

# 利用环形染色体构象捕获技术对*Bcl11b*基因座位在细胞核内空间组织的研究

任立成<sup>1</sup> 李美英<sup>2</sup> 孙元田<sup>1</sup> 苏振宇<sup>1</sup> 杨智<sup>3</sup> 李冬娜<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>海南医学院生物学教研室, 海口 571199; <sup>2</sup>中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101;

<sup>3</sup>海南医学院形态学教研室, 海口 571199)

**摘要** 环形染色体构象捕获(4C)技术实现了在全基因组范围内捕获与4C靶位点发生相互作用的基因座位, 因而通过4C相关技术可以进一步研究靶基因座位在细胞核内的空间组织形式。该文以*Bcl11b*基因座位作为4C分析的靶位点, 通过优化4C分析的反向巢式PCR扩增条件, 实现4C分析PCR的高效扩增; 并通过有限克隆筛选与普通测序分析相结合的方法, 在全基因组范围内捕获到一些与*Bcl11b*基因座位发生潜在相互作用的基因座位。这些基因座位与靶位点间的相互作用既有发生在相同染色体内的, 也有发生在不同染色体之间的。这些基因座位间的相互作用表明了*Bcl11b*基因座位在细胞核内复杂的空间组织形式。

**关键词** 环形染色体构象捕获技术; 染色体构象捕获技术; *Bcl11b*基因座位; 染色质空间组织

## Study on the Spatial Organization of *Bcl11b* Gene Locus in Cell Nucleus with the Circular Chromosome Conformation Capture Techniques

Ren Licheng<sup>1</sup>, Li Meiyang<sup>2</sup>, Sun Yuantian<sup>1</sup>, Su Zhenyu<sup>1</sup>, Yang Zhi<sup>3</sup>, Li Dongna<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Biology, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; <sup>2</sup>Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;

<sup>3</sup>Department of Morphology, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

**Abstract** The genome-wide gene loci can be captured by the circular chromosome conformation capture (4C) technique, which potentially interacted with the target gene locus of the 4C assay. The spatial organization of the 4C target gene locus in cell nucleus can be further investigated using the 4C-related techniques. In this article, the *Bcl11b* locus was chosen as the target gene locus for 4C assay. Based on the serials of optimization experiments for the PCR conditions, the nested-reverse PCR was efficiently amplified for 4C assay. Combined with the limited clone screening and the general DNA sequencing techniques, many genome-wide gene loci were captured with the 4C assay, which potentially interacted with the *Bcl11b* gene locus. These interactions between the gene loci and the 4C target gene locus were occurred in inter-chromosome and intra-chromosome. The interactions between these gene loci showed the complex spatial organization of *Bcl11b* locus in cell nucleus.

**Key words** circular chromosome conformation capture, 4C; chromosome conformation capture, 3C; *Bcl11b* gene locus; chromatin spatial organization

收稿日期: 2013-08-13 接受日期: 2013-10-15

国家自然科学基金(批准号: 31260269)和海南医学院科研培育基金项目(批准号: HY2012007)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0898-66983739, E-mail: lidongn2002@aliyun.com

Received: August 13, 2013 Accepted: October 15, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31260269) and the Promotion Foundation of Hainan Medical University (Grant No.HY2012007)

\*Corresponding author. Tel: +86-898-66983739, E-mail: lidongn2002@aliyun.com

网络出版时间: 2013-10-23 12:20 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131023.1220.001.html>

染色质在细胞核内逐级折叠形成不同级别的高级结构, 这种三维组织形式调控了染色体上相关基因的表达模式<sup>[1-5]</sup>。染色体构象捕获(chromosome conformation capture, 3C)是近年发展起来的一种研究染色质在细胞核内组织的一种重要技术。环形染色体构象捕获(circular chromosome conformation capture, 4C)技术是在染色体构象捕获技术基础上发展起来的<sup>[5-7]</sup>。染色体构象捕获技术的原理是, 通过交联、酶切、连接等处理过程, 使空间位置靠近的不同基因座位间发生交联, 并通过连接反应使酶切后的染色质片段连接在一起<sup>[6-7]</sup>。在环形染色体构象捕获技术中, 往往通过在特定的感兴趣位点或诱饵(bait)设计引物, 通过反向PCR的方法研究特定基因座位在整个基因组内的所有相互作用元件<sup>[5]</sup>。该技术可以结合大规模测序和芯片杂交技术实现高通量分析, 在整个基因组范围内捕获所有与4C靶位点发生相互作用的基因座位; 该技术也可以与有限克隆筛选的方法相结合, 在全基因组内筛选与4C靶位点发生相互作用的基因座位, 进而研究靶基因座位在细胞核内的空间组织形式<sup>[5]</sup>。

*Bcl11b*是BCL基因家族的主要成员, 作为重要的转录调控因子在功能上具有多元性。它与淋巴造血系统发育和增殖、神经系统发育以及牙釉发育密切相关。为了研究该基因潜在的空间组织及其调控模式, 本文以*Bcl11b*基因座位作为靶位点, 通过4C分析与有限克隆筛选的方法研究该基因座位在细胞核潜在的空间组织形式。在细胞核的空间组织过程中, 许多的蛋白因子参与了这一过程; 其中核蛋白因子CTCF在参与介导染色质的空间组织中发挥十分重要的作用<sup>[8-12]</sup>。以*Bcl11b*基因座位上的一段保守序列为4C的靶位点或诱饵, 经过一系列的4C分析PCR优化实验, 并通过有限克隆筛选与普通测序分析技术相结合的方法, 在全基因组有限范围内捕获到一些与*Bcl11b*基因座位发生潜在相互作用的基因座位。本研究对进一步研究*Bcl11b*基因座位在细胞核内的空间组织以及该基因的表达调控具有十分重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

乳腺癌细胞MCF-7由本研究室保存。细胞液体培养基DMEM、胎牛血清均购自Hyclone公司。T4

DNA连接酶、DNA限制性内切酶*Dpn* II均为New England Biolabs公司产品。普通DNA纯化试剂盒、质粒纯化试剂盒、胶回收纯化试剂盒等都为天根生化科技有限公司产品。Anti-CTCF Rabbit antiserum以及Rabbit Normal IgG都为Millipore公司产品; 染色质免疫共沉淀试剂盒为Santan Cruz公司产品。PCR所使用的*ExTaq*<sup>TM</sup>酶、pMD18-T载体为宝生物工程(大连)公司产品。本文所使用的引物全部由上海英俊公司合成。

### 1.2 细胞培养与交联细胞核的准备

乳腺癌细胞MCF-7培养在DMEM中, 并补充10%新鲜的胎牛血清。在5% CO<sub>2</sub>压力、37 °C恒温培养箱中培养, 当细胞生长到90%左右的时候, 即可用于交联细胞核的制备。交联细胞核的制备主要参照文献报道的方法进行<sup>[5-6]</sup>。首先, 用1%甲醛室温固定10 min, 加入0.125 mol/L甘氨酸终止甲醛固定反应; 收集细胞, 并加入细胞裂解液, 在冰上裂解细胞大约1 h左右; 取部分样品, 用台盼蓝染色, 显微镜下镜检。并用细胞计数器计数, 计算样品包含细胞的数量。

### 1.3 4C样品的制备

4C样品的制备主要参照文献报道的方法进行<sup>[5-6]</sup>。首先, 取准备好的大约10<sup>6</sup>细胞核数, 用300 μL含有0.1% SDS、2% Triton 100的1×*Dpn* II Buffer重悬细胞核, 37 °C下振荡温育1 h; 加入10 μL的*Dpn* II 37 °C下振荡温育, 酶切消化过夜(14~16 h)。加入终浓度为1%的SDS, 于65 °C下水浴中温育20 min以灭活限制性内切酶*Dpn* II。将酶切产物在10 mL的连接体系中进行连接反应, 16 °C条件下连接过夜(14~16 h), 于65 °C下水浴温育20 min灭活T4 DNA连接酶。4C DNA样品的回收通过蛋白酶消化和酚氯仿抽提法进行。纯化后的DNA样品在Nanodrop ND-2000(NanoDrop Technologies)上定量。

### 1.4 染色质免疫共沉淀(ChIP)分析

抗CTCF染色质免疫共沉淀(anti-CTCF ChIP)主要参照文献报道的方法以及试剂盒的说明进行<sup>[9-10]</sup>。首先, 取预先准备好的大约10<sup>7</sup>的MCF-7交联细胞核在VC750(Sonics & Materials, Inc. USA)超声仪上超声, 将染色质破碎成片段。取8~10 mL RIPA Buffer将超声样品稀释, 加入3 μL的抗CTCF血清(大约3 μg), 在4 °C下不断震荡, 亲和反应过夜; 再加入20 μL的Protein A/G Agarose在4 °C下不断震荡,

亲和反应过夜。4 °C下, 2 000×g转速离心1 min, 去上清。加入预冷的洗涤buffer重悬beads, 洗涤beads三次。最后加入100 μL的洗脱 buffer, 洗脱亲和富集的DNA样品。富集样品中加入1 μL的蛋白酶K(10 mg/mL)在65 °C的水浴条件下消化、解交联过夜。DNA样品用DNA纯化试剂盒纯化回收。以anti-CTCF ChIP富集回收的DNA样品为模板, 通过半定量PCR的方法进行验证分析, PCR产物用2%的凝胶电泳分析。

### 1.5 4C巢式反向PCR扩增条件的优化

通过PCR方法对4C靶位点进行扩增, 将回收的PCR产物克隆连接到pMD18-T载体上, 以此重组载体作为模拟4C样品中的目标环形分子, 进行4C分析PCR扩增条件的优化。

对巢式反向PCR引物扩增的敏感性分析和优化: PCR扩增反应的模板为pMD18-T与4C靶位点的重组载体。将质粒浓度进行梯度稀释, 分别为: 0.1 ng、10 pg、1 pg、0.1 pg、10 fg。在优化引物的退火温度后, PCR扩增方法参照大连宝生公司所提供的Taq酶ExTaq<sup>TM</sup>产品说明进行。第二轮PCR的模板分别为第一轮PCR产物的10倍稀释物。

对4C分析PCR扩增的特异性进行分析和优化: 模板分别为: 10 pg的pMD18与4C靶位点的重组载体作为阳性对照; 120 ng的基因组DNA作为阴性对照; 10 pg的重组载体与120 ng的基因组DNA混合样, 模拟4C样品作为特异性对照; 同时对30 ng的4C样品DNA进行扩增。第二轮PCR的模板分别为第一轮PCR产物的10倍、100倍稀释物。所有PCR产物在1%的琼脂糖凝胶上电泳分析。

### 1.6 4C巢式反向PCR对相互作用基因座位的捕获

4C巢式反向PCR对相互作用基因座位的扩增, PCR反应条件根据优化的程序为: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, 63 °C退火20 s, 72 °C延伸2 min, 共30个循环。在20 μL的PCR反应体系中, 模板量分别为: 200 ng、160 ng、80 ng的4C样品模板量; 0.1 ng的重组质粒作为阳性对照; 120 ng的基因组DNA作为阴性对照; 0.1 ng的重组质粒与120 ng的基因组DNA混合样品模拟4C样品, 作为特异性对照; 水为空白对照。第二轮PCR扩增的模板分别为第一轮PCR产物的10倍和100倍稀释。PCR产物在1%的琼脂糖凝胶上电泳分析。在紫外灯下对目的片段割胶回收。PCR产物的凝胶回收, 按天根公司产品凝胶回收试

剂盒提供的说明进行。

### 1.7 4C分析的有限重组克隆与克隆筛选

将凝胶电泳回收的4C巢式反向PCR产物克隆重组到pMD18-T载体上, 具体方法参照宝生物工程(大连)公司所提供的试剂盒说明进行。通过PCR方法对阳性重组克隆筛选。随机挑选100个阳性克隆进行测序分析, 克隆测序分别由北京华大基因公司和上海英俊公司完成。测序结果分别在NCBI基因库网站以及UCSC基因组浏览器上进行在线分析。

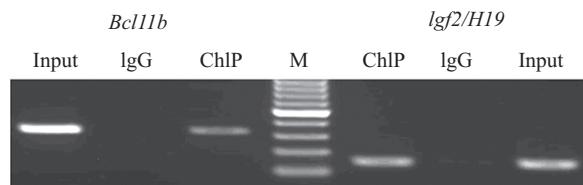
## 2 结果

### 2.1 *Bcl11b*基因座位上4C靶位点的选择

选择*Bcl11b*基因座位上保守序列为4C靶位点, 该位点位于*Bcl11b*基因座位的第一个内含子区。为了进一步研究CTCF在介导*Bcl11b*基因座位的空间组织过程中可能发挥的作用, 本文所选择的4C靶位点包含有潜在的CTCF结合位点<sup>[9-12]</sup>。首先, 通过anti-CTCF染色质免疫共沉淀(ChIP)验证分析, 验证4C靶位点能否被CTCF所结合。将ChIP所富集的DNA样品进行半定量PCR, 分析4C靶位点被ChIP相对富集效率; 以*Igf2/H19*基因座位作为anti-CTCF ChIP分析的阳性对照位点。在多种类型的细胞系中, *Igf2/H19*是非常普遍的CTCF的结合位点<sup>[9-10,13]</sup>。PCR产物在2.5%的凝胶上进行电泳半定量分析。分析结果表明, 阳性对照位点*Igf2/H19*能够被anti-CTCF ChIP有效富集; 同样, *Bcl11b*基因座位上保守的4C靶位点能够被anti-CTCF ChIP有效富集(图1)。因此, 在MCF-7细胞系中, 该位点是一个CTCF的结合位点。

### 2.2 4C PCR扩增条件的优化

4C技术是通过一系列的交联、酶切、连接等处理过程, 使空间位置靠近的不同基因座位间发生交联, 并被连接在一起成环形的双分子<sup>[5]</sup>。在已知



ChIP: ChIP样品DNA; Input: input样品DNA; IgG: normal IgG样品DNA; M: DNA marker。

ChIP: ChIP DNA sample; Input: input DNA sample; IgG: normal IgG DNA sample; M: DNA marker.

图1 anti-CTCF ChIP的半定量PCR分析

Fig.1 The semi-quantitative PCR for anti-CTCF ChIP assay

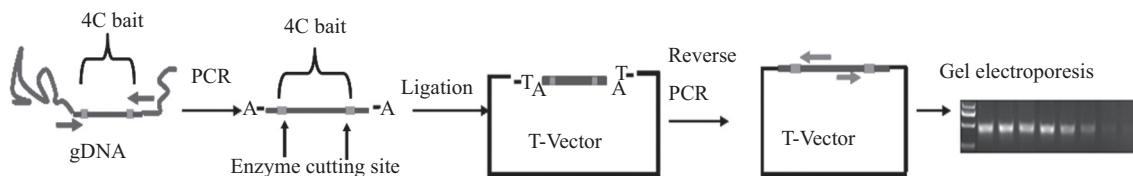
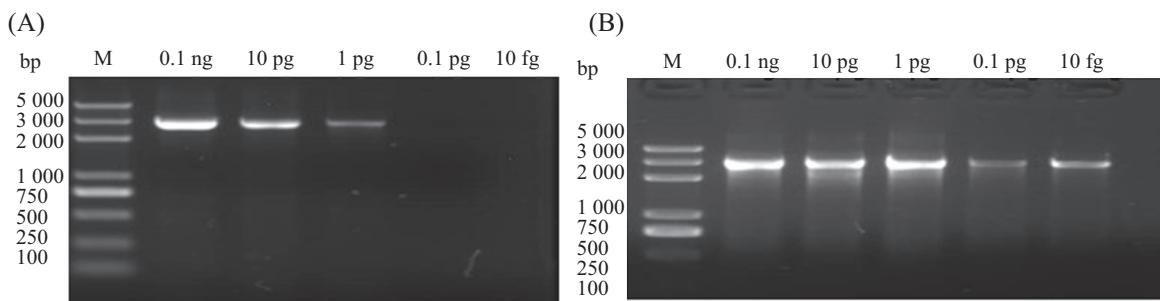


图2 模拟4C的方法优化PCR反应条件的策略

Fig.2 The scheme of optimization PCR condition with mimic 4C assay



A: 4C分析的反向巢式PCR第一轮扩增, 模板量分别为: 0.1 ng、10 pg、1 pg、0.1 pg、10 fg; B: 4C分析的反向巢式PCR第二轮扩增, 模板分别为第一轮PCR产物的10倍稀释。

A: the first round nested-reverse PCR for 4C assay, and the template amounts were 0.1 ng, 10 pg, 1 pg, 0.1 pg, 10 fg, respectively; B: the second round nested-reverse PCR for 4C assay, and the templates were used the 10 times dilution of the first round PCR products.

图3 对4C分析的反向巢式PCR扩增敏感性分析

Fig.3 The sensitivity analysis of the nest-reverse PCR for 4C assay

的目的基因座位上设计引物, 通过反向PCR方法捕获未知的基因座位。以*Bcl11b*基因座位上一保守序列为4C靶位点, 该位点为限制性内切酶*Dpn* II的酶切片段, 实际长为1 874 bp的DNA片段。在4C靶位点末端设计两轮反向PCR引物, 通过PCR的方法筛选与靶位点交联并被连接一起未知的相互作用基因位点。首先, 模拟4C样品优化反向巢式PCR的条件。具体策略是: 通过PCR方法获得4C靶位点全长, 并直接将PCR产物重组到T载体上, 形成类似于4C样品的环形分子; 其次通过构建的重组载体模拟4C样品以优化反向巢式PCR扩增条件(图2)。

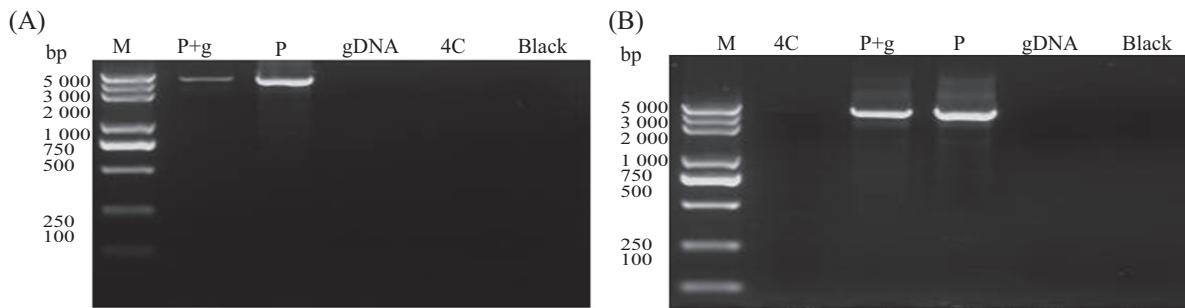
首先, 对4C反向巢式PCR扩增效率和敏感性的分析和优化。4C反向巢式PCR的第一轮扩增, 可以在重组载体质粒模板为10 pg的条件下实现有效扩增; 在模板DNA为1 pg的情况下也可以扩增, 但是扩增效率相对较低(图3A)。通过两轮PCR, 甚至可以达到对10 fg的DNA模板量进行有效扩增(图3B)。因此, 分析结果表明经过两轮反向PCR可以实现对低拷贝的分子有效扩增, 4C分析的PCR扩增是十分敏感和高效的。

对4C反向巢式PCR扩增条件的优化和扩增特异性的分析。4C DNA模板是一种混合样品, 大部分是线性基因组DNA分子, 真正的环形重组DNA双分

子含量非常低。因此在验证PCR扩增的特异性过程中, 在4C靶位点的重组质粒模板中加入高浓度的基因组DNA, 模拟4C样品, 对PCR扩增进行干扰分析。在20  $\mu$ L的PCR反应体系中, 以10 pg的重组质粒为模板进行扩增, 同时加入120 ng基因组DNA进行干扰。分析表明, 在有大量基因组DNA存在的条件下, 两轮PCR都可以对模板特异性地扩增(图4)。在第一轮PCR扩增过程中, 由于基因组的干扰, PCR扩增效率有所下降(图4A); 在两轮PCR反应中都没有非特异性扩增; 阴性对照基因组模板也没有非特异性扩增。在对30 ng的4C模板量进行PCR扩增中, 两轮PCR都没有对模板实现有效地扩增, 因此4C模板量较低, 需要进一步提高4C反向巢式PCR扩增的模板量。

### 2.3 反向巢式PCR对4C样品中相互作用基因座位的捕获

4C反向巢式PCR对4C样品进行扩增, 从中筛选与靶位点相互作用的DNA元件。对4C样品进行第一轮反向PCR扩增(图5A), 在20  $\mu$ L的PCR反应体系中, 4C样品DNA的模板量分别为200 ng(泳道5)、160 ng(泳道6)、80 ng(泳道7)三个浓度梯度, 同时选用不同的对照扩增体系。第一轮反向PCR扩增结果显示, 阳性对照重组质粒能够实现特异扩增(泳道4);

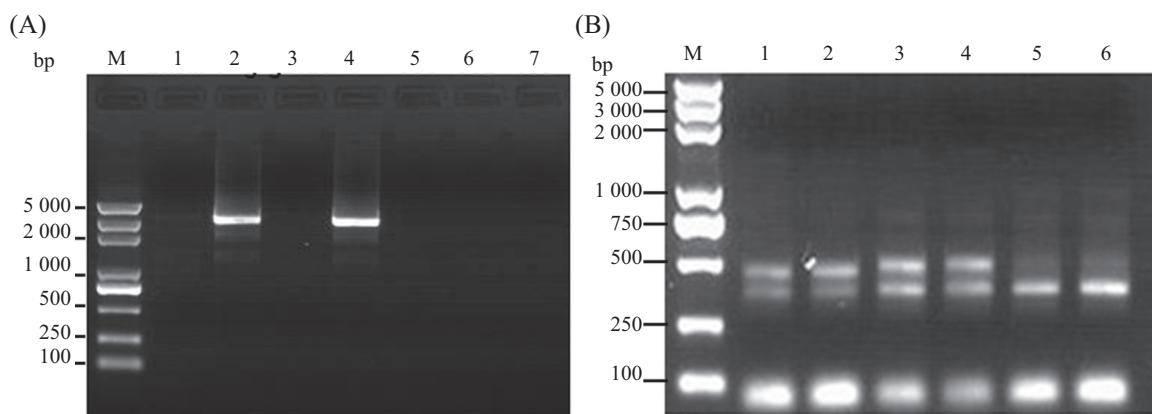


A: 4C反向巢式PCR的第一轮扩增; B: 4C反向巢式PCR的第二轮扩增。gDNA: 基因组DNA模板; P: 重组质粒模板; P+g: 重组质粒和基因组DNA模板; 4C: 4C样品DNA模板。

A: the first round nested-reverse PCR for 4C assay; B: the second round nested-reverse PCR for 4C assay. gDNA: the genomic DNA template; P: the recombinant plasmid template; P+g: the recombinant plasmid and the genomic DNA template; 4C: 4C DNA sample template.

图4 4C分析反向巢式PCR扩增的特异性分析

Fig.4 The specificity analysis of nested-reverse PCR for 4C assay



A: 4C分析的反向巢式PCR的第一轮扩增; B: 4C分析的反向巢式PCR的第二轮扩增。

A: the first round nested-reverse PCR for 4C assay; B: the second round nested-reverse PCR for 4C assay.

图5 4C反向巢式PCR扩增

Fig.5 The nested-reverse PCR for 4C assay

特异性对照为重组质粒混合基因组DNA的模拟4C样品(泳道2)没有对基因组DNA的非特异扩增; 水为空白对照(泳道1), 阴性对照为基因组DNA(泳道3), 二者都无非特异扩增。但是4C样品的三个浓度梯度也没有明显地扩增, 所以需要进行第二轮PCR扩增。第二轮PCR扩增是以第一轮PCR产物为模板, 依次分别以4C样品的3个浓度梯度扩增产物的10倍、100倍两个稀释倍数为模板进行扩增。PCR扩增结果显示, 在3个浓度梯度的4C样品模板中都有明显的差异条带扩增(图5B)。

#### 2.4 阳性克隆筛选与阳性克隆的随机测序

4C反向巢式PCR扩增产物进行凝胶电泳分析后, 对差异DNA条带分别割胶回收, 并将回收后的DNA样品混合并克隆于pMD18-T载体上, 进行克隆转化。通过PCR方法对阳性克隆进行筛选, 从中随

机挑选100个阳性克隆, 进行测序分析。

#### 2.5 测序结果分析

测序结果在NCBI网站上进行序列比对分析。比对分析结果表明, 在100个测序反应中, 有76个为阳性4C分析PCR扩增产物重组载体, 其余为非特异性扩增或假阳性克隆。将所有测序结果为正确的序列在UCSC基因组浏览器(UCSC genome browser)上在线分析, 并确定这些通过4C有限克隆技术所捕获的基因座位在染色体上的位置。图6所示为两个阳性克隆(克隆号: 14-9和14-1)的测序结果以及序列在UCSC基因组浏览器上比对分析结果。箭头所示位置为4C所捕获DNA片段的插入的两个位点(*Dpn* II酶切位点), 即与4C靶位点的连接位点。

这些通过4C技术和有限克隆筛选的方法所捕获的基因座位, 既有与4C靶位点位于同一条染色体上

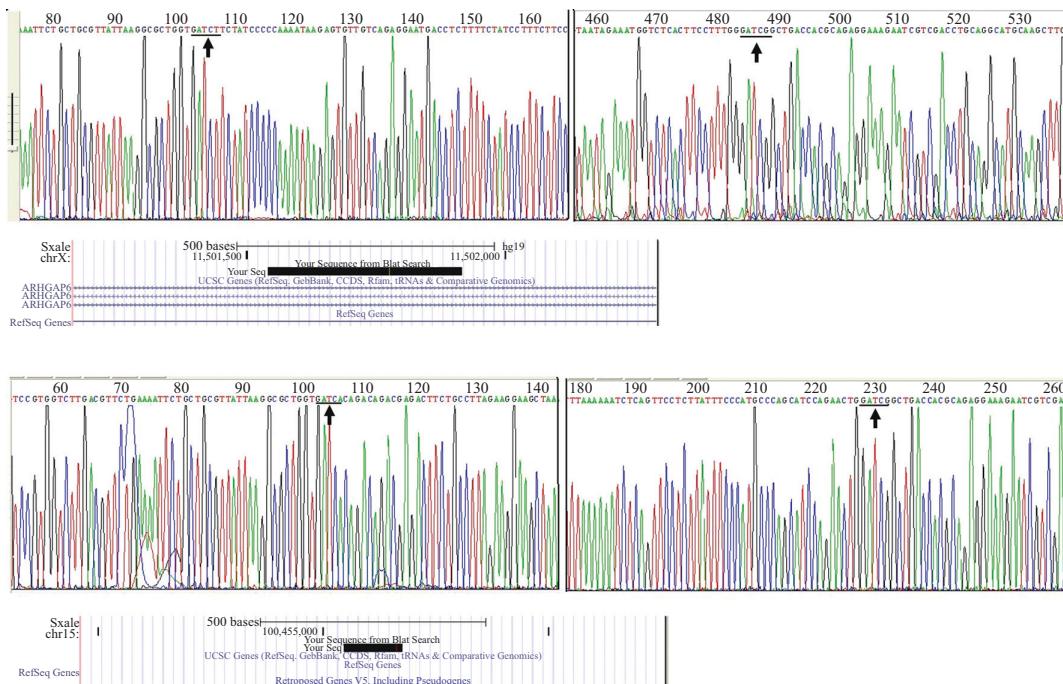
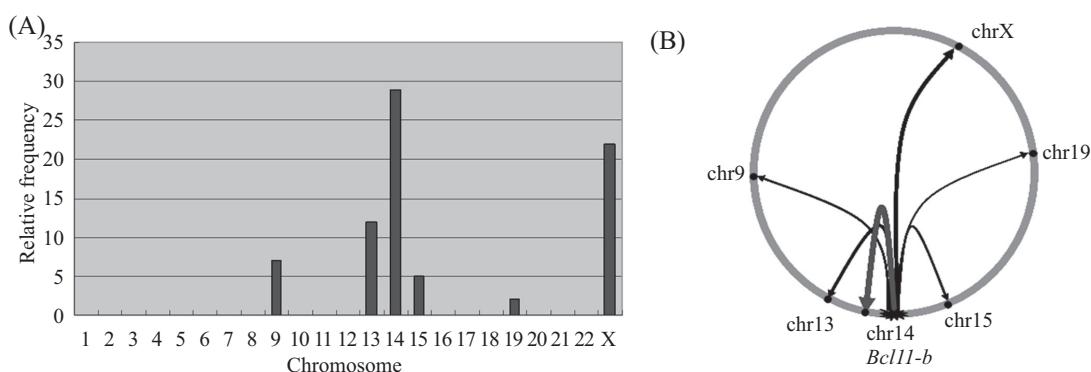


图6 部分克隆测序结果与分析  
Fig.6 The partial clones sequencing results and analysis

表1 测序结果分析

Table 1 The analysis of the sequencing results

克隆号 Clones ID	染色体 Chromosome	位置 Position	长度(bp) Length (bp)	测序频率 Frequency
14-4	chr9	129,626,461-129,626,855	394	7
14-6	chr13	96,478,505-96,478,673	168	12
14-5	chr14	98,802,163-98,802,461	298	29
14-1	chr15	98,272,569-98,272,697	128	5
14-7	chr19	1,127,701-1,127,867	166	2
14-9	chrX	11,411,463-11,411,838	375	22



A: 4C所捕获的基因座位在染色体上的分布与测序频率; B: *Bcl11b*基因座位在MCF-7细胞核中的相互作用网络。

A: the dispositions on the chromosomes of the gene locus captured with 4C assay and the sequencing frequencies; B: the interaction network of *Bcl11b* locus in MCF-7 cell nuclei.

图7 *Bcl11b*基因座位在MCF-7细胞核中的相互作用网络

Fig.7 The interaction network of *Bcl11b* locus in MCF-7 cell nuclei

的,也有位于不同染色体上的,这些位点测序频率也有显著的差异(表1和图7A)。位于同一条染色体上的基因座位与靶位点在同一个基因座上,该位点测序出现的频率非常高。其它所捕获到位于不同染色体上的5个基因座位中,位于X染色体上的基因座位测序频率也很高,有22次;其它依次分别位于13号染色体、9号染色体、15号染色体以及19号染色体上(图7A)。这种测序频率在某种程度上可以间接反应这些基因座位之间相互作用的相对频率。在MCF-7细胞核内,这些基因座位与*BclIIb*基因座位存在着潜在的相互作用关系(图7B)。

### 3 讨论

染色质在细胞核内的空间组织形式调控了相关基因的表达形式,染色质的空间组织上的动态变化从表观遗传学的角度反映了基因组的功能。基因组的这种三维组织,在正常细胞的发育和分化过程中,对基因表达调控发挥重要的作用,尤其是那些远距离的顺式调控元件与靶基因的相互作用普遍发生<sup>[1-4,14-16]</sup>。CTCF作为一种细胞核内普遍存在的调控蛋白<sup>[8,10,17]</sup>,在整个基因组内具有大量的结合位点,在介导核内染色体组织结构上发挥十分重要的作用。本文以*BclIIb*座位上高度保守的CTCF结合位点作为4C的靶位点,利用4C分析和有限克隆筛选的方法,通过在全基因组内筛选与*BclIIb*座位发生相互作用的基因座位,进而研究*BclIIb*座位在细胞核内的空间组织。

染色体构象捕获技术(3C)在研究基因座位间的互作中具有十分重要的意义,4C技术实现了通过已知的目的基因座位,在全基因组范围内筛选相互作用基因座位的目的。然而,由于4C样品中真正意义上的目的重组环形双分子比例很低,因此在4C巢式反向PCR扩增过程中,不但需要高浓度的模板,而且还需要两轮PCR扩增。这些扩增条件所带来的困难是,PCR容易产生非特异扩增和扩增的偏向性。4C分析反向巢式PCR的非特异扩增和扩增的偏向性掩盖了基因座位间的实际相互作用频率。因此,在4C分析之前,需要将4C PCR扩增条件进行优化,以降低PCR扩增的非特异和偏向性。本文以*BclIIb*基因座位为靶位点,分别对4C PCR的扩增效率、敏感性以及特异性进行分析与优化,确立了稳定高效的PCR扩增条件。4C PCR扩增的高效性和特异性,是

4C分析的前提,也为有限克隆筛选打下基础。PCR扩增的敏感性高,可以实现对低拷贝的4C分子进行有效扩增。本文针对4C技术的优化方法的报道,对进一步开展对染色质在细胞核内空间组织的研究具有十分重要的意义。

本文通过优化了的4C PCR扩增条件,可以对10 fg的模板量进行有效扩增。通过4C分析和有限克隆筛选的方法,部分实现了在全基因组内筛选与*BclIIb*发生相互作用的基因座位。4C分析所捕获的这些基因座位分别位于6条不同的染色体上。这些所捕获的基因座位测序频率有着显著的差异,这种差异在一定程度上间接反映了各个位点与4C靶位点间的相互作用频率;相互作用频率高的位点,在4C分析过程中,首先较容易地被捕获到,因而随机克隆测序出现的频率也相对较高。但是,这种随机克隆测序的频率并不表示实际的相互作用频率,因为克隆筛选过程受到多种不确定条件的限制。要分析各个位点与4C靶位点间的相互作用频率,还需要进一步通过3C技术进行分析验证。

研究证明,基因座位在细胞核内的相互作用网络具有细胞类型特异性<sup>[12,18]</sup>。这种细胞类型特异性的空间组织模式是由核内蛋白因子参与组织,并受到复杂的表观遗传环境的影响,如组蛋白的修饰、DNA序列的甲基化、小RNA等。*BclIIb*座位在细胞核内的相互作用网络具有细胞类型的特异性,在功能上可能调控了相关基因的表达<sup>[12]</sup>。我们曾以其中一个位于不同染色体上的潜在相互作用位点为研究对象(chrX: 11,411,463-11,411,838),进一步通过3C技术和3D-DNA FISH的验证分析,证明了在MCF-7细胞核内这种相互作用关系的存在;在功能上并进一步验证了这种相互作用关系调控相关基因的表达<sup>[12]</sup>。因此,通过4C技术所捕获到的这些基因座位位点,对研究*BclIIb*基因座位在整个基因组内的相互作用网络具有十分重要的意义,为进一步研究*BclIIb*基因座位在MCF-7细胞核内的空间组织打下基础。

### 参考文献 (References)

- 1 Fraser P, Bickmore W. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 2007; 447(7143): 413-7.
- 2 Misteli T. Beyond the sequence: Cellular organization of genome function. *Cell* 2007; 128(4): 787-800.
- 3 Dekker J. Gene regulation in the third dimension. *Science* 2008;

- 319(5871): 1793-4.
- 4 Simonis M, Klous P, Splinter E, Moshkin Y, Willemsen R, de Wit E, *et al.* Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nature Genet* 2006; 38(11): 1348-54.
- 5 Zhao Z, Tavoosidana G, Sjölander M, Göndör A, Mariano P, Wang S, *et al.* Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and inter-chromosomal interactions. *Nature Genet* 2006; 38(11): 1341-7.
- 6 Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. Capturing chromosome conformation. *Science* 2002; 295(5558): 1306-11.
- 7 Dekker J. The three 'C' of chromosome conformation capture: Controls, controls, controls. *Nature Methods* 2006; 3(1): 17-21.
- 8 Phillips, JE, Corces VG. CTCF: Master weaver of the genome. *Cell* 2009; 137(7): 1194-21.
- 9 Xi H, Shulha HP, Lin JM, Vales TR, Fu Y, Bodine DM, *et al.* Identification and characterization of cell type-specific and ubiquitous chromatin regulatory structures in the human genome. *PLoS Genet* 2007; 3(8): e136.
- 10 Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD, *et al.* Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* 2007; 128(6): 1231-45.
- 11 Williams A, Flavell RA. The role of CTCF in regulating nuclear organization. *J Exp Med* 2008; 205(4): 747-50.
- 12 Ren L, Shi M, Wang Y, Yang Z, Wang X, Zhao Z. CTCF and cohesin cooperatively mediate the cell-type specific interchromatin interaction between *Bcl11b* and *Arhgap6* loci. *Mol Cell Biochem* 2012; 360(1/2): 243-51.
- 13 Ling JQ, Li T, Hu JF, Vu TH, Chen HL, Qiu XW, *et al.* CTCF mediates interchromosomal colocalization between *Igf2/H19* and *Wsb1/Nfl*. *Science* 2006; 312(5771): 269-72.
- 14 Göndör A, Ohlsson R. Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature* 2009; 461(7261): 212-7.
- 15 Kumaran RI, Thakar R, Spector DL. Chromatin dynamics and gene positioning. *Cell* 2008; 132(2): 929-34.
- 16 Fröhler S, Dieterich C. 3PD: Rapid design of optimal primers for chromosome conformation capture assays. *BMC Genomics* 2009; 10: 635.
- 17 任立成, 王 洋, 师明磊, 马 骞, 杨 忠, 赵志虎, 等. CTCF是一种细胞类型特异性表达的核内定位蛋白因子. 国际遗传学杂志(Ren Licheng, Wang Yang, Shi Minglei, Ma Li, Yang Zhong, Zhao Zhihu, *et al.* CTCF is a cell-type specific expression and nuclei-located protein factor. International Journal of Genetics) 2012; 35(3): 146-50.
- 18 Ren L, Wang Y, Shi M, Wang X, Yang Z, Zhao Z. CTCF mediates the cell-type specific spatial organization of the *Kcnq5* locus and the local gene regulation. *PLoS One* 2012; 7(2): e31416.