

人体红细胞血影把 ^{125}I 标记的蛋白质和核酸转入动物细胞的试验

李昌本 赵寿元

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

摘 要

从制备的 ^{125}I 标记的牛血清白蛋白和人体 DNA 片段, 分别进行了红细胞血影的装载试验, 装载效率分别为 3.7% 和 3.0%。装载试验有很好的重复性。通过仙台病毒介导将红细胞血影装载的 ^{125}I - 人体 DNA 片段转入 DON 细胞内, 经放射自显影注射率为 58%。

早些时候我们报道了人体红细胞在形成血影过程中, 可把蛋白质和噬菌体装载在红细胞血影内, 装载蛋白质的效率很高, 每个红细胞血影装入的牛血清白蛋白分子可达 10^7 , 且较稳定^[1]。由于人体红细胞血影里没有 DNA 酶、RNA 酶和蛋白质水解酶, 装载在里面的核酸和蛋白质等生物大分子不致于有被降解的危险^[2]; 因此, 有人把红细胞血影作为装载酶的工具, 注入体内以治疗某些先天性代谢缺陷^[3]。也有把血影细胞作为特定物质的载体或“微注射器”, 来研究这些物质在活细胞内的活动情况^[4-6]、基因调控^[7-11]和外源遗传信息的表达^[12,13]等。可是, 用红细胞血影来转移人的 DNA 还未见报道; 可以设想, 这类研究对于了解人体细胞内基因的结构和功能, 以及遗传病的基因治疗研究等将会提供重要的资料。本文主要介绍 ^{125}I 标记的牛血清白蛋白和人 DNA 片段由红细胞血影装载后, 通过细胞融合途径将它们转入动物细胞内。

一、材料和方法

1. 牛血清白蛋白 (BSA) 的同位素碘化标记

BSA Serva 公司出品, 结晶纯度大于 99%。

Na^{125}I 北京原子能研究所, 6mCi/0.3 毫升, 保护剂含量 1.5, 放射性纯度(包括 ^{126}I) 大于 99.9%。

用氯胺 T 法^[14,15]标记; 具体操作程序见图 1。

放射性脉冲计数条件 井型 γ 计数器, 前置放大 10 倍, 工作电压 1 千伏, 甄别阈三档。每次测试的自然本底均为实验前后各五次计数的平均值。

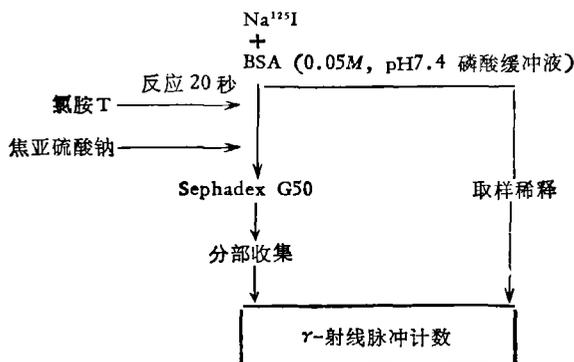


图 1 牛血清白蛋白的放射性碘化操作步骤

2. ^{125}I -DNA 片段

由本所蔡济东、柴建华同志制备提供。他们用流产胎儿为材料提取 DNA，经 DNase I 部分消化后，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳测定片段的大小。取平均长度为 450bp，范围在 100bp—1000bp 的 DNA 片段进行碘化标记； Na^{125}I 来源和放射性脉冲计数的条件和上述相同， ^{125}I -DNA 的比放射性为 50000cpm/微克。

3. 红细胞血影的装载试验

取 0.4 毫升经 rPBS(KCl 137mM, NaCl 2.7mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 1.5mM) 稀释的 ^{125}I -BSA (含蛋白质 0.7 毫克, 放射性为 2×10^6 cpm), 加入 0.1 毫升 20% (V/V) 的人体红细胞 (HRBC), 按照以前报道的方法装载^[1]。用 PBS (KCl 2.7mM, NaCl 137mM, Na_2HPO_4 8.1mM, KH_2PO_4 1.5mM) 离心洗涤 (2300rpm 5', 5—9 次, 由此制成装载 ^{125}I -BSA 的红细胞血影。

比放射性为 5×10^4 cpm/微克的人 DNA 片段, 用 rPBS 稀释至适当体积, 按 9:1 (V/V) 加入 50% (V/V) 的 HRBC 后, 对七倍稀释的 rPBS 低渗透析, 然后再对 PBS 等渗透析, BSS⁺ 液 (NaCl 140mM, KCl 5.4mM, Na_2HPO_4 0.34mM, KH_2PO_4 0.44mM, CaCl_2 1mM, Tris-HCl 10mM pH7.6) 离心洗涤 (2300rpm 5') 五次, 由此制成装载 ^{125}I -DNA 的红细胞血影。

4. “微注射”(融合)条件

DON 细胞株(中国仓鼠成纤维细胞)在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中长成单层后, 胰酶消化, 用 BSS⁺ 液制成细胞悬液 (10^6 /毫升), 作为红细胞血影转移所装载物质的受体细胞。

红细胞血影与受体细胞按 100:1 的比例, 在 4℃ 下混合后, 加入经紫外线灭活的仙台病毒, 最终浓度为每毫升 1000 个血凝单位。置 4℃ 冰浴中摇动 15 分钟, 37℃ 温浴放置 30 分钟。用不含血清的 RPMI 1640 培养液离心洗涤 (1000 rpm 5') 三次。最后一次离心洗涤沉淀下来的细胞团打匀后加入几滴小牛血清, 涂片, 空气干燥后甲醇固定。

5. 细胞涂片的放射自显影

甲醇固定的细胞涂片在 40℃ 恒温下涂核乳胶(核 #4, 北京原子能研究所), 室温下避光气干 2—3 小时, 浸闪烁液 (二氧六环 500 毫升, 2, 5-二苯基噁唑 3.5 克, 1,4-双 [5-苯基噁唑基]-二苯 100 毫克) 20 秒钟, 避光气干 2 小时, 自显 48 小时, 二氧六环浸洗除去残留的闪烁液, 水浸洗, 显影, 定影, 流水冲洗后, 气干。核固红 (1%) 染色, 镜检。

二、结果与讨论

1. 同位素碘化标记

蛋白质的碘化反应一般发生在酪氨酸残基上, 要得到比放射性较高的样品, 反应物必须是高浓度、小体积, 同位素投料也需大大过量^[14-16], 图 2 与图 3 的比较即反映了这一情况. 两图均反映 ^{125}I -BSA 经过 Sephadex G50 过滤后, 分部收集的各个试管中的放射性, 第一个峰是 ^{125}I -BSA, 第二个峰是游离的 Na^{125}I . 图 2 和图 3 用的是同一根凝胶柱, 由于后者反应物总体积较小, 分离效果也就较好.

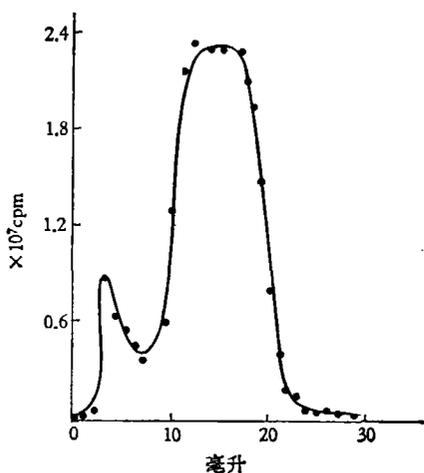


图 2 BSA 经 ^{125}I 标记后, Sephadex G50 过滤后各部分的放射性分布情况 (BSA 12 毫克, Na^{125}I 1.2×10^9 cpm; 凝胶柱 1×17 厘米, 流量 1 毫升/分, 反应总体积为 500 微升)

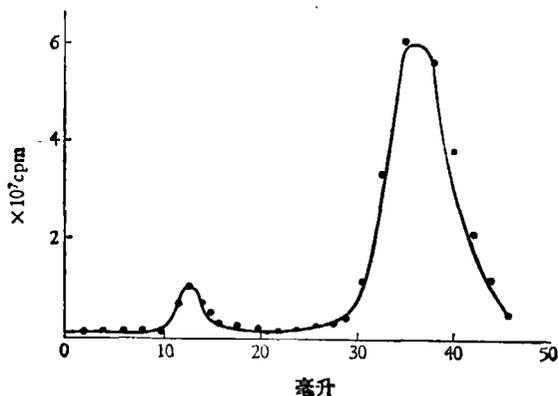


图 3 BSA 0.1 毫克, Na^{125}I 1×10^6 cpm, 反应总体积 100 微升, 凝胶柱 1×17 厘米, 流量 0.5 毫升/分; 凝胶过滤后的各部分的放射性分布

把图 2 中的第 3, 4, 5 支试管中的样品合并; 2, 6 两支合并, 用分光光度计分别测定 (O. D. 2800 埃) 这两份和第 7 管样品的蛋白质含量, 然后分别计算这三份样品的比放射性, 所得结果列于表 1.

表 1 Sephadex G50 过滤后各 BSA 部分的比放射性

管 号	3, 4, 5*	2, 6	7
总放射性 cpm	20461470	4933716	3851322
蛋白质质量 毫克	7.0	3.2	0.4
比放射性 cpm/毫克	2.9×10^6	1.5×10^6	1.2×10^6

* 下面的红细胞血影装载试验用的是这份样品.

2. 红细胞血影的装载效率

资料表明^[1,17], 在透析系统中待装载物质的浓度和投入的红血球总数不变的条件下, 红细胞血影装载物质的总量和血影的数目成正比, 而和投入的红血球总数无关. 因此, 可根据经充分洗涤后的红细胞血影所携带的放射性量来计算装载 ^{125}I -BSA 的效率, 结果见表 2.

表 2 ^{125}I -BSA 的血影细胞装载率

项目	放射性本底	^{125}I -BSA 投入量 (cpm)	实 验 I				实 验 II			
			A	B	a	b	A	B	a	b
放射性 (cpm)		1862520	1236	56550	1237	46988	1124	57514	—	41524
		1871592								
		1868496	1236	56391	1234	47062	1156	56961	—	41098
平均	774	1867536	1236	56471	1236	47025	1140	57238	—	41311
装载率%			3.7				3.8			

A: 第 6 次离心洗涤的上清液,

a: 第 9 次离心洗涤的上清液,

B: 第 6 次离心洗涤后的红细胞血影,

b: 第 9 次离心洗涤后的红细胞血影.

由表 2 可见,在一定条件下红细胞血影有一定的装载率且重复性很好,装载率与 Wesserman^[18] 的实验结果很接近. 此外,第 9 次离心洗涤上清液的放射性和第 6 次离心洗涤上清液的放射性一样,基本排除了细胞表面沾污放射性同位素的可能性,与我们过去的实验结果相符^[1]. 不过,每一次离心洗涤后,都会有一定数量的红细胞血影破裂而释出内含物,所以洗涤次数不宜过多,否则会降低红细胞血影的得率.

Auer^[19] 曾报道用红细胞血影来装载 T₂ 噬菌体的 DNA; Furusawa^[13] 也提到红细胞血影装载双链 DNA 的实验,但未发表具体数据. 因此,人体红细胞血影装载 ^{125}I 标记的人体 DNA 片段还属初次尝试,现将分别进行的两次装载实验的结果列于表 3.

表 3 ^{125}I -DNA 片段的红细胞血影装载效率

项 目	实 验 I				实 验 II			
	自然本底	cpm	A	B	自然本底	cpm	A	B
		0.5 微克 DNA				1 微克 DNA		
放射性 (cpm)		25061	954	1545		56232	911	2370
		24997	967	1520		56718	914	2344
		24826	987	1748		55764	891	2380
		24993						
平 均	789	24970	969	1604	764	56238	905	2365
装载率%	3.4				2.9			

A: 第 5 次离心洗涤的上清液, B: 第 5 次离心洗涤后的红细胞血影.

由表 3 可见,红细胞血影装载 ^{125}I - 人体 DNA 片段的效率在 3% 左右,实验的重复性也不错. 可是和 mRNA^[13] 和 rRNA^[11] 25% 左右的装载率相比,则要低很多. Schlegel 等^[20] 曾报道,红细胞血影装载 ^{32}P -rRNA, ^{32}P -snRNA 以及 ^{32}P -rRNA 的效率差别很大,前两者高达 25% 左右,而后者接近 0. 其原因可能包括装载方法和装载条件的不同,以及不同的核酸分子的理化性质和空间构型上的差异.

3. 红细胞血影与受体细胞融合

由于红细胞膜和大多数高等动物细胞膜上都有仙台病毒的受体,大大有利于通过病毒介导和类似细胞融合的过程将血影细胞内的装载物转入或“注入”受体细胞(图 4). 为使尽可

能多的受体细胞受到“注射”,同时尽量减少受体细胞之间彼此融合形成同型异核细胞的机会,我们采用高比率、稀病毒的融合条件;也就是红细胞血影与受体细胞数量之比为 100:1,紫外线灭活的仙台病毒加入量为每毫升 1000 血凝单位(最终浓度)。一般认为受体细胞与红细胞血影融合不会影响前者的分裂速率和形成克隆的效率^[20],融合后细胞的存活率达 95% 以上^[13]。

^{125}I -DNA 片段经血影细胞注入 DON 细胞后,在光学显微镜下检查融合细胞的放射自显影的银颗粒数(图 5),发现受体细胞接受 ^{125}I -DNA 的达 58%。同 Schlegel 等^[11]报道 ^3H -rRNA 的注射效率为 60% 相比,两者是相近的。但是,这次装载的人体 DNA 片段比较短,在 1000bp 以下,因此,还需进一步研究装载更大的 DNA 片段的可能性和装载效率,以探索遗传病的基因治疗的可能途径。

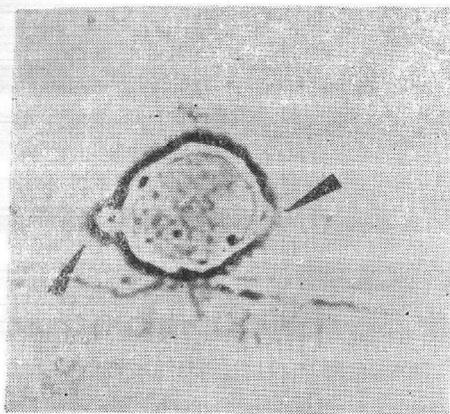


图 4 一个动物细胞正和两个红细胞血影融合(箭头所示)

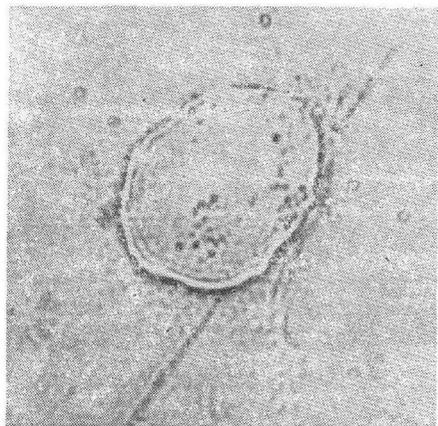


图 5 已经受到装有 ^{125}I -DNA 的红细胞血影“微注射”的一个动物细胞
(细胞内黑点是核乳胶经 ^{125}I -DNA 的 γ -线曝光后的银颗粒)

致谢: 徐丽玲同志参加部分工作。潘家勤同志协助显微摄影, 彭励吾、陆寿珍、郭兰萍同志协助同位素工作,特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 李昌本、赵寿元,科学通报, 26 (1981), 376—277.
- [2] Yamaizumi, M., Furusawa, M., Uchida, T. & Okada, Y., *Cell Struc. Funct.*, 3(1978), 293—304.
- [3] 孙定国, 国外医学遗传学分册, 4 (1980), 169—175.
- [4] Yamaizumi, M., Uchida, T., Mekada, E. & Okada, Y., *Cell*, 18(1979), 1009—1014.
- [5] Yamaizumi, M., Uchida, T. & Furusawa, M., *Cell*, 13(1978), 227—232.
- [6] Schlegel, R. A. & Rochsteiner, M. C., *Cell*, 5(1975), 371—378.
- [7] Capecchi, M. R., Vonder Haar, R. A., Capecchi, N. E. & Sveda, M. M., *Cell*, 12(1977), 371—381.
- [8] Yamaizumi M., Uchida, T. & Okada, Y., *Nature*, 273(1978), 782—784.
- [9] Rechsteiner, M. C. & Kuehl, L., *Cell*, 16(1979), 901—908.
- [10] Kaltoft, K., Zenthen, J., Engback, F., Piper, P. & Celis, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(1976), 2793—2797.
- [11] Schlegel, R. A., Darrah, L. B. & Rechsteiner, M., *Molecular mechanisms in the control of gene expres-*

- sion, 1976, 465—470.
- [12] Anderson, W. F. & Krueger, L. J., *J. Cell Biol.*, **70**(1967), 185a.
- [13] Furusawa, M., *Internat. Rev. Cytol.*, **62**(1980), 29—67.
- [14] Work, T. S. & Work, E., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, **6**(1978), 343—374.
- [15] Greenwood, F. C., *Biochem. J.*, **89**(1963), 114—123.
- [16] Opresko, L., Wiley, H. S. & Wallace, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**(1980), 1556—1560.
- [17] Rechsteiner, M., *Exptl. Cell Res.*, **93**(1975), 487—492.
- [18] Wasserman, M., Zakai, N., Loyter, A. & Kulka, R. G., *Cell*, **7**(1976), 551—556.
- [19] Auer, D. & Brandner, G., *Z. Naturforsch.*, **31c**(1976), 149—151.
- [20] Schlegel, R. A. & Rechsteiner, M. C., *Method in Cell Biology*, **20**(1979), 341—354.