

· 综 述 ·

广泛用于基因表达调控研究中的 *LacZ* 基因

何 维 吴鹤龄

(北京大学生命科学学院, 100871)

LacZ Gene Widely Applied in the Research of Gene Expression and Regulation

He Wei Wu Heling

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

LacZ 基因是大肠杆菌乳糖操纵子中的一个基因, 1969年, 美国哈佛大学以 Beckwith 博士为首的研究小组, 应用 DNA 分子杂交技术首次分离到该基因。 *LacZ* 基因编码的 beta-半乳糖苷酶(简称 beta-gal)是由 4 个亚基组成的四聚体, 可催化乳糖的水解。 Beta-gal 比较稳定, 用 X-Gal(5-溴-4-氯-3-吡啶-beta-半乳糖苷)为底物进行染色时, 呈蓝色, 便于检测和观察。 *LacZ* 基因的诸多优点使它成为基因工程实验中的一个常用标记基因。例如, 基因克隆中常用的质粒载体 pUC19 及噬菌体载体 M13 系列均带有 *LacZ* 基因。

通过重组 DNA 技术构建的融合基因(gene fusion)对于细菌基因调控方面的研究已被证明是一有力的工具, 也就是说将相关调控区域同易检测基因相融合来研究编码难于或不可能直接检测的蛋白质基因的调控。这一方法近年来已广泛应用于哺乳动物细胞和胚胎的基因表达和调控的研究。另外, 可以用抗 beta-gal 的多克隆抗体通过简单的免疫沉淀纯化蛋白, 从而获得基因表达产物。

1 基因的时空表达

转基因小鼠实验系统已被广泛用于单一基因功能的研究, 如组织特异表达和发育程序的调控。产生转基因小鼠最普遍的方法是将 DNA 通过显微注射注入受精卵的原核中。在研究小鼠胚胎发育过程中外源基因的时空表达方面, 将融合基因注射进入小鼠受精卵原核中更是一条行之有效的途径。Takeda 等人通过上述方法, 将 SV40 早期启动子和 *LacZ* 基因形成的融合基因注入原核来研究小鼠胚胎着床前期发育过程中外源基因的表达。发现注入的外源基因从 4 细胞到胚泡这段时期均有表达; 在桑葚胚时期基因表达的胚胎数占所检测胚胎数的百分比最高(38%); 另外, 表达依靠 SV40 启动子的存在。

LacZ 基因还可做为外源启动子在小鼠早期胚胎发育中是否有功能的指示基因, 评估来自不同真核启动子的基因表达情况。Stevens 等人构建的融合基因含有可诱导的小鼠 MT-1 promoter 和 *LacZ* 基因, 用锌诱导处理后, 表明 MT-1 promoter 从小鼠胚胎发育开始就有功能, 它在早至 1 细胞时期即能通过诱导使其后的 *LacZ* 基因表达。Bonnerot 等用逆转录病毒感染多能干细胞, 通过 beta-gal 酶活性检测或通过免疫电泳技术, 证明了所构建的融合基因(*nls-beta-Gal*)所表达的蛋白分布在细胞核周围。用原核注射方法所得结果表明, 与 *LacZ* 基因相融合的几种启动子(SV40 early, RSV, beta-actin)在 2 细胞胚胎中有功能而 Mo-MLV 启动子则没有功能。

2 已知调控序列有效区段的位置和作用

不仅用于研究外源基因的时空表达, *LacZ* 基因还可用于研究某基因转录起始点附近那段区域的 DNA 序列具有调控因子的作用及其功能如何。Kothary 等用 *LacZ* 基因与另一种来自小鼠热休克蛋白基因 *hsp68* 的启动子相连构成的融合基因来制造转基因小鼠。研究表明, *hsp68* 基因转录起始点附近-664 到+113 之间的序列对成体尾组织和胎儿阶段各种组织中 *LacZ* 基因的压力诱导表达(stress-inducible expression)是有效的; 融合基因从着床前期胚胎到发育的胚泡阶段为止对诱导不起反应, 如同对内源 *hsp68* 基因报道的那样; 在发育的任何阶段通过原位染色或 Northern 分析, 甚至在内源基因 *hsp68* 组成表达的组织中均无组成表达。由此表明, 该融合基因的 *hsp68* promoter 除含有对热和亚硝酸盐诱导有效的序列外, 还含有在发育期间控制组织特异性表达的序列。

3 找寻未知调控序列

用携带 *LacZ* 基因的重组逆转录病毒载体做为“可移动的外显子”, 可以对哺乳动物细胞未知转录单位进行原位分析。1989 年, Brenner 等构建了带有 *LacZ* 基因的 Mo-MuLV 无转录能力的病毒衍生物——Mo-MuLV*LacZ*, 这种逆转录病毒载体可以随机插入许多染色体位点, 但在每一个细胞中仅插在一个位点上, 该载体处于原病毒状态时缺乏转录活性, 当它插入到染色体上适当位置表达 *LacZ* 基因时, 证明周围染色体区域具转录单位, 从而为产物还不知道的各种哺乳动物基因转录单位的鉴定、作用、分离和研究开辟了一条新的道路。

4 用于医学研究

在医学方面, 利用 *LacZ* 基因在哺乳动物中对某些重要蛋白质基因的时空表达和调控进行研究近年来更是蓬勃发展, 文献量也增加较快。在哺乳动物中枢神经系统中, 髓磷脂(myelin)对于轴突的形态、功能和生长有显著影响。1992 年, Foran 等用由髓磷脂基本蛋白基因的启动子与 *LacZ* 基因构成的融合基因制成转基因小鼠来研究髓磷脂的时空表达, 所得结果也被免疫细胞化学和超微结构的资料所证实。在基因时空表达方面, 用类似方法人们还研究了人类 *zeta-globin* 基因、人类神经丝 H 基因、前脑啡肽基因、金属硫蛋白酶组织抑制物(TIMP)基因等等。Yagi 等人通过同源重组将 *LacZ* 基因插入到基因 *fyn* 位置, 从而检查 *fyn* 基因在中枢神经系统中的时空表达情况。在基因调控方面, Goldhamer 等人通过利用 *LacZ* 基因来分析生肌决定基因 *myoD* DNA 的调控元件, 从而进一步研究骨骼肌谱系决定的分子基础。

利用 *LacZ* 基因为基因治疗的实际应用进行基础理论方面的探索更是极为便利的。1990 年, Wolff 等人用 Rous 肉瘤病毒启动子控制 β -半乳糖苷酶基因和荧光素酶基因的转录, 分别注射到小鼠大腿骨骼肌中, 发现在注射区内的肌管中有这两种基因的表达。1992 年, Quantin 为研究腺病毒做为基因表达载体在肌细胞中的潜能, 构建含有在肌肉特异调节序列控制下的 *LacZ* 基因的重组腺病毒载体。注射后在小鼠体内肌肉中表达了 75 天。

在基因治疗方面, 血友病 B 是由于凝血因子 IX 缺乏所致的一种严重出血性疾病, 为 X 染色体连锁遗传, 在这种遗传病的基因治疗方面, Yao 等利用 *LacZ* 基因探索了用小鼠骨骼肌细胞作凝血因子 IX 的传递工具的可行性。他们首次用以 Moloney murine leukemia 病毒为基础, 含有细菌 *LacZ* 基因的载体感染 CZC12 成肌细胞, 用转化的细胞注入小鼠骨骼肌中, 发现这些细胞重新产生肌纤维, 并继续表达 β -半乳糖苷酶。用含有人类凝血因子 IX cDNA 的重组逆转录病毒载体做同样研究, 在小鼠骨骼肌中检测到每毫升血清中高达 1 微克的重组人类凝血因子 IX 的表达。在血友病 B 的体细胞基因治疗方面, 这些结果为用骨骼成肌细胞做为有效的基因传递工具提供了理论基础。