

用于 RNA 干扰研究的大肠杆菌表达系统的条件优化

姚琼, 董易之, 徐淑, 徐海明, 陈炳旭* (广东省农业科学院植物保护研究所, 广东广州 510640)

摘要 选取在 *E. coli* 中对于 dsRNA 表达比较重要的 3 个因素, 即诱导时间、诱导温度和诱导剂 IPTG 浓度。利用已经构建好的大肠杆菌 *E. coli* HT115(DE3), 并结合正交试验设计研究 dsRNA 在 HT115(DE3) 内的最优表达条件。结果表明, 工程菌在诱导时间 8 h、诱导温度 30 °C、诱导剂浓度 10.0 mmol/L 的培养条件下所得到的 dsRNA 表达量最大。

关键词 大肠杆菌 HT115(DE3); dsRNA; 表达条件; 正交试验

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)24-024-02

Optimal Condition for dsRNA Expression in *E. coli* for RNA Interference Research

YAO Qiong, DONG Yi-zhi, XU Shu, CHEN Bing-xu* et al (Plant Protection Research Institution, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640)

Abstract In this study, induction time, induction temperature and IPTG concentration are selected to optimize expression of dsRNA in *E. coli* HT115(DE3). The expression condition factors are studied by orthogonal experiment design. The results showed that the optimal condition for dsRNA expression was that induction time was 8 h, induction temperature was 30 °C and IPTG concentration was 10 mmol/L.

Key words *E. coli* HT115(DE3); dsRNA; Expressing condition; Orthogonal experiment

1998 年 Fire 等^[1]将体外转录得到的单链 RNA(正义 RNA(sense RNA)和反义 RNA(anti-sense RNA))注射到线虫 *Caenorhabditis elegans* 体内, 发现两者都能够特异性阻断相应基因的表达, 诱导了特异性的基因沉默(gene silencing), 该小组将此现象称为 RNA 干扰(RNA interference, 简称 RNAi)。目前, RNAi 技术已在多种模式生物如线虫(*Caenorhabditis elegans*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、小鼠(moth)等体内实现, 通常是用 dsRNA(double-stranded RNA)介导基因沉默作用, dsRNA 作为 RNAi 作用的前导物质, 对于干扰作用的发生起着决定性作用^[2-4]。以 dsRNA 为基点研究基因沉默的分子机制成为热点^[5]。

在线虫 *C. elegans* 中, 只需导入少量的 dsRNA 即可实现高效的 RNAi 效果, 但哺乳动物和果蝇中不存在 RNAi 的放大机制, 即导入 dsRNA 后产生的 RNAi 作用不持久, 具有瞬时性^[6-7]。为了克服此缺点, 研究者发展了基于 DNA 载体在动植物体内表达 dsRNA 的技术。这种载体可以是质粒, 也可以是病毒, 甚至可以是 DNA 片段^[8-9]。先在体外构建能表达 dsRNA 的载体, 再将载体转到细胞内合成 dsRNA, 不但能增加有效转染细胞的种类, 而且在长期稳定表达载体的细胞株中, dsRNA 能够长期稳定表达, 省时省力且高效^[10-11]。因此, 应用合适的表达载体表达 dsRNA, 对于采取喂食法和注射法实现的 RNAi 试验起着至关重要的作用。

由于质粒 L4440 作为表达载体具有含有双向 T7 强启动子, 载体本身具有氨苄抗性, 便于筛选等优点, 目前已成功用于多种 RNAi 试验所需 dsRNA 的表达^[12-13]。在干扰载体构建完成后克隆至大肠杆菌 HT115(DE3) 中, 该菌含有 T7

RNA 聚合酶基因(λ DE3 lysogen), 它可在 T7 启动子的控制下进行基因转录, 产生 T7 RNA 聚合酶。而且该菌有一个 *rnc* 基因突变, 它是编码特异性降解 dsRNA 的内切酶 RNase III 的基因, 有利于 dsRNA 的生成, 这样在 IPTG 诱导下在 *E. coli* 内很容易产生 dsRNA, 另外, 该菌为四环素抗性, 转入载体后具有双抗性, 便于筛选^[14-15]。因此, 该表达系统的成功构建, 可以快速经济地利用喂食法或注射法 RNAi 进行生物体某个基因功能的研究。

dsRNA 作为 RNAi 作用的前体分子, 在生物体中合适量的 dsRNA 对 RNAi 的效果起到了很重要的作用, 而大肠杆菌又是用于表达外源基因的较好载体^[12]。因此, 利用大肠杆菌大量表达 RNAi 试验所需的 dsRNA 并进一步优化其表达条件是必要的。笔者利用带有空载质粒 L4440 及重组质粒 LSA3 的表达工程菌 HT115(DE3), 借助正交试验设计优化其表达 dsRNA 的条件(例如诱导温度、时间等), 便于后续的以喂食法或注射法介导的 RNAi 在靶标生物体内的实现。

1 材料与方法

1.1 载体与菌株 菌株: HT115(DE3), 美国斯坦福大学 Fire 教授赠送(美国国家线虫遗传学研究中心提供)。

质粒 L4440: 美国斯坦福大学 Fire 教授赠送(美国麻省 Addgene 机构提供)。

有外源基因插入的质粒 LSA3: 在空载质粒 L4440 中插入甜菜夜蛾(*spodoptera exigua*) 几丁质合成酶 A 的一段长度为 450 bp 基因片段, 该重组质粒由中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室提供。

1.2 试剂 蛋白胨(peptone)、酵母粉(yeast extract) 购自 Oxoid 公司产品; 氨苄青霉素(ampicillin)、四环素(Tetracycline) 购自广州威佳科技有限公司; DNA marker III 购自 NEB 公司; IPTG 购自 Merck 公司; DEPC 购自 AMRESCO 公司; Trizol 购自天根生化科技(北京)有限公司; 氯仿、异丙醇、乙醇及其他常用的化学试剂购自广州化学试剂厂。

基金项目 广东省农业科学院院长基金项目(201425); 广东省农作物病虫害绿色防控技术研究开发中心建设项目。

作者简介 姚琼(1984-), 女, 湖南益阳人, 助理研究员, 博士, 从事农业昆虫与害虫防治研究。* 通讯作者, 研究员, 博士, 从事果树害虫综合防控研究。

收稿日期 2015-06-26

1.3 试验方法

1.3.1 目的基因在工程菌中的诱导表达。

1.3.1.1 正交试验设计。大肠杆菌经诱导表达外源基因的主要影响因素为诱导时间、诱导温度及诱导剂浓度,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表(表 1)。

表 1 正交试验因素水平

水平	因素		
	诱导时间(A)//h	诱导温度// °C	IPTG 浓度//mmol/L
1	2	25	0.1
2	4	30	1.0
3	8	37	10.0

1.3.1.2 目的基因的诱导表达。在 2 块分别含 LSA3、L4440 质粒的大肠杆菌平板上,用无菌牙签挑取一些白色菌落,分别接种到 3 ml LB 液体培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amp、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tet)中,37 °C、250 r/min 振荡培养 12~14 h,活化。然后以 1:50 转接至 2 × YT 培养基中,37 °C、250 r/min 振荡培养至 $OD_{600}=0.4$ 左右时,按试验号加入相应浓度 IPTG,并根据各试验号所需的条件诱导相应的时间及温度。

1.3.2 菌体 RNA 的提取及检测。菌体 RNA 抽提采用传统的 Trizol 提取法,并在该方法上稍作调整。

RNA 质量检测手段包括琼脂糖凝胶电泳检测和分光光度计测定。称取 0.2 g Agrose 溶于 1 × TAE 缓冲液中,定容至 20 ml,制成 1% 的电泳胶。将 5 μl RNA 样品与 1 μl 6 × Loading Buffer 充分混合后电泳检测。将 2 μl RNA 样品与 498 μl DEPC 水混匀(放大 250 倍),利用分光光度计检测,记录样品的 OD_{260} 、 OD_{260}/OD_{280} 及 RNA 浓度。

2 结果与分析

2.1 工程菌富集量直观对比 试验组与对照组组间对比:根据 3 次重复中菌液富集量情况,LSA3 组与 L4440 组菌量无明显差异。试验组与对照组组内对比:直观上看,L4440 组与 LSA3 组都存在一个现象,即 25 °C 培养条件下富集得到的菌量普遍比 30 °C、37 °C 这 2 种培养条件下的菌量少,但 30 °C 与 37 °C 条件下培养所得到的菌液浓度无明显差异。

2.2 菌体 RNA 的提取及 RNA 纯度检测 对 3 次重复所抽提的菌体 RNA 利用分光光度计检测其纯度,结果显示,3 次重复中所抽提的 RNA 纯度较好,2 个组 OD_{260}/OD_{280} 在 1.7~2.00 的样品比例都为 88.9%,说明样品很少蛋白污染,且没有 RNA 水解成单核苷酸的现象。

2.3 正交试验结果 由表 2 可知,3 个因素对结果的影响大小依次为 A、B、C。即对于大肠杆菌 HT115(DE3) 生长诱导时间的作用最大,其次是诱导温度,最后是诱导剂 IPTG 的浓度。

方差分析结果表明,3 个因素对于试验结果的影响并不显著,诱导时间对于试验结果有一定影响,而另外 2 个因素诱导时间与诱导剂浓度对试验结果影响不明显。

最佳组合为 $A_3B_2C_3$,即诱导时间 8 h,诱导温度 30 °C,诱导剂浓度 10.0 mmol/L。

表 2 正交试验结果

试验号	因素				平均浓度 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	A//h	B//°C	C//mmol/L	空列 X	
1	2	25	0.1	1	-388.067
2	2	30	1.0	2	-232.66
3	2	37	10.0	3	-241.943
4	4	25	1.0	3	-866.427
5	4	30	10.0	1	2 042.86
6	4	37	0.1	2	990.63
7	8	25	10.0	2	1 238.177
8	8	30	0.1	3	1 775.067
9	8	37	1.0	1	1 861.71
k_1	-862.670	-16.3167	2 377.627 0	3 516.503	
k_2	2 167.063	3 585.267 0	762.626 7	1 996.143	
k_3	4 874.953	2 610.397 0	3 039.093 0	666.696 7	
R	5737.623	3 601.583	2 276.467	2 849.807	

注:平均浓度为原始数据 -3000 后的数值。

3 结论与讨论

先在体外构建能表达 dsRNA 的载体,再将载体转到细胞内合成 dsRNA,可保证在细胞株中长期稳定表达 dsRNA,有效发挥 RNAi 阻断基因的效应^[15-16]。该试验选用 *E. coli* HT115(DE3) (具有四环素抗性)作为材料,转入含对应目标片段 dsRNA 的 cDNA 载体 L4440(具有氨苄抗性)后具有双抗性,便于筛选,这在 IPTG 诱导下在 *E. coli* 内很容易产生 dsRNA。

大肠杆菌表达外源基因的影响因素很多,该试验选用影响较大的几项:诱导剂 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间。因为工程菌表达外源基因的条件因基因不同也相应不同,因此设定了这 3 个影响因素的 3 个水平以期得到 *E. coli* HT115(DE3) 表达目的基因的最优条件。而试验组 LSA3 收菌量略小于空白对照组 L4440,可能的原因是:外源基因的存在对菌体的生长有一定影响。25 °C 培养条件下富集得到的菌量普遍比 30 °C、37 °C 这 2 种培养温度下的菌量少,但 30 °C 与 37 °C 温度下培养得到的菌量差别不大,造成这一现象可能的原因是工程菌 *E. coli* HT115(DE3) 的生长受温度影响较大,25 °C 并不是其适宜生长温度,其生长最适温度是 30~37 °C。

正交试验设计是一种解决多因素优化问题的卓有成效的方法^[17-20]。该试验采用正交试验设计研究了 dsRNA 在 HT115(DE3) 内的最优表达条件。结果表明,最适合工程菌 *E. coli* HT115(DE3) 生长并表达 dsRNA 的最佳组合为 $A_3B_2C_3$,即诱导时间 8 h,诱导温度 30 °C,诱导剂浓度 10.0 mmol/L。

参考文献

- [1] FIRE A, XU S Q, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391 (6669): 806-811.
- [2] GRISHOK A. RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans* [J]. FEBS Letters, 2005, 579 (26): 5932-5939.
- [3] 徐俊,毛颖,苗荻,等. RNA 干扰技术的研究进展[J]. 生物技术世界, 2012, 12(3): 15-17.
- [4] TIMMONS L, FIRE A. Specific interference by ingested dsRNA [J]. Nature, 1998, 395 (6705): 853-854.
- [5] FELLMANN C, LOWE S W. Stable RNA interference rules for silencing [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(1): 8-10.

OCH₃-5'), 5.08(1H, d, *J* = 8Hz, Glc-1), 3.16 ~ 3.50(葡萄糖上氢质子信号)。结合化合物 3 以及文献[16]数据进行对比, 鉴定化合物 11 为野鸢尾苷(iridin)。

3 结论

该研究采用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析和重结晶等方法进行分离纯化, 并根据波谱数据进行结构鉴定, 系统分析射干中萜和苷元类的化学成分。结果表明, 在乙酸乙酯萃取物中分离鉴定了 6 个化合物, 经波谱解析分别鉴定为鸢尾苷元(tectorigenin, 1)、鸢尾甲黄素 A(tectorigenin A, 2)、野鸢尾黄素(irigenin, 3)、鸢尾甲黄素 B(irstectorigenin B, 4)、次野鸢尾黄素(irisfloreintin, 5)、白射干素(dichotomitin, 6); 正丁醇萃取物中分离鉴定了 5 个化合物, 分别为芒果苷(mangiferin, 7)、鸢尾甲苷 A(irstectoridin A, 8)、鸢尾苷(tectoridin, 9)、鸢尾甲苷 B(irstectoridin B, 10)、野鸢尾苷(iridin, 11)。可见, 从射干中分离得到了 11 个化合物, 除化合物 7 属于双苯吡酮外, 其他化合物均属于异黄酮类。该研究结果涵盖了异黄酮和双苯吡酮类成分, 为其进一步的研究提供物质基础及其药用资源开发起到较好的促进作用。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 267-268.

[2] 吉文亮, 秦民坚, 王靖涛. 中药射干的化学与药理研究进展[J]. 国外医

药·植物药分册, 2000, 15(2): 57-58.

[3] PUAPAIROJ P, NAENGCHOMONG W, KIJJOA A, et al. Cytotoxic activity of lupine-type triterpenes from *Glachidion sphaerogynum* and *Glachidion eriocarpum*[J]. *Planta Med*, 2004, 70: 1234-1236.

[4] 韩杨, 孔红, 李宜平, 等. 射干的抗病毒实验研究[J]. *中草药*, 2004, 35(5): 306-308.

[5] 吴泽芳, 熊朝敏. 射干与鸢尾抗炎作用的比较[J]. *药物分析杂志*, 1985, 5(5): 167-168.

[6] 于军, 徐丽华, 王云, 等. 射干和马齿苋对 48 株绿脓杆菌体外抑菌试验的研究[J]. *白求恩医科大学学报*, 2001, 27(2): 150-151.

[7] 张良, 张玉奎, 陈艳, 等. 射干叶中异黄酮类化学成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(1): 69-71.

[8] 杨勇勋, 董小萍. 川射干的化学成分研究[J]. *中药与临床*, 2010, 1(1): 20-22.

[9] 邱鹰昆, 高玉白, 徐碧霞, 等. 射干的化学成分研究[J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(15): 1133-1135.

[10] 李英娜, 张国刚, 毛德双, 等. 射干化学成分的研究[J]. *中南药学*, 2007, 5(3): 222-224.

[11] 周立新, 林茂, 赫兰峰. 射干的化学成分研究[J]. *中草药*, 1996, 27(1): 8-10.

[12] 胡彦君, 刘梁, 王定勇. 芒果叶的化学成分研究[J]. *亚太传统医药*, 2010, 6(2): 18-19.

[13] 黄龙, 杨峻山, 彭勇, 等. 白射干的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(23): 3168-3171.

[14] 李应勤, 陆蕴茹, 魏璐雪. 白射干黄酮类成分的研究[J]. *药学报*, 1986, 21(11): 836-841.

[15] 赏后勤, 秦民坚, 吴新荣. 川射干的化学成分[J]. *中国天然药物*, 2007, 5(4): 312-314.

[16] 袁崇均, 玉茹, 陈帅, 等. 川射干化学成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20(3): 444-446.

(上接第 25 页)

[6] AHMET M D, HANNON G J. RNAi: An ever-growing puzzle[J]. *Biochemical Sciences*, 2003, 28(4): 196-201.

[7] FIRE A. RNA-triggered gene silencing[J]. *Trends Genet*, 1999, 15(9): 358-363.

[8] RAVI S K, MARTINEZ-CAMPOS M, ZIPPERLEN P, et al. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genome Biology*, 2000, 2(1): 1-10.

[9] PHILLIP A N, PETER W R, FRANCESC C, et al. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians[J]. *PNAS*, 2003, 100(1): 861-865.

[10] 颜怀城. RNA 干扰的研究进展[J]. *中国药业*, 2006, 15(16): 4-6.

[11] FRASER A G, KAMATH R S. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference[J]. *Nature*, 2000, 408(10): 325-330.

[12] TIMMONS L, COURT D L, FIRE A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Gene*, 2001, 263(1/2): 103-112.

[13] CARTHEW R W. Gene silencing by double-stranded RNA[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(2): 244-248.

[14] HAMMOND S M, CAUDY A A. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA[J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(2): 110-119.

[15] TENLLADO F, MARTINEZ-GARCIA B, VARGAS M, et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections[J]. *BMC Biotechnology*, 2003, 3(3): 1472-1570.

[16] G·J·汉农. RNAi——基因沉默指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 1-104.

[17] 王怀亮, 赵海水. 用正交实验法选择制备黄腐酸的最佳条件[J]. *腐植酸*, 1999, 1(2): 28-40.

[18] 唐春红, 蔡绍哲. 一种在生物医学工程科研中有实用价值的实验设计方法——均匀设计与正交实验设计联用的实验设计方法[J]. *生物医学工程杂志*, 2006, 23(6): 28-31.

[19] 李皓, 唐新军. 逐次正交设计优化法[J]. *长江科学院院报*, 1996, 9(13): 37-39.

[20] 杜荣寿. 生物统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 241-286.