RNAi 技术在蜂学研究中的应用*

刘 芳** 李志国 李文峰 苏松坤***

(浙江大学动物科学学院 杭州 310029)

摘 要 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指外源或内源的双链 RNA(dsRNA)特异性引起基因表达沉默的现象,特异性和高效性是 RNAi 技术的特点。本文主要从调控目标基因的表达、级型分化的分子基础、防治蜜蜂病毒病 3 个方面概述了 RNAi 技术在蜂学研究中的应用进展情况,并展望 RNAi 技术在蜜蜂功能基因组研究领域的应用前景。

关键词 蜜蜂, RNAi, 双链 RNA, 应用

RNAi technology and its application in honeybee science researches

LIU Fang** LI Zhi-Guo LI Wen-Feng SU Song-Kun***

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract RNA interference (RNAi) is a phenomenon whereby *in vitro* or *in vivo* dsRNA efficiently silences the expression of specific genes. There are three ways by which siRNA (small interfering RNA) is imported into organs. Here we summarize advances in the application of RNAi in research, such as the regulation of the expression of targeted genes and the molecular basis of caste differentiation. We also evaluate prospects for the application of RNAi in honeybee genomics.

Key words honeybee, RNAi, dsRNA, application

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指在进化过程中高度保守的、双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)引发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。这种现象是生物体为了保护自身基因组免受外源性(如病毒)和内源性(如转座元件)序列的侵袭,而特异地调节或干扰基因表达的一种自身防御"免疫"应答现象(Plasterk, 1998)。双链 RNA 能导致转录后基因沉默,最早来自 Guo 和 Kewphues(1995)对线虫的研究。Fire 等(1998)发现双链 RNA 有基因沉默效应。Hamilton 和 Baulcomb(1999)发现大小为 25 nt 左右的反义 RNA 能特异性抑制具有相应互补序列的基因表达。这一新发现决定 RNAi 在基因功能研究等领域的广阔应用。本文从调控目标基因的表达、级型分化的分子基础、防治蜜蜂病毒病 3 个方面概述 RNAi 技术在蜂学研究中的应用进展情况,并展望 RNAi 技术在蜜蜂功能基因组研究领域的应用前景。

1 RNAi 技术

Fire 等(1991)证明反义 RNA 能产生干扰效应, Seydoux 和 Fire(1994)发现这种干扰效应具有遗传性,随后 Guo 和 Kemphues(1995)研究证实正义 RNA 也能产生干扰效应。接着 Fire 等(1998)人发现双链 RNA 同样具有干扰效应,并且这种效应可以无限循环和放大。Hamilton 和 Baulcomb(1999)在马铃薯中发现大小为 25 nt 左右的反义 RNA 能特异性抑制具有相应互补序列的基因表达。

从上面可以得出 RNAi 三点特性:单独的正反

* 资助项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-43-kxj4)、科技部 863 项目(2007AA10Z332)、浙江省自然科学基金部分资助。

** E-mail: liufangbgh@163.com

*** 通讯作者, E-mail: susongkun@zju.edu.cn

收稿日期:2010-04-27,接受日期:2010-08-12

义 RNA 具有干扰效应;RNA 干扰效应具有可遗传性;双链 RNA 也具有干扰效应。然而 RNAi 技术的作用机制也存在三个阶段:起始阶段、效应阶段和扩增阶段(图 1)。起始阶段获得小的大小在 23 nt 左右的 dsRNA,效应阶段小的 dsRNA 与特定蛋白结合形成 RNA 诱导沉默复合物,并结合到靶 mRNA 上,从而抑制靶基因的表达,扩增阶段是 RNAi 的延续与循环,新形成的 dsRNA 重新与特定蛋白结合形成复合物,从而进一步抑制靶基因的表达(Fire *et al.*, 1998)。

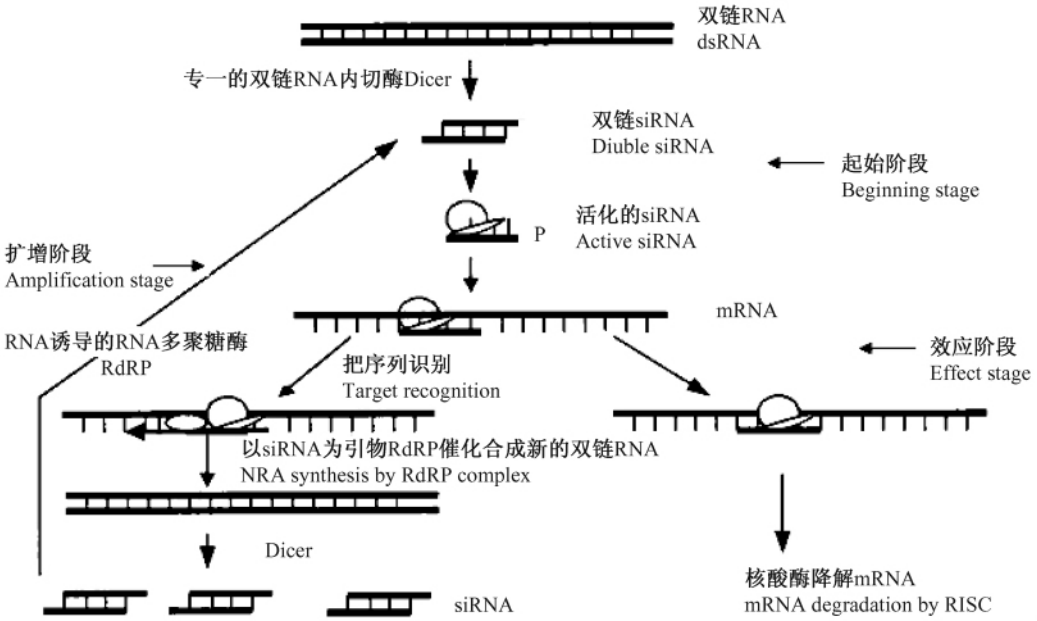

图 1 RNAi 作用机制

Fig. 1 Mechanism of RNAi

2 RNAi 在蜂学领域的应用

至今为止,RNAi 技术在很多生物体上都得到了应用,并且其基因沉默的效果都得到证实,比如谷蛀虫、布氏锥虫、水螅、蟑螂、蜘蛛等(Brown *et al.*, 1999; Lohnmann *et al.*, 1999; LaCount *et al.*, 2000; Marie *et al.*, 2000; Schoppmeier and Damen, 2001)。近几年在蜜蜂领域也开始陆续采用该技术进行研究,本文就蛋白表达、病毒检测和级型分化上做一总结介绍。

2.1 利用 RNAi 调控目标基因的表达

Beye 等(2002)首次开展了 RNAi 技术在蜜蜂研究领域的应用。他们将来自长度为 300 bp 的 E30 同源基序的 dsRNA 注射到蜜蜂的胚胎,成功阻断了靶基因在整个胚胎中的蛋白表达。

随后 Amdam 等(2003)利用 RNAi 技术在蜜蜂上成功地阻止了卵黄蛋白基因的表达,他们将来源 504 bp 大小的卵黄蛋白编码序列的 dsRNA 注射到胚胎前期的卵内,当那些被处理的卵发育出房后,结果显示有 15% 的蜜蜂被检测到卵黄蛋白 mRNA 水平有明显的下降;而直接将 dsRNA 通过内腹注射到刚出房的蜜蜂上,检测结果表明有 96% 的蜜蜂存在突变形态。实验最后他们发现,在卵期注射 dsRNA 会导致蜜蜂整个发育期的基因功能的破坏,而通过内腹注射却没有。保幼激素是蜜蜂行为转变的一个重要因子,但是这个重要因子受控于血淋巴内的卵黄蛋白水平,这意味着血淋巴内的卵黄蛋白对蜜蜂行为的转变起着巨大的调控作用。Amdam 等(2006)通过 RNAi 检测发现,下调卵黄蛋白基因的表达水平引起蜜蜂工蜂味觉反应的增强。

Gatehouse 等(2004)通过 RNAi 技术使得蜜蜂咽下腺的淀粉酶活性降低。他们将长度1 175 bp 的淀粉酶基因克隆到 pEGM-5Zf(+)载体内的两个 T7 启动子间,这个重组质粒可以在能产生 T7 RNA 聚合酶的大肠杆菌中产生特异的淀粉酶 dsRNA,得到的 dsRNA 通过内腹注射到采集蜂的血淋巴,结果发现被注射的蜜蜂中淀粉酶活性有

显著下降。

Maleszka 等(2007)采用 RNAi 技术发现 *csp5* 是蜜蜂的一个外胚层基因。他们利用 dsRNA 阻止 *csp5* 的表达,结果引起 *csp5* 高效表达部位的异常。那些被注射处理的胚胎有的奇形怪状,有的骨架看起来明显受损,它们有的不能孵化出房,有的未到幼虫期就死亡。

Nunes 和 Simões(2009)采用饲喂 dsRNA 的方法在自然条件下完成对卵黄蛋白的基因沉默。他们将卵黄蛋白 dsRNA 直接喂给 2 日龄的幼虫,实验中饲喂量的不同带来显著不同的效果,仅仅饲喂 0.5 μg 的 dsVg-RNA(dsRNA for vitellogenin)和 dsGFP-RNA 的幼虫有 60% 能够正常羽化出房,而饲喂 3.0 μg dsRNA 的幼虫没有能够存活到蛹期的。实验过程中处理组与未处理组的蜜蜂体重没有显著差别,这说明 dsRNA 的摄入并没有给蜜蜂带来明显的负面影响。

2.2　利用 RNAi 技术研究级型分化的分子基础

级型分化现象是昆虫学研究的热点之一,是一个极为复杂的生长发育调节过程。蜜蜂 *Apis mellifera* 是典型的社会性昆虫,成千上万的蜜蜂个体通过一种高度成熟的社会性组织形式构成一个统一整体——蜂群。蜂王、雄蜂和工蜂属蜂群社会的三种不同级型,长期以来,让人们感兴趣而又困惑不解的是蜂王与工蜂可由遗传上相同的受精卵发育而来,而它们的表型却存在巨大差异,是两种截然不同的级型。RNAi 技术的应用对于揭开人们的疑惑起到了很大的帮助。

Patel 等(2007)利用 RNAi 技术证实了一种营养能量感应激酶 TOR(target of rapamycin)路径是蜜蜂级型分化的重要因子。蜜蜂幼虫进食足够的王浆,则会发育成蜂王,如果进食蜂粮如蜂蜜花粉,则发育成工蜂。他们研究得出 TOR 控制着蜜蜂机体的生长发育变化。幼虫能否发育成蜂王与 TOR 编码基因的活性有关,敲除蜜蜂的 TOR(amTOR)基因能够阻止幼虫发育成蜂王,并最终发育成表现出工蜂特性的蜜蜂即发育成工蜂。

对这一营养功能关系的秘密,Kucharski 等(2008)进一步研究发现王浆控制着蜜蜂的生殖地位。他们利用 RNAi 技术解释了蜜蜂幼虫进食蜂王浆变成蜂王而不是工蜂是通过降低 DNA 甲基化水平来实现的。研究发现蜜蜂进食蜂王浆可以通过抑制 DNA 甲基化的过程来影响蜜蜂基因的表达。DNA 甲基转移酶 Dnmt3 在其中起着重要作用,他们将 Dnmt3 dsRNA 注射到新产出来的蜜蜂幼虫,检测到酶 Dnmt3 mRNA 明显的减少,而且最后有 72% 的蜜蜂羽化出房后是蜂王,有发育完好的卵巢管,另外 28% 的蜜蜂则是典型的工蜂,都是卵巢管发育不全的个体。证明了酶 Dnmt3 活性的破坏能使发育中的蜜蜂幼虫变成蜂王。

Antonio 等(2008)进一步证实了卵黄蛋白基因的作用。他们利用 RNAi 使卵黄蛋白沉默,从而发现被处理工蜂提前转变成采集蜂。

Aronstein 等(2006)通过 RNAi 技术证实跨膜蛋白 SId-1 在蜜蜂中的存在,及其作为一种跨膜通道功能,有利于 dsRNA 被吸收。AmSid-1 的表达在蜜蜂的所有组织都可以检测到,而在成年蜂的头部含量最丰富,其次是卵组织。通过饲喂 dsRNA 来诱导系统基因沉默,给蜜蜂基因沉默的结果使得蜜蜂大量的死亡和形态变异。

我国科技工作者利用新一代高通量测序技术筛选了蜂王幼虫和工蜂幼虫之间 37 个表达量差异显著的侯选目标基因,通过 RNAi 技术逐一进行小 RNA 对蜜蜂幼虫级型分化和形态发育影响的检测,共完成了 81 群次4 000多只蜂王24 000多个形态指标检测,筛选出若干个影响蜜蜂级型分化的功能基因。

2.3　利用 RNAi 技术防治蜜蜂病毒病

蜂群崩溃失调病(colony collapse disorder, CCD),即表面看起来很健康的蜂群短时间内大量成年工蜂突然消失,在巢脾上只剩下蜂王、幼虫和一些未成年工蜂以及花粉等残留食物,且在蜂箱内并无死亡蜜蜂的残存尸体,也没有寄生害虫的存在(Oldroyd, 2007)。科学家推测以色列急性麻痹病毒(Israeli acute paralysis virus, IAPV)与其有密切关系(Stokstad, 2007)。Maori 等(2007)报道给蜜蜂饲喂 IAPV 基因序列的 dsRNA 可以使 IAPV 感染沉默,阻止蜂群崩溃失调病(CCD)的发生。

3　小结与展望

RNAi 技术已经成为当今科学研究领域的重要技术之一,是研究基因功能的新工具,可以研究细胞信号转导通路和细胞生长发育过程,特异性地抑制基因表达,在很多研究领域都有广阔的应

用前景。蜜蜂已成为研究社会行为和学习记忆能力的模式生物，蜜蜂全基因组测序工作已经完成，进入功能基因组时代，阐明蜜蜂基因组内重要基因的功能及其调控机制是科学家面临的巨大挑战。RNAi 技术以其简便、高效、无需详尽遗传背景的特点，必将在蜜蜂基因功能研究中扮演越来越重要的作用。

RNAi 技术在蜂学研究领域的应用起步不久，还存在不少问题，比如导入方式哪一种效果好，RNAi 作用持续时间长短等，这些又都取决于靶基因、作用位点、摄入方式和被摄入的蜜蜂生理状况等因素。只有不断完善，发现并弥补这些不足，我们才能更充分利用 RNAi 技术。

参考文献(References)

Amdam GV, Norbergb K, Page Jr RE, Erber J, Scheiner R, 2006. Down regulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behav. Brain Res.*, 169(2): 201—205.

Amdam GV, Simões ZLP, Guidugli KR, Norberg K, Omholt SW, 2003. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol.*, 3(1): 1—8.

Antonio DSM, Guidugli-Lazzarini KR, Nascimento AM, Simões ZLP, Hartfelder K, 2008. RNAi-mediated silencing of *vitellogenin* gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften*, 95(10): 953—961.

Aronstein K, Pankiw T, Saldivar E, 2006. Sid-I is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. *J. Apic. Res.*, 45(1): 20—24.

Beye M, Hartel S, Hagen A, Hasselmann M, Omholt SW, 2002. Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Mol. Biol.*, 11(6): 527—532.

Brown SJ, Mahaffey JP, Lorenzen MD, Denell RE, Mahaffey JW, 1999. Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol. Dev.*, 1(1): 11—15.

Fire A, Albertson D, Harrison S, Moerman DG, 1991. Production of antisense RNA leads to effective andspecific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*, 113(2): 503—514.

Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC,1998. Potent and specificgenetic interference by double-stranded RNA in *C. elegans*. *Nature*, 391(6669): 806—811.

Gatehouse HS, Gatehouse LN, Malone LA, Hodges S, Regidga ET, Todd J, 2004. Amylase activity in honey bee hypopharyngeal glands reduced by RNA interference. *J. Apic. Res.*, 43(1): 9—13.

Guo S, Kemphues KJ, 1995. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegant* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81(4):611—620.

Hamilton AJ, Baulcombe DC, 1999. A species of small antisens RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441): 950—951.

Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319(5871): 1827—1830.

LaCount DJ, Bruse S, Hill KL, Donelson JE, 2000. Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 111(1): 67—76.

Lohmann JU, End I, Bosch TC, 1999. Silencing of developmental genes in Hydra. *Dev. Biol.*, 214(1): 211—214.

Maleszka J, Foret S, Saint R, Maleszka R, 2007. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev. Genes Evol.*, 217(3): 189—196.

Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Peretz Y, Edelbaum O, Tanne E, Sela I, 2007. Isolation and characterization of IAPV, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J. Gen. Virol.*, 88(12): 3428—3438.

Marie B, Bacon JP, Blagburn JM, 2000. Double-stranded RNA interference shows that Engrailed controls the synaptic specificity of identified sensory neurons. *Curr. Biol.*, 10(5): 289—292.

Nunes FMF, Simões ZLP, 2009. A Non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(2): 157—160.

Oldroyd BP, 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biol.*, 5(6): 1195—1199.

Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, Emore C, Hunt G, Frederick K, Amdam GV, 2007. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS ONE*, 62:e509.

Plasterk R, 1998. V(D)J recombination: Ragtime jumping. *Nature*, 394(6695): 718—719.

Schoppmeier M, Damen WGM, 2001. Double-stranded RNA interference in the spider *Cupienius salei*: the role of Distal-less is evolutionary conserved in arthropod appendage formation. *Cytogenet. Cell Genet.*, 211(2): 76—82.

Seydoux G, Fire A, 1994. Soma-germline asymmetry in the distributions of embryonic RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 120(10): 2823—2834.

Stokstad E, 2007. The case of the empty hives. *Science*,316(5827): 970—972.