

# 松材线虫 *Bxpel2* 基因的克隆及 RNA 干扰载体构建

邱秀文<sup>1</sup>, 吴小芹<sup>2</sup>, 黄麟<sup>2</sup>, 叶建仁<sup>2\*</sup>

(1. 九江学院鄱阳湖生态经济研究中心, 江西 九江 332005;

2. 江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室, 南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:**[目的]为了构建松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)果胶酶 *Bxpel2* 基因干扰载体。[方法]通过 Trizol 法提取松材线虫总 RNA, 反转录合成 cDNA, 设计带 T<sub>7</sub> 启动子的果胶酶 *Bxpel2* 基因引物, 以 cDNA 为模板扩增出果胶酶 *Bxpel2* 基因片段, 连接到 RNA 干扰载体, 再以干扰载体为模板, PCR 扩增出目的片段后进行测序鉴定, 合成果胶酶 *Bxpel2* 基因双链 RNA(dsRNA), 采用 RT-PCR 检测松材线虫 *Bxpel2* 基因干扰后的表达情况。[结果]表明:1) 提取的松材线虫总 RNA 完整性好, 无降解;2) 成功克隆出松材线虫果胶酶 *Bxpel2* 基因片段(790 bp)并将其连接至 pMD19-T 载体;3) 以 RNA 干扰载体为模板合成 dsRNA, 浓度分别为 1.313 mg·mL<sup>-1</sup> 和 1.152 mg·mL<sup>-1</sup>;4) RT-PCR 结果显示, 松材线虫经过 dsRNA 干扰后, *Bxpel2* 基因表达基本受到抑制。[结论]成功构建松材线虫果胶酶 *Bxpel2* 基因干扰载体, 为进一步研究 *Bxpel2* 基因在松材线虫致病过程中的作用和功能奠定了良好的基础。

**关键词:**松材线虫; *Bxpel2* 基因; RNA 干扰

中图分类号:S763

文献标识码:A

## Cloning of *Bursaphelenchus xylophilus* Pectate Lyase 2 Gene and Construction of Its RNA Interference Vector

QIU Xiu-wen<sup>1</sup>, WU Xiao-qin<sup>2</sup>, HUANG Lin<sup>2</sup>, YE Jian-ren<sup>2</sup>

(1. Poyang Lake Eco-economy Research Center, Jiujiang University, Jiujiang 332005, Jiangxi, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Management of Invasive Species, College of Forest, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** [Objective] To establish the interference vector of *Bxpel2* gene in *Bursaphelenchus xylophilus*. [Method] Total RNA was extracted and reverse transcribed into cDNA. The primer of *Bxpel2* gene containing T<sub>7</sub> promoter was designed to amplify the fragment of *Bxpel2* gene. The products of amplification were connected to RNAi vector and used to amplify the target fragment of double strand RNA (dsRNA) of *Bxpel2* gene. The expression of *Bxpel2* gene was tested by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). [Result] (1) The total RNA extracted by Trizol method was complete and without degradation. (2) The *Bxpel2* gene (790bp) of *B. xylophilus* was cloned and connected to pMD19-T vector. (3) dsRNA was synthesized based on RNA interference vector template, with the concentration of 1.313 and 1.152 mg·mL<sup>-1</sup>, respectively. (4) The expression of *Bxpel2* gene was inhibited by dsRNA interference. [Conclusion] The RNA interference vector of *Bxpel2* gene was established successfully. The constructed expression vector could provide a better understanding of the role and function of *Bxpel2* gene during the pathogenic process of *B. xylophilus*.

**Keywords:** *Bursaphelenchus xylophilus*, *Bxpel2* gene, RNA interference

松材线虫病又称松树萎蔫病(Pine Wilt Disease), 是由松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*

(Steiner & Buhner) Nickle)引起松属植物毁灭性死亡的一种世界性森林病害<sup>[1-3]</sup>。目前, 松材线虫致病

机制尚不清楚<sup>[4-5]</sup>。基因组学和分子生物技术的快速发展,为进一步研究松材线虫致病相关基因的作用和功能提供了技术支持。双链 RNA(dsRNA)进入细胞内在内切酶的作用下被分解为小的双链 RNA 分子(siRNA),siRNA 分子与同源 mRNA 结合,导致 mRNA 断裂,在核酸酶的作用下断裂形成的小分子 mRNA 被降解,从而导致目的基因的沉默,这种现象称为 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)。自从 1998 年发现小 RNA 双链能有效干扰生物体内特定基因的表达以来<sup>[6]</sup>,RNA 干扰技术已经在基因功能和细胞研究领域得到了广泛应用。RNA 干扰具有高效性的特点,低浓度的 dsRNA 便可以发生明显的抑制效应,即少量的 dsRNA 分子就可以使大量的内源性 mRNA 降解,达到阻抑靶基因表达的效果。RNA 干扰技术已经在秀丽线虫的生长发育、基因功能鉴定等研究中取得了一定的成果<sup>[7-8]</sup>。

Kikuchi 等<sup>[9]</sup>对松材线虫食道腺分泌的果胶裂解酶进行了研究,成功克隆出果胶酶基因 *Bxpel2* (GenBank 登录号: AB232908),发现该基因只在线虫食道腺细胞中表达。果胶是植物细胞壁的主要成分之一,松材线虫首先需要分泌果胶酶来破坏植物细胞壁从而成功侵入寄主细胞,因此,松材线虫将果胶酶分泌到植物的组织内对其取食与迁移有很大帮助。有研究认为松材线虫的致病力与其繁殖能力密切相关<sup>[10]</sup>。寄主被强致病力松材线虫感染后发病速度快且死亡率高,其体内松材线虫繁殖也快;被弱致病力株系感染后发病速度慢,体内松材线虫繁殖率低。目前,果胶酶基因 *Bxpel2* 在松材线虫致病过程中的功能和作用仍不清楚。构建果胶酶基因 *Bxpel2* RNA 干扰载体,对进一步研究 *Bxpel2* 基因在松材线虫致病过程中功能具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

供试松材线虫选用南京林业大学森林保护重点实验室保存的强毒力虫株 AMA3,该虫株于 2004 年 10 月从安徽省马鞍山市林场白马山病死松树上分离得到,将松材线虫接种至灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)上,置于 25℃ 生化培养箱中培养 7 d,保存于 4℃ 冰箱备用。

### 1.2 松材线虫总 RNA 提取与纯化

松材线虫总 RNA 采用 Trizol 法<sup>[11]</sup>进行提取,然后用 RNeasy® Kit 试剂盒(QIAGEN GmBH, Germany)对提取的 RNA 进行纯化。

### 1.3 松材线虫 cDNA 的合成

以提取纯化的总 RNA 为模板,采用 Transgen 公司(中国)生产的 EasyScript® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒合成松材线虫 cDNA,反应体系为:Total mRNA 500 ng,Random Primer(N9) (0.1 μg · μL<sup>-1</sup>) 1 μL,2 × ES Reaction Mix 10 μL,EasyScript® RT/RI Enzyme Mix 1 μL,添加 RNase-free Water 至 10 μL,轻轻混匀后置于 25℃ 孵育 10 min,42℃ 孵育 30 min,85℃ 加热 5 min 后冰上放置。

### 1.4 *Bxpel2* 基因片段的克隆

根据已发表的松材线虫 *Bxpel2* 基因的序列(GenBank 登录号为 AB232909.1),利用 Primer Premier 5.0 软件,设计合成两对带有 T<sub>7</sub> 启动子的特异性引物(引物有下划线部分为 T<sub>7</sub> 启动子),*Bxpel2*-1 上游引物:5'-TAATACGACTCACTATAGGGTTTTGGCATTCTCAGT-TGTAGC-3';*Bxpel2*-1 下游引物:5'-CCATCTTGTCCCTGTTTGTAAAG-3';*Bxpel2*-2 上游引物:5'-TTTTG-GCATTCTCAGTTGTAGC-3';*Bxpel2*-2 下游引物:TA-ATACGACTCACTATAGGGCCATCTTGTCCCTGTTTGTAAAG。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 试剂购自 TaKaRa 公司(日本),PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环,72℃ 10 min。

### 1.5 *Bxpel2* 扩增片段切胶回收

按 Axygen 公司(美国)提供的 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒说明进行切胶回收。

### 1.6 感受态细胞制备

挑取 5 个大肠杆菌单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基,37℃,200 r · min<sup>-1</sup> 振荡过夜。将上述菌液按 1:50 ~ 100 比例接种到装有 100 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中,37℃,200 r · min<sup>-1</sup> 振荡 5 ~ 6 h,将菌液置冰上冷却,4℃,5 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min,回收菌体,加入预冷的 0.1 mol · L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 重悬,4℃,5 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min,回收沉淀,向细胞沉淀中加入冰上预冷的含 15% 甘油的 CaCl<sub>2</sub> 溶液重悬,分装后置于 -80℃ 保存备用。

### 1.7 *Bxpel2* 片段与质粒载体连接

*Bxpel2* 片段采用 Pfu 高保真酶(购自 TaKaRa 公司,日本)进行扩增,扩增产物 3' 端为平末端,胶回收 PCR 平末端产物,进行 3'-末端加 A 反应,然后连接到克隆载体 pMD19-T 上,连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞中,涂布在含有 Amp 50 mg · L<sup>-1</sup> 的 X-gal/IPTG 的 LB 培养基上,37℃ 培养 16 h。挑选白色单菌落进行菌液 PCR,扩增产物送华大基因测序公司进行测序鉴定。

## 1.8 RNA 线性模板扩增

以构建好的质粒载体为模板,通过带有 T<sub>7</sub> 启动子的引物序列进行 PCR 扩增,PCR 反应体系:Ex Tag Mix 25  $\mu\text{L}$ ,引物(10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)各 1.0  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 2.0  $\mu\text{L}$ ,补 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu\text{L}$ ,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$  30 s,54 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  45 s,35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  7 min。扩增完毕,1% 琼脂糖电泳检查。

## 1.9 双链 RNA 合成及完整性分析

在体外通过 Life Technologies 公司生产的 ME-GAscript RNAi Kit Protocol 试剂盒合成 dsRNA,使用分光光度计测定合成的 dsRNA 含量,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 完整性。

## 1.10 松材线虫 *Bxpe12* 基因沉默方法构建

将松材线虫用无菌水洗 3 次,加入 0.9% 的硫酸链霉素溶液 10 mL 浸泡 5 min,2 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 3 min,弃上清,用无菌水洗 3 次,把表面消毒的松材线虫离心收集并制备成线虫悬液,吸取 20  $\mu\text{L}$ (约 800 条)线虫悬液至 20  $\mu\text{L}$  松材线虫果胶酶基因 *Bxpe12* 的 dsRNA(800 ng  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$ ) 溶液中,用移液器轻轻混匀后置于 20 $^{\circ}\text{C}$  摇床中 175 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 浸泡 48 h。为了评估 dsRNA 对松材线虫 *Bxpe12* 基因的沉默效果,采用实时定量 PCR(qRT-PCR)检测松材线虫果胶酶基因 *Bxpe12* 的表达量,以 *Actin* 基因作为内参照。

## 2 结果与分析

### 2.1 松材线虫总 RNA 提取

采用 Trizol 试剂法提取松材线虫 AMA3 四组样品的总 RNA。用紫外分光光度计测定 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值(见表 1),纯度均符合要求。总 RNA 琼脂糖凝胶电泳后,可见 28S、18S 两条明显的主带,说明 RNA 完整性良好,无降解(见图 1)。

表 1 总 RNA 测定结果

样品名称	浓度/( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	体积/ $\mu\text{L}$	总量/ $\mu\text{g}$	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	结果
1	1.36	60	81.60	1.93	合格
2	1.68	60	100.80	1.95	合格
3	1.35	60	81.00	1.89	合格
4	1.45	60	87.00	1.91	合格

### 2.2 松材线虫果胶酶 *Bxpe12* 基因片段克隆

将提取的松材线虫总 RNA 反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板对目的片段(长度为 790 bp)进行 PCR 扩增,扩增结果如图 2 所示,琼脂糖凝胶电泳条带单一,在 790 bp 处可见特异性片段,对 PCR 产物进行切胶回收,4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 2.3 松材线虫果胶酶基因片段 dsRNA 表达载体的构建

将克隆的松材线虫果胶酶基因片段连接到 pMD

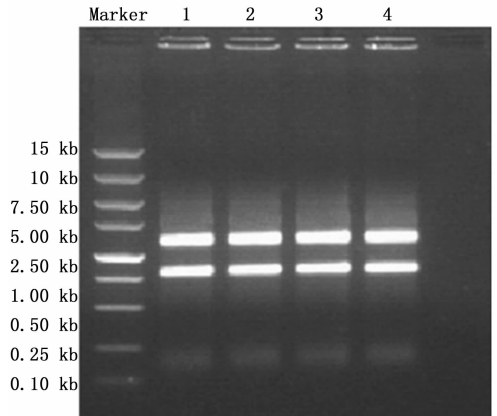


图 1 总 mRNA 琼脂糖凝胶电泳结果

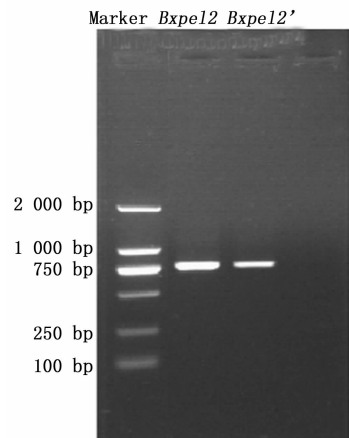


图 2 松材线虫果胶酶基因琼脂糖凝胶电泳结果

19-T 载体,转化至大肠杆菌中,在含有氨苄抗生素的 LB 琼脂培养基上培养 12 h,挑选菌落进行菌液 PCR。取 10  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳 25 min(电压 120V),在凝胶成像仪观察结果,如图 3 所示,琼脂糖凝胶电泳条带清晰,且大小与目的条带基本一致,说明松材线虫 *Bxpe12* 片段已成功克隆至 pMD 19-T 载体。

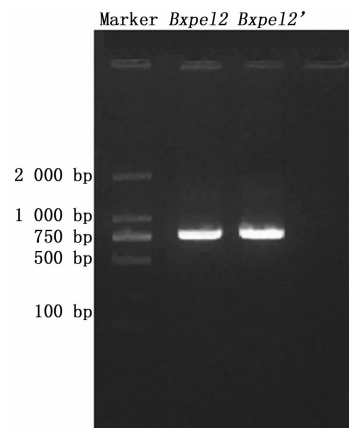


图 3 *Bxpe12* 基因琼脂糖凝胶电泳结果



## 2.5 松材线虫果胶酶基因模板线性化和 dsRNA 的合成

松材线虫果胶酶基因经过带有 T<sub>7</sub> 启动子引物扩增,连接 pMD 19-T 载体,转化到大肠杆菌中。提取大肠杆菌中带有松材线虫果胶酶基因片段的质粒,以质粒为模版进行扩增,再以 PCR 产物(线性 DNA,图 5)为模板合成 dsRNA(图 6)。经测定,合成 dsRNA 的浓度分别为: *Bxpe12*:1.313 mg · mL<sup>-1</sup>, *Bxpe12'*:1.152 mg · mL<sup>-1</sup>。

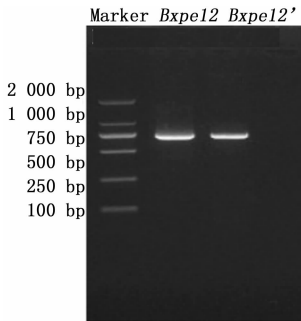


图 5 松材线虫果胶酶基因线性 DNA 模板电泳结果

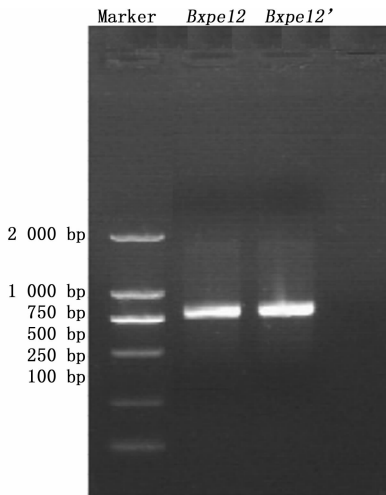


图 6 松材线虫果胶酶基因 dsRNA 电泳结果

## 2.6 松材线虫 *Bxpe12* 基因沉默效果分析

为了检测 dsRNA 干扰对松材线虫果胶酶基因的沉默效果,我们通过实时荧光定量 PCR (RT-PCR)测定 dsRNA 干扰后松材线虫 *Bxpe12* 基因的表达情况。实验结果如图 7 所示,经过果胶酶基因 dsRNA 干扰后,*Bxpe12* 基因表达量与 Actin 基因表达量之比为 0.067。实验结果表明:松材线虫经过 dsRNA 干扰后,*Bxpe12* 基因表达基本受到抑制。

## 3 讨论与结论

Fire 等<sup>[6]</sup>在 1998 年发现了 RNAi 现象,这种现

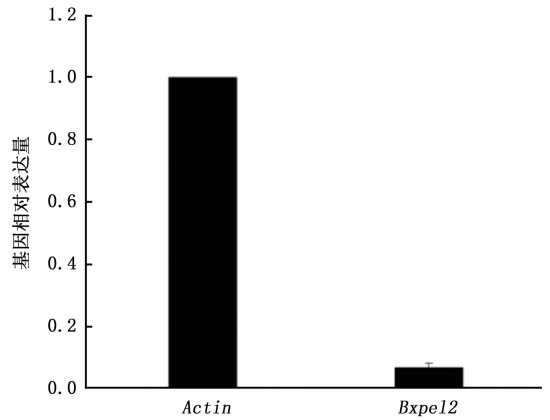


图 7 dsRNA 干扰后松材线虫 *Bxpe12* 基因表达量

象广泛存在于生物体内。目前, RNAi 的干扰机制已被初步阐明:生物细胞内的双链 RNA (double strand RNA, dsRNA) 被核酸内切酶分割成长度在 21 ~ 23 nt 之间的小片段 RNA,这种小片段 RNA 会与细胞内的多种酶结合形成 RNA 诱导的沉默复合物 RISC (RNA-induced silencing complex), RISC 通过与 mRNA 的同源区结合,致使 mRNA 降解,最终导致相应基因的沉默,从而抑制基因的表达。

引物设计是本实验成功的关键,引物长度通常在 15 ~ 30 bp 之间, GC 含量应该低于 40%。由于引物设计好后添加了 T<sub>7</sub> 启动子,使得引物长度过长和 GC 含量较高,导致合成引物相对困难。另外,引物自身不能有互补序列,否则容易自身互补配对形成发夹结构。本研究借助 primer premier 5.0 软件设计 *Bxpe12* 特异性扩增引物,从松材线虫转录组中克隆 *Bxpe12* 基因片段,将 *Bxpe12* 基因片段连接至 pMD19-T 载体,成功构建了松材线虫果胶酶基因 *Bxpe12* 的 RNA 干扰载体,并已合成出 dsRNA,为下一步利用 RNA 干扰技术研究 *Bxpe12* 基因功能提供了技术支撑。RNAi 经常会引起非靶基因的沉默,这种现象在早期研究中经常被忽略,然而越来越多的研究表明, siRNA 作用过程中存在非特异性,即可以对靶基因之外的其他基因发挥作用,从而导致非靶基因沉默,这种现象被称为脱靶效应 (Off-target Effects, OTEs)<sup>[12]</sup>。在 RNAi 中,发挥主要作用的是 siRNA, Persengiev 等<sup>[13]</sup>研究表明,高浓度的 siRNA 会导致更严重的脱靶效应,降低 siRNA 的剂量可以减少脱靶效应。Cafferey 等<sup>[14]</sup>发现当细胞给予相对低剂量的 siRNA (但仍足以有效沉默目的基因)时,脱靶效应会降低,甚至消除。因此,在以后的 RNAi 实验中可以通过筛选合适的 siRNA 浓度来降低脱靶

效应。

松材线虫致病相关基因大多数在食道腺细胞内表达,目前已经在其食道腺内发现了多种与致病相关的酶类,如纤维素酶系、果胶酶等<sup>[15-16]</sup>。Ma等<sup>[15]</sup>对松材线虫纤维素酶基因进行了 RNA 干扰,发现该基因沉默后降低了松材线虫的繁殖和迁移能力。有研究发现,在松材线虫致病过程中,其繁殖和迁移能力与致病性有重要的联系<sup>[17-18]</sup>。Shinya等<sup>[19]</sup>研究表明,松材线虫的繁殖能力越强,其毒性和致病能力也越强。因此,通过 RNAi 技术研究果胶酶基因在松材线虫致病过程中的作用和功能对从分子水平阐明松材线虫致病机理具有重要意义。目前,我们已成功建立松材线虫 *Bxpel2* 基因沉默方法,松材线虫 *Bxpel2* 基因沉默效果分析结果表明,松材线虫 *Bxpel2* 基因在 dsRNA 干扰后其表达基本受到抑制(图 7)。然而,松材线虫 *Bxpel2* 基因沉默后是否对松材线虫的形态、迁移、繁殖和致病性有影响,还需要通过进一步的实验验证。

#### 参考文献:

- [1] Zhu L H, Ye J R, Negi S, *et al.* Pathogenicity of aseptic *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e38095.
- [2] Pereira F, Moreira C, Fonseca L, *et al.* New insights into the phylogeny and worldwide dispersion of two closely related nematode species, *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* [J]. PLoS ONE, 2013, 8(2): e56288.
- [3] Mallez S, Castagnone C, Espada M, *et al.* First insights into the genetic diversity of the pine wood nematode in its native area using new polymorphic microsatellite loci [J]. PLoS ONE, 2013, 8(3): e59165.
- [4] Zhao H, Chen C, Liu S, *et al.* Aseptic *Bursaphelenchus xylophilus* does not reduce the mortality of young pine tree [J]. Forest Pathology, 2013, 43(6): 444-454.
- [5] Qiu X W, Wu X Q, Huang L, *et al.* Specifically Expressed Genes of the Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* involved with early interactions with pine trees [J]. PLoS ONE, 2013, 8(10): e78063.
- [6] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [7] Elen A F, M Auro D V, John T J, *et al.* Analysis of chitin synthesis function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi [J]. Gene, 2005, 349(2): 87-95.
- [8] Kimber M J, McKinney S, Master S, *et al.* Flp gene disruption in a

parasitic nematode reveals motor dysfunction and unusual neuronal sensitivity to RNA interference [J]. FASEB Journal, 2007, 21(4): 1233-1243.

- [9] Kikuchi T, Shibuya H, Aikawa T, *et al.* Cloning and characterization of pectate lyase genes expressed in the esophageal gland of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(3): 280-287.
- [10] Mota M M, Takemoto S, Takeuchi Y, *et al.* Comparative studies between Portuguese and Japanese isolates of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Nematology, 2006, 38(4): 429-433.
- [11] Cheng X Y, Dai S M, Xiao L, *et al.* Influence of cellulase gene knockdown by dsRNA interference on the development and reproduction of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Nematology, 2010, 12(2): 225-233.
- [12] Jackson A L, Linsley P S. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application [J]. Dressnature Reviews Drug Discovery, 2010, 9(1): 57-67.
- [13] Persengiev S P, Zhu X, Green M R. MR: Nonspecific, concentration-independent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs) [J]. Rna-a Publication of the Rna Society, 2004, 10(1): 12-18.
- [14] Caffrey D R, Zhao J, Song Z L, *et al.* siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency [J]. PLoS ONE, 2011, 6(7): e21503.
- [15] Ma H B, Lu Q, Liang J, *et al.* Functional analysis of the cellulose gene of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, using RNA interference [J]. Genetics & Molecular Research, 2011, 10(3): 1931-41.
- [16] Lee D W, Kang J S, Chan S J, *et al.* Identification and biochemical analysis of a novel pectate lyase 3 gene in *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2013, 16(3): 335-342.
- [17] Kulas J, Schmidt C, Rothe M, *et al.* Cytochrome P450-dependent metabolism of eicosapentaenoic acid in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2008, 472(1): 65-75.
- [18] Aikawa T, Kikuchi T. Estimation of virulence of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) based on its reproductive ability. Nematology, 2007, 9(3): 371-377.
- [19] Shinya R, Takeuchi Y, Ichimura K, *et al.* Establishment of a set of inbred strains of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae), and evidence of their varying levels of virulence. Applied Entomology & Zoology, 2012, 47(4): 341-350.

(责任编辑:崔 贝)