

- 142: 67
- 3 Giuseppe B, Federica D, Gabriella B *et al.* *Exp Cell Res*, 1995; **217**: 410
  - 4 Jiang S, Chow S C, Nicotera P *et al.* *Exp Cell Res*, 1994; **212**: 84
  - 5 Deckers C L P, Lyons A B, Samuel K *et al.* *Exp Cell Res*, 1993; **208**: 362
  - 6 Tanaka Y, Koichiro Y, Motokatsu T *et al.* *Exp Cell Res*, 1994; **213**: 242
  - 7 Tounekti O, Belehradec J, Mir JR L M *et al.* *Exp Cell Res*, 1995; **217**: 506
  - 8 Bertrand R, Solary E, Jenkins J *et al.* *Exp Cell Res*, 1993; **207**: 388
  - 9 Xu H M, Tepper C G, Jones J B *et al.* *Exp Cell Res*, 1993; **209**: 367
  - 10 Evelyne S B J, Sablon A J. *Exp Cell Res*, 1995; **218**: 201
  - 11 Yoshihama K, Itaya A, Hironaka T *et al.* *Exp Cell Res*, 1992; **200**: 126
  - 12 Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del B G *et al.* *Cytometry*, 1992; **13**: 795
  - 13 Lyons A B, Samuel K, Sanderson A *et al.* *Cytometry*, 1992; **13**: 809
  - 14 Nicoletti I, Miglirati G, Pagliacci M *et al.* *J Immunol Methods*, 1991; **139**: 271
  - 15 Wjciech G, Gong J, Ardel B *et al.* *Cancer Res*, 1993; **53**: 3186
  - 16 殷玉志, 陈姗姗. *北京医科大学学报*, 1995; **27**: 173
  - 17 Li Z, Chen W, Richard G M *et al.* *J Immunol Methods*, 1995; **181**: 17
  - 18 Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z *et al.* *Cancer Res*, 1993; **52**: 1945
  - 19 Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z *et al.* *Anal Biochem*, 1994; **218**: 314
  - 20 Xun Li, Traganos F, Darzynkiewicz Z *et al.* *Cancer Res*, 1994; **54**: 4289

**Application of Flow Cytometry in the Study of Cell Apoptosis.** Zhang Qunzhou, Zhou Keyuan, Ling Guangxin (*Institute of Medical Biochemistry of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*).

**Abstract** Apoptosis is a programmed cell death which can be triggered off by cells in response to various physiological and pathological stimuli. Recently, studies on apoptosis of tumour cells have attracted much attention. Some methods to detect apoptotic cells have been developed on bases of the typical morphological and biochemical changes during apoptosis. The application of flow cytometry (FCM) in the study of cell apoptosis, especially the value of some new methods based on FCM is described in detail.

**Key words** apoptosis, flow cytometry, nick translation, terminal deoxynucleotidyl transferase

## 基因打靶及其应用

王向东 童坦君<sup>1)</sup>

(北京医科大学生物化学及分子生物学系, 北京 100083)

**摘要** 用活细胞染色体 DNA 可与外源性 DNA 同源序列发生同源重组的性质, 达到定点修饰改造染色体某基因的目的, 此法称基因打靶. 基因的同源重组是较普遍的生物现象, 其分子机理尚未阐明, 但活细胞内确有一酶系可使 DNA 的同源序列在细胞内发生重组, 这一事实已无可争辩. 此事实为基因打靶的理论基础. 基因打靶技术操作的关键是建立一含筛选基因的重组载体, 并有效地把它转入细胞核内. 基因打靶命中的细胞可稳定遗传. 基因打靶在改造生物品种, 一些复杂生命现象 (如发育的分子机制等) 及临床理论研究均有广阔的前景.

<sup>1)</sup>通讯联系人. 收稿日期: 1995-11-27, 修回日期: 1996-03-11

**关键词** 基因打靶, 基因剔除, DNA 同源重组

利用活细胞染色体 DNA 可与外源性 DNA 的同源序列发生同源重组的性质, 以达到定点修饰改造染色体上某一基因的目的, 此法称为基因打靶<sup>[1]</sup>. 基因打靶可以改变原基因组的组成, 产生不同的生物效应, 亦可中止原基因的表达<sup>[2]</sup>. 用正常基因打靶突变基因, 有可能使原来突变的基因转变为野生型<sup>[3]</sup>, 亦可由此引入新基因使其在受体细胞表达. 总之, 基因打靶是一门精细地修饰与改造真核生物基因组的新技术<sup>[4]</sup>.

基因打靶是 80 年代后半期发展起来的新技术, 亦称为基因定点同源重组<sup>[5]</sup>, 或基因剔除<sup>[6]</sup> (gene knocking out).

生物中的基因重组分两种: 一是同源重组 (homologous recombination), 另一为非同源重组 (non-homologous recombination). 外源 DNA 片段大且同源性强者与宿主基因片段互补结合时, 结合区的任何部分都有与宿主的相应片段发生交换 (即重组) 的可能, 这种重组称为同源重组. 外源 DNA 片段的同源序列短、同源性弱与宿主基因片段互补结合时, 仅限于某些序列的结合, 由此发生的重组称为非同源重组<sup>[7]</sup>.

基因的同源重组是较普遍的生物现象, 从噬菌体、细菌到真核生物都有存在.

自原核生物基因工程技术成熟以来, 许多学者努力寻找类似于细菌基因克隆的方法, 把外源基因引入真核生物细胞, 并使引入的基因能在宿主细胞中表达. 后来人们发现, 有些被导入真核生物细胞的基因可稳定遗传. 分子生物学的方法表明, 能在细胞内稳定遗传的外来基因是以两种方式整合于某一染色体 DNA 上: 其一是随机整合; 其二是定向地整合于基因组 DNA 的特定位点上, 此特定位点为基因的同源区. 第二种情况即为基因打靶. 自从基因打靶的实验被证实以后, 人们对基因打靶的方法学进行了大量的探讨, 并发展为成熟的技术方法.

Capecchi 巧妙地选择胚胎干细胞 (embryonic stem cell) 的 Hprt 基因 (次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因) 为靶基因, 研究基因打靶. 该基因是性连锁基因, 在雄性动物体细胞内仅有一个拷贝. 由于 6-硫鸟嘌呤可杀死该基因正常 (Hprt<sup>+</sup>) 的细胞, 而丧失该基因的细胞却耐受 6-硫鸟嘌呤; 再者 Hprt 阴性的细胞在 HAT 培养基中不能生长. 因而该基因有良好的正负筛选系统. 如在打靶载体中使用新霉素抗性基因 (neo 基因), 则可表达此重组载体的宿主细胞可用 G418 培养基筛选.

Thomas 等<sup>[8]</sup>重组了一种缺少顺式作用元件的 neo 基因载体, 只有击中染色体基因后, 依赖于染色体基因组的相应促进子或启动子或聚 A 添加信号, 才能得以表达, 对 G418 产生抗性. 应用这一策略, 筛选而得 CD4、P<sub>53</sub> 基因打靶命中后的细胞株. 随后, Mansour 等<sup>[9]</sup>创建了一种正、负选择法, 用以甄别筛选同源重组体与随机整合重组体. 此法多有报道<sup>[10,11]</sup>, 其特点是使用正、负选择载体 (positive and negative selective carrier, PNS 载体), 此载体含有正、负选择基因各一: 正选择的基因 (多为 neo) 在随机整合与同源重组中均可正常表达; 负选择基因在靶基因的同源区之外, 位于载体的 3' 末端 (常用 HSV-TK 基因, herpes simplex viral thymidine kinase gene). 因大多数随机整合是外源 DNA 在染色体 DNA 末端的整合, 因此整合后保留 3' 末端基因. 载体 DNA 在与染色体 DNA 发生同源重组以后, 因载体末端的 HSV-TK 在同源区之外, 不参与整合而丢失. 胸苷激酶 (TK) 可使丙氧鸟苷 (ganciclovir) 转变为毒性核苷酸, 因而可用丙氧鸟苷筛选得同源重组的细胞株, 排除随机整合细胞株. 用 G418 作正选择, 筛选出含有 neo 基因的细胞株. 再用丙氧鸟苷做负筛选淘汰含 TK 基因的细胞株, 保留未含 TK 基因的同源重组细胞株. 正、负选择载体的筛选原理见图 1.

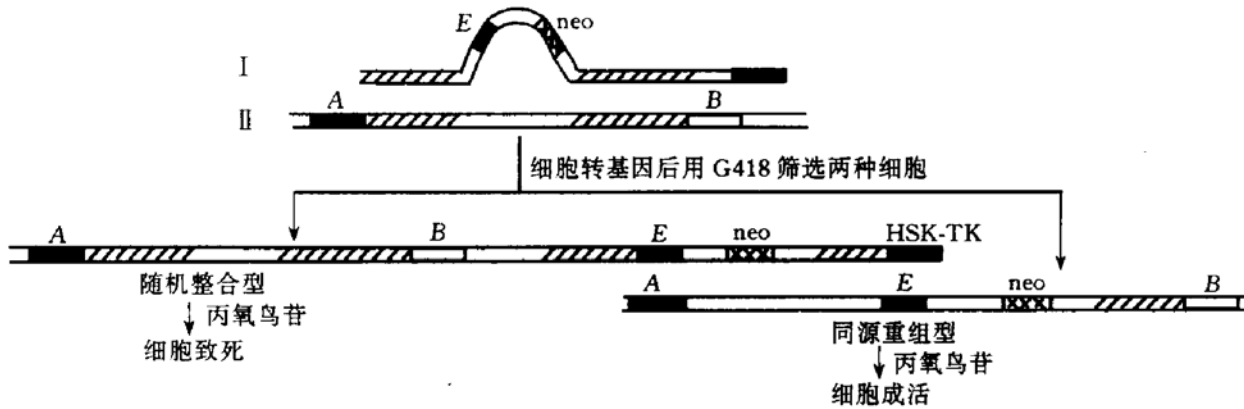


图 1 正、负选择载体的筛选流程图

I: 正、负选择 DNA. II: 染色体 DNA. I、II 之斜线部分为两者的同源区. A、B: 染色体上的两个基因; E: 载体上的外源基因. neo 为 G418 抗性基因, 即正选择基因; HSK-TK 为载体上负选择基因. 表达 HSK-TK 的细胞能为丙氧鸟苷致死.

近来随着 PCR 技术广泛应用, 已有许多研究者开始使用 PCR 技术筛选打靶命中的细胞株.

基因打靶技术亦可用于定点引入突变<sup>[12]</sup>. 还有人用双载体两步法对细胞的等位基因各个击破并获得了成功. 如设计一对分别来自染色体 DNA 及载体上外源 DNA 序列的引物, 因此对引物对筛选的细胞染色体 DNA 进行 PCR, 如有 PCR 特异产物, 便可确定此细胞被击中.

基因打靶技术除可用以中止某一基因表达、引入新的外源基因. 还可用于定点引入突变<sup>[12]</sup>.

## 1 基因打靶技术要点

### 1.1 基因打靶操作步骤

1.1.1 重组基因载体的构建: 把目的基因和与细胞内靶基因特异片段同源的 DNA 分子都重组到带有标记基因 (如 neo 基因, TK 基因等) 的载体上. 此重组载体为基因打靶载体. 因基因打靶的目的不同, 此载体有不同的设计方法. 如为了把某一外源基因引入染色体 DNA 的某一位点上, 这种情况下设计的载体要包括外源基因 (即目的基因)、同源基因片段及标记基因等部分. 如为了使某一基因失去其生理功能, 这时所要设计的打靶载体, 应包含含有此靶基因的启动子及第一外显子的

DNA 片段及标记基因诸成分.

1.1.2 用电穿孔、显微注射等方法把上述重组 DNA 转入受体细胞核内: 一般地, 显微注射命中率较高, 但技术难度较大, 电穿孔命中率比显微注射低, 但便于使用.

1.1.3 用选择性培养基筛选已击中的细胞: 一般地, 筛选使用正、负选择法, 用 G418 筛选所有能表达 neo 基因的细胞, 然后用 Ganciclovir 淘汰所有 HSV-TK 正常表达的细胞, 剩下的细胞为命中的细胞.

1.1.4 观察击中细胞的生物学特性. 将已击中的胚胎干细胞转入胚胎使其生长. 对转基因动物进行形态观察及分子生物学检测.

### 1.2 基因打靶的特点

做为新兴的遗传工程, 基因打靶有其特点.

a. 基因打靶所适应的细胞既可以是原核细胞, 又可以是真核细胞, 而较多的情况是用于真核细胞的基因改造.

b. 基因打靶能把外源基因引入染色体 DNA 的特定片段上. 在设计合理的情况下, 基因打靶可对宿主细胞染色体基因进行精细的改造.

c. 基因打靶后被击中的基因或新引入的基因随染色体 DNA 的复制而稳定复制.

## 2 基因打靶技术存在的问题

a. 命中率低, 打靶后有随机插入的情况,

因此双重筛选甚为重要。

b. 外源基因引入细胞核内难度较大, 如果该外源重组基因载体为正、负筛选型, 那么负选择基因由于处于载体的末端, 在进入细胞核前有可能因载体太长而被丢失。

c. 非同源重组随机插入的干扰, 使顺式作用元件失活, 或活化原癌基因, 使用显微注射法可降低非同源重组的发生<sup>[13]</sup>。

d. 在重组打靶基因载体时, 要充分掌握被打靶基因的序列及与之同源性较强的基因的序列, 以便重组一个仅对某一特定基因专一的打靶载体。

e. 染色体如有较大缺失, 在缺失部分进行打靶是无用的, 因为基因打靶的基本要求就是对染色体的 DNA 片段用体外含其同源片段的 DNA 去替换。

尽管基因打靶还存在一些技术问题, 但人们总能设法解决这些问题。基因打靶技术作为一项新的分子生物学技术正在不断完善与发展。

### 3 基因打靶技术的应用

#### 3.1 改造生物、培育新的生物品种

3.1.1 植物新植株的优选: 植物的体细胞具有全能性, 即每一个细胞具发展成一个植株的能力。对培养的植物细胞通过基因打靶的方法, 把某一抗病基因或抗寒(或旱)基因引入染色体基因组中, 可改变植物的遗传性, 获得优良品系。

3.1.2 对动物生殖细胞或早期胚胎干细胞的基因修饰改造以产生一些人类需要的新品种。加拿大多伦多大学生物化学系及临床生物系的研究人员把一种鱼的抗冻性基因, 通过转基因的方法转入一非抗冻性鱼的卵细胞, 产生新的抗冻鱼。

#### 3.2 临床治疗的应用

3.2.1 添加性的治疗: 日本有人将培养细胞进行基因打靶, 改造后的细胞移植于体内<sup>[14]</sup>。对一些血红蛋白类的遗传病, 可通过移取骨髓造血干细胞, 经培养后, 通过基因打靶的方法

修饰改造或替换原来异常的基因, 然后将改造的干细胞再移植于骨髓<sup>[15]</sup>。对一些由于点突变或小片段 DNA 缺失引起的分子病, 可从体内选择相应的细胞进行培养, 经基因打靶以正常的基因替代异常的基因, 把筛选出的细胞移入体内, 使新的基因在体内表达, 从而达到治疗的目的。治疗分子病新引入的基因不一定非要在原来的基因位点, 也可在一个对生物体生理功能无影响的基因位点引入。

3.2.2 去除多余的基因以达治疗的目的: 对过量表达而又影响正常生理功能的基因可通过基因打靶的方法阻断多余的基因拷贝以达到治疗的目的。如一些因基因过量表达(或基因扩增)而引起的白血病可通过骨髓穿刺, 培养骨髓细胞→打靶破坏多余的基因→筛选命中细胞→再移入骨髓的途径进行治疗。还有一些 XXY 或 XXX 三体类遗传病, 亦可通过基因打靶的方法中止多余的某些不利于正常生理功能的基因的表达。

#### 3.3 基因打靶技术在基础理论研究中的应用

3.3.1 对胚胎干细胞进行打靶修饰观察某些基因在发育中的作用: Imamoto<sup>[16]</sup>于 1993 年对鼠胚胎干细胞中的 CSK 基因(cerebrospinal kinase 基因)打靶以破坏此基因, 结果导致鼠的神经管发育异常, 鼠死亡。胚胎发育是非常复杂的生命现象, 在这一过程中包含着许多生理、生化的复杂变化。这一过程难以观察研究。尤其是要考察某一基因对某一组织器官发育的影响, 这在传统的研究方法中是难以办到的。基因打靶为这一领域的研究提供了理想的方法。

3.3.2 用基因打靶的方法研究基因对细胞周期的调控: 通过使用基因打靶的方法中止原癌基因或抑癌基因的表达, 观察细胞周期的变化, 分析被击中基因在细胞周期调节中的作用。Sands<sup>[17]</sup>使用基因打靶技术中止抑癌基因 P<sub>53</sub>的表达, 结果引起细胞的恶性增殖。此技术为筛选抑癌基因的理想方法。

3.3.3 基因打靶在分子免疫学中的应用: a. 通过基因打靶观察某一基因对免疫细胞发生发

展的影响. 有人用干扰素调节因子 1 或 2 (interferon regulatory factor 1 or 2) 做为靶基因, 打靶中止其活性后, 导致 I 型干扰素的异常, 并致使淋巴细胞发育异常<sup>[18]</sup>; b. 用基因打靶的方法去观察一些免疫机制. 有人用基因打靶技术破坏了 CD43 基因<sup>[19]</sup>, 结果提高了 T 淋巴细胞的粘附性.

**3.3.4 基因打靶技术可用于基因调控区的研究.** 有人用基因打靶技术把 DNA 调控区分开. 分析了珠蛋白调控区的功能.

**3.3.5 用基因打靶技术可对一些疑难病的发病机理进行研究.** 如心血管疾病的研究<sup>[20]</sup>.

**3.3.6 其他应用:** 因为基因打靶的原理是活细胞内 DNA 的同源重组, 因此一切活细胞在理论上都可用基因打靶技术进行研究. 如在细菌、酵母和寄生虫等生命特性研究中, 基因打靶均有有用武之地.

## 4 前景与展望

基因打靶技术是 80 年代后期发展起来的新兴的分子生物学技术. 它具有定位性强、打靶后新的基因随染色体 DNA 稳定遗传的特点. 它是一种理想的修饰改造生物遗传物质的方法. 这项新的技术无论在基础理论研究领域还是在实际应用中都有着美好而广阔的前景. 细菌的基因工程技术是本世纪分子生物学史上的一个重大突破, 而基因打靶技术则是遗传工程中的另一重大飞跃. 基因打靶技术使人们有可能真正地按自己的设想去改造生物的遗传物质, 且使改造后的遗传物质能稳定遗传. 一些复杂的生命现象如发育的分子机制有望通过此技术得以解答. 人们可使用此技术创造出更多有利于人类的新品种. 人们可望利用这一技术解决某些遗传病的治疗问题. 人们也可望通过这一技术更多更深地解决一些疾病的分子机理问题.

## 参 考 文 献

- 1 Capecchi M R. Gene Targeting Scientific American, 1994; 270 (3): 34
- 2 Tybulevice V L J, Tremblay M L, Lamarca M E *et al.*

Nature, 1992; 357: 407

- 3 Thompson S, Alan R, Angela M P *et al.* Cell, 1989; 56: 313
- 4 Robbins J. Circ Res, 1993; 73 (1): 3
- 5 Smithies O, Graggs R G, Boggs S S *et al.* Nature, 1985; 317: 230
- 6 Stacey A, Schnieke A, McWhir J *et al.* Mol Cell Biol, 1994; 14: 1009
- 7 盛祖嘉, 沈仁权. 分子遗传学. 上海: 复旦大学出版社, 1988: 93
- 8 Thomas K R, Capecchi M R. Cell, 1987; 51: 503
- 9 Mansour L S, Thomas K R, Capecchi M R. Nature, 1988; 336: 348
- 10 Zimmer A, Renolds K. Biochem Biophys Res Commun, 1994; 201 (2): 943
- 11 McCarric J W, Parnes J R, Seong R H. Transgenic Res, 1993; 2 (4): 183
- 12 Askaw G R, Doetschman T, Lingrel J *et al.* Mol Cell Biol, 1993; 13 (7): 4115
- 13 Walsman B C. Nucleic Acid Res, 1990; 18: 2733
- 14 Tanaka K. Cell Transplant, 1994; 3 (Suppl 1): 855
- 15 Apperlsy J F. Baillieres Clin Haematol, 1993; 6 (1): 299
- 16 Immamoto A, Soriano Cell, 1993; 73 (6): 1117
- 17 Sands A, Donshower L A, Bradley A *et al.* Mutat Res, 1994; 307 (2): 557
- 18 Matsuyama T, Kimura T, Kitagawa M *et al.* Cell, 1993; 75 (1): 83
- 19 Manjunath N, Johnson R S, Staunton D S *et al.* J Immunol, 1993; 151 (3): 1501
- 20 Mortensen R M. Hypertention, 1993; 22 (4): 645

**Gene Targeting and Its Application.** Wang Xiangdong, Tong Tanjun (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

**Abstract** In living cells, exploiting homologous recombination between sequences both from genomic DNA and extracellular DNA to accomplish site-modification in a certain gene on chromosome, is a method called gene targeting. Although the molecular mechanism of DNA homologous recombination is far from being elucidated, it is a common biological phenomenon. It is true that in cells there is an enzyme system that plays the role to make recombination of homologous DNAs, which is the theoretical foundation of gene targeting. The technology of gene targeting has been fully developed. The key step for operation is to construct a recombinant

carrier including one or two genes for selection and to transfer it into the nucleus effectively. The targeted cells can be inherited stably. Gene targeting has promising prospects in production of new strains of living things, in clinical usage

and in theoretical research of some complicated biological phenomena such as the molecular mechanism of development.

**Key words** gene targeting, gene knocking out, homologous recombination

## 双杂合系统及其应用

黄家学 马晓军 刘汀

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

**摘要** 蛋白质与蛋白质的相互作用是生物体内包括复制、转录、分泌、信号传导、代谢等生命活动得以进行的物质基础。以基因工程技术为基础的双杂合系统可以在体内检测蛋白质与蛋白质的相互作用, 并推广应用到寻找同某已知蛋白质相互作用的未知蛋白质, 直接克隆未知蛋白质的基因, 鉴别同已知蛋白质相互作用的关键氨基酸残基, 绘制蛋白质联系图谱等。双杂合系统在药物设计中的应用使其具有更重大的实用价值。

**关键词** 转录因子, 蛋白质与蛋白质相互作用, 双杂合系统, 蛋白质联系图谱, 药物设计

蛋白质与蛋白质的相互作用是几乎所有的生命活动得以进行的根据。在生物体的发育过程中, 不同物种、不同细胞的蛋白质因子同细胞核中 DNA-蛋白质复合物上的组蛋白、非组蛋白相互作用而导致基因的差别表达。不同的蛋白质同各自特异的结构蛋白作用形成特定的复合物, 定位在一定的区域内, 使生物体的结构高度有序。催化代谢反应的酶也可与不同种类的亚基、抑制剂、激活因子、结构组分结合而改变催化反应的速度甚至方向。细胞与细胞之间以及细胞内的信息传递也依赖于蛋白质之间的相互作用而得以进行。因此, 对某一生命过程中同已知蛋白质相互作用的蛋白质的研究可以更清楚地揭示这一生命过程。但由于蛋白质间的相互作用有持续的和暂时的, 作用力有大有小, 而且依赖于细胞内环境, 蛋白质与蛋白质相互作用的研究进展缓慢。最近兴起的双杂合系统 (two-hybrid system) 为研究蛋白质间的相互作用提供了崭新的方法。

### 1 双杂合系统的原理

典型的真核生物转录因子, 如 GAL4、GCN4、GAL80 等都具有两个结构域, DNA 结合域 (DNA-binding domain) 和转录激活域 (transcription-activating domain)。DNA 结合域可以识别 DNA 上的特异序列, 并使转录激活域位于所调节的基因的上游; 转录激活域可以同转录复合体的其他成分相作用, 启动它所调节的基因的转录。若在两个结构域连接区的适当部位打断, DNA 结合域仍能识别特异的 DNA 序列, 转录激活域的转录激活功能也不受影响<sup>[1]</sup>。把某个转录因子的 DNA 结合域与另一个转录因子的转录激活域重组可构成一个新的有功能的转录因子。这表明转录因子的两个结构域在结构和功能上不仅可以分离而且可以重建。