

RNAi 在植物功能基因组中的应用*

刁文一 蒋建雄 熊兴华 张 炎 彭昕琴 张志刚

(湖南农业大学作物基因工程湖南省重点实验室 湖南 长沙 410128)

摘要:植物生物学后基因组时代的主要目标就是确定植物基因组中所有基因所具有的功能。解决这个问题一个最直接的方法就是还原或者敲除某个在正常条件下其功能能表达出一定的可观察到的表型的特殊基因。对于这方面的研究,插入突变技术就是一个可用的工具,但是基因的随机性,致死敲除,无标记的突变体都大大地限制了这种技术的利用。RNAi 技术可以克服以上那些难题。它已经被广泛地应用在线虫的功能基因组上,并且所获得的有效资源还被广泛地用于植物功能基因组的分析。

关键词: RNAi; 转录后基因沉默; 功能基因组

Application of RNAi to Plant Functional Genome

DIAO Wen-yi, JIANG Jian-xiong, XIONG Xing-hua, ZHANG Yan, PENG Xin-qin, ZHANG Zhi-gang

Crop gene Engineering key Laboratory of Hunan Province, Changsha, China 410128

ABSTRACT: A major challenge in the post-genome era of plant biology is to determine the functions of all the genes in the plant genome. A straightforward approach to this problem is to reduce or knock out some phenotypic special gene which can be expressed and observed under the normal conditions. Insertion mutation can be applied to this research, but it is limited by gene randomness, lethal knock-out, non tagged mutants. RNAi can greatly overcome those problems, which has been widely used in *Caenorhabditis elegans* functional genome, and the obtained effective resources have been also applied to the analysis of plant functional genome.

Key word: RNA interference(RNAi); Post-transcriptional gene silencing; Functional genome

1 引言

目前,对植物基因组进行 EST 测序已经得到了大量的基因信息,这里包括重要的模式植物拟南芥和农作物水稻的基因组全序列。除此之外,大量的 EST 测序计划还在对其他许多种植物进行相似的研究,例如:玉米。这些信息的价值就在于它可以被一些高效的、高通量的方式所利用去进行功能基因组的分析。而且这已经被许多事实所阐明:在拟南芥基因组中,对数千个拟南芥的 CDNA 克隆序列分析发现,有 20% 的克隆基因的功能已被确定,其余的则多为待分离查明的新基因类型。当然,EST 策略也有很大的局限性,例如,难以寻找一些表达量极低或者不表达的新基因类型,也不能检测出许多重要基因的内含子序列和调控序列,克隆基因的功能也有待鉴定。

在植物中,为了抵抗病毒入侵,我们可以利用 RNAi 技术使其转录产生相应于病毒繁殖关键基因的双链 RNA,从而抵抗病毒的入侵和繁殖^[1],而且还可以利用不同病毒的转录序列中高度同源区段相应的双链 RNA 实现抵抗多种病毒,另外还可以用来控制内源基因^[2]。RNAi 的一个关键特征是能够产生出与需要沉默的靶基因具有同源性的双链 RNA^[3]。通过目前对线虫和果蝇所进行的 RNA 干扰机制的实验,研究者们归

纳出了 RNAi 的可能途径:外源或内源的 DNA、RNA 激发细胞产生相应的双链 RNA(dsRNA),然后 dsRNA 被一种称为 Dicer 的蛋白切割成 21~23 碱基的干扰性 RNA(siRNA),siRNA 又与 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC,由核酸内切酶、核酸外切酶、解旋酶等组成,对靶 mRNA 具有识别和切割作用)结合,结合了 siRNA 的 RISC 被 ATP 活化,活化形式的 RISC 利用其所包含的没有解链的 siRNA 作为向导,对具有同源序列的内源靶基因进行特异性降解^[4],这也突出了 RNA 干扰的特异性。另外在对 RNAi 的研究中,许多科学家还发现在一个细胞中仅仅少量的几个 dsRNA 就可以把靶基因降解,于是推测在 RNAi 过程中还包括一个 dsRNA 的复制过程。Sijen 等^[5]认为 siRNA 还为 RnpA 提供引物,并以靶 mRNA 为模板合成更多的双链 RNA,新的 dsRNA 又被 Dicer 切割成 siRNA,这样就很容易地解决了这个看似复杂的问题。目前 RNAi 在基因功能分析的高效性上已经从线虫中得到了很好的证明,但并没有在植物中进行充分的利用。

2 线虫的功能基因组

目前,对线虫功能基因组的研究进展已经超越了模式植物拟南芥。在对线虫的研究过程中,许多高通量的反向遗传学技术都是应用 RNAi 去干扰靶基因的表达。在预测的线虫

* 基金项目:湖南省教育厅青年基金课题(04B029),湖南农业大学校稳定人才基金(04WD11)

作者简介:刁文一,四川成都人,湖南农业大学硕士研究生。电子邮箱:diaowenyi81@sina.com,联系电话:13117313017

通讯作者:熊兴华,TEL:13786177732 湖南农业大学博士,副教授

(收稿日期:2006-02-15 接受日期:2006-03-10)

基因组中大约 86% 的敲除表型都是用此方法分析的。从那些研究中我们可以清晰地发现目前 RNAi 是研究线虫功能基因组最准确的方法。RNAi 的主要优势就是技术上的简易和高效: 通过把表达了 dsRNA 的大肠杆菌喂养给线虫或者把线虫浸泡在 dsRNA 液中就能降解线虫中的同源基因, 并且是反义 RNA 表达技术对基因抑制效率的 10 倍左右。目前大规模的 RNAi 应用和其他的技术途径达到了一个很好的结合, 特别是在蛋白质互作的酵母双杂交系统和基因芯片的转录层面上。

3 以突变为基础的植物功能基因组研究

和在线虫中的应用相反, 高通量表达调节技术并不能很容易地应用到植物中去。目前, 改变基因的表达和功能的技术包括使用甲基磺酸乙酯(EMS)的化学突变, 使用转位子、T-DNA、RNAi 的插入突变^[6]。利用 RNAi 的技术将在稍后被讨论。化学和插入突变技术已经被广泛地运用到植物基因组的功能鉴定上, 并且许多成功的例子也已经被公布。然而这些技术却有着一个明显的缺陷, 那就是突变上的随机性。这主要表现在突变必须被测序或者做图以证明他们的位置, 并且突变材料的大规模收集必须要通过对整个基因组进行筛选。这些限制也就意味着基因组规模上的突变: 技术含量底, 工作量过大。

比起化学突变, 插入突变被更加常见地使用到大规模植物功能基因组中, 例如, 已知序列的可移动 DNA 标签可以被利用去对插入突变体库的所有敲除突变体的旁测序列进行系统地测序, 这是基因组水平上大规模鉴定随机插入突变体的要求。现在大量的 T-DNA 和转座子随机插入突变品系被建成了数据库^[7], 例如: 拥有 52964 个插入突变品系的拟南芥插入突变文库(SAIL)就包含了大量的 T-DNA 旁测序列; Salk 研究所的基因组分析实验室(SIGNAL)已经拥有了 88122 个插入突变品系, 大约占可预测的拟南芥基因中的 74%^[8]。大规模的 T-DNA 和转座子插入突变品系的收集因为是建立在随机性的基础上, 这样对某个特异基因的突变体的获得就需要花较长的时间, 较强的工作量。混杂在突变品系分析中的复合转座子或多个 T-DNA 的随机插入使得对插入突变转基因的分析更加复杂。例如: 在 SIGNAL 收集的突变品系中, 每一个突变品系平均有大约 1.5 个随机 T-DNA 插入^[8]; 在 SAIL 收集的突变品系中, 每一个突变品系平均有大约 1.5-2 个 T-DNA 插入^[9]。也就是说, 在分离 M2 群体中利用插入突变系对隐性突变体进行大规模分析会使问题更加复杂。

突变的随机性在实验中所造成的不便已经被目前的一个实验所证明: 通过使用 T-DNA 和转座子随机插入突变体来鉴定 RAR3- MYB 基因家族成员^[10]。在拟南芥中 MYB 转录因子的 R2R3 亚家族有 125 名成员^[11]。通过利用 T-DNA 或转座子随机插入突变的方式对那些基因中的 73 个成员进行筛选, 结果在 36 个不同的目的基因里鉴定出了 47 个插入片段^[11]。

这就使得筛选的工作量非常的巨大—在 MYB 基因的亚群中因为随机插入的原因有超过 50000 个突变系要被进行筛选。因此, 尽管随机插入突变在显示突变体表型上展现了高效性, 但是在植物高通量的反向遗传学分析应用上却受到很大的限制。

甚至敲除掉某个基因并不一定就能获知该基因的功能, 其原因是: ①许多基因在功能上是冗余的, 敲除掉一个在功能上冗余的基因, 并不能造成容易识别的表型, 因为基因家族的其它成员可以提供同样的功能; ②拟南芥有 1000-2000 个必需基因, 它们在细胞生长和分裂中发挥作用。敲除这些基因会造成配子体或早期胚的致死性, 因而无法获得必需基因的纯合突变体, 也就谈不上对必需基因的纯合突变体的表型进行评估^[12]。

4 RNAi 在植物功能基因组上的应用

相对于随机插入突变的广泛应用, RNAi 对基因表达进行干扰的技术在植物功能基因组上才刚刚开始起步。如同上面所讨论的那样, dsRNA 引发了对同源性 mRNA 的降解, 阻止了其基因的表达。内含子剪接的发夹结构(靶基因的有义链和反义链被一个内含子隔离开)可以有效地合成 dsRNA, 这种方式被认为在诱导 RNAi 上有显著的效果^[13]。dsRNA 有许多种方式导入到植物中去: 可以利用含有 dsRNA 或者是利用含有内含子的发夹 RNA(ihpRNA)表达载体的基因枪法; 把农杆菌渗透入植物组织, 农杆菌中携带了表达 ihpRNA 载体的 T-DNA。不同的 RNAi 技术有它们各自的优点和缺点, 这要根据它们对受体产生效果所持续的时间和适用于不同范围的植物来就行评估: 基因枪法能应用于任何一种植物, 但是仅仅维持瞬间的效果, 虽然可以关闭目的基因的表达, 产生突变表型, 但这种表型变化却不能遗传。在使用这种 RNAi 技术时, 由于细胞分裂造成 dsRNA 的稀释(子代细胞中观察到, 但随之减弱直至消失), 使得这种方法在研究成体的基因功能时有一定的局限性。相对而言, 利用 ihpRNA 表达载体进行转化就提供了一种稳定的、可遗传的基因沉默, 但是它在植物中的转染效率还有待提高。以 ihpRNA 为载体转化受体目前已经被广泛地应用在不同植物中的大量靶基因上, 这也就阐明了 RNAi 机制可能是存在于所有植物中的一种保守机制^[14]。

在基因组的功能分析上, RNAi 技术比起随机插入突变策略有更多的优势, 特别是对所选择的的目的基因进行特异性的功能分析。RNAi 是一种依赖性的同源过程: 特异地选择靶基因上的一个单一序列进行降解就能确保这个基因家族中的一个单一的成员发生沉默, 或者可以利用同一基因家族的多个基因具有一段同源性很高的保守序列这一特性, 设计针对这一区段序列的 dsRNA 分子, 导入这种 dsRNA 即可产生多个基因同时被沉默的表型。当然如果选择第二种方式, 随机性也就没有被限制了。RNAi 也能被使用去分析一些特定基因的功能。

能。在使用相同 ihpRNA 结构基础上,不同的转基因品系通过选择可以进行不同程度的基因沉默。也就是说,含有诱导型启动子的 ihpRNA 表达能够控制基因沉默的程度和时间^[15]。这种技术解决了以往难以解决的诸多问题。首先使转基因可以遗传给后代,有利于突变的分析;其次 dsRNA 可以被诱导产生, RNAi 能够在发育特定阶段出现,从而使某个特定基因可以仅仅在可选择的生长阶段或者是在可选择的植物组织中进行沉默,也可以研究某个特定基因在不同器官中的功能。所以, RNAi 在对具有不同功能的基因的鉴定上体现了自身的灵活性,这是更受科学家偏爱的^[16]。

5 RNAi 在植物功能基因组中遇到的挑战

目前,在对不同植物的高通量功能基因组分析中, RNAi 也是有一定的局限性的。首先,不像插入突变那样随机的插入,靶基因序列必须要提前获得。当然,一旦基因序列的信息是已知的,所谓的高通量途径就可以迅速地利用。目前对拟南芥功能基因组的测序就是一个强有力的证据。随着已知基因的数目和 EST 测序项目的增加,要获得靶基因序列的信息已不再是件难事。第二,对于不同的受体,合成 dsRNA 的高通量途径也有所不同,例如:转化是 ihpRNA 转基因稳定的表达所必须的程序,拟南芥是唯一的能用简易的高通量途径进行转化的植物^[17]。就 VIGS 而言,选择不同的受体就要用不同的病毒载体进行转化。所以在将来,植物转化技术的改进和 VIGS 载体的完善是必不可少的。

检测微细的或有条件的突变表型所遇到的困难已经在大规模的线虫反向遗传学筛选中报道^[18]。就像在许多实验中所展现的那样,突变体表型被检测的效率主要取决于突变体被检测时所处的条件。因此,无表型的突变体就不能说一定是冗余的或者是无功能的基因。不同的条件下在对植物进行筛选的过程中就发现了这个问题,包括在拟南芥正常的生长发育过程中和拟南芥一系列生长阶段的生长发育过程中^[18]、不同环境下的生长发育过程中对特定的突变体进行检测^[19]。ihpRNA 中所包含的一些标记基因能体现基因沉默的强度,这为我们展示了一个用 RNAi 技术筛选细微表型的新方法。靠得到一个可见的表现型标记,这样一个系统就能被用来鉴定那些原来不能产生明显表现型的强沉默品系。当然这能在可变的环境条件下检测出更多的细节。

6 结语

由于大量的基因信息已经获得,在植物中特别是在拟南芥中,以 RNAi 为基础的功能基因组分析正在变成一种现实。当然大规模的随机筛选对检测未分类的或者是未鉴定的基因也还是非常必须的。对于目前的植物功能基因组分析, RNAi

不仅仅是解决它的重要工具,而且还会为植物功能基因组的发展带来更加广阔的前景。

参考文献

- [1] Waterhouse P, Wang M - B. Gene silencing as an adaptive defence against viruses[J]. Nature, 2001, 411: 834- 842
- [2] Hunter C, Poethig R. Missing links: miRNAs and plant development [J]. Curr Opin Genet Dev, 2003, 13: 372- 378
- [3] Waterhouse P, Graham M, Wang M - B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13
- [4] Hannon GJ. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418: 244- 251
- [5] Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora* by transformation with homologous sequences[J]. Mol Microbiol, 1992, 6: 3343- 3353
- [6] Kim SK. C. elegans: mining the functional genomic landscape[J]. Nature Rev Genet, 2001, 2: 681- 689
- [7] Bevan M. Genomics and plant cells: application of genomics strategies to *Arabidopsis* cell biology[J]. Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2002, 357: 731- 736
- [8] Sessions A, Burke E, Presting G, et al. A highthroughput *Arabidopsis* reverse genetics system[J]. Plant Cell, 2002, 14: 2985- 2994
- [9] Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, et al. Genomewide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*[J]. Science, 2003, 301: 653- 657
- [10] Kranz H, Denekamp M, Grew R, et al. Functional characterization of the members of the R2R3- MYB gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant, 1998, 16: 263- 276
- [11] Stracke R, Werber M, Weishaar B. The R2R3- MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4: 447- 456
- [12] Tabara H, Grishok A, Mello C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence [J]. Science, 1998, 282: 430- 431
- [13] Springe PS. Gene traps; tools for plant development and genomics [J]. plant Cell, 2000, 12(7): 1007- 1020
- [14] Smith N, Singh S, Wang M - B, et al. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs [J]. Nature, 2000, 407: 319- 320
- [15] Bezanilla M, Pan A, Quatrano R. RNA interference in the moss *Physcomitrella patens* [J]. Plant Physiol, 2003, 133: 470- 474
- [16] 郭晓红, 周忠孝. 转录后水平的基因沉默—RNA 干涉[J]. 基础医学与临床, 2003, 23(1): 24- 29
- [17] Clough S, Bent A. . Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant, 1998, 16: 735- 743
- [18] Boyes D, Zayed A, Ascenzi R, et al. Growth stagebased phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for highthroughput functional genomics in plants [J]. Plant Cell, 2001, 13: 1499- 1510
- [19] Arabidopsis Gantlet Project (accessed 23 January 2004): <http://thale.biologie.uni-erlangen.de/index/html>