

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00113

SV40 PolyA 序列及其 AATAAA 信号对上游 GFP 基因表达及转录终止的影响

李书平^{1,2}, 冯晶晶³, 王红钢⁴, 王秀芳¹, 吕占军¹

1. 河北医科大学实验动物学部遗传研究室, 河北省实验动物重点实验室, 石家庄 050017;
2. 河北省邢台市人民医院检验二科, 邢台 054001;
3. 华东精神卫生康复中心, 上海 200126;
4. 河南大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 开封 475004

摘要: SV40 PolyA(猴空泡病毒 PolyA, 简称 PolyA)序列是有转录终止作用和使转录的 mRNA 添加 PolyA 尾的 DNA 序列(240 bp), 含有 AATAAA 六核苷酸多腺苷化信号(Polyadenylation signal)。在 pEGFP-C1 质粒的 GFP 基因下游插入 14 个同向串联的 *Alu* 序列(*Alu*14), 构建 p*Alu*14 质粒, 瞬时转染 HeLa 细胞, 用 Northern blot 检测和荧光显微镜观察 GFP RNA 和 GFP 蛋白表达, 发现 *Alu* 串联序列强烈抑制 GFP 基因表达, 该序列没有转录终止作用产生高分子量 GFP 融合 RNA。又在 p*Alu*14 质粒 GFP 基因和 *Alu* 串联序列之间接正、反方向插入 PolyA 序列及去除 AATAAA 信号的 PolyA 序列, 插入的这些 PolyA 序列均能部分解除 *Alu*14 对 GFP 基因的抑制作用; 去除 AATAAA 信号的 PolyA 正、反序列仍然引起转录终止。将 PolyA 反序(PolyAas)分为 4 段每段 60 bp, 中间的 2 段分别称为 2F2R 和 3F3R, 将 2F2R 或 3F3R 插在 p*Alu*14 质粒的 *Alu* 串联序列的上游, 随着插入 2F2R 片段拷贝数的增加转录的 GFP 融合 RNA 的分子量增加; 2F2R 的下游如果依然是 2F2R 那么 2F2R 可以支持转录延伸, 如果 2F2R 下游是 *Alu* 串联序列则 2F2R 导致转录终止。无论插入一个 3F3R 或插入 64 个 3F3R, 均产生低分子量 GFP RNA。

关键词: *Alu*; SV40 PolyA; AATAAA 信号; GFP; 转录终止

The effects of SV40 PolyA sequence and its AATAAA signal on upstream GFP gene expression and transcription termination

LI Shu-Ping^{1,2}, FENG Jing-Jing³, WANG Hong-Gang⁴, WANG Xiu-Fang¹, LV Zhan-Jun¹

1. Department of Genetics, Hebei Key Lab of Laboratory Animal, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;
2. The Second Clinical Laboratory, Xingtai Renmin Hospital, Xingtai 054001, China;
3. East China Mental Health and Rehabilitation Centre, Shanghai 200126, China;
4. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College, Henan University, Kaifeng 475004, China

收稿日期: 2011-04-21; 修回日期: 2011-11-21

基金项目: 河北省自然科学基金项目(编号: C2008001065 和 C2011206043)资助

作者简介: 李书平, 硕士研究生, 专业方向: 基因表达调节。E-mail: lilishuping01@163.com

通讯作者: 吕占军, 博士生导师, 研究方向: 衰老机理。E-mail: LSLAB@hebm.u.edu.cn

王秀芳, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤遗传学。E-mail: wangxiufang@live.cn

网络出版时间: 2011-11-30 10:35:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20111130.1035.002.html>

Abstract: SV40 PolyA (Simian virus 40 PolyA, also called PolyA) sequence is DNA sequence (240 bp) that possesses the activity of transcription termination and can add PolyA tail to mRNA. PolyA contains AATAAA hexanucleotide polyadenylation signal. Fourteen copies of *Alu* in sense orientation (*Alu14*) were inserted downstream of *GFP* in pEGFP-C1 to construct pAlu14 plasmid, and then HeLa cells were transiently transfected with pAlu14. Northern blot and fluorescence microscope were used to observe GFP RNA and protein expressions. Our results found that *Alu* tandem sequence inhibited remarkably *GFP* gene expression, but produced higher-molecular-mass GFP fusion RNA. PolyA and its sequence that was deleted AATAAA signal in sense or antisense orientation were inserted between *GFP* and *Alu* tandem sequence in pAlu14. The results showed that all the inserted PolyA sequences partly eliminated the inhibition induced by *Alu14*. PolyA sequences without AATAAA signal in sense or antisense orientation still induced transcription termination. Antisense PolyA (PolyAas) was divided into four fragments that all are 60 bp long and the middle two fragments were named 2F2R and 3F3R. 2F2R or 3F3R was inserted upstream of *Alu* tandem sequence in pAlu14. The molecular mass of GFP fusion RNA increased when the copy number of 2F2R increased. 2F2R can support transcription elongation when 2F2R is located upstream of other 2F2R. Nevertheless, 2F2R located upstream of *Alu* tandem sequence can induce transcription termination. Inserting one copy or 64 copies of 3F3R in upstream of *Alu* tandem sequence caused the production of lower-molecular-mass GFP RNA.

Keywords: *Alu*; SV40 PolyA; AATAAA signal; *GFP*; transcription termination

AATAAA六核苷酸是最早被认识到的mRNA多腺苷化信号^[1], 90%的真核mRNA的AATAAA序列都在距剪切位点的 30 个核苷酸的范围内^[2], 它指导核酸内切酶在此序列下游 15~30 碱基处的特定位点上裂解前体mRNA, 然后通过多聚腺苷酸聚合酶的催化作用, 在 3'-OH上逐一引入 100~300个腺嘌呤核苷酸。AATAAA六核苷酸已经显示出其分子和生理的关联性: 例如, 一大类导致地中海贫血的血红蛋白病都归因于这个序列的点突变^[3,4]。人基因中多腺苷化信号不是严格保守的, 单碱基变异发生率很高, 通过EST定位研究推定mRNA 3'端仅 73%具有明显六核苷酸多腺苷化信号^[5]。

*Alu*在人基因组中大约有 100 万个拷贝, 占人类基因组的 10%, 一方面*Alu*在人基因组中存在广泛的多态性^[6], 另一方面*Alu*变异导致疾病^[7]。*Alu*元件下调基因表达, Ebihara 等^[8]证明*Alu*对烟碱乙酰胆碱受体 $\alpha 6$ 亚基基因有转录抑制作用而且与*Alu*方向无关。

本研究用 14 个 *Alu* 串联重复序列插入 pEGFP-C1 质粒, 观察 *Alu* 串联序列对 *GFP* 基因表达量和转录终止的作用; 再分别将 PolyA 正、反序列, 以及去除 AATAAA 信号的 PolyA 正、反序列插入 *GFP* 和 *Alu* 串联重复序列之间, 观察这些 PolyA 序列对上游

GFP 表达量以及转录终止的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、宿主菌和细胞

pEGFP-C1 质粒、DH5 α 大肠杆菌、HeLa 细胞株为本实验室保存; RP11-29107 克隆(含有 *Alu* 重复序列)引自英国 Wellcome Trust 实验室。

1.1.2 引物

引物序列及酶切位点见表 1, PCR 扩增各目的 DNA 片段的长度和所需引物见表 2。引物由赛百盛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 表达载体构建

1.2.1.1 pAlu14 质粒的制备

设计引物上游带有 *EcoR* I、*Xba* I 酶切位点, 下游带有 *Kpn* I、*Nhe* I 酶切位点, 用 RP11-29107 克隆作为模板, 扩增 *Alu* 序列。*EcoR* I 和 *Kpn* I 作为 *Alu* 插入的位点, 制备 pEGFP-*Alu1*(以下简称 pAlu1)。pEGFP-*Alu2* 的制备过程为: 用 *Hind*III 和 *Xba* I 酶切构建好的 pAlu1 质粒, 胶回收大片段, *Hind*III 和

表 1 引物序列及酶切位点

名称	序列(5'→3')	酶切位点
PolyAH3	ATCGAAGCTTAATCAGCCATACCACATTTG	Hind
PolyAH4	ATCGAAGCTTGAGCTTACAATTTACGCGTTAAG	Hind
PolyA7	AACTTGGCAGCTTATAATGGTTAC	无
PolyA8	ATAAGCTGCCAAGTTAACAACAAC	无
PolyA9	TGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTGTAAACCATTATA'	无
PolyA10	GCAATAGCATCACAAATTTACAGCATTTTTTTCAC	无
GFPP	CCACTACCTGAGCACCCAGTC	无

表 2 PCR 反应的目的基因、对应引物及 PCR 产物长度

目的基因	上游引物	下游引物	PCR 产物长度 (bp)
PolyA	PolyAH3	PolyAH4	250
PolyAa	PolyAH3	PolyA9	155
PolyAb	PolyA10	PolyAH4	94
PolyAaas	PolyAH4	PolyA7	142
PolyAbas	PolyA8	PolyAH3	125
ΔA	PolyAH3	PolyAH4	238
ΔAas	PolyAH4	PolyAH3	244
ΔA	GFPP	PolyAH4	368
ΔAas	GFPP	PolyAH3	374

Nhe I 酶切, 胶回收小片段, 再将大、小片段用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 DH5 α 感受态菌, PCR 和酶切筛选含有目的序列的阳性菌, 反复重复上述步骤, 直到插入序列为 14 个 *Alu* 元件(pAlu14), 参见文献[9]。

1.2.1.2 pA-Alu14、pAas-Alu14、pA-ORF2 和 pAas-ORF2 质粒的制备

以 pEGFP-C1 为模板, 带有 *Hind*III 酶切位点的 PolyAH3 和 PolyAH4 作为上、下游引物, 扩增位于多克隆位点(MCS)下游的 PolyA 序列(240 bp), 扩增产物经 *Hind*III 酶切后连入经 *Hind*III 酶切和碱性磷酸酶(CIAP)处理的 pAlu14 质粒的 *Alu*14 上游。选阳性菌提质粒, PCR 和测序鉴定获得插入正、反 PolyA 序列的质粒, 即 pA-Alu14 和 pAas-Alu14。将 *Hind*III 酶切的 PolyA 片段插入用 *Hind*III 酶切和 CIAP 处理的 pORF2 质粒[10], 获得 pA-ORF2 和 pAas-ORF2 质粒。

1.2.1.3 pΔA-Alu14 和 pΔAas-Alu14 质粒的制备

PCR 分别扩增 PolyA 序列中第 1 个 AATAAA 上游的序列(PolyAa)和第 2 个 AATAAA 下游的序列(PolyAb)。扩增 PolyAa 时以 PolyAH3 和 PolyA9 分

别为上、下游引物, 扩增 PolyAb 时, 以 PolyA10 和 PolyAH4 分别为上、下游引物, 重组 PCR 法融合 PolyAa 和 PolyAb 的 DNA 片段, 制成去除 AATAAA 的正序 PolyA 并命名为 ΔA 片段。去除反序 PolyA 中 AATAAA 的方法基本同 ΔA 片段制备, 将去除 AATAAA 的反序 PolyA 命名为 ΔAas。将 ΔA 和 ΔAas 用酶切法插入 pAlu14 质粒的 *Alu*14 上游, 方法同本文“1.2.1.2”, 制成 pΔA-Alu14 和 pΔAas-Alu14 质粒。

1.2.1.4 其他质粒

p2F2R*1-Alu14、p2F2R*16-Alu14、p2F2R*64-Alu14、p3F3R*1-Alu14 和 p3F3R*64-Alu14 质粒的构建参见文献[11]; pAlu1 和 pAlu8 质粒的制备参见文献[9]。

1.2.2 细胞转染

将 pEGFP-C1 和表达载体用 Lipofectamine™ 2000 脂质体瞬时转染 HeLa 细胞, 于 37℃、5%CO₂ 环境中培养 36 h, 提取 RNA 用于 Northern 检测; 4% 多聚甲醛固定, 用于荧光显微镜观察。

1.2.3 Northern 杂交

α -³²P-dCTP 标记 GFP 探针和 Neo 探针, 与转移到尼龙膜的 RNA 杂交, 放射自显影, 详见文献[12]。

1.2.4 荧光显微镜观察

4% 多聚甲醛固定的细胞于荧光显微镜下观察, 荧光下记数 GFP 荧光阳性细胞数, 白光下记数同样视野的细胞总数(每个样本至少计数 500 个细胞), 计算荧光阳性细胞百分率。在白光和荧光下分别对同一视野照相。

荧光细胞阳性率 = 荧光阳性细胞数 / 同样视野细胞总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 重组质粒结构及鉴定

重组质粒结构和片段插入位置见图 1。本文中使用的所有质粒均经 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序鉴定正确后用于实验。PCR 图、酶切图以及测序图略。

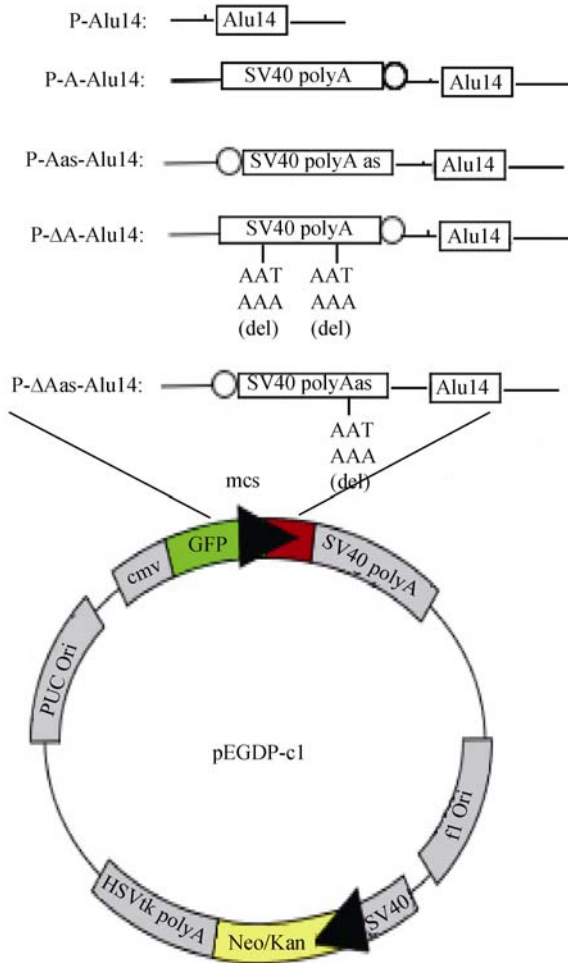


图 1 重组质粒结构模式图及插入片段位置 Alu14(或 L1-ORF2)插入 pEGFP-C1 的多克隆酶切位点; 其他片段插入位置均位于 GFP 基因和 Alu14(或 L1-ORF2)之间。

2.2 PolyA 及去除 AATAAA 信号的 PolyA 正、反序列活化 GFP 基因并引起转录终止

2.2.1 Northern blot 检测

8 种不同插入序列质粒转染 HeLa 细胞, Northern blot 检测结果见图 2。pAlu14(7 泳道)和 pORF2(9 泳道)GFP 基因表达量很低, 说明 14 个串联 Alu 或 L1-ORF2 插入 GFP 基因下游可以抑制 GFP 基因表

达; 这两个插入序列虽然均可以抑制 GFP 基因表达, 但是在转录终止方面表现不同, pAlu14 转录高分子量的 RNA(7 泳道箭头所示), pORF2 转录低分子量 RNA。在 pAlu14 质粒的 Alu 序列上游或 pORF2 质粒的 ORF2 上游插入正序或反序 PolyA, 可以促进 GFP 基因表达, 产生低分子量 RNA(图 2, 1~4 泳道), 说明 PolyA 正、反序列均可以促进 GFP 基因表达并引起转录终止。

为了检测 PolyA 中 AATAAA 六核苷酸信号对转录终止的作用, 将 PolyA 正、反序列的 AATAAA 去除, 插入 pAlu14 质粒的 Alu 串联序列上游。结果显示去除 AATAAA 的 PolyA 正、反序列依然可以促进 GFP 基因表达并引起转录终止(图 2, 5、6 泳道对比 1、2 泳道)。图 2A 的上图是 GFP 探针杂交结果, 图

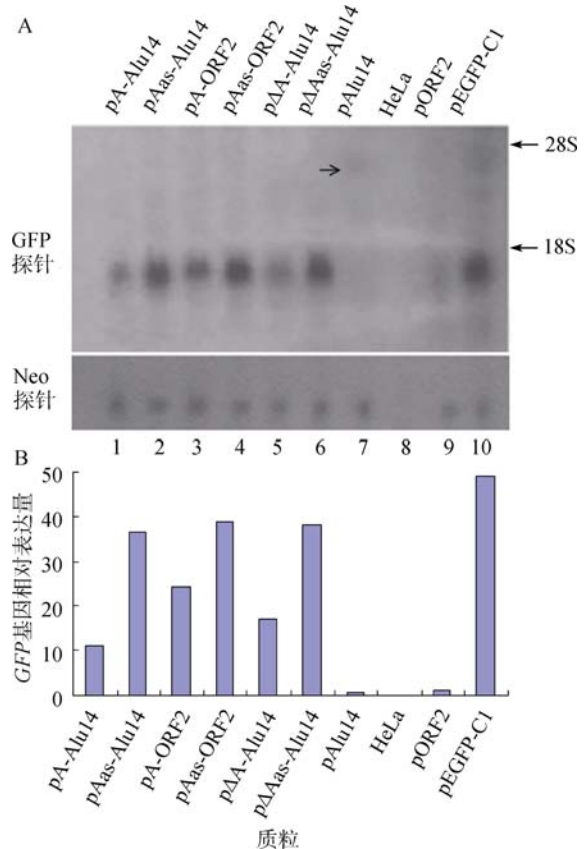


图 2 GFP 基因下游插入不同序列对 GFP 基因表达的影响 A: 不同质粒转染 HeLa 细胞 Northern blot 杂交结果。7 泳道箭头指示高分子量 GFP 融合 RNA 位置, 大概有 5.0 kb 碱基, 符合 GFP 加上 Alu 串联序列的大小(1017nt+283nt×14=4979nt)。28S 约相当于 6.3 kb, 18S 约相当于 2.4 kb 碱基 RNA 的位置。B: A 图中 GFP 探针杂交数据用图像分析软件测定, 绘制 GFP 相对表达量(相对表达量=面积×灰度)。

2A 的下图是 *Neo*(新霉素抗性基因)探针杂交结果。*Neo* 作为转染效率的对照, 各泳道的表达基本一致, HeLa 细胞(8 泳道)无 *Neo* 基因表达, 因此 GFP 探针杂交分析结果成立。

2.2.2 荧光观察

pAlu14、pA-Alu14、pAas-Alu14、p Δ A-Alu14、p Δ Aas-Alu14 和 pEGFP-C1 6 种质粒瞬时转染 HeLa 细胞, 荧光显微镜观察荧光阳性细胞(图 3), 计算荧光细胞阳性率(表 3)。6 种质粒转染可看出以下差异: (1)与对照 pEGFP-C1 相比, Alu14 插入 GFP 基因下

游强烈抑制 GFP 基因的表达, 荧光细胞阳性率由 $(26.5 \pm 1.02)\%$ 降至 $(0.10 \pm 0.03)\%$; (2)pA-Alu14 和 pAas-Alu14 中 PolyA 正、反插入 GFP 与 Alu14 序列间, 荧光细胞阳性率分别为 $(4.05 \pm 0.32)\%$ 和 $(5.08 \pm 0.31)\%$, 该值明显高于 pAlu14 的阳性率 $(0.10 \pm 0.03)\%$ ($P < 0.01$); (3)去除 AATAAA 的正序 PolyA 构建的 p Δ A-Alu14 质粒和去除 AATAAA 的反序 PolyA 构建的 p Δ Aas-Alu14 质粒, 转染细胞后荧光阳性率分别为 $(2.08 \pm 0.20)\%$ 和 $(4.03 \pm 0.24)\%$, 二者比未去除 AATAAA 前荧光阳性率略有减小, 但仍然高于 pAlu14 转染的阳性率 ($P < 0.01$)。荧光观察 GFP 蛋白

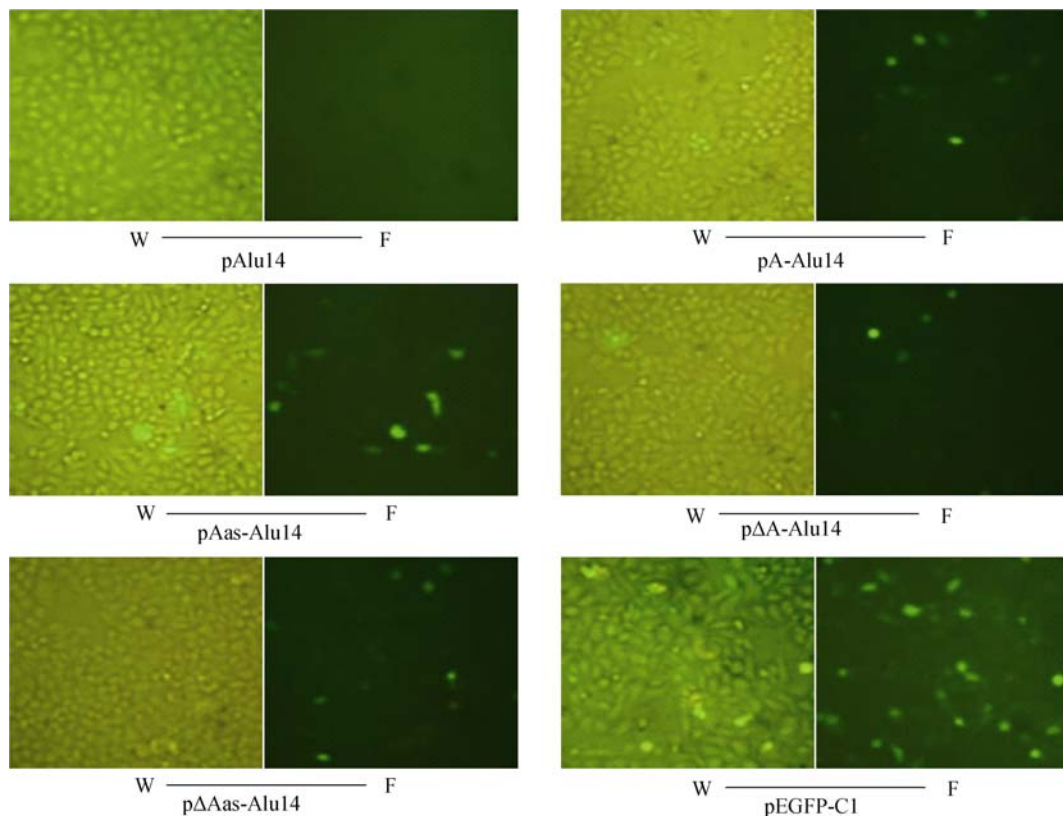


图 3 GFP 基因下游插入不同序列对 GFP 蛋白表达的影响
W: 白光观察结果; F: 同样视野荧光观察结果。

表 3 GFP 基因下游插入不同序列质粒转染 HeLa 细胞 GFP 蛋白阳性细胞百分率(6 例)

质粒	GFP 阳性细胞 (%)						均值 \pm SD
	0.09	0.08	0.12	0.10	0.14	0.07	
pAlu14	0.09	0.08	0.12	0.10	0.14	0.07	0.10 \pm 0.03
pA-Alu14	3.8	4.2	4.5	3.6	4.0	4.2	4.05 \pm 0.32
pAas-Alu14	4.7	5.5	5.3	5.0	5.2	4.8	5.08 \pm 0.31
p Δ A-Alu14	2.0	2.2	2.0	2.1	2.3	1.9	2.08 \pm 0.20
P Δ Aas-Alu14	3.7	4.0	4.2	3.8	4.2	4.3	4.03 \pm 0.24
pEGFP-C1	25.3	26.8	27.2	26.0	25.7	28.0	26.50 \pm 1.02

表达结果与 Northern blot 检测 GFP RNA 表达结果基本相同。

2.3 PolyAas 片段的转录终止作用

将 PolyAas 分为 4 段每段 60 bp, 中间的 2 段分别称为 2F2R 和 3F3R, 将 2F2R 或 3F3R 插在 pAlu14 质粒的 *Alu* 串联序列的上游可以活化基因并且随着串联拷贝数的增加活化 *GFP* 基因作用下降(图 4B, 1~3 泳道; 图 4C, 1 和 2 泳道)。在此我们要强调的是转录终止方面的发现。图 4A 的 1、2 和 3 泳道质粒分别插入 1, 8 和 14 个 *Alu*, 从转录 GFP 融合 RNA 大小来看, 依次增加(1.3 kb、3.3 kb 和 5.0 kb), 从这个结果看 *Alu* 没有转录终止信号属于转录延伸序列。图 4B 的 1, 2 和 3 泳道质粒分别在 pAlu14 的 *Alu* 串联序列上游插入 1, 16 和 64 个 2F2R, 从转录 GFP 融合 RNA 大小来看, 依次增加(1.1 kb、2.0 kb 和 4.8 kb), 这样看 2F2R 也属于转录延伸序列。但是 2F2R 作为转录延伸序列是有条件的, 2F2R 的下游如果是 2F2R 那么 2F2R 可以支持转录延伸, 如果 2F2R 下游是 *Alu* 串联序列则 2F2R 导致转录终止。3F3R 插入 pAlu14 质粒的 *Alu* 串联序列上游, 转录终止作用与插入 2F2R 不同, 无论插入一个 3F3R(图 4C, 1 泳道)或插入 64 个 3F3R(图 4C, 2 泳道), 转录终止位置相同, 均产生低分子量 GFP RNA, 3F3R 属于转录终止序列。

3 讨论

Alu 序列和 *L1-ORF2* 均有沉默子的作用, 本实验中 14 个正向同向串连的 *Alu* 元件或 *L1-ORF2* 插入 pEGFP-C1 质粒, 抑制了上游 *GFP* 基因表达, *Alu* 作为沉默子下调了 *GFP* 转录与 *Alu* 串联序列使染色质形成紧密包装有关^[9]。

本实验中所用的 PolyA 序列来自 pEGFP-C1 载体, 从多克隆位点结束以后第一个碱基(1418)到转录结束(1600)再延伸 17 bp, 长度为 240 bp, 其中 1550-1555 和 1579-1584 处各有一个 SV40 早期 mRNA PolyA 信号(多腺苷化信号)AATAAA。Yamakawa 等^[13]曾构建表达起源于 AV8 的 *gag*、*pol* 和 *env* 基因的表达载体, SV40 早期区域作为多腺苷化信号被使用。当一个 850 bp SV40 早期区域的片段被应用于表达载体时, 包虫膜基因 *env* 表达消失。当 SV40 早期区域被缩短到 140 bp 时 *env* 表达恢复。本实验所用的 PolyA 片段长 240 bp 介于 Yamakawa 等所使用的两种片段之间, 结果却使原本被 Alu14 序列抑制的 *GFP* 基因表达增加。

关于 PolyA 正、反序促进上游 *GFP* 基因表达, 起初我们认为与序列中的多腺苷化信号 AATAAA 的作用有关, 但是去除 AATAAA 的正序和反序 PolyA 插入 pAlu14 质粒的 *Alu* 序列上游均可以增强 *GFP* 基因的表达, 且同样发生转录终止, 说明转录

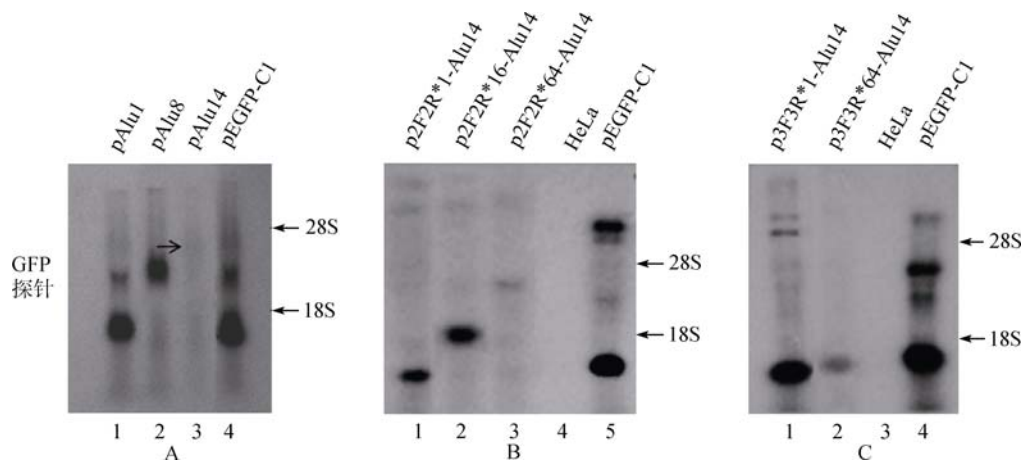


图 4 Northern blot 杂交检测 PolyAas 片段的转录终止作用

A: pEGFP-C1 质粒多克隆位点插入 1 个、8 个或 14 个 *Alu*, 显示随插入 *Alu* 拷贝数上升 GFP 融合 RNA 转录量下降, 分子量增加。3 泳道中的箭头指示 pAlu14 转录的高分子量 GFP 融合 RNA。B: 在 pAlu14 质粒的 *Alu* 串联序列上游再插入 1 个、16 个或 64 个 2F2R, 显示随插入 2F2R 拷贝数上升 GFP 融合 RNA 分子量增加, 说明转录可以通过 2F2R 序列, 但是不能进入 *Alu* 序列。C: 在 pAlu14 质粒的 *Alu* 串联序列上游再插入 1 个或 64 个 3F3R, 转录分子量相同的低分子量 GFP RNA, 说明转录不能通过 3F3R。

量和转录终止还受除多腺苷化信号以外的因素影响。

Alu 串联序列可以抑制 GFP 基因表达而且属于转录延伸序列(图 4A), 说明其上没有转录终止信号。将 PolyAas 分为 4 段每段 60 bp, 中间的 2 段即 2F2R 和 3F3R 插在 pAlu14 质粒的 *Alu* 串联序列的上游, 可以活化基因并且随着串联拷贝数的增加活化 GFP 基因作用下降(图 4B, 图 4C)。随着插入 2F2R 片段拷贝数的增加转录的 GFP 融合 RNA 的分子量增加(图 4B), 这样看 2F2R 也属于转录延伸序列。3F3R 插入 pAlu14 质粒的 *Alu* 串联序列上游, 转录终止作用与插入 2F2R 不同, 无论插入一个 3F3R(图 4C, 1 泳道)或插入 64 个 3F3R(图 4C, 2 泳道), 转录位置相同, 均产生低分子量 GFP RNA, 说明 3F3R 属于转录终止序列。需要提到的是, 2F2R 作为转录延伸序列是有条件的, 2F2R 的下游如果依然是 2F2R 那么 2F2R 可以支持转录延伸, 如果 2F2R 下游是 *Alu* 串联序列则 2F2R 导致转录终止。*Alu* 序列不存在转录终止信号, 所以形成高分子量 GFP 融合 RNA; 3F3R 序列存在强的转录终止信号, 所以无论什么情况均发生转录终止, 形成低分子量 GFP RNA; 2F2R 序列带有弱的转录终止信号, 如果下游序列是 2F2R 则转录可以延伸, 如果下游是 *Alu* 串联序列形成较大的阻力 2F2R 则为转录终止序列。

参考文献(References):

- [1] Proudfoot NJ, Brownlee GG. 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 1976, 263(5574): 211–214. [DOI](#)
- [2] MacDonald CC, Redondo JL. Reexamining the Polyadenylation signal: were we wrong about AAUAAA? *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 190(1–2): 1–8. [DOI](#)
- [3] Higgs DR, Goodbourn SEY, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Proudfoot NJ. α -thalassaemia caused by a Polyadenylation signal mutation. *Nature*, 1983, 306(5941): 398–400. [DOI](#)
- [4] Orkin SH, Cheng TC, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr. Thalassemia due to a mutation in the cleavage-Polyadenylation signal of the human beta-globin gene. *Embo J*, 1985, 4(2): 453–456. [DOI](#)
- [5] Beaulieu E, Freier S, Wyatt JR, Claverie JM, Gautheret D. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res*, 2000, 10(7): 1001–1010. [DOI](#)
- [6] Selvaggi A, Santovito A, Cervella P, Sella G, DelPero M. *Alu* insertion polymorphisms at 11 loci in a Piedmont (Northern Italy) sample. *Leg Med*, 2010, 12(4): 212–214. [DOI](#)
- [7] Védrine SM, Vourch P, Tabagh R, Mignon L, Höfflin S, Cherpi-Antar C, Mbarek O, Paubel A, Moraine C, Raynaud M, Andres CR. A functional tetranucleotide (AAAT) polymorphism in an *Alu* element in the *NF1* gene is associated with mental retardation. *Neurosci Lett*, 2011, 491(2): 118–121. [DOI](#)
- [8] Ebihara M, Ohba H, Ohno SI, Yoshikawa T. Genomic organization and promoter analysis of the human nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ subunit (*CHNRA6*) gene: *Alu* and other elements direct transcriptional repression. *Gene*, 2002, 298(1): 101–108. [DOI](#)
- [9] Wang XF, Wang XY, Liu J, Feng JJ, Mu WL, Shi XJ, Yang QQ, Duan XC, Xie Y, Lu ZJ. *Alu* tandem sequences inhibit GFP gene expression by triggering chromatin wrapping. *Genes Genom*, 2009, 31(3): 209–215. [DOI](#)
- [10] Wang XF, Jin X, Wang XY, Liu J, Feng JJ, Yang QQ, Mu WL, Shi XJ, Lu ZJ. Effects of L1-ORF2 fragments on green fluorescent protein gene expression. *Genet Mol Biol*, 2009, 32(4): 688–696. [DOI](#)
- [11] Yin K, Wang XF, Ma H, Xie Y, Feng JJ, Yang QQ, Lü ZJ. Impact of copy number of distinct SV40PolyA segments on expression of a GFP reporter gene. *Sci China Life Sci*, 2009, 53(5): 606–612. [DOI](#)
- [12] 王红钢, 马欢, 李珠, 张彬, 景向阳, 张媛, 吕占军. SV40PolyA顺式活化基因元件中不完整茎环结构的发现和序列研究. *遗传*, 2011, 33(4): 337–346. [DOI](#)
- [13] Yamakawa K, Takase-Yoden S, Watanabe R. Interruption of env gene expression depending on the length of the SV40 early region used for the PolyA Signal. *Jpn J Infect Dis*, 2005, 58(6): 380–382. [DOI](#)