

小球藻病毒基因调控序列在大肠杆菌和真核藻中的调控活性研究

康 明^{1,2} 韩继刚^{1,2} 刘平芳¹ 叶 寅^{1*} 田 波¹

¹ (中国科学院微生物研究所 北京 100080)

² (河北大学生命科学学院 保定 071002)

摘 要 以小球藻病毒腺嘌呤甲基转移酶基因(*amt*)和主要外壳蛋白 VP54 基因的 5'上游调控序列构建大肠杆菌和真核藻转化载体。以 P_RPL 及 CaMV35S 启动子为阳性对照,研究了小球藻病毒来源的两种调控序列在 *E. coli* 和真核藻细胞中的启动活性。发现 P_{AMT} 在 4 种 *E. coli* 菌株中都具有极强的调控活性,启动 Luc 基因表达而产生的酶活性高于 P_RPL 50~400 倍。P_{VP54} 在 DH5 α 中也具有较强的启动活性。同时 P_{AMT} 在两种小球藻中启动 GUS 基因瞬时表达的能力也明显高于 CaMV35S 启动子,表明它们有可能在真核藻类遗传转化中具有很好的应用前景。

关键词 病毒基因启动子,调控活性,*E. coli*,真核藻,瞬时表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0443-04

真核藻类的遗传转化起始于 80 年代^[1],到目前为止,其转化技术,尤其是所使用的外源基因载体及调控元件,均是从高等植物基因工程技术中移植过来的。CaMV35S SV40 NOS 启动子在一些真核藻中具有通用性,可被后者的转录系统识别^[2,3];而在另一些藻种中, CaMV35S 启动子等强启动子则没有活性^[4,5],或虽然能被细胞识别,但驱动选择标记基因表达的效率不足以克服选择压力^[6],因此寻找能在真核藻类细胞中普遍具有强启动活性的调控元件,对于完善真核藻类的遗传转化技术是很有必要的。AMT 启动子是小球藻病毒株 XZ-6E 基因组腺嘌呤甲基转移酶基因 *amt* 5'上游一段 851bp 序列,已证明在细菌和高等植物中具有强调控活性^[7,8]。VP54 基因启动子是小球藻病毒 PBCV-1 基因组主要外壳蛋白 VP54 编码基因 632bp 上游序列,同样证明在大肠杆菌和酵母中同时具有启动活性^[9]。本文拟以上述 2 种调控序列分别构建 *E. coli* 及真核藻转化载体,研究其在 *E. coli* 细胞及小球藻为代表的真核藻类细胞中的调控活性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株: TG1, DH5 α , Top10 均由本实验室保存, SK383 由本所资源室宋大康先生提供。

1.1.2 质粒: pNC1A14.8 由美国 Nebraska-Lincoln 大学 Van Etten 教授提供, pLuc 由本所方荣祥先生提供, pVP54 由张远征博士构建,其余质粒由本室保存。

1.1.3 小球藻株: 小球藻 NC64A(*Chlorella sp.*) 由 Van Etten 教授提供, 椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*) 由遗传所孙勇如先生提供。

1.1.4 培养基: 细菌培养基为 LB, 小球藻 NC64A 培养基为 MBBM^[10], 椭圆小球藻培养基为 Knop。

1.2 方法

1.2.1 *E. coli* 转化及重组质粒的构建均按《分子克隆》的方法进行。

1.2.2 小球藻细胞的基因枪转化: 60mg 直径 1 μ m 的金粉加 1mL 无水乙醇振荡 1min, 10 000r/min 离心 10s, 弃上清, 重悬于 1mL 无菌水, 取 50 μ L 金粉, 依次加入 10 μ g 质粒 DNA, 50 μ L 2.5mol/L CaCl₂, 20 μ L 0.1mol/L 亚精胺, 涡旋振荡 3min, 1000r/min 离心 10s, 250 μ L 乙醇洗 2 次, 金粉悬浮于 20 μ L 无水乙醇中, 供两枪使用。将密度为 10⁷ cells/mL 的小球藻细胞过滤到滤纸上, 并转移到 MBBM 或 Knop 固体培养基上, 用基因枪轰击, 压力为 1200psi, 距离 16cm, 每一处理 2 枪。转化后的小球藻用液体培养基洗下, 置于 25 $^{\circ}$ C 光下培养, 48h 进行 GUS 检测。

1.2.3 Luciferase 活性测定：用 Promega 公司的 Luciferase Assay System kit 测定,细胞破碎、粗酶液提取及化学发光测定均按其说明书进行。

1.2.4 GUS 活性测定：参照顾红雅的方法^[11]。

1.2.5 蛋白质含量测定：按 bradford 的方法^[12]。

1.3 仪器

液闪计数仪为 LKB 1209 RACKBETA, 荧光光度计为 DyNA quant 200 型, 基因枪为 PDS-1000/He 型。

1.4 药品

各种限制酶、修饰酶为 Promega, Boehringer Mannheim 及华美公司产品, 各种底物及常规试剂均为分析纯。

2 结 果

2.1 E. coli 及真核藻类转化载体的构建

用来自 pBV220, pNC1A14.8, pVP54 的启动子 P_{RPL}, P_{AMT} 及 P_{VP54} 置换 pLuc 中的 35S 启动子, 分别得到 pLRLuc, pALuc 和 pVPLuc 3 种 E. coli 转化载体, 鉴于小球藻细胞能在低倍显微镜下观察, 因此以 P_{AMT} 取代 pBI221 中的 35S 启动子, 得到真核藻类转化载体 pUCAG2, 以 GUS 基因为报告基因, 以便于瞬时表达产物的组织化学染色和观察。4 种转化载体及酶切鉴定图谱见图 1 和图 2。

2.2 两种小球藻病毒基因启动子在大肠杆菌中的调控活性

用原核转化载体 pLRLuc, pALuc, pVPLuc 分别转化 E. coli 菌株 DH5 α , SK383, TG1 和 Top10, 用 Luciferase Assay System Kit 裂解细胞, 提取粗酶液, 以空菌作为对照, 用液闪计数仪进行化学发光的定量测定, 每个处理 3 个重复, 结果见表 1。

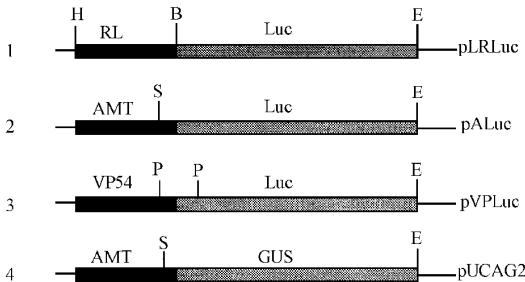


图 1 大肠杆菌及真核藻类转化载体

Fig. 1 Transformation vectors of *E. coli* and eucaryotic algae
1 2 3 for *E. coli* transformation 4 for Eucaryotic algae transformation

B: BamHI E: EcoRI H: HindIII P: PstI S: SalI

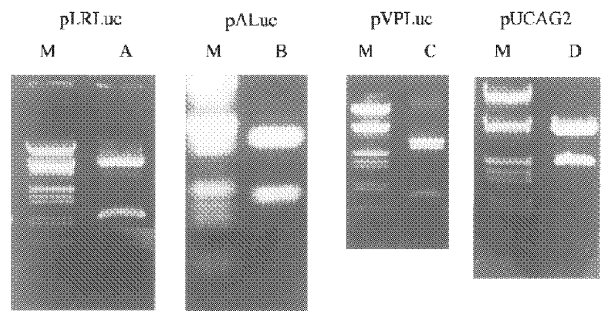


图 2 大肠杆菌与真核藻类转化载体的酶切图谱

Fig. 2 Restriction map of transformation vectors

for *E. coli* and Eucaryotic algae

M. λ DNA EcoRI/HindIII ; A. BamHI/HindIII (4.8kb 0.9 kb)
B. SalI/ScaI (3.7kb 1.9kb) ; C. ScaI/PstI (2.5kb 2.3kb 0.7kb)
D. SalI/ScaI (3.7kb 1.9kb)

表 1 不同启动子控制下的 Luc 基因在 E. coli 中的表达结果

Table 1 The expression of Luc gene controlled by different promoters in *E. coli*

Strains	Luciferase activity/Counts/(mg·min) $\times 10^5$			
	Control	P _{RPL}	P _{AMT}	P _{VP54}
DH5 α	0.01	3.58	1477.73	5.91
SK383	0.01	5.61	589.52	0.35
TG1	0.02	8.32	1809.77	1.21
Top10	0.04	120.42	5565.63	6.67

从表中可看出, 3 种不同来源的启动子在 4 个菌株中均可启动 Luc 基因的表达, 其中以 P_{AMT} 活性最强, 其活性为常用的原核串联启动子 P_{RPL} 的 50~400 倍。P_{VP54} 除在 DH5 α 中活性强于 P_{RPL} 外, 在其余菌株中均低于 P_{RPL}。同一启动子在不同菌株中活性也有很大差别, 以 P_{AMT} 为例, 在 Top10 中活性最强, SK383 中最弱, 活性相差 10 倍。

2.3 AMT 启动子在真核藻细胞中的调控活性

为了直接用组织化学方法检测到外源基因在小球藻细胞中的表达, 我们用 P_{AMT} 置换了 pBI221 中的 P_{35S} 构建了 pUCAG2, 用 pBI221 作为阳性对照, 不包裹质粒的金粉作为阴性对照, 一起对 2 种小球藻进行基因枪转化, 经 X-Gluc 染色后, 4 种处理均观察到了蓝色细胞, 而阴性对照则没有。其中 pUCAG2 转化的 2 种小球藻中蓝色细胞均多于 pBI221 的处理, 且椭圆小球藻中蓝色细胞数多于小球藻 NC64, 差异明显(表 2)。为了弥补细胞计数的人为误差, 又进行了 GUS 活性的荧光比色分析, 其结果与组织化学分析基本吻合(图 3)。

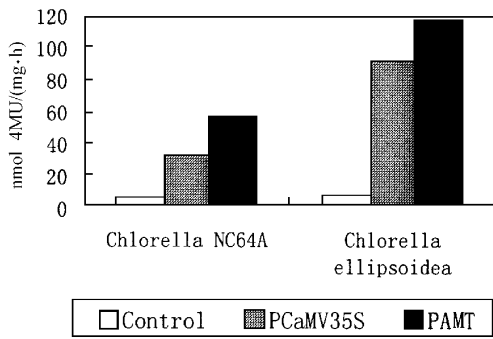


图 3 小球藻细胞中 GUS 基因瞬时表达的荧光分析

Fig. 3 Fluorescent assay of gus transient expression

3 讨论

来自小球藻病毒 XZ-6E 基因组的腺嘌呤甲基转移酶基因启动子 P_{AMT} 在 4 株 *E. coli* 菌株中均表现出极强的调控活性,其活性为 λ 噬菌体来源的 P_{RPL} 启动子的 50~400 倍,同时 P_{AMT} 在真核藻细胞中同样具有强调控活性,明显高于植物基因工程常用的 $P_{CaMV35S}$ 启动子是位于基因编码区 5' 上游具有保守序列的特殊区域,有趣的是 P_{AMT} 既不含有 TATA 和 CCAAT 真核序列,也没有 -10 和 -35 原核序列,但它却能同时被真核细胞中的 RNA 聚合酶 II 及 *E. coli* 的 RNA 聚合酶识别,启动外源基因的高效表达^[7,8]。小球藻病毒 PBCV-1 主要外壳蛋白 VP54 基因的启动子 P_{VP54} 也不含有原核或真核启动子的常见保守序列,但同样具有原核和真核启动活性^[9],由此可推测小球藻病毒的一些启动子中含有特殊的顺式调控元件。

如前所述,真核藻类遗传转化技术中所使用的载体及调控元件主要是从高等植物基因工程中移植而来,但 $P_{CaMV35S}$ 一类的强启动子在一些真核藻

表 2 小球藻细胞中 GUS 基因瞬时表达的组织化学分析

Table 2 Histochemical assay of gus transient expression in *Chlorella* cells

Promoters	Chlorella NC64A		Chlorella ellipsoidea	
	No. of total cells ($\times 10^5$)	No. of blue cells	No. of total cells ($\times 10^5$)	No. of blue cells
Control	1	0	1	0
P_{35S}	1	53	1	6
P_{AMT}	1	100	1	14

中没有启动活性或活性很弱,因此寻找筛选在真核藻中通用的强启动子是必要的。真核藻类病毒在宿主中能够高效复制,其启动子可能是高效的, P_{AMT} 、 P_{VP54} 在 *E. coli*、酵母及高等植物(拟南芥、烟草)中的调控活性已得到证实,本文证实了 P_{AMT} 在小球藻 NC64A、椭圆小球藻中具有强调控活性,而且证明它在大型真核藻海带中具有同样作用的同时,发现它调控外源基因表达的方式与 $P_{CaMV35S}$ 、Ubiquitin 启动子等调控序列明显不同(另文发表)。因此 P_{AMT} 在真核藻中可能有广泛的调控作用,在藻类基因工程中极具潜在应用价值。

P_{AMT} 与 P_{35S} 两种启动子在椭圆小球藻中的调控活性均高于小球藻 NC64A,这可能与两种藻细胞壁存在明显差别有关,椭圆小球藻细胞壁主要成分为纤维素,可用纤维素酶去壁形成原生质体^[13],而 NC64A 细胞壁中含有几丁质和壳聚糖,对各种商用去壁酶有抵抗作用^[14],两者细胞壁强度不同,用相同的压力和距离进行基因枪轰击则可能产生不同的转化效果。目前我们已从小球藻病毒 PBCV-1 中分离出了去除 NC64A 细胞壁的复合酶 Lysin,后者可有效地将 NC64A 去壁形成原生质体,这便为小球藻的电击转化提供了条件。

参 考 文 献

- [1] Rochaix J D, Dillewijn J V. *Nature*, 1982, **296**: 70~72
- [2] 秦 松. 海洋与湖沼, 1994, **25**(4): 353~357
- [3] Kubler J E. *Journal of Marine Biotechnology*, 1994, **4**: 165~169
- [4] Butanaev A M. *Mol Biol*, 1994, **28**: 682~686
- [5] Hall L M, Taylor K B, Jones D D. *Mol Cell Biol*, 1993, **5**: 3647~3650
- [6] Funahay T G, Jarvis E E, Roessler P G. *J Phycol*, 1995, **31**: 1004~1012
- [7] Mitra A, Higgins D W, Robe N J. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, **204**(1): 187~194
- [8] Mitra A, Higgins D W. *Plant Molecular Biology*, 1994, **26**: 85~93
- [9] 张远征. 中国科学院微生物研究所博士论文, 1997
- [10] Van Etten J L, Burbank D E, Kuczmariski D *et al.* *Science*, 1983, **219**: 994~996
- [11] 顾红雅. 植物基因与分子操作. 北京: 北京大学出版社, 1995: 275~276. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [12] Bradford M M Anal , *Bioch* ,1976 ,72 248~254
[13] Jarvis E E ,Brown L M. *Current Genetics* ,1991 ,19 317~321
[14] Van Etten J L ,Lane L C *et al* . *Microbiological Reviews* ,1991 55(4) 586~620

The Regulation Activity of Chlorella Virus Gene 5' Upstream Sequence in *Escherichia coli* and Eucaryotic Algae

KANG Ming^{1,2} HAN Ji-Gang^{1,2} LIU Ping-Fang¹ YE Yin¹ TIEN Po¹

¹(*Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080*)

²(*College of Life Science , Hebei University ,Baoding 071002*)

Abstract The 5' upstream regions of adenine methyltransferase gene and major coat protein gene (P_{AMT} ,P_{VP54}) in Chlorella virus genomes were used to construct transformation vectors in *E. coli* and eucaryotic algae. The regulation activities of P_{AMT} and P_{VP54} comparing with P_RP_L and CaMV35S promoters were analyzed in different *E. coli* strains and Chlorella species. It is found that the luciferase activity controlled by P_{AMT} is 50~400 times higher than that controlled by P_RP_L. The regulation activity of P_{AMT} in 2 Chlorella species is obviously higher than that of CaMV35S promoter. It is the first report that the 5' upstream region of Chlorella virus gene has strong regulation activity in eucaryotic algae. The result suggests this regulation sequence will have an excellent application in the eucaryotic algae genetic engineering.

Key words Virus gene promoter , regulation activity , *E. coli* eucaryotic algae , transient expression <http://journals.im.ac.cn>