

大肠杆菌 M 增强子样序列结构和功能的研究*

谢 明 吴淑华 来向红 徐云鹤
万晓余 潘 卫 侯云德

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

摘要 构建了以 β -半乳糖苷酶基因为报告基因, 适用于原核增强序列研究的 pAC 载体。应用该载体进行的转录增强实验证明, 一段已克隆的具有增强基因表达功能的大肠杆菌染色体 M 序列, 对被调控基因的增强作用是发生在转录水平, 其能使 β -半乳糖苷酶基因特异性的 mRNA 转录增加 6.5 倍, 与应用该载体测得的表达增强活性一致。通过构建一系列正、反向 M 序列缺失突变体并对其进行的研究表明, 在靠近 M 序列 5' 端的 340 bp 区域内存在 3 个相互作用、与增强活性密切相关的部位, 分别位于 M 序列 3' 端上游 770, 610 和 470 bp 处。应用 PCR 技术对大肠杆菌染色体对应于 M 序列 5' 端上游 207 bp 进行了克隆, 研究显示 M 序列具有功能上的完整性。

关键词 大肠杆菌染色体 增强子样序列

增强子是一种顺式作用元件, 其与反式因子相互作用而发挥转录增强功能。Benoist 和 Gruss^[1,2]等于 1981 年在真核病毒 SV40 基因组中, 首次发现这种序列并称之为增强子, 此后的研究证明增强子序列广泛存在于真核生物及其病毒中, 对基因转录调控具有重要作用。1985 年我国学者侯云德和吴淑华发现真核病毒 SV40 的 HindIII B 片段在大肠杆菌这一原核系统中也具有明显的增强活性^[3,4]。此后, 我们和国外的研究进一步肯定了在原核基因组转录调节中, 原核增强子也发挥着重要作用^[5~8]。

本文对来源于大肠杆菌的 M 增强子序列^[5]进行了研究, 证明了 M 序列的表达增强发生在转录水平。随后, 我们通过缺失突变研究, 证明在靠近 M 序列 5' 端的 340 bp 序列中存在 3 个相互联系的功能区。运用 PCR 技术对 M 序列 5' 端上游序列进行了克隆和分析, 结果表明 M 序列具有功能上的完整性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 质粒 pM1.6 携带有痘苗病毒启动子 pN₂, 在其上游 EcoR I 和 HindIII 位点之间插有 M 序列, pAL 质粒含有痘苗病毒启动子 P7.5K, 在其下游有 LacZ 基因作为标记基因。PM1.6 和 pAL 均由本室提供。质粒 pUC19, M13mp 18, 19 购自 Promega 公司。大肠

1996-05-21 收稿, 1996-08-05 收修改稿

* 国家“八六三”高科资助项目

杆菌 JM103 购自 BRL 公司.

1.1.2 限制性核酸内切酶及修饰酶 各种限制酶、T4 DNA 连接酶、和 Klenow 大片段购自 Biolabs 公司.

1.1.3 试剂及试剂盒 MOPS, ONPG, IPTG, X-gal 购自 Promega 公司; 放射性同位素 α -³²P dCTP 为 Amersham 公司产品; PCR 试剂盒为华美公司产品; Errase A base 试剂盒为 Promega 公司产品.

1.2 实验方法

1.2.1 增强子检测载体的构建及 β -半乳糖苷酸酶活性的测定 质粒制备、克隆方法按文献 [9], 构建过程见结果. β -半乳糖苷酶活性测定按文献[10].

1.2.2 RNA 的提取 按参考文献[11].

1.2.3 RNA 和 DNA 的杂交 斑点杂交和 Northern 杂交按文献[9]方法进行.

1.2.4 缺失突变 (1)定向缺失突变. 用 Sma I 酶切 pM1.6 质粒分离 M 序列, 将其与经 Xba I 酶切后用 Klenow 大片段补平的 pUC19 连接, 分别筛选 M 序列正、反向插入的克隆作正、反向定向缺失突变. DNA 样品用 Kpn I 和 BamH I 双酶切后参照文献[12]进行定向缺失, 筛选不同大小的缺失片段, 插入 pAC EcoR I 和 HindIII 位点中, 转化大肠杆菌 JM103, 测定不同缺失突变体的 β -半乳糖苷酶表达活性. (2)限制性内切酶缺失突变. 在 M 序列 3' 端上游 230 bp 和 830 bp 处有 Taq I 酶切位点; 在 740 bp 处有 Acc I 酶切位点, 分别酶切后回收大片段插入 pAC 检测载体, 同上法测 β -半乳糖苷酶表达量, 检测增强活性.

1.2.5 大肠杆菌染色体制备及 PCR 扩增 按文献[9]制备大肠杆菌染色体. PCR 扩增反应: 将 10 μ L 10 \times 反应缓冲液, 10 μ L 4 \times dNTP 混合物, 13 μ L 引物 1(4.78 pmol/ μ L) 2 μ L 引物 2(31.43 pmol/ μ L), 0.3 μ L JM103 染色体 DNA(400 ng/ μ L), 63.9 μ L 去离子水混匀于 Eppendorf 管中, 煮沸 10 min, 冰浴 5 min, 加 1 μ L(1 μ g/ μ L) Taq DNA 聚合酶混匀, 加 50 μ L 液体石蜡, 反应管在 100°C 变性 10 min, 然后进行 PCR 循环, 每个循环 95°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2.5 min, 共 30 个循环, 最后置 72°C 延伸 5 min. PCR 产物抽提、沉淀、克隆同常规.

2 结果

2.1 增强子检测载体的构建

用 Sma I 酶切 pM1.6 质粒, 回收 M 片段, 将其与经 Sma I 酶切的 pUC19 连接获得 M 序列正、反向插入的克隆 pUM(+) 和 pUM(-). 分别用 EcoR I 和 HindIII 双酶消化, 回收 M 序列, 与经同样的双酶消化后去掉 TK 基因的 pAL 大片段连接, 酶切鉴定, 分别得到 pAM(+) 和 pAM(-) 克隆, 将 M 序列正向克隆的 pAM(+) 用 Sma I 酶切, 回收除去 M 序列的大片段自身环化即得 pAC 检测载体. pAC 载体的 p7.5K 启动子下游克隆有除去乳糖操纵子抑制位点的 LacZ 基因, 上游约 300 bp 处有一个多克隆位点. 载体及构建过程如图 1.

2.2 M 序列对 β -半乳糖苷酶基因表达的增强作用

分别测定 pAC 载体, M 序列正向克隆于 pAC 载体和 M 序列反向克隆 pAC 载体转化菌的 β -半乳糖苷酶基因的表达水平, pAC 检测载体的基因表达活性为 8 个 Miller 单位, M 序列正向克隆可使该基因表达增强 6 倍, 为 48 个 Miller 单位; M 序列反向克隆可使该基因表达增强 2.6 倍, 为 21 个 Miller 单位.

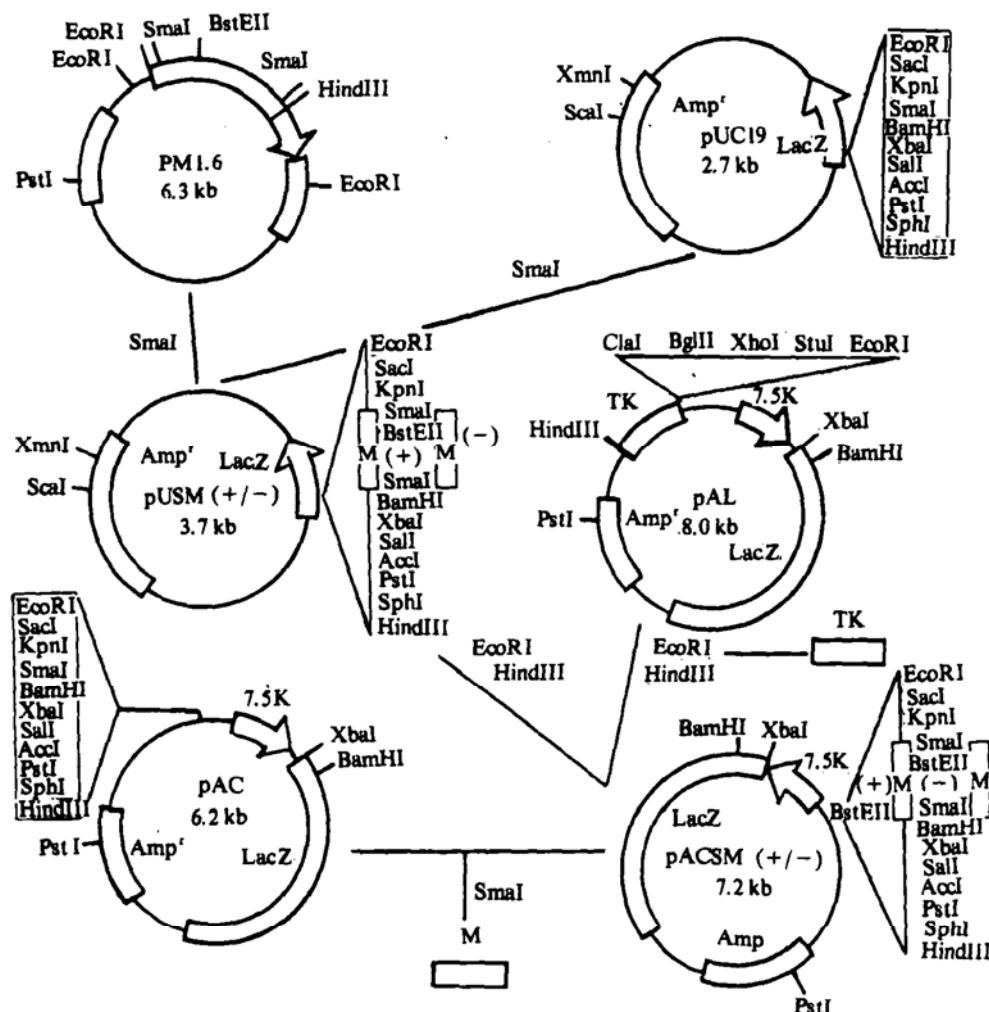


图 1 增强子检测载体的构建

2.3 M 序列对 β -半乳糖苷酶基因转录增强作用

为了探明 M 序列对基因表达的增强作用是否发生在转录水平上, 我们用放射性标记的部分 LacZ DNA 作为探针, 以 Dot 杂交和 Northern 杂交方法对携有 M 片段和不携有 M 片段的克隆菌的 LacZ mRNA 含量进行了测定和比较。Dot 杂交放射自显影片的扫描结果显示, 携有 M 片段的克隆菌中 mRNA 含量比无 M 片段的高约 6.5 倍(图 2), 与 β -半乳糖苷酶活性检测结果一致, Northern 杂交的放射自显影结果也显示了 M 序列转录水平的增强作用(图 3)。上述结果证明了 M 序列对基因表达的增强作用确是发生在转录水平上。

2.4 M 序列功能部位的研究

我们通过对 M 序列的一系列缺失突变体的研究, 对 M 序列上存在的与增强活性有关的功能部位进行了定位。将 M 序列 3' 端定向缺失的一系列缺失体中选出 12 个克隆, 分别用 EcoR I 和 Hind III 酶切回收后正向克隆到 pAC 载体 EcoR I 和 Hind III 位点中, 获得 D150, D170, D200, D260, D320, D350, D400, D460, D570, D700, D780, D860 缺失突变体(D 表

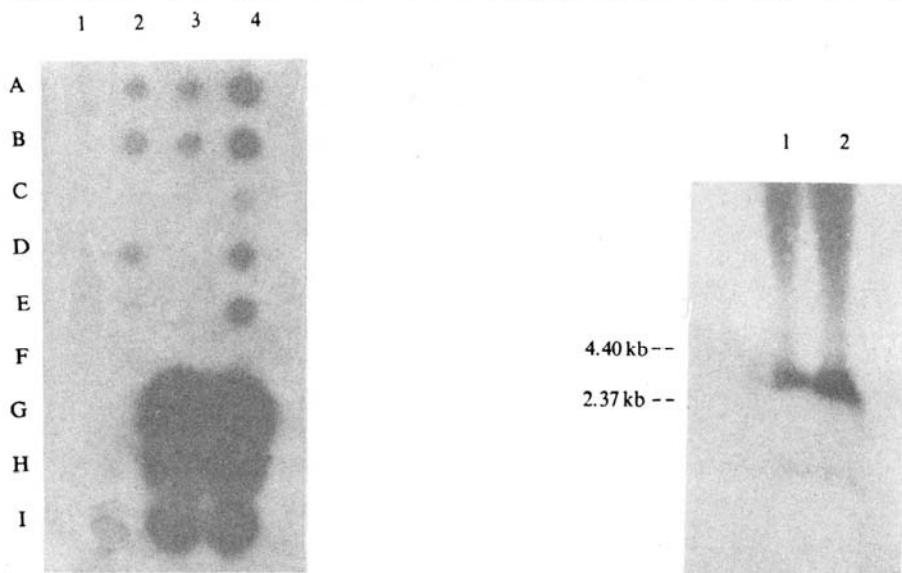


图 2 Dot 杂交结果

A~C 为新鲜提取的 RNA 样品; D~F 为冻存的 RNA 样品, 分别含 30, 15, 3.5 g 总 RNA. 1, 3 为无 M 序列的 pAC 克隆菌中提取的经和未经 RNA 酶消化的 RNA 样品; 2, 4 为含 M 序列的 pACSM(+) 克隆菌中提取的经和未经 RNA 酶部分消化的 RNA 样品; G~I 中 1, 2 为酵母 tRNA 阴性对照, 分别为 60, 30, 10 g; 3, 4 为 pAC 阳性对照, 分别含 2, 1, 0.2 g

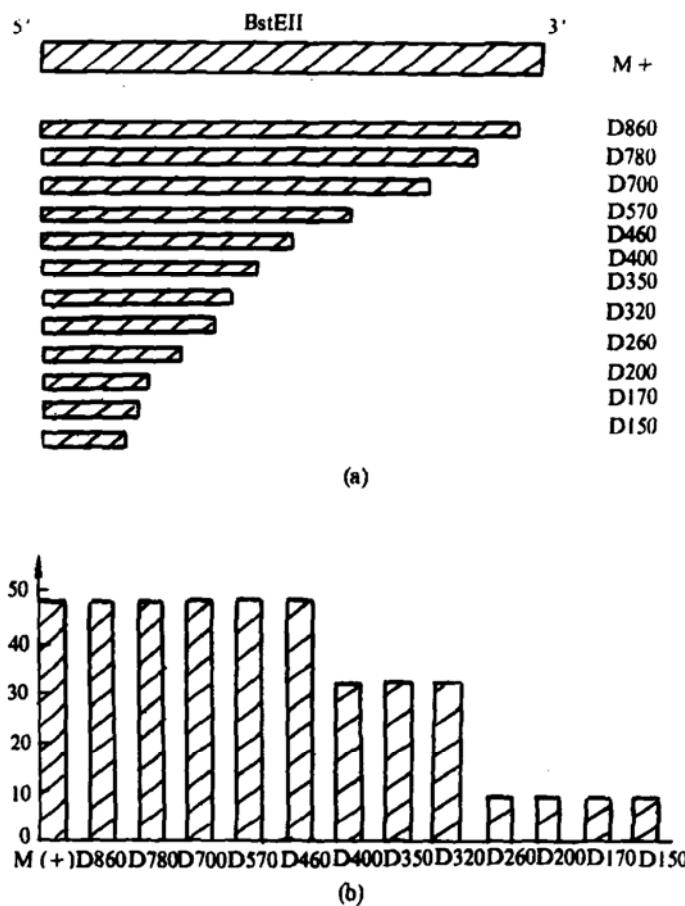
图 3 Northern 杂交结果

1 为从不携 M 序列的 pAC 克隆菌提取的 RNA 与 DNA 探针的杂交带; 2 为从携 M 序列的 pACSM(+) 克隆细菌中提取的 RNA 与 DNA 探针的杂交带

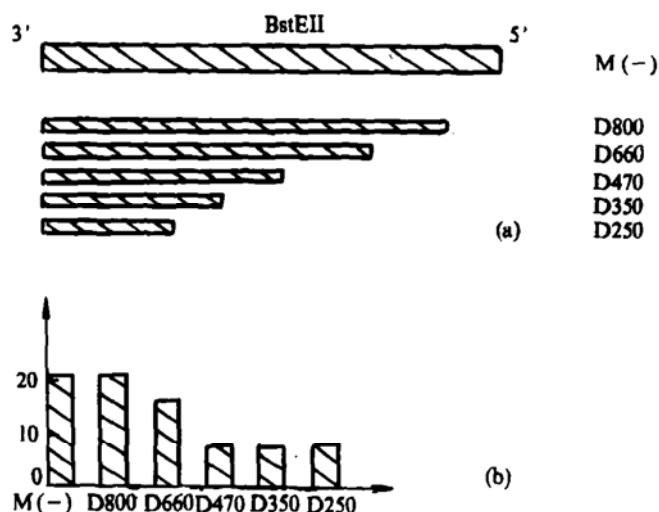
示缺失, 数字表示缺失后 M 序列的长度, 以 bp 为单位), 不同缺失突变体对 β -半乳糖苷酶基因的表达增强活性的改变见图 4; 从 M 序列 5' 端定向缺失的一系列突变体中选出 5 个克隆, 分别用 EcoR I 和 HindIII 酶切回收后反向克隆到 pAC 载体的同样的酶位点中, 获得 RD250, RD350, RD470, RD660 和 RD800 5 个反向缺失突变体 (R 表示反向, 其它同上), 不同缺失突变对基因表达的影响见图 5. 3' 端缺失正向克隆的结果显示, 在 3' 端上游 440 和 500 之间的 60 bp 中存在一个与增强活性有关的位点, 在 580 和 640 之间的 60 bp 中也存在一个与增强活性有关的位点, 这两个位点同时缺失使 M 序列功能完全丧失, 而 5' 端缺失的反向克隆结果也证明这一段约 200 bp 的序列缺失使 M 序列活性丧失, 但 5' 端缺失的反向克隆研究还表明, 在 3' 端上游 660 和 800 之间的 220 bp 中另有 1 个与增强活性有关的位点, 为了证明这一点, 我们分别用 Taq I 删去 5' 端 70 bp 获得 Mt 克隆体, 用 Acc I 删去 160 bp 获得 Ma 克隆体, 研究结果显示, 5' 端缺失 70 bp 后对增强活性无任何影响, 这与 5' 端缺失 100 bp 的反向克隆结果一致, 但 5' 端缺失 160 bp, 即在 M 序列 3' 端上游 660 和 800 之间的 740 bp 位点处缺失后, M 序列增强活性下降, 结果证明在此处另存在一个活性相关部位, 前面结果表明位于 450 和 620 bp 处的 2 个位点同时缺失可使 M 序列增强活性彻底丧失, 我们将缺失 450 bp 处后仍保留一定活性的 D400 用 Acc I 删去 160 bp 后获得 D400a 克隆体, M 序列的活性也随之彻底丧失, 以上结果见图 6, 研究表明在 M 序列靠近 5' 端的 340 bp 的序列中存在 3 个与增强活性相关且相互联系的功能位点, 3 个位点同时存在时增强活性最高, 同时失去任意 2 个位点时增强活性消失.

2.5 M 序列 5' 端上游相应序列的研究

我们通过缺失突变研究了解到 M 序列活性部位位于该序列的 5' 端, 且是多位点协同, 为

图 4 M 序列正向 3' 端缺失突变体及相应 β -半乳糖苷酶活性

(a) 正向克隆 3' 端缺失后的 M 片段长度; (b) 相应缺失体 β -半乳糖苷酶活性测定结果。纵坐标表示酶活性, 以 Miller 单位计算

图 5 M 序列反向克隆 5' 端缺失突变体及相应 β -半乳糖苷酶活性测定结果

(a) 反向克隆 5' 端缺失后的 M 片段长度; (b) 缺失体相应酶活性, 以 Miller 单位计算

了解在 5' 端更上游的大肠杆菌染色体序列中是否还存在活性相关位点, 我们以大肠杆菌染色体为模板将 M 序列由 3' 端上游 300 bp 处向 5' 端上游延伸至 5' 端上游 207 bp, 所得的克隆 Me 既含有 M 序列的 3 个活性相关位点, 又含有大肠杆菌染色体相应于 M 序列 5' 上游 207 bp 长的序列。将其正向克隆到 pAC 检测载体上, 研究表明其增强活性无任何变化, 说明在 M 序列 5' 端上游 207 bp 的上游序列中不存在影响 M 序列活性的作用位点, 结果见图 6。

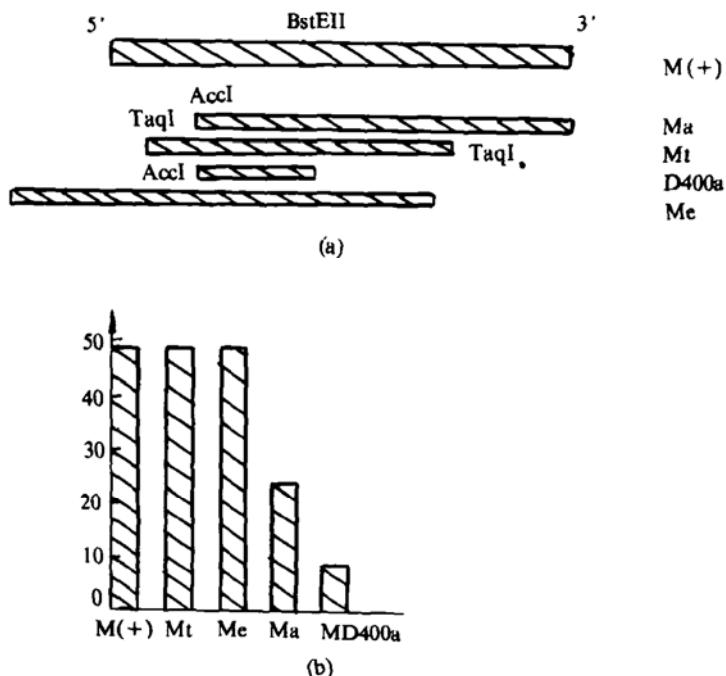


图 6 M 序列正向克隆 5' 端, 5' 和 3' 端缺失, M 序列 5' 端上游延伸体及相应

β -半乳糖苷酶活性测定结果

(a) M 序列缺失体; (b) 相应缺失体酶活性, 以 Miller 单位计算

3 讨论

1985 年我们发现 SV40 HindIII B 片段对人 α , β 干扰素基因的表达有增强子样效应以来, 相继发现 HPV-6b、HPV-16、痘苗病毒 HindIII K 片段、RSV G 片段和大肠杆菌 M 片段均具有类似的增强子样效应^[6]。1986 年 Buch 等^[7]发现固氮基因启动子的上游区有增强子样序列。1987 年 Garciarrabio 等^[8]发现在大肠杆菌 gln A 基因上游区有增强子样序列。因此, 我们和国外的研究进一步肯定了在原核基因组转录调节中, 原核增强子也发挥着重要作用。

通过对 β -半乳糖苷酶基因产物活性的对照比较, 我们证明了 M 序列对基因的调控是发生在转录水平, 这不仅进一步说明了 M 序列的增强功能类似于真核增强子序列, 同时还为 M 序列在今后的有关作用机制方面的研究和构建原核高效表达载体提供了重要依据。

无论真核增强子和原核转录增强序列, 它们在作为一种顺式作用元件而发挥作用时大多表现为多位点的协同作用^[13, 14], 为了探索 M 序列的作用位点特征, 我们进行了缺失突变体研究, 通过正、反向定向缺失和限制酶切缺失的相互映证, 我们在 M 序列 3' 端上游的 440~500, 580~640, 740~800 bp 处发现了 3 个与其调控活性有关的位点, 这 3 个部位长度均约 60 bp,

取其中间值, 将其位点标在 410, 610 和 770 bp 处, 左右移动范围为 30 bp, 这种初步定位不仅使我们了解到 M 序列和其它增强序列一样由多位点相互联系而起作用, 而且为今后进行凝胶阻抑试验(Gel retardation)和足印迹试验(Foot printing)提供了较好的位点依据.

参 考 文 献

- 1 Benoist C, Chambon P: on vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature*, 1981, 290:304
- 2 Gruss P, Dhar R, Khoury G. Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element of the early promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78:943
- 3 侯云德, 崔 宏, 段淑敏, 等. SV40 DNA Hind III B 片段增强人 α 干扰素基因在大肠杆菌中的表达. *病毒学报*, 1985, 1:278
- 4 吴淑华, 张丽兰, 张秀珍, 等. SV40 DNA Hind III B 片段增强人 β 干扰素基因在大肠杆菌中的表达. *病毒学报*, 1985, 1:385
- 5 潘 卫, 吴淑华, 金 奇, 等. 原核增强子样序列的研究. *生物工程学报*, 1990, 6:265
- 6 吴淑华, 阮 力, 潘 卫, 等. 某些动物病毒基因组以及大肠杆菌 DNA 序列具有原核增强子样功能. *科学通报*, 1990, 35(10):784
- 7 Buch M, Miller S, Drummond M, et al. Upstream activator sequences are present. *Nature*, 1986, 320:374
- 8 Garciarrubio A A, Covarrubias A A. Promoter selection by a bacterial enhancer-like activator element (BELE) in *Escherichia coli*. *Gene*, 1987, 54:275
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 10 Miller J H. Experiments In Molecular Genetics. CSH, NY: Cold Spring Harbour, 1972. 352
- 11 Jemilo D K, Taurence J S, Giese S. Mutation in 16s rRNA in *Escherichia coli* at methylmodified sites: G966, C967 and G1207. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19:4 259
- 12 Owen R J, Borman P. A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosomal DNA for restriction enzyme analysis. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15:3 631
- 13 Reitzer L J, Magasanik T. Transcription of glnA in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell*, 1986, 45:785
- 14 Buck M, Miller S, Drummond M, et al. In the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature*, 1986, 320:374