

DNA的重组

DNA Recombination

基因重组概念

- ❖ 遗传重组：造成基因型变化的基因交流过程
- ❖ 发生：减数分裂性细胞内，体细胞
- ❖ 地点：核基因间，叶绿体基因间，
线粒体基因间重组子间等
- ❖ 分子重组保证了遗传多样性，使生物得以进化，
也是基因工程的基础

DNA重组分类

同源重组：

细菌的基因转移与重组

位点特异重组

转座重组

接合作用

转化作用

转导作用

同源重组

- ◆ 发生在同源序列间的重组称为同源重组，又称基本重组，生物进化最基本的重组方式
- ◆ 通过链的断裂和再接，实现两个DNA分子大片同源序列间进行单链或双链片段的交换
- ◆ 只要两条DNA序列相同或相似，重组可以在序列的任何一点发生
- 进行同源重组至少75bp，实验证明如果同源顺序短于75bp，则重组频率大大降低

Homologous pair

Chiasma

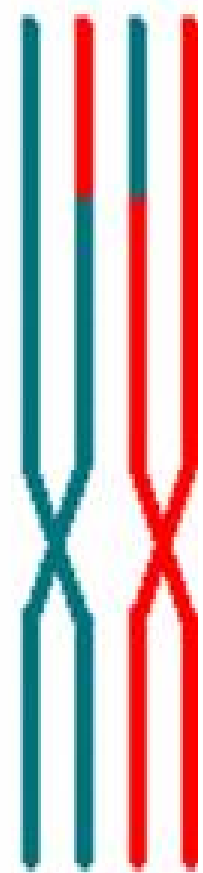
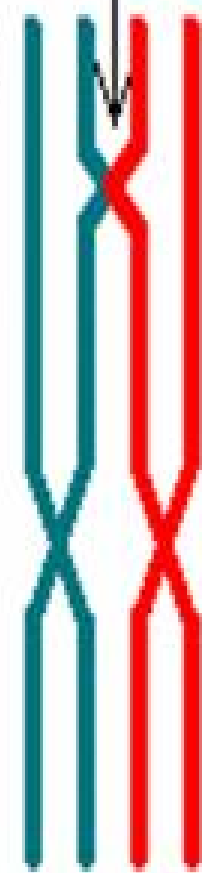
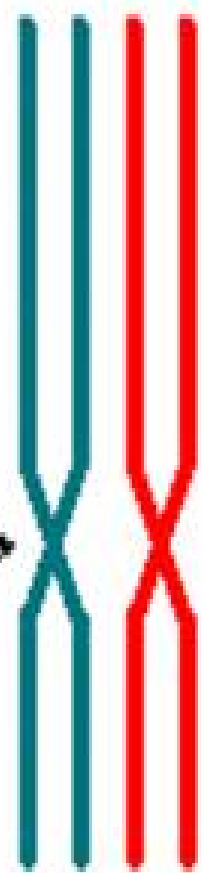
(a)

(b)

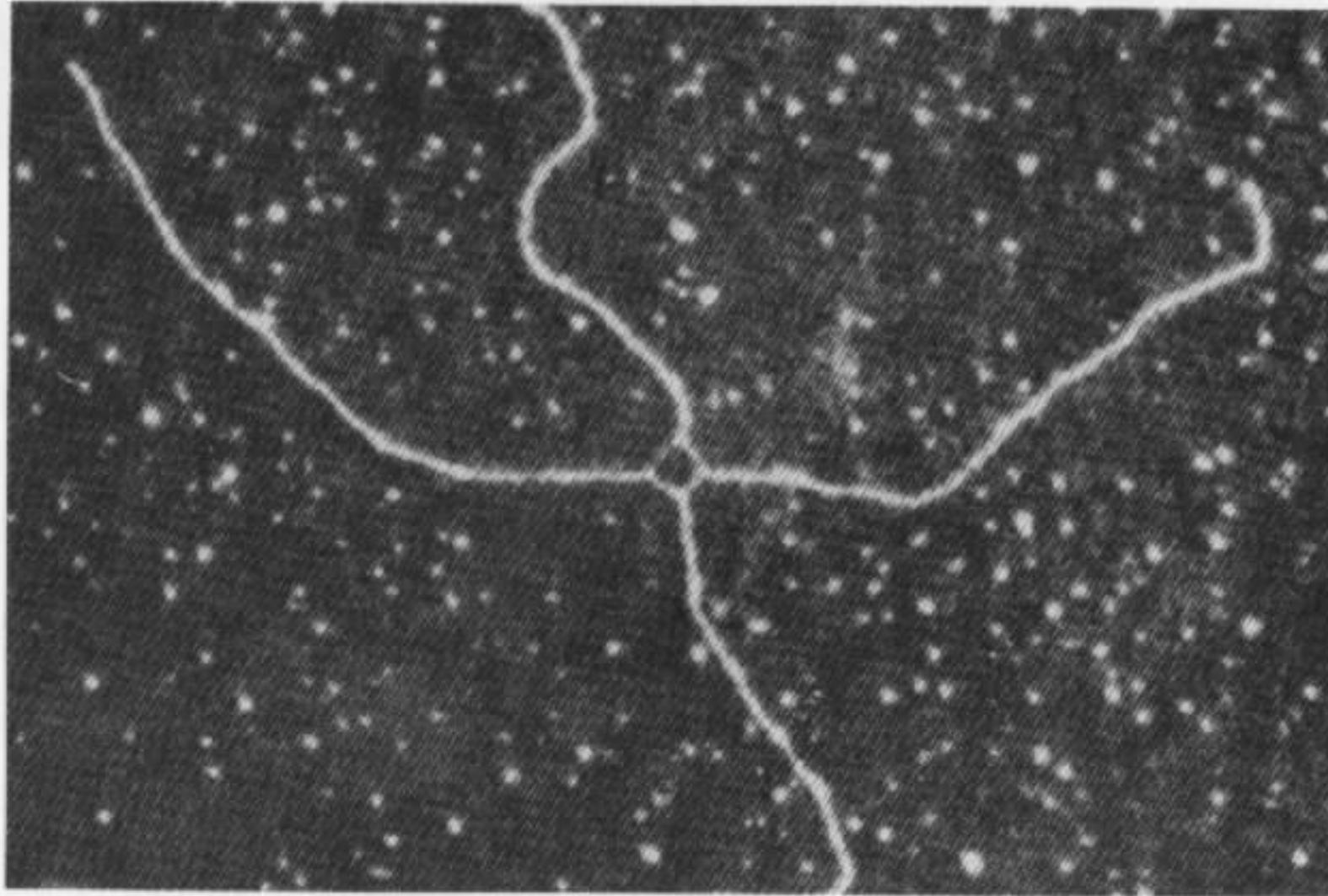
(c)

Centromere

Sister chromatids



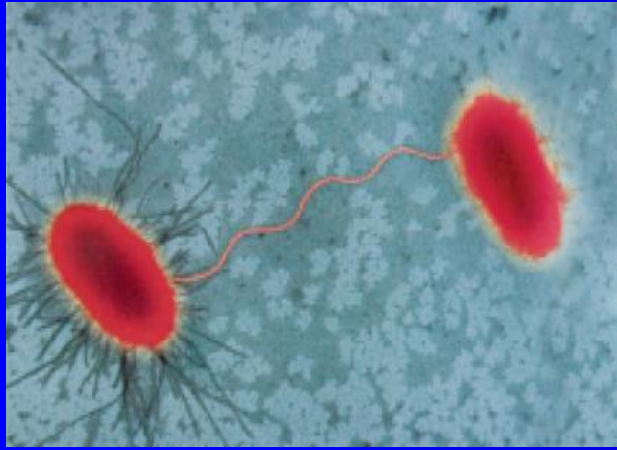
Electron micrograph of a Holliday intermediate with some single-stranded DNA in the branch point region.



细菌DNA转移-同源重组

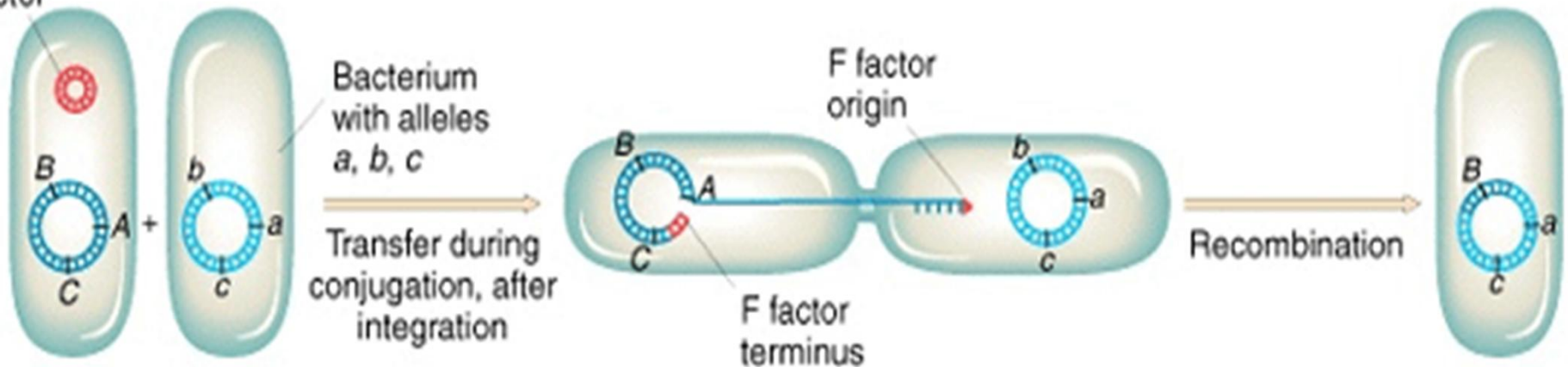
- ❖ 在细菌中遗传物质有三种转移的形式：
 - 转化 (transformation)
 - 接合 (conjugation)
 - 转导 (transduction)
- ❖ 共同特点是：
 - 单方向转移，产生部分二倍体 基因只有整合到环状染色体上才能稳定的遗传

接合作用-同源重组



当细胞与细胞、或细菌通过菌毛相互接触时，质粒DNA可以从一个细菌转移至另一细菌

(a) Conjugation
F factor



接合现象的发现和证实

黎德伯格(Lederberg)和塔特姆(Tatum)大肠杆菌杂交试验:

- 材料: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)K₁₂菌株的两个营养缺陷型品系:

- A—甲硫氨酸缺陷型met⁻和生物素缺陷型bi o⁻

- B—苏氨酸缺陷型thr⁻和亮氨酸缺陷型leu⁻

- 方法:

- 将A、B混和, 在基本培养基(固体)上涂布培养。

- 结果:

- 平板上长出原养型菌落(++++)

A 菌株
 $\text{met}^- \text{bio}^- \text{thr}^+ \text{leu}^+$

B 菌株
 $\text{met}^+ \text{bio}^+ \text{thr}^- \text{leu}^-$

完全培养基

离心并洗涤细胞

2×10^8 细胞

1×10^8 细胞

1×10^8 细胞

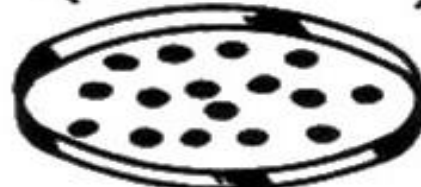
2×10^8 细胞

基本培养基

基本培养基



不生长



$\text{met}^+ \text{bio}^+ \text{thr}^+ \text{leu}^+$



不生长

黎德伯格和塔特姆的接合（杂交）试验

位点专一性重组

- ❖ 原核生物中，有时基因重组依赖于小范围的同源序列的联会，重组只限于该小范围特定位点的同源区：

位点专一性重组

- ❖ 完全不依赖于序列间的同源性，使一段DNA序列插入另一段中，在形成重组分子时依赖于DNA复制等过程完成重组：

转座重组

重组DNA分子的断裂与重接

证据

1961, M. Meselson and J. J. Wergle 两个
双标记 λ 噬菌体感染大肠杆菌



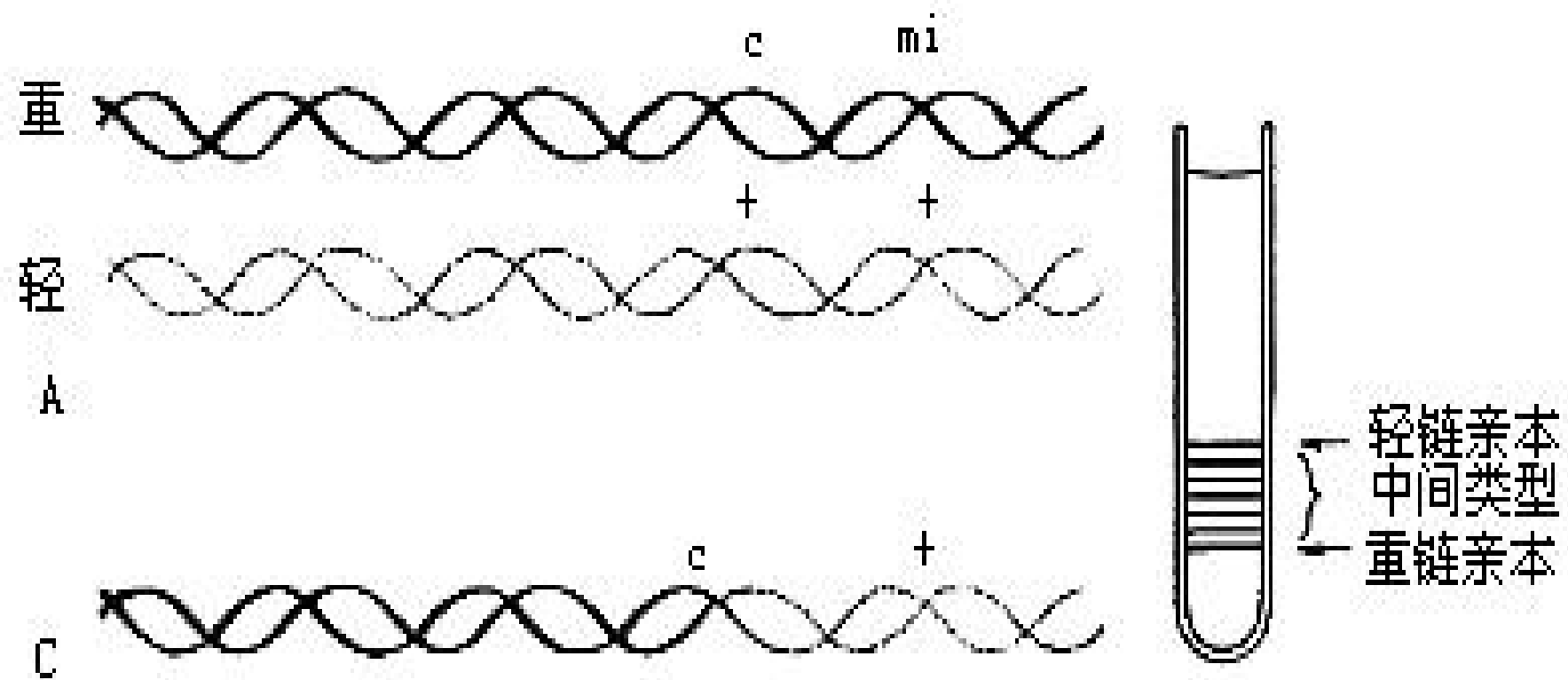


图8-1 λ 噬菌体的染色体断裂与重接的证据

A: 两个品系的 λ 噬菌体 ($c.mi, ++$) 感染 *E. coli*; B: 氯化铯密度梯度离心显示轻链亲本 (上层), 中间类型 (中) 和重链亲本 (下) 三种条带; C: 两个标记 ($c.mi$) 间的交换所产生的重组; ($c, +$) 后代, 进一步证明了DNA的断裂与重接

同源重组机制

断裂重接模型:

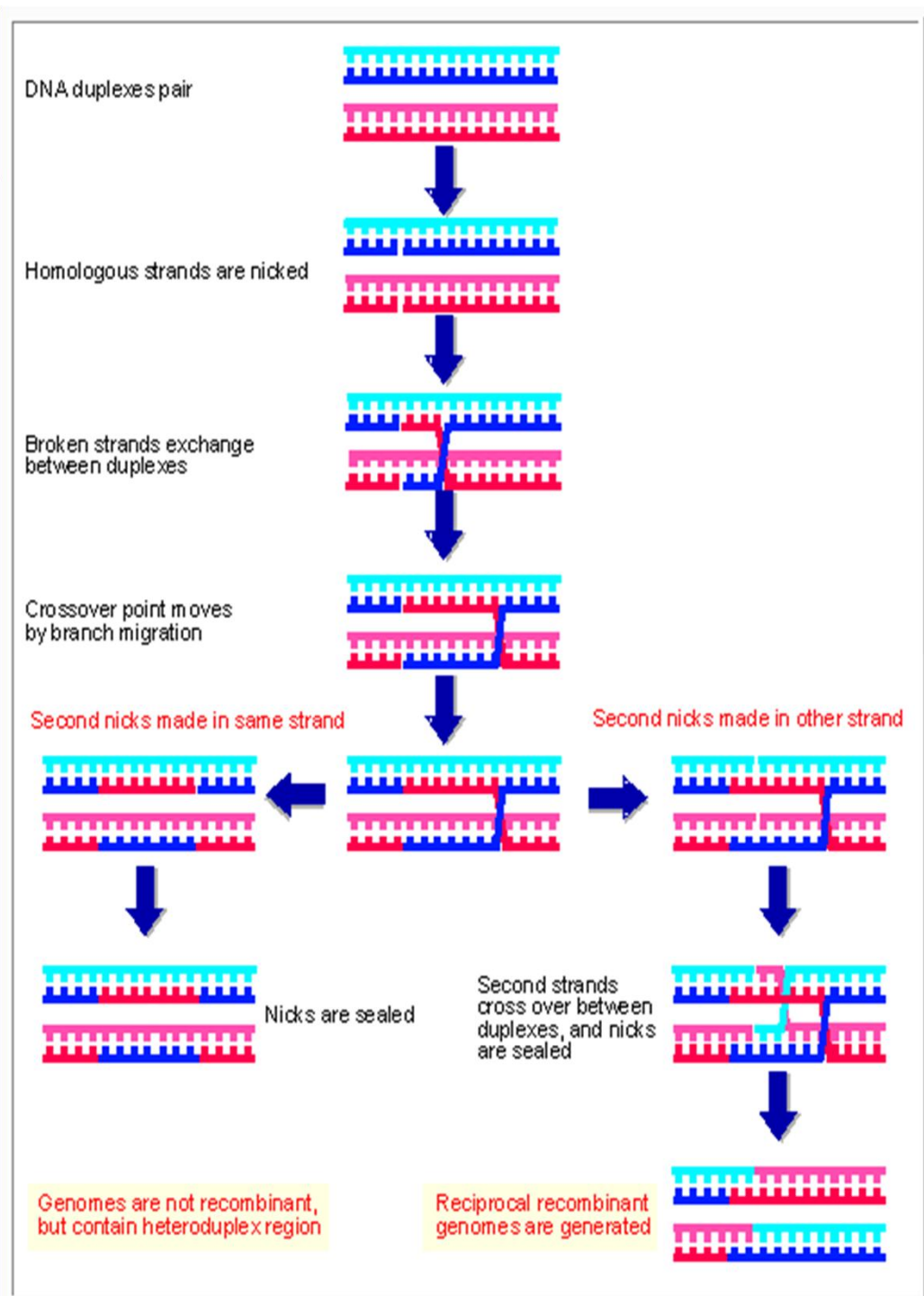
异源双链

支链迁移

Ni ck → 置换 → 侵入
(交换)

→ 支链迁移

Holliday模型





Holliday模型中，同源重组主要4个关键步骤

- ①两个同源染色体DNA排列整齐
- ②一个DNA的一条链断裂、并与另一个DNA对应的链连接，形成Holliday中间体
- ③通过分支移动产生异源双链DNA
- ④Holliday中间体切开并修复，形成两个双链重组体DNA，分别为：
 - 片段重组体(patch recombinant)
 - 拼接重组体(splice recombinant)

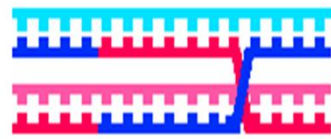


片段重组体

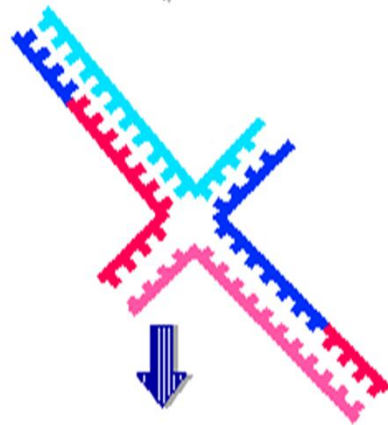
切开的链与原来断裂的是同一条链，重组体含有一段异源双链区，其两侧来自同一亲本DNA。

拼接重组体

切开的链并非原来断裂的链，重组体异源双链区的两侧来自不同亲本DNA。

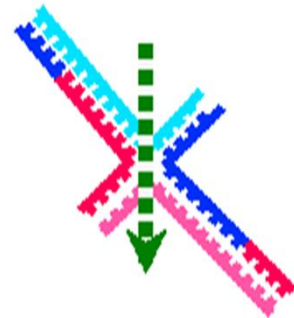


Rotation shows structure of Holliday junction

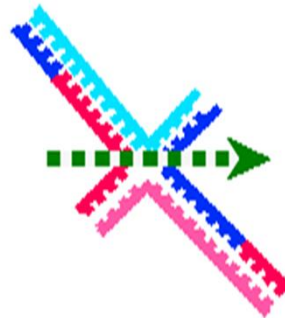


Nicking controls outcome

Nicks in other strands release splice recombinants (conventional)



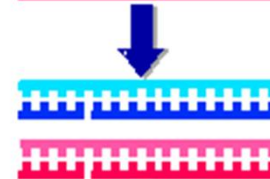
Nicks in same strands release patch recombinants



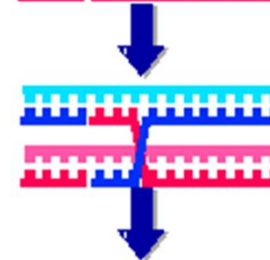
DNA duplexes pair



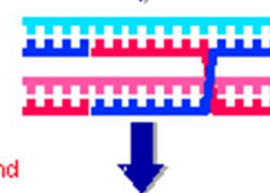
Homologous strands are nicked



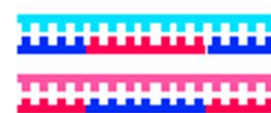
Broken strands exchange between duplexes



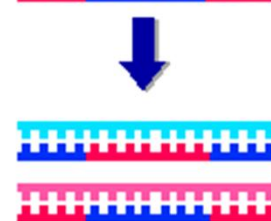
Crossover point moves by branch migration



Second nicks made in same strand



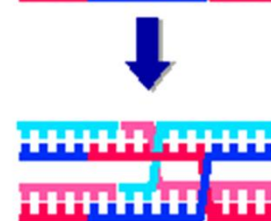
Second nicks made in other strand



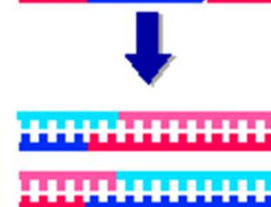
Nicks are sealed

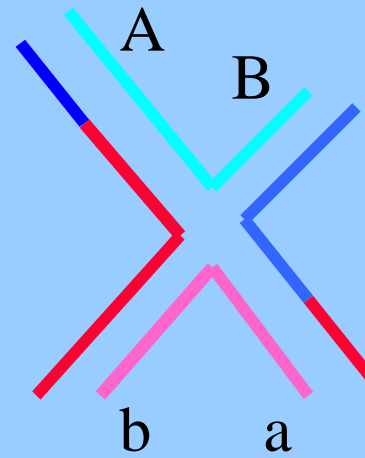
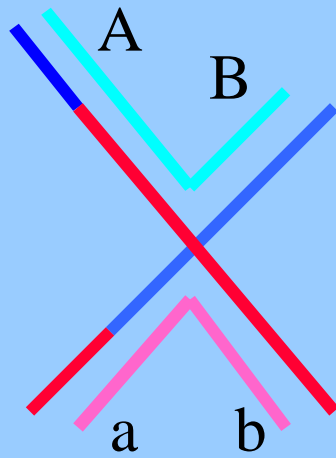
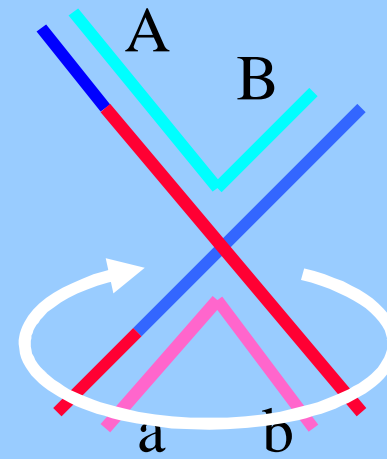
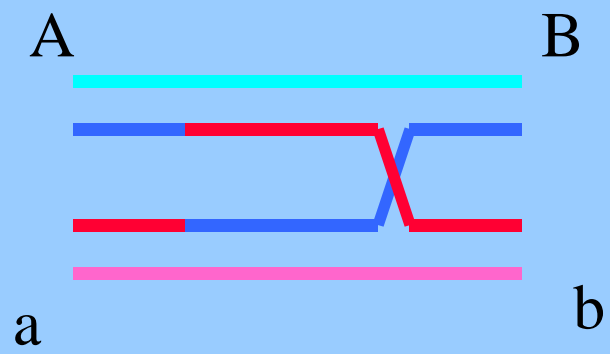
Genomes are not recombinant, but contain heteroduplex region

Second strands cross over between duplexes, and nicks are sealed



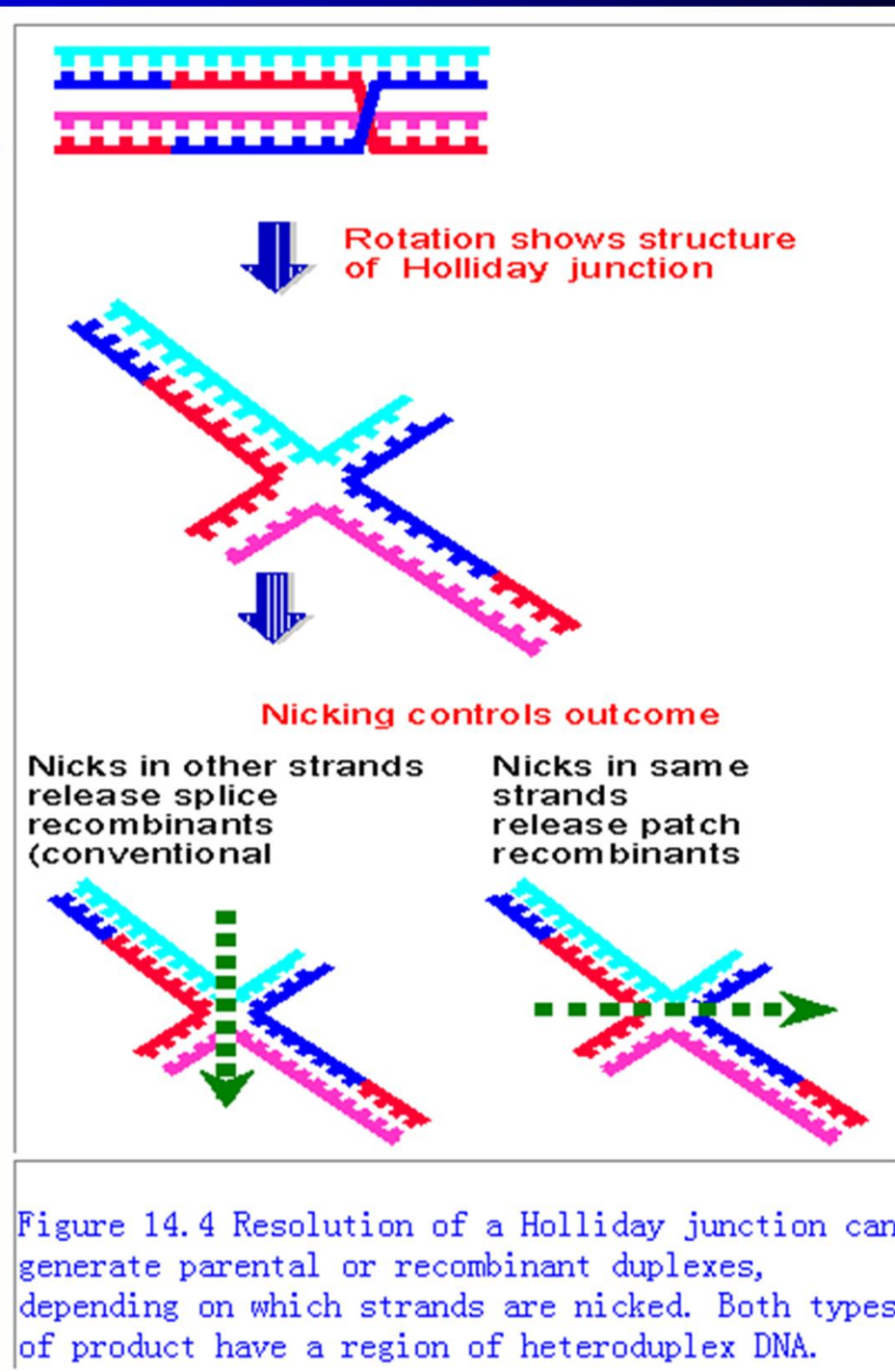
Reciprocal recombinant genomes are generated



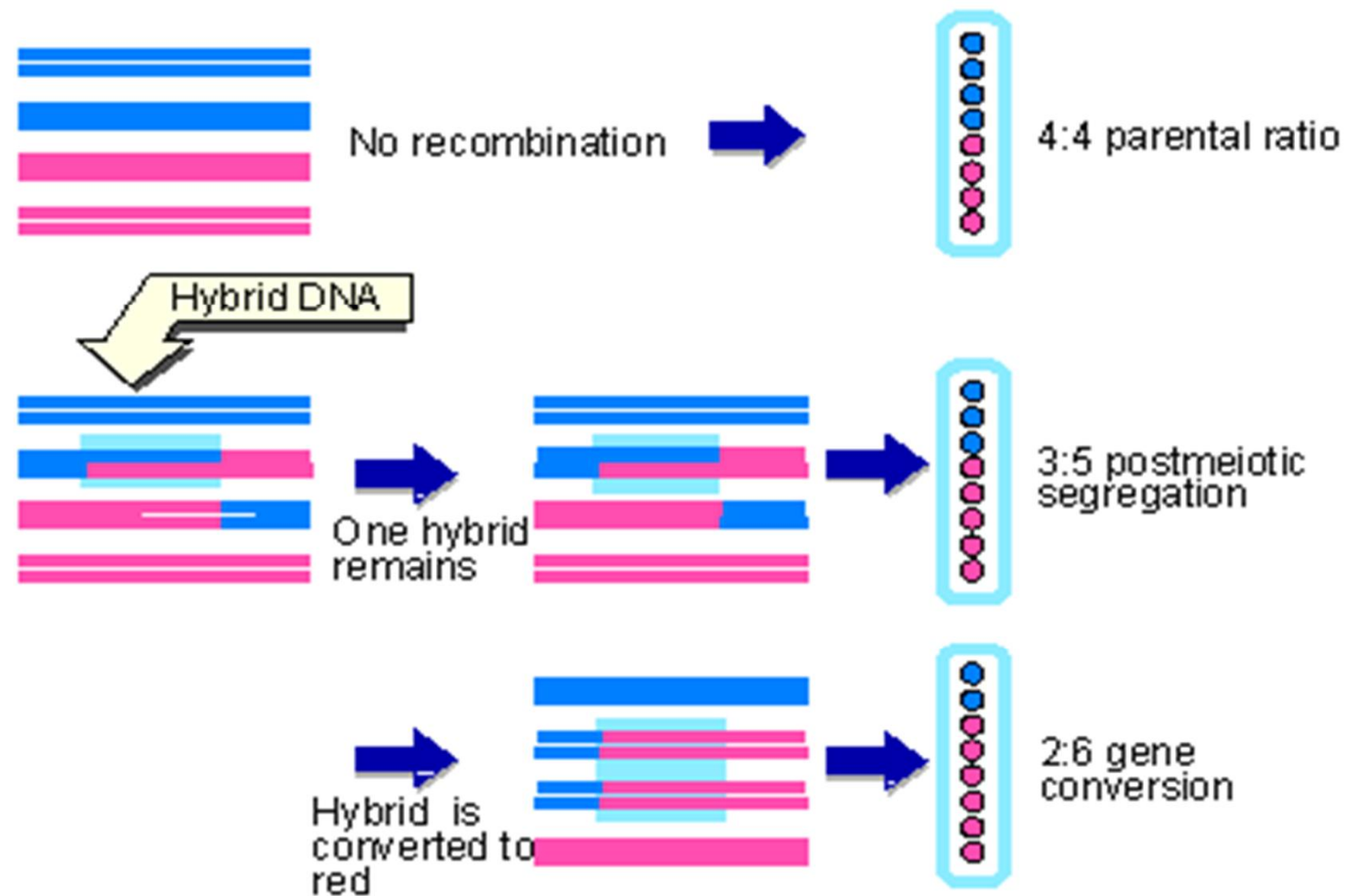


Holliday模型

基因转换

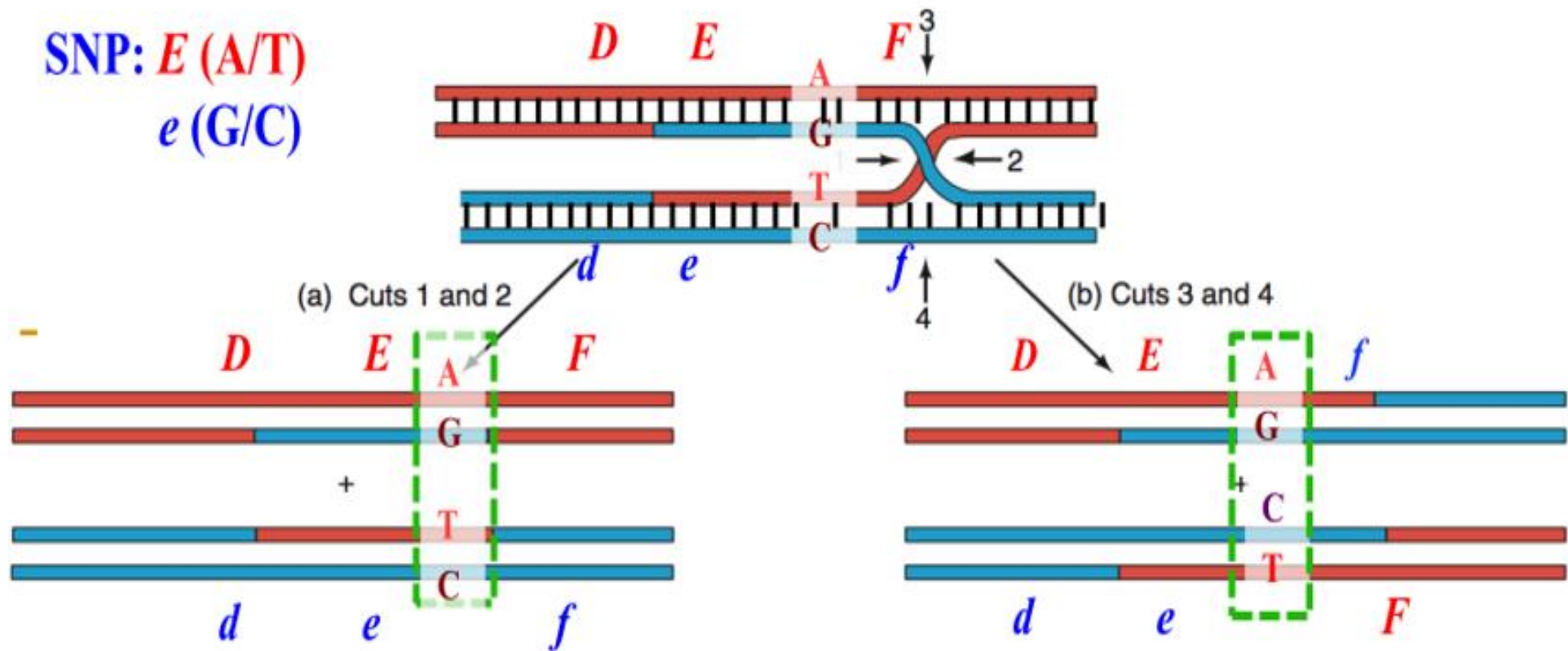


减数分裂中的重组 -子囊菌孢子杂交



片段重组体

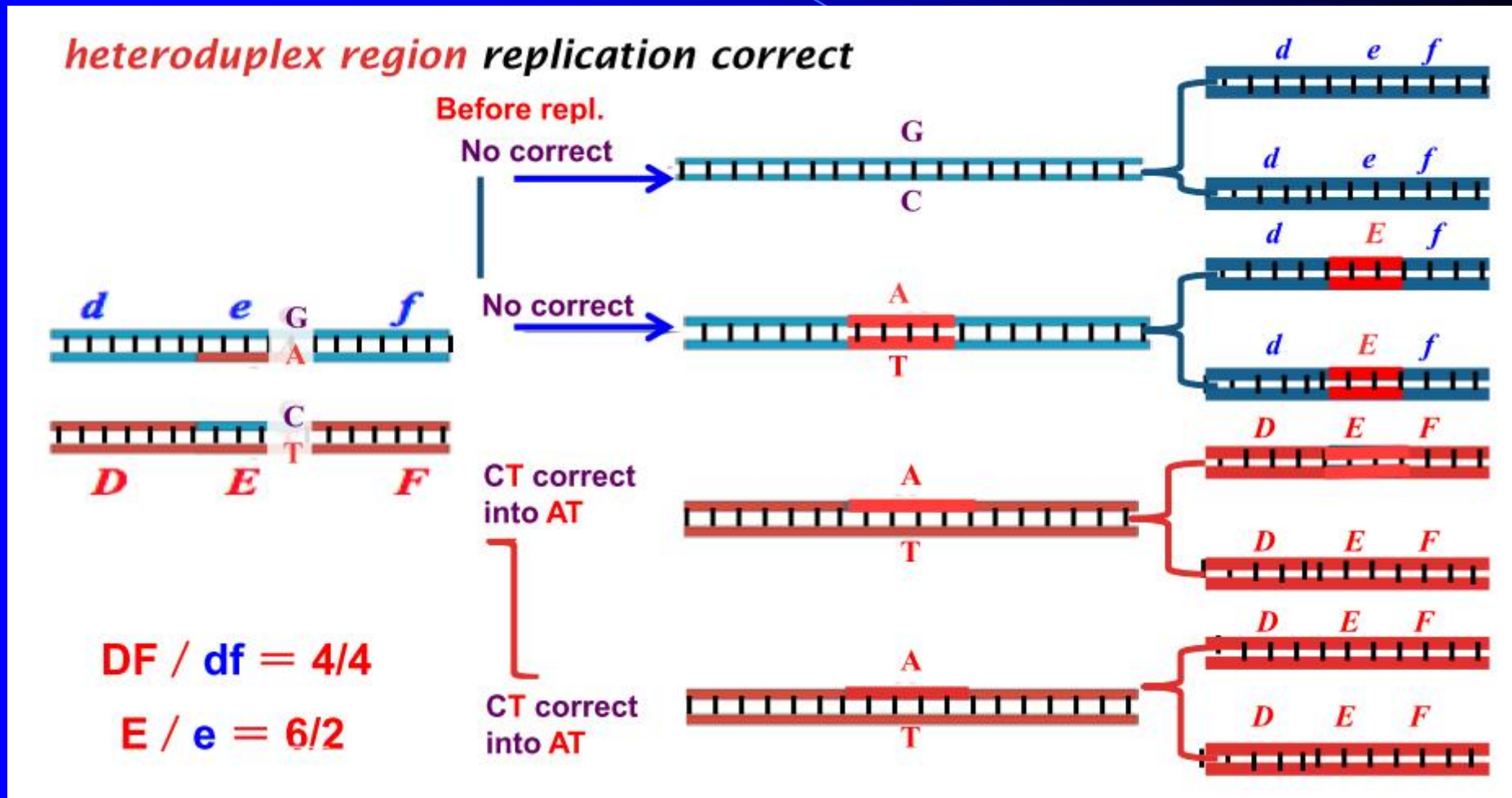
SNP: *E* (A/T)
e (G/C)



**Noncrossover (heteroduplex)
recombinants**

**Crossover
(splice) recombinants**

拼接重组体



拼接重组体局部异源双链区修复系统识别产生不同结果

重组的酶学

❖ E. coli rec^- 不能重组

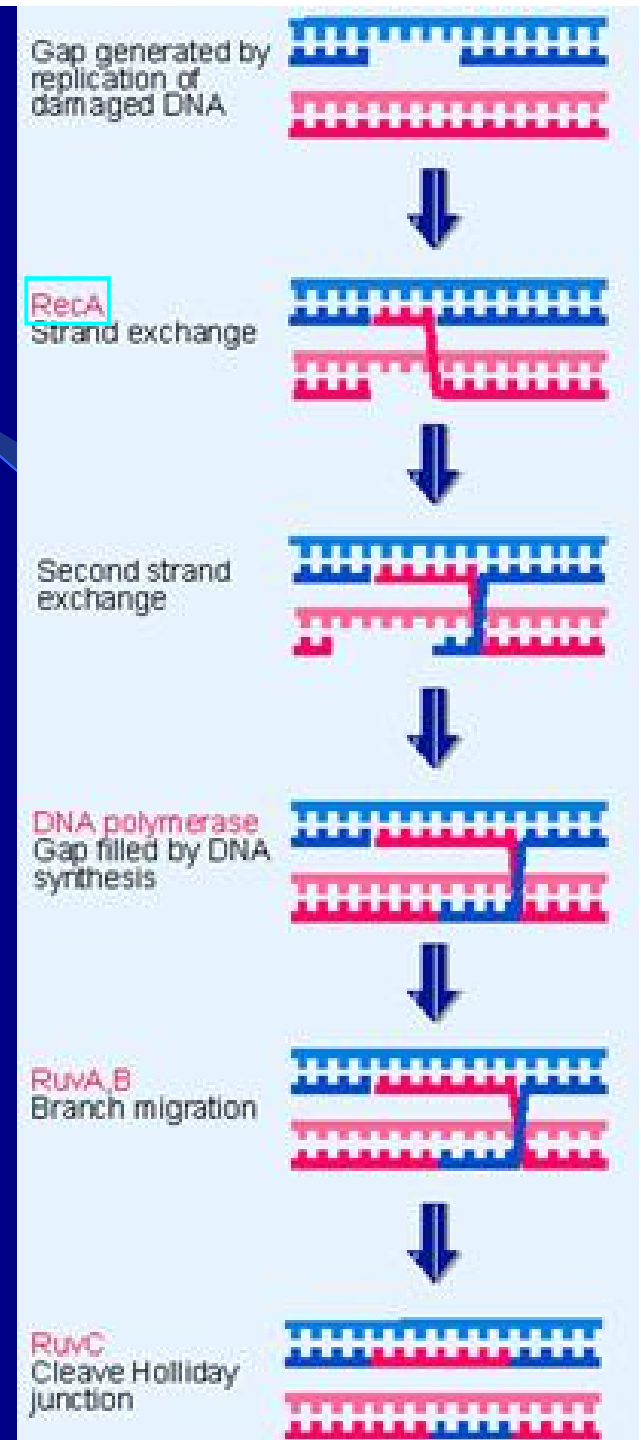
即使DNA分子有断裂或“空隙”，两个DNA分子也不一定重组，必须有推动重组反应的酶存在

❖ Rec A是重组联会的关键蛋白

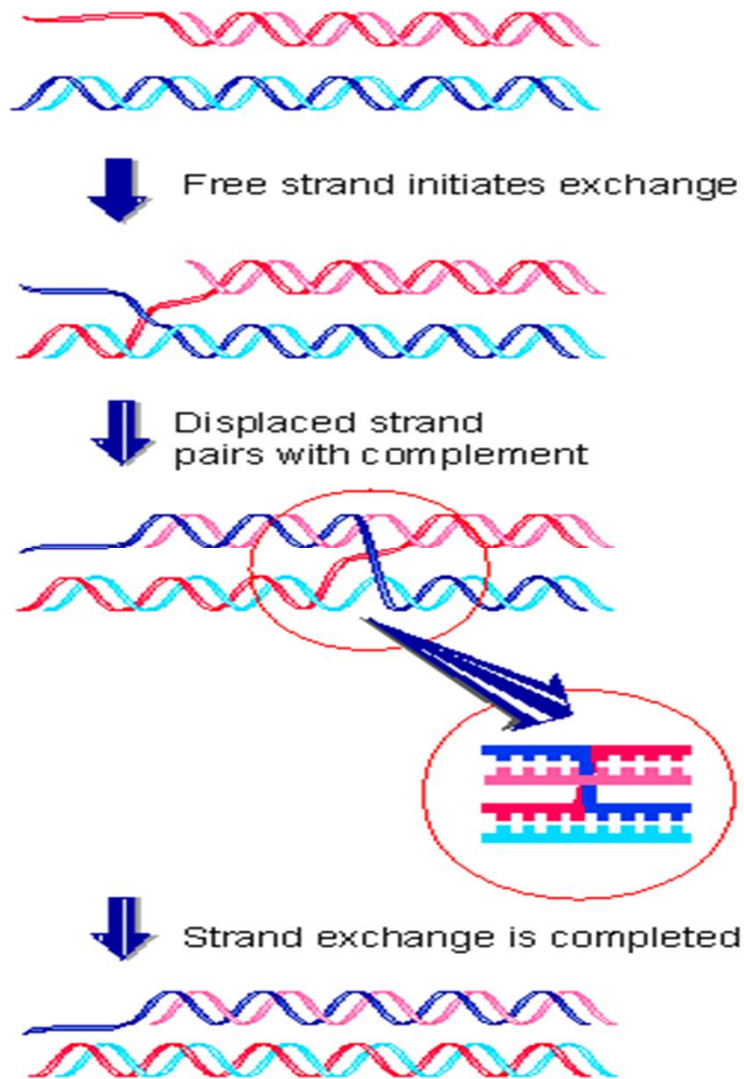
❖ RecBCD 产生单链 解旋 解链

识别chi位点: GCTGGTGG
CGACCACC

E. coli DNA上约有一千拷贝Chi序列，或者说每5个基因就有1个Chi作为RecBCD酶作用部位



RecA通过碱基配对使两个DNA连接成杂交分子



Hydrogen bond reform



heteroduplex



RecA蛋白的功能

- ❖ NTP酶活性：存在单链DNA时，RecA具有水解ATP/dATP活性，促进联会
- ❖ RecA蛋白能特异地识别单链DNA，使其免受核酸酶攻击并能将之与同源双螺旋中的互补顺序“退火”，同时将另一条链排挤出去，形成所谓D环（D—LOOP）
- ❖ RecA蛋白是recA基因的产物， 4个亚基的四聚体

RecBCD的作用

核酸酶活性:

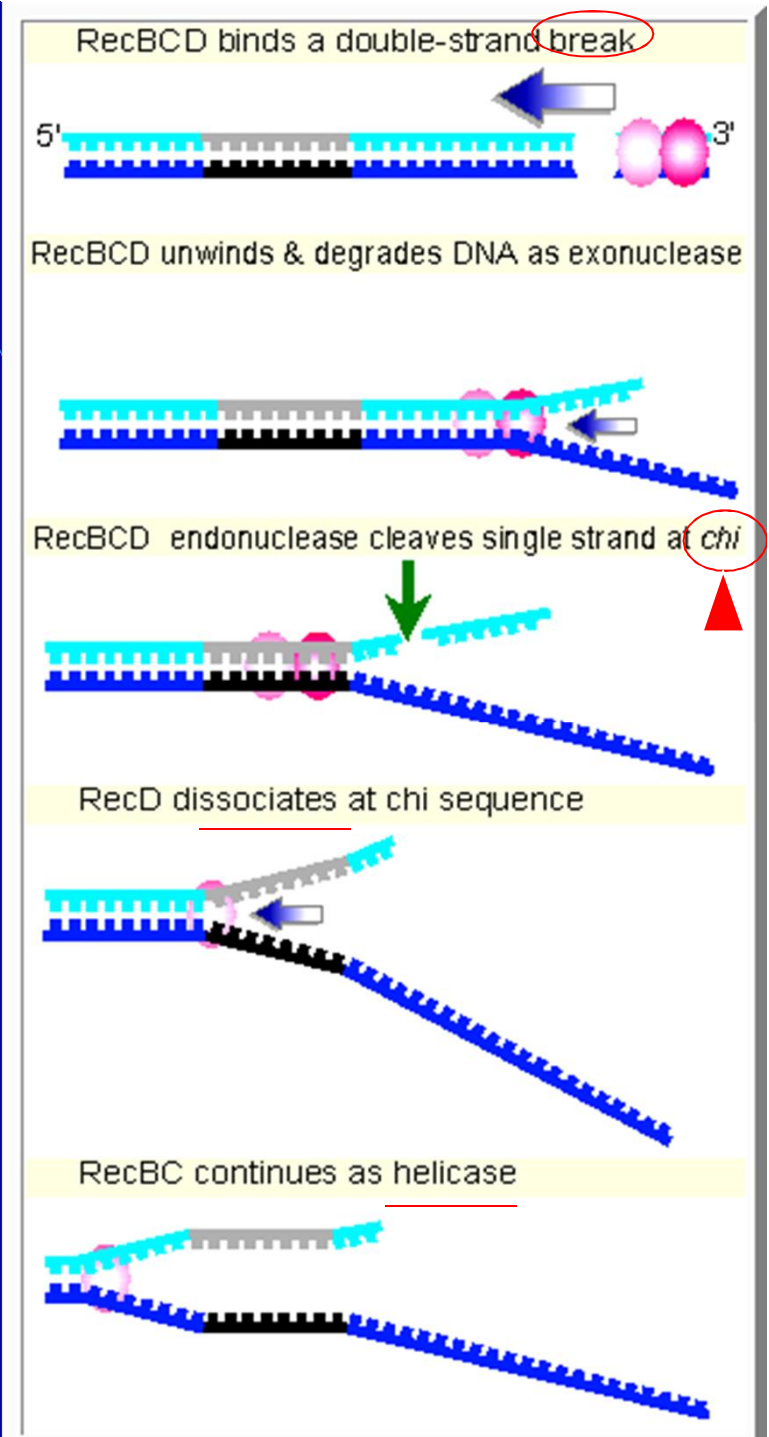
依赖ATP, 在DNA *chi* 位点右侧剪切

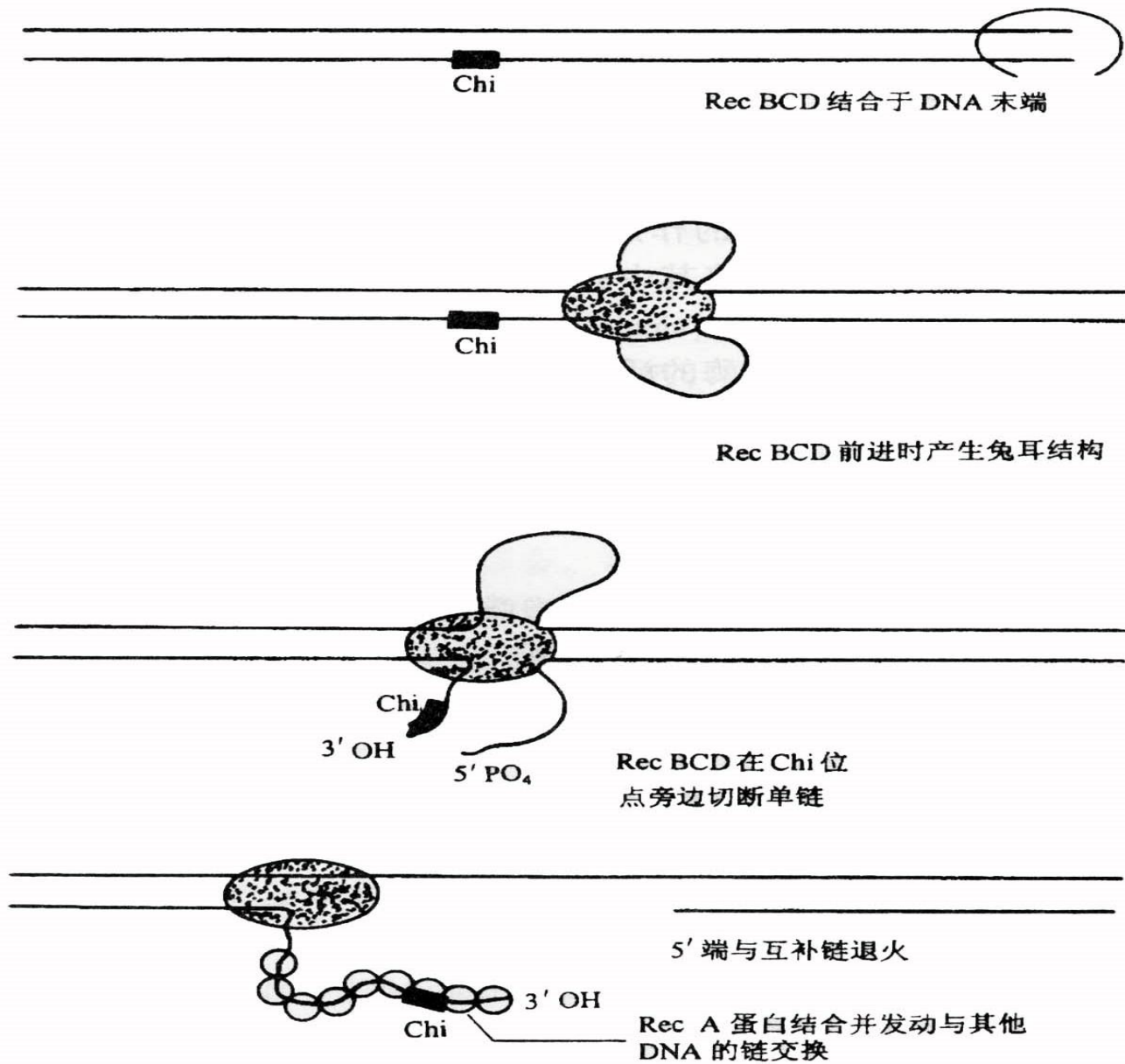
产生3' 游离末端

解旋酶活性:

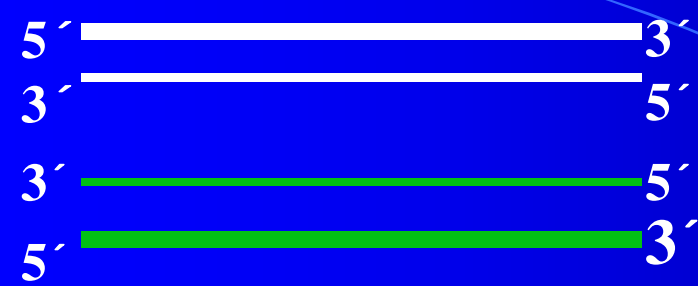
需ATP, 从DNA一端将双链DNA解开

ATPase活性: 水解ATP提供能量

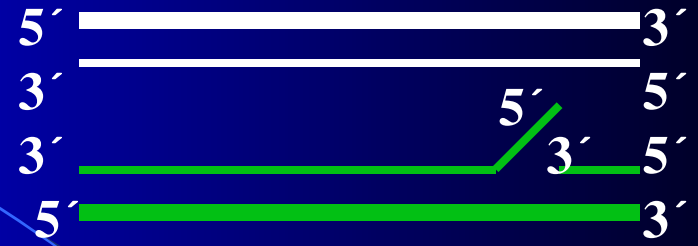




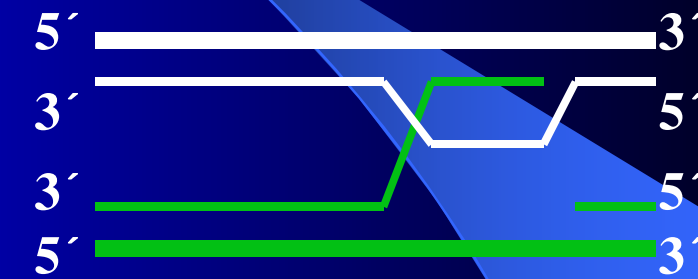
RecBCD 蛋白质作用于双链 DNA 末端，在 Chi 位点附近产生单链 DNA，继而由 RecA 蛋白质促进同源重组（孙乃恩等，分子遗传学，1990，p422）



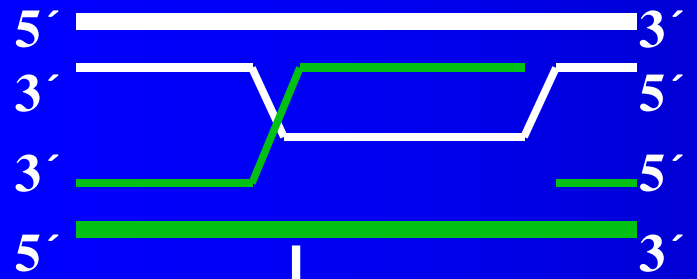
内切酶
(RecBCD)



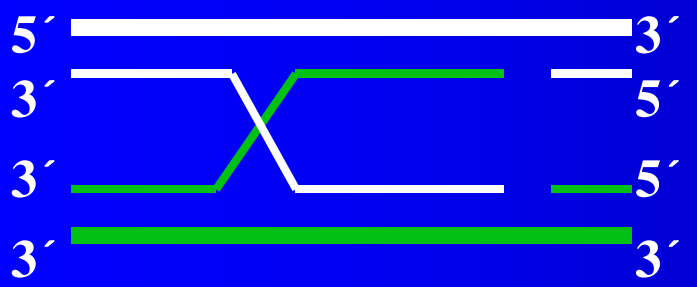
DNA 侵扰
(RecA)



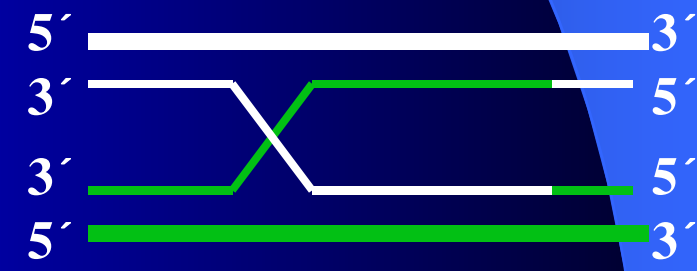
分支迁移
(RuvAB)



内切酶
(RuvC)



DNA
连接酶



Holliday 中间体

RuvAB的作用

Ruv AB 作用:

由A和B两种亚基组成，二者结合在一起才有活性

RuvAB主要功能:

通过解旋酶活性，推动Holliday中间体分支迁移

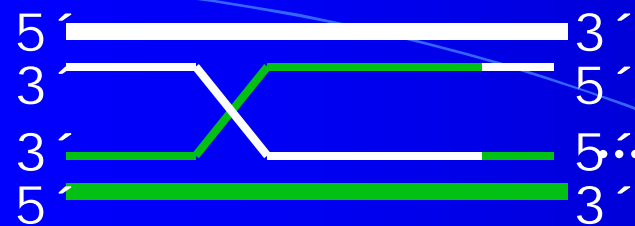
Ruv C 的作用

Ruv C 是一种内切酶，可特异识别Holliday分支

功能：在重组中诱发Holliday中间体的拆分作用

拆分过程：

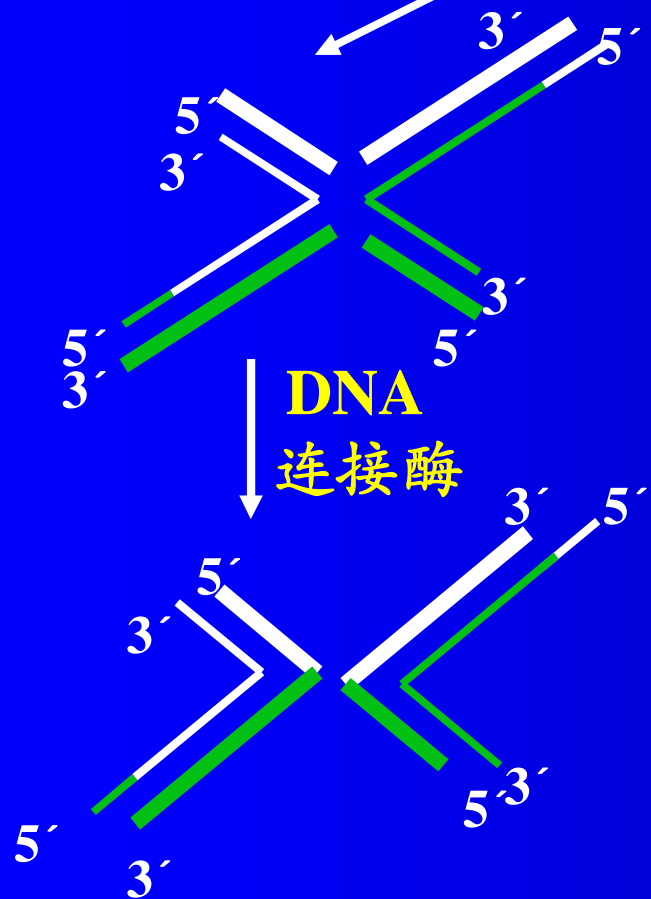
- Ruv C 结合于Holliday中间体
- 改变DNA构象，需用 Mg^{2+} 或 Ca^{2+}
- 切割，需用 Mg^{2+}



Holiday 中间体

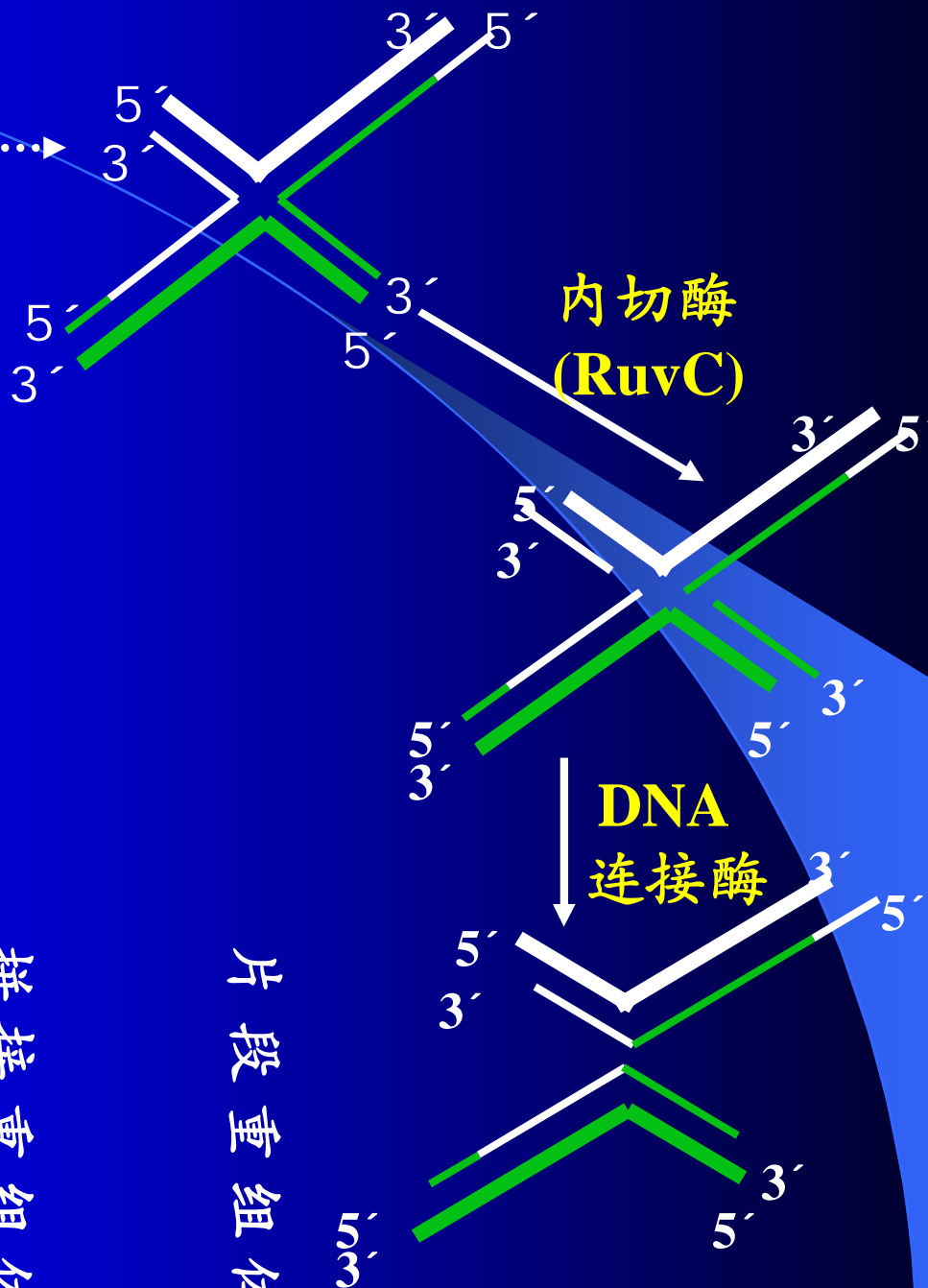
内切酶
(RuvC)

内切酶
(RuvC)



DNA
连接酶

拼接重组体



DNA
连接酶

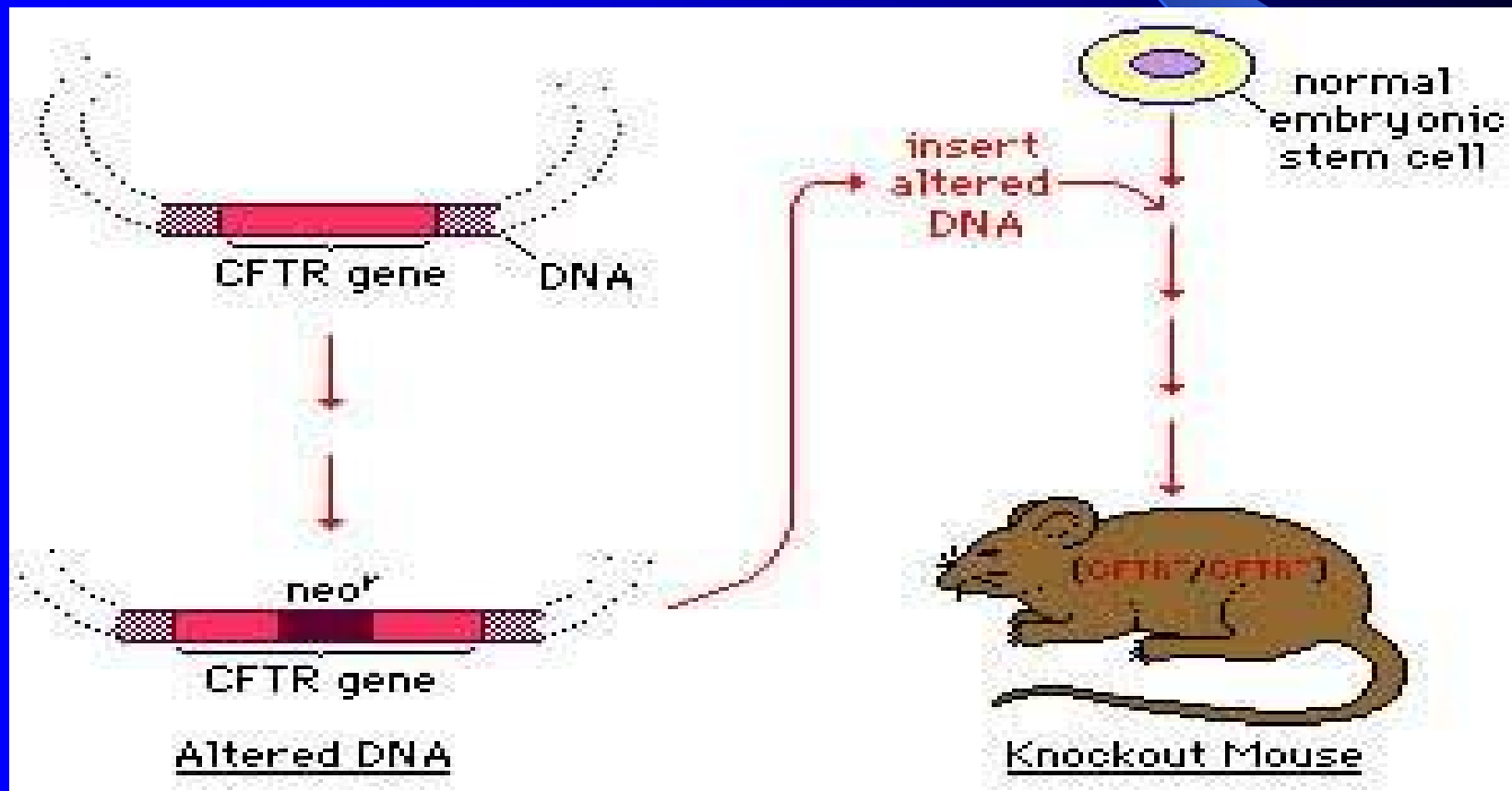
片段重组体

同源重组的主要途径

- Rec BCD 途径：是最重要的一条途径
- Rec F 途径：在Rec BCD 途径不能运作的情况下，大肠杆菌启动该途径
- Rec E 途径：不用Rec BCD ，也不用Rec A
- Red 途径：为重组缺陷途径，是 λ 噬菌体专用途径

基因敲除

基因敲除 (knock out of gene)：利用基因打靶技术，用无功能的外源基因转入细胞与基因组中同源序列进行同源重组，把具有功能的同源序列置换出来，造成功能基因的缺失或失活



位点特异性重组

- ❖ 位点特异性重组不依赖于DNA顺序的同源性
(亦可有很短的同源序列)，主要依赖于能与某些酶相结合的DNA序列
- ❖ 这些特异的酶能催化DNA链的断裂和重新连接，
并发动位点特异性重组作用
- ❖ 相反，在同源重组中，DNA链的切断完全是随机的
结果暴露出一些能与RecA这样的蛋白质相结合序列，
从而发动交叉重组

λ 噬菌体DNA对宿主整合

- λ 噬菌体感染大肠杆菌后，有两种生活方式：
 - 裂解生长途径
 - 溶源菌生长途径
- λ 噬菌体在溶源周期和裂解周期中，其DNA状态不同：整合与切离，两种状态相互转变通过位点特异性重组实现
- 这些特异位点叫附着点 (attachment site) 简称为 att

位点特异性重组— λ 噬菌体整合

attP: POP'

attB: BOB'

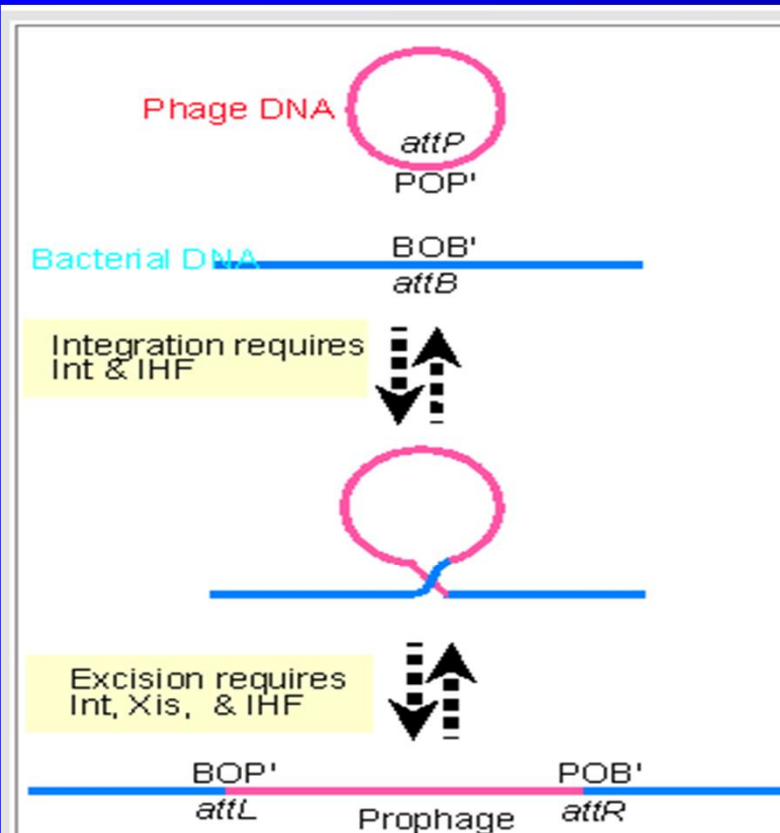


Figure 14.19 Circular phage DNA is converted to an integrated prophage by a reciprocal recombination between *attP* and *attB*; the prophage is excised by reciprocal recombination between *attL* and *attR*.

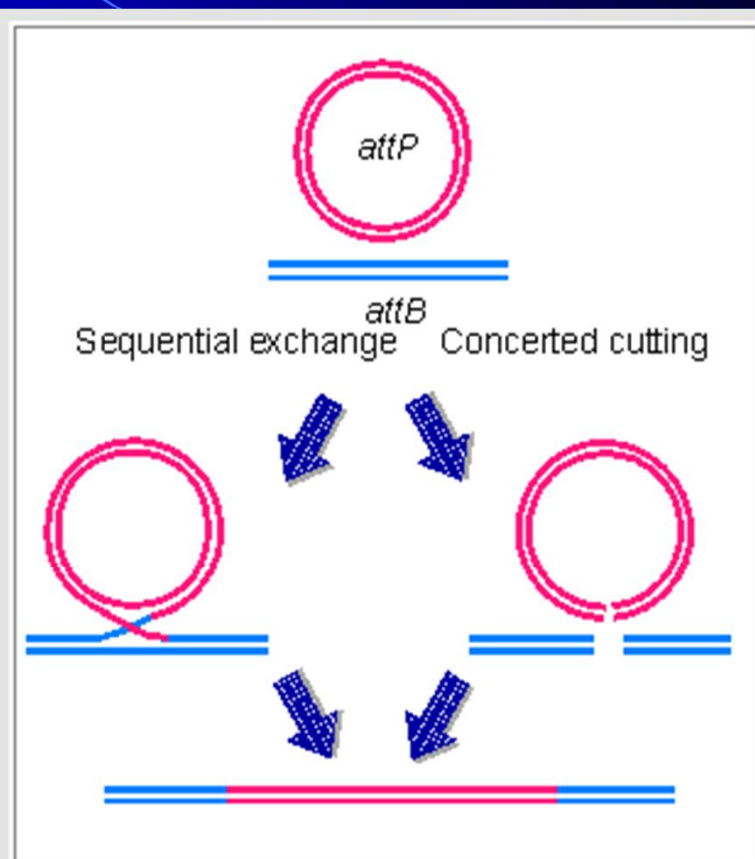


Figure 14.20 Does recombination between *attP* and *attB* proceed by sequential exchange or concerted cutting?

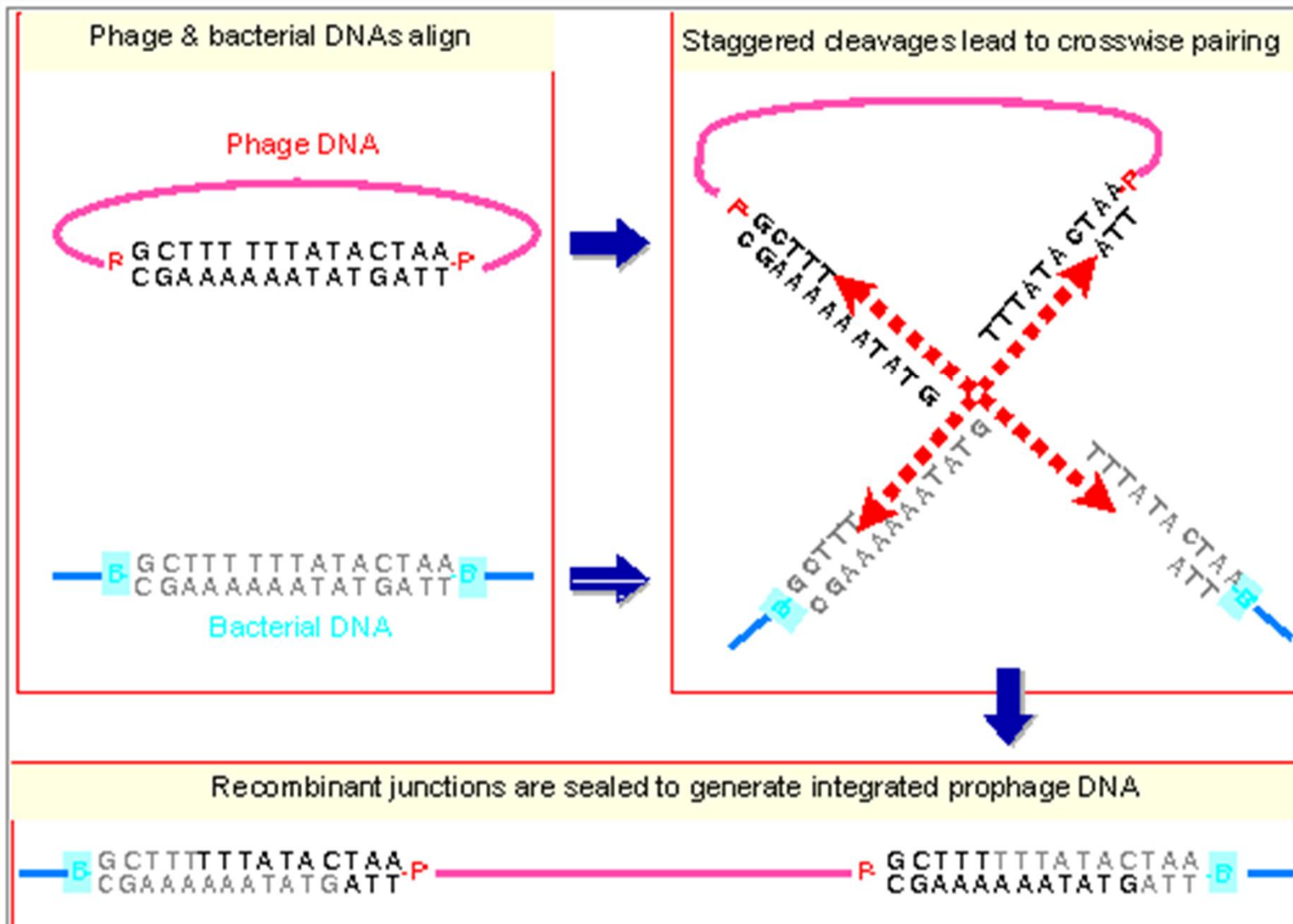


Figure 14.21 Staggered cleavages in the common core sequence of *attP* and *attB* allow crosswise reunion to generate reciprocal recombinant junctions.

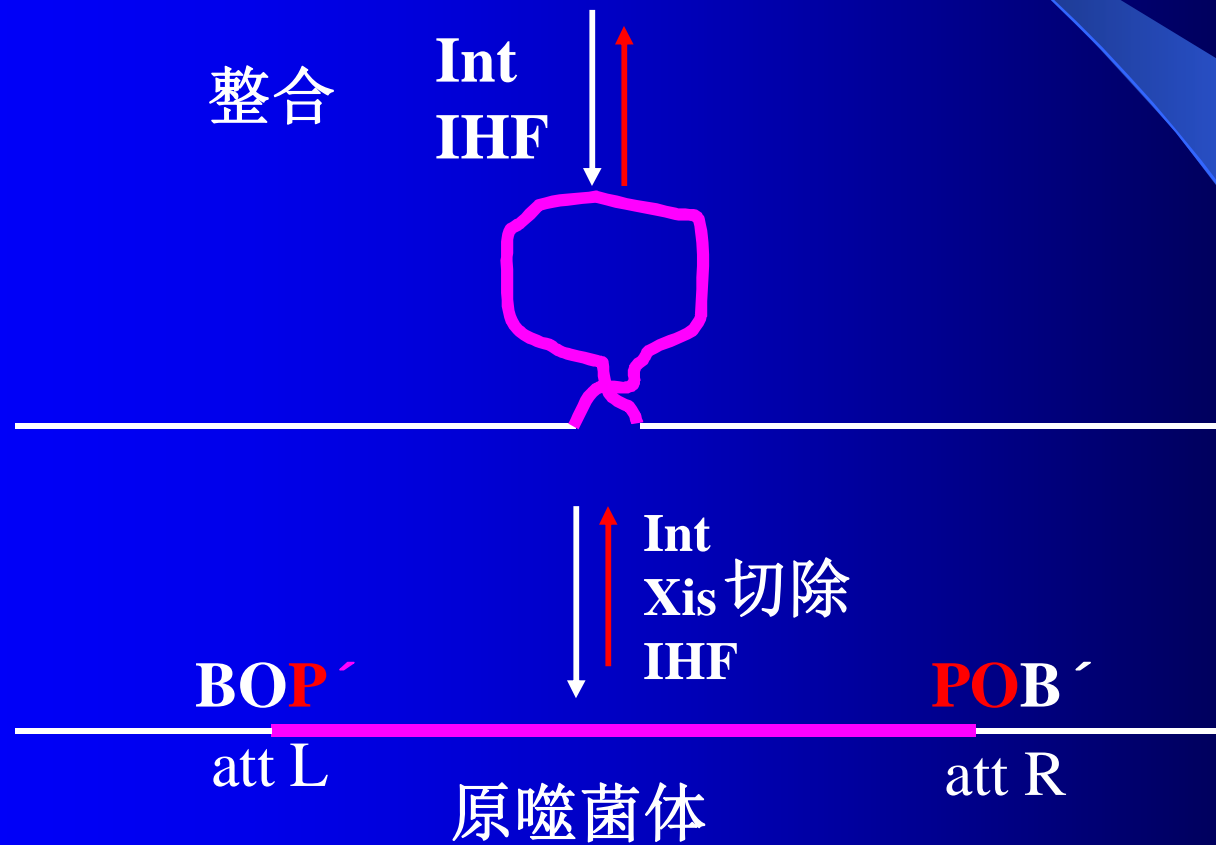
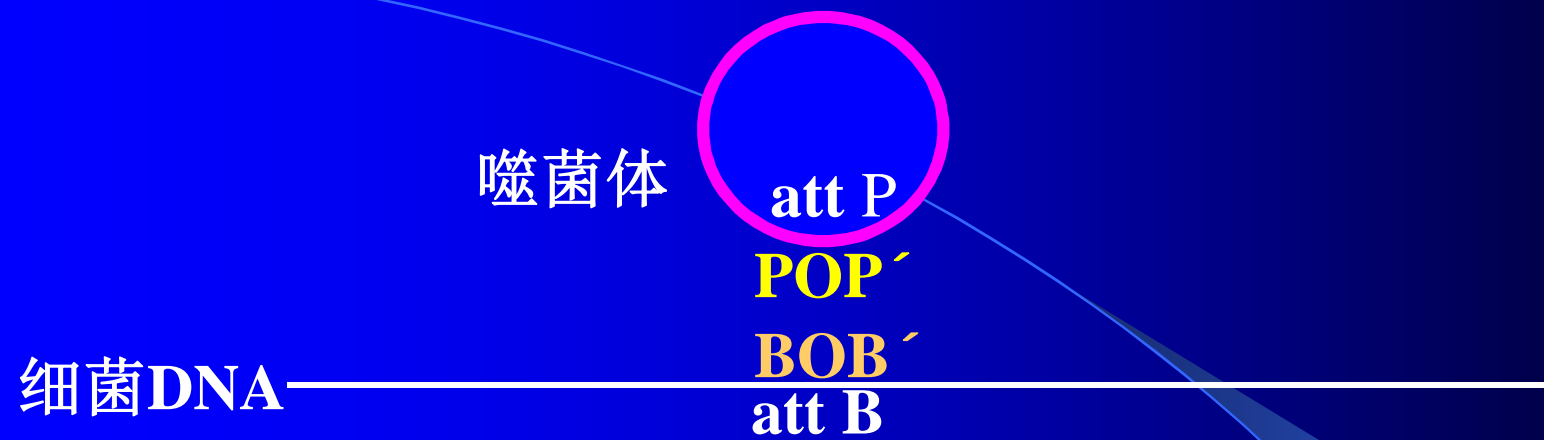
λ 噬菌体整合的分子机制

三个阶段:

- λ 整合酶与 λ DNA、宿主DNA的 att 位点结合
- 链交换，两条链形成中间体连接，形成重组分子

整合需要两种蛋白:

- 整合酶 (integratase, **Int**) : λ 噬菌体编码
λ 噬菌体的插入; 原噬菌体切离; 拓扑异构酶活性
- 整合宿主因子 (integration host factor, **IHF**)
宿主him A基因编码, 对整合起促进作用



λ 噬菌体切除的分子机制

λ 噬菌体的切除需要三种蛋白：

- 整合酶 (integratase, Int) :
- 整合宿主因子 (IHF) :
- 切除酶 (excisionase, Xis) : Xis和Int结合形成复合物, 作用于BOP' 和POB' 位点, 促进两者之间的相互作用和重组

整合与切离的反应如下：



酶作用的特异性

- Int、IHF只能在attP (POP')上形成整合体，再作用于attB (BOB')，继而切断、相互交换重组连接
 - Int、IHF不能在attL (BOP')或attR (POB')上形成整合体，从而决定重组方向
 - Xis、Int、IHF只能与attL (BOP')或attR (POB')上形成另一种整合体，重组结果是使原噬菌体从宿主基因组上切离下来
 - 整合需识别attP和attB，切离需识别attL和attR
- 位点特异性重组是通过重组位点的鉴别来控制

位点专一性重组及其应用

- λ 噬菌体的整合和切除

λ 噬菌体: attP

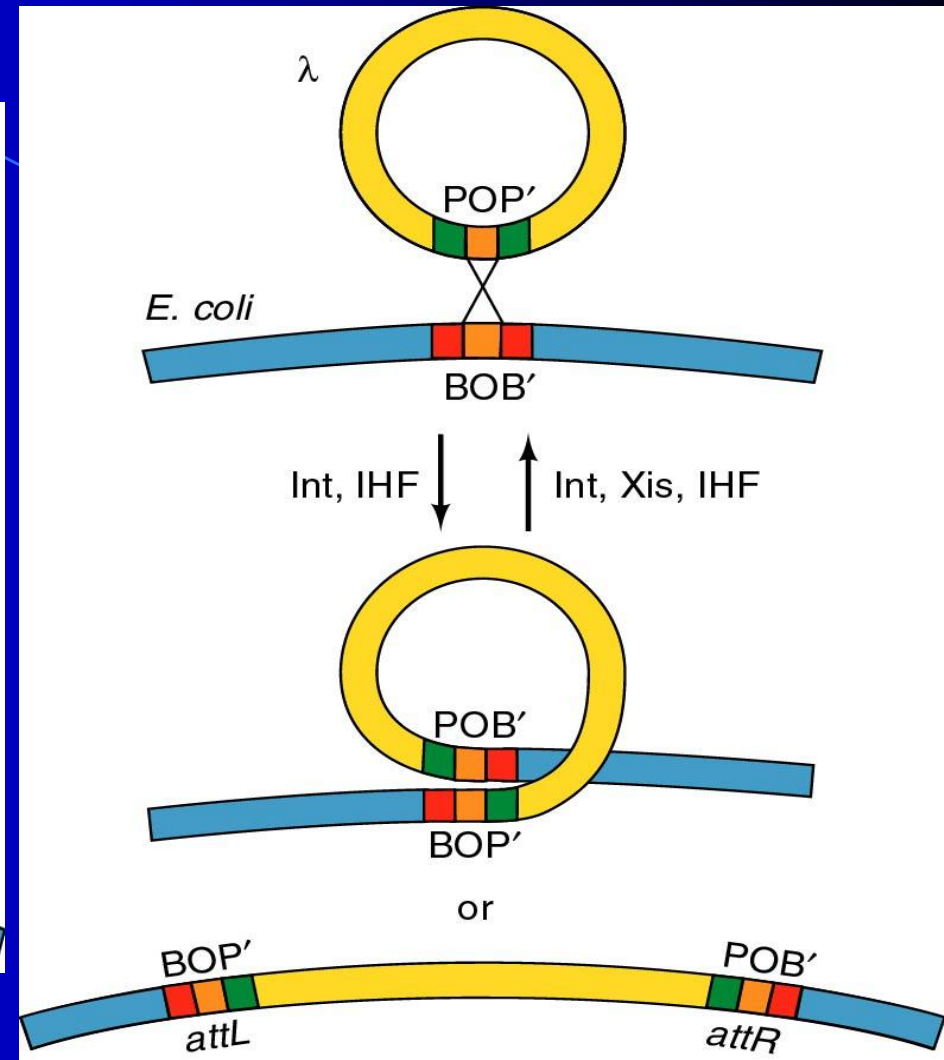
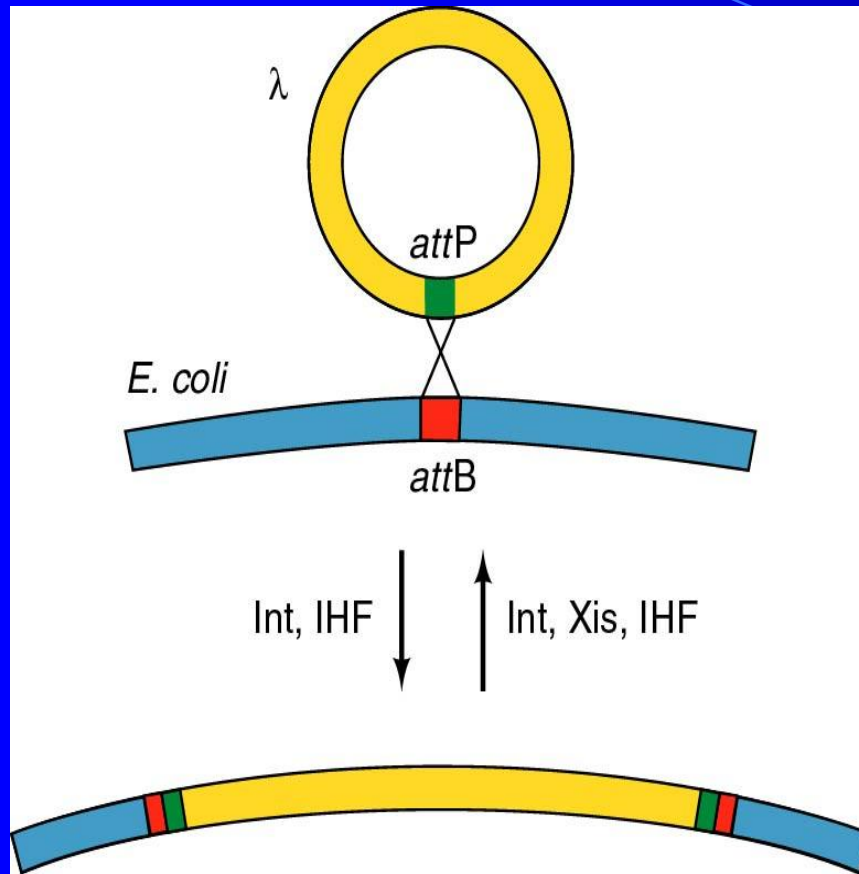
POP'

大肠杆菌: attB/ attλ

BOB'

1. 整合:
$$\begin{array}{ccc} \text{BOB}' + \text{POP}' & \xrightarrow[\text{IHF}]{\text{Int}} & \text{BOP}' + \text{POB}' \\ \text{attB} & & \text{attP} \end{array}$$

2. 切除:
$$\begin{array}{ccc} \text{BOP}' + \text{POB}' & \xrightarrow[\text{IHF}]{\text{Int, Xis}} & \text{BOB} + \text{POP} \\ \text{attL} & & \text{attR} \end{array}$$



通过attP和attB间的相互重组，环状的噬菌体DNA转换为整合的原噬菌体；原噬菌体通过attL和attR间的相互重组而切除

重组酶作用的特异性

- Int、IHF只能在attP (P0P')上形成整合体，再作用于attB (B0B')，继而切断、相互交换重组连接
 - Int、IHF不能在attL (B0P')或attR (P0B')上形成整合体，从而决定重组方向
 - Xis、Int、IHF只能与attL (B0P')或attR (P0B')上形成另一种整合体，重组结果是使原噬菌体从宿主基因组上切离下来
 - 整合需识别attP和attB，切离需识别attL和attR
- 位点特异性重组是通过重组位点的鉴别来控制

转座子(transposon, Tn)

- ❖ 1950年麦克林托克(McClintock)在对玉米籽粒颜色遗传进行观察时,认为存在着一种转座因子(transposable elements)控制着籽粒的颜色,这些因子可以在染色体上移动: AC/Ds系统调控玉米籽粒颜色

玉米转座子现象



1983年, 芭芭拉(81岁)开创性研究独立获得了诺贝尔奖

• 1914 A. Emerson

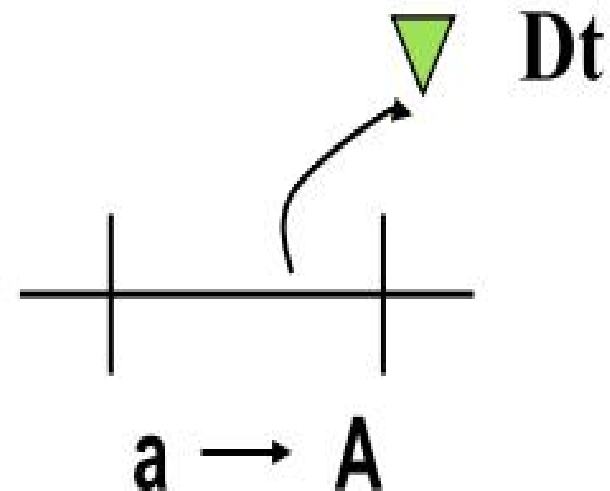
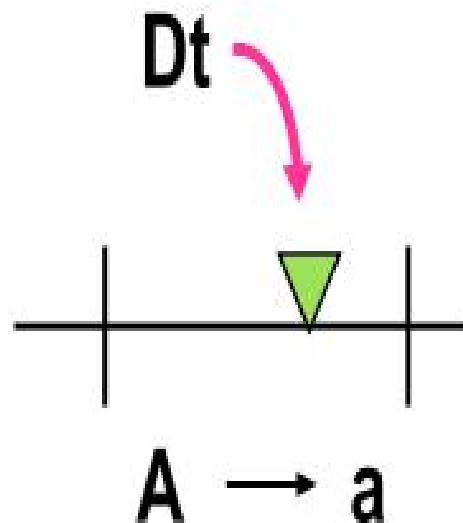
Cornell university

玉米果皮花斑突变

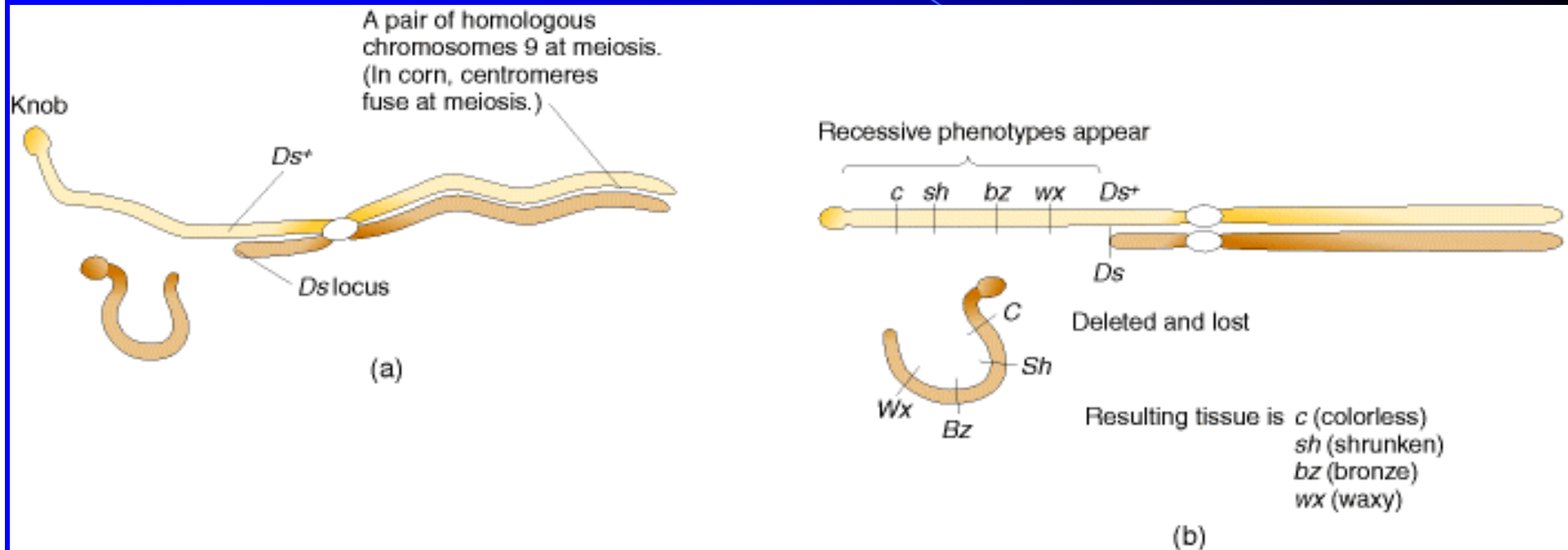


• 1936 Marcus . M. Rhoades Indiana University

玉米糊粉层斑点 (Dotted Dt) 突变



玉米中的控制因子的发现



Ds 因子导致染色体的断裂，使隐性基因得以表达

McClintock发现 Ds 存在于玉米9号染色体的一条臂上，可导致染色体断裂

断裂融合桥

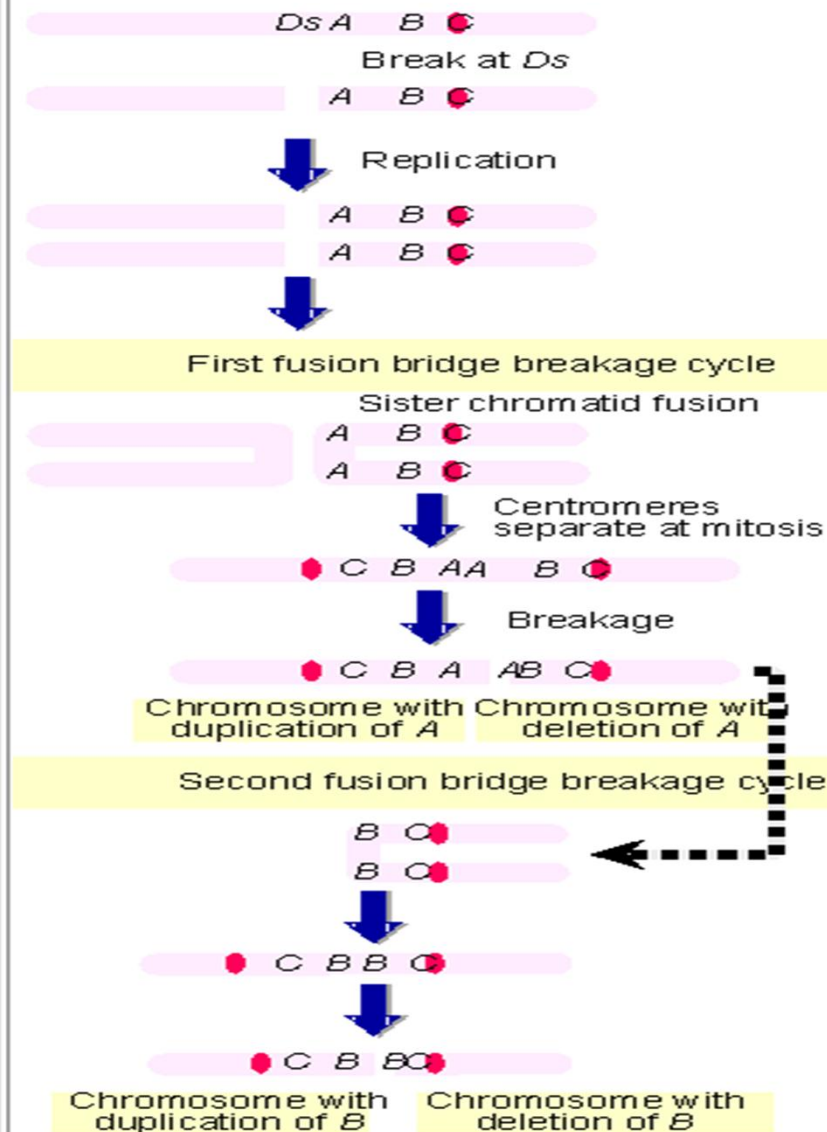


Figure 15.23 *Ds* provides a site to initiate the chromatid fusion-bridge-breakage cycle. The products can be followed by clonal analysis.

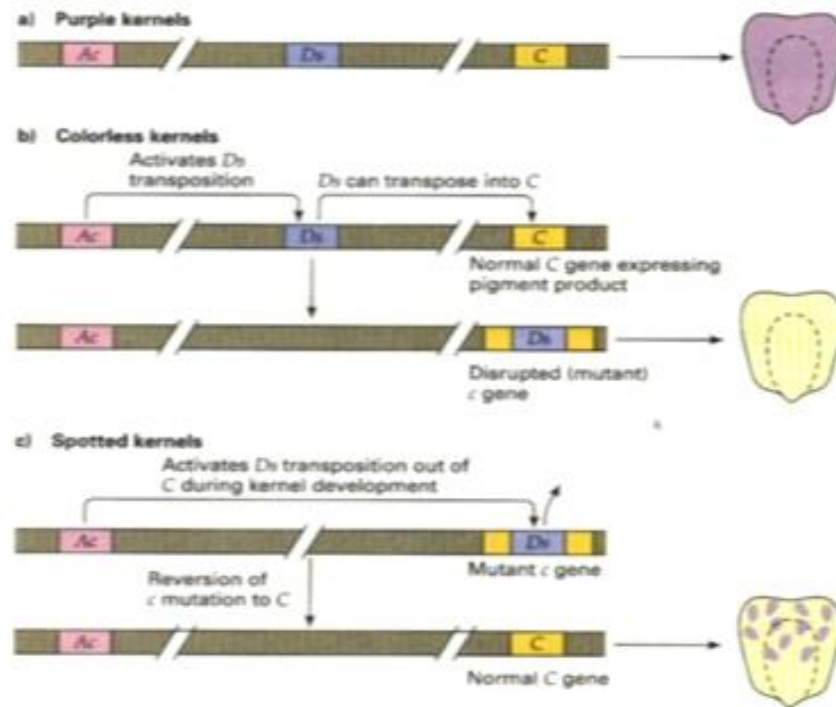
*Ds*的存在可导致其所在位点染色体断裂

导致染色体彼此连结，形成双着丝粒染色体

在有丝分裂中两个着丝点彼此分离向两极移动，形成染色体桥

桥的断裂使一端产生重复，一端产生缺失

这样周而复始形成融合桥断裂循环



47年：玉米糊粉层花斑

不稳定现象伴随的遗传

在 Ac (Activator) 因子存在时

$C^I \rightarrow c^i \rightarrow$ spots in aleurone layer

染色体 \rightarrow BFBC

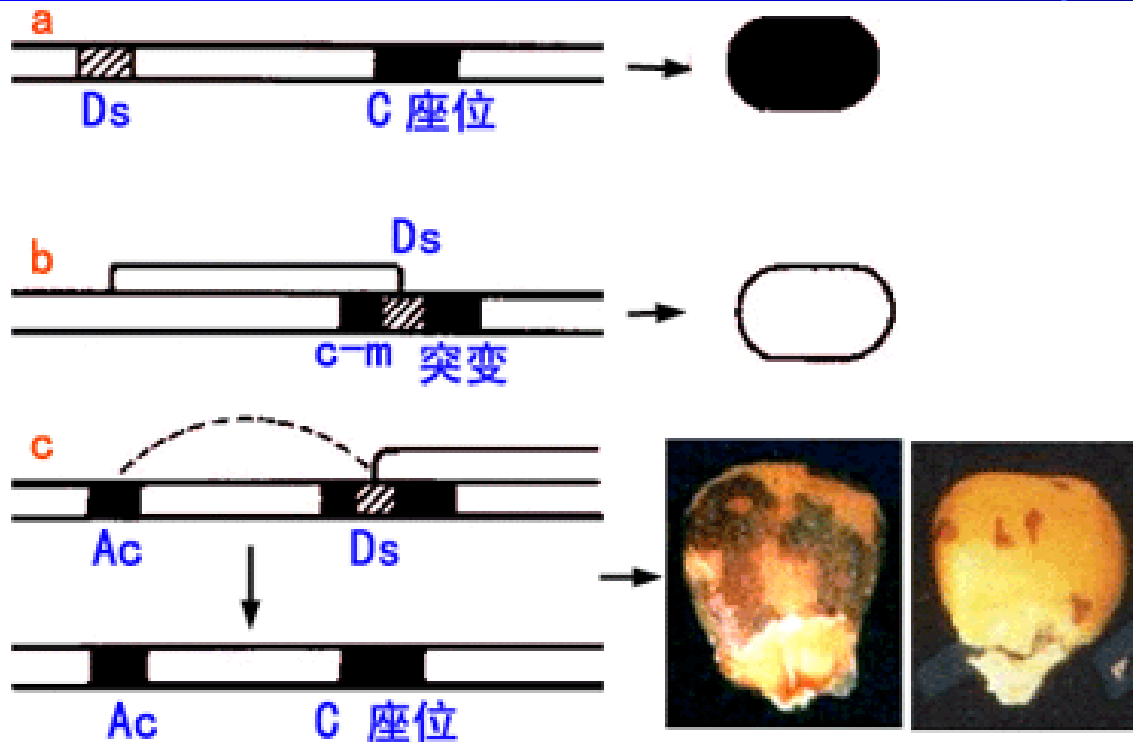
(Breakage - Fusion - Bridge - Cycle)



site named Ds
(Dissociator)



玉米转座子



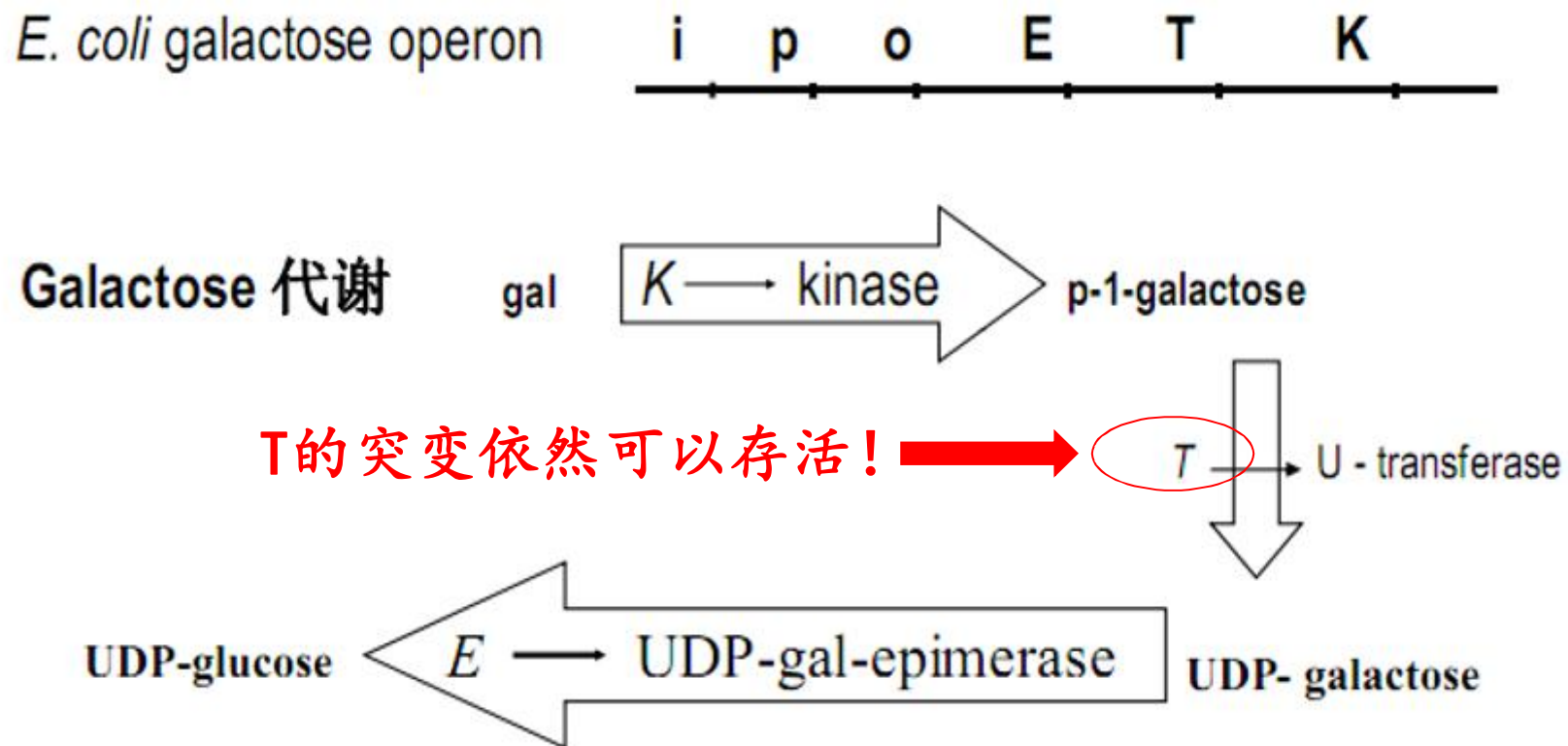
Ds是可以移动的！

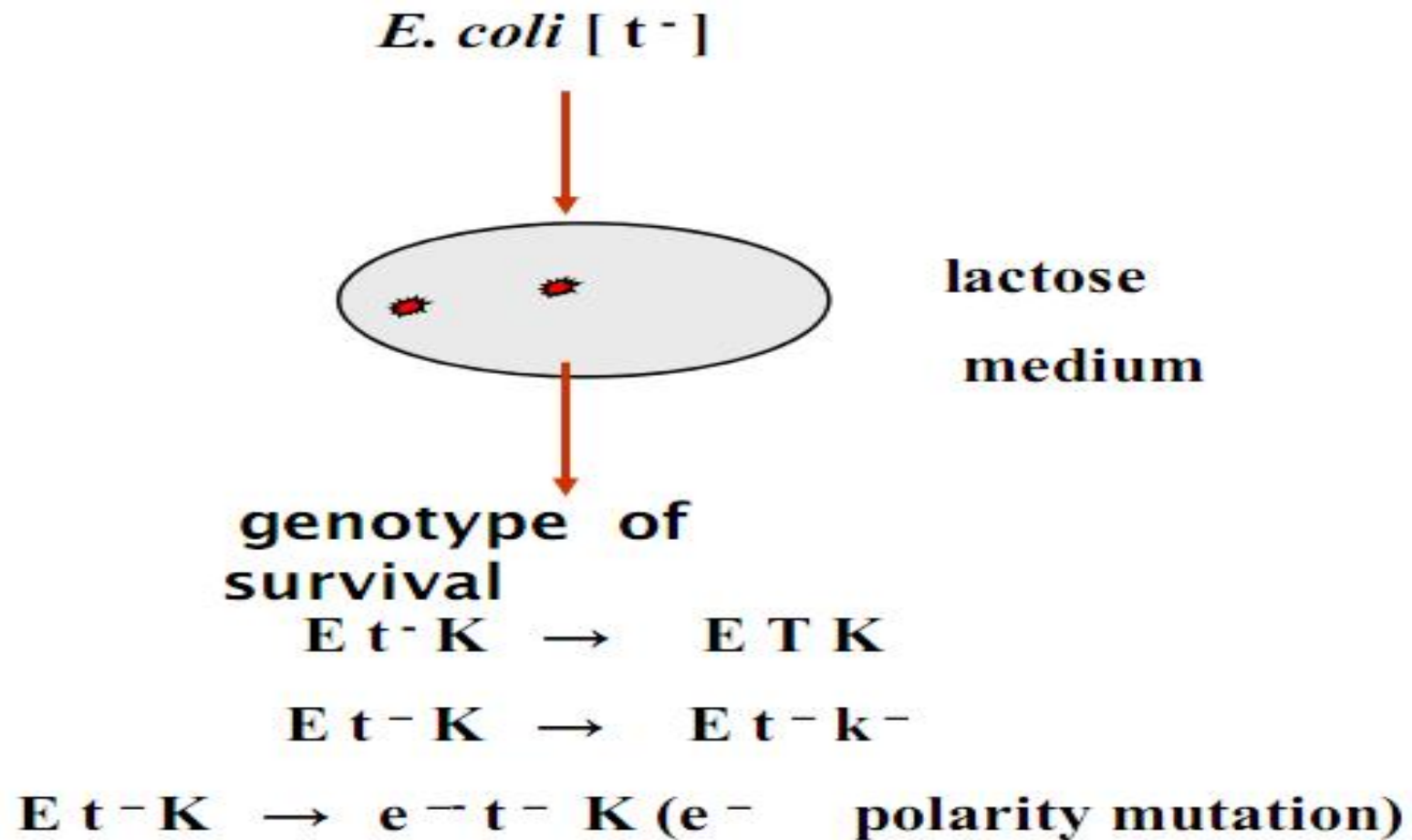
玉米C座位控制因子突变

- a. 显性基因C产生有色糊粉层；
- b. Ds因子插入C座位，使C突变为c-m，使糊粉层无色；
- c. 在Ac存在时，可引起Ds在某些细胞转座，产生回复突变，故整个子粒呈现出在无色背景下散布着有色斑点

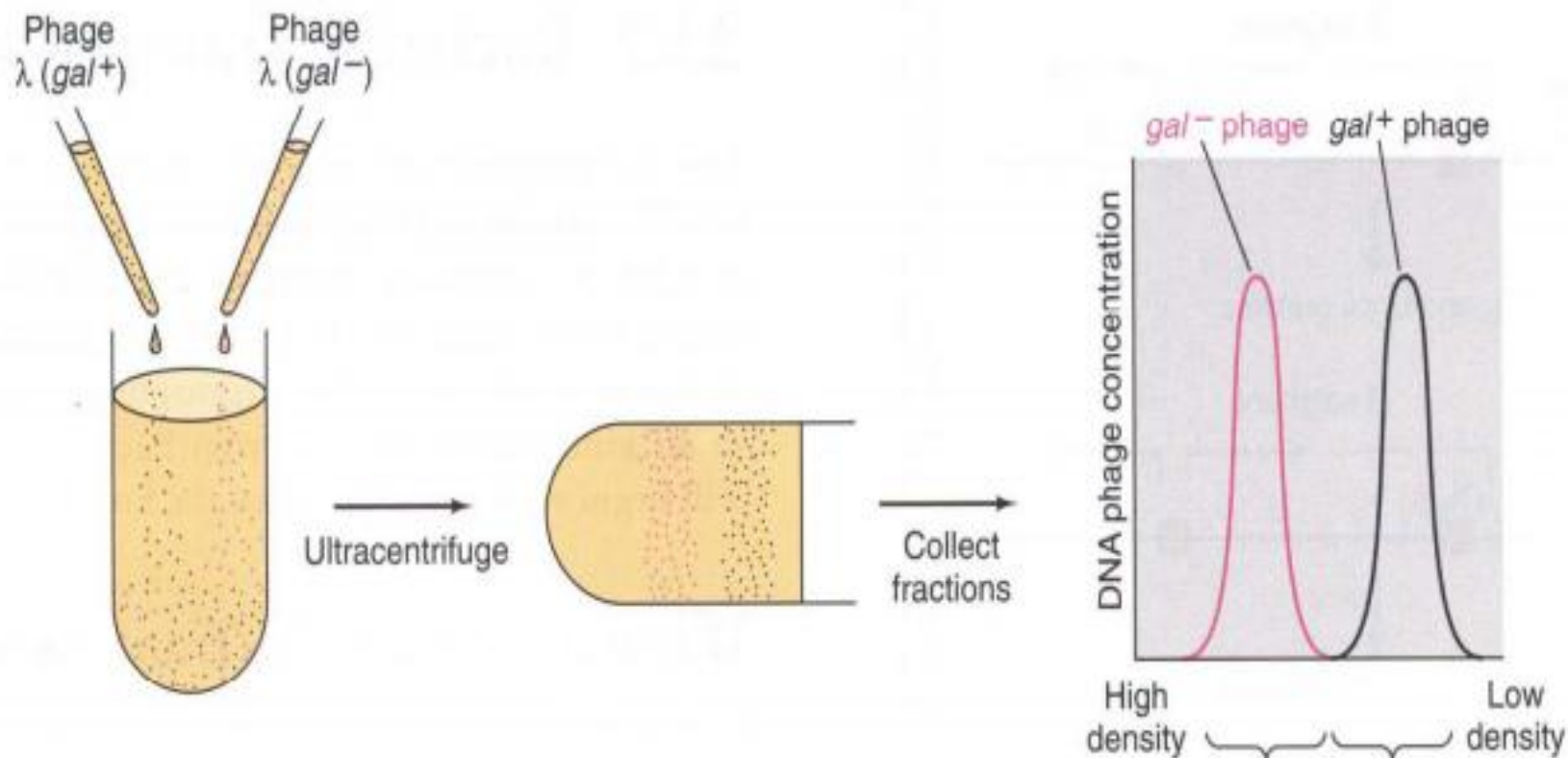
原核转座因子的发现

- 70年代Shapiro用E. coli 半乳糖操纵子突变株
- 进行杂交分析: gal-1-p 积累 引起 半乳糖症

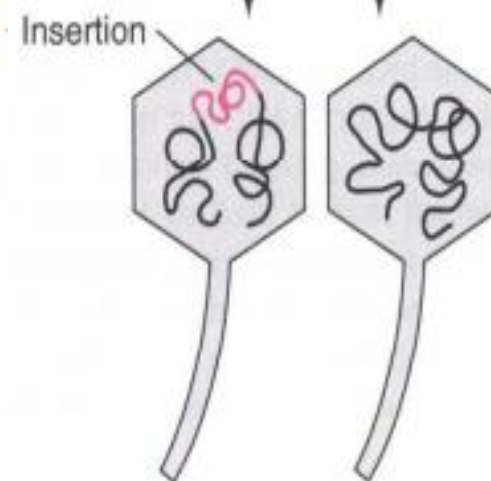
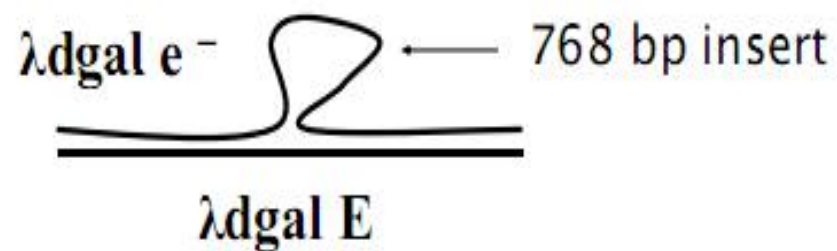




- ❖ gal T⁻在培养基上不能生长
 - ❖ 意外: gal E⁻ gal T⁻能少量生长
 - ❖ 原因: gal E⁻使gal K活性大大下降
- 但诱变剂处理不能增加其回复突变效率?

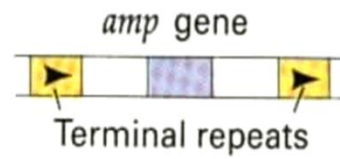
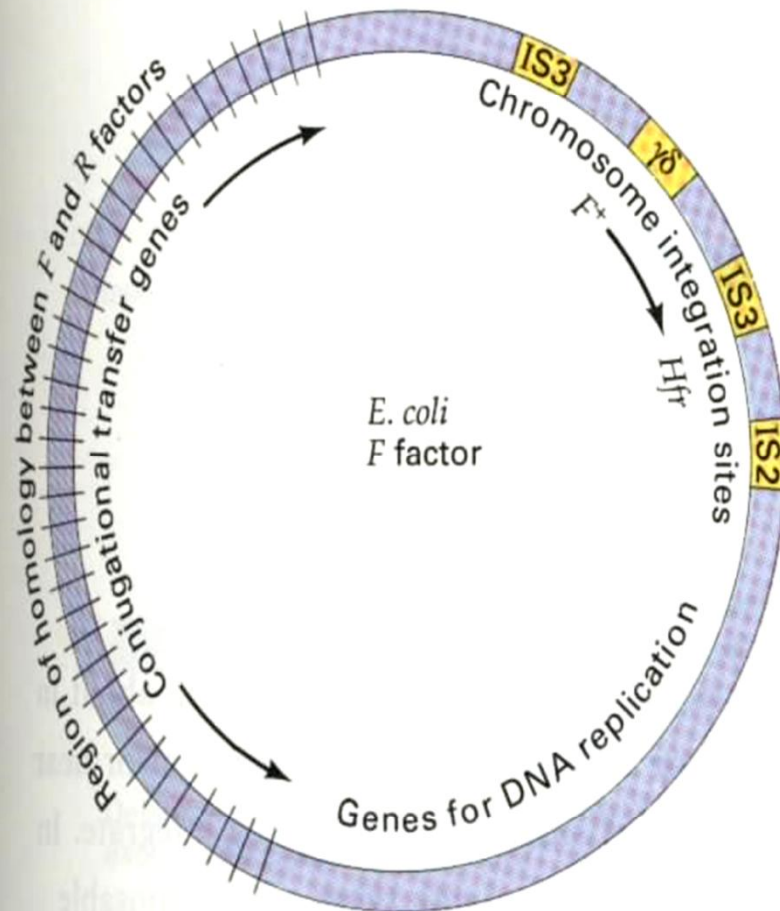


λ dgal e⁻ / λ dgal E 分子杂交

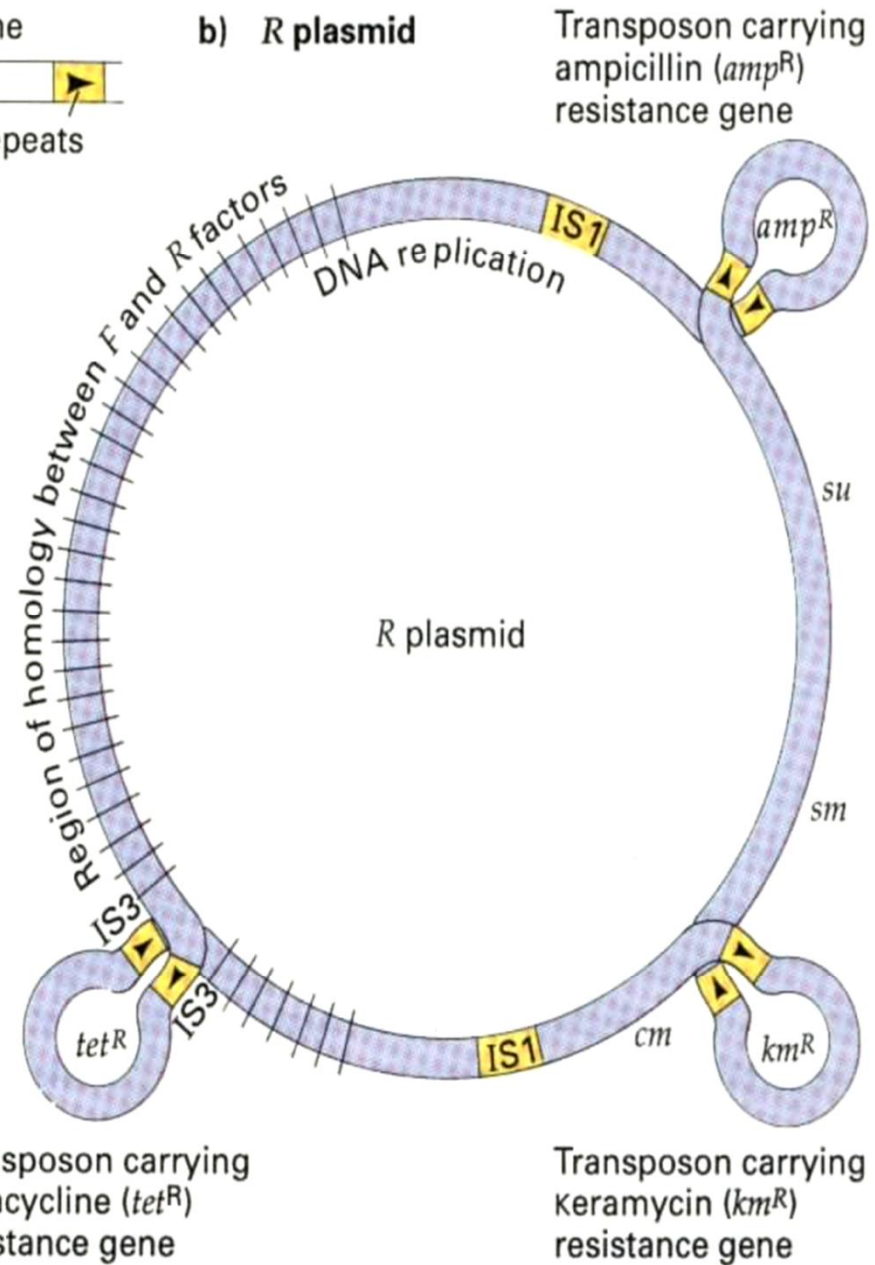


General transposon structure

a) *E. coli*
F factor



b) R plasmid



原核转座因子的类型

- ❖ IS命名：分离的次序
- ❖ 原核生物IS结构特征：
 - ❖ DR 正向重复序列 较短
 - ❖ IR 反向重复序列 较长
- ❖ IS本身没有任何表型效应，只携带和它转座作用有关的基因：转座酶基因
- ❖ 一个细菌细胞一般携带数个IS序列

Structure of repetitive sequence of DNA

DR direct repeats

ATCGATCGATCG
→ → →
← ← ←
TAGCTAGCTAGC

Tandem direct repeats

ATCGNNNATCGNNNNNNATCG
→ → →
← ← ←
TAGCNNNTAGCNNNNNNTAGC

Dispersed direct repeats

IR Inverted repeats

----AAGCTT----
→
----TTCGAA----
←

HindIII RE

ATCGNNNNNCGAT
→
TAGCNNNNNGCTA
←

• Stem-loop palindrome

ATCGGCTA
→ ←
TAGCCGAT

ATCGNNNNNGCTA
→ ←
TAGCNNNNNCGAT

• Mirror Structure

Homologous palindromic sequence

转座子的结构特征

插入序列 insertion sequences, IS

---简单的转座子

➤二个分离的反向末端重复序列

(inverted terminal repeats, ITR)

➤一个转座酶 (transposase) 编码基因



转座子**末端重复序列**是转座酶的识别位点

靶位点切割

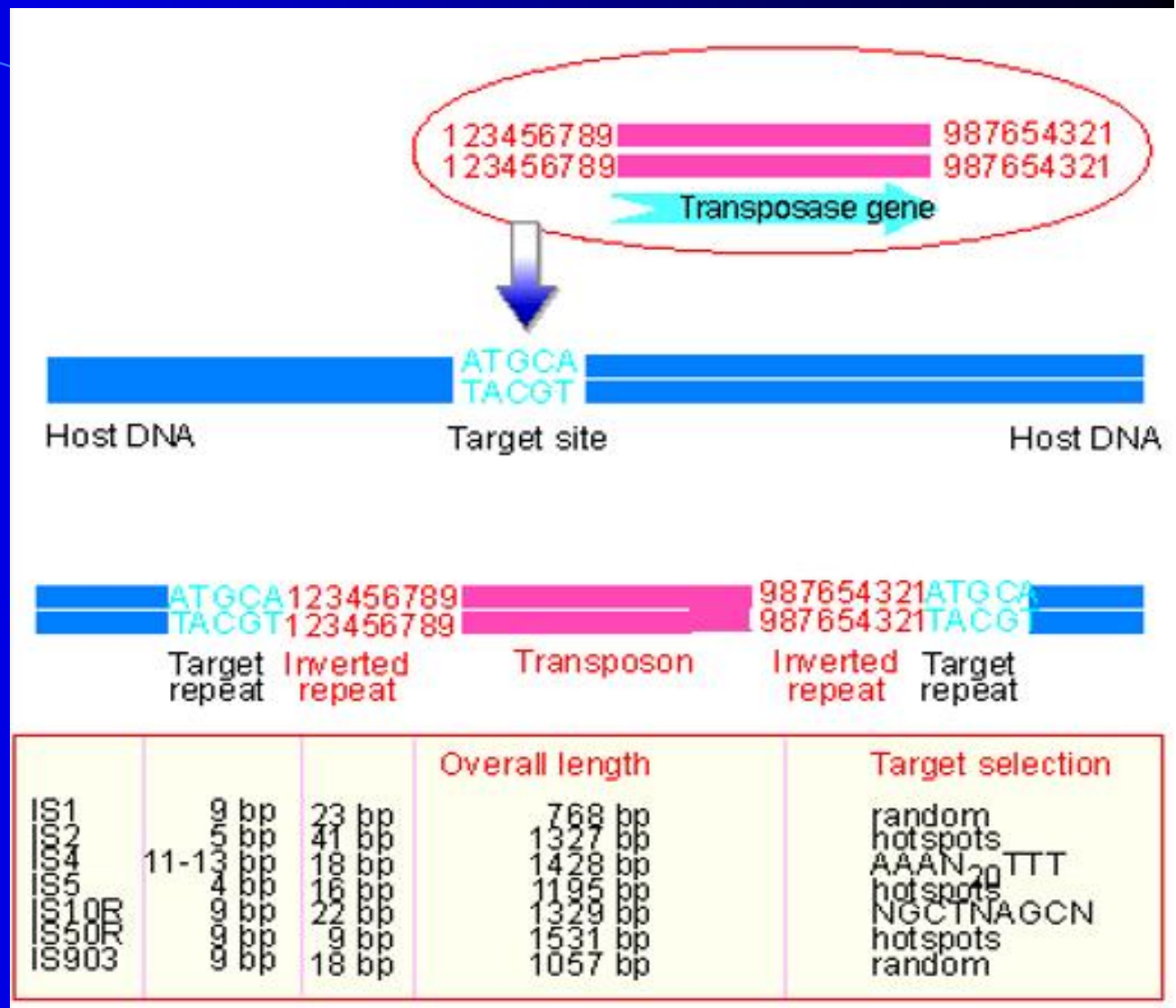


粘性末端



靶序列重复

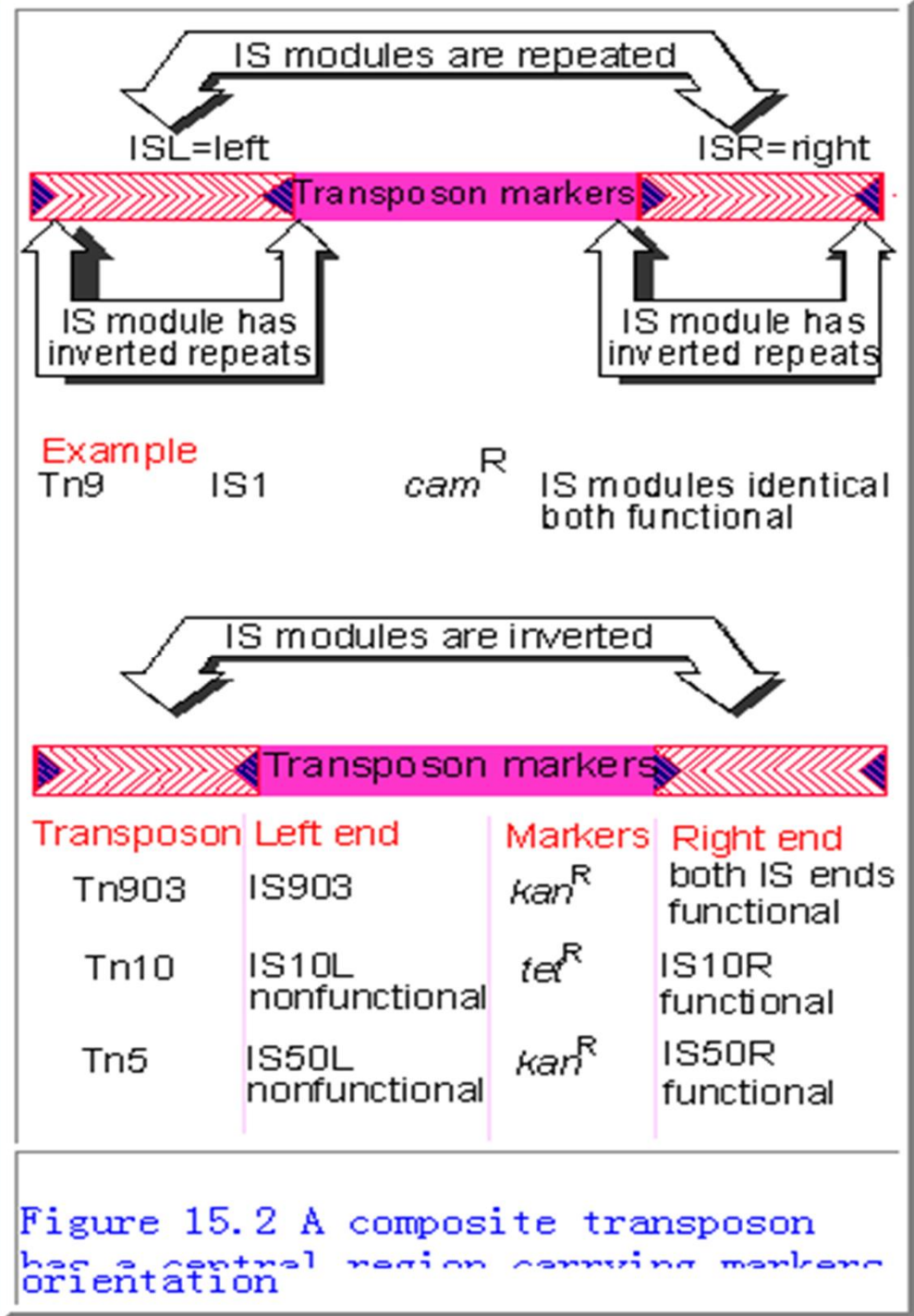
IR DR



IR 序列是转座酶的重要识别位点
转座完成后两端出现靶位点的正向重复
其长度取决于staggered cutting的长度

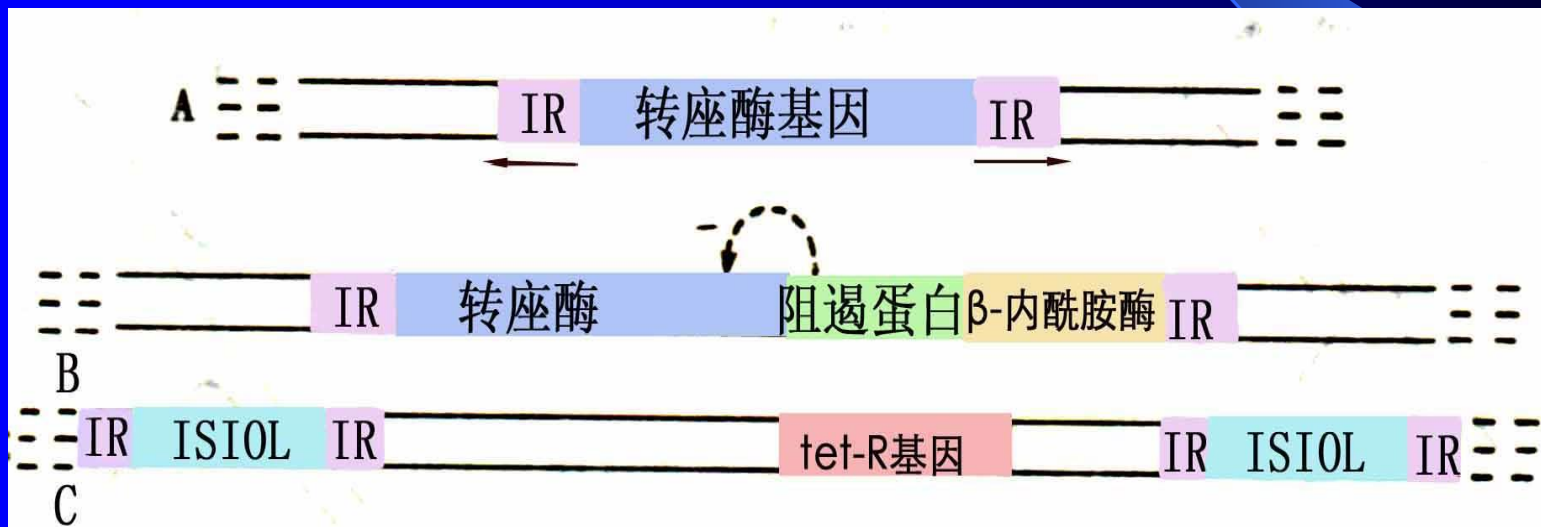
复合转座子 (Tn) 结构

- ❖ 两端由IS或类IS组成
- ❖ 两侧组件相同或不同
- ❖ 中心区编码抗性基因（标记）



复合转座子(Tn)结构

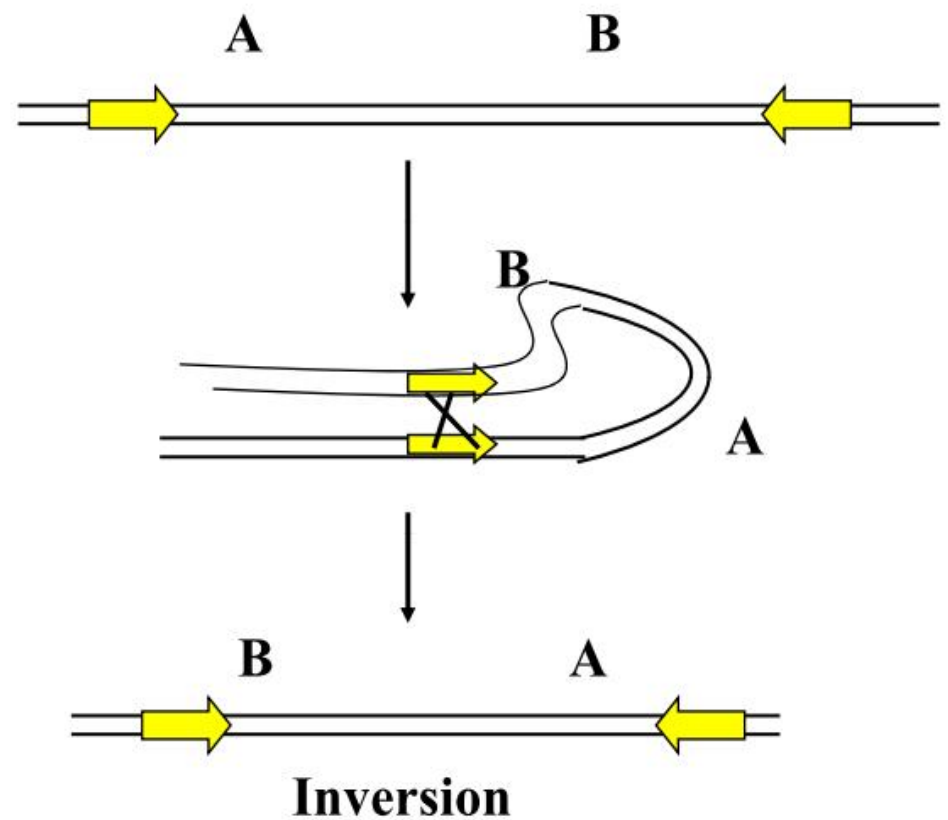
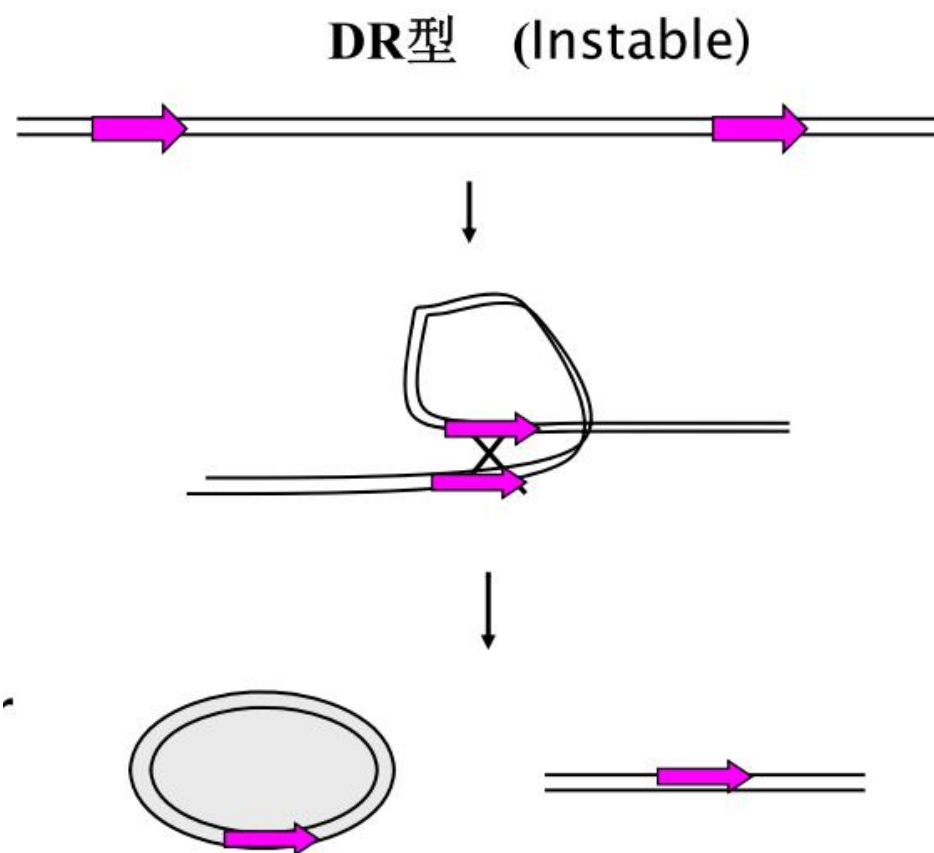
- 中间编码区含转座酶编码基因，及抗生素抗性和解离酶等编码基因



细菌的可流动性元件

- A. 插入序列：转座酶编码基因两侧连接反向末端重复序列(箭头所示)
- B. 转座子 Tn3：含有转座酶、 β -内酰胺酶及阻遏蛋白编码基因
- C. 转座子 Tn10：含四环素抗性基因及两个相同的插入序列 IS10L

由DR和IR引起的重组形式



转座的类型

- ❖ 复制型转座（原核）
- ❖ 非复制型转座（真核）
- ❖ 反转录转座

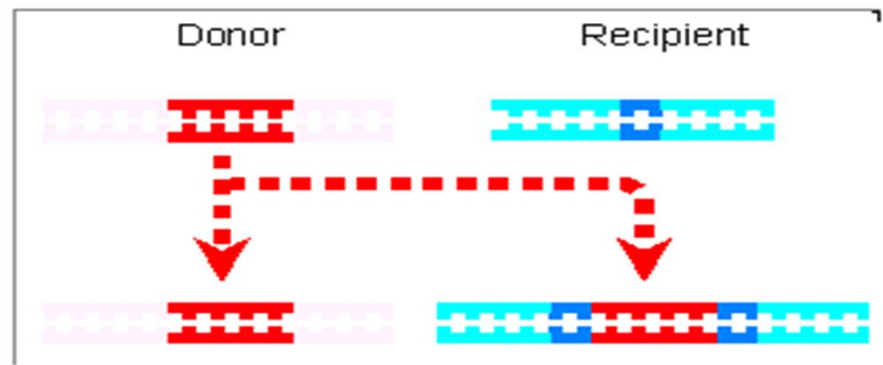


Figure 15.5 Replicative transposition creates a copy of the transposon, which inserts at a recipient site. The donor site remains unchanged, so both donor and recipient have a copy of the transposon.

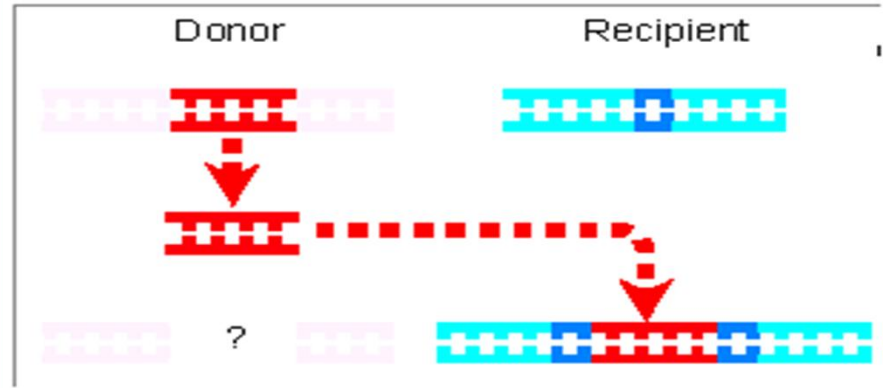
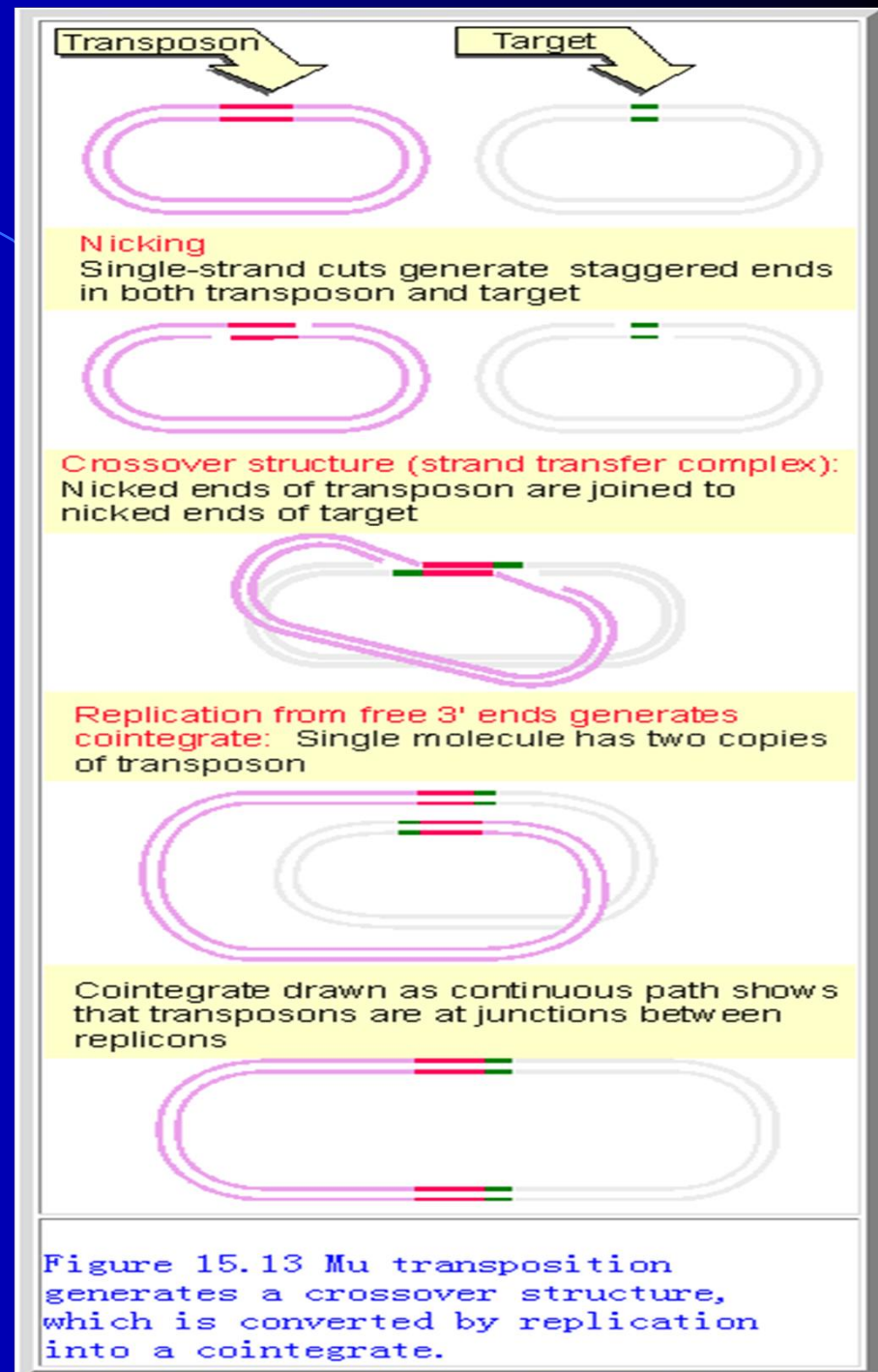


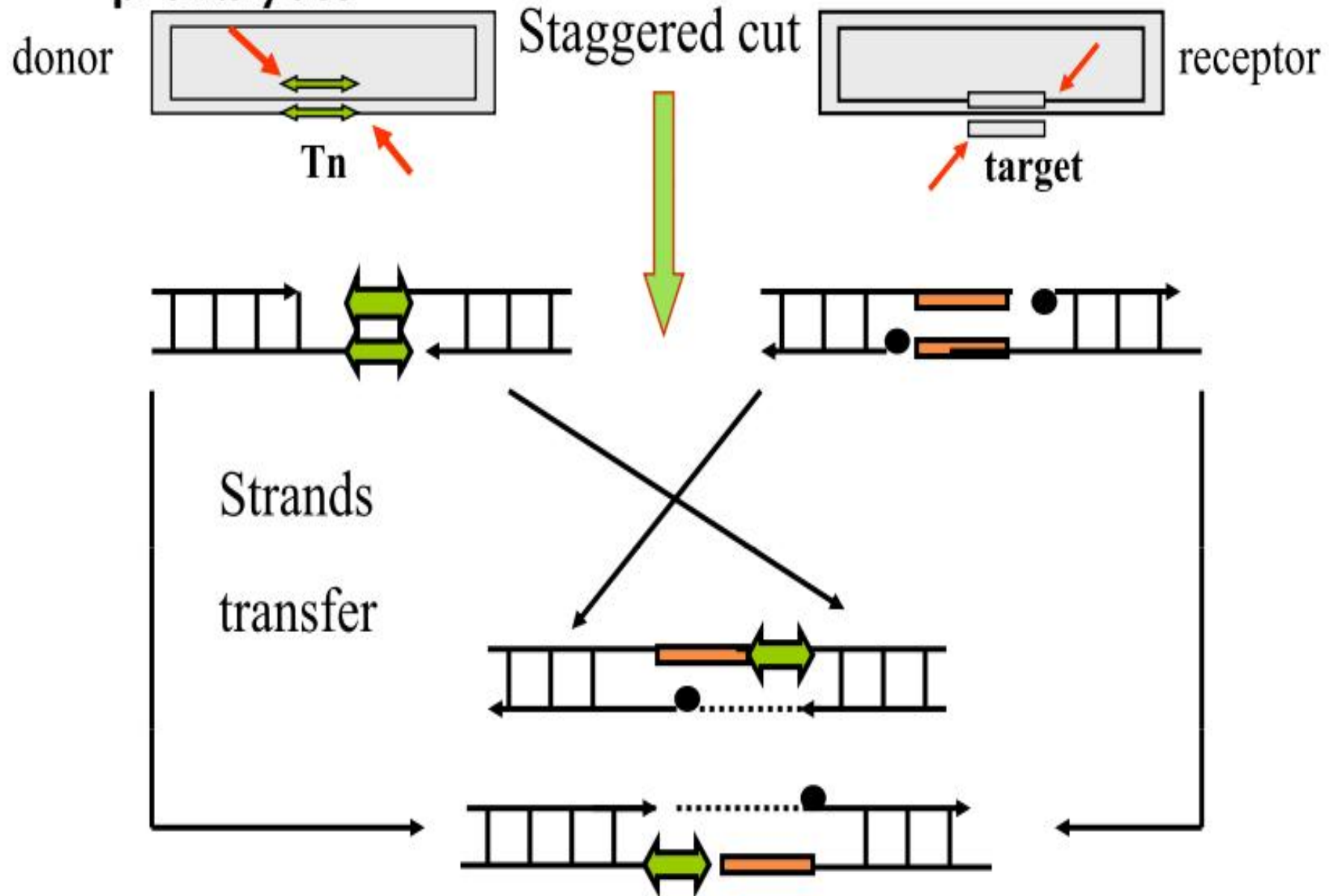
Figure 15.6 Nonreplicative transposition allows a transposon to move as a physical entity from a donor to a recipient site. This leaves a break at the donor site, which is lethal unless it can be repaired.

复制型转座

- ❖ 切开：转座酶识别受体的靶序列，在两条单链上均切开，形成粘性末端；识别自身反向重复序列，在3'端切开
- ❖ 连接：供体和受体结合形成不完整共联体，留下缺口
- ❖ 复制：DNA聚合酶补齐缺口，再连接形成完整的共联体，具有重复序列
- ❖ 重组：在特定位点进行重组，共联体分离：留下原来的转座子；并在靶序列上插入转座子，两端有同向重复序列

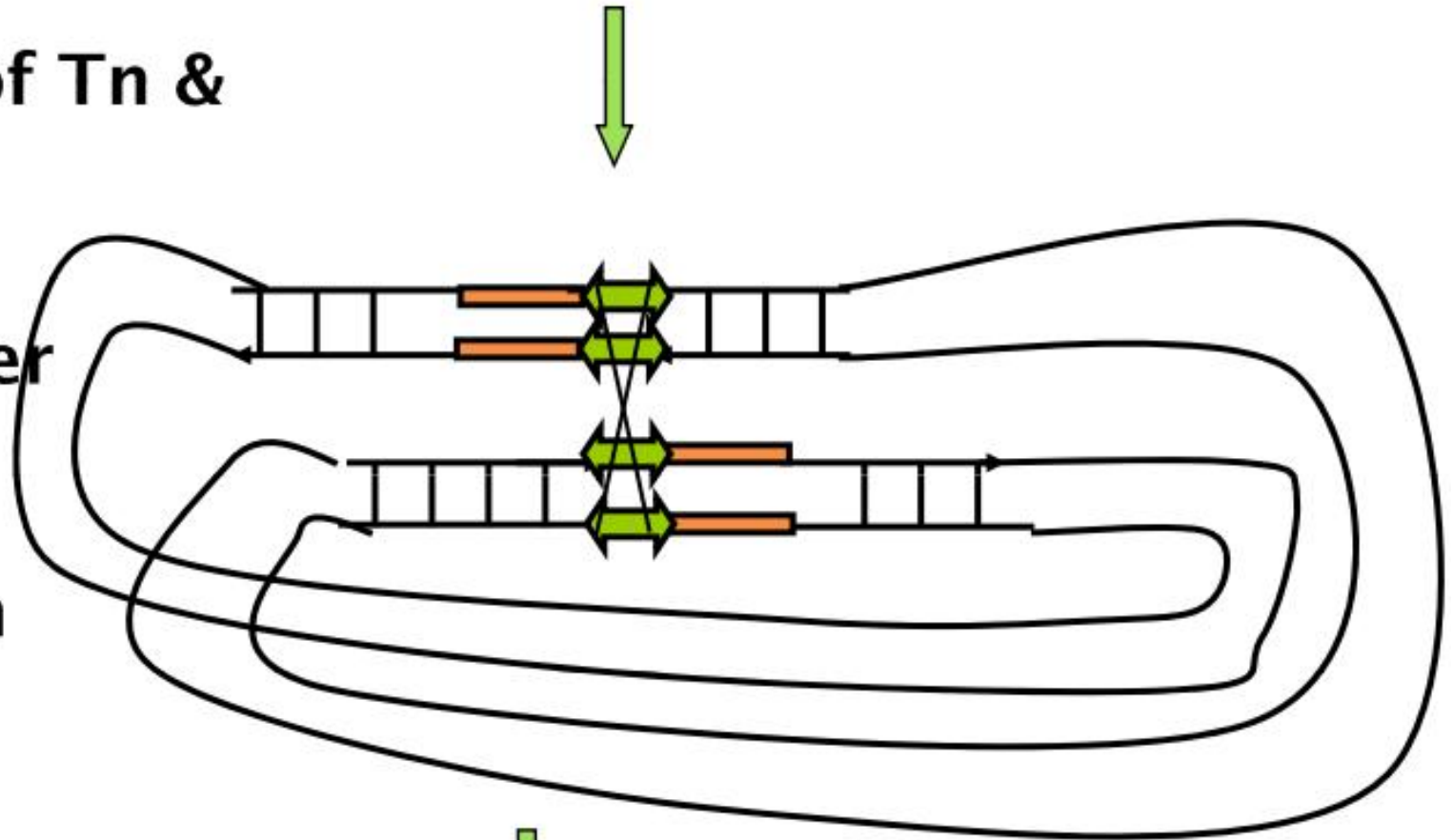


replicating transposition in prokaryote

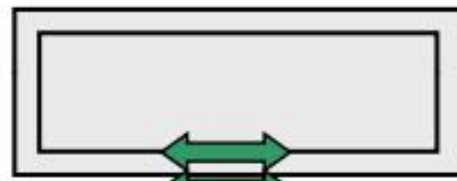


**copying of Tn &
target**

**cointegrater
&
resolution**

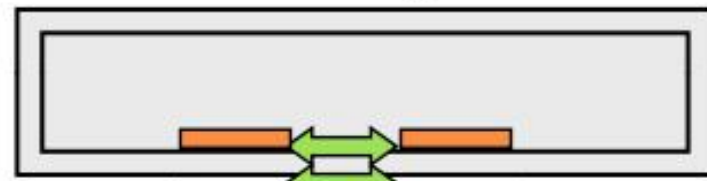


Donor



Tn

receptor



DR Tn DR

非复制型转座: Tn10

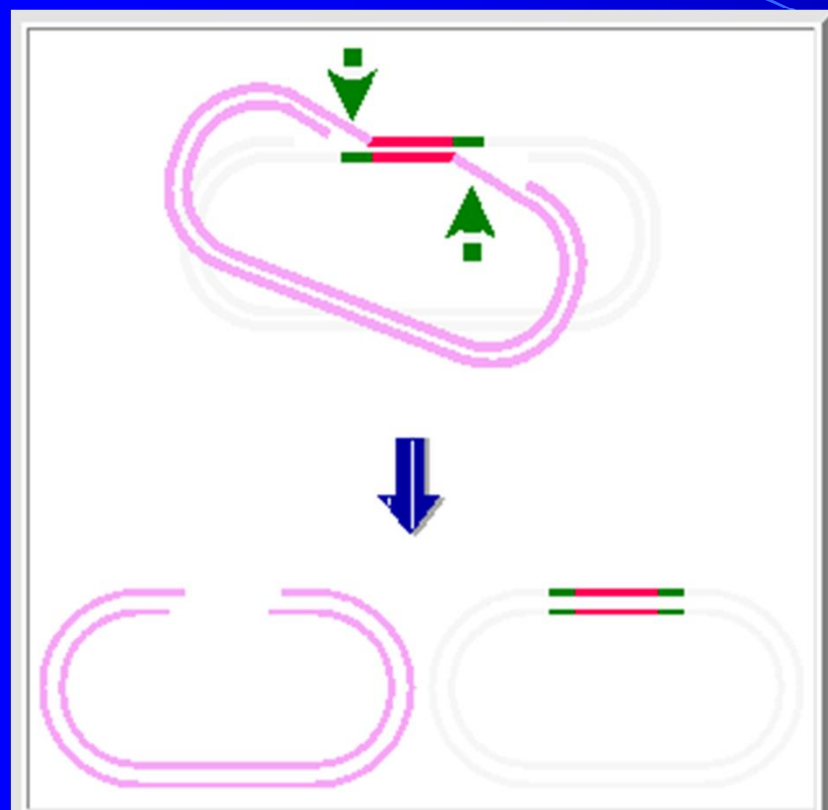


Figure 15.14 Nonreplicative transposition results when a crossover structure is released by nicking. This inserts the transposon into the target DNA, flanked by the direct repeats of the target, and the donor is left with a double-strand break.

Transposase binds to both ends of Tn



Transferred ends are nicked



Other strands are nicked Recipient is nicked

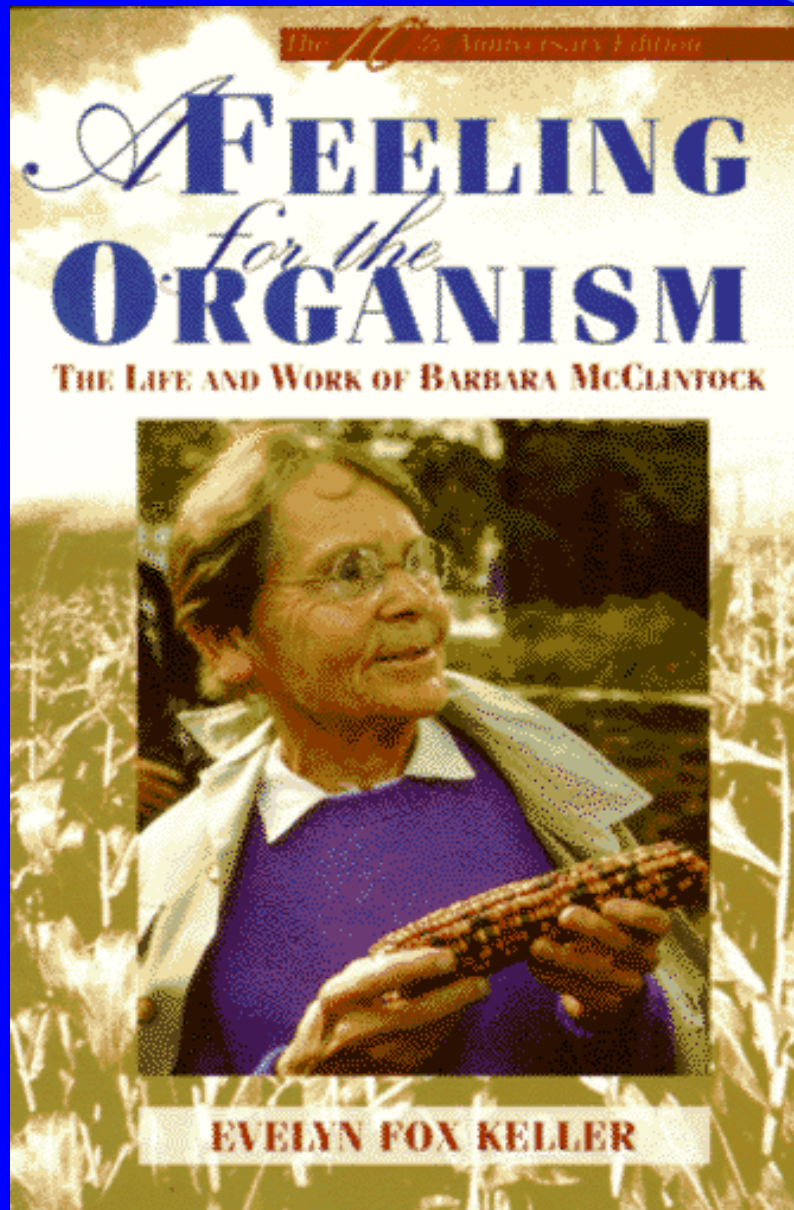


Donor is released

Tn joined to target



Figure 15.15 Both strands of Tn10 are cleaved sequentially, and then the transposon is joined to the nicked target site.



Barbara McClintock

(1902-1992)

Nobel Prize for Physiology or Medicine 1983

1932年美国玉米遗传学家

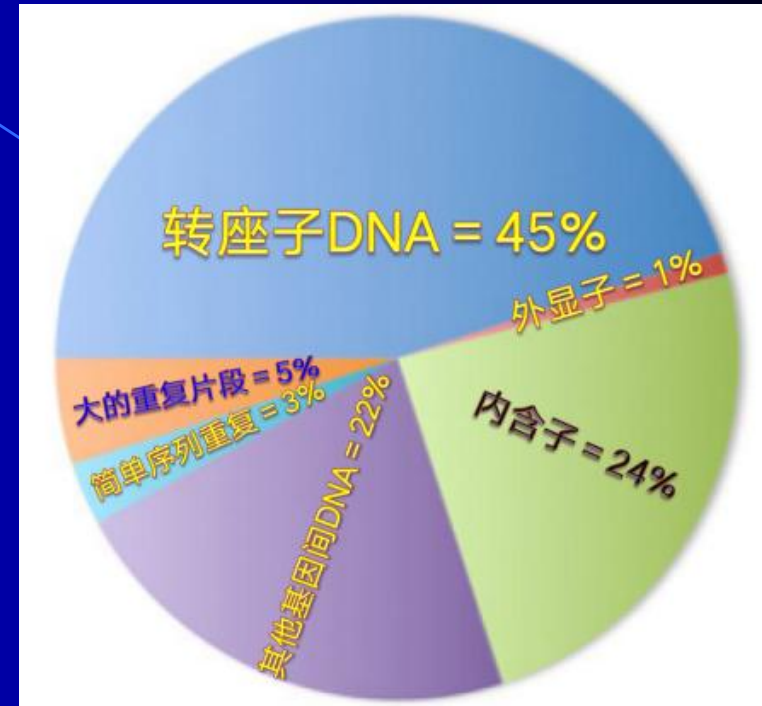
发现玉米籽粒色斑不稳定遗传现象,

1951年第一次提出转座子

“If you know you are on the right track, if you have this inner knowledge, then nobody can turn you off ... no matter what they say”

真核生物转座因子

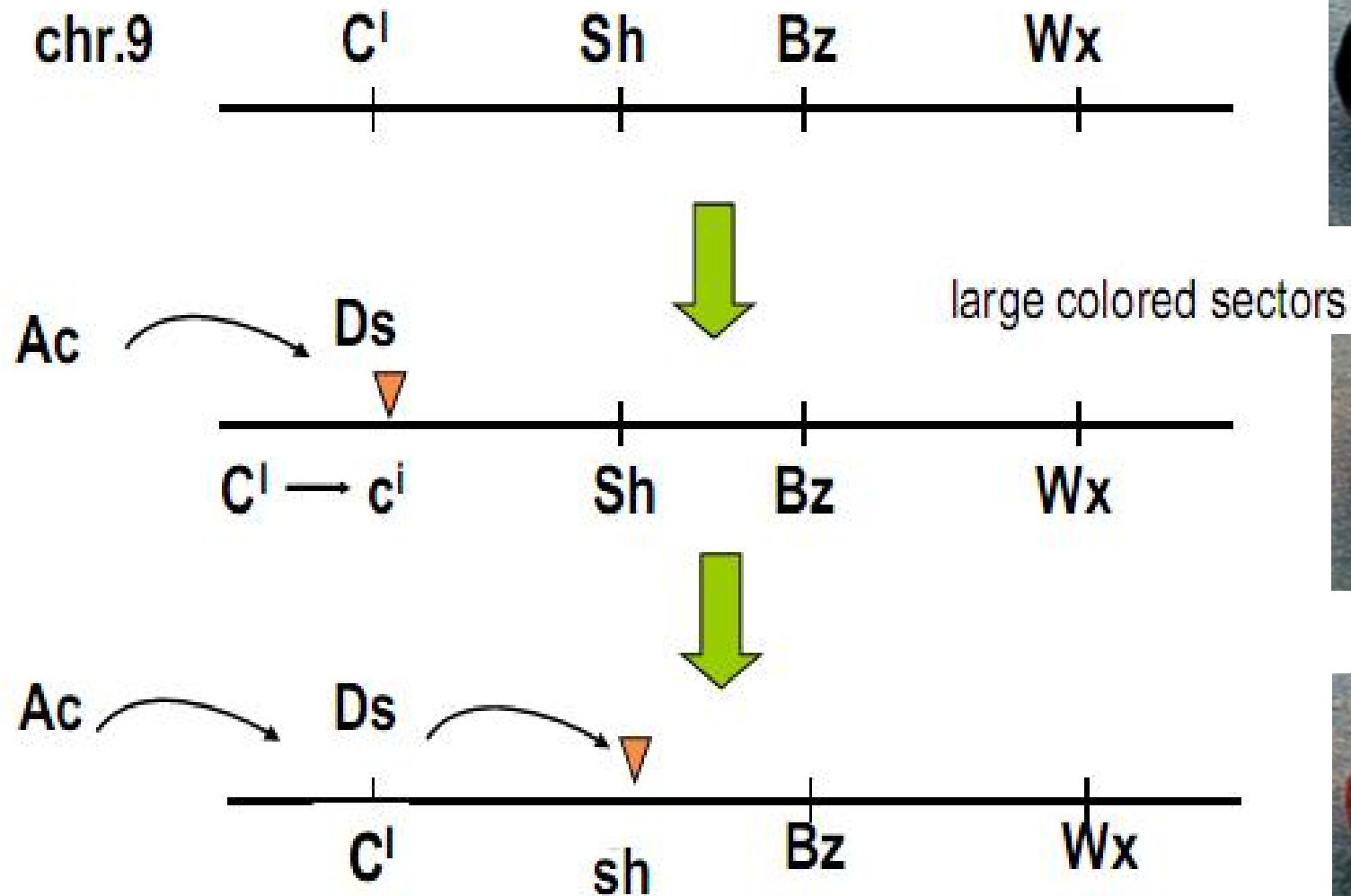
- I型：反转录转座子
通过RNA的反转录从
而转移到其他位置
人类中90%都是一类
转座子，**异质性**
- II型：两因子转座子



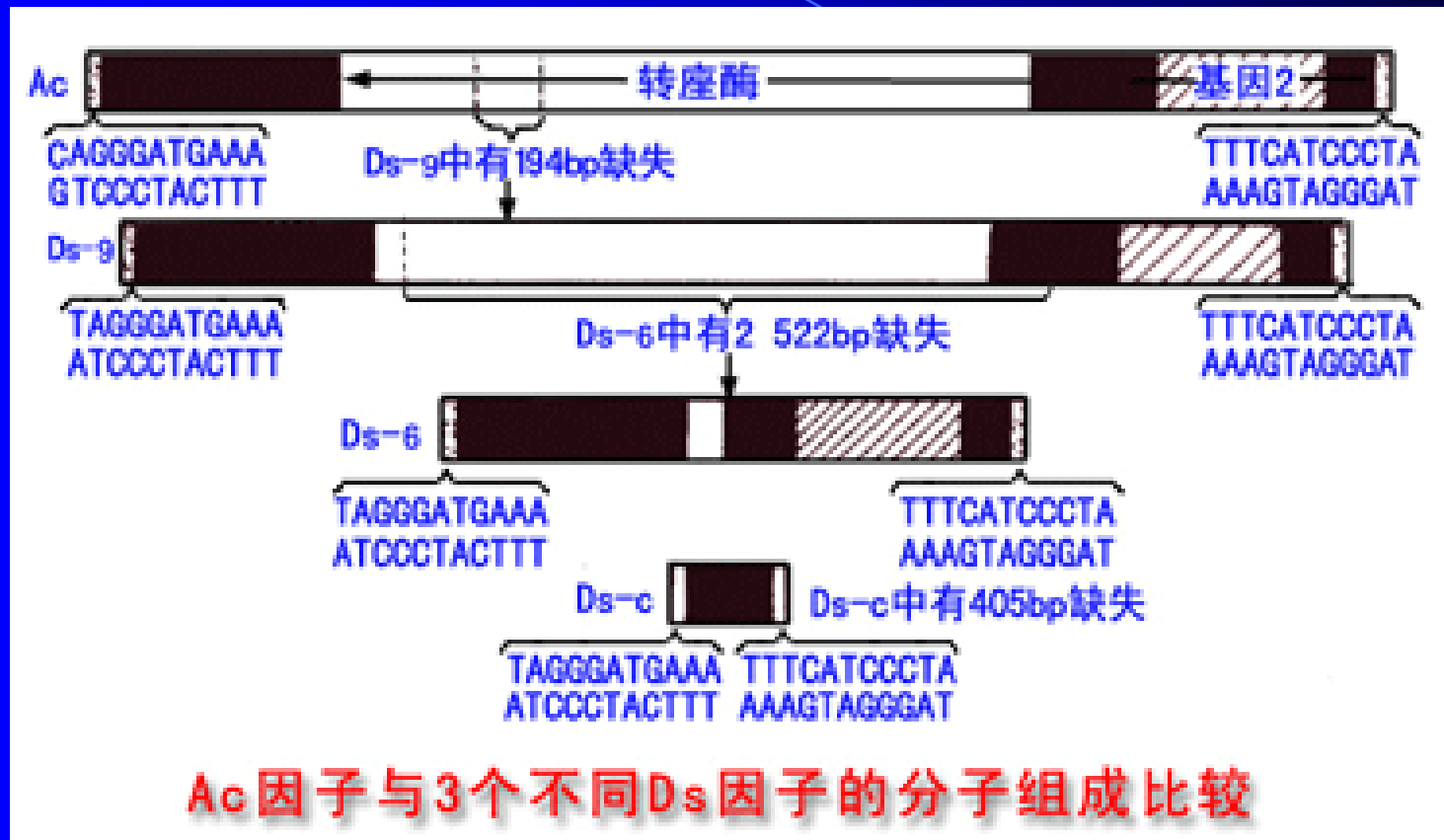
Ds控制因子-麦克林托克的伟大发现

- ❖ 一个“可移动的控制因子”（现在称转座子）**Ds**，即**解离因子**（**dissociator**），插入到**C**基因（色素合成）中，使之突变成无色素
- ❖ 另一个可移动的控制因子是**Ac**，称**激活因子**（**activator**）
- ❖ **Ac**能激活**Ds**转座进入**C**基因或其它基因，也能使**Ds**从基因中转出，使突变基因回复，**Ac-Ds**系统

transposable element 是引起玉米糊粉层花斑不稳定现象的遗传因子



Ds是Ac发生不同缺失而形成的突变体



- Ac因子由4563个核苷酸组成一个由11个核苷酸组成的末端反向重复区+两个与转座有关的酶
- 最小的Ds因子只有Ac长度的1/10，仅仅包括了Ac因子的IR

转座作用的遗传学效应

- ❖ 转座产生的染色体畸变 当复制性转座发生在宿主DNA原有位点附近时，往往导致转座子两个拷贝之间的同源重组，引起DNA缺失或倒位
- ❖ 若同源重组发生在两个正向重复转座区之间，就导致宿主染色体DNA缺失
- ❖ 若重组发生在两个反向重复转座区之间，则引起染色体DNA倒位

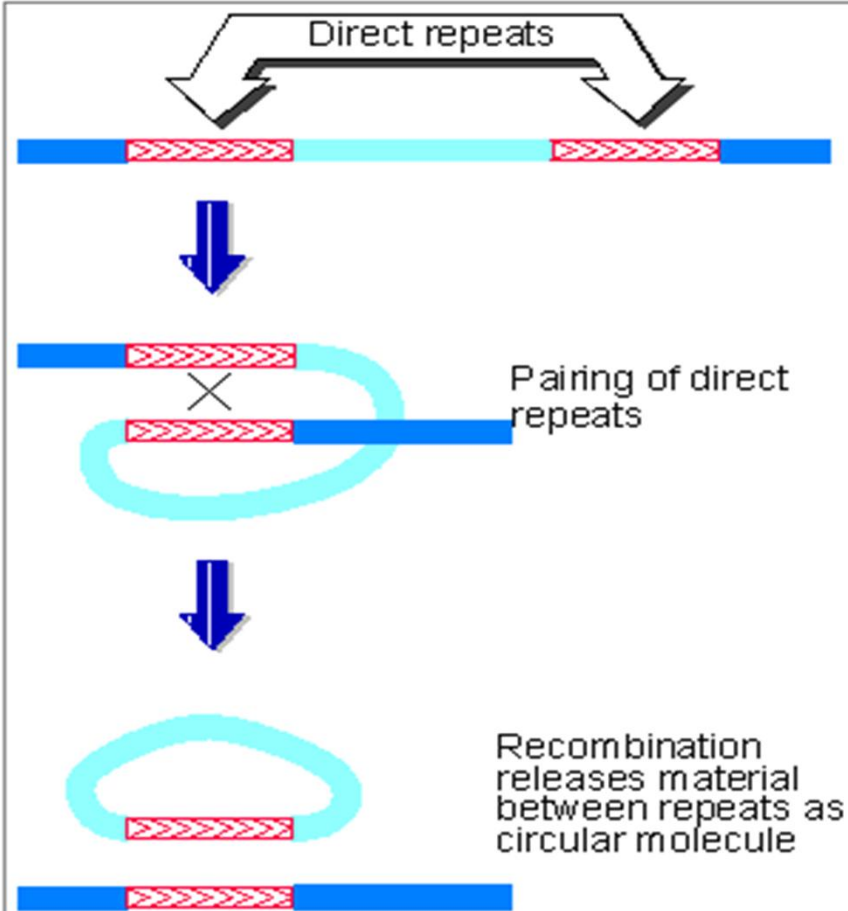


Figure 15.8 Reciprocal recombination between direct repeats excises the material between them; each product of recombination has one copy of the direct repeat.

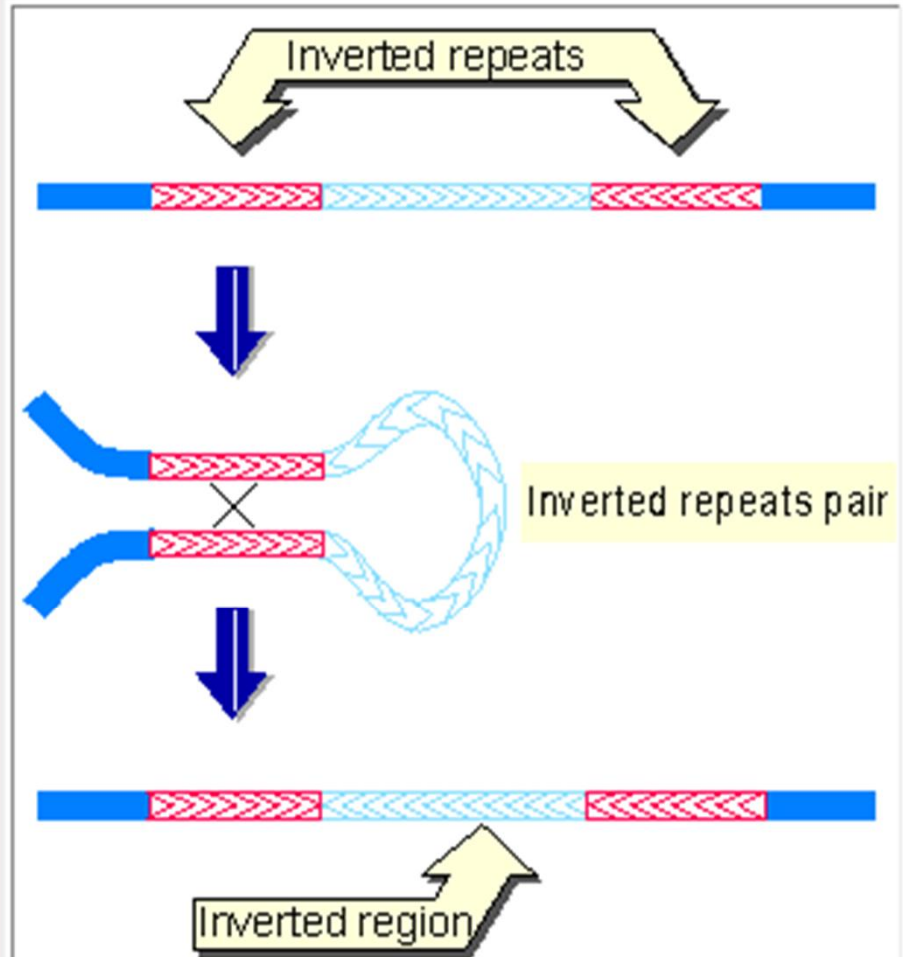
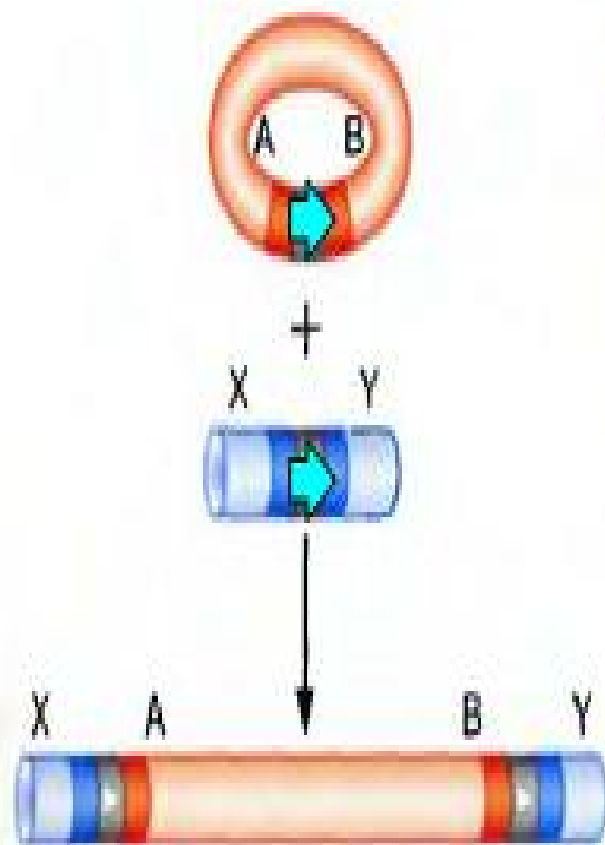


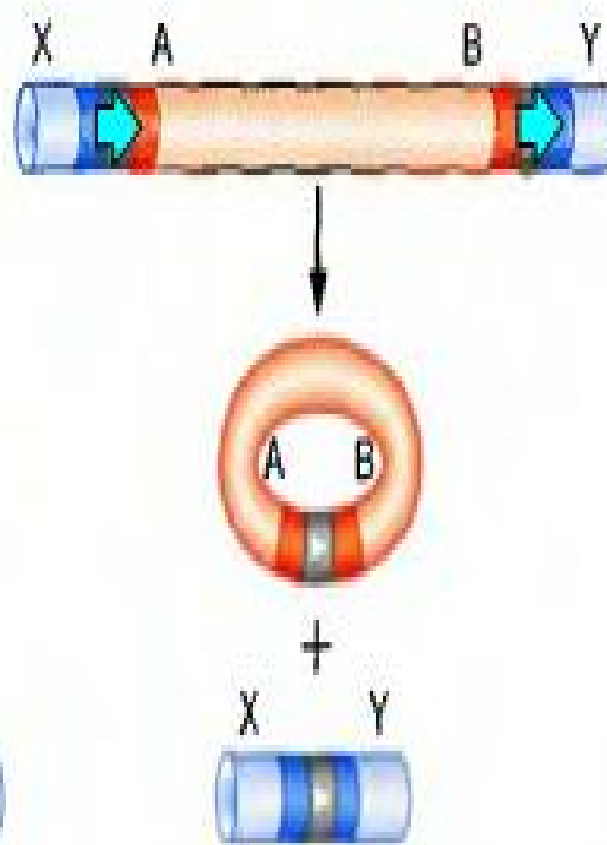
Figure 15.9 Reciprocal recombination between inverted repeats inverts the region between them.

转座的作用类型（缺失或倒位）

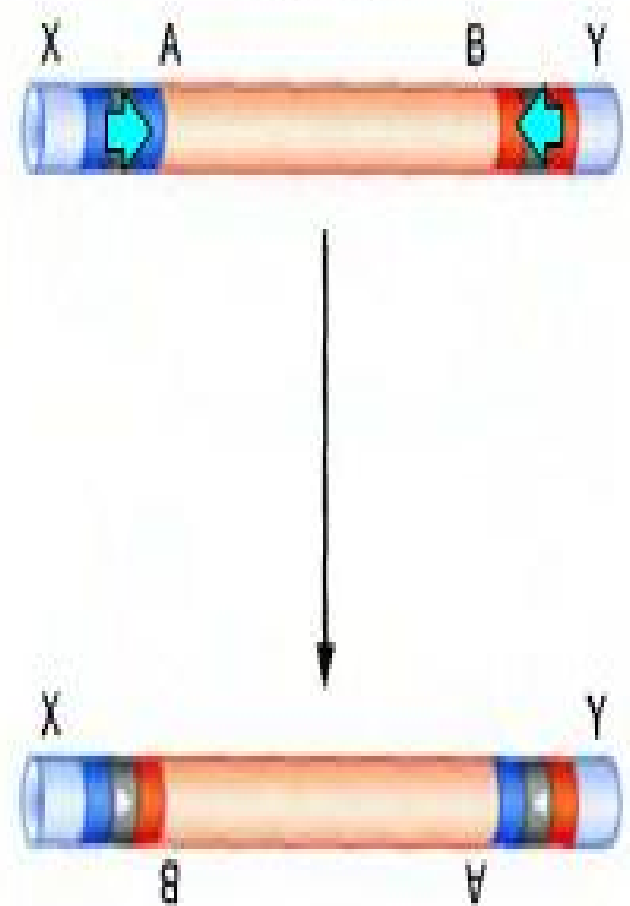
insertion



deletion



inversion



转座子特点

- ❖ 转座子不同于质粒或某些病毒，随着染色体复制而复制，是被动的
- ❖ 转座子可以同一条染色体或不同的染色体之间移动
- ❖ 导致DNA链的断裂/重接、基因启动/关闭、插入突变等多种遗传效应
- ❖ 转座子普遍存在于原核细胞和真核细胞中
- ❖ 与同源染色体重组相比，细胞中转座子作用的频率较低，但可以构建大量突变体库

思考题

同源重组的分子机制

同源重组的主要酶

位点特异重组特征

转座子结构特点

转座重组的分子机制及遗传学效应

RecA的功能