

研究通讯 Research Letter

基因打靶技术在模式植物小立碗藓的应用

刁阳 刘祥林* 何奕昆

首都师范大学生物系, 北京 100037

Application of Gene Targeting in *Physcomitrella patens*

XI Yang, LIU Xiang-Lin*, HE Yi-Kun

Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037

提要 介绍了基因打靶技术在新型模式植物小立碗藓(*Physcomitrella patens*)中的应用。

关键词 小立碗藓(*Physcomitrella patens*); 基因打靶; 同源重组; 基因敲除

所谓基因打靶(gene targeting),是将携带有选择标记的外源目的基因采用一定的实验方法导入受体细胞,再通过外源DNA序列与受体细胞染色体上同源DNA序列间发生重组,最终将外源DNA定点整合入受体细胞基因组某一确定的位点,或对某一预先确定的受体位点进行定点突变,导致受体细胞基因功能敲除或者点突变发生的技术^[1]。由于其可对基因产生特异性突变,这就避免了由于随机突变方法带来的许多限制,成为功能基因组学研究中最直接的遗传操作工具^[2]。

从1988年以来,人们对植物基因打靶就以各种不同形式进行了尝试。如直接将基因转入原生质体^[3],或者用根癌农杆菌介导转化人工座位,或者基因组上原来座位^[4]。但其随机整合频率很低(小于 10^{-4}),这使得基因打靶技术在植物基因功能基因组学领域的研究中受到严重的阻碍^[5]。苔藓植物中的小立碗藓(*Physcomitrella patens*)是一种极具分子生物学研究前景的新的遗传模式系统。它以单倍的配子体主导生活史和外源DNA的绝大部分可以同源重组整合入特定定位点等特征为人们所重视^[1]。被视为植物王国中新的“绿色酵母”,在植物基因功能的研究中有巨大的潜在应用价值^[2]。

1 作为模式植物的小立碗藓

苔藓是地球上陆生植物最古老的种群之一,起源于5亿年前,分布及其广泛^[6]。进化学认为苔藓植物和维管植物是单起源系统进化上的一个姐妹进化支^[7]。从苔藓植物在进化树上的相对位置说明它是研究陆生植物进化的理想材料。

小立碗藓以单倍的配子体形态占据主要生活世代,生活史经历3个发育阶段:幼小配子体时的丝状体、成熟配子体时的茎叶体和二倍体的孢子体时期。这为研究基因在不同发育阶段的表达调控提供了良好的材料^[8]。

虽然小立碗藓具有相对简单的植体结构,但它的组成却与其他陆生植物无异。基因组约为511 Mb,是拟南芥的4倍,和水稻基因组相差不多,有27条染色体^[9~12]。基因组相对较小,这为遗传操作带来了极大方便。

当然,小立碗藓最吸引生物学家的是它有极高的同源重组频率。为了验证基因打靶在小立碗藓中的可行性以及确定是否具有很高的同源重组频率, Schaefer和Zryd^[13]在1997年构建了3个不同的转化载体,对小立碗藓基因组中3个不同的染色体座位进行了基因打靶试验,结果证明在含有2.3~3.6 kb同源序列的情况下,小立碗藓同源重组频率可达到93%。如此高的同源重组频率在陆地植物中绝无仅有,因而它是植物功能基因组学研究的有利工具。

2 基因打靶在小立碗藓中的应用

自1997年在小立碗藓中基因打靶获得成功以后^[13],人们采用基因打靶技术研究小立碗藓基因功能逐渐进入新的阶段。主要采用插入型或者替

收稿 2003-07-21 修定 2003-12-02

资助 北京市自然科学基金重点项目(5021001)。

* 通讯作者(E-mail:xliliu@mail.cnu.edu.cn, Tel:010-68902345)。

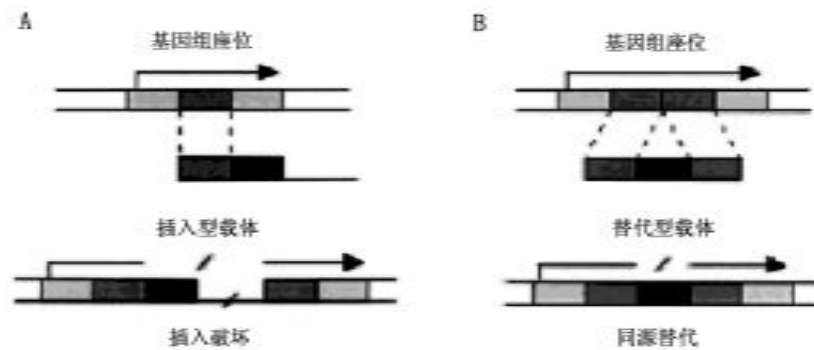


图1 小立碗藓转化中常用的载体设计^[8]

A. 插入型载体。将选择标记放在目的基因的一端, 可以单拷贝或者多拷贝形式通过同源重组整合入基因组。B. 替代型载体。将选择标记放在目的基因中间, 能够对目的基因进行点突变和精细打靶。灰色部分为目的基因, 黑色部分为选择标记。

代型载体经聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导对小立碗藓原生质体进行转化(图1)。

FtsZ蛋白是在细菌中发现的一种与细胞分裂有关的蛋白质, 在细胞分裂过程中对分裂环的形成起主要作用。迄今为止, 只在一种高等真核生物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中发现过与FtsZ具有同源性的核编码cDNA序列, 在氨基酸序列的N端有延伸部分, 可能在细胞器的植入方面起引导肽的作用, 并且分析ftsZ基因可能与质体分裂相关, 但具体功能目前仍未知^[14]。1998年Reski研究组^[15]从小立碗藓中通过PCR方法扩增到与细菌ftsZ基因同源的cDNA序列PpftsZ, 编码378个氨基酸, 此为真核生物中第二个ftsZ同系物。与拟南芥ftsZ基因不同, 小立碗藓ftsZ基因的产物缺少明显的N端延伸部分。当与大肠杆菌(*E. coli*)ftsZ基因比较时发现N端多出一个具有10个氨基酸的延伸部分, 具体功能仍不清楚。为获得PpftsZ基因的功能, 在此基因的编码区插入一个由35S启动子驱动的npt II选择标记基因, 两侧分别含有247和658 bp的PpftsZ cDNA序列, 用线性DNA经PEG介导转化小立碗藓原生质体, 进行基因敲除, 结果以14%的重组频率得到转基因植株。与正常细胞含50个左右的叶绿体相比, 转基因个体的每个细胞中只含有1个大的叶绿体。他们在真核生物中首次证明FtsZ蛋白与细胞分裂有关, 它为原核生物细胞器分裂和真核生物细胞器分裂之间是保守的学说第一次提供了分子水平上的证据。但是在维管植物的叶绿体中是否也存在类似结构, 仍需进一步研究。不管怎么样, 在苔藓植物中进行的此项工作, 可为进一步了解质体分裂提供新

的视点^[2]。

小立碗藓含有高水平的花生四烯酸(arachidonic acid), 它是由亚油酸经过脱氢和延长而来, 需要D5和D6-不饱和脱氢酶的参与。1998年, Girke等^[16]以PCR为基础在小立碗藓中得到一个全长的cDNA序列, 并推测它可能是一个新的脱氢酶。氨基酸序列显示含3个区域: N端含100个氨基酸左右, 无任何同源性, 紧接着是一个细胞色素b5相关区和一个与acyl-lipid desaturase具有27%的较低同源性的C端。为阐明此蛋白的功能, 他们用2 kb的同源序列构建载体, 即用一段含有正向选择标记的序列插入此基因中间, 并替代中间一小段序列, 线性DNA进行转化, 使此基因失活。随机选取5个转基因植株进行验证。结果所有5个个体都把基因整合进相应的基因组座位上, 并且在转基因个体中脂肪酸合成模式发生剧烈改变, 亚油酸、 γ -亚麻酸和花生四烯酸含量大大提高。从而证实新的cDNA编码的是D6-不饱和脱氢酶。这说明可以用小立碗藓对其目标基因进行敲除破坏, 从而发现新的植物基因, 并用以阐述某些代谢物质的新生化途径。

由腺苷-5'-磷酸硫酸酐还原酶(APR)催化将腺苷-5'-磷酸硫酸酐(adenosine-5'-phosphosulfate, APS)还原成亚硫酸盐的途径是高等植物硫酸盐同化的关键步骤。但类似于肠细菌, 由3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(3'-phosphoadenosine adenosine-5'-phosphosulfate, PAPS)介导的硫酸盐还原作用也有人提出过。而在植物中是否也存在此途径, 目前仍不清楚。为证实是否存在此种硫酸盐的同化途径, 2002年Koprivova等^[17]在小立碗藓中将

APR 基因敲除,即用抗性标记基因插入基因编码区,并替代其中一小部分序列之后,进行线性转化。由于 APR 基因在小立碗藓中以单拷贝存在,因此,如果小立碗藓只存在此种硫酸盐的同化途径的话,那么,APR 基因的失活即会使得植株中不出现硫醇或者其含量大大降低。但是他们却惊奇地发现转基因个体中硫醇的含量与野生个体没有任何差异,说明在小立碗藓中存在 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸还原酶基因。这也是首次在植物中从分子水平上证实有 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸还原酶基因的存在,同时小立碗藓也是第一个被证实同时存在相互独立的腺苷-5'-磷酸硫酸酐(APS)和 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(PAPS)两个硫酸盐消化吸收途径的植物。这说明用基因敲出的方法可以发现某些单个基因的互补生化途径。

大基因家族如蛋白质二硫异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)类似蛋白基因家族在同一基因组中具有很高的同源性和多样性,运用反向遗传学的方法研究某一基因功能时,往往由于基因的多样性很难对目标基因进行精确打靶,而序列间高的同源性又会导致某些特异基因特殊位点的突变被其他表型所掩盖。小立碗藓由于具有相当高的同源重组频率,用基因打靶技术能够对基因进行精确打靶。2002年 Meiri 等^[18]以 PCR 为基础在小立碗藓中得到 3 个 PDI 类似蛋白: PDI-H、PDI-M、PDI-L。与绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)叶绿体 RB60 蛋白分别具有 57%、60%、53% 的相似性。PDI-H、PDI-M 蛋白都具有典型的 PDI 类似蛋白的保守 N 和 C 端氧化还原激活位点,而 PDI-L 在 C 端的氧化还原位点具有一个短的内含子。但是它们的具体功能还不十分清楚,推测可能起内质网定位信号的作用。为了解基因的功能,他们用约 1 kb 的基因组 DNA 和由 35S 启动子启动的新霉素磷酸转移酶基因(*neo*)构建基因敲除载体,对此 3 个基因进行了敲除。即在此 3 个基因的中间插入 *neo* 基因,然后用 PCR 方法扩增到含有插入抗性基因的 PDI 类似蛋白基因,纯化之后,线性转化小立碗藓原生质体,得到 3 种突变株。但是突变株在正常生长条件下与野生株基本一致,说明在此蛋白家族中可能存在某些蛋白能够在功能上进行互补。初步研究认为与野生株相比,突变株在生长方面要稍微迟缓一些,进一步工作仍在进行

当中。但不管将来结果如何,利用小立碗藓有效的同源重组进行基因敲除的方法将有助于解决那些由于大基因家族相似性和多样性而给分析单个基因的功能带来的巨大问题。

基因打靶技术在小立碗藓中具有如此高的成功率可能与以下 3 方面有关系:(1)与小立碗藓以单倍配子体占据主要世代有关。单倍体细胞不存在严格的可在等位基因序列间阻止重组发生的机制。当转化 DNA 与个体本身存在同源序列时,就可以通过同源重组而将其导入相应位点^[13,19]。(2)与实验所选材料有关。大多数实验室用来进行基因打靶的材料都是选取生长 1 个星期左右的原生质体。此时材料幼嫩,生长旺盛,只含有 1 种主要处于 G2/M 期的细胞类型(chloronema)。而随着培养时间的延长植株体内将出现第二种主要含有 G1/S 期的细胞类型茎丝体(caulonema),如额外施加酒石酸氨将使小立碗藓保持 chloronema 状态和处于 G2/M 期,但外施生长素或细胞分裂素将使 caulonema 细胞增加,减少处于 G2/M 期的细胞数量。另外,植物生长调节因子能提高核内染色等倍数化。因此,认为细胞周期和细胞分化在小立碗藓中是紧密相连的,并推测这种独特的组织特异性细胞周期可能是小立碗藓核 DNA 具有如此高的同源重组频率的原因^[9,15,19]。(3)在芽殖酵母中,通过广泛的遗传和生化研究认为有效的基因打靶技术与 DNA 双链断裂修复机制相关。但迄今尚未得到一个在转化过程中可以特异改变随机整合频率的突变株^[20]。2001年, Brun 等^[21]在小立碗藓中首次报告存在错配修复基因 *MSH-2*(*MutS* homologues),并认为可能与 DNA 的修复及重组有关。其可能作用是在发生同源重组时阻止异源序列之间发生重组。2002年, Markmann-Mulish 等^[22]发现 *RAD51*(resistance to ionizing radiation)基因使得人们对小立碗藓的同源重组机制的认识更进了一层。一般认为有内含子是 *RAD51* 基因的显著特征,内含子具调控作用^[23]。而在小立碗藓中发现的 2 个 *RAD51* 基因都不具有内含子。这也可能就是小立碗藓的同源重组机制与其他真核生物不同之所在,对此仍需进一步证明。

3 结语

作为遗传模式植物的小立碗藓,除了有极高

的同源重组频率以外, 它自身还有许多特点, 如: 基因组较小, 生活周期不长, 个体小, 以及有与其他陆生植物相似的结构和功能特征等。因此用小立碗藓为材料研究生物学系统进化和遗传进化很有意义, 小立碗藓的有效基因打靶技术是研究植物基因精确功能的新的技术平台。用它研究复杂的发育过程, 如器官形成或者建立特定基因缺失突变株^[2]。相信今后有“绿色酵母”之称的小立碗藓可能成为研究真核多细胞生物功能基因组学的主要工具^[1]。

参考文献

- Schaefer DG. Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4:143~150
- Schaefer DG. A new moss genetics:targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53:477~501
- Paszowski J, Baur M, Bogucki A et al. Gene targeting in plants. *EMBO J*, 1988, 7:4021~4026
- Lee KY, Lund P, Lowe K et al. Homologous recombination in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell*, 1990, 2:415~425
- Vergunst AC, Hooykaas PJJ. Recombination in the plant genome and its application in biotechnology. *Crit Rev Plant Sci*, 1999, 18:1~31
- Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR et al. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plant. *Science*, 2001, 293:1129~1133
- Kenrick P, Crane P. The origin and early evolution of plant on land. *Nature*, 1997, 389:33~39
- Schaefer DG, Zryd JP. The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant Physiol*, 2001, 127:1430~1438
- Schween G, Gorr G, Hohe A et al. Unique tissue-specific cell cycle in *Physcomitrella patens*. *Plant Biol*, 2003, 5:1~9
- Reski R. *Physcomitrella* and *Arabidopsis*: the david and goliath of reverse genetics. *Trends Plant Sci*, 1998, 3:209~210
- Reski R. Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta*, 1999, 208:301~309
- Reski R, Faust M, Wang XH et al. Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet*, 1994, 244:352~359
- Schaefer DG, Zryd JP. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J*, 1997, 11:1195~1206
- Osteryoung KW, Vierling E. Conserved cell and organelle division. *Nature*, 1995, 376:473~474
- Strepp R, Scholz S, Kruse S et al. Plant nuclear gene knockout reveals a role in plastid division for the homolog of the bacterial cell division protein FtsZ, an ancestral tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:4368~4373
- Girke T, Schmidt H, Zahringer U et al. Identification of a novel $\Delta 6$ -acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J*, 1998, 15:39~48
- Koprivova A, Meyer AJ, Schween G et al. Functional knockout of the adenosine 5'-phosphosulfate reductase gene in *Physcomitrella patens* revives an old route of sulfate assimilation. *J Biol Chem*, 2002, 277:32195~32201
- Meiri E, Levitan A, Guo F et al. Characteration of three PDI-like genes in *Physcomitrella patens* and construction of knock-out mutants. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267:231~240
- Hohe A, Reski R. A tool for understanding homologous recombination in plants. *Plant Cell Rep*, 2003, 21:1135~1142
- Paques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Mol Biol Rev*, 1999, 63:349~404
- Brun F, Gonneau M, Doutriaux MP et al. Cloning of the PpMSH-2 cDNA of *Physcomitrella patens*, a moss in which gene targeting by homologous recombination occurs at high frequency. *Biochimie*, 2001, 83:1003~1008
- Markmann-Mulish U, Hadi MZ, Kerstin KC et al. The organization of *Physcomitrella patens RAD51* genes is unique among eukaryotic organisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:2959~2964
- Hartung F, Puchta H. Molecular characterization of homologues of both subunits A (SP011) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants. *Gene*, 2001, 271:81~86