

中华按蚊 RNAi 技术平台的建立及应用*

杜明辉, 陈 斌, 乔 梁

(重庆师范大学 昆虫与分子生物学研究所 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】建立一套经济、便捷及高效的 RNAi 技术平台。【方法】以中华按蚊(*Anopheles sinensis*)为模式物种,从材料固定、注射部位、注射剂量等方面进行改进,并利用该平台沉默中华按蚊黑色素代谢途径中在蛹期表达的一个关键基因,以验证该平台的操作性。【结果】建立了中华按蚊显微注射平台,通过摸索和改进注射操作技术,利用该平台成功地实现了幼虫、蛹和成蚊的显微注射;同时,有效地沉默了该关键基因的表达,获得了黑化缺陷的蛹表型。【结论】该平台体系的建立,不仅为中华按蚊功能基因的研究提供了分析手段,同时也为其他涉及显微注射的技术体系提供了参考。

关键词:中华按蚊;基因功能;RNAi;显微注射;体色黑化

中图分类号:Q966

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2017)01-0030-04

以蚊虫作为媒介传播的疟疾、登革热、黄热病、寨卡病等流行性传染病,威胁着世界上 1/3 的人口^[1-2]。因此,对媒介蚊虫种群数量的有效抑制是控制这些致命传染病蔓延的必不可少的措施。目前,不论是针对蚊虫生理代谢的化学杀虫剂,还是以遗传工程为主要技术支持的蚊虫绝育技术等新一代防控策略,它们的基础都是对蚊虫的传病机制、毒物代谢、生长发育等重要生理过程的清楚认识,而其中的前提则是对参与这些生理过程的关键基因的功能进行深入细致地分析。

目前,越来越多的媒介蚊虫的基因组被测序^[3-5],了解这些蚊虫基因组中的编码基因在蚊虫的生存及繁殖中扮演的角色不仅是蚊虫功能基因组研究的重要课题,同时也是蚊虫防控策略的理论基础。在功能基因研究中, RNAi 是一种相对高效、成熟、便捷且研究成本较低的技术手段^[6-7]。在昆虫研究中, RNAi 技术虽然已经普遍应用^[8],但操作难度因物种的不同而呈现出较大的差别。一般来说,昆虫体形越小,肢体越柔弱,在进行双链 RNA 注射操作时,材料准备及注射手段的难度则越大。因此,对于蚊虫这类微小的昆虫来说,是否能发展一套操作时间短、注射精度高且对各发育阶段损伤程度较小的 RNAi 技术体系,对于一些研究平台还不够完善的实验室来说,是亟待突破的技术瓶颈。

笔者所在实验室探索出了一套成本投入相对经济且操作简便的 RNAi 技术体系,并利用该体系对中华按蚊(*Anopheles sinensis*)黑色素代谢基因的功能进行了初步分析,并获得了较好的表型结果。这一平台的建立,为中华按蚊功能基因组研究提供了快速的初步研究策略,同时也为如 CRISPR-Cas9 等其他技术体系的摸索和建立提供了有价值的参考^[9-11]。

1 材料与方法

1.1 实验蚊虫

中华按蚊 WX-LS 品系饲养于重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所。幼虫以鱼苗饲料饲养于 27 °C,光周期为 12 h 光照、12 h 黑暗。取材为发育 2~3 d 的 4 龄幼虫、化蛹 2 h 以内的蛹和羽化 2 h 以内的成蚊。

* 收稿日期:2016-04-05 修回日期:2016-12-07 网络出版时间:2017-01-12 11:29

资助项目:“两江学者”计划专项经费;国家自然科学基金(No. 31302038;No. 31372265);国家科技基础性工作专项重点项目子课题(No. 2015FY210300);国际原子能机构 CRP 项目(No. 18268/R0);重庆市教委科学技术研究项目(No. KJ1500327);重庆市自然科学基金(No. CSTC2013JCYJA80022)

第一作者简介:杜明辉,男,研究方向为昆虫分子生物学,E-mail:decimusdmh@163.com;通信作者:乔梁,副教授,E-mail:qiaoliangswu@163.com

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20170112.1129.010.html

1.2 显微注射系统

所用仪器为 CFT-8401A 型精密 nL 注射器,并外连氮气钢瓶(12.5 MPa 标准气压)。注射用的玻璃针参考日本 NARISHIGE 公司 G-100 型规格,由成都华西医科大学仪器厂定制。上样吸头为 Eppendorf GELoader。注射用成像系统为 OLYMPUS SZX10 解剖镜,拉针仪为日本 NARISHIGE PN-30 型。显微注射所用的固定板根据文献^[12]的报道加以改进而获得。

1.3 注射操作

1.3.1 准备阶段 1) 玻璃电极使用 PN-30 PULLER 拉制成细长玻璃针,采用最大磁力,温度为 90 °C 左右。2) Eppendorf GELoader 吸头、滤纸、纯净水、枪头等采用高压灭菌;玻璃固定板、玻璃针等使用无水乙醇浸泡后烘干备用。3) 无水乙醇清洁显微注射实验台及解剖镜;打开 CFT-8401A 型精密 nL 注射器和解剖镜电源,打开氮气钢瓶阀门使之同注射器连通,按注射器“清洗”键清洗仪器,将解剖镜视野调至最佳。4) Eppendorf GELoader 吸头吸取样品并上样于玻璃针中,修剪玻璃针至刚能扎破材料表面又不至于造成大的创伤。5) 调节注射器上的氮气压力至注射样品剂量合适后即开始注射。

1.3.2 注射阶段 1) 材料置于自制玻璃固定板上,吸干水,并将材料紧靠在两条固定板相交处。2) 沿水平方向从材料背板柔软处将玻璃针扎入胸部 1/2 深度后随即通过 CFT-8401A 型精密 nL 注射器注射样品,然后轻柔地抽出注射针,将材料移至超纯水中培养。

1.3.3 注射后处理阶段 注射后的材料在超纯水中于实验室标准条件下培养,并仔细观察注射后材料个体的发育变化。

1.4 dsRNA 的合成及干扰后表型的观察

根据果蝇的黑色素代谢路径,鉴定得到中华按蚊也具有完整的代谢路径,并选取其中关键的促黑化基因,根据它的序列特征设计引物,并利用 T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega) 体外转录试剂盒合成 dsRNA,对照组为 *dsRed*。合成的 dsRNA 通过电泳检测合格后,稀释到 $6 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,并以每个个体 800 ng 的剂量进行注射,注射时期为化蛹初期(约 2 h 以内)。并于注射 36 h 观察基因干扰组与对照组蛹体色的变化,半定量 PCR 检测该黑色素代谢基因在两组个体中的表达差异。

2 结果与分析

2.1 RNAi 技术平台的构建

本实验构建了简易的 RNAi 技术平台(封二彩图 1)。该平台的核心部件为 CFT-8401A 型精密 nL 注射器,注射动力来源于外连的氮气钢瓶。在进行注射时,通过 OLYMPUS SZX10 解剖镜来观察材料以及调整到合适的注射部位后,通过脚踩注射器踏板,将合适剂量的样品推送至材料体内。

2.2 注射材料的有效固定方案

由于蚊虫的幼虫和蛹生活在水中且运动能力强,一旦转移至固相载体上,个体会剧烈挣扎、跳动,非常不利于玻璃针头的插入与后续操作中样品的注入。因此,对这两个发育阶段的个体进行注射时,材料的固定直接决定注射的效果。由本实验室自行设计的固定板由两块载玻片十字交叉粘合而成(图 2)。其中上层载玻片的棱所形成的靠面能够非常有效地贴合幼虫或蛹的侧面或腹面,通过阻挡幼虫或蛹躯体的弯曲来起到良好的固定作用。而对于成蚊则需要先置于冰面上使之晕厥后再移至玻片上固定并注射。

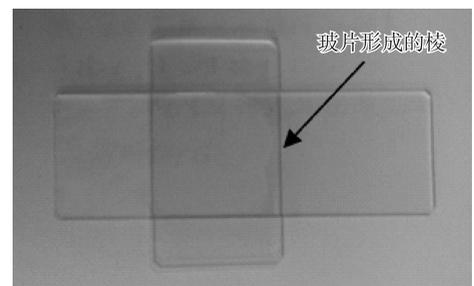


图 2 材料固定装置
Fig. 2 Material fixtures

2.3 注射部位及注射剂量的选择

对于幼虫来说,选取的注射部位是躯体后 1/3 处,此部位远离头部,且摆动程度相较于头部来说更低,因此可以降低注射受到的损伤。成虫的注射最为简单,注射部位为胸腔,注射时只需保证玻璃针不刺穿胸腔即可。由于蛹期个体的内压明显大于幼虫和成虫期,并且蛹的活动能力强,因此,蛹期的注射最为复杂。中华按蚊的蛹主要分为头胸部和腹部两部分。选择头胸部注射时,在头胸部正面扎针时给蛹造成巨大的机械损伤,容易死亡,并且样品极易在注射后从蛹体漏出而不能达到相应的效果。而化蛹

初期(2 h 左右)头胸部背板已成型,且具备合适的硬度,这使得扎针所带来的机械损伤也较小,同时样品不会漏出,因此,以头胸部为注射靶标时,背板处为理想的注射部位。在注射过程中,选用指示剂来检测注入及渗漏情况。结果显示,选择上述部位进行注射时,指示液基本被注入蛹体,极少发生渗漏现象,最大限度地降低了损耗,提高了潜在的效率。此外,为了在今后的实验中进一步提高干扰的效率,对幼虫、蛹、成虫的注射剂量进行了摸索。根据 Pelletier 和 Pondeville 等人的研究^[13-14]并结合笔者自身的摸索,初步结果显示,注射 200 nL 为幼虫、蛹和成虫所能承受的最适宜剂量,在这一剂量下,既可以保证外源样品的注入剂量达到较高水平,又不至于较大程度地造成个体死亡。不同发育时期的个体注射后羽化率或存活率均不同,这与个体经历的发育时间和承受创伤的能力有关,幼虫更为脆弱,且发育并羽化成成蚊所需的时间更长,因此最终的成虫羽化率最低(表 1)。

2.4 注射黑色素合成基因 dsRNA 后蛹的表型变化

笔者先前的调查发现,在中华按蚊蛹的发育过程中,蛹体色逐渐加深,最后明显黑化。这一变化规律普遍为:在化蛹早期(0~8 h)蛹体透明程度高,由浅黄和淡绿夹杂而构成主要的体色,复眼着色程度低;在化蛹中期(8~24 h),蛹体色加深,但主要表现为黄色体色的略微加深,复眼着色变化并不明显;而在化蛹后期至羽化前期(32~40 h),蛹体色变化最为剧烈,主要表现为剧烈的黑化(封二彩图 3a)。因此,在蛹发育期间,

体色可以作为评价 RNAi 效果的重要表型。本研究中选择的黑色素代谢关键基因主要负责蛹后期黑色素的大量生成和累积,因此理论上该基因表达被沉默后,蛹体着色可能受到影响。初步的 RNAi 结果显示:在黑色素基因干扰组中,超过 60% 的蛹表现为在化蛹后期无法着色(表 2),而对照组则同正常蛹的黑化类似,着色模式未受到影响(封二彩图 3b)。进一步发现,干扰组个体的黑色素代谢基因的表达量也明显低于对照组个体(封二彩图 3c),这与干扰组中表现出的着色(黑化)障碍相对应,表明初步的 RNAi 效果明显,结果真实可信。

3 讨论

本研究中,通过搭建简易的操作平台,摸索出了一套低成本,高效率的 RNAi 注射技术体系,并通过对促黑化基因的沉默和表型观察分析以及基因表达的分子检测,证实了这套技术体系的可靠性,这为后续深入开展中华按蚊功能基因组研究提供了有利的技术保障,也为其他涉及到显微注射的技术体系的摸索和建立提供了前期的参考。

在注射过程中,不论是注射背部还是腹部,都采取将个体腹部展开紧贴棱,并用滤纸吸干多余的水分。在除水的过程中,可能会遇到水分完全被吸干后蛹和幼虫更加剧烈跳动的情况,这可能是蛹和幼虫的一种强烈应激反应。此时,只需将水分吸收至不影响观察和注射即可。虽然该技术体系操作简便,但蚊虫自身脆弱这一先天条件还是决定了在操纵过程中的力度要尽可能地轻柔。并且在具体实施过程中,一般先以冷冻的方式降低蚊虫的活动能力,以减少物理损伤,特别是以成蚊为材料时更需注意。相比而言,早期类似的方法多采用琼脂糖,而琼脂糖浓度的配比技术要求相对较高:浓度太大不利于固定,而浓度过低又会大量粘附于虫体^[12]。而本研究所改进的固定方法既制备简单,又能够在最大程度避免损伤的情况下固定蚊虫,在操作可行性、成本控制及操作效率方面的优势是非常明显的。

目前虽然本实验室能够熟练地进行中华按蚊幼虫、蛹、成虫的注射实验,但还是有一定的局限性。对于蚊虫卵来说,因尺寸太小,肉眼难以清楚识别,且没有合适的工具移取、排列及固定,加之注射卵部位的精度相比其他时期个体要高得多,手动注射几乎无法完成,故而该平台目前还无法对蚊卵进行注射。而在后续研究中,对卵期注射体系的摸索和建立将会是研究工作中的重点。

表 1 不同处理个体羽化率或存活率比较

Tab. 1 The comparison of eclosion rate or survival rate of the different treatment individuals %

注射时期	羽化率或存活率	未经处理个体羽化率或存活率
幼虫	66.67	71.70
蛹	72.22	78.26
成虫	87.50	90.24

表 2 干扰效率

Tab. 2 Interference efficiency

干扰片段	注射头数	化蛹 36 h 颜色变浅的蛹头数(存活的)	干扰效率/%
<i>dsGene</i>	39	25	64.10
<i>dsRed</i>	41	0	0

参考文献:

- [1] World Health Organization. Disease burden [R]. Geneva: WHO, 2015.
- [2] CARABOLLO H, KING K. Emergency department management of mosquito-borne illness: malaria, dengue, and West Nile virus [J]. *Emerg Med Pract*, 2014, 16(5): 1-23.
- [3] HOLT R A, SUBRAMANIAN G M, HALPERN A, et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* [J]. *Science*, 2002, 298(5591): 129-149.
- [4] MARINOTTI O, CERQUEIRA G C, ALMEIDA L G P D, et al. The genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(15): 7387-7400.
- [5] CHEN X G, JIANG X T, GU J B, et al. Genome sequence of the asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(44): 5907-5915.
- [6] KENNERDELL J R, CARTHEW R W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway [J]. *Cell*, 1998, 95(7): 1017-1026.
- [7] OBER K A, JOCKUSCH E L. The roles of wingless and decapentaplegic in axis and appendage development in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. *Developmental Biology*, 2006, 294(2): 391-405.
- [8] PLASTERK R. V (D) J recombination: ragtime jumping [J]. *Nature*, 1998, 394(6695): 718-719.
- [9] HAMMOND A, GALIZI R, KYROU K, et al. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(1): 78-83.
- [10] GANTZ V M, JASINSKIENE N, TATARENKOVA O, et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(49): 6736-6743.
- [11] ADELMAN Z N, TU Z J. Control of mosquito-borne infectious diseases: sex and gene drive. *trends in parasitology* [J]. 2016, 32(3): 219-229
- [12] SAMPATH K S, PUTTARAJU H P. Improvised microinjection technique for mosquito vectors [J]. *The Indian Journal of Medical Research* [J], 2012, 136(6): 971-978.
- [13] PONDEVILLE E, DAVID J P, GUITTARD E, et al. Microarray and RNAi analysis of P450s in *Anopheles gambiae* male and female steroidogenic tissues; CYP307A1 is required for ecdysteroid synthesis [J]. *PloS one*, 2013, 8(12): e79861.
- [14] PELLETIER J, GUIDOLIN A, SYED Z, et al. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2010, 36(3): 245-248.

Animal Sciences

Establishment and Application of *Anopheles sinensis* RNAi Technology Platform

DU Minghui, CHEN Bin, QIAO Liang

(Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] The paper aims to establish an economical, convenient and efficient RNAi technology platform. [Methods] *Anopheles sinensis* was used as the model to improve the RNAi operation, including mosquito fixation, injection site and dose, etc. And the expression of a key gene in *An. sinensis* melanin metabolic pathway in the pupal stage was silenced via the platform to verify the operability of the platform. [Findings] The platform for *A. sinensis* microinjection was established. After the improvement of the injection operational technology, larva was injected successfully, pupa and adult and efficiently silenced the expression of the key gene via the platform, and finally the non-melanin pupae were obtained. [Conclusions] The establishment of the platform system not only provided us an analytical tool for the study of *A. sinensis* gene function, but also provided a reference for other technology systems involved in microinjection.

Keywords: *Anopheles sinensis*; gene function; RNAi; microinjection; melanization

(责任编辑 方 兴)