强 MAR 的分离及其体内外功能鉴定

张可伟 王健美 杨国栋 郭兴启 温孚江 崔德才 郑成超*

(山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018. * 联系人, E-mail: cczheng@sdau.edu.cn)

摘要 将 MAR(matrix attachment region)构建到外源基因表达盒两侧可以促进外源基因的表达克服基因沉默. 用 PCR 方法从烟草和拟南芥中分离到 4 个新的 MAR 序列(TM2, TM3, AM1 和 AM2), 以水稻悬浮细胞为材料, 提取大量细胞核制备核基质, 以已发表的 MAR(TM1)为对照, 对 4 个新 MARs 序列进行体外结合实验. 结果表明 TM2 和 TM3 与核基质的结合能力强于已知 MAR 序列. 将 4 个新 MARs 和对照分别顺向构建到表达载体 pBI121 *gus* 基因表达盒两侧, 用农杆菌介导法转化烟草, 获得转基因植株. 对转基因植株体内 GUS 酶活性检测表明, TM1, TM2, TM3 和 AM1 均能使外源基因表达增强, 其中 TM2 增强 5 倍, TM1 增强 1.5 倍, TM2 增强效果强于对照 TM1. 表明分离到一个新的强 MAR, 可以用于高效表达载体的构建. 对 5 个 MARs 的序列特征、体外结合能力及外源基因表达影响三者之间的关系进行了分析, 并对获得的强 MAR 在植物基因工程中的应用进行了讨论.

关键词 MAR 分离 核基质 体外结合 β -葡萄糖醛酸酶 外源基因表达 高效表达载体构建

核基质是参与细胞核组成的蛋白质结构, 推测其与基因转录、mRNA 成熟、基因重组和 DNA 复制等过程有关. 在细胞核中染色体 DNA 与核基质之间通过核基质结合序列(MARs)与核基质结合, 以利于细胞行使上述功能^[1]. 目前, 已有许多 MARs 从不同动植物和酵母中分离出来, 并对这些 MARs 与核基质的体外结合能力及其位于外源基因表达盒两侧时对外源基因表达影响等方面进行了研究, MARs 已被证明能在体外与核基质特异结合并能在体内增强外源基因的表达. Phi-van 等人^[2,3]证明来源于鸡溶菌酶的 MAR 可使外源基因表达增强 2 倍, 并能减少转基因个体间的表达差异; 李旭刚等人^[4]从豌豆中分离出的一段 MAR 可使外源基因表达增强 2 倍, 但未明显降低基因间的表达差异. 根据 MARs 与核基质的体外结合能力的强弱和体内增强外源基因表达能力的不同, 将 MARs 分为“强”, “中强”及“弱”MARs^[5]. 分离能在体内产生增强效果较好的强 MAR, 并以一定的方式构建高效表达载体是克服基因沉默的重要策略^[6]. MARs 的分离方法主要有两种: 一是 PCR 法分离, 另一种是从核基质上分离^[7,8]. 获得的 DNA 片段通过与核基质体外结合实验来验证是否为 MARs, 同时还可分析 MARs 与核基质结合能力的强弱, 但 MARs 对外源基因表达的增强作用最终要依赖于在转基因植株体内的鉴定^[9].

本研究用 PCR 方法从烟草和拟南芥中筛选到 4

个具有 MARs 序列特征的 DNA 片段, 以已鉴定功能的 MAR(TM1)作为阳性对照^[10], 与核基质进行体外结合实验. 实验表明 4 个新 MAR 与核基质有强弱不同的结合能力. 将新 MARs 和对照分别顺向连入 pBI121 *gus* 基因表达盒的两侧, 用农杆菌介导法转化烟草, 对转基因植株的 GUS 酶活检测结果表明, 新 MARs 在体内具有不同的增强效果. TM2^[1]增强外源基因表达的效果(5 倍)远强于已知 MAR(TM1)的增强效果(1.5 倍), 表明我们分离到一个强的 MAR 序列, 为进一步研制具有自主知识产权的高效表达载体提供了一个重要增强元件.

1 材料与方法

(i) 材料. 烟草 NC89(*Nicotiana tabacum* L cv NC89)、拟南芥(*Landberg erecta* L)种植在组织培养室内, 幼苗供 DNA 提取用, 圣稻 301 (*Oryza sativa* L cv Shengdao301)种子去壳后供细胞悬浮培养用.

(ii) MARs 的克隆. 依据 MARs 的特征序列设计 4 对富含 A/T 引物:

- 5'-TCGATTAAAAATCCCAATTA-3',
- 5'-TATTTTCAGAAGAAGTCCCC-3';
- 5'-GATACGTAAACAACGTGTAT-3',
- 5'-TATACTCTGGATCGGGCCG-3';
- 5'-CGATTGAGTATTACTTGTCT-3',
- 5'-GTTACAATGGTTGCCACTAG-3';

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-20-1572>

1) TM2 的核酸序列已在 GenBank 登录, 登录号为: AF373415

5'-TAAGAGGAGGAATGAGGAAG-3',
5'-GTGGGCTTTTGATTAGTAT-3'.

用常规 PCR 方法进行扩增, PCR 获得片段后, 分别克隆于载体 pGEM-T Easy 中, 测序, 用 Primer 5.0 软件进行序列分析, 利用 GenBank 进行核苷酸序列同源性比较.

(iii) 水稻悬浮细胞系细胞核的提取. 参考叶和春^[11]的方法于 AA 液体培养基中建立水稻悬浮细胞系. 细胞核的提取是在 Masuda 等人^[12]方法的基础上优化. 取 10 mL 培养至第 7 天的悬浮细胞(细胞体积), 在 20 mL 含 2%纤维素酶 RS, 1%离析酶和 0.2%果胶酶 Y-23 (Yakult Honsha, Tokyo, Japan)的酶解液中处理, 用全玻璃匀浆器匀浆, 研磨至单一细胞, 通过 83, 22 和 15 μm 的不锈钢网过筛核的粗悬液, 在 5000 $\times g$ 下离心 20 min, 收集沉淀, 用 60%和 30%的 Percoll 1000 $\times g$ 不连续密度梯度离心, 收集沉淀. 按每毫升 $A_{260\text{ nm}}$ 为 15 悬浮于 2 ~ 4 mL 保存液中, 液氮冷冻, -80°C 保存. 提取过程中用相差显微镜来鉴定提取细胞核的纯度和产量.

(iv) 核基质的制备与体外结合实验. 核基质的制备参考 Nomura 等人^[8]的方法. 将储存的核融化, 收集核, 加入 *EcoR* I 和 *Hind* III 两种限制性内切酶, 在 37°C 下轻摇处理 3 h, 然后在 16°C 下用 RNase (20 mg/L)消化 30 min, 再用含 2 mol/L NaCl 的高盐溶液抽提, 离心即可得核基质沉淀. 将样品与 1/4 体积的 DAPI(0.5 mg/L)混匀, 压片, 用 Olympus(AH2-RFL) 荧光显微镜观察照相, 在荧光显微镜下核基质由于大部分 DNA 被去除, 其荧光强度远弱于细胞核的发光强度. 体外结合实验参照 Hall 等人^[13]的方法. 将 200 ng MARs 克隆用相应的限制性内切酶酶切, 用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 或 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 末端标记切下的 MARs 序列和相应的空载体, 加入经超声波处理的长度约为 0.1 ~ 1.5 kb 的大肠杆菌基因组 DNA, 至终浓度 50 g/L 作为竞争性抑制剂, 与 $A_{260\text{ nm}}$ 相当于 3 的核基质在 400 μL 反应体系中 37°C 温育 8 h, 使 MARs 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, 苯酚/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 在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 然后用 TCA(三氯乙酸)固定, 干胶机干胶, X 射线放射自显影 3 h, 洗片. 每个样品在 X 射线片上呈现 4 条带, 即上清液中残留的载体片段, MAR 序列以及核基质结

合的载体片段, MAR 序列, 每条带的放射性强度用 LabworksTM Analysis Software Version 3.0 软件定量分析, 用 MAR 序列载体片段与核基质的结合率的比值来比较不同 MAR 序列的相对强弱.

(v) 植物表达载体的构建. Slatter 等人^[14]报道两个 MARs 顺向重复构建表达载体比反向重复构建表达载体更能增强外源基因的表达, 所以我们将 MARs 分别顺向插入 pBI121(图 1(a))表达盒两侧. 用 *EcoR* I 将 MARs 从质粒 pGEMMAR 上切下来, 一部分插入到碱性磷酸酶处理的 pBI121 上的 *EcoR* I 酶切位点, 获得质粒 pBI121MAR I (图 1(b)). 用 *gus* 上游引物 (ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCA) 和 MARs 的 3' 端特异引物通过 PCR 扩增来鉴别片段的插入方向. 筛选出正向插入 MAR 的表达载体 pBI121MAR I, 用 *Hind* III 酶切后再用碱性磷酸酶去磷, 然后将另一部分带有 *EcoR* I 黏性末端的 MAR 用 Klenow 酶补平, 连接 *Hind* III 接头, 经 *Hind* III 酶切后插入到 pBI121MAR I 的 *Hind* III 酶切位点产生 pBI121MAR II (图 1(c)), 用 35S 下游引物 (TGTTCCTCTCCAAATGAAAT)和 MARs 的 5' 端特异引物扩增来鉴别片段的插入方向, 得到一系列两侧均正向插入 MARs 的植物表达载体: pBI121-TM1MAR II, pBI121TM2MAR II, pBI121TM3MAR II, pBI121AM1MAR II 和 pBI121AM2 MAR II.

图 1 植物表达载体结构示意图

(a) 未加 MARs 的载体 pBI121, (b) 在 pBI121 *EcoR* I 位点插入 MAR 的载体 pBI121MAR I, (c) 在 pBI121MAR I *Hind* III 位点顺向插入 MAR 的载体 pBI121MAR II

(vi) 烟草转化及植株再生与筛选. 将 MARs 系列植物表达载体 pBI121TM1MAR II, pBI121TM2MAR II, pBI121TM3MAR II, pBI121AM1MAR II, pBI121AM2 MAR II 和不含 MAR 的对照 pBI121 通过冻融法转化农杆菌 LBA4404. 用叶盘法转化烟草, 在含有羧苄和卡那霉素的 MS 培养基上筛选抗性植株, 然后将其

移到生根培养基上生根,最后移栽到基质中在温室中长大.用 CTAB 法提取叶片基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,用 *gus* 基因引物 P1(ATGTTACGTCC-TGTAGAAACCCCA)和 P2(TTCCGCGCATAGTTAAAGAAAT)进行 PCR 扩增,检测 *gus* 基因的整合情况,转化的烟草植株中能扩增出 508 bp 的 *gus* 片段,而未转化的植株不能扩增出此片段.PCR 检测证明为阳性的植株用于 GUS 表达活性的定量测定.

(vii) GUS 表达活性定量测定. 按照 Jefferson^[15]的方法定量测定 *gus* 基因表达活性.取转基因烟草底部第 5 片叶片 150 mg,加入 500 μ L 提取缓冲液在研钵中研成匀浆,3000 $\times$ g 离心 10 min,收集上清液.在 1 mL 预热的反应缓冲液中(提取液中加入 1 mmol/L MUG)加入 20 μ L 上清液,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min 后取出 100 μ L 加入到 900 μ L 反应终止液中终止反应,用日立-850 型荧光分光光度计测定各样品 $E_{\lambda 365}/E_{\lambda 455}$ 值.蛋白质含量按 Bradford^[16]的方法测定,取上清液 20 μ L,用重蒸水定容至 4 mL,加入 1 mL 考马斯亮蓝溶液,测定 595 nm 光吸收值.用 4-甲基伞形酮(4-MU)的纳摩尔数与蛋白质含量及时间的比值(nmol $\cdot$ mg⁻¹ $\cdot$ min⁻¹)表示 GUS 活性.

2 结果

2.1 MARs 的克隆及序列分析

以烟草和拟南芥的基因组 DNA 为模板,利用人工合成的 4 对引物进行 PCR 反应,得到大小为 1001, 475 bp(烟草)和 812, 1066 bp(拟南芥)4 条具有 MARs 序列特征的 DNA 片段,分别命名为 TM2, TM3, AM1 和 AM2,它们均含有数目不等的 MARs 的特征性基序,初步确认它们是 MARs.利用 GenBank 进行核苷酸序列同源性比较发现, TM2, TM3, AM1 和 AM2 均是未在 GenBank 登录的未知功能的新 MARs 序列.4 个新 MARs 与对照 TM1 的序列特征分析见表 1,其中 A-box (AATAAAYAAA), T-box(TTWTWTTWTT), DNA 链解旋序列(AATATATTT 或 AATATT)和拓扑异

构酶 II 结合位点(GTNWAYATTNATNNR)按 Michalowski 等人^[5]的方法确定.

2.2 MARs 强弱的体外结合鉴定

MARs 强弱直接影响到染色质 Loop 环的形成,进而影响环内的基因转录效率^[6],因此,建立一个快速准确的 MARs 强弱鉴定方法对于 MARs 的有效利用至关重要.为了检测 5 个不同的 MARs 序列与核基质结合力的强弱,需要建立一个 MARs 与核基质结合的体外实验系统.我们采用放射性末端标记 MARs 片段和载体片段,然后与核基质进行竞争性结合的体外结合实验.从图 2 可以看出:(1)不管是 MARs 片段还是载体片段,如果在沉淀中信号强,在上清液中则信号弱;反之,如果在沉淀中信号弱,则在上清液中信号强.表明该体外结合实验系统是可靠的.(2)每一个 MAR 片段及其相应的载体片段与核基质结合的分子数量不同,用 LabworksTM Analysis Software Version 3.0 软件进行定量分析,其 MARs 序列、载体片段与核基质的结合率的比值分别是 TM1(3.08), TM2(5.81), TM3(6.15), AM1(3.01)和 AM2(1.71),其比值大小表明不同 MARs 片段与核基质结合的强弱,强弱顺序依次是: TM3 > TM2 > TM1 > AM1 > AM2.(3)作为对照的载体也与核基质发生一定程度的结合,这是由于载体中含有启动子和调控序列,它们与核基质蛋白也可能有一定的结合能力,但总的来看, MARs 片段与核基质的竞争性结合能力明显强于载体片段.

2.3 MARs 序列对转基因植株 *gus* 基因表达的影响

利用转基因植株检测不同表达载体的 GUS 活性高低是鉴定不同 MARs 功能强弱的最直接有效的方法.为此,我们利用农杆菌介导法转化烟草,获得了大量抗性植株,PCR 鉴定的阳性植株用于 GUS 活性检测.取转基因烟草底部第 5 片叶片参照 Jefferson^[15]方法,定量检测 GUS 表达活性.由于不同系列载体获得的转基因个体的数目不同,所以用于 GUS 酶活

表 1 5 个不同 MARs 序列的特征比较

MARs 名称	长度/bp	AT 含量/%	A-box 数目	T-box 数目	解旋基序数目	拓扑异构酶 II 结合位点数目
TM1	1165	73.3	1	0	6	0
TM2	1001	62.8	0	1	2	1
TM3	475	69.1	1	1	2	1
AM1	812	81.0	0	0	5	1
AM2	1066	75.9	0	0	6	1

图 2 5 个 MARs 与水稻核基质的体外结合
S 示上清液, P 示沉淀

检测的株数也不同,但检测株数均高于 15 株,能够较准确地反映外源 *gus* 基因的平均表达水平. 不含 MARs 的对照 pBI121 转化的烟草和 pBI121TM1MAR II 转化的烟草各检测了 23 株, pBI121TM2MAR II 转化的烟草检测了 29 株, pBI121TM3MAR II, pBI121-AM1MAR II 和 pBI121AM2MAR II 转化的烟草各检测了 16 株,未转基因的植株检测了 15 株. 结果发现,不同 MARs 序列对外源 *gus* 基因表达增强程度不同(图 3). 用 pBI121TM2MAR II 载体转化得到的烟草植株 GUS 活性最高,比未插入 MAR 序列的 pBI121 对照载体转化的植株 GUS 活性平均高 5 倍,最高单株高于未加 MAR 对照的平均值 26 倍; pBI121TM1-MAR II, pBI121TM3MAR II 和 pBI121AM1MAR II 比未插入 MAR 序列的 pBI121 对照载体转化的植株 GUS 活性平均高 1.5、1.35 和 1.3 倍; pBI121AM2-MAR II 载体转化植株的 GUS 表达活性没有明显的增强;未转基因的对照植株只能检测到微量的 GUS 活性,为本底活性. 从图 3 中还可以看到每个转基因群体各个株系之间 *gus* 基因表达强度不同,说明在外源基因两侧加入 MARs 虽然提高了外源基因的平均表达水平,但转基因个体之间的表达差异仍然存在,基因沉默现象未完全消除.

3 讨论

随着大量转基因植株的获得,人们发现外源基因沉默和外源基因表达量过低的问题普遍存在. 造成基因沉默原因很多,主要有甲基化、位置效应、共抑制、染色体包装方式及反式作用等^[17]. 如何克服基因沉默是完善转基因技术的关键. 近年来发现将 MARs 构建到表达盒两侧可以克服基因沉默增强外源基因表达, MARs 通过与核基质结合使外源基因形成 Loop 环,既可以使基因上游调控序列和基因启

动子相互靠近,又使环中的 DNA 序列靠近核基质,便于基因的启动子和增强子与 RNA 聚合酶和转录因子相互作用,减少其受周围染色质状态的影响,从而增强启动子的活性,提高基因转录水平^[6,18]. MARs 不仅可以使外源基因在当代稳定表达而且促进外源基因在后代中的稳定遗传^[19,20]. 所以 MARs 是一种很好的基因表达调控元件,分离具有良好增强效果的 MARs 并构建高效表达载体对于优化转基因技术有着重要意义.

本研究利用 MARs 的序列特征设计引物从烟草和拟南芥中分离得到 4 个具有 MARs 序列特征的 DNA 片段,利用 GenBank 同源性搜寻发现它们属于新的尚未注册的 DNA 序列. 因为 MARs 与核基质的结合具有很高的保守性^[7],我们用水稻的核基质来验证 MARs 与核基质的结合情况效果理想(图 2),表明不同生物种类的 MARs 与核基质是能够相互结合的,暗示 MARs 在转基因植物中的应用可能没有物种专一性,一个强 MAR 将具有广泛的应用价值. 体外结合实验结果表明有 2 个新 MARs 与核基质的结合能力强于 TM1 与核基质的结合能力,分析发现 5 个 MARs 序列含有数目不等的特征序列和不同的 A、T 含量(表 1). TM3 含有 T-box 和 A-box,与核基质的结合能力强于只含有 T-box 的 TM2 和只含有 A-box 的 TM1,更强于不含有 T-box 和 A-box 的 AM1, AM2,说明 T-box、A-box 与 MARs 结合核基质的能力关系密切,可以作为 MARs 与核基质结合的特征性序列. 而在本研究中解旋基序和拓扑异构酶 II 结合位点与核基质结合能力关系不明显,推测这两者与核基质结合能力较弱. 此外,AT 含量高是 MARs 的一个基本特征^[5,6],但本研究表明并不是 AT 含量越高越好,如 AT 含量高达 81% 的 AM1 与核基质的体外结合能力弱于

图 3 不同 pBI121MAR II 载体转基因植株的 GUS 活性检测
(a) 不含 MAR 的 pBI121 载体, (b)~(f) 含 MARs 的 pBI121 系列载体, (g) 不同转基因植株的平均 GUS 活性, 其中 35S, TM1, TM2, M3, AM1 和 AM2 分别指表达载体 pBI121, pBI121TM1MAR II, pBI121TM2MAR II, pBI121TM3MAR II, pBI121AM1MAR II 和 pBI121AM2MAR II 转化所得的烟草植株, CK 指未转基因的烟草植株

AT 含量为 69.1% 的 TM3. 说明 MARs 的序列特征和数目可以作为 MARs 序列的标志, 但还不能作为判断其与核基质结合强弱的标准. 为进一步揭示 MARs 的序列特征及其与核基质

体内外结合的确切关系，特别是筛选能够增强外源基因表达、减少位置效应的强 MARs 序列。我们将 5 个 MARs 序列分别顺向重复插入植物表达载体 pBI121 *gus* 基因表达盒的两侧，通过转基因植株来检测 MARs 对 *gus* 基因表达的影响。实验结果表明，TM1、TM2、TM3 和 AM1 分别使外源基因在烟草中稳定表达增强 1.5、5、1.35 和 1.3 倍(图 3)。MAR 对外源基因的增强效果与核基质结合能力存在一定的相关性，结合能力较强的 TM2 增强效果(5 倍)最明显，与核基质结合能力最弱的 AM2 几乎没有增强效果，但是与核基质结合能力最强的 TM3 的增强效果(1.35 倍)却不及结合能力较弱的对照 TM1(1.5 倍)，说明体外结合强度是 MARs 体内作用的必要条件而不是充分条件。实验中还发现尽管 TM1、TM2、TM3 和 AM1 可以使外源基因平均表达水平提高，但转基因个体之间的表达差异仍然存在，基因沉默现象未完全消除。这种现象对大多数 MARs 来讲较为普遍^[4,10]。

综合上述结果，我们认为可以利用体外结合实验初步鉴别 MARs 与核基质的结合强弱，筛选结合能力强的 MARs 构建植物表达载体，通过转基因在体内鉴定 MARs 对外源基因表达的影响来筛选强 MARs。在本研究中我们利用此方法从烟草中分离得到新 MAR(TM2)可以使外源 *gus* 基因在烟草植株中稳定表达活性提高 5 倍，远高于 TM1 使外源 *gus* 基因在烟草植株中稳定表达的增强效果。对照 TM1 在本实验系统中使外源基因增强表达 1.5 倍，类似 Allen 等人^[9, 10]报道的结果。目前，我们正在将含有 TM2 的表达载体转化拟南芥以进一步证明其在异源生物中的增强效果，相信有关 MARs 转基因植株的分子研究不仅为基因工程产业化提供高效表达载体，而且也会有助于 MARs 作用机制的阐明。

致谢 本工作为国家转基因植物研究与产业化专项(批准号：J99-A-038)和国家自然科学基金(批准号：39970075)资助项目。

参 考 文 献

1 Bereney R, Jeon K W. Nuclear Matrix Structure and Functional Organization. San Diego: Academic Press, 1995. 22~38

2 Katsuya S, Misa T, Goshima S, et al. Presence of an SAR-like sequence in junction regions between an introduced transgene and genomic DNA of cultured tobacco cells: its effect on transformation frequency. Plant J, 2001, 26(4): 375~384

3 Phi-van L, Strätling W H. Dissection of the ability of the chicken lysozyme gene 5' matrix attachment region to stimulate transgene

expression and to dampen position effects. Biochemistry, 1996, 35: 10735~10742

4 李旭刚, 朱祯, 徐军望, 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(3): 230~237

5 Michalowski S M, Allen G C, Hall G E, et al. Characterization of randomly-obtained matrix attachment regions (MARs) from higher plants. Biochemistry, 1999, 38: 12795~12804

6 Spiker S, Thompson W F. Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants. Plant Physiol, 1996, 110: 15~21

7 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

8 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

9 Allen G C, Spiker S, Thompson W F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. Plant Mol Biol, 2000, 43: 361~376

10 Allen G C, Hall G Jr, Michalowski S, et al. High-level transgene expression in plant cells: Effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. The Plant Cell, 1996, 8: 899~913

11 叶和春. 水稻细胞悬浮培养及再生植株的研究. 植物学报, 1984, 26: 52~59

12 Masuda K, Takahshi S, Nomura K, et al. A simple procedure for isolation of pure nuclei from carrot embryos in synchronized cultures. Plant Cell Rep, 1991, 10: 329~333

13 Hall J R, Allen G C, Loer D S, et al. Nuclear scaffold and scaffold-attachment regions in higher plants. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9320~9324

14 Slatter R E, Dupree P, Gray J C. A scaffold-associated DNA region is located downstream of the pea plastocyanin gene. Plant Cell, 1991, 3: 1239~1250

15 Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5: 387~405

16 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: 248~284

17 Fagard M, Vaucheret H. (Trans) Gene silencing in plants: how many mechanisms? Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000, 51: 167~194

18 Breyne P, Montogu M, Gheysen G. The role of scaffold attachment region in the structure and functional organizational of plant chromatin. Transgenic Res, 1994, 3: 195~202

19 Ülker B, Allen G C, Thompson W F, et al. A tobacco matrix attachment region reduces the loss of transgene expression in the progeny of transgenic tobacco plants. Plant J, 1999, 18(3): 253~263

20 Vain P, Wirlanf B, Kohli A, et al. Matrix attachment regions increase expression levels and stability in transgenic rices and their progeny. Plant J, 1999, 18: 233~242

(2002-04-23 收稿, 2002-08-02 收修改稿)