

盘基网柄菌尿囊酸酶基因 RNA 干扰载体的构建及干扰效果鉴定

刘伟 张树任 陈能星 侯连生*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 为探究尿囊酸酶(allantoicase)基因在盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)发育中的作用, 依据 RNA 干扰(RNAi)的原理和盘基网柄菌中构建 RNAi 载体的基本经验, 扩增出尿囊酸酶基因 642 bp 的长片段, 397 bp 的短片段, 并反向连接成含有发卡结构的寡核苷酸片段, 克隆至表达载体 pAct15Gal, 构建了以盘基网柄菌尿囊酸酶基因为靶标的 RNAi 载体 pAct15Gal-allCi。将此载体转染野生型 KAx-3 细胞, 经 G418 筛选出阳性克隆 RNAi-allc。将野生型细胞和 RNAi-allc 转染细胞发育 20 h 后发现, 转染细胞仅能形成类似细胞丘的小突起, 不能完成完整的发育, 而野生型细胞则能完成完整的发育, 形成子实体。Western 印迹几乎检测不到转染细胞有尿囊酸酶的免疫条带; 流式细胞术检测转染细胞内尿囊酸酶的表达, 发现表达率由野生型细胞的 72.18% 降为转染细胞的 0.67%。表明本研究设计的核苷酸序列对靶标基因的表达有较明显的干扰作用, 说明尿囊酸酶对盘基网柄菌细胞发育有一定的调控作用。

关键词 盘基网柄菌; 尿囊酸酶; RNA 干扰; 载体构建

尿囊酸酶是嘌呤代谢中一种重要的酶。在微生物、两栖动物和鱼中, 嘌呤经过代谢形成尿酸, 尿酸继续水解为尿囊酸, 在尿囊酸酶催化下尿囊酸生成脲基乙醇酸和尿素, 而脲基乙醇酸最终水解为氨气、二氧化碳和乙醛酸^[1]。但在灵长类、鸟类以及一些昆虫体内, 嘌呤经代谢后, 最终以尿酸的形式排出体外, 在这些生物中, 似乎不需要尿囊酸酶来行使正常的功能。令人意外的是许多学者在人、小鼠^[2-3]和大鼠^[4]中都克隆到尿囊酸酶的基因。如果是尿囊酸酶基因功能丧失了, 那在进化过程中还保留着该基因有什么意义呢? 所以近几年来许多学者关注该基因的进化^[1]、基因结构、组织表达谱^[5], 以及晶体组成^[6]等方面的研究, 尚未有其他方面的报道。笔者实验室在盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)发育过程中, 筛选到与发育调控相关的基因片段, 测序后证实是尿囊酸酶(GenBank 登录号是 AY894718)。这表明在低等真核生物盘基网柄菌中也存在尿囊酸酶, 并且在盘基网柄菌多细胞发育过程中能正常表达, 提示该基因可能存在着一些未知的生物功能。本文用 RNA 干扰(RNAi)技术研究了该基因在盘基网柄菌多细胞发育中的作用。

1.1 材料

1.1.1 细胞株 盘基网柄菌(*Dictyostelium*

discoideum)野生型细胞株 KAx-3。

1.1.2 质粒与菌株 克隆载体 pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司, 表达载体 pAct15Gal 由多伦多大学医学院生化实验室 Dr. Siu 惠赠, 大肠杆菌 DH5 α 由华东师范大学吴自荣教授实验室馈赠。

1.1.3 酶及主要试剂 T4 DNA 连接酶, 限制性内切酶 *Nde*I、*Cla*I 和 *Bgl*III, DNA marker (DL2000、DL15000)等购于 TaKaRa 公司, TRIZOL 购于 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购于 TOYOBO 公司, PCR 扩增试剂盒购于上海生工生物工程有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒(Gel Extraction Mini Kit)购于上海华舜生物工程有限公司, 尿囊酸酶抗体本室保存, GAPDH 抗体购于康成生物, AP 标记羊抗兔二抗为 Bio-Rad 公司产品, AP 标记马抗鼠二抗, 羊抗兔荧光二抗异硫氰酸荧光素(fluorescein-5-isothiocyanate, FITC)购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养和发育 固体培养盘基网柄菌 KAx-3 细胞培养在琼脂板上, 用 *Klebstella aerogenes* 喂养。在对数生长期时, 收集细胞, 并接种至 2% 琼

收稿日期: 2009-03-10 接受日期: 2009-05-25

国家自然科学基金资助项目(No.30670226)

* 通讯作者。Tel: 021-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

脂板上进行发育^[7]。

1.2.2 干扰载体的构建及转染 (1)细胞总RNA提取。收集盘基网柄菌发育 14 h 的 KAx-3 细胞,用 TRIZOL 提取法提取细胞总 RNA。通过电泳以及测定 A_{260}/A_{280} 检测总 RNA 完整性。(2)尿囊酸酶基因长、短片段的克隆。参考 Kuhlmann 等^[8]构建 RNAi 载体的方法,针对尿囊酸酶基因序列设计两对引物(引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。长片段上游引物 allC-L F: 5'-gaattcCATATGTATG-TATCTGAGTGTGCCG-3'; catatg 为 *NdeI* 酶切位点;长片段下游引物 allC-L R: 5'-ccatcgatTGAAC-GACCTGGCATGATG-3'; atcgat 为 *ClaI* 酶切位点。短片段上游引物 allC-S F: 5'-gaagatctTATGTATC-TGAGTGTGCCG-3'; agatct 为 *BglIII* 酶切位点。短片段下游引物 allC-S R: 5'-ccatcgatGAGCCAA-GATCGGATTTG-3'; atcgat 为 *ClaI* 酶切位点。总 RNA 反转录后进行 PCR 扩增。长片段 58 °C 退火 1 min, 短片段 50 °C 退火 1 min。(3) PCR 产物的克隆与测序。将两种 PCR 产物分别用 T4 DNA 连接酶连接到 pMD18-T 质粒中,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选获得阳性克隆。对获得的阳性克隆分别进行质粒提取,双酶切验证,阳性重组子送 Invitrogen 公司测序。(4)尿囊酸酶基因干扰载体(pAct15Gal-allci)的构建。尿囊酸酶基因 RNAi 表达选用 pAct15Gal 载体。在 Boeckeler 等^[9]方法基础上,笔者依据发夹 RNA (hairpin RNA, hpRNA)介导的 RNAi 技术的原理,将上述方法得到的两个片段反方向插入表达载体中。含有长片段的 pMD18-T 质粒和 pAct15Gal 质粒同时用 *NdeI* 和 *ClaI* 双酶切,将长片段插入到 pAct15Gal 载体,连接后转化到 *E. coli* DH5 α 中,提取重组质粒 pAct15-L,双酶切验证。短片段以同样的方法插入含长片段的重组质粒 pAct15-L 中,用 *BglIII* 和 *ClaI* 双酶切检验。最终的重组质粒 pAct15Gal-allci 用 *BglIII* 和 *NdeI* 双酶切验证。(5)细胞液体培养及转染。细胞在无菌培养基 HL5 [10 g 豚豚(proteose peptone)、5 g 酵母粉、10 g 葡萄糖、0.35 g Na_2HPO_4 、0.35 g KH_2PO_4 ,加水至 1 L, pH 6.4~6.6,高压灭菌]中,22 °C、150 r/min 摇床振荡培养^[10],其密度达到 $(1\sim 2)\times 10^6$ 个/ml 时,采用电击转化法^[11]将上述表达载体,即 pAct15Gal-allci 转染至盘基网柄菌细胞。平板法筛选^[11]阳性克隆,G418 浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$,1 周后可见阳性克隆形成。对阳性克隆进行扩大培养后获得稳定表达的细胞 RNAi-allc。倒

置显微镜下观察发育 24 h 的转染细胞形态,并与正常野生型细胞比较。

1.3 转染效率的检测

1.3.1 Western 印迹检测 分别收集野生型细胞 KAx-3 和转染 pAct15Gal-allci 并经抗性筛选后的 RNAi-allc 细胞,发育 14 h 后,提取总蛋白进行 SDS-PAGE 后,电转至硝酸纤维素膜(NC 膜)上,丽春红染色显示转印良好,封闭液封闭 2 h,一抗为兔源性尿囊酸酶抗体、GAPDH 抗体,室温反应 1 h。二抗为 AP 标记羊抗兔、马抗鼠 IgG,室温反应 1 h,最后加 NBT/BCIP 显色。

1.3.2 流式细胞仪分析 分别收集 RNAi-allc, KAx-3 发育 14 h 的细胞,总数达到 $(2\sim 4)\times 10^6$ 个,0.3% Triton X-100 透膜 15 min 后加尿囊酸酶抗体,4 °C,30 min 温育后洗涤,再加入羊抗兔荧光二抗 FITC,4 °C,30 min 温育后洗涤,加固定液后洗涤,加入至少 500 μl PBS 并确保细胞数达到 1×10^6 个送检。

2 结果

2.1 总 RNA 的质量鉴定

RNA 样品经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下观察,可见 28 S、18 S 及 5 S,3 条 rRNA 条带。RNA 样品稀释 400 倍后, A_{260} 为 0.083, A_{280} 为 0.042, A_{260}/A_{280} 为 1.98, RNA 含量为 1.328 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

2.2 尿囊酸酶基因 cDNA 扩增

以提取的 14 h 的 KAx-3 细胞总 RNA 为模板,用方法中提供的两对特异引物进行 RT-PCR 扩增,得到约 600 bp (图 1-1)和 400 bp (图 1-2)左右的两个 DNA 片段。

2.3 PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物分别用 Gel Extraction Mini Kit 回收,T4 DNA 连接酶连接到 pMD18-T 质粒中。分别用 *NdeI* 和 *ClaI*、*BglIII* 和 *ClaI* 双酶切长片段(图 1-3)和短片段重组载体(图 1-4)。Invitrogen 公司测序结果显示,扩增片段与原基因序列一致。

2.4 尿囊酸酶基因 RNAi 载体(pAct15Gal-allCi)的酶切鉴定

重组质粒 pMD18-T-allC-L 经 *NdeI* 和 *ClaI* 双酶切后得到长片段 allC-L (642 bp),而重组质粒 pMD18-T-allC-S 经 *ClaI* 和 *BglIII* 双酶切后得到短片段 allC-S (397 bp),反方向连接二者后插入到 pAct15Gal 中,对重组质粒进行 *BglIII* 和 *NdeI* 双酶切,切出了 1 039 bp 的条带(图 2),表明尿囊酸酶基因已插入到 pAct15Gal-

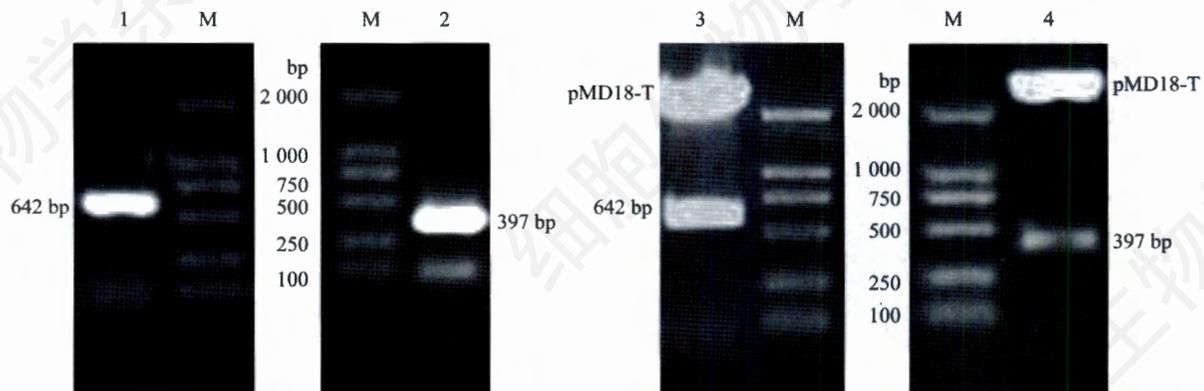


Fig.1 Agarose gel electrophoresis of *allC* gene and identification of pMD18-T-*allC*-L, pMD18-T-*allC*-S digested with both *NdeI* and *ClaI*, *BglIII* and *ClaI*

1, 2: *allC* gene; 3: pMD18-T-*allC*-L digested by *NdeI* and *ClaI*; 4: pMD18-T-*allC*-S digested by *BglIII* and *ClaI*; M: DNA marker DL2000.

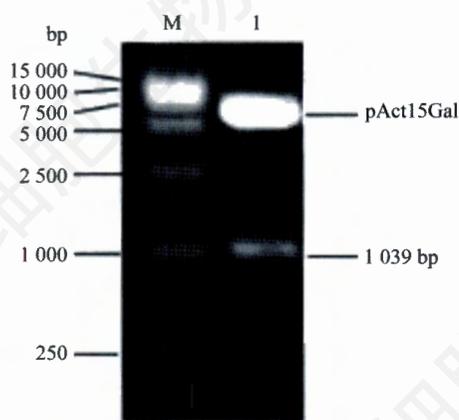


Fig.2 Identification of pAct15Gal-*allCi* digested with *BglIII* and *NdeI*

M: DNA marker DL15000; 1: pAct15Gal-*allCi* digested by *BglIII* and *NdeI*.

*allCi*重组质粒中, *allC*基因RNAi载体pAct15Gal-*allCi*构建成功(图3)。

2.5 细胞发育的形态比较观察

将野生型细胞及转染细胞分别接种至2%琼脂板上, 置湿盒中, 在24℃恒温条件下, 让两种类型细胞同时进行发育^[7]。20 h后, 在倒置显微镜下观察, 二者存在明显的形态差异, 正常KAx-3细胞几乎形成成熟的子实体, 能清楚地看到子实体的柄管和孢子囊(图4A), 而转染细胞则只能观察到类似细胞丘的小突起, 继续培养至24 h甚至更长的时间后, 其发育形态依旧停留在这种小突起的形态, 最终也无子实体形成(图4B)。

2.6 Western 印迹检测结果

从发育形态上看到的两种类型细胞存在的明显差异, 说明干扰效果明显。为进一步检测尿囊酸酶

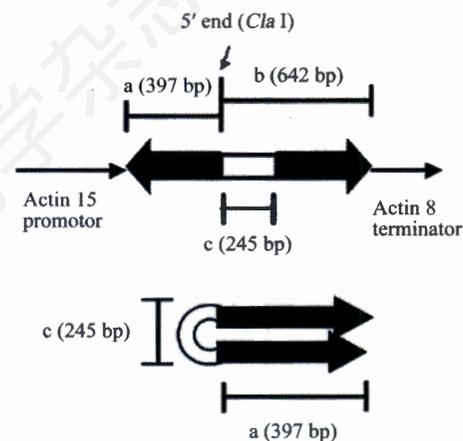


Fig.3 Construction of *allC* RNAi vector

a: *allC*-S; b: *allC*-L; c: loop.

基因表达水平的干扰效果, 我们采用了 Western 印迹方法。以野生型 KAx-3 作为对照, 并以 GAPDH 作为内参, 结果发现两种类型的细胞在 GAPDH 表达量相同的情况下, 野生型细胞在 42 kDa 处有明显的免疫印迹, 而干扰细胞在 42 kDa 处无任何免疫印迹, 说明 pAct15Gal-*allci* 对尿囊酸酶基因表达抑制效果明显, pAct15Gal-*allci* 为有效干扰序列(图5)。

2.7 流式细胞仪检测(flow cytometry, FCM)结果

那两种类型细胞的酶表达效率如何? 我们又用流式细胞仪进行了检测。分别收集野生型细胞和建系的细胞, 制成相同浓度的细胞悬液, 加入适量固定液后对细胞内尿囊酸酶进行 FCM 检测。从流式细胞仪的输出结果可以清楚地看到, 野生型 KAx-3 细胞内尿囊酸酶高表达, 高达 72.18% (图 6A), 而转入 pAct15Gal-*allCi* 细胞内尿囊酸酶的表达量大幅度下

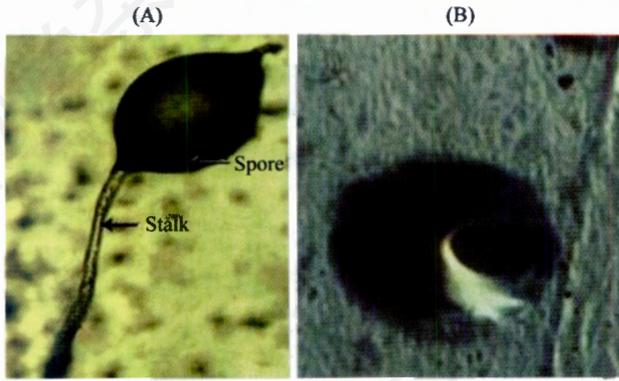


Fig.4 Morphological characters of cells at 20 h of development (10×10)

A: spores formed in cells KAx-3 (wild type) at 20 h of development; B: no spores formed in cells RNAi-alc (allantoicase-targeted siRNA transfectants) at 20 h of development.

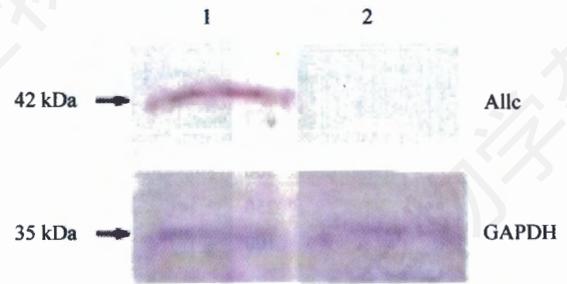


Fig.5 Expressions of allantoicase protein detected by Western blot

1: immunoblotting in cells KAx-3 (wild type) at 14 h of development; 2: no immunoblotting in cells RNAi-alc (allantoicase-targeted siRNA transfectants) at 14 h of development.

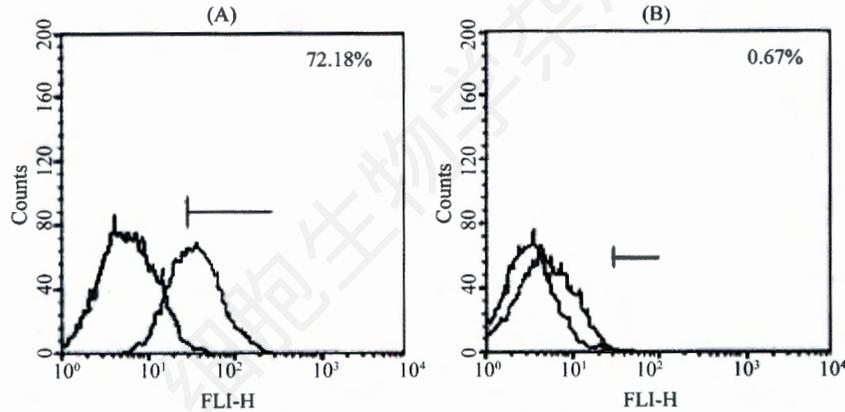


Fig.6 Detection of the inhibited expression of allantoicase in KAx-3 cell by FCM after RNAi

A: KAx-3 cells (wild type); B: RNAi-alc cells (allantoicase targeted siRNA transfectants).

调, 减少到 0.67% (图 6B)。

3 讨论

3.1 尿囊酸酶基因 RNAi 载体构建要点

对于 RNAi 载体的构建, 在哺乳动物体内, 一般都用小于 30 nt 的 dsRNA 进行 RNAi 研究, 而在一些低等真核生物中, 有些学者认为用长 dsRNA 可以获得较好的抑制效果。从笔者所得到的结果来看, 长的 dsRNA 确实有较强的抑制效果, 能明显抑制蛋白质的表达。但构建长 dsRNA 表达载体难度较大, 不易成功。笔者依据 hpRNA 介导的 RNAi 技术的原理, 构建了对应于盘基网柄菌尿囊酸酶基因的 RNAi 载体, 该结构在体内转录为 mRNA 后, 可以自我互补形成 hpRNA^[9], 而 hpRNA 所含有的双链 RNA 结构同样可被 Dicer 酶切产生小的 dsRNA, 从而导致盘基网

柄菌细胞内源同源基因编码的 mRNA 降解, 以抑制盘基网柄菌尿囊酸酶基因的表达。为研究该基因功能以及该基因在盘基网柄菌发育过程中的作用打下了基础。

构建的过程中, 有几点是比较重要的。首先, 在长短片段设计引物时, 在两对引物的下游引物加上相同的酶切位点, 可使两片段首尾反向相连, 形成 hpRNA。其次, 含 Act6、Act15、V8 的载体已成功作为启动子来启动外源 dsRNA 的转录^[8]。而本实验所采用的是 pAct15Gal 载体, 它既含有启动子 Act15, 又含有 neo 基因, 这样既可用 G418 抗性来筛选阳性克隆, 又可在 Act15 启动下, 转录出 RNA, 并且该 RNA 会自动折叠成发夹状双链 RNA 结构, 该结构容易被细胞内的 Dicer 酶识别, 剪切成 22 nt 左右的小 RNA, 发挥 RNAi 的功能。

3.2 尿囊酸酶与盘基网柄菌细胞形态

社会变形虫盘基网柄菌是一种单细胞真核生物, 以细菌和酵母为食。在营养丰富情况下, 以二分裂方式繁殖后代; 当食物耗尽时, 进入多细胞发育阶段。整个发育过程约需 24 h, 大致分 4 个阶段^[12]: 1) 细胞聚集(aggregation)阶段: 剥夺食物后, 饥饿细胞分泌的化学信号 cAMP 诱导邻近的饥饿细胞向 cAMP 来源方向移动, 形成细胞流样结构。2) 细胞丘(mound)阶段: KAx-3 细胞发育 12 h 后, 细胞从疏松聚集发展为致密聚集, 形成多细胞组成的丘状结构, 称为细胞丘。3) 蛞蝓体(slug)阶段: 细胞丘垂直向上延伸形成指状突出(tip), 这一指状结构倒向基质, 形成能移动的“蛞蝓”; 蛞蝓体在迁移过程中细胞进一步分化。4) 子实体(fruiting body)形成阶段: 蛞蝓体迁移到合适的地方后形成由不同结构组成的子实体。子实体由纤维化的柄支撑着含大量休眠孢子的孢囊共同组成。当环境适宜时, 孢囊破裂, 释放孢子重新萌发产生单细胞盘基网柄菌, 开始另一个生命周期^[13]。

在我们实验结果中可以清楚地看到, 干扰后的细胞发育至 14 h, 出现类似馒头样的突起结构, 细胞粘连比较紧密, 馒头样结构的外表较平滑, 即使细胞发育 24 h 后, 仍然是这种形态。结合笔者实验室以前研究 AK127(AK127 细胞株是 gp150 蛋白基因突变的细胞株, 也不能完成整个发育过程, 发育停留在细胞疏松结合阶段^[12])突变细胞发育结果来看, 笔者发现被干扰细胞的这种多细胞聚集比 AK127 突变细胞的多细胞聚集细胞间聚集得更为紧密, 而较野生型 KAx-3 细胞的多细胞聚集(细胞丘)来说, 干扰细胞又缺少其顶端所谓 tip 结构, 因 tip 结构是细胞继续发育的组织中心。所以即使干扰细胞继续发育至 20 h, 甚至更长时间, 其仍维持原来的突起状态, 无子实体形成。因此, 就发育的最终结果来讲, 被干扰细胞与 AK127 突变细胞几乎相同。值得指出的是尿囊酸酶基因是笔者实验室运用 DDRT-PCR 方法, 在野生型细胞 KAx-3 和突变细胞 AK127 发育 14 h 后筛选到的一段长度为 602 bp 的差异表达片段(GenBank 登录号 AY894718), 即野生型细胞表达了该基因, 而突变细胞则不能表达。因此有可能尿囊酸酶基因的表达与 gp150 蛋白基因关系比较密切, 这两种基因有可能处在相同的调节通路上, 都与盘基网柄菌多细胞发育调控有关。当然两者之间的相互关系还需要进一步的研究。

3.3 尿囊素酶作用分析

尿囊酸酶作为嘌呤代谢途径的重要酶之一, 其研究一直受到重视。已研究过的微生物尿囊酸酶以半失活方式存在, 但可被低 pH (<5) 激活^[14]。在大多数鱼类及两栖类动物中尿囊酸酶有活性, 而在爬行类、鸟类以及哺乳动物中没有活性^[5], 说明尿囊酸酶的活性在进化过程中逐渐丢失。有意思的是, 尽管哺乳动物体内不具有尿囊酸酶的活性, 但从小鼠、人体中却已克隆出尿囊酸酶的基因^[15]。我们实验结果说明盘基网柄菌细胞同哺乳动物一样, 也存在尿囊酸酶的基因^[16], 但是否真的如同哺乳动物一样, 尿囊酸酶仅仅是存在于盘基网柄菌细胞内而并不具活性? 通过我们的实验恰恰证实了尿囊酸酶不仅存在于盘基网柄菌细胞内, 而且对其细胞的发育起到了重要的作用。免疫印迹证明尿囊酸酶的表达有明显降低, FCM 表明细胞内尿囊酸酶的表达量大幅度下调。这不仅显示出 pAct15Gal-allci 干扰序列的有效性, 更从干扰细胞形态上的缺陷显示了尿囊酸酶的意义。由于尿囊酸酶的催化, 使嘌呤最终代谢为氨, 早期研究发现氨通过抑制诱导分化因子(DIF)的累积来抑制柄细胞的发育并促进孢子细胞的形成^[17]。因此笔者倾向于认为干扰细胞不能完成整个发育过程与氨有一定的关系。我们知道饥饿的盘基网柄菌细胞群中某些细胞开始分泌振荡的 cAMP 信号, 诱导其他细胞趋化性地爬向 cAMP 源, 在这里细胞聚集成多细胞体^[18]。氨可以抑制这种对 cAMP 的趋化运动^[17]。正常发育的野生型 KAx-3 在细胞丘顶部会形成所谓的 tip 结构, 该结构是细胞发育的组织中心, 其中细胞大多成为蛞蝓体前面部分的细胞, 即前柄细胞。因此这种 tip 结构的形成可能与这两种分子之间的协调有关, 正常细胞之所以能完成完整的形态发育, 正因为尿囊酸酶的功能正常, 能正常地催化代谢产生氨。由于 pAct15Gal-allci 干扰片段的插入抑制了尿囊酸酶的产生, 进而影响了氨的产生, 使细胞发育调控失效, 最终影响了细胞的正常发育。

参考文献(References)

- [1] Hayashi S, Fujiwara S, Noguchi T, *et al.* Evolution of urate degrading enzymes in animal peroxisomes, *Cell Biochem Biophys*, 2000, 32 Spring: 123-129
- [2] Vigetti D, Monetti C, Acquati F, *et al.* Human allantoicase gene: cDNA cloning, genomic organization and chromosome localization, *Gene*, 2000, 256(1-2): 253-260
- [3] Vigetti D, Monetti C, Bernardini G. Molecular cloning of mouse allantoicase cDNA, *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1519(1-2): 117-121

- [4] Vigetti D, Binelli G, Monetti C, *et al.* Selective pressure on the allantoicase gene during vertebrate evolution, *J Mol Evol*, 2003, 57(6): 650-658
- [5] Wang Y, Zhang S, Liu Z, *et al.* Amphioxus allantoicase: molecular cloning, expression and enzymatic activity, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2005, 141(2):237-243
- [6] Xu Q, Schwarzenbacher R, Page R, *et al.* Crystal structure of an allantoicase (YIR029W) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.4 Å resolution, *Proteins*, 2004, 56(3): 619-624
- [7] 侯连生, 马宁莎. 盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*) KAx-3 和 AK127 细胞形态发生和同工酶比较研究, *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2004, 2004(4): 103-110
- [8] Kuhlmann M, Popova B, Nellen W. RNA interference and antisense-mediated gene silencing in *Dictyostelium*, *Methods Mol Biol*, 2006, 346: 211-226
- [9] Boeckeler K, Tischendorf G, Mutzel R, *et al.* Aberrant stalk development and breakdown of tip dominance in *Dictyostelium* cell lines with RNAi-silenced expression of calcineurin B, *BMC Dev Biol*, 2006, 6: 12
- [10] Watts DJ, Ashworth JM. Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture, *Biochem J*, 1970, 119(2): 171-174
- [11] Gaudet P, Pilcher KE, Fey P, *et al.* Transformation of *Dictyostelium discoideum* with plasmid DNA, *Nat Protoc*, 2007, 2(6): 1317- 1324
- [12] 侯连生. gp150 蛋白在盘基网柄菌发育中的作用及粘附分子间关系的分析, *动物学报*, 2004, 50(1): 75-82
- [13] Firtel RA, Meili R. *Dictyostelium*: a model for regulated cell movement during morphogenesis, *Curr Opin Genet Dev*, 2000, 10(4): 421- 427
- [14] van der Drift C, Vogels GD. Allantoate amidohydrolase. II. Inactivation and instability, *Enzymologia*, 1969, 36(4): 278-286
- [15] 张跃群, 曹 军. 动物体尿囊酸酶的研究进展, *生物学通报*, 2008, 43(6): 13-14
- [16] Eichinger L, Pachebat JA, Glöckner G, *et al.* The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, *Nature*, 2005, 435(7038): 43-57
- [17] Feit IN, Medynski EJ, Rothrock MJ. Ammonia differentially suppresses the cAMP chemotaxis of anterior-like cells and prestalk cells in *Dictyostelium discoideum*, *J Biosci*, 2001, 26(2): 157-166
- [18] Kimmel AR, Firtel RA. Breaking symmetries: regulation of *Dictyostelium* development through chemoattractant and morphogen signal-response, *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(5): 540-549

Construction and Effect Identification of RNAi Expression Vector Targeting Allantoicase Gene in *Dictyostelium discoideum*

Wei Liu, Neng-Xing Chen, Lian-Sheng Hou*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract This study was aimed to limit cell development in *Dictyostelium discoideum* by RNAi strategy targeting allantoicase gene (*allC*). In accordance with the *allC* sequence in Genbank, partial cDNA sequences (642 bp, 397 bp) from *Dictyostelium discoideum* were amplified by RT-PCR. The gene-specific sequences (642 bp, 397 bp) of *allC* were linked in the antisense orientations in order to form hairpin RNA. The resulted construction was then inserted into vector pAct15Gal to obtain the RNAi expression vector pAct15Gal-*allCi*. Positive clones were obtained by stable transfection KAx-3 using pAct15Gal-*allCi* and G418 screening. Compared with untransfected KAx-3, transfected cells, arrested early stage of mound, could not complete integrative cell development. Western blot analysis showed allantoicase protein in interference sequence transfected cells was significantly down-regulated. The transfection rate was estimated by FACS analysis, indicating the allantoicase expression decreased from 72.18% to 0.67% after RNAi transfection. The results suggest that allantoicase is interfered, which is required for the development of *Dictyostelium discoideum*.

Key words *Dictyostelium discoideum*; allantoicase; RNAi; vector construction

Received: March 10, 2009 Accepted: May 25, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30670226)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn