DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.007
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
1342 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)15-1342-04

人T细胞基因组随机MARs的分离、克隆及序列分析

毛琼国[1],白 云[1],张 波[2],黄 钢[1],王 燕[1],代佳平[1] (第三军医大学:[1]基础医学部分子遗传学教研室,[2]西南医院检验科,重庆 400038)

提 要:目的 分离、克隆人基因组随机MARs片段,分析其序列特征,为进一步研究MARs在真核细胞DNA复制及基因表达调控中的作用与机制奠定基础。方法 用DNaseⅠ、高盐和蛋白酶K处理细胞核,分离人T细胞基因组随机MARs片段,并将其克隆进入PUC19质粒;用体外结合实验筛选能与核基质蛋白结合的克隆并测序,生物信息学分析其序列的特征。结果 从人T细胞基因组中分离得到大量的MARs片段,构建成MARs库,初步任意挑选58个克隆,体外结合实验证实其具有与核基质蛋白结合活性,对其中1个克隆的序列分析表明,其序列AT含量较高,不仅含有AC-和ATAT基序,还包含有多个转录/复制起点、增强子序列、弯曲DNA和扭结DNA基序以及多个反向重复序列。结论 分离获得的DNA片段具有MAR的特性,同一DNA序列中存在不同的元件组合,其参与基因表达调控的功能应该是复杂、多样的。

关键词:核基质;核基质附着区;基因组DNA
中图法分类号:R392.12;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Screening, cloning, and sequence analysis of random MARs in the genome of human T cells

MAO Qiong-guo[1], BAI Yun[1], ZHANG Bo[2], HUANG Gang[1], WANG Yan[1], DAI Jia-ping[1] ([1]Department of Molecular Genetics, College of Medicine, [2]Department of Medical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To screen and clone the fragment the random matrix association regions (MARs) in human genome and analyze the characteristics of their sequences in order to provide proof for further investigation of the molecular mechanisms of MARs in the regulation of eukaryotes gene expression. Methods The fragment of functions and the random MARs of human genome, isolated by treatment of the nuclei using DNase I, high salt, and protein K, was cloned into the PUC19 vector. MARs which could bind with nuclear matrix proteins were identified by binding assay *in vitro* and sequenced consequently. The characteristics were analyzed by the bioinformatic method. Results A large number of MARs fragments were screened and obtained from human T cells successfully. A MARs library was constructed and 58 clones were selected randomly from the library. The results of the binding assay *in vitro* showed that the random MARs had binding activity with nuclear matrix proteins, and sequence analysis of one of the clones showed that it was consisted of rich A and T base pair, AC-rich elements and ATAT motifs, many origin points of transcription/replication, enhancer, curved DNA, kinked DNA regions, and numerous reverse repeated base sequences. Conclusion The obtained DNA fragments have the characteristics of MARs and multiple cis-function elements in a DNA sequence, suggesting that the functions of MARs in regulation of gene expression are complicated and multiform.

Key words: nuclear matrix; matrix association region; genomic DNA

真核细胞染色质结构与基因的复制和表达密切相关[1]。大量证据表明:在细胞中,染色质以核小体串珠结构为基本单位螺旋盘绕,形成直径为30 nm的染色质纤维;这些折叠形成的染色质纤维,可阶段性地附着在间期细胞的核基质或中期细胞的核骨架(nuclear matrix or skeleton,简称核基质)上,形成一系列独立的长约30~100 kb的环状结构域。与核基质蛋白结合的特异DNA序列称为核基质结合区(scaffold/matrix attachment regions, MARs)[2]。MARs常出现在转录单位的两侧以及增强子等调控序列附近,能够保护转录单位不受非相关反式作用因子的干扰,判断转录活跃的环结构域并促使其组蛋白乙酰化;并参与染色体的重塑和去甲基化,以利于转录因子进入染色质[3]。在稳定整合的前提下,一些MARs能使外源基因的转录增

作者简介:毛琼国(1971-),女,四川省简阳县人,硕士,实验师,主要从事真核基因表达调控方面的研究。电话:(023)68753670
通信作者:白 云,电话:(023)68752258,E-mail:geneby@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-03-18;修回日期:2004-06-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

加[4]。因此, MARs 同核基质蛋白的结合参与染色质的高级包装及转录与表达的调控。

人基因组预计有 10 万个 MARs, 但目前 S/MARtDB 库中, 已经分离鉴定的 MARs 仅有 117 个, 还有大量的 MARs 有待进一步鉴定和研究。本研究从人 Jurkat 细胞基因组中, 利用 MAR 能够与核基质蛋白结合拮抗高盐和 DNaseⅠ处理的特性[5], 分离、抽提出随机 MARs DNA, 并将其克隆进入 PUC19 质粒, 构建 MARs 库; 通过体外结合实验验证其与核基质蛋白结合活性; 进行序列测定并应用生物信息学分析其序列特征, 为进一步研究 MARs 在真核细胞 DNA 复制及基因表达调控中的作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞株、质粒、载体　　Jurkat 细胞株、PUC_{19} 质粒及 JM109 大肠杆菌均为本室保存。

1.1.2　主要试剂　　Klenow 酶、X-gal、T_4 连接酶等均购自 Promega 公司, 限制性内切酶为华美公司产品, 其它试剂为国产分析纯试剂。

1.2　方法

1.2.1　核基质附着区 MARs 的制备　　离心收集培养的 Jurkat 细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入 1× 核分离缓冲液(50 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)悬浮、吹打, 4 000 r/min 离心 10 min (收集上清冻存, 管号为 6), 沉淀即是细胞核。将细胞核以 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)悬浮, 加入 DNaseⅠ至浓度为约 200 μg/ml, 37 ℃孵育 1 h, 离心, 所得沉淀以重悬缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 3 mmol/LEDTA, pH 7.4)重悬, 加入等体积的 4 mol/L NaCl, 室温离心 10 min; 沉淀用 2 mol/L NaCl 冲洗 2 次; 离心, 沉淀以 TE+1%SDS 缓冲液(pH 7.4) 重悬, 加入蛋白酶 K 至终浓度为 300 μg/ml, 37 ℃过夜。酚/氯仿抽提 DNA, 酒精沉淀后以 TE 溶解, 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。制备的 MARs 分装后－20 ℃冻存待用。

1.2.2　细胞核基质蛋白的制备　　将分离的细胞核以 1 mg/ml 核酸的浓度悬于 1× DNaseⅠ工作缓冲液中, 加入 DNaseⅠ至终浓度为 100 μg/ml, 23 ℃孵育 1～2 h 后离心(上清冻存, 管号为 5), 收集沉淀并重悬于 RSB-0.25 mol/L 蔗糖中, 加入等体积的重悬缓冲液, 离心(上清冻存, 管号为 4), 沉淀用 2 mol/L NaCl 抽提 2 次, 离心(上清冻存, 管号为 3, 2), 沉淀即为核基质, 以 PBS 洗两次后重悬于 PBS 中备用。抽提的核基质蛋白, 采用 12%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳观察。

1.2.3　核基质附着区 MARs 的克隆　　上述分离的 MARs DNA 3～5 μg, 用 Klenow 酶填平, 酚/氯仿抽提, 酒精沉淀, ddH_2O 溶解。载体 PUC19 用 *Sma*Ⅰ酶切平端化后酚/氯仿抽提, ddH_2O 溶解, 冻存备用。将平端化的 MARs DNA 和 PUC19 载体按 8∶1 的浓度混合, 45 ℃, 5 min, 打开局部双链, 并迅速冷却至 0 ℃, 加入 T_4 连接酶后, 16 ℃, 孵育 24 h, 转化 JM109 大肠杆菌。X-gal/IPTG 平板的制备和转化实验参考文献[6]的方法稍加改进。

1.2.4　MARs 体外结合实验　　每个结合反应管分别加入 300 ng 的 MAR DNA 和不同量的核基质蛋白(0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4 μg), 23 ℃, 孵育 1.5 h。反应混合物用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 荧光染料染色。

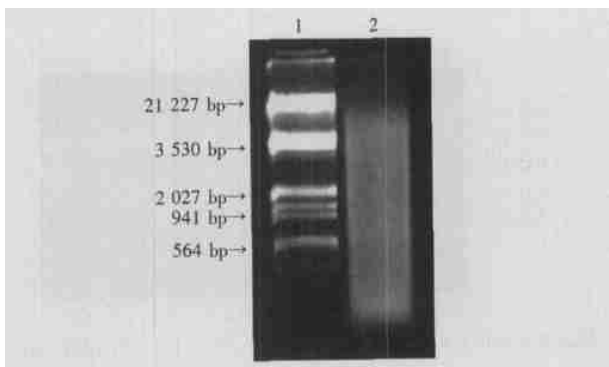
1.2.5　MARs 片段序列测定与分析　　挑选体外实验证实能与核基质蛋白结合的一个 MAR 克隆(JMr/F), 以重组细菌质粒为模板, 进行 DNA 序列测定(上海基康公司完成)。所得 MARs 片段序列用 MAR-Wiz(http://www.futuresoft.org/MAR-Wiz 1.0)软件进行生物信息学分析及在基因组库中(NCBI-Human genome resources-BLAST the genome)进行序列比对。

1.2.6　SDS-PAGE　　将抽提的核基质蛋白和离心过程中的每步上清(管号为 NM, 2, 3, 4, 5, 6)用 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色鉴定核基质蛋白纯度。

2　结果

2.1　核基质附着区 MARs 的制备

Jurkat 细胞核经 DNaseⅠ、高盐及蛋白酶消化处理后, 分离、抽提出随机 MARs DNA 片段, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳显示(图 1): 随机 MARs DNA 片段大小不均一, 在 100 bp 至 15 kb 之间, 呈弥散分布。



1: λDNA/*Eco*RⅠ＋*Hind*ⅢMarker; 2: MARs

图 1　**MARs** 琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1　Electrophoregram of MARs DNA on agarose gel

2.2　核基质蛋白的制备

核基质蛋白 SDS-PAGE 电泳结果见图 2。结果显示: 细胞核提取物经过 DNaseⅠ、4 mol/L NaCl 和 2 mol/L NaCl 处理后, 大部分杂蛋白被去除, 核基质复合物通过简单的离心能够获得大量的核基质蛋白。核基质蛋白大部分集中在(43～66)× 10^3 位置。

2.3　MARs DNA 克隆

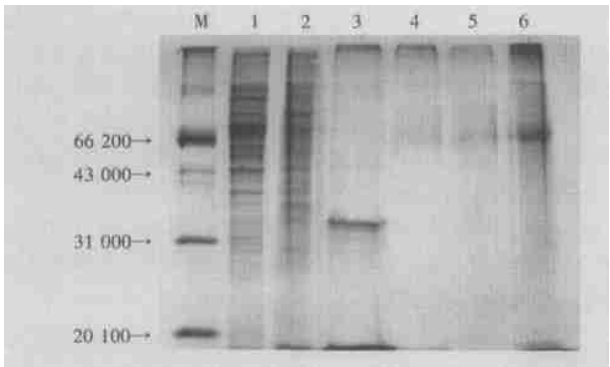
从 MARs 库中, 随机挑取 10 个 MARs 单克隆(JMr/1-10)质粒, 经限制性内切酶 *Eco*RⅠ和 *Hind*Ⅲ分别酶切后, 琼脂糖电泳, 结果见图 3。从图 3 可以看出, MARs DNA 被随机克隆到大肠杆菌中; 克隆所得的随机 MARs DNA 片段大小不一, 长度为 200 bp 至 3 kb, 符合 MARs 的序列长度特征。

2.4　结合实验

体外结合实验显示克隆的一些 MARs DNA 能够与核基质

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

蛋白结合，结果见图 4。从图 4 可以看出，随着核基质蛋白量的增加，结合的 MAR 量也增加，结果表明所得 MARs DNA 片段在体外具有与其核基质蛋白结合的能力。



M: Lower molecular weight Marker; 1: Supernatant by isolated nuclei; 2: DNase Ⅰ treated supernatant; 3: 4 mol/L NaCl treated supernatant; 4: Supernate of 1st elution with 2 mol/L NaCl; 5: Superate of 2nd elution with 2 mol/L Nacl; 6: Nuclear matrix protein

图 2 核基质蛋白 12% SDS-PAGE 电泳分析

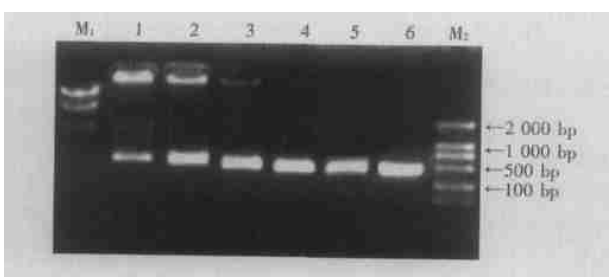
Fig 2 SDS-PAGE Coomassie blue-stained analysis of nuclear matrix proteins after 2 mol/L NaCl-extracted nuclei of human T cell



M: λDNA/*Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ Marker; P: Vector PUC_{19}; 1—10: JMr/1—10

图 3 ***Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ酶切 MARs 单克隆电泳图**

Fig 3 Electrophoregram of MARs mono-clones digested with *Eco*RⅠ + *Hind* Ⅲ



M_1: λDNA/*Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ Marker; 1—6: Each lane contained 300 ng MAR DNA, and the nuclear matrix proteins were 2.4, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 μg, 0; M_2: DL2000 Marker

图 4 **MAR** 与核基质蛋白的体外结合实验

Fig 4 MAR and nuclear matrix protein binding assay *in vitro*

2.5 MAR DNA 片段序列测定与生物信息学分析

2.5.1 从能够与核基质蛋白结合的 MAR 中，随机挑选一个克隆(JMr/f)作 DNA 序列测定，测序结果如下。JMr/f 的序列长度为 593 bp，其中 AT 含量较高，高达 66%。

5′-AGGGGTCAGAAGGGTCAATAGTAATATATTTTGAAGGTAGA
ATCAAGGGGATTGGGTGGGGTGAGATGTGAAAGAAAGAGGAGTC
AGGAGTGATTCCAAGGGTTTGTCTTGGGCAAGTAAAGGGATGGCAT
TGCCCTTTCCTGGGGCAGTGAGTTGGCCAGCCTACTCTTTTGTATTTT
TTTAAATTTACATCCACTTTTTATTCCTTCATAGATTTTAACAATTAT
ACACAACTTTTAACATAAGGTAGTGAAATCTCAAGGATAAGGAA
GCTATATATATGTATATACACACATACATATACATATACACACACA
TATATATACATATATACACACACATATACACACACACACACACACA
CACATATATATATATGGCTTCTTCTATTCATTCTTCAGGATGGAAGG
AAATTTCCAAAGGGTTACAATGTGTGAGATTTAACAATGGAAAAAT
ACATATGAAACTTGTTTAACTGGCTCCACTTAAGACCAGGCACAGC
ACAATAAATACAGAACTGCATCATCTTTTTAAAATTTTGTATTGCTT
TATGACACATGCACACGTATGTTTATTGCAGCACTATTCAG-3′

2.6 MAR DNA 序列生物信息学分析

测定的 JMr/f 序列用 MAR-Wiz(http://www.futuresoft.org/MAR-Wiz 1.0)软件进行相关生物信息学分析，结果见表 1。结果显示 JMr/f 序列中含有多个复制起点、Topo Ⅱ识别位点、AT 富集区、扭结 DNA 和弯曲 DNA，并且同植物 MAR 没有任何一致性。表明 JMr/f MAR 同时具备多种顺式作用元件，能同时与不同的蛋白质反式作用因子相互作用，其参与真核基因表达调控的功能和作用应该是复杂、多样的。将 JMr/f MAR 序列同人基因组序列同源性比对结果表明：其序列同人 20 号染色体短臂 1 区 3 带 2 亚带序列同源性高达 99.83%，我们将其定位在 20q13.2 上。

表 1 **MAR DNA** 序列生物信息学分析

Tab 1 Bioinformatic analysis of DNA sequence of MAR

Rule name	Human JMr/f	
	FS match count	RS match count
Sequence length	593 bp	593 bp
Maximum and minimum potential	[0.353859..20.9577]	[0.353859..20.9577]
High scoring regions with threshold	0.6	0.6
ORI pattern	4	4
TG-richness pattern	0	0
Curved DNA pattern	2	2
Kinked DNA pattern	1	1
Topo Ⅱ pattern	5	16
AT-richness pattern	10	7
Plant MAR consensus	0	0
ATC rule	107	28

Number of Rules Selected= 10; FS, RS: Forward strand, reverse strand

3 讨论

在真核生物中，染色质结构随细胞周期的变化而发生改变，蛋白质在染色体结构组成上发挥主导作用。以蛋白质为主的核基质通过与染色质上一段特殊的 DNA 序列-核基质结合区(MAR)特异结合，把染色体分隔为环状结构，形成染色体结构的基本单位，独立参与

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基因表达调控。研究表明,结合核基质蛋白的 MAR 序列除了作为染色质环的边界成分外,还参与 DNA 复制、基因转录等基因表达的调控[7]。因此,通过人体细胞 MAR 性质和功能的研究,对阐明基因表达调控的复杂机制具有重要意义。

我们利用 MARs 在真核基因组中能特异结合核基质蛋白,且结合复合体能拮抗 DNase Ⅰ 和高盐处理的特性,从人的 T 细胞基因组中分离、抽提出了 MARs。随机 MARc DNA 片段大小不均一,在 100 bp ~ 15 kb 之间,呈弥散分析,与文献[8]报道的结果一致。同时,将获得的 MARs 填平插入到 *Sma* Ⅰ 平端化的载体 PUC19 上,应用β-半乳糖苷酶选择系统筛选出 58 个阳性转化克隆。抽提出的 MARs 由于序列大小不同,碱基排列各异,如果选用某一种或几种内切酶势必会破坏某些 MAR 序列的完整性。因此,在实验中我们选用 DNA 多聚酶 Klenow Ⅰ 大片段使其平端化有益于连接又不破坏MARs 的完整性。平端化的载体自连率很高,β-半乳糖苷酶选择系统有利于筛选出插入外源 DNA 的克隆。实验过程中从克隆的 MARs 库中,随机挑取 58 个单菌落扩增后经碱变性法抽提,酶切电泳结果显示插入的片段约从 300 bp 至 3 kb,大小不同。而我们从基因组中抽提的 MARs 序列电泳结果片段大小约 100 bp 至 15 kb,这可能是太大的片段摩尔浓度太低,不利于连接到载体上,而分子量太小的片段热运动太快,连接后不稳定,分子量在 300 bp 至 3 kb 的片段摩尔浓度适中,热运动也不致使连接上的片段断裂。

目前,MAR 鉴定的方法包括体内结合法和体外结合法两种,体内结合法操作繁琐[9]。在本实验中,体外结合实验采用琼脂糖电泳,成功证明了分离的 MARs 具有在体外与核基质蛋白结合的生物活性。该方法不需要同位素,减少了标记同位素对人体和环境的辐射伤害和污染,而且不需用 PAGE 凝胶,实验快速、操作简便,是一种简便、快速、环保的新方法。研究表明,MAR 序列的主要特征是富含 AT,其 AT 含量可超过 70%,其长度可由几百 bp 到几个 kb 不等。比较不同 MARs 的碱基序列,发现 MAR 在碱基序列组成上不存在保守性,但不同的 MAR 又可以竞争结合核基质上的同一位点,表明不同来源的 MAR 序列之间有着相似的特征结构,包括链弯曲,狭窄的小沟和单链区等。特征结构的形成,是因为 MARs 通常包含 A-box (AATAAAAA/CAA)或 T-box (TTTTATTTTT)、TATAAA 结构域及拓扑异构酶 Ⅱ 识别切割序列等 DNA 结构域(Motifs)。MARs 的 DNA 特殊结构域在其功能发挥中具有不同的作用[10]。

我们从人 T 细胞基因组中分离、筛选出染色体的随机 MARs,任意挑选其中一个克隆,进行 MAR DNA 序列测定和分析。生物信息学分析结果显示:在长度为 593 bp 个碱基的 MAR 片段中,AT 含量高达 66%与文献[11]报道的 MARs 序列中 AT 含量较高一致,符合 MARs 的碱基组成特征;并且序列中含有多个复制起点、Topo Ⅱ 识别位点、AT 富集区、扭结 DNA 和弯曲 DNA 等 DNA 特殊结构域,并且同植物 MAR 没有任何一致性。同一 DNA 序列中存在不同元件的组合说明在控制一系列细胞的发育过程中,它们可能发挥有正的或负的调控元件的功能。这些作用元件还表明该序列可能具有能够保护稳定整合入宿主基因组的外源基因,形成特殊功能结构区域,防止被甲基化,也不被异染色质化,即使在靠近着丝粒的异染色质区域,外源基因也能够转录表达,从而使该基因的转录和表达效率得到明显的提高。因此,通过对 MAR 结构和功能的初步研究,为进一步研究 MARs 在真核细胞 DNA 复制及基因表达调控中的作用奠定基础。

参考文献:

[1] Heng H H, Goetze S, Ye C J, *et al*. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions[J]. J Cell Sci, 2004, 117 (pt 7): 999-1008.

[2] Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation[J]. Cell, 2004, 116(2): 259-272.

[3] Bode J, Benham C, Knopp A, *et al*. Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements)[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2000, 10(1): 73-90.

[4] Allen G C, Spiker S, Thompson W F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing[J]. Plant Mol Biol, 2000, 43(2-3): 361-376.

[5] Banerjee S, Lohia A. Molecular analysis of repetitive DNA elements from Entamoeba histolytica, which encode small RNAs and contain matrix/scaffold attachment recognition sequences[J]. Mol Biochem Parasitol, 2003, 126(1): 35-42.

[6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著. 金科雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1992. 56-69.

[7] Kim J M, Kim J S, Park D H, *et al*. Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions[J]. J Biotechnol, 2004, 107(2): 95-105.

[8] Michalowski S M, Allen G C, Hall G E Jr, *et al*. Characterization of randomly-obtained matrix attachment regions (MARs) from higher plants[J]. Biochemistry, 1999, 38(39): 12795-12804.

[9] Carey M, Smale S T. Transcriptional Regulation in Eukaryotes: Concepts, Strategies, and Techniques[M]. New York: Coold Spring Harbor Laboratory, 2003. 201-230.

[10] Iao W D, Zhang C S, Hu G F, *et al*. Multiple cis-acting sequences implicate function diversity in nuclear matrix attachment regions of bovine mammary gland[J]. Yi Chuan Xue Bao, 2003, 30(5): 397-406.

[11] Liebich I, Bode J, Reuter I, *et al*. Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs)[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(15): 3433-3442.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net