

有关果蝇 zip 基因突变株的一些探讨

俞慧 赵德标

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200032)

在果蝇晚期神经发生中, zip 基因参与了神经元的正常发生及神经纤维束化的建立和维持^[1]。zip RNA 原位杂交显示 zip 基因只在中枢神经系统中表达^[2,3], 抗 zip 蛋白抗体对完整果蝇胚胎的标记也表明 zip 蛋白主要分布在中枢神经系统中的某些神经元细胞上和来自中枢神经系统的侧神经纤维束的某些神经纤维上^[4]。纯合的 zip 突变胚胎则清晰地表现出神经系统的异常, zip^{ID16} 和 zip^{IF107} 是经 EMS 点突变诱导后获得的两个不同的 zip 等位突变基因, 虽然 RNA 原位杂交表明在中枢神经系统仍存在相应的转录物, 但在突变体胚胎中可以观察到脑组织的异常增生和侧神经纤维的异常束化, 以及作为次级效应的外壳表型的改变, 其中 zip^{ID16} 的突变效应更强一些^[1-3,5]。

根据初步的结构分析, zip 基因产物是一个膜上整合糖蛋白, 可能作为神经细胞的识别或粘着分子参与神经系统的发生。zip 蛋白除了通常的起始部分的 20 个氨基酸的信号肽以外, 主要的结构域包括五个可能的糖基化位点, 两个 α -螺旋区, 一个由 25 个疏水氨基酸组成的跨膜区和一个苏氨酸-丝氨酸重复区, 另外还可能构成一个二硫键的两个半胱氨酸^[1]。如果这些功能域发生了突变, 很可能导致该基因功能的改变或丧失, 尤其是其中的糖基化位点, 因往往与细胞的分子识别有关而尤为关键^[6]。那么突变体 zip^{ID16} 和 zip^{IF107} 的点突变位点会不会就位于这些结构域中呢? 为此, 在本实验中我们利用 PCR 方法对这两个 zip 突变基因除信号肽以外包括其他所有结构域的序列部分进行了扩增, 扩增片段在克隆后测序, 并与野生型的序列进行比较, 以期对 zip 基因结构和功能的相互关系作一些探讨。

试剂 DNA 高温聚合酶为复旦大学产品, Sequenase 测序试剂盒为美国 USB 公司产品, [α -³²P]dATP(10 μ Ci/ μ l)为英国 Amershan 公司产品, 限制性核酸内切酶 EcoR I、Sal I、BamH I 均购自华美公司, Xho I 为美国 Promega 公司产品, 其他限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶为德国 Boehringer Mannheim 公司产品, 其余均为进口分装或国产

分析纯产品。

PCR 引物的合成 由本所 DNA 合成室进行合成。

突变株果蝇总 DNA 的收集和纯化 zip^{ID16} 和 zip^{IF107} 均为纯合致死。使突变株果蝇 zip^{ID16}、zip^{IF107} 在涂布适量鲜酵母的琼脂(3%)蔗糖(10%)板上产卵, 室温放置 24 小时后收集死胚胎。100 μ g 胚胎用 0.25 ml 匀浆液(0.1 mol/L NaCl, 0.03 mol/L pH 8.0 的 Tris, 0.01 mol/L EDTA, 0.01 mol/L 的巯基乙醇, 0.5% TritonX-100)匀浆, 再用等体积的匀浆液洗一次。加 30 μ l 10% SDS, 9 μ l Proteinase K(10 mg/ml)在 65 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。用等体积的酚/氯仿(1:1)萃取二至三次, 氯仿/异戊醇(24:1)再萃取一次, 加 90 μ l 8 mol/L KAc 后冰浴放置 30 分钟。10000 rpm 离心 10 分钟, 取上清加等体积无水乙醇沉淀。沉淀的 DNA 溶于 75 μ l TE 溶液, 加 1 μ l RNase A(10 mg/ml), 混匀后 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。酚/氯仿和氯仿/异戊醇同上萃取, 上清液加 1/10 体积的 3 mol/L NaAc, 等体积的异丙醇沉淀。最后纯化的 DNA 溶于 50 μ l TE 溶液。

PCR 扩增 zip 突变基因 100 μ l 反应体系含 20 μ l 5 \times 反应缓冲液, 10 μ l 2 mmol/L dNTP, 各为 100 pmol 的两种引物, 2 μ g 基因组 DNA 模板, 1 μ l FD 聚合酶(2 u/ μ l), 上覆 80 μ l 液体石蜡。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 70 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟, 15 个循环后追加 1 μ l FD 聚合酶, 再进行 15 个循环, 最后 70 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟。

PCR 扩增片段的克隆 上述扩增片段经纯化后利用与 PCR 引物 5' 端或引物内侧的限制性位点相应的内切酶酶解, 和经相同酶解处理的 pBluescript 载体于 14 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化至 JM 101 宿主细胞, 涂布在含 X-gal 和 IPTG 的 LB-Amp 平板上。过夜培养后,

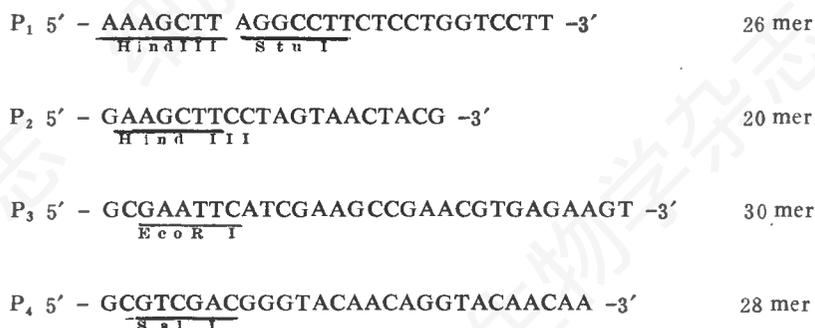
* 此项研究由上海生命科学联合开放实验室资助。本工作曾得到吴亚兰等同志的热情帮助, 宋秋宝老师对本文的撰写提出了宝贵意见, 特表谢意。

挑取呈白色的重组克隆, 参照 Sambrook 等的方法纯化出质粒 DNA^[7]。取 0.5—1 μg 质粒 DNA 用适当内切酶酶解后 0.8% agarose 电泳鉴定。

序列分析 选用不同的内切酶对含有 PCR 扩增片段的重组质粒进行酶解, 电泳纯化出各相应片段, 与经同样酶解的 M 13 RF DNA 载体连接, 转化 JM 101 宿主细胞。参照 USB 推荐的方法, 从重组体上清中抽提 ssDNA 作为模板, 用 Sanger 法进行 DNA

序列测定^[8]。

结果和讨论 根据野生型 zip 基因的 cDNA 序列, 设计了两对相互交叉的 PCR 引物。1 号引物 P₁ 位于信号肽之后, 第一个可能的糖基化位点之前; 和, 它对应的引物 P₂ 位于该基因的中部, 这一扩增片段长为 750 bp。第二对引物中的前一个引物 P₃ 位于 P₂ 之前, 后一个引物 P₄ 则在终止密码之后, 扩增片段长是 1070 bp。



对 zip^{ID16}、zip^{IIF107} 两个突变株的 PCR 扩增反应都获得了预期大小的片段。这些扩增片段的测序分析结果表明: 在第 1224 号碱基位置有一个 A→T 的转换, 核对读框, 这一改变正好是对应于第 321 号氨基酸—精氨酸的第三位密码子位置, 由于遗传密码的简并性, 这一 A→T 的转换并未造成其编码的氨基酸的改变, 这是一个沉默突变。而且 zip^{ID16}、zip^{IIF107} 两个突变株都有, 所以估计在这一核苷酸位置上两个突变株与野生型 zip 基因的不同为种群间的差异, 而非我们寻找的点突变位点。除此之外, 在两个突变株的所测序列中都没有发现其他的碱基变化, 故而这两个突变株的点突变位点都不在测定序列内, 显然它们的突变效应不是由这些功能结构域的改变而引起的, 至少和糖基化作用无关。因此, 可能的点突变位点或者是在结构基因的信号肽部分, 或者是在结构基因以外的调控区。一般地说, 在调控区域和信号肽部分发生的突变是有一定的宽容度的^[9,10], 对点突变来说应该更是如此。但在本实验所用的两个突变株中, 都是由在这些区域的一个碱基变化引起了强烈的突变效应, 这显然是一个很令人感兴趣的现象。因此下一步的实验将针对 zip^{ID16}、zip^{IIF107} 的信号肽部分和突变基因的调控区序列进行分析, 并结合抗 zip 蛋白抗体对突变胚胎的整体标记, 观察突变体胚胎中 zip 蛋白的分布情况, 从而确定点突变位点及其造成的功能变化, 为进一步了解 zip 基因的结构和功能关系提供依据。

摘 要

本文利用 PCR 技术对两个果蝇突变株 zip^{ID16}、zip^{IIF107} 的突变 zip 基因的主要结构域部分进行了扩增, 并在克隆后作序列分析。排除了突变发生在这些区域的可能性, 表明可能的突变位点: 一是位于信号肽部分, 二是处于调控区。提示在这两个区域可能有关键性的单个氨基酸或单个碱基位置的存在。

关键词: 果蝇 zip 基因 突变株 PCR 方法

参 考 文 献

- [1] Zhao, D. et al., 1988, *EMBO J.*, 10: 817—826.
- [2] Cote, S. et al., 1987, *EMBO J.*, 6: 2793—2801.
- [3] Zhao, D., 1988, Ph. D. Dissertation, Academia Sinica.
- [4] 赵德标等, 1994, *实验生物学报*, 27(2): 215—223.
- [5] Nusslein-Volhard, C. et al., 1984, *Roux Arch. Dev. Biol.*, 193: 267—282.
- [6] Davidson, E. A. et al., 1985, *Glycoconjugates: Proceedings of the VIIIth International Symposium*, pp: 383—403, Praeger Press, N. Y.
- [7] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold

Spring Harbor Laboratory Press.

- [8] Sanger, F. et al., 1977, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 5463—5467.
[9] Kingsman, S. M. and Kingsman, A. J., 1988, *Genetic Engineering, An Introduction to Gene Analysis and Exploita-*

tion in Eukaryotes, pp. 259—319, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- [10] Austen, B. M. and Westwood, O. M. R., 1991, *Protein Targeting and Secretion*, ed. by Richwood, D. and Male, D., pp. 25—35, IRL Press, Oxford.

MOLECULAR ANALYSIS OF TWO MUTANT ZIP GENES IN DROSOPHILIA

Yu Hui Zhao De-biao

(Shanghai Institute of Cell Biology, Chinese Academy of Sciences)

ABSTRACT

By the PCR method, the main domains of two mutants of *Drosophila* zip gene (zip^{ID16} and zip^{IF107}) have been amplified and cloned for DNA sequencing. The results showed that no expected mutant site was found within the amplified DNA fragments, indicating that the possible spot-mutant site may be located in either the signal peptide part or the regulation regions. Thus, there will be some single key amino acid or important base site in these two regions.

Key words: *Drosophila* zip gene Mutant PCR method

第四次全国钙与细胞功能专题学术会议征文通知

第四次全国钙与细胞功能专题学术会议拟于1996年10月在江苏省南京市举行,由解放军南京军区南京总医院全军医学检验中心承办。会议征稿范围为:钙、钙调节蛋白与钙离子有关的细胞信号系统及细胞功能等方面的研究论文(除特约稿件外,均写成1000字左右的摘要)。来稿务必用B₅复印纸电脑打字成一页(激光或深色色带打印,老五号字体,标题用三号字),文题下为作者署名(单位、邮政编码)。打印时空2.5cm,下空2.0cm,左边(装订)空2.5cm,右边空2.0cm,以利排版胶印。每篇文稿附稿件处理费10元。截稿日期:1996年7月31日,收件人:王咏梅,地址:南京市中山东路305号南京军区南京总医院全军医学检验中心,邮政编码:210002。会议将对研究生的会务和住宿费用予以优惠,详细情况可来信联系。

第四次全国钙与细胞功能专题学术会议筹委会
南京军区南京总医院全军医学检验中心
一九九五年十二月

细胞生物学杂志 1996年第18卷第1期

国内统一刊号:CN 31—1478/Q

编辑 细胞生物学杂志编辑委员会
上海岳阳路320号(200031)
主编 左嘉客
出版 上海科学技术出版社
发行 上海市报刊发行局
订阅 全国各地邮局
印刷 中国科学院上海分院印刷所

ISSN 0253-9977



刊号 4-296 1996年3月 定价 2.50元