

痘苗病毒 VV16 原核增强子样序列的克隆及其结构与功能的研究

秘晓林 曹 茹 何建新 韩 峰 吴淑华

(中国预防医科院病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

摘 要 利用带有氯霉素乙酰转移酶报道基因的检测载体,从痘苗病毒基因组 DNA 中筛选到一个增强子样片段 VV16。序列分析表明,该片段长 112bp,是痘苗病毒 DNA 依赖性 RNA 聚合酶、polyA 聚合酶亚单位和 DNA 聚合酶基因 RPO30 的一部分,含有 4 个 AT 丰富区。采用带有 β -半乳糖苷酶报道基因的载体检测发现,该片段正向可以增强报道基因表达 9.0 倍,反向可以增强报道基因表达 4.1 倍。RNA Dot blotting 实验证实,它对基因的增强活性表现在转录水平上。DNA 删切实验证实,5'端 10bp 及 3'端 12bp 对其活性有重要调节作用,而该片段 nt76~82 的序列对增强子的活性至关重要。

关键词 痘苗病毒 原核增强子样序列 缺失突变 大肠杆菌

中图分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0337-04

增强子最初是于 1981 年在 SV40 早期基因中发现的^[1,2],此后人们又从不同生物中发现了多种增强子序列^[3~7]。国内侯云德、吴淑华等^[8,9]在研究人 α 、 β 干扰素基因在大肠杆菌中的表达调节时,发现 SV40 *Hind* III B 片段可以明显增强干扰素基因的表达。增强子具有以下特点,它可以在离启动子较远的地方行使功能,可以在启动子上游和下游发挥作用,并且没有方向依赖性^[10]。目前认为,转录增强子是蛋白质结合序列,它能够以正调节方式参与转录调节^[11,12]。转录增强子和增强子结合蛋白在组织发育和分化以及代谢调节中具有重要作用。因此,研究增强子及其启动子之间的关系、功能,具有重要的理论意义和现实意义。

本文采用携带有氯霉素乙酰转移酶(CAT)报道基因的增强子检测载体,从痘苗病毒基因组 DNA 中筛选到一个长 112bp 的原核增强子样序列 VV16,并对其结构与功能进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:质粒 pKN2 和 pAL 均由本室提供,其中 pKN2 带有氯霉素乙酰转移酶(CAT)报道基因,pAL 带有 β -半乳糖苷酶(LacZ)报道基因。质粒 pBluescript SK(-)和 pGEM 7Z(+)购自华

美生物工程公司。大肠杆菌菌株 JM103 为本室冻存。

1.1.2 限制性核酸酶及修饰酶:各种内切酶、T4DNA 连接酶和 Klenow 大片段购自美国 New England Biolabs 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 Boehringer Mannheim 公司,IPTG 和 X-gal 购自 Promega 公司。Wizard Plus Midipreps DNA Purification System 购自 Promega 公司。Dig High Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Boehringer Mannheim 公司。Erase-A-Base System 购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 痘苗病毒染色体 DNA 的提取:按文献[13]进行。

1.2.2 重组质粒的构建:质粒制备,克隆方法按文献[14]。所用宿主菌为大肠杆菌 K12 系 JM103。构建过程见结果。

1.2.3 β -半乳糖苷酶活性测定:按文献[15]进行。

1.2.4 DNA 序列测定及分析:采用双脱氧链末端终止法在 373A DNA 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。

1.2.5 RNA Dot blotting:根据 Boehringer Mann-

heim 公司“ The DIG System User 's Guide for Filter Hybridization ”方法并作改进。

1.2.6 DNA 删切实验：根据 Promega 公司“ Erase-A-Base System ”方法并作改进。

2 实验结果

2.1 原核增强子样序列的克隆

采用 pKN2 质粒作为增强子的检测载体, pKN2 载体氯霉素耐受性为 50~100 μ g/mL。根据痘苗病毒基因组序列和限制酶图谱,选择识别 4 碱基序列的内切酶单一酶切或识别 6 碱基序列的不同内切酶两两组合,将痘苗病毒染色体 DNA 酶切,片段补平,克隆进入 pKN2 的 *Sma*I 位点中。转化,在含 200 μ g/mL 氯霉素的 LB(A) 平皿进行压力筛选,结果挑选出一株插入片段大小为 0.1kb 左右的阳性克隆 pKN2-VV16。测定 pKN2-VV16 的氯霉素抗性为 600~800 μ g/mL,即可使氯霉素抗性提高 10 倍左右。

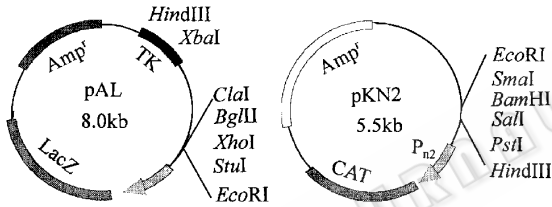


图 1 增强子检测载体

Fig.1 Vectors used in enhancer cloning

2.2 增强子样序列的方向、位置不依赖性及其增强活性的研究

为了检验 VV16 是否具有增强子的重要特性,即方向不依赖性,用限制酶 *Eco*RI/*Bam*HI 酶切回收插入片段,克隆进入质粒 pBluescript SK(-) 的相应位点中。再分别用 *Eco*RI/*Bam*HI 和 *Bam*HI/*Hind*III 酶切回收插入片段,克隆进入质粒 pAL 的 *Eco*RI/*Bgl*II(反向)和 *Hind*III/*Bgl*II(正向)位点,测定 β -半乳糖苷酶基因(*LacZ*)的表达水平。pAL 载体的 *LacZ* 基因表达活性为 6.9 个 Miller 单位,序列正向克隆可使该基因表达增强 9.0 倍,为 62.1 个 Miller 单位;序列反向克隆可使该基因表达增强 4.1 倍,为 28.3 个 Miller 单位。由于载体 pKN2 多克隆位点距离启动子 500bp,pAL 多克隆位点距离启动子 300bp,在两个载体中 VV16 均有增强活性,从而证实了它的方向不依赖性。

2.3 序列测定及分析

对 VV16 进行序列测定,然后在 Genbank 核酸数据库检索及利用 DNASIS 软件分析表明,该片段为痘苗病毒 DNA 依赖性 RNA 聚合酶, polyA 聚合酶亚单位和 DNA 聚合酶基因 RPO30 的一部分,同源性为 98%。VV16 全长 112bp,其中含有 4 个 AT 丰富区,分别位于 11, 22, 35 和 98 位。

2.4 VV16 片段对 β -半乳糖苷酶基因的转录增强作用

为了探明该序列对基因表达的增强作用是否发生在转录水平上,用 Digoxigenin 标记的 *LacZ* DNA 作为探针,采用 RNA Dot blotting 方法对携带有基因片段和不带有基因片段的菌株的 *LacZ* mRNA 的含量进行了测定和比较。结果显示该增强子样序列的正反向均能使报道基因的转录增强,并且增强活性与 β -半乳糖苷酶活性检测结果一致。说明该序列对 *LacZ* 基因表达的调控发生在转录水平上。结果见图 2。

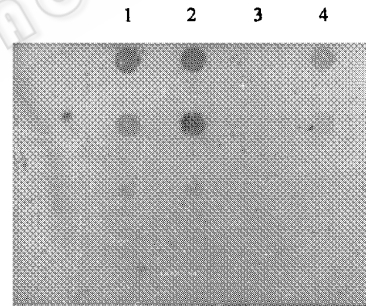


图 2 RNA 点杂交结果

Fig.2 Result of RNA Dot blotting experiment

1. pAL-VV16(-), negative direction;
2. pAL-VV16(+), positive direction;
3. tRNA, negative control;
4. *LacZ* gene, positive control

2.5 VV16 片段结构及功能区分析

为了确定 VV16 片段的功能区,我们对该片段进行缺失突变体分析:

A. 5'端删切实验:

用限制酶 *Kpn*I 和 *Hind* III 酶切消化质粒 pGEM 7Zf-VV16,可产生一个 3'凸出端和一个 5'凸出端,使得核酸外切酶 III(*Exo* III)可以从增强子片段 VV16 的 5'端开始删切。从一系列突变体中选出 6 个克隆,命名为 pGEM 7Zf-VV16.5D,分别克隆到检测载体 pAL 中,获得 6 个缺失突变体检测载体 pAL-VV16.5D(D10, D20, D30, D40, D50, D60, D 表示缺失突变体,后面的数字表示缺失的碱基数), ac. cn

B. 3'端删切实验：

用限制酶 *Bam*HI 和 *Sac*I 酶切消化质粒 pGEM 7Zf-VV16, 使得核酸外切酶 III (Exo III) 可以从增强子片段 VV16 的 3'端开始删切。从一系列突变体中选出 7 个克隆, 命名为 pGEM 7Zf-VV16.3D。再分别克隆到检测载体 pAL 的 *Hind* III/*Bgl* II 位点, 获得检测载体 pAL-VV16.3D (D06, D12, D18, D24, D30, D36, D60 共 7 个 3'端缺失突变体)。测定不同缺失突变体的 β -半乳糖苷酶活性。

DNA 删切实实验证实, 5'端在仅删除 10 余碱基时, 活性就发生明显变化, 下降至原活性的 66%, 从片段 3'端删切 12 碱基时, 活性下降至原活性的 64%, 继续删切至约 30 个碱基后, 活性仍为原活性的 64%, 但继续删切至约 36 个碱基后, 活性急剧下降, 仅剩原活性 10%, 与对照质粒 pAL 基本相同。DNA 删切实实验证实, 5'端 10bp 及 3'端 12bp 对其活性有重要调节作用, 而该片段 nt76~82 的序列对 VV16 原核增强子的活性至关重要 (见图 3、图 4)。

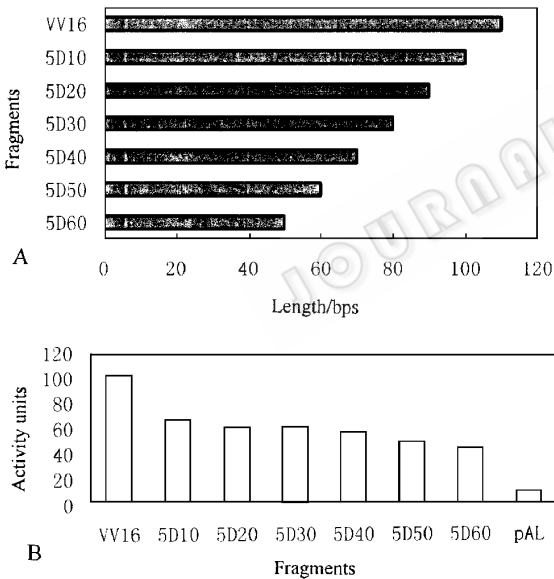


图 3 VV16 5'端缺失结果(3A)及缺失对 *LacZ* 基因表达活性的影响(3B)

Fig.3 5' terminal deletion results of VV16 fragments (3A) and its influence on *LacZ* expression activity (3B)

3 讨论

本文采用增强子检测载体, 从痘苗病毒基因组 DNA 中克隆到一个原核增强子样序列 VV16, 序列

分析结果表明该序列与痘苗病毒 DNA 依赖性 RNA 聚合酶、polyA 聚合酶亚单位和 DNA 聚合酶基因 RPO30 的部分序列, 同源性为 98%。VV16 具有方向不依赖性的增强活性。

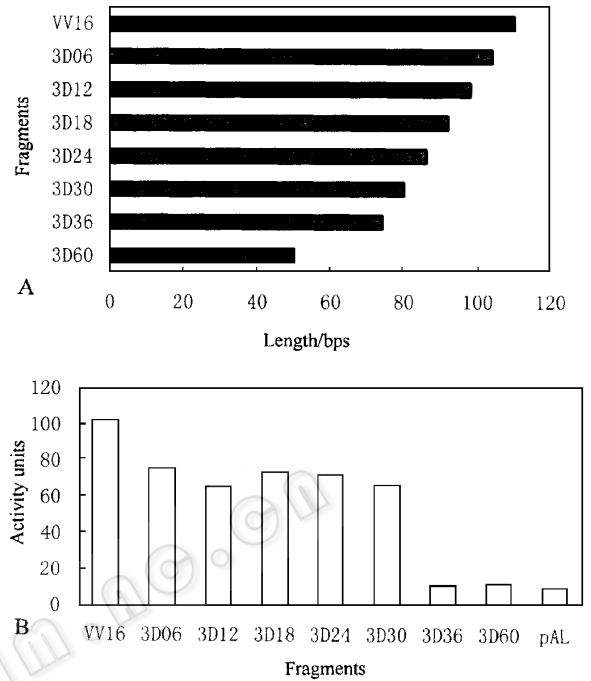


图 4 VV16 3'端缺失结果及缺失(4A)对 *LacZ* 基因表达活性的影响(4B)

Fig.4 3' terminal deletion results of VV16 (4A) and its influence on *LacZ* expression activity (4B)

增强子的重要特征之一是它的增强活性体现在转录水平上, 本文采用地高辛标记报道基因, 用 RNA 打点杂交的方法研究了细胞中 mRNA 的水平, 结果发现该增强子样序列的正反向均能使报道基因的转录增强, 并且增强活性与 β -半乳糖苷酶活性测定基本一致。结果证实了该序列对 *LacZ* 基因表达的调控发生在转录水平上, 说明了 VV16 序列的增强功能类似于真核增强子序列。

本文采用核酸外切酶 III 分别从 5'端和 3'端对 VV16 片段进行了删切, 结果发现, 5'端 10bp 及 3'端 12bp 对其活性有重要调节作用, 而该片段 nt76~82 的序列对增强子的活性至关重要。Blake 等^[16]发现 HBV 增强子 I 中 EP 元件的 20bp 的序列是完成增强子功能必需的部分。本文在痘苗病毒增强子中也发现存在类似现象。

参 考 文 献

- [1] Banerji J ,Rusconi S ,Schaffner W. *Cell* ,1981 **27** 299~308
- [2] Benoist C ,Chambon P. *Nature* ,1981 **290** 304~310
- [3] Boshart M ,Weber F ,Jahn G *et al.* *Cell* ,1985 **41** 521~530
- [4] Gowda S ,Rao A S ,Kim Y W *et al.* *Virology* ,1988 **162** 243~247
- [5] Michaelson P S ,Giannini S ,Birshtein B K. *Nucleic Acids Res* ,1995 **23** 975~981
- [6] Gidekel M ,Jimenez B ,Herrera-Estrella L. *Gene* ,1996 **170** 201~206
- [7] Schuetz J D ,Schuetz E G ,Thottassery J V *et al.* *Mol. Pharm.* 1996 **49** 63~72
- [8] 侯云德 ,崔 宏 ,段淑敏等. *病毒学报* ,1985 **1** 278~281
- [9] 吴淑华 ,张丽兰 ,张秀珍等. *病毒学报* ,1985 **1** 385~388
- [10] Serfling E ,Lubbe A ,Dorsch-Hasler K *et al.* *EMBO J* ,1985 **4** 3851~3859
- [11] Muller M M ,Gerster T ,Schaffner W. *Eur J Biochem* ,1988 **176** 485~495
- [12] Levine M and Hoey T. *Cell* ,1988 **55** 537~540
- [13] Rice C M ,Franke C A ,Strauss J H *et al.* *J Virol* ,1985 **56** 227~239
- [14] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning , A Laboratory Manual*. Second Edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- [15] Miller J H. *Experiments in Molecular Genetics*. CSH ,NY : Cold Spring Harbour ,1972 p. 352
- [16] Blake M ,Niklinske J and Zajac-Kaye M. *J Virol* . 1996 **70** 6060~6066

Functional and Structural Study of the Prokaryotic Enhancer-like Element VV16 from Vaccinia Virus Genome

BI Xiao-Lin CAO Ru HE Jian-Xin HAN Feng WU Shu-Hua

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

Abstract An enhancer-like element VV16 from Vaccinia virus genome DNA was obtained by using the plasmid with CAT reporter gene. Sequence analysis showed the element of 112bp is a part of the DNA-dependent RNA polymerase , polyA polymerase and DNA polymerase (RPO30 gene). It contains 4 AT-rich regions. Detection of β -galactosidase activity showed that VV16 in the positive direction can increase the activity 9.0 times and VV16 in the negative direction can increase 4.1 times. The RNA dot blotting confirmed the enhancing activity of the element are on the transcription level. DNA deletion experiment indicated the sequences of 10bp at the 5' end and 12bp at the 3' end in the element are important to its function and the sequence from nt76 to nt82 is essential to its activity.

Key words Vaccinia virus , prokaryotic enhancer-like element , deletion mutagenesis , *E. coli*