

Peptide Phage Display. TANG Weigang, GAN Renbao, WANG Keyi (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract Recently, phage display techniques have been applied to various biological aspects. Phage can be exploited to display peptides, protein domains and proteins on its surface. Especially peptide phage display is now well estab-

lished as a tool for the search for peptides binding to antibodies, enzymes, receptors, lectins, nucleic acids or other target molecules and in studying the substrate specificity of enzymes. It has great potential for application in the areas of drug discovery, vaccine development and other pharmaceutical development.

Key words phage display, immobilized target, peptide phage display

外显子捕捉法快速分离新基因的原理和方法

朱冠山¹⁾ 缪为民 焦炳华

(第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433)

摘要 从大片段基因组 DNA 中快速分离转录序列是疾病基因定位克隆 (positional cloning) 中的关键步骤. 外显子捕捉法是一种较为成功的方法. 文章对该法的基本原理、方法步骤及应用成果等作了较为详细的介绍.

关键词 外显子捕捉法, 定位克隆, 基因组研究

近年来, 由于人基因组微卫星 DNA 多态标志的广泛应用, 使人们可以通过家系分析的方法对众多单基因遗传, 甚至多基因遗传的疾病基因进行精细的染色体定位. 而人类基因组计划的飞速发展, 使人们几乎完成了各条染色体的酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC) 克隆及高分辨物理图谱. 这些成果大大方便了疾病基因的定位克隆 (positional cloning)^[1]. 当前, 在克隆某个疾病基因位点时, 人们根据其染色体定位, 能够迅速筛选到含有该位点的 YAC、粘粒 (cosmid) 或 p1 噬菌体等克隆. 但由于这些基因组大片段克隆长达几十至数百 kb, 因此, 如何快速从这些克隆中分离出基因转录序列, 则是决定定位克隆成功与否的关键步骤. 目前已经发展了数种方法, 其中由 Buckler 等^[2]建立的外显子捕捉法是较为成功的一种. 本文结合我们目前的工作拟对此法的原理及方法作一介绍.

1 基本原理

大多数真核生物的基因被较长的内含子序列分隔成数个较小的外显子. 这些基因最初被转录为 pre-mRNA, 之后经过在细胞核内拼接 (splicing) 过程, 将其中的内含子序列去除, 产生成熟的 mRNA 转运到细胞浆. 间隔外显子的拼接是由拼接体来完成的, 这种拼接体由 snRNP 和一些蛋白因子组成, 通过与 pre-mRNA 特定位点 (即 5' 拼接供位和 3' 拼接受位) 结合来实现拼接. 目前对拼接供位和受位的识别特征已有所了解, 已知拼接位点两侧有短的保守核苷酸序列, 其中 5' 端保守的拼接供位序列是 AG/GTRAGT, 3' 端保守的拼接受位序列是 NCAG/G ("R" 代表嘌呤核苷酸,

¹⁾第二军医大学第一附属医院传染病学教研室, 上海 200433.
收稿日期: 1996-05-07, 修回日期: 1996-09-20

“N”代表任意核苷酸，“/”表示拼接切割位点)。外显子捕捉法正是利用了这种 RNA 拼接原理及拼接位点序列的保守性而设计的一种从基因组 DNA 中捕捉未知外显子的方法。

该法设计了一种含有拼接位点序列的载体 (图1), 将基因组大片段 DNA 酶切后克隆入

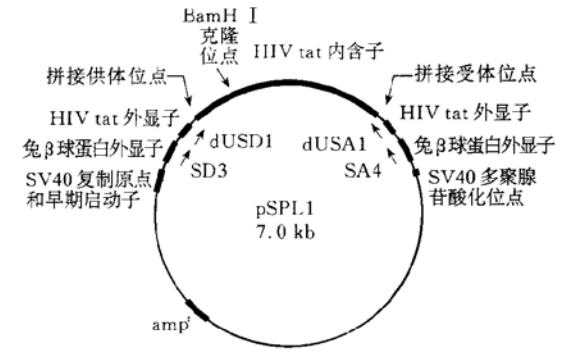


图1 外显子捕捉载体 pSPL1

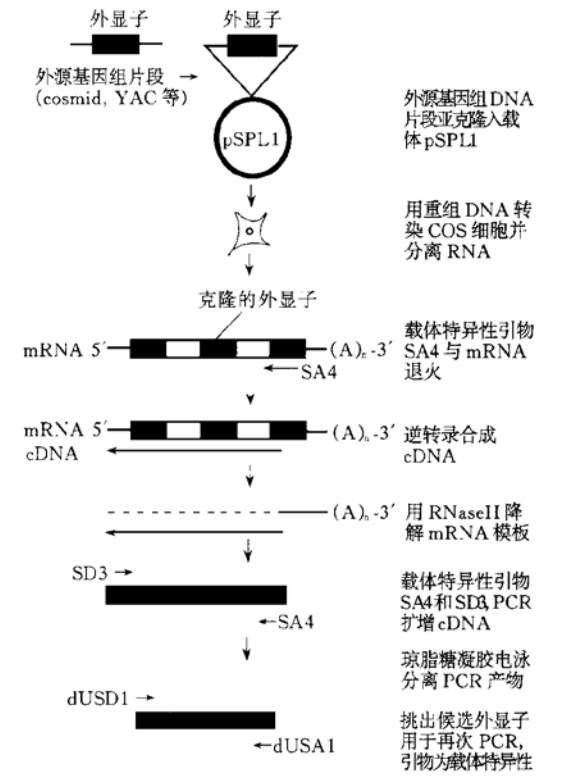


图2 外显子捕捉示意图

该载体. 如果外源片段中含有外显子序列及两端的拼接位点序列, 则该外显子两端侧的拼接

位点可和载体的拼接位点进行拼接. 最后可通过在哺乳动物细胞中短暂表达, 反转录 PCR 扩增捕获该外显子. 这一方法具体步骤是: a. 将基因组 DNA 片段亚克隆于拼接载体 pSPL1 的内含子中, 并经 *E. coli* 扩增; b. 用重组的 pSPL1 转染哺乳动物细胞 COS-7 短暂表达; c. 分离胞浆 RNA 并经 RT-PCR 扩增, 获取基因组片段中的外显子. 这一方法的全过程见图 2.

2 方法改进

外显子捕捉法可以大范围筛选基因组转录序列, 为新基因克隆提供了一条新途径. 自 1991 年 Buckler 首次建立该法以来, 经过若干次改进而逐步得到完善. 第一代载体为 pSPL1, 由于其基因结构上的缺陷, 具有以下缺点: a. 亚克隆和转染后 pSPL1 载体自我拼接的 RNA 占相当大的比例. 这些不期望的产物消耗了大部分后继 PCR 组分, 因此限制了该方法的敏感性. b. pSPL1 载体的第二个问题是, 在其克隆位点右侧有一隐蔽拼接供体位点. 正常情况下, 当一外显子被捕捉时, 克隆位点序列应被拼接删除. 但当这一隐蔽拼接供体位点起作用时则不然, 结果, 造成最终扩增的片段中不仅有外显子序列, 还有克隆位点右侧的一段载体序列. c. pSPL1 的克隆位点只有一个限制性内切酶单一一位点 (BamH I), 因此实验设计的自由度受到很大限制. 为了克服这些不足之处, 科学家们重点对拼接载体进行了一系列改进. 1994 年 Church 等^[3] 构建了 pSPL3 载体替代 pSPL1, 这一载体与 pSPL1 不同之处在于: a. 在载体拼接供体位点和拼接受体位点毗邻分别设计了 Bst XI 酶切位点的一半, 这样, 载体自我拼接产物, 在首次 PCR 后经 Bst XI 消化, 可阻止其在第二次 PCR 时的扩增, 从而提高了捕捉外显子的敏感性. b. pSPL3 以多克隆位点取代了 pSPL1 的单一克隆位点. 这一多克隆位点有如下限制酶位点: EcoR I、Sst I、Xho I、Not I、Xma III、Pst I、BamH I、EcoR V, 从而为实

验设计提供了较大的自由度。c. 在 pSPL3 多克隆位点的两端各有一 Bst XI 位点, 可用于减少隐蔽拼接产物的回收。1995 年, Burn 等^[4] 又对拼接载体做了进一步的改进, 构建两个新型载体: pSPL3b 和 pSPL3-CAM。pSPL3b 与 pSPL3 的不同之处在于, 它的隐蔽拼接供体位点序列被删除, 从而使得实验过程中隐蔽拼接的发生率由原来的 5%~50% 下降到 2% 以下, 大大提高了捕捉效率。而 pSPL3-CAM 则是在 pSPL3 基础上, 去除了 Ap^R 基因序列, 代之以 Cm^R 基因序列, 这一载体主要适用于从含有 Ap^R 基因的 cosmid 中捕捉外显子。因为用 pSPL3 随机克隆 Ap^R cosmid 产生的 Ap 抗性克隆中, 绝大部分是重新环化的 cosmid 载体片段。用 Cm^R 取代 Ap^R 可选择仅含 pSPL3 的 Cm 抗性克隆。用 pSPL3-CAM, 可使对 Ap^R cosmid 衍生片段的亚克隆效率提高 30~40 倍。新近, 一种更新型的载体 pSPL3b-CAM 亦已问世, 它兼具 pSPL3b 和 pSPL3-CAM 的优点, 必将使这一方法更加有效。

另外, 在用重组子转染 COS-7 细胞的方式上亦有所改进。现已基本上用阳离子脂质体转染替代了电转染方法。RNA 的制备及第一链 cDNA 的合成以及 PCR 扩增方案等更加成熟、高效。为了进一步提高效率, 有些学者还进行了一些操作上的改进, 如 Burfoot 等^[5] 用部分酶切的方法处理基因组 DNA, 可提高外显子捕捉法的敏感性。

3 3'末端外显子捕捉法

Buckler 设计的以 pSPL1 为拼接载体的外显子捕捉系统主要用于捕捉基因内部的外显子。研究表明, 3'末端外显子是脊椎动物 RNA 拼接过程中的识别单位^[6,7]。据此, Krizman 等^[8] 建立了一种新的外显子捕捉法, 目的在于捕捉转录单元的完整的 3'末端外显子。

这一捕捉策略所用拼接载体为质粒 pTAG4 (图 3)^[9], 4 120 bp, 亦是哺乳类表达载体, 总体结构与 pSPL 系列相似, 是在

pSL301 载体 Nco I 位点插入 710 bp 的转录单元构建而成。但不同之处在于, 它只包含一个

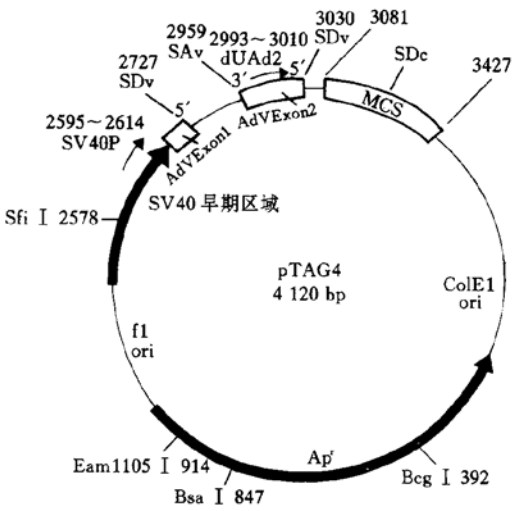


图 3 外显子捕捉载体 pTAG4

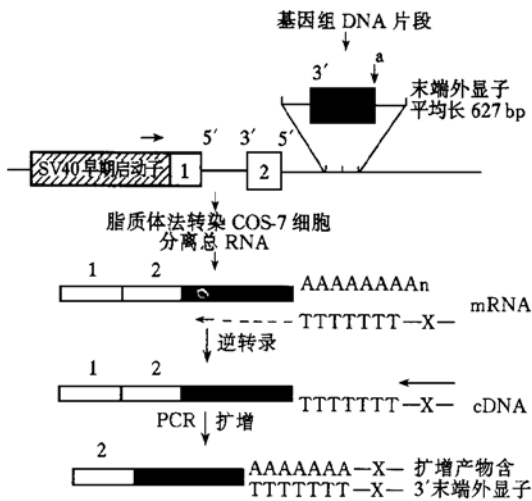


图 4 3'末端外显子捕捉策略示意图

部分转录单元, 这一部分单元有 SV40 早期区段启动子, 2 个腺病毒外显子, 但缺少 3'末端外显子。这样的一个转录单元在转染的 COS-7 细胞中不能产生稳定的 poly (A) mRNA, 而只有当被检测的外源插入的 DNA 提供一 3'末端外显子时, 才能有稳定的 poly (A) mRNA 表达。这里, 外源提供的 3'末端外显子必须完整才能成功转录出一个完整的单元。这一完

整 3' 末端外显子应包括: a. 完整的内含子序列, 用以识别外显子起始端侧 3' 拼接位点; b. 所有的 poly (A) 位点上下游序列, 用以外显子腺苷化. 这样所捕捉到的 3' 末端外显子, 再经 RT-PCR 扩增检出. 这一方法的基本过程见图 4.

3' 末端外显子捕捉法较以往的外显子捕捉法有如下优点: a. 末端外显子平均长 627 bp, 因此, 为基因物理图谱绘制提供了足够长的序列; b. 这一捕捉过程包含有阳性选择作用, 因此省略了从假阳性中的再次分选; c. 这一技术用于从随机 cosmid 检测 3' 末端外显子, 所得结果与理论估计值接近, 说明假阴性率不高; d. 绝大多数脊椎动物基因只包含一个 3' 末端外显子, 这样减少了多次分选同一基因的次數. 一旦获取代表给定基因 3' 末端外显子的 PCR 产物, 一经测序便提供了一基因位标, 可用于该基因的图谱分析.

这一方法的一个潜在局限是一些 3' 末端外显子可能有数 kb 长, 它们有可能在 PCR 中丢失. 好在多数末端外显子平均长 627 bp, 且绝大多数在 200~ 400 bp 范围, 正好为 PCR 反应的理想要求长度.

4 应 用

外显子捕捉法的最主要优点在于, 亚克隆 DNA 的表达是由病毒 (SV40) 启动子指导的, 不用考虑任何基因表达的发生和组织特异性. 因此, 这一方法广泛用于所有哺乳类基因组 DNA 外显子序列的分离. 筛选对象可以是 cosmid、YAC、BAC、P1、PAC 等. 应用这一方法的优势在于: a. 高效. 如一次转染可以筛选 10~ 20 个 cosmid (约 400~ 800 kb), 一次实验可同时操作 100 个以上 cosmid. b. 省时. 一次实验的周期为 7~ 8 d. 目前这一方法应用最多的还是从 cosmids 中钓取基因外显子. 而用 YAC 的相对较少, 其中主要原因可能是 YAC DNA 回收上的困难.

外显子捕捉法的建立, 为基因组作图及定位克隆人类疾病基因增添了一个有力的工具.

到目前为止, 用该法克隆人类疾病基因成功的例子有: 蒙科斯病 (1993 年), 甘油激酶缺乏 (1993 年), 神经纤维瘤 II 型 (1993 年), 亨丁顿氏病 (1993 年). 现在, 这一方法已由 BRL 公司做成试剂盒 (exon trapping system, 3'-terminal exon trapping system), 使得该方法的应用更加方便、高效.

目前, 我们正在应用该法筛选 X 连锁视网膜色素变性 3 型 (RP3) 区域的基因转录序列, 拟对 RP3 基因进行识别和克隆. 预计今后应用该法会有更多的疾病基因被克隆出来.

参 考 文 献

- 1 缪为民, 柴建华. 探讨人类遗传病的一种新策略——定位克隆法. 高技术通讯, 1993, 3 (9): 36~ 39
- 2 Buckler A L, Chang D D, Graw S L *et al.* Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 4005~ 4009
- 3 Church D M, Stotler C J, Rutter J L *et al.* Isolation of genes from complex sources of mammalian genomic DNA using exon amplification. Nature Genet, 1994, 6: 98~ 105
- 4 Burn T C, Connors T D, Katherine W K *et al.* Increased exon trapping efficiency through modifications to the pSPL3 splicing vector. Gene, 1995, 161: 183~ 187
- 5 Burfoot M S, Campbell R D. Improved method of gene detection using exon amplification. Nucleic Acids Research, 1994, 22 (24): 5510~ 5511
- 6 Niwa M, Rose S D, Berget S M. *in vitro* polyadenylation is stimulated by the presence of up stream intron. Genes & Dev, 1990, 4 (9): 1552~ 1559
- 7 Niwa M, Berget S M. Mutation of the AAUAAA polyadenylation signal depresses *in vitro* splicing of proximal but not distal introns. Genes & Dev, 1991, 5: 2086~ 2095
- 8 Krizman D B, Berget S M. Efficient selection of 3'-terminal exons from vertebrate DNA. Nucleic Acids Research, 1993, 21 (22): 5198~ 5220
- 9 Nisson P E, Kizman D. Trapping 3'-terminal exons from YACs using the 3'-exon trapping system. Focus, 1994, 16 (4): 108~ 111

Principle and Method of Exon Trapping to Isolate Novel Genes Rapidly. ZHU Guanshan, MIAO Weimin, JIAO Binghua (*Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*).

Abstract Rapidly isolating transcriptional

sequences from large fragment genomic DNA is a key step in the positional cloning of disease genes. Exon trapping is one of the most successful methods. The basic principle, methodology

improvements and practical achievements of the exon trapping approach are reviewed in detail.
Key words exon trapping, positional cloning, genome research

突触小泡膜蛋白与神经递质释放的局部调节*

吴馥梅 徐晓虹¹⁾ 强 梅²⁾
(南京大学生物科学与技术系, 南京 210093)

摘要 突触小泡膜蛋白及其在神经递质释放过程中的作用已取得若干研究进展. 突触素 I、SY 蛋白、SO 蛋白、SB 蛋白、SG 蛋白等都是突触小泡膜的重要蛋白质, 这些蛋白质在突触小泡的贴靠、膜融合及胞吐作用中起着局部自主性调节作用.
关键词 突触小泡, 膜蛋白, 神经递质释放, 胞吐融合

在长期进化过程中, 通过选择作用使突触区释放神经递质形成了局部调节的自主过程, 包括胞吐作用 (exocytosis) 和小泡膜重复循环 (recycling) 的自主调节等. 在这一过程中, 某些蛋白质起着重要作用. 目前, 突触蛋白的研究已取得不少进展. 突触区的蛋白质可以分为突触膜蛋白 (如 Ca^{2+} 通道蛋白、syntaxin、neurexin、SNAP-25 等)、突触胞浆蛋白 (如 NSF、Munc-18 等) 和突触小泡膜蛋白三类, 本文介绍后者.

1 突触小泡膜蛋白

在突触小泡膜蛋白中, 研究得较多的有以下几种, 现分别作简要介绍.

1.1 突触蛋白

突触蛋白 (synapsin, 又称突触素) 包括突触素 I 和突触素 II, 是突触小泡膜外侧的一种连接蛋白. 这种蛋白与突触小泡膜连接的亲和性大小受磷酸化作用调节, 它是几种不同的蛋白激酶的底物, 其分子尾部是与小泡膜相结合的部位, 有磷酸化作用位点, 通过磷酸化与脱磷酸化作用控制其与小泡膜结合的紧密程度并参与调节小泡在突触区的移动. 有关这种蛋

白质的特性与生理意义已有专门介绍^[1,2].

1.2 突触小泡蛋白

突触小泡蛋白 (synaptophysin, SY 蛋白) 是突触小泡的特异性组成膜蛋白. 这种蛋白质的分子有 4 个跨膜区段, 位于胞浆一侧的羧基端是含有磷酸化作用位点的肽段. 这种蛋白质既是 Ca^{2+} / CaM 依赖性蛋白激酶又是酪氨酸激酶作用的底物, 在进化过程中的保守性较强, 变异不大. SY 蛋白通常以同源四聚体或六聚体的形式存在. 以 ^{32}P 标记方法研究表明: 在鼠脑切片中或分离的突触体中, 膜的去极化作用能诱发 SY 蛋白迅速发生磷酸化作用. 其生理生化特征的研究提示: 它可能构成突触小泡特异性膜通道, 并参与突触小泡的形态发生和神经递质释放过程^[3~5].

1.3 突触孔蛋白

突触孔蛋白 (synaptoporin, SO 蛋白) 与 SY 蛋白都属于通道蛋白家族, 二者在神经递质释放过程参与形成类似于间隙连接的通道.

* 国家自然科学基金资助项目.
¹⁾ 浙江师范大学生物学系, 金华 321004.
²⁾ 山西医科大学生理学教研室, 太原 030001.
收稿日期: 1996-05-07, 修回日期: 1997-01-27