

构建重组系统分析回文结构对基因表达的影响*

张 锐 郭三堆** 任茂智

(中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘 要:回文结构序列是最常见的一种 DNA 序列,它是许多基因表达调控因子的顺式作用元件。本文设计了不同长度的回文结构序列,构建了 Cre-loxP 重组系统,通过共转化含有 *cre* 基因的质粒和含有 loxP 位点的质粒,观察共转化菌株质粒图谱的变化,研究了重组系统在细菌中对基因表达的作用,同时研究不同长度回文结构对基因表达的影响,结果发现长度在 20bp 以下回文序列对下游基因的表达没有影响,而长于 34bp 的回文结构序列则会抑制下游基因的表达。

关键词: Cre-loxP 重组系统,回文序列,基因表达

中图分类号: Q756 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2002) 02-0186-07

Cre-loxP 重组系统是由噬菌体 P1 编码的一个特异位点重组系统,包括重组位点 loxP 以及催化重组反应的重组酶 Cre^[1]。重组位点 loxP 长 34bp,中间是 8 碱基非对称间隔序列,两端各有一个 13bp 反向重复序列^[2](图 1),8 碱基间隔序列是 loxP 位点上唯一的非对称区,既作为 Cre 酶切割的 DNA 底物,同时又决定 loxP 位点之间重组反应进行的方向^[3]。Cre 酶切割 loxP 上的间隔序列,形成 6 个碱基的交错切口^[4],在重组过程中这个 6 碱基交错切口与另一个 loxP 位点上的同源序列发生配对。如果两个 loxP 位点位于同一条染色体或环形 DNA 上,且同向重复排列,那么,通过 Cre 酶的重组作用就会切除两个 loxP 位点间的 DNA;如果是反向重复排列,loxP 位点间的 DNA 只会发生倒位,而不会被切除;如果两个 loxP 位点一个在染色体上,一个在环形 DNA 上,在 Cre 酶的作用下,环形 DNA 就会整合到线性染色体的 loxP 位点上。利用 Cre-loxP 重组系统可以实现外源基因在基因组中的定点整合,并可降低多基因插入,相对提高单拷贝转化体的数目,提高转化效率。这种特异位点重组系统在酵母、动物细胞内均已得到成功利用^[5-6],但尚未见有人报道利用它在细菌中进行基因表达研究。



图 1 loxP 位点序列示意图

Fig. 1 Sequence of loxP site

回文结构序列是指顺读和倒读都一样的序列,是最常见的一种 DNA 序列,绝大多数限制性内切酶的识别位点是回文结构序列,许多蛋白调控因子的顺式作用元件也包含回

* 本工作为国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(Z17-02-01)

** 通讯作者。Tel:010-68975669,68975086 E-mail:gsdui@public.bta.net.cn

作者简介:张锐(1971-),女,博士,现从事植物基因工程方面的研究。

收稿日期:2001-05-17,修回日期:2001-08-17

文结构序列,而且这些回文结构序列一般都出现在增强子中。例如,在肝炎 B 病毒增强子 1 内有一个 8 碱基对的回文结构,是一种回文结构结合因子的结合位点,该因子可与肝实质细胞核因子 3 β 因子相互作用^[7];cAMP 应答元件增强子中也包括一个回文结构(TGACGTCA),它是 cAMP 应答元件转录因子的结合位点^[8]。回文序列如果出现在终止子之前,它可以有效提高 RNA 聚合酶 III 合成 mRNA 的活性^[9]。总之,目前大多数报道是回文结构序列可增强基因的表达。但是,回文结构序列处在基因上游时,是否在某些情况下也会抑制下游基因的表达,目前尚未见类似的文献报道。

为研究重组系统对在细菌中研究基因表达的作用及回文结构与功能的关系,构建了 Cre-loxP 重组系统,设计了不同长度的回文结构序列,研究了其对下游基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 。

1.1.2 质粒:与本实验有关的质粒有两类,一类含 loxP 位点,包括 pUCloxp 和 pUCloxpAB;另一类含 Cre 重组酶基因,pTICre、pTICre14a、pTICre14b。所有质粒均由本工作完成或本实验室保存。

1.1.3 试剂:工具酶购自 Promega、Biolabs 和 MBI 公司,其它化学试剂购自北京化学试剂商店。

1.2 方法

1.2.1 同向重复 loxP 序列的合成:人工设计带有 *Hind* III 位点的同向重复 loxP 序列,经退火、克隆和序列分析后,结果见图 2。

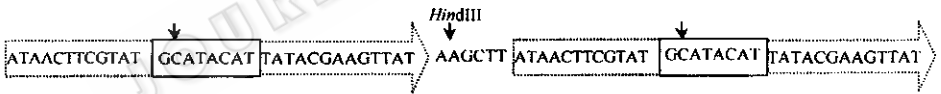


图 2 人工合成的同向重复 loxP 序列

Fig.2 Synthesized loxP sequence repeating in same direction

1.2.2 质粒的构建:(1)pUC 系列质粒构建:用 *Hind* III 酶切 pUC19 质粒 DNA,并用 Klenow 酶形成平端连接后,*Hind* III 酶切位点被钝化,构建成功的质粒被命名为 pUC19(*Hind* III⁻) (图 3A)。人工合成 2 个同向重复 loxP 序列(图 2),中间用 *Hind* III 酶切位点连接,将此合成序列插入 pUC19(*Hind* III⁻)质粒的 *Sma* I 酶切位点中,构建成功的质粒被命名为 pUCloxp (图 3B)。用 *Hind* III 酶切 pGActinBt 质粒(图 3C)和 pUCloxp 质粒,pGActinBt 质粒经酶切后产生两个片段,大片段约 3.7kb,含有 ActinBt 序列,小片段 2.7kb,为 pUC19 质粒 DNA,分离纯化带有 Actin 启动子和 Bt 杀虫基因片段(约 3.7kb),克隆到 pUCloxp 质粒的 *Hind* III 酶切位点中,构建出 pUCloxpAB 质粒,见图 3D。构建成功的 pUCloxpAB 质粒不仅带 Actin 启动子和 Bt 杀虫基因,而且它们的两端带有了可被 Cre 重组酶酶切的 loxP 序列位点。所有 pUC 系列质粒都带有抗氨苄青霉素的选择标记基因。(2)含 Cre 重组酶基因的质粒:包括 pTICre 质粒以及 pTICre14a 和 pTICre14b 质粒。这些质粒含有 *cre* 基因完整的植物表达盒,包括在花药绒毡层中特异表达的 Ta29 基因启动子(实验证明,该启动子在细菌中也有活

性),内含子, *cre* 基因的编码区和 *Nos* 终止子,以及带有抗卡那霉素的 *Npt II* 基因,(图 4)。

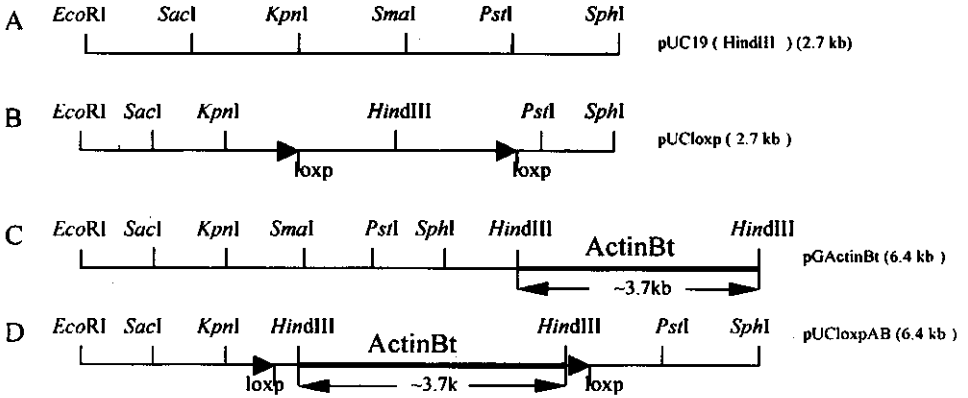


图 3 pUC 系列质粒的多克隆位点示意图

Fig.3 Sketch maps of polyclone sites in plasmid pUC series

A:pUC19(*Hind III*); B:pUCloxp; C:pGActinBt; D:pUCloxpAB.

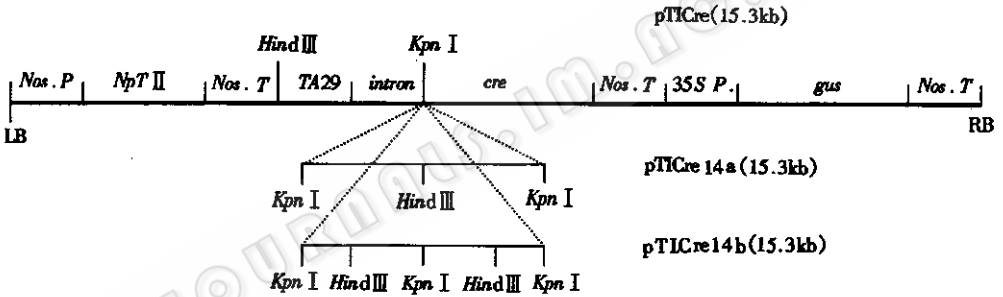


图 4 质粒 pTICre, pTICre 14a, pTICre 14b 简图

Fig.4 Plasmid maps of pTICre, pTICre 14a, pTICre 14b

合成一段长 14mer 的寡核苷酸回文序列:5'-AAGCTTAGGTAC-3',它可以自我退火,形

成两端具有 *KpnI* 酶切粘端的短链结构($5'-CTAAGCTTAGGTAC-3'$
 $3'-CATGGATTCGAATC-5'$)。经 *KpnI* 酶切的

pTICre 质粒与 14bp 回文序列相连,挑取重组子。因合成序列末端没有磷酸基团,这种直接连接产生的重组子含有 1 个拷贝的 14bp 回文结构序列,命名为 pTICre14a。同时,pTICre 质粒经 *KpnI* 酶切后在碱性磷酸酶的作用下脱去磷酸基团,而 14bp 短链核酸则在 T4 DNA 磷酸激酶的作用下,添加末端磷酸基团。后一种连接方式除获得含有单拷贝 14bp 回文序列质粒外,还获得含有 2 个拷贝的 14bp 回文序列质粒,命名为 pTICre14b。

1.2.3 质粒共转化及转化子的获得:将 pUCloxpAB 质粒(具氨苄青霉素抗性)与含有 Cre 基因的一系列质粒(具卡那霉素抗性)分别共转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,在同时添加氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 平板上挑取共转化成功的菌株,获得三类共转化子:(1) 含有 pUCloxpAB 和 pTICre 质粒;(2)含有 pUCloxpAB 和 pTICre14a 质粒;(3)含有 pUCloxpAB

和 pTICre14b 质粒。

1.2.4 重组系统对基因表达的影响:分离纯化重组转化子中的质粒 DNA,进行凝胶电泳,根据质粒带谱的变化,分析重组系统对基因表达的影响。

2 结果和分析

Cre 重组酶的作用位点是 loxp 序列,将含有 Cre 重组酶的质粒与含有 loxp 序列的质粒共转化,如果 cre 基因在细胞内得到表达,那么,同在一个细胞内的 loxp 序列就会被切割。相应地,根据 loxp 序列被切割的状况,就可以判断:(1)TA29 启动子在细菌中是否有功能;(2)Cre 重组酶在细菌中能否表达,是否有活性;(3)根据 Cre 重组酶的活性,证明回文结构序列的大小对基因表达的影响。

2.1 Cre-loxP 系统所需质粒的构建及验证

pUC19(*Hind*III⁻)质粒在 *Sma*I 酶切位点插入合成的两个同向重复 loxp 序列后,又能被 *Hind*III 酶切成一条带(图 5-2),说明两个同向重复 loxp 序列已被引入 pUC19(*Hind*III⁻)质粒。pUCloxpAB 质粒经 *Hind*III 酶切后,形成大小分别为 3.7kb 和 2.7kb 的两条带(图 5-1),大带为 ActinBt 片段,小带为 pUC19(*Hind*III⁻)质粒部分,与所设计的质粒图谱(图 3C)相符,证明质粒构建正确。

pTICre 质粒上只有一个 *Hind*III 酶切位点(见图 4),经 *Hind*III 酶切后,只产生单一的线性带(图 6-1,3),设计的 14bp 回文序列中含有一个 *Hind*III 酶切位点,插入 pTICre 质粒后,连接克隆被 *Hind*III 酶切产生两条带(图 6-2),其大小与质粒图谱预期的相符。另外通过测序证实图 6 中 pTICre14a 含有单拷贝的 14bp 回文结构序列片段,pTICre14b 含有两个拷贝的 14bp 回文结构序列片段(图 6-4)。

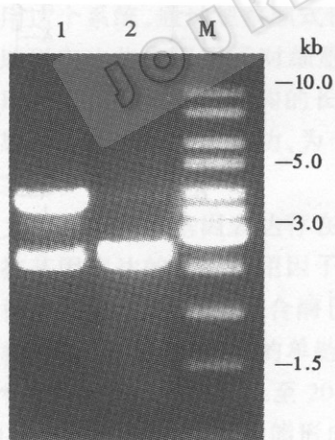


图 5 质粒 pUCloxp 和 pUCloxpAB 的酶切鉴定

Fig.5 Restriction analysis of pUCloxp and pUCloxpAB

1. pUCloxpAB digested by *Hind*III;
2. pUCloxp digested by *Hind*III;
- M. 1kb DNA ladder (from MBI).

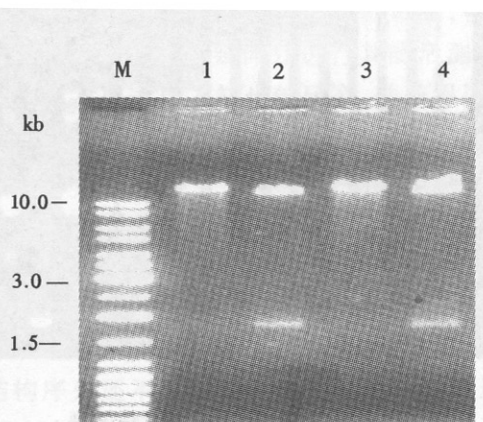


图 6 含 cre 基因质粒的酶切鉴定

Fig.6 Restriction analysis of plasmids containing cre gene

- 1,3. pTICre digested by *Hind*III;
2. pTICre14a digested by *Hind*III;
4. pTICre14b digested by *Hind*III;
- M. 1kb DNA ladder mix(from MBI).

2.2 pTICre 质粒上的 Cre 重组酶基因可以在大肠杆菌 DH5α 中表达

pTICre 质粒和 pUCloxpAB 质粒共转化大肠杆菌 DH5α, 在同时添加氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 平板上挑取共转化成功的菌株, 提取其质粒, 以单独转化 pUCloxp(图 7-15)、pUCloxpAB(图 7-16)以及 pTICre(图 7-17)质粒的菌株做对照, 1% 的琼脂糖凝胶电泳图谱显示: 共转化的菌株中, 除含有 pUCloxpAB 和 pTICre 质粒(图 7-1 ~ 4)外, 还出现了大小与 pUCloxp 相同的质粒带。这说明 pUCloxpAB 和 pTICre 可以同时共存于大肠杆菌 DH5α 中, 同时, 包含 *cre* 基因真核表达盒的 pTICre 质粒表达出了有活性的 Cre 重组酶, 它对 pUCloxpAB 质粒的两个同向 loxp 位点进行了特异性切割, 将位点间的 ActinBt 片段从质粒上切除, 剩余片段在细胞内重新环化, 形成一个与 pUCloxp 大小基本相同的质粒。这一结果证明, 不仅构建成功了重组系统, 而且这一系统能够在大肠杆菌中很好地表达。

2.3 单拷贝 14bp 回文序列插入不能抑制 cre 基因在大肠杆菌中的表达

pTICre14a 质粒与 pUCloxpAB 质粒共转化 DH5α 后, 其质粒图谱与 pTICre 和 pUCloxpAB 共转化的相比, 几乎没有差别。在 pTICre 和 pUCloxpAb 质粒带前面, 仍然存在大小与 pUCloxp 相同的质粒带(图 7-5 ~ 9)。说明在这种情况下, loxp 位点仍旧被 Cre 重组酶切割了, 即 *cre* 基因仍旧表达出了有活性的重组酶。14bp 的插入序列加上连接位置的 KpnI 酶切位点, 形成的回文序列实际长度为 20bp(GGTACCTAAGCTTAGGTACC), 其转录的单链 RNA 如果回折, 则可以形成一段长为 10bp 的双链结构(图 8A)。可能因为核苷酸之间的空间位置效应, 形成的双链结构不够稳定, 或这种双链结构尚不足以阻碍核糖体向前移动, 从而其下游基因的表达基本不受抑制。

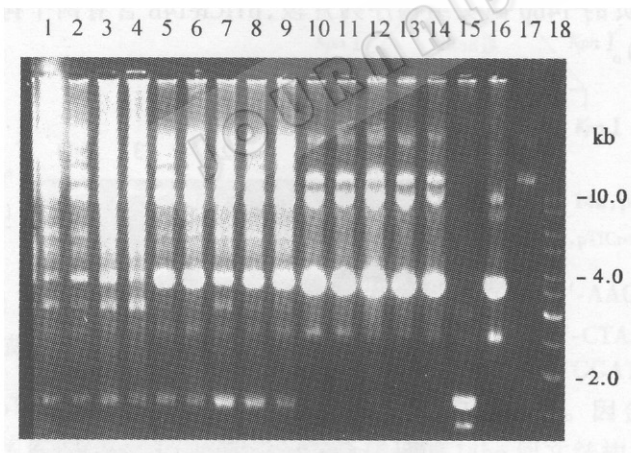


图 7 共转化质粒图谱

Fig. 7 Plasmid map of co-transformed strains

- 1 ~ 4. Different strains co-transformed by pTICre and pUCloxpAB;
- 5 ~ 9. Different strains co-transformed by pTICre14a and pUCloxpAB;
- 10 ~ 14. Different strains co-transformed by pTICre14b and pUCloxpAB;
- 15. pUCloxp; 16. pUCloxpAB; 17. pTICre; 18. 1kb DNA ladder (from MBI).

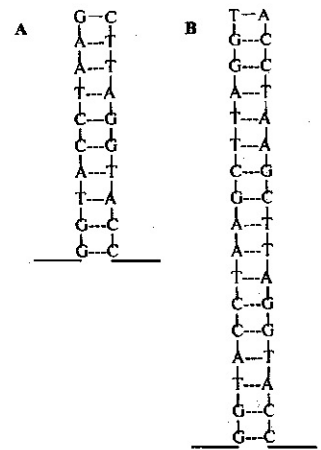


图 8 回文结构序列图

Fig. 8 Sequences of palindromic structure

- A. 10bp palindromic structure;
- B. 17bp palindromic structure.

2.4 两个拷贝 14bp 回文序列插入可以有效抑制 *cre* 基因在大肠杆菌中的表达

14bp 回文结构序列末端添加磷酸基团后,插入 pTICre 质粒的 *Kpn*I 位点,所获得的重组子与 pUCloxpAB 质粒共转化大肠杆菌,出现两种完全不同的情况:一类与 pTICre 及 pTI-Cre14a 共转化的质粒电泳图谱相似,在 pUCloxpAB 质粒带之前,仍然有大小与 pUCloxp 相同的质粒带,说明 *cre* 基因的表达未被抑制,测序证明这类质粒与 pTICre14a 相同,只含有单拷贝的 14bp 回文结构序列;另一类则不同,在 pUCloxpAB 质粒带之前,大小与 pUCloxp 相同的那条质粒带消失了(图 7-10 ~ 14),说明 loxp 位点不再被切割,因而也就说明在这种情况下,*cre* 基因的表达被抑制了,测序证明这类质粒含有两个拷贝的 14bp 回文结构序列,命名为 pTICre14b。这种方式插入,形成的回文序列实际长度为 34bp,其转录的单链 RNA 如果回折,则可以形成一段长为 17bp 的双链结构(图 8B)。从 *cre* 基因的表达受抑制这一结果来看,在这种情况下,转录产生的单链 RNA 可以有效回折,形成一段较稳定的双链结构,阻碍核糖体向前移动,从而有效地抑制下游基因的表达。

3 讨论

一般地,确定某个基因表达与否需要检测这个基因的表达产物,如果是酶基因,需要将酶提取纯化后确定它的活性,活性不易检测的表达产物,还需要通过抗原-抗体免疫反应,才能判断它表达与否。本文构建了 Cre-loxp 质粒系统,将含有 *cre* 基因的质粒与含有两个同向 loxp 序列(中间含一段 DNA 序列)的质粒同时转化大肠杆菌,在共转化成功的菌株中,*cre* 基因如果表达了,就会切割另一个质粒上的 loxp 序列,使其释放掉中间的 DNA 序列,自身环化成一个小质粒。根据质粒电泳图谱上是否出现小质粒带以及出现的小质粒带的强弱,就可以很直观地判断细胞内 *cre* 基因是否表达以及表达水平高低的大致情况。利用这个系统,通过观察顺式作用元件和反式作用因子对 *cre* 基因表达的影响,可以很方便地研究这些作用因子对细胞内基因表达的效应,而不需要体外进行其酶活测定。本文利用这个系统对回文结构的长度与基因表达的关系进行了初步的研究,并获得了较好的结果。重组系统构建成功,为今后更方便地分离、克隆表达调控元件,研究基因表达打下了基础。

回文结构序列与基因表达存在密切的关系。在增强子中出现的回文结构序列一般有利于调控基因表达的反式作用因子与之结合,从而促进基因表达^[7-8];在终止子前出现的回文结构序列有利于 RNA 聚合酶 III 从 DNA 模板上脱离下来,从而有效终止转录过程^[9]。回文结构序列在转录后形成的单链 RNA 上,具有回折以形成部分双链结构的趋势。从本文所获得的实验结果来看,长至 20bp 的回文结构序列还不足以抑制其下游基因的表达,只有 34bp 的回文结构序列才能形成较稳定的双链结构,抑制下游基因的表达。

在我们平常的基因操作中,经常会在不注意的时候设计出回文结构序列,从本文的实验结果看,只要其长度不超过 20bp,它就不会直接影响下游基因的表达。另外,广义上的回文结构序列还包括中间有几个核苷酸间隔的不对称序列,这样的回文序列转录成单链 RNA 后,常可以形成茎-环结构(即发夹结构)。环结构核苷酸在 4 个以上,配对的核苷酸达到 3 ~ 5 对时,核苷酸之间的空间位置障碍基本可以克服,这时形成的发夹结构就比较稳定。这种发夹结构很容易阻止核糖体前移,从而可有效地抑制下游基因的表达。所

以,在进行 DNA 序列设计时,如何利用回文结构序列,是值得考虑的因素之一。

在基因表达调控中,回文结构序列不仅可增强和促进基因的表达,本文结果证明,回文结构序列大于 34bp 时,也可有效地抑制基因的表达,因此,回文结构序列是极其重要的基因表达调控元件之一。目前在基因工程研究中,甲基化、拷贝数、RNA 过量表达等因素常可造成基因沉默,这样的文献很多,但类似本文的研究结果,目前还未见到报道。过长的回文结构序列是否也是造成基因沉默的原因之一,还有待进一步研究。

致谢 感谢王彩祥、崔洪志、张秀梅等在本文质粒构建过程中给予的帮助。

参 考 文 献

- [1] Sternberg N ,Hamilton D. *J Mol Biol* ,1981 ,**150** :467 ~ 486 .
- [2] Hoess R H ,ziese M ,Sternberg N. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1982 ,**79** :3398 ~ 3402 .
- [3] Abremski K ,Hoess R ,Sternberg N. *Cell* ,1983 ,**32** :1301 ~ 1311 .
- [4] Hoess R ,Abremski K ,Irwin S ,et al . *J Mol Biol* ,1990 ,**216** (4) :873 ~ 882 .
- [5] Fukushige S ,Sauer B. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1992 ,**89** :7905 ~ 7909 .
- [6] O 'Gorman S ,Fox D T ,Wahl G M. *Science* ,1991 ,**251** :1351 ~ 1355 .
- [7] Kosovsky M J ,Siddiqui A. *Virology* ,1999 ,**259** (1) :60 ~ 66 .
- [8] Park Y ,Nesterova M ,Agrawal S. et al . *J Biol Chem* ,1999 ,**274** (3) :1573 ~ 1580 .
- [9] Chu W ,Ballard R ,Schmid C. *Nucleic Acids Res* ,1997 ,**25** (11) :2077 ~ 2082 .

Analysis the Influence of Palindrome Structure to Gene Expression by Constructing Combination System *

Zhang Rui Guo Sandui Ren Maozhi

(Biotechnology Research Institute ,CAAS ,100081 ,China)

Abstract : Palindrome sequence is very common in DNA ,it usually acts as cis-elements of many regulative factors. In this paper ,we design two palindrome sequences which is different in length ,construct Cre-loxp combination system ,then co-transform two kinds of plasmids ,one contains cre gene ,the other contains loxp site to *E. coli* DH5a strain. We judge the expression degree of cre gene in *E. coli* by examining the changes of plasmid maps of co-transformed strains ,then conclude that 20bp or shorter than 20bp palindrome sequence uninhibit the expression of downstream genes ,however , 34bp or longer than 34bp palindrome sequence can inhibit that .

Key words : Cre-loxp combination system , Palindrome sequence , Gene expression

* Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) Z17-02-01