

# 痘苗病毒原核增强子样序列 VV1 的结构和功能的研究

曹茹 秘晓林 韩峰 杨贵宾 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)

关键词 痘苗病毒 原核增强子样序列 末端缺失 随机诱变

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0325-04

增强子是基因转录调控的一个重要而必需的元件,其最初发现于 SV40 早期基因的表达过程中<sup>[1,2]</sup>。自此以后,相继发现这一远端基因调控序列广泛存在于真核细胞、原核细胞和病毒基因组中<sup>[3-7]</sup>。本文选取活性较高的痘苗病毒原核增强子样序列 VV1 为目的片段,利用缺失和随机突变的方法对 VV1 功能区进行分析,阐明其结构和功能的关系,进一步丰富原核增强子的作用机理和基因转录调控方面的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**质粒 pAL 由本室提供,其带有  $\beta$ -半乳糖苷酶基因(*LacZ*)为报告基因。质粒 pBluescript SK(-)和 pGEM 7ZK(+)购自华美生物工程公司,质粒 pSP72 购自美国 Promega 公司。大肠杆菌菌株 JM103 为本室冻存。

**1.1.2 限制酶和修饰酶:**各种内切酶、T4DNA 连接酶、Klenow 大片段、牛小肠碱性磷酸酶(CIP)及核糖核酸酶(RNase),购自德国 Boehringer Mannheim 有限公司,美国 Promega 公司,宝生物大连有限公司和中国医学科学院友谊生物制品公司。

**1.1.3 试剂和试剂盒:**ONPG 购自德国 Boehringer Mannheim 公司。质粒制备试剂盒(Wizard Plus Midipreps DNA Purification System, Wizard Plus Minipreps DNA Purification System)和末端删切试剂盒(Erase-A-Base System)购自美国 Promega 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 重组质粒的构建:**质粒制备、克隆方法按文献[8],所用宿主菌为大肠杆菌 K12 系 JM103。构建过程见结果。

**1.2.2  $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定:**按文献[8]进行。

**1.2.3 DNA 序列测定及分析:**采用双脱氧链末端终止法在 373DNA 全自动测序仪(Applied Biosystems 公司)上测定核酸序列,并用 DNASIS 序列分析软件进行分析。

**1.2.4 DNA 末端缺失试验:**根据 Promega 公司“Erase-A-Base System”方法并作改进。

**1.2.5 化学诱变试验:**按文献[9]进行并作改进。

## 2 实验结果

### 2.1 痘苗病毒增强子样序列 VV1 的缺失突变体研究

为了对 VV1 功能区进行定位,我们对该片段进行缺失突变体分析。

**2.1.1 5'端删切实验:**首先构建删切质粒 pGEM-7ZF.VV1,用限制酶 *KpnI/HindIII* 消化可分别产生一个 3'凸出端和一个 5'凸出端,使得 *ExoIII* 可以从 *HindIII* 末端切向 VV1 片段的 5'端。多次酶切电泳分析并比较大小之后,从一系列突变体中选出 7 个克隆,命名为 pGEM-7ZF.VV1.5D,用 *EcoRI/BamHI* 酶切回收缺失不同大小的片段,克隆至质粒 pSP72 的 *BamHI/EcoRI* 位点中,获得中间质粒 pSP-VV1(-).5D。再用限制酶 *ClaI/XhoI* 回收片段,克隆至检测载体 pAL 的 *ClaI/XhoI* 位点,获得检测质粒 pAL-VV1.5D(D270, D260, D250, D230, D220, D210, D190, D)表示缺失突变体,后面的数字表示缺失后的 VV1 序列长度,以 bp 为单位(5'端删切实验技术路线见图 1)。

**2.1.2 3'端删切实验:**首先构建删切质粒 pSK-VV1,用限制酶 *BamHI/BstXI* 消化可分别产生一个 5'凸出端和一个 3'凸出端,使得 *ExoIII* 可以从 *BamHI* 末端切向 VV1 片段的 3'端。多次酶切电泳分析并比较大小之后,从一系列突变体中选出 6 个克隆,命名为 pSK-VV1.3D,用 *HindIII/SacI* 酶切回收缺失不同大小的片段,克隆至质粒 pSP72 的 *HindIII/SacI* 位点中,获得中间质粒 pSP-VV1.3D。再用限制酶 *HindIII/BglII* 回收片段,克隆至检测载体 pAL 的 *HindIII/BglII* 位点,获得检测质粒 pAL-VV1.3D(D260, D255, D250, D245, D210, D200)3'端删切实验技术路线见图 2)。

DNA 缺失实验结果表明,随着删切的进行,活性逐渐下降。5'端缺失 10bp 时,增强活性下降约 50%,缺失 20bp 时活性继续从 50% 下降到 24%,继续删切 30bp 时,活性基本保持稳定,说明距 5'端 20~30 个碱基之间的序列对 VV1 的活性仅有微弱的影响。删切至 50bp 时增强活性仅剩 11%,基本

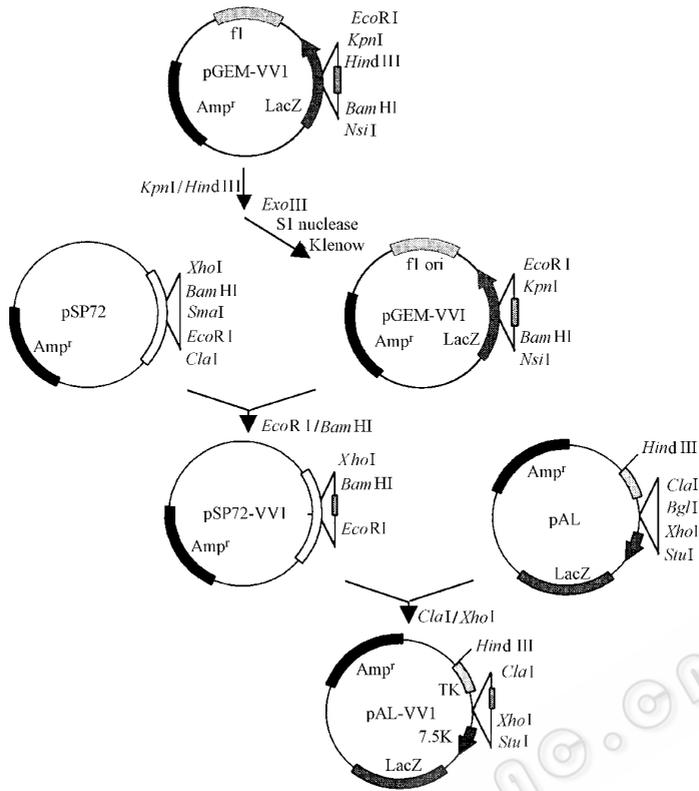


图 1 增强子样序列 VV1 的 5' 末端缺失实验技术路线

Fig. 1 Plasmid construction diagram for deletion experiment of enhancer-like sequence VV1 from 5' terminal

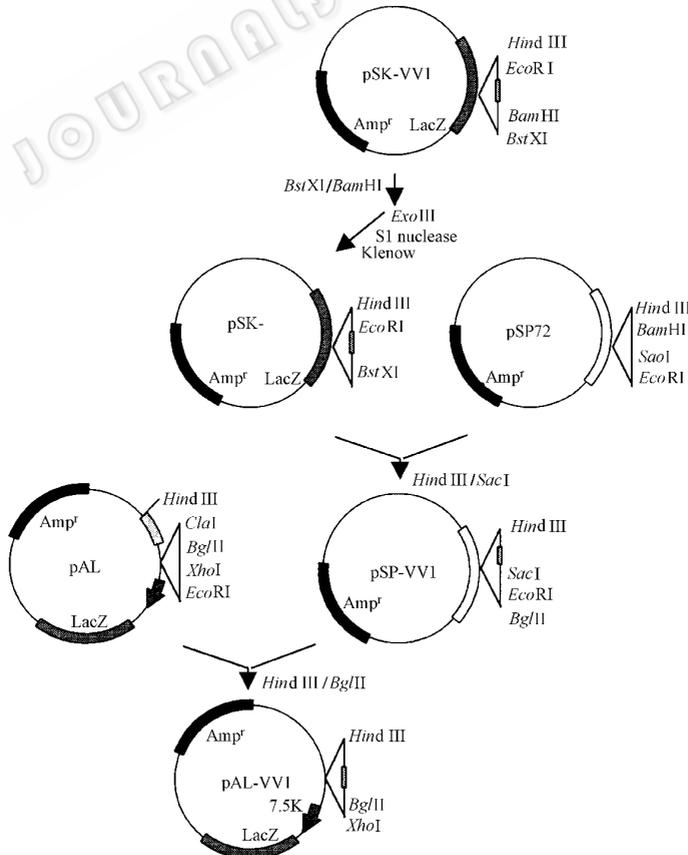


图 2 增强子样序列 VV1 的 3' 末端缺失实验技术路线

Fig. 2 Plasmid construction diagram for deletion experiment of enhancer-like sequence VV1 from 3' terminal

同 pAL 3'端缺失 20bp 时 增强活性发生明显变化 降至原始活性的 40% 继续缺失 25bp 时 活性继续下降至 20% 删切至 35bp 时增强活性仅剩 10% 同 pAL 基本相同。证实 5'末端 20bp 的核苷酸序列和 3'末端 20bp 的核苷酸序列对于 VV1

的活性具有重要作用 因为缺失任意一个都会导致增强活性的大幅度下降。而 5'末端 30~50bp 的核苷酸序列对于保持 VV1 片段的基本活性非常重要 当缺失它时 VV1 的活性完全消失(见图 3 图 4)。

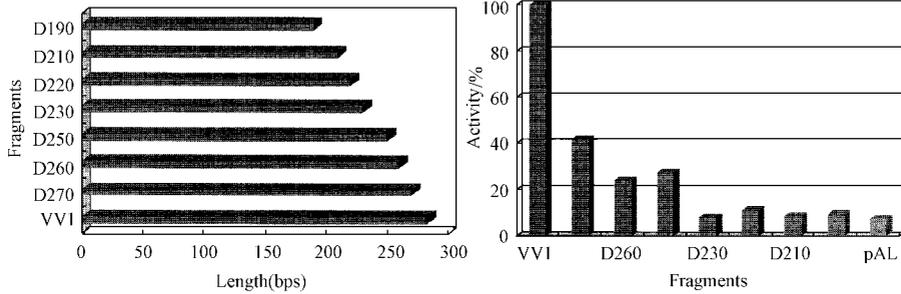


图 3 VV1 序列 5'端缺失结果及其对 lacZ 基因表达活性的影响

Fig.3 5'terminal deletion results of VV1 fragment and its influence on lacZ expression activity

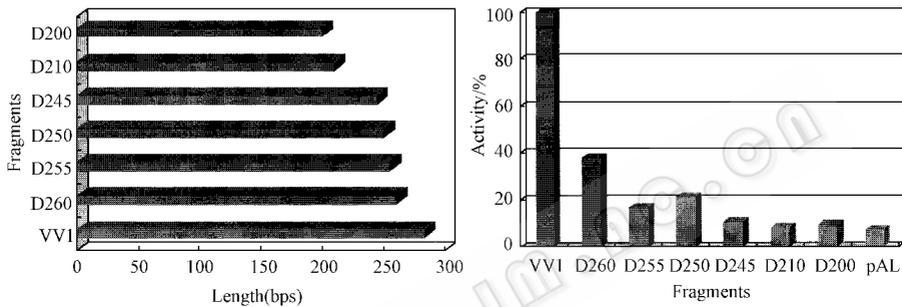


图 4 VV1 序列 3'端缺失结果及其对 lacZ 基因表达活性的影响

Fig.4 3'terminal deletion results of VV1 fragment and its influence on lacZ expression activity

### 2.2 痘病毒增强子样序列 VV1 的随机突变体研究

根据化学物质如亚硝酸钠可使 DNA 发生随机突变的原理 对 VV1 片段进行诱变 后用限制酶 HindIII/BamHI 消化回收片段 克隆至检测载体 pAL 的 HindIII/BglII 位点 测定 β-半乳糖苷酶活性变化。结果共得到 146 株活性发生变化的突变株 活性变化范围在 33%~131% 之间。其中 37 株活性下降 109 株活性上升 碱基突变对 VV1 的增强活性具有正调节和负调节作用。经反活性测定 选取其中数值稳定且变化较大的 5 株 其增强活性分别为原始增强子的 131%、123%、118%、77% 和 33% 分别命名为 M1、M2、M3、M4 和 M5 进行序列测定和分析 该序列及其功能等同物已申报专利 专利申请号为 00123595.8 (见图 5)。

### 3 讨论

本文选用外切核酸酶 III 消化法 通过控制剂量、反应温度在不同的时间点取样 从而获得不同大小的目的片段。结果发现 随着删切的进行 活性逐渐下降。5'末端 20bp 的核苷酸序列和 3'末端 20bp 的核苷酸序列对于 VV1 的活性具有重要作用。而且两个区域并不能单独起作用 因为缺失任意一个都会导致增强活性的大幅度下降。而 5'末端 30~50bp 的核苷酸序列对于保持 VV1 片段的基本活性非常重要 当缺失它时 VV1 的活性完全消失。随机诱变实验结果表明核苷酸变化对 VV1 的增强活性具有正调节和负调节作用。对

VV1	100%	CCCCACCTG	10	GGCACACFCG	20	TGTCCTCTGG	30	GCAGTCGAGC	40	ATCAATCAAT	50
Mut5	33%	.....T...		.....		.....		.....A.....		.....	
Mut4	77%	.....A.....		.....		.....		.....		.....	
Mut3	118%	.....A.....		.....		.....		.....		.....	
Mut2	123%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut1	131%	.....		.....		.....		.....		.....	
VV1	100%	ACCCCTCAGGT	60	CCATTTCTTC	70	TTATGACACC	80	AAGCTGGGAG	90	GGAGTTATGA	100
Mut5	33%	.....		.....		.....		.....C.....		.....	
Mut4	77%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut3	118%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut2	123%	.....T.....		.....		.....		.....		.....	
Mut1	131%	.....		.....		.....		.....A.....		.....	
VV1	100%	CACCAAGCTG	110	GGAGGGAGCG	120	TTGATCTGCG	130	AGAGGGGAGA	140	AGGGCACTAC	150
Mut5	33%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut4	77%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut3	118%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut2	123%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut1	131%	.....		.....		.....		.....A.....		.....	
VV1	100%	AGAGGGACCA	160	GGATAGACTG	170	GATCGATTGG	180	CCACTGTATG	190	TACTCTTACA	200
Mut5	33%	.....A.....		.....		.....		.....		.....	
Mut4	77%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut3	118%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut2	123%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut1	131%	.....		.....		.....		.....		.....	
VV1	100%	CCTACTGGTG	210	GTACAGTATG	220	TACAACAGCA	230	CAACAAAATC	240	CAAAATCCAGG	250
Mut5	33%	.....C.....		.....		.....		.....		.....	
Mut4	77%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut3	118%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut2	123%	.....		.....		.....		.....		.....	
Mut1	131%	.....		.....		.....		.....		.....	
VV1	100%	AGCAGCATCT	260	CAACAAAATC	270	TAG					
Mut5	33%	.....		.....		.....					
Mut4	77%	.....		.....		.....					
Mut3	118%	.....		.....		.....					
Mut2	123%	.....		.....		.....					
Mut1	131%	.....T.....		.....		.....					

图 5 VV1 及其突变体序列比较

Fig.5 Sequence comparison of VV1 and its mutants

于活性下降最多的突变体来说 它的碱基突变数目也最多 且分布在序列的各个部分 而对于单一碱基突变体 活性变

化相对较小,且对活性有影响的碱基突变多发生于5'末端50bp的核苷酸序列内。

综合删切和诱变实验结果,并对照VV1序列,可以认为VV1增强子样序列存在多个功能调节域,共同参与调节VV1增强子的活性。而且5'末端20bp和30~50bp的核苷酸序列和3'末端20bp的核苷酸序列对于VV1的活性具有重要作用。当缺失这些区域时,增强活性大幅度下降,且当此区域内的碱基发生替换突变后,活性也发生明显变化。

#### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Banerji J, Rusconi S, Schaffner W. Expression of a  $\beta$ -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequence. *cell*, 1981, **27**: 299 ~ 304
- [ 2 ] Benoist C and Chambon P. *In vivo* sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature*, 1981, **290**: 304 ~ 310
- [ 3 ] Gowda S, Rao A S, Kim Y M *et al.* Identification of sequences in the long terminal repeat of avian sarcoma virus required for efficient tran-

scription. *Virology*, 1988, **162**: 243 ~ 247

- [ 4 ] Boshart M, Weber F, Jahn G *et al.* A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 1985, **41**: 521 ~ 530
- [ 5 ] Gidekel M, Herrera-Estrella L. The fixation of the Arabidopsis thaliana gene coding for elongation factor 1 $\beta$  contains an enhancer-like element. *Gene*, 1996, **170**: 201 ~ 206
- [ 6 ] WU SH H(吴淑华), ZHANG L I(张丽兰), ZHANG X ZH(张秀珍) *et al.* SV40 DNA HindIII B fragment enhances the expression of human  $\beta$ -Interferon gene in *E. coli*. *Chinese Journal of Virology(病毒学报)*, 1985, **1**: 385 ~ 388
- [ 7 ] HOU Y I(侯云德), CUI H(崔宏), DUAN SH M(段淑敏) *et al.* SV40 DNA HindIII B fragment enhances the expression of human  $\alpha$ -Interferon gene in *E. coli*. *Chinese Journal of Virology(病毒学报)*, 1985, **1**: 278 ~ 281
- [ 8 ] JIN D Y(金冬雁), LI M F(黎孟枫) *et al.* *Molecular Cloning(分子克隆实验指南)*, 1993

## Structural and Functional Study of Prokaryotic Enhancer-like Element VV1 from Vaccinia Virus

CAO Ru BI Xiao-Lin HAN Feng YANG Gui-Bin WU Shu-Hua

(State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China)

**Abstract** Enhancer VV1 (about 283 bp) is selected as the target to analyze its structure and function systemically. Stepwise deletion experiment is used to identify the functional domain of VV1 element. The results suggest that the 20bp at 5' terminal and 20bp at 3' terminal are important to the activity of VV1, for without either of them its activity decreased greatly. Furthermore, the 30~50bp at 5' terminal is essential to its activity, without which will lead to complete loss of its activity. By random mutagenesis assay it is found that base mutation can regulate the activity of enhancer VV1 positively or negatively. The more the activities of mutants descend, the more mutations take place. For singlebase mutation, the activities change relatively little, and most of the mutations always occur in the 50 bp at the 5' terminal.

**Key words** vaccinia virus, prokaryotic enhancer, stepwise deletion, random mutation

Received: October 16, 2000

This work was supported by "863" High Biotechnology (102-11-03-03).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-63519134; Fax: 86-10-63532053; E-mail: shuhua@public3.bta.net.cn

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>