

综述与专论

利用基因诱捕识别哺乳动物发育调控基因

曾祎青 孙方臻

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

摘要 ES细胞是一种来源于胚胎的多潜能细胞, 它可在体外培养并进行基因操作, 而且通过囊胚注射制作嵌合体的途径, 能将外源基因掺入小鼠的基因库中, 因此利用ES细胞可筛选出发生基因突变的小概率事件并获得其遗传突变体. 利用基因诱捕载体与ES细胞, 研究与哺乳动物发育调控有关的未知基因, 这一新技术将成为阐明胚胎发育过程中基因表达的时空格式的有效手段.

关键词 胚胎干细胞, 基因诱捕, 发育调控基因

胚胎发育的过程首先是基因以一定的时空顺序表达的过程. 迄今为止我们所了解的只是一些形态上的变化, 从单细胞的受精卵, 通过桑椹胚、囊胚、原肠胚及器官的发生等, 最后形成一个能独立生活的个体. 对于这些变化的分子基础, 即基因表达的时空调控机制了解甚少. 据有关专家估计, 与哺乳动物胚胎发育有关的基因有上万个, 至今已了解其结构与功能的发育基因寥寥无几^[1]. 基因诱捕载体与胚胎干细胞的结合, 成为识别和分离发育调控基因的有效手段.

1 基因诱捕的基本原理及其发展简介

基因诱捕是近几年来, 伴随着胚胎干细胞(ES细胞)的出现而建立的探测与哺乳动物发育有关的基因调控的新技术. 其基本原理是: 当一个完全或部分缺失转录调控元件的报告基因被导入细胞后, 其表达完全依赖于内源基因的顺式调节因子(cis-regulating elements). 所以, 在理论上可认为, 这种报告基因若整合到一个内源基因中, 它的表达格式就反映了内源基因的正常表达格式. 而且, 报告基因可作为寻找并克隆整合位点的内源基因的标记; 同时, 由于载体整合于基因内部而破坏了内源基

因, 因此产生了突变, 通过将携带该突变的ES细胞重新导入囊胚产生嵌合鼠以及近交纯合等手段, 就可研究该基因在发育中的功能.

用于研究哺乳动物发育调控的基因诱捕载体的原型是早期用于检测细菌操纵子的载体, 这种载体是将lacZ基因置于一转座子内构成. 载体上没有启动子元件, 所以报告基因的激活要求载体整合到一个转录单位中, 因此产生一新的融合转录产物. 由于转座子具有转座功能, 会不断产生新的插入突变^[2], 人们就可从大量的突变中筛选出插入了操纵子的突变类型.

80年代后期, 这种载体设计思想被引进果蝇发育遗传学的研究中. 在果蝇中主要使用增强子诱捕载体, 利用果蝇的P因子实现多处随机整合. 增强子诱捕载体带有一个小启动子, 但其本身不足以驱动报告基因的表达. 当载体整合到果蝇的基因组中, 这一小启动子可被整合位点内源基因的顺式调控元件激活表达. 利用这种载体研究果蝇发育中基因表达的时空格式及分离新的基因获得了巨大的成功^[2].

哺乳动物中没有可作为载体的转座子. 基因诱捕载体的成功整合, 要求载体以正确的方向及阅读框架插入内源基因中, 而且 lacZ 的产物—— β -半乳糖苷酶的活性能用组织化学染色的方法检测出来. 也就是说, 载体的成功整合受到整合位置、整合方向、阅读框架和检测水平四个条件的限制, 因此, 基因诱捕载体成功整合的几率很小. 由于缺乏适当的受体细胞, 这一研究方法一直未被引入哺乳动物发育调控的研究中. 1981 年 ES 细胞的发现^[3,4], 为哺乳动物基因诱捕的研究提供了理想的受体细胞. ES 细胞是一种能在体外培养并保持未分化状态的胚胎性多能干细胞, 当 ES 细胞被重新导入囊胚后, 能参与受体胚胎各组织器官的发育, 并可通过生殖系传递. 因此, ES 细胞可作为遗传载体, 将突变导入基因库中.

正是由于 ES 细胞具有可在体外培养这一特性, 使外源基因整合的小概率事件的筛选成为可能, ES 细胞也因此成为进行基因诱捕研究的理想的受体细胞. 1989 年, Gossler 等^[5]首次报道了利用基因诱捕载体, 通过 ES 细胞途径, 观察到小鼠胚胎发育过程中某些基因表达的时空格式. 从此, 基因诱捕载体与 ES 细胞途径相结合, 为多年来无从入手的哺乳动物胚胎发育中基因调控的研究打开了大门.

2 基因诱捕对研究发育调控基因意义

利用基因诱捕载体可以捕捉到新的与发育有关的未知基因, 这是以往用其他方法难以做到的. 过去为分离早期胚胎中的发育调节基因也做过不少的努力, 但是, 由于不能获得纯的细胞群体以及利用 RNA 分析系统只能研究表达水平较高的基因而受到极大的限制.

利用保守序列寻找不同物种中同源基因的方法也非常有效, 但只局限于已知的基因. 利用普通逆转录病毒感染胚胎或 ES 细胞, 也能发现新基因^[6]. 逆转录病毒是随机整合到染色体中的, 因此有可能在某些位点破坏内源基因, 从这样的胚胎或 ES 细胞产生的转基因动物若有异常表型, 即可通过分子克隆手段, 将

整合位点的内源基因克隆出来. 这个方法有两个缺点: a. 整合造成的基因突变必须在个体水平上有异常表型, 所以这一方法并未脱离传统遗传学的研究方式, 即: 利用已存在的或诱发的突变, 去研究基因型; b. 异常表型的筛选工作是在个体水平上进行的, 由于病毒的整合是随机的, 因插入突变而造成异常表型的概率很小, 因此必须有相当数量的个体才能观察到突变表型. 大量实验动物的饲养及研究范围局限于有表型的突变, 使这种发现新基因的方法受到极大的限制.

集分子生物学、组织培养学、胚胎操作及整体动物遗传学为一体的 ES 细胞研究系统, 克服了以上两个缺点, 为哺乳动物发育调控的研究开辟了新的途径.

基因诱捕是在 DNA 水平上进行的工作, 从理论上讲, 报告基因可被随机导入基因组中的所有位置. 如果报告基因的低水平表达能被检测出来, 而且这种表达不会对细胞产生正或负作用, 那么, 利用基因诱捕就可捕捉到大部分与发育有关的基因, 并在此基础上建立起发育调控的基因图谱.

3 基因诱捕载体的结构

3.1 基因诱捕载体的基本结构

基因诱捕载体的基本结构如图 1 所示, 主要包括: a. 报告基因 lacZ, b. 连接于 lacZ 5'

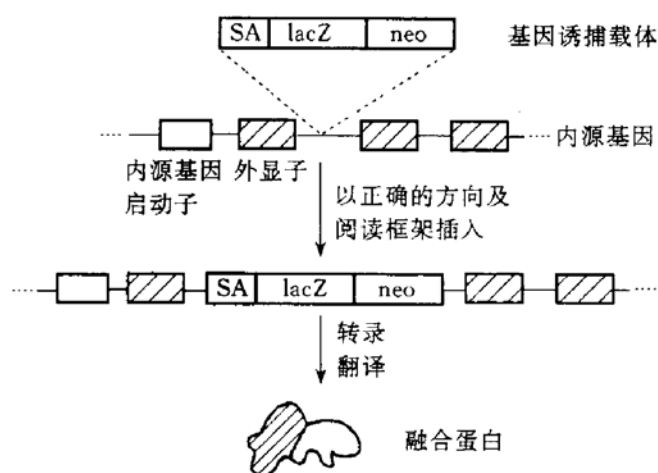
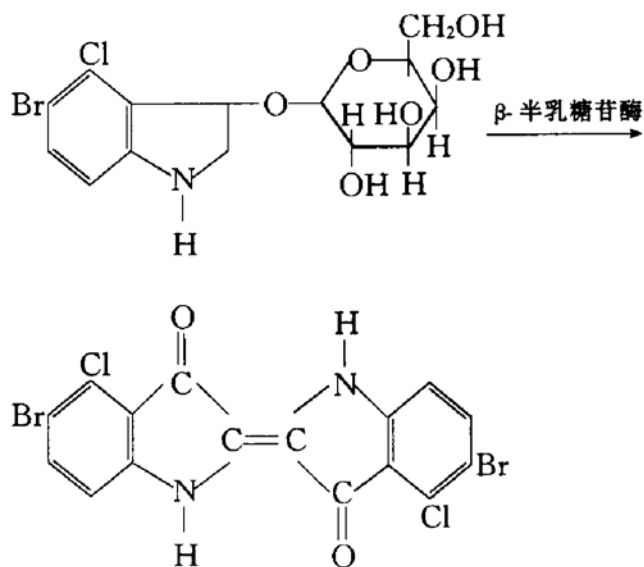


图 1 基因诱捕载体的基本结构及作用原理

端的剪接受体 (splice acceptor, SA 序列), c. 选择标记基因.

lacZ 是细菌中编码 β -半乳糖苷酶 (β -gal) 的基因, 它能在真核细胞中表达, 产物用简便的组织化学染色法即可检测到. β -gal 的一大特点是: 在其 N 端加上较长的肽链不会影响酶的活性^[7]. 基因诱捕载体正是利用这一特性, 使 lacZ 与内源基因形成融合产物后仍可被检测出来. β -gal 活性的检测非常简单: 底物 X-gal 在 β -gal 作用下, 水解出吲哚, 吲哚在空气中自发氧化成吲哚酚, 吲哚酚会自动聚合成二聚体, 呈靛蓝色. 反应式如下:



lacZ 基因前是一个剪接受体. 剪接所需的序列包括位于外显子/内含子交界处的剪接供体 (splice donor, SD 序列), 内含子/外显子交界处的 SA 序列及 SA 序列上游约 30 对碱基处的一个分支位点 (branch site). 所以, 基因诱捕载体上有分支位点及一个 SA 序列就足以实现剪接, SD 序列由整合位点 5' 端内源基因的外显子/内含子交界处提供^[8]. 不同基因的 SA 序列被用于基因诱捕载体, 虽然可能剪接效率会有所不同, 都获得了融合转录产物及有活性的 β -gal, 如 En-2^[5,9], c-fos^[8] 等, 这表明任何有功能的 SA 序列在基因诱捕载体中都能起作用.

哺乳动物细胞中可作为选择标记的基因有几个, 如: 新霉素磷酸转移酶基因 (neomycin

phosphotransferase gene, neo), 组氨醇脱氢酶基因 (histidinol dehydrogenase gene, hisD), 胸苷激酶基因 (thymidine kinase gene, tk), 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene, hprt) 等, 最常用的是 neo 和 hisD. 选择标记基因通常带有自己的启动子, 对其启动子的最低要求是: 能在靶细胞中驱动目的基因表达, 对报告基因和内源序列无调节作用 (尤其是增强子活性).

3.2 基因诱捕载体上的其他设计

3.2.1 “缓冲”序列: 在实验中, 人们发现用电激法导入 ES 细胞的线性 DNA 整合到基因组中后, 有相当一部分 DNA 丢失了两末端的侧序列^[10], 如 5' 端的 SA 序列, 3' 端的部分 neo 基因序列. 在基因诱捕载体中, 为防止 5' 端 SA 序列丢失, 可在 SA 序列前保留较长的内含子序列. 要注意的一点是: 缓冲序列中应该没有任何调节活性, 对报告基因的表达无任何调节作用.

3.2.2 辅助克隆序列: 利用基因诱捕载体捕捉到新的基因后, 必然要将其分离出来, 以进一步研究其结构和功能, 所以在载体上引入一些有助于在细菌中直接克隆基因的序列, 会使新基因的分离操作简便有效. 如果融合转录产物中的内源部分太小而不能直接分离 cDNA 或者要克隆整合位点时, 克隆辅助序列则非常有用. 常用的克隆辅助序列有: a. 与细菌抗抗菌素基因相连的质粒复制起始点; b. 琥珀突变抑制基因 (supF): 当一个质粒复制起始点和一个抗抗菌素基因插入载体中时, 整合位点的序列可通过质粒营救 (plasmid rescue) 克隆出来. 用内切酶消化基因组 DNA, 使产生包括复制起始点, 抗抗菌素基因及与其相连的基因组序列的 DNA 片段, 在适于分子内连接的条件下进行连接, 然后转化感受态细胞, 将获得携带部分诱捕载体及相应基因组序列的抗性克隆^[11]. supF 编码的细菌校正 tRNA, 可校正琥珀突变^[12]. 当载体上有 supF 基因时, 利用必需基因上有琥珀突变的 λ 载体进行克隆,

可选择出带有 supF 基因的 DNA 片段. 基因组 DNA 被消化后与 λ 载体相连接^[13], 并铺于 supF⁻ 受体菌上, 只有携带 supF 基因及侧序列的噬菌体才能生长. 当然, 琥珀突变的回复突变会导致一些假阳性.

4 基因诱捕的基本步骤

利用基因诱捕载体通过 ES 细胞途径研究哺乳动物发育调控基因及克隆新基因的程序, 基本上包括以下几个步骤:

a. ES 细胞的分离及培养; b. 基因诱捕载体的构建及扩增; c. 将载体导入 ES 细胞并筛选转化子; d. 用 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal) 染色检查表达 lacZ 的克隆; e. 通过囊胚注射将转化的 ES 细胞导入受体囊胚, 产生嵌合胚胎及转基因动物; 或与四倍体胚胎聚合, 制备纯粹由 ES 细胞来源的胚胎^[14]; f. 用 X-gal 染嵌合胚胎, 观察所捕捉到的基因表达的时空格式; g. 挑选有意义的 ES 细胞克隆进行分子水平的研究, 并从中克隆新的基因.

载体转化 ES 细胞后, 先用 G418 筛选出转化克隆, 然后在 ES 细胞水平或诱导分化状态下, 用 X-gal 检查 lacZ 基因的表达, 挑选出抗 G418 并表达 (或诱导分化后表达) lacZ 的 ES 细胞克隆进行囊胚注射, 在不同的发育时期分析嵌合胚胎中 lacZ 基因的表达. 1989 年, Gossler^[5]首次利用一个无启动子及 ATG 的基因诱捕载体转化 ES 细胞获得了满意的结果, 在 600 个抗 G418 的克隆中, 10 个表达

lacZ, 即成功整合率约为 1.7%; 其中 8 个克隆建成了系, 并进行了囊胚注射, 在发育的 9.5 d 和 12.5 d 分别取出嵌合胚胎, 分析 lacZ 的表达. 其中三个细胞系表现为连续表达, 四个细胞系表现出受发育调节的表达格式.

基因诱捕载体成功地整合到 ES 细胞中, 不仅导致 lacZ 的表达, 而且还造成插入突变. 通过近交使突变纯合, 就可研究隐性基因的功能. 这一点在 Friedrich 等^[15]的实验中充分体现出来, 他们先将获得的转基因雄鼠与野生型雌鼠交配, 取不同发育时期的胚胎检查 lacZ 的表达, 发现不同系之间 lacZ 的表达格式在时间及空间上不同. 为了确定是否存在与所诱捕的基因突变有关的隐性表型, 24 个系的杂合小鼠分别进行近交, 后代基因型用尾 DNA 的 DNA 印迹来确定. 其中有 9 个系没有得到纯合后代, 表明插入突变导致隐性致死表型. 余下的 15 个系中, 纯合动物形态及行为都正常, 表明用他们所设计的载体捕获的基因, 有相当一部分不是发育所必需的.

最近陆续发表了几篇文章, 报道利用基因诱捕已将一些内源基因的部分序列克隆出来. Skarnes 等^[9]对载体 pGT4.5 整合的三个细胞系作了进一步的研究, 克隆了三个细胞系中与诱捕载体相连的内源基因的 cDNA 序列, 通过序列测定证实了 SA 序列是有效的. 以克隆的 cDNA 片段作探针对正常胚胎进行原位杂交, 比较 lacZ 基因的表达格式与内源基因的表达格式. 正常胚胎的原位杂交结果与嵌合胚胎的染色结果极相似, 说明 lacZ 基因的表达能真

表 1 通过质粒营救克隆的内源基因的结构及表达的组织特异性^[10]

克隆	lacZ 的表达		所获得的 5' 端序列		表达的组织特异性	RNA 长度 /kb
	未分化	分化	长度/kb	启动子活性		
AYU-1	+	-	2.1	+	成年鼠脑, 十二指肠, 脾	10
AYU-2	+	+	1.2	+	几乎所有的成年组织	5
AYU-3	-	+	3.0	-	几乎所有的成年组织	1.8
AYU-6	+	-	0.6	+	只在未分化 ES 细胞中表达	2.5

注: lacZ 的表达用 X-gal 染色检查; 所获的 5' 端序列及与之相连的 lacZ 基因被重新导入 F9⁻tk⁻ 作短时表达, 3 d 后用 X-gal 染色, 检查所获的 5' 端序列是否具有启动子活性.

实地反映内源基因的表达格式。这是在胚胎学上所作的研究。Niwa 等^[10]在分子水平上作了详细的研究。载体导入 ES 细胞后, 通过质粒营救的方法, 克隆了部分内源基因序列, 对所获序列的结构作了详细分析, 并以这些序列为探针作 DNA 印迹, 检测该基因表达的组织特异性。结果见表 1。其中 AYU-1 基因在未分化细胞中表达水平极高, 在分化细胞中表达水平显著降低; AYU-3 正相反, 在未分化细胞中不表达, 在分化细胞中表达; AYU-2 在分化、未分化细胞及几乎所有的成年组织中都表达, 显然是一个看家基因。这些克隆都很有代表性, 说明基因诱捕法可成功地捕获与发育调控有关的未知基因。

5 载体的改进

以上所介绍的载体的结构是基因诱捕载体的通式。为了获得有功能的 β -gal, 基因诱捕载体不仅要以正确的方向整合到一基因内部, 而且 lacZ 基因与内源基因外显子序列的阅读框架必须一致。这些要求导致产生有功能 β -gal 的整合事件发生的频率极低, 在 ES 细胞水平上能表达 lacZ 的克隆一般不超过 2%^[8]。目前大多数的工作是用在 ES 细胞水平上表达, 或在体外诱导分化水平上表达 lacZ 的细胞系作基因诱捕工作。但是, 在 100 个细胞系中只获得一两个有用的细胞系是一件很繁琐的工作。为了提高有效整合的频率, 研究者对载体进行了一些改进, 虽然改进过的载体在进行基因诱捕时可能会有偏向, 但对早期基因诱捕工作还是很有帮助的。

5.1 在 lacZ 基因中加入一个 ATG 码

SA 序列的存在, 使诱捕载体有效整合的范围扩大到一个基因的内含子中。若 lacZ 基因前有一个能有效起始翻译的起始码, 当载体插入内源基因 5' 端非翻译外显子序列或紧跟在非翻译外显子后的内含子中时, 也能产生有功能的 β -gal。ATG 的存在将产生“蓝色”细胞克隆的频率提高 3~10 倍^[16]。不过在上述情况下产生的融合转录产物, 可能只包括一些

内源基因 5' 端非翻译序列的一些碱基, 因而不能直接在 cDNA 水平上克隆该基因, 此时, 克隆辅助序列将成为克隆基因组中该序列的有效手段。

5.2 报告基因与选择基因融合

利用 lacZ 与 neo 基因融合的载体, 可直接筛选表达 lacZ 的细胞。使用这些载体时, 只有当整合导致 lacZ/neo 融合基因的激活, 即同时产生有功能的 Neo 和 β -gal 蛋白, 细胞才能在药物筛选中存活。Friedrich 和 Soriano 构建了一个编码融合蛋白的新的报告基因 β -geo, 兼有 β -半乳糖苷酶及新霉素磷酸转移酶的活性, 该载体用电激法或逆转录病毒法导入 ES 细胞后, 并非所有的 G418^r 克隆都是 β -gal 阳性, 大约 95% 的抗 G418 克隆被 X-gal 染成蓝色, 说明抗 G418 所需的 Neo 蛋白可能比用染色法所能检测到的 β -gal 的蛋白少。以这些载体为基础的筛选排除了那些在胚胎干细胞中关闭的基因座位。

虽然 lacZ 基因的 3' 端对 β -gal 的活性是必需的^[17], 但在 3' 端的一个特殊位点与不同蛋白融合并不影响酶的活性, 因此, 可用 neo 等选择基因与 lacZ 融合, 产生具有双重功能的融合蛋白, 然而, Neo 蛋白的活性会因融合而受影响, 已有人证明 N 端较长的融合会导致 neo 基因产物酶活性发生显著变化^[18]。如果在某个特殊融合蛋白中, neo 基因产物的活性很低, 会导致所诱捕到的座位主要是高水平表达的基因。

5.3 删除 neo 基因 3' 端的 polyA 序列

许多真核基因的 3' 端都有一个加多聚腺苷酸的信号 (polyA addition signal), 转录出的 mRNA 带有一条 polyA 尾。人们认为 polyA 尾的存在与 mRNA 的稳定及翻译有关。目前所用的许多表达载体中都有加 polyA 信号。neo 基因的加 polyA 信号被删除后, 只能利用内源基因的加 polyA 信号进行表达。Niwa 等^[10]构建了一个由无启动子的 lacZ 及无加 polyA 信号的 neo 基因组成的诱捕载体, 实验表明这一设计对有效整合起一定的富集作用,

使有效整合对随机整合的比率提高了 5 倍。使用这种载体, 在发生两个以上拷贝整合时, 需要注意两点: 一是 neo 基因可能会利用 lacZ 基因的加 polyA 信号表达; 二是 lacZ 基因在 neo 基因的启动子控制下表达。实验结果发现前一种可能性是存在的, 而后一种情况未发生。当然, 如果控制单拷贝整合, 以上两种情况都不存在了。

5.4 用逆转录病毒作载体

逆转录病毒的感染率很高, 可达 100%, 控制病毒滴度可实现单拷贝整合。利用逆转录病毒作载体不会在整合位点发生重排, 而且病毒两端的 LTR 会保护 LTR 间的序列不会在整合过程中被删除, 因此, 有些实验者喜欢将诱捕载体置于逆转录病毒载体中进行基因诱捕研究^[15,19]。

载体的改进可提高工作的效率, 如果 lacZ 基因的表达能不受整合方向及阅读框架的限制, 将极大地提高捕捉基因的能力。用基因诱捕载体转化的 ES 细胞大多数不表达 lacZ, 其中有些细胞系有可能在诱导分化后或在发育过程中的某个时期表达, 也就是说, 载体所诱捕到的是在胚胎干细胞中沉默, 在发育过程中启动的基因座位, 这样的基因更有意义。ES 细胞在适当条件下进行体外分化这一特性, 可帮助我们预先筛选出可能在发育的某个时期表达 lacZ 的细胞系。

综上所述, 小鼠胚胎干细胞为探索哺乳动物发育调控的分子机理提供了一个理想的研究体系。ES 细胞作为载体, 可将其基因组上的人为改造和修饰导入小鼠基因库中。ES 细胞的体外培养和筛选为小概率事件的获得提供了方便。通过同源重组 (homologous recombination) 在小鼠基因组中制造定位改变的工作, 充分体现了 ES 细胞这一特点的优越性^[20]。

现在, 利用 ES 细胞进行基因诱捕, 成为继定位整合 (gene targeting) 之后 ES 细胞的又一极有特色的研究工作, 其优越性在于: a. 成功整合事件的筛选是在细胞水平上进行的; b. 成功整合发生的同时, 内源基因也被破坏,

即基因诱捕与功能测定一步完成; c. 捕捉基因并不要求载体插入所造成的突变一定要在个体水平上有异常表型; d. 新基因的发现并不依赖于转基因动物的获得。所以说, ES 细胞中的基因诱捕工作具有广阔的前景, 也许在不久的将来, 正是通过这条途径, 绘制出一幅哺乳动物胚胎发育过程中基因表达与调控的图谱。

致谢 感谢北京大学吴鹤龄教授、中国科学院发育生物学研究所郑瑞珍研究员对本文所提的宝贵意见。

参 考 文 献

- 1 Wolpert L. *Science*, 1994; **266**: 571
- 2 Skarnes W C. *Bio/Tech*, 1990; **8**: 827
- 3 Evans M J, Kaufman M H. *Nature*, 1981; **292**: 154
- 4 Martin G R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; **78**: 7634
- 5 Gossler A, Joyner A L, Rossant J *et al.* *Science*, 1989; **244**: 463
- 6 Zhou X, Sasaki H, Lowe L *et al.* *Nature*, 1993; **361**: 543
- 7 曾祎青, 吴鹤龄. *生物工程进展*, 1992; **12** (3): 6
- 8 Gossler A, Zachgo J. In: Joyner A L ed. *Gene Targeting, a practical approach*, Oxford: Oxford University Press, 1993: 181
- 9 Skarnes W C, Auerbach B A, Joyner A L. *Genes Dev*, 1992; **6**: 903
- 10 Niwa H, Araki K, Kimura S *et al.* *J Biochem*, 1993; **113**: 343
- 11 Wilson C, Kurth Pearson R, Bellen H J *et al.* *Genes Dev*, 1989; **3**: 1301
- 12 Seed B. *Nucleic Acids Res*, 1983; **11**: 2427
- 13 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 2.55~2.59
- 14 Nagy A, Gocza E, Diaz E M *et al.* *Development*, 1990; **110**: 815
- 15 Friedrich G, Soriano P. *Genes Dev*, 1991; **5**: 1513
- 16 Brenner D G, Lin-Chao S, Cohen S N. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 5517
- 17 Ruther U, Muller-Hill B. *EMBO J*, 1983; **2**: 1791
- 18 Reiss B, Sprengel R, Schaller H. *EMBO J*, 1984; **3**: 3317
- 19 von Melchner H, DeGregori J V, Rayburn H *et al.* *Genes Dev*, 1992; **6**: 919
- 20 刘爱民, 尚克刚. *生物工程进展*, 1991; **11** (3): 20

Using Gene Trap Screen to Identify Developmentally Regulated Genes in Mammals. Zeng Yiqing, Sun Fangzhen (*Institute of Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

Abstract ES cells are early embryo-derived multipotential cells that can be genetically manipulated in tissue culture. Thus genetic modification can be introduced into the gene pool by injecting transfected ES cells into blastocysts. The unique advantage that ES cells offer is that

they can be screened in culture for rare genetic events prior to germline transmission and the desired genetic mutant can be produced. Recently, genes which are involved in mouse development can be identified using gene trap vectors in combination with ES cells. This new approach is very efficient for studying gene expression pattern during embryogenesis.

Key words ES cells, gene trap, developmentally regulated genes

多肽生长因子受体的研究进展

龙建银 王会信

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 多肽生长因子受体是介导多肽生长因子对细胞的调控作用的膜结合糖蛋白。它们在结构上都可分成胞外区、跨膜区和胞内区三个区段。根据这些区域的结构特点, 特别是有无蛋白激酶结构域, 提出了新的分类方法; 并比较了各类生长因子受体信号转导的异同。

关键词 多肽生长因子受体, 结构, 分类, 信号转导

目前倾向于将细胞因子 (cytokine)、白细胞介素 (interleukin)、集落刺激因子 (clonystimulating factor) 等对细胞的生长增殖、分化具有调控作用的多肽, 统称为多肽生长因子^[1]。多肽生长因子受体是介导这些因子对细胞作用的关键成分。近年来基因克隆、定点突变和细胞转染等分子生物学技术手段的引入, 使得生长因子受体的研究取得了迅猛的发展。目前已经完成了 90 多种生长因子受体的分子克隆工作。

所有的多肽生长因子受体都是膜结合的 I 型糖蛋白, 它们在结构上可分成胞外的配体结合区、疏水氨基酸组成的单个跨膜区和胞内功能区; 近年来在胞内靠近跨膜区一侧, 又提出了近膜区这一概念。这些区域不同的结构特征是进行受体分类的依据。根据胞内是否含有蛋白激酶结构域, 我们将多肽生长因子受体分成

胞内含有蛋白激酶结构域的受体和胞内不含蛋白激酶结构域的受体两大类^[2]; 并进一步分成如下四类: 酪氨酸蛋白激酶型受体、丝/苏氨酸蛋白激酶型受体、造血受体超家族和 TNF 受体家族。下面按照上述分类, 对近几年来多肽生长因子受体的结构、功能的研究进展作一综述。

1 酪氨酸蛋白激酶型受体

这是最早被认识的多肽生长因子受体家族。目前已在哺乳动物中发现了 50 多种酪氨酸蛋白激酶 (TK) 受体, 除了一些生长因子如 EGF、FGF、NGF、PDGF 等的膜受体外, 还有一些结构类似的原癌蛋白。胞外配体结合区的不同特点, 使得它们分属于至少 14 种不