

RNA 干扰技术在果蝇中的应用

徐 荣 陈 峻 邓可京*

(复旦大学生命科学院遗传学研究所, 上海 200433)

摘要 RNA 干扰是双链 RNA 特异诱导的转录后期基因沉默。该技术随着不断完善而越来越被广泛地运用于果蝇的功能基因组研究上, 双链 RNA 已经成为果蝇中功能基因的一个十分有效的抑制子, 势必使 RNA 干扰技术成为研究果蝇体内基因功能的强有力的反向遗传学研究技术。

关键词 RNA 干扰, 转录后基因沉默, 果蝇, Dicer 酶

学科分类号 Q344

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术就是利用双链 RNA (double-stranded RNA) 诱导序列特异的转录后基因沉默 (posttranscriptional gene silencing), 由于它特有的简单性和快速性, 已经逐渐成为一项极具潜力的基因功能研究技术。到目前为止, RNA 干扰现象已经在许多生物体内被发现, 比如植物、真菌^[1]、果蝇^[2]、线虫及其他的一些脊椎动物 (包括小鼠胚胎^[3])。因此可以推测 RNA 干扰现象可能存在于所有的真核生物中包括人类, 这给利用 RNAi 研究真核生物基因功能提供条件。在研究果蝇基因功能时, 将外源的 dsRNA 注入果蝇体内, 可以特异地抑制有同源序列基因的表达, 而对于其他不相关序列的表达无干扰作用。RNA 干扰抑制基因表达是在转录后进行的, 仅含有内含子序列的 dsRNA 无法引起 RNA 干扰效应。

RNAi 最先是在线虫中发现的, 将与一基因序列同源的正义 RNA 或反义 RNA 注入线虫卵中, 所得到的表型与诱变所致的表型相类似。通过验证发现在这些正义 RNA 或反义 RNA 中都混有 dsRNA, 这些是在 RNA 的合成过程中形成的。将这些 dsRNA 去除后, 再将这些正义或反义的单链 RNA 注入线虫卵中, 没有产生 RNA 干扰现象, 但如果将这些单链的 RNA 混合, 退火复性后得到的 dsRNA 注入线虫卵中可以显著地产生 RNA 干扰现象, 所以 RNAi 是由于 dsRNA 的存在而引起的^[4] (图 1)。

尽管 RNAi 的机制还不完全清楚, 但最新的证据表明 RNAi 是生物体用来防止外来病毒侵染以及转座, 保护基因组的重要手段^[5]。这些外来的干扰一旦被激活就会在宿主细胞内产生异常的 RNA 或 dsRNA。而 RNAi 可以通过这些 RNA 使靶 mRNA 迅速降解, 在果蝇中这一过程与 “Dicer” 酶有关, 该酶推测具有 RNase III 类核酸酶的性质,

专一作用于 dsRNA, 其蛋白质序列组成上具有 RNase III 类酶的特征单元序列, 通过扫描果蝇基因组序列已经找到编码该酶的候选基因。

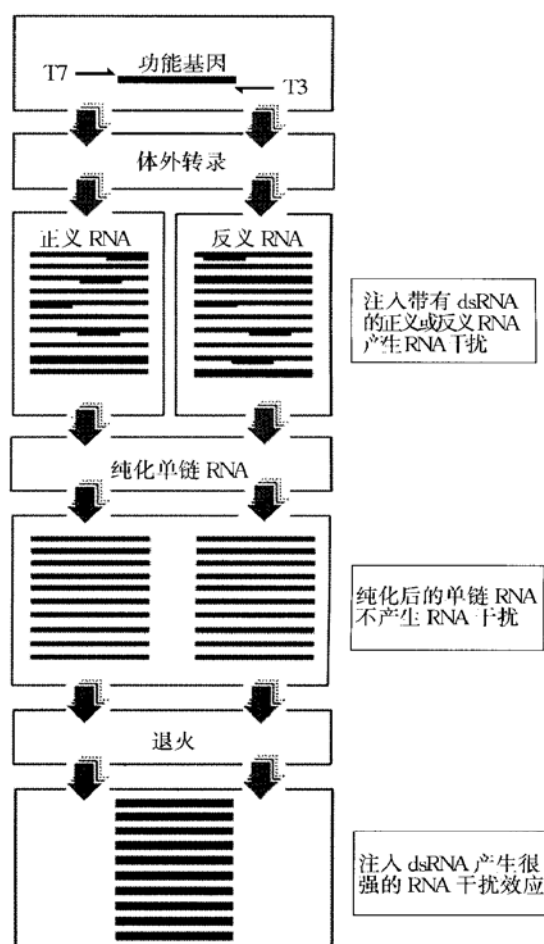


Fig 1 Discovery of RNAi

图 1 发现 RNAi 的实验

* 通讯联系人。

Tel: 021-65642518, E-mail: dengkj@fudan.edu.cn

收稿日期: 2001-04-28, 接受日期: 2001-06-28

在降解靶 mRNA 过程中, 由于 dsRNA 的二级结构特征结合 Dicer 酶并被加工成许多小片段, 称为引导 RNA (guide RNA, gRNA)^[6], 每个片段大约 22 nt. gRNA 参与形成多成分的复合酶^[7], 其中包括了多种 RNase, 除了 Dicer 酶外, 还有果蝇的 ARGONAUTE 蛋白, 两者都含有 PAZ 域, 并通过此结构结合起来. 复合酶再通过 gRNA 的引导作用于单链的靶 mRNA (图 2). 很明显, 由于 dsRNA 与靶 mRNA 序列的一致性, 加工成的 22 nt 的 gRNA 通过碱基配对可以引导复合酶的 RNA 降解酶部分有效地与靶 mRNA 作用, 使其降解.

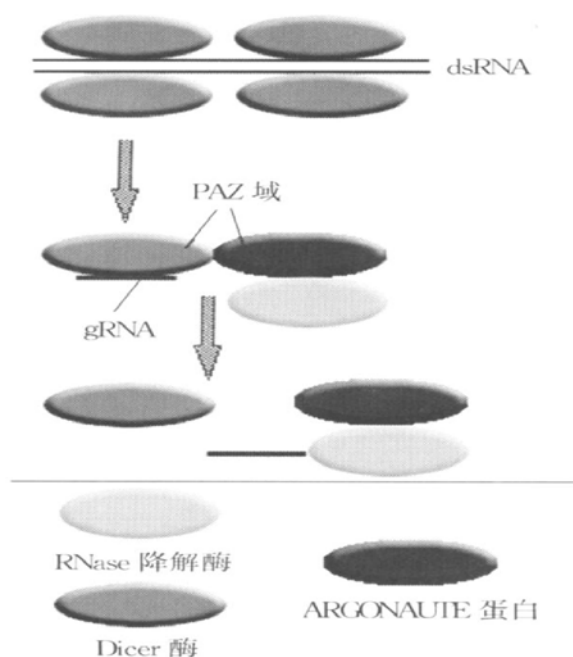


Fig. 2 The mechanism of RNAi

图 2 RNAi 作用机制图解

nautilus (*nau*) 基因是果蝇胚胎发育过程中与肌肉形成有关的重要基因, 它能使中胚层细胞分化为肌肉纤维组织. 胚胎期的肌肉形成都与能表达 *nau* 的细胞 (*nau*⁺) 有关. 但由于缺少已知的 *nau* 突变型, 可以利用 dsRNA 进行 RNAi, 观察在胚胎肌肉形成期 *nau*⁺ 细胞和 *nau* 基因的作用, 同时利用毒素消除手段^[8] 也对表型进行观察, 发现两者的表型极其相似. 如果没有 *nau* 的表达, 没有 *nau*⁺ 细胞的参与, 果蝇胚胎期肌肉组成会被严重破坏乃至消失. *frizzled* 和 *frizzled2* 在果蝇的无翅途径中的功能研究^[2] 以及 *EcR* 和 *BFTZ-F1* 在果蝇发育的幼虫期和蛹前期中的功能研究^[9] 都利用了 RNAi 技术. 可见, RNAi 技术现在已经广泛应用于果蝇基因的功能研究. 果蝇体内有 2/3 的

基因还没有已知的突变型, 因此目前利用果蝇的基因组序列信息进行 RNA 干扰可以获得更多的基因功能信息^[2, 8, 10].

RNA 干扰技术的迅速发展得益于其自身的优越性: a. 当一段与基因同源的 dsRNA 注射入果蝇胚胎时, 它可以特异的在体内干扰相应基因的表达, 其他基因即使是与靶基因同属于一个基因家族的基因都不会受到干扰. b. RNA 干扰基因的表达发生在转录后, 通过细胞质中同源 mRNA 的快速降解, 最终由于该基因缺少 mRNA 而无法产生蛋白质产物. 果蝇的 RNA 干扰实验结果在 2~3 d 内可以完成, 这一点是其他传统实验技术所无法比拟的. c. 尽管注入的 dsRNA 的浓度远远低于体内同源的 mRNA 水平, 但它却足以引起 RNA 干扰. 根据 Dicer 酶的作用模型, 每一分子的 dsRNA 可以产生多个 gRNA, 因此少量的 dsRNA 可以使宿主细胞产生强烈的反应. d. RNA 干扰技术可以在果蝇各个品系的细胞内实现, 这给研究果蝇各个方面的功能途径提供方便.

传统的 RNA 干扰技术对于研究一些与果蝇发育后期有关的基因是不合适的^[11, 12], 这类基因对于果蝇的个体发育十分重要, 一旦突变很容易致死. 如果利用 RNA 干扰技术对这类基因进行研究, 由于传统的注入外源 dsRNA 无法得到稳定的遗传, 介导干扰的 dsRNA 随着细胞分裂以及个体发育的进行, 浓度变得越来越低, 因此这类基因受到的干扰不如与胚胎期发育有关的基因. 为了解决这个难题, 目前采用的解决方法主要是利用 P 因子载体, 以更准确地了解这类基因功能, 在其上游构建热启动子和构建内源的可稳定遗传的 *IR* 基因 (*inverted repeat*) (图 3), 将该载体转入果蝇的品系中, 在需要时热诱导 *IR* 基因表达, 形成发夹结构 RNA (*hairpin-loop RNA*), 以此类 dsRNA 的结构实现对基因表达的干扰, 且效果与注射 dsRNA 相似.

利用热诱导控制表达形成 dsRNA 干扰基因表达, 可以控制 RNAi 在特定时期表达, 拓展了 RNA 干扰的应用空间. 利用热诱导可以使整个生物体产生全局性的干扰, 而不至于产生传统 RNA 微注射干扰带来的镶嵌现象^[2]; 利用 *IR* 序列可以构建大量稳定的果蝇品系, 比如一些温度敏感型, 而在过去, 这些突变型只能通过对开放末端 (*open-ended*) 进行反复筛选得到^[9]. 如果结合 *GAL4-UAS* 系统或组织特异性的启动子, 可以进

行一定时期一定组织特异的 dsRNA 表达以干扰相应的基因表达, 从而精确知道 RNAi 产生的时间和位置。

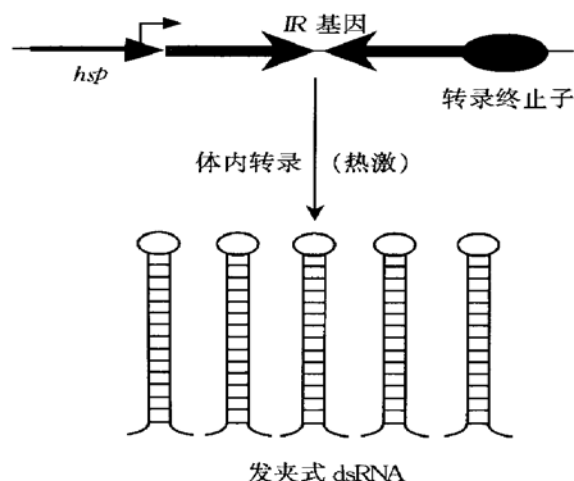


Fig. 3 The construction of IR gene

图3 构建 IR 基因

RNA 干扰技术作为反向遗传学技术已经越来越受到广泛的重视, 解决了技术上的难题, RNA 干扰技术便可以用于产生大量的缺陷型个体, 并对大量的表型模拟的突变体进行生化分析, 从而更进一步运用到研究果蝇体内许多基因, 特别是一些看守基因的研究, 以及更为深层精细的组织系统如神经系统等的研究。

参 考 文 献

- 1 Cogoni C, Macino G. Homology-dependent gene silencing in plants

- and fungi: A number of variations on the same theme. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2 (6): 657~ 662
- 2 Kennerdell J R, Carthew R W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell*, 1998, 95 (7): 1017~ 1026
- 3 Wianny F, Zernicka G M. Specific interference with gene function by double stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*, 2000, 2 (2): 70~ 75
- 4 Hunter C P. A touch of elegance with RNAi. *Curr Biol*, 1999, 9 (12): R440~ R442
- 5 Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, et al. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 2000, 101 (5): 533~ 542
- 6 Yang D, Lu H, Erickson J W. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, 2000, 10 (19): 1191 ~ 1200
- 7 Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2000, 409 (6818): 363~ 366
- 8 Misquitta L, Paterson B M. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (4): 1451~ 1456
- 9 Lam G, Thummel C S. Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2000, 10 (6): 957~ 963
- 10 Clemens J C, Worby C A, Leff N S, et al. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (12): 6499~ 6503
- 11 Kennerdell J R, Carthew R W. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotech*, 2000, 18 (8): 896~ 898
- 12 Tavernarakis N, Wang S L, Dorovkov M, et al. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet*, 2000, 24 (2): 180~ 183

RNA Interference in *Drosophila*

XU Rong, CHEN Jun, DENG Ke-Jing*

(Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract RNA interference is something of posttranscriptional gene silencing, specifically mediated by double-stranded RNA. With the development of this technology and wider applications in the study of *Drosophila*, dsRNA has come to be a potent and efficacious inhibitor of gene activity in *Drosophila*. RNAi now promises to be a powerful reverse-genetic method to determine gene function in *Drosophila*.

Key words RNA interference, posttranscriptional gene silencing, *Drosophila*, Dicer

* Corresponding author. Tel: 86-21-65642518, E-mail: dengkj@fudan.edu.cn

Received: April 28, 2001 Accepted: June 28, 2001