

RNA 干涉在纤毛虫中的研究进展*

刘星吟 黄炫 樊 或 金立培**

(中山大学生命科学院 广州 510275)

摘要: RNA 干涉是 dsRNA 介导的基因沉默现象, 本文简要介绍了其作用的机制和生物学意义, 重点阐述了 RNA 干涉在原生动物纤毛虫中的发现与应用, 比较了 RNA 干涉与纤毛虫大核基因组重排机理的异同, 并对 RNA 干涉在纤毛虫中传输的技术途径-RNAi 喂饲法的原理也做了详细的介绍。

关键词: 纤毛虫; 双链 RNA(dsRNA); RNA 干涉(RNAi)

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)01-117-05

Application of RNA Interference in the Study of Ciliated Protozoa

LIU Xing-Yin HUANG Xuan FAN Yu JIN Li-Pei

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275 China)

Abstract: RNA interference(RNAi) is the process of sequence-specific, post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA(dsRNA) that is homologous in sequence to the silenced gene. RNA interference has been proved to be a powerful method for reducing the expression of specific genes in many organisms. Recent researches have shown that small RNAs function to specify sequences to be eliminated by a mechanism similar to RNA-mediated gene silencing during the gene rearrangement of the ciliated protozoa, *Tetrahymena*. The review will focus on the practical application of RNAi, the RNAi pathway in the ciliated protozoa.

Key words: Ciliate; Double-stranded RNA(dsRNA); RNA interference(RNAi)

外源性或内源性双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA) 导入细胞中, 与该 dsRNA 同源的 mRNA 则受到降解, 因而其相应基因的表达受到抑制, 这种转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS) 现象首先在线虫^[1]中得到证实, 由于这是一种在 RNA 水平的基因表达抑制, 故也称 RNA 干涉(RNA interference, RNAi)。其后在果蝇^[2]、锥虫^[3]、草履虫^[4]、斑马鱼^[5]和小鼠^[6]中也相继得到证实。由于 RNA 干涉提供了一种简单、快速失活基因功能的方法, 已发展成为一种新兴的反义遗传学技术。该项技术在基因功能、表达调控、缺陷识别和基因治疗等研究领域已崭露头角, 广受青睐。2002 年 RNAi 研究又有了新的突破, 被证明在基因表达调控中发挥重要作用, 故《Science》再次将其评为 2002 年度的十大科学成就之首。Mochizuki 等的研究表明^[7], 纤毛虫大核基因组重排的过程和 RNA 干涉机制有着惊人的相似之处, 本文关注的焦点将集中于 RNA 干涉在原生动物纤毛虫的研究进展上, 结合作者正在

进行的相关研究予以评述。

1 作用的机制和生物学意义

陈忠斌^[8]等已报道过 RNAi 作用机制的研究进展, 这里仅做简要说明: 在 RNA 干涉过程中, dsRNA 首先被核酸酶(一种具有 Rnase III 样活性的核酸酶)切割成长度为 21 ~ 25 个核苷酸(nt) 的小干涉 RNA 分子(small interference RNA, siRNA)。果蝇中的 Rnase III 样核酸酶称为 Dicer。Dicer 具有解旋酶(helicase)活性, 含 dsRNA 结合域和 PAZ 结构域, 在多种生物中也发现 Dicer 相似物的存在。然后由 siRNA 中的反义链指导形成一种核

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39970089);

** 通讯作者, E-mail: Lpj@21cn.com;

第一作者简介 刘星吟, 女, 27 岁, 博士研究生; 研究方向: 发育分子遗传学。

收稿日期: 2003-04-28, 修回日期: 2003-09-15

蛋白体,即 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),再由 RISC 介导切割靶 mRNA 分子中与 siRNA 反义链互补的区域,从而达到干扰基因表达的作用。现已发现 PAZ/Piwi 蛋白家族成员是 RISC 的组成部分,并且较长的 dsRNA 向 siRNA 转变过程中需要 ATP 的参与。siRNA 可作为一种特殊的引物,在依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)作用下以靶 mRNA 为模板合成新的 dsRNA,后者可进一步被降解成 siRNA,新生成的 siRNA 又可进入上述循环。这一过程被称为随机降解 PCR(random degradative PCR)。

通过对脉孢菌、线虫、果蝇等多种生物的深入研究,现普遍认为 RNAi 现象的生物学意义表现为抵抗病毒入侵,抑制转座子活动,从而阻止不必要的和有害基因的表达,对维持细胞及机体的正常功能起着重要的作用^[9],是真核生物中普遍存在的、与防御和监控相关联的一种基因表达调控机制^[10]。

2 在纤毛虫中的应用

Sperling 领导的研究小组于 1998 年发现草履虫存在依赖同源识别的基因沉默现象(homology dependent gene silencing, HDGS),是纤毛虫中以 dsRNA 介导 RNAi 效应的首次报道。目前 RNAi 已作为研究草履虫和四膜虫基因功能的有效工具。

Ruiz^[4]等在分别转移单拷贝 ND7 基因(负责胞外分泌物溶解)和一个多基因家族的两个成员(中心体蛋白基因和刺丝胞基质蛋白基因)到大核的过程中发现,这些基因的表达显著降低,与之平行进化的同源基因的表达也受到影响。当 ND7 基因转移到小核后,细胞便失去了溶解胞外分泌物的能力,且 ND7 基因沉默的效率达到 100%;而注射相同拷贝该基因的完整基因组序列到大核时,细胞却仍能溶解胞外分泌物,ND7 基因不出现沉默现象。与此同时,在 ND7 基因沉默的细胞里发现 mRNA 呈特异性降解并形成小 RNA 分子。基因沉默的过程在草履虫中无性生活周期中是稳定存在的,但在有性过程中,由于大核的基因片段被降解,基因便不再沉默。这是首次在纤毛虫中报道了以 dsRNA 介导的特异性降解 mRNA,从而抑制细胞骨架组织相关基因以及分泌调节相关基因表达的依赖同源序列识别的基因沉默现象。1999 年, Ruiz^[11]继续用此方法对基体复制基因的功能进行验证。Froissard^[12]也用同样的方法查明了另一个调控分泌物的基因 ND7 的功能。Galvani 和 Sperling^[13]的研究表明,依赖同源识别基因沉默的过程并不需要启动子,而转移含有 3' 非编码区的

基因时,即使有反义 RNA 产生,相应基因也不发生沉默。在沉默过程中,基因的有义链(sense)和反义链(antisense)都被转录,这与 dsRNA 介导的基因转录后沉默过程完全一致,实际上是一种 dsRNA 引发的特定基因表达受抑的基因沉默现象。目前,这种 RNAi 现象已发展成为分析草履虫基因功能的重要工具,与基因敲除技术相比, RNAi 显得更加准确、高效^[11]。且干扰目标基因表达只需要该基因的一段开放读码框,而不需要基因的全长序列^[13]。

RNAi 技术在草履虫的成功应用也为探讨纤毛虫小核体功能的分子遗传机理提供了一个新的途径。纤毛虫核器两型化,历来认为大核专司营养,小核专司生殖。然而,这一传统观念因发现大量新的证据而受到质疑。对多种纤毛虫的研究表明^[14-22]:小核除了通过有性生殖演化为新的大核和小核,即主要行使生殖功能外,还直接对代谢、生长、发育及形态建造等过程发挥某种/些作用或影响,即兼具某些体功能。由于研究方法的局限,小核体功能的分子遗传机理一直未能得到阐明。RNAi 技术的出现及其它分子生物学方法的发展为解决这一难题提供了新的机遇,作者正设法筛选、克隆小核特异表达的 cDNA 序列,构建含有目标基因的工程菌,通过后面将要叙述的 RNAi 喂饲法(RNAi feeding)以揭示相关基因的功能。

在四膜虫、尖毛虫、游仆虫等纤毛虫中,已发现小核基因组中除了基因内部的非编码区存在间隔序列(internal eliminated sequence, IES)外,还存在很多功能未知的类似转座子的序列^[23],而且四膜虫某些转座子序列具有完整的读码框^[24,25],RNAi 提供了一种理想的方法,使这些具有编码框的转座子失活,从而验证其功能。这些序列在大核发育的过程中被全部剔除,它们的消失是否与 RNAi 相关呢?

3 与纤毛虫中的大核基因组重排

四膜虫细胞含有一枚大核和一枚小核。在有性生殖过程中,两个细胞配对,它们的小核经过减数分裂和受精后各自形成单倍体的配子核,其中一枚于原地不动(称静止核或雌原核),另一枚向对方迁移(称迁移核或雄原核)。当雄原核移近雌原核时,两者融为一体,于是接合双方各自形成一枚二倍体合子核。合子核经有丝分裂所产生的子核中,一枚变成二倍体的小核,一枚成为二倍体的大核原基,其基因组 DNA 须经过两个重组事件发育成为新的多倍体的大核。首先,大约 6000 个(分子变化范围 100 bp ~ 20 kb) IES 序列从小核的五对染色体上删除;接着,这些染色体被小于 50 nt 的

断裂消除序列(breakage eliminated sequence, BES)裂解成 200~300 个微型染色体,并由端粒酶加接末端^[26]。那么这一重组过程究竟在什么分子指导下完成的呢?

3.1 建立 ScanRNA 模型的实验依据 Mochizuki 及其同事通过一系列的实验认为小 RNA 分子可能介入这一重组事件^[7]。他认为 *TW1* 基因参与了 IES 序列的消除和染色体的断裂;同时这个基因还负责这些小 RNA 分子(大约 28 nt)在四膜虫接合过程中的积累。*TW1* 基因克隆于四膜虫早期配对的细胞,已证明是 *PPD* 基因家族的成员,这个基因家族具有保守的 PiWi 和 PAZ 结构域,现已证明这两个结构域参与了 RNAi 过程,如线虫中的 *rde-1* 的基因^[27]、真菌中的 *qde-2*^[28]、果蝇中的 *ago-1* 和 *ago-2*^[29]。实验过程中他们发现 *TW1* 基因的 mRNA 产物仅出现在有接合配对细胞中,而不出现在饥饿和正在生长的细胞,于是推测 *TW1* 基因可能仅在接合过程中发挥作用。为了进一步调查这个事件,他们通过基因敲除在后代中筛选到了不含 *TW1* 基因的子细胞,并发现这些子细胞虽然能产生接合后体,但其接合后体都不能存活。PCR 分析表明细胞死亡是由于大核基因组中 IES 和 BES 序列不能被正常消除。基于这个事实:即许多 *PPD* 基因家族成员参与了由 21~25 nt siRNA 分子介导的 RNAi 过程, Mochizuki^[7] 等又在接合的细胞中发现了分子量大约为 28 nt 的小 RNA 分子,而在 *TW1* 突变体细胞中却没有找到类似的小分子 RNA。他们推测小分子 RNA 可能在 *TW1* 敲出细胞中并没有被合成或者在合成后很快降解。同时还发现这些 RNA 分子的序列与小核特有序列 100% 同源,其正常表达也需要另一个与 IES 消除密切相关的 *PDD1* 基因的表达^[30]。以上实验结果表明 28 nt RNA 分子可能参予 IES 和 BES 地消除,这个事件发生在二倍大核向新的多聚大核转变过程中。最新的研究结果还表明 IES 的消除和组蛋白 H3 的第 9 个赖氨酸甲基化密切相关 [histone H3 lysine 9 methylation, Me(Lys9)H3]^[31]。与裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)^[32] 发生 RNA 干涉时着丝点的修饰和 *met* 位点的修饰作用完全一致。

3.2 “ScanRNA”模型 根据以上的实验结果, Mochizuki^[7] 提出了一个名为“ScanRNA model”来解释这些小分子 RNA,即定期扫描 RNA 分子(ScanRNAs)是如何介导 IES 和 BES 的消除(图 1)。在接合过程中,IES 的双链首先在四膜虫的小核(MIC)中转录,同时 *PDD1* 基因也开始表达,这些转录产物自身,和来自 BES 的转录产物将可能首先杂交,形成 dsRNA。dsRNA 然后被 DICER-like 酶切割成 28 nt “ScanRNA”分子。这些 ScanRNAs 分子与 *PDD1* 基因的产物 Pdd1p 结合后将从

老的小核转移到已经发生 IES 消除和染色体端裂的亲本大核(Parental MAC)中。这个转移过程将由 *TW1* 基因编码产物 TWIIP 介导。任何与亲本大核 DNA 同源的 ScanRNAs 将被 RnaseH-like 酶降解。保留下来的 ScanRNAs(Selected ScanRNAs)将再一次从亲本大核运输到正在发育的大核中,并特异地识别发育大核基因组中出现的小核,但未出现在亲本大核基因组中的 IES 和 BES 序列。它们也能识别在接合过程以前整合到小核基因组中的病毒和转座子序列。随后便通过与相关的蛋白复合体结合而直接将这些序列消除,或者通过化学变化(甲基化和组蛋白修饰)、结构变化(染色体重建)间接地干扰与染色体结合的区域而将其消除。

3.3 ScanRNA 模型与 RNAi 发生机制 由此可见, ScanRNA 模型与 RNAi 发生机制有着惊人的相似之处,可归纳为^[7,9,10]:1)作用的第一步都是 dsRNA 经 Rnase III 样核酸酶裂解成正义和反义序列组成的干扰性 RNA,或称定期扫描 RNA (small interfering RNAs, siRNAs or scan RNAs);2) siRNAs(ScanRNAs)的反义链依赖 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)特异降解与之同源的 mRNA;3) Rnase III-like 核酸酶都含有相同的与 dsRNA 结合的 PiWi 和 PAZ 结构域;4)尽管形成的 RNA 分子(28 nt)比在 RNAi 系统中的(20~26 nt)稍长,但两种单链的末端均为 5-磷酸和 3-羟基;5)形成的 siRNA 和 ScanRNA 都具有生物催化反应的基本动力学特征,能作为引物对靶 mRNA 特异性扩增;6)其生物学意义相同,都表现为阻抑不必要的基因或有害基因的表达。

4 在纤毛虫中产生的技术途径

在利用 RNAi 技术研究纤毛虫基因功能时,一个必须考虑的问题是 dsRNA 进入体内的方法。目前,导入 dsRNA 的方法有两种:第一种为体外传输,包括显微注射(microinjection)和浸没(soaking)两种途径;第二种是 DNA 载体介导的体内转染(cell culture transfection),通过线虫或纤毛虫直接摄入以此载体构建的工程菌来达到转染的目的,故又称 RNAi 喂饲法(RNAi feeding)。体外传输虽是 dsRNA 进入细胞的一种有效方法,但不能稳定遗传,介导干扰的 dsRNA 会随着细胞分裂而逐渐消失。用构建含有 dsRNA 表达质粒的工程菌喂饲线虫进行 RNAi 首次获得成功^[34], Sperling^[35] 领导的研究小组受其启发对草履虫开展 RNAi 喂饲试验,将目标基因的编码区插入含有两个 T7 启动子的载体中,通过载体产生的 dsRNA 成功地对相应基因的表达进行干扰,从而验证了目的基因的功能。RNAi 喂饲技术不仅能使基因

的功能关闭,而且通过停止喂饲又能使基因的功能马上恢复,因而对基因功能的大规模分析尤其有用。RNAi 喂饲法也适用于任何吞噬细菌的其它生物,在功

5 小结

RNAi 既是生命活动自我调控的一种机制,又是一种发展迅速、用途广泛的实验技术。通过阻止人体细胞中有害基因的表达,对于各种病毒病、癌症和艾滋病等疾病的防治具有不可估量的应用前景^[36]。纤毛虫细胞结构的精细和复杂性,核器的两型性为研究高等动物的生殖细胞和体细胞的分化、基因组重排、转座子起源等生物学上一些重要问题提供了理想的研究模型。RNAi 技术在纤毛虫中的应用无疑将促进这些生物学根本问题的解决。

参 考 文 献

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391**: 806 ~ 811.
- [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**: 1 017 ~ 1 026.
- [3] Ngo H, Tschudi C, Gull K, *et al.* Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 14 687 ~ 14 692.
- [4] Ruiz F, Vaysie L, Klotz C, *et al.* Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol Biol Cell*, 1998, **9**: 931 ~ 943.
- [5] Wargelius A, Ellingsen S, Fjose A. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **263**: 156 ~ 161.
- [6] Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature Cell Biol*, 2000, **2**: 70 ~ 75.
- [7] Mochizuki K, Fine N A, Fujisawa T, *et al.* Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell*, 2002, **110**(6): 689 ~ 699.
- [8] 陈忠斌, 于乐成, 王升启. RNA 干扰作用 (RNAi) 的研究进展. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, **18**(5): 525 ~ 528.
- [9] Barstead R. Genome-wide RNAi. *Current Opinion Chemical Biology*, 2002, **5**: 63 ~ 65.
- [10] Hutvagner G, Zamore P D. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, **12**(2): 225 ~ 232.
- [11] Ruiz F, Beisson J, Rossier J, *et al.* Basal body duplication in *Paramecium* requires gamma-tubulin. *Curr Biol*, 1999, **9**(1): 43 ~ 46.
- [12] Froissard M, Keller A M, Cohen J. ND9P, a novel protein with armadillo-like repeats involved in exocytosis: physiological studies using allelic mutants in *Paramecium*. *Genetics*, 2001,

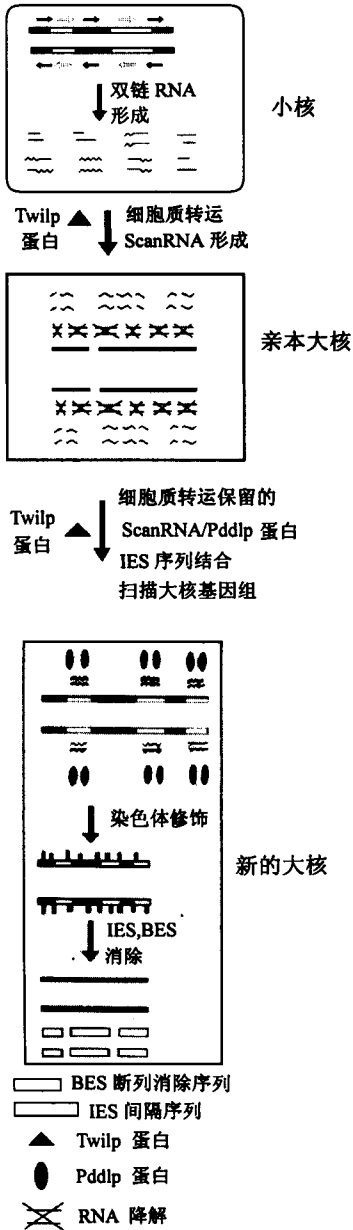


图 1 四膜虫中 ScanRNA 介导的 DNA 删除模型^[7,33]

能基因组的研究中可以大大缩短研究进程,降低研究成本。因此,借鉴上述技术,我们将小核特异表达的目标 cDNA 片段插入含有两个反向的 T7 启动子的 pBlueScript 质粒中以获得工程菌株,按一定比例,用诱导表达相应 dsRNA 的细菌喂饲有小核的纤毛虫,为阐明小核体功能的分子遗传机理带来了希望。

- 157(2):611 ~ 620.
- [13] Galvani A, Sperling L. Transgene-mediated post-transcriptional gene silencing is inhibited by 3' non-coding sequences in *Paramecium*. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**:4 387 ~ 4 394.
- [14] Ng S F. The somatic function of the micronucleus of ciliated protozoa. *Progress in Protistology*, 1986, **1**:215 ~ 286.
- [15] Ng S F. Developmental heterochrony in ciliated protozoa: overlap of asexual and sexual cycles during conjugation. *Biol Rev*, 1990, **65**:19 ~ 101.
- [16] Chau M F, Ng S F. Stomatogenetic function of the micronucleus in *Paramecium jenningsi*. *Eur J Protistol*, 1988, **24**:40 ~ 51.
- [17] Takahashi T. The organization in amiconucleates with defective mouth of ciliate *Pseudourostula levi*. *J Protozool*, 1988, **35**(1):141 ~ 150.
- [18] Jin L P, Ng S F. The somatic function of the germ nucleus in *Pseudourostyla cristata*: asexual reproduction and stomatogenesis. *J Protozool*, 1989, **36**:315 ~ 326.
- [19] 金立培, 刘小意, 金华中. 冠突伪尾柱虫有性生殖期间皮膜发育的核控制. *动物学研究*, 2001, **22**(2):99 ~ 104.
- [20] 金立培, 刘小意, 金华中. 五种腹毛类纤毛虫小核体功能的比较研究. 见:中国原生动物学学会编. 中国原生动物学学会第十一次学术讨论论文摘要汇编. 武汉:武汉电力大学出版社, 2001, 86.
- [21] Jin L P, Liu X Y, Zhang Z L, et al. Micronuclear effect on structural stability of oral apparatus in *Uroleptus piscis*. *Jpn J Protozool*, 2002, **35**(suppl.): 41.
- [22] 刘小意, 金立培. 念珠伪角毛虫小核体功能初步研究. *动物学研究*, 2002, **23**(3):258 ~ 260.
- [23] Chau M F, Orias E. Developmentally programmed DNA rearrangement in *Tetrahymena thermophila*: isolation and sequence characterization of three new alternative deletion systems. *Biol Cell*, 1999, **686**(2 ~ 3):111 ~ 120.
- [24] Gershan J A, Karrer K M. A family of developmentally excised DNA elements in *Tetrahymena* is under selective pressure to maintain an open reading frame encoding an integrase-like protein. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(21):4 105 ~ 4 112.
- [25] Wuitschick J D, Gershan J A, Lochowicz A J, et al. A novel family of mobile genetic elements is limited to the germline genome in *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(11):2 524 ~ 2 537.
- [26] Yao M C, Zheng K, Yao C H. A conserved nucleotide sequence at the site of developmentally regulated chromosomal breakage in *Tetrahymena*. *Cell*, 1987, **48**:779 ~ 788.
- [27] Tabara H, Sarkissian M, Kelly W G, et al. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 1999, **99**(2):123 ~ 132.
- [28] Catalanotto F A, Quissell D, Rekow D, et al. Local, regional, and global partnerships in developing a research program. *J Dent Educ*, 2002, **66**(8):942 ~ 951.
- [29] Williams R J, Frausto da Silva J J. The involvement of molybdenum in life. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **292**(2):293 ~ 299
- [30] Coyne R S, Nikiforov M A, Smothers J F, et al. Parental expression of the chromodomain protein Pdd1p is required for completion of programmed DNA elimination and nuclear differentiation. *Mol Cell*, 1999, **4**(5):865 ~ 872.
- [31] Taverna S D, Coyne R S, Allis C D. Methylation of histone H3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell*, 2002, **110**(6):701 ~ 711.
- [32] Nonaka N, Kitajima T, Yokobayashi S, et al. Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol*, 1999, **4**(1):89 ~ 93.
- [33] Dernburg A F, Karpen G H. A chromosome RNAissance. *Cell*, 2002, **111**(2):159 ~ 162.
- [34] Timmons L, Court D L, Fire A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 2001, **263**(1 ~ 2):103 ~ 112.
- [35] Galvani A, Sperling L. RNA interference by feeding in *Paramecium*. *TRENDS in Genetics*, 2002, **18**:11 ~ 12.
- [36] Lee N S, Dohjima T, Bauer G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature Biotechnol*, 2002, **20**:500 ~ 505.
- [37] Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science*, 2002, **298**(5 602):2 296 ~ 2 297.