

基因功能研究的技术和方法

孙春晓 于常海*

中国科学院上海生命科学研究中心(上海, 200031)

*香港科技大学生物系

摘要 随着基因组计划的深入,越来越多的有生理意义的基因被成功克隆,对基因功能的研究显得日益重要。目前基因功能研究的主要方法有:基因转导、反义技术、核酶、基因重组、染色体转导技术等。

关键词 基因功能;基因重组;基因转导

随着被克隆基因的日益增多,对基因功能的研究也显得日益迫切,这就是科学家们正在考虑的基因组序列和结构弄清楚之后的任务,也即“后基因组计划”(post-genome project)。目前关于这个计划的确切定义尚不明朗,这个计划主要研究的是基因的功能和基因与人体疾病的关系,因此有人将其又称为功能基因组学(functional genomics)。本文对研究基因功能的方法进行综述。

1 基因转导技术

研究基因的功能首先要求基因在体内外表达,其中最简单的方法是将目的基因转入某一种细胞中,通过观察细胞的生物学行为的变化而认识基因的功能。基因转导技术是目前用得最多,也是技术最成熟的基因功能研究方法。有关这方面的报道也很多,这里不作介绍,如有兴趣可参阅有关的书籍和文献^[1]。

2 反义核苷酸技术

反义核苷酸是相对于编码链(正义核苷酸)而言,是与正义链互补的一段核苷酸序列,它是一种核苷酸或其类似物;与正义核苷酸结合后,可阻止其转录和翻译。目前已广泛用于基础研究和临床试验上。这种方法用于

人体基因的功能研究较好。现在用得较多的反义核苷酸是经磷硫修饰的寡核苷酸(S-oligo),一般为 15~20 bp,有报道认为 8-mer 的 S-oligo 即可明显抑制基因的作用,其长度与敏感性不成正比;反义核苷酸一般设计在编码区或 3'UTR 区;目前已有软件可帮助设计反义核苷酸的序列^[2]。它也存在转导效率低下和体内容易降解等致命缺点。

3 核酶技术

核酶(ribozyme)虽然是一种 RNA 分子,但具有酶的活性,也具有自我催化和切割的作用,并且这种作用无需能量,它的作用可使 RNA 被降解而无法进行转录翻译。锤头状核酶具有特异的二级结构,这种结构对于它的催化作用至关重要,其切割位点在 GUC 部位。设计核酶的基本原则是:选择目的基因的 GUC 区域,合成两条 6~8 bp 长的反义寡核苷酸,并使这两条链间的序列形成锤头状结构。如果能够确保转导效率的话,核酶用于人体基因功能的研究也比较合适^[3]。

4 基因敲除技术和基因嵌入技术

识别基因功能最有效的方法可能是观察基因表达被阻断或基因开始表达后,细胞和机体所产生的表型的变化。在这方面,利用基

因敲除技术(gene knockout)和基因嵌入技术(gene knockin)产生的模式生物可能是最具研究价值的工具。这两种技术的诞生,直接导致了转基因动物的产生。转基因动物是指体内基因组中稳定地整合有外源基因的动物。利用转基因动物可在活体水平研究有关基因的结构和功能,它是一个多维的研究体系,是从分子到个体多层次、多方位研究基因的理想模型。

4.1 基因敲除技术

它是基因打靶(gene targeting)技术的一种,类似于基因的同源重组(homologous recombination),指外源 DNA 与受体细胞基因组中序列相同或相近的基因发生同源重组,从而替代受体细胞基因组中的相同/相近基因序列整合入受体细胞的基因组中^[4]。它可用电穿孔法或显微注射法将含有人工突变部位的目的载体转入胚胎衍生的干细胞(embryo-derived stem cell, ES)中。在多数情况下,载体随机插入 ES 细胞的基因组中,但有一小部分细胞目的载体可与细胞基因组发生同源重组;筛选克隆出这些含有同源重组的细胞,注射入预先移植的小鼠胚胎的囊胚腔中,再种植到育龄鼠的子宫中生长、发育;最后产出的鼠既有供体的干细胞,又有宿主的胚泡。用这种方法可以产生精确的基因突变,也可正确纠正机体的基因突变。

从大量的细胞中正确地分离出含有基因同源重组的细胞目前大致有 3 种方法:① hprt 基因的失活:次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因(hypoxanthine phosphoribosyl transferase gene, HPRT)位于 X 染色体上,在雄性个体上,只要单一拷贝的突变即可产生隐性的 hprt 表型,它可以在含有 6-TG(6-thioguanine)的培养基上生长,而 hprt⁺的细胞则不能。这种方法产生同源重组细胞的概率和目的载体与内源 DNA 序列的同源性成正比。如果有 2~4 kb 的基因同源,则 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$ 的细胞即可产生一个重组细胞^[5]。② 无

选择基因:此方法不用选择标记,而采用 PCR 的方法对插入的基因进行筛选。用该方法可从每 300 个细胞中筛选出 1 个重组细胞,但该方法只能在只有受体细胞表达目的基因时才可采用^[6]。③ PNS (positive-negative selection) 系统:采用 HSV-tk 基因(阴性)和 Neo 基因(阳性)的双重选择^[7]。

当今主要的基因敲除技术有:Cre/lox P 系统、FLP-FRT 系统、GAL4/UAS 系统及基因足迹(genetic footprinting)、分子标尺编码系统(molecular bar coding system)和标签交换战略(Tag- and exchange- strategy)等定点突变或敲除基因等。其中 Cre/lox P 系统是利用噬菌体的 P1 基因编码 38 kD 的 Cre (cyclization recombination) 重组酶,后者可在 34 bp 的重复序列 lox P (locus of X-over of P1) 间催化基因重组。Lox P 位点含有 13 bp 的反向重复序列和 8 bp 的核心序列^[8]。它已由原先只能在胚胎期就敲除基因使之不表达发展到特定发育阶段基因的不表达,这样就防止由于机体的代偿而使目的基因的表型不显现或出现混合表型改变;Kühn 等用 IFN 反应性增强子(Mx)来控制基因重组的时间;有人用四环素调控表达系统来控制 Cre 基因的活性,达到了基因的定时敲除^[9,10]。对于致死性基因的研究可以采用引入 lox2 终止盒(lox2 stop cassette)的方式,因为 Cre 的重组需在 2 个同向的 lox P 位点(lox2 P)间进行,先在 2 个 lox P 间插入一个终止信号并产生带有这种载体的转基因鼠,再与带有 Cre 基因及其启动子的转基因鼠杂交,这样可使 lox2 后的靶基因表达。采用这种方法还可以使所研究的基因产生条件性表达^[11]。

Flp-FRT 系统的作用机理与 Cre/lox P 系统的机理类似,FLP 也是位点特异的重组酶,它可在 FLP 识别位点(FLP recognition target FRT)对基因进行切割重组^[12]。该系统主要用于果蝇等,在哺乳动物上尚未见应用^[13]。GAL4/UAS(upstream activating site)

的作用原理与前两者略有不同, GAL4 是酵母转录活化因子, 它与某一基因的增强子结合可以使该基因错误表达, 从而使基因的功能丧失^[14]。尽管对 GAL4/UAS 系统作了许多改进, 但与 FLP/FRT 系统一样, 它也还局限于在果蝇中应用^[15]。

3.2 基因嵌入技术

基因嵌入又称基因置换 (gene replacement), 它是利用内源基因序列两侧或外面的断裂点, 用同源序列的目的基因整个替换内源基因。目前用于基因置换的技术有: Cre/lox P 系统^[16]和 FLP/FRT 系统^[17]等, 它们的工作原理已在基因敲除技术中描述, 它们在进行基因敲除的同时, 还可以进行基因置换。除了对上述这些技术进行改进以外, 可替换的基因长度也越来越长, 不仅一个基因的 cDNA 能被替换, 带有调控序列的片段也可以被替换, 如酵母人工染色体 (yeast artificial chromosomes, YACs)、哺乳动物人工染色体 (mammalian artificial chromosomes, MACs) 和细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosomes, BACs) 的片段等^[18]。这样所转入的基因更适于体内表达, 并有利于基因保持其固有空间构象和功能的发挥; 所产生的结果更有代表性, 更符合基因的真实功能。

5 人工染色体的转导

普通意义上的基因转导在基因功能和基因治疗上的应用已十分广泛, 但是这种方法主要的缺点是: 基因表达水平的低下或不恰当的表达和缺乏组织特异性等。近来采用转导 YACs 的方法来研究基因功能取得了比较理想的效果。采用转导 YACs 的方法研究基因功能有 2 个主要的好处: 一是可插入的基因片段较长, 它不仅可插入上千万的碱基对的基因, 而且还可包含位于基因外数万个碱基的全部基因表达调控序列, 这样有利于基因的组织特异性高水平表达; 它的第二个特点是对转导入的 YACs 预先通过同源重组

进行适当的修饰^[19]。

YACs 转导方法有前核注射、脂质体介导和与酵母原生质体融合等。其中前核注射可使转导入的 YACs 长度达到 600~700 kb, 转导入较短 YACs 的小鼠其保持 YAC DNA 完整的可能性比转导入较长 YACs 的小鼠大; 转导入的 YAC 一般以低拷贝的形式存在, 拷贝数在 1~10 之间, 即使多拷贝也是几个拷贝整合在同一个位点。采用脂质体介导 YAC 往往需与多胺合用以浓缩 DNA 和防止其断裂, 这种方法只适合于少数几种细胞, 且 YAC DNA 保持完整的可能性较小, 工作量又较大, 与显微注射相比并无明显的优势。与酵母原生质融合的方法不需要对 YAC DNA 进行纯化即可进行, 其对 YAC 的长度限制又较小, 它的缺点是酵母的基因组 DNA 也要被整合入鼠中且挑选出合适的 YAC 整合 ES 细胞比较困难。

多数 YAC 文库构建于酵母 AB1380 株和 pYAC4 载体, 它可转导入其它的酵母株中进行 YAC 转导前的修饰, 其中最简单的方法是利用核融合突变株 [karyogamy mutant (kar) strains^[20]]。对 YACs 的修饰方法有: 插入选择标记、导入单一限制酶切位点 (I-Sce I 位点、I-Ppo I 位点等)、在 YAC 上加上片段 (端粒、已知序列、Alu, B1, B2 重复元件等) 及通过同源重组进行点突变、插入、缺失修饰等。

采用转导 YACs 的方法可使基因的表达水平与内源基因相当, 又与机体的剪接机理相似, 更适宜于基因功能的研究和复杂性状的区分^[21]。

参 考 文 献

- 1 Verma IM *et al.* Nature, 1997;389:239
- 2 Mitsuhashi M. J Gastroenterol, 1997;32:282
- 3 Lieber A *et al.* Mol Cell Biol, 1995;15:540
- 4 Travis J. Science, 1992;256:1392
- 5 Doetschman T *et al.* Proc Natl Acad Sci USA,

- 1988;85:8553
- 6 Joyner AL *et al.* Nature, 1989;338:153
- 7 Mansour SL *et al.* Nature, 1988;336:348
- 8 Lakoson M *et al.* Proc Natl Acad Sci, 1992;89(4):6232
- 9 Kühn R *et al.* Science, 1995;269:1427
- 10 St-Onge L *et al.* Nucl Acids Res, 1996;24(19):3875
- 11 Sauer B. Methods, 1998;14:381
- 12 Luetke KH *et al.* Nucl Acids Res, 1997;25(21):4240
- 13 Theodosiou NA *et al.* Methods, 1998;14:355
- 14 Calleja M *et al.* Science, 1996;274:252
- 15 Phelps CB *et al.* Methods, 1998;14:367
- 16 Orban PC *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992;89:6861
- 17 Hoang TT *et al.* Gene, 1998;212:77
- 18 Smith DJ *et al.* Hum Mol Genet, 1997;6:1729
- 19 Huxley C. Methods, 1998;14:199
- 20 Spencer F *et al.* Genomics, 1994;22:118
- 21 Smith DJ *et al.* Hum Mol Genetics, 1997;6:1729

(1999-04-01 收稿)

反义核酸的骨架修饰及其应用

储 淳 罗天学综述 高小平 李伯刚审阅

中国科学院成都地奥制药公司(成都, 610041)

摘要 反义核酸的发展经历了反义寡核苷酸、混合骨架寡核苷酸和多肽核酸等几个阶段。这 3 种不同类型的反义核酸均能与 DNA 或 RNA 结合, 阻断目的基因的表达。3 种反义核酸的结构有较大差异, 各自的性质和反义作用机理也不尽相同。尽管作用机制还不十分明确, 反义核酸已广泛应用于生物学和医学等领域, 作为反义药物用于治疗癌症等疾病, 或作为试剂研究生物大分子的功能。

关键词 反义核酸; 骨架修饰; 硫代寡核苷酸; 混合骨架寡核苷酸; 多肽核酸

反义核酸(antisense nucleic acid)为一段天然或人工合成的核酸序列。它通过碱基配对与细胞内核酸结合后, 可特异地调节基因的表达。反义核酸包括反义 DNA、反义 RNA 和核酶(ribozyme)。反义 DNA 和 RNA 通过和细胞内基因或 mRNA 结合后, 封闭基因的转录或降解 mRNA。核酶和细胞内 mRNA 结合后, 通过特异的 GUX 位点切割 mRNA 分子, 从而调节基因的表达。

反义核酸根据来源不同可分为 3 类: ①用重组 DNA 技术构建表达载体在体内转录出反义核酸。②利用诱导物诱生体内的反义

核酸。③人工合成反义寡核苷酸(antisense oligonucleic acid)。

目前被广泛应用的是反义寡核苷酸, 一般由 15~20 个碱基组成, 具有合成方便、序列设计简单及容易修饰等特点。硫代寡核苷酸(phosphorothioate, S-ODN)被称为第一代反义核酸。在此基础上, 人们设计出混合骨架寡核苷酸(mixed backbone oligonucleic acid, MBO)和多肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)以改善第一代反义核酸的体内稳定性, 降低其携带的负电荷和免疫原性, 增强其反义效果和特异性。这两种反义核酸分别被