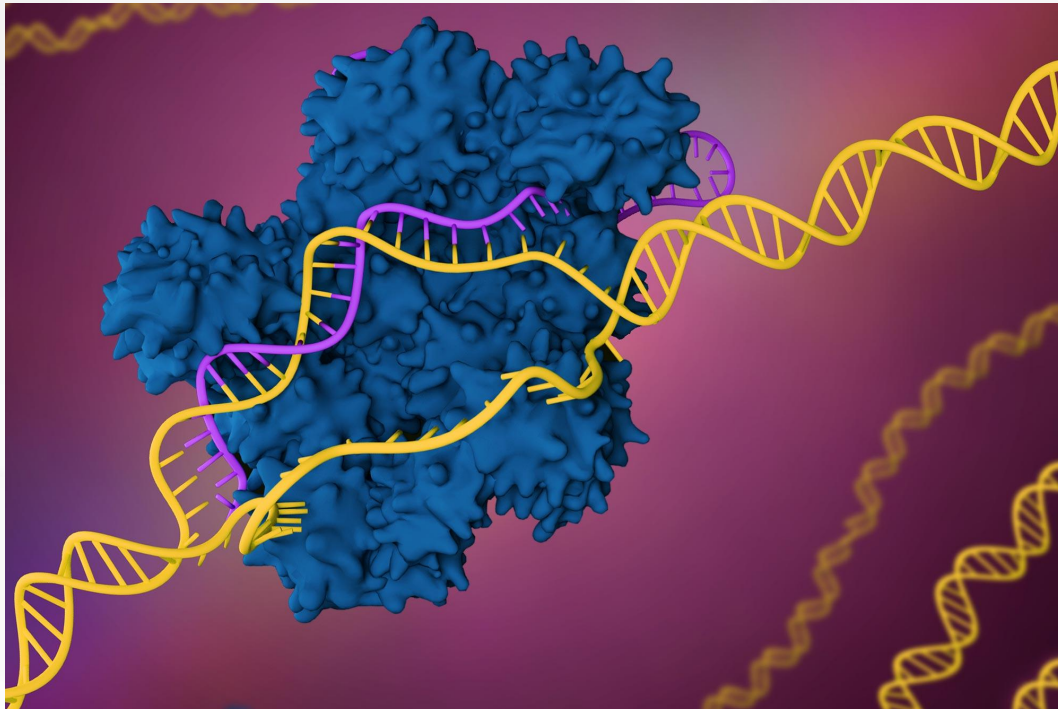


第三章 转录、转录后加工

Transcription and post-transcription processing



黎婕昕, 副教授

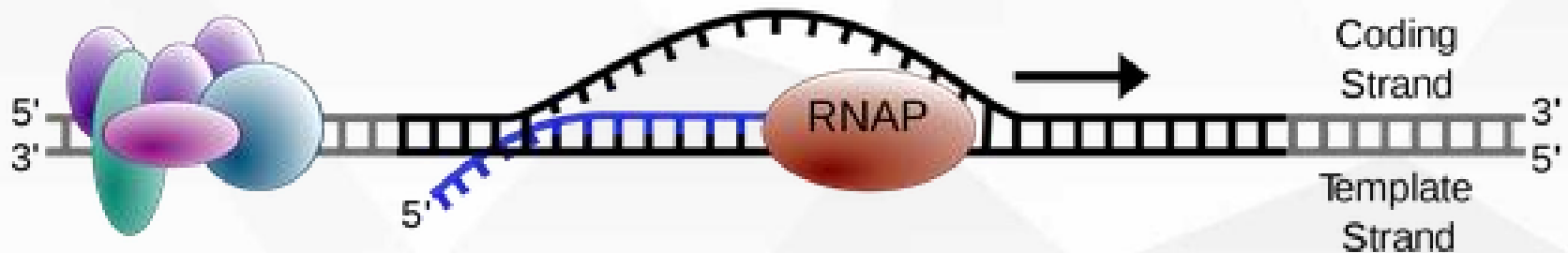
中山大学药学院, 406室

E-mail: lijixin3@mail.sysu.edu.cn

3. 转录过程

2

- I. 转录起始
- II. 转录延伸
- III. 转录终止
- IV. 转录后加工



3.1 原核生物的转录

3

I. 转录起始

- RNA聚合酶全酶催化；
- σ 因子协助核心酶识别并结合启动子元件；

II. 转录延伸

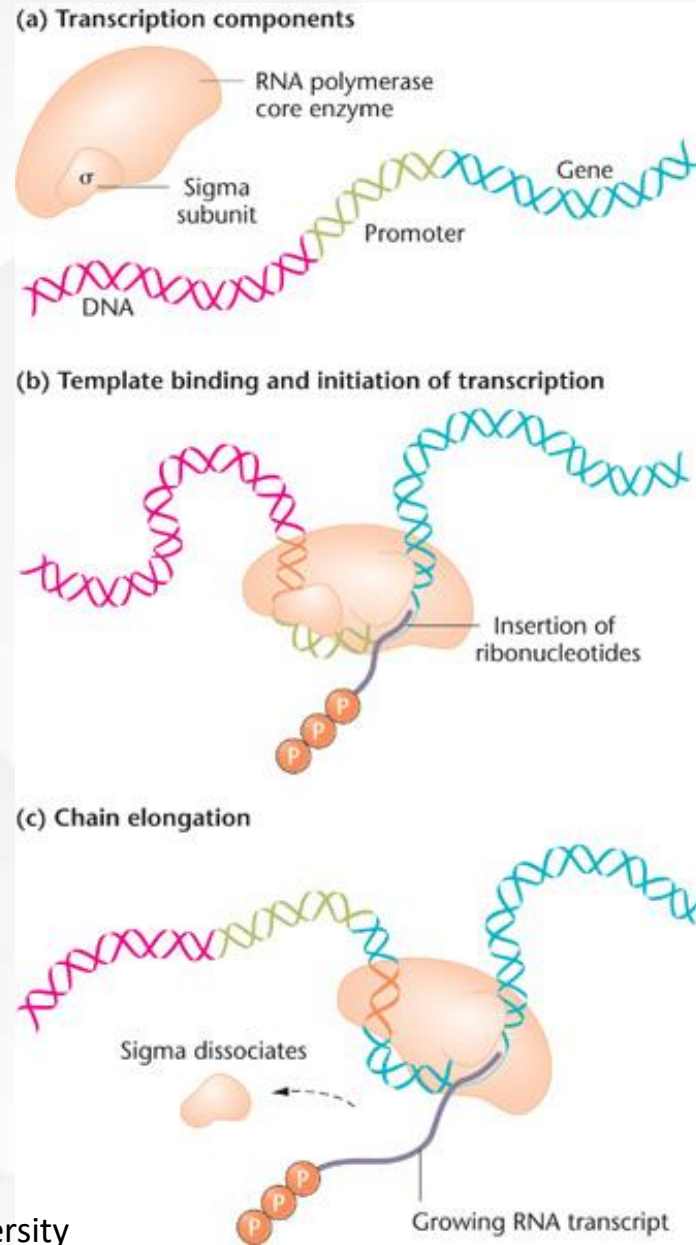
- 核心酶催化

III. 转录终止

- 依赖或不依赖 ρ 因子

IV. 转录后加工

- E.coli mRNA前体不需要加工；
- rRNA和tRNA前体需要加工成熟。



»» 3.1.1 原核生物转录的起始过程

4

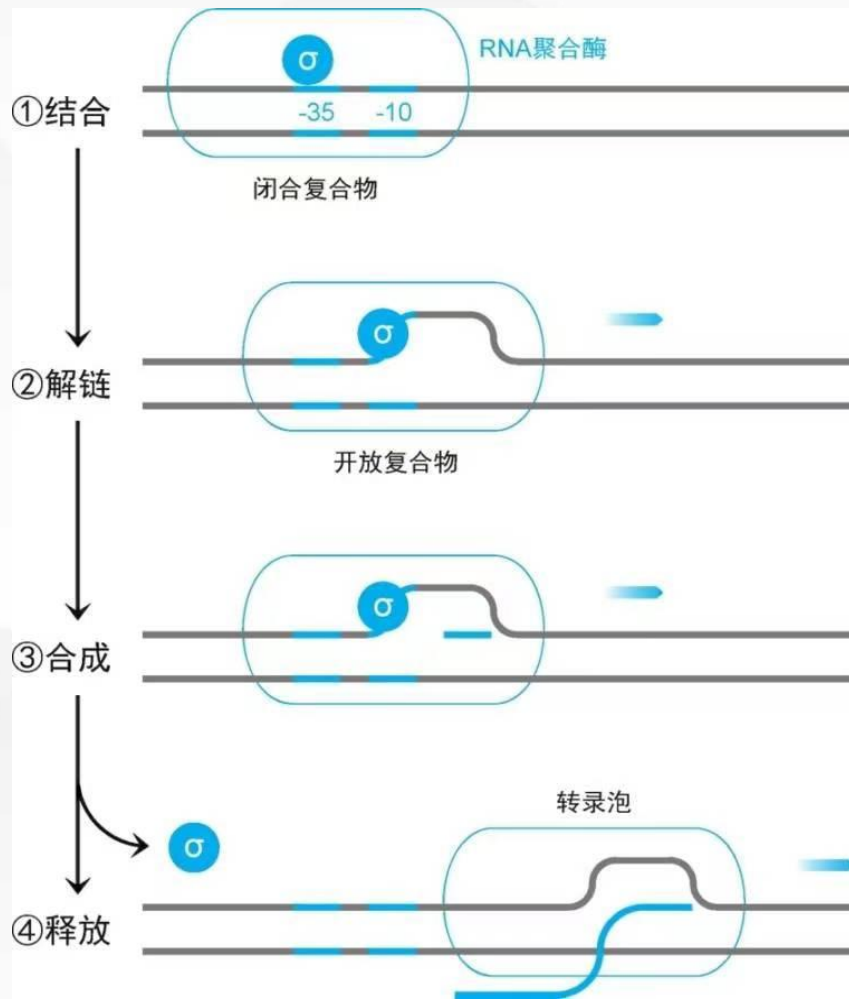
- **转录起始**实际上是RNA聚合酶与启动子相互作用并**形成活性转录起始复合物**的过程。
- **材料**: DNA模板、NTP、RNA聚合酶
- **特点**:
 - **起始位点 (initiation site): + 1位点**
 - RNA聚合酶的转录起始位点
 - 起始NTP多为**ATP或GTP**
 - **生成转录起始复合物**:
 - RNA pol ($\alpha 2\beta\beta' \sigma$) - DNA - pppGpN-OH-3'
 - 过程: RNA-pol(σ)结合启动子, DNA解旋
 - **形成第一个磷酸二酯键**。

3.1.1 原核生物转录的起始过程

5

可分为以下步骤：

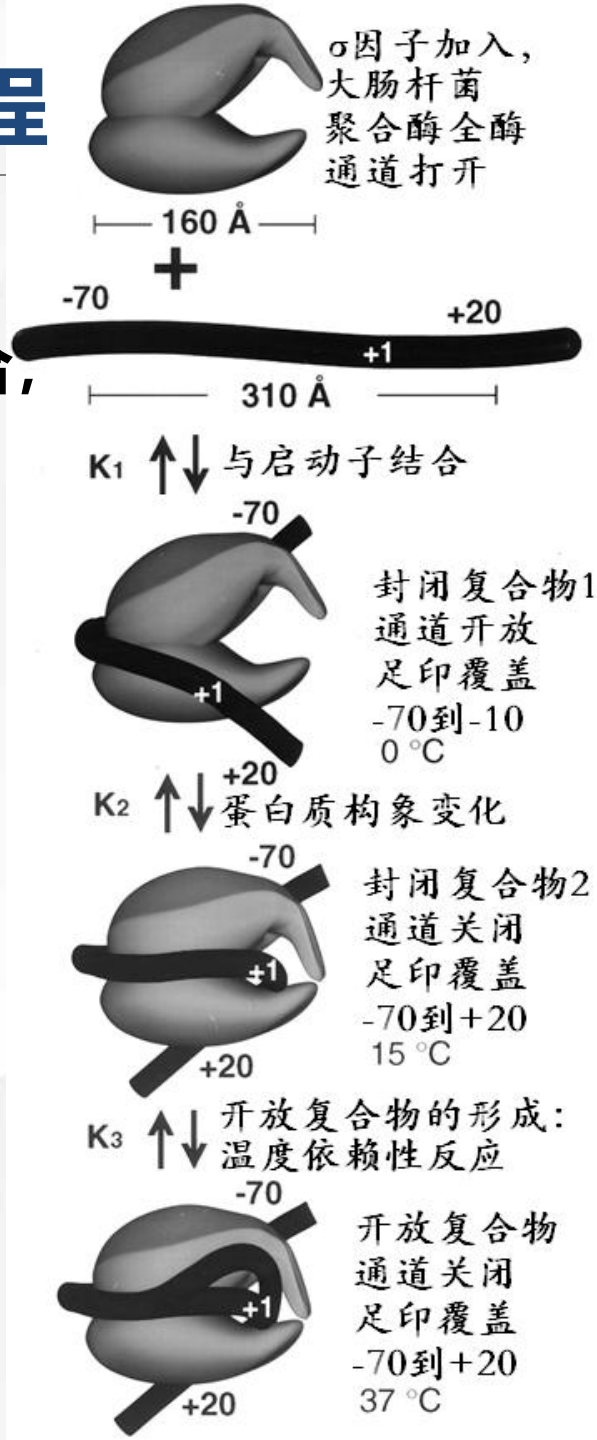
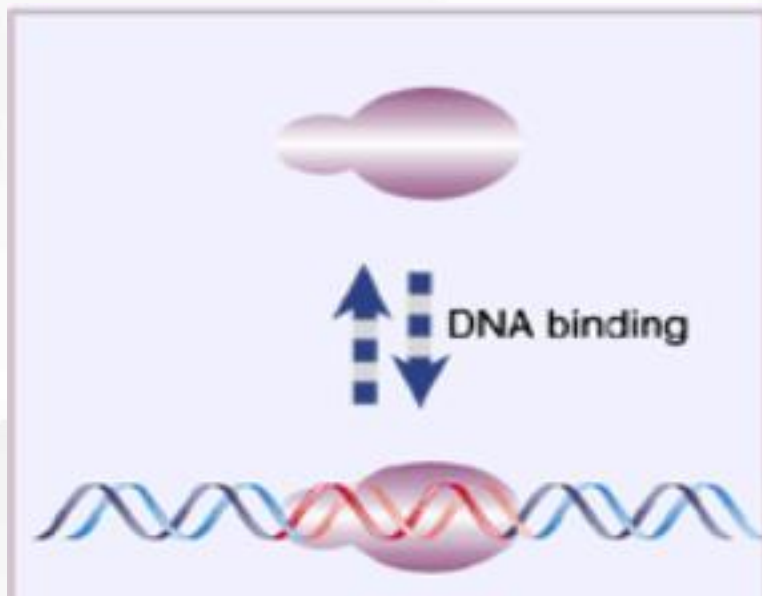
- A. 结合：** RNA聚合酶全酶与启动子形成封闭复合物；
- B. 解链：** 封闭复合物异构化，转变成开放复合物；
- C. 合成：** 第一个磷酸二酯键形成；
- D. 释放：** 启动子的清空。



3.1.1 原核生物转录的起始过程

A. 结合：全酶与启动子结合形成封闭复合物

- RNA聚合酶全酶通过其 σ 因子与启动子区结合，形成闭合复合物 (closed promoter complex, CPC) ；
- 覆盖约55 bp (-55 ~ +1)

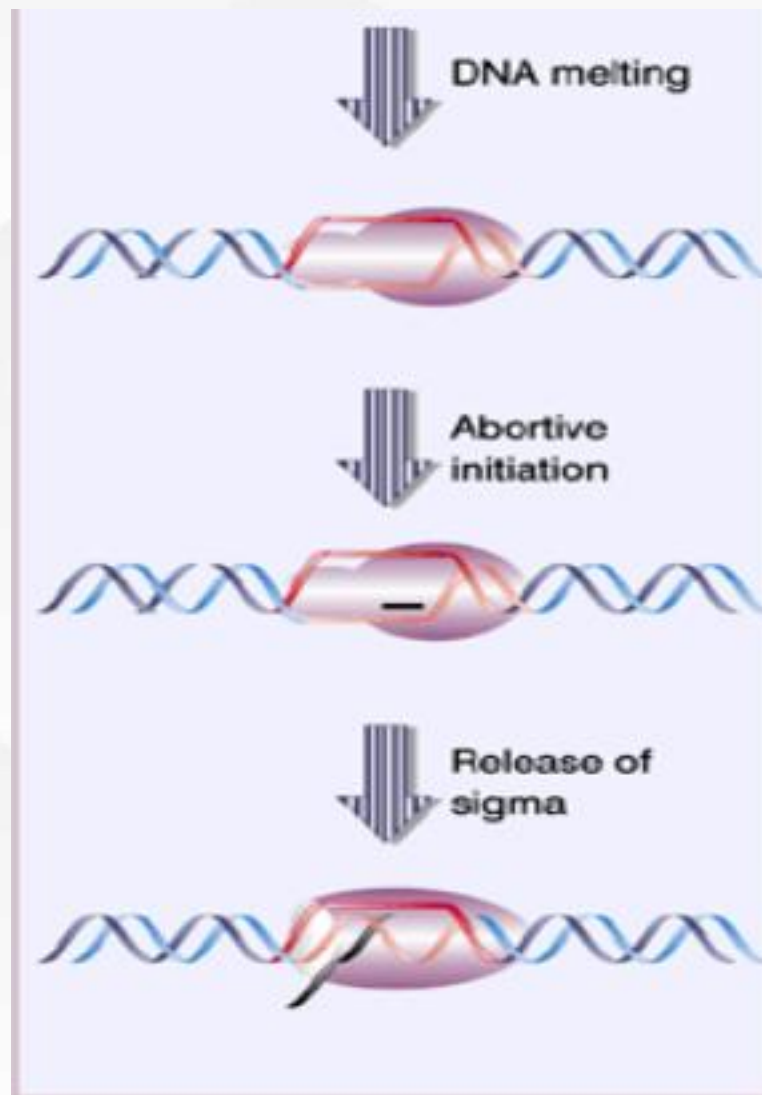


3.1.1 原核生物转录的起始过程

7

B. 解链：开放型启动子复合物的形成

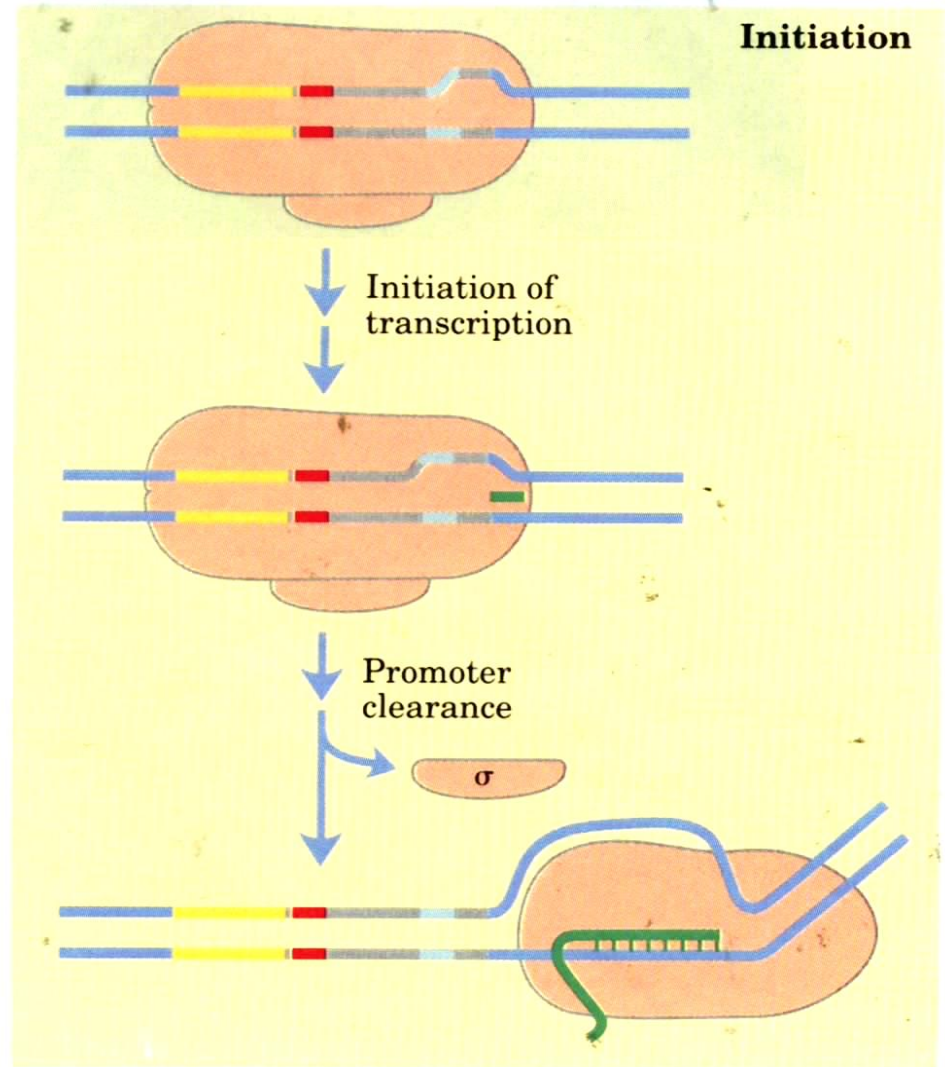
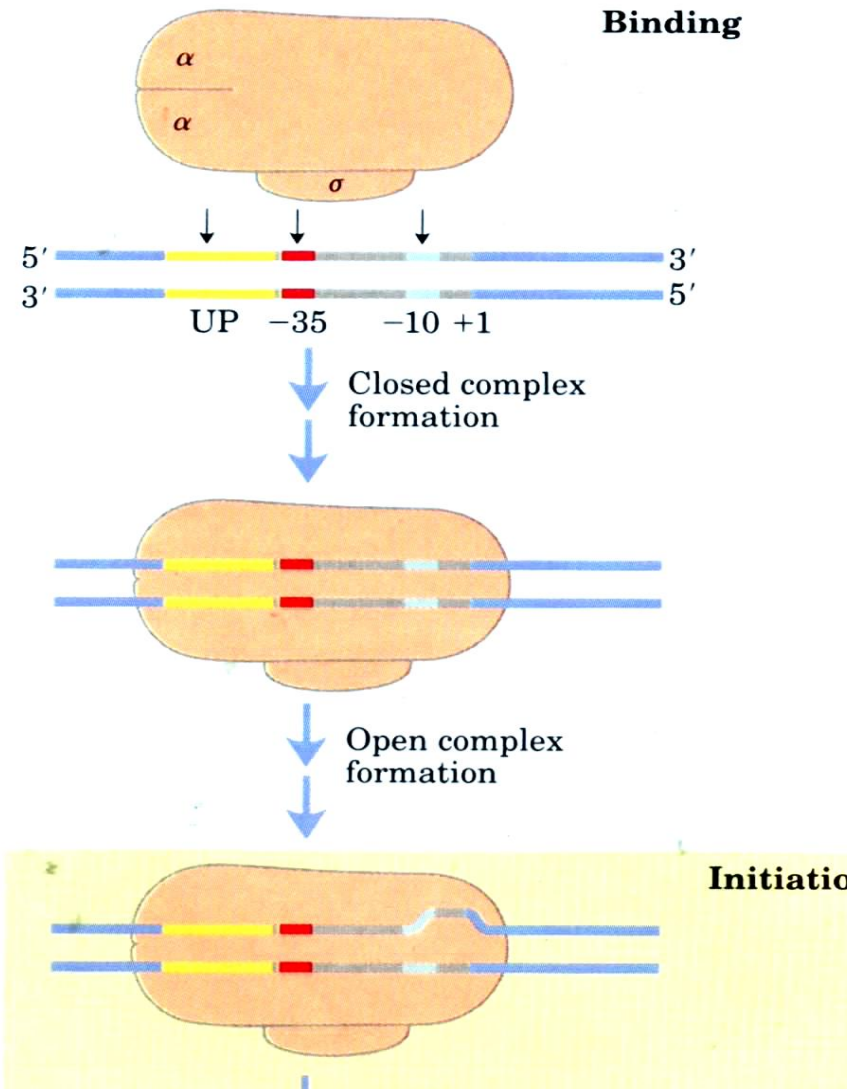
- RNA Pol的一个适合位点到达 - 10序列区域，诱导富含A•T的Pribnow 框的“熔解”，形成12 - 17bp的泡状物，同时酶分子向 - 10序列转移并与之牢固结合；
- 开放型启动子复合物 (open promoter complex, OPC) 使RNA Pol定向，顺流向下行使其转录功能；
- 二元复合物 (全酶和DNA)



开放型启动子复合物的形成

8

-35区是RNA聚合酶最先的结合部位，形成“闭合复合物”，然后向下游移动至富含AT的-10区域，这是转录时开始解链的部位，此时形成“开放复合物”。



» 3.1.1 原核生物转录的起始过程

9

C. 合成：在开放型的启动子复合物中，形成第一个磷酸二酯键

- 三元复合物形成



»» 3.1.1 原核生物转录的起始过程

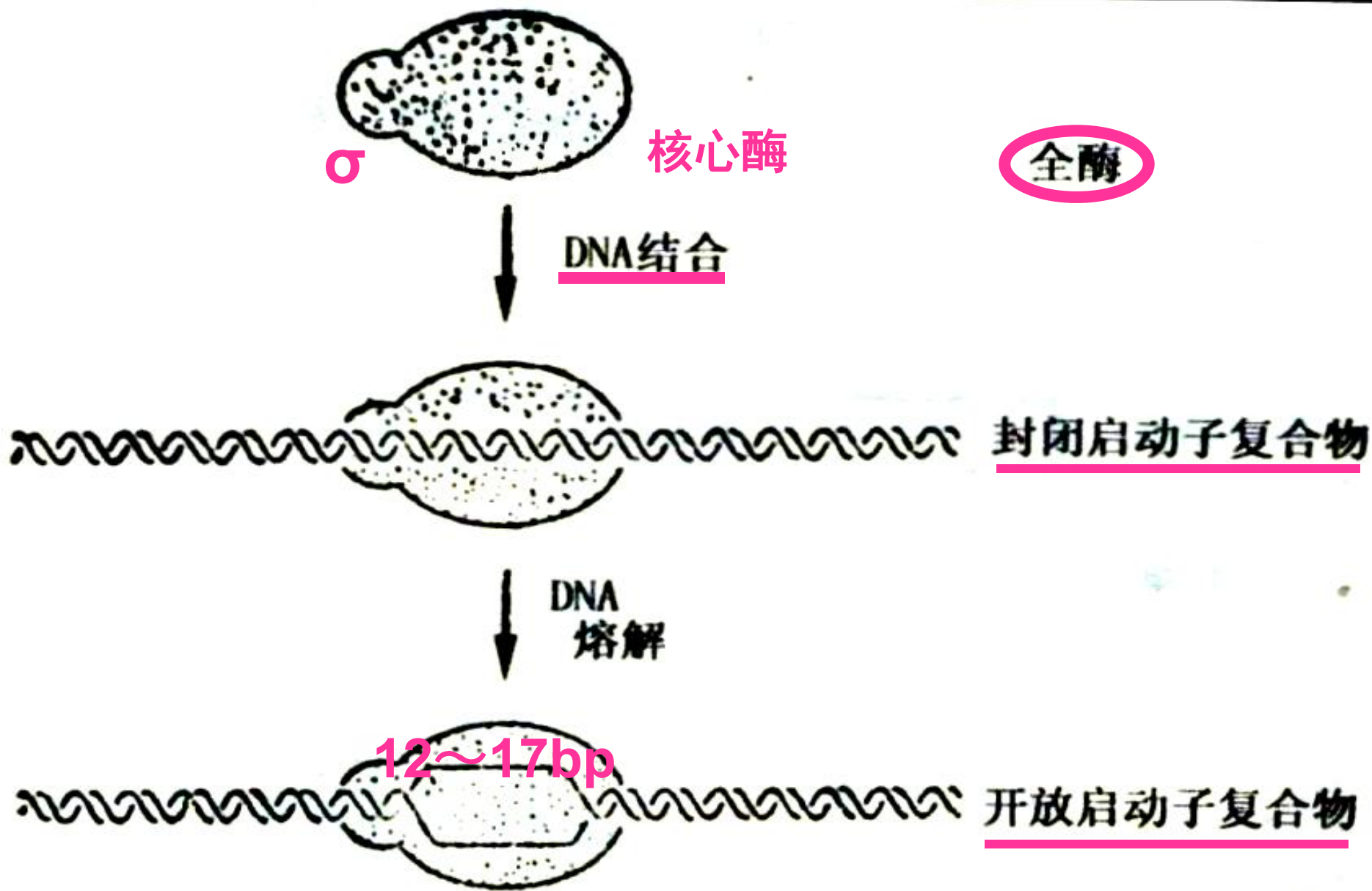
10

D. 释放：启动子的清空

- 催化合成10nt的RNA片段之后
- σ 因子解离 → 核心酶与DNA的亲合力下降
- 起始过程结束 → 核心酶移动进入延伸过程

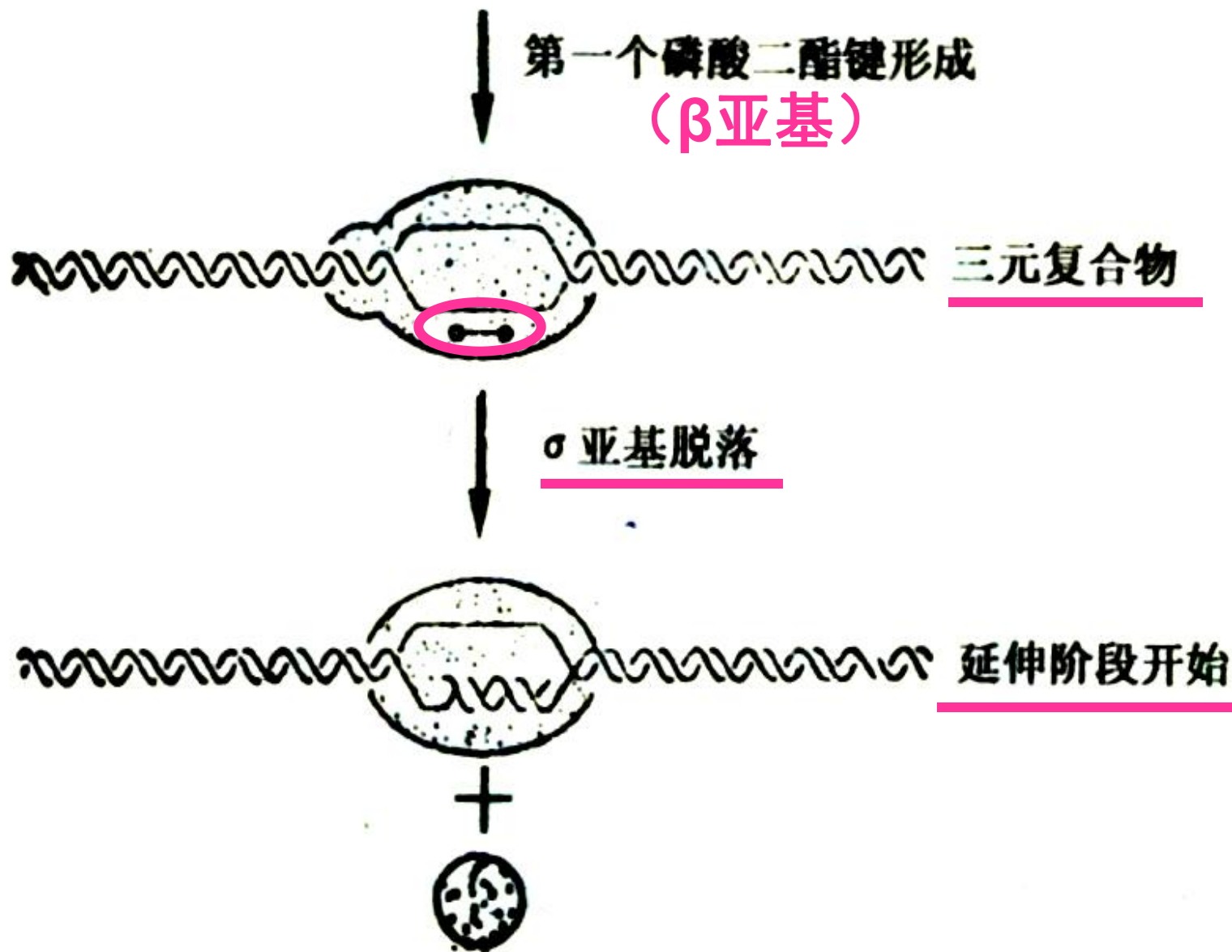
原核生物的转录起始

11



原核生物的转录起始

12

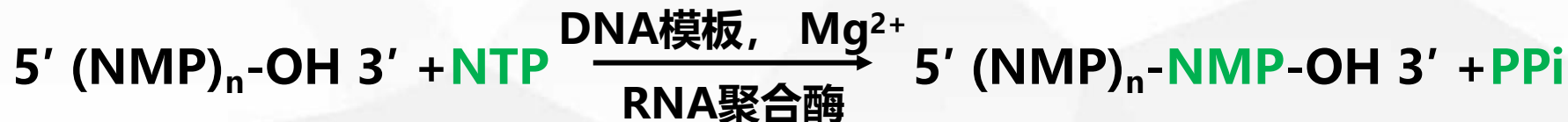


3.1.2 原核生物转录的延伸过程

13

- 起始到延伸的转变:

- 始于第1个/~10个磷酸二酯键的形成
- 伴随着DNA和酶分子构象的变化
 - 起始时, σ 因子有利于 β 和 β' 亚基具有与DNA专一性结合所要求的构象 - 紧密
 - 起始后, σ 因子解离, β 和 β' 亚基构象发生变化 - 疏松
 - DNA: 转录泡的移动



»» 3.1.2 原核生物转录的延伸过程

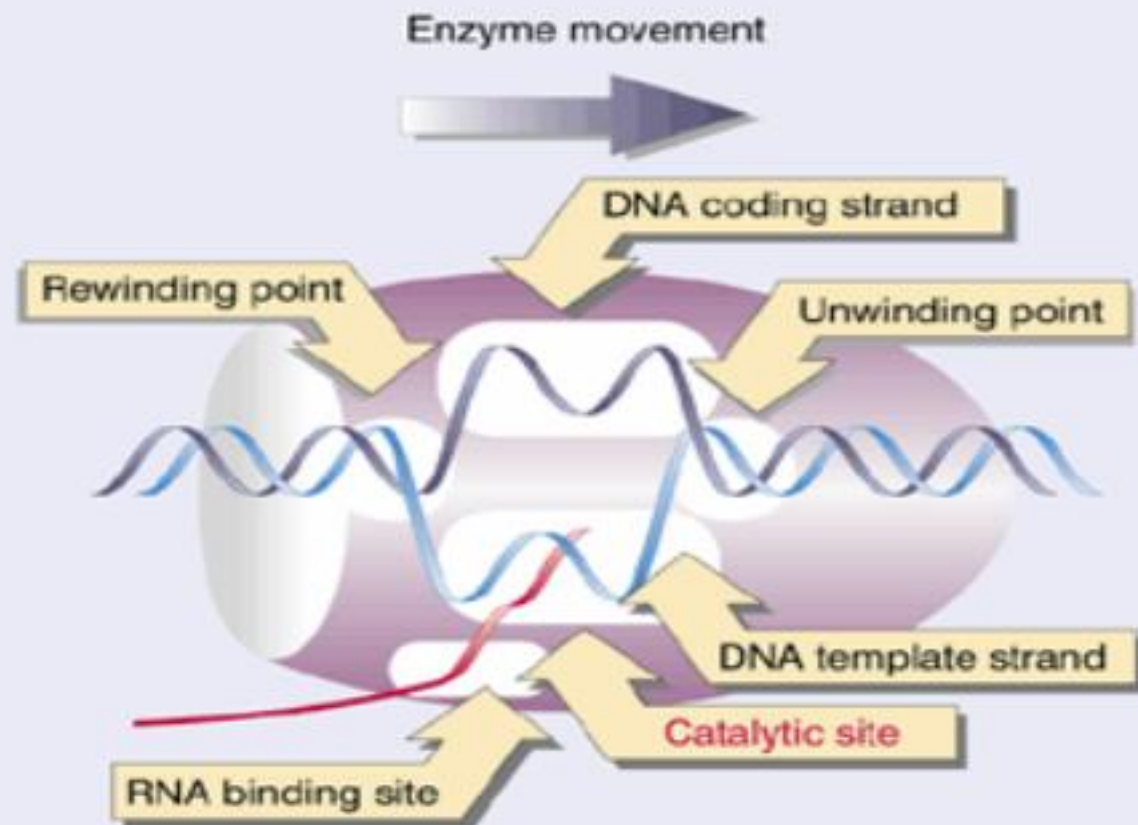
14

- **延伸过程中：**
 - 酶与产物RNA不解离；
 - 底物NTP不断加到RNA链的 3' -OH 端；
 - 形成一个磷酸二酯键后，核心酶向前滑动；
 - 延伸位点不断地接受新的NTP，RNA链不断延伸。
 - **始终保持三元复合物的结构**

»» 3.1.2 原核生物转录的延伸过程

15

Figure 9.4 During transcription, the bubble is maintained within bacterial RNA polymerase, which unwinds and rewinds DNA, maintains the conditions of the partner and template DNA strands, and synthesizes RNA.



3.1.2 原核生物转录的延伸过程

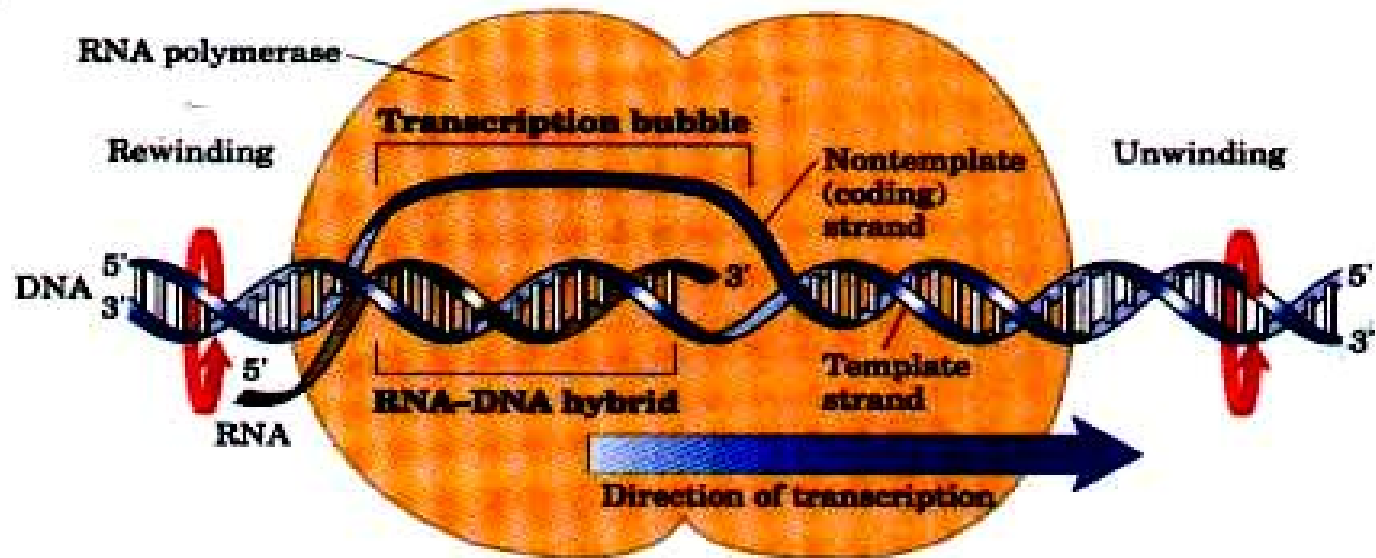
16

1. 当几个磷酸二酯键形成后， σ 因子从全酶上解离下来；
2. 每移动一次，新生RNA的3' 端羟基都与一分子相应的NTP生成一个新的磷酸二酯键，使新生RNA链按照5' \rightarrow 3' 方向不断延伸和加长；
 - 一般，每秒钟可使RNA延伸和加长30-50个核苷酸；
3. 新生RNA链与DNA模板通过氢键可形成RNA-DNA杂交双螺旋， $\sim 12\text{bp}$ ；
4. 5' 端DNA不断解链，同时在3' 端由于原配对的DNA单链重新形成DNA双链，并不断将RNA链挤出DNA-RNA杂和体；
 - RNA链与DNA链的亲合力，远不如DNA模板链和DNA编码链结合牢固。碱基配对稳定性：G-C > A-T > A-U

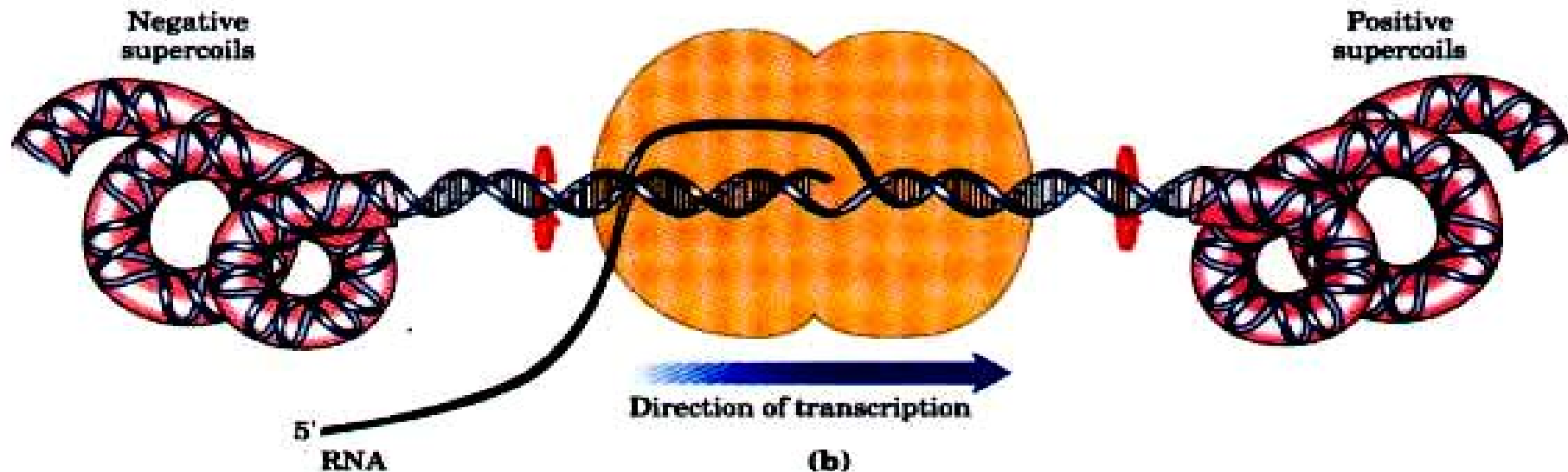
» 3.1.2 原核生物转录的延伸过程

17

rcoids form behind.



(a)

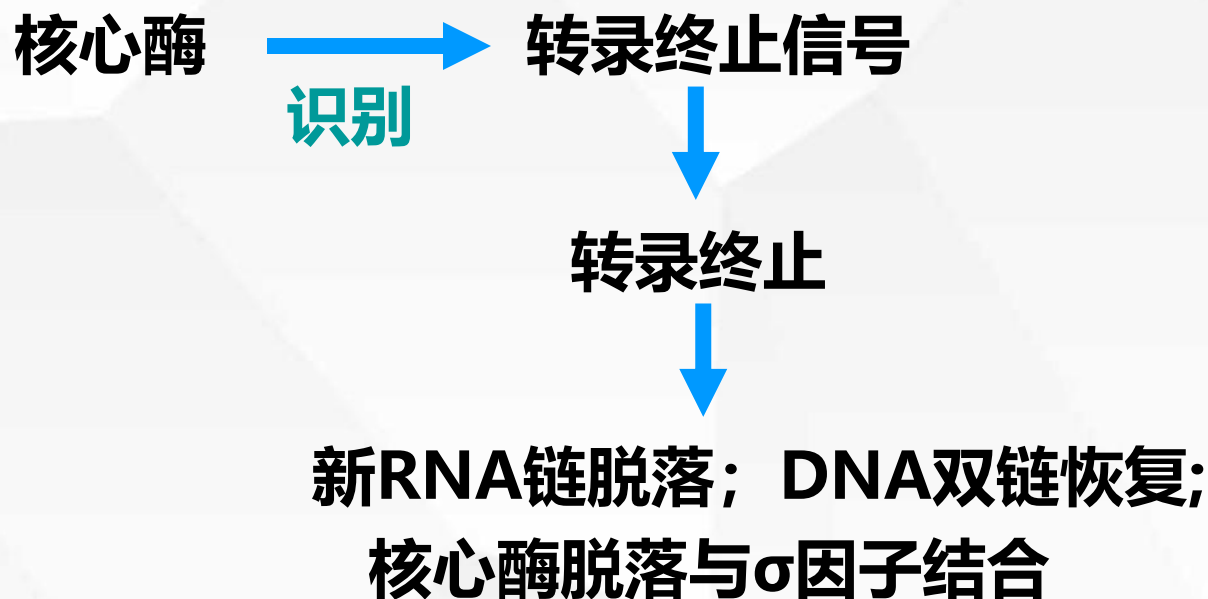


(b)



- 当合成错误导致形成非Watson-Crick碱基配对时，RNA聚合酶通过两种机制进行校对：
- ①焦磷酸解编辑（pyrophosphorolytic editing）：通过聚合反应的逆反应使错接的NMP与PPi重新生成NTP。
- ②水解编辑（hydrolytic editing）：RNA聚合酶停顿、后退1 ~ 2nt，从RNA的3'端切除错接的NMP，或含错接NMP的2nt，然后继续转录。大肠杆菌RNA的水解编辑需要辅助因子（accessory factor）GreA或GreB的协助。

3.1.3 原核生物的转录终止和新合成RNA的释放



机制 { 依赖 ρ 因子的转录终止
不依赖 ρ 因子的转录终止

3.2 真核生物和原核生物转录的异同

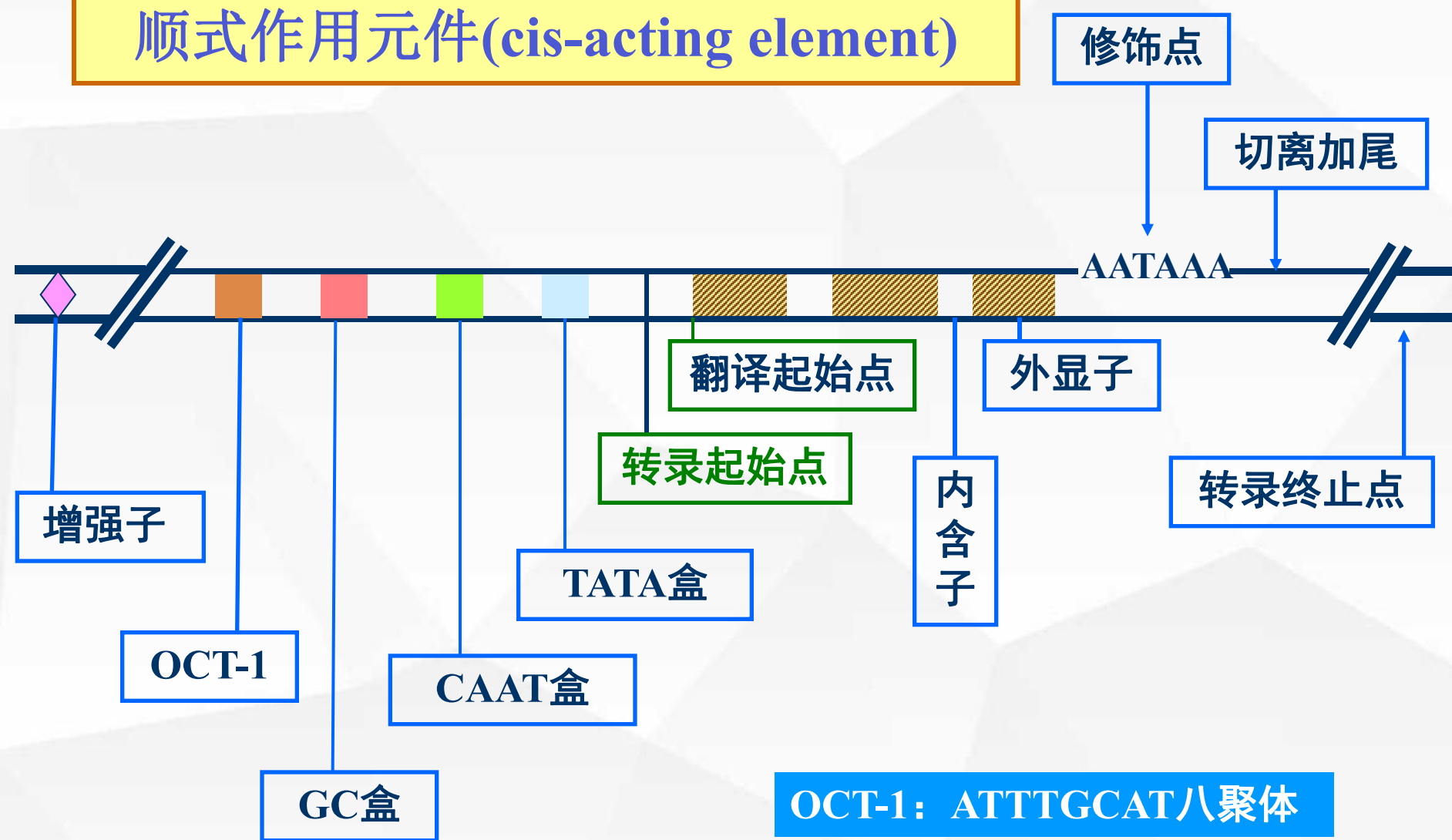
20

- 均分为四个阶段：起始、延伸、终止和后加工；
- 原核生物细胞只有一种**RNA聚合酶**，而真核生物细胞有三种RNA聚合酶；
- **启动子的结构特点**不同，真核细胞有三种不同的启动子和有关元件；
- 真核细胞的转录有**多种蛋白质因子**的介入。

3.2 真核生物的转录

21

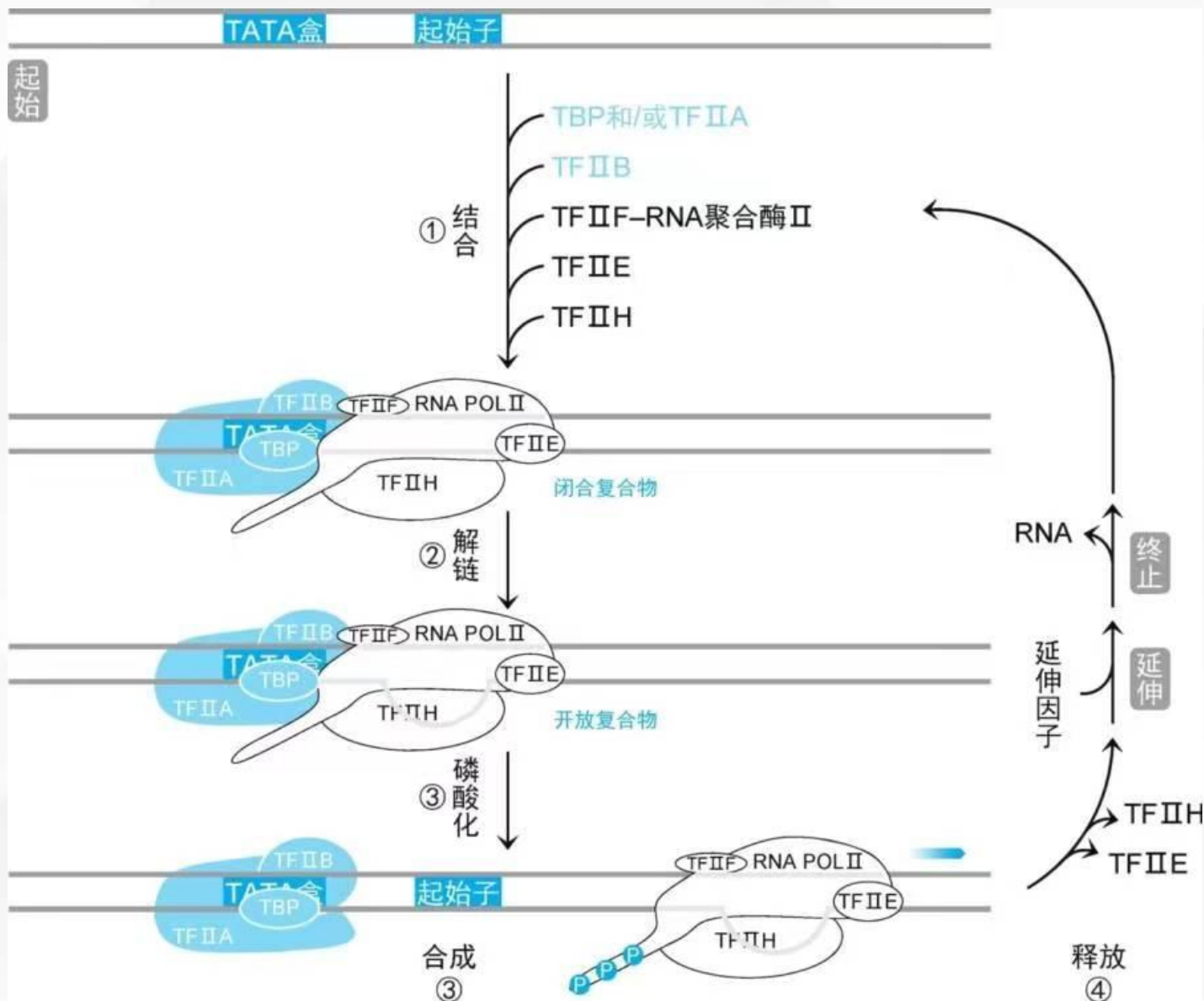
顺式作用元件(cis-acting element)



3.2 真核生物的转录

22

- I. 转录起始
- II. 转录延伸
- III. 转录终止
- IV. 转录后加工



»» 3.2.1 真核生物和原核生物转录的异同

23

I. 起始:

- 形成PIC: RNA pol-TF-DNA
- 生成第一个磷酸二酯键, RNA pol磷酸化
- TF(转录因子): 直接或间接结合RNA-pol的反式作用因子。
- 反式作用因子: 直接或间接辨认、结合顺式作用元件的蛋白质。
- TF能结合RNA pol和DNA

II. 延长

- 同原核

III. 终止

- 加尾信号处终止, PolyA后切断RNA。

IV. 转录后加工

- mRNA、rRNA和tRNA前体均需要加工成熟。

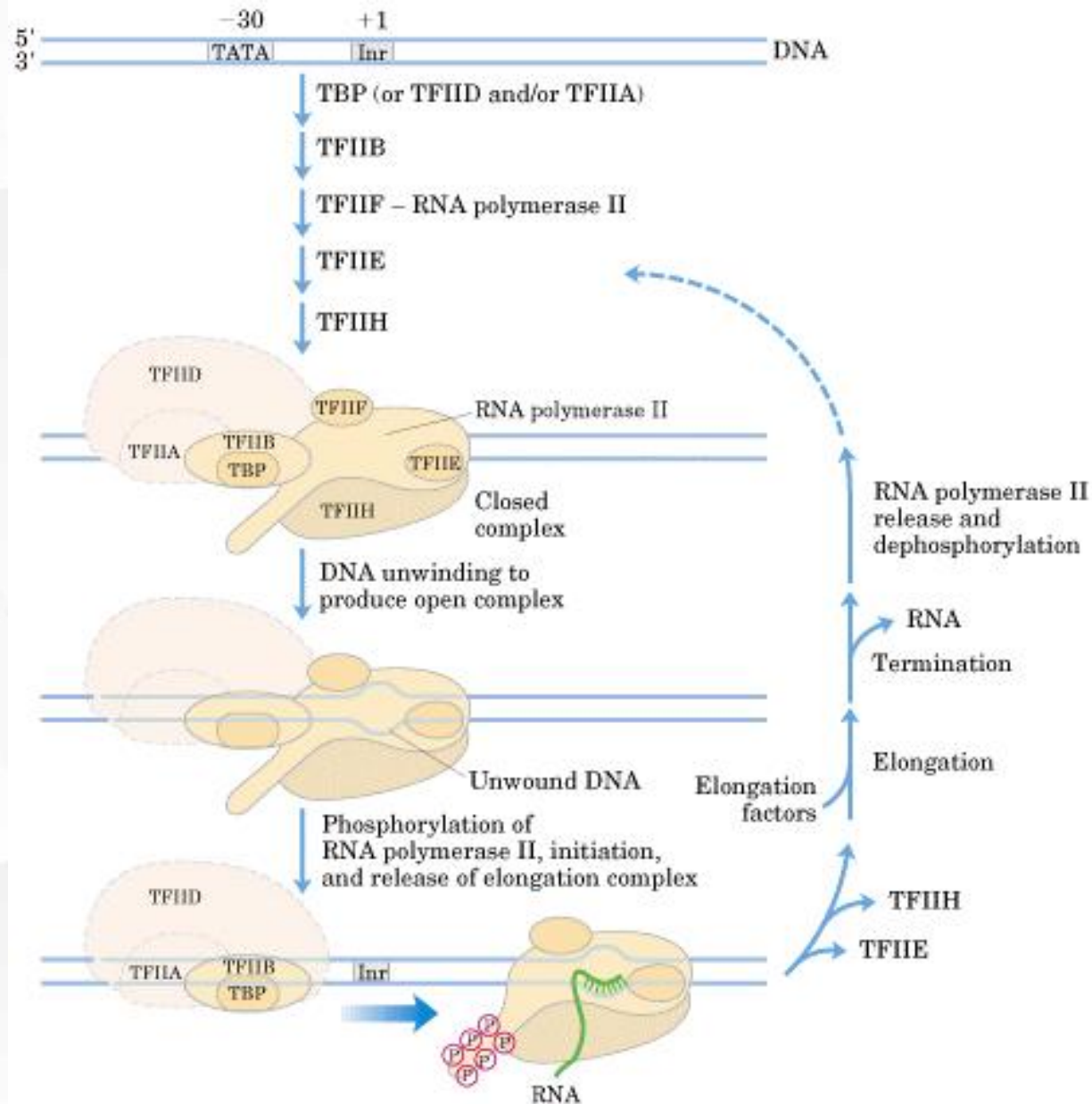
3.2.2 真核生物的转录过程

- ① 首先TATA结合蛋白 (TBP) 结合于TATA盒, 然后TFII B、TFIIF、TFIIE、pol II、TFIIH也依次结合在**启动子**处形成**闭合复合物**, 又称**起始前复合物** (preinitiation complex, PIC) ;
- ② TFIIH作用于起始子(Inr)位置开始解螺旋形成**开放复合物**;
- ③ TFIIH具有**激酶活性**, 它将RNA聚合酶的C-端结构域的多个位点磷酸化, 使起始复合物的构象改变而促进转录的起始阶段过渡进入**延伸阶段**;

- ④ 延长反应开始后，TFⅡE、TFⅡH释放；
 - ⑤ 延长因子加入，与RNA聚合酶、TFⅡF形成延伸复合物，使RNA聚合酶的延长效率大大促进；
 - ⑥ RNA聚合酶的终止反应的机理尚不明确。哺乳动物蛋白基因的最后—个外显子中有一段保守序列，称为加尾信号/多腺苷酸化信号，加尾信号下游10~30bp处是加尾位点。加尾位点下游20~40bp处还有一段富含G/T或T的序列。mRNA转录终止与加尾同步进行。
 - ⑦ 反应终止后，RNA聚合酶脱磷酸化，并重新进入下一个循环，准备下一个转录的起始。
- TFⅡF除了参与转录外，还与DNA损伤的修复有关。

3.2 真核生物的转录

26



»» 3.3 RNA生物合成的抑制剂

27

- 抑制靶标：

- I. 改变模板功能 – 模板干扰剂

- II. 嘌呤和嘧啶类似物 – 碱基类似物、核苷类似物

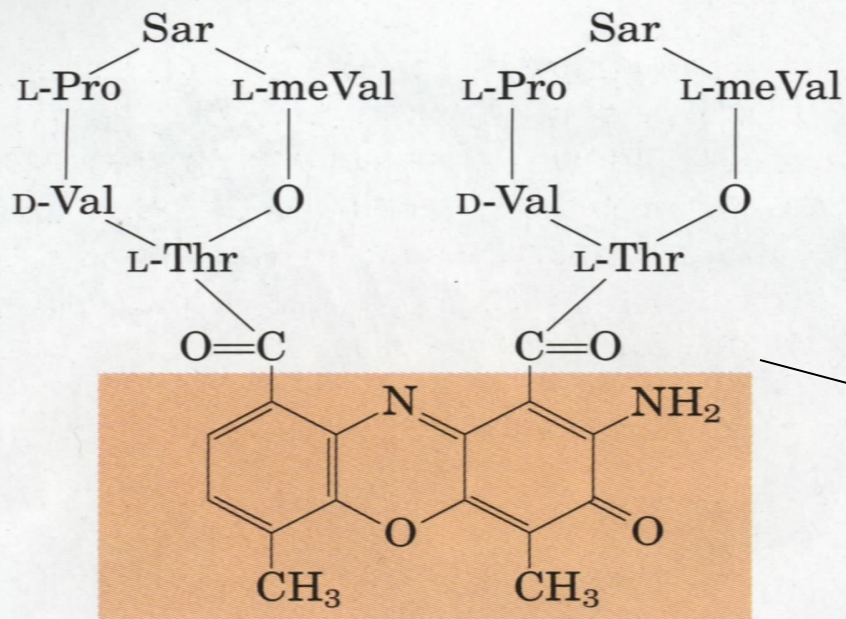
- III. RNA聚合酶抑制剂

I. 改变模板功能

- **烷化剂**：使DNA发生**烷基化**，发生在G-N₇， A-N₁、 N₃ N₇； C-N₁。易引起嘌呤的水解，在DNA上留下空隙干扰复制或转录；或引起碱基错配；
- **放线菌素D**：放线菌素D与DNA形成非共价的复合物，抑制其模板功能（低浓度抑制转录，较高浓度抑制复制）。具有类似作用的还有**色霉素A3**、**橄榄霉素**、**光神霉素**；
- **嵌入染料**：可插入双链DNA分子相邻的碱基对之间，一般具有芳香族发色团。**溴化乙锭 (EB)** 是一种高灵敏的荧光试剂，常用来检测DNA和RNA。与DNA结合后抑制其复制和转录。

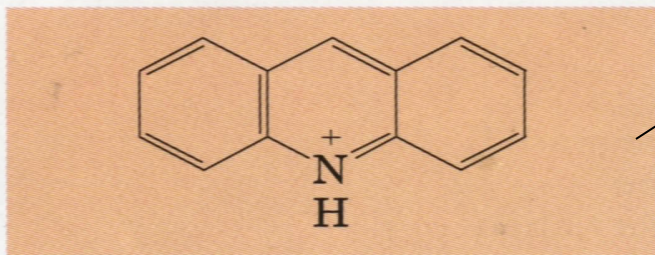
>>> 放线菌素D的结构与作用

29



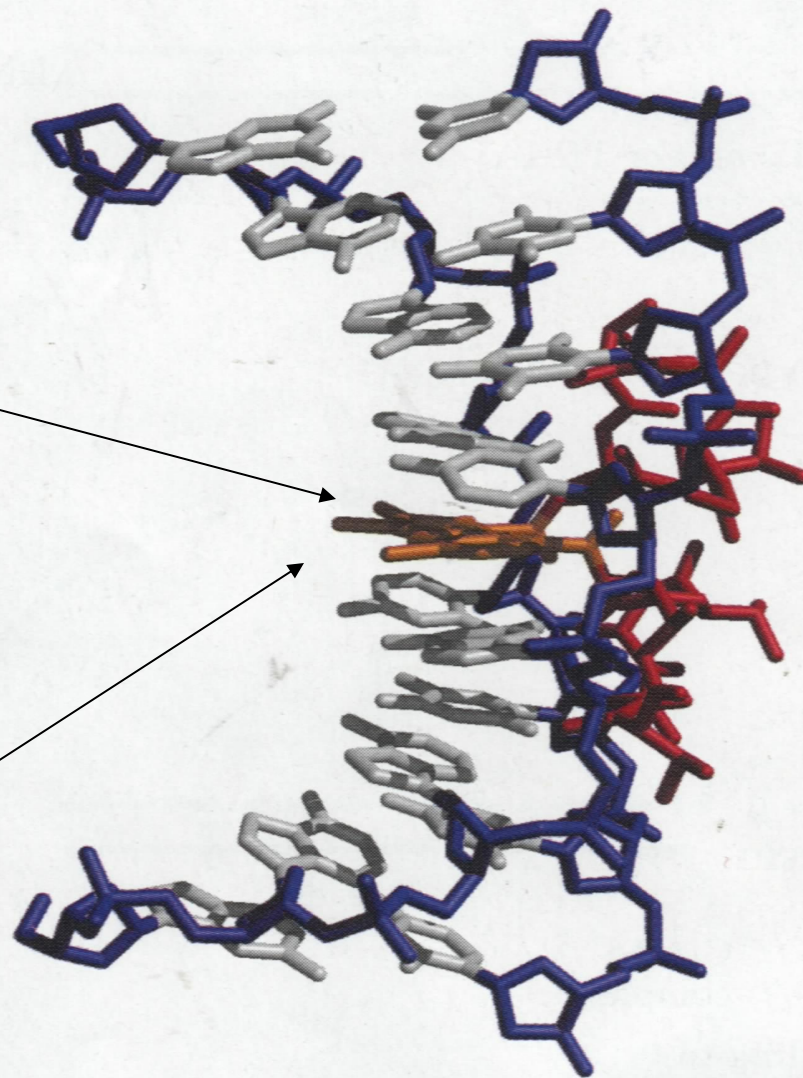
Actinomycin D

放线菌素 D: 模板抑制剂



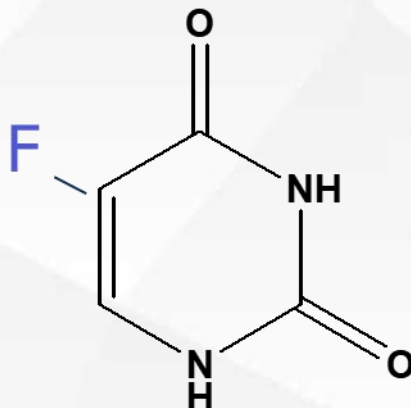
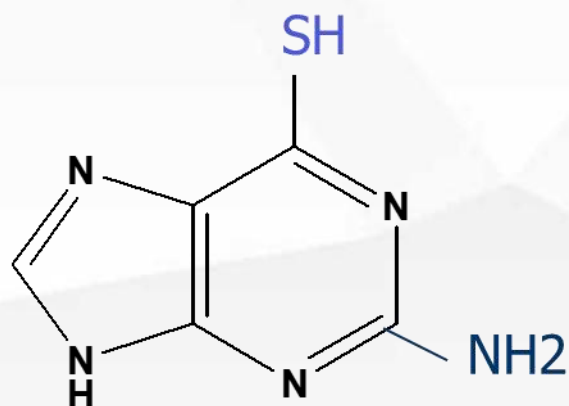
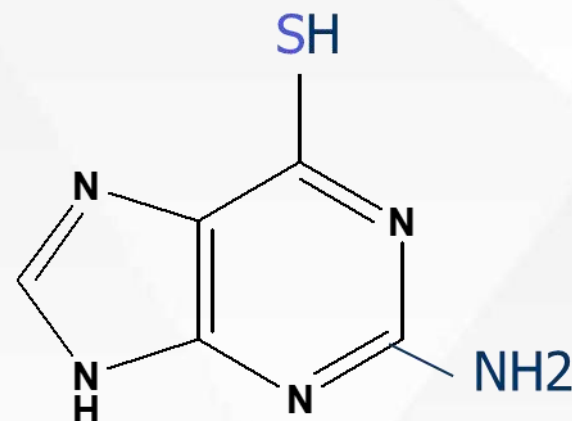
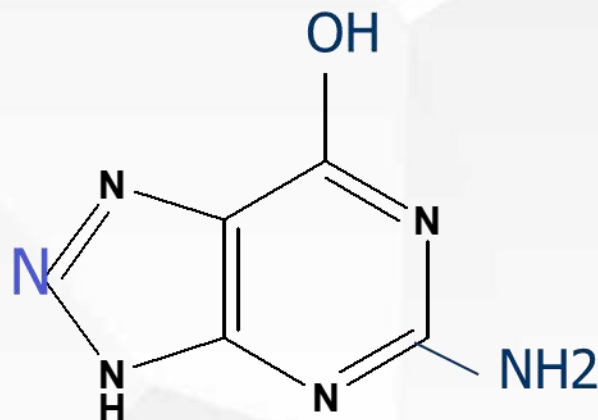
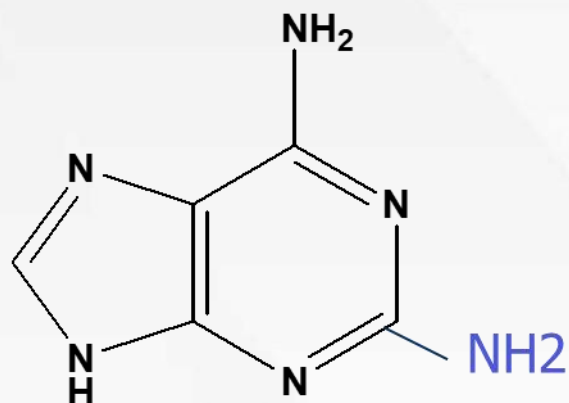
Acridine

(a)



(b)

II. 嘌呤和嘧啶类似物：人工合成的碱基类似物能够抑制和干扰核酸的合成。如：



作为代谢拮抗物抑制合成酶类或直接掺到核酸分子中，形成异常RNA或DNA。

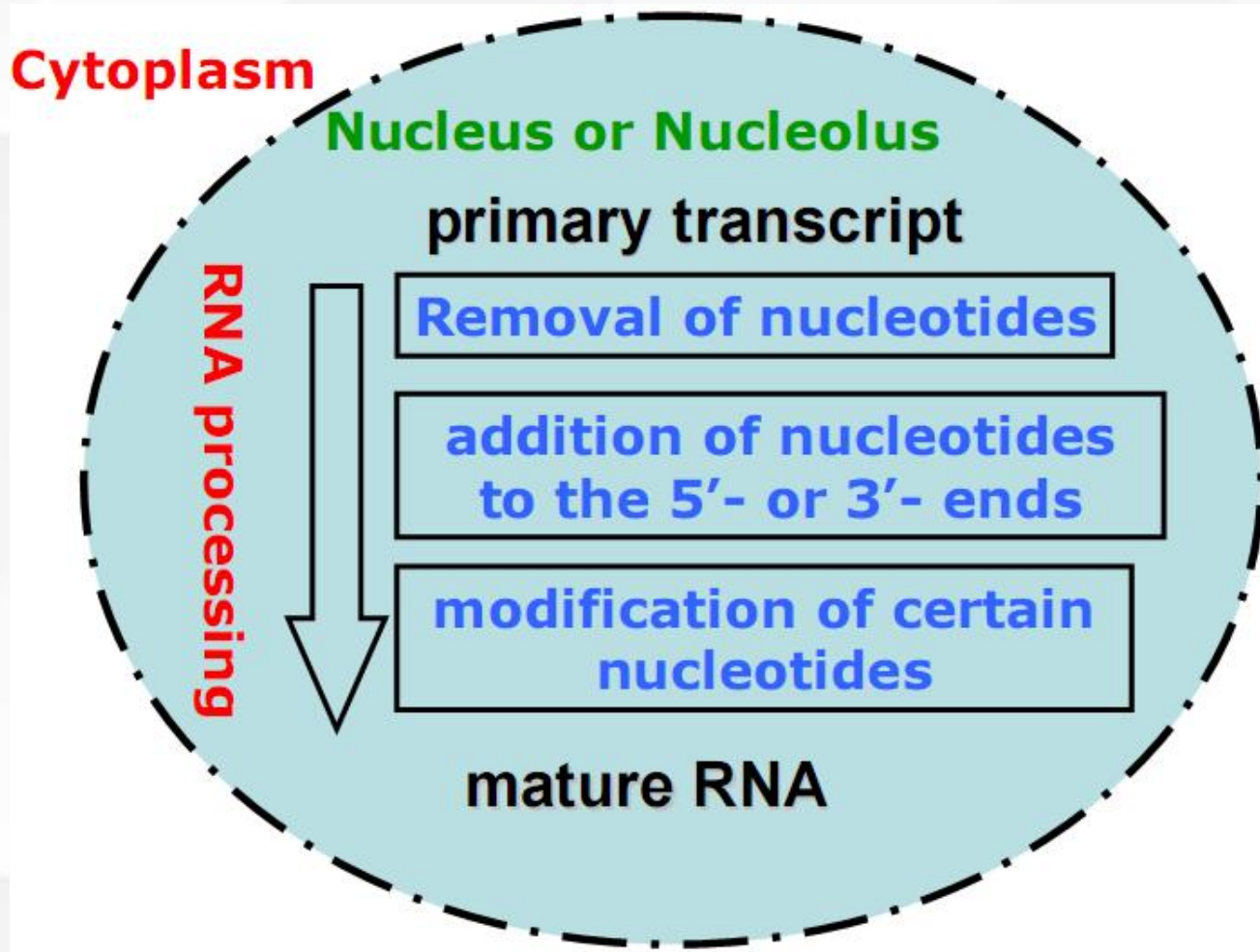
III. RNA聚合酶抑制剂：

- **利福霉素：**抑制细菌RNA聚合酶活性（起始作用）。
- **利链霉素：**与细菌RNA聚合酶亚基结合，抑制转录过程中RNA链的延长反应。
- **α -鹅膏蕈碱：**抑制真核生物RNA聚合酶活性。

抑制剂	靶酶	抑制作用
利福霉素	细菌的全酶	与 β 亚基结合，阻止起始
链霉素	细菌的核心酶	与 β 亚基结合，阻止延长
放线菌素	真核RNA聚合酶 I	与DNA结合，并阻止延长
α -鹅膏蕈碱	真核RNA聚合酶 II	与RNA聚合酶 II 结合

»» 4. 转录后加工

33



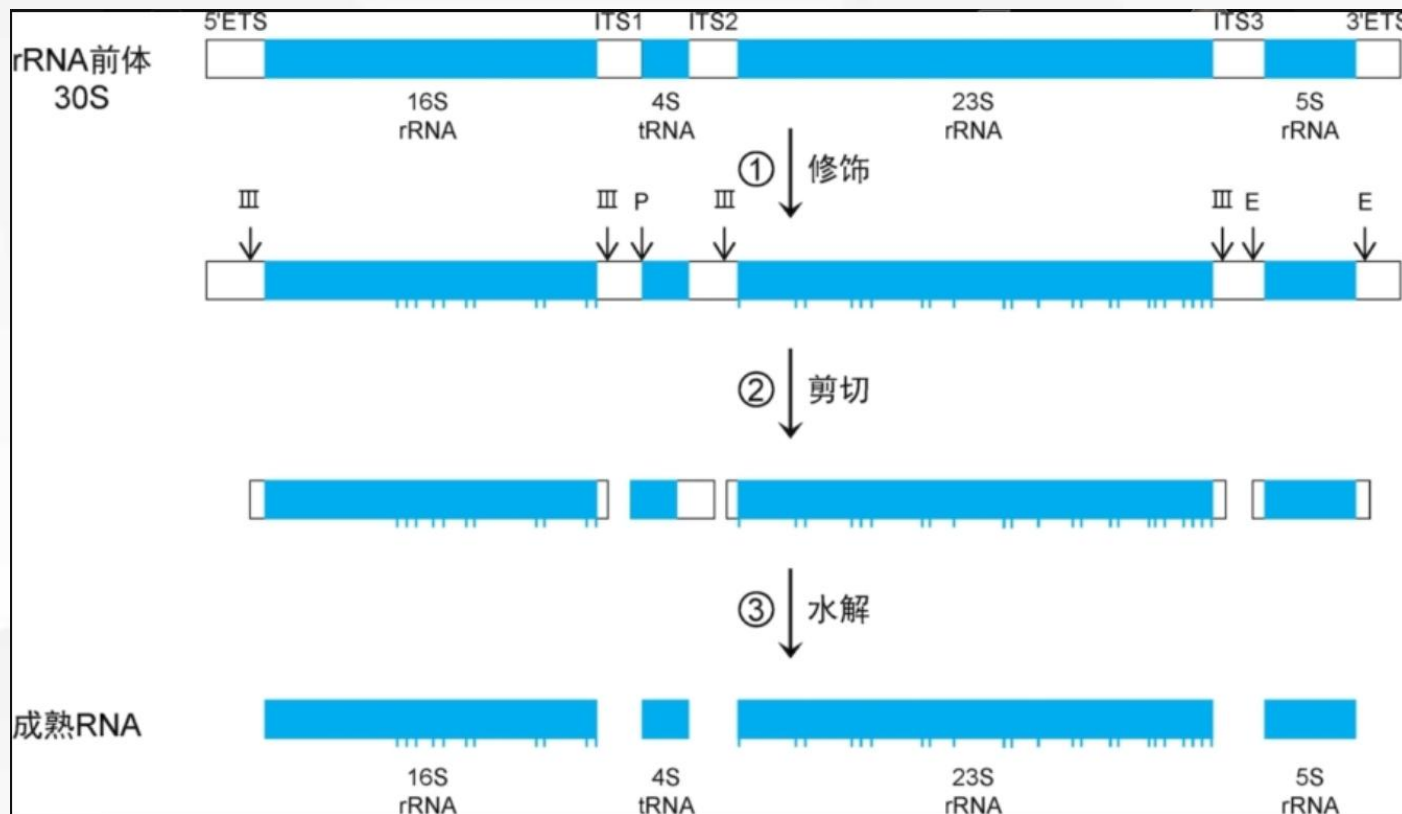
- **原核RNA前体的加工：**

- mRNA前体不需要加工，可以直接指导蛋白质合成；
 - 边转录边翻译
- rRNA前体和tRNA前体则需要经过加工才能成为有功能的成熟RNA分子；
 - rRNA：核苷酸修饰、剪切、水解、亚基聚合
 - tRNA：核苷酸修饰、剪切、添加3' CCA

原核rRNA的转录后加工

35

- 核苷酸修饰：主要是碱基甲基化和核糖2'-O-甲基化。
- 剪切：分别由RNase III、RNase P和RNase E催化切割不同位点。
- 水解：分别由RNase M16、M23和M5进一步水解，得到成熟RNA。
- 亚基聚合：rRNA加工与亚基聚合同步进行，加工完成即意味着形成核糖体小亚基（30S亚基）和大亚基（50S亚基），可以在mRNA上形成核糖体，合成蛋白质。

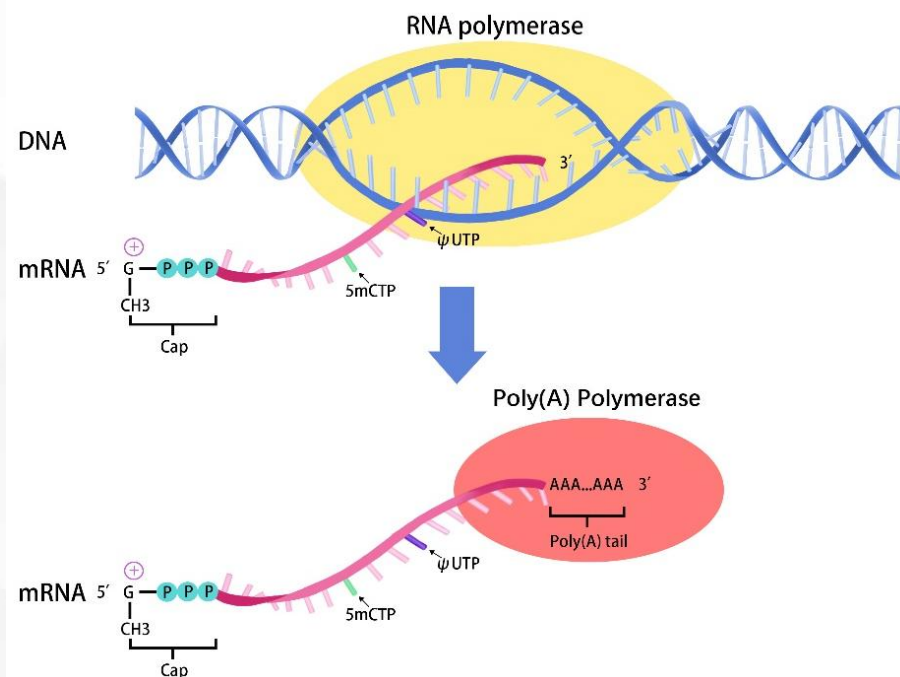


4. 转录后加工

36

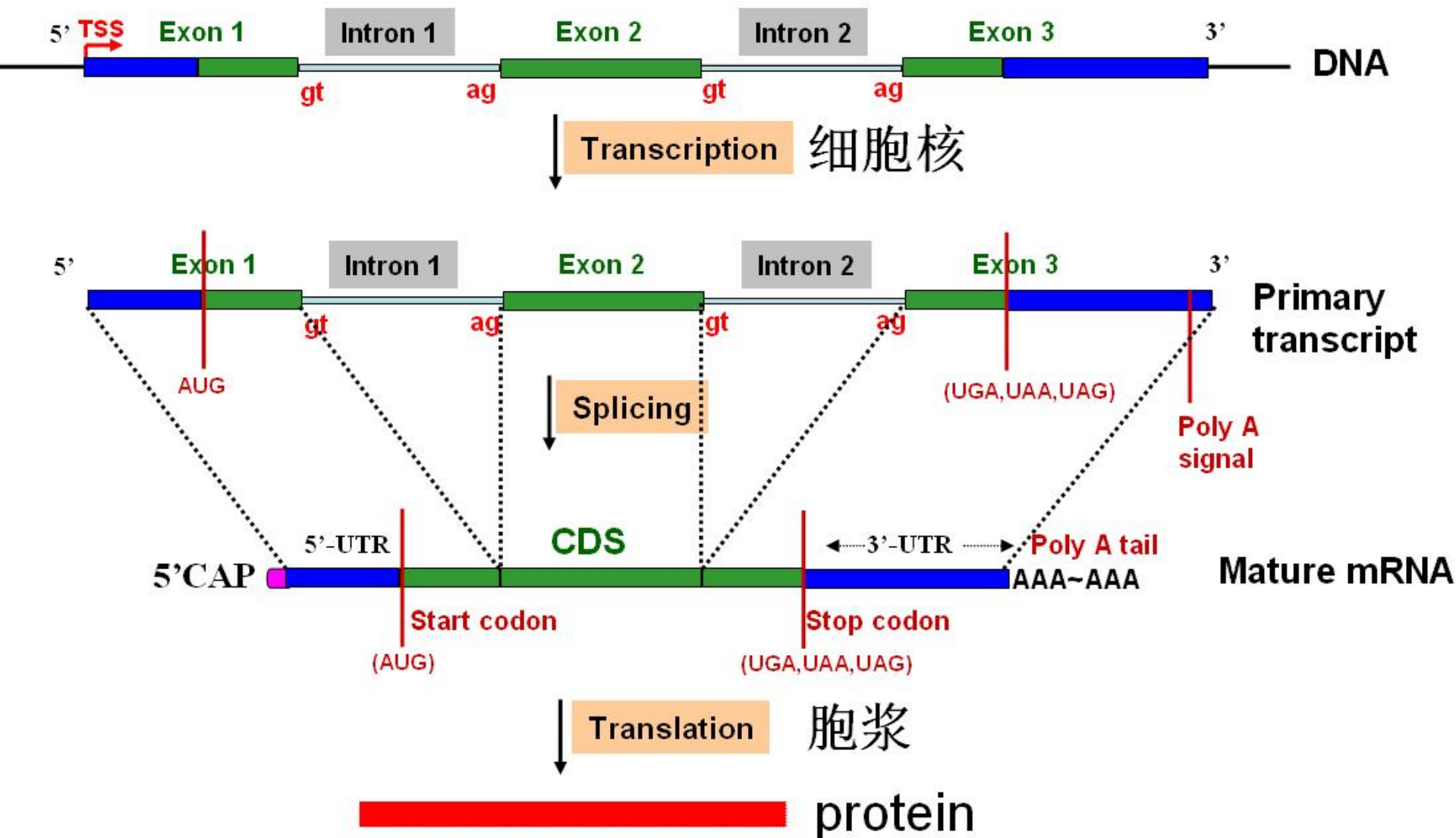
● 真核mRNA前体的加工包括：

- I. 5'端**连接“帽子”**结构 ($m^7G5'ppp5'NmpNp-$) ; ;
- II. 3'端**添加polyA “尾巴”** ;
- III. hnRNA被**剪接**, 把内含子 (DNA上非编码序列) 转录序列剪掉, 把外显子 (DNA上的编码序列) 转录序列剪接上, 真核生物一般为不连续基因;
- IV. 分子内部的核苷酸**甲基化**修饰。



4. 转录后加工

37





RNA processing

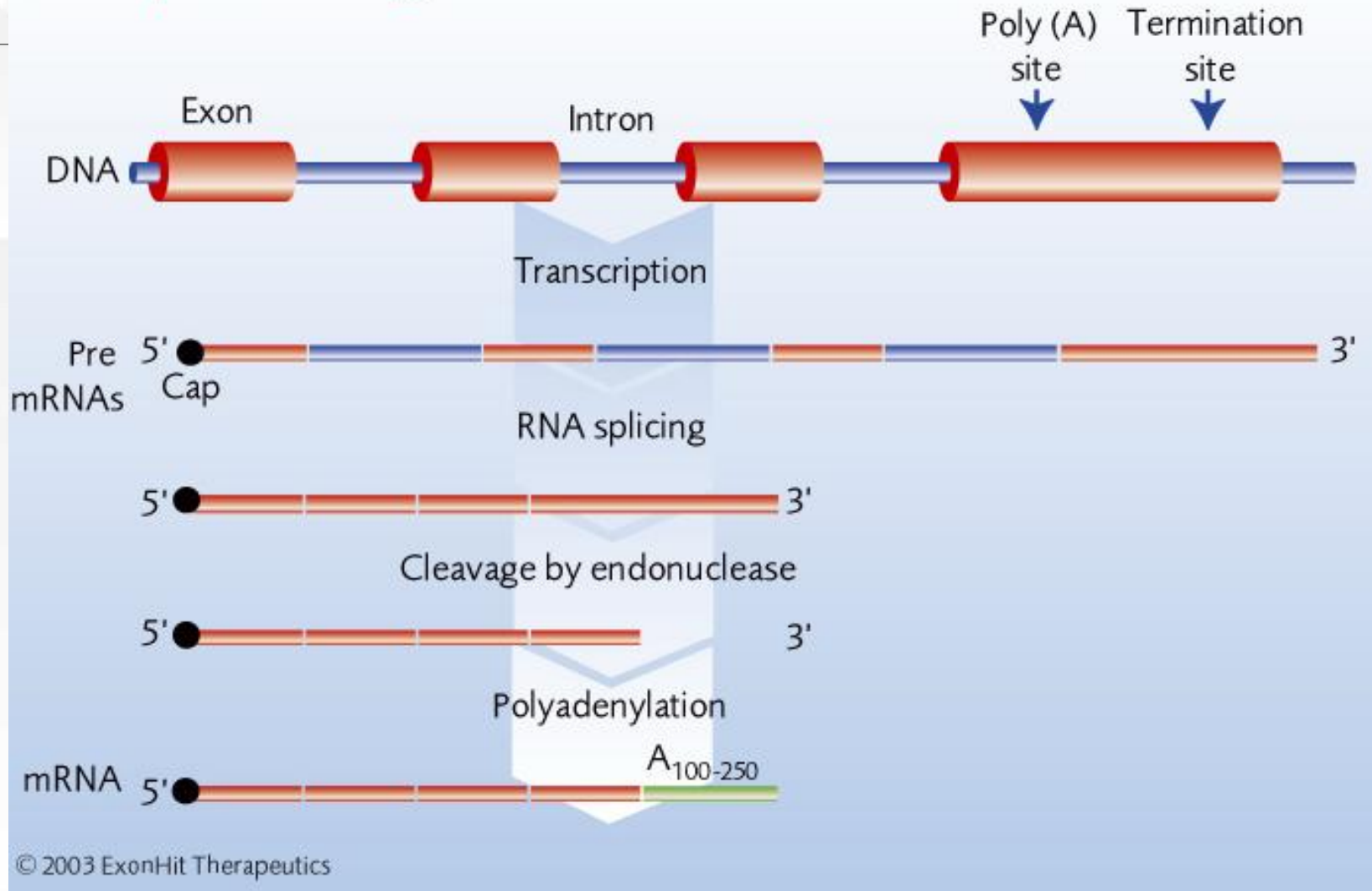


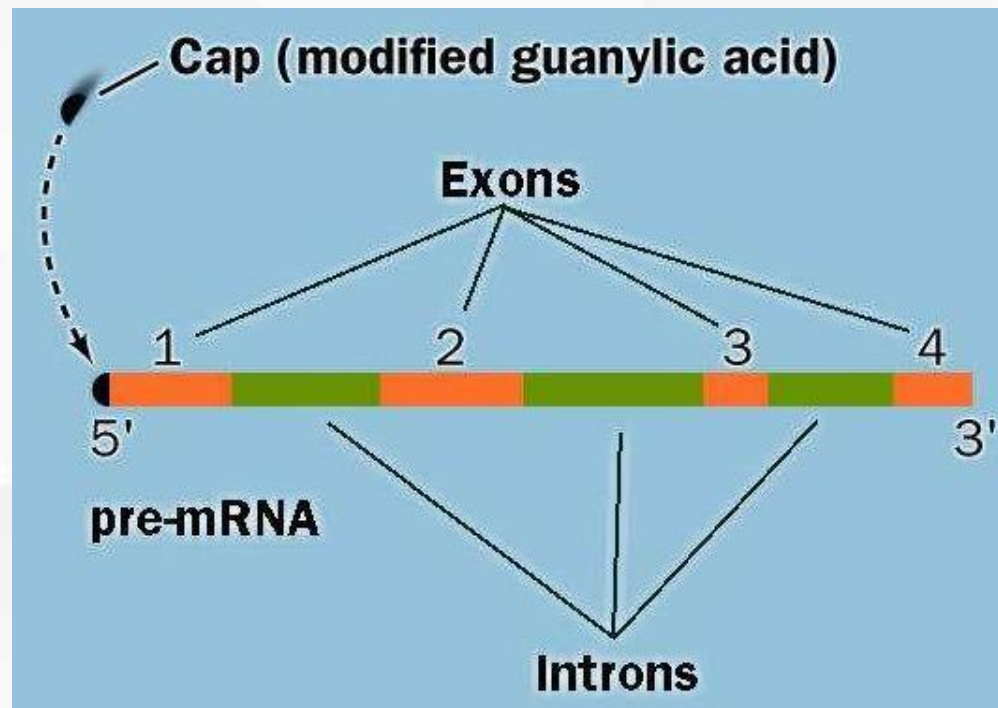
Figure: RNA processing

Nuclear RNA processing events include capping of the 5' end on the pre-mRNA, RNA splicing to remove intronic sequences and polyadenylation of the 3' end of the pre-mRNA.

4.1 真核细胞mRNA转录后加工 – 加帽

39

- **5'端加帽**：又称mRNA加帽。真核生物大多数mRNA 的5'端存在一种特殊结构，由一个5'-磷酸-7-甲基鸟苷 (5'-m⁷GMP) 与一个5'-核苷二磷酸 (5'-NDP) 通过**5'-5'三磷酸**连接形成。
- 目前已经发现三种5'帽子结构，其中1型最多，但单细胞真核生物mRNA主要是0型。



4.1 真核细胞mRNA转录后加工 – 加帽

40

● 帽子的种类:

种类	X	Y	结构	加帽场所
帽子0 (Cap-0)	H	H	$m^7GpppRpN$	细胞核
帽子1 (Cap-1)	CH_3	H	$m^7GpppRmpN$	细胞质 (0型帽子甲基化)
帽子2 (Cap-2)	CH_3	CH_3	$m^7GpppRmpNm$	细胞质 (1型帽子甲基化)

Cap-0: 共有结构 (m^7G , N^7 —甲基鸟苷)

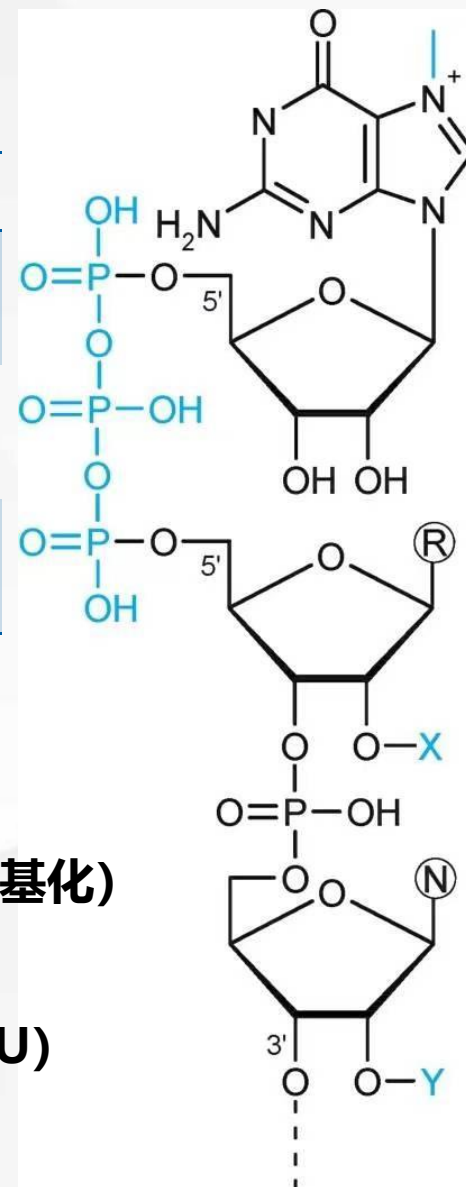
✓ 单细胞真核生物只有 Cap—0

Cap-1 : 第一个核苷酸的 2'-O 位上产生甲基化 (A, N^6 位甲基化)

✓ Cap-1 是其余真核生物的主要帽子形式

Cap-2 : 第二个核苷酸的 2'-O 位上产生甲基化 (A, G, C, U)

✓ Cap-2 存在于某些真核生物中



帽子的结构

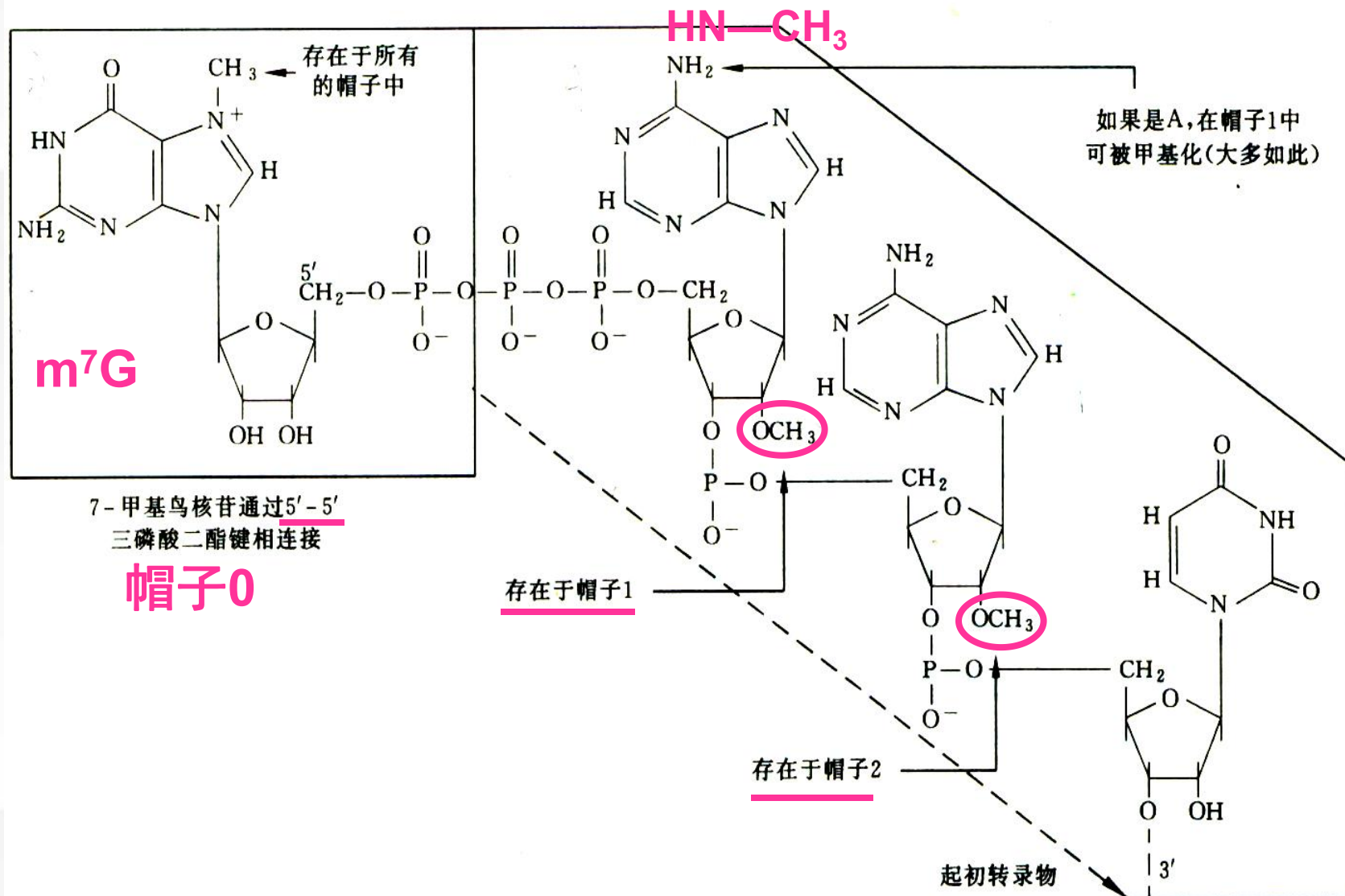


图6-19 真核生物 mRNA 5'端的三种不同的帽子结构

»» 4.1 真核细胞mRNA转录后加工 – 加帽

42

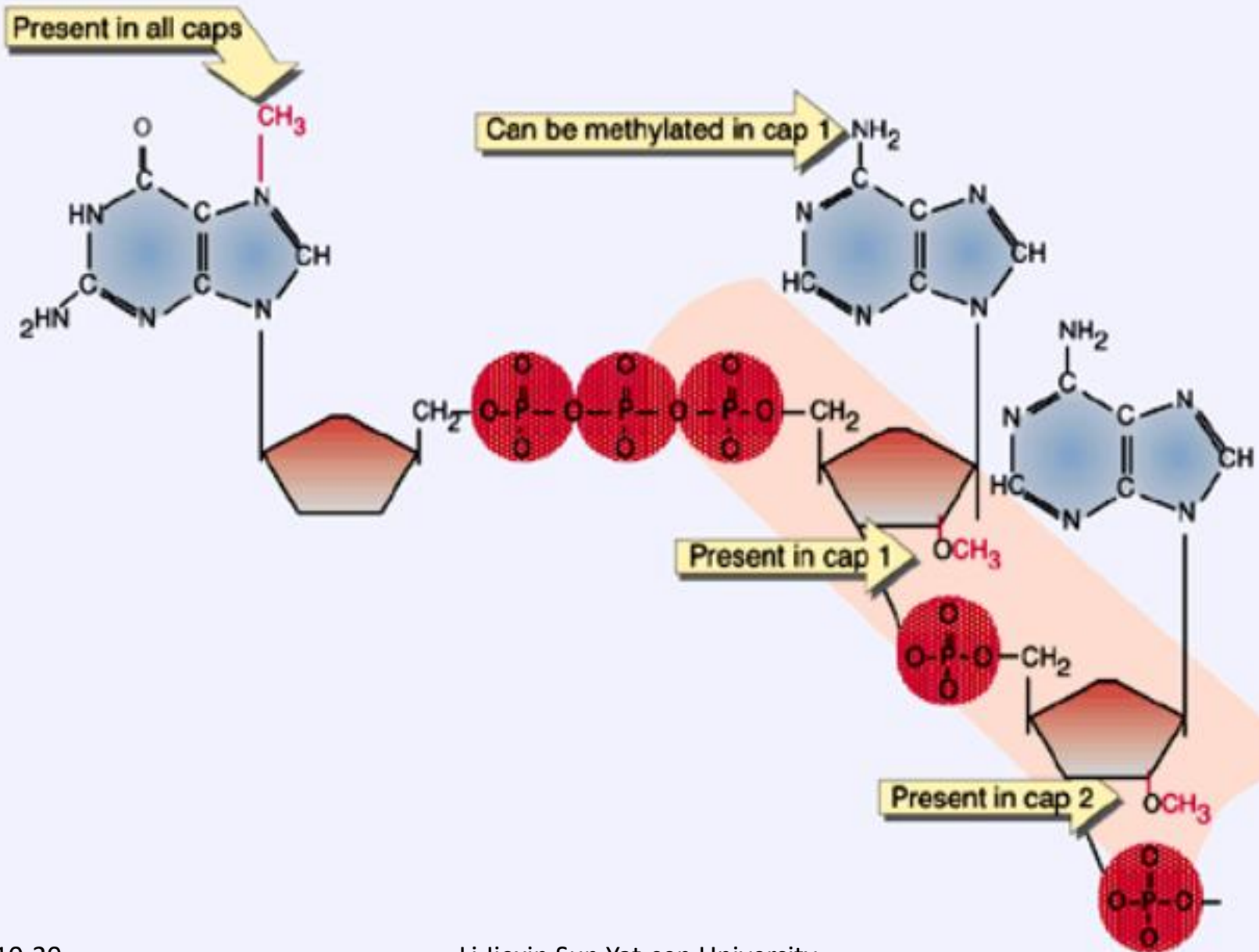
- 帽子结构的生成：
 - 甲基供体：S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)
 - 加帽酶 (capping enzyme) :
 - 双功能酶：mRNA鸟苷酸转移酶 + 多核苷酸-5' -三磷酸酶
 - 帽子特异性mRNA (核苷-2'-O-) 甲基转移酶1
 - 帽子特异性mRNA (核苷-2'-O-) 甲基转移酶2

mRNA加帽过程

43

酶	名称缩写	大小 (AA)
mRNA 加帽酶 (双功能酶: 多核苷酸-5'-三磷酸酶+mRNA 鸟苷酸转移酶)	HCAP1	597
mRNA 帽子鸟嘌呤- <i>N</i> ⁷ -甲基转移酶	RG7MT1	476
帽子特异性 mRNA (核苷-2'- <i>O</i> -)-甲基转移酶 1	MTr1	835
帽子特异性 mRNA (核苷-2'- <i>O</i> -)-甲基转移酶 2	MTr2	770





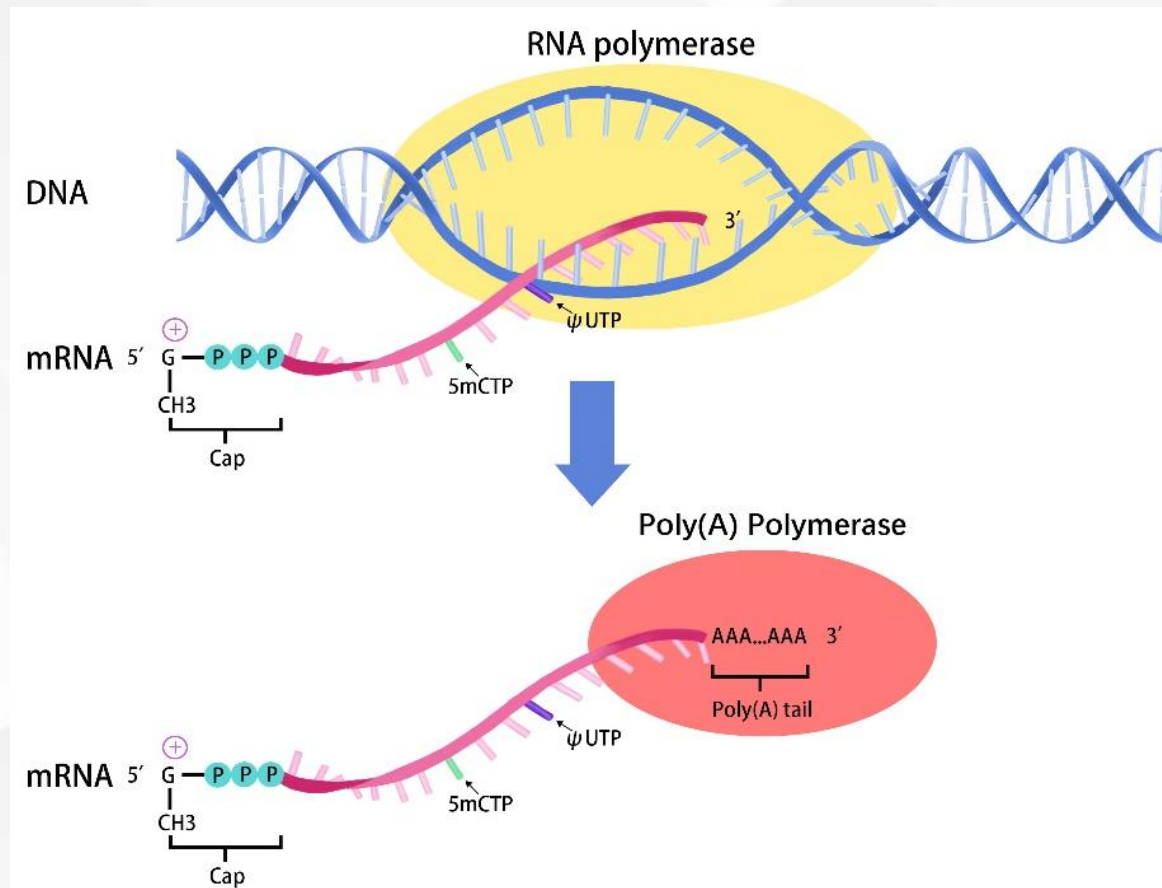
- 帽子结构的功能:

- 增加mRNA 的**稳定性**，使5'端免遭外切核酸酶的攻击
- 参与蛋白质合成起始：对**翻译起始识别**作用--为核糖体识别RNA提供信号
 - Cap—0 的全部都是识别的重要信号
 - Cap—1,2 的甲基化能增进识别
- 参与mRNA向细胞**核外转运**：是核孔复合体的识别和结合位点；
- 参与5'外显子**剪接**：是帽结合复合物的识别和结合位点。
- 与某些RNA病毒的正链合成有关

4.2 真核细胞mRNA转录后加工 – 加尾

46

□ 多聚(A)尾巴 (poly A tail): 3'端约长250bp (大多数Euk.的 mRNA)。



4.2 真核细胞mRNA转录后加工 – 加尾

47

- poly(A)的生成:

- I. RNA末端腺苷酸转移酶 (poly(A) 聚合酶) 催化

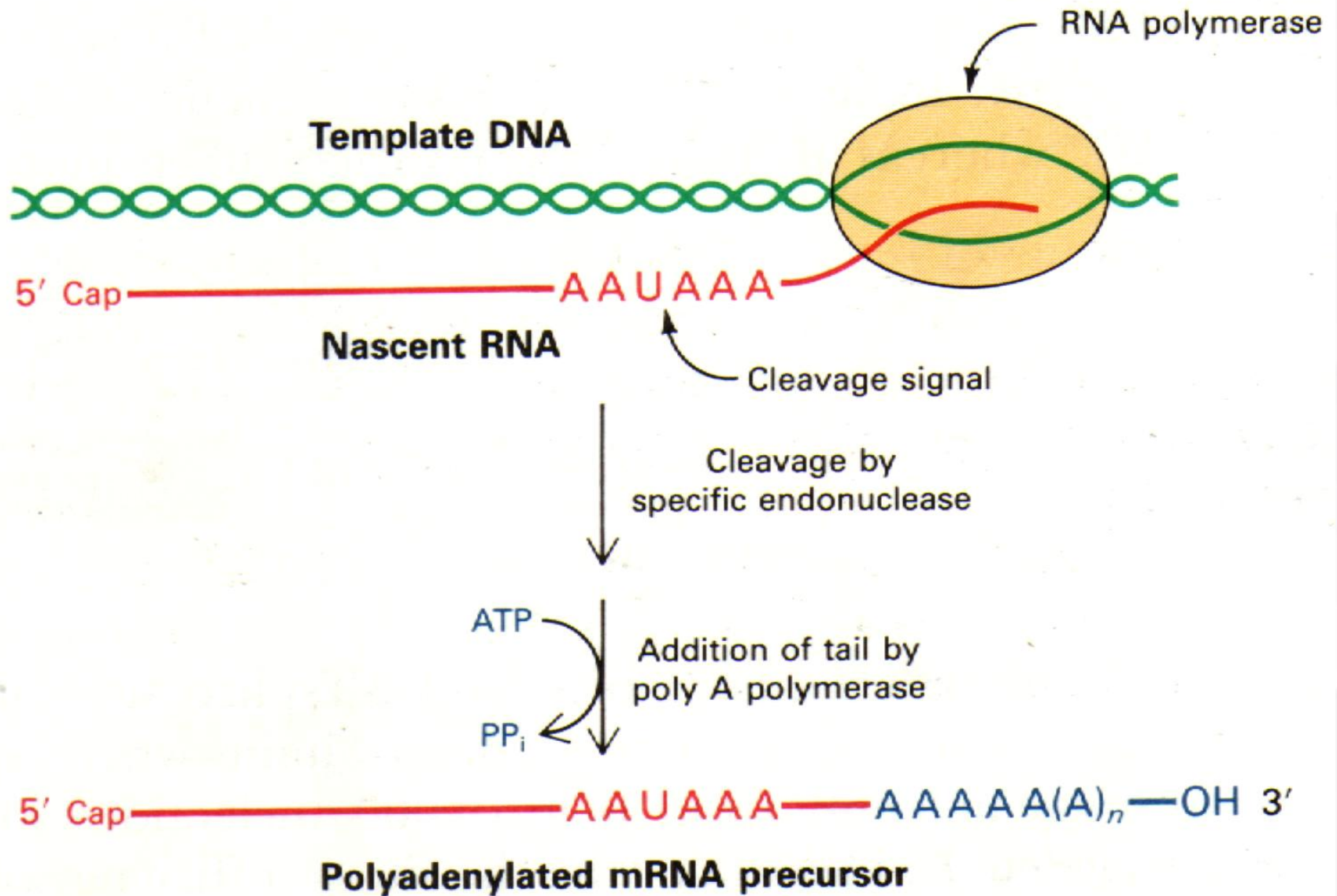


- II. 添加位点

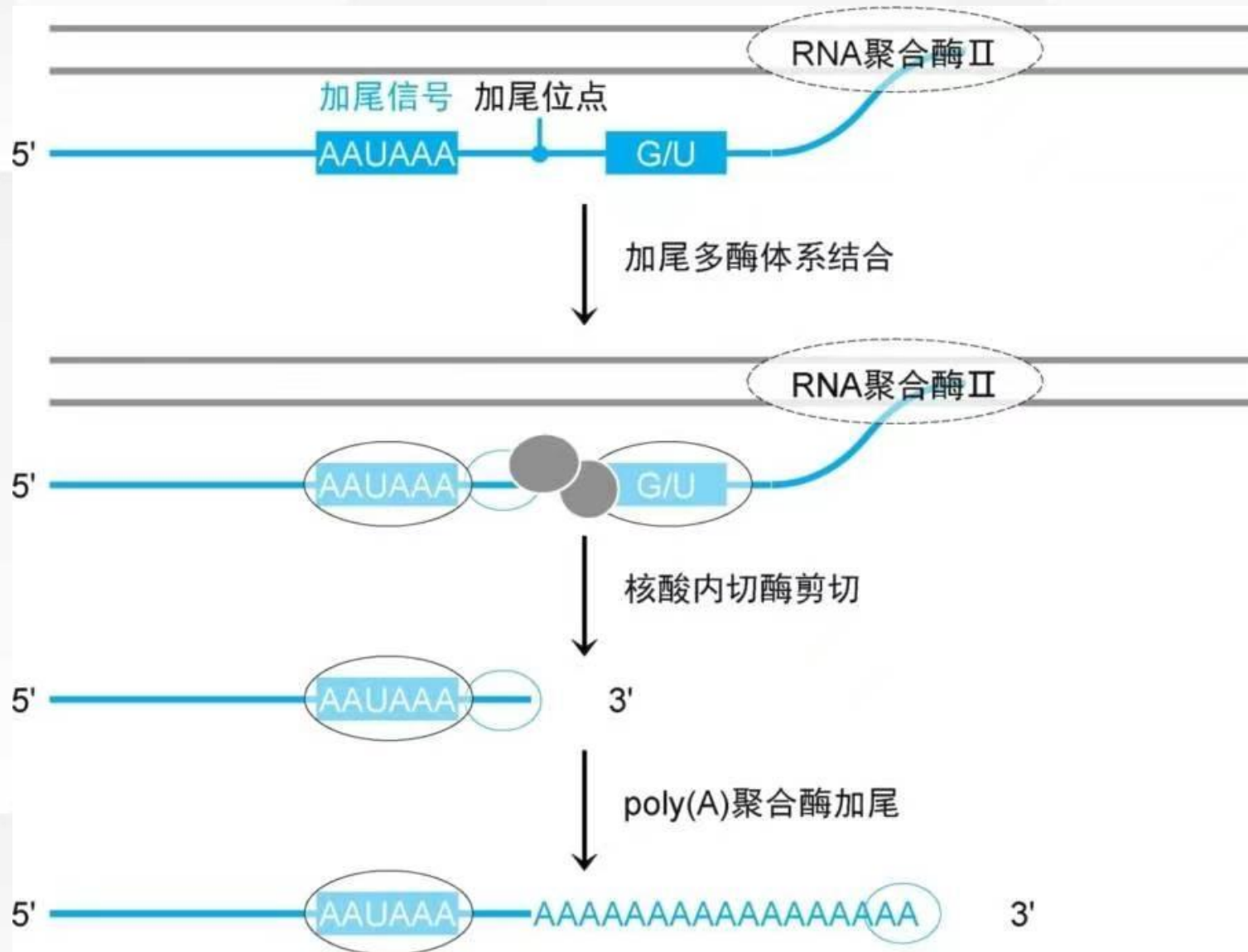
- 内切酶切除3'一段序列 → 由poly(A) 聚合酶催化添加poly(A)
 - 内切酶的识别位点 (有其它因子参与) :
5' -AAUAAA.....x.....GUGUGUG-3' (单细胞Euk.除外)
 - 两步反应

>>> poly(A)的生成

48



poly(A)的生成



4.2 真核细胞mRNA转录后加工 – 加尾

50

- **poly(A)的功能:**

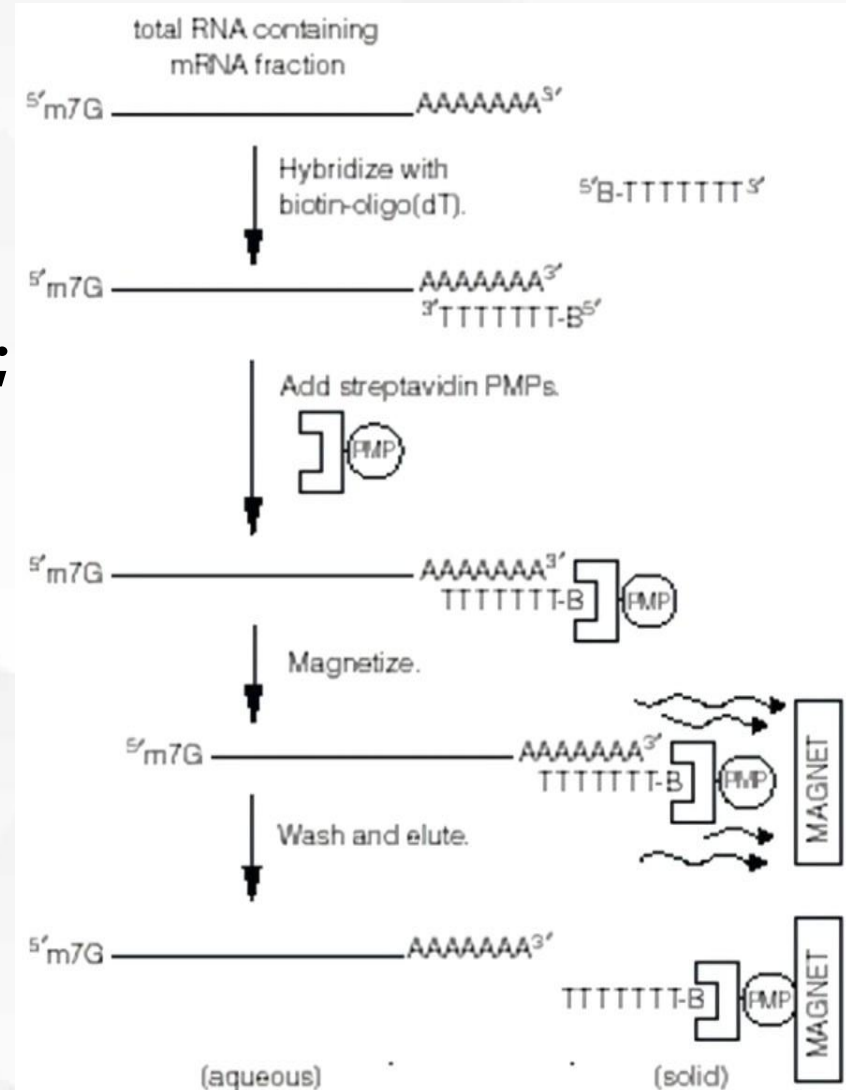
- **可能与核质转运有关**
- **与mRNA的寿命有关**
- **与翻译有关**
 - 缺失可抑制体外翻译的起始;
 - 胚胎发育中, poly(A) 对其mRNA的翻译有影响 (非poly(A) 化的为储藏形式) ;
 - 失去 poly(A) 可减弱其翻译。

4.2 真核细胞mRNA转录后加工 – 加尾

51

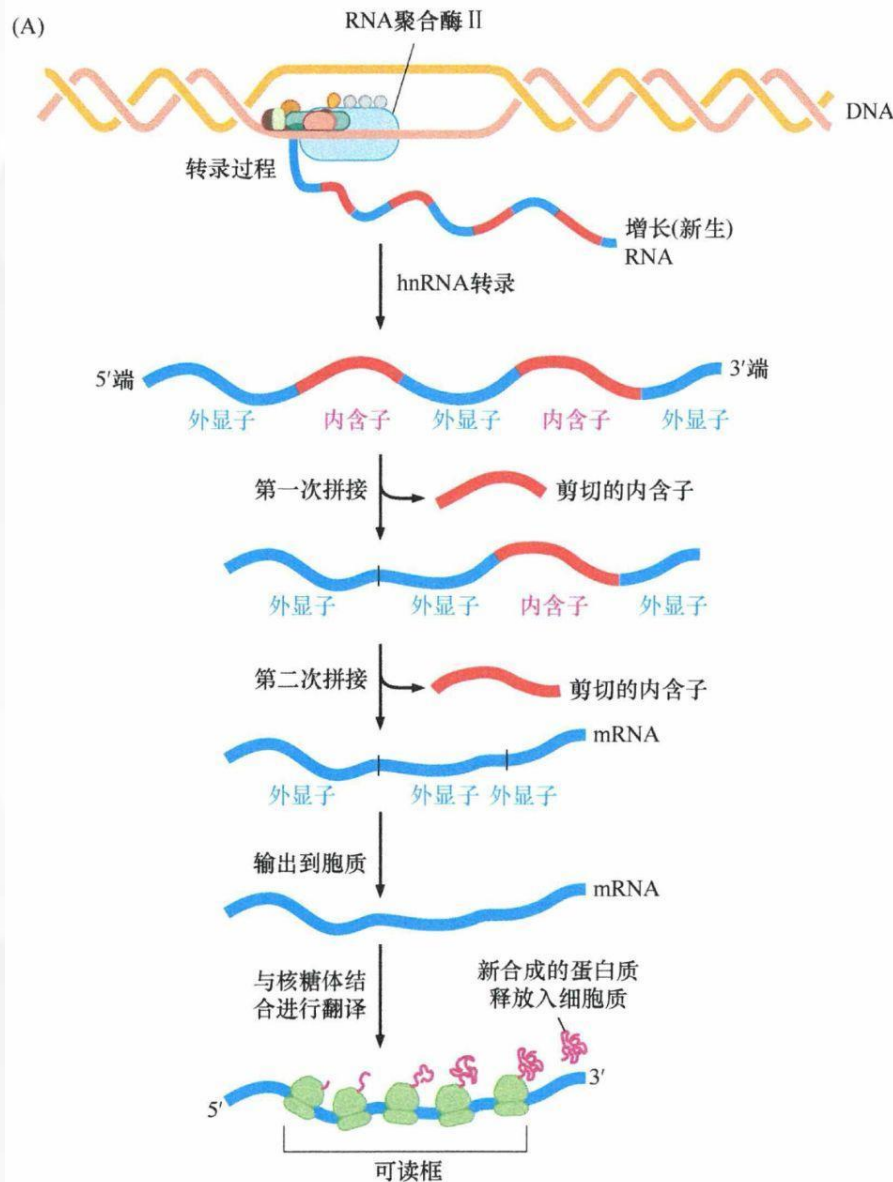
- poly(A)在分子生物学实验中的应用价值:

- 可将 oligo (dT) 与载体相连, 从总体RNA中分离纯化mRNA;
- 用寡聚dT (oligo (dT)) 为引物, 反转录合成 cDNA。

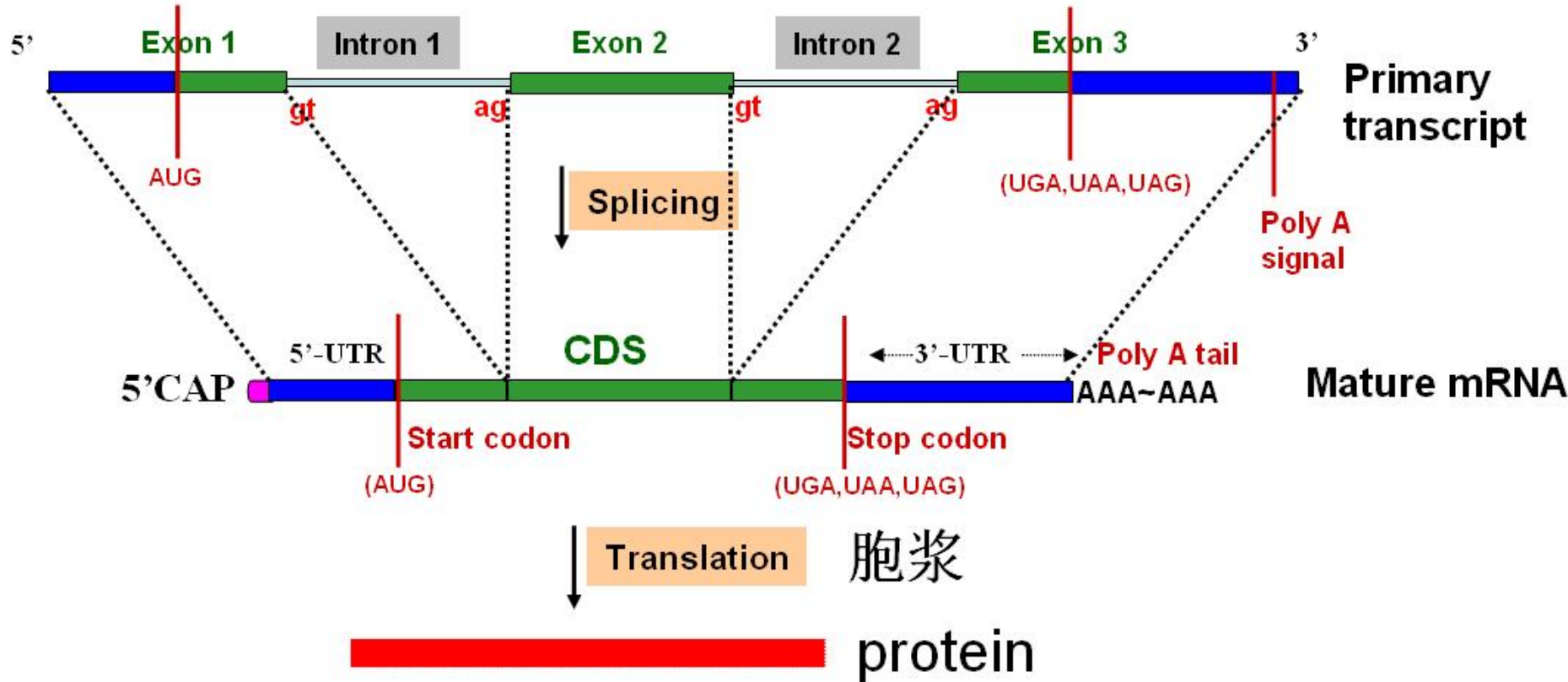


4.3 真核细胞mRNA转录后加工 – 剪接

52



- snRNA (小核糖体核蛋白) 介导的转酯反应:
 - snRNA识别并结合内含子的5' -GT、AG-3' 信号
 - snRNA拉近内含子两端→套索RNA
 - 剪接体(由不同snRNA组成)切除内含子, 并连接前后两个外显子



- 1981年Cech T在研究**四膜虫**(*Tetrahymena thermophila*) rRNA前体剪接过程中发现，此类的剪接**无需蛋白质的酶**参与作用，它可自我催化完成。
- Cech称具有催化功能的RNA为**核酶** (ribozyme) 。1989年cech T和Altman S共同获诺贝尔化学奖。Altman S的贡献是发现Rnase P中的**M1RNA单独也具有催化功能**。

The Nobel Prize in Chemistry 1989

"for their discovery of catalytic properties of RNA"

Press release

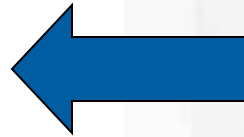
Sidney Altman

USA and Canada

Yale University
New Haven, CT, USA

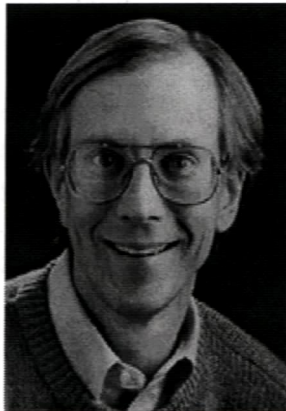
1939 -

Autobiography



因发现核酶而获诺贝尔奖的两位科学家：

**The M1 RNA
in ribonuclease
P is catalytic**



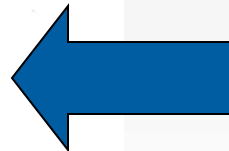
Thomas R. Cech

USA

University of Colorado
Boulder; CO, USA

1947 -

Autobiography
Other Resources



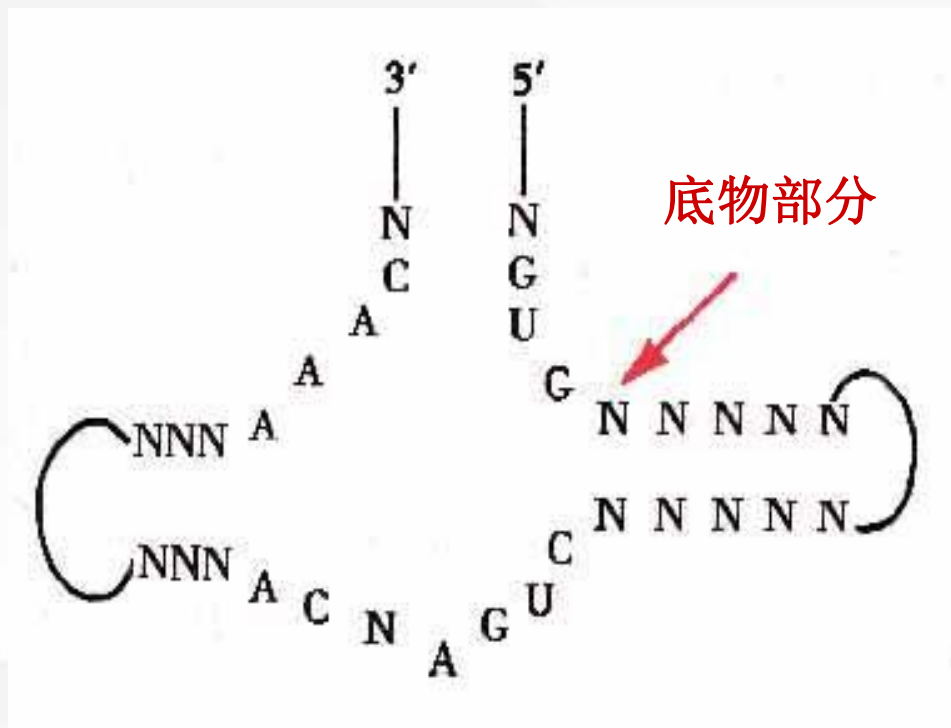
**The intron in
the pre-rRNA of
Tetrahemena
is self-spliced**

- **核酶 (ribozyme)**: RNA本身具有催化活性, 此种由RNA发挥催化作用的酶, 称为核酶。
- **核酶的发现**改变了酶的化学本质是蛋白质的传统观念, 被认为是近二十年来生物化学领域中最令人鼓舞的成就之一。
- 最简单的核酶呈槌头结构。
- **核酶与传统酶的区别:**
 - 一般的酶是纯的蛋白质, 而核酶是RNA或带有蛋白的RNA;
 - 核酶既是催化剂又是底物。而酶仅催化反应。

5.1 核酶

57

- 除rRNA外，tRNA、mRNA的加工也可采用自我剪接方式。
- 最简单的核酶二级结构——**槌头状结构(hammerhead structure)**



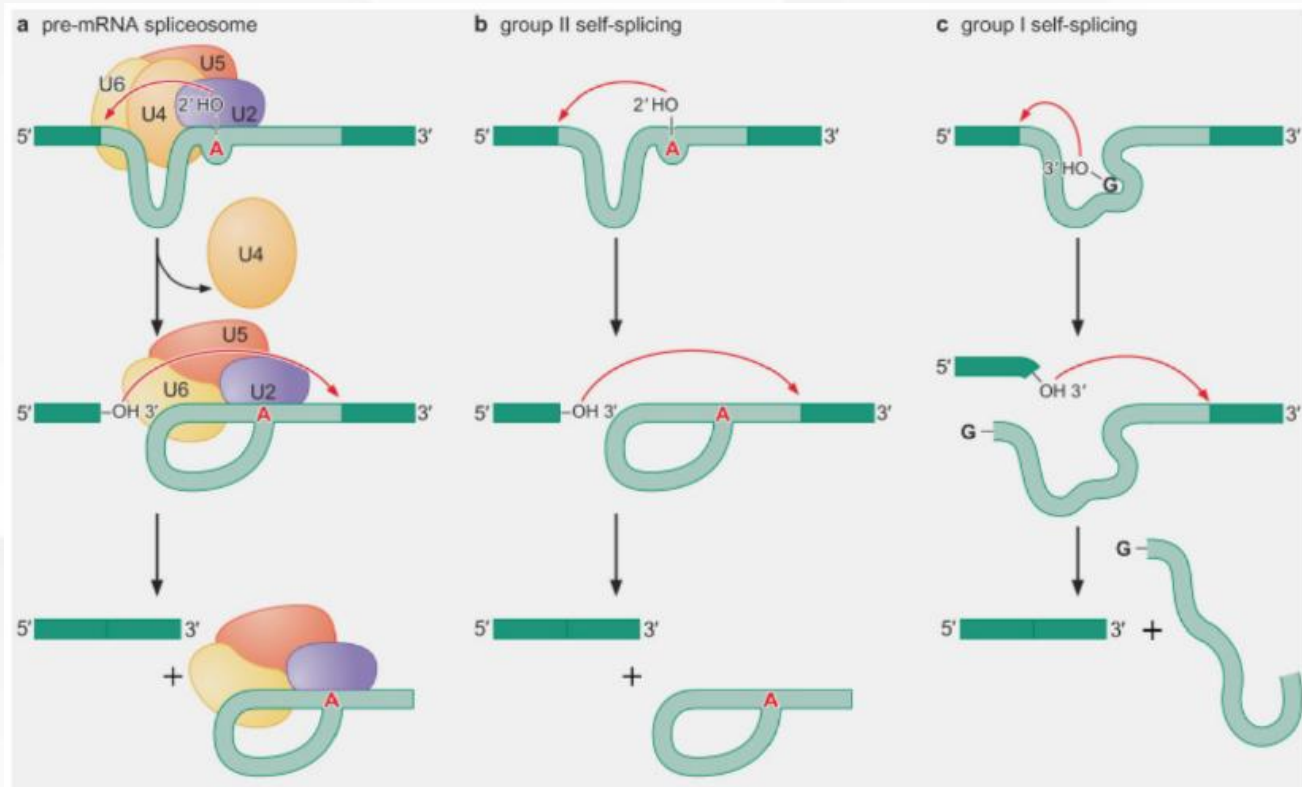
- 通常为60个核苷酸左右；
- 同一分子上包括有催化部份和底物部份；
- 催化部份和底物部份组成锤头结构。

5.2 核酶的催化活性

58

- RNA为什么能成为**催化中心**？

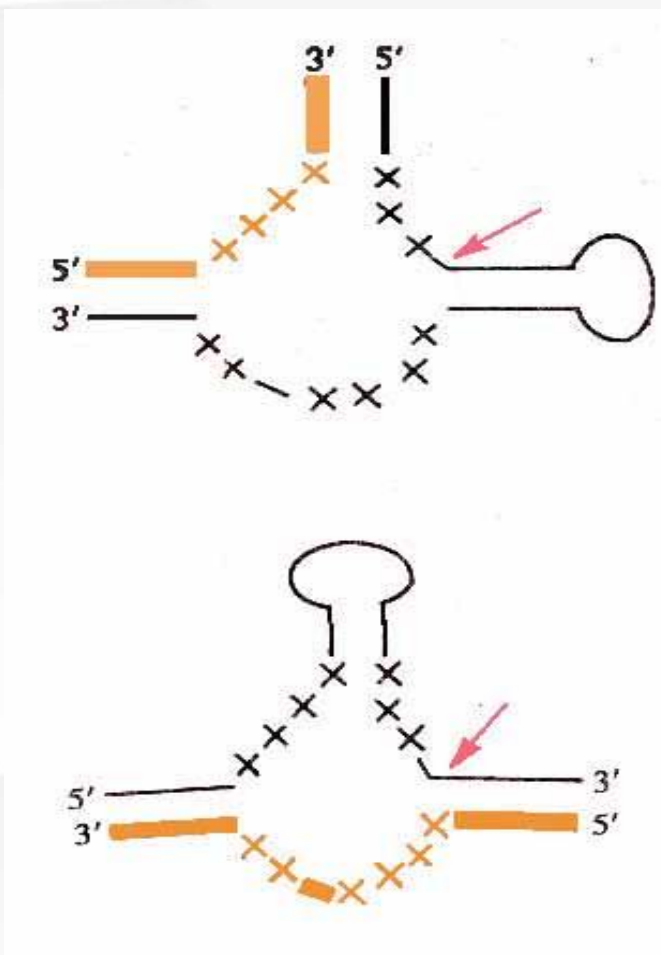
- 催化中心实际上是提供一个特定的**三维结构域**，以使参与反应的基因靠近并形成适宜的空间关系。RNA分子能够以其分子的三维构像，产生键的断裂和生成所必需的环境，催化RNA和底物RNA之间的配对，可能是产生这种催化环境的主要原因。



5.3 核酶研究的意义

59

- 利用核酶的结构设计合成人工核酶，应用于疾病的治疗。



人工设计的核酶

- 粗线表示合成的核酸分子
- 细线表示天然的核酸分子
- X 表示一致性序列
- 箭头表示切断点

一、基本概念:

转录单位, Pribnow框, Sextama框, σ 因子, ρ 因子, TATA框, CAAT框, ployA尾, 核酶, TF, TSS, 启动子, 终止子, 编码链

二、转录和复制的异同点

三、原核生物和真核生物启动子的异同点

四、原核生物转录起始的过程及特点

五、原核生物强终止子和弱终止子特点

六、真核生物mRNA前体的加工包括哪些过程

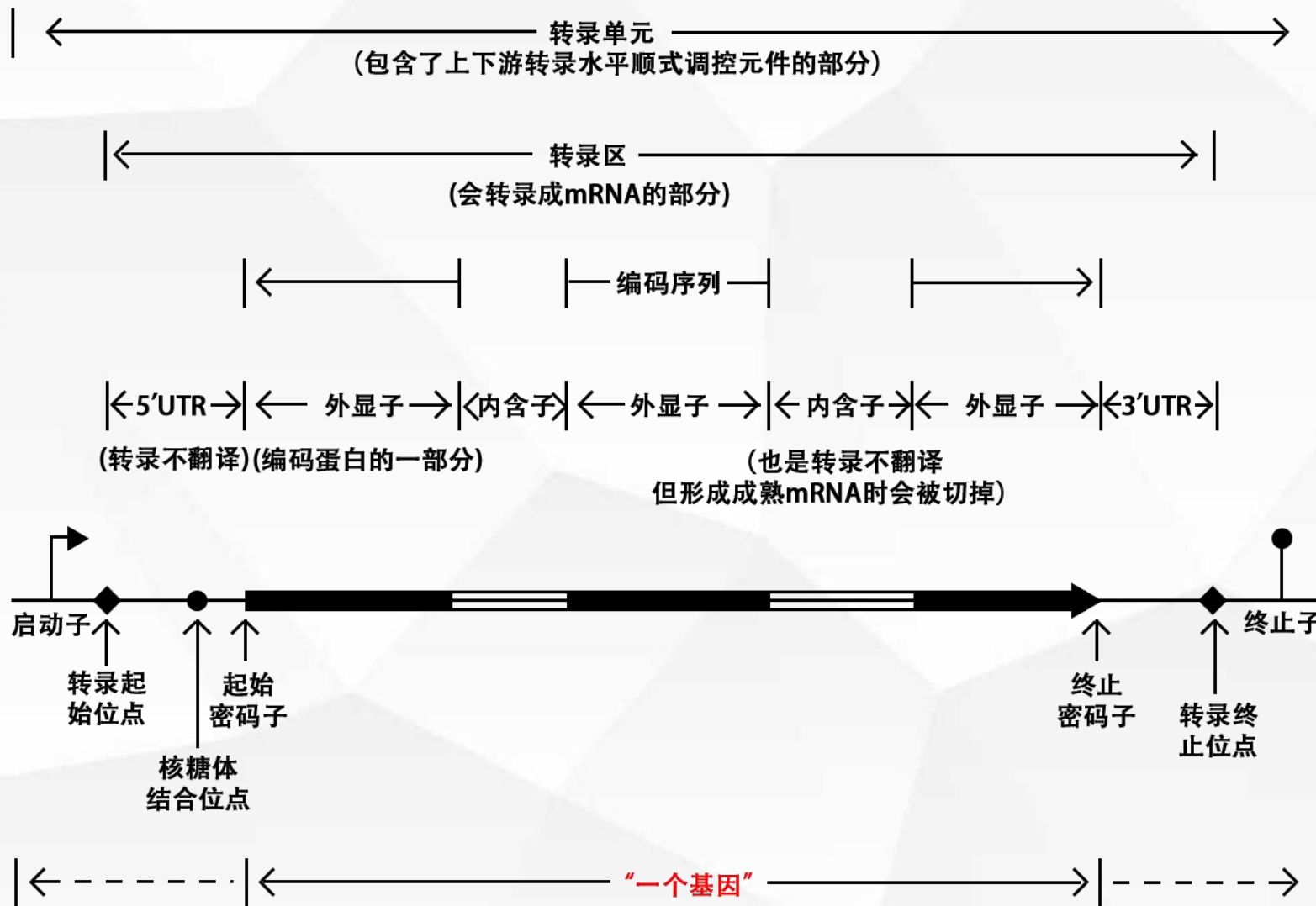
七、核酶的生物学意义

八、原核生物和真核生物转录单位的异同点

九、RNA聚合酶和DNA聚合酶的异同点

本章完

真核生物的“基因”结构





性质	模板链	编码链
其他名称	负链，反义链，非编码链	正链，正义链，有义链
可以转录	一定	不一定
转录后加工产物	mRNA、tRNA 或 rRNA	反义 RNA
转录范围	整个转录区	可以是转录区局部
转录时序	先	后

项目	转录	复制
聚合酶	RNA 聚合酶	DNA 聚合酶
DNA 模板	基因组局部（转录区，选择性转录） 转录单链（模板链，不对称转录）	基因组全部 复制双链（半保留复制）
原料	NTP	dNTP
起始	启动子	复制起点
引物	不需要	需要
碱基配对原则	dA-rU, dT-rA, dG-rC, dC-rG	dA-dT, dT-dA, dG-dC, dC-dG
错配率	$10^{-4} \sim 10^{-5}$ （保真性低）	$10^{-6} \sim 10^{-8}$ （保真性高）
连续性	连续	不连续
终止	终止子	终止区
产物	单链 RNA	双链 DNA
后加工	有	无

启动子区域的甲基化，启动子甲基化通常与基因表达呈现负相关：启动子区域高甲基化基因低表达。而与之相反的是，基因体（genebody）的高甲基化通常与基因高表达相关。

