

植物的 MAR 及其对转基因表达的效应

赵 艳^{1,2}, 高振宇³, 黄大年³

(1. 浙江大学生命科学学院 杭州 310012 2. 杭州商学院生物工程系 杭州 310035 ;

3. 中国水稻研究所农业部水稻生物学重点实验室 杭州 310006 ;)

摘 要 :与核基质结合的 DNA 序列称为基质附着区(matrix attachment regions ,MARs),可提高转基因的表达水平并降低转基因在不同转基因系间的表达差异 ,因其在植物基因工程中的巨大应用潜力而引起了研究者的极大兴趣。对植物中 MAR 的研究尚处于早期阶段 ,本文综述了植物中 MAR 的分离鉴定、序列特征及 MAR 对植物中转基因表达的影响 ,并进一步讨论了 MAR 对转基因效应的可能机制。

关键词 植物 ;基质附着区 ;转基因表达

中图分类号 :Q78

文献标识码 :A

文章编号 :0253 - 977X(2001)03 - 0281 - 04

MARs in Plants and Their Effects on the Transgene Expression

ZHAO Yan^{1,2}, GAO Zhen-yu³, HUANG Da-nian³

(1. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China ;

2. Biological Engineering Department, Hangzhou Institute of Commerce, Hangzhou 310035, China ;

3. Key Laboratory for Rice Biology, Ministry of Agriculture, China National Rice Institute, Hangzhou 310006, China ;)

Abstract DNA sequences called matrix attachment regions (MARs) have recently attracted much attention because of their perceived capacity to increase levels of transgene expression and to reduce transformant - to - transformant variation of transgene expression in plants. Work with MARs in plants is in its early stage .In the present paper ,we reviewed the procedure to isolate and identify MAR sequences from higher plants , the sequence characteristics of the plant MARs and the effect of MARs on the transgene expression in plants. Furthermore , the possible mechanism to explain how MARs affect transgene expression in transformants was discussed.

Key words plant ;matrix attachment region(MARs) ;transgene expression

染色体中与核基质(或核骨架)相结合从而将染色体固定于核基质的 DNA 序列称为基质附着区(matrix attachment regions , MARs)或骨架附着区(scaffold attachment regions , SARs)。MAR 与 SAR 无本质区别 ,不同仅在于制备核基质时去除组蛋白步骤所用方法不同。SAR 易和植物中系统获得抗性(system acquired resistance)的英文缩写相混 ,因此在外文中常用 MAR^[1]。按照染色体高级结构组织的环状结构模型 ,MAR 作为边界元件与核基质结合 ,使两个 MAR 之间的基因区段被界定成一独立的染色质环(loop) ,并作为隔离子(insulator)阻挡邻近染色质区的顺式调控元件对环内基因的影响 ,使位于染色质环内的基因可作为一独立的表达调控

单位而存在^[2]。对 MAR 的研究尚处于初级阶段 ,但 MAR 序列可能使转基因在受体基因组内整合后形成独立的环状结构 ,从而提高转基因的表达水平并减少转基因在不同株系间的表达差异即位置效应(position effect)。MAR 在植物基因工程中的潜在应用价值引起了研究者的极大兴趣。本文对植物中 MAR 的分离鉴定、序列特征、对转基因的影响及其可能机制作一综述。

1 植物 MAR 的分离鉴定

近十年来 ,已先后从大豆^[1]、玉米^[3]、高粱^[3]、烟草^[4]、水稻^[5]、拟南芥^[6]、豌豆^[7]中分离出了具有 MAR 活性的 DNA

收稿日期 :2000 - 07 - 12 ;修回日期 :2000 - 11 - 29

作者简介 :赵 艳(1970 -) ,女 ,河北临漳人 ,博士研究生 ,专业方向 :植物基因工程 ;

通讯作者 :黄大年(1938 -) ,男 ,教授 ,博导 ,联系电话 : (0571) 8370483。

片段。所用起始材料包括悬浮细胞、幼苗叶片或已构建的 DNA 文库。从细胞和幼苗中分离 MAR 主要根据 MAR 与核基质的亲和力。大致过程如下:分离纯化细胞核→用高盐或二碘水杨酸锂除去与 DNA 结合的组蛋白→限制酶消化未与核基质结合的染色质 DNA 区→离心得核基质沉淀。此核基质沉淀可用于分离含 MAR 的残余 DNA 片段,也可加入已标记的 DNA 片段检测其与核基质的亲和力。在分离 MARs 时,将核基质沉淀悬浮于含 1% SDS 的碱性缓冲液以使 DNA 与结合蛋白分离→用酚和氯仿抽提去蛋白质→水相加入冷乙醇沉淀 DNA 即可。

在检测 DNA 片段的 MAR 结合活性时,常同时加入高于待测 DNA 数量级的未标记的无 MAR 活性 DNA 片段作为竞争 DNA (competitor DNA),竞争 DNA 可以与待测 DNA 来源于同一材料,此时称内源结合实验 (endogenous assay),也可以是来源不同的任何 DNA 片段,此时称为外源结合实验 (exogenous assay)。待测 DNA 在竞争 DNA 存在下与核基质共温育后离心,则具有 MAR 活性的 DNA 片段与核基质结合而存在于沉淀中,无 MAR 活性的 DNA 片段则存在于上清。因此,将 DNA 含量相等的沉淀及上清电泳分离后放射自显影,仅在沉淀中出现的待测 DNA 片段 MAR 结合活性较高,仅在上清中出现的待测 DNA 片段不具 MAR 结合活性,由于加样量相等,可依据某些片段在沉淀和上清中相对分布量比较其 MAR 结合活性的相对大小^[8]。

对源于烟草随机 DNA 文库的 MAR 的研究表明, MAR 与核基质的结合活性大小不仅取决于 MAR 中结合位点的数目,而且取决于各位点的亲和力。其中类果蝇拓扑异构酶 II 识别位点基序 (motif) 与烟草 MAR 的结合活性无关,新鉴定的基序“90% AT-box”和烟草 MAR 结合活性的相关性最大^[4]。根据与核基质的结合力大小, Tikhonov 等^[3]将玉米和高粱中与乙醇脱氢酶基因 *Adh1* 相关的 MAR 分为两类:一类称为“永久”MAR (durable MARs),在高浓度竞争 DNA 存在时仍能与核基质结合,常位于基因外部,构成染色质环区的边界;另一类称为“不稳定”MAR (unstable MARs),在高浓度竞争 DNA 存在时即失去与核基质的结合力,主要位于内含子中。

MAR 对核基质的结合力在不同物种间较为保守,故可用一种核基质来检测不同来源的 MAR 的结合活性。但 MAR 与核基质的结合能力似乎并不与其对转基因的促进效应完全一致,研究表明,能与核基质结合的大豆 β -菜豆球蛋白 5' MAR 不能阻挡转基因烟草中增强子对转基因 *gus* 的转录激活^[9]相反在动物和果蝇中,一些不能与核基质结合的 DNA 序列却能作为隔离子阻挡顺式元件对转基因的激活作用或减弱转基因表达的位置效应^[10]。可见 MAR 与核基质的结合位点和隔离子功能域可能是位于同一边界 DNA 片段上的两个相互独立的区域。

2 植物 MAR 的序列特征

植物的 MAR 与动物的 MAR 一样,是在进化上较为保守的一类 DNA 序列,染色体上 MAR 序列分布间隔为 5 ~ 200 kb^[2], MAR 的长度从 100 bp 至数千 bp 不等,碱基组成上富含 A + T (> 70%),常含有一些特征性基序 (sequence motifs),如类 A-box、T-box、酵母自主复制序列 ARS、果蝇拓扑异构酶 II 识别位点和能形成蛋白质识别位点的松散 DNA (unwinding DNA) 富 AT 区、弯曲 DNA (curved DNA) 等^[11]。在从水稻悬浮细胞分离的 MAR 序列 NB-2 中还发现一独特的能形成发夹环 (hairpin loop) 结构的区段,预示着 MAR 可能有一定的种属特异性^[5]。这些特征性基序虽能反映 MAR 在序列组成上的某些共有特性,但它们往往变化较大,不能作为鉴定 MAR 的特征性元件。

植物中 MAR 的特征性序列元件首先在拟南芥中发现,该元件由间隔很近的两个序列组成, 7bp 的 TAWAWWW 和 12bp 的 AWWRTAANNWWG (其中 W = A/T; R = A/G; Y = C/T; N = G/A/T/C;下同),二者间隔仅数个 bp,共同构成长约 21bp 的元件,该 21bp 元件在拟南芥基因组中平均每隔 10kb 出现一次,可能是拟南芥 MAR 的特征性元件^[6]。最近 Cornelis 等^[12]发现另一真核细胞 MARs 的特征性元件 (MAR/SAR recognition signature, MRS),该 MRS 元件也由两个隔开的序列共同组成,一个序列为 8bp (AATAAYAA),另一序列为 16bp (AWWRTAANNWWGNNNC),两序列间有约 200bp 的间隔区。据此元件成功预测了 *C. elegans* 黏粒中 33kb DNA 片段上的 6 个 MAR 及拟南芥基因组 > 30kb DNA 片段上的 7 个 MAR。所做的研究中,含 MRS 元件的 DNA 片段无一例外地具有与核基质结合的 MAR 活性,但进一步研究发现,并非所有已知 MAR 均含有此 MRS 元件,表明至少有两类 MAR:一类含有 MRS 元件,一类不含有 MRS 元件。根据 MRS 元件中两个序列间隔区的大小推测,二者在不同核小体上的空间位置相互靠近,因此 MRS 可能与 MAR 的特定功能相关,而不与核基质结合。Zoya 等^[13]分析了与玉米中 *Al/Sh2* 基因序列同源的水稻 50kb 和高粱 30kb DNA 片段的序列特征后发现,虽然染色质环内的基因组成、基因方向、排列顺序、相对位置在三种作物中十分保守,但 MAR 序列的碱基组成不具有保守性,这些 MAR 的共有特征是常与较多的微小倒置重复可转移元件 (miniature inverted repeat transposable elements, MITEs) 共存,表明 MITE 优先插入在 MAR 附近和/或作为 MAR 起作用。Tikhonov 等^[3]在玉米和高粱的与乙醇脱氢酶基因 *Adh1* 相关的 MAR 片段中也发现了 MITE,且许多 MITE 可与核基质结合,认为 MITE 在体内可能起 MAR 的作用。

3 MARs 对植物中转基因表达的影响

MAR 对动物转基因效应的研究开展较早,也比植物中

的研究更为详尽。MAR 总体表现为能提高转基因表达水平(如比对照提高 10 倍以上),并降低转基因在不同转基因系间的表达差异。有些研究甚至称, MAR 消除了转基因在受体基因组中整合后的“位置效应”,从而使转基因表达表现为“位置独立性”(position-independent)和拷贝数依赖性(copy number-dependent)^[8]。

MAR 对植物转基因表达的研究尚处于早期阶段。材料主要集中在模式植物烟草上,多使用报道基因 *gus* 转化方法,主要采用农杆菌介导法和基因枪法,所得结果与在动物上的研究也很不一致。Breyne 等^[14]分别将动物和植物来源的 MAR 连接在报道基因 *gus* 两侧经农杆菌介导转化烟草悬浮细胞, MAR 仅使 *gus* 在不同转基因系间的表达差异稍有降低,未能提高其总表达水平,甚至有些转基因系的 *gus* 表达水平还有所降低,这与其他研究结果相差悬殊,但该试验中未估测转基因的拷贝数。Van der Geest 等^[1]发现 MAR 使大豆 β - 菜豆球蛋白基因在转基因烟草植株中的总表达水平有所提高,不同转基因系间的差异也稍有降低。Mlynárová 等^[15,16]将鸡的溶菌酶基因相邻的 MAR 置于 *gus* 两侧,结果 *gus* 在转基因烟草植株中的表达水平不仅平均提高了 4 倍,且各转基因株间的表达差异也降低了。源于大豆热激蛋白基因相邻的 MAR^[17]和源于拟南芥的 MAR^[18]使 *gus* 在转基因烟草植株中的表达量增加了 5~10 倍,但 MAR 既未降低转基因在不同转基因系间的表达差异,也未使转基因的表达量呈“拷贝数依赖性”。以上研究均由农杆菌介导转化,当以基因枪介导转化烟草悬浮细胞时取得了更加令人振奋的结果,按每拷贝基因的表达量计,源于酵母和烟草的 MAR 分别使 *gus* 的表达量增加了 24 倍^[19]和 140 倍^[20],尽管 MAR 使 *gus* 在不同转基因系间的表达差异稍有降低,却未观察到“拷贝数依赖性”效应,事实上,较高拷贝数反而抑制转基因的表达。

此外, MAR 对转基因的效应不仅表现出一定的物种特异性,而且转基因两侧 MAR 的同源性也是必需的。当源于拟南芥的 *At*MAR 同时出现在转基因 *gus* 两侧时才能提高其在烟草植株中的表达水平,当转基因两侧的 MAR 异源时(如 5' 为拟南芥的 *At*MAR, 3' 为豌豆的 *Vic*MAR)则不能提高转基因的表达水平^[18]。

4 MAR 作用的可能机制

解释 MAR 作用机制的假说普遍是建立在染色质环状结构模型基础上的。按照染色质组织的环状结构模型, MAR 作为边界元件限定了染色质的集缩程度,将不同的基因区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。这种学说认为, MAR 连接在转基因两侧可锚定于核基质,从而使转基因整合至宿主染色体后形成一独立的染色质环,并作为一独立的调控单位存在^[8]。反之,随机整合的转基因尤其拷贝数多时,可能整合

在转录活性低的异染色质区以至表达水平较低或不表达,即表现“位置效应”^[18]。按此假说,转基因两侧连有 MAR 时,其表达应表现为位置独立性(position independence),即所有单拷贝转基因按相同水平表达,转基因拷贝数越多,总表达量越大,即表现为“拷贝数依赖性”(copy number dependent)。

该假说虽能较好解释 MAR 普遍提高转基因表达水平的现象,但这个简单的模型不能完全解释 MAR 对转基因表达的实验结果。如鸡的溶菌酶 A 的 MAR 降低了报道基因 *gus* 在转基因烟草中表达的位置效应,但转基因表达的拷贝数依赖性主要取决于所用启动子而非 MAR^[15,16]。酵母 MAR-1 和烟草 Rb7 MAR 虽大大提高了转基因 *gus* 在烟草悬浮细胞中的表达水平,但位置效应并未减弱,转基因的表达量也不和拷贝数成正比,转基因拷贝数高时,无论 MAR 存在与否,其表达量均降至较低水平^[19,20]。该模型也无法解释农杆菌转化和基因枪转化时 MAR 对转基因表达影响的悬殊差异。

Allen 等提出了另一假说,对上述模型作了补充。他们认为 MAR 对转基因表达水平的提高主要是通过减少同源依赖性基因沉默而实现的^[20]。基因沉默主要由涉及转基因本身的同源依赖性相互作用造成的,同源依赖性沉默包括转基因之间同源和转基因与受体植物内源基因同源^[21]。转基因的位置效应反映了整合位点染色体的固有特性,如与基因组中的增强子间的距离、染色质的集缩程度等,但位置效应和基因沉默并非互不相干, MAR 有可能通过减弱基因沉默的负影响而提高转基因的表达效率^[20]。此假说能较好解释用农杆菌转化和基因枪转化时 MAR 对转基因表达影响的悬殊差异。农杆菌转化时,选择标记基因和报道基因 *gus* 共连接于 T-DNA 中, T-DNA 位点基因沉默使转基因 *gus* 和选择标记基因均以低水平表达,在药物筛选过程中就会排除表达效率较低的转基因系,从而提高了对照组的转基因表达的平均水平,致使 MAR 对转基因表达效率的提高幅度的表现值降低,基因枪转化时,转基因在受体中常以多拷贝存在,整合模式较为复杂,更易导致转基因同源依赖性沉默,无 MAR 的对照转基因系中由于基因沉默使转基因表达效率减低, MAR 则削弱了转基因沉默的影响,从而使 MAR 对转基因表达效率提高的表现值增大^[19,20]。此外,基因沉默机制复杂, MAR 对转基因表达的效应不表现为拷贝数依赖性也不足为奇。但 Vaucheret 等^[22]研究发现, MAR 不能阻止强沉默位点处的转基因在转录水平及转录后水平的反式沉默,源于鸡、大豆、酵母、烟草的 MAR 置于转基因 *gus* 两侧获得转基因烟草株系,与携带有两个强反式沉默位点 271 和 6b8 的烟草株系杂交时,无论有无 MAR,杂交后代均表现为沉默。

5 小 结

尽管植物中 MAR 的研究处于早期阶段,对 MAR 与核基质的相互作用、MAR 在染色质高级结构组织中的功能以及 MAR 对转基因表达效应的机制尚知之甚少,但 MAR 已

在防止转基因沉默、提高转基因在植物中的表达效率方面显示了巨大潜力,有可能作为转基因表达的促进剂很快被广泛应用。同时对 MAR 作用机制的阐明将有助于我们进一步认识真核细胞基因在染色质水平上的调控机理。

参考文献 (References):

- [1] Van der Geest A H M , Hall G E Jr , Spiker S , *et al.* The β -phaseolin gene is flanked by matrix attachment regions[J]. *Plant J* , 1994 , 6 :413 ~ 423 .
- [2] Zoya Avramova , Jeffrey L Bennetzen . Isolation of matrices from maize leaf nuclei :identification of a matrix - binding site adjacent to the *Adh1* gene[J]. *Plant Molecular Biology* , 1993 , 22 :1135 ~ 1143 .
- [3] Tikhonov A P , Bennetzen J L , Avramova Z V . Structural domains and matrix attachment regions along colinear chromosomal segments of maize and sorghum[J]. *Plant Cell* , 2000 , 12(2) :249 ~ 264 .
- [4] Michalowski S M , Allen G C , Hall G E Jr , *et al.* Characterization of randomly - obtained matrix attachment regions (MARs) from higher plants[J]. *Biochemistry* , 1999 , 38(39) :12795 ~ 12804 .
- [5] Koji Nomura , Wataru Saito , Kimiyo Ono , *et al.* Isolation and characterization of matrix associated region DNA fragments in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Cell Physiol* , 1997 , 38(9) :1060 ~ 1068 .
- [6] Cornelis M Van Drunen , Rob W Oosterling , Gerbiënne M K , *et al.* Analysis of the chromatin domain organisation around the plastocyanin gene reveals an MAR - specific sequence element in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nucleic Acids Research* , 1997 , 25(19) :3904 ~ 3911 .
- [7] Slatter R E , Dupree P , Gray J C A . Scaffold - associated DNA region is located downstream of the pea plastocyanin gene[J]. *Plant Cell* , 1991 , 3(11) :1239 ~ 1250 .
- [8] Steven Spiker , William F Thompson . Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants[J]. *Plant Physiol* , 1996 , 110 :15 ~ 21 .
- [9] Apolonia H M , van der Geest , Timothy C Hall . The β -phaseolin 5' matrix attachment region act as an enhancer facilitator[J]. *Plant Molecular Biology* , 1997 , 33 :553 ~ 557 .
- [10] Chung J H , Whiteley M , Felsenfeld G . A 5' element of the chicken globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protect against position effect in *Drosophila* [J]. *Cell* , 1993 , 74 :505 ~ 514 .
- [11] Yuji Fukuda . Characterization of matrix attachment sites in the upstream region of a tobacco chitinase gene[J]. *Plant Molecular Biology* , 1999 , 39 :1051 ~ 1062 .
- [12] Cornelis M van Drunen , Richard G A B Sewalt , Rob W Oosterling , *et al.* A bipartite sequence element associated with matrix/ scaffold attachment regions[J]. *Nucleic Acid Res.* 1999 , 27(14) :2924 ~ 2930 .
- [13] Zoya Avramova , Alexander Tikhonov , Mingsheng Chen , *et al.* Matrix attachment regions and structural colinearity in the genomes of two grass species[J]. *Nucleic Acids Research* , 1998 , 26(3) :761 ~ 767 .
- [14] Breynne P , Van Montagu M , Depicker N , *et al.* Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco[J]. *Plant Cell* , 1992 , 4(4) :463 ~ 471 .
- [15] Mlynárová L , Loonen A , Heldens J , *et al.* Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix associated region[J]. *Plant Cell* , 1994 , 6 :417 ~ 426 .
- [16] Mlynárová L , Jansen R C , Conner A J , *et al.* The MAR - mediated reduction in position effect can be uncoupled from copy number - dependent expression in transgenic plants[J]. *Plant Cell* , 1995 , 7 :599 ~ 609 .
- [17] Schöffl F , Schroder G , Kliem M , *et al.* An SAR sequence containing 395bp DNA fragment mediates enhanced , gene - dosage - correlated expression of a chimaeric heat shock gene in transgenic tobacco plants[J]. *Transgenic Res* , 1993 , 2 :93 ~ 100 .
- [18] Jian - wei Liu , Linda M Tabe . The influences of two plant nuclear matrix attachment regions (MARs) on gene expression in transgenic plants[J]. *Plant Cell Physiol* , 1998 , 39(1) :115 ~ 123 .
- [19] Allen G C , Hall G E Jr , Childs L C , *et al.* Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells[J]. *Plant Cell* , 1993 , 5 :603 ~ 613 .
- [20] George C Allen , Gerald Hall Jr , Susan Michalowski , *et al.* High - level transgene expression in plant cells :effects of a strong scaffold attachment region from tobacco[J]. *The Plant Cell* . 1996 , 8 :899 ~ 913 .
- [21] Matzke M A , Matzke A J . How and why do plants inactivate homologous (trans) genes[J]. *Plant Physiol* , 1995 , 107 :679 ~ 685 .
- [22] H Vaucheret , T Elmayer , D Thierry , *et al.* Flank matrix attachment regions (MAR) from chicken , bean , yeast or tobacco do not prevent homology - dependent trans - silencing in transgenic tobacco plants[J]. *Mol Genet* , 1998 , 259 :388 ~ 392 .