

杜氏盐藻核基质附着区的分离及特征性分析

王天云¹, 袁保梅¹, 柴玉荣¹, 王建人², 薛乐勋^{1*}

(1. 郑州大学细胞生物教研室, 河南郑州 450052; 2. 河南中医学院生理教研室, 河南郑州 450053)

摘要: 采用 0.5% Triton X-100 破碎细胞, 15% Percoll 分离盐藻细胞核, 25 mM 二碘水杨酸锂(lithium diiodosalicylate, LIS)抽提核蛋白, 限制酶消化除去结合松弛的 DNA, 蛋白酶 K-SDS 处理, 酚 氯仿抽提, 乙醇沉淀提取核基质附着 DNA, 限制酶酶切连至 pUC18 载体上构建 MARs 文库。随机挑选 6 个克隆进行体外结合实验筛选, 筛选出一能与核基质结合的克隆, 测序分析结果表明该序列具明显的 MAR 序列特征。

关键词: 盐藻; 核基质附着区; 核基质; 基因沉默

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)02-0145-04

Isolation and characterization of matrix attachment region from *Dunaliella salina*

WANG Tian-yun¹, YUAN Bao-mei¹, CHAI Yu-rong¹,

WANG Jian-ren², Xue Le-xun^{1*}

(1. Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Physiology, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: The *Dunaliella salina* cells were disrupted with 0.5% Triton X-100, purified by 15% Percoll. Nuclear proteins were removed using 25 mM lithium diiodosalicylate. After the nuclear matrices digested with restriction enzyme, the matrix attached DNAs were treated with proteinase K and SDS, extracted by phenol chloroform and ethanol precipitated, subsequently cut with restriction enzyme and ligated to the pUC18, transformed into *E. coli* JM109 and six colonies were picked randomly and screened through *in vitro* binding assay. One DNA fragments could specifically bind to the nuclear matrix and the sequence had the features of MAR typically.

Key words: *Dunaliella salina*; matrix attachment region; nuclear matrix; gene silencing

核基质结合区(Matrix attachment region, MAR)又称核骨架附着区(scaffold attachment region, SAR)是染色质被限制酶消化后仍与核基质或核骨架结合的 DNA 序列(Cockerill 等, 1986), 长度在 300~2 000 bp, 主要由 A-box, T-box, ATATTT(T)序列以及与果蝇拓扑异构酶 II 位点相近的同义顺序等特征序列组成。作为真核基因特有的一种顺式作用元件(cis-acting element), MAR 在真核细胞的染色体包装及基因的表达调控等方面发挥着非常

重要的作用(Vain 等, 1999)。外源基因在宿主中表达受到抑制的现象称之为转基因沉默(transgene silencing)。其作用机制主要有 3 种: 位置效应的基因沉默、转录水平的基因沉默和转录后水平的基因沉默(Fagard 等, 2000)。研究表明将 MAR 连接到报告基因的两翼在暂时及稳定表达的转基因植物中, 能在一定程度上可以克服基因沉默增强外源基因的表达, 同时还可降低转化体之间转基因表达水平的差异(Boreyne 等, 1994)。MAR 不仅可以使外源基

收稿日期: 2004-05-31 修订日期: 2004-10-20

基金项目: 国家自然科学基金(30270031); 国家高科技计划“863”资助(2002AA628050)项目。

作者简介: 王天云(1968-), 男, 山东梁山人, 新乡医学院讲师, 在读博士, 从事基因表达调控研究。* 通讯作者: 博士生导师, 研究员, 研究方向为肿瘤生物工程。

因在当代稳定表达而且可以促进外源基因在后代中的稳定遗传(Ulker 等,1999)。一般认为 MAR 序列定位于转录活跃的 DNA 环状结构域的边界,从而阻断邻近序列对基因表达的影响,使转基因能够形成一种独立的环状结构域,从而使位置效应降低到最低限度。迄今已有几十种 MAR 从不同植物中分离出来(Allen 等,2000),但尚没有真核藻类的相关报道。

1 材料与方法

1.1 材料

盐藻 (*Dunaliella salina* D. S. VTEX1644 Teod) 购自美国 (University Texas), 培养条件: 盐藻培养采用改良的 Ben-Amotz 盐藻培养基。26 °C, 光照强度 4 500 lx, 12 h 光照, 12 h 暗培养。限制酶、连接酶等分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司。pUC18, *E. coli* JM109 等由实验室保存。杂交试剂盒为 PIERCE 公司 North2SouthHRP 直接标记和检测试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 盐藻核的分离与核基质的制备 参见 Wang 等(2004)的方法。

1.2.2 核基质 DNA 的抽提与 MAR 文库的构建 参考 Nomura 等(1997)Michalowski 等(1999)的方法加以改进。LIS 抽提的核, 加入 100 μ L *Eco*RI 37 °C 过夜充分消化除去结合松弛的 DNA, 2 400 g 离心 10 min, 沉淀加入蛋白酶 K (100 μ g/mL), RNaseA (40 μ g/mL), 0.05% SDS 的 TE 缓冲液中, 37 °C 过夜或 55 °C 消化 3 h, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶于 TE 保存。提取的核基质 DNA 分别用限制酶 *Eco*RI, *Hind* III, *Taq*I 及 *Rsa*I 消化, 连接至用相应酶切的 pUC18 载体上, 转化 *E. coli* JM109, 挑选阳性克隆。

1.2.3 体外结合实验 参考 Mirkovitch 等(1984)加以改进, 随机挑选 6 个克隆, 培养提取质粒, 限制酶切出插入片段及载体 pUC18, 分别用辣根过氧化物酶标记, 加入经超声波破碎的长度在 0.1~1.5 kb 的 *E. coli* 基因组 DNA 至终浓度 50 μ g/L, 与 A260 nm 相当于 3 的核基质在 400 μ L 反应体系中 37 °C 温育 8 h, 使 MAR 序列与核基质充分结合, 离心分离核基质沉淀, 分别用蛋白酶 K 和 SDS 处理, 酚/氯仿抽提, 纯化与核基质结合的 DNA 及残留于上清液中的 DNA, 分别取 1/5 DNA 琼脂糖凝胶电泳, TCA 固定, 干胶机干燥, X 光放显。

1.2.4 测序及特征性分析 将体外结合证实为阳性的克隆抽提质粒后, 测序。序列采用 primer 5.0, BioEdit 等软件加以分析, 并通过 MAR-wiz (<http://www.futursoft.org/MAR-wiz>) 进行分析。

2 结果

2.1 体外结合实验

从文库中随机挑选 6 个克隆, 扩增后提取质粒, 酶切出插入片段及 pUC18 与核基质进行体外结合实验, 从图 1 可以看出, pUC18 载体不能与核基质沉淀结合, 插入片段具有明显与核基质结合的特性。

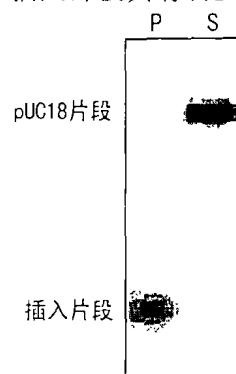


图 1 体外结合试验

Fig. 1 *In vitro* binding assay for MAR

P: 沉淀 Pellet; S: 上清液 Supernatant.

2.2 测序结果与特征性分析

将与核基质能够结合的片段进行测序, 结果见图 2, 片段长约 600bp, 其中 500bp 具有 MAR 序列特征。采用软件分析后结果见表 1。从图 2 测序结果和表 1 序列分析可以看出, 分离出的片断具有明显的 MAR 序列特征, 如富含 AT (62%), 具有一些 MAR 特有的模序 (motifs), 如 A-box, ARS, Topo II, BUR, MRS, OR I, kinked 等。

3 讨论

自从 1984 年 Mirkovitch 等分离出第一批 MAR 分子以来, 迄今已有几十种 MAR 分子从不同生物分离出来, 并对其在染色体包装、基因表达调控等方面作了一些研究。MAR 分离方法主要分为 3 种: (1) PCR 扩增法; (2) 核基质结合法; (3) MAR 文库筛选法。张可伟等(2002)首次利用 PCR 从烟草及拟南芥中扩增出 4 条具 MAR 序列特征的 MAR DNA 片段。绝大部分 MAR 序列都是通过核基质结合法分离出来的。核基质结合法分离鉴定的往往

是某一特定的 MAR 片段,不利于 MAR 序列一般特征的研究(Nomura 等,1997)。Nikolaev 等(1996)首次从人类 19 号染色体文库中选择 MAR 片段构建了一个特殊的 MAR 文库。Boulikas 等(1993)用高盐抽提,核酸酶酶切从人红细胞中制备核基质,构建了随机 MAR 文库,分离纯化出了 MAR。Michalowski 等(1999)用二碘水杨酸锂温和方法抽提制备烟草核基质,构建了烟草 MAR 文库,并从中分离出 13 个 MAR 序列。前期的研究用 percoll 梯度离心分离盐藻细胞核,用 25 mM LIS 抽提制备了盐藻的核基质(Wang,2004),本实验通过构建盐藻随机 MAR 文库,体外结合实验筛选随机挑选的 6 个克隆,其中有一克隆与核基质有明显的

结合能力,测序结果表明该序列富含 AT,并且包含 A-box(AATAAAYAA),及拓扑异构酶 II 结合位点等明显的 MAR 序列特征(GTNWAYATTNATNNR)。MAR 的鉴定依据主要有 2 个(Allen,2000):①作为内源 DNA 片段,当大多数 DNA 被核酸酶消化去除后与核基质仍紧密结合;②作为外源加入 DNA 片段,能在竞争性 DNA 存在情况下结合至纯化的核基质上。我们所分离的上述 MAR 片段,首先是核酸酶消化去除后仍与核基质能紧密结合;其次该片段在 *E. coli* 作为竞争性 DNA 情况下进行体外结合竞争实验,与核基质有较强结合能力,测序分析也表明序列具有明显的 MAR 特征,Blast 序列比较显示该序列为新序列。

AAGGTTATTGTTAAAGCGGGGATAGGCTATAATAATATCGATGTGGAGAACGCAACAAGAAGAGGTATTGTTG
TTGCTAATGTTCTCTG **ATT**ATTGCCAGGATGAAGTAATTGACCATACATTTGGTTTGCTCTTTTCGCTAGCTAGGA
AAACTTGTTATCT**AAATAAT**CAGGTTGCAAAAAAAGGTTAAAGACGCACCCAGGCTTAAAGG **TAAAACACTATG**
TTTGC **TGGGGTGGGTC** CTATTGGTCAACAGG **TAGCGCAACGCG** CTAAGCCTTT **TGGTTTGAATG**
TGGTTGGCTATGATCCCTTCAGCTCACCTCAAGTTTTTTGAAG A **TTTTAGAATT** GAA **AATATA** ACT
AACTTTGATTCTGTTTCTCAGATAGGTTGATTTTCTGTCCCTGCAAAATACCTCTGAAAGACCATACA
ATACAC **ATTATAAATAAAAA**TCAGTGTGCAAGGT**AAAAAAGCAGCTTTTGTG** AT **TAACACAGCAGC**
AGGAGGTCTTATCGAAGAAAACGATCTTTATTCCGCTCTTTACGAAAAAAACCTT

图 2 分离的盐藻 MAR 序列

Fig. 2 MAR sequence isolated from *D. salina*

表 1 盐藻 MAR 序列分析

Table 1 Analysis of MAR sequence from *D. salina*

Length	AT(%)	AT	A-box	T-box	ARS	Topo II	BUR	MRS	ORI	TG-rich	curved	kinked
540	62	41	2	0	1	1	1	2	4	0	0	5

A-box: AATAAAYAA; T-box: TTWTWTTWTT; ARS: WTTTATRTTTW; TopoII = GTNWAYATTNATNNR; BUR = AATATATTT; MRS = TAWAWWWNNAWRTAANNWWG or TAWAWWW + AWWRTAANNWWG; ORI = ATTA or ATTTA or ATTTTA; TG-rich = TGTTTTG or TGTTTTTTG or TTTTGGGG; Curved = AAAAN7AAAAAN7AAAA or TTTAAA; Kinked = TANNNTGNNNCA or TANNNCANNTG or TGNNNTANNNCA or CANNNTANNNTG.

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)是一类可生长在 0.05~5 M NaCl 无细胞壁单细胞真核藻类,盐藻作为外源基因表达系统具备许多优点(Karni 等,1998),目前转基因盐藻已在少数实验室开展。内源 MAR 与外源 MAR 作为边界元件对外源基因表达的影响有显著的差别(Allen,1993,1996)。因此分离盐藻的 MAR 无论在理论和应用实践上都具有一定的意义。本实验分离出了盐藻的一个 MAR 片段,为研究内源 MAR 在转基因盐藻中的功能奠定了基础。

本工作在河南省分子医学重点学科开放实验室

完成,特此感谢!

参考文献:

- 张可伟,王健美,杨国栋,等. 2002. 强 MAR 的分离及其体内外功能研究[J]. 科学通报, 47(20): 1 572-1 577.
- Allen GC, Hall GE, Jr, Childs LC, et al. 1993. Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells[J]. *Plant Cell*, 5: 603-613.
- Allen GC, Hall GE, Jr, Michalowski S, et al. 1996. High-level transgene expression in plant cells: Effects of a strong scaffold attachment region from tobacco[J]. *Plant Cell*, 8: 899-913.
- Allen GC, Spiker S, Thomposon WF. 2000. Use of matrix at-

- tachment regions (MARs) to minimize transgene silencing [J]. *Plant Mol Biol*, **43**(2-3): 311.
- Boreyne P, Montogu M, Gheysen G. 1994. The role of scaffold attachment region in the structure and functional organization of plant chromatin[J]. *Transgenic Res*, **3**: 195-202.
- Boukilas T, Kong CF. 1993. Multitude of inverted repeats characterizes a class of anchorage sites of chromatin loops to the nuclear matrix[J]. *J Cell Biochem*, **53**(1): 1-12.
- Cockerill P, Garrard WT. 1986. Chromosomal loop anchorage of the Kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites[J]. *Cell*, **44**: 273-282.
- Fagard M, Vaucheret H. 2000. Transgene silencing in plants: how many mechanisms? [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **51**: 167-194.
- Karni L, Avron M. 1988. Ion content of the halotolerant alga *Dunaliella salina*[J]. *Plant Cell Physiol*, **29**: 1131-1134.
- Michalowski SM, Allen GC, Hall GE, *et al.* 1999. Characterization of randomly obtained matrix attachment regions (MARs) from higher plants[J]. *Biochem*, **38**(12): 795-804.
- Mirkovitch J, Mirault ME, Laemmli UK. 1984. Organization of the higher-order chromatin loop; specific DNA attachment site on nuclear scaffold[J]. *Cell*, **39**: 223-232.
- Nikolaev LG, Tsevegiyn T, Akopov SB, *et al.* 1996. Construction of a chromosome specific library of human MARs and mapping of matrix attachment regions on human chromosome[J]. *Nucl Acids Res*, **24**(7): 1330-1336.
- Nomura K, Saito W, Moriyana H. 1997. Isolation and characterization of matrix associated region DNA fragments in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Cell Physiol*, **38**: 1060-1068.
- Ulker B, Allen GC, Thompson WF, *et al.* 1999. A tobacco matrix attachment region reduces the loss of transgene expression in the progeny of transgenic tobacco plants[J]. *Plant J*, **18**(3): 253-263.
- Vain P, Wirland B, Kohli A, *et al.* 1999. Matrix attachment regions increase expression levels and stability in transgenic rice and their progeny[J]. *Plant J*, **18**: 233-242.
- Wang TY(王天云), Chai YR(柴玉荣), Hou WH(侯卫红), *et al.* 2004. Preparation of nuclear matrix of *Dunaliella salina*(杜氏盐藻核基质的制备)[J]. *J Zhengzhou Univ(Med Sci)*(郑州大学学报(医学版)), **39**(1): 39-41.

(上接第 168 页 Continue from page 168)

- Luo LX, Sun TH, Jin YH. 1998. Accumulation of superoxide radical in wheat leaves under cadmium stress[J]. *Acta Science Circumstantiae*, **18**(5): 495-499.
- Wang HB, Wang HX, Wen CH, *et al.* Some detoxication mechanisms of different wheat varieties under cadmium treatment[J]. *Acta Science Circumstantiae*, 2002, **22**(4): 523-528.
- Ren AZ, Gao YB, Liu S. Response of protective enzymes in *Brassica chinensis* seedlings to Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} stress [J]. *Chinese J Applied Ecology*, 2002, **13**(4): 510-512.
- Xu QS, Shi GX, Hao HQ. 2001. Effects of Cd, Cr(VI) single and combined pollution on chlorophyll content and antioxidant enzymes systems of *Potamogeton crispus* Linn [J]. *Guizhou*, **21**(1): 87-90.
- Wang AG, Luo GH. 1990. Quantitative relation between the hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants[J]. *Plant Physiol Commun*, **6**: 55-57.
- Vitória AP, Lea PJ, Azevedo RA. 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues[J]. *Phytochemistry*, **57**: 701-710.
- Dixit V, Pandey V, Shyam R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad)[J]. *J Exp Bot*, **358**(52): 1101-1109.
- Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH, *et al.* 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Plant Sci*, **127**: 139-147.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, *et al.* 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants[J]. *J Exp Bot*, **52**(364): 2115-2126.
- Aravind P, Prasad MNV. 2003. Zinc alleviated cadmium induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.; a free floating freshwater macrophyte[J]. *Plant Physiol Biochem*, **41**: 391-397.
- Schützendübel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization[J]. *J Exp Bot*, **53**(372): 1351-1365.
- Fang YZ, Zheng RL. 2002. Theory and Application of Free Radical Biology[M]. Beijing: Science Press, 340-342.
- Romero-Puertas MC, McCarthy I, Sandalio LM, *et al.* 1999. Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes[J]. *Free Radical Research*, **31**: 25-31.
- Pastori GM, Grill VS. 1992. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought resistant maize strain[J]. *Plant Cell Physiol*, **33**: 957-961.
- Schützendübel A, Nikolova P, Rudolf C, *et al.* 2002. Cadmium and H_2O_2 -induced oxidative stress in *Populus x canescens* roots[J]. *Plant Physiol Biochem*, **40**: 577-584.