论著

文章编号:1000-5404(2007)17-1688-04

一种真核生物染色质隔离子筛选方案的初步建立

章 波,王 燕,许雪青,白 云,杨晓亚 (第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨建立染色质隔离子的正负筛选工具的可行性。**方法** 合成引物从鸡基因组 cHS4 区域扩增了1段特异的 DNA,将 PCR 产物克隆到 T-载体后测序,验证其对增强子的阻断功能;对 pEGFP-N1 载体进行一系列改造,评价其正负筛选效果。**结果** 成功地获得已知的隔离子片段,初步结果表明该片断能阻断增强子的转录激活作用。将 TK 基因作为负向筛选标记引入 pEGFP-N1 载体后获得了改造后的载体,转染 COS-7 细胞经过 G418 筛选 10d 后获得了稳定转染的细胞系,在不同浓度 GCV 药物作用下细胞杀伤效果有差异。**结论** 正负筛选方法被成功地引入到筛选系统,为进一步进行染色质隔离子的筛选与利用奠定了基础。

关键词:染色质隔离子;增强子;基因表达

中图法分类号:Q756;Q78 **文献标识码**:A

Construction of screen system for chromosome insulator in eukaryotes

ZHANG Bo, WANG Yan, XU Xue-qing, BAI Yun, YANG Xiao-ya (Department of Medical Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To further investigate the function of chromatin insulators and to construct a screen system for chromatin insulators. Methods A primer set targeting chicken cHS4 locus was designed and synthesized. The specific PCR product using this primer set was obtained and sequenced. In order to test its blocking activity, we further inserted this fragment between enhancer and promotor. Then TK gene was inserted into modified pEGFP-N1 plasmid, which was tested for its negative and positive selection. Results The result of luciferase activity showed that insulators could function when it was located on plasmid. Then vector pEGFP-N1 was modified as a screening system for chromatin insulator, in which phosphotransferase gene and thymidine kinase gene could function as selection marker. In order to evaluate its efficiency and viability, the recombinant vector was transfected into COS-7 cells. After selected with G418 for 10 d, stable transfected cells with G418 resistance were obtained. The sensitivity to pro-drug of GCV of these cells was different from that of its control cells by MTT. Conclusion This study provides an early research to further screen and utilize chromatin insulator in eukaryotes.

Key words: chromatin insulator; enhancer; gene expression

随着人类基因组测序工作的基本结束,人类基因组所拥有的基因数目比预计的要少,基因组包含了更多的调控序列[1],因而,对基因组中调控序列的鉴定工作就显得日益重要。最近的研究显示,真核基因组中的染色质隔离子对基因的表达调控具有重要的调控作用[2,3]。隔离子是基因组中的一段特异 DNA 序列,具有2个基本功能:一是增强子阻断活性;其二是位置效应保护作用[4]。为了深入研究染色质隔离子的分布和功能,就必须有一个能筛选隔离子的工具。我们在文献的追踪中发现:可以在附加体(质粒)上对染色质隔离子的功能进行研究。尽管主要的研究方法大多在染色质水平上进行,但有的研究是在基因组外的附加体上进行的。研究证明:转座因子 gypsy 内的隔离子在质粒上也可以阻断增强子的转录激活作用,而不必将重组基因整合到染色体上[5]。同样,Krebs[6]在质粒上分析 scs 和 scs′对增强子转录激活的阻断,发现隔离子在发挥作用时不必整合在染色体上。因而,我们有可能基于质粒来构建一个体外的筛选体系,鉴定那

基金项目:第三军医大学科研创新基金(2005)
Supported by the Scientific Research Funds of Third Military Medical University (2005)

作者简介:章 波(1972-),男,重庆市人,博士,副教授,主要从事基因表达与调控方面的研究。电话:(023)68753670

通讯作者:白 云,电话:(023)68752258

收稿日期:2006-09-25;修回日期:2007-03-23

些具有染色质隔离子功能的 DNA 序列。

研究表明：在鸡 β 血红蛋白基因 5′端有 4 个 DNA 酶敏感位点（hypersensitivity sites，HS），其中 cHS4 区域存在 1 个隔离子[7]。为了建立一个能够筛选真核生物隔离子的体系，需要获得已知具有隔离子功能的 DNA 片段，本研究首先根据已知的序列设计 PCR 引物，分别从小鼠和鸡基因组中克隆出相应的具有隔离子功能的片段，然后将其插入到报告质粒的增强子与启动子之间，比较其对报告基因表达的影响，以期初步证实其功能，然后进一步利用这些隔离子改造表达载体。

1　材料与方法

1.1　材料

重庆肉鸡购自重庆种鸡场。人结肠癌细胞 SW480 细胞、COS-7 细胞为本室保存。基因组 DNA 提取试剂盒购自博大泰克公司，DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 连接试剂盒、限制性内切酶、高保真 *Taq* 多聚酶均为大连宝生物公司产品，pGL3 系列载体及荧光素酶活性测定试剂盒购自 Promega 公司；GCV 为 Roche 产品，脂质体 Lipofectamine2000 为 Invitrogen 产品。其他试剂为国产分析纯度。

1.2　方法

1.2.1　基因组 DNA 提取　　取鸡肝脏组织，加入预冷 PBS 进行匀浆处理，离心后收集细胞，用预冷 PBS 洗 2 次，以试剂盒提供的 TE 溶液重悬细胞，然后按照试剂盒说明书进行操作。提取的 DNA 经电泳观察及紫外分光光度计测定浓度。

1.2.2　PCR 扩增隔离子及产物克隆　　以鸡基因 DNA 为模板，PCR 扩增目的 DNA。扩增鸡 cHS4 片段的引物为 CP1：5′-CTAGAGGGACAGCCCCCCCCCAAAG-3′，CP2：5′-CCCATCCT-CACTGACTCC GTCCTGG-3′。反应条件为：94 ℃变性 5 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30，72 ℃ 4 min，共 32 个循环，最后在 72 ℃保温 10 min。产物大小为 1.6 kb，PCR 产物经胶回收后与 T-载体连接并转化 *E. coli.* DH5α，筛选白色菌落进行鉴定、测序。

1.2.3　增强子阳性对照载体的构建　　采用 PCR 方法以 pGL3-control 质粒为模板扩增 SV40 增强子部分。引物为 SVP1：5′-CAGAGCTCGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGG-3′，SVP2：5′-GCGA GCTCTCTGAACGATGGAGCGGAGAATGGG-3′。产物大小为 240 bp，纯化的 PCR 产物酶切后连接到 pGL3-Promotor 的 *Sac* Ⅰ位点，并测序证实，命名为 pGL3-EP。

1.2.4　隔离子功能分析载体的构建　　采用 *Xho* Ⅰ和 *Nhe* Ⅰ从测序证实的 T-载体上切下片段，然后连接到 pGL3-EP，获得 pGL3-cHS4P。

1.2.5　SW480 细胞培养及转染　　SW480 细胞培养按照常规操作，使用 DMEM 培养基。提取构建好的各种质粒，测定 DNA 浓度以备转染。将对数生长期的细胞接种至 24 孔板，10^5/孔，37 ℃培养 12 h 后按照脂质体说明书进行转染。

1.2.6　报告基因的表达测定　　转染后 24 h，吸出培养基，用预冷的 PBS 洗 2 次。每孔加入裂解缓冲液 200 μl，收集液体，于液氮中反复冻融 3 次，然后 12 000 r/min，离心 15 min，取上清测定蛋白浓度和荧光素酶活性。以单位蛋白质中荧光素酶活性来表示基因表达强度。

1.2.7　TK 基因的克隆　　根据基因数据库中的记录，设计扩增 TK 基因编码区的引物。TKP1：CAGAAGCTTATGGCTTCG-TACCC TGC；TKP2：AGTCTAGATCAGTTAGCCTCCCCCATC，PCR 产物大小为 1.2 kb。含 TK 基因编码区的质粒由第三军医大学大坪医院野战外科研究所陈林教授赠送。以此质粒 DNA 为模板进行 PCR 反应，然后将产物纯化后克隆至 T-载体，进行序列测定。在此基础上将 TK 基因编码区克隆至 pGL3 载体，最后克隆至目的载体，获得可供隔离子筛选的重组质粒。

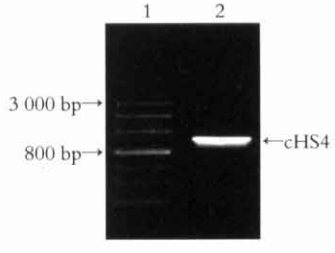
1.2.8　COS-7 细胞培养及转染　　COS-7 细胞培养按照常规操作，使用 RPMI1640 培养基，添加 10% 小牛血清。将处于对数生长期的 COS-7 细胞传代至 6 孔板，当细胞长满 60% 时进行转染。细胞转染按照脂质体的说明进行。转染完成以后换液，加入 G418（600 μg/ml）继续培养，适时换液。当抗 G418 细胞获得后，降低 G418 浓度为 300 μg/ml。

1.2.9　GCV 药物对 COS-7 细胞的杀伤作用　　GCV 浓度分别设定为 0、0.03、0.1、0.3、1、3、10、50 μg/ml。将 G418 抗性的 COS-7 细胞传代至 96 孔板，10^4/孔。细胞贴壁后加入含不同浓度 GCV 的培养基继续培养 96 h 后进行 MTT 测定。以不加入 GCV 药物的细胞吸光值作为对照，计算 GCV 对细胞的杀伤作用。

2　结果

2.1　cHS4 片段的克隆

按照基因组 DNA 提取方法从肉鸡肝脏可以提取出肉鸡基因组 DNA，经过 PCR 方法可以获得单一的 DNA 带（图 1）。将产物克隆至 pMD-T 载体后测序后表明：我们获得了 1 段具有隔离子功能的 DNA 片段，全长为 1 650 bp，其序列与数据库中序列相似性为 94%，估计与不同种属有关。



1：标准；2：PCR 产物

图 1　琼脂糖电泳鉴定 RT-PCR 扩增产物

2.2　荧光素酶报告基因表达载体的改建

在文献中报道：隔离子位于启动子与增强子间时可以阻断增强子的转录激活作用。因此，我们考虑在 pGL3-Promotor 载体的启动子前加 1 个 SV40 的增强子部分作为转录激活的阳性对照。采用的方法为 PCR 扩增 SV40 启动子序列，然后连接到载体 pGL3-Promotor 之 *Sac* Ⅰ位点。我们的结果显示：SV40 启动子序列被成功地扩增并且连接到 pGL3-Promotor 载体上，这被随后的测序所证实。该载体命名为 pGL3-EP，可进一步用于

随后隔离子功能验证之中。

在获得具有隔离子功能的 cHS4 DNA 片段后，为了验证其功能需要将其插入阳性对照载体。将重组于 T-载体中 cHS4 片段插入到阳性对照载体的 *Nhe* Ⅰ 与 *Xho* Ⅰ 位点之间（大小为 1 600 bp），命名为 pGL3-EcHS4P。获得这些重组子以后大量制备质粒 DNA 以备下一步的细胞转染。

2.3 荧光素酶报告基因的表达分析

将获得的阳性对照质粒 pGL3-EP、pGL3-cHS4P、pGL3-Promotor 和阴性对照 pGL-Control（启动子与增强子相距 2.0 kb）转染 SW480 细胞，在分子数目相同的情况进行转染，然后测定荧光素酶活性。在 SV40 增强子存在的情况，pGL3-EP 转染细胞的荧光素酶活性为 pGL3-Promotor 所转染细胞的 8.4 倍，当插入隔离子后，荧光素酶活性约为 pGL3-Promotor 所转染细胞的 2 倍，使增强子的功能得到 4 倍的降低，而以 pGL3-Control 为阴性对照组的荧光素酶活性约为 pGL3-Promotor 组的 7.2 倍（图 2）。这说明插入的隔离子序列起到一定的作用。

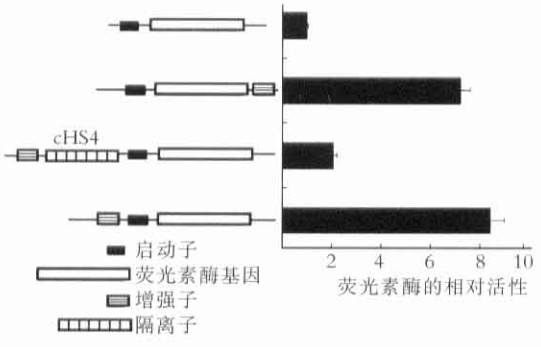


图 2 转染细胞的荧光素酶活性测定

2.4 具有正负筛选功能体系的建立

根据预先的设计，在我们所希望构建筛选体系将利用 *Neo* 基因进行正筛选，利用 TK 基因进行负筛选。根据核酸数据库的记录，我们设计了 TK 基因的引物，以获赠的质粒为模板进行 PCR 反应，然后将其克隆至 T-载体测序。结果显示：所克隆的 TK 基因编码框与预期完全一致，命名为 pUC-TK。以 TK 基因编码区替代 pGL3-EP 和 pGL3-Promotor 的荧光素酶报告基因，然后再克隆至 pEGFP-N1 载体中，从而获得了 pΔ-EP-TK 和 pΔ-Pro-TK。这两个载体既有 *Neo* 基因用于转染细胞后的正向筛选，也有 TK 基因用于负筛选，而 pΔ-EP-TK 中 TK 基因的表达受控于增强子。若增强子的作用被阻断，则 TK 基因的表达只有较低的本底水平。

2.5 TK 基因功能的检测

获得用于隔离子筛选的重组质粒以后，将 pΔ-EP-TK 转染至 COS-7 细胞，同时也转染 pΔ-Pro-TK 作为对照。细胞的转染按照常规操作；转染完成后立即更换为含 G418 的培养基。在更换培养基后 48 h，即可观察到大量的细胞死亡。5 d 后，可见细胞团生长；10 d 后抗 G418 的细胞得到大量扩增。此时将 G418 浓度减半，在以后的细胞培养中均以此浓度进行。细胞分别命名为 COS-ΔETK 和 COS-ΔPTK。

大量获得转染细胞后，分别测定其对 TK 基因的作用底物（GCV）的反应性。按照实验设定了 8 个 GCV 浓度梯度。分别在 GCV 作用 4 d 以后测定各组的吸光值。从表 1 可以看出在高浓度 GCV（大于 1 μg/ml）作用下，2 种细胞被杀伤超过 50%，最低达到 34%（COS-ΔETK）和 36.8%（COS-ΔPTK）。而在相对较低浓度的 GCV 药物作用下，2 株转染细胞被杀伤的比例有一定差别。在 0.1 μg/ml 的 GCV 作用下，COS-ΔETK 细胞被杀伤比例为 70%，而 COS-ΔPTK 细胞被杀伤比例为 89.6%。这说明 2 株转染细胞对 GCV 药物的反应是有差别的，与其 TK 基因表达量密切相关。

表 1 不同 GCV 浓度（1 μg/ml）作用下细胞的相对存活率

细胞类型	细胞的相对存活率							
	0	0.03	0.1	0.3	1	3	10	50
COS－ΔPTK	100	95.6	89.6	68.7	51.1	48.2	38.9	36.8
COS－ΔETK	100	90.1	70.0	55.7	49.1	45.3	36.4	34.0

3 讨论

随着人类基因组测序的完成，人们可以获得了全基因组的框架序列，并且对这些序列进行了解析，人类所拥有的全部基因大约为 3～4 万个。这些基因的编码序列在人类基因组中所占的比例约为 3%，更多的序列则为调控序列。在这些调控序列中包含了启动子、增强子、沉默子，以及隔离子序列。对染色质隔离子的研究起步于 1985 年，人们就在果蝇的染色体 87A7 的两侧发现了 scs 和 scs′（specialized chromatin structures，特殊染色质结构）[8]。而明确提出隔离子概念则在 1991 年，Kellum 等[9]作了关于隔离子的最早研究报道。他们根据这样的假设来设计实验：隔离不同转录功能区的边界元件可以抑制增强子对同一转录功能区中的基因的转录激活活性。从而发现了果蝇中的隔离子 scs 和 scs′。随后在其他生物中也发现了隔离子的存在。

隔离子的重要功能在于将整个基因组分隔成不同转录活性的区域。这与高等生物的染色质组装是相一致的[10]。因此，在某些时候，隔离子也被称为边界元件。在高等真核生物中，基因的表达有明显的时空特异性，且基因组中表达强弱部分间交替存在。若没有隔离子的存在，难以使基因表达得到精确控制。在基因组测序完成的今天，摆在人们面前的一个重要问题就是：在人类基因组中有多少个隔离子的存在？它们在整个基因组中是如何分布的？要回答这样的问题，人们必须有一个有效的分离鉴定隔离子的工具。

本研究在这方面进行了初步的探讨，试图能得到一个可以对基因组进行有效筛选的工具。我们根据隔

离子的功能特点，设计了一个可以在真核细胞中进行正负筛选的体系。由于隔离子功能的发挥离不开真核生物的环境，因此我们利用其对基因表达的一个“抑制”作用来设计。（实际上：隔离子对基因的表达没有增强，也没有沉默作用，只是在此筛选体系中对增强子的阻断而显示出抑制效果。）

我们首先对已知具有隔离子功能的 DNA 片段进行了初步的验证。文献报道：可以在质粒上研究隔离子的功能，而不必在染色质水平上进行。Krebs 在质粒上分析 scs 和 scs′对增强子转录激活的阻断，发现隔离子在发挥作用时不必整合在染色体上。这样的研究结果给予我们很大的提示：可以基于质粒构建体外的隔离子筛选体系。然而，对于这样的研究报道，我们还需要在实验体系中对此加以证实。我们的结果也初步证实这样的结论：隔离子可以在质粒上发挥其功能。进入到细胞核的质粒，实际上是与组蛋白相结合的，形成所谓的核小体结构。这样的结构与真核生物染色质结构是相类似的。因而，位于质粒结构中的隔离子对增强子或沉默子等的阻断作用与存在于复杂结构的染色质中的隔离子类似。故可以在质粒这样的小分子中分析隔离子的阻断作用。

TK（胸苷激酶）能将无毒的 GCV 药物磷酸化成单磷酸 GCV，继而在哺乳类动物细胞激酶的共同催化下转化为细胞毒物质三磷酸-GCV[11]。该基因也广泛被应用到基因治疗的负选择系统中。借助组织特异性启动子还可以将 TK 基因限制在某些类型细胞中表达。在无药存在的情况下，TK 基因的表达对细胞没有损害，故可以形成稳定转染的细胞系。在一定量的前药 GCV 存在时，细胞毒性作用与 TK 基因表达量是成正比的。因此，可以控制前药 GCV 的用量来区别不同表达活性 TK 基因的细胞。本实验中，由于 SV40 启动子本身有较好的转录活性，使得本底表达水平较高，GCV 杀伤细胞的差别不理想。在以后的实验中应该选取转录活性较弱的启动子进行，实验有待进一步改进。

参考文献：

[1] Lander E S, Linton L M, Birren B, *et al*. Initial sequencing and analysis of the human genome[J]. Nature, 2001, 409(6822): 860 - 921.

[2] 章　波，刘　昕. 染色质隔离子研究进展[J]. 遗传，2004，26(4)：551 - 555.

[3] Majumder P, Cai H N. The functional analysis of insulator interactions in the Drosophila embryo[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(9): 5223 - 5228.

[4] Zhan H C, Liu D P, Liang C C. Insulator: from chromatin domain boundary to gene regulation[J]. Hum Genet, 2001, 109(5): 471 - 478.

[5] Chen S, Corces V G. The gypsy insulator of Drosophila affects chromatin structure in a directional manner[J]. Genetics, 2001, 159(4): 1649 - 1658.

[6] Krebs J E, Dunaway M. The scs and scs′ insulator elements impart a cis requirement on enhancer-promoter interactions[J]. Mol Cell, 1998, 1(2): 301 - 308.

[7] Yusufzai T M, Felsenfeld G. The 5′-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(23): 8620 - 6824.

[8] Udvardy A, Maine E, Schedl P. The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains[J]. J Mol Biol, 1985, 185(2): 341 - 358.

[9] Kellum R, Schedl P. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains[J]. Cell, 1991, 64(5): 941 - 950.

[10] Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K. Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance[J]. Trends Genet, 2004, 20(7): 320 - 326.

[11] Wahlfors T, Hakkarainen T, Janne J, *et al*. *In vivo* enhancement of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy with polyamine biosynthesis inhibition[J]. Int J Cancer, 2006, 118(11): 2907 - 2910.

（编辑　王　红）

（上接 1687 页）

老年糖尿患者应避免重复使用较强的降糖药物，不应强求血糖必须控制在正常范围，可比正常值稍高一些。

严密观察病情变化，对老年糖尿病患者无论是使用胰岛素，强效降糖药的患者应密切监测血糖，教会患者及家属使用便携式血糖仪，以便调整药物剂量。特别应重视夜间血糖变化，因夜间低血糖发作可表现为次晨空腹高血糖；若继续降糖易造成严重后果。对肝肾功能不全及体弱消瘦导致肝糖原储备不足，年龄过大者要高度警惕以上情况易引起低血糖的发生甚至死亡。

日常应指导患者随身携带安全糖果，饼干，以备发生低血糖时食用或运动时应适量加餐。因故延迟进食或伴有胃肠功能紊乱：腹泻，呕吐者应适当减量用药或停药。体力活动增加，运动量增大时需及时加餐，注射胰岛素 30 min 时必须按时就餐。外出时，应携带卡片，写明患者姓名、地址、联系人、急救中心电话及所患疾病名称等以备急用。

关键词：老年糖尿病；低血糖；预防；护理

中图法分类号：R473.5　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘振平，陆菊明. 老年人糖尿病[J]. 中华老年医学杂志，1997，16(4)：249 - 252.

[2] 王　志，吴吉昌，李中男，等. 老年糖尿病严重低血糖症临床分析[J]. 中国临床保健杂志，2005，8(4)：351 - 352.

[3] 王　静，王慧芳. 短期胰岛素强化治疗初诊2型糖尿病的护理干预[J]. 实用临床医药杂志，2005，9(12)：70.

（编辑　张天春）