

# 放线菌酮诱导 SV40 增强子的启动子活性的研究\*

王金发, 王宏斌, 何海琼, 刘 兵, 冯冬茹

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘 要:** 在蛋白质合成抑制剂放线菌酮(CHX)诱导下, pCAT-E 质粒中 SV40 增强子能启动 CAT 基因的表达. 在很短的时间(5 min)和很低的 CHX 质量浓度(30 ng/mL)条件下, CHX 即能诱导 pCAT-E 中 SV40 增强子的启动子活性. 为了研究 CHX 诱导的 pCAT-E 质粒中 SV40 增强子的启动子活性是否与位置有关, 构建了两个重组体: pCAT-Bas-Enh(-)和 pCAT-Bas-Enh(+), 改变了 SV40 增强子序列与载体中 CAT 报告基因的相对位置, 用重组质粒转染 CHO 细胞并用 CHX 处理, 检测不到 CAT 活性, 说明 pCAT-E 质粒中 CHX 所诱导的 SV40 增强子的启动子活性受 SV40 增强子位置的影响.

**关键词:** 放线菌酮; SV40 增强子; 启动子; CHO 细胞

**中图分类号:** Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 01-0073-04

放线菌酮(cycloheximide, CHX)常常被用作蛋白质合成抑制剂来抑制某些基因的表达. 研究发现, 在某些条件下 CHX 可以激活基因表达, 具有超诱导(superinduction)作用<sup>[1]</sup>. 增强子最早发现于 SV40 病毒基因组中, 其主要结构是两个正向重复的 72 bp 序列<sup>[2]</sup>. 利用 CAT 报告基因与 SV40 启动子或增强子已经构建了一系列 CAT 报告基因载体, 用于研究启动子或增强子. 我们在利用该载体研究另一个基因表达调控时, 发现 SV40 增强子不仅具有增强基因表达的作用, 在 CHX 诱导下还具有启动基因表达的功能<sup>[3]</sup>. 本文就此诱导作用做了进一步地探讨.

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒 DNA

CAT 表达质粒(Promega 公司); pBluescript 由本室提供.

### 1.2 细胞株和培养基

CHO(中国仓鼠卵巢细胞)购自中科院上海细胞研究所, 用 1640 添加适量小牛血清的培养基培养.

### 1.3 主要试剂

主要限制性内切酶、T4 连接酶、TaqDNA 聚合酶均购自大连宝生物工程公司; 1640 培养基购自 BRL 公司; [<sup>14</sup>C] 氯霉素购自 Amersham 公司, FuGENE 6 转染试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司.

### 1.4 PCR 扩增 SV40 增强子片段

以 pCAT-Enhancer 质粒 DNA 作为 PCR 的模板, 引物为: 5' - GGGATATCTGCTGTGGAATGT GTG - 3' 和 5' - CACACATTCCACAGCAGATA - 3' PCR 反应条件: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s; 35 个循环.

### 1.5 重组 DNA 的构建

按《分子克隆》进行.

### 1.6 细胞转染与氯霉素乙酰转移酶活性分析

参见文献 [4].

## 2 结 果

### 2.1 CHX 诱导 SV40 增强子启动报告基因的表达

将 pCAT-E 转染 CHO 细胞, 以 pCAT-P、pCAT-C 及 pCAT-B 作为对照. 分别在转染 24 h 后加入/不加入放线菌酮(终质量浓度为 6 μg/mL), 继续培养 24 h 后, 分析转染细胞中的 CAT 活性(图 1).

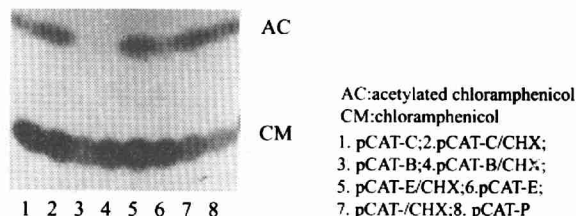


图1 CHX 处理的 CAT 表达载体转染 CHO 细胞的 CAT 活性分析

Fig.1 CAT assay of CAT report vector transformed CHO cell treated by CHX

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39370402)

收稿日期: 2000-02-22; 作者简介: 王金发(1947-), 男, 教授.

从图 1 可以看出: pCAT-C 在受 CHX 处理后 CAT 表达量增加; pCAT-B 不论是否经 CHX 处理均不表达 CAT 活性; pCAT-P 经 CHX 处理后, CAT 表达量变化不大; pCAT-E 在没有 CHX 处理时, 不表达 CAT 活性, 但是在 CHX 处理后表达出很强的 CAT 活性. 由于 pCAT-E 质粒是在 pCAT-B 质粒的基础上加入了 SV40 增强子序列而构建的(图 2), 可以推测在 CHX 诱导下 pCAT-E 中 SV40 增强子具有启动子功能.

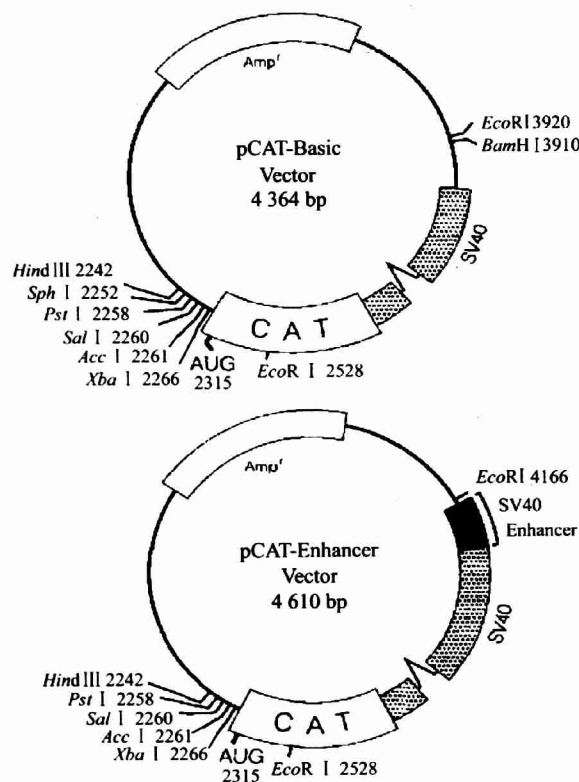


图 2 CAT 报告基因载体

Fig.2 The CAT reporter vectors

## 2.2 不同 CHX 浓度对诱导 SV40 增强子启动基因表达的影响

将 pCAT-E 转染 CHO 细胞 24 h 后, 分别用 60  $\mu\text{g/mL}$ 、6  $\mu\text{g/mL}$ 、600  $\text{ng/mL}$ 、60  $\text{ng/mL}$ 、30  $\text{ng/mL}$  等不同质量浓度 CHX 处理所转染的 CHO 细胞, 继续培养 24 h 后, 分析转染细胞中的 CAT 活性(图 3). 结果显示, 在不同质量浓度 CHX 作用下, SV40 增强子均能启动 CAT. 在质量浓度为 30  $\text{ng/mL}$  时 CAT 活性较强.

## 2.3 不同 CHX 作用时间对诱导 SV40 增强子启动基因表达的影响

将 pCAT-E 转染 CHO 细胞 24 h 后加入 CHX (终质量浓度为 6  $\mu\text{g/mL}$ ), 在分别作用 24 h、12

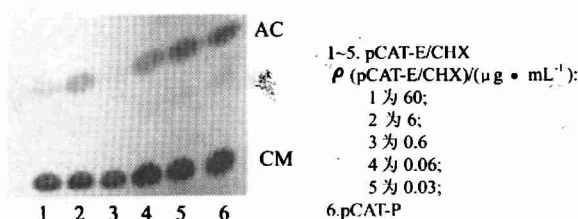


图 3 不同 CHX 质量浓度处理的 pCAT-E 转染 CHO 细胞的 CAT 活性分析

Fig.3 CAT assay of pCAT-E treated by decreasing mass concentrations of CHX

h、8 h、6 h、4 h、2 h、1 h、30 min、15 min、5 min 后, 分析转染细胞中的 CAT 活性(图 4), 结果表明, CHX 处理 5 min 后即可诱导 SV40 增强子的启动子活性, 延长处理时间, 表达活性无明显变化, 提示 CHX 能诱导 SV40 增强子快速启动基因表达.

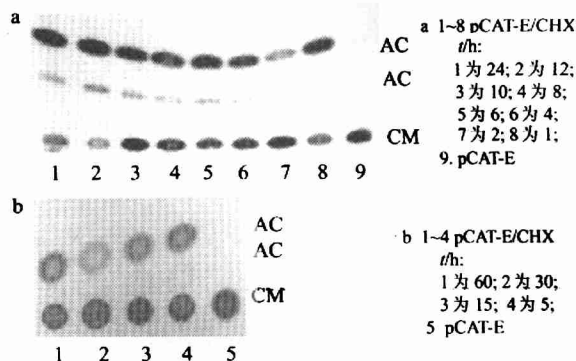


图 4 不同 CHX 作用时间对 pCAT-E 转染 CHO 细胞的 CAT 活性影响

Fig.4 CAT assay of pCAT-E treated by CHX of decreasing time

## 2.4 SV40 增强子的位置对 CHX 诱导 SV40 增强子启动基因表达的影响

为了探讨 CHX 诱导 SV40 增强子启动基因表达时与 SV40 增强子序列所在位置的关系, 构建了 2 个重组体: pCAT-Bas-Enh(+) 和 pCAT-Bas-Enh(-), 并转染 CHO 细胞, 以 pCAT-P 和 pCAT-E 为对照, 分别在转染 24 h 后加入/不加入 CHX (终质量浓度 6  $\mu\text{g/mL}$ ), 继续培养 24 h 后, 分析转染细胞中的 CAT 活性(图 5). 结果表明, 两个重组体所转染的细胞中, 不论是否用 CHX 处理, 均检测不到 CAT 活性. 这一结果说明, 在 pCAT-E 中 CHX 诱导 SV40 增强子的启动子活性与 SV40 增强子所在的位置有关.

### 3 讨 论

增强子是 20 世纪 80 年代初发现的一类顺式作用元件,能够增强邻近基因的表达,其作用不依赖于启动子的方向和距离.增强子通常由多个组件组成,其中某些组件与启动子相同.

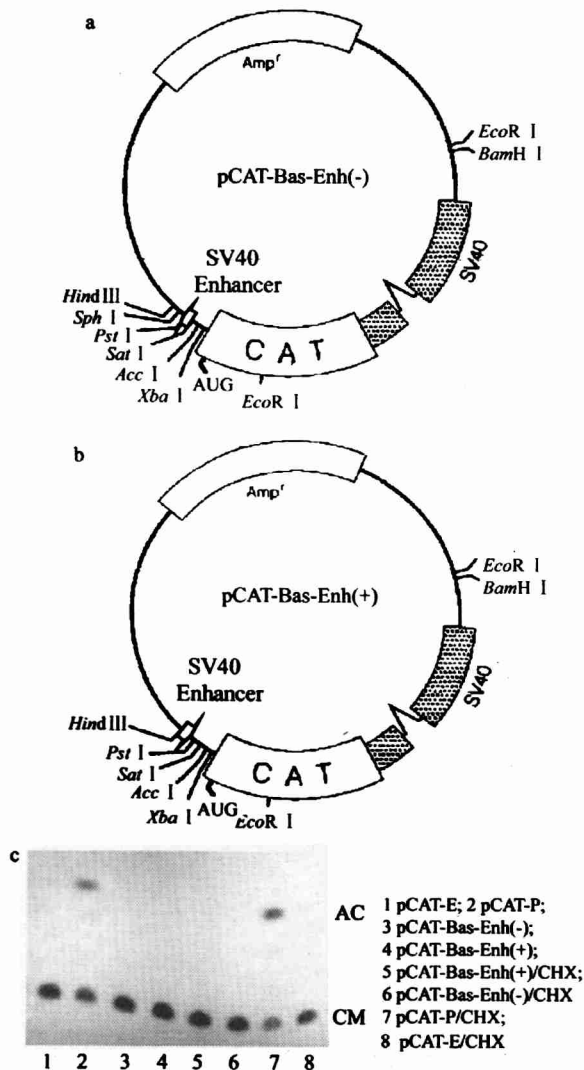


图 5 重组体的构建及 CAT 活性分析

Fig.5 Construction and CAT assays of recombinant DNA

- a Recombinant pCAT-Bas-Enh (-) DNA;  
b Recombinant pCAT-Bas-Enh (+) DNA;  
c CAT assays of DNA transfected cell

我们分析了 pCAT-E 中 SV40 增强子序列,发现它除了含有 SV40 增强子核心序列——2 个连续的 72 bp 重复序列之外,还包括了 SV40 转录调控区中的 21bp 重复序列,其中含有 6 个 GC 盒,这 6 个 GC 盒对于启动子活性有一定作用,其中 GC-I、GC-II、GC-III 对于 SV40 早期基因

起始表达非常重要<sup>[5]</sup>.因此,这 6 个 GC 盒可能也与放线菌酮诱导 pCAT E 的 CAT 基因表达有关.对于 CHX 诱导的基因表达的机制目前有两种假说:①CHX 通过抑制某些转录抑制因子和 mRNA 降解酶的合成,从而间接稳定并延长了转录过程<sup>[6,7]</sup>;②CHX 通过与细胞内信号分子相互作用从而直接激活了基因的转录表达<sup>[8,9]</sup>.本文中,在质量浓度低至 30 ng/mL 时,CHX 对蛋白质的合成已没有抑制作用,但仍可诱导 SV40 增强子启动 CAT 报告基因的表达,提示本研究中 CHX 的诱导机制可能不是通过抑制蛋白质的合成.

### 参考文献:

- [1] MAHADEVAN L C, EDWARDS D R. Signalling and superinduction[J]. *Nature*, 1992, 349: 747 - 748.
- [2] BANERJI J, RUSCONI S, SCHAFFNER W. Expression of a  $\beta$ -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences[J]. *Cell*, 1981, 27: 299 - 308.
- [3] WANG J F, CHEN S. Induction of aromatase gene expression in human placental choriocarcinoma (JAR) cells by phorbol esters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1218: 48 - 54.
- [4] WANG J F, CHEN S. Identification of a promoter and a silencer at the 3' end of the first intron of the human aromatase gene[J]. *Molecular Endocrinology*, 1992, 6(9): 1479 - 1488.
- [5] BARRERA-SALDANA H, TAKAHASHI K, VIGNERON M, et al. All six GC-motifs of the SV40 early upstream element contribute to promoter activity *in vivo* and *in vitro* [J]. *EMBO J*, 1985, 4: 3839 - 3849.
- [6] WILSON T, TREISMAN R. Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences[J]. *Nature*, 1988, 24: 396 - 399.
- [7] CASADO M, DIAZ-GUERRA M J, BOSCA L, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase mRNA expression by lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines in fetal hepatocytes treated with cycloheximide [J]. *Biochem J*, 1997, 327: 819 - 823.
- [8] BERBERICH T, KUSANO T. Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize[J]. *Mol Gen Genet*, 1997, 283: 254 - 275.
- [9] TAMARU H, NISHIDA T, HARASHIMA T, et al. Transcriptional activation of a cycloheximide-inducible gene encoding laccase is mediated by cpc-1, the cross-pathway control gene, in *Neurospora crassa* [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 243: 548 - 554.

## Cycloheximide Induced Promoter Activity of SV40 Enhancer

WANG Jin-fa, WANG Hong-bin, HE Hai-qiong, LIU Bing, FENG Dong-ru  
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The promoter activity of SV40 enhancer in the reporter vector of pCAT-Enhancer was induced by cycloheximide (CHX), a common protein synthesis inhibitor. This induced promoter activity can promote the CAT gene expression. The promoter activity of pCAT-Enhancer can be induced after treating 5 min and 30 ng/mL with CHX. In order to study whether the induced promoter activity of the pCAT-E by CHX is position-dependent. Two recombinant DNA has been constructed: pCAT-Bas-Enh (-) and pCAT-Bas-Enh (+), in which the position of SV40 enhancer element was changed. The pCAT-Bas-Enh (+)/(-) plasmids were used to transfect the CHO cell treated with CHX, no CAT activity detected. This result suggests that the CHX induced promoter activity of SV40 enhancer in pCAT-E is position-dependent.

**Keywords:** cycloheximide; SV40 enhancer; promoter; CHO cell

~~~~~

(上接第 67 页)

### 参考文献:

- [1] FABER K, HARDER W, VEENHUIS M, et al. Methylophilic yeasts as factories for the production of foreign protein[J]. Yeast, 1995, 11: 1331 - 1344.
- [2] TANI Y, SAKAI Y. Production of citric acid from methanol by a fluoroacetate-resistant mutant of *Candida* sp. Y-1[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 34: 5 - 9.
- [3] 罗进贤, 李政海, 李文清. 大麦  $\alpha$ -淀粉酶和黑曲酶糖化酶在酿酒酵母中的表达[J]. 中国科学(C 辑), 1998, 28: 50 - 55.
- [4] MANIATIS T, FRITSCH E, SAMBROOK J. Molecular Cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [5] SHERMAN F, FINK G R, LUKINS H B. Methods in yeast genetics p51 - 53[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1970.
- [6] 毛小洪, 蔡金科. 酵母完整细胞快速高效转化法[J]. 生物工程学报, 1990, 6: 102 - 107.
- [7] PHILIPPSEN P, STOTZ A, SHERF C. DNA of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Methods in Enzymology, 1991, 194: 169 - 181.
- [8] PLATT S T, YANG N S. Dot assay for neomycin phosphotransferase activity in crude cell extracts[J]. Annal Biochem, 1987, 162: 529 - 535.

## Cloning of Promoter from *Candida boidinii* and the Expression of Neomycin Resistant Gene

XU Bai-nian, WU Jiang-xue, LI Wen-qing, LUO Jin-xian  
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** *Candida boidinii* is one of the methylotrophic yeast with good development and application perspective but very little study has been done as a gene expression system. The *C. boidinii* promoter was cloned and the expression vector YE pNP181 was constructed by recombining the cloned promoter and Neo<sup>r</sup> gene onto an *E. coli*-yeast shuttle vector. YE pNP181 was then transformed into *C. boidinii* and Neo<sup>r</sup> gene on YE pNP181 expressed. The transformants grow on YPD plate containing 300  $\mu$ g/mL G418 and Neo<sup>r</sup>-G418 selection system was thus established, which facilitates the foreign gene expression in *C. boidinii*.

**Keywords:** promoter cloning; *Candida boidinii*; Neo<sup>r</sup> gene expression