

果蝇体内 RNAi 文库使用

Guideline for Using *in vivo* RNAi Libraries of *Drosophila*

郭健^{1,2}, 严冬^{1,*}

¹ 昆虫发育与进化生物学重点实验室, 分子植物科学卓越创新中心, 植物生理生态研究所, 中国科学院, 上海; ² 中国科学院大学, 北京

*通讯作者邮箱: yandong@sibs.ac.cn

引用格式: 郭健, 严冬. (2019). 果蝇体内 RNAi 文库使用. *Bio-101* e1010274. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010274.

How to cite: Guo, J. and Yan, D. (2019). Guideline for using *in vivo* RNAi libraries of *Drosophila*. *Bio-101* e1010274. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010274. (in Chinese)

摘要: 目前 RNAi 是在果蝇体内对基因进行功能分析最有力的工具之一。该技术使用简单, 只需要一步遗传杂交, 即可实现组织和时间特异性的基因干扰。全基因组 RNAi 文库的开发使得转基因 RNAi 品系几乎涵盖了果蝇基因组中的每一个基因, 并且使得大规模体内 RNAi 筛选成为可能。然而, 目前共有四个果蝇中心可提供 RNAi 品系, 每个中心的 RNAi 品系又基于不同的载体, 因此为挑选和使用果蝇 RNAi 品系造成了一定难度。本文对各个果蝇中心的 RNAi 文库进行介绍, 并为 RNAi 品系的使用提供指南。

关键词: 果蝇, RNAi, 体内筛选, Gal4-UAS

材料与试剂

1. 提供 RNAi 品系的果蝇中心:

Vienna Drosophila Resource Center (VDRC): <https://stockcenter.vdrc.at>

Transgenic RNAi Project (TRiP): <https://fgr.hms.harvard.edu/fly-in-vivo-rnai>

National Institute of Genetics in Japan (NIG-FLY): <https://shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly>

Tsinghua Fly Center (THFC): <http://fly.redbux.cn>

实验步骤

一、RNAi 文库介绍

1. VDRC 果蝇中心

维也纳的 VDRC 果蝇中心由 Barry Dickson 开创，其 RNAi 文库有着最高的基因组覆盖率，包括针对 12,671 个 (91%) 蛋白编码基因的 26,957 个转基因 RNAi 品系，由 GD 文库、KK 文库、和 shRNA 文库组成。

GD 文库在 2007 年公布 (Dietzl 等, 2007)，将长反转重复序列 (平均长度为 321 bp) 构建到 UAS 载体中，采用 w⁺作为标记，并通过 P-element 随机插入至 X, 2, 或 3 号染色体中。GD 文库包含 16,763 个果蝇品系，针对 11,292 个 (81%) 蛋白编码基因。由于 RNAi 载体的插入位点是随机的，它们在基因组中的位置会影响其表达水平，从而影响基因敲低的效率。据 VDRC 估计，超过 80% 的 GD 品系能够提供有效的基因特异性沉默。另一个必须注意的问题是 RNAi 的脱靶效应 (off-target)。长双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 被加工成许多 siRNA 而发挥沉默效果，目前尚无法精确预测每个 dsRNA 所有的脱靶效应。尽管如此，GD 文库被成功地应用于多个全基因组或大规模体内 RNAi 筛选。

2009 年的 KK 文库在两个方面做了改进，首先它更新了目标序列设计以减少脱靶效应，其次它使用了基于 phiC31 的系统，预期将转基因定点插入于 2 号染色体 40D3 的 attP-VIE-260B，从而消除位置效应。KK 文库仍然使用长反转重复序列 (平均长度为 357 bp)，包括了针对 9,646 个 (69%) 基因的 9,822 个品系，是 GD 文库的有益补充。然而研究表明，KK 文库实际上有 2 个基因组整合位点，最初预期的 40D3 和实际位点 30B3。在 75% 的 KK 品系中，RNAi 载体仅插入 30B3 位点，并且没有问题；在 25% 的 KK 品系中，RNAi 载体也插入 40D3 位点，并且与一些 Gal4 杂交时出现非特异性表型。因此在使用 KK 文库时一定要注意所观察到的表型是否属于假阳性，详情请参考 https://stockcenter.vdrc.at/control/library_rnai 中的 KK library-landing site information 以及文献 (Green 等, 2014; Vissers 等, 2016)。

由于短链 hairpin RNA (shRNA) 较长链 dsRNA 具有更多优点 (见下文)，VDRC 从 2016 年开始构建 shRNA 文库。该文库使用 TRiP 的 WALIUM20 载体，并全部整合于 2 号染色体的 attP40 位点，唯一的区别是 WALIUM20 采用 w⁺作为选择标记，而 TRiP 所有的品系都使用 v⁺作为选择标记。目前该文库已包括 726 个品

系，并且还在陆续增加中，该文库所选择的 hairpin 序列靶向 mRNA 序列的不同区域而且独立于其它所有 RNAi 文库。

2. 哈佛医学院 TRiP 果蝇中心

自 2008 年以来，Norbert Perrimon 领导的哈佛大学医学院果蝇中心不断地优化转基因 RNAi 方法并构建了 TRiP 文库 (Perkins 等, 2015)。目前 TRiP 文库包括了超过 13,000 个 RNAi 品系，覆盖了 80% 以上的蛋白编码基因，所有 TRiP 生产的果蝇品系都通过 Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) 立即公开提供给社区使用。

TRiP 使用一系列称为 VALIUM 的载体，并通过 phiC31 系统整合到二号染色体的 attP40 或三号染色体的 attP2 位点。由于担心 white 基因(w)的剂量在行为研究中的影响，所有 VALIUM 载体都使用 vermilion (朱红眼, v) 作为选择标记。值得当心的是，将 TRiP RNAi 品系与 w 突变体背景的果蝇杂交产生的后代会出现各种眼睛颜色。

第一代 VALIUM 载体包括 VALIUM1 和 VALIUM10，它们都导致 400~600 bp 的长链 dsRNA 的表达。VALIUM1 的敲低效果相对较弱，而 VALIUM10 由于在 hairpin 两侧加了 gypsy 绝缘子，导致敲低效率提高；但两者在生殖细胞中的效果都不理想。第二代 VALIUM 载体 VALIUM20 和 VALIUM22 采用了短 hairpin 的 shRNA 设计，将 21bp 的靶向序列嵌入 micro-RNA(miR-1)的骨架中。由于 hairpin 较短，这些 shRNA 品系可能比长链 dsRNA 品系具有更少的脱靶效应；同时由于 shRNA 被大量产生，它们比 dsRNA 品系具有更强的敲低效果。VALIUM22 含有 UASp 启动子因此只适合于生殖细胞表达，而 VALIUM20 对体细胞和生殖细胞都取得了极好的敲低效果 (Ni 等, 2011)。所以 VALIUM20 是目前果蝇体内 RNAi 的最佳载体，占了 TRiP 文库中超过 70% 的品系。目前 TRiP 新构建的 RNAi 品系也都基于 VALIUM20，而 VDRC 新构建的品系则使用类似的 WALIUM20 载体。尽管如此，并不是所有的 VALIUM20 RNAi 品系都起作用，一部分 RNAi 品系，特别是针对基因 3'UTR 区域的，不能产生有效的敲低效果 (Perkins 等, 2015)。

3. 日本 NIG 果蝇中心

从 2005 年开始，Ryu Ueda 领导的日本 National Institute of Genetics (NIG) 果蝇中心逐渐构建了包含 12,389 个果蝇品系的 NIG-RNAi 文库 (> 50% 基因组覆盖

率)。与 VDRC 的 GD 文库类似，这些品系采用长链 dsRNA 设计，以 w+ 作为选择标记，并通过 P-element 随机整合到基因组中。注意少量 NIG-RNAi 品系被白眼果蝇污染，因此使用前要检查它们的眼睛颜色。此外，与 TRiP 合作，NIG 现在也提供 5,958 个基于 VALIUM20 和 22 的 shRNA 品系，其中绝大部分与 TRiP 的品系相同。

4. 清华大学果蝇中心

倪建泉教授领导的清华大学果蝇中心 (TsingHua Fly Center, THFC) 成立于 2011 年，包含 VALIUM 系列的超过 8,000 个 RNAi 品系，其中大部分与 TRiP 的品系相同，然而有一部分是 TRiP 和 BDSC 所没有的。此外，THFC 还维护着 200 个常用的 Gal4 品系；并提供构建新的 shRNA RNAi 品系的服务。

二、RNAi 品系挑选

通过 Flybase 输入想要研究的基因名称，到达基因页面，点入 Stock Availability，查看可以订购的果蝇品系：其中 VDRC 的 RNAi 品系名称里面包括 GD, KK, 或 VSH。TRiP 品系名称中包含 TRiP，以 JF 开头的可能基于 VALIUM1 或 VALIUM10 载体；以 HM 开头的基于 VALIUM10 载体；以 HMS, HMC, HMJ 开头的都基于 VALIUM20 载体；以 GL 开头的基于 VALIUM22 载体。

清华大学果蝇中心和日本 NIG 果蝇中心的 RNAi 品系没有整合到 Flybase 数据库中，因此需要到相应网站进行搜索。此外，可以到各个果蝇中心下载所有 RNAi 品系的列表，里面有 hairpin 设计和目标序列的详细信息。

三、Gal4 品系使用

由于所有果蝇 RNAi 文库都基于 UAS 载体，它们必须与 Gal4 品系杂交才能发挥作用。全身性的敲低一般使用 Actin5C-或 Tubulin-Gal4，常见的组织特异性的 Gal4 包括 Mef2-Gal4 (肌肉)，elav-Gal4 (神经元)，nanos-Gal4 (生殖细胞)，ey-Gal4 (眼睛)，nubbin-Gal4 (翅膀)，ppl-Gal4 (脂肪体)，myo1A-Gal4 (肠道)。RNAi 实验一般在 25~29 °C 进行，由于 Gal4 的活性受温度影响，因此更高的温度会提高 RNAi 效率。

另一个增强 RNAi 效果的方法是过表达 Dicer2 (Dcr2)。由于 Dcr2 处理长链 dsRNA，但不处理短链 shRNA，因此 Dcr2 只对基于长 dsRNA 的文库有效，例如 VDRC GD, KK,

NIG-RNAi, TRiP VALIUM1 和 VALIUM10。常用的 GAL4 已经和 UAS-Dcr2 重组在一起以利于使用，例如 TRiP toolbox fly stocks (<https://fgr.hms.harvard.edu/trip-toolbox>) 所列出的。这些品系，以及在 X, 2, 或 3 号染色体单独的 UAS-Dcr2 果蝇都可以从 BDSC, VDRC 或清华果蝇中心订购。此外，TRiP 和 VDRC 还提供了可以用于实验对照的背景果蝇和 RNAi 品系 (<https://fgr.hms.harvard.edu/trip-rnai-control-fly-stocks>)。

结果与分析

对于 RNAi 实验而言，最重要的是需要对其敲低的表型进行验证，可以采用下面几个方法。

1. 检测敲低的效率

RNAi 品系敲低的效率可以通过检测所对应的蛋白或 mRNA 水平的降低。如果有靶蛋白的抗体，可以通过免疫组化或 Western Blot 确定敲低效率；如果没有对应抗体，则只能通过 qPCR 测量 mRNA 水平的降低。总的来说，蛋白质水平上的测试比 mRNA 水平的测试更加可靠。

2. 使用独立的 RNAi 品系

由于针对不同序列的 hairpin 不太可能出现相同的脱靶效应，因此最简单的办法是使用多个独立的，针对非重叠区域的 RNAi 品系验证同一表型。注意不同的 RNAi 品系可能含有相同的 hairpin，因此不属于独立的 RNAi 品系，例如有些 VALIUM20 和 VALIUM22 使用同样的 shRNA 序列。从 Flybase 基因的 JBrowse 可以很方便地看到每个 RNAi 所针对的序列。如果没有额外的 RNAi 品系，则需要使用相应文库的载体自己克隆并构建新的 RNAi 品系。

3. 采用 sgRNA 验证 RNAi 表型

最终，RNAi 所引起的表型可以通过分析遗传突变体进行确认，特别是利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统。目前 TRiP 和 NIG 已经开始大规模构建转基因 sgRNA 品系，结合各种组织特异性表达的 Cas9 品系，sgRNA 文库将是 RNAi 文库非常有益的补充。

致谢

严冬实验室的工作得到国家自然科学基金 31771586，91857114，上海市科委

17PJ1410300 以及中国科学院的支持。

参考文献

1. Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K. and Dickson, B. J. (2007). [A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*](#). *Nature* 448(7150): 151-156.
2. Green, E. W., Fedele, G., Giorgini, F. and Kyriacou, C. P. (2014). [A *Drosophila* RNAi collection is subject to dominant phenotypic effects](#). *Nat Methods* 11(3): 222-223.
3. Ni, J. Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L. P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H. S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., Binari, R., Booker, M., Brennecke, J., Perkins, L. A., Hannon, G. J. and Perrimon, N. (2011). [A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*](#). *Nat Methods* 8(5): 405-407.
4. Perkins, L. A., Holderbaum, L., Tao, R., Hu, Y., Sopko, R., McCall, K., Yang-Zhou, D., Flockhart, I., Binari, R., Shim, H. S., Miller, A., Housden, A., Foos, M., Randkelt, S., Kelley, C., Namgyal, P., Villalta, C., Liu, L. P., Jiang, X., Huan-Huan, Q., Wang, X., Fujiyama, A., Toyoda, A., Ayers, K., Blum, A., Czech, B., Neumuller, R., Yan, D., Cavallaro, A., Hibbard, K., Hall, D., Cooley, L., Hannon, G. J., Lehmann, R., Parks, A., Mohr, S. E., Ueda, R., Kondo, S., Ni, J. Q. and Perrimon, N. (2015). [The transgenic RNAi project at Harvard Medical School: resources and validation](#). *Genetics* 201(3): 843-852.
5. Vissers, J. H., Manning, S. A., Kulkarni, A. and Harvey, K. F. (2016). [A *Drosophila* RNAi library modulates Hippo pathway-dependent tissue growth](#). *Nat Commun* 7: 10368.