

- 2 Palmiter R D, Brinster R L. *Ann Rev Genet*, 1986; **20**: 465
- 3 戴旭明, 胡以平, 傅继梁. *中华医学遗传学杂志*, 1995; **12** (2): 99
- 4 戴旭明, 胡以平. *国外医学遗传学分册*, 1994; **17** (3): 116
- 5 Mansour S L, Thomas K R, Capecchi M R. *Nature*, 1988; **336**: 348
- 6 Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E *et al.* *Nature*, 1982; **300**: 611
- 7 Gossen M, Bonin A C, Bujard H. *TIBTECH*, 1994; **12**: 58
- 8 Gossen M, Bujard H. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; **89**: 5547
- 9 Flavell R B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 3490
- 10 Finnegan J, McElroy D. *Biotechnology*, 1994; **12**: 883
- 11 Janne J, Hyttinen J M, Peura T *et al.* *Ann Med*, 1992; **24**: 273

Molecular Biological Characteristics of Transgene. Dai Xuming, Pan Xinghua, Fu Jiliang (*Department of Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*).

Abstract Transgene, a concept becoming more and more widely used in modern molecular biology research, has been used to refer to all the foreign genes which were reconstructed and transferred by genetic engineering strategies, and then stably integrated into the genomes of higher eukaryotic cells. The types of transgene structure, its genetic behavior in the recipient cells, the characteristics of transgene expression, the factors involved in the expression regulation and the biological effects of the transgenes are reviewed. The unknown problems in the transgenic research are illustrated. The necessity of doing the systematical research about the molecular biological characteristics of the transgenes is pointed out.

Key words transgene, molecular biological characteristics, transgenic organism, gene structure, gene expression regulation, biological effects

DNA 切除修复与转录偶联

周平坤

(北京放射医学研究所生物化学研究室, 北京 100850)

摘要 细胞 DNA 受到某些环境理化因子损伤后, 其中活性转录基因和 DNA 转录链上的损伤被优先切除修复, 这种 DNA 选择性修复直接与基因转录过程偶联. 在大肠杆菌中已分离到实现此功能的转录修复偶联因子 (TRCF), 是由 *mdf* 基因编码的一种具有 ATPase 活性的 DNA 结合蛋白. 在真核细胞中, 发现某些 DNA 修复蛋白也在 DNA 转录中起作用, 如人 DNA 切除修复基因 ERCC-3 编码产物, 是转录因子 TF II H 中最大亚基 p89, 酵母切除修复基因 RAD3 就是编码因子 b 的最大亚基 p85.

关键词 DNA 选择性修复, 转录修复偶联因子, DNA 修复基因, 转录因子

DNA 作为环境中电离辐射、紫外线等多种理化因子损伤细胞的靶分子, 受到损伤后, 将通过一系列的修复机制被修复, 以恢复 DNA 的正常结构, 维系细胞的遗传稳定性. 核苷酸切除修复, 是一种重要的 DNA 修复机制, 在原

核细胞中, 由 UvrA、UvrB 和 UvrC 蛋白形成 ABC 切除核酸酶复合物, 在损伤点 5' 端第 8 个磷酸二酯键和 3' 端第 15 个磷酸二酯键

切除包括损伤部位在内的一段碱基, 留下缺口由 DNA 聚合酶 I 和连接酶来修补. 真核细胞切除修复发生在损伤点 3' 端第 15 个磷酸二酯键到 5' 端第 21~23 个磷酸二酯键, 人类这种切除核酸酶活性由 8~10 个蛋白协同完成 (着色性干皮病基因产物 XPA~XPG, ERCC 系列), 酵母是由 RAD3 系列蛋白完成. 随研究技术手段不断发展, 人们对这类 DNA 损伤修复的认识已进入了新的阶段, DNA 选择性修复为揭示生命过程中的微观现象增加了新的内容, 也使得人们开始认识到 DNA 修复与基因转录这两个基本的生命过程之间的内在联系.

1 DNA 选择性修复中的启示

细胞 DNA 受到环境理化因子损伤后, 通过一系列的机制进行修复. 多年来, 人们在研究 DNA 损伤修复中, 将细胞的全基因组 DNA 作为一个均一体来看待, 直到 80 年代中后期, 随着新的研究技术不断出现, 开始对不同转录活性状态 DNA 的损伤修复有了新的认识. 1985 年, 斯坦福大学 Hanawalt 研究小组^[1]首次报道活性转录基因的优先修复. 他们检测的是 CHO 细胞中活性转录的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因, 其转录产物参与嘧啶合成, 是细胞存活必需基因. 细胞受紫外线 (UV) 照射后 24 h, 位于 DHFR 基因内的 UV 诱发环丁烷嘧啶二聚体切除修复率为 75%, 明显高于基因下游附近的序列和全基因组 DNA 的修复 (10%~15%). 接着又报道了在 Swiss 小鼠 3T3 成纤维细胞中, 活性转录的 c-abl 原癌基因内 UV 损伤的修复水平, 明显高于静止转录的 c-mos 原癌基因^[2]. 进一步研究发现, 人和 CHO 细胞中 DHFR 基因还存在链特异性选择性修复, 即 DHFR 基因中转录链 (模板链) 的修复水平比非转录链 (编码链) 高 2~10 倍^[3].

在我们的实验室发现, 人 HL-60 细胞经 DMSO 诱导后, c-myc 基因停止转录, 其 UV 损伤的修复水平也相应下降, 另外, 活性转录时 c-myc 基因的修复明显快于不转录的 β 珠蛋

白基因及全基因组^[4].

Terleth 等^[5]以酵母 *S. cerevisiae* 中决定交配型的基因作为研究材料, 该基因在染色体 III 有序列完全相同的 3 个拷贝, 通常只有其中一个拷贝 (MAT α) 表达, 其余拷贝 (HML α) 不表达. 他们的实验结果显示活性转录拷贝 MAT α 比不转录拷贝的修复效率高 2.5 倍. Sweder 等^[6]和 Leadon 等^[7]又分别报道酵母细胞活性转录的 RPB₂ 基因和 GAL7 基因转录链的优先修复.

细菌同样存在 DNA 选择性修复. Mellon 等^[8]报道大肠杆菌 LacZ 基因未经诱导时, 两条链的修复效率相同, 经 IPTG 诱导后, 转录链修复明显优于非转录链.

对于这种活性转录基因和 DNA 转录链优先修复的机制, 人们首先是从细胞染色质结构来考虑, 认为活性转录区域的染色质结构较为松散、开放, 有利于修复酶的接近, 从而使损伤容易被识别和修复. 但仅此还难解释以下几点: a. 活性转录基因的两条链都处在同一染色质结构域中, 为何 DNA 优先修复只发生在转录链? b. 原核细胞虽然没有真核的染色质结构特点, 但同样具有 DNA 选择性修复作用; c. 转录链优先修复只在基因转录时才发生. 因此, 从基因转录链选择性修复现象中, 预示着细胞 DNA 修复与转录这两个基本的生命过程可能通过某种机制相偶联.

2 DNA 选择性修复依赖于基因转录

Sweder 等^[6]利用一株 II 型转录温度敏感突变酵母细胞, 对 DNA 转录链优先修复与基因转录的相关性进行了研究. Y₂₆₀ 是一株 rpb-1 位点 (编码 RNA 聚合酶 II 最大亚基) 突变酵母, 其特征是在 24℃ 条件下能进行基因转录, 36℃ 时, 由 RNA 聚合酶 II 催化的基因转录停止. 他们将含有编码 RNA 聚合酶 II 第二大亚基 RPB2 基因的质粒导入 Y₂₆₀ 细胞和一株野生型酵母 DB1033, 分别得到转化克隆 YSH11 和 YSH10, 各自都含两个拷贝 RPB2 基因, 一个是自身位于染色体上的, 另一个是

导入的质粒中. 细胞受 UV 照射后, 在 24℃ 条件下修复, 两株细胞中无论是染色体上还是质粒中的 RPB2 基因, 转录链的修复明显优于非转录链. 当细胞处于 36℃ 条件下, 来源于野生型细胞的转化克隆 YSH10, 仍然存在转录链优先修复, 而来源于温度敏感突变株的转化克隆 YSH11, 完全丧失转录链优先修复, 所测得 RPB2 基因转录链的修复效率已下降到非转录链水平.

RNA 聚合酶抑制剂能阻止活性转录基因的转录链优先修复. Leadon 等^[9]研究发现人金属巯基组氨酸三甲基内酯基因在细胞中被糖皮质激素或重金属诱导转录时, 其转录链上 UV 损伤修复明显提高, 而非转录链无变化. 如果细胞同时还受到 RNA P II 抑制剂 α -鹅膏蕈碱处理时, 就不会出现这种转录链优先修复. 同样, 利福平或 Lac 阻抑子, 通过阻止原核细胞的基因转录, 也能消除其 DNA 转录链的优先修复作用^[8], 说明 DNA 选择性修复与基因转录直接相偶联.

3 DNA 修复与转录偶联的分子机制

3.1 原核细胞中转录与修复偶联因子

对于 DNA 修复与转录偶联的机制, 人们最初的设想是 RNA 聚合酶在 DNA 损伤位点受阻, 并协助 DNA 修复酶识别损伤部位, 促进 DNA 修复. 但体外模型的研究结果恰好相反, 当 RNA 聚合酶在损伤位点受阻后, 实际上是抑制了转录链的 DNA 修复, 而不影响非转录链的修复^[10]. 因此就提出在此修复模型中还缺少一种偶联 DNA 修复与转录的关键因子, 并假设其功能是: a. 克服受阻 RNA 聚合酶对修复的抑制作用; b. 将修复酶“招集”到损伤位点. 很快 Selby 和 Sancar 就从大肠杆菌中分离出这种 DNA 转录与修复偶联因子 (transcription-repair coupling factor, TRCF)^[11]. 大肠杆菌的 *mfd*⁻ 突变株不能进行 DNA 转录链优先修复, 在其无细胞提取物中加入上述 TRCF, 就能在体外转录与修复模型中恢复其转录链优先修复的功能^[12], 由此推

导, *mfd* 编码的就是此 TRCF, 并很快被证实.

mfd 基因定位于大肠杆菌的 25.3' 位置, 编码的 TRCF 是一个 1148 个氨基酸组成的蛋白质分子, 在其序列中有三个特别的功能区域^[12]: a. 中部具有解旋酶中高度保守的解旋活性基元序列, 如与 *E. coli* 的 RecG 蛋白的解旋酶基元有 38% 的同源性; b. 氨基末端的 140 个氨基酸序列与 UvrB 蛋白质有 22% ~ 25% 的同源性; c. 羧基末端有一个亮氨酸拉链基元序列, 可能参与 TRCF 与 RNA 聚合酶之间的相互作用. TRCF 是一种 DNA 结合蛋白, 并且有 ATPase 活性. 体外转录和修复模型表明, 加入 TRCF 足以实现细菌 DNA 修复与转录偶联反应, 并必须在基因转录的同时, 才能特异性诱发 DNA 转录链的优先修复.

TRCF 在原核细胞 DNA 修复与转录偶联中起的作用包括: a. 特异性结合受阻于损伤位点的 RNA 聚合酶, 并通过一个需 ATP 的反应释放 RNA 聚合酶, 解除其对修复的抑制; b. 与修复酶 UvrABC 复合物中 UvrA 亚基结合, 将修复酶招集到损伤部位. 据此, 人们设想了一个转录与修复偶联的模型^[12]. RNA 聚合酶 (RNAP) 遇到转录链上损伤点后受阻, TRCF 特异性识别受阻的 RNAP-RNA-DNA 三元复合物, 释放 RNAP 和未完成的转录产物 RNA, 并取代 RNAP 结合在损伤附近. TRCF 以其与 UvrA 亚基的亲合性, 将修复酶复合物 A₂B₁ 招集到损伤部位, 然后解离 UvrA 亚基, 自身也从 DNA 上解离, 促成 UvrB-DNA 复合物形成. UvrC 亚基再结合上去, 在损伤位点 3' 侧和 5' 侧切除长约 23 个碱基的片段, 在解旋酶 II (UvrD) 的协助下释放出损伤片段, 留下的缺口由 DNA 聚合酶 I 和连接酶来修补. 有关 TRCF 在此偶联过程的作用, 已由足迹图谱技术检测证实.

3.2 真核细胞中转录与修复偶联机制

人们对真核细胞的转录与 DNA 修复偶联机制的认识还不是很清楚, 但也取得了一些重要进展. Cockayne 综合征是一种对 UV 敏感的人类常染色体隐性遗传病, 典型症状有身体

矮小, 侏儒型, 神经退化, 极度光敏. 细胞融合实验表明至少有两个互补组 (CS-A, CS-B)^[13]. CS 细胞具有大肠杆菌 *mfd*⁻ 突变株相同表型, 即不能进行基因和转录链特异性优先修复. 据此推论 CS 基因编码产物, 可能就是相当于细菌 *mfd* 蛋白的人类基因转录与 DNA 修复偶联因子 (TRCF)^[14,15]. 互补 CS-B 细胞 UV 敏感性的基因, 是人 DNA 切除修复基因 ERCC-6^[16], 已被克隆和测序, 是一巨大基因片段, 全长 168 kb. CS-B/ERCC-6 基因编码的是分子量为 160 000 蛋白质, 也有解旋酶基元序列.

值得注意的是, 近来研究者们不断发现有些 DNA 修复基因编码的产物, 就是 DNA 转录因子中的某个亚基, 从而为深刻认识 DNA 转录与修复间的直接联系提供了重要的线索. 其中最具有代表性的是 Schaeffer 等^[17] 发现人 DNA 切除修复基因 XPB/ERCC3 所编码的就是人类转录因子 TF II H (BTF2) 的最大亚基 p89. ERCC-3 基因是通过用人基因组 DNA 修补 CHO 细胞 UV 敏感突变株而克隆出来的, 全长 89 kb, 能修补人着色性干皮病互补组 B (XPB) 的缺陷. 从 ERCC-3 基因 cDNA 序列推导所编码的是一个 782 个氨基酸的蛋白质分子, 有如下几个功能区域: a. 潜在的核定位信号 (NLS); b. 类似于高迁移蛋白组分, 转录因子中的酸性功能区; c. 潜在的螺旋-转角-螺旋基元序列; d. ATP 和 Mg^{2+} 结合位点, 可能为 ATPase 活性功能区; e. DNA 和 RNA 解旋酶中的高度保守区.

TF II H (BTF2) 是一种通用转录起始因子与其他至少 6 个通用转录因子 (TF II A、TF II B、TF II D、TF II E、TF II F、TF II J/TF II G) 一同结合在 TATA box 附近核苷酸序列上, 形成活性起始复合物, 启动 RNAP II 催化的转录. TF II H 由 8~10 个多肽亚基组成, 其中最大亚基 p89 就是由 XPB/ERCC-3 基因编码, 具有 DNA 依赖的 ATPase 活性、DNA 解旋酶活性和羧基末端功能域 (CTD) 特异性激酶活性.

酵母细胞中与 TF II H 功能同源性蛋白是因子 b, 有 5 个亚基 (p85、p75、p55、p50、p38), 其中有 3 个亚基 (p85、p75、p50) 也在 DNA 切除修复过程中起作用. 最大亚基 p85, 就是酵母切除修复基因 RAD3 的产物, RAD3 基因与人类 DNA 切除修复基因 XPD/ERCC-2 有较高的同源性^[18]. p75 和 p50 分别由酵母切除修复基因 TFB1 和 SSL1 编码^[19,20]. 另外, 与人 XPB/ERCC-3 基因有同源性的酵母细胞 DNA 切除修复基因 RAD25/SSL2, 也具有解旋酶活性, 尽管不是因子 b 的成分, 但也是 RNAP II 催化的转录反应的必需因子^[21].

上述因子是以同一催化活性参与 DNA 转录和修复反应, 还是以不同功能在这两个过程中发挥作用, 目前尚无明确定论. 最近的报道, 针对 XPB/ERCC-3 和 XPD/ERCC-2 的抗体, 能抑制基因转录, 高度纯化的 TF II H 因子能互补 XPB/ERCC-3 和 XPD/ERCC-2 突变株的切除修复缺陷^[15]. 根据已有的信息, Drapkin 等^[15] 提出了一个人 DNA 转录与修复偶联模型: 在基因转录过程中, DNA 受到损伤时, RNAP II 在损伤位点受阻, 以其对 TF II H (XPB/ERCC-3~XPD/ERCC-2) 的高亲和力将此复合物吸引到损伤部位. CSB/ERCC-6 可能作为 TRCF, 同时具有对 RNAP II 和 DNA 修复酶中损伤识别亚基的高亲和力, 取代 RNAP II 结合到 DNA 损伤位点, 并招集有关的 DNA 修复蛋白. 待形成稳定的 DNA-蛋白质复合物后, CSB/ERCC6 从复合物中解析出来, 启动 DNA 切除修复过程. 除 CSB 之外, 人类可能还有其他因子起到 TRCF 作用, 如 CSA 因子.

目前尚未在酵母中发现 DNA 选择性修复缺陷株, 因酵母细胞是一很好的实验材料, 如在此方面有所突破, 无疑将会对认识真核细胞 DNA 转录与修复偶联机制起很大推动作用.

参 考 文 献

359

- 2 Madhani H D, Bohr V A, Hanawalt P C. *Cell*, 1986; **45**: 417
- 3 Mellon L, Spivak G, Hanawalt P C. *Cell*, 1987; **51**: 241
- 4 严涛, 崔立斌, 孙丽亚等. *科学通报*, 1994; **39**: 1029
- 5 Terleth C, van Sluis C A, van de Putt P *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1989; **17**: 433
- 6 Sweder K S, Hanawalt P C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 10696
- 7 Leadon S A, Lawrence D A. *J Biol Chem*, 1992; **267**: 23175
- 8 Mellon I, Hanawalt P C. *Nature*, 1989; **342**: 95
- 9 Leadon S A, Lawrence D A. *Mutat Res*, 1991; **255**: 67
- 10 Selby C P, Sancar A. *J Biol Chem*, 1990; **265**: 21330
- 11 Selby C P, Sancar A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 8232
- 12 Selby C P, Sancar A. *Science*, 1993; **260**: 53
- 13 Zelle B, Lohman P M. *Mutat Res*, 1979; **62**: 363
- 14 Venema J, Mullenders L H F, Natarajan A T *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 4707
- 15 Drapkin R, Sancar A, Reinberg D. *Cell*, 1994; **77**: 9
- 16 Troelstra C, van Gool A, de Wit J *et al.* *Cell*, 1992; **71**: 939
- 17 Schaeffer L, Roy R, Humbert S. *Science*, 1993; **260**: 58
- 18 Feaver W, Svejstrup J Q, Li Y *et al.* *Cell*, 1993; **75**: 1379
- 19 Gileadi O, Feaver W J, Kornberg R D. *Science*, 1992; **257**: 1389
- 20 Yoon H, Miller S P, Pabich E K *et al.* *Genes Dev*, 1992; **6**: 2463
- 21 Guzder S N, Sung P, Bailly V *et al.* *Nature*, 1994; **369**:

578

DNA Excision Repair and Coupling Transcription. Zhou Pingkun (*Department of Biochemistry, Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract With DNA lesions induced by environmental physical and chemical factors, actively transcribed genes and DNA transcribed strands were preferentially repaired. This preferential DNA repair directly connected with the process of gene transcription. A transcription-repair coupling factor (TRCF) encoded by *mdf* gene has been identified and isolated in *E. coli*. TRCF is a DNA binding protein with ATPase activity. In eukaryotes, some DNA repair proteins were found to be involved in transcription. For example, the largest subunit of general transcription factor TF II H, p89, is the encoding product of human excision repair gene ERCC-3. And the excision repair gene RAD3 of yeast encodes the largest subunit of transcription factor b, p85.

Key words preferential DNA repair, transcription-repair coupling factor (TRCF), DNA repair gene, transcription factor

叶绿体 PS II 光能耗散机制的研究进展*

李晓萍 陈贻竹 郭俊彦

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 植物的光合作用包括光能固定和过剩光能的耗散两个方面, 在光能耗散方面, 除了人们以前所认识的光呼吸、Mehler 反应等生化机制外, 近几年人们发现在光合系统 II (PS II) 复合体内还存在三种光能耗散方式: a. 围绕 PS II 的电子循环; b. 与类囊体膜的能量化和叶黄素循环有关的热耗散; c. 与 PS II 反应中心异质化及 D1 蛋白修复循环有关的能量耗散机制。

关键词 光能耗散, 围绕 PS II 的电子循环, 类囊体膜的能量化, 叶黄素循环, PS II 反应中心异质化, D1 蛋白循环