



原核增强子样序列的研究

潘卫* 吴淑华 金奇 宇文稿
刘哲伟** 金冬雁 杜平* 侯云德

(病毒基因工程国家重点实验室, 北京)

本文采用启动子检测载体和增强子检测载体发现来自大肠杆菌 JM103 DNA 的一个 1.0 kb 左右的片段能在痘苗病毒启动子上游增强细菌 CAT 和 β -半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达, 这种增强效应无明显的方向性, 一般可使基因表达水平提高 3—6 倍, 此原核增强子样序列同时也具有启动子功能。此外还测定了增强片段的部分 DNA 序列。

关键词 增强子; 细菌染色体

增强子是一种在真核生物中广泛存在并已深入研究的调控序列, 它通过与结合于增强子的各种转录激活蛋白相互作用而发挥其转录增强调节功能。增强子序列能在不同的方向和位置上增强邻近基因的转录表达^[1]。随着对增强子和转录激活蛋白(activator protein)深入研究, 人们发现从酵母到人增强子调控机理是相类似的^[2]。

近年来, 在原核生物的调控系统中也发现了类似于真核转录增强调控模式^[3-8]。但对于原核增强 DNA 成分的研究报道甚少。1985 年, 吴淑华、侯云德等^[9,10]报道了 SV40 HindIII B 片段能在大肠杆菌中增强人 β 和人 $\alpha 1$ 干扰素基因的表达。最近本文作者在研究痘苗病毒 DNA 在原核生物中的作用时意外地发现了大肠杆菌染色体 DNA 片段能以方向不依赖性的特点增强邻近下游基因的转录表达, 这种增强作用在不同的菌株中有差异。此片段同时具有启动子功能。

材料与方 法

(一) 材料

1. 菌株和质粒: 增强子检测载体质粒 pKN2 带有 CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 基因, 其上游有痘苗病毒启动子 N 及多克隆位点, 质粒 pG7 (+)、pG7(-) 带有痘苗病毒 7.5K 启动子及 β -半乳糖苷酶基因, 其上游和下游分别带有多克隆位点, 上述质粒均由本室宇文稿提供^[11]。pTE7.5 带有痘苗病毒 7.5K 启动子及 CAT 基因, 后者上游也有多克隆位点, 由本室刘哲伟提供。E. coli JM103 [基因型为: Δ (lac pro), thi, strA, supE, endA, sbcB, hsdR⁻, F' traD36, proAB, lacIq, z Δ M15], E. coli C600 [基因型为: F⁻, thi-1, thr-1, leuB6,

本文于 1989 年 7 月 29 日收到。

本文为 863 高技术生物领域支持项目。

* 第二军医大学。 ** 首都儿科研究所。

lacY1, tonA21, supE44, λ^-), *E. coli* MC1061(基因型为: Δ (lacI POZYA) X 74, galU, galK, strAr, hsdR⁻, Δ (ara, leu)), *E. coli* HB101(基因型为: F⁻, hsdS20(rR⁻, mR⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(Smr), xyl-5, mtl-1, supE44, λ^-)均为本室保存菌种。

2. 限制酶及修饰酶: 各种限制酶、T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酶、豆芽核酸酶均购自美国新英格兰Bio-Labs公司。限制酶及修饰酶的使用按文献〔12, 13〕进行。

(二) 方法

1. 重组质粒的组建及制备: 均按文献〔12, 13〕进行。所用宿主菌为大肠杆菌 K12系JM103。具体过程见结果。

2. 半乳糖苷酶活性测定: 按文献〔14〕进行。

3. 细菌氯霉素抗性测定: 受检菌先经37℃过夜活化, 按1:100接种在含有不同浓度氯霉素梯度的LB液中, 37℃振荡培养12h。测定细菌的OD₆₀₀值。

4. 大肠杆菌染色体DNA的制备: 参考文献〔15〕进行, 并作部分修改。1.5 ml的JM103活化菌5000rpm, 离心5min, 弃上清液, 沉淀菌重悬于200 μ l 25%的蔗糖溶液中, 加30 μ l 10mg/ml溶菌酶, 室温放置5min, 加60 μ l 0.25mol/L EDTA, 室温5min, 再加20 μ g/ml的蛋白酶K10 μ l, 37℃作用20min, 然后加200 μ l TritonX-100, 室温10min, 用酚和酚/氯仿各抽提一遍, 无水乙醇沉淀, 真空抽干, 沉淀物溶于400 μ l TE中加10 μ l 10mg/ml溶菌酶37℃, 1h, 用酚/氯仿再抽提一遍, 无水乙醇沉淀, 真空抽干, 沉淀溶于适量的TE中。

5. DNA序列测定: 测序方法为San-

ger双脱氧末端终止法, 详见文献〔16, 17〕。

6. 微机用IBM-AT兼容机和DOS 3.20操作系统, 及用Caltech等程序包进行。

结 果

(一) 原核增强子样序列的发现

我们采用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〔11〕, 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—200 μ g/ml。染色体DNA用限制酶HindIII和HaeIII消化, 豆芽核酸酶处理。所获得的各大小片段插入pKN2的SmaI位点中, 转化菌在原质粒pKN2不能生长的高浓度氯霉素(400 μ g/ml)琼脂平皿进行压力筛选, 结果选择出一株插入片段大小为1.0kb左右的阳性克隆菌pM1.6, 经杂交试验证明这一片段来源于大肠杆菌JM103染色体DNA。测定pM1.6的氯霉素抗性为600—800 μ g/ml, 即可使氯霉素抗性提高4—5倍(见图2)。我们称这一克隆片段为JM103-M。

(二) JM103-M片段增强子样特性研究

JM103-M片段不仅可使其邻近的CAT基因表达有明显的增强效应, 而且, 对 β -半乳糖苷酶也具有类似作用。

我们又选择pG7(-)为克隆载体。用限制酶HindIII和EcoRI消化pM1.6取出JM103-M片段, 与先用HindIII消化后经过碱性磷酸酶处理的pG7(-)DNA连接, 再将连接好的DNA用豆芽核酸酶处理去除不匹配的单链末端, T4 DNA连接酶连接。在20 μ g/ml的X-gal平皿上挑选特别

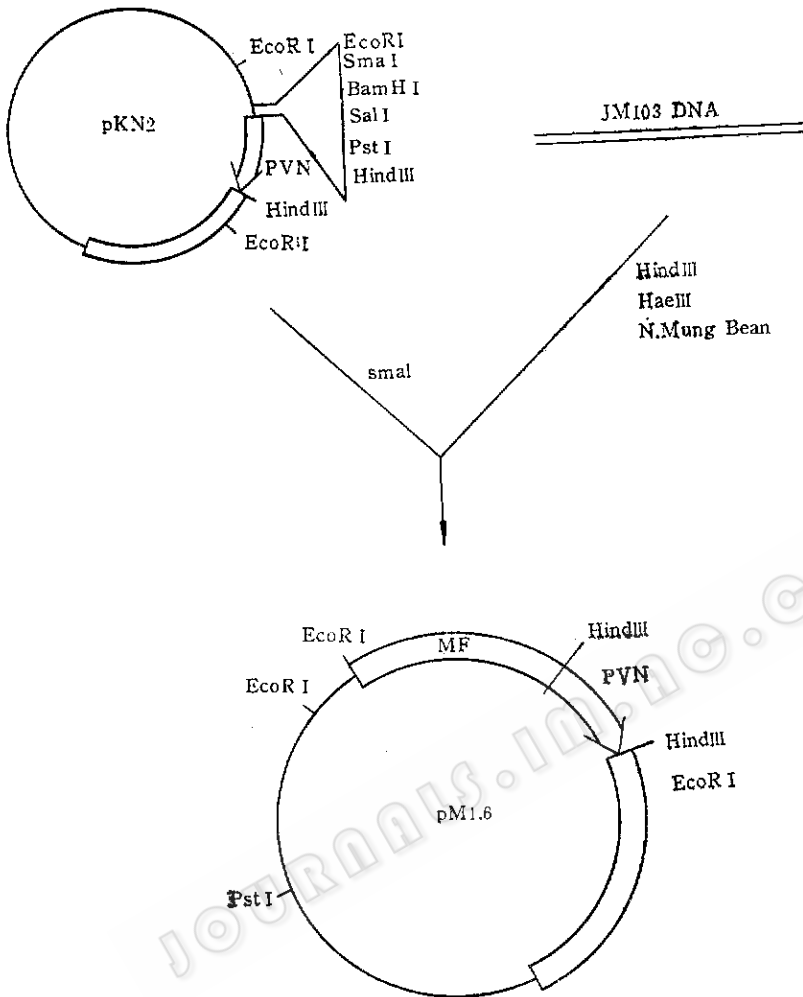


图 1 pM1.6质粒的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pM1.6

(PVN为痘苗病毒N启动子, MF为JM103-M片段)

PVN indicates N promoter from vaccinia virus,

MF indicates a M fragment from JM103

蓝的转化菌落提取质粒进行酶切鉴定, 结果得到了 JM103-M 片段插入方向不同的二个重组质粒 pGM(-)、pGM(+) 见图(3), 我们对 pGM(+), pGM(-)、pG7(-) 在 JM103 宿主菌中的 β 半乳糖苷酶活性进行比较, 结果发现, JM103-M 片段以两种方向插入 pG7(-), 均对 β 半乳糖苷酶基因的表达到有明显的增强效应, 其中, M 片段的插入方向与在 pM1.6 中相同者 [pGM(+)] 为最高, 方向相反者 [pGM

(-)] 次之, 经统计学处理有无 JM103-M 两者差异均十分显著 ($P < 0.01$)。此外, 我们把 JM103-M 片段克隆到启动子检测载体 pKK 232-8 中^[11], 重组质粒产生了氯霉素抗性, 这说明 JM103-M 片段具有启动子功能。

鉴于真核增强子有组织细胞特异性的特点, 我们有兴趣也想了解这一片段增强作用在不同的细菌中是否也有差异。为此比较了 pGM(+), pGM(-) 及 pG7(+)

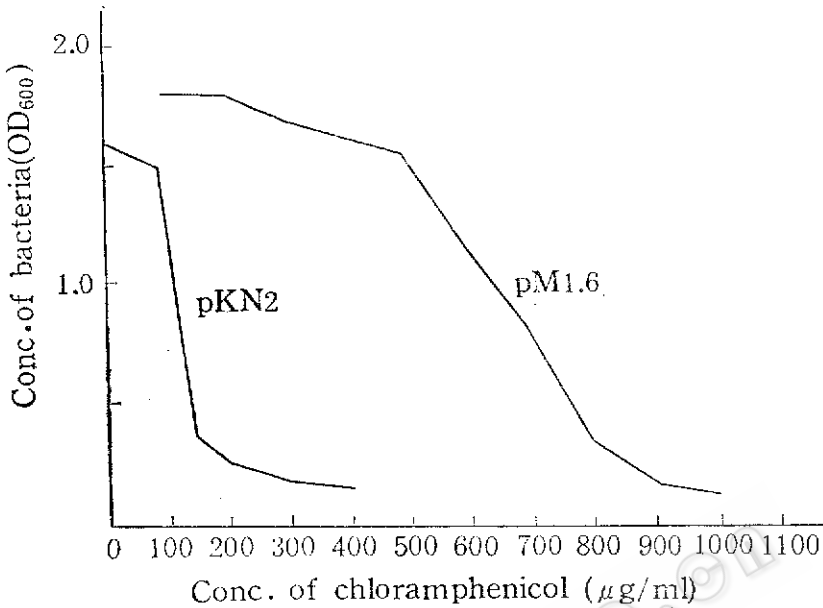


图 2 质粒pKN2, pM1.6的氯霉素抗性测定
Fig. 2 Anti-chloramphenicol activity of pKN2, pM1.6

在JM103、MC1061、C600及HB101宿主菌中的半乳糖苷酶活性见表1,结果表明M片段在JM103、MC1061和C600中的增强表达效应大致相同,而在HB101中的表达增强作用不明显。

活性,结果pG7(-)M为38.5u, pG7(-)为40.3u。可见JM103-M片段在lac的3'没有增强作用。

表 1 pG7(+), pGM(+), pGM(-)在不同宿主菌的β-半乳糖苷酶活性的比较

Table 1 Comparison of β-galactosidase caused by pG7(+), pGM(+), and pGM(-) in different hosts

宿主菌 Hosts	细菌半乳糖苷酶活性 Activity of β-galactosidase		
	pGM(+)	pGM(-)	pG7(+)
JM103	205.3 ± 31.8	112.5 ± 16.7	36.5 ± 4.6
MC1061	42.8 ± 7.3	21.9 ± 3.1	7.5 ± 2.2
C600	115.7 ± 26.4	54.2 ± 12.4	22.8 ± 5.2
HB101	174.6 ± 7.2	149.1 ± 12.4	116.4 ± 24.6

样本数为10

Ten samples

为了研究JM103-M片段增强作用的位置效应,我们把JM103-M片段克隆到pG7(+)中β-半乳糖苷酶3'端的多克隆位点中,得到重组质粒pG7(-)M(见图4),测定其在大肠杆菌JM103的β半乳糖苷酶

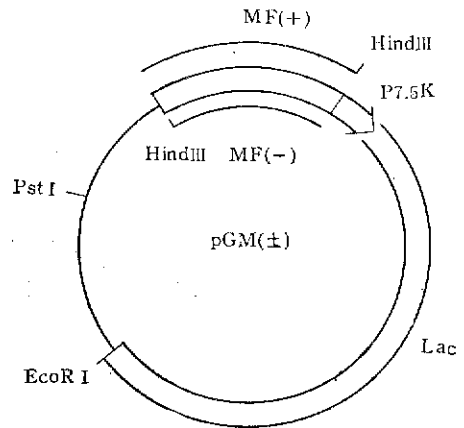


图 3 pGM(±)质粒图

Fig. 3 Plasmid pGM(±)

P7.5 为痘苗病毒7.5K启动子, MF为JM103的一个片段

P7.5 indicates a P7.5K promoter from vaccinia virus, MF indicates a M fragment from JM103

为了探讨JM103-M的表达增强作用是否是简单地由用于启动子串联所引起

的, 我们用HindIII切开pTE7.5介于启动子和CAT基因间的HindIII位点, 碱性磷酸酶处理, 在此位点与从pM1.6分离出的HindIII-EcoRI片段连接, 而后再用豆芽核酸酶处理, T4连接酶连接。这样得到了M片段插入方向不同的二个重组质粒pTE7.5M(+)、pTE7.5M(-)(见图5)。比较pTE7.5、pTE7.5M(+)和pTE7.5M(-)的氯霉素抗性, 结果pTE7.5M(-)的氯霉素抗性消失, pTE7.5M(+)与pTE7.5的氯霉素抗性无明显差异。

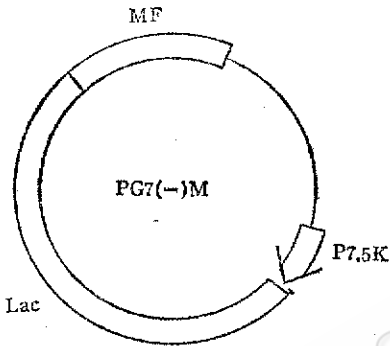


图4 pG7(-)M质粒图
Fig. 4 Plasmid pG7(-)

上文已述大肠杆菌染色体M片段如果在pG7(-)中的插入方向与在pM1.6中的插入方向相同〔pGM(+)〕则增强作用要更强一些。因此我们选择从这一方向上接近启动子的一端测定序列。我们用内切酶HindIII和EcoRI切下M片段, 再把它克隆到M13mp18的HindIII和EcoRI位点中。提取阳性克隆的单链噬菌体, 用Sanger等方法测定了JM103-M片段的HindIII端308 bp的核苷酸序列(见图6)。通过计算机分析发现在所测的这部分序列的另一条链中的145, 163位置上连续有两个转录因子SP1结合序列GC-box^[18], 在此上游6位上有一与激活蛋白AP-1在SV40 DNA中的结合序列完全一样的序列TGACTAA^[19](见图7)。

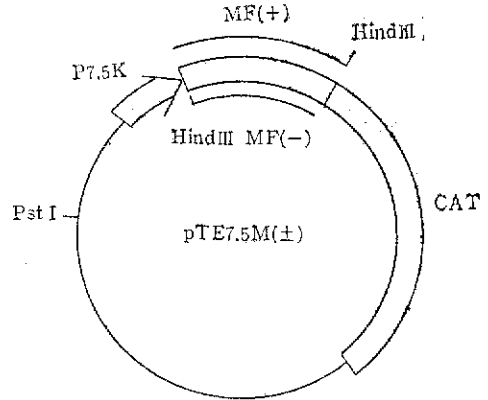


图5 pTE7.5M(+)质粒图
Fig. 5 plasmid pTE7.5M(+)

讨 论

增强子作为一种调控基因在真核生物普遍存在, 而且有共同的转录调控机理^[2]。在RNA的转录过程中, 真核和原核虽有根本的不同, 但也有许多共同之处, 真核的RNA多聚酶II的大亚单位和原核RNA多聚酶的 β 亚单位高度同源。而且有作者证明真核启动子也能在原核中起作用, 不仅如此, 一些真核DNA成分也发现可以增强原核系统的表达^[9], 因此增强调控机理也可能存在于原核生物中。

本文结果表明, 1.0kb大小的JM103-M片段有明显的增强子样效应, 理由是: 第一, JM103-M片段以两种方向插入P7.5-lac操纵子上游均对 β -半乳糖苷酶基因表达有明显的增强效应, 但距离超过2kb, 无明显效应(图4); 第二, 这一片段不仅对痘苗病毒P7.5K启动子有效应, 而且对痘苗病毒N启动子也有效应; 第三, 该片段不仅对 β -半乳糖苷酶基因的表达, 也对CAT基因的表达起增强作用。JM103-M片段本身也具有启动子功能。但是, JM103-M片段的增强作用似不能简单地以串

```

      10          20          30          40          50          60
ATCCCGGGAT AACGAAGTCA ACACCGTCCG GATCAGAGTT GGTATCAACG ATAGCAAATA

      70          80          90          100         110         120
CCGGAATAACC CAGGTTGTTT GCTTTCTTGA TAGCAATGTG TTCGTGGTCA GCATCGATTA

      130         140         150         160         170         180
CAAACAGAGC GTCCGGCAGA CCGCCCATGT CTTTGATACC GCCCAGGCTG TTTTCCAGTT

      190         200         210         220         230         240
TCCTCAGCTC ACAGGTGCGC ATCAGGCTTC TTTCTTGGTC AGCTTGTCGA AACTACCGTC

      250         260         270         280         290         300
CTGAGACTGA TGTTCAGGT CTCAGAGCTT TGATGGAAC TACGAACGGT TTCCAGTTAG

      310         320         330         340         350         360
TCAGACTA

```

图6 JM103-M片段的部分序列

Fig. 6 Partial DNA sequence of JM103-M fragment

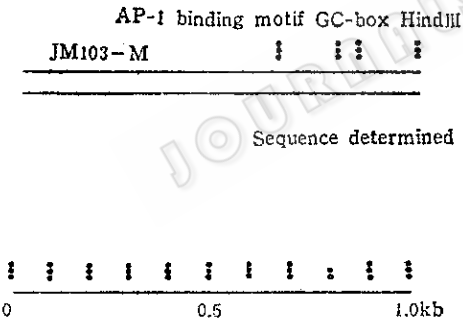


图7 JM103-M所测序列及其中一些蛋白结合序列的图示

Fig. 7 Probable transacting protein DNA binding site

联启动子的功能来解释,因为在 pTE 7.5 M质粒中,在 P 7.5-JM103-M-CAT基因排列时, CAT 的表达并不明显增加,氯霉素抗性仅为 100-200 μ g/ml,与 pTE7.5 相近。因此 JM103-M 片段很可能是通过与真核增强子相似的机理发挥其增强作用的。

我们又检测了一些原核启动子,发现绝大部分没有上述的增强子样效应。

JM103-M 片段 3' 端 308bp 的序列分析表明,有两个转录激活蛋白 SP-1 的结合保守序列 GGGCGG (即 GC box) 和一个 Ap-1 激活蛋白的结合位点 TGAATA。是否在 JM103 菌体中存在 SP-1 和 Ap-1 类似功能的蛋白,从而发挥其类似真核增强子的作用,尚待进一步研究。在 JM103-M 片段 3' 端 308bp 中未发现细菌 Fis 因子的 DNA 结合位点。至于 JM103-M 片段来源细菌染色体 DNA 还是 F 因子尚待进一步研究。

Hertz 等^[20]的研究表明,在 SV40 72bp 和 GGGCGG 序列中存在启动子成分,这一点与本研究所发现原核增强子样序列的功能是相似的。

我们比较了 pGM(+), pGM(-) 和 pG7(-) 在不同宿主菌中的 β 半乳糖苷酶活性,很有趣地发现插入片段在 JM103、C 600 和 MC 1061 中的增强作用均很相似。

(见表 1), 而在 HB 101 中却没有明显的 有关。
增强作用。这种差异可能与宿主细胞因子

参 考 文 献

- [1] Yakov, G. and Tomas, S.: Enhancer and Eukaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, NY, 1983.
- [2] Guarente, L. et al.: *Cell*, 5:169, 1988.
- [3] Raibaud, O. and Schwartz, M.: *Ann. Rev. Genet.*, 18:173, 1984.
- [4] Dunn, T. M. et al.: *PNAS*, 81:5017, 1984.
- [5] Dan, D. G. et al.: *Nature*, 325:823, 1987.
- [6] Irani, M. H. et al.: *Cell*, 32:783, 1983.
- [7] Ptashne, M. and Hochsield, A.: *Cell*, 44:681, 1986.
- [8] Garciarrubio, A. A. and Corarrubias, A. A.: *Gene*, 54:275, 1987
- [9] 吴淑华等: 病毒学报, 1:385, 1985.
- [10] 侯云德等: 病毒学报, 1:278, 1985.
- [11] 宇文辅等: 病毒学报, 3:217, 1987.
- [12] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, CSH, NY, 1982.
- [13] 侯云德等: 病毒基因工程的原理及方法, 人民卫生出版社, 北京.
- [14] Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, CSH, NY, 1972.
- [15] Robert, F. S. et al.: *Practical Methods in Molecular Biology*, Springer-Verlag New York Inc. NY, 1981.
- [16] Sanger, F. et al.: *PNAS*, 74:5463, 1977.
- [17] Taber, S. et al.: *PNAS*, 84:4767, 1987.
- [18] Lee, W. et al.: *Cell*, 49:741, 1987.
- [19] Gerald, H. Z. et al.: *Virology*, 163(2):579, 1988.
- [20] Hertz, G. Z. et al.: *Virology*, 163(2):579, 1988.

STUDY ON THE ENHANCER-LIKE ELEMENT IN *ESCHERICHIA COLI*

Pan Wei Wu Shuhua Jin Qi Yu Wenhao

Liu Zhewei Jin Dongyan Du Ping Hou Yunde

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

An enhancer-like element of 1.0kb from *E. coli* JM103 chromosome was obtained (JM103-M) using enhancer-probing vector. The JM 103-M fragment was shown to stimulate the nearly CAT or β -galactosidase gene expressin in *E. coli* with both direction at the stimulation rate of 3—6. The same fragment was also demonstrated to have promoter function when a promoter-probing vector was tested. Result obtained from sequencing date showed a sequence TGACTAA homologous to the DNA binding motif of SV40 for AP-1 and GC box.

Key words

Enhancer; bacteria chromosome