

牛金属硫蛋白基因序列测定及结构分析*

杨靖¹⁾ 沈孝宙 杨卫民

(中国科学院动物研究所生殖生物学开放研究实验室,北京100080; ¹⁾中国科学院发育生物学研究所,北京 100080)

M. G. Peterson J. F. B. Mercer

(澳大利亚皇家儿童医院,帕克威利)

Savio L. C. Woo

(美国贝勒医学院细胞生物系,休斯敦)

关键词 牛金属硫蛋白基因、DNA 序列测定、基因结构

金属硫蛋白 (Metallothionein, 简称 MT) 是一类能特异性地结合重金属,并富含半胱氨酸的低分子量蛋白质,它们广泛地存在于从酵母到人类的真核细胞生物体中。MT 基因是动物细胞基因表达调控中一直受人重视的实验模型。为了在转基因家畜的研究中提供可诱导的调控元件,我们克隆了牛金属硫蛋白基因 (bMT),并发现牛的 MT 基因家族至少含有 4 个成员^[1]。本文对其中一个具有功能的基因 (bMTc) 进行了序列测定,在此基础上对该基因的结构特性作了分析。

一、材料和方法

1. 材料 限制性内切酶购自 BRL 公司和华美生物工程公司。pUC/M13 测序盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司,千碱基测序盒购自瑞典 Pharmacia 公司和 BRL 公司。³²S-dATP 购自英国 Amersham 公司。测序装置 2010 MACROPHOR Electrophoresis Unit 购自 LKB 公司。

2. bMTc 基因的次级克隆 参照 bMTc 基因的图谱^[1],选择适当的酶切位点,将 bMTc 基因分成 7 个片段分别插在 M13mp18 或 M13mp19 的相应酶切位点上。以此次级克隆株分别进行序列测定,据 Sanger 等的双脱氧法^[2]程序进行。

二、结果和讨论

bMTc 基因的次级克隆如图 1 所示。对每个次级克隆序列至少测定二次。bMTc 基因序列如图 2 所示。与其它动物 MT 基因的结构比较,在不同区域,变异的程度也不尽相同,兹分述如下:

1. 外显子 bMTc 也有 3 个外显子,与一般动物 MT 外显子共有序列^[3]比较,同源性约为 92%;与羊 MT-II 外显子^[4]比较,同源性为 87%;与羊 MT-Ic^[4]比较,同源性为 98%。而与羊 MT-Ia^[5]和 MT-Ib^[4]外显子序列比较,同源性则为 100%。因此可推知我们所测定

本文 1991 年 6 月 10 日收到。1991 年 12 月 5 日收到修改稿。

* 美国洛克菲勒基金会资助课题。

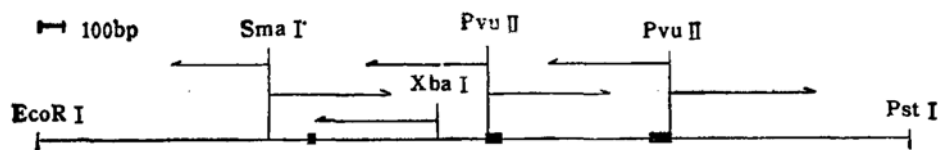


图1 bMTc 基因亚克隆和序列测定的策略图示
箭头指示测序的方向和长度,粗线表示该基因的三个外显子

的 bMTc 基因序列应属于 MT-I 基因序列。

2. 内含子 bMTc 内含子 1 和 2 分别与已知序列的羊^[4,5]、小鼠^[3]、兔^[6]和人^[7]等的 MT 内含子比较,与羊 MT-Ia 内含子同源性最好(参见图 2)。bMTc 内含子 1 和 2 (分别长 695 bp 和 704bp) 的 5'-及 3'-端符合 GT-AG 规律^[8]。内含子的左侧供体位点 (donor) 序列分别是 5'-CTG/GTAAGG-3' 和 5'-AGA/GTGAGT-3', 符合共有序列 5'- $\overset{A}{C}$ AG/GT $\overset{A}{G}$ AGT-3'^[6]。内含子的右侧受体位点 (acceptor) 序列分别为 5'-(Y)₁₃GGCAG/GC-3' 和 5'-(Y)₁₆CTAG/GC, 符合共有序列 5'-(Y)_nNYAG/G-3' (Y: 嘧啶碱基; $n \geq 11$; N: 任意碱基)^[6]。这二种特异性序列是剪接信号的所在部位。

3. 启动子区域 bMTc 基因的 5'-侧翼区有几个典型的序列(参见图 2)。(1) 帽位点: bMTc 基因中距起始密码子上游 82—83 bp 的序列 CTGGGCTCCAGCACGCCTCC, 基本同源于 mRNA 帽位点共有序列 CTRNRCYCCAYCACGCCTYC (R: 嘌呤碱基)^[9]。(2) TATA 盒: bMTc 基因 -27 与 -21 bp 之间的 TATAATA 与共有序列的 $\overset{A}{T}ATA\overset{A}{T}$ ^[8] 略有差异, 但仍具有 A/T 富集的特点, 而且与羊 MT-Ia 的 TATA 盒序列完全相同。(3) GC 盒: bMTc 基因 5'-上游区有典型的 GC 盒序列, 即位于 -104 与 -99 bp 之间的 CCGCCC。该序列是转录调节因子 SP1 的结合部位。(4) 金属调节部位 (MRE) 与 MRE 共有序列^[9]相比较, 可推测出在 bMTc 基因启动子区有 14 个以上的 MRE 序列, 如表 1 所示。(5) 糖皮质激素调

表 1*

元件	序 列	方向	相同的碱基数目
MRE1	-54 CTCTGCGCCCGGCC -40	正向	15
MRE2	-66 GCCTGCACCCGCGCT -80	反向	10
MRE3	-84 CCGTGCGCCCGGGCC -98	反向	13
MRE4	-109 CACCACGCGCGGCCG -123	反向	11
MRE5	-134 CCGGGAATGCGGCTG -148	反向	9
MRE6	-164 CCGTGCACACGGAGC -150	正向	12
MRE7	-231 CCAGGCTTCCTGCCC -245	反向	11
MRE8	-289 ACGGGAACCCAGCCC -303	反向	10
MRE9	-315 CAGTCTTCCCTGCCC -329	反向	10
MRE10	-366 CTCTGGGAAAGGGTG -352	正向	9
MRE11	-379 GGTTGCGCATGGGCT -365	正向	10
MRE12	-397 ATGTGAGCACGAGGC -383	正向	10
MRE13	-434 CTCTGCACACAACAC -420	正向	12
MRE14	-454 TTCACCACCATGCCC -468	反向	10

* 共有序列: CTNTGCRNCGGCC (R, N 分别表示嘌呤和任意碱基)。

节部位 (GRE) 与共有序列 TGGTACANNNTGTTCT^[10] 及羊 MT-Ia GRE 相比较, -214 与 -201 bp 之间的 CGGGACAAAGTTCC 很可能是一个 GRE。

4. 3'-非翻译区域 与典型的加尾信号 AATAAA 相比较, bMTc 基因中距终止密码子 121 与 126 bp 处的 AGTAAA 序列很可能就是该基因转录时 poly (A) 的加尾信号。这种非典型的加尾信号与羊 MT-Ia 加尾信号相同。

从上述可以看出, bMTc 基因无论是外显子, 还是启动子区域, 甚至是内含子部分的序列及加尾信号都与羊 MT-Ia 基因序列有极高的同源性, 因此可以确认我们所选择测定的 bMTc 是牛 MT-Ia 基因 (bMT-Ia)。bMT-Ia 基因有着基因表达及调控所必需的序列结构, 该研究结果为进一步深入研究牛 MT 基因奠定了基础。目前, 我们正在研究牛 MT-Ia 基因上游调节区的功能, 以期为转基因牛提供调控元件。

致谢: 作者感谢中国科学院动物研究所生殖生物学开放研究实验室已故主任张致一教授的支持。感谢中国科学院上海细胞生物学研究所施履吉教授的指导。

参 考 文 献

- [1] Shen Xiao zhou et al., *Chinese Science Bulletin*, 34(1989), 953—956.
- [2] Sanger, F. et al., *J. Mol. Biol.*, 143(1980), 161—178.
- [3] Searle, P. F. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 4(1984), 1221—1230.
- [4] Peterson, M. G., Mercer, J. F. B., *Eur. J. Biochem.*, 174(1988), 417—424.
- [5] Peterson, M. G., Mercer, J. F. B., *Eur. J. Biochem.*, 160(1986), 579—585.
- [6] Tam, Y. C. et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 153(1988), 209—216.
- [7] Richards, R. I. et al., *Cell*, 37(1984), 263—272.
- [8] Breathnach, R. et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 50(1981), 349—383.
- [9] Stuart, G. W. et al., *Nature*, 317(1985), 828—831.
- [10] Karin, M. et al., *Nature*, 308(1984), 513—519.