大肠杆菌 C600 染色体 DNA 中原核增强子样序列的克隆和鉴定*

何建新 廖小慧 秘晓林 韩 峰 王 艳 吴淑华**

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

摘要 采用大肠杆菌 trp 启动子，氯霉素乙酰转移酶(CAT)作为标记基因，构建了两个应用氯霉素压力筛选增强子序列的检测载体 pKT 和 pKTR. 用 pKT，pKTR 及 pKN2 从大肠杆菌 C600 染色体基因组中克隆到 3 个原核增强子样序列 3A，8A 和 V6S，这 3 个片段均具有正、反向增强活性，对 β-半乳糖苷酶表达的正向增强活性达到 7～8 倍，反向增强活性 2～3 倍. RNA 斑点杂交实验证明，3A，8A 和 V6S 片段对于基因表达调控的增强作用均发生在转录水平上.

关键词 原核增强子 大肠杆菌染色体 原核增强子检测载体

增强子是 RNA 聚合酶转录时远距离地对启动子发挥顺式调节作用的一种基因组元件，它在启动子的上游、下游及本身处于正向或反向位置时都具有活性[1]. 侯云德和吴淑华等发现了 SV40 的 *Hin*d III B 片段在大肠杆菌中有明显的原核增强子样活性[2, 3]，后来我国学者又陆续报道了痘苗病毒 K 片段、人乳头瘤病毒 6b 型和 16 型的 URR 区域及大肠杆菌 JM103 染色体中的 M 序列都具有增强子样活性[4～6]. 国外学者在 1986 年发现和证明了大肠杆菌中的 σ54 型增强子，并在后来的研究中阐明了此类增强子的作用机理[1, 7, 8]. 为了对大肠杆菌原核增强子有更深入的了解，并使原核增强子在生物技术产品生产中得到有效的应用，本文构建了两个增强子检测载体，从大肠杆菌 C600 染色体基因组中克隆到 3 个原核增强子样序列 3A，8A 和 V6S.

1 材料和方法

菌株：大肠杆菌 C600，DH5α 和 JM103 为本室保存菌种，C600 基因型为 supE44hsdRthi-1thr-1leuB6lacY1tonA21.

质粒：原核增强子检测质粒 pKN2，pAL 和质粒 pBV321 均由本试验室构建[4, 9, 10]. pBluescript M13 SK(+)(简称 pSK)，pKK232-8 和 pGEM-3ZF(+)分别购自 Stratagene，Pharmacia 和 Promega 公司.

大肠杆菌染色体 DNA 的提取：按 Owen 的方法[11]进行. 大肠杆菌 RNA 的提取，按文献[12]方法进行. β-半乳糖苷酶活性的测定，按文献[13]进行. DNA 序列分析，用 ABI PRISM

2000-05-17 收稿，2000-09-29 收修改稿

*“八六三”高科技资助项目(批准号：102-11-03-03)

**通讯联系人：E-mail：shuhuawu@public3.bta.net.cn

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

377 型自动序列分析仪进行.

细菌抗氯霉素活性的测定:按文献[4]方法进行. 用纯化质粒进行快速转化,琼脂平板在 37℃孵育 12 h 后,挑单菌落接种含不同浓度氯霉素的 ALB 溶液 2.0 mL, 37℃孵育 8 h 后,测菌液的 $OD_{600\ nm}$.

Northern blot 及 Digxon 的标记和检测:用 Boehringer Mannheim 公司试剂盒,按文献[13]方法进行. 从 pAL 质粒中回收约 700 bp 的 *Bam*H I/*Cla* I 片段作为 Northern blot 的探针.

2 结果和讨论

2.1 原核增强子检测载体的构建

用大肠杆菌 Trp 启动子构建两种新的增强子检测载体. pKK232-8 质粒在报告基因氯霉素乙酰转移酶基因(CAT)之前没有启动子, 并在多克隆位点前后分别有转录和翻译终止信号, 用来构建增强子检测载体很有利. 从 pBV321 中切下含 Trp 启动子的 0.3 kb 片段,补平连接于载体 pKK232-8, 得到 pKT 载体. 对 pKT 载体的多克隆位点进行改造, 得到 pKTR(图 1). pKT 和 pKTR 仅在多克隆位点上有差别, 都能用于增强子的筛选, 但由于后者在多克隆位点上有更多的单一切点及 *Eco*R V 和 *Sma* I 两个产生平端的位点, 因而后者在实际应用中将更为方便.

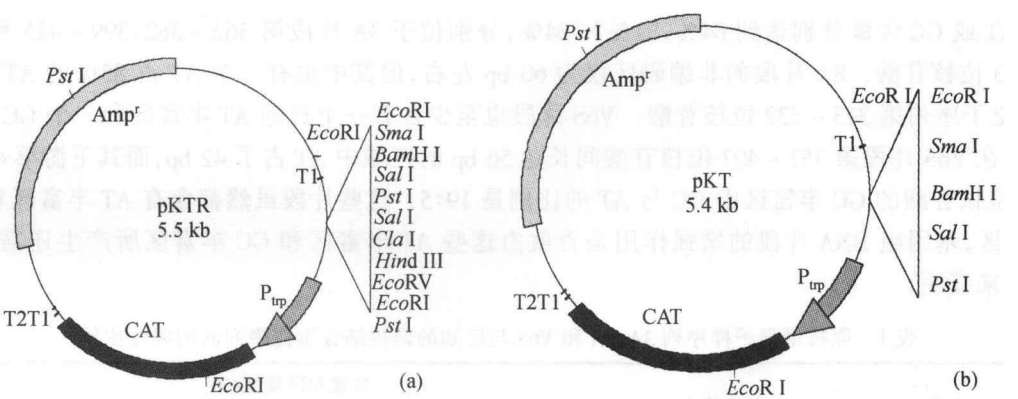


图 1　pKTR(左)和 pKT(右)质粒图

CAT: 氯霉素乙酰转移酶基因; Trp: Trp 启动子; T2T1 和 T1: 转录终止信号

2.2 从大肠杆菌 C600 株染色体基因组中克隆原核增强子样序列

采用 pKN2,pKT 和 pKTR 增强子检测载体, 从大肠杆菌 C600 株染色体基因组中克隆原核增强子样序列,pKN2 载体氯霉素耐受性为 50 ~ 100 μg/mL, 而 pKT 和 pKTR 载体氯霉素耐受性为 300 μg/mL, 将大肠杆菌 C600 株染色体 DNA 分别用 *Hae* III, *Sau*3A I 和 *Hae* III + *Eco* RV 等内切酶组合充分消化,然后克隆进入 pKN2,pKT 和 pKTR 载体的多克隆位点中. pKN2 连接产物在含 400 μg/mL 氯霉素的 ALB 平皿进行压力筛选,而 pKT 和 pKTR 的连接产物在含 800 μg/mL氯霉素的 ALB 平皿进行压力筛选,结果挑选出 3 株阳性克隆——pKN3A,pKN8A 和 pTRV6S,获得了 3 个增强活性明显的基因组 DNA 片段. 用多种常用内切酶对所筛选出的 DNA 片段进行初步鉴定,证明这些 DNA 片段相互间不同,没有出现由同一增强活性序列构成的

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

DNA 片段(结果未显示).

测定 pKN3A,pKN8A 和 pKTRV6S 抗氯霉素活性的结果表明,3 个增强活性序列的抗氯霉素活性均高于对照质粒,具有明显增强 CAT 基因表达的能力(图 2).

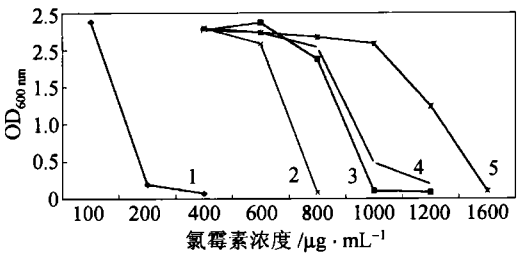


图 2 原核增强子样序列的抗氯霉素活性

1 为 pkN_2, 2 为 pkN3A, 3 为 pKN8A, 4 为 pKTR, 5 为 pKTRV6S

2.3 原核增强子样序列 3A,8A 和 V6S 的一级结构分析

将 3A 和 8A 片段插入 pGEM-3Zf,V6S 片段插入到 pSP72 中进行序列分析. 然后在 GenBank 中查寻同源序列,结果表明这 3 个片段均是来自大肠杆菌基因组,与大肠杆菌已知基因序列[14,15]同源性分别达到 99%,98% 和 99% 以上. 3A,8A 和 V6S 片段全长分别为 669 bp,451 bp 和 773 bp.

将 3A, 8A 和 V6S 片段的 DNA 序列输入 DNASIS 软件,同一些已知的转录调节蛋白的 DNA 结合序列进行比较(表 1),结果表明它们可能含能增强报告基因表达的增强子位点. 近年来有文献报道基因组序列中的 AT 丰富区或 GC 丰富区结合转录调节蛋白,对基因的调控起作用[16,17]. 3A,8A 和 V6S 片段都不仅含有大肠杆菌基因组的蛋白编码区,也都有长短不一的非编码区. 在 3A 片段中,含有至少两个可能是蛋白结合位点的 AT 丰富区和至少一个 GC 丰富区,AT 或 GC 含量分别达到 84%,81% 和 84%,分别位于 3A 片段第 362 ~ 382,399 ~ 415 和 284 ~ 313 位核苷酸. 8A 片段的非编码区仅为 60 bp 左右,但其中也有一个 AT 占 85% 的 AT 丰富区,位于序列第 313 ~ 332 位核苷酸. V6S 片段也至少含有一个长的 AT 丰富区和一个 GC 丰富区. 在 V6S 片段第 351 ~ 407 位核苷酸间长达 56 bp 的区域中 AT 占了 42 bp,而其下游第 448 ~ 471 位核苷酸的 GC 丰富区中 GC 与 AT 的比例是 19:5. 这些片段虽然都含有 AT 丰富区和 GC 丰富区,基因组 DNA 片段的增强作用是否就由这些 AT 丰富区和 GC 丰富区所产生还需要有实验来证明.

表 1 原核增强子样序列 3A,8A 和 V6S 与已知的调控结合蛋白序列的同源性比较

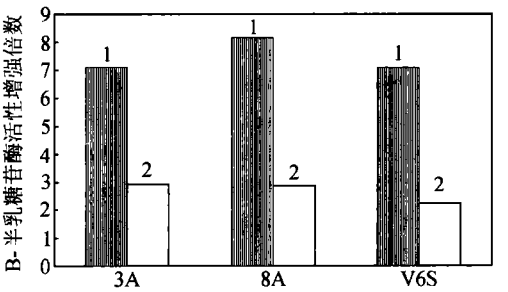
名称	结合位点	位置和同源性/%		
		3A	8A	V6S
NifA	$TGT(N)_{10}ACA$	330,450,543(94%)	192(100%)	251,480(94%)
Fis	CAANANNTGANC	266(92%)	55,78,109,133,141,148 304,369,382,395(75%)	87,244,377(83%)
glnA	CGTGNTNNNACCACN	638(80%)	352(87%)	610(80%)
HPV E2	$ACC(N)_6GGT$	68, 537 (92%)	57,143,253 (83%)	737(92%)
Ap-1	TGACTCA	64,280,339,461,475(71%)	35(86%)	18,100,159,546(87%)
IHF	$CNNTAA(N)_4$	180,250,402,408(100%)	257,267,312(100%)	94,525(100%)

2.4 原核增强子样序列 3A,8A 和 V6S 对 β-半乳糖苷酶表达的增强作用

为检测 3A,8A 和 V6S 片段增强子的方向不依赖性,我们把这 3 个片段分别以正反两个方向克隆到增强子检测载体 pAL. 将 3A 和 8A 片段分别从相应的 pKN2 上取下, 连接到 pAL 质粒多克隆位点中 *Bgl* II 位点, 分别挑选出它们的正、反向克隆检测载体. V6S 片段从 pKTR 上

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

切下，连接到 pAL 的 *Eco*R I 位点进行同样的分析．测定所有这些 pAL 系列质粒转化 JM103 菌株的 β-半乳糖苷酶活性，它们的结果和 pAL 的进行比较（图 3）．结果表明，3A，8A 和 V6S 片段增强活性明显，正向增强活性达到 7～8 倍左右，反向增强活性亦有 2～3 倍左右．



大肠杆菌 C600 基因组片段

图 3　原核增强子样序列对 β-半乳糖苷酶活性的增强作用

1—正向，2—反向

以上的结果表明，基因组 DNA 片段 3A，8A 和 V6S 具有原核增强子的特征：方向不依赖、位置不依赖性和对不同的启动子都起作用[1,15]．这 3 种序列都具有正、反向增强活性，表明了它们具有方向不依赖性；这 3 种序列在 pKN2，pAL 和 pKTR 与报告基因 CAT 或 LacZ 启动子距离不相同，分别为 500 bp，300 bp 和 230 bp 左右，因而 3A，8A 和 V6S 具有一定的位置不依赖性．在 pKN2，pAL 和 pKTR 中报告基因 CAT 或 LacZ 启动子分别是痘苗病毒 N2，P7.5 和大肠杆菌 Trp 启动子，每种基因组片段都至少对两种以上启动子发挥了作用．

2.5　原核增强子样序列 3A，8A 和 V6S 片段对 LacZ 基因转录的增强作用

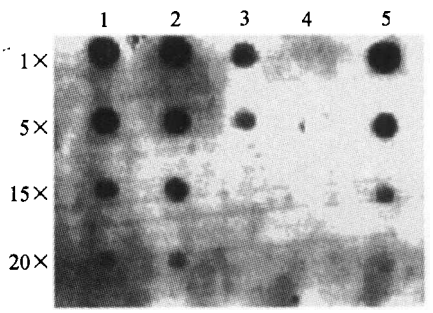


图 4　LacZ 基因 mRNA 的斑点杂交

1 pAL8A（+）；2 pAL3A（+）；3 pAL；4 阴性对照（yeast tRNA）；5 pALV6S（+）

提取 pAL，pAL3A（+），pAL8A（+）和 pALV6S（+）等转化的大肠杆菌 JM103 细胞总 RNA，进行斑点杂交分析．以地高辛标记的 LacZ 基因序列作为核酸杂交的探针，与不同稀释度的 RNA 样品杂交．结果表明，3A，8A 和 V6S 在 pAL 中报告基因 mRNA 转录水平均升高（图 4），与 β-半乳糖苷酶活性增强结果基本一致．这些结果说明这些基因组 DNA 片段的增强作用发生在转录水平上．

3　结论

从以上结果分析可以得出下列结论：(1) 新构建的原核增强子检测载体能够有效地获得大肠杆菌基因组中的具有增强活性的 DNA 序列，为原核增强子的研究提供了极为方便的途径．(2) 在所筛选出的有增强活性的大肠杆菌基因组序列中，被称为 3A，8A 和 V6S 的 3 个片段具有高的增强活性．这种增强活性经鉴定具有原核增强子特征．(3) 3A，8A 和 V6S 的 3 个片段具有的增强活性是由转录增强作用而产生的．

参　考　文　献

1　Kustu S, et al. Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. TIBS. 1991, 16: 397

2　侯云德，等．SV40 DNA Hind III B 片断增强人 α 干扰素在大肠杆菌中的表达．病毒学报，1985，1：278

3　吴淑华，等．SV40 DNA Hind III B 片断增强人 β 干扰素在大肠杆菌中的表达．病毒学报，1985，1：385

4　潘　卫，等．原核增强子序列的研究．生物工程学报，1990，6：265

5　吴淑华，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)：791

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

6 吴淑华. 原核增强子. 自然科学进展. 1991, (4): 296

7 Buck M, et al. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. Nature, 1986, 320: 374

8 Weiss D S, et al. Prokaryotic transcriptional enhancers. In: McKnight S L, et al. eds. Transcriptional Regulation. Book 2, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992, 667 ~ 694

9 谢 明,等. 大肠杆菌M增强子样序列的结构和功能. 中国科学,C辑. 1997, 27: 179

10 薛水星,等. 在大肠杆菌中高效表达人α1b型基因工程干扰素. 自然科学进展. 1997, (7): 322

11 Owen R J, et al. A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosome DNA for restriction analysis. Nucleic Acids Res, 1987, 15: 3631

12 Sambrook J, et al. 分子克隆. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社 1992: 343 ~ 349

13 姜 泊,等. 分子生物学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 1996, 30 ~ 83

14 Gluzman Y, et al. Enhancers and Eukaryotic Gene Expression. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983. 21 ~ 45

15 Schollmeier K, et al. Transposon Tn10 contains two structural genes with opposite polarity between tetA and IS10R. J Bacteriol, 1984, 160: 499

16 Robison K, et al. A comprehensive library of DNA-binding site matrices for 55 proteins applied to the complete *Escherichia* coli K-12 genome. J Mol Biol, 1998, 284: 241

17 Nishi T, et al. Enhancement of transcriptional activity of the Escherichia coli trp promoter by upstream A + T-rich regions. Gene, 1986, 44: 29

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net