

反义 RNA 及其在植物学研究中的应用

石东乔 陈正华

(中国科学院遗传研究所,北京,100101)

关键词:反义 RNA;反义 RNA 技术;基因调控;基因工程

中图分类号:Q522

文献标识码:A

文章编号:0253-977X(2001)01-0073-04

Antisense RNA and Its Application in Botany Research

SHI Dong-qiao, CHEN Zheng-hua

(Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Key words antisense RNA; antisense RNA strategy; gene regulation; genetic engineering

反义 RNA 最初发现于细菌中,它们是一些较短的、散布
的转录产物^[1]。本身缺乏编码能力,但可以通过碱基配对的方式与靶 RNA 的特定互补区域结合,从而阻抑基因的正常表达。因此,反义 RNA 是高度特异性的基因表达抑制因子。

1 自然界中存在的反义 RNA

参与基因表达调控的反义 RNA 是在原核生物中发现的。一些实验结果表明,在质粒的复制、转座子的转座作用及噬菌体的发育进程中,反义 RNA 的调控起着至关重要的作用。

ColE1 以及其他相关质粒的复制过程中,DNA 的延伸起始于一种特殊引物的形成。而这一引物所在的区段,亦可产生与引物本身 5' 端序列互补的反义 RNA 分子。两者之间通过碱基配对形成的构象变化,控制着质粒 DNA 的复制以及质粒拷贝数的变化,使得每个细胞中的 ColE1 数目保持在一定水平。而且,当同一细胞中存在不同的 ColE1 型质粒时,如果它们具有相同的反义/靶 RNA 序列,则彼此之间不相容;反之,则可共存于同一细胞内^[2]。

转座子 IS10 编码产生使转座作用增强的转座酶^[3]。但 IS10 的存在受多拷贝抑制,因为它同时还编码一个反义 RNA,其启动子位于转座酶基因的内部,二者相互重叠。随着 IS10 拷贝数的增加,反义 RNA 通过与转座酶编码序列碱基配对而产生的抑制作用也逐步加强,阻碍转座酶基因的表达,从而限制 IS10 拷贝数的增加,使其数目保持恒定。

P22 噬菌体和 λ 噬菌体都是温和型噬菌体,它们的裂解/溶源状态的转化亦不失为反义 RNA 调控的范例。噬菌体 P22 编码一种被称为 Ant 的抗阻抑子。Ant 能抑制一些阻抑子与 DNA 的结合,从而促进了噬菌体的早期侵染,而且增加

了重组的频率。但是 Ant 的过量生产,会破坏 P22 溶源性的建立。研究结果显示,ant 的表达,受控于被称为 sar (small antisense RNA) 的一种反义 RNA, sar 是 P22 特异性的反义 RNA,它与 ant 基因翻译起始区的配对阻止了 ant 的表达^[4]。在 λ 噬菌体中,蛋白质 cII 严格控制着噬菌体的发育状态,它在促进某些噬菌体整合所需早期基因转录的同时,还通过与 Q 基因启动子的结合而推迟晚期基因的表达,以保证溶源状态建立所需的充裕时间。但 Q 基因内部亦可产生特定的反义 RNA 分子,它可与 Q 基因启动子特异配对,因此解除了 cII 对 Q 基因的抑制,破坏了噬菌体的溶源状态。在这种情况下,反义 RNA 的反式调节降低了 λ 噬菌体的溶源性。而且, cII 基因本身亦被一段长为 77 个核苷酸的反义 RNA——oop RNA——所调控。oop RNA 与 cII 基因 3' 端的互补,有效地阻止了 cII 基因的表达,进一步影响着噬菌体的生活状态^[5]。

在大肠杆菌中发现的两例反义 RNA 与以上情况不同,它们并不与靶基因的模板重叠,而且在反义 RNA 与靶 RNA 分子之间只是部分地互补。例如在 *E. coli* 基因组上,ompF 基因和 ompC 基因彼此间相距很远^[6],但 ompC 基因上游转录产生的 micF RNA,却与 ompF mRNA 的 5' 端有 70% 的同源,二者之间的配对严重抑制了 ompF 基因的表达。而对于 crp 基因的研究结果表明,此基因具有负向自我调控功能。这种调控由 tic RNA (transcription inhibitory complementary RNA),一种依赖于 cAMP-CRP 而合成的反义 RNA 所介导。在离体实验中发现,tic RNA 产生于 crp 基因转录起始位点的上游,其序列与 crp mRNA 的 5' 端部分地互补,它的转录可以被 cAMP-CRP 激活^[7]。

在原核生物中发现广泛分布的反义 RNA 的同时,真核生物中天然存在的反义 RNA 也不断地见诸报道。研究发现,SRK(S locus receptor kinase, S 基因座受体激酶)基因启动子、外显子 I 区、内含子 I 区均能反向转录,产生反义 RNA^[8]。另外还有:在大麦中发现的 α -淀粉酶全长的反义 RNA^[9],在玉米中发现的 Bz2 基因座的双向转录产物^[10],在水稻中发现的与 *atp6* 基因转录产物互补的反义 RNA,以及存在于人及其他动物中的某些反义 RNA 等^[11-13]。

2 反义 RNA 的作用机理

反义 RNA 被发现以后,其作用机理的研究引起了人们的极大兴趣。反义 RNA 通过与靶 RNA 进行碱基配对的结合方式参与有关基因的表达调控。其作用方式主要表现在以下几个方面:

2.1 在 DNA 复制水平的调控

如前所述,ColE1 等其他有关质粒复制的前提条件是合成适当的 RNA 引物(RNAII),它可以折叠形成一定的构象,与模板 DNA 恰当地结合。而反义 RNA(RNAI)在一些蛋白质分子作用下,与 RNAII 及其前体配对,不但阻止了 RNAII 与 DNA 模板间的变性,而且还抑制了 RNaseH 对 RNAII 前体的加工,因此无法产生合适的引物,使 ColE1 的复制受到抑制。

2.2 在转录水平的调控

Okamoto 和 Freundlich 认为, *tic* RNA 结合于 *crp* mRNA 的 5' 端,这种分子间形成的结构,类似于 RNA 聚合酶识别的转录终止信号的二级结构。在此,反义 RNA 的作用方式与衰减子的作用方式相似,以反式作用对转录过程本身进行调控。

2.3 在翻译水平上的调控

mic F、*sar* 及 IS10 的反义 RNA 可以结合于靶 mRNA 的 SD 序列及编码区,从而抑制核糖体与 mRNA 的结合,直接参与翻译水平的调控。近来, Malmgren 等的研究结果也显示,在质粒 R1 中,虽然反义 RNA、CopA 并不能与 *repA* mRNA 在 SD 序列完全配对,但二者之间同样能形成吻触复合体(kissing complex),阻止核糖体在此处的结合^[14]。另一方面, Krink 和 Wulff(1987)通过研究 *oop* RNA 对 *cII* 基因的调控推测,反义 RNA 与靶 RNA 互补区段结合,形成 RNA:RNA 双链结构, RNaseIII 可以特异性地对其识别,并将二者剪切掉,这种间接调控影响了翻译的进行。

3 反义 RNA 技术在植物学研究中的应用

3.1 反义 RNA 技术在植物基因功能及植物生理代谢途径研究中的应用

有关突变体的产生是植物基因功能及生理代谢调控研究的一个重要前提。目前在真核生物中获得突变体的一条有效途径是抑制相关基因的表达,然而在许多情况下,对某些基因的完全抑制所产生的突变对生物体来说又是致死的。因此,利用反义 RNA 技术对基因表达部分地抑制不失为产生某些缺失突变的好方法。CHS(chalcone synthase, 查尔酮合酶)基因是第一个利用反义 RNA 技术研究的植物内源基

因^[15]。有关结果表明,CHS 不但在植物花色形成上有重要作用,而且还与 CHC(chalcone flavanone isomerase, 查尔酮黄烷酮异构酶)及 DFR(dihydroflavonol, 二氢黄烷醇)之间存在着相互作用。*pTOM5* 是从番茄中分离的一个基因,通过研究表达其反义 RNA 的植物发现, *pTOM5* mRNA 的减少可以导致果实变黄,花色苍白,而且类胡萝卜素的含量减少 97%,由此推测 *pTOM5* 是控制果实成熟及类胡萝卜素合成的一个基因^[16]。

在植物光合作用研究中,反义 RNA 技术发挥了巨大作用,并取得一系列的重要成果。在对表达反义 RNA 的转基因植物的研究中发现,将 Rubisco(ribulose biphosphate carboxylate, 二磷酸核酮糖羧化酶)的含量降至野生型的 1/2,对光合作用的速率几乎没有什么影响,提示野生型植物中存在着过量的二磷酸核酮糖羧化酶;而 Rubisco 含量的减少对二磷酸核酮糖激酶(phosphoribulokinase)的活性、电子传导以及叶绿素的含量也没有多大关系,说明此基因与光合作用的诸如此类的其他组分之间并无关联。但在强光照以及高密度 CO₂ 作用下,无论 C₃ 还是 C₄ 植物, Rubisco 的活性将成为决定光合作用速率的一个主要因素^[17]。

在对 β -conglycinin(β -大豆球蛋白)基因的研究中, Fujiwara 等采用反义 RNA 技术,将此基因的启动子与反向的 GUS 基因相连,来转化表达 GUS 基因的烟草,结果发现,在转化植株中, GUS 基因的表达发生了种子特异性抑制,从而证实 β -conglycinin 基因的启动子为种子特异性启动子^[18]。

反义 RNA 技术并非仅局限于反义基因表达载体的构建、植物转化的单一途径,还可利用反义 RNA 与靶 RNA 的特异结合,以标记的反义 RNA 为探针,对靶 RNA 的存在及代谢活动进行标定。Shi 等曾利用地高辛标记的 *aMAG* 基因的反义 RNA 为探针,对 *aMAG* 基因的发育阶段性及组织特异性表达进行了研究,并且指出, *aMAG* 的存在不但对于 DNA 损伤修复是必需的,而且对于细胞的生长也是至关重要的^[19]。

3.2 反义 RNA 技术在植物基因工程中的应用

3.2.1 在果实性状上的控制

植物生理学研究证实,番茄、苹果、香蕉等果实成熟的启动与乙烯合成的增加有直接关系,因此乙烯也被视为果实成熟激素。在乙烯合成途径中, ACC 合成酶(1-氨基环丙酸-1-羧基合酶)与 ACC 氧化酶(乙烯形成酶,又称为 EFE)是催化最后两个步骤的关键酶。人们正是通过对这两个酶的调控来限制乙烯的合成,从而达到控制果实成熟的目的。利用反义 RNA 技术, Hamilton 等成功地降低了番茄成熟过程中 EFE 的活性,使乙烯的合成减少了 97%,虽然果实的着色时间与对照相同,但贮藏实验表明,在抗皱缩及耐贮藏方面,它具有极大的优势^[20]。1991 年, Oeller 等将 ACC 合成酶的反义基因导入番茄,使乙烯的合成被抑制了 99.5%,并大幅度地推迟了果实的成熟期^[21]。Bolitho 曾尝试将反义的苹果 ACC 氧化酶基因转入番茄,也获得了与以上相似的结果,同时也为选择不同物种来源的目的基因进行果实成熟控制方面的

研究提供了实例^[22]。目前,有关的研究工作已扩展到许多其他物种,所选择的的目的基因的范围也进一步扩大,除以上所提到的 ACC 合成酶基因、ACC 氧化酶基因外,还有纤维素酶基因、果胶酶基因等^[23]。

采用反义 RNA 技术,除了对果实的成熟进行控制外,人们还在改变果实其他性状的研究上进行了尝试。TIV1(β -果糖苷酶)催化蔗糖水解产生己糖的反应,它对于植物的生长发育起着重要的作用。将反义的 TIV1 基因导入番茄,发现转化植株生长状态与野生型相同,但前者体内蔗糖含量升高而己糖含量降低,其所结的果实与对照相比,除含有更多的蔗糖外,果实大小比对照小了约 30%^[24]。

3.2.2 植物抗病性研究

在植物抗病基因工程研究中,反义 RNA 技术受到了充分重视,所取得的成果亦不胜枚举。但在早期的抗病毒实验中,通过将反义的病毒外壳蛋白(CP)基因导入植物,并未使植物的抗病性得到显著增强。这可能是因为 CP 基因在植物病毒侵染后期高频率地表达,使得转基因植物所产生的反义 RNA 不足以对其完全抑制。因此,以后大多通过与病毒生命活动密切相关的基因的反义 RNA 的表达来提高植物的抗病性。如 Yang 等将 RDV(rice dwarf virus,水稻矮缩病毒)的核酶基因反向构建于载体中,转化水稻。结果发现,在转化植株中,虽然病毒的侵染性没有降低,但其所表现的感病性状比对照明显减轻,进一步的检测表明,RDV 在转化植株中的复制受到了显著的抑制^[51]。TYCCV(tomato yellow leaf curl virus,番茄黄缩叶病毒)可导致番茄发生严重病害,Bendahmane 等以其稀有的 Rep mRNA 为靶 RNA,运用反义 RNA 技术,得到了对 TYLCV 具有良好抗性、而且几乎完全抑制 TYLCV 复制的转基因烟草^[26]。

利用反义 RNA 技术,开展植物抗病基因工程的研究,具有很大的优势。首先,因为反义/病毒 RNA 的作用,一般是长片段的 RNA 结合,而且并不要求 100% 的碱基配对,所以这种缓冲作用间接地降低了病毒发生变异的频率,有利于长期的病毒防治策略,这是采用其他方法难以达到的,其次,一些研究结果表明,某些病毒含有一些高度保守序列,这种潜在的发育上多功能性的反义 RNA 盒(developing multifunctional antisense cassettes)的存在,为植物的广谱抗病毒基因工程研究提供了理论依据^[27],而且,反义 RNA 技术的运用,可以从打断植物防御反应路径入手,破坏信号传导通路,使植物不但对病毒、病原菌产生抗性,而且还能对某些逆境产生抗性。

3.2.3 改变油料作物种子脂肪酸含量

植物种子中合成的脂肪酸一直与人类生活息息相关,因此,利用基因工程手段获得大量的某些食用或工业用脂肪酸成了植物基因工程研究中的一个重要课题。随着分子生物学的发展,植物脂肪酸代谢途径已日益清晰。而利用反义 RNA 技术调控种子脂肪酸含量的研究也在许多实验室进行着,Knutzon 等成功地将对反义的硬脂酰——ACP 脱饱和酶基

因导入芜菁和油菜,使该酶活性在种子中大大降低,转基因油菜种子中的硬脂酸含量由 2% 提高到 40%,增加了 20 倍^[28]。在国内,石东乔等也构建了包含反义 *Fad2* 基因(油酸脱饱和酶基因)的植物表达载体并转化油菜,以期获得高油酸含量的油菜新品系^[29]。

3.2.4 在植物雄性不育及其育性恢复研究中的应用

杂种优势的利用在育种上有很大的意义,而雄性不育系与恢复系的培育,又是产生具有优良性状的杂交种子的前提。当前,利用反义 RNA 进行植物雄性不育及其育性恢复的研究也得到了蓬勃发展。线粒体呼吸链复合物 I 是一个由多亚基组成的酶,这些亚基分别由细胞器或核基因组编码,向马铃薯中导入反义的 NADH 结合亚基基因,可使花粉的发育受到干扰,导致雄性不育^[30]。Zabaleta 等曾将 *atp9* 基因导入烟草,得到了雄性不育的转化植株;另外,他们还将反义 *atp9* 基因转入烟草,也得到了转化植株,而且,将分别含有正义和反义 *atp9* 基因的转化植株杂交,所得到的后代育性得到了恢复,他们的研究,为雄性不育系及其恢复系的建立提供了一条新思路^[31]。

3.2.5 在其他方面的应用

反义 RNA 技术操作简单,准确高效,因此受到植物基因工程研究工作者的普遍关注。除以上介绍外,目前正在进行的具有潜在开发前景的研究项目还有:利用反义 RNA 技术改变花卉颜色,调控植物淀粉合成途径,增加植物对除草剂的抗性,转基因植物中标记基因及选择标记的封闭,改变植物中淀粉的含量等许多方面^[32]。

对反义 RNA 的深入研究提示,此类分子所参与的 RNA/RNA 相互作用,可能是植物基因表达调控的一个重要路径,其作用方式,也赋予了反义 RNA 技术多方面的优越性(1)反义 RNA 所介导的基因表达阻抑效应是特异的,其调控对象是有选择性的(2)低丰度的反义 RNA,同样可以产生高效的阻抑作用(3)反义 RNA 不能翻译产生蛋白质,因此反义 RNA 技术在基因工程上的应用具有很大的安全性(4)技术操作简单易行,适用范围广泛。

参 考 文 献 (References):

- [1] Simons R W. Naturally occurring antisense control-A brief review[J]. Gene, 1988 (72): 35 ~ 44.
- [2] Tomizawa J, Itoh T. Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981 (78): 1421 ~ 1425.
- [3] Simons R W. Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes [J]. Annu Rev Genet, 1988 (22): 567 ~ 600.
- [4] Wu T H, Liao S M, McClure W R, et al. Control of gene expression in bacteriophage P22 by a small antisense RNA II Characterization of mutants defective in repressor[J]. Genes Dev, 1987 (1): 204 ~ 212.
- [5] Hoopes B C, McClure W R. A cII-dependent promoter is located within the Q gene of bacteriophage lambda [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, (82): 3134 ~ 3138.

- [6] Kawaji H , Mizuno T , Mizushima S . Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins 0 ~ 8 and 0 ~ 9 of *Escherichia coli* K-12 [J] . *J Bacteriol* , 1979 , (140) : 834 ~ 847 .
- [7] Okamoto K , Freundlich M . Mechanism for the autogenous control of the *crp* operon : Transcriptional inhibition by a divergent RNA transcript [J] . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1986 (83) : 5000 ~ 5004 .
- [8] Cock J M , Swarup R , Dumas C . Natural antisense transcripts of the S locus receptor kinase gene and related sequences in *Brassica oleracea* [J] . *Mol Gen Genet* , 1997 (255) : 514 ~ 524 .
- [9] Rogers J C . RNA complementary to α -amylase mRNA in barley [J] . *Plant Mol Biol* , 1988 (11) : 125 ~ 138 .
- [10] Schmitz G , Theres K . Structural and functional analysis of the Bz2 locus of *Zea mays* : characterization of overlapping transcripts [J] . *Mol Gen Genet* , 1992 (233) : 269 ~ 277 .
- [11] Volk R , Köster M , Pötting A , *et al* . An antisense transcript from the *Xenopus laevis* bFGF gene coding for an evolutionarily conserved 24kd protein [J] . *EMBO J* , 1989 (8) : 2983 ~ 2988 .
- [12] Tasic M , Roach A , de Rivac J C , *et al* . Post transcriptional events are responsible for low expression of myelin basic protein in myelin deficient mice : role of natural antisense RNA [J] . *EMBO J* , 1990 (9) : 401 ~ 406 .
- [13] Adelman J P , Bond C T , Douglass J , *et al* . Two mammalian genes transcribe from opposite strands of the same DNA locus [J] . *Science* , 1987 , (235) : 1514 ~ 1517 .
- [14] Malmgren C , Engdahl H M , Romby P , *et al* . An antisense / target RNA duplex forms a strong intramolecular RNA structure 5' of plasmid RI [J] . *RNA* , 1996 (2) : 1022 ~ 1032 .
- [15] van der Krol A R , Mur L A , de Lange L P , *et al* . Antisense chalcone synthase genes in petunia : Visualization of variable transgene expression [J] . *Mol Gen Genet* , 1990 (220) : 204 ~ 212 .
- [16] Bird C R , Ray J A , Fletcher J D , *et al* . Using antisense RNA to study gene function : inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes [J] . *BioTechnology* , 1991 (9) : 635 ~ 639 .
- [17] Furbank R T , Chitty J A , Von Caemmerer S , *et al* . Antisense RNA inhibition of RbcS gene expression reduces rubisco level and photosynthesis in the C-4 plant *Flaveria bidentifolia* [J] . *Plant Physiol* , 1996 (111) : 725 ~ 734 .
- [18] Fujiwara T , Lessard P A , Beachy R N . Seed-specific repression of GUS activity in tobacco plants by antisense RNA [J] . *Plant Mol Biol* , 1992 , (20) : 1059 ~ 1069 .
- [19] Shi L , Kent R , Benne N , *et al* . Developmental expression of a DNA re-pair gene in *Arabidopsis* [J] . *Mutation Research* , 1997 (384) : 145 ~ 156 .
- [20] van der Krol A R , Mol J N M , Stuitje A R . Antisense genes in plants : an overview [J] . *Gene* , 1988 (72) : 45 ~ 50 .
- [21] Oeller P W , Lu M W , Tanlor P L , *et al* . Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA [J] . *Science* , 1991 (254) : 437 ~ 439 .
- [22] Bolitho K M , Yee M Lay , Knighton M L , *et al* . Antisense apple ACC-oxidase RNA reduces ethylene production in transgenic tomato fruit [J] . *Plant Science* , 1997 (122) : 91 ~ 99 .
- [23] Gaffe J , Tiznado M E , Handa A K . Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase [J] . *Plant Physiol* , 1997 (114) : 1547 ~ 1546 .
- [24] Klann E M , Hall B , Bennett A B . Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit [J] . *Plant Physiol* , 1996 (112) : 1321 ~ 1330 .
- [25] Yang W D , Wang S Y , Liu W P , *et al* . Inhibition of replication of rice dwarf virus in transgenic rice plant expressing antisense ribozyme gene [J] . *Virologica Sinica* , 1996 (11) : 277 ~ 283 .
- [26] Bendahmane M , Gronenborn B . Engineering resistance against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) using antisense RNA [J] . *Plant Mol Bio* , 1997 (33) : 351 ~ 357 .
- [27] von Arnim A , Stanley J . Inhibition of African cassava mosaic virus systemic infection by a movement protein from the related geminivirus tomato golden mosaic virus [J] . *Virology* , 1992 (187) : 555 ~ 564 .
- [28] Knutzon D S , Thompson G A , Rsadke S E , *et al* . Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearylacyl carrier protein desaturase gene [J] . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1992 (89) : 2624 ~ 2628 .
- [29] 石东乔 , 周奕华 , 张丽华 , 等 . 油菜 BcNA1 启动子与拟南芥 Fad2 基因的克隆及相关植物表达载体的构建 [J] . *云南大学学报 (自然科学版)* , 1999 (21) 增刊 : 47 .
- [30] Heiser V , Rasmussen A G , Thieck O , *et al* . Antisense repression of the mitochondrial NADH-binding subunit of complex I in transgenic potato plants affects male fertility [J] . *Plant Science* , 1997 (127) : 61 ~ 69 .
- [31] Zabaleta E , Mouras A , Hernould M , *et al* . Transgenic male-sterile plant induced by an unedited *atp9* gene is restored to fertility by inhibiting its expression with antisense RNA [J] . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 , (93) : 11259 ~ 11263 .
- [32] Sewalt V J H , Ni W , Jung H G , *et al* . Lignin impact on fiber degradation : increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco (*Nicotiana tabacum*) stems reduced in lignin content [J] . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 1997 (45) : 1977 ~ 1983 .