

热点评析

人造染色体与“重组染色体技术”

郭礼和

今年本刊第一期(中国细胞生物学学报2011; 33(1): 95-9.)我介绍了美国科学家克雷格·文特尔实验室人工合成支原体基因组,创造了人造生命体。这个基因组长度为1.08 Mb,用化学方法合成了该基因组所有的DNA片段,然后借助酵母“同源重组技术”将这些片段组装成完整的支原体基因组(环形染色体)。虽然,该研究是一项庞大的工程,工作量巨大,操作繁琐,周期冗长;但在技术上是可行的,只要有足够的经济实力和有经验的科技人员,实施这一类研究还是能够做得到的。随着合成生物学的发展,上述的技术和方法会日臻完美,必定会有越来越多的实验室从事该领域的研究工作。

随着生命科学研究工作的深入开展,人工合成真核生物基因组这项任务,也会逐渐提到议事日程上来。尤其是生物医学的社会需求、经济利益的追逐,必定会加速这一进程。不久的将来,像“染色体治疗”、“人源化动物”、“医用植物”等这一类新名词会一一跳入我们的眼帘,沁润我们的脑海。真核生物基因组是由多条染色体组成的,要想人工合成基因组,首先要人工合成染色体。

微生物基因组只由一条环状的DNA分子组成,结构很简单。真核生物染色体结构比微生物要复杂得多,形态呈线状,两头有端粒结构,中间或顶端有一个着丝粒。DNA分子内部存在大量非编码序列和重复序列,外部有大量蛋白结合,同时缠绕着由四种组蛋白八个亚基组成的核小体,呈链珠状。这些形态和结构为化学合成DNA设置了几乎不可逾越的障碍,尤其是大量高度重复序列的存在,会给序列测定和化学合成造成难以克服的困难。目前来说,完全用化学方法全合成真核生物基因组是可望而不可及的。要想人工合成真核基因组,只能采用天然存在的染色体片段和部分化学合成的DNA片段进行组装,形成人造染色体。在方法学上很像分子生物学常用的DNA重组技术,但在技术上有着本质

的区别。目前,人造的真核生物染色体可分成三大类:酵母人造染色体(Yeast artificial chromosome, 缩写为YAC);哺乳类人造染色体(Mammalian artificial chromosome, 缩写为MAC);人类人造染色体(Human artificial chromosome, 缩写为HAC)。

酵母是真核生物最简单的模型代表,研究得最多。它含有17条染色体,全长12.052 Mb, 6 500多个基因。上世纪80年代初,它的人造染色体(YAC)已经诞生了,已经为人类基因组计划的顺利完成做出了重大贡献。YAC技术就是利用酵母染色体的基本元件,构建出具有基因表达调控和遗传复制功能的人造染色体。YAC是由酵母染色体的端粒(染色体末端的特殊DNA序列,保证染色体在细胞内的稳定性)、着丝粒(保证染色单体在细胞分裂时能准确分配到两个子细胞,保证遗传的稳定性)、DNA复制子(DNA复制时的起始点)和所需研究的染色体片段组装而成。YAC无论在细胞活动或静止状态和有丝分裂或减数分裂过程中都是稳定的,已经广泛应用于原核和真核染色体片段克隆、扩增、基因表达及功能的研究,尤其在各种结构基因组及功能基因组的研究领域已经发挥了重要作用。然而, YAC技术仍然存在一些问题。例如,它的容量较小,装载染色体片段长度一般不超过1.0 Mb,在酵母细胞内容易发生重组或缺失,造成人为假象。利用YAC技术推广到哺乳类细胞和人的染色体还存在很大障碍。

哺乳类细胞的基因组长度比酵母的要大两到三个数量级,但染色体个数差别不大,基因数量只相差两到三倍。基因组长度差别主要反映在非编码序列和重复序列上。它们在端粒结构上很相似,说明端粒在进化上很保守,它们之间可以相互取代。可是,哺乳类细胞着丝粒和酵母的在组成和结构上有很大的区别。就是哺乳类之间的着丝粒在结构上也有区别,甚至同一细胞不同染色体之间也有差异。因此,着丝粒结构很复杂, DNA序列高度重复或变异,

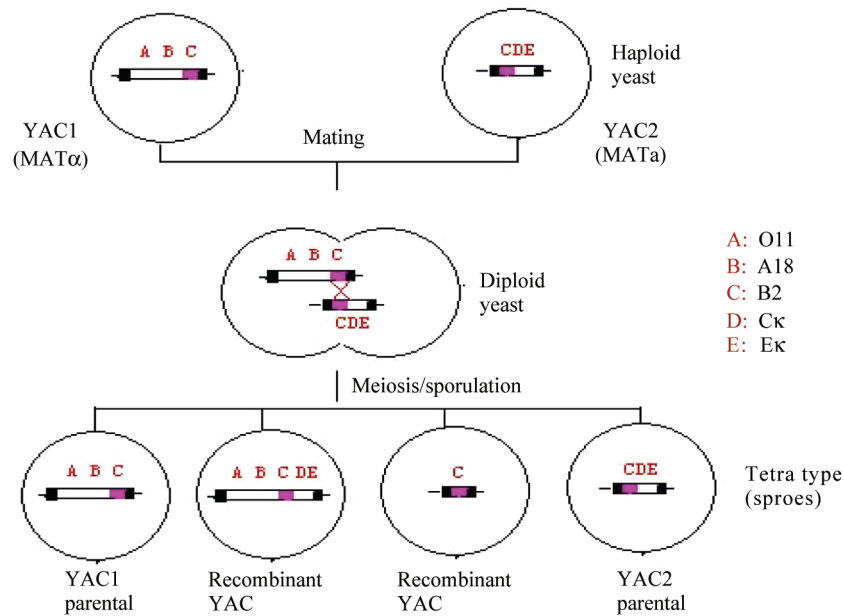


图1 两个YAC(含有人2号染色体κ轻链基因簇, 分别用A、B、C、D、E代表), 分别在MATa和MATα酵母菌内, 融合(有性生殖)成为二倍体酵母, 发生同源重组。经过减数分裂, 形成孢囊。每个孢囊含有四个单孢子, 每个单孢子含有一种“重组染色体”(图片来源于本实验室)。

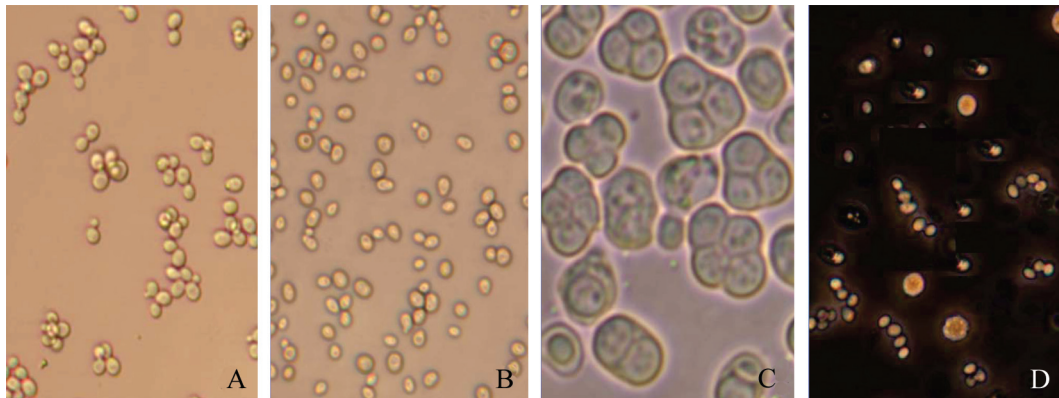


图2 含YAC的酵母菌经有性生殖过程所发生的形态变化, 形成的孢囊(图2C)经消化后应产生四个单倍体的孢子(单孢子, 图2D)(图片来源于本实验室)。A: 单倍体; B: 二倍体; C: 孢囊孢子; D: 消化后单孢子。

至今只有少数染色体的着丝粒区域结构被弄清楚。在人鼠融合的细胞内, 人的染色体着丝粒在细胞分裂过程中对纺锤丝的粘附亲和力较鼠的要弱, 在子代细胞内人的染色体容易发生丢失, 故而在人鼠融合细胞内保持人的染色体不丢失, 须在人的染色体中插入抗性基因, 并在培养时给予选择压力。

在构建哺乳类或人类的人造染色体时, 首先要考虑着丝粒功能性的强弱。因为, 人造染色体在不同的宿主细胞内稳定性差别很大, 对纺锤丝的亲连接存在与宿主细胞的染色体竞争, 防止在细胞分裂过程中被丢失。虽然, 理论上已知α卫星DNA(染

色体缢痕上或附近的显性串联重复DNA序列)阵列附近区域内存在着着丝粒位点, 但有很多例外情况存在, 着丝粒不一定落在α卫星DNA区域。着丝粒卫星DNA阵列的详细图谱(包括人类和其他生物体)分析显示有一些非卫星序列存在, 它们大多数是反转录转座子(可移动DNA)家族的成员。

下面简要介绍构建真核细胞人造染色体(主要为MAC和HAC)的基本操作技术。这项技术也可称为“重组染色体技术”(recombinant chromosome technology), 因为它很像“重组DNA技术”, 但使用工具和方法恰不同, 克隆DNA片段长度也有数量级

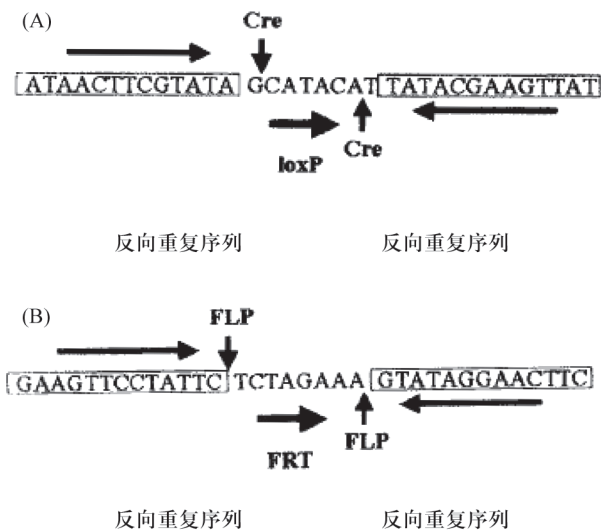


图3 (A)显示Cre酶切位点及其识别的Loxp序列; (B)显示FLP酶切位点及其识别的FRT序列(图片来源于本实验室)。

间或天然染色体之间有较长的DNA序列(一般要大于几百bp或更长,要视细胞同源重组能力而异)有同源性结构。图1为酵母YAC对人2号染色体(含免疫球蛋白κ链基因簇)两个片段同源重组实验示意图。图2为图1的实验结果图(显示酵母从单倍体经过二倍体重组再到四孢子单倍体的形态变化)。Cre/Loxp(FLP/FRT)技术是利用Cre(FLP)酶对Loxp(FRT)序列的识别进行切割和连接(图3和图4)。端粒位于染色体两端,维持染色体的稳定。若将人造端粒随机插入,染色体就会在插入处断裂,形成短了一截的人造染色体(图5)。若将人造端粒DNA序列两端连接上与染色体内某一位点的同源序列,利用“同源重组技术”,可将这一染色体从同源位点处删除一段,这就是定点打靶进行染色体片段删除(图5)。

“重组染色体技术”首先需要染色体片段,它既

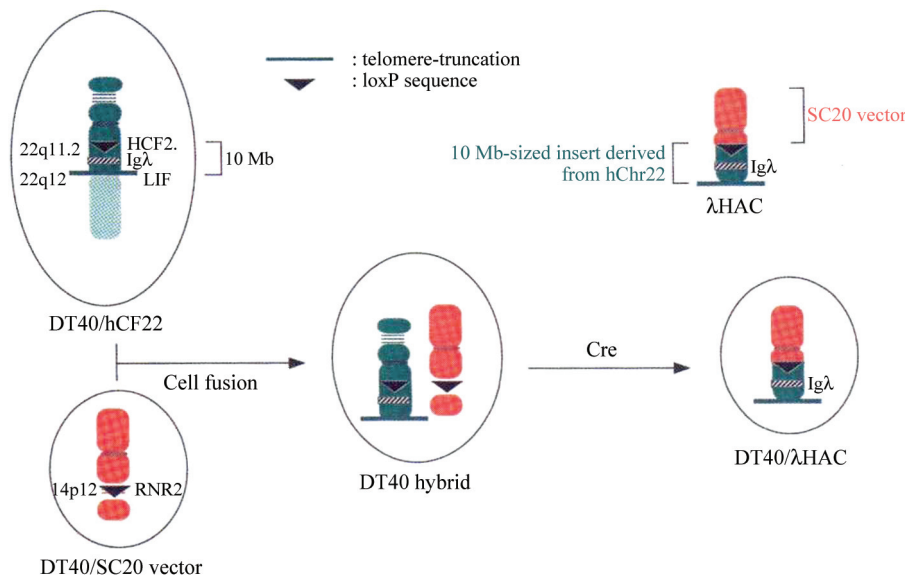


图4 两个鸡细胞DT40,一个含有人的人造染色体hCF22(人的22号染色体在22q12位点的长臂段被删除),另一个含有人造染色体SC20,作为载体。经过细胞融合后,引入Cre酶基因表达,在两条人造染色体的Loxp位点之间进行染色体片段交换,产生的子细胞应含有“重组染色体”λHAC(含有长度为10 Mb的λ轻链基因簇的人造染色体)(图片来源于本实验室)。

的差别。“重组DNA技术”主要使用DNA限制性内切酶、DNA连接酶、质粒和噬菌体(病毒)载体、大肠杆菌等;“重组染色体技术”主要使用“同源重组技术”(homologous recombinant technology)、Cre/Loxp(FLP/FRT)技术、含有端粒和着丝粒的载体(可来自天然的染色体)、酵母菌和哺乳细胞等。

“同源重组技术”是利用克隆的染色体片段之

可来自天然的染色体,也可来自人工合成(包括化学合成)。天然的染色体片段采用“同源重组技术”和/或Cre/Loxp技术从哺乳类细胞或人类细胞内取得。若需要扩增,一般放到酵母人工染色体(作为载体),利用酵母发酵来扩增。如果不需要扩增,可在哺乳细胞内利用上述技术方法直接进行修饰或改造。

构建好的染色体可在哺乳类细胞之间进行

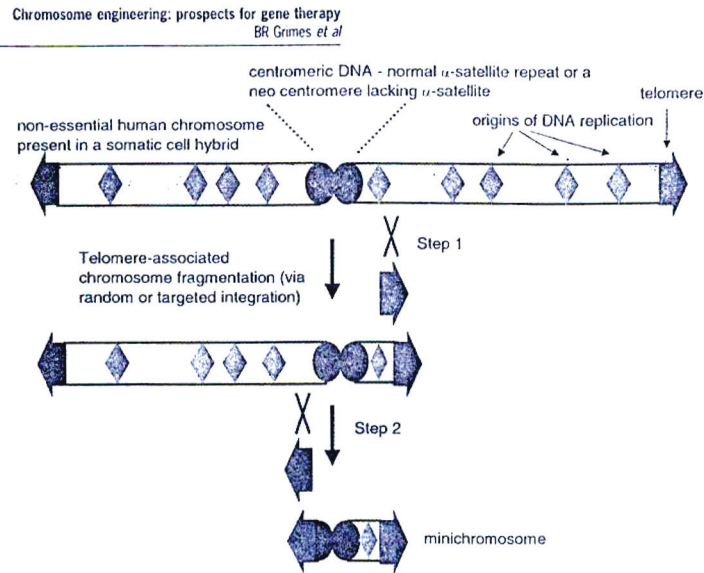


图5 利用随机或打靶技术(同源重组技术)在染色体内插入人工合成的端粒,可以删除一条染色体臂,达到缩短染色体目的(图片来源: Chromosome engineering products for gene therapy By BR Grimes *et al*)。

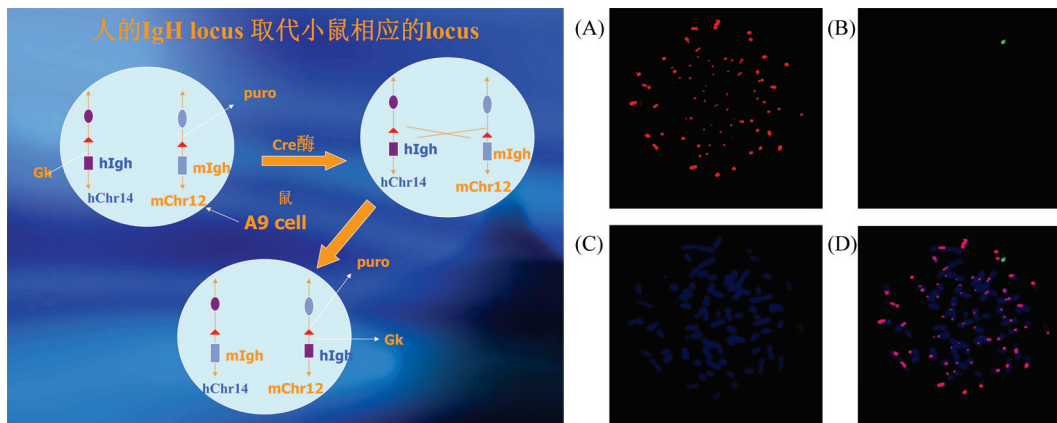


图6 左图示意人的14号染色体上的免疫球蛋白重链基因簇位点(locus)取代了小鼠12号染色体相应位点,使人的基因簇在小鼠A9细胞内能够稳定遗传。右图显示人的染色体片段转移到小鼠染色体上取代了相应的染色体片段(绿色显示)。A: 小鼠着丝粒荧光染色(红色)(小鼠着丝粒皆位于染色体的顶端); B: 人的Igh基因簇荧光染色(绿色); C: 小鼠细胞内染色体(表明染色体位置); D: 上述三图的重叠,说明人的染色体片段转移在小鼠染色体上(图片来源于本实验室)。

转移,包括转移到胚胎干细胞,然后利用“胚胎工程技术”,构建转染色体动物(trans-chromosome animal)。含有人造染色体的人类细胞也可用于基因(染色体)治疗。在哺乳类细胞(包括胚胎干细胞)之间进行人造染色体转移,通常使用的技术称为“MMCT”(microcell-mediated chromosome transfer)。图7和图8显示MMCT在细胞之间转移人造染色体方面的应用。

人造染色体为后基因组提供了强有力的研究

工具和方法,尤其在“染色体生物学”研究领域内能够大展宏图。人造染色体技术的发展将为解决大量复杂的生物学和医学问题提供理论方面的指导;同时,对表观遗传学的发展会起到决定性的作用,包括染色体上DNA和组蛋白的甲基化,组蛋白的乙酰化、磷酸化和microRNA对基因和基因组的调控影响,表观印迹(定义母系或父系等位基因是否表达的遗传学方法),X染色体失活(女性有两条X染色体,其中有一条处于转录失活状态),位置效应(一个基因

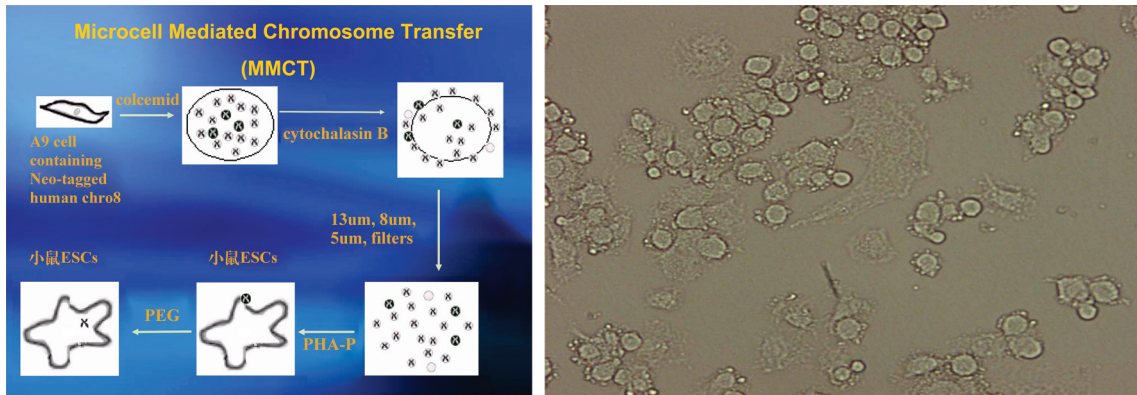


图7 左图示意MMCT(microcell-mediated chromosome transfer)技术。小鼠细胞含有带有neo基因的人8号染色体,细胞同步分裂进入中期,用秋水仙素和细胞松弛素B先后处理,使细胞核膜和骨架散失,单个染色体包裹着外膜,形成微小细胞,然后吐胞出芽。经离心或过滤,收集微小细胞,用植物粘集素促使微小细胞对小鼠胚胎干细胞的黏附,再用PEG使之融合。加G418对融合的干细胞培养,筛出抗G418的细胞株,经过人的8号染色体鉴定,说明小鼠胚胎干细胞含有人的8号染色体。右图显示小鼠胚胎的吐胞出芽(图片来源于本实验室)。

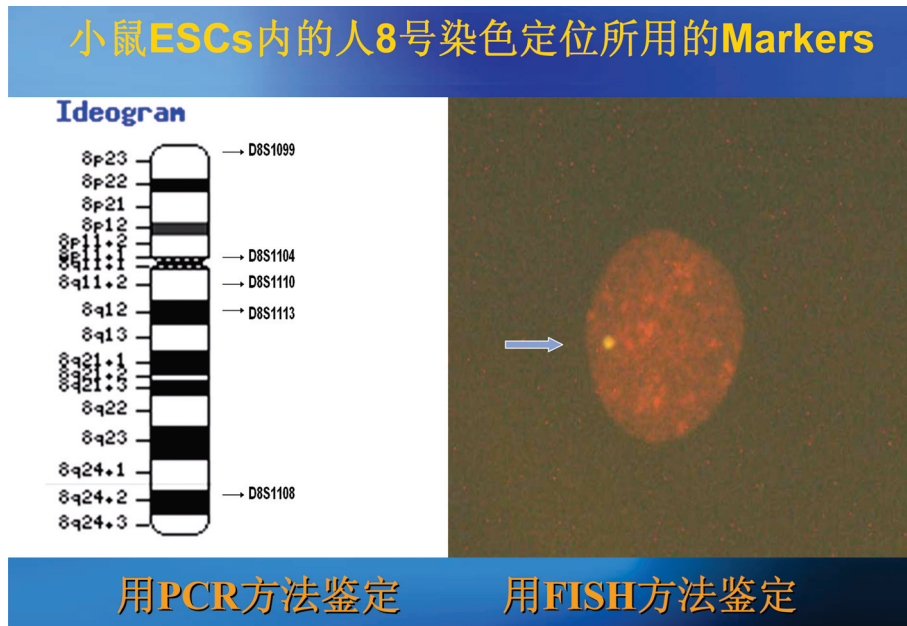


图8 人的8号染色体转入小鼠胚胎肝细胞的PCR和FISH鉴定(图片来源于本实验室)。

的表达受到周围序列的影响), 无序染色质装配或运作, 核小体结构及功能, 以及大范围基因表达控制等; 对染色体的空间结构和重编程的关系, 包含染色质组装过程或组装方式对重编程的影响。这些研究皆会依赖人造染色体技术的发展和运用。另外, 人

造染色体也会为活性或非活性染色质在多种发育中的作用研究提供技术支撑。当然, 人造染色体技术为生物经济推动和发展有可能起到巨大作用。总之, 这些领域和方面皆需要“重组染色体技术”的广泛运用和发展。