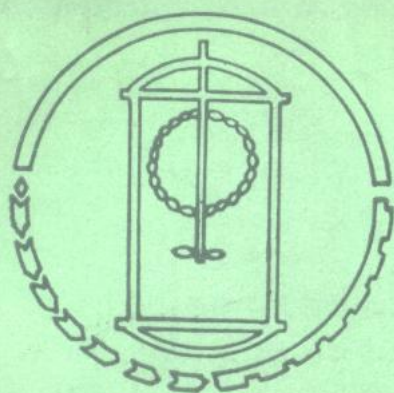


Collected Papers in Biotechnology

纪念《生物工程学报》创刊 10 周年



生物工程论文集

《生物工程学报》编辑部 编

化学工业出版社

生 物 工 程 论 文 集

纪念《生物工程学报》创刊十周年

《生物工程学报》编辑部 编

化 学 工 业 出 版 社

(京)新登字第 039号

生物工程论文集

纪念《生物工程学报》创刊十周年

《生物工程学报》编辑部 编

责任编辑: 侯奎荣

封面设计: 李德懿

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里3号)

北京市百善印刷厂印刷

新华书店北京发行所经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 9.25 字数 225 千字

1994年5月第1版 1994年5月北京第1次印刷

印数 1—1200

ISBN 7-5025-1337-X/Q·9

定价 12.00元

纪念《生物工程学报》创刊十周年

70年代末期, 基因工程作为里程碑的事件出现标志着人们能按自己的意图改造生物的遗传性状, 就如机电工程师按设计蓝图构建一台发电机一样, 其实践价值和理论意义是十分明显的。于是以基因工程为核心, 结合发酵工程、细胞工程、酶工程、生化工程等成为生物工程, 在各国迅猛发展, 创造了巨大的生物技术产业。我国重视新技术革命, 而且优先发展的领域之一就是生物工程, 国家及时成立了领导全国生物工程的机构, 制定了规划等等, 这样生物工程研究事业便欣欣向荣地开展起来。在这种令人鼓舞的形势下, 为了给生物工程研究创造交流的新园地, 微生物学会的同志们决定出版《生物工程学报》(“Chinese Journal of Biotechnology”)。多承国家科委生物工程开发中心和上海市科委大力支持了启动费, 各位专家教授热心承担审稿工作, 这样中国的《生物工程学报》第一卷就于1985年和大家见面了。

今年是学报创刊十周年, 是值得志庆的。回顾过去9卷学报共刊出了517篇论文, 35篇综述和20篇评论, 论文中基因工程为数最多, 占43.5%, 其次是细胞工程14.2%, 酶工程9.7%, 微生物工程7.7%, 生化工程14.3%。承全国从事生物工程研究和生产的专家们的支持, 学报的稿件源源而来, 经编委及有关专家的认真审阅, 从中择优刊出, 我们对赐寄稿件的同志们表示衷心的感谢。

在这过程中值得提起的是英文版的出版。1988年, 素以出版前苏联科技情报的Allerton Press, Inc. (纽约) 的副经理提出为学报出版英文版的建议。我们认为这是学报走向国门与国外交流的好机会, 协约较快成立, 由编辑部提供英文稿件, 出版发行事宜则由该公司完全负责。

编辑部人力从一开始便是紧张的, 同志们都是力疾办刊的。英文版的刊出, 等于办两个刊物, 工作之繁重, 可以想见。我们不能忘记我们两位具有才华的编辑之一的张震元同志, 英年早逝, 想起来使人伤感。学报开创之初, 当时的学会秘书长王大昶教授多方联系, 争取经费, 他的劳苦功高, 我们也是不能忘记的。

在缅怀创刊十周年之际, 我们要感谢热心的朋友们和编委们的大力资助, 使编辑部能够出版这册论文集, 作为创刊十周年的纪念品。

学报将继续前进, 我们竭诚希望各方人士继续赐于稿件, 提出改进的建议, 使《生物工程学报》为我国生物工程科研和生产更好地服务。

焦 瑞 身

1993年11月30日

纪念《生物工程学报》创刊十周年 (焦瑞身)

目 录

生物技术正在改变着世界——祝《生物工程学报》创刊十周年 孟广震 (1)

爪蟾核糖体蛋白 S19 基因 5' UTR 在翻译水平上没有特殊的功能

..... 陈启民 杨丽珠 纪永刚 耿运琪 Mariottini P., Amaldi F. (5)

牛生长激素 cDNA 基因的聚合酶链反应法制备、克隆和表达 石榜驰 周顺伍 (11)

牛的性别鉴定及性别决定基因 SRY 的克隆和分析

..... 王京红 郭三堆 杨应昌 范云六 王大可 许罕华 周鼎年 朱裕鼎 (17)

在线检测葡萄糖浓度酶电极系统研究.....张先恩 张治平 张晓梅 胡伟平 唐建客 (22)

水稻原生质体高分化频率再生植株的获得..... 陈季楚 张 栋 王六发 (28)

固定化活细胞传质—反应过程的模型化研究

..... 魏东芝 袁渭康 袁中一 尹光琳 陈敏恒 (32)

链激酶基因的克隆和表达

..... 汤其群 任 军 丁 皓 肖国伟 丁莉莉 朱运松 宋后燕 (40)

在豌豆根瘤菌中发现离调控蛋白结合区 100 多个核苷酸的二级结构区

参与结瘤基因调控 毛成建 杨国平 史文文 洪国藩 (44)

水稻 10kDa 醇溶蛋白的抗体制备及其克隆基因表达

..... 徐晓明 陈智源 范云六 马建忠 俞梅敏 (49)

抗人重组白细胞介素 1β (rHIL- 1β) 单克隆抗体的研制

..... 杨天兵 陈 勇 沈倍奋 孙启鸿 (55)

高效毛细管电泳在生物领域的应用 李红旗 沈忠耀 (60)

假单胞菌菌株 T46 中与抗杀菌剂福美霜有关基因的分子克隆

..... 蒋伶活 武 波 唐东阶 柏学亮 马庆生 (65)

甘氨酸和 L-异亮氨酸对表达 h α AIFN 和 TNF-h α AIFN 融合蛋白的工程菌的作用

..... 夏东翔 智 刚 汪美先 (70)

低分子量单链尿激酶 cDNA 的构建及其在大肠杆菌中的表达

..... 李秀珍 唐红娣 刘风云 方继明 李 军 俞炜源 (75)

I 型纤溶酶原激活物抑制剂 cDNA 在大肠杆菌中克隆及表达

..... 何 诚 贺 平 张欣平 郝 勤 宋后燕 朱运松 (80)

醋酸泼尼松生产菌株的选育及转化条件的研究

..... 鲁梅芳 路福平 王昌禄 杜连祥 武淑婷 庞俊陆 (84)

共固定化活细胞生产维生素 C 前体的研究

..... 魏东芝 袁渭康 袁中一 尹光琳 陈敏恒 (90)

紫孢侧耳与糙皮侧耳灭活原生质体融合研究·····	朱宝成 燕克勤 王俊刚 李庆余	(95)
氨基酸组成及表达载体对大肠杆菌中重组 HIV-1RT 蛋白形成包涵体的影响 ·····	李 满 陈 辉 马贤凯	(100)
蔗渣纤维素预处理和纤维素酶水解条件的研究 ·····	任 源 谭字榴 浦跃武 高孔荣	(105)
羔羊腹泻双价基因工程亚单位疫苗的应用研究 黄培堂 王叙甫 王焕金 陈 明 黄翠芬 郭 海 尹德萱 常晓琴 郭湘林		(110)
电导法监测植物细胞的生长 ·····	陈 路 柯善强 何子灿 彭艳华 徐立铭 桂耀林 郭仲琛	(115)
pH 扰动导致植物细胞胞内产物的动态释放 ·····	元英进 胡宗定	(119)

简 报

乳杆菌对有机溶剂的适应性研究 ·····	范先国 周可可 李友荣 <u>苏元复</u>	(123)
新疆紫草培养细胞色素的原位提取 ·····	陈士云 侯嵩生 李新明 卢大炎	(127)
壳多糖的制备、性质和固定化三角酵母细胞 ·····	魏中获 杨 勇 金志坤 焦瑞身	(131)

生物技术正在改变着世界

——祝《生物工程学报》创刊十周年

孟 广 震

(中国科学院应用研究与发展局, 北京 100864)

20年前, 两位美国科学家 S. Cohen 和 H. Boyer 在他们的实验室里静悄悄地完成了 DNA 分子的体外重组实验。科学家们始料不及的是他们的成功在日后竟会引发出如此强大的、爆炸性的经济和社会冲击波。他们的成功意味着人类在干预生物进化过程方面获得了更大的自由, 他们的成功实际上也为行将形成的生物高技术产业举行了奠基礼。概言之, 他们的成功开辟了一个生物科学与生物技术的伟大世纪, 把人类文明推向一个新的高度。

科学技术是第一生产力, 重大的科学发明和发现在推动人类社会进步和经济发展方面总是能显示出巨大的作用。

据初步统计, 自 1982 年 Eli Lilly 公司宣布第一个基因工程药物胰岛素投放市场以来, 美国各生物技术公司开发并由 FDA 批准上市的人用治疗药物已逾 25 种, 其中销售量比较大的有促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、人胰岛素、 α -干扰素、人组织纤溶酶原激活素、乙肝疫苗、人凝血因子 VII、白细胞介素-2、人肿瘤坏死因子等, 还有 100 多种医药生物技术产品已进入临床试验阶段。基因治疗技术正在发展, 预计到本世纪末或下世纪初, 人类肿瘤、艾滋病等严重疾病的防治可望实现突破。随着人类 10 万基因序列之阐明, 基因治疗技术将被进一步推广应用。另外, 业已上市的单克隆抗体多达 110 多种。美国 1988 年生物技术产品的销售额为 6.55 亿美元, 到 1992 年则为 49.2 亿美元, 短短的 5 年时间约提高了 7 倍, 其中 53% 为医药产品。

通过前一时期的不懈努力, 农业生物技术一些关键技术已经有所突破, 转基因植物和动物早已问世, 抗病毒、抗虫菸草、蔬菜、棉花等农作物已经进入实用化阶段。目前, 美国农业生物技术约占生物技术销售总额的 8%。据著名的孟山都公司估计, 除培育抗盐碱、抗旱农作物在本世纪尚有困难之外, 其他转基因植物将从 90 年代中期开始陆续投放市场。下个世纪农业生物技术将会有更大的作为, 美国人预测全球农产品增加的 5/6 将靠技术, 只有 1/6 才依靠扩大耕地面积。

医、农以外的生物技术产品 (包括特殊化学品、酶制剂、环境监控生物制品等) 由于微生物技术及生化工程等方面的快速进展, 也表现出强劲的发展势头。以丹麦著名的 Novo Nordisk 公司的情况为例, 该公司用基因工程方法除能生产一些医药产品外, 自 1988 年以来, 以下几种基因工程工业酶制剂已先后投放市场: 洗涤剂用脂肪酶和纤维素酶、酿造用乙酰乳酸脱羧酶、面包制造用淀粉酶、造纸用脂肪酶、纺织用淀粉酶。1991 年又将经蛋白质工程改造

的用于洗涤剂的蛋白酶投放市场。最令人惊异的是该公司正计划发展一种简单的蛋白质结晶技术，准备将来以结晶形式推出洗涤剂用蛋白酶，以无可挑剔的高质量进一步争夺世界酶制剂市场。由此可见，酶工程领域的高技术已不再是科学家实验室里的“游戏”，而已经真的成为创造利润、造福人类的有效手段了。

在展望生物技术的发展前景时，有专家在 *Genetic Engineering News* 上撰文说，90 年代生物技术研究工作的十大热点是基因扩增、人类基因组计划、重组生物体的大田试验、生物传感器、神经科学、蛋白质工程、农业生物技术、转基因生物体、细胞培养以及反义核酸和其类似物。生物技术产业化的十大热点是人的临床治疗、人的临床诊断、植物的生物技术、动物病的防治、添加剂—酶制剂等特殊产物、环境污染监测、毒物的生物降解、生物技术试剂与设备、生物塑料以及化妆品等消费者日常生活用品。预计到本世纪末，美国的生物技术产品的销售额将超过 500 亿美元，经营收入将超过 650 亿美元。而日本的生物技术产业总产值则将达到 127 万亿日元，占当时日本 GNP 的 10%。这是何等振奋人心的前景啊！

上述情况表明，无论生物技术研究还是产业化均显示极好的发展前景。当今的世界，在冷战结束之后，代之而起的是在全球范围内以高技术为核心的经济扩张和市场竞争。世界生物高技术的较量和我国生物高技术的发展势必也将在这个大背景下展开。

作为一个发展中国家，我国的生物技术自 1982 年被列入国家科技攻关重点以来，从国家科技攻关、863 计划、重大科学基金、重点实验室、水稻基因组计划及国际合作等多种渠道获得财政支持，生物技术研究与开发呈现出蓬勃的发展势头，并取得一批很有显示度的成果，如乙肝疫苗、青霉素酰化酶、幼畜腹泻疫苗、干扰素系列、人生长激素、白细胞介素-2、人表皮生长因子等基因工程药物；家兔、鲤鱼等转基因动物；棉花、菸草、番茄、大豆、杨树、木瓜等转基因植物；用于治疗及体外/体内诊断的单克隆抗体；用细胞工程方法育成的全雌性鲤鱼、鲤-鲫核/质杂交鱼、小麦、水稻等动、植物品系；在组织培养技术基础上建立的马铃薯、香蕉、桉树、杨树、香荚兰等植物快繁技术；热稳定 DNA 聚合酶及各种临床诊断酶盒；还有活性干酵母、耐高温酵母、大型气升式发酵罐、自控发酵罐、分离膜和膜组件以及各种传感器等等。上述各项工作均在小试、中试或产业化等不同层次上作出了很好的成绩。

中国生物技术研究与开发的成绩也不断受到国际社会的承认，如 1991 年美国的 *New York Times* 认为：“中国科学院水生生物所所育出的转基因鱼比美国的同类工作领先 3 年”；中国科学院上海生化所创立的外源 DNA 通过花粉管通道的植物转化技术被收录到国际权威性书刊里，并被国外同行广泛引用；中国科学院上海生化所的基因工程乙肝疫苗、中国科学院上海药物所的基因工程青霉素酰化酶都曾荣膺来自海外的科技奖励；中国科学院微生物所的维生素 C 两步发酵技术、中国科学院生物工程研究中心的幼畜腹泻疫苗、上海工业微生物所的赖氨酸和天津工业微生物所的柠檬酸发酵菌种受到海外厂商的青睐并完成了技术出口。总之，在此期间，我国的生物技术经历了一个从无到有、从跟踪模仿到有所创新、从实验室到大田或车间的发展历程。

据 90 年代初期统计，我国工业和医药生物技术产业年产值超过 310 亿元，主要由传统发酵产品、酿酒、抗生素、维生素 C、氨基酸、核苷酸、酶制剂、柠檬酸、酵母、微生物多糖等构成。与先进国家比较，我国生物技术产业的差距在于产品结构不合理、技术水平低、

产品的质量和成本在国际上缺乏竞争力，而依托高技术的现代生物技术产业还处于创业阶段。可喜的是，最近从广东、上海及北京等地不断传来的信息表明，生物高技术产业化在那里显示强劲的发展势头，千万元以上产值的生物高技术企业已经出现。

在西方经济持续萧条的情况下，中国的国民经济却连年以超过 10% 的高速度发展。与此同时，计划经济体制正在加速向社会主义市场经济体制过渡，中国的发展正在不可避免地逐步融入世界经济—科技体系。我国生物技术今后的发展必需与上述基本国情相适应，并通过生物技术的发展促进国家总体经济目标的实现。

基于上述国内外生物技术发展态势的分析，笔者认为在确定今后我国生物技术的发展战略时，应特别强调以下几点。

1. 积极推进生物技术的产业化，争取为国民经济发展做出几项有巨大显示度的成果。首先，生物技术是一门综合性的应用科学技术，它的价值归根结底要看是否在发展国民经济中发挥了作用；其次，我国生物高技术产业化明显滞后于科研，是我国发展生物技术的薄弱环节，应予加强；第三，生物高技术的开发周期一般为 10 年左右，通过前两个五年计划的努力，我们已积累了一批实验室成果，推动生物高技术产业化，此其时也；最后一个原因是通过生物技术产业化可以显示中国这支生物技术队伍是支能战斗的队伍，从而使我们在争取社会和政府更多的理解和支持方面处于有利地位。

2. 认真加强生物技术创新所必需的应用基础研究，争取为国家科技进步做出几项有巨大显示度的成果。首先，各国强化知识产权的保护固然为我们带来了巨大压力，却也为我们的发明创造活动提供了必要的外部条件；其次，发展生物技术和产业的历史过程一再证明，某些关键技术已成为制约生物技术迅速发展的“瓶颈”。如果事事总是要求“短、平、快”，就难免碰壁。到头来，还得折返原地，从头开始。

3. 大力提倡科研院所与国内外企业界的合作。首先，应承认我们的科研机构在许多方面，尤其在产业化方面有许多不足，如经费匮乏、工程技术力量不足、市场开拓能力有限等等；其次，作为计划经济向市场经济过渡的必然结果，中央计划的成分将逐步消弱。如果把我们的工作全部建筑在中央的财政拨款之上，无疑势将进一步加剧科研工作的危机；最后，在科技面向国民经济、发展市场经济的大环境下我们的研究院不能关起门来谋求自我完善。若与国内外企业建立广泛而紧密的联系，则可以在很大程度上弥补我们的不足，并能从根本上解决应用研究的市场导向、成果转化渠道及科研经费等三大难题，这种优势互补的合作必将大大加快整个工作的进程。近几年来，许多研究单位在这方面已作过一些十分有益的探索，并创造出许多与企业结合的好形式，如成果转让、技术入股、合作研究、共建发展基金会、建立合资公司、开展国际合作等等。我们要及时总结这些经验，推而广之，以适应市场经济的客观需要，为我们的科研与技术开发注入新的活力。

4. 重视并适度安排在学科交界面上新生长点的研究工作。首先，科学技术发展史一再证明，学科交界面经常是科学技术新生长点的温床。生物技术本身就是多学科交叉的产物，相信不同学科间进一步的融合一定会诞生出更多新的学科生长点。如神经科学与电子学结合所派生的神经计算机技术；海洋生物学与生物技术结合所派生的海洋生物技术；环境科学与生物技术结合所派生的环境生物技术；此外，还有抗体工程、胚胎工程等等都是不同学科融合的产物。其次，中国科学院和某些高等学校有多学科配置的优势，具备发展新学科生长点所

需的许多有利条件。因此在财力、人力及其他条件允许的情况下应适当安排一批这类研究课题。

短短 20 年的发展历程表明，年轻的生物技术具有强大的生命力。如今，生物技术已深入人类生活的各个领域。可以说，人类创造了生物技术，反过来生物技术又正在深刻地改变着我们的这个世界。当我们意识到发生在身边这些事实之后，就应不失时机地调整我们的步伐，制定我们的策略，让生物技术前进的车轮旋转得快些、更快些！

爪蟾核糖体蛋白 S19 基因 5'UTR 在翻译水平上没有特殊的功能

陈启民 杨丽珠 纪永刚 耿运琪

(南开大学生物工程研究室, 天津 300071)

Mariottini P., Amaldi F.

(Department of Biology, II University of Roma Via E.Carnevale, 00173, Italy)

摘要 为了研究 *Xenopus laevis* 核糖体蛋白 S19 基因 5'UTR 的功能, 通过定点诱变技术, 将它的嘧啶碱基用嘌呤碱基随机取代, 得到 6 个不同的突变型菌株, 将这些不同的突变质粒 DNA 分别显微注射进入 *Xenopus laevis* 卵母细胞表达, CAT 分析结果显示 S19 基因 5'UTR 未必在翻译水平调控其下游基因的表达。

关键词 *Xenopus laevis*, S19 基因, 定点诱变, CAT 分析

在爪蟾 (*Xenopus laevis*) 中, 不同的核糖体蛋白合成的调节控制作用至少发生在转录和翻译两个水平上⁽²⁾。核糖体蛋白 mRNA(rp-mRNA) 的翻译控制不是通过核糖体蛋白的自我调节⁽¹²⁾。在鼠^(3,6,7,11)、果蝇^(8,14)和 *Dictyostelium discoideum*⁽¹⁵⁾ 中也存在与 *Xenopus* 类似的翻译控制作用。这就激励人们去寻找与翻译控制有关的特殊序列或结构。Mariottini⁽⁹⁾ 通过比较 *Xenopus* 中已经研究过的 rp-mRNA 核苷酸序列发现, 在 5' 非翻译区 (5'UTR) 都存在大约 20~30 个连续的嘧啶残基, 并且非常类似, 转录的起点位于这些嘧啶残基的中部。Sary levy⁽⁷⁾ 近来阐明鼠 rp-mRNA 5' 端在翻译调节上的重要性。Wagner⁽¹⁶⁾ 描述了 rp-mRNA 类似的 5'UTR, 推测 *Xenopus* rp-mRNA 5'UTR 在翻译调节水平上具有重要功能。Marittini⁽¹⁰⁾ 构建了 pS19-CAT 融合基因, 我们利用 pS19-CAT, 通过定点诱变技术, 在 5'UTR 由嘌呤随机取代嘧啶, 构建了一系列 5'UTR 的突变型。将这些突变的 pS19-CAT 分别显微注射进入 *Xenopus laevis* 的卵母细胞, 通过对 CAT 基因表达分析, 研究 *Xenopus laevis* 核糖体蛋白 S19 基因 5'UTR 在翻译水平上的功能。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 菌株、质粒和噬菌体 本文所使用的菌株、质粒和噬菌体见表 1。

由第三世界科学院 (TWAS) 自然科学基金资助。

本文于 1993 年 9 月 4 日收到。

表 1 菌株、质粒和噬菌体

菌株、质粒和噬菌体	基因型或表现型	来源
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44 hsdS20(r⁻m⁻)</i>	lab. stock
	<i>recA13 ara-14 proA2</i>	
	<i>lacY1 galK2 rpsL20</i>	
	<i>xyl-5 mtl-19</i>	
pS19-CAT	Ap ^r	Amaldi F.
M13	wide type	lab. stock

均为分析纯。

1.2 方法

(1) 培养基 LB 培养基^[13]用于细菌培养; 固体培养基含 1% 琼脂; 选择培养基含 Ap 50μg/ml。

(2) DNA 制备及纯化 *E. coli* 质粒提取纯化按 Sambrook^[13] 法; pS19-CAT DNA 经 Bgl II 和 Nco I 双消化后, 按辛丰^[1] 法制备 pS19-CAT B-N 大片段。

(3) ss-pS19-CAT DNA 制备 在含 Ap 100μg/ml LB 液体培养基中接入 *E. coli* HB101 (pS19-CAT) 单菌落, 37℃ 过夜培养, 按 2% 接种量转接 200ml 新鲜 LB 培养液继续培养约 2~3 小时, OD₅₀₀ 达到 0.2~0.3, 按 MOI=100:1 加入 M13 噬菌体裂解液, 37℃, 100r/min 继续培养 5 小时。离心收集上清液, 按 Sambrook^[13] 法制备噬菌体颗粒和提取 DNA (该 DNA 几乎全部是 ss-pS19-CAT DNA) 作为定点诱变模板。

(4) 诱变引物 M1 的磷酸化 0.5μl (500ng) M1, 2μl 10×Kinase 缓冲液, 2μl 10mmol/L ATP, 15.5μl H₂O, 2u T4 DNA 聚核苷酸激酶, 37℃ 保温 15 分钟。

(5) 菌落杂交探针 P1 的制备 5μl (50ng) P1 DNA, 2μl 10×Kinase 缓冲液, 2μl 100mmol/L 亚精胺, 2μl (20μCi) γ-³²P-ATP, 8μl H₂O, 2μl T4 DNA 聚核苷酸激酶, 37℃ 保温 30 分钟, 然后通过 Sephadex G-25 柱, 收集第一个放射活性峰, 备用。

(6) 质粒转化 将质粒 DNA 按 Sambrook^[13] 法转化。

(7) 菌落杂交 菌落杂交按 Sambrook^[13] 法。

(8) DNA 序列分析 制备各突变型的质粒 DNA, 并分别取 2μg, 加入 18μl H₂O、2μl 2mol/L NaOH 和 2mmol/L EDTA, 室温 5 分钟, 然后加入 3μl 3mol/L NaAc (pH5) 中, 并纯化变性后的质粒 DNA。以变性质粒 DNA 为模板, Mo 为序列分析引物, 按照 United States Biochemical Corp. 推荐的方法完成序列分析。

(9) 将 DNA 显微注射入卵母细胞核 将质粒 DNA 溶于 80mmol/L NaCl, 88mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 制成 200ng/μl, 然后按 Gurdon^[5] 法注射入卵母细胞核, 使每核 5ng。

(10) CAT 分析 将注射后的卵母细胞在修改的 Barth medium 中 22℃ 保温 16 小时, 收集细胞, 用 0.25mol/L Tris pH7.5 洗涤一次, 冷冻, 然后按每个卵母细胞加入 10μl 0.25mol/L Tris pH7.5 缓冲液, 匀浆 (每一种 DNA 注射 50 个卵母细胞), 离心, 取相当于 0.5~1 个卵母细胞的体积, 按 Gorman^[4] 法进行 CAT 活性分析。

(2) 酶及试剂 限制性内切酶 Bgl II、Nco I、T4DNA 聚核苷酸激酶、Klenow enzyme、T4DNA 连接酶购自 New England Biolabs, TAQuenceTM Kit (Taq DNA Polymerase Sequencing System) 购自 United States Biochemical Corp.。以上各种酶均按厂家推荐方法进行反应; ³²P-dATP、³²P-ATP 购自福瑞公司; [¹⁴C]-Cm (50μCi/mmol) 购自 New England Nuclear Corp.; 乙酰-CoA 购自 Sigma 公司; 其他试剂

2 结果

2.1 定点诱变引物 M1、负选择引物 P1 和序列分析引物 M0 的合成

图 1 表明 pS19-CAT 部分核苷酸序列。+1 ~ +35 为 *Xenopus* 核糖体小亚基 S19 基因的 5'UTR。为了确定该区对核糖体蛋白质合成的生理作用, 拟将 +1 ~ +6 位的嘧啶核苷酸残基用嘌呤核苷酸随机取代, 故设计盒式定点诱变引物 (-10 ~ +16), 同时合成负选择探针 (-5 ~ +11)。为鉴定诱变后选出突变体的碱基变化, 需要序列分析验证, 于是合成序列分析引物 Mo(-30 ~ -48)。

p S19-CAT:

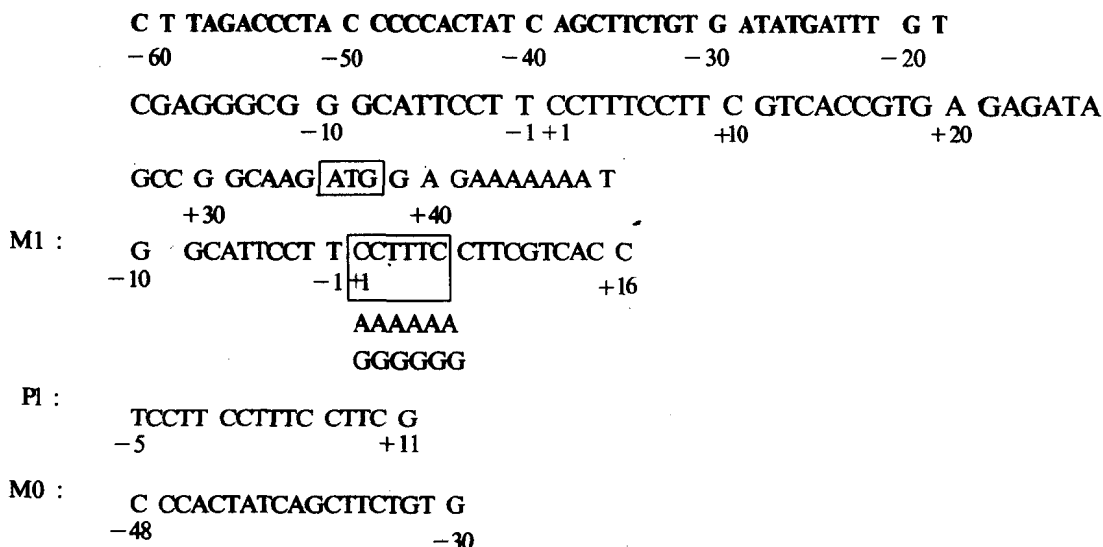


图 1 基因 5'-非翻译区的结构和寡聚核苷酸序列

M1- 突变引物; P1- 筛选用的探针; M0-DNA 序列引物

2.2 定点诱变

磷酸化的 M1 50ng, pS19-CAT B-N 片段 50ng 和 ss-pS19-CAT DNA 300ng 在退火缓冲液 (50mmol/L KCl, 20mmol/L Tris-HCl pH7.6, 5mmol/L MgCl₂, 0.5mmol/L DTT) 中一块退火, 然后加入终浓度为 0.4mmol/L ATP 和 0.8mmol/L dNTP, 最后加 2 u Klenow enzyme 和 1u T4 DNA 连接酶, 室温下放置 30 分钟。图 2 表示定点诱变过程。将得到的完整的质粒 DNA 转化 *E.coli* HB101。转化后的细胞在含 Ap50μg/ml 的 LB 培养基中培养, 提取质粒 DNA, 再转化 *E.coli* HB101。在选择性平板上得到 500 个转化子/每个平板。

2.3 突变体的检出

将转化子对应点接在 LB 平板和携带硝酸纤维膜的 LB 平板上, 共点接 200 个转化子, 培养后, 按材料和方法进行菌落杂交, 探针为 ³²P 标记的 P1。杂交后的滤膜依次在 30℃、40℃、50℃、60℃ 的 10×SSC 溶液中洗涤, 并分别对 X 光片自显影。凡是随洗涤温度的提高而杂交斑点逐渐消失的菌落则为突变型转化子; 相反, 野生型菌落的杂交斑点始

终不变。在 50 °C 洗涤后得到的照片见图 3。在 200 个转化子中共得到 13 个突变型菌落。

2.4 突变型的 DNA 序列分析

按材料和方法提取 1~13 号突变型的质粒 DNA, 取大约 1ng 变性质粒 DNA 和 11ng 序列分析引物 M0 混合, 利用 TAQuence™ kit 完成突变型 DNA 序列分析。从 13 株突变型中获得 6 株完全不同的突变型, 它们的突变位点见图 4。

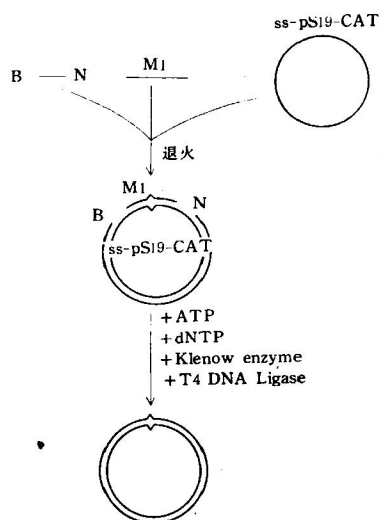


图 2 S19-CAT 突变体的构建

B 为 Bgl II; N 为 Nco I

将这些突变型分别命名为 pS19-CAT-101、102、103、104、105、106。

2.5 S19 基因 5'UTR 在翻译水平上没有特殊功能

将获得的 6 种突变型和 pS19-CAT 分别提取质粒 DNA, 显微注射进入 *Xenopus laevis* 卵母细胞的细胞核, 每个核注入 5ng, 22 °C 培养 16 小时, 然后进行 CAT 分析。放射自显影的结果见图 5, 光密度扫描仪定量结果显示 pS19-CAT pS19-CAT-101, 102, 103, 104, 105, 106

图 3 菌落杂交

pS19-CAT:CCTTTC.....
 pS19-CAT-101:**AGAGAA**.....
 102:**ACTGAA**.....
 103:**AGCTTA**.....
 104:**CATAGC**.....
 105:**AATTTA**.....
 106:**ACTTTC**.....

图 4 突变型序列与野生型序列的比较

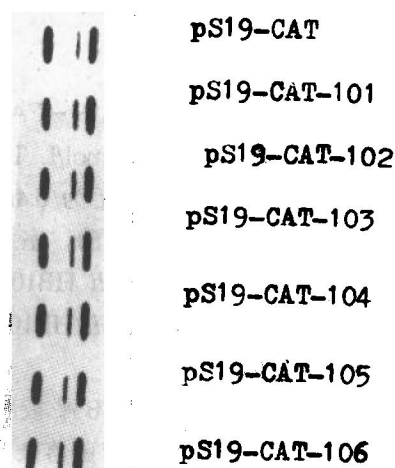
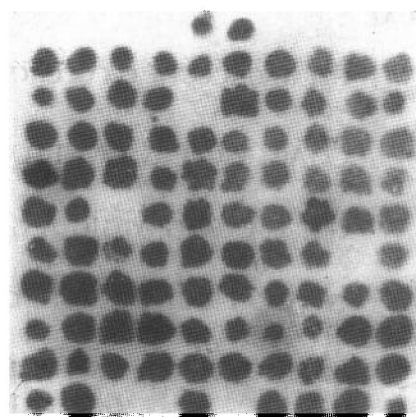


图 5 野生型和构建的突变型 CAT 分析

没有统计学上的差异, 说明 S19 基因 5'UTR 对其下游基因的表达没有特殊的调节功能, 这与 Hariharan⁽⁶⁾ 用鼠核糖体蛋白基因表达的结果一致。

3 讨论

完成定点诱变的质粒 DNA, 其中一条链是野生型的链, 另一条为突变型的链。该质粒转化进入 *E.coli* HB101 后, 经过半保留复制, 在一个细胞中包含野生型和突变型两类质粒, 难于分离到只含突变型质粒的细胞。经过转化体细胞质粒的重提和再转化, 只有一个野生型或突变型质粒进入受体细胞, 获得转化子, 从而避免了野生型和突变型细胞的混杂, 有利于通过原位杂交检出突变型转化子。

本实验结果不能证明 S19 基因 5'UTR 在翻译水平上有特殊的调节功能 (在 5'UTR 其他区域获得的突变型与本文使用的突变型在卵母细胞中表达结果类似), 但是这种结果无法解释 5'UTR 的保守性。也许在 *Xenopus* 胚胎发育的某些阶段行使功能, 这些工作正在进行深入的研究。

4 参考文献

- 1 辛丰, 蒋如璋. 生物工程学报, 1992, 8(1): 40 ~ 47
- 2 Amaldi F, et al. Trends Biochem. Sci., 1989, 14: 175 ~ 178
- 3 Bowman L H. Mol. Cell. Biol., 1987, 7: 4464 ~ 4471
- 4 Gorman C M, et al. Mol. Cell. Biology, 1982, 2: 1044 ~ 1051
- 5 Gurdon J B. Methods Cell. Biol., 1977, 14: 125 ~ 139
- 6 Hariharan N, et al. PANS. USA, 1990, 87: 1526 ~ 1530
- 7 Levy S, et al. PANS. USA, 1991, 88: 3319 ~ 3323
- 8 Kay M A, et al. Mol. Cell. Biol., 1985, 5: 3583 ~ 3592
- 9 Mariottini P, et al. Gene, 1988, 67: 69 ~ 74
- 10 Mariottini P, et al. Mol. Cell. Biol., 1990, 10: 816 ~ 822
- 11 Meyuhas, O, et al. Mol. Cell. Biol., 1987, 7: 2691 ~ 2699
- 12 Pierandrei-Amaldi P, et al. Dev. Biology, 1985, 107: 281 ~ 289
- 13 Sambrook J, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1989
- 14 Schmidt T, et al. J. Biol. Chem., 1985, 260: 7645 ~ 7650
- 15 Steel L F, et al. Mol. Cell. Biol., 1987, 7: 965 ~ 972
- 16 Wagner M, et al. Mol. Cell. Biol., 1985, 5: 3560 ~ 3576

The 5'UTR of Ribosomal Protein S19 Gene in *Xenopus Laevis* is not Obligatory at the Translation Level for Activity in Oocytes

Chen Qimin, Yang Lizhu, Ji Yonggang, Geng Yunqi

(Lab of Biotechnology, Nankai University, Tianjin, 300071)

Mariottini P., Amaldi F.

(Department of Biology, II University of Roma, Via E. Carnevale, 00173 Roma, Italy)

Abstract In order to investigate the function of 5'UTR of ribosomal protein S19 gene in *Xenopus laevis*, the pyrimidine base(s) between +1 and +6 was randomly replaced by purine base(s) using site-directed mutagenesis. The plasmid DNA of the different mutants was microinjected into the oocytes of *Xenopus laevis* for measuring the expression of wild type and mutants rp(S19) - CAT constructs. The CAT assay shows that the 5' UTR of S19 gene is unlikely involved in the regulation of its downstream gene expression at translational level.

Key words *Xenopus laevis*, S19 gene, site-directed-mutagenesis, CAT assay

牛生长激素 cDNA 基因的聚合酶链 反应法制备、克隆和表达

石榜驰 周顺伍

(北京农业大学动物生物化学教研室, 北京 100094)

摘 要 从牛垂体中提取总RNA,经Oligo(dT)-纤维素亲和层析分离出mRNA,反向转录合成cDNA。以此cDNA为模板进行PCR的扩增,回收扩增产物的620 bp的片段,钝端连接重组到pGEM-7Zf (+)的SmaI位点,转化大肠杆菌XLI-blue获得10个白色克隆。抽提其中的一个重组体,经酶切和全序列分析,证明我们获得了全长牛生长激素cDNA基因。将此cDNA基因重组到表达载体pJW2上,转化大肠杆菌JA221,温度诱导,获得高效表达。经Western blot、SDS-PAGE测定证明表达产物是牛生长激素,扫描估测表达量占大肠杆菌全蛋白的21%左右。

关键词 牛生长激素, 聚合酶链反应 (PCR), 温度诱导, 高效表达

牛生长激素 (Bovine growth hormone, bGH) 是由190个氨基酸残基组成的多肽, 含有两个二硫键, 分子量21800Da。1983年Seeburg等^[1]首次以牛垂体的总mRNA为模板经反转录克隆和筛选获得了牛生长激素的cDNA基因, 并成功地进行了表达。但这个获得cDNA基因的常用方法比较复杂, 而且获得的基因需经过适当的改造才能重组到表达载体中进行表达。本实验试图利用PCR方法扩增牛生长激素cDNA, 并且按预定设计的引物, 使扩增产物能够很方便地重组到表达载体中进行表达。

1 材料与方法

1.1 材料

- (1) 牛垂体 北京市肉联厂。
- (2) 大肠杆菌 JM107、XLI-blue、JA221 和质粒 pJW2、pGEM-7Zf (+) 均由本室提供。
- (3) 酶及生化试剂 各种限制酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、AMV 反转录酶、DNA 聚合酶 I、RNase H 等购自华美生物工程公司、百泰生物技术公司和 Promega 公司。蛋白胨和酵母粉为 OXOID、Labm 及日本制药株式会社制造; 琼脂糖为 Serva 分装。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和 SDS 为上海化学试剂公司进口分装; 分子量标准蛋白为中科院上海生化所产品; Taq DNA 聚合酶为 BRL 公司产品。序列分析试剂盒为 Promega 公司产品。其它化学试剂为北京化工厂产品。寡聚核苷酸引物由中科院微生物所合成。兔抗牛生长激素抗体由本校动物生理室提供。

本文于1992年4月15日收到。