

Alpha 1 抗胰蛋白酶核基质附着区增强 RNA 聚合酶 II 依赖的转录*

李志艳 张涌**

(西北农林科技大学生物工程研究所 杨陵 712100)

摘要 核基质附着区是一种真核生物的 DNA 元件,能调控染色体结构和活性。为研究体内 MAR 相关的染色质准入和转录调控,从人基因组中克隆了 Alpha 1 抗胰蛋白酶核基质附着区 ($\alpha 1$ -AT MAR) 并将其连入 pEGFP-C1 载体。分别以空载体和携带 MAR 的载体通过脂质体法转染人胚肾 293 细胞系。经 G418 筛选 20 天的细胞池用作实验分析。半定量 RT-PCR 及荧光显微镜观察显示此 MAR 能够增强临近基因的表达。进一步用染色质免疫共沉淀 (ChIP) 共定位 CMV 启动子和 RNA 聚合酶 II (RNAPII), PCR 结果显示存在 MAR 元件时,更多的 RNA 聚合酶 II 被富集到启动子区。ChIP 方法可用于证实 MAR 介导的转录激活,在实时检测方面比 RT-PCR 提供了更多动力学信息。这项技术为进一步研究基因表达调控提供了技术平台。

关键词 核基质附着区 染色质免疫共沉淀 转录调控 RNA 聚合酶 II

中图分类号 Q814

核基质附着区 (S/MAR) 是长约 300 ~ 3000 bp 的 DNA 调控元件,常组织成独立染色质环^[1]。在组织抽提后,通过 DNA 核晕结构荧光原位杂交 (Halo-FISH) 的方法,可以看见这些环锚定在核基质或染色体支架上^[2]。作为一种功能单位, S/MAR 参加不同的生物学过程,包括 DNA 复制,转录调控和染色体包装^[3~5]。近年来其在信号转导,凋亡,胚胎发育,染色质印记和基因组不稳定性方面的作用^[6~9] 也相继被报道。

许多 S/MAR 相关的转录因子和酶是参与转录和 RNA 成熟复合体的一部分^[10,11]。一些研究也表明 S/MAR 为染色质重塑提供一个锚定平台^[12], 便利染色质环的移动。在细胞周期的某个阶段, S/MAR 为转录机启动创造一个准入环,随后转录激活物富集,转录前引发复合物装配,从而提高了建立一个活性基因座的可能性。然而实际情况可能更复杂,一个基因在适合细胞恰当阶段激活是一个综合过程,其中涉及许多因子的调控平衡。即便是 S/MAR 已

被普遍认为是一个正调控因子,一些研究也显示其在转录方面的不同效果,这就是所谓争议活性^[13]。因此对其作用机理进行研究显得更加必要。在最近几十年,通过体内和体外结合实验,许多 MAR 结合蛋白被鉴定和特性化。但最大的争议在于从核中分离纯化蛋白的过程中,生化方法的局限性引起沉淀,改变了蛋白的结合特异性^[14]。几种蛋白被报道以非严谨的方式结合 S/MAR^[15], 比如 STATB1, HistoneH1, SAF-A/HnRNP-U, SAF-B and ARBP. Topo-2 的定位与以前的功能模式也并不一致^[16]。总之, S/MAR 与它的结合关系是一个可逆的动力学反应,是细胞特异的空间时序过程。在研究分子相互作用方面,许多方法^[16,17] 都展示了诱人的前景,比如电磁波,核磁共振,染色体构象捕获,染色质免疫共沉淀 (ChIP)。传统生物化学技术与这些新方法结合,再借助计算机的分析,使研究分子动力学和染色质工程学的工具更有效和可靠。ChIP 经常被应用于共定位启动子和转录因子来分析 DNA 和蛋白之间的关系。在此方法中,超声破碎染色质以产生一些小片段,然后用相应的抗体-蛋白复合物与特异片段免疫沉淀,用 PCR

收稿日期: 2006-11-24 修回日期: 2007-01-05

* 国家“863”计划资助项目 (2004AA213072)。

** 通讯作者, 电子信箱: zhangyong0085@yahoo.com.cn

方法分析预期的DNA序列,来揭示体内蛋白质和DNA的结合关系。作为一种高度灵敏和特异性的实验,曾被用于展示转录因子和MAR序列的结合。然而转录是一个涉及大量激活和抑制因子的复杂过程,这种单因子的结合不能为转录调控提供充分的证据,为了更好地预测MAR在转录调控方面的作用,用ChIP来研究RNA聚合酶和启动子相互关系来确定MAR的功能应该是一个很好的选择。Rolling等^[18]已经分离并确定了 $\alpha 1$ -AT MAR位于抗胰凝乳蛋白酶基因的上游,在本文中用 $\alpha 1$ -AT MAR作为模型,利用ChIP方法研究基因表达的调控。

1 材料和方法

1.1 PCR

人血液基因组DNA的提取参照Sambrook等^[19]提供的方法。根据GenBank的信息(No: AF156542),通过PCR获得1252 bp的 $\alpha 1$ -AT MAR序列,为方便定向克隆,在上下游引物的5'端分别引入BsrG1和XhoI酶切位点。

上游引物: 5'-TG TACAAGTAATGCATATTGGCTTA GATAAGTGAGTGCT-3'

下游引物: 5'-CTCGAGACCTTTTACAACCTTACTCA GACCTTTCATTA -3'

PCR反应条件为: 94°C 5min; 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 90s, 执行30个循环后, 72°C进一步延伸10min, 1% 琼脂糖凝胶分析扩增产物。

1.2 克隆技术和载体构建

根据载体说明书进行TA克隆,将 $\alpha 1$ -AT MAR的PCR产物连入pMD-18T (TaKaRa)载体中得到pMM质粒。酶切和测序证实了插入的正确性。用BsrG1和XhoI消化pMM,并将 $\alpha 1$ -AT MAR片段插入pEGFP-C1载体(Clontech)的相应位点,获得重组载体pME。

1.3 细胞培养和转染

人胚肾293细胞被培养在含10%胎牛血清的DMEM培养基中。根据Invitrogen公司的说明,用脂质体2000在六孔板中分别转染pEGFP-C1和pME质粒。转染24h后,用终浓度500 μ g/ml的G418筛选20天,阳性细胞用于实验分析。

1.4 半定量 RT-PCR

对EGFP的表达进行半定量RT-PCR分析。用TRIzol试剂(Invitrogen)提取总RNA,取2 μ g用MMLV反转录酶(Promega)反转录后,以EGFP特异性引物进行PCR反应,获得422 bp的产物。459 bp的人GAPDH

用作内参。反应条件为94°C预变性5min后,94°C变性1min,56°C退火30s,72°C延伸40s,执行30个循环后,进行72°C 10 min的终末延伸。

EGFP引物如下:

上游引物: 5'-CCACAAGTTCAGCGTGTCCG -3';

下游引物: 5'-AGTTCACCTTGATGCCGTTCTTC-3'。

GAPDH引物为:

上游引物: 5'-GATGCCCCCATGTTTCGTCAT-3 ;

下游引物: 5'-GTGCTCAGTGTAGCCAGGATG-3'。

1.5 染色质免疫共沉淀(ChIP)

甲醛处理293细胞使DNA和蛋白质交联,分离染色质,用抗RNA聚合酶II抗体(Upstate)按文献[20]描述的进行免疫共沉淀。简而言之,取 2×10^6 个稳定转染细胞,用1%的甲醛室温固定10min,然后用1.25mol/L甘氨酸终止交联反应。在裂解缓冲液中,裂解细胞并且超声破碎,产生大约500bp左右的DNA片段。超声破碎以后取一小部分检测破碎效率,其他的裂解液上清在IP缓冲液中稀释6倍,在特异性抗体加入之前,用琼脂糖/G珠子进行预清除,然后加入特异性抗RNA聚合酶II抗体和阴性对照抗体IgG 4°C过夜。几次洗涤以后,复合物从珠子上洗脱下来。用酚氯仿抽提纯化DNA,最后应用于PCR分析。取1/50免疫沉淀前的输入样品和1/10免疫沉淀后的DNA样品进行扩增。PCR按照标准的反应体系配置,反应条件为94°C预变性4 min,94°C变性1 min,55°C退火30 s,72°C延伸30 s,执行30个循环后,进行72°C 10 min的终末延伸。用于扩增的引物如下:

上游引物: 5'-CGTATTAGTCATCGCTATTACCA-3';

下游引物: 5' - GCGGATCTGACGGTTCACCTA-3'。

2 结果

2.1 $\alpha 1$ -AT MAR的PCR扩增和鉴定

1%的琼脂糖凝胶分析PCR扩增产物,图1显示获得了预期的1252bp的片段。为了保证亚克隆片段位点和大小正确性,重组质粒pMM用BsrG1和XhoI酶切鉴定,电泳结果如图2所示。

2.2 表达载体pME的构建和鉴定

利用引入的限制性酶切位点, $\alpha 1$ -AT MAR被插入pEGFP-C1的下游得到pME表达载体,构建结构图见图3。重组质粒pME用酶切和PCR进行鉴定,可见1252bp的MAR和4700bp的载体片段(图4)。

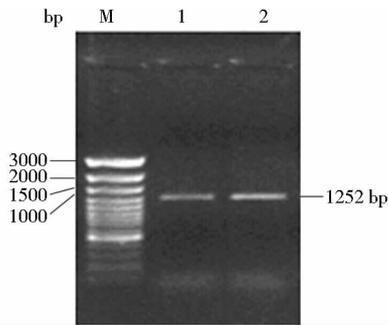


图 1 $\alpha 1$ -AT MAR 的 PCR 结果
M: DNA 分子量标记; 1, 2: $\alpha 1$ -AT MAR 的 PCR 产物

Fig.1 PCR products for $\alpha 1$ -AT MAR

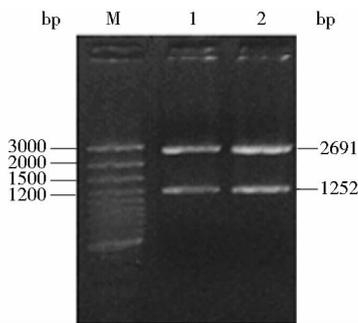


图 2 pMM 的酶切鉴定结果
M: DNA 分子量标记; 1, 2: pMM 的酶切片段

Fig.2 pMM enzyme digestion results



图 3 重组质粒 pME 的构建图

CMV: CMV 启动子; EGFP: 增强型绿色荧光蛋白报告基因; MAR: $\alpha 1$ -AT MAR; TAA: 终止密码子

Fig.3 The structure of recombinant pME

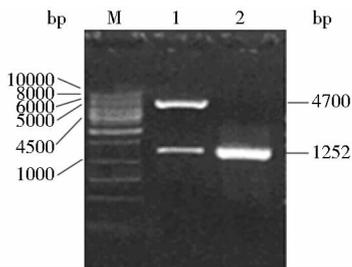


图 4 重组质粒 pME 的鉴定

M: DNA 分子量标记; 1: pME 的酶切片段; 2: pME 的 PCR 结果

Fig.4 Identification of recombinant pME

2.3 荧光显微镜分析

转染后 20 天, 表达 EGFP 阳性细胞用 Nikon 显微镜观察, 结果见图 5。与转染 pEGFP-C1 细胞 (A) 比较, 转染 pME 细胞 (B) 其 EGFP 表达明显提高。

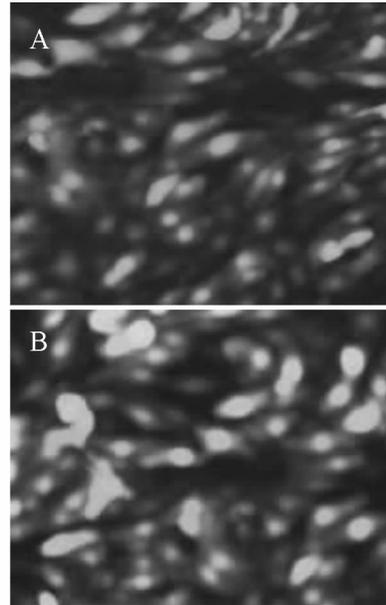


图 5 荧光显微镜图像

Fig.5 The image of fluorescence microscope

2.4 EGFP 的半定量 RT-PCR 分析

转染后 20 天, 提取总 RNA 进行半定量 RT-PCR 分析。GAPDH (422 bp) 和 EGFP (459 bp) 的琼脂糖凝胶电泳结果见图 6 的 a 和 b。在 b 中, 比较整合了 pEGFP-C1 (4) 和 pME (2, 3) 载体细胞克隆, 发现 EGFP 的表达提高了大约 2 倍。

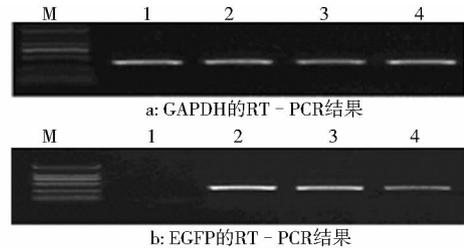


图 6 EGFP 的半定量 RT-PCR 分析

M: DNA 分子量标准; 1: 未转染细胞; 2: 整合 pME 细胞克隆 1; 3: 整合 pME 细胞克隆 2; 4: 整合 pEGFP-C1 细胞克隆

Fig.6 Semiquantitative RT-PCR analysis of EGFP

2.5 ChIP 分析

在制备细胞核/染色质片段后, 移走 25 μ l 裂解液上清, 检测破碎效率, 图 7a 显示了染色质片段达到了大约

500bp 左右为理想长度。然后进一步分析其余样品,图 7b 的 CMV 的 PCR 分析显示了免疫沉淀前的质量控制。图 7c 显示,用抗 RNA 聚合酶 II 的抗体免疫沉淀后,含 MAR 元件的载体 pME 与空载体 pEGFP-C1 比较,CMV 的 PCR 结果提高了 30% ~ 40% 左右。阴性对照用鼠 IgG 进行免疫沉淀,具有背景 PCR 产物,但其并不掩盖特异性抗体免疫沉淀的变化趋势。

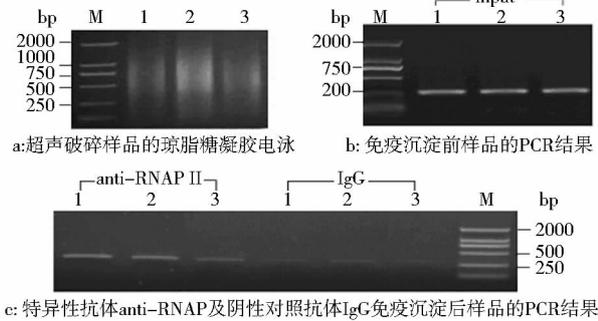


图 7 CMV 启动子的 ChIP 结果

M: DNA 分子量标准; 1: 整合 pME 细胞克隆 1;

2: 整合 pME 细胞克隆 2; 3: 整合 pEGFP-C1 细胞克隆

Fig. 7 ChIP results of CMV promoter

3 讨论

定位在 alpha 1 抗胰凝乳蛋白酶基因上游的 $\alpha 1$ -AT MAR 可能是一个大染色质结构域 5' 边界。除此之外, $\alpha 1$ -AT MAR 还有一些很有吸引力的特征,在其构成中, LTR 转座子元件占 85%, 并且还含有一个小的外显子残留。这些都暗示这个区域可能与真核生物基因组进化有关^[18]。提示此 MAR 不仅能够用作基本转基因构件,也可以为同源重组实验提供一个支架。在这里,我们把它作为一个模式系统,对其在转录调控方面的作用进行研究和确定,然后应用 ChIP 方法进一步揭示其作用机制。

转录率是基因表达的一个重要标准,通常用于此目的方法包括 northern 印迹,原位杂交, RNA 保护实验和定量 RT-PCR。然而,在某个阶段,转录已经停止, mRNA 水平并不是总能反映真实的转录激活率^[21]。特别是对那些具有长半衰期基因,实际的转录情况要考虑 mRNA 的稳定性。ChIP 是一个有力的方法,能够分析细胞内转录因子和染色质调控复合物与 DNA 的相互作用。本文中,我们用 ChIP 来研究基因实时转录活性, RNAPII 锚定在启动子上是染色质准入的一个关键决定因素,能很好地反应存在 MAR 元件时,报

告基因的转录率。同时,与抗聚合酶 II 抗体的一次免疫共沉淀可以通过设计不同引物对许多感兴趣的基因进行研究。最重要是, ChIP 提供一个天然染色质结构及不同功能状态下因子与基因结合活细胞图谱。

根据基因登录号,克隆了 $\alpha 1$ -AT MAR, 其中 75% 的 AT 含量给 PCR 带来了困难。在优化引物设计后,得到 1252 bp 的片段。通过在线软件分析显示此 MAR 含有很多活性基序。为了进一步研究它的活性和机制,我们进行了转基因构件来研究报告基因 EGFP 的表达和 CMV 启动子富集 RNAPII 的能力。用细胞池作为研究系统以减少与拷贝数和整合位点相关的差异。当 MAR 被用作顺式元件时,在总体细胞水平中展示了增强荧光表达,其中个别细胞也展示了额外的提高。与不含 MAR 的载体相比,携带 MAR 元件的载体, RT-PCR 分析显示 EGFP 的 mRNA 水平提高两倍;通过 ChIP 实验的 PCR 分析,表明 CMV 和 RNAPII 共定位比率提高了约 30%。所有这些都提示当整合入基因组中时,此 MAR 能够增强异源报告基因的表达并且调控染色质准入。与血液结合素结果不同^[22],对于具有 26h 半衰期的 EGFP 而言, RT-PCR 和 ChIP 保持一致,但并不完全相同。也就是说 ChIP 可以用作转录效率的稳定性和定量预测。并且 ChIP 提供更多信息,提示 MAR 可作为边界元件帮助打开一些活性结构域并且指导其它转录因子与 RNAPII 结合。在这里,我们建立了研究转录调控的技术平台,并展示了涉及 MAR 的生理状态的准入和 DNA-蛋白质相互作用的可行性。

参考文献

[1] Heng H H, Krawetz S A, Lu W, et al. Re-defining the chromatin loop domain. *Cytogenet Cell Genet*, 2001, 93: 155 ~ 161

[2] Goetze S, Baer A, Winkelmann S, et al. Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(6): 2260 ~ 2272

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

[4] Stein G S, Van Wijnen A J, Stein J L, et al. Interrelationships of transcriptional machinery with nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1999, 9(3 ~ 4): 183 ~ 190

[5] Sumer H, Craig J M, Sibson M, et al. A rapid method of genomic array analysis of scaffold/matrix attachment regions (S/MARs) identifies a 2.5-Mb region of enhanced scaffold/matrix attachment at a human neocentromere. *Genome Res*, 2003, 13(7): 1737 ~ 1743

[6] Gohring F, Schwab B L, Nicotera P, et al. The novel SAR-

- binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown. *EMBO J*, 1997, 16 (24): 7361 ~ 7371
- [7] Nawaz M, Sung K, Khan S A, et al. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 (10): 6461 ~ 6466
- [8] Purbowasito W, Suda C, Yokomine T, et al. Large-scale identification and mapping of nuclear matrix-attachment regions in the distal imprinted domain of mouse chromosome 7. *DNA Res*, 2004, 11(6): 391 ~ 407
- [9] Jackson J A, Trevino A V, Herzig M C, et al. Matrix attachment region (MAR) properties and abnormal expansion of AT island minisatellites in FRA16B fragile sites in leukemic CEM cells. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(21): 6354 ~ 6364
- [10] Nayler O, Stratling W, Bourquin J P, et al. SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(15): 3542 ~ 3549
- [11] Martens J H, Verlaan M, Kalkhoven E, et al. Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(8): 2598 ~ 2606
- [12] Yasui D, Miyano M, Cai S, et al. SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances. *Nature*, 2002, 419(6907): 641 ~ 645
- [13] Bode J, Benham C, Knopp A, et al. Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by scaffold/matrix-attached regions (S/MAR elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2000, 10(1): 73 ~ 90
- [14] Hancock R. A new look at the nuclear matrix. *Chromosoma*, 2000, 109: 219 ~ 225
- [15] Tagashira H, Shimotori T, Sakamoto N, et al. Unichrom, a novel nuclear matrix protein, binds to the Ars insulator and canonical MARs. *Zool Sci*, 2006, 23(1): 9 ~ 21
- [16] Blanton J, Gaszner M, Schedl P. Protein-protein interactions and the pairing of boundary elements *in vivo*. *Genes Dev*, 2003, 17(5): 664 ~ 675
- [17] Tsutsui K M, Sano K, Tsutsui K. Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Med Okayama*, 2005, 59(4): 113 ~ 120
- [18] Rollini P, Namciu S J, Marsden M D, et al. Identification and characterization of nuclear matrix-attachment regions in the human serpin gene cluster at 14q32.1. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(19): 3779 ~ 3791
- [19] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 14 ~ 21
- [20] Shang Y, Hu X, Di Renzo J, et al. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, 2000, 103(6): 843 ~ 852
- [21] Sandoval J, Rodriguez J L, Tur G, et al. RNAPol-ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time gene transcription. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(11): e88
- [22] Albrecht J H, Muller-Eberhard U, Kren B T, et al. Influence of transcriptional regulation and mRNA stability on hemopexin gene expression in regenerating liver. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 31(4): 229 ~ 233

Alpha 1-antitrypsin Matrix Attachment Region Enhances RNA Polymerase II-dependent Transcription

LI Zhi-yan ZHANG Yong

(Institute of Biotechnology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract Eukaryotic DNA element called Matrix Attachment Regions (MARs) can function on regulating the structure and activity of chromosome. Traditional quantitation *in vitro* and indirect functional analysis can not always reflect MAR-involved physiological state. In order to study transcription regulation and make a try in methodism, α 1-antitrypsin MAR (α 1-AT MAR) is cloned and incorporated into pEGFP-C1 vector. Non-MAR-containing and MAR-containing plasmids were then transfected into HEK-293 cells with LipofectamineTM 2000 respectively. Positive cell clones were assayed after 20 days of selection by G418. Semiquantitative RT-PCR and fluorescence microscope analysis show that this MAR has a positive effect on modulating nearby gene expression. Further, co-localization with newly CMV promoter and RNA polymerase II (RNAPII) was detected by chromatin immunoprecipitation (ChIP). The PCR result demonstrates that more RNAPII was recruited to the CMV promoter to initiate transcription in presence of MAR. ChIP can be used to confirm the MAR-mediated transcriptional activation and provide more reliable information than RT-PCR in real time. The technology is also providing a platform for our research in gene expression regulation.

Key words S/MAR Chromatin immunoprecipitation (ChIP) Transcription regulation RNA polymerase II (RNAPII)