

• 综述 •

表达序列标签在药用植物研究中的应用

吴春颖^{1,2}, 宋经元¹, 陈士林^{1*}

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2. 北京林业大学, 北京 100083)

摘要:功能基因研究是目前国际上研究热点之一, 近几年来药用植物功能基因逐渐受到各国学者的广泛关注。序列表达标签(expressed sequence tag, ESTs)技术是认识生物体基因与基因组快速高效的研究手段之一, 广泛应用于鉴定和发现新的基因、研究比较基因组学和生物信息学、建立分子标记、构建生物体遗传图谱和制作基因芯片等各个方面。首先对ESTs技术的原理、优势和研究现状进行简要介绍, 重点对ESTs技术的主要研究方法及其在药用植物研究中的应用进行概述, 并讨论了ESTs技术在药用植物研究中的应用前景及应注意的问题。

关键词:药用植物; 序列表达标签技术; 功能基因

中图分类号: R282.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2008)05-0778-05

Application of expressed sequence tags to study on medicinal plant

WU Chun-ying^{1,2}, SONG Jing-yuan¹, CHEN Shi-lin¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 2. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Key words: medicinal plant; expressed sequence tags (ESTs) technique; functional genes

药用植物功能基因研究是药用植物基因组研究领域里极其重要的部分, 药用植物活性成分及其合成的相关基因是研究者的主要研究目标。药用植物功能基因组研究在国际上已进行了很多年, 我国虽是药用植物资源大国, 但起步相对较晚。目前已有许多新兴技术用于基因研究, 表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)技术便是其中之一。ESTs是由美国科学家 Venter 等随着人类基因组计划(HGP)的开展于1991年提出的^[1], 该技术首先应用于寻找人类新基因、绘制人类基因组图谱、识别基因组序列编码区^[2]等研究领域, 随后广泛应用于动植物基因组研究。ESTs由于在一定程度上可获得大量的生物信息, 为药用植物的开发利用和保护提供科技支持, 是我国药用生物资源可持续发展利用的一项基础研究^[3]。

基因资源作为一种可争夺的国际性战略资源, 很多发达国家都已经投入了大量资金和人力进行研究, 尤其是ESTs序列的构建与注册, 更是每年以指数的增量增长。根据基因数据库(GenBank)2007年10月公布的ESTs数据库, 人类ESTs数目超过813万条, 高居所有物种ESTs数目之首。动物和植物ESTs数目列前3名的物种分别是: 鼠、牛、猪; 拟南芥、水稻、玉米, 这6个物种的ESTs数目均超过100万条。在这些研究中, 除了水稻、玉米等与人们生活息息相关的农作物外, 药用植物逐渐成为研究者关注的焦点。如美国的

冷泉港基因组研究中心较早地对银杏与买麻藤进行了ESTs研究; 人参主产国之一的韩国也在积极研究与人参生长发育相关的各种基因ESTs序列。我国药用资源丰富, 很多国外学者已经开始关注中国中草药资源, 所以国内学者应该更加积极主动地关注、保护并且合理开发利用国内珍贵的植物药材, 使我国重要的基因资源得到保护, 取得合法的知识产权, 并且结合各种生物信息努力开发新的品种。药用植物的功能基因研究是物种持续发展的基础, 国际上对于基因专利的竞争已经非常的激烈^[4]。2007年, 中国医学科学院药用植物研究所率先注册了西洋参、川贝母等重要药材的部分ESTs序列, 发现一些与人参皂苷、贝母碱合成相关的基因, 并且在积极开展其他珍贵药材的ESTs研究。

ESTs技术的广泛应用和飞速发展研究结构基因组、功能基因组、比较基因组和蛋白质组学提供了有效的研究手段, 为批量克隆功能基因和研究基因功能建立了高效的技术平台, 促进人们从整体水平去理解整个基因组之间结构与功能的相互关系以及植物的代谢调控网络。

1 ESTs技术的原理

真核生物基因表达, 首先通过DNA转录成mRNA, 然后mRNA经过一系列剪接修饰形成成熟mRNA, 最后再经过释放, 形成有功能的蛋白质分子。绝大多数真核生物成熟的mRNA分子都是由5'端非翻译区(5' UTR)、开放阅读框

收稿日期: 2007-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772735); 中央级公益型科研院所基本科研业务费资助项目(YZ-1-01)

作者简介: 吴春颖(1984—), 女, 满族, 北京人, 硕士, 主要从事中草药基因组方面的研究。

Tel: (010)62811448 E-mail: wuchunyingbio@163.com

* 通讯作者 陈士林 Tel: (010)62899700 E-mail: slchen@implad.ac.cn

(ORF)和3'端非翻译区(3'UTR,含poly A尾)3部分组成,成熟的mRNA分子通过反转录作用得到的cDNA序列也具有相应的3部分结构。对于任何一个基因,其5'UTR和3'UTR都是特定的,即每条cDNA 5'端或3'端的有限序列长约100~500 bp,可特异性地代表生物体某种组织某个时期的一个表达基因,称为“表达序列标签”^[5]。如果将成熟的mRNA视为核酸序列经转录修饰后序列变化的最终端,进而由它直接指挥蛋白质的合成,那么ESTs序列就是显示这个最终端的基因标签,也就是直接显示了生物体在某一特定点正在发生着的基因表达^[6]。ESTs是长约100~500 bp的基因表达序列片段,将mRNA反转录成cDNA并克隆到载体构建cDNA文库后,大规模随机挑选cDNA克隆,对其5'或3'端进行单向测序^[7],获得有限序列的集合,形成一个物种某时期、某部位的ESTs数据库。然后将ESTs数据库与基因数据库已知序列进行比较,可以获得对生物生长发育、繁殖分化、遗传变异、衰老死亡等一系列生命过程相关的生物信息^[8]。

2 ESTs技术的特点和优势

真核生物的基因组极其庞大,仅有很少序列(2%~3%)用于编码基因^[9]。如人类基因组大约包含了 3.16×10^9 bp,其中约有3.3万个基因参与人体生长发育所需蛋白质的基因编码^[10];水稻基因组中大约包 4.2×10^8 bp,其中参与编码的基因约有5万个^[11]。如果要对真核生物基因组的基因序列逐一研究,那基本上是不可能完成的^[8]。在这方面,ESTs技术就显示出非常突出的特点和优势;ESTs是直接编码蛋白质有效基因序列的代表,直接反映了基因表达的生物信息。用ESTs代替基因组测序,可使研究费用大大降低,效果大大提高;ESTs技术应用的研究对象可以是遗传背景还不清楚的实验材料,十分符合药用植物的研究现状;ESTs技术是分离与鉴定新基因、构建遗传学图谱、研究基因定位和基因表达谱、研究比较基因组学和生物信息学、建立分子标记等有效的工具^[4,12,13],也是一种快速有效揭示基因组容量的方法^[3]。

3 ESTs技术发展现状

随着cDNA文库构建技术的成熟和DNA测序成本的降低,ESTs技术已经成为分子生物学的常用研究手段之一。其基本流程大致可以包括6个步骤:1)从材料中提取总RNA;2)分离纯化mRNA;3)构建高质量的cDNA文库;4)随机挑选cDNA克隆进行测序;5)通过搜索已知的核酸和蛋白质序列数据库,与同种和异种生物进行比较(BLAST、Interproscan),利用GO和KEGG工具进行功能和代谢途径分析;6)发现新基因或将未知基因在GenBank中登录。当前国际上科学家对基因组研究的热点之一就是发现新基因,运用ESTs技术正是快速高效的发现新基因的途径之一。所以收集、富集生物种类的ESTs数据是目前实验室主要研究方式之一。目前公共的生物学信息资源很多,较为权威的除了NCBI的GenBank外,还有EMBL、DDBJ等。现今ESTs技术在人类和动植物的研究中发展十分迅速,近两年来在全球范围内生物物种的ESTs数目增长极快,平均每月增加10万余条。截止到2007年11月,在GenBank中登陆的dbESTs

总数已经达到47 077 918个。

4 ESTs技术的应用研究

4.1 直接建立ESTs数据库以及应用ESTs数据:ESTs技术最基本的应用方法就是选取合适的植物材料(主要选择不同生长年限植物的不同组织器官),建立该植物特定时期特定组织的ESTs数据库^[14]。长春花植物中含有的长春碱和长春新碱是一种有效的抗癌剂,Murata等^[15]分别建立马达加斯加岛长春花叶子和根尖的ESTs数据库,从嫩叶和根尖构建的cDNA文库中随机挑取克隆测序,得到9 842条序列。通过重叠群分析产生3 327个重叠群序列(clusters)和1 696个单拷贝序列(singletons),总共获得5 023条非冗余序列(non-redundant ESTs)。这些单一序列中,有44.7%来自叶片文库,55.3%来自根尖文库。经BLASTX检索比较,发现有3 363条ESTs是有功能注释的序列;940条是未知功能的基因序列;还有715条序列可能编码长春花蛋白,但是在GenBank中没有相似序列的ESTs。研究发现尽管长春花叶片在合成单萜吲哚生物碱(monoterpenoid indole alkaloids, MIA)方面相当活跃,但是所得到的这两个ESTs文库中除了牻牛儿醇-10-羟化酶(geraniol 10-hydroxylase, G10H)和异胡豆苷-β-糖苷酶(strictosidine β-glucosidase, SGD)外,并没有检测到其他已知的MIA合成相关基因;而这两个文库存在两种特有的序列,即deacetylvindoline-O-乙酰转移酶(deacetylvindoline-O-acetyltransferase, DAT)和小长春蓼辛宁-19-O-乙酰转移酶(minovincinine-19-O-acetyltransferase, MAT)。研究者推测,长春花叶片和根尖在合成MIA过程中存在一些具有合成MIA能力的潜在基因,包含编码MIA过程中一些新的基因序列,所以该文库是一个很好地探寻新基因的资源库。为分析研究长春花的转录机制以及寻找在长春碱合成过程中出现的新基因提供可靠的参考资料。

2006年, Kim等^[16]也通过这种直接的方法建立了四年生人参叶片的ESTs数据库。以四年生人参叶片为样本构建cDNA文库,获得高质量的ESTs序列2 896条,其中81.6%长度小于500 bp,14.5%在500~1 000 bp,ESTs平均长度为373 bp。在这2 896条序列中,1 167条为单拷贝序列,409条为重叠群序列,该重叠群序列共包含1 729条ESTs。所以总共得到1 576条单序列(1 167+409)。将2 896 ESTs与GenBank nr database比较,发现约有87.3%的ESTs与已知的植物ESTs具有显著的序列同源性。通过BLASTX的检索比较,有48.8%(1 412 ESTs)为已知功能基因,51.2%为未知功能基因。在已知功能的基因中,参与能量和新陈代谢的两类功能基因的表达量最大,十分符合叶片在植物生长发育过程中所起到的能量转换作用。该研究是以土壤种植的人参叶片为实验材料(以体外培养的人参材料作对照),大量的表达基因都与光合作用有关。叶绿素a/b结合蛋白i型(chlorophyll a/b-binding protein type i)和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(RuBisCo)有最大量表达,冗余度分别为142 ESTs和53 ESTs。其次,光系统I相关蛋白(photosystem I-

related proteins)和依赖于ATP的CLPB蛋白(ATP-dependent CLPB proteins)也有相对大量的表达。这是土壤种植的人参作为半阴生植物特有的一种基因表达模式。最后在人参叶片的ESTs中确定了可能与合成人参皂苷相关的6个不同的基因序列:牻牛儿苗萜合酶(geranyl diphosphate synthase, GPS)、鲨烯合酶(squalene synthase, SS)、沙烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)、 β -香树脂合酶(β -amyrin synthase, β -AS)、细胞色素P450(cytochrome P450)和糖基转移酶(glycosyltransferase, GT),为进一步了解人参次生代谢过程提供了依据。

由于ESTs所含有的信息具有直接显示生物体表达现状的明显优势,不仅可以发现新的基因,还可以通过利用已知的植物ESTs数据去寻找真核生物中采用直接克隆的方法不易发现的表达丰度低的基因。目前国内很多学者也正在进行各种研究,2007年郭强^[17]等利用ESTs及生物信息学方法预测马铃薯中miRNA及其靶基因。通过把拟南芥、水稻等植物已知的miRNAs与马铃薯ESTs数据库进行比对搜索,筛选出候选的miRNA,然后再设置一系列严格的筛选标准,分析候选miRNA序列特征,从上述候选库中筛选出了22个miRNA,再利用新鉴定的miRNA序列,预测到43个靶基因。

4.2 植物生长物质处理研究:茉莉酸甲酯(MeJA)是一种植物生长调节剂,在植物生长发育、代谢调节、抗逆、防御等相关基因的诱导表达等方面均起着重要的作用,它可以改变植物次生代谢物质的表达量^[18],用MeJA处理植物材料再进行ESTs研究是目前常用的一种研究方法。如采用MeJA来处理人参的毛状根,再进行ESTs分析,通过构建cDNA文库得到3134条经由MeJA处理的人参毛状根的ESTs序列,再进行片段重叠群分析,获得370个重叠群序列和1680个单拷贝序列。确定了与人参皂苷合成途径相关的基因,如氧化鲨烯环化酶(oxidosqualene cyclase, OSC)、细胞色素P450和糖基转移酶等关键酶的基因。并且分析发现一个新的OSC基因,通过RNA凝胶电泳分析(RNA gel blot analysis)显示,这个OSC基因与SS和SE一起,由于MeJA处理而使其表达量增加。这一研究丰富了人参ESTs数据库的信息内容,并且提供了人参中人参皂苷生物合成途径关键酶基因的生物信息^[19]。

4.3 植物抗性研究:植物抗性一直是人们研究的焦点,在不同胁迫环境下植物会产生不同的应激反应,利用ESTs技术可以分析鉴别植物组织在应激条件下基因表达的特点^[20,21]。2005年有学者以杜鹃花属植物为材料研究其在寒冷胁迫下植物组织基因表达的差异^[22]。取其叶片,一组叶片经-53℃处理(CA);另一组叶片经-7℃处理(NA),然后分别构建两组处理的cDNA文库并做ESTs数据分析。进行对比发现,两种处理的表达样本仅有6.3%的序列为共有序列,显示了CA和NA在基因表达上有非常显著的差异。进一步分析发现,早期光诱导蛋白^[23](early light-induced proteins, ELIP)、类脱水素蛋白(dehydrins/late embryogenesis abundant proteins, LEA)、细胞色素P450和 β -淀粉酶(beta-amylase)在CA中有大量表达;叶绿素a/b结合蛋白、

NADH脱氢酶亚基I(NADH dehydrogenase subunit I)、plastidic醛缩酶(plastidic aldolase)和丝氨酸:乙醛酸转氨酶(serine:glyoxylate aminotransferase)在NA中有大量表达。通过对比这些功能基因,结果表明在杜鹃花属植物体中,相关渗透调节、光抑制、光合成的蛋白也是抗冻物质的关键因子。

另外,还可以通过不同胁迫处理构建植物材料的消减文库,研究植物的个别特征表象和基因差别。玉米是世界主要粮食作物之一,干旱是实际生产中一种最重要的胁迫,所以对玉米抗旱基因的研究有着非常积极的意义^[24]。2004年广西大学微生物及植物遗传工程教育部重点实验室以Clontech公司的pDNR-LIB质粒为载体,构建了干旱和盐碱共胁迫与无胁迫的耐旱玉米YQ7-96品系的雌雄分化期(12片叶龄)的cDNA消减文库,并进一步建立该文库的ESTs体系^[25]。研究人员随机对3168个克隆中插入的cDNA进行测序获得有效序列2098条,对其中的2002个克隆中的cDNA进行了5'端测序,另外96个克隆进行了5'和3'两端测序。最后通过对GenBank中玉米ESTs数据库和BLAST分析进行核苷酸同源性比较,发现130条属于新基因的序列。

上述研究为药用植物ESTs文库构建技术提供了许多新的研究思路,对阐明药用植物对环境的适应和道地药材形成的分子机制具有重要指导意义。

5 ESTs技术在药用植物研究中的应用

5.1 利用ESTs技术发现药效成分相关的新基因:利用ESTs数据库构建技术在药用植物研究方面的重要用途之一是鉴别药用植物代谢途径中的新基因。基于ESTs技术发现基因最成功的例子就是分离参与合成不饱和脂肪酸生物合成酶的基因,即蓖麻油酸(12-羟基油酸)生物合成的关键酶基因,通过ESTs技术发现了2个异戊二烯类的生物合成酶基因等^[26-30]。另外,还从人参根中获得人参皂苷生物合成的相关基因。2003年,科研人员从5个人参cDNA文库中随机测序获得11636条ESTs序列,其中只有59%的ESTs序列显示与已知的多肽序列的同源性。在四年生的人参根中鉴别出与人参皂苷生物合成途径相关的ESTs序列,其中包括4个在角鲨烯环化作用中有相关作用的氧环角鲨烯环化酶的候选基因(oxidosqualene cyclase candidates)和可能参与修饰三萜主链的9个细胞色素P450和12个糖基转移酶的候选基因(glycosyltransferase candidates),并通过检索BLASTX发现了大量与胁迫和病原菌抗性有关的应激蛋白的基因^[31,32]。

5.2 ESTs技术在药用植物亲缘关系方面的应用研究:ESTs除了发现新基因外,还可利用已知的古老保守序列(ancient conserved region, ACR)研究物种的进化与亲缘关系。如在拟南芥的研究中得到约有2/3的ESTs序列是属于ACR序列,为研究拟南芥物种进化提供了依据^[33],也为药用植物亲缘关系的研究提供了借鉴。

银杏是世界上最古老的裸子植物,也是重要的药用植物,通过提取银杏树雄、雌生殖器官和未成熟叶片的RNA分别构建了3个不同的cDNA文库,并随机测序获得6434条ESTs,

分属3 830条unigenes(单拷贝基因序列与重叠群序列的合称)。通过与水稻、拟南芥等有完整基因组序列的植物进行比较,发现仅有256条unigenes的ESTs与裸子植物和非种子植物相匹配,另一组uniESTs同被子植物中与发展进化相关的转录因子高度同源,如MADS box基因和转录后调控子。并且银杏中存在许多与苏特科植物同源的进化保守基因和一些裸子植物特有的潜在基因。这些工作为进一步研究银杏种子和花粉的进化、解决银杏在裸子植物中尚不清楚的系统发育关系奠定了基础^[34]。

5.3 利用ESTs技术建立药用植物基因数据库:利用ESTs技术已经针对人类、部分模式动植物和重要作物建立了数据庞大的基因数据库,但药用植物的基因数据库研究十分薄弱,仅在很少的药用物种上有报道^[3]。2007年D'Agostino等^[35]发表了关于藏红花柱头的ESTs数据库及其分析的研究报告,他们获得了6 603个高质量ESTs,分别归为1 893个重叠群序列,每一个重叠群代表着一个不同的表达基因,如性别决定基因、类脂化合物或叶红素代谢酶和转录因子的基因等,该研究为更好地研究藏红花代谢过程的相关内容提供了重要的资料。2006年研究人员通过ESTs技术构建了长春花叶和根尖的cDNA文库,在随机挑选的9 824个ESTs序列中发现3 663个可能的功能基因并进行克隆,获得的5 023条非冗余ESTs序列为长春花的转录分析和基因发现提供了很好的数据资源^[15]。利用ESTs技术建立基因数据库的其他药用植物还有人参、丹参、薄荷、甜叶菊、银杏、甘草等。

可见,利用ESTs技术建立药用植物基因数据库对于药用植物基因资源的保护有重要价值,为药用植物功能基因的挖掘和开发利用奠定物质基础。而且,ESTs作为某个特定时期细胞组织表达基因的代表,与非表达序列标签相比在物种间具有更高联系性^[36]。如对于一个缺少目标基因的药用物种,可以根据其他物种的相关基因作为寻找依据,ESTs允许物种之间生物信息的转化。这一特点对丰富药用植物基因库起着非常积极的作用。

6 ESTs技术在药用植物研究中的前景

ESTs技术作为研究物种基因和基因组的有效手段,其方法一直在不断更新和改进。尽管ESTs技术用于药用植物研究起步较晚,但展现了十分诱人的发展前景。具体表现在以下4个方面。

6.1 有效保护药用植物基因资源:由于药用植物野生资源的破坏十分严重,30%中药材品种面临濒危,我国被列入濒危野生动植物种国际贸易公约(CITES)附录的物种占其总数的1/4,是世界上CITES濒危物种数量最多的5个国家之一,世界自然基金会(WWF)在2004年报告指出,全世界20%的药用植物处于濒危和灭绝状态,大部分尚未被认识的药用植物功能基因也会随着资源的丧失而消失,势必对中医药现代化的发展造成影响。利用ESTs技术,通过构建和分析药用植物的ESTs数据,建立我国中草药基因资源信息数据库,形成我国丰富中草药基因资源的有效保护技术平台,对濒危药用植物物种、我国特有药用植物物种和特色药用植物

物种的基因资源保护具有十分重要的学术价值和广泛的应用前景。

6.2 推动药用植物功能基因的合理开发利用:药用植物功能基因是一种重要的物质资源,对于物种改良和种质创新具有极高的价值,能够形成独立自主的知识产权。与差减杂交法、mRNA差异显示技术等相比较,ESTs技术在批量发现功能基因方面具有稳定性好、分析规模大等优势,获得的功能基因可能涉及药用植物活性成分生物合成的调控、药用植物生长发育的调节、适应胁迫等环境因子变化产生对应的分子应答等。这些功能基因的合理开发利用将对药用植物品种改良和种质创新产生巨大影响,有利于中药资源的可持续利用。

6.3 有利于中药材道地性形成机制的研究:ESTs数据库为制备基因芯片提供了很好的基因资源,将基因芯片与标记后待测样本杂交,分析杂交信息检测待测样本的基因表达谱,通过比较道地药材与非道地药材基因表达谱的差异,可以阐明道地药材形成的分子机制。此外,对于ESTs数据的功能分析本身就展示了药材在特定时空的基因表达谱,对比道地药材与非道地药材ESTs数据的基因功能差异可以直接反应道地药材形成的分子机制。

6.4 为中药材鉴别提供新的技术手段:由于ESTs可获得足够的生物信息,显示其所代表基因的功能以及与其他基因之间的关系,因此ESTs是以测序为核心的新型分子标记方法的典型代表。ESTs技术可以和PCR-RFLP分子标记等很多现有的分子生物技术结合应用,更快、更有效地研究物种的基因转录与基因表达的生物信息。随着全世界范围内ESTs数量的迅速增长,ESTs与SSR(微卫星或简单序列重复标记)、SNP(单核苷酸多态性标记)等相结合又成为一种新的分子标记^[37]。与多数来自非表达区的其他标记如AFLP、RAPD、SSR相比,这种以ESTs为基础的分子标记具有非常显著的优势:易于开发、信息量高、更可能在物种之间转换等。目前基于ESTs开发的分子标记已有数千并且在很多植物中都已应用^[38]。ESTs-SSR在物种间有很好的通用性^[39],便于比较基因组的研究,在小麦、大豆、玉米、棉花等重要作物上都有相关的研究报道。基于ESTs开发的分子标记对药用植物的研究可以用于遗传多样性、性状关联基因标记、中药材真伪和品质优劣的鉴别等,为中药材鉴别提供新的技术手段。

7 ESTs技术在药用植物研究中应注意的问题

ESTs技术作为基因组学、功能基因组学与后基因组学之间的桥梁,已成为分子生物学研究的有力工具。生物体在某一时期特定细胞组织内,不同的基因表达状态不一样。高丰度表达的基因会产生大量的ESTs片段,如果表达量过大则造成冗余,浪费实验成本;对于某些低丰度表达的基因其ESTs又可能会丢失,这些问题会通过构建均一化cDNA文库得到解决,使ESTs技术成为可靠有效的研究工具。但目前dbESTs数据库中的ESTs并不精确,且存在一定的错误,可能在识别ESTs代表已知基因还是新基因时造成误差,ESTs技术所获得的是一种模拟序列,只能作为实验前的一种参

考,对结果的最终确认和接受还要通过实验验证;ESTs的测序方法存在误差(精确度为97%),功能分析应用程度存在局限,使 unigene 在聚类拼接过程中可能将同源性较高的不同基因混杂在一起,从而给功能分析造成误判。上述局限性在药用植物功能基因的挖掘中应给予足够的重视,以免造成不必要的损失。尽管如此,ESTs 数据库仍是发现新基因相对较快且经济的方法,如何充分挖掘其中的生物信息,关键在于充分了解其数据的特征,开发相应高效、可靠的生物信息学工具对其进行分析,相信通过生物学家和生物信息学家的共同努力,会使 ESTs 技术获得更广泛、更深入的应用。

参考文献:

- [1] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project [J]. *Science*, 1991, 252 (5013): 1651-1656.
- [2] Boguski M S. The turning point in genome research [J]. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20(8): 250-296.
- [3] 王伟,朱平,程克棟. 药用植物基因组及 ESTs 研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1): 1-5.
- [4] 朱平,王伟,程克棟. 药用植物功能基因 [J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2): 3-8.
- [5] 万海伟,杜立新. 表达序列标签(ESTs)在基因组学研究中的应用 [J]. 生物技术通报, 2004(1): 34-38.
- [6] White J A, Todd J, Newman T, et al. A new set of Arabidopsis expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124(4): 1582-1594.
- [7] Pereira S L, Leonard A E, Huang Y S, et al. Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid [J]. *Biochem J*, 2004, 384 (Part 2): 357-366.
- [8] 于凤池. ESTs 技术及其应用综述 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 54-58.
- [9] Wu J, Maehara T, Shimokawa T, et al. A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 525-535.
- [10] Venter J C, Adams M D, Eugene W M, et al. The sequence of the human genome [J]. *Science*, 2001, 291: 1304-1352.
- [11] 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(5565): 92-100.
- [12] Collins F S, Patrinos A, Jordan E, et al. New goals for the U. S. human genome project: 1998-2003 [J]. *Science*, 1998, 282(5389): 682-690.
- [13] Hattori M, Tsukahara F, Furuhashi Y, et al. A novel method for making nested deletions and its application for sequencing of a 300 kb region of human APP locus [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(9): 1802-1808.
- [14] Liu C J, Huhman D, Sumner L W, et al. Regiospecific hydroxylation of isoflavones by cytochrome p450 81E enzymes from *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2003, 36 (4): 471-484.
- [15] Murata J, Bienzle D, Brandle J E, et al. Expressed sequence tags from *Madagascar periwinkle* (*Catharanthus roseus*) [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(18): 4501-4507.
- [16] Kim M K, Lee B S, In J G, et al. Comparative analysis of expressed sequence tags (ESTs) of ginseng leaf [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(6): 599-606.
- [17] 郭强,项安玲,杨清,等. 利用 ESTs 及生物信息学方法挖掘马铃薯中 miRNA 及其靶基因 [J]. 科学通报, 2007, 52 (14): 1656-1664.
- [18] Lee M H, Jeong J H, Seo J W, et al. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8): 976-984.
- [19] Choi D W, Jung J, Ha Y I, et al. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 557-566.
- [20] Nam M H, Heo E J, Kim J Y, et al. Proteome analysis of the responses of *Panax ginseng* C. A. Meyer leaves to high light: use of electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry and expressed sequence tag data [J]. *Proteomics*, 2003, 3(12): 2351-2367.
- [21] Chen C, Bai L H, Qiao D R, et al. Cloning and expression study of a putative carotene biosynthesis related (cbr) gene from the halotolerant green alga *Dunaliella salina* [J]. *Mol Biol Rep*, 10. 1007/s11033-007-9089-z, 2007-06-12.
- [22] Wei H, Dhanaraj A L, Rowland L J, et al. Comparative analysis of expressed sequence tags from cold-acclimated and non-acclimated leaves of *Rhododendron catawbiense* Michx [J]. *Planta*, 2005, 221(3): 406-416.
- [23] Zeng Q, Chen X, Wood A J. Two early light-inducible protein (ELIP) cDNAs from the resurrection plant *Tortula ruralis* are differentially expressed in response to desiccation, rehydration, salinity, and high light [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(371): 1197-1205.
- [24] Whitelaw C A, Barbazuk W B, Pertea G, et al. Enrichment of gene-coding sequences in maize by genome filtration [J]. *Science*, 2003, 302(5653): 2118-2120.
- [25] 张洁,焦岳宏,陆海峰,等. 玉米混合组织的 ESTs 文库的构建和部分 ESTs 序列的分析 [J]. 广西农业生物科学, 2004, 23(3): 243-248.
- [26] Crock H, Wildung M, Croteau R. Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha piperita* L.) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)- β -farnesene [J]. *Plant Physiol*, 1997, 94: 12833-12838.
- [27] Lange B M, Wildung M R, McCaskill D, et al. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 2100-2104.
- [28] Cahoon E B, Carlson T J, Ripp K G, et al. Biosynthetic origin of conjugated double bonds: production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 12935-12940.
- [29] Lange B M, Wildung M R, Staube E J, et al. Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 2934-2939.
- [30] Brandle J E, Richman A, Swanson A K, et al. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 50: 613-622.
- [31] Luo Z Y, Lu Q H, Liu S P, et al. Screening and identification of novel genes involved in biosynthesis of ginsenoside in *Panax ginseng* plant [J]. *Acta Biochim Biophysica Sin* (生物化学与生物物理学报·英文版), 2003, 35(6): 554-560.
- [32] Jung J D, Park H W, Hahn Y, et al. Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 22(3): 224-230.
- [33] Dunaeva M, Adamska I. Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of *Arabidopsis thaliana* using RNA differential display [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(21): 5521-5529.
- [34] Brenner E D, Katari M S, Stevenson D W, et al. ESTs analysis in *Ginkgo biloba*: an assessment of conserved developmental regulators and gymnosperm specific genes [J]. *BMC Genomics*, 2005, 6: 143.
- [35] D'Agostino N, Pizzichini D, Chiusano M L, et al. An ESTs database from saffron stigmas [J]. *BMC Plant Biol*, 2007, 7 (1): 53.
- [36] 刘稳升,吴忠道. 表达序列标签大规模序列分析策略及方法 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2007, 34(3): 139-146.
- [37] Eujayl I, Sorrells M E, Baum M, et al. Isolation of ESTs-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104(2-3): 399-407.
- [38] Yu J K, Dake T M, Singh S, et al. Development and mapping of ESTs-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat [J]. *Genome*, 2004, 47(5): 805-818.
- [39] Thiel T, Michalek W, Varshney R K, et al. Exploiting ESTs databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(3): 411-422.

表达序列标签在药用植物研究中的应用

作者: 吴春颖, 宋经元, 陈士林, WU Chun-ying, SONG Jing-yuan, CHEN Shi-lin
作者单位: 吴春颖, WU Chun-ying(中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京, 100094; 北京林业大学, 北京, 100083), 宋经元, 陈士林, SONG Jing-yuan, CHEN Shi-lin(中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京, 100094)
刊名: 中草药 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期): 2008, 39(5)
被引用次数: 5次

参考文献(39条)

1. Adams M D;Kelley J M;Gocayne J D [Complementary DNA sequencing:expressed sequence tags and human genome project](#)[外文期刊] 1991(5013)
2. Boguski M S [The turning point in genome research](#)[外文期刊] 1995(08)
3. 王伟;朱平;程克棣 [药用植物基因组及ESTs研究](#)[期刊论文]-[中国生物工程杂志](#) 2004(01)
4. 朱平;王伟;程克棣 [药用植物功能基因](#)[期刊论文]-[中国生物工程杂志](#) 2004(02)
5. 万海伟;杜立新 [表达序列标签\(ESTs\)在基因组学研究中的应用](#)[期刊论文]-[生物技术通报](#) 2004(01)
6. White J A;Todd J-Newman T [A new set of Arabidopsis expressed sequence tags from developing seeds The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil](#)[外文期刊] 2000(04)
7. Pereirao S L;Leonard A E;Huang Y S [Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega3-fatty acid,eicosapentaenoic acid,into docosahexaenoic acid](#)[外文期刊] 2004
8. 于凤池 [ESTs技术及其应用综述](#)[期刊论文]-[中国农学通报](#) 2005(02)
9. Wu J;Maehara T Shimokawa T [A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites](#)[外文期刊] 2002(03)
10. Venter J C;Adams M D;Eugene W M [The sequence of the human genome](#)[外文期刊] 2001
11. Goff S A;Ricke D;Lan T H [A draft sequence of the rice genome\(Oryza sativa L. ssp. japonica\)](#)[外文期刊] 2002(5565)
12. Collins F S;Patrinos A;Jordan E [New goals for the U.S.human genome project:1998-2003](#)[外文期刊] 1998(5389)
13. Hattori M;Tsukahara F;Furuhata Y [A novel method for making nested deletions and its application for sequencing of a 300 kb region of human APP locus](#)[外文期刊] 1997(09)
14. Liu C J;Huhman D;Sumner L W [Regiospecific hydroxylation of isoflavones by cytochrome p450 81E enzymes from Medicago truncatula](#)[外文期刊] 2003(04)
15. Murata J;Bienzle D;Brandle J E [Expressed sequence tags from Madagascar periwinkle\(Catharanthus roseus\)](#) 2006(18)
16. Kim M K;Lee B S;In J G [Comparative analysis of expressed sequence tags\(ESTs\)of ginseng leaf](#)[外文期刊] 2006(06)
17. 郭强;项安玲;杨清 [利用ESTs及生物信息学方法挖掘马铃薯中miRNA及其靶基因](#)[期刊论文]-[科学通报](#) 2007(14)
18. Lee M H;Jeong J H;Seo J W [Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in Panax ginseng overexpressing squalene synthase gene](#)[外文期刊] 2004(08)
19. Choi D W;Jung J;Ha Y I [Analysia of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to](#)

[identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites](#)[外文期刊]
] 2005(08)

20. [Nam M H;Heo E J;Kim J Y Proteome analysis of the responses of Panax ginseng C.A.Meyer leaves to high light:use of electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry and expressed sequence tag data](#)[外文期刊] 2003(12)

21. [Chen C;Bai L H;Qiao D R Cloning and expression study of a putative carotene biosynthesis related\(cbr\)gene from the halotolerant green alga Dunaliella salina](#) 2007

22. [Wei H;Dhanaraj A L;Rowland L J Comparative analysis of expressed sequence tags from cold-acclimated and non-acclimated leaves of Rhododendron catawbiense Michx](#)[外文期刊] 2005(03)

23. [geng Q;Chen X;Wood A J Two early light-inducible protein\(ELIP\)eDNAs from the resurrection plant Tortula ruralis are differentially expressed in response to desiccation, rehydration, salinity, and high light](#)[外文期刊] 2002(371)

24. [Whitelaw C A;Barbazuk W B;Perteau G Enrichment of gene-coding sequences in maize by genome filtration](#)[外文期刊] 2003(5653)

25. [张洁;焦岳宏;陆海峰 玉米混合组织的ESTs文库的构建和部分ESTs序列的分析](#)[期刊论文]-[广西农业生物科学](#) 2004(03)

26. [Crock H;Wildung M;Croteau R Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint\(Mentha piperita L.\)that produces the aphid alarm pheromone\(E\)- \$\beta\$ -farnesene](#) 1997

27. [Lange B M;Wildung M R;McCaskill D A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway](#)[外文期刊] 1998(5)

28. [Cahoon E B;Carlson T J;Ripp K G Biosynthetic origin of conjugated double bonds:production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos](#)[外文期刊] 1999

29. [Lange B M;Wildung M R;Staube E J Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes](#)[外文期刊] 2000(6)

30. [Brandle J E;Richman A;Swanson A K Leaf ESTs from Stevia rebaudiana:a resource for gene discovery in diterpene synthesis](#)[外文期刊] 2002

31. [Luo Z Y;Lu Q H;Liu S P Screening and identification of novel genes involved in biosynthesis of ginsenoside in Panax ginseng plant](#)[期刊论文]-[生物化学与生物物理学报\(英文版\)](#) 2003(06)

32. [Jung J D;Park H W;Hahn Y- Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags](#)[外文期刊] 2003(03)

33. [Dunaeva M;Adamska I Identification of genes expressed in response to light stress in leaves of Arabidopsis thaliana using RNA differential display](#)[外文期刊] 2001(21)

34. [Brenner E D;Katari M S;Stevenson D W ESTs analysis in Ginkgo biloba:an assessment of conserved developmental regulators and gymnosperm specific genes](#)[外文期刊] 2005

35. [D'Agostino N;Pizzichini D;Chiusano M L An ESTs database from saffron stigms](#)[外文期刊] 2007(01)

36. [刘稳升;吴忠道 表达序列标签大规模序列分析策略及方法](#)[期刊论文]-[国际医学寄生虫病杂志](#) 2007(03)

37. [Eujayl I;Sorrells M E;Baum M Isolation of ESTsderived microsatellite markers for genotyping the A](#)

[and B genomes of wheat](#)[外文期刊] 2002(2-3)

38. [Yu J K;Dake T M;Singh S](#) [Development and mapping of ESTs-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat](#) 2004(05)

39. [Thiel T;Michalek W;Varshney R K](#) [Exploiting ESTs databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley\(Hordernm vulgare L.\)](#)[外文期刊] 2003(03)

本文读者也读过(1条)

1. [宋经元](#), [吴春颖](#), [陈士林](#) [EST技术及其在药用植物功能基因挖掘中的应用研究](#)[会议论文]-2007

引证文献(5条)

1. [冯辉](#), [金永三](#), [刘燕楠](#), [刘震](#), [韩宇宁](#), [孙海波](#), [张绍鹏](#) [冬虫夏草菌表达序列标签的分析](#)[期刊论文]-[世界科学技术-中医药现代化](#) 2010(4)

2. [陈小芳](#) [中西医结合基础研究进展初探](#)[期刊论文]-[中国民族民间医药](#) 2013(4)

3. [吴琼](#), [孙超](#), [陈士林](#), [罗红梅](#), [李滢](#), [孙永珍](#), [牛云云](#) [转录组学在药用植物研究中的应用](#)[期刊论文]-[世界科学技术-中医药现代化](#) 2010(3)

4. [平军娇](#), [张珍](#), [蔡振锋](#), [汤贤春](#), [钱刚](#) [千里光全长cDNA文库的构建及分析](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2012(3)

5. [陈士林](#), [谢彩香](#), [姚辉](#), [宋经元](#), [孙超](#) [中药资源创新方法研究](#)[期刊论文]-[世界科学技术-中医药现代化](#) 2008(5)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200805047.aspx