牛泡沫病毒内部启动子上顺式作用元件 具有增强子特性

乔文涛 郭春光 王书晖 王金忠 陈启民 耿运琪

(南开大学生命科学学院, 天津 300071. E-mail: qiaowtao@public.tpt.tj.cn)

摘要 以牛泡沫病毒(bovine foamy virus, BFV)中国毒株 BFV₃₀₂₆ 为材料, 研究 *env* 基因内部启动子(internal promoter, IP)上顺式作用元件的功能特点. 用 PCR 方法进行系列缺失, 将 IP 中 BFV 反式激活因子 Tas 应答元件(TRE^{IP})精确定位于 TATA 盒近上游的 72 bp 区段中(9205 ~ 9276). 发现此段可激活同源及异源启动子, 具有典型增强子特性; 此区段与已知 SFV-1 TRE^{IP} 近启动子区和 SFV-3 TRE^{IP} 序列同源性高, 都具有核因子 NF-1(nuclear factor 1)的结合位点, 位置相同, 推测此类顺式作用元件具有相似功能特点.

关键词 牛泡沫病毒 内部启动子(IP) 反式激活因子应答元件(TRE) 增强子

反转录病毒科泡沫病毒属(spumaviruses 或 foamy virus, FVs)具有独特的基因组结构. 除具有典型反转录病毒共有长末端重复序列(long terminal repeats, LTR)启动子外, 其 *env* 基因内部存在独有的内部启动子(internal promoter, IP), 启动下游反式作用因子 Tas 的表达^[1~3]. 两类启动子共同调节着病毒基因的复制与表达^[4]. 已有的研究表明, Tas 是一种 DNA 结合蛋白, 可以反式激活 IP 与 LTR, 控制病毒基因表达由早期向晚期转换^[5]. 由于两类启动子上游序列同源性较低, 暗示 Tas 对它们的激活机制各不相同^[6]. 推测 Tas 可能首先作用于 IP 上游顺式作用元件激活自身基因表达, 之后通过 LTR U3 区的多个顺式调控位点调控 LTR 起始的结构基因的表达^[2]. 同时, Tas 对两启动子的激活程度也因宿主细胞而异^[7]. 为了研究此类调控模式, 本文从 Tas 对 IP 的反式调节作用开始, 以本室分离并鉴定的牛泡沫病毒中国毒株 BFV₃₀₂₆ 为材料^[8], 采用 PCR 进行系列缺失, 构建了一系列 IP 缺失质粒以及异源启动子杂合质粒, 引入 *luc* 基因作为报告基因, 将它们单独或与 Tas 蛋白表达质粒 pBorf-1(1 ~ 249 AA, BFV 又称 Borf-1)共转染牛肺细胞系 BL-12, 作瞬时表达分析, 对 IP 中顺式作用元件 TRE^{IP} 精确定位, 探寻其作用的功能特点. 结果将 TRE^{IP} 精确定位于基因组 9205 ~ 9276 之间. 同时发现该顺式作用元件具有典型增强子特性, 这在牛泡沫病毒研究中尚未见报道. 本工作的完成为进一步研究泡沫病毒基因表达调控机制并阐明 Tas 与 LTR 及 IP 的相互作用奠定了基础.

1 材料与方法

(i) 引物的设计与 PCR 反应. 参考有关人泡沫病毒 HFV, 猴泡沫病毒 1 型 SFV-1 和 BFV 基因组序列, 根据 *env* 基因中的保守序列设计引物, 旨在扩增 IP 基础启动子及构建缺失质粒. PCR 反应条件为: 94℃, 3 min, 50℃, 1 min, 72℃, 1 min; 94℃, 30 s, 50℃, 1 min, 72℃, 1 min, 30 个循环; 94℃, 30 s, 50℃, 1 min, 72℃, 10 min. 引物序列如下:

P9112~9130: 5'-CTC TGT CGA CTG CTA TGG T-3',
Sal I
P9200~9218: 5'-AGA GGT CGA CTT CCT CAT T-3',
Sal I
P9260~9279: 5'-GTA ACG TCG ACT TGG GAA TC-3',
Sal I
P9285~9267: 5'-TTT AAA GCT TCC CAA GTG C-3',
Hind III
P9414~9395: 5'-CTC AAA GCT TAC GCA GCT AC-3',
Hind III

(ii) 酶和试剂. 实验用限制性内切酶, *E. coli* DNA 聚合酶 I (KF), T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司. T4 聚合酶, ONPG 和 β-半乳糖苷酶购自 Sigma 公司. DMEM 细胞培养基, 胎牛血清, 青霉素/链霉素(p/s), hepes, 胰酶及 lipofectAMINE reagent 购自美国 GIBCO/BRL 公司. 细胞裂解液和 Luc 酶活力测定试剂盒购自 Promega 公司.

(iii) 质粒的构建. 质粒 pBFVIP-1-*luc*, pBFVIP-

4-*luc*, pBFVIP-5-*luc*, pbBFVLTR 和 pBFVIP1-bBFVLTR 为本室构建保藏, 分别克隆序列: BFVIP 8572/9509, BFVIP 9117/9405, BFVIP 9205/9405, BFVLTR-140/29 和 BFVIP 9117/9276-BFVLTR-140/29; 质粒 pbBIVLTR 克隆有牛免疫缺陷病毒 BIV LTR 启动子序列-115/

204, 亦为本室构建保藏. 上述各质粒启动子下游为萤火虫荧光素酶报告基因(图 1 和 2). 分别以它们为出发质粒构建其他质粒.

质粒 pBorf-1, pUC19, pCMV-*lacZ*, 宿主菌 *E. coli* JM103 和 TG1 均为本室保存. 质粒 pBorf-1 表达完整

图 1 IP 系列质粒的结构示意图
(a) BFV IP 结构示意图, (b) BFV IP 各质粒结构示意图. *luc* 示萤火虫荧光素酶基因

图 2 异源基础启动子、TRE^{IP}与异源启动子不同组合系列质粒的结构示意图

的 Borf-1 蛋白, 即 BFV 反式激活因子 Tas, 其上游启动子为强启动子 RSV LTR.

质粒的提取、酶切、DNA 片段制备、连接及转化操作均参考文献[9].

(iv) 细胞培养和转染. 用含 10% 胎牛血清的 DMEM, 37℃, 5% CO₂ 培养. BL-12 细胞系用于转染. 采用阳离子脂质体法(lipofectAMINE reagent), 具体步骤参见 GIBCO/BRL 产品说明书. 每孔用含报告基因 *luc* 的质粒 0.2 μg, pBorf-1(或 pUC19) 0.75 μg, pCMV β-gal 0.6 μg 与 3 μg lipofectAMINE (GIBCO/BRL)混合. 每份样品设 3 孔平行对照. 转染 72 h 后裂解细胞测定荧光素酶活性(Luc 值). Luc 值经β-gal 内对照校正后, 各平行组之间变异系数<15%. 按试剂盒提供的方法, 用生物化学发光测量仪(上海检测技术研究所检测仪器厂生产)测定化学发光强度, 方法原理见文献[9], Luc 酶的活力以 4 s 内的光强度表示.

(v) DNA 序列分析. 用 DNASIS 序列分析软件进行.

2 结果

2.1 IP 上 Borf-1 蛋白的应答元件(TRE^{IP})位于 9205~9276 间 72 bp 区段

为将 TRE^{IP} 精细定位, 本文构建了 IP 的系列缺失克隆(图 1), 将它们分别单独转染或与 pBorf-1 质粒共转染 BL-12 细胞系. 瞬时表达分析结果见表 1.

表 1 IP 系列质粒转染 BL-12 细胞系的 Luc 分析结果			
报告质粒	-Tas ^{a)}	+Tas ^{b)}	激活倍数
pBFVIP-4- <i>luc</i>	194.4	43196.2	222.2
pBFVIP-5- <i>luc</i>	258.9	49508.7	191.3
pBFVIP-bp- <i>luc</i>	217.4	180.1	0.83
pBFVIP-11- <i>luc</i>	207.2	41149.9	198.6
pBFVIP-12- <i>luc</i>	212.5	36744.0	179.2
pBFVIP-13- <i>luc</i>	201.1	36766.7	182.4
pBFVIP-14- <i>luc</i>	178.7	29281.8	169.4
pBFVIP-15- <i>luc</i>	166.3	50823.5	305.0
pIP1-bBFVLTR- <i>luc</i>	92.2	10676.6	115.8

a) -Tas 示各质粒与 pUC19 对照质粒共转染, b) +Tas 示各质粒与表达质粒 pBorf-1 共转染

缺失体 pBFVIP-bp-*luc* 的基础活性与完整启动子 pBFVIP-4-*luc* 近似, 可视为基础启动子, Borf-1 对其没有激活(仅为 0.83 倍), 同时, 插入 BFV LTR 启动子上游的 IP 9117 ~ 9276 可独立完成对 Tas 的激活应答作用(激

活 115.8 倍), 推断 IP TATA 盒下游 9280 ~ 9405 间不含正调控作用的 TRE^{IP}. 比较 pBFVIP-5-*luc* 与 pBFVIP-4-*luc* 转染结果, 缺失 9117 ~ 9205 区段对 Borf-1 激活作用影响不大, 推断为无关序列. 而 9205 ~ 9266 区段缺失后, Borf-1 激活作用消失, 表明 9205 ~ 9266 区段存在 Borf-1 激活作用的必需元件. 质粒 pBFVIP-11-*luc* 与 pBorf-1 质粒共转染结果表明加入 9205 ~ 9276 区段, 激活活性达 198.6 倍, 证实 IP 上 Borf-1 蛋白的应答元件(TRE^{IP})位于 9205 ~ 9276 间 72 bp 区段中, 为正调控元件.

2.2 TRE^{IP} 作用机制具有典型的增强子特点

为深入研究 Borf-1 激活 IP 起始基因表达调控的特点, 本文对 72 bp TRE^{IP} 与 Borf-1 蛋白之间的作用做了进一步研究. 分别将 TRE^{IP} 以不同方向、位置和距离克隆至 BFV IP 基础启动子 pBFVIP-bp-*luc* 上, 观察 TRE^{IP} 对 Borf-1 蛋白的应答是否与启动子方向、距离等因素有关, 之后构建双 TRE^{IP} 杂合质粒观察叠加效应; 进而将 TRE^{IP} 克隆到 BFVLTR 基础启动子 pbBFVLTR 和 BIVLTR 基础启动子 pbBIVLTR 上游, 构建杂合质粒, 测试 TRE^{IP} 对异源启动子转录激活的作用. 转染结果见表 1 和 2.

可以看出: 在 pBFVIP-12-*luc* 中, TRE^{IP} 位于 BFVIP 基础启动子及报告基因 *luc* 下游, 共转染 Luc 值高达 36744.0, 激活倍数为 179.2 倍, 可见 TRE^{IP} 对 Tas 的应答与其同启动子相对位置无关. pBFVIP-13-*luc* 中 TRE^{IP} 位于 BFVIP 基础启动子上游, 距 TATA 盒 337 bp, 共转染 Luc 值为 36766.7, 激活倍数为 182.4 倍, 此结果低于野生型 pBFVIP-4-*luc* 与 pBorf-1 共转染激活 222.2 倍, 但同同源回复质粒 pBFVIP-11-*luc* 共转染激活 198.6 倍相比差别不大, 可认为与启动子间的距离并不影响 TRE^{IP} 的功能. 比较 pBFVIP-13-*luc* 与

表 2 各异源基础启动子、异源杂合启动子报告质粒转染 BL-12 细胞系的 Luc 分析结果

报告质粒	-Tas ^{a)}	+Tas ^{b)}	激活倍数
pbBFVLTR	50.5	450.3	8.9
pIP1-bBFVLTR	92.2	10676.6	115.8
pIP2-bBFVLTR	61.3	555.6	90.6
pIP3-bBFVLTR	50.8	4053.8	79.8
pbBIVLTR	89.1	153.3	1.7
pIP-bBIVLTR	113.4	2245.3	19.8

a) 和 b) 同表 1 注

pBFVIP-14-*luc* 转染结果, 二者区别不大, 可见 TRE^{IP} 功能与其本身方向无关. 在 pBFVIP- 15-*luc* 中, TRE^{IP} 位于完整的 BFVIP 启动子上游, 因此该报告质粒带有两段同向重复的 TRE^{IP}, 共转染激活高达 305.0 倍. 此结果比具有单拷贝的 TRE^{IP} 的野生型 pBFVIP-4-*luc* 与 pBorf-1 共转染激活 222.2 倍还高, 为所有质粒中激活倍数最高值, 可见 TRE^{IP} 功能具有一定的叠加效应.

本室在研究 BFV LTR 工作中曾构建 pbBFVLTR, 该质粒在 *luc* 基因上游含有 BFV LTR 启动子关键序列 (-140/+29), 具有 BFV LTR 的启动子功能, 但 Tas 对它的反式激活效应低^[10,11]. 以 pbBFVLTR 为出发质粒, 将 BFV TRE^{IP} 克隆至同种异源基础启动子 BFV LTR 的上游, 构建杂合启动子表达质粒 pIP1-bBFVLTR, pIP2-bBFVLTR 和 pIP3-bBFVLTR. 比较 pIP2-bBFVLTR 和 pIP3-bBFVLTR 转染结果与 pbBFVLTR 转染结果可以看出, 克隆入 TRE^{IP} 对启动子基础活性没有影响, 但对 Tas 激活作用的应答明显提高. 无论 TRE^{IP} 与基础启动子 BFV LTR 相对方向如何, 共转染激活倍数均大大高于无 TRE 元件的基础启动子, 说明 Tas 对 TRE^{IP} 激活作用可在异源启动子中实现, 且与 TRE^{IP} 本身及启动子的相对方向无关. pIP2-bBFVLTR 与 pIP1-bBFVLTR 转染激活结果相近, 可见 TRE^{IP} 与异源基础启动子间的距离对激活倍数也无太大影响, 结果与 BFV TRE^{IP} 激活同源启动子功能特征一致.

本室前期工作中曾研究牛免疫缺陷病毒 BIV, 该病毒与牛泡沫病毒同属反转录病毒科, 但属慢病毒属, 其基因表达调控与泡沫病毒差异较大. 在研究其 LTR 时, 曾构建质粒 pbBIVLTR, 该质粒在 *luc* 基因上游含有 BIV LTR 启动子关键序列 (-115/204, 此区域包括 CACA 盒、TATA 盒及 RU5 区), 该部分序列具有

BIV LTR 的启动子功能, 但对 BFV Tas 的激活没有应答^[12]. 将 BFV TRE^{IP} 克隆其上游构建 pIP-bBIVLTR, 转染结果表明, pBorf-1 可激活 pIP-bBIVLTR 起始基因的表达. TRE^{IP} 可以在异种异源启动子中完成对 Tas 的应答, 使下游异源启动子的启动活性增高.

2.3 BFV TRE^{IP} 与 HFV, SFV-1 和 SFV-3 相应区段的同源性比较

以 TATA 盒为参照物, 将 BFV 内部启动子 TRE^{IP} 区段分别与 HFV, SFV-1 和 SFV-3 *env* 基因相应区段进行比较, 分析同源程度. 结果见图 3.

序列同源性分析表明 BFV TRE^{IP} 与 HFV, SFV-1 和 SFV-3 相应区段的同源性较高, 72 bp 中四者完全同源碱基达 45.8%, 表明在 TATA 盒 5' 近上游应包含有重要的调控位点或 Tas 反式激活的靶位点(TRE^{IP}). 这在 BFV, SFV-1 和 SFV-3 中得到证实, 仅 HFV 例外, 其原因还有待探讨. BFV TRE^{IP} 这段序列中存在核因子 1(NF-1)高亲和力应答序列, 我们发现 4 种病毒在此应答序列区同源性高达 78.6%. 暗示 NF-1 直接或间接参与了 TRE^{IP} 对 Tas 反式激活的应答.

3 讨论

转录增强子是一段 DNA 序列, 它带有特殊基序可与 DNA 结合蛋白相互作用, 在基因间传递分子信号. 作为一种顺式作用的 DNA 序列, 增强子能够显著提高转录效率, 它的作用不受方向及与 RNA 转录起点距离等因素限制. 本文通过缺失分析将 IP 中 Tas 应答元件(TRE^{IP})精确定位于 72 bp 的序列 (9205 ~ 9276). 此 72 bp 序列为 Borf-1 蛋白行使反式激活作用所必需; 该区段对 Borf-1 蛋白反式激活作用的应答与所处位置、方向无关, 与下游启动子来源无关, 且具

图 3 BFV TRE^{IP} 与 HFV, SFV-1 和 SFV-3 相应区段的同源性比较
以 TATA 盒为参照物, 星号示相同碱基, 阴影区为 NF-1 位点. 黑体字示 TATA 盒
<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-7-535>

有增强叠加效应,表明该区段具有典型增强子元件特性. 该区段位于核心启动子的临近上游区(转录起始点前-34/-145)是典型的识别位点区,转录因子在这里与 DNA 结合并发生相互作用. 有关增强子-启动子作用机制的“异化通道”理论认为,增强子结合蛋白和启动子结合因子之间存在某种特异的相互作用, DNA 特异结合蛋白先直接与增强子上的识别位点结合,然后可能与辅激活物及结合蛋白相互作用. 这种相互作用可能促进启动子完整转录复合物的形成,然后再从这里实现转录的起始和再起始^[13]. 我们通过凝胶阻滞试验证实 72 bp 的核酸序列可与 Bof-1 蛋白直接结合,竞争试验证实结合具有特异性(另文发表),进一步证实该区段的增强子特性.

序列分析表明该区段与 SFV-1 *env* IP 中 Taf-1 近启动子应答元件^[14]及 SFV-3 *env* IP 中 Taf-3 作用序列^[15]位置相似,均位于 TATA 盒近上游. BFV TRE^{IP}与 SFV-1 *env* IP 及 SFV-3 *env* IP 中相同位置区段同源性较高,三者均存在于该区段惟一的细胞因子与核因子的结合位点 NF-1(nuclear factor 1),且位置完全相同. Zou 等人^[14]的凝胶阻滞试验和 DNA 足迹分析结果也表明, SFV-1 *env* IP 中 Taf-1 近启动子顺式作用元件可与 GST-Taf-1 融合蛋白直接结合,表明泡沫病毒自身反式激活因子 Tas 可能通过相似模式激活 IP. 目前有关真核基因调控机制的研究,更多涉及到染色质结构对启动子活性的影响,认为转录因子与相应的辅激活物通过改变启动子附近区域的结构,使得 RNA 聚合酶 II 得以接触并识别启动子核心序列,从而促进形成转录复合体,激活基因转录^[16]. SFV-1 中 Taf-1 近启动子应答元件、SFV-3 *env* IP 中 Taf-3 作用序列与 BFV TRE^{IP} 位置相似性是否与这些元件结合反式激活因子发挥作用有关? 本文研究结果表明,位置相似性似乎与这些 TRE^{IP} 的增强功能关系不大. 它们的作用机制可能是:增强子与其激活因子及辅激活物形成复合体,该复合体沿染色质向前滑动,直至到达相应启动子区后,形成稳定的环状结构. 这种相互作用改变 DNA 空间结构,促进启动子处完整转录复合物的形式,再从这里实现转录的起始和再起始. 这种复合体沿 DNA 链滑动,使这类元件具有方向、位置的不依赖性. IP 上顺式作用元件的这一功能特性为反转录病毒科泡沫病毒属基因调控的特点

之一.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39970033)和高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 98005516)资助项目.

参 考 文 献

1

Linial M L. Foamy viruses are unconventional retroviruses. J Virol, 1999, 73(3): 1747~1755

2

Mergia A. Simian foamy virus type 1 contains a second promoter located at the 3' end of the env gene. Virology, 1994, 199(1): 219~222

3

张莉, 王世珍, 刘佳建, 等. 牛泡沫病毒内部启动子(IP)的克隆及功能分析. 病毒学报, 2000, 16(3): 227~231

4

刘淑红, 耿运琪. 泡沫病毒基因组结构及其调节蛋白的功能. 病毒学报, 1999, 15(1): 84~91

5

Lecellier C H, Saib A. Foamy virus: between retroviruses and pararetroviruses. Virology, 2000, 271(1): 1~8

6

Kang Y, Blair W S, Cullen B R. Identification and functional characterization of a high affinity Bel-1 DNA binding site located in the human foamy virus internal promoter. J Virol, 1998, 72: 504~511

7

Christopher D M, Clandia R, Cynthia M, et al. Cell-type-specific regulation of the two foamy virus promoters. J Virol, 2001, 75: 6547~6557

8

刘淑红, 陈荷新, 陈家童, 等. 牛泡沫病毒 BSV₃₀₂₆ 毒株的分离及分子生物学鉴定. 病毒学报, 1997, 13(2): 140~145

9

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.21~1.85

10

刘佳建, 刘淑红, 陈启民, 等. Bof-1 蛋白是牛泡沫病毒的反式激活因子. 科学通报, 1999, 44(8): 844~847

11

刘佳建, 王世珍, 张莉, 等. 牛泡沫病毒调节蛋白及其在 LTR 上应答元件的研究. 病毒学报, 2000, 16(2): 141~148

12

刘佳建, 刘淑红, 陈启民, 等. 牛泡沫病毒对牛免疫缺陷病毒的激活作用. 中国病毒学, 1999, 14(3): 249~254

13

Elizabeth M B, James T K. Going the distance: a current view of enhancer action. Science, 1998, 281: 60~64

14

Zou J X, Luciw P A. The transcriptional transactivator of simian foamy virus 1 binds to a DNA target element in the viral internal promoter. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(1): 326~330

15

Campell M, Renshaw-gegg L, Renne R, et al. Characterization of the internal promoter of simian foamy viruses. J Virol, 1994, 68(8): 4811~4820

16

Fry J, Peggy J F. Context-dependent transcriptional regulation. J Biochem, 1999, 274(12): 29583~29586

(2001-12-04 收稿, 2002-02-09 收修改稿)