

烟草 MARs 的分离及其功能分析

Isolation and Functional Analysis of Tobacco MARs

黄慧珍^{1,2}, 王 瑶^{1*}, 陈士云¹, 王志华¹, 杨宝玉¹

HUANG Hui-Zhen^{1,2}, WANG Yao^{1*}, CHEN Shi-Yun¹, WANG Zhi-Hua¹ and YANG Bao-Yu¹

1 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071

2 西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100

1 Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

2 Department of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China

摘 要 从烟草基因组中克隆到两条新的 MAR 片段 (M14 和 M17), 序列分析表明, 它们具有 90% AT-box, A-box, T-box, 碱基非配对区域, 拓扑异构酶 II 识别位点, 弯曲 DNA 序列, 复制起始序列和 ATATTT 等典型的 MAR 序列特征, 并与原有 MAR 序列的特征不同。将它们分别构建到植物表达载体 pCambia2301 GUS 基因 (*uidA*) 表达盒一侧及两侧, 通过农杆菌介导转化烟草。组织化学染色法定性检测 GUS 活性表明, 带有 M14 和 M17 的 *uidA* 基因在转基因烟草中稳定表达。GUS 活性的定量检测表明, 表达载体上 *uidA* 基因一端或两端连接有 MAR 的转化烟草中, GUS 的表达水平与对照相比都有了明显提高, 而 *uidA* 基因两侧连有 MAR 的载体提高表达水平的效果优于一端连有 MAR 的载体, 可使 GUS 活性增强 3.14 倍, 但不同转化个体之间表达水平的差异仍然明显。上述结果表明, 所得 DNA 序列为两条新的 MAR 片段, 并且具有提高转基因表达水平的功能。

关键词 MARs, 烟草, β -葡萄糖醛酸酶, 转基因表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0970-05

Abstract Two new MAR segments (M14 and M17) were cloned from tobacco genome. Both of the sequences contained several typical consensus sequences of MARs, which were different from the original MAR sequence, such as 90% AT-box, A-box, T-box, the base unpairing region (BUR), autonomously replicating sequences (ARS), the consensus sequence for topoisomerase II, MAR recognition sequence (MRS), origin of replication (ORI), curved DNA motifs and ATATTT *et al.* To investigate the effects of these two sequences on gene expression in transgenic plants, 3 plant expression vectors were constructed with *uidA* gene coding β -glucuronidase (GUS) which were flanked on one side and on both sides by the MARs we obtained. These plant expression vectors with one or two MARs were transformed into tobaccos via *Agrobacterium*-mediated transformation method, with the plant expression vector pCambia2301 without MAR and wild type tobacco as controls. GUS histochemical staining results showed that the *uidA* gene expressed stably in transgenic tobaccos. Quantitative detection of GUS activity showed that the MARs could increase GUS expression levels in vivo in contrast to the controls wherever they were flanked on one side or both sides of *uidA* gene. The vector ligated with MARs in the same direction on both sides of *uidA* could increase the GUS expression level much better than both vectors which just ligated with single MARs on one side. The former one increased the average GUS activity for 3.14 folds, but 1.56 and 2.43 folds for the latter two vectors with single MARs respectively contrasting to the

Received: May 19, 2005; Accepted: July 1, 2005.

This work was supported by a grant from the National Sciences Foundation of China (No.30200222).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87199354; E-mail: ywang@wh.iov.cn

国家自然科学基金资助项目 (No.30200222).

pCAMBIA2301 control. But the expression differences among individual transformants were still obvious. Therefore, it was concluded that the DNA sequences we obtained in this experiment were two novel MARs and could enhance gene expression *in vivo*. In the meanwhile, although the numbers of the MARs typical motifs in M14 were more than in M17, especially the 90% AT box which had been considered to be the highest correlative motif with binding strength *in vitro*, the enhancement of gene expression was lower yet, which implied no correlation between improvement of gene expression and binding strength between MARs and nuclear matrix *in vitro*.

Key words MARs, β -glucuronidase, tobacco, transgene expression

核基质附着区(nuclear matrix/scaffold attachment regions, M/SARs)是真核生物染色质中与核基质或核骨架特异结合的一段 DNA 序列。在真核生物的细胞核内,基因组是通过 MARs 与核骨架结合,锚定在核骨架网状系统上的。MARs 既有一定的特征,又有多多样性,它参与了 DNA 复制调控和转录调控等多种核生化过程,同时能使染色质形成独立的环状结构,避免位置效应引起的基因沉默。通过构建合适的表达载体,在目的基因的一侧或两侧连接 MARs 后导入动植物,目的基因的表达可增强几倍至几十倍,或者降低转基因个体间表达水平差异^[1]。MARs 的分离方法主要有两种:PCR 法和从核基质上分离^[2,3],对外源基因表达的增强作用则最终取决于在转基因植物体内的鉴定^[4]。

本研究用 PCR 方法从烟草中分离出两个具有 MAR 序列特征的 DNA 片段,并将其分别构建在植物表达载体 pCAMBIA2301 GUS 基因(*uidA*)表达盒一侧及两侧,通过农杆菌介导转化烟草,研究它们对外源基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105、植物表达载体质粒 pCAMBIA 2301、烟草 *Nicotiana tabacum* L. 无菌苗品种 NC89 均为本实验室保存。T 载体 pMD18-T,限制酶均购自 TaKaRa 公司。Taq 酶购自 BioStar 公司。

1.2 方法

1.2.1 烟草基因组 DNA 的提取:取烟草新鲜组织 1~2 g, -20℃预冷 30min 后研成粉末,加 2mL DNA 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 50mmol/L EDTA pH8.0, 500mmol/L NaCl) 20 μ L β -巯基乙醇混匀,再加 10%SDS 270 μ L 迅速混匀。65℃温浴 30min,加入 Proteinase K(100 μ g/mL),55℃温浴 1h。加 670 μ L 预冷的 5mol/L KAC,冰浴 30min。离心取上清,酚氯仿抽提 2~3 次。无水乙醇沉淀 DNA,70%乙醇洗涤后用适量 TE 溶解。

1.2.2 MARs 序列的克隆:根据已发表的烟草 MAR 序列 PS211-1(GenBank 登录号 AF065884)设计引物:

P1 :GAATTCCTGGTTTTCAGCACGGTC;

P2 :AAGCTTAAGTCATACTAACAATATGAATTTTAA。

以烟草基因组 DNA 为模板,用 ramp PCR 方法进行扩增。PCR 产物用于 TA 克隆,将得到的克隆子酶切筛选,挑选酶切

图谱有代表性的克隆子测序。

1.2.3 植物表达载体的构建:*Bam*H I / *Sal* I 双酶切质粒 pMD18-T-M14 和 pMD18-T-M17,所得片段 M14 和 M17 分别插入植物表达载体 pCAMBIA2301 的 *Bam*H I / *Sal* I 酶切位点,获得重组质粒 p2301M14 I 和 p2301M17 I。以 pMD18-T-M17 为模板,扩增含有 *Bst*E II 酶切位点的 M17 片段(P3 :-CAGGGTGACCTGTCATATTGGCT-P4 :-ATGGGTCACCATCCCCAACTATGG-)插入到重组质粒 p2301M17 I 的 *Bst*E II 酶切位点。为获得 *uidA* 两端含有相同插入方向的顺式重复表达载体,以 P4 作为上游引物,T-NOSpoly(A)的一段序列作为下游引物 P5 :-GAATCCTGTTGCCGGTCTTGC-,PCR 扩增鉴别片段的插入方向,得到 *uidA* 基因两端连有同向 M17 插入的质粒 p2301M17 II。

1.2.4 烟草转化及再生植株的筛选:将上述植物表达载体冻融法转化根癌农杆菌 EHA105,利用改良叶盘法通过根癌土壤杆菌介导转化烟草 NC89。获得的抗卡那霉素(50mg/L)再生苗生根后,移栽到温室中。

1.2.5 GUS 活性的定性检测:采用组织化学染色法^[5]。取烟草幼苗叶片投入到 GUS 染液(50mmol/L KH₂PO₄ pH7.0, 0.5mg/mL X-gulc)中,37℃过夜染色。70%乙醇脱色 2~3 次,阳性转化株用于 GUS 活性的定量测定。

1.2.6 GUS 活性的定量测定:按照 Jefferson^[6]的方法进行。取温室中成熟烟草叶片,为减小误差,全部样品取烟草顶部第 3 片叶片 300mg,加入提取缓冲液,冰上研成匀浆,离心收集上清。吸取 50 μ L 上清加入到 450 μ L 预热的反应缓冲液中(含 1mmol/L 4-MUG)混匀,37℃静置 30min。吸取 50 μ L 反应液加入 450 μ L 反应终止液中,点样于 96 孔板,测定样品在激发光 360nm,发射光 460nm 下的荧光值。总蛋白含量按 Bradford^[7]的方法测定。以 4-甲基伞形酮(4-MU)的纳摩尔数(nmol)与总蛋白的含量(mg)及时间(min)的比值表示 GUS 活性单位为(nmol \cdot mg⁻¹ \cdot min⁻¹)。

2 结果

2.1 MARs 的克隆及序列分析

PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 中并测序。6 个测序的样品中,M14 和 M17 的 AT% 含量大于 70%,有明显的 90% AT 等结构域。进一步的序列分析和 MARs motif 分析表明,M14 和 M17 大小分别为 710bp 和 674bp,AT% 含量分别为 73.9% 和 71.5% 均含有 MARs 的部分特征基元如 90% A-T box,A-

box ,T-box ,拓扑异构酶 II 识别位点 ,自主复制序列(ARS , autonomously replicating sequences) ,碱基非配对区(BUR ,base unpairing region) ,MAR 识别序列(MRS , MAR recognition sequence) ,复制起始点(ORI ,origin of replication) ,弯曲 DNA 序列(curved DNA motifs)等^[5]。它们与原烟草 MAR 的特征 motif

表 1 M14 和 M17 序列特征分析*
Table 1 Properties of M14 and M17*

	Length(bp)	AT/%	90% AT	A box	T box	ARS	TopoII	BUR	MRS	ORI	Curved	ATATTT
M14	710	73.9	16	9	13	4	2	3	4	19	2	2
M17	674	71.5	10	5	7	2	2	1	2	25	3	2
PS211-1	685	71.7	10	7	11	2	4	0	2	43	3	2

* The numbers from the 3rd line represent the number of the motifs in the sequence. Sequences of each of the motifs are given below followed by the number of mismatches allowed in the searches. 90% AT box = W₂₀(2 mismatches) ; A box = AATAAAYAA (2 mismatches) ; T box = TTWTWTTWTT (1 mismatch) ; ARS = WTTTATRTTTW (1 mismatch) ; TopoII = GTNWAYATTNATNNR (2 mismatches but no mismatches in WAYATT) ; BUR = AATATATTT (1 mismatch) ; MRS = TAWAWWNNAWWRTAANNWWG (full MRS with 2 mismatches but must end in G) or TAWAWWW + AWWRTAANNWWG (1 mismatch but must end in G) ; ORI = ATTA or ATTTA or ATTTTA ; curved = AAAAN7AAAAA or TTTAAA.

2.2 植物表达载体的构建和烟草转化

以不含 MARs 序列的植物表达载体 pCAMBIA2301(图 1A)为对照 ,此载体只含有 CaMV35S 启动子控制的 uidA 基因。利用本实验室分离的 MARs 序列 ,以 CaMV35S 启动子控制的 uidA 基因为报告基因构建了 3 个带有 MARs 的植物表达载体 ,其中 p2301M14(图 1B)和 p2301M17(图 1C)为一端分别连接 M14 和 M17 的载体。根据文献报道 ,顺式重复的 MARs 比反式重复的 MARs 对基因表达的作用更好 ,所以在我们构建的 p2301M17II(图 1D)中 M17 序列成顺式重复。转化烟草后在含有卡那霉素培养基中生根的植株视为转基因植株用于后续检测。

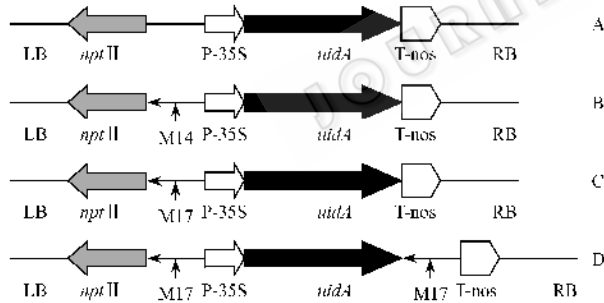


图 1 植物表达载体结构示意图

Fig. 1 Diagrams of plant expression vectors

A :pCAMBIA2301 ;B :p2301M14 I ;C :p2301M17 I ;D :p2301M17 II . P-35S , CaMV35S promoter ; uidA , reporter gene uidA ;T-nos , terminator of nopaline synthase(nos)gene.

2.3 定性分析报告基因的表达

用 GUS 染液浸泡烟草幼苗的幼嫩叶片 ,37℃ 静置过夜 ,再用 70% 的乙醇脱色观察 ,叶片呈蓝色的植株为阳性转化株。结果显示 ,绝大部分转基因植株的叶片呈现蓝色 ,说明 uidA 基因在转基因植株中稳定表达。但相同方法下不同叶片的显色程度和面积不同 ,有的叶片上为蓝色斑点 ,有的为整个叶片呈现蓝色 ,而且颜色的深浅稍有差异。

2.4 MARs 对转基因表达的作用

利用转基因植株检测不同植物表达载体的 GUS 活性高

及其它序列特征并不相同(表 1) ,Blast 分析认为与 GenBank 中已登录 MARs 无明显相似性 ,因此认为是两个新的 MARs 片段。现已登录 GenBank ,登录号分别为 AY766246 和 AY766247。详细的序列特征分析见表 1。

低是鉴定不同 MARs 功能强弱的最直接有效的方法。我们将 GUS 定性检测中叶片呈蓝色的阳性植株用于 GUS 活性定量检测(见图 2)。载体对照 pCAMBIA2301 及无载体野生型对照烟草分别检测了 29 株和 13 株 ,表达载体 p2301M14I ,p2301M17I 和 p2301M17II 转化的烟草分别检测了 26 株 ,30 株 ,30 株。除阴性对照以外 ,所有用于 GUS 酶活检测的植株数目均高于 25 株 ,能准确反应外源 GUS 基因的平均表达水平。野生型转化烟草的内源 GUS 活性很低 ,其平均值仅为 0.79 (nmol · mg⁻¹ min⁻¹) 为本底水平。未克隆 MAR 的载体对照 pCAMBIA2301 转化株中 GUS 平均活性则达到了 10.47 (nmol · mg⁻¹ min⁻¹) ,其单株最低值接近本底水平 ,最高值为 28.33。连接有 M14 和 M17 的转化株中 ,其 GUS 表达量有了较明显提高 ,其中 p2301M14I 的平均值提高到 16.31 ,p2301M17I 则达到 25.45 ,分别为载体对照 GUS 平均表达量的 1.56 倍和 2.43 倍 ,其单株 GUS 活性最低值和最高值也都比对照明显提高。在 29 株 pCAMBIA2301 载体对照转化株中有 7 株的 GUS 酶活接近本底水平 ,约达总数的 25% ,而其他连接 MAR 的载体其单株都比本底水平高得多 ,说明克隆到的 MARs 提高了转基因的表达水平。

对比一端及两端顺向重复连接 M17 的载体转化株 ,发现 p2301M17II 的转化株中 GUS 活性都大大提高 ,测定的 30 株中有 22 株的单株酶活大于 20 (nmol · mg⁻¹ min⁻¹) ,单株最低值为 6.98 ,平均 GUS 活性达到 32.88 (nmol · mg⁻¹ min⁻¹) ,为载体对照平均 GUS 活性的 3.14 倍 ,是 p2301M17I 平均 GUS 活性的 1.3 倍 ,为 3 个连接 MAR 的载体中提高 GUS 表达最高。其中 ,最高单株 GUS 活性是对照平均 GUS 活性的 6 倍。虽然 GUS 的平均表达水平在 MAR 的影响下都有了明显提高 ,但各转化体之间的表达水平仍然参差不齐 ,差异比较明显。相对而言 ,p2301M17II 的单株 GUS 活性处于 6.98 ~ 57.53 较之 p2301M14I 的 2.65 ~ 43.61 和 p2301M17I 的 5.44 ~ 65.52 ,在明显提高 GUS 表达水平的同时 ,其单株间的表达水平差异降低。

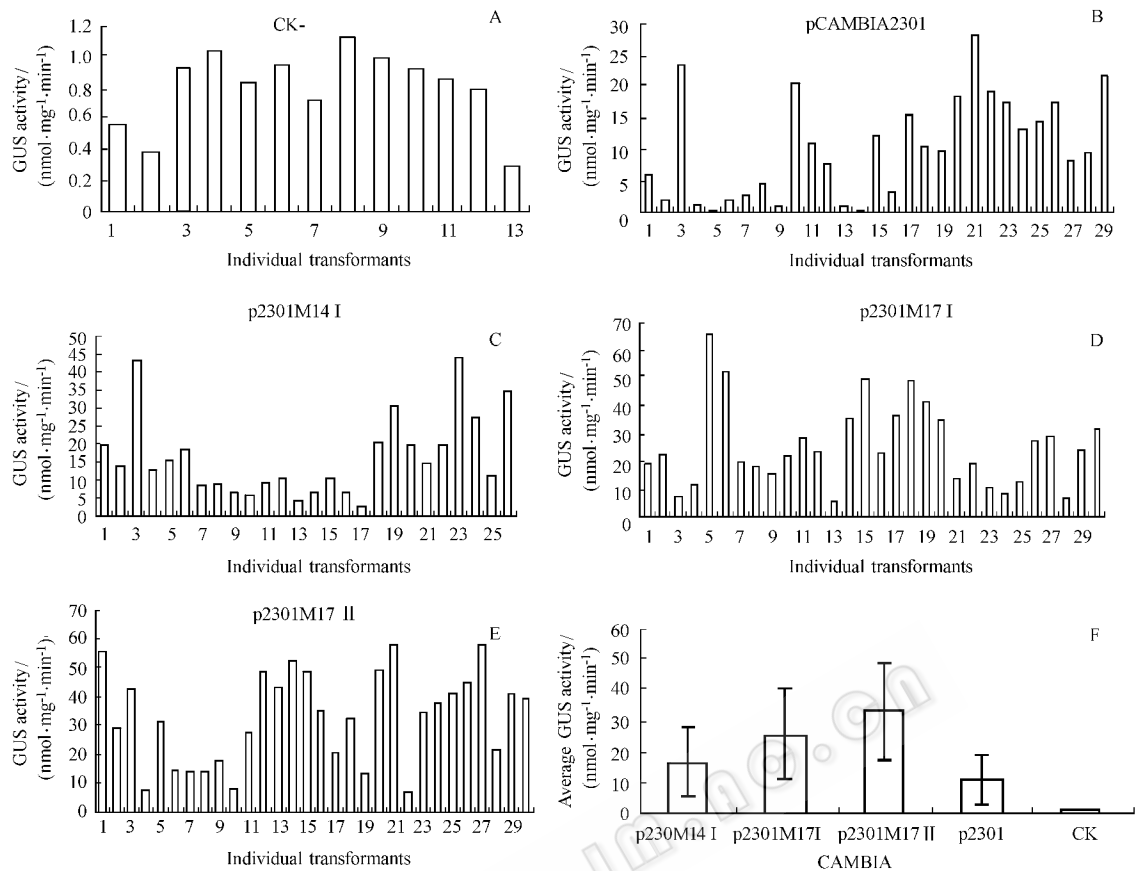


图 2 转基因烟草植株 GUS 活性检测

Fig. 2 GUS activity of transgenic tobaccos

A :Transformed wild type tobaccos ; Charts B ~ E show GUS activities of tobaccos transformed with pCAMBIA2301 , p2301M14 I , p2301M17 I and p2301M17 II respectively ; F :average GUS activity of different groups of transgenic tobaccos .

3 讨论

本研究从烟草中分离得到两个具有 MARs 序列特征的片段 M14 和 M17。鉴定所获得的 DNA 片段是否为 MAR ,可以与核基质体外结合或仅基于序列分析 ,最常用的方法就是在序列中查找 MARs 特征结构域来预测 ,研究者普遍接受的常见结构特征包括非配对和形成弯曲 DNA 的趋势 ,以及形成十字形结构的趋势^[8] ,但 MARs 对外源基因表达的作用最终要依赖于在转基因植株体内的鉴定^[4]。本研究得到的两个序列经分析发现 ,它们 AT 含量丰富 ,都含有数目不等的 MARs 特征基元 ,经后续转化烟草及对报告基因 GUS 活性的测定 ,发现它们都提高了 GUS 的表达 ,认为分离到的为 MARs 片段。因扩增所用引物是根据已发表序列的部分区段设计 ,所以在不同的烟草品种中可能得到不同的 MARs ,而试验结果也验证了这一点 ,连接到 pMD18T 后所得克隆的酶切图谱并不相同。这两个序列与原烟草 MAR 的特征 motif 以及其它序列特征不尽相同 ,分离到的应该是两个新的 MAR 片段。

与对照相比 ,单侧连接 M14 和 M17 的转化植株 ,其平均 GUS 活性分别提高 1.56 倍和 2.43 倍 ,两侧顺式重复连接 M17 的转化植株中 GUS 活性可提高 3.14 倍。说明单侧连接

MAR 能提高外源基因表达水平 ,而两侧顺式连接 MAR 对外源基因表达的增强作用更明显。这也许与 MAR 的作用机制有关 ,与单侧连接 MAR 的外源基因相比 ,两端顺式连接 MAR 的外源基因与核基质的结合更稳定 ,可以富集更多的调控因子促进转录 ,所形成的空间拓扑结构也更有利于环内转录。

Michalowski^[9]等通过对 MARs 与核基质体外结合能力以及 motif 的关系分析 ,认为 90% AT 的数目与结合能力的相关性最高 ,AT% 含量和 T-box 数目与结合能力的相关性中等 ,而 A-box ,BUR 和 ARS 的相关性比较低。在本研究中 ,M14 所含特征基元的数目普遍高于 M17 ,尤其是与核基质结合能力相关性很大的 90% A-T box 较多 ,但它对 uidA 表达的提高作用并不比 M17 强 ,这似乎说明 MARs 对外源基因表达的影响与其所含特征基元相关性不明显 ,而特征基元又与 MARs 的体外核基质结合能力正相关 ,进一步暗示 MARs 和核基质的体外亲和性与提高转基因表达的效应之间没有关系。同时我们还发现 ,M14 和 M17 虽然来源相同 ,但因其序列和结构不同 ,对外源基因表达的改善作用也不相同 ,说明不同的 MAR 对转基因表达的调节作用并不相同。

虽然报告基因的平均表达水平在 MAR 的影响下有了明显提高 ,但各转化体之间报告基因表达水平仍然参差不齐 ,

差异明显,可见本研究所分离的 MAR 并未降低转基因表达水平的差异。这与多数研究的结果相符,只在少数研究中 MAR 可以降低转基因个体间表达水平的差异^[10]。原因可能是外源基因随机插入植物染色体后,它们插入的位置不同,而 MAR 序列在不同染色质环境中参与染色质的包装方式也不尽相同,而且受转基因拷贝数的影响,所以在不同的转基因个体, MAR 序列虽然普遍改善了外源基因的表达环境,但改变的程度仍与外源基因的整合位置以及拷贝数有关,使得外源基因在不同的转基因个体中仍有表达水平上的差异^[11]。

李旭刚等^[12]将从豌豆基因组中分离的 MAR 构建在 *uidA* 基因的两侧,转化烟草后和不连接 MAR 的转基因植株相比, MAR 序列使 GUS 的平均表达水平提高 2 倍,但并未消除转基因个体间表达水平的差异。张可伟等^[13]将通过 PCR 方法从烟草和拟南芥中分离到的四个 MAR 序列构建到 *uidA* 表达盒两侧并转化烟草, GUS 活性定量检测表明,四个 MAR 序列均能使外源基因表达增强,最强的可提高 5 倍,其余几个 MAR 分别提高 1.3 倍、1.35 倍和 1.5 倍。和本试验中的研究结果类似,可以看出, MAR 虽然可以提高外源基因的平均表达水平,但提高的幅度普遍不很理想,而且对消除转基因个体间表达水平的差异作用不明显,基因表达往往达不到预期水平,使 MAR 在实际中的应用受到限制。如何筛选出增强效果稳定的高效的 MAR 序列,减少 MAR 应用的局限性是亟待解决的一大难题。相信随着 MAR 序列研究的深入,其作用机理会逐渐明朗,人们可根据实际需要选择合适的 MAR 以实现对外源基因表达效果的人为调控。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Huang HZ(黄慧珍), Chen SY(陈士云), Ji WQ(吉万全) *et al.* Matrix attachment regions and transgene expression. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2004 **24** 2-6
- [2] Sawasaki T, Takahashi M, Goshima N *et al.* Structure of transgene loci in transgenic *Arabidopsis* plants obtained by particle bombardment: Junction regions can bind to nuclear matrices. *Gene*, 1998 **218** 27-35

- [3] Nomura K, Saito W, Moriyana H. Isolation and characterization of matrix associated region DNA fragments in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol*, 1997 **38** 1060-1068
- [4] Allen GC, Spiker S, Thompson WF. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol Biol*, 2000 **43** 361-376
- [5] Wang GL(王关林), Fang HJ(方宏筠). *Plant Genetic Engineering* (植物基因工程), 2nd ed, Beijing: Science Press, 2002
- [6] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987 **6** 3901-3907
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976 **72** 248-254
- [8] Benham C, Kohwi-Shigematsu T, Bode J. Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol*, 1997 **274** 181-196
- [9] Michalowski SM, Allen GC, Hall GE *et al.* Characterization of randomly-obtained matrix attachment regions (MARs) from higher plants. *Biochemistry*, 1999, **38**: 12795-12804
- [10] Mankin S, Allen GC, Phelan T *et al.* Elevation of transgene expression level by flanking matrix attachment regions (MAR) is promoter dependent: a study of the interactions of six promoters with the RB73 MAR. *Transgenic Research*, 2003, **12**: 3-12
- [11] Zhang KW(张可伟), Wang JM(王健美), Zheng CC(郑成超). The potential role of nuclear matrix attachment regions (MARs) in regulation of gene expression. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2004 **20** 6-9
- [12] Li XG(李旭刚), Lu ZX(路子显), Chen L(陈蕾) *et al.* The influence of matrix attachment regions on transgene expression in transgenic tobaccos. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2001 **43**: 405-408
- [13] Zhang KW(张可伟), Wang JM(王健美), Yang GX(杨国栋) *et al.* The isolation of strong MAR and its functional identification *in vivo* and *in vitro*. *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 2002 **47**: 1572-1577

本刊加入《中国学术期刊(光盘版)》声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《生物工程学报》编辑部