

夏广清 ◆ 著

RNA
interference and plant growth
and development

RNA干扰
与植物生长发育



 吉林大学出版社

通化师范学院学术著作出版基金资助出版
吉林省重点学科专项建设经费资助出版

RNA干扰与植物生长发育

夏广清/著



吉林
大学
出版社

图书在版编目(CIP)数据

RNA 干扰与植物生长发育 / 夏广清著. — 长春 : 吉林大学出版社, 2013.10

ISBN 978-7-5677-0756-6

I. ①R… II. ①夏… III. ①核糖核酸-生物技术-影响-植物生长 IV. ①Q522②Q945.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 250234 号

RNA 干扰与植物生长发育

夏广清 著

责任编辑、责任校对：段桂花

吉林大学出版社出版、发行

开本：787×1092 1/16

印张：11.625 字数：200 千字

ISBN 978-7-5677-0756-6

封面设计：张沐沉

长春科普快速印刷有限公司 印刷

2013 年 10 月 第 1 版

2013 年 10 月 第 1 次印刷

定价：42.00 元

版权所有 翻印必究

社址：长春市明德路 501 号 邮编：130021

发行部电话：0431-89580026/28/29

网址：<http://www.jlup.com.cn>

E-mail:jlup@mail.jlu.edu.cn

· 序 言 ·

通化师范学院地处长白山区，为吉林省东南部地区唯一一所本科院校，学校突出长白山自然科学和长白山人文社会科学研究，尤其在高句丽历史文化研究、长白山非物质文化遗产研究和长白山生物资源研究方面取得了重要成果，在国内外引起了重要的反响。为吉林省东南部地区教育、文化、科技事业的发展提供了重要的智力支撑。

通化师范学院博士文库是集中学校博士教师完成的科研成果，由学校学术著作出版基金资助出版的系列学术著作，分批次进行出版，既有博士教师经过完善的博士学位毕业论文，又有承担的各级科研项目研究成果。出版设立通化师范学院博士文库，一方面，为博士教师科研成果的发表搭建了平台，提高他们科研工作的积极性；另一方面，集中展示了学校学科建设和科研工作的研究成果，有助于扩大对外交流和宣传。

近年来，学校坚持教师教育及非教师教育多学科协调发展，在开展培养实践性应用型人才教学工作的同时，积极开展科学研究工作，不断提高科学研究水平。承担完成了多项国家级和省部级的自然科学和社会科学基金项目，出版了多部高水平有影响的学术著作，在国内外学术期刊杂志上发表了多篇学术论文，使学校的教学水平和科研水平不断提高，学校的知名度和影响力不断提升。尤其，年轻的博士教师，他们精力充沛，工作热情高，受过系统的科研训练，探究科学前沿能力强，研究方法先进，科研成果层次较高，已成为学校学科建设和科研工作的主力。

首次出版的 15 部学术著作，是从已经通过答辩并经过作者修改的博士论文中遴选出来的。作者在攻读博士学位期间，在导师和业内专家学者的帮助指导下，克服困难，调查研究，科学实验，查阅大量国内外文献，进行归纳整理、比较鉴别、反复修改，形成自己的研究成果，并在各自研

究的领域内取得专家学者的认可。相信各专业的同仁会从他们的著作中了解到研究的方向与轨迹，同时发现取得的成果和存在的不足。这对于开展学术交流、促进学术水平提高是很有好处的。此次出版的 15 部著作，涵盖化学、生物学、计算机科学、历史学、民俗学和社会学等学科。这些成果的集结与出版，对于我校学科建设和教学科研工作的深入开展具有重要意义。

今后，我们还将陆续资助出版博士教师的学术研究成果，促进我校的学术繁荣，使我校的教学和科研成果以更新的视角、更新的资料、更新的方法得以展现。

通化师范学院校长

A stylized, bold handwritten signature in black ink, reading '康子伟' (Kang Ziwei).

2013 年 8 月 31 日于通化师范学院

• 前 言 •

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 在绝大多数生物中是一种非常保守的基因表达调控机制, 在发育调控、基因组维持等方面发挥重要作用。RNAi 是由双链 RNA 诱导的多步骤, 多因素参与的过程, 其中包括长度 21 ~ 24 nt 的 small RNA 发挥了核心功能的作用。RNAi 的发现使人们对 RNA 分子功能有了更深入的理解, 开辟了基因功能研究的新领域, 目前发展起来的 RNAi 技术已成为遗传研究的重要工具, 在基因功能分析和鉴定、生物的遗传改良、药物靶标的筛选、疾病的防治等方面都已展开深入的研究和利用成为生物技术领域的一个热点。

本书针对近些年来 RNA 干扰研究的最新发展成果进行介绍, 并对其与植物生长发育影响进行详细的论述, 为在植物中更好地应用该技术进行良种繁育、品种改良、提高植物抗性等方面提供参考。

本书适合从事育种工作的研究人员、技术管理人员以及大学本科生、研究生阅读和参考。

目 录

第一章

RNAi 概述	/003
第一节 siRNA 与基因沉默	/005
第二节 miRNA 与基因沉默	/011
第三节 RNA 干扰的组分及作用机制	/021
第四节 RNA 沉默的生物学意义	/028
参考文献	/031

第二章

植物生长发育基础理论	/047
第一节 调节植物生长发育的环境信号	/051
第二节 调节植物发育的化学信号——植物生长调节剂	/065
第三节 植物的开花机理研究	/070
参考文献	/086

第三章

植物 RNA 干扰	/105
第一节 植物 RNAi 及其诱导	/105
第二节 植物 RNA 干扰目的片段的选择与表达载体的构建	/110
第三节 RNAi 文库构建	/117
第四节 RNA 干扰与植物生长发育	/127
参考文献	/133



第四章



RNA 干扰在植物上的应用	/145
参考文献	/155



第五章



RNA 干扰在其他方面的应用	/167
参考文献	/175

第一章

DIYIZHANG



RNAi 概述

RNAi (RNA interference) 是由双链 RNA (double strand RNA) 介导, 由特定酶参与的特异性基因沉默现象。它在转录水平、转录后水平和翻译水平上阻断基因的表达。2001、2002 及 2004 年基因沉默的研究曾 3 次被《Science》杂志评为自然科学十大突破之一^[1~2], 美国科学家 Andrew Z. Fire 和 Craig C. Mello 因为 RNA 干涉 (RNA interference, RNAi) 的相关研究而获得了 2006 年度诺贝尔生理学 and 医学奖^[3]。RNA 沉默现象最早在转查尔酮合成酶基因——CHS (Chalcone synthase, CHS) 的矮牵牛上发现的。1990 年, 美国和荷兰的两个转基因植物实验中分别报道了将外源性紫色素合成基因 CHS 导入矮牵牛花中, 试图加深花朵的紫颜色, 结果多数花成了花斑的甚至白的。并且过量表达查尔酮合成酶的矮牵牛花中查尔酮合成酶的浓度比正常矮牵牛花中的浓度低 50 倍, 推测外源转入的查尔酮合成酶基因同时抑制了内源查尔酮合成酶基因的表达。这表明在转入的外源基因与内源基因具有同源序列时, 会导致内源基因和外源基因同时出现表达减弱, 后来发现在其他许多植物中也有类似的现象, 并将这种转基因与同源内源基因共同沉默的现象称为共抑制 (Co-suppressor)^[4~5]。1992 年, Macino 也在粗糙链孢霉中发现了外源基因可以抑制具有同源序列的内源基因的表达, 称之为基因压制 (quelling)。所有共抑制现象都有一个共同的特点: 内源和外源转入基因的转录水平都显著减少。随后的研究显示这种现象是由于转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing PTGS) 引起的, 即发生沉默的基因的转录仍正常进行, 而转录后的 mRNA 在细胞质中发生了序列特异的降解, 从而导致基因不能正常表达成蛋白质。

首次发现 dsRNA 能够导致基因沉默的线索来源于线虫的研究。1995 年康乃尔大学的 Guo 和 Kemphues^[6] 发现正义 RNA 与反义 RNA 一样能够阻断 *par-1* 基因的表达。1998 年华盛顿卡耐基研究院的 Fire 和马萨诸塞大学癌症中心的 Mello 教授首次将 dsRNA——正义链和反义链的混合物注入线虫, 结果表现出比单独注射正义链或者反义链都要强得多的基因沉默, 这种正义及反义 RNA 抑制基因表达及阻断, 都是由于体外转录所得 RNA 中污染了微量双链 RNA 而引起的。从与靶 mRNA 的分子量比考虑, 加入的双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA) 的抑制效果要强于理论上 1:1 配对时的抑制效果, 因此推测在双链 RNA 介导的基因沉默存在扩增效应, 可能有某种酶活性参与其中, 并将这种现象命名为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。现在将上述这类由 RNA 介导的通过核酸序列特异性抑制同源基因表达的现象称为 RNA 沉默, 在真核生物中普遍存在。2000 年, Wianny 和 Zemicka 等发现基因沉默现象也同样存在于哺乳动物中^[7], dsRNA 注入小鼠受精卵和着床前的胚胎时能够特异地阻断相应的 *c-mos*、GFP (绿色荧光蛋白) 基因表达, 这为研究人类基因功能和治疗人类疾病提供了很好的思路。2001 年 Elbashir^[8] 通过实验发现 21 个核苷酸的 dsRNA 可以有效地激发哺乳动物细胞基因沉默; 随后 Paddison^[9] 报道了小干扰 RNA (short interferece RNA, siRNA) 可以稳定地抑制小鼠的体细胞和胚胎干细胞的基因表达, 由此人们认识到基因沉默是控制基因及其表达的有效途径。Waterhouse^[10] 等人首先发现在植物中, 双链 RNA 分子能诱导 PTGS 现象, 他们证明, 在被病毒感染后, 能同样产生与病毒基因同源的正义和反义 RNA 的植物比那些只能产生正义或反义 RNA 的植物能更有效地抵御病毒的入侵。Waterhouse 和 Fire 等这两个独立的发现揭示 RNAi 是生物体普遍存在的基因调控机制。

自 RNA 沉默现象发现以来, 被广泛地发现于真菌、拟南芥菜、水螅、涡虫、锥虫、斑马鱼等大多数真核生物中^[11~21], 这种存在揭示了 RNAi 很可能是出现于生命进化的早期阶段。随着研究的不断深入, RNAi 机制正在被逐步阐明, 而同时作为功能基因组研究领域中的有力工具, RNAi 也越来越为人们所重视。研究表明参与该过程的许多基因具有高度的保守

性,这可能是生物调控基因表达及抵御病毒侵染或转座子诱导 DNA 突变的一种共有的古老生理机制。由于 RNAi 具有定向、高效、快速、序列特异性强及不改变基因组的遗传等特性,成为研究基因功能的强有力工具,并为植物基因功能研究提供了一个崭新的思路。因此 RNAi 技术在未来植物育种及遗传改良等方面将有广阔的应用前景。

第一节 siRNA 与基因沉默

RNAi 是生物基因组削弱或抵抗外来遗传信息入侵的一种保护性机制,他们有一个共同的特点,即都是在双链 RNA 介导下的对内源核酸或外源核酸入侵的阻抗以及调控编码基因的表达,具体来说,有以下几个重要特征。(1) 引发基因沉默的信号分子是与靶基因具有同源序列的小 RNA^[22]; (2) 组成 RNA 降解复合体的蛋白组分在大多数生物体中具有相似的结构和功能; (3) 在多数情况下, RNAi 效应能够被传播和放大。

RNAi 的标志是双链 RNA 即小 RNA 的形成,因此将双链 RNA 归结到了小 RNA 之中。小 RNA 是 RNA III (单独的 Dicer 或 Drosha 和 Dicer) 发挥活性作用而产生的。外源性长双链前体由于病毒感染或由人工引入小干扰 RNAs (siRNAs) 后,经过编码基因颈环结构的加工产生了微 RNAs (miRNAs)。利用高通量序列测定技术,已经测出几种新的内源性小 RNA,包括 PIWI 干扰 RNAs (piRNAs) 和内源性小干扰 RNAs (esiRNAs)。所有这些小 RNA 分子长度大约是 25 个核苷酸,植物中,相同的蛋白组分和重叠的功能组成了 RNA 沉默这个复杂的网络。

一、siRNAs

小干扰 RNAs (siRNAs) 或短干扰 RNAs,一般为 20 ~ 24 个核苷酸,来自于转基因、内源重复序列、病毒或转座子^[23]。siRNAs 首次在遭受共抑制或者病毒诱发的基因沉默的植物中被检测到,而在未被沉默的对照植

株中检测不到 siRNAs 的存在。Hamilton 和 Baulcombe, 出乎意料地发现与靶标 mRNA 序列相对应的正义和反义的大约 25nt 的短 RNA 与转录后基因沉默的过程紧密相关, 是启动整个干扰过程的决定因素。

1. siRNAs 的产生

1999 年, Baulcombe^[24]等在研究由转基因诱导的植物 PTGS 和病毒诱导的 VIGS 时, 发现有与沉默的目标 RNA 互补的小分子 RNA 形成, 2000 年, Zamore^[25]及其同事证明果蝇胚胎裂解物能够将长的 dsRNAs 分子加工成长约 22 个核苷酸的双链 RNA 片段, 称为小的干扰 RNA (small interference RNAs, siRNAs)。siRNAs 首次在遭受共抑制或者病毒诱发的基因沉默的植物中被检测到, 而在未被沉默的对照植株中检测不到 siRNAs 的存在。后来证明, 在各种生物中长为 21 ~ 25 个核苷酸的 siRNAs (线虫的 siRNAs 为 21 ~ 23 核苷酸) 都是直接指导目标 RNA 分子降解的关键分子。Hamilton^[26~29]等对 GFP 转基因植株中的 siRNA 的分析表明, 植物中的 siRNAs 可以分成长的 (24 ~ 26nt) 和短的 (21 ~ 22nt) 两种类型, 而由内源的逆转座子产生的 siRNAs 则只有长的一种。通过病毒编码 RNA 沉默抑制子的研究和拟南芥中沉默突变体的研究表明, 这两种 siRNAs 具有不同的功能: 长的 siRNAs 与系统性沉默和逆转座子的甲基化有关, 短的 siRNAs 则与序列特异性的 mRNAs 的降解有关^[30]。线虫中由长的 dsRNAs 分子形成 siRNAs 的过程依赖于 Dicer 核酸内切酶的作用。后来证明, 在各种生物中催化产生 siRNAs 的酶都是 Dicer 的同源物。Dicer 属于 RNase III 家族 (该家族特异地识别 dsRNAs 为底物), 它在进化上是非常保守的, 其 N 末端具有解旋酶活性, C 末端有两个 RNase III 结构域, 另外还有 dsRNA 结合位点和 PAZ 结构域^[31]。Dicer 的催化作用需要 ATP 的存在, 对重组的人类 Dicer 的研究表明可能是剪切后 dsRNA 的释放需要 ATP 提供能量。Dicer 对序列的特异性切割产生 siRNA 的机理尚需进一步研究。

siRNA 是 RNAi 途径中的中间产物, 是 RNAi 发挥效应所必需的因子。siRNA 的形成主要由 Dicer 和 Rde-1 调控完成^[32~33]。由于 RNA 病毒入侵、转座子转录、基因组中反向重复序列转录等原因, 细胞中出现了 dsRNA, Rde-1 (RNAi 缺陷基因-1) 编码的蛋白质识别外源 dsRNA, 当

dsRNA 达到一定量的时候, Rde - 1 引导 dsRNA 与 Rde - 1 编码的 Dicer (Dicer 是一种 RNase III 活性核酸内切酶, 具有四个结构域: Argonaute 家族的 PAZ 结构域, III 型 RNA 酶活性区域, dsRNA 结合区域以及 DEAH/DEXH RNA 解旋酶活性区) 结合, 形成酶 - dsRNA 复合体^[34]。在线虫中, dsRNA 转变为 siRNA 至少有三种扩增途径^[35]。(1) Dicer 酶可以把长的 dsRNA 截成 10 ~ 20 段, 等于扩增 10 ~ 20 倍。(2) 存在一种催化机制使 siRNA 常常成倍地增加, 以用于进一步的扩增。(3) 短的 RNAs 能作为靶 mRNA 的引物, 启动一个 RNA 指导的 RNA 多聚化反应, 随后产生许多次级 siRNAs, 称之为靶指导的扩增。

在由 dsRNA 转变成 siRNA 的过程中, 首先由 dsRNA 转换成 ssRNA, 这些单链的 siRNA 如果没有识别同源的靶 mRNA 并与之配对, 就会被降解掉。一旦反义的 siRNA 与靶 mRNA 配对, 则靶指导的 siRNA 的扩增就会发生。这时, 与靶 mRNA 配对的 siRNA 小段将沿 mRNA 延伸 (双向的或单向的), 但只能延伸几百个碱基左右就停止, 并从该区域裂解下来而成为次级 siRNA。这种效应称之为“可迁移效应”^[36]。于是, siRNA 与靶 mRNA 的稳定化与“可迁移效应”的结合就形成了一个链式反应, 在这个反应中, 随着 Dicer 的作用、primer siRNA 的更新, 以及新一轮的扩增, 将发生 siRNA 多轮的复制。

2. dsRNA 产生的途径

dsRNA 和 siRNA 引发和介导了 RNA 沉默。在 RNA 沉默的早期能够检测到正义和反义的 siRNA 分子, 这说明在 siRNA 形成之前可能存在 dsRNA 阶段。基因转化中转反向重复序列也比正向重复序列更容易引起目标基因的基因沉默^[37]。说明 dsRNA 参与了 RNA 沉默的触发过程。将在体外合成的 dsRNA 降解成 siRNA 后, 导入生物体内也能诱发 RNA 沉默。这充分说明 dsRNA 产生早于 siRNA, 并且能有效地引发基因沉默。

RNA 沉默被 dsRNA 触发, 这些 dsRNA 的形成可以有多种途径, 如转基因设计成反向重复序列以使其转录产生发夹结构的 mRNA, 同时转入反义和正义基因序列则其转录后可以配对产生 dsRNA, 两个启动子背对背相邻驱动同一个基因转录后也会产生 dsRNA^[38]。而且, 通过研究也发现发

生转基因共抑制的植株在基因整合插入位点存在反向重复的现象,更进一步证明了这一点^[39~41]。从发生转录后基因沉默的植物中存在小分子 RNA,既有正义序列,又有反义序列也说明双链 RNA 的作用。后来越来越多的研究结果显示^[42~50], dsRNA 极可能是植物 PTGS 的起始因素,植物中的转基因、dsRNA、病毒都是能启动相同的沉默现象,转基因和病毒都有可能产生 dsRNA,因此推测有一个 dsRNA 阶段是他们的共同连接点^[42~51]。

由于最初在转基因植物中发现的 PTGS 且出现共抑制的植物,其转基因常常是多拷贝的,而且拷贝数多,同源性强,发生 PTGS 的几率就高。多拷贝转基因的整合排列方式是影响 PTGS 的重要因素。当多拷贝基因以重复的方式连接时,特别是以反向重复的方式连接时容易诱发 PTGS^[52]。因此,推测可能是由于多拷贝基因产生了大量的超水平的转基因 mRNA,从而诱发了细胞中的降解体系。有人推测沉默起始可能是转基因由于甲基化或 DNA 的异位配对而产生的异常 RNA (aberrant RNA, abRNA) 导致的, abRNA 是由于基因表达的变异而产生的一些异常的 RNA (转录提前终止的小分子 RNA 等)^[53~54]。abRNA 的产生可与转基因甲基化表达和过量表达有关^[55]。在转基因尚未表达达到一定水平 (mRNA 积累量尚未达到一个临界值) 的情况下,可通过接种具有同源序列的病毒或重复导入具有同源序列的 DNA 片段来诱发 abRNA 的产生。abRNA 还可以通过多拷贝转基因重复序列之间的互作产生。abRNA 可能被细胞内依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRP) 特异识别,并且 RdRP 以 abRNA 为模板合成双链 RNA。实际上,比全长 RNA 还长的超长 RNA,截短 RNA (短于全长 RNA),反义 RNA, dsRNA 和化学修饰 RNA 等异常 RNA 在 PTGS 中都出现过。很多模型试图解释转基因是如何产生这些异常 RNA 的,越来越多的证据表明, dsRNA 本身可能是引发 PTGS 的起始因素。多拷贝的转基因有更多的机会形成反向重复序列,从而通过通读转录形成 dsRNA,这一猜测通过向植物中转入特意设计的反向重复序列基因,可以高频率诱导高抗病毒病,发生基因沉默的植株得到验证^[56]。

3. siRNAs 的制备

siRNAs 根据制备的方法不同,可分为体外制备和体内制备两种方法,

在体外制备方法中,由于化学合成方法定制周期较长,价格较高,因此一般多用体外转录及酶解法制备;在体内制备方法中,不需要直接操作 RNA,而通过 siRNA 表达载体和基于 PCR 的表达框架,直接从转染到细胞的 DNA 模版中在体内转录得到 siRNAs。各种制备方法总结如下:

(1) 化学合成法最贵但却最方便。化学合成 siRNA 几乎不需要研究者的操作。研究者要做的只是根据目的基因设计 2~4 条 siRNA 序列,然后将序列交给专业公司合成,得到 siRNA 后转入载体再转染靶细胞^[57]。其优点是:化学合成 siRNA 方便简单,易标记 siRNA 以追踪其在体内的活动状况。但缺点主要是价格高,定制周期长,作用时间短暂。包括特异性 siRNA 合成和非特异性 siRNA 合成两种。特异性制备 siRNA 的方法的不足,是需要设计和检验多个 siRNA 序列以便找到一个有效的 siRNA。

(2) 体外转录法合成 siRNA 是指用 DNA 为模版,使用 T7RNA 聚合酶在体外转录合成 dsRNAs^[58],成本相对化学合成法而言比较低。

(3) siRNA 表达载体法是针对化学合成与体外转录方法的不足 (siRNA 进入细胞后容易被降解,进入细胞 siRNA 在细胞内的 RNAi 效应持续时间短等) 而逐渐发展而来的。该方法的基本思路是:将 siRNA 对应的 DNA 双链模板序列克隆入载体的 RNA 聚合酶 III 的启动子后,这样就能在体内表达所需的 siRNA 分子^[59]。这种方法总体的优点在于不需要直接操作 RNA,能达到较长时间的基因沉默效果。目前这种方法得到广泛应用。

(4) siRNA 表达框架 (siRNA expression cassettes, SECs) 是一种由 PCR 得全长的 siRNA 表达模版^[60],包括一个 RNAPol II 启动子,一段发夹结构 siRNA,一个 RNAPol III 终止位点。它能够直接导入细胞进行表达而无需先克隆到载体中。因此,SECs 是筛选 siRNA 的最简单的有效工具,可作为构建高效的体内转录载体进行 RNAi 研究的预实验,对不同宿主细胞优化筛选转录启动子和 siRNA 靶序列。如果在 PCR 两端添加酶切位点,那么通过 SECs 筛选出的最有效的 siRNA 后,可以直接克隆到载体中构建 siRNA 表达载体。构建好的载体可以用于稳定表达 siRNA 和长效抑制的研究,这个方法的主要缺点是 PCR 产物比较难转染到细胞中。如果有适合的新型转染试剂能提高 SECs 的转染效率的话,那可以解决很大问题。另