

全国高等院校教材

供基础医学、临床医学、检验医学、生物化学与分子生物学等专业使用

医学分子生物学

Medical Molecular Biology

主 编 魏晓东

副主编 张鹏霞



北京大学医学出版社

全国高等院校教材

供基础医学、临床医学、检验医学、生物化学与分子生物学等专业使用

医学分子生物学

主 编 魏晓东

副主编 张鹏霞 张 涛

编 者 (以姓氏笔画排序)

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学分子生物学/魏晓东主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2010. 7

ISBN 978-7-81116-936-2

I. ①医… II. ①魏… III. ①医药学: 分子生物学
IV. ①Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 079045 号

医学分子生物学

主 编: 魏晓东

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 韩忠刚 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 850mm×1168mm 1/16 印张: 17.25 字数: 512 千字

版 次: 2010 年 7 月第 1 版 2010 年 7 月第 1 次印刷 印数: 1 - 2000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-936-2

定 价: 45.00 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

医学分子生物学是一门从分子水平研究生命现象、生命本质、生命活动及其规律的科学。它是医学各专业学生的必修课程之一，并带动了各基础科学的全面发展，已经成为生命科学领域的带头学科。医学分子生物学的发展对生命科学乃至整个社会的发展都具有重大的意义，特别是酶工程、基因工程、细胞工程以及转基因、基因治疗等一大批新兴分支学科与技术的相继出现，为临床医学诊断和危害人类健康疾病的防治，开辟了广阔的应用前景。

正是由于分子生物学技术具有如此诱人的前景，我们组织了多年来从事生物化学、分子生物学、基因工程学科研和教学工作的专家、教授编写本教材，各位编者在所撰写的章节中尽可能融会个人的科研成果和教学经验，以使读者对相关理论有更为深刻的理解。全书共十章理论和四个实验内容，力求反映现代医学分子生物学研究的基础理论与实验技术的新进展。本书不仅可作为高等医药院校研究生教材，亦可供七年制学生及普通高等院校基础医学、生物化学与分子生物学、临床医学、检验医学、口腔医学等相关专业的本科生、青年教师、临床医师、科研人员自学参考。

由于编写时间仓促，编者水平有限，加之分子生物学发展迅速，本书难免存在不妥之处，期盼同行专家、使用本教材的师生和其他读者批评指正。

魏晓东 张鹏霞
2010年1月

目 录

第一章 基因表达调控..... 1	三、原核表达载体 66
第一节 概述..... 1	四、真核表达载体 68
第二节 原核生物基因表达调控..... 1	第四节 目的基因的获取 69
一、转录起始调控..... 2	一、从基因文库中筛选 69
二、原核生物的转录后调控..... 9	二、cDNA的合成和克隆 70
三、DNA重排对基因表达的调控..... 13	三、化学法合成目的基因 70
第三节 真核生物基因表达调控 13	第五节 重组体的构建、导入与筛选 71
一、真核生物基因表达调控的特点 13	一、DNA的连接..... 71
二、染色质结构与基因表达 14	二、重组体的导入 75
三、DNA甲基化与基因活性的调控 16	三、重组体克隆的筛选与鉴定 76
四、转录水平的调控 18	第六节 克隆基因的表达 78
五、翻译水平的调控 23	一、外源基因在大肠埃希菌体系中的表达 78
参考文献 26	二、外源基因在真核细胞中的表达 81
第二章 细胞增殖、分化与细胞凋亡的分子 机制 28	参考文献 82
第一节 细胞增殖 28	第四章 细胞信号转导与分子机制 83
一、细胞周期 28	第一节 细胞通讯 83
二、细胞周期的调控 33	一、细胞间隙连接 83
第二节 细胞分化 34	二、膜表面分子的直接通讯 84
一、细胞分化 35	三、化学通讯 85
二、细胞分化的基因调控机制 37	第二节 细胞信号转导的分子基础 85
三、干细胞分化 39	一、细胞间的信号转导分子 85
第三节 细胞凋亡 43	二、细胞膜的信号转导分子 86
一、细胞凋亡 45	三、细胞内重要的信号转导分子 91
二、细胞凋亡的信号转导途径 46	四、信号转导分子的作用机制..... 101
参考文献 52	五、信号转导分子的作用特点..... 102
第三章 基因工程 53	第三节 受体介导的信号转导途径..... 105
第一节 概述 53	一、细胞内受体介导的信号转导途径 105
一、基因工程的基本概念 53	二、细胞膜受体介导的信号转导途径 106
二、基因工程的发展历史 54	第四节 细胞信号转导的相互联系..... 113
三、基因工程的应用 55	一、细胞信号转导途径之间的联系..... 113
第二节 基因工程中常用的工具酶 56	二、影响细胞信号转导的因素..... 114
一、限制性核酸内切酶 56	第五节 细胞代谢异常影响信号转导的基本 机制..... 114
二、DNA连接酶..... 59	一、信号转导异常的概念..... 114
三、其他用于DNA重组的工具酶 59	二、引起细胞信号转导异常的因素..... 114
第三节 基因工程中的载体 60	
一、质粒载体 60	
二、噬菌体载体 63	

三、信号转导异常发生的机制·····	115	二、基因治疗的策略·····	151
四、信号转导异常的后果·····	115	三、基因治疗的基本程序·····	153
五、信息转导异常疾病发生的种类·····	115	四、基因治疗中的病毒载体·····	155
参考文献·····	116	五、基因治疗的靶向·····	157
第五章 分子杂交 ·····	117	六、基因治疗的现状与展望·····	158
第一节 分子杂交概论 ·····	117	参考文献·····	158
一、分子杂交技术的发展简史及展望	117	第七章 生物酶工程 ·····	160
·····	117	第一节 克隆酶 ·····	160
二、分子杂交的基本原理·····	118	一、酶基因的克隆·····	160
三、分子杂交的基本方法·····	123	二、酶的异源表达·····	164
四、分子杂交的基本类型·····	130	第二节 突变酶 ·····	168
第二节 Southern 印迹杂交 ·····	133	一、酶的定点突变·····	168
一、实验原理·····	133	二、酶分子定向进化·····	169
二、实验方法·····	133	第三节 杂合酶 ·····	175
三、实验结果·····	137	一、杂合酶的构建策略·····	175
四、注意事项·····	137	二、杂合酶的制备方法·····	180
第三节 Northern 印迹杂交 ·····	137	三、杂合酶的应用·····	180
一、实验原理·····	137	参考文献·····	181
二、实验方法·····	137	第八章 转基因动物 ·····	183
第四节 Western 印迹杂交 ·····	139	第一节 转基因动物研究简史及其技术	
一、蛋白质样品的制备·····	139	原理·····	183
二、蛋白质样品的定量·····	140	一、转基因动物研究简史·····	183
三、蛋白质样品的分离·····	140	二、转基因动物技术原理·····	184
四、蛋白质样品的转移·····	141	第二节 转基因动物表达载体的设计 ·····	185
五、蛋白质样品的检测·····	142	第三节 转基因动物制作的方法 ·····	186
六、注意事项·····	143	一、DNA 显微注射法·····	187
第五节 几种常用的分子杂交新技术 ·····	143	二、逆转录病毒载体法和慢病毒载体法	189
一、地高辛原位杂交技术·····	143	·····	189
二、荧光原位杂交技术·····	144	三、胚胎干细胞法·····	194
三、抑制消减杂交技术·····	144	四、体细胞核移植法·····	196
四、辐射性杂交技术·····	144	五、精子载体法·····	197
五、反义核酸分子杂交技术·····	145	六、YAC 和 BAC 介导的基因转移·····	199
六、基因芯片固相分子杂交技术·····	145	第四节 转入基因的整合、表达及转基因	
参考文献·····	146	动物的鉴定·····	200
第六章 基因诊断与基因治疗 ·····	147	一、外源基因导入后的存在方式·····	200
第一节 基因诊断 ·····	147	二、外源基因导入后的表达·····	200
一、基因诊断的概念·····	147	三、转基因动物的鉴定·····	200
二、基因诊断的特点·····	147	第五节 转基因动物在医学上的应用 ·····	201
三、基因诊断的对象·····	147	一、人类疾病及遗传病的转基因动物	
四、基因诊断的方法·····	147	模型研究·····	201
五、基因诊断的应用·····	150	二、利用转基因动物作为生物反应器	
第二节 基因治疗 ·····	151	生产药用蛋白·····	205
一、基因治疗的概念·····	151	三、利用转基因动物生产可供人体移植	

用的器官·····	206	二、衰老与细胞凋亡·····	241
第六节 转基因动物研究存在的问题·····	207	三、DNA 与衰老·····	245
一、技术方面的问题·····	207	四、线粒体 DNA 与衰老·····	248
二、伦理学方面的问题·····	208	参考文献·····	250
参考文献·····	208	实验一 RT-PCR 方法检测 HL-60 细胞中	
第九章 蛋白质组学 ·····	209	bax mRNA 表达 ·····	251
第一节 概述·····	209	一、总 RNA 提取及其定量·····	251
一、蛋白质组学研究的背景与历史·····	209	二、逆转录合成 cDNA 第一链·····	252
二、蛋白质组学的研究内容·····	210	三、PCR 反应·····	253
三、蛋白质组学研究面临的挑战·····	211	四、电泳·····	254
第二节 蛋白质组学研究的工具·····	212	五、注意事项·····	254
一、蛋白质的分离技术·····	213	六、实验准备·····	254
二、蛋白质鉴定策略·····	216	七、需购置的 RT-PCR 材料·····	255
三、蛋白质组学与生物信息学·····	219	实验二 GAPDH 基因的获得、连接到 T 载	
四、蛋白质组学中的定量方法·····	220	体形成重组质粒 ·····	256
五、蛋白质相互作用研究技术·····	222	一、GAPDH 基因的获得·····	256
第三节 蛋白质组学在医药学领域中的		二、目的基因连接到 pGM-T 载体·····	256
应用·····	226	实验三 大肠埃希菌 DH_{5α} 感受态细胞的制备	
参考文献·····	227	及转化、筛选 ·····	258
第十章 衰老的分子机制 ·····	229	一、大肠埃希菌感受态细胞的制备·····	258
第一节 衰老的机制与特征·····	229	二、重组 DNA 的转化及蓝白斑筛选	
一、衰老的概念·····	229	·····	258
二、衰老的机制·····	229	三、重组质粒的质粒鉴定·····	258
三、衰老的特征·····	237	实验四 Western blot 检测蛋白表达 ·····	260
第二节 衰老的分子机制·····	239	一、操作步骤·····	260
一、衰老与基因·····	239	二、试剂配制·····	262

第一章 基因表达调控

第一节 概述

基因表达 (gene expression) 就是指在一定调节因素的作用下, DNA 分子上特定的基因被激活并转录生成特定的 RNA, 或进一步翻译成特定蛋白质的过程。基因表达具有: ①时间特异性: 基因表达的时间特异性 (temporal specificity) 是指特定基因的表达严格按照特定的时间顺序发生, 以适应细胞或个体特定分化、发育阶段的需要。故又称为阶段特异性。②空间特异性: 基因表达的空间特异性 (spatial specificity) 是指多细胞生物个体在某一特定生长发育阶段, 同一基因的表达在不同的细胞或组织器官不同, 从而导致特异性的蛋白质分布于不同的细胞或组织器官。故又称为细胞特异性或组织特异性。基因表达的方式分为: ①组成性基因表达 (constitutive gene expression): 是指在个体发育的任一阶段都能在大多数细胞中持续进行的基因表达。其基因表达产物通常是对生命过程必需的或必不可少的, 且较少受环境因素的影响。这类基因通常被称为管家基因 (housekeeping gene)。②诱导和阻遏表达: 诱导表达 (induction) 是指在特定环境因素刺激下, 基因被激活, 从而使基因的表达产物增加。这类基因称为可诱导基因。阻遏表达 (repression) 是指在特定环境因素刺激下, 基因被抑制, 从而使基因的表达产物减少。这类基因称为可阻遏基因。

基因表达调控可见于从基因激活到蛋白质生物合成的各个阶段, 因此基因表达的调控可发生在转录水平 (基因激活及转录起始), 转录后水平 (加工及转运), 翻译水平及翻译后水平, 但以转录水平的基因表达调控最重要。转录的调控主要发生在起始阶段, 这样可避免浪费能量合成不必要的转录产物。通常不在转录延伸阶段进行调控, 但可在终止阶段进行调控, 这样可以防止 RNA 聚合酶越过终止子而进行下一个基因的转录。RNA 的初级转录产物本身是一个受调控的靶分子, 转录物作为一个整体, 其有效性可以受到调控, 例如, 它的稳定性可以决定它是否保存下来用于翻译。此外, 初级转录产物转变为成熟分子的加工能力可决定最后 mRNA 分子的组成和功能。在真核细胞中, 还可对 RNA 从核到胞质中的转运进行调控。但是在细菌中, mRNA 只要一合成, 就可用于翻译。翻译也像转录一样, 在起始阶段和终止阶段进行调控。DNA 转录的起始和 RNA 翻译的起始路线也很相似。

基因组是指含有一个生物体生存、发育、活动和繁殖所需要的全部遗传信息的整套核酸。但生物基因组的遗传信息并不是同时全部都表达出来的, 即使极简单的生物 (如最简单的病毒), 其基因组所含的全部基因也不是以同样的强度同时表达的。大肠杆菌 (大肠埃希菌) 基因组含有约 4000 个基因, 一般情况下只有 5%~10% 在高水平转录状态, 其他基因有的处于较低水平的表达, 有的就暂时不表达。哺乳类基因组更复杂, 人的基因组约含有 3 万~4 万个基因, 但在一个组织细胞中通常只有一部分基因表达, 多数基因处在沉静状态, 典型的哺乳类细胞中开放转录的基因约在 1 万个上下, 即使蛋白质合成量比较多, 基因开放比例较高的肝细胞, 一般也只有不超过 20% 的基因处于表达状态。

第二节 原核生物基因表达调控

原核生物在发育过程中表现出对环境条件的高度适应性, 可根据环境条件的变化, 迅速调节各种不同基因的表达水平。这说明, 原核生物具有严格的基因表达调控机制。原核生物基因表达的调控可以在 DNA、转录和翻译三个不同层次进行, 但转录水平的调控是最主要的方式, 也是最经济, 最有效的方式。当需要某一特定基因产物时, 合成这种 mRNA。当不需要这种产物时, mRNA 转录受到

抑制。但要说明一点,即使是基因不表达,通常也是指该基因的表达水平很低,但仍维持在一个基本水平,每个细胞也有一至几个 mRNA 分子。

一、转录起始调控

(一) 操纵子

1. 乳糖操纵子 1961年法国科学家 Jacob 和 Monod 提出了一个控制细胞基因表达的模型并称为操纵子,此模型的提出使基因概念又向前迈出了一大步。表明人们已认识到基因的功能并不是固定不变的,而是可以根据环境的变化进行调节。随之人们发现无论是真核还是原核生物转录调节都是涉及编码蛋白的基因和 DNA 上的元件。这一发现获得了 1965 年诺贝尔奖。Jacob 和 Monod 最初发现的是大肠埃希菌的乳糖操纵子。这是一个十分巧妙的自动控制系统,这个自动控制系统负责调控大肠埃希菌的乳糖代谢。

乳糖可作为培养大肠埃希菌的能源。大肠埃希菌能产生半乳糖苷酶。该酶能够催化乳糖分解为半乳糖和葡萄糖,以便作进一步的代谢利用。编码半乳糖苷酶的基因是一个结构基因 (structural gene)。这个结构基因与操纵序列等共同组成操纵子。操纵序列受一种叫作阻遏蛋白的蛋白质的调控。当阻遏蛋白结合到操纵序列之上时,乳糖会起诱导作用,它与阻遏蛋白结合,使之从操纵序列上脱落下来。这时,操纵序列开启,相邻的结构基因也表现活性,细菌就能分解并利用乳糖了,这样,乳糖便成了诱导半乳糖苷酶产生的诱导物。上述内容表明,大肠埃希菌的乳糖操纵子是一个十分巧妙的自动控制系统:当培养基中含有充分的乳糖,同时不含葡萄糖时,细菌便会自动产生半乳糖苷酶来分解乳糖,以资利用;当培养基中不含乳糖时,细菌便自动关闭乳糖操纵子,以免浪费物质和能量。

操纵子是原核生物基因表达和调控的单元。典型的操纵子包括一组结构基因和调节结构基因转录所需的顺式作用元件,这些序列包括启动子 (promoter)、操纵序列 (operator) 以及其他与转录调控有关的序列。一个操纵子的所有结构基因均由同一启动子起始转录并受到相同调控元件的调节,所以从结构上可以把它们看作一个整体。操纵子的结构基因编码在某一特定代谢途径中起作用的酶,它们被转录成一条多顺反子 mRNA,这是原核生物的典型特征。

(1) 乳糖操纵子的结构:乳糖操纵子具有三个结构基因:*lacZ* 编码 β -半乳糖苷酶,它可将乳糖水解为半乳糖和葡萄糖;*lacY* 编码乳糖转移酶,该蛋白插入细胞膜中,将乳糖转运到细胞内;*lacA* 编码硫代半乳糖苷乙酰转移酶,该酶的作用是消除同时被乳糖转移酶转运到细胞内的硫代半乳糖苷对细胞造成的毒性。此外还有一个操纵序列 O,一个启动子 P 及一个调节基因 I。I 基因编码一种阻遏蛋白,后者与 O 序列结合,使操纵子受阻遏而处于转录失活状态。在启动子 P 上游还有一个分解(代谢)物基因激活蛋白 CAP 结合位点,由启动子、操纵序列和 CAP 结合位点共同构成 *lac* 操纵子的调控区,三个酶的编码基因即由同一调控区调节,实现基因产物的协调表达。由于这 3 个结构基因受一个调控系统控制,它们作为一个转录单位形成一条多顺反子 mRNA,使 3 个基因同时翻译成蛋白质,这 3 种酶的比例通常是 1.0 : 0.5 : 0.2,这种比例关系与多顺反子中的基因顺序直接相关,位于下游的结构基因由于不能重新启动,而使翻译效率降低。

P 区是从 I 基因结束到 mRNA 转录开始点为止,而 O 区的范围是抑制物结合区。mRNA 是从第 85 对碱基开始的,所以 P 区共 84 个碱基,抑制物结合区从 78~112,共 35 对碱基,和 P 区有 7 个碱基的重复,使这段序列可能无法同时结合 RNA 聚合酶和阻遏蛋白。也可能虽然可以同时结合,但无法形成开放的转录起始复合物。P-O 区碱基对的命序,是从 mRNA 起始的第一个核苷酸为 +1 与转录方向一致的为正,与转录方向相反的为负。所以 P 区从 -84 到 -1,抑制物保护区是 -7 到 28 (图 1-1)。

(2) 乳糖操纵子的负性调控:细菌能随环境的变化,迅速改变某些基因表达的状态,这就是很好的基因表达调控的实验型。人们就是从研究这种现象开始,打开认识基因表达调控分子机制的窗口的。大肠埃希菌可以利用葡萄糖、乳糖、麦芽糖、阿拉伯糖等作为碳源而生长繁殖。当培养基中有葡

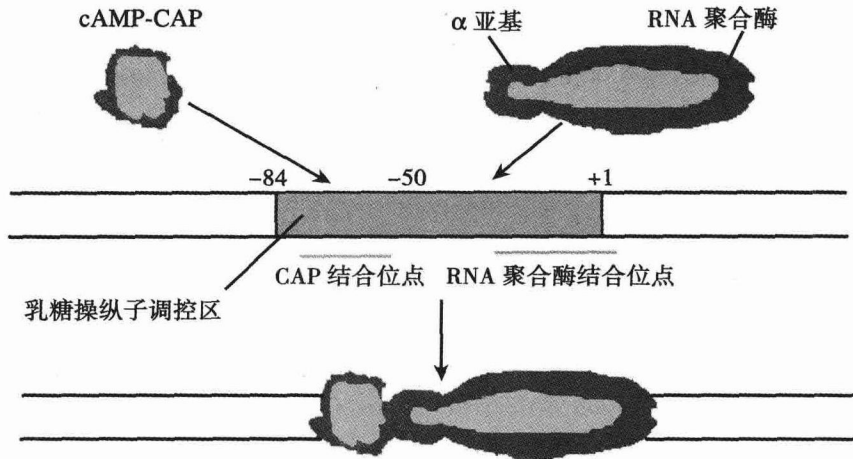


图 1-1 乳糖操纵子调节序列分布

葡萄糖和乳糖时，细菌优先使用葡萄糖，当葡萄糖耗尽，细菌停止生长，经过短时间的适应，就能利用乳糖，细菌继续呈指数式繁殖增长。说明酶可以诱导。用 ^{32}P 标记，结果表明培养基中加入乳糖 1~2min 后，编码 β -半乳糖苷酶和透过酶的 lac mRNA 量就迅速增加。去掉乳糖后，lac mRNA 量立即下降到几乎无法检测，表明乳糖确实能激发 lac mRNA 的合成。

在不含乳糖及 β -半乳糖苷的培养基中，lac 操纵子处于阻遏状态。此 I 基因在其自身的启动子 P_i 控制下，低水平、组成性表达产生阻遏蛋白 R，每个细胞中仅维持约 10 个分子的阻遏蛋白。R 以四聚体形式与操纵子 O 结合，阻碍了 RNA 聚合酶与启动子 P_{lac} 的结合，阻止了基因的转录启动。R 的阻遏作用不是绝对的，R 与 O 偶尔解离，使细胞中还有极低水平的 β -半乳糖苷酶及透过酶的生成。lac⁺ 基因型每个大肠埃希菌细胞内大约只有 1~2 个酶分子。如果在培养基中加入乳糖，酶的浓度很快达到细胞总蛋白量的 6% 或 7%，每个细胞中可有超过 10^5 个酶分子。当有乳糖供应时，在无葡萄糖培养基中生长的 lac⁺ 中将同时合成 β -半乳糖苷酶和透过酶。乳糖受 β -半乳糖苷酶的催化转变为别乳糖，与 R 结合，使 R 构象变化，R 四聚体解聚成单体，失去与 O 的亲合力，与 O 解离，基因转录开放，使 β -半乳糖苷酶在细胞内的含量可增加 1000 倍。这就是乳糖对 lac 操纵子的诱导作用。

有两种组成型突变，破坏了这种分子间的相互作用，使结构基因不受诱导物控制，阻遏基因 I 的基因突变型 (I^-) 以及调控位点操纵子 O 的突变型 (O^c)，在有无诱导物时均可产生大量组成型表达 3 种乳糖代谢酶。在 I^- 突变中，形成的阻遏物构型发生改变，而不能与操纵子结合，使结构基因总是处于表达状态。在 O^c 突变中，操纵子 DNA 序列发生变化而不能结合阻遏物蛋白分子，结果结构基因也总是处于表达状态 (图 1-2)。

事实上，研究诱导作用时很少使用乳糖，因为培养基中的乳糖会被诱导合成的 β -半乳糖苷酶所催化降解，从而使其浓度不断发生变化。实验中通常使用乳糖类似物：异丙基硫基半乳糖苷 (IPTG)、琉甲基半乳糖苷 (TMC) 和 O-硝基半乳糖苷 (ONPG)。它们都是高效诱导物，因为它们都不是半乳糖苷酶的底物，所以又称为安慰性诱导物 (gratuitous inducer)。X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷) 也是一种人工化学合成的半乳糖苷，可被 β -半乳糖苷酶水解产生蓝色化合物，因此可以用作 β -半乳糖苷酶活性的指示剂。IPTG 和 X-gal 都被广泛应用在分子生物学和基因工程的工作中。

细菌对环境的改变必须作出迅速的反应。营养供给随时都可能发生变化。要能以幸存必须具有可以变换不同代谢底物的能力。单细胞真核生物也同样生活在不断变化的环境中，而更为复杂的多细胞生物都具有一套恒定的代谢途径，而无需对外部环境作出反应。

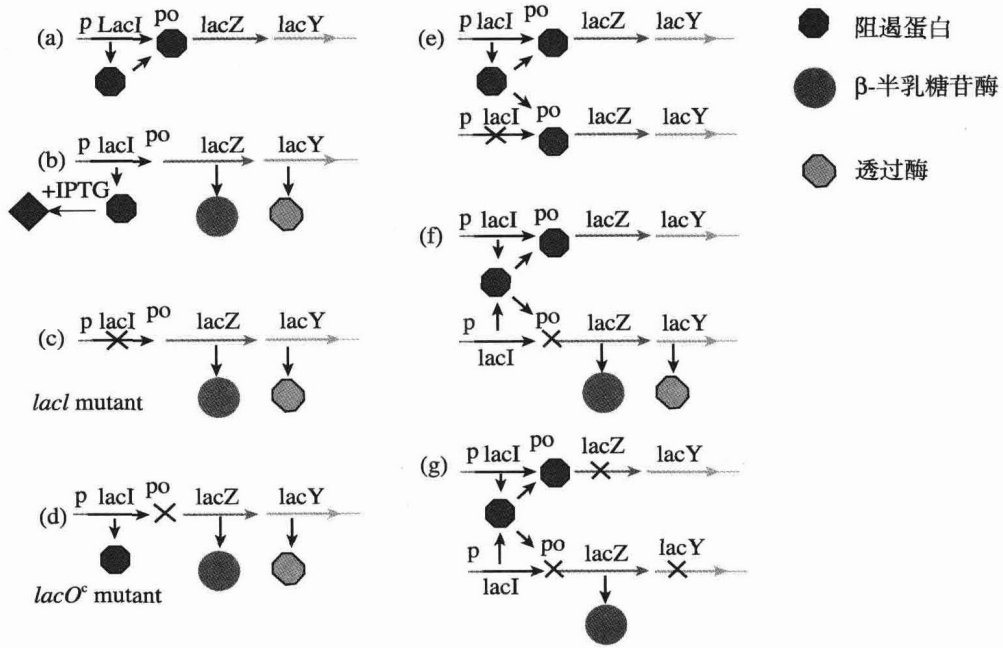


图 1-2 对调控序列突变后产物表达情况

(3) CAP 的正性调节：我们已经知道，β-半乳糖苷酶在乳糖代谢中的作用是将乳糖分解成葡萄糖和半乳糖，半乳糖又被细胞转变成葡萄糖后加以利用。那么当细菌处于既有大量乳糖又有葡萄糖时的情况会怎么样呢？大肠埃希菌只利用葡萄糖，它具有优先利用葡萄糖的特点。实际上只要有葡萄糖存在，细菌细胞就不产生 β-半乳糖苷酶。由此说明，除了阻遏蛋白能抑制乳糖操纵子转录外，还有其他因子也能有效地抑制乳糖的 mRNA 转录。而这个因子的活性与葡萄糖有关。研究表明，细菌中的 cAMP 含量与葡萄糖的分解代谢有关，当细菌利用葡萄糖分解供给能量时，cAMP 生成少而分解多，cAMP 含量低；相反，当环境中无葡萄糖可供利用时，cAMP 含量就升高。细菌中有一种能与 cAMP 特异结合的 cAMP 受体蛋白 CRP (cAMP receptor protein)，当 CRP 未与 cAMP 结合时它是没有活性的，当 cAMP 浓度升高时，CRP 与 cAMP 结合并发生空间构象的变化而活化，称为 CAP (CRP cAMP activated protein)，能以二聚体的方式与特定的 DNA 序列结合。

在 lac 操纵子的启动子 Plac 上游端有一段与 Plac 部分重叠的序列，能与 CAP 特异结合，称为 CAP 结合位点 (CAP binding site) (图 1-1)。该区域位于 -72 至 -52bp 处，中心在 -61bp 处。很可能有两个 CAP 与其结合。其结合模式为：CAP 主要结合在 DNA 的一个面上，RNA 聚合酶也正好结合在此面上，CAP 与 RNA 聚合酶正好相互挨着。当 cAMP-CAP 复合物的二聚体插入到 CAP 结合位点时，使启动子 DNA 弯曲形成新的构型，弯曲点位于二重对称的中心。弯曲相当严重，弯曲度大于 90°，所以 CAP 结合后，DNA 双螺旋结构有很大变化。弯曲的机制是：TGTGA 保守序列内产生一个尖纽结，每个拷贝中的两个纽结呈回文结构，引起超过 90° 的弯曲。弯曲对转录可能有一些直接作用，但是更可能的情况是弯曲使 CAP 能与启动子上的 RNA 接触。RNA 聚合酶与这种 DNA 新构型的结合更加牢固，因而转录效率更高，可使转录提高 50 倍 (图 1-3)。在有葡萄糖存在时，不能形成 cAMP，也就没有操纵子的正调控因子 cAMP-CAP 复合物，因此基因不表达。核酸-蛋白质相互作用的研究结果进一步证实，单独的 cAMP-CAP 复合体或 RNA 聚合酶与乳糖启动子结合的亲和力都不高，与其他 DNA 分子的亲和力也很低。如果二者同时与乳糖启动子 DNA 结合，可以迅速形成紧密牢固的复合体，表现为典型的协调结合的方式。由于 Plac 是弱启动子，单纯因乳糖的存在发生去阻遏使 lac 操纵子转录开放，还不能使细胞很好地利用乳糖，必须同时有 CAP 来加强转录活性，细菌才能合成足够的酶来利用乳糖。lac 操纵子的强诱导既需要有乳糖的存在，又需要没有葡萄糖可

供利用。通过这种机制，细菌优先利用环境中的葡萄糖，只有在无葡萄糖而又有乳糖时，细菌才去充分利用乳糖。

细菌对葡萄糖以外的其他糖（如阿拉伯糖、半乳糖、麦芽糖等）的利用上也有类似对乳糖利用的情况，在含有编码利用阿拉伯糖的酶类基因群的阿拉伯糖操纵子（ara operon）、半乳糖操纵子（gal operon）中也有 CAP 结合位点，CAP 也起类似的正性调控作用。所以 CAP 的通用名称是分解代谢基因激活蛋白（catabolic gene activator protein）。

不难看出：CAP 结合位点就是一种起正性调控作用的操纵子，CAP 则是对转录起正性作用的调控蛋白激活蛋白，编码 CRP 的基因也是一个调控基因，不过它并不在 lac 操纵子的附近，CAP 可以对几个操纵子都起作用。

由上可知，乳糖操纵子属于可诱导型操纵子（inducible operon），这类操纵子通常是关闭的，当受效应物作用后诱导开放转录。这类操纵子使细菌能适应环境的变化，最有效地利用环境能提供的能源底物。

2. 色氨酸操纵子 色氨酸是构成蛋白质的组分，一般的环境难以给细菌提供足够的色氨酸，细菌要生存繁殖通常需要自己经过许多步骤合成色氨酸，但是一旦环境能够提供色氨酸时，细菌就会充分利用外界的色氨酸，减少或停止合成色氨酸，以减轻自己的负担。细菌所以能做到这点是因为有色氨酸操纵子的调控。在色氨酸操纵子中，阻遏蛋白自身并不能与操纵序列结合，关闭结构基因的转录。它们需要首先与称作辅阻遏物（corepressor）的小分子物质结合后才能与操纵序列结合。在大肠埃希菌中，参与很多氨基酸和维生素合成的酶的表达就是以这种方式受到调控的。

（1）色氨酸操纵子的结构：大肠埃希菌色氨酸操纵子结构较简单，也是研究得最清楚的操纵子，结构基因依次排列为 *trpEDCBA*，这 5 个基因由共同的启动子（*P_{trp}*）起始转录，形成一条多顺反子 mRNA。它们编码的酶是由分支酸合成色氨酸所必需的。像许多氨基酸生物合成操纵子一样，当细胞缺乏生物合成途径的终产物色氨酸时，这些基因协同表达。*trpE* 编码邻氨基苯甲酸合酶，*trpD* 编码邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶，*trpC* 编码吡啶甘油磷酸合酶，*trpA* 和 *trpB* 分别编码色氨酸合酶的 α 和 β 亚基。*trpE* 的上游为调控区，由启动子、操纵序列和 162bp 的前导序列组成（图 1-4）。其特点是：①阻遏物基因 *trpR* 和结构基因（*trpEDCBA*）不紧密连锁；②操纵序列在启动子区域内；③启动子，操纵序列不直接和结构基因毗邻，而和前导顺序直接相联；④有衰减子结构，在合成代谢的操纵子的前导区内，存在着类似终止子结构的一段 DNA 顺序，称为衰减子，该顺序可以辅助阻遏作用进行转录调控。

（2）色氨酸操纵子的调控作用途径：Trp 合成途径较漫长，需消耗大量能量和前体物，如丝氨酸、磷酸核糖焦磷酸（PRPP）、谷氨酰胺等，是细胞内最昂贵的代谢途径之一，因此受到严格调控，其中色氨酸操纵子发挥着关键作用。调控作用主要有三种方式：阻遏作用、弱化作用以及终产物 Trp 对合成酶的反馈抑制作用。

1) 阻遏作用：*trp* 操纵子转录起始的调控是通过阻遏蛋白实现的。产生阻遏蛋白的基因是 *trpR*，该基因距 *trp* operon 基因簇很远。它结合于 *trp* 操纵序列特异序列，阻止转录起始。但阻遏蛋白的 DNA 结合活性受 Trp 调控，Trp 起着一个效应分子的作用，Trp 与之结合的动力学常数为 $1\sim 2\times 10^{-5}$ mol/L。在有高浓度 Trp 存在时，阻遏蛋白-色氨酸复合物形成一个同源二聚体，并且与色氨酸操纵子紧密结合，因此可以阻止转录。阻遏蛋白-色氨酸复合物与基因特异位点结合的能力很强，动力学常数为 2×10^{-10} mol/L，因此细胞内阻遏蛋白数量仅有 20~30 分子已可充分发挥作用。当 Trp

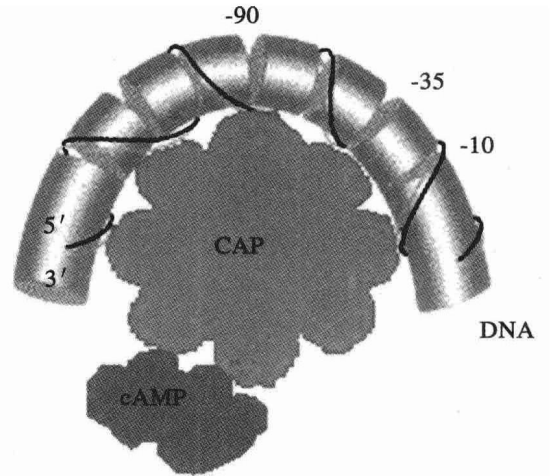
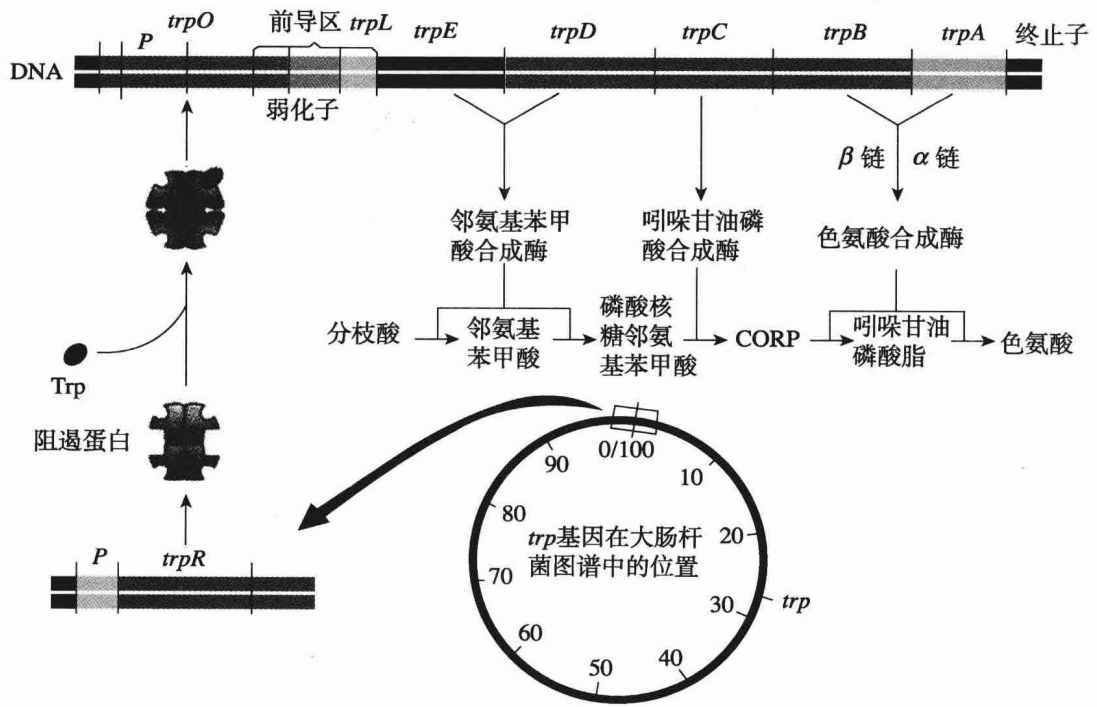


图 1-3 cAMP-CAP 复合体与 CAP 结合位点结合



到表达，转录开始于基因簇的左端，邻接的是操纵序列，*trpR* 就结合于此区。在操纵序列和编码区之间是前导序列。结构基因的转录部分是终止于内部的终止子 *trpt*，它在编码区外，长 36bp，后面间隔约 250bp 还有一个 ρ -依赖性终止子 *trpt*。现已证明了这个终止位点对于 *trp* 操纵子来说是不需要的。无论在 *E. coli* 还是在沙门菌中这种操纵子的本质都是相同的。

a 前导序列可能编码了 14 个前导肽。前导顺序编码 13 个密码子。这个顺序是否翻译成前导肽呢？虽然在体内测不出产物，但可能由于其不稳定所致，我们已知道其核糖体结合位点是有功能的。当细胞中 Trp 用完时，核糖体开始翻译前导肽，但它们达到 Trp 密码子时就停下来。mRNA 的顺序表明核糖体的延宕 (ribosome stalling) 影响了在衰减子处的终止。

b 衰减子 (内部终止子) 为结构基因的转录设了一道关卡，无论在体内还是在体外，RNA 聚合酶在此处终止都只产生 140b 的转录本。衰减子转录物中具有 4 段特殊的序列，片段 1 和 2、2 和 3、3 和 4 能配对形成的发夹结构，而形成发夹能力的强弱依次为片段 1/2 > 片段 2/3 > 片段 3/4。3 区和 4 区配对产生的发夹，其末端存在 8 个 U 的寡聚 U 顺序，这实质上是内部终止信号。如果 1 区不和 2 区配对就会形成不同的结构。在这种情况下，游离的 2 区可以和 3 区配对，那么 4 区就失去了配对伙伴，而保持单链状态，这样就不能形成终止子的结构 (图 1-6)。

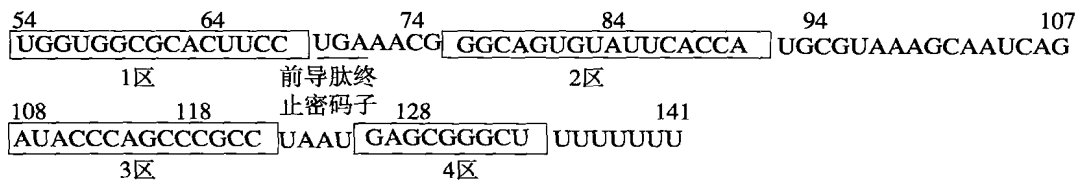


图 1-6 *Trp* 操纵子前导序列中的 4 个核苷酸互补配对区

通过衰减子控制转录的终止仅发生在原核生物中。核糖体暂停的位置决定了二级结构形成的方式，从而控制转录的终止，因此必须转录和翻译偶联才行。当 RNA Pol 达到终止位点时，前导肽的翻译必须同时发生。控制时间的关键是存在一个位点导致 RNA Pol 停留在前导顺序的第 90 个碱基处。RNA Pol 一直停着，直到核糖体翻译了前导肽。然后多聚酶被释放并在衰减位点解离下来。当它到达时，衰减区域的二级结构已经确定了。核糖体所处的位置能决定不同结构的形成。衰减作用以这种方式来终止转录仅仅在缺乏 Trp 的时候。这一重要的性质是由于在前导顺序中 Trp 密码子的位置来确定的。当 Trp 存在时，核糖体能合成前导肽，核糖可以沿着前导顺序的 mRNA 向前延伸，直到终止密码子 UGA 才停下，此 UGA 位于 1 区和 2 区之间，核糖体覆盖了 1 区和 2 区的部分区域，2 区余下的部分只能和 3 区的少数碱基配对时，3 区余下的部分仍可以和 4 区配对形成发夹的终止子结构，可以终止转录。在此情况下，RNA Pol 在衰减子上终止。当缺乏 Trp 时，核糖体进行到 1 区的 Trp 密码子时出现了：1 区完全被核糖体所占据，无法与 2 区配对，这样在 4 区被转录前 2 区就和 3 区配对，使整个的 4 区保持单链状态。而不能形成终发夹，RNA Pol 就能持续转录 (图 1-7、8)。

阻遏与衰减以相似的方式对 Trp 存在的水平作出反应，当 Trp 存在时，操纵序列被阻遏；但由于阻遏的能力不强，使大部分的 RNA 聚合酶得以逃脱，继续向前，可是最终还是在衰减子处被拦了下来。当去除 Trp 时，RNA Pol 能自由地通过启动子，也不大会过早被终止。在只有阻遏控制的衰减子突变体中，无衰减时转录的作用增加 10 倍左右；当 Trp 存在时终止是有效的，而衰减子仅允许约 10% 的 RNA 聚合酶前进。在缺乏 Trp 时，衰减子允许所有的聚合酶通过。由于阻遏的释放，在转录起始增加约 70 倍，这样二者的作用使操纵子的调节范围增加 700 倍左右。

其他一些氨基酸合成操纵子也有衰减机制。它们的分子信息表明在各种情况下，衰减的机制是相似的。十分有趣的是某些操纵子仅使用衰减而不用阻遏，例如没有发现组氨酸的阻遏蛋白。

3) 反馈抑制作用：由于基因表达必然消耗一定的能源和前体物，相对于阻遏和弱化作用，反馈

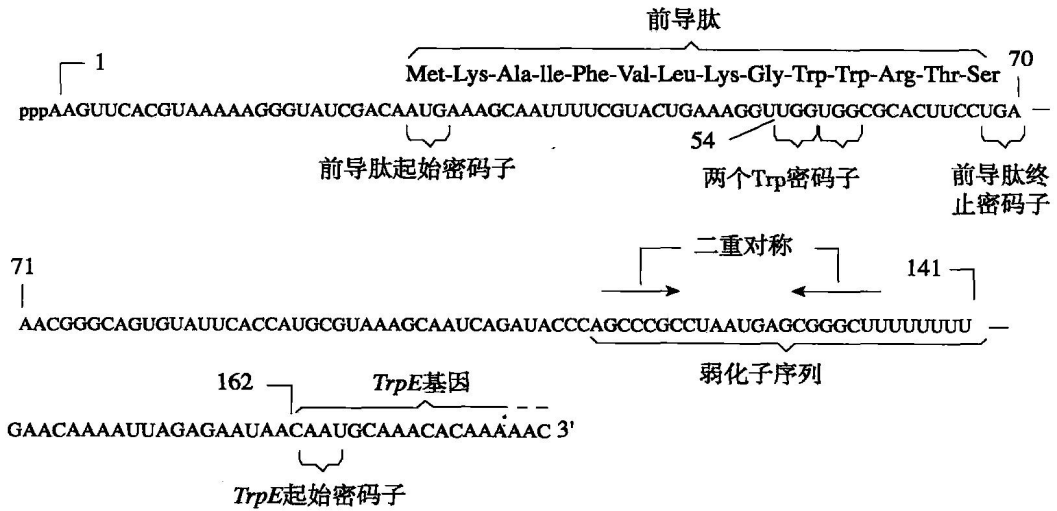


图 1-7 色氨酸操纵子 mRNA 前导区核苷酸序列

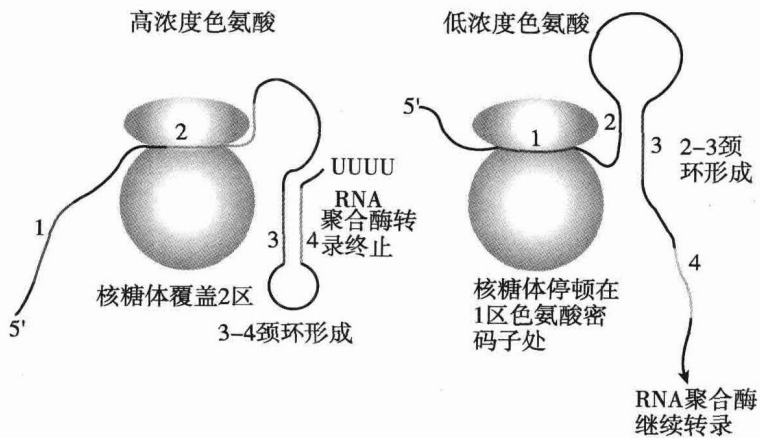


图 1-8 Trp 操纵子前导序列中的 4 个核苷酸互补配对情况

抑制作用更为经济和高效。终产物 Trp 对催化分支途径几步反应的酶具有反馈抑制作用，其 50% 抑制浓度分别为：邻氨基苯甲酸合酶，0.0015mmol/L；邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶，0.15mmol/L；色氨酸合成酶，7.7mmol/L。对于普通野生菌株，邻氨基苯甲酸合酶对 Trp 合成起到关键调控作用，常被称为瓶颈酶；但对高产 Trp 工程菌而言，上述任何一种酶的反馈抑制都会直接影响 Trp 产量。研究发现酶蛋白某些特殊位点突变可以导致对反馈抑制作用的敏感性显著下降，如邻氨基苯甲酸合酶 38 位的丝氨酸被精氨酸取代，抗反馈抑制能力显著提高，当环境中 Trp 浓度为 10mmol/L 时酶活性不受影响，而相同条件下野生型酶活性不到 1%。邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶 162 位缬氨酸被谷氨酸取代，抗反馈抑制能力也有显著提高，当环境中含有 0.83mmol/L 色氨酸或 0.32mmol/L 5-甲基色氨酸时，酶活性分别为野生菌的 3.6 倍和 2.4 倍。

(二) 不同 σ 因子对转录的调控

在转录起始过程中， σ 因子的作用是负责识别启动子的共有序列，并参与围绕 -10 区打开 DNA 双链的过程。包括大肠埃希菌在内的许多细菌能产生一系列识别不同类型启动子的 σ 因子。当环境条件需要细胞内基因表达模式发生较大改变时，细菌会利用一种特定的 σ 因子来指导 RNA 聚合酶结合到不同的启动子序列上，转录不同类型的基因。

二、原核生物的转录后调控

基因表达的转录调控是生物最经济的调控方式——既然是用不着某种蛋白质，就用不着转录其 mRNA。但转录生成 mRNA 以后，再在翻译或翻译后水平进行“微调”，是对转录调控的补充，它使基因表达的调控更加适应生物本身的需求和外界条件的变化。

(一) 翻译起始的调控

遗传信息翻译成多肽链起始于 mRNA 上的核糖体结合位点 (RBS)。所谓 RBS，是指起始密码子 AUG 上游的一段非翻译区。在 RBS 中有 SD (Shine-Dalgarno) 序列，长度一般为 5 个核苷酸，富含 G、A，该序列与核糖体 16S rRNA 的 3' 端互补配对，促使核糖体结合到 mRNA 上，有利于翻译的起始。RBS 的结合强度取决于 SD 序列的结构及其与起始密码 AUG 之间的距离。SD 与 AUG 之间相距一般以 4~10 个核苷酸为佳，9 个核苷酸最佳。此外，mRNA 的二级结构也是翻译起始调控的重要因素。因为核糖体的 30S 亚基必须与 mRNA 结合，要求 mRNA 5' 端有一定的空间结构。SD 序列的微小变化，往往会导致表达效率上百倍甚至上千倍的差异，这是由于核苷酸的变化改变了形成 mRNA 5' 端二级结构的自由能，影响了核糖体 30S 亚基与 mRNA 的结合，从而造成了蛋白质合成效率上的差异。

(二) 稀有密码子对翻译的影响

大肠埃希菌 DNA 复制时，冈崎片段之前的 RNA 引物是由 dnaG 基因编码的引物酶催化合成的，细胞对这种酶的需求量不大，而引物酶过多对细胞是有害的。已知 dnaG 和 rpoD 及 rpsU (30S 核糖体上的 S21 蛋白) 属于大肠埃希菌基因组上的同一个操纵子，而这 3 个基因产物在数量上却大不相同，每个细胞内仅有 50 个拷贝的 dnaG 蛋白，却有 2800 个拷贝的 rpoD 蛋白，更有高达 40000 个拷贝的 rpsU 蛋白。细胞通过翻译调控，解决了这个问题。即由基因转录出来的三个蛋白相应的 mRNA 拷贝数大体相同，由于翻译的调控使得蛋白的拷贝数发生了很大的变化。研究 dnaG 序列发现其中含有不少稀有密码子。分别计算大肠埃希菌中 25 种结构蛋白和 dnaC，rpoD 序列中 64 种密码子的利用频率，可以看出 dnaG 与其他两类有明显不同。很明显，稀有密码子 AUA 在高效表达的结构蛋白及 σ 因子中均极少使用，而在表达要求较低的 dnaG 蛋白中使用频率就相当高。此外，UCG (Ser)、CCU (Pro)、CCC (Pro)、ACG (Thr)、CAA (Gln)、AAT (Asn) 和 AGG (Arg) 等 7 个密码子的使用频率在不同蛋白中也有明显差异。许多调控蛋白在细胞内含量也很低，这些蛋白的编码基因中密码子的使用频率和 dnaG 相似，而明显不同于结构蛋白。由于细胞内对应于稀有密码子的 tRNA 较少，高频率使用这些密码子的基因翻译过程容易受阻，影响了蛋白质合成的总量。

(三) 重叠基因对翻译的影响

重叠基因最早在大肠埃希菌噬菌体 Φ X174 中发现，例如 B 基因包含在 A 基因内，E 基因包含在 D 基因内，用不同的阅读方式得到不同的蛋白质。当时认为重叠基因的生物意义是它可以包含更多的遗传信息，后来发现丝状 RNA 噬菌体、线粒体 DNA 和细菌染色体上都有重叠基因存在，暗示这一现象可能对基因表达调控有影响。现用 trp 操纵子中的 trpE 基因和 trpD 基因之间的翻译偶联现象来说明这个问题。

在正常情况下，trp 操纵子中 5 个基因产物是等量的，但 trpE 突变后，其邻近的 trpD 产量比下游的 trpBA 产量要低得多。研究 trpE 和 trpD 以及 trpB 和 trpA 两对基因中核苷酸序列与翻译偶联的关系，发现 trpE 基因的终止密码子和 trpD 基因的起始密码子共用一个核苷酸。由于 trpE 的终止密码子与 trpD 的起始密码重叠，trpE 翻译终止时核糖体立即处在起始环境中，这种重叠的密码保证了同一核糖体对两个连续基因进行翻译的机制。实验证明，偶联翻译可能是保证两个基因产物在数量上相等的重要手段。

(四) poly (A) 对翻译的影响

在营养丰富的培养基中，细菌以营养生长为主；当营养不足或细胞密度过大时，生长停止，而开

始一系列程序化的发育过程。从生长到发育的关键在于氨基酸饥饿以及细胞与细胞之间的相互作用。营养细胞和发育早期细胞显著的不同是 mRNA 上核糖体多少和 mRNA 上 poly (A) 的长短。细胞中蛋白质合成旺盛时, mRNA 链上核糖体的数量就多, mRNA 链上的 poly (A) 也较长; 当某些 mRNA 链不再被翻译时, 核糖体就被释放出来, 其 poly (A) 也相应缩短。目前还不知道两者之间的关系。

(五) 翻译的阻遏

蛋白质阻遏或激活基因转录的例子已经屡见不鲜, 那么, 蛋白质是否也能对翻译起类似的调控作用呢? 在大肠埃希菌 RNA 噬菌体 Q β 中发现了这种现象。Q β 噬菌体基因组包含有 3 个基因, 从 5' 到 3' 方向依次是与噬菌体组装和吸附有关的成熟蛋白基因、外壳蛋白基因和 RNA 复制酶基因。当噬菌体感染细菌, RNA 进入细胞后, 这条称为 (+) 链的 RNA 立即作为模板指导合成复制酶, 并与宿主中已有的亚基结合行使复制功能。但是, Q β (+) RNA 链上此时已有不少核糖体, 它们从 5' 向 3' 方向进行翻译, 这无疑影响了复制酶催化的从 3' 向 5' 方向进行的 (-) 链合成。克服这个矛盾的办法便是由 Q β 复制酶作为翻译阻遏物进行调节。体外实验证明, 纯化的复制酶可以和外壳蛋白的翻译起始区结合, 抑制蛋白质的合成。由于复制酶的存在, 核糖体便不能与起始区结合, 但已经起始的翻译仍能继续下去, 直到翻译完毕, 核糖体脱落, 与 (+) RNA 3' 端结合的复制酶便开始了 RNA 的复制。这里复制酶既能与外壳蛋白的翻译起始区结合, 又能与 (+) 链 RNA 的 3' 端结合。序列分析表明, 这两个位点上都有 CUUUU-AAA 序列, 能形成稳定的茎-环结构, 具备翻译阻遏特征。

(六) 魔斑核苷酸水平对翻译的影响

当细菌发现它们自己生长在饥饿的条件下, 缺乏维持蛋白质合成的氨基酸时, 它们将大部分活性区域都关闭掉。这就称为严紧反应 (stringent response), 这是它们抵御不良条件, 保存自己的一种机制。细菌通过仅仅维持最低量的活性来节约其资源, 直到条件改善时, 它们又恢复活动, 所有代谢区域也都活跃起来。严紧反应导致 rRNA 和 tRNA 合成大量减少, 使 RNA 的总量下降到正常水平的 5%~10%。显然核苷酸、碳水化合物、肽类等的合成都随之减少。严紧反应导致两种特殊核苷酸积聚: ① ppGpp-四磷酸鸟苷 (在 G 的 5' 和 3' 位点各附着两个磷酸); ② pppGpp-五磷酸鸟苷 (鸟苷 5'-三磷酸-3'二磷酸)。人们最初发现细菌在氨基酸饥饿时, 出现两种特殊的核苷酸, 其电泳的迁移率和一般的核酸不同, 感到很奇怪, 就称之为“魔斑 I”和“魔斑 II”, 后来发现魔斑 I 便是 ppGpp, 魔斑 II 是 pppGpp。

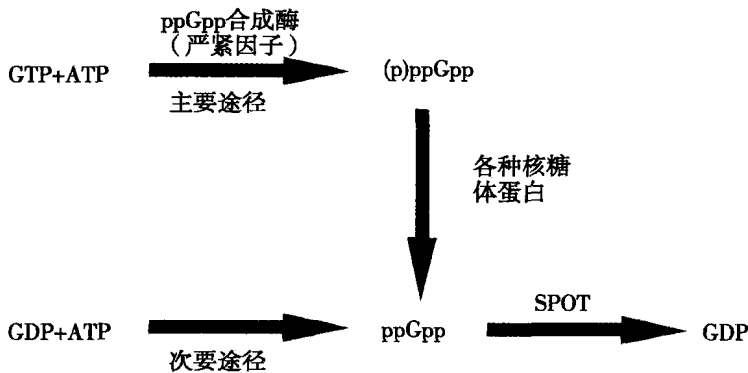


图 1-9 严紧因子 (RelA) 催化 (p) ppGpp 合成

这些鸟苷是典型的小分子效应物, 预期它们的功能是和靶蛋白结合改变它们的活性, 有时它们被称为 (p) ppGpp。 (p) ppGpp 的功能是调节细胞活性大分子的协调性。它们的产生是由两种途径来控制的 (图 1-9) 氨基酸的缺乏或氨基酰-tRNA 合成酶的失活突变都足以引起严紧反应, 此表明严紧反应的触发器是位于核糖体 A 位点中的空载 tRNA。但当氨基酰-tRNA 对一个特殊的密码子不能作出有效反应时, 空载 tRNA 便能得以进入, 当然这就阻断了核糖体的进程, 而触发了一个空转反应 (idling reaction)。

通过空转反应产生 (p) ppGpp 的有关成分已通过松弛型突变体 [relaxed mutants (*rel*)] 被鉴别出来。*rel* 突变能去除严紧反应。这样氨基酸的饥饿便不会导致合成 (p) ppGpp。松弛突变大部分基因位点位于 *relA* 基因中, 此基因编码一种蛋白, 称为严紧因子 (stringent factor)。此因子和核糖体结合, 虽然它的总量较低——每 200 核糖体低于 1 分子的严紧因子。因此似乎只有在核糖体少量存在

的细胞中, 严紧反应才会发生。在氨基酸饥饿时, 严紧因子与核糖体结合, 阻止核糖体在 mRNA 链上移动, 从而阻止了核糖体的进程, 而触发了一个空转反应 (idling reaction)。