

# 植物基因克隆研究进程分析

王新宇

北京市朝阳区爱迪外国语学校

DOI:10.12238/bmtr.v5i2.6052

**[摘要]** 近年来,我国植物基因克隆技术有了新发展,玉米、小麦及水稻等均克隆了较多与植物产品品质、产量等相关的基因。本文就植物基因克隆技术展开研究,以供借鉴。

**[关键词]** 植物; 基因; 克隆技术

**中图分类号:** Q94 **文献标识码:** A

## Analysis of the Research Process of Plant Gene Cloning

Xinyu Wang

Aidi School

**[Abstract]** In recent years, there have been new developments in plant gene cloning technology in China, with many genes related to plant product quality, yield, etc. cloned from corn, wheat, and rice. This article conducts research on plant gene cloning technology for reference.

**[Key words]** plants; genes; cloning technology

植物基因克隆技术是现代生命科学的关键组成,也是现代生命科学技术最为关键的要素,基于20世纪70年代初DNA体外重组技术的诞生,经历了甄别、分离特异性的基因并得到基因完整的序列,明确其在染色体上的确切位置,阐明其生化功能,以及结合生物工程方式应用于生产实践中的过程。通常基因克隆策略包含两类,即正向遗传学方式和反向遗传学方式。前者主要以待克隆基因所表现出的功能为前提,基于对包括基因表达产物及其表现现状实现克隆,包含了功能方面以及表现方面等多个部分;后者更多综合基因自有的序列或基因组之中的特殊点位进行克隆,如定位克隆和同源序列法克隆等。随着DNA测序和生物信息学等理念不断完善,电子克隆等新兴技术诞生。

### 1 功能克隆技术

功能克隆是以蛋白质的功能为基础进行的基因克隆,主要内容是综合确切的生化问题或已知与这一功能存在关联性的蛋白质,对纯化蛋白进行分离,测定出相关氨基酸序列,结合遗传密码研究明确潜在的编码序列,开发出相关的核苷酸探针、杂交筛选基因组文库等,基于抗原反应锁定特异克隆,完成测序处理,继而获得对应的序列。结合该形式克隆基因的核心分离得到纯蛋白,得到其部分序列以及相关抗体,随后搭建基因组文库,并结合文库予以筛选。相关学者结合该方式,自拟南芥中克隆到一个解毒外运载体蛋白基因AtDTX1的同时,也发现了一个涵盖不少于56个编码相关蛋白基因的基因家族。

### 2 定位克隆技术

定位克隆技术的核心是通过目标基因在染色体之中的点位实现基因克隆的方式,对于克隆编码产物基因不明确的基因更为适用。定位克隆技术的原理主要为结合功能基因于基因组中较为稳定的基因座,基于分子标记模式对其实施精准定位,选择和目标基因两端联系紧密的分子标记筛选带有较大片断的基因组文库,结合获得的阳性克隆形成基因区,利用染色体步行,稳步接近候选区的方式,得到带有目标基因的大片段克隆,对于这一目标基因片段实施亚克隆,或是利用这一克隆作为探针得到基因组文库,以实现目标基因精确值小片段区间内完成序列的研究,利用遗传转化以及功能互补测试研究,对提取的目标基因进行判断。植物方面的应用主要包括水稻、番茄、大麦以及马铃薯等植株,目前均已提取了数十个关键的基因,其中抗病基因的克隆较多,典型的包括马铃薯的Gpa2基因以及水稻的Xa1基因等。

### 3 抑制性消减杂交技术

抑制性消减杂交技术以DNA消减杂交方式及抑制聚合酶链式反应(PCR)为基础,并以此获得高品质及快捷的分离基因。其中,PCR是一种能够对特定DNA片段扩增放大的分子生物技术,通常可以把其视为生物体外所具有的特殊DNA复制,其最大的特征是能够大幅增加微量的DNA。抑制性消减杂交模式综合了抑制PCR的高效动力学和消减杂交策略。抑制性消减杂交技术的优势如下。

第一,较高的特异性,样品通过两次消减杂交,使差异基因富集,又经抑制PCR增加了差异基因,致使特异性提升,同时假阳

性率显著降低。

第二, 有较高的灵敏性, 对于分离体量不高的基因有突出优势。基于使用均等化的设计方式, 促使含量不一的单链DNA分子含量趋同, 有利于低含量单链DNA分子的甄选。

第三, 能够开展大面域的基因筛选, 该技术1次可同时分隔得到数百个差异基因。

第四, 操作方式较为便捷, 有助于掌握, 该技术只要求开展两次杂交、两次PCR, 无须移出杂交复合体, 接头的设计也相对简便, 无须频繁更换和移出接头。

第五, 筛选周期不长, 结合SSH(安全外壳协议)通常仅3~4d即可得到差异基因。

此外, 抑制性消减杂交技术也存在一定的不足, 比如诉求的起始mRNA(信使核糖核酸, 由DNA的其中一条链作为模板转录而来, 并携带有遗传信息, 继而指导蛋白质合成的一类单链核酸)过大。如若mRNA的量不足, 两次差减之后有部分关键、低丰度表达差异cDNA(互补脱氧核糖核酸, 和mRNA链具有互补的单链DNA, 并以mRNA为模板)片段或许无法检测得到, 其次单次抑制性消减杂交反应只可以对比两个mRNA池, 不适宜分析多个原料以及处理彼此间的不同。

#### 4 同源序列法

当前, 很多植株基因序列已经掌握, 在对类似基因进行克隆时, 需对对应的库内检索得到关联基因序列, 设计出特异引物; 模板设定为植物基因组DNA或cDNA, 利用PCR等方式完成基因的扩增操作, 之后引入纯化工艺, 与契合的载体连接, 开展序列研究, 对比论证以及明确目标基因克隆。这是在PCR技术出现以来而研发出的一种相对快捷、简易的克隆植物基因的办法, RGAs也属于该技术范畴。虽然抗病基因病原物种类型存在差异性, 但此类抗病基因产物有着极为相似的结构域, 包括NBS(N-溴代琥珀酰亚胺)、LRR(氨基酸序列)、STK(种抑癌基因, 编码一种丝苏氨酸蛋白激酶)等。结合此类保守结构域特点, 设计特有异性的简并引物, 基于植物总DNA以及cDNA为模板开展PCR扩增, 由此获得抗病基因候选片段, 结合分析检验, 确定目的基因克隆。

#### 5 基因芯片技术

基因芯片技术是以探针技术杂交测序技术为基础形成的一类更具高效性的便捷核算研究模式。多个探针片段按照特定的秩序固化于支持物表面的形式, 组成DNA探针阵列, 之后和标记的试样杂交, 结合检测杂交参量完成对于目标物高效、并行的检测。在芯片的研发生产等方面均支持自动化形式, 杂交、洗片等流程均可完成自动化, 工作效能全面提升。基因芯片技术在植物基因克隆方面的应用较为普遍, 比如在研究生物体对于逆境的反应方面, 通过芯片技术能够实现更为便捷、有效地分析基因的差异性表达。赵宝存及其团队结合基因芯片分析了小麦于各个盐胁迫环境下的根位置基因的应答表现, 共得到了61215个小麦基因差异性表达图谱, 并完成了不同盐胁迫情况下根部基因表达的明显变化。和对照组对比, 盐胁迫1h的试样内, 5.6个百分点

的基因上调表达, 12.4个百分点的基因下调表达, 80.9个百分点未有变化; 盐胁迫6h试样内, 上调表达、下调表达以及未有变化的基因分别占比6.8个百分点、9.6个百分点以及82.7个百分点。基因芯片技术在基因表达水平领域也得到了普及。将已然明确了基因置入芯片内, 对其mRNA进行反转录处理, 得到cDNA, 对应性地开展荧光标记处理, 之后与芯片实施杂交, 通过杂交信号等强度情况来明确具体的表达丰度指标数据, 结合基因芯片对表达水平进行分析, 通过自主、高效分析得到数万个基因的表达情况。

Bevan通过拟南芥基因组内的45个cDNA, 分析得到了该植物根、叶等位置的基因表达信息, 对不同荧光剂的标记逆转录研究分析后实现同该阵列的有效杂交研究, 在激光共聚焦显微镜技术的支持下, 了解并掌握了植株的根部位置及其他位置等存在的26个基因表达特点及不同之处, 参与叶绿素合成的CAB1基因在叶组织比根组织表达高出500倍。高志勇及其团队基于基因芯片分析了水稻孕穗期不同器官基因表现, 最终得到了主控花的形态组成MADS2box基因家族中的相关基因, 于水稻的孕穗期阶段在叶和根中得到强烈表达。该基因在叶位置进行表达, 也反映了NAC(乙酰半胱氨酸)之中的Zinc(锌)和EST(钾)等都出现在了幼穗之中的可靠基因表达情况, 这证明了水稻花类似的基因已远优于花发育ABC(向前叶片概念)机制下的MADS2box基因。此类发现进一步扩展了对Zinc及EST等基因在植株内生长发育效用的认知, 也为该领域后期全面性研究工作的开展打下了重要基础。此外, 基因芯片技术在转基因产品检验领域有较好的效用。搜集关于转基因技术的启动子、目的基因以及标记基因的多个基因序列信息, 得到基因芯片, 可对转基因农产品展开研究。Suzuki及其团队选择寡聚核苷酸序列展开研究, 综合芯片技术确定了353个VP1/ABA控制基因。此类基因分布在73%的植株组织内, 且VP1以及ABA存在联系, 由此反映了ABA信号传达以及VP1功用彼此的联系。

#### 6 电子克隆技术

电子克隆技术即计算机杂交技术, 主要以数学算法为核心, 强调计算机、互联网等方式对已有的基因序列、EST等生物学测试编码和功能验证的基因手段。电子克隆技术的主要流程如下。第一步, 综合目标基因和同源基因EST当作是搜索序列, 确定BLASTN(序列比对分析), 搜索对应的EST库未有研究或是得到起始检索的片段有着同源性和部分重合的序列, 长度大于100bp。第二步, 分析得到的序列组装成重叠群, 综合这一重叠群作为检测序列, 反复开展BLAST检索, 并确保序列充足, 进一步扩展重叠群, 循环这一流程, 直到不出现新的EST序列, 最终获得cDNA。第三步, 将该cDNA和相关数据库进行相似度对比分析, 假设不存在精准匹配基因情况, 将这一序列数据通过EST序列6类阅读框转化为蛋白质形式, 随后和蛋白质序信息库对比。基因研究结果为3类, 一是已知基因为人类已然甄别以及掌握的基因; 二是位置基因, 此类基因彼此并无同种以及异种基因匹配, 之前未有鉴定新基因; 三是新基因以及未知基因予以生物学的分析, 由此综合

获得基因序列得到引物,引入PCR模式获得基因组的序列数据,随后深入开展功能分析,于电子克隆的前提下,结合IMAGE协议得到对应的免费克隆,有效避免了筛选全长基因的制约,加强基因功能方面的研究。电子克隆的应用获取明确的数据资源,结合ESTs序列,利用同源筛查得到基因系列及全长的cDNA序列,大大削减了搭建及筛选cDNA文库等频繁的试验活动,进一步加快基因克隆。和以往的实验室方式对比,电子克隆技术更为快捷、高效、成本更低。基于多类模式生物基因测序工作,和各个生物EST数据库构建以及完善,电子克隆势必会对基因克隆起到重要作用,也必定加速新基因等发展及克隆技术发展。

### 7 植物克隆技术发展趋势

生物基因犹如汪洋,在基因克隆方面人类已然迈出了坚定的步伐,但要想切实掌握该技术,基因克隆工作任重道远。展望未来,基因克隆技术将会朝着以下方向发展。第一,高通量、高效能及更经济性的方向,SSH(安全外壳协议)技术以及基因芯片技术等为未来发展主流方向之一。第二,全基因组测序的方向,拟南芥以及水稻等基因测序已然完成,势必会对更多植株进行全基因组测序,比如玉米以及柑橘等。第三,分析更多功能基因彼此的调控网络。高速发展及持续完善的高通量基因克隆技术,包括芯片技术等在短期内实现对诸多基因团的表达分析,可以对植株功能整体层面的基因作用机理进行深层次剖析,继而把对基因调控效用的认知从单个基因提升到多基因网络层面上。对有关分析数据进行综合统筹,从而系统性地认识功能基因的调控网络,有利于从更多层面利用功能基因开展植物基因工程改良。

### 8 结束语

一直以来,生命科学研究人员创造了多类植物基因克隆方式,各种方式有着不同的特色,也存在不同的问题。未来,随着技术的发展以及社会关注的不断提升,生命科学研究必将迎来新的广阔空间,实现更好的发展。

### [参考文献]

- [1]任宏伟,孟寒寒,徐瑶,等.药用植物珊瑚菜G1AT基因的克隆和生物信息学分析[J].世界中医药,2020,15(5):683-688.
- [2]付亚娟,侯荟玲,乔洁,等.大花杓兰钙依赖蛋白激酶基因克隆及植物表达载体构建[J].植物遗传资源学报,2019,20(6):1613-1620.
- [3]姚娜,刘建雨,田媛媛,等.红花bHLH转录因子基因的克隆、表达分析及植物表达载体构建[J].中国中药杂志,2019,44(2):278-282.
- [4]张超,付三雄,周小婴,等.甘蓝型油菜GPDH基因克隆,表达分析及植物过表达载体构建[J].南方农业学报,2019,50(7):1399-1407.
- [5]雷欣,居利香,赵成志,等.黄灯笼辣椒CcCAD1基因的克隆与植物表达载体的构建[J].分子植物育种,2020,18(16):5373-5379.
- [6]董敏,杜立啸,袁洪振,等.悬铃木方翅网蝽非典型气味受体基因CcilOrco的克隆与序列分析[J].植物保护,2018,44(4):53-59.
- [7]赵春丽,王晓,潘君飞,等.菟菜AtGAI基因克隆及表达分析[J].西北植物学报,2019,39(2):199-209.