

植物逆境胁迫耐受性功能基因组研究进展*

陈其军¹⁾ 王学臣^{1)**} 刘 强^{1, 2)}

(¹⁾ 中国农业大学农业部生理生化开放实验室, 北京 100094; ²⁾ 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 为了更加高效地利用基因工程技术提高植物对逆境胁迫的耐受性, 需要在全基因组水平上对植物逆境胁迫耐受性的复杂机制进行整合性研究. 植物逆境胁迫耐受性功能基因组的研究可概括为: 利用胁迫特异性的表达序列标签 (EST) 及 cDNA 微阵列 (或基因芯片) 技术筛选与胁迫相关的候选基因, 然后利用反向遗传学等技术对候选基因的功能进行研究, 利用酵母双杂交、正向遗传学等技术对基因及基因产物间的相互关系进行研究. 通过这些研究可以全面地了解植物对胁迫 (渗透、干旱、极端温度) 响应的复杂机制和相互作用以及相应的信号转导途径, 从而为更加高效地利用基因工程技术提高植物对逆境胁迫的耐受性奠定基础.

关键词 逆境胁迫, 功能基因组, 表达序列标签, 微阵列, 反向遗传学

学科分类号 Q51

造成缺水胁迫的环境因子, 如干旱、高盐和极端的温度是限制植物生产力的主要因子. 为了应付日渐膨胀的人口, 需要培育出更多耐受胁迫的作物以克服这些限制, 提高生产效率.

比起传统的育种技术和用标记物辅助进行筛选的方法, 通过基因工程的方法直接导入少数基因似乎是提高植物耐受性的更具吸引力的捷径^[1, 2]. 但是由于逆境胁迫响应在遗传上和生理上的复杂性使得人们对逆境胁迫的耐受机制如逆境信息传递、代谢途径、分室化作用等认识还远远不够, 限制了基因工程技术的应用. 这就需要在全基因组水平上对各类胁迫耐受机制进行整合性研究. 植物逆境胁迫耐受性功能基因组学研究策略可概括为: 利用胁迫特异性的表达序列标签 (EST) 及 cDNA 微阵列 (或基因芯片) 技术筛选与胁迫相关的候选基因, 然后, 利用正向和反向遗传学 (如基因敲除) 等技术对候选基因进行功能研究, 利用正向遗传学和酵母双杂交等技术对基因间相互关系及基因产物间的相互作用进行研究. 通过这些研究就可以全面地了解胁迫 (渗透、干旱、极端温度) 耐受机制的复杂性和相互作用, 以及相应的信号转导途径, 从而为更加合理地、高效地利用基因工程方法培育抗逆植物奠定基础.

1 利用表达序列标签寻找胁迫相关基因

表达序列标签 (expressed sequence tags, EST) 就是用一个基因 (cDNA) 的 5' 或 3' 部分序列代表

该基因 (cDNA), 换句话说, 就是用一个基因的 5' 或 3' 部分序列作为该基因的标签. EST 技术为寻找新基因和未知基因提供了一个高效的工具. 利用 EST 技术克隆基因的步骤大体上是: a. 构建 cDNA 文库; b. 随机挑选 cDNA 克隆; c. 每个克隆从 5' 或 3' 进行一次测序; d. 与同种和异种生物已知的核酸和蛋白质数据库进行比较分析; e. 在基因库 (GenBank) 中登记新基因及未知基因.

1.1 甜土植物的胁迫相关基因

为了对非生物胁迫响应的复杂机制进行全面的、整合性的研究, 首要的任务是通过对随机选择的 cDNA 克隆进行大规模的部分测序寻找各类胁迫响应相关的 EST. 目前, 拟南芥和水稻的大规模的 EST 数据库已经建立, 各种作物 (包括棉花, 玉米, 大豆, 土豆和高粱等) 的大规模测序工作也已在进行之中. 对盐胁迫诱导的、具有组织特异性和发育阶段特异性的拟南芥和水稻 cDNA 文库也开展了大规模的 EST 测序. 最新的 EST 数据库可在胁迫功能基因组协会 (Stress Functional Genomics Consortium) 的网站 (http://stress_genomics.org/) 浏览和搜索. 作为玉米基因组研究的一部分, 来自盐胁迫玉米根和茎 cDNA 的 EST 库也正在建立之中 (http://www.zmdb.iastate.edu/zmdb/EST_project.html).

* 国家重点基础研究专项经费资助项目 (G1999011700).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62892706, E-mail: xcwang@public.bta.net.cn

收稿日期: 2001-01-09, 接受日期: 2001-02-23

1.2 胁迫耐受性模式植物的胁迫相关性基因

胁迫耐受性模式植物包括盐生植物(如冰草)、耐干燥植物(如更苏植物)等。尽管在甜土植物中功能性适应盐胁迫的机制可能在很大程度上是保守的,但盐生生物在进化中已额外形成了结构上或调控上的不同机制以抵制严重的渗透胁迫或离子胁迫。为了搞清楚这些潜在的机制,以盐生植物冰草和盐生绿藻为材料进行的大规模 EST 测序工作已经展开。一些耐干燥植物(如土生墙藓^[3]),它们的营养组织逐渐形成了对干燥胁迫的耐受性,推测它们可能拥有利于耐受干燥的特异基因或调控过程。土生墙藓的配子体在缓慢的干燥过程中,营养细胞中形成了较大(> 150 ku)的核蛋白颗粒(RNP),这有利于在水份恢复后快速地恢复蛋白质合成,从而有利于干燥组织的复活^[4]。用干燥的土生墙藓的多聚核蛋白颗粒(RNP)构建 cDNA 文库,从中取出 152 个 EST 样品进行测序发现,约 70% 的 EST 代表新的基因序列^[4]。一种模式苔藓植物展叶剑叶藓的 EST 库也已开始建立。

2 利用基因芯片技术分析胁迫相关基因

在拟南芥中,约半数根据氨基酸序列信息推测为编码蛋白的基因,其精确功能仍不祥。在缺乏其他信息的情况下,差异表达模式通常能提供基因表达的线索。对个别 EST 标签出现的频率进行分析,可以发现相应基因的差异表达称为“数字化的 Northern”方法。快速定量分析一个特殊群体的大量转录本出现频率的方法——基因表达的系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)技术已经得到应用^[5]。

尽管用上述方法可以获得部分基因的差异表达模式,但要得到全面的基因表达谱信息,上述方法远远不够。拟南芥基因已全部完成序列测定,在 25 498 个拟南芥基因中 30% 以上的基因与已知功能或可以推测功能的基因没有同源性,成千上万的基因只能被鉴定为某一大类(如蛋白激酶、转录因子)的成员,而无法获知其特异的功能。cDNA 微阵列技术为了解与胁迫响应相关的基因的功能和调控机制,提供了一种高通量的方法^[6,7]。它可以在一个实验中提供成千上万个基因的表达模式的信息,这些信息除能够对未鉴定基因的功能提供线索外,还可以对已经描述的基因提供新的认识。在冰草、水稻和拟南芥中利用 cDNA 微阵列大规模地分析盐胁迫相关基因表达谱已在进行中。

利用各种发育时期(从种子发芽到成熟),经不同处理(例如经干旱、冷胁迫处理及未经胁迫处理)的拟南芥构建 cDNA 文库,从中得到 1 300 个全长的 cDNA 并制作成微阵列。用经胁迫(干旱、冷)处理和未经胁迫处理的拟南芥 RNA,以及用野生型及 *DREB1A/CBF3* 转基因拟南芥的 RNA 与这种微阵列杂交,结果微阵列中的 1 300 种 cDNA 中有 44 种受干旱诱导,19 种受冷诱导。其中 30 种和 10 种是未报道过的胁迫诱导基因。12 种胁迫诱导基因被鉴定为受 *DREB1A* 调控的靶基因,其中,有 6 种是未报道过的新基因,有 11 种基因的启动子区域含有 DREB/CBF 类转录因子特异性识别及结合的顺式作用元件(即 DRE 元件或 DRE 相关的 CCGAC 核心序列),它们的基因组序列已在 GenBank 中登记^[8]。

用经盐胁迫处理的一种耐盐水稻的根构建 cDNA 文库,从中得到 1 728 个 cDNA 制作成微阵列。微阵列研究表明在盐胁迫 15 min 后该耐盐水稻品系的转录本表现出升调节,约有 10% 的转录本在盐胁迫 1 h 内显著受到升调节或降调节。随着植株对盐胁迫的适应,对照和盐胁迫水稻转录本的差异在持续数小时后变小,一周后盐胁迫植株中受到升调节的转录本恢复到对照水平。与耐盐水稻品系相比,盐敏感水稻在受到盐胁迫时转录本受到的升调节明显滞后,随后转录本受到降调节,植株死亡^[9]。

目前,至少有两个公众资助的项目提供世界范围的微阵列服务:美国的 AFGC 项目和英国的 GARNet's 项目。前者已于 2000 年投入服务,后者计划于 2001 年上半年投入服务。AFGC 项目由拟南芥功能基因组协会(Arabidopsis Functional Genomics Consortium, AFGC)承担,该项目正在完成不同组织(包括根、叶、角果、花和茎),不同发育阶段(从种子萌发到种子成熟),不同基因型的基因表达谱分析。该项目的对外服务接受来自世界各地的研究者的 RNA 样品完成微阵列分析(包括标记、杂交和数据收集)。AFGC 得到的全部实验数据存放于斯坦福微阵列数据库中,研究者可以利用该数据库搜索基因表达情况^[6]。AFGC 承担的另一项任务是利用 T-DNA 或转座子插入突变技术(基因敲除)进行功能研究。

基因芯片技术在植物逆境胁迫耐受性研究中的应用可大致归纳为以下几个方面: a. 不同的组织在不同的发育阶段对不同环境胁迫因子响应的敏感

性不同. 通过详细研究基因表达谱, 我们可以理解植物如何在不同的发育阶段和分类复杂的组织中整合胁迫响应. b. 利用微阵列技术可以在一种或更多种甜土的 (如拟南芥和水稻), 盐生的 (如冰草) 和耐干燥的 (如一些更苏植物) 模式植物间进行比较, 可以鉴定到表达谱的相同和不同之处, 以及与胁迫 (如高盐、干旱及极端温度) 耐受性有关的特异基因. c. 通过检测突变体和野生型在胁迫条件下转录本的不同, 微阵列技术为鉴定胁迫耐受性的决定性基因提供了一种快速而全面的技术. d. 通过对蓝细菌、真菌和植物基因组进行比较, 可以找到能够解释细胞耐受机制的一群基因.

然而, 单凭表达模式, 对于获知植物受胁迫诱导的未知基因的功能还远远不够, 未知基因的功能尚需利用正向和反向遗传学的方法进行研究.

3 利用正向和反向遗传学进行功能研究

随着植物基因组计划的实施和完成, 新的、更多的基因组数据库和 EST 数据库得以建立和完成, 因此产生的问题是成千上万新基因的功能有待分子生物学家鉴定. 为此, 需要利用反向遗传学的手段对所有与胁迫有关的候选基因进行功能研究. 经典分子遗传学利用正向遗传学的方法 (即通过筛选突变体进而克隆相关基因) 研究参与胁迫响应过程中的信号转导级联反应及代谢变化的基因. 正向遗传学的策略是从功能 (表型) → 突变体 → 基因, 最后得到具有相关功能 (如对盐敏感或耐盐) 的基因. 随着基因组研究由结构基因组时期进入功能基因组时期, 反向遗传学应运而生. 反向遗传学的策略是从基因 → (突变体) → 功能, 最后得到未知基因的功能.

尽管利用生物信息学的方法和技术能够推测未知基因的功能, 但最终的答案还是要来自对突变体进行的生物学鉴定^[10]. 相应地, 对于胁迫耐受性的基因组研究而言, 为了补充从基因筛选 (EST 技术) 和表达谱分析 (基因芯片技术) 中获得的信息, 需要系统化地突变所有胁迫相关的基因. 拟南芥和水稻大规模的 T-DNA 或转座子突变体库的建立和筛选可为胁迫相关基因的功能研究提供基本资源. 可以使用正向遗传学和反向遗传学的方法从大规模的 T-DNA 或转座子突变体库分离耐受胁迫或对胁迫敏感的敲除突变体. 反向遗传学筛选突变体的原理是: 当随机插入的 T-DNA 或转座子突变体品系达到足够数量时, 理论上, 任何目的基因 (致

死基因除外) 都有可能在其中的某个品系发生插入突变 (即被敲除掉), 用 PCR 的方法即可检测出目的基因发生突变的品系. 为了用 PCR 的方法检测发生突变的品系, 需要将各种突变体品系按照一定的规则或阵列混合成由小到大的亚库、库及超级库, 分别根据目的基因和 T-DNA 或转座子序列设计引物, 先后以各种库 (按由大到小的顺序) 的混合 DNA 为模板进行扩增, 根据扩增结果可将目的基因发生突变的品系定位于某一个超级库、库及亚库内, 最后从亚库中找出相应的敲除突变体. 现在, 各国的研究人员可以利用国际上的突变体库筛选敲除目的基因的突变体, 而不必亲自建立突变体库. 前面提到过 AFGC 除承担利用微阵列技术研究基因表达谱外, 还承担利用基因敲除突变体进行功能研究. Wisconsin 大学生物技术中心敲除植物的服务机构 (Knockout Plant Facility) 即隶属于 AFGC. 除了现有的突变体库, 他们计划在将来用包含转座子的 T-DNA 产生突变体品系, 这样的突变体品系 (T-DNA 插入突变) 由于转座子 (位于 T-DNA 内) 的转座可以使邻近的基因发生转座子插入突变从而可以创建双突变体. 该机构计划利用热不对称交错 PCR (thermal asymmetric interlaced PCR) 技术鉴定所有突变体品系的 T-DNA 或转座子两侧的序列并建立数据库, 将来研究人员只需根据目的基因的序列检索数据库, 根据检索结果索要敲除目的基因的突变体^[11].

就研究逆境胁迫耐受性相关基因功能而言, 有另一套突变体库可以利用. 以转基因拟南芥为材料, 产生激活性的 T-DNA (bialaphos 抗性标记物和 4 × 35S 增强子) 标记的突变体库用于分离影响胁迫信号转导的突变位点. 转基因拟南芥的外源基因为嵌合基因, 是将对渗透势、冷胁迫和脱落酸 (ABA) 反应的启动子 (如 *RD29A*) 与萤火虫的荧光素酶基因 (*LUC*) 的编码区融合^[12]. 荧光素酶的活性可以用来快速鉴定启动子活性, 而启动子活性在突变体中可能增强、减弱或不再被胁迫激活, 可据此用正向遗传学的方法筛选相应的突变体并克隆相应的基因. 到目前为止, 以 *RD29A-LUC* 转基因植物为材料建立了约 90 000 个 T-DNA 标记品系, 胁迫信号转导或对胁迫的敏感性发生改变的突变体已经分离出来. 标记群体的 DNA 库的构建工作正在进行中, 将来研究者可以通过 Ohio 州立大学的拟南芥库存中心获得各种 DNA 库用于反向遗传学的研究.

反向遗传学还包括基因的互补实验、超表达实验及利用反义技术进行的抑制实验等。可通过定点敲除和随机插入在单细胞的模式生物（如集胞藻属植物 PCC6803，酵母和构巢曲霉）中产生胁迫敏感性的突变体，用这些突变体与拟南芥、水稻、烟草和冰草的表达文库进行互补实验，可分离相关基因在植物中的定向进化同源基因（orthologs）^[13]。可通过在野生型中转入目的基因或通过在盐敏感突变体中转入目的基因的反义序列来评估盐胁迫耐受性的决定因子。最后，可以构建目的基因与 GFP 融合表达载体，观察个体基因的时空表达模式和基因产物的亚细胞定位。

4 总结与展望

正在进行中基因组测序和基因组规模的 EST 测序，以及 cDNA 微阵列分析有望快速地分离和鉴定与渗透势、干旱、温度胁迫相关的所有的候选基因。然后，大型的数据库经过整合及在不同的细胞模型和各类植物模型（甜土的、盐生的和旱生的）中进行比较，可以发现进化上保守的细胞耐受机制。通过对大型数据库中的资料进行分析、比较、归纳，结合微阵列分析，利用 T-DNA 或转座子标记的突变体库、互补实验和超表达实验所进行的功能分析及遗传学分析，就可以找到特异的信号组分与下游的效应基因之间的级联关系。利用酵母双杂交技术构建蛋白质连锁图谱可以了解蛋白质与蛋白质间的特异性的相互作用。利用蛋白质组的方法可以搞清楚蛋白质的结构信息，估测与胁迫耐受性有关的蛋白质修饰作用和蛋白质与配基的相互作用。最后，随着参与胁迫适应性或耐受性反应的所有基因的功能得到鉴定，人们就可以综合地理解植物对胁迫响应的生理和生化基础。利用这些来自模式生物的信息，用遗传工程的方法合理地操纵和优化胁迫

耐受性状以改善作物的生产力将成为可能^[1]。

参 考 文 献

- 1 Cushman J C, Bohnert H J. Genomics approaches to plant stress. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, **3** (2): 117~ 124
- 2 刘 强, 赵南明, Yamaguchi Shinozaki K, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用. *科学通报*, 2000, **45** (1): 11~ 160
- 3 Liu Q, Zhao N M, Yamaguchi Shinozaki K, *et al.* *Chinese Science Bulletin*, 2000, **45** (1): 11~ 16
- 3 Wood A J, Oliver M J. Translational control in plant stress. The formation of messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) in response to desiccation of *Tortula ruralis* gametophytes. *Plant J*, 1999, **18** (4): 359~ 370
- 4 Wood A J, Duff R J, Oliver M J. Expressed sequence tags (ESTs) from desiccated *Tortula ruralis* identify a large number of novel plant genes. *Plant Cell Physiol*, 1999, **40** (4): 361~ 368
- 5 Velculescu V E, Zhang L, Vogelstein B, *et al.* Serial analysis of gene expression. *Science*, 1995, **270** (5235): 484~ 487
- 6 Wisman E, Ohlrogge J. *Arabidopsis* microarray service facilities. *Plant Physiol*, 2000, **124** (4): 1468~ 1471
- 7 Richmond T, Shauna S. Chasing the dream: plant EST microarrays. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, **3** (2): 108~ 116
- 8 Seki M, Narusaka M, Abe H, *et al.* Monitoring the expression pattern of 1 300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, 2001, **13** (1): 61~ 72
- 9 Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, *et al.* Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, 2001, **13** (4): 889~ 906
- 10 Miklos G L, Rubin G M. The role of the genome project in determining gene function: Insights from model organisms. *Cell*, 1996, **86** (4): 521~ 529
- 11 Sussman M R, Amasino R M, Young J C, *et al.* The *Arabidopsis* knockout facility at the University of Wisconsin-Madison. *Plant Physiol*, 2000, **124**: 1465~ 1467
- 12 Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, *et al.* Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell*, 1997, **9** (11): 1935~ 1949
- 13 Lee J H, van Montagu M, Verbruggen N. A highly conserved kinase is an essential component of stress tolerance in yeast and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (10): 5873~ 5877

Progress in Functional Genomics of Plant Stress Tolerance*

CHEN Qi-Jun¹⁾, WANG Xue-Chen^{1)**}, LIU Qiang^{1,2)}

¹⁾ College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

²⁾ Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The genomic-scale EST and genome sequencing, and cDNA microarray analyses that are now under way promise to rapidly isolate and identify all candidate genes essential for tolerance of osmotic potential, desiccation or temperature stresses. The large datasets generated by these efforts will provide basis for functional

analysis with the use of tagged mutant collections, complementation and overexpression tests accompanied by microarray analyses. By using yeast two-hybrid technologies, the specific protein-protein interactions will be well understood. When the functions of all genes that participate in stress adaptation or tolerance reactions are determined, an integrated understanding of the biochemical and physiological basis of stress responses in plants will be obtained, and then, it will be therefore possible to rationally manipulate and optimize tolerance traits for improved crop productivity.

Key words stress, functional genomics, EST (expressed sequence tags), microarray, reverse genetics

* This work was supported by a grant from the National Key Basic Research Special Funds (G1999011700).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62892706, E-mail: xcwang@public.bta.net.cn

Received: January 9, 2001 Accepted: February 23, 2001

“溴”结构域 (bromo-domain) 简介

陈建业 张 晔 陈俊杰 李瑞祥

(四川大学华西医学中心基础医学院, 成都 610041)

“溴”结构域是近 10 年来发现的广泛存在于多种真核生物中的保守结构域, 由 60~110 个高度保守的氨基酸残基组成, 有形成双性 α 螺旋的潜能。常见的“溴”结构域含 60 或 110 个氨基酸残基。“溴”结构域蛋白一般有 1~5 个“溴”结构域拷贝, 这类蛋白质“溴”基序所在位置变异颇多, 已经登录的“溴”结构域蛋白有 50 余种。

“溴”结构域的空间结构相似。含 60 或 110 个氨基酸残基的“溴”结构域可分别形成两个或四个反向平行的 α 螺旋。P/CAF “溴”结构域的空间构型为左手旋转反向平行的上下四螺旋束状结构, 由 αZ 、 αA 、 αB 和 αC 四个 α 螺旋、ZA 和 BC 两个连接环及一个疏水穴构成, 是单“溴”结构域的典型代表。TAF II 250 含两个“溴”结构域, 为两个肩并肩带极化电荷表面的四螺旋束状结构, 其空间结构与 P/CAF 的“溴”结构域相似, 此外, 附加一个 αL 螺旋。

“溴”结构域的功能迄今知之不多, 它可能在蛋白质功能的某些方面起重要作用。其疏水穴可能为蛋白质间相互作用提供场所, 从而影响蛋白质复合体的装配或功能, 如转录活性或其他细胞过程。

“溴”结构域是否参与转录调控尚无定论, 许多与染色质有关的蛋白质以及与转录有关的转录因子都含有“溴”

结构域。例如, GCN5 “溴”结构域作为与组蛋白 H3 和 H4 N 端相互作用的场所, 促进染色质开放。p300 的“溴”结构域介导分化调节因子复合体亚基间的相互作用。TIF1B 的“溴”结构域是转录因子 C/EBP β 和糖皮质激素受体相互作用所必需的。SNF2 和 TgGCN5 “溴”结构域参与染色质的重建与重排。BRG1 的“溴”结构域参与转录激活。

“溴”结构域可能与基因活化时的乙酰化作用有关, 因为几乎所有与转录有关的 HATs 都含有“溴”结构域。例如, SAGA 复合体在啤酒酵母转录中催化组蛋白乙酰化时必需“溴”结构域的参与; p300 “溴”结构域为催化 c-Myb 乙酰化必不可少的。

研究证明, “溴”结构域是一种乙酰赖氨酸结合域, 能特异地与乙酰赖氨酸肽相互作用, 通过限制特定位点 HATs 活性, 调节组蛋白乙酰化, 进而参与染色质的形态结构变化和转录调控, 其主要功能是介导蛋白质-蛋白质间的相互作用。各种“溴”结构域蛋白的功能各异, 多数与基因的转录调控有关, 其中有的是转录因子, 有的是转录共激活剂, 有的为染色质成分, 有的具有酶活性。它们相互协同作用, 调控着基因的有序表达。由于“溴”结构域的研究起步较晚, 有关该结构域的确切功能和作用机理有待进一步研究。