

## VIGS 技术在植物基因功能研究中的应用

杨迎伍, 李正国\*, 宋红丽, 杨平

重庆大学生物工程学院基因工程研究中心, 重庆市高校功能基因及调控技术重点实验室, 重庆 400044

### Application of VIGS in Plant Gene Function Study

YANG Ying-Wu, LI Zheng-Guo\*, SONG Hong-Li, YANG Ping

Genetic Engineering Research Center, College of Bio-Engineering, Chongqing University, Key Laboratory of Functional Gene and Regulation Technologies under Chongqing Municipal Education Commission, Chongqing 400044, China

摘要: 文章就病毒载体选择、目标基因插入片段设计、病毒嫁接技术、环境条件控制、沉默植株检测等方面对应用病毒诱导的基因沉默(VIGS)技术研究植物基因功能应遵循的基本原则进行介绍,并讨论了其在应用中存在的一些问题。

关键词: 病毒诱导的基因沉默(VIGS); 植物基因功能; 应用; 基本原则

病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是近年来发现的一种转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)现象,可引起内源 mRNA 序列特异性降解(Ratcliff 等 1997; 王宏芝等 2005)。即如果在病毒载体中插入目标基因片段,侵染寄主植物后,植物会表现出目标基因功能丧失或表达水平下降的表型,从而可以确定基因功能。其作用机制为:含有目的基因片段的病毒载体在被侵染的植物组织中大量复制,病毒载体中的目的基因片段在 RNA 引导的 RNA 聚合酶(RNA-directed RNA polymerase, RdRP)作用下合成大量的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA); dsRNA 在 Dicer 酶作用下产生 21~25 个核苷酸的短干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA); 然后, siRNA 的反义链与 RNA 诱导基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合,特异性识别细胞质中的目的基因的单链 mRNA,造成目的基因 mRNA 特异性降解,从而导致目的基因在 RNA 水平上的沉默(Bartel 2004; Burch-Smith 等 2004; Klahre 等 2002; Martinez 等 2002; Waterhouse 等 1998)。

与其它导致基因功能缺失的研究方法(如反义抑制、基因突变等)相比,病毒诱导的基因沉默具有研究周期短、不需要遗传转化、可在不同的遗传背景下生效以及能在不同的物种间进行基因功能的快速比较等优点,此种技术正在发展成为一种简单、快速、有效、高通量的分析基因功能的方法(Burch-Smith 等 2004; 王宏芝等 2005)。

但如何有效地在植物中应用 VIGS 技术,获

得可靠的数据,是人们在实际应用中最为关心的问题。本文结合我们实验室的工作,介绍 VIGS 应用过程中应该遵循的一些基本原则。

#### 1 选择合适的病毒载体

经过几年的发展,已有多种病毒载体在 VIGS 上成功应用,如烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX)、番茄金色花叶病毒(tomato golden mosaic virus, TGMV)、烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)、卫星病毒诱导的沉默系统(satellite virus-induced silencing system, SVISS)、大麦条状花叶病毒(barley stripe mosaic virus, BSMV)、甘蓝缩叶病毒(cabbage leaf curl virus, CbLCV)等(Burch-Smith 等 2004; 王宏芝等 2005)。但每种病毒载体都存在一定的宿主范围,诱导沉默效果也不同。例如 PVX 病毒虽然具有较好的稳定性,但只有 3 个植物宿主家族,而 TMV 则有 9 个植物宿主家族(Brunt 等 1996; Burch-Smith 等 2004)。而且,有些病毒载体感染植物后会引发较强烈的疾病表型,干扰目标基因沉默的表型,以致目标基因的功能分析很困难,如 TMV 和 PVX 等病毒载体(Ratcliff 等 2001)。另外,许多病毒不能侵染宿主植物的生长点或分生组织,以致这些组织的目标基因无法有效沉默(Ratcliff 等 2001)。但采用 TRV 病毒载体能有效的

收稿 2006-12-20 修定 2007-03-09

资助 国家自然科学基金(30600422、30371006)和重庆市自然科学基金(2006BB1139)。

\* 通讯作者(E-mail: zhengguoli@cqu.edu.cn; Tel: 023-65120483)。

使目标基因在生长点或分生组织中沉默,产生系统的沉默效果(Liu等2002b)。

因此,在应用VIGS研究植物基因功能时,所选择的病毒载体应对实验植物有很好的侵染性、在寄主植物中不产生疾病表型或只有轻微的疾病表型,最好能在寄主植物中产生系统的沉默效果。

## 2 选择正确的目的基因片段和适当的长度

根据VIGS的作用机制,理论上引起目的基因沉默的最小插入片段为23个核苷酸(Bartel 2004),但在实际操作中23个核苷酸长度常常不能够有效地启动目标基因沉默的发生,所以需要选择更长的目标基因片段(数倍于23 nt)(Ekengren等2003; Ratcliff等1997)。但如果插入片段太长,可能会导致病毒不能在宿主植物体内传播,也可能导致插入片段易于丢失,如PVX或TRV的病毒载体允许的最大插入片段为1.5 kb(Thomas等2001)。为了使目标基因能够有效的沉默,有人对此研究的结果表明以300~500 bp插入片段的沉默效果最佳(Burch-Smith等2004; Ekengren等2003; Lu等2003b)。当然,也可能存在其它影响沉默效果的因素,如目标基因序列的核苷酸组成(Thomas等2001)、siRNA及目标序列的碱基对的热力学特性等(Khvorova等2003; Schwarz等2003)。

由于VIGS可能引起任何与目标序列存在至少23个核苷酸一致的转录产物的降解,所以在选择目标基因的插入序列区域时必须非常慎重。通常事先进行BLAST序列比对或DNA杂交分析以核实是否可能引起基因家族的其他成员的沉默是非常必要的(Burch-Smith等2004)。当然,对于单拷贝的基因,理论上开放阅读框(open reading frame, ORF)内的任何区域都可以用于基因沉默。然而,如果要使基因家族中的单个基因沉默,必须要谨慎选择插入病毒载体的基因片段区域,保证不能含有与家族其他成员具有23个或更多核苷酸的一致序列。如果家族基因之间具有高度保守的开放阅读框,则可以选择非翻译区(untranslated region, UTR)作为目标基因的插入片段。相反,要想同时沉默一个基因家族中的多个基因,则可以选择高度保守的区域,同时还可克服可能存在的基因功能冗余(Lu等2003a)。VIGS在沉默基因家族中

单个基因或几个基因方面的灵活性,可能会成为研究基因家族中基因之间交迭功能非常有用的工具。

根据目前的研究及VIGS的作用原理,目标基因片段在病毒载体中的插入方向对基因的沉默效果没有影响,即正向插入或反向插入都能达到同样的沉默效果。

## 3 同时使几个不同基因沉默的方法

对于几个基因之间不存在多于23 nt保守序列或几个基因根本就不属于一个基因家族,易于想到的方法是分别构建几个不同基因的病毒载体,然后共感染植物。但此方法在目前的情况下很难获得满意的结果,这主要是由于目前病毒诱导的基因沉默技术并不能保证所有被感染的植物都能产生系统的沉默效果,即几个病毒载体同时感染植物后可能产生基因沉默的部位不一致;另外,此方法也很难确保病毒在植物体内的传播和作用的同步性。所以,对于不具有保守序列的几个不同基因来说,有效的方法是把几个基因的片段串联构建到同一个病毒载体上,这样可保证VIGS作用部位和时期的同步性。如Peele等(2001)用TGMV病毒载体使编码镁离子螯合酶亚组分的基因(*su*)和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)(或称为细胞周期蛋白)的基因共沉默; Turnage等(2002)用CbLCV病毒载体在拟南芥中共沉默 *Chlorate 42* 和 *PDS* 基因。

## 4 病毒载体的嫁接技术

如何有效地使病毒载体转入植物细胞,是病毒在植物体内复制与转移,以及发生目标基因沉默的关键。目前通常把含目标基因的病毒载体转入农杆菌中,然后通过农杆菌介导法感染宿主植物。迄今已发展了几种病毒嫁接方式,如牙签接种(Lu等2003a)、注射渗透(Fu等2005)、高压喷射(Liu等2002a)及真空渗透(Ekengren等2003)等。但对于不同的植物和不同的病毒载体来说,每种嫁接技术的效果也不同,所以在实际工作中应根据植物和病毒载体的种类选择合适的方法(Ekengren等2003; Liu等2002a)。例如,用PVX病毒侵染烟草只需牙签挑取含PVX载体的农杆菌,刺伤叶片即可引发足够强的感染(Lu等2003a),但此方法在应用TRV感染番茄时的效果却不好(Ekengren等2003)。对于TRV在番茄和烟草中的

应用, 实验证明真空渗透和高压喷射幼叶都能获得很好的感染效果(Ekengren 等 2003; Liu 等 2002a)。如果要在植物的局部区域获得有效的沉默, 注射渗透技术比较理想(Fu 等 2005)。例如, 可以通过注射花柄或果梗的方式获得基因在花或果实中的沉默。虽然各种方法在方式上存在很大的差异, 但引发 VIGS 发生的基本原理是一致的, 即含有目标基因片段的病毒载体被接种到幼嫩的植物体内, 然后随着植物的生长, 病毒从接种的部位传播到生长区域, 进而引发 PTGS (Dinesh-Kumar 等 2003; Liu 等 2002a, 2002b; Ekengren 等 2003)。

迄今, 病毒载体的接种技术还没有形成一套非常成熟有效的方法, 已有的报道也只是在少数物种中获得成功, 如烟草、番茄、拟南芥等, 许多接种条件还需要进一步优化, 如农杆菌株系的选择、农杆菌的感染活力、感染缓冲液的选择、农杆菌感染液浓度的确定以及接种方式的优化等。所以, 在实际应用中, 尤其对于尚无 VIGS 报道的植物, 预备试验是必不可少的。

### 5 VIGS 环境条件的控制

成功的基因沉默依赖于病毒在植物体内的传播和植物生长之间的相互作用, 而这 2 个方面都受到环境条件的影响(Burch-Smith 等 2004)。对于病毒的传播和有效的沉默, 温度是最重要的影响因素之一。而对于不同的植物, 有效沉默所需要的温度也可能不同。例如, 用 TRV 感染番茄, 较好的沉默表型在 22 或更低的温度下发生; 而用 TRV 感染烟草, 合适的温度则在 25 左右(Burch-Smith 等 2004; Ekengren 等 2003; Liu 等 2002a; Nethra 等 2006)。目前的研究证明, 植物培养室(growth chamber)是进行 VIGS 实验较为理想的选择, 而控温较差和温度波动大的温室不适宜于做 VIGS 实验。另外, Fu 等(2006)发现, 低温和低湿的条件可以增强基因沉默的强度和延长沉默的持续时间。

### 6 设计合理的实验对照

对于每个 VIGS 实验, 都必须要有合适的对照来监控沉默的效果。阳性对照通常采用八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)基因的沉默, 因为 PDS 沉默能引起沉默区域发生光漂白, 并迅速产生可见的表型(Kumagai 1995)。也

有一些研究选用镁离子螯合酶(magnesium chelatase)基因作为阳性对照(Kjemtrup 等 1998; Peele 等 2001)。实验中, 为了说明病毒自身是否会引起表型, 还必须用空病毒载体接种植物作为阴性对照。另一方面, 阴性对照也可以显示接种技术对植物生长的影响。我们在实验中观察到, 较强烈的接种处理对植物自身生长可能会产生一定的影响, 如真空渗透处理番茄幼苗 10 d 左右的时间内, 对番茄植株的生长具有较明显的抑制(未发表资料)。如果阴性对照(空病毒载体接种的植物)出现非正常的表型, 往往还需要添加新的阴性对照, 即以不含病毒载体的水或侵染缓冲液采用相应的接种技术处理植株。以便明确非正常的表型是来自于病毒自身的原因, 还是由于接种方式引起的, 从而可以进一步选择合适的方法或优化条件来消除此不利影响。另外, 阴性对照对后继的沉默检测也是必不可少的, 所有的检测都应该以接种空病毒载体的阴性对照材料作为检测的阴性对照。

### 7 沉默植株的检测

植物接种含病毒载体的农杆菌后, 随着植物的生长, 病毒从接种位点传播到植物的生长区域并引发目标基因的沉默。从接种到引发基因沉默所需的时间与多种因素有关, 如病毒载体的类型、植物的种类和植物生长条件等。而随着植物体内防御系统的启动, VIGS 将被减弱或消除, 从而恢复目标基因的表达。所以, 病毒诱导的基因沉默通常只能存在于当代的植物中, 甚至只是病毒感染后的某个阶段。因此, 选择沉默植株检测的时机非常重要。另外, 检测材料的选择也非常重要, 通常应选取植株上端的新生叶(Burch-Smith 等 2004; Ekengren 等 2003; Liu 等 2002a)。

VIGS 技术并不能使接受侵染的全部植株都发生目标基因的沉默, 因此首先必须筛选出沉默植株。对于目标基因的沉默能引起植株产生较为明显的表型, 则可以通过表型分析初步确定沉默植株, 再采用分子生物学的方法进一步验证。但对于目标基因的沉默后没有明显表型的植株, 则只能通过分子生物学的方法确认。分子生物学的方法筛选沉默植株有 2 种方式: 一是直接通过半定量或定量 RT-PCR 技术检测目标基因的表达量来确

定(Liu等2002a);二是在病毒侵染后的早期阶段(如番茄约1周左右)提取新生叶RNA,并反转录成cDNA,PCR检测病毒序列来确定病毒是否侵染成功,从而缩小半定量或定量RT-PCR鉴定沉默植株的范围,减少检测的工作量(Fu等2006)。

值得注意的是,采用半定量或定量RT-PCR检测目标基因的表达量时,引物应该设计在目标基因转录本内,且至少有一条引物必须设计在VIGS载体中目的基因片断之外,以避免扩增出病毒中的目标基因序列。另外,还必须选择植物中组成型表达的基因作为半定量或定量RT-PCR的内参照,如*ubi3*、*actin*等。

沉默植株确定后,即可进行目标基因功能的相关研究,如沉默植株的表型分析、生理生化指标测定、通过半定量或定量PCR检测相关基因的表达情况等。

## 8 结语

二十一世纪的分子生物学已经进入后基因组时代,植物功能基因研究已成为植物分子生物学研究的热点。但由于植物的生长周期长,传统的植物功能基因研究方法越来越不能满足植物功能基因组研究。而病毒诱导的基因沉默技术具有简单、快速、高通量等优点,可望解决植物功能基因研究周期长的瓶颈问题。虽然VIGS技术短短几年中取得较大的发展,但此种技术目前仍然存在一定的缺陷。

首先,VIGS引起目标基因的沉默特征不具有遗传性(Burch-Smith等2004),以致VIGS技术并不能彻底揭示基因的功能,这是此种技术自身最大的局限性。但VIGS技术可以对植物EST序列进行快速的高通量筛选,初步确定功能基因,再通过传统的植物功能基因研究手段对基因功能进行进一步的研究,从而节约大量的时间、人力和物力。另外,由于VIGS采用幼苗或植株局部接种的方式,且不具遗传性,所以无法应用于种子萌发和在幼苗生长早期表达的功能基因研究。

其次,如何获得目标基因的系统性沉默仍然是VIGS技术目前需要解决的问题。据目前的研究发现,VIGS虽然可以引发目标基因的系统性沉默,但植株各个部位的沉默效率往往表现出的一致性(Ekengren等2003),即有些部位沉默效率很

高,但有些部位只有轻微的沉默表型。我们用组成性表达*GUS*基因的转基因番茄植株为材料,研究VIGS的组织特异性也获得了相似的结果(未发表资料),有些沉默植株甚至只在局部组织有表型。如果目标基因沉默不能引起植株的明显表型,判断是否系统性沉默将是非常困难的工作,这也往往会对研究结果产生一定的影响。

第三,沉默持续的时间问题。目前的研究发现,VIGS持续的时间可达到2~3个月(Liu等2002a, 2002b; Lu等2003b; Ratcliff等2001),这对于生长周期较长的植物显然还不够。虽然在番茄中采用低温和低湿的方法可适当延长VIGS的作用时间(Fu等2006),但过低温度和湿度对植物本身生长将会产生影响,并延长植物的生长周期,以致目标基因的沉默仍然不能维持到植物生长的后期。通过病毒载体的选择或改造来增强病毒的活性,从而延长VIGS的作用时间和增强目标基因的沉默效果,可能是今后值得尝试的工作。

第四,目前最稳定和最有效的VIGS载体都有一定的宿主范围限制,其中绝大部分都只是在烟草和茄科植物(如番茄)中应用(Burch-Smith等2004)。发展更宽宿主范围的VIGS载体,尤其是能易于在拟南芥和水稻上有效应用,对植物功能基因组研究将是非常有用的。另外,应用VIGS研究特定的基因需要相关序列信息,使此技术在目前只有相对小的EST库的物种中的应用将受到限制。

第五,病毒载体如何有效地接种入植物体内,并产生较强的沉默效果,是VIGS技术实验操作中的关键性步骤。接种过程中的多种因素都可能影响接种效果,如接种方式、农杆菌的活性及浓度、缓冲液的类型等。针对不同的植物和病毒载体,探索出相应的有效接种方法将是VIGS技术应用中需要解决的问题。

虽然VIGS技术目前还存着一些问题,但随着VIGS技术研究的深入必将得到逐步完善。相信VIGS技术必将在更多的植物物种中得到应用,并将成为植物功能基因组学研究中广泛应用的技术。

## 参考文献

- 王宏芝,李瑞芬,王国英,马荣才,魏建华(2005). 病毒诱导的基因沉默及其在植物功能基因组学中的应用. 自然科学进展,

- 15 (1): 8~14
- Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281~297
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJE (1996). Plant viruses online: descriptions and lists from the VIDE database. Version: 20 th August 1996. URL: <http://image.fs.uidaho.edu/videl/descr803.htm#Range>
- Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, Dinesh-Kumar SP (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J*, 39: 734~746
- Dinesh-Kumar SP, Anandalakshmi R, Marathe R, Schiff M, Liu Y (2003). Virus-induced gene silencing. *Methods Mol Biol*, 236: 287~294
- Ekengren SK, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP, Martin GB (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J*, 36: 905~917
- Fu DQ, Zhu BZ, Zhu HL, Jiang WB, Luo YB (2005). Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J*, 43: 299~308
- Fu DQ, Zhu BZ, Zhu HL, Zhang HX, Xie YH, Jiang WB, Zhao XD, Luo YB (2006). Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. *Mol Cell*, 1: 153~160
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115: 209~216
- Kjemtrup S, Sampson KS, Peele CG, Nguyen LV, Conkling MA, Thompson WF, Robertson D (1998). Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant J*, 14: 91~100
- Klahre U, Cr  t   P, Leuenberger SA, Iglesias VA, Jr Meins F (2002). High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 11981~11986
- Kumagai MH, Donson J, Della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1679~1683
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP (2002a). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J*, 31: 777~786
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP (2002b). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPRI/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 30: 415~429
- Lu R, Malcuit I, Moffett P, Ruiz MT, Peart J, Wu AJ, Rathjen JP, Bendahmane A, Day L, Baulcombe DC (2003a). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J*, 22: 5690~5699
- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC (2003b). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30: 296~303
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, L  hrmann R, Tuschl T (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110: 563~574
- Nethra P, Nataraja KN, Rama N, Udayakumar M (2006). Standardization of environmental conditions for induction and retention of post-transcriptional gene silencing using tobacco rattle virus vector. *Curr Sci*, 3: 431~435
- Peele C, Jordan CV, Muangsan N, Turnage M, Egelkroust E, Eagle P, Hanley-Bowdoin L, Robertson D (2001). Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant J*, 27: 357~366
- Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, 276: 1558~1560
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*, 25: 237~245
- Schwarz DS, Hutv  gner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115: 199~208
- Thomas CL, Jones L, Baulcombe DC, Maule AJ (2001). Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana bethamiana* using a potato virus X vector. *Plant J*, 25: 417~425
- Turnage MA, Muangsan N, Peele CG, Robertson D (2002). Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant J*, 30: 107~114
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998). Virus resistance and gene silencing in plants is induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 13959~13964