

## 萤火虫荧光素酶基因在爪蟾卵母细胞中的表达

金振华 陆德裕 黄河 王海燕 裴文 罗林\*

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

用限制酶BamHI切割质粒 pDO432并经琼脂糖凝胶电泳分离, 将所得荧光素酶编码序列作为插入片段。用Hind III和 BamHI I 切割pSVK100去除 galk基因及部分 t splice 序列作为载体, 构建了一对其启动区和荧光素酶编码序列位向相反的质粒, pSV-Luc19及pSV-Luc20。正位向的pSV-Luc20能在爪蟾卵母细胞中转录, 翻译并产生活性酶蛋白。结果表明: 荧光素酶基因和爪蟾卵母细胞可以构成一个监测启动子活性的有效系统。

**关键词** 荧光素酶(Luciferase); 爪蟾卵母细胞; 基因表达

近年来, 有不少关于萤火虫荧光素酶基因结构、转移和表达的研究<sup>[1,2]</sup>。David等(1986)通过电激将该酶基因引入胡萝卜的原生质体, 或经根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)Ti质粒引入烟草植株<sup>[1]</sup>。接着, Jeffrey等(1987)通过转染将荧光素酶基因引入哺乳动物培养细胞CV-1<sup>[2]</sup>, 它们都得到表达。这方面的研究所以引起生物学家的兴趣和重视, 不仅在荧光素酶本身具有广泛的商业应用价值, 更重要的是它可以作为一种报道基因(Reporter gene)。通过测定荧光素酶基因的表达, 监测各种启动子的活性, 利用荧光素酶基因与特定目的基因的连锁或共转移, 可以建立非放射性的外源基因检测体系。

David等(1986)和Jeffrey等(1987)分别采用电激或质粒转染途径得到的转荧光素酶基因植株或细胞株比例低、选择步骤烦琐。本实验室首次通过显微注射将该基因引入爪蟾卵母细胞, 目的在于建立一个有较大适用范围、快速、简便的荧光素酶基因表达体系。

本文介绍含萤火虫荧光素酶基因融合

质粒的构建, 正位向融合质粒在爪蟾卵母细胞中的表达, 以及利用该系统证明基因编码序列与启动区连接位向对表达的影响和其它可能用途。

## 材料和方法

### (一) 融合质粒的构建

用限制酶BamHI消化质粒pDO432, 经琼脂糖凝胶电泳分离, 取得大小约1.9kb的荧光素酶编码片段(无内含子, 下同)。用限制酶Hind III及BamHI I 消化质粒pSVK100, 取得含有SV-40启动子、Amp<sup>r</sup>基因的3.4 kb片段作为载体。在dATP, dGTP, dCTP, dTTP及大肠杆菌DNA聚合酶I的Klenow片段作用下, 将上述两个DNA片段两端填补成平末端, 然后在T4连接酶作用下, 按文献[3]步骤连接成环。

本文于1990年5月25日收到。

Dr. David W. OW惠赠pDO432质粒及荧光素酶基因序列分析资料; 于德康教授提供pSVK100; 杜森教授指导显微注射技术, 谨致谢意。

\* 现工作地址: 四川大学生物工程系。

## (二) DNA 的转化和转化体的筛选鉴别

用上述连接混合物转化大肠杆菌 RRI, 并用补充 50 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 选择培养基筛选转化体。通过随机引物 DNA 标记步骤<sup>[4]</sup>, 用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP 标记荧光素酶基因片段作为杂交探针, 经菌落原位杂交从 Amp<sup>r</sup> 转化体中筛选出杂交阳性菌落。

## (三) 融合质粒的鉴定及纯化

用文献[5]所述步骤从阳性菌落培养物制备质粒 DNA。用 Pvu II 消化质粒, 1% 琼脂糖电泳鉴定质粒大小。质粒扩增及氯化铯-溴化乙锭等密度超离心纯化均按文献[5]步骤。

## (四) 荧光素酶基因片段与启动子连接位点的鉴定

选择载体质粒和荧光素酶基因片段上的特定限制位点, 分别用 Xba I 及 Xba I + Pvu II 酶切融合质粒, 并用琼脂糖凝胶电泳分离, 根据限制酶片段大小确定连接位向。

## (五) 融合质粒引入爪蟾卵母细胞

经显微注射, 将 MB 液稀释的浓度约为 135  $\mu$ g/ml 的质粒溶液引入 V—VI 期的爪蟾卵母细胞核, 每核平均注入 ~40nl, 然后转移到新鲜的 MB 溶液中, 19 $^{\circ}$ C 培育不同时间<sup>[6]</sup>。

## (六) Northern blot 分析

按文献[7]所述步骤制备不同培育时期卵母细胞的全 RNA, 分别取 20 $\mu$ g 经甲醛变性, 琼脂糖凝胶电泳, 转移到硝化纤维素膜, 用前述随机引物 DNA 标记法得到比强 10<sup>8</sup>cpm/200ng 的 <sup>32</sup>P-荧光素酶基因片段作为探针, 进行 Northern blot 分析。

## (七) 荧光素酶活性的检测

取注射和培育过的卵母细胞 30 枚, 置 1.5 ml 的小塑料管内, 加入 30  $\mu$ l 抽提缓

冲液 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液 pH7.5, 1 mmol/L DTT) 用玻璃棒研碎, 12000rpm 离心 5 min, 上清液即荧光素酶粗制品。活性测定时, 取反应缓冲液 (甘氨酸-甘氨酸, 25mmol/L, pH7.8, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 15 mmol/L, ATP 6 mmol/L) 350 $\mu$ l, 加入 1 mmol/L 荧光素 100 $\mu$ l, 最后加粗酶制剂 20 $\mu$ l。用光度计 (Luminometer LKB, 1250型) 测定发射光。

## 结果与讨论

### (一) 融合质粒的构建

图 1 表示按实验方法所述步骤得到的 pSV-Luc20 融合质粒。图 2 表示融合质粒的结构。当荧光素酶基因片段以其起始密码子 ATG 一端, 与启动子 SV-40 下游连接时, 即构成正位向产物 (Sense-Orientation) pSV-Luc20 融合质粒。反之, 荧光素酶基因片段倒转后, 连接于启动子下游即构建反位向的 (antisense orientation) pSV-Luc19 质粒。

### (二) 荧光素酶基因在爪蟾卵母细胞中的转录

图 3 下侧表示不同培育时期 mRNA 的杂交信号, 上侧为与含量对应的 mRNA 的激光扫描密度测定曲线。结果表明, 注射的 pSV-Luc20 质粒在培育 20h 即出现转录表达, 产生荧光素酶基因的 mRNA, 40 h 时转录达最高值, 然后在 60 h 时逐步下降。

### (三) 荧光素酶催化底物发射荧光

图 4 表明只有注射具有正位向的融合质粒 pSV-Luc20, 其荧光素酶基因的 mRNA 能被翻译, 并能产生催化底物发射荧光的生物活性酶蛋白。注射反向连接产物 pSV-Luc19 质粒, 则不能形成有生物活性的酶蛋白。

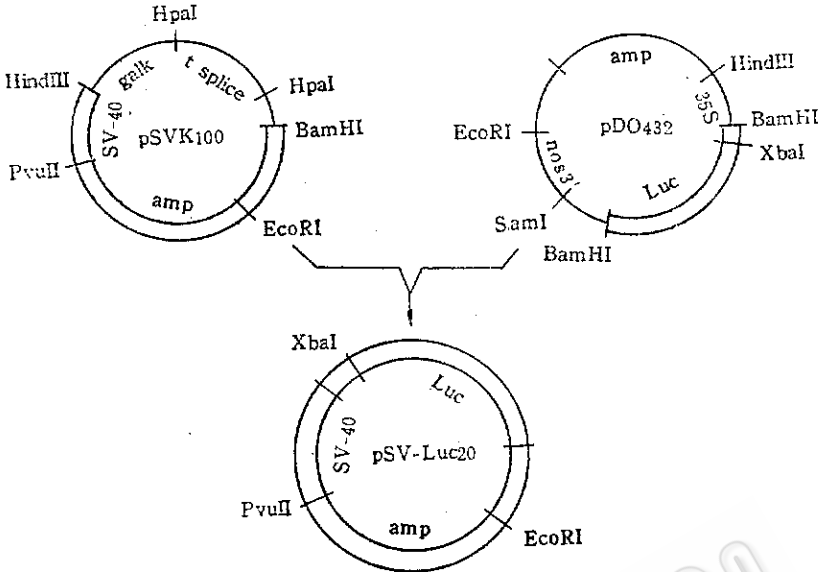


图 1 融合质粒pSV-Luc20的构建

Fig.1 Construction of the fusion plasmid pSV-Luc20

双线部分分别表示作为构建融合质粒的载体和插入片段

Open boxes indicate the parts which were used to construct the fusion plasmids as vectors and inserts, respectively

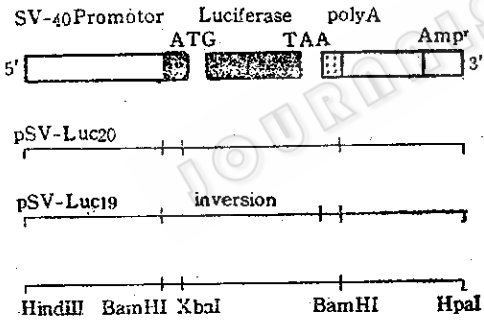


图 2 融合质粒pSV-Luc20及pSV-Luc19的结构

Fig.2 Structure of the fusion plasmids pSV-Luc20 and pSV-Luc19

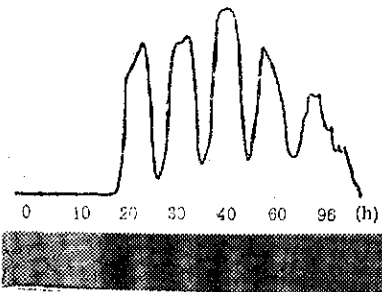


图 3 荧光素酶基因在不同培育时间的爪蟾卵母细胞中的时序表达

Fig.3 Time course expression of luciferase gene in *Xenopus* oocytes

10枚注射 pSV-Luc20 的卵母细胞的粗酶抽提液与 10μl (1 μg/μl) 荧光素酶 (Sigma公司No: L5256) 制剂的催化活性相当。

(四) 荧光发射特性

图5显示在反应体系中加入注射pSV-Luc20 卵母细胞抽提物后约 30 秒内即出现光单位的峰值(闪光), 随后迅即衰减到低水平, 并延续至 6 min。

根据上述结果可以确定, 所构建的 pSV-Luc20 是一个能够在爪蟾卵母细胞中表达并产生活性荧光素酶的质粒。基因片段连接位向与表达活性密切相关。反位向的pSV-Luc19则完全不能产生活性蛋白。

由于取自萤火虫荧光素酶是一种以荧光素, ATP 及氧为底物, 将化学能转变

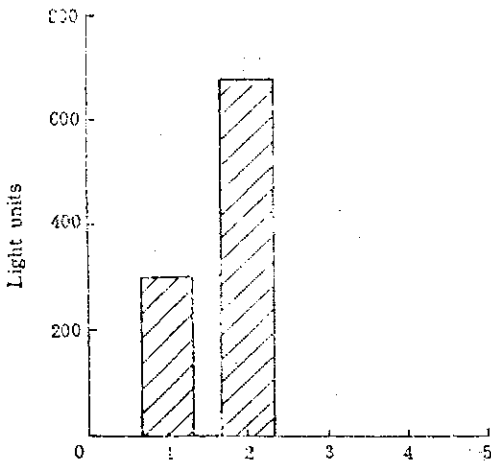


图 4 不同实验组合的荧光素酶活性

Fig.4 Activity of luciferase in the different experiment groups

1. Sigma公司生产的荧光素酶制剂 + 荧光素 + ATP  
Luciferase (Sigma) + luciferin + ATP
2. 注射pSV-Luc20质粒的卵母细胞抽提液 + 荧光素 + ATP  
Extract of *Xenopus* oocytes injecting plasmid pSV-Luc20 + luciferin + ATP
3. 注射pSV-Luc19质粒的卵母细胞抽提液 + 荧光素 + ATP  
Extract of *Xenopus* oocytes injecting plasmid pSV-Luc19 + luciferin + ATP
4. 未注射质粒的卵母细胞抽提液 + 荧光素 + ATP  
Extract of *Xenopus* oocytes un-injecting plasmid + luciferin + ATP
5. 水 + 荧光素 + ATP  
Water + luciferin + ATP

为光能的高效生物催化剂。在有过量底物的情况下, 它催化产生的光发射值与加入反应系统中的酶量成比例。因此, 荧光素酶基因的表达可以精确定量。用爪蟾卵母细胞表达荧光素酶基因, 简便、直接。可

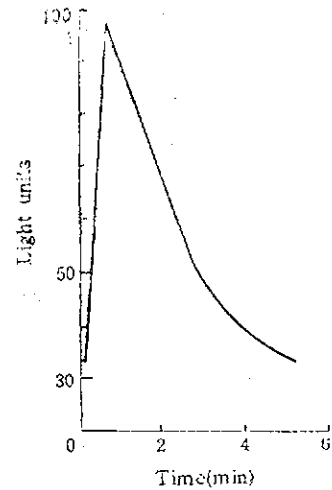


图 5 荧光发射特性

Fig.5 Time course of light emission

以避免转基因株的选择分离。因此, 有理由认为, Luc 基因-爪蟾卵母细胞可以作为精确、快速、廉价的监测动物基因启动子活性的良好系统。

上述结果还表明, 当荧光素酶基因的编码序列以其起读密码子 ATG 一端连接于 SV-40 启动子下游, 构成正向的融合质粒 pSV-Luc20。它能在爪蟾卵母细胞中转录产生 mRNA, 继而通过翻译形成有生物活性的荧光素酶蛋白。相反, 如其荧光素酶编码序列倒转, 即构成反位向的融合质粒——pSV-Luc19。通过转录它只能产生反义 RNA (antisense RNA)。反义 RNA 有与相应目的基因互补的特性, 所以能定向地与其结合, 从而阻碍相应蛋白质的合成。因此, 这一系统还是一个从空间、时间及数量方面研究反义 RNA 调节基因表达的良好模型。

## 参 考 文 献

- [1] David W.O.W., et al.; *Science*, 234:856-859, 1986.
- [2] Jeffrey R.DE Wet, et al.; *Mol.cell.Biol.*, 7:725-737, 1987.
- [3] Pheiffer. B. H. and Zimmerman. S. B.; *Nucl.Acids.Res.*, 11:7853, 1983.
- [4] Feinberg. A. P. and Vogelstein. B.; *Anal,Biochem.*, 132: 6, 1983.

- [5] T.Maniatis, et al.: Mol.cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 88—94, 1982.
- [6] 黄河等, 生物工程学报, 4(1):26—31, 1988.
- [7] Current protocols in Molecular Biology, published by Greene publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987.

## Expression of the Firefly Luciferase Gene in Oocytes of *Xenopus laevis*

Jin Zhenhua Lu Deyu Huang He Wang Haiyian Pei Wen Luo Lin  
(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing)

A couple of fusion plasmids, pSV-Luc20 and pSV-Luc19, were constructed by using the larger BamHI restricted fragment of plasmid pSVK 100 and the smaller HindIII-BamHI restricted fragment of plasmid pDO 432. They have different fusion orientations between the coding sequence of the luciferase and SV-40 promoter, they are sense and anti-sense plasmids.

The results indicated that pSV-Luc20 could be expressed and luciferase with high activity was formed when the plasmid was introduced into *Xenopus* oocytes by micro-injection. Therefore, the luciferase gene -*Xenopus* oocyte is an excellent system for monitoring the promoter activity.

### Key words

Luciferase; oocyte of *Xenopus laevis*; gene expression