

导入人 HeLaS 3 细胞 DNA 提高 XP 细胞的紫外线抗性*

章扬培 白晓彬 陈月能 徐惠英 范国才 夏寿萱

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

摘要 用电脉冲介导和 DNA-磷酸钙共沉淀两种基因转移方法, 将人 HeLaS 3 细胞 DNA 及限制性核酸内切酶切割后的 DNA 片段, 与选择标记基因一同导入 XP 细胞, 经两次选择后得到转化的细胞。实验证明 HeLaS 3 DNA 及经 Bgl I、Xho I 切割后的 DNA 片段可以修复 XP 细胞切除修复基因的缺陷, 提高它们对紫外辐射的抗性。二次转化实验进一步证明, 导入的 HeLaS 3 DNA 已在 XP 细胞基因组中整合, 并得到稳定的表达。

关键词 紫外辐射, 切除修复, 基因转移, XP 细胞, HeLaS 3 DNA

紫外照射会引起细胞内 DNA 碱基间出现嘧啶二聚体, 阻碍 DNA 的半保留复制。大多数哺乳动物细胞可以切除嘧啶二聚体, 使损伤得到修复。人着色性干皮症(Xeroderma Pigmentosum, 简写 XP)细胞缺乏这种切除修复的功能。XP 是人类的一种遗传性疾病, 患者的皮肤和眼睛对光照过敏, 皮肤癌发病率高。近年来世界上不少实验室以 XP 为受体细胞, 力图用基因转移法, 导入切除修复功能正常的供体细胞 DNA, 以提高 XP 细胞的紫外抗性, 但成功的极少。我们用电脉冲介导和 DNA-磷酸钙共沉淀两种基因转移方法, 将人 HeLaS 3 细胞 DNA 及酶切后的 DNA 片段, 导入 XP 细胞获得成功。

材 料 和 方 法

(1) 细胞 XP 20 S(SV 40)(为经 SV 40 病毒 DNA 转化的人着色性干皮症细胞)和 HeLaS 3 (人宫颈癌细胞), 均在含 10% 胎牛血清的 DMEM(Gibco)培养液中生长, 青链霉素终浓度 50 U/ml, 37°C, 5% CO₂。Hoechst 33258 荧光染色法证明实验过程中二种细胞无支原体污染。

(2) 供体 DNA 的提取与酶切 收集约 10⁷ 个处于指数生长期的 HeLaS 3 细胞, 用 0.1 mol/L NaCl-0.02 mol/L Tris·HCl-6 mmol/L EDTA-0.5% S. D. S 液溶胞, RNase, Proteinase K 消化细胞内 RNA 和蛋白质。然后用 Tris·HCl 饱和的酚和氯仿(2:1 v/v)混合液抽提数次, 核酸相经 Tris·EDTA (pH 7.5)缓冲液透析后, 加 2.5 倍体积的冷无水乙醇沉淀 DNA, 并用干净的玻璃棒收集 DNA 纤维。再经 70% 乙醇除盐、无水乙醇脱水后, 于超净台中风干, 供基因转移使用。

转移 HeLaS 3 DNA 酶切片段时, 取 20 μg HeLaS 3 DNA, 分别加入 10 倍的酶反应缓冲液和各 40 个单位的 E. CoR I、Xba I、Xho I、Sal I、Bgl I, 按常规, 除 Bgl I 用中盐缓冲液(50 mmol/L NaCl-10 mmol/L Tris·HCl-10 mmol/L MgCl₂-1 mmol/L DTT)外, 其余四种限制性核酸内切酶都使用高盐缓冲液(100 mmol/L NaCl-50 mmol/L Tris·HCl-10 mmol/L MgCl₂-1 mmol/L DTT), 加三蒸水使总体积为 80 μl。对照组 20 μg HeLaS 3 DNA 加 40 μg DNase I。酶

切反应 37℃下2 h。然后加等体积的酚和氯仿混合液,沉淀蛋白质,上相液加无水乙醇沉淀 DNA,风干后供基因转移使用。

(3) 基因转移 20 μg HeLaS 3 DNA 或酶切后的 DNA 片段;与 5 μg PSV₂Neo(PSV₂Neo 质粒)DNA一同导入 XP 20 s(SV 40)细胞。

电脉冲介导基因转移步骤为^[1]: HeLaS 3 DNA 和 PSV₂Neo DNA 共溶于 1 ml 磷酸盐缓冲液,与 5×10⁶ 个处于指数生长期的 XP 细胞混匀,冰浴 10 min,移入电激槽中。调电激仪(日本和研药株式会社: Model ECB-1001)的电容为 22 μF,极间电阻 500 Ω,高压直流电 1500 V 脉冲放电三次,将供体 DNA 导入受体细胞。

DNA-磷酸钙共沉淀法步骤为^[2], HeLaS 3 DNA 和 PSV₂Neo DNA 溶于 1 ml HBS (8 g/l NaCl、5 g/l Hepes、0.1 mol/L NaOH 调 pH=6.95)。然后加 10 μl Na₂HPO₄·12 H₂O(12 g/l), 50 μl 2.5 mol/L CaCl₂, 室温放置 20 min。把形成的 DNA-磷酸钙共沉淀物加到 5×10⁵ 个 XP 细胞的培养液中, 37℃培养 6 h。再用含 10% 二甲基亚砜的 DMEM 培养液室温下处理转化细胞 5 min, 更换新鲜 DMEM 后, 37℃继续培养。

(4) 基因转移后的选择 基因转移后,经两次选择,筛选出 HeLaS 3 DNA 转化的细胞。第一次用含 400 μg/ml Geneticin (G 418)的 DMEM 培养液,10 天后可出现抗 G 418 的细胞克隆。将这些细胞克隆用胰酶消化,重新接种。次日用足以使 XP 20 S(SV 40)细胞致死的 3 J/m² 紫外线照射,进行第二次选择。两周左右可以得到活存下来的转化细胞。将这些细胞克隆分离出来,加以扩增,待长到足够数量时,可进行紫外照射活存率的测定。

(5) 紫外照射活存率的测定^[3] 将一定数量的基因转移前后的细胞种入 φ 60 mm 的塑料培养皿(Falcon 3002)中。第二天,吸走培养液,按预先设计的剂量用波长为 254 nm 的紫外光灯照射。XP 20 S(SV 40)细胞的照射剂量为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 J/m²。转化细胞为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 J/m²。照后用 PBS 缓冲液洗涤,加新鲜 DMEM 培养,每三天换一次培养液。二周后用结晶紫——甲醛液固定、染色。10 倍放大镜下计活存的细胞克隆数。以存活率为纵坐标,紫外照射剂量为横坐标,在半对数纸上画图。

实 验 结 果

1. HeLaS 3 细胞 DNA 导入 XP 20 s(SV 40)细胞。

用电脉冲介导和 DNA-磷酸钙共沉淀法将 HeLaS 3 细胞 DNA 与 PSV₂Neo DNA 导入 XP 20 S(SV 40)细胞后,经 400 μg/ml G 418 和 3 J/m² UV₂₅₄ 照射选择后,得到转化细胞,从中分离出三个转化细胞克隆,编号为 EP 2-1、EP 2-2(电脉冲介导法),CaPi 1-3(共沉淀法),并在 DMEM 中扩增。然后比较 XP 20 S(SV 40)、EP 2-1、EP 2-2、CaPi 1-3 细胞受紫外照射后的活存率,结果见表 1。可以看出 XP 20 S(SV 40)对紫外照射很敏感,活存率很低。植入 HeLaS 3 DNA 后,转化细胞对紫外线的抗性明显提高。当照射剂量为 1、2、3 J/m² 时,转化后细胞的活存率要比转化前高出 1~2 个数量级。反映细胞辐射敏感性的两个参数 Do(细胞平均致死剂量)和 D₃₇(37%细胞活存时的照射剂量)均比转化前增加。说明 HeLaS 3 细胞 DNA 已经在 XP 20 S(SV 40)细胞中表达。修补了它们切除修复基因的缺陷,提高了 XP 细胞对紫外辐射损伤的抗性。

2. 二次转化

导入 HeLaS 3 DNA 后,得到的第一次转化的 XP 细胞 CaPi 1-3,经 30 代传代培养,再从

Tab 1. Comparison of cell sensitivity to UV-irradiation

Cell	UV ₂₅₄ (J/m ²) Survival Fraction(%)			D ₀ (J/m ²)	D ₃₇ (J/m ²)
	1	2	3		
XP20S(SV40)	5	0.3	0.02	0.3	0.3
CaPi 1-3	35	6.2	1.7	0.6	1.0
EP 2-1	20	5.4	0.8	0.6	0.6
EP 2-2	35	4.5	0.6	0.6	1.0

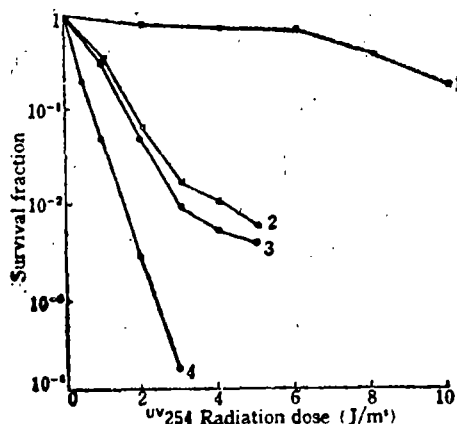


Fig 1. UV Survival Curves of XP 20 S (SV 40), First and Secondary Transfectant Clles.

× 1: HeLaS 3 △ 2: XP 20 S/HeLaS 3 DNA (CaPi 1-3) ○ 3: XP 20 S/(XP/S 3 DNA)DNA ● 4: XP20 S (SV 40)

Tab 2. Number of G₄₁₈ and 3 J/P² UV resistant colonies

DNA Fragments	G ₄₁₈ ^r colonies	3J/m ² UV ^r colonies
Bgl I	120	104
Xho I	144	74
Xba I	124	2
Sal I	108	0
EcoR I	98	0
DNase I	142	0

CaPi 1—3 细胞中提取 DNA, 用与第一次转化完全相同的方法, 与 PSV₂ Neo DNA 一起导入 XP 20 S(SV 40)细胞, 做二次转化实验。经 400 μg/ml G 418 和 3 J/m²UV 照射两次选择后, 得到二次转化的细胞。紫外照射活存率测定证明, 二次转化的细胞 XP/(XP/S 3) DNA 与一次转化的细胞 XP/S 3 DNA (Capi 1—3)

具有相似的紫外抗性(图 1), 都比未转化的 XP 细胞的紫外抗性有明显的提高。提示 HeLaS 3 DNA 中的有关切除修复基因已经整合到 XP 20 S(SV 40)细胞的基因组中, 并在其中得到稳定表达。

3. HeLaS 3 DNA 片段导入 XP 20 S(SV 40)细胞

HeLaS 3 细胞 DNA 经 EcoR I、Xba I、Sal I、Xho I、Bgl I 和 DNase I 消化后, 得到长度不同的 HeLaS 3 DNA 片段, 将它们分别与 PSV₂Neo DNA 一起用磷酸钙共沉淀法导入 XP 20 S (SV 40)细胞中。经 400 μg/ml G 418 第一次选择, 出现抗 G 418 的细胞克隆, 再经 3 J/m² UV₂₅₄ 照射进行第二次选择, 得到抗 3 J/m² UV₂₅₄ 的细胞克隆, 结果见表 2。当进行 G 418 第一次选择时, 六种酶切片段与完整的 PSV₂Neo DNA, 可以形成数目大体相等的抗 G 418 的转化克隆, 说明在共转移过程中, 这些 DNA 片段与 PSV₂Neo DNA 一起导入了 XP 细胞。将这些抗 G 418 克隆重新接种, 再用 3 J/m² UV₂₅₄ 选择后, DNase I、E. CoR I, Sal I 酶切组全部死亡, Xba I 组仅有二个抗 3 J/m² UV₂₅₄ 的转化克隆, 而 Bgl I、Xho I 组分别为 104 和 74 个转化克隆。把 Bgl I 和 Xho I 组的 3 J/m² UV₂₅₄ 抗性的转化克隆分离、扩增后, 比较它们与 XP 20 S(SV 40)细胞的紫外照射活存曲线(图 2), 发现 Bgl I、Xho I 酶切后的 HeLaS 3 DNA 片段, 可以提高 XP 20 S(SV 40)细胞的紫外抗性, 增加程度与一次转化和二次转化的实验结果基本一致。提示 HeLaS 3

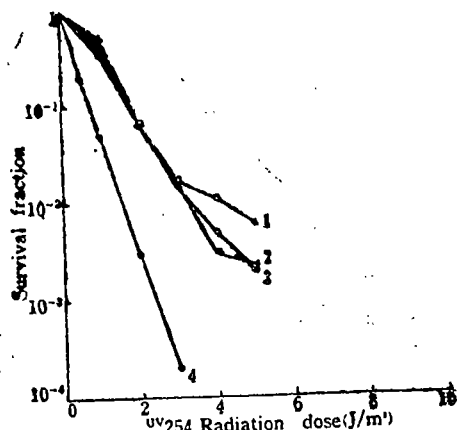


Fig 2. UV Survival Curves of XP 20 S (SV 40) and Transfectants by Digested HeLaS 3 DNA.

- △ 1: XP 20 S/HeLaS 3 DNA (CaPi 1-3)
- ▲ 2: XP 20 S/HeLaS 3 Xho I -DNA
- 3: XP 20 S/HeLaS 3 Bgl I -DNA
- 4: XP 20 S(SV 40)

细胞中所含的切除修复基因位于 Bgl I 和 Xho I 限制性核酸内切酶切割的 DNA 片段之内,换言之 Bgl I 和 Xho I 不会切断 HeLaS 3 DNA 中的切除修复基因。而 EcoR I, Xba I、Sal I 的酶切片段与 DNase I 一样,会切断、破坏 HeLaS 3 DNA 中的切除修复基因。即使这些酶切片段被导入 XP 细胞,但因切除修复基因已失去活性,亦不能修补 XP 细胞切除修复基因的缺陷。同时也提示对 HeLaS 3 DNA 的 Bgl I 和 Xho I 酶切片段进行深入的实验研究,就有可能最终分离克隆出人细胞的切除修复基因。

讨 论

(1) 实验中,我们采用基因共转移技术将供体细胞 HeLaS 3 DNA 与选择标记基因 PSV₂Neo DNA 一同导入 XP 受体细胞,然后经过二次选择,筛选

出转化细胞。第一次选择用的 G 418 可以破坏真核细胞核糖体,抑制真核细胞的蛋白质生物合成,几乎所有的哺乳动物细胞都不能在 G 418 中生长。细菌质粒 PSV₂Neo DNA 中含有新霉素抗性基因(Neo^R)^[4],它编码的产物可使 G 418 失活,所以用 G 418 进行第一次选择后,活存下来的细胞都是被导入了 PSV₂Neo DNA 的细胞,由于是基因共转移,在很大比例上,供体 HeLaS 3 DNA 亦被同时导入这些细胞。第二次选择再利用 XP 细胞对 UV₂₅₄ 照射敏感的特点,用大剂量 UV₂₅₄ 照射,筛选出 HeLaS 3 DNA 转化的细胞。根据我们多次预实验,用 HeLaS 3 DNA 和 PSV₂Neo DNA 共转化 5×10^5 个 XP 细胞,经 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G 418 选择后,最多可出现 150 个左右的活存细胞克隆,每个克隆平均含细胞 50 到 100 个,即在第二次选择前,细胞总数一般为 1.5×10^4 左右。预实验同时表明 XP 20 S(SV 40)细胞在 3 J/m^2 UV₂₅₄ 照射后,活存率为 2×10^{-4} 。所以用 3 J/m^2 UV₂₅₄ 做为第二次选择,足以淘汰那些只导入了 PSV₂Neo DNA 而没有导入 HeLaS 3 DNA 的细胞。经过这样两次选择基本上排除了细胞突变的可能性,得到了真正转化的细胞。

(2) 实验结果表明在六种酶切片段中, Bgl I 和 Xho I 切割后的 HeLaS 3 DNA 片段,可以提高 XP 细胞对 UV₂₅₄ 的辐射抗性。Bgl I 的识别序列为 GCCNNNN↓NGGC, Xho I 为 C↓TCGAG。Xho I 具有很强的专一性, Bgl I 中的 N 可是四种碱基中的任意一种。由此推测在 HeLaS 3 DNA 的 Bgl I 或 Xho I 酶切片段中含有切除修复基因,这个基因的内部不应含有 GCCNNNNNGGC 和 CTCGAG 的碱基排列方式。

(3) DNA 损伤修复一直是生命科学研究的前沿课题,已经发现在哺乳动物细胞中存在着多种修复 DNA 损伤的途径,紫外照射后的切除修复就是其中的一种。近年来,人们已经分离出原核细胞的切除修复基因 UVrA、UVrB、UVrC 和 UVrD,但真核细胞特别是哺乳动物细胞切除修复基因分离的工作,进展非常缓慢。其难点之一在于如何在哺乳动物细胞庞大的基因组中寻找出包括切除修复基因在内的 DNA 片段,并把这个分子量很大的切除修复基因导入这个基因有缺陷的细胞,使它们在受体细胞基因组中整合,表达。1980 年以来,世界上不少实验室致力于这个方

面的研究, 但仅有一篇将人横纹肌肉瘤细胞 DNA 导入 XP 细胞的报道^[6], 其它都是阴性结果^[6,7,8]。我们用两种基因转移方法, 采用共转化技术, 并通过两次选择筛选, 成功地将 HeLaS 3 细胞 DNA 及限制性核酸内切酶切后的片段导入 XP 细胞, 完成了二次转移和切除基因有效片段寻找的实验。紫外照射活存率测定证明, 得到的转化细胞呈现出一定的紫外抗性。这说明 HeLaS 3 DNA 中的切除修复基因在 XP 细胞修复 DNA 紫外损伤过程中发挥了作用。这些都为分离哺乳动物细胞的切除修复基因迈出了重要的一步。

* 本课题得到国家自然科学基金和军事医学科学院青年科研基金的资助。XP 20 S(SV 40)和 HeLaS 3 细胞由日本京都大学放射线生物研究中心池永满生教授惠赠。

参 考 文 献

- [1] E. Neumann, EMBO, 7, 841 (1982).
- [2] F. L. Graham, Virology, 52, 456(1973).
- [3] M. Ikenaga, Jpn. J. Hum. Genet., 28, 1 (1983).
- [4] P. J. Southern & P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1(4)327 (1982).
- [5] T. Takano, M. Noda. and T. Tamura, Nature, 296, 269 (1980).
- [6] A. R. Lehmann, Mutat. Res., 150, 61(1985).
- [7] H. L. Green, J. Cell. Sci. Suppl., 6, 127(1987).
- [8] A. Matsumoto and Y. Fujiwara (E. M. Fielder, Ed) Radiation Research Proceeding of the 8th International Congress of Radiation Research, Taylor & Francis, Edinburg, P. 110, 1987.

(稿件收到日期: 1988 年 8 月 8 日)

INCREASE OF UV-RESISTANCE IN XERODERMA PIGMENTOSUM CELLS BY HUMAN HELAS3 DNA TRANSFECTION

Zhang Yangpei, Bai Xiaobin, Chen Yueneng, Xu Huiying,
Fan Guocai and Xia Shouxuan

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT The DNA-mediated gene transfer had been carried out by both Calcium phosphate coprecipitation and electroporation method. The cellular DNA and DNA fragments from human cervical carcinoma HeLaS3 cells were introduced with PSV2Neo DNA into XP20S (SV40) cells. The transfectants were picked up after twice selections by G418 and 3J/m² UV-irradiation. The results showed that cellular DNA and Bgl I, Xho I digested DNA fragments from HeLaS 3 could correct the deficiency of excision repair gene in XP cells, and cause the recipient cells resistant to UV irradiation. The second transfection experiment confirmed that HeLaS3 DNA were really integrated into XP cell chromosome and stably expressed within the cell genome.

KEY WORDS UV-irradiation, Excision repair, Gene transfer, XP cell, HeLaS3 DNA