Source:Stanley N. Cohen/Photo Researchers,*Inc*

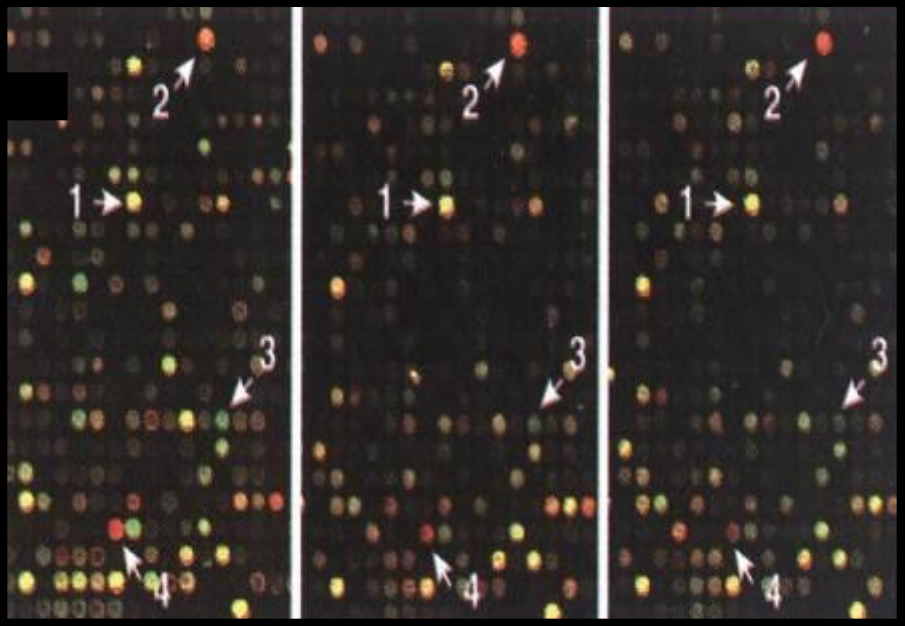
第7 章

基因突变与交换

Gene Mutation

&

Crossing-Over



(Source:Lyer,V,The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum.Science 283(1 Jan 1999)f.1,p.83)

7.1. Point mutation 的类型与机理

7.2.诱发突变

7.3. 保证遗传稳定的机制

7.4. 基因重组交换的分子机制

7.1. 1. Point mutation 的类型

- **conversion (取代)**

  transition(转换) **Py ⇄ Py** **Pu ⇄ Pu**

  transvertion(颠换) **Py ⇄ Pu**

- **dNt deletion or insertion**

  = 3x dNt ±n x Amino acid

  ≠ 3x dNt Framshift

南京大学田大成等发现的遗传突变新机制

Nature，doi:10.1038/nature07175，Dacheng Tian，Jian-Qun Chen

第一，基因组各区域的突变率很不相同，自发突变的数量是由**Indel**的数量和密度所决定

第二，生物多样性最初变异来源主要是由**Indel**诱导产生

第三，自然选择在很大程度上是通过对**Indel**的选择而实现

第四，生物通过调节自身变异能力而适应环境的能力，突变在进化中的作用比人们原先想象的要大得多相当巨。

- **conversion effect**

  ---Samesense mut. **GAA(E) → GAG(E)**

  ---Missense mut. **GAA(E) → AAA(K)**

  ---Nonsense mut. **GAA(E) → TAA(stop)**

- 突变的表达类型

---获得突变型是遗传学研究的重要前提

---非条件型突变；**allele in DNA level (RFLP, RAPD…)**

allele in phenotype (红花/白花，糯/非糯…**)**

条件型突变； 突变的表现 = 突变基因型 + 诱导条件

（光，温敏感不育，Ts, su^{--}…）

● 突变的表达类型

- 无效突变 Null mutation：

  完全消除了基因功能的突变（缺失）

- 功能丧失型突变（loss-of-function mutation）

  无效突变或其他阻止基因功能的突变

- 功能获得型突变（gain-of-function mutation）

  突变使蛋白质获得新的功能

- 沉默突变（silent mutation）

  没有明显表型效应改变的突变

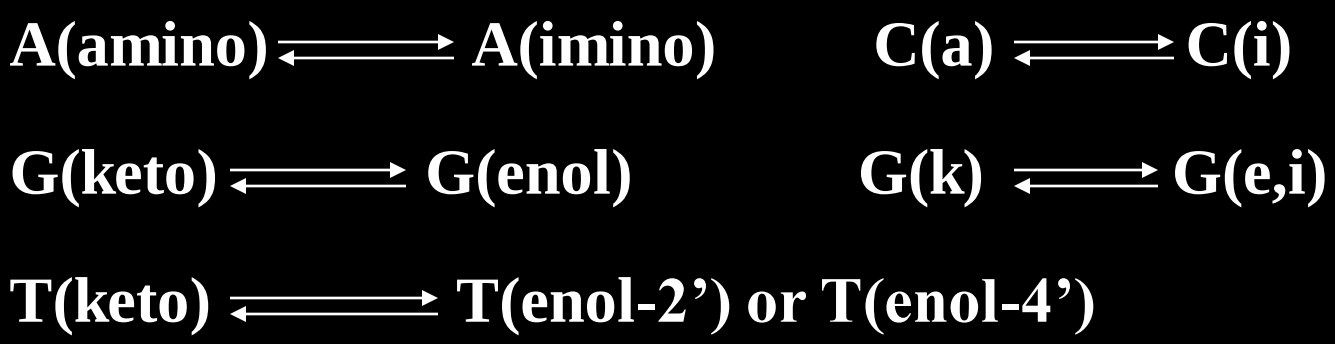
7.1.2. 突变发生的机理

（自发突变，诱发突变）

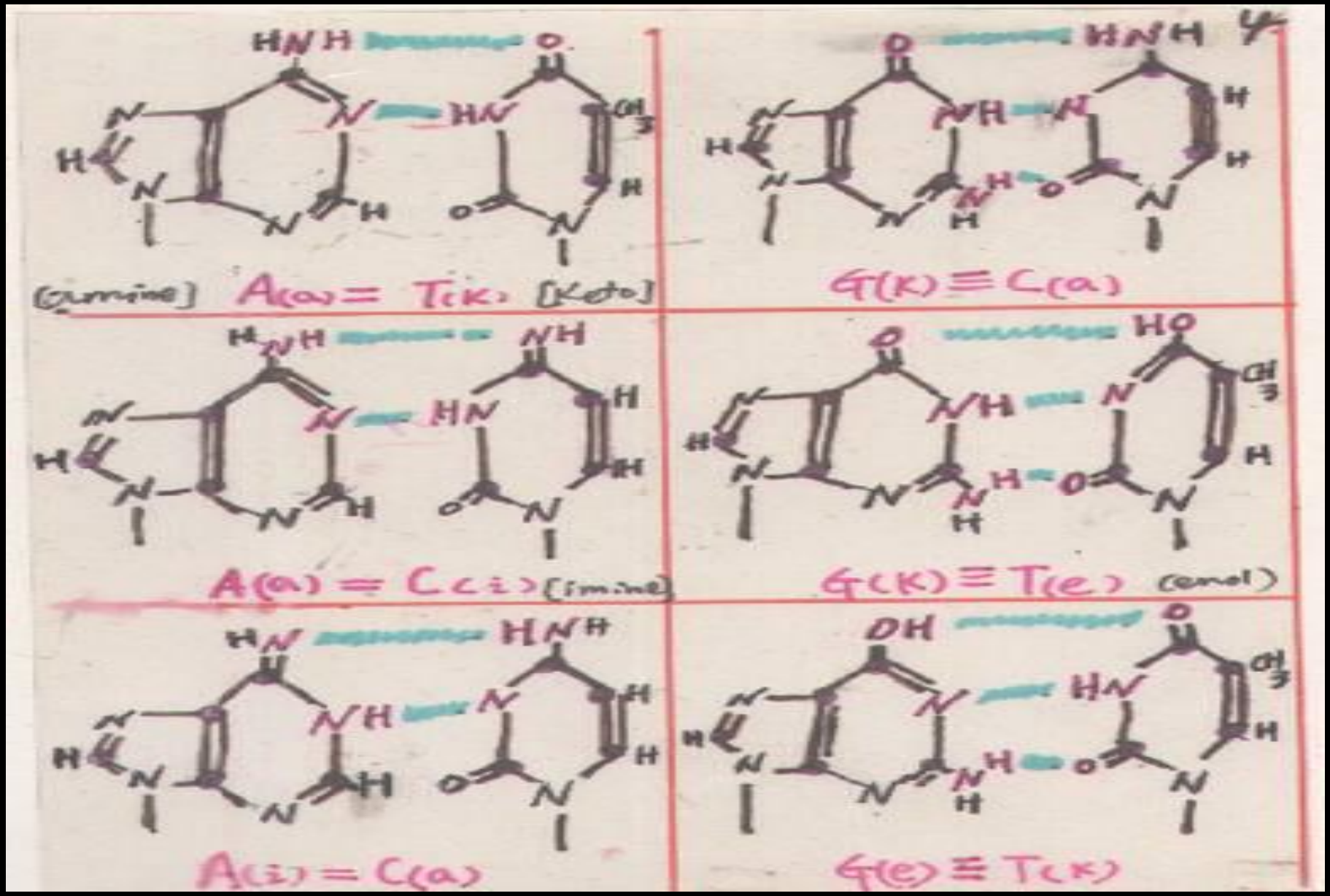
7.1.2.1. 自发突变

7.1.2.1.1. 碱基异构式引起DNA复制过程的错误

a) 碱基异构式

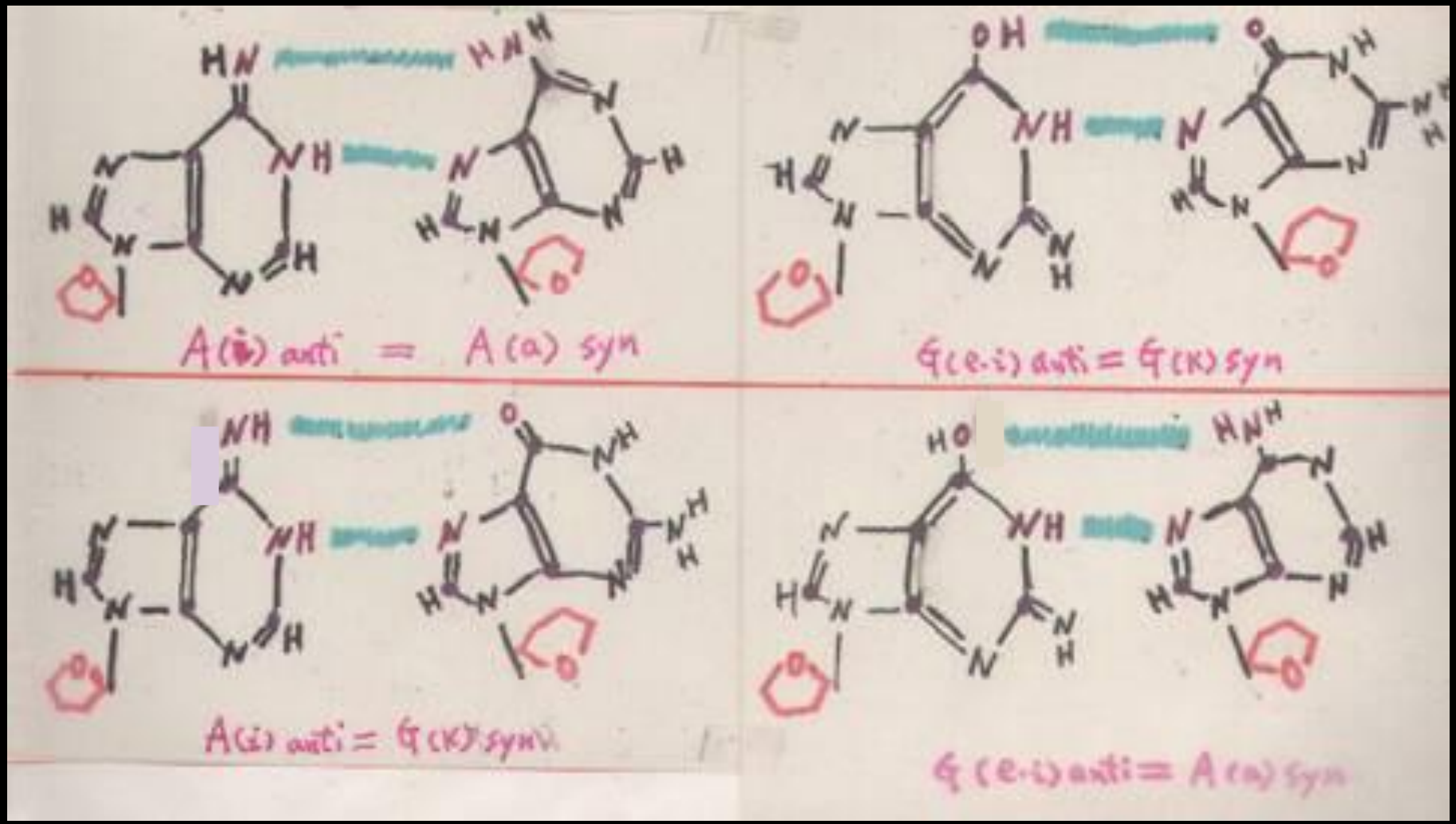


b) 碱基异构式引起DNA复制的错配



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第321页)

碱基异构式引起DNA复制的错配



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第321页)

碱基异构式引起DNA复制的错配

正确配对 A(a) ═ T(k)　　G(k) ≡ C(a)

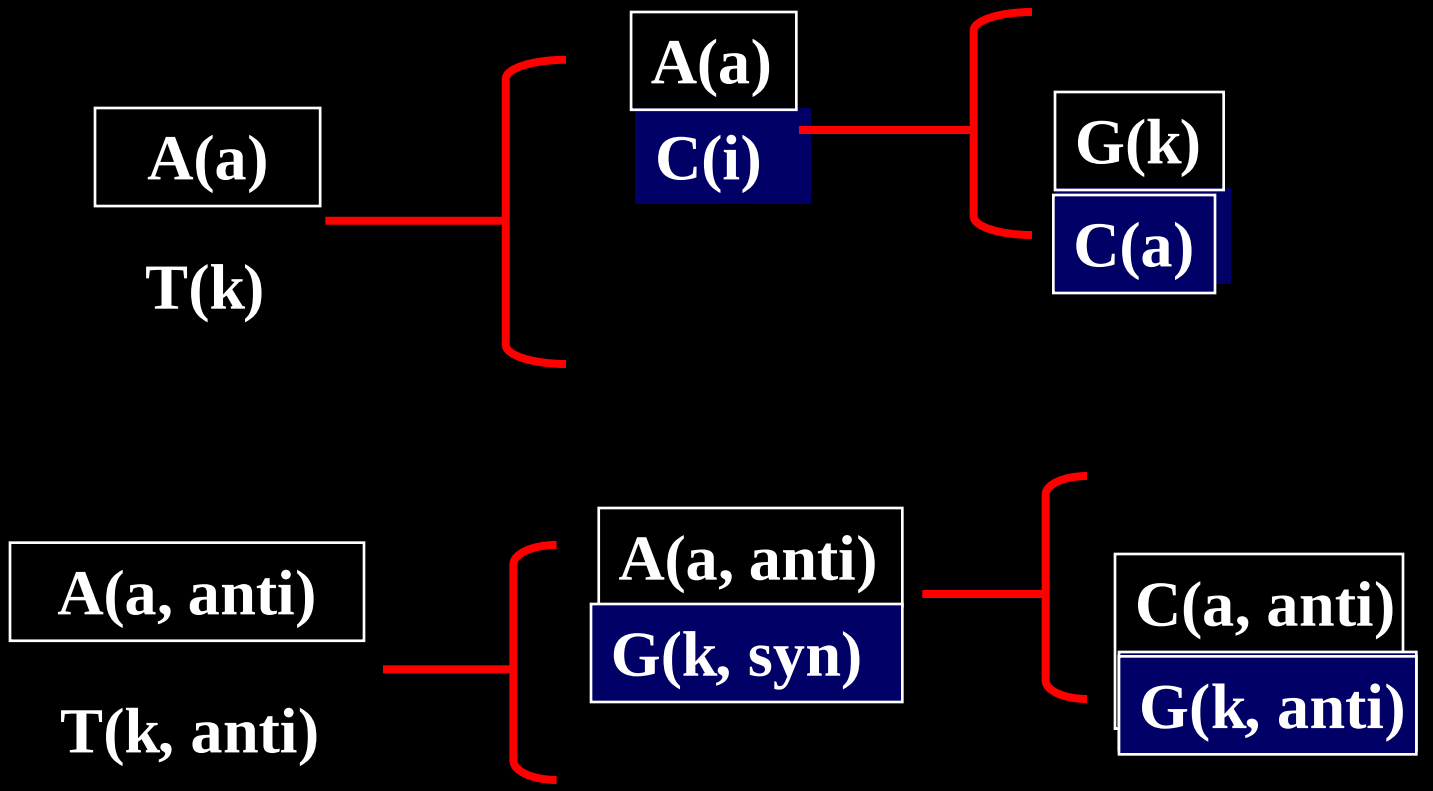
错误配对 A(a) ═ C(i)　　G(k) ≡ T(e)

A(i) ═ C(a)　　G(e) ≡ T(k)

A(i, anti) ═ A(a, syn)　　A(i, anti) ═ G(k, syn)

G(e,i, anti) ═ G(k, syn)　　G(e,i, anti) ═ A(a, syn)

碱基异构式引起DNA的错配突变



7.1.2.2.增变基因（mutator gene ）

but be wronged

增变基因类别：

修复过程是基因突变的重要来源

DNA polymerase 相关基因

3’→ 5’ editing function mutation

错配修复系统的基因

MCE (mismatch correction enzyme)

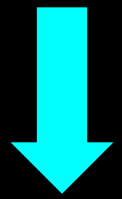
DNA 损伤修复系统基因

错配修复功能丧失 ⟶ 突变率升高

7.1.2.3 不对称交换

内源转座子

(Retro-transposon,Helitron)



Indel

Source:Stanley N. Cohen/Photo Researchers,*Inc*

第7 章

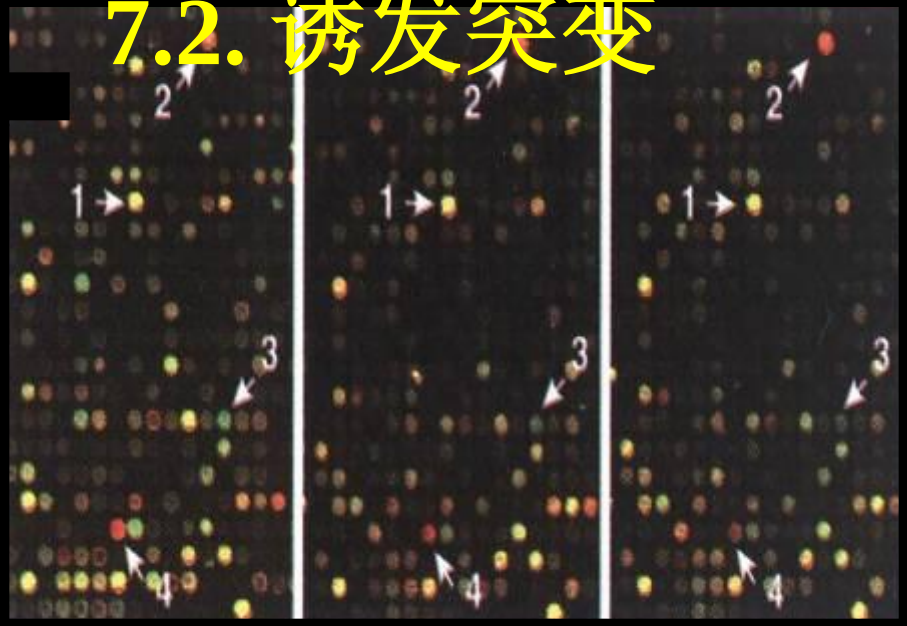
基因突变与交换

7.2. 诱发突变

Gene Mutation

&

Crossing-Over



(Source:Lyer,V,The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum.Science 283(1 Jan 1999)f.1,p.83)

7.2.1. 物理诱变

a) 电离辐射诱变；

Co^{60} (χ)(γ) ray

Cs^{137}(χ) (γ) ray

H^{3} (α) ray

P^{32}, S^{35}(β) ray

(χ)(γ) ray穿透性

（外照射处理）

(α) (β) ray非穿透性

（内标记处理）

卫星搭载诱变；高真空，强辐射，微重力

dNt电荷及结构改变

卫星搭载育种——太空蔬菜

重力

辐射

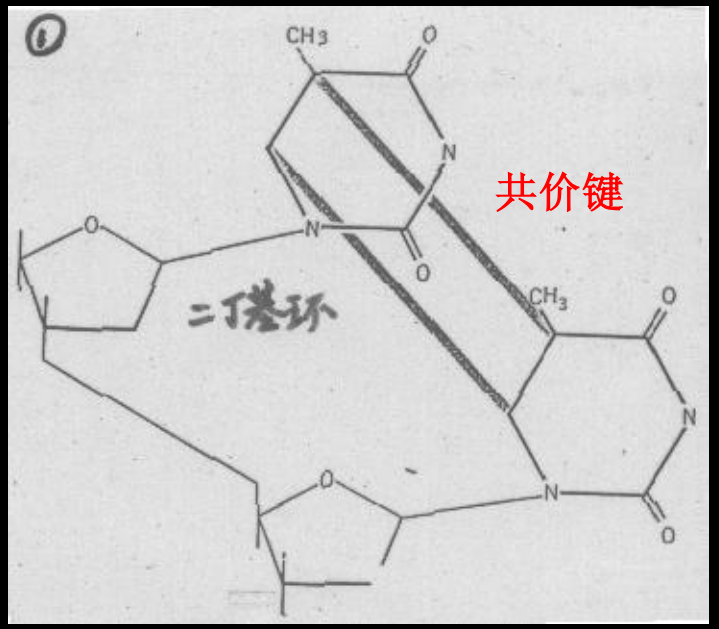
射线

(来源：不详)

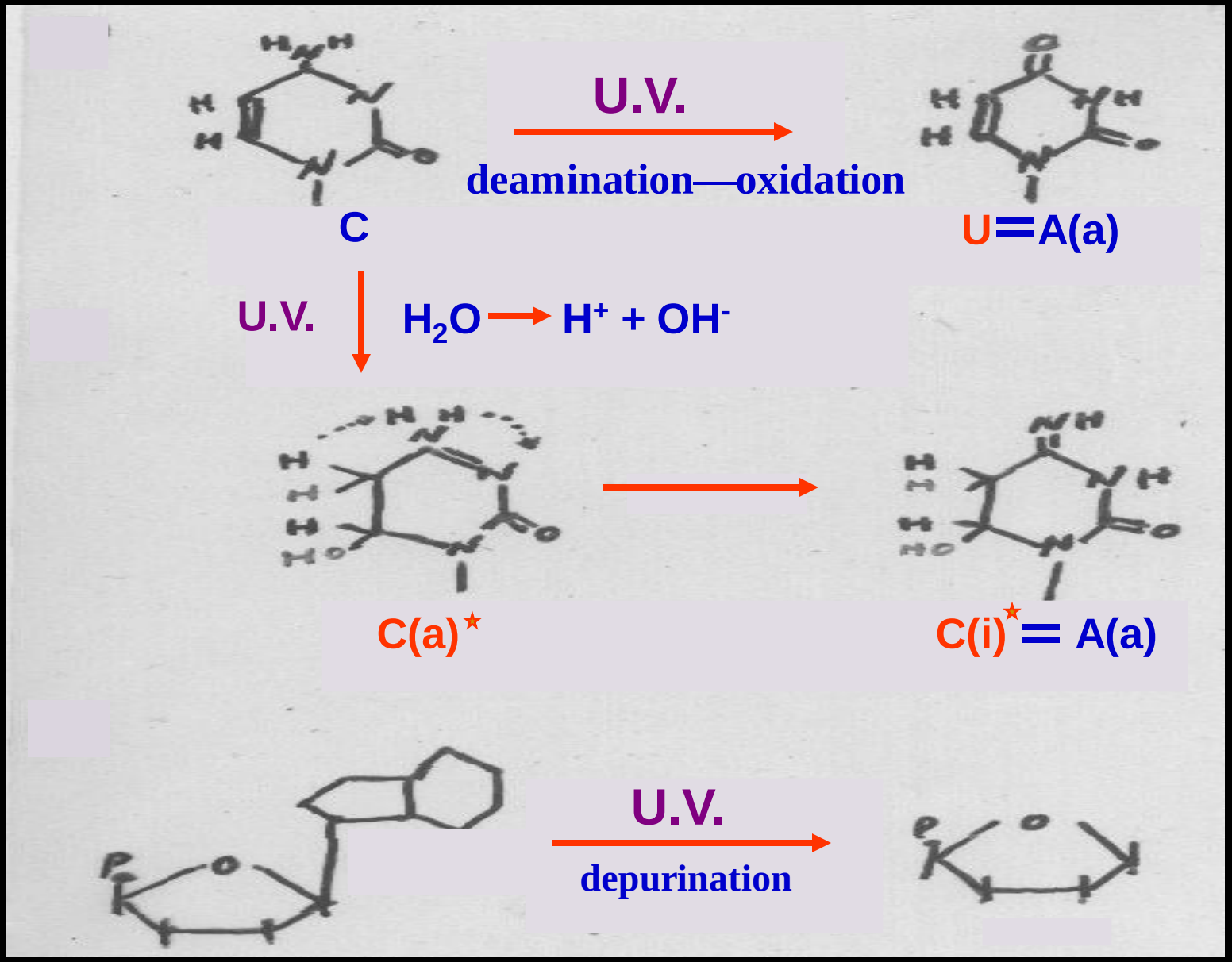
b) 非电离辐射—Ultra Violet light (U.V)

---pyrimidine dimer (TT dimer)is generated by covalent links between adjacent TT

…C T T A… —U.V.→



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第309页)



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第309页)

遗传多型性的概念

（genetic polymorphism / hetergeneity）

Allele (结构基因，DNA区域…)

Multiple alleles

Allele in DNA

Point mutation **inversion**

deletion **insertion**

Repetitive copies……

Testing allele in DNA electrophoresis pattern

1980 Botstein 限制性片段长度的多型性

RFLP（Restrictin Fragment Length Polymorphism）

VNTR(various number of tandem repeats)

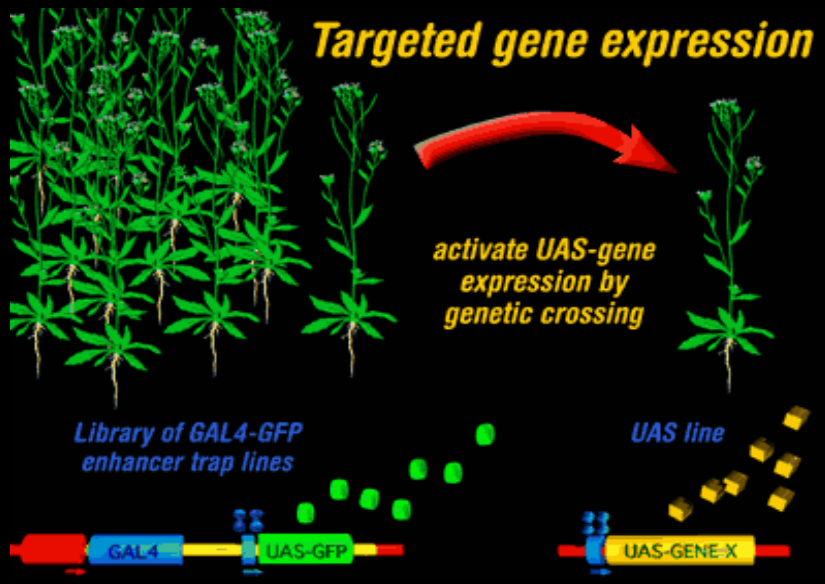
1985 K.B.Mullis 基于聚合酶链式反应的多型性

PCR-based polymorphism

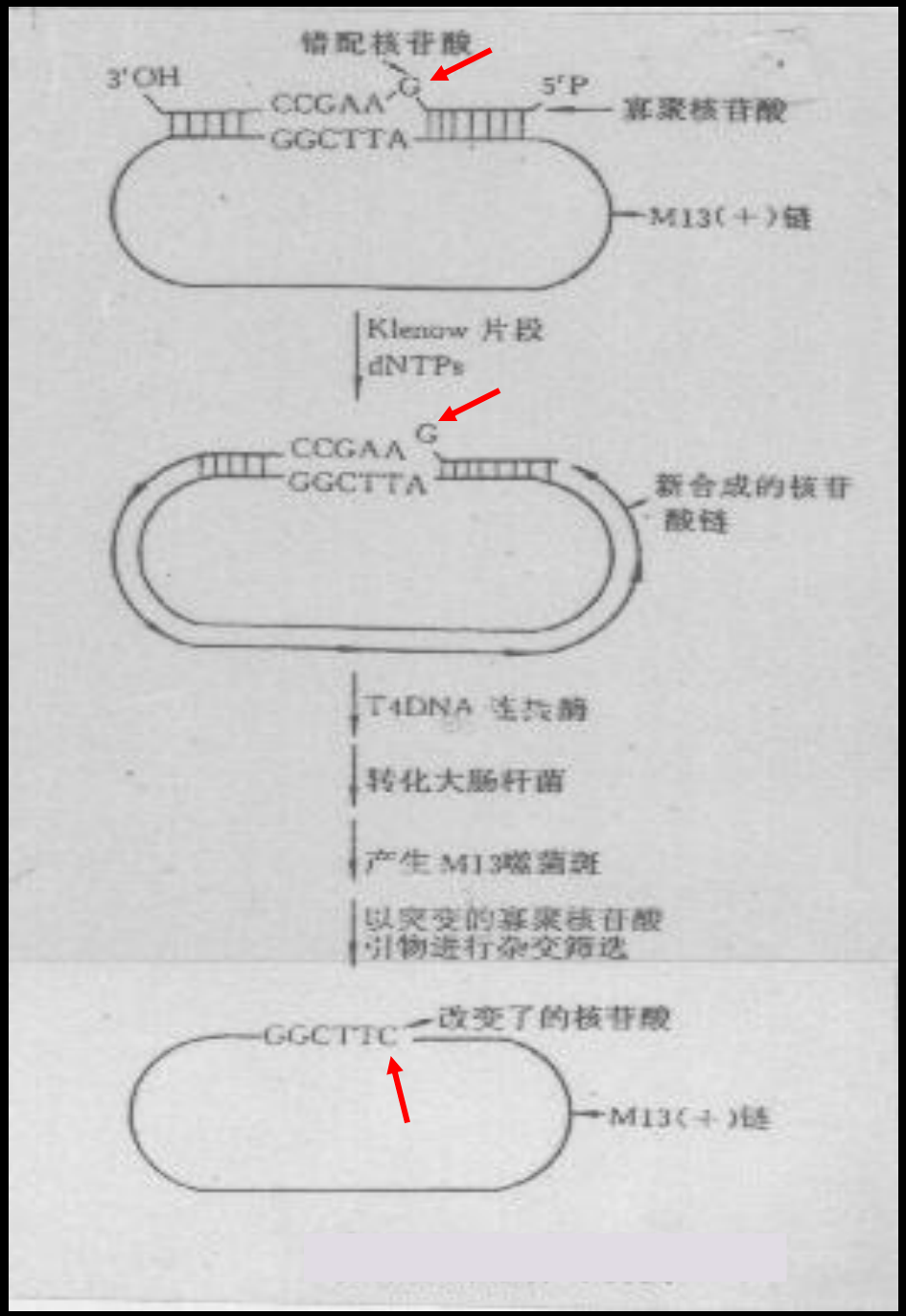
1996 E.Lander单核苷酸多型性

SNP(single nucleotide polymorphism)

7.2.2.
生物技术
定点诱变



(来源：不详)



基因的定点诱变

- **oligo-dNt 介导的定点诱变**

合成与目标基因某区段互补

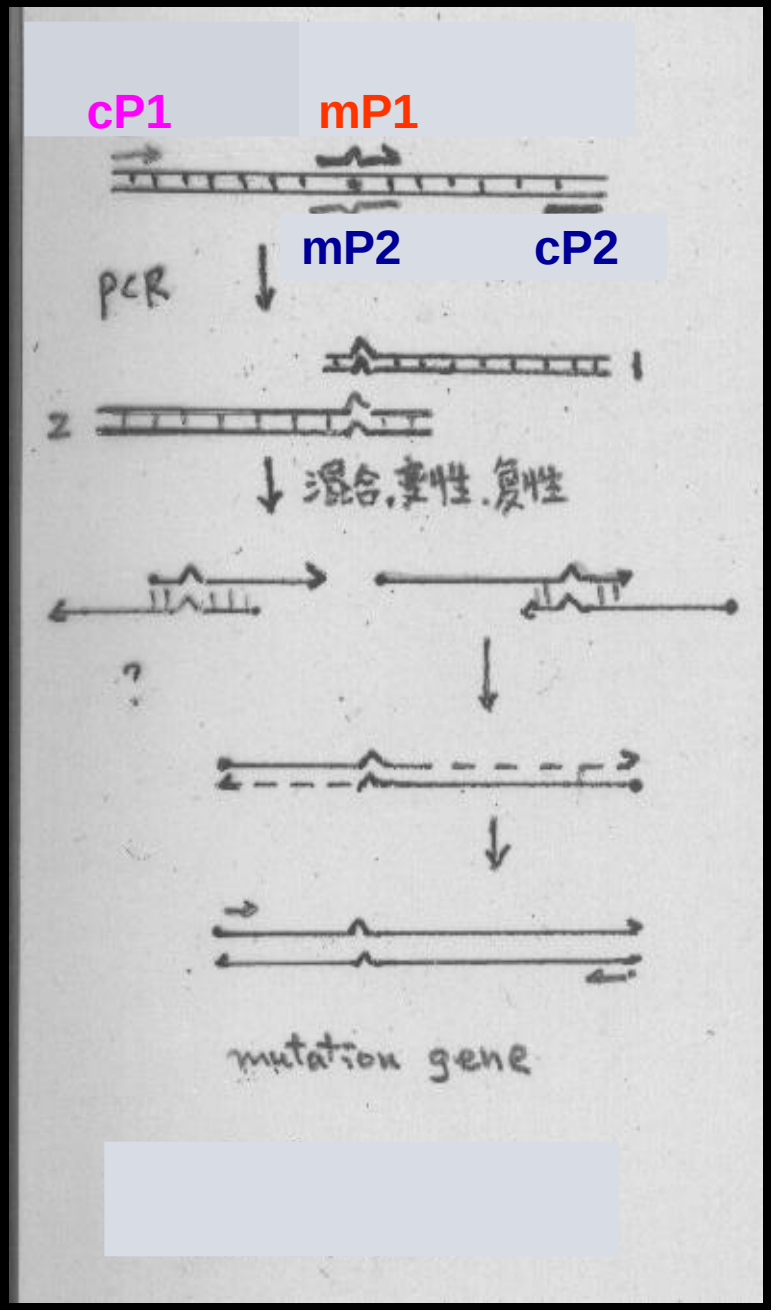
并含突变 位点的**oligo-dNt**

错配位点不能在3‘-end

renaturation

replication two times

(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第314页)



• 引物重叠延伸的PCR诱变

设计两突变引物（**mut.P1** & **mut.P2**）

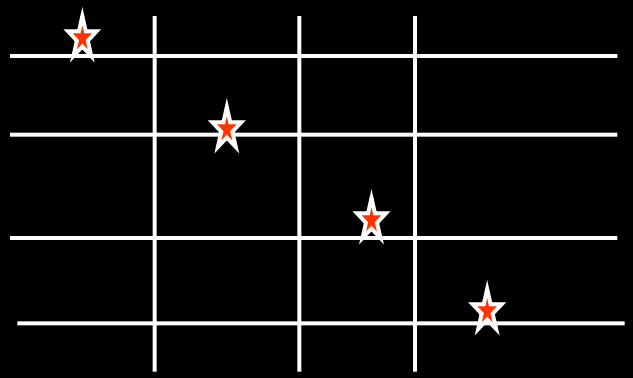
两通用引物（**common P1** & **common P2**）

第一次两种PCR产物混合，变性，复性

其中一对双链分子不能进行第二次PCR

另一对双链分子的PCR产物为诱变基因

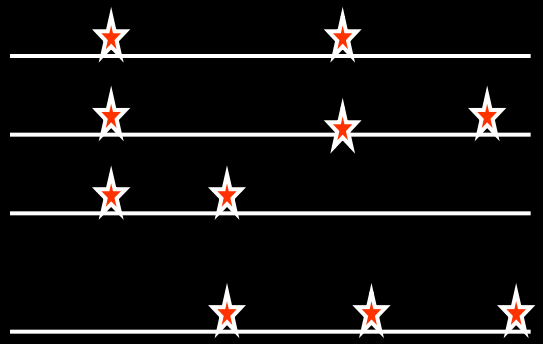
DNA shuffling 技术的基因诱变



Mutants.

Digestion

ligation



transformation

selection

插入突变体库的构建

具有标签的植物突变体

转座子介导的突变体库的构建

↓

定向选择

表型鉴定＋AIMS…

Ti质粒介导的突变体库的构建

↓

定向选择

表型鉴定 ＋ gfp…

T-DNA-mediated Gene trap

- 是经过改造的质粒、转座子载体插入到基因组中使被插入位点正常基因功能丧失，通过载体携带的报告基因的表达及载体的保守序列识别插入位点并分离基因。

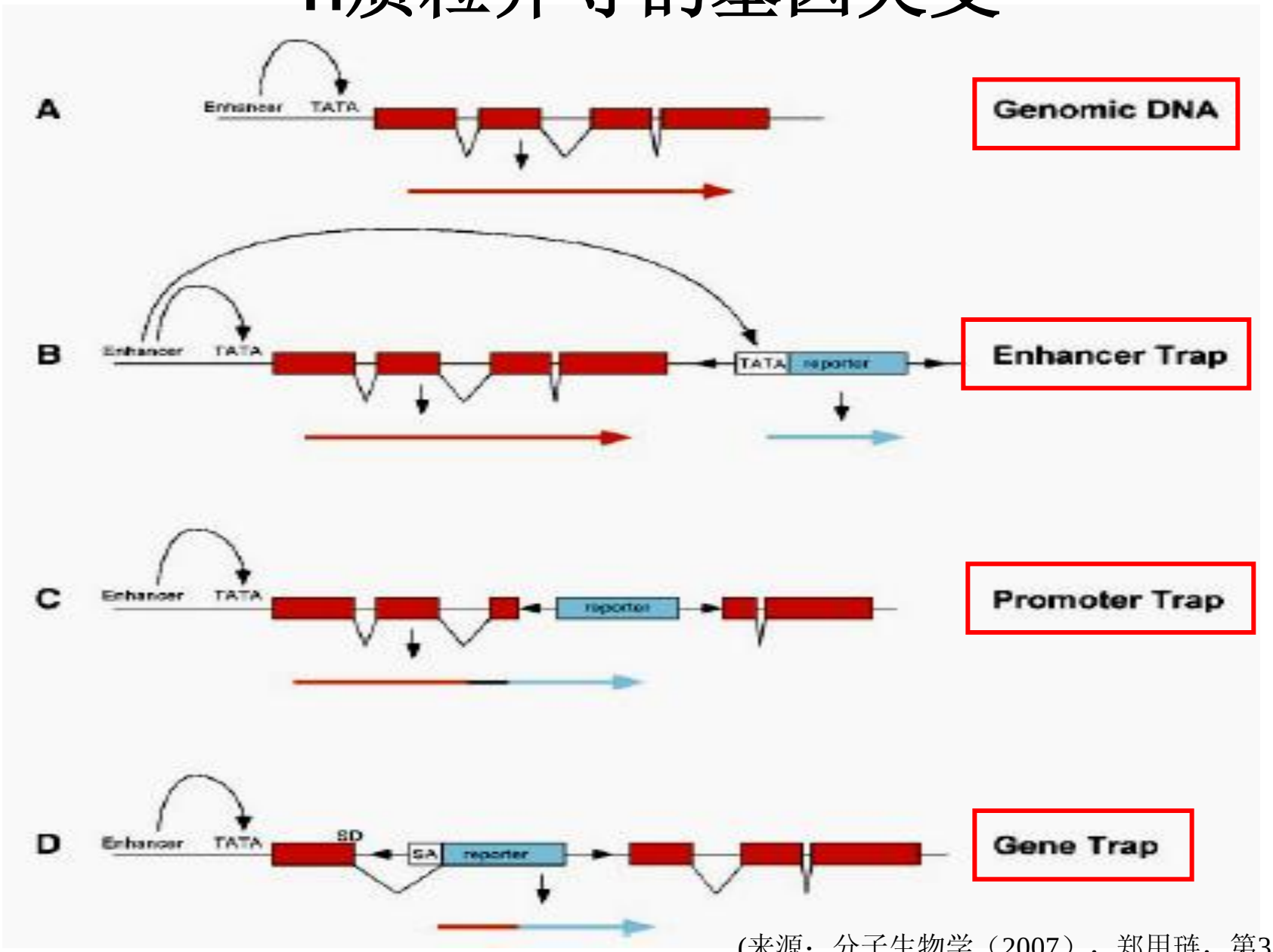
- 根据结构和表现“陷阱效应”的插入位点：

增强子陷阱（enhancer trap）

启动子陷阱 (promoter trap)

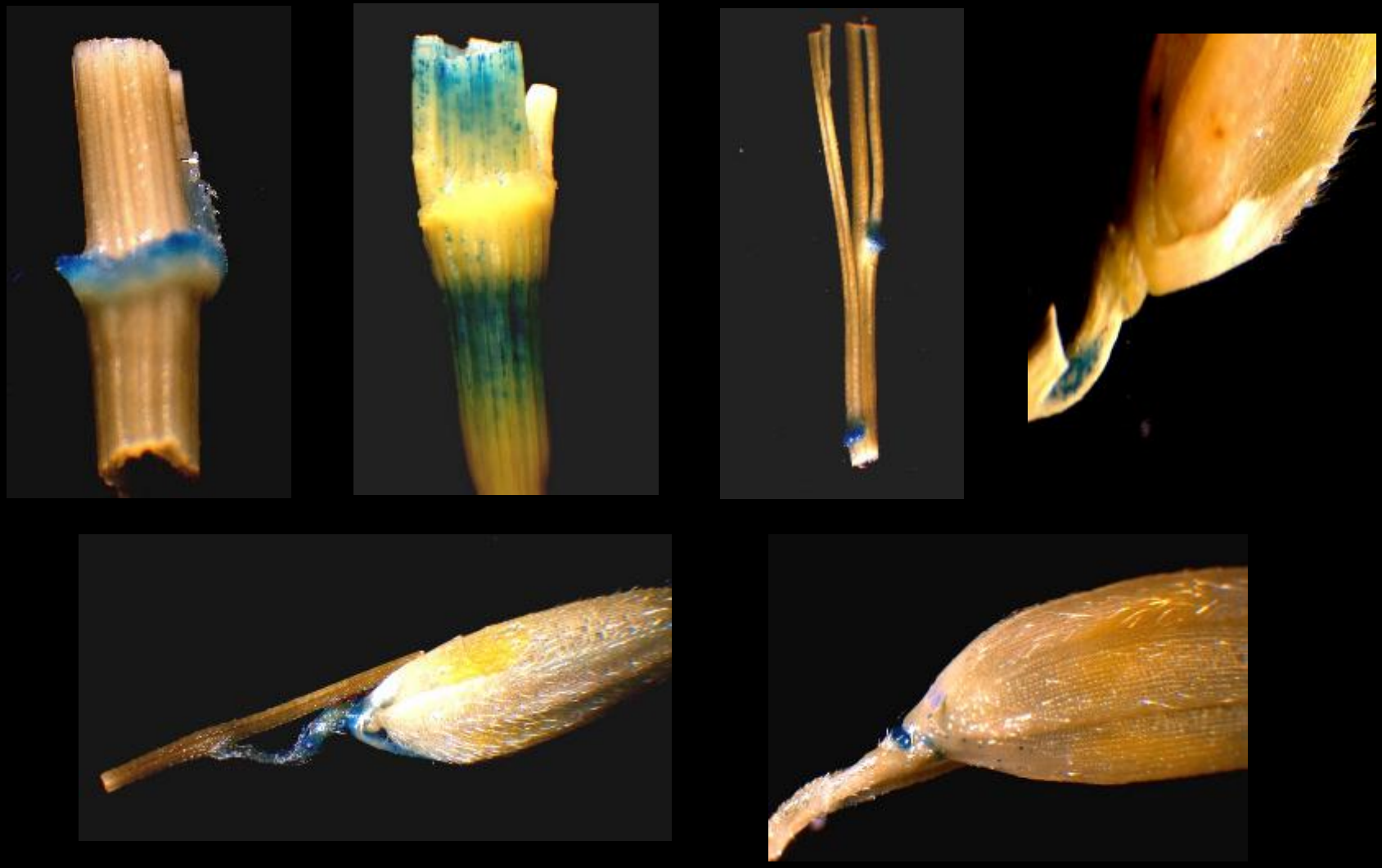
基因陷阱（gene trap）

Ti质粒介导的基因突变



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第318页)

GUS assay in rice flower organs (I)



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第319页)

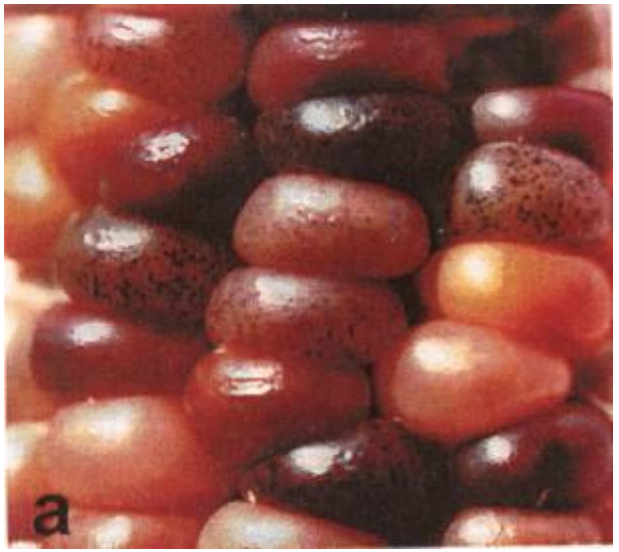
GUS assay in rice flower organs (II)

(来源：不详)

Mutant Information:

Result: 01S0454-07

BZ2 × Mu Activator



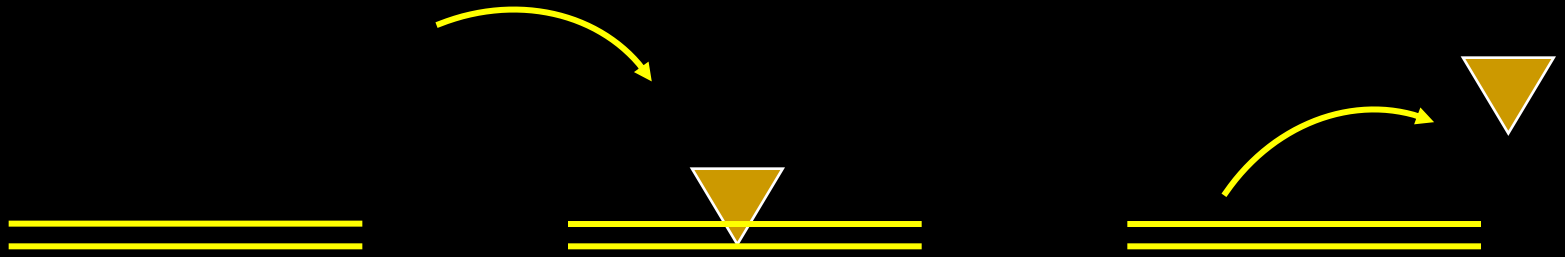
Bz2

(来源：不详)

Bz

bz

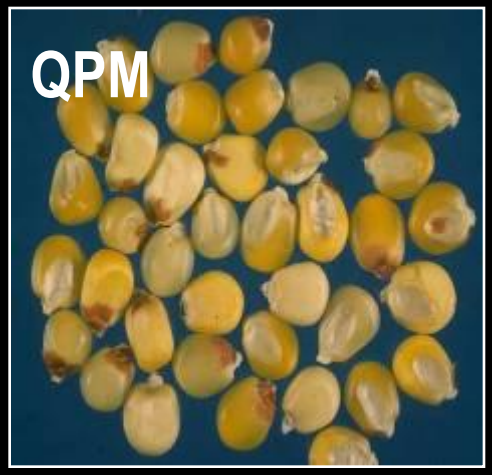
bz-m



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第81页)


大型Mu插入突变体库

(来源：不详)

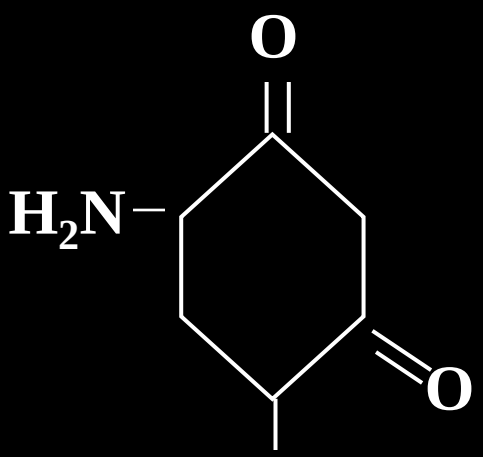


(来源：不详)

7.2.3. 化学诱变

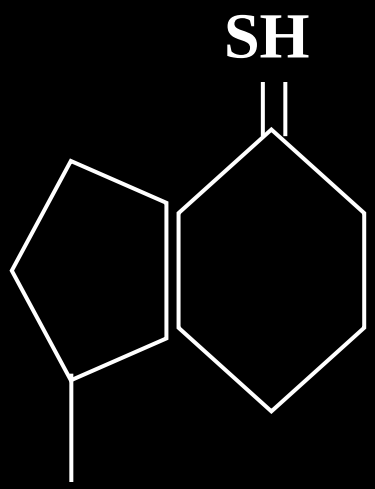
a) 干扰碱基合成的化学诱变剂

5-Amino Uracil



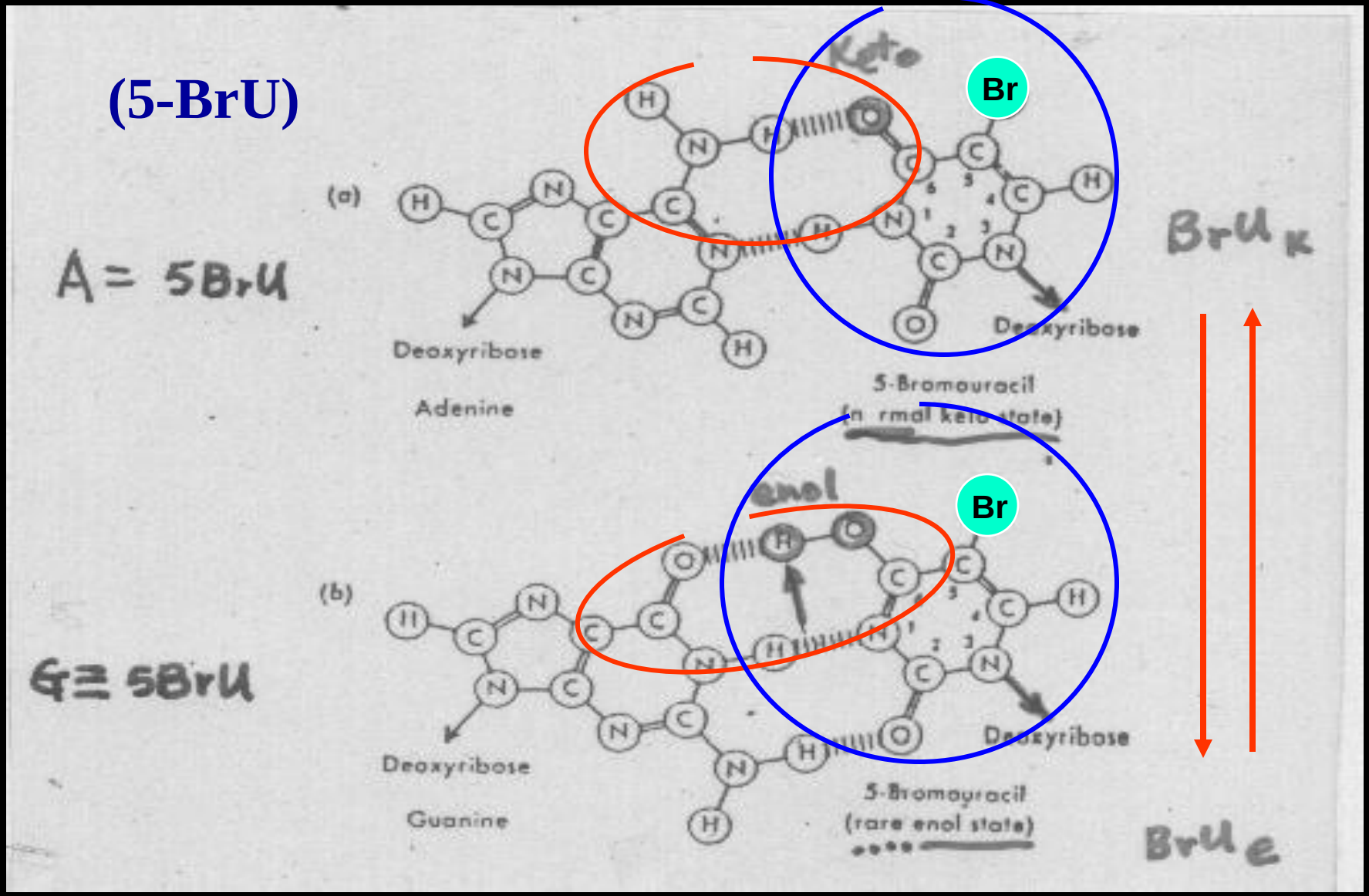
干扰嘧啶合成

6-Mercalto purine

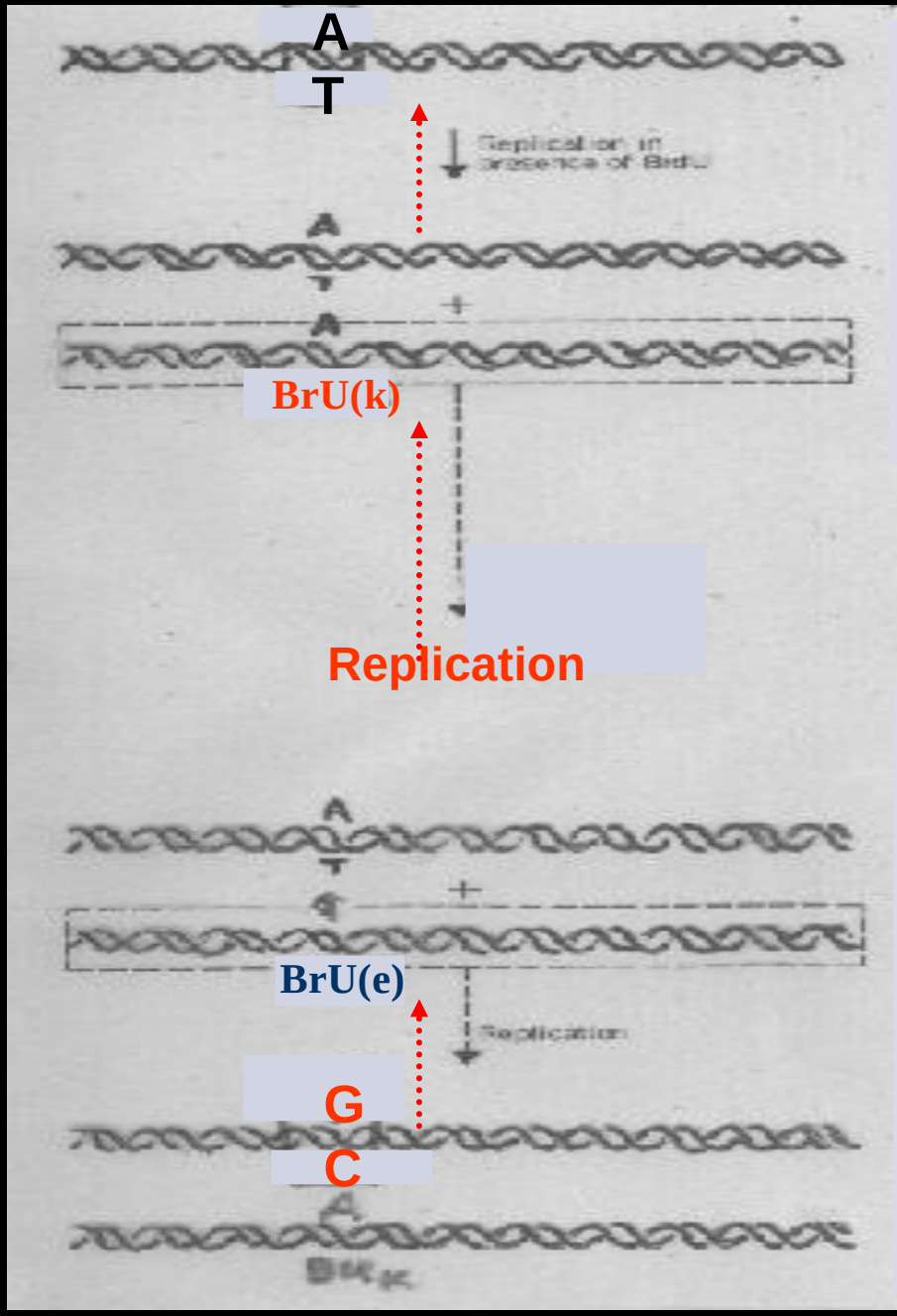


干扰嘌呤合成

b) base anologs leads base mispairing

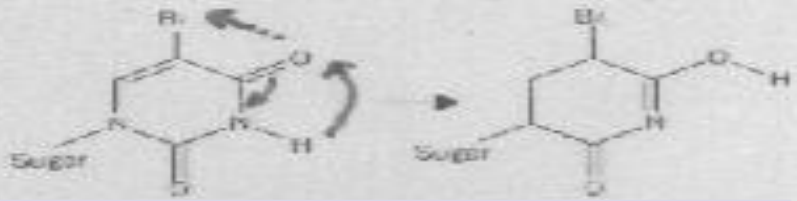


(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第309页)



replication error

A/T ➡ G/C



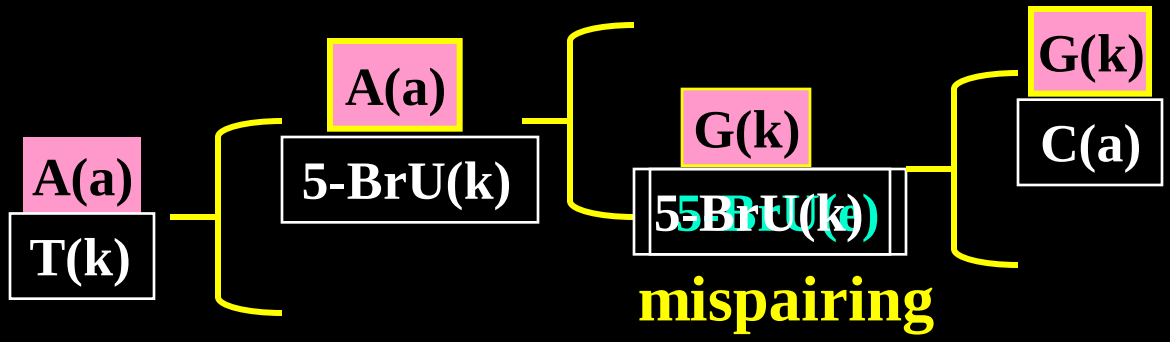
5-BrU(k) ⇌ 5-BrU(e)

incorporation error

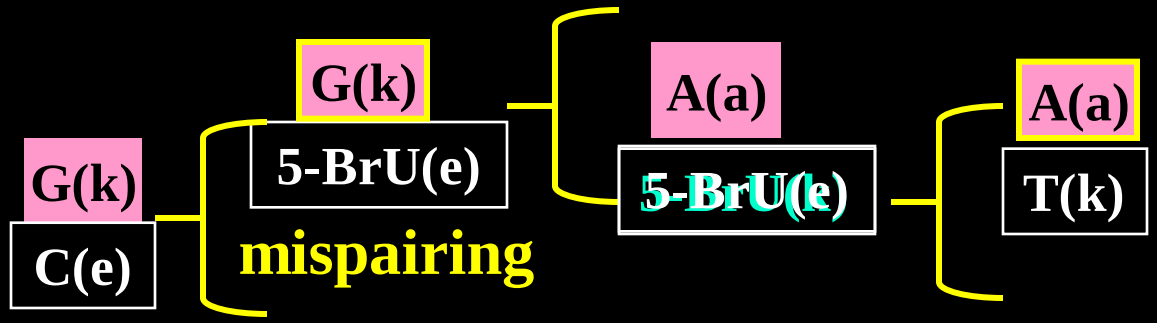
G/C ➡ A/T

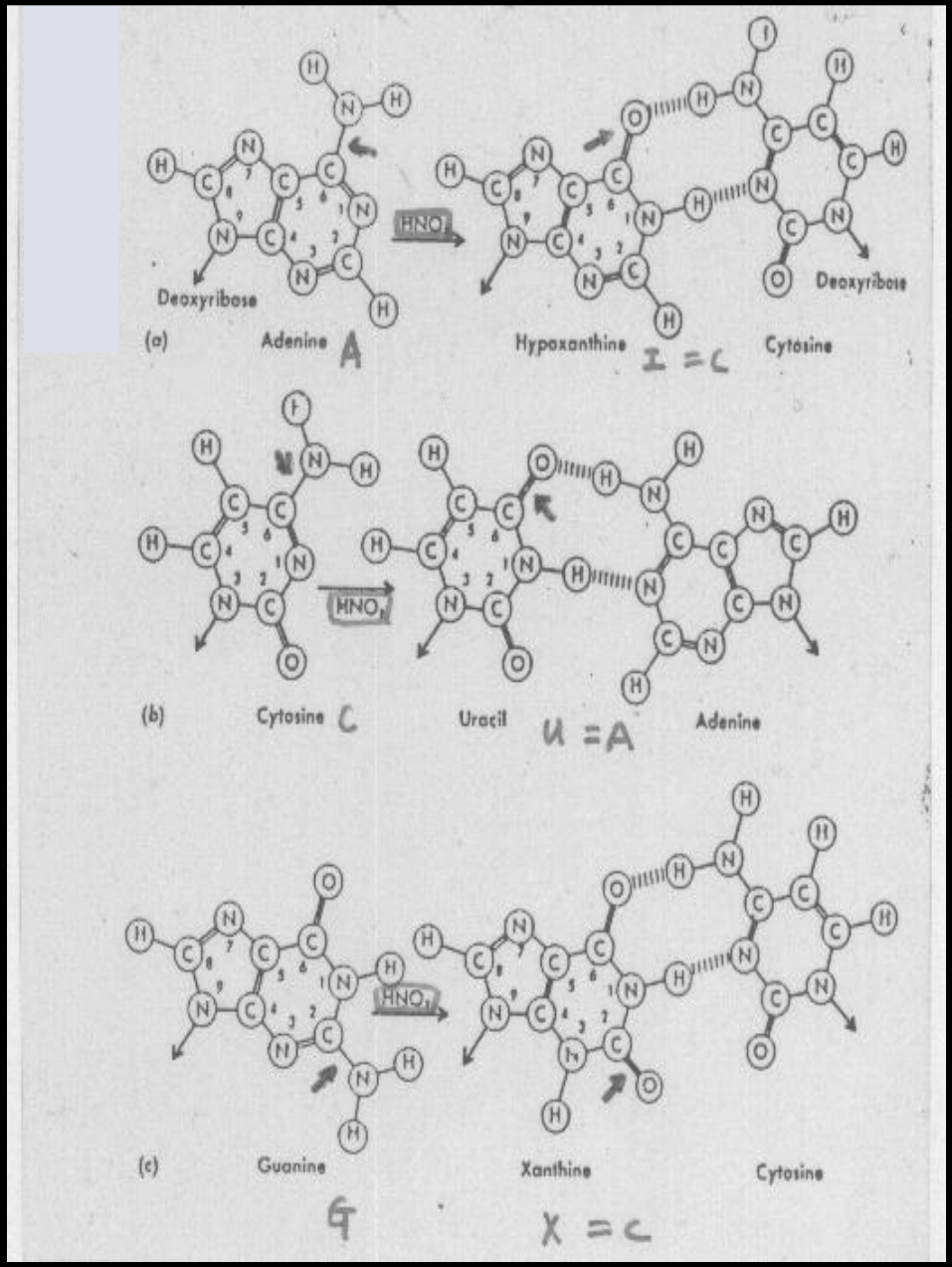
(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第311页)

Replication error



Incorporation error





c) Base modifying chemical mutagen

HNO_2 (Nitrous acid NA)

A
C
G

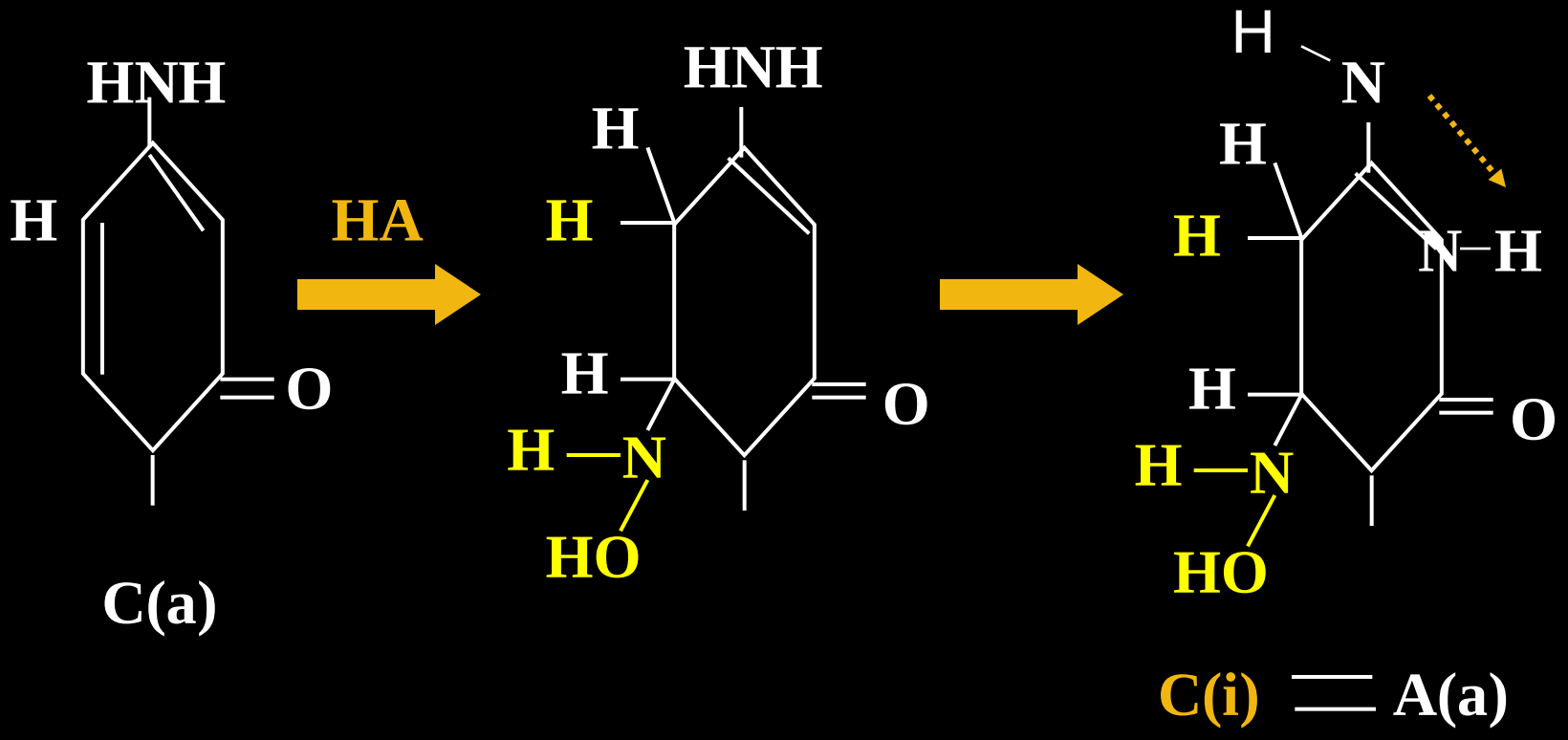
HNO_2 deamination

Inosine = C
Uracil = A
Xanthine = C

(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第312页)

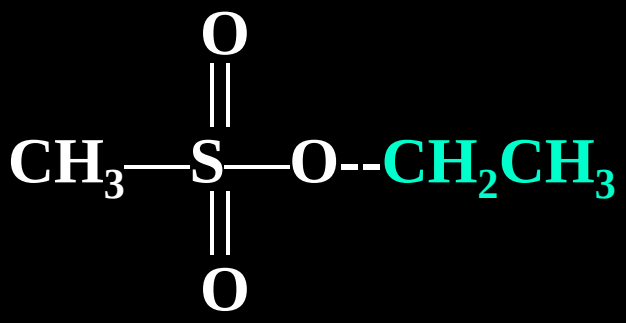
Base modifying chemical mutagen

NH_2OH (Hydroxylamine HA 羟胺)

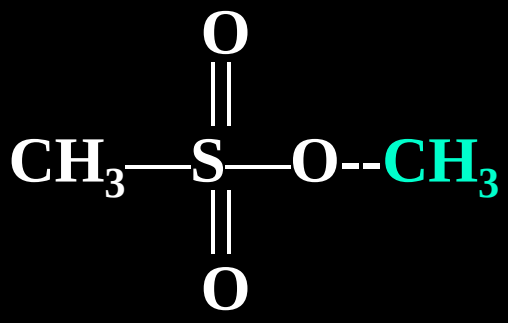


d) Alkylation agent mutagens

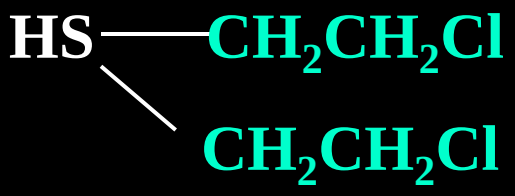
EMS (Ethyl methane sulfonate)



MMS



SM (Sulfur Mustards gas 硫芥子气)



e) Mutagen—insertion--framshift

AO (Acridine Orange)
EB (Ethidium Bromide)

扁平分子

分子插入

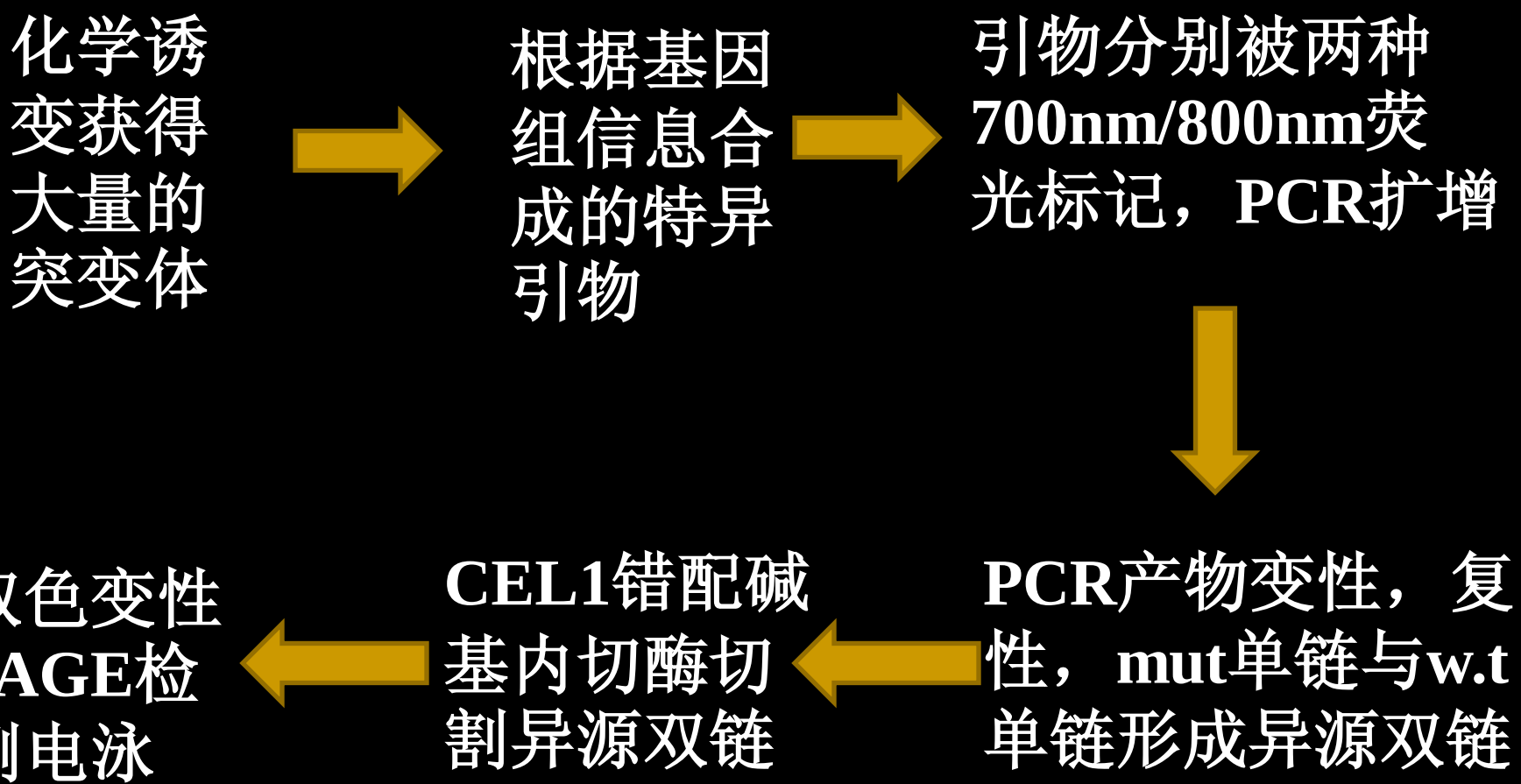
Targeting Induced Local Lesions In Genome

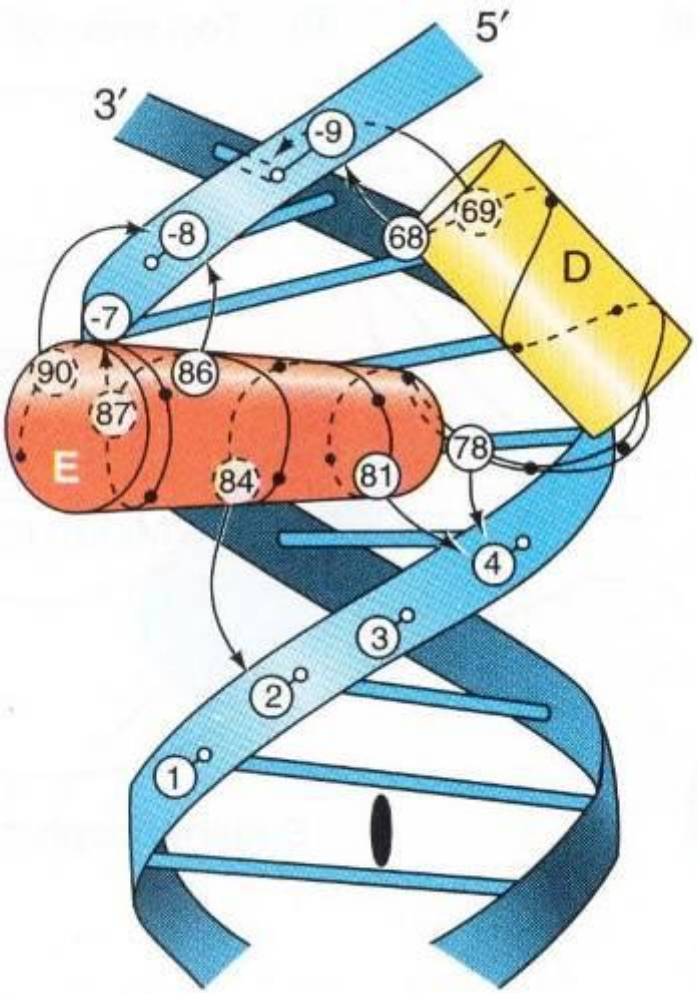
TILLING
靶向诱导基因组局部突变

突变型鉴定为主的正向遗传学研究

→ 定向筛选突变基因为主的反响遗传学研究

基本技术：


化学诱变获得大量的突变体
根据基因组信息合成的特异引物
引物分别被两种700nm/800nm荧光标记，PCR扩增
PCR产物变性，复性，mut单链与w.t单链形成异源双链
CEL1错配碱基内切酶切割异源双链
双色变性PAGE检测电泳



7.3. 保证遗传稳定的机制

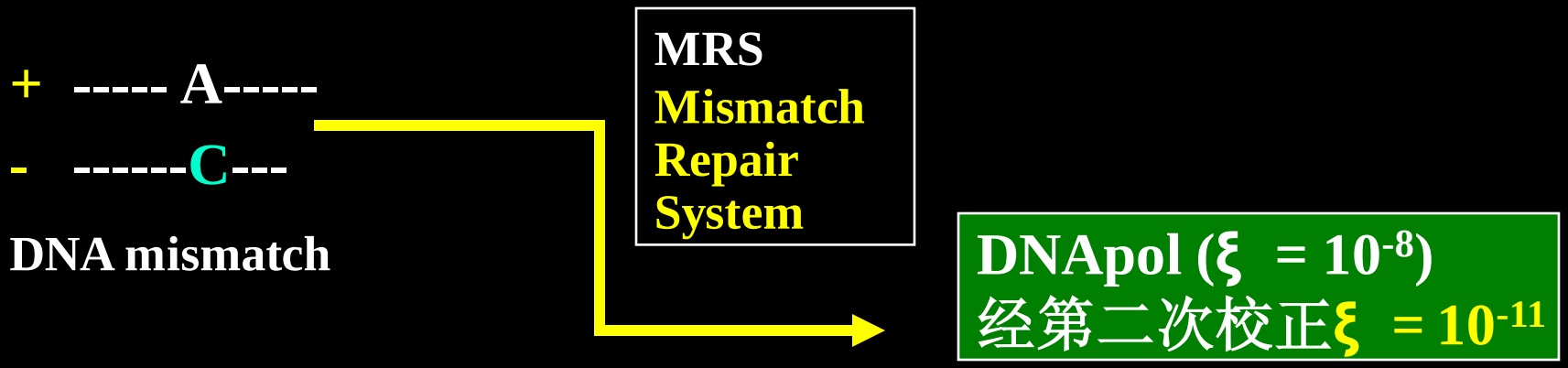
(来源：不详)

复制过程中的错配修复　　DNA的损伤修复

基因的回复突变　　密码的简并

致死突变　　多倍体……

7.3.1. 复制过程中的错配修复机制 ($\xi = 10^{-11}$)



7.3.1.1. Mismatch repair system

DNA polymerase

ligase

dam gene → m^6A甲基化酶

MCE (mismatch correct enzyme)

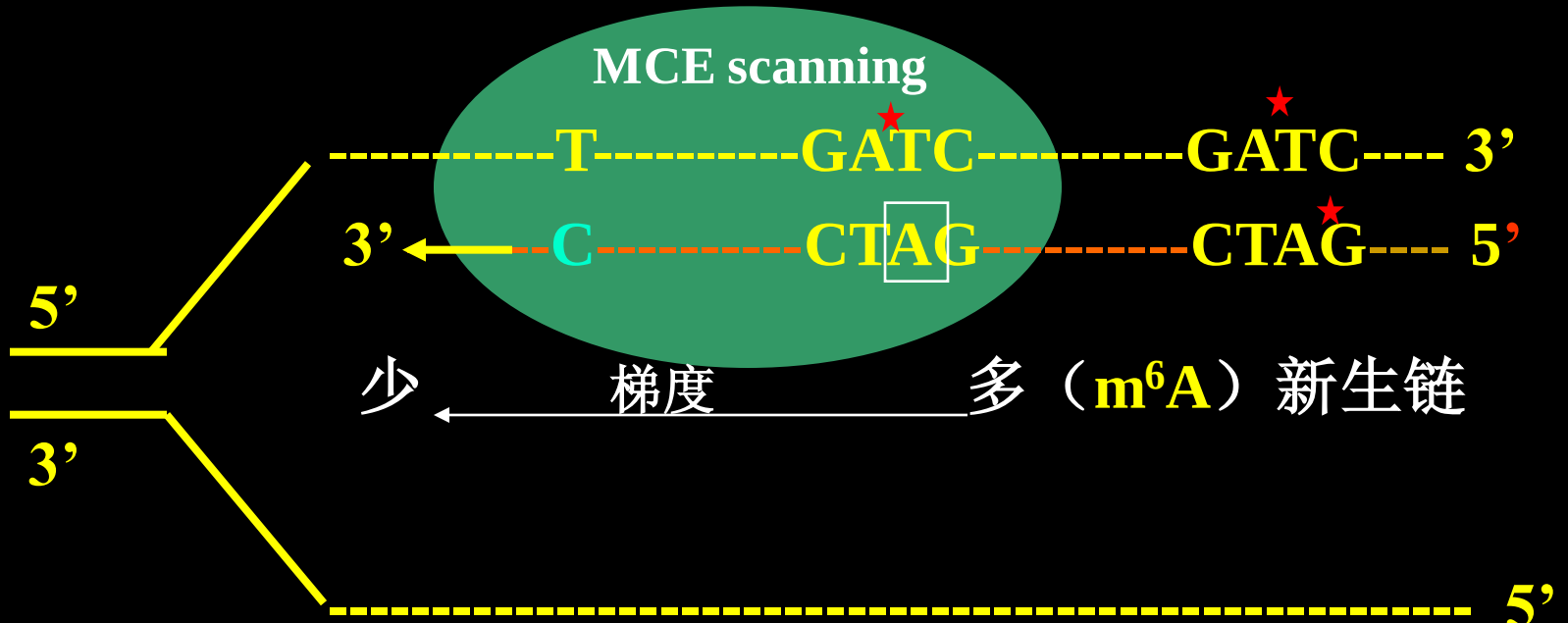
3 subunits mutH, L, S

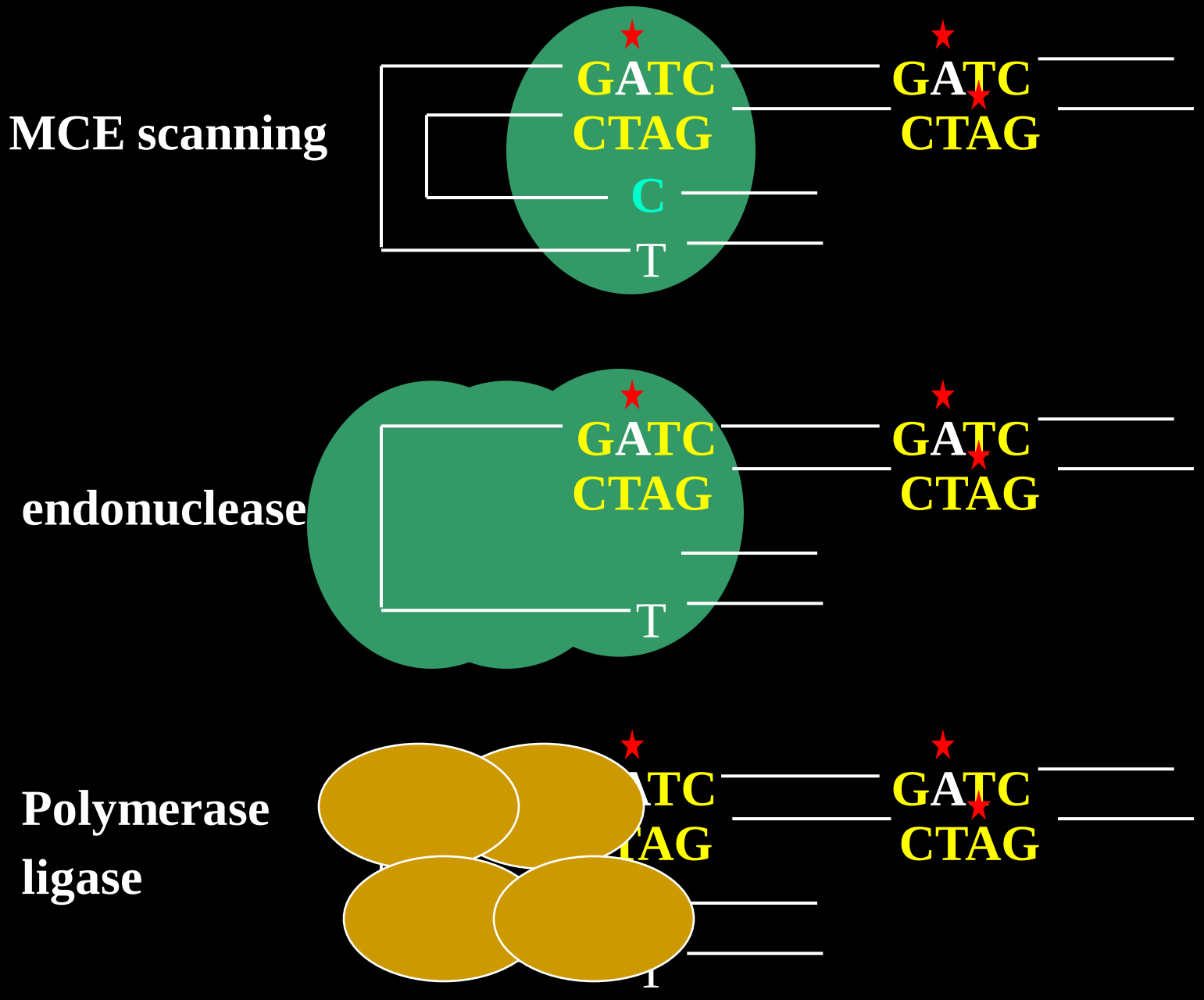
- 识别新生链中非m^6A的GATC序列
- Scanning 新生链中错配碱基
- 酶切含错配碱基的新生DNA区段

DNA中的GATC(palindromic seq.)

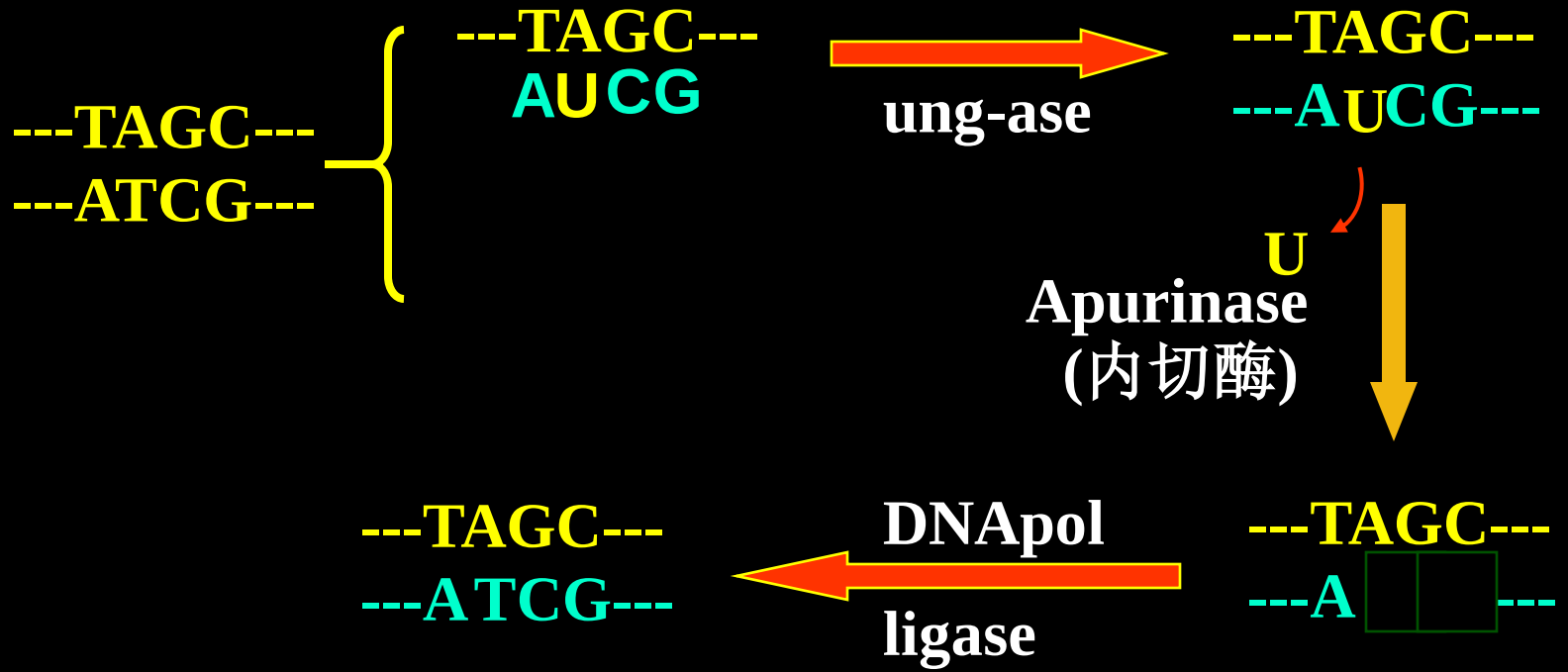
为m^6A甲基化敏感位点

平均每2kb左右有一GATC seq.




MCE scanning
GATC
CTAG
C
T
GATC
CTAG
endonuclease
GATC
CTAG
T
GATC
CTAG
Polymerase
ligase
GATC
CTAG
T
GATC
CTAG

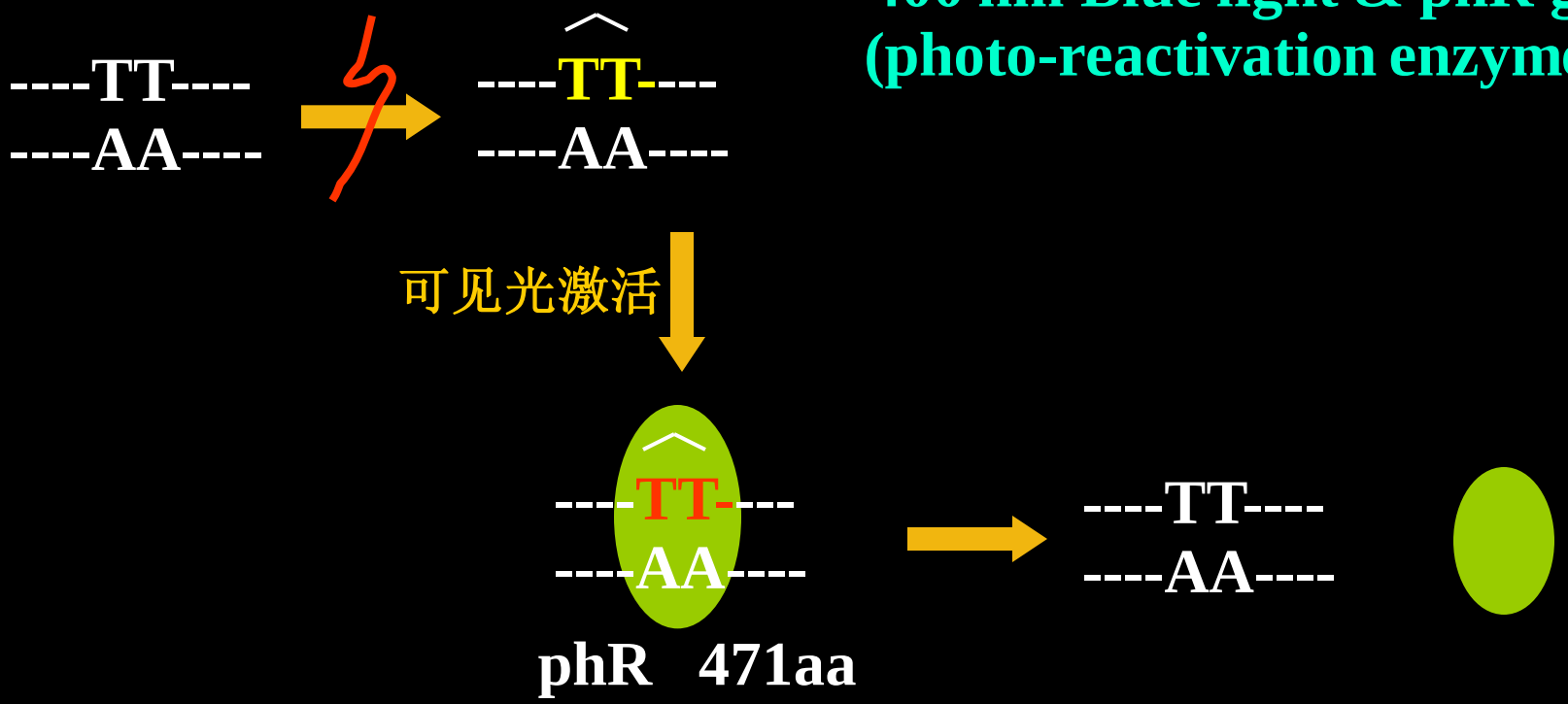
7.3.1.2. ung system (尿嘧啶-N-糖苷酶系统)



7.3.2. DNA的损伤修复

7.3.2.1. photo reactivation

- Before replication & Error-free
- 400 nm Blue light & phR gene (photo-reactivation enzyme)



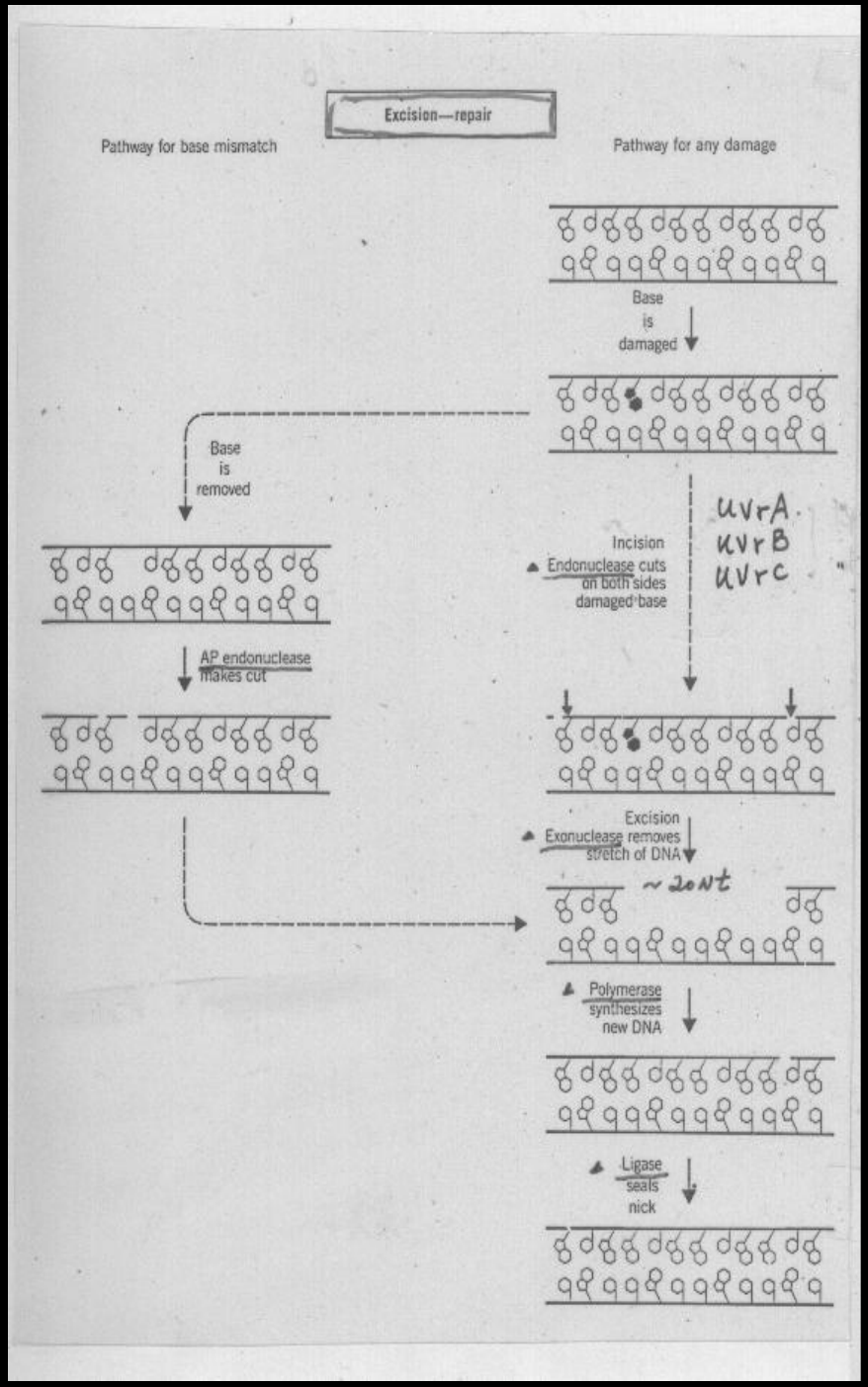
7.3.2.2.

Exision—Repair

- Before Replication
- Error-free
- UvrA, B, C gene

  Endonucleases

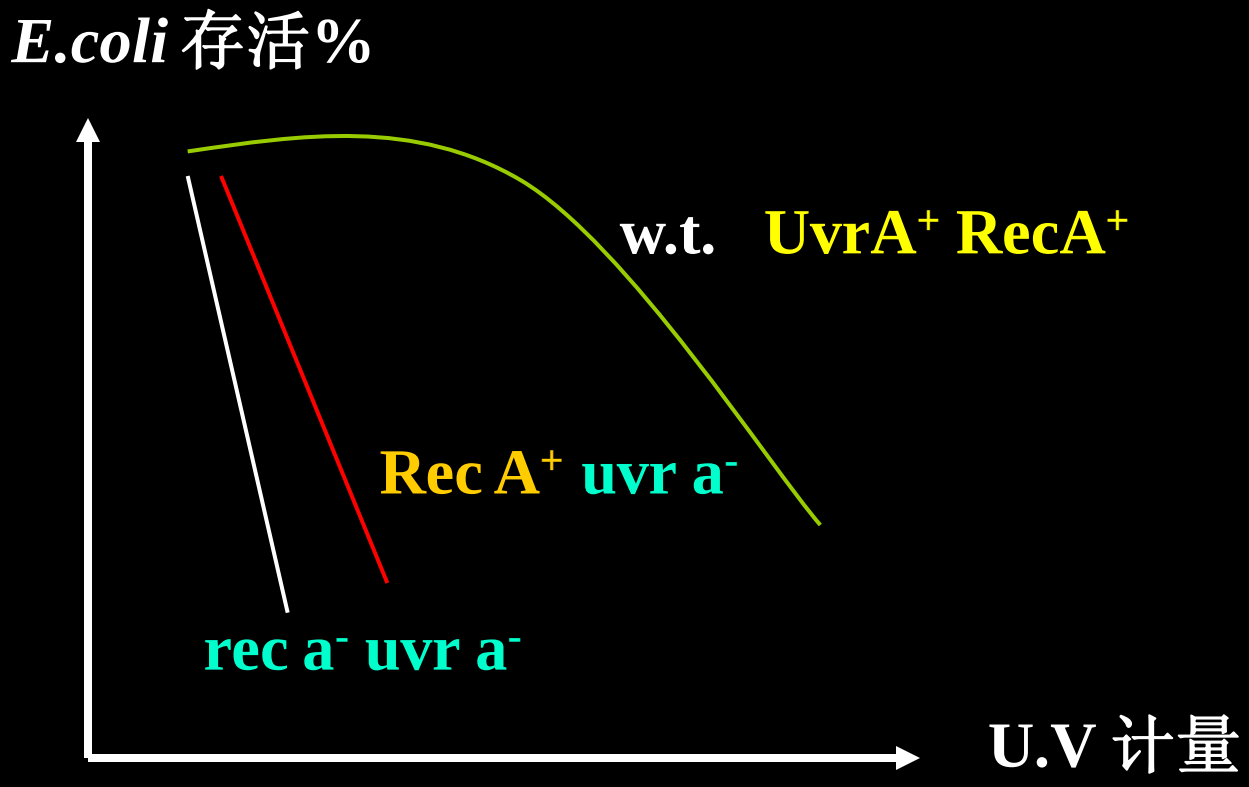
  Exonuclease
- DNA pol
- Ligase



切补修复

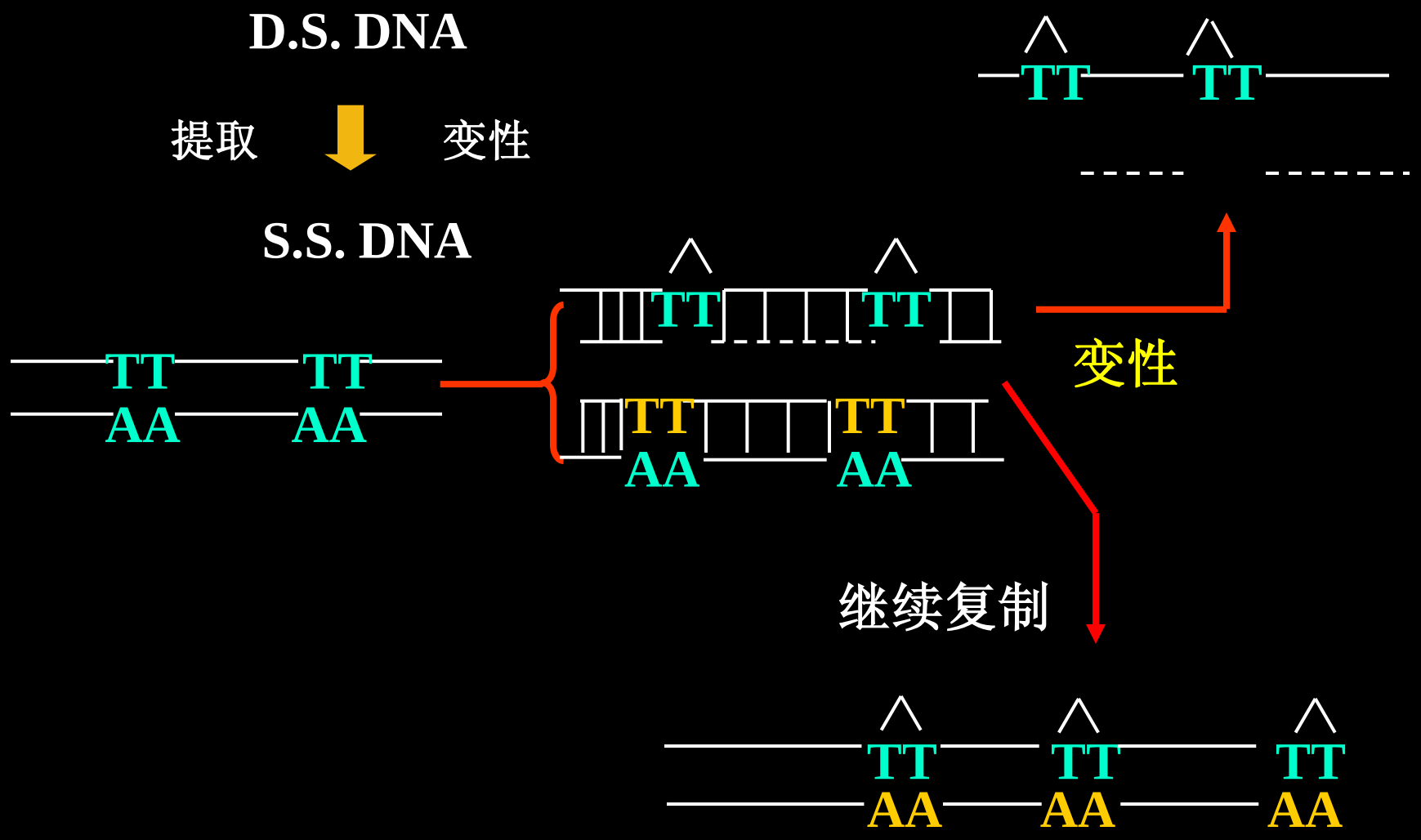
(来源：不详)

7.3.2.3. Recombinative—Repair



Rec-A. gene 以某种方式参与DNA损伤修复

Replication is forced to skip past TT dimer gap left in newly strand



E.coli k12

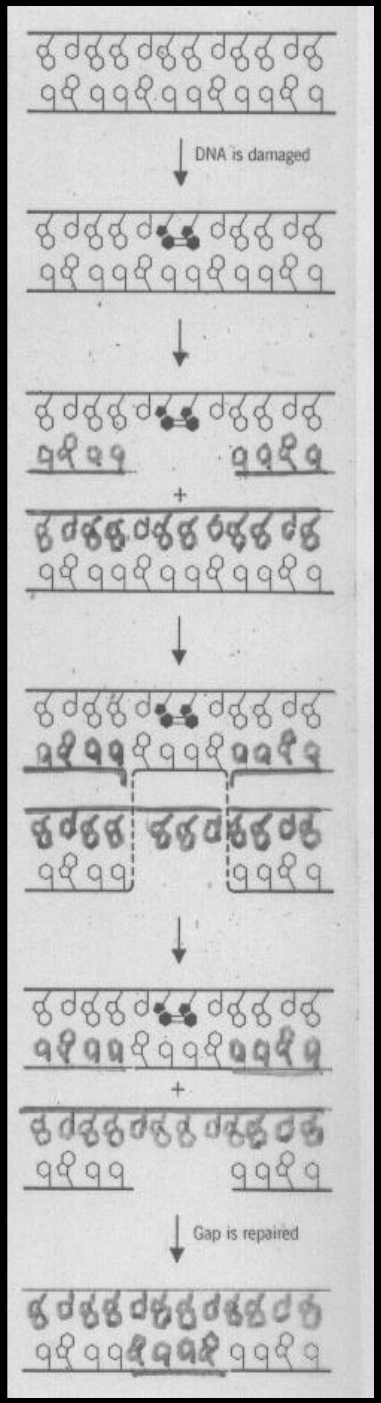
Genotype	(尔格/mm^2)★	TT数量/10^7 bp^
w.t.	500	3200
uvr-a/Rec-A	8	50
Uvr-A/rec-a	3	20
uvr-a/rec-a	0.2	1.3

★ 存活率为对照37%的U.V.计量

- 存在与重组有关的暗修复机制
- 与Rec-A基因引起的strand transfer有关
- TT dimer未被修复，仅表现在后代群体中TT dimer浓度的稀释
- 链的非准确转移，导致突变机率的增加

Recombinative—Repair (strand transfer repair)

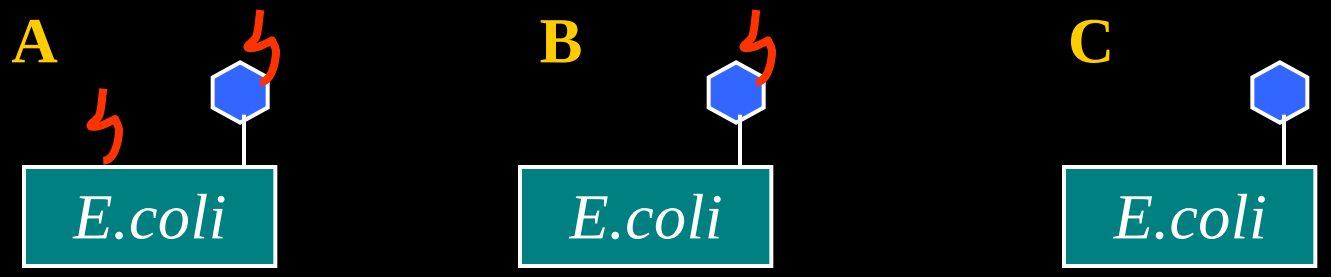
- After replication repair
- Error-prone
- RecA, DNA polymerae
- ligase genes be needed



(来源：不详)

7.3.2.4. SOS repair (U.V. reactivation or W reactivation)

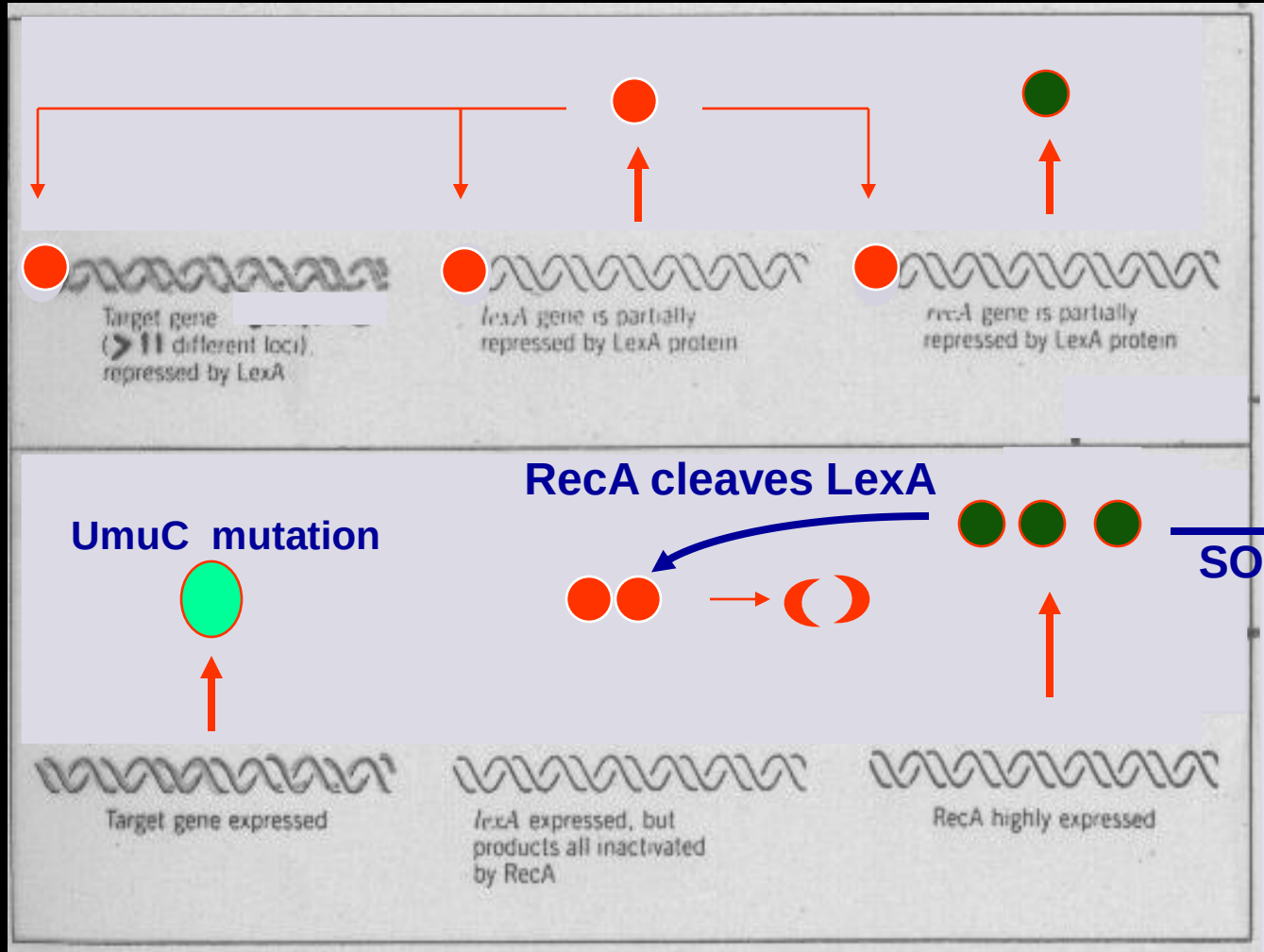
Jean Weigle



	A	B	C
λ	80	10	100
mut.	100%	50%	10%

- Damaged DNA of phage be repaired in *E.coli A*
- SOS repair in *E. coli* have to be induced by U.V. (A & B)
- High frequency mutation by SOS repair (Error-prone)

机制



---Before inducing. LexA-p —Neg. repression→ Rec-A,UmuC…11genes

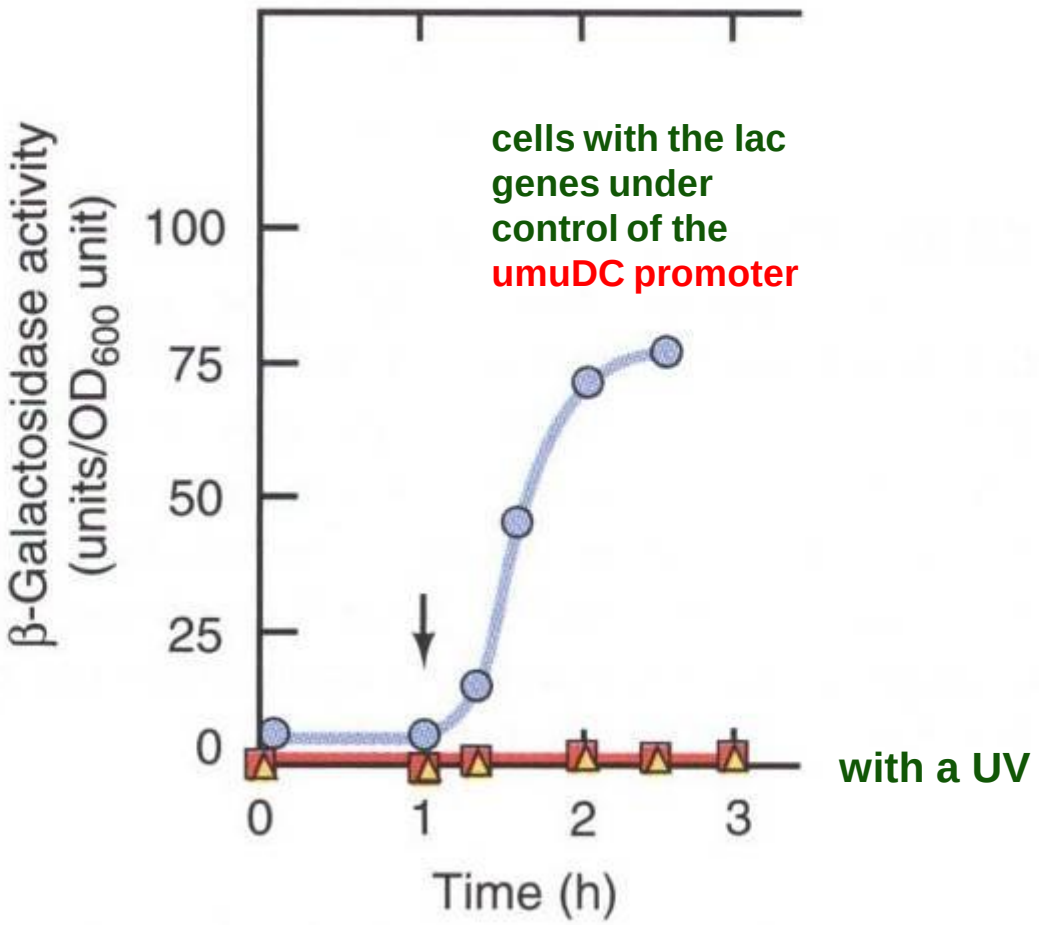
---U.V. → damage DNA → Signal (S.S. DNA tail or 5Nt S.S.DNA)

(来源：不详)

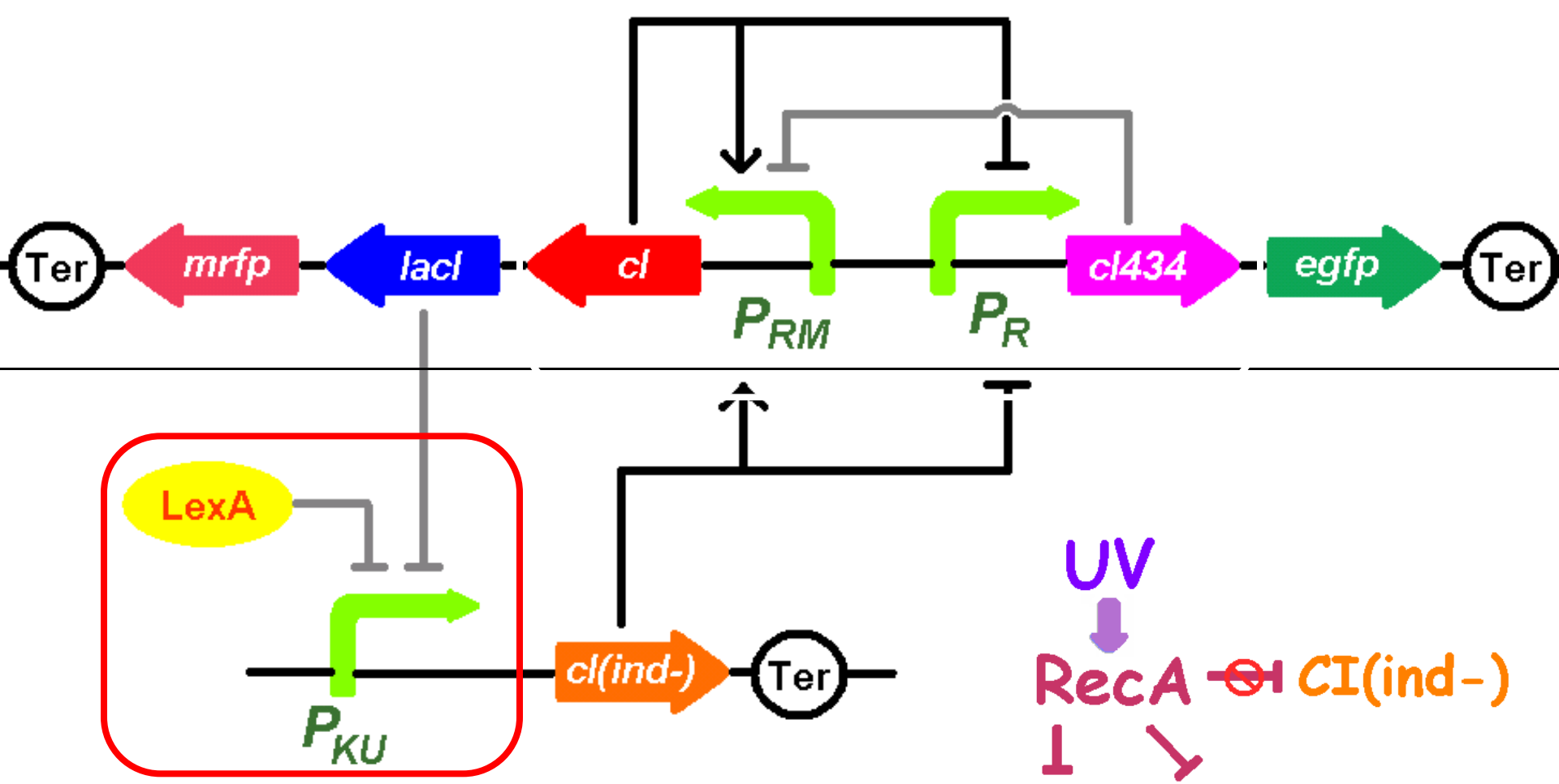
umuDC promoter is UV-inducible

with a UV of 10 J/m2.

measured the β-galactosidase activity

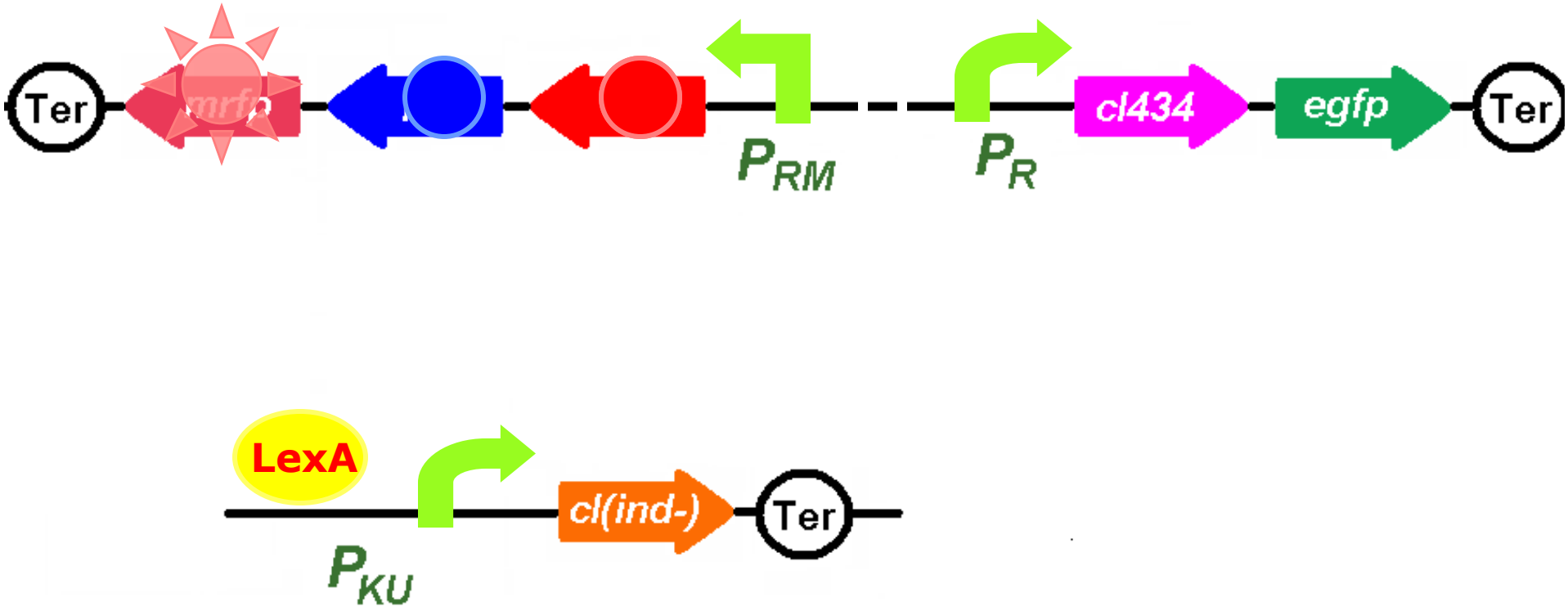


(Source:Bagg et al. P.N.A.S. 78:5751, 1981)

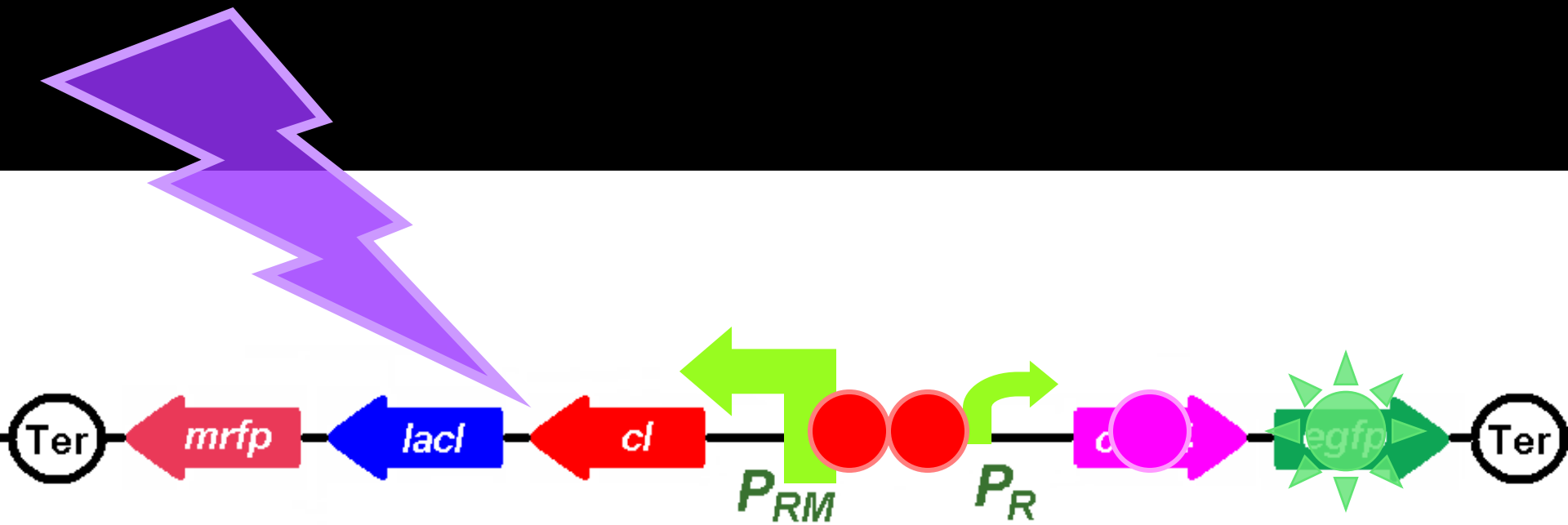

Ter
mrfp
lacI
cI
cI434
egfp
Ter
P_{RM}
P_R
LexA
P_{KU}
cI(ind-)
Ter
UV
RecA
CI(ind-)
LexA
CI, CI434
CRO-like

(来源：不详)

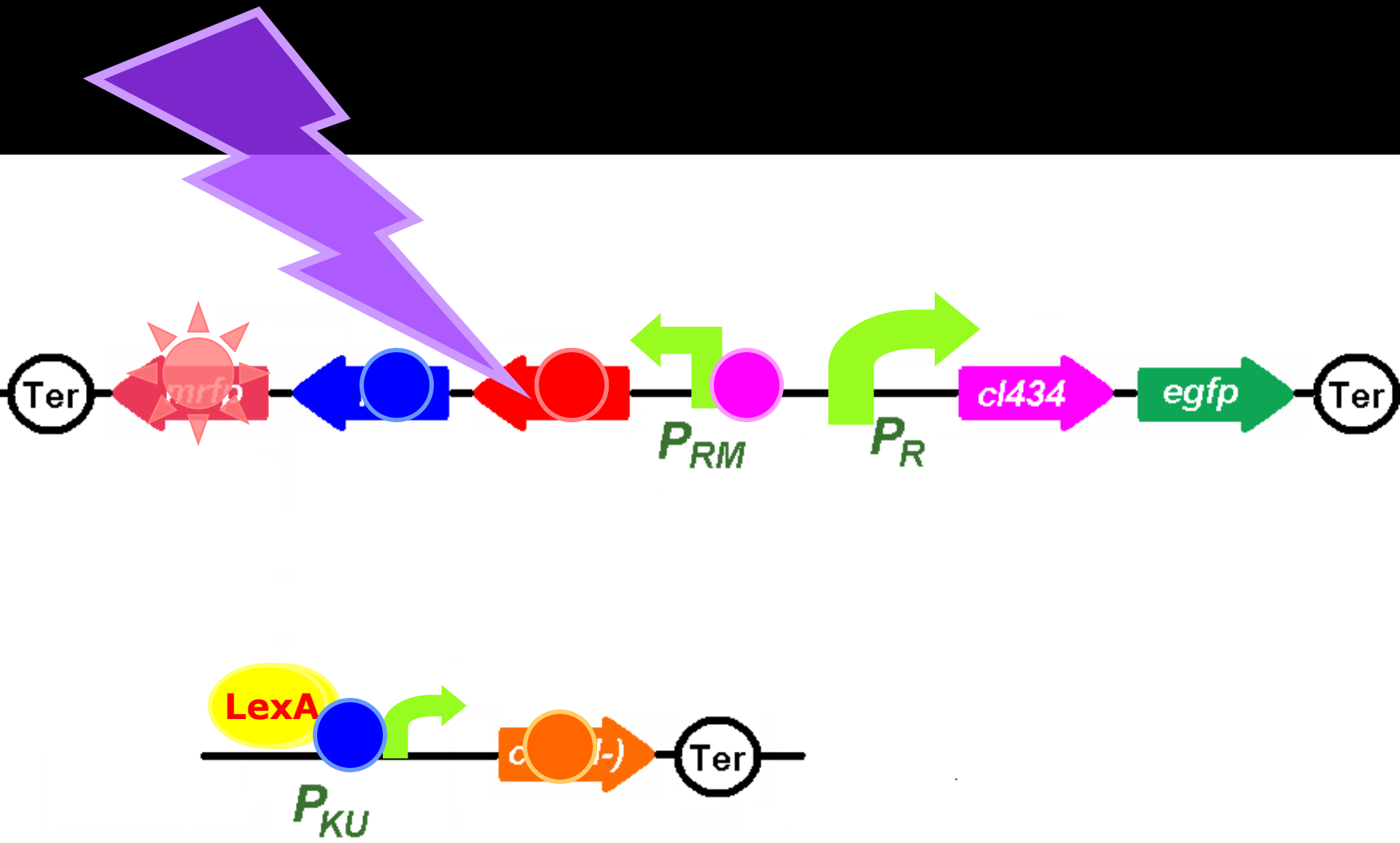
Dynamics



(来源：不详)



(来源：不详)



(来源：不详)

RecA-P; 三种功能

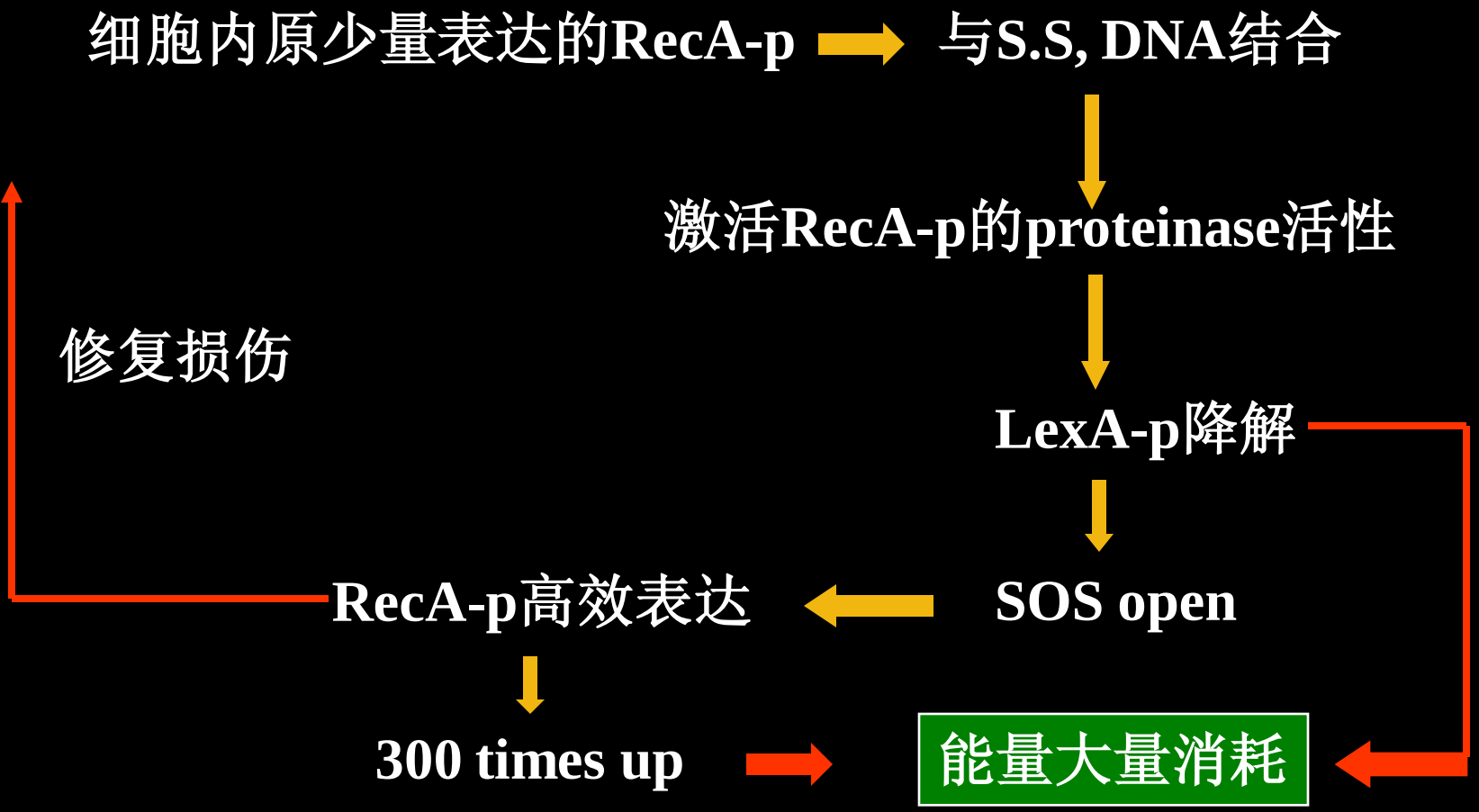
- **DNA 重组活性**
- **与S.S. DNA结合活性**
- **少数蛋白的proteinase活性**

当DNA正常复制时

（无复制受阻，无DNA损伤， 无TT dimer）

RecA-p不表现proteinase活性

当DNA复制受阻/ DNA damaged



当DNA复制度过难关后

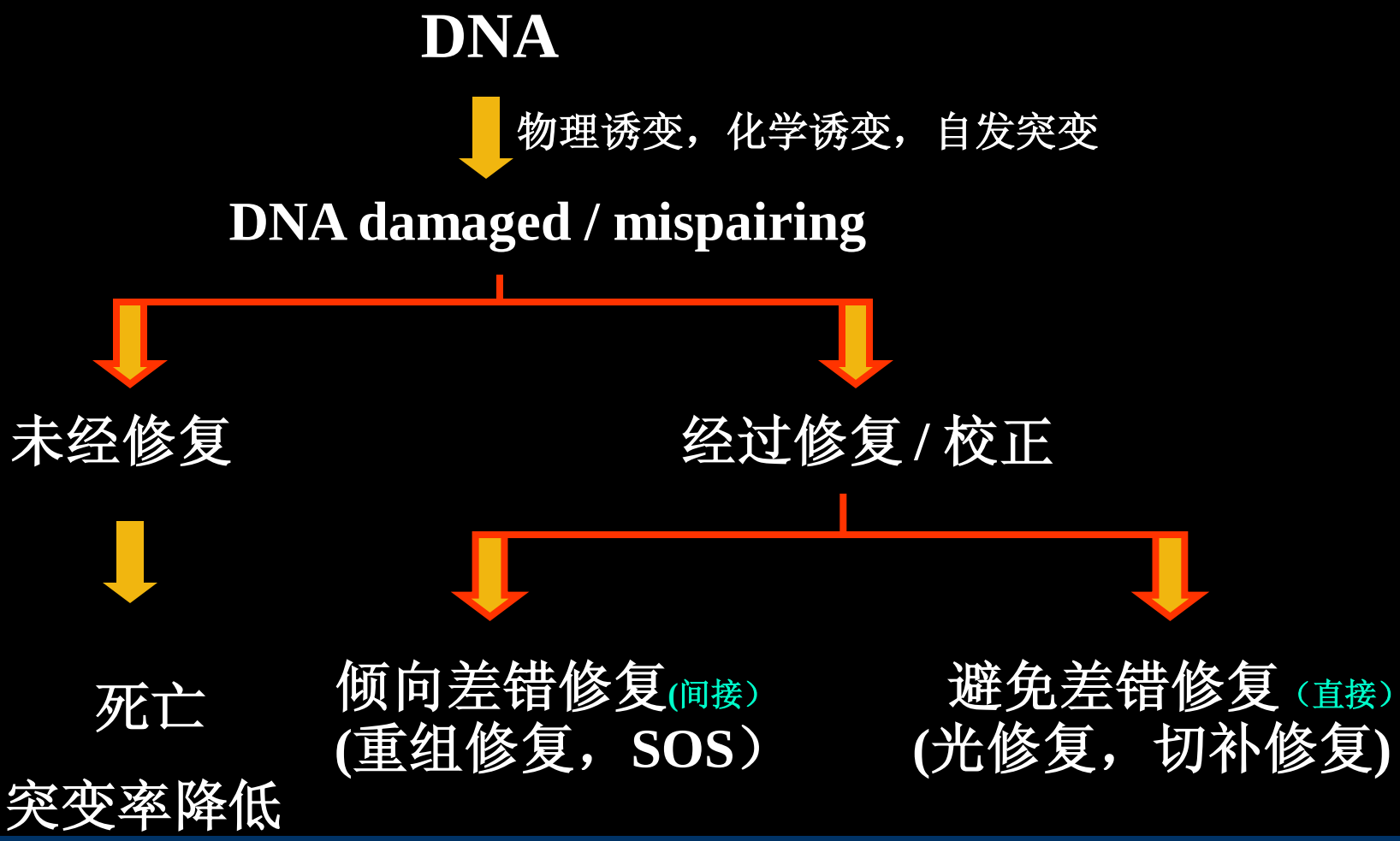
RecA-p很快消失 → LexA gene on → SOS off

SOS repair 是一种error-prone 极强的修复机制

是进化中形成的“ 竭尽全力，治病救人” 的措施

（正常状态下，SOS是关闭的）

7.3.2.5. 突变的形成



突变是在修复过程中形成的（非准确的修复）

形成突变　　不形成突变

7.3.3. 基因的回复突变（back mutation / reverse mutation）

7.3.3.1. 回复突变的概念

wild type ⇌ mutant (in phenotype)

mutation (low F.)

back mutation (very low F.)

7.3.3.2. 回复突变的分子机制

a) AGC (Ser) → ACC (Thr) → AGC (Ser)

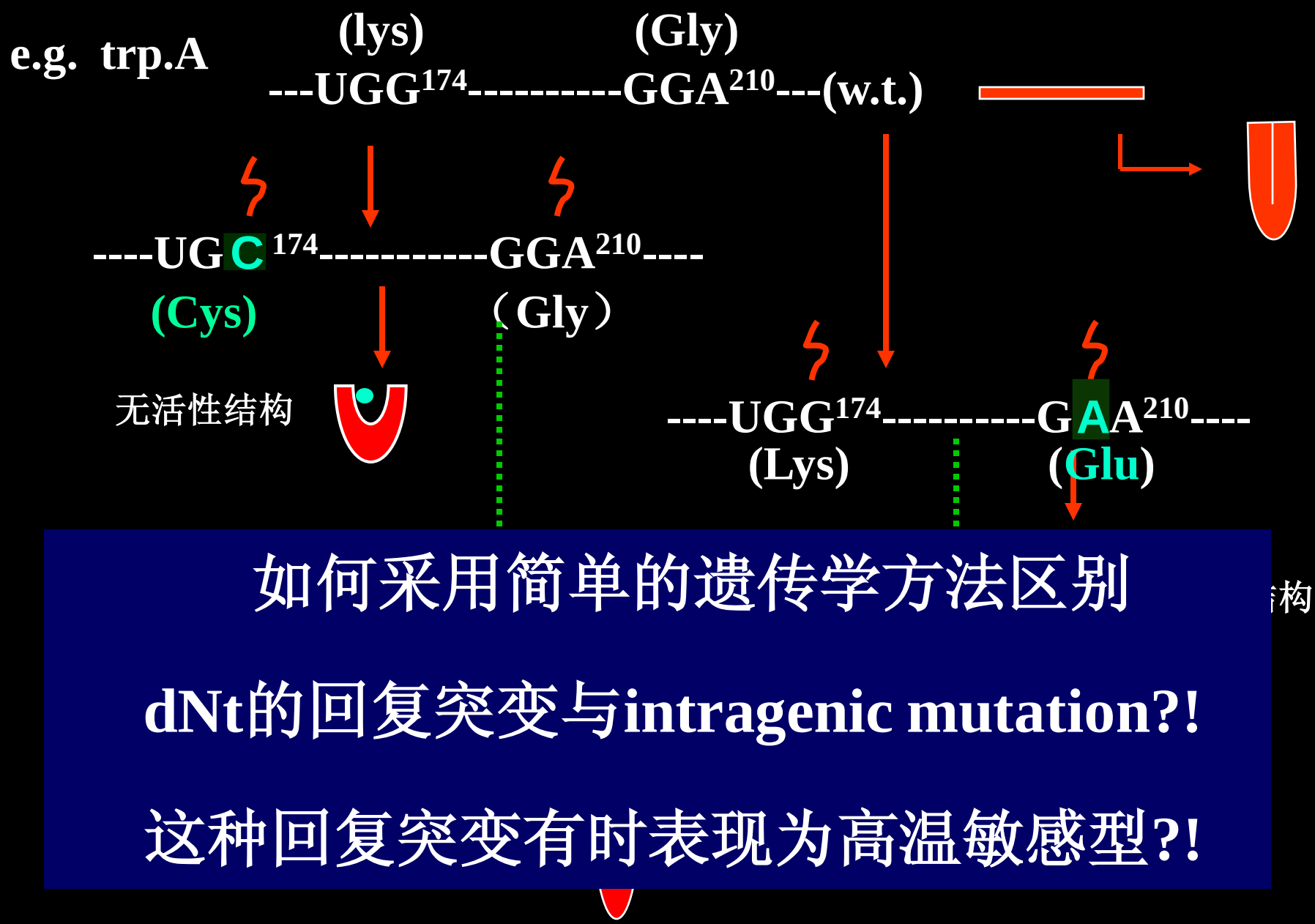
b) AGC (Ser) → AGG (Arg) → AGT (Ser)

c) AGC (Ser) → AGG (Arg) → AAG (Lys)

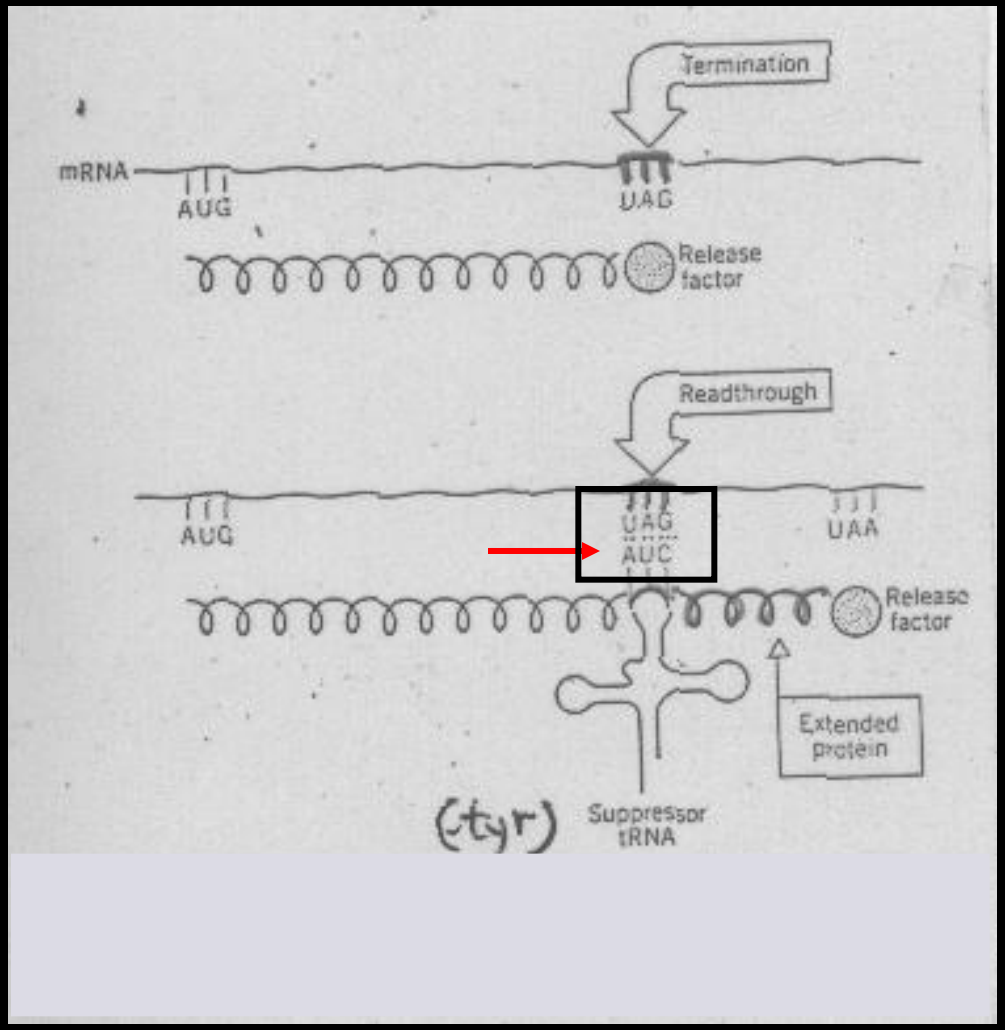
if Ser ≈ Lys

d) Intragenic suppression

(第二位点突变引起的基因内校正/密码子间两次错义突变的互补)

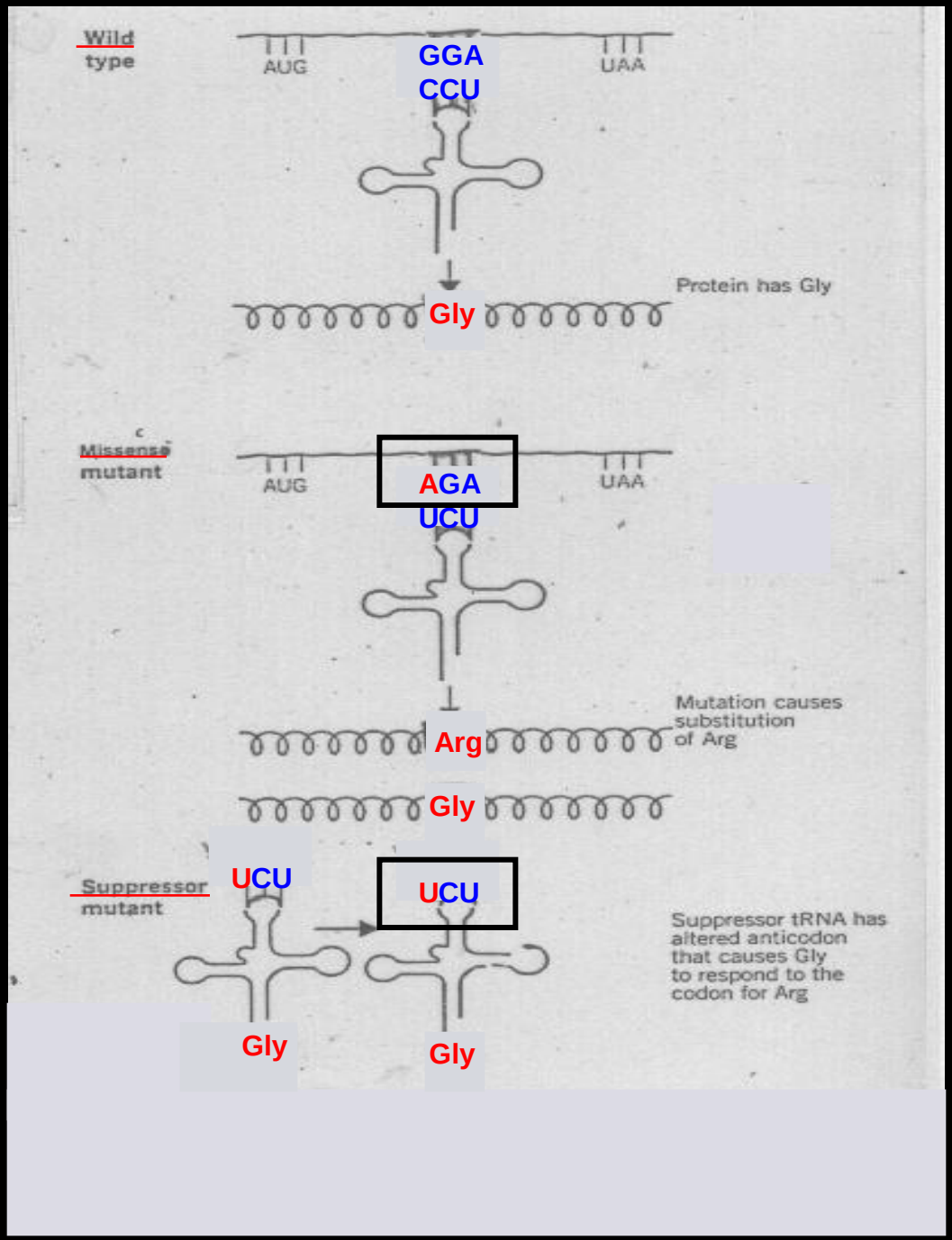

e.g. trp.A
(lys)
(Gly)
---UGG174---------GGA210---(w.t.)
----UGC 174----------GGA210----
(Cys)
（Gly）
无活性结构
----UGG174---------GAA210----
(Lys)
(Glu)
如何采用简单的遗传学方法区别
dNt的回复突变与intragenic mutation?!
这种回复突变有时表现为高温敏感型?!

Intergenic suppression—2 （Su^+）



Nonsense suppressor

(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第329页)

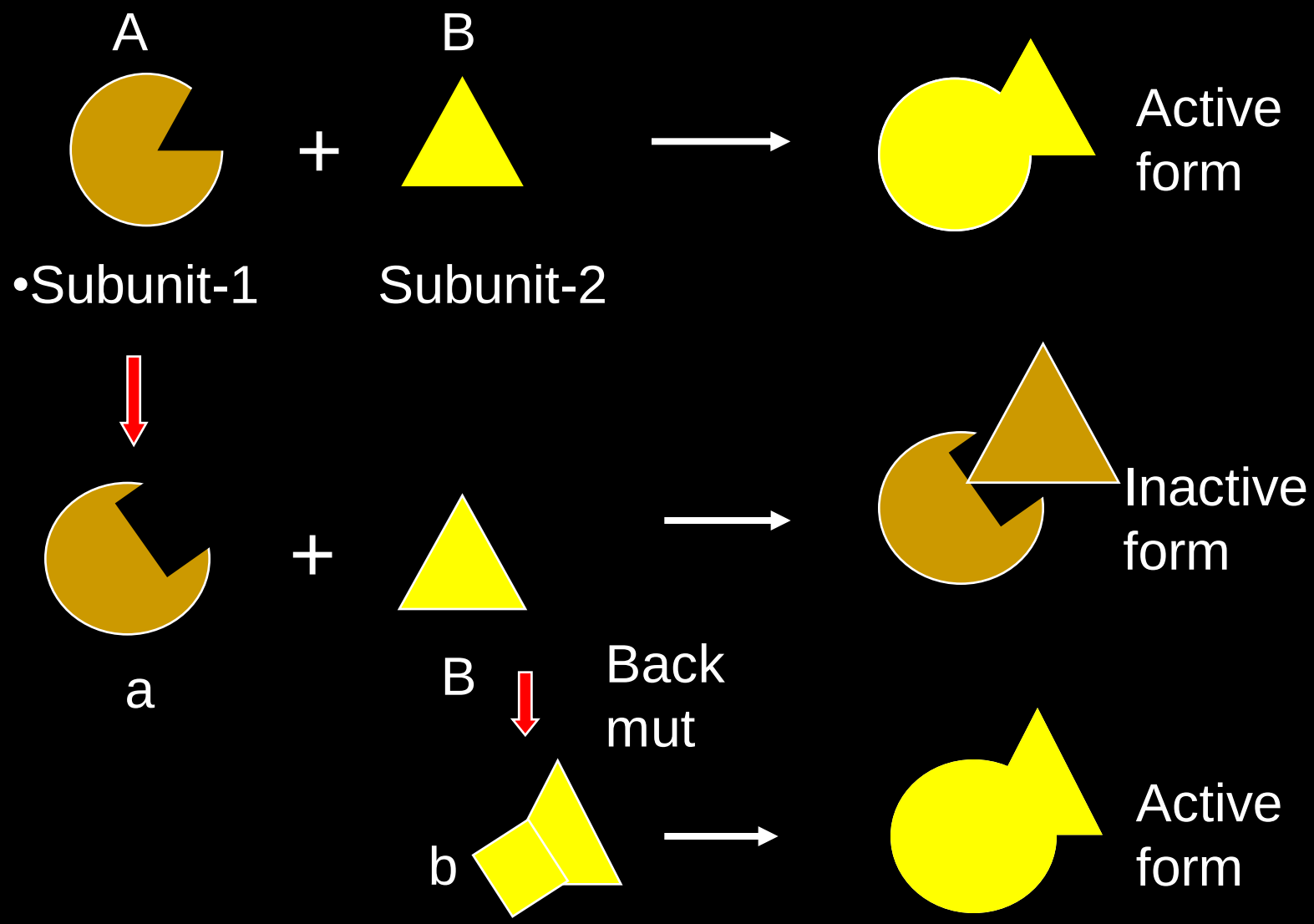


Intergenic suppression—2

Missense suppressor

(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第330页)

- Intergenic suppresion-3 **(多聚体酶类构型的吻合)**



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第332页)

Source:Stanley N. Coher

第7 章

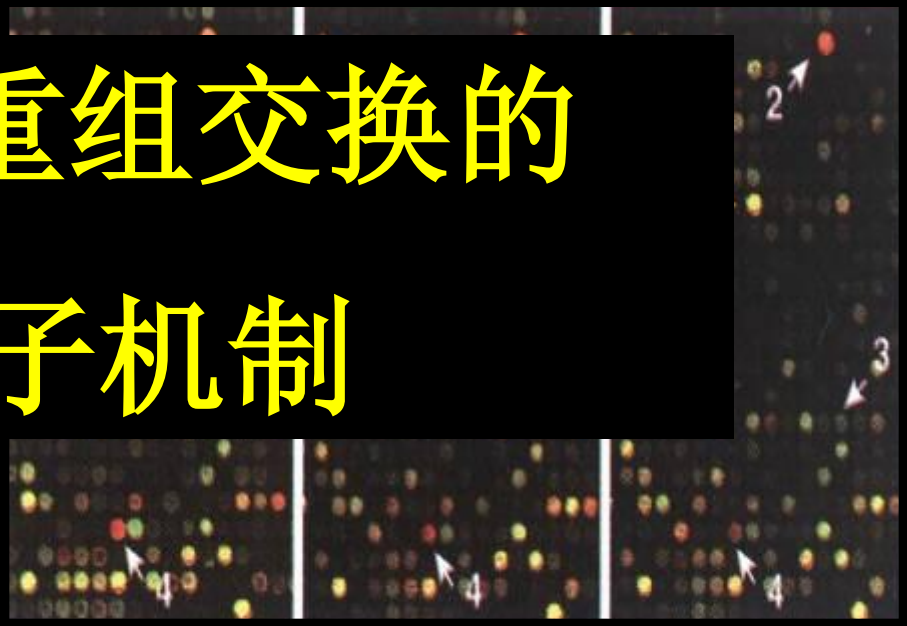
基因突变与交换

7.4. 基因重组交换的分子机制

Gene

&

Crossing-Over



(Source:Lyer,V,The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum.Science 283(1 Jan 1999)f.1,p.83)

7.4.1. 自然界的DNA分子均是重组体 (recombinant)

变异是生物进化的重要因素之一

生物对环境的适应机制

自然选择的重要基础

可遗传的变异；

突变 （点突变，染色体变异）

频率低，突变修复

突变压改变群体的基因频率$P_n = (1-P_0)^n$

遗传重组交换

染色体的自由组合

染色单体间的交换

普遍发生

自然界DNA分子

均是重组体

分子克隆和转基因技术(*in vitro*)

7.4.2. 遗传重组的类型

a) Homologous Recombination

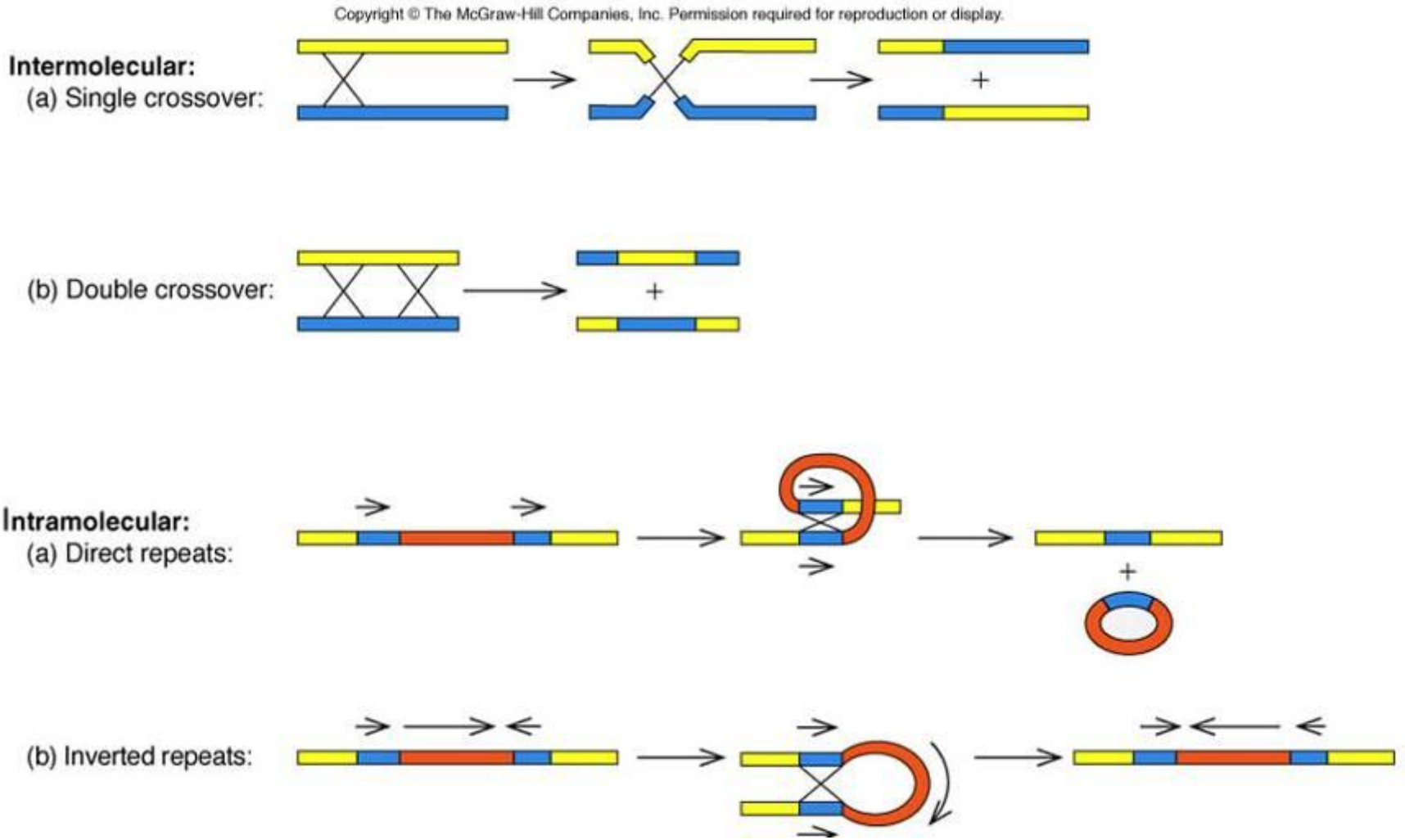
- occur between Homo-chromosome / Homo-seq.

  sister & non-sister chromatids

  transformation, transduction

  conjugation, transfection…

- large fragment exchange
- Recombination site is in hotspot mostly
- Recombinase be needed (RecA, BC)

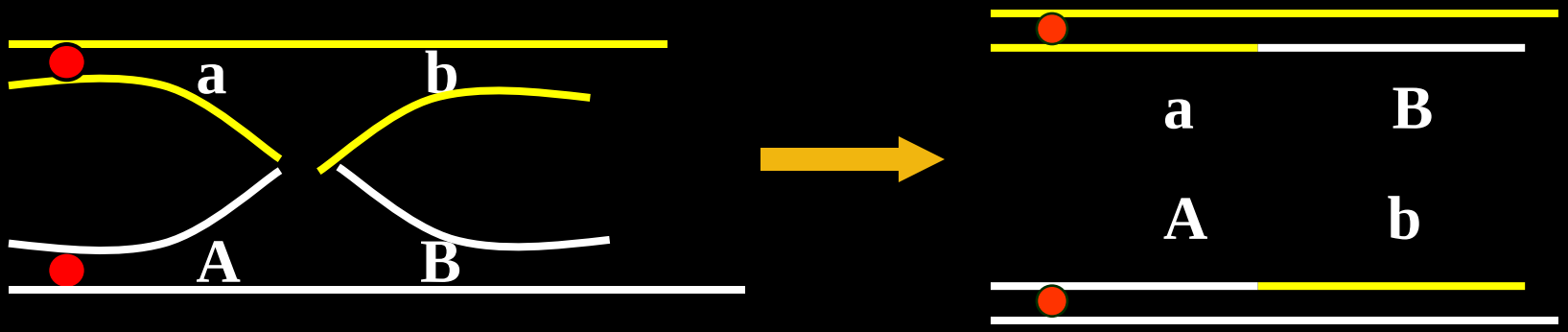


(Source:Molecular Biology(2002),Robert F.Weaver,Page719）

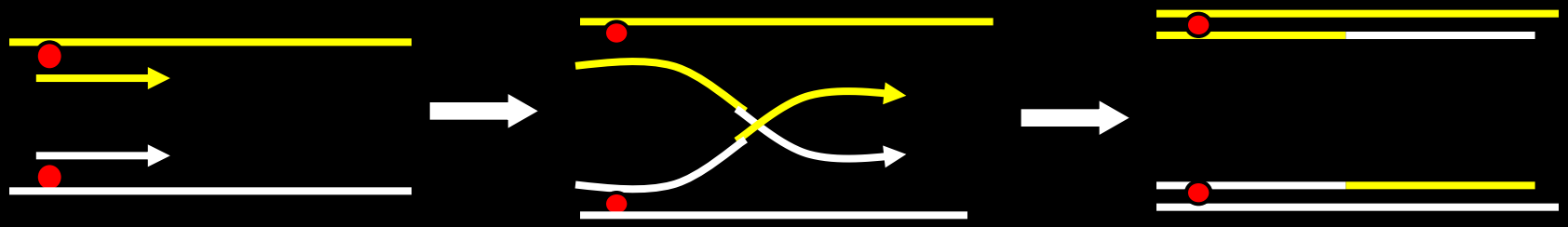
7.4.3. Homologous recombination

7.4.3.1. 前期的两种假说

a) Breakage—rejoining（1930 Darlington)



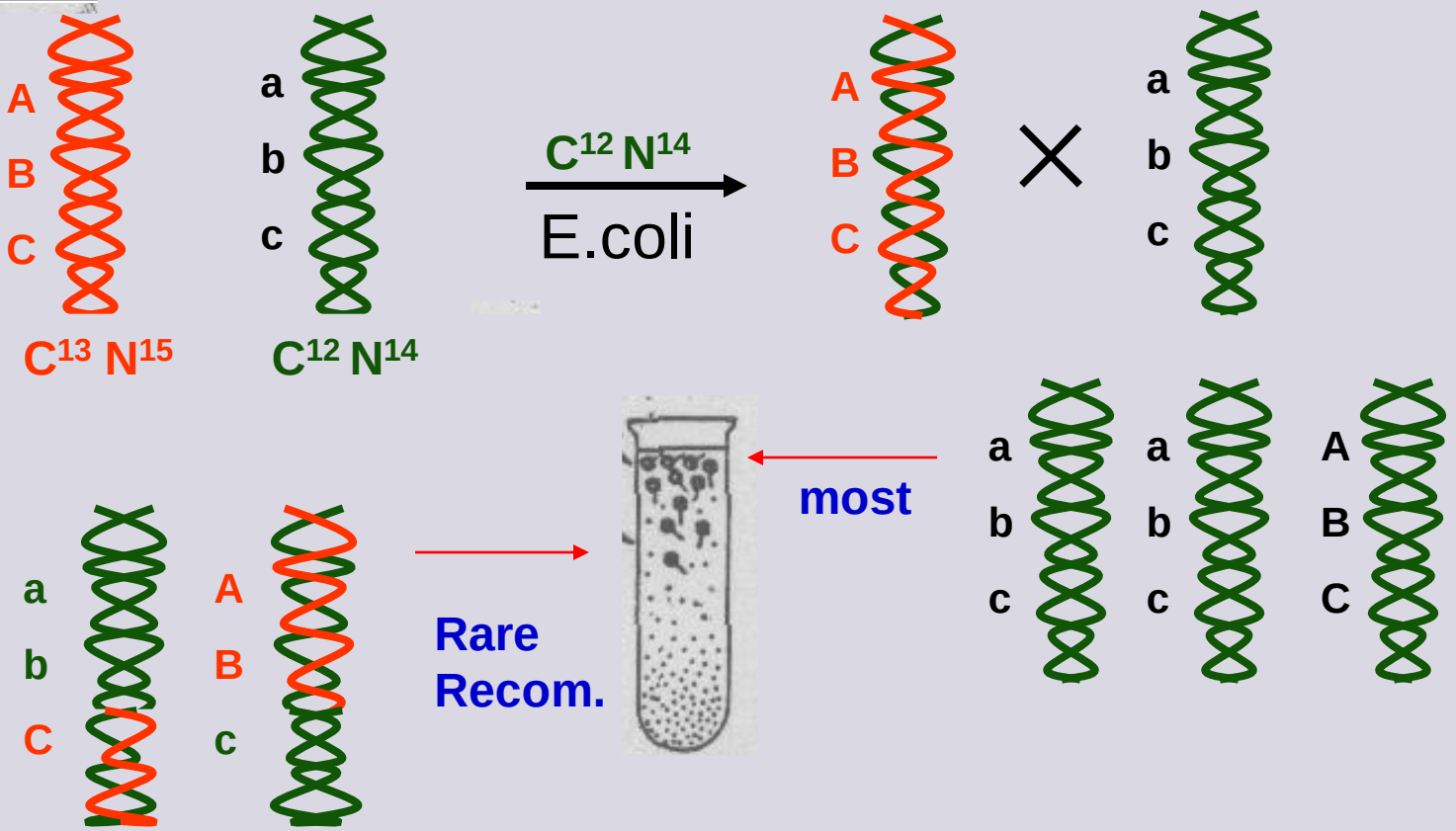
b) copy-choice (1931 Belling)



染色体的交换与复制有关！

c) Breakage –rejoining model 的证据-1

E.coli growing in a medium of C^{12} & N^{14} infected with phage of ABC & abc

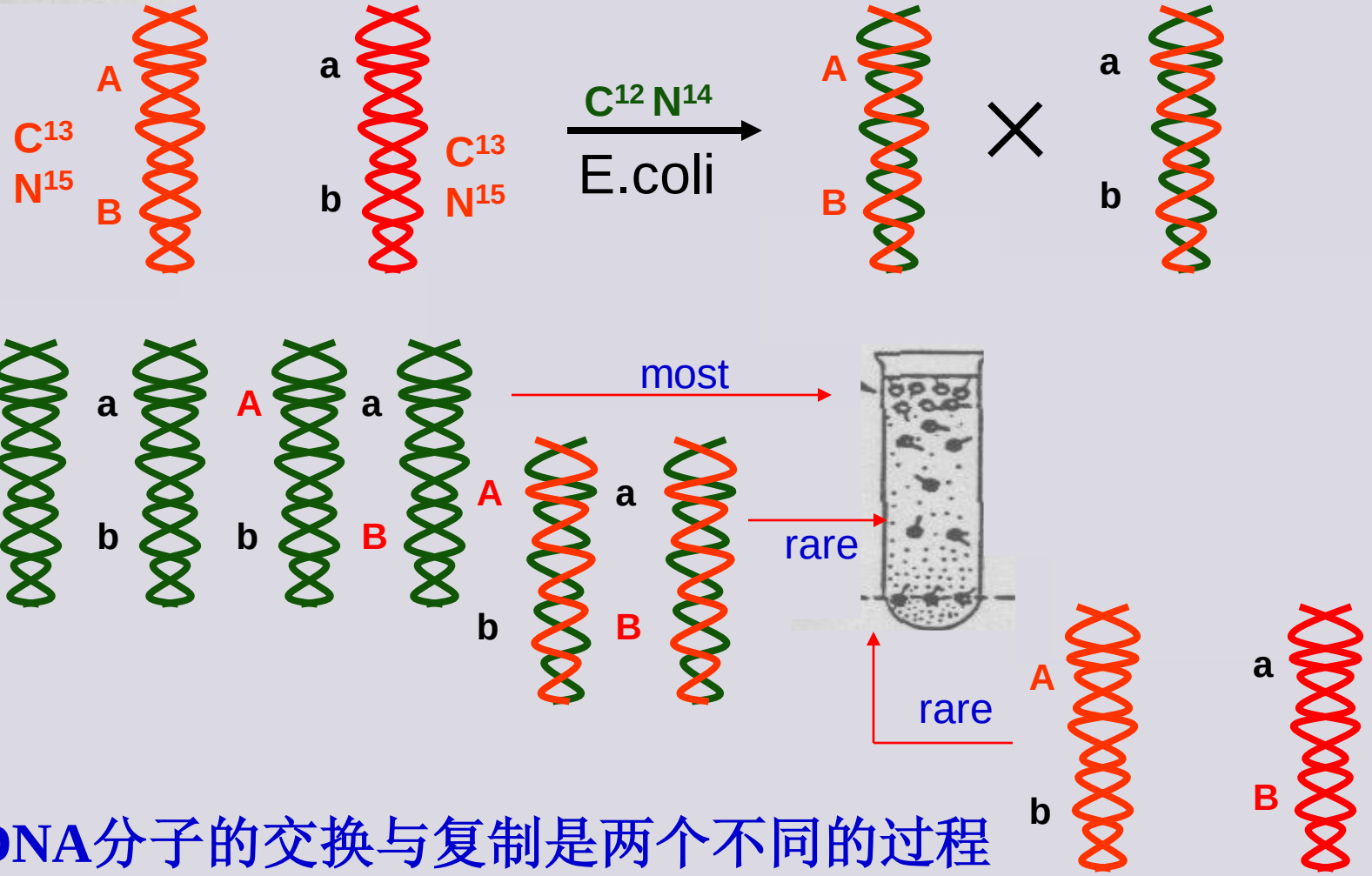


DNA分子的交换是断裂—错接的过程

(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第334页)

Breakage –rejoining model 的证据-2

E.coli growing in a medium of C^{12} & N^{14} infected with phage of AB & ab



DNA分子的交换与复制是两个不同的过程

(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第334页)

7.4.3.2. 同源重组的分子模式

a) Illegitimate segregation 现象— 基因转换(gene conversion)

一条染色体上特定的遗传基因被同源染色体上的等位基因所替代的非相互重组的现象— 基因转换

Drosophila (ry 黄嘌呤脱氢酶)

ry41⁻⁻ ry5⁻(♀) X ryx⁻ryx⁻(♂)

a few w.t.

非全同等位基因内

不同位点的影响？

回复突变？

基因间互补？

ryx⁻⁻ ryx⁻(♀) X ry41⁻ry5⁻(♂)

no w.t.

转换不会伴随ry 基因

两侧基因的交换！

雄果蝇染色体不发生交换！

基因内交换！

b) 同源重组的基本特征

- 涉及同源染色体的同源序列间的联会配对
- 涉及DNA分子在特定的交换位点发生断裂和错接的生化过程
- 单链DNA分子或单链DNA末端是交换发生的重要信号

c) 同源重组的分子模式

1964. Holliday. R **Holliday Intermediate**

1965. Whitehouse **Polaron Hybrid DNA model**

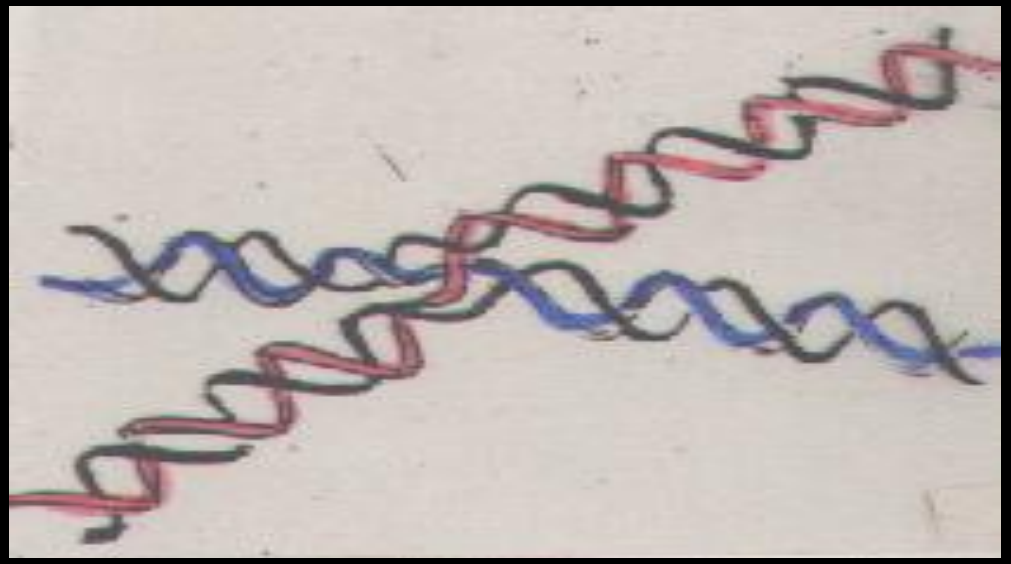
交换发生的相关事件

Synapsis ; paired DNA duplexes

RecBCD ; nicks made in homologous strands between two DNA

RecA ; leads to broken ends move and cross-over to pair with complement in other duplex

Holliday Intermediate structure



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第336页)

P Q R

p q r

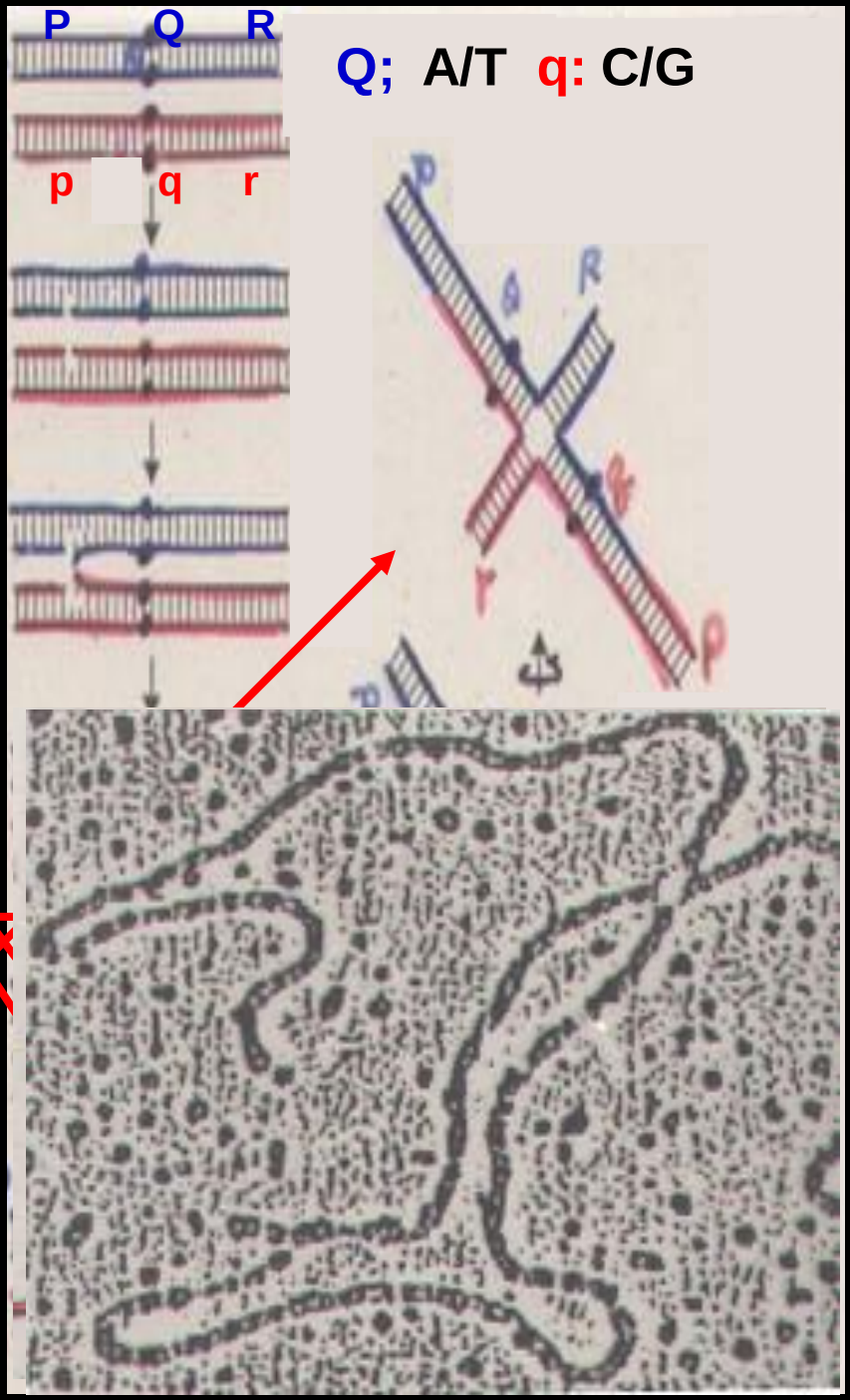
Q; A/T q: C/G

Nicks are sealed

Cross-over point moves by branch migration

Isomerization

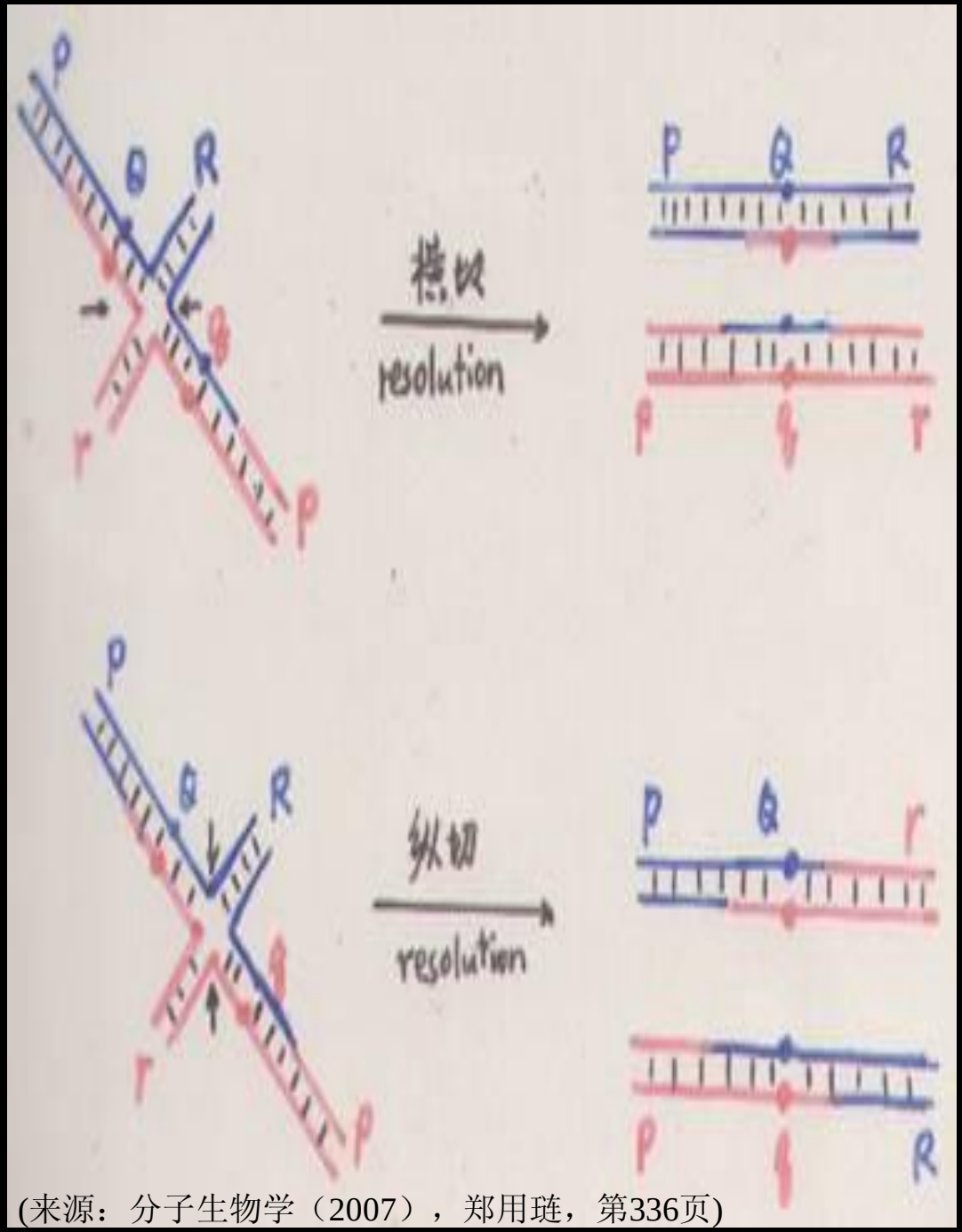
Generate planar molecular by rotation



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第336页)

Resolution in two directions

Heteroduplex region made in Q/q (C/T)

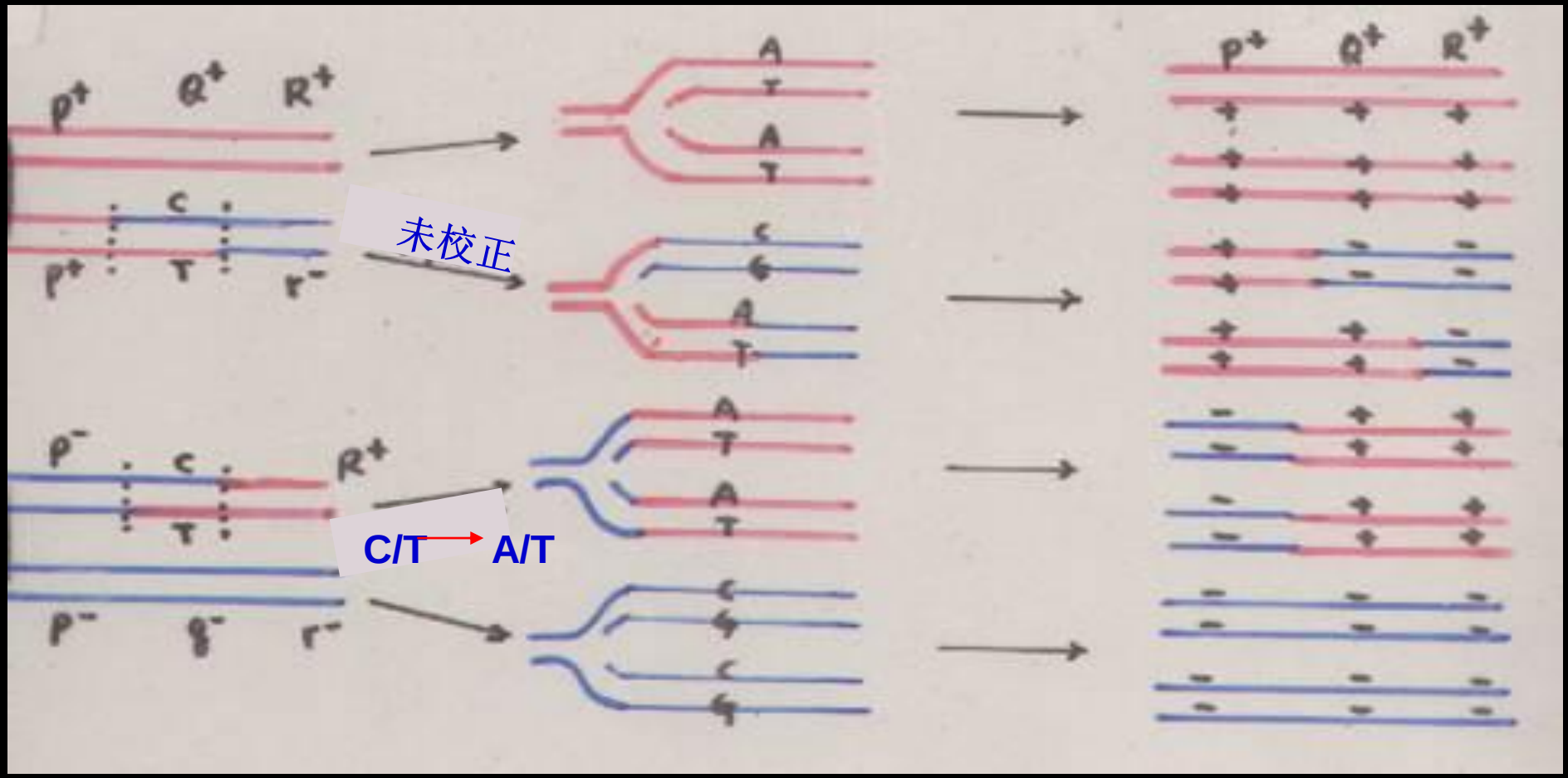


(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第336页)

R,r
未交换
Q,q
含C/T 结构

R,r
发生交换
Q,q
含C/T 结构

Heteroduplex region replication correct and illegitimate segregation



$$\frac{Pt}{Rt} = \frac{PR + pr}{Pr + pR} = \frac{1}{1} \qquad \frac{Q}{q} = \frac{5}{3}$$

(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第338页)

杂合DNA区域内C/T的校正与否
与形成不同比例的异常分离配子

第一条染色单体内C/T校正可能	第二条染色单体内C/T 的校正可能		
	C/T → A/T	C/T → C/G	未校正
C/T → A/T	AAAAAACC TTTTTTGG (6:2)	AACCAACC TTGGTTGG (4:4)	AAACAACC TTTGTTGG (5:3)
C/T → C/G		AACCCCCC TTGGGGGG (2:6)	AAACCCCC TTTGGGGG (3:5)
未校正			AAACACCC TTTGTGGG (4:4)

palaron hybrid DNA model

conclusion

- 交换不是简单发生在1 bp之间的断裂—错接事件
- 交换涉及两条D.S. DNA之间的holliday intermediate, branch migration, isomerization, resolution 等一系列复杂的过程
- 交换发生后，其两端的会出现Pt : Rt = 1:1的正常分离比例
- 当交换发生在某对等位基因内，其突变位点可能因交叉移动，而被包括在heteroduplex region之内，从而引起基因转换
- 基因转换(conversion)发生的机率, 随突变位点离DNA crossover point的距离增大，而表现逐渐变小的极性梯度的效应

e.g. yeast Arg4 gene （1989年， Jack Szostak）

7 multip—alleles (非全同 等位基因)

Nsph I, Acc-I, R-V, Bel-I, Dra-III, Aha-II, Bgl-II

在杂合二倍体中，基因转换频率 从5’→ 3’极性递减

Why?

d) 相关酶类及交换热点

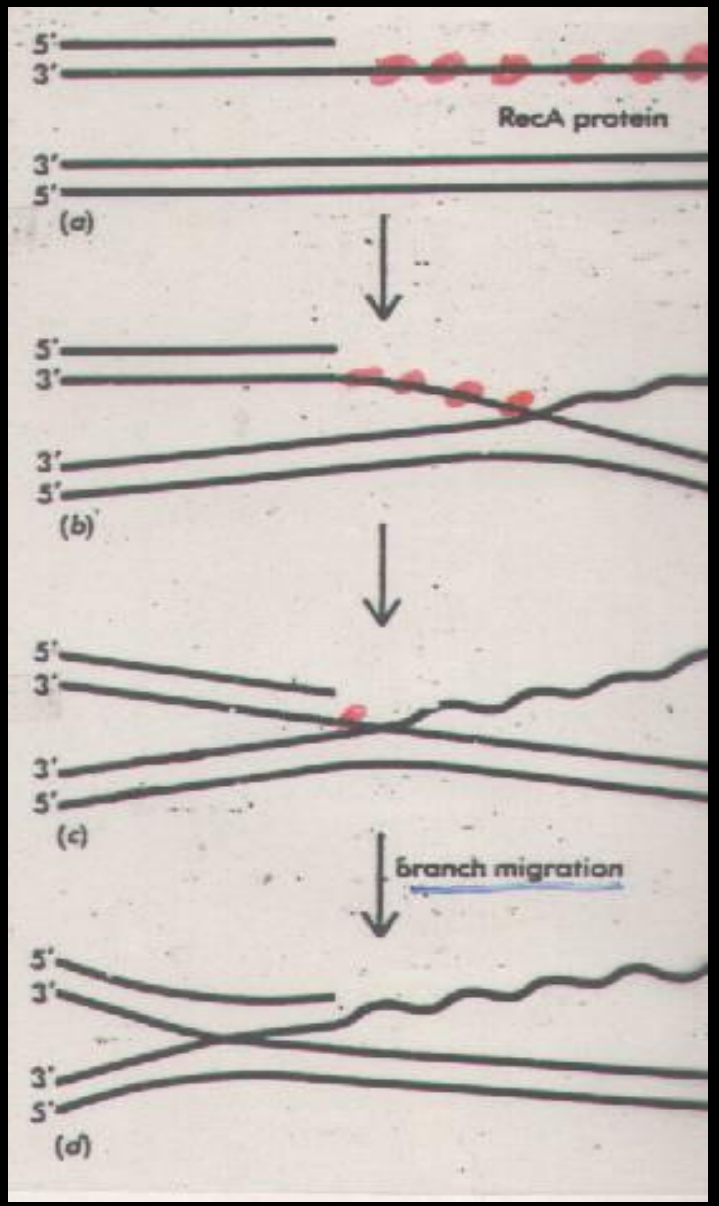
RecA-p;

- 40kd　monomer　2000 / cell
- U.V.　bleomycin,　mitomycin

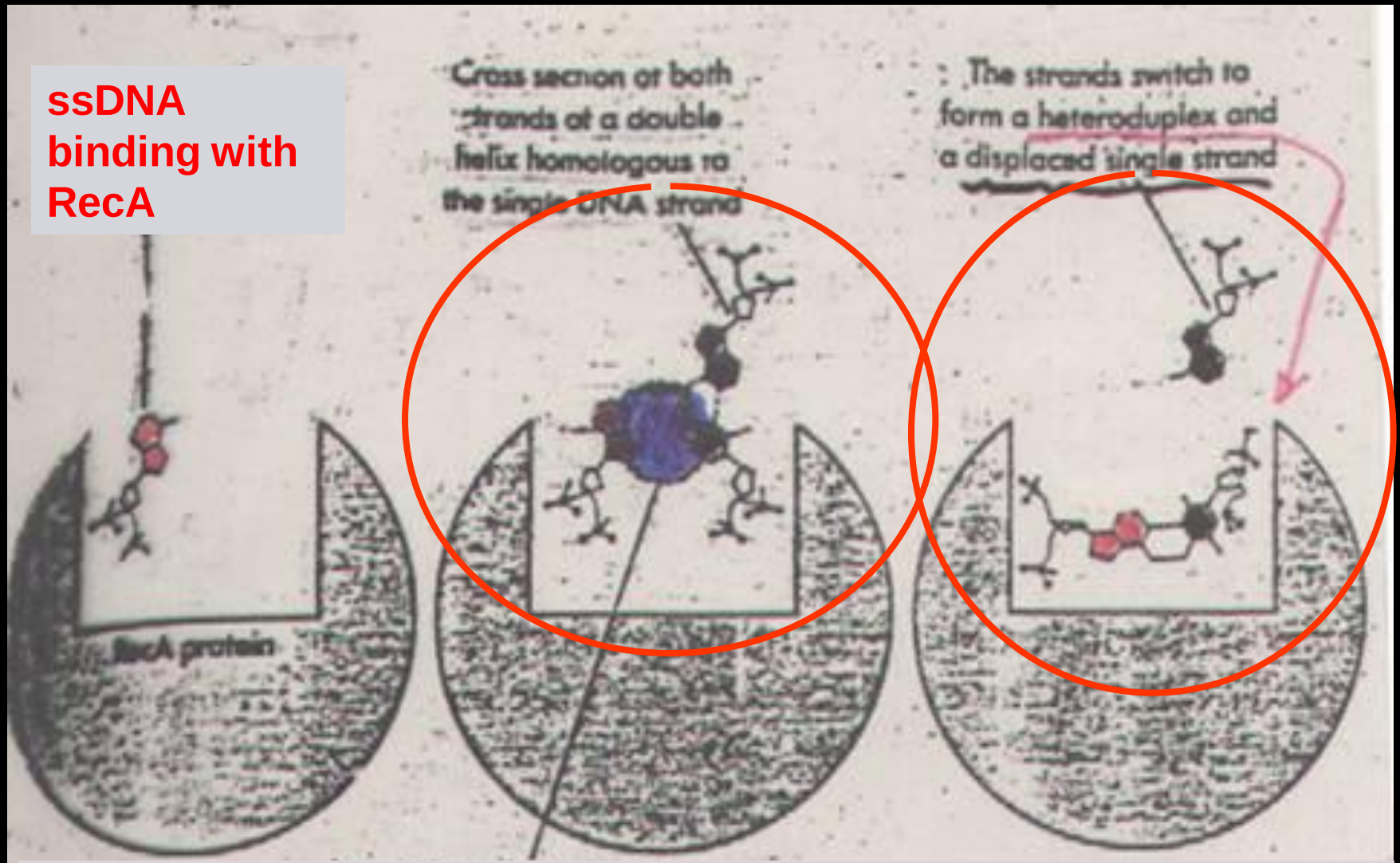
　　→　RecA-p to 5000 / cell

- RecA-p binding with S.S.DNA
- ATPase activity

(S.S.DNA—dependent ATPase activity)



(来源：分子生物学（2007），郑用琏，第339页)

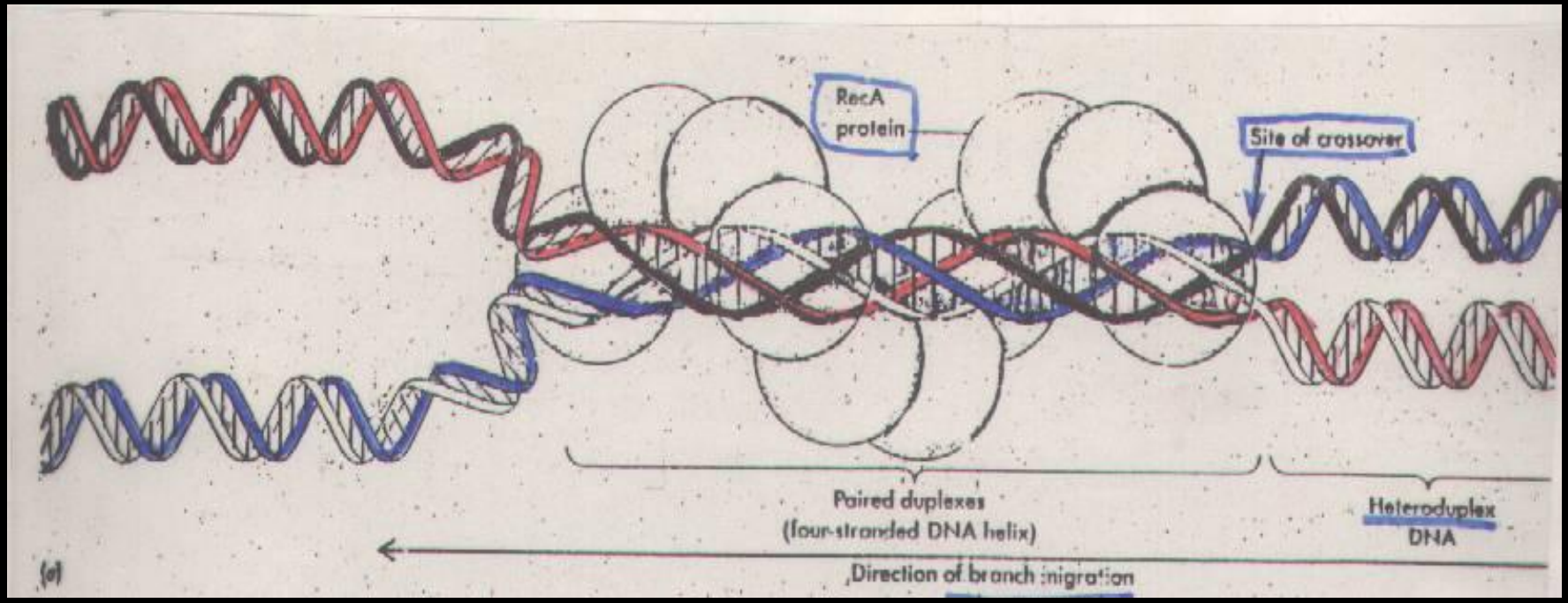


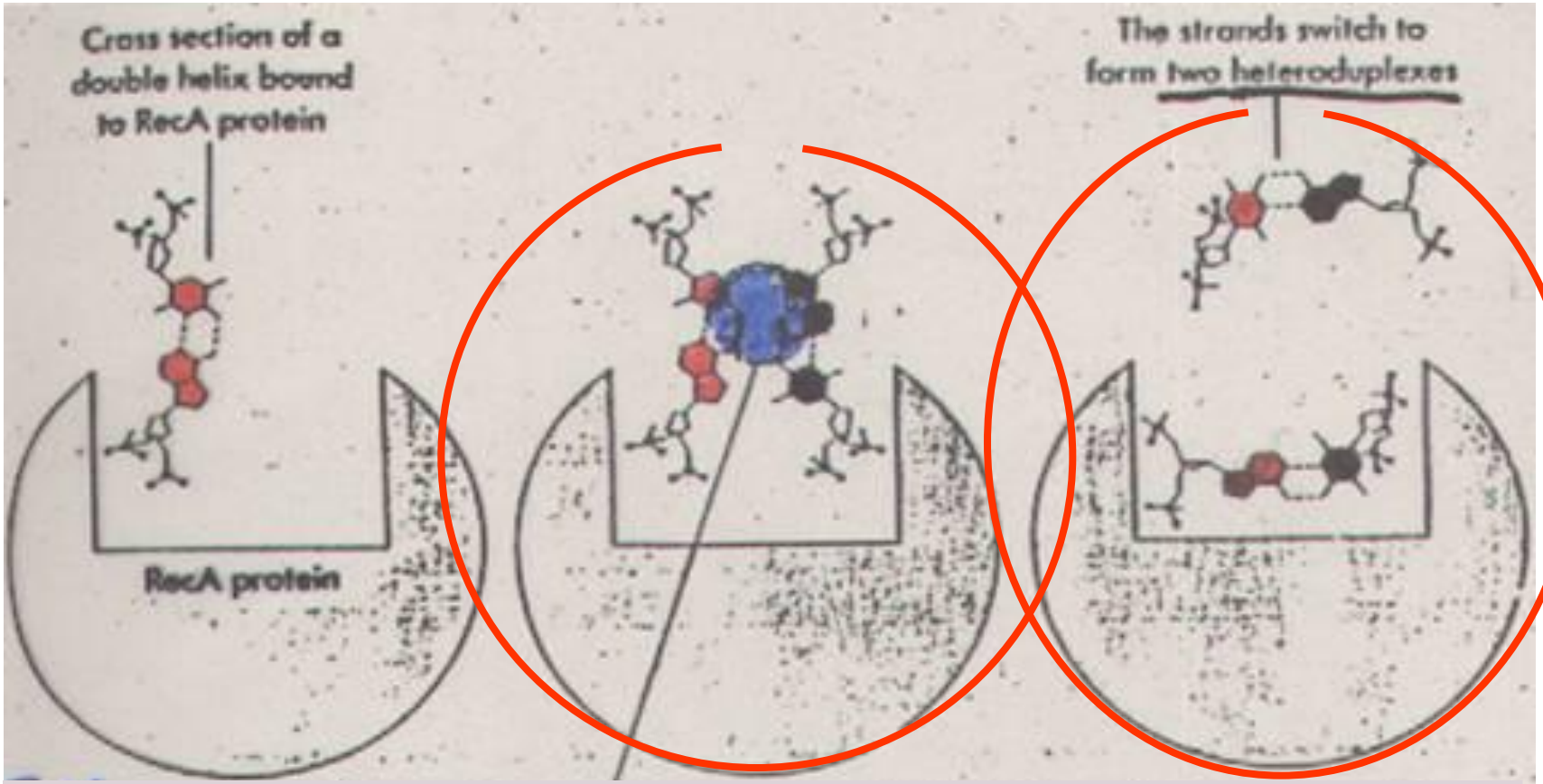
Rec A in Prok.

(来源：不详)

Rec.A-p

Hydrogen bond reform → heterodulpex




Cross section of a
double helix bound
to RecA protein
RecA protein
The strands switch to
form two heteroduplexes

Rec A in Euk.

RecB. C ,D—P

- Rec-b,c,d mut. → 同源重组率下降100 X
- RecBCD complex 300kd
- 具有解链酶活性（ATPase）& 核酸外切酶活性

重组蛋白BCD具有产生单链尾的功能。产生的单链尾被重组蛋白A（RecA protein）（recA基因产物）包裹，同时重组蛋白BCD帮助将RecA蛋白装载到3’-DNA尾上。

- 使D.S. DNA ➡ nick ➡ release S.S. DNA(被RecA-p结合)

  使crossover point 沿D.S.DNA 解旋的方向移端(migration)

  使heteroduplex region 重新形成螺旋

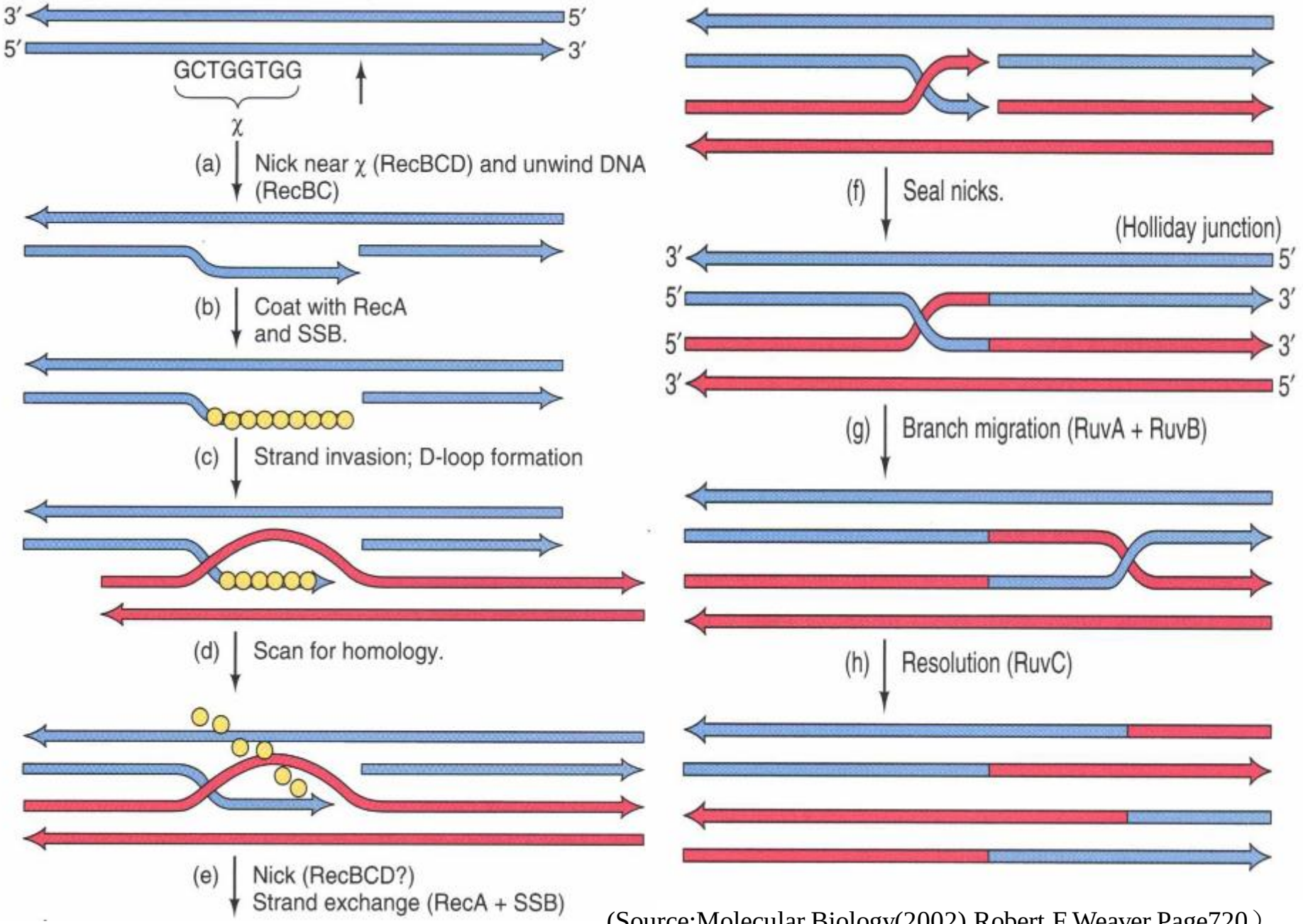
- RecBCD-p特异识别GCTGGTGGT 序列

  并在其下游4-6bp处切断S.S.DNA

χ *(chi)*—sequence Chiasma 交换热点

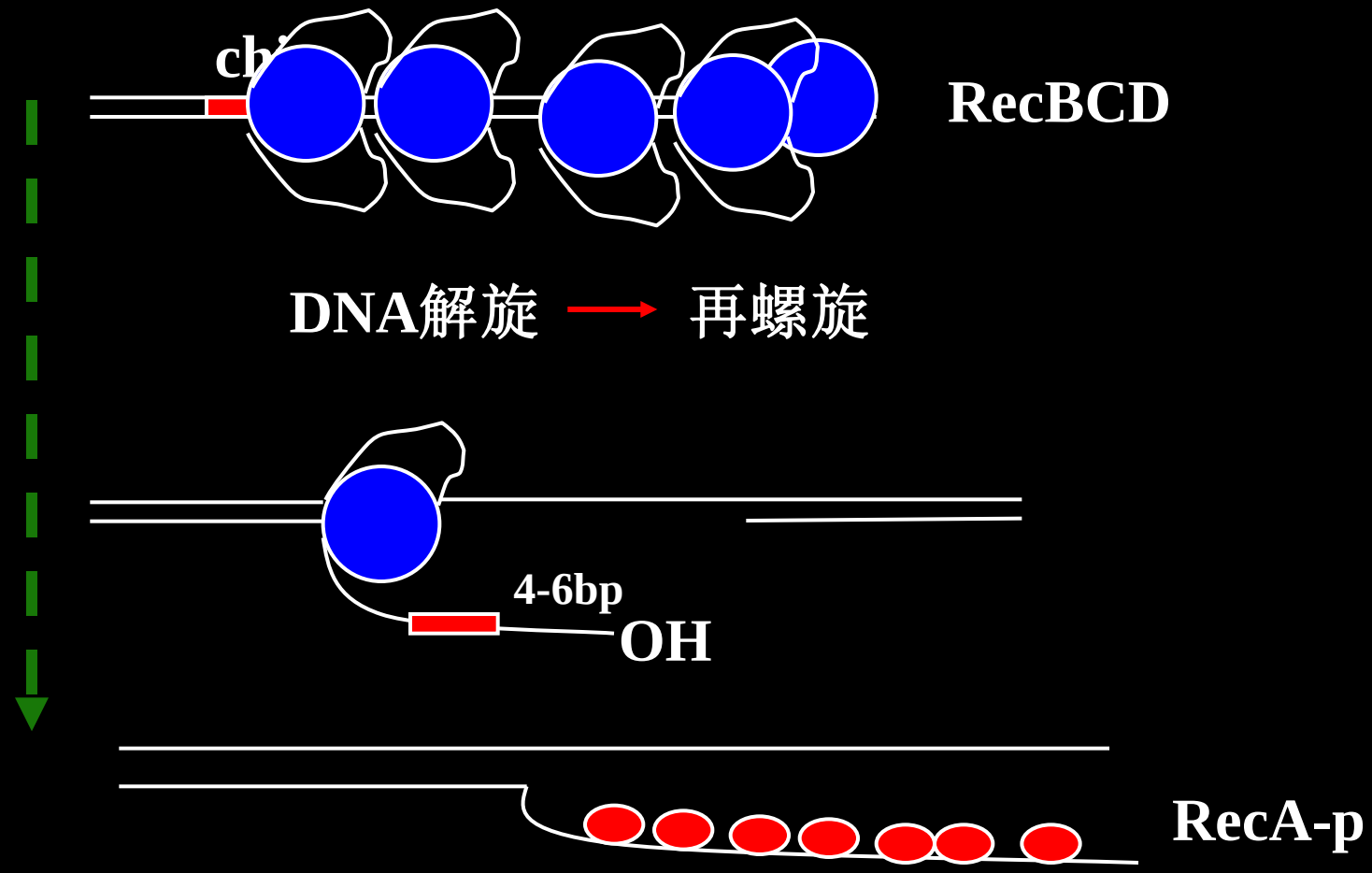
Homologous Recombination

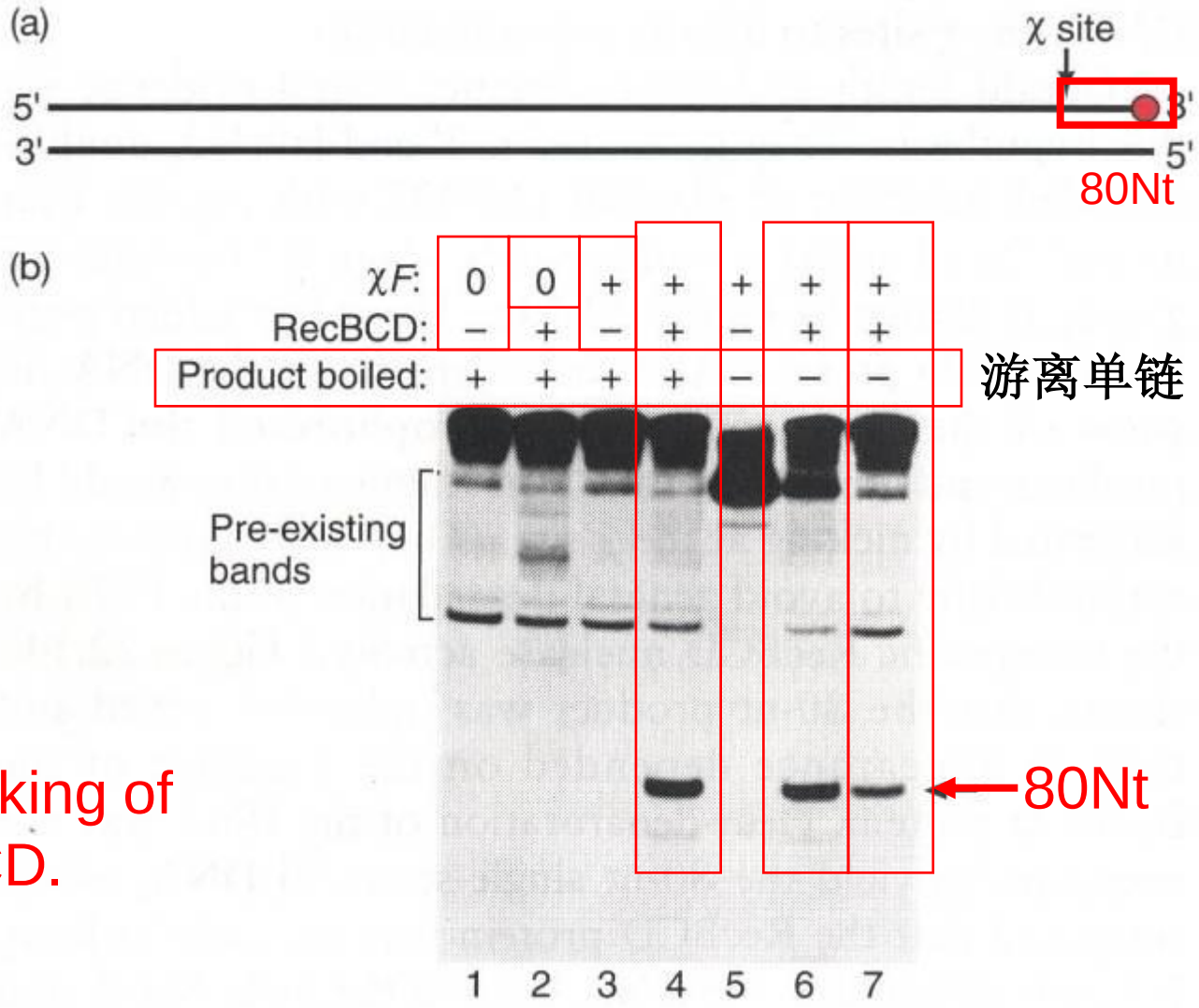
RecBCD pathway



(Source:Molecular Biology(2002),Robert F.Weaver,Page720）

χ(chi)—seq具有物种和基因的特异性

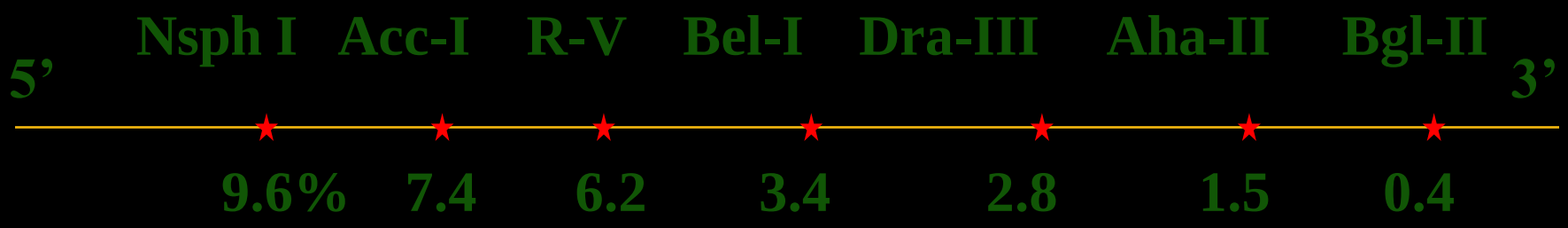


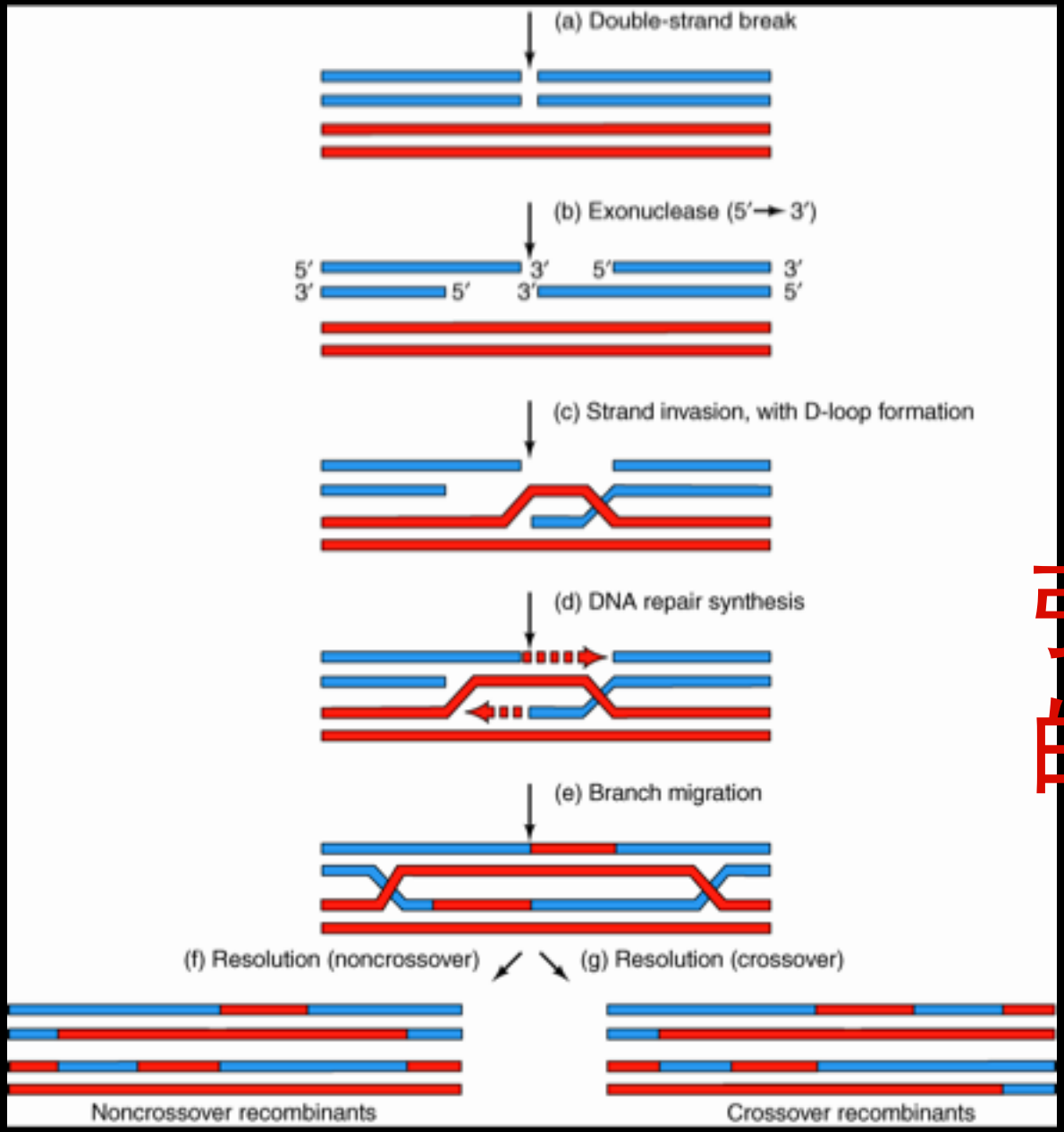


Chi-specific nicking of DNA by RecBCD.

(Source:Ponticelli,A.S.,Chi-dependent DNA strand cleavage by recBC enzyme.Cell 41(May 1985) f.2,p. 146.)

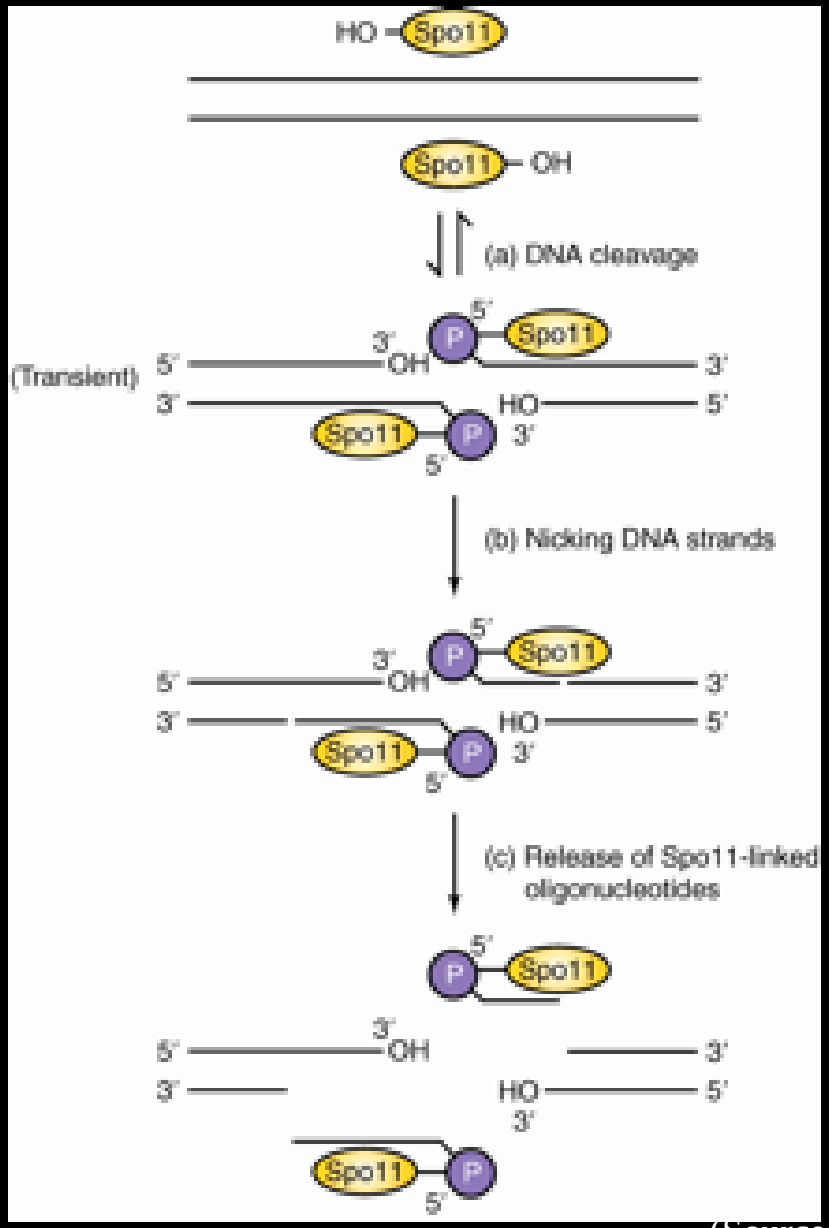
Jack Szostak所证明的Yeast Arg4 位点的基因转换现象, 始于靠近基因的5‘-端双链DNA的断裂(DSB Double-Strand Break)所引发的重组





引发DSB的因子？

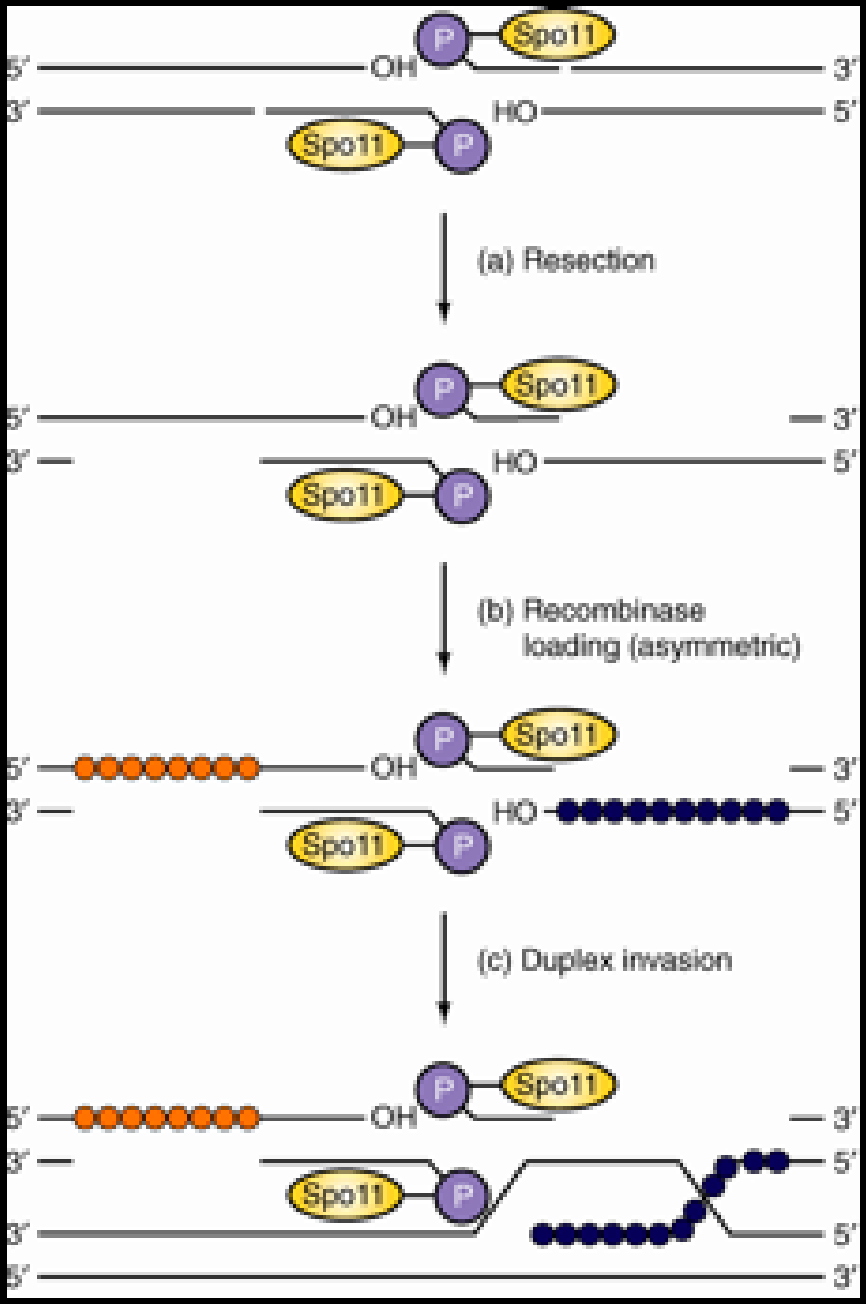
(Source:Molecular Biology(2002),Robert F.Weaver,Page732）



Spo11 分子利用 tyr^{135} 攻击DNA的两条单链，tyr与被切割的DNA5’磷酸发生共价连接。不对称的切割产生两种不同大小的与Spo11连接的寡核苷酸

（Source:Molecular Biology(2002),Robert F.Weaver,Page735）

重组酶(Rad51和Dmc1利用Spo11释放的DSB缺口不对称地的负载到新产生的单链区域，（蓝色）蛋白包裹一条链，（橘色）蛋白包裹另一条链。入侵一个同源双螺旋，起始Holliday 中间体的形成



(Source:Molecular Biology(2002),Robert F.Weaver,Page737)

将一切生物学问题还原到DNA水平的同时

人类必将用整体的，

综合的观点去思考生物学

(来源：不详)

(来源：不详)