

细菌介导的 RNA 干扰对 *C.elegans* 中 *par-3* 基因的作用

杨玉荣* 高雅君

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 设计并构建了针对 *par-3* 基因的发夹 RNA 载体, 将构建好的质粒转入大肠杆菌 HT115, 25 °C 喂食 *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) 野生型虫体, 24 h 后观察 *par-3* (RNA 干扰) *C.elegans* 的胚胎发育情况。结果显示通过喂食形成发夹结构 dsRNA 的细菌可以对 *C.elegans* 中 *par-3* 基因进行 RNA 干扰, 干扰率可以达到 60% 以上。干扰后的早期胚胎发育丧失第一次卵裂的不对称性, 第二次卵裂的纺锤体方向发生改变, 与 *par-3* 突变体的观察结果一致, 为进一步在 *mex-3* 转基因虫体中通过 RNA 干扰研究基因表达打下了基础。

关键词 *C.elegans*; *par-3*; RNA 干扰; 克隆

自由生活的线虫 *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) 作为重要的模式生物, 对其基因功能的研究, 不但可以阐明其在发育生物学中的作用, 而且结果可运用在寄生线虫的控制和疾病的预防上。*C.elegans* 的早期胚胎发育提供了一个研究发育过程的极佳模式, 其胚胎的第一次分裂是不对称的, 产生的两个子细胞在大小和发育命运上均有不同。研究发现一系列基因参与早期胚胎的极性决定和卵裂球的发育方向确定。

线虫的受精诱发了极性蛋白 PAR (partitioning-defective) 分布的不对称, 这些蛋白质对不对称分裂和极性发育是至关重要的。目前已经分离出 6 种相关基因, 所有 *par* 突变体(除 *par-4* 外)都导致了受精卵分裂的两个子细胞 AB 与 P₁ 大小一致, 均分了 P 颗粒, 使细胞周期同步、纺锤体排列方式相似。*par* 基因的研究对于探索胚胎发育不对称性的发生意义重大, 目前对 *par* 基因的研究进展迅速。其中 PAR-3 是含有保守的 PDZ 区的蛋白质^[1-3], 研究发现 PAR-3 与 PKC-3 和 PAR-6 结合形成复合体^[4-7]。*par-3* 基因的突变导致胚胎分裂不对称性的丧失, 同时使纺锤体的方向改变^[8], 两个卵裂球有丝分裂纺锤体方向不定, 但多数情况下都沿着与胚胎前后轴平行的方向。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术目前在 *C.elegans* 中的应用已趋成熟。目前在 *C.elegans* 中应用的 RNAi 技术主要有显微注射、细菌介导等;

基于细菌介导中构建的载体 DNA 比 RNA 便宜、稳定, 且喂食法相对于显微注射操作简便, 对于进行大量的基因干扰更为理想、经济^[10-12], 国外已有很多这方面的应用报道。由于在 *C.elegans* 中进行 RNAi 的大部分载体都来自 Andrew Fire 实验室, 在没有该种载体的情况下, 我们利用 pBluescript II SK (+)构建发夹 RNA, 应用细菌介导的 RNAi 技术对 *C.elegans* 进行 RNAi, 从而研究基因之间的相互作用和调控。

本文报道我们构建的质粒载体通过细菌介导的 RNAi 对 *C.elegans* 中 *par-3* 基因功能的影响, 以及细菌喂食法介导的 RNAi 效果分析。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所使用的虫株 N2 野生型及 HT115 菌由 *Caenorhabditis Genetics Center* 提供。

反应中所用的 dNTP、PCR 缓冲液、Taq 酶、限制性内切酶、GeneRuler DNA Mixture ladder 和琼脂糖购自 MBI Fermentas 公司。胶回收试剂盒购自华舜公司。引物由上海生工合成, 两对引物分别为: *par-3R* 5'-CCTAGGGGTGATGAAGCATC-

收稿日期: 2006-01-19 接受日期: 2006-06-01

国家自然科学基金资助项目(No.30370695)

* 通讯作者。Tel: 0592-2181792, Fax: 0592-218266, E-mail:

yryang@jingxian.xmu.edu.cn

CACAGTAA-3', 其中 CCTAGG 为 *AvrII* 酶切位点; *par-3F* 5'-ACCGGTCTTATGACACCTC-3'; *GSTR* 5'-AAGTGCTAGCCTAATTTTGGGAACGCATTC-3', *GSTF* 5'-CTAAGCTAGCGTGCAACCCACTCG-ATTCT-3', 其中 GCTAGC 为 *NheI* 酶切位点。克隆试剂盒 pMD-18T 购自 TaKaRa, *par-3* cDNA 质粒、PGEX-4T 质粒、pBluescript II SK(+), *E.coli* DH5 α 、HT115 感受态细胞由本实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 *par-3*、*GST* 的 PCR 扩增、酶切、基因重组及纯化 以 *par-3* cDNA 的质粒为模板, 在 0.5 μ l Eppendorf 管中依次加入 34.5 μ l ddH₂O、5 μ l 10 $\times$ 缓冲液、5 μ l dNTP、2.5 μ l *par-3F* 和 2.5 μ l *par-3R*、0.25 μ l 模板 DNA, 反应总体积 50 μ l。95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 55 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 37 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保持。扩增产物经 *AvrII* 酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收柱回收。以 PGEX-4T 质粒为模板, *GSTF* 和 *GSTR* 为引物同样条件下 58.0 $^{\circ}$ C 退火, 扩增。产物经 *NheI* 酶切后, 凝胶电泳纯化回收。回收的 *par-3* 片段与 *GST* 片段以 2:1 摩尔比混合进行连接, 同时加入 *AvrII* 和 *NheI*, 16 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 交替连接 4 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段(约 1.5 kb)。

1.2.2 目的基因与载体 DNA 的连接、转化及鉴定

2.25 μ l *par-3*、0.25 μ l pMD-18T 载体(克隆试剂盒)和 2.5 μ l 连接缓冲液, 16 $^{\circ}$ C 连接 14 h, 取连接产物转化入 *E.coli* DH5 α , 在含氨苄青霉素的 LB 平板上挑取单菌落, PCR 筛选阳性克隆。碱裂解法进行质粒(以下称 T 质粒)提取, *HindIII* 和 *SmaI* 分别进行单、双酶切, 并以所筛重组质粒为模板进行 PCR 扩增, 进行进一步鉴定。

1.2.3 目的基因的亚克隆 上述 T 质粒用 *HindIII* 和 *SmaI* 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离可得到大小约 1.5 kb 的目的 DNA 片段, 试剂盒回收该片段。同时提取 pBluescript II SK (+) 质粒同样采用 *HindIII* 和 *SmaI* 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离纯化, 回收载体片段。将目的片段亚克隆到 pBluescript II SK(+), 连接体系: 7.5 μ l 回收 1.5 kb 片段、pBluescript II SK(+)-回收产物 0.5 μ l、1 μ l T4 连接酶、1 μ l T4 连接酶缓冲液, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。转化入 50 μ l *E.coli* HT115 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 提取质粒(以下称 p 质粒)、酶切、PCR 鉴定, 并测序。

1.2.4 RNAi 及结果分析 接种含有 p 质粒的大肠



图 1 基因重组模式图

杆菌 HT115 于 LB 液体培养基(含 50 μ g/ml 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 h 至菌液较浓, 离心收集菌体, 4 倍体积的 M9(含 30% 甘油)重新悬浮。在 60 mm 的 NGM 平板上加入 30 μ l 菌液, 摇动平板使菌液迅速干燥。将 *C. elegans* 野生型雌雄同体虫数条次氯酸盐溶液处理得到虫卵, 接种 10~20 个虫卵于含有菌液的平板上, 25 $^{\circ}$ C 培养约 48 h, 观察早期胚胎分裂情况并与野生型比较, 同时用与 CCD 连接的 Nikon 显微镜拍照。

2 结果

我们设计形成的发夹结构的 dsRNA 的基因重组见图 1 所示, 克隆进 pBluescript II SK(+)-后在 HT115 细菌中可转录出单链 RNA, 由于两端的 *par-3* 互补, 因此可形成发夹结构的 dsRNA, *C. elegans* 摄食该细菌后可以引起细菌介导的 RNAi。

2.1 目的基因的 PCR 扩增、重组及克隆

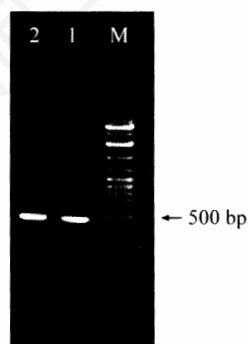
PCR 扩增 *par-3* 得到约 540 bp 的片段, *GST* 扩增得到约 490 bp 的片段(图 2), 分别用限制性内切酶 *AvrII* 和 *NheI* 酶切这两个基因的 PCR 产物后, 将纯化后的 *par-3* 和 *GST* 酶切片断以 2:1 的浓度比连接, 连接产物琼脂糖凝胶电泳(图 3), 回收约 1.5 kb 的目的片段, 转入 pMD18-T 载体, 转化入 *E.coli* DH5 α 后, 筛选并提取质粒(图 4)并进行酶切(图 5)及 PCR 扩增(图 6)鉴定及测序。

2.2 发夹结构的 dsRNA 的质粒构建

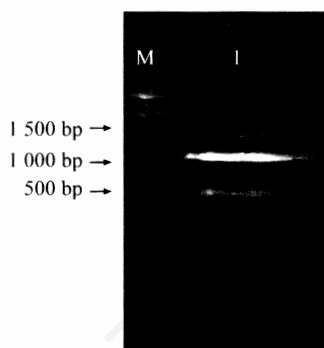
T 质粒用 *HindIII* 和 *SmaI* 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离可得到大小约 1.5 kb 的目的 DNA 片段, 胶回收该片段。同时提取 pBluescript II SK(+)-质粒用 *HindIII* 和 *SmaI* 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离纯化, 回收制备载体。将目的片段亚克隆到 pBluescript II SK(+), 转入 50 μ l *E.coli* HT115 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 提取质粒(图 7)、PCR 鉴定(图 8)、酶切(图 9), 并测序, 测序结果表明构建进去的 *par-3* 序列正确。

2.3 RNAi 结果分析

野生型胚胎受精后, 雌雄原核融合。第一次卵裂时, 纺锤体的方向沿着前后轴的方向进行不对称分裂, 产生两个不同大小的子细胞: 前端为较大

图2 *par-3* 及 *GST* 的 PCR 扩增

M: Gene Ruler DNA Mixture ladder; 1: *par-3* 的 PCR 产物; 2: *GST* 的 PCR。

图3 *par-3*、*GST* 连接产物

M: Gene Ruler DNA Mixture ladder; 2: *par-3*、*GST* 连接产物。

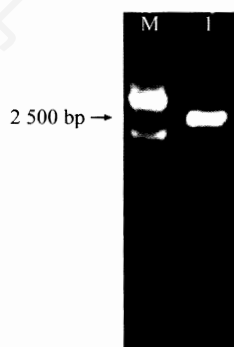


图4 质粒 T 提取

M: Gene Ruler DNA Mixture ladder; 2: 提取质粒。

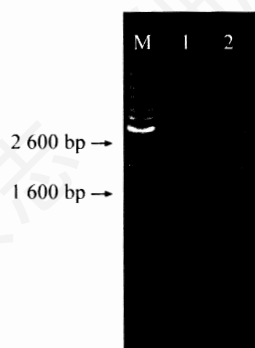


图5 重组质粒 T 酶切

M: Gene Ruler DNA Mixture ladder; 1: *Hind*III/*Eco*RI 酶切; 2: 质粒。

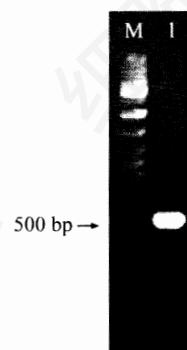


图6 质粒 T PCR 筛选

M: Gene Ruler DNA Mixture ladder; 1: 以 *GST* 引物 PCR 筛选。

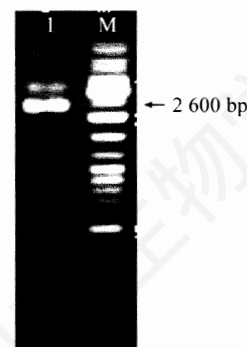


图7 p 质粒提取

M: Gene Ruler DNA Mixture ladder; 1: 提取质粒。

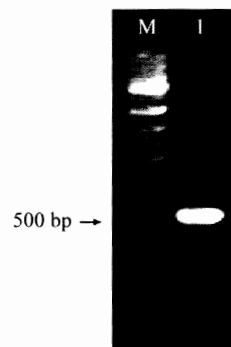


图8 p 质粒 PCR 筛选

M: Gene Ruler DNA Mixture ladder; 1: 以 *GST* 引物 PCR 筛选。

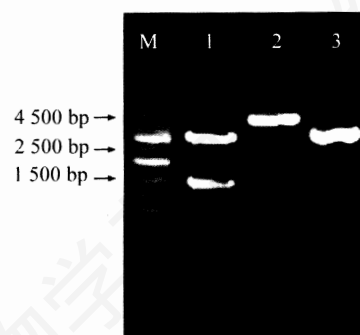


图9 p 质粒酶切鉴定

M: Gene Ruler DNA Mixture ladder; 1: *Hind*III/*Eco*RI 酶切; 2: *Hind*III 酶切; 3: 质粒。

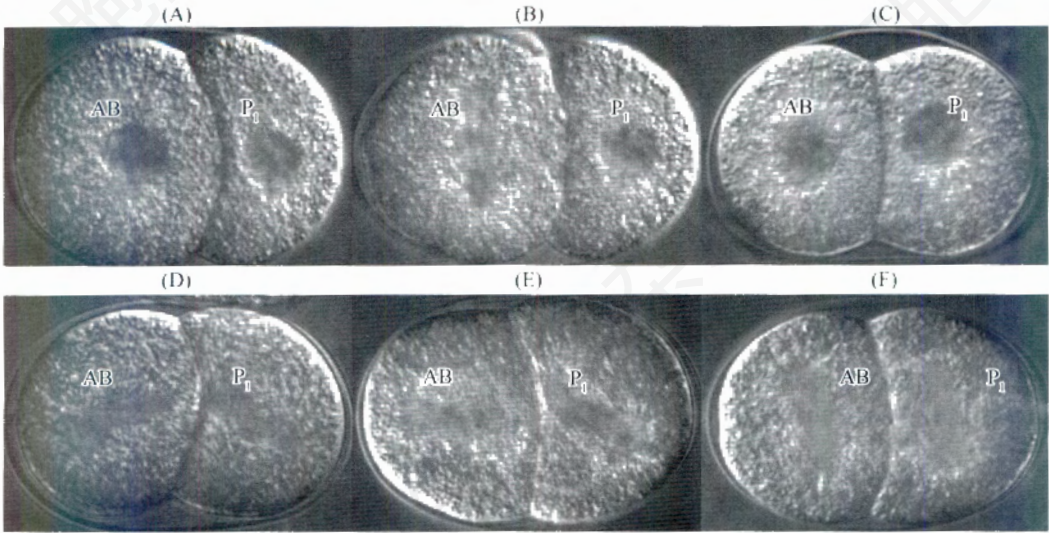


图 10 野生型及 RNAi 后 *C.elegans* 早期胚胎分裂

A: 野生型胚胎第一次卵裂; B: 野生型胚胎第二次卵裂; C: *par-3* (RNAi) 胚胎的第一次卵裂; D 和 E: *par-3* (RNAi) 胚胎第二次卵裂横向的纺锤体; F: *par-3* (RNAi) 胚胎二次卵裂纵向纺锤体。

表 1 *par-3* (RNAi) 干扰效率统计

组别	观察胚胎卵总数	观察干扰胚胎数	干扰效率(%)
1	12	8	66.7%
2	10	6	60.0%
3	8	5	62.5%
总计	30	19	63.3%

的细胞 AB，后端为较小的细胞 P₁(图 10A)。第二次卵裂时两个细胞的分裂不同步，AB 大卵裂球先分裂，纺锤体较早出现，纺锤体沿着与前后轴垂直的方向(图 10B)；P₁ 小卵裂球后分裂，纺锤体沿着与前后轴平行的方向，第二次分裂结束后产生 4 个大小不同的细胞。

野生型虫体喂食可以表达 *par-3* dsRNA 的 HT115 细菌 24 h 后(即 *par-3* 基因 RNAi 24 h 后)，观察到的胚胎的分裂方式发生改变：单细胞胚胎第一次卵裂时纺锤体方向不变，仍沿着前后轴的方向；但分裂的不对称性丧失，分裂轴前移，形成两个大小相同的子细胞 AB 和 P₁(图 10C)。第二次卵裂时由野生型的不同步变为同步，两个子细胞的纺锤体同时出现，同时发生分裂；但纺锤体的方向不定(图 10D, 图 10E, 图 10F)，出现各种形式：AB 和 P₁ 纺锤体方向或者都是沿着分裂轴的方向(图 10D、图 10E)，或者沿着与分裂轴垂直的方向(图 10F)，但大多数情况下两个子细胞纺锤体方向沿着与前后轴平行的方向。

我们对 *par-3* (RNAi) 胚胎的发育情况进行了观察和统计，结果如表 1 所示，总共 30 个胚胎(每个胚

胎对应不同的成虫)中 19 个都表现出了 *par-3* 突变体的表型，即第二次卵裂时两个细胞的纺锤体同时出现，两子细胞同时分裂。纺锤体方向除与前后轴方向平行外，还有其他方向。RNAi 效率可达约 60%~70%，这为我们以后要开展的 RNAi 实验打下了基础。

3 讨论

极性是多种不同类型细胞的共同特征，对细胞的分化 and 功能是必需的。研究发现 *C.elegans* 卵细胞受精过程中极性的建立决定了胚胎的发育。细胞极性的形成和多种因素有关，如胞质流动、细胞骨架、P 颗粒成分和 *par* 基因等。目前 *par* 基因的研究进展非常迅速，PAR 蛋白之间相互依赖又各具特色 [12~13]。

在线虫第一次卵裂的有丝分裂周期中，估计有 100~400 个母性效应基因产物参与了这一过程。这些基因是直接还是间接对 A/P 轴极性的形成发挥作用的以及胞质的重新分布又是如何产生胚胎的不对称性的，目前都还未知。目前迅速发展的 RNAi 技术为大规模、高通量研究基因功能打下了良好的技

术基础。*C.elegans* 中应用极广的细菌 RNAi 技术主要采用 Andy Fire 实验室的双 T7 promoter 载体。我们借鉴 Craig P.Hunter 实验室发夹结构 dsRNA 干扰构建方法, 在 pBluescript II SK (+) 中构建了表达和转录 dsRNA 的发夹结构重组质粒为以后进一步对转基因虫体的 RNAi 实验打下了基础。

通过构建以上可形成发夹 RNA 的质粒载体, 转入细菌中, 通过喂食法对 *C. elegans par-3* 基因进行 RNAi, 发现该方法可以有效的抑制 *par-3* 基因的功能。由于 *par-3* 与多个基因分布有关, 因此 RNA 干扰后的胚胎中有丝分裂纺锤体轴方向除与前后轴方向平行外还有其他的方向, 这与我们所观察的 *par-3* 突变体一致^[14]。

参考文献 (References)

- [1] Ohno S *et al. Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13**: 641
- [2] Hung TJ *et al. Development*, 1999, **126**: 127
- [3] Izumi Y *et al. J Cell Biol*, 1998, **143**: 95
- [4] Fire A *et al. Nature*, 1998, **391**: 806
- [5] Nance J *et al. Development*, 2003, **130**: 5339
- [6] Cuenca A A *et al. Development*, 2003, **130**: 1255
- [7] Cheng N N *et al. Genetics*, 1995, **139**: 549
- [8] Timmons L *et al. Gene*, 2001, **103**: 112
- [9] Aballay A *et al. Curr Biol*, 2003, **13**: 47
- [10] Kamath RS *et al. Genome Biol*, 2000, **2**: research0002.1
- [11] Fraser AG *et al. Nature*, 2000, **408**: 325
- [12] 冯应龙. *生命科学*, 2003, **15**: 238
- [13] 杨玉荣等. *动物学报*, 2005, **51**: 884
- [14] 傅 兴等. *细胞生物学杂志*, 2005, **27**: 713

RNAi of *par-3* Gene in *C. elegans* Delivered by Feeding Bacteria

Yu-Rong Yang*, Ya-Jun Gao

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Life Science School,
Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The hairpin dsRNA expression vector targeting *par-3* gene was constructed and transformed into *E.coli* HT115. The development of *C.elegans* embryo was observed after fed bacteria which contain *par-3* dsRNA plasmids for 24 h in 25 °C. The results showed that this construct of RNAi targeting *par-3* gene delivered by feeding this bacteria is efficient. The bacteria mediated RNAi of *par-3* result in the loss of the asymmetry of the *C. elegans* early embryo and the change of the spindle orientation in the second cleavage. This construct can be applied into the further study of gene expression in transgenic worms via bacteria mediated RNAi.

Key words *C. elegans*; *par-3*; RNAi; cloning; construct

Received: January 19, 2006 Accepted: June 1, 2006

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

*Corresponding author. Tel: 86-592-2181792, Fax: 86-592-2182066, E-mail: yryang@jingxian.xmu.edu.cn