

大肠杆菌原核增强子样 M 片段的进一步研究

官庆红 苏志国

(大连理工大学生化工程研究室 大连 116012)

吴淑华 侯云德

(中国预防医学科学院病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

阐明基因转录调控机理一直是分子生物学的研究热点。增强子是广泛存在于真核、病毒及原核生物中的重要的调控元件之一,它通过与各种调控蛋白因子相互作用而发挥其转录增强调节功能^[1,2]。

原核转录增强子的发现是近几年的事,有关研究报道远少于真核和病毒增强子。1989年,潘卫、吴淑华等^[3]报告了大肠杆菌基因组 DNA 片段具有原核增强子样效应。本文作者进一步研究表明:M 片段增强子样功能主要集中在经 BstE I 酶切后所得的较小片段上。

真核增强子与原核增强子的转录增强作用和转录调控机制具有一些共性,如真核、原核 RNA 聚合酶亚单位有着高度的同源性;某些真核启动子可在原核表达系统中工作,而原核系统转录调节机制的研究,反过来又可增进人们对真核基因转录调控的认识。本文研究结果对了解和揭示原核系统的基因表达调控和进化有重大理论意义;同时,对增强外源基因在原核系统中的表达水平,提高基因工程产品的产量具有一定的实用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:增强子检测载体质粒 pKN₂ 带有 CAT (Chloramphenicolacetyltransferase) 基因,其上游有痘苗病毒启动子 N 及多克隆位点^[3];质粒 pM1-6 为 pKN₂ 质粒中痘苗病毒 N 启动子上游 Sma I 插入原核增强子样 M 片段所构成^[3],均由病毒基因工程国家重点实验室提供。

E. coli JM103: Δ(lac pro), thi strA, supE, endA, sbcb, hsdR⁻, F' traD36, proA⁺ B⁺, lacI^s, ZΔM15;

E. coli DH5α: supE44, ΔlacU169 (Ψ80 lacZ ΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1;

E. coli LE392: supE44, supF58, hsdR514, galK2, galT22, metB1, trp5, lacY1;

E. coli HB101: F⁻, supE44, hsdS20, (rB⁻, mB⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Smr), xyl-5, mtl-1, λ⁻

均为病毒基因工程国家重点实验室保存菌种。

1.1.2 主要酶制剂:各种限制酶购自德国 Boehringer Mannheim 公司,美国 New England Biolab 公司和 BRL 公司;T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酶、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 大片段,核糖核酸酶均购自德国 Boehringer Mannheim 公司;溶菌酶购自中国科学院生物物理研究所生化试剂厂,各种酶制剂的使用按文献 [4, 5] 进行。

1.1.3 主要生化试剂:DTT, X-Gal, IPTG、地高辛非放射性 DNA 标记及检测试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司;Tris, SDS 购自美国 SERVA 公司;[α-³²P] dCTP 购自英国 AMERSHAM 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的组建、酶切电泳、杂交鉴定及制备:均按文献 [4, 5] 进行,所用宿主菌为大肠杆菌 K12 系 JM103。

本文于 1994 年 9 月 26 日收到。

1.2.2 细菌氯霉素抗性测定：按文献〔3〕进行。

1.2.3 原核增强子样 M 片段的进一步缩短定位：采用 pKN₂ 质粒作为增强子的检测载体（图 1），质粒中细菌的 CAT 基因由能在原核细胞工作的痘苗病毒 N 启动子启动⁽⁸⁾，CAT 基因的表达水平通过检测其宿主菌对不同浓度的氯霉素的抗性来估价，pKN₂ 的氯霉素抗性为 100~200μg/ml。

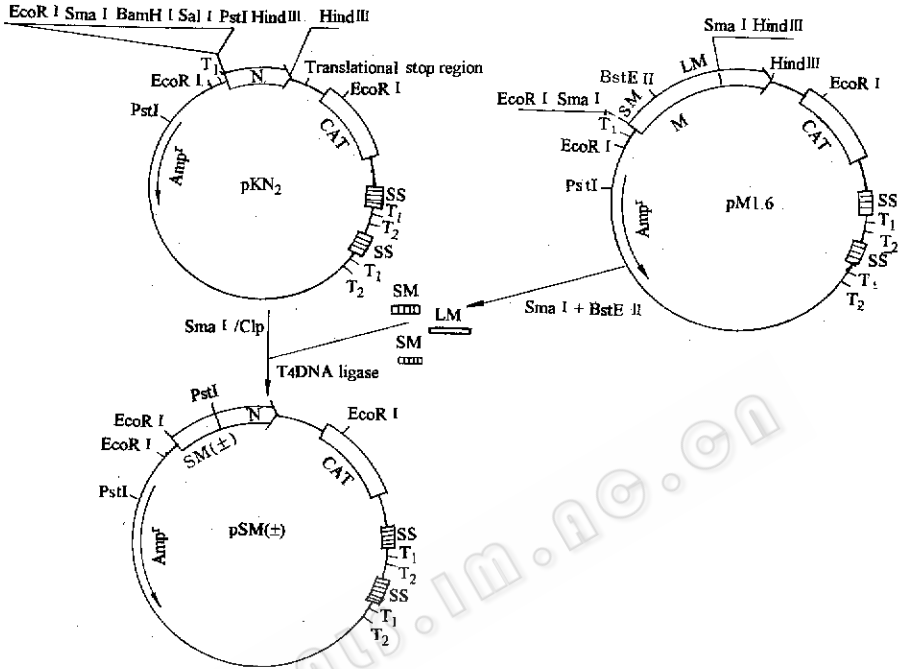


图 1 pSM (+), pSM (-) 重组质粒构建过程示意图

2 结果与讨论

我们将 M 片段用限制酶 Bst E I 消化成 LM (~535bp)、SM (~355bp) 大小两片段并补平后，分别各自插入 pKN₂ 的 Sma I 位点中，将转化菌在原质粒不能生长的高浓度氯霉素 (600μg/ml) 琼脂平板上进行压力筛选，结果选出两株阳性克隆菌，经酶切电泳鉴定、杂交试验证明插入片段分别为正反向的 SM 片段、分别命名为 pSM (+)、pSM (-) (以与 pM1.6 上 M 片段一致的方向为正) (图版 I)，转化受体菌 pKN₂ 不能生长，测定 pSM (+)、pSM (-) 在大肠杆菌 JM103, DH5α, LE392, HB101 中的氯霉素抗性分别约为 1400μg/ml, 800μg/ml, 800μg/ml, 600μg/ml，即可使氯霉素抗性提高 3~7 倍 (见图 2A~D)，其增强活性具有相对的宿主依赖性，在 JM103 中的增强活性最强，在 DH5α, LE392 中的增强表达的效应大致相同，而在 HB101 中的表达增强作用最弱，因 pSM (+)，pSM (-) 的各种活性都大致相当，故无明显的方向依赖性；因 pLM (插入 LM 的 pKN₂) 无增强作用 (高浓度氯霉素下不生长)，排除了 pKN₂ 增强子的插入增强突变；SM 在 pSM (+) 中与 N 启动子的距离比在 pM1.6 中少了约 535bp，但增强效应却无明显差异，说明具有一定程度的位置不依赖性。

M 片段长近 1kb，实际其功能区段远比那小得多，过长的片段不利于克隆操作，也不方便结合因子的研究，本文的目的之一就是缩短这个片段。潘卫等⁽⁹⁾曾根据 M 片段近启动子那端的序列特点推测其与增强活性有关，但无实验证明；而本文研究结果表明，M 片段增强子样活性主要集中的 M 片段远离启动子段的 SM (~355bp) 中，它比 M 小了许多，从而方便了以后的研究，当然，限于实验条件等因素，我们不能完全排除其它区段的作用；同时，还需进一步弄清核心序列是什么，它 (们) 与其它增强子的核心序列相比有什么特性与共性，以及能否将激活蛋白基因及增强子序列转入某一宿主细胞中去，从而提高该系统的表达效率等问题。

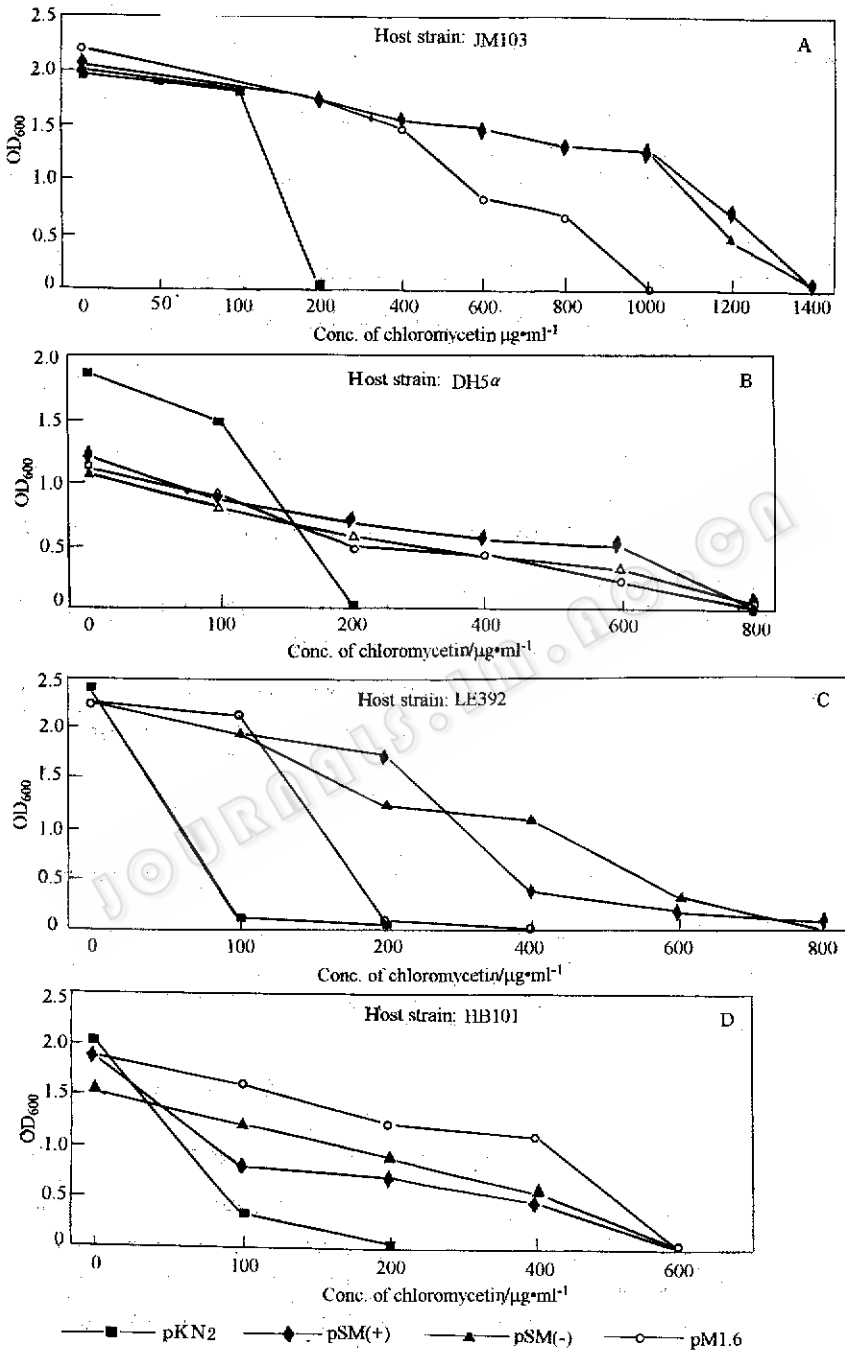


图2 pSM (+), pSM (-) 重组质粒分别转化 *E. coli* JM103、DH5 α 、LE392、HB101 后在不同氯霉素浓度梯度培养液中的生长曲线
pM1.6 质粒为阳性对照, pKN₂ 为阴性对照。

参 考 文 献

- [1] Dynan W S, Cell, 1989, 58: 1.
[2] Kustu S. TIBS16, November, 1991.
[3] 潘 卫, 吴淑华, 金奇等. 生物工程学报, 1990, 6 (4): 265~271.
[4] 侯云德编著. 病毒基因工程的原理和方法, 北京: 人民卫生出版社, 1985.
[5] Sambrook, J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning-a laboratory manual, 2nd ed., CSH, New York 1989.

A Further Study on the Enhancer-like M Fragment in *Escherichia coli* JM103 Genome

Gong Qinghong Su Zhiguo

(Dalian University of Technology, Dalian 116012)

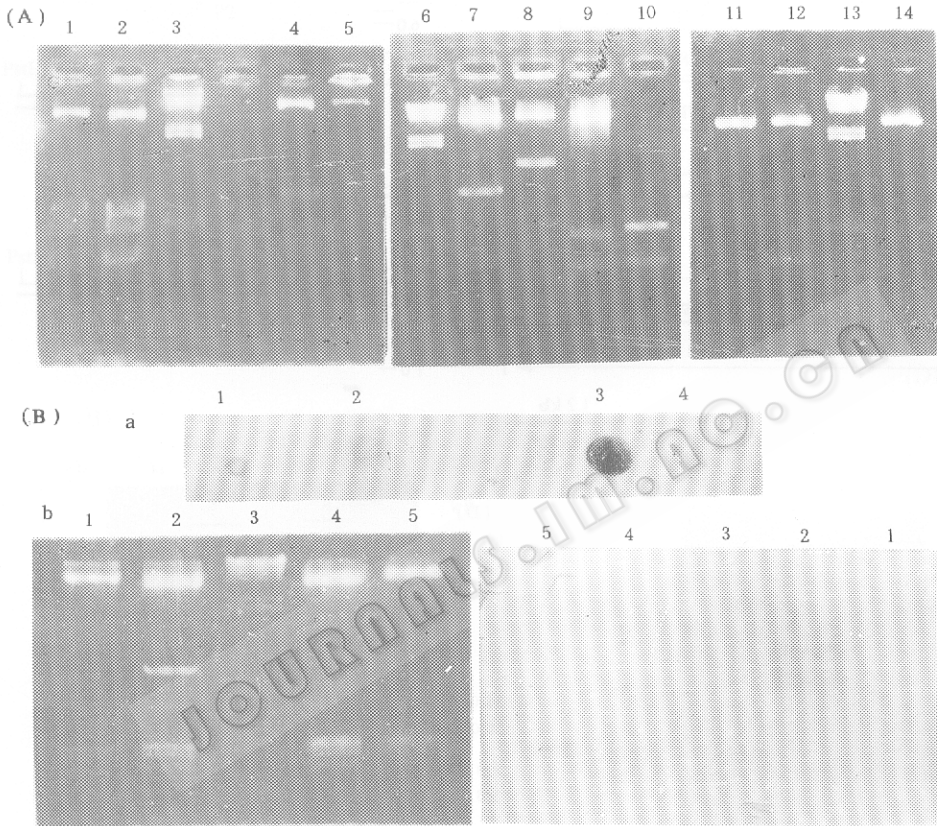
Wu Shuhua Hou Yunde

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

Abstract With the enhancer detecting vector pKN₂ a genomic SM fragment about 355bp long was found to have prokaryotic enhancer-like properties. The smaller fragment was obtained by cutting a larger M fragment with Bst E I. It can enhance the expression of CAT gene in its cognate host strains (*E. coli*) by 3~7 times.

Key words Enhancer, prokaryotic

M fragment in *Escherichia coli* JM103 genome



A. pSM (+), pSM (-), pGSM 重组质粒酶切鉴定电泳图谱

3, 6, 13 λ DNA/Hind III Marker

1. pKN₂ 质粒 EcoR I, Pst I 酶解, 2. pSM (+) 质粒 EcoR I, Pst I 酶解, 4. pM1.6 质粒 Sma I 酶解, 5. pKN₂ 质粒 Sma I 酶解, 7. pSM (+) 质粒 Sma I, Pst I 酶解, 8. pSM (-) 质粒 Sma I, Pst I 酶解, 9. pM1.6 质粒 Sma I, BstE I 酶解, 10. M (EcoR I, Hind III 酶切自 pM1.6 质粒) 片段 BstE I 酶解, 11. pGEM-3Zf (-) 酶解, 12. pGSM 质粒 EcoR I, Pst I 酶解, 14. pGEM-3Zf (-) 质粒 EcoR I 酶解

B. pSM (+), pSM (-) 重组质粒杂交鉴定。

a. 打点杂交。 1. pSM (+) 重组质粒。 2. pSM (-) 重组质粒。 3. pM1.6 质粒: 阳性对照。 4. pKN₂ 质粒: 阴性对照。
b. Southern 杂交。 1. pKN₂ 质粒 EcoR I, Pst I 酶解: 阴性对照。 2. pM1.6 质粒 EcoR I, Pst I 酶解: 阳性对照。 3. λ DNA/Hind III Marker。 4. pSM (+) 重组质粒 EcoR I, Pst I 酶解。 5. pSM (-) 重组质粒 EcoR I, Pst I 酶解