

植物转基因沉默及控制

韦珂, 黄艳, 何勇强

(广西大学农学院, 广西南宁 530005)

摘要: 植物基因工程的目的就是获取外源基因能够按照设计要求正常表达和稳定遗传的转基因植物。近几年来, 广泛报道了转基因植物中存在转基因沉默现象。主要阐述了两种转基因沉默的机理即转录水平的基因沉默和转录后水平的基因沉默, 各种机理都涉及 DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA 的相互作用。同时, 还讨论一些控制转基因沉默现象的策略, 特别是 MAR 在转基因植物中具有增强基因表达和减少株间差异的作用。

关键词: 转基因植物; 基因沉默; 控制

中图分类号: Q784 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2003)01-0031-05

Plant transgene silencing and its controlling

WEI Ke, HUANG Yan, HE Yong-qiang

(The Agriculture Department of Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: The goal of plant genetic engineering is to obtain transgenic plants that foreign gene can be normally expressed and faithfully inherited in a predictable manner. But in recent years, it was widely reported that transgene silencing was often found in transgene plant. In this article, we discuss two level of transgene silencing phenomenon: Transcriptional Gene silencing and Post-transcriptional Gene silencing. Its mechanisms involved DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA, interaction respectively, and we discuss some strategies to overcome transgene silencing also. Especially, Matrix attachment region(MAR) show capacity to increase level of transgene expression and reduce transformant-to-transformant variation of transgene expression in stable transformed plant.

Key words: transgene plant; gene silencing; controlling

植物基因工程研究为培育作物优良新品种开辟了一条崭新的途径, 随着该学科的日益发展, 许多具有重要经济价值的转基因作物已开始陆续进入实际应用阶段。自 1996~2000 年, 全球共有 13 个国家种植了转基因作物, 2000 年种植面积达到 4 420 万 hm^2 , 是 1996 年 25 倍。然而各国学者大量研究结果表明外源基因在转基因植物中并不一定能稳定表达, 甚至完全不表达是一个较为普遍的现象。这种遗传不稳定性并不是由于所导入的 DNA 发生缺失或突变, 而是转基因失活, 即所谓的转基因沉默造成

的。转基因沉默是指利用遗传转化方法导入并稳定整合进入受体细胞中的完整的外源基因在当代转化体或在其后代中表达受到抑制的现象。首例基因沉默是 1986 年, Peerbolte 发现根癌农杆菌 T-DNA 上的基因在转基因烟草中发生甲基化而其表达受到了抑制^[1]。

1 转基因沉默的机理

转基因沉默有多种机理, 并且各种机理都涉及

收稿日期: 2001-08-21; 修订日期: 2002-01-10

作者简介: 韦珂(1972-), 女, 广西宜州市人, 讲师, 博士生, 植物病理学专业。

到 DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA 间的相互作用, 形成相互影响、相互制约的复杂调控机理。目前人们通常将转基因沉默分为转录水平的基因沉默 (Transcriptional Gene silencing; TGS) 和转录后水平的基因沉默 (Post-transcription Gene silencing; PTGS) 两种。

1.1 转录水平的基因沉默 (TGS)

它是指对转基因专一的细胞核 RNA 合成的失活, 它的发生主要是由于基因无法被顺利转录成相应的 RNA 而导致基因沉默。引起 TGS 的机理主要有以下几种:

1.1.1 转基因及其启动子甲基化 甲基化修饰在基因表达, 植物细胞分化以及系统发育中起着重要的调节作用。植物 DNA 甲基化程度是较高的, 核基因组中几乎 20%~30% 的胞嘧啶残基处于甲基化状态。然而大量研究表明, 在转基因植物中 DNA 甲基化严重影响了转基因的正常表达。Kilby 等 (1992)^[2] 使用新霉素磷酸转移酶 (Npt II) 基因 (npt II) 转化拟南芥, 获得了具有卡那霉素 (Kanamycin; kan) 抗性的转基因植株。对后代进行遗传稳定性分析时发现了两个卡那霉素敏感株系, Southern-blot 分析表明 Kan 抗性的消失并不是由于外源 DNA 的畸变或丢失造成的, 使用去甲基化试剂 5-氮胞苷 (5-ozacytidine) 可使抗性再度恢复。用限制性内切酶 Sst I 和 Hind III 酶切分析 Kan 敏感株系的基因组时发现, npt II 基因上游的胭脂碱合成酶基因启动子 (Pnos) 中的 Sst I 位点被甲基化。目前发现, DNA 甲基化易发生在外源基因启动子区 CG 和 CXG 位点的胞嘧啶残基上 (Kilby, 1992)^[2], 该区域碱基的甲基化往往导致的转录受到抑制 (Kumpatla, 1997)^[3]。植物 DNA 甲基化引起外源基因失活的现象十分类似细菌的限制修饰系统, 这一防御机制可以有效识别出外来 DNA 序列。植物染色体上的碱基组成是不均一的, 某些区段常有确定的 GC 含量比例, 外源 DNA 的插入会破坏其原有的组织结构, 因此可被植物修饰系统所识别, 并通过甲基化使之失活^[4,5]。

1.1.2 位置效应 (position-effect) 当导入的外源基因随机地插入到宿主基因组时, 如果它被导入到转录活跃区, 如常染色质中的解旋 DNA, 转基因就会顺应那个区域的染色质结构, 因而可能进行高水平的转录。相反, 如果转基因插入转录不活跃区域或异染色质区域, 转基因通常会融入该区域的染色质

结构, 使转基因进行很低水平的转录, 或使转基因发生异染色质化而导致基因沉默^[6]。

1.1.3 多拷贝重复转基因序列引起的 TGS 直接基因转化法常常导致多拷贝转基因在宿主细胞基因组中的整合, 多拷贝转基因无论是单位点整合还是多位点整合分散在基因组中, 都能使转基因植株发生较高机率的基因沉默现象。其中之一原因是同源基因间的反式失活 (transinactivation): 反式失活主要是由于拥有同源序列的沉默位点其它位点的 DNA 相互作用而引起的转基因沉默^[7,8,9]。原因之二是 DNA-RNA 协同 (association)。当外源 DNA 的插入使转录出的 RNA 水平过高时, 这些过剩的 RNA 就会与同源的 DNA 配对, 使这个基因位点甲基化或异染色质化, 阻碍了基因正常转录。

1.1.4 后成修饰作用 (epigenetic effect) 导致的转基因沉默 后成修饰作用是指转基因的序列和碱基组成不发生改变, 但是其功能却在个体发育的某一阶段受到细胞内因子的修饰作用后而关闭。后成修饰作用导致的转基因沉默与受体植物的染色体组型结构有关^[10]。

1.2 转录后水平的基因沉默 (Post transcriptional Gene silencing; PTGS)

转录后水平的基因沉默是指转基因在细胞核里能稳定转录, 但在细胞质里却无相应的稳定态 mRNA 存在现象。其中共抑制 (cosuppression) 是转录后水平基因沉默中最常见的现象。它是由于转基因编码区与受体细胞基因组间存在的同源性, 导致转基因与内源基因的表达同时受到抑制。共抑制现象最初由 Mol 等^[11] 在研究矮牵牛苯基苯乙烯酮合成酶 (HS) 时报道。目前人们通常用以下几种模型来解释 PTGS:

1.2.1 RNA 阈值模型 (RNA threshold model) 由 MeinsandKunz 提出。该模型主要是指细胞只能容纳和处理一个特定阈值以下的转基因转录物, 一旦细胞内的转基因转录物超过这个阈值后, 内源 RNA 依赖下的 RNA 聚合酶以过多的转基因 mRNA 为模板, 通过反转录合成拷贝 RNA (cRNA), 触发了转基因及其相关内源基因转录物的序列依赖性降解。这些 cRNA 能与转基因和内源基因的 mRNA 杂交, 成为降解的靶同源转录物^[12]。

1.2.2 异常 RNA 模型 (aberrant RNA model) 由 David 和 James 提出, 异位配对的 DNA 转录出异常 RNA (rRNA), 在原生质中 rRNA 与 RNA 相互作

用,使正常 RNA 被降解。

1.2.3 碱基配对模型(inter-orintra-molecular base pairing model) 是指转录物间的碱基配对以及转录物内的碱基配对造成同源转录物的降解^[13,14]。

2 转基因沉默的控制

为了克服转基因沉默,世界各国分子生物学家对转基因沉默的机理及其防止开展了广泛研究,积累了不少经验(表 1),其中关于 MAR 的研究取得令人兴奋的进展。

2.1 MAR

2.1.1 MAR 的提出 Leammli 等^[15]于 1971 年首先提出非组蛋白核骨架假设,他们在除去组蛋白

(histone proteins; HP)和大部分非组蛋白(non-histone proteins; NHP)后,在电子显微镜下观察到由 NHP 构成的染色体骨架(scaffold)和由骨架伸展出的无数 DNA 侧环组成的晕圈,环的大小大致自十至数千碱基对, DNA 环的基部与非组蛋白的骨架相联结。每个侧环代表染色质的一个独立的结构域,进行基因的转录和表达。侧环 DNA 的基部有一段特殊的序列与蛋白质的核骨架相结合,称为核基质结合序列(Matrix attachment region; MAR)或核骨架结合序列(Scaffold attachment region; SAR)。目前已经纯化和鉴定的 MAR 结合蛋白共 10 余种, MAR 结合蛋白的发现,及 MAR 结合蛋白既可以和 MAR 紧密结合,又是核基质的组分,有力证明了 MAR 能与核基质相互作用^[16]。

表 1 转基因沉默的控制方法
Table 1 The control of transgene silencing

转基因失活的可能原因 Probable reason of transgene inactivation	控制失活的可能措施 Probable method of inactivation controlling
多拷贝的插入	农杆菌法优于基因枪及电激法。谷类作物改用农杆菌转化法。选择完整单拷贝插入序列。
转基因甲基化	避免同源序列,包括启动子,结构基因及标记基因;不同基因用不同启动子驱动;避免用相同的选择标记;第二次转化时用两种选择标记同时选择,建立删除选择标记的技术体系。鉴定并利用去甲基化序列,如免疫球蛋白 K 链基因中的一个增强子可局部去甲基化(direct regional demethylation)。
共抑制	从大量转基因植株中筛选稳定表达的个体。建立位点特异重组体系。
转基因与插入位点附近 序列的相互作用	用 MAR(Matrix attachment region)建立独立的结构域。

2.1.2 MAR 的分子结构特征 通过对截至 1997 年底所发现并鉴定的所有 MAR 分子的序列分析,我们可以找到一些 MAR 的结构特征。1MAR 的分子结构特征 MAR 一般长约 100~1 000 bp,但也有长达 7 kb 的(如人 β 干扰素基因 5'上游的 MAR)。富含 A/T。一般大于 70%。MAR 中有几类基序(Breyne, *et al.*, 1994)^[17]。

A. 10bp A-box AAT AAA(A/C)AAA

B. 10bp T-box, TT(T/A)T(T/A)TT(T/A)
TT

C. AT ATTT

D. 与果蝇拓扑异构酶 II (topoisomerase II) 共有切割位点 GTN(A/T)A(T/C)ATTNATNN(G/A)的同源序列。在动物和酵母 MAR 中很多,植物 MAR 中较少。

以上基序虽常在 MAR 中发现,但没有一个基序是普遍共有的。有些 MAR 没有或只有很少几个这种基序。成串的 Topo II 位点也在非 MAR DNA

中发现。不同的 MAR 分子之间并不能相互杂交^[18]。故不同的 MAR 序列同源性不高,也无严格的保守序列。

MAR 二级结构表现为狭窄的 DNA 小沟,易于弯曲和解链。富含 AT 的 DNA 并不一定就是 MAR,一些 AT 含量较低的 DNA 序列由于具有 MAR 的二级结构特征而可以与核基质特异性体外结合。通过比较 MAR 与来源于不同物种的核基质的体外结合能力,发现 MAR 与核基质的相互作用在进化上是高度保守的^[19]。

MAR 一般位于功能转录单位的侧翼,作为一种边界元件;但也有一些 MAR 位于某些基因的内含子中(如中国仓鼠 DHFR 基因、人类拓扑异构酶 I 基因、小鼠 Ig κ 和 Ig μ 基因)。

2.2 MAR 在转基因中的作用

将 MAR 置于所转基因的两侧翼,构建成 MAR-gene-MAR,可以创造一个独立的结构域(转录域)。推测其作用一是可克服基因组对碱基组成

不同的外来基因的识别,二是可避免插入位点附近染色体的影响。从而能够减少甲基化增强基因表达,消除减少位置效应消除多拷贝数的引起的反式失活。事实上不同作者报道的 MAR 的消除转基因沉默的结果各不相同(Spiker, Thompson, 1996)原因可能是所用的 MAR、报告基因、细胞或有机体及转化方法不同。比较肯定的一点是,多数实验有提高基因表达水平的效果,有的则明显减少了株间差异。

值得注意的是,人工合成的类似 MAR 的基序也有增强基因表达的作用。Bode J 等(1992)报道^[20],免疫球蛋白重链基因(IgH)增强子的 MAR 3'有 AATATATTT 基序,可使碱基不配对,若将其突变成 ACTGTCTTT 或 ACTGCTTT,碱基不配对被抑制,与核骨架的亲和力降低。因此它们人工合成了 25 mer 的寡核苷酸 5' TCTTTA-ATTTCTAATATATTTAGAA 3'并将这 25bp 重复连接 7 次成(25bp)₇ 共 190bp,发现它与核骨架的结合力达 75%,用它作两侧翼转基因后荧光素酶(luc)的活性比无(25bp)₇ 的载体高 6 倍。

基于上述,预计可能会在未来转基因中更多地使用 MAR,以增强基因表达和减少株间变异。

3 小 结

由于真核生物基因的表达调控是发生在多水平上的,所以造成植物转基因沉默的原因可能很多,而且会有不同的作用机制。它们不一定在某一例转基因失活中同时出现,但也不彼此排斥,而是相互影响甚至协同作用。转基因失活反映了生物体在基因调控水平上进行的一种自我保护。可以推测:细胞本身存在着沉默系统。转基因诱导的基因沉默可能是由于外源 DNA 插入后,破坏宿主基因组的特征性组成,使染色质的三维结构改变,同时,同源序列的插入还会造成异位配对,这些都可能触动沉默机制的开关,进而导致一系列连锁反应,包括甲基化、异染色质化或 RNA 的降解,最终造成基因不能正常表达。

近年来在研究转基因沉默方面已取得了不少进展^[21],但仍有许多问题尚不清楚,如对转基因沉默机制的认识还很朦胧,所提出的各种模型和假设还不能解释各种实验结果。转基因沉默已经成为生物遗传工程商品化和实用化的巨大障碍。如何减少并

克服转基因沉默已经成为世界各国生物界亟待解决的问题。

致谢 感谢王强同学所提供的帮助。

参考文献:

- [1] Peerbolte R, Loonhouts K, Hooykaas-van Slogteren, *et al.* Clone from a shooty tobacco crown gall tumor II, irregular T-DNA structures and organization T-DNA, methylation and conditional expression of opine genes[J]. *Plant Mol. Bio.*, 1986, **7**: 285—299.
- [2] Kilby NJ, Ottoline leyser HM. Promotor methylation and progressive transgene inactivation in Arabidopsis[J]. *Plant Mol. Bio.*, 1992, **120**: 103—112.
- [3] Kumpatla. SP, Teng W. Epigenetic transcriptional silencing and 5-azacytidine-mediated reactivation of a complex transgene in rice[J]. *Plant physiol*, 1997, **115**: 361—371.
- [4] Nan X, Ng H H, Johnson CA, *et al.* Transcriptional repression by the methyl Cp G-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex[J]. *Nature*, 1998, **393**: 386—389.
- [5] Pazin M J. What's up and down with histone deacetylation and transcription? [J]. *Cell*, 1997, **89**: 15—328.
- [6] Iglesias V A, Moscone EA, Papp I, *et al.* Molecular and cytogenetic analyses of stable and unstably expressed transgene loci in tobacco[J] *Plant cell*, 1997, **9**: 1 251—1 264.
- [7] Matzke MA. Gene interactions and epigenetic Variation in transgenic plants[J]. *Dev Genet*, 1990, **11**: 214—223.
- [8] Park R D, Papp I, Moscone EA, *et al.* Gene silencing mediated by promoter homology occur at the level of transcription and results in meiotically heritable alternation in methylation and gene activity[J]. *Plant J.*, 1996, **9**(2): 183—194.
- [9] Vausheret H. Identification of a general silencer for 19s and 35s promoter in a transgenic tobacco plant: 90 bp of homology in the promoter sequence are sufficient for tran-inactivation[J]. *CR. Acad. Sci. Paris.*, 1993, **316**: 1 471—1 483.
- [10] Mittditen S O. A change of ploidy can modify epigenetic silencing[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**: 7 114—7 119.
- [11] Mol J NM, Stuitje A. Genetic manipulation of fleral

- pigmentation genes[J]. *plant Mol. Biol.*, 1989, **13**: 287—294.
- [12] Dougherty W G, Parks T D. Transgene and gene suppression: Telling us something new? [J]. *Curr opin cell Biol*, 1995, **7**: 399—405.
- [13] Cameron F H, Jennings P A. Inhibition of gene expression by a short sense fragment [J]. *Nucleic Acid Res*, 1991, **19**: 469—474.
- [14] Metzloff M, o' Dell M, Cluster PD, *et al.* RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in Petunia[J]. *Cell*, 1997, **88**: 845—854.
- [15] Laemmli UK, Kas E, Poljak L, *et al.* Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1992, **2**: 275—285.
- [16] 周丛照, 钱信果, 李振刚, 等. MAR 的分子结构[J]. 遗传, 1999, **21**: 39—43.
- [17] Breyne P, Van montagu Met, *et al.* Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco[J]. *The plant cell*, 1992, **4**: 463—471.
- [18] Cockerill PN, Garrard WT. Chromosomal loop anchorage of the kappa immuno-globulin gene occurs next to the enhancer region containing to poiserasell site[J]. *Cell*, 1986, **44**: 273—282.
- [19] Izaurrealde E, Mirkovitch J, Laemmli UK. Interaction of DNA with nuclear scaffolds in vitro[J]. *J. Mol. Biol*, 1988, **200**: 111—125.
- [20] Bode J, kohwir. Dickinson L, *et al.* Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNA [J]. *Science*, 1992, **255**: 195—197.
- [21] 刘 昕, 傅荣昭, 蔡民华, 等. SAR 与植物转基因沉默的消除[J]. 生物工程进展, 1998, **18**(4): 33—57.

《广西植物》文后参考文献著录格式更改的说明

为便于国外检索期刊能够收录中文期刊的文献,自 2003 年第 3 期起,本刊发表的论文,其文后参考文献的著录格式将要作一些调整,将原来采用的“顺序编码制”形式改为“著者—年份制”的著录形式,请广大作者注意并执行我刊的规定。具体内容如下:

A. 期刊: 作者. 年份. 文题[J]. 刊名(外文刊名用斜体,规范缩写,不用缩写点),卷(期): 起止页码。

在引用国内刊物的文献时,无论其原文是用中文还是英文刊出,一律用英文形式列出,但原文是中文的需列出中文作者名和中文刊名(用括号排于相应位置);若原文无英文题目,则仍以中文形式,按著者姓氏笔划排于文献的最前面。举例如下:

Chen QF(陈庆富). 2001. Karyotype analysis of five *Fagopyrum* species native to China[J]. *Guihaia*(广西植物), **21**(2): 107—110.

Wei ZX(韦仲新), Wang H(王 红). 2001. Studies on pollen morphology of four genera of Trilliaceae[J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究), **23**(4): 451—456.

Ding T(丁 坦), Liao WB(廖文波), Jin JH(金建华), *et al.* 2002. Floristic analysis on the seed plants of Mt. Diaoluo in Hainan Island[J]. *Guihaia*(广西植物), **22**(4): 311—319.

B. 图书: 著者. 年份. 书名[M]. 版次(初版不写). 出版地: 出版社, 起止页码。

在引用中文书籍文献时,均用中文形式列出,若引用的是翻译为中文的书籍,也用中文形式列出,并按著者姓氏笔划排于文献的最前面。

C. 论文汇编、会议文集: 著者. 出版年. 题名[A]. In(见): 原书编者. 书名[C]. 出版地: 出版者, 起止页码。

D. 文献排列顺序: 中文、日文、英文。中文以著者姓氏笔划为序,英文以姓氏字母为序(包括用汉语拼音所列作者文献)。