

双链 RNA 和植物对病毒的抗性

白云凤, 王小琦, 白冬梅, 郭志华, 张维锋

(山西省农业科学院 作物遗传研究所, 中国山西 太原 030031)

摘要: 双链 RNA 能诱导转录后的基因沉默, 是生物抵御病毒入侵、维持自身基因稳定的一种自我保护机制。把源自病毒的基因构建成反向重复结构转入植物体内, 其转录出的 RNA 会通过分子内序列互补形成双链, 将入侵病毒的同源序列降解, 使转基因植株获得对病毒的高抗性。RNA 干扰型抗病毒转基因植株中, 转病毒基因的 mRNA 不存在或存在量很少, 也不会翻译成有功能的病毒蛋白, 因此不存在病毒 RNA 重组、异源包装及协作作用的潜在风险, 具有较高的生物安全性。双链 RNA 抗病毒转基因正在成为一种高效、安全的植物抗病毒策略。

关键词: 双链 RNA; 基因沉默; 抗病毒; 基因工程

中图分类号: Q81

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)S2-0044-05

dsRNA-mediated Gene Silence and Antiviral Genetic Engineering

BAI Yun-feng, WANG Xiao-qi, BAI Dong-mei, GUO Zhi-hua, ZHANG Wei-feng

(Crop Genetics Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, Shanxi, China)

Abstract: RNA silencing is a post-transcriptional gene-silencing phenomenon induced by double-stranded RNA (dsRNA). Since its formal discovery in 1998, dsRNA has rapidly developed into one of the most widely applied biotechnologies. Plants transformed with constructs that produce RNAs capable of duplex formation containing target virus sequences have induced virus immunity with high efficiency when targeted against viruses. Biotechnological utilization of dsRNA-based engineered resistance is appealing for biosafety reasons as well. Since little or no transgene mRNA is accumulated in plant cells, there is essentially no template for events such as complementation, heterologous encapsidation, synergy, and recombination.

Key words: dsRNA; gene silence; viral resistance; gene engineering

(Life Science Research, 2006, 10(4)S2: 044 ~ 048)

真核细胞中出现的双链 RNA 会引起同源 mRNA 降解, 抑制相应基因的表达, 称之为 RNA 干扰 (RNAi, RNA interference)。RNA 干扰已作为关闭基因的新技术广泛用于功能基因组的研究, 并逐步用于农作物抗病毒基因工程。

1 双链 RNA 诱导基因沉默的生物学意义及其应用

发现双链 RNA 能够导致基因沉默最初源于对线虫 (*C. elegans*) 的研究。1995 年, 康乃尔大学

收稿日期: 2006-09-14; 修回日期: 2006-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471102); 山西省回国留学人员科研资助项目; 山西省农业科学院博士研究基金项目 (YBSJJ0604)

作者简介: 白云凤 (1957-), 女, 山西文水人, 山西农科院作物遗传研究所研究员, 博士, 主要从事作物抗病毒基因工程研究, Tel: 0351-7120885, E-mail: byf57@sina.com.

的 Guo 等^[11] 给线虫注射反义 RNA 以阻断 *par-1* 基因的表达, 同时注射正义 RNA 作对照, 以期观测到基因表达的增强, 结果二者都同样切断了 *par-1* 基因的表达途径. 1998 年, 华盛顿卡耐基研究院的 Fire 等^[12] 经过大量工作, 证实了前述的正义 RNA 或者反义 RNA 抑制基因表达, 都是由于体外转录得到的单链 RNA 中污染了微量双链 RNA 所引起. 当他们将体外转录得到的单链 RNA 纯化后注射线虫, 发现基因效应十分微弱, 而经过纯化的双链 RNA 却能高效特异地阻断基因表达, 这是双链 RNA 对基因表达的干扰, 他们称之为 RNA 干扰. 随后在果蝇、老鼠和人细胞中也发现类似现象^[3-5].

双链 RNA 干扰基因表达也存在于植物界. Chuang 等^[6] 把与花发育相关的 4 个基因 (*agamous*, *clavata3*, *apetala1* 和 *perianthia*) 的双链 RNA 表达载体导入拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*), 获得了功能丧失或降低的突变体, 表型与通过其他方法鉴定的突变体类似. 植物界发现的类似现象也被称为“共抑制”(co-suppression) 或“转录后基因沉默”(PTGS, posttranscriptional gene silencing).

通过广泛研究, 现已明确双链 RNA 的作用机制^[7]. 生物细胞内出现双链 RNA 后, 细胞内的 Dicer 酶 (RnaseIII 家族中特异识别双链 RNA 的一员) 将其切割成 21~25nt 的 siRNA (small interference RNA, 一种小分子双链 RNA 片段). siRNA 解双链, 其反义链通过碱基配对与 mRNA 杂交, 然后进入两条途径: 1) RISC (RNA-induced silencing complex, RNA 诱导沉默复合物, 具有核酸酶的作用) 将 mRNA 切断, 使 mRNA 丧失功能; 2) 在 RdRP (RNA-dependent RNA polymerase, RNA 依赖性 RNA 聚合酶) 作用下, 反义链作为引物通过类似 PCR 的扩增作用再次形成双链 RNA, 新的双链 RNA 又被 Dicer 切割产生次级 siRNA, 使 RNA 干扰产生强大的扩增效应.

植物体内, 双链 RNA 引起基因沉默的信号 (siRNA) 可通过胞间连丝在细胞间扩散或通过维管系统长距离扩散到整个植株^[8-10], 引起基因的系统沉默.

双链 RNA 干扰的生物学意义主要在于维持基因组的稳定: 1) 保护植物免受病毒侵染. 多数病毒侵染生物体后, 会产生双链 RNA 复制中间体, 这种双链 RNA 就可激发生物体内的 RNA 干扰机制, 将病毒核酸降解; 2) 抑制转座子运动.

线虫的一些 RNA 干扰突变株表现出内源性转座子的运动增加^[11,12]. 抑制转座子运动可能是 RNA 干扰的在生物体内的一项自然功能.

2 双链 RNA 激发的植物对病毒的抗性

植物病毒病是重要的植物病害, 每年由此造成的产量损失约占粮食总产量的 10%. 危害病毒种类也很多, 仅以马铃薯命名的就有 16 种. 已知多数植物病毒是正单链 (+SS) RNA 病毒, 侵染细胞后以其基因组 RNA 为模板转录产生负链 RNA, 形成双链 RNA 复制中间体 (RI, replicative intermediate), 这种双链中间体会激发植物体 RNA 干扰机制, 把入侵病毒的 RNA 降解, 终止病毒的复制, 将其限制在入侵部位, 使植物表现出一种后天免疫状态^[11,12]. 植物本身固有的这种抗性机制可以限制或阻止病毒的再次入侵, 而且沉默信号 siRNA 可以传导到其它部位, 使远离侵染部位的组织也产生对该病毒的抗性.

双链 RNA 干扰是植物本身固有的抗病毒防御机制, 如果病毒不能逃避或抑制这种机制对它的影响, 就不能在植株上生存. 如果病毒只能逃避或抑制这种机制对它的影响, 但不能阻止沉默信号的传导, 那么病毒局部侵染或系统侵染的能力就会大大削弱. 为了自身繁衍, 在和植物共进化的过程中, 病毒通过编码一些蛋白质来抵制寄主植物的防御系统, 达到在植物体内侵染繁殖的目的. 如黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 编码的 2b 蛋白至少部分能阻止基因沉默的起始^[13], 阻止^[14]或延迟^[15]沉默信号的扩散. 2b 蛋白有一个核定位信号, 表明基因沉默可能是在核中被阻断的^[16]. 马铃薯 Y 病毒 (potato virus Y, PVY) 编码的辅助成分蛋白酶 (helper-component protease, HC-Pro), 能逆转已经建立起来的沉默反应^[17], 有助于病毒在植株体内的传播和积累. 用 HC-Pro 作诱饵, 利用酵母双杂交系统分离到了一种与钙调蛋白有关的蛋白质 rgs-CaM^[18], 说明基因沉默的抑制可能与钙离子介导的信号通路有关. 番茄丛矮病毒 (tomato bushy stunt virus, TBSV) 编码的 p19 蛋白能与 RNA 干扰过程中出现的 siRNA 结合, 阻止其扩散^[19]. 甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV) 编码的 P14 蛋白和水稻黑条矮缩病毒 (RBSDV) 编码的 S6 蛋白均能够强烈抑制转基因本生烟 (16C) 中由同源序列引起的 *gfp* 基因沉默, 说明它们可能是由病毒编码的 RNA 沉默抑制因

子。其中, RBSDVS6 基因对植株体内基因组 DNA 甲基化过程的抑制作用更为强烈^[20]。中国番茄黄化曲叶病毒 Y10 分离物 (TYLCCNV-Y10) 和烟草曲茎病毒 Y35 分离物 (TbCSV-Y35) 的 AC2 和 AC4 蛋白亦能抑制 GFP 的局部沉默, 为 RNA 沉默的抑制子^[21]。

3 双链 RNA 在植物抗病毒基因工程中的应用

植物与病毒的协同进化犹如一场战争。植物抗病毒基因工程的目的在于通过基因操作给植物导入一些有用的基因, 赋予或增强植物对病毒的抗性。

利用病毒基因抗病是植物基因工程的重要途径。1985 年, Sanford 和 Johnstone 提出了来源于病原抗性 (PDR) 的概念^[22], 1986 年, Beachy 研究小组首次证实表达烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋白的转基因植物对其供体病毒产生抗性, 随后出现了许多抗病毒转基因报道, 所转基因包括病毒外壳蛋白、移动蛋白、复制酶蛋白基因的全序列或部分序列, 或者是反义序列, 转基因植物在阻止或降低病毒侵染方面均收到了一定效果, 但较难获得对相关病毒高抗或免疫的植株。双链 RNA 诱导基因沉默为植物的抗病毒基因工程提供了新思路。根据双链 RNA 作用原理, 植物体内表达的源自病毒的 RNA 如果形成双链结构, 就会激发植物的 RNA 干扰机制, 把该双链 RNA 降解成 siRNA, 进而引导核酸酶将入侵病毒的同源 RNA 降解。双链 RNA 是否比传统的转基因 (正义基因、反义基因) 能获得更好的抗病效果呢? Waterhouse 等做出了令人信服的实验结果^[23]。他们将马铃薯 Y 病毒蛋白酶 (pro) 的正义基因、反义基因和正义基因 + 反义基因分别导入烟草, 结果表明导入同时导入正义基因和反义基因的抗病或免疫株率明显高于单纯转正义或单纯转反义基因, 且抗病或免疫性符合孟德尔分离规律, 说明获得的抗病性是稳定遗传的。他们将转正义基因和反义基因的感病株杂交, 后代出现了一定比率的抗病或免疫株, Southern 杂交表明同时含正义基因和反义基因的植株均表现抗病或免疫, 而只包含正义基因或反义基因的植株均表现感病。将转正义基因的感病株自交或相互杂交, 后代均表现感病, 转反义基因的也一样。研究结果表明, 导入正义基因 + 反义基因的植株体内转录出的 mRNA 形成的双链结构诱导了入侵病毒同源序

列的降解, 使转基因植株获得了对病毒的免疫性。随后该研究组将 PVY 的 Pro 基因构建成反向重复序列表达载体导入烟草^[24], 该序列的转录产物是一种自我互补的发夹状双链 RNA (hairpin RNA, hpRNA)。结果表明转基因植株对 PVY 的抗病株率远远高于转正义或反义基因的抗病株率, 且抗病性达免疫水平。该研究组进而把大麦黄矮病毒 (barley yellow dwarf luteovirus-PAV) 的分离物 (BYDV-PVA) 多聚蛋白酶基因的反向重复序列 (hpBYDVpol) 导入大麦^[25], 含转基因植株的免疫率近乎 100%, 且免疫性状以简单的孟德尔方式遗传。Missiou 等^[26] 把马铃薯 Y 病毒编码外壳蛋白的基因片段的反向重复序列导入马铃薯推广品种 "Spunta", 15 株转基因植株中有 13 株对 PVY 病毒的 3 个株系 PVY^N、PVY^O 和 PVY^{NTN} 都具有高抗性。PVX 的侵染与否不影响转基因植株对 PVY 的高抗性。抗病转基因植株在接种 PVY 病毒前就已检测到了来自转基因的 siRNAs, 表明 RNA 干扰机制在病毒入侵前就已启动。朱俊华等^[27] 把 PVY 外壳蛋白基因片段的反向重复序列导入烟草, 获得了对 PVY 免疫的植株, 免疫株率远远高于转正义基因。

Tenllado 等^[28] 的研究结果为双链 RNA 介导的抗病性提供了直接的实验证据。他们体外转录合成辣椒轻斑病毒 (PMMoV) 54 kDa 蛋白基因的双链 RNA 和烟草蚀纹病毒 (TEV) 的双链 RNA, 用 PMMoV 与其双链 RNA 混合侵染烟草的半个叶片, 被侵染叶片没有出现任何病症, 而只用 PMMoV 或用 PMMoV 与其正义 RNA 的混合物或 PMMoV 与其反义 RNA 的混合物侵染, 或用 PMMoV 与 TEV 的双链 RNA 的混合物侵染的另半个叶片, 则出现了明显的感病症状, 表明抗病性是双链 RNA 作用的结果, 并且双链 RNA 作用具有序列特异性。该实验还发现双链 RNA 的干扰程度与双链 RNA 的长度有关, 长度为 997 nt 和 596 nt 时干扰效果好, 315nt 时则效果微弱。该实验也从另一方面证明了双链 RNA 介导的抗病性具有高效性和序列特异性及双链 RNA 的长度依赖性。

转基因抗病植株异位表达的病毒特异性双链 RNA 模拟病毒感染而激发了植物体内的 RNA 干扰机制, 阻止了病毒的复制和繁殖。与自然界病毒感染不同的是, 转基因转录出的 RNA 会通过分子内的序列互补自发形成双链结构, 不需 RdRP 的参与, RNA 干扰机制在病毒侵染之前就已经启

动。如果病毒侵入植株体内,立即就会被 RISC 降解。转基因植株的每个细胞都会产生双链 RNA,不需要沉默信号的系统扩散,也就不会被病毒编码的抑制子所抑制。因此,双链 RNA 干扰型转基因植株更易获得高抗性。另一方面,病毒基因的反向重复序列转入植物以后形成的双链 RNA 会被植物体内的 Dicer 酶降解成 21~25nt 的 siRNA,转病毒基因的 mRNA 不存在或存在量很少,也不会翻译成有功能的病毒蛋白,因此不存在类似于传统的植物抗病毒载体转化所引起的病毒 RNA 重组、异源包装及协生作用的潜在风险,具有较高的生物安全性。

获得 RNA 干扰型抗病毒转基因植物无疑是高效、安全的抗病毒策略,但是有些重要的植物种类或某些优良品种往往不易转化成功。为了克服这个障碍, Tenllado 等^[29]做了一个令人感兴趣的实验。他们在大肠杆菌改良菌株 HT115(Rnase I-II 缺陷型)中用 IPTG 诱导表达出大量的源自辣椒轻斑斑驳病毒(PMMoV)基因序列的双链 RNA,用该菌株的裂解液喷撒烟草,几天后接种 PMMoV,植株表现出抗病性。这项研究启发我们能否用工厂化生产表达源自病毒序列的双链 RNA 细菌制剂喷洒植物,防治植物病毒病,甚至同时防治多种植物病毒病。

参考文献(References):

- [1] GUO S, KEMPHUES K J. *Par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed[J]. *Cell*, 1995, 84: 611-620.
- [2] 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(19): 806-811.
- [3] 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.
- [4] ELBASHIR S M, HARBORTH J, LENDECKEL W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured *mammalian* cells[J]. *Nature*, 2001, 411: 494-498.
- [5] BILLY E, BRONDANI V, ZHANG H D, *et al.* Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 14428-14433.
- [6] CHUANG C F, MEYEROWITZ E M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9): 4985-4990.
- [7] LECELLIER C H, VOINNET O. RNA silencing in antiviral defense[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198: 285-303.
- [8] PALAUQUI J C, ELMAYAN T, POLLIEN J M, *et al.* Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions[J]. *EMBO J*, 1997, 16: 4738-4745.
- [9] VOINNET O, BAULCOMBE D. Systemic signaling in gene silencing[J]. *Nature*, 1997, 389: 553.
- [10] SONODA S, NISHIGUCHI M. Graft transmission of post-transcriptional gene silencing: target specificity for RNA degradation is transmissible between silenced and non-silenced plants, but not between silenced plants[J]. *Plant J*, 2000, 21: 1-8.
- [11] BRUENING G. Plant gene silencing regularized[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 13349-13351.
- [12] RATCLIFF F, HARRISON B D, BAULCOMBE D C. A similarity between viral defense and gene silencing in plants[J]. *Science*, 1997, 276(6): 1558-1561.
- [13] VOINNET O, PINTO Y M, BAULCOMBE D C. Suppressors of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(24): 14147-14152.
- [14] GUO H S, DING S W. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal[J]. *EMBO J*, 2002, 21: 398-407.
- [15] HAMILTON A, VOINNET O, CHAPPELL L, *et al.* Two classes of short interfering RNA in RNA silencing[J]. *EMBO J*, 2002, 21: 4671-4679.
- [16] ANDREW P. Suppression of posttranscriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus[J]. *EMBO J*, 2000, 19: 1672-1680.
- [17] BRIGNETI G, VOINNET O, LI W X, *et al.* Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*[J]. *EMBO J*, 1998, 17: 6739-6746.
- [18] ANANDALAKSHMI R, MARATHE R, GE X, *et al.* A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants[J]. *Science*, 2000, 290: 142-144.
- [19] SILHAVY D, MOLNAR A, LUCIOLI A, *et al.* A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs[J]. *EMBO J*, 2002, 21: 3070-3080.
- [20] 张凌娣, 王朝辉, 王献兵, 等. 两种植物病毒编码蛋白的基因沉默抑制子功能鉴定 [J]. *科学通报*, 2005, 50(3): 219-224.
- [21] 崔晓峰, 周雪平. 中国番茄黄花曲叶病毒和烟草曲茎病毒 AC2 和 AC4 蛋白为 RNA 沉默的抑制子 [J]. *科学通报*, 2004, 49(23): 2331-2436.
- [22] SANFORD J C, JOHNSTON S A. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome[J]. *J Theor Biol*, 1985, 113: 395-405.

- [23] WATERHOUSE P M, GRAHAM M W, 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: 13959-13964.
- [24] SMITH N A, SINGH S P, WANG M B, *et al.* Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs[J]. Nature, 2000, 407: 319-320.
- [25] WANG M B, ABBOTT D C, WATERHOUSE P M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus[J]. Mol plant pathol, 2000, 1(60): 347-356.
- [26] MISSIOU A, KALANTIDIS K, BOUTLAI A, *et al.* Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing[J]. Molecular Breeding, 2004, 14: 185-197.
- [27] 朱俊华, 朱长香, 温孚江, 等. 正向和反向重复 RNA 介导的抗马铃薯 Y 病毒基因工程比较研究 [J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 133-140.
- [28] TENLLADO F, DIAZ-RUIZ J R. Double-strand RNA-mediated interference with plant virus infection[J]. J Virology, 2001, 75(24): 12288-12297.
- [29] TENLLADO F, LLAVE C, RUIZ J R. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants[J]. Virus Research, 2004, 102: 85-96.

《生命科学研究》专辑征稿启事

《生命科学研究》是经国家新闻出版署和国家科委批准,面向全世界公开发行的反映国内外生命科学领域中最新研究成果的综合性学术期刊,属国家科技部中国科技论文统计源期刊及中国科技核心期刊。

《生命科学研究》由国内外著名的专家、学者 50 人组成编辑委员会,其中国内编委 39 人,国外编委 11 人,分布在美国、英、日、瑞典等国家。由国内著名专家邹承鲁、袁隆平、戚正武、刘以训、顾孝诚、翟中和、刘筠、姚开泰、姚守拙、尹长民、刘德富教授担任学术顾问。

本刊拟于 2007 年上半年出版一期《生命科学研究进展专辑》增刊,主要刊登生物学、农业科学、基础医学等学科最新研究进展,特别欢迎反映各学科国内外最新研究动态的综述类文章。该专辑的公开刊号、版式标准、印刷质量、发行范围等等与正刊完全一致。作者来稿请按现行国家标准或行业标准及本刊规范格式撰写,通过 E-mail 向我部发送(文稿请贴在 E-mail 的附件中,要求使用 word 文字处理系统),可不寄打印稿。经 E-mail 投稿的作者如超过 10 个工作日未收到本刊通过 E-mail 回复的收稿函,请发邮件或来电咨询。但如果是用打印稿投稿,则需要寄两份。文章是否被采用一般需三个月时间。

另请附上作者的详细通讯地址、联系电话和 E-mail 地址,信封上需注明“专辑论文”字样。

来稿请寄:

长沙市湖南师范大学《生命科学研究》编辑部 邮编 410081 投稿 E-mail life@hunnu.edu.cn; smky6688@yahoo.com.cn; 咨询 E-mail: sky@hunnu.edu.cn; 咨询电话 0731-8872616; 传真 0731-8872616。

欢迎从事生命科学研究的广大读者赐稿! 欢迎订阅2007年《生命科学研究》杂志!