

RNA 干涉及其在植物功能基因组学中的应用

杨坤 王琦 李艳红*

首都师范大学生命科学学院, 北京 100037

RNA Interference and Its Application in Researches of Plant Functional Genomics

YANG Kun, WANG Qi, LI Yan-Hong*

College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037

提要 介绍了RNA干涉(RNA interference)过程中所涉及的一些关键因子以及其在植物基因功能和抗病毒研究中的最新研究进展。

关键词 RNA干涉; 双链RNA; 植物基因功能

1998年, Fire等^[1]首次在秀丽新小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现,将体外转录得到的单链RNA经纯化后注射入线虫,基因抑制效应即变得十分微弱,而经过纯化的双链RNA则能高效特异性地阻断相应基因的表达,这一现象称为RNA干涉(RNA interference, RNAi)。在随后的2年内,人们相继发现RNA干涉现象广泛存在于植物、真菌、线虫、昆虫、蛙类、鸟类、大鼠、小鼠、猴等几乎所有的真核生物中^[2]。迄今, RNAi发生机制的研究已取得了一定的进展,现对这一现象的研究概况作一些介绍。

1 RNAi涉及的因子

1.1 双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA) 在RNAi过程中, dsRNA起了至关重要的作用。dsRNA可因RNA病毒的入侵、转座子转录、基因组中反向重复序列转录而产生。它既可以是分开的2个RNA分子互补形成分子间双链,也可以是一个RNA分子回折,自身互补,形成分子内双链。RNAi的触发依赖于dsRNA的产生,然后dsRNA与细胞中的特定蛋白质复合物结合,启动相关蛋白质结合到dsRNA分子上,再在依赖于RNA的RNA聚合酶的作用下,引发dsRNA分子的扩增效应,产生更多的dsRNA。同时, RNase III特异地识别dsRNA,将其降解成21~25 nt双链小RNA。这些带有21~25 nt双链小RNA的蛋白复合物结合到mRNA分子上去,双链小RNA可以识别与其同源的mRNA,如果mRNA序列可以与双链

小RNA互补,则双链小RNA与mRNA序列发生链交换,结合在蛋白质复合物上的RNase III将与小RNA反义链配对的mRNA切断,最终导致RNA干涉的发生。这些说明双链RNA在整个RNAi发生过程中的作用非常重要。

1.2 小的干涉RNA(small interferenced RNA, siRNA)

不同情况siRNAs诱导RNAi的效率不同,最有效的siRNA是21个碱基大小,3'端有两个碱基突出的双链RNA,它能使靶RNA和蛋白水平降低90%以上。siRNA对靶序列专一性要求非常严格,与靶mRNA之间的1个碱基错配都会显著削弱基因沉默的效果。

修饰或错配的核糖核酸多集中在5'内部位置或距siRNA双链3'端一半的位置。研究表明,5'端的完整性相对于siRNA距3'一半的位置对RNAi的发生更加重要^[3,4]。这也说明siRNA结构的不对称性是诱发RNAi发生所必需的,5'端的完整性对于RNAi的发生是不可缺少的,但它也会因3'端的修饰而有所减弱。

有人用体外培养的哺乳动物细胞研究发现,siRNA的两条链在诱导产生RNAi过程中的作用不同^[5]。发生在其反义链的唯一的1个碱基错配就会导致RNAi的明显降低,而如果正义链上出现这

收稿 2004-04-19 修定 2004-12-27

资助 北京市科技新星计划项目(H013610020112)。

*通讯作者(E-mail: liyhzx@ceh.ac.uk, Tel: 010-68901692)。

种错配就不会干扰RNAi的发生;而且发生在反义链而不是正义链的3'端2-羟乙基磷酸盐的替换也会阻止RNAi现象,当用2'-O,4'-C-乙烯胸苷修饰siRNA的3'末端时,不论是正义链还是反义链均会完全消除RNAi。这进一步说明化学修饰的性质不同也会导致siRNA的两条链对RNAi有不同的影响^[3]。

1.3 stRNA (small temporal RNA) 最近,发现有一组小分子RNA(stRNA),它们是70 nt的单链RNA折叠成茎环结构后形成的,也是由Dicer酶加工而成的。这些RNA包括22 nt的*lin-4*和*let-7* RNA, stRNA可与目标mRNA的3'非翻译区结合,阻止靶mRNA的翻译,进而在生物发育过程中起短暂的调节作用。

1.4 MicroRNA (miRNA) miRNA存在于各种不同生物中,包括植物、果蝇甚至人等。一般miRNAs具有以下特点:(1)miRNA必须是20~24 nt,用Northern blot可以观察到;(2)RNA具有与侧翼基因组序列配对的潜力,含有成熟miRNA的不完整的RNA的双链体,为转录加工过程必需的。典型的miRNA是来自于基因组的片段,但不是蛋白质翻译区^[5~7]。大多数miRNA基因来自不同的转录单元,它们的转录一般不是从他们自己的起始子,而是从内含子开始^[8~11]。miRNA也可通过Dicer加工形成,一些证据表明,22 nt未编码的RNA分子在真核生物中作为基因表达的调节因子起作用^[11]。

1.5 RNA诱导的基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC) RISC是一种核酸和蛋白质的复合物(包括蛋白质和siRNA),可以将同源的mRNA分解成siRNA。RISC已经在果蝇和人类细胞中得到纯化,而且都含有Argonaute蛋白家族的成员^[12],这种蛋白被认为是该复合物的核心成分^[13~15]。Tabara等^[16]的研究表明Argonaute蛋白质RDE-1、QDE2和AGO1是RNAi过程中至关重要的成分,其作用与蠕虫、果蝇和植物中的干涉过程类似^[16~18]。Argonaute及其同源蛋白质的分子量大约有100 kD,称为PPD蛋白质,均含有PAZ和Piwi结构域。PAZ结构域有一个很稳定的褶皱层和一个 β -桶状中心,侧旁的附属物能与长于5 nt的单链RNA和双链RNA呈现很弱的结合^[19~21]。由

于这种双重结合能力,所以Argonaute蛋白识别目标mRNA之前或之后都能与siRNA结合。

1.6 siRNA、miRNA与RISC的相互作用 siRNA或miRNA双链与RISC结合的链几乎都是5'末端配对不太紧密的链^[22,23]。判断双链中的哪条链与RISC结合得更好,可用动物实验进行观察,现在也应用于植物的siRNA^[23]和miRNA中。一些脊椎动物和昆虫基因,它们的miRNA双链同时与RISC结合,因此推测2条链中有1条或2条会起作用^[6,22,23]。miRNA或siRNA可以通过两种转录后基因沉默机制中的任意一种来指导RISC抑制基因的表达:一种是通过降解目标mRNA;另一种是通过抑制mRNA的翻译。两种机制中选择哪一种,是根据目标mRNA的特性确定的:当mRNA与细胞中的RISC结合时,如果mRNA的翻译区与RISC中的miRNA或siRNA有足够的互补区域,则mRNA将被特异地降解;如果没有足够的互补区,RISC中的miRNA或siRNA则与mRNA的不翻译区结合,特异性地抑制mRNA的正常翻译^[4,14]。

1.7 RNA诱导的转录后基因沉默起始复合物(RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing, RITS) RITS是一种RNAi的执行因子,裂殖酵母异染色质的形成过程中需要RITS复合物。该复合物包括Ago1(裂殖酵母Argonaute同源物)、Chp1(一种与异染色质相关的染色质区域的蛋白)和Tas3(一种新蛋白),还包括通过Dicer核酸酶加工产生的小RNA(这些小RNA与着丝粒的拷贝同源,且与异染色质中的RITS定位有关)^[24]。

2 RNAi在植物研究中的应用

2.1 植物基因功能的研究 RNAi已成功地应用于单个基因和基因家族中的多个成员的沉默^[25~27],植物中运用转基因所形成的RNAi可以遗传到下一代^[28],产生基因表达效应较低的转基因植物,导致植物表现出相应的缺失表型,可用于研究基因功能。

拟南芥是研究植物生长发育过程中基因功能的重要模型植物,主要通过构建正义、反义RNA和dsRNA载体,采用农杆菌介导法来转化植物基因,正义、反义RNA可产生弱的基因干涉功能。dsRNA在拟南芥中作用有如下特点:(1)在dsRNA植物亲代中,*apl*基因以孟德尔方式遗传,其效

应可持续到子代,从而可提示 dsRNA 基因是否可整合到植物基因组中;(2) dsRNA 能够非常特异地只降解与之序列相应的单个内源基因的 mRNA;(3)载体中两条链表达强度有差异,如果选用两个强度相等的启动子则会产生共阻遏效应,从而影响 dsRNA 的干涉效应,因此必须选用强度不同的两种强启动子才能产生强的 dsRNA 作用;(4)拟南芥的组织对 dsRNA 耐受性不同。dsRNA 是研究拟南芥生长及发育基因功能的有效手段。原位杂交显示, *ag* mRNA 累计的下降与 *ag*(RNAi)突变体严格表现型的增加是相关的,因此通过该实验现象可以推测内源 mRNA 是否是 dsRNA 介导的 RNAi 的靶物质^[29~31]。

运用 RNAi 技术生产咖啡因较低的咖啡豆已成功在即。目前采用的除去咖啡豆中天然咖啡因的技术既昂贵又会影响咖啡味道,日本奈良先端科学技术大学基因教育研究中心植物细胞工学部门佐野浩实验室,已发展出一个用 RNAi 的基因工程降低咖啡豆中的咖啡因含量的技术(<http://www.bioon.com>)。咖啡树中的咖啡因是黄苷经过 3 个转甲基酶逐步添加甲基后转变成的,该实验室用 RNAi 抑制第二个转甲基酶——咖啡因合成酶(theobromine synthase)基因的表达,阻断黄苷转变咖啡因的过程后,结果生长 1 年的咖啡树叶子中咖啡因含量降低 5~7 成。

通过 RNAi 技术寻找 ABA 受体已有了突破。细胞生物学和电生理学的技术已经验证,植物保卫细胞内外均有 ABA 受体,用 RNAi 技术将其转化拟南芥,可形成几个突变体,其中一个对 ABA 不敏感,实验证明此蛋白可能是 G 蛋白偶联 ABA 的受体(<http://www.bioon.com>)。

2.2 植物抗病毒的研究 自然状态下,病毒在植物体内不正常复制中断时会产生 dsRNA,引发植物体的 RNAi,降解病毒基因组,因此, RNAi 系统是植物天然的病毒防御系统。利用 RNAi 赋予植物病毒抗性的原理在于:人为将与病毒同源的 dsRNA 导入植物体,基于植物体的 RNA 干扰机制对病毒基因组进行特异性切割降解,阻止病毒的复制扩散,从而保护植物体不受病毒危害。

通过各种方式利用 RNA 介导的干扰技术进行植物抗病毒的研究中,应用方式最多的是用农杆

菌介导的转化使可表达 dsRNA 的 T-DNA 片段整合到植物体基因组,然后检测转化体对病毒的抗性;或者用农杆菌瞬时转化系统,在 dsRNA 瞬时表达期间对植物体进行病毒感染检测,以确定 dsRNA 介导的病毒抗性的有效性。Kalantidis 等^[32]在转有黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)反向重复序列的再生烟草植株中,检测到一个完全抗性的株系,并且发现烟草病毒抗性直接与 siRNA 的产生相关。Wang 等^[33]利用含有大麦黄矮病毒(barley yellow dwarf virus, BYDV) PAV 株系的复制酶基因片段,将其设计成可产生发夹结构的反向重复序列,并将该外源序列导入大麦,在 25 个转化系中,有 9 个转化系表现出强的抗性;稳定遗传的 2 个株系后代中,ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)检测不到接种病毒的存在。Tenllado 和 Diaz-Ruiz^[34]观察了以直接注射和农杆菌介导转化两种方式将病毒基因序列来源的 dsRNA 导入植物叶片细胞后的效果,发现两种方式都可成功干扰烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)和苜蓿花叶病毒(alfalfa mosaic virus, AMV)这 3 种病毒的侵染过程。Pandolfini 等^[35]的实验结果表明,即使导入烟草的李痘病毒(plum-pox virus, PPV)病毒基因组片段含有内含子序列,在转化体中也可以检测到转化片段 siRNA 的存在,并表现出对 PPV 侵染的系统抗性。这一现象说明,诱导 RNAi 的 dsRNA 分子中含有可剪接的内含子不影响它的诱导功能。

采用 RNAi 技术以工程化的手段赋予植物体病毒抗性具有高度可行性,为植物抗病毒基因工程研究提供了又一特异而高效的抗性手段。尽管在 RNAi 研究中还存在一些尚未明确的问题,如 RNAi 介导的异染色质化、系统性沉默、病毒编码的沉默抑制蛋白等问题,可以在深入研究其机制的同时开展一些 RNAi 介导的作物抗病毒育种研究。这不但有助于进一步发现、解决 RNAi 研究中的一些问题,也可为农业生产发展发挥一定的作用。

3 结语

总之, RNAi 技术的发现已经为我们深入了解基因功能、疾病发生以及植物-病毒互作关系提

供了一个简捷、高效的特异性手段。目前, 采用 RNAi 技术进行植物体发育过程中基因功能的研究, 植物体内致病基因、细胞程序性死亡有关基因的研究, 动物的工程化抗病毒研究等还很少, 这也为 RNAi 技术更广泛的应用提供了广阔的空间。

参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Mintgomery MK et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391:806~811
- 2 Boaher JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 31~36
- 3 Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA*, 2003, 9(9):1034~1048
- 4 Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes*, 2003, 4:38~42
- 5 Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*, 2002, 16:720~728
- 6 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001, 294:853~858
- 7 Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294:862~864
- 8 Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A et al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*, 2003, 5:337~350
- 9 Lai EC, Tomancak P, Willams RW et al. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol*, 2003, 4: R42
- 10 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 2003, 12:735~739
- 11 Lim LP, Lau NC, Weinstein EG et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, 2003, 17:991~1008
- 12 Zilbrtmsn D, Cao X, Jacobsen SE. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003, 299:716~719
- 13 Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNA. *Cell*, 2002, 110:563~574
- 14 Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*, 2001, 293:834~838
- 15 Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*, 2004, 116:281~297
- 16 Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG et al. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 1999, 99: 123~132
- 17 Catalanotto C, Azzalin G, Macino G et al. Gene silencing in worms and fungi. *Nature*, 2000, 404:245~248
- 18 Fagard M, Bourwr S, Morel JB et al. AGO1, QDE2, and RED-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:11650~11654
- 19 Lingel A, Simon B, Izaurralde E et al. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 2003, 426:465~469
- 20 Song JJ, Liu J, Tolia NH et al. The crystal structure of the Argonaute 2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*, 2003, 10: 1026~1032
- 21 Yan KS, Yan S, Farooq A et al. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, 2003, 426:468~474
- 22 Schwarz DS, Hutvagner G, Du T et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003, 115: 199~208
- 23 Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 2003, 115:209~216
- 24 Verdel A, Jia S, Gerber S et al. RNAi-mediate targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, 2004, 303: 672~676
- 25 Hannon GJ. RNA interference. *Nature*, 2002, 425:411~414
- 26 Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature*, 2003, 425:411~414
- 27 Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genes*, 2002, 36:489~519
- 28 Chuang CF, Meyerowitz EM. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 97:4985~4990
- 29 Parrish S, Fleenor J, Xu S. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell*, 2000, 6:1077~1087
- 30 Yang D, Lu H, Erickson J. Evidence that processed small dsRNA may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, 2000, 10: 1191~1200
- 31 Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG et al. Heterochromatic silencing and HPI localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science*, 2004, 303: 669~672
- 32 Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M et al. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15: 826~833
- 33 Wang MB, Abbott DC, Waterhouse PM. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol Plant Pathol*, 2000, 1: 347~356
- 34 Tenllado F, Diaz-Ruiz JR. Double-stranded RNAi mediated interference with plant virus infection. *J Virol*, 2001, 75: 12288~12297
- 35 Pandolfini T, Molesini B, Avesani L et al. Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the *rolC* promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection. *BMC Biotechnol*, 2003, 3:7~10