

*C. elegans*中*dyn-1*基因对寿命和发育的影响

曹 蕾 杨玉荣*

(厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要 细胞极性对于细胞的多样性起着很重要的作用。发动蛋白是一个大的GTP酶, 作用于胞吞作用和肌动蛋白的动力学过程。*C. elegans*中发动蛋白的同源基因*dyn-1*起着维持早期细胞极性的功能。我们对*C. elegans*中*dyn-1*基因进行了克隆, 并构建到表达载体和RNAi载体中。经IPTG诱导表达得到了约90 kDa的DYN-1融合蛋白。同时, 利用RNAi方法研究了*dyn-1*基因沉默后对三种线虫虫株N2、*daf-2(e1370)*和*daf-16(e1038)*寿命的影响。*C. elegans*在喂食*dyn-1* RNAi食物后寿命明显缩短, 也会导致严重的不育和胚胎致死。

关键词 *C. elegans*; 细胞极性; 发动蛋白

细胞极性是一个十分保守的过程, 它在细胞分化、细胞迁移以及胚胎发育过程中都起着十分重要的作用^[1]。*C. elegans*的卵子在受精之后, 单细胞胚胎很快发生极化。发动蛋白dynamin在细胞极性形成的过程中起着十分重要的作用, 并且在其他极性相关的PAR蛋白的维持中起着很重要的作用^[2]。在之前的报道中, DYN-1b-GFP转基因菌株(可以完整表达带荧光标记的DYN-1蛋白)的实验结果显示, DYN-1b-GFP分布于前皮质中以及新形成的沟膜部位, 它标识着内源DYN-1的分布^[3]。研究中也发现, DYN-1在*C. elegans*的胚胎发育过程中通过保持前部极性因子从而起着维持前部细胞极性的功能^[4]。DYN-1-GFP在前皮质中富集并通过PAR-6和PKC-3来维持^[5]。在极性维持阶段单细胞胚胎前端进行包吞作用, *dyn-1*经RNAi后胚胎前端的胞吞作用会被阻断, 并且这些胚胎也无法维持之前构建起来的PAR蛋白的不对称分布^[6-7]。由于DYN-1对细胞极性蛋白的表达和定位起着关键性的作用, 而极性基因*par-5*与寿命有关, 极性基因之间又互相作用, 我们猜想, 可能*dyn-1*会对*C. elegans*的寿命有影响。因此, 我们希望通过*dyn-1* RNAi抑制和表型观察来研究*dyn-1*对线虫寿命和发育的影响。

在线虫寿命的调控中, 类胰岛素(IGF-1)信号途径起了很重要的作用^[8-9], 其中*daf*(dauer formation)基因*daf-2*编码一个类胰岛素受体, 调节内分泌信号, 同时调节线虫的一种选择性发育状态dauer的形成。*daf-2*基因突变以后会使线虫的寿命显著延长, 而*daf-16*编码一个叉头蛋白转录因子, 是类胰岛素途

径中主要的靶目标, *daf-16*的突变使线虫寿命缩短^[10-11]。我们采用这两种突变型虫株作为研究对象, 同时以野生型N2作为参照, 发现*dyn-1*经RNAi后会显著减少三种虫株的寿命。RNAi是一种进化上保守的遗传调控机制, 它对特定序列的靶基因进行转录后下调。RNAi现象首先由Fire等^[12]在*C. elegans*中被描述出来, 人们发现将双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)导入到细胞中后可在特定的生物系统中使内源基因的功能被干扰。即通过dsRNA介导相应基因内源的mRNA的降解, 从而使该基因潜在地或特异地失活。这一技术可快速产生基因特异的功能缺失型或亚等位基因表型, 而且干扰效应还会出现在被干扰动物的后代中。因为RNAi抑制导致了有效、特异且持久的干扰效果, 而且在使线虫基因失活上RNAi是最简单和快速的方法, 它已作为一种反向遗传学的工具快速地用来研究特定基因的功能^[13]。

RNAi的原理是, 当dsRNA或具有相同结构的RNA出现在细胞中时, 一种被称为Dicer的核酸内切酶会识别这一分子并把dsRNA切成更小的RNA片段(siRNAs)。具有多个亚基的核蛋白复合物RISC(RNA-induced silencing complex)结合其中一个siRNA, RISC通过扫描机制鉴定出靶目标mRNA所含有的与siRNA互补的序列, 随后RISC用自身的核酸内切酶和核酸外切酶将mRNA降解。降解产生的siRNA可以循环使用使得有更多互补的siRNA与靶目标

收稿日期: 2012-02-22 接受日期: 2012-05-14

国家自然科学基金(No.30370695, No.30972181)资助项目

*通讯作者。Tel: 0592-2181792, E-mail: yryang@xmu.edu.cn

mRNA结合^[14]。介导RNAi的方法有很多种,如合成的dsRNA介导RNAi,载体介导的RNAi以及在RNAi载体中利用启动子介导RNAi等^[15]。有研究表明,喂食RNAi干扰菌与注射dsRNA的效应一样,都会造成缺陷的胚胎表型,而且喂食的方法对不育以及胚后发育的表型更有效^[13]。本文采用的方法是构建RNAi载体,转到特定的大肠杆菌后制备成干扰菌,以喂食的方法进行干扰。其中构建RNAi所使用的L4440载体具有T7双启动子,分别在插入基因片段的两端,在IPTG的诱导下可以产生dsRNA^[7],从而达到沉默该基因的效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验中所用到的虫株分别是野生型N2、突变体*daf-2(e1370)*和*daf-16(e1038)*,由Caenorhabditis Genetics Center提供,本实验室保存。根据线虫培养的标准方法,配置NGM培养基,以大肠杆菌OP50为食物在15℃恒温培养箱中进行培养。实验所使用的菌株*E. coli* DH5 α 、HT115以及质粒L4440由本实验室保存。pMD-18T载体载体购买于TaKaRa公司。

1.2 试剂药品

实验中所用的dNTP、PCR缓冲液、Taq酶、限制性内切酶、核酸分子量标准GeneRuler DNA Ladder Mixture、反转试剂盒购于TaKaRa公司;其它试剂均为国产分析纯产品;引物*dyn-1F*(5'-CGC GGA TCC GGT CAT CGC TTT GTG GAT T-3')和*dyn-1R*(5'-CCG GAA TTC TTA GCG CTT CTG GGC TTC TAT-3')由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 *C. elegans*总RNA的提取及反转录 将培养好的*C. elegans*挑置1.5 mL离心管中,约50 μ L,加1 mL Trizol试剂研磨,按试剂盒说明书操作,用1%的琼脂糖凝胶中电泳验证。以*C. elegans*总RNA为模板进行的反转录,反应体系如下:总RNA 9 μ L(约900 ng),Oligo(dT, 0.5 μ g/ μ L) 1 μ L, DEPC水2 μ L,混合后于70℃孵育5 min后置于冰上,在混合物中加入5 $\times$ Reaction Buffer 4 μ L, 10 mmol/L dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 2 μ L, RNase Inhibitor(20 U/ μ L) 1 μ L,混匀后在37℃反应5 min,置冰上;再继续加入Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H-) 1 μ L,总体积为20 μ L, 42℃ 90 min,反应完成后于-20℃保存。

1.3.2 *C. elegans*中*dyn-1*基因的cDNA扩增和克隆 *dyn-1*的cDNA扩增体系如下: cDNA模板2 μ L, PCR mixture(10 $\times$ buffer, 2 mmol/L dNTP, 25 mmol/L MgCl₂以2:1:1比例混合) 10 μ L, 引物*dyn-1F*(20 μ g/ μ L) 2.5 μ L, *dyn-1R*(20 μ g/ μ L) 2.5 μ L, Taq酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 32.75 μ L, 总体积50 μ L。反应如下: ①95℃ 5 min; ②95℃ 30 s, 50.6℃ 35 s, 72℃ 2 min; 40 cycles; ③72℃ 8 min; ④保持在4℃。取5 μ L PCR产物电泳检查扩增结果,将其余的目的条带电泳分离切胶回收。将*dyn-1* cDNA PCR回收产物7 μ L、pMD18-T载体0.25 μ L、连接buffer 2.5 μ L, 16℃连接14 h。取连接产物转化入*E. coli* DH5 α 感受态细菌中,冰上放置30 min, 42℃水浴90 s,冰上放置1~2 min,加150 μ L的LB液体培养基于37℃摇床缓慢摇45 min,含Amp的LB平板,37℃培养过夜。在平板上挑取单菌落,PCR筛选阳性克隆。碱裂解法进行质粒提取,*EcoR* I和*Bam* H I双酶切验证后送去上海英俊公司测序。酶切体系: *dyn-1*-pMD质粒10 μ L、*EcoR* I 0.5 μ L、*Bam* H I 0.5 μ L、10 $\times$ Tango buffer 4 μ L,加水5 μ L至总体积20 μ L,酶切过夜。

1.3.3 表达载体的构建及表达 将测序正确且方向正置的*dyn-1*-pMD质粒以及pET-32a载体同时进行双酶切(*EcoR* I/*Bam* H I), 37℃酶切过夜,电泳分离目的条带并进行胶回收后连接二者,体系为:回收片段7.5 μ L、pET-32a回收产物0.5 μ L、T4 ligase 1 μ L、T4 ligase buffer 1 μ L, 16℃连接过夜。转化入50 uL大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,提取质粒、酶切、PCR鉴定。将鉴定正确的pET32a-*dyn-1*质粒转化入50 uL大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,提取质粒、酶切验证后送去测序。将含有测序正确的阳性菌涂布于含氨苄青霉素50 μ g/mL的LB平板上, 37℃培养过夜。次日,挑单菌落培养,当 D_{550} 接近0.6时,转入大瓶培养基中,至 D_{550} 接近0.8时,加入IPTG至终浓度1 mmol/L,在25℃培养6 h,收菌。用1 $\times$ 上样缓冲液裂解,沸水中煮5 min。10 000 r/min离心1 min,搜集上层菌液裂解液进行SDS-PAGE电泳分析。

1.3.4 干扰载体的构建 我们采取Andrew Fire实验室的双T7 promoter载体进行RNA干扰载体的构建。将测序正确的含有基因片段的质粒与L4440载体同时进行双酶切(*EcoR* I/*Bam* H I), 37℃酶切过夜,电泳分离目的条带后胶回收片段。将二者连接,连接体系:回收片段7.5 μ L、L4440回收产物0.5 μ L、

T4 ligase 1 μ L、T4 ligase buffer 1 μ L, 16 $^{\circ}$ C连接过夜。转化入50 μ L大肠杆菌HT115感受态细胞,制成干扰食物,同时提取质粒,酶切鉴定正确后,送去测序。

1.3.5 RNA干扰方法及寿命分析 用裂解液处理 *C. elegans* 怀卵成虫,将卵移至加有干扰菌的含100 mg/mL FU(氟尿嘧啶)、50 mg/mL氨苄青霉素以及1 mmol/mL IPTG的NGM平板上。25 $^{\circ}$ C培养到L4幼虫时,将虫子挑到新的含有干扰菌的平板上,每个板60或80条虫,各做三个平行组,放于25 $^{\circ}$ C恒温箱中培养,每天统计死亡数目。以喂食含L4440空载体的HT115(L4440)细菌的线虫作为对照。用SPSS软件进行数据处理和P值分析,用Excel制图。

1.3.6 产卵量及孵化率的统计 用同步化方法处理成虫,将所得卵移至NGM平板上,用OP50喂食,在25 $^{\circ}$ C培养箱中培养,当线虫进入L4期后转移至加有干扰菌的含100 mg/mL FU、50 mg/mL氨苄青霉素以及1 mmol/mL IPTG的NGM平板上,各做三个平行组,放于25 $^{\circ}$ C恒温箱中培养。每天将虫子转移到新板上,在产卵高峰期2~4 h转板一次,并统计旧板上的产卵数。孵化数的统计是在此基础上,统计孵化成为幼虫的数目。同时以喂食含L4440空载体的HT115(L4440)细菌的线虫作为对照。

2 结果

2.1 *dyn-1*基因的克隆

用Trizol试剂按说明书提取 *C. elegans* N2总RNA,

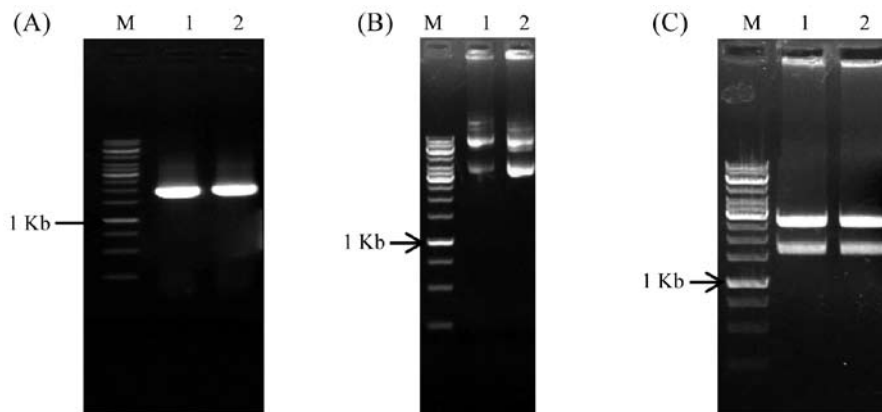
电泳结果发现有3条主带,分别为28S rRNA、18S rRNA和5S rRNA,带型清晰完整说明RNA没有降解,可以进行反转录反应和RT-PCR扩增。随后用反转录得到的cDNA进行PCR扩增,得到2 000 bp左右的*dyn-1*片段(图1)。将得到的目的片段连接到pMD-18T载体上,酶切验证,经测序和Blast比对确定为 *C. elegans* 的*dyn-1*基因全长cDNA。将测序的*dyn-1* cDNA序列进行分析,结果显示:我们所得到的*dyn-1* cDNA序列长度为1 955 bp,起始密码子位于235-237碱基处,约表达了610个氨基酸。下划线处为引物和起密码子(图2)。

2.2 DYN-1蛋白的表达

将*dyn-1*-pMD与Pet-32a载体同时进行双酶切,回收片段后用T4连接酶进行连接并转化,挑选阳性克隆,摇菌提质粒酶切验证(图3),结果与连进去的片段大小一致,测序结果正确。将重组质粒转入BL21(DE3)中,在IPTG诱导下表达出90 kDa左右的融合蛋白(图4)。

2.3 *dyn-1* RNAi干扰载体的构建以及RNA干扰效果的考察

将*dyn-1*构建到L4440干扰载体上,酶切验证及测序结果正确后(图5)转化至HT115感受态细菌中制备成干扰菌喂食N2,同时以喂食含L4440空载体的HT115菌做为对照组,我们收集实验组和对照组的虫体蛋白,利用Western blot检测对虫体的干扰效果(图6),可以发现相比对照组,经RNAi组的DYN-1蛋



A: *dyn-1* cDNA PCR片段; B: *dyn-1*-pMD质粒; C: *dyn-1*-pMD质粒酶切(*EcoR* I/*Bam* H I); M: GeneRuler DNA梯状混合。

A: amplification of *C. elegans dyn-1* cDNA; B: construct of *dyn-1*-pMD plasmid; C: *dyn-1*-pMD digestion with *EcoR* I and *Bam* H I; M: GeneRuler DNA ladder mixture.

图1 *dyn-1*的扩增以及*dyn-1*-pMD载体的构建

Fig.1 Amplification of *C. elegans dyn-1* cDNA and construct of *dyn-1*-pMD plasmid

```

1    CATGCCTGC AGGTCGACG ATTGGTCAT CGCTTTGTG GATTTTGAT GCAGTTCGG AAAAGAGATT GAGGATGAG
73   ACTGATCGT GTCACCTGGA CAGAATAAG GGAATCAGT CCACATCCA ATCAACTTG CGTGTCTTT TCTCCAAAT
145  GTTCTAAAT CTGACACTC ATCGATTTG CCCGGTCTC ACAAAGGTG CCCGTCGGA GATCAACCA GCAGATATT
217  GAGCAACAG ATCCGTGAC ATGATTCTC ACATTTCAT AACCGTGAG ACTTGCTC ATTCTTGCC GTCATCCG
      M I L T F I N R E T C L I L A V T P
289  GCCAACAGC GATCTCGCC ACTTCGGAT GCGTTGAAA CTTGCGAAG GAAATCGAT CCACAGGGT CTTGCGCAG
      A N S D L A T S D A L K L A K E V D P Q G L R T
361  ATTGGAGTC CTCACCAAA CTTGACTTG ATGGACGAG GGAACCGAT GCTCGCGAG ATCCTCGAG AACCAAGCTG
      I G V L T K L D L M D E G T D A R E I L E N K L
433  TTCACACTT CGTCGTGGC TACGTGGA GTTGTCAT CGTGGGCAG AAGGATATT GTCGTGCGC AAGGATATT
      F T L R R G Y V G V V N R G Q K D I V G R K D I
505  AGAGCTGCT TTGGACGCC GAGAGAAAG TTCTTCATC TCACACCCA TCCTACCGA CATATGGCT GATCGGTTG
      R A A L D A E R K F F I S H P S Y R H M A D R L
577  GGAACAAGC TACCTTCAA CACACTCCT AATCAACAG CTCACCAAT CATATCCGT GATACACTG CCAACACTT
      G T S Y L Q H T P N Q Q L T N H I R D T L P T L
649  CGTGATAGT CTTCAAAAG AAGATGTTT GCTATGGA AAGGATGTG GCCGAGTAC AAGAAGTAC CAGCCAAAT
      R D S L Q K K M F A M E K D V A E Y K N Y L P N
721  GATCCAGGC CGCAAGACC AAGGCTCTT TTGCAATG GTTACCCAG TTCAATGCT GACATTGAG CGCTCCATT
      D P G R K T K A L L Q M V T Q F N A D I E R S I
793  GAAGGTTCC TCTGCAAA GCTGGTTCA ACCAATGAG CTCAGTGGA GGAGCCCGT ATCAATCGG CTTTTCAT
      E G S S A K L V S T N E L S G G A R I N R L F H
865  GAGCGTTTC CCATTGAG ATTGTTAAA ATGGAATTG ACGAGAAAG AAATGCGCA AAGAAATCC AGTATGCCA
      E R F P F E I V K M E L T R K K C A K K S S M P
937  TCAGAAACA TTCACGGTA TCCGCGTCG GTCTCTTCA CTCGGATAT GCGCTCTTC ACTCCGGAT ATGGCGTTT
      S E T F T V S A S V S L G Y A L F T P D M A F
1009 GAGGCAATT GCCAAAAAG CAAATCACC CGTCTGAAG GAGCCATCG TTGAAATGC GTTGATCTG GTGGTCAAC
      E A I A K K Q I T R L K E P S L K C V D L V V N
1081 GAGTTGGCT AATGTGATC AGACAGTGC GCTGACACT ATGGCTAGA TATCCACGT CTTGCTGAC GAGCTGGAA
      E L A N V I R Q C A D T M A R Y P R L R D E L E
1153 AGAATCGTC GTCTCGCAT ATGCGTGAA CGTGAGCAA ATTGCCAAG CAGCAAATT GGGCTCATT GTTGACTAC
      R I V V S H M R E R E Q I A K Q Q I G L I V D Y
1225 GAACTCGCT TATATGAAC ACAAACCAT GAGGATTTC ATTGGATTC AGCAATGCT GAAGCAAAA GCCTCCCAA
      E L A Y M N T N H E D F I G F S N A E A K A S Q
1297 GGACAATCA GCGAAGAAG AATCTTGA AACCAGGTG ATCAGAAA GGTGGGCTC TCACTGAGC AACGTATCG
      G Q S A K K N L G N Q V I R K G W L S L S N V S
1369 TTTGTGCGT GGCTCCAAG GACAATTGG TTTGTGCTC ATGTCGGAC AGTTTGAGT TGGTACAAA GATGATGAG
      F V R G S K D N W F V L M S D S L S W Y K D D E
1441 GAGAAGGAG AAGAAGTAC ATGCTCCCA TTGGATGGT GTCAAGCTG AAGGATATT GAGGGTGA TTTATGTCT
      E K E K K Y M L P L D G V K L K D I E G G F M S
1513 CGTAACCAC AAGTTTGCT CTGTTCTAC CCCGACGGA AAGAATC TACAAGGAT TACAAGCAG CTTGAGTTG
      R N H K F A L F Y P D G K N I Y K D Y L E L
1585 GGATGCACC AATTTGGAC GAAATTGAT GCGTGGAAG GCTTCATTC TTGCGTGCT GGTGTCTAT CCAGAAAAG
      G C T N L D E I D A W K A S F L R A G V Y P E K
1657 CAGAAGGCA CAGGAAGAT GAGTCCCAA CAAGAGATG GAGGATACC TCGATTGAT CCACAACCT GAGAGACAG
      Q K A Q E D E S Q Q E M E D T S I D P Q L E R Q
1729 GTGGAGACA ATCCGTAAT TTGGTTGAT TCCTACATG AGAATCATT ACCAAGACA ATTAAGGAC CTGGTTCCA
      V E T I R N L V D S Y M R I I T K T I K D L V P
1801 AAGGCGGTG ATGCATTG ATTGTTAAC CAGACAGGT GAGTTCATG AAAGATGAA CTTTGGCC CATCTCTAC
      K A V M H L I V N Q T G E F M K D E L L A H L Y
1873 CAATGCGGC GACACTGAT GCTCTCATG GAGGAATCT CAAATAGAA GCCCAGAA CGAATCTCT AGAGGATCC
      Q C G D T D A L M E E S Q I E A Q K R I S R G S
1945 CCGGGTACC GA
      P G T

```

图2 *dyn-1* cDNA编码蛋白的氨基酸序列Fig.2 The deduced protein sequence of *dyn-1* cDNA

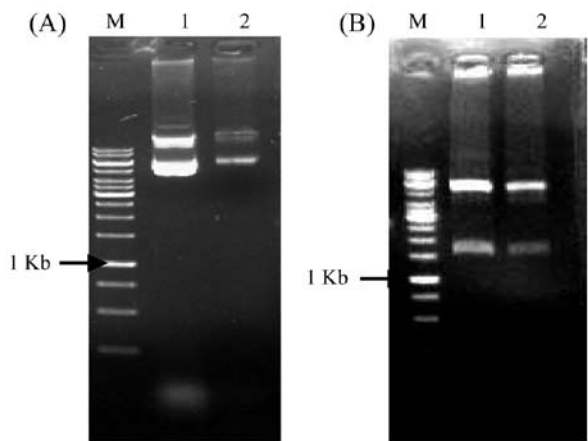
白的表达水平显著减少,证明确实起到了RNA干扰的效果。

2.4 采用RNA干扰观察 *dyn-1*对 *C. elegans*寿命、产卵和发育的影响

将*dyn-1* RNA干扰菌喂食N2、*daf-2(e1370)*和*daf-16(e1038)*三种虫株,同时以喂食含L4440空载体的HT115菌做为对照组,在25℃恒温箱中培养观察该基因干扰后对线虫寿命的影响。实验结果发现,

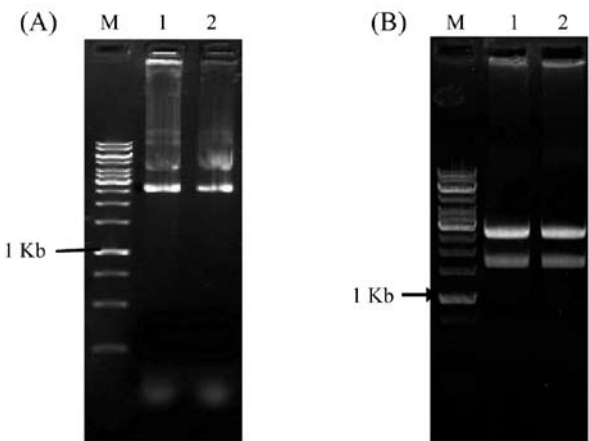
N2、*daf-2(e1370)*以及*daf-16(e1038)*经RNAi后虫体的平均寿命显著缩短(差异极显著,表1和图7)。

为了进一步验证*dyn-1*对*C. elegans*生殖的影响,我们对5条野生型线虫N2喂食*dyn-1* RNAi干扰菌,统计其产卵量及孵化率的变化。结果发现,*dyn-1*干扰之后5条虫子的平均产卵量只有40个,而喂食空白载体的对照组有180个,干扰后虫体产卵量大大降低,而且经*dyn-1*干扰所产的卵,只有32.4%能孵化成幼



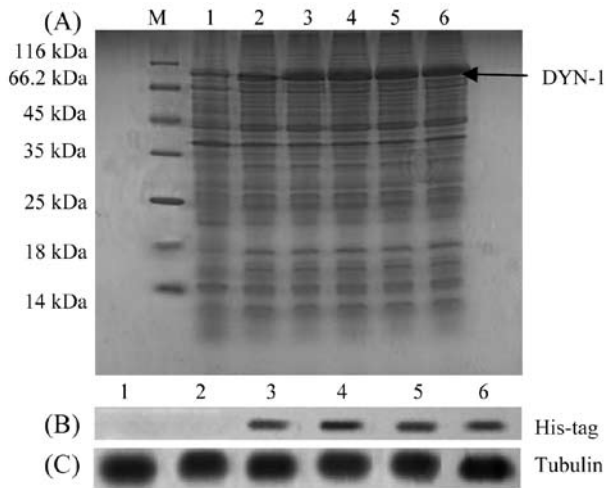
A: *dyn-1*-pET质粒; B: *dyn-1*-pET质粒酶切(*EcoR* I/*Bam*H I); M: GeneRuler DNA梯状混合。
A: construct of *dyn-1*-pET plasmid; B: *dyn-1*-pET digestion with *EcoR* I and *Bam*H I; M: GeneRuler DNA ladder mixture.

图3 *dyn-1*-pET 载体的构建
Fig.3 Construct of *dyn-1*-pET plasmid

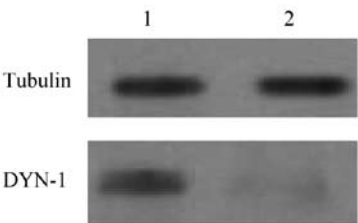


A: *dyn-1*-L4440质粒构建; B: *dyn-1*-L4440质粒酶切(*EcoR* I/*Bam*H I); M: GeneRuler DNA梯状混合。
A: construct of *dyn-1*-L4440 plasmid; B: *dyn-1*-L4440 digestion with *EcoR* I and *Bam*H I; M: GeneRuler DNA ladder mixture.

图5 *dyn-1*-L4440载体的构建
Fig.5 Construct of *dyn-1*-L4440 plasmid



1: BL空菌; 2-6: 含有*dyn-1*-pET质粒的BL21菌分别以0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 mmol/L IPTG在37 °C诱导4 h; M: marker。
1: control; 2-6: expression of DYN-1 with IPTG induced in 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 mmol/L at 37 °C for 4 h; M: protein standard marker。
图4 DYN-1重组蛋白的诱导表达及Western blot检测
Fig.4 The expression of DYN-1 and analyze by Western blot

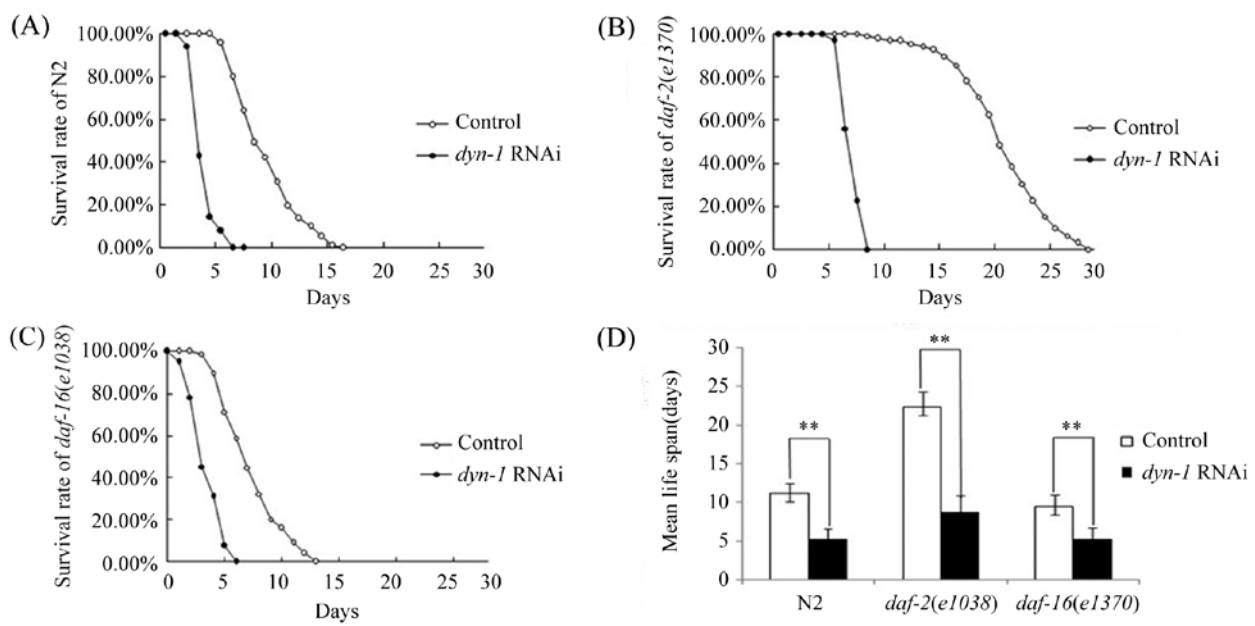


1: N2喂食空载体转化菌; 2: N2经*dyn-1*(RNAi)。
1: N2 control; 2: N2 by *dyn-1*-RNAi。
图6 Western blot检测*dyn-1* RNAi干扰效果
Fig.6 The effect of *dyn-1* RNAi by Western blot

虫, 说明对孵化率产生了很大的影响(表2)。
为了进一步研究*dyn-1*的功能, 我们将裂解之后的卵分别接种到*dyn-1*干扰平板和含空白载体菌的平板, 对虫体进行活体实时观察, 结果见图8。实验发现, 含有*dyn-1* RNAi食物的平板上只有很少虫卵

表1 三种虫株喂食*dyn-1*-L4440干扰菌后在25 °C下平均寿命(天)等数据统计
Table 1 Statistics of three strains fed *dyn-1*-L4440 interference bacteria at 25 °C

基因型	RNAi处理	有效数/观察数	次数	平均寿命	P值vs对照
Gene type	RNAi treatment	Availability/Total	Trial	Mean lifespan	P value vs control
N2	Control	169/180	3	11.124±0.216	**P<0.001
	<i>dyn-1</i> RNAi	163/180	3	5.337±0.098	
<i>daf-2(e1370)</i>	Control	167/180	3	22.298±0.316	**P<0.001
	<i>dyn-1</i> RNAi	165/180	3	8.747±0.065	
<i>daf-16(e1038)</i>	Control	166/180	3	9.455±0.198	**P<0.001
	<i>dyn-1</i> RNAi	171/180	3	5.236±0.204	



A: *N2*在*dyn-1* RNAi后25 °C下的生存曲线; B: *daf-2(e1370)*在*dyn-1* RNAi后25 °C下的生存曲线; C: *daf-16(e1038)*在*dyn-1* RNAi后25 °C下的生存曲线; D: *N2*、*daf-2(e1370)*、*daf-16(e1038)*在*dyn-1* RNAi后的平均寿命。
A: survival rate of *N2* by *dyn-1* RNAi at 25 °C; B: survival rate of *daf-2(e1370)* by *dyn-1* RNAi at 25 °C; C: survival rate of *daf-16(e1038)* by *dyn-1* RNAi at 25 °C; D: mean lifespan of *N2*, *daf-2(e1370)*, *daf-16(e1038)* by *dyn-1* RNAi at 25 °C.

图7 三种虫株*N2*、*daf-2(e1370)*、*daf-16(e1038)*经*dyn-1* RNAi后在25 °C下寿命曲线及平均寿命
Fig.7 Survival rate and mean lifespan of *N2*, *daf-2(e1370)* and *daf-16(e1038)* by *dyn-1* RNAi at 25 °C

表2 *dyn-1* RNAi对*N2*产卵量及孵化率统计
Table 2 Statistics of egg laying and hatching rate in *dyn-1*(RNAi) worm

RNAi处理	平均卵数/5条	孵化率/5条
RNAi treatment	Mean fecundity/5	Hatching rate/5
Control	182	100%
<i>dyn-1</i> RNAi	40	32.4%

可以孵化成幼虫, 而且孵化出来的幼虫并不能如正常的虫体一样发育到成虫。在56 h时, 喂食空载体食物的虫子已经开始产卵了, 但是*dyn-1*经RNAi后的虫体有一部分已经开始死亡了。到80 h时, 正常虫体产的卵已经发育成幼虫, 而*dyn-1* RNAi下的虫体已经全部死亡了。

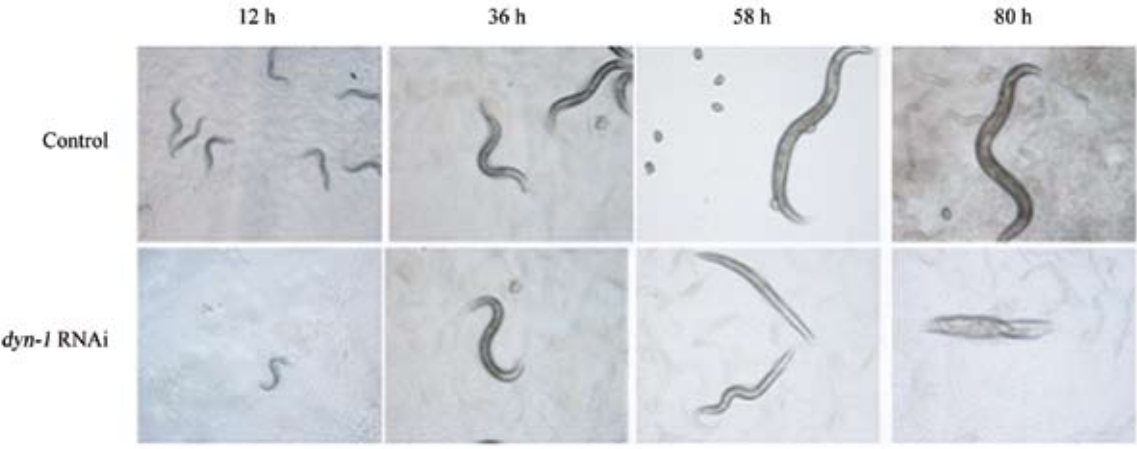
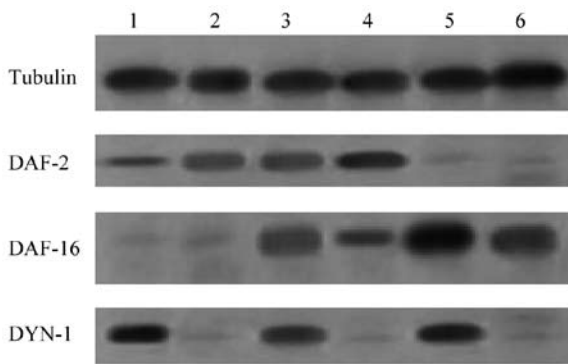


图8 实时观察*dyn-1* RNAi下*N2*的发育
Fig.8 Real-time observation of *N2* in *dyn-1* RNAi at 25 °C

2.5 *dyn-1*影响寿命的机制探讨

在线虫寿命调控中, 类胰岛素(IGF-1)信号途径中*daf-2*和*daf-16*基因起着十分关键的作用^[8-9], 为了进一步探讨DYN-1显著缩短寿命的机制, 我们利用表达纯化的重组蛋白免疫小鼠得到抗DYN-1的抗体。利用DAF-2、DAF-16以及DYN-1的抗体对N2、*daf-2(e1370)*、*daf-16(e1038)*突变株以及*dyn-1*干扰虫株的虫体进行Western blot实验。实验前对各种蛋白利用DAB试剂盒测定蛋白浓度, 根据浓度确定其上样量确保上样量一致。

实验结果发现, 在*dyn-1*经RNAi之后的虫株中DAF-2的表达量增加, 而DAF-16的表达量下降(图9)。如引言所述, 线虫的寿命调控机制中, *daf-2*基因的突变会使线虫寿命延长, 而*daf-16*的突变使线虫寿命缩短^[10-11], 可以发现*dyn-1*经RNAi后, DAF-2在*daf-16*突变体和N2的RNA干扰的虫体中表达量明显增加, 而DAF-16的表达量则在*dyn-1*经RNAi后的*daf-2*突变体和N2中降低。因此, 在三种虫体中*dyn-1*经RNAi后寿命的减少是由于这两种蛋白表达的改变直接导致的。



1: *daf-16(e1038)*; 2: *daf-16(e1038)*经*dyn-1* RNAi; 3: N2; 4: N2经*dyn-1* RNAi; 5: *daf-2(e1370)*; 6: *daf-2(e1370)*经*dyn-1* RNAi。

1: *daf-16(e1038)*; 2: *daf-16(e1038)* by *dyn-1* RNAi; 3: N2; 4: N2 by *dyn-1* RNAi; 5: *daf-2(e1370)*; 6: *daf-2(e1370)* by *dyn-1* RNAi。

图9 Western blot检测DYN-1与其他蛋白的相互作用

Fig.9 The interaction of DYN-1 with other proteins by Western blot

3 讨论

发动蛋白dynammin是一个大的GTP酶, 它参与了众多的细胞学进程, 例如网格蛋白介导的胞吞作用、膜的重建、动力蛋白的募集以及动力蛋白介导的囊泡运动^[2,16]。一些发动蛋白的同源染色体以及亚型

在形成细胞不平衡性以及这些相关因素相互作用的过程中发挥作用。胚胎细胞极性的维持对于胚胎的发育起着关键的作用, 因此*dyn-1*对*C. elegans*的胚胎发育和寿命具有很大的影响^[17-18]。我们根据*C. elegans*中*dyn-1*的序列设计引物, 克隆得到正确的*dyn-1*, 并成功构建到表达载体和干扰载体上, 诱导表达出DYN-1融合蛋白, 大小与根据序列预测的一致, 得到蛋白后免疫小鼠获得抗体, 继而进行后续的实验。另外, 我们还利用RNAi技术研究了RNAi下调*dyn-1*对*C. elegans*寿命、产卵以及发育形态进行的影响。

RNAi对寿命以及产卵的研究发现, *dyn-1*经RNAi下调后对寿命、产卵量产生十分明显的影响。寿命试验中, 我们除了对野生型N2进行RNAi下调*dyn-1*的表达后, 发现其寿命显著缩短, 为了进一步验证这种缩短是否通过DAF-2途径, 我们选用两种突变株*daf-2(e1370)*和*daf-16(e1038)*进行相同的通过RNAi抑制*dyn-1*的表达, 结果发现两种突变体经RNAi下调*dyn-1*后都有着与野生型类似的寿命显著缩短。在产卵量的观察中我们发现, 野生型N2经RNAi抑制*dyn-1*后虫体产卵能力显著降低, 并且所产的卵很难发育成成虫。我们对这些*dyn-1*经RNAi后的虫体进行实时的观察, 以正常的喂食含有L4440的HT115菌为对照, 发现这些RNAi后的虫体产生的虫卵孵化后不能发育为成虫。

本文的成果主要在于成功地克隆了全长的*dyn-1*基因, 获得了DYN-1蛋白; 并成功地构建了*dyn-1*的RNAi载体, 利用该技术研究了该基因在*C. elegans*发育、生长过程中发挥的作用。接下来我们可以对DYN-1在虫体内的分布以及与其他蛋白的功能关系进行进一步的研究。

参考文献 (References)

- 1 Nakayama Y, Shivas JM, Poole DS, Squirrell JM, Kulkoski JM, Schleede JB, *et al.* Dynammin participates in the maintenance of anterior polarity in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Dev Cell* 2009; 16(6): 889-900.
- 2 Kinchen JM, Doukoumetzidis K, Almendinger J, Stergiou L, Tosello-Tramont A, Sifri CD, *et al.* A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 2008; 10(5): 556-66.
- 3 Ai E, Poole DS, Skop AR. Long astral microtubules and RACK-1 stabilize polarity domains during maintenance phase in *Caenorhabditis elegans* embryos. *PLoS One* 2011; 6(4): e19020.
- 4 Bodmer D, Ascano M, Kuruvilla R. Isoform-specific dephospho-

- rylation of dynamin1 by calcineurin couples neurotrophin receptor endocytosis to axonal growth. *Neuron* 2011; 70(6): 1085-99.
- 5 Song HO, Lee J, Ji YJ, Dwivedi M, Cho JH, Park BJ, *et al.* Calcineurin regulates coelomocyte endocytosis via DYN-1 and CUP-4 in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* 2010; 30(3): 255-62.
 - 6 He B, Yu X, Margolis M, Liu X, Leng X, Etzion Y, *et al.* Live-cell imaging in *Caenorhabditis elegans* reveals the distinct roles of dynamin self-assembly and guanosine triphosphate hydrolysis in the removal of apoptotic cells. *Mol Biol Cell* 2010; 21(4): 610-29.
 - 7 Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 1998; 395(6705): 854.
 - 8 Dorman J B, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C. The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1995; 141(4): 1399-406.
 - 9 Yang CC, Chen D, Lee SS, Walter L. The dynamin-related protein DRP-1 and the insulin signaling pathway cooperate to modulate *Caenorhabditis elegans* longevity. *Aging Cell* 2011; 10(4): 724-8.
 - 10 Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997; 277(5328): 942-6.
 - 11 Thompson HM, Skop AR, Euteneuer U, Meyer BJ, Mcniven MA. The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis. *Curr Biol* 2002; 12(24): 2111-7.
 - 12 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806-11.
 - 13 Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahlinger J. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2001; 2(1): RESEARCH0002.
 - 14 Ameres SL, Martinez J, Schroeder R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell* 2007; 130(1): 101-12.
 - 15 Lee SK, Kumar P. Conditional RNAi: Towards a silent gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(7/8): 650-64.
 - 16 Clark SG, Shurland DL, Meyerowitz EM, Bargmann CI, van Der Blick AM. A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature-inducible locomotion defect in *C. elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(19): 10438-43.
 - 17 Yu X, Lu N, Zhou Z. Phagocytic receptor CED-1 initiates a signaling pathway for degrading engulfed apoptotic cells. *PLoS Biol* 2008; 6(3): e61.
 - 18 Yu X, Odera S, Chuang CH, Lu N, Zhou Z. *C. elegans* dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells. *Dev Cell* 2006; 10(6): 743-57.

Effects of *Caenorhabditis elegans* *dyn-1* on Lifespan and Fecundity

Cao Lei, Yang Yurong*

(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Cell polarity is crucial for the generation of cell diversity. Dynamin, a large GTPase, functions in both endocytosis and actin dynamics. Here, the *C. elegans* dynamin ortholog, DYN-1, maintains anterior polarity cues. *dyn-1* was amplified from *C. elegans* cDNA by PCR and cloned into an expression vector and a RNA interference vector. The effects of *dyn-1* on lifespan of N2, *daf-2(e1370)* and *daf-16(e1038)* were studied by RNAi. The lifespans of N2, *daf-2(e1370)* and *daf-16(e1038)* were shortened significantly. In this study, we also observed sterility and embryonic lethality in the *dyn-1* RNAi-treated worms.

Key words *C. elegans*; cell polarity; dynamin

Received: February 22, 2012 Accepted: May 14, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370695, No.30972181)

*Corresponding author. Tel: 86-592-2181792, E-mail: yryang@xmu.edu.cn