华中农业大学生物化学精品课程组 yangzq@mail.hzau.edu.cn

第十三章　基因转移和基因打靶

第一节 基因转移

第二节 基因打靶

基因转移

应用物理、化学方法将外源基因转移到受体菌或细胞，并实现其转入基因的扩增和表达。

基因打靶

通过外源基因与靶细胞染色体上同源序列间的重组，将外源基因定点整合到靶细胞染色体上某一确定位点，或使某一基因发生定位突变的技术。

第一节 基因转移

一、物理学方法

二、化学方法

三、生物学方法：

一、物理学方法

1、显微注射法

2、电穿孔法

3、基因抢法

1、显微注射法：

用玻璃显微注射器，在外科手术显微镜下将外源DNA直接注射入靶细胞的核内。其受体细胞主要是体积较大的受精卵细胞，这也是转基因动物的常用方法之一。

用贴塑培养的体细胞作为受体细胞，注入核内的外源基因大约有25%整合到受体细胞的染色体中，并稳定表达。

方法的熟练十分重要，用电脑控制的微注射装置，每小时可注1500个细胞。

2、电穿孔法：

在高压电场的短暂作用下，细胞膜上可出现可逆的孔洞，外源DNA可通过此孔洞进入胞内。

方法适应不同细胞如细菌、酵母、植物及动物细胞。 需电穿孔仪。

方法：细胞悬浮于石英池内，将外源DNA加入到池内的介质中，池的两边有两个电极，接高压电源。

当给予极短的高压脉冲电场时，在细胞膜两边产生一个高于其阈电位的膜电压势能，使细胞膜被打碎，形成许多瞬间小孔，允许外源DNA分子进入。

此法可将150kb的DNA分子转入灵长类动物细胞。

该法简单，复制性好，效率高，尤其是酵母细胞和细菌，远高于化学法，且转染DNA的突变率也比化学法低。

适用于克隆基因的短暂或持续表达。

缺点：细胞损伤较大，不易成活。

3、基因抢法：

又称为微抛射物撞击法或颗粒加速法等。

广泛地用于细菌、酵母、真菌藻类、植物和动物细胞，甚至离体组织器官的基因转移。特别对一些用其它方法很难或不能转化的细胞可用此法。

该法还可使叶绿体和线粒体基因组的转化成为可能。

方法和原理

将**DNA**吸附到高粘度微小的金属颗粒（钙或金）上，在一种加速装置的作用下，将这些颗粒高速射入细胞或组织中，以实现**DNA**的转移。

该法虽应用的细胞范围广，但需特殊装置，转染率的影响因素也很多，如金属颗粒的性质、大小、粘度、密度、冲击力大小、**DNA**浓度、细胞状态等。

二、基因转移的化学方法

1、氯化钙转移法

2、金属离子转移法：

3、DNA-磷酸钙共沉淀法

4、DEAE-右旋糖苷法

5、脂质体转染法

6、原生质体融合法

1、氯化钙转移法

$CaCl_2$转移法对λ DNA和超螺旋质粒转化大肠杆菌的效率可达10^{5-6}菌落/μg DNA。

常规法是：

（1）离心收集对数期细菌，悬于预冷$CaCl_2$溶液中（原培养液1/2体积），离心后重悬细菌(原培养液1/5的$CaCl_2$)。

(2)细菌悬液和一定量的待转化质粒DNA或噬菌体DNA混合，0℃放置30分钟，42℃热冲击90秒，快速冷却，加适量LB培养基，37℃使冻存的细菌复苏，涂布到原抗生素的选择培养基上筛选转化子。

使用不同组合的二价阳离子混合液（Ca^{2+}，Mn^{2+}）。延长$CaCl_2$处理菌的时间 或加用二甲亚砜（DMSO）等试剂辅助处理菌等，可提高转化效率至100-1000倍。

本法适用于大多数大肠杆菌的转化。

原理：

$CaCl_2$处理细菌，使其变为短暂的“感受态”形式，可以摄取不同来源的DNA。

但$CaCl_2$的作用机理或DNA如何进入感受态细菌的过程，仍尚不清楚。

影响转化的因素主要与细菌种类、细菌的生长状态，$CaCl_2$的浓度及处理的时间等。

碱金属离子（Li^+、Na^+、Rb^+、Cs^+）能较好诱导酿酒酵母产生感受态，特别是LiCl和LiAc对含有arsl复制起始区的质粒，其转化效率分别表达230转化子/μgDNA和400转化子/μgDNA。

碱金属的转化机制尚尚不清楚。有人酵母细胞较好提出化学渗透学说。LiAc对酿酒酵母效果好，而LiCl则对甲醇营养型。

3、DNA-磷酸钙共沉淀法

将DNA分子与CaCl溶液混合，再缓慢滴加入含有磷酸的HEPES溶液中，形成DNA-磷酸钙共沉淀颗粒。

小心地将颗粒加入到培养的靶细胞表面，保温数小时后，使DNA被靶细胞摄取。

更换培养液使外源DNA在细胞中表达，筛选转化细胞或分析外源基因的表达量。

该法可用于外源基因的短暂表达，也可用于建立稳定的转化细胞系。

缺点：是转化效率低，约为1^{-3}~10^{-6}。应用甘油或DMSO休克，或用氯喹处理阻断溶酶体酶活性，可提高转染效率。

4、DEAE-右旋糖苷法

该法先用来促进病毒DNA导入，后来发展为一种哺乳动物细胞的基因转移方法。

方法：用外源DNA和DEAE-右旋糖酶的混合物处理细胞。

通常只用于克隆化基因的瞬间表达，不用于细胞的稳定转化。它对BSC-1，CV-1和COS细胞转染较好，因此应用上有限制。

5、脂质体转染法

脂质体是一种人造的封闭磷脂膜，强极性DNA分子可被包裹在脂质体内部的水相。

在融合剂如聚乙二醇（PEG）或植物凝集素的作用下，靶细胞与装截DNA的脂质体融合，通过胞吞作用将脂质体摄入胞内。

近来发现，使脂质体表面带正电荷，形成阳离子脂质体，转染效率比阴性和中性脂质体法高10-100倍。

该法不但介导DNA转染，也可介导RNA转染。

该法转染效率尽管不高，但方法简便，对多种类型细胞有效，安全，因此广为实验室采用。

6、原生质体融合法

质粒(目的基因)转化细菌或酵母细胞，大量扩增，用溶菌酶或蜗牛酶除去胞壁部分，在高盐状态下，制成原生质体，然后铺到培养的单层哺乳动物细胞上，在融合剂如PEG的作用下，经融合过程，使染色体和质粒DNA转入哺乳动物细胞中。

优点： 转化效率高，基因片段大，既可用于克隆化基因的瞬时表达，也可用于建立稳定转化的哺乳动物细胞系。

缺点： 操作较繁，细菌或酵母碎片影响细胞的生长。

三、基因转移的生物学方法

1、逆转录病毒载体

2、腺病毒载体

上述方法中，基因转移效率相对偏低，表达水平也不高。不能满足真核细胞基因转移，尤其是以基因治疗为目的的基因转移。因此，在80年代后期引入了动物病毒载体技术，转染效率几乎可达100%。

1、逆转录病毒载体

逆转录病毒是一种RNA病毒，基因大小为3-10kb。不同于其它病毒，它具有二倍体基因，即含有两个相同的RNA分子，有典型的真核mRNA结构（包括帽子和尾巴）。

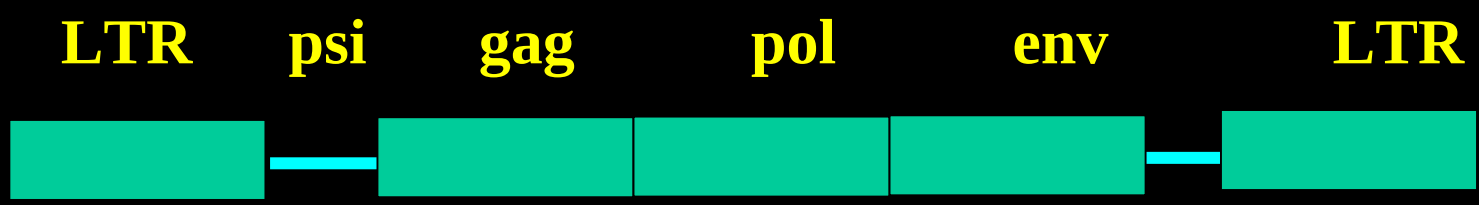
目前常用的逆转录病毒载体是经过改造的Moloney鼠白血病病毒（MoMLV）。

基因结构分子两端含长末端重复序列（其中含启动、增强子及病毒整合到宿主基因组中所需的序列）。

结构基因主要编码核壳蛋白（*gag*）、逆转录酶（*pol*）和外壳糖蛋白（*env*）。

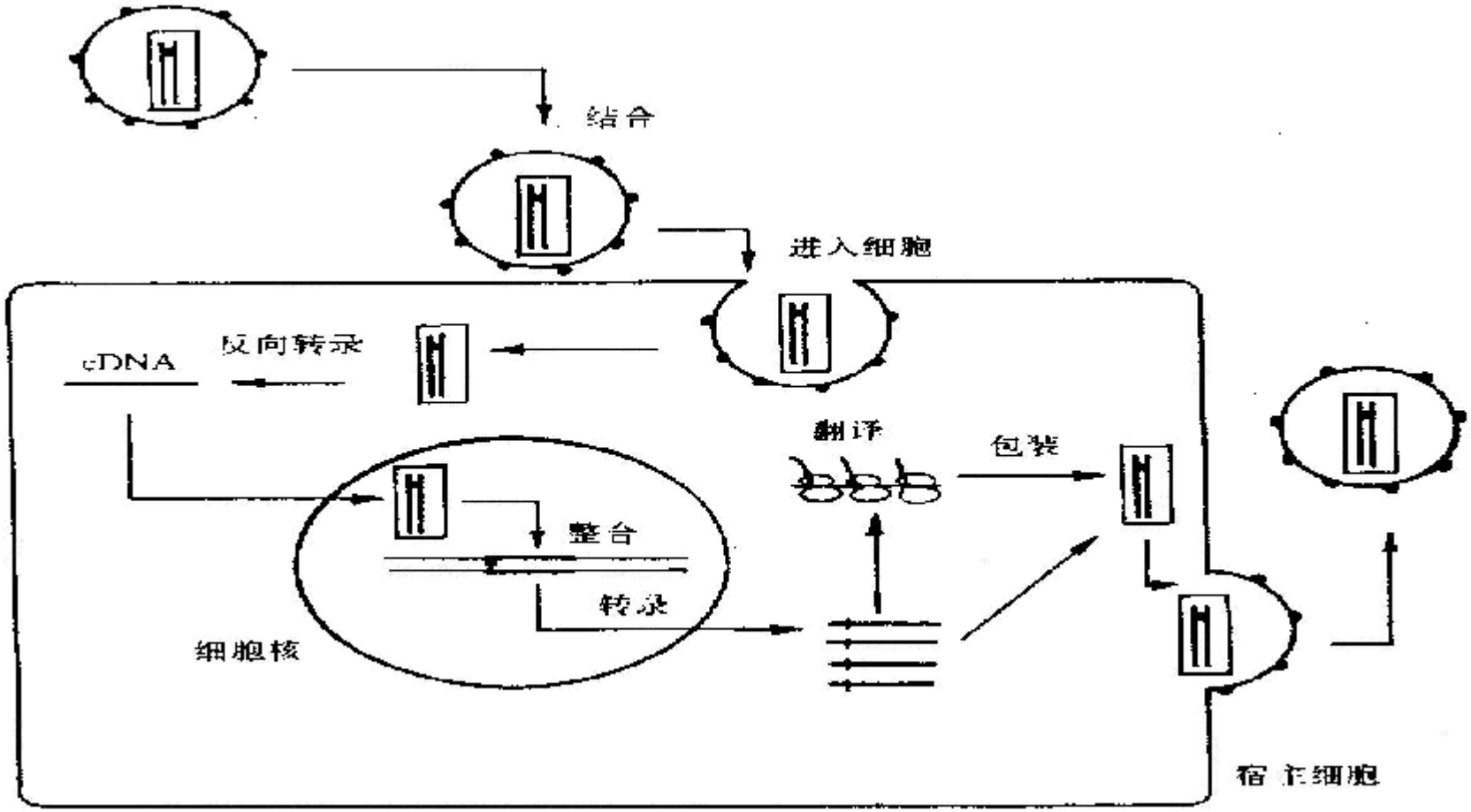
5′ 端 LTR与*gag*间还有一段包装信号序列（psi,φ）。

psi的功能是介导两个基因组RNA的聚合，然后与*gag*编码的锌指蛋白结合，包装成成熟的二倍体病毒颗粒。



逆转录病毒基因组的结构

LTR：长末端重复序列；gag：核壳蛋白基因；pol：逆转录酶基因；env：外壳糖蛋白基因；psi：包装信号序列



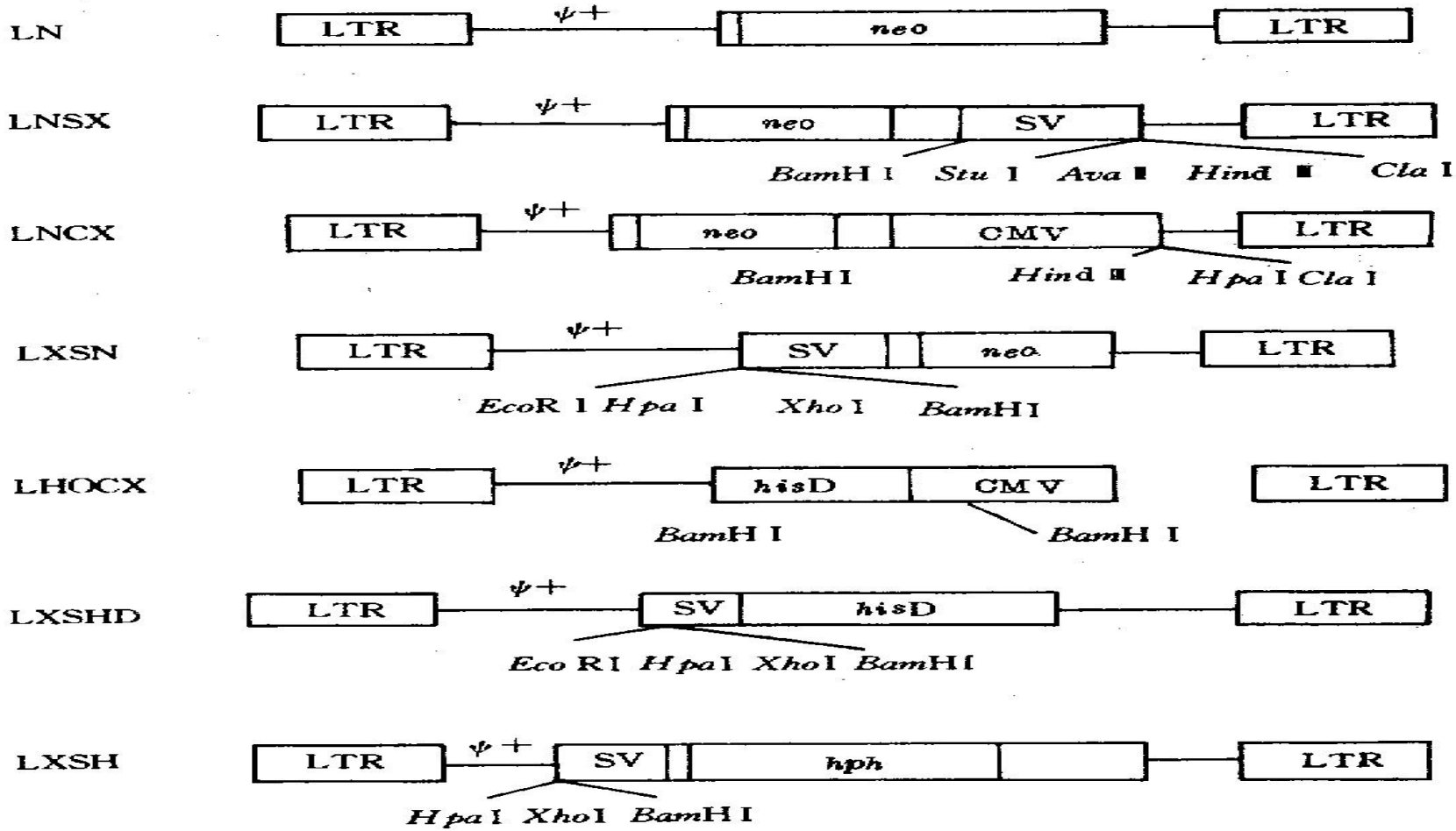
逆转录病毒的生活周期

逆转录病毒外壳pr识别细胞膜上的受体而感染靶细胞

逆转录病毒载体的构建

先构建前病毒DNA的载体，包括两端LTR和包装序列，除去结构基因，插入标记基因、细菌复制子和多克隆位点。

保留逆转录病毒的基因调控序列，利于外源基因的整合和表达。除去致病的结构基因。往往还插入受控于LTR的外源启动子（如SV_{40}和CMV）等，位置多位于目的基因和标记基因之间。



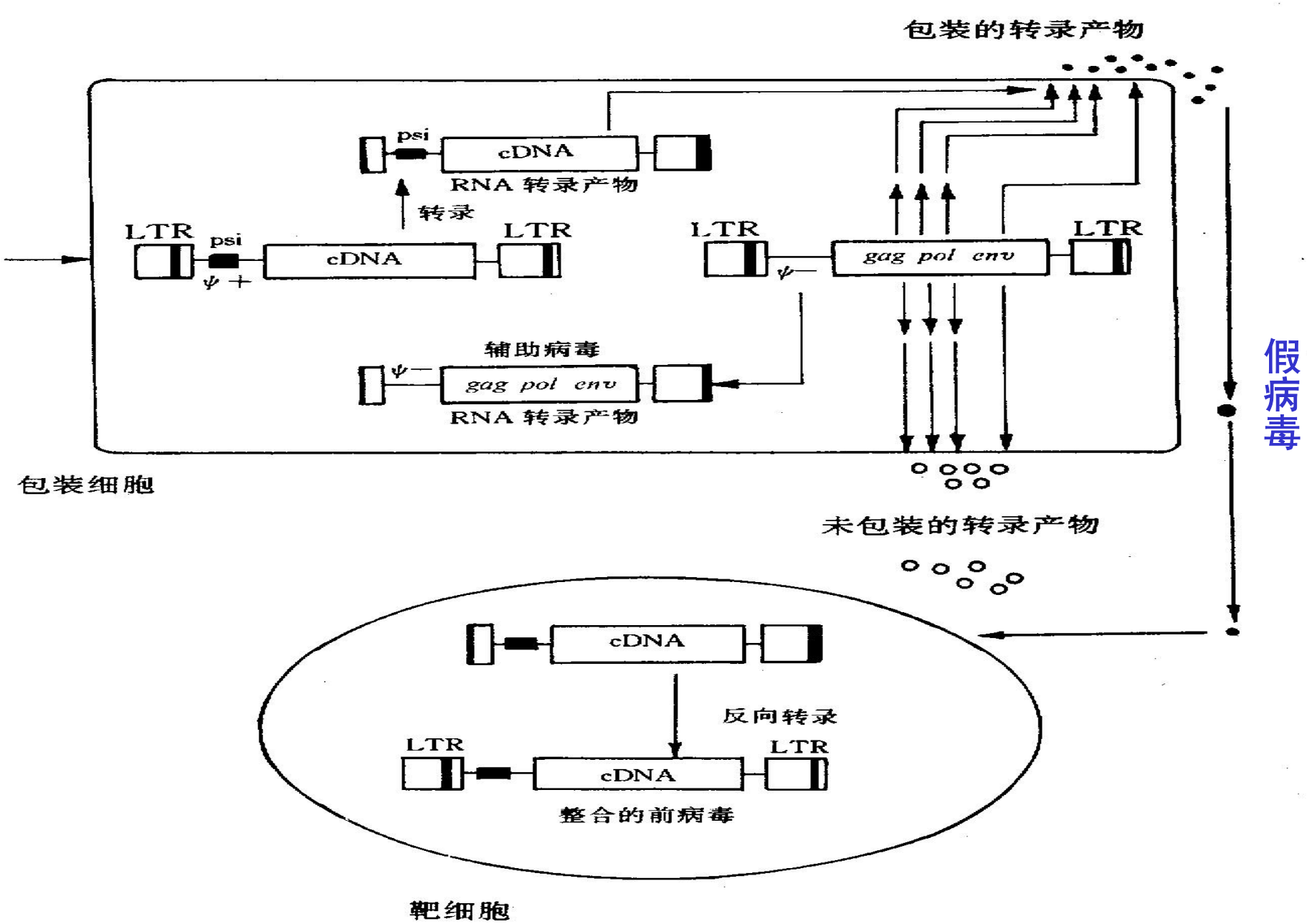
常用的小鼠逆转录病毒载体的结构

neo：新霉素抗性基因（标记基因）；his D：组氨醇脱氢酶基因（标记基因）；hph：湿霉素(hygromycin)磷酸转移酶（标记基因）；SV：SV_{40}启动子；CMV：CMV病毒启动子；Ψ+：表示带有包装信号序列

重组逆转录病毒载体由于缺乏结构基因，不能包装完整的有感染能力的病毒颗粒。因此，需要将其导入整合有辅助病毒的包装细胞，才能完成生活周期。

辅助病毒也是经过改造的MoMLV，它的结构基因完整，但包装信号序列缺损.

辅助病毒在包装细胞中可表达病毒的全部基因产物，但由于缺psi（Ψ），不能装配完整的颗粒，因此，只能存于靶细胞中，不能扩散。


包装的转录产物
psi
cDNA
RNA 转录产物
转录
LTR
psi
cDNA
LTR
ψ +
LTR
ψ—
gag pol env
LTR
辅助病毒
ψ—
gag pol env
RNA 转录产物
包装细胞
假病毒
未包装的转录产物
cDNA
反向转录
LTR
cDNA
LTR
整合的前病毒
靶细胞

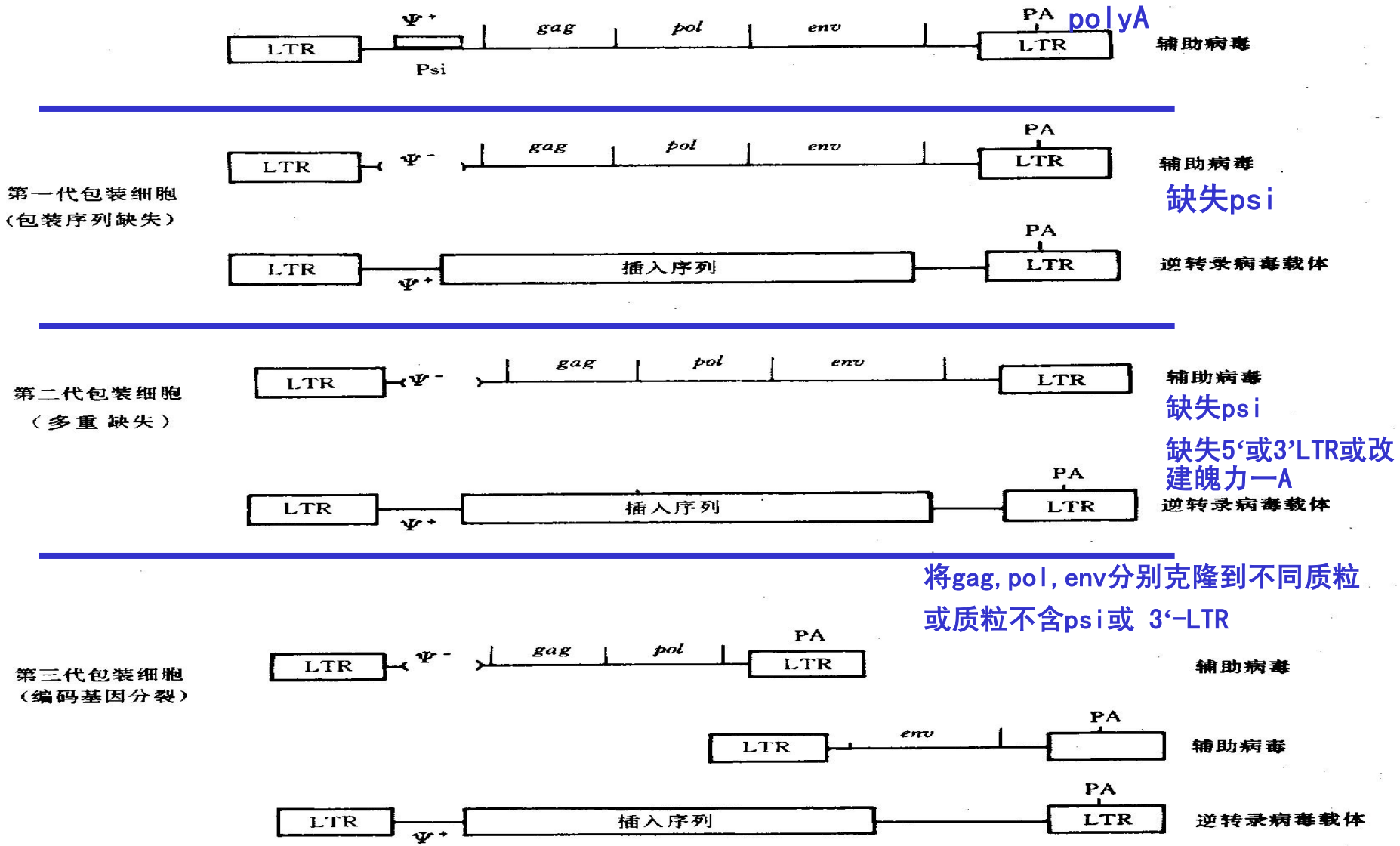
逆转录病毒包装细胞

逆转录病毒载体的安全性

虽然载体已是改造过的，不表达病毒pr，且该病毒对人类感染性低。

但载体与辅助病毒或其它的污染的病原体形成野生型或有复制能力的病毒的可能性依然存在。

另外，从随机整合的理论上讲也可能导致某些癌基因或原癌基因的激活。因此，人们在不断地改造辅助病毒和包装细胞。



辅助病毒和包装细胞的构建

PA：聚腺苷酸，

2、腺病毒载体

腺病毒是一类无细胞膜的双线性DNA病毒.

已发现多个腺病毒的血清型，其中2和5 （Ad2和Ad5）研究较多，DNA结构的特点是带有末端反向重复序列（ITR），而且在基因组每条链的5′端结合一个Mr5.5万的末端蛋白。

腺病毒基因组的复制分为早期和晚期。早期调控蛋白的编码基因分别为E1、E2a、E2b、E3和E4。

其中E1与病毒相关基因的复制和表达有关，且编码蛋白有致病性和致癌性。E3编码的1.9万蛋白与MHC Ⅰ类抗原分子结合并抑制其转运到细胞膜上。

载体的构建

通常采用缺失基因组E_1区和/或E_3区。

由于缺失了E_1区，从而失去了复制和转化细胞的能力，需要在转染了E_1基因的包装细胞中，才能装配成有感染力的病毒颗粒。

第二节　基因打靶（Gene targeting）

一、基本原理

二、靶细胞的选择

三、同源重组细胞的筛选

基因打靶

利用基因转移方法，将外源基因引入细胞，通过外源基因与靶细胞染色体序列间的重组，将外源基因定位整合入靶细胞染色体上的特定部位，使基因发生定位突变的技术。

定位突变包括：基因缺失、基因置换、基因插入和点突变等。使基因失活，或使基因激活。

本节主要介绍通过基因打靶使目标基因缺失或分裂失活，这也称为基因剔（敲）除（gene knock-out）。

一、基本原理

通过基因转移，将外源基因引入靶细胞，外源DNA与靶位点上相同核苷酸序列间的同源重组，使外源基因稳定地插入预定的位点，再筛选出基因剔除的细胞。

外源基因的引入，绝大多数是随机整合。因此，具有整合的随机性和拷贝数的变异性，所以整合的效率受如下影响：

①同源序列的多少；

②插入外源基因拷贝数的多少；

③插入位点染色质的松散程度。

二、靶细胞的选择

靶细胞可分为两类：

一类：生殖细胞，将克隆基因直接注入受精卵的雄原核，然后重新植入同步化的受体动物，培育转基因动物。

二类：体细胞。具有发育全能性的细胞，如造血干细胞，淋巴细胞，内皮细胞，成纤维细胞等。

胚胎干细胞（embryonic stem cell，ESC或ES）是主要的受体细胞。

三、同源重组细胞的筛选

（一）正负双向选择法

（二）新霉素抗性和胸苷激酶正负双向选择法

（三）正向选择法

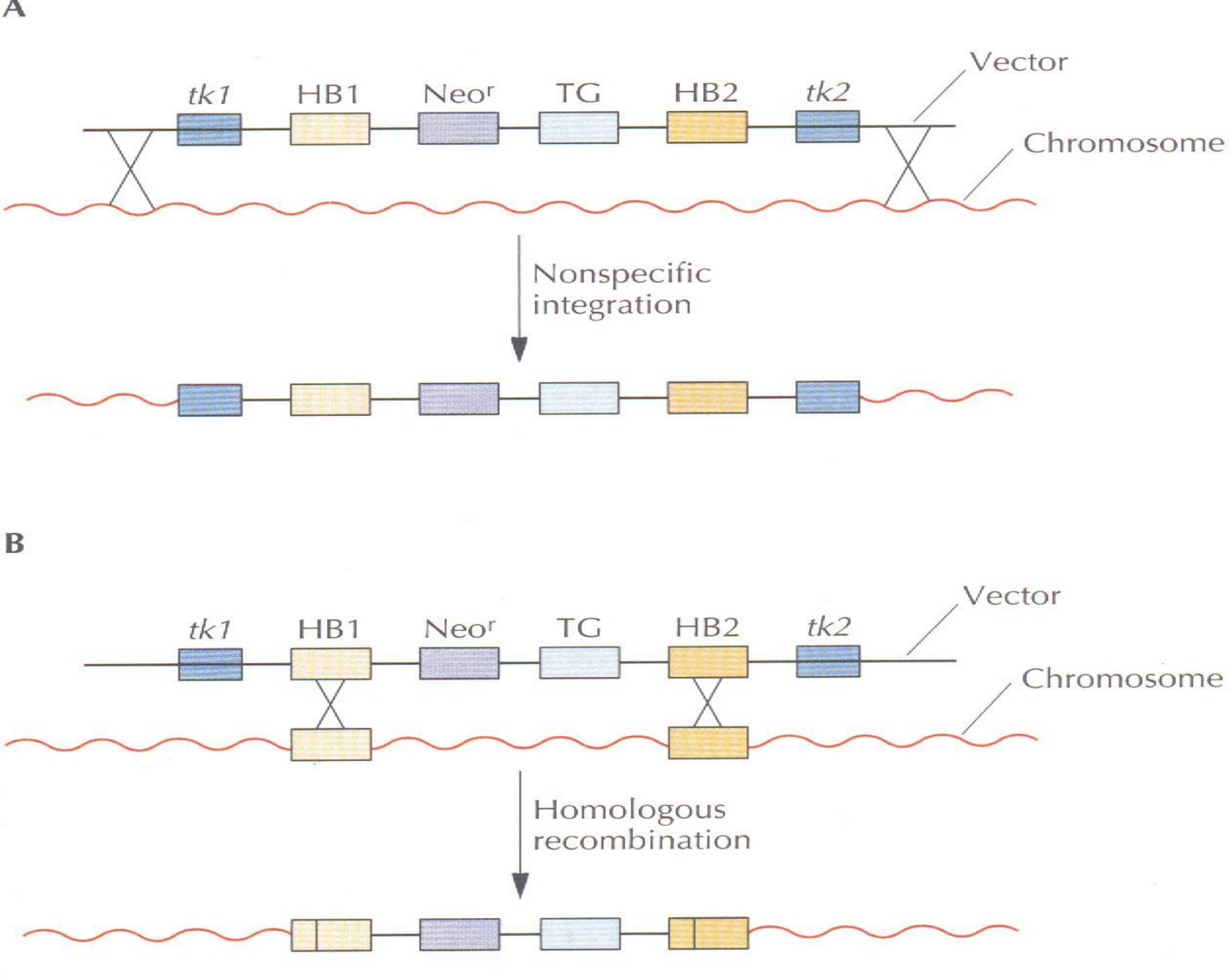
（一）正负双向选择法（用标志基因作报告基因）

基因打靶的经典实验中常用次黄嘌呤转磷酸核糖基酶（hprt）基因作为基因打靶的靶基因，内源性hprt基因可作为正向和负向选择的标记基因。

$Hprt^{+}hprt^{-}$细胞可分别用HAT（氨基嘌呤胸苷）或6-TG（巯基鸟嘌呤）选择培养筛选出来。

只有$hprt^{+}$才能在HAT培养基中生长，这是正向选择。

只有$hprt^{-}$才能在6-TG培养基中生长，这是负向选择。

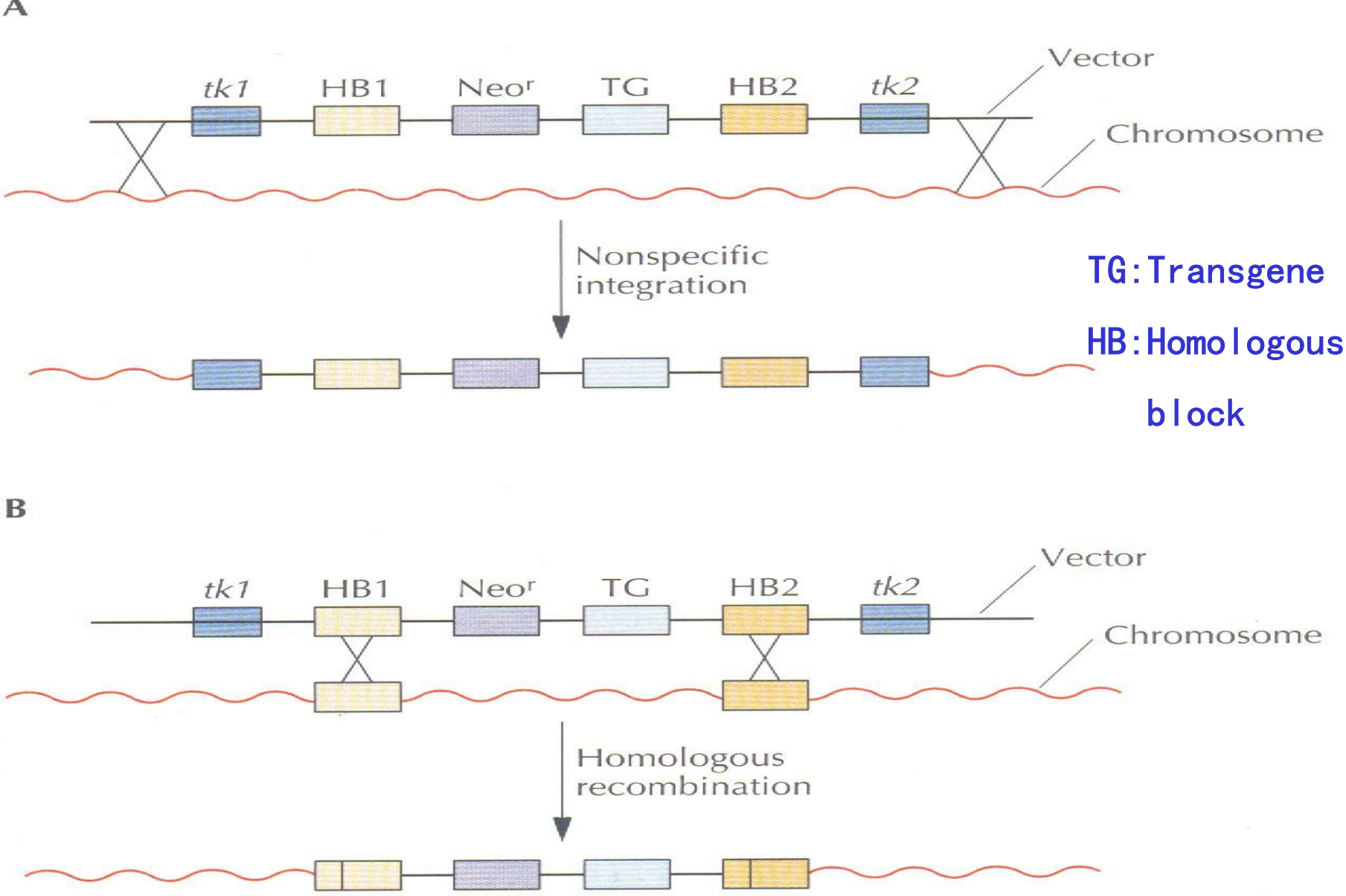

A
tk1
HB1
Neor
TG
HB2
tk2
Vector
Chromosome
Nonspecific
integration
B
tk1
HB1
Neor
TG
HB2
tk2
Vector
Chromosome
Homologous
recombination

（二）、新霉素抗性和胸苷激酶正负双向选择法

neo^r：新霉素抗性

HSV-tk：单纯疱疹病毒—胸苷激酶

ＧＡＮＣ：９－（１，３－二羟二丙氧）甲基鸟嘌呤，可使ＨＳＶ-tk磷酸化失活，磷酸化的ＧＡＮＣ可干扰ＤＮＡ的合成。杀伤细胞。



A:外源基因随机插入基因组。 B:置换载体含插入的neo^r 基因和HSV-tk基因。载体与内源X基因同源重组后，HSV-tk基因被排除。

neo^-/tk^-：无外源基因整合，在G418中死亡；

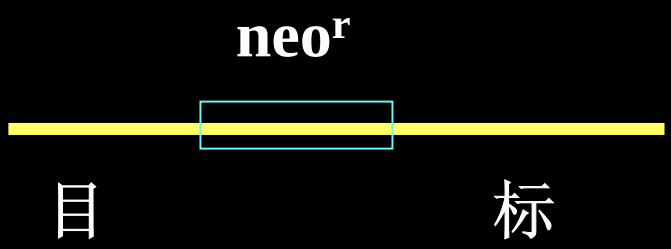
neo^+/tk^+：随机整合，在GANC中死亡；

neo^+/tk^-：同源重组，在G418和GANC中存活。

即用G418正向选择neo^r，而用GANC负向选择HSV-tk。

（三）正向选择法

neo^r的启动子和AUG



将除去启动子和起始密码的neo^r插入目标载体的靶位点同源序列中，并引入靶细胞基因

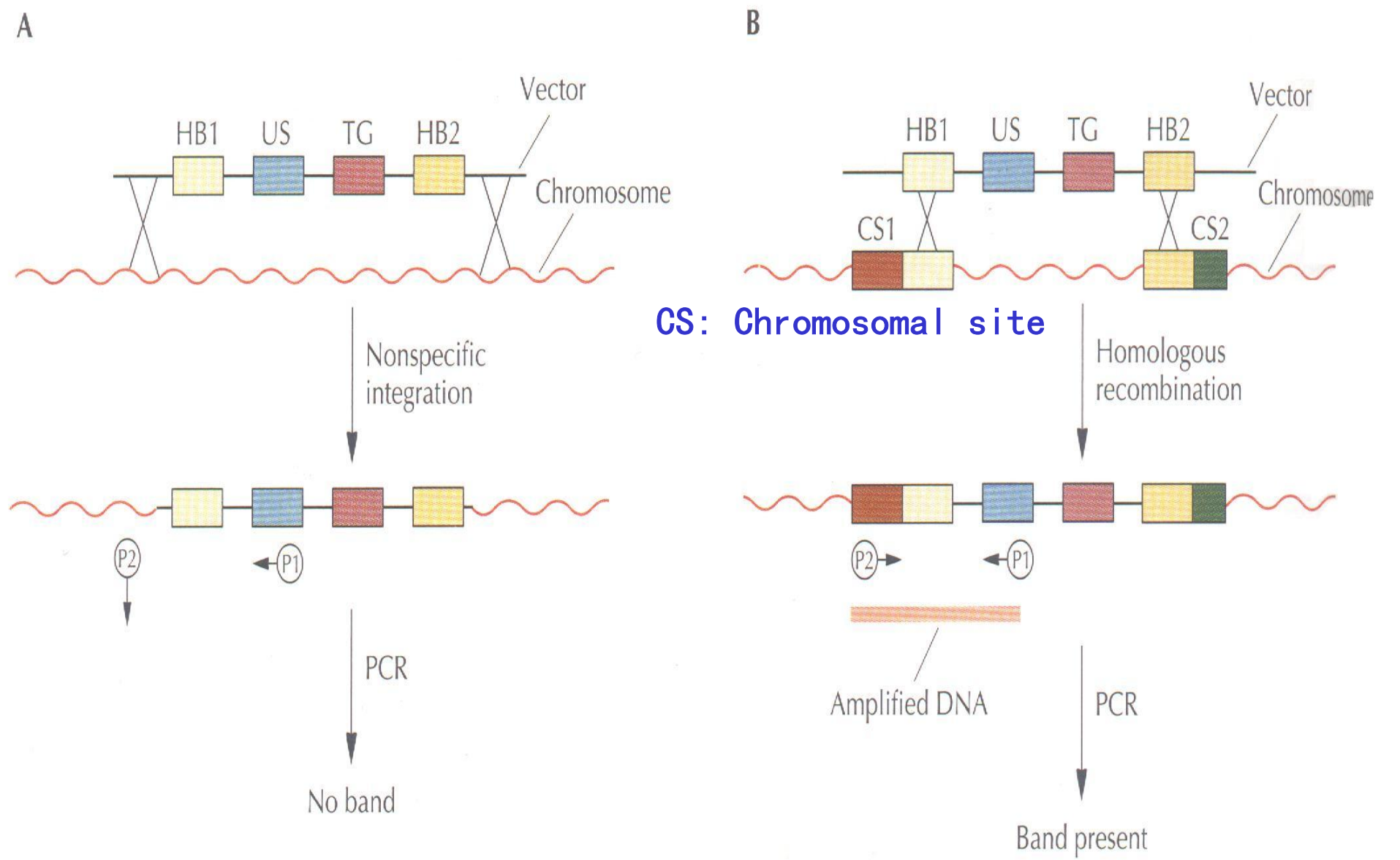
①无整合：则目标载体随传代而丢失；

②随机整合：则neo^r无启动子，neo^r表达受阻或因整个位点旁侧基因启动子作用使neor表达；

③同源重组：则可借助自然存在的靶基因启动子和AUG，而neo^r高表达。

用G418筛选抗性细胞，Southern Blot区别同源或随机重组的细胞克隆，G418只需一次筛选。

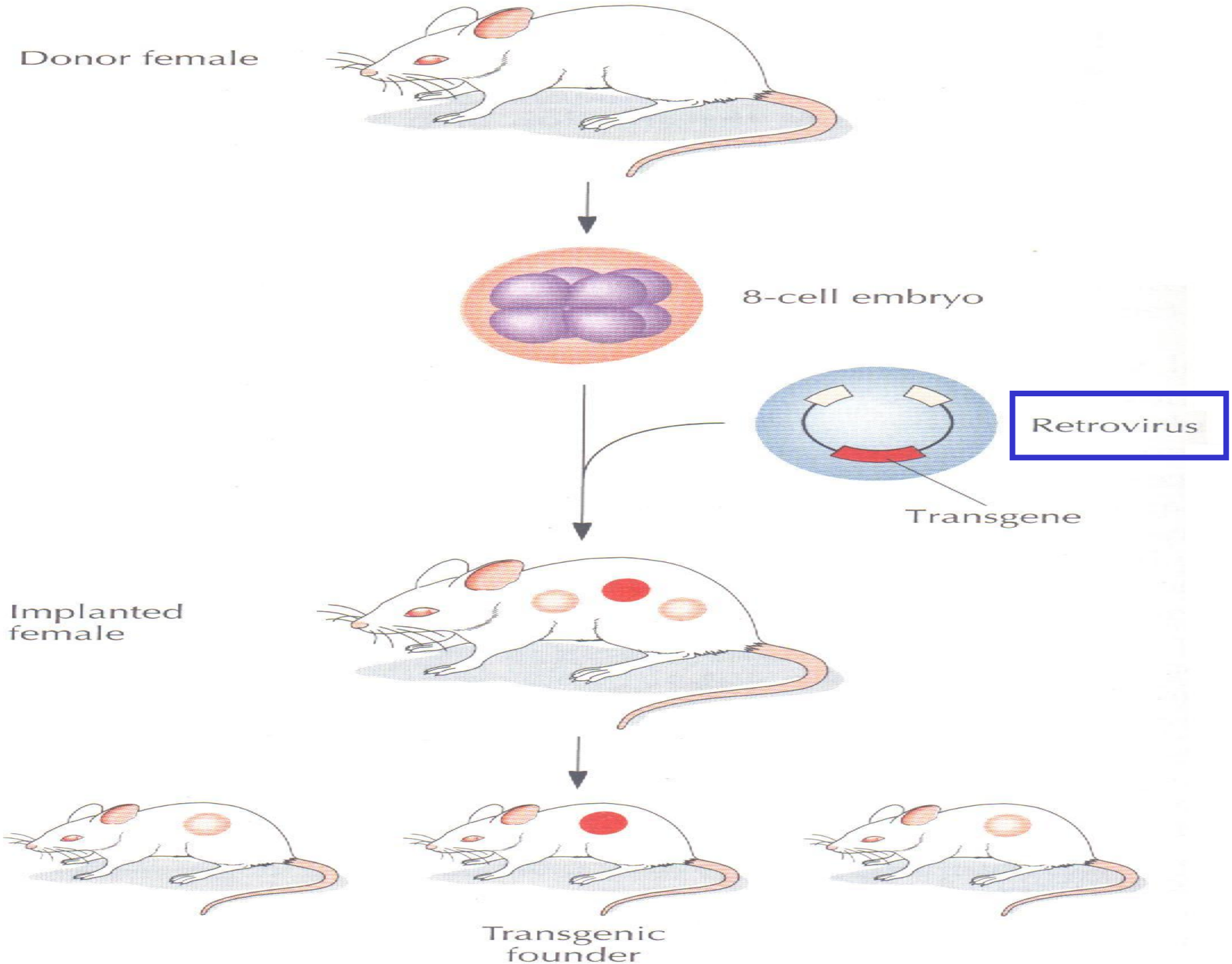
(四)PCR筛选

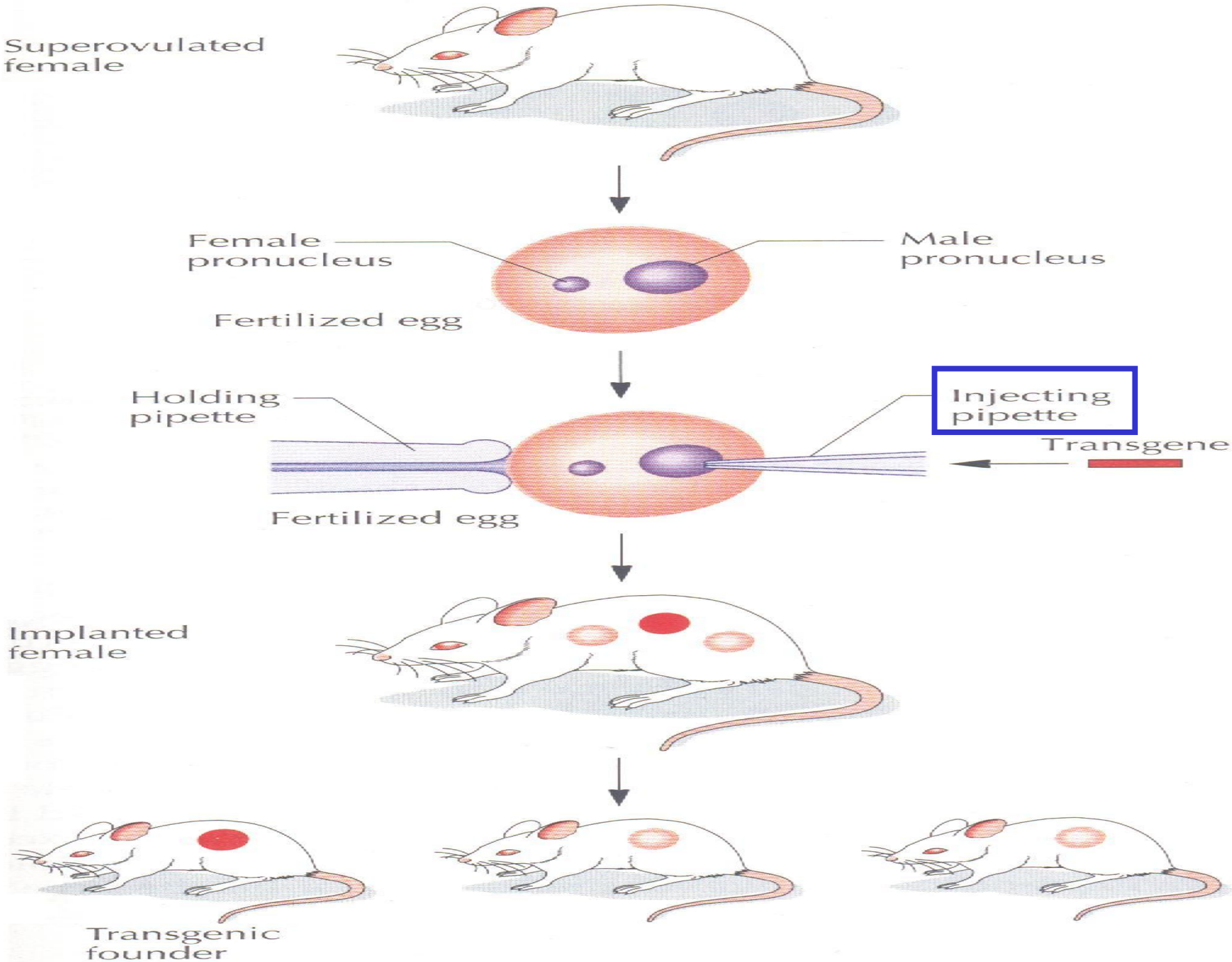

A
Vector
HB1
US
TG
HB2
Chromosome
Nonspecific
integration
P2
P1
PCR
No band
B
Vector
HB1
US
TG
HB2
Chromosome
CS1
CS2
CS: Chromosomal site
Homologous
recombination
P2
P1
Amplified DNA
PCR
Band present

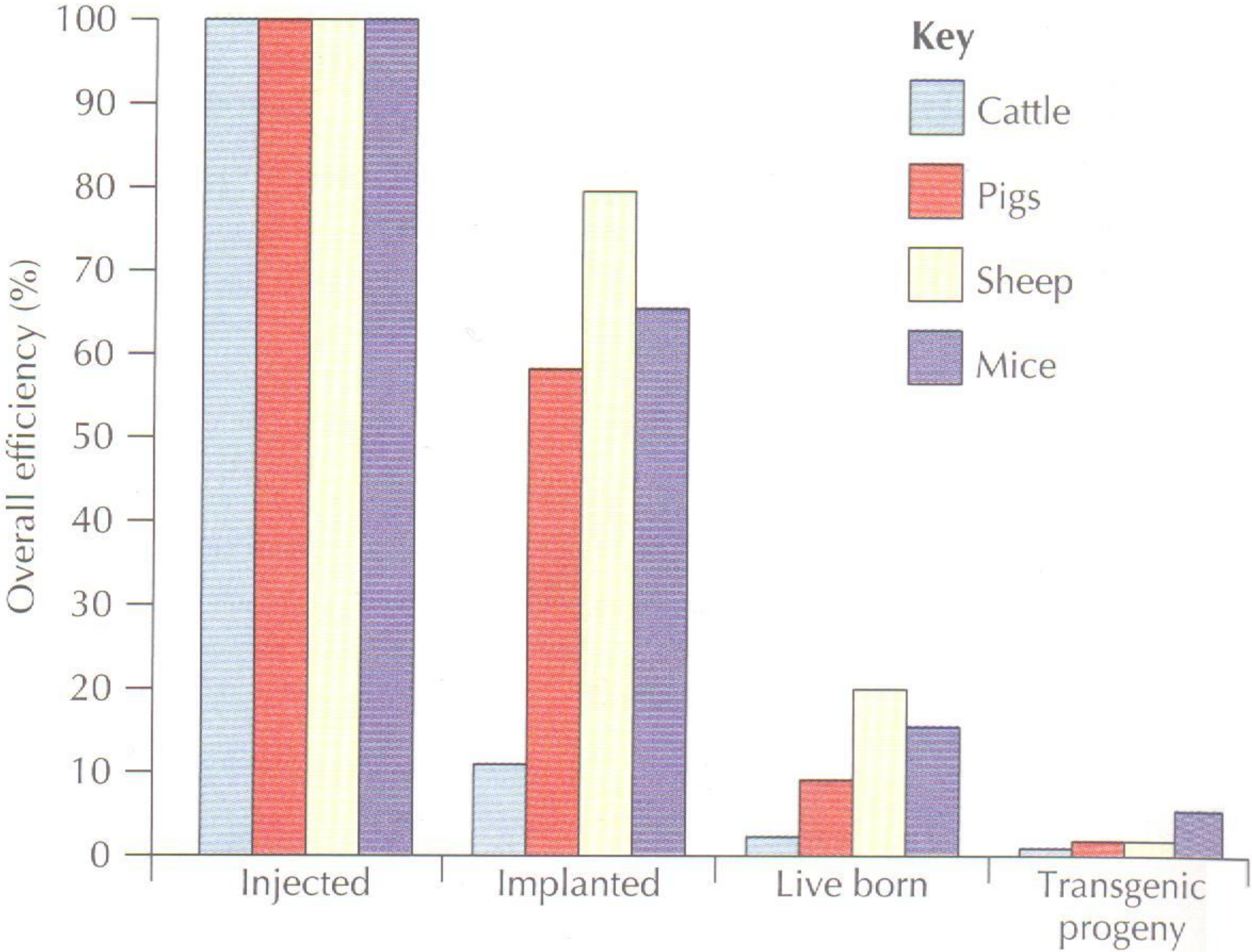
第三节　转基因动物和植物

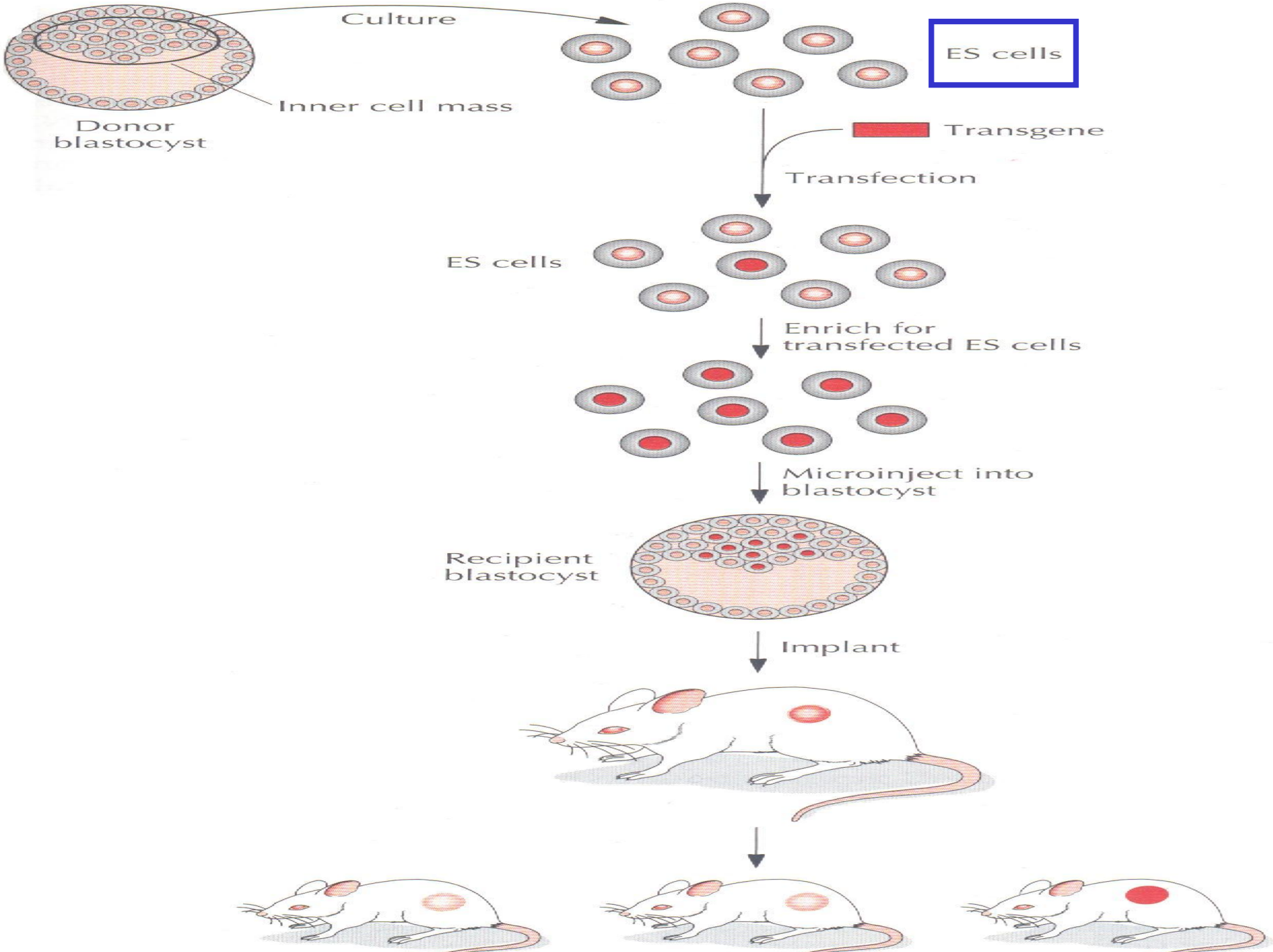
一、转基因动物

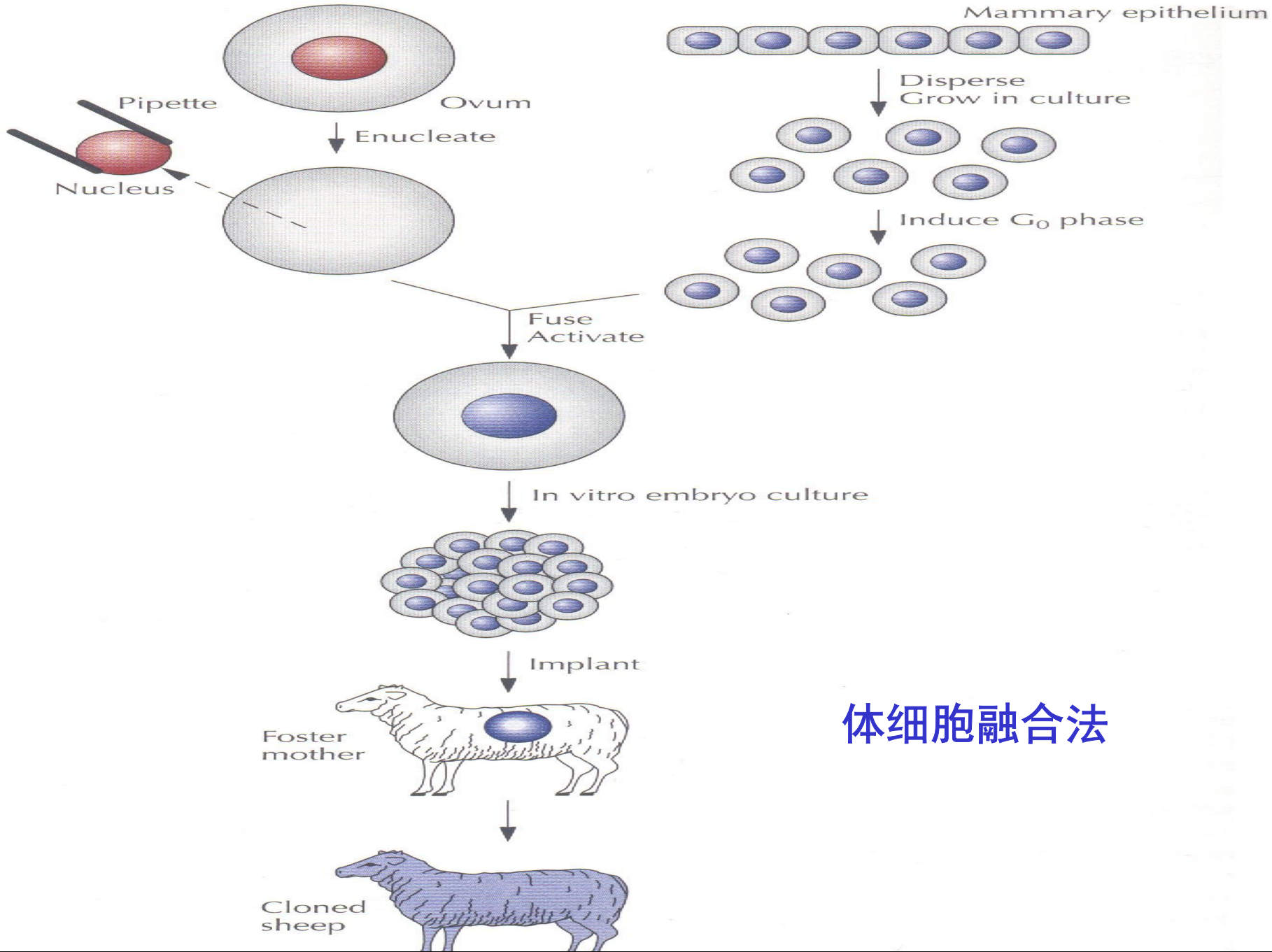
二、转基因植物


Donor female
8-cell embryo
Retrovirus
Transgene
Implanted female
Transgenic founder

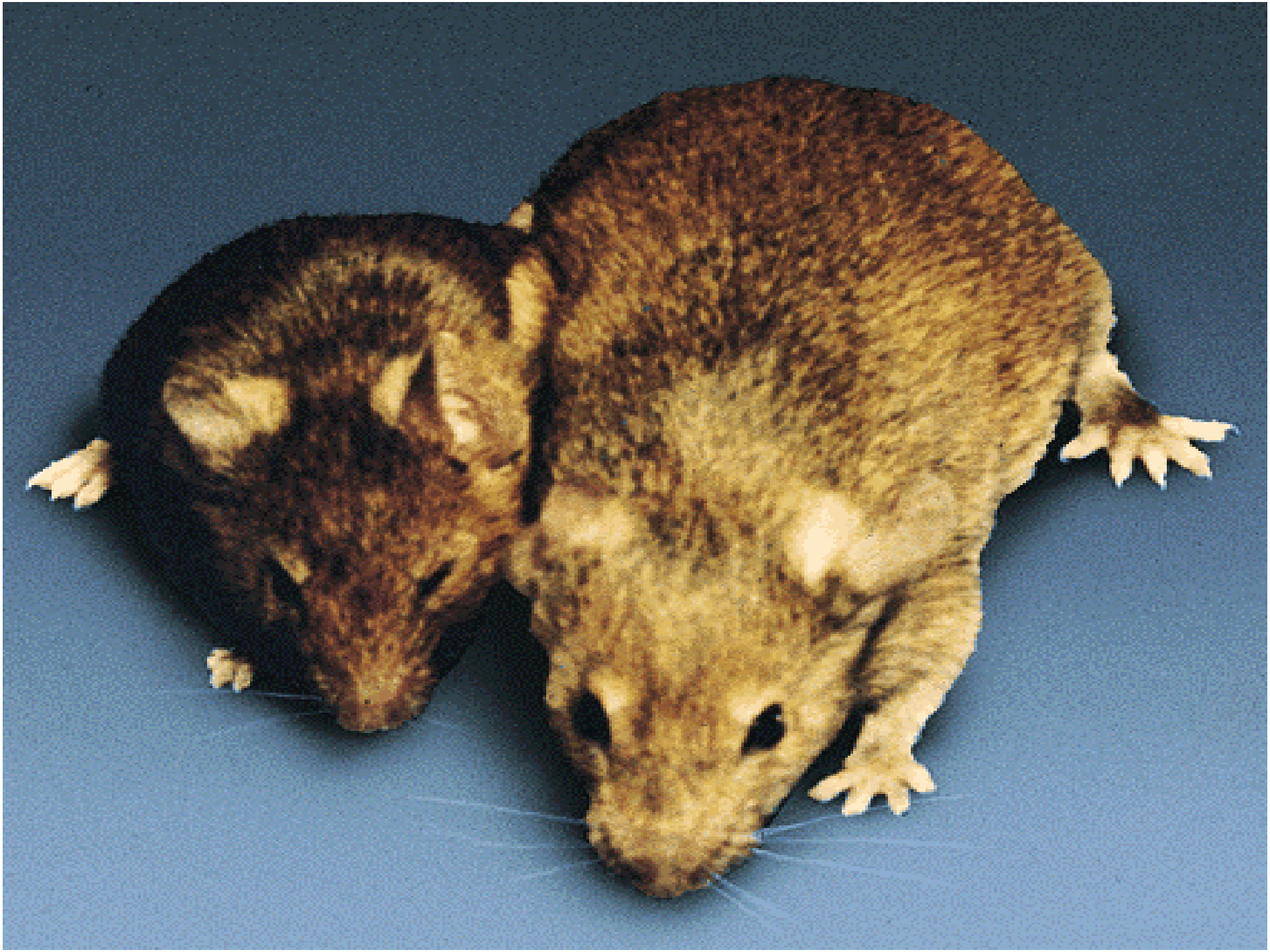

Superovulated female
Female pronucleus
Male pronucleus
Fertilized egg
Holding pipette
Injecting pipette
Transgene
Fertilized egg
Implanted female
Transgenic founder


Overall efficiency (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Key
Cattle
Pigs
Sheep
Mice
Injected
Implanted
Live born
Transgenic progeny

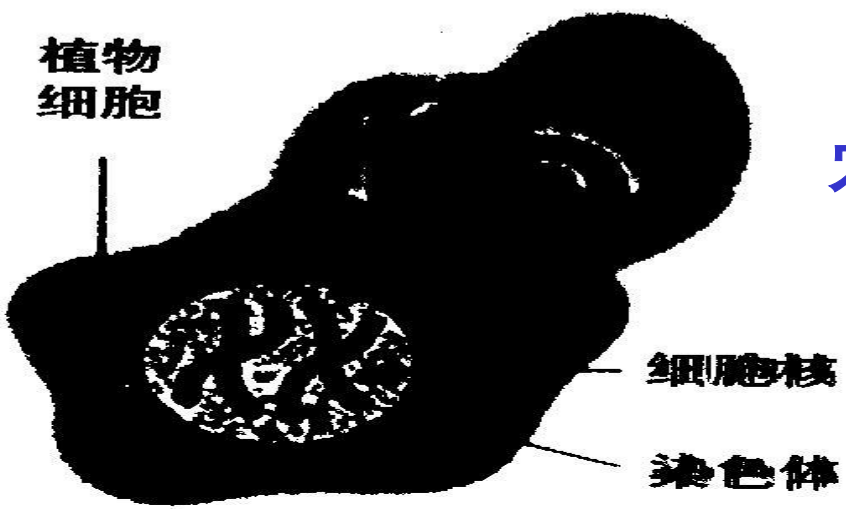

Culture
Inner cell mass
Donor blastocyst
ES cells
Transgene
Transfection
ES cells
Enrich for transfected ES cells
Microinject into blastocyst
Recipient blastocyst
Implant


Mammary epithelium
Disperse
Grow in culture
Induce G_0 phase
Pipette
Ovum
Enucleate
Nucleus
Fuse
Activate
In vitro embryo culture
Implant
Foster mother
Cloned sheep

体细胞融合法

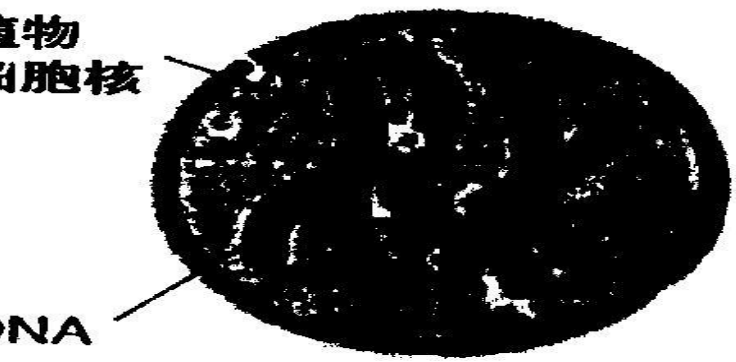


含目的基因的质粒转化农杆菌

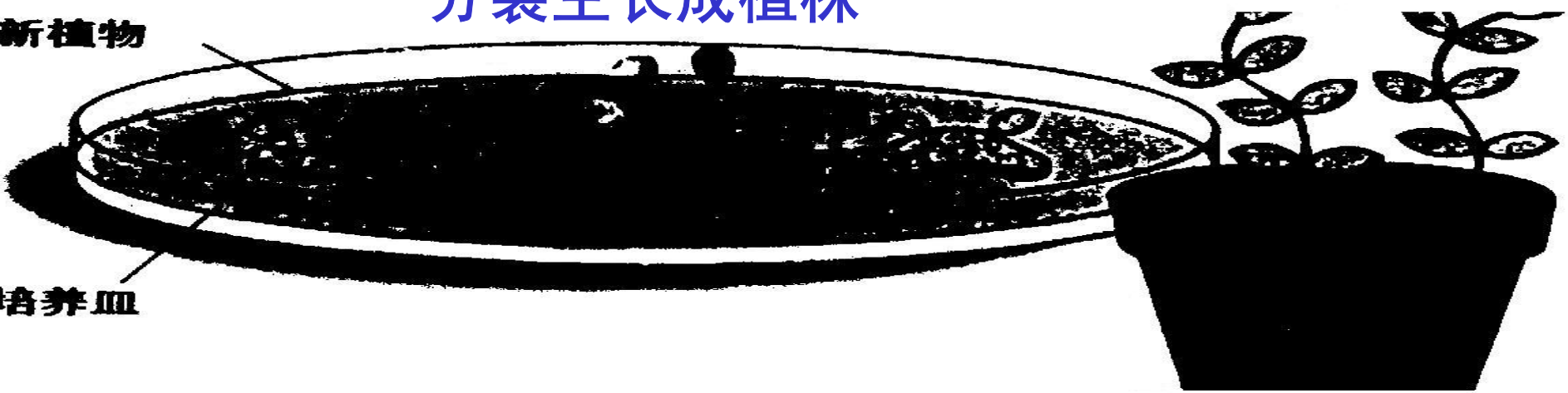


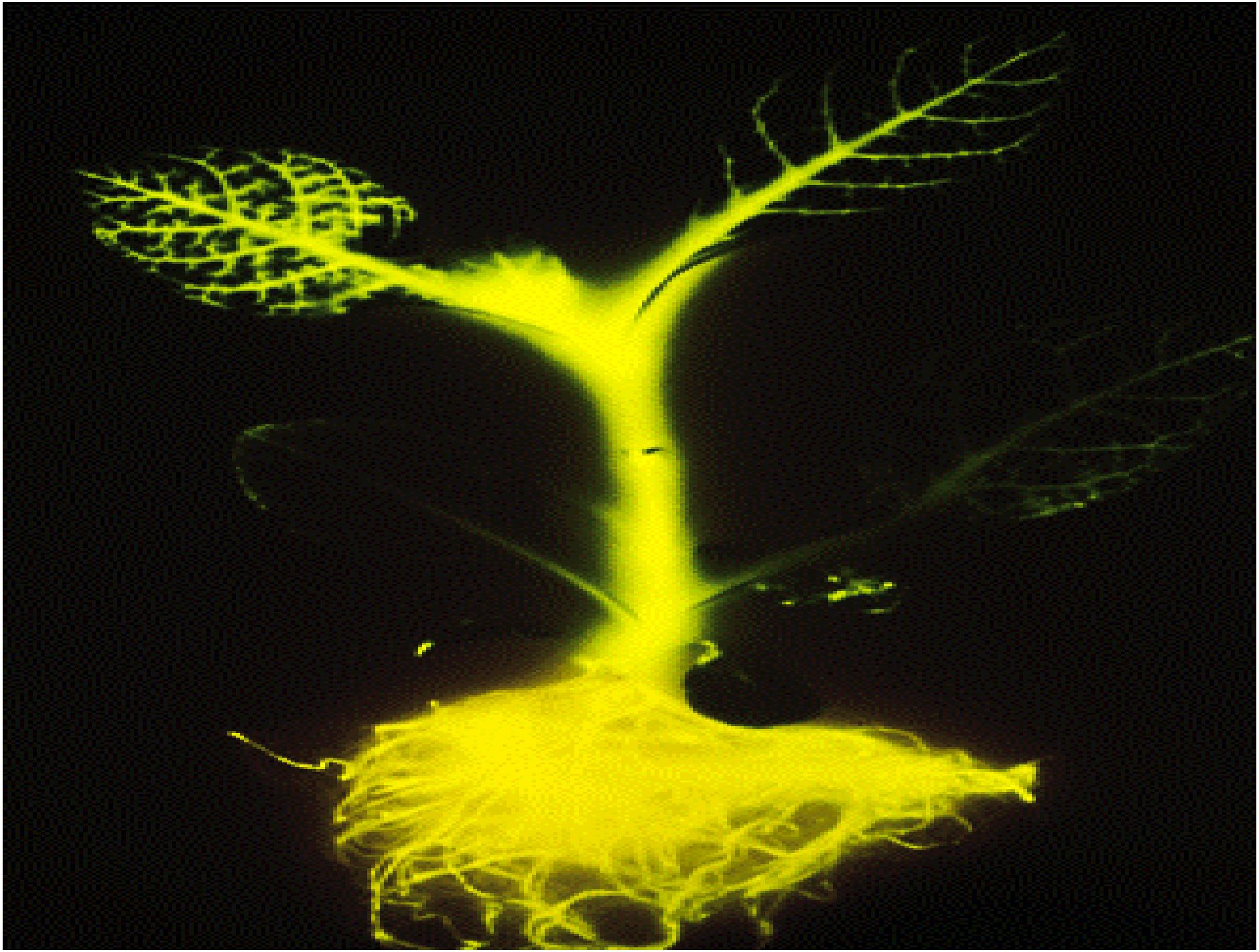
农杆菌感染叶片

外源DNA整合到染色体中



培育植物细胞，至
分裂生长成植株





(b)