

病毒诱导的基因沉默在植物中的应用现状

刘 海 萍

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要:传统的病毒诱导的基因沉默(Virus induced gene silencing, VIGS)是一种小干扰 RNA (Small interfering RNAs, siRNA)介导的 RNA 沉默技术(SIR VIGS),作为一种有效的反向遗传学技术广泛的用于植物基因组功能的鉴定。另外, VIGS 技术开始用来研究植物内源 miRNA (microRNA)的功能, 这为 miRNA 的功能研究提供了快速有效的方法。随着基因沉默技术的应用和改进, 将会有越来越多的植物基因组功能得到快速有效的验证。

关键词:病毒诱导的基因沉默; 沉默载体; 小干扰 RNA; miRNA

中图分类号:S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0171-03

基因沉默^[1] (Gene silencing)的表现形式是基因的失活, 即基因不表达, 它是普遍存在于植物界的一种防御反应。基因沉默可以发生在转录水平 (Transcriptional gene silencing, TGS) 和转录后水平 (Post transcriptional gene silencing, PTGS), 其中病毒诱导的基因沉默就是从转录后基因沉默发展而来的^[2]。目前, SIR VIGS 已成为研究的热点, 已在多种植物中成功应用, 例如拟南芥、烟草、番茄、辣椒等。VIGS 技术日渐成熟, 同时不断有新的沉默载体出现, 这些载体大部分都是为烟草而设计, 在烟草中的沉默效率也相对较高。随着对基因沉默技术研究的深入, 病毒诱导的基因沉默可以在植株的不同部位成功沉默内源基因, 为研究不同生长时期的基因功能提供了切实可行的手段。此外, 人工合成的 miRNA (amiRNA)介导的 VIGS 已在烟草中成功的应用^[3], 为植物中 miRNA 功能的研究提供了一个便捷的工具。

1 基因沉默的机理

1.1 siRNA 介导的 VIGS 机理

SIR VIGS 的作用机理包括信号引发、信号扩大以及信号传递 3 个阶段。首先是单链 RNA (Single-stranded RNA, ssRNA) 在 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerases, RDRP) 的作用下形成双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA)。这些 dsRNA 被类似 Dicer 的核酸酶切割成 21~23 nt 大小的 RNA 片段, 这些小片段就是所谓的小干扰 RNA。反义 siRNAs 与体内酶结合形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC 与其同源的信使 RNA (Mes-

senger RNA, mRNA) 进行特异性结合, 在结合部位对 mRNA 完成切割, 切割断裂后的 mRNA 随即降解^[4], 导致靶 mRNA 表达水平的下降。另外细胞内还可以以反义的 siRNA 作为引物, 以 mRNA 为模板形成大量的 dsRNA, 再回到引发阶段形成大量新的 siRNAs, 参与切割更多的 mRNA, 从而增强基因沉默的效果^[5]。

1.2 人工 miRNA 沉默基因的机理

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类广泛存在于动植物的非蛋白编码区域具有基因调控作用的小分子 RNA, 长度大约为 20~24 nt (少数小于 20 nt)^[6], 主要参与转录后基因的表达调控。最早发现的 miRNA 是 lin-4, 它是由 Lee 等在线虫中于 1993 年用定位克隆的方法所得, 目前已有上万条 miRNA 被发现, 人工 miRNA 技术也相继产生。人工 miRNA 技术是建立在内源 miRNA 结构特点和作用机制基础之上的^[7], amiRNA 技术利用内源 miRNA 前体骨架, 通过重叠 PCR 的方法替换成熟 miRNA 序列产生新的 miRNA 前体^[8]。目的 miRNA 会随着病毒的大量自我复制在生物体内大量表达, 从而增强对靶 mRNA 的切割作用, 降低靶 mRNA 的表达水平。

miRNA 主要有 2 种调控方式: 介导靶 mRNA 的特异性切割和抑制靶 mRNA 的翻译。在植物中, 对靶 mRNA 的特异性切割起主要作用。病毒侵入植物细胞核后, 病毒质粒会大量的自我复制, 在内源酶的作用下形成具有颈环结构的初级转录本 (pri-miRNA), 然后 pri-miRNA 在 DCL1 (植物中 RNase III 家族的 Dicer 同源体) 切割作用下, 释放出 miRNA 前体 (pre-miRNA)。随后, DCL1 在另外一端的位点进行第 2 次切割, 形成互补的双链 miRNA: miRNA*。双链的 miRNA: miRNA* 在 HASTY 蛋白的作用下运送出细胞核至细胞质中, 解螺旋酶将双链 miRNA 解开, 其中 1 条链整合到 RNA 诱导

作者简介: 刘海萍 (1988-), 女, 在读硕士, 研究方向为食品生物技术。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31000925)。

收稿日期: 2011-12-08

的基因沉默复合物(RISC)中形成成熟的 miRNA,而另 1 条链 miRNA* 被立即降解掉。当成熟的 amiRNA 与靶 mRNA 几乎完全互补时会切割靶 mRNA,导致 mRNA 表达量的降低,miRNA 可以继续识别并切割其它靶 mRNA。miRNA 的 5'端的 2~8 位残基是与靶 mRNA 互补识别的核心部位^[9],而切割位点在与 miRNA 的 10~11 位核苷酸残基配对的靶 mRNA 的开放阅读框(Open reading frame,ORF)区^[10]。

2 2 种沉默方式的优缺点

2.1 siRNA 介导的 VIGS

在 VIGS 出现之前,最常用的研究植物基因组功能的一种反向遗传学手段主要是转基因的方法,该方法可以得到稳定遗传的转基因植株。但是在某些植物中,尤其是对生长周期比较长的物种,需要很长时间才能得到稳定遗传的植株,转基因技术同时依赖于植物遗传转化体系的成熟度。siRNA VIGS(SIR VIGS)的出现使对基因组功能的研究步入一个新的时代,在生命科学领域掀起了一股热潮。较转基因的方法 SIR VIGS 主要有以下优点。

SIR VIGS 容易操作,成本低,而且一般在农杆菌感染 3 周左右就能观察到明显的基因沉默效果,鉴于 VIGS 的这些特点,VIGS 可以较大规模进行基因组序列的功能鉴定,并在短期内得到准确的基因组功能;目前已经研发出的病毒载体即可应用在单子叶植物也可应用在双子叶植物中;经过合理设计插入载体中的目的基因片段,可以沉默某个基因家族中的单个或多个基因,能解决基因家族的冗余性问题^[5];VIGS 对植株造成的致死率很低,所以可以大大提高沉默效率^[5]。鉴于以上优势,VIGS 日渐成为基因功能分析和功能基因筛选的工具。然而 VIGS 也存在亟待克服的困难。外界环境对 VIGS 的效率影响极大,温度、湿度、光照都会影响沉默效率^[11];VIGS 存在沉默差异性,同一植株的不同组织沉默效率相差极大,不同时期的植株沉默效率也参差不齐,一般幼苗沉默效果最好,而较老的植株则很难发生基因沉默;病毒诱导的基因沉默在植株中的沉默时间有限,一般只能持续 3 个月左右,所以不适合用于观察生命周期比较长的植株;目前 VIGS 主要集中在植株早期的研究,而对于花和果实的研究较少。

2.2 miRNA 介导的 VIGS

随着植物中第 1 个 miRNA 的发现以来,miRNA 在生命科学领域一直是研究的热点,人工 miRNA 技术也相继出现。目前,人工 miRNA 技术主要用于获得 miRNA 的转基因植株,用于 VIGS 的研究还相对较少,主要原因是沉默载体的稀少和载体的应用范围有限。miRNA 介导的 VIGS(MIR VIGS)已经在烟草中成功应用^[3],他们用改造过的 CbLCV 在烟草中成功表达了 amiRNA,为研究植物内源 miRNA 的功能奠定了基础。miRNA 靶基因的验证一直以来都是一个难题,5'RACE

的方法是一种常规且可靠的方法,已经成功验证了多个 miRNA 的靶基因。但此方法费用昂贵且操作繁琐,不适合大规模的实验研究。VIGS 在 miRNA 领域的应用,为该领域的研究者提供了一个新视角。较 5'RACE 的方法,miRNA 介导的 VIGS 主要有以下优点。首先,miRNA 介导的 VIGS 操作步骤与 siRNA 介导的 VIGS 步骤类似,同时继承了传统的 VIGS 的省时省力的优点,操作过程中不需要昂贵复杂的仪器,能够在短时间内获得沉默表型;其次,当用于鉴定靶 mRNA 时,只需简单的半定量 PCR 或 Real-time PCR 即可达到实验目的;MIR VIGS 可以很精确的沉默预测的靶基因,对植物细胞致死率小^[3]。MIR VIGS 的应用会使 miRNA 领域的研究步上一个新的台阶。

3 植物中基因沉默的应用

3.1 siRNA 介导的 VIGS 载体及其应用

SIR VIGS 载体大体上可分为 3 类:RNA 病毒载体、DNA 病毒载体和卫星病毒载体^[12]。最常用的 VIGS 载体通常是由 RNA 病毒构建来的,较常用的主要有烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)^[13]、马铃薯病毒 X(Potato virus X, PVX)^[14]、烟草脆裂病毒(Tobacco rattle virus, TRV)^[15]以及菜豆荚斑驳病毒(Been pod mottle virus, BPMV)等。TMV 是最早应用于 VIGS 的病毒并成功的在烟草中沉默了八氢番茄红素脱氢酶基因(Phytoene desaturase, PDS)。其次是 PVX,但是 TMV 和 PVX 的沉默效率低且不持久,并且对植株本身造成的病毒症状较严重,这些症状往往会影响目标性状的观察;有些病毒侵染不均匀,会在叶片上留下斑点状沉默效果,对目标基因表达量的鉴定产生困难;另外,这些病毒不能够侵染生长点,所以不能用来研究植物组织的发育^[16]。TRV 是目前应用最为广泛的一个,已成功应用于拟南芥、烟草、番茄、辣椒、罂粟、唐古草属^[17]等。TRV 不但沉默效率高、持续时间长而且对植株造成的伤害小,不会掩盖沉默表型。近年来,TRV 成功的应用在番茄不同的部位,如叶片^[18]、花^[11]、果实^[19]等。最近的报道表明 BPMV 可以在大豆中成功的诱发基因沉默,大豆是一种重要的经济作物,VIGS 的成功应用可以用于提高大豆的经济价值。较常用的 DNA 病毒主要有番茄金色花叶病毒(Tomato golden mosaic virus, TGMV)^[20]、大白菜曲叶病毒(Cabbage leaf curl virus, CbLCV)等。目前,SIR VIGS 技术可用于植物的抗病虫害、对逆境的反应、代谢方面的研究,进而改良作物的品质。

3.2 miRNA 介导的基因沉默载体及其应用

目前已知的并且已经成功应用在植株中的 MIR VIGS 载体是经过 Tang Y 等^[3]改造过的大白菜曲叶病毒(Cabbage leaf curl virus, CbLCV)。改造过的 CbLCV 可以在烟草中成功的大量表达 amiRNA,进而诱导同源的靶 mRNA 的沉默。CbLCV 的基因组由 2 个大约 2.6

knt 的圆形单链 DNA 元件组成;DNA-A 和 DNA-B。Tang 等^[3]将 DNA-A 和 DNA-B 部分重叠的基因组序列克隆到 pCambia1301(AF234297)上分别产生 pCVA 和 pCVB 质粒,从而激起 MIR VIGS。根据目前的文献报道,这种 VIGS 技术只在烟草中得到了成功的应用且沉默效率高。Tang Y 等^[3]用 amiRNA 技术成功的沉默了烟草的 *PDS*、*Su* 和 *CLA1* 基因。他们的研究还表明, MIR VIGS 可以用来研究烟草内源 miRNA 的功能。他们用改造过的 CbLCV 载体在烟草体内成功的过表达了拟南芥的 miR156b 和 miRNA165a 的前体,证明了这 2 种 miRNAs 的过表达都会导致植株叶子的卷曲,与之前的研究结果相符合。

4 结论和展望

VIGS 已经成为研究基因功能的一种强有力的手段,并且已经在不同植物及不同的植物组织中得到成功的应用。目前主要有 2 种形式的 VIGS: SIR VIGS 和 MIR VIGS。SIR VIGS 应用范围较为广泛,沉默载体种类众多,沉默效果明显。SIR VIGS 具有高通量的优点,可以用于 cDNA 文库的研究,开发新基因的功能。越来越多新的沉默载体随着研究的需要出现,设计适用于花和果实中的基因沉默载体,延长沉默时间是目前亟待解决的问题。农杆菌的侵染方法也有待进一步的提升空间,在 VIGS 体系中农杆菌侵染的方法包括:叶片的高压喷射、叶片注射和根浸泡侵染。要想实现大规模的侵染,这 3 种方法带来的工作量还相对较大;此外这 3 种方法不能用来研究植株早期基因的功能,所以一种新的、简单且能实现早期幼苗研究的方法急需挖掘。miRNA 介导的 VIGS 还没有得到广泛应用且 VIGS 载体种类稀少,开发可应用于其它植物品种的新载体是大势所趋,才能使更多的 miRNA 的功能得到验证。同时 VIGS 存在一定的局限性,随着研究者对 VIGS 机制研究的不断深入,相信这些局限性将会被消除,这种技术将会更广泛的应用于生命科学的各个领域。

参考文献

- [1] 饶红宇,黄敏仁,王明麻.转基因植物中外源基因的沉默[J].南京林业大学学报,2000,24(3):56-60.
- [2] Dinesh-Kumar S P, Anandalakshmi R, Marathe R, et al. Virus-induced

gene silencing [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 236: 287-294.

- [3] Tang Y, Wang F, Zhao J P, et al. Virus-based microRNA expression for gene functional analysis in plants [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153: 632-641.
- [4] Robertson D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 495-519.
- [5] 傅达奇,朱本忠,赵晓丹,等.植物中病毒诱导基因沉默的研究进展[J].中国生物工程杂志,2005(12):62-66.
- [6] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 19-53.
- [7] 高鹏.人工 miRNA 技术及其在植物中的应用研究进展[J].浙江农业学报,2010,22(3):393-397.
- [8] Alvarez J P, Pekker I, Goldshmidt A, et al. Endogenous and Synthetic MicroRNAs Stimulate Simultaneous, Efficient, and Localized Regulation of Multiple Targets in Diverse Species [J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 1134-1151.
- [9] Elbashir S M, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate [J]. *Embo J*, 2001, 20: 6877-6888.
- [10] Llave C, Xie Z, Kasschau K D, et al. Cleavage of *Scarecrow*-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA [J]. *Science*, 2002, 297: 2053-2056.
- [11] Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, et al. Enhancement of virus-induced gene silencing through low temperature and low humidity in tomato [J]. *Mol Cells*, 2006, 121: 153-160.
- [12] 张花美,朱胜男,张丽莎,等.病毒诱导的基因沉默[J].杭州师范大学学报,2001,10(2):158-163.
- [13] Kumagai M H, Donson J, Della-Cioppa G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 1679-1683.
- [14] Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe D C. Initiation and maintenance of virus induced gene silencing [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 937-946.
- [15] Ratcliff F, Martin-Hernandez A M, Baulcombe D C. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing [J]. *Plant J*, 2001, 25: 237-245.
- [16] 王宏芝,李瑞芬,王国英,等.病毒诱导的基因沉默及其在植物功能基因组学研究中的应用[J].自然科学进展,2005,15(1):8-14.
- [17] Di Stilio V S, Kumar R A, Oddone A M, et al. Virus-Induced Gene Silencing as a Tool for Comparative Functional Studies in *Thalictrum* [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(8): e12064.
- [18] Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar S P. Virus-induced gene silencing in tomato [J]. *Plant J*, 2002, 31: 777-786.
- [19] Fu D Q, Zhu B Z, Liang H, et al. Virus-induced gene silencing in tomato fruit [J]. *Plant J*, 2005, 43: 299-308.
- [20] Kjemtrup S, Sampson K S, Peele C G, et al. Gene silencing from plant DNA carried by a Geminivirus [J]. *Plant J*, 1998, 14: 91-100.

The Application Status of Virus Induced Gene Silencing (VIGS) in Plant

LIU Hai-ping

(College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: Small interfere RNA plays the main role in traditional virus induced gene silencing which is a reverse genetics technology and has been widely used in plants to study gene function. Besides, VIGS also provides a rapid and effective method in researching function of miRNA. As the development of VIGS, more and more gene function will be validated in plant in the future.

Key words: virus induced gene silencing; vectors; small interfere RNA; microRNA