

转座子标签在植物基因组学研究中的应用

李宏 (重庆工商大学环境与生物工程学院, 重庆 400033)

摘要 转座子因其插入突变的特征可用于基因的分离和克隆, 转座子标签法克隆基因是近年来发展起来的一种分子生物学技术。主要介绍了转座子家族的概念, 植物内源转座子标签和异源转座子标签的研究, 转座子陷阱技术以及在植物基因组学研究中的应用。

关键词 转座子; 基因标签; 基因组; 克隆; 陷阱

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611 (2009) 02 - 00527 - 02

Application of Transposon Tags on the Study of Plant Genomics

LI Hong (Environmental and Biological Engineering College, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400033)

Abstract Transposons may be used in the separation and clone of genes owe to their properties of inserting mutation. The transposon tag method is a kind of molecular biological techniques to clone a gene in recent years. This study aimed to introduce the conception of transposon families, the research of intrinsic and extrinsic transposon tags, the technique of transposon trap and its application in the study of plant genomics.

Key words Transposon; Gene tags; Genome; Clone; Trap

随着拟南芥、水稻基因组测序工作的完成, 植物科学研究已进入了后基因组时代^[1]。1981年 Balcells 等^[2]提出了转座子基因标签的概念, 即用转座子的特异性片段作探针, 通过杂交, 分离出有转座子导致突变的基因。

由于转座子标签法的宿主范围很广, 目前已成为植物基因分离和基因功能基因组研究的有力工具。笔者主要介绍了转座子标签法的研究进展以及在植物功能基因组学研究方面的应用。

1 植物转座子家族及内源转座子标签

McClintock 在以玉米为材料的遗传学研究中, 首先提出转座子的概念^[3]。此后, 研究者又相继发现其他转座子, 如酵母的 Ty-1、Ty-5, 果蝇的 P 因子、copia、Tip、412, 玉米的 Enhance、modulator, 金鱼草的 Tam1、Tam2 和 Tam3, 拟南芥菜的 Tag1、烟草的 Slide1, 水稻的 Tnr3 和矮牵牛的 Psl 等。根据植物转座子各成员的末端, 可将植物转座子分成不同的家族, 如转座子 Ac-Ds 家族、En/Spm 家族等。

在玉米中, 3 个家族的转座子 Ac、Spm 和 Mu 都已被广泛用作标记分离基因。金鱼草的 Tam 因子和矮牵牛的 dTph 因子在基因分离中也很有价值。有些内源转座子家族, 如玉米 Mu 因子家族和矮牵牛 dTph 因子家族, 由于存在多个插入点, 因而会发生切除足迹 (footprint) 而产生突变的可能, 事实上不是真正的转座子标记^[4]。

反转录转座子是一类很有潜力的转座子标签体系, 包括了许多亚群。目前共发现 4 种类型的反转录转座子, 高等植物中的反转录转座子主要属于 Ty1-copia 类。目前已在许多植物中发现了逆转录转座子, 如玉米中的 Bs1、烟草中的 Tnt1 和拟南芥菜中的 Tal^[5]。1996 年 Hirchick 等就利用水稻反转录转座子 Tos17 建立了水稻基因敲除体系。1999 年 Sato 等利用 Tos17 基因敲除体系分离克隆了 6 个水稻 knl 型同源异型框基因, 发现了引起水稻植株矮化的突变基因 OSH15^[6]。目前 Tos17 反转录转座子已发展成为一个在水稻上很有希望的体系^[7]。

2 异源植物的转座子标签

Baker 等在研究转基因烟草时发现玉米转座子 Ac/Ds 在烟草体系中被激活, 从而开创了转座子标签在异源植物中应用的先例^[8]。以后的研究表明, 玉米的 Ac 因子能在烟草、亚麻、大豆、杨树、拟南芥菜、胡萝卜、繸子花等植物中转座, 玉米的 Ac/Ds 因子在拟南芥菜、水稻、番茄、矮牵牛、亚麻、胡萝卜、莴苣、马铃薯等异源植物中也具有转座活性。另外, 玉米的 Spm/dSpm (En/I) 也被应用于烟草、番茄、马铃薯和拟南芥菜等异源植物中。拟南芥菜的转座子 Tag1 也被应用于烟草和水稻中。金鱼草 Tam3 转座子被应用于烟草和矮牵牛中。

转座子标签系统可以根据转座子种类数分为一元标签系统、二元标签系统和三元标签系统。一元标签系统中最常见的是自主性转座子, 如玉米的 Ac 转座子、Mu 转座子和矮牵牛的 dTph1 转座子。二元标签系统中最常见的是 Ac/Ds 系统。大多数的转座子, 包括 Ac/Ds 和 En/Spm, 都有优先转座到相邻区域的趋势, 这可通过将 Ds/dSpm 均匀分配到不同染色体的起始基因系来解决。Sundaresan 等通过供体的负选择标记解决了 Ac/Ds 系统中 Ds 因子转移到连锁区的倾向。Tissier 等对 Spm/En 系统进行了修饰, 将 Spm 转移酶和转座子 dSpm 同时包含于同一个 T-DNA 中^[9]。二元标签系统虽然有许多优点, 但转座子插入的有效突变率很低, 并且还存在着转座子继续转座的问题。如果将 Ds 与特异重组系统 Cre/lox 结合起来, 把一个 lox 位点放在 T-DNA 区, 而另一个 lox 放在 Ds 内部, 当 Ds 转座到 T-DNA 附近时, 两个近邻的 lox 位点可经 Cre 的反式作用而发生重组, 产生 T-DNA 和 Ds 之间的重排, 使突变率大大提高^[10], 并且产生位点特异性的突变。三元标签系统目前的报道很少。

3 转座子捕获

转座子捕获可分为基因捕获 (gene trap) 和增强子捕获 (enhancer trap) 2 种。增强子捕获是由一个小启动子 (TA-TA) 驱动报告基因, 当转座发生在一个基因的内部或附近时, 由于染色体增强子 (En) 的激活使报告基因表达。另一种叫作启动子捕获 (promoter trap) 的载体带有一个无启动子的报告基因, 只有当转座子插入到一个活跃的启动子下游时, 报告基因才表达。因此增强子捕获和启动子捕获适用于

分离和克隆由顺式作用元件激活的基因。相反,基因捕获载体上没有促进报告基因表达的启动子,而是在报告基因的前面设计一个或多个剪接受体(Splice acceptor, SA)序列。SA能够确保报道基因是翻译的mRNA的一部分,只有当转座子以合适的框架和一定的方向插入目的基因的转座区时,报道基因才能表达。剪接供体位置来自内源基因的内含子,而在报告基因之前的剪接受体序列,将会被剪接产生一个融合转录体。

4 转座子标签基因的筛选和功能分析策略

筛选转座子标签基因的策略有很多种,如混合PCR(pooled PCR)、随机扩增插入侧翼的DNA和反向PCR(gPCR)。混合PCR将几个插入基因系合在一起提取基因组DNA,然后采用一个基因特异引物和一个插入特异引物用于PCR反应^[11]。如果种群数量太大,还可将几个混合(pool)合并成更大的混合。而且三维矩阵混合策略只需较少的扩增就可直接确定具有插入的植株。随机扩增插入侧翼的DNA方法可分为2种,即转座子排列(transposon display)和插入突变位点扩增(AIMS)。反向PCR(gPCR)是由反向插入排列(inverse display of insertions, IDI)改进而来的,也属于随机扩增的方法。

基于转座子的反向遗传学方法有助于分析它们的功能,这些方法的分析策略有2个:第一,对含高拷贝转座子的植物而言,首先是获得大量含有位点选择性转座子突变(site-selected transposon mutagenesis)的突变体,然后用与转座子和目的基因互补的序列作为引物进行突变体的PCR筛选。在筛选突变体时,可以根据PCR结果建立DNA库的三维矩阵,以便处理更大量的样品;第二,对于单拷贝转座子植物,建立转座子插入不同基因座的突变库,然后就可以对任何突变的基因进行扩增、测序和功能分析。

5 展望

几乎每一种生物都存在转座子,如果利用自身的转座子来研究生物的基因,不仅简便快捷,而且排除了生物安全性问题。生物基因组大部分是由转座子构成,因此研究转座子就是研究基因组,不仅如此,转座子的特点使它成为有效的研究工具,两端的重复序列使分子跟踪成为可能,可以移动的特点使它成为一种高效的标记。

转座子元件是植物分子生物学和植物基因工程中分离基因和研究基因功能最有力的工具之一,其中反转录转座子具有分布广、异源转座高和受组织培养诱导激活等优势,因此它的发现和利用又为转座子标签的应用提供了更广阔的前景。此外通过对现有转座元件的改造以及转座元件作为载体改造的工具,将会大大加快植物基因和功能序列的分离与研究。但转座子标签的推广还存在一些困境,目前可供利用的转座子的种类太少,转座频率在物种间也存在很大差别,复杂的转化过程、鉴定突变体的筛选方法等因素限制了转座子标签法的应用范围。但随着可供利用的转座子数量的日益增多,转座子标签系统的不断完善与改进,将推动转座子标签技术的应用,为植物功能基因组的研究分离更多的基因,并可以促进植物基因表达机制等基础理论的研究。

参考文献

- [1] GOFF S A, RICKE D, LAN T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) [J]. *Science*, 2002, 296: 92-100.
- [2] BALCELLS L, SWINBURNE J, COUPLAND G. Transposons as tools for the isolation of plant genes [J]. *TIBTECH*, 1991, 9: 31-37.
- [3] MCCLINTOCK B. Chromosome organization and gene expression [J]. *Cold Spring Harbor Symp*, 1951, 16: 13.
- [4] HARING M A. The use of transgenic plants to understand transposition mechanisms and to develop transposon tagging strategies [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16: 449-461.
- [5] WALBOT V. Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 49-82.
- [6] YUTAKA S, NAOKI S, YOSSHI O M, et al. Loss-of-function Mutations in the rice homeobox gene OSH15 affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants [J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18 (4): 992-1002.
- [7] HIROCHIKA H. Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 231-240.
- [8] BAKER B, SCHELL J, LORZ H, et al. Transposition of the maize controlling element 'Activator' in tobacco [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 4844-4848.
- [9] TISSIER A F, MARILLONNET S, KIMYUK V, et al. Multiple independent defective Suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: A tool for functional genomics [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 1841-1852.
- [10] VAN HAAREN M J J, OW D W. Prospects of applying a combination of DNA transposon and site specific recombination in plants: a strategy for gene identification and cloning [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 23: 525-533.
- [11] MEISSNER R C, JIN H, CORMINELLI E, et al. Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: Assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in *r2r3 myb* genes [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 1827-1840.

本刊提示 参考文献只列主要的、公开发表的文献,序号按文中出现先后编排。著录格式(含标点)如下:(1)期刊——作者(不超过3人者全部写出,超过者只写前3位,后加“等”)。文章题名[J]。期刊名,年份,卷(期):起止页码。(2)图书——编著者。书名[M]。版次(第一版不写)。出版地:出版者,出版年:起止页码。(3)论文集——析出文献作者。题名[C]//。主编。论文集名。出版地:出版者,出版年:起止页码。