

3 van der Vaart J M, Caro L H P, Chapman J W *et al.* Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 1995, **177** (11): 3104~3110

4 Gil M L, Casanova M, Martinez J P. Changes in the cell wall glycoprotein composition of *Candida albicans* associated to the inhibition of germ tube formation by EDTA. Arch Microbiol, 1994, **161**: 489~494

5 Ermacova S A, Mansurova S E, Lobakova E S *et al.* Accumulation of pyrophosphate and other energy rich phosphorus compounds under various conditions of yeast growth. Arch Microbiol, 1981, **128**: 394~397

6 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, **227**: 680~685

7 Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted into polyvinylidene difluoride membrane. J Biol Chem, 1987, **262**: 10035~10038

8 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem, 1956, **28**: 350~357

9 Zubatov A S, Rainina E J. A cytochemical study of the localization of acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* at different growth phases. Histochem J, 1979, **11**: 299~310

10 Klebl F, Tanner W. Molecular cloning of a cell wall α -1, 3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 1989, **171** (11): 6259~6264

11 Vladimirov M, Klebl F, Tanner W. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall α -1, 3-glucanase. J Bacteriol, 1993, **175** (7): 2102~2106

12 Gil M L, Casanova M, Martinez J P *et al.* Antigenic cell wall mannoproteins in *Candida albicans* isolates and in other *Candida* species. J Gen Microbiol, 1991, **137**: 1053~1061

13 Aguiar J M, Baquero F, Jones J M. *Candida albicans* extracellular antigens released into a synthetic culture medium: characterization and serological response in rabbits. J Gen Microbiol, 1993, **139**: 3005~3010

14 Elorza M V, Marcilla A, Sentandreu R. Wall mannoproteins of the yeast and mycelial cells of *Candida albicans*: nature of

the glycosidic bonds and polydispersity of their mannan moieties. J Gen Microbiol, 1988, **134**: 2393~2403

15 Van Berkel M A A, Caro L H P, Montijn R C *et al.* Glucosylation of chimeric proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters, 1994, **349**: 135~138

Study on the Function of 33 ku Cell Wall Protein of *Candida utilis*. ZHANG Xiping, ZHANG Chuyu, WANG Esheng (College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract By means of proteolysis with trypsin and subtilisin, in the cell wall of *Candida utilis*, a major structural cell wall protein with molecular mass of 33 ku was found. The 33 ku protein was quite different from most of the other cell wall proteins in *Candida utilis*. In cell wall it was not hydrolysed by trypsin, but was sensitive to subtilisin. The 33 ku protein was found to exist in cell wall of all logarithmic growth phases. Especially in early logarithmic growth phase, it was proved to be the only protein that was not sensitive to trypsin. The result demonstrated that this protein was important for connection of cell wall skeleton components-glucan, and for the intact structure of cell wall. It was an important integral cell wall protein.

Key words *Candida utilis*, cell wall protein, proteolysis

外源基因在蛙神经元中的表达*

夏另朝 李金照 陈燕 邱蓉 张瑛 邓巍

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 含 β -半乳糖苷酶基因的真核表达载体 DNA, 直接注射到视神经切断或正常的黑斑蛙的视网膜中. 注射 2 周后, 观察到蛙视网膜神经细胞仍然有转基因表达, 这种基因转染对神经元的类型没有选择性. 被转染神经元主要局限于注射点周围. 蛙视神经切断后, 被外源基因转染的细胞分布区域略广于视神经未切断的情况.

* 中国科学院视觉信息加工开放实验室资助项目. 收稿日期: 1996-12-13, 修回日期: 1997-03-10

关键词 视网膜, 基因转染, 基因表达, β -半乳糖苷酶, 蛙

基因转染是细胞生物学研究中一种强有力的新技术, 已应用于基因调控或蛋白质的功能研究、农作物或家畜品种的改良及疾病的基因治疗等各个研究领域. 离体细胞的基因转染已建立了一些比较有效的方法^[1], 包括磷酸钙共沉淀、脂质体介导、电穿孔、粒子轰击、重组缺陷病毒感染等. 在体细胞的转染, 要考虑到对生物体的毒性及遗传的影响, 在体内延续时间等, 问题比较复杂. 目前在基因治疗研究中常用的方法主要有两种: 一种是先对离体细胞进行基因转染, 筛出被转染细胞, 再将这些细胞移植回体内^[2], 这种方法十分复杂, 耗时, 尤其对中枢神经系统困难更大. 第二种方法是直接注射含目的基因的重组缺陷型病毒^[3,4], 利用这些病毒感染体内细胞或注射重组 DNA 与脂质体^[5,6]等介导物质的混合物. 这方面的工作已取得相当大进展. 但在安全性和转染效率方面还有待进一步改进.

为了研究视神经损伤的修复与再生机理, 我们用 β -半乳糖苷酶基因作为报告基因, 将其重组到 pZipneoSV (X) 质粒中, 利用 lipofectin 介导, 直接注射到黑斑蛙右眼视网膜中, 应用组织化学方法, X-gal 染色, 光学显微镜观察, 检测 β -半乳糖苷酶基因表达产物的活性, 以确定神经元被基因转染情况. 追踪外源基因在体内存在的时间, 是否整合到再生细胞的染色体中, 探讨视神经再生工程中视网膜神经元的变化.

1 材料与方法

1.1 试剂

Lipofectin (GIBCO BRL), X-gal (购自中国科学院生态环境研究中心), $10 \times$ 转染缓冲液: 1.5 mol/L NaCl , $200 \text{ mmol/L Tris-HCl}$, pH 7.4, X-gal 染色液: $2 \text{ mmol/L K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 $2 \text{ mmol/L K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 4 mmol/L MgCl_2 、 0.4 g/L X-gal 、 $1 \times \text{PBS}$. 复红染色液: 0.5 g 碱性复红在 100°C 溶于

100 ml 蒸馏水, 振荡 5 min 冷却到 50°C 过滤到棕色瓶中, 加入 $10 \text{ ml } 1 \text{ mol/L HCl}$, 冷却到 25°C , 加入 0.5 g 无水亚硫酸钠. 待溶液呈草黄色后用.

1.2 实验动物

野生黑斑蛙, 体长 $6 \sim 8 \text{ cm}$, 实验前在实验室饲养两个月. 蛙分为两组, 从上颌内切断一组右眼视神经, 养两周后进行基因转染. 一组为对照, 没有切断视神经, 同样养两周后进行基因转染, 基因转染后于不同时期杀死动物, 观察视网膜神经元基因转染的变化.

1.3 基因转染

动物乙醚全身麻醉后用注射针头先沿眼底刺一微孔, 然后注射 $5 \mu\text{l}$ 转染液 ($1 \times$ 转染缓冲液, $0.33\% \text{ Lipofectin}$, 0.2 g/L pZip-gal) 到眼底, 伤口处涂上庆大霉素, 动物转染后分别于 2 周、3 周、4 周、8 周后, 实验动物乙醚全身麻醉后杀死, 手术取出视网膜, 在 4°C $95\% \text{ 乙醇}$ 中固定 30 min , $100\% \text{ 乙醇}$ 脱水三次, 然后在二甲苯中透明三次, 在 56°C 石蜡中置换三次, 最后包埋在石蜡中, 切片 $10 \mu\text{m}$, 展片, 干燥过夜, 二甲苯脱蜡三次, 晾干, X-gal 染色过夜, 然后用 $0.5\% \text{ 复红}$ 染色, 染色后放入 $95\% \text{ 乙醇}$ 中脱水两次, $100\% \text{ 乙醇}$ 脱水两次, 二甲苯透明两次, 加拿大树胶封片. 光镜观察, 照相.

1.4 真核表达载体质粒的构建

如图 1 所示, 重组质粒按 Maniatis^[7] 的方法进行. 利用限制性内切酶 Hind III 和 BamH I 将质粒 pSV- β -gal 中的 β -半乳糖苷酶基因切下, 用 DEAE-纤维素膜回收, 然后将此片段插入 pCB6 的 BamH I 和 Hind III 位点中, 获得的重组质粒 pCB-gal 用 Bgl II 和 BamH I 酶切, 按前述方法回收含 β -半乳糖苷酶基因的片段, 最后插入 pZipneoSV (X) 质粒的 BamH I 位点. 转化体用 Hind III、EcoR I 及 BamH I 酶切方法选出重组方向正确的质粒. 该重组质粒因存在逆转录病毒 LTR 序列, 有可能整合到再生

细胞的染色体中. 从而随细胞分裂传代.

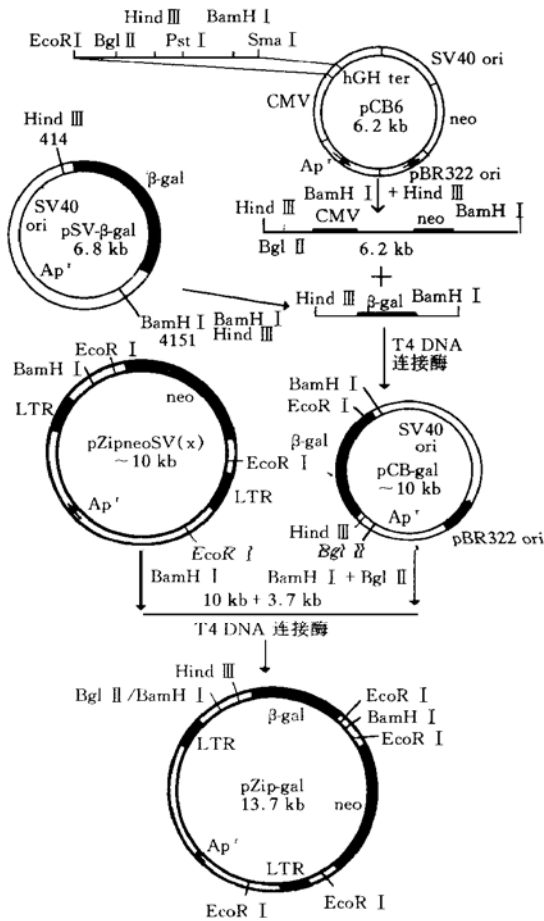


图 1 重组真核表达载体 pZip-gal 简图

2 结果与讨论

含有β半乳糖苷酶基因的质粒转染细胞, 在细胞内能表达β半乳糖苷酶, 用X-gal染色就应能观察到细胞被染成蓝色. 由图2b可见视网膜切片的几乎各层次都显示有表达了β半乳糖苷酶的细胞, 证明直接注射Lipofectin质粒DNA转染黑斑蛙视网膜后, 基因可以转染到视网膜不同层次的神经细胞中, 转染细胞中重组质粒表达了β半乳糖苷酶. 图2c为没有切断视神经动物的视网膜基因转染结果, 被转染细胞比较集中. 图3为节细胞层的局部放大照片, 可见表达产物在细胞质内. 基因转染后2周、3周和4周内都观察到转染的细胞, 但

3周后转染细胞非常稀少, 说明外源基因在被转染的视网膜神经细胞内维持的时间较长但3周后逐渐消失. 并非如有些研究所报道的那样

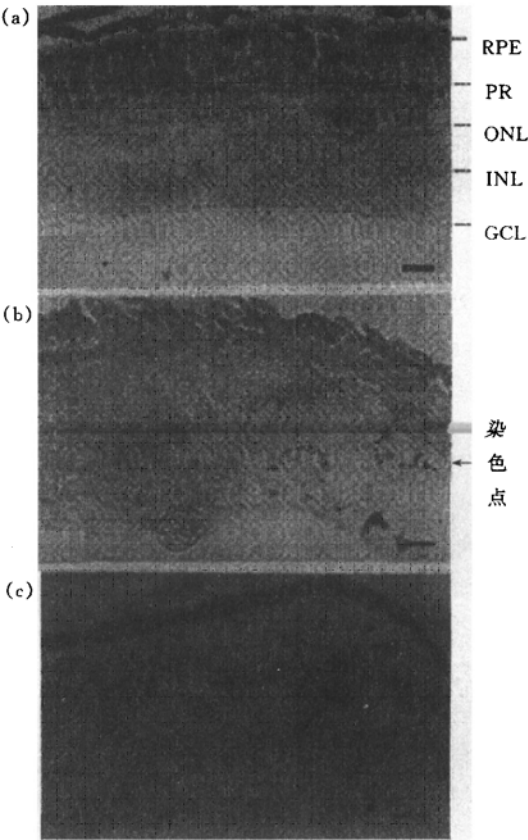


图 2 黑斑蛙视网膜切片染色照片

(a) 对照组 (未损伤视神经也未注射 pZip-gal·Lipofectin 质粒混合物); (b) 实验组 (切断视神经 2 周后, 注射 pZip-gal·Lipofectin 质粒混合物到视网膜中, 继续饲养 2 周); (c) 实验组 (未切断视神经, 直接注射 pZip-gal·Lipofectin 质粒混合物到视网膜中, 继续饲养 2 周). (b) 和 (c) 中黑点是 X-gal 染色细胞. 视网膜石蜡切片厚度为 10 μm. GCL: 节细胞层 (ganglion cell layer); INL: 内核层 (inner nuclear layer); ONL: 外核层 (outer nuclear layer); PR: 光受体细胞 (photoreceptors); RPE: 视网膜色素上皮 (retina pigmented epithelium). 标尺长度为 50 μm.

长, 这种差别是否因组织的不同所致, 有待进一步研究. 另一方面, 因为该质粒为逆转录病毒载体, 含病毒基因组 LTR 序列, 按照过去

的研究报道鱼视网膜损伤后在两周内开始再生^[8]，再生过程中存在细胞分化、增殖、形成新的神经元，可以推想，重组质粒就可能借助 LTR 序列插入新合成的染色体中，从而随细胞分裂而传代，能在一系列细胞中测出 β -半乳糖苷酶，并长期存在于细胞内。视神经切断 2 周后进行基因转染，不同时期内检测基因表达情况，发现与正常蛙基因转染稍有不同。未切断视神经的视网膜中被转染的细胞相对少而且比较集中，染色也较浅。视神经被切断动物的视网膜，被 X-gal 染色的细胞分布比较广泛而且染色相对较深。这表明视神经损伤后的视网膜细胞较易被转染。同时视神经损伤后转染的视网膜在较长时间后还能见到零星的 X-gal 染色细胞，这可能意味着视神经损伤后，视神经元的大量再生^[9]，使得重组质粒 pZip-gal 被整合到视网膜神经细胞的染色体中。而其表达逐渐减少是否因为整合到细胞基因组中后其基因的表达受细胞控制所致，有待进一步研究。

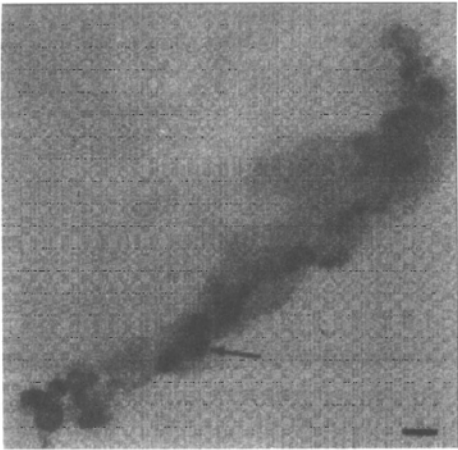


图 3 黑斑蛙视网膜切片染色照片

损伤视神经 2 周后注射 pZip-gal•Lipofectin 质粒混合物到视网膜中，然后饲养 2 周。切片中黑点是 X-gal 染色的视网膜节细胞。视网膜石蜡切片厚度为 10 μ m，标尺长度为 20 μ m。

参 考 文 献

1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor

Laboratory press, 1989. 16. 30~ 16. 81
2 Yoshimoto Y, Lin Q, Collier T J *et al.* Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. Brain Res, 1995, **691**: 25~ 36
3 Tsuda M. Retrovirus mediated gene transfer into mouse cerebellar culture. Methods in Neurosci, 1992, **9**: 313~ 323
4 Cleyman G L, E-Naggar A K, Roth J A *et al.* In vivo molecular therapy with p53 adenovirus for microscopic residual head and neck squamous carcinoma. Cancer Res, 1995, **55**: 1~ 6
5 Barthel F, Bentillier A L, Giraud P *et al.* Gene Regulation Analysis by lipopolyamine mediated DNA transfer in primary neurons. Methods in Neurosci, 1992, **9**: 291~ 309
6 Kato K, Yoneda Y, Okada Y *et al.* Gene transfer and the expression of a foreign gene *in vivo* in post-mitotic neurons of the adult rat brain using the hemagglutinating virus of the Japan liposome method. Mol Brain Res, 1994, **25**: 359~ 363
7 Maniatis T, Firtsch E F, Sambrook J. Molecular cloning, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1982. 363~ 402
8 Hildcock P F, Raymond P A. Retina regeneration. Trends in neurosci, 1992, **15** (3): 103~ 108
9 Beazley L D, Darby J E, Perry V H. Cell death in the retina ganglion cell layer during optic nerve regeneration for the frog RANA PIPIENS. Vision Res, 1986, **26** (4): 543~ 556

Foreign Gene Expression in Frog Neurons. XIA Lingchao, LI Jinzhao, CHEN Yan, QIU Rong, ZHANG Ying, DENG Wei (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Recombinant eukaryotic expression vector DNA containing β -galactosidase gene was injected directly into retina of normal and nerve transected frog *Rana pipiens*. β -Galactosidase in retina neurons was still identified in two weeks after transfection. Gene transfection to retina neurons is non-selectivity for any neuron. The transfected neurons are around the injection area. Comparing with the normal, the neurons transfected in retina of frog optic nerve transected distribute in a slightly wider area.

Key words retina, gene transfection, gene expression, β -galactosidase, frog