

玉米 MAR 序列的分离及其在转基因烟草中的功能研究*

李旭刚 陈松彪 徐军望 刘翔 朱祯**

中国科学院遗传研究所, 北京 100101

摘要 从玉米基因组中分离了一段核基质结合区(MAR)序列, 它位于乙醇脱氢酶 1 基因的 5' 端启动子区域. 为研究此段 MAR 序列在转基因植物中的功能, 将 MAR 构建在报告基因 β -葡糖醛酸酶(GUS)基因(*uidA*)和植物选择标记新霉素磷酸转移酶 II 基因(*nptII*)的两侧形成植物表达载体, 在载体中两段 MAR 之间的距离为 6.2 kb. GUS 活性检测表明, MAR 序列对报告基因的表达水平没有影响. 这一现象与 MAR 只构建在报告基因两侧形成小环时提高外源基因表达的结果不同, 为进一步研究 MAR 作用机制提供了基础.

关键词 MAR β -葡糖醛酸酶 转基因植物 基因表达

核基质结合区(MAR)是真核生物染色质中能特异性地和核基质结合的 DNA 片段. MAR 序列的主要特征是富含 AT, 其含量可超过 70%, 此外不同来源的 MAR 序列通常还包含 A-box 或 T-box, AT 结构域及拓扑异构酶 II 识别序列等结构域^[1]. 随着越来越多的 MAR 序列被分离鉴定出来, 研究人员对它的功能有了比较全面的认识. 根据 MAR 序列在生物体内功能的不同, 可以简单地把 MAR 序列分为 3 类: 第 1 类位于基因的下游较远处, 此类 MAR 序列和核基质的亲和力比较高, 在整个细胞周期中都保持与核基质的结合状态. 它们的作用是将染色质分成许多大小不等的环, 这些 DNA 环除了作为染色质高级组织结构的基本成分, 同时也是基因表达调控单位^[2]. 第 2 类 MAR 序列通常位于基因的启动子区和上游调控序列的附近, 与核基质亲和力较弱, 只是在基因表达, 启动转录时才与核基质暂时性地结合. 第 3 类 MAR 和第 2 类 MAR 相同之处是它也只和核基质暂时性地结合, 不同之处是它们位于 DNA 复制起始区附近, 和 DNA 复制起始点相邻或在 DNA 复制起始点中, 在 DNA 复制时便于复制叉的形成^[3].

本实验室从豌豆基因组中分离了位质体蓝素基因下游的 MAR 序列, 并在烟草中研究了此 MAR 序列的功能^[4,5], 表明 MAR 可以稳定提高外源基因的表达水平. 为进一步研究其他种类的 MAR 对外源基因表达的影响, 我们从玉米基因组中分离了乙醇脱氢酶 1(Adh1)基因启动子区域的 MAR 序列, 此 MAR 序列构建在外源报告基因的两侧, 形成 4.2 kb 的小环时, 可以明显提高外源 *uidA* 基因的表达水平¹⁾. 进一步将玉米 MAR 序列构建在外源报告基因 β -葡糖醛酸酶(GUS)基因 *uidA* 和植物选择标记新霉素磷酸转移酶 II(NPT-II)基因 *nptII* 的两侧形成植物表达载体, 其中两段 MAR 序列中心相距为 6.2 kb. 通过农杆菌介导转化烟草, 来验证此 MAR 序列在植物细胞中的功能.

1 材料与方 法

1.1 植物总 DNA 的制备

按照文献[6]方法从萌发 15 d 的玉米(*Zeamays* L., 自交系 340)苗期叶片中提取基因组 DNA.

1.2 MAR 序列的分离、测序和表达载体构建

以玉米苗中提取的总 DNA 为模板, 参考文献[7]

2001-06-05 收稿, 2001-07-23 收修改稿

* 国家“八六三”高技术计划(批准号: Z-17-01-01, BH-02-01-01)、国家自然科学基金(批准号: 39989001)和国家转基因植物研究与产业化开发专项基金(批准号: ZJY-B-01)资助项目

** 联系人, E-mail: zzhu@genetics.ac.cn

1) 未发表的结果

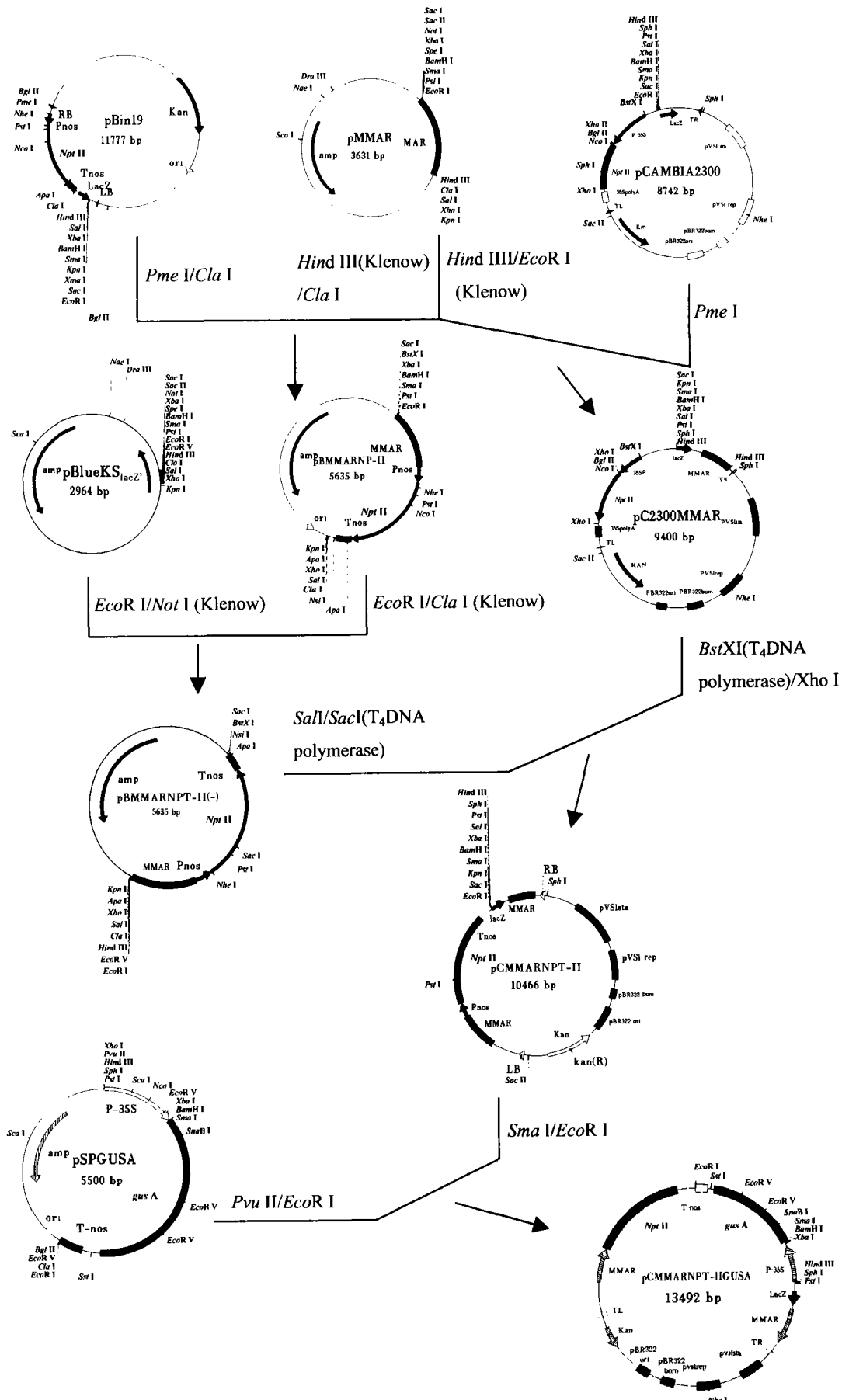


图1 植物表达载体 pCMMARNPT-IIIGUSA 构建图

设计引物 P1 (5'-TATGGAAGCACCGAAGCAGGAG-3') 和引物 P2 (5'-TCCAAACAGTCACTTAGGATATG-3'), PCR 扩增 MAR 序列片段. PCR 反应按高保真 Taq 酶扩增系统 (Boehringer Mannheim 公司) 说明书进行. PCR 产物用 Klenow 酶平端化后, 插入到克隆载体 pBluescriptKS(+) 的 EcoR V 位点, 形成重组质粒 pBlueMMAR. MAR 片段用 ABI373A DNA 测序仪测序. 植物表达载体构建过程见图 1, 中间载体 pSPGUSA, pBlueNPT-II 和植物表达载体 pCNPT-IIGUSA 为本实验室构建.

1.3 烟草转化及再生植株的筛选及 GUS 活性测定

将植物表达载体 pCMMARNPT-IIGUSA 与不含 MAR 序列的植物表达载体 pCNPT-IIGUSA 通过电激法转化到农杆菌 LBA4404 内 (参照 Bio-Rad 说明书). 同时将空载体 pCNPT-II 转化到农杆菌中作为对照. 参照文献 [6] 通过农杆菌介导法转化烟草. 获得的再生苗在含有卡那霉素 (50 mg/L) 的生根培养基上生根, 将根系发育完全的卡那霉素抗性植株转移至温室生长. 成熟的转基因烟草叶片中的 GUS 活性按 Jeffer-

son^[8] 的方法进行, 总蛋白含量按标准 Bradford 方法测定^[9]. GUS 活性以 nmol/mg·min⁻¹ 表示.

1.4 Southern 杂交

按文献 [6] 方法提取烟草基因组 DNA, 用 EcoR I 酶切后, 按照 Sambrook 等的方法^[10] 进行 Southern 杂交. 用 BamH I/Sac I 双酶切质粒 pSPGUSA 获得约 2.0 kb 长的 uidA 编码区片段作探针, α-³²PdCTP 标记后与膜杂交. 杂交膜用 0.1 × SSC, 0.1% SDS 洗去背景后放射自显影.

1.5 Northern 杂交

采用异硫氰酸胍法^[11] 提取烟草叶片总 RNA. 各取 30 μg 不同 GUS 活性的转基因植株 RNA 进行甲醛变性电泳分离后, 转移至 Hybond N⁺ (Amersham) 尼龙膜. 分别将 uidA 基因和 18S rDNA 作为探针进行杂交, 其他操作过程同 DNA 杂交.

2 结果

2.1 玉米 MAR 序列的克隆

通过 PCR 方法扩增的玉米 MAR 序列见图 2.

```

1   TCCAAACAGT CACTTAGCAT ATGTTTGGAA GCACACCGAC ATGTTTGGAA GCACACAGTT
61  TTAAAAAACT ATTTTCTATC CTCACCTTCT TGAAAATGTT TTATGAAAAA AATTGGGTGG
121 GGTGTTTGGG ACCTAGTTTC TAGTTTTTTT ATAAGGAGAG TAGCTTCTTG GTTTTAGTTA
181 TGGGAGAGTA GCTTCTTGGT TTTTAAGAAA CTAAGAATCC AGTTTTTATA AACTGAGACA
241 TAAACAAGTA TATTTGGAAT CACTCTAGTT TGTACAAACC AATTCCTAG AAATTGGATG
301 CTTATAAATA GGCCCTCAAT GTCCTTGTG GGTTTATGAA ATTTACATCT ATTACCATTA
361 TTTTAAAAAAT AGACGAAGAA TATGTTAGTA ATTATGTATA AAAAACTAGA AACTTTTTA
421 AAAAAAACT GACTTCCAGT TACCTTATC TAATCTTTT ATAAGCTAAT TTTTAGACAC
481 TGAGGATAGA AACTGTTTTT AAAAAACTGG TGTGCTTCTG TTAACTCTT CGTAAGAACA
541 GTGGTACGTC CCGTGTCTAT ATTTGGCTTT TGTTAAAGCC AATAGTACAT GCTTGCGTGG
601 GTGAAAATGT GAAATGCCAT CGCTGTGCTA CAACTTTTCG GCTCCCTCCT GCTTCGGTGC
661 TTCCATA
    
```

图 2 玉米 *adh1* MAR 序列

阴影表示 3' 端与 5' 端引物, 黑体表示 ARS 同源序列, 方框表示与 SATB1 识别序列相似的序列

结果表明,克隆片段长 667 bp, 此段序列中, 含有 5' -TTTTA-3' 序列, 此 DNA 序列与酵母自主复制序列(ARS)中结合核基质的 DNA 结构域中的部分序列同源^[7]. 同时, 克隆片段还含有几段(图 2 中方框中序列)与人 DNA 结合蛋白 SATB1 识别序列^[12]相似的序列.

2.2 植物表达载体的构建

植物表达载体 pCMMARNPT-IIGUSA (T-DNA) 结构见图 3(a). 按照文献[13]报道, 两个 MAR 成顺式重复的效果比反式重复的效果好, 所以我们构建的植物表达载体中两个 MAR 序列成顺式重复. MAR 位于 *uidA* 基因与 *nptII* 基因的两侧. 以不含 MAR 序列的植物表达载体 pCNPT-IIGUSA 为对照(图 3(b)), 来研究玉米来源的 MAR 序列对外源基因表达水平的影响.

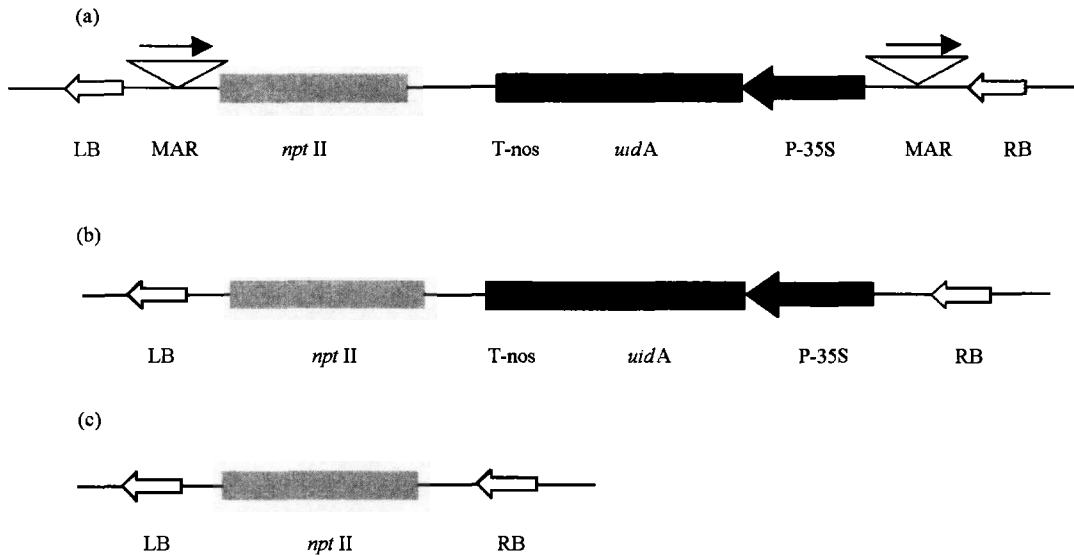


图3 植物表达载体 T-DNA 结构

(a) pCMMARNPT-IIGUSA; (b) pCNPT-IIGUSA; (c) pCNPT-II. P-35S, 花椰菜花叶病毒 35S(CaMV35S)蛋白基因启动子; T-nos, 胭脂碱合成酶(Nos)基因终止子; *uidA*, 报道基因 *uidA* 基因; *nptII*, 植物选择标记基因新霉素磷酸转移酶基因; LB 和 RB 为 T-DNA 左右边界

2.3 报告基因表达水平的定量分析

检测了表达载体 pCMMARNPT-IIGUSA 转化的烟草 48 株, pCNPT-IIGUSA 转化的烟草 42 株. 结果发现在 pCMMARNPT-IIGUSA 转化群体中, 无论是单株 GUS 活性, 还是在转基因植株中基因 *uidA* 表达的总体趋势, 与不含有 MAR 序列的 pCNPT-IIGUSA 转基因烟草群体没有差别. 转基因植株的 GUS 平均活性比较也表明, 含有 MAR 序列的转基因植株 GUS 活性没有提高(图 4).

2.4 转基因植株的 Southern 杂交

共分析了 28 株转基因植株(pCNPT-IIGUSA 转化的和 pCMMARNPT-IIGUSA 转化的植株各 14 株), 全部转基因烟草都出现了 *uidA* 杂交带, 说明 *uidA* 基因都整合入烟草基因组上, 并且拷贝数多少不一(图 5).

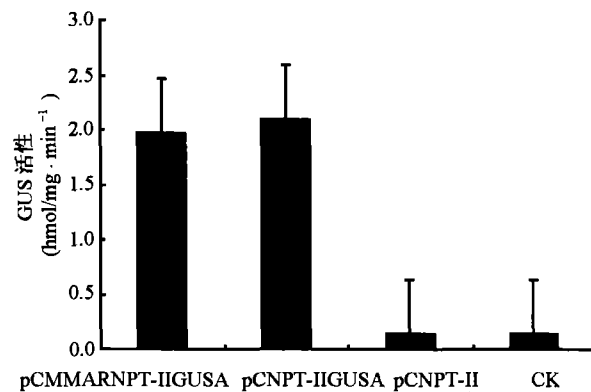


图4 转基因烟草植株平均 GUS 活性

转基因植株叶片 GUS 活性测定荧光值的激发波长为 360 nm, 发射波长为 460 nm. pCMMARNPT-IIGUSA, pCNPT-IIGUSA 和 pCNPT-II 分别表示对应载体转基因植株平均 GUS 活性; CK 表示未转化阴性对照植株平均 GUS 活性

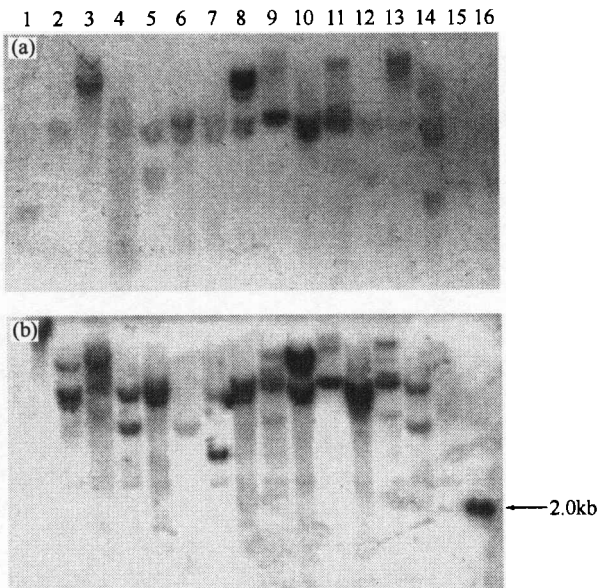


图5 转基因植株 Southern blot 结果

(a) pCNPT-IIGUSA 转基因植株. (b) pCMMARNPT-IIGUSA 转基因植株. 1~14 为转基因植株 DNA 样品 EcoR I 酶切; (b) 中 15 为非转化植株的 DNA EcoR I 酶切, 作阴性对照; (b) 中 16 为 *uidA* 基因片段, 作阳性对照

2.5 转基因植株的 Northern 杂交

将含有玉米 MAR 序列的转基因烟草与不带 MAR 序列的转基因烟草的 RNA, 分别以 *uidA* 基因片段和 18S rDNA 杂交. 18S rDNA 杂交结果表明, 在 RNA 量一致的情况下, GUS 活性不同的转基因植株 RNA 杂交信号强弱不同. GUS 活性较高的烟草植株杂交信号较强(图 6 A, B, F, H), 而 GUS 活性较低的植株杂交信号相对较弱(图 6 C, G), 表明 GUS 活性与 *uidA* 基因转录的 mRNA 量成正比. 无 GUS 活性的植株检测与 CK 一样检测不到 mRNA(图 6 D, E). 含有 MAR 序列的转基因植株与不含有 MAR 序列的转基因植株相比, 在 RNA 水平上没有差别.

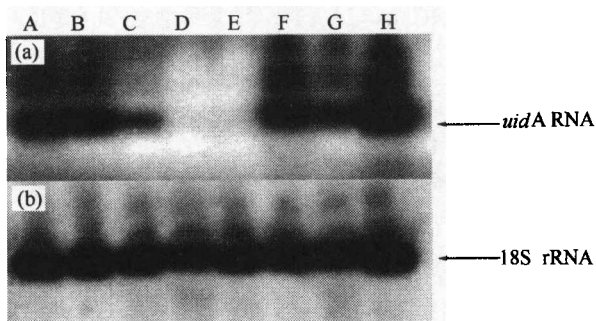


图6 转基因植株 Northern blot 结果

(a) *uidA* 基因作探针杂交结果. (b) 18S rDNA 作探针杂交结果. A~D, pCNPT-IIGUSA 转基因植株 RNA 样品; E, 非转化植株 RNA 样品; F~H, pCMMARNPT-IIGUSA 转基因植株 RNA 样品

3 讨论

本研究从玉米基因组中分离了位于 *Adh1* 基因启动子区域的 DNA 序列, 此 DNA 序列长 667 bp, 其中 AT 含量为 66.7%, 在 DNA 序列中还含有 ARS 序列^[7]和 STAB1 识别序列^[12]. ARS 序列在细胞中可以与核基质结合, 而 SATB1 蛋白选择性地与核基质结合的 DNA 结合, 表明我们分离的 DNA 序列在碱基组成上具有 MAR 的特征. 为研究此段 MAR 序列在转基因植物中对外源基因表达水平的影响, 将此 MAR 序列构建在 *uidA* 基因和 *nptII* 基因的两侧, 使两段 MAR 形成的环约为 6.2 kb. 经农杆菌介导转化烟草, 结果表明在获得的转基因植株中, 不论是在单株 GUS 活性还是平均 GUS 活性, 含有 MAR 的转基因植株与不含有 MAR 序列的转基因植株没有差别. Southern 杂交和 Northern 杂交结果也表明, 在分子水平上 MAR 对外源基因也没有影响. MAR 构建在 *uidA* 基因两侧形成小环时可以明显提高外源基因的表达, 而构建在 *uidA* 基因和 *nptII* 基因的两侧形成大环时却不影响外源基因表达水平, 这一现象与其他研究结果不同. Mlynárová 等将鸡溶菌酶基因的 MAR 序列构建在选择标记与报告基因的两侧形成大环时, 发现对外源基因表达的稳定性好于只将 MAR 序列构建在报告基因两侧形成的小环^[14]. 其他类似的研究也认为 MAR 序列构建选择标记和外源基因的两侧时可以稳定提高外源基因的表达.

不同 MAR 的作用效果不同, 可能与 MAR 与植物核基质的结合能力有关. 如 Allen 等用酵母基因组来源的 MAR 构建载体, 转化烟草后发现 *uidA* 表达量比对照提高了 12 倍. 用与烟草核基质结合力强的烟草自身的 MAR 转化烟草, 发现效果更加明显^[15]. 上述 MAR 都属于第一类 MAR 序列, 与核基质的结合力强, 因此在植物中对外源基因的作用比较明显. 我们的实验结果也表明, 从豌豆基因组中分离的 MAR 序列构建在 *uidA* 基因两侧形成小环或构建在 *uidA* 基因和 *nptII* 基因两侧形成大环时均可以稳定提高外源报道基因的表达水平^[4, 5]. 本实验中分离的 MAR 序列位于玉米 *Adh1* 基因启动子区, 与核基质结合力弱, 可能导致其在大环形成时对外源基因的表达没有影响. 尽管普遍的观点认为, 环内基因的表达水平与两段 MAR 所形成环的大小成反比, 而我们的发现直接说明了小环形成

时可以提高外源基因表达的 MAR 序列在大环形成时对外源基因的表达没有影响,这一结果表明 MAR 的作用机制不能仅仅归结于其使外源基因形成 DNA 环状结构,可能与一些其他因素有关.此现象的发现为进一步研究 MAR 作用机制提供了基础.

参 考 文 献

- 1 李旭刚,等.核基质结合区的研究进展.农业生物技术学报,2000,2:200
- 2 Jackson D A, et al. The size of chromatin loops in HeLa cell. EMBO J, 1990, 9: 567
- 3 Breyné P, et al. The role of scaffold attachment region in the structural and functional organization of plant chromatin. Transgenic Res, 1994, 3: 195
- 4 李旭刚,等.核基质结合区在转基因烟草中对转基因表达的影响.植物学报,2001,43:405
- 5 李旭刚,等.豌豆核基质结合区的分离及其在转基因烟草中的功能分析.中国科学(C辑),2001,31:230
- 6 高越峰,等.大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的分离及其在抗虫植物基因工程中的应用.植物学报,1998,40:405
- 7 Avramova, et al. Isolation of matrices from maize leaf nuclei: Identification of a matrix-binding site adjacent to the Adh1 gene. Plant Mol Biol, 1993, 22: 1135
- 8 Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5: 387
- 9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248
- 10 Sambrook J, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 11 Chomczynski P, et al. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162: 156
- 12 Dickenson L A, et al. A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. Cell, 1992, 70: 631
- 13 Mlynárová L, et al. The MAR-mediated reduction in position effect can be uncoupled copy-number expression in transgenic plants. Plant Cell, 1995, 7: 599
- 14 Mlynárová L, et al. Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. Plant cell, 1994, 6: 417
- 15 Allen G C, et al. Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. Plant Cell, 1993, 5: 603

2005 年“国际气象学和大气科学协会(IAMAS)” 第九届科学大会将在中国举办

2001年7月在奥地利 Innsbruck 召开的国际气象学和大气科学协会(IAMAS)第八届科学大会上,中国代表团经过努力争得了 IAMAS 2005 年第九届科学大会在我国的举办权,这在发展中国家举办是首次.

IAMAS(International Association of Meteorology and Atmospheric Sciences)成立于1919年,其基本任务是促进世界各国在气象学和大气科学领域的研究,筹划、组织和协调国际合作的科研项目,开展国际学术交流活动.

IAMAS 下设 10 个专业委员会,分别为:(1)国际辐射委员会(IRC);(2)国际大气臭氧委员会(IOC);(3)国际大气化学和全球污染委员会(ICACGP);(4)国际高层大气气象学委员会(ICMUA);(5)国际云物理学委员会(ICPM);(6)国际大气电学委员会(ICPM);(7)国际动力气象学委员会(ICDM);(8)国际极地气象学委员会(ICPM);(9)国际气候学委员会(ICCL);(10)国际行星大气及其演变委员会(ICPAE).

IAMAS 大会每 4 年召开一次,是目前国际气象学和大气科学领域影响范围最大、学术水平最高的大型综合性国际会议,被誉为国际大气科学界的奥林匹克大会.2005 年 IAMAS 第九届大会在中国举办,将对推动我国大气科学发展、加强我国与国际间的交流与合作无疑将有着十分重要而深远的意义,对宣传我国大气科学研究成果、尽快使我国的研究与国际接轨也将起到积极的作用.

(供稿:罗云峰)