

原核生物基因表达调控笔记

本笔记主要整理了原核生物基因表达调控的相关知识，重点介绍了操纵子 (Operon) 模型，特别是 Lac 操纵子 (Lac Operon) 和 Trp 操纵子 (Trp Operon)，以及核糖开关 (Riboswitches)。

第一部分：原核生物转录基础回顾

- **RNA 聚合酶结构 (RNA Polymerase Structure):**
 - 包含不同的亚基 (Subunit function: α , β' , β , σ)。
 - α 亚基的 C 末端结构域 (α CTD) 和 N 末端结构域 (α NTD)。
- **原核生物启动子 (Prokaryotic Promoter):**
 - -10 框与 RNA 聚合酶 σ 因子特定区域相互作用 (例如 2.4 区)。
 - α 亚基的 C 末端结构域 (α CTD) 能够识别和结合启动子的上游启动子 (UP) 元件。
- **转录起始 (Transcription Initiation):**
 - 启动子清除 (promoter clearance)。
- **转录延伸 (Transcription Elongation):**
 - 由核心酶 (core enzyme) 完成。
- **转录终止 (Transcription Termination):**
 - 内在终止子 (intrinsic terminator) 结构特点：一段反向重复序列紧接一串 U。

第二部分：操纵子 (Operon) - 原核生物基因表达的精细调控

- **定义 (Definition):** 操纵子是将功能相关的基因集中在一起，以便于协同调控的一个基因簇。这是一个连续的、协同控制的基因组。
- **结构 (Structure):** 不同的操纵子结构多样，也代表了不同的调控模式。

- **操纵子模型的重要性 (Significance of Operon Model):** 开辟了分子生物学研究的新天地，暗示了“三联体遗传密码”以外的“空间调控密码”的存在 - 基因表达调控，为分子生物学的发展奠定了基础。
- **基因表达控制的必要性 (Necessity of Gene Expression Control):**
 - *E. coli* 基因组包含 3000 多个基因。
 - 有些基因持续活跃 (active)，有些基因大部分时间关闭 (turned off)。
 - 基因表达是一个耗能过程 (expensive process)，因此控制基因表达对生命至关重要 (essential to life)。
- **原核生物基因表达特点 (Characteristics of Prokaryotic Gene Expression):**
 - 基因表达分两步：转录和翻译，其中转录是关键部分。
 - 原核生物中转录和翻译是偶联的，不能简单分开。
 - 原核生物的基因表达以操纵子形式呈现，即功能相似基因集中在一起受同一调控区调节。

第三部分：Lac 操纵子 (Lac Operon) - 分解代谢的调控

- **发现 (Discovery):** Lac 操纵子是第一个被发现的操纵子。
- **功能 (Function):** 包含 3 个基因，使细菌能够利用乳糖 (lactose)。
- **结构 (Structure):**
 - **调节基因 (Repressor gene):** lacI，编码阻遏物 (repressor)。在负调控中起关键作用。
 - **控制区 (Control region):**
 - 启动子 (Promoter)。
 - 操纵基因 (Operator)。
 - **结构基因 (Structure genes):**

- lacZ: 编码 β -半乳糖苷酶 (β -Galactosidase), 将乳糖分解为半乳糖 (galactose) 和葡萄糖 (glucose)。
- lacY: 编码半乳糖苷透性酶 (Permease), 负责将乳糖转运到细胞内。
- lacA: 编码半乳糖苷乙酰转移酶 (Transacetylase), 功能尚不明确。
- **乳糖的代谢 (Lactose Metabolism):** 乳糖是二糖, 需要分解成半乳糖和葡萄糖才能被细菌利用。
- **多顺反子 mRNA (Polycistronic mRNA):** 所有 3 个基因一起转录产生一个 mRNA 分子, 即多顺反子 mRNA, 它从一个单一启动子起始。每个顺反子 (cistron) 或基因都有自己的核糖体结合位点 (ribosome binding site), 可以被独立的核糖体翻译。
- **Lac 操纵子的调控 (Control of Lac Operon):** Lac 操纵子受到两种类型的严格调控。
 - **负调控 (Negative Control):** 像汽车的刹车, 操纵基因是“刹车”, Lac 阻遏物是踩刹车的“脚”。
 - **无乳糖时 (No lactose):** 阻遏物四聚体 (tetramer) 结合到操纵基因上, 阻止 RNA 聚合酶结合到启动子并转录操纵子, 操纵子处于关闭或阻遏状态 (off or repressed)。
 - **诱导物 (Inducer):**
 - 阻遏物是一种变构蛋白 (allosteric protein)。诱导物结合到阻遏物上, 改变其构象 (conformation), 使其有利于从操纵基因上释放。
 - 实际诱导物是**异乳糖 (allolactose)**, 由 β -半乳糖苷酶代谢乳糖产生。

- **悖论 (Paradox):** 在转录开始前如何产生异乳糖？实际上，阻遏并非完全严格 (somewhat leaky), **Lac 操纵子产物总是存在低水平的基础表达 (low basal level)**, 产生少量 β -半乳糖苷酶, **将乳糖转化为异乳糖作为诱导物**。
- **IPTG (Isopropyl-b-D-Thiogalactoside):** 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷, 是 Lac 操纵子的人工合成诱导物, 能与阻遏物结合。
- **有乳糖时 (+lactose):** 诱导物 (异乳糖) 结合阻遏物, 使其变构并从操纵基因解离, 操纵子处于开启或**去阻遏**状态 (on or derepressed)。
- **阻遏物-操纵基因互作 (Repressor-Operator Interactions):**
 - 涉及蛋白质-DNA 相互作用 (Protein-DNA interaction)。
 - 研究方法: 滤膜结合实验 (Filter Binding Assay)、凝胶阻滞实验 (Gel Shift Assay / Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)、DNase 足迹实验 (DNase Footprinting)。这些方法都可以用于研究 DNA 和蛋白质的相互作用。
- **阻遏机制 (Mechanism of Repression):**
 - 在体内, 在非高浓度下, **聚合酶和阻遏物存在竞争**。
 - 聚合酶-启动子复合物与游离聚合酶和启动子处于动态平衡 (equilibrium)。
 - 阻遏物结合到紧邻启动子的操纵基因上, 阻止聚合酶重新结合。
 - Lac 操纵子共有三个操纵基因 (three operators): 一个主要的 (**O1**) 紧邻启动子, 两个辅助的 (auxiliary), 一个在上游 (**O3**), 一个在下游 (**O2**)。

- 三个操纵基因都对于最佳阻遏是必需的 (required for optimum repression)。主要的操纵基因 (O1) 只能产生适度的阻遏 (modest amount of repression)。阻遏物二聚体 (dimers) 分别结合在两个操纵基因上。
- **正调控 (Positive Control):** 像汽车的油门踏板，添加激活因子 (activator) 以刺激 Lac 操纵子的转录。
 - **代谢物阻遏 (Catabolite Repression):**
 - 当葡萄糖 (glucose) 存在时，*E. coli* 细胞通常使 Lac 操纵子保持相对非激活状态。这是因为葡萄糖代谢的分解产物 (breakdown product) 对其他能源的使用进行控制，优先选择葡萄糖代谢。
 - **二次生长曲线 (Diauxic growth curve):** 显示细菌在有葡萄糖和乳糖时，首先利用葡萄糖，葡萄糖耗尽后有一段停滞期 (lag)，然后才开始利用乳糖，表现出两次生长。
 - **环腺苷酸 (cyclic-AMP, cAMP):** 是理想的正向控制分子，感知葡萄糖的缺乏，并激活 Lac 操纵子。
 - 高浓度葡萄糖分解产物抑制**腺苷酸环化酶** (Adenylate Cyclase) 的活性，**降低 cAMP** 产量；反之，低浓度分解产物导致 cAMP 浓度升高。
 - **代谢物激活蛋白 (Catabolite activator protein, CAP) / cAMP 受体蛋白 (cAMP receptor protein, CRP):** Lac 操纵子的正调控因子是 cAMP 与 CAP 组成的二元复合物。

- **CAP-cAMP 复合物对 Lac 操纵子的激活 (Stimulation of lac Operon by CAP-cAMP complex):** cAMP + CAP 的功能类似于油门功能。β-半乳糖苷酶的活性可以指示 Lac 操纵子的激活程度。
- **CAP+cAMP 的作用机制 (The Mechanism of CAP+cAMP action):**
 - CAP-cAMP 复合物结合在激活因子结合位点 (activator-binding site), 位于 Lac 启动子上游。
 - 这种结合帮助 RNA 聚合酶形成开放启动子复合物 (open promoter complex)。
 - 转录起始过程: 形成关闭启动子复合物 (closed promoter complex) -> 形成开放启动子复合物 -> 掺入前几个核苷酸 -> 启动子清除 (promoter clearance)。
 - **利福平抗性 (Rifampicin resistance):** 在 RNA 合成开始前, RNA 聚合酶对利福平不具有抗性。一旦 RNA 合成开始, RNA 聚合酶获得利福平抗性。只有开放启动子复合物才能启动 RNA 合成。因此, CAP-cAMP 促进开放启动子复合物的形成。
 - **招募作用 (Recruitment):** CAP-cAMP 通过招募作用将聚合酶招募到启动子, 分两步: 形成关闭启动子复合物; 将关闭启动子复合物转变为开放启动子复合物。
 - CAP 和 RNA 聚合酶在结合到各自的 DNA 靶位点时实际接触 (touch), 因此它们协同结合 (cooperatively bind)。CAP-cAMP 二聚体结合到 DNA 上的靶位点, 聚合酶的 αCTD 与 CAP 上的特定位点相互作用, 增强启动子和聚合酶之间的结合。

• **Lac 操纵子调控总结 (Summary of the control of lac Operon):**

- **有葡萄糖时 (When glucose is present):**

- 正调控关闭 (Positive control off): 葡萄糖分解代谢物 -> 抑制腺苷酸环化酶活性 -> cAMP 水平降低 -> 无 cAMP+CAP 复合物。
 - 无乳糖时 (No lactose): 负调控开启 (Negative control on)。Lac 操纵子同时受到负调控和正调控的阻遏 (negatively and positively repressed)。
 - 有乳糖时 (+Lactose): 负调控关闭 (Negative control off)。Lac 操纵子负调控去阻遏，但正调控未激活 (negatively derepressed but positively not activated)。启动子较弱 (Lac Promoter is weak!)。就像刹车松开了，但油门没踩。
- 无葡萄糖时 (When glucose is not present):
- 正调控开启 (Positive control on): -葡萄糖 -> -分解代谢物 -> +腺苷酸环化酶活性 -> +cAMP 水平 -> +cAMP+CAP 复合物。
 - 无乳糖时 (No lactose): 负调控开启 (Negative control on)。Lac 操纵子仍被阻遏。此时，如果其他糖源 (gal, ara) 可用，相关的操纵子会开启。
 - 有乳糖时 (+Lactose): 负调控关闭 (Negative control off)。Lac 操纵子负调控去阻遏且正调控激活 (negatively derepressed and positively activated)。形成开放启动子复合物，进行转录。就像刹车松开，油门踩下。

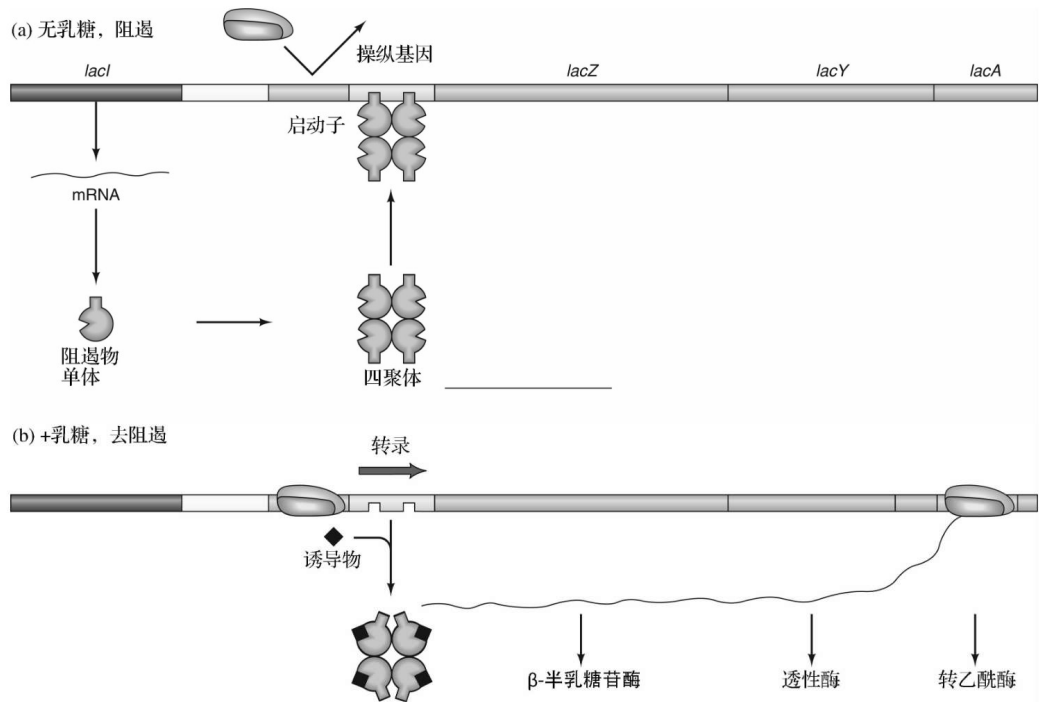
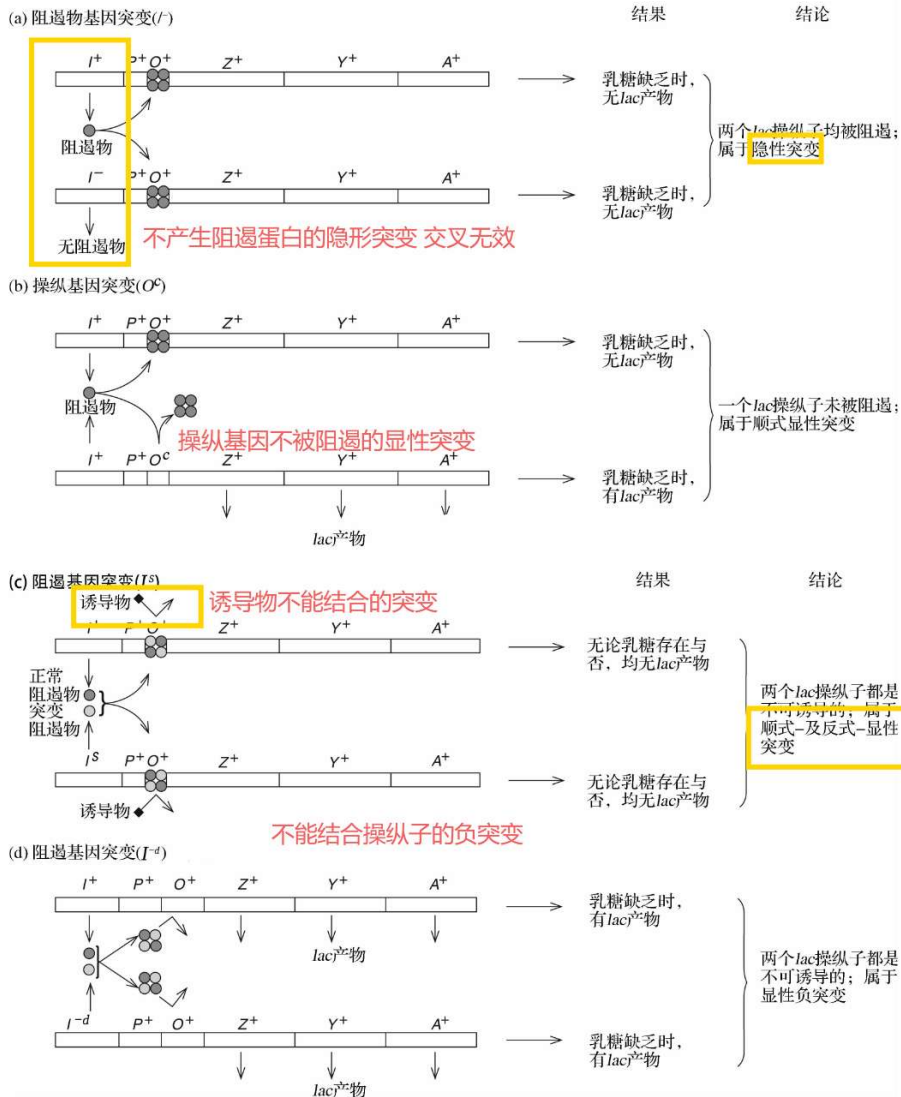


图 7.3 *lac* 操纵子负调控。(a) 无乳糖时，操纵子被阻遏。*lac I* 基因表达产生阻遏物（绿色），阻遏物结合操纵基因，阻止 RNA 聚合酶转录 *lac* 基因。(b) 有乳糖时，操纵子去阻遏。诱导物（黑色）与阻遏物结合，改变了阻遏物的构象（图下方），使其不再与操纵基因结合。阻遏物脱离操纵基因，RNA 聚合酶起始结构基因的转录，产生多顺反子 mRNA，进而翻译产生 β -半乳糖苷酶、透性酶和转乙酰酶。

含有一个野生型基因和一个突变基因的部分二倍体：



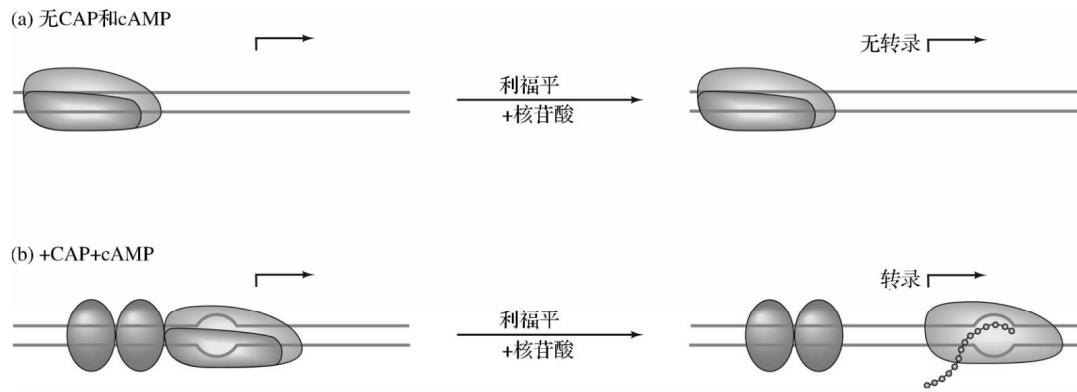


图 7.15 CAP 与 cAMP 协同促进开放启动子复合体的形成。(a) 无 CAP 时，RNA 聚合酶与含 *lac* 启动子的 DNA 片段随机松散地结合，在同时加入利福平及核苷酸后，这种结合受到利福平抑制，因此无转录发生。(b) 有 CAP 和 cAMP（紫色）存在时，RNA 聚合酶与 *lac* 启动子结合形成开放启动子复合体，在同时加入利福平及核苷酸后，这种结合不受利福平抑制，因为核苷酸先于利福平与聚合酶结合，使开放启动子复合体能启动核苷酸聚合。一旦第一个磷酸二酯键形成，RNA 聚合酶在重新起始转录前一直具有利福平抗性。在这些条件下能转录，表明 CAP 和 cAMP 促进了开放启动子复合体的形成。绿色链条代表 RNA 分子。

第四部分：Trp 操纵子 (Trp Operon) - 合成代谢的调控

- **定义 (Definition):** 将功能相关的基因集中在一起，用于色氨酸 (tryptophan) 合成代谢 (anabolism)。Trp 操纵子包含 5 个功能基因。
- **与 Lac 操纵子的区别 (Differences between lac Operon and trp Operon):**
 - Lac 操纵子涉及糖 (lactose)，Trp 操纵子涉及氨基酸 (tryptophan)。
 - Lac 操纵子是分解代谢 (catabolism)，Trp 操纵子是合成代谢 (anabolism)。
 - 无乳糖时，Lac 操纵子关闭 (off)；而低 Trp 时，Trp 操纵子开启 (on)。
- **Trp 操纵子结构 (Trp Operon structure):** 包含调节基因 *trpR*，启动子，操纵基因 *trpO*，前导序列 (leading seq, LS)，衰减子 (Attenuator)，以及 5 个结构基因 *trpEDCBA*。
- **相关定义 (Some definitions in trp operon):**
 - Aporepressor: 脱辅基阻遏物蛋白。
 - Corepressor: 辅阻遏物 (即色氨酸)。
 - Leader sequence: 前导序列。
 - Attenuation: 衰减作用。
 - Attenuator: 衰减子。

- 负调控 (Negative control of the *trp* operon):

- 低色氨酸时 (Low tryptophan): 脱辅基阻遏物单体 (monomer) 无法有效结合操纵基因, 无阻遏, 进行转录。
- 高色氨酸时 (High tryptophan): 色氨酸作为辅阻遏物结合脱辅基阻遏物单体形成阻遏物二聚体 (dimer), 阻遏物二聚体结合到操纵基因上, 阻遏 Trp 操纵子转录。然而, 这种阻遏作用较弱 (weak), 比 Lac 操纵子弱得多。

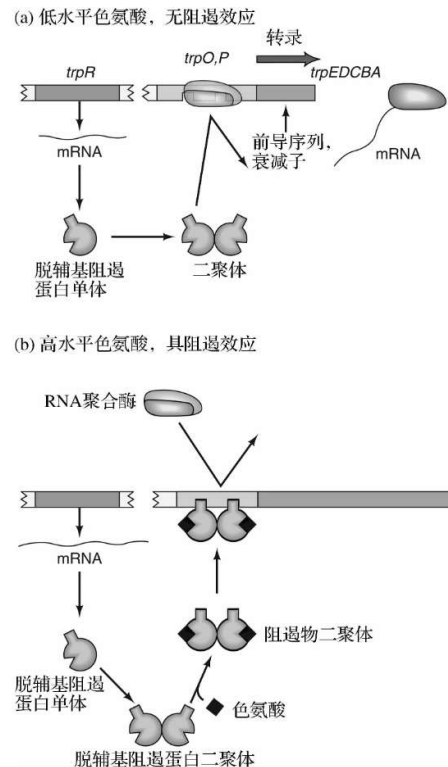


图 7.25 *trp* 操纵子的负调控。(a) 去阻遏。RNA 聚合酶 (红色和蓝色) 与 *trp* 启动子结合, 起始 *trp* 基因 (*trpE*、*D*、*C*、*B*、*A*) 的转录。无色氨酸时, 脱辅基阻遏蛋白 (绿色) 不能与操纵基因结合。(b) 阻遏。色氨酸作为辅阻遏物 (黑色) 与无活性的脱辅基阻遏蛋白结合, 使之成为有活性的阻遏物, 具有与 *trp* 操纵基因结合的构型, 从而阻止 RNA 聚合酶与启动子结合, 因此无转录发生。

- 另一种调控机制: 衰减作用 (Attenuation):

- 衰减子控制 (Attenuator control)。
- 衰减作用 (Attenuation) 在 Trp 操纵子中发生。
- 阻遏作用较弱时, 衰减作用存在, 可将表达水平再降低 70 倍。如果结合阻遏和衰减, 可控制操纵子表达范围超过 700 倍。

- **低色氨酸时 (Low tryptophan):** 转录 Trp 结构基因。无阻遏，无衰减。核糖体在前导肽序列的 Trp 密码子处停滞 (stalls)。mRNA 链形成非终止子结构，聚合酶继续转录 (continues)，衰减作用被解除 (defeated)。
- **高色氨酸时 (High tryptophan):** 发生阻遏和衰减，转录提前终止 (premature termination)。核糖体顺利翻译前导肽，遇到终止密码子脱落。mRNA 链形成终止子发夹结构 (terminator hairpin)，聚合酶停止 (stops)，转录终止 (Terminated)。
- **前导序列和衰减子结构 (The primary structure of leader sequence and attenuator):** 前导序列包含一个开放阅读框 (ORF) 编码一个 14 个氨基酸的前导肽，其中富含 Trp 密码子。衰减子包含几个富含 GC 的区域，可形成发夹结构，紧接一串 U，形成 ρ 非依赖性终止子结构。
- **衰减作用的控制 (Control of the attenuation):** 在 *E. coli* 中，转录和翻译是偶联的，后者影响前者。前导肽序列中的 Trp 密码子频率较高。
- **衰减机制的普遍性 (Universality of Attenuation Mechanism):** 原核生物中衰减机制普遍存在。许多负责氨基酸合成的 Operon 都受衰减子控制，尤其是 His operon 中，衰减子是唯一的调控机制。

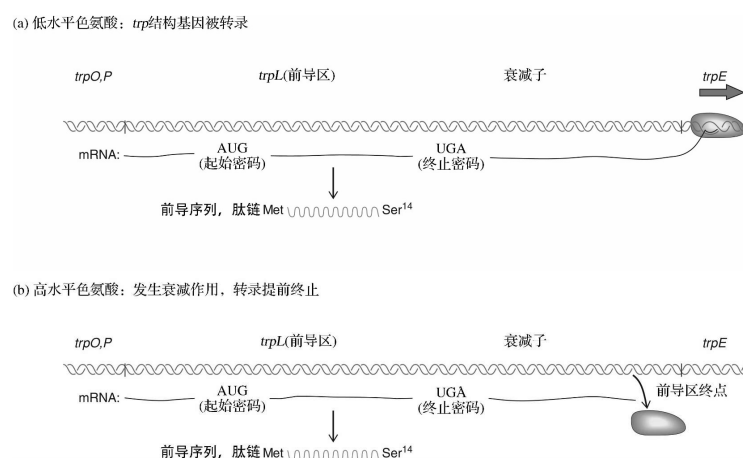


图 7.26 *trp* 操纵子的衰减作用。(a) 色氨酸低浓度时, RNA 聚合酶 (红色) 通读衰减子, 结构基因被转录。(b) 色氨酸高浓度时, 衰减子引起转录的提前终止, 结构基因不能转录。

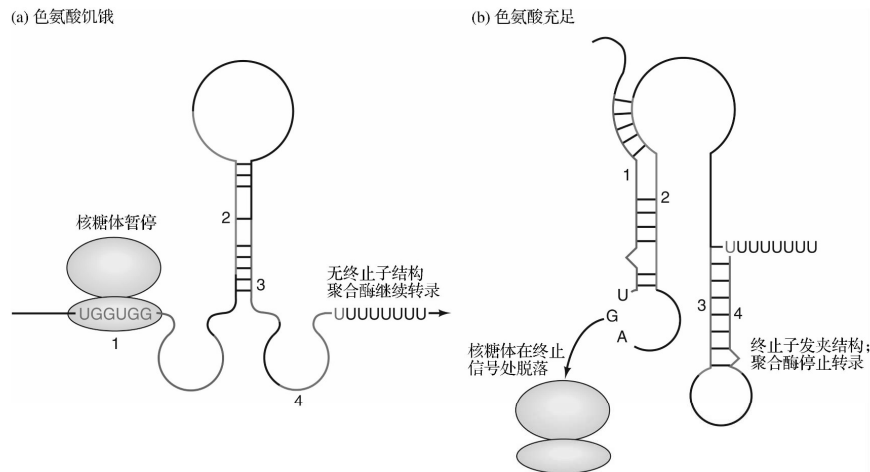


图 7.29 衰减作用的克服。(a) 色氨酸饥饿时，核糖体（黄色）停顿在色氨酸密码子处，阻止元件 1（红色）和 2（蓝色）间的碱基配对，只形成一个无终止子的单发夹结构，因此不会发生衰减作用。(b) 色氨酸充足时，核糖体通读两个色氨酸密码子，翻译形成前导肽，并在翻译终止信号（UGA）处脱离 mRNA。因此，核糖体不干扰前导区转录物分子内的碱基配对，形成更为稳定的双发夹结构，其中包括终止子，所以能够发生衰减作用。

第五部分：核糖开关 (Riboswitches)

- **定义 (Definition):** 位于 mRNA 5'-非翻译区 (UTR) 的区域，能够通过改变其结构来响应配体 (ligand, 小分子) 结合，从而控制基因表达。
- **关于核糖开关 (About Riboswitch):**
 - 不是核糖体开关 (Not ribosome switch)。
 - 由核糖核苷酸 (Ribonucleotide) 和调控元件组成。
 - 转录后调控 (Posttranscriptional regulation)，基于 mRNA 单链内部二级结构。
- **核糖开关作用 (Riboswitch Action):**
 - 结构包含两部分：适配体 (Aptamer) + 表达平台 (expression platform)。
 - 与配体结合的区域是适配体。
 - 表达平台是核糖开关中的另一个模块 (module)，可以是终止子 (Terminator)、核糖体结合位点 (ribosome-binding site) 或其他影响基因表达的 RNA 元件。
 - 作用是抑制基因表达 (depressing gene expression)。有些在转录水平发挥作用，有些在翻译水平发挥作用。
- **核糖开关作用的一般模型 (General Model of Riboswitch Action):**

- 。 **开启状态 (On):** 无配体结合，适配体和表达平台形成特定结构，允许转录或翻译进行。
- 。 **关闭状态 (Off):** 配体结合到适配体，导致核糖开关构象改变，表达平台形成另一种结构 (例如终止子)，抑制转录或翻译。

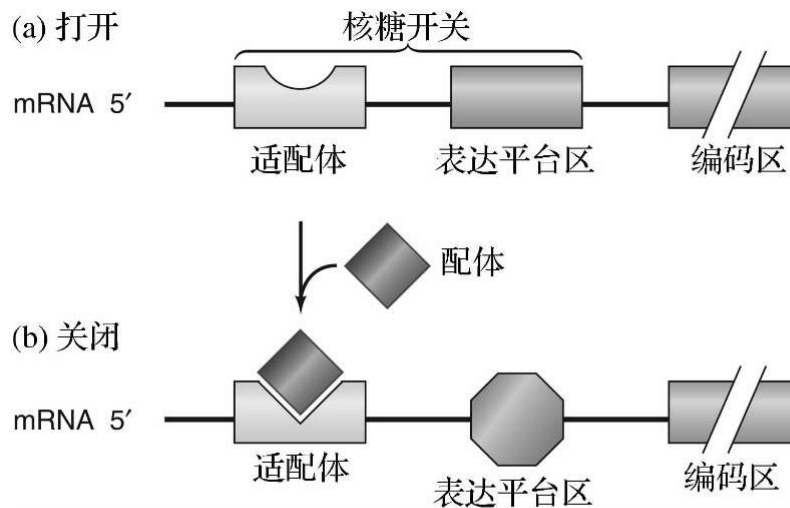


图 7.31 核糖开关作用模型。 (a) 无配体时，基因处于表达状态。(b) 有配体时，配体与核糖开关上的适配体结合，引起核糖开关、表达平台区构象的改变，从而关闭基因的表达。

- **示例 (Example):** 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中 *ribD* 操纵子的 mRNA 5'-UTR 核糖开关。控制核黄素 (Riboflavin) 的合成和转运。配体是黄素单核苷酸 (Flavin mononucleotide, FMN)。
- 。 FMN 结合到适配体后，核糖开关中的碱基配对发生改变，形成一个终止子。转录被衰减 (attenuated)。