

大肠杆菌原核增强子样序列的克隆及其结构与功能的研究

朱 民 吴淑华* 秘晓林 薛水星 韩 峰

(中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

摘 要 利用氯霉素乙酰转移酶(*cat*)以及 β -半乳糖苷酶(*lacZ*)基因作为报告基因,从大肠杆菌 MC1061 株染色体基因组中克隆到 3 个原核增强子样序列——MC2, MC8, MC9, 这 3 个片段均具有正反向增强活性,对 β -半乳糖苷酶基因的增强活性(正向)在 2~5.5 倍之间。采用体内转录, RNA Dot blot 杂交的方法对 MC8 的功能进行了研究,结果表明, MC8 片段对于基因表达的调控发生在转录水平上。用核酸外切酶 III 末端缺失的方法对 MC8 的功能区进行了定位。结果显示, MC8 的功能区位于距其正向克隆 5' 端 450~950bp 长约 500bp 的区段内。在 450~600bp 以及 840~950bp 区段内至少分别含有一个功能位点。序列分析的结果表明, MC8 功能区有 3 个 AT 丰富区,其中 2 个分别位于 450~600bp 以及 840~950bp 区段内。

关键词 大肠杆菌 原核增强子样序列

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0027-04

原核增强子是一种可调节基因表达的顺式元件,它与真核增强子类似,也具有位置与方向的不依赖性、组织特异性等特征,一部分原核增强子已证实可以被特异性结合蛋白所识别,并通过细胞内其他一些辅助蛋白因子来激活转录^[1~3]。

本室曾在大肠杆菌 K12 系 JM103 株中筛选到一个原核增强子样序列 M 片段,在 JM103 株可以增强报告基因——氯霉素乙酰转移酶(*cat*)和 β -半乳糖苷酶(*lacZ*)基因的表达,这种增强子效应无明显方向性;并具有组织特异性,在大肠杆菌 K12 系 JM103, MC1061 和 C600 中可发挥增强功能,而在非 K12 系菌株 HB101 中作用不明显^[4],进一步研究表明, M 片段的增强作用是在转录水平上^[5]。本实验选择同为大肠杆菌 K12 系的 MC1061 菌株,从中筛选新的原核增强子。并从筛选到的 3 个原核增强子样序列 MC2, MC8 和 MC9 中选择增强活性较好的 MC8 片段,对其结构与功能进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株:克隆载体 pSK, pGEM-3Z(-) 和增强子检测载体 pKN2, pAL 均由本室提供 MC1061:基因型为 *hsdRmcrBaraD139Δ(araABC-*

leu)7679ΔlacX74galUgalKrrpsLthi。

1.1.2 工具酶:限制酶和其他修饰酶购自美国 New England Biolabs 公司和中国医学科学院友谊生物制品公司。

1.1.3 试剂盒:非放射性 DNA 标记及检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 有限公司,大量质粒制备试剂盒和质粒末端删切 Erase A Base 试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 方法

大肠杆菌 MC1061 株染色体 DNA 的制备按文献 [6] 细菌质粒的制备,片段回收及重组转化,参照文献 [7] β -半乳糖苷酶活性测定,按文献 [8] 进行。地高辛标记 DNA 探针的制备及检测参照试剂盒说明,定向缺失突变体的制备参照试剂盒说明。序列同源性比较,采用 DNASIS 软件进行。

2 实验结果

2.1 原核增强子样序列的克隆

采用 pKN α (见图 1) 作为增强子检测载体,它带有多克隆位点,痘苗病毒启动子 N 和氯霉素乙酰转移酶(*cat*)报告基因,在氯霉素 50~100 μ g/mL 的平皿上生长。

提取大肠杆菌 MC1061 株染色体,经 *Hae* III 内

收稿日期:1998-09-21 修回日期:1999-07-05。

基金项目:国家高技术研究发展计划项目。

* 通讯作者,电话:63519134。

切酶消化,插入到 pKN2 启动子上游多克隆位点的 *Sma*I 位点,经连接转化大肠杆菌后,在浓度为 200 μ g/mL 的氯霉素平板上进行压力筛选。结果筛选到 3 个阳性克隆,其插入片段的大小分别为 0.6kb, 1.2kb 和 1.9kb 左右,分别命名为 MC2, MC8 和 MC9。

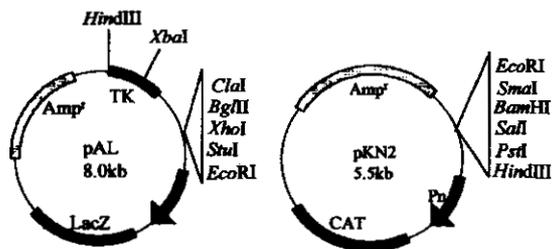


图 1 增强子检测载体

Fig.1 Vectors used in enhancers cloning

2.2 MC2, MC8 和 MC9 序列对基因表达的增强作用

为检测 MC2, MC8 和 MC9 片段是否具有增强子的重要特征,即方向不依赖性,将这 3 个片段分别以正反两个方向克隆到增强子检测载体 pAL(见图 1)。pAL 带有多克隆位点,痘苗病毒 7.5K 启动子和 β -半乳糖苷酶报告基因(*lacZ*)。

结果发现 3 个片段正反向对 *lacZ* 基因表达均有一定的增强活性,其中以 8 号片段正向较高,为 5.5 倍(图 2)。由此可确定 MC2, MC8 和 MC9 片段为我们在 MC1061 株筛选到的原核增强子序列。

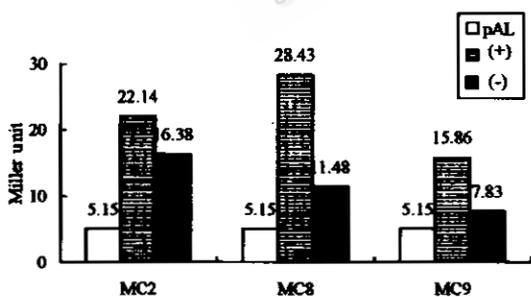


图 2 原核增强子样序列对半乳糖苷酶活性的影响

Fig.2 Influence of prokaryotic enhancer-like sequences on the expression of *lacZ* gene in host *E. coli* strain

2.3 序列测定及比较

为了测定原核增强子样序列 MC2, MC8 和 MC9 是否来源于大肠杆菌 MC1061 染色体以及它们之间是否具有同源序列,我们对 3 个片段分别进行序列测定。然后在 Genbank 核酸数据库中查询同源序列,结果表明,3 个片段与大肠杆菌 K12 系菌

株的同源性均在 90% 以上,说明均来自同为大肠杆菌 K12 系的 MC1061 菌株,并且三者之间并无同源序列。这样,我们选择 MC8 号片段作进一步结构与功能的研究。

2.4 MC8 序列对 β -半乳糖苷酶基因转录的增强作用

用地高辛标记的部分 *lacZ* DNA 片段作为探针,以 Dot 杂交对带有和不带有 MC8 片段的克隆菌的 *lacZ* mRNA 含量进行了测定和比较。Dot 杂交的结果显示,带有正向和反向 MC8 片段的克隆菌中, *lacZ* mRNA 含量分别比不带 MC8 片段的高 4 倍和 2 倍以上(图 3)。这说明 MC8 序列对 *lacZ* 基因表达的增强作用发生在转录水平上。

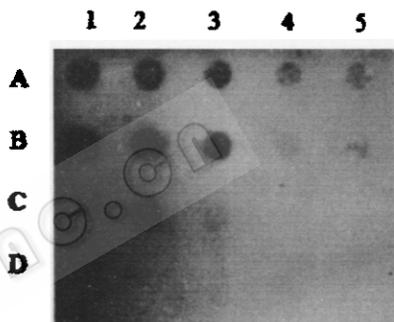


图 3 *lacZ* 基因 mRNA 斑点杂交

Fig.3 Dot blot hybridization of *lacZ* gene

1~5: Dilution with 2 \times gradient; A: pAL-MC8 (+); B: pAL-MC8 (-); C: pAL, positive control; D: JM103, negative control

2.5 MC8 序列功能部位的研究

为了确定 MC8 片段的功能部位,我们对 MC8 片段进行缺失突变体分析。首先构建 pGEM 3Zf (-)-MC8(\pm)。此质粒上的 *Kpn*I 和 *Bam*HI 分别可产生一个 3' 和 5' 突出端,使得核酸外切酶 III (*Exo*III) 可以从 *Bam*HI 末端切向 MC8 片段。从 MC8 序列正向克隆 5' 端和 3' 端一系列突变体中分别选出 7 个克隆和 6 个克隆,用 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切回收不同大小缺失的 MC8 序列,克隆到 pAL 检测载体中,获得 D300, D430, D480, D740, D840, D950, D1100 7 个正向缺失突变体和 D220, D340, D400, D600, D750, D1000 6 个反向缺失突变体(D 表示缺失克隆体,后面的数字表示缺失后的 MC8 序列长度,以 bp 为单位)。测定不同缺失突变体的 β -半乳糖苷酶活性,结果证明,正向缺失突变体 3' 端缺失 250bp 对增强子活性没有影响,缺失至 360bp 处增强活性消失(见图 4),5' 端缺失 450bp 对增强作用无影响,缺失至 600bp 处则增强活性消失(见图 5)。

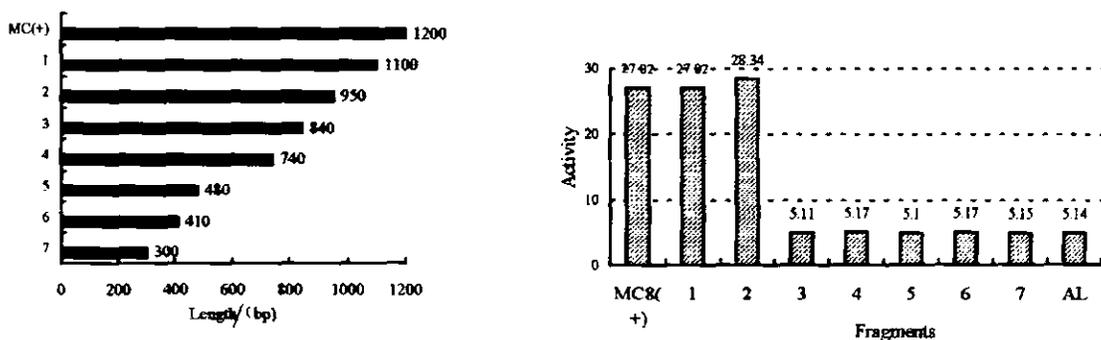


图 4 MC8 正向缺失突变体对半乳糖苷酶基因表达的影响

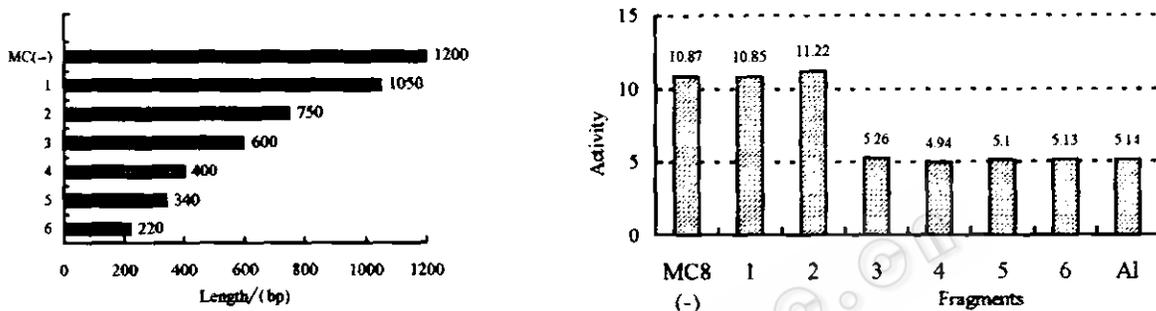
Fig. 4 The influence of MC8(+) on the expression of *lacZ* gene in *E. coli*

图 5 MC8 反向缺失突变体半乳糖苷酶基因表达的影响

Fig. 5 The influence of MC8(-) on the expression of *lacZ* gene in *E. coli*

对 MC8 序列正反向缺失突变体的研究显示,其功能区位于距正向克隆 5' 450 ~ 950bp 的长约 500bp 的序列中,并含有 3 个 AT 丰富区,分别位于 71, 169 和 460 位。

3 讨论

我们用 pKN2 和 pAL 两个原核增强子检测载体,从大肠杆菌 K12 系 MC1061 株筛到 MC2, MC8, MC9 片段,大小分别为 0.6kb, 1.2kb 和 2.0kb 左右,正反向对 *lacZ* 基因的表达均有增强作用,具有原核增强子的一些基本特征。序列分析的结果表明,3 个片段与大肠杆菌 K12 系 MG1655 菌株染色体不同区段之间有 95% 以上的同源性,而它们之间并无同源性,这基本肯定 3 个片段来自 MC1061 株染色体,并且为 3 个不同的增强子序列。

基因转录水平的调节是增强子的一个重要特征,通过 DNA/RNA 杂交对 β -半乳糖苷酶特异性的 mRNA 载录量进行了比较,结果显示原核增强子样序列 MC8 正向克隆能使 β -半乳糖苷酶基因转录增强 5 倍以上,与 β -半乳糖苷酶活性测定基本一致,从而证明了序列 MC8 的增强子功能确实发挥在转录水平上,这一证明为以后的 MC8 理论研究和实际应用提供了依据。

在结合蛋白未知的情况下,确定一顺式调控元件的特异性功能区,一般常采用缺失或突变的方法。本实验采用 *Exo III* 核酸外切酶对 MC8 片段进行正反向删切,以期进一步缩小其功能区的范围,删切结果表明,在距 MC8 正向克隆 5' 端 250 ~ 360bp 以及 600 ~ 750bp 的两个区段内至少分别含有一个功能位点,并且这两个功能位点并不能单独起作用,因为缺失了任意一个都会导致增强活性的消失。

对 MC8 功能区的序列分析表明,在包含两个功能位点的 250 ~ 360bp 区和 500 ~ 700bp 区均含有一个 AT 丰富区,而在 360 ~ 500bp 之间亦含有一个 AT 丰富区,并且 MC8 250 ~ 360bp 区的 AT 丰富区反向亦含有大肠杆菌血溶素基因增强子同源序列“CAAAAAAT”^[9]。两个功能区段对增强子来说都是必需的,这说明,MC8 功能区两端的 AT 丰富区,或者加上中间的 AT 丰富区有可能通过协同作用发挥其转录增强活性。作用于 δ^{70} 型的原核增强子,据推测一般包含数个 AT 丰富区,如大肠杆菌 *trp* 启动子上游 -43--56 和 -83--94 各有 AT 丰富序列。这一 AT 序列对 *trp* 启动子的转录起增强作用^[10,11]。除了 *trp* 启动子以外,大肠杆菌 *tyrT*^[12], *recA*^[13], *dnaA-P1*^[14] 等启动子上游均含有 AT 丰富区,而且 *tyrT* 启动子 -67--77 的 AT 丰富区对

其有效转录也是必需的^[15],推测它可导致 DNA 转
折^[16],使其在空间上更接近启动子,并且此 AT

丰富区可结合其特异性蛋白,从而以一种目前尚未
得到的方式激活转录。

参 考 文 献

- [1] 吴淑华,张丽兰,张秀珍等.病毒学报,1985,1:385
[2] 侯云德,崔宏,段淑敏.病毒学报,1985,1:278
[3] Kustu S,North A K,Weiss D S. *Trend in Bio Sci*,1991,16:397~402
[4] 潘卫,吴淑华,侯云德等.生物工程学报,1990,6:265~271
[5] 谢明,吴淑华,侯云德等.中国科学(C),1997,27:179~185
[6] Owen R J. *Nucl Acid Res*,1987,15:3631~3634
[7] Sambrook J. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual Second Edition* Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989
[8] Berger S L. *Methods in Enzymology*,1987,152:704
[9] Vogel M,Hess J,Then I *et al.* *Mol Gen Genet*,1998,212:76~84
[10] Stock J B,Ninfa A J,Stock A M. *Microbio. Rev.*1989,53:450
[11] Nishi T,Itoh S. *Gene*,1986,44:29~36
[12] Shirakwa M,Tsurimoto T,Matsubara K *et al.* *Gene*,1984,28:127~132
[13] Hansen E B,Hansen F G. *Nucl Acid Res*,1982,10:7373~7375
[14] Lamond A I. *Nature*,1983,305:248~250
[15] Narunum J C,Levene S D,Crothers D M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*,1982,79:7664~7668
[16] Wu H M,Crothers D M. *Nature*,1984,308:509~513

Functional and Structural Analysis of A Prokaryotic Enhancer-like Element in *Escherichia coli* MC1061 Strain

ZHU Min WU Shu-hua BI Xiao-lin XUE Shui-xing HAN Feng

(National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Beijing 100052)

Abstract *Cat* and *lacZ* genes were used as reporter gene and three prokaryotic enhancer-like element (MC2, MC8 and MC9) were identified in the genomic DNA of MC1061 strain. All three fragments can improve the expression of *lacZ* gene by 2~5 times with the orientation independence. The results of *in vivo* transcription and Dot blot hybridization assays suggested that MC8 regulated the expression of *lacZ* at transcription level. Stepwise deletion experiments showed the functional domain of MC8 located at 450~950bp, and in regions 450~600bp and 840~950bp contain at least one functional loci. Sequence data indicated three are 3 A+T rich sections in MC8, 2 of them are in the functional loci.

Key words *E. coli*, prokaryotic enhancer-like element