

# 基质结合区与转基因动物的基因表达

卢一凡 邓继先 肖成祖 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

**摘要** 基质结合区 (MAR) 在稳定转染的细胞系中的研究结果显示, 能缓冲在其侧翼的染色质某些拮抗作用. 这为外源基因在染色体中随机整合的转基因动物研究提供了新的方向. 文章对其在转基因动物中的探索性研究及可能的机理进行综述. 指出在转基因动物中, MAR 的应用能导致建立独立的基因活性结构域. 它对基因高效表达无疑具有重要作用. MAR 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.

**关键词** 基质结合区, 基因表达, 转基因动物

转基因动物研究发展至今, 对生命科学研究起到了巨大的推动作用. 迄今为止, 已有众多的外源基因在转基因动物中进行组织特异性表达. 尽管如此, 由于转基因的不可预测性, 转基因在染色体上的随机整合致使表达水平难以大幅度提高. 为解决这一难题, 各国学者一直在多途径下进行不懈的努力.

基质结合区 (matrix association region 或 matrix attachment region, MAR) 是真核基因组的 DNA 序列中能特异地和核基质紧密结合的区域, 它广泛地存在于从酵母到人的所有真核生物基因组中. 近年来的研究表明, MAR 独立地存在于非编码区, 位于功能转录框架附近. 邻接 MAR 的往往是一些转录调控元件, 如启动子、增强子等. 这为 MAR 的功能研究提供了依据. 在稳定转染的细胞系中的研究结果显示, 它能缓冲在其侧翼的染色质的某些拮抗作用<sup>[1]</sup>. 这为外源基因在染色体中随机整合的转基因动物研究提供了新的方向. 本文对其在转基因动物中的探索性研究及可能的机理加以综述.

## 1 MAR 与转基因动物的基因表达

### 1.1 MAR 的结构

在真核生物的细胞核中, 核基质主要由非组蛋白的纤维蛋白和高分子质量的 RNA 所组

成. 它在发挥其功能时, 大多是借助于基质结合区 (MAR) 与 DNA 相结合来完成的. 而 MAR 是通过一些特异的 MAR 结合蛋白与核基质紧密结合. 在细胞核中存在有近 20 000 个 MAR 位点, 然而并不是所有的 MAR 位点都能与单链 DNA 结合, 它取决于 MAR 与核基质的相互作用以及在某种程度上对单链 DNA 的识别<sup>[2]</sup>.

MAR 一般存在于某个特定基因的侧翼区域, 常与一些调控因子相邻. 如鸡溶菌酶基因和人的  $\beta$  干扰素基因的上游和下游均含有 MAR; 小鼠免疫球蛋白 k 轻链基因的 MAR 则紧邻上游区的增强子; 果蝇的两个 hsp70 基因的 MAR 存在于启动子等调控元件的上游; 但例外的是, 在中国仓鼠二氢叶酸还原酶基因的第四内含子中以及人  $\beta$  球蛋白基因的第二内含子中均含有 MAR, 其作用仍然未知<sup>[3]</sup>. 现有的研究表明, MAR 长约 300~1 000 bp, A+T 的含量高达 70% 左右, 以几个特异的序列为主, 如 A 盒 (AATAAAT/CAAA), T 盒 (TTATTT/ATTT/ATT). 这些 DNA 序列以及它们与核基质之间的相互作用都是高度保守的. 由于其高度富含 A+T 和寡聚 (dA) 序列, MAR 的三维结构表现为一个狭窄的 DNA 小沟, 具有碱基的不配对特性. 在负超螺旋状

态下, MAR 很容易发生解链, 从而形成单链 DNA. MAR 的解链特性对于它和核基质的有效结合以及转录的起始都是十分重要的, 它将活化的线状染色质分子通过 MAR 锚定到核基质上以防止其自由转动, 从而使扭力作用被引入染色质结构域<sup>[4,5]</sup>. 这对于转基因在染色体上的随机整合来说, 无疑具有相当的重要意义.

## 1.2 转基因动物基因表达元件中的 MAR

转基因动物基因表达元件的组成, 是转基因表达的基础. 在现有的表达载体构建中, 元件的组成无非是采用组织特异性调控序列 (启动子以及增强子), 内源性或异源性 polyA<sup>+</sup> 信号以及插入的外源 cDNA 或基因组 DNA 序列. MAR 的研究进展, 使转基因表达载体的构建呈现新的内涵. 在现有的几种构件中, MAR 的应用如下面所述.

**1.2.1 共注射建立含 MAR 的表达元件:** 利用显微注射的方法建立转基因动物, 对不同的基因片段采用共注射的方法已被公认. McKnight 等<sup>[6]</sup> 利用这一方法将小鼠的乳清酸蛋白 (WAP) 的完整基因 7 kb 片段, 与鸡溶菌酶基因 5' 区 3 kb 的 BamH I - Xba I 片段进行共注射, 建立了五个 WAP/MAR 转基因系.

**1.2.2 删除内源性 MAR 的表达载体:** Xu 等<sup>[7,8]</sup> 研究免疫球蛋白 k 基因中内含子内的 MAR 和增强子对 k 基因表达的影响, 共构建三个表达载体, 分别是删除 0.5 kb 内源性 MAR 的构件, 删除 1 kb 内源性 MAR 和增强子的构件以及含有完整的内源性 MAR 和增强子的构件. 与其他研究不同的是, 其 MAR 不是置于构件的上游序列, 也不是下游序列, 而是处于基因中部的内含子内.

**1.2.3 表达载体构建中的 MAR:** Hyttinen 等<sup>[9]</sup> 构建转基因奶牛乳腺表达载体生产人红细胞生成素 (EPO), 在采用  $\alpha$  sI-酪蛋白作为调控序列的前提下, 将 1.3 kb 的鸡溶菌酶 A 元件 (即鸡溶菌酶的 MAR) Hind III/Xba I 片段克隆至  $\alpha$  sI-酪蛋白调控序列的上游, 利用此构件结合 PCR 方法筛选胚胎已成功地生产

出三头转基因牛, 表达水平还未见报道.

## 1.3 MAR 对转基因动物基因表达的影响

转基因由于在染色体上的随机整合而未能建立独立的基因活性结构域, 从而对染色体可能具有位置效应而导致难以高水平表达外源基因. McKnight 等<sup>[6]</sup> 证实, MARs (来源于鸡的溶菌酶位点) 在转基因鼠中能表现出从位置效应来隔绝一个异源基因. 通过对 WAP 和 MAR 两个基因片段共注射, 在所有的转基因鼠系中发现转基因获得表达. 这些系中有完整的 WAP 和 MAR 共整合. 相似地, 在稳定转染的组培细胞中鸡的溶菌酶位点的 MAR, 在同源和异源启动子中对位置依赖性表达不明显, 在这些研究中, 看到 MAR 的存在并没有提高表达水平, 这支持了早期的观察, 即 MAR 并不具有如增强子这样的功能<sup>[1]</sup>. 然而, MAR 对表达的影响如何呢? Xu 等<sup>[7]</sup> 建立了删除内含子中内源性 MAR 的转基因鼠, 发现删除 MAR 能降低免疫球蛋白 k 基因表达 3 倍, 而同时删除 MAR 和内含子内的增强子则降低表达水平 4 倍. 他们研究小组在浆细胞瘤细胞表达该基因也获得几乎相同的结果<sup>[8]</sup>. 可见, MAR 对基因表达似乎是不可缺少的.

由于泌乳机制的复杂性, 转基因动物乳腺表达外源基因受机体内复杂调控机制的影响. WAP 做为乳腺特异性启动子指导外源基因在乳腺表达已有众多报道. 一些研究指出, WAP 转基因在妊娠期和泌乳期的复杂激素的调控下, 其表达在强度上有所降低是由于缺乏阻遏物和其他转录元件. 然而, McKnight 等以往的研究表明, 7 kb 的 WAP 基因已经含大多数对发育和激素调控必要的元件, 但缺乏一高水平表达的元件. 极可能是隔绝序列<sup>[10]</sup>. MAR 的存在, 恢复了在妊娠泌乳与激素协同作用期间 WAP 转基因的发育调控, 并对其进行精巧的调解. 同不含有 MAR 元件的 WAP 转基因相比较, 二者在妊娠和泌乳上调控的差异可以发现, MAR 调控元件对位置影响所具有的敏感性<sup>[6]</sup>.

如在稳定转染细胞系培养中一样. 现有的

文献表明,转基因动物基因表达与拷贝数无明显关系,即并不总依赖于拷贝数<sup>[1]</sup>.但采用MAR(鸡溶菌基因)产生的转基因鼠表明,它表现出转基因与拷贝数的依赖性表达,在McKnight等(1992年)的试验中,由于用同样的构件,不含MAR没有转基因鼠产生,难以决定是否拷贝数的依赖性产生于一个特异的溶菌酶基因的特性,还是基因与MAR互作所造成.但在这一试验中,某些拷贝数依赖性表达的不充分可反映MAR隔绝能力的不完全性,或MAR的作用没有侧翼到所有WAP转基因.

## 2 MAR的作用机制

MAR在基因中的位置具有明显特征.大多数MAR位于基因的两侧并与DNA环基部相对应;而且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表达所必需的.这个特点可能决定了MAR的几种重要功能:参与染色体包装和基因复制,调节基因的表达.Pienta等<sup>[11]</sup>提出染色组装的放射环模型,指出了MAR在染色体包装中的作用.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有60 kb大小的DNA环,这些环以核骨架为轴心,形成直径为0.84 nm的放射环结构,最后叠加盘绕成染色体.此过程中MAR位于环的基部,与核基质结合对DNA环具有锚定作用.这种DNA环不仅是染色体组织的结构基础,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.不仅如此,它还防止了正在活跃转录的基因邻近的染色质区域.在McKnight的转基因鼠试验中,将MAR与WAP共注射,检查四个插入位点,都发现MAR显示出保护WAP转基因具有位置效应.但表现出的差异性可能是这一特定的整合位点未能由MAR足够的加以缓冲.这一点在果蝇的热休克(heat shock)基因的SCS

元件也获得相似结果.

对不同物种MAR的研究发现,它有一个共同的特点即含有拓扑异构酶II的酶切位点,该酶能使DNA超螺旋解链,从而使转录因子与启动子进行有效的结合<sup>[12]</sup>.MAR解链产生的热力学能量通过MAR与核基质的结合而储存起来,其他时候再被释放出来而在同一个环中相距较远的位点引入负超螺旋.因此,当基因活跃转录时,MAR、拓扑异构酶、转录因子与核基质结合形成具有转录活性的复合体,它松弛转录区域的正超螺旋,同时防止螺旋被传递到邻近的结构域中去<sup>[13,14]</sup>.

尽管现有的证据大多表明,MAR在稳定转染的细胞系发挥作用,在转基因动物中研究还较少,但McKnight的试验证实,MAR确实进入WAP转基因位点,并导致建立独立的基因活性结构域.但还没有证据表明这些MAR是实际处在染色质结构域的界限边缘.尽管如此,MAR对转基因鼠以及其他表达系统的基因高效表达无疑具有重要作用.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.

## 3 结 语

转基因动物为基因表达调控的研究提供新手段,远非细胞水平的三维的基因表达调控系统所能比拟.MAR在转基因动物上的开拓性研究为其结构与功能的进一步探索提供了新的资料.MAR的研究已从理论研究步入实际应用,它作为一种决定染色体结构和功能性区域的新的顺式调控因子,在不久的将来,可望成为基因表达调控的普遍性的新元件.

## 参 考 文 献

- 1 Stief A, Winter D M, Stratling W H *et al.* A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature*, 1989, **341** (28): 343~345
- 2 Klehr D, Schlake T, Maass K *et al.* Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry*, 1992, **31** (12): 3222~ 3229
- 3 罗文捷, 焦仁杰, 翟中和. DNA的核骨架结合序列

(MARs) 研究进展. 细胞生物学杂志, 1995, 17 (2): 54~ 59

4 Bode J, Maass K. Chromatin domain surrounding the human interferon $\beta$  gene as defined by scaffold-attached region. Biochemistry, 1988, 27 (13): 4706~ 4711

5 Bode J, Kohwi Y, Dickinson L *et al.* Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. Biochemistry, 1992, 255 (5041): 195~ 197

6 McKnight R A, Shamay A, Sankaran L *et al.* Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89 (8): 6943~ 6947

7 Xu M, Hammer R E, Blasquez V C *et al.* Immunoglobulin k gene expression after stable integration. ( II ) Role of the intronic MAR and enhancer in transgenic mice. J Biol Chem, 1989, 264 (35): 21190~ 21195

8 Blasquez V, Xu M, Moses S C *et al.* Immunoglobulin k gene expression after stable integration. ( I ) Role of the intronic MAR and enhancer in plasmacytoma cells. J Biol Chem, 1989, 264 (35): 21183~ 21189

9 Hyttinen J M, Peura T, Tolvanen M. Generation of transgenic dairy cattle from transgenic analyzed and sexed embryos produced *in vitro*. Bio/Technology, 1994, 12 (3): 606~ 608

10 Burdon T, Sankaran L, Wall R J *et al.* Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. J Biol Chem, 1991, 266 (11): 6906~ 6914

11 Pienta K J, Partin A W, Coffey D S. Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. Cancer Res, 1989, 49 (5): 2525~ 2532

12 Kay V, Bode J. Binding specificity of a nuclear scaffold: supercoiled, single-stranded, and scaffold-attached region

DNA. Biochemistry, 1994, 33 (1): 367~ 374

13 Klehr D, Maass K, Bode J. Scaffold-attached regions from the human interferon  $\beta$  domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. Biochemistry, 1991, 30 (5): 1264~ 1270

14 Cockerill P N, Garrard W T. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. Cell, 1986, 44 (2): 237~ 282

**MAR: A New Element of Gene Expression in Transgenic Animal.** LU Yifan, DENG Jixian, XIAO Chengzu, MA Qingjun ( *Institute of Biotechnology, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100071, China* ).

**Abstract** Matrix-attachment regions ( MARs ) has been identified to buffer the effects of flanking chromatin in stably transfected cell lines. This gives new area in transgenic animal gene expression. Some researchs on MARs in transgenic animal and possible mechanism are reviewed. It suggests that MARs can establish independent genetic domains and have important significance on increaseing gene expression in transgenic animal.

**Key words** MAR, gene expression, transgenic animal

# DNA 生物传感器进展

翟俊辉 崔 红 杨瑞馥

( 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071 )

**摘要** 近几年来, 酶传感器、免疫传感器及微生物传感器等发展较为成熟, 而 DNA 生物传感器的研究相对较少. 文章从核酸杂交的原理出发介绍了 DNA 生物传感器的工作原理, 举例说明了电化学、光学和声学等几种典型的 DNA 生物传感器, 指出了其固有的优缺点, 肯定了 DNA 传感器发展前景.

**关键词** DNA 生物传感器, 核酸杂交, 探针, 压电晶体, 光纤

生物传感器 ( biosensors ) 的产生在医药卫生、食品检验和环境监测等各个领域引起了一场革命, 其简单、快速和准确的特点打破了以往诸多分析手段<sup>[1]</sup>. 这种优越性使人们的

注意力越来越集中于生物传感器的研究, 并同时推动着它们的发展. 其中发展较快的有酶传感器、免疫传感器和微生物传感器等, 酶传感