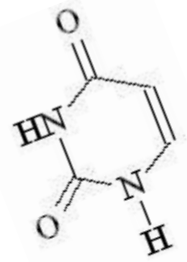
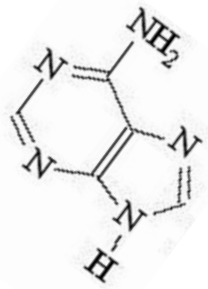
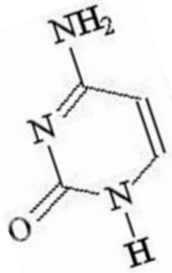
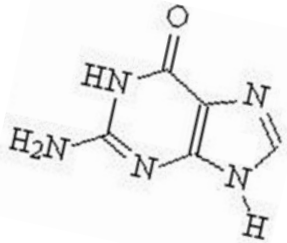
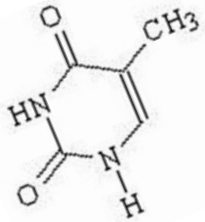
РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ

Доказательство полуконсервативного способа репликации ДНК.

Опыты Мэтью Мезельсона и Франклина Сталя.

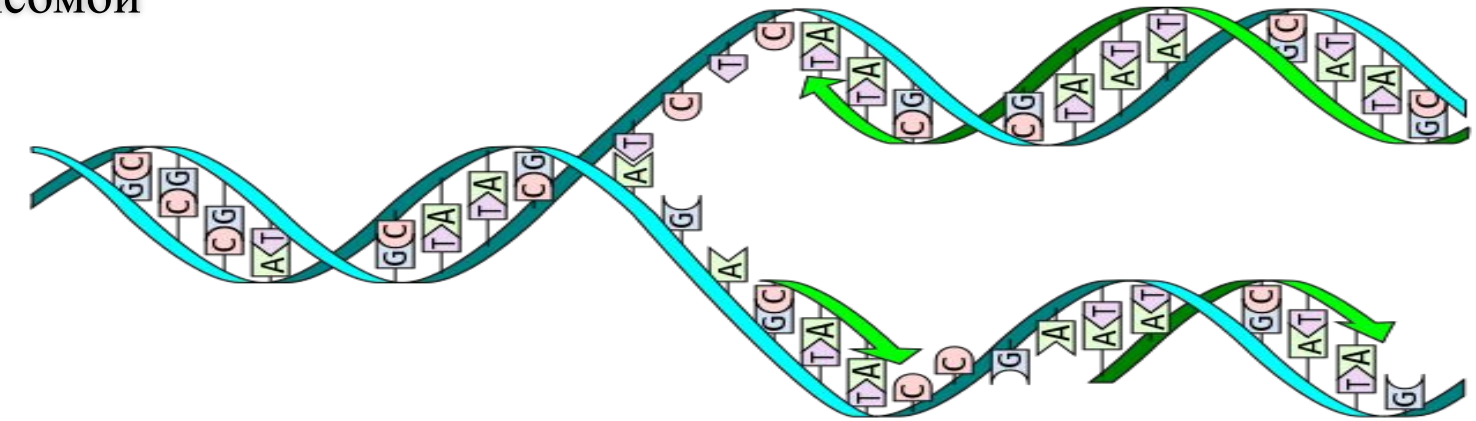






Выполнили:
студентки 4 курса ИНБИО
группы 38БиБ136
Смолеева Н. С.
Нечаева Ж.И.
Проверил:
к.б.н. Трофимов О.В.

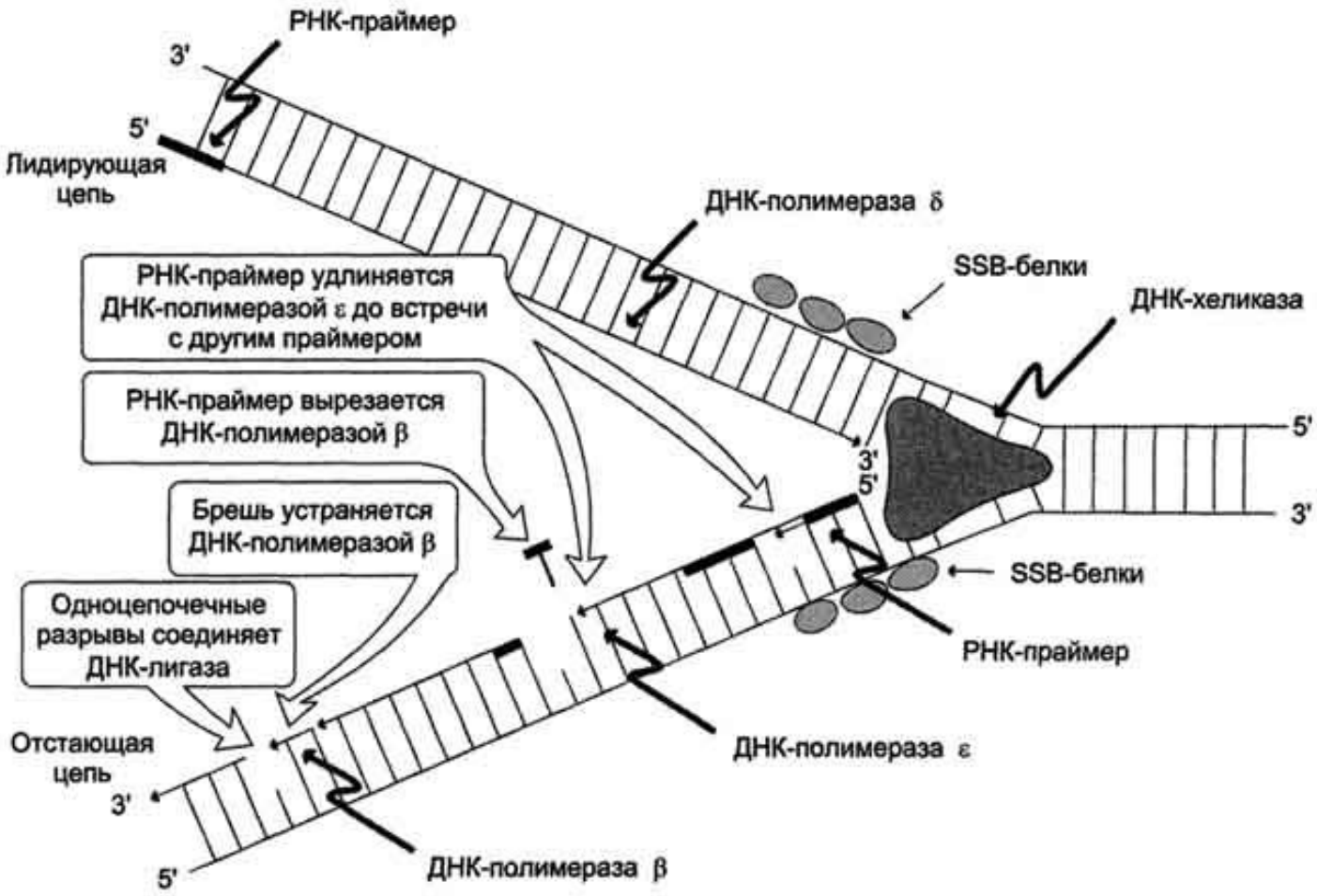
2016 г.

• Общее понятие:

- Репликация — процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты на матрице родительской молекулы ДНК.
- В ходе последующего деления материнской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной материнской клетки.
- Этот процесс обеспечивает точную передачу генетической информации из поколения в поколение.
- Репликацию ДНК осуществляет сложный ферментный комплекс, состоящий из 15—20 различных белков, называемый реплисомой



3 этапа



- Репликационная вилка движется со скоростью порядка 100 000 пар нуклеотидов в минуту у прокариот и 500—5000 — у эукариот.

• Предварительные гипотезы:

Консервативный механизм:

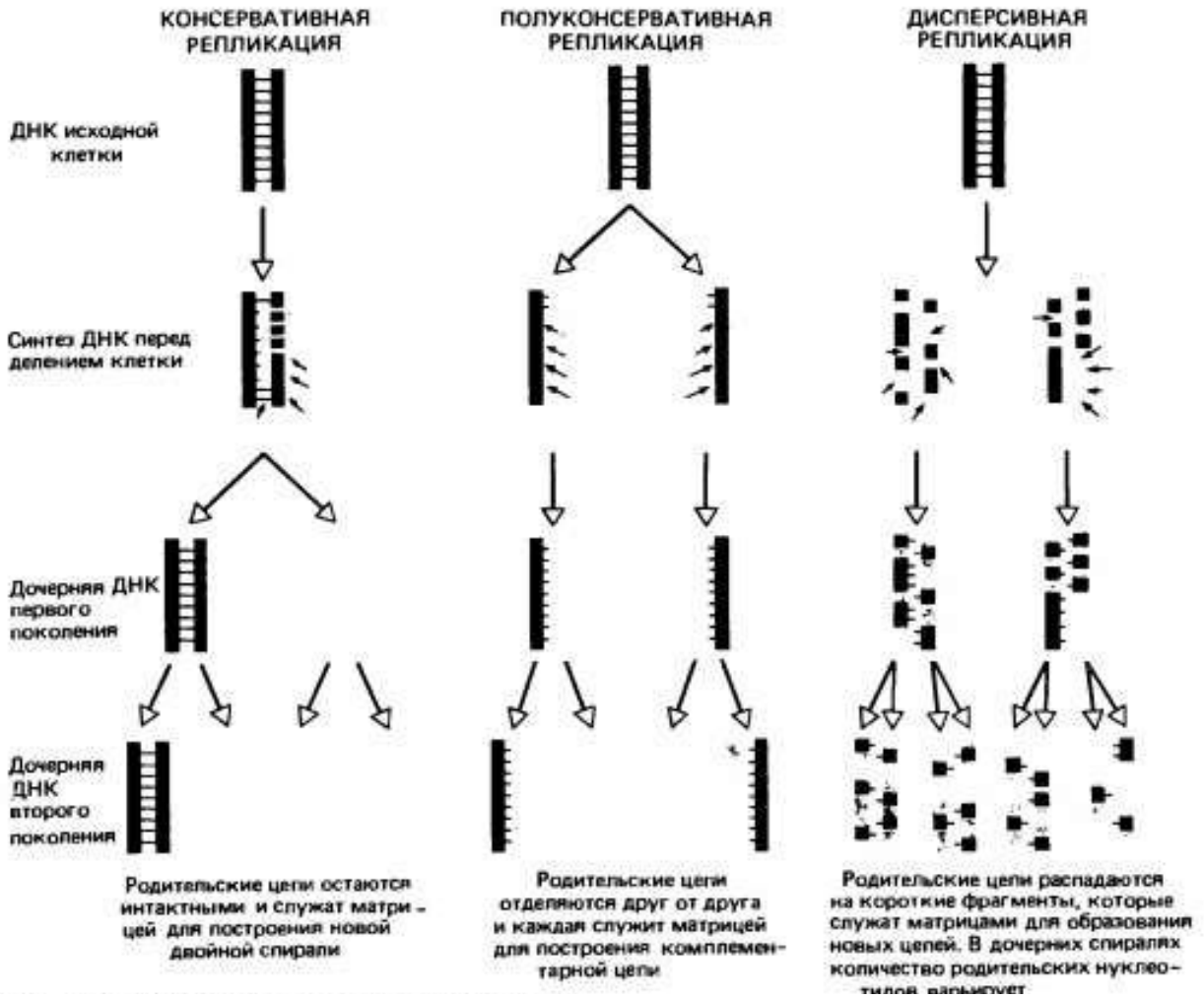
•при таком способе раскрутки спирали не происходит, существующая двойная спираль является матрицей для синтеза двух новых цепей. Новая спираль строится полностью из нового материала, существующая спираль

Полуконсервативный механизм:

•существующая спираль раскручивается, на каждом полинуклеотидных цепи комплементарно строится новый. Таким образом новая двойная спираль является «гибридом» старого и нового цепей

Дисперсивний механизм:

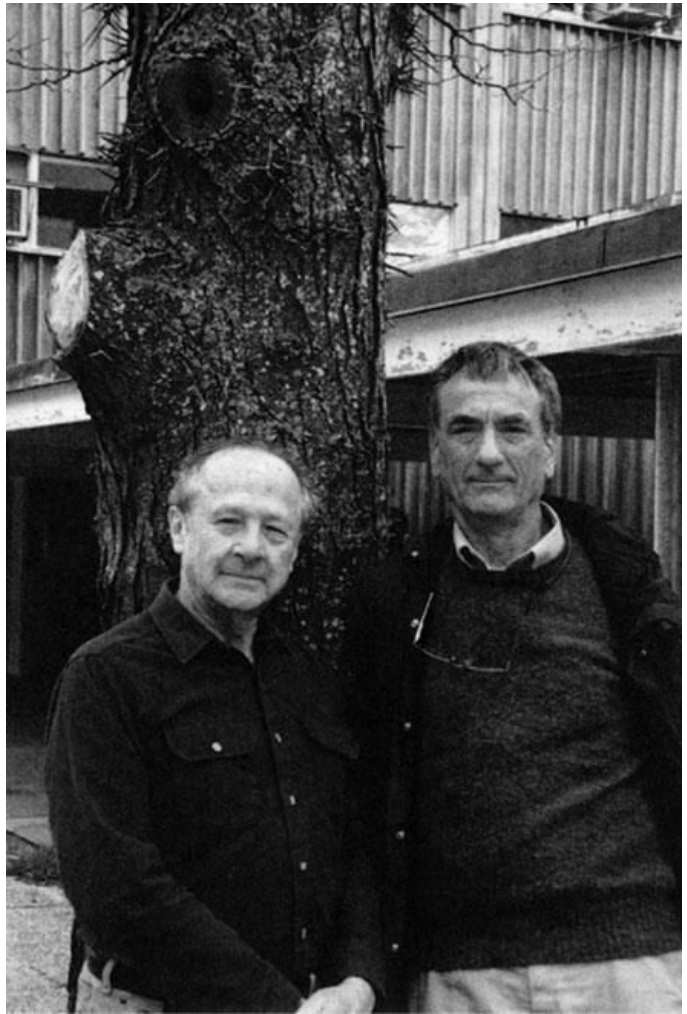
• существующая спираль разрывается на каждом полуобороте путем многократной фрагментации. Синтез новых цепей проходит на фрагментах, которые затем крест-накрест сливаются с отрезками нового материала. Каждый полинуклеотид ный цепь состоит из отрезков старого и нового материала, которые чередуются.



• Краткая биография:

Мэтью Стэнли Мезелсон

- Дата рождения: 24 мая 1930
- Американский учёный-генетик
- Активный сторонник запрета биологического и химического оружия
- Учёная степень: доктор философии.
- Докторская диссертация была о центрифугировании градиента плотности равновесия и о кристаллографии рентгена.

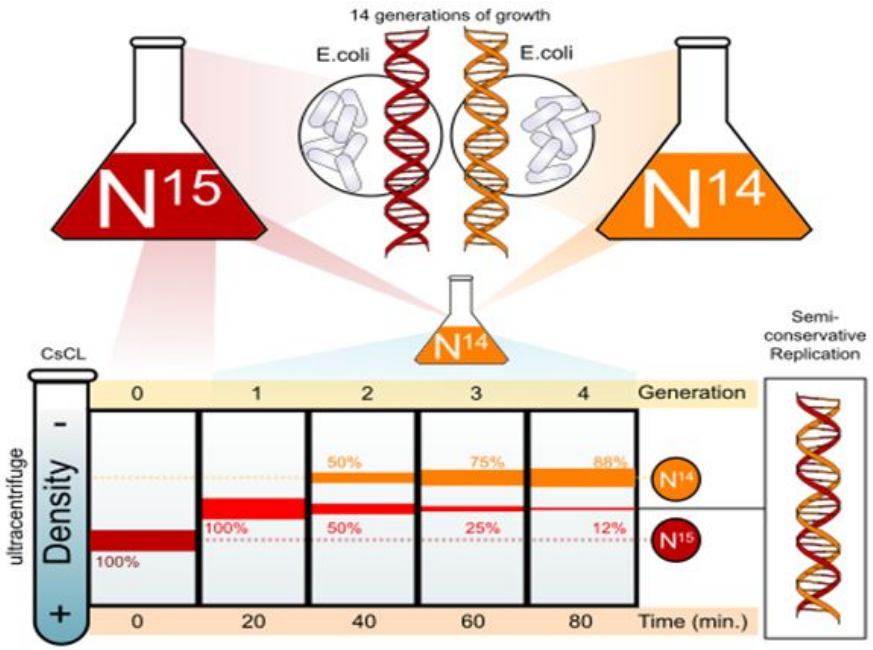


Франклин Уильям Сталь

- Дата рождения: 8 октября 1929
- Американский учёный-генетик
- Заслуженный профессор Биологии в университете Института Орегона Молекулярной биологии
- Внес множество экспериментальных и теоретических данных насчет фага Т4, лямбды и дрожжей.

• Эксперимент Мезельсона и Сталя:

- В 1957 году Мезельсон, Сталь и Джером Виноград опубликовали статью о новом методе изучения молекулярного веса и парциального удельного объёма макромолекул — равновесном ультрацентрифугировании в градиенте плотности.
- Этот метод позволяет разделять молекулы ДНК по их плотности: каждая молекула остановится в том месте градиента, где плотность раствора совпадает с её плавучей плотностью.
- Авторы применили этот метод для разделения молекул ДНК, содержащих изотопы азота ^{14}N и ^{15}N. ^{15}N не радиоактивен, а лишь тяжелее ^{14}N. Содержащие тяжелый изотоп молекулы ДНК функциональны и могут удваиваться.



- Мезельсон и Сталь показали, что если вырастить несколько поколений бактерий Escherichia coli в среде, богатой ^{15}N или ^{14}N, затем центрифугировать их ДНК в градиенте плотности хлористого цезия, то окажется, что более тяжёлая ^{15}N-ДНК останавливается ближе ко дну центрифужной пробирки, чем ^{14}N-ДНК.

• Эксперимент Мезельсона и Сталя:

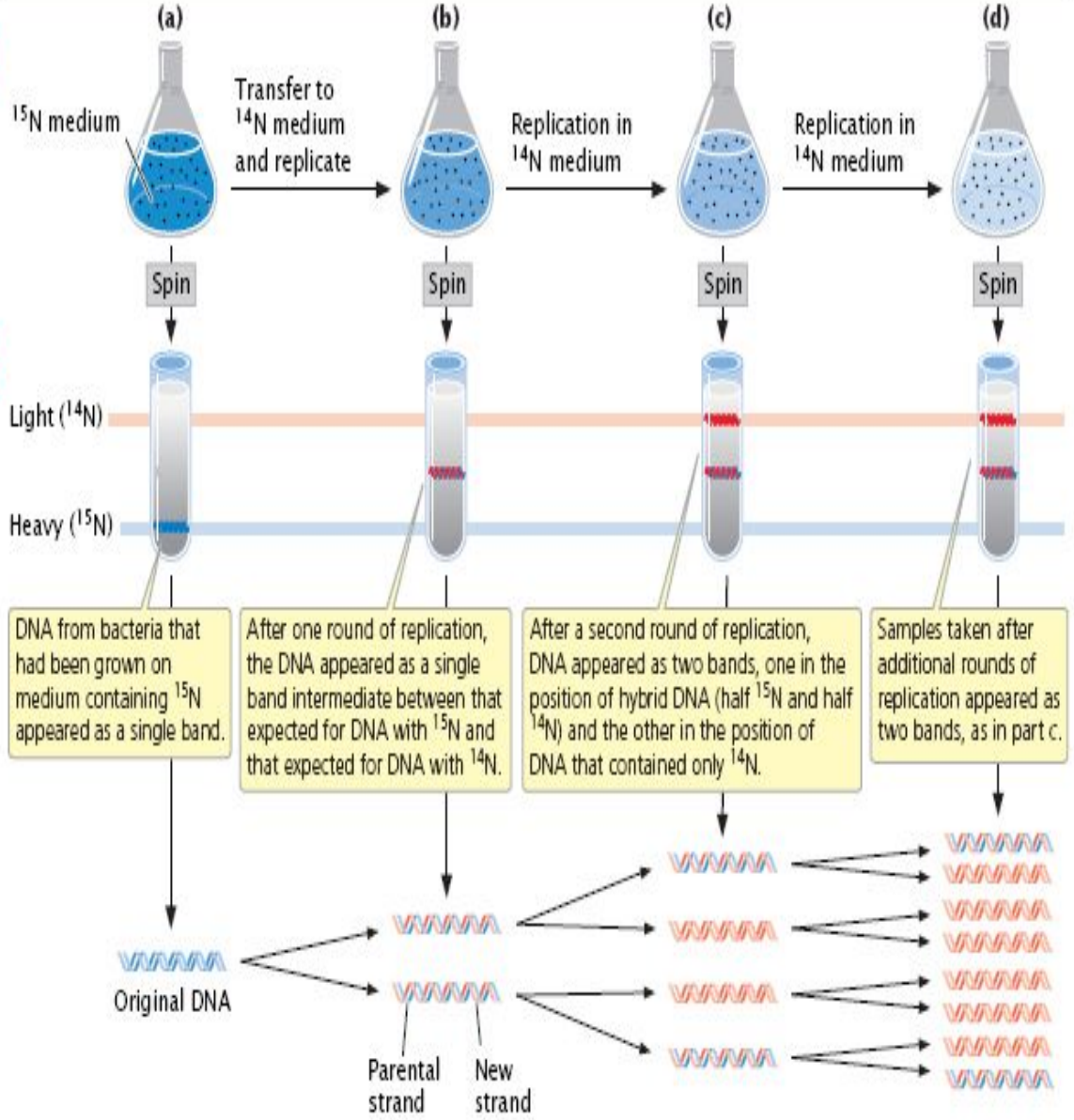
- Для того чтобы установить механизм репликации, E. coli, которые в течение нескольких поколений росли в 15N-содержащей среде (а значит их ДНК содержала только 15N) были перенесены в 14N-содержащую среду, где им было позволено разделиться только один раз.
- Плотность выделенной из этих клеток ДНК оказалась больше плотности ДНК бактерий, выращенных в среде, богатой 14N, но меньше плотности ДНК бактерий, выращенных в 15N среде. Это противоречило гипотезе о консервативном характере репликации ДНК, при котором ДНК разделились бы на две фракции с высокой и низкой плотностью, но не с промежуточной. Таким образом, первая гипотеза была отброшена.
- Однако полученный результат не исключал дисперсный механизм репликации, при котором участки материнской ДНК чередуются с участками дочерней ДНК. Чтобы выяснить, какой из оставшихся механизмов верен, была проанализирована плотность ДНК второго поколения бактерий.
- По гипотезе дисперсной репликации плотность ДНК второго поколения бактерий должна быть одинаковой для всех молекул и занимать промежуточное положение между плотностью ДНК клеток первого поколения и плотностью самой лёгкой ДНК. Оказалось, однако, что клетки второго поколения содержали примерно равные количества лёгких и гибридных ДНК. Этот факт позволил исключить гипотезу дисперсного механизма репликации

Experiment

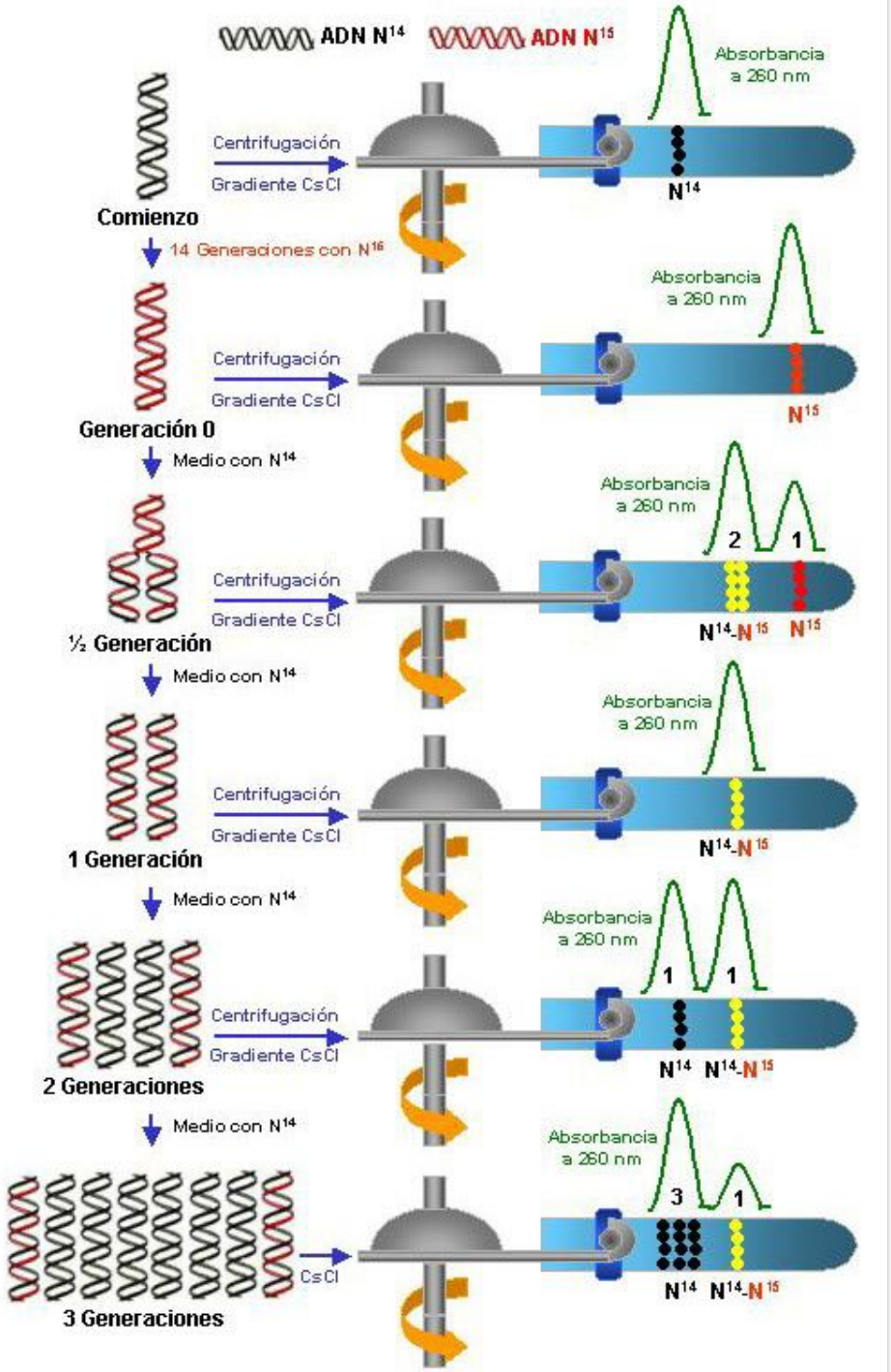
Question: Which model of DNA replication—conservative, dispersive, or semiconservative—applies to *E. coli*?

Method

Results



Conclusion: DNA replication in *E.coli* is semiconservative.



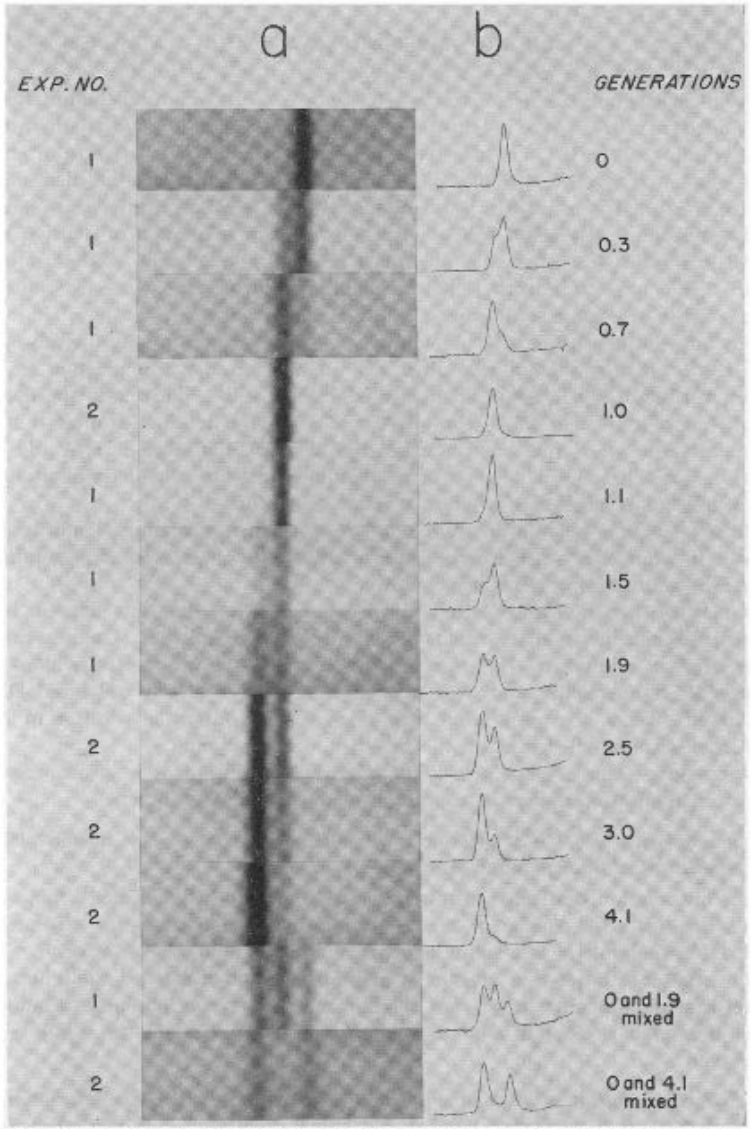


FIG. 4—*a:* Ultraviolet absorption photographs showing DNA bands resulting from density-gradient centrifugation of lysates of bacteria sampled at various times after the addition of an excess of N^{14} substrates to a growing N^{15}-labeled culture. Each photograph was taken after 20 hours of centrifugation at 44,770 rpm under the conditions described in the text. The density of the CsCl solution increases to the right. Regions of equal density occupy the same horizontal position on each photograph. The time of sampling is measured from the time of the addition of N^{14} in units of the generation time. The generation times for Experiments 1 and 2 were estimated from the measurements of bacterial growth presented in Fig. 3. *b:* Microdensitometer tracings of the DNA bands shown in the adjacent photographs. The microdensitometer pen displacement above the base line is directly proportional to the concentration of DNA. The degree of labeling of a species of DNA corresponds to the relative position of its band between the bands of fully labeled and unlabeled DNA shown in the lowermost frame, which serves as a density reference. A test of the conclusion that the DNA in the band of intermediate density is just half-labeled is provided by the frame showing the mixture of generations 0 and 1.9. When allowance is made for the relative amounts of DNA in the three peaks, the peak of intermediate density is found to be centered at 50 ± 2 per cent of the distance between the N^{14} and N^{15} peaks.

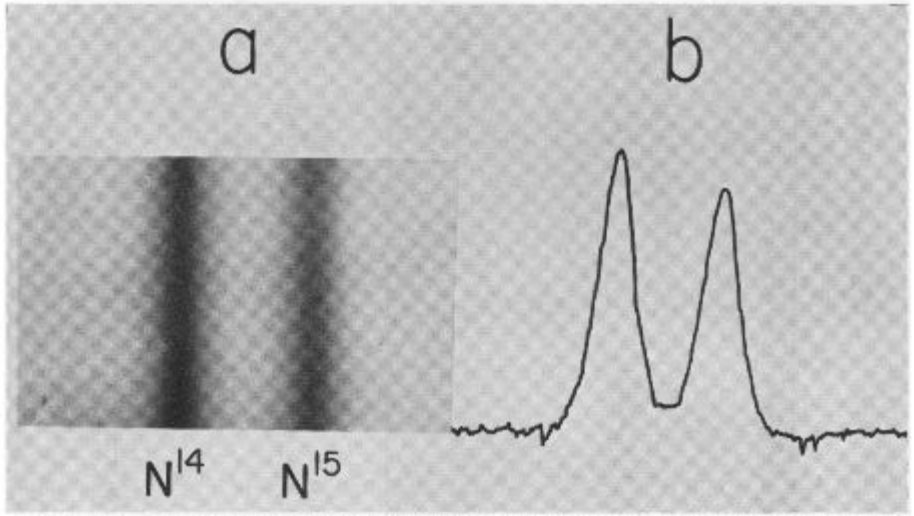


FIG. 2—*a:* The resolution of N^{14} DNA from N^{15} DNA by density-gradient centrifugation. A mixture of N^{14} and N^{15} bacterial lysates, each containing about 10^8 lysed cells, was centrifuged in CsCl solution as described in the text. The photograph was taken after 24 hours of centrifugation at 44,770 rpm. *b:* A microdensitometer tracing showing the DNA distribution in the region of the two bands of Fig. 2*a*. The separation between the peaks corresponds to a difference in buoyant density of 0.014 gm. cm.$^{-3}$

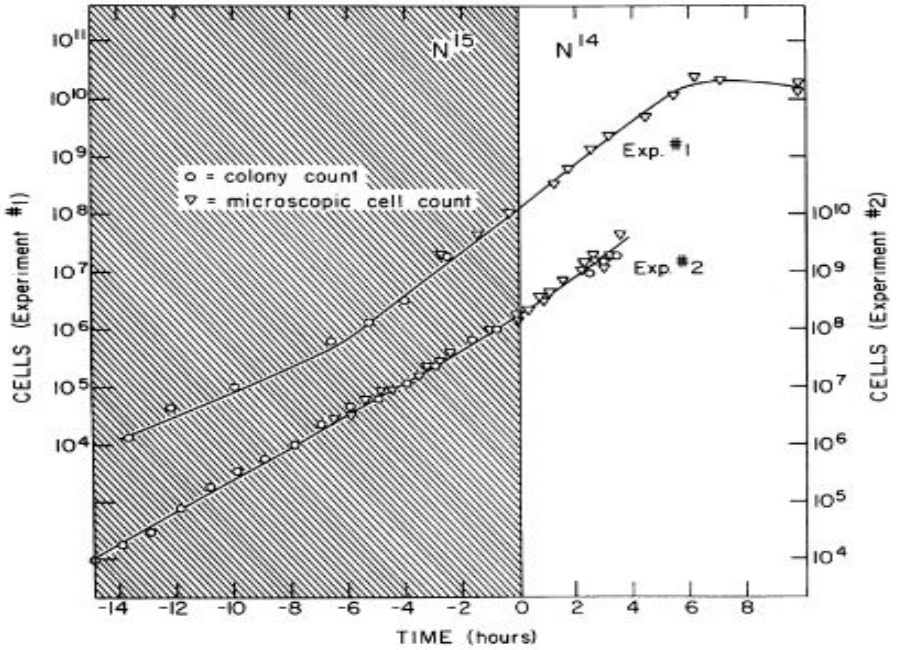


FIG. 3.—Growth of bacterial populations first in N^{15} and then in N^{14} medium. The values on the ordinates give the actual titers of the cultures up to the time of addition of N^{14}. Thereafter, during the period when samples were being withdrawn for density-gradient centrifugation, the actual titer was kept between 1 and 2 × 10^8 by additions of fresh medium. The values on the ordinates during this later period have been corrected for the withdrawals and additions. During the period of sampling for density-gradient centrifugation, the generation time was 0.81 hours in Experiment 1 and 0.85 hours in Experiment 2.

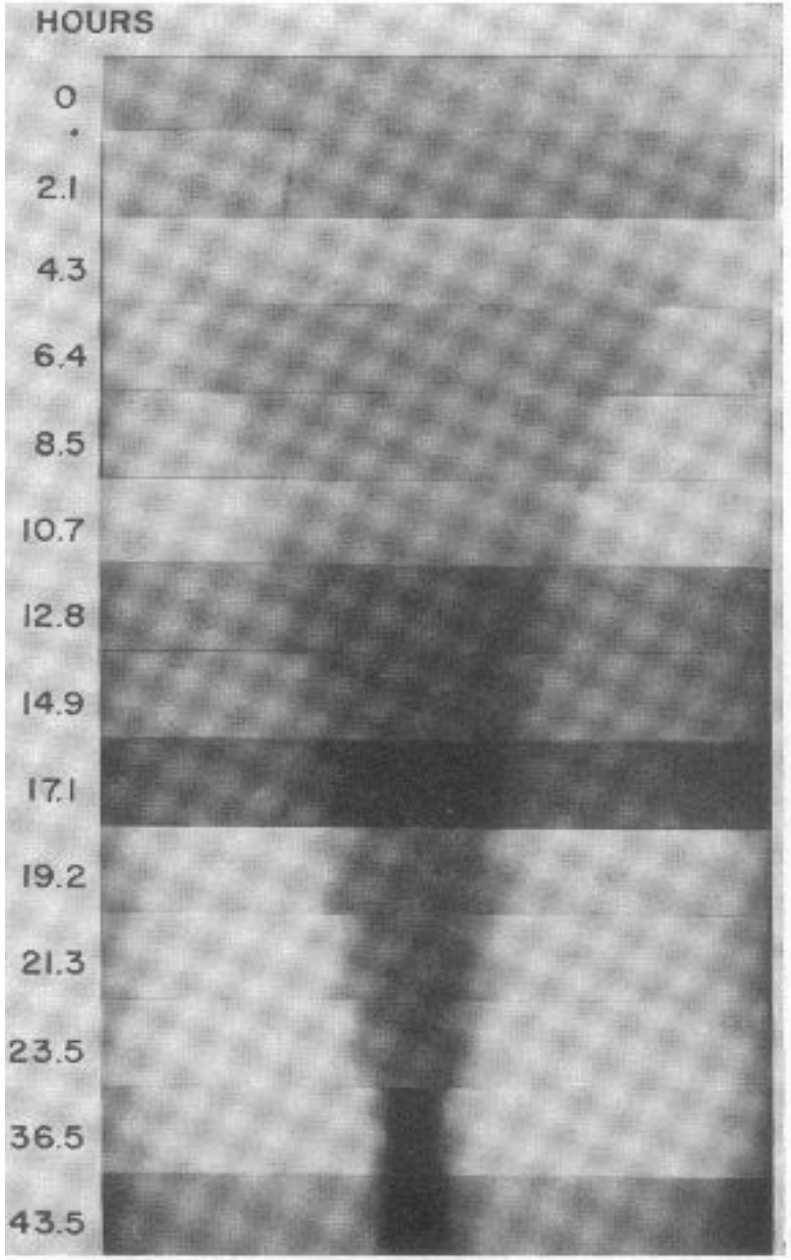


FIG. 1.—Ultraviolet absorption photographs showing successive stages in the banding of DNA from *E. coli*. An aliquot of bacterial lysate containing approximately 10^8 lysed cells was centrifuged at 31,410 rpm in a CsCl solution as described in the text. Distance from the axis of rotation increases toward the right. The number beside each photograph gives the time elapsed after reaching 31,410 rpm.

• Список лиературы:

- THE REPLICATION OF DNA IN ESCHERICHIA COLI* / BY MATTHEW MESELSON AND FRANKLIN W. STAHL https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC528642/pdf/pnas00686-0041.pdf
- Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Т. 3. Пер. с англ.-М.: Мир, 1985.-320 с.
- Курс "Молекулярная Биология" для студентов ФЕН и МедФ, проф. Дымшиц Г. М.
- Сохранение ДНК в ряду поколений: Репликация ДНК (Фаворова О.О., СОЖ, 1996)

Спасибо за внимание!