

利用核质结合区(MAR)增强外源转基因表达的研究进展

康定明 贺舒雅 郭二艳 叶凌凤 关建军

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 核质结合区(Matrix attachment region, MAR)是真核细胞染色质中与核基质结合的一段 DNA 序列。当大多数染色质蛋白和其他 DNA 被切割降解后, MAR 仍能和核基质结合,或者能在竞争性 DNA 片段存在的条件下,在体外与纯化的核基质结合。将 MAR 构建于外源基因两侧时,能够增强外源基因的高效稳定表达,减少基因沉默。笔者评述了近年来应用 MAR 序列提高外源转基因在受体植物中表达的最新进展,分析了存在的问题。同时,对如何进一步应用 MAR 于转基因作物,提高外源转基因的功能表达进行了展望。

关键词 核质结合区; 转基因; 基因表达

中图分类号 Q 943; S 033

文章编号 1007-4333(2013)05-0226-07

文献标志码 A

New progresses in enhancing the transgenes expression with incorporating matrix attachment regions into expression construct

KANG Ding-ming, HE Shu-ya, GUO Er-yan, YE Ling-feng, GUAN Jian-jun

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Matrix attachment regions (MARs) are operationally defined as DNA elements bound to the nuclear matrix after chromatin proteins and other DNAs are degraded, or that bound to extracted nuclear matrix in the presence of competitive DNAs *in vitro*. When constructing the MARs into a vector in neighborhood with transgenes, this frame usually results in enhancing efficient and stable expression of transgenes, or minimizing the gene silencing. This review will comment the advances in the effect of the MARs derived from different species and its variant ways of vectors in transgenic plants. We classify the successful events and potential problems published in recent years. We finally propose the further application of MAR to modify the transgenes expression in the crop improvement.

Key words matrix attachment region; transgene; gene expression

转基因技术的研究和应用,既需要研究开发出高效、易操作和低成本的外源基因遗传转化技术,也要求使已经整合到转基因受体生物染色体上的外源转基因能够高水平的稳定表达,以在受体生物上实现外源基因的功能。但是,植物的遗传转化这种技术常受到转基因表达量差异的影响,外源转基因进入受体后常常发生表达量降低,甚至转基因沉默等现象,并没有达到预期表达水平。据报道,外源基因插入受体染色的位置效应,转录中和转录后的基因

沉默等影响了外源基因在转基因植物中表达效率^[1]。目前,提高外源基因表达主要采用选择强的启动子和诱导型启动子,使用受体生物偏爱的密码子,选择强的终止子,使用受体生物偏爱的密码子,使用增强子等方法;也可以选择适宜的转化方法,用叶绿体作为转化受体,筛选单拷贝后代植株;使用信号肽,使用病毒编码蛋白;外源基因的修饰与改造,消除 DNA 甲基化的影响,包括使用核质结合区序列(MAR 序列)等^[2-3]。而研究证实,将 MAR 与外

收稿日期:2013-02-15

基金项目:农业部转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08015-003A)

第一作者:康定明,教授,博士生导师,主要从事转基因生物工程研究, E-mail: kdm@pku.edu.cn

源基因作为共同单元,构建表达载体可以不受物种限制,并具有操作简单效率高的特点,能够使外源基因整合到细胞基因组当中,降低基因沉默并在当代稳定表达,降低表达差异,促进外源基因在后代的稳定遗传,赢得重视^[4-5]。笔者分析已报道的有关MAR序列应用的成功事例,总结了不同物种来源的MAR序列功能特点,分析了在利用MAR序列提高外源基因表达中应该注意的问题,以及利用MAR序列优化载体构建方案的选择标准,最后对该技术的现状与未来前景做了简要评述。

1 MAR序列的特点

MAR序列是染色质上的一段与核基质结合的DNA序列,富含AT区,分布间隔为5~200 kb, MAR的长度一般为300~1 000 bp,少数可达几个kb,常含一些特征基序,如T-box(TTWTWTT-WTT)、A-box(AATAAAYAAA)、能形成蛋白质识别位点的松散DNA、弯曲DNA、酵母自主复制序列ARS、拓扑异构酶II识别位点等。在水稻细胞分离的MAR序列NB-2中还发现4个独特的能形成发夹环结构的区段,预示着MAR可能有一定的种属特异性^[6-7]。Cornelis等^[8]对拟南芥的7段MAR序列进行比对时发现,这7段MAR序列中都有一个类似大小为21 bp的序列元件。这个元件由TAWAWWW和AWWRTAANNWWG组成,是2段在空间上紧密结合的序列元件,两者被几个碱基隔开,或部分重叠在一起,这段21 bp序列作为识别拟南芥中MAR序列的标志(MRS)。同时还发现MRS是拟南芥MAR序列所特有的,平均每隔10 kb就出现一次,但MRS并不参与MAR序列与核基质的结合。所以,MRS不是MAR序列与核基质结合所必需的,而可能是MAR序列完成其他功能所必需的。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,但往往变化较大,不能作为鉴定MAR的特征性元件^[2]。

除了上述的一般特征外,不同的MAR还具有其特殊的序列或结构特征。一些基因两侧的MAR有着不同的属性,玉米*Adh1*基因附近区域的MAR与核基质结合时能形成7-70 kb的染色质环,在这

个染色质区域*Adh1*基因5'端的MAR对核酸酶的酶解尤其敏感,而它对*Adh1*基因的表达调控又是必需的。而西红柿*Hsc 80*基因的5'-MAR与3'-MAR有着截然不同的结合属性。 β -菜豆蛋白基因5'-MAR与3'-MAR却有着截然不同的调节属性^[9]。

总体说,定义MAR序列有2个标准:1)可以和核基质结合的内源DNA片段,当大多数DNA被内切酶切割降解后,MAR仍能与核基质相结合;2)能在竞争性DNA片段存在的条件下,在体外与纯化的核基质结合。对于MAR序列的鉴定目前主要看该序列能否与核基质发生特异性结合^[10]。

2 MAR序列的功能与在转化载体中的位置及方向

2.1 MAR序列的功能

MAR可以帮助生成和维持一片开放的染色质区域,通过与核基质结合使外源基因形成Loop环,而MAR处于Loop环的边界处,每一个Loop环形成一个拓扑上独立的区域,环的大小不影响其对外源基因的表达,染色体凝缩与DNA转录在此区域不受干扰独立进行,从而造成一种分割作用,使每个转录单元保持相对的独立性,从而使环内基因免受周围染色质的影响^[11]。Loop结构模型暗示MAR序列可能作为一个边界元件,阻止染色体的凝缩区域或外源基因附近的调控元件对外源基因表达产生影响,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,降低其受周围染色质状态的影响,从而增强启动子的活性,利于提高基因的转录水平,减少基因沉默^[12-13]。例如 γ -RV受到表观遗传效应(DNA甲基化和组蛋白修饰)的影响,使得它的功能产生负面作用。Micheal等^[14]尝试利用染色体边界原件例如MAR解决出现的基因沉默现象,结论表明MAR对提高外源基因的功能方面体现出不同程度的稳定性和有效性。含有人类 β -干扰素核基质结合区IFN-SAR的逆转录病毒结构可以克服后生压力,产生统一的高水平基因表达^[15]。Burkov等^[16]的研究表明在转基因小鼠中,只有含MAR的*hGM-CSF*基因

可以检测到在乳腺上皮细胞有表达。杜氏盐藻中含有 MAR 载体的氯霉素乙酰转移酶 CAT 的表达量比不含 MAR 的高出 4.5 倍,而且转基因植株个体间的表达差异降低了 3 倍^[17]。某些 MAR 序列的功能会受到启动子的影响,例如在玉米转基因植株中,以 WP 为启动子的 *Adh1*-MAR 并不影响 GUS 基因的表达,但是 *Rsyn7* 做启动子时却增强了 GUS 转基因植株的表达^[18]。

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。第 2 类 MAR 序列通常位于基因启动子区和上游调控序列附近,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 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^[19]。在某些大片段基因的内含子区域也存在 MAR 序列,Youn 等^[20]在精子穿孔蛋白基因的第 2 个内含子上也发现了 MAR 序列。在人染色体内发现的 40 个 MAR 中 36% 位于基因内的内含子上^[21]。

MAR 和核基质之间的相互作用具有进化上的保守性,MAR 可以与异源的核基质相互作用^[22]。张伟等^[23]用水稻的核基质来验证来自烟草和拟南芥的 MAR 序列与核基质的结合情况效果理想,Lili Geng 等^[24]分析了 MAR 对 *cry8Ea1* 基因活力的影响,结论表明将从烟草中分离的 MAR 序列构建到载体两侧后 *cry8Ea1* 基因在花生根中的平均表达水平明显提高。李旭刚等^[25]的研究结果显示来源于豌豆的 MAR 可以在烟草中提高外源基因的表达水平,表明不同生物种类的 MAR 与核基质是能够相互结合的,但并不是所有的 MAR 都能够与异源的核基质相互作用,如人 β -珠蛋白基因中的 MAR 与烟草核基质之间的结合能力就很弱。

2.2 转化载体中 MAR 序列的常用位置与方向

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 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 异源时则不能提高转基因的表达水平^[26],其原因还有待于进一步探索。

将 MAR 置于外源基因表达框两侧,2 段 MAR 序列成正向重复的效果要好于反向重复的,因此在构建植物表达载体时使 2 段 MAR 序列成正向重复^[27],能减少位置效应,抑制转基因沉默,对外源基因的表达具有很强的增强作用,或者可以降低不同转基因个体间表达水平的差异。这也许与 MAR 的作用机制有关,与单侧连接 MAR 的外源基因相比,两端顺式连接 MAR 的外源基因与核基质的结合更稳定,可以富集更多的调控因子促进转录,所形成的空间拓扑结构也更有利于环内转录。黄慧珍等^[28]从烟草基因组中克隆到 2 条新的 MAR 片段 M14 和 M17,单侧连接 M14 和 M17 的转化植株,其平均 GUS 活性分别提高 1.56 和 2.43 倍,两侧顺式重复连接 M17 的转化植株中 GUS 活性可提高 3.14 倍。说明单侧连接 MAR 能提高外源基因表达水平,而两侧顺式连接 MAR 对外源基因表达的增强作用更明显。同时还发现,M14 和 M17 虽然来源相同,但因其序列和结构不同,对外源基因表达的改善作用也不相同,说明不同的 MAR 对转基因表达的调节作用并不相同。大部分研究者构建的表达载体,都是在表达盒的两侧或者是在表达盒的上游连接 MAR 片段,它们对转基因表达作用所表现出来的大多是明显的促进效应,但在转基因下游,MAR 在一定程度上能抑制外源基因的表达水平。张俊河等^[29]研究表明转基因下游 β -珠蛋白 MAR 在一定程度上能抑制外源基因的表达水平。另外,为了提高目的基因的表达水平,针对不同的物种,构建方式也不尽相同。对于大豆和豌豆材料来说,将 MAR 构建到目的基因单侧或两侧都可以促进 GUS 基因活性表达,但在拟南芥当中,双侧构建的效果明显好于单侧构建,在玉米材料中 MAR 则必须放在两侧才能起作用^[11]。

3 MAR 序列对转基因植株的其他影响

MAR 对植物转基因的表达研究尚处于初始阶段。Breyne 等^[19]最先将 MAR 用于转化植物的研究中,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 在不同转基因株系间的表达略有提高,未能提高其总体表达水平,甚至有些转基因株系的 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。源于大豆热激蛋白基因相邻的 MAR 和源于拟南芥的 MAR 使 GUS 在转基因烟草植株中的表达量增加了 5~10 倍,但 MAR 也未降低不同转基因株系间的表达差异,转基因的表达水平也没有表现出“拷贝数依赖性”^[23]。Han 等^[30]证明在转基因杨树中烟草 MAR 序列的存在可使 GUS 表达量明显提高,并且转基因杨树中的效果好于转基因烟草中的。目前为止,统计已发表的 MAR 序列(表 1),有许多是动物的,包括果蝇、家蚕、鸡和哺乳动物细胞等;也有来自植物的,如豌豆、黄豆、拟南芥、烟草和番茄。烟草、拟南芥、杨树和玉米中的 MAR 序列已经被证实有增强外源基因表达的作用。表 2 是报道的已克隆的 MAR 序列在作物上的应用情况及作用。

表 1 总结了已经报道的从不同物种上发现的 MAR 序列数量,可见 MAR 序列物种来源的广泛性。从微生物、动物、植物和人类基因组中都分离和鉴定了大量 MAR 序列,从已发表的结果可以发现,目前在人类基因组中发现的 MAR 序列数量最多,其次是果蝇和小白鼠,而植物中单子叶植物例如玉米、水稻和高粱中发现的 MAR 序列数量多于双子叶植物,如大豆和烟草等。而在微生物中发现的 MAR 较少,只有在人类乳头状瘤病毒中发现的较多。

从表 2 总结的内容,可以发现 MAR 序列来源广泛,如大豆热激蛋白基因,人 β -球蛋白基因和鸡溶源酶基因等都含有 MAR 的结构序列,转基因研究多是烟草,验证基因表达使用的是 GUS 报告基因,主要采用农杆菌介导法,也有采用基因枪法转化。已报道的结果中 MAR 序列大都是从双子叶植物即烟草、拟南芥和大豆等中克隆。总体上看,不同物种来源的 MAR 在不同程度上提高外源基因的稳定表达,减少基因沉默。

表 1 已发现的 MAR 序列

Table 1 Matrix attachment regions shown in the publications

来源 Origin	物种 Species	MAR 数量 Number of MAR
高等动物 Higher Animal	人类	185
动物 Animal	牛	1
	蚕蛾	1
	爪蛙	1
	兔子	2
	羊	2
	中国仓鼠	9
	鸡	10
	泥鳅	16
	老鼠	16
	果蝇	80
	小白鼠	144
植物 Plant	马铃薯	1
	四季豆	2
	矮牵牛	2
	四棱豆	2
	豌豆	4
	番茄	5
	小麦	6
	大豆	8
	拟南芥	13
	烟草	18
	油菜	20
	水稻	23
	高粱	23
	玉米	40
微生物 Microorganism	曲霉菌	1
	小鼠乳腺肿瘤病毒	2
	巴尔病毒	2
	猿猴病毒	2
	红褐肉座菌	3
	酵母菌	5
	土壤线虫	6
	人类乳头状瘤病毒	10

表2 MAR序列在转基因植株上的作用
Table 2 Effects of MAR in transgenic plants

转基因植物 Transgenic plant	转化方法 Transgenic method	转化载体结构 Structure of transgenic vector	MAR来源 Origin of MAR	对目的基因表达的影响 Effect to target gene
烟草 Tobacco	农杆菌	-MAR-P35S-GUS-NOS-MAR-	豌豆	平均表达水平比对照提高了2倍,最高的可达5倍 ^[31]
烟草 Tobacco	基因枪	-MAR-GUS-MAR-	烟草	在稳定的转基因细胞中GUS表达量提高60倍, T ₀ 代转基因植株GUS基因的平均表达量比对照提高了2倍 ^[32]
烟草 Tobacco	农杆菌	-P35S-GUS-NOS-MAR- -MAR-P35S-GUS-NOS-MAR-	TM1 TM2:烟草 AM1 AM2:拟南芥	TM1, TM2, TM3和AM1均能使外源基因表达增强,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 ^[23]
烟草 Tobacco	基因枪	-MAR-GUS-MAR-	烟草 <i>R67</i> 基因	表达量比对照提高140倍;拷贝数低于10个拷贝, MAR可以降低同源抑制,拷贝数高时则不能 ^[33]
烟草 Tobacco	农杆菌	-MAR1-GUS-MAR1- -MAR2-GUS-MAR2-	MAR1:豌豆 MAR2:拟南芥	MAR未显著降低转化体子代间的变异;两端有拟南芥MAR的转基因植株的表达量提高了5-10倍 ^[26]
烟草 Tobacco	农杆菌	-MAR-GUS-MAR-	烟草	表达量提高60倍,转化体间的变异稍有降低;未发现表达量与拷贝数有关,高拷贝有同源抑制现象 ^[34]
烟草 Tobacco	农杆菌	-MAR-P35S-GUS-MAR- -MAR-NOS-NPTII-MAR-	鸡溶源酶基因 A 元件	转基因表达水平提高了4倍;转化体间的变异有所降低,但未表现出拷贝数效应 ^[35]
烟草 Tobacco	农杆菌	-MAR-PRO- β -phaseolin gene- NOS-MAR-	烟草	转化植株稳定表达;转化体间的变异也有所降低 ^[36]
烟草 Tobacco	农杆菌	-MAR-GUS-MAR-	大豆热激蛋白基因	转化体间的变异没有变化;基因拷贝数的增加能提高基因表达水平,即表现拷贝数效应 ^[37]
烟草 Tobacco	农杆菌	-MAR1-GUS-MAR1- -MAR2-GUS-MAR2- -MAR3-GUS-MAR3-	MAR1:果蝇 <i>ftz</i> MAR2:人 β -球蛋白基因 MAR3:大豆	转化体间的变异降低了20倍;GUS活性有所提高,位置效应降低 ^[38]
烟草 Tobacco	农杆菌	-nptII-M14-P35S-GUS-TNOS- -nptII-M17-P35S-GUS-TNOS- -nptII-M17-P35S-GUS-M17-TNOS-	M14M17:烟草	GUS的表达水平与对照相比都有了明显提高;双侧效果优于单侧,可使GUS活性增强3.14倍 ^[28]
兰花 Orchid	基因枪	-MAR-GUS-INT-MAR- -MAR-NPTII-MAR-	烟草	转化植株稳定表达 ^[39]
甘蔗 Sugarcane	农杆菌	-MAR-CAM35S-HYG-TNOS- UBI-AVAC-TNOS-MAR-	未知	经筛选鉴定获得阳性克隆,为开展植物抗虫基因工程奠定基础 ^[40]
水稻 Rice	农杆菌	-MAR1-GUS-MAR1- -MAR2-GUS-MAR2-	MAR1:烟草 <i>R67</i> 基因 MAR2:酵母 <i>ARS-1</i> 元件	<i>R67</i> 和 <i>ARS-1</i> 的MAR都显著提高了转基因的表达水平,减少了转基因沉默现象 ^[41]

4 小结与展望

当前,现代生物技术在全球得到迅猛发展,取得了令人瞩目的成就,但同时也并没有减弱公众对生物安全,尤其是对转基因生物安全,特别是对抗生素选择标记进入体内给人体健康带来危害的可能性,以及除草剂基因对物种多样性与生态安全的威胁等的疑虑和关注^[42]。双 T-DNA 转化载体的运用^[43],以及非抗生素选择标记和定位表达特异启动子的应用就是为实现在转基因植物及器官有选择地表达转基因产物。实际上,有许多对转基因生物安全的疑虑是来自目前转基因生物技术的理论和机制研究尚不清楚的地方,比如携带有外源转基因的 T-DNA 整合到受体植物染色体上的机制, T-DNA 的随机与偏爱插入受体植物染色体的影响因素,实现 T-DNA 在转基因植物的有效定点整合的方法。再者,目前还无法实现外源转基因在受体植物表达量的稳定调控。然而,这些问题却不仅与转基因生物安全密切相关,也关系到转基因品种优良特性的质量和持续时间。

已有报道指出,在动物基因的表达调控中, MAR 在转基因的稳定表达中具有重要作用^[44],一般与核基质区结合的除了转录因子,也包括和转录因子 AT 序列结合的 SATB 结合蛋白,对基因转录调控和染色质重构发挥作用^[45]。已证明,在脊椎动物中,基因表达区域并不是按照其表达模式进行,通常在不同类型和不同发育阶段的细胞中发现同一基因表达,说明它们分享染色体的某一特殊区段。有报道表明,通过进化和自然选择,动物基因组中存在基因的边界区,绝缘子等非编码基因调控元件,若干基因调控包括 MAR 和增强子等^[46],许多不同基因组序列可汇集在一起,转换为相似的功能,作用于一个遗传位点,促进其表达,而又不影响自身的表达和附近位点的干扰,依次可利用设计新的高效转基因策略,以确保外源基因在基因组中异位高效表达^[47]。外源转基因在受体植物的表达与调控是相当复杂的,前述已分析, MAR 在转基因植物的稳定表达中具有显著作用,已在转基因烟草和水稻上得到证明。但在不同转化事件之间增强表达作用的稳定性和一致性上有待改善。下一步建议在理论研究上,争取在植物中发现和克隆更多的 MAR 序列,并加强对 MAR 及与其共同作用于基因表达调控的基因组元件的研究,而且随着 DNA 甲基化、乙酰化和

小分子 RNA 等表观遗传作用对基因表达作用的深入认识,基因组深度测序技术的进步,深入揭示在 MAR 基础上的基因组微序列组成对基因表达调控的作用^[48]。应用上加快在不同转基因植物中验证不同物种的 MAR 对转基因稳定表达的作用,以期在增强转基因稳定表达方面,能有目的地选用和构建应用 MAR 序列的高效稳定表达转化载体,提高其在转基因植物稳定表达上的作用与应用范围。

参 考 文 献

- [1] Singer S D, Liu Z, Cox K D. Minimizing the unpredictability of transgene expression in plants; The role of genetic insulators [J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(1): 13-25
- [2] Stief A, Winter D M, Stratling W H, et al. A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity [J]. *Nature*, 1989, 341: 343-345
- [3] Ali Ramezani, Robert G, Hawley. Strategies to insulate lentiviral vector-expressed transgenes [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 614: 77-100
- [4] Miguel F C, Butaye K, Goderis I, et al. The influence of matrix attachment regions on transgene expression in *Arabidopsis thaliana* wild type and gene silencing mutants [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 63(4): 533-543
- [5] Wilson R H, Coverley D. Relationship between DNA replication and the nuclear matrix [J]. *Genes Cells*, 2013, 18(1): 17-31
- [6] 王健美, 张可伟, 叶文静, 等. MAR 序列研究进展 [J]. *山东农业大学学报*, 2002, 33(2): 244-247
- [7] 张杰道. 烟草 TM2 MAR 序列作用机理研究及其应用 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2008
- [8] Cornelis M, Rob W, Gerbienne M, et al. Analysis of the chromatin domain organization around the plastocyanin gene reveals an MAR-specific sequence element in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(19): 3904-3911
- [9] 刘峰, 许明, 赵伊英, 等. 核基质结合区与转基因植物的基因表达 [J]. *福建农林大学学报*, 2003, 32(1): 93-97
- [10] 冀芦沙. 烟草核基质结合序列 TM6 在转基因植物中的功能鉴定及机理分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2010
- [11] Xu M, Zhang X, Zhang L, et al. Functional analysis of BnMAR element in transgenic tobacco plants [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 38(5): 3285-3291
- [12] Maximova S, Miller C, Antúnez de Mayolo G, et al. Stable transformation of *Theobroma cacao* L. and influence of matrix attachment regions on GFP expression [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(9): 872-883
- [13] Harraghy N, Buceta M, Regamey A, et al. Using matrix attachment regions to improve recombinant protein production [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 801: 93-110
- [14] Michael Antoniou, Kristian Alsbjerg Skipper, Omer Anakok. Optimizing retroviral gene expression for effective therapies [J]. *Human Gene Therapy*, 2013, 24(4): 363-374

- [15] Moreno R, Martínez I, Petriz J, et al. The β -interferon scaffold attachment region confers high-level transgene expression and avoids extinction by epigenetic modifications of integrated provirus in adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2011, 17(3): 275-87
- [16] Burkov I A, Serova I A, Battulin N R, et al. Expression of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (*hGM-CSF*) gene under control of the 5'-regulatory sequence of the goat *alpha-S1-casein* gene with and without a MAR element in transgenic mice[J]. Transgenic Res, 2013(1): 1-16
- [17] Wang T, Xue L, Hou W, et al. Increased expression of transgene in stably transformed cells of *Dunaliella salina* by matrix attachment regions[J]. Appl Micro Biotechnol, 2007, 76(3): 651-657
- [18] Sidorenko L, Bruce W, Maddock S, et al. Functional analysis of two matrix attachment region (MAR) elements in transgenic maize plants[J]. Transgenic Res, 2003, 12(2): 137-154
- [19] Breyne P, Van Montagu M, Gheysen G. The role of scaffold attachment regions in the structural and functional organization of plant chromatin[J]. Transgenic Res, 1994, 3(3): 195-202
- [20] Youn B S, Lim C L, Shin M K, et al. An intronic silencer of the mouse perforin gene[J]. Mol Cells, 2002, 13(1): 61-68
- [21] Shaposhnikov S A, Akopov S B, Chernov I P, et al. A map of nuclear matrix attachment regions within the breast cancer loss-of-heterozygosity region on human chromosome 16q22. 1 [J]. Genomics, 2007, 89(3): 354-361
- [22] Tetko I V, Haberer G, Rudd S, et al. Spatiotemporal expression control correlates with intragenic scaffold matrix attachment regions (S/MARs) in *Arabidopsis thaliana* [J]. PloS Comput Biol, 2006, 2: 21
- [23] 张可伟, 王健美, 杨国栋, 等. 强 MAR 的分离及其体内外功能鉴定[J]. 科学通报, 2002, 20(4): 1572-1577
- [24] Lili Geng, Jing Chi, Changlong Shu, et al. A chimeric *cry3Ea1* gene flanked by MARs efficiently controls *Holotrichia parallela* [J]. Plant Cell Reports, 2013, 32(3): 1-8
- [25] 李旭刚, 路子显, 陈蕾, 等. 核基质结合区在转基因烟草中对转基因表达的影响[J]. 植物学报, 2001, 43(4): 405-408
- [26] LIU J W, TABE L M. The influences of two plant nuclear matrix attachment regions (MARs) on gene expression in transgenic plants[J]. Plant and Cell Physiology(Japan), 1998, 39(1): 115-123
- [27] 武冬梅, 陈创夫, 史芳芳, 等. 含有 MAR 序列的植物表达载体 PBI121-MARS 的构建[J]. 石河子大学学报, 2006, 24(4): 429-432
- [28] 黄慧珍, 王瑶, 陈士云, 等. 烟草 MAR 的分离及其功能分析 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 970-974
- [29] 张俊河, 张艳芳, 王芳, 等. 转基因下游 MAR 在稳定转化的 CHO 细胞中对基因表达的调控作用[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(18): 8359-8361
- [30] Han K H, Ma C, Strauss S. Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequency and transgene expression in poplar[J]. Transgenic Res, 1997, 6(6): 415-420
- [31] 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[J]. 中国科学, 2001, 31(3): 230-237
- [32] Ulker B, Allen G C, Thompson W F. A tobacco matrix attachment region reduces the loss of transgene expression in the progeny of transgenic tobacco plants [J]. Plant Journal, 1999, 18(3): 253-263
- [33] 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 [J]. Plant Cell, 1996, 8(5): 899-913
- [34] Spiker S, Allen G C, Hall G E, et al. Nuclear matrix attachment regions (MARs) in plants; Affinity for the nuclear matrix and effect on transient and stable gene expression [J]. Cell Bio Chem, 1995, 2: 93-100
- [35] Mlynarova L, Loonen A, Heldens J. Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region [J]. Plant Cell, 1994, 6(3): 417-426
- [36] Vander Geest A H M, Hall G E, Spiker S. The β -phaseolin gene is flanked by matrix attachment regions [J]. Plant Journal, 1994, 6(3): 413-423
- [37] Schöffl F, Schröder G, Kliem M. A SAR sequence containing 395 bp fragment mediates enhanced, gene-dosage-correlated expression of a chimaeric heat shock gene in transgenic tobacco plants [J]. Transgenic Res, 1993, 2(2): 93-100
- [38] Breyne P, Montagu M B van, Depicker A, 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
- [39] Yang J, Lee H J, Shin D H, et al. Genetic transformation of cymbidium orchid by particle bombardment [J]. Plant Cell Reports, 1999, 18(12): 978-984
- [40] 邓智年, 魏源文, 黄诚梅, 等. 杀虫基因高效植物表达载体的构建 [J]. 广西农业科学, 2010, 41(9): 886-888
- [41] Strissel P L, Espinosa R E, Rowley J D, et al. Scaffold attachment regions in centromere-associated DNA [J]. Chromosome, 1996, 105(2): 122-133
- [42] 曲瑛德, 陈源泉, 侯宇鹏, 等. 我国转基因生物安全调查 I: 公众对转基因生物安全与风险的认知 [J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(6): 1-10
- [43] 叶凌凤, 王映皓, 贺舒雅, 等. 无选择标记的植物转基因方法研究技术进展 [J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(2): 1-7
- [44] Harraghy N, Gaussin A, Mermod N. Sustained transgene expression using MAR elements [J]. Curr Gene Ther, 2008, 8(5): 353-66
- [45] 钱琰琰, 王慧君, 马端, 等. 特异 AT 序列结合蛋白 2 (SATB2) 的研究进展 [J]. 遗传, 2011, 33(9): 947-952
- [46] Eduardo Moltó, Almudena Fernández, Lluís Montoliu. Boundaries in vertebrate genomes; Different solutions to adequately insulate gene expression domains [J]. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 2009, 8(4): 283-296
- [47] Malonia S K, Sinha S, Lakshminarasimhan P, et al. Gene regulation by SMAR1: Role in cellular homeostasis and cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1815(1): 1-12
- [48] Sjakste N, Bielskiene K, Bagdoniene L, et al. Tightly bound to DNA proteins; possible universal substrates for intranuclear processes [J]. Gene, 2012, 492(1): 54-64