

# 核基质结合区提高稳定整合的 CAT 报告基因 在 NIH3T3 细胞中的表达

王天云 田芳 张胜力 侯卫红 王建民 薛乐勋\*

(郑州大学细胞生物研究室, 郑州 450052)

**摘要** 通过 PCR 从人基因组扩增  $\beta$  珠蛋白核基质结合区(matrix attachment region, MAR)及  $\beta$  干扰素 MAR, 正向及反向克隆至 pCAT3 载体 SV40 启动子的上游, 分别检测瞬时及稳定表达的情况下 MAR 在 NIH3T3 细胞内对 CAT 报告基因的影响情况。结果显示: 瞬时表达情况下, 反向及正向插入的 MAR 均不能提高 CAT 基因的表达; 稳定整合的情况下, 插入的  $\beta$  珠蛋白 MAR 可使 CAT 报告基因表达水平提高 8 倍,  $\beta$  干扰素 MAR 提高 3 倍, 反向及正向插入的 MAR 没有明显的差别。这表明 MAR 能在一定程度上提高外源基因的表达水平, 并且不同的 MAR 对外源基因表达的影响存在差异, MAR 的插入方向对外源基因的表达水平没有明显的作用。

**关键词** 核基质结合区; 转基因; 基因沉默; 报告基因

真核哺乳细胞表达系统能使外源基因完成蛋白质正确折叠和翻译后加工, 因而不失为基因工程中一个重要的表达系统, 然而由于位置效应等原因导致的基因沉默而使外源基因表达水平不高<sup>[1]</sup>, 因此提高外源基因表达水平、克服基因沉默至关重要。利用核基质结合区(matrix attachment region, MAR)是近年来发展起来的克服外源基因失活的一种有效方法<sup>[2]</sup>。MAR 是真核生物染色质上的一段富含 A/T 的 DNA 序列, 能使染色质形成环状结构, 还可以作为 DNA 复制的起始点或调控基因的转录<sup>[3]</sup>, 尤其是将 MAR 构建成载体后能提高外源基因表达水平, 增强外源基因表达的稳定性及提高转化细胞稳定株的频率等<sup>[2]</sup>。然而研究发现不同的 MAR 对外源基因表达的影响不一<sup>[2-4]</sup>, 其作用机制目前仍不清楚<sup>[2,4-11]</sup>。为进一步探索 MAR 对基因表达的影响及其作用机制, 我们从人基因组 DNA 克隆了  $\beta$  珠蛋白 MAR、 $\beta$  干扰素 MAR, 克隆至 pCAT3 载体 SV40 启动子前, 研究了其在小鼠成纤维细胞系 NIH3T3 的表达调控功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DNA 限制酶、PCR 试剂等购自 TaKaRa 公司, DMEM 细胞培养基、小牛血清、G418 购自 Gibco BRL 公司; 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自

杭州维特洁(v-gene)生化公司; pCAT3-control 载体购自 Promega 公司、CAT-ELISA 检测试剂盒购自 Roche 公司。其他所用试剂均购自上海生工公司, 引物合成及测序由上海生工公司完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 MAR 片段的克隆及 pCAT3-MAR 载体的构建** 根据 GenBank 报道的人的  $\beta$  珠蛋白 MAR (No. L22754),  $\beta$  干扰素 MAR (No. M83137) 分别设计引物,  $\beta$  珠蛋白 MAR: 5'-TTAGTAAGACATCACCTT-GCATT-3', 5'-AGCCATAGTTTGTAGTTACCCCTT-3',  $\beta$  干扰素 MAR: 5'-CTAAGAGGAACCCAAGGA-GACA-3', 5'-AATCATTCAACTAGGCCAGCA-3'。为实现定向克隆, 引物的 5' 分别引入 *SacI/XhoI* 酶切位点 (GTCGAGCTC; AGCCTCGAC) 及 *SacI/KpnI* 酶切位点 (GTCGAGCTC; GTCGGTACC)。PCR 条件如下: 95 °C 3 min, 94 °C 40 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s 30 个循环, 72 °C 3 min。采用酚氯仿抽提, 乙醇沉淀提取基因组 DNA, PCR 扩增 MAR 序列, PCR 产物 1% 凝胶电泳鉴定正确后送上海生工测序。

将  $\beta$  珠蛋白 MAR 及  $\beta$  干扰素 MAR 分别用 *SacI/XhoI*、*SacI/KpnI* 酶切, T4 连接酶连接至用相应内

收稿日期: 2004-08-23 接受日期: 2004-12-10

国家自然科学基金(No.30270031)及国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(No.2002AA628050)资助

\* 通讯作者。Tel: 0371-6658332, Fax: 0371-6658332, E-mail: lxxue@public2.zz.ha.cn

切酶酶切的 pCAT3 载体上, 转化 *E. coli* JM109, 提取质粒酶切电泳鉴定。

**1.2.2 瞬时表达实验** 在 6 孔板内接种  $3 \times 10^5$  个/孔 NIH3T3 细胞, 次日取 pCAT3-MAR 质粒各 6  $\mu\text{g}$  (用限制酶 *Bgl*III 线性化), 利用磷酸钙转染试剂盒 (Promega) 转染 NIH3T3 细胞, 48 h 后收集细胞。每组重组子导入 4~6 孔细胞, CAT 报告基因表达的检测采用 ELISA 方法, 按 Roche 试剂盒说明书进行。每组样品重复检测 3 次。

**1.2.3 稳定表达实验** 培养细胞如上, 取 pCAT3-MAR 质粒各 6  $\mu\text{g}$ , 分别与 2  $\mu\text{g}$  质粒 pcDNA3.0 (Invitrogen) 混合, 利用磷酸钙转染试剂盒 (Promega) 共转染 NIH3T3 细胞, 48 h 转入 10 cm 的培养皿内, 加入 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 进行持续筛选 2 周, 约 10~15 天待稳定转化的细胞集落形成后, 用 0.25% 胰酶消化后转入培养瓶内继续培养, 待细胞密度达 80%~90% 收集细胞检测 CAT 酶的活性, 检测方法同上。

**1.2.4 稳定整合试验** 分别收集稳定筛选的细胞株, 用常规基因组提取方法提取基因组 DNA, 根据 CAT 基因序列设计引物: 5'-ATCACTGGATA-TACCACCGTTG-3', 5'-GTCGCCTTGCGTATAA-TATTTG-3'。PCR 条件如下: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  40 s 30 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  3 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

## 2 结果

### 2.1 pCAT3-MAR 载体的构建及酶切鉴定

提取人血液基因组 DNA, PCR 扩增  $\beta$  珠蛋白 MAR 及  $\beta$  干扰素 MAR, 测序结果 Blast 分析与 GenBank 报道的序列完全一致。将 PCR 产物清洁后用相应的内切酶酶切, 连接至用相应的限制酶酶切的 pCAT3 载体上, 提取质粒分别用 *Sac*I/*Xho*I、*Sac*I/*Kpn*I 酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果见图 1。从图 1 可以看出, 无论正向还是反向构建的载体, 酶切后均有插入片段切出 ( $\beta$  珠蛋白 770 bp,  $\beta$  干扰素 MAR 800 bp), 切出的片段与预期片段大小相符。由于 PCR 引物中引入了酶切位点, 从而实现了正向及反向克隆。

### 2.2 瞬时表达实验

分别将构建好的 pCAT3-MAR 系列载体转化 NIH3T3 细胞, 以不含 MAR 的 pCAT3 作为对照。转化质粒 48 h 后收集细胞裂解液, 检测 CAT 酶活

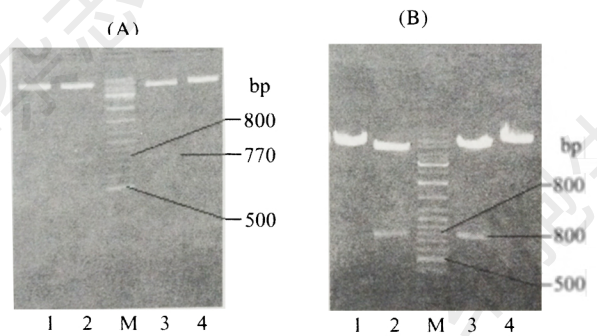


图 1 pCAT3-MAR 酶切鉴定图

A:  $\beta$  珠蛋白 MAR; B:  $\beta$  干扰素 MAR。1: *Sac*I 单酶切; 2: *Sac*I/*Xho*I 酶切(反向鉴定); 3: *Sac*I 单酶切; 4: *Sac*I/*Kpn*I 酶切(正向鉴定); M: DNA marker。

表 1 瞬时表达下各实验组 CAT 酶活性检测

载体	CAT ( $A_{415}$ )
pCAT3-control	0.567
pCAT3- $\beta$ -globin-MAR (R)	0.571
pCAT3- $\beta$ -globin-MAR (P)	0.489
pCAT3- $\beta$ -interferon-MAR (R)	0.501
pCAT3- $\beta$ -interferon-MAR (P)	0.456

表 2 稳定表达下各实验组 CAT 酶活性检测

载体	CAT ( $A_{415}$ )
pCAT3-control	0.567
pCAT3- $\beta$ -globin-MAR (R)	4.671
pCAT3- $\beta$ -globin-MAR (P)	4.529
pCAT3- $\beta$ -interferon-MAR (R)	1.701
pCAT3- $\beta$ -interferon-MAR (P)	1.686

性, 结果见表 1。从表 1 可以看出无论正向还是反向 MAR 构建的载体与对照质粒 CAT 基因表达水平差异不大。这说明瞬时表达的情况下 MAR 对基因的表达影响不大。

### 2.3 稳定表达实验

由于 pCAT3 无筛选标记, 我们将载体 pcDNA3.0 与构建的 pCAT3-MAR 进行共转化, 然后进行 G418 筛选, CAT 酶活性检测结果表明: MAR 能明显提高 CAT 基因的表达水平。其中  $\beta$  珠蛋白 MAR 可使 CAT 报告基因表达水平提高 8 倍,  $\beta$  干扰素 MAR 提高 3 倍, 反向及正向插入的 MAR 对 CAT 报告基因表达的影响没有明显的差异 (表 2)。

### 2.4 MAR 稳定转化株的鉴定

为证实 pCAT3-MAR 载体是否稳定整合在宿主基因组上, 提取具有 G418 抗性的细胞株的细胞基因组 DNA, 设计引物 PCR 扩增 CAT 基因, 结果稳定转化的细胞株基因组 DNA 都扩增出了 530 bp 的目的片段 (图 2), 而对照组没有目的片段, 这说明 pCAT3-MAR 已经稳定整合到了基因组上。

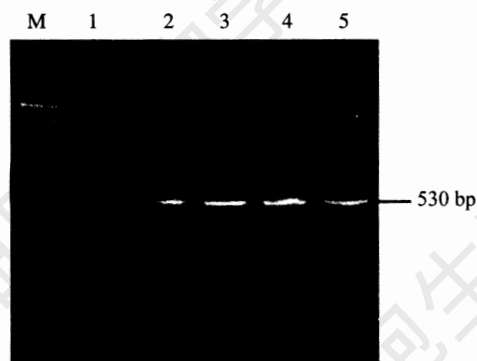


图2 MAR 稳定转化株的鉴定

1: 对照(未转化); 2: pCAT3- $\beta$ -globin-MAR (R); 3: pCAT3- $\beta$ -globin-MAR (P); 4: pCAT3- $\beta$ -interferon-MAR (R); 5: pCAT3- $\beta$ -interferon-MAR (P); M: DNA marker。

### 3 讨论

转基因沉默是在转基因动植物中所遇到的急需解决的关键问题, 利用核基质结合区来稳定、提高外源基因表达是近年来发展起来的克服外源基因沉默的有效策略。目前已有不少利用核基质结合区提高外源基因表达的相关报道<sup>[3]</sup>。

我们从人类基因组克隆克隆了 $\beta$ 珠蛋白MAR及 $\beta$ 干扰素MAR, 测序分析序列与GenBank (No. L22754, M83137)报道的序列完全一致。为研究MAR的功能, 我们将MAR片段分别正向及反向克隆到报告基因载体pCAT3上转染NIH3T3细胞。实验结果表明, 瞬时表达的情况下MAR对CAT基因的表达没有明显的促进作用, 这与以往的研究结果基本一致<sup>[6,9,11]</sup>。其原因可能与MAR的作用机制相关, 现在普遍认为, MAR作为边界元件(boundary elements)限定了染色质的集缩程度, 将不同的基因片段界定于不同的染色质环内, 并阻挡了邻近染色质区的顺式调控元件对环内基因的影响。转基因连有MAR时, 有可能形成一个独立的环区, 此区受周围染色质的影响很小, 使得外源基因能够进行高水平的转录, 即存在“拷贝数依赖性”(copy gene dependent)<sup>[13]</sup>。根据这个观点, MAR必须整合到染色质上才能起作用。其次我们研究发现, MAR插

入的方向与其作用没有直接的关系, 实验中反向插入和正向插入的MAR的均能提高CAT基因的表达, 说明实验所用的人的 $\beta$ 珠蛋白MAR、 $\beta$ 干扰素MAR的作用是无方向性的, 这与前期的研究报道基本一致<sup>[4,9]</sup>。但有的报道认为MAR的作用与其插入方向有关<sup>[6,7]</sup>, 这可能与所用的MAR有关。另外我们还发现, 相同的条件下不同的MAR的作用效果不同,  $\beta$ 珠蛋白MAR及 $\beta$ 干扰素MAR促进CAT基因表达水平的提高存在差异。这可能与MAR与核基质的亲和力有关。Michalowski等<sup>[14]</sup>根据MAR与核基质的亲和性将MAR分成“强”、“中”、“弱”三种, 并证明与核基质结合能力较强的MAR序列比弱的增强外源表达水平要高<sup>[10,15]</sup>。但有的实验也已证实MAR的作用效果与其与核基质的亲和性并没有直接的相关性, 与核基质亲和性高的MAR其促进基因表达的效应并不比亲和性低的高<sup>[4,8,11]</sup>。这可能是因为MAR的作用不仅仅与核基质的结合状态相关, 还可能存在着与调控蛋白结合调控启动子活性的机制。关于这方面的作用机制尚有待于进一步研究。

本工作是在河南省分子医学重点学科开放实验室完成, 特此致谢!

### 参考文献 (References)

- [1] Matzke MA *et al.* *Plant Mol Biol*, 2000, **43**: 401
- [2] Allen GC *et al.* *Plant Mol Biol*, 2000, **43**: 361.
- [3] 王天云等. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 587
- [4] Kim JM *et al.* *J Biotechnol*, 2004, **107**: 95
- [5] Bode J *et al.* *Science*, 1992, **255**: 195
- [6] 戴冰冰等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**: 24
- [7] 吴震宇等. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33**: 59
- [8] 张可伟等. *科学通报*, 2002, **47**: 1572
- [9] Zahn-Zabal M *et al.* *J Biotechnol*, 2001, **87**: 29
- [10] Allen GC *et al.* *Plant Cell*, 1996, **8**: 899
- [11] Brouwer C *et al.* *Plant Cell*, 2002, **14**: 2251
- [12] Schubeler D *et al.* *Biochemistry*, 1996, **35**: 11160
- [13] Stief A *et al.* *Nature*, 1989, **341**: 343
- [14] Michalowski SM *et al.* *Biochemistry*, 1999, **38**: 12795
- [15] Allen GC *et al.* *Plant Cell*, 1993, **5**: 603

## Matrix Attachment Regions Increased Stable Integrated CAT Reporter Gene Expression Level in NIH3T3 Cells

Tian-Yun Wang, Fang Tian, Sheng-Li Zhang, Wei-Hong Hou, Jian-Min Wang, Le-Xun Xue\*  
(Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract** The  $\beta$ -globin matrix attachment region (MAR) and  $\beta$ -interferon MAR DNA fragments were amplified through PCR, and cloned into the upstream of SV40 promoter of pCAT3 vector in forward and reverse orientation, the CAR enzyme activities of different constructs were examined under transient and stable expression respectively. The results showed that  $\beta$ -globin MAR could increase the CAT gene expression 8 fold,  $\beta$ -interferon MAR 3 fold in stable integration transformants, however there were little effects of MAR on CAT gene expression levels under transient expression. The orientation of two MARs inserted into the vector had no effect on CAT gene expression.

**Key words** matrix attachment region; transgene; gene silence; reporter gene

Received: August 23, 2004 Accepted: December 10, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270031) and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2002AA628050)

\*Corresponding author. Tel: 86-371-6658332, Fax: 86-371-6658332, E-mail: lxxue@public2.zz.ha.cn