

异源 MAR 介导外源基因与家蚕受精卵核基质的体外结合^①

周丛照 李振刚 聂焰 高红

(中国科学技术大学生物系, 合肥 230027)

摘要 以携带人 β 干扰素基因 5' 上游 MAR(Matrix Association regions)的质粒 pCL 为载体, 在其 BamHI 位点上正向插入天蚕 (*Antheraea ramamai*) 丝素基因核心区 Af6.8 而构建成质粒 pMAC。通过质粒 pMAC、pAy6.8 和 pCL 与家蚕 (*Bombyx mori*) 受精卵核基质的体外结合及其比较分析发现, 在体外异源 MAR 能有效地介导外源基因与核基质结合。这为 MAR 作为真核基因转移、整合和表达的载体提供了一个初步的实验证据。

关键词 MAR, 核基质, 体外结合

In vitro Association of Exogenous Gene with the Nuclear Matrix of *Bombyx mori* Fertilized Eggs Mediated by Heterogeneous MAR

Zhou Congzhao Li Zhengang Nie Yan Gao Hong

(Department of Biology, USTC, Hefei 230027)

Abstract We have constructed a plasmid pMAC by inserting the core region of *Antheraea yamamai* fibroin gene into the BamHI site of the plasmid pCL which contains the MAR upstream huIFN- β gene. *In vitro* association of pCL, pAy6.8 and pMAC with the nuclear matrix of *Bombyx mori* fertilized eggs indicated that pMAC and pCL could tightly bind to the nuclear matrix, but pAy 6.8 found much more ineffectively. This provides a preliminary evidence for MAR as a vector for eukaryotic genes transfer, integration and expression.

Key words Matrix association regions, Nuclear matrix, *in vitro* association

核基质 (Nuclear matrix) 是存在于真核生物细胞核中的一种三维网架体系, 它不仅参与了真核生物的 DNA 复制、RNA 合成以及 hnRNA 的加工, 而且与染色体的功能构建、有丝分裂、甾类激素作用、病毒复制和致癌作用有关⁽⁵⁾。DNA 与核基质的相互作用是通过 MAR(Matrix association regions)特异性地结合到核基质上来完成的, 真核生物的染色质被 MAR 分割成拓扑学限制的功能区域而结合在核基质上⁽²⁾。尽管 MAR 是真核基因特有的一种顺式作用元件(Cis-acting element), 但不同于经典的增强子, 它并不增强内源基因的表达, 只对稳定整合到宿主细胞染色体上的外源基因表现出明显的增强作用⁽³⁾。这种转录增强作用与转录的起始点和外源基因与 MAR 之间的距离无关, 只与该基因的拷贝数及其整合状态有关⁽⁴⁾。

家蚕 (*Bombyx mori*) 是一种重要的经济昆虫, 同时还是研究真核基因表达调控的一种理想模型。由于 MAR 与核基质紧密结合的特异性及其对外源基因的转录增强作用, 它有可能作为真核基因转移、整合和表达的一种有效载体⁽¹⁾。为此, 我们将天蚕 (*Antheraea yamamai*) 丝素基因核心区 6.8kb 片段 Af6.8 正向插入质粒 pCL 的

^①本课题由中国科学技术大学校内青年基金资助。

*Bam*HI 位点而构建成质粒 pMAC, Af6.8 与 pCL 中携带的人 β 干扰素基因 5' 上游的 MAR 相连。通过 pMAC、pAy6.8 和 pCL 与家蚕受精卵核基质的体外结合及其比较分析, 为 MAR 介导外源基因与核基质的紧密结合提供初步的实验证据。

1 材料与 方法

1.1 材料与试剂

家蚕品种由中国农业科学院蚕业研究所提供, 质粒 pAy6.8 为日本国立基础生物研究所发育生物系的 Y. Suzuki 博士赠送, 质粒 pCL 由德国 GBF, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Genetik von Eukaryoten 的 J. Bode 教授惠赠。限制性内切酶、T4 DNA Ligase 及 CIAP 均购自华美生物工程公司, *E. coli* DNA 聚合酶 I Klenow 片段为 Bio-Lab 公司产品, α -³²P-dATP 购自北京亚辉生物工程公司。

1.2 质粒 pMAC 的构建

质粒 pCL 和 pAy6.8 的扩增、抽提和纯化参照 *Molecular Cloning* 一书的方法进行⁽⁵⁾。质粒 pAy6.8 经 *Bam*HI 完全酶解后以低熔点琼脂糖电泳回收 6.8kb 的片段 Af6.8; 以 *Bam*HI 酶切 pCL 而获得线性质粒, 再经 CIAP 脱磷酸化。Af6.8 和处理后的 pCL 在 16℃ 以 T4 DNA Ligase 连接 12 小时, 连接产物直接转化处于感受态的 *E. coli* DH5 α 菌株。

1.3 质粒 pCL、pAy6.8 和 pMAC 的 *Eco*RI 的酶解及其标记

分别取等摩尔数的质粒 pCL、pAy6.8 和 pMAC, 以足量的 *Eco*RI 完全酶解, 直接向酶解后的反应液中加入 α -³²P-dATP 和 *E. coli* DNA 聚合酶 I Klenow 片段于室温下标记 25 分钟, 质粒 DNA 的放射性强度与其摩尔数成正比。

1.4 家蚕受精卵核基质的制备

主要参照 Cockerill 和 Garrard 的方法进行⁽²⁾。家蚕受精卵经玻璃匀浆后以蔗糖密度梯度法提取细胞核, 纯化的细胞核再经 DNase I 处理足够的时间以保证内源 DNA 剩下不到 1%。

1.5 质粒与核基质的体外结合和回收⁽²⁾

在 3 个 Eppendorf 管中加入等量的核基质, 然后向每管中分别加入等摩尔数的标记质粒 pCL、pAy6.8 和 pMAC 以及超声处理的 *E. coli* DNA (作为非特异性竞争剂), 在测定溶液 (50mM NaCl, 10mM Tris · Cl, pH7.4, 2mM EDTA, 0.25M 蔗糖, 0.25mg/ml BSA, 20ng/ml 32P 标记的 DNA, 100 μ g/ml 超声处理的 *E. coli* DNA) 中于 23℃ 保温 1.5hr (不时摇晃)。通过离心和洗涤除去未结合的 DNA, 蛋白酶 K 消化 3hr 后以苯酚: 氯仿抽提法回收核基质上结合的质粒 DNA。

1.6 电泳及放射自显影⁽⁵⁾

将回收的 3 组 DNA 分别点于 1% 的琼脂糖凝胶上, 电泳后用滤纸干燥凝胶, 压于带有增感屏的 X 光片夹中在 -20℃ 下曝光 24hr, 然后进行放射自显影并照相。

2 结果与 讨论

2.1 质粒 pMAC 的构建及其鉴定 (图 1)

在转化后长出的菌落中有两种重组子, 一种是 Af6.8 正向插入 pCL; 另一种则是反向插入, 随机挑取 5 个进行小规模培养, 抽提其质粒, 分别以 *Bam*HI 单酶解以及 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶解, pMAC 经两组酶解均产生 6.8kb 和 3.7kb 左右的两种片段, 说明 Af6.8 是正向插入 pCL 的。

2.2 MAR 在体外结合时的介导作用

由于 pMAC、pAy6.8 和 pCL 中均只有一个 *Eco*RI 酶切位点, 而且采用 *E. coli* DNA 聚合酶 I Klenow 片断

掺入 α - 32 P-dATP 进行末端标记, 三者的实验条件完全相同, 因此比较凝胶上的放射自显影强度即可得知从核基质上回收的 DNA 的摩尔数。结果表明(图 2), 质粒 pCL 和 pMAC 均能有效地和家蚕受精卵核基质结合, 而质粒 pAy6.8 的结合能力明显较低。Monitor 测得 pMAC 的结合量与 pCL 相当, 但比 pAy6.8 至少高出一个数量级。这说明人 β 干扰素基因 5' 上游的 MAR 能有效地介导天蚕丝素基因核心区与家蚕受精卵核基质的体外结合。

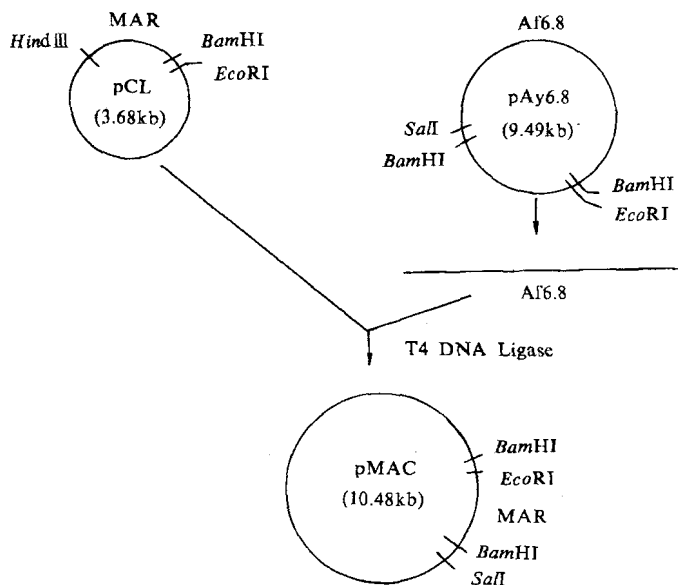


图 1 质粒 pMAC 的构建示意图

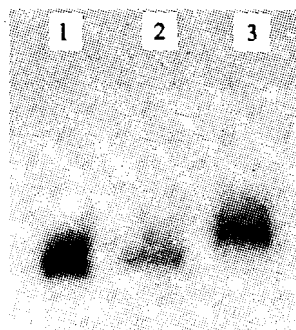


图 2 质粒 pCL、pAy6.8 和 pMAC 与家蚕受精卵核基质体外结合后电泳的放射自显影结果

1. pCL; 2. pAy6.8; 3. pMAC.

参 考 文 献

- (1) 周丛照, 李振刚, 1994. 高技术通讯, 4(12): 37.
- (2) Cockerill P N *et al*, 1986. Cell, 44: 273.
- (3) Jackson D A *et al*, 1990. EMBO J, 9: 567.
- (4) Phi-Van L *et al*, 1990. Prog. Mol. Subcell Biol., 11: 1.
- (5) Sambrook J *et al*, 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1.21.
- (6) Verheijen R *et al*, 1988. J. Cell Sci., 90: 11-36.

本文于 1995 年 7 月 10 日收到, 1995 年 11 月 14 日修回。