

# 转基因植物内源基因与外源基因共抑制问题研究进展<sup>\*</sup>

李 艳 李 毅<sup>\*\*</sup> 陈章良

(北京大学生命科学学院蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

**摘 要** 在植物基因工程研究中,有时外源转化基因和植物中同源的內源基因的表达均被抑制了,这种现象被称为共抑制。引起该现象的原因包括许多因素,有外源基因和与之同源的內源基因 RNA 的转录量, DNA 的甲基化, T-DNA 的结构形式, RNA 依赖的 RNA 聚合酶, 非正常 RNA 以及非等位配对等。其具体机制仍不清楚。最近的研究结果表明转基因植物对病毒的抗性在某些方面与共抑制有相似之处。两者都表现为外源转化基因转录水平很高而稳定 RNA 的水平很低。本文综述了这方面的最新研究进展。

**关键词** 共抑制 转录后的基因沉默 病毒抗性

**分类号** Q 784 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(1999)01-0001-05

在植物基因工程研究领域中,从第一棵转基因植物问世以来,一系列具有重要性状的的目的基因先后被导入植物中,希望这些基因大量表达。然而有时却事与愿违,转化基因发生了沉默(Gene silencing)。随着研究的深入,科学家们发现基因沉默可分为两种,即转录水平上的基因沉默(Transcriptional gene silencing, TGS)和转录后的基因沉默(Post transcriptional gene silencing, PTGS)<sup>[1]</sup>。转录水平上的基因沉默是由于某种原因使得启动子失活,不能起始转录。转录后的基因沉默是发生在转录后,虽然基因被转录了,但 mRNA 被降解了不能积累。这两种基因沉默都可以定义为“同源依赖的,或重复序列诱导的基因沉默(Homology-dependent or repeat-induced gene silencing)<sup>[2]</sup>”。转录水平上的基因沉默一般是只有外源基因发生沉默,而转录后的基因沉默一般是外源基因与同源的內源基因一起发生沉默,即外源基因转入植物后,不但它不表达,与外源基因同源的內源基因也一起被抑制了。因此,转录后的基因沉默也被称为共抑制(Cosuppression)。本文主要介绍一下共抑制的研究情况。

## 1 共抑制研究的意义

共抑制最早的报道是在 1990 年,将与花色有关的查尔酮合酶基因(CHSA)导入到矮牵牛中后,约 50% 的转基因植株的外源 CHSA 基因及內源基因一起发生了沉默,导致花色改变<sup>[3,4]</sup>。共抑制现象使国际上许多科学家产生了浓厚的兴趣。当需要在植物中大量表达某种外源基因时,共抑制导致所需要的基因得不到表达,探明共抑制的发生机制,有助于找到解决的办法。共抑制的意义不仅在应用研究方面,对于进行基础研究如基因表达调控也有重要意义。Matzke 认为共抑制的机制可能是一扇大门,开启了人们没有想到的一个问题,即植物能天然利用同源或互补的核酸序列,在 DNA 或 RNA 水平上来调节基因的表达<sup>[5]</sup>。Dawson 则认为共抑制的出现提示了一种可能性,即细胞内天然存在一种 RNA 监视(RNA surveillance)机制用以排除不必要的 RNA<sup>[6]</sup>。除了植物以外,在真菌及细菌中也有共抑制现象的

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金资助项目(No. 39670415)。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者。

收稿日期:1998-05-06,修回日期:1998-09-05。

报道,最近 Bircher 又在动物中发现了共抑制现象<sup>[7]</sup>,揭示了该现象可能具有共同的基础。因此,1995 年在日本举行的《Modification of gene expression and non-Mendelian inheritance》的植物学国际会议上,与会学者一致认为共抑制等基因沉默现象是一种非孟德尔式的遗传,其机制的探讨将会加强遗传理论。

2 共抑制机制的探讨

共抑制现象发现后的几年内,不同的实验室以不同的实验系统作了大量的工作,积累了大量的实验证据,并提出了一些相应的假说。但是,由于是应用不同的系统,从不同的角度作的研究工作,这些假说并不能统一。因此,目前需要将众多不同实验系统得出的实验证据统一归纳出其共同的特征,得出一个合理的解释。也许共抑制不是单一的机制,不同的系统自有其特有的机制。这两种可能性还需要将来更多的实验研究证实。下面介绍几种重要的假说:

2.1 RNA 域值模型(RNA threshold model)

这种模型最早是由 Dougherty 和 Lindbo 提出来的,他们发现与定位在细胞质内的 RNA 病毒同源的外源基因大量转录后,能够抵抗同源病毒的侵染<sup>[8]</sup>。也就是说在转基因植物体内外源基因 RNA 的量可能有一个域值,如果再有 RNA 病毒的侵染,则超过了此值,从而发生了共抑制。但是,某些共抑制是与转基因 RNA 转录量无关的。例如,对病毒的抗性不一定是与病毒同源的转基因 RNA 的量有关<sup>[9]</sup>。也许,共抑制不是与正常 RNA 的绝对量有关,而是与非正常 RNA(Aberrant RNA, aRNA)相对于正常 RNA 的量有关<sup>[10]</sup>。

2.2 甲基化与共抑制

共抑制是与转录后水平上的甲基化有关。Ingelbrecht 发现在一个发生共抑制的转基因植物的外源 NPTII 基因的上游和下游区域都发生了甲基化。甲基化能引起转录的提前终止,产生非正常 RNA。English 等人发现在转基因 GUS 的 3'区域发生了甲基化,并且该 3'区域是发生共抑制的关键,如果缺失该 3'区域共抑制将不能发生<sup>[12]</sup>。可能是由于转录终止在 3'甲基化区域,产生特定的非正常 aRNA 从而引起沉默。共抑制中的外源基因可能发生甲基化,但与之同源的內源基因却从未发现甲基化存在。它的转录也是正常的。因此,目前尚无法认定甲基化是引起共抑制的原因,至少不是唯一的原因。

2.3 T-DNA 的结构形式与共抑制

据报道,T-DNA 序列的组织形式与共抑制也有联系。Paul 分析了 47 株转 CHSA 基因表现共抑制的矮牵牛,发现外源转化基因的结构与花色的样式有很大关系<sup>[13]</sup>。其中 34%是带有单拷贝的 T-DNA,66%是多拷贝的,T-DNA 右臂反转重复片段的出现是其它形式(左臂反转和不反转重复)的 3 倍。单拷贝外源基因所产生的花色形式大部分是规律的“Junction type”,而具反转重复的多拷贝外源基因产生的花色形式极其复杂,称为“Cossack Dancer”形式。尽管 T-DNA 的结构影响共抑制,但如何影响却不太清楚,有两种可能性,T-DNA 组织形式可能影响非正常 RNA 的产生,进而引发 RNA 的降解,也可能是由于外源基因与內源基因形成非等位配对(Ectopic pairing),这种配对可能改变了內源基因的特性,导致了不能修改的加工过程或转运失常,使得转录产物被降解。两个或多个拷贝的 T-DNA 位点易产生配对,进而导致共抑制。

2.4 RdRp-cRNA 模型

由于共抑制是发生在转录后水平上的,那么 RNA 是如何被降解掉的,是一个关键问题。Dougherty 提出了 RdRp-cRNA 模型来解释这个问题,他认为,植物编码一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp),它能以 mRNA 为模板合成 cRNA,该 cRNA 则与 mRNA 杂交,从而被双链 RNA 特异的 RNA 酶降解掉<sup>[8,10]</sup>。番茄中的这种 RdRp 已经找到,体外实验表明它能以 mRNA 为模板合成 RNA<sup>[14]</sup>。Metzlaff & Flavell 在转 CHSA 的矮牵牛中,检测到了 RNA 降解的片段,既存在有 poly(A)也存在无 poly(A)的片段,大部分是无 poly(A)片段<sup>[15]</sup>,可能是 RNA 特异降解的结果。其中 1 个 3'末端特异的 RNA 片段对降解的抵抗力比较强,该片段的 2 个末端处在 1 个 CHSA 3'编码区与 3'非编码区互补的区域,可以形成一定

的二级结构,使得降解特异。

### 3 共抑制研究的最新动态——转基因植物对病毒的抗性与共抑制的关系

尽管关于共抑制的机制有多种假设,但离其真正机理的揭示,还有一定距离。在植物抗病毒基因工程研究过程中,人们发现转基因植物对病毒的抗性与共抑制在许多方面有相似性。(1)表达源于病毒的某些基因的转基因植物可以抵抗病毒侵染。从病毒来源的转基因若能发生沉默,则也能抑制具有相似序列的病毒积累<sup>[16]</sup>。非病毒来源的转基因能抑制带有该基因片段的病毒侵染,如将带有报告基因 $\beta$ -葡萄糖苷酶(GUS)的马铃薯病毒X(PVX)接种到转GUS基因的烟草,不表现病毒侵染症状<sup>[12]</sup>。(2)病毒也能使宿主基因发生沉默。例如,TMV病毒带有宿主烟草的一个基因片段,侵染烟草后,能使烟草内源的宿主基因发生沉默<sup>[17]</sup>。(3)侵染转基因植物的病毒能诱导与该病毒序列同源的外源转化基因发生沉默。即当病毒侵染含有与病毒序列同源的植物,在侵染一开始,转基因植物中外源基因的表达不受影响,通常表现侵染的症状,当病毒系统运动以后,新生出的叶片中就会发生基因沉默,既影响病毒积累,又影响转化基因表达。这种现象称为恢复<sup>[8,18]</sup>。这些对病毒的抗性是由RNA介导的,是同源依赖的,特征是RNA及蛋白质积累水平极低。它与以前研究的由外壳蛋白等介导的病毒抗性有很大区别,而与共抑制(转录后的基因沉默)却有相似性,表现在(1)都可以高水平转录,却没有稳定的RNA的存在。(2)都是同源序列依赖的。因此,可以通过研究转基因植物对病毒的抗性,进而揭示共抑制的机制,这方面的工作已成为共抑制研究的热点。

Baulcombe实验室对这种RNA介导的病毒抗性作了深入研究。他们本想利用PVX cDNA作为载体,插入目的基因后转化植物,以使之大量表达,该PVX结构被称为扩增子。但是当他们将GUS插入Amplicon转化烟草后,没有病毒的症状,GUS的表达水平也不高。用不同株系的PVX病毒进行的侵染实验发现有株系特异的抗性。共抑制的瞬时表达实验,发现该体系能将通过基因枪打入的GUS基因抑制。可见该Amplicon体系既介导了对病毒的抗性,又介导了对外源基因的抑制<sup>[19]</sup>。这同Dawson的假设一致,他设想植物中天然存在一种RNA监视机制来选择性去除RNA,共抑制或病毒抗性的发生是由于因故开启了此机制<sup>[6]</sup>。另外,此Amplicon显著的特点是抑制发生率为100%,这与普通共抑制的不可预料性是不一样的。因此,我们可以利用该系统来探讨共抑制发生的真正原因。

在利用病毒抗性进行共抑制研究的过程中,Baulcombe等人还发现一种系统信号分子存在的可能性。他们用带有GFP(Green fluorescent protein)报告基因的农杆菌菌液浸润转化了GFP的烟草叶片,检测到GFP基因的高水平表达,而转基因GFP的本底表达水平很低。然而,在浸润区的边缘有一狭窄区域没有检测到荧光,表明GFP转化基因的表达发生了沉默。18d后,检测上部新生的叶片,发现GFP转化基因发生了完全沉默。以带有GFP基因的PVX病毒侵染发生GFP沉默的叶片,也没有病毒的积累。这种抑制是序列特异性的,因为对照带有GUS基因的PVX病毒可以大量积累。由于在发生沉默的上部叶片中,检测不到农杆菌或T-DNA的存在,推测对病毒的抗性和转基因的沉默都是通过一种系统信号传导过去的,且此信号是针对GFP的,可能是GFP相关的DNA或RNA,目前尚未确定这个信号究竟为何物<sup>[20]</sup>。Vaucheret实验室的工作也有类似的发现<sup>[21]</sup>。他们利用嫁接技术,将转基因烟草中未发生共抑制的烟草幼芽嫁接到发生共抑制的去掉芽的烟草上,则也能发生共抑制,反之则不行。这种结果表明有一种沉默信号从下部运动到上部。由于这种获得性的系统沉默是转化基因特异的,所以沉默信号可能包括转化基因或其一部分。例如非正常RNA。但沉默信号是如何传递的,尚不太清楚,可能是通过胞间连丝进行细胞间传递的,并通过维管进行长距离运输。

至今为止,尽管在许多别的系统中,以及最近在病毒系统中都做了许多工作,共抑制的机制仍在迷雾中,还有许多问题需要解决。细胞如何感知RNA量的积累?非正常RNA的来源到底是什么?甲基化是共抑制的原因还是结果?T-DNA的结构是否是引起共抑制的关键?RNA降解机制是如何启动的?共抑制的发育及遗传调控机制是什么?希望不久的将来能对这些问题有更深入的了解。

## 4 本实验室的一些研究进展

本实验室从矮牵牛花瓣中克隆到了查尔酮合酶 CHSA 基因<sup>[22]</sup>,并将正向 CHSA 基因转入矮牵牛中,得到的转基因矮牵牛的花色由原来的紫色变成了白色或具有不同模式的紫白相间的花朵,且发生机率显著高于以前的报道,达到 100%<sup>[23]</sup>。Northern 实验表明外源及内源 CHSA 基因的 RNA 水平皆极低,认为是发生了共抑制现象。在转基因植物花色改变的同时,我们还发现转基因植物出现了雄性不育的现象。在研究的 30 株转基因植物中,除 2 株外,其余转基因植物的花药中均没有可见花粉粒的产生。我们认为,CHSA 转基因植物雄性不育现象的产生可能是由于查尔酮合酶在绒毡层细胞中表达受到抑制从而抑制了类黄酮合成的结果。因为类黄酮是组成花粉粒外壁的一个重要成分。这种由于共抑制而导致的雄性不育可能成为培养雄性不育植物的一条新途径。目前,进一步的研究工作正在进行中。另外,我们实验室目前还利用马铃薯 X 病毒为载体,通过研究对病毒的抗性进而研究共抑制的机制。

## 参 考 文 献

- [1] S. Maïke, N. M. Joseph *et al.* *Annals of Botany*, 1997, **79** :3~12.
- [2] R. A. Jorgensen. *Science*, 1995, **268** :686~691.
- [3] C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen. *Plant Cell*, 1990, **2** :279~289.
- [4] Van der Krol, L. A. Mur, M. Beld *et al.* *Plant Cell*, 1990, **2** :291~299.
- [5] M. A. Matzke, A. J. M. Matzke. *Plant Physiol.* 1995, **107** :679~685.
- [6] O. D. Williams. *Trends Plant Sci.* 1996, **1** (4) :107~108.
- [7] P. B. Manika, U. Bhadra, J. Birchler. *Cell*, 1997, **90** :479.
- [8] J. A. Lindbo, Silva-Rosales L, W. M. Proebstina *et al.* *Plant Cell*, 1993, **5** :1749~1759.
- [9] E. Mueller, J. Gilbert, C. Davenport *et al.* *Plant J.*, 1995, **7** :1001~1013.
- [10] W. G. Daugherty, T. D. Parks, *Curr. Opin. in Cell Biol.*, 1995, **7** :399~405.
- [11] I. Ingelbrecht, H. Van Houdt, M. Van Montagu *et al.* *PNAS*, 1994, **91** :10502~10506.
- [12] J. J. English, E. Mueller, D. C. Baulcombe. *Plant Cell*, 1996, **8** :179~188.
- [13] D. C. Paul, o 'Dell, M. Metzlafl *et al.* *Plant Mol. Biol.*, 1996, **32** :1197~1203.
- [14] W. Schiebel, B. Haas, S. Marinkovic *et al.* *J. of Bioche.*, 1993, **268** :11851~11857.
- [15] M. Metzlafl, M. o 'Dell, P. D. Cluster *et al.* *Cell*, 1997, **88** :845~854.
- [16] D. C. Baulcombe. *Plant Cell*, 1996, **8** :1833~1844.
- [17] M. H. Kumagni, J. Donson, G. Della-Cioppa *et al.* *PNAS*, 1995, **92** :1679~1683.
- [18] H. A. Smith, S. L. Swaney, T. D. Parks *et al.* *Plant Cell*, 1994, **6** :1441~1453.
- [19] S. M. Angel, D. C. Baulcombe. *The EMBO J.*, 1997, **6** :3675~3684.
- [20] O. Voinnet, D. C. Baulcombe. *Nature*, 1997, **389** :553.
- [21] J. C. Palauqui, T. Elmayan, J. M. Pollien *et al.* *The EMBO J.*, 1997, **16** (5) :4738~4745.
- [22] 邵莉,李毅,潘爱华等. *生物工程学报*, 1995, **11** (2) :145~149.
- [23] 邵莉,李毅,杨美珠等. *植物学报*, 1996, **38** (7) :517~524.

## Recent Advances on Cosuppression of Transgenes and Endogenous Genes in Transgenic Plants<sup>\*</sup>

Li Yan Li Yi Chen Zhangliang

( *The National Laboratory for Protein Engineering and Plant Genetic Engineering ,  
College of Life Sciences ,Peking University ,Beijing 100871* )

**Abstract** In transgenic plants ,transgenes may be silenced together with the homologous endogenous genes in some cases. This phenomenon is called cosuppression. Many factors may be involved in causing this phenomenon. These factors include RNA quantities ,DNA methylation ,T-DNA organizations ,RNA-dependent RNA polymerase ,aberrant RNA and ectopic pairing etc. But the exact mechanism is not clear yet. Recent work demonstrates that virus resistant transgenic plant expressing PVX amplicon is similar to cosuppression in some respects. They both relate to high levels of transgene transcription and low steady-state levels of RNA. This paper also summarizes the studies on cosuppression in the authors ' laboratry.

**Key words** Cosuppression ,post-transcriptional gene silencing ,virus-resistance

<sup>\*</sup> Project Granted by Chinese National Natural Science Fund( No. 39670415 ).