

原核增强子样序列 3A 的克隆及其结构与功能的研究

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 从大肠杆菌 C600 株染色体基因组中筛选到一个原核增强子样序列 3A, 其正、反向增强活性分别能提高 β 半乳糖苷酶活性 7.11 和 2.93 倍。采用体内转录, RNA 斑点印迹杂交的方法, 证明 3A 序列对于基因表达的调控发生在转录水平上。3A 功能区的研究表明, 3A 增强活性主要位于距其正向克隆 5' 端 (增强活性较强的方向称为正向, 反之为反向) 300~ 540 bp, 长约 240 bp 的区内, 并证明 3A 片段增强活性至少由两个增强活性位点组成。

关键词 大肠杆菌, 原核增强子样序列, 末端缺失, 结构与功能
中图分类号 Q 75, Q 78

Cloning and Structure-function of Prokaryotic Enhancer-like Sequence 3A

HE Jian-xin, LIAO Xiao-hui, BIXiao-lin, HAN Feng, WANG Yan, WU Shu-hua*

(State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute of Virology, CAM, Beijing 100052, China)

Abstract A prokaryotic enhancer-like sequence 3A, was screened from the genome of *Escherichia coli* strain C600 and its enhancement effect was analyzed. Its positive and negative enhancement activities were about 7.11 times and 2.93 times respectively by increasing the expression of β galactosidase gene. By RNA dot hybrid assay, the enhancer-like sequence 3A enhanced the expression of the reporter gene at the transcription level. The end-deletion assay showed that the enhancing function region of sequence 3A was about 240 bp between 300 bp and 540 bp area at the 5' end of the sequence and the function region consisted of at least two enhancing sites.

Key words *Escherichia coli*, prokaryotic enhancer-like sequence, end deletion, structure and function

增强子是远距离地对启动子发挥顺式调节作用的一种元件, 它在启动子的上游或下游及本身处于正向或反向位置都具有活性^[1,2]。1981年在真核病毒 SV 40 中首次发现了增强子, 此后增强子被发现广泛存在于真核基因组中, 并对基因的表达调控都具有重要作用。我国学者侯云德和吴淑华首先发现 SV 40 的 *Hind*III B 片段在大肠杆菌中有明显的增强子样活性^[2~4]。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 JM 103 染色体中的 M 序列都具有增强子样活性^[5~8]。国外学者在 1986 年发现和证明了大肠杆菌中的 σ 54 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^[1,9~12]。鉴于大肠杆菌系统仍是目前国际上用于大规模生产基因工程产物的表达载体, 也是真核表达体系的基础性载体, 所以原核增强子的发现和研究不仅对了解原核基因转

录调节的机理具有根本性的理论意义, 而且具有明显的实用价值, 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, 本实验选择大肠杆菌 K12 系的 C600 菌株, 从中筛选新的原核原增强子 3A, 并对其结构与功能进行了研究。

收稿日期: 2000-05-18, 接受日期: 2000-09-30

国家科委“863”高科技资助项目 (No. 102-11-03-03)

* 联系人 Tel: (010) 63519134, Fax: (010) 63532053

E-mail: shuhuawu@public3.bta.net.cn

何建新, 男, 1966年3月生, 博士

Received: May 18, 2000; Accepted: September 30, 2000

Supported by National High Technology “863” Project of China, No. 102-11-03-03

* Corresponding author Tel: (010) 63519134, Fax: (010) 63532053

E-mail: shuhuawu@public3.bta.net.cn

1 材料和方法

1.1 菌株

大肠杆菌 JM 103 为本室保存菌种, 大肠杆菌 DH 5 α 购自 Promega 公司。

1.2 质粒

原核增强子增强活性检测质粒 pKN 2 和 pAL 由本实验室构建^[5, 6, 13], pGEM -3ZF (+), pB luescrit SK (+) 和 pSP72 购自 Stratagene, Promega 公司。

1.3 大肠杆菌染色体 DNA 的提取

按 Owen (1987) 方法进行^[14]。

1.4 Northern 印迹及 Digoxon 的标记和检测

按参考文献 [15] 中列出方法进行。使用 Boehringer Mannheim 公司试剂盒。从 pAL 质粒中回收约 700 bp 的 *LacZ* 基因 *BamH I* / *Cla I* 片段作为 Northern 印迹探针。

1.5 缺失突变方法

采用 Promega 公司的“Erase-a-base”试剂盒。在 DNA 一端是 5' 突出末端, 一端为 3' 突出末端时, EXO III 只从 5' 突出末端削去核苷酸, 而另一端将保持完好。我们将此特点对来自大肠杆菌基因组的原核增强子样序列 3A 进行末端连续删切, 获得一系列 3A 缺失突变体。具体方法见参考文献 [5] 和 [16]。

1.6 β -半乳糖苷酶活性的测定

按文献 [5] 方法进行。

1.7 DNA 序列分析

用 ABI PRISM 377 型自动测序仪进行。

2 结果

2.1 原核增强子样序列 3A 的克隆

采用 pKN 2 作为增强子检测载体 (Fig 1), 它在多克隆位点后有痘苗病毒启动子 N 2 和报告基因氯霉素乙酰转移酶 (CAT), 只能在氯霉素浓度低于 100 mg/L 的 LB 平板中生长^[6]。纯化的大肠杆菌 C600 株染色体 DNA^[14], 经内切酶 *Hae III* 充分消化, 末端补平后, 插入 pKN 2 多克隆位点中 *Sma I* 位点中, 然后转化于大肠杆菌 JM 103, 在氯霉素浓度为 400 mg/L 的 LB 平板中进行压力筛选。结果获得一阳性克隆 pKN 3A, 能在氯霉素浓度为 800~1000 mg/L 的培养液中生长 (pKN 2 仅为 100~200 mg/L)。经酶切鉴定插入的基因组片段有 0.7 kb 左右。

2.2 原核增强子样序列 3A 对 β -半乳糖苷酶基因表达的增强作用

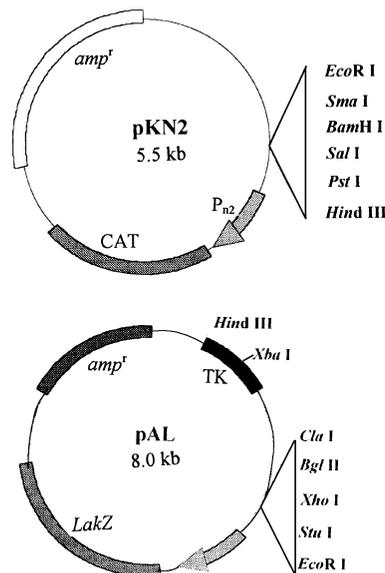


Fig 1 Physical maps of plasmid pKN 2 and pAL

原核增强子的重要特征之一就是具有方向不依赖性。为检测 3A 序列的这一特征, 将其以正、反两个方向克隆到另一检测载体 pAL 中 (Fig 1), 测定其对 β -半乳糖苷酶基因表达的增强作用。3A 片段用 *EcoR I* / *Sal I* 从 pKN 3A 上取下, 插入到 pB luescrit SK (+) 中的相应位点中, 获得 pSK 3A 中间质粒; 然后用 *BamH I* 切下 3A 片段, 与 *Bgl II* 消化过的 pAL 载体连结, 获得 3A 片段分别以正、反方向插入的 pAL 3A (+) 和 pAL 3A (-)。测定 pAL 3A (+) 和 pAL 3A (-) 转化大肠杆菌 JM 103 株的 β -半乳糖苷酶活性, 并和 pAL 空载体转化株比较 (Fig 2)。结果表明, 3A 序列的正、反向分别增强 β -半乳糖苷酶表达 7.11 和 2.93 倍。

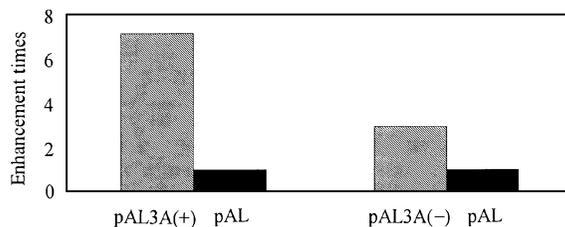


Fig 2 The enhancement effect of prokaryotic enhancer-like sequence 3A by detecting the β -galactosidase activity

2.3 原核增强子样序列 3A 对 β -半乳糖苷酶基因的转录增强作用

提取 pAL、pAL 3A (+) 等转化的大肠杆菌 JM 103 细胞总 RNA, 进行斑点杂交分析。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, pAL 3A (+) 中报告基因 *LacZ* mRNA 转录水平比 pAL 中高 (Fig 3), 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.

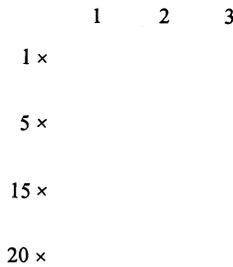


Fig 3 RNA Dot-blotting of pAL 3A (+) and pAL
1 pAL 3A (+); 2 pAL; 3 Control(yeast tRNA)

2.4 原核增强子样序列 3A 的 DNA 序列分析

将 3A 片段插入 pGEM-3Zf 中进行自动 DNA 序列测定并用 DNA SIS 软件分析. 结果表明 3A 序列为 669 bp (Fig 4, 该序列及其功能等同物已申请

专利, 申请号为 00123595.8), 与已报道的大肠杆菌基因组序列的同源性高达 99%^[17,18]. 3A 片段由 3 段不连续的大肠杆菌基因组序列组成. 1~260 bp 是大肠杆菌 *smcB* 基因的 3 端序列, 431~531 bp 是 *ssrA* 基因的 5 端序列, 而 261~430 bp 是一个未知功能的非编码区. 532~669 bp 是大肠杆菌基因 *tra5-2* 编码区中的一段序列.

2.5 原核增强子样序列 3A 缺失突变研究

为研究原核增强子样序列 3A 的增强作用功能区, 对 3A 序列进行了缺失突变研究. 用 *EcoR* I / *Pst* I 切开 pSK3A 质粒, EXO III 从 *EcoR* I 末端对原核增强子样序列 3A 片段进行 5 端定向缺失, 得到 7 个序列长度不等的 3A 5 端定向缺失突变体, 分别命名为 pSK3P1~pSK3P7. 经鉴定 P1~P7 的长度分别为 200~630 bp 不等 (Fig. 5). 然后将 P1~P7 片段插入至 pAL 中, 检测它们的 β 半乳糖苷酶活性并计算出它们的增强活性 (Fig. 5). 结果表明, 3A 片段从 5 端缺失 300 bp 时 (P3) 对增强活性没有明显影响, 说明 *smcB* 基因的 3 端序列不具有增强活性; 继续缺失 110 bp (P2), 此时活性已开始下降; 到只剩下 200 bp 时, 增强活性已不明显.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CCTCCACGCA	TGTAATGTGC	GATCCTTCGG	TACCCGCAAG	TTACTTCTCA	ACCAGCGCGA	ACTGGACTCC	TTGTACGGTC	GCGTCAATCG	AGAAGCTATA
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
CCGTAGTGCC	GCTCTCCCTG	TACTGGAAAA	ATGCCTGGTG	CAAAGTGAAA	ATCGGCGTCG	CCAAAGGTAA	GAAACAGCAC	GATAAACGTT	CAGATATCAA
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AGAGCGCGAA	TGGCAGGTGG	ATAAAGCACG	TATCATGAAA	AACGCCACCC	GTTAAACCTG	CACTCCAATT	ATTGACCAGT	TCCTCACCGC	GCCTCCTCT
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CCGCGGCGC	GAATGAACAT	CTTATTGGCT	ATCACATCCG	ACACAAATGT	TGCCATCCCA	TTGCTTAATC	GAATAAAAAT	CAGGCTACAT	GGGTGCTAAA
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
TCTTTAACGA	TAACGCCATT	GAGGCTGGTC	ATGGCGCTCA	TAAATCTGGT	ATACTTACCT	TTACACATTG	GGGCTGATTC	TGGATTCGAC	GGGATTTGCG
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
AAACCCAAGG	TGCATGCCGA	GGGGCGGTTG	GCCCGAACCA	GAAGTGGGGC	AGGAGACATC	ACGTACAATC	GTACAGATGA	AGGCTGGCTG	TATCTGGCAG
610	620	630	640	650	660	669			
TGGTCATTGA	CATGTGGTCA	CGTGCCGTTA	TTGGGGGCTT	AATGTCGCCA	CGCATGACGG	CGCAACTGG			

Fig 4 DNA sequence of the prokaryotic enhancer-like sequence 3A

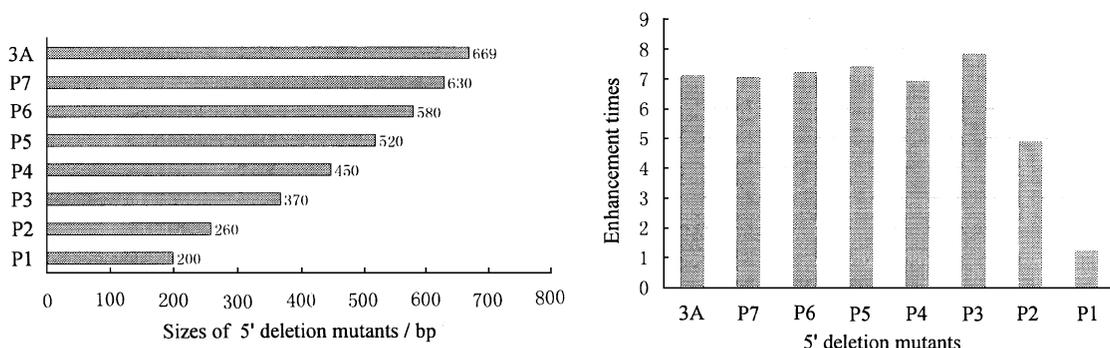


Fig 5 The sizes (left) and the enhancement effect (right) of the 5' deletion mutants

用 *Apa* I/*Sal* I 双酶切 pSK3A 质粒, 使 EXO III 从其 3 端的 *Sal* I 末端对 3A 片段定向缺失突变, 同样也得到 7 个 3 端定向缺失突变体 pSK3K1~7 (Fig 5), K1~K7 长度分别为 150~540 bp 不等. 然后将这些片段插入到 pAL 中, 检测它们的 β -半乳糖苷酶活性并比较其增强活性变化 (Fig 6). 结

果表明 3A 片段从 3 端缺失 170 bp 左右时 (K2), 它的增强活性已略有降低, 表明 *tra5-2* 编码区对原核增强子样序列 3A 增强活性没有明显作用; 当缺失 350 bp 时 (K3), 片段增强活性明显降低; 当片段缺失到不足 250 bp 后, 已几乎不存在增强活性.

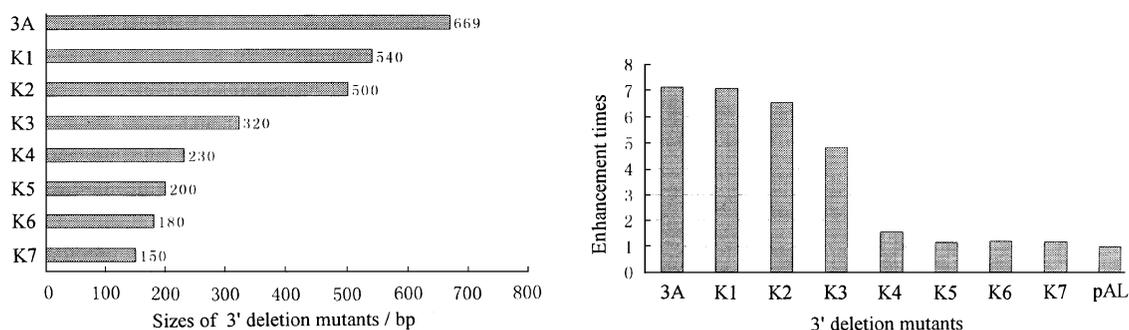


Fig 6 The sizes (left) and the enhancement effect (right) of the 3' deletion mutants

3 讨论

本文采用增强子检测载体, 从大肠杆菌 C600 株染色体基因组中克隆到一个原核增强子样序列 3A, 它具有方向不依赖性的增强活性. 正、反向位置都具有增强活性, 在 pAL 质粒中分别对 β -半乳糖苷酶基因表达增强了 7.11 倍和 2.93 倍.

基因转录水平的调节是增强子的一个重要特征. 通过 DNA/RNA 杂交对 β -半乳糖苷酶的 mRNA 转录量进行了比较, 结果显示原核增强子样序列 3A 对 β -半乳糖苷酶基因转录增强, 从而证明确实发挥在转录水平上. 这一证明为以后 3A 的理论研究和实际应用提供了依据.

为了进一步了解原核增强子样序列 3A 的特征, 我们采用缺失突变方法对 3A 序列进行增强作用功能区的分析. 用核酸外切酶 III 末端缺失的方法对 3A 的功能区进行了定位, 缺失突变体片段 P3、K1 和 3A 完整序列有一样增强活性. 所以 3A 的功能区位于距其正向克隆 5 端 300~540 bp 长约 240 bp 的区段内, 而 P1、K4~K6 的增强活性变化也说明了这点. 序列分析的结果表明, 在此功能区内含两个 AT 丰富区, 分别在第 362~382 和 399~415 位核苷酸位置. 已有报告认为增强活性与 AT 丰富区或 GC 丰富区有关^[11, 19, 20]. 缺失突变体 K3 和 P3 都具有增强活性, 说明 K3 和 P3 序列重叠区 (仅 20 bp) 中含有 3A 片段增强活性位点. 3 端缺失突变体

K2 的增强活性明显高于 K3, 说明其中有增强活性位点, 因此 3A 片段增强活性至少由两个增强活性位点组成. 已经报道多个大肠杆菌基因的转录调节是由上游序列多个增强活性位点或转录激活蛋白结合位点进行, 范围从启动子附近至上游 100 bp 以上之间, 如 DNA 结合蛋白 A_{da} 就结合在 *ada* 和 *aidB* 启动子上游 -60 至 -40 碱基对间, 而 Fis 蛋白对 *hupA* 基因启动子的作用位点有 4 个, 其中心位置分别是 -94 - 168 - 215 和 -260 碱基对^[21, 22]. 因此, 3A 序列中同时存在多个增强活性位点符合大肠杆菌基因转录调节特点. 3A 序列的原核增强活性主要来自非编码区和 *ssrA* 基因 5 端. 因此这些增强活性位点在自然状态可能就是调节 *ssrA* 基因转录与表达, 但这需要更进一步的研究分析, 包括鉴定它们的 DNA 结合蛋白和进行定点突变等研究.

参考文献 (References)

- 1 Kustu S, North A K, Weiss D S. Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. *TIBS*, 1991, 16: 397 ~ 402
- 2 吴淑华. 原核增强子. 自然科学进展 (Wu Shu-hua. Enhancer elements in prokaryotic system. *Prog Nat Sci*), 1991, 4: 296 ~ 300
- 3 侯云德, 崔宏, 段淑敏. 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 (Hou Yun-de, Cui Hong, Duan Shu-min. Enhancing effect of SV40 DNA *Hind* III B fragment on expression of human α IFN gene in prokaryotic

- cells *Chin J Virol*), 1985, **1**: 278~ 281
- 4 吴淑华, 张丽兰, 张秀珍 SV40 DNA HindIII B 片断增强人 β 干扰素在大肠杆菌中的表达 病毒学报 (Wu Shu-hua, Zhang Lir-lan, Zhang Xiu-zhen. Enhancing effect of the SV40 DNA Hind III B fragment on the expression of human β interferon gene in *E. coli* *Chin J Virol*), 1985, **1**: 385~ 388
 - 5 谢明, 吴淑华, 栾向红 大肠杆菌 M 增强子样序列的结构和功能 中国科学 (Xie Ming, Wu Shu-hua, Luan Xiang-hong. Study on structure and function of M enhancer-like element from JM 103 *Science in China*), 1997, **27**: 179~ 185
 - 6 潘卫, 吴淑华, 金奇. 原核增强子序列的研究 生物工程学报 (Pan Wei, Wu Shu-hua, Jin Qi. Study on the Enhancer-like element in *Escherichia coli* *Chin J Biotechnol*), 1990, **6**: 265~ 271
 - 7 吴淑华, 阮力, 潘卫 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 (Wu Shu-hua, Ruan Li, Pan Wei. Some DNA sequences from animal viruses and *E. coli* possess prokaryotic enhancer-like function. *Chin Sci Bull*), 1990, **10**: 784~ 786
 - 8 刘哲伟, 吴淑华, 金奇. 人乳头瘤病毒 6b 型 (HPV-6b) 上游调控区在大肠杆菌中也具有增强子样效应 病毒学报 (Liu Zhe-wei, Wu Shu-hua, Jin Qi. A DNA fragment from the upstream regulating region of human papillomavirus type 6b genome possesses enhancer activity in *E. coli* *Chin J Virol*), 1992, **8**: 195~ 199
 - 9 Reitzer L, Magasanik B. Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter *Cell*, 1986, **45**: 785~ 792
 - 10 Buck M, Miller S, Drummond M. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes *Nature*, 1986, **320**: 374~ 378
 - 11 Weiss D S, Klose K E, Hoover T R. Prokaryotic transcriptional enhancers In: McKnight S L, Yamamoto K R. eds *Transcriptional Regulation* (book 2). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992, 667~ 694
 - 12 Geiduschek, E P. Two prokaryotic transcriptional enhancer systems *Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1992, **43**: 109~ 133
 - 13 薛水星, 吴淑华, 韩峰 在大肠杆菌中高效表达人 α 1b 型基因工程干扰素 自然科学进展 (Xue Shui-xing, Wu Shu-hua, Han Feng. High expression of a human interferon- α 1b in *Escherichia coli* *Prog Natur Sci*), 1997, **7**: 322~ 326
 - 14 Owen R J, Boman P. A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosome DNA for restriction analysis *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**: 3631
 - 15 Berger S L. Preparation and characterization of RNA. *Methods in Enzymology*. 1987, **152**: 215~ 219
 - 16 Henikoff S. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing *Gene*, 1984, **28**: 357~ 359
 - 17 Blattner R F, Plunkett G, Blosch C A, Perna N T, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner J D, Rode C K, Mayhew G F, Gregor J, Davis N W, Kirkpatrick H A, Goeden M A, Rose D J, Mau B, Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 *Science*, 1997, **277**: 1453~ 1468
 - 18 Scholmeier K, Hillen M. Transposon Tn10 contains two structural genes with opposite polarity between tetA and IS10R. *J Bacteriol*, 1984, **160**: 499~ 503
 - 19 Nishi T, Itoh S. Enhancement of transcriptional activity of the *Escherichia coli* *trp* promoter by upstream A+ T-rich regions *Gene*, 1986, **44**: 29~ 36
 - 20 Robison K, McGuire A M, Church G M. 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~ 254
 - 21 Claret L, Rouviere-Yaniv J. Regulation of Hu α and Hu β by CRP and FIS in *Escherichia coli* *J Mol Biol*, 1996, **263**: 126~ 139
 - 22 Landini P, Bown J A, Volkert M R, Busby S J. A σ subunit interaction and α subunit promoter DNA interaction are necessary at different steps in transcription initiation at the *Escherichia coli* *ada* and *aidB* promoters *J Biol Chem*, 1998, **273**: 13307~ 13312