

日本三角涡虫 *Dj- β -catenin-1* 基因干扰载体的构建 与干扰效果的鉴定

马克学,张玉梅,陈广文

(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

摘要:为了研究抑制 *Dj- β -catenin-1* 基因对涡虫再生的影响,构建了 L4440-*Dj- β -catenin-1* 干扰载体.将含有重组质粒 L4440-*Dj- β -catenin-1* 的 HT115 细菌经 IPTG 诱导后直接喂食涡虫.结果表明,*Dj- β -catenin-1* 基因经 RNA 干扰后涡虫不能正常再生,面向后端伤口再生出一个头部而不是尾.此外,*Dj- β -catenin-1* 基因的沉默还能使涡虫正常的尾转变成头.上述工作为进一步研究 *Dj- β -catenin-1* 基因在日本三角涡虫再生中的作用奠定良好基础.

关键词:涡虫;RNA 干扰; β -catenin;再生

中图分类号:Q954

文献标志码:A

经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路在对动物胚胎发育过程中前后(anterior-posterior axis)轴和背腹轴(dorsal-ventral axis)极性的建立非常重要^[1],其功能缺失导致动物胚胎发育异常. β -Catenin 是该信号通路的核心元件,它是一种进化上保守的多功能蛋白质,参与调控细胞增殖、细胞黏附和细胞命运的决定^[2-3].研究发现, β -Catenin 在许多癌症中上调表达,因此, β -Catenin 是许多抗癌药物作用的靶点^[4-6].

淡水涡虫具有强大的再生能力,3 d 再生出眼点,7 d 就能够再生出一条完整的涡虫,是研究发育和再生的模式生物^[7-8].涡虫再生过程中前后轴极性的重建是一个重要的生物学问题,在地中海涡虫(*Schmidtea mediterranea*)中研究表明,*Smed- β -catenin-1* 对涡虫再生过程中前后轴极性的确立非常重要.RNAi—*Smed- β -catenin-1* 导致涡虫后端再生出头部,形成双头涡虫表型^[9-10].为了深入研究 Wnt/ β -Catenin 信号通路在涡虫再生中的作用机制,本研究构建了日本三角涡虫(*Dugesia japonica*)*Dj- β -catenin-1* 基因干扰载体,成功制备出双头涡虫表型.该项工作作为我们的后续研究奠定了良好基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的日本三角涡虫(*Dugesia japonica*)采集于河南省鹤壁市淇县鱼泉村.L4440 干扰载体、大肠杆菌(*Escherichia coli*)HT115 是实验室保存.pMD19-T 克隆载体、氨苄西林、四环素、T4 连接酶、XbaI 和 HindIII 限制性内切酶、Taq 酶、胶回收试剂盒,反转录试剂盒均购自 TaKaRa 公司.Real time PCR Master Mix (SYBR® Green Master Mix) 购自诺唯赞生物科技有限公司,所用引物由苏州金唯智生物技术公司合成.其他试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 *Dj- β -catenin-1* 基因 cDNA 片段的 PCR 扩增

根据获得的 *Dj- β -catenin-1* 基因(Genbank 注册号:MG599480)序列,设计一对特异性引物(forward:

收稿日期:2018-03-05;修回日期:2019-03-08.

基金项目:国家自然科学基金项目(31572267;31471965;31170357);河南师范大学博士启动经费课题(qd14173).

作者简介:马克学(1972—),男,河南项城人,河南师范大学副教授,硕士生导师,研究方向为动物学.

张玉梅(1991—),女,河南民权人,河南师范大学硕士研究生,研究方向为动物学.

通信作者:陈广文(1963—),男,教授,博士生导师,研究方向为淡水涡虫资源与保护,E-mail:chengw0183@sina.com.

5'-ACA ACC ATC GAA TCT TAT CCG CCA G-3'; reverse: 5'-CAT TGT GTA ACC GAA TTA TGT CTG T-3')扩增目的基因 cDNA 序列,将目的片段与 pMD19-T 载体连接,提取重组质粒测序验证结果。

1.2.2 L4440 载体的构建和鉴定

将上述测序正确的重组质粒与 L4440 质粒分别用 XbaI 和 Hind III 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段用 T4 DNA 连接酶连接,重组质粒转化大肠杆菌 HT115 感受态细胞.挑选阳性菌落 PCR 检测,提取重组质粒送测序验证。

1.2.3 dsRNA 诱导表达和喂食涡虫

将含重组质粒 L4440-*Dj-β-catenin-1* 的 HT115 细菌接种于含 0.1 g/mL 氨苄西林和 0.012 5 g/mL 四环素的 LB 液体培养基中,37 °C 恒温振荡培养至 OD600 约为 0.4~0.5 时,加 IPTG 诱导表达 dsRNA 4 h 后,4 °C 离心收集细菌.将细菌与牛肝混匀后喂食涡虫,每隔 3 d 喂食一次,喂食 5 次后咽前咽后切割三段让其再生,期间每天显微镜下观察涡虫再生情况,并拍照.对照组用含有 L4440 空载体的 HT115 细菌喂食涡虫。

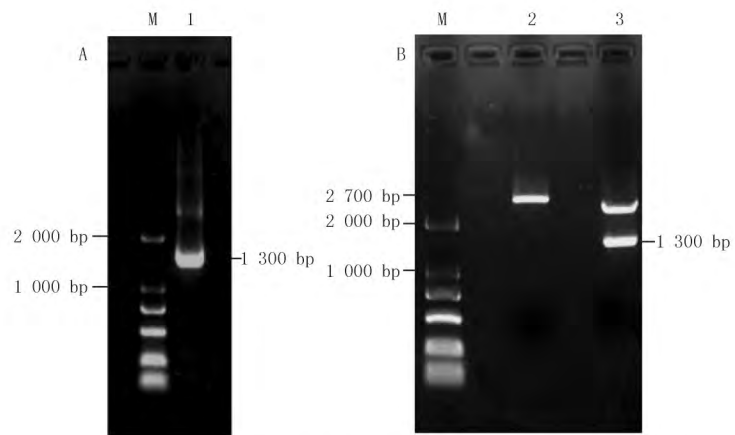
1.2.4 Real-time PCR 检测干扰后涡虫 *Dj-β-catenin-1* 基因表达变化

随机挑选对照组和 RNAi 干扰组中央片段再生 7 d 的涡虫用液氮研磨成粉末后加入 RNAiso Reagent 试剂抽提总 RNA^[11],反转录合成 cDNA.我们设计一对基因特异性引物(forward:5'-CTG AAG CAG CCC AAG CGT CAA TA-3'; reverse:5'-TCG GTA CGA AAT TAC AAG GAG AC-3'),用实时荧光定量 PCR 技术检测干扰后 *Dj-β-catenin-1* 基因表达变化.涡虫的 DjEF2 基因(forward:5'-AAG ACG ATG AAG TTG CTA TTG C-3'; reverse: 5'-AAC TCC GAC AAG ACC ACA GAT-3')作为内参.用相对 CT 值法即 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[12]来计算干扰后 *Dj-β-catenin-1* 基因 mRNA 的相对表达量.仪器为 ABI7500 real-time System,每个处理重复 3 次.用 SPSS 13.0 对 Real-time PCR 获得的数据单因素方差分析, $P < 0.01$ 为显著性差异。

2 结 果

2.1 L4440 干扰载体的构建

首先采用 PCR 方法获得目的基因 *Dj-β-catenin-1* cDNA 片段,结果(如图 1A)所示,条带为 1 300 bp 左右,与预期大小一致.将目的基因与 L4440 载体双酶切后连接转化 HT115 细菌,挑选阳性克隆,提取 L4440-*Dj-β-catenin-1* 重组质粒,用 XbaI 和 Hind III 对重组质粒进行双酶切,酶切后释放出 1 300 bp 左右的目的条带,表明 *Dj-β-catenin-1* 基因已插入质粒载体 L4440 中(图 1B).重组质粒测序结果与 *Dj-β-catenin-1* 基因序列完全一致,说明已经成功构建 L4440-*Dj-β-catenin-1* 重组质粒.菌液扩大培养,保存菌种于 -80 °C。



M. 2 000 bp DNA Marker; 1. PCR 扩增产物; 2. 重组质粒; 3. 酶切重组质粒产物

图 1 L4440-*Dj-β-catenin-1* 载体的构建

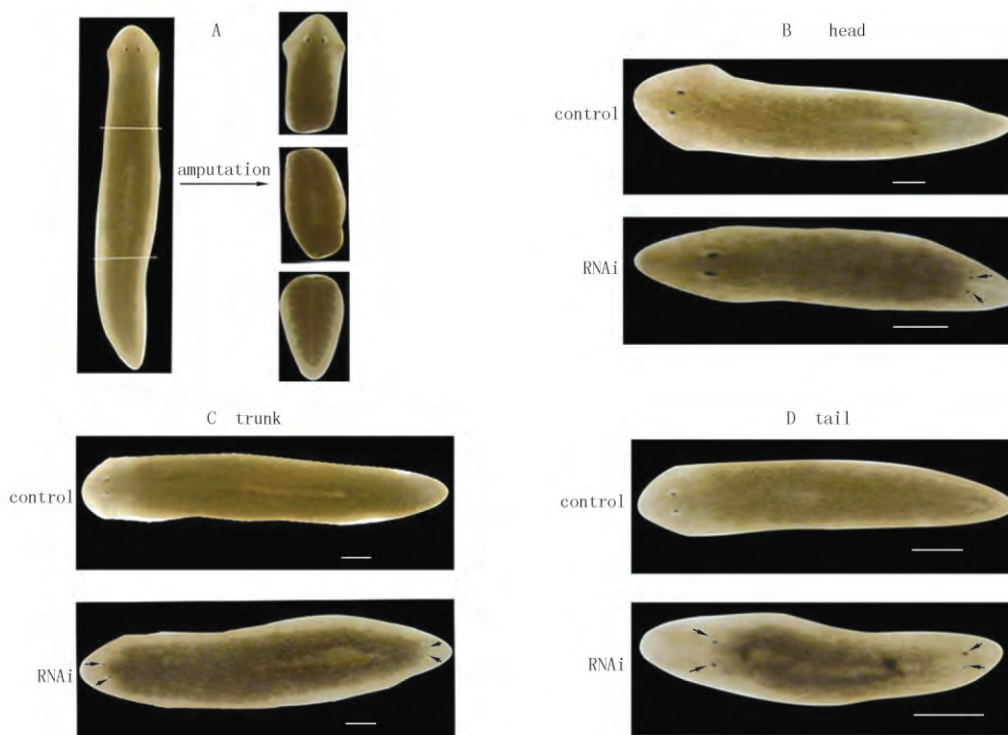
M: 2000bp DNA Marker; 1. Amplification fragment of target gene; 2. Recombinant plasmid; 3. Recombinant plasmid digested by HindIII and XbaI.

Fig. 1 Construction of L4440*Dj-β-catenin-1* vector

2.2 RNAi-*Dj-β-catenin-1* 基因对涡虫再生的影响

含有 L4440-*Dj-β-catenin-1* 重组质粒的 HT115 细菌经 IPTG 诱导产生 dsRNA,将细菌喂食涡虫进行 *Dj-β-catenin-1* 基因干扰实验.干扰后的涡虫从咽前咽后切割成 3 段观察再生表型变化(如图 2A).再生 7 d 后,头部片段的后端再生出两个眼点(如图 2B),表型率为 26/30.中央片段的两端都能再生出眼点(如图

2C),表型率为 20/30.令人惊奇的是,RNAi-*Dj- β -catenin-1* 基因不仅能使再生涡虫的后端形成眼点,而且还能使正常涡虫尾部结构改变,在正常的涡虫尾部形成双眼点(如图 2D),表型率为 12/30.由此可见,RNAi-*Dj- β -catenin-1* 基因使涡虫前后轴极性发生改变.



A. 切割模式; B. 头部再生; C. 中间片段再生; D. 尾部再生 (Scale bar: 500 μ m) 箭头示眼点.
Arrow indicated the eyespots. A: Schematic depicting of the amputation; B: Head fragment regeneration;
C: Trunk fragment regeneration; D: Tail fragment regeneration. Scale bar: 500 μ m.

图2 *Dj- β -catenin-1* 基因干扰后再生涡虫的形态变化

Fig.2 Phenotype changes in regenerating planarians following *Dj- β -catenin-1* interference

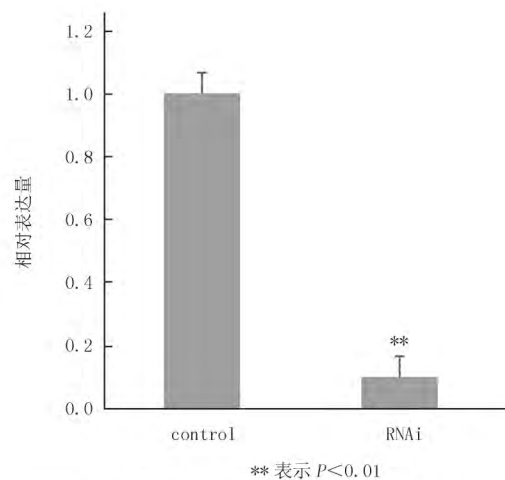
2.3 Real-time PCR 检测 *Dj- β -catenin-1* 基因干扰效果

采用 Real-time PCR 技术检测干扰后涡虫 *Dj- β -catenin-1* 基因的表达变化.结果显示,与对照组相比,RNAi 涡虫体内该基因表达量极显著下降,是对照水平的 0.1 倍(如图 3).

3 讨论

淡水涡虫是一个非常神奇的动物,将其横切后总是面向前端的伤口再生出头,面向后端的伤口再生出尾.著名遗传学大师摩尔根认为,涡虫从前到后有一种物质浓度梯度决定了涡虫前后轴的极性.在地中海涡虫中研究表明: *β -catenin-1* 基因主要在涡虫后端表达.干扰 *β -catenin-1* 表达能导致涡虫前后轴极性逆转,涡虫后端再生出眼点,形成异位头部^[13-14].

β -Catenin 是 Wnt/ β -Catenin 信号通路的重要组成部分,它进入细胞核与转录因子 Tcf/Lef 结合激活靶基因转录.但是,抑制 *β -catenin-1* 引起哪些基因表达的改变并不清楚.HOX 同源基因沿前后体轴分布对



**表示 $P < 0.01$
图3 *Dj- β -catenin-1* 基因干扰后 mRNA 相对表达量
Fig.3 Relative expression level of *Dj- β -catenin-1* following interference

动物个体的发育非常重要.抑制 β -catenin-1 对 HOX 基因的表达模式有何影响并不清楚.为了深入研究 β -catenin-1 对下游基因的调控作用,制备出双头涡虫是解决这一问题的基础.

L4440 是一个含有双启动子的干扰载体,经 IPTG 诱导后在细菌体内形成 dsRNA.喂食含有 dsRNA 的细菌干扰基因表达已经在线虫和涡虫等多种动物中广泛应用^[45].我们将日本三角涡虫 β -catenin-1 基因构建到 L4440 干扰载体上,诱导产生 dsRNA 喂食涡虫,这种方法表现出很好的干扰效果.喂食细菌后的涡虫切割后端再生出眼点,形成头部.qRT-PCR 检测表明干扰后涡虫体内内源性 β -catenin-1 基因的表达量显著下降.L4440 干扰载体的成功构建和双头涡虫模型的建立为后续研究工作奠定了良好的基础.

参 考 文 献

- [1] Iglesias M, Gomez-Skarmeta J L, Salo E, et al. Silencing of *Smed-βcatenin1* generates radia-like hypercephalized planarians[J]. *Development*, 2008, 135(7): 1215-1217.
- [2] Su H, Suredagomez M, Rabanedalombarte N, et al. A C-terminally truncated form of β -catenin acts as a novel regulator of Wnt/ β -catenin signaling in planarians[J]. *Plos Genetics*, 2017, 13(10): e1007030.
- [3] Nelson W J, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways[J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1483-1487.
- [4] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192-1205.
- [5] Ormanns S, Neumann J, Horst D, et al. WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear β -Catenin depend on active PI3K signaling[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(10): 2999-3011.
- [6] 陈劲松, 梁庆模. Wnt/ β -Catenin 信号通路与抗癌治疗新靶点[J]. *中国临床医学*, 2007, 14(1): 118-121.
- [7] 陈广文, 马克学. 淡水涡虫: 分类地位、胚胎发生和再生[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 36(4): 140-144.
- [8] Reddien P W, Sánchez A A. Fundamentals of planarian regeneration[J]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, 2004, 20(1): 725-757.
- [9] Gurley K A, Rink J C, Alvarado A S. β -catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis[J]. *Science*, 2008, 319(5861): 323-327.
- [10] Petersen C P, Reddien P W. *Smed-βcatenin-1* is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration[J]. *Science*, 2008, 319(5861): 327-330.
- [11] 陆国清, 王春玲, 郝宇琼, 等. 转 G10eve 基因棉花的获得及草甘膦抗性的初探[J]. *棉花学报*, 2018, 30(1): 21-28.
- [12] 丁颜朋, 葛晓阳, 王鹏, 等. 棉花盐胁迫应答基因 GhEXO70B1 功能分析[J]. *棉花学报*, 2018, 30(6): 423-434.
- [13] Iglesias M, Almuedocastillo M, Aboobaker A A, et al. Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Developmental Biology*, 2011, 358(1): 68-78.
- [14] Hill E M, Petersen C P. Wnt/Notum spatial feedback inhibition controls neoblast differentiation to regulate reversible growth of the planarian brain[J]. *Development*, 2015, 142(24): 4217-4229.
- [15] Kim J K, Gabel H W, Kamath R S, et al. Functional genomic analysis of RNA interference in *C. elegans*[J]. *Science*, 2005, 308(5725): 1164-1167.

Construction of *Dj-β-catenin-1* gene interference vector of planarian *dugesia japonica* and identification of its interference efficiency

Ma Kexue, Zhang Yumei, Chen Guangwen

(College of Life Science, Henan Normal University, Xixiang 453007, China)

Abstract: In order to investigate the effects of inhibition of *Dj-β-catenin-1* gene on planarian regeneration, the interference vector of L4440-*Dj-β-catenin-1* is constructed in this research. After the IPTG induction of dsRNA, the bacteria HT115 containing the recombinant plasmid L4440-*Dj-β-catenin-1* are directly fed to planarians. The results show that RNA interference (RNAi) of *Dj-β-catenin-1* causes the inappropriate regeneration of a head instead of a tail at posterior amputations. In addition, the silencing of *Dj-β-catenin-1* is sufficient to transform the normal tail into a head. This work plays a good foundation for further studying the function of *Dj-β-catenin-1* gene in planarian regeneration.

Keywords: planarian; RNAi; β -catenin; regeneration

[责任编辑 王凤产 杨浦]