

## • 中药现代化论坛 •

## 基因芯片技术在药用植物研究中的应用

朱 华, 吴耀生\*

(广西医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 广西南宁 530021)

**摘要:** 基因芯片技术是近年来迅速发展起来的一项生物技术。由于其具有大规模、高通量、平行检测等优势, 已在多个领域得到广泛应用。根据新近的研究资料讨论该技术在药用植物中最新的应用情况, 包括分离差异表达的基因及发现新基因、功能基因组学的研究、中药的鉴定、转基因药用植物的检测、药用植物作用分子机制及病害的相关研究等内容, 并简要介绍其存在的问题及未来应用的展望。

**关键词:** 基因芯片技术; 药用植物; 应用

**中图分类号:** R282.12

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2005)10-1441-04

## Application of gene chip technology to medicinal plant researches

ZHU Hua, WU Yao-sheng

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**Abstract:** Recently, gene chip technology has become a rapidly developed biotechnology. It contains so many advantages including large-scale, high flux, and parallelism that it has been widely applied in many fields. In this paper, the updated advances on applications of gene chip technology to medicinal plant researches are discussed and the contents are ranged from isolation of differentially expressed genes, discovery of new genes, research on functional genomics, identification of Chinese materia medica, detection of genetically transformed medicinal plants, and the molecular mechanisms of medicinal plant pharmacology and their diseases as well. Some problems and prospects related to the technology are also briefly presented.

**Key words:** gene chip technology; medicinal plant; application

基因芯片或微阵列技术于 20 世纪 80 年代提出, 90 年代初期迅速发展。此项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。有人曾以“微阵列技术铺平了通向 21 世纪的医学之路”高度评价了该项技术在生命科学中举足轻重的作用。目前, 拟南芥和水稻的基因组测序工作已经完成, 玉米和大豆的基因图绘制也在进行之中, 这些研究成果为基因芯片技术在植物研究中的应用奠定了基础。其在药用植物研究中的广阔应用前景也备受关注。近年来该项技术已在药用植物研究中得到较为广泛的应用。本文着重综述近两三年来该技术在药

用植物研究中的最新应用进展。

## 1 分离差异表达基因及发现新基因

生物体的特性由内在基因表达决定。同一机体的各种细胞含有相同的遗传信息, 即相同的结构基因, 它们在各种细胞中并非同时表达, 而是具有时空的差异性。基因的差异表达调控着植物发育、分化、衰老、抗逆等生命过程。因此将不同来源的植物材料, 即不同的组织器官、发育时间、生活的环境条件、生理状态的样品与含有代表该植物基因的寡核苷酸或 cDNA 片段的基因芯片杂交, 即可得知不同条件下各基因是否表达及各自表达的程度。不同的环境对植物基因表达的影响在实验室即可获得, 而无须进行耗时间及财力的田间试验。目前, 利用基因芯片技术分离差异表达的基因无疑是植物研究领域的

收稿日期: 2005-01-21

基金项目: 广西科学基金资助(桂科自 0342003-3)

作者简介: 朱 华(1979-), 女, 广西桂林人, 在读硕士, 研究课题为三七皂苷合成相关基因的研究。

E-mail: zhubaobao1213@126.com

\* 通讯作者 吴耀生 Tel: (0771)5358817 E-mail: wuyaosheng03@sina.com

重要方向和热点之一。根据集成在芯片上 DNA 片段的不同可将基因芯片分为寡核苷酸微阵列芯片和 cDNA 微阵列芯片两种。前者一般要依赖于对基因序列有所了解,而 cDNA 微阵列在缺乏任何序列信息的情况下也可进行差异表达的分析,并由此可能发现未知的新基因。

Rabbani 等用含有 1 700 条独立的水稻 cDNA 片段的 cDNA 微阵列来分析寒冷、干旱、高盐及脱落酸诱导的水稻基因表达的差异情况。一共发现了 73 个基因受胁迫诱导;36、62、57、43 个基因分别受寒冷,干旱,高盐和脱落酸诱导。其中有 58 个基因是从未报道过的<sup>[1]</sup>。Kimura 等用水稻 DNA 微阵列研究 DNA 修复基因的表达情况,发现大多数切除修复的基因在顶端分生组织的表达要比成熟的叶子中的表达强得多<sup>[2]</sup>。无疑,该项技术也适用于药用植物的相关研究。美国密歇根州立大学的 Yang 等用含有 2 278 个基因的 cDNA 微阵列来分析洋槐 (*Robinia pseudoacacia* L., black locust) 树干的基因表达变化的情况。结果表明基因的表达随树干取材部位的不同而有差异。例如,编码糖转运蛋白的基因在边材中高表达,而参与类黄酮生物合成的基因在边材~心材的过渡带呈上调趋势。此次试验还建立了 341 种未知基因的表达图谱<sup>[3]</sup>。

## 2 功能基因组学研究方面的应用

模式植物拟南芥中已有超过 25 000 个基因被成功测序和作图,然而功能明确的基因却少于 15%,同样,在水稻的超过 55 000 个的预测基因中约有半数的基因功能尚不明确<sup>[4]</sup>。每年都有大量的药用植物基因被克隆测序并在 GenBank 中注册。植物基因组学今后研究的重点将从结构基因组学转移到功能基因组学。功能基因组学研究的内容是利用结构基因组所提供的信息,发展和应用新的试验手段,系统地分析基因的功能<sup>[5]</sup>。基因芯片技术是当今研究功能基因组学的工具箱中重要的一员。它具有小型化、自动化及大规模平行检测的优势,可以从多个样品中获得整个基因的定量生物学信息<sup>[6]</sup>。利用该技术研究基因的功能大体有几种策略:(1)通过研究基因的时空表达模式确定其在细胞学和发育学上的功能;(2)通过比较研究自发或诱发突变体与其野生型植株在特定环境条件下基因表达的差异来获取基因功能的可能信息。后者即传统的突变方式加上高通量的检测方法,在植物功能基因组的研究中将会越来越重要<sup>[7]</sup>。上文提到的分离差异表达基因也在一定程度上提供了相应的基因功能。

Feng 等从消减的棉花 cDNA 文库中得到 5 种基因家族 (PRPs、AGPs、expansins、tubulins 和 LTPs) 共 32 个独立的 cDNA 制成微阵列,以开花后不同天数的棉花纤维 RNA 为探针分别与芯片杂交。结果说明这 5 种基因家族在棉花纤维的延长阶段具有重要作用<sup>[8]</sup>。目前,基因芯片技术在药用植物功能基因组学方面的研究报道虽较少,但可以大胆预测运用这项技术可寻找药用植物有效成分合成的相关基因、筛选出促进药用植物生长发育及抗逆的基因,为进一步利用基因工程的方法提高有效成分的合成、培育高产量的抗逆植物奠定基础,更有效地保护我国药用植物资源特别是某些珍稀药用植物资源。

## 3 中药的鉴定

中药材通常经过处理而成为干药材,一般凭性状辨别不同的类别,有时连专家也感到困难。尤其是要鉴别外观类似但药性及价值均差别很大的草本药材,更为棘手。若能将基因芯片技术用于中药的鉴别相信可以解决一些难题。

利用这一技术的前提是应用分子生物学技术找出待鉴定中药的特定寡核苷酸序列,并将其集成在芯片上。然后提取样本 DNA 进行扩增,荧光标记后与芯片杂交。若样本中存在与之互补的序列即可检测出来。李绍平等将川贝母 5S rRNA 的一段特异序列做为探针制成芯片,用该芯片能准确地鉴定出真正的高效低毒、价格昂贵的川贝母。基因芯片还可用于药用植物种属的验证。这种检测的方法与上述方法不同,是将针对药用植物不同种属某基因多态性片段的寡核苷酸探针全部集成于芯片上,并设计特异引物,将来自于不同种属的 PCR 产物与芯片杂交,即得到结果。香港大学的研究者们将 16 种石斛 (*Herba Dendrobii*) 的 ITS1-5.8-ITS2 合并序列集成于玻片上,用荧光标记的 ITS2 序列为探针与之杂交,不同种的石斛即可在芯片的不同位置获得杂交信号<sup>[9]</sup>。

需要指出的是,基因芯片是从遗传学的角度来鉴别中药。但中药药效成分大多是次级代谢产物,因而基因芯片鉴定的是中药的真伪而不是中药的优劣。并不能取代中药化学成分指纹图谱等的鉴定。

## 4 检测转基因药用植物

1988 年,第 1 例转基因植物(烟草)试验成功<sup>[10]</sup>。全世界现已有超过 73 个品种的转基因作物获准可进行商业化种植,转基因药用植物也应运而生。人们可以通过基因技术从遗传上改变现存药材的有效成分,甚至给某些植物附加一些新的遗传成

分,成为“转基因药用植物”。如可供生产狂犬病口服疫苗的转基因西红柿、含有 $\gamma$ -亚麻酸的转基因油籽植物、药用的转基因烟草等。它们被称为“新世纪的品种”,但其安全性也令人担忧。因此,对转基因植物进行检测和标识已势在必行。一般在转基因植物中装入了基因表达所需要的启动子、终止子序列,为方便筛选还整合了报告基因和抗性基因等标志序列。针对这些特点,即使对转入的目的基因并不了解,通过检测这些标志基因序列便可对转基因植物进行鉴定。目前,国际上常用的转基因产品检测方法有酶联免疫吸附法、PCR-电泳检测、荧光定量PCR检测等技术。这些方法一次只能对单个基因进行检测,在对含有多种转基因成分的样品进行检测时,极易漏诊。基因芯片技术正好弥补此缺陷,非常适合同时检测转基因植物中大量的外源基因。

黄迎春等人选用常用的两种报告基因、两种抗性基因、两种启动子序列和两种终止子序列为探针制成基因芯片。对4种转基因植物水稻、木瓜、大豆、玉米进行了检测。Bordoni等用微阵列技术结合LDR(ligation detection reaction)对转基因玉米进行了检测<sup>[11]</sup>。Germini甚至用肽核酸(PNA)芯片对转基因大豆进行了检测<sup>[12]</sup>。我国首张转基因商品检测芯片已在上海亮相,该芯片可以鉴别40种基因,同时还能判断被检测的转基因植物是否属于国家批准物质,整个检测过程只需4h。随着转基因药用植物品种不断出现,该技术也将能应用于检测转基因药用植物。

利用基因芯片技术检测转基因植物的潜力是显而易见的,但要成功地利用该技术评价转基因植物的安全性还需要建立相应的数据库。该数据库中应包含植物在不同的发育阶段,不同的环境条件下基因表达变化的信息<sup>[13]</sup>。

## 5 研究药用植物作用的分子机制

中草药化学成分复杂,有效成分不清且定性、定量困难,个体差异大。长期以来,中草药药效作用机制的研究往往局限于传统的中医药理论,难以应用现代生物医学知识做为理论基础,缺乏可以量化的现代生物医学指标,如蛋白质水平和基因表达水平方面的量化指标等。因此中药的现代化研究难度较大且难于得到国际上的普遍认可。而借助基因芯片技术,有可能研究药物对基因表达水平的影响,从而为揭开中药的作用机制提供了有效工具。

利用基因芯片技术研究药用植物作用的分子机制的思路一般是:在细胞或动物水平上建立给药、对

照组,分别提取各组mRNA,反转录为cDNA,掺入标记分子与芯片杂交得到基因表达差异谱。根据基因表达的变化,从cDNA推导出蛋白质。由于很多蛋白质功能已经了解,从而有可能推导出药物的作用机制。Li等研究了知母根中提取的皂苷成分对心血管疾病的作用机制。通过采用含有87条人类心血管疾病相关基因制成的芯片,得到用皂苷处理的人脐静脉内皮细胞及未处理细胞的基因差异表达谱。结果表明,在皂苷处理的细胞中血管紧张素原基因、 $\alpha$ 2A-肾上腺素受体基因、内皮素转化酶1基因分别下调了2.8、1.9、3.1倍。说明皂苷通过调节内皮细胞的功能对心血管疾病起良性作用<sup>[14]</sup>。Yin等在用cDNA微阵列研究半枝莲*Scutellaria barbata* D. Don的抗癌机制中发现16个基因(包括DNA损伤、细胞周期调控、蛋白质磷酸化的相关基因)上调了5倍以上,提示这些过程可能参与了半枝莲诱导的癌细胞死亡<sup>[15]</sup>。

此外,利用基因芯片还可通过比较正常组织(细胞)及病变组织(细胞)中大量相关基因表达的变化,从而可将所发现的一组疾病相关基因做为药物筛选的靶标,进一步用于筛选中草药的有效成分,甚至可发现新的药用成分。在研究中草药的毒副作用时,若某种正在筛选的药用成分作用靶细胞得到的基因表达图谱与已知的具有毒副作用的药物得到的基因表达图谱相似,就要考虑是否停止药物的开发。Nuwaysir等已研制出包括涉及细胞凋亡、DNA复制和修复、细胞周期调控、转录因子等约2090个基因的毒理芯片(ToxChip v1.0)。该芯片既可用于毒物的检测和遗传多态性的检测,又可用于受检毒物的毒副作用机制的检测<sup>[16]</sup>。

## 6 应用于药用植物病害的研究

6.1 药用植物病害的诊断:随着基因组测序方法的改进,大量的药用植物病原基因组被解码,许多EST已经公布。收集这些EST,或是从病原物的cDNA克隆中获得病原物的cDNA片段制作成植物检测芯片,可用于植物病害的快速诊断,进而可在发病前进行有效的防治。

2003年6月Lee等首次报道了用cDNA微阵列芯片来检测植物病毒。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。试验结果表明该芯片成功地检测了特异的目的病毒<sup>[17]</sup>,其灵敏度可与ELISA相媲美<sup>[18]</sup>。基因芯片技术不仅仅只是用于植物病毒的检测,而且可用于所有病原体的检测,是一种高度平行化的现

代诊断技术。将大量药用植物易感病原物的特异且保守序列集成在芯片上,通过检测即可知道某种药用植物是否受到感染或是受哪些病原物的感染。

6.2 研究药用植物与病原体相互作用机制:植物与病原的相互作用是一个长期进化的过程,病原对植物的系统性侵染需要病原能够改造宿主细胞以利于侵染。这些改造包括诱导宿主的复制因子和抑制宿主的防御反应,而这些过程都有可能与改变宿主的基因表达有关。过去研究病原侵染易感宿主后引起的基因表达变化的情况都局限于仅有少数基因,要获得更多的认识则需要用到基因芯片技术<sup>[19]</sup>。Narusaka 等人用包括 7 000 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<sup>[20]</sup>。可见,应用基因芯片技术研究植物与病原的相互作用机制不仅有利于明确植物的抗病机制,而且对于发现致病基因、抗病基因,为病害的诊断和治疗均提供了信息。尽管这方面的应用在药用植物中还未广泛开展,但若要求全方位保护药用植物资源,走可持续利用的道路,这一方面的研究当然也是不可或缺的。

7 问题与展望

基因芯片技术发展到今天不过短短十多年,却已经取得了令人瞩目的成绩。虽然还存在这样或那样的一些关键问题有待解决,如基因芯片特异性的提高;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、基因扩增、核酸标记及检测仪器的研发;降低成本以利于普及等。但不可否认的是该技术在生物学和医学基础研究、农业、疾病诊断、新药开发、食品、环保等已呈现出巨大的应用前景。随着研究的不断深入和技术的更加完善,上述问题终将会逐步解决。Ku 等已研究出在杂交液中加入右旋糖苷硫酸盐可减少反应所需的时间及提高灵敏度<sup>[21]</sup>;Konishi 提出 3 参数的对数正态分布模型可以简化芯片的数据分析,且具有普遍适用性<sup>[22]</sup>。基因芯片技术将从根本上改变目前生物学和生物技术的观念和效率,同时给社会带来无限商机。它是继大规模集成电路之后的又一次具有深远意义的科学技术革命。

References:

[1] Rabbani M A, Maruyama K, Abe H, et al. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using

cDNA microarray and RNA gel-blot analyses [J]. *Plant Physiol*, 2003, 133(4): 1755-1767.

[2] Kimura S, Tahira Y, Ishibashi T, et al. DNA repair in higher plants; photoreactivation is the major DNA repair pathway in non-proliferating cells while excision repair (nucleotide excision repair and base excision repair) is active in proliferating cells [J]. *Nucl Acid Res*, 2004, 32(9): 2760-2767.

[3] Yang J, Park S, Kamdem D P, et al. Novel gene expression profiles define the metabolic and physiological processes characteristic of wood and its extractive formation in a hardwood tree species, *Robinia pseudoacacia* [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 52(5): 935-956.

[4] Acosta-Garcia G, Autran D, Vielle-Calzada J P. Enhancer detection and gene trapping as tools for functional genomics in plants [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 267: 397-414.

[5] Hieter P, Boguski M. Functional genomics; it's all how you read it [J]. *Science*, 1997, 278: 601-602.

[6] Aharoni A, Vorst O. DNA microarrays for functional plant genomics [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(1-2): 99-118.

[7] Henikoff S, Comai L. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 375-401.

[8] Feng J X, Ji S J, Shi Y H, et al. Analysis of five differentially expressed gene families in fast elongating cotton fiber [J]. *Acta Biochem Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 2004, 36(1): 51-56.

[9] Zhang Y B, Wang J, Wang Z T, et al. DNA microarray for identification of the herb of dendrobium species from Chinese medicinal formulations [J]. *Planta Med*, 2003, 69(12): 1172-1174.

[10] Kuiper H A, Kleter G A, Notebrn H P, et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods [J]. *Plant J*, 2001, 27(6): 503-528.

[11] Bordoni R, Mezzelani A, Consolandi C, et al. Detection and quantitation of genetically modified maize (Bt-176transgenic maize) by applying ligation detection reaction and universal array technology [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(5): 1049-1054.

[12] 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.

[13] Kuiper H A, Kok E J, Engel K H. Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(2): 238-243.

[14] Li Z S, Li D L, Huang J, et al. Investigations on the molecular mechanisms of saponins from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge using oligonucleotide microarrays [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2003, 38(7): 496-500.

[15] Yin X, Zhou J, Jie C, et al. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549 [J]. *Life Sci*, 2004, 75(18): 2233-2244.

[16] Nuwaysir E F, Bittner M, Trent J, et al. Microarray and toxicology; the advent of toxicogenomics [J]. *Mol Carcinog*, 1999, 24(3): 153-159.

[17] 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.

[18] Boonham N, Walsh K, Smith P, et al. Detection of potato viruses using microarray technology; towards a generic method for plant viral disease diagnosis [J]. *J Virol Methods*, 2003, 108(2): 181-187.

[19] Whitham S A, Quan S, Cooper B, et al. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants [J]. *Plant J*, 2003, 33(2): 271-283.

[20] 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 Physiol*, 2003, 44(4): 377-387.

[21] Ku W C, Lau W K, Tseng Y T, et al. Dextran sulfate provides a quantitative and quick microarray hybridization reaction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(1): 30-37.

[22] Konishi T. Three-parameter lognormal distribution ubiquitously found in cDNA microarray data and its application to parametric data treatment [J]. *BMC Bioinformatics*, 2004, 5(1): 5.