

现代生物技术前沿

陈金中 薛京伦 主编

载体学与基因操作



科学出版社

www.sciencep.com

现代生物技术前沿

陈金中 薛京伦 主编

载体学与基因操作

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书系统介绍了基因载体的结构、功能和在基因操作中的应用。全书共 15 章,前 8 章主要介绍基因载体的历史,非病毒载体的结构功能原理以及在基因克隆、蛋白质表达和结构功能研究方面的应用;后 7 章内容主要集中于常用病毒载体的结构功能原理及其在功能研究和基因治疗等领域中的应用,并探讨高效安全基因载体的发展方向。

本书可以作为分子生物学、基因工程等相关课程的参考教材,也可以作为有关研究人员和实验室的技术参考资料。

图书在版编目(CIP)数据

载体学与基因操作/陈金中,薛京伦主编. —北京:科学出版社,2007
(现代生物技术前沿)

ISBN 978-7-03-018876-2

I. 载… II. ①陈…②薛… III. 基因-载体-研究 IV. Q782

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 055879 号

责任编辑:夏 梁 王 静/责任校对:张 琪

责任印制:钱玉芬/封面设计:陈 敬

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 5 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2007 年 5 月第一次印刷 印张:17 3/4

印数:1—3 000 字数:400 000

定价:45.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

前 言

基因操作毫无疑问是 20 世纪生物科学研究的标志性技术，其大大加快了生命科学研究的步伐，也影响到其他学科领域。而基因载体则是基因操作最有活力的部分，其不仅使基因的研究体系变得容易，也使基因变成产品和药物。对于弄潮基因研究、企盼到达成功彼岸的人来说，了解基因载体是必要的。

基因载体是负载目的基因到达指定目标发挥预期作用的基因运载工具。其可以是生物系统，也可以不是。基于生物系统的基因载体可以大致分为病毒、非病毒载体。而现在的人工系统往往具备多种生物来源的特性。本书从载体的基本原理入手，介绍不同载体的结构和应用，希望可供有关领域的学生和研究人员参考，也希望能对从事载体研制的人员有所帮助。

这本《载体学与基因操作》是复旦大学基因治疗课题研究小组组织编写的，凝聚了我们自 20 世纪 80 年代以来的科研和教学经验。从载体学的历史、基本原理到研究应用和载体开发，从人类遗传病基因治疗的基础和临床试验到目前向基因治疗载体安全性与有效性的挑战，不仅使我们整个课题组处于基因诊断和基因治疗研究的前沿，同时使本书独具特色。

由于编者水平有限，错误在所难免，欢迎读者批评指正。

薛京伦

2007 年 2 月 27 日于复旦大学

目 录

前言

第一章 基因载体概论	1
第一节 载体在基因操作中的作用和地位	1
第二节 基因载体的一般特性	2
第三节 基因载体的分类	3
第四节 基因载体研究发展方向	7
参考文献	8
第二章 基因载体的结构	9
第一节 基因载体的基本结构和功能	9
第二节 基因载体的构建和改造	18
参考文献	20
第三章 克隆性基因载体	22
第一节 克隆性基因载体的一般特性	22
第二节 克隆性基因载体的分类和选择	23
第三节 个别基因载体操作的基本过程	35
参考文献	37
第四章 克隆性基因文库	39
第一节 克隆性基因文库的一般特性	39
第二节 基因组文库的构建	41
第三节 克隆性 cDNA 文库的构建	45
参考文献	52
第五章 表达性基因载体	54
第一节 表达性基因载体的一般结构	54
第二节 表达性基因载体分类和选择	60
第三节 个别基因的表达体系构建	68
参考文献	69
第六章 表达性基因文库构建	70
第一节 表达性基因文库的一般特性	70
第二节 噬菌体展示文库	71
第三节 酵母杂交文库	78
参考文献	81
第七章 RNA 干扰载体的结构 and 应用	83
第一节 RNAi 的原理	83
第二节 获得 siRNA 的方法	85

第三节	siRNA 的沉默效应及脱靶效应	95
第四节	siRNA 载体转移至靶细胞和靶组织	96
第五节	siRNA 效应的分析	99
第六节	展望未来	100
	参考文献	102
第八章	蛋白质的表达和纯化	112
第一节	体外表达体系和载体	112
第二节	细菌蛋白质表达体系	117
第三节	酵母蛋白质表达体系	133
第四节	真核细胞表达体系	149
	参考文献	167
第九章	基因治疗载体的发展	169
第一节	基因治疗载体的历史	169
第二节	基因治疗载体的分类	171
第三节	载体靶向性与基因治疗	177
第四节	基因治疗载体的发展方向	179
	参考文献	180
第十章	反转录病毒基因治疗载体	183
第一节	反转录病毒的基因结构	183
第二节	反转录病毒基因载体及特点	185
第三节	反转录病毒基因载体的发展方向	187
第四节	反转录病毒载体介导的血友病 B 的基因治疗	191
	参考文献	195
第十一章	腺病毒基因治疗载体	197
第一节	腺病毒的基因结构	197
第二节	腺病毒基因载体及特点	200
	参考文献	209
第十二章	腺相关病毒基因治疗载体	211
第一节	AAV 的生物学特征	211
第二节	AAV 与基因治疗	213
第三节	重组 AAV 载体的制备及优化	215
	参考文献	219
第十三章	溶瘤病毒基因治疗载体和肿瘤的基因治疗	222
第一节	溶瘤增殖病毒介导的肿瘤治疗	222
第二节	肿瘤基因治疗研究进展	229
	参考文献	238
第十四章	其他病毒性基因载体	240
第一节	慢病毒基因治疗载体	240
第二节	VSV 基因治疗载体	247

第三节 其他病毒载体·····	251
参考文献·····	252
第十五章 非病毒性基因治疗载体·····	256
第一节 非病毒载体的优势、问题和发展方向·····	256
第二节 非病毒载体的类型·····	257
第三节 非病毒载体的基因导入方法·····	266
参考文献·····	270

第一章 基因载体概论

20 世纪有许多值得记忆的科学突破, 原子弹爆炸、人类登上月球、移动通讯普及和互联网。但是基因操作和基因修饰过的产品却悄无声息地进入人们的生活, 我们已经不再熟悉我们的食物, 不仅是工业化带来的口味变化, 更是包装上的一行小字: “采用转基因原料”。弗兰肯斯坦的怪物* 现在没有几个人会相信, 但是怪物通过基因操作得以实现不仅仅是可能性的问题。从 1972 年的第一次基因操作算起, 基因操作已经为我们提供了更加高产的作物, 更加精确的诊断和有效的药物及方法, 也产生了继发于基因治疗的肿瘤, 危害生态的花粉。生物学中心法则提示可能通过基因的修饰达到改变性状的目的, 基因操作使得生物世界变成一个可以调制的工厂。

第一节 载体在基因操作中的作用和地位

基因操作 (gene manipulation), 也叫基因工程、遗传工程或重组体 DNA 技术, 是将生物的某个基因通过基因载体运送到另一种生物的活性细胞中, 并行使正常功能, 从而创造生物新品种或新性状的遗传学技术。典型的基因操作包括: 在体外将各种来源的 DNA 与载体系统 DNA 结合成一个复制子; 杂合分子在复制子所在的宿主生物或细胞中复制, 继而通过转化或转染宿主细胞、生长和筛选转化子, 无性繁殖使之成为克隆; 然后利用克隆的分子导入适当的表达体系, 使重组基因在细胞内表达, 产生特定的基因产物。基因工程中内、外源 DNA 插入载体分子所形成的杂合分子又称为嵌合 DNA 或重组 DNA。构建这类重组体分子的过程, 重组体分子的无性繁殖过程又称为分子克隆 (molecular cloning) 或基因克隆 (gene cloning)。被操作的基因不仅能够克隆, 而且能够表达。但是在一些情况下, 仅仅需要制备和纯化一段 DNA 序列, 也是一种操作。

1972 年, 美国斯坦福大学的学者首先在体外构建了 SV40 DNA 和噬菌体 DNA 重组的人工 DNA 分子。1973 年 Cohen 等首次在体外将重组的 DNA 分子导入大肠杆菌中, 成功地进行了无性繁殖, 从而完成了 DNA 体外重组和扩增的全过程。在这些工作的基础上, 仅仅 30 多年的时间, 科学家们已能使异源基因在受体细胞中成功地表达具有特异生物学活性的蛋白质。通过体外基因重组, 人工创造出新的生物物种改良生物品种, 纠正疾病性状和制造廉价、安全、有效的药物。基因操作也产生了继发于基因治疗的肿瘤, 危害生态的花粉。当 HIV 和 SARS 肆虐时也有人想到基因操作的武器面世了。基因操作的迅速发展得益于生物化学成果的积累和运用。限制性内切核酸酶的发现、对噬菌体和细菌质粒的生物学研究成果以及聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 自动化的 DNA 序列分析技术和 DNA 合成技术等重大技术革新都给基因工程带来新的进展和突破。

* 英国女作家玛丽·雪莱的小说《弗兰肯斯坦》中的人物

基因操作技术就其本身基本目的有三个：一是克隆保持基因片段，二是高效表达特定基因产物，三是改良和修正生物性状。在克隆保持基因片段方面，人类基因组计划的完成可以说即便在一些方面还不尽完善，但该目的是基本可以保证完成的。基因载体涵盖从质粒到细菌人工染色体、酵母人工染色体，正是这些载体的高效、高保真及大容量特性，可以保证可靠地克隆保持任何已知的基因片段和基因组。对于高效功能性表达特定基因产物，当前已将突破点集中于外源基因在受体细胞内的表达问题上，使外源基因在受体细胞内表达出有生物学活性的蛋白质，这是使基因操作产业化的关键，其不仅涉及对基因工程许多细节的认识，还广泛涉及人们对受体细胞、基因结构与功能的关系以及基因表达调控的认识。在载体的稳定性和高效表达方面的改造基本完成，目前的关键可能在于如何选择合适的细胞或重建合适的细胞体系。改良和修正生物性状是基因操作的最高境界，因为在如此条件下，导入基因的表达需要在生物体内实现特定的目的，而不至于影响机体的遗传平衡和自然界的生态平衡。在基因转移的过程中，包括转移效率、对宿主的急性毒性、目的基因沉默、宿主基因表达异常等。基因载体目前无论在细胞和整体水平都有引起上述问题的可能性。1999年9月《自然》杂志报道的 Gelsinger 事件是由于载体的异源性；Hacein-Bey-Abina 等在 2003 年报道的继发于基因治疗的白血病则是载体本身影响机体遗传物质结构的副作用。当然现在更多的问题是目的基因导入靶细胞效率低下和不稳定等问题而无法达成预期目标。

基因操作有三个关键部分——目的基因、宿主和基因载体。目的基因的阐明可能不是基因操作本身的任务，而宿主的选择应该建立在对目的基因的理解之上。实现目的的关键是把目的基因运载到实现目的的场所，因此基因载体在基因操作中的关键性就像运载火箭之于卫星一样的关键因素。

基因载体技术是基因操作的核心技术，具有很强的通用性，同一种载体无论携带什么不同的基因，都具有基本相同的操作方法，具有明显的工业化潜质。因此，国外对基因载体的研究生产和相应的 GMP 设施也十分重视，成为基因操作行业中的重要参与者。这样使从事基因治疗的基础研究和临床试验的研究者不必投入大量的时间和精力进行载体有关工作，从而加强创新性探索和研究。美国有 5 家受 NIH 资助的国家基因载体实验室，目前可以提供反转录病毒载体、腺病毒载体、AAV 载体、质粒 DNA 等的制备、检测等多种相关服务，而商业性基因载体公司有数十家。

第二节 基因载体的一般特性

近年来基因载体无论在基因操作和基因研究方面总是及时跟进和推动研究和应用的发展，甚至产生了一个专门研究基因载体的学科——载体学 (vectorology)，而且基因载体也是主流生物公司稳定的业务。尽管目前基因载体在基因操作和基因研究领域广泛应用，但是要给基因载体一个准确的定义却越来越困难，因为基因载体的用途越来越广泛而变得越来越具有个性从而难于概括了。基因载体到目前还可以统一的特性是具有将外源目的 DNA 导入受体细胞，并能自我复制和增殖的工具。其实，也就是大多数基因载体第一个阶段的共性。

为达成以上目的，一般要求载体首先是一个独立的复制子，这样目的基因可以随载

体在宿主中复制，因为利用生物体系复制无论成本还是准确性都是目前非生物体系或非细胞体系可以比拟的，所以不论以何种形式应用，目前的载体体系均要求载体有在低等生物中复制的阶段。

尽管载体源自天然生物体系，但是要发挥运载 DNA 的作用，天然体系的可插入量是有限的，所以一般在载体构建过程中总是尽可能去除非必要的因素，在有些情况下把一些必要的因素制成一个辅助体系，从而保证载体可以负载较大的 DNA 片段。当然，使用辅助体系有时要考虑安全因素。对于基因载体来讲，在保证复制子功能和其他必需功能的条件下，一个尽可能小的分子在一定条件下可以负载较大的 DNA 是一种理想的情况。

出于基因操作本身方便性的考虑，人工构建的基因载体系统一般会附加一个多克隆位点和一个选择标记。事实上天然的生物体系是不宜直接用作基因载体的，基本原因之一是其往往含有一些限制性酶切位点，人工载体在改建过程中一般会对天然生物体系原料中非预期位点进行消除，而设计一个人工合成的多克隆位点方便目的序列的插入。生物标记对于载体不是必需的，但是生物标记可以在克隆筛选阶段大大简化工作而被广泛应用，商业化的载体一般具有一个或多个生物标记，大部分为抗药和营养补偿标记。虽然生物标记在一些生物体系中是固有的，但是在广泛使用的基因载体中这些标记也经修饰，使之简洁、高效并且避免影响多克隆位点的功能。无害性是基因载体的又一个基本要求，当然依据不同的情况可能有一些差异。其包括两方面的无害性要求：插入对载体本身的无害性及载体对宿主的无害性。有关插入对载体本身的无害性包括两个方面：一是插入部位的无害性，这在基因载体的设计中已经考虑；二是插入片段的无害性，这一点在大部分情况下是指片段长度的限制，超过一定的长度往往会影响复制子的功能，其决定了一定载体的负载量。

第三节 基因载体的分类

1972 年在美国斯坦福大学的第一次基因操作构建了 SV40 DNA 和噬菌体 DNA 重组的分子，而其中的两个基本分子都是目前广泛使用的载体体系。事实上小分子基因组作为载体的骨架到现在依然是主流的方法。基因载体按照用途大致可以分为克隆基因载体和表达性基因载体。前者的基本目标是保存与扩增基因片段，一般要求具有较好的效率与忠实性；表达性基因载体一般也要求具备克隆载体的基本特性，同时要求具备在一定条件下表达基因产物。尽管载体源于不同的生物体系，理论上都可以建立克隆和表达性载体系统。具有复制能力的基因载体在目前主要源于质粒、病毒、噬菌体和人工染色体。

一、病毒载体和非病毒载体

依据载体的生物来源，基因载体可以分为病毒载体和非病毒载体。十分有趣的是第一次基因操作是在两个类型的基因载体之间进行的。根据载体是否为病毒来源进行分类可以看出病毒在基因载体中的地位。病毒载体转染率较高，但是存在免疫原性；存在与宿主细胞整合的潜在危险，对插入 DNA 长度有限制。非病毒载体则具有低毒、低免疫反应、易组装、经济、便于大规模生产等优点，但是其存在难以通过细胞膜屏障、靶向

性差、基因表达不稳定、不能长期表达等缺点。

(一) 病毒载体

大多数野生型病毒具有致病性,且负载外源 DNA 能力有限,因此作为基因载体对其进行改建是必需的。从纯理论角度上看,所有病毒都可能改造成病毒载体。但由于病毒的多样性及与机体的复杂关系,大量病毒的分子生物学及与疾病发生、发展的关系等还未阐明,限制了许多病毒发展成为实用性的载体。目前还只有少数病毒,如反转录病毒、腺病毒、腺病毒伴随病毒、疱疹病毒等被成功地改造成成为相对成熟的基因转移载体并得到应用。但是对其他病毒改造研究的工作也不断获得进展,例如,仙台病毒、麻疹病毒、VSV 病毒、流感病毒、乙肝病毒等也表现出成熟载体的一些特点。从天然病毒变成病毒载体的改建至少应具备以下基本条件:可以携带外源基因并能包装成病毒颗粒;可以介导外源基因的转移和表达;改造后载体不具致病性。

病毒基因组可分为编码区和非编码区。编码区基因产生病毒的结构蛋白和非结构蛋白;根据其对病毒感染性复制的影响,又可分为必需基因和非必需基因。非编码区中含有病毒进行复制和包装等功能所必需的顺式作用元件。在病毒基因载体改建中,去除非必需序列,把一些包装必需的序列通过构建反式系统来补充。病毒颗粒都具有一定的包装容量,一般来说,病毒包装容量不超过自身基因组大小的 110%。依据改建的方法不同,病毒载体可以分为两类:重组型病毒载体和无病毒基因的病毒载体。

重组型病毒载体是以完整的病毒基因组为改造对象。一般的步骤是选择性地删除病毒的某些必需基因尤其是立早基因或早期基因,或控制其表达;缺失的必需基因的功能由互补细胞反式提供;用外源基因表达单位替代病毒非必需基因区;病毒复制和包装所需的顺式作用元件不变。

无病毒基因的病毒载体 (gutless vector) 的基因组中不含有任何病毒基因,仅含有病毒复制和包装所必需的顺式作用元件。如源于腺病毒的 mini-Ad;基于 HSV 扩增子 (amplicon) 载体;重组 AAV 载体也属于无病毒基因的病毒载体。这类病毒载体的优点在于安全性好,容量相对较大。缺点在于往往需要辅助病毒参与载体 DNA 的包装,而辅助病毒又难以同载体病毒分离开来,造成最终产品中辅助病毒污染。

由于后续章节有较大篇幅讲述病毒基因载体,这里不赘述有关详细内容。

(二) 非病毒载体

从字面上理解,非病毒载体为一个排除性的命题,也就是说除了病毒载体其他的基因载体均是非病毒载体。排除非生物系统,目前广泛应用的有质粒、 λ 噬菌体、黏粒、BAC、YAC、PI 等载体。从生物体系上看,病毒性载体具有直接感染高级生物宿主细胞的特点,而非病毒载体则往往在低等生物中操作,如果要用于高级生物细胞一般需要 DNA 运载体协助。事实上,大部分病毒载体往往也有一个非病毒操作阶段。

1. 质粒载体

质粒载体系统为基因操作中最广泛应用的系统。质粒是独立于细菌染色体 DNA 的

双链环状 DNA 分子。其中大肠杆菌 pBR322, pSC101 等质粒为目前多数商业质粒的基本骨架。真核生物——酵母质粒也是广泛应用的体系。目前应用的系统中, 在细菌中扩增及在酵母或哺乳动物细胞中表达是一种常规的方法, 事实上这是通过把不同生物来源的顺式元件混合构建的结果。

2. 噬菌体载体

噬菌体是一种可在体外包装的细菌病毒, 可高效感染大肠杆菌, 其中基于 λ 噬菌体的基因载体最为广泛应用。 λ 噬菌体 DNA 是线状双链 DNA 分子, 长约 50kb, 单链末端含 12bp 的互补末端 (COS 序列)。进入宿主细胞后不久, COS 序列碱基配对环化。改建后的 λ 噬菌体发展了多种较质粒容量大的克隆系统: 如置换 λ 载体使用溶解途径, 载体可以负载约 23kb 的外源 DNA 整合到宿主菌 DNA 中; 插入 λ 载体使用裂解途径, 载体在宿主细胞中自主复制, 然后包装成噬菌体, 裂解宿主, 释放噬菌体, 该类型载体一般可负载 5kb 的 DNA。

3. 黏粒载体 (cosmid vector)

黏粒是将质粒和 λ 噬菌体改建的一种人工载体。它含 COS 序列, 插入一小质粒而得名 cosmid。改建后的黏粒含有 λ 噬菌体的复制起点和 *cos* 末端, 全长 8kb。大片段外源 DNA 插入后, 在体外包装进而被克隆。可包装 30~45kb 长的 DNA 片段, 多用于基因文库构建。尽管黏粒获得了一些质粒和噬菌体的优点, 但是也继承了噬菌体稳定较差的缺点。

4. 人工染色体

以上载体系统事实上可以满足大部分 cDNA 水平相关的基因操作, 但是对于基因组, 尤其是含有巨大内含子和调节序列的真核细胞基因来讲操作变得几无可能。由于附加部分调节序列和边界元件的迷你基因比 cDNA 具有明显优势, 这样的要求使得不能利用上述体系操作的基因即便在 cDNA 水平也大量上升。人工染色体技术的出现正是基于这样的需求。依据元件的来源不同, 人工染色体可以分为 BAC、YAC 和 PAC。有关内容见相关章节。

二、克隆载体和表达载体

依据载体的基本用途, 基因载体可以分为克隆性基因载体和表达性基因载体。

(一) 克隆性基因载体

克隆性基因载体是指以保存基因为主要目的的载体, 其主要考虑的是载体的容量、稳定性和效率、对序列的偏好性、操作的方便性等方面的因素。对于 cDNA 一般质粒和噬菌体载体就可以满足这些要求。但是对于基因组, 尤其是大规模基因组, 就需要大容量载体, 这些载体没有直接的生物体系原型, 一般需要集和多个系统的特点来构建,

如黏性质粒载体、人工染色体载体等。在基因组操作中，构成一个多种多级克隆载体文库是一种基本的策略，可以在保存的可靠性和应用方便性两个方面权衡考虑（表 1-1，图 1-1）。文库的分级有利于重叠构建克隆群及具体基因分析对于 DNA 长度的不同需求。实际应用中，一般先构建较大的文库，然后再从大文库钓取相应片段构建亚文库。

表 1-1 主要大容量载体的外源基因容量

	P1	pBAC	pucBAC	pCYPAC	YAC
载体大小(kb)	31	6.5	7.2	19.3	11.5
载体拷贝数	1	1	1+	1+	1+
插入容量(kb)	75~95	0~300	0~300	0~300	0~2000
克隆策略	2 臂	单酶切	单酶切	单酶切	双酶切
	<i>Bam</i> H I / <i>Sca</i> I	<i>Bam</i> H I 或 <i>Hind</i> Ⅲ	<i>Bam</i> H I 或 <i>Hind</i> Ⅲ	<i>Bam</i> H I / <i>Sca</i> I	<i>Bam</i> H I / <i>Eco</i> R I
克隆方法	包装	电转	电转	电转	电转
维持拷贝数	11	1	1	1	1
杂合克隆(%)	0	2	2	0	20~60
阳性克隆筛选	是	否	否	是	是

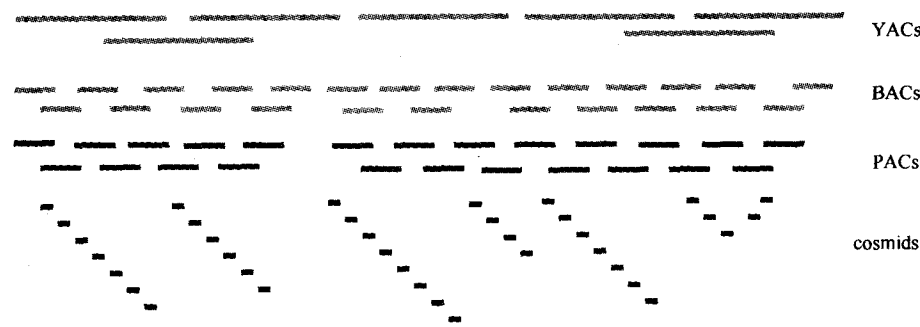


图 1-1 染色体分级文库关系示意图

酵母人工染色体 yeast artificial chromosome (YAC)；细菌人工染色体 bacterial artificial chromosome (BAC)；P1 人工染色体 P1 artificial chromosome (PAC)；黏性质粒 cosmid

(二) 表达性基因载体

表达性基因载体就是在克隆基因载体的基础上，在多克隆位点附加表达调控序列以表达外源基因，或者在一个可表达报告基因的上游附加多克隆位点用于检测顺式元件功能。表达质粒依据其用途可以进一步分为翻译性表达载体、转录性表达载体和报告性表达载体。与克隆性载体克隆策略不同，表达载体克隆一般需要考虑方向性。有关内容详见相关章节内容。

三、游离载体和整合载体

在生物界，有三个主要的载体原型——质粒、噬菌体和病毒，不同个体可以表现出

游离存在和整合到宿主染色体等不同的特性。在基因工程操作中,为了操作的方便性和达到特定的研究目的,可以依据游离存在和整合的机制设计两种不同的基因载体。当然也不尽然,任何体系都不是完全游离和绝对整合存在的。一般来说,构建整合载体需要更多的功能元件。有关内容参见第二章有关内容。

四、穿梭载体

所谓穿梭载体是指在两种宿主中发挥作用的基因载体。现在一般是利用细菌体系的方便性来扩增,而在高等生物中用作具体研究。穿梭载体的功能一般通过使用两套顺式元件来完成,是一种广泛应用的基因载体策略。有关内容参见第二章。

第四节 基因载体研究发展方向

基因载体的发展在 HGP 完成前,大片段克隆问题一直是最重要的问题。随 HGP 完成,这个问题可能会变得更加精细、简便和有利,但是目前的水平基本可以满足研究的需要。HGP 以及多个基因组计划和 cDNA 计划的完成从事实上证明了这一点。在细菌等低等生物中,目的基因的表达和后续研究也基本没有影响试验研究。目前的问题是工业化潜力和开发的研究。目前基因载体,无论是病毒基因载体还是非病毒基因载体的关键问题在于其应用于高等生物细胞和生物体时所表现出的一系列问题,如非病毒体系的低效率和需要附加运载体系,病毒的病原性、免疫原性问题,当然还有对于所有体系的成本和遗传安全性问题。基因载体的发展方向在于克服这些困难。

目的基因运送到宿主细胞是基因操作的基本条件。病毒较好地解决了该问题。一般认为整体条件下,大型动物使用病毒载体是目前唯一可能达成目的的方法。所以病毒载体的研究发展是基因载体发展最活跃的部分。在用于高等生物细胞的研究体系中,高效、稳定转移大片段 DNA 依然是一个有待解决的问题。对于一些大型基因,基于目前的体系即便是转移 cDNA 也是困难的,所以现在积极研究开发新型病毒载体是一个重要的领域。

尽管在成年大型动物体内可能对基于病毒体系运载的基因具有较大的免疫反应,而使效率下降,但是结合免疫抑制的技术获得较高的转移效率依然是可以预期的。开发通用的病毒包装系统是基因操作从实验室到应用的重要环节。辅助包装系统也是开发安全的无病毒载体的必要条件。

靶向性是基因载体的又一个问题,并且目的基因在靶细胞的表达应该是可以调节的,这对于基因功能的研究和应用都有重要意义。尽管一些病毒表现出一定的组织细胞特异性,如 HSV 的亲神经特性、HBV 的亲肝性,但是大部分病毒的靶向性是不明确的。现在一般在病毒包装体系表面和其他载体表面表达一定表位使其具备一定的组织细胞靶向性,同时在载体中集成一定反应元件(如四环素反应元件、低氧反应元件)从而实现特定细胞组织的可调节表达。目前丰富和特异化载体的靶向性和可调节性是基因载体完善的关键点。

出于安全性考虑,基因载体在最终应用的生物体中一般被设计为不可复制性的。这

样就大大降低了载体在体内的时效性。尤其对于肿瘤基因治疗,这不是一个好的特性。靶向性条件增殖型病毒就是为解决该问题而提出的解决方案。如 Onyx-015 在 $p53$ 突变细胞中的条件性复制。

在保证有效性的情况下,安全性是应用于生物体系尤其是基因治疗体系时最重要的考虑因素。对于病毒载体,改建病毒的安全性、寻找使用安全的病毒、改善病毒制备工艺都是努力的方向。然而,这些努力的结果难以预期,继发于基因治疗的白血病提示病毒系统的危险性可能还没有被完全阐明,病毒包壳引起的问题是短时可能容易解决的,而 DNA 插入的后果不是一个孤立事件且具有不确定性。另外一个方面,同源重组提供最高的安全性但是效率太低限制了它的用途。所以开发一个载体体系使 DNA 插入可以控制又具有较高效率是目前研究的热点。最早在 Cre-LoxP 体系证明具有这种可能性。随后发现基于 rep-RBS 和 C31-att 的体系都可以高效特异性地介导 DNA 插入。预期结合病毒/非病毒载体与位点特异性整合的体系在一段时间内将是载体发展的基本方向。

参 考 文 献

- Barzon L, Stefani A L, Pacenti M, Palu G. Versatility of gene therapy vectors through viruses. *Expert Opin Biol Ther.* 2005, 5(5): 639~62
- Brown W R, Mee P J, Hong Shen M. Artificial chromosomes; ideal vectors? *Trends Biotechnol.* 2000, 18(5): 218~23
- Dominic J Glover, Hans J Lipps, David A. Jans TOWARDS SAFE, NON-VIRAL THERAPEUTIC GENE EXPRESSION IN HUMANS. *Nature genetics.* 2005, (6): 299~311
- Fabb S A, Ragoussis J. Yeast artificial chromosome vectors. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* 1995, 5: 104~24
- Goncalves M A, de Vries A A. Adenovirus; from foe to friend. *Rev Med Virol.* 2006, 16(3): 167~86
- Hibbitt O C, Wade-Martins R. Delivery of large genomic DNA inserts >100 kb using HSV-1 amplicons. *Curr Gene Ther.* 2006, 6(3): 325~36
- Louise C. Nonviral vectors. *Methods Mol Biol.* 2006, 333: 201~26
- Manuel A F V Goncalves. Adeno-associated virus; from defective virus to effective vector. *Virology Journal.* 2005, 2: 43
- Monaco A P, Larin Z. YAC, BAC, PAC and MAC; artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol.* 1994, 12(7): 280~6
- Turner P C, McLennan A G, Bates A D, White M R H. *Instant notes in molecular biology*, Bios Scientific Publishers Limited. 1999
- Wolff J, Lewis D L, Herweijer H, Hegge J, Hagstrom J. Non-viral approaches for gene transfer. *Acta Myol.* 2005, 24(3): 202~8

(陈金中 薛京伦)

第二章 基因载体的结构

基因载体为基因操作最基本的要素。目前所用的基因载体依据其生物学来源基本可以分为细菌质粒、噬菌体和病毒三种。事实上这也是载体的三种最基本类型。尤其是质粒为大部分载体最基本的来源，几乎所有载体都有一个质粒操作阶段。为了实现扩展基因容量和宿主范围、操作方便和有效转染，往往把多个不同来源独立的元件，包括高等生物的一些基因组元件结合使用，从而产生了一系列新的基因载体。它们具有多种优势，成为基因操作的有力工具。现在使用原始分离的载体可能仅仅是出于教学目的。

在第一章描述了基因载体的基本特性，包括复制子、遗传标记、多克隆位点等。但是在不同载体体系中它们是不同的，有许多元件往往只在一定的生物宿主环境下才表现出对应的生物学特点，了解这些基本结构的功能原理对于正确选用和改建基因载体具有重要意义。

第一节 基因载体的基本结构和功能

一、质粒载体的结构和功能

质粒为最简单的染色体外基因组之一，与其他遗传物质一样，其赋予生物一定的性状（表性特征），其可以独立复制（复制特性），有拷贝数的控制机制和分配机制，有基本种群。但是质粒不是一个完整的生物体系，其必须依赖宿主才能得以遗传和体现生物特性。

目前发现的质粒大部分为双链、闭环超螺旋 DNA 分子，但是也有一些质粒分子可以表现为线性特点。质粒主要见于细菌，也见于古细菌和酵母菌。质粒的分子规模从 2kb~1Mb。质粒编码的性状一般包括抗性特点，如抗生素抵抗、不利环境抵抗（重金属抗性）、产毒特性和抗毒特性等。从质粒本身的特性来看，质粒具备复制特性、分离特性、判别特性和进化特性。

（一）质粒的生物学特性

1. 复制特性

质粒含有一个与之对应的控制复制的顺式元件和表达基因组成的复制子（replicon）。目前使用的大肠杆菌质粒一般含有源自 pMbB1 和 pColE1 的复制起始控制序列。复制控制有三个主要因素，RNA II，RNA I 和蛋白 Rop。RNA II 为正调节因素，其前体经 RNase H 修饰成为三叶草结构的成熟 RNA II 并作为复制的引物。RNA I 与 RNA II 部分互补，妨碍 RNA II 形成正确的二级结构，Rop 则可以加强 RNA I 的作用。所以后两者突变可加强质粒的复制能力。

表 2-1 常用质粒的拷贝数

质粒	复制子	拷贝数
pBR332 及衍生系列	pMB1	15
pUC 及衍生系列	突变 pMB1	500
PSC101 及衍生系列	pSC101	5
ColE1 及衍生系列	ColE1	15
pACYC 及衍生系列	p15A	15

质粒的复制位点决定质粒的复制方式和起始频率。依据复制起始点的控制严谨度不同,质粒可分为高拷贝质粒和低拷贝质粒(表 2-1)。由于质粒复制不需要本身基因表达蛋白质,而利用的细菌蛋白质半衰期较长,所以利用抑制蛋白质合成的药物(如氯霉素)可以造成质粒在细菌内的积累,这对于获得低拷贝质粒有一定意义。

质粒复制控制元件不仅仅控制复制特性,也是质粒不相容性的物质基础。原因在于使用相同机制的不同质粒可能竞争复制系统,而最后是不同的质粒的微小差别积累到其中一个质粒被清除。大肠杆菌质粒可分为 30 多个不相容群体,常见的有 ColE1 和 pMB1, pSC101 和 p15A 等。对于不相容的质粒体系,长期稳定的共存是不可能的,但是对于一些需要作短期的多质粒检测体系,共存一定时间也是可能的。

2. 遗传筛选标记

质粒通过表达蛋白质可以提供给宿主一些新的生物学特性,有一些特性便于区分质粒的特性,被用作质粒的筛选标志。目前使用最为广泛的是抗生素抗性标记、抗突变标记、人工插入失活和 α 互补标记等。

氨苄青霉素抗性(ampicillin resistance, *amp^r*)为最常用的抗性标记。该基因编码 β -内酰胺环水解酶,可分泌到细菌膜周隙将氨苄青霉素水解解毒。卡那霉素抗性基因(kanamycin resistance, *kan^r*)也是常用的抗性基因,其决定质粒对氨基糖苷类抗生素的抵抗力。一般可以在大肠杆菌条件下使用,更广泛的用法是用于真核生物体系,作为 G418 的筛选基因。其基本原理是基因产物氨基糖苷转移酶对抗生素的磷酸化灭活。四环素抗性基因(tetracycline resistance, *tet^r*)、氯霉素抗性基因(chloramphenicol resistance, *cat* 或 *cm^r*)也是载体系统常用的抗性标记,前者编码一个 300 个氨基酸的膜蛋白,可以妨碍四环素被细胞吸收;而后者编码氯霉素乙酰转移酶可以使氯霉素结合核糖体的能力丧失。当使用到真核生物系统时,除了上述卡那霉素抗性外,潮霉素抗性基因(hygromycin resistance, *hph*)和嘌呤霉素抗性基因(puromycin resistance, *pur^r*)也是常用的抗性标记。*hph* 编码潮霉素磷酸转移酶,而后者可以消除嘌呤霉素对核糖体 A 位的干预。

在早期研究中,质粒抗突变作用也是基本的筛选标记之一,如抗终止突变。*SupF* 编码的 tRNA 可以用 UAG 编码酪氨酸。但是现在由于其他筛选标记的方便性使这些标记的使用有限。营养缺陷性突变在细菌使用中并不广泛,但是在酵母体系应用的比较多,如 *Leu2*、*His3*、*Trp1* 等。

插入失活和 α 互补是应用的较为广泛的两个筛选方法。理论上讲,插入失活可以用于任何功能基因,事实上目前应用较多的仅仅有 *tet^r* 基因的插入失活,基本原理是在基因中设计多克隆位点,外源基因插入将导致标记基因产物功能丢失。 α 互补的基本原理在于 β -半乳糖苷酶两个缺陷型的互补作用。在宿主菌中预设 F 质粒携带的 *LacZ Δ l-tam15* 突变基因,而在研究载体中附加编码 N 端 140 个氨基酸的 *LacZ'* 基因,中间设计