

通过鸡和爪蟾 cDNA 文库筛查分离不同动物的 *Pitx2* (或其同源物), 一些动物的 *Pitx2* 同源鉴定结果为: 鼠与人: 98%; 鸡与小鼠: 97%; 鸡与人: 96%; 爪蟾与鸡、小鼠或人: 89%。研究者还发现小鼠 *Lefty* 蛋白可以影响鸡 *Pitx2* 表达^[3]。种种迹象表明, *Pitx2* 是在脊椎动物沿整个左右轴建立不对称性的信号级联中的一个进化保守的下游效应子^[1, 4, 5]。

参 考 文 献

- 1 Ryan A K, Blumberg B, Rodriguez-Esteban C, *et al.* *Pitx2* determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature*, 1998, **394** (6693): 545~ 551
- 2 Meno C, Shimono A, Saijoh Y, *et al.* *Lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell*, 1998, **94** (3): 287~ 297
- 3 Yoshioka H, Meno C, Koshihara K, *et al.* *Pitx2*, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell*, 1998, **94** (3): 299~ 305
- 4 Logan M, Pagar-Westphal S M, Smith D M, *et al.* The transcription factor *Pitx2* mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell*, 1998, **94** (3): 307~ 317
- 5 Piedra M E, Icardo J M, Albajar M, *et al.* *Pitx2* participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell*, 1998, **94** (3): 319~ 324
- 6 Amendt B A, Sutherland L B, Semina E V, *et al.* The molecular basis of Rieger syndrome: analysis of *Pitx2* homeodomain protein

activities. *J Biol Chem*, 1998, **273** (32): 20066~ 20072

- 7 Gage P, Camper S. Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum Mol Genet*, 1998, **6**: 457~ 464
- 8 Harvey R P. Links in the left/right axial pathway. *Cell*, 1998, **94** (3): 273~ 276

Pitx2: a left-right Asymmetric Signalling Molecule.

LIU Ji-Long, TAN Yan¹⁾ (*State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; ¹⁾ WBL Peking University Biotech Co. Ltd., Beijing 100080, China*).

Abstract *Pitx2* is asymmetrically expressed in the left lateral plate mesoderm and derived organs such as heart and gut during chick, mouse and *Xenopus* development. *Pitx2* appears to be downstream effector of Shh and Nodal. Misexpression of *Pitx2* is sufficient to produce reversed organs of body rotation. Defect of *Pitx2* in human may cause Rieger syndrome. *Pitx2* seems to be a key conserved signalling molecules that mediates left-right asymmetry in vertebrate.

Key words left-right asymmetry, *Pitx2*, vertebrate

蛋白质的玻璃化*

范培昌

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

摘要 在成玻载体 (糖类) 和保护剂 (分子伴侣和脱水蛋白) 存在下, 蛋白质类生物活性物质可在室温下被玻璃化。这类玻璃态产品在室温下极其稳定, 已被用于可在室温下长期储、运的新一代体外诊断试剂盒的生产。有迹象表明, 植物种子的休眠即是由于种子内含有全套成玻物和保护剂, 使其所含活性分子能在自然条件下玻璃化而高度稳定。

关键词 玻璃化作用, 蛋白质, 植物种子, 诊断试剂, 稳定性

学科分类号 Q51

何谓玻璃化技术? 物理学界早就指出, 当某些物质处在低于或等于该物质的“玻璃转换温度 (glass transition temperature; T_g)”时就会形成玻璃 (glasses)。此时, 因分子几无活动和扩散, 故能在常温下保持永久稳定。正如 Franks 所述^[1], 由于玻璃化过程中物质并不结晶, 而是形成一种极粘滞的“超冷冻 (super cooled)”液体。此时, 因

仍保持着作为液体特征的分子无序性, 故把玻璃也称为“无定形固体 (amorphous solid)”, 并以此区别于真正的固体。1997 年, Poole 总结了各种物质玻璃化过程, 提出液体也具多态性的理论^[2], 认为一种多组分溶液 (流动态) 若在 T_g 条件下蒸发

* 上海市科委立项并已通过鉴定的项目 (沪科鉴 (98) ZR4277)。

收稿日期: 1998-06-22, 修回日期: 1998-11-24

除水,其浓度就会逐渐增加,经“浆态”、“橡皮态”,进而成为一种“固化了的”液体 (“solidified” liquids),俗称玻璃,此过程则称之为玻璃化作用 (vitrification). 其实,物质的玻璃化现象在现实生活中也常见.例如,包糖果的糯米纸即是糯米中某些物质的玻璃态;煲粥到一定时候,其表面会形成一层“粥衣”,这即是大米中某些物质的玻璃态.

由于人们早已习惯采用冻干技术来保存酶蛋白等生物活性物质,又一直误认为它们在常温下难以保持活性,致使国外,如 Pharmacia 公司在设计玻璃化工艺时,除用了昂贵的 Ficoll 400 和松三糖作为成玻载体 (glass-forming carrier) 外,只能把欲玻璃化的限制性内切酶先在超低温 (-70°C) 下冰冻,然后在逐渐升温并减压脱水下,使之玻璃化成试剂半球^[3]或试剂球^[4].致使玻璃化时程长达 72 h. 所得玻璃态微球又因难以分装,只得再设计一种专用玻球分装器^[5].

90 年代初,作者与英、美等国,同时开始了作者称之为可逆性固定化 (reversible immobilization) 的研究.其内容实为液态试剂的片剂化和玻璃化.迄今,研制成功的可在常温长期储运的玻璃态试剂,几乎都属体外诊断试剂盒中所附原需冰箱储运的蛋白质类液态试剂.这类产品,Pharmacia 公司称为 “Ready-To-Go”; Sigma 公司称为 “Ready-to-Use”; 作者则称为 “便您用” 试剂.

生物活性分子真的不能在 25°C 以上温度下脱水玻化吗? 作者注意到,在自然界,许多植物种子需经太阳曝晒,如晒谷,才形成翌年能发芽的休眠种子.甚至,千年古墓出土的种子都还能发芽! 为什么种子能在长时间曝晒后仍能保持其所含酶、蛋白质等生物活性分子不失活呢? 作者研究表明,形成玻璃态需要两类物质,一是成玻载体,属糖化物;另是保护剂,属热休克蛋白 (heat-shock proteins)^[6],和脱水蛋白类 (dehydrins)^[7]. 植物种子、真菌孢子、容易发生假死的微生物等等,都因有这两类物质存在而能在日晒下脱水,使活性分子形成玻璃态而在古墓中存放千年仍不失活.据此,作者取市售种子加工物,经粗的分部分离,就得到了含全套成玻物的廉价玻化溶液,并由此创立了只费 12 h 即可完成的室温玻璃化工艺.5 年来,作者用此室温玻化技术已为生产诊断试剂盒的厂家加工成功了 23 种蛋白质类玻璃态产品.其中,玻璃态 DNA 聚合酶 (Taq 酶) 和一种诊断肾病的全玻璃

化试剂盒已批量生产.

玻璃化试剂具下列特色: a. 可在常温长期储运而无需作冷藏和解冻操作; b. 可把某多步反应试剂混合玻璃化,形成一步反应试剂而简化步骤; c. 用时只需加水复溶,用后即弃,免除了用户自配试剂时因称量、定容、受化学试剂污染等烦恼,故商品名为 “便您用” 试剂; d. 可分拆高价大包装活性试剂为众多低价小包装,售价更易被客户接受,也免除了大包装开封后之剩余物因易被空气氧化、试剂交叉污染或微生物侵入等使之变质所造成的浪费; e. 玻璃化可增加溶解度,免去搅拌促溶而省时.此外,玻璃态产品活性的高度稳定 (如: Taq 酶存放 45°C 达 20 天活力不变) 将产生巨大的社会效益.例如,当今规模庞大的诊断试剂工业,生产着数百种诊断试剂盒.其中,诸如诊断各型肝炎病毒的试剂盒,国家卫生部虽严格实行着 “批批检” 的质控制度,但输血中仍时有误输含肝炎病毒血液的 “血案” 发生.究其原因之一,就在于出厂后试剂盒内所附包被抗体等活性分子,在非冷储运条件下失活 (“冷链” 断裂),导致检测时出现假阴性结果所致.

迄今,有关体内使用的含活性分子的片剂、针剂等的玻璃化产品尚未见有报道.

参 考 文 献

- 1 Franks F. Long-term stabilization of biologicals. *Bio/Technology*, 1994, **12** (March): 253~256
- 2 Poole P H, Grande T, Angell C A, *et al.* Polymorphic phase transitions in liquids and glasses. *Science*, 1997, **275** (5298): 322~325
- 3 Walker D W, DiFrancesco R A, Heaster J A, *et al.* Room temperature stable reagent semi-spheres. US Patent, C12Q, 5 565318, 1996-10-15
- 4 Trembl S B, Dall C J, Draveling C A, *et al.* Biological reagent spheres. US Patent, C12Q, 5 593824, 1997-01-14
- 5 David W W, Milwaukee B A, Burdick B, *et al.* Dispenser for dried biological reagent spheres. US Patent, B01L, 5 616299, 1997-04-01
- 6 Trent J D, Horwich A L. Archaeobacterial chaperonin-mediated protein stabilization. US Patent, C07K, 5 428131, 1995-06-27
- 7 Sarhan F, Houde M, Laliberte J-F. Freezing tolerance proteins Wcs19 and Wcor410 from gramineae. US Patent, C07K, 5 731419, 1998-03-24

Vitrification of Proteins. FAN Pei-Chang (Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062, China).

Abstract The glassified proteinaceous bioactive substances are extremely stabilized at room temperature

by the presence of the specific carbohydrates as a glass-forming carrier and chaperonins/dehydrins as a protector. There are indications that the natural vitrification of bioactive substances in seed of plant lead

the seeds into the dormant phase.

Key words vitrification, protein, seed, diagnostic reagent, stability

肌肉抑制素基因及在食用肉类生产中的应用前景

梁旭方

(暨南大学生物工程学系, 广州 510632)

摘要 肌肉抑制素 (Mstn) 基因是 TGF- β 超家族的一种新基因, 仅在骨骼肌特异表达并作为肌肉生长的负调控因子。由于该基因为单一开关基因, 其缺失即导致肌肉量增加, 同时 Mstn 基因天然敲除的肌肉加倍良种牛的存在, 说明这种基因操作不会扰乱其他生长调控系统并带来不正常病理变化, 因而 Mstn 基因是提高肉用动物肌肉产量的理想靶基因。

关键词 肌肉抑制素 (Mstn) 基因, 基因敲除, 动物基因工程

学科分类号 Q78

1 肌肉抑制素 (Mstn) 基因

1997 年 McPherron 等^[1]通过简并引物 PCR 方法, 首次鉴定小鼠转化生长因子- β (TGF- β) 超家族的一种新基因生长/转化因子-8 (GDF-8), 它仅在骨骼肌特异表达。完整的 GDF-8 cDNA 克隆, 包含一个长开放阅读框, 编码长 376 个氨基酸残基的蛋白质。预测的 GDF-8 氨基酸序列具有 TGF- β 超家族成员的所有标志特征, 包括分泌用信号序列、蛋白酶解加工位点及含有半胱氨酸残基保守结构的 C 端区域。GDF-8 cDNA 在 CHO 细胞表达研究表明, 它能被分泌到胞外并被酶解加工, 其 C 端通过形成二硫键组成二聚体。GDF-8 在不同物种间高度保守。基因组 DNA 印迹分析表明, 被检测的所有哺乳动物及禽类均发现有 GDF-8 的同源序列。

为了确定 GDF-8 的生物学功能, McPherron 等^[1]通过基因打靶定点突变小鼠 ES 细胞的 GDF-8 基因, 使其表达的蛋白质因缺失 C 端区域而失活。将这些转化的 ES 细胞重新植回小鼠胚胎, 获得来自 5 个独立 ES 细胞克隆的 GDF-8 突变嵌合体小鼠。这些嵌合体小鼠与 C57BL/6 小鼠交配的子一代为杂合体, 杂合体自交的子二代纯合体为 19%。GDF-8 突变的纯合体小鼠不仅可成活和生育, 并且其个体较同窝杂合体及野生型小鼠大 30% 左右。

进一步研究表明, 突变纯合体体重的增加是由于肌肉细胞的增生及部分肥大, 其肌肉的重量较野生型大 2~3 倍。GDF-8 突变后, 不同骨骼肌的重量增加幅度与其原有 GDF-8 表达水平基本一致。GDF-8 的生物学特性在某些方面类似于抗肥胖蛋白 (leptin), 其生理作用的分子机制尚待进一步阐明。由于 GDF-8 失活小鼠的表型及其表达的组织特异性, McPherron 等称 GDF-8 为肌肉抑制素 (myostatin, Mstn)。

2 肌肉加倍良种牛

肌肉加倍表型 (double-muscled phenotype) 在几种牛品系中均有发现, 并已引起牛生产者的足够重视。“比利时蓝”是最著名的肌肉加倍良种牛, 由于肌肉增生, 其骨骼肌重量较一般品种大 20% 左右。1997 年 Grobet 等^[2]依据小鼠 Mstn 基因 DNA 序列设计两对引物, 扩增牛 Mstn 基因的整个编码区及 76 bp 的 5' 非编码区和 83 bp 的 3' 非编码区。野生型牛 Mstn 基因 DNA 序列与小鼠在 1 128 bp 的编码区有 89.1% 的同源性, 预测的蛋白质序列与小鼠 Mstn 在 375 氨基酸残基中有 92.5% 的同源性。作为 TGF- β 超家族成员, 牛 Mstn 也具有蛋白酶解加工位点、C 端结构域及其 9 个半胱氨酸残基。“比利时蓝”良种牛 Mstn 基因 DNA 序列