

Chapter 10 Nucleic Acid Metabolism (14h)

【教学目的】

通过本章教学,使学生掌握嘌呤、嘧啶核苷酸的合成原料、特点及嘌呤碱、嘧啶碱分解的最终产物;参与DNA复制的酶类及DNA生物合成过程;转录过程及转录后加工修饰。熟悉DNA聚合酶、DNA连接酶的作用;原核生物的RNA聚合酶及其亚基组成。了解核苷酸合成的主要步骤及其调节;DNA的修复方式。

【重点难点】

重点:DNA复制(半保留复制和半不连续复制)和损伤修复;RNA转录及转录后的加工

难点:DNA复制的机制及保真性;复制与转录的起始和终止;DNA损伤修复机制。

【教学内容】

Overview:

核苷酸的生物功能

- ①合成核酸
- ②是多种生物合成的活性中间物
糖原合成, UDP-Glc。磷脂合成, CDP-乙醇胺, CDP-二脂酰甘油。
- ③生物能量的载体 ATP、GTP
- ④腺苷酸是三种重要辅酶的组分
NAD、FAD、CoA
- ⑤信号分子 cAMP、cGMP

第一节 核酸和核苷酸的分解代谢(Nucleic Acid and Nucleoside Acid Catabolism)

核酸是核苷酸以 3'、5'-磷酸二酯键连成的高聚物,核酸分解代谢的第一步就是分解为核苷酸,作用于磷酸二酯键的酶称核酸酶(实质是磷酸二酯酶)。

根据对底物的专一性可分为:核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、非特异性核酸酶。

根据酶的作用方式分:内切酶、外切酶。

一、核酸外切酶和核酸内切酶(Exonuclease and Endonuclease)

1. Nucleic acids exonuclease :

Non specific phosphodiesterase, breaking down the nucleic acids to a free nucleotide once a time from one end of the DNA or RNA chain. (它们是非特异性的磷酸二酯酶,作用于核酸链的一端,逐个水解下核苷酸;但它们作用的方向有差异,如蛇毒磷酸二酯酶和牛脾磷酸二酯酶作用方向。

2. Nucleic acids endonuclease

内切核酸酶特异地水解多核苷酸内部的磷酸二酯键,它们是特异性强的磷酸二酯酶,如牛胰核酸酶(RNase),专一作用于RNA,对DNA不作用。脱氧核糖核酸酶(DNase)专一水

解DNA.

如：牛胰脱氧核糖核酸酶（DNase I），可切割双链和单链DNA，产物是5'-磷酸为末端的寡核苷酸。而牛脾脱氧核糖核酸酶（DNase II）降解DNA产生3-磷酸为末端的寡核苷酸。

3. Restriction endonuclease（限制性内切酶）also called restriction enzyme，是指细菌和霉菌中一类能识别并水解外源双链DNA的核酸内切酶，其特点是具有极强的专一性，能识别DNA双链上的特定位点（识别序列）。

二、 Catabolism of nucleotides

Nucleic acids can be hydrolyzed to nucleotides. Whereas, nucleotides may be further degraded to nitrogenous base, pentose and phosphate.

1. Nucleotides degradation

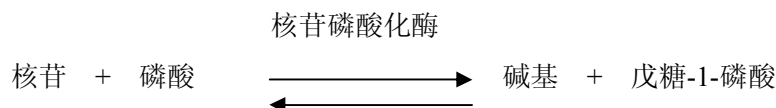
Nucleotides are hydrolyzed to nucleosides and phosphate catalyzed by nucleotidase（核苷酸酶）.Some nucleotidases are non-specific, but others are highly specific.水解核苷酸，产生核苷和磷酸。

非特异性磷酸单酯酶：不论磷酸基在戊糖的2'、3'、5'，都能水解下来。

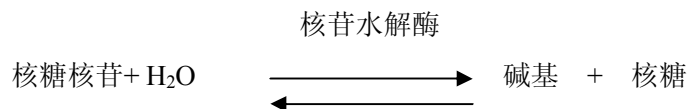
特异性磷酸单酯酶：只能水解3'核苷酸或5'核苷酸（3'核苷酸酶、5'核苷酸酶）

Nucleosides are further break down to base and pentose catalyzed by nucleosidase（核苷酶）There are two types of nucleosidase: nucleoside phosphorylase（核苷磷酸化酶）and nucleoside hydrolase（核苷水解酶）.

① 核苷磷酸化酶：广泛存在，反应可逆。



② 核苷水解酶：主要存在于植物、微生物中，只水解核糖核苷，不可逆



2 .Purine degradation

A和G均经脱氨氧化变为黄嘌呤再进行降解，不同种类的生物分解嘌呤碱的酶系不一样。

各种脱氨酶催化的水解脱氨可发生在嘌呤碱、核苷及核苷酸水平上。

不同种类的生物分解嘌呤碱的能力不同，因此，终产物也不同。

排尿酸动物：灵长类、鸟类、昆虫、排尿酸爬虫类

排尿酸素动物：哺乳动物（灵长类除外）、腹足类

排尿酸酸动物：硬骨鱼类

排尿素动物：大多数鱼类、两栖类

某些低等动物能将尿素进一步分解成NH₃和CO₂排出。

植物分解嘌呤的途径与动物相似，产生各种中间产物（尿酸素、尿酸、尿素、NH₃）。

微生物分解嘌呤类物质，生成NH₃、CO₂及有机酸（甲酸、乙酸、乳酸、等）。

生物进化程度愈高，则分解嘌呤的能力愈差

3. Pyrimide degradation

与嘌呤分解类似，嘧啶分解时有氨基的先水解脱氨基。

胞嘧啶先水解脱氨基转化为尿嘧啶，尿嘧啶和胸腺嘧啶经还原打破环内双键后，水解开环成链状化合物，再水解成 CO_2 ， NH_3 ，-丙氨酸，氨基异丁酸，后者脱氨基后进入有机酸代谢或直接排出体外。

第二节 核苷酸的生物合成(Nucleoside Acid Biosynthesis)

一、从头合成 de novo biosynthetic pathways

由5'-磷酸核糖-1'-焦磷酸(5'-PRPP)开始，先合成次黄嘌呤核苷酸，然后由次黄嘌呤核苷酸(IMP)转化为腺嘌呤核苷酸和鸟嘌呤核苷酸。

嘌呤环合成的前体： CO_2 、甲酸盐、Gln、Asp、Gly

A. Gln 提供 $-\text{NH}_2$ ； N^9 B. Gly: C^4 、 C^5 、 N^7 C. 5,10-甲川 THFA: C^8

D. Gln 提供 $-\text{NH}_2$ ； N^3

闭环

E CO_2 ； C^6 F. Asp 提供 $-\text{NH}_2$ ； N^1 G 10-甲酰 THFA: C^2

Many organisms also have salvage pathways (回补途径) to recover purine and pyrimidine compounds obtained in die diet or released during nucleic acid turnover and degradation.

(一) 嘌呤核糖核苷酸的合成(Purine Nucleoside Acid Synthesis)

1、De nove synthesis of purine nucleotides

首先，从磷酸核糖，Gln， CO_2 ，Gly，Asp 等形成黄嘌呤核苷酸(IMP，也叫肌苷酸)。其中的要点：

1) 嘌呤核苷酸的合成并不是先形成游离的嘌呤，然后生成核苷酸，而是直接形成IMP，以后才转变为其它的嘌呤核苷酸。

2) 5-磷酸核糖-1-焦磷酸(PRPP)是核苷酸中核糖磷酸部分的供体，它是从ATP和核糖-5-磷酸合成的。

3) 嘌呤的各原子是在PRPP的C-1位置上逐渐加上去的。

其关键步骤是从PRPP和Gln形成5-磷酸核糖胺。在这个反应里C-1从 α -构型转变为 β -构型。由此形成的C-N糖苷键具有天然核苷酸所特有的 β -构型。这个反应由焦磷酸的水解向前驱动。

The key point of the de novo pathway for purine synthesis

4) 在5-磷酸核糖胺的位置上，由甘氨酸和甲川四氢叶酸先后提供和原子形成甲酰甘氨酸，至此嘌呤环骨架的—4，5，7，8，9位顺序已形成；

5) 由Gln的酰胺基提供第三位N原子，形成甲酰甘氨酸核苷酸，接着脱水闭环成5-氨基咪唑核苷酸，反应所需的能量来自ATP；

6) 再后，由 CO_2 ，Asp，甲酰四氢叶酸先后提供六员环上的其它原子，最后形成次黄嘌呤核苷酸。

从PRPP到IMP共包括10步反应，整个过程是由大的多酶复合体系催化的；从5'-磷酸核糖合成IMP 共需水解来自ATP的6个高能磷酸键。

7) IMP在细胞中进一步转变成 AMP和GMP。

The biosynthesi 总反应式：



2、AMP、GMP 生物合成的调节

5-磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶是关键酶，可被终产物 AMP、GMP 反馈抑制。

AMP 过量可反馈抑制自身的合成。

GMP 过量可反馈抑制自身的合成。

3、药物对嘌呤核苷酸合成的影响

筛选抗肿瘤药物，肿瘤细胞核酸合成速度快，药物能抑制。

①羽田杀菌素

与 Asp 竞争腺苷酸琥珀酸合成酶，阻止次黄嘌呤核苷酸转化成 AMP。

②重氮乙酰丝氨酸、6-重氮-5-氧正亮氨酸，是 Gln 的结构类似物，抑制 Gln 参与的反应。

③氨基蝶呤、氨甲蝶呤 叶酸的结构类似物，能与二氢叶酸还原酶发生不可逆结合，阻止 FH₄ 的生成，从而抑制 FH₄ 参与的各种一碳单位转移反应。

(二) 嘧啶核糖核苷酸的合成(Pyrimidine Nucleoside Acid Synthesis)

1. The de novo biosynthesis of pyrimidines begin with the formation of carbamoyl phosphate

The key point of de nove synthesis of pyrimidines

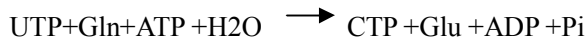
1) 与嘌呤核苷酸从头合成的反应顺序相反，嘧啶核苷酸的合成是嘧啶环先组装好，然后再与核糖磷酸结合，形成嘧啶核苷酸。

2) 天冬氨酸和氨甲酰磷酸反应，脱氢形成二氢乳清酸，嘧啶环形成。二氢乳清酸脱氢形成乳清酸。

3) PRPP也是嘧啶核苷酸合成中的核糖磷酸供体,乳清酸从获得核糖磷酸部分，经脱羧后便生成尿苷酸。

4) 胞嘧啶核苷酸则是从尿苷三磷酸的水平上由Gln提供氨基转变而成。

CTP合成酶



2. 嘧啶核苷酸生物合成的调节（大肠杆菌）

氨甲酰磷酸合成酶：受 UMP 反馈抑制

天冬氨酸转氨甲酰酶：受 CTP 反馈抑制

CTP 合成酶：受 CTP 反馈抑制

3. 药物对嘧啶核苷酸合成的影响

有多种嘧啶类似物可抑制嘧啶核苷酸的合成。

5-氟尿嘧啶抑制胸腺嘧啶脱氧核苷酸的合成。

5-氟尿嘧啶在人体内转变成相应的核苷酸，再转变成脱氧核苷酸，可抑制脱氧胸腺嘧啶核苷酸合成酶，干扰尿嘧啶脱氧核苷酸经甲基化生成脱氧胸苷的过程，DNA 合成受阻。

二、补救途径

利用已有的碱基和核苷合成核苷酸

(1) 磷酸核糖转移酶途径（重要途径）

嘌呤碱和 5-PRPP 在特异的磷酸核糖转移酶的作用下生成嘌呤核苷酸

(2) 核苷激酶途径（但在生物体内只发现有腺苷激酶）

腺嘌呤在核苷磷酸化酶作用下转化为腺嘌呤核苷，后者在核苷磷酸激酶的作用下与 ATP 反应，生成腺嘌呤核苷酸。

嘌呤核苷酸的从头合成与补救途径之间存在平衡。Lesch-Nyan 综合症就是由于次黄嘌呤

呤：鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷，AMP合成增加，大量积累尿酸，肾结石和痛风。

三、脱氧核糖核苷酸的合成(Deoxy-Nucleoside Acid Synthesis)

脱氧核糖核苷酸是由相应的核糖核苷酸衍生而来的。

(1) 腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶核糖核苷酸经还原，将核糖第二位碳原子的氧脱去，即成为相应的脱氧核糖核苷酸。

(2) 胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸：先由尿嘧啶核糖核苷酸还原形成尿嘧啶脱氧核糖核苷酸，然后尿嘧啶再经甲基化转变成胸腺嘧啶。

在生物合成和能量转换中，核苷酸的活泼形式是核苷二磷酸(NDP)和核苷三磷酸(NTP)。

NMP转变成NTP是所有生物共有的。

NDP, NTP的生成是由核苷一磷酸(NMP)分别在相应(专一)的激酶催化下，由提供磷酸基团，转变而成的。

I 核苷酸还原酶系

由硫氧还蛋白、硫氧还蛋白还原酶和核苷酸还原酶(B₁、B₂)三部分组成。

B₁、B₂亚基结合后，才具有催化活性。

B₁上的巯基和B₂上的酪氨酸残基是活性中心的催化基因。

另外核苷酸还原酶所需的还原当量还可来自谷胱甘肽。

II 核苷酸还原酶结构模型及催化机理

B₁亚基上有两个调节部位，一个影响整个酶的活性(一级调节部位)，另一个调节对底物的专一性(底物结合部位)

一级调节部位：ATP是生物合成的信号分子，而dATP是核苷酸被还原的信号。

底物调节部位：①与ATP结合，可促进嘧啶类的UDP、CDP还原成dUDP、dCDP；②与dTTP或dGTP结合，可促使GDP(ADP)还原成dGDP(dADP)

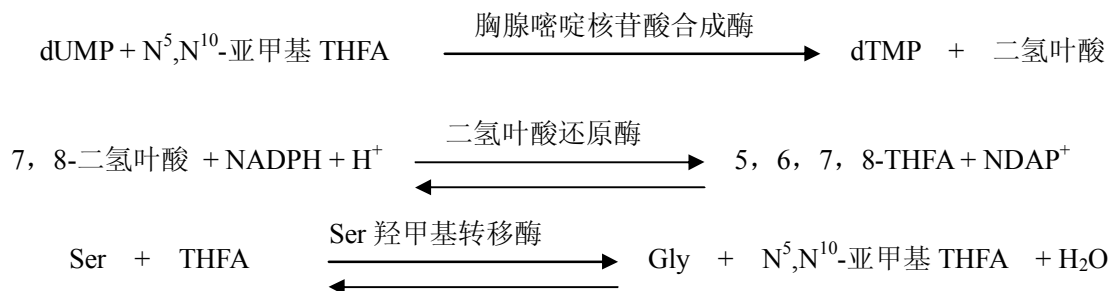
III 脱氧核苷酸的补救(脱氧核苷激酶途径)

脱氧核苷酸也能利用已有的碱基或核苷进行合成(补救途径)，但只有脱氧核苷激酶途径，不存在类似的磷酸核糖转移酶途径。

VI 胸腺嘧啶脱氧核苷酸的合成

由尿嘧啶脱氧核苷酸(dUMP)经甲基化生成。

Ser提供甲基，NADPH提供还原当量。



四氢叶酸是一碳的载体，参与嘌呤核苷酸和胸腺嘧啶脱氧核苷酸的合成。

氨基嘌呤、氨甲蝶呤是叶酸的类似物，能与二氢叶酸还原酶不可逆结合，阻止FH₄的生

成，从而抑制 FH₄ 参与的一碳单位的转移。可用于抗肿瘤。

第三节 DNA 的生物合成(DNA Biosynthesis)

生物体的遗传信息储存在 DNA 中，并通过 DNA 的复制由亲代传给子代。在子代的生长发育中遗传信息自 DNA 转录给 RNA，然后翻译成蛋白质以执行各种生命功能，使后代表现出与亲代相似的遗传性状。

1958 年，F.Crick 提出中心法则：

- (1) 以原 DNA 分子为模板，合成出相同 DNA 分子的过程。
- (2) 以某一段 DNA 分子为模板，合成出与其序列对应的 RNA 分子的过程。
- (3) 以 mRNA 为模板，根据三联密码规则，合成对应蛋白质的过程。

DNA 生物合成有两种方式：DNA 复制和反转录

DNA 体内复制涉及：原核、真核生物的染色体、细菌质粒（环状，双链）、真核细胞器 DNA（线粒体、叶绿体）、病毒（双链，环状）

DNA 的体外复制：分子克隆。

DNA replication (DNA 复制) refers to the process of DNA biosynthesis by the rule of bases complementary pairing and using each strand of the parental duplex as templates(以亲代 DNA 分子的双链为模板，按照碱基配对的原则，合成出与亲代 DNA 分子相同的两个双链 DNA 分子的过程)。

一、DNA 复制

(一) DNA 的半保留复制及实验证据(Semiconservative Replication and Experiment Evidence)

1. Semi-conservative mechanism (半保留复制的机理)

在 DNA 复制过程中亲代 DNA 分子的两条链首先分开，然后以每条链为模板，按照碱基配对原则 (A—T, G—C)，这两条模板链各合成一条互补链。

这样，从亲代的一个双螺旋分子形成了两个与原先的碱基序列完全相同的子代 DNA 分子。

碱基的配对使得双螺旋碱基的配对使得双螺旋 DNA 分子在复制时以半保留的形式进子在复制时以半保留的形式进行。

2. DNA replication was proved to be semiconservative by the Meselson-Stahl experiment using E. coli cells. 1958 年，Meselson 和 Stahl 用 ¹⁵N 标记 E.coli. DNA，证明了 DNA 的复制是半保留复制。

1963 年，Cairns 用放射自显影法，在显微镜下首次观察到完整的正在复制的 E. coli. 染色体 DNA。

3. Biological sense:

DNA replication by semi-conservation makes the two daughter duplexes have the same sequence as the parental duplex. Thus, genetic message of organism keeps relative stable.

DNA is much more stable than other components in cell. This is consisted with its function —— carrier of genetic message.

DNA 的半保留复制可以说明 DNA 在代谢上的稳定性。经过多代复制，DNA 的多核苷酸链仍可以保持完整，并存在于后代而不被分解掉。

4. The direction of DNA strand synthesis :

The template strands are in the 3' -5'direction while the new strands are synthesized 5'-3' (模板链的方向是3'-5'，而新生链的方向是5'-3')

replicons (复制子), origins (起始点), termini (终止点) and replication forks (复制叉)。任何一段能够独立复制的DNA片段成为一个复制子。

5. DNA的几种复制方式

(1) 直线双向复制

单点，双向，T7

多点，双向，真核染色体 DNA

(2) θ 型复制：环状双链 DNA，单向或双向 (E .coli.)

(3) 滚环复制：环状单链 DNA， Φ_x174

(4) D 环复制：线粒体、叶绿体 DNA

(5) 多复制叉复制：

第一轮复制尚未完成，复制起点就开始第二轮的复制。

在 E.coli. 富营养时，可采取多复制叉复制方式。E.coli. DNA 的复制最快可达 50Kb/min，完全复制需 40min，富营养时，20min 分裂。而真核染色体要 6-8 小时。

(二) DNA 的聚合反应及其有关的酶(DNA Polymerases)

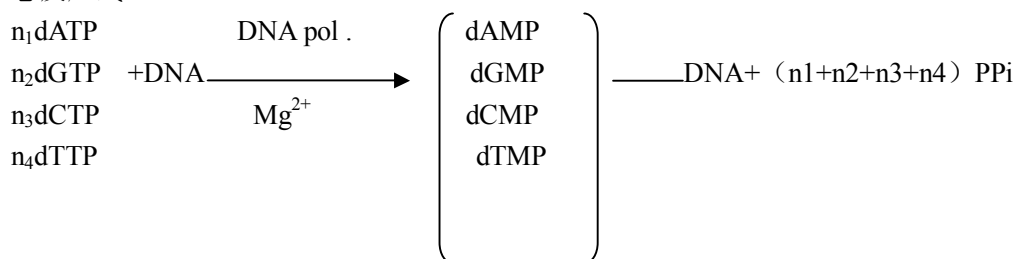
1. DNA 聚合反应

DNA 聚合反应必备的条件

- (1) DNA 聚合酶
- (2) DNA 模板(反转录时用 RNA 模板)
- (3) 引物 (DNA、RNA 或蛋白质)
- (4) 4 种 dNTP
- (5) Mg^{2+}

聚合反应过程及特点

总反应式：



在链的延长过程中，链的游离 3' -羟基，对进入的脱氧核糖核苷三磷酸 α 磷原子发生亲核攻击，生成 3' .5' -磷酸二酯键，并脱下焦磷酸。

DNA 聚合酶的反应特点:

- (1) 以 4 种 dNTP 为底物
- (2) 反应需要接受模板的指导, 不能催化游离的 dNTP 的聚合。
- (3) 反应需有引物 3'-羟基存在
- (4) 链生长方向 5' → 3'

2、DNA 聚合反应有关的酶

(1) **DNA polymerase in prokaryotes** (**DNA 聚合酶** 又称依赖 DNA 的 DNA 聚合酶, 是复制的关键酶)

Three types of DNA polymerase have been found in prokaryotes:

DNA polymerase I, II and III (DNA 聚合酶 I, DNA 聚合酶 II, DNA 聚合酶 III).

① DNA polymerase I in E.coli. DNA pol. I (Kornberg 酶, 400 copy/cell)

单体酶, 分子量 109Kd, 含一个 Zn^{2+} , 每个细胞中含 400 个 DNA pol. I

催化活性:

5' → 3' 聚合活性

3' → 5' 外切活性

5' → 3' 外切活性

用蛋白水解酶将 DNA pol. I 部分水解可得:

大片段 (Klenow), 75Kd, 活性: 5' → 3' 聚合活性、3' → 5' 外切活性。

小片段, 36Kd, 活性: 5' → 3' 外切活性 (只作用于双链 DNA 的碱基配对部分, 切除修复)。

DNA 聚合酶具有的 3'—5' 的外切酶活性, 使其在聚合过程中可及时切除参与新链 3' 末端的错误核苷酸。即它具有校对功能, 这使它具有高保真度。

DNA 聚合酶具有的 5'—3' 的外切酶活性, 在切除 RNA 引物和 DNA 损伤修复中发挥主要作用。

② DNA polymerase II in prokaryotes (100 copy/cell)

单体酶, 分子量 120Kd

催化活性: 5' → 3' 聚合(活性很低)

3' → 5' 外切

可能在 DNA 的修复中起某中作用。

③ E.coli. DNA pol. III in prokaryotes (复制酶, 10-20 copy/cell)

寡聚酶, 全酶由 10 种共 22 个亚基组成, α 、 ϵ 和 θ 三种亚基组成核心酶。

DNA pol. III 是合成新链 DNA 主要的酶, 又称复制酶 (Replicase)

Pol. III 的 5' → 3' 外切酶活性只作用于单链 DNA。

DNA 聚合酶 III 为寡聚酶, 全酶 (holoenzyme) 由 10 种亚基组成一个非对称的二聚体。其中 α 、 ϵ 、 θ 亚基组成核心酶 (core enzyme), 两个 β 亚基象夹子一样包围 DNA, 在 DNA 链上滑动, 保持酶与模板的紧密结合, 有力增强酶的工作效率。

实验证明, DNA 聚合酶 III 才是大肠杆菌复制的重要酶。

DNA 聚合酶有 6 个结合位点

- (1) 模板 DNA 结合位点

- (2) 引物结合位点
- (3) 引物 3' -OH 位点、反应位点
- (4) 底物 dNTP 结合位点
- (5) 5' → 3' 外切位点(pol. II 没有)
- (6) 3' → 5' 外切位点(校正)

(2) 真核生物 DNA 聚合酶

真核 DNA 聚合酶一般不具备外切活力，可能由另外的酶在 DNA 复制中起校正功能。

- (1) DNA 聚合酶 α ，多亚基，功能与 E.coli. pol.III 类似，是真核 DNA 复制酶。
- (2) DNA 聚合酶 β ，主要在 DNA 损伤的修复中起作用。
- (3) DNA 聚合酶 γ ，从线粒体得到，可能与线粒体 DNA 的复制有关。
- (4) DNA 聚合酶 δ ，特点：有 3' → 5' 外切活力。

(3) DNA helicase(DNA解螺旋酶)

大肠杆菌的解螺旋酶 I、II、III 与 rep 蛋白共同作用，将 DNA 两条链解开。

解螺旋酶 I、II、III 沿着模板链的 5' → 3' 方向随着复制叉的前进而移动，而 rep 蛋白则在另一条模板链上沿 3' → 5' 方向移动。

(4) Single-stranded DNA-binding protein(SSB proteins) (单链结合蛋白)

复制叉上的解螺旋酶，沿双链 DNA 前进，产生单链区，大量的单链 DNA 结合蛋白与单链区结合，阻止复性和保护单链 DNA 不被核酸酶降解。

It can prevent the single-stranded regions from base-pairing again so that each of the two strand is accessible for replication.

(5) Topoisomerase(拓扑异构酶)

DNA 复制时，模板 DNA 超螺旋的松弛和复制后超螺旋的再恢复都需要拓扑异构酶的参与。

有两种类型拓扑异构酶：

拓扑异构酶 I (DNA 解螺旋酶, The DNA template is a double helix with each strand)

可松解负超螺旋。

拓扑异构酶 II (topoisomerase II also called DNA gyrase DNA 即促旋酶)

可同时切断双链，让另一双链穿过切口，再把切断的双链重新接好，它可引入负超螺旋，消除复制叉前进时产生的扭曲张力，这两种酶共同控制着 DNA 的拓扑结构。

(6) Primerase and primosome (引物酶和引发体)

引物酶单独存在时相当不活泼，只有与有关蛋白结合成为一个复合体时才有活性，这种复合体称为引发体。

引发体上几个比较重要的辅助蛋白是：

细胞内，DNA 的复制需要引物 (DNA 或 RNA)，引物酶或 RNA 聚合酶可合成 6-10 个碱基的 RNA 引物。

DNA 复制为什么要用 RNA 引物？(为什么 DNA 聚合酶要用引物，RNA 聚合酶不需要引物？)

- (1) 从模板复制最初几个核酸时，碱基堆集力和氢键都较弱，易发生错配。
- (2) 新复制的最初几个核苷酸，没有与模板形成稳定双链，DNA 聚合酶的 5' → 3' 校对功

能难发挥作用。

(7) DNA ligase (DNA连接酶)

催化双链DNA中的一条链上的缺口(nick)共价连接,缺口上的3'-OH与5'-磷酸基必须相邻。否则DNA连接酶就不能将缺口弥合,它也不能将两条游离的单链连接起来。

DNA连接酶是DNA复制,损伤修复和重组中不可缺少的酶。

大肠杆菌连接酶只能在模板上连接DNA缺口。T₄DNA ligase即可连接粘性末端的DNA,又可连接平齐末端的双链DNA。

E.coli和其它细菌的DNA ligase以NAD为能源,动物细胞和噬菌体DNA ligase以ATP为能源。

(三) DNA的半不连续复制(Semidiscontinuous Replication)

DNA双链复制时,一条链是连续合成的(前导链,leading strand),另一条链是不连续合成的(滞后链或后随链,lagging strand),这种前导链的连续复制和后随链的不连续复制方式称DNA的半不连续复制。

冈崎片段(Okazaki fragment):在不连续的后随链DNA合成中形成的DNA短片段。1968年发现。

长度:细菌:1Kb-2Kb,相当于一个顺反子的大小。

真核:100-200bp,约等于一个核小体DNA的长度。

On the template 3' 5' orientation, the new DNA is synthesized continuously.

This new DNA is called the leading strand (在走向3'5'的模板链上,新DNA是连续合成的,这条新DNA称先导链 The leading strand

The new DNA strand which is made by this discontinuous method is called the lagging strand (滞后链) (在走向5'3'的模板链上,DNA多聚酶只能按5'3'的方向合成许多约100个核苷酸长的小片段,然后再将其连接成一条完整的子代链,称为滞后链。

RNA primer (RNA 引物)

任何一种DNA聚合酶都不能从头起始合成一条新的DNA链,必需有一段引物。在后滞连上,每个冈崎片段都需要引物才能开始合成DNA

DNA合成时的引物为一段大约5个核苷酸长的RNA,它是由引物酶合成的。该酶能在单链DNA模板上直接从头合成RNA,不需要引物。

DNA聚合酶把脱氧核糖核苷酸逐个加到引物的3'-OH末端,即向3'端延伸。

因此DNA合成由RNA作引物。在冈崎片段被连接之前这些引物被切除,留下的空隙用DNA填补。

DNA复制以RNA作引物,这与DNA复制高保真度有关。

(四) DNA复制的过程(DNA replication)

DNA replication in prokaryotes

1. 复制的起始

引发:当DNA的双螺旋解开后,合成RNA引物的过程。

引发体:引物合成酶与各种蛋白质因子(dnaB、dnaC、n、n' n'' I)构成的复合体,

负责 RNA 引物的合成。

引发体沿着模板链 5' → 3' 方向移动 (与冈崎片段合成的方向正好相反, 而与复制叉移动的方向相同), 移到一定位置上即可引发 RNA 引物的合成。

大肠杆菌的复制起始点(oriC) 的结构为: 含有两个系列的重复单位, 其中有3个13bp 重复序列和4个9bp重复序列, 均富含AT。此序列在所有细菌复制起始位点中都是保守的。

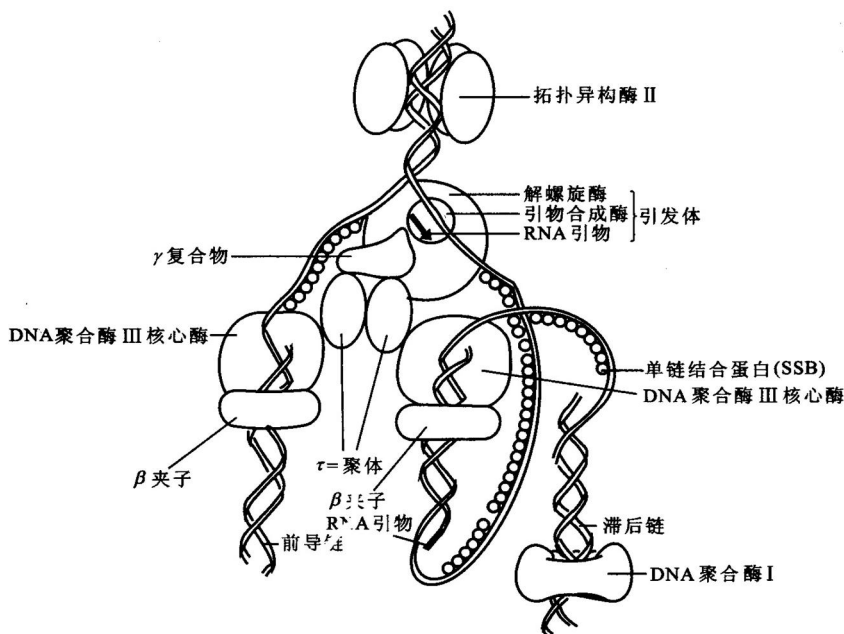


图 大肠杆菌复制体结构示意图

大肠杆菌复制原点起始复制所需蛋白质:

- | | |
|--------------|--------------------|
| DNaA | 在 原 点 处 打 开 双 螺 旋 |
| DNaB | 使 DNA 解 旋 |
| DNaC | DNaB 结 合 在 原 点 所 需 |
| Hu | 刺 激 起 始 |
| 引 物 酶 (DNaG) | 合 成 RNA 引 物 |
| SSB | 结 合 单 链 DNA |
| RNA 聚 合 酶 | 促 进 DNaA 活 性 |
| 旋 转 酶 | 松 弛 DNA 扭 曲 应 力 |

20 个 DnaA 结 合 在 四 组 9bp 重 复 区, 形 成 起 始 复 合 物, DNA 环 绕 此 复 合 物。

三 组 13bp 重 复 区 依 次 变 性, 产 生 开 放 型 复 合 物。

DnaB (在 DnaC 协 助 下) 与 开 放 复 合 物 结 合, 进 一 步 解 链。

2. DNA 链的延长反应

前导链只需要一个 RNA 引物, 后随链的每一个冈崎片段都需要一个 RNA 引物, 链的延长反应由 DNA pol.III 催化。

复制体: 在 DNA 合成的生长点 (既复制叉上) 分布着许多与复制有关的酶和辅助因子, 它们在 DNA 的模板链形成离散的复合物, 彼此配合进行高度精确的复制, 称为复制体。

复制体沿着复制叉方向前进就合成 DNA。

3. RNA 引物的切除及缺口补齐

DNA pol I 的 5' → 3' 外切活力, 切除 RNA 引物。

DNA pol I 的 5' → 3' 合成活性补齐缺口。

4. DNA 切口的连接

DNA ligase, 动物、真核由 ATP 供能, 原核由 NAD 供能。

5. DNA 合成的终止

环状 DNA、线性 DNA, 复制叉相遇即终止。

复制终止是在终止位点, 有一种称为终止利用基质和终止位点结合, 抑制复制体的 DnaB 解螺旋酶活性, 防止复制叉通过终止位点。

复制完成时, 两个子代链 DNA 双链是互相套在一起的。

两个完整的 DNA 分子最终分离需要拓扑异构酶 II。

细胞分裂时, 两个分子分割到子代细胞中的过程及有关这个过程的详细机制还不完全清楚。

小结:

(1) DNA 解螺旋酶解开双链 DNA。

(2) SSB 结合于 DNA 单链。

(3) DNA 旋转酶引入负超螺旋, 消除复制叉前进时带来的扭曲张力。

(4) DNA 引物酶(在引发体中)合成 RNA 引物。

(5) DNA pol.III 在两条新生链上合成 DNA。

(6) DNA pol I 切除 RNA 引物, 并补上 DNA。

(7) DNA ligase 连接一个冈崎片段。

DNA 复制过程中, 聚合酶对 dTTP 和 dUTP 的分辨能力高, 有少量 dUTP 掺入 DNA 链中, 此时, U-糖苷酶、AP 内切酶、DNA pol I、DNA ligase 共同作用, 切除尿嘧啶, 接上正确的碱基。

真核生物 DNA 的复制 (DNA replication in eukaryotes)

1. 复制起点和单位

真核生物染色体 DNA 是多复制子, 有多个复制起点, 可以多点起始, 分段进行复制。每个复制子大多在 100-200bp 之间, 比细菌染色体 DNA (单复制子) 小得多。

真核生物 DNA 复制叉移动的速度比原核的慢, 如哺乳动物复制叉移动的速度每分钟 1-3Kb, 细菌每分钟 5Kb。

真核生物染色体全部复制完成前, 起点不再从新开始复制。而在快速生长的原核生物中, 起点可以连续发动复制。真核生物在快速生长时, 可采用更多的复制起点同时复制。如黑腹果蝇, 早期胚胎细胞中相邻复制起点的平均距离为 7.9kb, 而在培养的成体细胞中, 平均距离为 40kb, 成体细胞只利用一部分复制起点。

2. 复制过程中组蛋白的装配

核小体的结构 (200bp 左右)

在真核生物的复制子上, 亲代染色体的核小体被逐个打开, 组蛋白以完整的八聚体形式直接转移到子代 DNA 的前导链上, 新合成的组蛋白与后随链组装成核小体。因此, DNA 的复制是半保留的, 而组蛋白则是全保留的。

3. 真核生物 DNA 复制的终止

端粒：一段 DNA 序列与蛋白质形成的一种复合体，是真核细胞染色体末端所特有的结构。

功能：

- (1) 保证线性 DNA 的完整复制
- (2) 保护染色体末端
- (3) 决定细胞寿命，胚系细胞含端粒酶，体细胞不表达端粒酶。

端粒 (telomeres) 分布于线性真核染色体末端。酵母端粒约 100bp 的重复序列，形式为：5' (TxGy) n 3' (AxCy) n, x 和 y 一般为 1—4。

端粒末端的重复序列，通过端粒酶 (telomerase) 将其加到染色体末端。

端粒酶含有 RNA 和蛋白质 (起 DNA 聚合酶的作用) 两种组分，RNA 分子约 159b, 含有多个 CyAx 重复序列，RNA 分子用作端粒 TxGy 链合成的模板。端粒酶是一种反转录酶，它只合成与酶自身的 RNA 模板互补的 DNA 片段。

人类体细胞的端粒长度，随个体年龄增加而逐渐缩短。细胞每分裂一次，端粒缩短 50-200bp, 短至 1-4Kbp 时，细胞就停止分裂。若能重建端粒，则细胞可以永远分裂。恶性肿瘤细胞端酶表达多。

(五) RNA 指导下的 DNA 合成 (Reverse Transcription 反转录)

Reverse transcription (逆转录) some RNA virus (retrovirus) can synthesis DNA by using its RNA as template (一些逆转录病毒能以其 RNA 为模板合成 DNA, 称为逆转录)。

1. reverse transcriptase (反转录酶)：

1970年 Temin 和 Baltimore 同时分别从劳氏肉瘤病毒和小鼠白血病病毒等致癌的 RNA 病毒中分离出逆转录酶。逆转录酶是一种多功能酶，拥有三种酶的活力：

- (1) 依赖 RNA 的 DNA 聚合酶活力，即以 RNA 为模板，合成一条 DNA 互补链 (cDNA, complementary DNA)，形成 RNA-DNA 杂交分子；
- (2) 具有核糖核酸酶 H 的活力，即水解 RNA—DNA 杂交链中的 RNA，起着 3'—5' 和 5'—3' 外切酶活力；
- (3) 依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶活力，即以新合成的 DNA 为模板，合成互补 DNA 链，形成 DNA 双螺旋。

2. The process of reverse transcription (反转录过程)

逆转录酶催化反应方式与其它 DNA 聚合相同，也是 5'—3' 方向聚合，并需要引物。该酶需要一个专一的 tRNA 分子作为引物和提供启动合成所需要的游离的 3'—OH 末端。由于它能催化上述三类反应，从而能以单链病毒 RNA 基因组为模板合成双链 DNA 基因组。合成的双链病毒 DNA 参入到被感染的真核细胞双链 DNA 基因组中，宿主细胞基因组因此而发生改变，正常的细胞转变成癌细胞。细胞分裂后，病毒 DNA 被转录产生病毒 RNA，病毒 RNA 翻译产生病毒蛋白。病毒 RNA 和病毒蛋白结合形成新的病毒颗粒并与细胞膜结合，最后从细胞中释放出来。

3. Biological sense of reverse transcription (逆转录的生物学意义)

逆转录过程的发现，不仅扩充了中心法则，还有其重要的生物学意义。它有助于人们对 RNA 病毒致癌机制的了解，并对防治肿瘤提供了重要线索。

20世纪80年代初发现的一种对人类健康威胁极大的传染病—艾滋病，现已证明它也是一种逆转录病毒引起的，为了了解艾滋病的起因以及寻找防治途径，都需要深入研究这类病毒

的生活周期和逆转录过程。

后来的研究表明, 逆转录酶不仅存在于逆转录病毒, 也存在于正常细胞中如分裂期的淋巴细胞和胚胎细胞等, 因而认为这些酶可能在细胞分裂和胚胎发生中起某种作用。

另外, 转录酶已成为分子生物学和基因工程中常用的一种工具酶, 利用它可以从 mRNA 合成相应的 cDNA, 在基因结构研究、氨基酸序列预测以及基因工程中具有十分重要的意义。

(六) DNA 的损伤与修复(DNA Damage and Repair)

一些物理化学因子如紫外线、电离辐射和化学诱变剂均可引起 DNA 损伤, 破坏其结构与功能。然而在一定条件下, 生物机体能使这种损伤得到修复。

紫外线可使 DNA 分子中同一条链上两个相邻的胸腺嘧啶碱基之间形成二聚体 (TT), 两个 T 以共价键形成环丁烷结构。CT、CC 间也可形成少量二聚体 (CT、CC), 使复制、转录受阻。

细胞内具有一系列起修复作用的酶系统, 可以除去 DNA 上的损伤, 恢复 DNA 的双螺旋结构。目前已知有 4 种酶修复系统: 光复活、切除修复、重组修复、SOS 反应诱导的修复, 后三种不需要光, 又称为暗修复。

1. 直接修复

1949 年已发现光复活现象, 可见光 (最有效 400nm) 可激活光复活酶, 此酶能分解由于紫外线形成的嘧啶二聚体。高等哺乳动物没有此酶。

A 形成嘧啶二聚体 B. 光复合酶结合于损伤部位 C 酶被可见光激活 D. 修复后释放酶

2. 切除修复

在一系列酶的作用下, 将 DNA 分子中受损伤部分切除, 并以完整的那一条链为模板, 合成出切去部分, DNA 恢复正常结构。

(1) 结构缺陷的修复:

- (1) 核酸内切酶识别 DNA 损伤部位, 在其附近将其切开。
- (2) 核酸外切酶切除损伤的 DNA。
- (3) DNA 聚合酶修复。
- (4) DNA 连接酶连接。

(2) 无嘌呤无嘧啶——碱基缺陷或错配——脱碱基 (N-糖苷酶):

甲基磺酸甲酯可使鸟嘌呤第 7 位氮原子烷基化, 活化 β -糖苷键, 造成脱嘌呤作用; 酸也能使 DNA 脱嘌呤。

DNA 复制时, DNA 聚合酶对 dTTP 和 dUTP 分辨力不高, 有少量 dUTP 掺入 DNA 链。细胞中的尿嘧啶-N-糖苷酶可以切掉尿嘧啶。腺嘌呤脱氨形成次黄嘌呤时也可以被次黄嘌呤-N-糖苷酶切掉次黄嘌呤。

对于无嘌呤无嘧啶的损伤有两种修复方法:

- (1) AP 核酸内切酶切开, 核酸外切酶切除, DNA 聚合酶修复, DNA 连接酶连接。
- (2) 插入酶插入正确碱基

3. 重组修复

切除修复发生在 DNA 复制之前, 而当 DNA 发动复制时尚未修复的损伤部位, 可以先

复制，再重组修复。

在重组修复过程中，DNA 链的损伤并未除去。

重组修复至少需要 4 种酶组分。

重组基因 *recA* 编码一种分子量为 40000 的蛋白质，它具有交换 DNA 链的活力。*RecA* 蛋白被认为在 DNA 重组和重组修复中均起关键作用。

recB、*recC* 基因分别编码核酸外切酶 V 的两个亚基。

此外，修复合成还需要 DNA 聚合酶和连接酶。

4. 易错修复和应急反应 (SOS 反应)

诱导修复是细胞 DNA 受到严重损伤或 DNA 复制系统受到抑制的紧急情况下，为求得生存而出现的一系列诱导性修复。

SOS 反应诱导的修复系统包括避免差错的修复（无差错修复）和倾向差错的修复。

避免差错的修复：SOS 反应能诱导光复活切除修复和重组修复中某些关键酶和蛋白质的产生，从而加强光复活切除修复和重组修复的能力，这属于避免差错的修复。

倾向差错的修复：SOS 反应还能诱导产生缺乏校对功能的 DNA 聚合酶，它能在 DNA 损伤部位进行复制而避免了死亡，可是却带来了高的突变率，这属于倾向差错的修复。

SOS 反应是由 *RecA* 蛋白和 *LexA* 阻遏物相互作用引起的。*RecA* 蛋白不仅在同源重组中起重要作用，而且它也是 SOS 反应的最初发动因子。在有单链 DNA 和 ATP 存在时，*RecA* 蛋白被激活而表现出蛋白水解酶的活力，它能分解 λ 噬菌体的阻遏蛋白和 *LexA* 蛋白。*LexA* 蛋白 (22Kd) 许多基因的阻遏物，当它被 *RecA* 的蛋白水解酶分解后就可以使一系列基因得到表达其中包括紫外线损伤的修复基因 *uvrA*、*uvrB*、*uvrC*（分别编码核酸内切酶的亚基）以及 *recA* 和 *lexA* 基因本身，还有单链结合蛋白基因 *ssb*，与 λ 噬菌体 DNA 整合有关的基因 *himA*、与诱变作用有关的基因 *umuDC*，与细胞分裂有关的基因 *sulA*，*ruv*，和 *lon*，以及一些功能不清楚的基因 *dinA*，*B*，*D*，*F* 等。

SOS 反应广泛存在于原核生物和真核生物，它是生物在极为不利的环境中求得生存的一种基本功能。

然而癌变有可能也是通过 SOS 反应造成的，因为能引起 SOS 反应的作用剂通常都具有致癌作用，如 X-射线，紫外线，烷化剂，黄曲霉素等，而某些不能致癌的诱变剂并不引起 SOS 反应，如 5-溴尿嘧啶。目前，有关致癌物的一些简便检测方法就是根据 SOS 反应原理而设计的，既测定细菌的 SOS 反应。

第四节 RNA 的生物合成(RNA Biosynthesis)

RNA 的生物合成包括转录和 RNA 的复制。

一、DNA 指导的 RNA 合成 (转录)

转录 (transcription): 以一段 DNA 的遗传信息为模板，在 RNA 聚合酶作用下，合成出对应的 RNA 的过程，或在 DNA 指导下合成 RNA。

转录产物: mRNA、rRNA、tRNA、小 RNA

除某些病毒基因组 RNA 外，绝大多数 RNA 分子都来自 DNA 转录的产物。

转录研究的主要问题

①RNA 聚合酶 ②转录过程 ③转录后加工 ④转录的调控

①~③是基本内容，④是目前研究的焦点，转录调控是基因调控的核心。

转录过程涉及两个方面

①RNA 合成的酶学过程

②RNA 合成的起始信号和终止信号，即 DNA 分子上的特定序列。

DNA 正链：与 mRNA 序列相同的 DNA 链。The nontemplate is called the sense(+)strand (有意义 (+) 链) or coding strand.

负链：与正链互补的 DNA 链。反意义(-)链, 也称模板链 template。

转录单位的起点核苷酸为+1, 起点右边为下游 (转录区), 转录起点左侧为上游, 用负数表示: -1, -2, -3。

RNA 链的转录, 起始于 DNA 模板的一个特定位点, 并在另一位点终止, 此转录区域称为一个转录单位。一个转录单位可以是一个基因 (真核), 也可以是多个基因 (原核)。

基因的转录是有选择性的, 细胞不同生长发育阶段和细胞环境条件的改变, 将转录不同的基因。

转录的起始由 DNA 上的启动子区控制, 转录的终止由 DNA 上的终止子控制, 转录是通过 DNA 指导的 RNA 聚合酶来实现的。

(一) RNA 聚合酶

RNA 合成的基本特征

①底物: NTP (ATP、GTP、CTP、UTP)

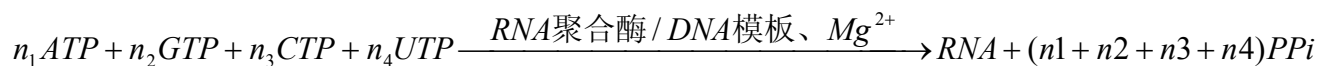
②RNA 链生长方向: 5'→3'

③不需引物

④需 DNA 模板

反应:

1. E.coli RNA 聚合酶 (原核)



E.coli 和其它原核细胞一样, 只有一种 RNA 聚合酶, 合成各种 RNA (mRNA、tRNA、rRNA)。

一个 E.coli 细胞中约有 7000 个 RNA 聚合酶分子, 在任一时刻, 大部分聚合酶 (5000 左右) 正在参与 RNA 的合成, 具体数量依生长条件而定。

E.coli RNA 聚合酶全酶 (holoenzyme) 分子量 46 万 Da, 由六个亚基组成, $\alpha_2\beta'\sigma$, 另有两个 Zn^{2+} 。

无 σ 亚基的酶叫核心酶, 核心酶只能使已开始合成的 RNA 链延长, 而不具备起始合成活性, 加入 σ 亚基后, 全酶才具有起始合成 RNA 的能力, 因此, σ 亚基称为起始因子。

E.coli RNA 聚合酶各亚基的大小与功能:

亚基	亚基数	分子量 (KD)	基因	功能
β'	1	160	rpoC	与模板 DNA 结合
β	1	150	rpoB	与核苷酸结合, 起始和催化部位。
σ	1	70	rpoD	起始识别因子
α	2	37	rpoA	与 DNA 上启动子结合

ω	1	9	----	不详
----------	---	---	------	----

不同的细菌, β' 、 β 、 α 亚基分子量变化不大, σ 亚基分子量变化较大, 44KD~92KD。

σ 亚基的功能: 核心酶在 DNA 上滑动, σ 亚基能增加酶与 DNA 启动子的结合常数, 增加停留时间, 使聚合酶迅速找到启动子并与其结合, σ 亚基本身无催化活性。

不同的 σ 因子识别不同的启动子, 从而表达不同的基因。

不同的原核生物, 都具有相同的核心酶, 但 σ 亚基有所差别, 这决定了原核基因表达的选择性。

RNA 聚合酶的催化活性: RNA 聚合酶以完整的双链 DNA 为模板, 转录时 DNA 的双链结构部分解开, 转录后 DNA 仍然保持双链的结构。

核心酶覆盖 60bp 的 DNA 区域, 其中解链部分 17bp 左右, RNA-DNA 杂合链约 12bp。

纯的 RNA 聚合酶, 在离体条件下可转录双链 DNA, 但在体内, DNA 的两条链中只有一条可用于转录, 这可能是由于 RNA 聚合酶在分离时丢失了 σ 亚基引起的。

解旋和重新螺旋化也是 RNA 聚合酶的内在特性, 在酶的前端解螺旋, 在后端以相反方向重新螺旋化, 活体状况中, 可能还有其它酶活性来帮助调整 DNA 的拓扑学性质。

37°C 时, RNA 聚合酶的聚合速度可达 40~100 个核苷酸/秒

2. 真核生物 RNA 聚合酶

真核生物的转录机制要复杂得多, 有三种细胞核内的 RNA 聚合酶: RNA 聚合酶 I 转录 rRNA, RNA 聚合酶 II 转录 mRNA, RNA 聚合酶 III 转录 tRNA 和其它小分子 RNA。这三种 RNA 聚合酶分子量都在 50 万左右, 亚基数分别为 6-15。

动物、植物、昆虫等不同来源的细胞, RNAPol II 的活性都可被低浓度的 α -鹅膏蕈碱抑制, 而 RNAPol I 不受抑制。

动物 RNAPol III 受高浓度的 α -鹅膏蕈碱抑制, 而酵母、昆虫的 RNAPol III 不受抑制。

除了细胞核 RNA 聚合酶外, 还分离到线粒体和叶绿体 RNA 聚合酶, 它们的结构简单, 能转录所有种类的 RNA, 类似于细菌 RNA 聚合酶。

3. RNA 聚合酶催化的转录过程 (E.coli)

(1) 起始

RNA 聚合酶结合到 DNA 双链的特定部位, 局部解开双螺旋, 第一个核苷酸掺入转录起始位点, 从此开始 RNA 链的延伸。

在新合成的 RNA 链的 5' 末端, 通常为带有三个磷酸基团的鸟苷或腺苷 (pppG 或 pppA), 即合成的第一个底物是 GTP 或 ATP。

起始过程中, σ 因子起关键作用, 它能使聚合酶迅速地与 DNA 的启动子结合, σ 亚基与 β' 结合时, β' 亚基的构象有利于核心酶与启动子紧密结合。

正链: 与 mRNA 序列相同的两、链。

负链: 模板链。

转录起点是 +1, 上游是 -1。

(2) 延长

转录起始后, σ 亚基释放, 离开核心酶, 使核心酶的 β' 亚基构象变化, 与 DNA 模板亲和力和下降, 在 DNA 上移动速度加快, 使 RNA 链不断延长。

转录起始后, σ 亚基便从全酶中解离出来, 然后 nusA 亚基结合到核心酶上, 由 nusA 亚基识别序列序列。

(3) 终止

RNA 聚合酶到达转录终止点时, 在终止辅助因子的帮助下, 聚合反应停止, RNA 链和

聚合酶脱离 DNA 模板链，nusA 又被 σ 亚基所取代。

由此形成 RNA 聚合酶起始复合物与终止复合物两种形式的循环。

4. 启动子和转录因子

启动子：RNA 聚合酶识别、结合并开始转录所必需的一段 DNA 序列。

转录因子：RNA 聚合酶在进行转录时，常需要一些辅助因子（蛋白质）参与作用，此类蛋白质统称为转录因子。

足迹法和 DNA 测序法确定启动子的序列结构。

(1) 原核启动子结构与功能

分析比较上百种启动子序列，发现不同的启动子都存在保守的共同序列，包括 RNA 聚合酶识别位点和结合位点。

① -10 序列（Pribnow 框）

在转录起点上游大约-10 处，有一个 6bp 的保守序列 TATAAT，称 Pribnow 框。此段序列出现在-4 到-13bp 之间，每个位点的保守性在 45%-100%。

频度： T₈₉ A₈₉ T₅₀ A₆₅ A₆₅ T₁₀₀

据预测，Pribnow 框中，一开始的 TA 和第 6 位最保守的 T 在结合 RNA 聚合酶时起十分重要的作用。

目前认为，Pribnow 框决定转录方向。酶在此部位与 DNA 结合形成稳定的复合物，Pribnow 框中 DNA 序列在转录方向上解开，形成开放型起始结构，它是 RNA 聚合酶牢固的结合位点，是启动子的关键部位。

RNA 聚合酶的结合，诱导富含 AT 的 Pribnow 框的双链解开，然后进一步扩大成 17 个核苷酸长度的泡状物，在泡状物中 RNA 聚合酶从模板链开始转录 RNA 产物。

② -35 序列（Sexfama box）（识别区域）

只含-10 序列的 DNA 不能转录，在-10 序列上游还有一个保守序列，其中心约在-35 位置，称为-35 序列，此序列为 RNA 酶的识别区域。

各碱基出现频率如下：T₈₅ T₈₃ G₈₁ A₆₁ C₆₉ A₅₂，其中 TTG 十分保守。

-35 序列的功能：它是原核 RNA 聚合酶全酶依靠 σ 因子的初始识别位点。因此，-35 序列对 RNA 聚合酶全酶有很高的亲和性。-35 序列的核苷酸结构，在很大程度上决定了启动子的强度，RNA 聚合酶易识别强的启动子。

-35 序列提供 RNA 聚合酶识别信号，

-10 序列有助于 DNA 局部双链解开，

启动子结构的不对称性决定了转录的方向。

(2) 真核启动子

真核基因的转录十分复杂，对启动子的分析要比原核基因的困难得多。

真核生物有三种 RNA 聚合酶：RNA 聚合酶 I、II、III，分别转录 rRNA、mRNA、tRNA 和小分子 RNA，这三类聚合酶的启动子各有其结构特点。

5. 终止子和终止因子

终止子：提供转录终止信号的一段 DNA 序列。

终止因子：协助 RNA 聚合酶识别终止子的蛋白质辅助因子。

有些终止子的作用可被特异的因子所阻止，使酶越过终止子继续转录，称为通读，这类引起抗终止作用的蛋白质称为抗终止因子。

终止子位于已转录的序列中，DNA 的终止子可被 RNA 聚合酶本身或其辅助因子识别。

所有原核生物的终止子在终止点之前都有一个回文结构，它转录出来的 RNA 可以形成一个颈环式的发夹结构。

(1) 不依赖于 ρ 的终止子（简单终止子）

简单终止子除具有发夹结构外，在终止点前有一寡聚 U 序列，回文对称区通常有一段富含 GC 的序列。

寡聚 U 序列可能提供信号使 RNA 聚合酶脱离模板。

(2) 依赖 ρ 的终止子

依赖 ρ 的终止子，必需在 ρ 因子存在时，才发生终止作用。终止点前无寡聚 U 序列，回文对称区不富含 GC。

ρ 因子是 55KD 的蛋白质，可水解三磷酸核苷。

6. 抗终止作用

通读往往发生在强启动子、弱终止子的基因上。

抗终止作用常见于某些噬菌体的时序控制。早期基因于后基因之间以终止子相隔开，通过抗终止作用可以打开后基因的表达。

λ 噬菌体前早期 (immediate early) 基因的产物 N 蛋白就是一种抗终止因子。它与 RNA 聚合酶作用使其在左右两个终止子处发生通读，从而表达晚早期 (delayed early) 基因。晚早期基因的产物 Q 蛋白也是一种抗终止因子，它能使晚早期基因得以表达。

转录与 DNA 复制的异同：

相同：要有模板，新链延伸方向 $5' \rightarrow 3'$ ，碱基的加入严格遵循碱基配对原则。

相异：①复制需要引物，转录不需引物。

②转录时，模板 DNA 的信息全保留，复制时模板信息是半保留。

③ 转录时，RNA 聚合酶只有 $5' \rightarrow 3'$ 聚合作用，无 $5' \rightarrow 3'$ 及 $3' \rightarrow 5'$ 外切活性。

二、RNA 转录后的加工

RNA 聚合酶合成的原初转录产物，要经过剪切、修饰、拼接等过程，才能转变成成熟的 RNA 分子，此过程称 RNA 转录后的加工。

细胞内的 tRNA、rRNA 相对稳定，半衰期一般为几个小时。所有的 tRNA、rRNA 都不是原初转录产物，都要经过一系列的加工才能成为有活性的分子。

- 原初转录产物的 5' 是三磷酸 (pppG、pppA)，而成熟的 tRNA、rRNA，5' 是单磷酸。
- 成熟 tRNA、rRNA 分子都比原初转录物小。
- 所有的 tRNA 分子，都有原初转录物所没有的稀有碱基 (A、G、C、U 以外的碱基)。

(一) 原核生物 RNA 的加工

在原核生物中，rRNA 基因与某些 tRNA 基因组成混合操纵子，可提高效率、节省空间 (增加有效信息)。其它的 tRNA 基因也成簇存在，并与编码蛋白质的基因组成操纵子，它们在形式多顺反子转录物后，断裂成为 rRNA 和 tRNA 的前体，然后进一步加工成熟。

1. 原核 rRNA 前体的加工 (E.coli)

E.coli 共有三种 rRNA

5S rRNA 120b

16S rRNA 1541b

23S rRNA 2904b

rRNA 原初转录物含 6300 个核苷酸, 约 30S。

大肠杆菌有 7 个 rRNA 的转录单位 (操纵子), 它们分散在基因组的各处。每个转录单位由 16SrRNA、23SrRNA、5SrRNA 以及一个或几个 tRNA 基因所组成。每个操纵子中 tRNA 基因的种类、数量和位置都各不相同。

RNAaseIII 是一种 rRNA、多顺反子 mRNA 加工的内切酶, 识别特定的 RNA 双螺旋区。

RNAase E 也可识别 P5 (5SrRNA 前体) 两端形成的双螺旋区。

2. 原核 tRNA 前体的加工

E.coli 染色体基因组有 60 个 tRNA 基因, 即某种 a.a. 的 tRNA 基因不止一个拷贝。

tRNA 基因大多成簇存在, 或与 rRNA 基因, 或与蛋白质基因组成混合转录单位。

tRNA 前体加工步骤

- 核酸内切酶(RNAaseP、RNAaseF)在 tRNA 两端切断。
- 核酸外切酶(RNAaseD)从 3' 端逐个切去附加序列。
- 在 tRNA 3' 端加上 -CCA-OH。tRNA 核苷酰转移酶
- 核苷的修饰 (修饰酶): 甲基化酶 / S-腺苷蛋氨酸 (SAM), 假尿苷合成酶。

RNAase P

能识别空间结构, 很干净地切除 tRNA 前体的 5' 端。

含有蛋白质和 RNA (M1 RNA) 两部分。M1 RNA 含 375nt, 在某些条件下, (提高 $[Mg^{2+}]$ 、或加入胺类), RNAase P 的 RNA 能单独地切断 tRNA 前体的 5' 端序列。

RNAaseF

不干净地切除 tRNA 前体的 3' 端序列, 需要 RNAase D 进一步修剪。

3. 原核 mRNA 前体的加工

由多顺反子构成 mRNA, 一般不需加工, 一经转录, 即可直接进行翻译。有些多顺反子构成的 mRNA, 须由核酸内切酶切成较小的 mRNA, 然后再进行翻译。

例: 核糖体大亚基蛋白 L10、L7、L12 与 RNA 聚合酶 β 、 β' 亚基的基因组成混合操纵子。

它在转录出多顺反子 mRNA 后, 由 RNAaseIII 将核糖体蛋白质基因与聚合酶亚基基因的 mRNA 切开, 然后各自翻译。

该加工过程的意义: 可对 mRNA 的翻译进行调节, 核糖体蛋白质的合成必须适应于 rRNA 的合成水平, 而细胞内 RNA 聚合酶的合成水平则要低得多。两者切开, 有利于各自的翻译调控。

(二) 真核生物 RNA 的加工

真核 rRNA、tRNA 前体的加工过程与原核的很相似, 但 mRNA 的加工过程与原核的有很大不同。

1. 真核 rRNA 前体的加工

真核生物核糖体的小亚基含: 16-18S rRNA, 大亚基含: 26-28S rRNA、5S rRNA、5.8S

rRNA (特有)。

真核 rRNA 基因拷贝数较多, 几十至几千个之间。

真核 rRNA 基因也成簇排列在一起, 18S、5.8S、28S rRNA 基因组成一个转录单位, 彼此被间隔区分开, 由 RNA 聚合酶 I 转录生成一个长的 rRNA 前体。5SrRNA 基因也成簇排列, 间隔区不被转录, 由 RNA 聚合酶 III 转录后经适当加工。

哺乳动物: 45SrRNA 前体, 含 18S、5.8S、28S rRNA

果蝇: 38SrRNA 前体, 含 18S、5.8S、28S rRNA

酵母: 37SrRNA 前体, 17S、5.8S、26S rRNA

rRNA 在成熟过程中可被甲基化, 位点主要在核糖 2'-OH 上。真核 rRNA 甲基化程度比原核的高, 约 1-2%的核苷酸被甲基化。

真核生物的核仁是 rRNA 合成、加工和装配成核糖体的场所, 大、小亚基分别组装后, 通过核孔转移到胞质中参与核糖体循环。

2. 真核 tRNA 前体的加工

真核 tRNA 基因的数目比原核 tRNA 的要多的多。例如, E.coli 有 60 个 tRNA 基因, 啤酒酵母 250 个, 果蝇 850 个, 爪蟾 1150 个, 人 1300 个。

真核 tRNA 基因也成簇排列, 被间隔区分开, tRNA 基因由 RNA 聚合酶 III 转录。

真核 tRNA 前体的剪切、修饰过程与原核相似。

3. 真核生物 mRNA 前体的加工

真核的 mRNA 为单顺反子, 多内含子。寿命比原核 mRNA 的长。

mRNA 原初转录物是分子量很大的前体, 在核内加工过程中形成分子大小不等的中间产物, 它们被称为核内不均一 RNA (hnRNA)。其中, 约有 25%可转变成成熟的 mRNA。

hnRNA 半寿期很短, 比细胞质中的 mRNA 更不稳定, 一般在几分钟至 1 小时。而细胞质 mRNA 的半寿期为 1-10 小时, 神经细胞 mRNA 最长可达数年。

hnRNA 转变成 mRNA 的加工过程主要包括:

- a. 5'末端形成帽子结构
- b. 3'末端切断并加上 polyA
- c. 剪接除去内含子对应的序列
- d. 甲基化: 某些真核 mRNA 内部有甲基化的位点, 主要是在 N⁶-甲基腺嘌呤 (m⁶A)。

5'末端加帽

RNA 三磷酸酶, mRNA 鸟苷酰转移酶, mRNA (鸟嘌呤-7) 甲基转移酶, mRNA (核糖-2') 甲基转移酶。

由于甲基化的程度不同, 有三种类型的帽子: CAPO 型, CAPI 型, CAP II 型。

5'帽子也出现于 hnRNA, 说明加帽过程可能在转录的早期阶段或转录终止前就已完成。

5'帽子的功能

- a. 在翻译过程中起信号识别作用, 协助核糖体与 mRNA 结合, 使翻译从 AUG 开始。
- b. 保护 mRNA, 避免 5'端受核酸外切酶的降解。

3'端加 polyA

hnRNA 链由 RNAaseIII 切断, 由多聚腺苷酸聚合酶催化, 加上 polyA, ATP 为供体。

加尾信号: AATAAA、YGTGTGYY (Y 为嘧啶)。

高等真核生物和病毒的 mRNA 在靠近 3'端区都有一段非常保守的序列 AAUAAA, 这一序列离多聚腺苷酸加入位点的距离在 11-30nt 范围之内。

核内 hnRNA 的 3'端也有多聚腺苷酸,表明加尾过程早在核内已经完成。hnRNA 中的 poly(A)比 mRNA 略长,平均 150-200nt。

polyA 的功能

- 防止核酸外切酶对 mRNA 信息序列的降解,起缓冲作用。
- 与 mRNA 从细胞核转移到细胞质有关。

3'脱氧腺苷(既冬虫夏草素)是多聚腺苷酸化的特异抑制剂,但它不抑制 hnRNA 的转录。

(三) RNA 的拼接和催化作用(内含子的切除)

多数真核基因是断裂基因,其转录产物通过拼接,去除内含子,使编码区(外显子)成为连续序列。

内含子、内元(intron):在原初转录物中,通过 RNA 拼接反应而被去除的 RNA 序列,或基因中与这种序列对应的 DNA 序列。

外显子、外元(exon):原初转录物通过 RNA 拼接反应后,而保留于成熟 RNA 中的序列,或基因中与成熟 RNA 对应的 DNA 序列

有些内含子可以催化自身的拼接(self-splicing),有些内含子需要在有关酶的作用下才能拼接。

1. tRNA 前体的拼接

酵母 tRNA 约有 400 个基因,有内含子的基因约占 1/10,内含子长度 14-46bp,没有保守性。

切除内含子的酶识别的是 tRNA 的二级结构,而不是什么保守序列。

拼接过程:

第一步切除内含子,第二步 RNA 连接酶将两个 tRNA 半分子连接。

2. 四膜虫 rRNA 前体的自我拼接

四膜虫 35S rRNA 前体,经加工可以生成 5.8S、17S 和 26SrRNA。

某些品系的四膜虫在其 26SrRNA 基因中有一个内含子,35S rRNA 前体需要拼接除去内含子。该拼接过程只需一价和二价阳离子和鸟苷酸(提供 3'-OH),无需能量和酶。

3. mRNA 前体的拼接

真核生物所有编码蛋白质的核结构基因,其内含子的左端均为 GT,右端均为 AG。此规律称 GT-AG 规律(对于 mRNA 就是 GU-AG,此规律不适合于线粒体、叶绿体的内含子,也不适合于 tRNA 和某些 rRNA 的核结构基因)。

酵母核基因的内含子在靠近 3'端还有一个保守序列,与 5'端序列互补,称为 TACTAAC box,也与拼接有关。

真核细胞内存在许多种类的小分子 RNA,大小在 100-300nt,有些由聚合酶 III 转录,有些由聚合酶 II 转录。

核内小 RNA(snRNA)主要存在于核内,细胞质小 RNA(scRNA)主要存在于细胞质。

重要的 snRNA 有 U 系列 snRNA,因其尿嘧啶含量高而得名。U 系列 snRNA 通常都与多肽或蛋白质结合形成核糖核蛋白颗粒(RNP)。U-snRNA 参与 hnRNA 的拼接过程。U3-snRNA 与 rRNA 前体的加工有关,U1、U2、U4、U5、U6 可能都与 hnRNA 的加工有关。

4. RNA 的催化功能

(1) I类内含子的自我剪接(顺式剪接)

I类内含子包括四膜虫 rRNA 的内含子, 几种酵母线粒体的内含子, 噬菌体 T4 胸苷酸合成酶的内含子等。这些内含子有较大的同源性, 可自我拼接。

1981, Cech (美国), 四膜虫 rRNA 前体 (约 6400nt) 能自动切除 413 个 nt 的内含子, 然后加工生成 5.8S、17S、26S rRNA。

1984, Apirion (美国), 噬菌体 T4 的 RNA 可以在没有蛋白质参与下自我断裂, 由 215nt 前体链切下 76nt。

(2) 独具催化活性的小分子 RNA

1984, Altman, Pace (美国), 细菌加工 tRNA 前体的酶—RNAase P 中的 M_1 RNA (375nt) 在高浓度的 Mg^{2+} 或胺类存在时能单独切下 tRNA 前体的 5'端。

1, 4- α 葡聚糖分支酶中的 RNA (31nt) 也单独具有分支酶活力。

真核的 U-snRNA 催化 rRNA 前体、hnRNA 前体的加工。

RNA 的复制

有些 RNA 病毒, 进入寄主细胞后, 借助复制酶而进行 RNA 病毒的复制。

从感染 RNA 病毒的细胞中可以分离出 RNA 复制酶, 这些 RNA 复制酶的模板特异性很强, 只识别病毒自身的 RNA, 它以病毒 RNA 为模板, 合成与模板性质相同的 RNA。

一、噬菌体 Q β RNA 的复制

噬菌体 Q β : 直径 20nm, 正十二面体, 含 30%RNA, 其余为蛋白质, 单链 RNA, 4500 个核苷酸, 编码 3-4 个蛋白质。

结构: 5'端——成熟蛋白 (A 或 A₂ 蛋白) ——外壳蛋白 (或 A₁ 蛋白) ——复制酶 β 亚基——3'端

Q β 复制酶: $\alpha\beta\gamma\delta$ 四个亚基, 只有 β 是自己编码, 其余三个亚基来自寄主细胞。

进入 E.coli 细胞后, 其 RNA 即为 mRNA, 可以直接合成与病毒繁殖有关的蛋白质 (复制酶 β 亚基)。

Q β RNA 翻译和复制的自我调节:

Q β RNA 的高级结构 (尤其是双螺旋区的结构) 参与翻译的调节控制:

- (1) 只有刚复制的 Q β RNA, 成熟蛋白基因才能翻译。
- (2) 核糖体能直接启动外壳蛋白基因的翻译
- (3) 复制酶 β 亚基基因只有在外壳蛋白合成时双链打开才能进行翻译。

Q β RNA 的翻译、复制受寄主细胞调节, 以正链 RNA 为模板复制负链 RNA 时, 另需寄主细胞的 HF I 和 HF II 因子。而以负链 RNA 为模板复制正链 RNA 时, 不需这两个因子, 感染后期大量合成的是正链 RNA。

三、病毒 RNA 复制的主要方式**1. 正链 RNA 病毒 (mRNA): 噬菌体 Q β 、灰质炎病毒等。**

进入寄主细胞后, 利用寄主的翻译系统, 首先合成复制酶及有关的蛋白质, 然后进行病毒 RNA 的复制, 最后由病毒 RNA 和蛋白质装配成病毒颗粒。

2. 负链 RNA 病毒 (带有复制酶): 狂犬病毒等

此类病毒带有复制酶，侵入后，复制酶首先合成出正链 RNA (mRNA)，再以正链 RNA 为模板，合成负链 RNA 及蛋白质，然后装配。

3. 双链 RNA 病毒 (带有复制酶): 呼肠孤病毒等

以双链 RNA 为模板，在复制酶作用下先转录正链 RNA (mRNA)，从而翻译出蛋白质，然后合成负链 RNA，形成双链 RNA，再包装。

4. 反转录病毒 (含反转录酶): 白血病病毒、肉瘤病毒等致癌 RNA 病毒

正链 RNA 病毒，它们的复制需要经过 DNA 前病毒阶段。

【思考题】

- 1、比较不同生物体分解嘌呤的最终代谢产物。
- 2、试从合成原料、合成程序、反馈调节等方面比较嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸从头合成过程的异同点。
- 3、何谓 DNA 半保留复制? 有哪些酶类参与 DNA 复制? 哪种酶起着关键作用? 为什么?
- 4、何谓转录? 比较原核生物和真核生物的转录过程有哪些不同点?
- 5、原核生物 RNA 聚合酶全酶的结构与功能?
- 6、有哪些物理或化学因子能引起 DNA 分子损伤? 体内有何 DNA 修复机制?
- 7、比较原核生物和真核生物的 DNA 复制有哪些异同点?
- 8、What factors do ensure the fidelity of DNA replication?
- 9、How was the semi-conservative mechanism of DNA replication demonstrated experimentally by Meselson and Stahl ?
- 10、What are the techniques used in genetic code deciphering? How did they work?