

# 基因激活标签体系及其在植物功能基因组学研究中的应用

宛淑艳<sup>1</sup>, 张治国<sup>2</sup>, 赵桂兰<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 湛江师范学院生命科学与技术学院, 湛江 524048;

<sup>2</sup> 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; <sup>3</sup> 吉林省农业科学院, 长春 130024)

**摘要:** 利用传统的基因缺失产生的突变体的方法来鉴定基因的功能效率很低, 因为对于发育早期的基因特别是配子发育相关的基因以及冗余基因, 这种突变体显得无能为力, 前者基因纯合突变体导致死亡、而后者由于冗余基因之间的功能互补而不显示任何表型。而通过基因激活标签技术可以获得显性突变体即功能获得型突变体, 为研究这类基因的功能提供了一个重要的手段。基因激活标签技术是指含有 35S 增强子或启动子的 T-DNA 或转座子若插入基因内, 可导致插入突变, 引起插入失活突变体的产生; 若插入基因附近 (上游或下游), 则可能激活正常情况下不表达或表达极弱的基因, 导致显性功能获得 (dominant gain-of-function) 性突变。近年来通过 T-DNA 或转座子介导的方法建立了多种植物的基因激活标签突变体库, 在植物基因功能研究中发挥了重要作用, 使一些由多个基因或基因家族决定的功能的研究获得突破性进展。就植物基因激活标签技术的原理, 特点和创制方法以及在植物生长发育、代谢等一系列方面研究中的应用进行了阐述, 并对该技术的发展趋势进行了较为详细的探讨。

**关键词:** 功能基因组学; 突变体; 激活标签系统

中图分类号: Q78 文献标识码: A

## Activation Tagging and the Application in Plant Functional Genomics

Wan Shuyan<sup>1</sup>, Zhang Zhiguo<sup>2</sup>, Zhao Guilan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science and Technology of Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048;

<sup>2</sup> Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

<sup>3</sup> Chinese Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130024)

**Abstract:** The method of the mutants result from loss-of-function is ineffective to assign the genes function, because of early embryonic whose homozygous mutant results in lethality or functional redundancy which are compensated by other genes possessing of the same function. Dominant mutants or Gain-of-function mutants by activation tagging is an important approach for exploring function of this kind of genes. Activation tagging is the T-DNA or transposons harboring the 35S enhancers or promoters, if it inserts in the genes, there will be loss-of-function mutants; if it inserts upstream or downstream to the gene, the gene expression can be increased above normal level and the dominant gain-of-function mutants will be obtained. Activation tagging mutant pools based on T-DNAs and transposons have been established in several kinds of plants and it suggested the important role of the activation tagging in functional genomics and make the important development for the function explored of the gene family. This paper presents the principle, character, create method of activation tagging, its application in study of growth, development, metabolism of plants and the prospects of activation tagging is also inquired.

**Key words:** function genomics, mutant, activation tagging

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (编号: 30270854, 30340049)。

**第一作者简介:** 宛淑艳, 女, 1968 年出生, 黑龙江省肇东人, 讲师, 理学博士。研究方向及学术成就: 2003~2006 年, 中国农业科学院研究生院生物化学与分子生物学专业博士, 从事水稻分子生物学和功能基因组学研究, 现在湛江师范学院教师。通信地址: 524048 广东省湛江市赤坎区寸金路 29 号湛江师范学院生命科学与技术学院。E-mail: yuanwen-2005@163.com。

**收稿日期:** 2008-01-12, 修回日期: 2008-03-12。

功能基因组学是后基因组时代的重点研究内容,主要研究生物有机体内各基因的生物功能进而了解所有基因如何协调发挥作用完成一序列的生长发育过程。通过与已知基因序列(包括核苷酸序列、mRNA序列和蛋白质序列)的同源性比较可以预测许多未知基因的假定功能,也可能通过它们在染色体上的位置进行预测。然而,要精确了解每个基因的功能及基因间的互作功能,必须分析单个基因和多个基因的突变表型以及它们的时空表达剖面。要分离鉴定基因的功能首先是构建饱和的基因突变群体,通过突变体分析鉴定基因功能。因此突变群体的构建是功能基因组学的基础。通过物理的、化学的以及组织培养产生的碱基替换、DNA片段插入、丢失引起的功能缺失型突变体克隆了大量的功能基因。而基因组规模的插入突变技术已成为拟南芥和水稻中主要的创制突变体库的策略,插入突变技术即将某些元件插入到植物基因组中后,相应位点的基因的表达就可能受到抑制,插入元件同时又可用作标签,从基因组中分离出相应的基因并鉴定其功能。T-DNA插入突变(insertional mutagenesis)和转座子插入突变技术是目前较为常用的两条创制突变体的技术路线。然而这些基因缺失突变技术有个很重要的缺点,就是有些基因被缺失或被T-DNA、转座子插入后并不能产生可见表型变化的突变体,主要是因为以下几个方面:

首先,真核生物中有大量的冗余的基因以防止出现无意突变<sup>[1]</sup>。通过对拟南芥及水稻的基因组的研究,阐明了这两类植物含有大量基因家族<sup>[2-4]</sup>。拟南芥中大约有2/3的基因是两个拷贝<sup>[5]</sup>;其次,大约有4000个基因串联重复2个或更多个拷贝,而对于水稻,依染色体的不同两个拷贝的基因大约为15.4%~30.4%<sup>[3]</sup>。序列分析表明,当相同序列超过100bp,并且相同序列至少已达的80%就认为这些序列为重复序列,2000个水稻cDNA中有851个(41%)是单拷贝,509(24%)是两个拷贝,其余(35%)为3个或多个拷贝<sup>[3]</sup>,其中11和12染色体两个拷贝的序列是最多的<sup>[3]</sup>。因此,除非多个基因同时突变,T-DNA插入标签系和转座子标签系对分离这些多拷贝基因的效率很低。据估计,在拟南芥和水稻的插入突变群体中可以产生可见的表型变化的标签基因不到10%<sup>[6,7]</sup>。

基因功能的冗余对于分离基因的功能是一个明显的障碍<sup>[8]</sup>。许多插入突变体没有可见的表型改变,主要是因为功能互补而不显示任何表型。除了突变基因有冗余(redundant gene),同一基因家族的其它成员有功能重复之外;突变体观察不到表型的另一可能原因是

发育早期的基因特别是配子发育相关的基因或者在植物多个发育阶段有功能的基因,这些基因的缺失突变体则导致死亡;另外有些基因可能已经进化到仅在特定的生理状态下才有功能,为检验某一未知功能基因的在一定条件下的表型,必须采用一系列环境条件或生理条件的处理加以诱导;有的基因可能有多效性,它能在一个特定的代谢途径中掩盖某一基因的作用。此外,瞬间表达的基因、表达水平很低的基因、以及在少数细胞中表达的基因,这些基因利用简单的插入突变技术都难以被鉴定出来。因此在大多数情况下基因的缺失突变并不能够产生明显的表型变化,这给分析基因功能带来了难度。因此对传统插入突变技术进行一些改进,如激活标签(activation tagging)技术,可在一定程度上解决了上述问题。

### 1 激活标签系统的概述

弥补插入失活突变的缺陷最有效的方法是产生具有显性性状的功能获得性突变体。功能获得性突变的一种是通过基因编码区的突变引起该类蛋白的组成性表达;还有一种功能性突变是基因表达类型和表达程度的改变。传统的引起基因表达类型或表达程度的改变是通过染色体重组或转座子转座引起的基因置于新的启动子或增强子作用之下<sup>[9]</sup>,而更直接的引起这种功能获得性突变是将外源的增强子或启动子插入基因附近,引起该基因的增强表达。一般来说,高等生物细胞的通用型启动子多数来自病毒的基因组,而对植物来说,花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus, CaMV)35S RNA的启动子是研究的最为深入、应用最为广泛的植物基因启动子,这是因为35S启动子不需要病毒编码的转录因子就能几乎在所有植物,包括单子叶和双子叶植物,在不同组织,甚至不同细胞类型中启动下游基因的大量表达。1992年,由Walden和他的同伴们<sup>[10]</sup>构建的带有4个多聚花椰菜花叶病毒(CaMV)35S基因的增强子序列的T-DNA载体产生了引起的基因表达增强的突变体。这些增强子可以激活附近位置的基因转录表达,因为这些激活的基因是由T-DNA插入引起的,这种方法称为激活标签法。另一种激活标签的方法是将其方向朝向外部的整个35S启动子序列置于转座子Ds内,已经在拟南芥用于鉴定各种显性突变体如TINY, LATEELONGATED HYPOCOTYL (LHY), and SHORT INTERNODES (SHI)<sup>[11-13]</sup>。含有35S增强子或启动子的T-DNA或转座子若插入基因内,可导致插入突变,引起插入失活突变体的产生;若插入基因附近(上游或下游),则可能激活正常情况下不表达或表达极弱的基因,导致显性功能

能获得(dominant gain-of-function)突变。研究表明,该系统 CaMV 35S 增强子确实引起大部分其附近基因过量表达,其表达为基因原有的表达模式而不引起组成型的异位表达<sup>[14]</sup>。

## 2 激活标签系统在拟南芥和水稻中的具体应用

Weigel 等<sup>[14]</sup>在拟南芥中应用该系统进行基因功能的研究,其载体为 pSKI015(图 1),T-DNA 区右边界含有 4 个 35S 增强子序列,左边界是抗除草剂 BAR 基因。在再生植株中已经鉴定两个在长日照条件下延迟开花的显性突变体 esc-1D 和 jaw-1D 和一些半显性突变体。通过对 25000 个株系的筛选确定了 23 个有明显表型的突变体,通过共分离和 Southern 杂交分析,确定突变体的产生是由 35S 增强子基因增强表达引起的。为了验证激活标签系统的功能,对突变体进行了一系列的分析,首先,对突变体插入位点的结构分析表明,增强表达的基因在距离载体 CaMV35S 增强子

380~36000bp 内,35S 序列或者位于基因上游或者位于基因的下游;其次是与 T-DNA 的简单插入失活突变相比,该系统很少引起插入位点的序列重排等复杂结构,因而容易得到其侧翼序列,这可能是由于激活表型的形成需要 T-DNA 高效的插入植物基因组中;另外发现有的基因位于 CaMV35S 序列附近但没有被激活表达,推测其中一个可能的原因是在拟南芥中基因组中存在大量绝缘序列(insulator sequence),是植物本身的一种保护机制,保护基因不受附近的其他增强子或启动子的影响而改变表达方式,没有被激活表达另一个原因可能是因为有的启动子有偏好性,CaMV35S 增强子只对部分内源启动子起作用;最后是研究这些功能获得性突变体是否反映基因原有的功能,分析表明,由激活标签系统引起的这些突变体只是增强表达基因原有的表型而不会改变表达模式,因此比基因的异位表达更能反应基因本身的功能。

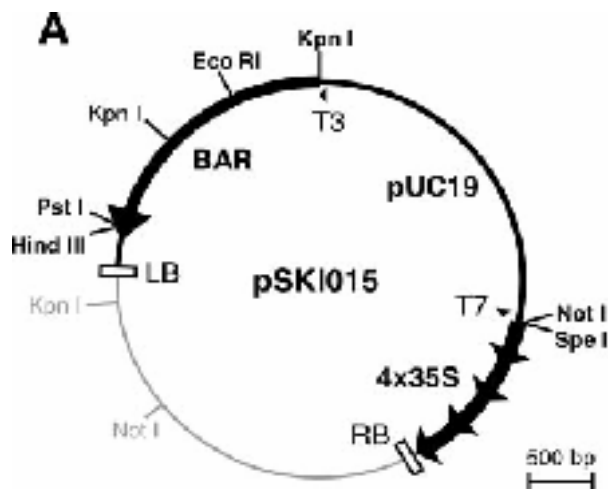


图 1 激活标签载体 pSKI015 (Weigel et al 2000)

4x35S, 4 个串联重复的多聚花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 的增强子序列, pUC19, pUC19 序列;

BAR, Basta 选择标记; LB, T-DNA 边界 RB, T-DNA 右边界.Hind III, Pst I, Kpn I 等为酶切位点

激活标签系统从产生后就已经广泛应用于拟南芥中,2002 年,为了研究在单子叶植物中激活标签系统的功能,Jeong 等<sup>[15]</sup>将此系统利用农杆菌转化法在水稻中进行了应用。Jeong 首先验证了 CaMV35S 增强子在水稻中的激活基因表达情况,把 4 个 CaMV35S 增强子序列置于带有一个弱 CaMV35S 启动子(minimal promoter)的 GUS 基因的上游组成的表达载体 pGA2523(图 2),其对照载体 pGA2520 与其不同的只是不含有 4 个 35S 增强子序列。然后又将这 4 个 35S 增强子序列置于带有一个弱 NOS 启动子的 GUS 基因的上游组成的表达载体为 pGA2526(图 2),其对照载体 pGA2525 也同样只是不含 4 个 35S 增强子序列。转入水稻后,GUS 染色结果表明,对照载体植株 GUS 基

因只在愈伤组织有轻微表达,而叶和花中未见表达。而 pGA2523 和 pGA2526 的载体的 35S 增强子确实增强了弱启动子的基因表达,不管是 35S 的弱启动子还是 NOS 的弱启动子的 GUS 基因都表现为表达增强,而且既在愈伤组织中表达又见在叶和花中表达。

为进一步确定 35S 增强子的激活基因表达的作用,又将 35S 的 4 个增强子序列置于带有 35S 弱启动子 GUS 基因的上游但方向相反,其载体为 pGA2524(图 2),另一个载体 pGA2522 则是将 35S 的 4 个增强子序列置于带有 35S 弱启动子 GUS 基因的下游也是方向相反。经检测在两种载体的转基因再生植株中叶和化中都表现为 GUS 基因的增强表达。这充分说明在水稻中,35S 的增强子不管位于基因的上游还是下游,

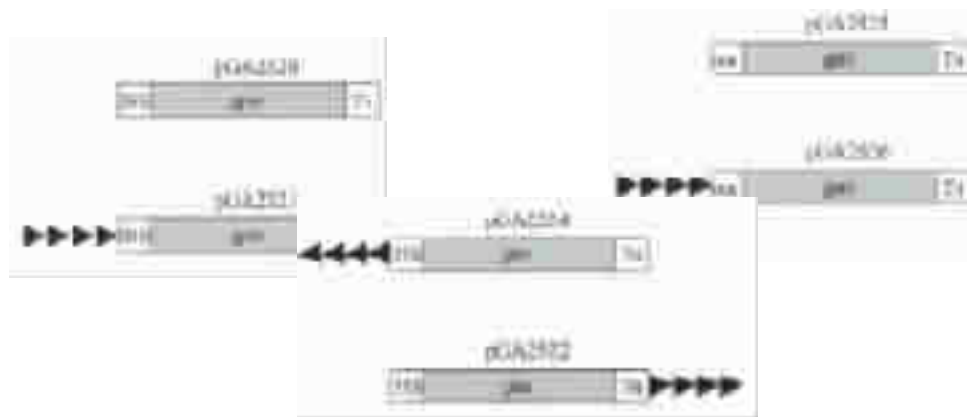


图2 4个35S增强子与含有弱启动子的GUS基因的融合载体极其对照载体(Jeong, et al. 2002)

4个黑色箭头代表4个35S增强子, 35S为35S弱启动子, 是启动子上距离基因转录起始位点90bp的一段序列; gus为GUS报告基因; Tn为nos(胭脂碱合成酶)终止子; nos为nos弱启动子, 是启动子上距离基因转录起始位点101bp的一段序列

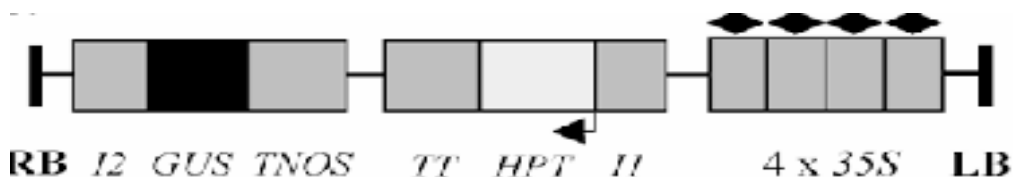


图3 pGA2715载体(Jeong, et al. 2002)

4x35S, 4个串联重复的多聚花椰菜花叶病毒(CaMV)35S的增强子序列 OsTubA1(水稻α微管蛋白启动子)的第二个内涵子带有3个用于基因捕获的3个拼接点; GUS, 报告基因; TNOS, NOS终止子序列; TT, OsTubA1的终止子; HPT, 潮霉素抗性基因; (I1), OsTubA1的第一个内涵子以增强基因的表达。

不管是正向还是反向都能激活基因的表达, 与在双子叶中的情况一样。

Jeong等应用的激活标签载体载体为pGA2715(图3), 其T-DNA左边界含有4个串联重复的CaMV35S增强子, 起到激活基因表达的功能, 中间是潮霉素抗性基因, 右边界含有一个不含启动子的GUS报告基因及用于基因捕获功能的几个拼接位点, 又具有增强子捕获的功能, 同时又用一个与pGA2715完全一样而只是不含35S增强子序列的载体pGA2707作对照。对两个载体的GUS染色分析表明, pGA2715的再生植株的各个部位的GUS基因的表达均高于pGA2707的2倍, 这是由于pGA2715载体本身的35S增强子增强了GUS基因的表达的作用。pGA2715载体共产生了大约13450株可育再生苗, RT-PCR分析表明被检测的距离35S增强子1.5~4.3kb以内10个基因中有4个被激活表达, 其余未见增强表达, 这可能是由于有绝缘序列的原因, 也可能是激活表达的基因不全部产生可见的表型改变, 或只在特定的组织和特殊的环境条件下表达。而且也发现35S的增强子只是增强基因的原有的表达模式, 而不会产生其他的表型变化。

由此确定了激活标签系统在单子叶植物如水稻中的作用, 并证明35S增强子同35S启动子一样也可以

广泛应用于单子叶植物中用于增强基因的表达。

由于T-DNA载体在与基因组整合时容易发生边界缺失, 载体重复, 通读等复杂结构而影响其激活基因的效率又不易分离侧翼序列, 而应用转座子激活标签法可以克服此缺点, 同样也起到激活基因表达的作用。即利用玉米中的非自主转座子成分Ds元件含有(CaMV)35S的启动子序列<sup>[11]</sup>或玉米中的自主转座成分Ac和35S启动子结合<sup>[16]</sup>, 转入植物体内引起基因的增强表达。

早在1996年, Wilson等就在拟南芥中利用被修饰的玉米的非自主转座子元件Ds带有CaMV35S启动子成分和选择标记抗潮霉素HPT基因的激活标签载体(图4)产生了激活标签群体, 经鉴定在1100个含有DS(HYG35S)再生株系中, 发现33个突变体, 其中有4个为显性突变体。并鉴定了一个显性突变体tiny, 表现为植物体极度矮小, 分析表明在野生型中该基因表达很弱, 但在突变体中则有高水平的表达, 并与Ds(HYG35S)成分表现共分离, 因此是由于Ds(HYG35S)成分插入引起基因的过量表达所致。

Marsch-Martinez等<sup>[17]</sup>是将玉米En-1转座子组成的激活标签系统应用于拟南芥中, 其载体上由非自主成分I(dSpm)含有4个CaMV35S的增强子序列和选择标记BAR基因组成激活元件, 产生了8300株再生

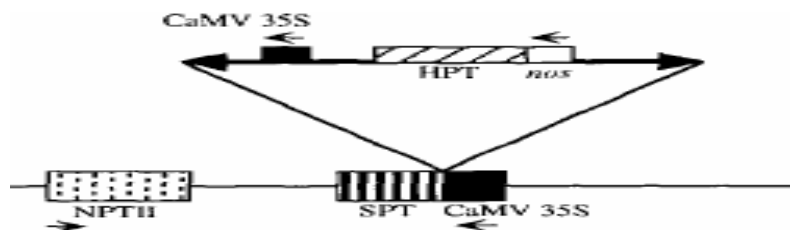


图4 转座子激活标签载体 T-DNA 的 Ds(HYG 35s)结构

T-DNA 区内含有带有 35S 和 HPT 的 Ds 成分, 另一个 35S 启动子在转座后驱动 SPT 的表达. The NPTII, HPT, and SPT genes 分别是编码卡那霉素, 潮霉素, 链霉素抗性基因; nos 为终止子

植株, 对 2900 个插入位点的分析鉴定 31 个显性突变体, 出现显性突变体的效率是 1%。

### 3 激活标签系统在植物功能基因组研究中的具体应用

在拟南芥中, 利用此系统已在转基因株系中将大量的与植物生长发育、代谢、以及与环境相互作用的基因鉴定出来<sup>[18-21]</sup>。植物在生长发育、抗病及一些次生物质的合成代谢方面存在着复杂的代谢调控, 虽然进行的多年的正向遗传学的研究, 但取得的进展有限, 而运用简单的 T-DNA 和转座子标签系统产生的插入突变的研究也收效甚微。而通过运用一系列激活标签系统产生的功能获得性突变的研究已经取得了可喜的进展<sup>[22]</sup>。

#### 3.1 激活标签系统在植物生长发育研究中的应用

尽管经过近 100 年的研究, 生长素的生物合成机制现在也是比较模糊的, 关于吲哚乙酸的合成机制已经提出很多途径, 包括依赖色氨酸途径和非依赖色氨酸途径<sup>[23]</sup>。尽管经过大量一系列的筛选, 生长素的缺失突变体仍很难鉴定。如当株系表现生长素含量升高时, 不清楚是否是由内源基因的突变引起的, 这就需要有一个更有效的方法来鉴定。而运用激活标签系统已在拟南芥中发现两个下胚轴较长的突变体, 命名为 *yucca*, 类似生长素过量的突变体, 突变体表现为子叶的偏上性生长和顶端优势。通过鉴定, 该基因编码生长素合成过程的一个限速酶, *yucca* 基因是一个基因家族的一员, 很多基因有此相同的功能, 而这类基因很难用缺失突变来鉴定。

激活标签系统还可以通过突变体鉴定基因的增强子和抑制子。一个明显的例子就是在拟南芥中发现一个突变体的抑制子<sup>[24]</sup>, 该突变体对油菜素内酯 (BRs) 的不敏感, 主要表现为识别油菜素内酯的物质生物合成减少或者是对油菜素内酯的识别程度降低, 性状表现为植物体矮小、雄性不育、多叶、和光形态建成的缺陷。在植物中, 油菜素内酯的识别需要 *BRI1* 一个类受体

激酶 (RLK), 胞外富含亮氨酸重复序列 (LRRS), 类似 LRR-RLK 的酶<sup>[25]</sup>, 该基因突变则出现上述表型。运用激活标签系统发现了 *BRS1*, 是 *BRI1* 突变体的抑制子, 在油菜素内酯存在的情况下, 抑制 *BRI1* 的突变体的产生, 表明 *BRS1* 在 BR 信号传导中其调节作用。*BRI1* 的另一个抑制子也是通过激活标签系统发现的, 该抑制子 *BAK1* 也是编码类似 LRR-RLK 的酶, 过量表达该基因使植物的器官延长, 类似 BR 的拟表型 (由环境变化引起的不遗传的表型), 该基因缺失则出现很明显的矮化, 类似 *BRI1* 基因的缺失。研究表明 *BRI1* 和 *BAK1* 在细胞内外相互作用, 为配体结合的自动磷酸化模式。

#### 3.2 激活标签系统在植物抗病研究中的应用

植物抗病系统是一个复杂的代谢网络, 需要植物的抗病基因 (R) 的产物对病毒无毒基因 (avr) 产物的识别, 通过研究发现抗病基因 (R) 有许多等位基因, 现在只有一部分与 R 有关基因的功能被揭示出来。运用激活标签系统, 已发现了一批与植物抗病相关的基因—例如 *CDR1*<sup>[26]</sup>, *CDR1* 编码天冬氨酸蛋白酶, 是一个大的具有类似功能的基因家族的一员。反意表达 *CDR1* 的 RNA 发现抗病功能的丧失, 表明 *CDR1* 基因与 R 基因的功能有关, 但 *CDR1* 的功能还有待于进一步确定, 可能是在抗病过程中促进一系列蛋白酶成簇表达, 进而产生一系列微小生物分子和内源蛋白。有趣的是蛋白酶成簇表达是动物本能的免疫系统的反应。

另外是对系统性抗病的研究, 运用激活标签系统也分离到了一些有重要作用的基因。遗传学的研究表明<sup>[27]</sup> 系统性抗病 SAR (systemic acquired resistance) 是在 R 基因介导细胞程序性死亡时被激活表达并提供植物具有系统性的抗病的能力, 水杨酸 SA (salicylic acid) 的积累可以使与识别病毒相关的蛋白 PR 的表达, 该蛋白与 SAR 的形成有关。现在的证据表明, SA 可能是在 SAR 网络系统中处于多个交叉位点的重要成分, 可能起到信号放大的作用<sup>[28]</sup>。一些实验室通过基

因缺失突变找到了一些 SA 不敏感的突变体,但是只分离到几个相关基因。而运用带有 PR1::luciferase (LUC) 报告基因融合载体的激活标签系统<sup>[21]</sup>产生的再生植株,通过检测 LUC 的活性,已从 30000 个转基因株系中分离到 12 个功能获得性突变体,激活表达 PR1 基因和一系列抗病相关基因,从而取得了突破性进展。

### 3.3 激活标签系统在植物次生代谢研究中的应用

植物由于固定不动,因此产生了大量次生代谢物质以适应周围环境的变化使植物能够得到保护。这些次生代谢物质已被用做药物、香料、芳香剂、染料等。这些天然物质的商业价值还有待认识,主要是由于植物中的产量过低和具有组织特异性。这些物质一般都是化学成分复杂很难人工合成,因此尽管产量低,植物中的来源仍然是比较可观的,诱导这些物质的合成是一个比较好的方法,然而确定合成途径过程中的酶和调节因子则是一个很艰巨的任务,而运用激活标签系统很快就发现了一个编码重要调节蛋白的基因。类帖 (TIAs) 的生物合成包括 20 多个步骤,对于这些次生物质的产生,植物一定具有很好的调控网络,然而其重要的调控步骤一直不清楚,最近运用激活标签系统在 *Catharanthus roseus* 已发现 (TIAs) 合成途径的重要的调节因子—ORCA3<sup>[29]</sup>,该基因编码 AP2 因子的一部分蛋白,AP2 是参与植物进行一系列抵抗胁迫反应的转录因子。ORCA3 的过量表达导致 TIAs 的生物合成途径的一系列基因 *Tdc*、*Str*、*Sgd*、*Cpr* 及 *D4h* 的表达增强,而这些基因还编码 AS 和 DXS (编码 TIAs 前体产生的酶) 的一个亚基。可见一个简单的 AP2 转录因子即可以调节初生物质又可以调节次生物质的代谢。

另外,激活标签系统在花青素的研究中也取得了一些进展,植物中的花青素属于另一类次生物质,其产生有严格的组织特异性,只在某些特定部位表达如花瓣和种皮等处表达以防止紫外线的伤害<sup>[30]</sup>。而激活标签系统中的转基因植株可以在植物的根、茎、叶等处表达并且在萼片、花粉囊及花瓣中表达的一样。这些异位表达的基因编码合成查尔酮的酶,是在芳香族化合物合成中起关键作用的酶。经研究发现了转录因子 PAPI<sup>[31,32]</sup>,是 MYB 转录因子的一员,编码该转录因子的类似基因在拟南芥中有 100 多个,参与花青素的表达。因此激活标签系统在鉴定表达量很少或有组织特异性的基因也非常有效。

### 3.4 激活标签系统在其他模式植物中的应用

激活标签系统已广泛应用于拟南芥中各个领域的基因功能的研究,其他一些模式植物也进行了应用并

取得了很好的效果。在树木的模式植物白杨中应用了转座子激活标签系统,树木在生长过程中经过很多世代,基因的重复率很高,常规的 T-DNA 标签和转座子标签系统效率很低。现已证明激活标签系统很有效<sup>[6]</sup>,其载体构建方法是 35S 启动子和玉米中的自主转座成分 Ac 及一个形态选择标记 rolC (来自 *Agrobacterium rhizogenes*) 结合组成 35S-Ac-rolC 成分转入白杨中,并获得了重要的功能获得性突变体。

在番茄中,已经利用激活标签系统分离到了一个代谢调控的重要的调节因子—ANT1,为编码 MYB 转录因子<sup>[33]</sup>。该系统的突变效率较高,在 10427 再生株系中,T0 代的 1338 (12.8%) 株明显与野生型不同。随机抽取的 T1 代 1014 株中有 103 (10.2%) 出现 T0 代未出现的表型,这是由于 T-DNA 插入引起的功能缺失突变。在激活表达的株系中发现一株表现浓重的紫色的株系,是由花青素积累过多引起的,通过对其进一步的研究确定了 ANT1 的功能。

在矮牵牛中,利用激活标签系统,Elena<sup>[34]</sup>鉴定出一个参与细胞分裂素生物合成的基因,从再生植株中发现一株具有与细胞分裂素处理的植物相似的表型的株系,其顶端优势减弱,分枝增多,开花和衰老延缓,命名为 Ph-sh,其编码基因 sho 位于 T-DNA 的插入位点 1305bp,在野生型植物中,几乎检测不到该基因的表达,但在突变体 Ph-sh 中,sho 的 mRNA 却大量存在。序列分析表明,sho 与农杆菌和枯草杆菌的异戊烯基转移酶具有同源性。把该基因转移至烟草中得到 Ph-sh 类似的表现型,并伴随着细胞分裂素表达量的增高。

### 3.5 水稻基因激活标签群体的功能验证

通过与合作者的共同努力,笔者参与建立了高效、快速的大规模根癌农杆菌介导的水稻 T-DNA 插入突变遗传转化体系,从成熟胚诱导愈伤组织开始,约 90d 后即可得到转化植株。构建了大规模的水稻基因激活标签突变体库和增强子捕获突变体库 (各约 5 万份)。

利用 PCR walking 和 Tail-PCR 技术对激活标签 PER38 和增强子捕获标签 pFX-E24.2-15R 两个体系产生的再生植株 T-DNA 侧翼序列进行分离,分别获得 172 条和 493 条水稻水稻基因组侧翼序列。通过对两个体系的侧翼序列的分离效率;T-DNA 插入位点的分布分析以及激活标签系 RT-PCR 的分析,结果表明:(1) 激活标签载体 PER38 获得的再生植株获得 T-DNA 的侧翼序列明显高于增强子捕获载体 pFX-E24.2-15R,比例分别为 63.2%和 38.1%。(2) 通过激活标签系的 RT-PCR 的分析,与野生型比较,在检测

的 11 个基因中有 6 个基因明显被激活表达,其 T-DNA 的插入位点在距离基因上游或下游 1.1~4kb 内,表明该载体的 35S 增强子确实起到激活基因表达的作用。

该标签突变群体具有上述激活标签突变体的一系列优点,而且通过该突变体库的田间观察及分析表明,其该激活标签突变体出现的频率确实远远高于增强子捕获群体(数据未列出),因此,本人认为激活标签系统是最适合利用大规模突变群体研究基因功能的手段。

#### 4 激活标签系统的特点

激活标签系统具有以下几个特点:首先,通过该系统可以产生显性突变,可有效用于分析多拷贝基因,而且其突变表型在转基因当代就可以看到。其次,其突变表型与缺失突变完全不同,常常产生有利于作物生长发育的性状而且其显性突变表型反映基因本身固有的功能<sup>[35]</sup>。再次,该系统既可以进行基因增强表达的显性突变体的筛选又可以进行基因失活引起突变体的筛选,引起的突变率要远远高于单位点插入的突变率。

另外由 35S 增强子或启动子序列<sup>[36]</sup>作为该系统的激活元件,被增强表达的基因不都表现为表型的变化,这和其他强启动子如 *Actin* 或 *ubiquitin* 引起的异位表达不同,这些启动子常引起基因的组成型表达。还有,与简单的 T-DNA 插入突变相比,激活标签突变体的 T-DNA 插入位点形成 T-DNA 的串联重复的情况较少<sup>[14]</sup>,而有利于进行插入位点的侧翼序列的分离。

最后激活标签系统 35S 增强子有组织特异性<sup>[37]</sup>,35S 的增强子有时在叶中有明显增强作用而在根中很弱。因此需要构建一批新的载体,利用 T-DNA 区特殊的增强子或启动子序列来进行组织特异性的分析

#### 5 激活标签系统的发展

在研究中发现有时 35S 增强子并不总是激活附近的基因的表达,推测一个可能原因是某些植物基因组中存在绝缘序列(*insular sequence*),这些序列可能在拟南芥和水稻中大量存在,以防止基因附近的异源的增强子或抑制因子对基因的表达的影响。另一个原因 35S 增强子有组织特异性,有时这些增强子只在叶中起作用而在根中活性很弱。因此为了更好的运用该系统来揭示基因的功能,现在逐步运用其他种类的或有组织特异性的增强子和启动子构建一些新的载体来激活基因的表达。

激活标签的另一个改进是利用诱导型启动子激活基因表达产生条件型突变体,如利用化学物质诱导的激活标签系统已经在拟南芥中进行了应用<sup>[38]</sup>,通过诱导表达产生了与正常表型完全不同的功能获得性突变

体,并已分离到可以控制由营养生长转向生殖生长的相关基因,其突变体的生长发育与野生型完全不同。具体方法是将诱导型启动子序列置于 T-DNA 的左边界附近以诱导插入位点的基因在一定条件下表达而产生功能获得性突变体。

再有就是利用热激激活标签系统鉴定温度依赖型突变体基因<sup>[39]</sup>。方法是将拟南芥中的热激启动子 HSP18.2 置于 T-DNA 的左边界或右边界激活旁侧基因的表达而产生的温度依赖型变化的突变体。

综上所述,激活标签系统已经广泛应用于各类植物基因功能的研究,而且已经显示出极大的优越性,更重要的是该激活标签系统更适合利用大规模突变群体研究基因的功能。今后,通过对该系统的进一步改进将在功能基因组学中发挥更大的作用。

#### 参考文献

- [1] Gu Z, Steinmetz L.M, Gu X, Scharfe, et al. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature*, 2003, 421: 63-66.
- [2] Arabidopsis genome initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000, 408: 796-815.
- [3] Goff S.A, Ricke D, Lan T.H, A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 2002, 296: 92-100.
- [4] Yu J, Hu S, Wang J, et al, A draft sequence of the rice genome. *Science*, 2002a, 296: 79-92.
- [5] Harushima Y, Yano M, Shomura A. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. *Genetics*, 1998, 148: 479-494.
- [6] Feldmann K.A. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant Journal*, 1991, 1: 71-82.
- [7] Jeon J.S, An G. . Gene tagging in rice : a high through put system for functional genomics. *Plant Science*, 2001, 161: 211-219.
- [8] Normandy J, Bartel B. Redundancy as a way of life—IAA metabolism. *Current opinion in plant biology*, 1999, 2: 207-213.
- [9] Chadwick R, Jones B, Jack T, McGinnis W. Ectopic expression from the Deformed gene triggers a dominant defect in *Drosophila* adult head development. *Developmental Biology*, 1990, 141: 130-140.
- [10] Hayashi H, Czaja I, Lubenow H, et al. Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth in vitro. *Science*, 1992, 258: 1350-1353.
- [11] Wilson K, Long D, Swinburne J, et al. *Dissociation* insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an *Arabidopsis* gene related to APETALA2. *Plant Cell*, 1996, 8: 659-671.
- [12] Schaffer R, Ramsay N, Samach A, et al. The late *elongated hypocotyl* mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell*, 1998, 93: 1219-1229.
- [13] Fridborg I, Kuusk S, Moritz T, et al. The *Arabidopsis* dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *Plant Cell*, 1999, 11: 1019-1032.

- [14] Weigel D, Ahn J.H., Blazquez M.A., et al. Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2000, 122: 1003-1013.
- [15] Jeong D.H., An S, Kang H.G., T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiology*, 2002, 130: 1636-1644.
- [16] Fladung M, Ahuja M R. Excision of the maize transposable element Ac in periclinal chimeric leaves of 35S-Ac-rolC transgenic aspen-populus. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33: 1097-1103.
- [17] Marsch N, Greco R, Arkel G.V., et al. Activation tagging using the En-I maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2002, 129: 1544-1596.
- [18] Kardailsky I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., et al. Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*, 1999, 286: 1962-1965.
- [19] Li J, Wen J, Lease KA, et al. An *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signalling. *Cell*, 2002, 110: 213-222.
- [20] Borevitz J.O., Xia Y, Blount J, et al. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 2000, 12: 2383-2393.
- [21] Grant J, Chini A, Basu D, et al. Targeted activation tagging of ADR1, a NBS-LRR gene, conveys resistance to virulent pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16: 669-680.
- [22] Helen T., Xin C., Pedro N, et al. Activation tagging in plants: a tool for gene discovery. *Functional & Integrative Genomics*, 2004, 1-9.
- [23] Bartel B., Auxin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, 1997, 48: 51-64.
- [24] Clouse S.D, Angford M, McMorris T.C., A brassinosteroidinsensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology*, 1996, 111: 671-678.
- [25] Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signaling transduction. *Cell*, 1997, 90: 929-938.
- [26] Xia Y, Suzuki H, Borevitz J, et al.. An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signalling. *The EMBO Journal*, 2004, 23: 980-988.
- [27] Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., et al. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 1996, 8: 1809-1819.
- [28] Conrath U, Chen Z.X., Ricigliano J, et al. Two inducers of plant defense responses, 2, 6-dichloroisonicotinic acid and salicylic-acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92: 7143-7147.
- [29] Hashimoto T, Yamada Y. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, 1994, 45: 257-285.
- [30] Mol J, Grotewold E, Koes R. How genes paint flowers and seeds? *Trends in Plant Science* 1998, 3: 212-217.
- [31] Kranz H.D., Denekamp M, Greco R, et al. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 1998, 16: 263-276.
- [32] Romero I, Fuentes A, Benito M.J., et al. More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 1998, 14: 273-281.
- [33] Helena Mathews I, Stephanie K. Clendennen, Colby G. Caldwell, et al. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell*, 2003, 15: 1689-1703.
- [34] Elena Z., Christopher J. Adams, I, et al. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant Journal*, 2002, 29: 797-808.
- [35] An G, Lee S, Kim S.H. Molecular genetics using T-DNA in rice. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46: 14-22.
- [36] Odell J.T., Nagy F, Chua N.H., Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 1985, 313: 810-812.
- [37] Benfey P.N. Chua N.H. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *The EMBO Journal*, 1989, 8: 2195-2202.
- [38] Zuo J, Niu Q.W, Frugis G, et al. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 2002, 30: 349-359.
- [39] Matsuhara S, Jingu F, Takahashi T, et al. Heat-shock tagging: a simple method for expression and isolation of plant genome DNA flanked by T-DNA insertions. *Plant Journal*, 2000, 22: 79-86.