

Paraoxonase in Human Serum. Wang Qingding, Sun Manji (*Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China*).

Abstract Paraoxonase can hydrolyzes paraoxon, the most highly toxic pesticide, and was paid good attention in recent decades, but there was no published report in our country. Its existence, substrate specificity, isolation, purification,

polymorphism, genetic properties, relations with some diseases, and its protection against organophosphorus compounds are introduced. It is beneficial for further studies of its biological properties, physiological function and application.

Key words paraoxonase, isolation, purification, substrate specificity, polymorphism

体外遗传学方法及应用

史国利 陈德凤

(南开大学分子生物学研究所, 天津 300071)

摘要 体外遗传学是利用核酸分子本身一定的表型(如结合、催化等)在试管中分离筛选特定核酸分子序列进行研究的方法。由于体外遗传学方法改变了自然界缓慢的进化过程, 使人为的进化得以简单地实现, 同时也使许多核酸功能区的识别和确定由被动变为主动, 为进一步探索基因的调控规律及主动地调节生化反应过程提供了有效的手段, 近年来体外遗传学方法及在分子生物学方面的应用得到了很大的发展。

关键词 体外遗传学, 离体筛选, 核酸序列, 应用

经典的遗传学研究是从活体的基因型变化研究表型的变化, 或者按相反的方式进行, 而许多核酸分子本身具有一定的表型(如与配体的结合特性, 催化特性等), 碱基序列的变化可导致核酸本身表型的变化, 体外遗传学(*in vitro genetics*)就是利用上述特点在试管中分离目标核酸分子序列并对其功能进行研究的新兴研究领域。

体外遗传学的概念是 Szostak^[1]在 1992 年提出的, 但有关的方法和研究在 80 年代末期已有报道, 如 1989 年 Kinzler 和 Vogelstein^[2]报道了用全基因组 PCR (whole genome PCR) 的方法筛选爪蟾转录因子 III A (TF III A) 特异性 DNA 结合位点, 同年 Oliphant 等^[3]用人工合成的随机寡核苷酸作随机序列库体外筛选了酵母转录活化蛋白 GCN4 的 DNA 结合位点。这是体外遗传学的初级形式。近年来体外遗传学有关方法和应用研究都有很大的发展, 本文

对此作了简要的综述。

1 体外遗传学方法

离体筛选和体外进化是目前体外遗传学研究的主要内容, 其主要模式是先根据研究目标建立随机序列库, 经多次体外筛选后, 得到所需的核酸序列, 再测定序列进行分析(图 1)。

筛选所用随机序列库可以是全细胞 DNA 文库, 亦可以是化学合成的带随机序列的 DNA 片段。早期的许多研究用 DNA 文库作随机序列库, 如 Kinzler 和 Vogelstein^[2,4]将人类淋巴细胞的全细胞 DNA 剪切成 200~300 bp 的片段, 再在片段两端连接两个 PCR 引物作为随机序列库分离选择出爪蟾转录因子 III A (TF III A) 特异性 DNA 结合位点的保守序列和 GLI 核蛋白的 DNA 结合序列。与细胞 DNA 文库不同, 化学合成的随机序列库是将

等摩尔或一定比例的四种碱基随机合成, 四种碱基可排列组合成大量序列不同片段, 由于化学合成的序列随机性大, 所含突变信息丰富, 而且片段大小一定, 在其两端可同时合成设定的引物序列及其他所需的特定序列, 使测序和筛选过程简便, 故在目前的研究中多被应用。

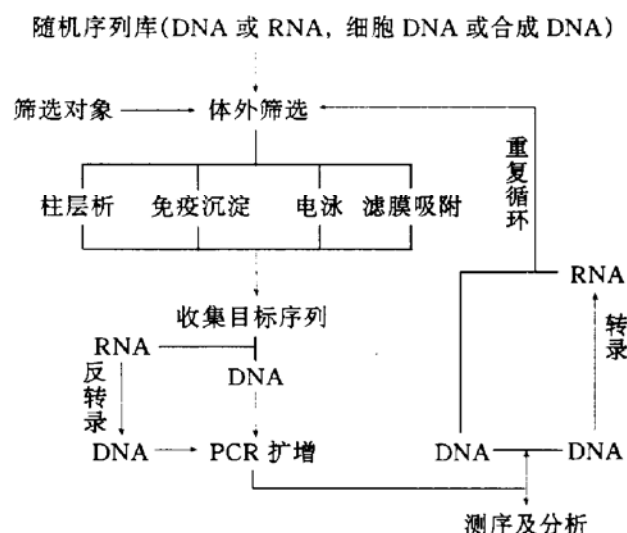


图1 体外筛选 (*in vitro* selection) 模式

与活性筛选不同, 体外筛选的过程主要利用特定序列的结合特性、催化特性及其他可分离性质而进行, 具体过程也随筛选对象的不同而异。目前筛选分离的方法大体有几类: a. 柱层析, b. 免疫沉淀, c. 电泳, d. 滤膜吸附。体外筛选需要经过多次重复过程完成, 每次筛选得到的序列都需要经过扩增, 所以随机序列的两端都连接有引物供 PCR 扩增, 而引物上也常设计有酶切位点供克隆用。筛选 RNA 序列时, 在随机序列的一端还连接转录启动子 (如 T7 启动子), 为转录启动所用, 每次筛选后 RNA 被反转录成 cDNA, 再 PCR 扩增, 进行下一轮循环选择。

随着体外遗传学方法应用范围的增加, 最近又发展了许多新的筛选方法。1994 年 Breaker 等^[5]报道通过 3SR 扩增 RNA 的方法离体进化噬菌体 T7、T3 和 SP6 RNA 聚合酶启动子, 基本原理是合成含取代噬菌体 RNA 聚合酶启动子保守序列的随机片段 DNA, 在

反转录酶的作用下延伸为含茎-环结构的 Filled-in DNA, 带有启动子的 DNA 可在噬菌体 T7、T3 以及 SP6 RNA 聚合酶的作用下转录成 RNA, 进一步扩增, 经几个循环后得到启动子的进化序列。

Jamieson 等^[6]发展了用离体进化和筛选改变转录因子 Zif268 的 DNA 结合特性的方法。该方法是用合成的带定点随机突变序列的 DNA 片段取代野生型转录因子 Zif268 关键结合部位基因序列, 从而改变结合部位氨基酸残基, 构建的突变 cDNA 被克隆于 pHGHamg3 噬菌体载体中并表达, 用特定的 DNA 片段对噬菌体颗粒进行体外筛选, 带有表达结合多肽基因的噬菌体颗粒被分离, 增殖后, 经重复筛选, 得到进化的转录因子。这种方法可对结合蛋白与 DNA 的识别规律进行分析。

2 体外遗传学的应用

体外遗传学目前主要应用以下几个方面:

2.1 转录调控蛋白识别位点进化及确定

研究转录调控蛋白的结合位点对研究基因的表达和调控具有重要意义。体外遗传学的一个重要应用是调节蛋白结合序列的进化和确定, 因为许多调控蛋白的结合序列是通过对少数基因的直接测序得到的, 对其普遍意义及结合规律需要进一步证实, 体外遗传学为此提供了一种简便的方法。如通过 DNA 测序得到的酵母转录活化蛋白 GCN4 的 DNA 结合区为 ATGA (C/G) TCAT, Oliphant 等^[3]用体外筛选的方法更精确地确定 TGA (C/G) TCA 为主要的识别序列。Blackwell 等^[7]对 bHLH 区 (basic-helix-loop-helix motif) 调节蛋白 MyoD 和 E2A 的 DNA 结合区离体筛选后发现, 其主要在 CA-TG 区结合, 但在核酸的侧端与中间区有所不同, 这两种蛋白是半位点识别。c-Myc 蛋白曾被认为在 DNA 上无确定的结合序列, Blackwell 等^[8]用离体筛选的方法得到了特异性的结合序列为 CACGTG。此外对爪蟾转录因子 III A (TF III A)、人细胞转录因子 SP1 蛋白、转录因子 SRF (serum response fac-

tor) 和 Fos 癌蛋白、噬菌体 T4 DNA 聚合酶等蛋白^[1]的核酸结合序列都有人作了进一步的研究。

应用体外遗传学方法也有人对未知结合序列的蛋白的结合序列进行分析。GLI 基因在人类肿瘤的形成中起重要作用, GLI 核蛋白具有五个锌指区, 但是否与 DNA 有特定的结合区一直未知, Kinzler 和 Vogelstein^[4]用体外筛选的方法确定了 GLI 蛋白的特定 DNA 结合序列。Bartel 等^[9]从 117 个碱基的随机片段库中离体筛选了 HIV 病毒 Rev 蛋白的 RNA 结合区, 发现结合区呈茎-环-茎结构, 而且环区为 G:G 型, 这种非 Watson-Crick 结构在 Rev 蛋白的离体结合和活体应答中都是必需的。

体外遗传学方法对调控蛋白特异性识别位点的确定也有助于调控机理的研究。视网膜神经胶质瘤蛋白 (RB) 能够调控细胞周期, 但对其如何调节开始并不清楚。Chittenden 等^[10]用结合细胞提取物的谷胱甘肽-S-转移酶与视网膜神经胶质瘤蛋白嵌合体从随机序列库中筛选特异性的 DNA 结合序列, 发现与某些调节蛋白的结合区相同, 而未结合细胞提取物的嵌合体则无特定的 DNA 结合序列, 故以此推断 RB 的调控是通过 T/E1A 连接区结合调节蛋白而进行的。

应用离体筛选方法可得到抑制调控蛋白的核酸序列。HIV-1 病毒的反转录酶 (RT) 在病毒的感染和繁殖中有重要作用, Tuerk 等^[11]从随机序列库中离体筛选了 RT 的 RNA 结合序列, 从中得到了一个可抑制 HIV 逆转录酶活性的序列片段。

2.2 特殊蛋白与核酸分子的作用

研究某些与转录调控无直接关系但与代谢有关的蛋白的核酸结合序列也有一定的意义。1992 年 Bock 等^[12]用合成的 96 个碱基的寡核苷酸链作随机序列库筛选到 32 个凝血酶的 DNA 适应子 (aptamers), 它们具有 14~17 个碱基的保守区, 其中几个适应子对凝血酶的活性有抑制作用, 这为药物选择增加了一条新途径。

此外, 体外遗传技术也被用来研究抗体与核酸之间的反应。一些自身免疫失调的疾病 (如系统性红斑狼疮), 病人血清中抗体往往与核酸反应, 研究其作用机理对治疗具有重要意义。1992 年 Tsai 等^[13]用合成的含 13 个氨基酸的多肽免疫制备的抗血清从合成的 RNA 随机库中筛选出 RNA 抗原决定簇 (epitope), 而且发现得到的 RNA 和多肽与抗血清具有同样的反应, 且相互竞争, 可作为抗原-抗体反应的特异性抑制剂。

2.3 小分子物质的核酸结合位点的确定

研究小分子物质 (如氨基酸、维生素等) 与核酸的结合对探讨分子识别规律、研究序列进化及核酶设计方法都有指导意义。体外遗传学方法为研究小分子与核酸之间的结合提供了有效手段。

Szostak 等^[14]是较早报道用体外筛选方法研究小分子与核酸之间结合的, 先后报道了用合成的寡核苷酸链作随机序列库筛选有机染料的 RNA 适应子和单链 DNA 适应子的方法。1994 年, Lorsch 等^[15]又从 5×10^{14} 个 RNA 随机序列库中经过 8 轮亲和色谱和酶学扩增筛选后得到 VB12 的 RNA 适应子, 并测定 RNA 适应子的序列及解离常数, 该研究为钴胺素依赖性核酶的离体进化及设计提供了出发点。此外也有人用体外筛选的方法对氨基酸的 RNA 结合序列进行研究^[16]。

2.4 核酶的选择及进化

新型高效核酶的筛选及核酶的进化也是体外遗传学方法应用的一个重要方面。Robertson 和 Joyce^[17]在 1990 年采用体外筛选的方法筛选到可切割单链 DNA 的四膜虫 I 型内含子核酶, 因为正常的四膜虫型核酶切割 DNA 需要较高的温度和较高的 Mg^{2+} 浓度, Beaudry 等^[18]又于 1992 年用体外筛选直接进化的方法得到了在生理条件切割活力较高的核酶。Szostak 研究小组^[19]也研究直接从大量的随机序列库中筛选新核酶的方法。最近 Schultz 等^[20]采用体外筛选的方法得到催化二苯桥键异构化的核酶, 这为新型核酶催化剂的研究开

辟新的思路.

3 体外遗传学展望

体外遗传学的兴起只有几年的时间,但已在分子生物学许多领域显示出强大的生命力,这是因为体外遗传学方法不仅改变了自然界缓慢的进化过程,使人为的进化得以简单地实现,同时也使许多核酸功能区的识别和确定由被动变为主动,为进一步探索基因的调控规律及主动地调节生化反应过程提供了有效的方法.此外,体外遗传学方法也为其构建自然界不存在的催化分子提供了可能性.相信随着人们对体外遗传学的了解,体外遗传学将在体外进化、药物筛选及新结合调控序列的发现等许多方面应用更加广泛.

参 考 文 献

- 1 Szostak J W. Trends Biochem Sci, 1992; 17: 89
- 2 Kinzler K W, Vogelstein B. Nucleic Acids Res, 1989; 17: 3645
- 3 Oliphant A R, Brandl C J, Struhl K. Mol Cell Biol, 1989; 9: 2944
- 4 Kinzler K W, Vogelstein B. Mol Cell Biol, 1990; 10: 634
- 5 Breaker R R, Banerji A, Joyce G F. Biochemistry, 1994; 33: 11980
- 6 Jamieson A C, Kim S-H, Well J A. Biochemistry, 1994; 33: 5689
- 7 Blackwell T K, Weintraub H. Science, 1990; 250: 1104
- 8 Blackwell T K, Kretzner L, Blackwood E M *et al.* Science, 1990; 250: 1149
- 9 Bartel D P, Zapp M L, Green M R *et al.* Cell, 1991; 67: 529
- 10 Chittenden T, Livingston D M, Kaellin W G. Cell, 1991;

65: 1073

- 11 Tuerk C, Macdougall S, Gold L. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 6988
- 12 Bock L C, Griffin L C, Latham J A *et al.* Nature, 1992; 355: 564
- 13 Tsai D E, Kenan D J, Keene J D. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 8864
- 14 Ellington A D, Szostak J W. Nature, 1992; 355: 850
- 15 Lorsch J R, Szostak J W. Biochemistry, 1994; 33: 973
- 16 Connell G J, Illangsekare M, Yarus M. Biochemistry, 1993; 32: 5497
- 17 Robertson D L, Joyce G F. Nature, 1990; 344: 467
- 18 Beaudry A A, Joyce G F. Science, 1992; 257: 635
- 19 Bartel D P, Szostak J W. Science, 1993; 261: 1411
- 20 Prudent J R, Uno T, Schultz P G. Science, 1994; 264: 1924

The Methods and Applications of *In Vitro* Genetics. Shi Guoli, Chen Defeng (*Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China*).

Abstract *In vitro* genetics is a method for isolating and studying functional nucleic acid molecules in test-tubes based on their special phenotypes (e. g. binding properties, catalytic properties). *In vitro* genetic provides an effective, active method for determinating and artificial evolution of nucleic acid function sequences, so it was widely used in investigating the regulation of gene expression and biochemical reaction. The progress of *in vitro* genetic methods and applications in recent years is reviewed.

Key words *in vitro* genetics, *in vitro* selection, nucleic acid sequences, application

参与细胞增殖调控的多功能分子 p21

孟祥兵 叶常青

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 p21是近年来发现的一类调控细胞增殖的小分子,是依赖周期素的CDK抑制因子.这些蛋白