

RNAi 及其在植物研究中的应用

张彦桃

(内蒙古大学生命科学学院生物工程中心, 呼和浩特 010021)

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2006)05-0051-02

RNA 对基因的表达调控称为 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)。它是一种转录后基因沉默现象(post transcriptional gene silence, PTGS)。是双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA)触发细胞质中与其同源的 mRNA 的降解,或在细胞核中 dsRNA 诱导同源的 DNA 甲基化而导致转录水平上的沉默。1998 年 Fire 等将 dsRNA 注射到 *Caenorhabditis elegans* 中,发现能够启动特异 mRNA 的降解^[1]。在后来的实验中还表明在线虫中注入 dsRNA 不但可以阻断整个线虫的同源基因表达,还会导致其子代的同源基因沉默。近年来 RNAi 引起的 PTGS 逐步被用于基因功能的研究,并且在植物的抗病毒及品质遗传改良中的应用也得到了长足的发展。

1 RNAi 作用机制及特点

由 dsRNA 引起的 PTGS 过程首先是核酸酶 Dicer 把 dsRNA 裂解为 21~23 nt 的小的 siRNAs(small interfering RNAs)分子。这些 siRNA 的 3' 端都具有 2 个突出的碱基,多为腺嘌呤也可以是具有羟基的胸腺嘧啶,5' 端被磷酸化。这可能也是这些 siRNA 区别于其他 RNA 而被识别的结构特征。由 siRNA、Dicer 和 siRNA/蛋白复合物(siRNA/protein complex, siRNP)组成的 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RSIC),在 ATP 的参与下激活,活化的 RSIC 解开双链,RSIC 是一种蛋白-RNA 效应核酸酶复合物,能识别并降解靶 mRNA,通过碱基互补配对识别同源性的 mRNA 并将其降解。许多研究还显示 RNAi 过程中有新的 dsRNA 分子的合成,当 siRNA 反义链识别并结合靶 mRNA 后,siRNA 的反义链可作为引物,以靶 mRNA 为模板在依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRp)催化下合成新的 dsRNA,然后由 Dicer 切割产生新的 siRNA,经若干切割循环,沉默信号会不断扩大。

RNAi 的作用特点是: (1) 高度的特异性。RNAi 是一种 PTGS 机制,dsRNA 能够非常特异地使与之同源的 mRNA 降解,而无关基因不受影响^[3]; (2) 高效性和放大效应。少量 dsRNA 就能有效抑制靶基因的表达,在低等动物中抑制效率大于 90%,这表示 dsRNA 介导的 RNA 干扰是以催化放大的方式进行的,因此双链 RNA 的抑制作用要比单独用反义 RNA 的抑制作用高出 10 倍以上^[4]; (3) siRNA 为中介分子。dsRNA 介导的 RNA 效应过程是一个同源依赖的降解反应,较长 dsRNA 在 Dicer 核酸酶作用下切割成 21~23 nt 的

siRNA,后者为降解靶基因的中介分子,并决定 mRNA 的切割位置^[5]; (4) 需要 ATP 参与。RNAi 效应中,切割 dsRNA 过程及 RISC 形成过程中都需要 ATP 的参与^[6]。由于 RNAi 具有以上优点,所以在现代植物研究中得到广泛应用,主要用于基因功能研究、抗病毒机制及品质改良中。

2 RNAi 在植物基因功能研究中的应用

RNAi 技术进行功能基因组的筛选的基本原理是根据基因测序结果,针对每个基因设计对应序列的 dsRNA,构成基因组的 dsRNA 文库,将文库中不同序列的 dsRNA 分别导入不同个体的细胞内,通过表型上的改变筛选相关基因,并由此大致确定基因功能。其特点有:与传统的难度大、费用高、试验周期长的探针杂交相比,简单易行,容易开展;与基因敲除相比,试验周期短,成本低;与反义技术相比具有高度特异性和高效性;可进行高通量基因功能分析。

目前根据拟南芥和水稻测序结果已经得到了大量的基因序列,研究者们也利用比较基因组学的方法对其中一些基因的功能进行了预测。随着 RNAi 技术的出现,人们逐渐利用这一技术对这些基因功能进行分析,从而得到这些基因功能的准确信息,进而分离出大量调节植物发育以及参与植物抗逆性的基因,这将对植物的品质改良以及抗性的分子育种具有重要的理论指导和实践意义。另外利用植物中已知基因的保守序列,通过 PCR 扩增的方法也得到了大量可能具有同种功能的候选基因,这些候选基因的进一步鉴定也可以用 RNAi 技术来进行。

Chung 等人构建了可以在细胞内转录为双链 RNA 的 DNA 嵌合结构,利用农杆菌把此结构转化到拟南芥中,成功的利用 RNAi 的干扰作用证实了拟南芥中与花发育有关的基因的功能,并证实 RNAi 可以稳定地遗传给后代^[7]。

植物毛茸是许多开花植物表面的特殊结构,它们被认为是植物抵御昆虫、病原微生物和食草动物的第一道屏障。此外一些由腺体组成的植物表面毛茸结构也是某些具有重要经济价值的天然产物的“绿色工厂”。在烟草叶中就有这样的浸出液,他的主要成分是双萜类的 CBT-diols。Erming Wang 等利用 RNAi 技术使催化双萜牛儿基焦磷酸转化为 CBT-ol 环化酵素基因和由 CBT-ol 转化为 CBT-diols 的 P450 基因沉默,从而断定这两个编码酶的特异性基因在产生植物毛茸中有广泛而不同的作用^[8]。

3 RNAi 在植物抗病毒中的应用

RNA 沉默作为植物抗病毒的一种本身固有的机制,但某些病毒如马铃薯 Y 病毒(PVY)HC-pro 等本身含有一些病毒抑制因子,它们可以通过编码一种蛋白(病毒抑制子)来抑制植物 RNA 沉默的抗病毒机制。从而研究者们推测通过外源基因与植物内源基因的同源性形成双链 RNA 来诱导植物体内的 RNA 沉默,后来的许多试验也证实了这一点。因而利用 RNA 沉默介导的抗病性机制,采用表达病毒来源的



第一作者简介:张彦桃,女,1975 年 7 月生,硕士,2002 年毕业于新疆农业大学作物遗传育种专业,现工作于内蒙古大学生命科学学院生物系工程中心,助理研究员,主要从事植物学研究,并讲授本科生《细胞与分子免疫》课程。

收稿日期:2006-03-23

dsRNA 是目前得到抗病毒转基因植株的很有效的方法。

Wang 等就将大麦黄矮病毒 PAV 分离物(BYDV-PAV)的多聚蛋白基因的反向重复序列转化大麦,在所得的 25 株转基因大麦中就有 9 株对 BYDV-PAV 有免疫作用^[9]。中国科学院的马中良等,也将矮缩病毒(RDV)基因组中的第八片段编码区 128、754 序列为臂构建 HpRNA,并克隆到植物表达载体 pROK-1 上。通过农杆菌介导的方法转化水稻“中花 11” Southern blot 分析表明,共获得 12 株阳性转化株^[10]。在后代试验中也证明, HpRNA 在转基因水稻对 RDV 的抗性方面发挥重要作用。

但另一点非常值得注意的是, Ming-Bo Wang 等在研究 RNA 沉默在类病毒和卫星病毒的致病力及其病情发展方面的研究中发现, RNA 沉默能增强类病毒及卫星 RNA 的致病力。这是因为源于病原菌 dsRNA 的 siRNA 介导着致病菌基因组的同源性降解,从而起到保护植物不受其侵害的作用。而类病毒和病毒卫星 RNA 不能编码任何功能蛋白,并且在植物中能高水平地积累。他们认为类病毒和卫星 RNA 正是通过 RNA 沉默增强了核酸的耐受性而使它们不被降解^[11]。

4 RNAi 在品种改良中的应用

我们人类生活必需品都是直接或间接地来源于植物。但当解决了温饱需求以后,对其品质也提出了新的要求。植物的某些代谢产物会给我们身体带来直接的危害,传统育种又很难实现我们对不同品质的改变的要求。随着生物化学与分子生物学技术的不断发展,使得我们对植物进行分子改良成为可能。研究者们同样也把 RNAi 技术用于植物品种改良,并且也有了一些成就。

油料中的硫苷的含量和不饱和脂肪酸的种类及含量都影响其品质,普通棉籽油加工后会产生反式脂肪酸,食用后会生成胆固醇增加人体心血管疾病的发病机率。经过研究,人们已经对他们的生化物质代谢有了足够的认识,这也为油料作物的分子改良提供了理论和物质基础。Liu 等利用导入双链 RNA 技术,以 $\delta 9$ 去饱和酶基因 ghSAD-1 和 $\delta 12$ 去饱和酶基因 ghFAD2-1 为目的基因,分别转化棉花 Coker 315 引起基因沉默,分别得到了高硬脂酸和高油酸的转化植株,然后通过二者杂交产生的 F2 代分离群体得到了高硬脂酸、高油酸的棉花植株^[13]。Marina Byzova 等通过表达油菜的 BAP3 或 BPI 基因的 hpRNA 结构,将拟南芥和油菜 B 型 MADS-box 花器特征基因沉默,创造出没有花瓣但功能完整的花器,使它更利于昆虫的授粉,从而使产量大大增加^[14]。这些用常规的育种方法都是很难实现的,但 RNAi 技术可以做到并且表现了很大的优势。

5 问题与展望

虽然近年来 RNAi 的机制、作用方式以及在动植物中的表达的研究都有很大程度的进展,但在研究过程中研究者们也不断发现了一些不可避免的弊端,如一些低水平表达的基因 RNAi 现象并不明显,如果几个基因有相同或近似的序列, RNAi 会同时作用它们,这样所观察到的表型就不能肯定是由哪些基因被干扰所致。因此在这些情况下, RNAi 不能精确的表型模拟所有基因,会造成 RNAi 筛选基因遗失。同时在研究中还发现 RNAi 还会有“脱靶”现象发生,即作用于靶基因的 RNAi 会造成相关基因的沉默,这样的基因也可能是一个、几个甚至是几百个。研究者们正通过一些措施来解决这一问题,如可以设计高度保守的 RNAi,使它只能作用于与其全序列相同的靶基因才能够引起沉默,否则没有作用,但至今为止此问题仍在解决之中。

关于 RNAi 的机理及应用正在被研究者们揭晓,尤其是关于 RNAi 表达载体的研究成果更是层出不穷。载体 PHANNIBAL 与其姊妹载体 PKANNIBAL 是含有内含子间隔的载体,它们可以与目的片段的正反义序列形成 i-hpRNA 构建到植物表达载体 pART27 后更有利于植物 RNAi 的表达。而载体 pHELLSGATE 是一个高拷贝数复制起点的 RNAi 表达载体,由 pHELLSGATE 结合的目的片段能直接进行农杆菌转化^[14]。pKONCKOUT 是由 CHRISTOPHER 等人构建的一种新的 RNAi 植物表达载体,包含有 CbCi 内含子,同样结合的目的片段直接进行农杆菌转化^[15]。这两种表达载体使植物 RNAi 技术操作更简便,并且相对更容易表达。虽然有关 RNAi 的许多方面仍不被我们所知,但它作为一种新技术方法,在植物研究领域已得到广泛应用,并且已经有了一定的研究成果,在后基因组研究时代将作为一种很好的研究手段,为植物的研究开辟出更广阔的天地。

参考文献:

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] Sijen T, Vijn I, Rebocho A, et al. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related [J]. *Curr Biol*, 2001, 11(6): 436-440.
- [3] McManus MT, Sharo PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(10): 737-747.
- [4] Davenport RJ. Gene silencing: A faster way to shut down genes [J]. *Science*, 2001, 292(5521): 1469-1471.
- [5] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nt RNAs [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188-200.
- [6] Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway [J]. *Cell*, 2001, 107(3): 309-321.
- [7] Chung-H AN, Aki SAWADA, Yoshiaki KAWAGUCHI, et al. Transient RNAi Induction against Endogenous Genes in Arabidopsis protoplasts Using in Vitro-prepared Double-Stranded RNA [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 2005, 69(2): 415-418.
- [8] Erming Wang, George J. Wagner. Elucidation of the function of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing [J]. *Planta*, 2003, 216: 686-691.
- [9] Wang M B, David C A, Peter M W. A single copy of virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus [J]. *Molecular plant pathology*, 2000, 1(6): 347-356.
- [10] Ma Zhong-Liang, Yang Huai-Yi, Wang Rong, et al. Construct Hairpin RNA to fight against rice dwarf virus [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(3): 332-336.
- [11] Ming-Bo Wang, Xue-Yu Bian, Li-Min Wu, et al. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites [J]. *PNAS*, 2004, 101(9): 3275-3280.
- [12] Liu Q, Singh A G. High-stearic and High-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1732-1749.
- [13] Marina Byzova, Christoph Verduyn, et al. Transformation petals into sepaloid organs in Arabidopsis and oilseed rape: implementation of the hairpin RNA mediated gene silencing technology in organ-specific manner [J]. *Planta*, 2004, 218(4): 379-387.
- [14] S. Varsha Welsey, Christopher A. Helliwell, Neil A. Smith, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. *The Plant Journal*, 2001, 27(6): 581-590.
- [15] Christopher Ian Cazzonedi, Jeff Velten. Analysis of RNA-Mediated gene silencing using a new vector (pKONCKOUT) and an in planta Agrobacterium transient expression system [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22(9): 347-359.