

- gonadotropin production: its possible implication during pregnancy, including implantation period. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, **80** (4): 1449~ 1456
- 2 Bhatt H, Brunet L J, Stewart C L. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (24): 11408~ 11412
- 3 Laird S M, Tuckerman E M, Dalton C F, *et al.* The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod*, 1997, **12** (3): 569~ 574
- 4 Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, *et al.* Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod*, 1994, **50** (4): 882~ 887
- 5 Lavranos T C, Rathjen P D, Seamark R F. Trophic effects of myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos. *J Reprod Fertil*, 1995, **105** (2): 331~ 338
- 6 Sawai K, Matsuzaki N, Okada T, *et al.* Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor: regulation by decidual cytokines and steroid hormones. *Biol Reprod*, 1997, **56** (5): 1274~ 280
- 7 Harvey M B, Leco K J, Arcellana Panlilio M Y, *et al.* Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development*, 1995, **121** (4): 1005~ 1014
- 8 Arici A, Engin O, Attar E, *et al.* Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, **80** (6): 1908~ 1915
- 9 Bischof P, Haeggeli L, Campana A. Effect of leukemia inhibitory factor on cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol*, 1995, **34** (4): 225~ 230
- 10 Yang Z M, Le S P, Chen D B, *et al.* Expression patterns of leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) and the gp130 receptor component in rabbit uterus early pregnancy. *J Reprod Fertil*, 1995, **103** (2): 249~ 255
- 11 Yin T G, Yang Y C. Mitogen-activated protein kinase and ribosomal S6 protein kinase are involved in signaling pathways shared by interleukin 1, interleukin 6, leukemia inhibitory factor,

and oncostatin M in mouse 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, 1994, **269** (5): 3781~ 3788

- 12 Stewart C L, Kaspar P, Brunet L J, *et al.* Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 1992, **359** (6390): 76~ 79

Effects of Leukemia Inhibitory Factor on the Blastocyst Implantation. CAI Li-Quan, DUAN Er-Kui, ZHU Cheng (*State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

Abstract Leukemia inhibitory factor (LIF), mainly secreted by endometrium gland during peri-implantation, is a glycoprotein with pleiotrophic activity on a wide variety of cell types. The principal function of LIF *in vivo* may be to regulate the growth and to initiate implantation of blastocyst. LIF expression is under maternal control, which is influenced by steroid hormones and cytokines. Gp130, a signal transducer receptor component shared by the cytokines such as LIF, IL-6, OSM and CNTF, can convert the low affinity LIFR β into a high affinity form, and its homodimerization (in the case of IL-6) or heterodimerization (in the case of LIF, OSM and CNTF) can activate tyrosine kinases, which further regulate expression of target genes by some kinds of pathway.

Key words leukemia inhibitory factor, blastocyst implantation, gp130

分析基因表达图式的新方法

冯闻铮 曹竹安 刘进元¹⁾

(清华大学生命科学与工程研究院, 北京 100084)

摘要 随着基因组研究的深入进行, 基因的分子生物学除了要寻找在生物学上重要的个别基因并研究其结构与功能外, 更重要的应是了解整个基因组的功能活动, 即细胞全部基因的表达图式. 要解决如此复杂的问题就必须在研究方法上有所创新, 基因表达系列分析法、cDNA 微阵列分析法、DNA 微芯片分析法等正是近几年发展起来的分析基因表达图式的新方法.

关键词 基因表达图式, 基因表达系列分析法, cDNA 微阵列分析法, DNA 微芯片分析法

学科分类号 Q78

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-11-03, 修回日期: 1998-02-23

的总 mRNA 作模板, 加入 5' 端接有生物素的寡聚核苷酸 (dT) 引物, 反转录成 cDNA; 选用 4 碱基识别位点的限制性内切酶 (anchoring enzyme, AE) 切割 cDNA 并使生物素与链亲和素化小球结合, 以筛选 cDNA 文库中每一 cDNA 3' 端的一小段 DNA 片段. 然后将上述 cDNA 片段 1 分为 2, 分别与含有特定 II 型限制性核酸内切酶位点的 A, B 引物通过 AE 粘性末端结合, 再用识别同一 II 型识别位点的限制性内切酶 (tagging enzyme, TE) 在下游 10~20 bp 处切割, 形成平末端, 连接后用 PCR 进行扩增就可获得双探针的片段. 若用 AE 酶切去引物, 并把双探针相连, 形成 kb 级的片段. 克隆此片段并测序, 就能获得大量 cDNA 的短序列探针, 其中每两个探针尾尾相连, 两边有 AE 位点相隔. 对用上述方法制备的大量探针序列进行计算机分析, 就会得到某一特定探针在整个 cDNA 文库中出现的频率, 因为这一频率应与其所代表的 mRNA 在总 mRNA 中的出现频率相同, 从而可定量检测出细胞中特定基因的表达水平. 另一方面若某一探针在特定细胞基因表达图式中是重要且又是未知的, 因为 9~10 个 bp 的探针长度已给出了足量的信息来克隆新基因. 再有应用这些探针进行杂交可测出正常细胞与病变细胞基因表达图式的差异, 进而发展成对某疾病进行基因诊断的新方法^[3].

Velculescu 等^[4]应用 SAGE 技术对酵母基因组中的表达基因也即转录组 (transcriptome) 进行了分析, 在 60 633 转录产物中有 4 665 个基因, 其中有 1 981 个基因的功能是已知的, 而另有 2 184 个是未知的. 特定部位的基因表达信息不仅可以获得能分辨转录活性的物理区域的表达图谱, 也能鉴定出仅靠序列信息不能预测其功能的基因. 上述研究展示了对酵母的基因表达总图式进行分析的前景, 同时表明了用 SAGE 对真核全基因组进行表达图式研究的可行性. 另一方面的应用是对高等动物病变细胞和正常细胞间, 以及不同分化细胞间的基因表达总图式的差异分析^[5].

2 cDNA 微阵列荧光分析法

cDNA 微阵列荧光分析法简称微阵列法 (microarray)^[6], 其原理是对已知 cDNA 进行 PCR 扩增, 并分别等量转入微量滴定板的小孔内, 利用微量液体转移器, 将样品“转印”至玻璃板上, 经化学和热处理使样品中的 cDNA 附着于玻璃板表面

并使之变性, 制作成 cDNA 阵列杂交板. 从待检物中提取总 RNA, 单周期反向转录制备荧光探针 (可加入已知量的 mRNA 作内标), 将荧光标记的 cDNA 混合物与上述制成的 cDNA 阵列杂交板进行严格杂交, 然后用激光扫描记录荧光强度, 由于荧光标记的 cDNA 探针与阵列板中 cDNA 相比数量稀少, 不能产生饱和现象, 所以每一阵列点的荧光强度决定了相应基因的转录强度, 其结果应与 RNA 印迹结果相符. 若用于对同一基因的表达进行分析时, 可用两个不同来源的 mRNA 分别制作以不同荧光染料为标记的 cDNA 探针, 两者等量混合并与同一阵列杂交后, 分别扫描两种不同激发态的发光强度即可确知不同来源细胞的某一基因的转录水平, 能直观地反映出基因组中该基因的表达图谱. 若阵列板中包含的 cDNA 的数目接近整个基因组的表达基因数目, 那么杂交的结果就能反应出基因组全部基因的表达概貌. 目前阵列板可以容纳多至 2 万个 cDNA 探针. 由于其巨大的分析能力, 样品的用量极少, 使用简便, 还因具有可在同一杂交板上并在同一杂交反应中进行不同样品的比较等优点, 此法在临床检测与基因研究中具有广阔的应用前景^[6].

最近 Heller 等^[7]应用该技术对风湿性关节炎病变细胞与正常细胞间基因表达图式的差异进行了考察, 发现了一些与炎症相关的新基因, 并经对风湿性关节炎与炎性肠道疾患的组织比较确实了白细胞介素-3、趋化因子 Gr α -金属蛋白酶基质的胰肽酶与这两种疾病的新关系. 从这两种病症的末梢血库得出的信息也揭示了金属蛋白酶-1 的组织抑制物、铁蛋白的轻链和锰超氧化物歧化酶的基因表达具有显著性差异. 综上所述, cDNA 微阵列可以成为深入分析人类疾病的有效通用手段. 受 DNA 微阵列方法的启发, Chu 等^[8]1997 年新发展了免疫微阵列, 即以抗体代替寡核苷酸链制成的微阵列, 可以同时检测微量样品 (如一滴血) 中数百个不同的待测蛋白质组分的含量, 会在环境监测等方面具有广泛的应用前景.

3 DNA 微芯片法

杂交板上寡核苷酸探针制备的简单化、直接化、缩微化, 可使微阵列板“升级”为微芯片 (microchip), 这是用液体分配式探针固化法制作的 DNA 微芯片. 而当应用半导体工业中通用的光导合成法指导芯片上寡核苷酸的直接合成而产生的

DNA 微芯片那就是用原位光化学合成探针法制作的 DNA 微芯片^[9].

所谓光导合成法是指汞灯发出的光束首先通过计算机工业标准光导合成法的掩模, 再落到合成表面上, 其不同区域的光束强度可通过调节掩模相应位置的透光能力来实现, 从而可以分别控制合成表面任一区域的光照的强度. 当合成表面的特定区域被光激活后, 其可与预定的核苷酸 3' 端化学键合, 而其 5' 端由于具有保护基团, 防止了进一步反应的进行. 光照也可激活核苷酸使保护基团解离, 留下 5' 活泼的羟基以与其他核苷酸继续反应, 使键增长. 如此重复激活与反应的循环, 即可在特定区域合成特定的寡核苷酸链, 制成 DNA 微芯片^[9]. 目前应用液体分配式探针固化法制成的 DNA 微芯片可固化几十万个探针, 而用原位光化学合成探针法制作成的 DNA 微芯片在 1.6 cm² 面积上可排布百万个探针之多.

DNA 微芯片现在的应用主要集中于疾病诊断与基因分析两方面. 由于 DNA 测序与突变检测需考察基因序列上的每一核苷酸, 所以芯片设计时需对某一基因全序列的各核苷酸进行排列组合, 从而获得覆盖所有可能的系列化探针. 由于杂交与否或强弱取决于探针与靶序列的一致程度, 根据仅有一个位置有差别的四种探针的杂交强度对比, 可知此位置的核苷酸种类, 从而可以精确检测到单核苷酸的精度. 如果有突变发生, 则与非突变区域对应的探针会由于配对产生荧光增强; 而突变点对应的探针会由于结合力的减小而失去或减弱荧光信号, 形成一个“印迹”^[10, 11]. 而在基因表达检测与基因搜寻方面, 由于不涉及已有的完全精确序列的细节, 所以只需足够多寡核苷酸链头尾相连能够覆盖整个基因长度即可^[9]. Mirzabekov 实验室正是利用寡核苷酸链长为 10~12 的微芯片与具荧光标记的 DNA 杂交对 β -地中海贫血症的各种突变进行了探查^[12]. 由于双链的稳定性和 AT 含量会不同, 通过选择解链曲线中分辨能力强的温度, 可以提高杂交的专一性. 对同一样品进行两种不同荧光标记, 并与同一微芯片杂交, 在多波长荧光显微镜下平行检测两者的激发光强度即可以提高突变检测的精度^[12]. Guschin 等^[13]用与某类微生物的小亚基 rRNA 序列的互补序列为寡核苷酸探针, 所选择的群体包括了硝化细菌的主要种类, 可以很好的有选择的保留目标序列. 通过改变探针的量可以使信号强度处于检测范围内, 而且对标记的靶序列的选择性也极高.

利用多色荧光检测法表明了同时定量测定多个目标探针群体的可行性. 随着 DNA 芯片技术的不断成熟, 将在 DNA 的序列分析, 多态性分析, 基因表达图式分析, 药物开发等诸多领域得到广泛的应用.

随着越来越多的基因被定位, 越来越多的 DNA 序列被测定, 越来越多的基因组计划的完成, 毫无疑问将给人类提供研究生命奥秘的第一手资料, 同时也要求在研究方法上有重大突破. 上述方法学上的突破为分析基因组功能活动提供了条件, 同时预示着分子生物学的重点将从对个别基因的分析转移到对整个基因组功能的研究上来.

参 考 文 献

- 1 Morell V. Life's last domain. *Science*, 1996, **273**: 1043~ 4045
- 2 王亚辉 (Wang Y H). “后基因组时代”的生物学. *生命科学 (Chinese Bulletin of Life Sciences)*, 1997, **9** (4): 145~ 153
- 3 Velculescu V E, Zhang L, Vogelstein B, *et al.* Serial analysis of gene expression. *Science*, 1995, **270** (20): 484~ 487
- 4 Velculescu V E, Zhang L, Zhou W, *et al.* Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, 1997, **88** (2): 243~ 251
- 5 Sun Y P, Yolken R H. Serial analysis of gene expression of brain tissue from schizophrenia patient. *Schizophrenia Research*, 1997, **24** (1~ 2): 88~ 88
- 6 Schena M, Schalon D, Davis R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270** (20): 467~ 470
- 7 Heller R A, Schena M, Chai A, *et al.* Discovery and analysis of inflammatory disease related genes using cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (6): 2150~ 2155
- 8 Chu F W, Edwards P R, Ekins R P, *et al.* Microarray-based Immunoassays, *Acs Symposium series. Environmental Applications*. In: the 211th National Meeting of the American Chemical Society, Symposium on Immunochemical Technology for New Orleans, 1997, **657**: 170~ 184
- 9 Editors. To affinity... and beyond!. *Nature Genetics*, 1996, **14** (4): 367~ 370
- 10 Hacia J G, Brody L C, Chee M S, *et al.* Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two colour fluorescence analysis. *Nature Genetics*, 1996, **14** (4): 441~ 447
- 11 Ivanov I B, Yershow G M, barsky V E, *et al.* Identification of gene mutations on oligonucleotide microchips. *Molecular Biology*, 1997, **31** (1): 133~ 140
- 12 Drobyshev A, Mologina N, Shik V, *et al.* Sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchip identification of beta-thalassemia mutations. *Gene*, 1997, **188** (1): 45~ 52
- 13 Guschin D Y, Movarry B K, Proudnikov D, *et al.* Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63** (6): 2397~ 2402

Novel Methods of Gene Expression Pattern Analysis.

FENG Wen-Zheng, CAO Zhu-An, LIU Jin-Yuan

(School of Life Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China).

Abstract In the progress of the genome projects, the most important purpose of molecular biology of the gene is to investigate the structure and function of not only single important gene but also the whole genome, that is the gene transcription and expression patterns of the whole cell. In order to resolve such complex problem, revolutionary research methods

must be developed. Serial analysis of gene expression (SAGE), cDNA microarray, DNA microchip are the novel methods for fast and quantitative analysis of gene characteristics which are recently advanced in this background.

Key words gene expression patterns, serial analysis of gene expression (SAGE), cDNA microarray, DNA microchip

雄激素受体的作用机制

解 芳 刘 峻 张永莲

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 主要概述了雄激素受体的作用机制, 特别对影响雄激素受体特异性的因素进行探讨. 雄激素受体 (AR) 属于甾体激素受体超家族, 能通过配体依赖方式与特异的 DNA 序列结合, 调控基因转录.

关键词 雄激素受体, 应答元件, 转录调控, 专一性

学科分类号 Q71

雄激素可以扩散进入靶组织和非靶组织, 但它只在雄激素受体存在的靶组织细胞中行使其生物学功能. 象其他所有甾体激素受体一样, 雄激素受体也是一种转录因子, 它一旦被雄激素激活便能识别靶因子上专一的 DNA 序列并与之结合, 从而调控该基因的转录, 并表达新的蛋白质, 最终使得细胞的功能发生改变. 雄激素受体对其靶基因的调控具有高度的专一性, 这种专一性无法简单地用受体与特异 DNA 序列结合来解释, 本文将从受体表达的细胞特异性, 受体相对应的配体特异性分布, 辅助性顺式元件的参与, 辅激活因子 (coactivator) 的发现以及染色质结构等方面加以阐述.

1 雄激素受体 (AR) 的结构和功能

雄激素受体基因由 8 个外显子组成, 其编码的雄激素受体是一种核蛋白, 由 918 个氨基酸组成^[1]. AR 的基因及蛋白质的结构特征如图 1 所示. 外显子 1 最大, 编码受体的 N 端, N 端的残基最不保守. 结构分析表明, N 端结构域与 AR 的转录激活有关^[2]. 这个区域包含两种多聚体——多聚谷氨酸和多聚脯氨酸, 多聚氨基酸结构被认为在转录激活方面起重要作用^[3]. 外显子 2 和 3 编码

AR 的 DNA 结合结构域 (DBD), 该结构域高度保守, 由 68 个氨基酸组成, 能折叠成两个锌指结构. 外显子 4 至 8 编码受体的铰链区和配体结合结构域 (LBD), 该区域起着形成二聚体和结合配体的作用.

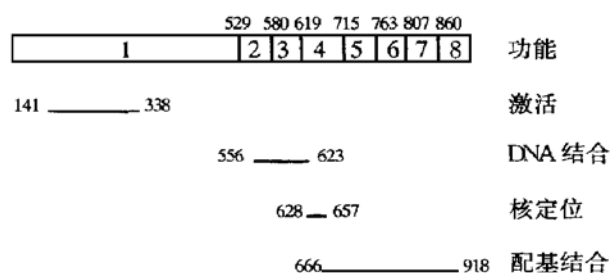


图 1 雄激素受体结构功能示意图

2 AR 的作用机制

2.1 AR 的活化与进核

AR 在胞浆中能与热休克蛋白 (Hsp) 结合, 当雄激素与 AR 结合后, AR 被激活, 热休克蛋白解离, AR 进入核中与 DNA 作用. 在过去 10 年中, 发现了许多核定位信号 (NLS) 与蛋白质的核定位有关^[4]. 该信号的一个共同特征是富含赖氨酸