

文章编号: 1009-038X(2004)04-0006-04

# 质粒 DNA 经胃肠道吸收整合宿主基因组的可能性评价

刘建文, 施用晖, 乐国伟\*, 方希修  
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 给小鼠灌胃裸 pcDNA3s 质粒 DNA, 于 3 周后提取小鼠肺、肾、脾、肠系膜淋巴结、胸腺、生殖器官、肌肉及肝脏组织中的总 DNA, 琼脂糖凝胶分离游离质粒 DNA 与基因组 DNA, 以组织基因组 DNA 为模板, PCR 法检测质粒 DNA 的整合率. 对照模板中加入不同拷贝数的 pcDNA3s 质粒, 确定 PCR 反应的敏感性. 结果表明, 各组织基因组 DNA 经 PCR 扩增均呈阴性, 低于 PCR 反应的最低检出率. pcDNA3s 质粒可能整合入宿主基因组的拷贝数是基因自发突变率的 1/3 000, 尚未发现外源质粒 DNA 经胃肠道途径整合入宿主基因组的证据.

**关键词:** 质粒 pcDNA3s; 宿主基因组; 整合

中图分类号: Q 782

文献标识码: A

## Plasmid DNA : Investigation of Integration into Host Cellular DNA Following Absorption Via the Gastrointestinal Tract

LIU Jian-wen, SHI Yong-hui, LE Guo-wei\*, FANG Xi-xiu

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Samples including lung, kidney, spleen, mesenteric lymph node, thymus, gonads, muscle and liver were obtained 3 weeks after oral administration of pcDNA3s plasmid in mice. Genomic DNA can be assayed for integrated plasmid by PCR after purification of high-molecular-weight genomic DNA away from free plasmid using gel electrophoresis. The sensitivity of PCR reaction was determined by PCR amplification of the control tissue genome after administering different copies pcDNA3s plasmid. The result indicated that each tissue genome was negative after PCR amplification and it was lower than the sensitivity of PCR reaction. The potential copies of pcDNA3s integration into host cell genome was about 1/3 000 of the spontaneous mutation. It was indicated that foreign plasmid DNA was genetically safe after uptake via the gastrointestinal tract.

**Key words:** plasmid pcDNA3s; host cell genome; integration

胃肠道是哺乳动物吸收外源性 DNA 的主要途径,人和动物不断地通过食物摄入大量的外源 DNA. 食物中的 DNA 主要以 DNA-蛋白质复合物的

形式存在<sup>[1]</sup>. 研究表明,大部分外源 DNA 在胃肠道中降解为较小的碎片随粪便排出,约有质量分数 1%~2%的外源 DNA 通过肠道上皮细胞和肠壁淋

收稿日期: 2003-12-17; 修回日期: 2004-02-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270970)资助课题.

作者简介: 刘建文(1977-),男,福建仙游人,分子生物学与营养博士研究生;\* 项目负责人.

巴结运送到血液白细胞、脾脏及肝脏中,并发现外源DNA会插入到小鼠脾脏基因组DNA中,与基因组DNA共价相连<sup>[2-5]</sup>。外源DNA整合到宿主染色体基因组上会扰乱正常的基因组功能,引起宿主基因组的缺失或重排,改变宿主基因组相关基因的转录活性,可能激活原癌基因、抑制抑癌基因而导致癌变<sup>[6-8]</sup>。宿主基因组会启动改变甲基化模式的防御机制来抵抗外源DNA的入侵<sup>[2]</sup>。食物中含有大量的外源DNA,通过胃肠道途径摄入外源DNA必将影响宿主DNA的正常功能,从而对进化产生深远的影响。本实验采用基因重组质粒pcDNA3s作为外源DNA,通过胃肠道途径给药探讨外源质粒pcDNA3s整合入小鼠宿主基因组的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

昆明种小鼠,约6周龄,雌雄各半,体重 $20 \pm 2$  g,由江苏省实验动物中心提供。

### 1.2 菌株与质粒

大肠杆菌JM109及重组质粒pcDNA3s由本室保存。pcDNA3s上BamHI与EcoRI位点之间插入HBsAg抗原基因,长度为930 bp,质粒pcDNA3s总长约6400 bp。pcDNA3s上具有CMV启动子,可在大肠杆菌中复制,在真核细胞中表达外源抗原,是一种典型的真核表达载体。

### 1.3 质粒的制备

碱裂解法大量提取5 L发酵液,酚/氯仿/异戊醇抽提,2倍体积无水乙醇沉淀,RNase去除RNA,聚乙二醇纯化,TE(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA pH8.0)溶解沉淀,-20℃保存备用<sup>[9]</sup>。

### 1.4 动物试验

将26只小鼠分为两组:一组为质粒pcDNA3s口服组20只(雄性10只,雌性10只);一组为TE溶液对照组6只(雄性3只,雌性3只)。给每只小鼠灌注200 μL pcDNA3s质粒溶液(1 μg/μL),1次/周,共3次,对照组采用TE溶液灌喂。于3周时分离肺、肾、脾、肠系膜淋巴结、胸腺、生殖器官(卵巢/睾丸)、肌肉及肝脏,分离后的组织分别放入塑料袋中封口,在液氮中快速冷冻,于-80℃保存待用。

### 1.5 组织中总DNA的提取

取50 mg的新鲜组织加入DNA提取缓冲液[0.4 mol/L NaCl,10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),2 mmol/L EDTA(pH 8.0)],用匀浆器彻底匀浆后,加入40 μL质量分数10%的SDS,32 μL 5 mg/mL蛋

白酶K(终质量浓度400 μg/mL);充分混匀后放入55℃水浴锅中温浴2 h,加300 μL 6 mol/L NaCl,混匀,10 000 g离心30 min;移上清液到另一离心管中,等体积的酚-氯仿抽提一次,无水乙醇沉淀;沉淀得到的DNA用400 μL 20 μg/mL的RNase溶液溶解,37℃水浴30 min,等体积的酚-氯仿、氯仿各抽提一次,无水乙醇沉淀;沉淀以体积分数70%的乙醇洗涤后用无菌水溶解。检测DNA样品在260 nm/280 nm下的光密度值,确保两者之比大于1.8;用质量分数0.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,确保DNA的完整性并无RNA<sup>[9]</sup>。

### 1.6 基因组DNA的分离纯化

质粒在细胞中有3种存在方式:游离状态、多聚状态及整合入细胞基因组的质粒。将各组基因组DNA用EcoRI酶切,使游离状态及多聚状态质粒变成线性单体(整合入基因组的质粒只能在酶切位点才将基因组切开,而不能将质粒从基因组上切下),在质量分数0.5%琼脂糖凝胶下,100 V、电泳4 h、小量柱式胶回收试剂盒回收基因组DNA<sup>[10-13]</sup>。

### 1.7 PCR敏感参照

以对照组各种组织基因组DNA为模板,加入不同梯度拷贝数的质粒pcDNA3s。上游引物:5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA 3';下游引物:5' TAG TTG ATG TTC CTG GAA GTA 3'。上游引物取自pcDNA3s骨架上的T7启动子,下游引物取自pcDNA3s上HBsAg抗原部分基因序列,扩增产物长度为396 bp,引物设计采用oligo 6.0软件。

PCR反应体积50 μL,含有10×缓冲液(含15 mmol MgCl<sub>2</sub>),dNTP各200 μmol/L,上下游引物各100 pmol,DNA模板10 μL,TaqDNA聚合酶1 μL,无菌去离子水36 μL。PCR扩增热循环条件如下:第1循环,95℃10 min;第2循环94℃1 min,55℃1 min,72℃1 min,35次循环;第3循环,72℃10 min,4℃保存。PCR产物于质量分数2.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。

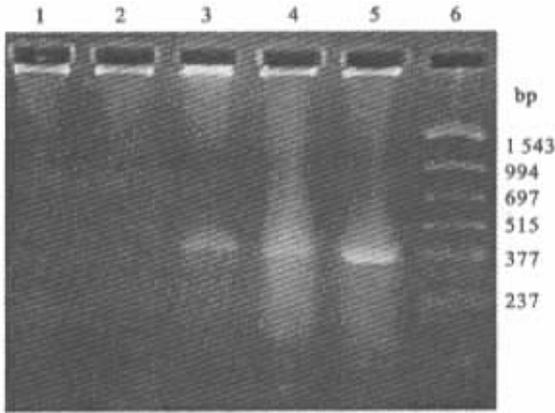
### 1.8 质粒pcDNA3s整合率检测

PCR反应扩增经琼脂糖凝胶分离纯化的组织基因组DNA,PCR引物、反应条件同1.7。每个样品PCR试验重复3次。

## 2 结果

PCR敏感性参照,取100,50,25,10,0拷贝质粒DNA加入到1 μg基因组DNA中,琼脂糖凝胶观察,当质粒为100,50,25拷贝时PCR检测为阳性,10拷贝时检测为阴性,说明PCR的灵敏度为25拷

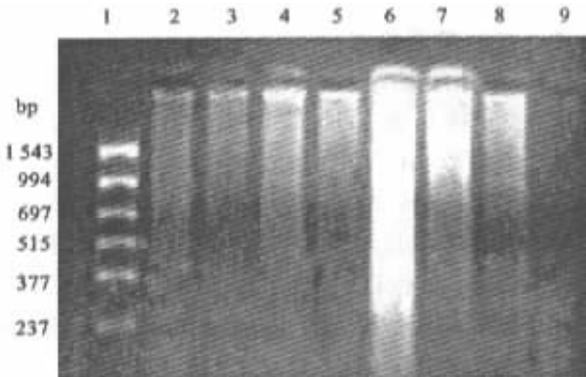
贝(见图1)。外源质粒如整合入基因组中,其拷贝数应低于25拷贝。3周时口服组各组织PCR检测结果均呈阴性(见图2)。因此质粒pcDNA3s即使整合到宿主基因组中,其拷贝数也应低于25拷贝。



1. 0拷贝 2. 10拷贝 3. 25拷贝 4. 50拷贝 5. 100拷贝;  
6. PCR相对分子质量标准,1拷贝质粒 $\approx 4.11 \times 10^{-9}$  ng

图1 PCR敏感性对照

Fig. 1 Result of PCR sensitivity of assay



1. PCR相对分子质量标准 2. 肺 3. 肾 4. 脾 5. 肠系膜淋巴结 6. 胸腺 7. 生殖器官 8. 肌肉 9. 肝脏

图2 灌胃后各组织基因组PCR扩增结果

Fig. 2 PCR negative of tissue genome after oral administration

## 3 讨论

### 3.1 各组织细胞基因组DNA的提取

质粒DNA通过宿主细胞膜上的DNA受体介导的胞饮作用吞入宿主细胞中,质粒DNA主要在宿主细胞浆中完成转录与表达<sup>[15]</sup>,同时质粒DNA也存在进入细胞核,整合入宿主细胞基因组的可能性,因此分离细胞浆中游离体质粒DNA与整合入宿主细胞核中的质粒DNA是本实验的关键。各组织细胞基因组DNA如采用小量组织基因组提取试剂盒初步提纯,组织细胞浆中的质粒DNA不免会混入细胞基因组DNA中,造成细胞基因组

DNA的污染,从而导致假阳性的产生。通过琼脂糖凝胶可以有效地分离游离体质粒DNA与高相对分子质量基因组DNA,避免了细胞浆中的质粒DNA对基因组DNA的污染,保证了实验的准确性。

### 3.2 外源质粒DNA整合性评价

由于细菌的质粒DNA是一种独立于细胞染色体的具有自我复制功能的核酸分子,不具备逆转录病毒的染色体插入序列,因此在理论上不会与细胞基因组DNA整合。然而质粒DNA通过胃肠道途径被机体吸收,局部组织细胞可能存在高浓度的质粒DNA分子,因此不能排除质粒DNA与基因组DNA发生随机整合的可能性。

与PCR敏感性参照比较,整合的外源质粒低于25拷贝。如果以30个拷贝数进行计算,也就是外源质粒进入宿主细胞后,在1  $\mu$ g细胞染色体DNA中引起基因突变的最大可能性为30。小鼠的1个细胞染色体组约含有 $3 \times 10^9$ 个碱基对,质量为6 g,那么1  $\mu$ g的染色体组约含有 $1.5 \times 10^5$ 个染色体组。实际上,哺乳动物染色体组中的基因是不断地发生着自发突变,只要其发生的概率对于每一个基因来说不超过 $10^{-6}$ ,就不会对哺乳动物的健康造成影响。由于每个细胞染色体组中大约含有 $7.5 \times 10^4$ 个基因,那么 $1.5 \times 10^5$ 个细胞染色体组就含有 $11.25 \times 10^9$ 个基因,如果外源DNA在 $1.5 \times 10^5$ 个细胞染色体中造成30次突变,那么它的突变概率就是 $2.7 \times 10^{-9}$ 。根据计算的结果和正常所容许的基因突变概率 $10^{-6}$ 相比,外源质粒DNA经胃肠道吸收后可能引起的基因突变概率要比细胞的自发突变率低3000倍<sup>[9]</sup>。因此认为,外源质粒即使有可能和细胞染色体组的DNA发生随机整合,对于其安全性也勿需考虑<sup>[10,11,13]</sup>。

### 3.3 外源质粒DNA整合与宿主基因组功能分析

最有可能接触外源DNA的就是胃肠道,哺乳动物每天都会通过胃肠道途径摄入大量的外源DNA。Schubbert R.用M13 DNA研究外源DNA在小鼠体内的吸收与降解发现,食物中的外源DNA经在鼠胃肠道中是不完全降解的。应用Southern杂交、PCR及FISH技术发现小肠、盲肠、大肠和粪便及肝脏、脾脏中均可检测到M13碎片。将插有M13DNA的小鼠脾细胞DNA再次克隆入质粒载体中,序列分析发现,这些克隆之一含有约1300 bp的M13片段。有质量分数70%的M13片段与小鼠中的IgE受体基因相连<sup>[4]</sup>。外源DNA(质粒、细菌DNA及食物DNA)经胃肠道吸收后绝大部分被降解为较小的片段,其整合的几率微乎其微。本实验

检测的质粒整合率远远低于基因自发突变率,符合 WHO 及 FDA 制定的标准<sup>[1]</sup>。当然,如果一旦外源 DNA 整合到宿主基因组上,有可能产生的后果是:(1)整合的外源 DNA 常常以特定的模式从头甲基化,引起外源 DNA 长时间的基因沉默(2)宿主基因组 DNA 会改变甲基化模式来抵御外源 DNA 的入侵,细胞 DNA 甲基化与细胞基因转录模式息息相关,与真核基因表达呈负相关,从而影响细胞的

功能(3)外源 DNA 插入也会引起插入突变,激活原癌基因、抑制抑癌基因引起癌症等不可预见的后果。

哺乳动物经胃肠道不断地通过食物的方式摄入外源 DNA 以维持生存,到目前为止还没有外源 DNA 经胃肠道吸收后整合入宿主基因组引起危害性的证据,但是外源 DNA 被吸收后对宿主基因组功能及长期进化的影响还有待于进一步探讨。

## 参考文献:

- [ 1 ] Beaver DE , Kemp CF. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops[ J ]. **Nutrition Abstracts and Reviews. Series B : Livestock Feeds and Feeding** ,2000 ,70( 3 ) :175 -182.
- [ 2 ] Hohlweg U , Doerfler W. On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice[ J ]. **Mol Genet Genomics** ,2001 ,265( 2 ) :225 -233.
- [ 3 ] Schubbert R , Lettmann C , Doerfler W. *et al.* Ingested foreign( phage M13 ) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice[ J ]. **Mol Gen Genet** ,1994 ,242( 5 ) :495 -504.
- [ 4 ] Schubbert R , Renz D , Doerfler W , *et al.* Foreign ( M13 ) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes , spleen , and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA[ J ]. **Proc Natl Acad Sci USA** ,1997 ,94( 3 ) :961 -966.
- [ 5 ] Schubbert R , Hohlweg D , Doerfler W , *et al.* On the fate of orally ingested foreign DNA in mice : chromosomal association and placental transmission to the fetus[ J ]. **Mol Gen Genet** ,1998 ,259( 6 ) :569 -576.
- [ 6 ] Doerfler W. Patterns of DNA methylation-evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism-a proposal[ J ]. **Biol Chem HoppeSeyler** ,1991 ,372( 8 ) :557 -564.
- [ 7 ] Doerfler W , Orend G , Schubbert R , *et al.* On the insertion of foreign DNA into mammalian genomes : mechanism and consequences[ J ]. **Gene** ,1995 ,157( 1 ~2 ) :241 -245.
- [ 8 ] Doerfler W , Schubbert R , Heller H *et al.* Integration of foreign DNA and its consequences in mammalian systems[ J ]. **Trends Biotechnol** ,1997 ,15( 8 ) :297 -301.
- [ 9 ] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T , *et al.* **Molecular Cloning : a Laboratory Manual**[ M ]. New York : Cold Spring Harbour Laboratory Press ,1989. 101 -253.
- [ 10 ] Nichols WW , Ledwith BJ , Manam SV , *et al.* Potential DNA vaccine integration into host cell genome[ J ]. **Ann NY Acad Sci** ,1995 ,772( 27 ) ,30 -39.
- [ 11 ] Ledwith BJ , Manam S , Troilo PJ , *et al.* Plasmid DNA vaccines : investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice[ J ]. **Intervirology** ,2000 ,43( 4 ~6 ) :258 -272.
- [ 12 ] Manam S , Ledwith BJ , Barnum AB , *et al.* Plasmid DNA vaccines : tissue distribution and effects of DNA sequence , adjuvants and delivery method on integration into host DNA[ J ]. **Intervirology** ,2000 ,43( 4 ~6 ) :273 -281.
- [ 13 ] Martin T , Parker SE , Hedstrom R , *et al.* Plasmid DNA malaria vaccine : the potential for genomic integration after intramuscular injection[ J ]. **Hum Gene Ther** ,1999 ,10( 5 ) :759 -768.
- [ 14 ] Muller K , Heller H , Doerfler W , *et al.* Foreign DNA integration : genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes[ J ]. **J Biol Chem** ,2001 ,276( 17 ) :14271 -14278.
- [ 15 ] Wolff JA , Malone RW , Williams P , *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[ J ]. **Science** ,1990 ,247( 23 ) ,1465 -1468.

( 责任编辑 杨 勇 )