

分子生物学第六章笔记：原核生物的转录机制 ***重点哦

本章深入探讨了原核生物中基因表达的第一步——转录（Transcription）的详细机制。转录是将 DNA 的遗传信息转化为 RNA 的过程，这一过程在原核生物中主要由单一类型的 RNA 聚合酶（RNA Polymerase）完成，并严格遵循起始、延伸和终止三个阶段。

1. 中心法则回顾 (Review of Central Dogma)

经典的中心法则描述了遗传信息流的方向：DNA → RNA → 蛋白质。DNA 可以自我复制（replication），RNA 可以作为逆转录（Reverse transcription）的模板生成 DNA，某些 RNA 病毒可以进行 RNA 复制（RNA replication）。本章重点关注从 DNA 到 RNA 的转录过程，特别是在原核生物中的实现机制。

2. 原核生物 RNA 聚合酶的结构与功能 (RNA Polymerase Structure and Function in Prokaryotes)

原核生物通常只有一种类型的 RNA 聚合酶负责合成所有类型的 RNA（mRNA、rRNA、tRNA 等）。

- **组成 (Composition):** 原核 RNA 聚合酶存在两种形式：
 - **核心酶 (Core enzyme):** 由 β' 、 β 、两个 α 亚基和一个 ω 亚基组成 ($\beta'\beta\alpha_2\omega$)。核心酶包含基本的转录机器，能够催化磷酸二酯键的形成。
 - **全酶 (Holoenzyme):** 由核心酶与一个 σ 因子 (σ subunit) 结合而成 ($\beta'\beta\alpha_2\omega\sigma$)。 σ 因子是启动转录所必需的，赋予 RNA 聚合酶识别特异性启动子区域的能力。
- **亚基功能 (Subunit Functions):**
 - β' 亚基：可能与 DNA 模板结合有关，其特定区域（如 262-309aa 片段）

与 σ 因子相互作用，有助于启动子区域的 DNA 解链。

- β 亚基：包含催化活性位点，负责磷酸二酯键 (phosphodiester bond) 的形成。
- α 亚基：有两个 α 亚基，其 C-末端结构域 (CTD) 负责识别上游启动子元件 (UP element)，N-末端结构域 (NTD) 参与酶的组装。
- σ 亚基 (σ factor)：是转录起始的关键特异性因子，指导核心酶结合到基因的启动子区域。不同的 σ 因子识别不同的启动子序列，调控不同基因的表达。其结构中的保守区域 (Regions 1, 2, 3, 4) 分别参与与核心酶和 DNA 的结合，特别是 Region 2.4 识别 -10 box，Region 4.2 识别 -35 box。
- ω 亚基 (ω subunit)：体积较小，对细胞生存活性或体外酶活性并非必需，可能在酶的组装中起作用。

- 全酶与核心酶的活性比较 (Comparison of Holoenzyme and Core Enzyme Activity):

- 体外转录实验表明，核心酶在裸露的 DNA (如带有缺刻 nick 或断裂 break 的 DNA) 上也能进行非特异性转录。
- 全酶在完整 (native, intact) 的 DNA 模板上具有更高的转录活性，因为它能特异性识别启动子。这证明了 σ 因子赋予了 RNA 聚合酶启动转录的特异性。滤膜结合实验 (Filter-binding assay) 也证实，全酶与 DNA 的结合比核心酶更紧密，尤其是在存在启动子区域时。

3. 原核生物启动子 (Prokaryotic Promoter)

启动子 (Promoter) 是位于基因转录起始位点 (transcription start site) 上游的一段 DNA 序列，是 RNA 聚合酶结合并启动转录的特异性区域。

- **核心启动子元件 (Core promoter elements):** 大多数原核启动子包含两个保守序列区域，它们位于转录起始位点上游的特定位置：
 - **-10 框 (-10 box):** 位于转录起始位点上游约 -10 bp 处，共有序列为 TATAAT。
 - **-35 框 (-35 box):** 位于转录起始位点上游约 -35 bp 处，共有序列为 TTGACA。
 - 这些共有序列的**保守性** (consensus sequences) 越高，启动子通常越强，转录效率越高。突变 (**down mutation** 或 **up mutation**) 改变共有序列会影响启动子强度。
- **上游启动子元件 (UP element):** 某些非常强的启动子在核心启动子上游还含有一个 UP element。该元件可以显著增强转录效率 (可提高 30 倍)，主要由 RNA 聚合酶的 α 亚基的 CTD 结构域识别和结合。DNase 足迹法 (DNase footprinting) 可以用来确定蛋白质 (如 RNA 聚合酶或其亚基) 与 DNA 的结合区域，从而验证 CTD 结合 UP element。

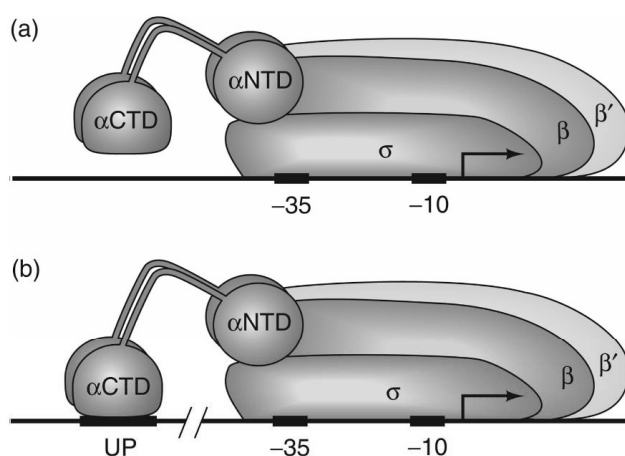


图 6.27 聚合酶 α 亚基 C 端结构域 (CTD) 的功能模型。 (a) 在核心启动子中， α 亚基不参与结合；(b) 在含有 UP 元件的启动子中，CTD 与 UP 元件结合。注意，两个 α 亚基均在图中显示，另一个重叠在后。

4. 转录起始 (Transcription Initiation)

转录起始是整个转录过程的关键调控步骤。它包括以下连续的阶段：

1. 形成**闭合**启动子复合体 (Forming the closed promoter complex): RNA 聚合酶全酶识别并松散地结合到启动子区域的 DNA 上，此时 DNA 仍为双链状态。这是一种可逆的结合。
2. 形成**开放**启动子复合体 (Forming the open promoter complex): 全酶将启动子区域的 DNA 双链局部解开，形成一个**转录泡** (transcription bubble)，长度约为 10-18 bp。此时全酶与 DNA 的结合变得更紧密，形成开放启动子复合体。这个过程是温度敏感的，高温有利于 DNA 解链。
3. 掺入最初几个核苷酸 (Incorporating the first few nucleotides): RNA 聚合酶在转录起始位点开始催化核苷酸的聚合，合成**短**的 RNA 链。
4. 启动子**清除** (Promoter clearance): RNA 聚合酶合成的 RNA 链达到一定长度（通常为 2-10 nt，此时产生的短 RNA 链称为**流产**转录本 abortive transcripts），并与模板链形成稳定的 RNA-DNA 杂交体。转录复合体变得更稳定，RNA 聚合酶构象发生变化，释放 σ 因子，并**离开启动子区域**，进入延伸阶段。 σ 因子被释放后，可以与新的核心酶结合，参与下一轮的转录起始循环 (σ cycle)。

5. 转录延伸 (Elongation of Transcription)

转录延伸是 RNA 链合成阶段，由核心酶负责催化。

- **核心酶的作用 (Role of Core Enzyme):** 核心酶包含催化磷酸二酯键形成的活性位点（主要位于 β 亚基上），在沿着 DNA 模板移动的过程中，逐步添加核苷酸，使 RNA 链延长。

- **转录泡与 DNA 拓扑结构 (Transcription Bubble and DNA Topology):** RNA 聚合酶在延伸过程中维持一个短的 DNA 解链区域，即转录泡。随着聚合酶的移动，DNA 双链在其前方必须解开 (unwind)，在其后方必须重新螺旋化 (rewind)。这会在 DNA 模板前方引入正超螺旋 (positive supercoiling) 张力，在后方引入负超螺旋 (negative supercoiling) 张力。这些张力需要通过拓扑异构酶 (topoisomerases) 来解除 (relaxed)。关于聚合酶在双链 DNA 上移动的拓扑学机制，目前主要有两种假说：聚合酶围绕 DNA 双螺旋旋转；或聚合酶直线移动，**DNA 在前后方发生解旋和重旋，并由拓扑异构酶调节。**

6. 转录终止 (Termination of Transcription)

转录终止是转录过程的最后一个阶段，当 RNA 聚合酶到达基因末端的终止子 (terminator) 序列时，**RNA 聚合酶从 DNA 模板上脱落**，释放新合成的 RNA 分子。原核生物有两种主要的转录终止机制：

- **内在终止子 (Rho-independent terminator, Intrinsic terminator):** 这类终止子无需额外的蛋白因子辅助，自身结构即可导致转录终止。
 - **结构特点 (Structural Features):** 在 DNA 模板链上包含两个元件：一个**富含 G/C 碱基的回文序列** (inverted repeat)，转录后在 RNA 中形成茎环 (stem-loop) 二级结构；以及一段紧随其后的**T 碱基串** (string of T)。
 - **终止机制 (Termination Mechanism):** 当 RNA 聚合酶转录到回文序列时，形成的 RNA 茎环结构会导致聚合酶暂停 (pause)。紧随茎环的 U 碱基串与模板链的 A 碱基形成 rU-dA 碱基对，这些碱基对较弱且不稳定。**茎环结构与不稳定的 RNA-DNA 杂交体 (rU:dA pairs) 共同作用，削弱 RNA 聚合酶与模板 DNA 的结合**，最终导致 RNA 分子和聚合酶从 DNA 模板上解离，转录终止。

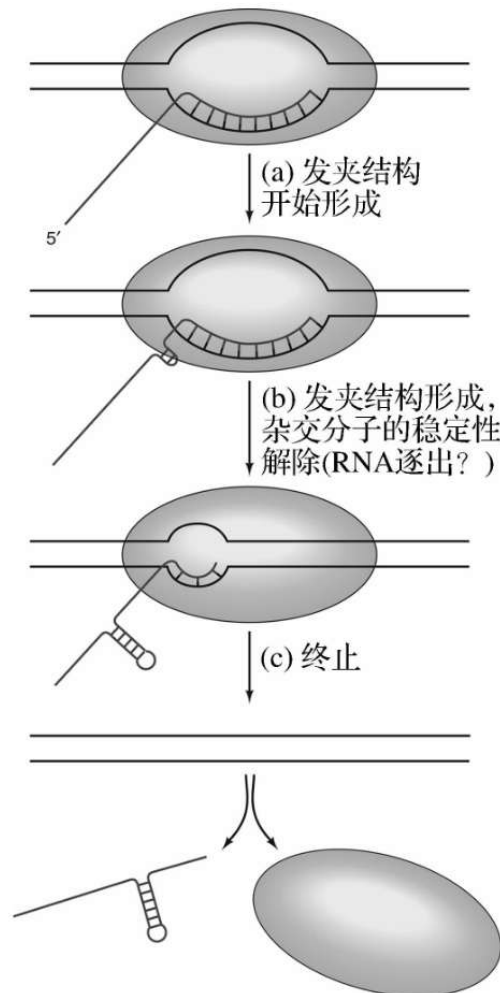


图 6.41 内源型终止子的终止模型。(a) RNA 聚合酶在连续排列的弱 rU-dA 碱基对处停顿，RNA 链在 rU-dA 碱基对上游开始形成发夹结构。(b) 发夹结构形成后，进一步降低了 RNA-DNA 杂交分子的稳定性。不稳定性表现为以下几种形式：形成的发夹结构使转录物退出 RNA 聚合酶，引发转录泡解体；或相反，形成的发夹结构引起转录泡解体，使 RNA 从杂交分子中释放出来。(c) RNA 产物与聚合酶完全从 DNA 模板上解离下来，转录终止。

- **ρ 因子依赖型终止子 (Rho-dependent terminator):** 这类终止子的转录终止需要 ρ 因子 (Rho factor) 的参与。ρ 因子是一个具有解螺旋酶 (helicase) 活性的蛋白质。
 - **结构特点 (Structural Features):** 这类终止子区域的 DNA 序列通常不含明显的富含 G/C 的回文序列 (或形成松散的 RNA 发夹结构) 和紧随其后的 T 碱基串。它们包含一个称为 **rho** 利用位点 (rho utilization site, rut

site) 的序列, ρ 因子可以结合到转录本的 rut 位点上。

- **终止机制 (Termination Mechanism):** ρ 因子结合到新合成的 RNA 链的 rut 位点上, 并沿着 RNA 链向 3'端移动, 追赶 RNA 聚合酶。当 RNA 聚合酶遇到一个暂停位点 (pause site) (有时是由于 RNA 二级结构引起) 而暂停时, ρ 因子赶上聚合酶。 ρ 因子的解螺旋酶活性解开 RNA-DNA 杂交体, 导致 RNA 链从模板上释放, 转录终止。 ρ 因子只影响链的延伸, 不影响起始, 并导致产生较短的转录本 (相对于在没有终止情况下一直转录)。

本章详细阐述了原核生物转录的分子机制, 理解这些过程对于后续学习真核生物转录以及基因表达调控至关重要。掌握 RNA 聚合酶的组成与功能、启动子和终止子的结构与类型、以及转录起始、延伸和终止的每个步骤, 是本章学习的重点。