

基因芯片技术在植物病害中的应用

魏松红, 刘志恒, 纪明山, 谷祖敏, 王英姿, 张 杨, 祁之秋

(沈阳农业大学 植物保护学院 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 综述了基因芯片技术的基本原理、特点与类型, 以及在植物—病原物基因组测序、植物病害快速诊断、植物抗病基因的分离、基因表达水平的检测、转基因植物的检测等方面的应用进展, 并简要介绍其存在的问题及未来的应用前景。

关键词: 基因芯片; 植物病害; 应用

中图分类号: Q812 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-3268(2008)03-0020-03

基因芯片 (gene chip) 技术起源于核酸分子杂交, 于 20 世纪 80 年代提出, 是近年来在生命科学技术领域中迅速发展起来的一项探索基因组功能的高新技术。1991 年, Affymetrix 公司 Fodor 小组对原位合成的 DNA 芯片作了首次报道后, 以 DNA 芯片为代表的基因芯片技术在生命科学各领域不断得到应用。基因芯片技术已在基因表达水平分析、新基因发现、目的基因分离、核酸序列测定、基因突变检测、基因多态性分析等方面得到广泛应用, 成为高效率、大规模获取相关基因信息及后基因组时代基因功能分析最重要的技术之一。为此, 总结了基因芯片的基本原理与特点以及主要的基因芯片类型, 综述了近年来基因芯片在植物病害领域中的最新应用现状, 并展望其在该研究领域的前景。

1 基因芯片概述

1.1 基因芯片技术的基本原理与特点

基因芯片是指高密度固定在玻片、硅片、陶瓷等固相支持介质上的生物分子 (寡核苷酸、cDNA、基因组 DNA 等) 的微阵列, 是专门用于核酸检测的生物芯片^[1]。依据核酸分子杂交的特异性, 将样品基因组 DNA/RNA 通过体外逆转录、PCR/RT-PCR 扩增等技术掺入标记分子后, 与固定在基因芯片上的探针分子进行杂交, 通过荧光显影法, 近年主要应用激光共聚焦荧光检测系统对芯片进行扫描, 检测杂交信号强度, 计算机软件进行数据的比较和综合分析后, 即可获得样品中大量基因序列特征或基因表达特征信息。由于芯片上的每个分子的序列及位

置是已知的, 杂交信号通过处理之后即可得到精确的分析结果。

基因芯片的主要特点是高通量、微型化和自动化, 可以在 1 cm^2 的载体表面固定数以万计的探针分子, 然后对获得的信息进行同步快速的全自动分析。另外, 由于基因芯片上探针定位的精确性及信息的可知性, 可以利用芯片进行靶基因不同状态及单个碱基的分析。因此, 基因芯片检测手段在使样品的需要量降低的同时, 相应地提高了检测的灵敏度。

1.2 基因芯片类型

基因芯片主要用于 DNA, RNA 分析, 根据核酸类物质的不同主要有两种类型: 寡核苷酸微阵列 (oligonucleotide microarray) 和 cDNA 微阵列 (cDNA microarray)。寡核苷酸微阵列是指主要利用原位合成法或将已合成好的一系列寡核苷酸固定在介质上, 制备成高密度的寡核苷酸阵列, 寡核苷酸的长度随芯片用途不同而不同, 但一般在 50 bp 以内, 以 8~25 bp 为多, 主要用于基因转录情况分析、DNA 测序、基因多态性及基因突变分析等。cDNA 微阵列是指利用点样法制备的较低密度的玻片或尼龙膜芯片, 芯片上固定的探针主要是 cDNA 片段, 在基因表达分析中具有重要作用。

2 基因芯片技术在植物病害中的应用

2.1 植物—病原物基因组测序

利用 cDNA 微阵列研究基因的表达谱, 最早用于序列分析。其原理是依靠短的寡核苷酸探针与 DNA 杂交, 利用杂交谱重建 DNA 序列进行大规模

收稿日期: 2007-09-19

基金项目: 辽宁省教育厅青年基金项目 (05 L411)

作者简介: 魏松红 (1974-), 女, 吉林延吉人, 副教授, 主要从事农药毒理学及植物基因转化研究。

基因测序。基因的表达谱芯片已被广泛应用于检测病组织和健康组织基因表达在 mRNA 水平上差异, 不仅可为病害发生机制提供强有力工具, 更为病害的诊断与治疗提供更新的参考依据。通过 DNA 微阵列也可进行植物—病原物基因组的突变与多态性检测^[2]。

2.2 植物病害快速诊断

常规的病害鉴定、诊断或越冬秋苗上的潜伏感染率的调查需要大量的人力、物力和时间, 因此, 有必要研制出一种方法简便, 检测快速, 灵敏可靠, 既能在植物组织中有高的检测灵敏度又能具有高度的种或种群间鉴别力, 而且还能同时检测多种病害来取代常规方法。基因芯片技术是将无数预先设计好的寡核苷酸、cDNA、基因组 DNA 在芯片上做成点阵, 与样品中同源核酸分子杂交, 对样品的序列信息进行高效的解读和分析, 大规模获取相关生物信息, 在植物病害的快速检测上具有广阔的应用前景^[3]。

非编码的内部转录间隔区(internal transcribed spacer; ITS)和非编码的串联排列的重复基因序列的拷贝间隔区(intergenic spacer; IGS)表现高度种间序列多态性, 尤其是 ITS 表现出更强的种间或生物种群间的 DNA 多型性。由此, ITS 被更广泛地用来研制区分和检测真菌种间和种群间特异性的快速检测技术。Levesque 等^[4]利用这种专化性的核苷酸序列作为探针的检测方法检测并区分出腐霉菌属(*Pythium*)和疫霉属(*Phytophthora*)内不同种的差异。Koch 和 Utkhede^[5]研制出快速检测温室内的黄瓜茎流胶疫病菌(*Didymella bryoniae*)的斑点杂交技术。在此技术基础上, 将膜上或承载片上固定 PCR 产物改变为固定 DNA 探针即成为可检测多至若干个病害的基因芯片技术。Lee 等^[6]首次报道, 应用 cDNA 芯片检测植物病毒, 该植物病毒芯片所包含的 cDNA 片段来自 4 种葫芦科植物易感染病毒的 cDNA 克隆。王进忠等^[7]根据已知的黄瓜花叶病毒、百合无症病毒、百合斑驳病毒基因核苷酸序列, 设计引物和探针, 用 Cy3 标记核苷酸引物, 不对称 RT-PCR 扩增产物与芯片上的寡核苷酸探针杂交, 荧光扫描仪进行检测。研究制备的寡核苷酸芯片能够检测侵染百合的 3 种重要病毒核酸的特异性荧光信号。

随着药用植物病原基因组被解码, 可以将药用植物病原物的 EST 或是从病原物的 cDNA 克隆中获得 cDNA 片段制作成基因芯片, 用于药用植物病害的快速诊断^[8]。

2.3 植物抗病基因的分离

应用基因芯片技术目前主要通过两种方式分离目的基因^[9]: 一种是利用 DNA 芯片分离目的基因。首先进行序列分析, 根据基因序列中特异的片段设计探针, 制备出代表该生物所有基因的寡核苷酸阵列, 然后将不同条件下从某生物体中转录出来的所有 mRNA 标记与芯片杂交, 通过分析杂交位点及信号强弱, 可得知在不同条件下各基因是否表达及各自表达程度。另一种是利用同源探针从 cDNA 或 EST 微阵列中筛选分离目的基因。首先构建足够的已知或未知的 cDNA 克隆并进行 PCR 扩增, 或者扩增 cDNA 文库中的 cDNA 片段, 然后将各 cDNA 的扩增产物固定在介质表面, 制成 cDNA 微点阵。从待分析的样品提取 mRNA, 通过一次反转录制备出荧光标记的 cDNA 探针。将 cDNA 与 cDNA 微点阵杂交, 每一点阵位点的荧光强度就反映相应基因的转录强度。

饶志明等^[10]构建了 cDNA 微阵列, 对水稻抗稻瘟病近等基因系的稻瘟病菌胁迫基因表达谱进行了分析, 发现稻瘟病菌应答基因分别与防卫反应、信号传递、逆境胁迫和光合作用及糖代谢等功能相关, 他们还证实了富含甘氨酸蛋白基因(glycine rich protein, grp)是一个稻瘟病诱导基因, 为阐明植物抗病机制提供了信息。

2.4 基因表达水平的检测

基因芯片技术可用于植物—病原物基因组表达水平分析的检测。Schena 等^[11]选定拟南芥基因组中的 45 个基因, 扩增出其 cDNA 序列, 用探针制作基因芯片, 检测该植物的根和叶中这些基因的表达水平。结果表明, 该植物的根和叶中存在 26 个基因的表达差异, 为植物—病原物基因表达水平分析检测的可行性提供了依据。利用基因芯片技术, 还可以获得农作物在不同基因型时空表达阶段病原物影响条件下基因表达的量度, 对这些量度进行分析, 可以从基因型与表现型的角度找出植物抗病性与病原物致病性之间的关系, 为植物抗病育种提供方便快捷的手段^[3]。Narusaka 等^[12]用包括 7000 个拟南芥基因的 cDNA 微阵列研究受甘蓝链格孢菌(*Alternaria brassicicola*)侵染后基因表达谱的变化情况。结果显示: pad3-1 突变型不仅改变了抗毒素 camalexin 的积累, 且许多参与防御反应的基因得到适时地表达, 因而对 *A. brassicicola* 具有抗性。黄丽俊等^[13]应用基因表达谱检测植物激活蛋白处理水稻相关差异基因的表达, 建立相关基因表达谱。

2.5 转基因植物的检测

通过广泛收集用于转基因技术的启动子、抗病基因和标记基因的 EST 序列制成基因芯片, 可对转基因大豆、玉米、水稻、番茄等产品进行检测^[14, 15]。应用基因芯片技术检测转基因植物具有灵敏度高、特异性强, 操作简便、快速, 自动化程度高及结果准确率高等特点。

高秀丽等^[16]将转基因水稻中常用的质粒载体 pCambia1301 中的 4 个基因 GUS, 35S 启动子、*hpt*, *aadA* 的特异引物固定于芯片上, 通过引物延伸芯片法, 实现了对质粒 pCambia1301 中 4 个基因的检测。表明基因芯片能快速、准确、高效、全面的实现对转基因水稻的检测, 不仅可判断其是否是转基因产品, 还可对转入的外源基因的种类进行确定^[17]。黄文胜等^[18]根据油菜中所转入的外源基因, 选择了 CaMV35S 启动子、FMV35S 启动子、Nos 终止子、*Bar* 基因、*Barnase* 基因、*Barstar* 基因、*EP-SPS* 基因、*GOX* 基因、*PAT* 基因等设计引物与探针, 并制备了寡核苷酸芯片, 通过多重 PCR 对样品核酸进行扩增和荧光标记后, 将 PCR 产物与芯片杂交, 检测油菜样品中所含的外源基因, 在检测低含量的转基因油菜时灵敏度可达到 0.5%。

3 问题与展望

基因芯片作为一个生物技术平台已经在生命科学的许多领域得到广泛应用, 与传统的杂交技术相比所具有的检测系统微型化、样品需求的微量化、检测的高效化及高通量化使其在植物病害研究中的应用前景非常广阔。但基因芯片在应用上仍然有一些关键问题有待解决, 如样品制备及标记操作的简化, 增加信号检测的灵敏度及稳定性, 高度集成化样品制备等。随着研究的不断深入和技术的日益完善, 基因芯片技术一定会在植物病害研究领域发挥重要的作用, 为植物病害控制提供一条新的捷径。基因芯片技术还广泛地应用于生物学和医学领域, 并可对动、植物产品、食品中的农药残留、抗生素残留等有害物质进行快速监测。作为近年来迅速发展起来的高新技术, 基因芯片技术在生命科学技术领域中将得到迅速发展和更广泛的应用。

参考文献:

- [1] 李瑶. 基因芯片与功能基因组[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 31.
- [2] 李森, 檀根甲, 周冬生, 等. 基因芯片技术及其在植物病

害研究中的应用[J]. 植物保护, 2003, 29(1): 5—9.

- [3] Levesque C A. Molecular methods for detection of plant pathogen—what is the future[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2001, 24: 333—336.
- [4] Levesque C A. Identification of some oomycetes by reverse dot blot hybridization[J]. Phytopathology, 1998, 88: 213—222.
- [5] Koch C A, Utkhede R S. Diagnosis and identification of *Didymella bryoniae*, causal agent of gummy stem blight of greenhouse cucumbers, using a dot blot technique[J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2002, 77: 62—66.
- [6] Lee G P, Min B E, Kim C S, *et al.* Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit infecting Tobamoviruses[J]. J Virol Methods, 2003, 110(1): 19—24.
- [7] 王进忠, 贾慧, 文思远, 等. 百合病毒的 DNA 芯片检测技术研究[J]. 中国病毒学, 2005, 20(4): 429—433.
- [8] 朱华, 吴耀生. 基因芯片技术在药用植物研究中的应用[J]. 中草药, 2005, 36(10): 1441—1444.
- [9] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 128—129.
- [10] 饶志明, 董海涛, 庄杰云, 等. 水稻抗稻瘟病近等基因系的 cDNA 微阵列分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(10): 887—893.
- [11] Schena M, Shalon D, Davis R, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(20): 467—470.
- [12] Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, *et al.* The cDNA microarray analysis using an Arabidopsis pad3 mutant reveals the expression profiles and classification of genes induced by *Alternaria brassicicola* attack[J]. Plant Cell Physiology, 2003, 44(4): 377—387.
- [13] 黄丽俊, 邱德文, 刘峰. 应用表达谱基因芯片筛选植物激活蛋白处理水稻相关差异基因[J]. 科学技术与工程, 2005, 24(5): 1885—1889.
- [14] Germini A, Mezzelani A, Lesignoli F, *et al.* Detection of genetically modified soybean using peptide nucleic acids (PNAs) and microarray technology[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(14): 4535—4540.
- [15] 刘垣, 郑文杰, 刘伟, 等. 转基因番茄 DNA 检测芯片的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(4): 109—112.
- [16] 高秀丽, 杨剑波, 景奉香, 等. 用引物延伸芯片法实现对转基因水稻中质粒 pCambia1301 的检测[J]. 遗传, 2005, 27(2): 271—278.
- [17] 王颖娟, 邓其明, 李平. 基因芯片技术在水稻研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2006, 22(8): 55—59.
- [18] 黄文胜, 潘良文, 粟智平, 等. 基因芯片检测转基因油菜[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(6): 588—592.