

DNA的核骨架结合序列(MARs)研究进展

罗文捷 焦仁杰 翟中和

(北京大学生命科学学院细胞生物学及遗传学系 100871)

我们知道,在真核细胞的生命活动中细胞核起着核心作用。首先它将巨大的DNA分子有效地组织起来,使基因能灵活开放与关闭;其次,基因组的高度准确的复制,精密而有选择的转录和程序化的RNA加工与转运都在细胞核内进行。可以想象,如此复杂有序的过程必须要有一个很特殊的高度结构化的细胞器来组织完成。但是,这方面的研究一直无法突破,直到核骨架等核内结构分离方法的建立,尤其是一种新的决定染色质结构性和功能性区域的顺式作用因子——核骨架结合序列(MARs, Matrix-associated Regions)的发现,才使分析细胞内这种重要的控制机制成为可能。

一、MARs的发现

核骨架,又称核基质(Nucleoskeleton, Nuclear matrix),是存在于真核生物细胞核内的纤维蛋白网络结构,由膜下核纤层,内部的核基质纤维网络以及核仁骨架三部分组成。早在70年代初, Berezney 和 Coffey^[1]发现经2 mol/L NaCl 抽提及DNase I 消化得到的核骨架成分中含有约1%的核DNA;近年,汪国顺等人利用元素分析电镜直接在核骨架形态上原位观察到残留核酸的存在^[2]。因此,通过利用生化及电镜技术对核骨架与染色质的关系进行研究^[3,4],人们提出了染色质(体)的DNA环模型,认为染色质DNA是以loop的形式结合在核骨架上的。到1984年, Mirkovitch 在研究果蝇的组蛋白基因的组织结构时,发现在H3与H1基因之间的非转录区内有一段特殊序列能与核骨架结合,这种结合使每一组组蛋

白基因单元(H1, H2b, H2a, H4, H3)构成一个DNA环结构^[5]。此后,人们陆续从不同的基因中找到了核骨架结合序列(MARs, 又称SARs, MAR element)(表1)。它们可以存在于不同类型的细胞中,包括酵母,果蝇,鸡和哺乳动物,甚至在植物中也有报道。

随着MARs的陆续发现,一些学者开始研究其结构特点及生物学功能。研究表明MARs有可能是一种新的序列因子,它参与了细胞的许多重要生命活动。

二、MARs的特点

对已报道的MARs进行分析,很难找到一个本质上完全相同的特性,但它们之间又存在一些类似的特点。首先,MARs常常存在于某个特定基因的侧翼区域,并常常与一些调控因子相邻。如鸡溶菌酶基因^[6]和人的 β -干扰素基因^[15]的上游和下游区均含有MARs;小鼠免疫球蛋白 κ 轻链基因的MARs则紧挨上游区的增强子^[11];果蝇的两个hsp70基因的MARs存在于启动子与调节元件的上游^[5];然而,例外的是,有的MARs存在于基因内部:中国仓鼠二氢叶酸还原酶基因的第四个内含子^[14]以及人的 β 球蛋白基因的第二个内含子^[16]中均存在MARs,这种MARs在基因编码区内存在的作用迄今仍不清楚。其次,大多数的MARs都是单拷贝的(除人的 β -干扰素基因有三个MARs),而且大多含有相当高的A-T对^[6],有的则富含A碱基^[6]或T碱基。此外,比较果蝇的组蛋白基因组,二氢叶酸还原酶基因, Sgs-4 基因, hsp70 热休克基因的87

表 1 迄今已经发现的 MARs

果蝇(<i>Drosophila melanogaster</i>)	
组蛋白基因重复片段(Histone-gene repeat)	[5]
热休克基因 hsp 70(87 A 7 位点)	
热休克基因 hsp 70(87 C 1 位点)	
乙醇脱氢酶基因(Alcohol dehydrogenase)	[6]
Sgs-4	
Fushi tarazu	
Region of rosy and Ace loci	[7]
肌动蛋白基因(Actin 5 C)	
酵母(Yeast)	
自动复制序列(ARS elements, ARS 1, HO ARS, Histone H 4 ARS, HMR-E ARS, 2 μm Plasmid ARS)	[8]
中心粒序列因子(Centromere elements, CEN III, CENIV, CENXI)	
鸡(Chicken)	
溶菌酶基因(Lysozyme)	[9]
α 球蛋白基因(α-globin gene)	[10]
鼠类(Murine)	
β 球蛋白基因(β-globin gene)	[19]
小鼠(Mouse)	
免疫球蛋白 κ 轻链基因(Immunoglobulin κ light chain)	[11]
免疫球蛋白重链基因(Immunoglobulin heavy chain)	[12]
大鼠(Rat)	
谷氨酸脱氢酶基因(GDH gene)	[13]
中国仓鼠(Chinese hamster)	
二氢叶酸还原酶基因(Dihydrofolate reductase)	[14]
人(Human)	
β 干扰素基因(β-Interferon)	[15]
β 球蛋白基因(β-globin gene)	[16]
次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(HPRT gene)	[17]
载脂蛋白 B 基因(Apolipoprotein B gene)	[18]
植物(Plants)	
烟草的三种根特异性的基因(Three root-specific tobacco genes)	[20]
玉米乙醇脱氢酶 1-S 基因(Maize Adh 1-S gene)	[21]

A 7 位点和鼠的免疫球蛋白 κ 轻链基因的 MARs 可以发现它们具有一个共同的特点,即含有拓扑异构酶 II (topoisomerase II) 的酶切位点^[6,11]。拓扑异构酶 II 是一种与 DNA 拓扑结构有关的酶类,它能松解 DNA 超螺旋,使 DNA 折叠与去折叠。研究发现拓扑异构酶 II 是核骨架和染色体骨架的主要成分^[12,23]之一,并且在细胞进入中期时参与染色体的浓缩过程^[24]。利用拓扑异构酶 II 的专一抑制剂 VM 26 能阻止 MARs 与核骨架的体外结合^[25], 这现象说明 DNA 拓扑异构酶 II 在 MARs 与核骨架结合中起重要作用。

迄今尚未发现 MARs 与核骨架结合的共同序列,其原因可能是 MAR-核骨架复合物十分庞大,覆盖 1000 个碱基对左右的 DNA,同时涉及多种蛋白与 DNA 的关系。然而, MARs 序列所具有的 A-T 丰富的特点在 MARs 与核骨架的体外结合中可能起某种作用,即使富含 dA-dT 的 DNA 链可以形成一种能与蛋白质作用的特殊结构。同时,有人用来源于不同基因和种类的 MARs 进行竞争实验发现:对于小鼠浆细胞核骨架而言,果蝇的组蛋白基因 MARs 是鼠免疫球蛋白 κ 轻链基因 MARs 的有效竞争者^[11];而鸡溶菌酶基因 5' MAR 与输卵

管核骨架的结合能被来源于果蝇和鼠的 MARs 所抑制^[18]。这些实验说明 MARs 可能具有序列非常相似或结构非常相近的特点。人们对此做进一步的研究,发现鼠免疫球蛋白 κ 轻链等几种基因的 MARs 内部含有能形成弯曲的周期性重复序列,这种弯曲结构可能在 DNA 环与核骨架的结合以及超螺旋结构的形成与维持中起作用^[26]。因此,可以推测核骨架对 MARs 的识别可能是由几种不同序列组成的一种特殊结构来实现的。

三、MARs 的功能

MARs 在基因中的位置是一个很引人注意的特征。大多数的 MAR 位于基因的两侧并与 DNA 环基部相对应,而且常常与一些重要的顺式调控元件如增强子,启动子,复制起始点相邻,这些元件是 DNA 复制,基因的高水平转录和发育中组织特异性表达所必须的。这个特点可能决定了 MARs 的几种重要功能:参与染色质包装和基因复制,调节基因的表达。

DNA 的合成以及复制起始位点与核骨架的结合已为越来越多的实验所证实^[27-29],对酵母自主复制序列(ARSs)的研究则将 MARs 与 DNA 复制直接联系起来。酵母的 ARSs 是能赋予质粒具有独立生存能力的序列,其作用相当于复制起始区,Amati 等人发现含有 ARS¹ 和 2 μm 环状质粒的质粒中,ARS 片段能与核骨架结合^[8]。组蛋白 H4 ARS, HO ARS 和 HMR-E 的研究也得到类似的结果。

长期以来,人们一直在研究染色体的组装机制。1989年 Pienta 提出染色体组装的放射环模型^[30],其中较明显的一点是引入了核骨架与 MARs 在染色体组装过程中的作用。DNA 双链绕核小体形成串珠状结构,在此基础上再盘绕成 30 nm 的螺线管,此螺线管与核骨架结合形成约 60 kb 大小的 DNA 环,这些环以核骨架为轴心,形成直径为 0.84 μm 的放射环结构,最后叠加盘绕成染色体。在这个过程中,

MARs 位于环的基部,它与核骨架的结合对 DNA 环具有锚定作用。

这种 DNA 环不仅是染色质包装的结构基础,而且对于基因的转录和表达有重要作用,即形成一个有转录活性的功能域。然而,什么机制启动环的打开?此 DNA 环的打开与染色质的去浓缩有何关系?环的大小是由哪种因子决定的?DNA 环打开后,如何防止染色质环的去浓缩波及相邻区域的?Bonifer 等人对环的基因结构和它与基因表达的关系进行了大量研究,提出了一个与基因表达有关的染色质环结构模型^[31](图 1)。此模型引入两个位于基因侧翼区的顺式调控因子——位点控制序列(LCRs, Locus Control Regions)和 A-因子(Attachment element)——其中 LCRs 对于整个环结构的激活有重要作用。A-element 实际上是一种 MARs,它能将环的结构锚定在核骨架上,不仅决定了环的大小,而且防止了正在活跃转录的基因影响邻近染色质区域。次年,Bode 等人发现人的 β 干扰素基因 5' 端 MAR 和免疫球蛋白基因的增强子 MAR 在超螺旋应力作用下出现稳定的碱基不配对状态,这种状态是 DNA 解旋所特有的,因此,当基因活跃转录时, MARs、拓扑异构酶、转录因子与核

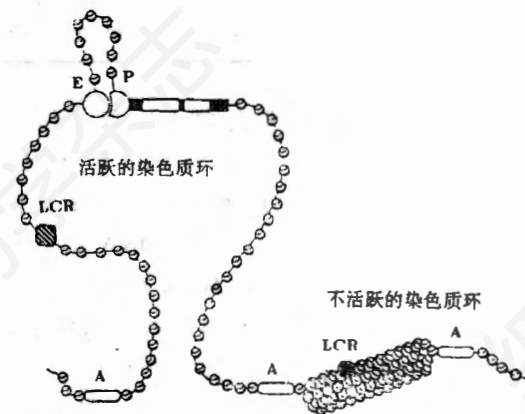


图 1 作为基因调节单位的染色质环模型

左为开放的活跃基因,右为凝集的非活跃基因。(LCR: 位点控制序列 locus control region; A: 骨架附着因子 attachment elements; E, 增强子 enhancer; P: 启动子 promoter)(引自 Bonifer 等^[31])

骨架结合形成具有转录活性的复合体, 其中 MARs 与拓扑异构酶相互作用, 以利于转录的进行^[32]。

近年来人们开始利用体外构建的人工染色质结构域来研究 MARs 在基因表达中的功能和它的作用特点。比较典型的实验是将鸡溶菌酶基因的 MAR 插入转染表达载体, 当表达系统侧翼含有 5'MAR 时, 其表达效率大大提高^[33]。为了进一步研究 MAR 在基因表达中的作用, Blasquez 等人进行删除实验, 去除正常基因的 MAR 来观察对基因表达的影响, 结果发现去除免疫球蛋白 κ 链基因内部的 MAR 能导致基因表达率下降四倍; 当内部的 MAR 与增强子区的 MAR 同时去除时, 表达率下降 11 倍^[34]。这些实验接着被导入体内, 发现体外构建的含 MARs 的基因在转基因动物中也有组织特异性表达^[35]。在以上实验中同时还观察到 MARs 对基因表达的作用不具有位置效应。因此, MARs 对基因的高效表达有重要作用, 它可能是一种新的顺式作用元件, 与增强子、启动子协同作用调节基因的表达。

四、MARs 与核骨架的结合以及 MARs 的研究方法

MAR 与核骨架蛋白的关系实际上是一种 DNA 与蛋白质的关系, 人们对此结合机制了解得甚少。Lichtenstein 等人采用不同的条件分步提取核骨架上结合的 DNA 片段, 并根据这些片段与核骨架结合的紧密程度总结出两类 DNA-核骨架结合位点(图 2)。在松散结合的位点中, MAR 通过氢键, 离子键和疏水键与核骨架结合, 核骨架蛋白位于双螺旋的外侧; 对于紧密结合的位点而言, 除了单纯的化学键外, DNA 与核骨架主要通过拓扑作用结合在一起, 核骨架蛋白从局部变性区穿过 DNA 双链。推测紧密结合位点位于染色质环的基部, 而松散结合位点则形成环的次级结构^[36]。此

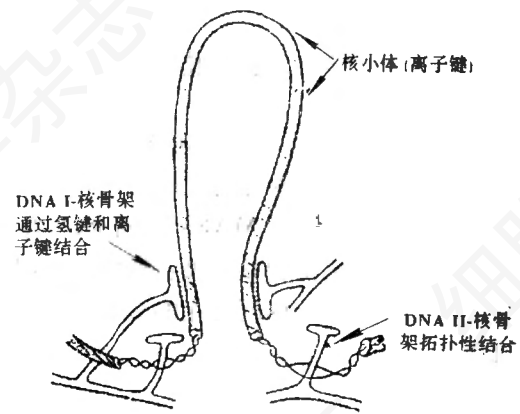


图 2 染色质环结构模型。

显示两类 DNA-核骨架结合位点。
(引自 Lichtenstein 等^[36])

外, 一些能与 MARs 结合的蛋白质具有独特的 DNA 结合特性, 如 Matrin F/G 蛋白含有两段锌指结构域(zinc finger motif)^[37]; 另一种能与 MAR 组织特异性结合的蛋白 SATB 1 则与双链 DNA 的小沟结合, 通过改变后的磷酸戊糖链间接识别 MARs^[38]。

一般研究 MARs 的方法有 Southern 杂交和体外 DNA-蛋白质吸附杂交(in vitro binding, southwestern blot)两种。前者是提取核骨架上所结合的 DNA, 再与同位素标记的探针片段进行 Southern 杂交, 以检测与核骨架结合的 DNA 中是否含有目标 DNA 片段; 后者研究 MARs 与核骨架蛋白的结合关系, 首先将探针 DNA 片段与核骨架蛋白质在有竞争性 DNA 存在的条件下温育, 核骨架蛋白可以保持原有核骨架形态参加反应, 再提取与核骨架结合的片段, 应用电泳分离, 自显影观察; 或者核骨架蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转移到膜上, 再与探针片段温育^[39]。近年来, 对 MARs 的研究越来越深入, 人们利用 Gel retardation、DNA footprinting 和 DNA 分子的电镜原位杂交等新发展起来的分子生物学技术来探寻 MARs 与核骨架结合的核心序列以及原位观察 MARs 在细胞核骨架上的分布。

结 束 语

综上所述, 我们可以看出 MARs 作为一种新型的顺式作用元件参与了细胞的许多重要生命活动, 因此通过对 MARs 的研究, 有助于我们进一步了解细胞核内染色质的空间组织结构, 以及探索细胞核内所存在的多种重要的调控机理。

摘 要

核骨架结合序列(Matrix-associated Regions, MARs)是存在于真核细胞染色质中的一段与核骨架特异性结合的 DNA 序列。它常常位于基因的侧翼区内, 与一些调控因子相邻; 序列具有 A-T 丰富的特点, 而且常常含有拓扑异构酶 II 的酶切位点。近年来的研究表明 MARs 参与了细胞的许多重要的生命活动, 包括染色质的组装, 基因的复制和表达。因此, MARs 被认为是一种决定染色质结构性和功能性区域的新的顺式调控因子。本文对 MARs 的特点, 生物学功能以及研究方法等方面的最新进展进行了阐述。

参 考 文 献

- [1] Berezney, R., Coffey, D., 1974, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60: 1410—1419.
- [2] 汪国顺等, 1993, *中国科学(B)*, 23: 723—729.
- [3] Benyajati, C., Worcel, A., 1976, *Cell*, 9: 393—407.
- [4] Lebkowski, J. S. and Laemmli, U. K., 1982, *J. Mol. Biol.*, 156: 309—324.
- [5] Mirkovitch, J., Mirault, M.-E. and Laemmli, U. K., 1984, *Cell*, 39: 223—232.
- [6] Gasser, S. M. and Laemmli, U. K., 1986, *Cell*, 46: 521—530.
- [7] Mirkovitch, J., Gasser, S. M., Laemmli, U. K., 1988, *J. Mol. Biol.*, 200: 101—109.
- [8] Amati, B. B., and Gasser, S. M., 1988, *Cell*, 54: 967—978.
- [9] Phi-van, L., and Stratling, W. H., 1988, *EMBO J.*, 7: 655—664.
- [10] Farache, G., Razin, S. V., Targa, F. R. and Scherrer, K. 1990, *Nucl. Acids Res.*, 18: 401—409.
- [11] Cockerill, P. N., Garrard, W. T., 1986, *Cell*, 44: 273—282.
- [12] Cockerill, P. N., Yuen, M.-H., Garrard, W. T., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 5394—5397.
- [13] Das, A. T., Luderus, M. E. and Lamers, W. H., 1993, *Eur. J. Biochem.*, 215 (3): 777—785.
- [14] Kas, E., Chasin, L. A., 1987, *J. Mol. Biol.*, 156: 309—324.
- [15] Bode, J., Maa β , K., 1988, *Biochemistry*, 27: 4706—4711.
- [16] Jarman, A. P., and Higgs, D. R., 1988, *EMBO J.*, 7: 3337—3344.
- [17] Sykes, R. C., Lin, D., Hwang, S. J., Framson, P. E., Chinault, A. C., 1988, *Mol. Gen. Genet.*, 212: 301—309.
- [18] Levy-Wolson, B. and Fortier, C., 1989, *J. Biol. Chem.*, 21196—21204.
- [19] Greenstein, R. J., 1988, *DNA*, 7: 601—607.
- [20] Hall, G., Allen, G. C., Loer, D. S., Thompson, W. F. and Spider, S., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9320—9324.
- [21] Avramova, Z., and Bennetzen, J. L., 1993, *Plant Mol. Biol.*, 22 (6): 1135—1143.
- [22] Berrios, M., Osheroff, N., Fisher, P. A., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4142—4146.
- [23] Earshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heok, M. M. S., and Liu, L. F., 1985, *J. Cell Biol.*, 100: 1706—1715.
- [24] Adachi Y., Luke M., and Laemmli U. K., 1991, *Cell*, 64: 137—148.
- [25] Razin, S. V., and Vassetzky, Y. S., 1992, *Cell Biology International Reports* 16(8): 697—708.
- [26] Anderson, J. N., 1986, *Nucl. Acids Res.*, 14: 8513—8533.
- [27] Berezney, R., and Coffey, D. S., 1975, *Science*, 189: 291—293.
- [28] 陈枫等, 1990, *实验生物学报*, 23: 227—232.
- [29] Vaughn, J. P., Dijkwel, P. A., Mullenders L. H. F., and Hamlin, J. L., 1990, *Nucl. Acids Res.*, 18: 1965—1969.
- [30] Pienta, K. J., Partin, A. W. and Coffey,

- D. S., 1989, *Cancer Res.*, 49: 2525—2532.
- [31] Bonifer, C., Hecht, A., Saueressing, H., Winter, D. M., and Sippel, A. E., 1991, *J. Cellular Biochem.*, 47: 99—108.
- [32] Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C., and Kohwi-Shigematsu, T., 1992, *Science*, 255: 195—197.
- [33] Stief, A., Winter, D. M., Stratling, W. H. and Sippel, A. E., 1989, *Nature*, 341: 343—345.
- [34] Blasques, V. C., Xu, M., Moses, S. C. and Garrard, W. T., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264: 21183—21189.
- [35] Xu, M., Hammer, R. E., Blasquez, V. C., Jones, S. L., and Garrard, W. T., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264: 21190—21195.
- [36] Lichtenstein, A. V., Zaboikin, M. M., Osjakste, N. I., and Alechina, R. P., 1991, *J. Cell Sci.*, 99(3): 503—513.
- [37] Hakes, D. J., and Berezney, R., 1991, *J. Biol. Chem.*, 266(17): 11131—11140.
- [38] Dickinson, L. A., Tadashi, J. H., Yoshinori, K., and Kohwi-Shigematsu, T., 1992, *Cell*, 70: 631—645.
- [39] Bowen, B., Steinberg, J., Laemmli, U. K. and Weintraub, H., 1980, *Nucl. Acids Res.*, 8(1): 1—20.

基因工程抗体的获得

何明亮 李载平

(中国科学院上海生化所、中国科学院上海生命科学联合开放实验室 200031)

一、抗体结构和抗体基因

1. 抗体结构

抗体分为五类,即 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE,其理化性质各不相同,在体内的比例、分布及代谢速率也很不一样。IgG 是最重要的血清免疫球蛋白,分为四种亚型; IgG 1 是主要的亚型(占 IgG 总量的 67%),其次是 IgG2、IgG3、IgG4。IgA 是主要的分泌型 Ig,分为 IgA1, IgA2 两个亚型。IgM 是一五聚体分子,由 10 条 H 链、10 条 L 链和一条 J 链通过二硫键连接而成。它是一个多价体。在 B 细胞膜上的 IgM 作为抗原受体与 B 细胞成熟、分化有关。

抗体均具 IgG 的基本四链结构: 两条相同的重链(H)和轻链(L),链间以二硫键相连(图 1)。分子头部的两个抗原结合片段(Fab)通过“绞链区”与抗体的效应物结合区 Fc 相连。

肽链的 N-端多变,分别称为 VH 和 VL,它们参与抗原的识别与结合。在 VH 和 VL 上各有

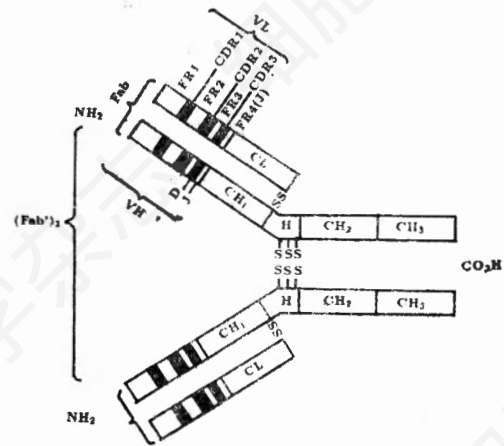


图 1 小鼠 IgG 分子基本结构

Ig 分子由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链组成,每条链由 N-端 V 区(VL 或 VH)和 C-端 C 区(CL 或 CH)组成, V 区氨基酸对抗原发生反应,集中体现于三个互补决定区 CDR₁, CDR₂ 和 CDR₃, V 区其余部分称为支架区: FR₁, FR₂, FR₃ 和 FR₄, C 区有多种效应物功能。