

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.03.040

莱茵衣藻外源基因整合特征分析及蛋白表达

刘芮均, 丁涛, 彭丝伦, 白林含

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 将衣藻表达载体 pSP108 转化莱茵衣藻细胞壁缺陷型藻株 CC-400, 通过接头 PCR 获得并分析阳性转化子中 *ble* 基因的侧翼序列发现: 外源基因的插入位点呈现随机性, 并且有些转化子中衣藻基因组和质粒序列发生断裂和重排. 通过间接 ELISA 分析外源蛋白表达量, 并结合外源基因整合状态时发现: 在 *ble* 基因启动子核心区域缺失的阳性转化子中, *ble* 可以利用自身基因启动子进行蛋白表达, 但表达量相比使用质粒载体 PSP108 上 RBCS2 启动子的表达量要低; 在部分启动子完整的阳性转化子中蛋白表达量低下, 可能与衣藻基因组大片段的缺失相关.

关键词: 莱茵衣藻; 整合特征; 外源基因表达; 博来霉素抗性基因

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)03-0655-06

The characteristic of transgene insertion and exogenous protein expression in *Chlamydomonas reinhardtii*

LIU Rui-Jun, DING Tao, PENG Si-Lun, BAI Lin-Han

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Transformation of the cell wall deficient *C. reinhardtii* CC-400 with the plasmid pSP108 was carried out. Adapter PCR analysis on flanking sequences of *ble* in positive transformants showed that: the foreign gene *ble* inserted randomly, plasmid sequences rearranged with nuclear genome sequences and fracture phenomenon occurred. ELISA was used to analyze the expression of foreign gene, combined with the gene insertion which indicated that. In the positive transformants of which promote was partially truncated, the promoter in the unknown gene can initiate the expression, but the level was lower than the RBCS2 promoter initiation. In the other transformants of which the promoter was complete, the protein expression level is low, may be due to the lacking of partial *C. reinhardtii* genome.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*; Integration characteristic; Expression of exogenous gene; Bleomycin resistance gene *ble*

1 引言

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 是带有两条鞭毛和一个占细胞总体积 40% 左右杯状叶绿体的真核单细胞生物, 隶属于绿藻门团藻目衣藻

属. 因为其遗传背景清楚, 便于进行遗传改造等特点广泛应用于细胞和分子生物学的基础研究中, 例如鞭毛运动、光合作用、叶绿体功能等^[1-3]. 由于衣藻培养方便, 生长速度快, 可以进行光合作用等优势成为了生物反应器的理想选择. 另外, 衣藻具有

收稿日期: 2017-04-29

基金项目: 国家自然科学基金(30970043); 国际科技合作专项(2015DFR31060)

作者简介: 刘芮均(1992-), 女, 陕西安康人, 硕士, 研究方向为微生物生物技术. E-mail: 15680683780@163.com

通讯作者: 白林含. E-mail: bailinhan@scu.edu.cn.

的翻译后修饰、细胞亚结构的靶向定位、重组蛋白分泌^[4-6]等特点,为其生产外源重组蛋白提供了便利的条件。

莱茵衣藻拥有细胞核、叶绿体、线粒体三套基因组,并且是唯一一套基因组均可遗传转化的光合单细胞生物.核基因组转化相比叶绿体转化来说具有转化效率高,性状可以稳定遗传,重组蛋白可以糖基化等特点.叶绿体转化一般采用同源重组的整合方式,通过在目的片段两端设计“同源臂”使其能够定点整合到衣藻叶绿体中.在核基因组转化中由于其非同源重组的整合方式,外源基因会随机整合到基因组上,断裂位点和整合位点无法确定,所以其整合状态及位置效应可能会影响下游蛋白的表达.目前非同源重组的整合机制还未完全清楚^[7],并且核遗传转化依然存在诸多问题,所以研究外源基因整合插入特征与蛋白表达的关系,对衣藻核遗传转化具有重要意义.本文拟将 pSP108 质粒载体转化莱茵衣藻细胞壁缺陷型藻株 CC-400,通过对外源基因侧翼序列的分析,解析外源基因整合特征及位点效应等因素对蛋白表达的影响,为核基因组遗传转化的深入研究和优化外源蛋白表达量提供实验基础和理论依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 藻株 莱茵衣藻细胞壁缺陷型 CC-400,购买于杜克大学藻种中心。

2.1.2 载体 pSP108 质粒由 Saul Purton 博士惠赠,pCold II 载体购买于大连宝生物公司。

2.1.3 培养基 TAP 培养基(1L):0.4g NH₄Cl; 0.1g MgSO₄·7H₂O; 0.045g 无水 CaCl₂; 0.094g K₂HPO₄; 0.062g KH₂PO₄; 0.245g MgSO₄·7H₂O; 2.423g Tris; 1mL Huther's trace element 以上溶液配置 1L 的培养基,用冰醋酸调 pH 7.0,固体培养基加 1.3%~1.4%琼脂。

2.1.4 主要试剂 1)博来霉素购买于 Invitrogen 有限公司;2)HRP 标记羊抗兔 IgG 购买于 AB-clonal 生物技术有限公司。

2.1.5 动物 新西兰大白兔,雄性,2~3kg。

2.1.6 引物合成 所有引物由北京擎科新业有限公司合成。

2.2 实验方法

2.2.1 莱茵衣藻的转化及抗性藻株筛选 待衣藻生长至细胞对数期,取培养液 100mL 分装于两个

50mL 离心管中,于离心机中 4℃,4000r/min 离心 4min,弃上清;取 600μL 新鲜 TAP 培养基重悬藻细胞;在每个 Kimble Tube 中加入 300mg 的玻璃珠和悬浮的 300μL 藻液以及 5μg pSP108 质粒;将 Kimble Tube 于涡旋振荡仪上以最大功率震荡 20s,后将藻液加入 15mL 新鲜的 TAP 培养基中弱光照培养 8h;培养后于离心机中 4℃,4000r/min 离心 4min,弃上清,涂板于 15μg/mL 的博来霉素抗性平板上,于光照培养箱中培养 3~4 周直至转化子肉眼可见,挑取转化子于 15μg/mL 博来霉素平板上划线 2~3 轮,后接种于 15μg/mL 博来霉素液体培养基中培养,筛选出可以正常生长的衣藻转化子进行下一步分子鉴定。

2.2.2 莱茵衣藻阳性转化子的分子鉴定 待衣藻生长至对数生长期时,使用 CTAB/NaCl 法进行衣藻基因组的提取^[8],用表 1 中设计的引物 ble-AS 和 ble-S 进行 *ble* 基因的验证;PCR 反应条件如下:94℃ 5min; 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 25s (30cycles); 72℃ 7min。

2.2.3 外源基因侧翼序列的获取 参照文献^[9,10]合成步移长接头和短接头以及接头引物 AP1 和 AP2. 参见文献^[9]进行基因组步行文库的构建,构成限制性内切酶 *Dra* I 酶切文库、*Eco*R V 酶切文库、*Pvu* II 酶切文库和 *Stu* I 酶切文库备用.在 *ble* 已知序列上设计步移引物 GSP-1 和 GSP-2 如表 1 所示,取酶切文库 0.5μL 作为模板进行第一轮巢式 PCR. PCR 反应条件如下:94℃ 5min; 94℃ 30s, 47℃ 30s, 72℃ 2min (30cycles); 72℃ 7min; 第一轮 PCR 产物稀释 50 倍取 1μL 作为第二轮 PCR 的模板,反应体系如下:94℃ 5min; 94℃ 30s, 69℃ 30s, 72℃ 2min (35cycles); 72℃ 7min. 琼脂糖凝胶电泳后胶回收条带进行测序验证,将所得序列在 NCBI 数据库中进行比对分析。

2.2.4 *ble* 原核表达载体构建 在 *ble* 上设计两对带有酶切位点的引物 ble sense I、ble anti I 和 ble sense II、ble anti II (表 1)进行串联 *ble* 片段的扩增,片段连接转化测序正确后分别使用 *Bgl* II 和 *Hind* III 限制性内切酶对两个克隆载体进行双酶切,将得到的大小两个酶切片段进行连接,即将 *ble* 串联片段连接到 pMD19-T 载体上.将串联 *ble* 载体和 pCold II 载体分别进行 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切,将酶切得到的片段进行连接转化并测序验证,即获得 pCold II-*ble* 载体。

表1 使用的PCR引物
Tab.1 PCR primers used

引物	序列(5'→3')
ble-AS	TCCTGGACCGCGCTGATGAA
ble-S	CGCAGCCAAACCAGGATGATG
GSP-1	CGGGCTTGCACGCAGAGTGAG
GSP-2	ACGGGTGCACGCGCACGATAGTCAC
ble sense I	GAATTCATGGCCAAGCTGACCAGCGCCGTTTC
ble anti I	AAGCTTGATCGAAGATCTCTGCTCCTCGGCC ACGAAG
ble sense II	AGATCTATGGCCAAGCTGACCAGCGCCGTTA
ble anti II	AAGCTTGTCTGCTCCTCGGCCACGAAG

2.2.5 *ble* 基因的原核表达及抗体制备 将 pCold II-*ble* 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取转化子于 1% 氨苄抗性的 LB 液体培养基中 37°C 培养。取 OD₆₀₀ = 0.4 时期菌液接种于 1000 mL LB 液体培养基中, 37°C 培养至 OD₆₀₀ = 0.4 时取出, 16°C 培养至对数生长期 (OD₆₀₀ = 0.5) 时, 加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG 进行诱导过夜。离心收集菌体至 30 mL PBS 缓冲液中, 超声破碎并用磁珠纯化蛋白后, 将获得的 300~500 μg 纯蛋白与等体积佐剂充分混匀。采用皮下或背部多点皮内注射兔子, 每点注射 0.1 mL 左右。每两周加强免疫一次, 第二次加强免疫后两周, 从兔子耳缘静脉取血制备血清。用间接法 ELISA 检测抗体效价, 抗体效价已经达到 320000 以上, 抗体浓度已达实验要求, 放血制备抗体。

2.2.6 间接 ELISA 法分析外源蛋白表达水平 提取衣藻总蛋白后, 用包被液将蛋白包被至 5 μg/mL, 按照间接法 ELISA 加入包被的抗原、封闭液、1:160000 倍稀释的一抗和 1:10000 倍稀释的二抗; 每次加入试剂后 37°C 孵育 1h, 弃去溶液, PBST 缓冲液清洗 3 次。最后加入 TMB 显色液, 暗室反应 15min 后加入终止液, OD₄₅₀ 下测量吸光度。

2.2.7 阳性转化子的抗性梯度实验 衣藻阳性转化子的博来霉素筛选浓度为 15 μg/mL, 分别对其中 9 个转化子培养基中添加博来霉素, 使得终浓度为 15 μg/mL, 20 μg/mL 和 25 μg/mL, 每天对其最大吸收峰所对应的紫外波长下的 OD₆₈₀ 吸光度进行测定, 绘制抗性梯度下的生长曲线。

3 结果与分析

3.1 阳性转化子的分子鉴定

使用 ble-AS 和 ble-S 引物对衣藻转化子进行

ble 基因的阳性验证, 从图 1 中可以看出扩增的条带单一, 大小位置正确 (361bp), 经过测序进一步验证了扩增片段的正确性, 将对得到的 *ble* 阳性转化子进行侧翼序列的分析。

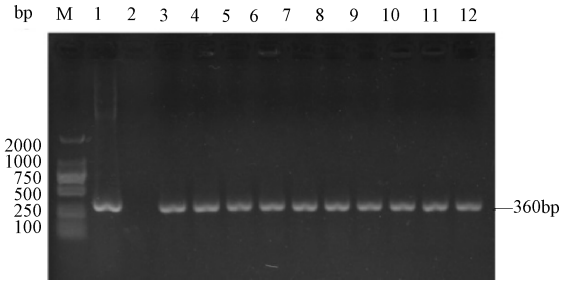


图1 衣藻阳性转化子的分子鉴定

Fig. 1 Molecular identification of *C. reinhardtii* positive transformants

M: λ -HindIII marker; 1: 质粒阳性对照; 2: 野生型阴性对照; 3-12: 衣藻转化子

3.2 阳性转化子中外源基因侧翼序列分析

对阳性转化子分别制备四种酶切文库, 将目的条带测序结果与莱茵衣藻 (NCBI Taxid: 3055) 基因组进行比对, 整理获得的 15 个阳性转化子在衣藻中的整合情况如表 2 所示。从插入位置上可以看出, 衣藻中外源基因的插入位点呈现随机性。其中四个转化子 (1 号、151 号、154 号、157 号) 出现了断裂及重排的情况: 1 号和 157 号转化子出现了外源基因插入位置的“断裂”, 即插入位点上下游核基因组出现了 89kb 和 16kb 的缺失。通过对衣藻核基因组所在位置 PCR 鉴定分析该段基因组缺失。在其他未发生重排的阳性转化子中也出现了核基因组 2~102bp 长度的缺失。151 号转化子中, *ble* 基因在整合过程中表达框断裂成了两个片段, 其中一个片段倒置后通过其中 7bp 的重叠序列与另一个片段连接, 共同整合到了衣藻核基因组中。154 号转化子的外源基因在整合过程中, 质粒和核基因组及叶绿体基因组产生了交叉重排, 具体下游插入位点还未定位。

从插入片段的长度来看, 从 522bp 到 2008bp 长度不等。在部分转化子的衣藻核基因组和插入片段的侧翼序列中发现了 2~13bp 序列的重合。另外, 在大部分转化子中质粒插入片段和衣藻侧翼序列 GC 含量很接近 (见表 2)。根据整合位置基因的信息分析, 大多数外源基因偏好插入到染色体非基因区域中, 而只有少部分插入到了基因的表达框中, 而在表达框中更趋向于插入到外显子中。

表 2 外源基因在衣藻基因组上整合情况

Tab. 2 The characteristic of integration of exogenous gene in *C. reinhardtii* nuclear genome

转化子	质粒方向	插入长度(bp)	基因组位置(bp)	插入位置的基因	衣藻缺失长度(bp)	重合序列	GC 含量
1	正向	1546	上游 137783 下游 227606	半乳糖激酶 Gene ID: 5727071	发生重排	无	C 0.61 P 0.60
2/5	反向	1609	222380	SCR1 混杂酶基因 Gene ID: 5717455	无	无	C 0.55 P 0.53
18	反向	2008	1613473	未知	102(插入位点上游)	CACCCT	C 0.64 P 0.67
20/22/23	正向	1530	331450	未知 Gene ID: 5722276	51(插入位点下游)	AACCACA GCAGCC	C 0.64 P 0.61
151	2806~ 3388bp 倒置	1274	1787393	衣藻 FAP20 鞭毛辅助 蛋白 Gene ID: 5718073	29(插入位点下游)	无	C 0.52 P 0.46
152	反向	1409	418366	未知	23(插入位点下游)	TAC	C 0.53 P 0.49
153	反向	1662	6073427	未知	14(插入位点上游)	无	C 0.51 P 0.60
154	发生重排	未定位	34565 159636	叶绿体基因组	——	AT	C 0.52 P 0.46
156	正向	未定位	535277	——	——	CT	C 0.60 P 0.52
157	反向	1424	上游 2597498 下游 2580551	未知	无	无	C 0.42 P 0.55
pt1/pt3	正向	522	227599	未知	2(插入位点上游)	GCGGT	C 0.50 P 0.52

注:序列均为衣藻的模板链,上下游以衣藻基因组中断裂位点的方向为准,衣藻序列的方向始终为 5'端到 3'端.若质粒插入方向为正向,则质粒序列为从 5'到 3';GC 含量中 C 代表莱茵衣藻,P 代表 pSP108 质粒

3.3 抗性梯度与外源蛋白表达水平

为了探究外源基因整合情况对蛋白表达的影响,选用间接 ELISA 法测定其中 9 个 *ble* 阳性转化子中 BLE 蛋白表达水平.在抗生素筛选阳性转化子的实验中,使用 15 μ g/mL 的博来霉素进行筛选,在正常生长的转化子中提取基因组进行分子鉴定.因此排除了表达框不完全,无法正常表达抗性蛋白的转化子.从实验结果来看,每个转化子的表达情况都不同:18 号、1 号、5 号、22 号、151 号转化子蛋白表达量相对较高(表 3).抗性梯度实验(图 2)也表明这些藻株可以耐受 25 μ g/mL 的博来霉素抗性.152 号、153 号、157 号、pt1 四个转化子蛋白表达量较低,抗性梯度实验中最高可以耐受 15 μ g/mL 的博来霉素

抗性(图 2).具体情况可以分为以下三类:1)18 号、1 号、5 号包含完整的启动子区,22 号和 151 号启动子序列部分缺失和倒置.这 5 个转化子可以利用自身表达框上的 RBCS2 启动子正常表达 *ble* 基因.虽然 22 号启动子部分缺失(69bp),151 号启动子部分倒置,但都未影响其核心区域的序列,所以也表现出抗生素的高耐受性;2)152 号和 pt1 号启动子有大片段的缺失,分析 152 号和 pt1 号 *ble* 基因整合到了衣藻自身基因的启动子下游,使其可以正常转录,但是因为其蛋白表达水平不如启动子 RBCS2,因此造成了 BLE 表达量的低下和抗生素的低耐受性;3)157 号启动子区完整,153 号启动子区仅小部分缺失(53bp),但这两个转化子的蛋白表达量相对较低.

表 3 转基因阳性转化子间接法 ELISA 吸光度

Tab. 3 The optical density of ELISA in *C. reinhardtii* positive transformants

转化子	1	5	18	22	151	152	153	157	pt1	CC-400
OD ₄₅₀	0.533	0.478	0.735	0.468	0.428	0.289	0.369	0.321	0.295	0.154
OD ₄₅₀	0.524	0.427	0.511	0.487	0.414	0.284	0.357	0.297	0.279	0.183
平均值	0.529	0.453	0.623	0.478	0.421	0.287	0.363	0.309	0.287	0.169

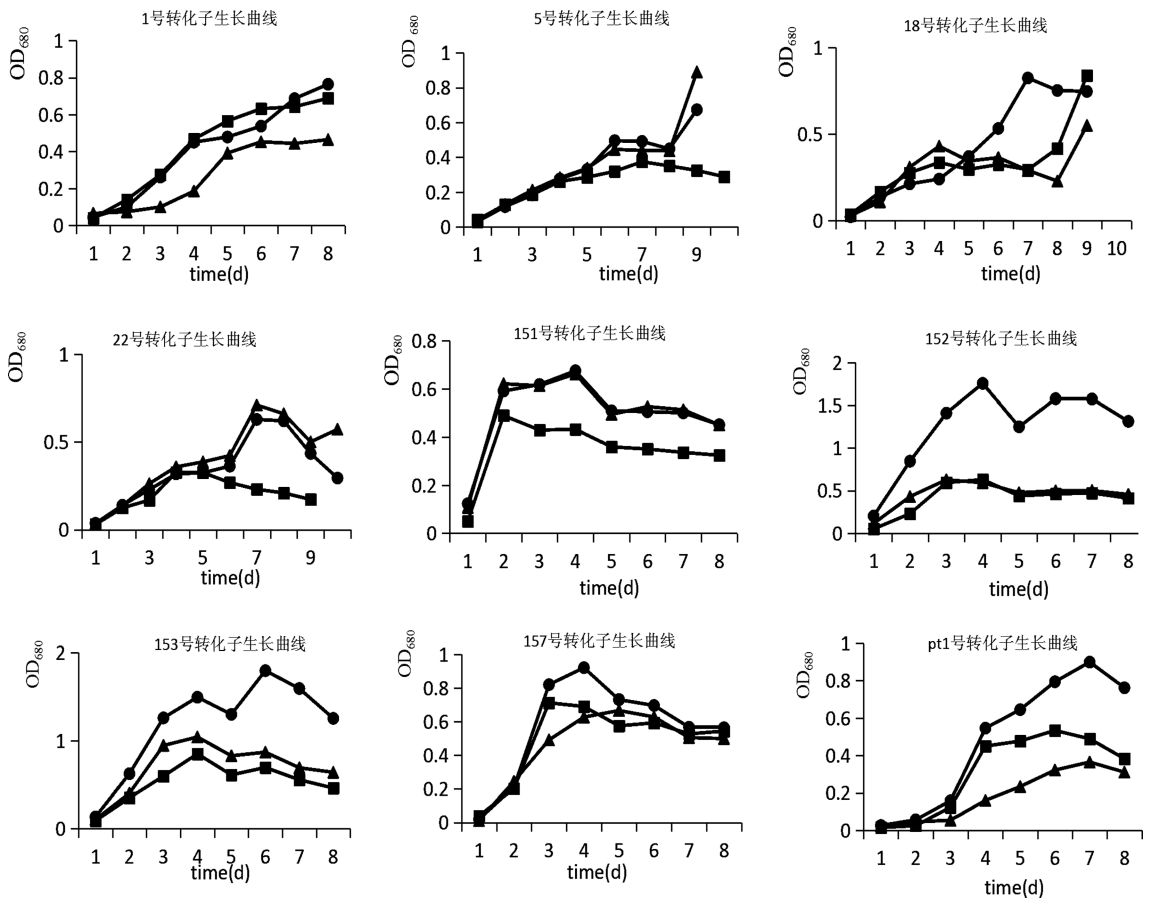


图 2 转基因阳性转化子在不同抗性梯度下的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of positive transformants in different zeocin concentration

● 15 μg/mL ■ 20 μg/mL ▲ 25 μg/mL

4 讨论

本文通过对 15 个衣藻阳性转化子中 *ble* 基因侧翼序列的研究, 获得了外源基因在核基因组中的整合情况. 从目前的数据来看, 外源基因在转化过程中呈现随机整合插入, 这与 Zhang 等人^[7]得到的结论是一致的. 但是出现了几个转化子整合位点一致的情况, 由于在珠磨法转化中转化后的衣藻会进行复原培养 8h, 整合位点一致的转化子可能为培养过程中同一单克隆分裂而来, 因此这几处整合位点是否为“热点”有待进一步的研究. 从整合情况来看, 有少数阳性转化子中出现了核基因组大片的缺失和重排. 其中有可能的原因是外源基因在插入过程中导致了非同源重组修复出现差错, 出现重排; 另一种原因可能为在转化过程中, 死亡细胞中的基因组片段和外源基因一起进入了细胞内, 在双链 DNA 修复的过程中和外源基因一起整合到了核基因组中, 使基因组出现重排^[7]. 从衣藻侧翼序列和质粒侧翼序列的 GC 含量上来看, 其 GC 含量

很接近. 猜测是否可能为内源的核酸内切酶在进行酶切时有 GC 含量的偏好性, 着重使外源片段整合到 GC 含量相近的衣藻基因组中, 以便完成基因组的修复过程, 这点有待进一步的证实.

在对其中 9 个阳性转化子的表达情况进行分析后发现: 虽然部分转化子的启动子出现大部分缺失, 但是由于其整合到未知基因的启动子下游而依然可以进行正常转录翻译. 这与我们实验室之前的研究是一致的: 在同一转基因单克隆藻株上同时使用 *ble* 编码区中间和末端的两对引物 *ble-1* 和 *ble-2* 进行荧光定量 PCR, 结果显示: 部分单克隆使用 *ble-1* 引物得到的转录水平比 *ble-2* 引物得到的低, 可能是 *ble* 基因存在多拷贝并且部分拷贝仅 *ble* 基因的后半部分整合到基因组上, 整合的位置带有启动子时, 也可以被转录^[8]. 另外还发现利用质粒表达框上启动子 RBCS2 表达的蛋白量要明显高于利用衣藻未知基因启动子的蛋白表达量. 这可能与 RBCS2 启动子本身的表达调控能力相关. RBCS2 启动子被认为是至今为止所发现的最强的基本启

动子之一,被广泛应用于衣藻核基因组中外源蛋白的表达中^[11]. 157 号转化子启动子区完整,但在表达水平上却显著低于 1 号、18 号等转化子,可能说明蛋白的表达水平受多种因素的影响,不仅表达框的完整性会影响蛋白表达,整合插入位点、mRNA 稳定性、核基因组的缺失情况等均会影响蛋白的表达. 从 157 号中 *ble* 基因的插入位置分析,可能是其所在位置的衣藻核基因组片段的缺失以及整合位置的差异影响了核基因组中的表达调控元件,从而降低了外源蛋白的表达^[12]. 大量的研究表明间期核中基因在染色质上的位置对基因的正常表达具有至关重要的作用^[13]. 基因在常染色质和异染色质间的易位会导致基因失活,异染色质着丝粒区和异染色质其他区域的互相作用也可以调节间期核中基因的位置并且决定其转录活性^[14]. 在酿酒酵母中,核基因组中基因的位置会导致基因失活也说明了这一问题^[15].

本文针对莱茵衣藻中外源基因在核基因组中的整合方式及整合特征进行了初步的探索,对影响外源基因蛋白表达的几种因素进行了探究分析,为莱茵衣藻作为生物反应器的研究提供了有价值的基础资料.

参考文献:

- [1] Sartori P, Geyer V F, Scholich A, *et al.* Dynamic curvature regulation accounts for the symmetric and asymmetric beats of *Chlamydomonas* flagella[J]. *Elife*, 2016, 11: 5.
- [2] Roach T, Baur T, Stoggl W, *et al.* *Chlamydomonas reinhardtii* responding to high light: A role for 2-propenal (acrolein)[J]. *Physiol Plant*, 2017, 161: 75.
- [3] Morales-Sanchez D, Kim Y, Terng E L, *et al.* A multidomain enzyme, with glycerol-3-phosphate dehydrogenase and phosphatase activities, is involved in a chloroplastic pathway for glycerol synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant J*, 2017, 90: 1079.
- [4] Lauersen K J, Berger H, Mussgnug J H, *et al.* Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *J Biotechnol*, 2013, 167: 101.
- [5] Plucinak T M, Horken K M, Jiang W, *et al.* Improved and versatile viral 2A platforms for dependable and inducible high-level expression of dicistronic nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant J*, 2015, 82: 717.
- [6] Ramos-Martinez E M, Fimognari L, Sakuragi Y. High yield secretion of recombinant proteins from the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15: 1214.
- [7] Zhang R, Patena W, Armbruster U, *et al.* High-throughput genotyping of green algal mutants reveals random distribution of mutagenic insertion sites and endonucleolytic cleavage of transforming DNA[J]. *Plant Cell*, 2014, 26: 1398.
- [8] 王双辉,刘芮均,兰利琼. 衣藻的核基因组转化及外源基因转录分析[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2016, 53: 695.
- [9] Siebert P D, Chenchik A, Kellogg D E, *et al.* An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 1087.
- [10] Noguchi A, Takekawa N, Einarsdottir T, *et al.* Chromosomal mapping and zygoty check of transgenes based on flanking genome sequences determined by genomic walking[J]. *Exp Anim*, 2004, 53: 103.
- [11] Schroda M. RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools[J]. *Curr Genet*, 2006, 49: 69.
- [12] Surzycki R, Greenham K, Kitayama K, *et al.* Factors effecting expression of vaccines in microalgae [J]. *Biologicals*, 2009, 37: 133.
- [13] Weiler K S, Wakimoto B T. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*[J]. *Annu Rev Genet*, 1995, 29: 577.
- [14] Csink A K, Henikoff S. Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*[J]. *Nature*, 1996, 381: 529.
- [15] Maillat L, Boscheron C, Gotta M, *et al.* Evidence for silencing compartments within the yeast nucleus: a role for telomere proximity and Sir protein concentration in silencer-mediated repression [J]. *Genes Dev*, 1996, 10: 1796.