

# RNA/DNA 嵌合分子介导的高效基因修复

汤富酬 韩 嵘 薛友纺

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

**摘要:** 本文介绍了 RNA/DNA 嵌合分子介导的高效基因修复技术。这一技术是 1996 年开始发展起来的全新技术,它通过人工合成的双链开环 RNA/DNA 嵌合分子转染细胞而使特定基因靶位点产生单碱基改变,从而修复突变基因。这一技术高效(目前最高可达 50% 以上)、特异性强、安全、无随机插入致变的危险、无免疫反应、无明显毒性,能够用于定点突变、基因敲除、动植物功能基因组学、药物遗传学等很多方面的研究,在不久的将来能够应用于人类基因治疗,具有很高的应用价值和医学前景。

**关键词:** RNA/DNA 嵌合分子;基因治疗;基因修复

中图分类号: Q52 文献标识码: A 文章编号: 0253-9772(2000)04-0265-04

## Targeted Gene Correction Directed by Chimeric RNA/DNA Oligonucleotides

TANG Fu-chou, HAN Rong, XUE You-fang

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract:** We introduce a new technique-targeted gene correction directed by chimeric RNA/ DNA oligonucleotides which began at 1996. It uses synthetic double-stranded non-circular RNA/ DNA chimeric oligonucleotides to transfect cells and make a single-based change at the targeted site of the target gene. It is highly efficient (the highest efficiency is more than 50%), highly special, safe, without danger of mutation caused by random insertion, without immune response, and without obvious toxicity. It can be used to make point mutation, or gene knock-out plants and animals, and is very likely to be used in human gene therapy in the near future. It is also valuable in the study of functional genomics, pharmacogenetics, and medicine.

**Key words:** RNA/DNA chimeric oligonucleotides; gene therapy; gene correction

在过去的 20 年中科学家们一直在试图用 DNA 或 RNA 疗法治疗遗传疾病、癌症和传染病。科学家们的努力虽然已经取得了很大进展,但是在实际应用中仍然困难重重,临床治疗的成功率很低<sup>[16,22]</sup>。

一般的基因治疗大部分采用的是基因转入 (gene addition) 的方法,即向细胞内转入原有缺陷基因的功能正常的拷贝。但是这种方法有很多缺陷<sup>[22]</sup>: (1) 基因常常很大,含有许多外显子和复杂的调控序列,调控序列甚至可能距离表达序列数百个 kb<sup>[17]</sup>,常常使构建运载体很困难,有时甚至不可能; (2) 运载体通常是病毒载体,虽然转染效率高,但是会产生免疫反应,特别是多次使用时会明显减弱转入基因的表达效率; (3) 一般的基因治疗采用的都是将正确拷贝的基因

随机整合入基因组中。随机插入的正确拷贝的基因要得到合适的表达和平衡是很困难的,因为许多基因的表达是受到严密控制的,并且严格依赖于基因上下游的 DNA 序列 (context dependent),而且随机整合有插入致变的危险。采用同源重组 (homologous recombination) 的办法将正确拷贝的基因打靶到对应的缺陷基因位置上,虽然能够克服随机整合带来的问题<sup>[22]</sup>,但是这种方法效率非常低,远远达不到基因治疗的临床要求。

近年来发展起来的 RNA/DNA 嵌合分子介导的基因修复 (targeted gene correction directed by chimeric RNA/ DNA oligonucleotides) 技术<sup>[23]</sup>克服了上述缺点,将对人类疾病的基因治疗产生重要影响。

收稿日期: 2000-01-24; 修回日期: 2000-04-10

基金项目: 国家自然科学基金 (39730250) 资助

作者简介: 汤富酬 (1975-) 男, 沈阳市人, 博士生, 专业: 遗传学。电话: 010-62751858; E-mail: tangchou@263.net

致谢: 谨对尚克刚教授对本文写作的直接指导和仔细审阅表示衷心的感谢。

## 1 RNA/DNA 嵌合分子介导的基因修复的机制

RNA/DNA 嵌合分子介导的基因修复 (targeted gene correction), 也可称为基因转变 (targeted gene conversion), 是指用含有 RNA 成分的寡核苷酸分子 (一般长 68nt) 转染细胞, 利用细胞内 DNA 错配修复机制, 改变靶基因上的特定碱基的过程。1996 年, 托马斯杰弗逊大学癌症研究所的 Kmiec 小组在美国科学院院报上发表文章<sup>[23]</sup>, 开创了 RNA/DNA 嵌合分子介导的基因修复的时代。早在 1994 年, Kmiec 小组在研究 RecA 蛋白介导的 DNA 配对 (DNA pairing) 时发现, RNA 能极大地提高 DNA 配对的效率<sup>[10]</sup>, 而他们认为 DNA 配对的效率是同源重组的关键步骤。据此, 他们设计了一种 RNA/DNA 嵌合在一起的寡核苷酸分子<sup>[23]</sup> (图 1)。在要改变的碱基处设计 5 个 DNA 碱基 (脱氧核糖核苷酸), 两侧分别加上 10 个 RNA 碱基 (核糖核苷酸), 并对其中 RNA 碱基的 2 的 -OH 进行甲基化修饰, 然后在 3' 端加上 5 个 GC 保护碱基, 再在两端各加上 4 个 T 碱基, 然后回折成互补双链 (全长 68 个碱基)。这一人工合成分子的二级结构呈 A 型螺旋 (A-DNA)<sup>[22]</sup>。在要改变的碱基两侧的 24 个碱基与靶位点的序列完全互补, 只有要改变的那个碱基不同。

RNA/DNA 嵌合分子两端形成的发卡结构可以防止嵌合分子被细胞内的核酸外切酶降解, 防止解旋酶使嵌合分子不稳定, 而且还可以防止形成首尾相接的多联体分子; RNA 成分的存在将极大地提高同源配对的效率; 对嵌合分子中的 RNA 碱基进行甲基化修饰, 可以防止嵌合分子被 RNase H 降解。不形成共价闭环的目的是允许嵌合分子自由进行拓扑翻转, 有利于同源配对<sup>[22]</sup>。

Kmiec<sup>[11]</sup>认为 RNA/DNA 嵌合分子介导的基因修复的可

能机制是 (图 2): (1) 在脂质体的帮助下, 嵌合分子穿过细胞膜与核膜, 进入细胞核<sup>[23-24]</sup>; (2) Rec A 样蛋白<sup>[7-10]</sup>参与的 DNA 配对, 使嵌合分子与染色体上靶位点 DNA 形成双 D 环结构, RNA 成分的存在大大提高了这一结构的稳定性, 增加了它的半衰期, 这正是提高同源重组效率的关键; (3) 很可能是 DNA 错配修复机制介导碱基转变这一过程。在 DNA 错配修复相关酶的参与下, 以 RNA/DNA 嵌合分子为模板, 将靶位点不配对的碱基替换成与模板配对的碱基, 而且这一转变是可遗传的, 有表型效应。原核细胞和真核细胞中都存在有能力介导这种反应的细胞机制。

## 2 RNA/DNA 嵌合分子介导的基因修复技术的发展

### 2.1 体外基因修复

1996 年 3 月, Kmiec 小组利用 RNA/DNA 嵌合分子, 用脂质体转染的方法转染中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cells, CHO 细胞), 实现对细胞中瞬时转染 (transient transfection) 的质粒上 (染色体外质粒 extrachromosomal plasmid) 对应位点的单碱基改正 (A→G), 效率高达 30% 以上<sup>[23]</sup>。随后, 该小组又利用这一技术对镰刀型贫血症病人的永生化的淋巴细胞系进行打靶, 使 β-珠蛋白基因由突变型转变成野生型 (GTG→GAG, Val→Glu), 转变的效率高达 50% 以上<sup>[5]</sup>。该技术具有很高的特异性和安全性, 未观察到非靶位点碱基的改变。在与 β-珠蛋白在此靶位点的 25 个碱基只差 2 个碱基的 δ-珠蛋白基因中, 也未检测到任何碱基改变。对于 Hprt 位点的检测表明, 细胞的自发突变率无任何明显改变。

1997 年, Kmiec 小组利用 RNA/DNA 嵌合分子实现了对人体正常细胞的基因转变。他们使人正常红细胞前体细胞 (CD34+ 细胞) 中的 β-珠蛋白基因发生了碱基转变 (GAG→

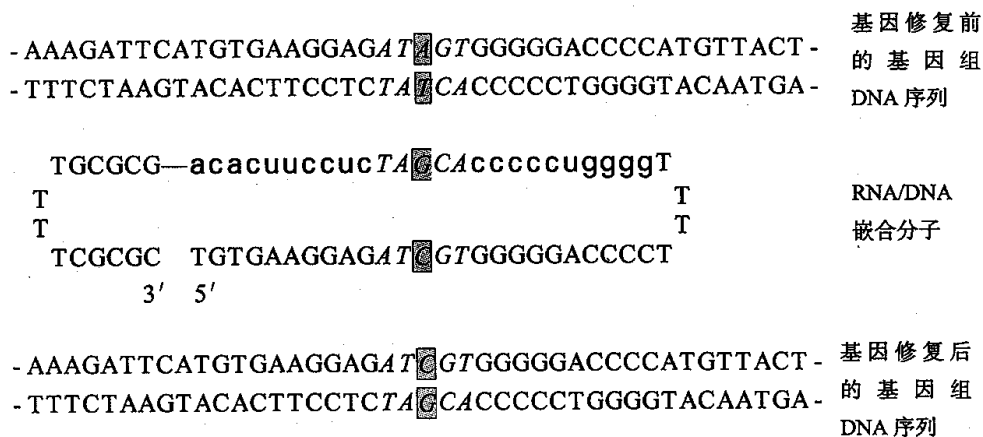


图 1 RNA/DNA 嵌合分子示意图 (仿 Kren 等, 见参考文献 [12])

小写字母代表甲基化修饰的 RNA 碱基, 大写字母代表 DNA 碱基, 灰色方框代表的是要改变的错配碱基, 斜体大写字母代表的是以要改变碱基为中心的 5 个 DNA 碱基

Fig. 1 RNA/DNA chimeric oligonucleotides (After Kren et al, see reference [12])

The 2'-O-methyl RNA residues are in lowercase type and DNA residues are in uppercase type. The target site is in solid box and the five DNA residues surrounding the target site are in italic type

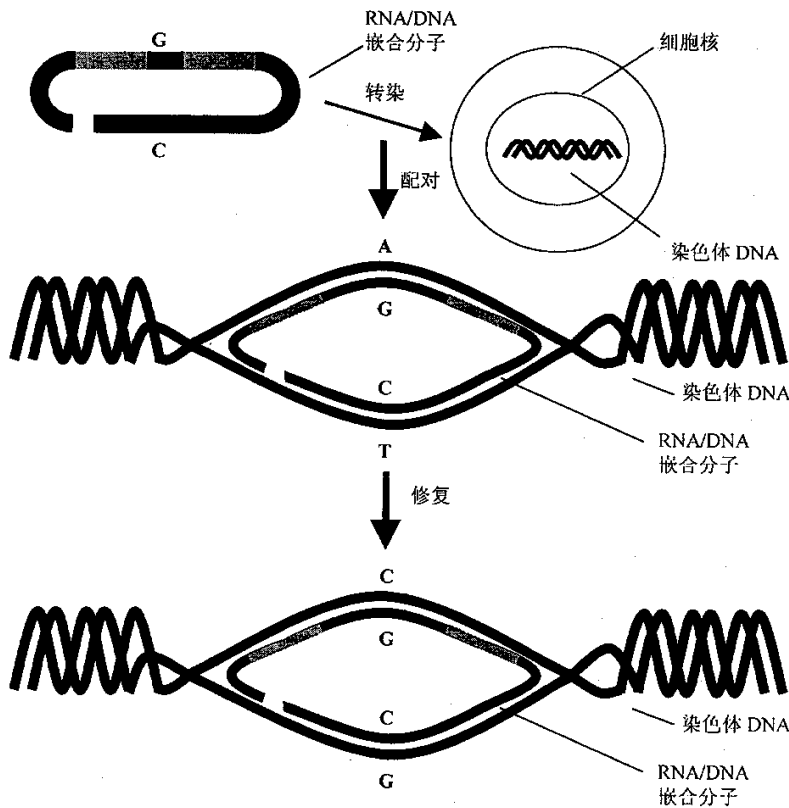


图2 RNA/DNA 嵌合分子介导的基因修复的可能机制的示意图  
(仿 Kmiec 见参考文献[11])

嵌合分子中灰色部分为 RNA(核糖核苷酸)成分,黑色部分为 DNA  
(脱氧核糖核苷酸)成分

Fig. 2 The mechanism of targeted gene correction directed by chimeric RNA/DNA oligonucleotides (After Kmiec, see reference[11])

In the chimeric oligonucleotides, the RNA part is in grey and the DNA part is in dark

GTG, Glu→Val)<sup>[21]</sup>,效率达 10%~13%。体外基因修复的成功,为体内基因修复打下了基础,并且表明用这一技术进行离体 *Ex Vivo* 的基因治疗是可行的。

体外基因修复中检测碱基转变的主要手段是 PCR 扩增基础上的 RFLP 检测和测序检测,有可能产生扩增假象<sup>[23]</sup>,所以一直有人对这一技术的有效性表示怀疑<sup>[20,22]</sup>。而且如此高的基因修复效率也使人难以置信,因为在同源重组技术很成熟的小鼠 ES 细胞中用长达数 kb 的同源 DNA 序列进行基因打靶,同源重组效率一般也只有  $10^{-5} \sim 10^{-6}$ <sup>[14,15,19]</sup>。直到 1998 年 12 月,托马斯杰弗逊大学医学院的 Yoon 小组打靶修复了小鼠黑色素细胞酪氨酸酶基因的点突变(TCT→TGT, Ser→Cys),细胞基因转变后产生出黑色素,实现了基因修复的直接表型检测<sup>[1]</sup>。表型转变率最高达 15%。完全证实了这一方法的有效性和可靠性。

## 2.2 体内基因修复

1998 年,明尼苏达大学医学院的 Steer 小组通过尾静脉注射 RNA/DNA 嵌合分子使大鼠肝细胞中的凝血因子 IX 基

因发生单碱基改变(AGT→CGT, Ser→Arg),由血友病野生型转变成突变型<sup>[12]</sup>。通过个体水平的检测发现,经过两次尾静脉注射(连续两天,每天注射一次),肝脏细胞基因转变比率高达 40%。不久,他们又改进了转染系统,通过尾静脉注射,使大鼠肝脏细胞中的凝血因子 IX 基因单碱基改变的比率高达 48%<sup>[3]</sup>。而且效果稳定,注射后 18 周的检测结果与注射后 1 周的检测结果没有明显差别。Steer 小组尝试了 4 种高效的体内(*in Vivo*)转染系统,都具有易于制备、性质稳定、毒性小、转染结果可靠、重复性好的优点。

至此,多数研究表明,这一方法对于单碱基替换的基因修复效率可高达  $10^{-1}$ ,但是对于碱基插入或缺失的基因修复,效率至少要低一个数量级<sup>[23]</sup>。1999 年 8 月,Steer 小组取得突破,利用 RNA/DNA 嵌合分子修复了作为遗传性黄疸病(Crigler-Najjar syndrome,克-纳二氏综合征)的大鼠动物模型的尿苷二磷酸-葡萄糖苷转移酶(UDP-glucuronosyltransferase)基因<sup>[13]</sup>,实现一个碱基(G)在靶位点的插入,使该基因由突变型转变为野生型。对于体外细胞系,转染一次,碱基插入效率即高达 15%;再转染一次,碱基插入效率可达 23%暗示这一方法可能具有累加效应。通过尾静脉注射患病大鼠(连续 5 天,每天注射 1 次),特异性地打靶肝脏组织,肝脏中碱基插入效率可达 20%,而且修复效果 6 个月以后仍然稳定。肝脏组织中尿苷二磷酸-葡萄糖苷转移酶的含量恢复至野生型的 8%~15%。

以上研究表明这一技术已经渐趋成熟。这一技术的创始人 Kmiec 认为,在不远的将来,这一技术将对人类遗传疾病和获得性疾病(例如:癌症,病毒感染引起的疾病等)的基因治疗产生重要影响<sup>[11]</sup>。与传统基因治疗方法相比,这一技术具有很多优点<sup>[22]</sup>:(1)遗传缺陷得到准确纠正的同时,不存在插入致变的危险;(2)载体本身是很小的寡核苷酸分子(一般只有 68nt),不会像病毒载体那样产生免疫反应;(3)具有很强的普适性,可以在很多种细胞中使用;(4)如果转染系统设计合理,可以特异性地只对功能缺陷需要纠正的细胞或组织进行打靶。

随着这一技术的成熟,该技术被用于非正当目的的潜在危险也越来越明显<sup>[22]</sup>,有必要广泛讨论这一技术的正当应用和非正当应用,并尽早制定出相应的措施和规范。

### 2.3 其他方面的应用

事实上,这一技术的应用已经不仅局限于哺乳动物细胞和组织的基因转变<sup>[2]</sup>和人类疾病的基因治疗,还可以用于定点突变、基因敲除、等位基因置换等很多方面<sup>[25]</sup>,对于功能基因组学的研究和药物遗传学的研究也都将有明显的推动作用<sup>[11]</sup>。1998年Kumar和Metz等人利用RNA/DNA嵌合分子在大肠杆菌中实现基因转变<sup>[22]</sup>,使抗四环素抗性缺陷型转变为野生型(A→T),抗卡那霉素抗性缺陷型转变为野生型(G→T→C)。

1999年7月,康奈尔大学的May研究小组利用RNA/DNA嵌合分子在烟草中实现基因转变。通过电穿孔或基因枪将嵌合分子导入细胞核,使乙酰乳酸合成酶基因定点突变(CCA→CAA,Pro→Glu),产生抗除草剂特性,基因转变的效率比对照组提高2个数量级<sup>[4]</sup>。与此同时,PHBI公司的Bowen小组利用这一技术使玉米的乙酰乳酸合成酶基因发生转变(AGT→AAT, Ser→Asn)转变效率大约为0.01%,比植物中通常的同源重组效率高1~3个数量级<sup>[25]</sup>。因此,这一技术可能对于植物的功能基因组学研究具有重要意义。

### 2.4 RNA/DNA嵌合分子介导的基因修复技术的局限性

但是,目前这一技术也存在一些问题<sup>[18]</sup>:只适合于改变一般为一个碱基的修复,不能用于修复多个碱基发生改变的缺陷基因<sup>[23]</sup>;基因修复效率不稳定<sup>[1]</sup>,每批独立实验的结果都有差异,有时甚至差异极大;对转录链和非转录链的打靶效果,有的实验认为有很大差别<sup>[23]</sup>,有的认为无差别<sup>[3,11,12]</sup>;植物中基因转变的碱基改变不全都在预先设定的位点,而且预设位点的碱基改变也不全都与预想的相同<sup>[4,25]</sup>。

随着RNA/DNA嵌合分子介导的基因修复技术的不断完善,这一技术在人类的基因治疗<sup>[22]</sup>、植物基因治疗<sup>[8]</sup>、动植物功能基因组学<sup>[4,9,25]</sup>、药物遗传学<sup>[11]</sup>等方面都将有重要的应用价值。对于动植物DNA错配修复机制的深入了解<sup>[4,6,25]</sup>也将有促进作用。

### 参考文献:

- Alexeev V, Yoon K. Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 1343 ~ 1346.
- Alexeev V, Igoucheva O, Domashenko A, et al. Localized in vivo genotypic and phenotypic correction of the albino mutation in skin by RNA-DNA oligonucleotide[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 43 ~ 47.
- Bandyopadhyay P, Ma X, Linehan-Stieers C, et al. Nucleotide exchange in genomic DNA of rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (15): 10163 ~ 10172.
- Beetham P R, Kipp P B, Sawycky X L, et al. A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (15): 8774 ~ 8778.
- Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, et al. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA ~ DNA oligonucleotide[J]. *Science*, 1996, 273: 1386 ~ 1389.
- Feldmann K A. The greening of chimeric oligonucleotides[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 857 ~ 858.
- Genschel J, Littman S J, Drummond J T, et al. Isolation of MutS-beta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS-beta and MutS-alpha[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (31): 19895 ~ 19901.
- Hohn B, Puchta H. Gene therapy in plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (15): 8321 ~ 8323.
- Kipp PB, Van Eck JM, Beetham PR, et al. Gene targeting in plants via site-directed mutagenesis[J]. *Methods Mol Biol*, 2000, 133: 213 ~ 221.
- Kmieciak E B, Cole A, Holloman W K. The REC2 gene encodes the homologous pairing protein of *Ustilago maydis*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(11): 7163 ~ 7172.
- Kmieciak E B. Targeted gene repair[J]. *Gene Therapy*, 1999, 6: 1 ~ 3.
- Kren B T, Bandyopadhyay P, Steer CJ. In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides[J]. *Nature Medicine*, 1998, 4: 285 ~ 290.
- Kren B T, Parashar B, Bandyopadhyay P, et al. Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (18): 10349 ~ 10354.
- Mansour S L, Thomas K R, Capecchi M R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes[J]. *Nature*, 1988, 336: 348 ~ 352.
- Morgan R A, Anderson W F. Human gene therapy[J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 191 ~ 217.
- Morgan R A, Blaese RM. Gene therapy: lessons learnt from the past decade[J]. *British Medical Journal*, 1999, 319: 1310 ~ 1318.
- Pham C T N, Macivor D M, Hug B A, et al. Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13090 ~ 13095.
- Schuster MJ, Wu GY. Chimeric oligonucleotides: an exciting answer that raises more questions[J]. *Hepatology*, 1998, 28(2): 594 ~ 596.
- Thomas K R, Capecchi M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells[J]. *Cell*, 1987, 51: 503 ~ 512.
- Thomas K R, Capecchi M R. Recombinant DNA technique and sickle cell anemia research[J]. *Science*, 1997, 275: 1404.
- Xiang Y, Cole-Strauss A, Yoon K, et al. Targeted gene conversion in a mammalian CD34<sup>+</sup>-enriched cell population using a chimeric RNA/DNA oligonucleotide[J]. *J. Mol. Med.*, 1997, 75: 829 ~ 835.
- Ye S, Cole-Strauss A, Frank B, et al. Targeted gene correction: a new strategy for molecular medicine[J]. *Molecular Medicine Today*, 1998, 6: 431 ~ 437.
- Yoon K, Cole-Strauss K, Kmiec E B. Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA(DNA oligonucleotide)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 2071 ~ 2076.
- Zelphati O, Szoka F C. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (21): 11493 ~ 11498.
- Zhu T, Peterson D J, Tagliani L, et al. Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (15): 8768 ~ 8773.