

今后工作重点应放在前三项,其他六项也值得试验研究,其中有些项目也获得一些经济价值。但比起前三项似乎较为次要些,遥远的将来它们可能被分子遗传研究成果所代替。

## 2. 走向未来

1) 新植物的创造——当遗传工程技术达到随心所欲的时候,人们可以从植物染色体、叶绿体、线粒体中的几百万基因中分离出所需要的基因,经转移后表达,达到一个自由世界时,就可能去创造有益人类需要的新型植物,可根据人们的愿望创造新的农作物、森林植物、观赏植物、园艺、药用、草原、海藻等各种植物,或几种类型植物的混合体。预计21世纪是生物时代有可能实现以上设想。

### 2) 农业革命

(1) 新的农作物出现。按照上述,创造新植物种适合人类要求,不仅营养丰富且具有各种抗性。例如禾本科和豆科植物的新物种,以及将农作物改变成多年生的谷物树种等等。

(2) 新技术的应用。以细胞培养的胚状体制成超级种子,按照季节时间定时萌发(如定时炸弹)。目前已在少数非农作物上试验,获得

一定结果。未来也将用在林业、园艺,并应以人类主要的粮食作物为主。

植物和农作物工业、食品工业和饲料工业的突起,使粮食、食品、饲料生产均在工厂里进行,不受天时、地理、时间的影响和阻碍,生产的粮食可满足世界人口不断增长的需求。

### (3) 海洋与空间的利用

人类早已在各个方面的利用海洋。从古代用围垦海洋种植到近代在海洋上建立城市。利用比陆地大几倍面积的海洋去培养人类所需要的植物,又可从海水中提取人类有用且又有高度经济价值的化学物质。近十年美苏已开始规划利用太空,包括其他星球在内,探索全球宇宙太空中生产人类需要的物质和移民等问题。据闻美苏太空研究规划中,已包含有许多动、植物材料。

## 参 考 文 献

- [1] VI Intern. Congress of Plant tissue and Cell Culture, Abstracts, 1986, ed D. A. Somers.
- [2] News letter, IAPTC No. 50, 1986, ed. J. M. Widholm.
- [3] TCA (Tissue Culture Association) Report, 1986. Vol. 20 No. 5.

# mic RNA 基因调控原理及应用

肖 韦

(南京农学院)

## 1. 何谓 mic RNA

micRNA 是英文 mRNA Interfering Complementary RNA 的缩写<sup>[1]</sup>。我们知道,基因的转录与 DNA 复制的一个重要不同之处是:当 DNA 转录时,只以一条链作为模板来合成 mRNA,这条 DNA 链被称为“有义链”(sense strand),相对应的另一条链则被称为“反义链”(antisense strand)。一般认为反义链是不被转录的。假若反义链被转录,它所指导合成的 RNA 会不会象 DNA 的复制一样,同

从有义链转录的与它碱基顺序互补的 mRNA 相结合?这一结合对基因表达时 mRNA 的翻译又会产生什么影响?

有人曾做过这样的实验:用变性为单链的某一 DNA 片段与细胞 mRNA 提取物作分子杂交,经体外翻译后再作蛋白质电泳,同未作杂交的蛋白质电泳对照,发现经过分子杂交后,那段 DNA 所编码的蛋白质在电泳谱上消失,说明与 DNA 杂交后的 mRNA 失去了作为翻译模板的功能。根据这一原理设计的“分子杂交捕捉”技术的应用作者曾在另一篇文章中提

及<sup>[2]</sup>。人们设想,在活体状态下,如果引入一段单链RNA使之与某特定基因的mRNA配对,就会抑制这一基因的表达。实验结果证实了这一设想。于是,可以通过分子互补而干扰正常mRNA翻译功能的RNA就被称为micRNA,也有人叫它“反义RNA”。

## 2. 天然存在的micRNA调控系统

迄今所知micRNA的基因调控至少在原核生物中是天然存在的。

大肠杆菌*E. coli*有两种主要的外膜蛋白分子OmpF和OmpC,共同组成亲水分子的扩散通道。在高渗环境中,OmpC增加,OmpF减少,二者总量相对稳定。研究发现OmpC基因是受另一操纵子OmpB上OmpR正向调节的,OmpF基因则不受OmpR直接控制。在大肠杆菌基因组上,这三个基因都相距很远。Mizuno等<sup>[1]</sup>在研究OmpC基因时出乎意料地发现:在OmpC基因5'末端外,有一个很短的转录单位,方向与OmpC转录方向相反,同样受OmpR正向调节。它所转录的含有174碱基的RNA与OmpF mRNA的5'末端有惊人的互补关系,互补区段包括了为核糖体识别的位点及前9个用于OmpF氨基酸合成的密码,而在这个小RNA两端各自形成一个折叠配对的“发夹”结构,以保证RNA分子本身的稳定。在活体条件下,这种天然产生的mic(OmpF)RNA已被测到,并证明它有与OmpF mRNA配对的特性。尽管有些研究对这个小RNA分子在翻译水平上抑制OmpF合成的重要性还有所怀疑,然而作为一个基因调控系统的实例,已被人们普遍接受。

事实上,Simons和Kleckner<sup>[3]</sup>在此之前就发现转座子Tn 10的被称为“多拷贝抑制”(multiplicity inhibition)的现象是通过micRNA实现的。当被克隆到质粒上的Tn 10右臂的IS 10转化入大肠杆菌后,尽管寄主细胞内的IS 10是多拷贝的,却只有少量IS 10进入寄主基因组。研究表明,IS 10右臂有一个重叠基因,

启动区pIN指导合成转座酶(transposase),而pOU侧指导合成一个小RNA,转录方向与pIN相反,因此它正好和转座酶mRNA的5'末端互补。由于pOUT启动能力较强,足量的小RNA有效地在翻译水平上控制了转座酶的合成,从而阻止过量的IS 10插入寄主DNA。这种调控据认为有利于转座子和寄主的共处。本例和前例的不同之处在于:由于两个基因的重叠,micRNA与mRNA的互补是完全的。二者的比较见图1。

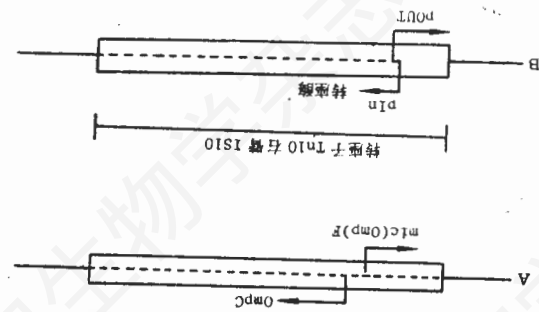


图1 两种天然micRNA基因结构的比较

- A. mic(OmpF)与OmpC基因的相互位置,它们位于大肠杆菌基因组47'处,同受OmpR调控。  
B. 转座子Tn 10右臂IS 10的基因结构,由pOUT转录的RNA与转座酶mRNA有一段互补区。

细菌质粒ColEI拷贝量的反馈调节及“不亲和性”为人们所熟悉,其机制也源于RNA的分子杂交<sup>[4,5]</sup>。由此质粒DNA所转录的一个RNA II分子可与靠近ColEI复制起点的一段DNA结合,然后在核糖核酸酶H的作用下生成RNA引物,启动DNA复制。当质粒拷贝量增加时,另一转录单位RNA I的含量提高,它专一性地与RNA II杂交,改变后者的二级结构,使之失去RNA引物功能,从而阻遏质粒的复制,达到拷贝量的反馈调控。另外一些研究结果证明质粒PI, IncF II等也具有类似ColEI的反馈调节机制。

在真核生物中,Wong和Verma<sup>[6]</sup>曾在研究一个大豆根瘤蛋白基因时发现,这一基因5'末端外有一个完整的可转录顺序,由它假定合成的RNA与此蛋白基因mRNA 5'末端的80个

核苷酸碱基互补,但尚未在活体中发现这个RNA分子。此外,Rezaian和Symons<sup>[7]</sup>发现黄瓜花叶病毒(CMV)中被称为卫星RNA的某些片段可与病毒基因组中具有合成外壳蛋白功能的两个RNA分子互补,推测卫星RNA的功能与调控CMV外壳蛋白有关。

另一方面,RNA:RNA分子杂交被用来解释真核细胞转录后加工的机制<sup>[8,9]</sup>。研究表明一些真核细胞中大量存在的核内小分子RNA与mRNA前体中的识别和切割位点处的保守碱基顺序有着充分的互补关系。新近的报道<sup>[10]</sup>已证实RNA:RNA碱基配对是识别内含子、RNA切割及外显子重接的重要步骤。

### 3. micRNA在基因调节中的应用

DNA的反义链不被转录,主要是因为它没有适当的启动区和终止信号,因而不能构成一个“转录单位”。可是,通过施以简单的重组DNA操作,把一个基因X的内部转录部分颠倒过来(如图2所示),就可以使原来的反义链处于启动区和终止区控制之下,从而转录出一段可与基因X的mRNA互补的RNA,称为mic(X)RNA。自1984年以来从不同实验室已获得了许多成功的例子。

Inouye的实验室在发现了大肠杆菌中OmpC/OmpF调控机理后,体外重组了一个与脂蛋白Ipp基因互补的“基因”并通过质粒载入大肠杆菌,发现其内源脂蛋白的合成可以被mic(Ipp)RNA有效地阻断。他们还将重组的mic(OmpC)基因引入大肠杆菌,发现它能抑制

OmpC的合成<sup>[11]</sup>。Pestka等<sup>[12]</sup>用同样办法颠倒了克隆在质粒中的乳糖操纵子第一个基因LacZ的片段,在乳糖诱导下,通过颜色反应定量测出 $\beta$ -半乳糖苷酶的活性降低了98%,顺序而下的另两个酶,半乳糖苷通透酶和转乙酰酶的活性分别下降了80%和55%。

人工合成的micRNA也可以在真核细胞中发挥作用。Izant和Weintraub<sup>[13]</sup>做过这样的实验:将一种疱疹病毒HSV所携带的胸苷激酶(TK)基因直接注入TK<sup>-</sup>的小鼠L细胞核,可将其转化成TK<sup>+</sup>细胞;若将改造了的mic(TK)RNA基因与TK基因同时注入,当配比量达到100:1时,TK<sup>+</sup>的细胞数量减少了四倍。鸡TK基因与HSV-TK基因不同源,但同样可以转化TK<sup>-</sup>鼠细胞,若以100:1将mic(HSV-TK)基因与鸡TK基因注入小鼠TK<sup>-</sup>细胞,则未见有抑制转化的效应,说明基因调节确是通过RNA互补来实现的。Rubenstein等的实验<sup>[14]</sup>表明,用分别克隆在质粒中的LacZ基因和mic(LacZ)基因同时转染鼠细胞, $\beta$ -半乳糖苷酶的合成比对照减少了90%,同一质粒上的非同源基因则不受影响。Kim和Wold<sup>[15]</sup>对micRNA在真核生物中的表达作了详尽研究,他们发现低水平的mic(TK)RNA不足以抑制寄主内源TK<sup>+</sup>基因的表达。当mic(TK)RNA在寄主体内大量增殖时,细胞内TK水平大大降低。他们还在这种细胞核提取物中测到了RNA:RNA分子,认为这种分子杂交阻碍了mRNA向细胞质的转运。

直接将体外合成的micRNA或其类似物引

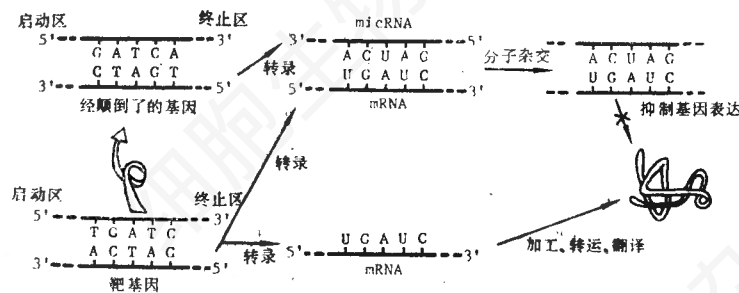


图2 micRNA的工作原理。图中说明了人工重组micRNA基因的一般方法

入寄主细胞同样能起到抑制特定基因表达的功效。最早的例子见文献[16]。作者将人工合成的含有13个碱基的寡聚脱氧核苷酸加入被劳斯氏肉瘤病毒(RMV)侵染的鸡胚成纤维细胞,由于这段核苷酸链与RMV病毒35S RNA末端互补,结果使病毒蛋白质合成及增殖受阻。Metton<sup>[17]</sup>则直接将体外合成的与珠蛋白mRNA互补的RNA注入蛙卵母细胞,发现这种RNA专一性地与珠蛋白mRNA结合,进而阻遏了细胞中珠蛋白的合成。

目前,类似的工作已经在粘菌 *Dictyostelium*<sup>[18]</sup>、高等植物<sup>[19]</sup>和果蝇<sup>[20]</sup>等不同生物类型上取得成功。细胞内源基因的表达被micRNA抑制后,出现了相当于基因突变的“拟表型(phenocopy)”。被抑制的基因种类也很普遍。

从以上分析可以看到, micRNA的调控系统具有普遍适用性、专一性和高效性等特点,无论在理论和实践上都有重要的研究价值。通过总结现有实验结果,下述几个因素直接关系micRNA的有效性<sup>[15,21]</sup>。

(1) **micRNA在mRNA上的互补区域:** 能够互补mRNA 5'末端的micRNA较有效。也就是说互补区应包括被认为与核糖体-mRNA复合物形成有关的所谓Shine-Dalgarno顺序。只互补mRNA 3'末端的micRNA效果较差,但也有例外。

(2) **micRNA的长度:** 有人认为, micRNA以含有30—400核苷酸为宜。比如天然IS 10中micRNA基因必需长度为180核苷酸,实际互补区约长40核苷酸; mic(OmpF)RNA与OmpF mRNA互补区长82核苷酸,配对碱基51个。长于2000核苷酸的micRNA会降低有效性,可能是由于小分子RNA容易杂交的缘故。

(3) **micRNA分子的稳定性:** 延长micRNA的寿命显然有利于提高基因调控能力。

(4) **为了有效地抑制基因的表达, micRNA量通常要比靶基因mRNA多至20倍以上:** 这一要求可以通过多种遗传操作手段来满足,常见的如增加基因拷贝,或用可诱导的强启动区

来控制micRNA基因等。

micRNA的研究目前虽然处于初级阶段,但进展较快,人们已经逐渐认识到这一生物调控机制潜在的实践意义。比如,癌症历来是医学上的一大难题。有人设想,即使我们尚不能确知致癌基因,却可以制造癌细胞的micRNA基因文库,用它来全面抑制癌细胞的生长,并从中筛选出致癌基因。有了癌基因就可以利用micRNA更有效地抑制它。传染性疾病的预防也是人们感兴趣的课题。如果事先针对某种病原基因合成micRNA基因并转入生物基因组,一旦病菌(毒)侵染,就可以自动诱导micRNA基因的表达,从而阻断致病所需蛋白质的合成。这可能为生物免疫学开辟一个新领域。micRNA的作用原理还可以被用来人工调节细胞发育代谢的进程。在农业生产上,对于抗病、除草、保鲜提高产品品质等都有不可估量的前景。

在基础生物学研究方面, micRNA也将是强有力的工具之一。用它来专一性地阻断生物代谢途径,可以深入地研究各种基因的表达及酶的功能,以及各种物质在细胞内的代谢过程。

## 摘 要

与正常mRNA碱基顺序互补,并能通过与mRNA生成互补杂交分子而干扰mRNA翻译功能的RNA被称为micRNA或antisense RNA。micRNA调控系统在原核生物中是天然存在的,真核细胞中某些转录后加工机制也与RNA:RNA分子杂交有关。利用基因操作技术可以获得人为的micRNA,来研究某些特定基因的表达调节和功能。

## 参 考 文 献

- [1] Mizuno, T. et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1966—1970.
- [2] 肖伟, 1985, *细胞生物学杂志*, 7卷第4期: 149—153.
- [3] Simons, R. W. and N. Kleckner, 1983, *Cell* 34: 683—691.
- [4] Tomizawa, J. I., 1984, *Cell*, 38: 861—870.
- [5] Tomizawa, J. I. and T. Tom, 1984, *Cell*

- 34: 871—878.
- [6] Wong, S. L. and D. P. S. Verma, 1985, *EMBO J* 4: 2431—2438.
- [7] Rezaian, M. A. and R. H. Symons, 1986, *Nucleic Acids Res.* 14: 3229—3239.
- [8] Murray, V. and R. Holliday, 1979, *FEBS Letts* 106: 5—7.
- [9] Rogers, J and R. Wall, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1877—1879.
- [10] Berget, S. W. and B. L. Robberson, 1986, *Cell* 46: 691—696.
- [11] Coleman, J. et. al., 1984, *Cell* 37: 429—436.
- [12] Pestka, S. et. al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7525—7528.
- [13] Izant, J. G. and H. Weintraub, 1984, *Cell* 36: 1007—1015.
- [14] Rubenstein, J. L. R. et al., 1984, *Compts. Rendus Academie Sciences* 299: 271—274.
- [15] Kim, S. K. and B. J. Wold, 1985, *Cell* 42: 129—138.
- [16] Zamecnik, P. C. and M. L. Stephenson, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 280—284.
- [17] Melton, D. A., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 144—148.
- [18] Crowley, T. E. et. al., 1985, *Cell* 43: 633—641.
- [19] Ecker, J. R. and R. W. Davis, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5372—5376.
- [20] Rosenberg, U. B. et al., 1985, *Nature* 313: 703—706.
- [21] Weintraub, H. and J. G. Izant, 1985, *Trends in Genetics* 1: 22—25.

## 植物基因载体—Ti 质粒的应用方法 (下)

朱群 白永延

(中科院上海植物生理研究所)

### (三)Ti 质粒的改建

众所周知, Ti 质粒分子大, 并有许多基因分布其上, 为克服直接操作完整 Ti 质粒的困难, Chilton, Framond 等(1983)分别构建了一批微型 Ti 质粒(Mini Ti)<sup>[22, 28]</sup>, 他们将 T 区 DNA 插入既能在大肠杆菌中, 又能在根癌农杆菌中复制的广宿主质粒上, 这个微小的 Ti 自身并无转化植物细胞的能力, 但当有 Ti 质粒 Vir 区域在同一菌中起反式互补作用时, 这个微型 Ti 即能将 T-DNA 转入植物细胞的染色体之中, 因而外源基因只要能插入微型 Ti 的 T 区 DNA, 便能被转入植物细胞的基因组。

无论是野生型的 Ti 质粒, 还是改建的微型 Ti 质粒, 尽管它们已能将外源基因引入植物细胞, 并能使此外来基因通过减数分裂, 但由于被转化的植物会产生肿瘤, 而肿瘤组织难以再生成完整植株, 因而必须将 Ti 质粒的致

瘤基因去掉, 构建出解除了“武装”的 Ti 质粒用作基因载体。

#### (1) pGV 3850 系统

pGV 3850 是 Zambryski 等(1983)利用 pAcgB 和 pGV 3839 构建而成的。pAcgB 是 pBR 322 中插有胭脂碱型质粒 T-DNA 左右两个边

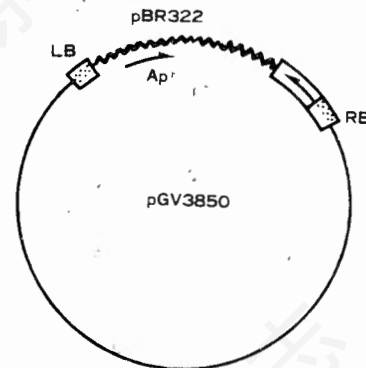


图 7 pGV 3850 结构示意图<sup>[15]</sup>  
LB、RB 分别表示左、右边界。□表示胭脂碱合成酶基因