

一种新的 DNA 复制和转录模型

张汉波* 丁骅孙

(云南大学生物系, 昆明 650091)

摘要 DNA 复制和转录有两种模型, 一种是传统的滑动模型, 复制和转录发生时参与反应的蛋白质沿 DNA 模板滑动. 在另一种新提出的工厂模型中, 固定在核结构上的蛋白质拉动模板来完成 DNA 的复制和转录. 来自生物化学、生物物理学和细胞生物学等的实验证据表明, 新的工厂模型是生物活体细胞内真实的复制和转录模式.

关键词 复制, 转录, 滑动模型, 工厂模型

学科分类号 Q 50

DNA 复制和转录是生物学的中心内容之一. 随着生物化学和分子生物学技术的发展, 大量的体外复制和转录实验使得许多问题得以阐明, 诸如参与 DNA 复制和转录的各种蛋白质成分、复制和转录起始点的发动和调控等^[1-4]. 同时, 也因为这些过于简单化的体外实验证据, 可能使我们错误地理解了一些问题. 当我们在试管中加入 DNA 模板和必需的蛋白质成分以及合成反应所需的前体物质后, DNA 的复制和转录即可自动进行. 基于这些现象, 我们假定存在这样的模型, 即当 DNA 复制和转录发生时, 参与 DNA 复制和转录的各种蛋白质因子组织在一起, 形成一个类似“火车头”的复合体, 沿 DNA 模板滑动, 后面拖着复制的子代 DNA 链或 mRNA (图 1a、b). 这种我们非常熟

悉的复制和转录的滑动模型 (sliding model) 或轨道模型 (tracking model) 长期以来一直很合理地存在, 并被编入了各种教科书.

实际上, 传统的模型在很大程度上是建立在假定的基础上, 并没有直接的生物化学和细胞学的证据. 相反, 随着证据的积累, 我们有更多的理由相信一种新的模型存在^[5]. 在这个模型中, 参与复制或转录的蛋白质组成的复合体是固定在核基质和骨架上的, 复制和转录发生时, 它们将 DNA 模板卷进来, 排出新合成的子代 DNA 和 RNA (图 1c、d). 本文针对这个新的模型, 用近几年来生物化学、生物物理学和细胞学取得的证据, 从另一些不同的角度来进一步说明该模型.

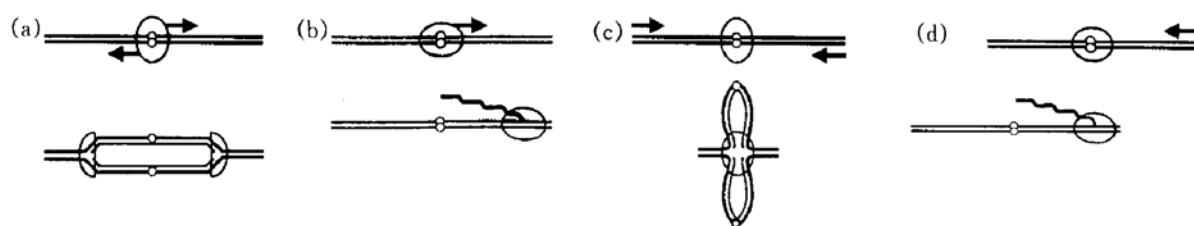


Fig.1 Two models for DNA replication and transcription

图 1 两种 DNA 复制和转录模型

在传统的滑动模型中, 参与 DNA 复制 (a) 和转录 (b) 的蛋白质沿模板滑动; 在新的工厂模型中与 DNA 复制 (c) 和转录 (d) 有关的蛋白质被固定在某些细胞结构物质上, 移动的是 DNA 模板. (a) DNA 四聚体分为两半, 每半由两个 DNA 聚合酶组成, 它们各负责一条先导链和后随链的复制; (b) 转录时, RNA 聚合酶沿模板滑动; (c) DNA 四聚体被固定, 当母链卷入时, 排出新合成的子代 DNA; (d) 模板滑过固定的 RNA 聚合酶, 排出转录产物. 小圆示复制或转录起始点, 箭头示聚合酶或模板的移动方向, 椭圆为聚合酶, 粗线为模板, 细线为新合成的 DNA, 曲线为转录产物 (引自 Cook^[5]).

1 固定的复制和转录位点

如果参与复制和转录的蛋白质沿 DNA 模板滑

* 通讯联系人.

Tel: 0871-5034282, E-mail: zhbdm@ynmail.com

收稿日期: 2000-03-06, 接受日期: 2000-03-31

动, 每个复制位点发动后, 产生两个复制叉, 负责两个复制叉向前推进的有关蛋白质必须分开, 背向而行 (图 1a). 把 DNA 聚合酶的催化亚单位和绿色荧光蛋白融合, 在枯草芽孢杆菌活细胞内观察 DNA 聚合酶的活动形式^[6]. 如果 DNA 聚合酶沿 DNA 模板滑动, 为了应付两个复制叉, 将看到两个绿色荧光点, 但绝大多数细胞中央只有单个绿色荧光点, 说明参与复制的蛋白质并没有分开.

大量来自荧光标记激光扫描显微实验的证据表明, 在 S 期的哺乳动物细胞核中, 大约有 10 000 个复制位点 (replication site, RS. 它们不是通常说的复制起始点, 而是复制活动进行的场所)^[7]. 每个 RS 负责约 1×10^6 bp 的 DNA 复制, 为了能在 45min 内完成这些 DNA 复制, 估计其中约包含了 6 个同时发动复制的复制子 (replicon). 在 S 期内追踪这些 RS 的位置变化, 如果复制进行时有关蛋白质沿模板滑动, 一是应见到同一个 RS 位置的不断变化, 二是前期发动的 RS 和后期发动的 RS 会有不同程度的混合. 但在整个细胞周期, 这些 RS 的位置不发生改变, 它们活跃的图式 (patterns) 在接下来的几代细胞中保持一致, 即同一个 RS 在后代细胞中同样的位置和时间发动. 这些 RS 实际上是由很多参与复制和转录的蛋白质因子组成的类似一个工厂的结构, 每个工厂同时完成多个复制和转录单位^[8,9]. 因此, 这种新模型又称为工厂模型 (factory model)^[6].

2 核基质和核骨架

上述复制和转录的蛋白质很可能固定在核基质和核骨架上, 后者是细胞核经高浓度的盐溶液抽提后残留的部分核仁、核片层、和遍布核空间的蛋白样网络组织^[10]. 早有证据表明, DNA 复制可能与这些结构有关. 用 2 mol/L 或更高浓度的盐溶液抽提去除中期染色体的大多数蛋白质, 留下 10% 的骨架蛋白. 从这些骨架蛋白处, 染色体松弛形成许多小环, 这些 DNA 环是 DNA 转录和复制结构域的基础. 在骨架蛋白中发现结合有 DNA 拓扑异构酶 II^[11]. 反过来, 构成核基质和核片层的大多数蛋白质也可以优先和潜在的 DNA 复制起始点结合, 实际上, 如果抽提了细胞核的大多数蛋白质成分, 前述那些 RS 位点仍然在遗留下来的核基质上保存完好^[7]. RNA 多聚酶 II 的大亚单位的超磷酸化形式 (hyperphosphorylated) 也发现能选择性地遗留在抽提的核基质制备物上^[12]. 因此, 不管核

基质或核骨架的结构是因染色体的结构而组织, 还是反过来, 后者依据前者而被组织, 总之, 与 DNA 复制和转录有关的蛋白质的确是与这些固定成分有联系.

在原核生物和某些细胞器中, 参与复制的蛋白质也和某些结构固定在一起. 原生动物线粒体的动基体 DNA (kinetoplast DNA, kDNA) 在复制时, 复制位点固定在线粒体基质内, 在整个细胞周期中不变, 拓扑异构酶 II 和 DNA 复制的引发酶也发现密集分布在相应的复制位点处. 这些固定的位点可能和线粒体膜结合在一起^[13]. 在细菌中, 有关染色体排列和行使转录和复制的成分也是通过某些蛋白质组分与细胞膜固定在一起.

3 前体物质的分区

前体物质 dNTP 的浓度是 DNA 复制的正调控因子. 在非饱和浓度下, 随 dNTP 的浓度增高, 复制速率增加. 一般来说, 如果按细胞体积来平均, 细胞内的 dNTP 浓度在 10~ 100 $\mu\text{mol/L}$, 这个值在大多数情况下达不到 DNA 多聚酶所需的底物饱和浓度 (50~ 100 $\mu\text{mol/L}$). 在原核生物中, 复制蛋白对 dNTP 的亲合力要比真核生物的低, 饱和浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$. 只从计算的 dNTP 浓度值来看, DNA 的复制不能达到最大速率. 然而, 通过实验测定, 细胞内 DNA 复制是在 dNTP 饱和浓度下进行的, 对这种现象的解释只能说明 dNTP 在复制位点是饱和的. 实际上, 在原核和真核生物中发现有 dNTP 相对集中的区域, 它们就在复制位点处^[14].

这种分布与固定的复制位点吻合, 但不符合传统的滑动模型. 因为随着多聚酶的滑动, 这些原材料库也必须滑动, 或者是 dNTP 沿模板均匀分布, 这种组织形式的调控和效率都不符合生物系统的高效性.

4 拉动 DNA 模板移动的力

无论是传统模型中多聚酶的移动还是新模型中 DNA 模板的移动, 都需要 ATP 水解产生的能量. 前者用来推动蛋白质, 后者则是拉动模板. 问题是推动蛋白质移动的力能否可以拉动长的 DNA 模板移动? 靠水解产生的能量来同时拉动整个基因组是不可能的, 但这个工作可以分区域和时段来完成, 即在某个时刻, 细胞只复制和转录一部分 DNA, 细胞中的 DNA 恰是按照这种方式来组织的. 以复制为例, 在鼠成纤维细胞中, 在某个时段估计每个

复制叉仅需负责约 75 kb 的 DNA 复制^[7]。即在某个时刻, 有关的蛋白质成分只进行这些区段的 DNA 复制和转录, 要拉动的也只是这些 DNA 区域。

有关蛋白质复合体能否拉动这样大小的 DNA, 先来看大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 F 质粒 (94.5 kb) 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的 Ti 质粒 (200 kb) 在细胞间的转移。这些质粒的转移首先由松弛体 (relaxosome) 作用, 被转移的一条链在 oriT 处特定位点断裂, 称为 T 链。该条链在解旋酶作用下, 由解链反应产生的力推动到受体细胞中, 涉及此反应有关的酶被锚定在细胞膜上^[15]。这些锚定的蛋白质能推动如此大的一条 DNA 单链进入受体细胞, 用同样的蛋白质组织形式反向将一条 75kb 的 DNA 双链卷入是完全有可能的。

随生物物理技术的发展, 现在已能通过光镊子 (optical tweezers) 的方法来测量单个生物大分子产生的力。通过这些方法, 测定了一个 RNA 多聚酶对 DNA 模板拉动的力约为 14 pN^[16], 这个力比目前已知的动基蛋白 (kinesin) 和肌球蛋白 (myosin) 的拉力要大, 前者约为 5~8 pN, 而后者仅为 3 pN^[17]。另外, 每水解一个 NTP, RNA 多聚酶可以使 DNA 移动 0.34 nm^[5]。DNA 多聚酶也应该有这个能力, 但关于其作用的细节研究未见报道。

5 结 语

总的来说, 对 DNA 复制和转录时有关蛋白质组织模型的认识应该转变, 虽然只是在一对相互作用的结构中否定了一个结构的运动 (复制和转录蛋白) 而支持另一个结构的运动 (DNA 模板), 但接受新的模型可以解释很多难以解释的实验现象。关于 DNA 复制起始点的特异性问题是一个例子。长期以来, 我们一直认为 DNA 的复制启动依赖特异的 DNA 序列 (oriT), 但有很多证据表明, 这种特异性不是完全基于 DNA 本身的序列, 而是也可能依赖于核的某些结构。提纯的中国仓鼠 (chinese hamster) 的 DHFR 基因在蟾蜍 (*Xenopus*) 的卵提取物中复制, DNA 复制的启动是非特异性的, 可以在多个位点启动复制。但 DHFR 基因在仓鼠的核内, 用同样的蟾蜍卵提取物来复制, 其复制启动是特异的。说明 DNA 在核中的组织形式在一定程度上决定了 DNA 复制启动的特异性。实际上,

DNA 复制可以在很多位点启动, 但 DNA 的延长只有启动发生在固定的复制位点时才能进行^[3]。

如果 DNA 的复制和转录是在固定的位置发生, 如何解释大量的体外复制和转录实验呢? 因为在那样的系统中并没有任何支持可溶性蛋白质因子固定的成分。Cook^[5]指出, 在大多数体外转录实验中, 由于长时间的预保温和高浓度的蛋白质成分, 这些转录因子有机会聚集成大的复合物, 使得这些成分有可能被固定。虽然这种可能性完全存在, 但我们认为, 这两个成分的运动是相对的, 在一定的条件下, 运动的角色可能发生转换。比如, 在体外的实验中, 如果拉动长的模板存在困难, 同时因为参与反应的蛋白质成分没有被固定, 水解 ATP 的能量也可能推动这些蛋白质成分沿模板滑动。但在活体细胞内, 这些蛋白质成分被核骨架和核基质固定在某些区域, DNA 模板也被组织成特定的形式。在这种条件下, 复制和转录就只能在固定的位点上发生, 大量的证据表明, 这可能是发生在活体细胞内真实的事件。另一个需要解释的问题是, 两个同时发动复制固定位点之间的 DNA 是如何完成复制的呢? 即当两个固定位点不断拉动 DNA 模板, 中间一段 DNA 将怎样完成复制? 是由这两个位点中的一个来完成, 还是重新组织蛋白质因子来发动复制? 这些问题尚需新的模型和实验证据来说明。

参 考 文 献

- 1 Waga S, Stillman B. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 721~751
- 2 Wold M S. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*, 1997, **66**: 61~92
- 3 Coverley D, Laskey R A. Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem*, 1994, **63**: 745~776
- 4 Uptain S M, Kane C M, Chamberlin M J. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem*, 1997, **66**: 117~172
- 5 Cook P R. The organization of replication and transcription. *Science*, 1999, **284** (5421): 1790~1795
- 6 Lemon K P, Grossman A D. Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science*, 1998, **282** (5359): 1516~1519
- 7 Ma H, Samarabandu J, Devdhar R S, *et al.* Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *J Cell Biol*, 1998, **143** (6): 1415~1425
- 8 Jackson D A, Pombo A. Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol*, 1998, **140** (6): 1285~1295

- 9 Leger-Silvestre I, Trumtel S, Noaillac-Depeyre J, *et al.* Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma*, 1999, **108** (2): 103~113
- 10 Croft J A, Bridger J M, Boyle S, *et al.* Difference in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*, 1999, **145** (6): 1119~1131
- 11 van Hodel K E. *Chromatin*. New York: Springer Verlag, 1988. 213~215
- 12 Pederson T. Thinking about a nuclear matrix. *J Mol Biol*, 1998, **277** (2): 147~159
- 13 Johnson C E, Englund P T. Changes in organization of *Crithidia fasciculata* kinetoplast DNA replication proteins during the cell cycle. *J Cell Biol*, 1998, **143** (4): 911~919
- 14 Mathews C K. Enzymes of DNA precursor synthesis and the control of DNA replication. In: Adolph KW, eds. *Molecular Biology of Chromosome Function*. New York: Springer-Verlag, 1989. 7~12
- 15 Lanka E, Wilkins B M. DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64**: 141~169
- 16 Yin H, Wang M D, Svoboda K, *et al.* Transcription against an applied force. *Science*, 1995, **270** (5242): 1653~1657
- 17 Mehta A D, Rock R S, Rief M, *et al.* Myosin V is a processive actin-based motor. *Nature*. 1999, **400** (6744): 590~593

A Novel Model for DNA Replication and Transcription

ZHANG Han-Bo^{*}, DING Hua-Sun

(Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract In two models for DNA replication and transcription, traditional one known as sliding model postulates that proteins involving replication and transcription track on the DNA template as a locomotive. In factory model proposed recently, those proteins are immobilized on nuclear structure, to pull the template. Growing evidence from biochemistry, biophysics, and cell biology suggests that the factory model is an actual fact *in vivo*.

Key words replication, transcription, sliding model, factory model

^{*} Corresponding author. Tel: 86-871-5034282, E-mail: zhbdm@ynmail.com

Received: March 6, 2000 Accepted: March 31, 2000