DNA 甲基化与植物转基因沉默研究进展

王忠华　夏英武
(浙江大学农业与生物技术学院核农学研究所,杭州　310029)

摘要　基因沉默现象已成为转基因植物商品化生产的严重阻碍。本文就 DNA 甲基化的作用机制及由其引起转基因沉默的研究作了简要综述。另外,结合基因表达的抑制因素,对如何消除 DNA 甲基化,促使外源基因高效表达的策略进行了初步探讨。

关键词　DNA 甲基化　植物转基因　基因沉默

自 1983 年首次获得转基因植株以来,利用转基因技术改良作物已取得巨大成功。据不完全统计,目前已获得转基因植物上百种,涉及 50 多个物种,上千例转基因植物,其中包括水稻、小麦、玉米、棉花、烟草、马铃薯、大豆等重要粮食和经济作物[1]。我们实验室与加拿大渥太华大学合作利用农杆菌介导法成功地将 cry1Ab 基因和 cry1Ac 基因导入秀水 11、中 8215 等粳稻品种中获得转基因植株[2]。但研究中发现,转基因在受体植物中的表达很不稳定,甚至出现不表达的情形,即出现了所谓的转基因"沉默"现象(Transgenes Silence)。它既不等同于 DNA 歧变引起的基因表达水平低下,也不同于转基因在有性世代分离和传递中的丢失,而是指利用遗传转化技术导入并稳定整合进受体植物细胞中的 T-DNA 由于受到各种因素的影响,在转基因植株的当代或后代中表达受到抑制的现象。国内外许多实验室也发现了类似的情形,因此转基因沉默机制的研究已成为当今生物技术研究领域的热点问题。通过近十年的研究,在这方面已取得不少进展。本文就 DNA 甲基化与植物转基因表达的关系及其对策作一简要综述。

1　DNA 甲基化与转基因沉默

DNA 甲基化(DNA methylation)现象广泛存在于动植物细胞中。DNA 甲基化在调节基因表达、控制植物细胞分化及系统发育等过程中有着重要的生物学功能。研究表明[1],高等植物的 DNA 甲基化程度较高,核基因组大约 20～30 %的胞嘧啶残基处于甲基化状态。DNA 甲基化具有抑制基因表达的作用,活化的基因往往处于未甲基化状态。通过改变 DNA 的甲基化状态可以调控基因的表达,在转基因植物中也不例外。众所周知,每一种物种长期进化过程中形成各自独特的识别、代谢和调控方式,细胞中存在某种识别外源 DNA 插入顺序并对其加以修饰的机制。转基因作为外源基因,它的"入侵"当然会受到各种各样的排斥,包括 DNA 甲基化。

1.1　DNA 甲基化的作用机制

细胞 DNA 甲基化过程发生在 DNA 合成之后,通常以半保留方式进行 DNA 修饰,即双链 DNA 中仅对新合成链的相应位点胞嘧啶残基进行甲基化修饰。目前发现起甲基化修饰作用的有两类酶:一类是维持性甲基化酶(Maintenance methylase),在 DNA 复制时,维持性甲基化酶可识别新合成的半甲基化双链,并将甲基加到新链的非甲基化胞嘧啶上;另一类是构建性甲基化酶(Establishment methylase),它不需要甲基化的 DNA 模板作指导,可以直接使非甲基化的 DNA 甲基化,在真核细胞中绝大多数甲基化发生在 CG 二核苷酸对[1]。

细胞内 DNA 的甲基化状态是可以改变的。根据细胞内基因表达的需要,在一定的碱基位置可以发生从头开始的甲基化或去甲基化作用[3]。因此,当人们发现转基因沉默现象之后,很自然地将基因的失活与 DNA 甲基化修饰联系起来。

植物 DNA 甲基化引起外源基因失活的现象十分类似于细菌的限制修饰系统,这一防御机制可以有效地识别出导入的外源 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,T-DNA 的插入会破坏其原有的组织机构,因此可被植物修饰系统识别,并通过甲基化使之失活[4]。当前人们对 DNA 甲基化引起植物转基因沉默的具体机理尚不是很清楚。Razin[5] 认为 CpG 甲基化是通过一个包含蛋白脱乙酰基酶在内的转录

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

抑制复合体诱发组蛋白脱乙酰基化(Deacetylation)导致染色质结构变化而引起转基因沉默的。Bestor[6]则以“甲基化遇到乙酰基化”为题在Nature杂志上撰文,提出甲基化导致转基因沉默的原因在于,一种称为MeCP2的蛋白可与甲基化的DNA选择性结合,而MeCP2本身又是和组蛋白的脱乙酰基酶(如组蛋白脱乙酰基酶HDAC1和HDAC2)结合在一起,从而促使组蛋白脱乙酰基化。由于组蛋白乙酰基化是保持DNA高度转录活性的前提,由此可见甲基化是通过组蛋白的脱乙酰基化而发生沉默的。Stefan等[7]、Jones等[8]、Nan等[9]和Pazin等[10]也报道了类似的观点。

1.2 DNA甲基化与植物转基因沉默

早在八十年代中期Pcerbolte等人[11]就发现转基因烟草中T-DNA上的冠瘿碱基因由于发生甲基化使表达受到抑制的现象。现在发现,几乎所有的转基因沉默现象均与转基因及其启动子的甲基化有关。目前普遍认为,转基因沉默分为转录水平上的基因沉默(Transcriptional gene silence TGS)和转录后水平的基因沉默(Post-transcriptional gene silence PTGS)[12-16]。TGS往往是由于启动子区被甲基化而影响转录的起始,而PTGS是由于编码区甲基化造成的。下表就近十几年来DNA甲基化与植物转基因沉默的研究作一简要回顾。

表1 近十年植物转基因沉默与DNA甲基化研究举例

转基因植物	沉默基因	沉默机理	参考文献
烟草	冠瘿碱基因	T-DNA编码区域发生甲基化	[11]
烟草	新霉素磷酸转移酶基因nptII	胭脂碱合成酶基因启动子Pnos区域甲基化	[17]、[18]
烟草	报告基因gus	T-DNA编码区域发生甲基化	[19]
矮牵牛	玉米4-二氢酮醇还原酶基因a1	转基因A1编码区域发生甲基化	[20]
拟南芥	新霉素磷酸转移酶基因nptII	胭脂碱合成酶基因启动子Pnos区域甲基化	[21]
拟南芥	潮霉素抗性基因hph	启动子区域发生甲基化	[22]
烟草	潮霉素抗性基因hph	转基因编码区域甲基化	[23]
烟草	马铃薯纺锤形块茎病毒(PSDV)cDNA单元	转基因编码区域特异序列发生甲基化	[24]
矮牵牛	玉米4-二氢酮醇还原酶基因a1	启动子P35s区域发生甲基化	[25]
烟草	报告基因gus	转基因编码区域甲基化	[26]、[27]
拟南芥	苯基苯乙烯酮合成酶(CHS)基因chs	T-DNA编码区域甲基化,并诱发同源内源基因产生副突变	[28]
烟草	新霉素磷酸转移酶基因nptII	编码序列3端甲基化	[29]
蕃茄	le-acs2	T-DNA编码区域发生甲基化形成异常RNA	[30]
水稻	抗除草剂基因bar	启动子P35s区域发生甲基化	[31]
水稻	报告基因gus	启动子P35s区域发生甲基化	[32]
小麦	苏云金杆菌基因	Bt基因编码区域的A和C的甲基化形式发生改变	[33]
烟草	李痘病病毒(PPV)基因	转基因编码区域甲基化	[34]

2 对策

外源基因失活的原因是相当复杂的,它既存在转基因植物本身表达调控的内在因素,还存在外界环境因子的影响。同时,不同形式外源基因失活现象之间既有本质上的差别,又有相互间的联系。DNA甲基化作为直接导致外源基因失活的机制之一,在反式失活(Trans-inactivation)、共抑制(Co-suppression)及重复序列诱导的基因沉默现象(Repeat induced silencing)中又均有涉及。笔者根据DNA甲基化的作用机制与基因表达的调控与抑制因素,提出了几种消除DNA甲基化,促使外源基因高效表达的策略。

(1)增强子策略。利用具有组织和发育特异性调控作用的增强子是一条确保外源基因有效表达的理想途径。Lichtenstein等人[35]研究发现,K链基因的增强子在细胞发育的特定阶段指导该基因区段的去甲基化从而启动基因的转录。从植物基因中分离相应的增强子并构建嵌合基因,可望确保外源基因按照合适的调控模式表达,消除因DNA甲基化所产生的失活问题。

(2)转化方法策略。多拷贝重复序列易导致外

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

源基因甲基化形成异染色质,对外源基因的表达极为不利。因此,在植物遗传转化时应尽量避免外源基因以多拷贝方式整合进植物基因组中,而是以低拷贝,最好是单拷贝插入植物基因组中。利用基因枪法、电激法等 DNA 直接导入法易引起多拷贝基因整合。对于这一点,目前人们已达成共识。近年来应用较多的是农杆菌介导法,它不但转化机制清楚、转化方法简单、效率高,而且转入的基因拷贝数少,这样产生同源抑制就使外源基因发生沉默的机率大大降低。

(3) 密码子优化策略。外源 DNA 序列与植物基因组 DNA 碱基组成的差异是引发 DNA 甲基化的重要原因。因此,在进行植物遗传转化之前,应对外源基因密码子进行修饰优化,尽量使外源基因 DNA 组成与受体植物 DNA 碱基组成相一致。这样就减少外源基因甲基化的可能性,进而促使外源基因高效表达。

(4) 其它策略。DNA 甲基化引起的外源基因失活是不稳定的,在一定的条件下可恢复活性。目前人们已经知道,用 5-氮胞嘧啶处理植株具有很好的抑制甲基化和脱甲基化作用。但由于其价格昂贵,兼有致癌性,因此实用价值不大。另外,也有人报道[36-37],有性杂交、嫁接和体外培养等处理可使外源基因的甲基化程度发生变化。

3 展望

随着植物转基因沉默机理研究的不断深入,人们最终将彻底了解外源基因失活的产生机制,并采取针对性的措施消除转基因沉默的影响因素,促使外源基因的稳定高效表达,进而使转基因技术真正成为人类改良作物的有力工具。同时,转基因沉默现象为分子生物学中基因表达调控的研究领域提供了崭新的课题,随着机制的不断明了,必将极大地丰富分子生物学的内容。

参考文献

[1] 王关林,方宏筠主编, 植物基因工程原理与技术. 科学出版社 北京 1998.

[2] 王忠华等,基因工程在水稻改良方面的研究进展. 生物技术通报,1999,15(2):5-8.

[3] 杨金水等, 植物转基因的失活与沉默. 生物工程进展, 1995, 15(3):41-45.

[4] 李旭刚等, 外源基因在转基因植物中的失活. 生物技术通报,1998,14(2):1-8.

[5] Razin A, The EMBO J, 1998,17:4905-4908.

[6] Bestor T H, Nature, 1998,393:311-312.

[7] Stefan U K et al, TIG, 1997,13(11):444-449.

[8] Jones P L et al, Nat. Genet, 1998, 19:187-191.

[9] Nan X et al, Nature, 1998, 393:386-389.

[10] Pazin M J et al,Cell, 1997, 89:315-328.

[11] Peerbolte R et al,Plant Molecular Biology, 1986, 7:285-299.

[12] 华志华等, 植物转基因沉默研究与对策. 生命科学, 1999, 11(2):51-54.

[13] 朱莉等, 转基因植物中外源基因沉默机制的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(2):102-104.

[14] Meyer P, TIB, 1995,13(9):332-337.

[15] Stam M et al, Annals of Botany, 1997,79:3-‘12.

[16] Wassengger M et al, Plant Molecular Biology, 1998,37:349-362.

[17] Matzke M A et al, The EMBO J, 1989, 8:643-649.

[18] Matzke M A et al, Plant Molecular Biology, 1991, 16:821-830.

[19] Hobbs SLA et al, Plant Molecular Biology, 1990, 15:851-864.

[20] Linn F et al,Molecular & General Genetics, 1990, 222:329-336.

[21] Kilby N J et al,Plant molecular Biology, 1992, 20:103-112.

[22] Assaad F F et al, Plant molecular Biology, 1993, 22:1067-1085.

[23] Neuhuber F et al, Molecular & General Genetics, 1994,244:230-241.

[24] Wassengger M et al, Cell, 1994, 76:567-576.

[25] Meyer P et al,The EMBO J, 1994,13:2084-2088.

[26] Ingelbrecht I et al, Proc. Natur. Acad. Sci. USA, 1994, 91:10502-10506.

[27] English J J et al, Plant Cell, 1996, 8:179-188.

[28] Davies GJ et al, Plant J, 1997, 12:791-804.

[29] Van houdt H et al, Plant J, 1997, 12:379-392.

[30] Lee K Y et al, Plant J, 1997, 12(5):1127-1137.

[31] Kumpatla S P et al, Plant Physiol, 1997,115:361-371.

[32] Zhong X et al, DNA cytosine methylation and stability of transgene expression in rice. General meeting of the international program on rice biotechnology, September 15-19, 1997. Malacca, Malaysia Abstract:pp70.

[33] 郭亮等,苏云金芽孢杆菌 Bt 蛋白基因在小麦基因组中的甲基化修饰 遗传学报 1997, 24(3):255-262.

[34] Guo H S et al, MPMI,1999, 12(2):103-111.

[35] Lichtenstein M et al, Cell, 1994, 76:913-923.

[36] Van Slogteren G M S et al. Plant Molecular Biology, 1984,30:333-336.

[37] Mittelsten S O et al, Molecular & General Genetics, 1991,228:104-112.

(下转第 12 页)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

系,掌握世界科技发展前沿,充分利用共享的生物信息资源,充分发挥海外生物技术人才的智力优势,逐步在国内外生物技术研发环境中实现一种双赢的协作竞争。

5.4.7 专业化人才的培养和人力资源的开发在生物技术领域是一项更为紧迫的任务,特别是多学科背景的科技与管理复合型人才的吸引和培养。要不断探索新经济条件下人才的激励约束机制,积极推动持股权、期权等分配形式的改革;

5.4.8 生物技术在实现产业化的同时要关注社会经济的可持续发展,在保护环境和合理利用资源方面发挥作用;关注技术发展可能给社会带来的负面影响,以科学的态度正确看待并积极研究生物安全和社会伦理问题。

中国经济正处于全球化的冲击波中,在没有彻底完成工业化革命的条件下,在迎接信息化浪潮的同时,更要面对"生物技术革命"的挑战。中国是一个拥有丰富生物资源的国家,具有发展生物经济得天独厚的条件,同时又面临巨大的人口压力和人民提高生活质量的迫切要求,我们应正确对待历史发展潮流所带来的挑战和机遇,及时推动生物技术创新,大力发展生物技术产业。

参考文献

[1] 刘红. 国际技术经济研究. 2000,3(2):44 - 50

[2] 刘谦等. 生物工程进展. 2000,20(1):3 - 5

[3] 《第四届北京生物医药产业发展论坛国际研讨会》相关资料. 2000

[4] 中国科学院. 《科学发展报告》. 2001

[5] 《国家"863"计划生物技术领域十五年回顾》相关资料. 2001

(接第25页)

Progress in the Studies of DNA Methylation and Transgenes Silencing in Transgenic Plants

Wang Zhong-hua　Xia Ying-wu

(Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Agricultural and Biotechnological College, Zhejiang University　Hangzhou　310029)

Abstract　The commercial production of transgenic plants was inhibited by genes silencing. This review will focus on the researches of the mechanisms of DNA methylation and transgenes silencing induced by DNA methylation. In addition, combined with repressed elements of gene expression, the approach to dissolving DNA methylation and improving transgenes expression will preliminarily be discussed.

Key words　DNA methylation, Transgenic plants, Gene silencing

(接第29页)

The Progress on Sex Determination of Mammalian

Zhang Yong　Xu Jin-lin

(Department of Biological Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China);

Chen Chun　Gu Jian-Xin

(The Center of Gene Research, Shanghai Medical University, Shanghai　200032, China)

Abstract　Researches on the structure, the function and gene interactions of SRY, SOX 9, SF-1, WT1 and DAX - 1 show that these genes play critical role in the mammalian sex determination, and this is important to developmental biology and the evolution of sex determination.

Key words　sex determination, the mammalian　SRY　SOX 9　SF-1　WT1　DAX-1

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net