

# 大肠杆菌galK 基因与gpt基因在爪蟾卵母细胞中的表达

黄河 于建康 陆德裕

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

把含有*E. coli* gal K基因和gpt基因的几种重组质粒显微注射到爪蟾(*Xenopus Laevis*)卵母细胞的核中, 用淀粉凝胶电泳检测到了细菌基因的表达产物。*E. coli* gal K基因和gpt基因在爪蟾卵母细胞中的表达依赖于SV40病毒早期启动子的存在, 而小鼠 $\beta$ -珠蛋白启动子在爪蟾卵母细胞中缺乏活性。此外, 增强子在爪蟾卵母细胞中对细菌基因的活性有较为明显的增强作用。

**关键词** 显微注射; 启动子; 增强子

非洲爪蟾卵母细胞作为克隆基因的功能检测系统, 具有材料易得, 操作方便, 转录正确和效率高等优点。外源基因导入这种活细胞后不会发生整合等复杂过程<sup>[1,2]</sup>, 故不存在宿主DNA对导入的外源基因表达的影响, 因而外源基因在这种系统中的表达更接近于细胞内真实的生物学过程。近些年, 国外不少研究者选择该系统来研究基因表达的调控机理<sup>[3,4]</sup>。但在国内, 迄今尚未见到用爪蟾卵母细胞研究基因表达的工作报告。

本文报道了在爪蟾卵母细胞系统中小鼠 $\beta$ -珠蛋白启动子(mouse  $\beta$ -globin promoter)和SV40病毒早期启动子(early promoter)对*E. coli* gal K基因和gpt基因表达能力的影响及HaSV增强子(enhancer)对于基因表达的效应。

## 材料和方法

### (一) 材料

非洲爪蟾系本所动物房饲养。

重组质粒全部由美国NIH的Anderson, W.F.博士惠赠。

淀粉凝胶为Sigma公司产品。

放射性同位素( $^3\text{H}$ )-鸟嘌呤和( $^3\text{H}$ )-半乳糖为上海原子核研究所产品。

### (二) 方法

1. 质粒DNA的制备: 质粒DNA按Berg, P.E.等人的方法<sup>[5]</sup>制备。纯化后的DNA按180 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度溶于MB溶液(内含: 88mM NaCl, 1mM KCl, 2.4mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.82mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.33mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.41mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 7.5mM Tris-HCl, pH 7.6)<sup>[6]</sup>, 供注射用。

2. 卵母细胞的制备: 选体重40—90g的成熟雌爪蟾, 埋于碎冰中冰麻30—60min, 视其不再活动即可手术。手术时使爪蟾腹部向上摊放于冰面, 四肢及头部仍埋存冰内, 用消毒手术剪沿腹中线一侧剪开表皮与肌肉层, 根据实验需要剪取部分卵巢放入盛有MB溶液的培养皿中; 缝合切口, 把爪蟾整个腹部用碘酒和70%酒精

本文于1986年12月24日收到。

本文为中国科学院科学基金资助课题, 并得到美国洛氏基金RF84031资助。

承蒙吴政安副教授的具体指导, 特此致谢。

消毒后。浸于高锰酸钾稀溶液中至苏醒。

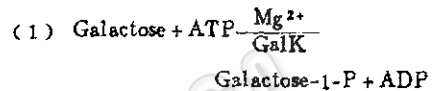
3. 注射 DNA 到卵母细胞的核中: Brown, D.D. 和 Gurdon, J.B.<sup>[4]</sup> 经研究证实 DNA 只有注射到卵母细胞的核中才能被有效地转录。通常爪蟾卵母细胞的核看不见, 必须用特殊的离心方法<sup>[8]</sup>, 使卵母细胞的核浮现于细胞表面, 才能把 DNA 溶液准确地注入核内。实验中选用第 5, 6 期的卵母细胞<sup>[7]</sup>。具体操作方法是: 用氯仿将孔径为 1mm 的尼龙网粘贴于塑料培养皿底部, 用 5 号钟表镊子将卵母细胞从卵巢中分离出来, 转移到尼龙网并使动物极向上, 经 8min, 900g 离心, 核即清晰可见。注射针尖孔径为 20—30 $\mu$ m, 每个卵母细胞的核平均注入 40nl DNA 溶液。卵母细胞的分离与注射均在解剖镜下完成。注射后的卵母细胞置 MB 溶液中 19℃ 培养 40h, 挑选存活的卵母细胞按每组 30 个分装于 1.5ml 塑料小离心管中, 于 -20℃ 冰箱内保存供分析用。

4. 酶活性检测: 基本上按 Schumpertli, D. 等人的方法<sup>[9]</sup>, 取冻存的卵母细胞(每组 30 个, 实验组与对照组均同), 加 45 $\mu$ l 缓冲液 (1mM DTT, 0.1% Triton X-100, 10% 甘油, 10mM Tris-HCl, pH 8.0) 匀浆, 经 10000rpm, 3min 离心后, 吸取上清液 40 $\mu$ l (每孔均同) 于 12.5% 的淀粉凝胶中电泳过夜 (120V, 4℃), 淀粉溶解液为 1.21mM 柠檬酸, 6.07mM  $K_2HPO_4$ , 0.5mM DTT。电泳缓冲液为 27mM 柠檬酸, 167mM  $K_2HPO_4$ 。电泳完毕, 将胶水平剖成两片, 分别加 35 $\mu$ l [<sup>3</sup>H]-鸟嘌呤混合液 (9.3mM MgCl<sub>2</sub>, 4.7mM PRPP, 93mM Tris-HCl, pH 7.5) 和 35 $\mu$ l [<sup>3</sup>H]-半乳糖混合液 (29.4mM ATP, 38.2mM MgCl<sub>2</sub>, 294mM Tris-HCl pH 8.0), 37℃ 反应 1h, 加固定液 (0.1M LaCl<sub>3</sub>, 0.1M Tris-HCl,

pH 7.5) 固定 3h, 于 4℃ 下蒸馏水充分漂洗, 甲醇脱水 3 次后, 放入含 10% PPO 的甲醇溶液中浸泡 3h 以上, 将胶烘干加 X-光胶片于 -70℃ 冰箱中放射自显影 3—4 周。

## 结 果

已知半乳糖激酶 (galactokinase, GalK) 和鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (guanine phosphoribosyl transferase, GPT) 催化如下反应:



当卵母细胞提取物与同位素标记的底物发生反应时, 即可确知上述两种酶存在与否。尽管卵母细胞自身也具有 GalK 酶和 GPT 酶, 但实验证实它们与 *E. coli* 的 Gal K 酶和 GPT 酶在淀粉凝胶电泳中是截然可分的。

### (一) *E. coli* gal K 基因的表达

重组质粒 pSVK 100, pPB22 和 pPB12 均含有 *E. coli* gal K 基因, 将它们导入爪蟾卵母细胞后, pSVK 100 中的 gal K 基因表达出细菌 Gal K 酶产物, pPB22 和 pPB12 两组则与未经导入外源基因的正常卵母细胞一样, 只产生爪蟾卵母细胞的内源 Gal K 酶 (图 1)。这三种质粒中 gal K 基因构造上的差异是, pSVK 100 中 gal K 的启动子为 SV40 早期启动子, pPB22 和 pPB12 的 gal K 连接的是小鼠  $\beta$ -珠蛋白启动子。不同的启动子造成了 *E. coli* gal K 基因在爪蟾卵母细胞中表达上的差异。

### (二) *E. coli* gpt 基因的表达

pPB22 与 pPB22H 两种重组质粒均含 *E. coli* gpt 基因, 且 5'-末端与 SV40 早期

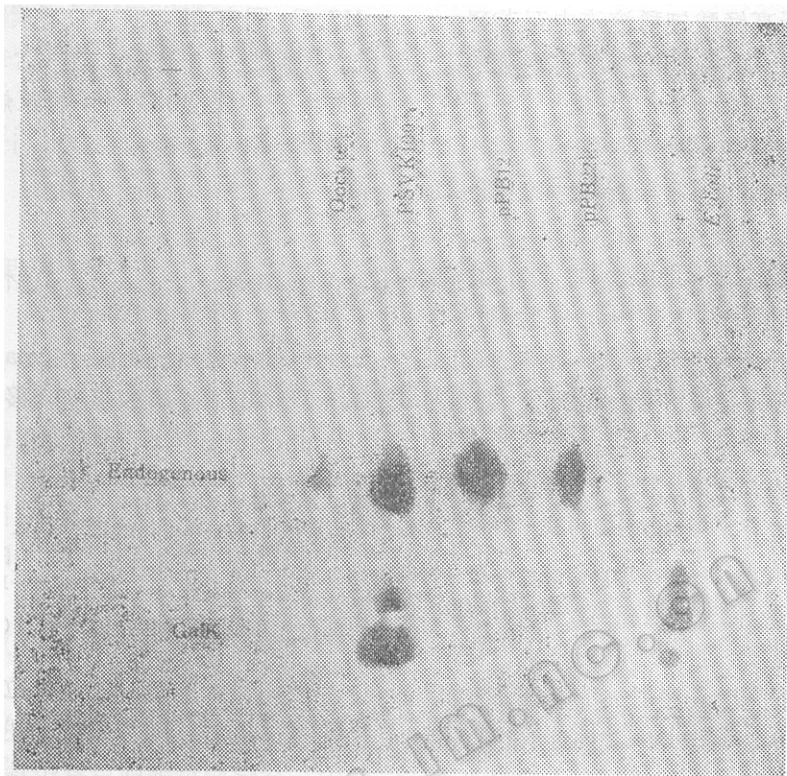


图 1 SV40启动子使*E. coli* galK基因在爪蟾卵母细胞中表达

Fig. 1 SV40 promoter made expression of *E. coli* galK gene in oocytes of *Xenopus laevis*

启动子相连接。在这两种质粒中，虽也含*E. coli* gal K 基因，但由于酶检测的专一性，不至产生混淆。实验显示，注射过这两种重组质粒的爪蟾卵母细胞提取物，除具有正常卵母细胞的GPT酶外，还检测到*E. coli*的 GPT 酶（图2）。这一结果表明，SV40早期启动子不仅可使*E. coli* gal K基因，也能使*E. coli* gpt 基因在爪蟾卵母细胞中正常表达。

### （三）增强子对基因表达的影响

图2结果中，pPB22与 pPB22H 显示出酶产物量的差异，经激光密度仪对图2的放射自显影 X-光胶片扫描测定表明，pPB22H的GPT酶产物量比 pPB22 要高出1.66倍（图3，产物量的计算由面积分方法求得），此图内源GPT产物量二者无差异。

pPB22H 重组质粒在构造上除多插入

一个HaSV 增强子外，其余部分与 pPB22 相同。显然，pPB22 H中gpt基因表达的强化与该增强子的存在密切相关，这与Berg, P. E. 等人<sup>[12]</sup>使用同样的基因在培养细胞转化的工作中的结论一致。

如前所述，pPB12与pPB22 质粒中的galK 基因由于携带小鼠  $\beta$ -珠蛋白启动子而未有表达，至少表明这个启动子在爪蟾卵母细胞中活性较低。Banerji, J. 等<sup>[11]</sup>认为，当某些启动子活性很低时，加入增强子可使其活性提高。由此，我们又以 pPB12H及pPB22H（在pPB12和 pPB22 重组质粒上分别插入一个 HaSV 增强子而构成）注入爪蟾卵母细胞，然后测定*E. coli* galK基因的表达情况。图4的结果指出，这几个重组质粒中*E. coli* galK基因都未有可检测出的表达。这提示，小鼠 $\beta$ -珠蛋白

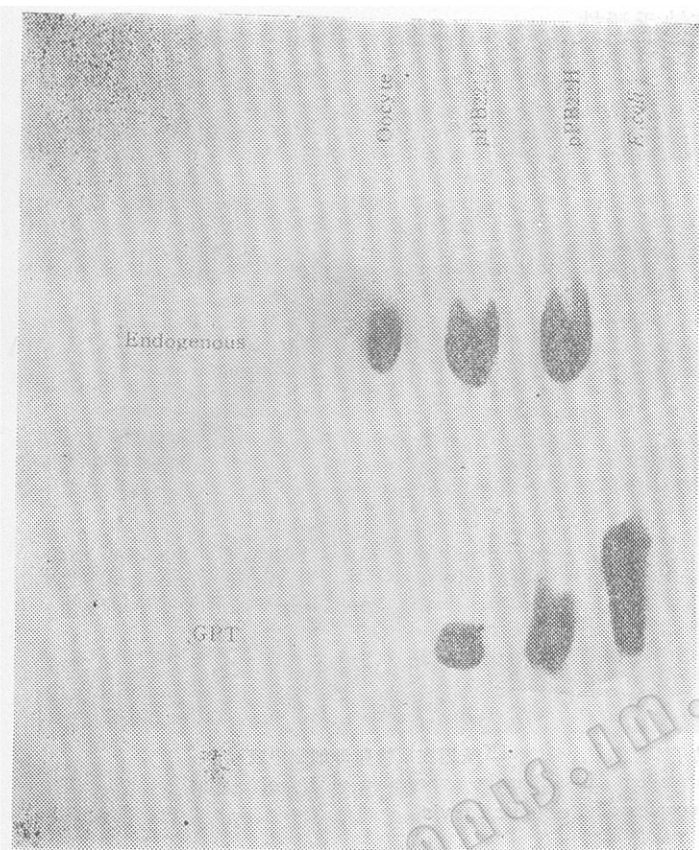


图 2 SV40 启动子使 *E. coli gpt* 基  
因在爪蟾卵母细胞中的表达

Fig. 2 SV40 promoter made  
expression of *E. coli gpt* gene in  
oocytes of *Xenopus laevis*

pPB22H

pPB22

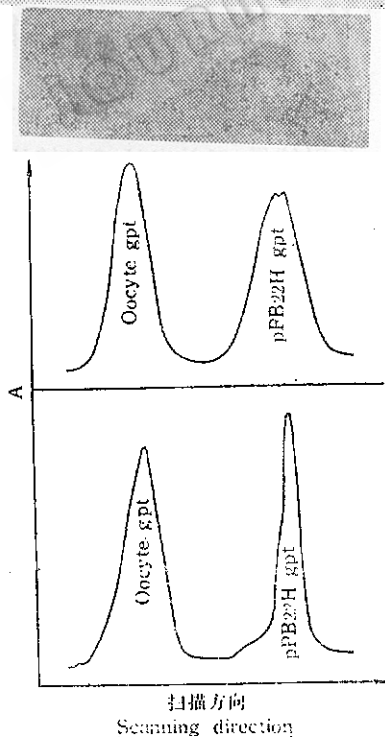


图 3 增强子对酶产物的影响

Fig. 3 Effect of the enhancer on  
the enzymic product

启动子在爪蟾卵母细胞中可能根本缺乏活性。



图 4 小鼠 $\beta$ -珠蛋白启动子不能使*E. coli* *galK*基因在爪蟾卵母细胞中表达  
Fig. 4 Mouse  $\beta$ -globin promoter can not make expression of *E. coli* genes in oocytes of *Xenopus laevis*

## 讨 论

本实验的结果证明, 克隆的 *E. coli* *galK*和 *gpt* 基因在爪蟾卵母细胞中的正常表达依赖于 SV40 病毒早期启动子的存在。当*E. coli* *galK*基因与小鼠 $\beta$ -珠蛋白启动子相连接时, 该基因不能表达; 即使插入HaSV增强子也不能改善这种情况。故小鼠 $\beta$ -珠蛋白启动子在上述胞中没活性。

Anderson, W. F. 则报道这个启动子在小鼠受精卵中也缺乏活性, 其原因是 DNA 序列被严重甲基化了<sup>[10]</sup>。

一些研究工作已证实甲基化作用(methylation)是与真核基因的表达调控密切相关的<sup>[13-16]</sup>, 而在已分化的细胞中, 甲基化作用比较弱<sup>[17]</sup>。Anderson, W. F. 进一步指出, 小鼠 $\beta$ -珠蛋白启动子在培养

细胞中之所以有活性, 正是因为该启动子在这里很少被甲基化的缘故<sup>[10]</sup>。至于它在爪蟾卵母细胞中的失活是否也系甲基化作用结果, 目前尚缺乏足够的证据, 有待进一步分析。

在本实验中,*E. coli* *galK*基因和*gpt*基因在爪蟾卵母细胞中的表达产物与 *E. coli* GalK 酶和 GPT 酶在淀粉凝胶电泳上显示了一致的迁移率。但用同样的基因转化培养细胞, 发现被转化细胞的表达产物与 *E. coli* GalK酶和GPT酶的电泳迁移率略有差异<sup>[9,12]</sup>。这说明, 外源基因在爪蟾卵母细胞系统中的转录及转录产物的加工与修饰, 比培养细胞更加接近其本来的生物学过程。

此外, 实验还观察到, 当外源基因存在时, 不论其是否有效表达, 均使卵母细胞的内源Gal K酶或 GPT酶活性得到一定程

度的增强(图 1、2、4), 因此, 在加样量一致时(每组 30 个卵母细胞), 对照组的内源酶活性看上去较实验组相对弱一些。这种现象还不能有满意的解释。

### 参 考 文 献

- [1] Ford, C.C. & Woosland, H.R., *Dev. Biol.*, 43:189, 1975.
- [2] Harland, R.M. & Laskey, R.A., *Cell*, 21:761, 1980.
- [3] Gurdon, J. B. & Melton, D.A., *Ann. Rev. Genet.*, 15:189, 1981.
- [4] Gurdon J. B. & Brown, D.D., *Dev. Biol.*, 67:346, 1977.
- [5] Berg, P. E. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73:697, 1976.
- [6] Gurdon, J. B., *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 20:401, 1968.
- [7] Dumont, J. N., *J. Morphol.*, 136:153, 1972.
- [8] Kressmann, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75:1176, 1978.
- [9] Schumperli, D. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79:257, 1982.
- [10] Anderson, W.F., *Science*, 226:401, 1984.
- [11] Banerji, J. et al., *Cell*, 27:299, 1981.
- [12] Berg, P.E. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 3:1246, 1983.
- [13] Doerfler, W., *Annu. Rev. Biochem.*, 52:93, 1983.
- [14] Storb, U. & Arp, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80:6642, 1983.
- [15] Mavilio, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80:6907, 1983.
- [16] Razin, A. & Riggs, A.D., *Science*, 210:604, 1980.
- [17] Graessmann, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80:6470, 1983.

## EXPRESSION OF *E. COLI* GALK AND GPT GENES IN OOCYTES OF *XENOPUS LAEVIS*

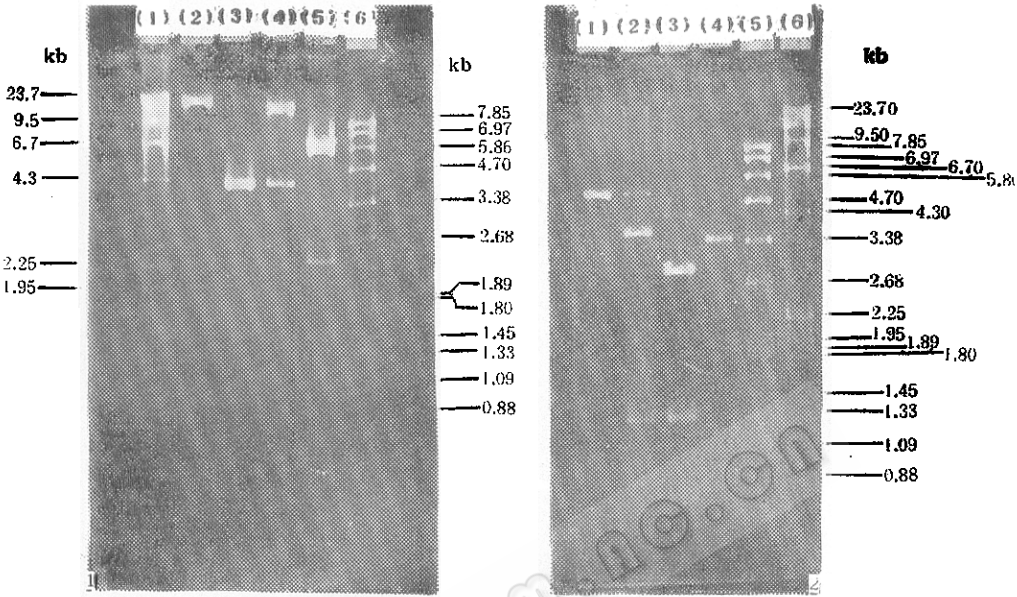
Huang He Yu Jiankang Lu Deyu

(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing)

Recombinant plasmids, pSVK100, pPB12, pPB22 and pPB22H which contain *E. coli* galk and gpt genes, were introduced into the germinal vesicle of *Xenopus laevis* oocytes by microinjection. After incubation at 19°C for 40h, starch gel electrophoresis was used for assaying the enzyme activity. It was shown that the expression of *E. coli* galk and gpt genes in *Xenopus* oocytes depended on the presence of SV40 early promoter. In contrast, *E. coli* galk gene did not show any activity in *Xenopus* oocytes when only mouse  $\beta$ -globin promoter was present. Our results also showed that HaSV enhancer stimulated the expression of *E. coli* gpt gene in oocytes of *Xenopus laevis*.

### Key words

Microinjection; promoter; enhancer



图版说明

Explanation of plate

1. 质粒pX0100的限制酶酶切电泳图  
The electrophoresis pattern of restriction endonuclease cleavage sites on the plasmid pX0100  
以下列酶消化 pX0100 pX0100 digested with following endonucleases: (2) EcoRI,  
(4) HindIII; (5) BglIII; (3) HindIII 消化的 pBR322 pBR322 digested with HindIII; 分子量标准 mol-  
ecular weight standard: (1) HindIII酶切λDNA λDNA digwsted with HindIII; (6) EcoRI酶切 sPPI  
DNA sPPI DNA digested with EcoRI.
2. 质粒 pXI201 的限制酶酶切电泳图  
The electrophoresis pattern of restriction endonuclease cleavage sites on the plasmid pXI201  
以下列酶消化 pXI201 pXI201 digested with following endonucleases: (1) HindIII; (2) SalI,  
(3) HindIII and SalI; (4) HindIII酶切pAT153 pAT153 digested with HindIII.  
分子量标准 molecular weight standard: (5) EcoRI 酶切的 sPPI DNA sPPI DNA digested  
with EcoRI; (6) HindIII; 酶切λ DNA λDNA digested with HindIII.

(continued from page 47)

Meanwhile, effects of different host strains on the expression of the gene were examined. The results show that both the D-xylose operon and the isomerase gene can be expressed in the different *E. coli* strains.

Key words

D-xylose isomerase; molecular cloning; gene expression