

章節：Ch. 25 DNA Replication	
教師：王子堅	日期：2014/06/03
撰稿組：聿辰、聲旻、洪松、葉衡	審稿組：章杰、正傑、彧誠、毅勛

[本章熱門重點]

- 1.各酵素的作用方式，以及對應之基因名稱(特別是 **polymerase!!!!!!**)
- 2.telomere、topoisomer 也是熱門重點之一

一、 Early Insights into DNA Replication

1. DNA 複製為半保留模式：

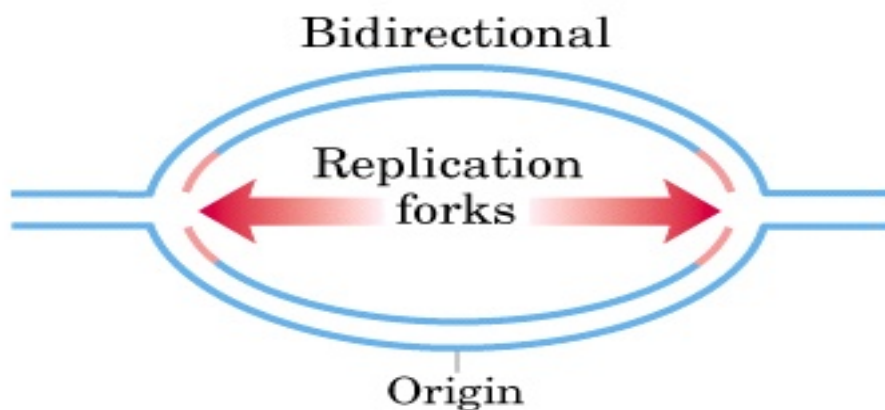
以單股的 DNA 作為模板行新的 DNA 複製，新的雙股 DNA 會包含一股新做的及一股舊有的 DNA。

2. 複製叉(fork):

DNA 複製發生在複製叉上，並且複製起始點(replication origins)可以是一個或多個以上的

3. DNA 複製是雙向性的(Bidirectionally):

由實驗得知 E-Coli 為雙向複製(Bidirectional)，可以用放射性、螢光標定在一些複製所需要的物質，經一段時間複製之後，觀察其複製之方向。



二、 DNA Polymerases: Enzyme Catalyzing Polynucleotide Chain Elongation

1. 第一個發現的 DNA Polymerase 為 DNA Polymerase I

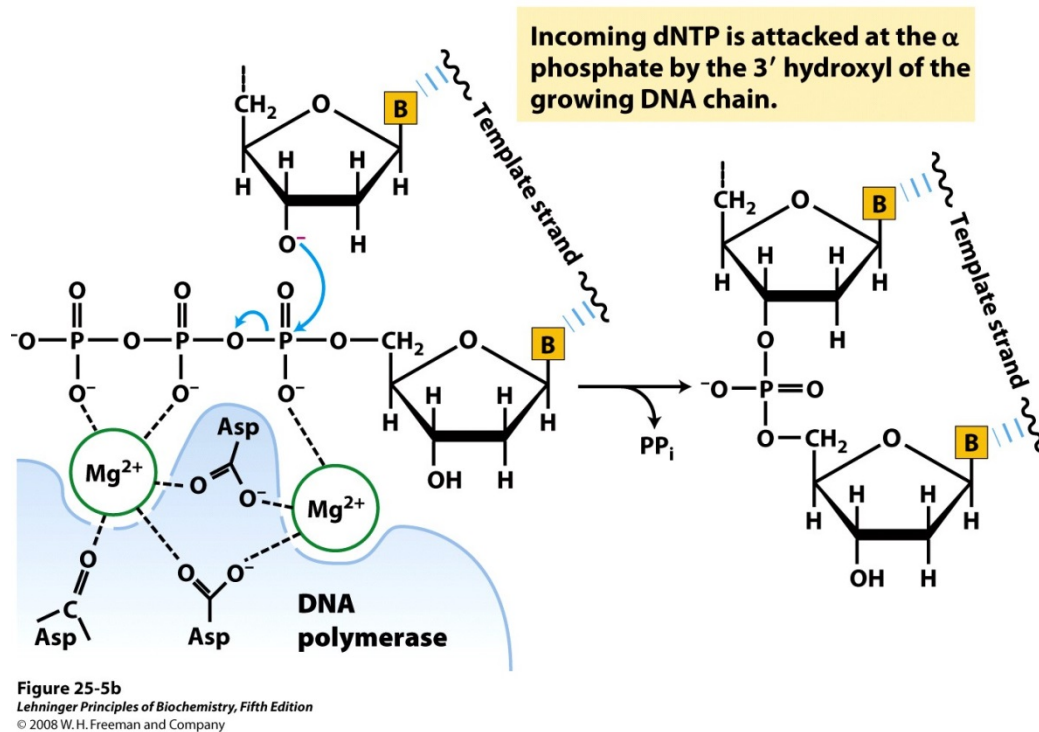
2. DNA 的複製需要 DNA Polymerases 的催化，另外還需要

- (1) Primer(引子): 可為 DNA/RNA，要有 3'OH 基
- (2) Template(模板): 單股 DNA
- (3) dNTPs: 作為材料
- (4) 二價離子，例如 Mg^{2+}

3. DNA 複製是由 3'的 OH 基上的 lone pair 接到新的 dNTP 上的 α -phosphorus 並脫去 pyrophosphate。

- (1) 母代 DNA 作為模板
- (2) dNTP 在合成的過程中作為材料
- (3) 在 3'尾端的 OH 基會和 α -phosphorus 形成鍵結

- (4) Pyrophosphate 是很好的 leaving group
4. DNA polymerase 的功能
- (1) 只能由 5' 到 3' 的位置延長序列
- (2) 只能由原本就已存在的 3' hydroxyl termini 開始延長，並不能直接開始和成新的 DNA 鏈



三、A Brief Review of Microbial Genetics

1. genetic map:

某一物種的**染色體圖譜**，顯示所知的基因和/或遺傳標記的相對位置。

2. phenotype:

對於一個生物而言，表示它**某一特定的物理外觀或成分**。一個人是否有耳珠、植物的高度、人的血型、蛾的顏色等等，都是表型的例子。

3. genotype:

指的是一個**生物體內的 DNA 所包含的基因**，也就是說該生物的細胞內所包含的、它所特有的那組基因。

4. allele:

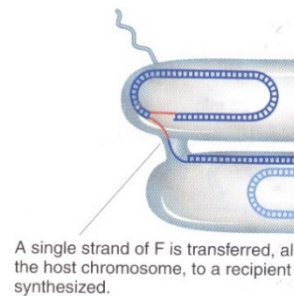
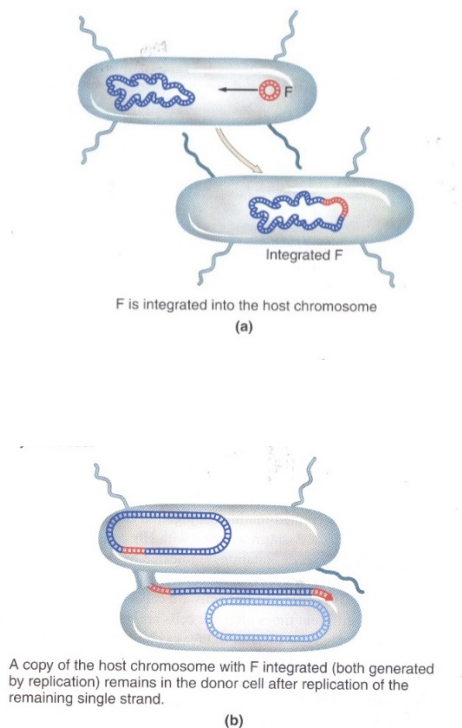
又稱**對偶基因**，是染色體內的基因座的可以複製的脫氧核糖核酸 DNA 序列，其在細胞有絲分裂時的染色體上的兩個基因座是對應排列的，故在早期細胞遺傳學裡稱其為等位。

5. diploid/haploid:

染色體倍性是指細胞內同源染色體的數目，只有一組稱為「單套」或「單倍體」(haploid)，兩組稱為「雙套」或「二倍體」(diploid)。

6.conjugation:

又稱為接合作用、細菌接合，是發生於原生動物間的現象，指的是兩個細菌之間發生的一種**遺傳物質交換現象**，屬於細菌有性生殖的一個重要階段。在接合現象發生時，兩個細胞直接接合或者通過類似於橋一樣的通道接合，並且發生基因的轉移。



三、 Multiple DNA Polymerases

1.DNA Polymerase I 是第一個被發現並證明功能的 Polymerase，但是有幾個原因證明 Pol I 並不是主要複製 DNA 的酵素：

- (1)DNA polymerase I 聚合速率太低。
- (2)DNA polymerase I 的 processivity(一次作用能聚合的核苷酸數量)相對較低。
- (3)基因研究顯示有許多蛋白質參與複製，不只有 DNA polymerase I。
- (4)科學家發現一無法正常製造 DNA polymerase I 的細菌仍能存活，只是對 DNA 損傷比較敏感。

2.E. coli 中主要有三種 DNA 聚合酶作用。

3.Pol II 主要用於 DNA repair(Section 25.3)。

4.細胞當中最主要使用於複製的酵素為 Pol III。

5.Pol III 比起 Pol I 非常大，有很多次單元，Pol II 如今也被認為有許多次單元。

6.Polymerization rate，簡單來說就是每秒鐘能複製 bp 的數量，Pol III 最多。

7.Processivity: 即 Polymerase 一接到 DNA，在離開前所能複製的 bp 數

※i.e.:複製一條染色體需要 40 分鐘，請問一秒鐘需要複製幾個 bp?

Ans: $4600000/2/40/60=1000$

TABLE 25.1 The classical DNA polymerases of *E. coli*

Characteristic	Polymerase I	Polymerase II	Polymerase III
Structural gene	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC</i>
Molecular weight	103,000	90,000	130,000
Number of molecules/cell	400	100	10
V_{\max} , nucleotides/second	16–20	2–5	250–1000
3' exonuclease	Yes	Yes	No ^a
5' exonuclease	Yes	No	No
Processivity ^b	3–200	10,000	500,000
Mutant phenotype	'UV' ^s MMS ^s	None	<i>dna</i> ^{ts}
Biological function	DNA repair, RNA primer excision	SOS DNA repair?	Replicative chain extension

四、Other proteins at the replication fork

※在討論 DNA 複製前，要先清楚：

DNA 複製的關鍵三步驟：

1.起始(initiation) 2.延長(elongation) 3.終結(termination)

(本小節討論的是 DNA 的 elongation)

(1) Discontinuous DNA synthesis

Reiji Okazaki 認為 DNA 複製是不連續的。

DNA 複製時分成兩股，一股為 Leading strand（領先股），一股為 Lagging strand

（延遲股）。

領先股：**連續型的複製**，合成方向與複製叉產生方向相同，一開始由 primase 合

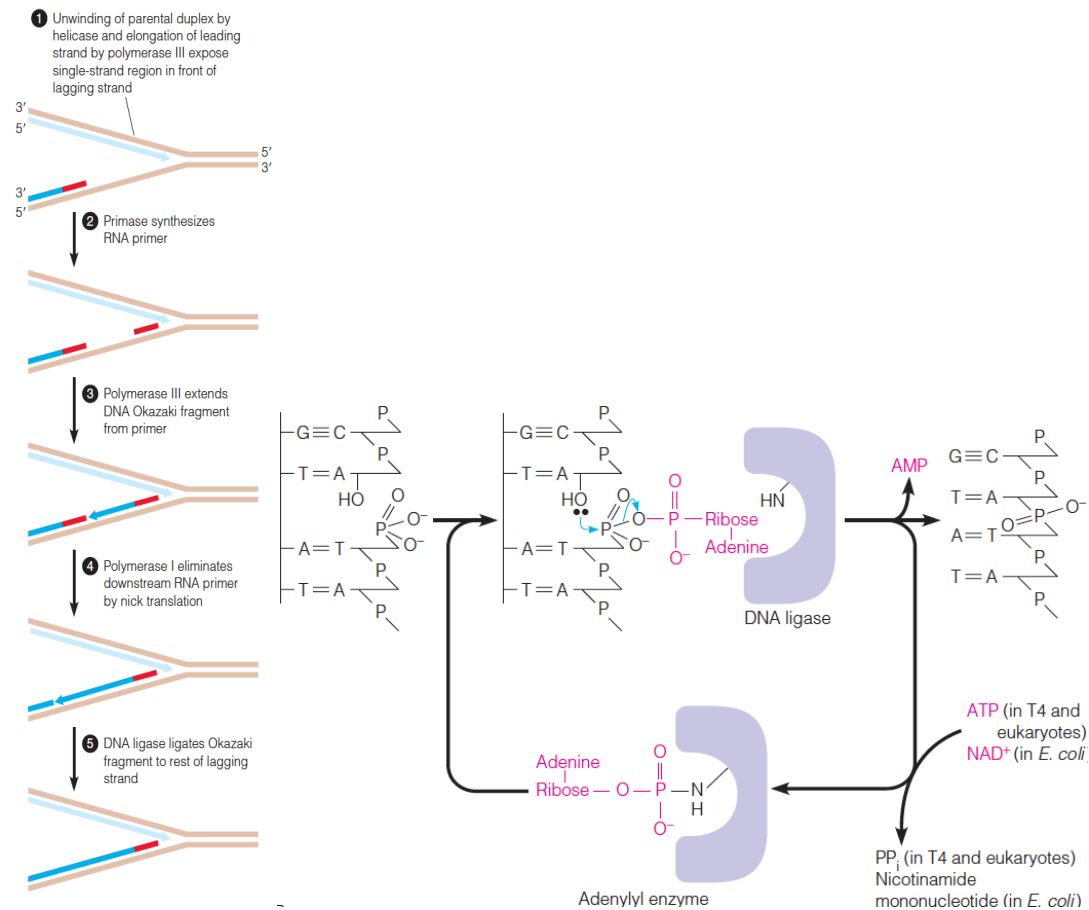
成一小段 RNA 引子後，由 polymerase 3 進行複製，為一長串沒有斷裂的 DNA。

延遲股是**不連續的複製**，因為領先股的複製速度較延遲股快，因此當複製叉產生

時，延遲股**會有一小段的 DNA 模板暴露出來**，而此時 RNA 引子以及 DNA

polymerase 3 會馬上進行延遲股的複製，所以**延遲股上有小段小段的 fragment**，

稱為岡崎片段(Okazaki fragment)，如下圖左(課本 25.14)



岡崎片段是小分子量的 DNA 片段，它們會被 DNA 連接酶(ligase)連接成高分子量的 DNA，上圖右(課本 25.15)，是 DNA 連接酶的作用機制。

連接酶可以將 DNA 連接起來，用的是 3'端的 OH 基跟 5'的 PO₃ 這兩個部分連接，連接的兩個核苷一定要鄰近，連接酶的啟動是經過在 lysine residue 的 NH 基上發生 adenylation，連接酶可將 adenylyl moiety 轉移到 5'的 phosphate 上讓它變成親核性，讓 3'的 OH 基更容易攻擊上以便連結。

T4 噬菌體上用 ATP 來進行 adenylylate，*E. coli* 核其他細菌則是使用 NAD⁺。

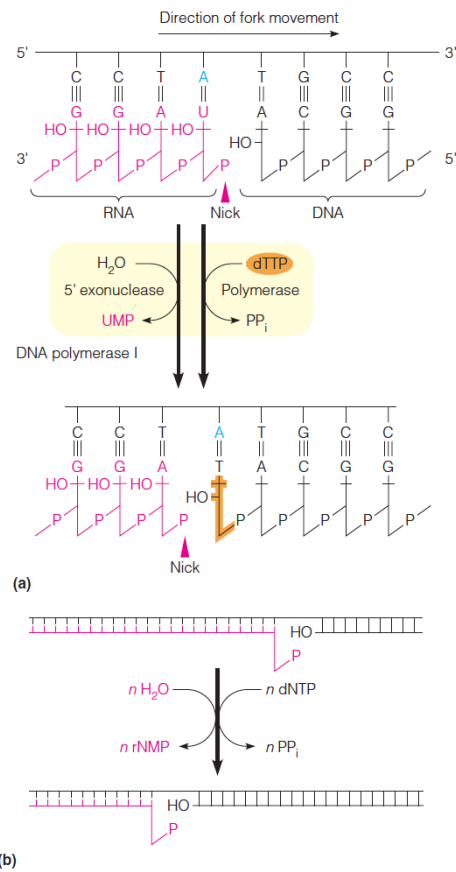
(2) RNA primer

小段的 RNA 在 DNA 複製中不可或缺，作為 DNA polymerase 的引子，在 DNA 複製的時候，RNA 引子會和 DNA 的以共價鍵結的方式連接在一起。

Reiji 和 Tuneko Okazaki 用 *E. coli* 以及同位素標定在 phosphate 上的實驗方式，證明了 DNA 複製中 RNA 引子的存在以及作用非常重要。(將 *E. coli* 養在有同位素標記的 dNTP 的環境，但是其 RNA 引子上不會有同位素標記，之後等 DNA 合成完成後，利用鹼性水解將 RNA 分解，如若可以在 rNMP 上面發現有同位素標記的 phosphate，便可知道 RNA 引子和 DNA 合成是有關的，可看課本 25.16 的圖)

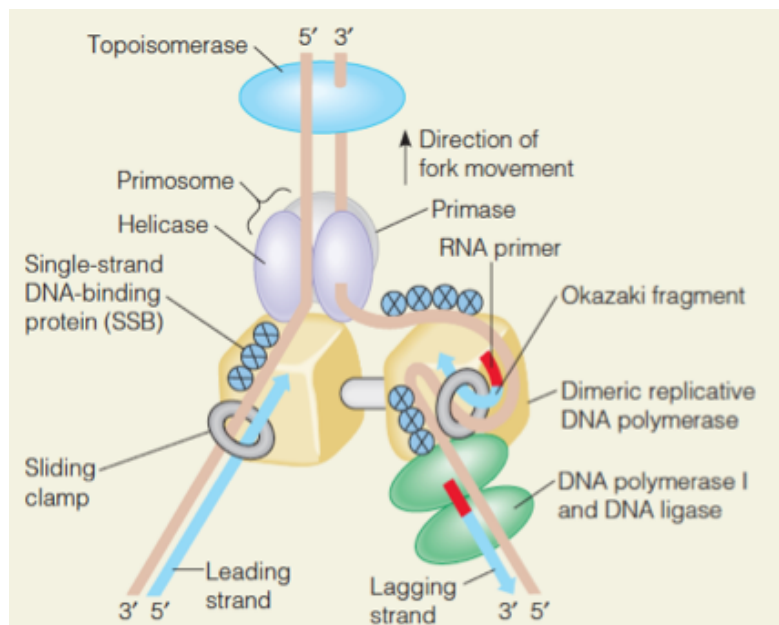
合成 RNA 引子的酵素為 Primase，主要的工作內容是將 rNTP 依照模板 DNA 的順序 Pairing 上去。RNA 引子的長度會依照物種而不同，如 T4 噬菌體的引子長度為 5 個 residue，而 *E. coli* 有 11 個，大多數的引子都以 ATP 當作 5'端的第一個核苷酸。

每個岡崎片段的 RNA 引子會被 DNA polymerase 1 以 dNTP 取代，這個取代是從 primer 的 5'端開始。除了 DNA polymerase 1 以外，還有一種酵素叫做 ribonuclease H 可以水解與 DNA 配對好的 RNA。



接下來的部分是 DNA polymerase 3 holoenzyme，在此之前，我們要來整理一下在

複製叉作用的所有蛋白質：



酵素

功能

DNA 合成酶 (polymerases)	將 dNTP 依照模板的序列由 5'到 3'的方向合成 DNA
-------------------------------------	---------------------------------

※ **Primosome:**

1. 解旋酶(helicase)：將雙股 DNA 解開成兩股模板
2. RNA primase：合成小段的 RNA 引子

連接酶(ligase)	將 DNA fragment 由 5'-3'的方向連接起來
Circular sliding clamp	催化使 DNA 合成酶持續接合在 DNA 上
Single-strand DNA-binding protein(SSB)	接合在已被解旋酶解開的單股 DNA 模板上，保持 DNA 在延長的樣子使得鹼基配對更順利。
Topoisomerase	在複製叉前面消除 DNA 的扭曲，使 DNA 不要形成超螺旋結構。
Clamp-loading complex	能夠將 sliding clamp 接上和卸下 DNA。

Replisome：

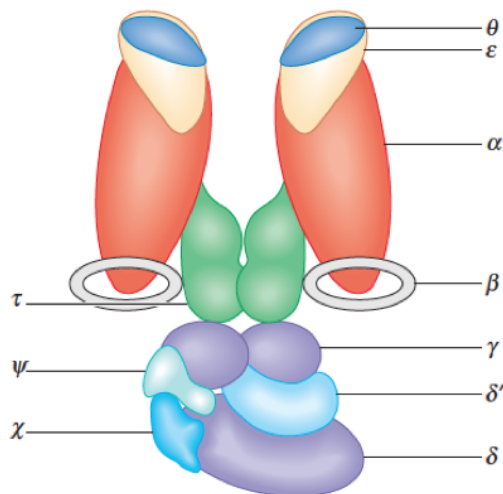
所有的協助複製的酵素，所形成的 complex 幫助 replication，稱作 replisome。

TABLE 25-4 Proteins of the <i>E. coli</i> Replisome			
Protein	M_r	Number of subunits	Function
SSB	75,600	4	Binding to single-stranded DNA
DnaB protein (helicase)	300,000	6	DNA unwinding; primosome constituent
Primase (DnaG protein)	60,000	1	RNA primer synthesis; primosome constituent
DNA polymerase III	791,500	17	New strand elongation
DNA polymerase I	103,000	1	Filling of gaps; excision of primers
DNA ligase	74,000	1	Ligation
DNA gyrase (DNA topoisomerase II)	400,000	4	Supercoiling

Source: Modified from Kornberg, A. (1982) *Supplement to DNA Replication*, Table S11-2, W. H. Freeman and Company, New York.

Table 25-4
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

(3) The DNA polymerase 3 holoenzyme



在 *E. coli* 中，有一個 *polC* 的基因會合成一條長條的 polypeptide chain，這蛋白質可以表現原始的 DNA polymerase 的功能，在 *E. coli* 細胞中的作用是和其他 polypeptide chain 聚集在一起作用，稱作 DNA polymerase 3 holoenzyme。樣子如上圖(課本圖 25.19)，此 holoenzyme 在細菌體中 DNA 複製延長非常重要。

在此 holoenzyme 中有十條不同的 polypeptide chains，每個都有以一個希臘字母來表示，他們的功能如下表。

TABLE 25-2 Subunits of DNA Polymerase III of <i>E. coli</i>				
Subunit	Number of subunits per holoenzyme	M_r of subunit	Gene	Function of subunit
α	2	129,900	<i>polC (dnaE)</i>	Polymerization activity
ϵ	2	27,500	<i>dnaQ (mutD)</i>	3'→5' Proofreading exonuclease
θ	2	8,600	<i>holE</i>	Stabilization of ϵ subunit
τ	2	71,100	<i>dnaX</i>	Stable template binding; core enzyme dimerization
γ	1	47,500	<i>dnaX*</i>	Clamp loader
δ	1	38,700	<i>holA</i>	Clamp opener
δ'	1	36,900	<i>holB</i>	Clamp loader
χ	1	16,600	<i>holC</i>	Interaction with SSB
ψ	1	15,200	<i>holD</i>	Interaction with γ and χ
β	4	40,600	<i>dnaN</i>	DNA clamp required for optimal processivity

*The γ subunit is encoded by a portion of the gene for the τ subunit, such that the amino-terminal 66% of the τ subunit has the same amino acid sequence as the γ subunit. The γ subunit is generated by a translational frameshifting mechanism (see p. 1000) that leads to premature translational termination.

Table 25-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Core polymerase 的部分：

1. 由 α 、 ϵ 和 θ subunit 所組成
2. 除了有聚合酶的功能之外，還有 exonuclease 的功能，其功用是用來修正配對錯的鹼基對或者是用來切 RNA 引子的。

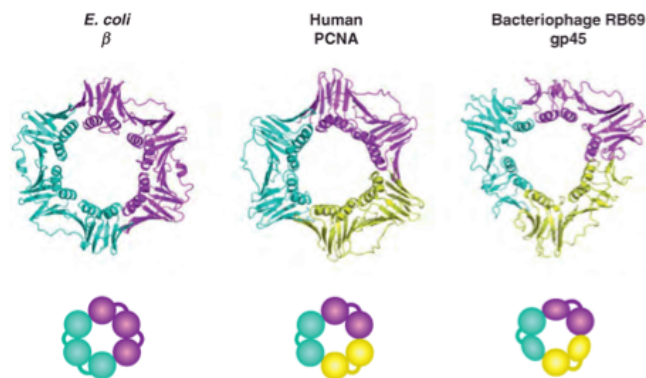
Sliding Clamp 的部分： β 次單元的功能主要是來增加 DNA polymerase 的持續合成

能力(processivity)，經過 β 次單元的調節後，可以使聚合酶在引子後合成幾千個

核苷酸，使 DNA 聚合酶轉變為一個有高度合成能力的酵素。當 β 次單元當作

sliding clamp 的時候，可以緊密的在 DNA 分子旁滑動，不會分離。大多數的 sliding

clamp 是二聚體的三聚體。



Clamp-loading complex 的部分：此部分主要的功能是幫助 β 次單元纏繞在 DNA

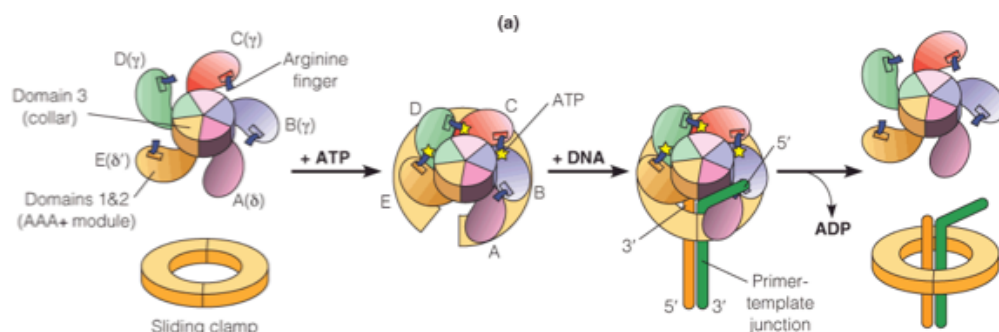
上。 γ complex 也被稱作 clamp loader。在此 complex 裡面的次單元功能是調節

RNA primer 的合成。這裡的作用需要 ATP 提供能量，步驟如下：

1. ATP 接上 clamp loader
2. 使 complex 接合 β clamp 並且幫助打開 clamp
3. clamp 打開後接上 DNA
4. 進行 ATP 的水解
5. clamp 關閉。

此作用每次複製發生一次（有一次 primer 發生一次），故領先股只會發生一次，

而延遲股則每有一個岡崎片段就必須要有一個 Clamp loader 接上發生此作用。



(4)Single-strand DNA-binding proteins: maintaining optimal template conformation

最早被發現的 DNA 複製蛋白中，除了 DNA 聚合酶外，還有一種 T4 蛋白，稱

為 Single-strand DNA-binding protein(或 Helix-destabilizing protein)。

有一種 SSB 蛋白在第 32 號基因突變的時候無法作用，會使的 DNA 無法修復也不能進行複製。因此稱此蛋白為 gp32。gp32 與 DNA 的結合十分的“cooperative”，如果 DNA 上面已經有 gp32 的接合，接下來的 gp32 蛋白會更容易接上，所以 gp32 可以促使 DNA 的 denaturation。gp32 可以使 DNA 模板保持單股伸展的狀態，使得鹼基配對能夠更順利。gp32 蛋白的作用在 DNA 的修復、基因重新組合以及 DNA 複製都很重要，這三個都是 DNA 重新變回雙股結構很重要的步驟，因此 gp32 不僅可以促進 DNA 的 denature 也可以使 DNA 回復成雙股的狀態。

gp32 與 DNA 的作用方式很特別(可以參考課本 25.22 的圖)，gp32 並不會自己解開雙螺旋的結構，只會在 DNA 小部分稍微解開雙螺旋時接上 DNA，當只有小部分接上 DNA 的時候，是一種微弱結合，此時的 gp32 稱為 flap down 狀態。當 gp32 被小部分的 proteolysis 並被拿掉 C 端的片段時，就會和 DNA 變成一個強的結合，此時的 gp32 被稱為 flap up 狀態，也會吸引更多 gp32 蛋白質來接合在同一條 DNA 上面，是一種 cooperative 的結合。而什麼時候會使 gp32 從 flap down 和 flap up 的狀態間互相轉變，就要看 gp32 和其他蛋白質的作用來決定。

SSB 存在於很多生物中，作用方式都稍微的不相同。在 E. coli 中的 SSB 蛋白質包在 DNA 外的方式是一種四聚體的方式，而且是 negative cooperativity，SSB 蛋白質會選在沒有 SSB 接合的 DNA 部分接合。在真核細胞中，這種四聚體式的 SSB 蛋白稱作 Replication factor A。

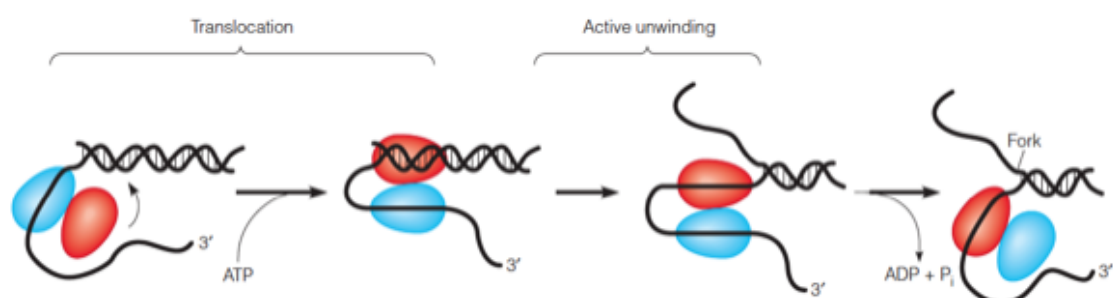
(5)Helicases: unwinding DNA ahead of the fork

SSB 蛋白並不會 denature DNA，denature 的工作是由解旋酶負責。解旋酶的作用

必須依賴 ATP，在 *E. coli* 裏面最少有六種以上不同的解旋酶。主要的 DNA 解旋酶是 DnaB，會和 DnaG 還有其他的蛋白質組合成 Primosome。在 T4 噬菌體內負責解旋酶作用的蛋白質是 gp41，負責 primase 的蛋白質是 gp61，在 T7 噬菌體內只有一個蛋白質 gp4 負責解旋酶還有引子酶的功能。

大多數的解旋酶都是由數個次單元組合起來的蛋白質，大多數是二聚體，但也有例外（如：DnaB 蛋白質是六聚體），**解旋酶一開始是接在臨近雙股 DNA 的單股的 DNA 上**（看下圖），**並且往固定方向作用**（如 5'到 3'或者是 3'到 5'），將**雙股 DNA 隨著它的移動分開**（會消耗 ATP）。雖然解旋酶是同型的多聚體，但是在接上 DNA 之後，他們的作用會不一樣。

Hand-over-hand 機制：每個次單元會隨著 ATP 和 ADP 的接合，而在 tight-binding 和 loose-binding 的構型間改變（如下圖）



Step 1: ATP 接合在紅色次單元使得紅色次單元接合在單股 DNA 和雙股 DNA 的交界

Step 2：解開雙股 DNA 的螺旋

Step 3：ATP 的水解使得藍色次單元接 DNA 的能力變弱，使它脫離 DNA

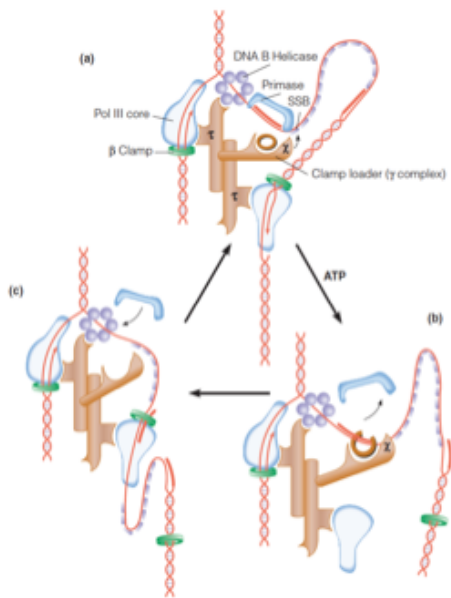
Step 4: 新的 ATP 接合在藍色次單元使得藍色次單元接合在單股 DNA 和雙股 DNA

的交界，整個解旋酶有旋轉的現象。

在 T7 噬菌體內的 gp4 蛋白自己有解旋酶和引子酶的功能。它是一個環狀的蛋白質，使用 dTTP 而不是 ATP 來進行能量來源，會把單股 DNA 環繞起來進行作用。

(老師 ppt 沒有提到，如果想要看圖可以看課本的 25.24)

E.coli 的 DnaB 解旋酶是同型六聚體，它的作用方式是把單股 DNA 環繞起來，每個次單元都有兩個可以跟 DNA 接合的作用域，一個結合力強一個結合力弱，一個次單元大概可以涵蓋二十個核苷酸單元。



Primosome 可以跟 gamma complex 整合作用，

透過 ATP 能量的消耗，將延遲股上的 primase 移走變成 polymerase。作用方式如左圖。

(a) DnaB 解旋酶環繞在延遲股上，而且 primase 合成 RNA 引子。Primase 一定要緊跟著 SSB 來維持與 DNA 的接合。在延遲股上的 Core polymerase 會使前方在 Primase

之後與聚合酶之前的 DNA 形成一個圈環

(b) 在 gamma complex 裡的 x 次單元匯合 SSB 作用，使 primase 被移走，接著 gamma complex 會打開 clamp，一個新的完整岡崎片段會跟其模板一起被釋出

(c) Primase 會重新接何一個單股的模板 DNA 上繼續合成新的引子

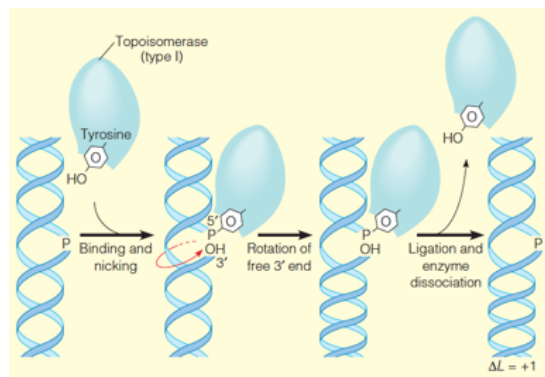
Werner's syndrome 和 Bloom's syndrome 是因為解旋酶缺陷而造成的遺傳疾病。

症狀都包括癌症的風險增加。Werner's syndrome 的患者在二十歲前就會白頭髮和白內障，並且在五十歲前會自然死亡的風險增加。

(6)Topoisomerases: Relieving Torsional Stress

在雙向的 DNA 複製中，有一種酵素可以紓解 DNA 的扭轉力。Topoisomerases 是一群酵素可以提供一種扭轉的方式來疏解 DNA 上的扭轉利來保護 DNA，最常被觀察到的作用是可以使超螺旋結構的 DNA 被伸展開來。主要可以分成兩種類別的 topoisomerases：type1 和 type2

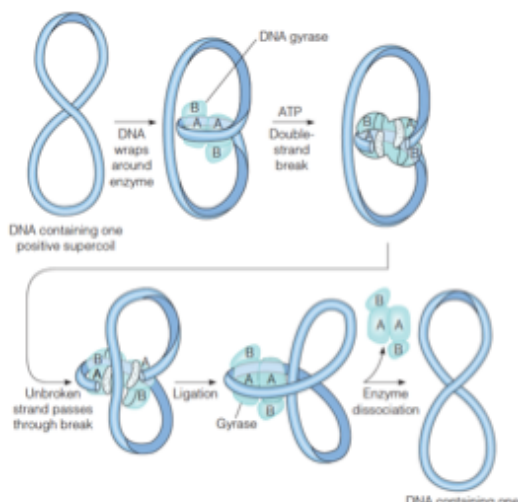
1. Actions of type1 and type2 topoisomerases



(i)Type 1 topoisomerase：打斷雙股 DNA

的其中一股，此酵素 tyrosine 上的 OH 基以共價鍵結的方式接合在 DNA 5'端的 phosphate 上，3'端的 OH 基則是可以自由旋轉，最後在 3'端上的 OH 基則會被 5'

端上的 phosphate 基攻擊而關起斷裂，造成 linking number 的改變(以上的機制以 E. coli 來舉例)。linking number 改變為 1。真核細胞內的作用大致相同，只是 3' 變為不可以旋轉，而 5'變成可旋轉。



(ii)Type 2 topoisomerase：打斷雙股 DNA

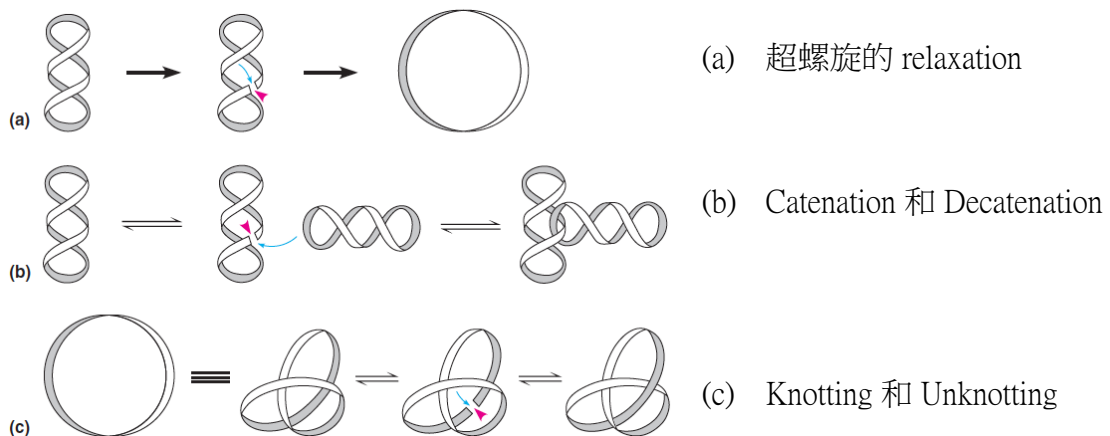
的雙股，而沒有斷裂的雙股 DNA 部分可以繞過和已被打斷的雙股 DNA 中間的空

隙，最常被拿出來討論的 type 2 topoisomerase 是 E. coli 裡面的 topoisomerase，也被稱作是 DNA gyrase。DNA gyrase 可以疏解超螺旋的分子也可以引發在 DNA 分子內的 negative superhelical turns。DNA gyrase 作用時需消耗 ATP，它是一個四聚體，有 2A2B 四個次單元，A 次單元負責接合以及剪 DNA，而 B 次單元則是負責能量的運輸。type 2 topoisomerase 改變 DNA 的 linking number 為 2。

E. coli 有四種不同的 topoisomerases，第一型和第三型的 topoisomerase 為 type 1，第二型和第四型的 topoisomerase 為 type 2。而 DNA gyrase(type 2)在 DNA 複製延長裡面則是有不可或缺的地位。

gyrase 的抑制物常常可以抑制 DNA 的複製，如 gyrase 上 A 次單元的抑制劑 Nalidixic acid、B 次單元上的抑制劑 Novobiocin，可以抑制 ATP 的切割水解，使能量無法產生。這些藥物可以當作抗生素來使用。

※幾種 Topoisomerase 會作用的 DNA 超螺旋形狀：



※實際的 replisome 作用情形：在 replisome 上其實有三個 core，在合成時，只有其中兩個 core 和 sliding clamp 結合(可由三個 τ subunit 的事實佐證)。

五、在真核細胞內的 DNA 複製所參與之 protein

目前已發現的 polymerase 共有五種，其中三種負責進行核 DNA 的複製，一種

負責粒線體 DNA 的複製，另一種則是負責 DNA 的修復。(Table 25.2)

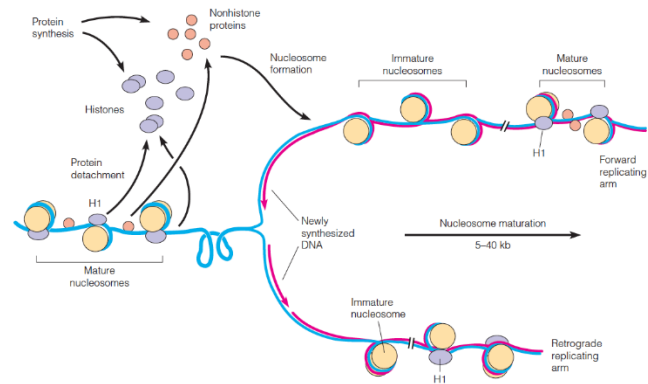
TABLE 25.2 Properties of the five “classical” eukaryotic DNA polymerases						
Polymerase	Catalytic Subunit, kDa	Accessory Subunits, kDa	3' Exonuclease	Fidelity	Processivity (with PCNA)	Biological Function
Pol α	160	49, 58, 70	No	$10^{-4} - 10^{-5}$	Moderate	Lagging strand primer synthesis
Pol β	37	None	No	5×10^{-4}	Low	DNA repair
Pol γ	137	55	Yes	10^{-5}	High	Mitochondrial DNA replication
Pol δ	122	12, 50, 68	Yes	$10^{-5} - 10^{-6}$	High	Lagging strand replication
Pol ϵ	251	12, 17, 59	Yes	$10^{-6} - 10^{-7}$	High	Leading strand replication

其中，polymerase γ 在進行粒線體 DNA 複製時，兩個 subunit(γ A:進行 DNA 複製， γ B:促進酵素對於 DNA 的親和力、並加速反應)會作用。由於構形上與病毒的 polymerase 相似，可以藉由 pol γ 的抑制物(如:HIV 的抑制藥物)抑制病毒增生。其餘所參與的酵素，大多都具有有一致性(真核細胞所用的酵素相似性極高)。(Table 25.3)

TABLE 25.3 Proteins that carry out analogous functions in DNA replication				
Function	<i>E. coli</i>	Phage T4	SV40/Human	Yeast
DNA polymerase	Pol III core enzyme	gp43	Pol δ , Pol ϵ	Pol δ , Pol ϵ
Primase	DnaG	gp61	Pol α	Pol α
Helicase	DnaB	gp41	SV40 T antigen	MCM proteins
Proofreading	ϵ subunit of Pol III holoenzyme	gp43	Pol δ	Pol δ , Pol ϵ 3' exonuclease
Sliding clamp	β subunit of Pol III holoenzyme	gp45	PCNA	PCNA
Clamp loader	γ complex of Pol III holoenzyme	gp44/62	Replication factor C	Replication factor C
Single-strand DNA-binding protein	SSB	gp32	Replication protein A	Replication protein A
RNA primer removal	Pol I, RNase H	<i>E. coli</i> Pol I T4 RNase H	Pol δ , FEN 1	Pol δ , FEN 1

六、染色質的複製

(步驟和複製原核生物的DNA類似，只是真核細胞還要多處理一個問題：和 DNA 連結的 Histone 與其他蛋白質)



如左圖所示，histones 和其他連接在 DNA 上的蛋白質，會在複製叉抵達前離開 DNA，然後在新合成的 DNA 雙股上和 DNA 連結。在解離到重新連結的過程中，histone 的構形不變，但有些 histone 會被修飾(接上乙醯基)，有些可能會重新組合(八聚體的

histone 在解離過程中不安定)。

其中 DNA 在新合成到接上 histone 前，此雙股 DNA 並未成熟，一直到 DNA 接上 Histone 和相關蛋白質後才算成熟。而成熟過程相當緩慢，從複製叉處到實際成熟區，通常相隔了 5-40kbp。

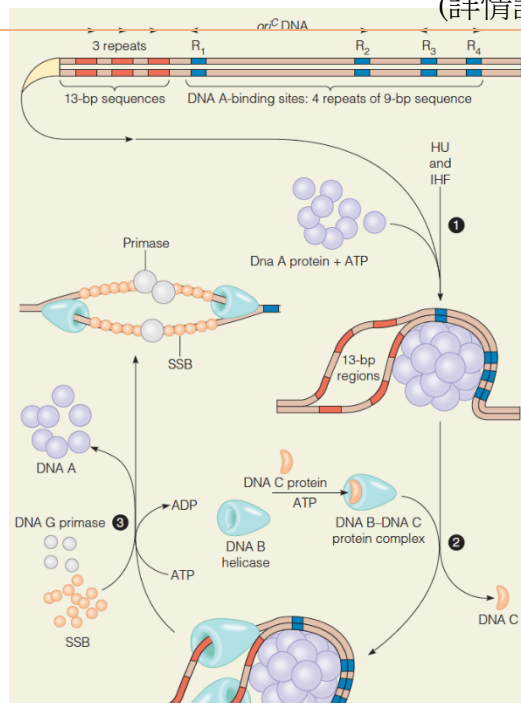
七、DNA 複製的起始(The initiation of DNA replication)

※DNA 複製的關鍵三步驟：1.起始(initiation) 2.延長(elongation) 3.終結(termination)

DNA 必須滿足兩個需求，才能開始複製

1. 可以和 initiation protein 結合的 DNA 序列
2. 可以產生 primer，讓 dNTP 能夠接上合成 DNA 的機制

需求	解決方式	E coli.的解決方式	真核細胞(酵母菌)的解決方式
和 initiation protein 結合的 DNA 序列	起始點通常包含了一段重複序列 (direct repeat 或 inverted repeat) 作為 initiation protein 的結合點	<p>ori^c序列：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 包含了 4 次以 9bp 為單位的重複序列，供 DNA A protein 結合 2. 在此序列左方 3 個以 13bp 為單位的重複序列，此序列多含 AT 核苷酸，除易於解離外，也可以提供 basic protein (HU&IHF)結合，促使 DNA 彎曲 	<p>真核細胞具有較多的起始點，而每次的複製並不是所有的起始點都會作用，即便會作用也不一定是在同一時間作用。</p> <p>ARS：在酵母菌上發現的起始點，含幾百 bp，其中有一組重複序列 (5' -TTTTATATTT-3') 作為解螺旋的起始點</p>
產生 primer 使 dNTP 接上	在起始點附近讓模板股解螺旋	在 DNA B & C protein (helicase)的作用下，形成複製叉，而 DNA G(Primase) 和 SSB protein 結合在 DNA 上，並開始製作 primer (詳情請見下圖)	多蛋白質的參與 (詳情請見下圖)



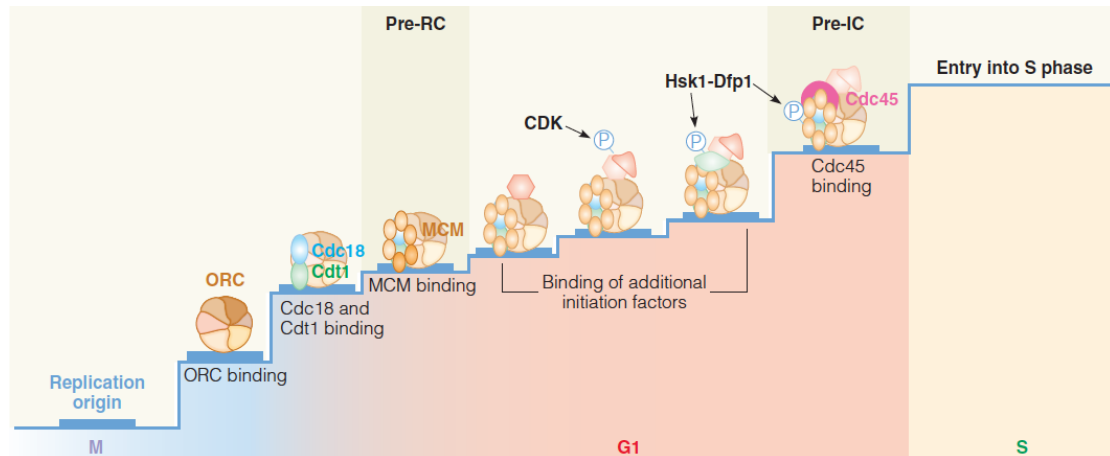
※E coli.的 DNA 複製起始方式：

步驟如右圖所示

1. ori^c在 HU 和 IHF 的作用之下，和 10-20 個 DNA A protein 與 ATP 進行聚合，使 DNA 雙股彎曲。
(phospholipid 會參與反應，並作為其他細胞內開始細胞分裂動作的協調點)
2. 在 DNA C protein 的協助下，作為

- helicase 的 DNA B 會 binding 在 13bp 的重複序列區，形成複製叉
3. 在 DNA G(Primase)的作用下，primer 形成

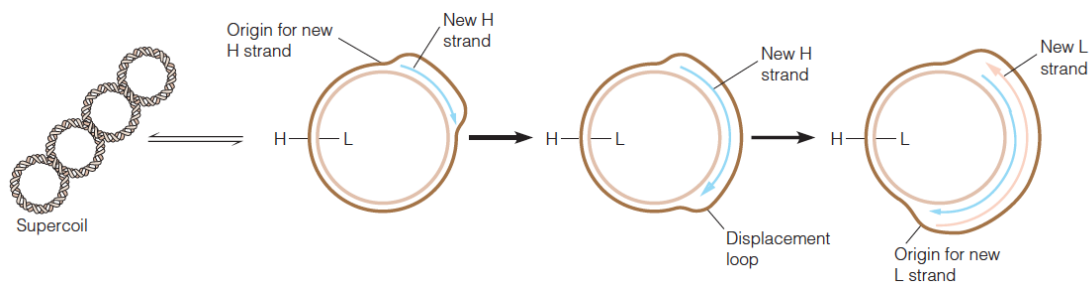
※真核細胞(酵母菌)的 DNA 複製起始方式：



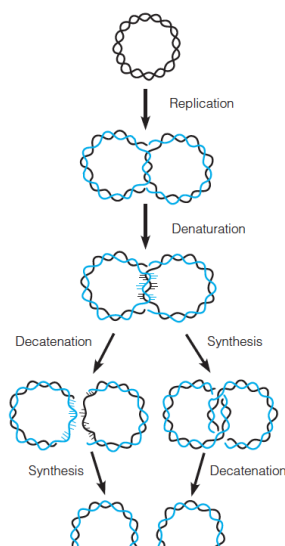
步驟大致如下：

1. 在細胞分裂期，由六個蛋白質組成的 ORC 會和起始點結合
2. 之後再慢慢接上其他蛋白質(Cdc18、Cdt1 為底，形成 MCM)，形成 Pre-RC
3. 陸續接上蛋白質或 factor 後，由 CDK 或其他 kinase(Hsk1-Dfp1)磷酸化，形成 Pre-IC
4. Pre-IC 就可以開始 loading primase 或 DNA polymerase

※粒線體 DNA 的複製起始方式—Strand Displacement 模式：



複製開始時，粒線體先合成環形 DNA 的 L 股(L strand，或 Light strand)上的 DNA，另一股(H 股)則會形成圈環(displacement loop)。在合成 2/3 圈後，在抵達 H 股的起始點後，H 股上的複製才會開始，並以合成 L 股上 DNA 之反方向合成。



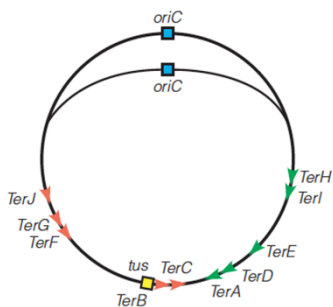
八、DNA 複製的終止

1. 圈環 DNA

※Topoisomerase 在 circular DNA 複製的 termination 作用：

當圈形DNA複製到最後時，會產生類似像左圖第二個Complex(兩圈還連在一起，即為 catenation)。此時連接處的DNA雙股先解離，之後可能分成兩步：

1. 藉由 Topoisomerase 先扯開兩個圈環DNA，之後再進行複製
2. 先進行複製，形成兩完整圈環DNA後，再藉由 Topoisomerase 扯開兩個圈環DNA



在圈環DNA上，會有特殊序列形成 Ter site，其上會 binding 特殊蛋白質 Tus。當 replisome 到達 Ter site 時，藉由處理 Tus(移除)調控雙邊的 replisome 抵達最終的 Ter site 的時間一致。

2. 線性 DNA

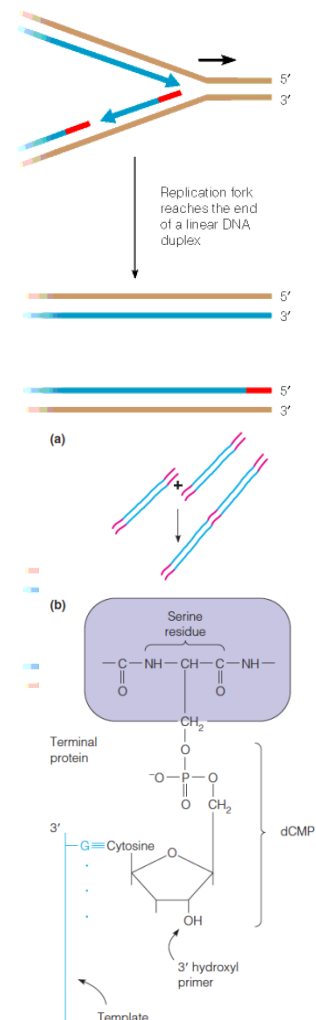
※ End-Replication problem of linear genomes :

線性 DNA 在終止複製時會碰的問題

在缺乏 primer 的情況下，所有已知的 DNA 聚合酶都無法開始合成 DNA strand。Circular genomes 透過切開其中一條 strand，利用暴露的 3'尾端當作 primer，RNA primer 沿著環狀開始複製然後回到起點，起始的 RNA 可以被 DNA 聚合酶移除掉。

但對於線性 DNA 就沒有這麼好康了，如果他們使用 RNA 來啟動複製染色體的末端，那麼線性 DNA 就必須要有一些方法用 DNA 來取代 RNA，不然就必須在每次的複製當中失去一些 DNA。在現實中，真核細胞的染色體採取後者的方法：每次複製中失去一些尾端的染色體，那些染色體我們稱之為端粒(telomere)。

端粒包含了許多重複的少量核苷酸序列，並且不會 code。端粒酶可以重建已經縮短的端粒，但是在大部分的細胞中端粒酶並沒有被激活，幸運的是，端粒序列是相當長的，所以細胞才可以進行大量複製，損失的都是不重要的端粒編碼序列。



特殊的是噬菌體 T4 和 T7 在末端包含多餘的 DNA，產生 concatemers，利用再結合可以再生完整的端粒序列。

(a) T4 跟 T7 的尾端結合

以及噬菌體 ϕ 29 和腺病毒，它們藉由 novel priming system 來使共價蛋白質連接在 5'大部分的核苷酸上。

(b) 利用 dCMP 與 protein serine hydroxyl 結合成一個 primer