

脂染色体与真核细胞基因工程

易 健 华

(武汉大学生物系)

提 要

本文着重介绍以脂染色体 (Lipochromosome) 作载体将一种真核基因转移至另一真核细胞的新技术(脂染色体的制备及其检测、脂染色体转移基因及其检测)。脂染色体不但能促进基因转移和提高基因的稳定性,而且还能提高基因组活性。将基因导入真核细胞的现有技术,一般需要贵重的原料和设备,并且仅限于特殊的细胞类型。而脂染色体转移基因技术较为简单,各种不同类型的细胞均可作为靶细胞。基于上述这些独特优点,在真核细胞基因工程中它将成为一种极为有用的工具。

目前将基因引入到体外真核细胞的技术很多,包括: (1) 直接显微注射法 (Capecchi, 1980、Anderson 等, 1980); (2) 聚阳离子法 (Pagan, 1969); (3) 磷酸钙沉淀法 (Graham 等, 1973); (4) 病毒载体转移法 (Hamer 等, 1979、Shimotohno 等, 1981); (5) 红细胞血影融合法 (Straus 等, 1980); (6) 脂质体载体转移法^[2-5]; (7) 微细胞载体转移法 (Ruddle, 1981); (8) 染色体载体转移法^[6-8]等。由于以上这些方法对于转移真核基因来说均有某些局限性,近年来在染色体载体转移法和脂质体载体转移法的基础上研究建立一种脂染色体载体转移法。所谓脂染色体就是将染色体或其片段包装在脂质体 (Liposome) 内所形成的复合物^[1]。用脂染色体作载体不但能促进真核基因转移和提高基因的稳定性,而且还能提高基因组的活性,它是真核细胞基因工程很有希望的一种新载体。本文将介绍脂染色转移基因这一整套技术及脂染色体在真核细胞基因工程方面应用的状况。同时还将论述脂染色体转移真核基因至真核细胞的巨大潜力。

一、脂染色体的制备

脂染色体作为真核细胞基因载体是否具有优越性,首先应从脂质体包装染色体或其片段的效率及脂染色体运载基因至受体细胞的效率加以衡量,而制备脂质体的原料及脂质体制备方法是提高以上两个效率的关键。制备脂质体的原料^[9]及方法较多(表 1、表 2),应根据具体情况加以选择。

制备脂质体的原料对其运载基因物质(染色体 DNA、染色体及其片段、病毒 DNA 及病毒颗粒等)至受体细胞的效率的影响是多方面的。

不少研究证明磷脂的带电性质明显地影响脂质体与细胞结合的能力及细胞对脂质体的吸收效率^[2,9]。尽管脂质体运载基因物质至受体细胞的机理目前尚未阐明清楚,然而,无论是通过内吞或融合,还是通过脂质交换或其他方式^[10],均需要二者之间具有一定的亲和力,而后才能将其内容物转移至受体细胞内。组成脂质体的磷脂种类,特别是磷脂的带电性质直接与

这种作用有关。Fraley^[11] 用磷脂酰胆碱(PC) 制备中性脂质体,用磷脂酰胆碱和十八烷胺(PC-SA) 制备正电荷脂质体,用磷脂酰丝氨酸(PS) 或磷脂酰甘油(PG) 分别制备负电荷脂质体,用它们包装 SV40DNA, 然后让其与猴肾细胞一起温育, 结果发现 PS 脂质体和 PG 脂质体与猴肾细胞结合的脂质数量比 PC 或 PC-SA 脂质体的要高 5—9 倍。更有趣的是, 当向 PC 脂质体和 PC-SA 脂质体中加入 PS, 用这样的脂质体与猴肾细胞一起温育, 它们与猴肾细胞结合的脂质量也能增加, 并且它们与猴肾细胞结合的脂质量与加入 PS 的量为一种正相关关系, 由此表明, 带负电荷的脂质体比中性脂质体与猴肾细胞有较高的亲和力。因此, 它容易与猴肾细胞相互作用, 有利于将其内容物转移至猴肾细胞。

此外, 组成脂质体的磷脂种类、各种脂质的比例、磷脂的饱和程度、甚至磷脂的新鲜程度都将影响脂质体的稳定性, 而脂质体的稳定性是保证基因物质到达受体细胞之前免受破坏的前提。例如, PS 和 PG 负电荷脂质体, 尽管它们与受体细胞结合的能力基本相同, 但由于 PG 脂

质体的稳定性比 PS 脂质体低, 其漏泄率高, 所以 PG 脂质体将其内容物真正运载至受体细胞的量相应减少, 从而降低运载基因物质的效率^[11]。另外还发现, 单纯用磷脂制备的脂质体, 当其与受体细胞一起温育时, 在整个温育期间, 受体细胞诱发脂质体内容物的漏泄, 导致运载效率降低。在这种脂质体中加入适量的胆固醇能增加脂质体的稳定性, 可有效地抵抗受体细胞诱发脂质体内容物的漏泄^[11]。实验证明, 由被氧化的不新鲜的磷脂制备的脂质体不但稳定性差, 而且包装各种物质(包括遗传物质)的效率显著降低。由氧化后的磷脂制备的脂质体, 其中所含过氧化物对受体细胞还会产生毒害作用^[19]。

包装基因物质的脂质体要求具有较大的水相空间。改变脂质体的组成能增加脂质体的水相空间, 例如, 在 PG 或 PS 的脂质体中加入一定量的胆固醇就能达到这一目的。

综合现有的研究证明, 以 PC、PS 和胆固醇为原料, 按一定比例配合, 采用 Szoka 和 Papahadjopoulos (1978) 的逆相蒸发(reversephase evaporation, REV) 法制备带负电荷的大单层脂

表 1 制备脂质体的磷脂种类及其带电状态

名 称	英 文 名	代 号	电 荷
磷脂酰胆碱	phosphatidyl choline	PC	0
双软脂酰磷脂酰胆碱	dipalmitoyl phosphatidylcholine	DPPC	0
双硬脂酰磷脂酰胆碱	distearoyl phosphatidylcholine	DSPE	0
溶血磷脂酰胆碱	lysophosphatidyl choline	LPC	0
磷脂酰乙醇胺	phosphatidyl ethanolamine	PE	0
双十四酰磷脂酰乙醇胺	dimyristoyl phosphatidylethanolamine	DMPE	0
神经鞘磷脂	sphingomyelin	SM	0
磷脂酰丝氨酸	phosphatidyl serine	PS	-1
磷脂酰肌醇	phosphatidyl inositol	PI	-1
磷脂酰甘油	phosphatidyl glycerol	PG	-1
双十六烷磷酸盐	dicetyl phosphate	DCP	-1
双十四酰磷脂酰甘油	dimyristoyl phosphatidylglycerol	DMPG	-1
双磷脂酰甘油 (心磷脂)	diphosphatidyl glycerol (cardio lipid)	DPG (CL)	-2
双十四酰磷脂酸	dimyristoyl phosphatidic acid	DMPA	-2
磷脂酸	phosphatidic acid	PA	-2
十六烷胺*	stearylamine	SA	+1
胆固醇*	cholesterol	CHO(Cho)	0

* 在制备脂质体时加入一定量的胆固醇可提高脂质体的稳定性防止漏泄和增大脂质体的水相空间; 欲制备带正电荷的脂质体常加入十八烷胺, 它们并非磷脂, 由于制备某种所需的脂质体时常用到它们, 所以和磷脂一同列出。

表 2 脂质体类型及制备方法

类 型	英 文 名	代号	制备方法
多层脂质体	multilamellar Vesicle	MLV	机械振荡法(手摇法)
小单层脂质体	small unilamellar Vesicle	SUV	超 声 法
大单层脂质体	Large unilamellar Vesicle	LUV	1.乙醚注射法 2.Ca ²⁺ -EDTA 螯合法 3.逆相(反相)蒸发法

脂质体包装染色体为好,这是因为,这样的脂质体与受体细胞(对动物细胞而言)亲和力强,使染色体易于进入受体细胞,并且它的水相空间大,能有效地包装染色体。

二、脂染色体的检测

染色体是否包入脂质体内,可通过以下几种方法检测:

1. 荧光显微镜检测^[1,12] 分离中期染色体,用荧光染料染色^[13,14],用逆相蒸发制备大单层脂质体包装荧光染色体(荧光脂染色体)。用荧光染色体加入预先形成好的大单层脂质体作对照。荧光脂染色体和对照样品分别置荧光显微镜下观察,可清楚的见到脂染色体内发荧光的染色体,当用 HBSS 充分洗涤脂染色体时,荧光染色体始终与脂质体膜紧密结合,丝毫不与脂质体膜分离,由此证明这种染色体已经包入脂质体内。而对照样品见不到染色体外周的脂质体膜,由此证明,它只是一种染色体与脂质体的混合物,荧光染色体并未包入脂质体内。

2. 电子显微镜检测^[1] 将脂染色体固定和包埋后^[15],对整个脂染色体连续切片,用电镜观察,可观察到染色体周围脂质层的存在。

3. 同位素分析^[1] 用同位素标记染色体,并将其包入脂质体内,然后根据放射性计数可知染色体包入脂质体的情况(图 1)。

从图 1 说明,用 [³H] 标记的染色体制备的脂染色体,进行或不进行洗涤其放射性量几乎没有多大变化(图 1A 和 B),由此证明染色体已包入脂质体内,而对照样品经洗涤 3 次后其放射性量大大降低(图 1C),由此证明染色体未包入脂质体内。

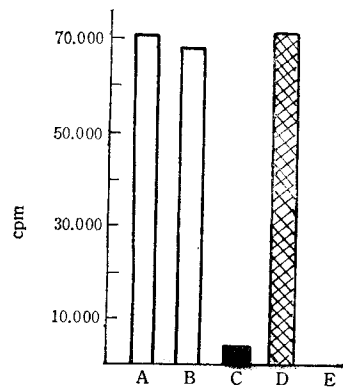


图 1 脂染色体的同位素分析

(A) [³H] 脂染色体未被洗涤, (B) [³H] 脂染色体洗涤 3 次, (C) 脂质体与 [³H] 染色体混合并洗涤 3 次, (D) [³H] 染色体 (E) 脂质体

三、脂染色体转移基因的检测

1. 基因转移体系的选择 为了便于检测脂染色体转移基因效果,首先应选择适当的脂染色体转移基因体系,该体系应包括供体染色体、受体细胞和转移子,一般从杂种细胞中获得供体染色体或其片段,在供体染色体及其片段中应包含有可供选择的标志基因(带标志的染色体),而作为受体细胞应恰好缺乏这种可供选择的标志基因。受体细胞接受供体染色体及其基因形成转移子(transferent)。转移子所获得的标志基因,可从两个水平上进行检测:一是检测转移子的标志基因转录产物(mRNA);二是检测转移子的标志基因表达的最终产物(蛋白质或酶)。

Mukherjee^[1] 选择一种缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HGPRT)基因的鼠细胞(A9)作为受体细胞,然后选择另一种 A9/HRBC2 作为供体细胞,该细胞是由 A9 和人的

成纤维细胞杂交形成的杂种细胞,它保留有人的X染色体和它的 HGPRT 基因、葡糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PD) 基因和磷酸甘油激酶(PGK) 基因。从 A9/HRBC2 中分离中期染色体,将其包装在脂质体内形成脂染色体。将脂染色体与 A9 细胞一起温育,脂染色体与 A9 细胞融合,中期染色体及其基因转移至 A9 细胞形成转移子,由于转移子获得 HGPRT 基因、G6PD 基因和 PGK 基因,表达为三种相应的酶可供基因转移检测。

Willian 等^[12]选择极微染色体 (minichrom-

osome) 包装在脂质体内(脂极微染色体),然后与猴肾细胞一起温育。脂极微染色体与猴肾细胞融合后形成空斑,由此证明 SV40 DNA 已转移至猴肾细胞。

2. 基因转移及其表达的检测

(1) 酶电泳分析 在一定条件下培养供体细胞、受体细胞及转移子至单细胞层,然后分别进行细胞匀浆,取细胞匀浆液进行凝胶电泳,并进行标志酶活性分析。图 2 为 Mukherjee (1978)所作的 A9、A9/HRBC2、转移子 (A9/GT3、A9/GT4) 淀粉凝胶电泳酶谱。

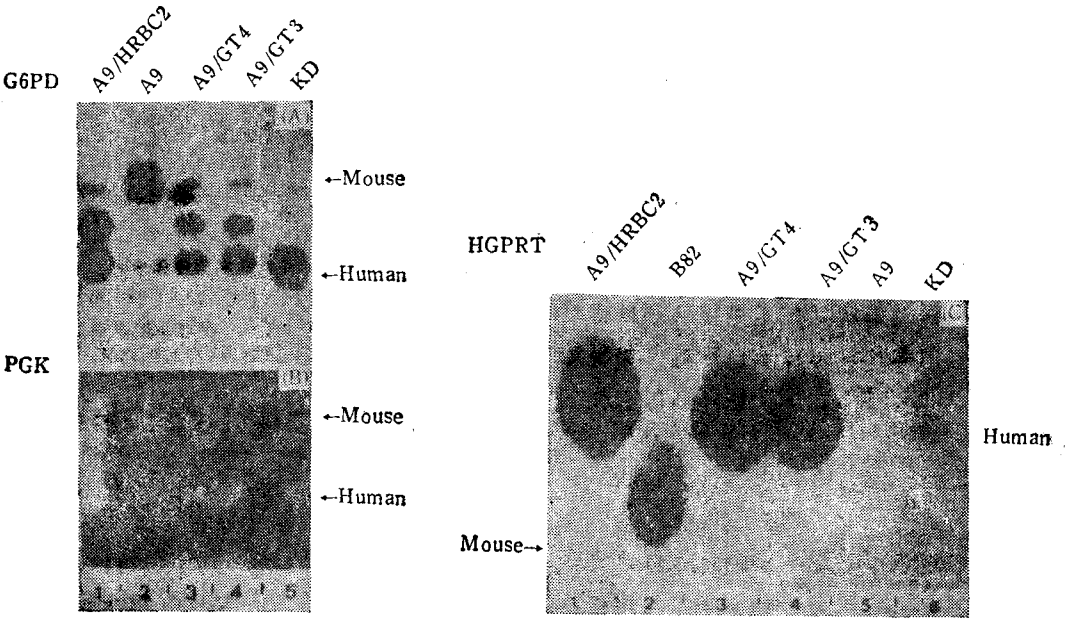


图 2 A9、A9/HRBC2、转移子 (A9/GT3、A9/GT4) 淀粉凝胶电泳酶谱

图 2(A) 为 G6PD 的电泳酶谱,受体细胞 A9 的 G6PD (槽 2)向阳极迁移比正常人(KD)的 G6PD (槽 5)要快,两者均为一条带。供体细胞 A9/HRBC2 的 G6PD 为三条带,而转移子 (A9/GT4、A9/GT3) 和 A9/HRBC2 一样为三条带,一条带的迁移率和人的亲本形式相同,另一条带的则与鼠的亲本形式相同,中间的一条带为异聚体(因为 G6PD) 为二聚体)。

图 2(B) 为 PGK 的电泳酶谱,人的 (KD) PGK 向阳极的迁移比鼠的要慢。由于 PGK 是一种单体,不会形成异聚体,所以在转移子中只

有两条带,即保留鼠和人的两种亲本形式的 PGK。

图 2(C) 为 HGPRT 的电泳酶谱,A9 缺乏 HGPRT 活性(槽 5),A9/HRBC2 和 KD 具有 HGPRT 活性,而转移子 (A9/GT4、A9/GT3) 和 A9/HRBC2 一样具有 HGPRT 活性,由此证明,人的 HGPRT 基因通过脂染色体转移至 A9,因此转移子具有 HGPRT 活性。

从图 2(A)、(B)、(C) 证明 X 连锁的三个位点 (G6PD 基因、PGK 基因及 HGPRT 基因) 通过脂染色体进行了转移,由以上电泳结果提

示, X 染色体的相当大的片段发生了转移。

(2) 染色体显带分析 脂染色体转移基因还可通过染色体显带加以证明。Mukherjee 用染色体显带技术分析转移体系的染色体,发现转移子的染色体组型基本上与 A9 相同,进行 C 带和 Q 带分析,未发现人的整个 X 染色体或与 A9 基因组相结合的人 X 染色体额外可见片段,由此说明,转移子已经发生了 X 染色体部分转移,至少有三个 X-连锁的基因通过脂染色体从一个真核细胞转移至另一个真核细胞。

(3) 用特殊培养基选择转移子 如将转移子从 HAT 培养基中移出,用最低必需培养基培养使其繁殖后再回到 HAT 培养基中,经过选择与非选择培养基反复培养,转移子在 HAT 培养基中存活良好,由此可以说明转移子仍保留了 HGPRT 基因,转移子是稳定的。

四、脂染色体介导真核转移的巨大潜力

近几年来国外对应用脂染色体作为真核基因载体进行了卓有成效的研究,充分显示脂染色体介导真核基因转移的巨大潜力。

1. 脂染色体易于大量获得 由于脂质体制备技术难度不大,染色体容易被脂质体包装,在制备脂染色体的同时,染色体便可包装于脂质体内。

2. 提高染色体的稳定性 实验证明,染色体一旦经脂质体包装,就受到保护,可免遭酶的破坏。从表 4 可明显看出,游离极微染色体用 DNase 处理后失去活性,它与猴肾细胞一起温育几乎不形成空斑,但脂极微染色体当用 DNase 处理后仍保持较高的生物活性,能很好的形成空斑。脂染色体不但对 DNase 酶有抗性,它和游离的染色体相比,在低温下能保存较长的时间而不致失去活性,例如,在氮气下于 4℃ 可保存 2 个星期。脂染色体稳定性高的这一特性,对于基因转移实验的连续操作和顺利进行是十分有意义的。

3. 促进基因转移 脂染色体与受体细胞膜相互作用(内吞、融合及带电性质的影响等)有利于染色体或其片段转移至受体细胞的细胞质

内,而后由细胞质通过核膜进入核内,因此,它能大大提高转移基因效率(表 3、表 4)。

表 3 脂(中期)染色体*介导基因转移效率^[1]

处 理	转移效率
	集落/5×10 ⁶ 细胞
中期染色体	3.9(4,5,2)**
中期染色体+脂质体	1.3(3,0,1)
脂(中期)染色体	51(55,48,52)
脂(中期)染色体 + PEG	51(58,42,55)

* 脂(中期)染色体为脂质体包装中期染色体后形成的脂染色体。

** 括号外为 3 次实验数据的平均值,括号内为每一次实验的数据。

表 4 脂(极微)染色体*介导基因转移的效率^[1,2]

处 理	PFU/μgDNA(×10 ⁻⁴)
游离极微染色体	0.6
游离极微染色体+DNase	<0.0001
脂(极微)染色体+DNase	12
脂质体包装 SV40DNA	10

* 脂(极微)染色体为脂质体包装极微染色体后形成的脂染色体。

表 3 表明,脂(中期)染色体的转移基因的效率大大超过单独使用中期染色体,前者比后者提高约 13 倍,中期染色体加脂质体处理的其效率也很低。

表 4 表明,脂极微染色体的感染力比游离极微染色体的要高 20 倍。

4. 调节基因组活性 染色体经脂质体包装后其活性将会发生改变(改性),改性的主要原因是由于脂染色体中的磷脂能调节基因组活性。Wickner 等^[16]和 Novello 等^[17]曾报道,在体外合成 DNA 时,磷脂能提高大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 和 DNA 聚合酶 III 的活性,尽管哺乳动物细胞的 DNA 复制机理极其复杂,通过体外 DNA 合成实验证明^[18],磷脂同样能提高 DNA 聚合酶 α 的活性,从而加快哺乳动物的 DNA 合成。除此之外,磷脂与 DNA 相互作用以后,能改变 DNA 的模板活力。磷脂与 DNA 之间相互作用通过热变性和电泳等技术已被描

述 (Manzoli, F. A. 等, 1972, 1974, 1976, 1978)。在磷脂与 DNA 的相互作用的过程中, 磷脂分子中的极性部分可能直接与 DNA 分子中的磷酸基团相互结合, 而这种结合可能有利于 DNA 的解链而促进 DNA 的复制。也有可能磷脂通过与核组蛋白相互作用而解除核组蛋白对基因的抑制, 从而提高 DNA 模板活力。事实上, 这点已有不少研究证明, 例如用带不同电荷的磷脂制备脂质体包装病毒 DNA 其感染力有显著差别 (Willan 等 1983)^[12], 用 PC 和 Cho 按一定比例制备大单层脂质体包装极微染色体感染猴肾细胞, 其结果几乎不形成空斑, 若用 PS 代替 PC, 结果感染力大大提高 (约 20 倍), 由此提示, 由 PS 所制备的脂质体由于带有负电荷, 使有利于与带正电荷的组蛋白结合, 从而解除组蛋白对基因的抑制而促进 DNA 的复制。以上事实说明, 磷脂能从提高 DNA 聚合酶活性和提高 DNA 模板活力两条途径来提高基因组活性。也有研究指出^[18], 哺乳动物细胞的染色质中磷脂含量并非恒定, 随细胞周期的不同时期而有规律的变化。处在活性状态的染色质中的磷脂含量要比处在抑制状态的要高。这一事实同样也证明磷脂在基因活动中起着调节作用。至于何种磷脂或那几种磷脂能最佳地提高基因组活性, 将此问题研究清楚是十分有价值的, 因为用这种或这几种磷脂和其他物质按一定比例配合, 制备大单层脂质体包装遗传物质, 特别是真核遗传物质, 使其与

真核细胞相互作用, 这样, 既能提高运载基因的效率, 又能活化基因。

综上所述, 脂染色体载体转移基因技术和现有其他载体转移基因技术相比, 确有其独特的优点, 但它毕竟是建立不久, 方法尚有待进一步完善, 机理也有待更深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Mukherjee, A. B., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 1361, 1978.
- [2] Schaefer-Ridder, M., et al.: *Science*, **215**, 166, 1982.
- [3] Lavelle, D., et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **215**, 486, 1982.
- [4] Lurguin, P. F., et al.: *Plant Science Letters*, **25**, 1933, 1982.
- [5] Radford, A., et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **184**, 576, 1981.
- [6] McBride, O. W., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 1258, 1973.
- [7] McBride, O. W., et al.: *In Vitro*, **12**, 777, 1977.
- [8] Spardidos, D. A., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **74**, 4380, 1977.
- [9] Forge, A., et al.: *J. Membr. Biol.*, **41**, 249, 1978.
- [10] Pagano, R. E., et al.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **7**: 435—68, 1978.
- [11] Fraley, R., et al.: *Biochemistry*, **20**, 6978, 1981.
- [12] Willian, B., et al.: *J. Gen. Virol.*, **64**, 911, 1983.
- [13] Von Bertalanffy, L., et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **4**, 481, 1956.
- [14] Armstrong, J. A.: *Exp. Cell Res.*, **11**, 640, 1956.
- [15] Spurlock, B. O., et al.: *J. Cell Biol.*, **17**, 203, 1963.
- [16] Wickner, W., et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 6244, 1974.
- [17] Novello, F., et al.: *J. Biochem.*, **24**, 325, 1975.
- [18] Capitani, G.: *Mol. Cell Biochem.*, **27**, 135, 1979.
- [19] 曾治义、易健华: 《武汉大学学报》, 1984 年, 1 期, 123 页。

[本文于 1986 年 7 月 15 日收到]

(上接第 36 页)

(张志鸿、刘宏志 整理)

结果, 如某种囊泡膜上出现新的蛋白质成份, 现在正在作更细致的确认。其中采用的一种分析方法是针对某些特异组分的蛋白质, 制备其单克隆抗体, 然后观察这种抗体作用后是否会引起细胞内物质运输方向的改变。但本法只能追踪含配体囊泡的细胞内过程。当内含体中配体-受体分离后, 对含受体的囊泡就无能为力了。显然, 这些研究工作的难度很大, 但可以期待随着研究工作的深入开展, 将大大有助于我们对细胞内物质定向运输机制的了解。

参 考 文 献

- [1] Kirchhausen, T. and Harrison, S. C.: *J. Cell Biol.*, **99**, 1725, 1984.
- [2] Schlossman, D. M. et al.: *J. Cell Biol.*, **99**, 723, 1984.
- [3] Dunphy, W. G. and Rothman, J. E.: *Cell*, **42**, 13, 1985.
- [4] Wilschut, J. et al.: *Biochemistry*, **19**, 6011, 1980.
- [5] Maeda, T. et al.: *Biochemistry*, **14**, 3736, 1975.
- [6] Goldstein, J. L. et al.: *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 1, 1985.
- [7] Sato, S. B. et al.: *J. Cell Biol.*, Submitted.