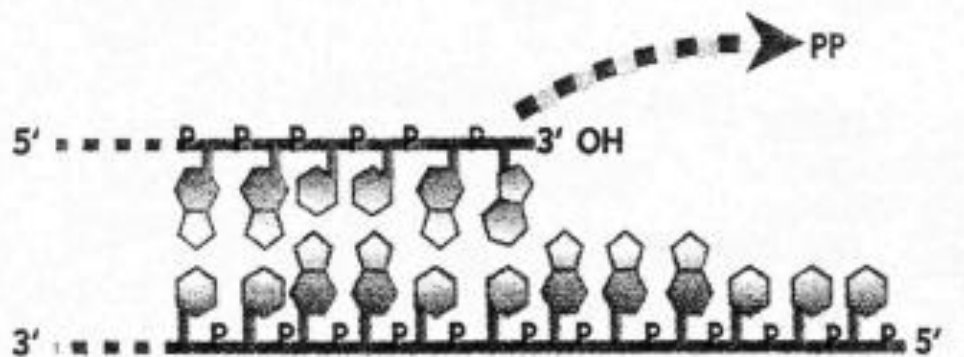
- односторонний шаблон
- дезоксирибонуклеотиды с 5' трифосфат (дНТФ)
- ионы магния
- отожженный праймер с 3'ОН



Праймер имеет 3'-ОН

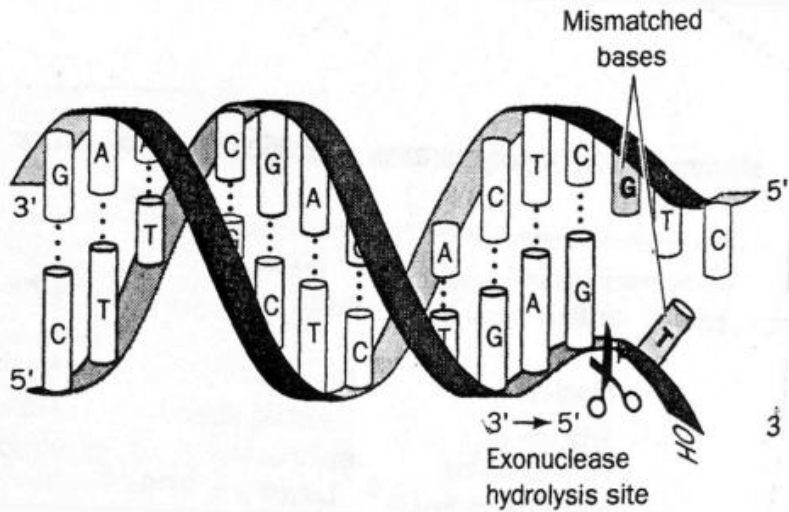


Входящий дНТФ содержит 5'-трифосфат.



Пирофосфат (PP) теряется при добавлении дНМФ в цепь

E. coli DNA polymerase I 3'-5' exonuclease

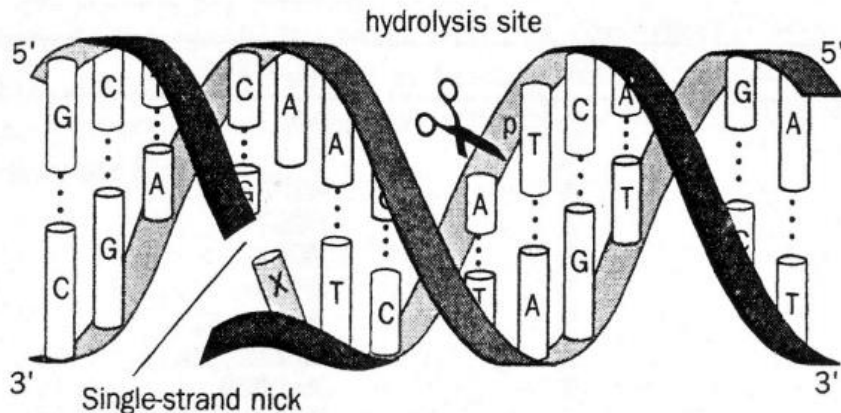


•**ДНК-полимераза I** задействована в восстановлении ДНК, обладает и 5'-3', и 3'-5'-экзонуклеазным действием;

Противоположная полярность по сравнению с полимеразой: активность полимеразы должна прекратиться, чтобы позволить 3'-5'экзонуклеазной активности;

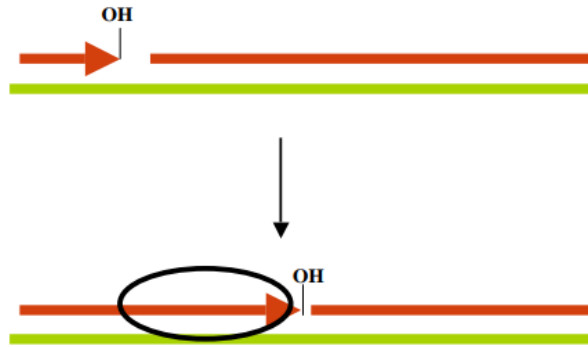
Ни один dNTP не может быть переработан в обратном 3'-5' направлении: дНМФ высвобождается при гидролизе фосодиэфирного остова.

E. coli DNA polymerase I 5'-3' exonuclease



Создает одноцепочечный шаблон из дцДНК в месте разрыва, перемещая 5'-3' на разорванной цепи

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



Comparison of DNA Polymerases of *E. coli*

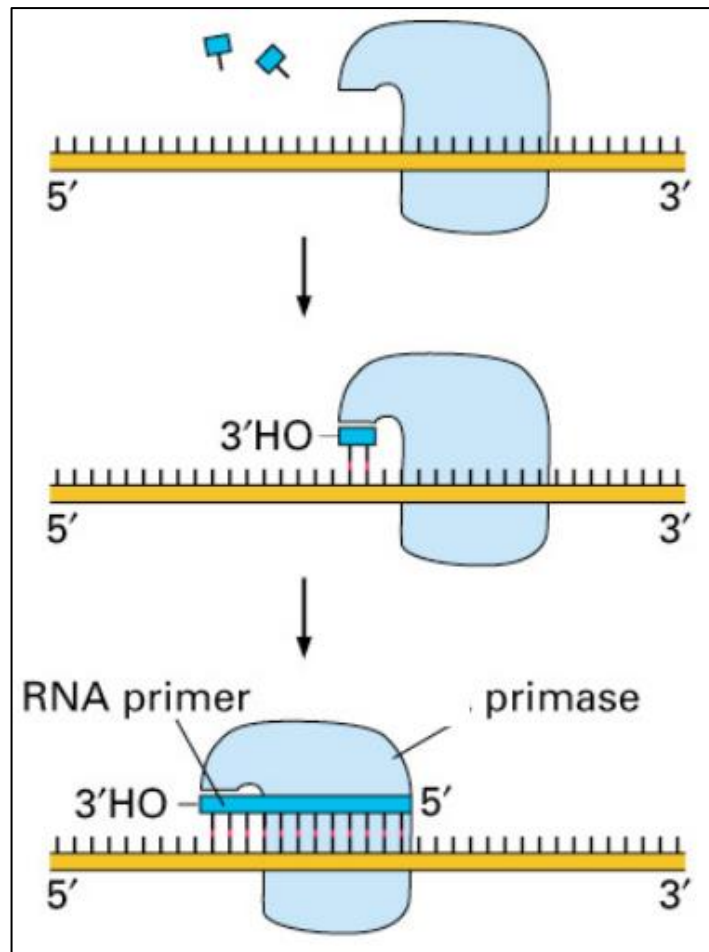
	DNA polymerase		
	I	II	III
Structural gene*	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Subunits (number of different types)	1	≥4	≥10
M_r	103,000	88,000 [†]	830,000
3'→5' Exonuclease (proofreading)	Yes	Yes	Yes
5'→3' Exonuclease	Yes	No	No
Polymerization rate (nucleotides/sec)	16–20	40	250–1,000
Processivity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

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

Направление движения репликативной вилки

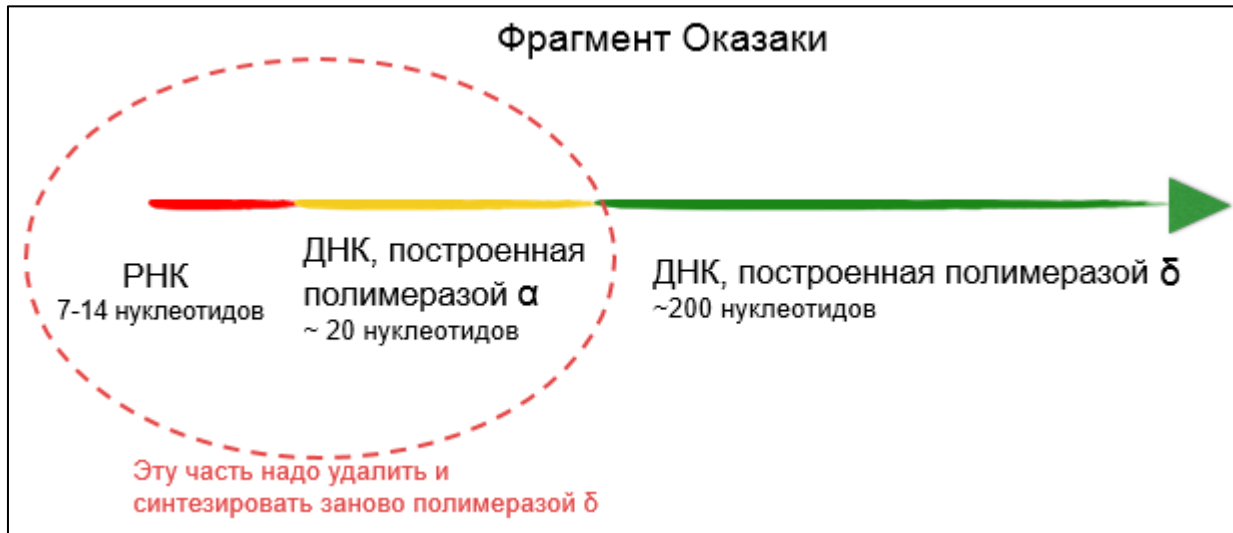


В ходе репликации достраивается 3'-
конец цепи ДНК



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).

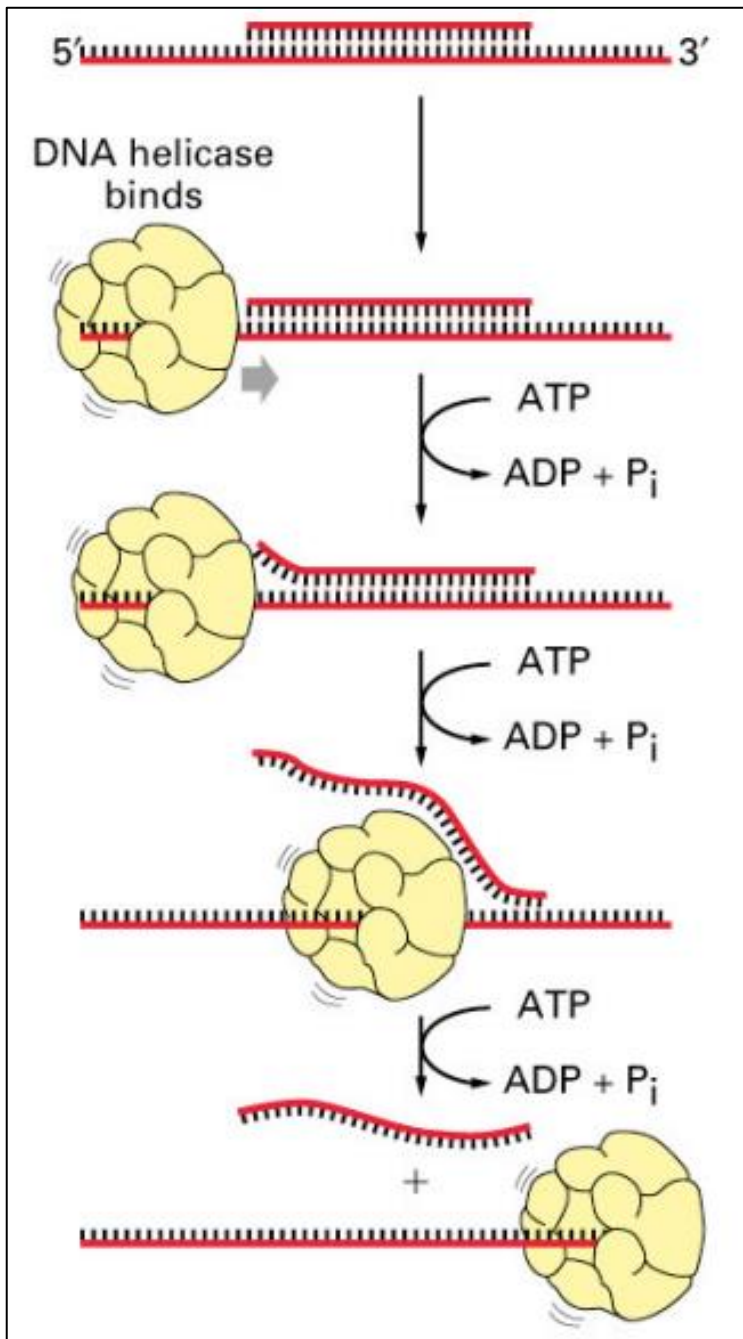
Okazaki fragment synthesis in E. coli

RNA primer synthesis by DnaG



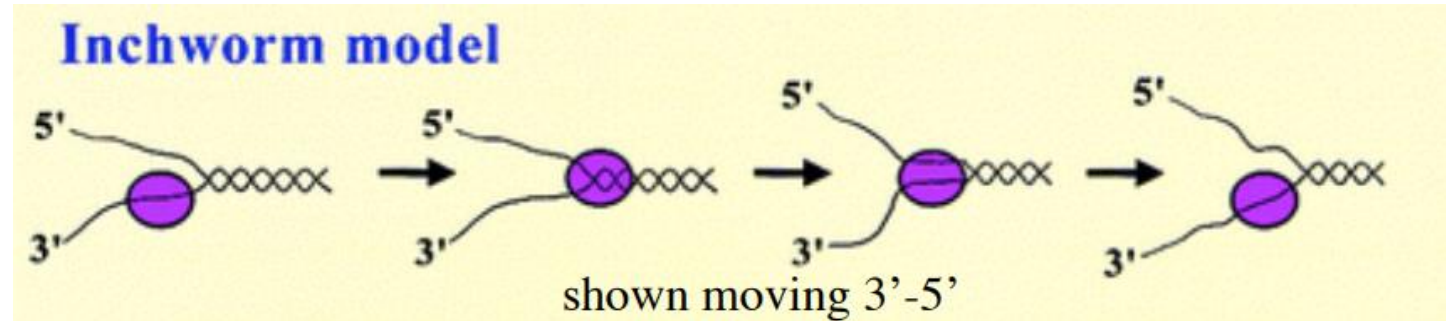
DNA synthesis from RNA primer by DNA pol III



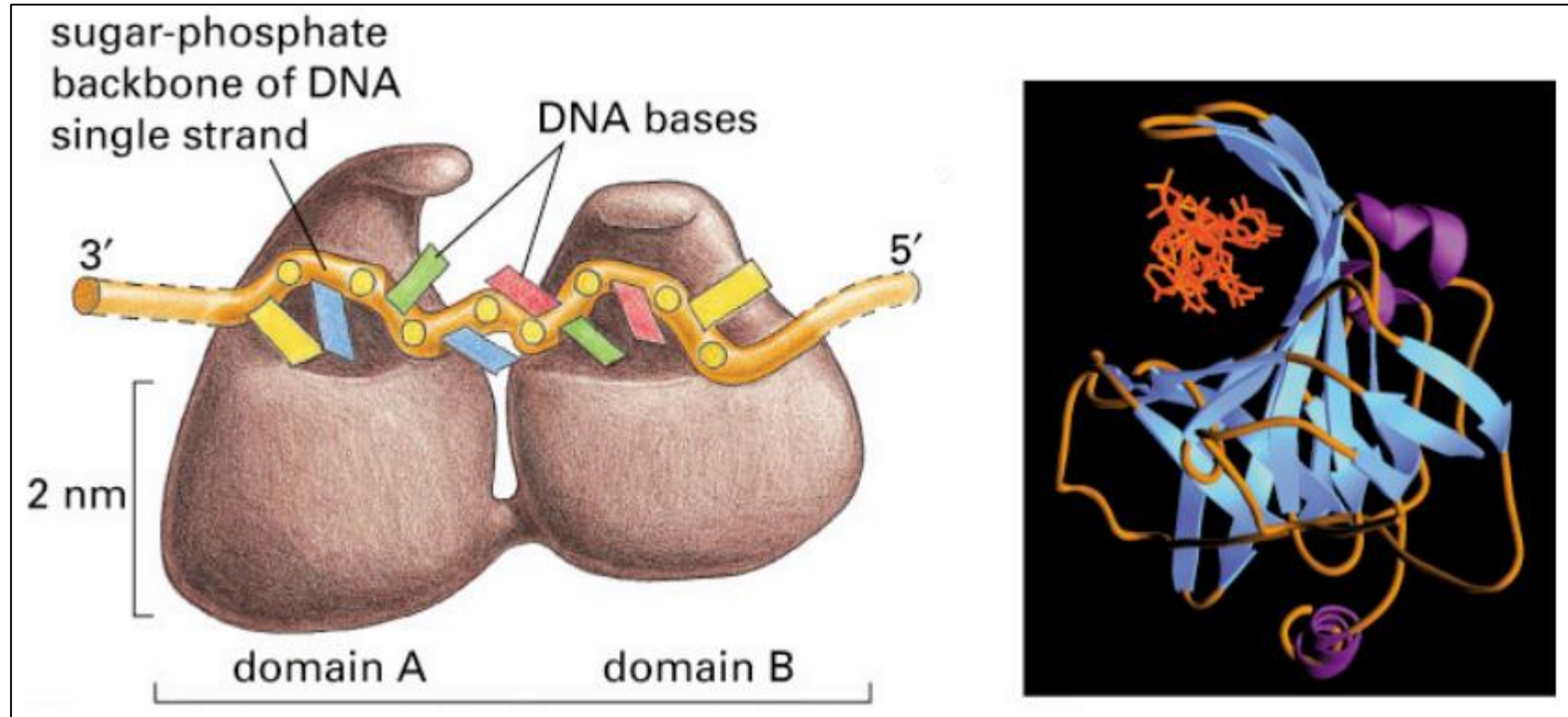


ДНК-геликазы разделяют нити ДНК

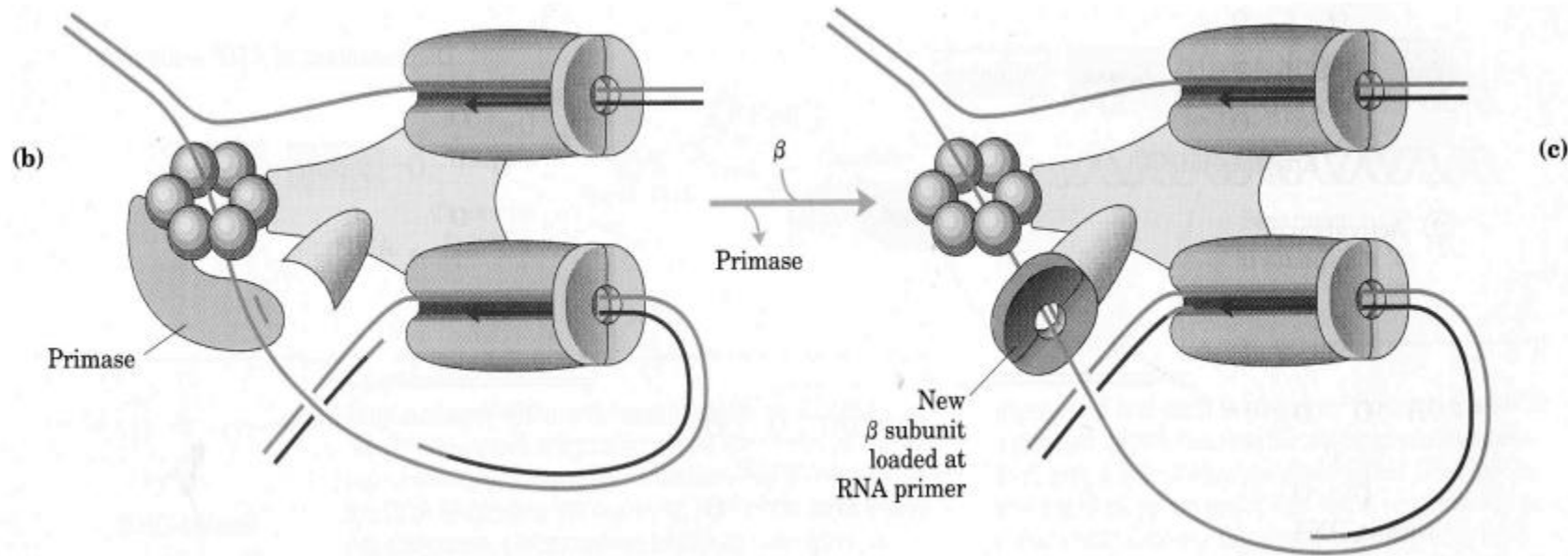
Геликаза репликационной вилки *E. coli* представляет собой гексамерный **DnaB**: 5'-3'-полярность

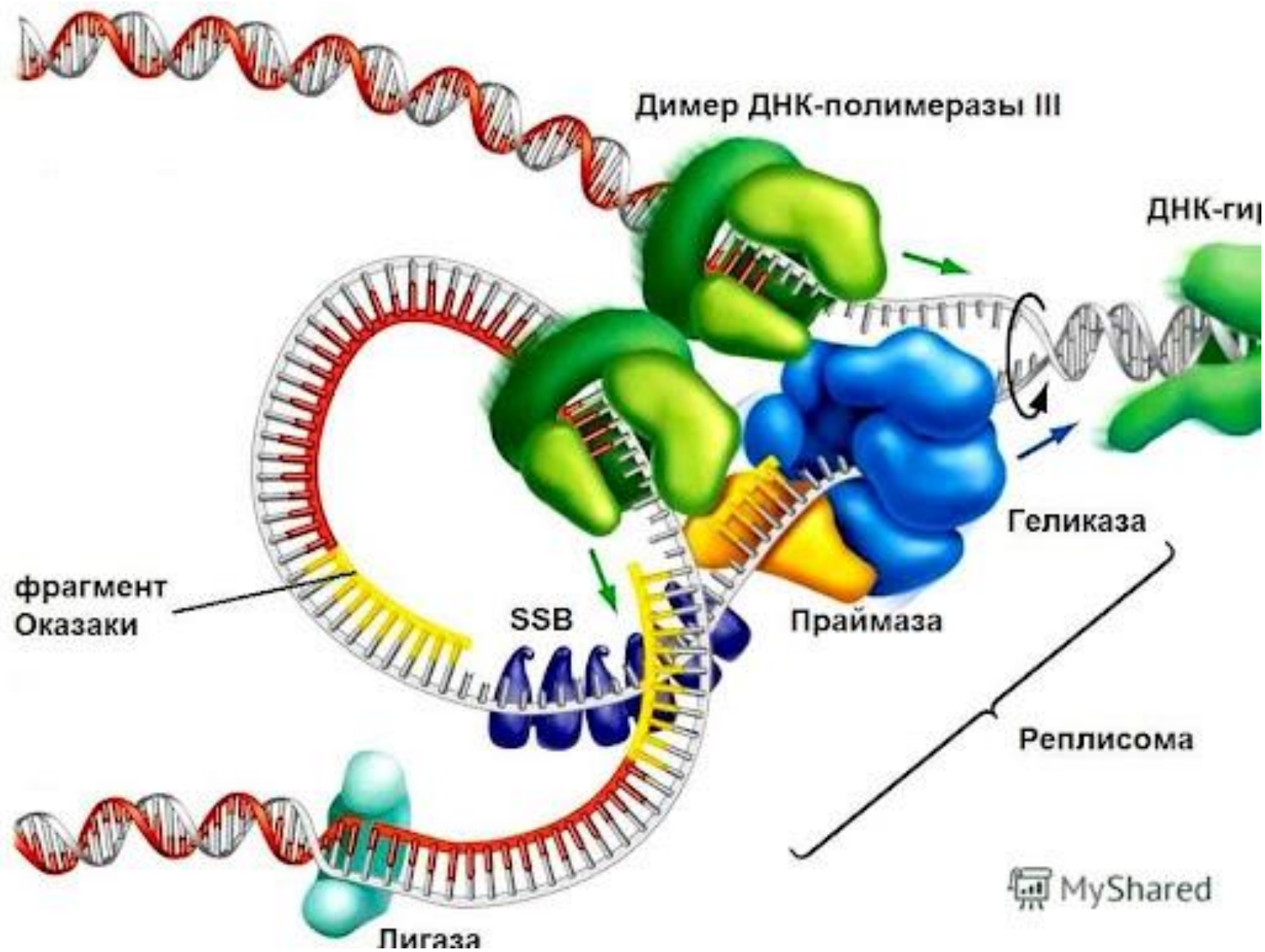


Одноцепочечный ДНК-связывающий белок *E. coli* (SSB)
Эукариотическим эквивалентом является фактор репликации А (RF-A)

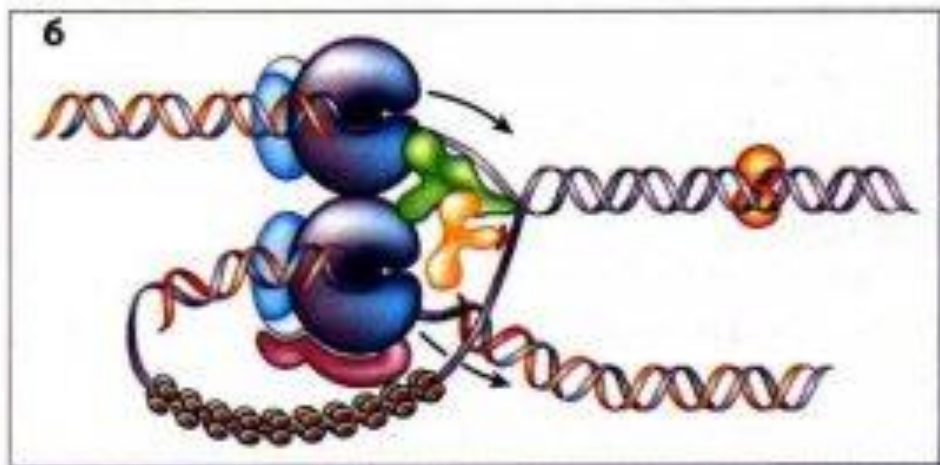
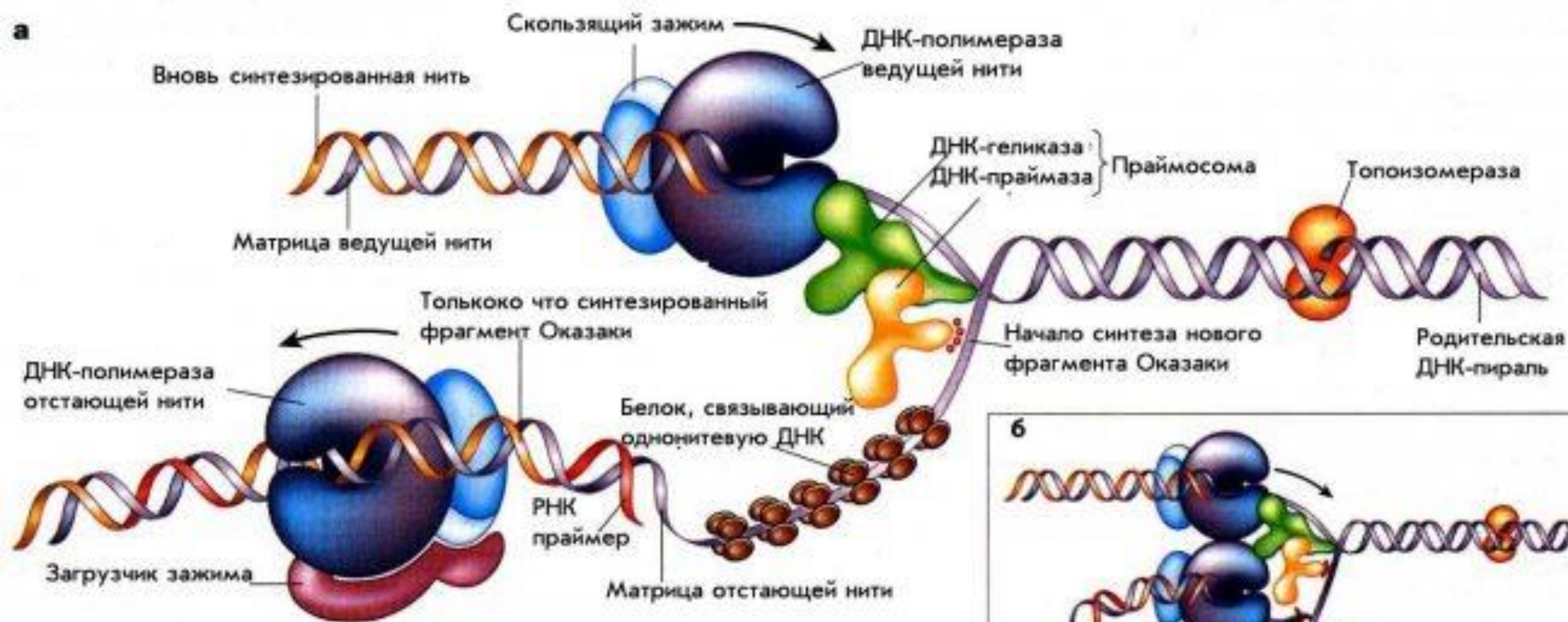


На вилке репликации существует координация факторов:
физическое взаимодействие обеих полимераз, примазы отстающей
цепи и загрузчика зажима, а также геликазы.





а



ЛИТЕРАТУРА

1. Щелкунов С.Н. «Генетическая инженерия», Учебно-справочное пособие. 3-е изд. Новосибирск: СУИ, 2008 – 514 с
2. Жимулев И.Ф. «Общая и молекулярная генетика» учебное пособие. Новосибирск: СУИ, 2007.
3. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
4. Brown T.A. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. 7th edition. Wiley-Blackwell, 2016.
5. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. Molecular Cell Biology. 9th edition. W.H. Freeman, 2021.