

立仍需作很多的研究。

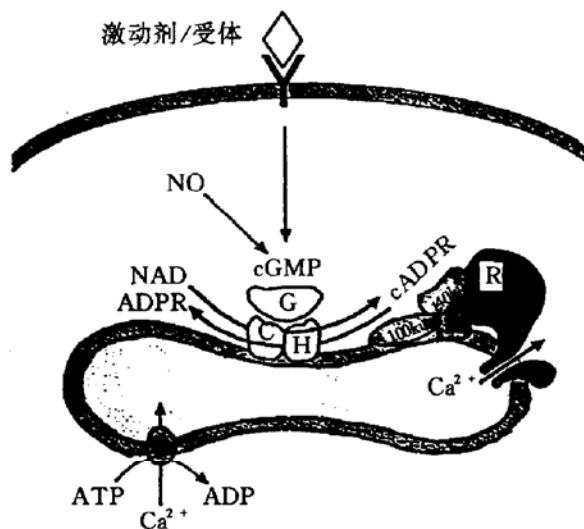


图3 cADPR敏感的胞内钙释放系统的可能模型和细胞内可能存在的新信号途径^[3]

NAD: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; ADPR: 二磷酸腺苷核糖; NO: 一氧化氮; cADPR: 环化二磷酸腺苷核糖; cGMP: 环化鸟苷酸; G: 环化鸟苷酸依赖的蛋白激酶; C: 二磷酸腺苷核糖环化酶; H: 环化二磷酸腺苷核糖水解酶; R: Ryanodine 受体或类 Ryanodine 受体/钙离子通道。

参 考 文 献

- 1 Henzi V, MacDermott A B. Neuroscience, 1992; 46: 251
- 2 Berridge M J. Nature, 1993; 361: 315
- 3 Lee H C, Galione A, Walseth T F. In: Litwack G ed. Vitamins and hormones, Orlando, Florida: Academic Press, 1994; 48: 199
- 4 Clapper D L, Walseth T F, Dargie P J *et al.* J Biol Chem, 1987; 262: 9561
- 5 Lee H C. News Physiol Sci, 1994; 9: 134

- 6 Galione A, Lee H C, Busa W B. Science, 1991; 253: 1143
- 7 Lee H C. J Biol Chem, 1993; 268: 293
- 8 McPerson S M, McPerson P S, Mathews L *et al.* J Cell Biol, 1992; 116: 1111
- 9 Lee H C, Aarhus R, Graeff R *et al.* Nature, 1994; 370: 307

Cyclic ADP-Ribose and Its Calcium Mobilizing Function. Zhang Xiaohui, Zhu Peihong (Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract Cyclic ADP-ribose (cADPR) is a novel endogenous metabolite of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), and is a recently discovered second messenger. cADPR is active in mobilizing intracellular Ca²⁺ in invertebrate as well as mammalian cells. The mechanism of releasing Ca²⁺ from internal pool(s) has been studied. cADPR may bind its receptor, which in turn induces the release of Ca²⁺ from cADPR-sensitive Ca²⁺ pool(s) through ryanodine receptor or ryanodine receptor-like mediated Ca²⁺ channel. In addition, a possible intracellular signal transduction pathway involving nitric oxide (NO), cyclic guanylic acid (cGMP) and cADPR has been suggested to exist in various cells.

Key words cADPR, Ca²⁺ mobilization, signal transduction

转基因的分子生物学特性

戴旭明 潘星华 傅继梁¹⁾

(第二军医大学生物学教研室, 上海 200433)

摘要 现代分子生物学研究中, 转基因概念的出现越来越频繁, 它渐渐被用来表示所有的用基因工程手段构建、导入高等真核生物细胞, 并稳定地整合入受体基因组的外源DNA. 文章较系统地总结了

¹⁾通讯联系人。 收稿日期: 1995-05-05, 修回日期: 1995-07-17

已见报道的转基因的结构类型、它在受体细胞内的遗传学行为、表达特性和影响因素及其相应的生物学效应; 分析了转基因研究中尚待研究的问题, 提出了系统地进行转基因本身的分子生物学特性研究的必要性。

关键词 转基因, 生物学特性, 转基因生物, 基因结构, 基因表达调控, 生物学效应

70 年代末到 80 年代初, 通过受精卵原核显微注射法及早期胚胎细胞的逆转录病毒载体感染等手段, 使种系细胞基因转移获得成功, 出现了由此发育而来的经遗传修饰的生物 (genetical modified organism, GMO), 并产生了转基因生物 (transgenic organism) (包括转基因动物和转基因植物) 和转基因 (trans-gene) 的概念^[1]。转基因通常是指整合到转基因动植物基因组中的外源基因^[2]。近年来, 在许多体外培养的哺乳动物细胞基因转移实验研究中, 整合入体细胞基因组中的外源基因也被称作转基因, 所以, 转基因概念有被用来表示所有经基因工程实验手段构建、导入高等真核生物细胞, 并稳定地整合入该细胞基因组中的外源基因的趋势。基因转移技术作为分子生物学研究的最基本技术, 已被越来越广泛地应用于生命科学研究的各个领域。为此, 对转基因本身的分子生物学基础的认识显得非常重要, 只有深入地认识, 才能更精确地调控、改造和应用。本文对近年来转基因动植物中转基因的分子生物学特性研究所积累的资料作一总结, 并展望了对转基因作系统的遗传学研究的意义和前景。

1 转基因的结构

根据不同的研究目的, 可运用 DNA 重组技术构建不同结构的转基因, 通常可归纳为 5 大类: a. 基因组 DNA 片段: 用人工酵母染色体 (yeast artificial chromosome, YAC)、粘粒载体 (cosmid)、P1 等作载体克隆的真核基因组片段, 及用质粒载体克隆的完整或部分病毒基因组片段等。这类转基因可以保持较完整的基因结构, 其表达不易受受体基因组及其他因素的影响, 得到更可靠的对有关基因内在调控和表达特性的认识^[3]; b. 小基因 (minigene):

分别取同一基因的某些不同部分组成的转基因, 用于研究该基因的各部分在基因功能表达中的作用; c. 异源基因的融合基因: 结构基因的 DNA 与异源调控序列的融合基因; 未知功能的调控序列与报告基因的融合基因; 异源启动子与反义 DNA 或编码核酶 (ribozyme) 的 DNA 的融合基因; 不同异源结构基因的融合基因等, 这是一类研究最多、应用最广泛的转基因结构; d. 用于在诱变剂检测时作为靶 DNA 的转基因, 常含有易于回收的基因结构以及突变后有可能用于筛选的明显的表型特征; e. 适用于通过同源重组机制进行基因打靶 (gene targeting) 的置换型载体和插入型载体, 常含有某内源基因的同源片段和选择标记。

2 转基因的导入方式及其遗传学行为

将转基因导入细胞的常用方法有: 显微注射法、电穿孔法、原生质体融合法、脂质体介导法、磷酸钙沉淀法及病毒载体 (逆病毒载体、腺病毒相关载体等) 感染法等。不同结构的转基因所适用的基因转移的方法也有所不同, 与此相应, 转基因在受体基因组中的遗传学行为也有差别。显微注射法适用于导入各种结构的转基因, 导入后的转基因常以头尾相连的多拷贝方式随机地整合到单一的染色体位点上, 整合机制较复杂, 并可引起插入位点的插入突变及其附近的重组、突变、易位、缺失等突变^[4]。用病毒载体构建的转基因, 可直接通过病毒感染法导入, 并常以单拷贝形式整合, 以较明确的病毒 DNA 整合机制进行, 如常在 LTR 区域整合, 不易破坏转基因中所含的重要结构。转基因整合后常能稳定地向后代遗传。线性化的基因打靶载体常用电穿孔法导入 ES 细胞 (embryonic stem cells, 胚胎干细胞), 发生同源重组和随机整合, 并能通过严

格的筛选得到同源重组的克隆^[5]。

3 转基因的表达特性

3.1 转基因的时空特异性表达

基因的表达常与顺式调控元件、反式作用因子及相应的分子环境有关,转基因在动物体内的表达同样受多种因素的影响,转基因的时空特异性表达(发育时序特异性和组织特异性表达)方面研究得最多,也是最有应用价值的特性。主要是通过构建转基因时加入时空特异表达的启动子,在此顺式调控元件的作用下,常可得到相应的表达。如 a. 用组织特异性的启动子、增强子与癌基因等功能基因融合的转基因,在特定的组织中表达后,可以得到某癌基因或其他功能基因在特殊组织中的表达和生物效应; b. 小基因结构表现出来的结构基因表达的时空特异性能反映出小基因中调控元件的性能; c. 用无启动子的报告基因作转基因,可在动物发育的不同时期和不同组织器官中检测报告基因的表达情况,可以反映出该转基因整合位点附近的基因的相应表达特性,是近来分离发育相关基因的一种常用途径; d. 大片段的基因组 DNA 作为转基因时的表达,因结构基因的 5'端、3'端侧翼调控区及内含子等结构及其本身的调控元件较完整,整合后的位置效应也相对较小,还保持了相应的染色体高级结构水平的调控信号,所以常能得到较精细的表达调控^[3]。

3.2 转基因的诱导表达

3.2.1 真核表达元件调控的诱导表达: 实验证明有作用的真核基因的可诱导性表达元件有多种,如重金属离子诱导的金属硫蛋白(met-allothionein, MT)启动子;糖皮质激素诱导的长末端重复序列(LTR)启动子;热休克诱导的启动子等等。用此类启动子元件与结构基因融合而成的转基因,常可表现为相应的可诱导性表达。如经典的“超级小鼠(super-mice)”,就是用鼠 MT-I 启动子与大鼠生长激素基因融合后的转基因得到的表型^[6]。

3.2.2 原核调控元件对真核转基因的调控:

由于真核基因的诱导型表达启动子控制转基因表达时常有以下不足: a. 诱导的特异性不高; b. 启动子本身有较强的背景活性; c. 诱导物常有一定的生物学效应,甚至是毒性作用。所以,人们开始探索用原核的调控元件来控制真核转基因的表达,因原核启动子的诱导物在真核细胞中不常存在,对真核细胞也无毒副作用,可克服上述的不足。主要有两方面的工作: a. 基于大肠杆菌乳糖操纵子(LacR/O)系统的表达调控,即将 LacO 序列置于真核基因启动子 TATA 盒与转录起始位点之间, LacR 与 LacO 的结合同样阻遏了该真核转基因的表达,表达的诱导物是 IPTG^[7]; b. 基于大肠杆菌 Tn10 转座子编码的四环素抗性基因操纵子(Tc R/O)系统的表达调控^[8]。

3.3 转基因的失活现象及其他影响因素

在转基因动植物研究中,转基因的表达特性常会出现许多出人意料的又难以解释的现象,通常被多数研究者所忽视。其中最显著也是很普遍的是转基因的失活现象(inactivation),也称为转基因的沉默。迄今为止,转基因植物中转基因的失活现象研究得较深入^[9,10],发现了转基因与内源同源基因的共抑制(co-suppression)现象,即当受体基因组中含有转基因的同源基因时,转基因与内源基因的表达同时受到抑制。有人曾对美国 30 多家从事转基因植物研究的公司进行调查,结果所有的单位都承认曾观察到转基因的失活现象,这提醒我们注意,其中可能存在某种普遍的基因表达调控机制来影响转基因的表达而导致失活。总结转基因植物中所得到的有关共抑制现象的特征有: a. 共抑制只发生在转基因与同源的内源基因之间,对其他基因表达不发生影响; b. 转基因与内源基因经重组发生分离后,共抑制现象消失,基因的表达恢复正常; c. 共抑制现象的发生与启动子的来源无关; d. 两个相同的转基因之间也可发生共抑制现象,这也许是转基因动植物中单拷贝的转基因通常具有最高表达的原因之一; e. 共抑制现象还表现为精确的发育控制模式。对共抑

制现象、转基因失活等现象的机制,主要有4种假说, a. 转基因与同源的内源基因相互作用后,造成某种后成(epigenetical)的存在状态而影响它的表达; b. 同源基因之间因竞争性地结合核基质、核胞膜等结构上的转录翻译所必需的不可扩散元件,而出现相互的抑制; c. 产生反义RNA,并使正义链的RNA与之结合而共同被快速降解; d. 由于外源基因的存在,使mRNA开始时大量堆积,并激发某种未知的机制使mRNA降解. 现有的研究资料尚不能完整地解释转基因的许多表达特性,但以下与转基因表达相关的因素和机理已得到许多实验结果的支持,并得到了普遍的承认. a. 转基因被受体识别为异己DNA后的甲基化修饰作用使转基因失活; b. 转基因的插入可引起染色质类型的改变,而使相关的基因失活; c. 转基因整合入异染色质部位,受局部区域的影响而不表达; d. 转基因在核中的不同存在部位,可影响相应基因转录产物的正常转位、加工和运输; e. 转基因与同源的内源基因互相影响,可因不同的机制产生反义RNA而导致正常mRNA的降解; f. 转基因本身的结构对其表达的影响,除了调控元件外,内含子的存在与否也有较大的影响,另外,转基因中如果存在原核载体的DNA片段,可以抑制转基因的表达. 可以看出,转基因在受体细胞中的表达确实受到细胞内分子环境的很大影响,而且许多方面都未明了.

4 转基因的生物学效应

转基因的生物学效应由转基因本身的结构和组成决定,也受受体细胞内分子环境的影响,它是应用转基因进行研究和开发的基础,主要表现为 a. 转基因中结构基因以一定的方式表达,出现相应的生物效应,是研究其功能及相应的生化过程和表型效应的有效手段; b. 作为“生物反应器(bioreactor)”,在乳腺等组织中表达的编码药用蛋白的转基因,常不表现出明显的生物效应,仅在乳汁中分泌相应的蛋白产物用于生产^[11]; c. 转基因中报告基因的

时空表达特性可以反应出未知序列的调控功能; d. 反义基因表达反义RNA在一定程度上有可能阻止相应内源基因的表达,使之出现功能缺陷表型; e. 用于基因打靶(gene targeting)的转基因与受体基因组中同源片段发生精确的同源重组,使人为地改造受体基因组成为可能,这种改造包括内源基因的失活、引入微小突变、定点修复突变及增加内源基因拷贝数等; f. 转基因引起插入部位内源基因的插入突变,可造成相应缺失型表型,而转基因可作为克隆分离与该表型相关基因的标鉴(tag); g. 作为诱变剂检测模型的转基因动物中的转基因不表达出有功能的基因产物,除了插入突变外,无明显的生物学效应,仅作为诱变剂作用的靶DNA,经诱变处理后,可将转基因回收到体外系统(细胞系统或细菌系统)进行进一步分析研究.

目前,人们在致力于提高基因转移方法的有效性和相应的选择系统的特异性的同时,注意力主要集中在从大量的基因转移事件中筛选出符合设计要求的小概率事件,并用它来作更深入的研究,已有的结果也证实了这种研究在一定程度上的有效性. 然而,还有更多的“不符合要求的”基因转移事件并没有得到很好的解释,被多数人所忽略. 其中,转基因整合入受体基因组的精确机制尚不明确;对转基因在受体基因组中的整合位点、拷贝数及整合后引起相邻基因位点的基因突变的规律和机制等所知甚少;转基因在受体细胞内的表达所受的调控很复杂,常常可遇到的与设计要求不相符的表达特性,其发生机理还不能得到清楚的解释;转基因在动物个体的传代中表现的遗传规律还不清楚. 要想能对基因转移及转基因的分子生物学特性进行更精确的人为控制,以使转基因研究更好更稳定地为人类服务,深入开展有关转基因本身的分子生物学特性的基础研究很有必要.

参 考 文 献

- 1 Petri W. Nature, 1982; 299: 399

- 2 Palmiter R D, Brinster R L. *Ann Rev Genet*, 1986; **20**: 465
- 3 戴旭明, 胡以平, 傅继梁. *中华医学遗传学杂志*, 1995; **12** (2): 99
- 4 戴旭明, 胡以平. *国外医学遗传学分册*, 1994; **17** (3): 116
- 5 Mansour S L, Thomas K R, Capecchi M R. *Nature*, 1988; **336**: 348
- 6 Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E *et al.* *Nature*, 1982; **300**: 611
- 7 Gossen M, Bonin A C, Bujard H. *TIBTECH*, 1994; **12**: 58
- 8 Gossen M, Bujard H. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; **89**: 5547
- 9 Flavell R B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 3490
- 10 Finnegan J, McElroy D. *Biotechnology*, 1994; **12**: 883
- 11 Janne J, Hyttinen J M, Peura T *et al.* *Ann Med*, 1992; **24**: 273

Molecular Biological Characteristics of Transgene. Dai Xuming, Pan Xinghua, Fu Jiliang (*Department of Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*).

Abstract Transgene, a concept becoming more and more widely used in modern molecular biology research, has been used to refer to all the foreign genes which were reconstructed and transferred by genetic engineering strategies, and then stably integrated into the genomes of higher eukaryotic cells. The types of transgene structure, its genetic behavior in the recipient cells, the characteristics of transgene expression, the factors involved in the expression regulation and the biological effects of the transgenes are reviewed. The unknown problems in the transgenic research are illustrated. The necessity of doing the systematical research about the molecular biological characteristics of the transgenes is pointed out.

Key words transgene, molecular biological characteristics, transgenic organism, gene structure, gene expression regulation, biological effects

DNA 切除修复与转录偶联

周平坤

(北京放射医学研究所生物化学研究室, 北京 100850)

摘要 细胞 DNA 受到某些环境理化因子损伤后, 其中活性转录基因和 DNA 转录链上的损伤被优先切除修复, 这种 DNA 选择性修复直接与基因转录过程偶联. 在大肠杆菌中已分离到实现此功能的转录修复偶联因子 (TRCF), 是由 *mdf* 基因编码的一种具有 ATPase 活性的 DNA 结合蛋白. 在真核细胞中, 发现某些 DNA 修复蛋白也在 DNA 转录中起作用, 如人 DNA 切除修复基因 ERCC-3 编码产物, 是转录因子 TF II H 中最大亚基 p89, 酵母切除修复基因 RAD3 就是编码因子 b 的最大亚基 p85.

关键词 DNA 选择性修复, 转录修复偶联因子, DNA 修复基因, 转录因子

DNA 作为环境中电离辐射、紫外线等多种理化因子损伤细胞的靶分子, 受到损伤后, 将通过一系列的修复机制被修复, 以恢复 DNA 的正常结构, 维系细胞的遗传稳定性. 核苷酸切除修复, 是一种重要的 DNA 修复机制, 在原

核细胞中, 由 UvrA、UvrB 和 UvrC 蛋白形成 ABC 切除核酸酶复合物, 在损伤点 5' 端第 8 个磷酸二酯键和 3' 端第 15 个磷酸二酯键