

# 第十二章 RNA的结构与功能

## 第一节 RNA的结构

## 第二节 RNA的生物合成及其调控

## 第三节 RNA的功能

RNA是由4种核苷酸以3′—5′-磷酸二酯键连接形成的多聚核苷酸长链。

除局部互补形成双螺旋外，RNA都以单链形式存在。

RNA链中除了AU和GC标准碱基对外，还存在G和U变偶碱基对。

RNA的二级结构是存在于**同一平面**的结构，在此基础上可以形成**立体的三级结构**。

某些RNA具有酶的活性，称为**核酶**（**ribozyme**）。

以肽为骨架的核酸类似物，称为**肽核酸**，具有DNA的功能。

# 第一节 RNA的结构

一、mRNA的结构

二、rRNA的结构

三、tRNA的结构

四、snRNA的结构

每个细胞内含有三类不同的RNA:

mRNA、rRNA和tRNA。

真核细胞中还含有核内小分子RNA

(snRNA) 和胞质小分RNA (scRNA)。

# 一、mRNA的结构

## (一) 概述

mRNA占细胞总RNA的1%-2%，很不均一。

有以下特点：

 mRNA代谢很快，细菌mRNA平均半寿期为2分钟；真核mRNA半寿期平均5小时。

原核mRNA与基因共线的 (co-linear)

多顺反子mRNA 5'端为pppN, 3'端无poly A, 转录与翻译与同一空间进行。

真核mRNA与基因是非共线的, 转录产物是hnRNA, 核内剪接后转运到细胞质进行翻译。

。

 mRNA也有二级结构，某些二级

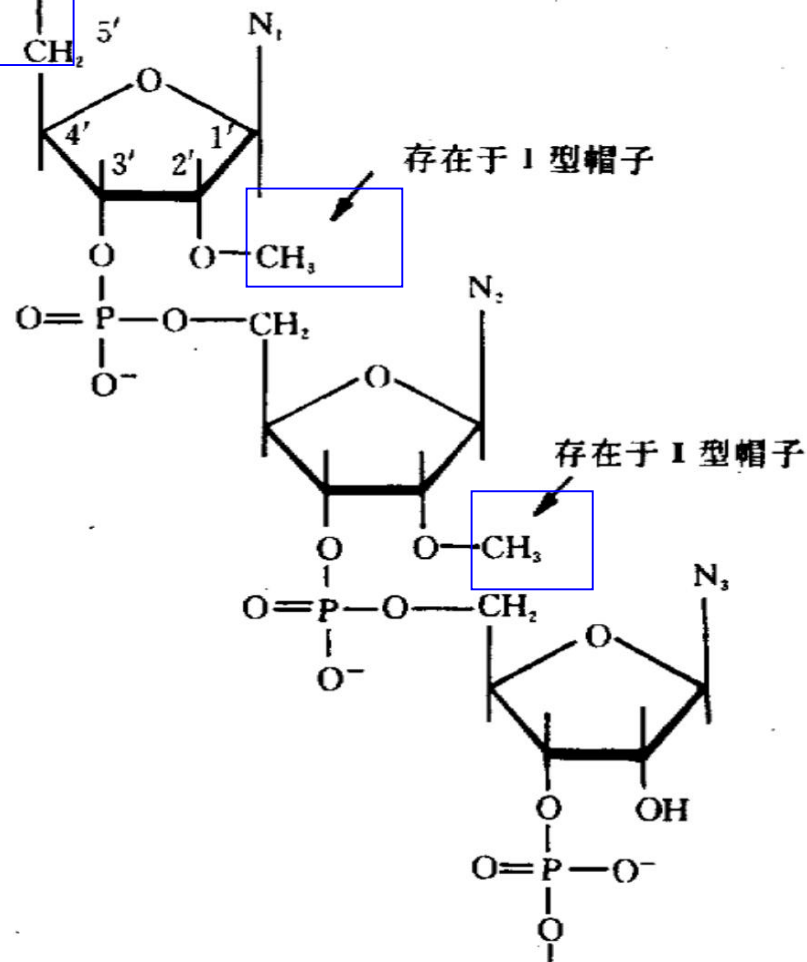
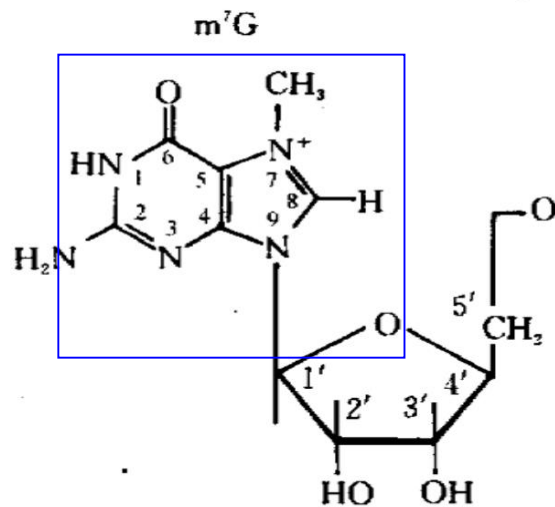
结构在转录及翻译中起调控作用。



## （二）mRNA帽子结构

真核mRNA合成不超过15个核苷酸时，由鸟苷酰转移酶在新生hnRNA5'端添加G，再经过一系列甲基化即可形成各种类型的帽子。

帽子结构的功能是保护mRNA免受核酸酶从5'端开始的降解，在翻译起始中起重要作用。



mRNA的帽子结构

5' End of RNA  
with triphosphate group



phosphohydrolase

$P_i$

pp Np

$\alpha\beta\gamma$   
Gppp

GTP

guanylyltransferase

$PP_i$

Gppp Np

adoMet

guanine-7-methyltransferase

adoHcy

$m^7$ Gppp Np

adoMet

2'-O-methyltransferase

adoHcy

$m^7$ Gpppm Np

(b)

5' End of RNA with cap

### (三) mRNA 5' 和 3' 端不译区

mRNA 编码序列上游有 5' UTR。

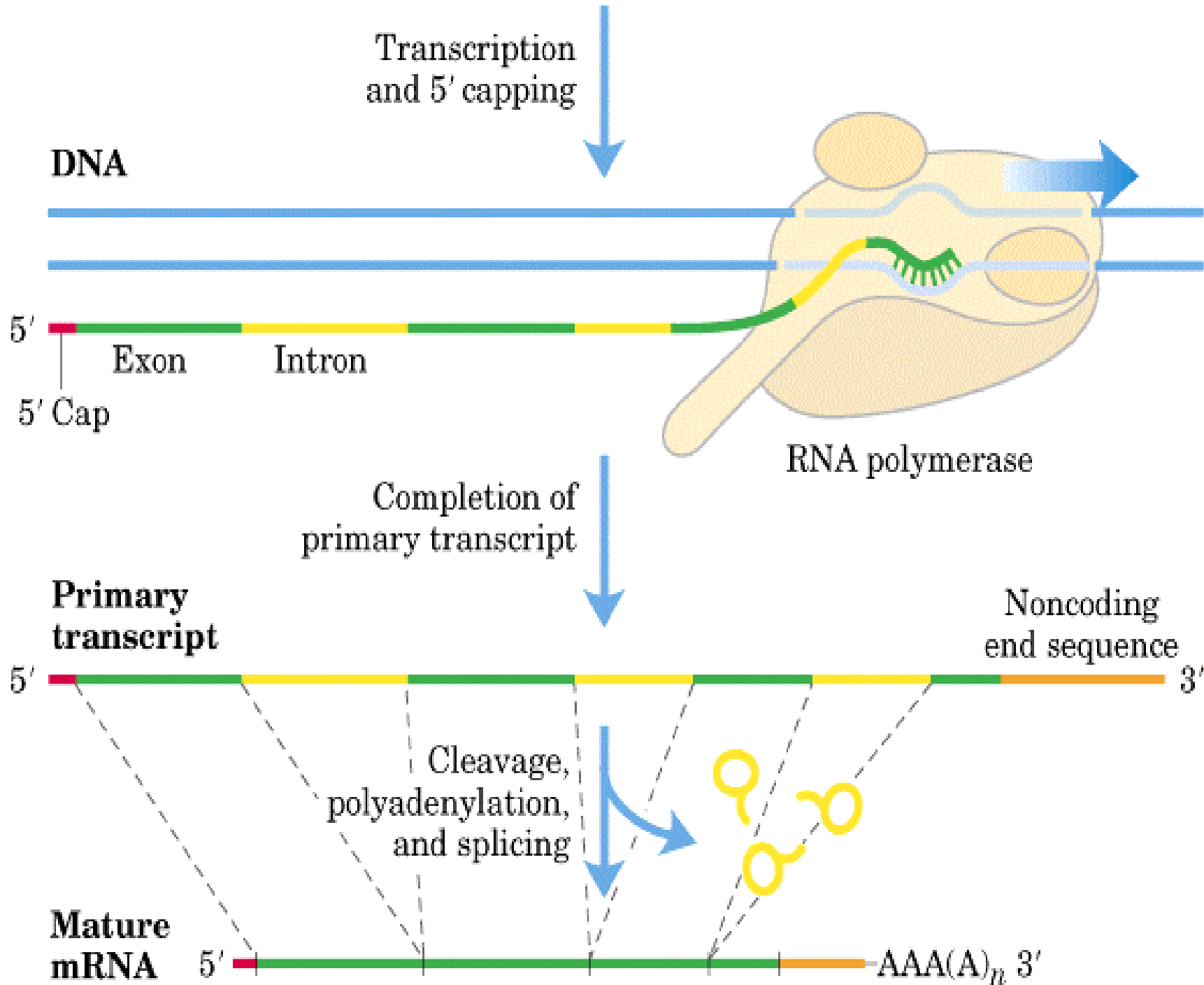
原核 mRNA 5' UTR 有嘌呤丰富的序列参与翻译起始。

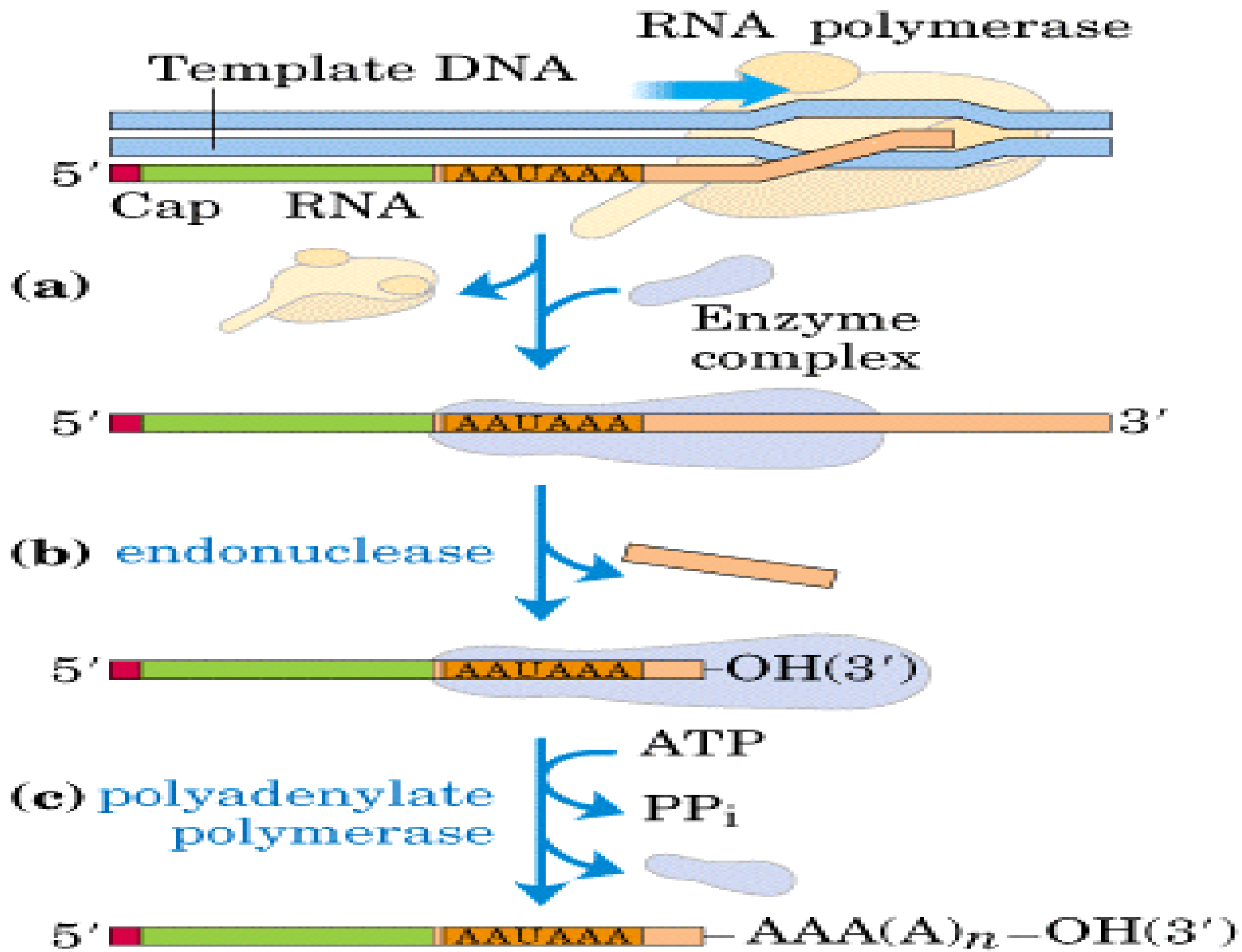
真核 mRNA 5' UTR 的长度差别很大。5' UTR 区与特异蛋白因子结合调控翻译起始。

## （四）mRNA 3' 端 polyA 尾巴

绝大多数真核 mRNA 3' 端有 200 多个核苷酸 polyA 的尾巴，是无模板的方式添加的。

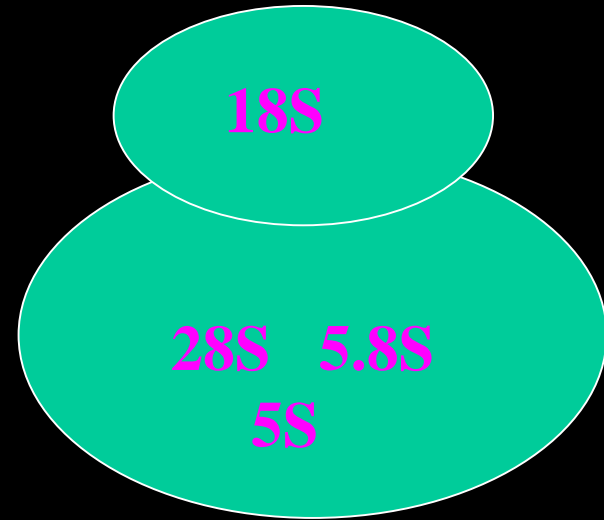
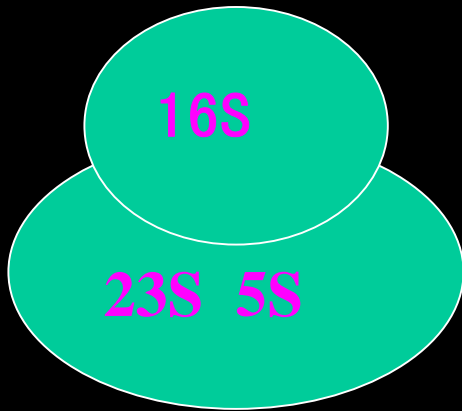
加尾与转录终止是偶联的。PolyA 尾可增加 mRNA 的稳定性及维持 mRNA 的翻译活性。





## 二、rRNA的结构

rRNA是胞内含量最丰富的RNA，占总RNA的80%以上。

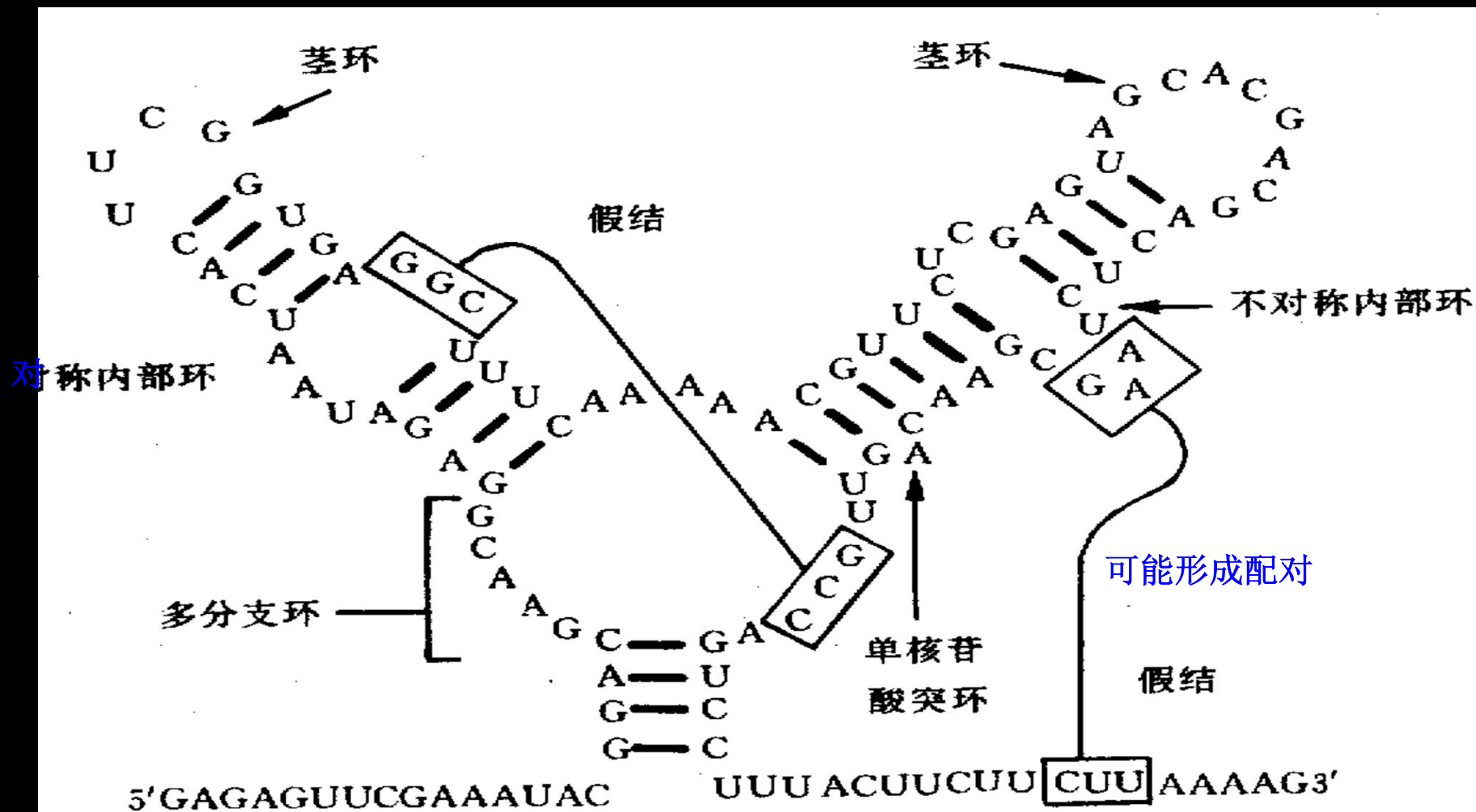


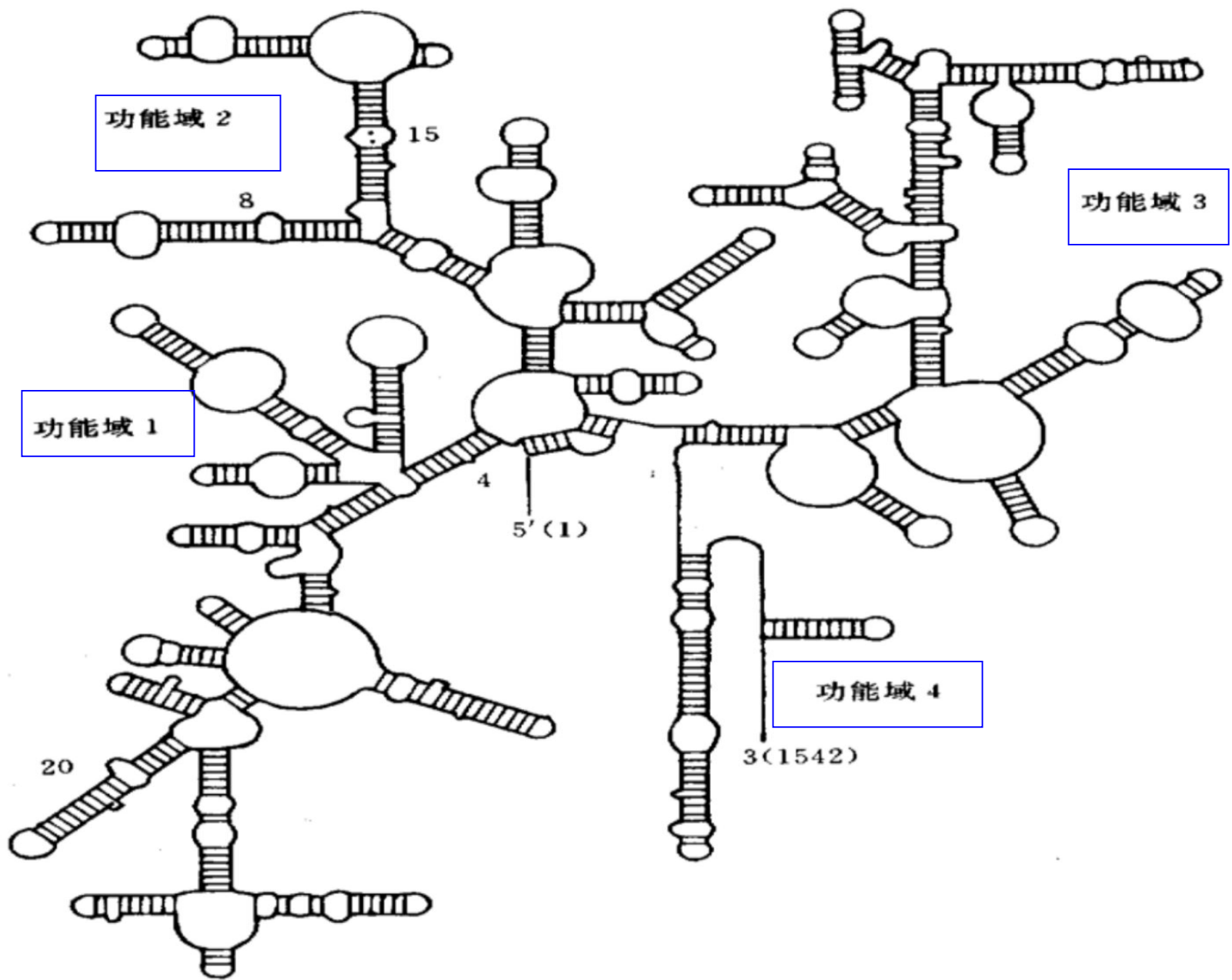
5.8S rRNA与细菌23S rRNA 5'端同源；  
单子叶植物叶绿体大亚基中的4.5S rRNA，也与  
细菌23S rRNA 3'端同源。

高等生物线粒体核糖体中只有两种rRNA，  
即大亚基中无5S rRNA。



rRNA中有非配对的单链区及配对的双链区相间排列，组成**茎环、突环、内部环、多分支环和假结**等二级结构。





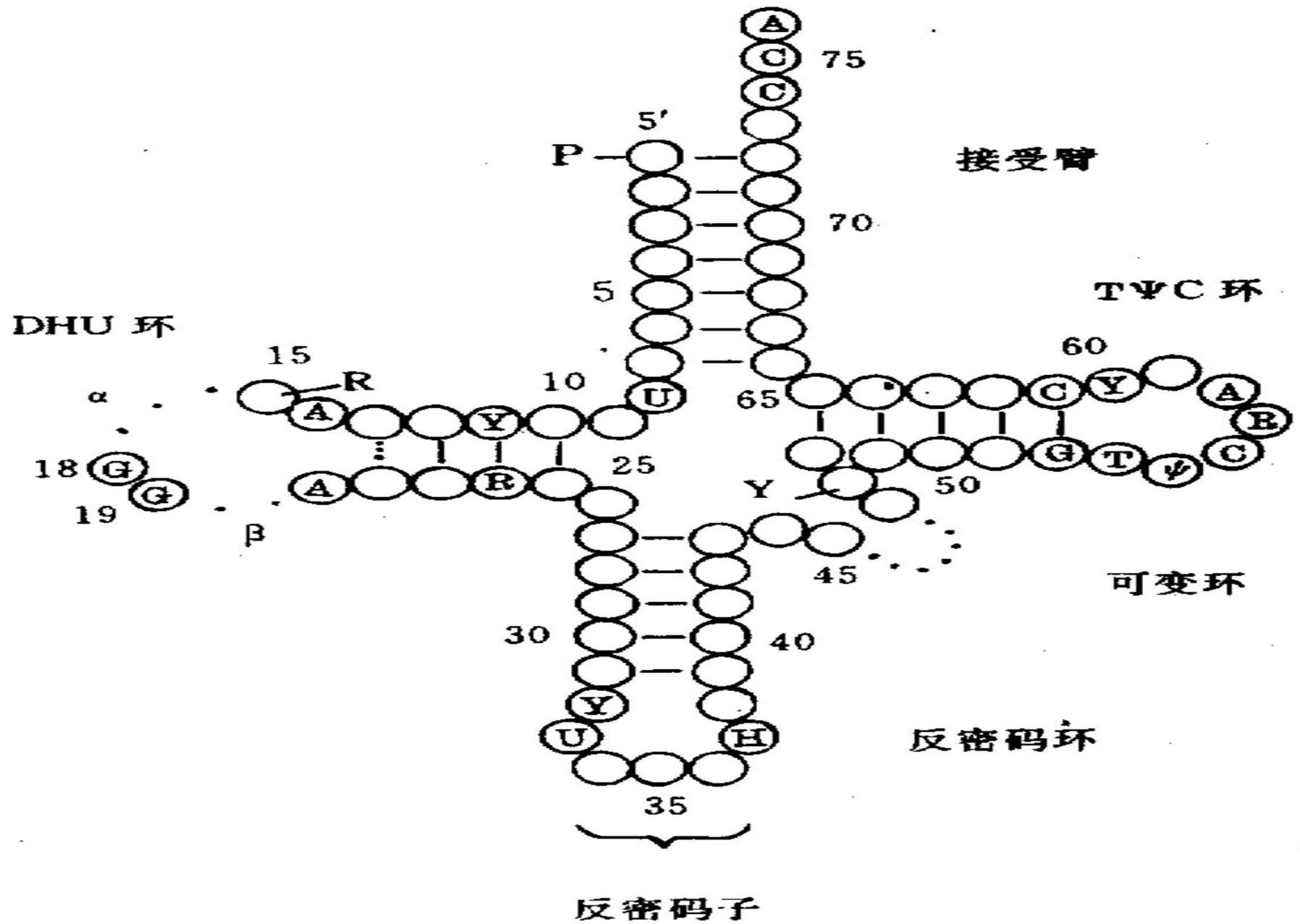
rRNA的二级结构为四个典型的结构域组成

### 三、tRNA的结构

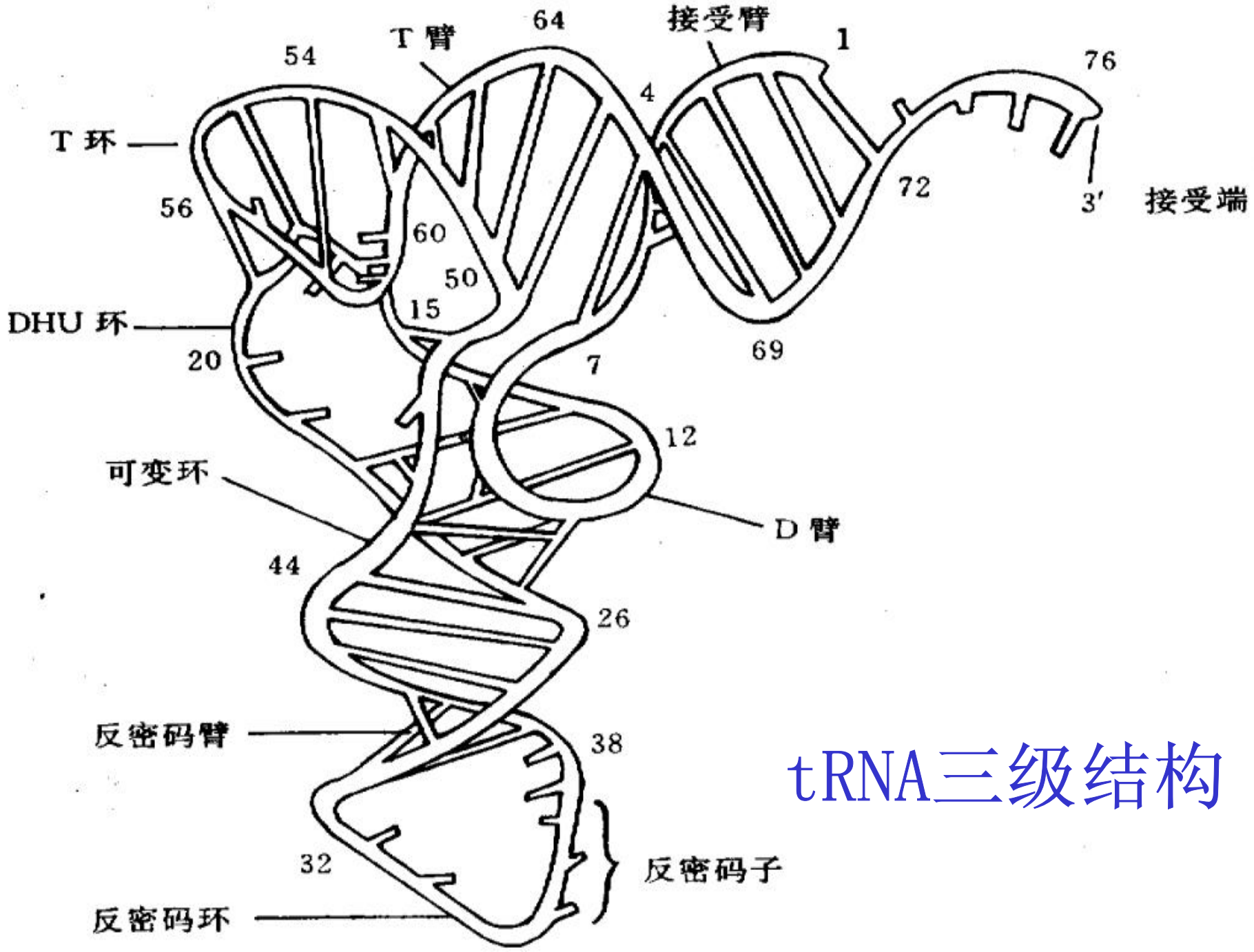
tRNA的含量可**占总RNA的10%**。tRNA的种类多，尤其是真核细胞，不仅有胞质tRNA，细胞器也有自己的tRNA。

tRNA的分子量为**60-95个核苷酸**，大多数tRNA分子为**76个核苷酸左右**。

tRNA中**稀有碱基的含量较高**，可达**20%**，它们都是在**转录后酶促修饰形成的**。



# tRNA二级结构



tRNA三级结构

## 四、snRNA的结构

真核细胞有许多小于300核苷酸的稳定的小分子RNA，分别称为snRNA和scRNA。同源snRNA序列高度保守。

脊椎动物有6种含量最丰富的snRNA，因序列中富含U，分别称U1、U2、U3、U4、U5和U6RNA。有茎环状二级结构及修饰的碱基。除U6RNA外，其余snRNA 5'端都有帽子结构。

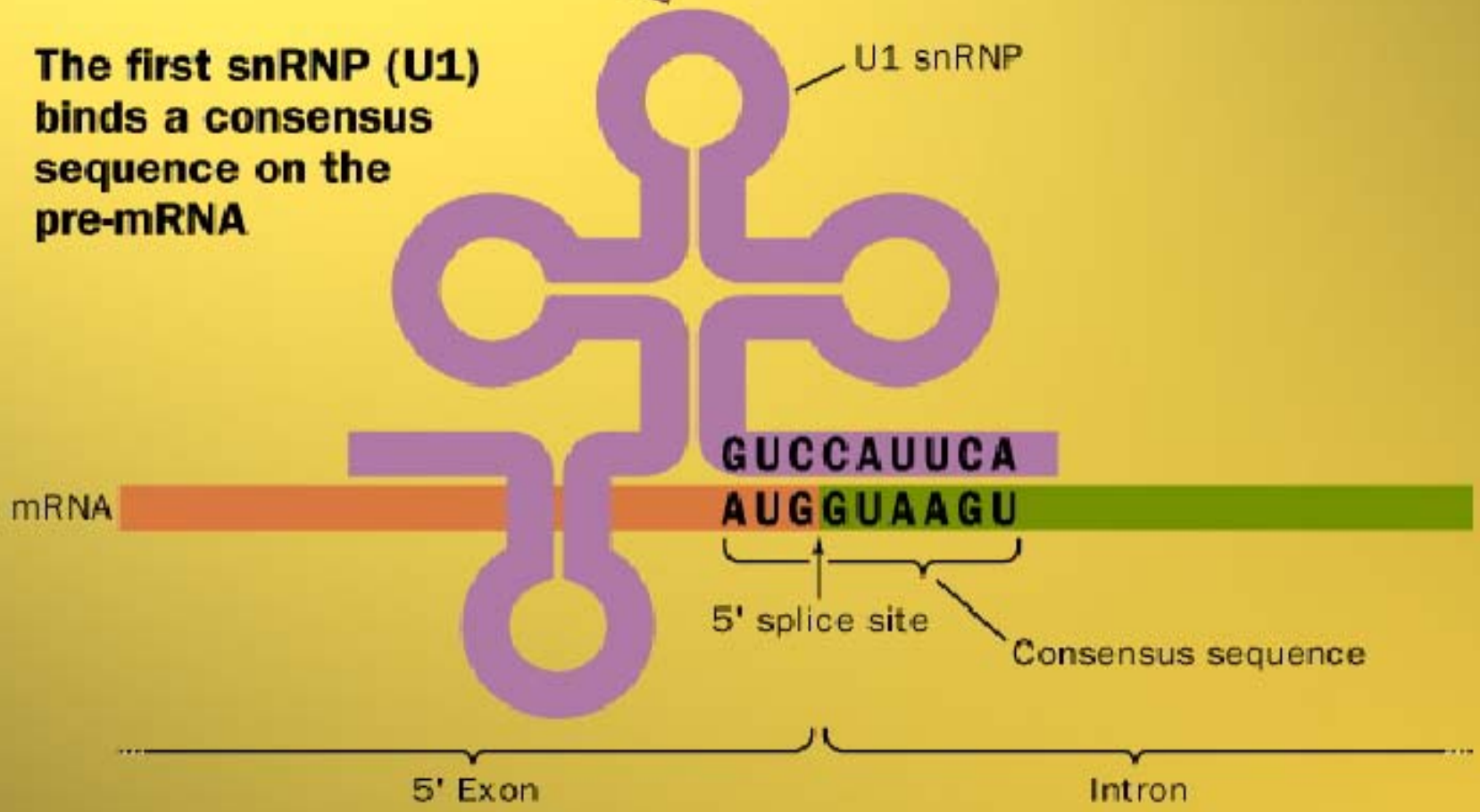
在海胆中存在U7RNA，它可与mRNA3'端茎环结构下游配对，为核酸内切酶提供识别位点，产生3'末端。

snRNA + Pr.  $\rightarrow$  snRNP  $\rightarrow$  mRNA剪接

scRNA + Pr.  $\rightarrow$  scRNP  $\rightarrow$  分泌蛋白质和  
膜蛋白跨膜转运  
中起重要作用。



**The first snRNP (U1) binds a consensus sequence on the pre-mRNA**





# 第二节 RNA生物合成及其调控

## 一、原核操纵子转录

## 二、真核基因转录及其调控

## 三、真核RNA前体的加工

非模板、有意义链 (+)，与转录本相同

5'  3'

 5'

3' 模板、反意义链 (-)，与转录本互补

5'  3'

 3' mRNA

 3' 5'

双链DNA中的一条链对某些基因是有义链而对另一些基因则是反义链。

(5') CGCTATAGCGTTT(3')

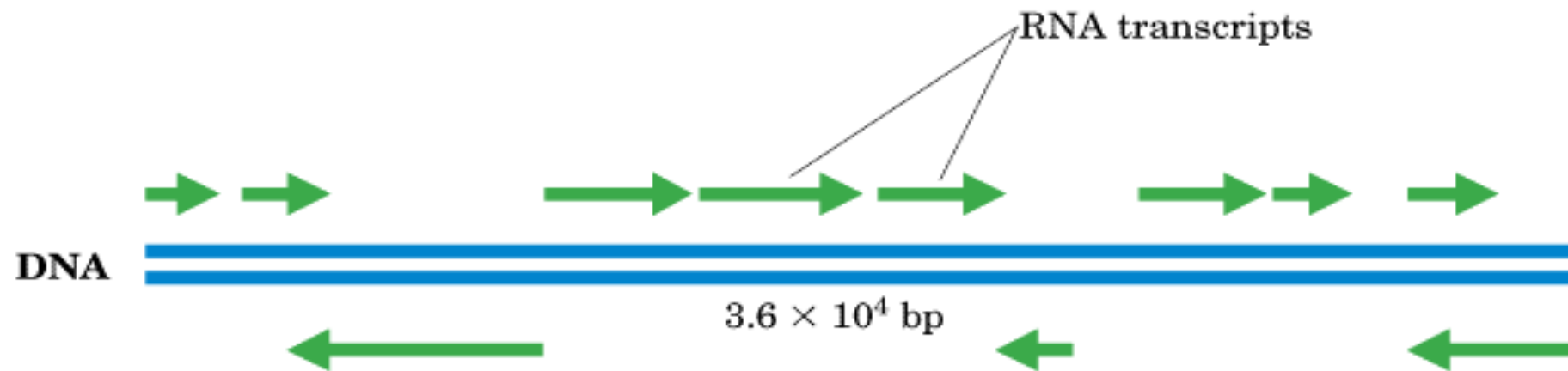
DNA nontemplate (coding) strand

(3') GCGATATCGCAA(5')

DNA template strand

(5') CGCUAUAGCGUUU(3')

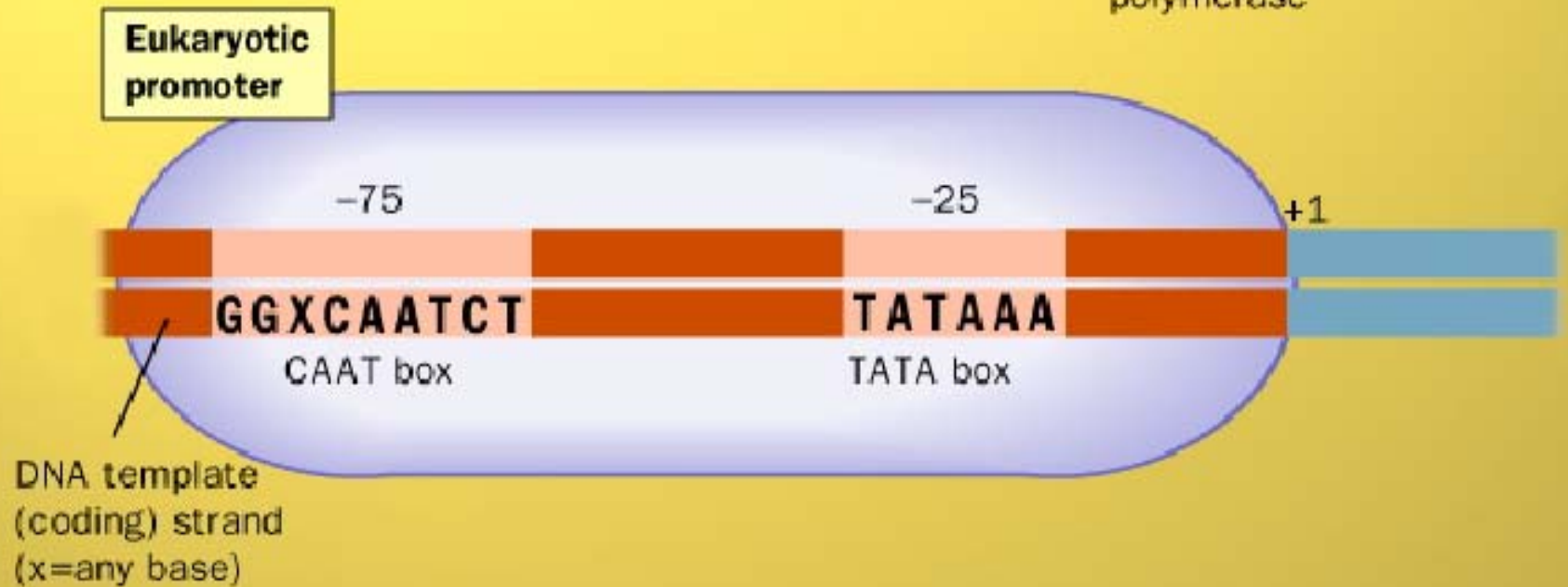
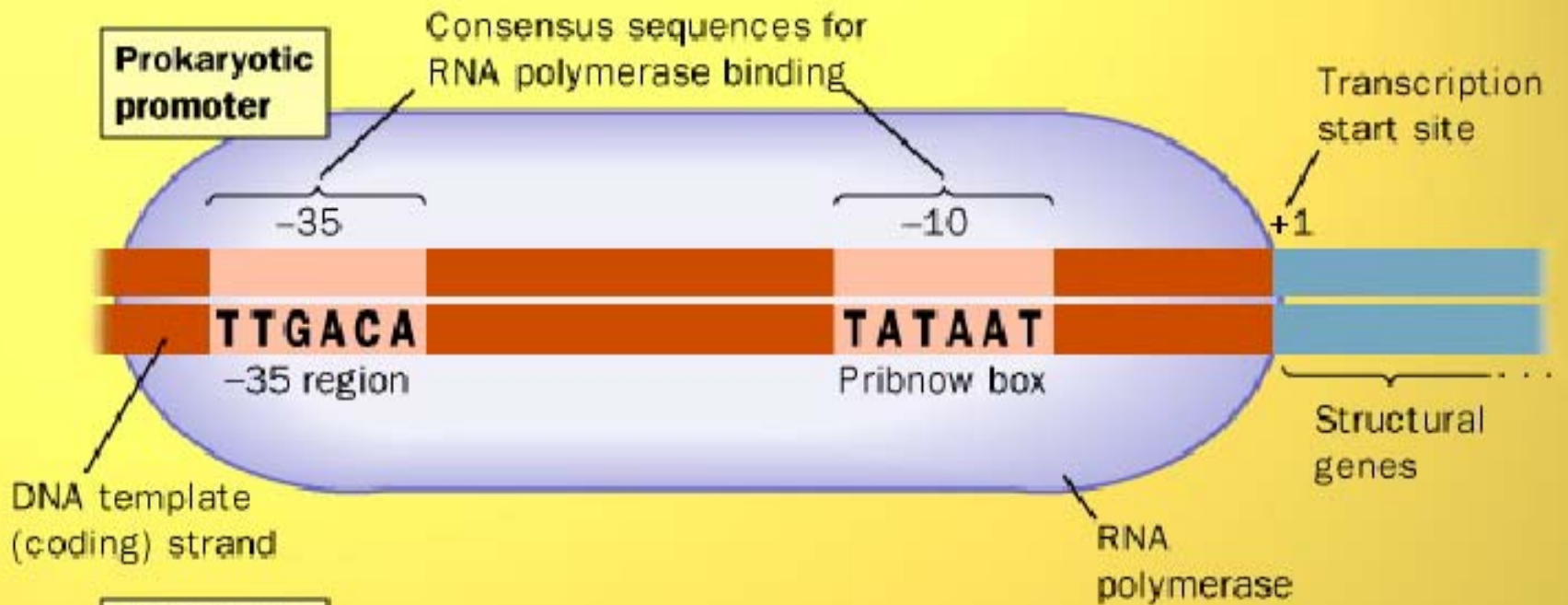
RNA transcript



# 一、原核操纵子转录及其调控

启动子中有两段保守的序列，一段是在-10区，另一段是在-35区。

启动子序列与保守序列的保守程度越接近，转录效率越高，与保守序列差别越大，转录效率越低。



## (1) 转录起始与延伸:

大肠杆菌RNA聚合酶全酶由4种共5个亚基组成 ( $\alpha_2$ 、 $\beta$ 、 $\beta'$ 、 $\sigma$ )。

当 $\sigma$ 亚基加入后，全酶与启动子结合，覆盖DNA的范围为-55~+20。其中-35区是 $\sigma$ 因子结合的部位，这样就形成闭合的起始复合物。

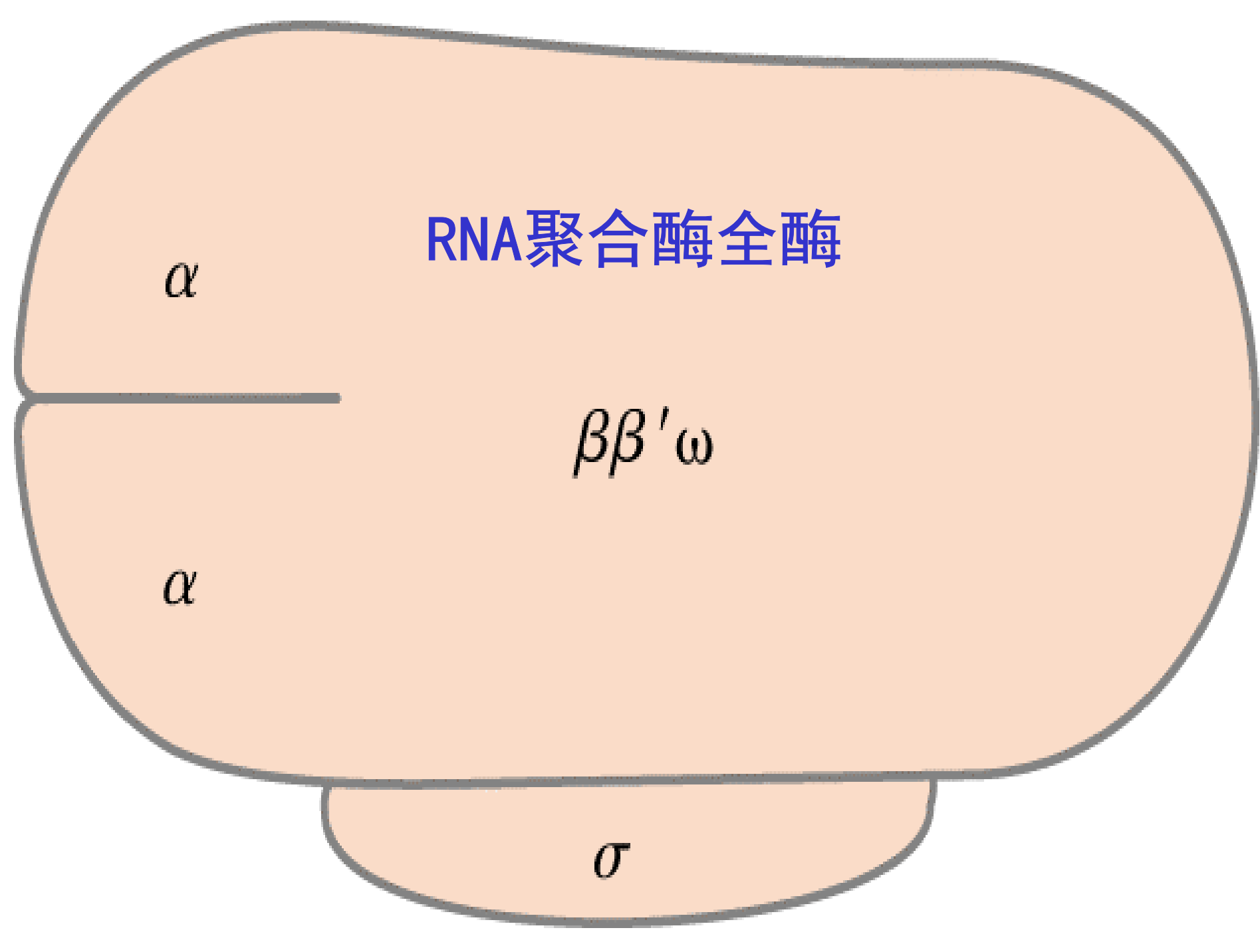
# RNA聚合酶全酶

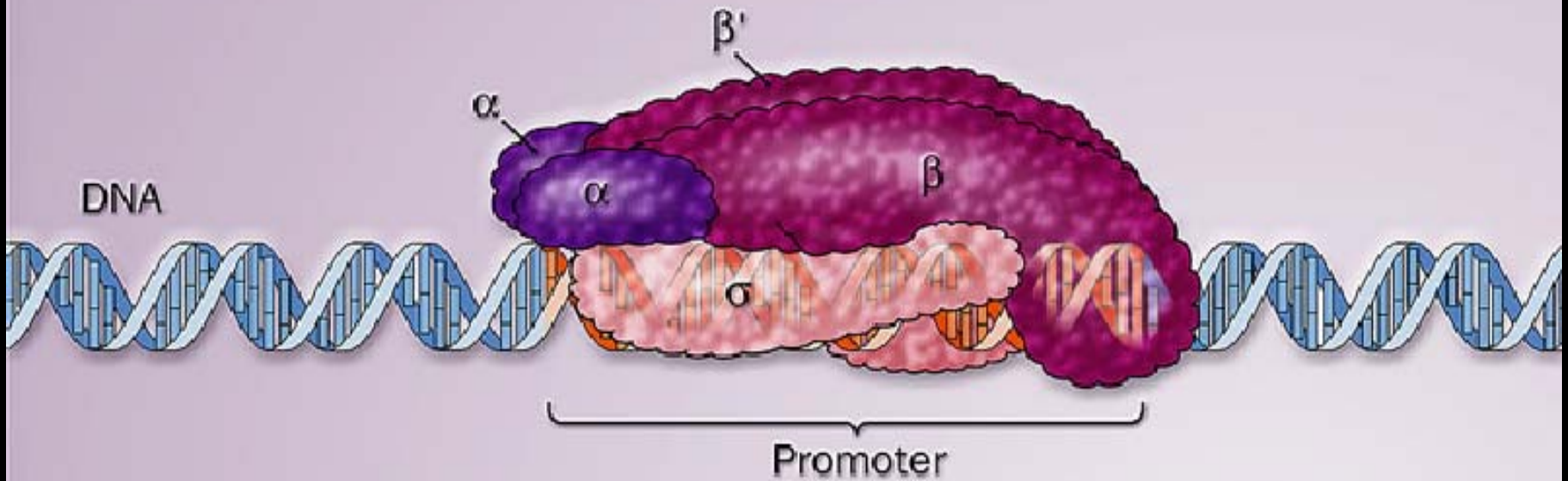
$\alpha$

$\beta\beta'\omega$

$\alpha$

$\sigma$





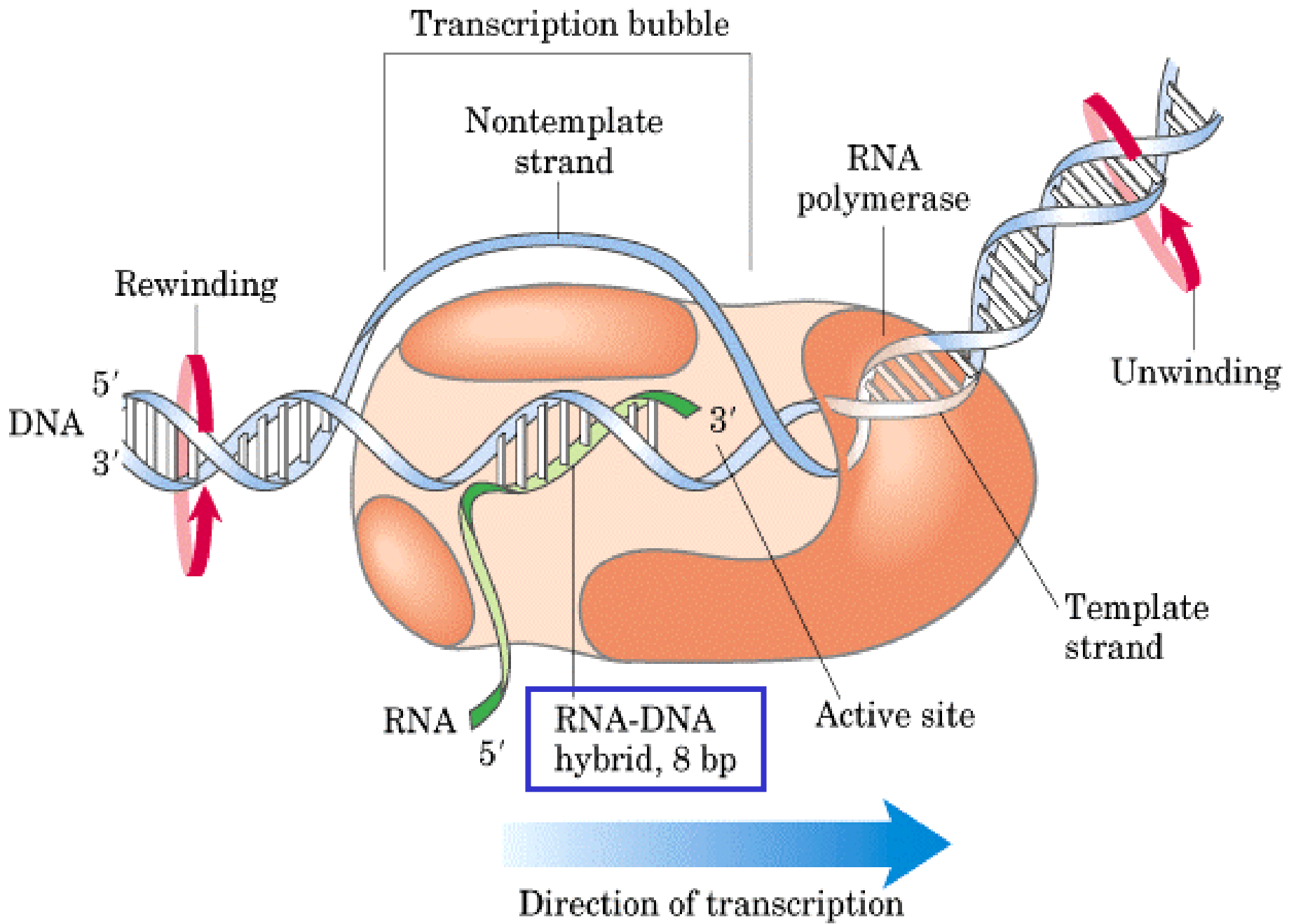
***E. coli* RNA polymerase holoenzyme**



当闭合的起始复合物中-10区AT丰富的保守序列双链打开后，成为开放的复合物。

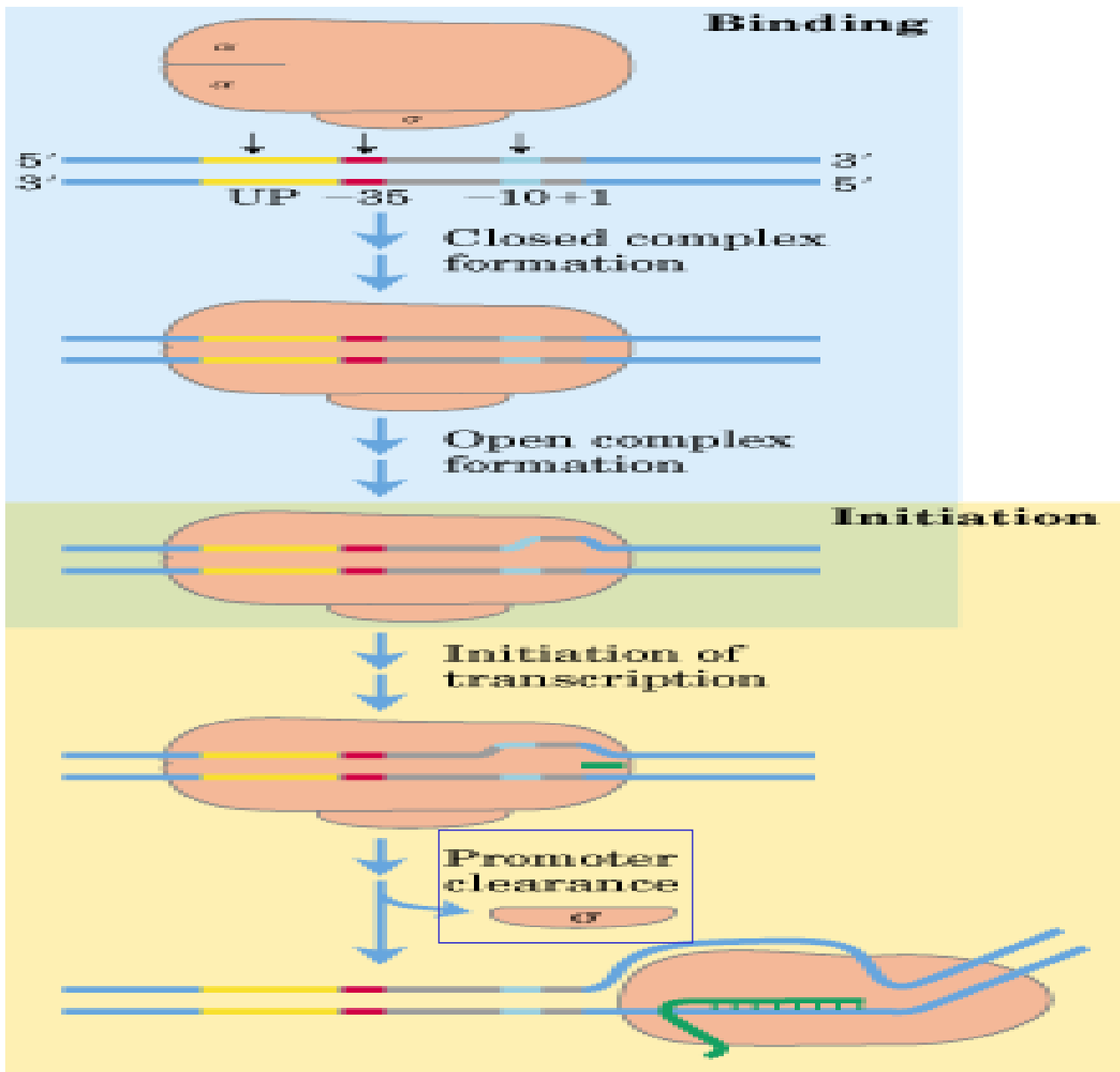
双链打开越过转录起始点时，RNA开始合成。

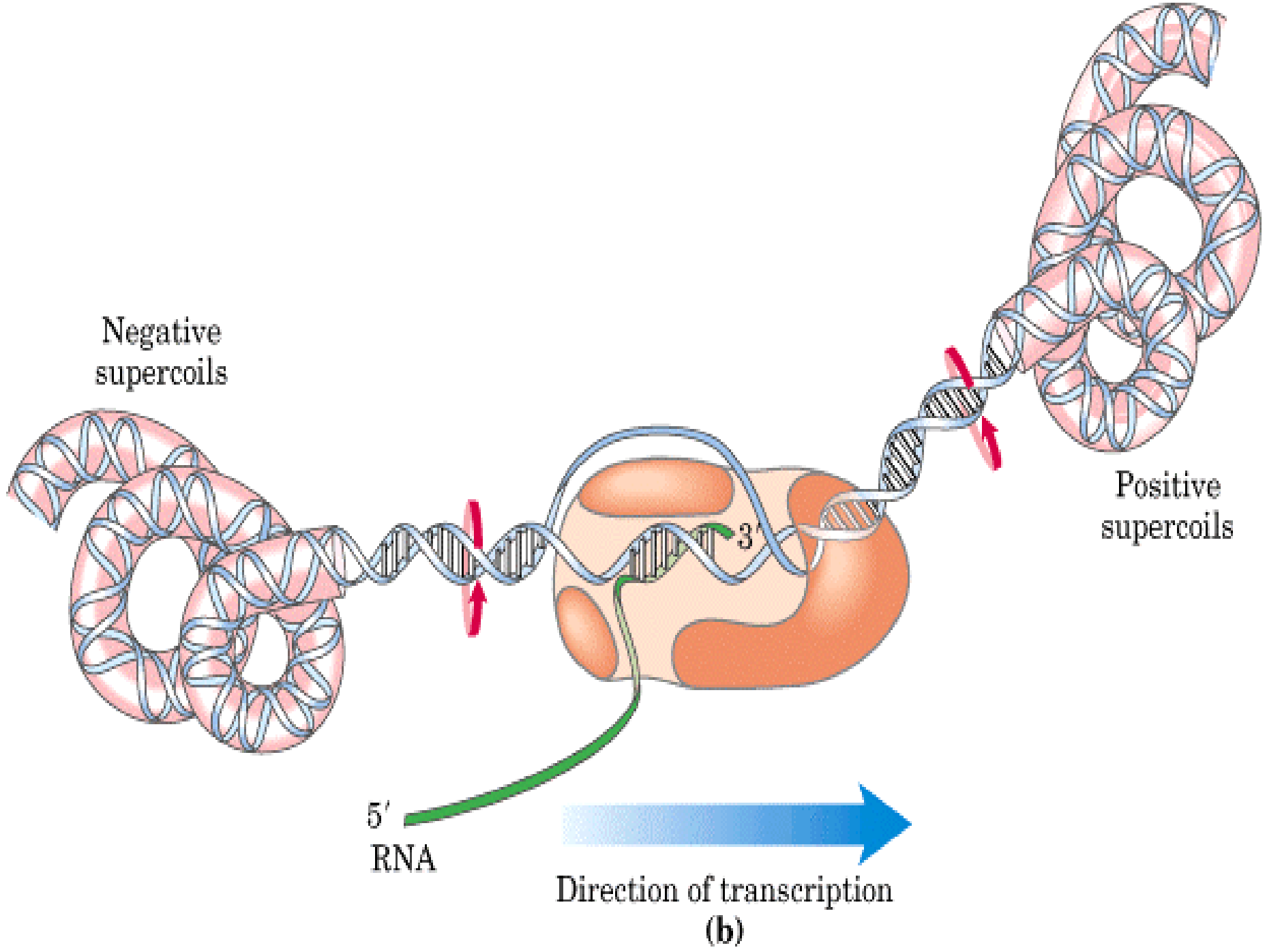
由于全酶与启动子的亲和性较高，在转录起始过渡到延伸阶段往往有少于9个核苷酸（NT）的RNA链从模板上脱落及并重新起始合成RNA链的过程。



(a)

一旦合成的RNA链超过9个NT,  $\sigma$  因子从启动子上脱落, 核心酶变构并向下游移动, 转录进入延伸阶段。





编码基因	$\sigma$ 因子	功能	-35区序列	-10序列
<i>rpoD</i>	$\sigma$ 70	普遍转录	<b>TTGACA</b>	<b>TATAAT</b>
<i>rpoH</i>	$\sigma$ 32	热休克转录	<b>CCCTTGA A</b>	<b>CCCGATN T</b>
<i>rpoN</i>	$\sigma$ 54	与氮源有关的转录	<b>CTGGNA</b>	<b>TTGCA</b>
<i>fliA</i>	$\sigma$ 28	与鞭毛有关的转录	<b>CTAAA</b>	<b>GCCGATA A</b>

原核生物的核心酶只有一种，识别启动子的  $\sigma$  亚基有多种

## (2) 转录终止:

因3'端终止子序列不同, 故有**两种终止方式**。

### ▶▶依赖于 $\rho$ 因子的转录终止:

终止位点序列无相似性, 转录出的RNA中富C。

$\rho$  因子是亚基为六聚体, 能与RNA结合; 水解

ATP供能而使RNA与模板DNA解开, 使转录终止。



## 二、真核基因转录及其调控

(一) 转录起始

(二) 转录起始调控



# （一）真核基因转录起始

转录起始有 RNA 聚合酶（RNAPol）和转录因子等多种蛋白因子的参与。

# ① RNA聚合酶及转录因子

## RNA聚合酶:

**原核细胞:** 中只有一种RNA聚合酶。

**真核细胞:** 有3种RNA聚合酶。具结构上的相似性，都由两个大亚基和若干小亚基构成。3种酶的大亚基有同源性，某些小亚基为3种酶共有。

**RNA聚合酶 I**：转录 rRNA 前体（不包括 5SrRNA）；

**RNA聚合酶 II**：转录编码蛋白质和 snRNA

（U6RNA除外）；其最大亚基有特异的羧端功能域 (CTD)，由 7 肽序列 (YSPTSPS) 重复几十次构成。其中的 T、S 和 Y 残基可被磷酸化 CTD 参与转录起始。

**RNA聚合酶 III**：合成 5SrRNA、tRNA、U6RNA 及

# 真核转录因子：

3种RNA聚合酶单独不能完成转录起始，需一系列转录因子的辅助才能与启动子结合，形成稳定的起始复合物。根据其不同的功能和可分3类：

## 普通因子

是基础转录必需的因子。

与RNA聚合酶一起在转录起始点周围形成复合物。

在体外，这种基础转录复合物已经能够决定转录起始。



## 上游因子

是DNA结合蛋白，能够特异地识别转录起点上游的顺式作用元件（特异的DNA调控序列）并与之结合。

上游因子的表达及其活性是不受调控的。广泛地存在于细胞核中，对任何含有相应的顺式作用元件的启动子都能起作用，使转录达到足够水平。



## 可诱导的因子

也是一种DNA结合蛋白，与之结合的顺式元件称为应答元件。

可诱导因子的作用方式与上游因子相同，但其自身的表达或活化是有时间及组织特异性的，它们能在时间及空间上调控某些基因的转录。

## ②真核转录起始阶段

真核启动子一般由**核心启动子和上游元件组成**。转录起始分为**三或四个阶段**：

 **核心形成：** 由普遍转录因子识别核心启动子并与之结合形成核心。



## 转录起始前复合物的形成：

另一些普遍转录因子加入核心，形成转录起始前复合物。这些转录因子既能与核心又能与RNA聚合酶 相互作用，起桥梁功能。

## RNA聚合酶就位：

RNA聚合酶与转录起始复合物结合。其中RNA聚合酶 I 和III可以直接就位并起始转录。

RNA聚合酶 II 就位后还需成熟。

## 复合物成熟：

RNA聚合酶 II 就位后还有一些普遍性转录因子加入复合物，使其成熟并起始转录。

### ③ RNA聚合酶I的转录起始

RNA聚合酶I转录产物是rRNA前体。

人rRNA转录单位启动子包括两部分：

**核心启动子：**转录起点周围（-45- +20）称，  
已具有转录起始的功能，但效率很低。

**上游调控元件（UCE）：**位于核心启动子上游  
能增强转录的起始。

两部分序列都富有GC碱基对，并且同源程度  
达85%。

## 转录起始:

上游结合因子1 (upstream binding factor, UBF1) 与核心启动子及上游调控元件 (UCE) 中的GC丰富序列结合。

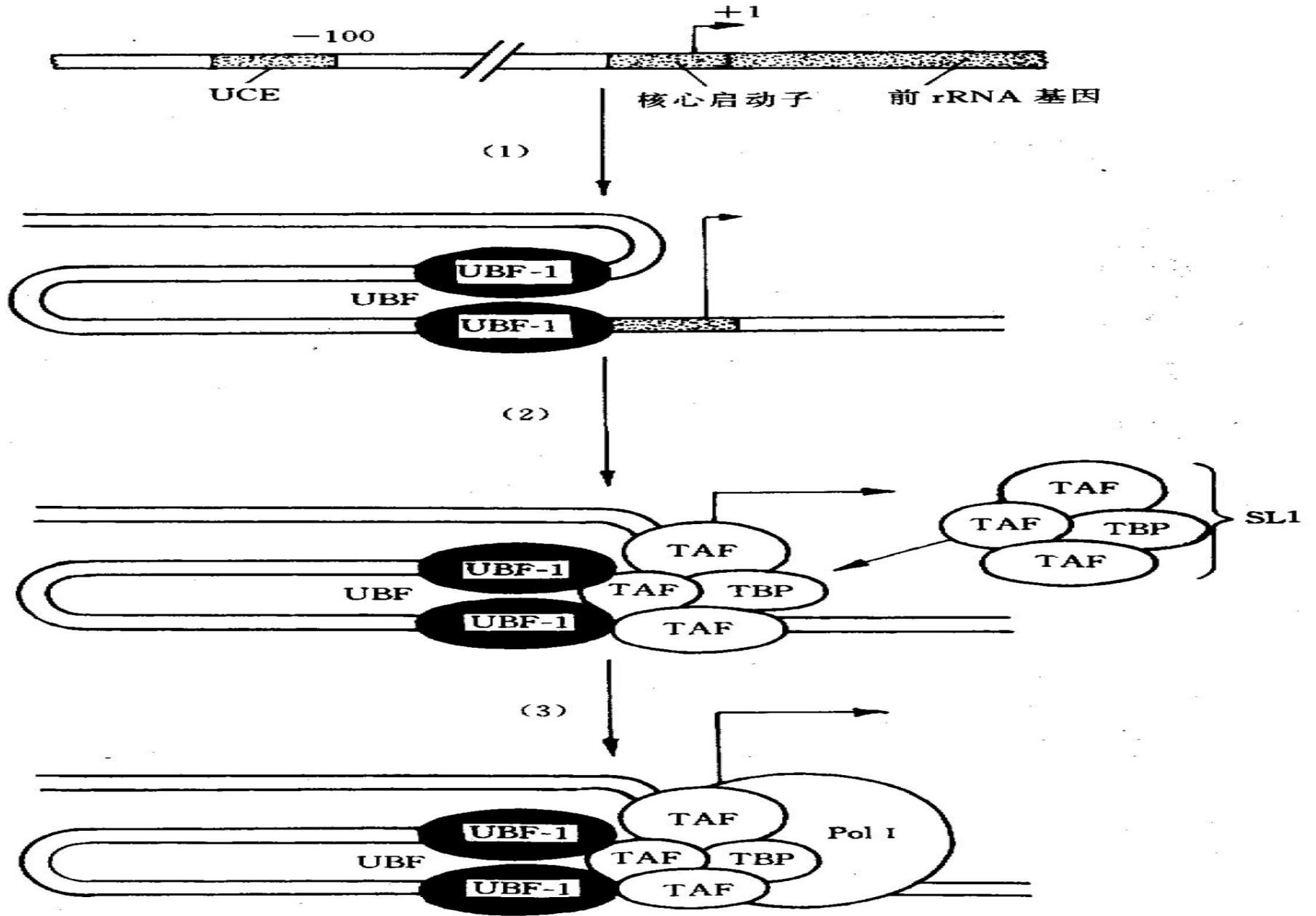
通过UBF1之间蛋白质-蛋白质相互作用, 使启动子中的两部分互相靠拢, 转录因子SL1 (selectivity factor1, 选择因子) 加入, 组成稳定的转录起始前复合物。

SL1由4个亚基组成：

一个亚基是TBP (TATA结合蛋白)

3个亚基为TAFs (TATA相关因子)。

SL1通过TAFs与UBF1结合，TBP亚基能与RNA聚合酶I作用，使RNA聚合酶I就位并起始转录。



# RNA聚合酶I的转录起始

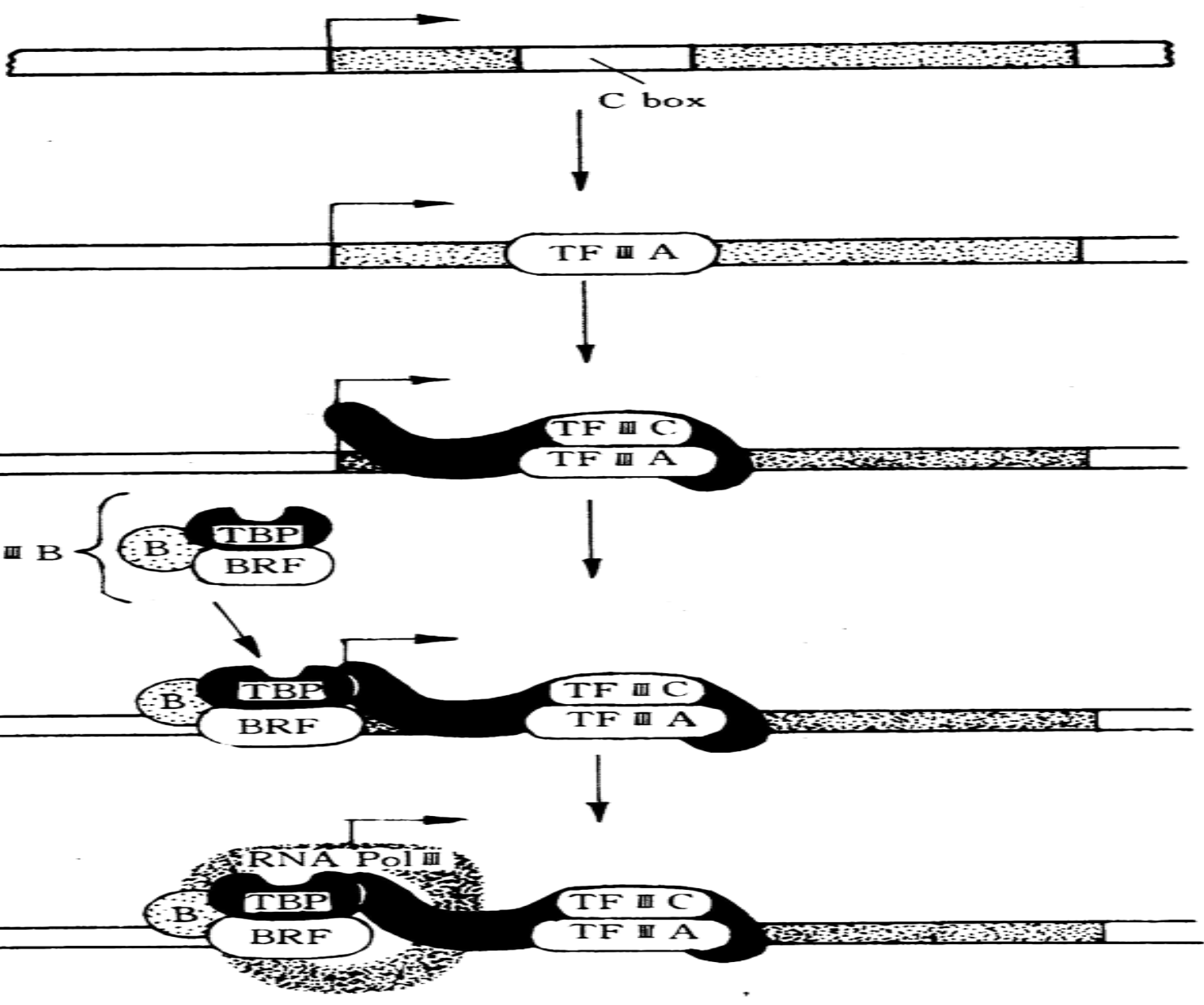
## ④ RNA聚合酶III的转录起始

RNApol III转录的启动子有3种类型：

### ⌚ I型启动子：

启动子位于转录起点下游的基因编码序列之中。

例如爪蟾卵母细胞的5SrRNA基因启动子位于基因+55- +80核苷酸序列。



TFIIIA与启动子结合

多亚基的TFIIIC加入

三个亚基的TFIIIB与上游转录起始点周围结合

TFIIIB中的TBP与pol III结合，就位。

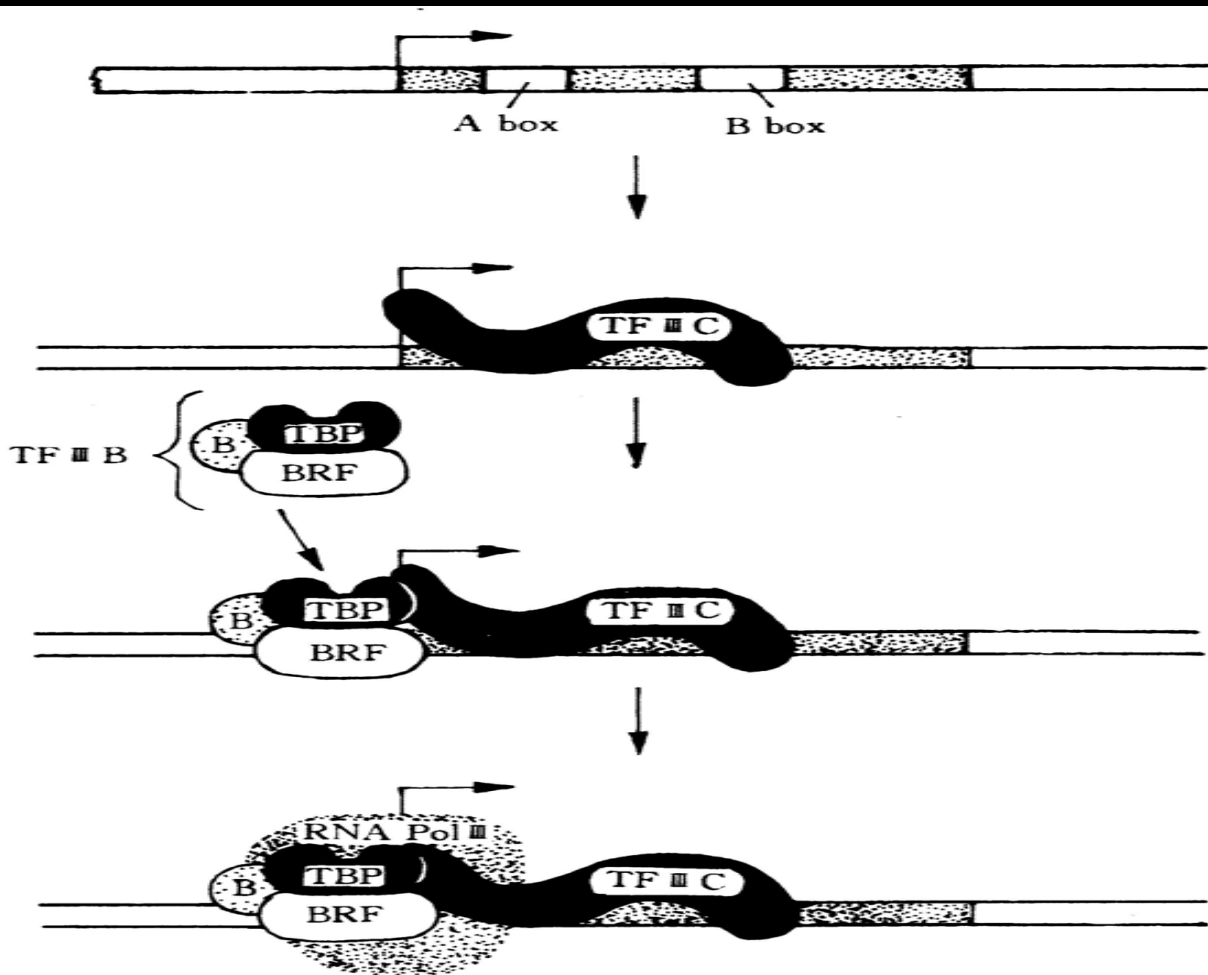
# I型启动子的转录起始





## II型启动子:

存在于tRNA基因中，位于转录起点下游的基因编码序列之中，分为两个区域。



A盒编码二氢尿嘧啶环，  
B盒编码T $\psi$ C环。

转录起始时，先由  
TFIIIC识别并结合B盒，  
同时延伸结合到A盒。

接着是TFIIIB结合  
在转录起点周围，

RNA聚合酶III就  
位并起始转录

## ① III型启动子:

与RNA聚合酶II转录的基因启动子类似。

如U5RNA，转录起点上游有TATA盒及上游元件

PSE（启动子近侧序列元件）和OCT（八聚体结合蛋白）。转录起始可能通过

① TBP复合物识别并结合TATA盒，

② 一些转录因子及其复合物识别并结合上游元件

③ RNA聚合酶III就位并起始转录。

## ⑤ RNA聚合酶 II 的转录起始

核心启动子 = Inr + TATA盒

起始子 (Inr) : PyPyCAPyPyPyPyP (A<sup>+</sup>)

TATA盒: TATAAATA, 中心位置-25。

# 转录因子:

包括TFIIA, B, D, F, J, H

TFII A: 识别与DNA结合的TFII D;

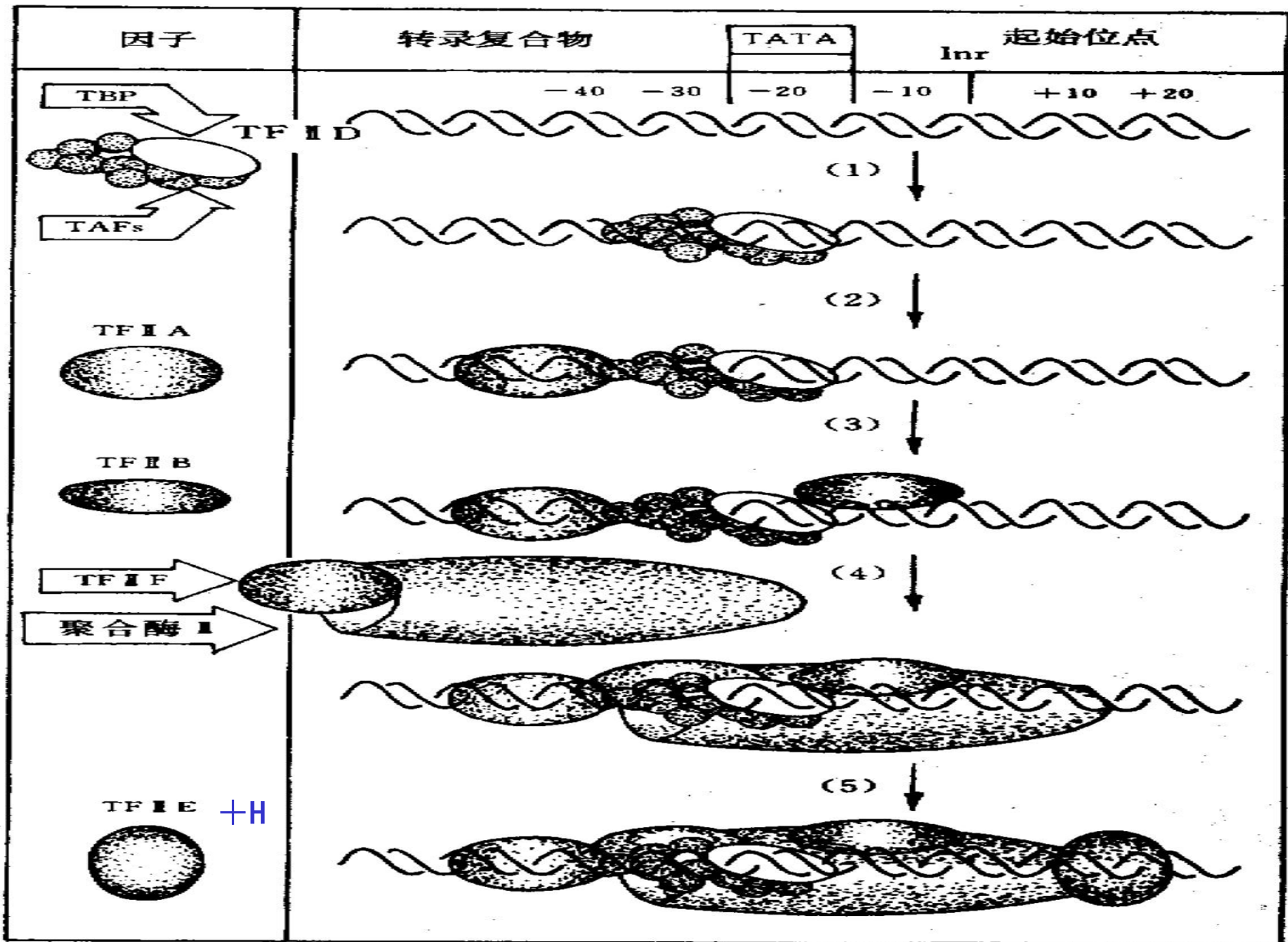
TFII B: 识别与DNA结合的TFII D, 并覆盖到  
-10位, 提供与RNAPol II结合的表面;

TFII D: 含TBP和TAFs, TBP结合TATA盒, 覆盖  
-45--10;

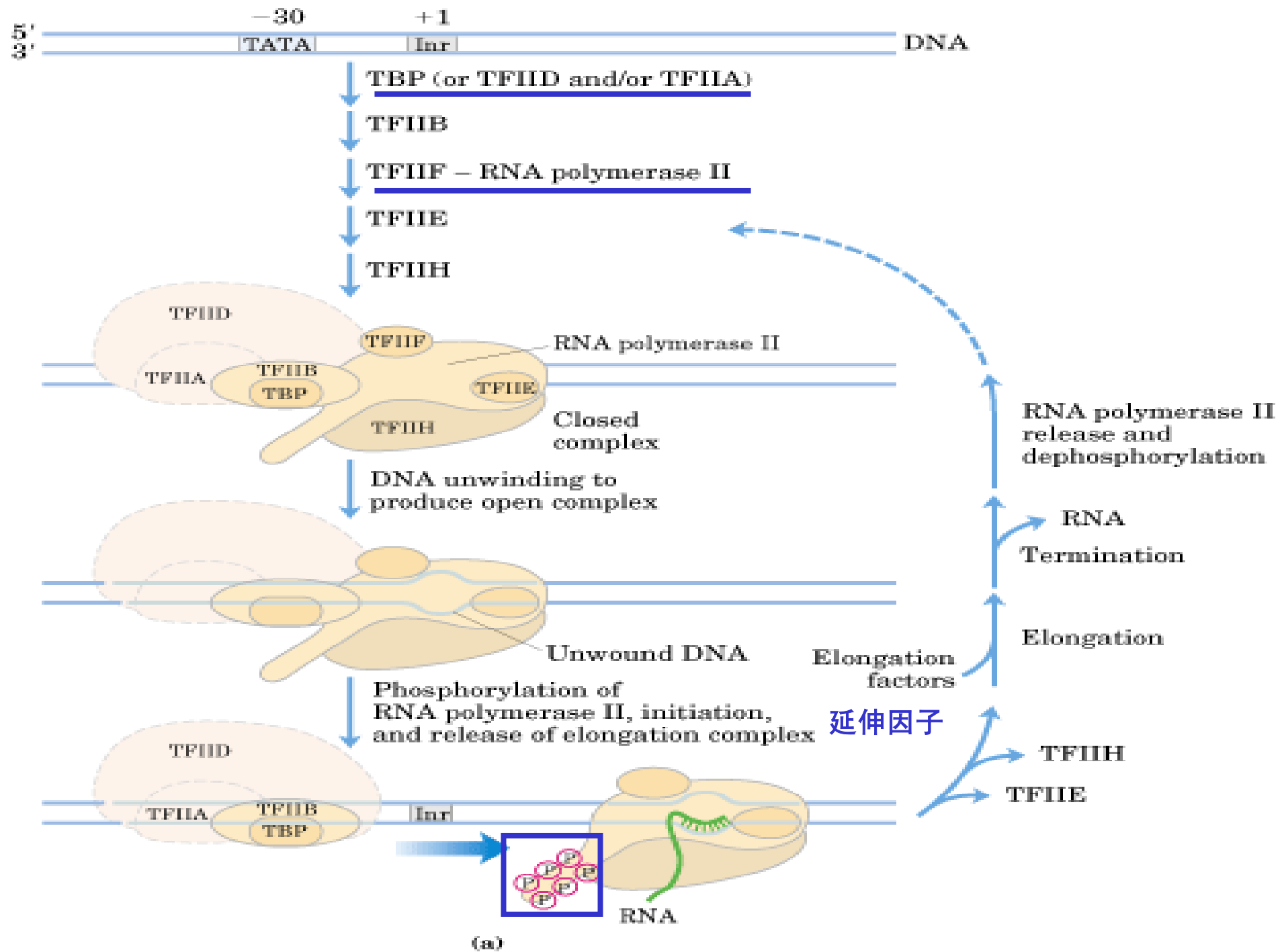
**TFII F:** 与RNA pol II形成复合物，再与  
TFII B结合；TFII F大亚基有解  
链酶活性，小亚基有细菌 $\sigma$ 同源性

**TFII E和TFII J:** 参与RNAPol II就位后的  
转录起始；

**TFII H:** 解链酶、ATP酶和蛋白激酶活性，可使RNA pol II 最大亚基的羧基端功能域（CTD）磷酸化，使RNA pol II能离开核心启动子进入延伸阶段。因此，TFII H有原核生物中 $\sigma$ 因子的功能。



RNA聚合酶 II 的转录起始





TATA盒的核心启动子中，TATA盒与Inr之间的距离是固定的，因此TBP与TATA盒的结合，对后续的TF II B的加入，RNA聚合酶 II 的就位以及从固定的位点起始转录十分重要。

少数缺乏TATA盒的核心启动子中，TF IID能与Inr结合，并组装转录起始复合物。由于缺乏TATA盒，转录起始点并不固定，可从Inr中任一位核苷酸开始。

## (二) 真核转录起始的调控

在体外：

真核启动子 = 核心启动子 + 一般因子：基因转录

在体内：

真核启动子 = 核心启动子 + 上游元件（包括应答元件） + 转录因子（包括上游因子及可诱导因子）。

上游因子：促进转录起始复合物的装配，使转录达到足够的水平。

**可诱导因子：**与某些基因启动子中的应答元件结合，特异地提高转录起始复合物在核心启动子处的装配和转录起始效率，从而决定这些基因的时间及空间表达模式。

**增强子：**增强启动子的作用。可位于启动子的上游、下游或基因之中，可隔几个kb.

# 1. 上游元件与上游因子

真核启动子中，转录起点上游100bp内（有时可超出这一距离）分布着一些较短的特异核苷酸序列，它们统称为上游元件，是上游因子结合的部位。

最常出现于启动子中的几种上游元件及其结合的上游因子

上游元件	序列	上游因子	分布
CAAT盒	GGCCAAT CT	CTF/NF1	普遍
GC盒	GGGCGG	SP1	普遍
八聚体	ATTTGCA	OCT1	普遍
ATF	GTG <sup>T</sup> ACGT	ATF	普遍

CTF: CAAT结合因子; NF1: 核因子1; SP1: 分泌蛋白1;

OCT1: 八聚体结合蛋白1; ATF: 活化转录因子

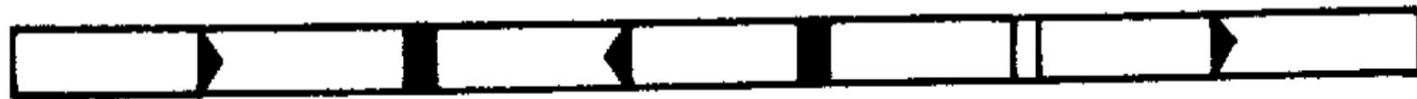
# 对于启动子：

- 不是每一启动子都有各种不同的上游元件；
- 各种元件“混合匹配”，组织在一起，对启动子作贡献。
- 元件在启动子中的数目、分布及方向有差别。
- 一种上游元件可被一种以上上游因子识别，  
一种上游因子又能识别一种以上的上游元件

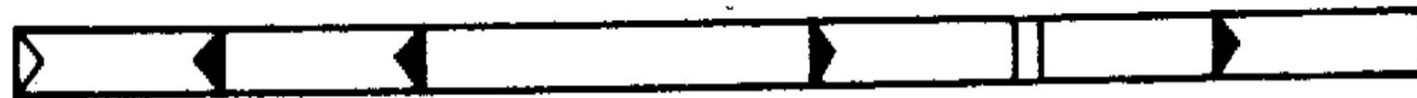
SV40 早期



胸腺嘧啶  
核苷激酶



组蛋白 H2B



-140   -120   -100   -80   -60   -40   20



▶   ◀   ■   □  
八聚体   CAAT   GC   TATA

常见启动子上游元件的混合匹配

## 2. 应答元件与可诱导因子

**应答元件：** 一些较短的特异的DNA序列，  
一般分布在转录起点上游-200bp范围内。  
常为单个，但有时也有多拷贝。

应答元件与可诱导因子的结合，能促进起始复合物在核心启动子周围的组装。



# 常见的应答元件及可诱导因子

应答元件	序列	可诱导因子	诱导因素
热休克蛋白元件(HSE)	CNNGAANNTCCNNG	热休克转录因子(HSTF)	热休克
糖皮质激素反应元件(GRE)	TGGTACAAATGTTCT	糖皮质激素受体	糖皮质激素
血清反应元件(SRE)	CCATATTAGG	血清反应因子(SRF)	血清
佛波酯反应元件(TRE)	TGACTCA	AP1	佛波酯

可诱导因子的表达或活化受内源或外源诱导因素的调控。

某些基因的启动子中有一种以上的应答元件，能分别与不同的可诱导因子结合，各自独立地行使其功能。这些基因应答一种以上的诱导因素。

### 3. 增强子的结构与功能

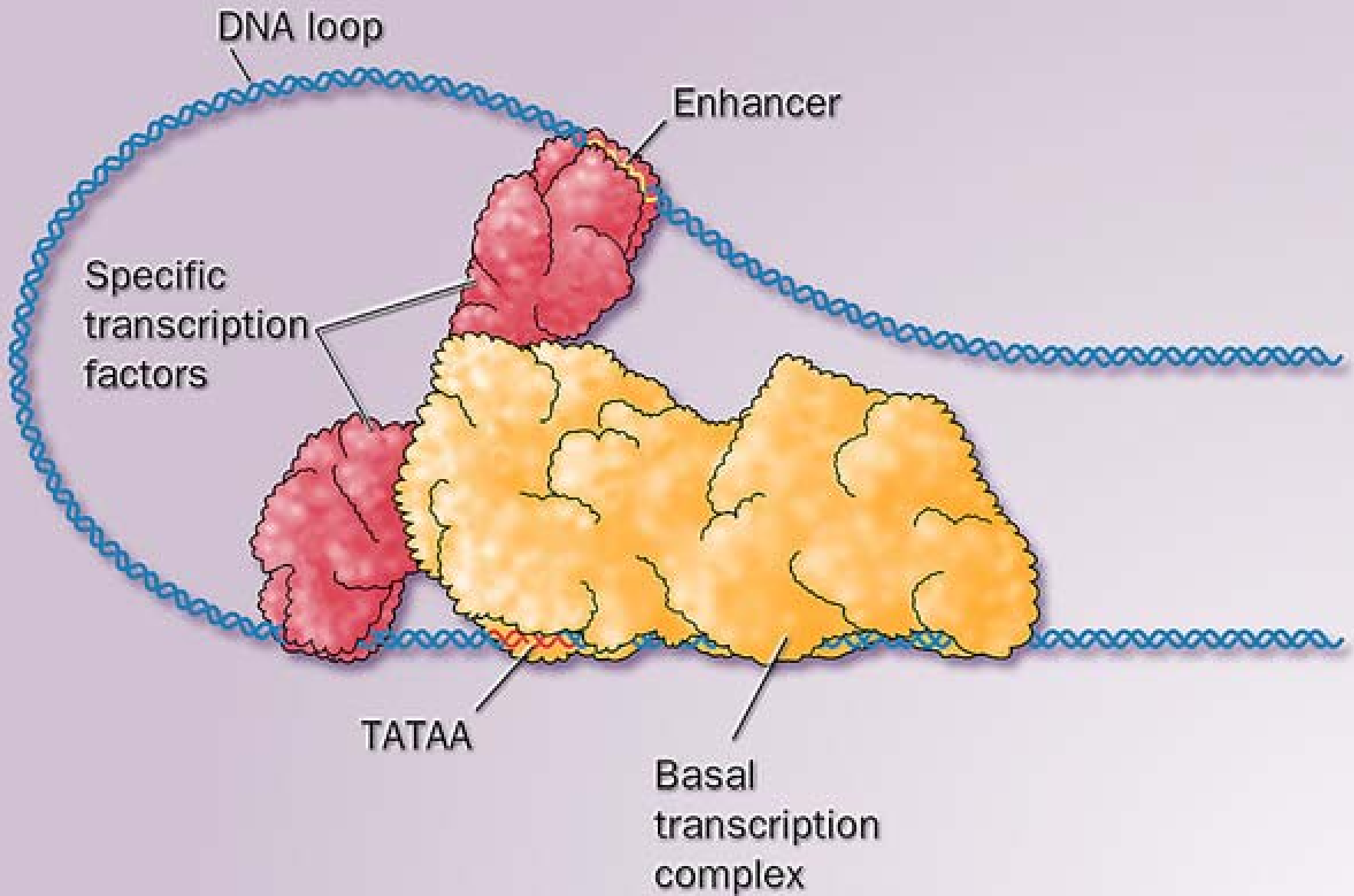
增强子的结构与启动子有类似之处，也是由各种顺式元件组成，有些本身就是启动子中的上游元件或应答元件。

增强子与启动子的上游元件在功能上有**相同之处**：

结合蛋白质因子，通过蛋白质-蛋白质相互作用促进转录起始复合物的装配及转录起始。

**不同之处**：

- ①增强子有远距离调控功能。
- ②增强子与受其调控的基因之间的位置关系是多样的。



## 4. 上游因子与可诱导因子的结构

上游因子与可诱导因子至少有两个功能域：

一个是DNA结合功能域；

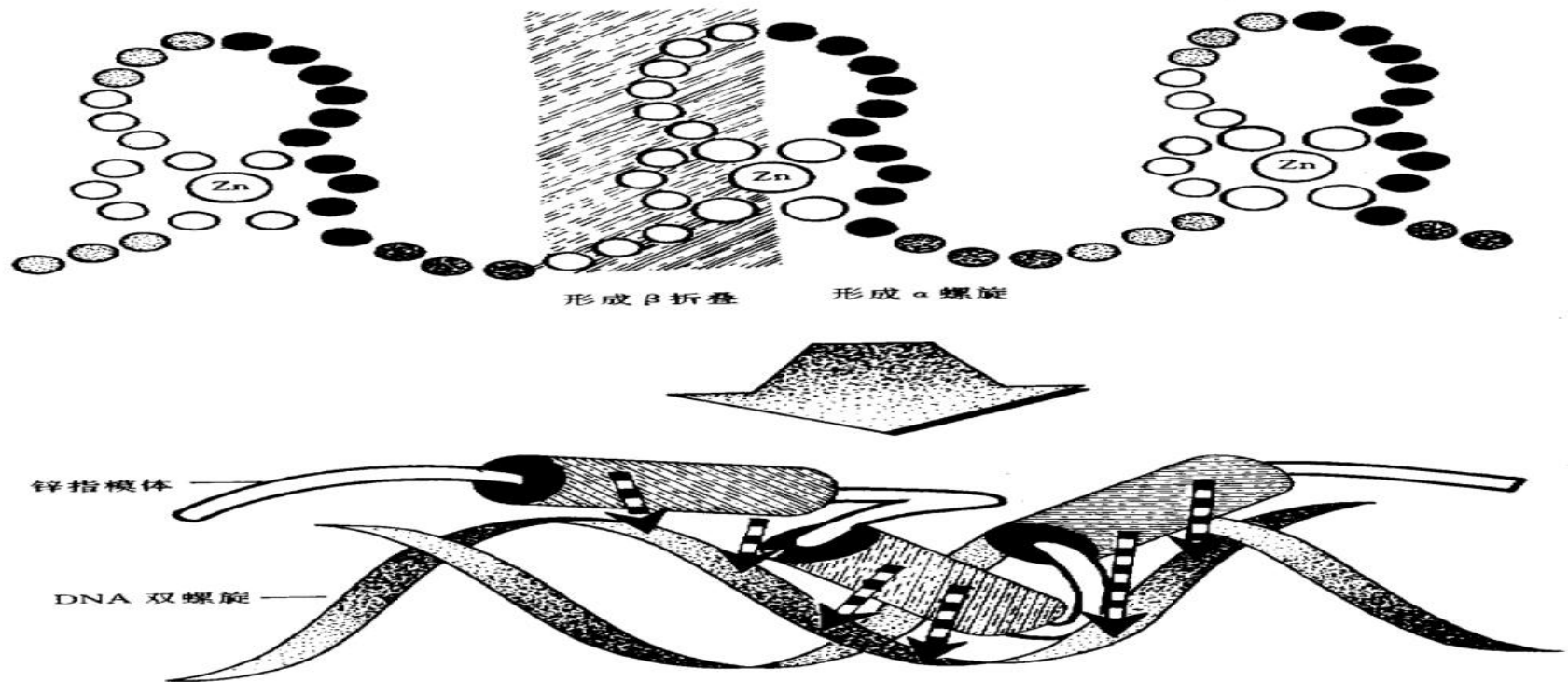
一个是蛋白质-蛋白质相互作用功能域。

DNA结合功能域的立体结构又可称为模体 (motif)，目前已知有以下几种：



# 锌指模体：

由一些保守的氨基酸序列构成，它们能形成突环二级结构，中间包含一个锌离子，故名锌指。锌指模体有几种：



## Cys2/His2锌

是经典的锌指模体。由多个锌指串联在一起，其间有7—8个氨基酸残基分隔。

每个锌指的序列如下式：

Cys-X<sub>2</sub>-4-Cys-X<sub>3</sub>-Phe-X<sub>5</sub>-Leu-X<sub>2</sub>-

His-X<sub>3</sub>-His



## Cys2/Cys2锌指

这种模体中**锌指数目较少**（1-2个）。锌指

**序列为：**

**Cys-X2-Cys-X13-Cys-X2-Cys**

这一类锌指**结合的DNA序列常为较短的回**

**文序列**。如类固醇激素受体。

## C2/C (6Cys+2Zn) :

如酵母转录激活因子GAL4。其中有两个Cys为两个Zn离子共有。

## C2/HC :

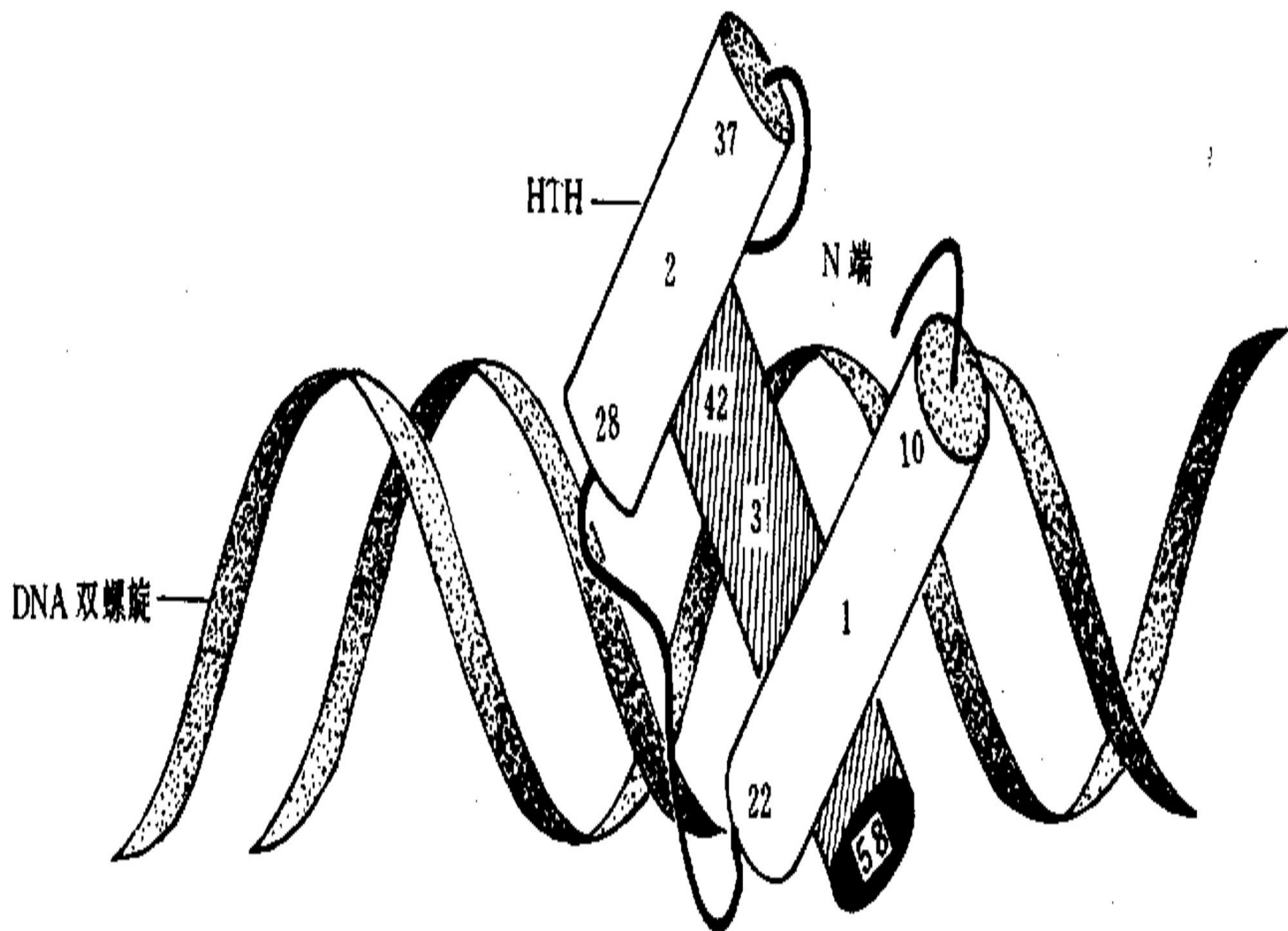
反转录病毒的核衣壳蛋白中。该锌指具有：

**Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys**序列。

## 螺旋-转角-螺旋 (HTH)

由60个氨基酸残基构成，可以形成三个 $\alpha$ 螺旋；

位于C端的第三个螺旋插入DNA的大沟中，第一和第二螺旋与第三螺旋之间有一定的转角，架在DNA表面，第一螺旋的N端与DNA的小沟接触。





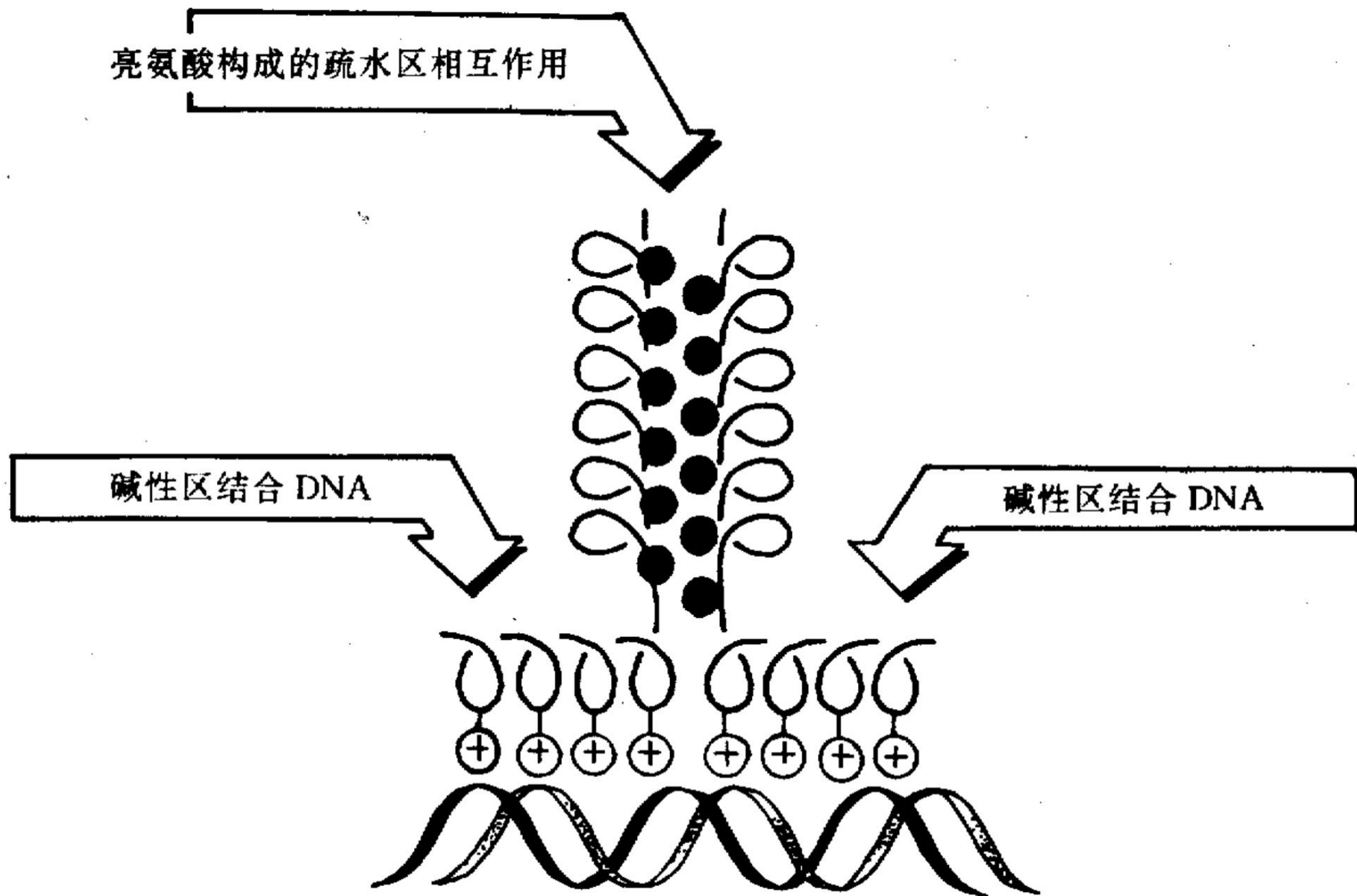
## 螺旋—环—螺旋（HLH）

HLH也存在于调控发育的**转录因子**之中，包含**40—50个氨基酸**，能形成两个 $\alpha$ 螺旋，其间由**突环连接**。

两个 $\alpha$ 螺旋都是**两亲螺旋**。两个相同或相似的HLH模体，可形成同源或异源二聚体。

HLH模体附近往往有一个含**碱性氨基酸**的区域，它是与DNA结合必需的。

# 🔒 亮氨酸拉链模体:



## 5. 染色质活化与转录起始

DNA酶I处理上述染色质，只能分解连接DNA，构成核小体的DNA受组蛋白的保护。

有转录起始的染色质对DNA酶I高度敏感，这表面转录起始部位的染色质结构发生了变化。已知有两方面变化：

◀依赖于能量的核小体解体：某些蛋白因子特异地与转录部位的核小体作用，水解ATP供能使核小体的组蛋白解体。

◀核小体结构重排：转录因子与组蛋白或非组蛋白作用，使核小体发生位相变化，暴露出转录因子的结合位点，促进转录。



某些基因的转录起始除了受启动子和增强子的调控外，还受到局部调控区域 (locus control region, LCR) 的调控。

**LCR:** 一种顺式元件，可调控一组基因的转录，对DNA聚合酶I高度敏感。

如 $\beta$ 珠蛋白基因家族 $\epsilon$ 基因上游20kb处有5个LCR调控区。

## 6. 甲基化与基因转录

脊椎动物基因组中CpG序列约占GC含量的20%，它们在基因组中分布是不均匀的，集中在某些区域，形成CpG岛。CpG序列中胞嘧啶可被甲基化5'-甲基胞嘧啶。

**实验证明：**表达组织中的CpG岛是非甲基化的；而非表达组织的CpG岛是甲基化的。

**甲基化鉴定：**HpaII和MspI为同裂酶，HpaII切割非甲基化的CpG；而MspI则能切割甲基化和非甲基化的CpG。

## （三）真核基因转录终止

### ■ RNA聚合酶I的转录终止

RNA聚合酶I只转录rRNA基因，产物是含有3种主要rRNA的大前体。

RNA聚合酶I转录出大前体3'末端后继续向下游转录超过1000碱基，该处有18bp的终止序列，在辅因子的帮助下，转录终止。核酸内切酶切割产生大前体的3'末端。

## ■ RNA聚合酶III的转录终止

RNA聚合酶III有内源性的转录终止功能，可识别终止子，使转录终止。

终止子是位于GC丰富序列之中的TTTT。

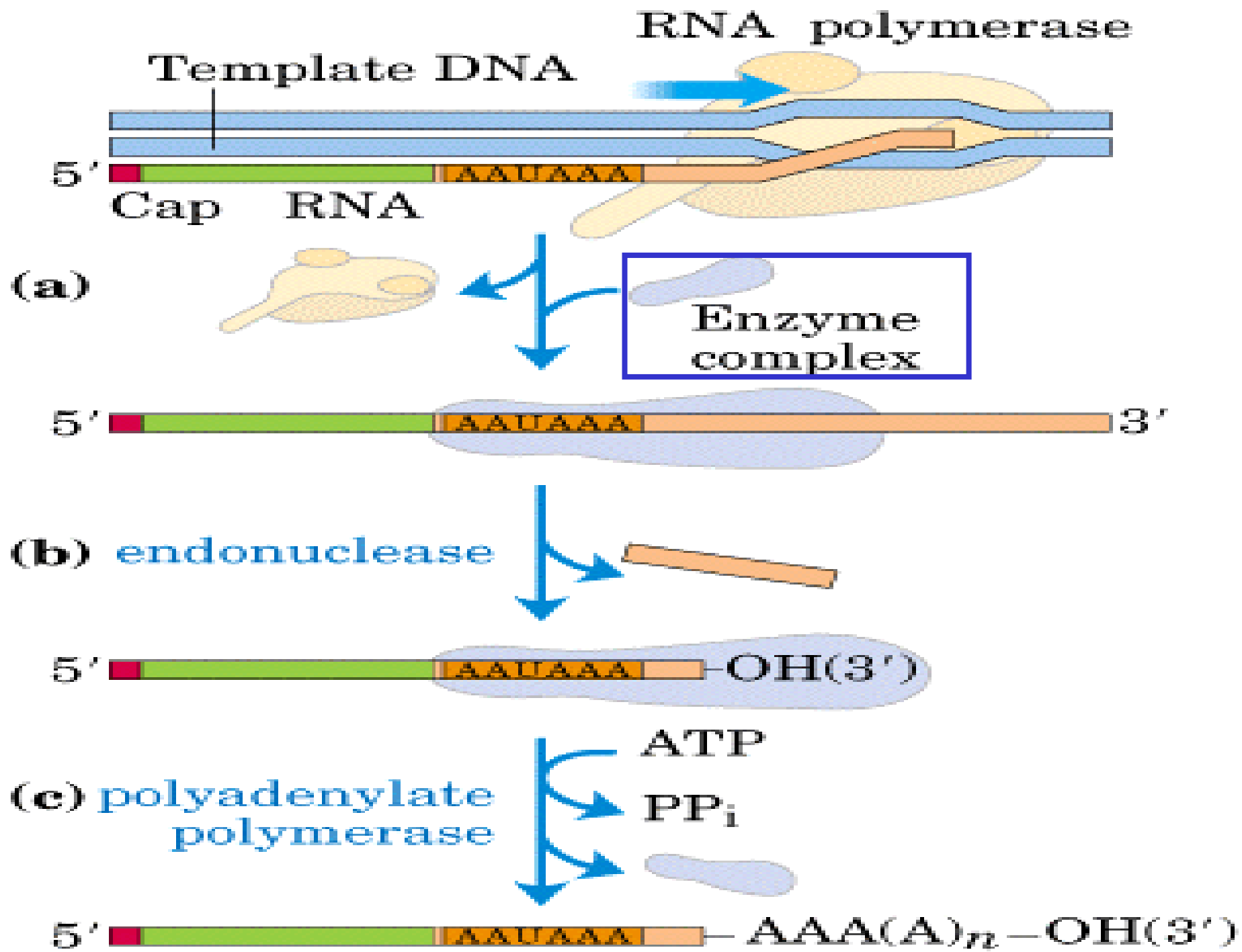
终止位点一般在第二个T，但也可能在第三或第四个T，因此，RNA前体3'端有U序列。

# RNA聚合酶 II 转录终止

① 转录终止与3'末端的产生：

绝大多数mRNA 3'端有polyA尾巴，但基因3'端并无polyA序列。

当RNA聚合酶 II 转录出AAUAAA（加尾信号）后，在核酸内切酶的作用下，切下3'末端，添加poly A.



具体的作用过程：

切割/聚腺苷酸特异因子（CPSF）能识别加尾信号，并与之结合。

在CPSF及其他因子的指导下，如切割活化因子（CstF），特异的核酸内切酶在AAUAAA下游11-30核苷酸处，切断RNA链，腺苷酸多聚酶（PAP）在新生的3'末端添加腺苷酸。分两阶段进行：

👁️ P<sub>AP</sub>在指导下合成含10个腺苷酸。

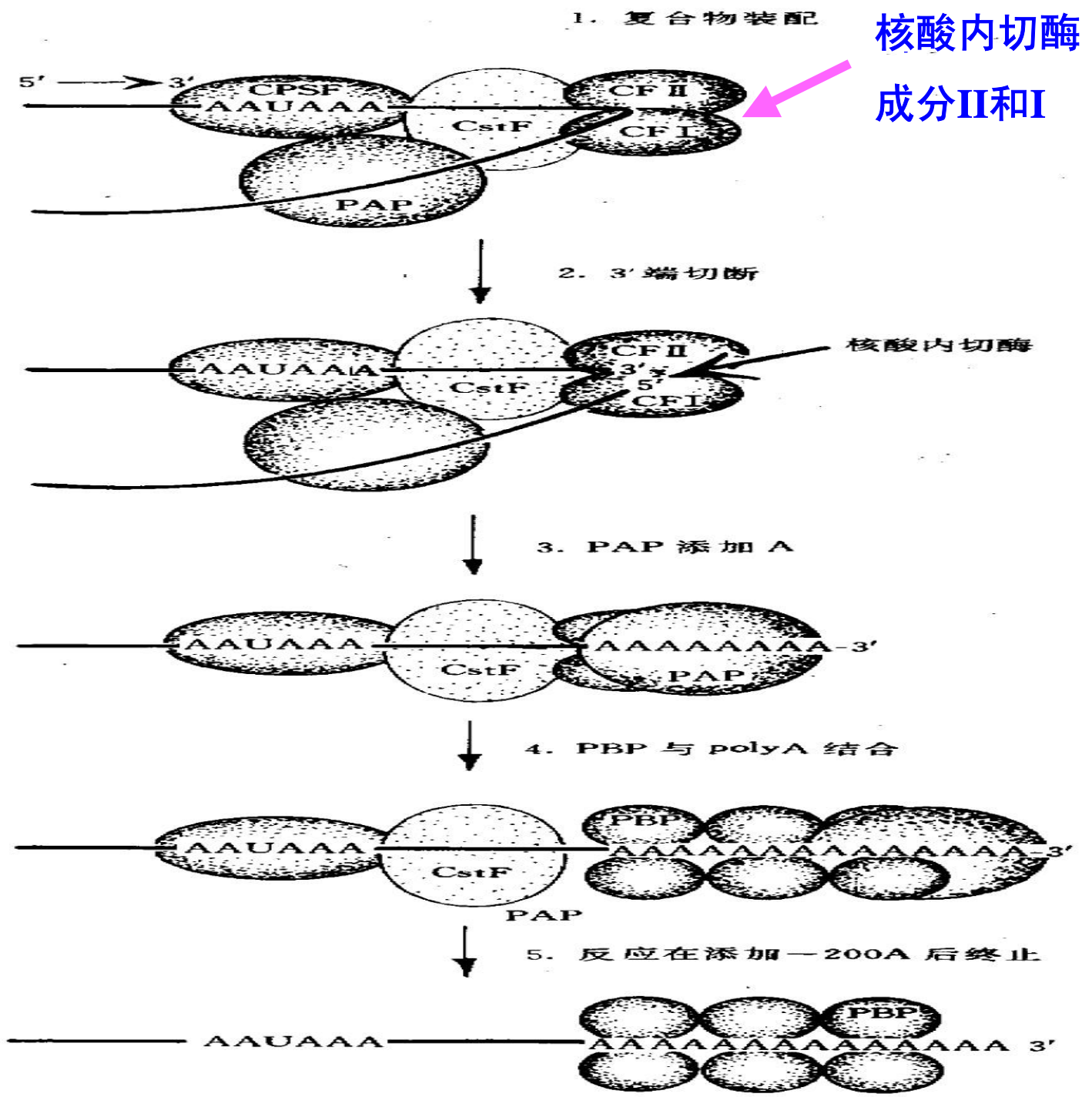
👁️ P<sub>AP</sub>在多聚腺苷酸结合蛋白PBP的激

活下，继续添加腺苷酸直至200个腺苷酸。

PBP的作用：活化P<sub>AP</sub>，与polyA结合  
和控制polyA长度。



# RNA 3'末端的产生和加尾



在加尾的同时RNA聚合酶 II 虽继续转录，但因新生RNA 5'端无帽子而被RNA酶降解，转录终止。

极少数mRNA 3'端并无polyA尾巴，如海胆组蛋白mRNA，3'末端能形成茎环二级结构，其下游能与U7 RNA 5'末端配对形成双链。

特异的核酸酶能在配对处的上游固定的部位切割RNA，产生3'末端。

## ② 3'端加尾与基因表达调控:

加尾也是基因表达调控方式之一。U1A 是 U1核糖核蛋白 (U1RNP) 家族的重要成分, 能与 U1RNA中的七核苷酸保守序列结合。

编码U1A蛋白的mRNA在加尾信号上游也有两处七核苷酸保守序列。

## 三、真核RNA前体的加工

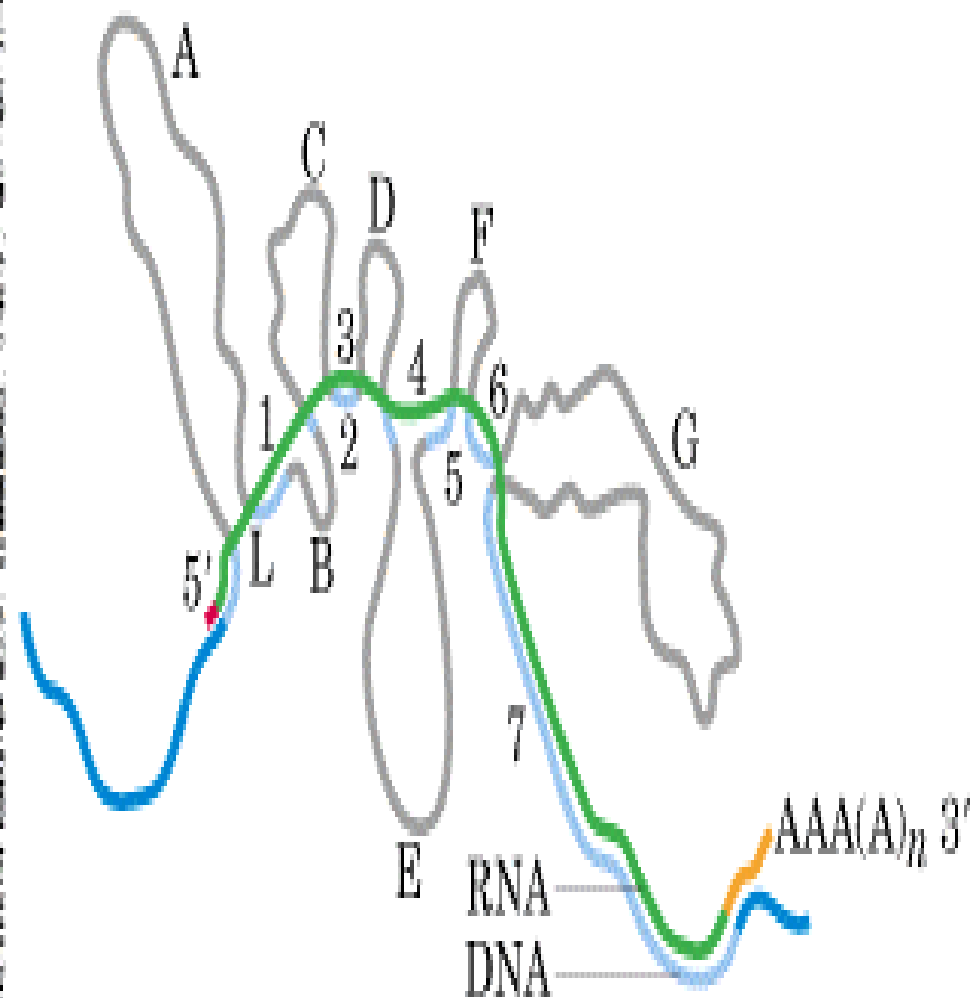
真核hnRNA的加帽、加尾已有介绍，下面介绍真核RNA前体的剪接及RNA编辑。

### (一) RNA剪接

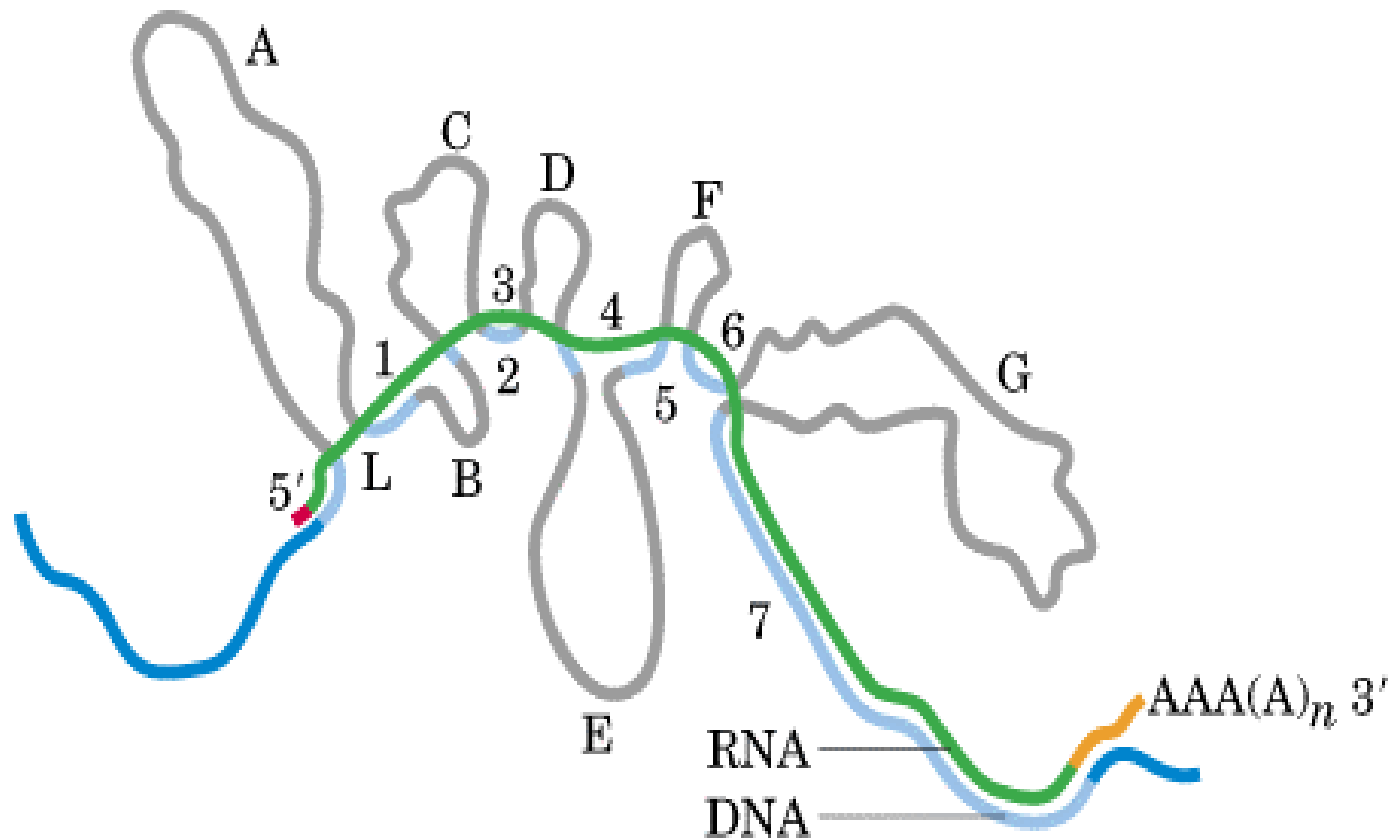
绝大多数真核基因是割裂基因，转录产生的RNA前体经过剪接，去除内含子后才能成为成熟的RNA。



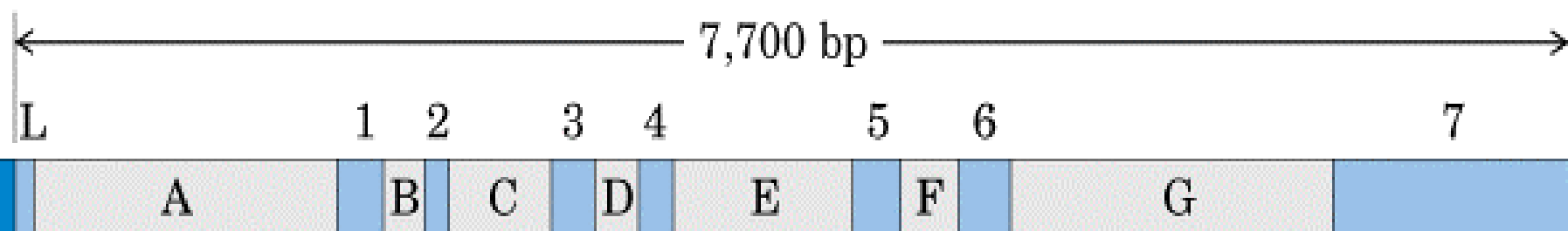
(a)



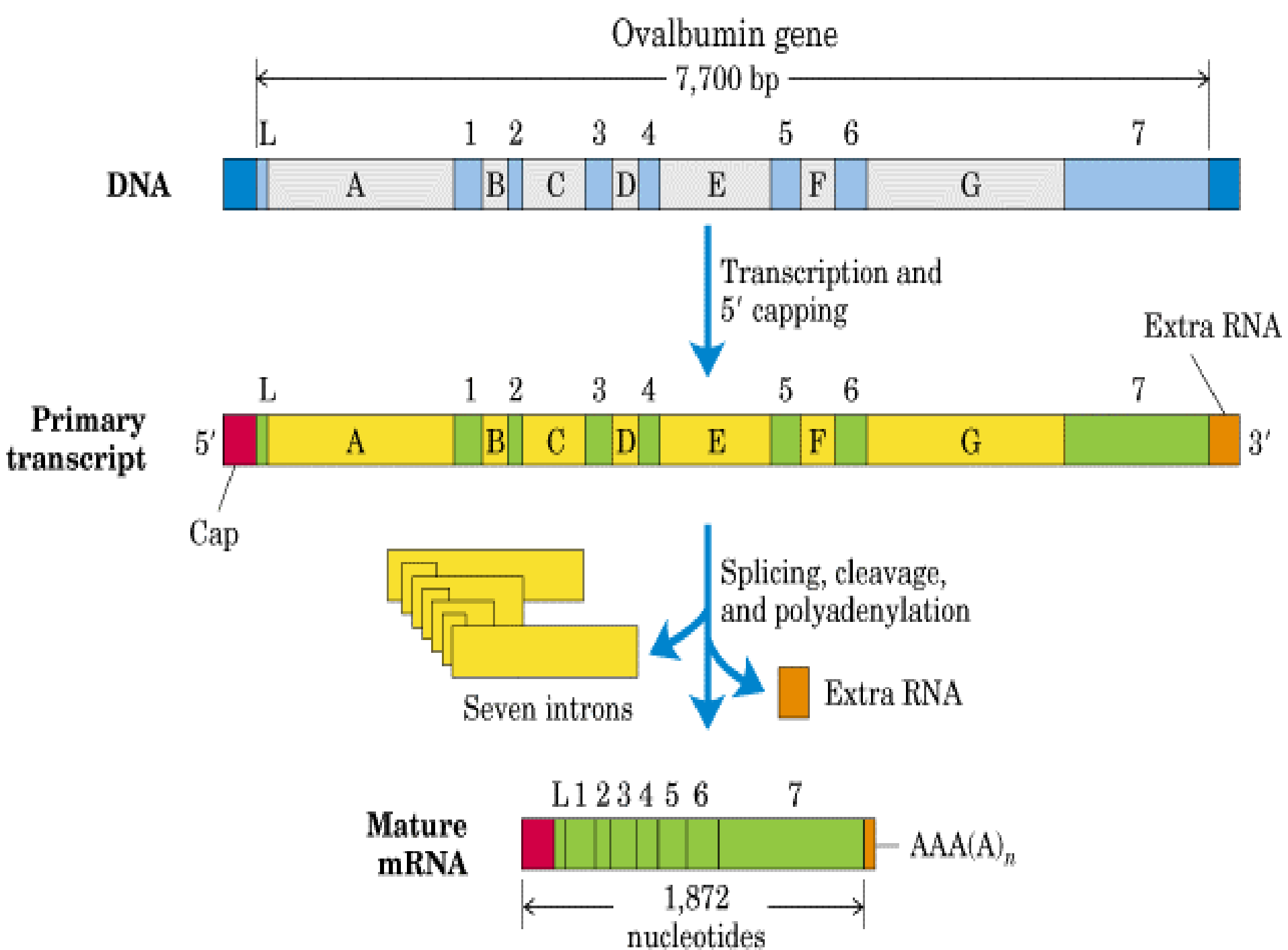
(b)



(b)

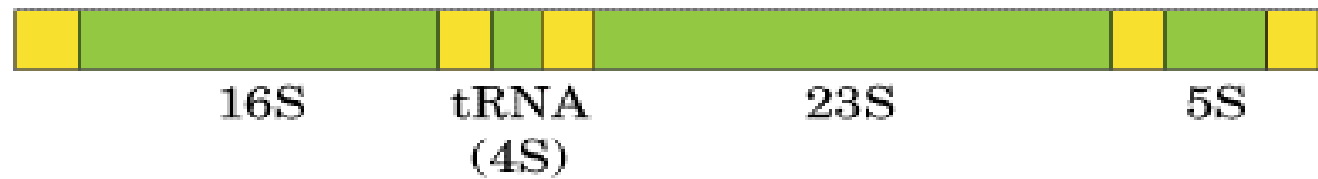


(c)

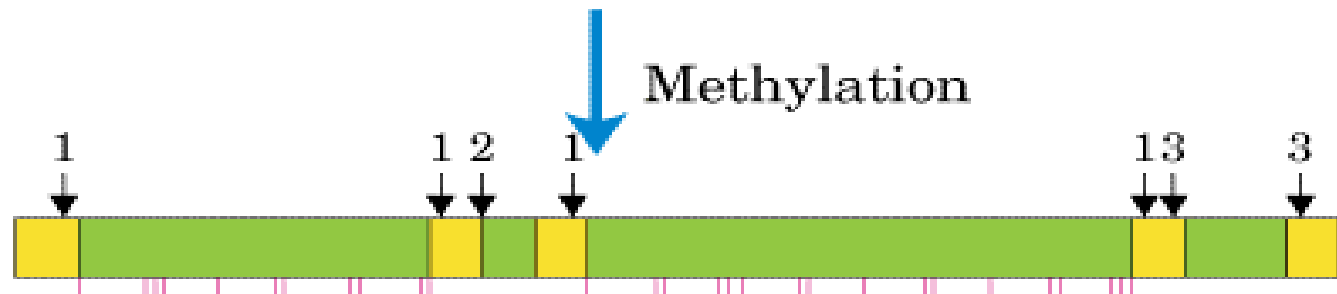


# 原核核糖体rRNA的剪切

Pre-rRNA transcript (30S)



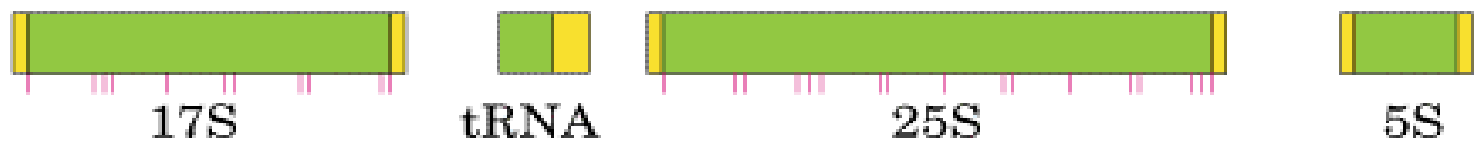
(a)



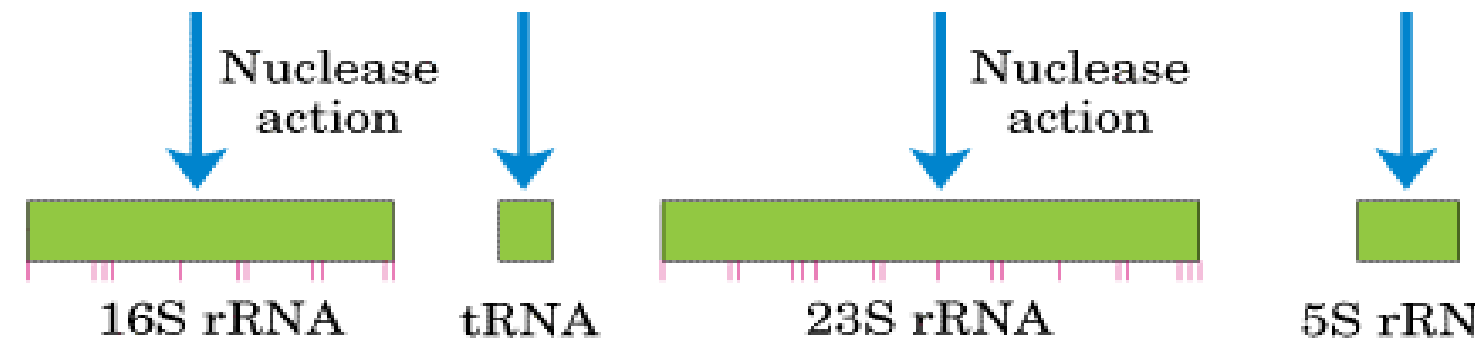
(b)



Intermediates



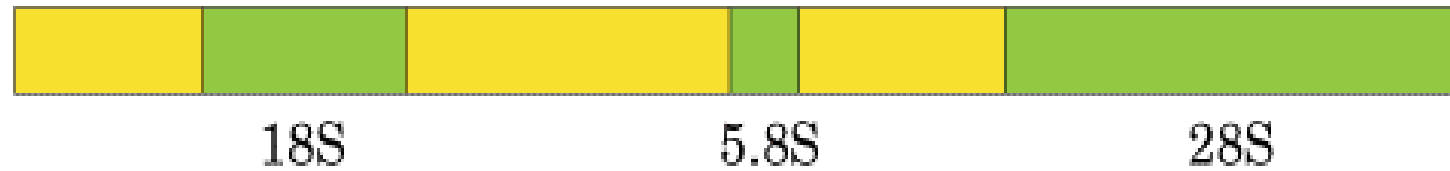
(c)





# 真核核糖体rRNA的剪切

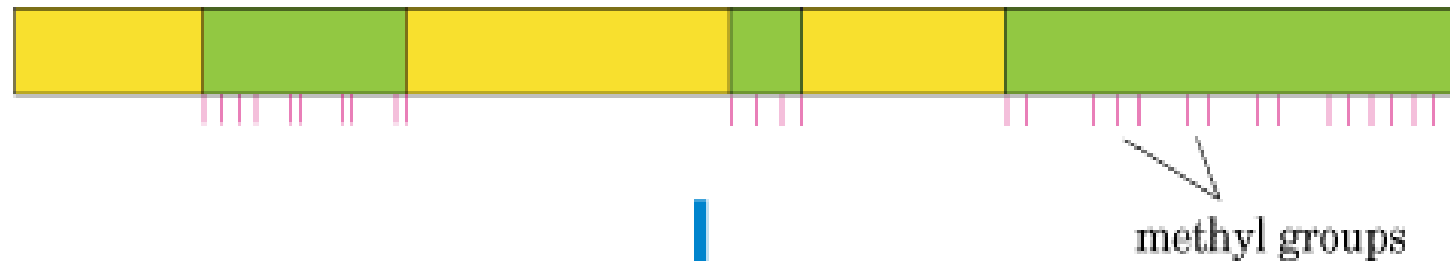
Pre-rRNA  
transcript  
(45S)



(a)



Methylation



(b)



Cleavage

Mature rRNAs



剪接分成两大类：

 通过磷酸酯键的转移反应切除内含子

包括：细胞核内hnRNA的内含子、I型

(group I)和II型 (group II)内含子的剪接，

后两种是靠核酶(ribozyme)活性的自我剪接。

 通过特异的核酸内切酶切割去除内含

子，再由特异RNA连接酶将外显子连接。

# 1、磷酸酯键转移反应

## 回核内hnRNA的剪接

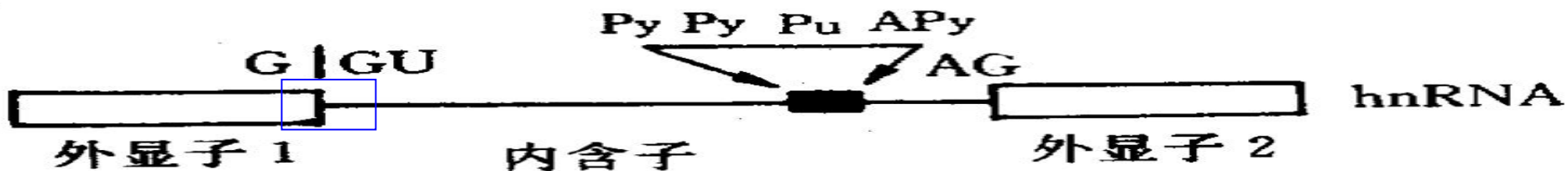
剪接机制：

剪接在保守5'GU和3'AG交界处（GT-AG规则）

。分两步：

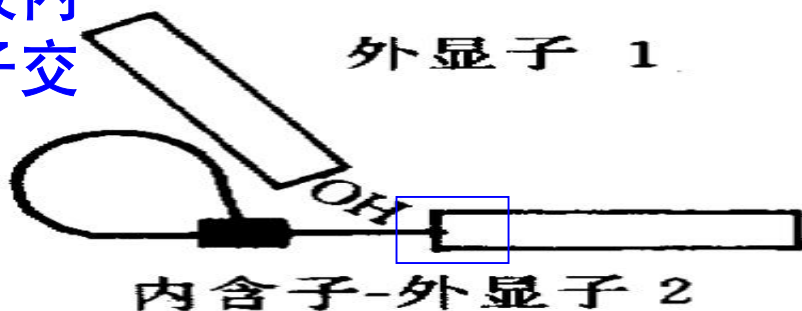
① 内含子分支点中A的2'OH亲核进攻内含子5'端外显子交界处，使外显子的3'端被游离。

② 外显子的3'端OH亲核进攻内含子的3'端外显子交界处，内含子被游离。



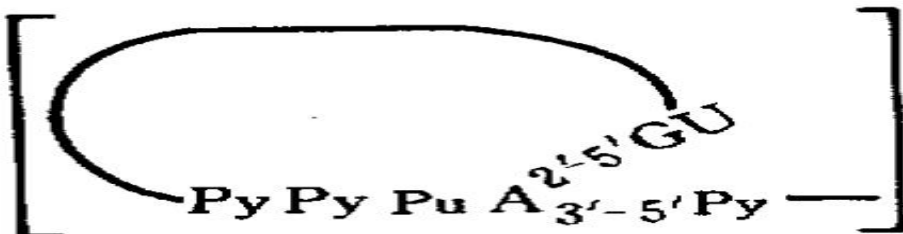
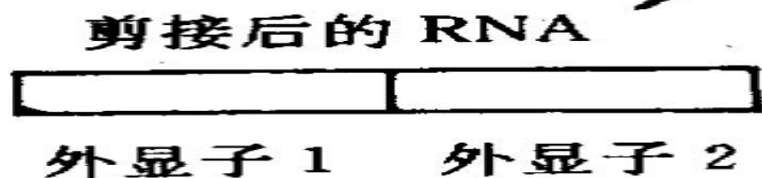
内含子分支点中A的2'OH亲核进攻内含子5'端外显子交界处，

反应 1



外显子的3'端OH亲核进攻内含子的3'端外显子交界处

反应 2

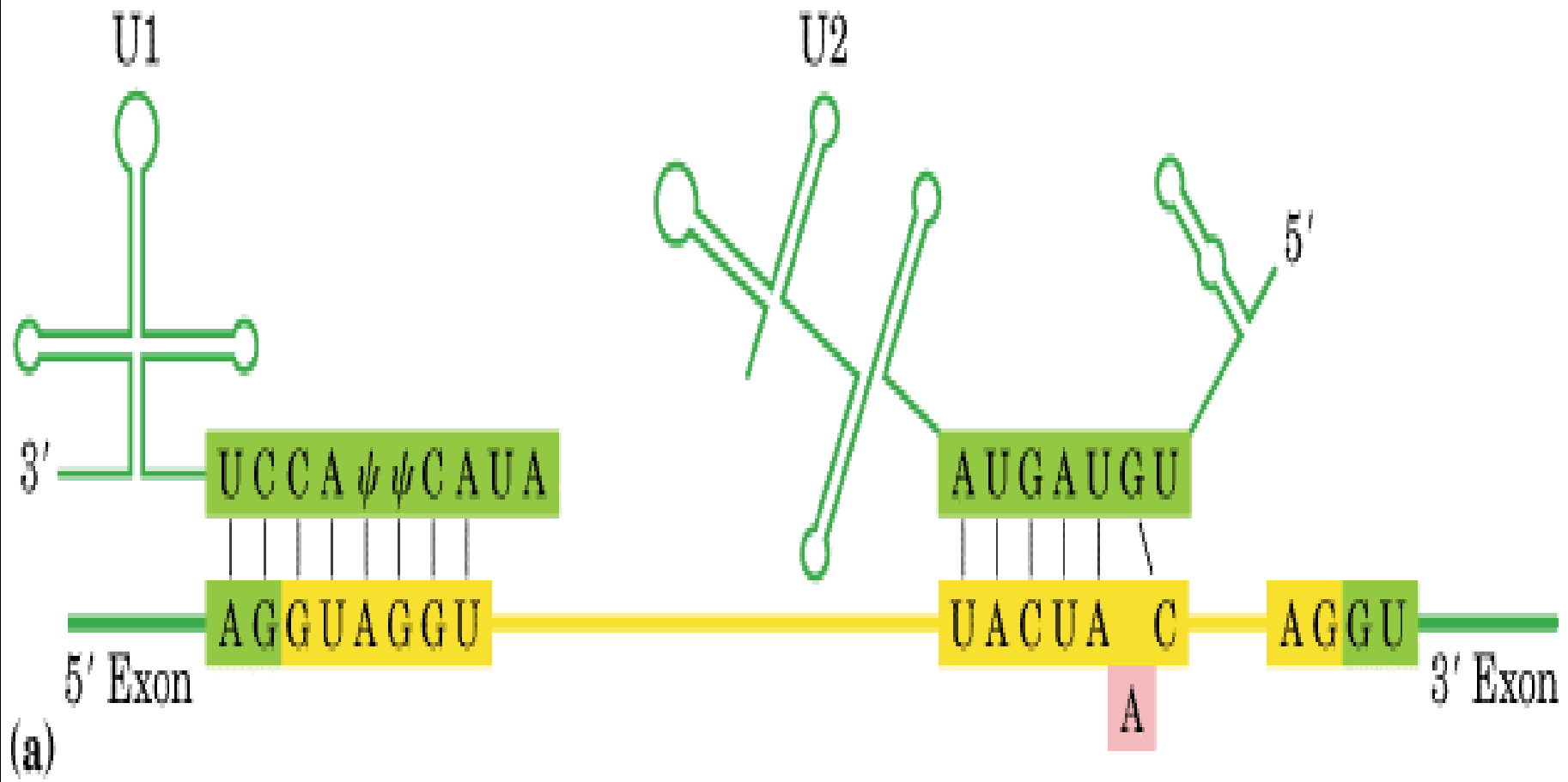


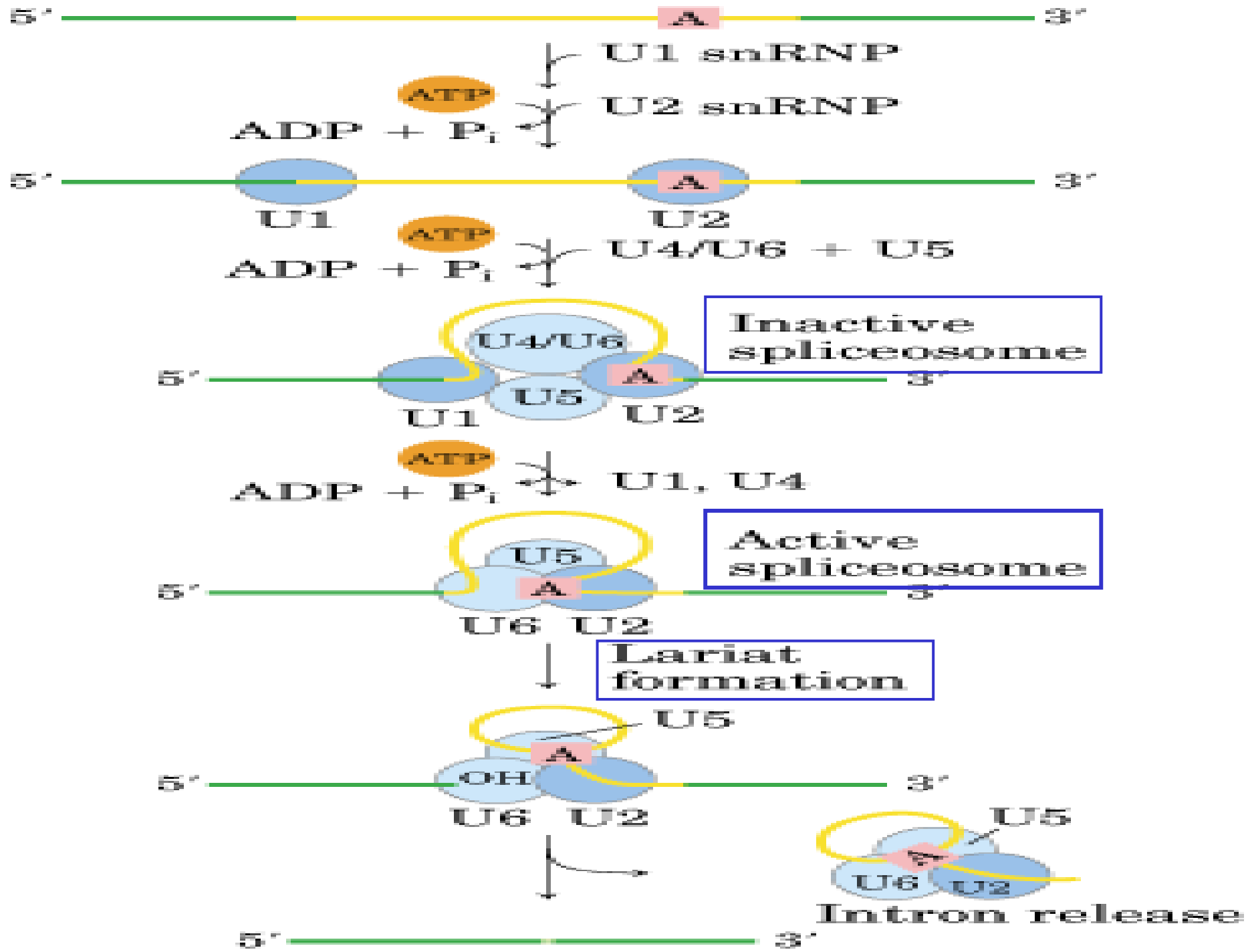
磷酸酯键转移反应除去内含子

上述磷酸转移反应是在**剪接体内**进行。

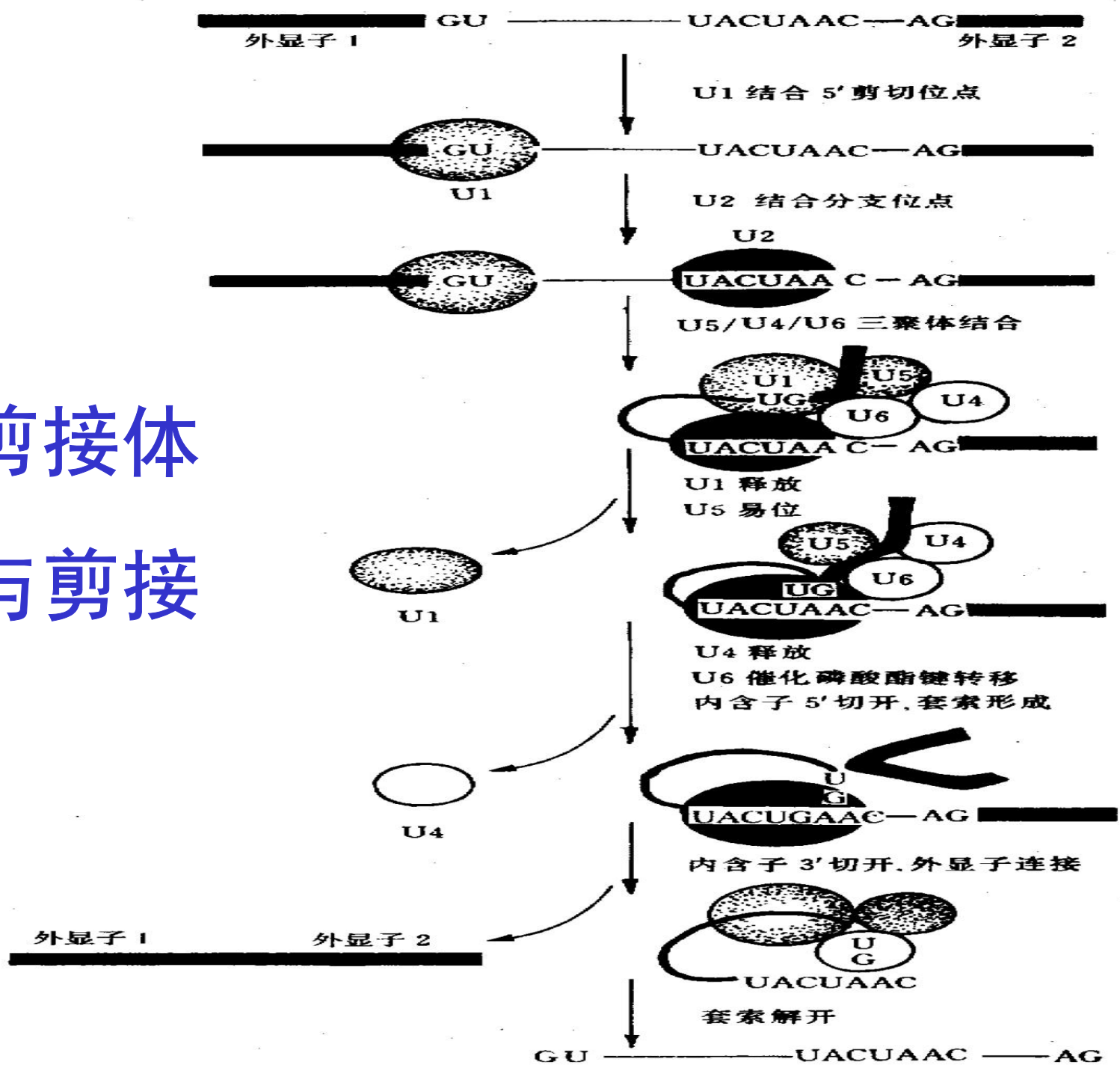
**剪接体**：剪接体 (spliceosome) 是由 snRNA 和多种蛋白因子在外显子与内含子交界处及分支点周围组装形成的复合体。

以酵母为例：U1RNA和U2RNA可分别与内含子5'端和分支点周围的碱基配对，使相应的URNP与之结合，过程需水解ATP。





# 剪接体 与剪接





# 说明：

- # 存在多个剪接位点时，一个位点剪接成功，诱导结构变化，暴露新的剪接位点。
- # 精确的识别可能与SR蛋白相关（富丝/精氨酸蛋白）。

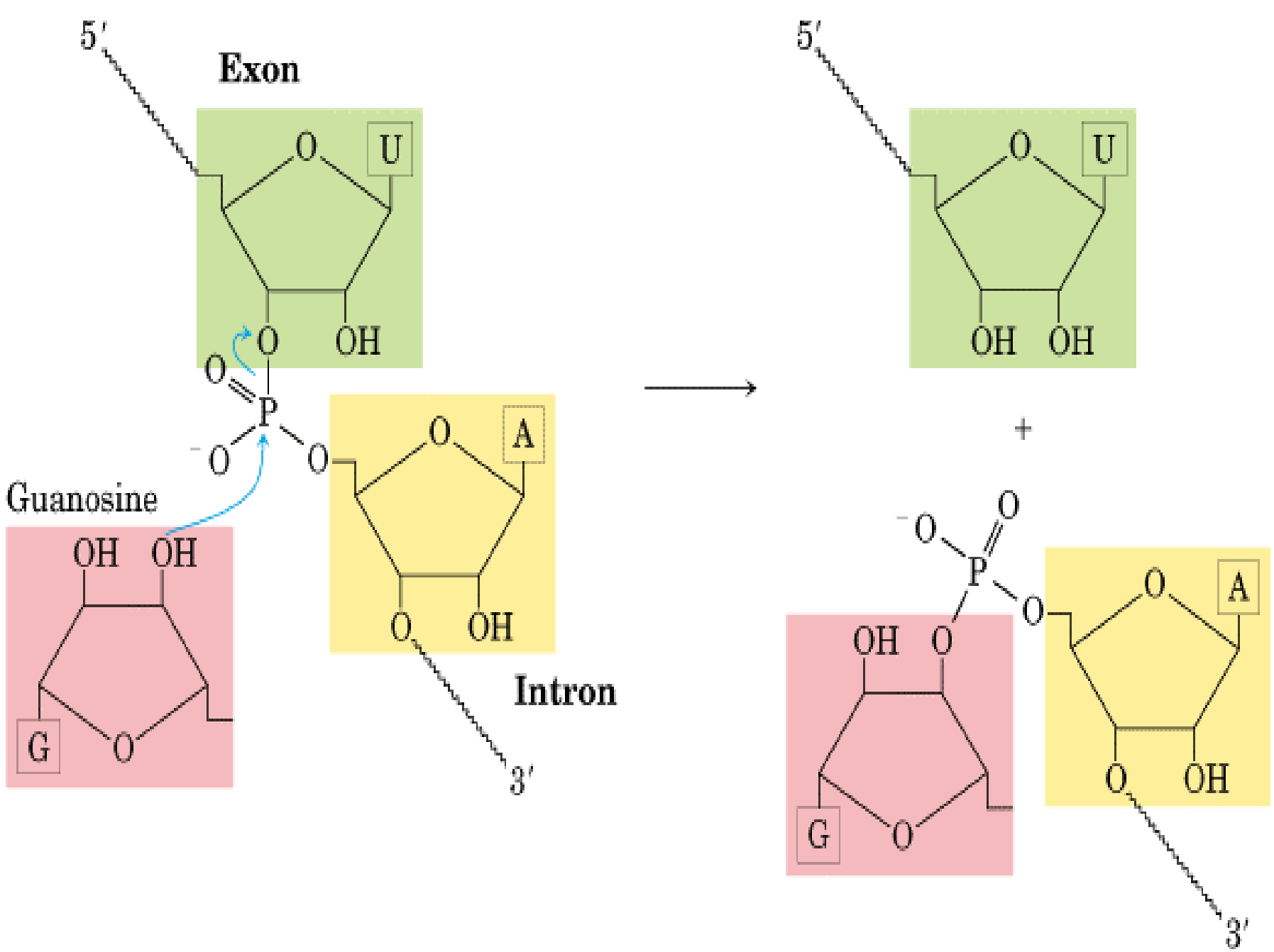
## 回 II型内含子的自我剪接

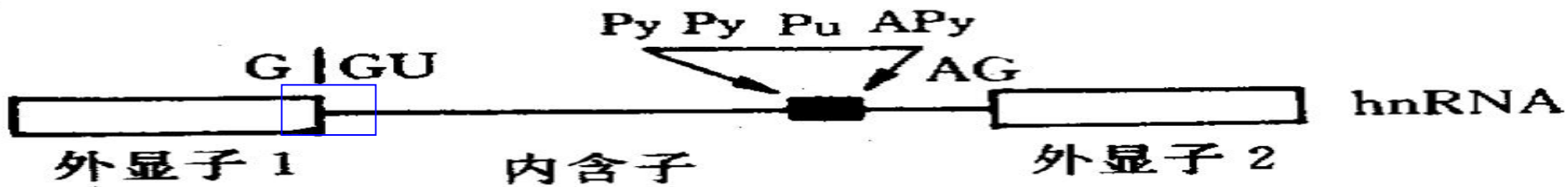
II型内含子存在于真核细胞器的基因中。

剪接方式同核内hnRNA内含子相同，经过两次磷酸酯键转移反应切除内含子，被切除的内含子呈套索状。

在体外：不需要剪接因子及补充能量；

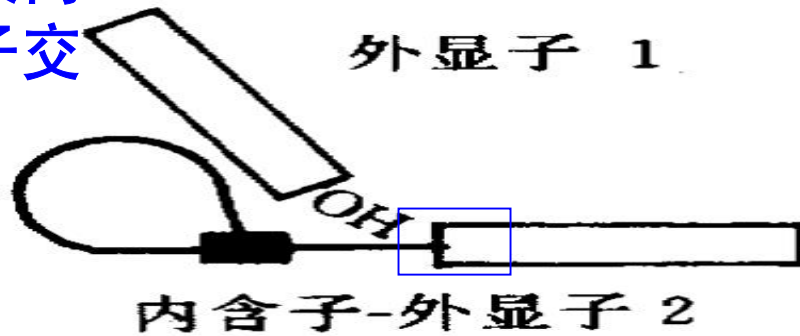
在活体：剪接有蛋白质因子的辅助。





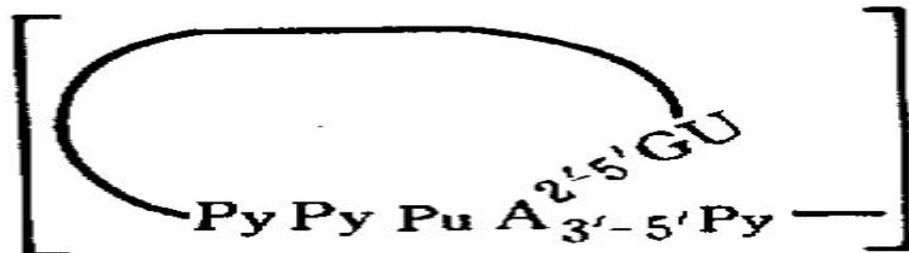
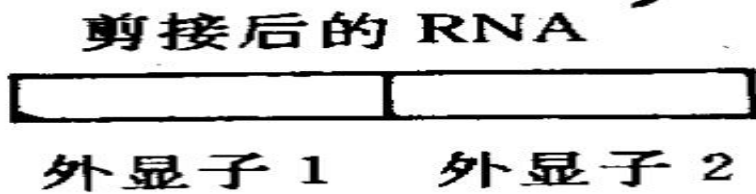
内含子分支点中A的2'OH亲核进攻内含子5'端外显子交界处，

反应 1



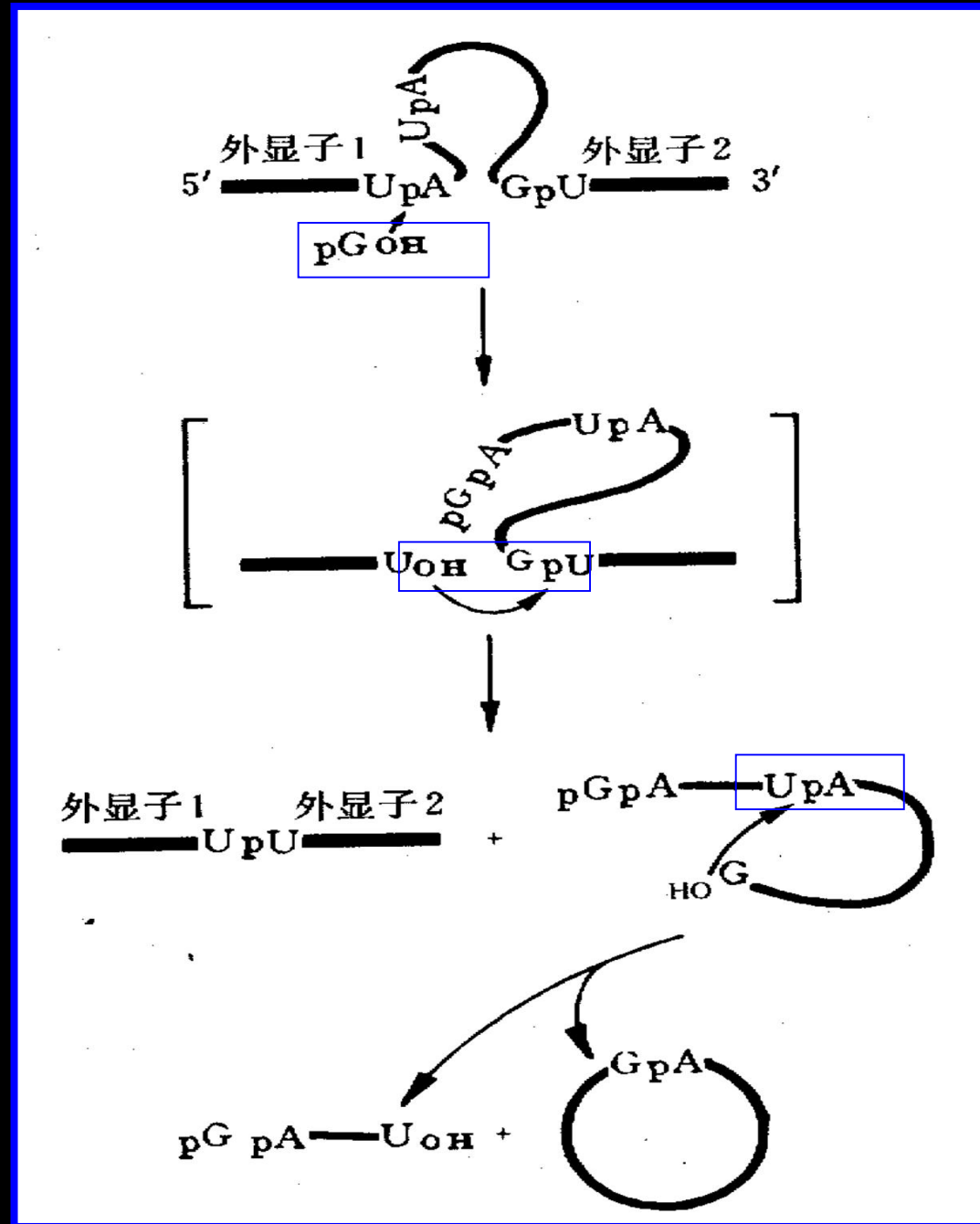
外显子的3'端OH亲核进攻内含子的3'端外显子交界处

反应 2



# 回 I 型内含子的自我剪接

存在于真菌线粒体基因和低等真核生物的细胞核 rRNA 基因之中。四膜虫 rRNA 前体内含子的剪接最清楚。



## 2. tRNA前体的剪接

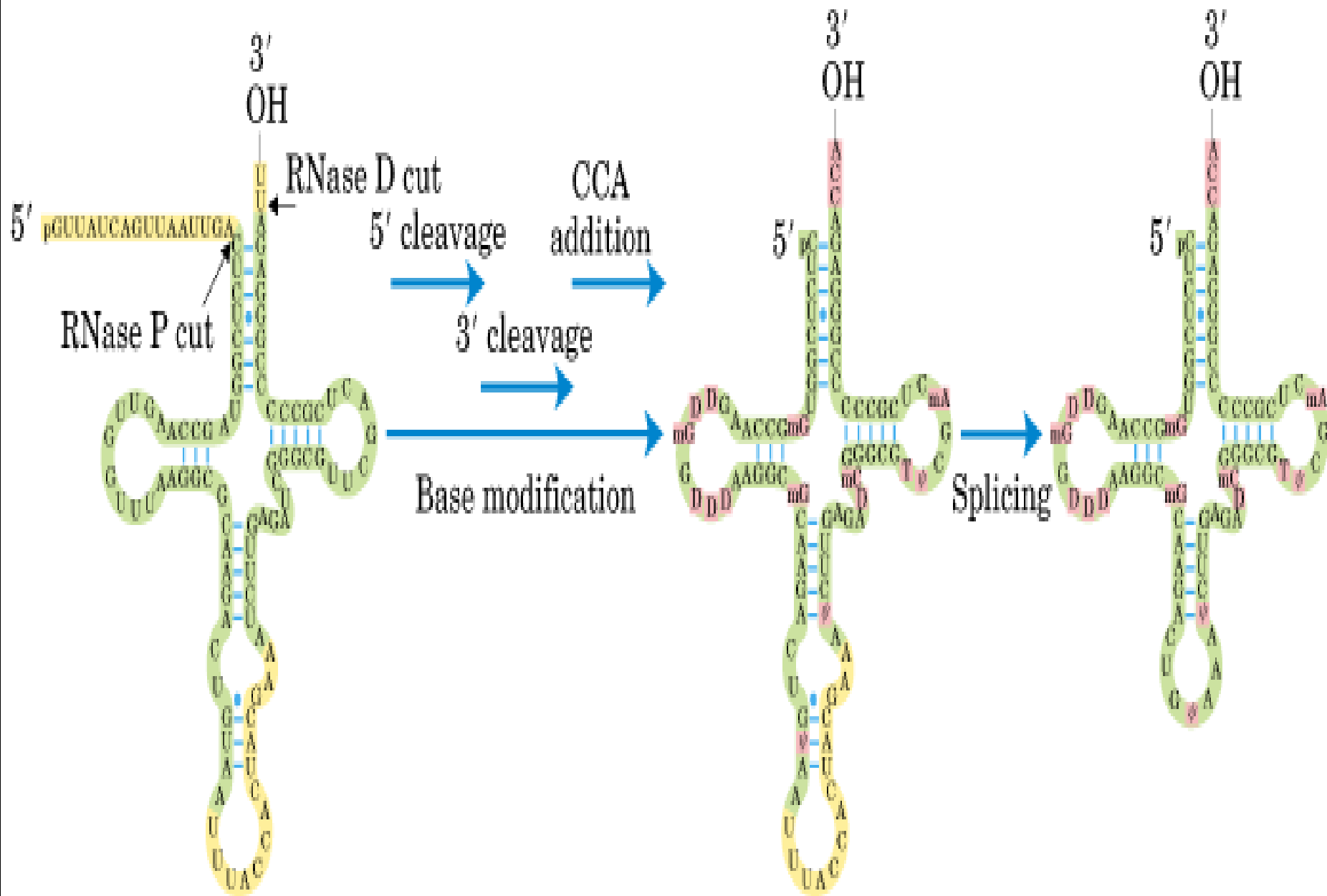
tRNA前体的剪接包括：5'端的剪切，3'端CCA的增加，内含子的切除。

如<sup>Tyr</sup>-tRNA前体的剪接。

# Primary transcript

# Intermediate

# Mature tRNA<sup>Tyr</sup>

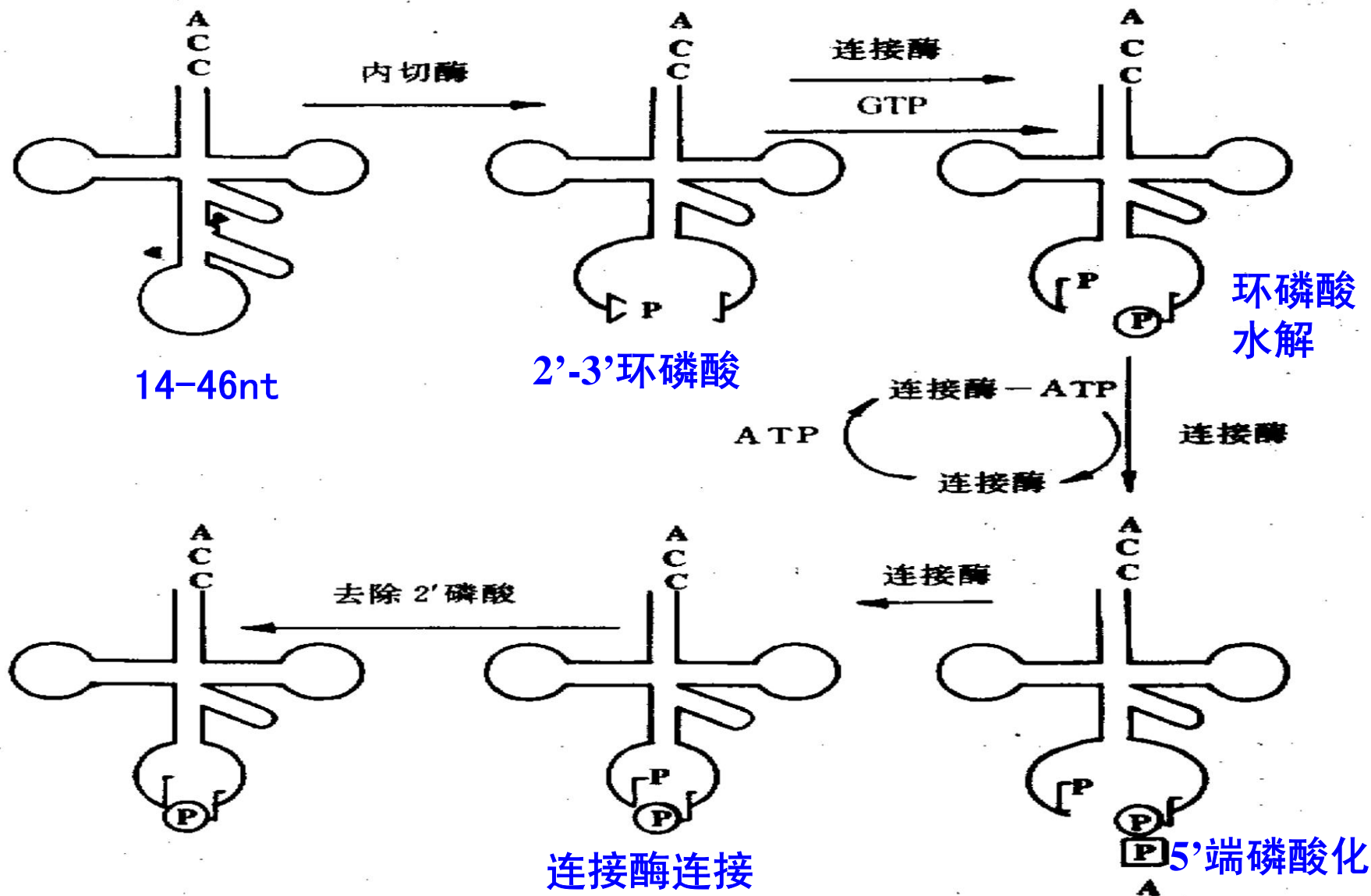


大约1/10的酵母细胞核tRNA基因有内含子，从反密码子3'端第二个核苷酸开始，长度为14-46bp不等。剪接分两步进行：

♪ 特异的核酸内切酶切断内含子两端的磷酸二酯键，不需要能量。

♪ 两个外显子连接。





# 酵母tRNA前体的剪接

### 3. 反式剪接

锥虫、线虫中发现RNA剪接可发生在分子之间，将来源不同的RNA前体连接在一起，形成成熟的RNA。这就是反式剪接。

mRNA 5'端有由另一种基因编码的35个核苷酸的前导序列。存在于剪接前导RNA (spliced leader RNA, SLRNA) 5'端。

SLRNA形成类似于U1RNA二级结构，  
替代锥虫中缺少的U1RNA参与形成剪接  
体，通过磷酸脂键转移反应将5'端前  
导序列与其他RNA前体的外显子连接，  
完成反式剪接。

## 4. 交替剪接 (alternative splicing)

是指一种mRNA前体在剪接中使用了不同的剪接位点，产生一种以上的mRNA。

约有5%的高等真核生物基因通过交替剪接表达出不同产物。

有两种类型：

**组成型交替剪接：**一种mRNA前体的不同剪接模式同时存在于同一细胞中，并且表达出不同的蛋白质。

**组织特异的交替剪接：**一种mRNA前体在不同的细胞中，通过交替剪接表达出不同的mRNA及蛋白质产物。

## （二）RNA编辑

**RNA编辑：** 是通过对mRNA中外显子加工，使遗传信息在mRNA水平上发生改变。

已知的RNA编辑有两种类型：

- 一是哺乳动物细胞中mRNA的个别碱基的改变；
- 一种是原生动物如锥虫、利什曼原虫的线粒体中某些mRNA的碱基广泛地缺失及添加。

# 1. 哺乳动物mRNA的编辑

是调控基因组织特异性表达的方式之一。

如Apo B基因：

肝细胞：表达Mr 500000的Apo B<sub>100</sub>，

肠上皮细胞：表达240000的Apo B<sub>48</sub>。

Apo B<sub>100</sub>与ApoB<sub>48</sub> mRNA只在6666位核苷酸有差

别，分别是C和U。使原来的CAA密码子变成为UAA

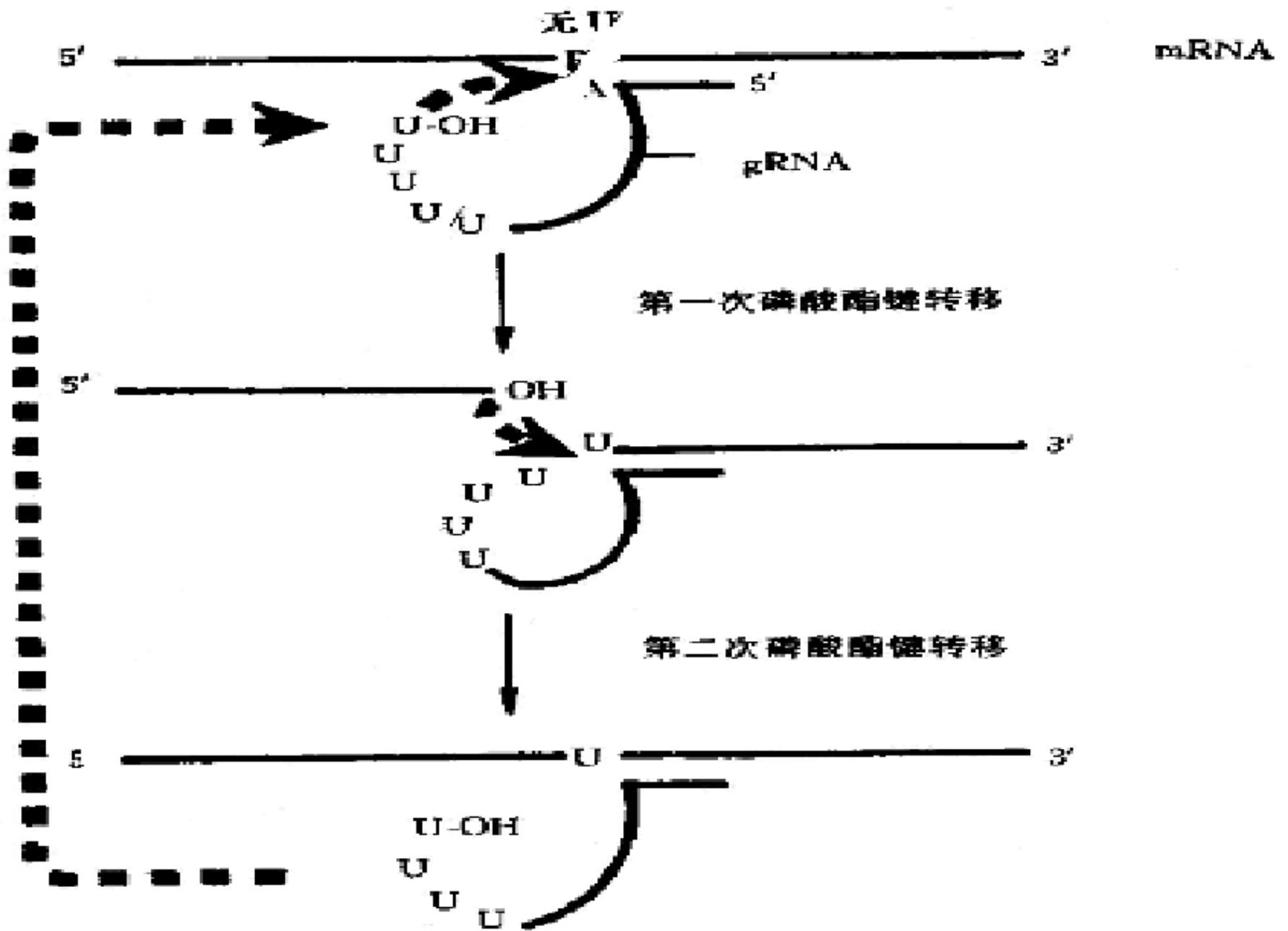
终止密码子，因此ApoB<sub>48</sub>是截短了的Apo B<sub>100</sub>。

## 2. 锥虫线粒中RNA编辑

锥虫线粒中编码**细胞色素c**亚基的RNA前体都是经过编辑后才成为有功能的mRNA，编辑过程包括碱基的缺失及添加。

**CoxIII mRNA前体**：由**引导RNA (gRNA)**作模板，通过碱基配对缔合，gRNA 3'端的寡聚U提供U源，通过磷酸酯键转移反应在mRNA前体中**添加U**。





gRNA介导的RNA编辑

# 第三节 RNA的功能

一、蛋白质生物合成

二、RNA作为遗传物质

# 一、蛋白质生物合成

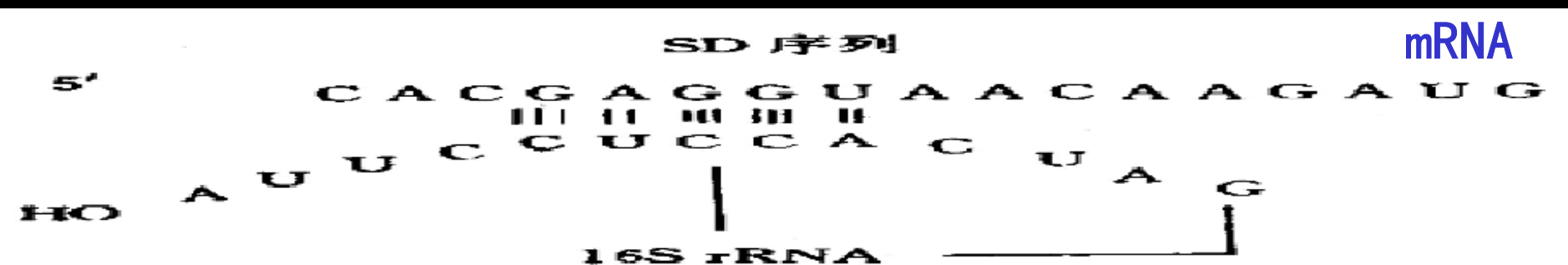
RNA (mRNA, tRNA, rRNA)、蛋白质  
因子、酶、氨基酸和核苷酸等200多  
种生物分子共同参与。

**mRNA:** 64个密码子, 其中**终止**: UAG、UGA、  
UAA; **起始**: AUG, GUG(菌)

**tRNA:**  $AA + ATP - E \rightarrow AA - AMP - E + PP$

$tRNA + A - AMP - E \rightarrow AAtRNA + AMP + E$

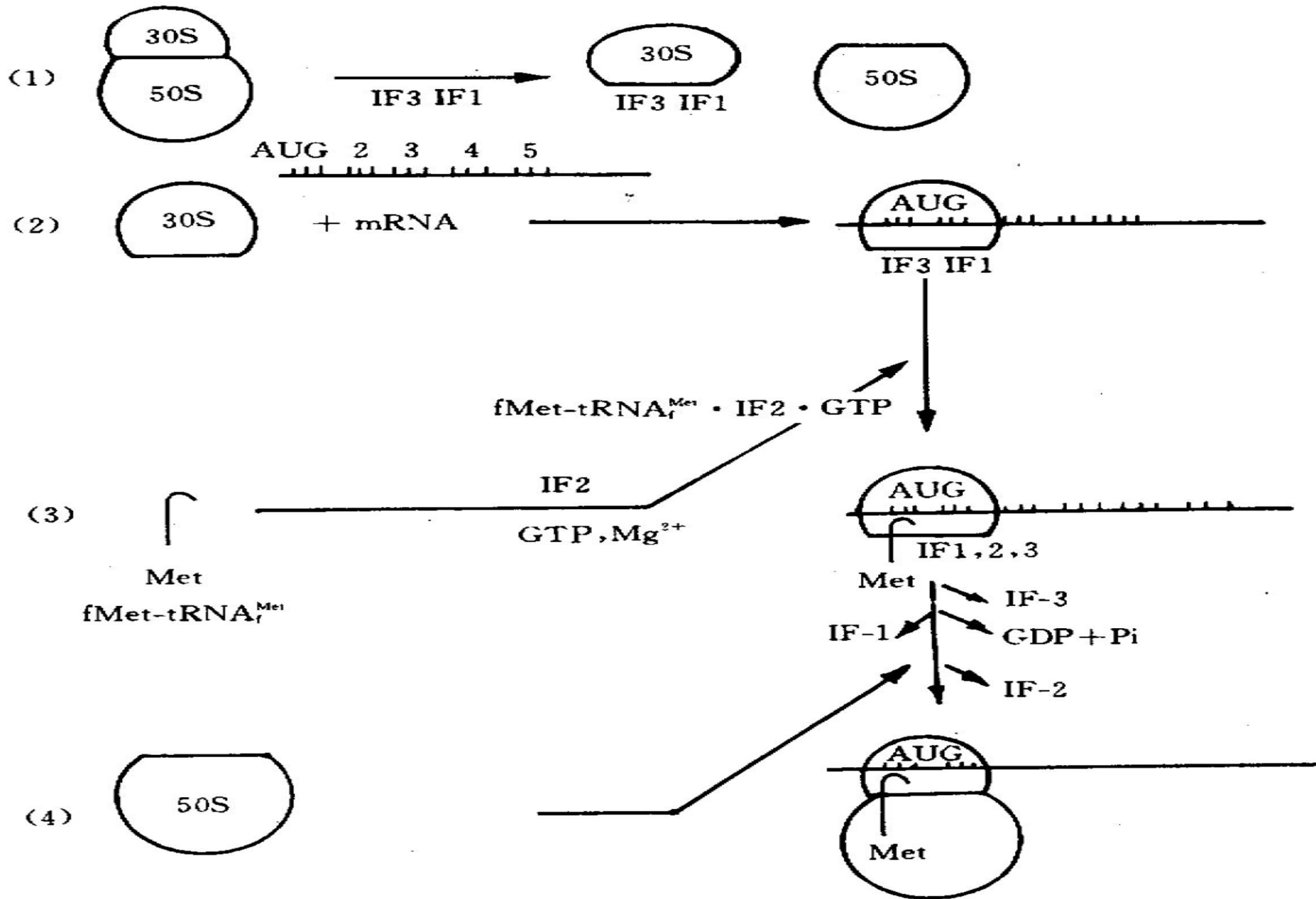
**rRNA:** SD (Shine-Dalgarno) : 起始密码前的一段保守序列。(真核 Kozak Sequence)



# 蛋白质生物合成步骤

## 原核蛋白质生物合成

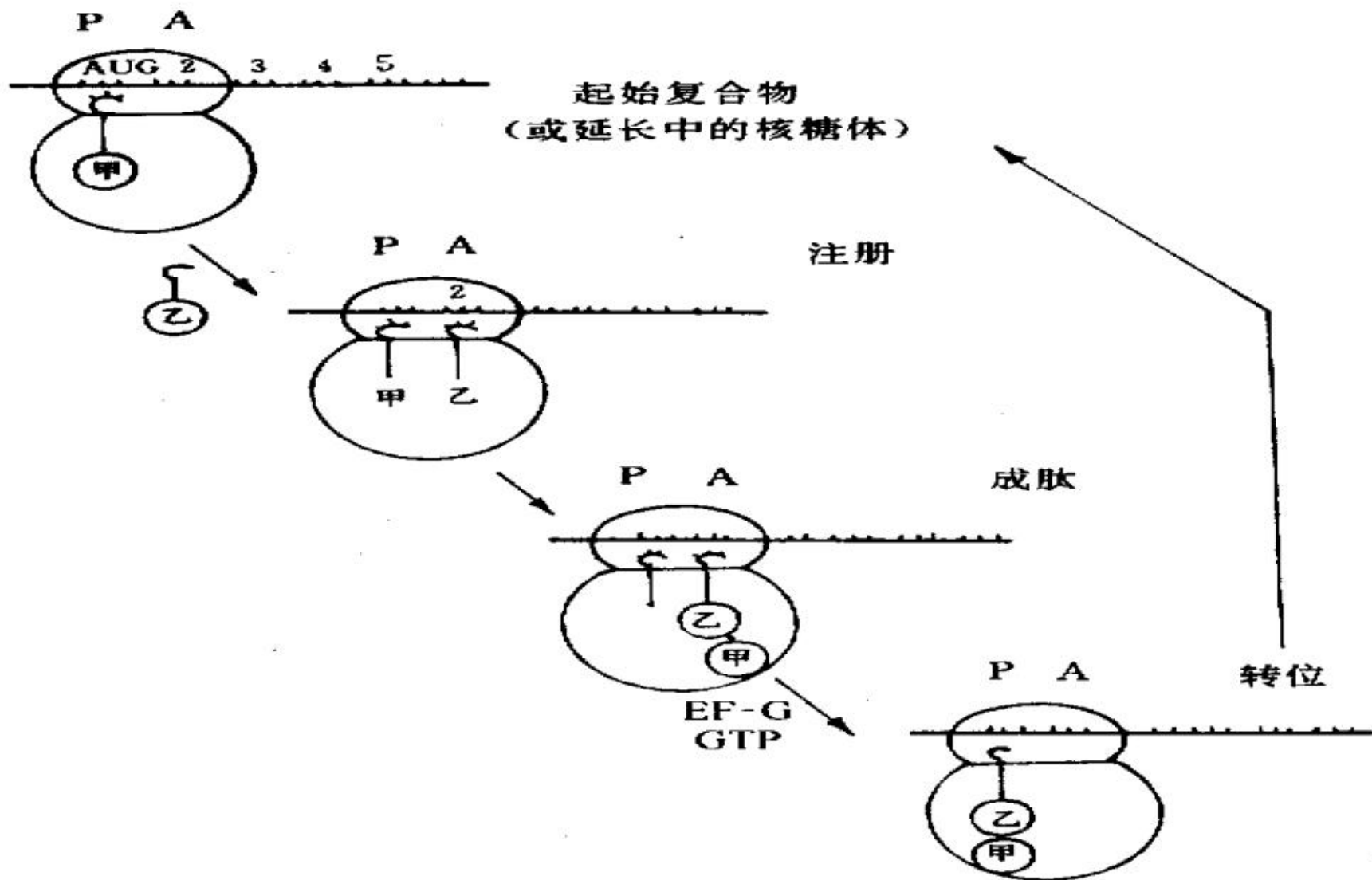
起始、延伸和终止三个阶段。

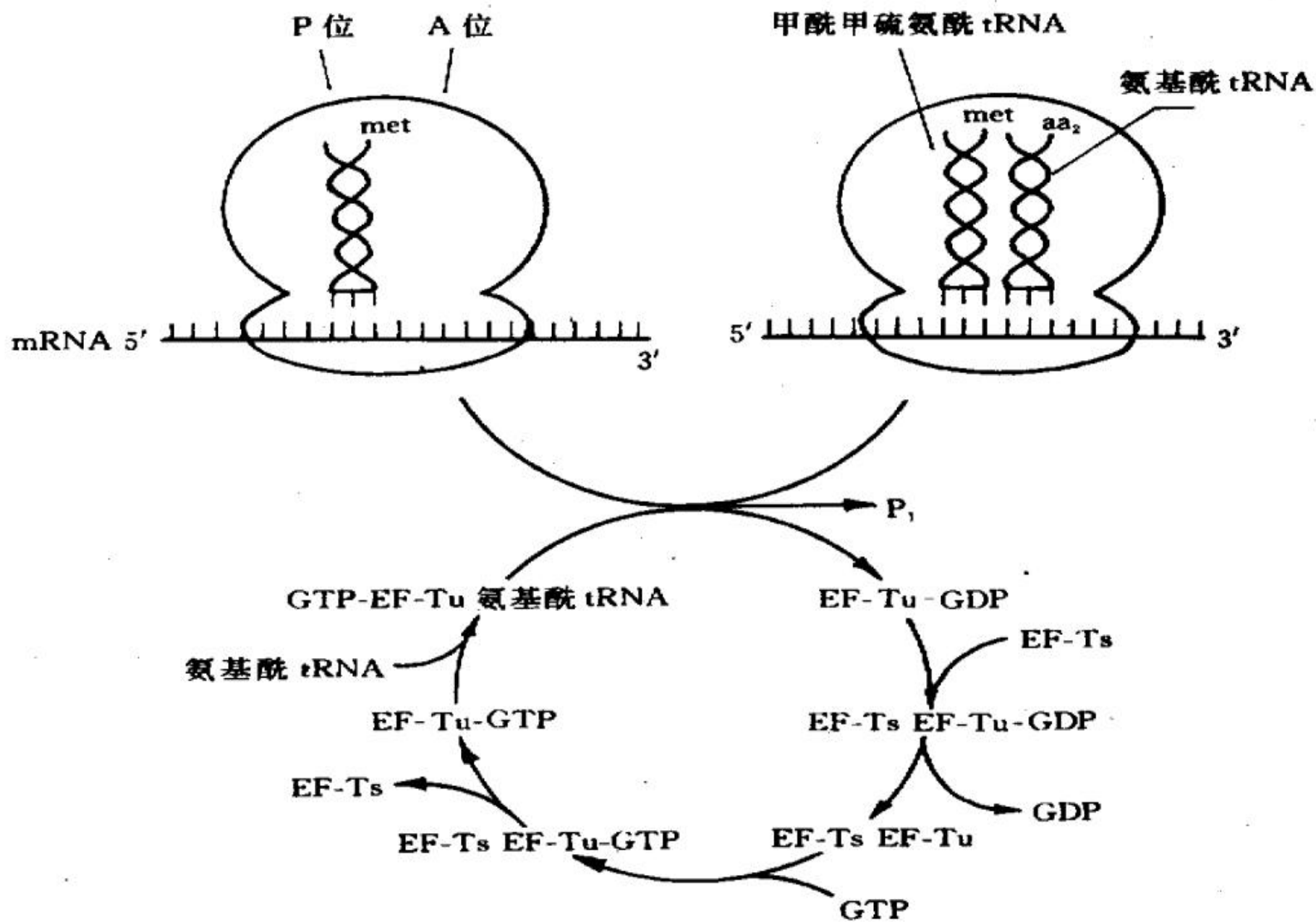


# 原核生物蛋白质合成的起始

# 肽链延伸

分三步：注册、成肽和转位。





# 延伸因子的再循环



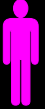
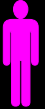
### (3) 肽链合成终止:


当A位出现终止密码子时，在RF-3的辅助下，释放因子RF-1（识别UAA及UAG密码子）或RF-2（识别UGA密码子）与核糖体结合，使转肽酶将肽链转移给水分子，P位上肽链与tRNA分离。

GTP水解使tRNA、释放因子及mRNA与核糖体分离。离开了mRNA的核糖体又可参与翻译起始。

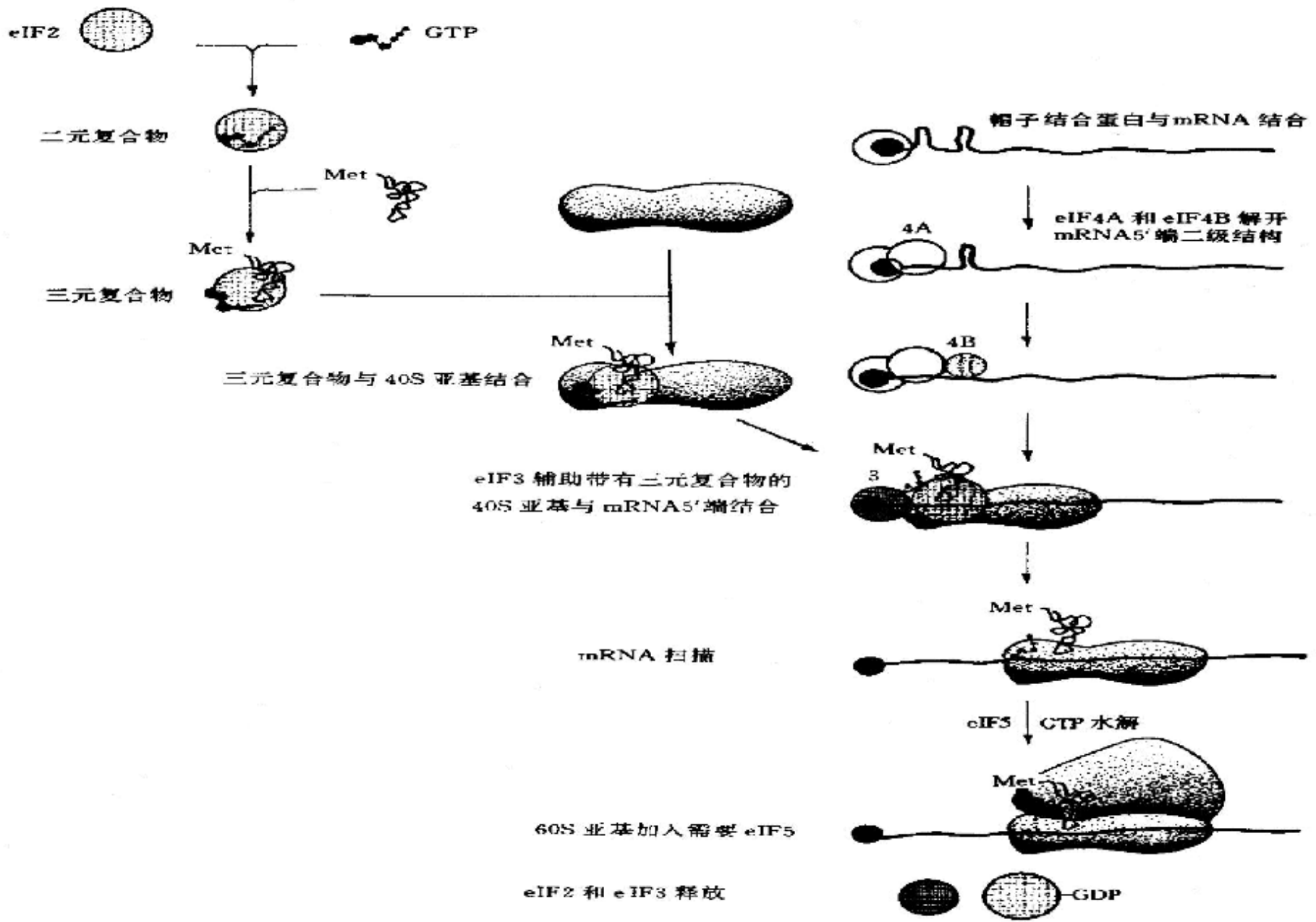
## 2. 真核蛋白质的生物合成

真核蛋白质生物合成与原核相比不同之处如下：

-  参与翻译的因子较多，尤其eIF；
-  甲硫氨酰tRNA，eIF-2和GTP先形成复合物；

 mRNA与小亚基结合前，需在帽子结合蛋白（CBP）、eIF-4A、eIF-4B和ATP的作用下，解开5'端的二级结构。

 由于AUG距帽子结构较远，小亚基需扫描寻找下游的AUG。



# 真核生物蛋白质生物合成的起始

## (2) 延伸与终止:

真核蛋白质合成延伸及终止过程与原核类似，相应的因子见表。

因子	真核生物	原核生物	功能
延伸因子	EF-1 $\alpha$ $\beta$ $\gamma$	EF-Tu, EF-Ts	协助氨基酰tRNA进入A位，并与GTP结合
延伸因子	EF-2	EF-G	转位酶，使mRNA前移，原A位变为P位，空载tRNA释放
终止因子	eRF	RF-1, RF-2, RF-3	肽链合成终止

## （三）蛋白质生物合成的调控

发育相关基因的表达具有精确的时间及空间性，而且，一些基因的表达可决定另一些基因的表达。

除发育外，其他某些基因功能的生理生化过程也存在这些调控。

要实现基因产物的**有序变化**，  
单独依靠转录调控是能够的，还必须  
**及时地去除已合成的mRNA**，或**阻  
断其翻译**，或使已合成的**蛋白质失  
活**，才能使基因功能及时终止。

# 1. mRNA稳定性的调控

mRNA的稳定性与其3'端非翻译

区中多拷贝的AUUUA序列有关。

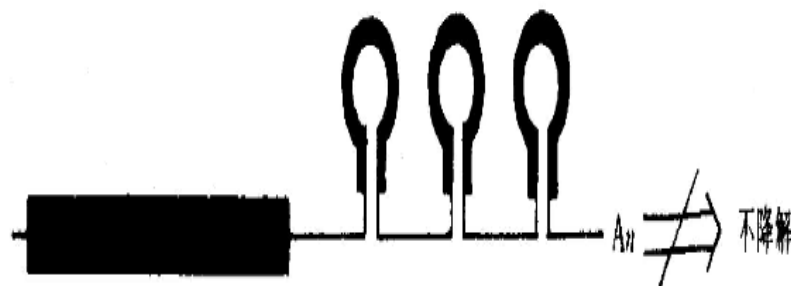
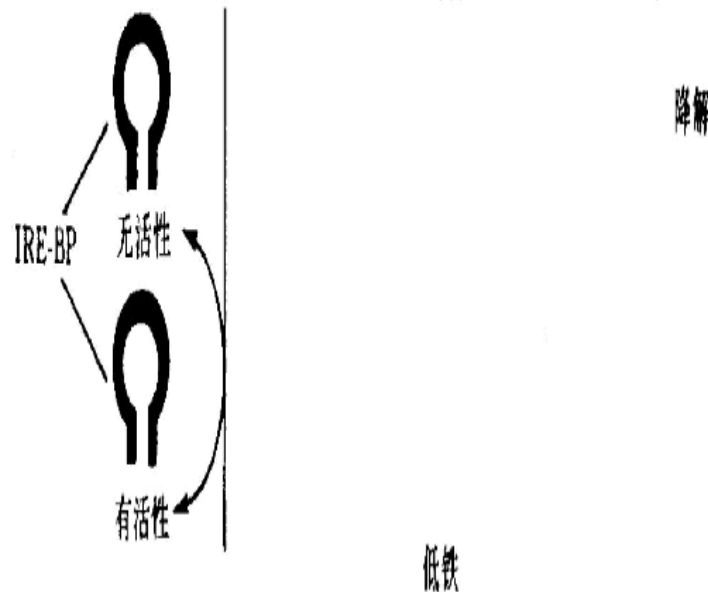
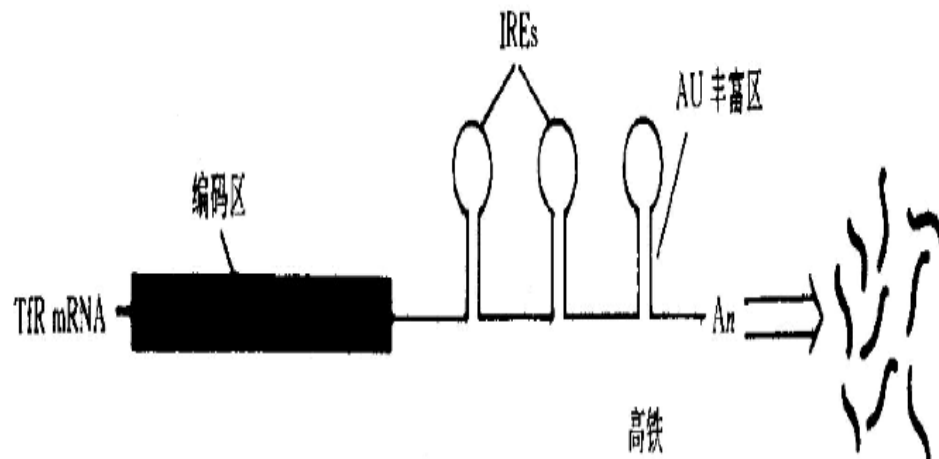


如**运铁蛋白受体 (TfR) mRNA**:

细胞内的铁浓度是受调控的, 与**TfR mRNA**的稳定性有关。

TfR mRNA 3'端除了有**多拷贝AUUUA**序列外, 还有**多拷贝的铁应答元件 (IRE)**。

每个**IRE**与**AUUUA**序列相间排列并有部分重叠, 能形成茎环结构。



当Fe ↑ :

IREBP不与IRE结合, AUUUA起作用, TFR mRNA降解, TFR不能合成, Fe不能运入Cell

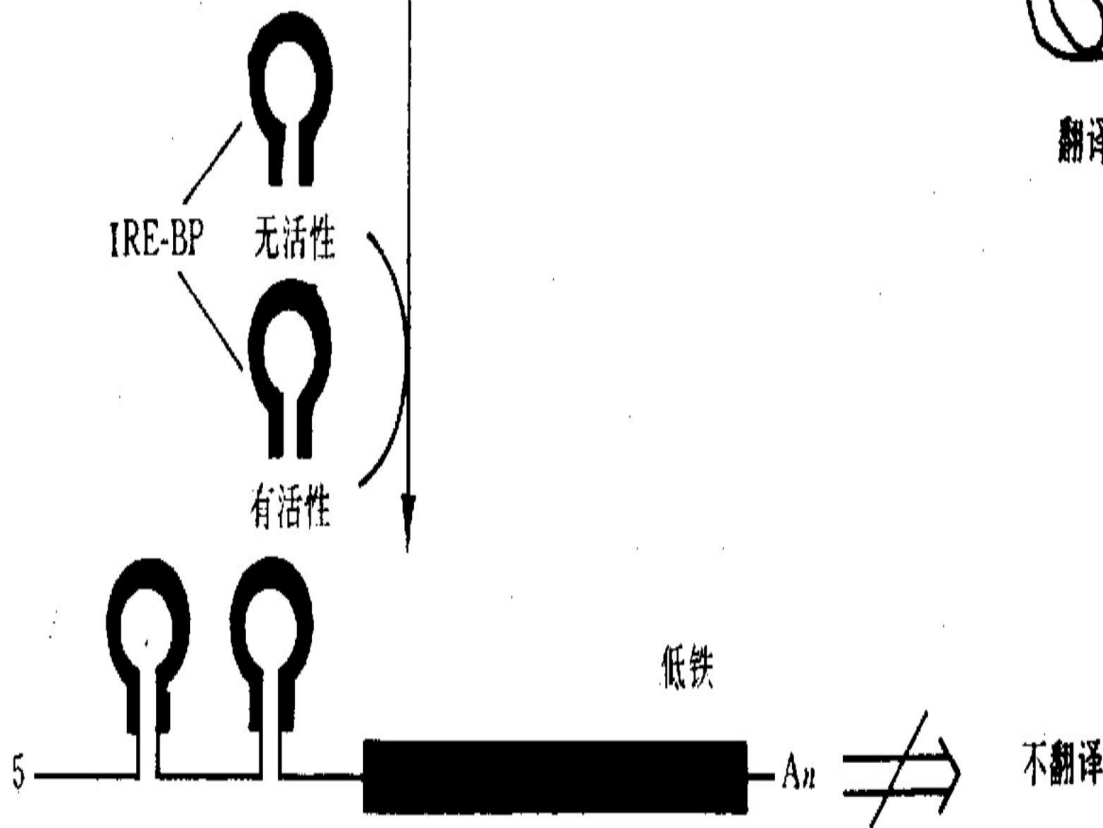
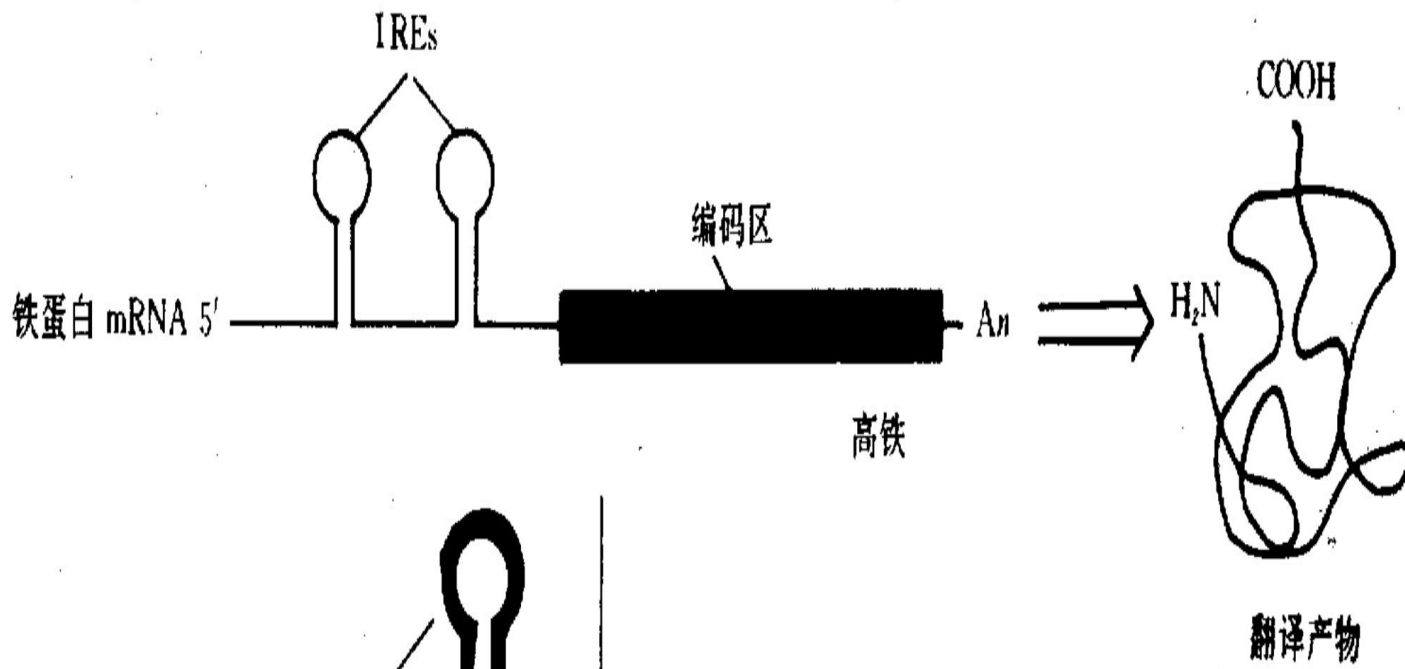
当Fe ↓:

IREBP与IRE结合, 阻断AUUUA功能, TFR mRNA 稳定, TFR翻译, Fe可运入Cell

## 2. mRNA翻译过程中的调控

### RNA结合蛋白对翻译的调控:

胞内的铁蛋白可与运入胞内的Fe结合，以储存Fe并解除Fe的毒性。血红素的合成需要铁。  $\delta$  氨基  $\gamma$  酮酸 (ALA) 合成酶是血红素合成的重要酶，该酶 mRNA的5'-UTR也有多拷贝的IRE序列。该酶的翻译合成受铁离子和IRE结合蛋白调控。



当细胞内铁↑，IREBP不与ALA合成酶mRNA 5'端的IRE结合，Fe蛋白合成，胞内Fe被铁蛋白结合。ALA合成酶表达，血红素可合成，

当细胞内铁↓，IREBP与ALA合成酶mRNA 5'端的IRE结合，阻断铁蛋白和ALA合成酶的翻译被阻断，铁蛋白不再合成，与胞内Fe减少相协调，



## eIF-2磷酸化与翻译调控:

血红素是一中调节性抑制剂

(heme controlled inhibitor, HCI)

，它可抑制网织红细胞内的一种蛋白激酶。

当**血红蛋白**↓:

该**蛋白激酶**活力↑, 使**eIF-2**磷酸化, 磷酸化的**eIF-2**与**eIF-2B**的复合物对**GTP**的亲合力↓, 不能再循环参与翻译起始。

**eIF-2**磷酸化的翻译调控可能具有普遍意义。

# 3. mRNA翻译中的重编码

🕒 移码

🕒 密码子意义重定义 (redefine)

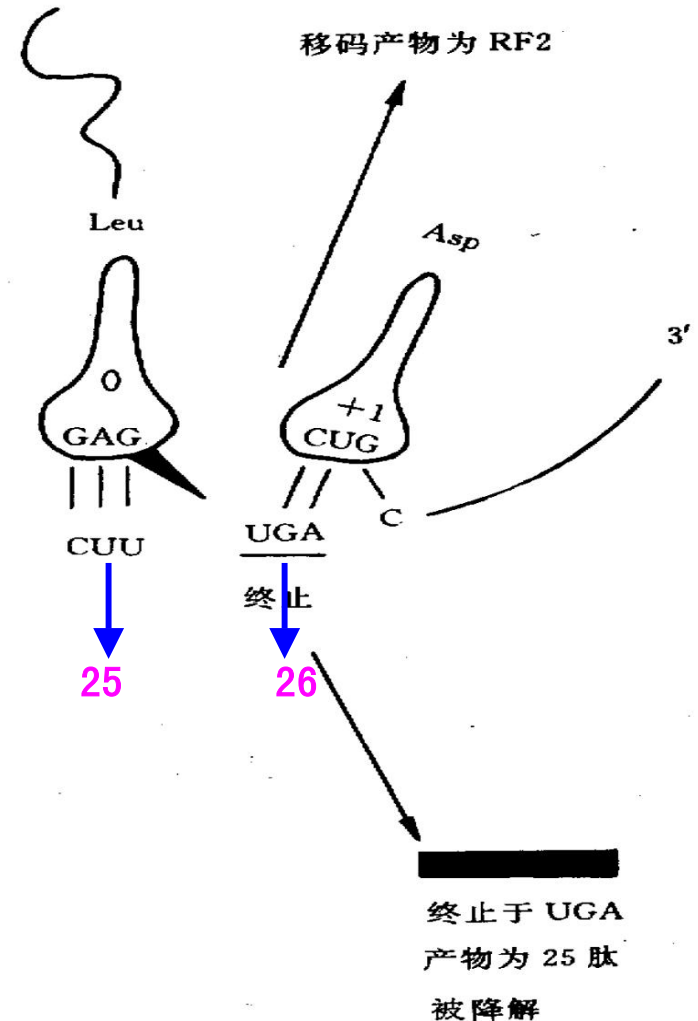
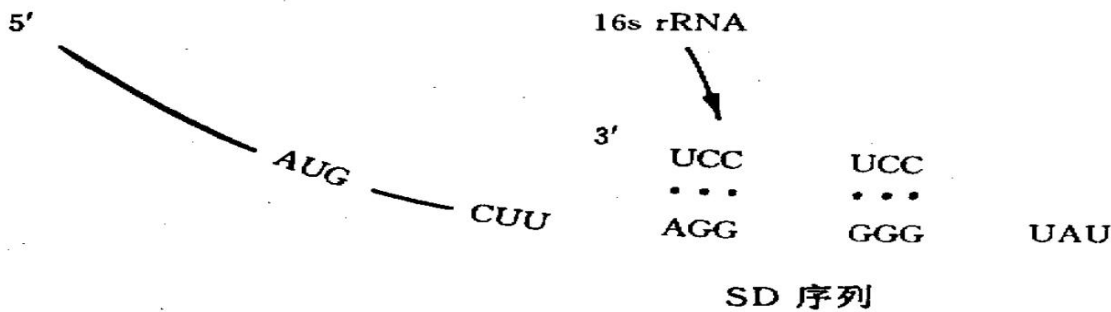
🕒 翻译中模板的不连续性

(subversion of contiguity)

# 🕒 移码:

大肠杆菌中RF<sub>2</sub>识别UGA，翻译终止。RF2 mRNA 26位是UGA，上游是CUU和下游C可促进移码。

当RF<sub>2</sub>↑: 能及时识别UGA，使翻译终止于密码25，25肽产物被降解。RF2的翻译被阻断。



当RF<sub>2</sub>↓: RF2 mRNA翻译到CUU UGA C序列时，翻译终止。使与CUU配对的Leu-tRNA下移一个nt, 与UUU配对, 从而继续翻译出RF2。



## 🕒 密码子意义重定义 (redefine) :

某些mRNA的翻译中，存在终止密码子重新定义。

如UAG→Glu; UGA →Ser or Sel-Cys。

即在同一翻译系统中，同一密码有不同意义。

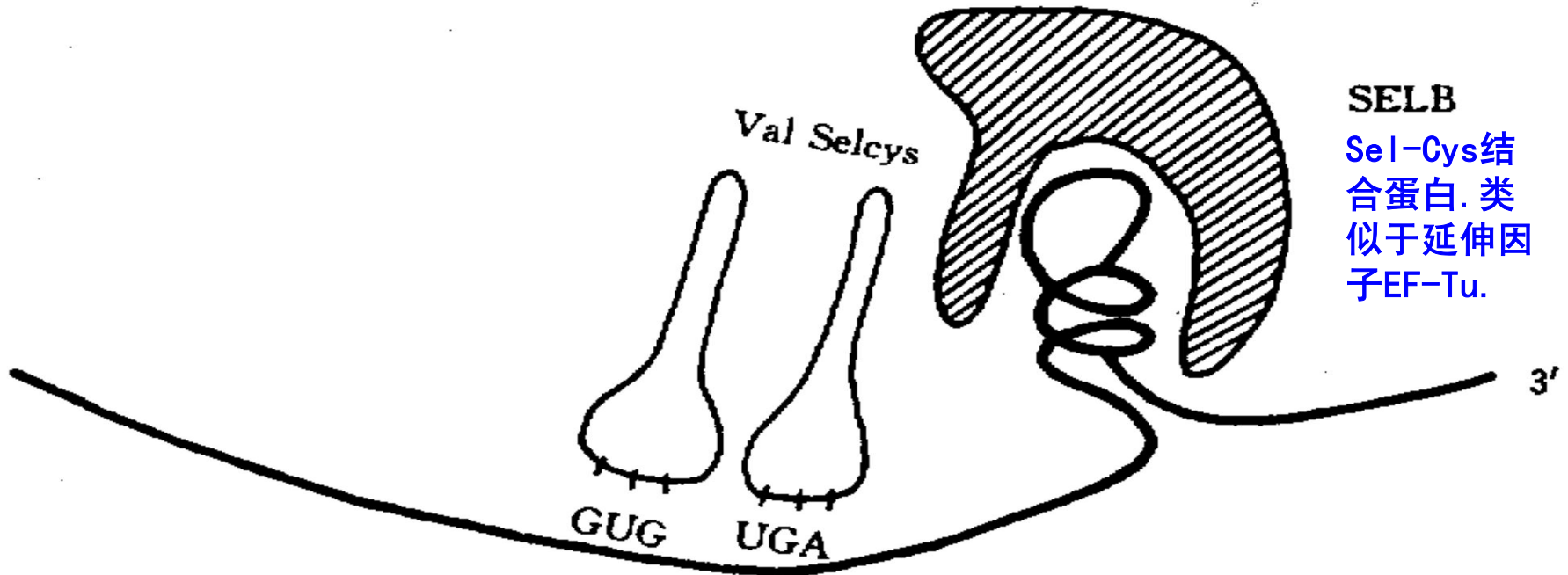
大肠杆菌的甲酸脱氢酶和哺乳动物中谷胱甘肽还原酶都含有Sel-Cys，它不是合成后修饰的，而是以Sel-Cys掺入的。

# 甲酸合成酶合成中：

**SELB**

**Ser-tRNA → Selcys-tRNA → Selcys-tRNA-SELB**

当合成到UGA时，Selcys-tRNA-SELB与下游的茎环结构结合，引导其进入核糖体与UGA配对，完成重定义。



# 🕒 翻译中模板的不连续性

(subversion of contiguity) :

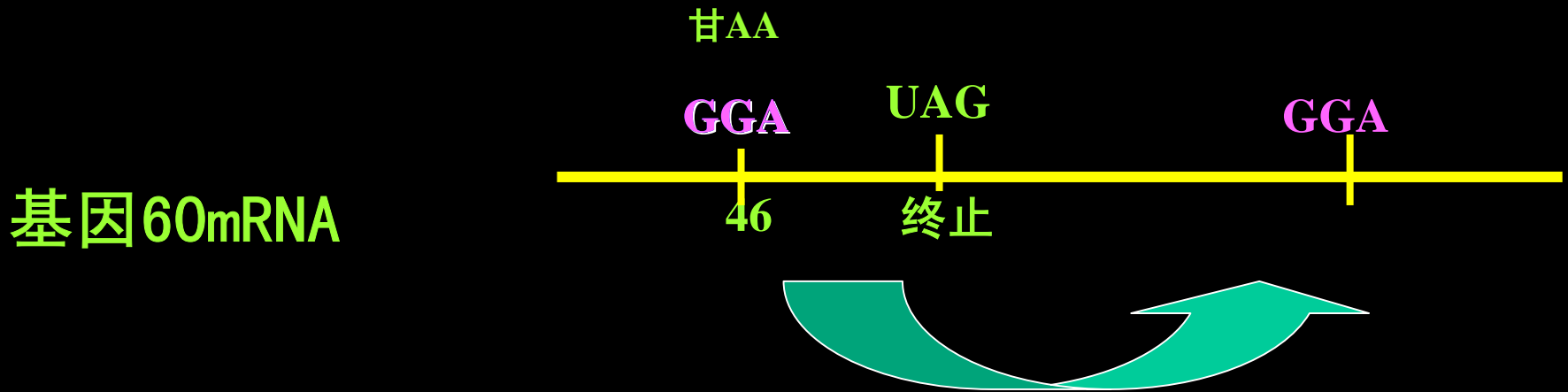
包括:

翻译绕过 (translational bypassing)

反式翻译 (trans-translation) 。

## ♠ 翻译绕过:

如噬菌体T4基因60编码拓扑异构酶的一个亚基。



当翻译完成46位密码子后不是终止，而是mRNA扫描，掠过包括UAG在内的50个核苷酸，然后继续翻译。被绕过的50个核苷酸上游是密码子GGA，下游的密码子也是GGA。

# ♠反式翻译:

大肠杆菌:

编码10个氨基酸

10SaRNA: tRNA的功能(丙AA)

称tmRNA

当核糖体翻译过程中, 出现3'端截断或转录提前终止而缺乏终止密码时, mRNA的翻译可以过渡到tmRNA进行翻译。

首先是tmRNA起tRNA作用，转运丙氨酸，接着起mRNA的作用，翻译其编码序列，因此合成的蛋白质C端有11个AA来自10SaRNA的编码序列。

意义：

- ① 避免核糖体阻滞在异常mRNA上，加速核糖体再循环。
- ② 翻译出异常多肽链的C端标记，便于被识别和降解。

## 二、RNA作为遗传物质

如某些噬菌体如Q $\beta$ ，MS2等；

绝大多数植物病毒；

六类动物病毒中的第III、IV、V和VI类，及最小的植物病原体类病毒（viroid）都是以RNA为基因组。

## 第四节 核酶

核酶（ribozyme）是具有酶活性的可在预选位点剪切RNA的反义RNA，又称催化RNA（catalytic RNA）、RNA催化剂。

核酶具有5种酶活力，即核苷酸转移酶、磷酸二酯酶、磷酸转移酶、酸性磷酸酯酶和RNA限制性内切酶，能催化转酯反应及磷酸二酯键水解反应。催化符合米氏动力学。



# 一、核酶的分类

## (一) 按其作用方式

1. 剪切型
2. 剪接型

## (二) 按作用底物

1. 自体催化
2. 异体催化

# (一) 按其作用方式

## 剪切型

### ✦ 发生在RNA前体的成熟过程中

如大肠杆菌核糖核酸酶P: 含M1RNA (377 nt) 和Mr 17500的Pr, 对tRNA前体有剪切反应。

### ✦ 发生在动植物病原体RNA的复制过程中

如植物类病毒 (viroid)、环状单链卫星RNA (也称拟病毒virusoid)、线性卫星RNA等。

## 剪接型

不但具有限制性内切酶活性，而且还包括连接酶活性。

### I型内含子

含有四段保守序列：

**P** (AUGCUG-GAAA)

**Q** (AAUCAGCAGG)

**R** (UCAGAGACUACA)

**S** (AAGAUAUAGUCC)

能形成相同的二级结构。

还有两段短的保守序列E和E'；依次排列成5'-E-P-Q-R-E'-S-3'

具有这一特征的内含子称为I型内含子。

包括大多数真菌线粒体基因内含子、某些叶绿体基因内含子、四膜虫核前体rRNA内含子和T偶数噬菌体基因内含子。

## II型内含子:

与I型内含子不同。II型内含子含有**共同的二级结构模型**，结构分为**六区（I~IV）**，I区又分为A、B、C、D4个亚区。

II型内含子的**自我剪接反应**包括：**少数真菌线粒体基因内含子、大多数叶绿体基因内含子和植物线粒体基因内含子的剪接反应。**

## (二) 按作用底物分类

### ✦ 自体催化

绝大多数核酶以自身RNA为底物，进行自我剪切，或自我剪接。许多RNA前体的加工成熟属于自体催化。

## ✦ 异体催化

是以其他化合物为作用底物，可以是RNA，也可以是多糖、DNA和氨基酸酯等。如：

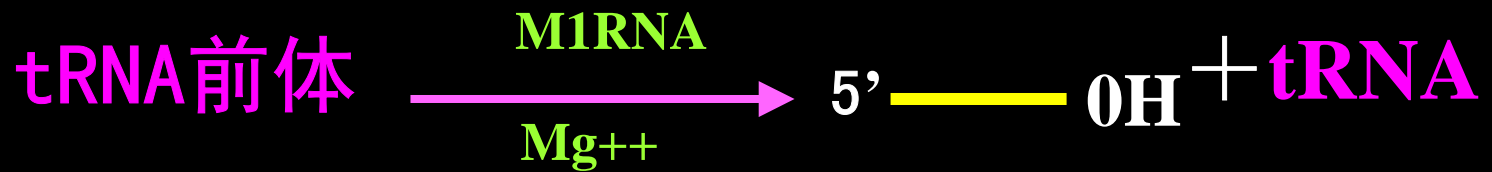
细菌RNA酶P中的RNA：能以前体tRNA为底物，加工催化tRNA前体5'端成熟。

兔肌直链淀粉异构酶中的RNA能以淀粉为底物，催化分支反应。

四膜虫核酶衍生物也可以催化DNA的定点切割。

## 二、核酶的作用机制

### (一) RNA酶P中RNA的剪切作用



在体内：蛋白因子辅助，起稳定作用。



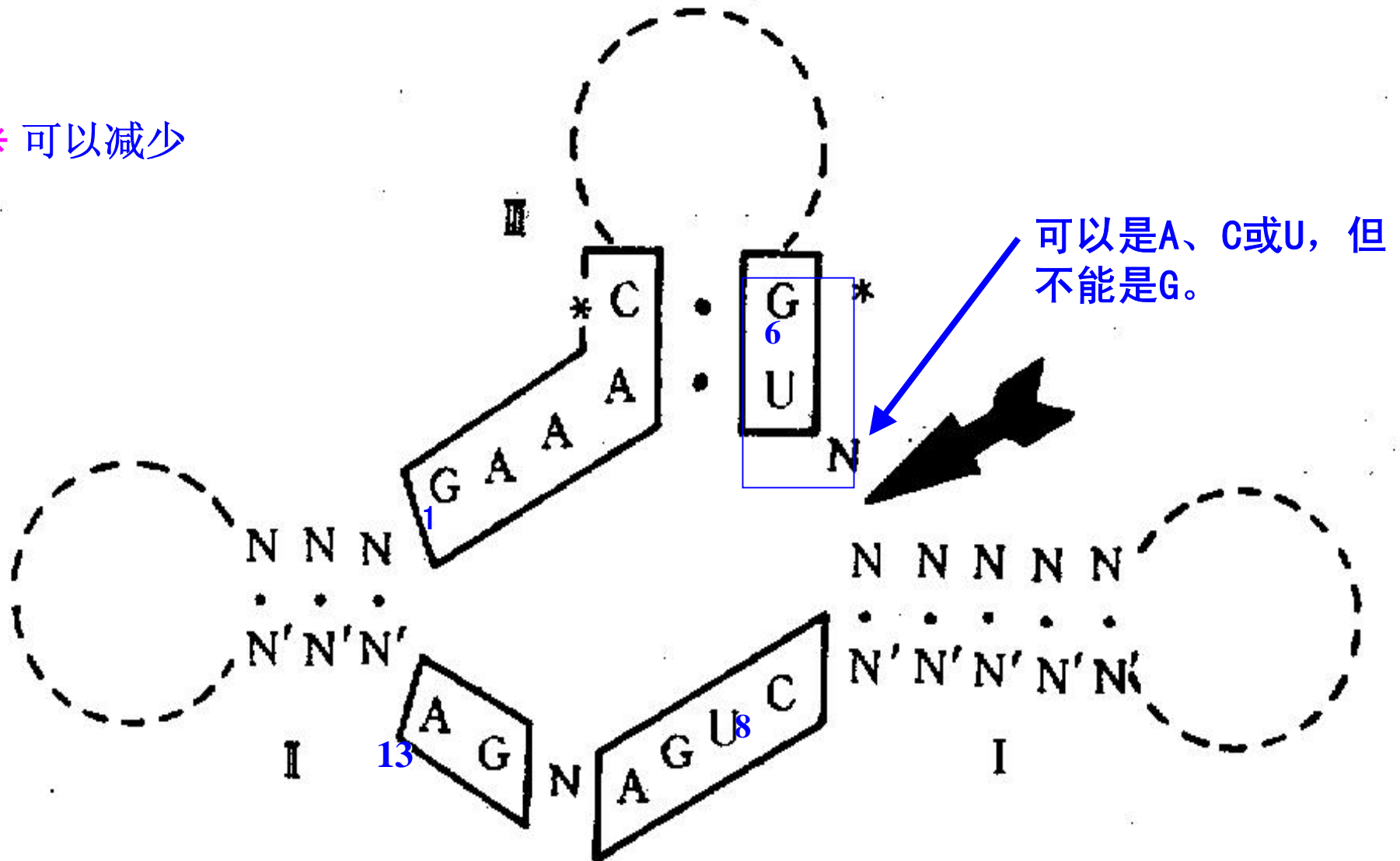
## (二) 第二类剪切反应RNA

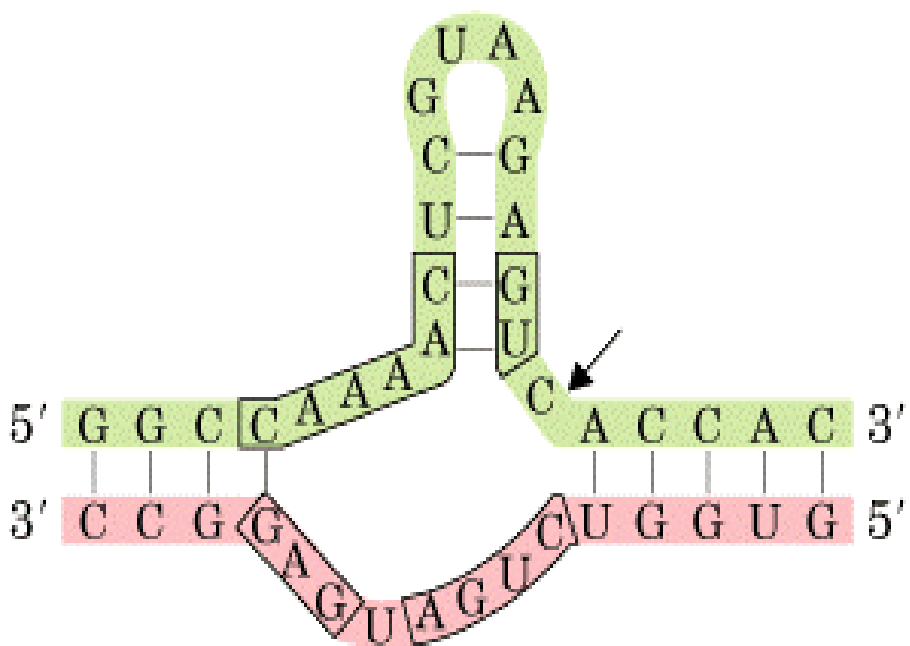
特征:

- ①  $Mg^{2+}$ 的存在;
- ② 产生5' -OH和2', 3' -环化磷酸二酯末端;
- ③ 催化区域很小, 不超过60个核苷酸;
- ④ 剪切点附近能形成锤头、T形或发夹结构。

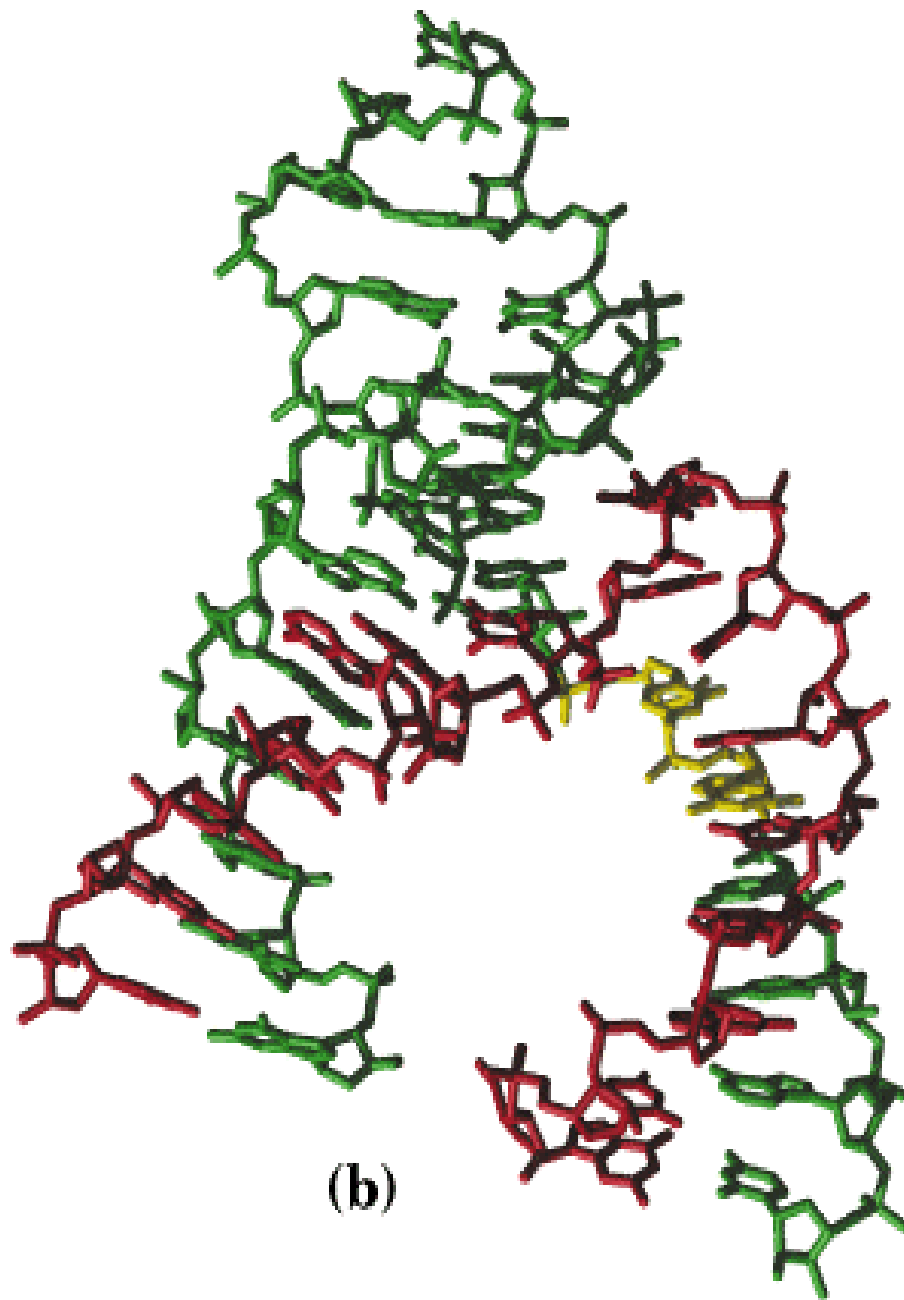
# 锤头或T形结构形成自我剪切

\* 可以减少



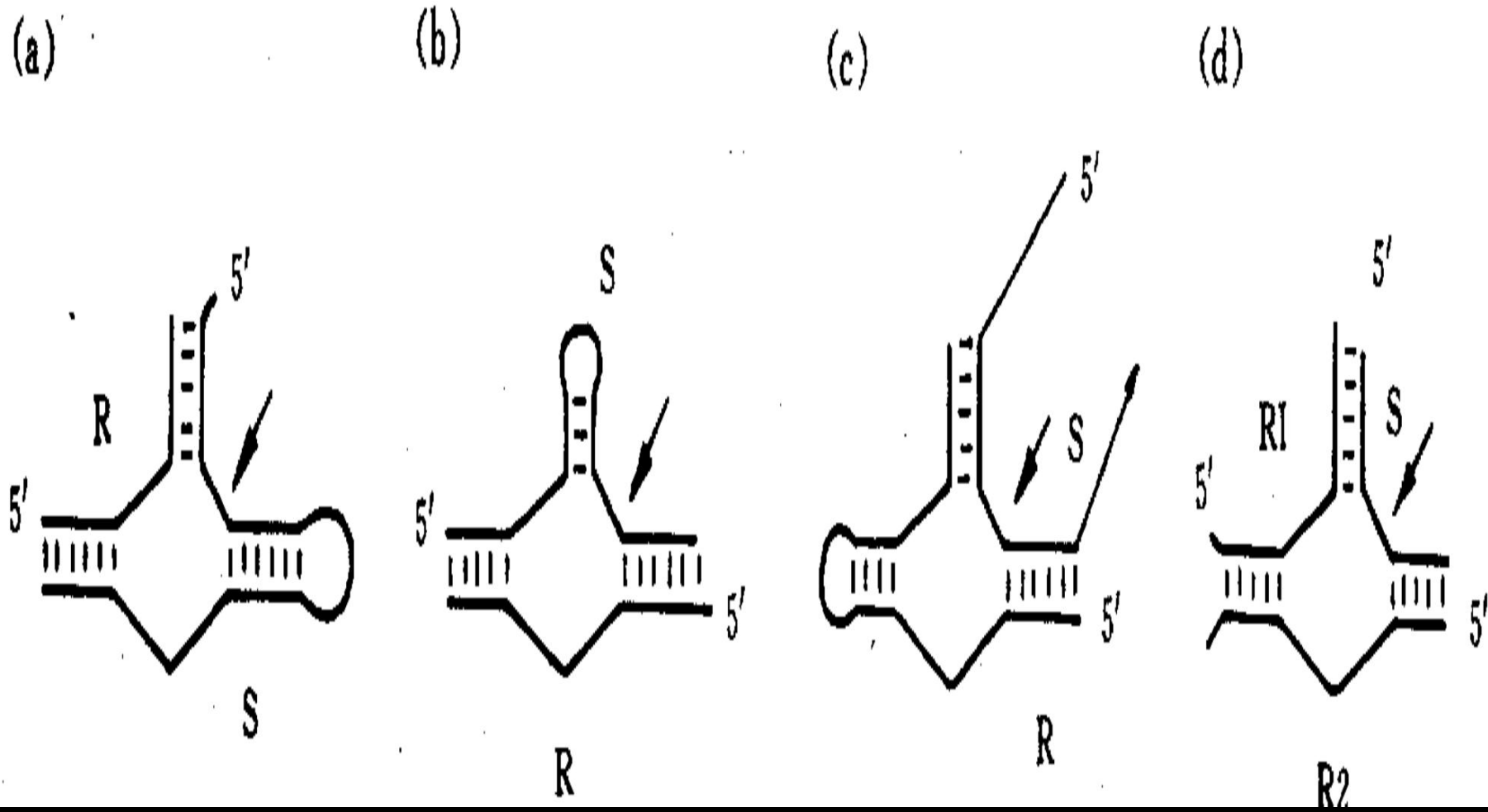


(a)



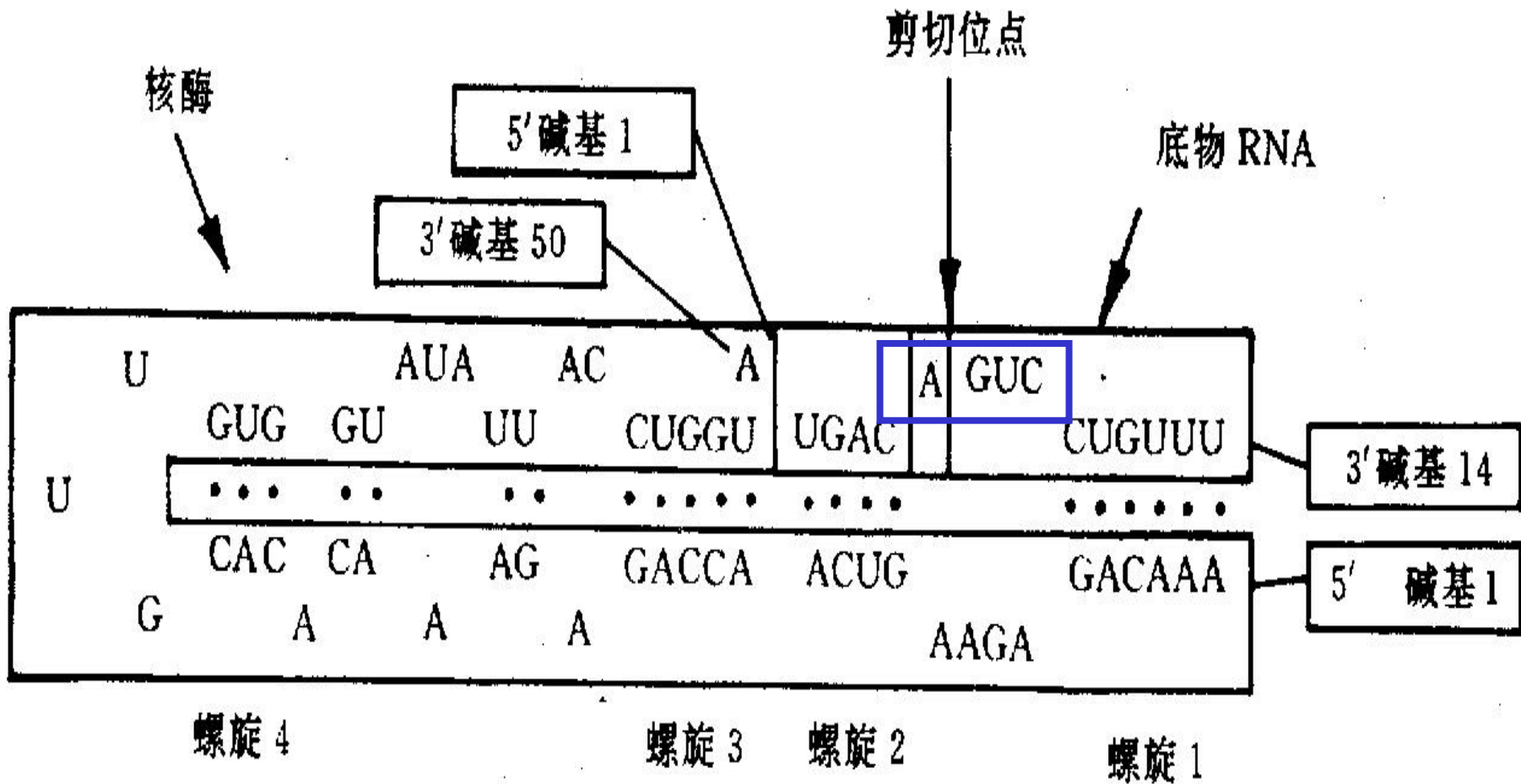
(b)

# 天然和人工合成的垂头或T型结构分类



**R: 核酶**

**S: 底物**

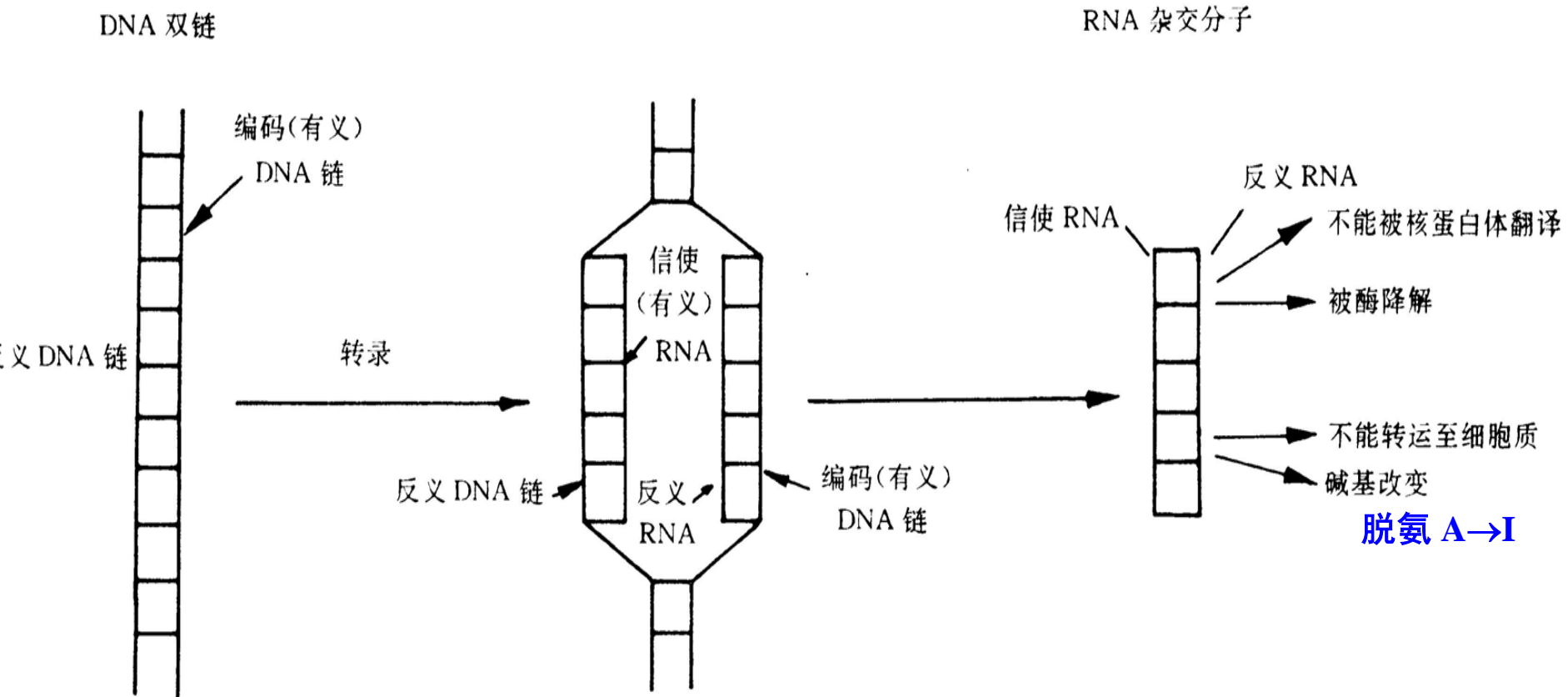


## 发夹二级结构自我剪切

烟草环点病毒卫星RNA负链的催化中心。5'端50nt为核酶，3'端14个nt作为底物。

# 第五节 反意RNA (micRNA)

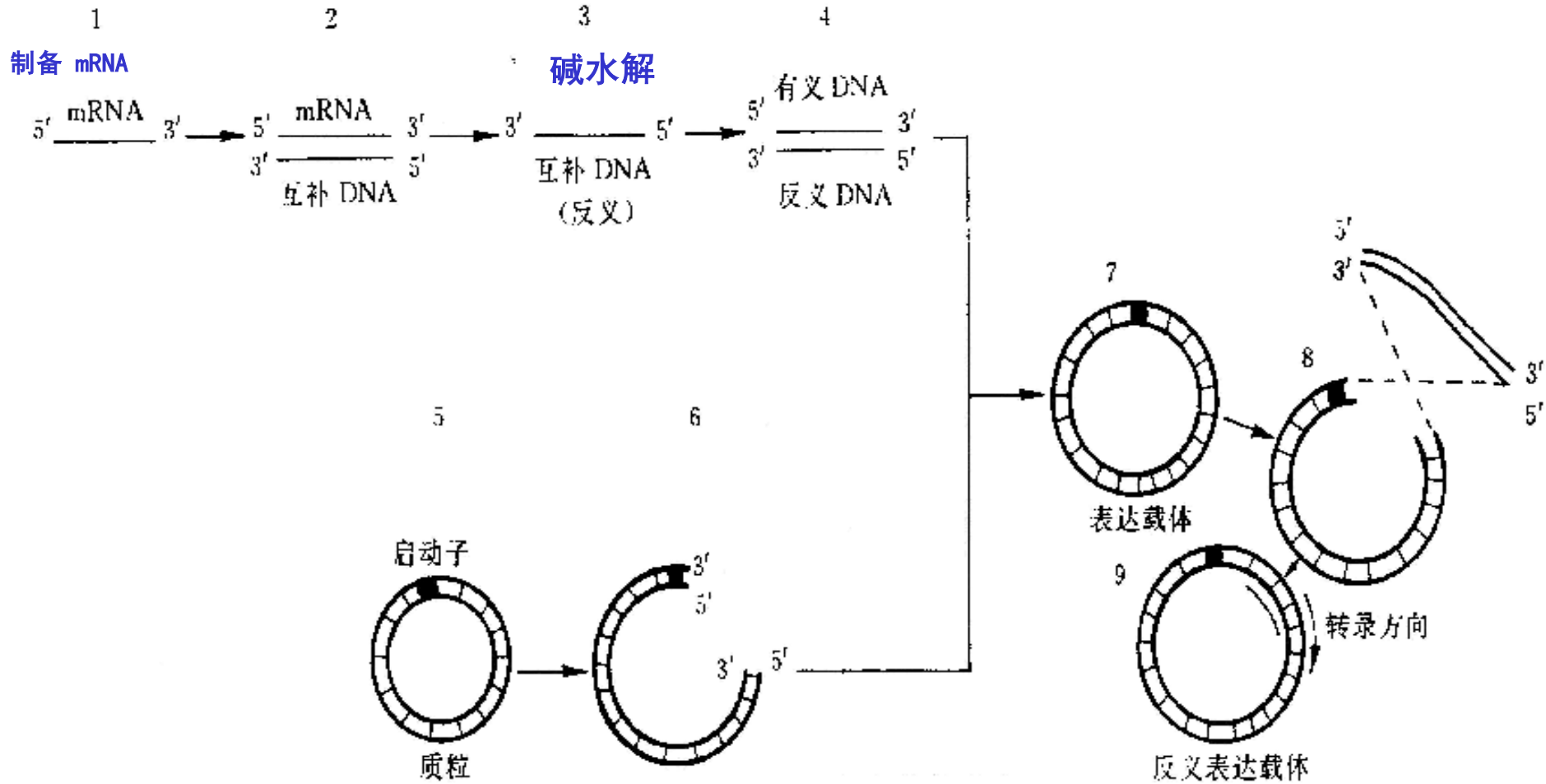
**反意RNA:** 由调节基因产生的, 对结构基因表达起调节作用的RNA。

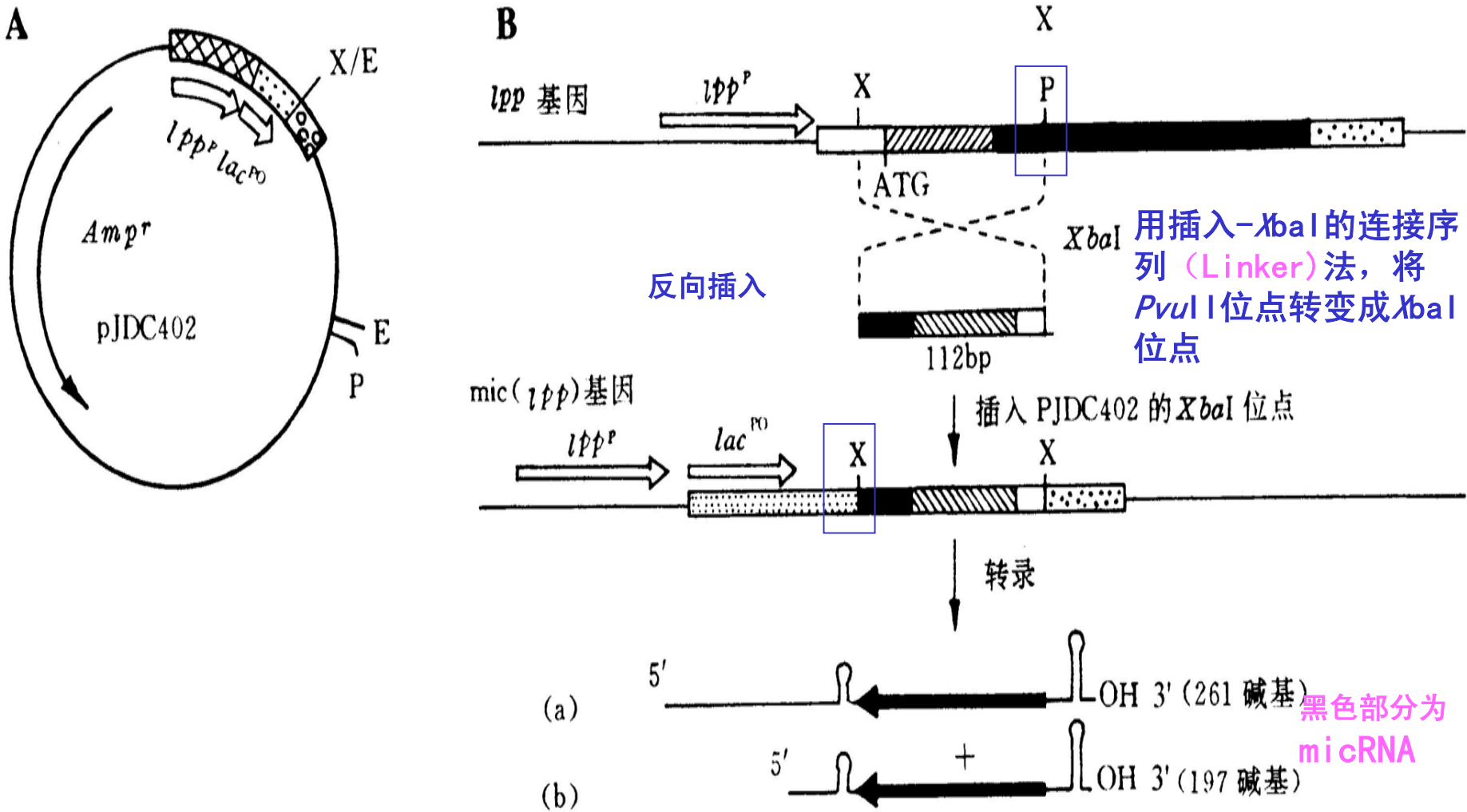


## 二、反意RNA的构建

可通过化学和酶法合成，也可利用重组DNA技术从反意表达载体上产生。

### 1、反意表达载体的构建





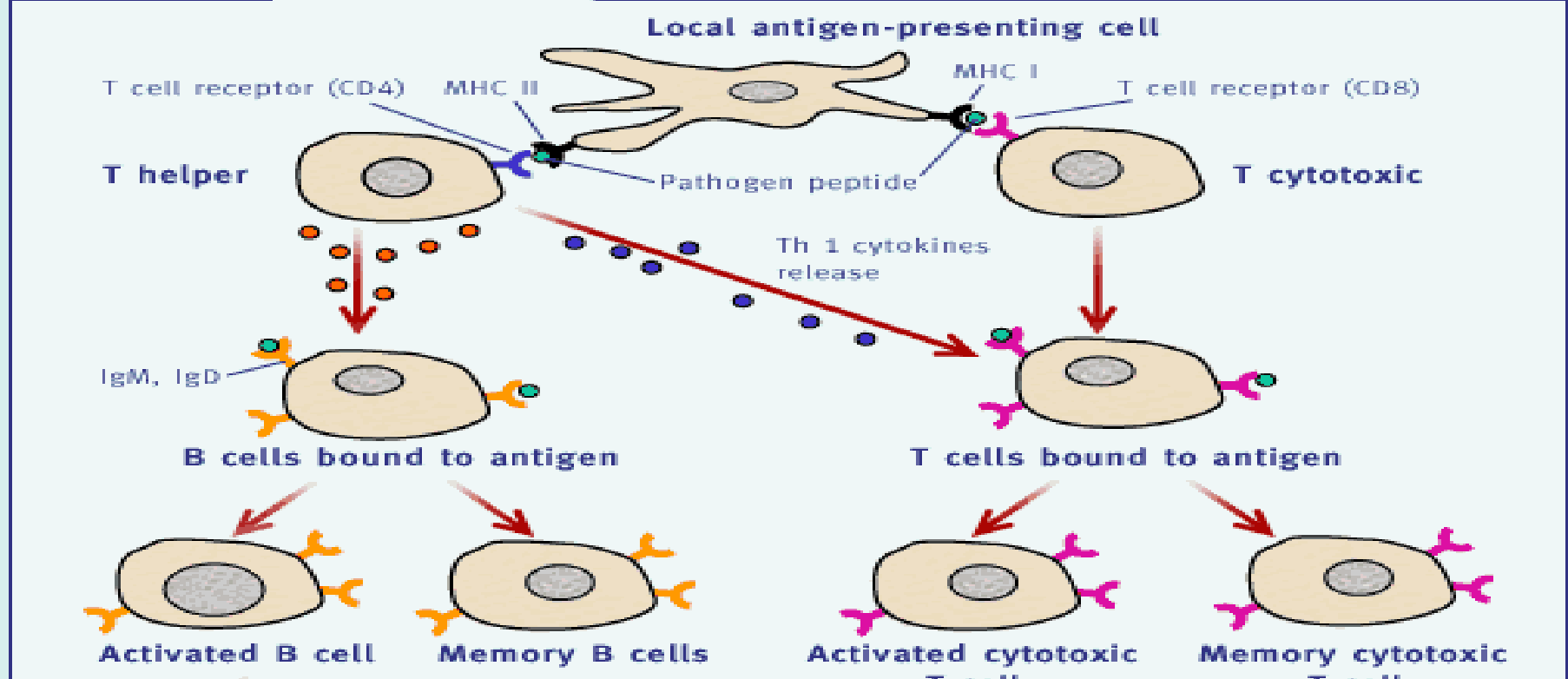
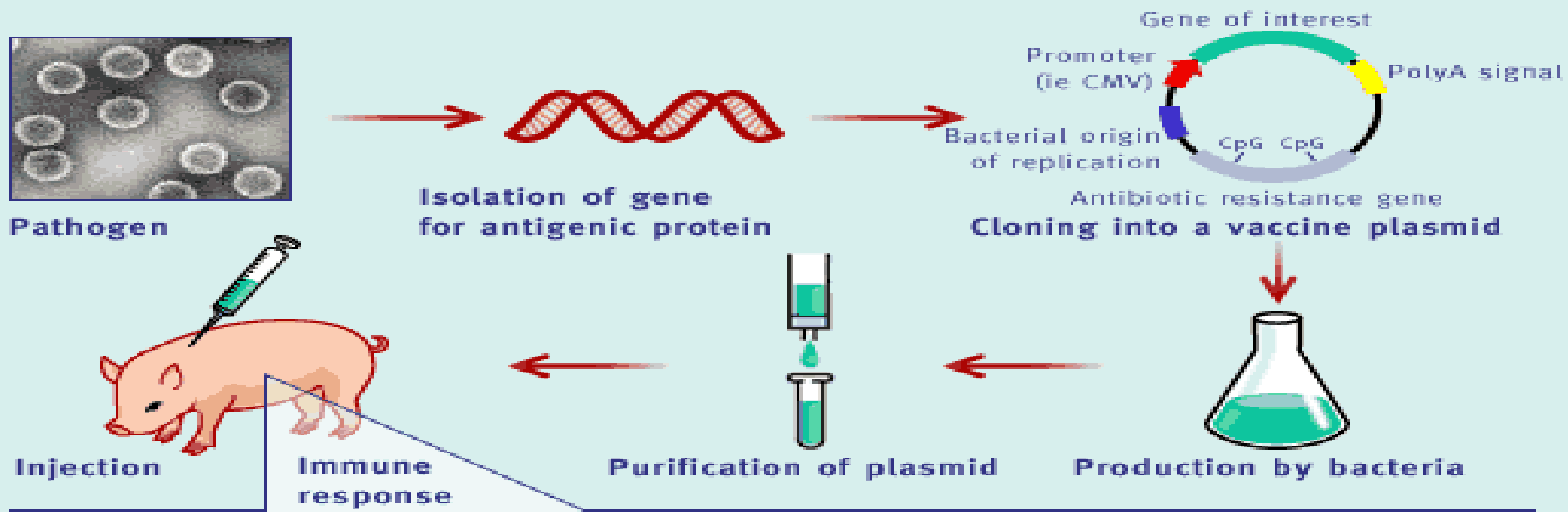
## 反意脂蛋白基因表达载体的构建

pJDC402载体,  $lpp^p$ :脂蛋白启动子; X: XbaI切点; a和b分别为利用  $lpp^p$  和  $lac^{pO}$  转录出来的mRNA. P: Pvu II; E: EcoR I

导入细胞的方法: 1、显微注射法; 2、共转化法

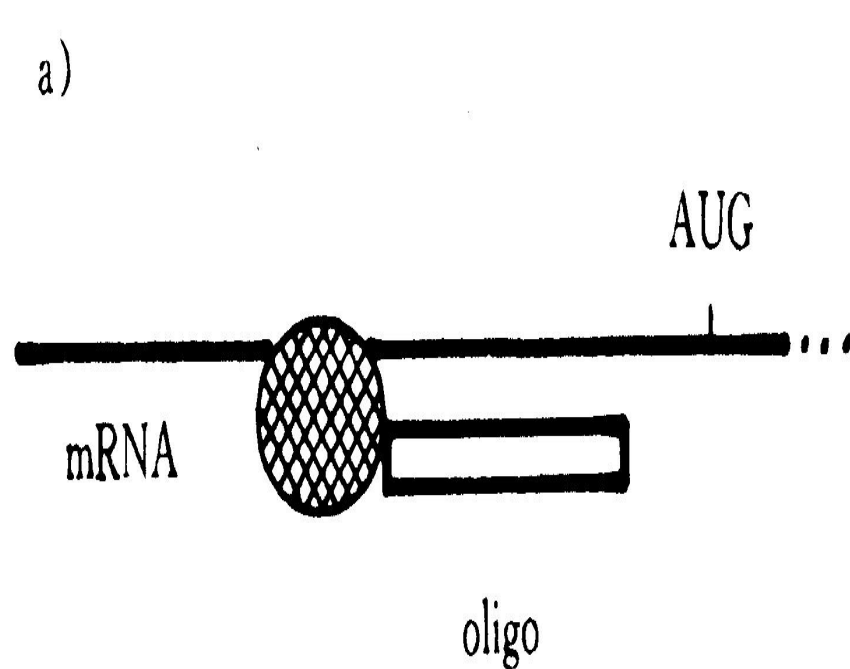


# Principle of DNA vaccination

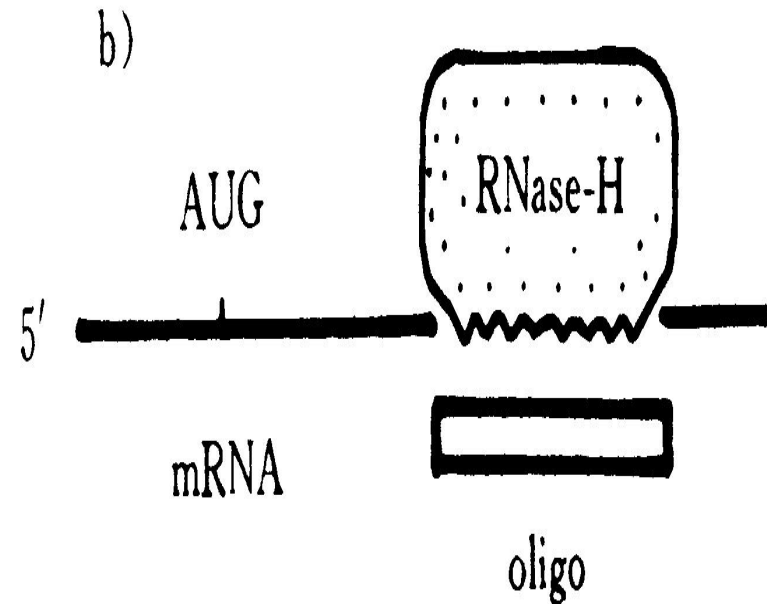


# 三、反意RNA的作用机理

## 1、抑制翻译



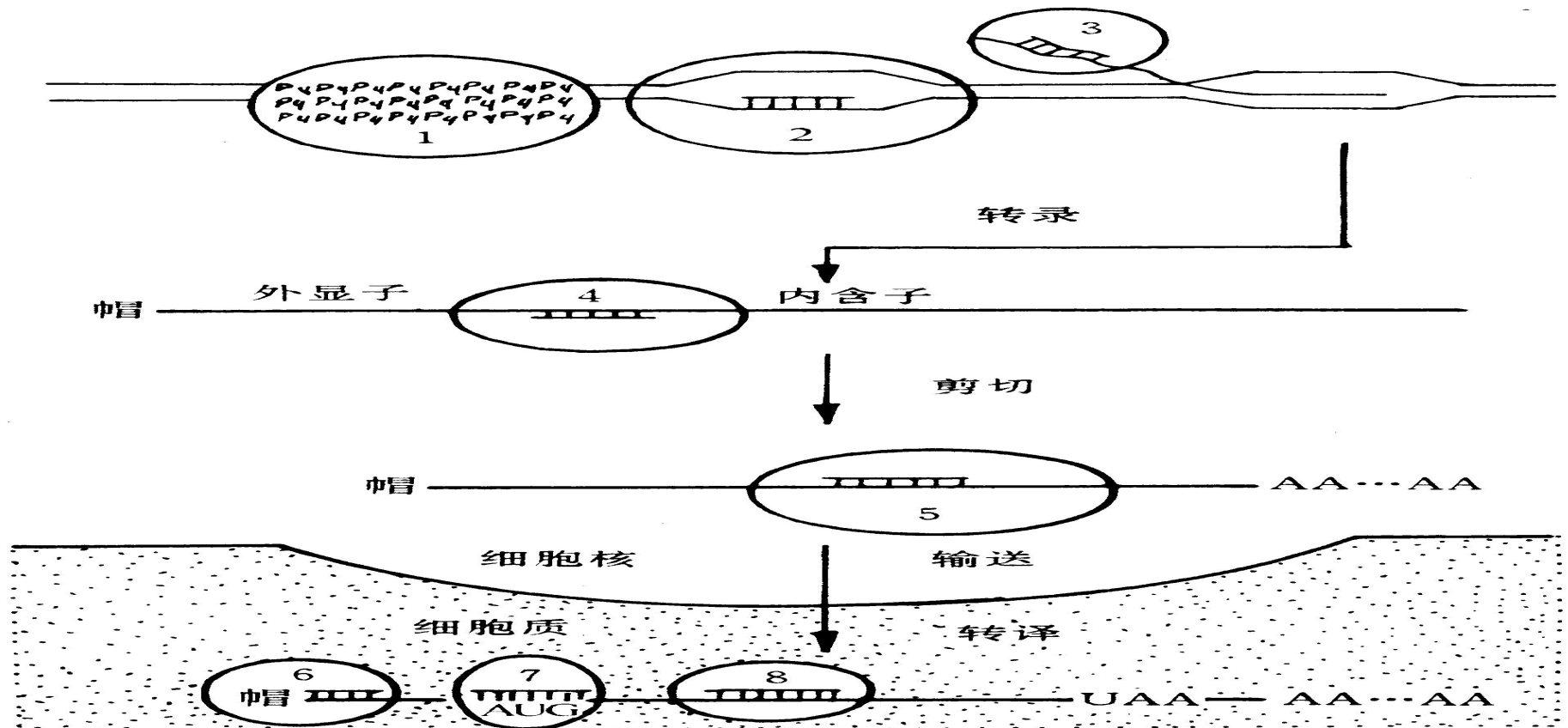
**a:反意寡核苷酸-mRNA  
杂交体阻断核糖体与  
mRNA的结合**



**b:反意寡核苷酸-mRNA  
杂交体促进RNA酶H降  
解mRNA**

## 2、micRNA对遗传信息流的可能作用

- 1: 与双链DNA结合形成DNA三股螺旋，从而抑制转录；
- 2: 与单链DNA结合，影响DNA转录；
- 3: 与DNA转录产物RNA结合干扰转录；
- 4: 与新生RNA的内含子与外显子交界处结合，干扰RNA的加工剪接；
- 5: 与RNA形成RNA-DNA杂交体，诱导RNA酶H水解RNA链；
- 6: 抑制转录起始因子与mRNA结合，干扰翻译起始；
- 7: 在起始密码处抑制mRNA与核糖体小亚基结合；
- 8: 与mRNA其他部位结合，诱导RNA酶H的水解，阻止新生肽链的延长



## 第六节 肽核酸

肽核酸（peptide nucleic acid，PNA）：一种以肽为骨架的DNA类似物。它是由手性不对称的中性肽骨架置换脱氧核糖磷酸骨架而成。

PNA链侵入双链DNA局部，置换其中一条DNA链，形成置换环（displacement loop, D-环）。

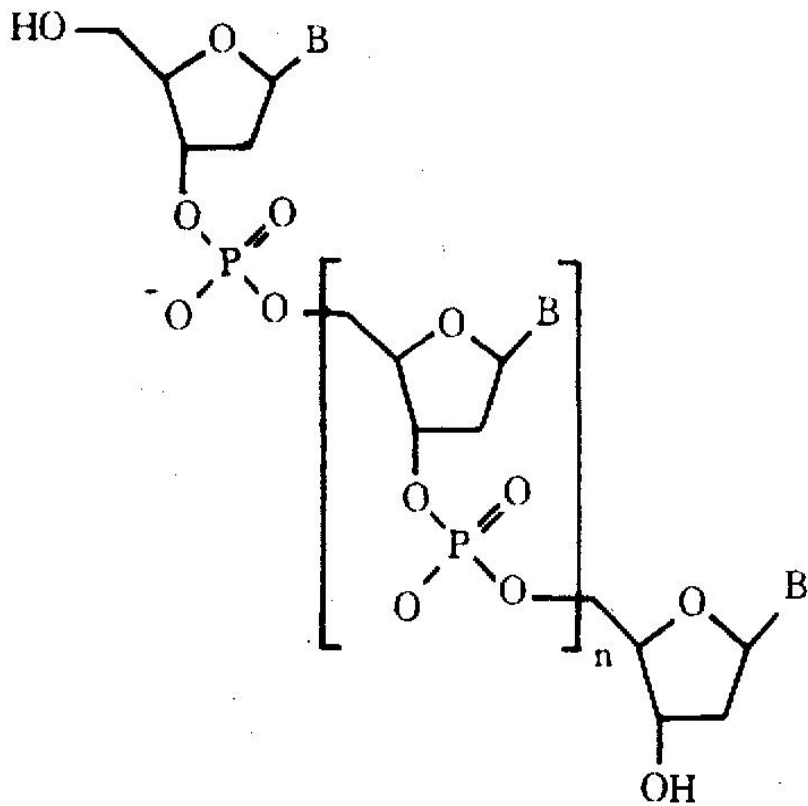
PNA 是一种肽和核酸碱基的嵌合体 (chimera)。肽核酸的表示法是从氨基端写到羧基端。

以胸腺嘧啶核苷十聚体PNA为例，可写成 PNA H-T<sub>10</sub>-Lys-NH<sub>2</sub> (其中H代表氨基端，或简写成 PNA T<sub>10</sub>-Lys NH<sub>2</sub>)，其中Lys NH<sub>2</sub>表示赖氨酸-ε 氨基附着于PNA的末端。

# 一、肽核酸的特性

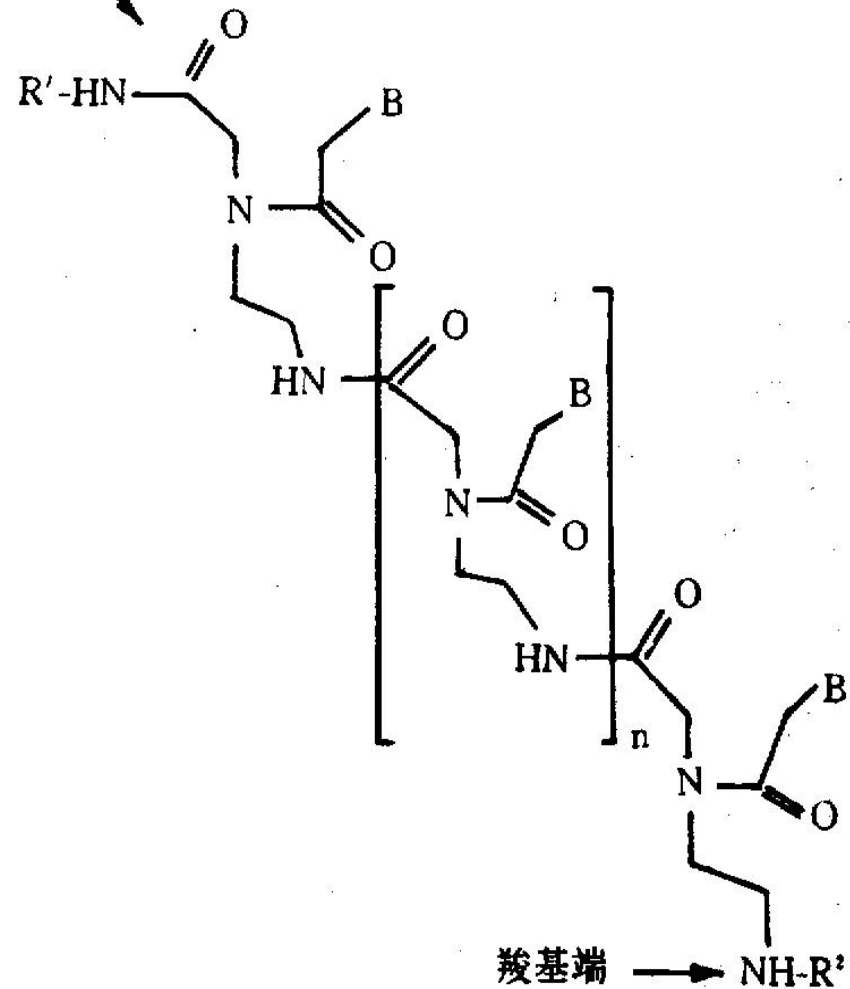
## ● PNA与DNA的同形性

PNA中两个碱基间的骨架键数目与碱基间的距离与DNA十分类似。PNA中的肽骨架是由（2-氨基乙基）甘氨酸单位所组成，与碱基是通过亚甲羰基接头连接。这种骨架与DNA的脱氧核糖磷酸骨架呈同形（homomorphous）。



DNA

氨基端



羧基端

PNA

PNA骨架与DNA的脱氧核糖磷酸骨架同形

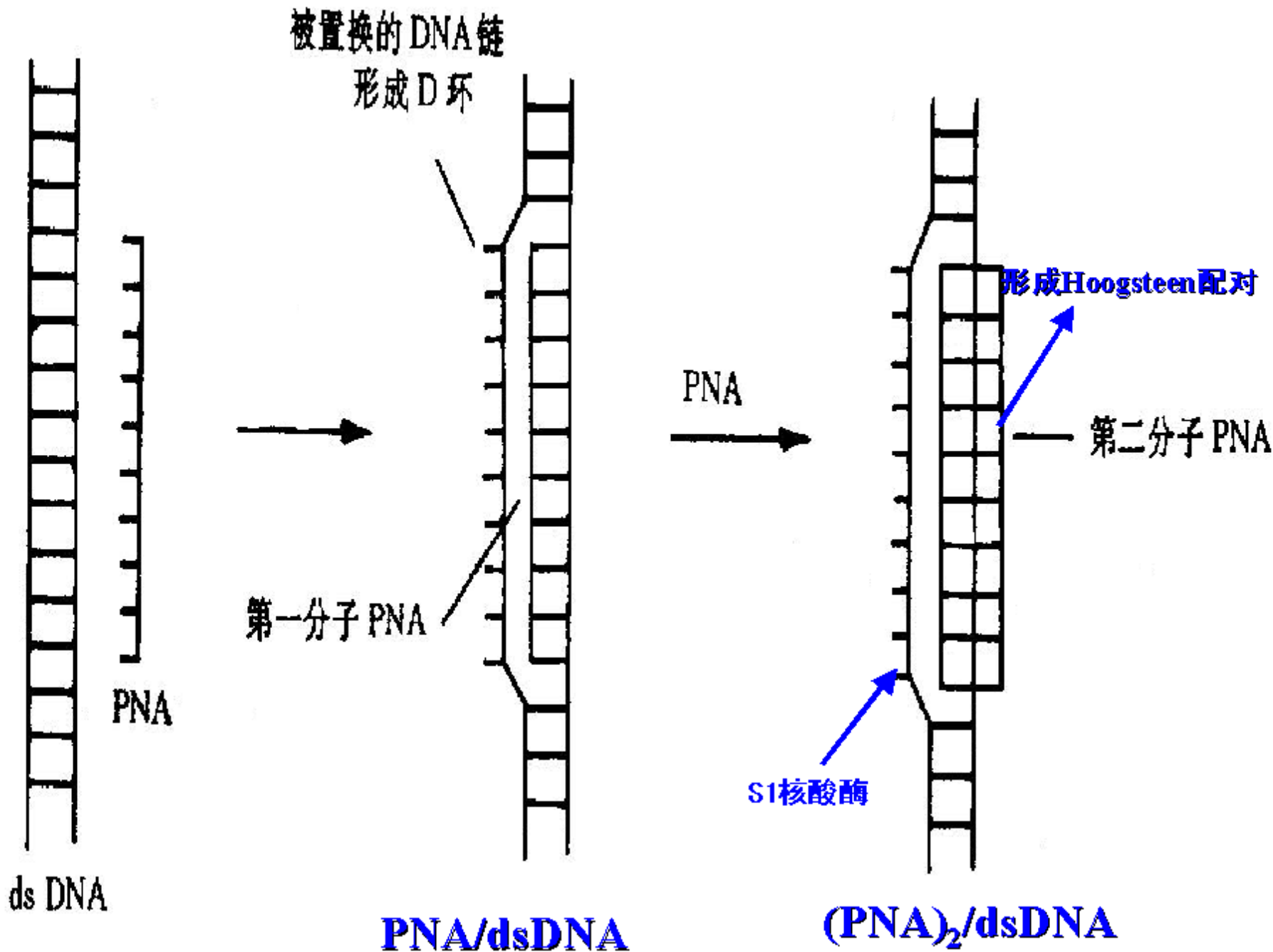
## ● PNA保留DNA的杂交性质

PNA能与互补的DNA或RNA形成稳定的Watson-Crick氢键。

## ● PNA与双链DNA序列特异结合

PNA能与双链DNA序列特异结合，并通过链置换（strand displacement）形成D环。





PNA与双链DNA结合有高度序列特异性。这由

PNA/DNA杂交体的热稳定性所决定。

如  $(\text{H-T}_{10}\text{-Lys-NH}_2)_2\text{d(A)}_{10}$  杂交体的熔解温

度  $T_m$  是  $72^\circ\text{C}$ ，引入单错配对时， $T_m$  只降低  $13^\circ\text{C}$ ，

如两个PNA分子结合形成的杂交体，即使含有单错

配对， $37^\circ\text{C}$  仍稳定。

## 二、肽核酸的作用

### 抑制转录：

$T_{10}$ PNA或混合序列15聚PNA与无G转录合的DNA转录链结合，在转录延长位点可引起90%~100%RNA聚合酶II的特异终止；而和 $T_{10}$ PNA与非转录链结合，位点特异抑制不超过50%。

## 抑制翻译

PNA可与DNA或RNA结合，抑制可发生在转录水平，也可发生在翻译水平。

体外翻译在PNA/RNA杂交分子位点发生特异终止。

如细胞核显微注射目标为T抗原mRNA的15聚或20聚PNA，可引起T抗原表达的特异抑制。