

《生物工程讲座》(IV)

——基因工程的理论及应用(三) 真核细胞的 基因转移技术及其应用

史 瀛 仙

(中国科学院发育生物学研究所)

真核细胞基因的转移可以通过转移整个染色体组,也可以转移一组染色体或重组的 DNA 分子到细胞中去,这些,若从方法学上加以分类有:

1. 细胞杂交法;
2. 微细胞 (microcell) 融合;
3. 染色体介导的基因转移;
4. DNA 介导的基因转移;
5. 细胞微量注射法。

用细胞杂交方法可以转移整个基因组,而用微细胞转移基因则是用微细胞作供体。在微细胞中有一个或几个染色体与遗传性完整的受体融合,因此,在微细胞系统中只有一个或很少的染色体转移到受体中去。用染色体转移基因是由受体细胞经细胞内吞作用 (endocytosis) 来实现的。在这种系统中仅有亚染色体片段仍保持受体细胞中。用 DNA 来转移基因是由受体细胞吸收纯化的单一基因进行的。在这种情况下,只有供体基因组中很小的片段可以转移到受体细胞中去。用微量注射法转移基因,一般是将重组特定的基因转移到受精卵中去,观察基因整合到受精卵染色体组中的情况。以上几种方法中,特别是用染色体转移基因和用 DNA 转移基因,为方便起见给转移的供体物质命名为“转移基因组 (transgenome)”。而转化的受体细胞叫做“转移因子 (transgene)”。下面较详细的叙述这几种基因转移的方法,使大小不同的转移基因组都能够转移到受体中去,在各种水平上来解决基因的表达。

一、用细胞杂交法转移基因

细胞杂交可转移整个核的基因组。用融合膜的制剂,如灭活的仙台病毒 (sendai virus)^[1,19] 或聚乙二醇^[20]来处理细胞,使其融合。融合后选择异核融合细胞,而将未融合的母细胞和同核的融合细胞除去。这种方法大多数依靠在母细胞中能有不同的、隐性的、互补的和能调节的标记基因。如果使用显性标记也可能有用^[2]。

在种间杂交细胞中染色体自动地排除。杂交细胞中有一组完整的受体亲本单倍体染色体 (至少有一组),而供体的染色体组部分是单体。供体的染色体不断地排除,但排除的速度逐渐降低,那些保留很少供体染色体的杂交细胞,一般都很稳定。决定染色体分离方向的因素尚不太清楚,但是染色体的数目、在体外生长的适应性、逐渐发展的情况、种的起源等似乎都起作用。在小鼠和地鼠的杂交细胞中,小鼠的染色体经常丢失。在人和小鼠的杂交细胞中,人的染色体经常被排除,但并不是一成不变的,人的染色体的丢失也不是绝对随意的,而是某些染色体有时优先保留下来。

供体染色体的排除可以用实验来调节。假如供体染色体带有原养型基因,在选择条件下,只有带这种基因的染色体能够存活。如,编码次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT) 的基因,迄今为止在所有的哺乳动物中找到的都是与 X 染色体连接的。细胞有条件的依赖 HGPRT

的活性,而在含有次黄嘌呤 (hypoxanthine)、氨基嘌呤 (amino pterin) 和胸腺嘧啶核苷 (thymidine) 的 HAT 培养基中生存。因此,在缺少 HGPRT 的小鼠受体细胞 (mo HGPRT⁻) 和人供体细胞对 HGPRT 原养型的细胞 (hu HGPRT⁺) 之间形成的小鼠和人杂交细胞群,能在 HAT 培养基中生长,显示出优先保留人的 X 染色体。将细胞培养在 HAT 培养基中,就有可能选择具有 HGPRT 活性的细胞。

细胞杂交系统是第一个发展起来的基因转移系统^[25],为基因定位提供了一个快速、有效和经济的程序。过去的十年中,从遗传学角度研究了约有 200 多种人类的基因,并确定了其位置。此外,应用区域定位试验提供了染色体上基因位置的信息,以及基因沿染色体长轴上的顺序和间隔。总之,这方面进展很快,专著也出版了许多,如 1983 年美国耶鲁大学人类的基因会议录^[3],以后每隔 1—2 年,就可出版这类会议录一次^[4-6]。

二、用微细胞转移基因

用微细胞转移基因的好处是只转移一个或几个“供体”染色体到一个受体细胞中去^[10]。将共体细胞用阻断有丝分裂剂处理,促使它形成多核细胞 (polykaryocytes),在多核细胞中,染色体在许多小核中分裂。这种细胞用细胞松弛素 B 处理后,再离心,所得到的片段就是微细胞。微细胞有一个微核,含有一个或几个完整的染色体,一圈细胞质和一个完整的质膜。这种细胞只能存活几个小时,但可能用融合方法使其成为完整的、存活的受体细胞。仙台病毒和 PEG 被用来作为融合制剂。选择微细胞的杂交细胞,必需选择带有营养缺陷标记的受体细胞。还必需将污染的供体细胞除去,只留下微细胞的杂交细胞。在这样的系统中,供体微细胞染色体带有互补的原养型基因,在所有的杂交细胞中也应该如此。

微细胞系统有以下的优点:

1. 只结合一个或很少的染色体,简化了供体和供体表型表达之间的联系。

2. 因为供体只引进小核和细胞质物质,就可以减少扰乱受体细胞的后成过程。

3. 用选择微细胞的方法来控制染色体排除的方向。共体染色体全部进入受体细胞是和细胞杂交的机制一样。微细胞供体的染色体很少或不受破损,也不进行重新排列。微细胞方法与整个细胞杂交不同,在融合以前染色体已经分离。

三、用染色体转移基因

用染色体来转移基因,首先是由麦克布赖德 (McBride) 和奥赞 (Ozar) 报道的^[16]。供体细胞进行有丝分裂,释放中期染色体。染色体与受体细胞混合,一般每个细胞相当于 0.5—2 个基因组的重复。带有营养缺陷标记的受体细胞 (如 HGPRT⁻),用原养型供体染色体处理,受体细胞在低频率上能表达供体染色体的标记基因。最近改进了这一技术,先用磷酸钙和染色体一起沉淀,再用二甲亚砜处理受体细胞,使转移频率上升到 2×10^{-5} ,在这个系统中染色体的亚片段转移到受体细胞中,片段的大小有很大差异,在光学显微镜下可以看到大的片段^[13,17],而有的片段,除了原养型标记以外,没有任何可以测到的信息^[22]。

在不稳定形式的受体细胞中“转移基因组”的表达是很典型的,在不稳定转移细胞群中每一代约有 1—10% 的细胞失去了表达原养型标记的能力。这种丢失现象是全或无,与原养型标记系的供体标记的丢失,是以一致形式进行的^[16,17]。稳定传代株的细胞群不再以可察觉的速度丢失原养型标记^[18,27]。转移基因组在这些稳定细胞株中与受体染色体成紧密联系^[10,29]。在这种情况下,大片段很稳定,在受体细胞染色体中^[13,17]可以找到形态很特殊的区域,这种转移的染色体组中的中心体需要有功能,才能使基因在每次有丝分裂时转移到子细胞中去。

转移基因组中主要的问题是结构问题,转移基因组的大小、范围有多大?在不稳定及稳定状态下,其构造怎样?稳定的分子基础是什么?最近发展了用 DNA 来转移基因,用编码

胸腺嘧啶核苷激酶 [thymidine kinase (TK)] 基因, 提供了探讨这些问题的好方法。用活^[23]的或紫外光^[24]处理过的疱疹病毒 (HSV-1) 来处理缺少 TK 活性的鼠类细胞株, 细胞表达 TK 的活性会升高, 而所表达的 TK 酶很明显是由 HSV-1 编码的, 不是鼠的酶。这些是由等电聚焦、电泳迁移率、免疫化学特性和对磷酸化碘代脱氧胞嘧啶 (iododeoxycytidine) 的反应能力来判断的^[23]。

四、用 DNA 转移基因

威格列(Wigler)等^[24]报道用纯化的 HSV-1 的 DNA 有效地转移鼠类 TK 缺陷型细胞。用限制性内切酶切病毒 DNA, 可以切割 TK 基因, 如 EcoRI, 使其失去转移活性。内切酶如 BamHI, 不能切割基因, 也不能影响转移活性。也就是说纯化的 3.4kb Bam HI 片段, 具有 TK 转移活性。转化细胞的频率是 1 株/10⁶ 细胞/40pg DNA。这个小组还报道了在转化的小鼠胸腺嘧啶核苷激酶缺失的寄主细胞中^[25], 3.4kb 的 BamHI 片段整合到寄主的 DNA 序列中, 并进一步证实整合的单拷贝 3.4kb HSV-TK 片段在受体哺乳动物基因组中冲淡以后, 能再次转移 TK 缺失的小鼠细胞, 这种转移叫次级转移。次级转移的频率为 1 株/10³ 细胞到 1 株/5×10⁶ 细胞/20μg 细胞的 DNA。因此, HSV-1 基因组特异的片段可以用来高效地转移哺乳动物细胞, 这些片段的命运可用生化方法来分析。

威格列等^[27]报道了包括脊椎动物鸡、牛、地鼠、小鼠和人的内源 TK 基因转移成功的实验, 只有在 TK 作为人的供体实验中发现转移的 TK 具有供体特异生化性质。转移速度增大, 几乎超过 10 倍, 最低转移率对人的 DNA 为 1 株/10⁶ 细胞/20μg DNA。

哺乳动物有了在体外有效的转移 DNA 的系统, 为进一步研究创造了重要和有利的条件及可能性。例如, 现在有可能转移供体染色体片段上已知的很小部分到受体细胞中去, 因此, 有可能分析染色体片段上含有选择性标记的遗传组成。另一种可能性是用 DNA 来转移基因

进行生物分析, 可以分析复杂基因组中的特异遗传片段。在这种情况下, 供体 DNA 用各种各样的生化方法均可分段分离, 检测每个分段的生物活性, DNA 可继续用多维分离法进行纯化。如反相层析、琼脂糖凝胶电泳和重组 DNA 克隆。还有一种方法是可能形成转移基因子, 它具有供体高特异性和小的转移基因组, 有时是整合的, 有时是独立的, 像附加体一样的实体。外源 DNA 转移基因因为真核生物提供了解决基因定位、从复杂的哺乳动物基因组中纯化基因、以及哺乳动物细胞中研究特异遗传变化的方法。这些新方法对哺乳动物包括人在内的分化细胞遗传调节的遗传分析都是非常有用的, 而且前景是不可估量的。

五、用细胞微量注射法转移基因

1982 年帕尔米特(Palmiter)等^[19]将大鼠的生长激素基因注入小鼠受精卵的雄原核中, 再将受精卵放入假母生殖道中。这种卵发育的动物外源 DNA 整合到早期胚胎发育阶段寄主的染色体之一上, 结果, 外源 DNA 可以通过生殖谱系遗传。有时也能测到这种外源基因的表达。如, 他们用金属结合蛋白-1 (MT-1) 启动基因与大鼠生长激素基因融合, 这种基因在小鼠卵中能指导合成生长激素。用重金属可以诱导它表达, 使改变了遗传性的小鼠产生生长激素的水平较正常小鼠的水平为高, 成为巨型小鼠^[1]。这种方法对改良家畜、家禽、鱼类及毛皮动物品种具有极大的实践和理论意义。

参 考 文 献

- [1] 史瀛仙 1984 经济动物的基因工程 遗传工程(3): 1
- [2] Baker R. et al., 1974. *Cell* 1: 9.
- [3] Begsma E (ed). 1974 New Haven Conference First International Workshop on Human Gene Mapping The National Foundation-March of Dimes.
- [4] ———— 1975 Rotterdam Conference: Second Int. Wol on human Gene mapping The national Foundation-March of Dimes.
- [5] ———— 1976 Baltimore Conference: Third. Int. Workshop on human Gene mapping The national Foundation-March of Dimes.
- [6] ———— 1978 Winnipeg Conference: Fourth