

Thế hệ ruồi này gọi là ruồi F_0 , có màu mắt trắng. Mỗi ruồi F_0 được giao phối với ruồi W1118 theo tỉ lệ 1:3. Chọn các ruồi chuyển gen thế hệ F_1 có kiểu hình mắt đỏ. Tiến hành đồng hợp tử hoá các dòng ruồi chuyển gen chọn được và định vị gen chèn trên nhiễm sắc thể bằng các phép lai với ruồi mang chỉ thị nhiễm sắc thể (balancer).

Định lượng mRNA

mRNA được tách chiết từ tế bào thu được, sau đó xử lý với DNase, tinh sạch và định lượng mRNA mục tiêu bằng phương pháp realtime PCR với hệ thống Biosystems 7500 Real Time PCR sử dụng Takara high fidelity RNA PCR kit (Takara) và SYBR Green I kit (Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. mRNA của *act5C* được sử dụng như mẫu chứng âm.

Lai Western

Protein trên SDS-PAGE được chuyển lên màng nitrocellulose bằng tác nhân điện. Khóa màng trong dung dịch sữa gầy 5% trong PBST (80 mM Na_2HPO_4 , 25 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20), tắt nhẹ trong 1 giờ cho dung dịch tiếp xúc đều với bề mặt của màng lai. Sau đó, màng lai được ngâm tắt nhẹ 1 giờ trong kháng thể kháng Duch-L1 (1:10000) hoặc kháng thể kháng α -tubulin. Sau đó màng được rửa kỹ 5x 5 phút với PBST. Tiếp tục màng được ủ, tắt nhẹ 1 giờ với kháng thể thứ cấp đánh dấu bằng HRP pha loãng trong PBST với tỉ lệ 1/20000. Sau đó màng được rửa kỹ bằng PBST 5x 5 phút. Hiện phim bằng dung dịch ECL1 và ECL2 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Nhuộm miễn dịch huỳnh quang (Immunofluorescence)

Tách đĩa tiền phân sinh mắt từ ấu trùng thứ 3 trong PBS (140 μM NaCl, 3 μM KCl, 8 μM Na_2HPO_4 , và 15 μM KH_2PO_4 , pH 7.4) trên đĩa. Cố định đĩa bằng 2% paraformaldehyde trong PBS ở 4°C qua đêm. Sau đó rửa 6 lần bằng PBS ở nhiệt độ phòng. Ủ với kháng thể sơ cấp α -DUCH antibody (1/10000) ở 4°C qua đêm. Rửa 6 lần bằng PBS và ủ với kháng thể thứ cấp α -FITC antibody (1/1500) 4 giờ ở nhiệt độ phòng hoặc 4°C qua đêm. Rửa 6 lần bằng PBS và ủ mẫu trong 100% glycerol trong 30 phút. Quan sát tín hiệu bằng kính hiển vi huỳnh quang.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết lập các dòng ruồi chuyển gen mang phức hợp UAS-IR.DUCH và định vị phức hợp gen này trên nhiễm sắc thể ruồi giám chuyển gen

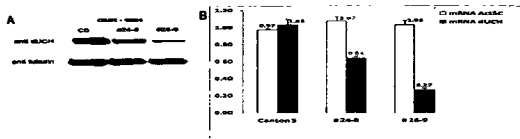
Sau khi chuyển gen bằng phương pháp vi tiêm, các dòng ruồi chuyển gen được tuyển chọn dựa vào gen chỉ thị w cho phép ruồi mang gen mục tiêu có màu mắt đỏ. Chúng tôi chọn được 54 dòng ruồi dự đoán có mang gen mục tiêu thông qua gen chỉ thị màu mắt đỏ. Trong 54 dòng này, chúng tôi chọn khảo sát 2 dòng có sức sống và khả năng sinh sản tốt (dòng #24-8 và #26-9). Các dòng ruồi dự tuyển được tiến hành làm thuần và xác định nhiễm sắc thể mang gen mục tiêu (UAS – IR.DUCH) bằng các phép lai với ruồi mang balancer. Kết quả định vị gen mục tiêu trong ruồi chuyển gen được tổng hợp trong Bảng 1 như sau.

Bảng 1. Danh sách các dòng ruồi mang phức hợp gen UAS-IR.DUCH

Dòng ruồi chuyển gen mang UAS-IR. DUCH	Nhiễm sắc thể chứa gen chèn	Kiểu gen	Kiểu hình
#24-8	III	w ⁺ ; UAS-IR.DUCH	Mắt đỏ, thân dài, cánh thẳng
#26-9	III	w ⁺ ; UAS-IR DUCH/TM3 (chết khi ở trạng thái đồng hợp tử)	Mắt đỏ, thân ngắn, cánh thẳng, lông lưng ngắn

Kiểm tra hiệu quả giảm biểu hiện gen DUCH trong ruồi chuyển gen mang phức hợp UAS-IR.DUCH

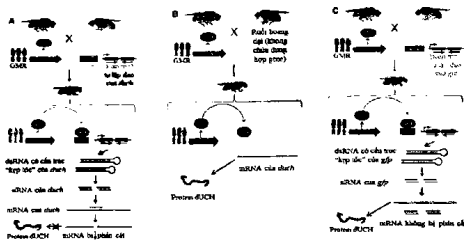
Trong các thí nghiệm kiểm tra hiệu quả giảm biểu hiện gen DUCH, chúng tôi sử dụng tổ hợp GMR-Gal4 kết hợp với phức hợp UAS-IR.DUCH nhằm biểu hiện dsRNA chuyên biệt cho mRNA *duch* trong mô mắt ruồi. Thu nhận mô tiền phân sinh mắt, tiến hành định lượng mRNA của DUCH bằng kỹ thuật real time PCR và thực hiện lai western blot với kháng thể kháng DUCH. Trong các thí nghiệm này, chúng tôi so sánh lượng mRNA DUCH trong các dòng ruồi chuyển gen với lượng mRNA DUCH trong dòng ruồi hoang dại Canton S. Sử dụng *rp49* như gen tham chiếu và *act5C* như đối chứng âm. Kết quả RT-PCR cho thấy lượng mRNA DUCH giảm 36% trong dòng ruồi 24-8; và giảm 73% trong dòng ruồi 26-9 trong khi đó không có sự khác biệt về lượng mRNA *act5C* giữa dòng ruồi hoang dại và các dòng ruồi chuyển gen (hình 1) Kết quả western blot cũng cho thấy ở các dòng ruồi chuyển gen, sự biểu hiện protein DUCH giảm đi so với dòng ruồi hoang dại Canton S, ở dòng 26-4 sự biểu hiện protein DUCH giảm mạnh hơn so với dòng 24-8. Các kết quả thí nghiệm cho thấy, chúng tôi đã thành công trong việc thiết lập các dòng ruồi giám biểu hiện gen *duch* bằng kỹ thuật RNAi.



Hình 1. Hiệu quả knock-down DUCH trong các dòng ruồi chuyển gen. A. Kiểm tra sự biểu hiện protein DUCH trong các dòng ruồi chuyển gen. B. Định lượng mRNA DUCH trong các dòng ruồi chuyển gen.

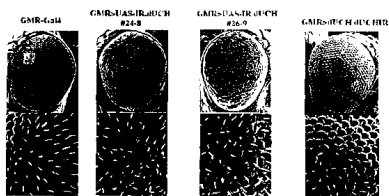
Khảo sát ảnh hưởng của giảm biểu hiện *duch* tại mô tiền phân sinh mắt lên sự phát triển của mô mắt

Nhằm giảm biểu hiện gen *duch* định hướng tại mô mắt, chúng tôi sử dụng hệ thống Gal4-UAS với promoter GMR, một promoter chuyên biệt cho mô mắt, để định hướng biểu hiện các dsRNA *duch* tại mô mắt. Ruồi lai F1 mang phức hợp GMR-Gal4>UAS-IR.dUCH (hình 2A) là các dòng ruồi giảm biểu hiện gen *duch*, các dòng GMR-Gal4 (hình 2B) và GMR-Gal4>UAS-IR.GFP (hình 2C) được sử dụng làm đối chứng trong các thí nghiệm khảo sát hiệu quả giảm biểu hiện và ảnh hưởng của việc giảm biểu hiện *duch* trong mô mắt ruồi. Các phân tích kiểu hình mắt ruồi trưởng thành dưới kính hiển vi điện tử cho thấy ruồi chuyển gen mang phức hợp GMR-Gal4>UAS-IR.dUCH có kiểu hình nhám bất thường khi so sánh với các dòng ruồi đối chứng (hình 3). Thủ vị hơn nữa, khi chúng tôi gia tăng số lượng mRNA *duch* trong các dòng ruồi GMR-Gal4>IR.dUCH thông qua việc đồng biểu hiện phức hợp UAS-dUCH trong các dòng ruồi này, chúng tôi nhận thấy kiểu hình nhám trong các dòng ruồi giảm biểu hiện *duch* được phục hồi. Điều đó có nghĩa là khi cân bằng lượng mRNA *duch* bị phân giải dưới tác động của RNAi bằng các mRNA *duch* được biểu hiện từ phức hợp UAS-dUCH, các tác động do giảm biểu hiện *duch* hoàn toàn bị giải trừ. Hay nói cách khác, dữ liệu thực nghiệm cho thấy, kiểu hình nhám ở ruồi giảm biểu hiện *duch* tại mô mắt là do sự giảm biểu hiện *duch* gây ra.

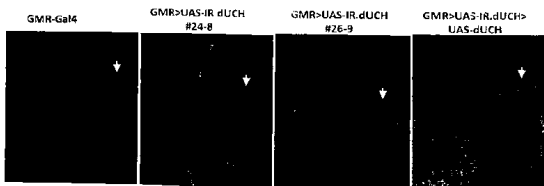


Hình 2. Chiến lược giảm biểu hiện gen *duch* định hướng mô mắt trong ruồi chuyển gen

Bên cạnh kết quả phân tích kiểu hình mắt ruồi, chúng tôi cũng thực hiện nhuộm miễn dịch đĩa phân sinh mắt ruồi với kháng thể kháng dUCH để kiểm tra sự biểu hiện protein dUCH. Kết quả cũng cho thấy, protein dUCH trong đĩa tiền phân sinh mắt ruồi chuyển gen mang UAS – IR. dUCH giảm nhiều so với ruồi đối chứng. Sự biểu hiện protein dUCH được khôi phục trong ruồi mang UAS- IR dUCH>UAS.dUCH (Hình 4).



Hình 3. Giảm biểu hiện dUCH gây kiểu hình mắt nhám trong ruồi chuyển gen



Hình 4. Kiểm tra sự biểu hiện của protein dUCH trong mô tiền phân sinh mắt ruồi

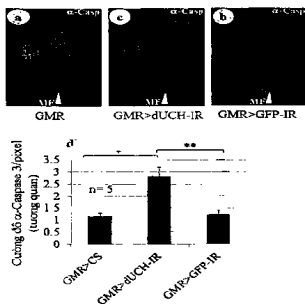
Giảm biểu hiện DUCH gây apoptosis tại giai đoạn biệt hóa của các tế bào mắt

Các kết quả nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể kháng DUCH cũng cho thấy sự giảm biểu hiện *duch* diễn ra tại vùng các tế bào biệt hóa của đĩa tiền phân sinh mắt (Hình 4). Chúng tôi tiếp tục tìm hiểu ảnh hưởng của sự giảm biểu hiện *duch* đến quá trình phát triển của các tế bào mắt tại vùng này. Các nghiên cứu trước đây cho thấy kiểu hình mắt nhám ở ruồi giảm có thể do nhiều nguyên nhân tuy nhiên đã có nhiều nghiên cứu cho thấy rằng apoptosis là một trong những nguyên nhân chính (Thao DT. et al., 2012). Do vậy, chúng tôi tiến hành nhuộm đĩa tiền phân sinh mắt với kháng thể kháng caspase-3 đang hoạt hóa để kiểm tra sự apoptosis xảy ra tại đĩa tiền phân sinh mắt. Kết quả cho thấy, tại đĩa tiền phân sinh mắt của ruồi giảm biểu hiện *duch* tín hiệu caspase-3 dày đặc ngay sau vùng phân sinh (MF-morphogenetic furrow) (hình 5c) trong khi đó tín hiệu này rải rác từ MF đến posterior ở dòng 2 dòng đối chứng (hình 5-a,b). Kết quả đo cường độ tín hiệu caspase-3 tại 5 đĩa tiền phân sinh mắt được chọn ngẫu nhiên từ các dòng được biểu diễn bằng biểu đồ hình 5d cho thấy tín hiệu caspase-3 của dòng giảm biểu hiện *duch* cao gấp 2 lần so với dòng đối chứng với giá trị $p < 0.05$.

Như vậy, khi giảm biểu hiện DUCH tại các tế bào thuộc vùng biệt hóa của đĩa tiền phân sinh mắt làm tăng quá trình apoptosis xảy ra tại các tế bào của vùng này từ đó ảnh hưởng đến quá trình biệt hóa của các tế bào mắt và có thể đây là một trong những nguyên nhân gây ra kiểu hình mắt nhám ở ruồi trưởng thành. Ở các dòng đối chứng vẫn có tín hiệu caspase-3 là do apoptosis vẫn xảy ra một cách tự nhiên trong quá trình tăng sinh và biệt hóa của các tế bào đồng thời sự biểu hiện Gal4 cũng có thể gây apoptosis trên các tế bào này (Kramer JM. et al., 2003; Thao DT. et al., 2012).

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế thành công các dòng ruồi chuyển gen giảm biểu hiện *duch* định hướng tại mô mắt ruồi. Kết quả khảo sát cho thấy có thể giảm biểu hiện 36% mRNA *duch* trong dòng 24-8 và 73% mRNA *duch* trong dòng 26-9. Sự giảm biểu hiện *duch* cảm ứng apoptosis trong mô tiền phân sinh mắt ruồi và do đó gây kiểu hình mắt nhám ở ruồi trưởng thành. Các kết quả nghiên cứu này đã bước đầu làm rõ vai trò của protein DUCH trong cơ thể sống và tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn nhằm làm sáng tỏ chức năng của protein này



Hình 5. Giảm biểu hiện DUCH gây apoptosis tại các tế bào đĩa tiền phân sinh mắt (a-c) Đĩa tiền phân sinh mắt của ruồi giảm biểu hiện và đối chứng nhuộm với α -caspase-3 ở độ phóng đại 400X (d) Biểu đồ cường độ tín hiệu α -caspase-3/3pxel thu được với *, $p = 0.004$ ($p < 0.05$); **, $p = 0.004$ ($p < 0.05$)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Kim HJ, Kim YM, Lim S, Nam YK, Jeong J, Kim HJ, Lee KJ (2009) Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 is a key regulator of tumor cell invasion and metastasis. *Oncogene*, 28(1):117-127.
- Jang MJ, Baek SH, Kim JH (2011) UCH-L1 promotes cancer metastasis in prostate cancer cells through EMT induction. *Cancer Lett*, 302(2):128-135.
- Hurst-Kennedy J, Chin LS, Li L (2012) Ubiquitin C-terminal hydrolase 11 in tumorigenesis. *Biochem Res Int*, 2012:123706.
- McNaught KSP (2007) The Ubiquitin-Proteasome System in Parkinson's Disease. In: Protein Degradation. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 169-194.
- Liu X, Zeng B, Ma J, Wan C (2009) Comparative proteomic analysis of osteosarcoma cell and human primary cultured osteoblastic cell. *Cancer Invest*, 27(3):345-352.
- Takase T, Hibi K, Yamazaki T, Nakayama H, Taguchi M, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, Nagasaka T, Nakao A (2003) PGP95 overexpression in esophageal squamous cell carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 50(53):1278-1280.
- Lee YM, Lee JY, Kim MJ, Bae HJ, Park JY, Kim SG, Kim DS (2006) Hypomethylation of the protein gene product 9.5 promoter region in gallbladder cancer and its relationship with clinicopathological features. *Cancer Sci*, 97(11):1205-1210
- Feany MB, Bender WW (2000) A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature*, 404(6776):394-398

Bhandari P, Shashidhara LS (2001) Studies on human colon cancer gene APC by targeted expression in *Drosophila*. *Oncogene*, 20(47):6871-6880.

Pandey UB, Nichols CD (2011) Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery *Pharmacol Rev*, 63(2): 411-436

Thao DT, et al., (2012) Overexpression of ubiquitin carboxyl terminal hydrolase impairs multiple pathways during eye development in *Drosophila melanogaster* *Cell Tissue Res*, 348(3): 453-63.

Kramer JM, Staveley BE (2003) GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res*, 2(1): 43-7.

KNOCKDOWN OF *duch* (DROSOPHILA UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE) AND STUDY ROLES OF *duch* IN TRANSGENIC FLY MODEL

Dang Thi Phuong Thao^{1,2}, Tran Linh Thuoc^{1,2}

¹Department of Molecular and Environmental Biotechnology, University of Science

²Laboratory of Molecular Biotechnology, University of Science, VNU-HCM

SUMMARY

UCH-L1 (ubiquitin carboxyl terminal hydrolase L1) is a member of DUBs (deubiquitinating enzymes) which regulates free ubiquitin mechanism of ubiquitin-proteasome system. Recently, many studies have demonstrated that *uch-l1* gene is involved in various types of human cancer and neurodegenerative disease, but its roles in living organisms are still unclear. Although the genetically modified mouse model has been widely used to study human diseases, this model has high cost and time consuming. Recently *Drosophila melanogaster* has been widely used as an effective model for human diseases with low cost and time saving. We, therefore investigate the functions of *uch-l1* through studying its homologue, *duch* in *Drosophila melanogaster*. The dsRNA of *duch* gene were designed and constructed in to pUAST vector and introduced into *Drosophila* fertilized embryo. Two lines of transgenic *Drosophila*, which carried dsRNA *duch* producing cassette gene, were screened out of 54 lines of transgenic fly. The two lines of chosen transgenic fly were checked and proved by reduction of *duch* mRNA level in eye imaginal discs. We then established transgenic flies carrying *duch* RNAi under the control of eye-specific enhancer GMR and Gal4/UAS system, which are applicable for eye-specific knockdown of *duch* . Knockdown of *duch* causes rough eye phenotype, triggers caspase-dependent cell death in eye imaginal discs. The results strongly indicate that *duch* involved in apoptotic and additionally, these results also support for further studies to discover targets of *duch* in apoptosis pathways to develop novel targeted therapies and early diagnosis for cancer and neurodegenerative diseases

Keywords: *uch-l1*, *Drosophila* model, Gal4-UAS, cancer, neurodegenerative disease.

* Author for correspondence: Tel: +84 -8 38307079; Email: thaodp@hcmus.edu.vn