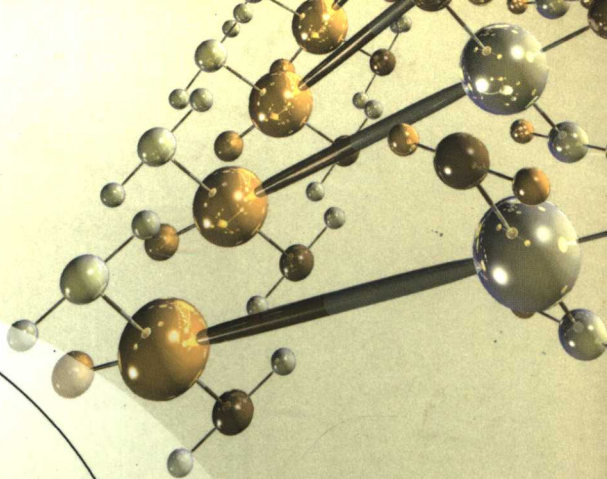




RNA

干扰的生物学原理与应用

主编 宋尔卫



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

RNA 干扰的生物学 原理与应用

主 编 宋尔卫

副主编 苏逢锡 欧阳能勇 朱鹏程

编 者 (按姓氏笔画排列)

于凤燕	王晓蕾	向燕群	朱鹏程
孙 诺	宋尔卫	何以平	苏逢锡
张 立	张立新	张崇建	林隽姬
欧阳能勇	周 婕	郭巨江	秦 丽
贾卫娟	贾海霞	徐天宏	徐焕宾
龚 畅			



高等教育出版社

图书在版编目(CIP)数据

RNA 干扰的生物学原理与应用/宋尔卫主编. —北京:
高等教育出版社, 2005. 6

ISBN 7-04-017325-5

I. R... II. 宋... III. 核糖核酸—生物技术
IV. Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 050766 号

策划编辑 安琪 责任编辑 安琪 封面设计 刘晓翔 责任印制 杨明

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-58581118
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100011	网 址	http://www.hep.edu.cn
总 机	010-58581000		http://www.hep.com.cn
		网上订购	http://www.landaco.com
经 销	北京蓝色畅想图书发行有限公司		http://www.landaco.com.cn
印 刷	国防工业出版社印刷厂		
开 本	787×960 1/16	版 次	2005 年 6 月第 1 版
印 张	21.5	印 次	2005 年 6 月第 1 次印刷
字 数	390 000	定 价	43.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 17325-00

前 言

RNA 干扰(RNA interference)是生物进化过程中遗留下来的一种在转录后通过 RNA 调控基因表达的机制。最早的 RNA 干扰研究是从植物和线虫开始,2001 年 Tuschl 等首次应用长度约为 19~23 个碱基对的双链小分子干扰 RNA (siRNA) 在哺乳动物细胞中诱发基因沉默现象,证实这些细胞也普遍存在 RNA 干扰的机制,从而在世界范围内掀起了研究和应用 RNA 干扰技术的热潮。从此,科学家们不但研究 RNA 干扰抑制基因表达的机制,而且着力于开发其应用价值。

RNA 干扰之所以能引起生物医学界几乎所有研究领域的广泛兴趣,是因为 siRNA 具有强大的抑制基因表达的效应和高度的序列特异性。与抑制基因表达的传统工具,如反义寡核苷酸和核酶等比较,siRNA 沉默基因的效率高达数十到数千倍,是逆基因工具的革命性改进。此外,与目标基因信使 RNA 相差一个碱基序列的 siRNA 的基因沉默效应大大受到削弱,从而保证了抑制目标基因的高度特异性。因此,siRNA 的发现具有划时代的意义,它不仅深入揭示了细胞内基因沉默的机制,而且它还是基因功能分析的有力工具,极大地促进了人类揭示生命奥秘的进程。siRNA 本身还是一种极具前景的基因靶向药物,可广泛地用于诸如癌症等疾病的治疗。鉴于 siRNA 技术的巨大意义与广阔应用前景,2002 年和 2003 年, siRNA 技术分别进入美国《Science》杂志评选的“全球年度十大科学突破”;2002 年, siRNA 被评为年度分子。

小分子 RNA 干扰技术的全面开发和利用,有待对 RNA 干扰机制、研究方法和应用价值的全面深入了解。因此,系统地介绍 RNA 干扰技术的基础研究和应用研究进展,特别是从药物开发和临床治病应用的角度阐述 siRNA 作为新型基因药物的价值,将会对我们研发基于 RNA 干扰的药物产品提供新的思路。

我们课题组在与哈佛大学血液研究中心 Judy Lieberman 组合作开发 RNA 干扰治疗价值的课题研究中,应用 siRNA 治疗动物暴发型肝炎模型获得成功,是国际上首次在动物模型的整体水平上对 RNA 干扰治疗价值的肯定。本书将在我们的研究基础上,对小分子 RNA 干扰的基础研究及其临床开发前景进行总结,力求全面系统而又偏重应用开发的角度介绍 RNA 干扰技术。在学术思想和内容范围方面,本书主要具备以下特点:

1. 新颖性:本书是结合基础研究和应用开发的角度 RNA 干扰专著,并着重

阐述 RNA 干扰技术在药物开发的價值。同时,本书的写作材料首先建立在 RNA 干扰领域实验研究的第一手材料,其中某些内容,例如应用单链抗体融合蛋白作为生物导弹的制导系统导向 siRNA 进入癌细胞,是最新的实验结果,尚在整理发表论文的阶段。

2. 实用性:对于科研工作者,本书不仅为他们提供了详细的实验方案和多种 siRNA 序列,而且总结了 RNA 干扰技术应用研究中的存在问题和解决途径,能为他们建立 RNA 干扰实验室以及申报课题,设计实验提供参考。

3. 启发性:对于药物开发工作者,本书能给他们对新产品,特别是新型基因药物的开发提供新思路和新线索。

4. 系统性:本书内容包括基础理论和开发应用两大部分,共 14 章。各章自成体系,又注意了全篇的完整的结构体系,使读者容易读懂明白。

本书不仅给广大生物医学科学工作者研究和应用小分子 RNA 干扰技术提供参考,同时也深入浅出地给临床医师和医学生们系统介绍这项新技术,为 siRNA 作为新型药物迅速进入临床使用作准备。更重要的是,本书将为医药生物公司的研究开发工作者提供开发 siRNA 药物的新思路,推动该技术迅速实用化。由于 RNA 干扰的研究日新月异,更新周期很短,所以在本书出版的时候,在该领域内可能又有了新的突破。此外,由于编写时间仓促,错漏之处,请读者批评指正。

中山大学附属二院乳腺肿瘤中心
宋尔卫

作者名录

于凤燕	中山大学附属二院乳腺肿瘤中心	510120
王晓蕾	复旦大学生理学系	200032
向燕群	中山大学肿瘤医院鼻咽癌科	510080
朱鹏程	美国哈佛大学 CBR 生物医学研究所	
孙 诺	山东大学微生物学系	250100
宋尔卫	中山大学附属二院乳腺肿瘤中心	510120
何以平	广东省职业病防止医院	510140
苏逢锡	中山大学附属二院乳腺肿瘤中心	510120
张 立	四川大学华西医院移植工程与移植免疫重点实验室	610065
张立新	中国科学院广州生命健康研究院	510020
张崇建	中山大学附属二院乳腺肿瘤中心	510120
林隽姬	复旦大学生命科学院	200032
欧阳能勇	中山大学附属二院妇产科	510120
周 婕	中山大学附属二院乳腺肿瘤中心	510120
郭巨江	中山大学附属二院乳腺肿瘤中心	510120
秦 丽	中山大学附属二院乳腺肿瘤中心	510120
贾卫娟	中山大学附属二院乳腺肿瘤中心	510120
贾海霞	中山大学附属二院乳腺肿瘤中心	510120
徐天宏	美国 Baylor 大学德州儿童医院	
徐煥宾	美国土伦大学医学院癌症研究中心	
龚 畅	中山大学附属二院乳腺肿瘤中心	510120

郑 重 声 明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail：dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

目 录

1 RNA 干扰理论的研究历程	(1)
1.1 RNA 干扰理论的萌芽阶段	(2)
1.2 RNA 干扰理论的诞生	(5)
1.3 RNA 干扰理论的白热化阶段	(7)
1.4 RNA 干扰技术加盟基因组学	(11)
1.5 RNA 干扰的研究前沿	(12)
2 RNA 干扰理论的开发应用前景	(14)
2.1 RNA 干扰:科学时髦还是技术革命	(14)
2.2 RNA 干扰是生物体细胞调节基因表达的内在机制	(15)
2.3 RNA 干扰工作机制的特点	(16)
2.3.1 RNA 干扰技术应用的普遍性	(17)
2.3.2 RNA 干扰的高效性	(17)
2.3.3 RNA 干扰的特异性	(18)
2.4 RNA 干扰是基因功能分析的工具	(18)
2.4.1 体外细胞培养	(19)
2.4.2 RNA 干扰芯片分析系统	(20)
2.4.3 “基因敲低小鼠”	(21)
2.5 RNA 干扰应用于疾病治疗的前景	(22)
2.5.1 用于疾病治疗的 RNA 干扰工具	(23)
2.5.2 体内注入 RNA 干扰的方案	(26)
2.5.3 RNA 干扰疗法的适应证	(27)
3 RNA 对基因表达的调控	(33)
3.1 转录水平的基因沉默	(33)
3.1.1 RNA 介导的 DNA 甲基化	(34)
3.1.2 RNA 介导的异染色质形成	(41)
3.1.3 RNA 介导的 DNA 分子消融	(43)
3.2 转录后水平的基因沉默:siRNA 介导的 RNA 干扰	(44)
3.2.1 生物体自然的 RNA 干扰现象	(45)
3.2.2 siRNA 介导的 RNA 干扰的机制	(47)
3.2.3 RNA 干扰的生物学意义	(52)

3.3 转录后水平的基因沉默:miRNA 介导的 RNA 干扰	(54)
3.3.1 miRNA 分子的发现	(54)
3.3.2 miRNA 分子的筛查方法	(55)
3.3.3 miRNA 的生物来源	(55)
3.3.4 miRNA 的功能分类	(56)
3.3.5 miRNA 与 siRNA 介导的 RNA 干扰机制的联系与区别	(57)
4 RNA 干扰的生物化学	(59)
4.1 研究 RNA 干扰生物化学的模型	(59)
4.1.1 RNA 干扰体内研究的初探	(59)
4.1.2 RNA 干扰的生物化学模型	(60)
4.1.3 哺乳动物细胞中 RNA 干扰的生化机制	(61)
4.2 RNase III 的研究	(62)
4.2.1 细菌的 RNase III	(63)
4.2.2 酵母 RNase III 同源分子的底物和功能	(67)
4.2.3 高等真核生物 RNase III 同源分子结构与功能	(69)
4.3 Dicer 的研究	(70)
4.3.1 Dicer 的生物学特性	(70)
4.3.2 Dicer 的生物学功能	(71)
4.4 RISC 复合酶的研究	(73)
4.5 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的研究	(78)
4.5.1 番茄细胞 RdRP 的发现	(79)
4.5.2 RdRP 的纯化和物理特性	(80)
4.5.3 RdRP 的体外催化特性	(80)
4.5.4 RdRP 在基因沉默中的作用	(81)
4.5.5 RdRP 同源基因在几种生物基因沉默中的研究	(82)
4.5.6 基因沉默中 RdRP 作用模型	(84)
4.6 RNA 和 DNA 解旋酶	(85)
5 小分子干扰 RNA	(87)
5.1 小分子干扰 RNA	(87)
5.1.1 siRNA 的起源与定义	(87)
5.1.2 RISC 的形成以及 mRNA 的切割	(87)
5.1.3 siRNA 介导的 RISC 复合体对 mRNA 的剪切作用	(88)
5.2 微小分子干扰 RNA	(89)
5.2.1 miRNA 的发现与定义	(89)
5.2.2 miRNA 的生物起源	(90)
5.2.3 miRNA 对基因表达的抑制性调控	(92)

5.2.4 miRNA 的研究手段	(96)
5.3 两种引起 RNA 干扰的功能小分子的异同及其作用	(98)
5.3.1 siRNA 与 miRNA 具有不同的起源	(98)
5.3.2 siRNA 与 miRNA 对基因调控有不同的调控方式	(98)
5.3.3 未来要解决的问题	(99)
6 线虫的 RNA 干扰机制和应用	(100)
6.1 线虫模型的简介	(101)
6.1.1 理想的模式生物——秀丽新杆线虫	(101)
6.1.2 优秀的研究模型	(103)
6.1.3 用于基因功能分析的秀丽新杆线虫	(104)
6.2 线虫的 RNA 干扰机制	(105)
6.2.1 线虫 RNA 干扰特点及分子机制	(105)
6.2.2 放大倍增作用	(108)
6.2.3 RNA 干扰技术要点	(109)
6.3 线虫 RNA 干扰的实验技术	(110)
6.3.1 体外 dsRNA 的构建	(110)
6.3.2 dsRNA 的表达产生途径	(111)
6.3.3 siRNA 的合成方法	(112)
6.3.4 dsRNA 的导入方法	(113)
6.3.5 表达双链 dsRNA 的转基因线虫	(116)
6.4 RNA 干扰在线虫中的应用	(116)
6.4.1 RNA 干扰技术的优点	(116)
6.4.2 线虫功能基因组学的理想工具	(117)
6.4.3 用于研究线虫信号传导	(119)
6.4.4 寄生虫的 RNA 干扰	(119)
6.4.5 发育生物学与神经科学	(120)
6.4.6 生物进化分析	(120)
6.5 stRNA 与 miRNA	(121)
7 果蝇的 RNA 干扰机制及其应用	(123)
7.1 果蝇模型的简介	(124)
7.1.1 优秀的模式生物——果蝇	(124)
7.1.2 果蝇细胞株的选择与培养	(125)
7.2 果蝇中的 RNA 干扰机制	(126)
7.2.1 Dicer 的发现以及其作用方式	(127)
7.2.2 RNA 干扰的标准模型	(128)
7.2.3 RNA 诱导的沉默复合体——RISC	(130)

7.2.4 RNA 干扰是一个依赖 ATP 的过程	(131)
7.3 果蝇 RNA 干扰的实验技术	(131)
7.3.1 双链 RNA 的制备	(131)
7.3.2 细胞转染	(134)
7.3.3 转染结果分析	(136)
7.4 RNA 干扰在果蝇中的应用	(137)
7.4.1 功能基因组学研究	(137)
7.4.2 热诱导控制	(139)
7.4.3 在治疗疾病和药物开发中的应用	(139)
7.4.4 研究信号传导通路	(141)
8 高等生物的 RNA 干扰	(142)
8.1 高等植物的 RNA 干扰机制	(142)
8.1.1 植物功能基因研究中的问题	(142)
8.1.2 植物中不同的 RNA 沉默途径	(143)
8.1.3 植物中 RNA 干扰的机制	(144)
8.1.4 植物 RNA 干扰的蛋白质家族	(144)
8.1.5 植物 RNA 干扰的常用载体种类及其优缺点	(145)
8.1.6 植物 RNA 沉默的启动和放大	(146)
8.1.7 植物中 miRNA 的反馈调节	(147)
8.1.8 植物中 miRNA 的功能研究	(148)
8.2 哺乳动物的 RNA 干扰机制	(152)
8.2.1 哺乳动物中的 RNA 干扰机制	(152)
8.2.2 哺乳动物中的两种 RNA 干扰类型	(154)
8.2.3 动物模型的研究	(155)
8.2.4 miRNA 的研究	(157)
8.2.5 哺乳动物细胞内小分子 RNA 在 DNA 甲基化和异染色质化中的作用	(159)
8.2.6 RNA 干扰机制与生物医学应用的联系	(160)
8.2.7 RNA 干扰在临床治疗中的问题和挑战	(165)
9 siRNA 的设计方法	(166)
9.1 随机 siRNA 设计法	(169)
9.2 常规 siRNA 设计法	(170)
9.3 应用反义寡核苷酸芯片筛选 siRNA	(173)
9.3.1 筛选 mRNA 中易接近的区域	(174)
9.3.2 针对 IGF1R 设计 siRNA	(175)
9.4 运用多元生物信息法则设计 siRNA	(176)
9.4.1 理性 siRNA 设计的生物学原理	(177)

9.4.2	理性规则设计的 siRNA 的效能和寿命	(178)
9.4.3	理性规则设计的 siRNA 的特异性	(179)
10	外源性 siRNA 的合成和体外导入方法	(181)
10.1	siRNA 的化学合成	(182)
10.1.1	siRNA 的化学合成方法	(182)
10.1.2	siRNA 的 2' - ACE 去保护和退火	(182)
10.1.3	siRNA 去盐和乙醇沉淀	(183)
10.1.4	siRNA 定量检测	(184)
10.2	T7 启动的体外转录和酶切 siRNA 合成	(184)
10.2.1	体外转录法合成 siRNA 的原理	(185)
10.2.2	设计 DNA 寡核苷酸模板合成 siRNA	(186)
10.2.3	设计去氧核酶合成 siRNA	(186)
10.2.4	体外酶切双链 RNA 法生产 siRNA	(191)
10.3	DNA 质粒载体表达的 siRNA	(193)
10.3.1	Pol II 启动双链 RNA 表达	(193)
10.3.2	Pol III 启动 siRNA 表达	(194)
10.4	病毒载体携带的 siRNA	(195)
10.4.1	肿瘤逆转录病毒载体表达 siRNA/shRNA	(195)
10.4.2	腺病毒和腺相关病毒载体表达 siRNA/shRNA	(196)
10.4.3	慢病毒载体携带 siRNA	(197)
11	RNA 干扰技术在基因功能研究中的应用	(202)
11.1	基因组范围的基因功能系统性筛查	(203)
11.1.1	RNA 干扰技术用于基因组功能筛查的程序	(204)
11.1.2	RNA 干扰技术和正向遗传学技术	(209)
11.1.3	RNA 干扰技术在系统性基因组功能筛查中的意义	(211)
11.2	基因干预动物模型与在体基因功能研究	(212)
11.2.1	利用基因打靶建立基因敲除鼠	(213)
11.2.2	转基因小鼠	(215)
11.2.3	RNA 干扰的基因敲低鼠	(217)
12	体内导入 siRNA 的技术	(220)
12.1	高压静脉注射法导入 siRNA	(220)
12.1.1	高压静脉注射法的靶器官	(221)
12.1.2	高压静脉注射法的原理	(226)
12.2	高压静脉注射法的临床应用雏型: 隔离型肝脏灌注法	(228)
12.2.1	肝脏插管灌注方法的发展	(228)
12.2.2	隔离型肝脏灌注的原理和方法	(229)

12.2.3	隔离型肝脏灌注法的治疗效果	(230)
12.2.4	隔离型肝脏灌注法应用于导入 siRNA 的前景	(231)
12.3	提高体内 siRNA 生物稳定度的化学修饰方法	(232)
12.3.1	“加帽”的 siRNA	(232)
12.3.2	硫代磷酸酯 siRNA	(233)
12.3.3	甲基化和烯丙基化的 siRNA	(234)
12.3.4	硼烷磷酸酯 siRNA	(234)
12.4	细胞选择性导入 siRNA 的方法	(237)
12.4.1	应用胆固醇衍生物在肝脏导入 siRNA	(237)
12.4.2	应用单链片段抗体技术选择性导入 siRNA	(239)
13	RNA 干扰技术在感染性疾病中的应用	(243)
13.1	病毒性肝炎的 RNA 干扰疗法	(244)
13.1.1	干扰丙型肝炎病毒基因	(244)
13.1.2	干扰乙型肝炎病毒基因	(246)
13.1.3	宿主肝细胞的 <i>Fas</i> 基因的 RNA 干扰	(249)
13.1.4	宿主肝脏细胞因子基因的 RNA 干扰	(251)
13.1.5	宿主肝细胞癌基因的 RNA 干扰	(252)
13.2	HIV 感染的 RNA 干扰疗法	(252)
13.2.1	HIV 感染人类靶细胞的周期	(254)
13.2.2	RNA 干扰控制 HIV 感染	(255)
13.2.3	RNA 干扰在治疗 HIV 感染中存在的问题和解决方法	(260)
13.2.4	抗 HIV 的 RNA 干扰药物开发的前景	(264)
14	RNA 干扰技术在恶性肿瘤中的应用	(266)
14.1	癌基因的 RNA 干扰	(267)
14.1.1	<i>Ras</i> 基因的 RNA 干扰	(267)
14.1.2	<i>Her2</i> 基因的 RNA 干扰	(271)
14.2	丧失杂合性等位基因的 RNA 干扰	(275)
14.2.1	ASI 抗肿瘤疗法的基本原理	(276)
14.2.2	逆基因药物应用于 ASI 的研究	(278)
14.3	肿瘤血管生成的 RNA 干扰	(280)
14.3.1	肿瘤血管形成的机制与肿瘤血管系统	(280)
14.3.2	血管生成因子的 RNA 干扰	(282)
14.4	肿瘤化疗耐药的 RNA 干扰	(285)
14.4.1	ABC 转运蛋白的 RNA 干扰	(286)
14.4.2	谷胱甘肽转移酶与化疗耐药	(288)
14.4.3	抗凋亡基因的 RNA 干扰	(289)

附录 常用 RNA 干扰技术的实验方法	(292)
实验 1 体外 siRNA 单链的 2' - ACE 去保护和退火合成方法	(292)
实验 2 siRNA 去盐和乙醇沉淀的方法	(293)
实验 3 定量检测 siRNA 的方法	(294)
实验 4 Klenow 反应的方法	(294)
实验 5 寡核苷酸和去氧核酶的鉴定	(295)
实验 6 寡核苷酸模板的凝胶提纯方法	(296)
实验 7 前体 RNA 的体外转录的方法	(297)
实验 8 前体转录本的去氧核酶消化方法	(298)
实验 9 消化产物定量和 siRNA 的制备方法	(299)
实验 10 构建 U6 启动子启动的 siRNA 表达载体的方法	(300)
实验 11 构建携带 shRNA 的慢病毒的方法	(302)
实验 12 RNA 干扰基因敲低鼠模型的建立方法	(303)
参考文献	(306)

1

RNA 干扰理论的研究历程

20 世纪 50 年代 Watson 和 Crick 提出了生物体基因表达的中心法则,揭示了从微生物到植物,从低等动物到人类细胞内遗传信息传导的基本规律。在几乎所有的生物细胞内,遗传信息从 DNA 通过转录传递给信使 RNA,再从信使 RNA 通过翻译传递给蛋白质,赋予生物体细胞各种不同的表型。后来,根据对逆转录病毒的研究,科学家们又发现了遗传信息可以从信使 RNA 经过反转录传递并保留在 DNA 的规律,补充了中心法则。以往人们都认为对中心法则各个环节的调控主要依赖于 DNA 分子上的启动子和各种蛋白质调节因子,而 RNA 只起到传递信息的中介作用。随着研究的深入,科学家们意识到细胞内存在着大量的 RNA 分子,包括非编码的 RNA 分子,它们在转录水平和转录后水平等各个环节对基因表达进行着精密的调控。其中,通过 RNA 干扰的过程调节基因表达的现象越来越引起人们的重视。RNA 干扰是在生物进化过程中保留下来的生物学现象,在低等生物体内和植物体细胞内就已经可以观察到完善的 RNA 干扰机制,而在高等的哺乳动物和人类细胞,这种古老的机制依然存在。虽然 RNA 干扰是古老的生物学机制,但是对它的全面研究是在近十年,特别是近三四年内才开始。本节将介绍科学家们对这种古老的生物学机制的研究历程,从它的发现到 RNA 干扰理论的提出,再到 RNA 干扰研究的白热化,以及现在和今后的研究重点进行简单的介绍,而详细的机制和方法,将分别在后面各章详细论述。

1.1 RNA 干扰理论的萌芽阶段

虽然 RNA 干扰是一种古老的机制,但是第一篇报道这种现象的论文是在 1990 年发表。Napoli 和 van der Krol 等同时发现了植物体转基因的共抑制现象 (cosuppression)。为了让矮牵牛花的颜色更加鲜艳,Napoli 等把与紫色相关的查尔酮基因转染到牵牛花内,结果意外地发现,植物体的颜色不但没有变得更鲜艳,而且连内源性的查尔酮基因也被沉默,花瓣的颜色却褪掉了(图 1-1)。人们把这种现象称为基因共抑制或同源基因沉默 (homology - dependent gene silencing, HDGS)。一开始有人把基因共抑制归属于以往提出的基因副突变 (paramutation) 的范畴,但是科学家们很快意识到这两种现象之间存在着本质上的差别,虽然基因副突变的最终结果也是目标基因的表达受到抑制,但它是指某基因的隐性等位序列在细胞分裂过程中遗留下来,对目标基因进行表基因调控而引起目标基因沉默的过程。因此在基因沉默发生以前,引起副突变的基因序列就已经是不表达的序列,与基因共沉默所引入的具有表达功能的基因序列不同。



图 1-1 矮牵牛花的基因共抑制现象

矮牵牛花查尔酮基因的表达决定了花色为紫色,但是,把外源性的查尔酮基因转染到紫色的矮牵牛花内,不但没有增强紫色的表达,还使原来的紫色褪去。Napoli 等把这种现象称为基因共抑制。

不久,人们发现基因共抑制不仅是人为的通过转基因引起的基因抑制现象,在植物界这也是普遍存在的生理现象。1996 年,Baulcombe 和 English 等通过研究植物病毒感染后恢复的机制提出基因共抑制是植物体用于抗病毒感染的免疫机制。大部分植物病毒属于 RNA 病毒,它们侵入植物细胞后便启动了基因共沉默的过程,也就是后来提出的 RNA 干扰过程,把病毒的 RNA 链切割掉,使病毒基因得不到表达,从而达到抗病毒的功能。Goodwin 等把与病毒 RNA 序列相同的基因转入植物细胞内,也能通过基因共抑制对抗同种病毒的感染。其后,Chabossier 等

(1998) 和 Jensen, Ketting 和 Tabara 等 (1999) 几乎同时证实了植物体在发育过程中基因转位子的沉默也是通过基因共抑制来完成的, 把植物的基因变异控制在很低的水平。因此, 基因共抑制 (后来更名为转录后基因沉默或 RNA 干扰) 是植物体细胞内在的基因调控机制, 与植物体重要的生理和抗病功能相关。

在概念提出的时候, 人们还弄不清楚这种共抑制现象是在转录水平还是在转录后水平的基因沉默。在这种现象发现后 1 年内, 至少存在着三种不同的假说解释它: ① van der Krol 等提出基因共抑制是由于外源基因引入细胞后目标基因发生过度转录, 转录产物达到一定的阈值量后所引起的一种负反馈调节机制; ② Grierson 等提出基因共抑制是由于外源基因序列邻近的与基因正常表达不相关的启动子被异常激活, 转录出与目标基因互补的反义 RNA 链, 导致反义基因抑制; ③ Jorgensen 等提出基因共抑制是由于引入的同源性外源基因与细胞内的内源基因序列发生异常的配对, 干扰了染色体的稳定状态, 导致转录受到抑制, 转录的效率降低。

以上三种假说都不能满意地解释基因共抑制的机制, 当时在该领域引起了广泛的争论, 焦点集中在基因共抑制究竟是转录水平的基因沉默还是转录后水平的基因沉默。认为基因共抑制是转录水平基因沉默的流派提出这种现象是由于外源基因 DNA 与内源 DNA 启动子发生异常的配对, 从而抑制了转录的发生。相反, 认为共抑制是转录后基因沉默的人们则提出外源基因导入后引起目标基因过度转录, 产物积累太多而产生负反馈抑制。因此, 当时很多人认为基因共抑制是多种机制作用而引起的结果。

后来人们认识到上述的假说都不能正确或全面地揭示基因共抑制的现象, 当时导致对这种现象五花八门的解释主要根源于人们用来研究基因共抑制的模型没有代表性, 把不同的基因转染到不同的植物体所得出的结果差异很大, 很难得出统一的结论。因此, 科学家们意识到解决这个问题的关键是建立一个有代表性的模型系统。由于基因共抑制现象是在植物体转基因后或病毒感染后观察到的现象, 所以最好选择一个植物基因转染和植物病毒感染都研究得比较成熟的模型系统。烟草植物正符合上述的条件, 因而被作为研究植物基因共抑制的理想模型。此外, 拟南芥 (*Arabidopsis*) 因为是基因分析的重要模型, 所以也被用于基因共抑制的机制研究, 后来很多与 RNA 干扰相关的基因都是通过对这个模型的研究发现的。矮牵牛花是最早用于研究植物基因共抑制的模型, 由于通过花瓣颜色便可以观察到表型的变化, 因此也成为基因共抑制的常用模型。

随着研究的进一步深入, 1994 年 Blokland 等通过细胞核转录分析试验 (transcription run-on assay) 发现在共抑制发生的时候细胞核内的基因转录效率并