

reduced gradually with the culture time for cisplatin-resistant A549/DDP cells. It would be suggested that the anti-apoptotic character of A549/DDP cells is related with the relative intracellular basification, the persistence of mitochondrial membrane potential and decrease in intracellular free Ca^{2+} concentration which would be responsible for the resistance of A549/DDP cells to cisplatin.

Key words A549 cells, apoptosis, pH_i , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mitochondrial membrane potential

* This work was supported by grants from National Natural Science Foundation of China (39730130) and Key Research Project of The Chinese Academy of Sciences (KJ951-B1-609).

** Corresponding author. Tel: 86-10-64888518, E-mail: huang@sun5.ibp.ac.cn

Received: December 27, 2000 Accepted: February 23, 2001

mas 双向启动子

郑成超 刘石娟

(山东农业大学生命科学院, 泰安 271018)

农杆菌 Ti 质粒上存在甘露碱合成酶 (mannopine synthase) 基因 *mas1'* 和 *mas2'*, 两基因之间 479 bp 的间隔区即为由 *mas1'* 和 *mas2'* 基因共用的双向启动子. 由于 *mas* 启动子长度较短, 且在各种类型的植物中能够高效表达, 所以可用于许多植物基因表达载体的构建.

为确定 *mas1'* 启动子不同区段的作用, 将不同缺失长度的 *mas1'* 启动子与 GUS 报告基因融合. 在转基因烟草中发现, 随着 *mas1'* 启动子片段的缩短, GUS 活性表达水平反而提高, 但当缺失至 -58 时便没有了活性. 表明有多个 DNA 元件调节 *mas1'* 启动子的活性. 进一步分析发现, 在 -100~-58 之间存在一个正调控元件, -100 bp 以上的上游序列中则至少含有两个负调控元件, 它们抑制 -100~-58 之间正调控元件的作用, 从而使 *mas1'* 转录活性降低. 精细的序列分析证实, 在 -100~-58 之间的区域中有一个 20 bp 的对基因表达起重要作用的 *ocs* 元件. 这表明, 对于 *mas1'* 启动子, 提高基因转录活性最主要的是 -100 至 -58 区段, 它包含有 A/T 富含区和 *ocs* 元件.

利用内部缺失策略研究发现, -293~-263 之间存在阻遏蛋白结合序列, 去掉该序列, *mas1'* 启动子转录活性大大增加. 在 -262~-161 内含有 a、a' 和 a'' 三个回文结构, 这三个回文结构相继缺失, 会导致 *mas1'* 活性的逐渐下降. 因此, a、a'、a'' 回文结构对维持 *mas1'* 活性有重要作用.

当 *mas2'* 启动子序列缺失至 -318 时, 能够检测到较高的转录活性; 缺失至 -138 时, 转录活性较低; 缺失至 -57 时, 则不能转录. 序列分析表明, -318 至 -215 区段起关键作用, 此区段可分为三个区域, 即区域 I (-318~-298)、区域 II (-298~-284)、区域 III (-283~-215). 该区域不仅含有 *ocs* 元件序列, 而且含有 A/T 富含区. 表明 *ocs* 元件和 A/T 富含区对 *mas1'* 和 *mas2'* 基因的转录活性是非常重要的. 同样, 回文序列 a、a' 和 a'' 对维持 *mas2'* 的活性也起重要作用. 新近实验发现, -186~-90 区段作为 *mas1'* 活性的增强子恰好是 *mas2'* 活性的抑制子, 而 -343~-256 和 -271~-172 两个区段作为 *mas1'* 活性的抑制子序列又是 *mas2'* 活性的增强子.

用多种植物材料实验均发现, *mas2'* 启动子的基因转录活性远远高于 *mas1'* 启动子, 可达 7~8 倍. 这可能是因为 *mas2'* 启动子含有一个抑制子和两个增强子, 而 *mas1'* 启动子含有两个抑制子和一个增强子所致. 总之, *mas* 启动子含有六个重要区段, 即一个 A/T 富含区、两个 *ocs* 元件和三个回文结构, 它们均对 *mas* 基因的转录具有重要作用, 其中两个 *ocs* 元件的作用可以相互补充. 但在构建高效启动子时, 应当尽量减少 *mas* 启动子序列在空间和方向上的改变, 维持其原有构型, 并应首先考虑利用 *mas2'* 启动子.