

评述与展望

Review and Progress

## VIGS 技术在基因功能研究中的应用进展

李小龙 谢伶俐 焦靖芝 魏淑东 何勇 严寒 许本波\*

长江大学生命科学学院, 荆州, 434025

\* 通讯作者, benboxu@yangtzeu.edu.cn

**摘要** 病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)是指携带目标基因片段的重组载体在侵染植株后,可诱导植物内源基因发生沉默。该技术已经广泛用于植物功能基因研究。本文针对 VIGS 技术分子机理、载体来源、载体选择标记、技术局限性以及其在植物基因功能研究中的应用做一概述,展望了 VIGS 技术作为植物功能研究的前景和需要改进的方向。

**关键词** 病毒诱导的基因沉默, 分子机理, 选择标记, 功能分析

## The Application Progress of VIGS Technology in Gene Function Research

Li Xiaolong Xie Lingli Jiao Jingzhi Wei Shudong He Yong Yan Han Xu Benbo\*

College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou, 434025

\* Corresponding author, benboxu@yangtzeu.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.033.001401

**Abstract** Virus-induced gene silencing (VIGS) is a new technology which has been widely used in functional analysis for plants. The recombinant virus vector which has target gene of plant can induce plant endogenous gene silence. The technology has been widely used in the research of plant gene function. In this paper, advance about molecular mechanism, vector source and selected marker, limitations of VIGS, and its application in functional research about plant genes, was reviewed. And the prospects of VIGS in plant functional genes and the direction of progressing are introduced.

**Keywords** Virus-induced gene silencing, Molecular mechanism, Selected marker, Functional analysis

反向遗传学,特别是针对特定基因的敲除或沉默是研究基因功能的重要手段。目前,T-DNA 广泛用于与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),番茄(*Solanum lycopersicum* L.)等植物的突变体的创建和基因功能的研究。但复杂遗传转化过程、基因致死突变、多基因家族应用困难等缺点限制了 T-DNA 技术的大规模应用。因而一些基因沉默的方法,如 RNAi,病毒诱导的基因沉默(virus-Induced gene silencing)在植物基因功能研究中的应用越来越广泛。

与传统的转基因基因功能分析方法相比,VIGS 具有以下优点:(1)高通量。VIGS 除可以对一条序列进行功能鉴定外,还可将 cDNA 文库整合到病毒载体上而进行高通量基因筛选分析,适合现代大规范基因功能分析。(2)速率高。VIGS 操作简便,实验成本低,沉默后能够快速观察功能丧失表型。(3) VIGS

可以迅速比较物种间同源基因功能(Scofield et al., 2005)。(4) VIGS 可用于同一种植物不同遗传背景下的基因功能研究(Burch-Smith et al., 2004)。

### 1 VIGS 的分子机理

转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)是植物体内最适合和最特异的一种降解外源 DNA 或 RNA 的方式,从而保护自身的一种防卫机制。利用特定核酸片段与正在复制的病毒相结合,PTGS 可用于植物病毒防御(Voinnet, 2001)。在识别过程中,产生杂种双链,植物细胞识别该双链并在 Dicer 酶的作用下将双链切割成小 RNA 分子(small oligonucleotides, siRNA)。siRNA 结合 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)并识别特异系列,从而降解转录本而导致基因沉默。对于

基金项目:本研究由国家 863 计划项目(2011AA10A104)资助

VIGS, 其机制为利用包含目标基因的核酸片段与宿主内源性 mRNAs 想结合, 从而下调目标基因的表达, 从其本质来说, 也是一种转录后的基因沉默(Kumagai et al., 1995)。目前该技术广泛用于拟南芥(*Arabidopsis*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)和矮牵牛(*Petunia hybrida*) (Chen et al., 2005; Orzaez et al., 2009)。VIGS 具有技术简单、周期短、侵染效率高等特点, 已成为一种高效和高通量基因功能鉴定的新技术, 在植物功能基因组学中发挥重要作用。

## 2 VIGS 载体来源

目前已经发现多种植物病毒可以用作 VIGS 基础载体, 用于开发 VIGS 载体。如烟草花叶病毒(mosaic virus, TMV) (Kumagai et al., 1995), 马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX) (Angell and Baulcombe, 1997), 番茄金花叶病毒(tomato golden mosaic virus, TGMV) (Kumagai et al., 1995)。但这些病毒载体都造成明显的侵染症状, 如黄萎、叶片卷曲、坏疽。同时, 由于病毒难以侵染植物顶端分生组织, 因此不能应用于植物茎尖分生组织的研究。

相对于 PVX、TMV 和 TGMV 载体, 烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)除具有宿主广泛特点外, 还具有很多其它优点, 如仅导致比较温和的症状, 能够感染侵入区的大量细胞, 能够侵染分生组织, 因而被认为是一种最有潜力的 VIGS 载体(Ratcliff et al., 2001; Liu et al., 2002; Wu et al., 2011; Bachan and Dinesh-Kumar, 2012)。目前, 基于 TRV 的 VIGS 载体系统广泛用于拟南芥、本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)、番茄(Wang et al., 2006; Ho et al., 2009; Wu et al., 2011; Bachan and Dinesh-Kumar, 2012)。

TRV 是由正义和反义链 2 部分 RNA 组成的杆状病毒。RNA1 编码 2 个复制酶和半胱氨酸富集蛋白。RNA2 编码包壳蛋白和 2 个非结构蛋白。由于 TRV RNA1 在 RNA2 缺乏条件下能在植物体内复制和移动, 因此学者们认为能够对 RNA2 进行改造而适宜插入目标基因片段, 从而沉默目的基因。在该理论指导下, 学者们利用农杆菌 T-DNA 构建了双价表达载体, 分别携带有 35S 启动子和 RNA1 以及 RNA2 (Ratcliff et al., 2001; Liu et al., 2002)。35S 组成型启动子启动病毒基因组的起始转录, 保证病毒快速感染植物。在 RNA2 中, 利用多克隆位点取代编码非结构蛋白的区域, 用于插入外源片段(图 1)。在 VIGS 载体中插入的外源片段长度及序列均影响 VIGS 沉默效率。一般认为插入的片段大小为 150~500 bp 为宜, 且

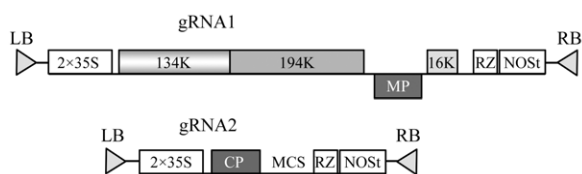


图 1 TRV VIGS 载体示意图

Figure 1 Schematic diagram of TRV VIGS vector

插入片段与目的基因同源性越高, 特异性越强越好。而对于多基因家族的目标基因, 最好选用保守域。

除上述的 RNA 病毒载体外, 现在还开发有多种 DNA 病毒载体, 包括番茄金色花叶病毒(tomato golden mosaic virus, TGMV) (Kjemtrup et al., 1998)、大白菜曲叶病毒(cabbage leaf curl virus, CbLCV) (Turnage et al., 2002)及非洲木薯花叶病毒(african cassava mosaic virus, ACMV) (Turnage et al., 2002; Fofana et al., 2004), 已分别被应用于烟草、拟南芥和木薯的基因沉默研究。另外还有一类应用较少的卫星病毒载体, 一个是由 TMV 的卫星病毒构建成的 SVISS 系统(Gosselét et al., 2002); 另一个是由中国番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV)的伴随卫星分子 DNAm $\beta$ 构建成的病毒载体(Cai et al., 2007)。

虽然各种载体都有成功的应用案例, 但由于不同载体的宿主范围有限, 而且沉默的效果也有所差异。因此, 在 VIGS 技术应用过程中, 应选择重复性好, 侵染能力强, 伴随的不良性状少的载体。

## 3 VIGS 载体选择标记

由于 VIGS 载体通常只侵染部分组织器官或者仅沉默部分基因, 致使植株表现为嵌合体, 因此优良报告基因是评价和改进沉默效果, 确定沉默位点的有效工具。抑制八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase gene, PDS)基因表达, 导致合成的胡萝卜素含量较少, 植株表现为光漂白(photo bleaching)。因此早期研究中, 用空载病毒载体接种植物作为阴性对照, 利用 PDS 基因作为报告基因评价 VIGS 效果。用 PDS 作为报告基因的不利方面为 PDS 和绿色植物光合系统紧密相关, 沉默 PDS 导致不利的表型。因此, 又开发绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)作为报告基因, 克服对绿色植物的影响(Burch-Smith et al., 2006)。而在植物花器官的发育中, 由于黄酮途径的关键基因影响植物花色, 因此也可以利用查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)等基因作为报告基因(Chen et al., 2004)。当前, 在水稻等植物中发现了一些斑点叶, 相关的基因如 Spl7、Sp30 将来也有望开发

成相关的标记基因(Yamanouchi et al., 2002)。

#### 4 VIGS 技术在植物基因功能研究中的应用

VIGS 技术自开发以来,广泛用于番茄、拟南芥、烟草、矮牵牛等植物生长发育、代谢调控、抗病反应等相关基因的功能分析。在番茄中,利用 VIGS 技术鉴定了 NbCA1、NPR1、TGA1a、MEK1、MEK2 及 NTF6 等多个抗病相关基因的功能(Liu et al., 2002; Wang et al., 2006),谷氧还原蛋白 SIGRX1 在抗旱、抗盐等过程中的作用(Guo et al., 2010)。在烟草中,利用 VIGS 方法证实 NbHSP90c-1、NbHSP70c-1、WIPK 和 SIPK 这些基因在抗病中的作用(Maimbo et al., 2010),探讨了依赖 ABA 的耐旱途径(Re et al., 2011)。在花器官发育方面,利用 VIGS 研究了开花相关的基因 FCA 和 FY,花器官形成相关基因 AP3 和 DEFICIENS(Kramer et al., 2007)。

#### 5 VIGS 技术的局限性

虽然 VIGS 作为基因功能研究工具有以上诸多优点,但同时也存在着不足之处。概括起来有以下几点:(1)当前的一些 VIGS 载体宿主范围狭小,主要集中于番茄等茄科植物中(Wang et al., 2010)。(2) VIGS 很少能完全抑制一个目标基因的表达,对某些基因,特别是多基因家族基因,VIGS 虽然能抑制部分转录本,但还有部分转录本能产生大量功能蛋白,从而表现出相应性状(Zheng et al., 2010)。(3) VIGS 可能沉默高度同源的非靶基因,因此,若只需要沉默某一特异基因,需要知道该基因的完整序列。(4)遗传不稳定,当前 VIGS 主要应用于当代,难以用于应用研究和用于植物苗期早期基因表达的研究。而且 VIGS 技术重复性差,在不同时间点、不同实验、不同植株中,实验结果差异比较大(Zheng et al., 2010)。

#### 6 展望

当前,植物分子生物学已经进入后基因组时代,随着基因芯片技术,转录组测序技术的大规模发展使植物功能基因组学研究成为植物分子生物学热点。VIGS 技术凭借其快速、简单和高效的特点,逐渐成为植物基因功能研究和高通量功能基因组学的强有力的工具,但由于当前 VIGS 技术的局限性,必须突破现有技术基础。首先,在 VIGS 载体上,需开发更多载体,建立适合更多寄主范围并使用高通量分析的 VIGS 体系,特别是建立适合水稻、玉米、油菜、小

麦等重要粮食作物的 VIGS 体系。其次,开发新的无毒害、直观的筛选标记,建立适合植物早期发育研究的 VIGS 体系。再次,提高沉默靶基因的特异性和有效性。从而使 VIGS 技术更加广泛应用于植物功能基因研究。

#### 作者贡献

李小龙完成综述的主要框架;许本波完成主要修改任务;其他相关作者完成审阅并提出修改意见。

#### 致谢

感谢“863”计划项目“强优势油菜杂交种的创制与应用”(2011AA10A104)的课题支撑;感谢加州大学戴维斯分校的 Caizhong Jiang 教授对从事 VIGS 研究工作的指导。

#### 参考文献

- Angell S.M., and Baulcombe D.C., 1997, Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA, *EMBO J.*, 16(12): 3675-3684
- Bachan S., and Dinesh-Kumar S.P., 2012, Tobacco rattle virus (TRV)-based virus-induced gene silencing, *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 894: 83-92
- Burch-Smith T.M., Anderson J.C., Martin G.B., and Dinesh-Kumar S.P., 2004, Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants, *The Plant Journal*, 39(5): 734-746
- Burch-Smith T.M., Schiff M., Liu Y., and Dinesh-Kumar S.P., 2006, Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 142(1): 21-27
- Cai X., Wang C., Xu Y., Xu Q., Zheng Z., and Zhou X., 2007, Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector, *Virus Research*, 125(2): 169-175
- Chen J.C., Jiang C.Z., and Reid M.S., 2005, Silencing a prohibitin alters plant development and senescence, *Plant J.*, 44(1): 16-24
- Chen J.C., Jiang C.Z., Gookin T.E., Hunter D.A., Clark D.G., and Reid M.S., 2004, Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence, *Plant Molecular Biology*, 55(4): 521-530
- Fofana I.B., Sangaré A., Collier R., Taylor C., and Fauquet C.M., 2004, A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava, *Plant Molecular Biology*, 56(4): 613-624
- Gosselé V., Faché I., Meulewaeter F., Cornelissen M., and Metzlauff M., 2002, SVISS-a novel transient gene silencing sys-

- tem for gene function discovery and validation in tobacco plants, *The Plant Journal*, 32(5): 859-866
- Guo Y., Huang C., Xie Y., Song F., and Zhou X., 2010, A tomato glutaredoxin gene SIGRX1 regulates plant responses to oxidative, drought and salt stresses, *Planta*, 232(6): 1499-1509
- Ho F.I., Chen Y.Y., Lin Y.M., Cheng C.P., and Wang J.F., 2009, A tobacco rattle virus-induced gene silencing system for a soil-borne vascular pathogen *Ralstonia solanacearum*, *Botanical Studies*, 50: 413-424
- Kjemtrup S., Sampson K.S., Peele C.G., Nguyen L.V., Conkling M.A., Thompson W.F., and Robertson D., 1998, Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus, *The Plant Journal*, 14(1): 91-100
- Kramer E.M., Holappa L., Gould B., Jaramillo M.A., Setnikov D., and Santiago P.M., 2007, Elaboration of B gene function to include the identity of novel floral organs in the lower eudicot *Aquilegia*, *Plant Cell*, 19(3): 750-766
- Kumagai M.H., Donson J., della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K., and Grill L.K., 1995, Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(5): 1679-1683
- Liu Y.L., Schiff M., and Dinesh-Kumar S.P., 2002, Virus-induced gene silencing in tomato, *Plant Journal*, 31(6): 777-786
- Maimbo M., Ohnishi K., Hikichi Y., Yoshioka H., and Kiba A., 2010, S-glycoprotein-like protein regulates defense responses in *Nicotiana* plants against *Ralstonia solanacearum*, *Plant Physiol.*, 152(4): 2023-2035
- Orzaez D., Medina A., Torre S., Fernandez-Moreno J.P., Rambla J.L., Fernandez-Del-Carmen A., Butelli E., Martin C., and Granell A., 2009, A visual reporter system for virus-induced gene silencing in tomato fruit based on anthocyanin accumulation, *Plant Physiol.*, 150(3): 1122-1134
- Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M., and Baulcombe D.C., 2001, Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing, *Plant Journal*, 25(2): 237-245
- Re D.A., Dezar C.A., Chan R.L., Baldwin I.T., and Bonaventure G., 2011, *Nicotiana attenuata* NaHD20 plays a role in leaf ABA accumulation during water stress, benzylacetone emission from flowers, and the timing of bolting and flower transitions, *J. Exp. Bot.*, 62: 155-166
- Scofield S.R., Huang L., Brandt A.S., and Gill B.S., 2005, Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway, *Plant Physiology*, 138(4): 2165-2173
- Turnage M.A., Muangsan N., Peele C.G., and Robertson D., 2002, Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*, *The Plant Journal*, 30(1): 107-114
- Voinnet O., 2001, RNA silencing as a plant immune system against viruses, *Trends in Genetics*, 17: 449-459
- Wang C.C., Cai X.Z., Wang X.M., and Zheng Z., 2006, Optimization of tobacco rattle virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*, *Functional Plant Biology*, 33: 347-355
- Wang X., Cao A., Yu C., Wang D., Wang X., and Chen P., 2010, Establishment of an effective virus induced gene silencing system with BSMV in *Haynaldia villosa*, *Molecular Biology Reports*, 37(2): 967-972
- Wu C., Jia L., and Goggin F., 2011, The reliability of virus-induced gene silencing experiments using tobacco rattle virus in tomato is influenced by the size of the vector control, *Molecular Plant Pathology*, 12(3): 299-305
- Yamanouchi U., Yano M., Lin H., Ashikari M., and Yamada K., 2002, A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(11): 7530-7535
- Zheng S.J., Snoeren T.A., Hogewoning S.W., van Loon J.J., and Dicke M., 2010, Disruption of plant carotenoid biosynthesis through virus-induced gene silencing affects oviposition behaviour of the butterfly *Pieris rapae*, *New Phytologist*, 186(3): 733-745