

- [2] 李银妹等,1993,生物化学与生物物理进展, 20:49-52.  
[3] 李银妹等,1993,量子电子学,10:161-163.  
[4] 李银妹等,1992,激光生物学,1:170.

- [5] 产品说明书: MERIDIAN, The ACAS Series, 1994 Meridian Instruments, (Hong Kong)Ltd.

## 研究工作

# 家蚕(*Bombyx mori*)5龄幼虫丝腺染色质在核基质上的结构

周丛照 钱信果 刘兵 李振刚

(中国科学技术大学生命科学学院 合肥 230027)

家蚕(*Bombyx mori*)丝腺是研究真核基因表达调控的理想模型之一。家蚕幼虫发育至5龄,丝腺的生长速度加快,但其细胞数量自胚胎期停止分裂后一直保持不变,而只是发生核内有丝分裂,形成多倍体,此时丝腺细胞核呈高度分枝状态而充满整个细胞。较蚁蚕而言,5龄第6日的中丝腺(middle silk gland, MSG)和后丝腺(posterior silk gland, PSG)的大小分别增长86,000倍和57,000倍,核内DNA达到 $10^5$ 至 $10^6$ 个拷贝(单位体积内的DNA量提高约10倍)。尽管丝腺中丝蛋白(silk proteins)基因进行组织特异性高效表达,并不存在其组织特异性扩增,而是整个基因组同步大量复制<sup>[1]</sup>。这些高度多线化的染色体结构如何?由于大量的基因正在活跃表达,因此它们所在的染色质区域应处于松弛状态,这些染色质如何保持有条不紊地高效复制和转录?

核基质是广泛存在于真核细胞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的合成和调控以及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<sup>[2]</sup>。MAR(matrix association regions)通过与核基质上的一些MAR结合蛋白(MAR-binding proteins)特异性紧密结合而将染色质分隔成拓扑

学限制性的区域(DNA loop)。这些DNA loop的大小从1kb至300kb不等<sup>[3]</sup>,而且在不同的真核生物中大小不同。Marilley和Gassend-Bonnet在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)中发现,rRNA基因所在的一个复制子既是一个转录单位,又是一个DNA loop区<sup>[4]</sup>;酵母的复制起点ARS(artificial replication sequences)就是MAR<sup>[5]</sup>;这说明DNA loop不仅是真核染色体包装的一个结构单位,同时也与复制子和转录单位之间存在某种对应关系。

## 材料与方 法

### 1. 家蚕解剖及细胞核的分离纯化

家蚕品种(苏春)由安徽省农业科学院蚕桑研究所提供,在本实验室人工饲养至5龄第三天,沿背部解剖后分别取出中丝腺和后丝腺(由于前丝腺太小,而且与丝蛋白基因的合成和表达无关,因此未加研究),去除内脏及杂物,回收剩下的蚕体作为丝腺的参照组。于25mmol/L柠檬酸中玻璃匀浆后依次经RSB-0.25mol/L蔗糖(RSB:10mmol/L NaCl,10mmol/L Tris,pH 7.4,3mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1mmol/L PMSF)和RSB-2mol/L蔗糖密度梯度离心后即得细胞核,以RSB-0.25mmol/L蔗糖洗涤数次而纯化之。

### 2. 核基质结合DNA片段的分离及其电泳

高度纯化的细胞核重悬于IS buffer(100mmol/L NaCl,50mmol/L KCl,5mmol/L MgCl<sub>2</sub>,20mmol/L

Tris, pH7.2, 0.5mmol/L PMSF, 0.02mmol/L DTT), 加入1% NP-40, 玻璃匀浆10次, 750g离心5min, 沉淀以 $2-3 \times 10^6$ /ml的浓度重悬于IS buffer中, 加入等体积的TMPD/S (4mmol/L NaCl, 20mmol/L Tris, pH7.2, 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5mmol/L PMSF, 0.02mmol/L DTT), 1500g离心10min, 沉淀悬于含4%甘油的HS buffer (2mmol/L NaCl, 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 20mmol/L Tris, pH7.2)中, 铺于含有60%甘油的HS buffer上, 1500g离心15min, 回收位于夹层的沉淀加入20-40倍体积的TMB buffer (100mmol/L Tris, pH7.2, 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2mmol/L  $\beta$ 巯基乙醇), 加入EcoRI (20-40unit/ml)或MboI (10-20unit/ml), 37℃消化1-2hr, 10000g离心20min, 分别抽提上清和沉淀中的DNA, 以紫外分光光度计测定各自的DNA量, 琼脂糖凝胶电泳测定核基质结合DNA的大小。

### 3. DNA印迹法

上述后丝腺的核晕经EcoRI酶解后, 将上清和沉淀中的DNA各30 $\mu$ g进一步以EcoRI完全酶解后, 参照《Molecular Cloning》上的方法进行琼脂糖凝胶电泳、DNA印迹和杂交<sup>[6]</sup> (以丝素基因5'端序列为探针)。

## 结 果

### 1. 部分DNA在体内与核基质紧密结合

依次经低盐和高盐抽提细胞核后, 组蛋白被去掉, 大部分裸露的DNA伸出核外而形成核晕(nuclear halo), 它们易于受到核酸酶的攻击而游离出来, 只有与核基质紧密结合的DNA仍然残留在核基质中。从图1可以看出, 以5unit/ $\mu$ g DNA的EcoRI消化核晕后, 开始时残留在核基质中的DNA明显减少, 至60min时与核基质结合的DNA维持在20%左右不变; 但以1unit/ $\mu$ g DNA的MboI消化核晕, DNA游离出来的速度明显快于EcoRI, 而且同样处理至60min时, 只有9%的DNA与核基质结合在一起, 至90min时, 只剩下3%。

### 2. 家蚕5龄中丝腺和后丝腺细胞中与核基质结合的DNA loop的平均大小

染色质DNA通过MAR或其他顺式作用元件(cis-acting elements)与核基质上的DNA

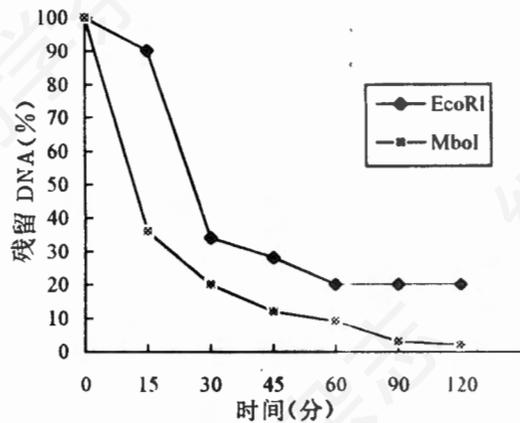


图1 核基质上残留的DNA百分比与限制性内切酶消化时间的关系

结合蛋白特异性识别并结合而被分割成拓扑学限制性的功能区域(DNA loop), 大量的DNA loop伸出细胞核而形成核晕。将核晕DNA以限制性内切酶消化后, 只有结合较紧密的DNA残留在核基质上, 而大部分伸出的DNA被切开并脱离核基质, 离心后即游离于上清中。分别回收沉淀(与核基质结合的)与上清(脱离核基质的)中的DNA, 并以紫外分光光度计进行定量, 电泳测得与核基质结合的DNA的长度, 除以它在核晕总DNA中的百分比即可得出DNA loop的平均长度。从表1中可以看出, 不仅中丝腺与后丝腺细胞的DNA loop长度没有区别, 丝腺与蚕体细胞的DNA loop长度也几乎相同, 均为67kb左右。

表1 家蚕5龄中丝腺和后丝腺细胞中与核基质结合的DNA loop的平均大小

组织类别	酶类	核基质结合DNA (%)	核基质结合DNA平均长度(Kb)	DNA loop平均长度(Kb)
中丝腺	EcoRI	20	14.0	70.0
	MboI	9	6.0	66.7
后丝腺	EcoRI	21	13.5	64.3
	MboI	10	6.7	67.0
蚕体	EcoRI	24	16.0	66.7
	MboI	4	2.6	65.0

总平均长度为 $66.6 \pm 2.0$ kb, 任意两种组织之间均满足 $P > 0.05$  (无显著性差异)。

### 3. 5 龄家蚕中丝素基因与后丝腺细胞核基质的特异性结合

DNA 印迹的结果表明,沉淀 DNA(即与核基质结合的 DNA)中可检测到 21kb 的 EcoRI 片段,而上清 DNA 的相应位置的杂交信号却明显较弱(图 2),说明丝素基因富集于核基质结合 DNA 片段中,即在 5 龄家蚕的后丝腺细胞中特异性表达的丝素基因与核基质特异性结合在一起。

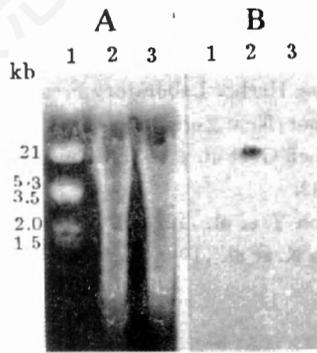


图 2 丝素基因与 5 龄家蚕后丝腺核基质的特异性结合

A. 杂交前的电泳照片。B. DNA 杂交结果(与 A 完全对应)。

泳道 1 为分子量标记,2 为核基质结合的 DNA,3 为上清中的 DNA。

## 讨 论

核晕经限制性内切酶消化后仍有部分染色质 DNA 结合在核基质上,但剩下的 DNA 所占的百分比与消化时间、酶量以及所用的酶类有关。如 EcoRI 是 6 碱基酶,而 MboI 是 4 碱基酶,理论上核晕 DNA 序列中的 MboI 位点是 EcoRI 位点的 16 倍左右,所以 MboI 能够更加充分地切割核晕上的 DNA。但不同的限制性内切酶充分消化后仍有部分 DNA 在体内与核基质紧密结合,这就是所谓的 MAR 序列,它们将染色质分隔成拓扑学限制性的 DNA loop。

尽管 5 龄幼虫丝腺为高度多倍体,而其他组织中大多为二倍体,但两者之间的染色质在

核基质上的组织却是相近的。5 龄丝腺细胞中约  $10^5$  至  $10^6$  个拷贝的基因组也同样被分隔成长约 67kb 的 DNA loop 而结合在核基质上,如此高度多倍化的染色质或许正是借助核基质作为一个支持框架,从而保证其有序排列。DNA 印迹的实验结果则进一步暗示核基质可能与丝素基因的组织特异性高效表达有关。

不同真核生物的 DNA loop 大小是不同的,对于某一物种而言,基因组中的 MAR 分子数是固定的,但并非所有的 MAR 分子都结合到核基质上,而且活体细胞中还有一些调控序列也可以与核基质结合而作为 DNA loop 的边界元件,因此 loop 大小在发育过程中是可变的。某一发育时期的 DNA loop 是作为一个功能单位,而不是一个固定的结构单位。在非洲爪蟾胚胎中,从囊胚到蝌蚪,DNA loop 的平均大小增加了 60%<sup>[7]</sup>,从 50kb 增加到 80kb,细胞核中 DNA loop 的总数相应减少,与核基质紧密结合的活性 MAR 分子(以及其他与核基质结合的 DNA 序列)减少,说明整个基因组的复制和表达等一系列生命活动的速度减慢。但在家蚕 5 龄幼虫中,活跃复制的丝腺组织与复制较慢的蚕体细胞之间并不存在 DNA loop 大小的差别,这也许暗示同一真核生物 DNA loop 的平均大小只与其发育时期有关,而与组织类型无关。

表 2 几种真核生物 DNA loop 大小的比较

真核生物名称	基因组 DNA loop	
	(Mb)	(kb)
酵母( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	13.5	36
人类( <i>Homo sapiens</i> )HeLa 细胞 <sup>[8]</sup>	3,300	75-86
果蝇( <i>Drosophila melanogaster</i> )成体 <sup>[9]</sup>	165	22
爪蟾( <i>Xenopus laevis</i> )胚胎 <sup>[7]</sup>	100	50-80
家蚕( <i>Bombyx mori</i> )5 龄幼虫	530	67

## 摘 要

家蚕(*Bombyx mori*)5 龄幼虫丝腺的染色质高度多倍化,整个基因组达  $10^5$  至  $10^6$  个拷贝。依次经低盐和高盐抽提 5 龄幼虫中丝腺、后丝腺和蚕体的细胞核,得到其核晕

(nuclearhalo),限制性内切酶消化后还有一部分 DNA 片段与核基质紧密结合在一起,说明染色质的组织与核基质有关。通过测定核基质上残留的 DNA 片段的平均长度及其在全基因组 DNA 中所占的百分比计算出,核晕上 DNA loop 的平均大小在中丝腺、后丝腺以及蚕体细胞中均为 67kb 左右。丝腺中高度多倍化的染色质与二倍体蚕体组织之间并不存在差异,它们同样被锚定在核基质上而分隔成长约 67kb 的染色质 loop,从而保证整个基因组的有序排列。以丝素基因为探针进行 DNA 印迹杂交发现,在 5 龄后丝腺中丝素基因特异性地和核基质紧密结合,说明核基质与丝素基因的组织特异性表达有关。

关键词: 家蚕 丝腺 核基质 染色体结构 丝素基因

## 参 考 文 献

- [1] 黄君霞,1989,丝蛋白分子生物学,安徽科技出版社,p93.
- [2] Verheijen,R. et al. ,1988,*J. Cell Sci.* , **90**:11-36.
- [3] Kramer P. R. et al. ,1997,*Biochem.* ,**36**:3151-3158.
- [4] Marilley M. et al. ,1989,*Expt. Cell Res.* , **180**:475-489.
- [5] Amati B. B. et al. ,1988,*Cell* ,**54**:967-978.
- [6] Sambrook J. et al. ,1989, In *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [7] Micheli G. et al. ,1993,*Chromosoma* ,**102**:478-483.
- [8] Saitoh Y. et al. ,1994,*Cell* ,**76**:609-622.
- [9] Zhao K. et al. ,1995,*Cell* ,**81**:879-889.

## NUCLEAR MATRIX-BASED CHROMOSOMAL ORGANIZATION IN THE 5TH INSTAR LARVAE OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*

ZHOU Cong Zhao QIAN Xin Guo LIU Bing LI Zhen Gang

(School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

### ABSTRACT

The chromosomes in the fifth instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori* are amplified to about  $10^5 \sim 10^6$  copies. After the nuclei of middle silkglands (MSG), posterior silkglands (PSG) and bodies from the 5th instar larvae were extracted with low-salt and high-salt solution, the nuclear halos were harvested. There were still some DNA fragments associated with the nuclear matrix after complete digestion with a variety of restriction endonucleases. This indicated that the chromosomal organization was related to the nuclear matrix. By means of detecting the average length and percentage of matrix-binding DNA fragments, the average length of DNA loops in MSG, PSG and body were counted. There is no obvious difference detected among the three parts. The loop size is about 67kb in multineme chromosomes of MSG and PSG cells as well as in diploid body cells. Southern blot of nuclear matrix-binding DNAs with the fibroin gene suggested that the nuclear matrix is also the base for efficient replication and tissue-specific transcription of fibroin gene.

Key words: *Bombyx mori* Silkgland Nuclear matrix Chromosomal organization Fibroin gene

本刊通过邮局向全国发行,订阅请至当地邮局。邮购可直接汇款至编辑部,每本另加邮杂费 1.50 元。