



基因纯系扩增与细胞生物学

John Paul

研究真核细胞基因表达的主要问题是基因组的结构复杂性。要想如 λ 嗜菌体一样详细地了解真核细胞的遗传学,就要做大量的令人生畏的统计,因为人的基因组容纳了近十万倍那么多的 λ 遗传信息。分析这样一个复杂的遗传体系事实上是不可能的,直到大约前四年产生了将任何来源的DNA片段插入细菌质粒扩增的方法,情况才有了改变。这种方法能够纯系繁殖长度从几百至几千个碱基对的DNA片段(大多数比 λ 嗜菌体小得多)。技术上虽然复杂但并非异常困难。由于用这种方法传递DNA时,人们尚未认识它能跨越种间障碍,所以觉得在掌握生物学后果之前须要施加严格的限制,但结果却人为地引起这领域的研究三年徘徊不前。现在又重新获得动力,了解这方面的技术对所有专业细胞生物学者是非常重要的。

这篇简要综述要讨论:(1)技术问题,(2)在细胞生物学中研究的现状和前景,(3)这类工作有关的立法和规则。进一步的探讨可参考Glover(1977)的评述。

一、基因纯系扩增技术

(一) 重组体的组建和繁殖

组建和繁殖生化重组体的能力依靠运用四种主要技术。

(1)用质粒和嗜菌体DNA转化细菌。

(2)限制性核酸内切酶的应用。

(3)组合DNA分子的生化方法,突出的如应用末端转移酶、RNA和DNA聚合酶、连接酶、一些核酸酶。

(4)细菌遗传学技术。

1. 转化与此系繁殖的载体(Vector) 细菌内有许多基因组外的DNA片段能够自我复

制。与纯系繁殖最有关的是嗜菌体和质粒。这些粒体固然能够借助细胞分裂传给子代,也能由特别机制直接感染另一细胞。已知嗜菌体有很复杂的机制去直接感染细胞。质粒划分为两类,接合型与非接合型的。接合型质粒携带起动物细菌接合的基因,通过接合作用,包含质粒DNA的细菌DNA从一个细胞传递给另一细胞。非接合型质粒没有这种能力。然而,自从Avery, McLeod, McCarty(1944)的经典实验之后,知道赤裸的DNA分子可以传递遗传性状。特别是,赤裸嗜菌体DNA或环状质粒DNA能够感染大肠杆菌,当然照例要给以特殊的条件如高渗钙溶液来打开细菌膜,容许完整的DNA分子透过,这样才能取得理想的转化频率。假如这些DNA分子已用人工方法插入一片外源DNA,这样的重组体能够同样准确地感染细菌

质粒主要是一个封闭的环状DNA分子,有一个复制点。广泛被用做载体是因为它容易操纵,又能容纳几乎任何大小的插入片段。应用于纯系繁殖的质粒都带有遗传标记,很方便用来选择重组体。目前大多数用作载体的质粒是两类质粒的衍生物。它们叫做Col质粒(生成大肠杆菌素)和R质粒(抗抗生素)。Col质粒带有大肠杆菌素的基因,大肠杆菌素是一种具有抗菌活性的蛋白质。这种质粒还有一种特性,就是它们的DNA合成与宿主细菌的DNA合成不紧密连接;因此,宿主DNA合成用氯霉素抑制而质粒DNA合成继续进行,从而得到高产量的质粒。R质粒带有抗抗生素的基因,这种功能有利于选择重组体的菌落。现在最常用的质粒是结合这两类质粒的DNA组建的。例如,Col E1 Kan质粒(Convey等,1976)不仅含有来自ColE1质粒的大肠杆菌素的功能,也含有来自R质粒R6-5的卡

那霉素抗性的功能。卡那霉素抗性使它能够从含有卡那霉素的培养基中挑选含有质粒的菌落。

另外最常用的基因纯系繁殖载体是λ嗜菌体的衍生物。它们的有用价值在于对嗜菌体遗传学知道得很多,可以充分利用。然而,嗜菌体有其缺点,插入的DNA量是有限制的,重组体的DNA总量一定不能超过嗜菌体头部的容纳量。

嗜菌体和质粒载体被利用于在原核细胞中纯系繁殖人工重组体。利用病毒载体在真核细胞中纯系繁殖DNA的研究也正在进行。例如SV40、多瘤病毒、或腺病毒这些DNA病毒,正被用作载体在培养的哺乳动物细胞中进行DNA的纯系繁殖(Nussbaum等,1976)。

2. 限制性核酸内切酶 这领域许多技术上的进展是利用限制性核酸内切酶的特异专一性得到的。这些酶在特异核苷酸顺序的专一位点上裂解DNA。有几类限制酶,有些裂解的切点离开识别位。但遗传重组最感兴趣的是裂解识别位本身的限制酶。识别位一般由4或6个碱基组成。由于在任何的编码位置都有四种碱基存在,一个由4个碱基对组成的识别位的核苷酸顺序只是 4^4 次排列机率之一,即 $\frac{1}{256}$;一个由6个碱基对组成的识别位则是 4^6 次排列机率之一,即 $\frac{1}{4096}$ 。因此,粗略地讲,在一个DNA分子中限制位点出现的总频率相当于这些数字。限制位点还有另一特点,它们毫无例外都有回文结构,即都有2或3个核苷酸对的反向重复,形成碱基顺序对称(表1)。有些限制酶裂解双链,切点都在限制位点的中央,另一些只裂解单链,切点离开对称中心1或2个碱基。后一类限制酶熟悉的有EcoRI和HindIII,它们裂解DNA后就产生互补末端,与相同的互补末端能够进行碱基配对结合。这种末端有时称做“粘性”末端(Mertz和Davis,1972)。

由这类限制酶裂解产生的DNA不同片段能够自行退火。单链上的断口由多核苷酸连接酶连接,产生重组体分子(图1)。这种非常简易的技术已应用于将外源DNA片段插入到

表1 通常使用的限制性核酸内切酶和限制位点(箭头示切点)

微生物	限制酶	限制位点核苷酸顺序
大肠杆菌(E. Coli)	Eco RI	5'GAATTC 3'CTTAAG
溶血性流感杆菌 (H. Influenzae)	HindIII	5'AAGCTT 3'TCGAA
淀粉溶化杆菌 (B. Amylolyquefaciens)	BamI	5'GGATCC 3'CCTAGG

只有一限制酶切点的载体上(Morrow等,1974)。外源DNA不论来自真核或原核细胞都可以。这种技术已广泛使用在真核细胞的DNA片段的纯系繁殖上。

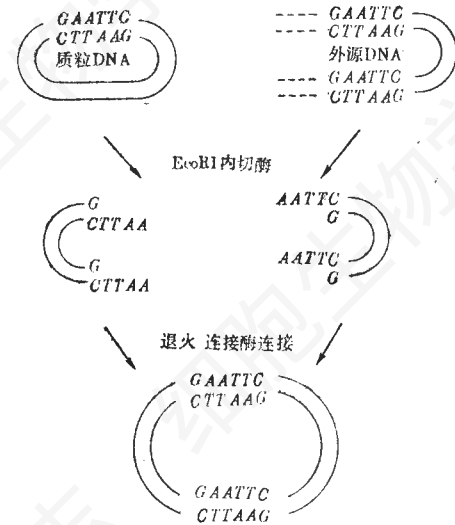


图1 使用 EcoRI 限制性核酸内切酶从一限制切点的质粒与一片外源 DNA 制备重组体

3. 其他生化技术 某些情况下不容易或不可能由限制性核酸内切酶的消化得到互补的末端,用末端转移酶可以将均质多核苷酸加到DNA片段的尾部,这酶把脱氧核苷三磷酸的单核苷酸加到DNA分子的3'端(Jackson等,1972; Lobban和Kaiser,1973)。照此,寡胸腺嘧啶核苷酸顺序(Oligo-dT)接到一DNA分子的末端,而寡腺嘌呤脱氧核苷酸顺序(Oligo-dA)接到另一分子DNA的末端。这些分子互相杂交,遗留的缺沟用DNA聚合酶I修补,继以聚核苷酸连接酶连接。用此法,从打开的环状质

粒与打算插入的一片DNA能够重新制备成封闭的环状分子。虽然在此叙述的修补和连接步骤可以改进以后感染和转化效率，但它们不是必需的，因为细菌自己能实现这些步骤（Wen-sinck等，1974）。

这种技术已经应用到把从信息RNA复制的互补DNA（cDNA）插入到细菌质粒。插入的步骤如下（图2）：（1）信息RNA（如血红蛋白信息RNA）用反转录酶转录成cDNA。这cDNA有一发夹环在一端。信息RNA用碱消

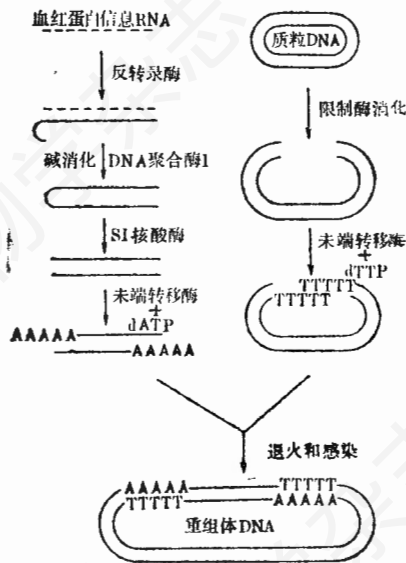


图2 Oligo (dA) 接尾的双链 cDNA 的制备和它与 Oligo (dT) 接尾的质粒 DNA 的重组

化后，余下的单链cDNA用大肠杆菌DNA聚合酶I转变成双链。用对单链DNA专一的S1核酸酶处理，除去发夹环和不配对的顺序。双链DNA用末端转移酶在末端延伸Oligo-(dA)，形成的DNA分子适合于与Oligo-(dT)接尾的质粒重组。这种质粒通常用一种限制酶切开成线状结构，经S1核酸酶修剪，再用转移酶接上Oligo(dT)末端。尾部接Oligo(dT)的质粒和尾部接Oligo(dA)的cDNA互相退火，并利用它去感染合适的细菌。重组体用以后叙述的一种方法加以鉴定。

4. 细菌遗传学的应用 细菌遗传学的专门知识主要应用于建立宿主—载体系统。有两

个主要目标：一是产生易于繁殖的、嵌入有选择性标记的载体，使重组体能够分离；二是发展有高度生物学限制的宿主—载体系统，即除开在特殊的实验室条件下，它不能生存和繁殖。发展这些系统已经投入了许多聪明才智，在这篇有限的综述中不可能包括内容广泛的各种评述。一些已使用的专一标记，如前已提及的卡那霉素抗性是这些原理的良好示范。然而，对生物学限制所需要的条件须加以补充说明。

要产生一个安全的宿主—载体系统，其中一方面细菌宿主应是广泛残缺的，要求特殊的生长条件。最熟识的宿主例子是Curtis(1976)提供的大肠杆菌X 1776。这细菌有大量的营养缺陷，包括二氨基庚二酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、生物素和胸腺嘧啶；是热敏的；对去污剂的溶解和UV线特别敏感。其次，这载体在改良的K₁₂系统是有欠缺的。这就减少DNA存活的机会，即使它无意中传给了其他细菌的话。这种细菌宿主可以与几种不同的质粒并用。

其他一些受限制的宿主—载体系统是以载体的缺陷为特征，通常是需要特殊细菌宿主的嗜菌体。一个很好的例子是λ嗜菌体的衍生物λgt WES (Leder等，1977)。

EcoRI 限制酶在λgt WES 的切点减少至2个（野生型λ有5个），使嗜菌体DNA裂解成3个片段。中间片段没有嗜菌的复制功能。然而由两侧片段组成的重组体DNA量又不足以充塞嗜菌体头部，不能完成溶菌周期。假如用一DNA片段（可以是真核DNA片段）以代替中间片段填满头部的空隙，那么嗜菌体就能够复制。两外侧DNA片段可以用电泳与中间片段分离。它们只有与其他DNA组成重组体才能产生感染颗粒。这种嗜菌体也存在某些功能的突变，如连接头尾部必需的功能W，裂解复制的DNA必需的功能E和溶菌的功能S。因此，它在野生型大肠杆菌K₁₂中不能复制。然而，这些功能的突变在宿主细胞中可由校正基因的突变而得到恢复（校正基因E和F）。综合这些因素使λgt WES 与含有校正基因E和F的细菌宿

主结合,形成一个非常有效的生物学限制系统。

为了各种各样的目的,正在发展许多其他遗传的改变。可能最重要的是改进载体,使真核细胞的DNA在细菌中发生转录和转译。这方面至今尚在研究。

(二)重组体的鉴定和分析

有许多方法鉴定和分析重组体,最通用的如下:

1. 选择 业已叙述,载体通常是这样组建的,使感染的菌落很易识别。其次,如果插入的DNA带有适当的专一性标记,立即就可能选出重组体。有些载体是由此着眼组建的。例如pBR313带有抗氨基青霉素和四环素的基因。在四环素基因上有一个Hind III切点,假如外源DNA插入此处,就破坏这功能。通常要进行两次选择。

2. 菌落杂交 (Grunstein和Hogness, 1975)

其中一种方法是利用原位杂交方法。Grunstein的技术是将单个的菌落接种在琼脂板上,覆以硝化纤维素薄膜。菌落生长后,移去薄膜,用碱将细菌溶解,滤膜上菌落的DNA与标记的RNA或DNA进行杂交,这些放射性标记核酸都是与检测的DNA互补的。杂交之后,滤膜贴在感光胶片上,可以检出放射性斑点的位置。放射性阳性的菌落接种在复份的琼脂板上生长,以便进一步的分析。

3. 核酸分子杂交 由于方便, Grunstein方法通常用于初步筛选。要求继续用更具分辨力的液相杂交分析。同样用适当的放射性标记的互补核酸作为探针。

4. 杂交阻止转译方法 (Patterson等, 1977) 许多质粒的重组体是由已知的信息RNA制成的cDNA来纯系繁殖的。标准的鉴定信息RNA方法是在小麦胚或网织红血球的无细胞蛋白合成系统中转译。假如已知的信息RNA与含有相应互补顺序的质粒杂交,转译受到阻止;假如DNA顺序十分不同,就没有阻止作用。

5. 电镜分析 核酸分子杂交也广泛应用在用电镜鉴定质粒。有两种技术特别有用。一

种是形成异质双链,依靠两个核酸分子的杂交,它们大部分顺序是互补的。只有一个区域不能配对 (Davis等, 1971)。例如,质粒DNA与由此质粒和另外DNA分子制备的重组体DNA杂交,就会形成异质双链分子,插入的顺序没有配对,展现单链的环。

另一种常用鉴定插入DNA的技术是R-环制图 (Thomas等, 1976)。这种技术是在形成的RNA/DNA杂交物比DNA/DNA杂交物更稳定的条件中使信息RNA与质粒杂交。假如信息RNA在DNA的一条链上找到它的互补顺序,形成的RNA/DNA杂交物使DNA的另一条链游离,在电镜下能够识别,现出眼状结构。这种技术能够鉴定插入物的性质和在重组体上的定位。

6. 限制酶分析 质粒的DNA用一种识别四核苷酸顺序的限制酶处理时,一般产生几个片段。它们可以用琼脂糖凝胶电泳分离,提供质粒的特征性图谱。假如质粒由于增加插入顺序而改变,用同一种限制酶消化会产生不同的图谱。例如,一条原有的带可能消失,代以较大分子量的带,这是由于有外源DNA插入该片段。

7. 核苷酸顺序分析 最终为插入物提供肯定的鉴定,最好是分析核苷酸顺序。所用的技术是近年Maxam和Gilbert (1977)和Sanger (1977)提出的。这些技术已经变成相当简易的操作。

二、基因纯系扩增在细胞生物学的应用

在过去三年里逐步积累了在原核细胞中纯系繁殖真核细胞DNA的实验结果。纯系繁殖从信息RNA复制的cDNA取得了许多进展。如以上所述, DNA首先用反转录酶从信息RNA复制,然后用DNA聚合酶I或反转录酶复制单链DNA成双链,最后插进适合的质粒。这种技术最先由几个不同的研究者应用到纯系繁殖血红蛋白cDNA (Rabbits, 1976; Rougeon等, 1976; Maniatis等, 1976; Wood和Lee

1976; Wilson等, 1978; Humphries等, 1978)。从兔、爪蟾、小鼠和人血红蛋白信息RNA制备的cDNA, 已用此法纯系繁殖。也应用到其他信息RNA, 突出的是卵清蛋白信息RNA (Humphries等, 1977; McReynold等, 1977)。最近令人兴奋的有纯系繁殖前胰岛素蛋白原 (Ullrich等, 1977), 生长激素 (Shine等, 1977; Seeburg等, 1977) 的cDNA, 还进行了巨大的努力来纯系繁殖其他有兴趣的类别, 突出的如干扰素。

这种研究的主要目的之一是想用细菌发酵方法来合成相应的人类蛋白。特别象干扰素的例子, 有很大的社会价值 (不谈商业价值)。早先的实验曾经提出纯系繁殖cDNA等于纯系繁殖相应的信息RNA的基因, 现在知道这是过于简单化。然而含有相应信息RNA顺序的重组体会比含有基因组内真实基因的重组体对于在原核细胞内生产真核细胞的蛋白质更有用。现时, 这些重组体的主要用途是作为核酸杂交的探针和用Maxam和Gilbert (1977) 或Sanger (1977) 方法做顺序分析的材料。

在这领域最感兴趣的一些部分是纯系繁殖基因组DNA。本文开头曾说过研究真核细胞调节的主要困难是基因组的复杂性。这个困难现在完全能够克服, 可以制备纯净的、纯系繁殖的单个基因以供研究。最初的一些结果是纯系繁殖爪蟾的5S和核糖体DNA。有许多工作是从整个DNA分子中用物理方法分离这些重复顺序的DNA。由此获得纯化的DNA进行纯系繁殖, 同时证明用限制酶裂解这些DNA, 得到带有粘附末端的片段是相当简单的, 能够插入到用同一限制酶裂解的质粒内 (Morrow等1974; Carrol和Brown, 1976; Wellauer等, 1976)。

海胆的组蛋白基因也能用密度离心方法提纯, 因为它们也是以一段一段的重复顺序存在。Kedes等 (1975) 和Gross等 (1976) 进行了纯系繁殖。有些纯系繁殖片段包含整块组蛋白基因群, 使它有可能用限制酶分析并确定组蛋白5个基因的排列顺序和它们的间隔。

取代在开始时使用的已经纯化的基因, Wensinck等 (1974) 在细菌质粒内纯系繁殖果蝇DNA的任意片段。象其他双翅目, 果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 提供特别有用的研究对象, 用为在它的巨染色体上进行原位杂交, 能够鉴定插入顺序的染色体定位和绘制带的定位图。

纯系繁殖小鼠的免疫球蛋白基因和血红蛋白基因出现很有趣的结果 (Tonegawa等, 1977; Brack和Tonegawa, 1977; Tilghman等, 1977)。在所有这些例子中发现相当长的核苷酸顺序插入到结构基因顺序内。它的含义是这些基因的转录物是一个大RNA分子, 含有一些顺序, 后者与信息RNA决定蛋白质的氨基酸顺序是无关的。推想这些无关顺序在信息RNA的加工过程被切掉。已经确定有几个其他例子有同样的现象。一个特别感兴趣的例子是酵母转移RNA的校正基因, 它有一段14个核苷酸的插入, 紧挨着反密码子顺序 (Goodman等, 1977)。这些观察的意义尚未清楚, 但不能否认它的基本重要性。毫无疑问, 真核细胞的纯系繁殖不久将会提供更新奇和意想不到的发现。

一个长期存在的生物学课题——免疫球蛋白多样性的发生, 已经从这些研究中开始有所收获。将小鼠基因组DNA纯系繁殖, Brack和Tonegawa (1977) 表明, 非免疫组织的免疫球蛋白的恒定区和可变区基因是不连在一起的。而在骨髓瘤细胞DNA, 它们紧密连在一起。这提示这个或那个基因的位移可能涉及B细胞的分化。

三、遗传重组DNA研究的规则

在某些地区存在着许多推测, 认为真核基因的纯系繁殖会在原核细胞中创造一个完全崭新的生物状态, 会有潜在的危险, 如创造新的致病病毒。假如记得每天大约有2万吨人的肉体遭受细菌降解和存在着外源DNA相当容易插入细菌的机制, 那么, 遗传工程学家要取得比自然创造的多几千倍以上的东西看来似乎是

不可能的，但我们不能确定这点。因此在掌握必需的知识之前，比较聪明的办法是对这类工作施加严格的限制。

在美国，国立卫生研究院（NIH）公布了重组DNA研究的详细准则。规定凡接受NIH研究基金的研究人员必须遵守，但不限制外单位（如工业单位）的工作。然而，目前正在推动变成联邦立法，以控制全美国所有这类工作。

在英国，“微生物遗传成分实验处理委员会”考虑这问题，在1975年提出一个报告，通常叫做Ashby报告。报告中的建议由另一委员会“实用遗传处理委员会”进一步考虑。这委员会提出的报告，通称William报告，是英国遗传重组工作条例的基础。最后建立了一个委员会，叫做“遗传处理顾问组”（GMAG），它负责审查英国所有这类工作的申请。其他国家是照美国或照英国的法规形式。

美国和英国系统的差别首先是在美国有一个训令式的条文，所有NIH研究基金接受者一定要遵守。在英国每一应用要考虑它的价值，然后提出适当限制的规定。由此积累许多先行的案例，导出可行的法规。虽然GMAG完全是顾问性质，但它由强有力的卫生和安全行政部门支持并保证使用者遵守满意的工作标准，这使GMAG的建议是有权威性的。除开这些程序的差别外，两系统有非常相同的一些规定。都承认要有生物和物理的限制。关于物理的限制有4种类别，在英国称作类别I至IV；在美国P1至P4，代表逐步增加的严格程度。类别I或P1的限制条件是指这类工作在规定的实

验室内照正常一样小心操作。在另一极端类别IV或P4，设备全受控制。全部流出空气必须经过绝对净菌滤器滤过，全部流出液体必须消毒，任何设备离开实验室都要经过高压锅消毒或浸消毒液消毒，同样，所有工作人员离开之前必须淋浴和更衣。

美国系统的生物限制归类为EK1，EK2，EK3。EK1表示野生型细菌如大肠杆菌K12与质粒的任何结合。EK2的结合必须如此残缺，除在非常特殊实验室条件下，它们的生存机率是很微小的。X1776/质粒和 λ gtWES/大肠杆菌K12DP50校正基因F结合是EK2系统的例子。EK3结合必须证明在人肠道中不能生存，但至今没有肯定一个例子。英国的规则非常相似，虽然生物宿主—载体系统的分类较欠严格。一般地讲，物理和生物限制水平被认为有某种等同的效果。因此，假如生物限制水平是高的，在某实验的物理限制的要求会相应降低。

两套规则都经常受到检查，将来会有很大改变，朝那方向很难预测。这些安排现在是较为合理的。这领域的研究经过三年人为的约束后正开始加快步伐。这种新技术的冲击对我们了解细胞生物学一定不会缺少革命性，对医学上的意义将会表现出来是很深远的。

李文裕译自《Cell Biology International Reports》Vol. 2, No. 4,

* 遗传工程中现在开始用无性繁殖表达Cloning一词，由于在生物学用语中无性繁殖一词已有其固定意义，而且用来表达Cloning不够确切，因此建议用纯系扩增或纯系繁殖。

学术交流

美国Mount Sinai 医科大学实验细胞生物学研究中心，著名肿瘤病毒学家Friend教授和白白血病免疫化疗专家Cuttner副教授等二人，应中国科学院上海细胞生物学研究所的邀请，于六月四日至十七日来我国进行学术交流。在上海和北京曾先后访问了科学院上海生化研究所，上海细胞生物学研究所，上海市肿瘤研究所，以及医学科学院肿瘤研究所，病毒研究所

等单位，并与有关科研工作者进行了学术座谈。在沪期间，Friend教授曾作过两次学术报告，题目分别为：“小鼠红白血病细胞分化的诱导”及“体外培养的小鼠红白血病细胞内Friend病毒的合成”。关于这两篇报告的内容，将在整理后陆续在本杂志内刊载。

——编辑部——