

专家论坛

拟南芥基因组研究进展

黄娟 李家洋

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

(续上期)

使一个基因完全失活通常是了解其功能的最直接方法。但是,在显花植物中还缺乏有效的方法使目的基因置换。于是像反义失活及共抑制等方法就被广泛地应用在使某些已知序列的基因的失活研究方面。但这些策略对大范围使用并不够有效,目前仍主要应用在单基因的研究上。

最近,最为有效的改善措施就是随机大范围插入诱导突变(Random Large-scale Insertional Mutagenesis)^[15], T-DNA 或转座子的插入可导致基因的完全失活。由于插入片段的序列已知,用与插入片段末端及感兴趣基因互补的序列为引物,即可用多聚酶链式反应(PCR, Polymorphism Chain Reaction)的方法筛选到在感兴趣基因中含有插入序列的突变体。或者可对每一插入序列的两侧进行测序,由此直接确定被打断的基因。基因组测序的完成使我们即使只知道插入序列两侧很短的部分也可确定插入在基因组 DNA 中的确切位置,并由此可分析确认被打断的基因,而对相应突变体的表型及其他性状的分析就可对被打断基因的功能有了大致了解^[22]。

要获得随机插入有两种方法可供使用:T-DNA 法^[23]和转座子法^[24]。下面就分别论述这两种方法的优缺点。

农杆菌介导的 T-DNA 转化已被广泛应用于不同物种的插入诱导突变中。植物被农杆菌转化的结果就是一段由细菌质粒携带的被称为 T-DNA 的序列整合至植物的核基因组中。使用 T-DNA 做插入诱变剂的一大优点是它直接导致了在基因组 DNA 中的稳定插入。另一优点是 T-DNA 插入表现了较大的随机性。但是, T-DNA 整合的复杂模式,包括 T-DNA 边界附近的载体序列的共转移及 T-DNA 插入的高频环化都使得进一步的 PCR 分析复杂起来,而由 T-DNA 诱导的染色体的重组也可能导致突变表型其实与插入的 T-DNA 无关。这些都使插入突变体的遗传学分析困难起来。但不管怎样,随着方法的改进和 T-DNA 转化效率的提高, T-DNA 在拟南芥中仍然是一种被广泛应用的插入诱变剂。目前已经获得了拟南芥 T-DNA 插入的突变群体库,可以从中筛选某一已知序列的基因突变^[25]。

同样起源于玉米的两种异源转座子系统 Ac/Ds (Activator/Dissociation) 和 En/Spm (Enhancer/Suppressor-mutator) 也被成功地运用于拟南芥的插入诱变中。使用转座子插入诱变有两大优势,首先,转座子还可从插入部位切除掉,并伴随着突变表型恢复为野生型,这就提供了一种简便的方法来确认突变确由转座子引起;其次,转座事件更易发生在连锁区域,即如果有一转座子靠近我们感兴趣的基因,就很容易使这一转座子转移,重新插入到这一基因中。但另一方面,转座子插入位点的倾向性也使得随机

插入的机会变小。不同的实验室应用这一方法得到了众多的突变体。

为大规模鉴定高等植物功能基因,最近我们发展出表达文库转化法系统鉴定植物功能基因的技术体系。该技术体系能以基因表达抑制、基因过量表达、插入突变的方式引起转基因植物表型的变化,从而达到大规模鉴定功能基因的目的。通过对这些转基因拟南芥植株 T2 代的遗传分析,已从中鉴定出一批能引起重要表型变异的基因。这一技术体系可以用于水稻与油菜等重要农作物重要农艺性状基因的大规模鉴定之上。

4 展望

拟南芥基因组是第一个经过完全测序的高等植物基因组,它为我们深入了解开花植物的各种机制提供了可能,而这种了解不仅对植物生物学而且对未来的作物育种都将产生重大影响^[26]。因为,虽然即使是关系较近的物种在基因组大小上也有较大差别,但最近几年比较遗传学图谱实验已经确认,同一类型的植物表现了大范围的基因组同线性,更近的微同线性的研究已证实在基因水平上同线性同样广泛存在^[27]。因此,通过分析拟南芥中的各种生理过程获得相关知识,将大大加速我们对农作物中相应过程的了解并为作物改良提供了理论基础。

二十世纪的遗传学研究以孟德尔定律的重新发现开始,以模式植物拟南芥基因组完全测序结束。基因组全序列的得到完全改变了植物遗传学分析的基础,为功能基因组时代的到来开辟了新纪元。预计在 10 年以内,拟南芥中每一基因的表达模式、蛋白质的定位和修饰及基因产物之间的相互作用等信息都可以从相关数据库中得到。由这些信息不仅可以推测基因产物的独特功能,了解它们在组织生长及发育中的作用,而且对研究拟南芥以外的所有高等植物都将大有帮助^[28]。

(参考文献:略)