

2.5 底物酯的碳链长对酶促转酯反应的影响

底物酯的碳链长短对 L-1754 促转酯反应有显著的影响 (表 3)。丁酸乙酯为酰基供体时的转化率高于丙酸乙酯为酰基供体时的转化率。这是因为, 随着脂肪酸酯碳链的加长, 其疏水性增大, 故与脂肪酶疏水性活性中心之间的亲和力增大, 导致酶促反应速度的提高。然而随着碳链的进一步加长, 酶促反应速度下降。这是酶促反应的空间障碍随着底物分子碳链加长而增大的结果。

表 3 底物酯的碳链长对酶促转酯反应的影响

底物	转化率/%			
	丙酸乙酯	丁酸乙酯	戊酸乙酯	己酸乙酯
(±)-1-三甲基硅烷基-1-丙醇	23.0	34.0	14.5	10.0
(±)-1-三甲基硅烷基-2-丙醇	11.0	15.2	4.5	2.1

介质: 水饱和正辛烷; 反应时间: 48 h.

参 考 文 献

- Colvin E W. Silicon Reagents in Organic Synthesis. New York: Academic press, 1988. 1~5
- Tacke R, Zilch H. Sila-substitutions—a useful strategy for drug design. Endeavour, New Series, 1986, 10 (4): 191~197
- Zong M H, Fukui T, Kawamoto T, *et al.* Bioconversion of organosilicon compounds by horse liver alcohol dehydrogenase: The role of the silicon atom in enzymatic reactions. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 36 (1): 40~43
- Fukui T, Zong M H, Kawamoto T, *et al.* Kinetic resolution of organosilicon compounds by stereoselective dehydrogenation with horse liver alcohol dehydrogenase. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 38 (2): 209~213
- Uejima A, Fukui T, Fukusaki E, *et al.* Efficient kinetic resolu-

tion of organosilicon compounds by stereoselective esterification with hydrolases in organic solvent. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 38 (4): 482~486

- Tanaka A, Fukui T, Zong M H, *et al.* Bioconversion of nonnatural organic compounds: esterification and dehydrogenation of organosilicon compounds. Ann N Y Acad Sci, 1992, 672: 431~435
- Fukui T, Kawamoto T, Tanaka A. Enzymatic preparation of optically active silyl-methanol derivatives having a stereogenic silicon atom by hydrolase-catalyzed enantioselective esterification. Tetrahedron: Asymmetry, 1994, 5 (1): 73~82
- 邱树毅, 姚汝华, 宗敏华 (Qiu S Y, Yao R H, Zong M H). 固定化脂肪酶催化有机硅烷醇的酯化反应. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1996, 23 (4): 369~372
- Lanne C, Boeren S, Vos K, *et al.* Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol Bioeng, 1987, 30 (1): 81~87

Transesterification of Organosilyl Alcohol Catalyzed by Lipase in Organic Phase. ZONG Min-Hua, CHENG Qian, LIN Ying (Department of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China).

Abstract Transesterification of non-natural trimethylsilyl alcohol with fatty ester in organic phase could be catalyzed by lipase from *Candida cylindracea*. The transesterification reaction was apparently affected by the hydrophobicity of reaction medium, the water activity of the reaction system and the structure of the substrates. n-Octane was found to be the best medium for the reaction and the optimum water activity for the reaction is about 0.55.

Key words organic phase, lipase, organosilyl alcohol, transesterification

RNA 的错误剪接影响转基因的表达

卢一凡 田 毅¹⁾ 邓继先 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 利用 PCR 扩增方法获得 1.5 kb 人粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 基因组基因, 将其受控于 2.6 kb 的鼠乳清蛋白 (WAP) 基因的启动子下, 构建成乳腺表达载体。通过显微注射方法建立转基因鼠, PCR 及 DNA 印迹鉴定证实获得两只转基因阳性鼠。在其乳腺表达出极低的 G-CSF。为探讨低表达的原因, 采用 RT-PCR 方法, 从转基因鼠乳腺获得 G-CSF cDNA, 序列分析表明, 其 RNA 剪接出现错误, 将其第四外显子识别为内含子, 由此导致其低水平表达。

关键词 转基因鼠, 低表达, 粒细胞集落刺激因子, RNA 剪接

学科分类号 Q78

¹⁾中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100071. 收稿日期: 1998-02-23, 修回日期: 1998-06-05

利用转基因动物乳腺生产重组蛋白质, 在研究小鼠模型基础上, 1990 年, 生产人 α -抗胰蛋白酶的转基因羊在英国诞生, 乳中蛋白质的表达水平已达 30 g/L, 迄今已稳定遗传三代, 现已进入临床实验^[1]. 对于产奶量极高的动物来说, 从其乳中获取重组蛋白, 获益是相当巨大的. 目前利用转基因动物做为生物反应器生产重组蛋白已引起广泛兴趣, 许多模型已相继建立, 展示出良好前景. 但同时许多基础理论问题仍在深入研究, 在众多的报道中, 低表达是目前所面临的一个主要问题^[2]. 我们在所建立的转基因鼠乳腺表达人 G-CSF 中, 所获得的表达水平很低. 通过逆转录 PCR 方法, 从转基因鼠乳腺获得 G-CSF cDNA, 发现 RNA 剪接出现错误. 这一发现为研究转基因低表达机理提供了资料.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种: 宿主菌 JM103, pUC 19 质粒, 为本室保存. 含有鼠乳清酸蛋白 (whey acid protein, WAP) 全长基因组 DNA 质粒 pWAP-4 由作者自行亚克隆. 含有人集落刺激因子 (human granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) cDNA 的质粒 pC16 为本室保存.

1.1.2 限制性内切酶及主要化学试剂: 限制性内切酶, T4 连接酶等均购于中国华美生物工程公司及 Promega 公司. Vent DNA 聚合酶购于 Biolabs 公司. 化学试剂: 60% 乳酸钠, 透明质酸酶, 丙酮酸钠等均购自美国 Sigma 公司; 其他均为国产分析纯试剂; 孕马血清促性腺激素 (PMSG) 购于天津实验动物中心; 人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 购自上海生物制药厂, Fluorescein 12-dUTP 标记和检测试剂盒购于杜邦公司 (美国).

1.1.3 实验动物: 昆明小白鼠和昆明小鼠与 C57XBL 杂交鼠, 购自本院实验动物中心.

1.1.4 主要实验仪器: 倒置相差显微镜 (日本尼康公司), 显微操作仪 (日本岛津公司), 拉针仪 (日本岛津公司), 解剖显微镜, 二氧化碳培养箱 (NAPCO), 常规手术器械, MiniCyclerTM 仪.

1.2 实验方法

1.2.1 质粒 DNA 及人染色体总 DNA 的提取、感受态的制备、DNA 的连接、转化、DNA 片段的回收, 按照分子克隆手册进行^[3]. 序列分析按试剂盒说明书进行.

1.2.2 Fluorescein 12-dUTP 标记 G-CSF cDNA 探针, 操作按说明书进行.

1.2.3 基因组 G-CSF 基因的获得: 参考发表基因组 G-CSF 基因序列^[4], 设计一对引物. 引物 1: 5'-CCATGGCTGGACCTGCCACCCAGAG-3', 引物 2: 5'-ACGCTCAGGGCTGGGCAAGGTGGCG-3'. 以正常中国人脐带血提取的染色体 DNA 为模板, 采用 Vent DNA 聚合酶, 按如下条件进行扩增, 94℃ 变性 1 min, 68℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 反应进行 40 循环, 72℃ 保温 10 min. 取 10 μ l PCR 扩增产物电泳检查.

1.3 转基因实验方法

1.3.1 M2 及 M16 培养液的配制, 超排卵与取卵, 受精卵的显微注射及输卵管移植按文献 [5] 进行.

1.3.2 转基因鼠的检测及 DNA 印迹鉴定转基因阳性鼠按文献 [3]. 在 WAP 基因的调控序列 - 70 bp 处合成第一条引物为 5'-ATCTAGAGCTGTGCCAGCCTCT-3', 反向引物为 3'-CGCTACCGCGTCGCGAGGTCCTCT-5', 是在 G-CSF 基因第二个外显子上合成一段序列. 两条引物间距 447 bp. PCR 筛选转基因鼠的循环条件为: 94℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 72℃ 保温 10 min, 反应进行 30 循环.

1.3.3 乳腺总 RNA 的提取: 采用酚/氯仿一步法^[6]. RT-PCR 逆转录以 PCR 扩增 G-CSF 基因组基因第二条引物进行 cDNA 合成, 条件为 42℃, 1 h. PCR 条件为 94℃ 50 s, 58℃ 50 s, 72℃ 1 h, 反应进行 35 循环.

1.3.4 乳中 G-CSF 的检测: 按试剂说明书进行 (购于华美公司).

2 结 果

2.1 人 G-CSF 转基因小鼠的建立及表达

利用从脐带血提取人总 DNA 为模板, 通过 PCR 方法获得 1.5 kb 的中国人 G-CSF 基因组基因. 将其克隆至 pUC19 的 *Sma* I 位点, 命名为 pGG-2. 序列分析 (图略) 表明与国外发表序列一致. 将其克隆于 pWAP-4, 使其受控于 2.6 kb 的小鼠乳清酸蛋白基因的调控序列下, 所构建的用于显微注射的基因构件 pWGG 如图 1.

用 *Eco*RI 酶切 pWGG, 回收 8.7 kb 片段, 以显微注射法将其导入小鼠受精卵雄原核中, 先后注射 1200 余枚受精卵, 将其移植到假孕小鼠的输卵管内, 22 只受孕, 足月后共产生 85 只仔鼠. 存活

61 只. 从小鼠尾组织中提取基因组 DNA 做 PCR 检测, 获得两只阳性鼠, 经 DNA 印迹分析, 证实为整合人 G-CSF 基因, 出生鼠整合率为 3.27%. PCR 结果及 DNA 印迹结果见图 2 和图 3.

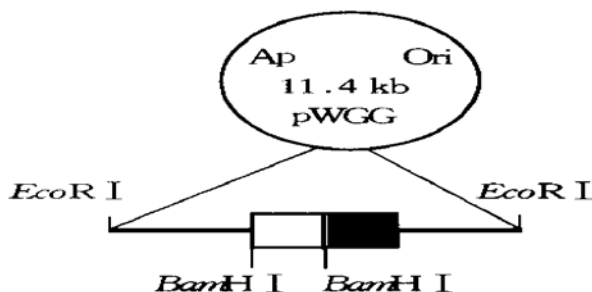


图 1 显微注射的基因构件

□: 人 G-CSF 基因; ■: WAP 结构基因;
—: WAP 基因的 5' 和 3' 区.

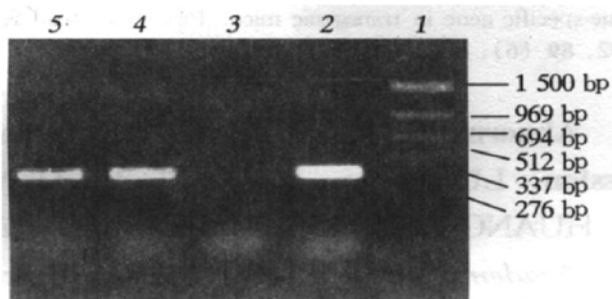


图 2 人 G-CSF 转基因鼠的 PCR 筛选

1: PCR 分子质量标记; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照;
4: 阳性转基因鼠; 5: 阳性转基因鼠.

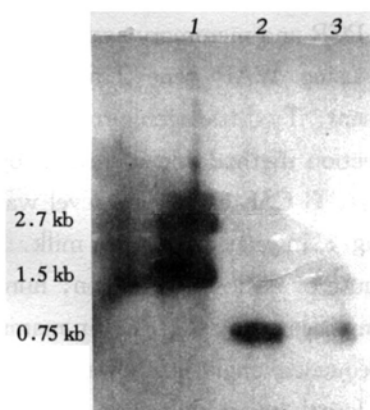


图 3 转基因鼠的 DNA 印迹鉴定

1: 阳性对照; 2: 阳性转基因鼠; 3: 阳性转基因鼠.

在对这些鼠进行繁殖传代的基础上, 经 PCR 检测确定出转基因稳定遗传的鼠, 对雌性鼠进行了表达分析, 乳汁经 ELISA 检测, 证明在 1、3 号转基因鼠中检测出人 G-CSF 的表达, 表达量较低为 120~250 $\mu\text{g/L}$. 为了研究这些鼠的低表达的原因, 我们从 RNA 水平进行了探讨.

2.2 RNA 错误剪接的鉴定

提取转基因鼠乳腺总 RNA, 经 RT-PCR 方法获得转基因的 G-CSF cDNA, 克隆于 pGEM 载体. 发现所获得 cDNA 比人 G-CSF cDNA 少一段序列 (图 4). 序列分析表明 G-CSF 第四外显子缺失 (图 5). 从序列分析看出, 所缺失的部分与发表的人 G-CSF 基因组基因比较在第三外显子末端及第四外显子前存在有内含子剪接的受体和供体位点.

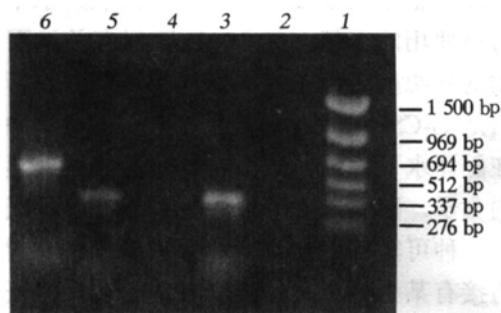


图 4 RT-PCR 扩增人 G-CSF

1: PCR 分子质量标准; 2: 阴性对照; 3, 5: RT-PCR 扩增结果; 4: 阴性结果; 6: 质粒为模板 G-CSF cDNA 的 PCR 扩增.

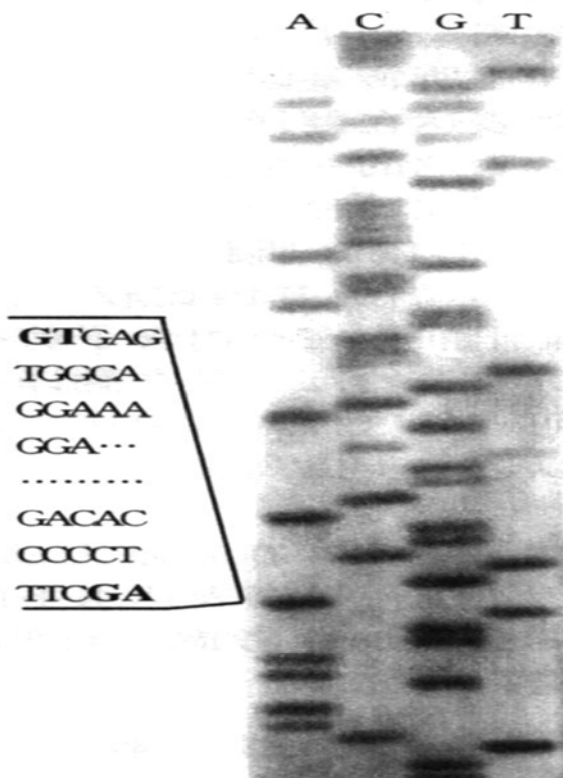


图 5 RT-PCR 结果序列分析

标出的序列为缺失的 G-CSF 第三、第四内含子及第四外显子位置, GT 和 AG 为剪接的供体和受体位点.

3 讨 论

外源基因在转基因动物中的低水平表达一直是研究的热点。目前已提出通过添加内含子,共注射其他基因构件^[2],以及在基因的构件中加入鸡溶菌酶 A 元件 (MAR) 来提高转基因的表达^[7,8]。虽然如此,由于转基因在动物体内的随机整合,仍使转基因的表达呈现不可预测性。如何克服这一难点,在随机整合的基础上尽可能提高表达水平,这不仅与所使用的构件,如 MAR 序列有关,而且与所使用的外源基因种类有关。在本试验中,所使用的基因是 G-CSF 基因组基因,在转基因鼠中,其表达在翻译水平发生错误剪接,将其第四外显子识别为内含子。因此导致其低水平表达。这种低水平表达,一种可能的解释是机体在极低水平下对这种错误剪接有某种微小的修复,故能检查出极低的人 G-CSF。与人体相比较,人 G-CSF 在转基因鼠内的异常剪接可归因于物种在长期进化中所形成的对外来基因的不相容性,也可能是转基因的随机整合,激活整合位点侧翼某些序列或转录因子,从而导致 G-CSF 的异常剪接。

目前在转基因动物中所遇到的低表达问题,往往将其简单地归于所转基因在宿主染色体内的随机整合。而转基因表达在翻译水平发生错误剪接可能是导致转基因低表达的一个重要因素。本实验的结果表明,外源基因在转移的过程中,并未发生异常的突变和缺失。RT-PCR 所获得的 G-CSF cDNA 与发表的人 G-CSF 基因组基因比较,在第三外显子末端及第四外显子前存在有内含子剪接的受体和供体位点,说明所缺失的部分是在翻译水平上异常剪接造成的。如何避免这种异常剪接,在基因的构建上深入研究,以进一步提高表达水平是值得研究的课题。

本研究的结果证实,在转基因动物的建立中,在利用现有的理论进行提高表达水平的同时,也应对所转移基因的种类加以考虑,对低表达的结果,应在翻译水平进行研究。

参 考 文 献

- 1 Carver A S, Dalrymple M A, Wright G, *et al.* Transgenic Livestock as bioreactors: stable expression of human alpha-1-

antitrypsin by a flock of sheep. *Bio/Technology*, 1993, **11** (4): 1263~ 1270

- 2 Clark A J, Cowper A, Wallace R, *et al.* Rescuing transgene expression by co-integration. *Bio/Technology*, 1992, **10** (2): 1450~ 1454
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Manatis T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 363~ 372
- 4 Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, *et al.* The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. *EMBO J*, 1986, **3** (3): 575~ 581
- 5 Hogan B, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986. 341~ 353
- 6 Chomozyski P, Sachi N. Single step of RNA isolation by guanidium thocyanate phenol chloroform Extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (2): 125~ 126
- 7 Bonifer C, Hecht A, Saueressing H, *et al.* Dynamic chromatin: the regulatory domain organization of eukaryotic gene loci. *J Cell Biochem*, 1991, **47** (1): 99~ 108
- 8 McKnight R A, Sanmay A, Sankaran L, *et al.* Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (6): 6943~ 6947

RNA Abnormal Splice Affects Transgenic Expression. LU Yi-Fan, TIAN Chai¹⁾, DENG Ji-Xian, HUANG Pei-Tang (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medicine Science, Beijing 100071, China;* ¹⁾ *Cardiovascular Institute, Chinese Academy of Medicine Science, Beijing 100037, China*).

Abstract Human G-CSF genomic DNA was obtained by PCR and mammary expression vector was constructed using WAP gene 2.6 kb promoter as control element. Two transgenic mice were produced by microinjection method and identified by PCR and Southern blot. G-CSF expression level was as low as 120~ 250 µg/L in transgenic mice milk. In order to study the cause of its low expression, human G-CSF gene was amplified by RT-PCR in mammary gland of mice. Sequence analysis showed that this gene missed the fourth exon that was recognised as the intron due to RNA abnormal splice. It is possible that RNA abnormal splice lead to low expression in transgenic mice.

Key words transgenic mice, low expression, human granulocyte colony-stimulating factor, RNA splice