

大肠杆菌碱性磷酸酶 (PhoA) 基因启动子及信号肽核苷酸顺序测定与解析

静国忠 刘莉军 蒋美岩

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100012)

提 要

在 pFOG405 重组质粒中的大肠杆菌碱性磷酸酶基因 (PhoA) 的启动子及信号肽区的核苷酸顺序被测定并同 Kikuchi 等人在 pYK190 重组质粒中所报道的顺序进行了比较。结果指出, 包含有 PhoA 基因启动子及信号肽的 PvuII-HpaI 片段对于调控外源基因的表达是足够的; 启动子 5'-端的二元对称结构 (26bp) 的缺失并不影响外源基因的表达水平。由于 pYK190 及 pFOG405 中 PhoA 基因启动子的上游区核苷酸顺序的不同源性, 说明此上游区顺序与 PhoA 启动子调控下的外源基因表达无关。这一分析为我们利用 Pvu II-HpaI 片段组建高效分泌表达载体及研究基因表达调控提供了有用信息。

关键词 顺序分析, 启动子, 信号肽

大肠杆菌碱性磷酸酶 (PhoA) 是在低磷酸盐条件下被合成并穿过内膜分泌到周质中去, 它的表达调控机制是一个复杂的过程, 可能是通过一些特定的蛋白质因子同其启动子区直接或间接的相互作用来实现的。Kikuchi 等人^[1]从大肠杆菌染色体 DNA 中含 PhoA 启动子的 DNA 片段组建了 pYK190 质粒, 他们的实验指出, 处于 PhoA 启动子下游区的 β -半乳糖苷酶基因只有在低磷酸盐浓度下才能表达并对 PhoA 基因, 启动子区段的核苷酸顺序进行了分析。Shortle 利用含有 PhoA 基因启动子及其信号肽的 DNA 片段组建了 pFOG405 质粒, 在 PhoA 基因启动子的调控下, 处于其下游的葡萄球菌的核酸酶基因得以高效分泌表达; 为进一步研究 PhoA 基因启动子区与基因表达调控的关系, 我们将从 λ 噬菌体来的 P_RP_L 启动子插入到 pFOG405 的 PhoA 启动子的上游区, 在低磷酸盐条件下, 葡萄球菌核酸酶基因得以高效表达并分泌到大肠杆菌周质中, 但在较高

磷酸盐存在的条件下, RNA 多聚酶不能通过处于 PhoA 启动子上游区的 P_RP_L 启动子使此核酸酶基因表达。为了更好地了解 PhoA 启动子及其信号肽在基因表达调控中的作用以及与有关蛋白质因子相互作用的机理, 我们对 pFOG405 中 PhoA 基因启动子及信号肽区的核苷酸顺序进行了测定及进一步解析。

材 料 与 方 法

一、菌株及主要试剂 SE6004 菌株及 pFOG405 质粒由 Dr. Shortle 惠赠。M₁₃mp19RF DNA, JM101 菌株, EcoRI、Hind III 限制内切酶, T₄ DNA 连接酶、³⁵S-DNA 顺序分析试剂盒均购于 Biolabs, 其反应条件按商品说明进行。[α -³⁵S] dATP (500ci/m mole) 购于 New England Nuclear 公司。

二、pFOG405 EcoRI-HindIII 片段的亚克隆 质粒 pFOG405 DNA 及 M₁₃mp19RF DNA 按 David 方法^[2]制备。质粒 pFOG405

DNA 及 $M_{13mp19RF}$ DNA 经 $EcoRI$ 、 $HindIII$ 酶解后,在 0.8% 琼脂糖凝胶上对酶解片段进行电泳分离,再用低熔点琼脂糖凝胶法^[3]制备质粒的 $EcoRI$ - $HindIII$ 小片段(大约 700bp,包含 *PhoA* 启动子、信号肽及部分核酸酶基因)及 $M_{13mp19RF}$ DNA 的 $EcoRI$ - $HindIII$ 大片段。两种片段经 T_4 DNA 连接酶连接后(16℃ 8h),所得的连接混合物转染经氯化钙处理的感受态菌 JM101。重组体通过噬斑的颜色反应在 X-gal/IPTG 指示平板上进行筛选,无色噬斑作为阳性克隆,最后通过对重组的 M_{13mp19} DNA RF 型的 $EcoRI$ / $HindIII$ 酶切图谱来确证(图 1)。

进行。

结果与讨论

1. 利用双脱氧顺序分析方法对 pFOG405 的 $EcoRI$ - $HindIII$ 片段 5'-端的核苷酸顺序进行了测定,从可读的顺序同 Kikuchi 所报道的结果相比较,pFOG405 的 $EcoRI$ - $HindIII$ 片段 5'-端的 375bp 包含有 *PhoA* 基因启动子区主要顺序及为信号肽编码的全部核苷酸顺序。二者的不同点是在所测出的 375bp 的顺序中自 -41—-272 核苷酸同 Kikuchi 所报道的顺序并不同源,在启动子区的 5'-端缺少 Kikuchi 等人所报道的二元对称顺序:

CA GTAAAAAGTTT AAT CTTT CAACA G
GTCATTTTCAA TTA GAAAA GTTGT C

(图 2)。Kikuchi 指出这一顺序的缺少可能会影响基因表达的效率,然而葡萄球菌核酸酶基因在上述 *PhoA* 启动子顺序调控下的高效表达表明,大肠杆菌碱性磷酸酶基因启动子中的 $PvuII$ - $HpaII$ 最小片段(144bp)对于外源基因的分泌表达是足够的。这一事实使得我们用 $PvuII$ 和 $HpaII$ / $MspI$ 从 pYK190 质粒 DNA (Dr. Kikuchi 惠赠)分离包含有 *PhoA* 启动子及其信号肽顺序的最小片段,去研究 *PhoA* 启动子及其信号肽对其他外源基因表达的调控。

2. 顺序分析的结果指出,*PhoA* 启动子具有典型的 Pribnow box TATAGC (核苷酸 -6—-12) 及相当于原核细胞启动子 -35 区的 TTGTCA 顺序(核苷酸 -24—-40)。在 Pribnow box 和起始密码子 GTG 之间存在着富 AT 的顺序(80%),反映出 *PhoA* 启动子是一个强启动子^[7],核酸酶基因在其调控下的高效分泌表达印证了这一结构与功能的关系。

3. 信号肽的结构特性在蛋白质的分泌过程中起着重要的作用^[8],核苷酸 +41—+103 顺序为 *PhoA* N-端的信号肽编码(图 2)。整个信号肽由 21 个氨基酸组成 Met-Lys-Gln-Ser-Thr-Ile-Ala-Leu-Ala-Leu-Leupro-Leu-Leu-Phe-Thr-Pro-Val-Thr-lys-Ala 具有荷正电的 N-端,在亲水的 C-端有一个具短侧链的氨基酸

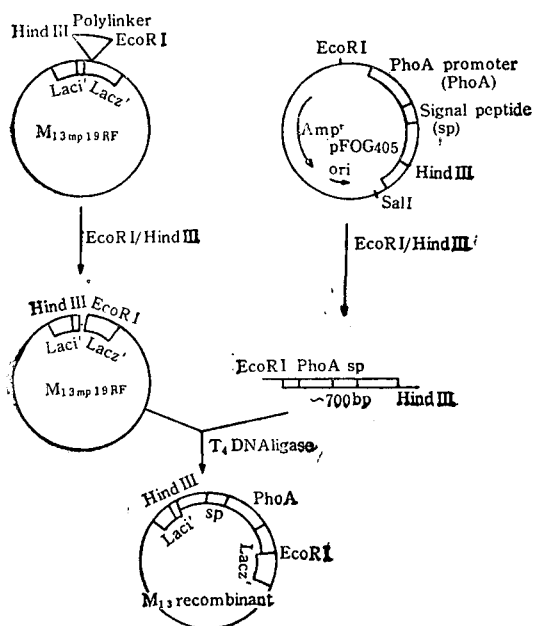


图 1 pFOG405 $EcoRI$ - $HindIII$ 片段亚克隆示意图

Fig 1 Subcloning of pFOG405 $EcoRI$ - $HindIII$ fragment

三、*PhoA* 基因启动子、信号肽 DNA 片段的顺序分析 单链模板 DNA 的制备按 Davis 等人^[2]方法进行,对数中期的 JM101 细胞经重组的 M13 噬菌体感染后,在 37℃ 培养 3h,噬菌体经聚乙二醇 8000/NaCl 溶液沉淀后,经酚-酚/氯仿-氯仿抽提、乙醇沉淀后溶于 TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1mmol/L Na_2 EDTA)贮于 -20℃ 备用。DNA 的顺序分析按 BioLabs 的顺序分析指南^[4]

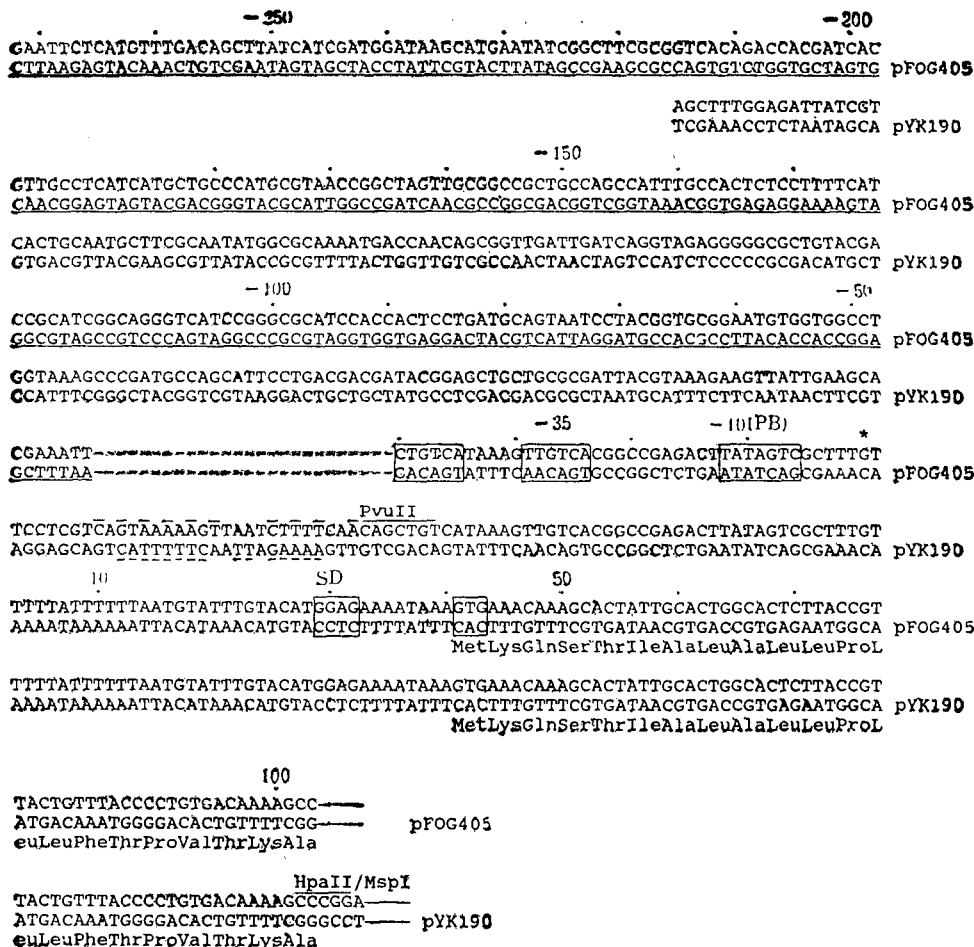


图 2 pFOG405 中 *phoA* 基因启动子及信号肽的核苷酸顺序分析及同
pYK190 中核苷酸顺序的比较

Fig 2 The Nucleotide Sequence of the Promotor and Signal Peptide of *PhoA*
gene from pFOG405 and the Sequence Comparision between
pFOG405 and pYK190

——示 *PhoA* 基因启动子上游区的不同源顺序

Indicating the nonhomogenous sequence of the upstream region of *PhoA* gene promoter

==示二元对称顺序的缺失

Indicating deletion of the dyad sequence

SD 核糖体结合位点 Ribosome binding site PB Pribnow box

* 转录起始点 Initiation site of transcription
G

作为信号肽的切割位点,在二者之间有一个由 10 个疏水氨基酸为主体的疏水区,从上述氨基酸顺序看这是一个典型的信号肽.实验指出,在 *PhoA* 启动子及其信号肽调控下得以分泌表达的核酸酶的量最高可占周质内蛋白质总量的 70%,这一结果证明了 *PhoA* 信号肽在参与蛋白质分泌过程中的作用.还要指出的是在信号

肽基因中 GTG 作为起始密码子,其与 SD 顺序 GGAG 之间的距离是 8bp,其 AT 碱基比率是 100% (图 2),起始密码子与 SD 之间的这种特定的核苷酸顺序将大大提高蛋白质的翻译效率^[7].

4. 从图 2 可见, *PhoA* 启动子最小的片段 (包括 SD 顺序) 只有 80bp (核苷酸 -40—

+40),如果加上信号肽的顺序一共也只有 144 bp,这不但可以从 pYK190 中用限制内切酶分离,更便于用化学合成方法进行合成。因此,PhoA 基因启动子及其信号肽顺序的测定和解析为研究 PhoA 基因表达的调控及组建高效分泌表达载体提供了有用的信息。

参 考 文 献

1 Kikuchi Y *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1981;9(12):

5671

- 2 Davis L G *et al.* *Basic Methods in Molecular Biology*, New York: Elsevier, 1986
- 3 彭秀玲 袁汉英. 基因工程实验技术. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1987
- 4 *Biolabs M13 Cloning and Sequencing System*, A Laboratory Manual, 1989
- 5 Chamberlin M J. In: Losick R and Chamberlin M ed. *RNA Polymerase*, 1976; 159—191
- 6 Benson S A. *Ann Rev Biochem*, 1985; 54: 101
- 7 Dalboge H *et al.* *DNA*, 1988; 7(6): 399

[本文于 1990 年 9 月 10 日收到, 12 月 6 日修回]

THE NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF THE PROMOTER AND THE SIGNAL PEPTIDE OF THE ALKALINE PHOSPHATASE GENE OF *Escherichia coli*

Jing Guozhong, Liu Lijun, Jiang Meiyan
(*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100080*)

ABSTRACT

The nucleotide sequence of the promoter and the signal peptide of *E. coli* alkaline phosphatase gene from pFOG405 plasmid has been disclosed and compared with the sequence reported by Kikuchi *et al.* The result shows that the PvuII-HpaII fragment (144bp) containing the promoter and signal peptide sequence from pYK190 plasmid is sufficient for expression and secretion of foreign genes in *E. coli*. The deletion of the dyad sequence (26bp) from 5' end of the promoter region doesn't affect expression level of foreign target genes. The experiment also provides the useful information for construction of efficient expression and secretion vector using the PvuII-HpaII fragment and studying regulation of gene expression.

Key words Sequence analysis, promoter, signal peptide