

一种大规模制备双链 RNA 的简单方法及其在斑节对虾中的应用

梁艳¹, Vanvimon Saksamerprorn^{2,3}, Kallaya Sritunyalucksan^{2,3}, 黄捷^{1*}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室,山东青岛 266071;

2. Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology,
Faculty of Science, Mahidol University, 泰国曼谷 10400;

3. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and
Technology Development Agency (NSTDA), 泰国曼谷 12120)

摘要: RNA 干扰 (RNAi) 是由双链 RNA (dsRNA) 诱发的特异性沉默目的基因表达的过程, 一种大规模制备双链 RNA 的方法可以便利 RNAi 技术的应用。以斑节对虾 *kazal* 型蛋白激酶抑制剂 (KPI) 基因为例, 详细介绍了一种以体内载体表达大量制备 dsRNA (>300 nt) 的方法。使用商业载体 pGEMT 和 pDRIVE, 以 2 步克隆法构建含有发夹环 (hairpin loop) dsRNA 表达载体, 转化 RNA 酶 III 缺陷的大肠杆菌 HT115 (DE3) 进行体内转录制备 dsRNA。构建的发夹 RNA 表达载体含有 494 bp 的正向靶序列和 403 bp 的反向互补靶序列, 其中正向靶序列多出的 91 bp 即可成为 loop 环, 而无需再次克隆加入。培养 30 mL 的细菌, 即可得到 1 mg 纯化的 dsRNA, 而其成本仅为使用商业化体外转录试剂盒的四分之一。为评估 RNAi 效果, 按照每 1 克虾体肌肉注射 2 μ g dsRNA 的剂量, 在 dsRNA 注射后 0, 6, 12 和 24 h 采集血淋巴, RT-PCR 检测 KPI mRNA 的基因转录水平。与对照组 GFP-dsRNA 和 NaCl 注射组相比, KPI-dsRNA 注射组可以在 24 h 内沉默血淋巴中的 KPI 基因。结果表明该方法是可大规模制备长的 dsRNA 的方法。

关键词: 斑节对虾; RNA 干扰; 双链 RNA; 体内转录; 大肠杆菌 HT115; *kazal* 型蛋白激酶抑制剂

中图分类号: Q 789; S 917

文献标识码: A

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 介导、细胞本身固有的对抗外源基因及其侵害的一种自我保护现象, 可以被称为是生物体基因组的免疫系统^[1-2]。RNAi 具有快速、有效、容易操作和序列特异性强等优点, 被称为基因抑制 (knockdown) 技术, 是一种高效的、特异性沉默同源 mRNA 的敲减工具, 可阻断特定基因表达, 是研究特定基因功能的有效方法, 在某种程度上可以替代操作复杂和费用昂贵的基因敲除技术。RNAi 作为一种新的研究工具, 在功能基因组学领域呈现出巨大的应用前景^[3]。

RNAi 技术现已在线虫、果蝇、植物、多种哺乳动物, 以及水生生物中对基因功能、基因治疗、信号传导通路、抗病毒机制、药物靶位点筛选及开发研究中有了广泛应用^[3-4]。RNAi 被认为是非常有应用前景的病毒病防治技术^[5], 也可用来研究单个基因功能, 病毒的感染及整个基因组范围的基因筛查。在对虾病毒病相关研究中, 目前已有报道针对对虾的几种主要病毒性病原, 如白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV)、黄头病毒 (yellow head virus, YHV) 及桃拉病毒 (taura syndrome virus, TSV) 干扰特定的病毒基因^[6-7], 可以干扰病毒复制, 提高对虾的存活率。

收稿日期: 2010-02-05 修回日期: 2010-04-07

资助项目: 国家“九七三”项目 (2006CB101801); 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA100312); 泰国 BIOTEC; 基本科研业务费专项经费 (2060302/2)

通讯作者: 黄捷, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

参与病毒侵染复制过程的细胞因子也是使用 RNAi 抑制病毒增殖的靶标,用序列特异性 dsRNA 沉默对虾 PmRab7 基因表达,有效抑制了对虾体内 WSSV 和 YHV 的感染和增殖^[8-9]。

dsRNA 可以通过注射,电穿孔和化学试剂介导的转染等方式介入动物和细胞内。dsRNA 的制备是实施 RNAi 较为关键的一步,一种操作简单,低成本的制备 dsRNA 方法可以便利 RNAi 相关研究和应用。目前常用的 dsRNA 制备方法主要有 2 种,体外转录法和体内载体表达法。其中体外转录法合成 dsRNA 可以在预期的 PCR 产物两端连上转录起始点(如 T7,SP6 等),先用 RNA 聚合酶转录合成单链的 RNA,再互补成 dsRNA。选取商业化的体外转录试剂盒就可以方便的制备出 dsRNA,但缺点是成本较高。相比而言,要制备大量的 dsRNA,采用体内载体表达法即构建质粒,用细菌体内表达更为经济高效^[9-11]。带有发夹环的 dsRNA 包括 2 个反向互补的靶序列片段,中间插入一个单链环。通常,构建这样的 DNA 模板,需要 3 步连接(3 步克隆法)实现。在满足获得大量双链 RNA 需求的同时,却不可避免多步克隆带来的较为繁琐操作过程。

本文以我们前期研究中通过 VOPBA (virus overlay protein binding assay) 技术鉴定得到的,与 WSSV 的主要囊膜蛋白 VP28 存在相互作用的对虾 kazal 型蛋白激酶抑制剂 (kazal proteinase inhibitor, KPI)^[12] 基因为例,详细的介绍采用 2 步克隆法构建 KPI-dsRNA 的表达载体,制备大量

dsRNA 的方法。实验证明这是一种简单易行,可以大规模高效制备 dsRNA 的方法,满足了我们在活体对虾 RNAi 实验中大量注射 dsRNA 的需求,也降低了实验成本。

1 材料与方法

1.1 RNAi 靶序列选定及引物设计

利用网上 siRNA 设计软件 (<http://www.promega.com/siRNADesigner/program/>) 初步分析 KPI 基因序列 (GenBank: AY267200),并结合结构域特征选取有效的干扰位点。针对选中的长约 500 bp 靶序列,设计 3 条引物(图 1),以含有 KPI 完整编码框序列的 pBluescript-KPI 质粒为模板,分别用于 PCR 扩增合成双链 RNA 的 DNA 模板。其中引物 1 和引物 3 用于扩增 494 bp 的正向靶序列,引物 1 和引物 2 用于扩增 403 bp 的反向互补靶序列(表 1)。PCR 反应条件为:预变性 94 °C 3 min,然后是 35 个循环的 94 °C 30 s,55 °C 30 s,和 72 °C 40 s,最后 72 °C 延伸 5 min。

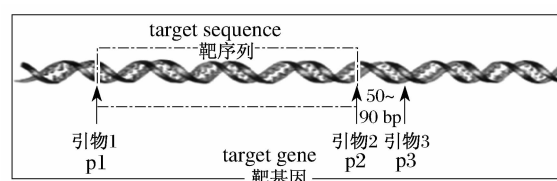


图 1 针对靶片段设计的 3 条引物的相互关系示意图
Fig. 1 Schematic diagram to show the relationship between 3 designed primers of the target fragment

表 1 引物序列及产物片段大小
Tab. 1 Primer sequences and estimated product size

PCR 产物 PCR product	引物名称 primer name	引物序列 sequence of primer	退火温度(°C) annealing temperature	产物大小(bp) product size
正向靶片段 sense target fragment	引物 1 primer 1	5'GTGGCTCTGATGGAAAAACG3'	55	494
	引物 3 primer 3	5'GTTCTTGCACTGAGCAACCTTG3'		
反向靶片段 anti-sense target fragment	引物 1 primer 1	5'GTGGCTCTGATGGAAAAACG3'	55	403
	引物 2 primer 2	5'ATGAGAGGAGTGCAGTCGCA3'		

以绿色荧光蛋白 GFP-dsRNA 为非序列特异性 dsRNA 对照,其 dsRNA 表达载体构建方法同上,所用引物序列为 5' TGG TGA GCA AGG

GCG AGG 3',5' GGA TCT TGA AGT TCA CCT TGA 3',5' TGG TGA GCA AGG GCG AGG 3',和 5' GCC GTC CTC CTT GAA GTC 3'。

1.2 第 1 步克隆构建正、反向靶序列载体

使用 PCR 产物纯化试剂盒 (QIAquick, Qiagen) 将上述 PCR 产物纯化后,将正向靶片段克隆到商业载体 pGEM-T easy vector (Proemega) 中,使用 42 °C 热休克法转化大肠杆菌感受态细胞 JM109,在含氨苄青霉素的 LB 平板上挑取白斑,使用载体通用引物 T7 和引物 3 作菌落 PCR 筛选具有正向插入片段的重组子。同时将反向互补靶片段克隆到载体 pDRIVE cloning vector (Qiagen) 中,转化大肠杆菌感受态细胞 XL 1-blue,在含有氨苄青霉素 (Amp) 和四环素 (Tet) 的 LB 平板上挑取白斑,使用 T7 和引物 1 作菌落 PCR 筛选具有反向插入片段的重组子。

1.3 第 2 步克隆构建 dsRNA 表达载体

分别纯化具有正向插入片段和反向插入片段的阳性克隆重组质粒 (Gene JET™ plasmid miniprep kit, Fermentas),用 *Sal* I 和 *Pst* I 酶切。pDRIVE 质粒酶切产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收目的片段,同时用 PCR 产物纯化试剂盒纯化 pGEM-T 质粒酶切产物,按照 7:1 比例混合,再加入 T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs),冰浴 3 h,将反向互补靶片段亚克隆到已含有正向插入片段的线性 pGEM-T 质粒中 (图 2)。42 °C 热休克法将其转化到 RNA 酶 III 缺陷型大肠杆菌感受态细胞 HT115 (DE3),涂布 LB (Amp + Tet) 平板,37 °C 培养过夜。

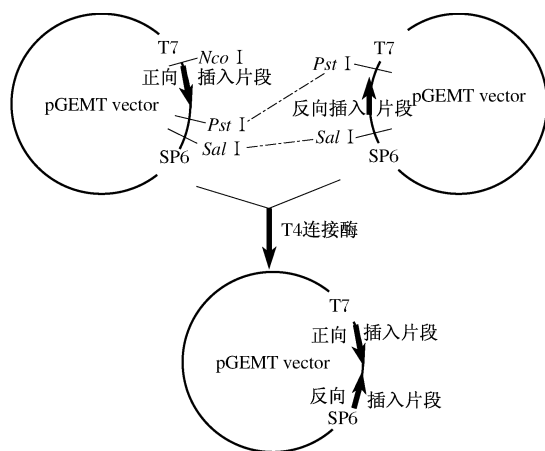


图 2 dsRNA 表达载体第 2 步克隆原理示意图

Fig. 2 The schematic diagram of step 2 for constructing dsRNA expression vector

1.4 阳性菌落筛选

用灭菌牙签刮取菌落,50 μL 灭菌水重悬,加

入等体积酚氯仿抽提总 DNA,12 000 r/min 4 °C 离心 10 min,取 7 μL 上清,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,初筛选定阳性克隆菌落。将得到的阳性克隆接种到 4 mL LB (Amp + Tet) 液体培养基,37 °C 振荡培养过夜。提取质粒,使用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Sac* I 在 37 °C 孵育 2 h,电泳观察酶切结果,第 2 次筛选鉴定 dsRNA 表达载体阳性克隆。

1.5 dsRNA 的诱导表达

挑取阳性克隆,接种到 4 mL LB (Amp + Tet) 液体培养基,37 °C 振荡培养过夜。次日按照 1:100 的比例进行扩大培养,检测 OD₆₀₀ 达到 0.4 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 继续诱导培养 4 h。4 000 r/min 4 °C 离心 5 min,收集细胞沉淀,并用 700 μL TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA,用 DEPC H₂O 配置,pH 8.0) 缓冲液重悬,然后用酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提法提取 RNA。再用 RNase A 和 DNase 处理,除去单链 RNA 和基因组 DNA,最终得到 dsRNA。测定 OD₂₆₀ 计算 dsRNA 浓度。取部分样品用 RNase III 消化处理再次检验 dsRNA 的质量。

1.6 RNAi 效果评估

实验中使用的斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 购于泰国中部一养殖场,平均体重 8 g,随机抽样经 PCR 检测无 WSSV 感染 (IQ 2000 kit, Farming Intelligene),实验室暂养 3 d 后使用。对照组 (12 尾虾) 注射 100 μL 150 mmol/L NaCl,另外 2 个实验组 (各 12 尾虾) 分别注射 KPI-dsRNA, GFP-dsRNA, 每尾虾注射 0.1 mL (16 μg) dsRNA (150 mmol/L NaCl 稀释) 于对虾第四或第五节肌肉。注射 dsRNA 0 h, 6 h, 12 h 和 24 h, 每组随机取 3 尾虾分别抽取 200 μL 血淋巴,按 1:1 的比例使用预冷的 AC-1 做抗凝剂 (0.45 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 葡萄糖, 30 mmol/L 柠檬酸钠, 26 mmol/L 柠檬酸, 10 mmol/L EDTA, pH 4.6)^[13]。提取 RNA, 以引物 1 和引物 3, 用一步 RT-PCR (Titan, Roche) 检测 KPI mRNA 的转录水平。EF (elongation factor) 为内参, 用来指示加载的 RNA 模板量, 引物序列为 5' GGT GCT GGA CAA GCT GAA GGC 3' 和 5' CGT TCC GGT GAT CAT GTT CTT GAT G 3'。PCR 反应条件为: 50 °C 30 min, 94 °C 2 min, 然后是 30 个循环的 94 °C 10 s, 55 °C 30 s 和 68 °C 45 s, 最后 68 °C 延伸 7 min。1.2% 琼脂糖电泳分析靶基

因的转录表达结果。

2 结果与分析

2.1 dsRNA 表达载体的构建

根据设计的引物,PCR 扩增后得到正向插入片段 493 bp,反向插入片段 403 bp(图 3-A)。前者长出的 90 bp 片段即为形成 dsRNA 时的发夹结构片段(spacer)。

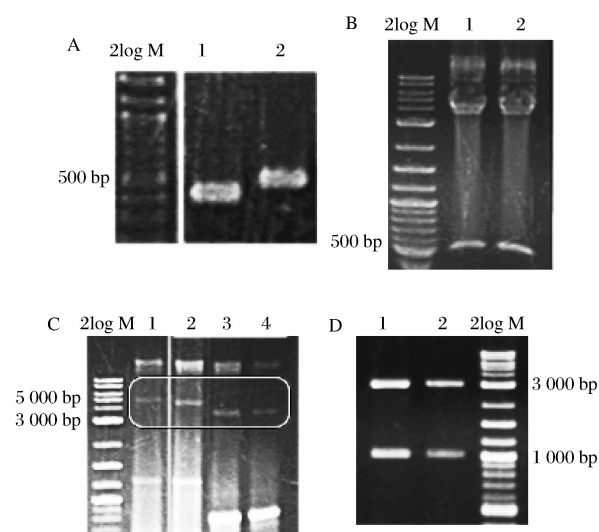


图3 dsRNA 表达载体构建及阳性克隆筛选

(A) 正/反向靶片段的 PCR 扩增结果。2log M; DNA 分子质量标准(100 ~ 10 kb)(NEB);泳道 1. 为 403 bp 的反向靶片段;泳道 2. 为 493 bp 的正向靶片段。(B) *Sal* I 和 *Pst* I 酶切 pDRIVE 质粒,得到含有反向靶序列的插入片段。(C) 酚氯仿抽提法初筛第 2 步构建载体的阳性克隆。泳道 1 和泳道 2 为含有插入片段的阳性克隆;泳道 3 和泳道 4 为没有插入片段的克隆。图中方框所示为筛选的指标片段。(D) *NCO* I 和 *Sac* I 酶切进一步验证 dsRNA 表达载体的阳性克隆。

Fig. 3 The construction of dsRNA expression vector and selection of positive clone

(A) the PCR product of sense and antisense target fragments. 2log M; DNA maker (100 - 10 kb) (NEB). Lane 1 was the product of antisense fragment with molecular weight 403 bp, lane 2 was the product of antisense fragment with molecular weight 493 bp. (B) plasmid pDRIVE with the reverted insert digested by *Sal* I and *Pst* I. (C) the first screening for the positive clones of secondary constructed vector by phenol-chloroform extraction method. Lane 1 and lane 2 are the positive clones with inserts, lane 3 and lane 4 showed the negative results. Indicator fragments were showed in the frame. (D) secondary screening for the positive clones by *NCO* I and *Sac* I digestion.

第 1 步克隆后,酶切 pDRIVE 质粒得到长约 500 bp 核酸片段(内含反向插入片段)(图 3-B),

胶回收后,将其作为插入片段,进行第 2 次克隆,得到带有发夹结构(hairpin)的 KPI-dsRNA 载体。以 RNase III 缺陷型的 *E. coli* HT115 (DE3) 作为 dsRNA 表达菌株。

酚氯仿抽提总 DNA,琼脂糖凝胶电泳后,通过比对 3 000 ~ 5 000 bp 间的产物片段大小,初筛阳性克隆。其中阳性克隆在该区域内的产物片段大小为 5 000 bp(图 3-C)。进一步提取质粒,经 *NCO* I 和 *Sac* I 酶切后,再次确定得到长度约为 1 000 bp 的目的插入片段(图 3-D),保证筛选到的阳性克隆的正确性。

2.2 验证诱导表达 RNA 产物

IPTG 诱导后,酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提法总核酸,用 RNase A 和 DNase 处理去除 DNA,单链 RNA(ssRNA)和 dsRNA 的 hairpin 环,即得到了长度约为 500 bp 的,序列特异性的 KPI-dsRNA(图 4)。经 RNase III 处理后,所得到的 dsRNA 被消化,泳道内看不到 RNA 片段,再次证实制备的样品是 dsRNA(图 4)。根据测定的 OD₂₆₀,计算 dsRNA 的产量,约为 1 mg dsRNA/30 mL 菌液。

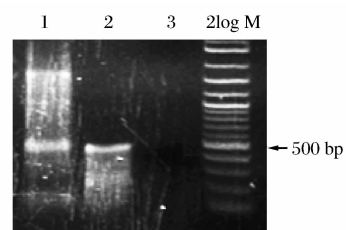


图4 由表达载体诱导出的 RNA 结果分析

泳道 1. 体内转录得到的 RNA;泳道 2. RNA 酶 A 消化后的产物;泳道 3. RNA 酶 III 消化后的产物。

Fig. 4 Analysis of RNA produced by the dsRNA expression vector

Lane 1 was total RNA obtained by *in vivo* transcription, lane 2 was the RNA product digested by RNase A, lane 3 was the final product digested by RNase III.

2.3 序列特异性 dsRNA 沉默 KPI 基因的转录

注射 dsRNA 后 0 h, 6 h, 12 h 和 24 h 取样, RT-PCR 检测 KPI 基因的 mRNA 转录水平。结果显示与 150 mmol/L NaCl 和 GFP-dsRNA 注射对照组相比,序列特异性的 KPI-dsRNA 可以在 24 h 内沉默血淋巴中的 KPI 基因(图 5)。内参 EF 的扩增量基本相同,显示反应中所用的 RNA 模板量基本一致。

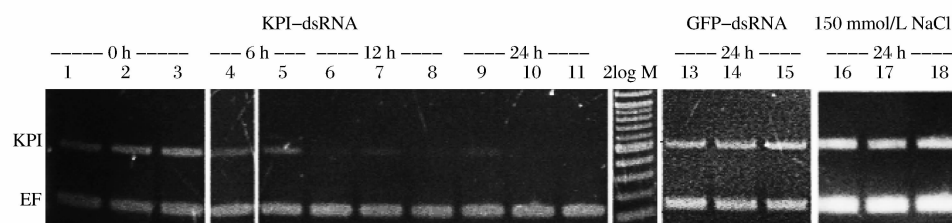


图5 RT-PCR 检测 KPI 转录表达水平

EF(187 bp)为内参,KPI(494 bp)为检测的目的片段。泳道1~11为KPI-dsRNA注射组。其中泳道1~3为0 h样品;泳道4,5为6 h样品;泳道6~8为12 h样品;泳道9~11为24 h样品;泳道13~15为GFP-dsRNA(阴性对照)注射后24 h样品;泳道16~18为150 mmol/L NaCl(空白对照)注射后24 h样品。各个泳道均代表不同的虾。

Fig.5 mRNA expression level of KPI detected by RT-PCR

EF(187 bp) was used as internal control, KPI(494 bp) was the target fragment for detection. From lane 1 to lane 11 were samples collected in KPI-dsRNA injected group. Among that, from lane 1 to lane 3 were samples collected at 0 h, lane 4 and 5 were samples collected at 6 h, from lane 6 to lane 8 were samples collected at 12 h, from lane 9 to lane 11 were samples collected at 24 h, from lane 13 to lane 15 were samples collected in GFP-dsRNA injected group(negative control) at 24 h post injection, from lane 16 to lane 18 were samples collected in 150 mmol/L NaCl injected control(blank control) at 24 h post injection. All lanes were representative of different shrimp.

3 讨论

dsRNA在RNAi过程中可以触发一个强大的、序列特异性的同源mRNA的抑制现象。一般可以通过体外转录和构建细菌体内表达载体2种方式来制备dsRNA。在使用RNAi技术研究特定基因功能及病毒防御机制时常常需要大量的dsRNA,一种操作简单,成本低廉的dsRNA制备方法可以便利RNAi技术的进一步推广和应用。2003年有学者用细菌*E. coli* HT115(RNA酶III缺陷型)菌株表达的dsRNA粗提物成功抑制了病毒对植物的感染,文中采用了3步克隆法构建含有3个基因片段的重组T载体制备dsRNA,其中插入了外源性的抗生素基因作为loop片段,以形成含有特定序列的RNA发夹结构,该方法实现了dsRNA的大规模制备,培养20 mL的菌液可制备约1 mg的dsRNA^[10,14]。

本文在该方法的基础上进行优化,建立了一种2步法克隆构建dsRNA体内表达载体的方法。与已报道的体内转录dsRNA方法相比^[9-11],本文的这种方法从经济和技术角度来看有几个显著的优点。首先,我们采用正向插入片段长出的90 bp作为hairpin loop,而无需直接插入与靶基因序列无关的loop片段,避免多步克隆的相对复杂性,简化了载体构建步骤;其次,减少了扩增发夹结构模板的引物;第三,设计的引物不需要限制性酶切位点,因为不需要DNA模板与表达载体间连接。构建好载体后,按需增加转化菌培养体积,

2 d内即可制备出实验所需的大量dsRNA。培养30 mL菌液可制备约1 mg dsRNA,而其成本仅为使用商业化试剂盒的体外转录法的四分之一。

本文以对虾KPI基因为例,通过体内法转录制备序列特异性的dsRNA,并对RNAi效果进行验证。采用肌肉注射的方式,将KPI-dsRNA注入对虾体内,通过RT-PCR检测,证实24 h内可以实现沉默目的KPI基因的表达。使用本方法也成功制备了针对YHV序列特异性的dsRNA,在一定程度上减缓了黄头病在凡纳滨对虾体内的增殖^[15]。充分验证了该方法制备的dsRNA可以很好的满足RNAi技术的需求,可高效特异地消减沉默目的基因表达。

目前RNAi在水生动物水生生物胚胎发育、基因功能和海洋生物抗病毒研究中都有了越来越广泛的应用^[3-4]。对对虾而言,因其缺少真正的获得性免疫应答反应,只有非序列特异性的先天免疫防御应答,而且对虾对病毒的防御机制尚未得到阐明,至今没有一个非常有效的防治病毒病的方法。RNAi被认为是一种非常有应用前景的抗病毒技术,还可以用来研究对虾病毒与宿主的相互作用机制,可以为对虾病毒病的有效防治提供理论依据。但目前dsRNA注入虾体的方式还主要以人工肌肉注射为主,耗时耗力,对实验动物的健康也不可避免的造成一定损伤。而且因一次注射的dsRNA数量有限,产生的RNAi效果具有时效性,不能实现长期的沉默效果。如果能构建一个在虾体内持续分泌的dsRNA表达系统,通过

口服等方式导入来实现目的基因的长期消减或沉默,进而有望实现对对虾防御一个或多个病毒的长久保护。

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* [J]. Nature, 1998, 391: 806 - 811.
- [2] Bagasra O, Prilliman K R. RNA interference: The molecular immune system [J]. Journal of Molecular Histology, 2004, 35: 545 - 553.
- [3] Agrawal N, Dasaradhi P V N, Mohmmmed A, *et al.* RNA interference: biology, mechanism, and applications [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67 (4): 657 - 685.
- [4] 孙修勤, 闫秀英. RNA 干扰技术在水生生物研究中的应用 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2008, 38 (2): 281 - 284.
- [5] Li H W, Ding S W. Antiviral silencing in animals [J]. FEBS Letters, 2005, 579 (26): 5965 - 5973.
- [6] Kurreck J. RNA interference: From basic research to therapeutic applications [J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2009, 48 (8): 1378 - 1398.
- [7] Assavalapsakul W, Chinnirunvong W, Panyim S. Application of YHV-protease dsRNA for protection and therapeutic treatment against yellow head virus infection in *Litopenaeus vannamei* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2009, 84 (2): 167 - 171.
- [8] Attasart P, Kaewkhaw R, Chimwai C, *et al.* Inhibition of white spot syndrome virus replication in *Penaeus monodon* by combined silencing of viral r2 and shrimp PmRab7 [J]. Virus Research, 2009, 145 (1): 127 - 133.
- [9] Ongvarrasopone C, Chanasakulniyom M, Srituny-alucksana K, *et al.* Suppression of PmRab7 by dsRNA inhibits WSSV or YHV infection in shrimp [J]. Marine Biotechnology, 2008, 10 (4): 374 - 381.
- [10] 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/OL]. BMC Biotechnology, 2003, 3 (1). <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6750-3-3.pdf>.
- [11] Ongvarrasopone C, Roshorm Y, Panyim S. A simple and cost effective method to generate dsRNA for RNAi studies in invertebrates [J]. Science Asia, 2007, 33: 35 - 39.
- [12] Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo C F, *et al.* PmRab7 is a vp28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp [J]. J Virol, 2006, 80 (21): 10734 - 10742.
- [13] Söderhall K, Smith V J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution [J]. Dev Comp Immunol, 1983, 7 (2): 229 - 239.
- [14] Sarathi M S M, Ahmed V P, Kumar S R, *et al.* Silencing VP28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA [J]. Mar Biotechnol, 2008, 10 (2): 198 - 206.
- [15] Saksmerprome V, Charoonart P, Gangnonngiw W, *et al.* A novel and inexpensive application of RNAi technology to protect shrimp from viral disease [J]. Journal of Virological Methods, 2009, 162 (1 - 2): 213 - 217.

Synthesis double-stranded RNA on a large scale and its application in *Penaeus monodon*

LIANG Yan¹, Vanvimon Saksamerprom^{2,3}, Kallaya Sritunyalucksan^{2,3}, HUANG Jie^{1*}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Lab of Sustainable

Utilization of Marine Fishery Resource, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China;

2. Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Science,

Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok 10400, Thailand;

3. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and

Technology Development Agency (NSTDA), Bangkok 12120, Thailand)

Abstract: RNA interference (RNAi) is initiated by double-stranded RNA (dsRNA) and has been used to improve our knowledge of the shrimp immune system. RNAi has also been used on a therapeutic approach for shrimp virus control. Method for dsRNA synthesis on a large scale will facilitate the application of RNAi in farmed shrimp. Kazal proteinase inhibitor (KPI) gene of shrimp *Penaeus monodon* was used as an example to show a large-scale preparation of long double-stranded RNA (>300 nt) in detail by a 2-step cloning method. Two commercial vectors pGEMT and pDRIVE were used to construct a dsRNA-expression system, which transformed into RNase-deficient *Escherichia coli* HT115 (DE3). The hairpin-RNA consisted of the target forward sequence (494 bp) and a 91-base shortened version of its inverted repeat (403 bp) to introduce a loop, no more need for direct cloning of the loop segment. The hairpin-expression vector resulted in large-scale dsRNA synthesis, the yield of dsRNA was about 1 mg dsRNA/30 mL bacterial culture, and its cost was approximately one fourth of the cost of same production by using a commercial *in vitro* transcription kit. A test group of shrimp *Penaeus monodon* (8 g, 12 shrimp each group) was injected intramuscularly in the fourth or fifth abdominal segment with 16 μ g dsRNA to investigate the sequence specific RNAi effect on endogenous KPI mRNA expression. The NaCl injected group and GFP-dsRNA injected group were used as control. Hemolymph (200 μ L) was collected from 3 shrimp at 0 h, 6 h, 12 h, and 24 h. RT-PCR test showed that KPI expression was completely knocked-down at 24 h. It should be possible to produce industrial-scale dsRNA production for shrimp farms by this *in vivo* transcription method.

Key words: *Penaeus monodon*; RNAi; dsRNA; *in vivo* transcription; *Escherichia coli* HT115; kazal proteinase inhibitor

Corresponding author: HUANG Jie. E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn