

美国白蛾几丁质酶细菌表达的 RNA 干扰载体构建及其介导的 RNA 干扰

王 越, 张苏芳, 徐 瑶, 方加兴, 孔祥波, 刘 福, 张 真*

(中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

摘要: [目的] 探索细菌表达 dsRNA 介导的 RNAi 在美国白蛾中的可行性, 为 RNAi 技术在美国白蛾等林业害虫上的应用提供依据。[方法] 选择几丁质酶 *HcChi* 基因作为靶标, 设计有效的干扰片段, 构建到 L4440 干扰载体上, 并转入 HT115 大肠杆菌菌株。IPTG 诱导 HT115 表达 *HcChi* 的干扰片段, 用菌液持续饲喂美国白蛾幼虫, 观察幼虫生长情况, 定量 PCR 检测 *HcChi* 的转录水平。[结果] 构建了带有 *HcChi*-L4440 表达载体的 HT115 菌株, 经 IPTG 诱导能够合成 *HcChi*-dsRNA, 浓缩菌液持续饲喂幼虫显著抑制 *HcChi* 的表达, 相对表达量显著下降了 76.7%~90.3%, 幼虫生长发育迟缓, 体重增长量与对照相比显著减小 40.7%。[结论] 成功构建 *HcChi* RNA 干扰载体, 通过饲喂法在美国白蛾中获得 RNAi 效应。该体系首次在美国白蛾中建立, 为该物种的基因功能研究和生物防治提供新思路。

关键词: 美国白蛾; HT115 菌株; L4440; 几丁质酶; RNA 干扰

中图分类号: S763.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2019)02-0001-08

RNA 干扰 (RNAi) 是由双链 RNA (dsRNA) 引发的内源特异性基因转录后沉默机制^[1]。dsRNA 导入生物体内后, 被细胞中称为 *Dicer* 的 RNase III 分解成 21~23 bp 的小干扰 RNA (siRNA), siRNA 在沉默复合体 (RISC) 的作用下与目标 mRNA 结合, 序列特异性地降解靶 mRNA, 阻止相应蛋白产物的合成, 造成靶标基因的功能丧失^[2]。自从这种快速且直接沉默特定基因的机制被发现以来, RNAi 技术迅速在非模式动物的基因功能研究领域得到广泛应用^[3]。在多种农林害虫中的成功试验^[4-6], 也证实了利用 RNAi 进行害虫防治的可能性和广泛性。

RNAi 技术在害虫防治领域的应用需要大剂量 dsRNA, 目前最常用的试剂盒合成方法价格昂贵、不能持续生产。利用转基因寄主植物表达昆虫源 dsRNA 对害虫有一定防效^[4,7], 但植物转基因难度高、研究周期长, 具有很大的局限性。用细菌表达 dsRNA 的方法, 最早由 Timmons 和 Fire 开创使用, 他们将带有靶基因片段的 L4440 重组载体转入 BL21

(DE3) 菌株合成 dsRNA, 饲喂线虫引发 RNAi^[8]。随后他们从多个菌株中筛选出具有高 dsRNA 表达效率的 HT115 菌株, 并在线虫中得到应用^[9]。RNaseI-II 是细菌中普遍存在的 dsRNA 特异性核酸内切酶, 由 *rnc* 基因编码, HT115 菌株为 *rnc*-突变不能降解自身合成的 dsRNA^[10]。HT115 经过修饰, 插入一个 λ DE3 噬菌体衍生物, 可通过 IPTG 诱导表达 T7 RNA 聚合酶^[11]。HT115 的四环素和 Amp 抗性, 可在培养过程中分别排除 *rnc* + 反突变体和空载质粒。L4440 载体序列的多克隆位点两侧各有一个相反方向的 T7 聚合酶启动子, 转入 HT115 菌株后, 可经 IPTG 诱导表达 dsRNA^[8]。在玉米上喷施表达菌液可抑制花叶病毒的感染^[12], 饲喂或注射细菌表达的 dsRNA 也能显著干扰甜菜夜蛾^[13]、非洲甘薯象鼻虫^[14] 等害虫的生长, 证明该技术在植物保护方面的应用潜力。

美国白蛾 (*Hyphantria cunea* (Drury)) 是我国重要检疫性害虫, 其幼虫取食范围超过 175 种植物, 包

收稿日期: 2017-11-20 修回日期: 2018-02-05

基金项目: 林业公益性行业科研专项 (201504302); 中国林科院森环森保所基本科研业务费专项资金 (CAFRIFEEP 201406)

* 通讯作者: 张真, E-mail: zhangzhen@caf.ac.cn.

括几乎所有的园林树木、花卉及农作物^[15]。美国白蛾繁殖力和传播能力强^[16],适生范围广,严重威胁我国生态安全。目前对该害虫的防治手段主要有人工防治、化学防治和利用寄生天敌及性诱剂的生物防治等,这些手段具有一定的防治效果,但总体存在效率低、成本高、对生态环境不友好的问题^[17],因此 RNA 干扰这种靶标性强、环境友好型的技术在害虫防控领域展现较大的应用潜力。几丁质主要存在于昆虫的表皮、中肠围食膜(占4%~20%)中,形成昆虫的外骨骼,起支撑和保护作用^[18]。几丁质酶是几丁质水解的关键酶,在昆虫的变态发育中参与新旧表皮的更替和围食膜的降解,选择几丁质酶基因作为 RNA 干扰靶标,破坏昆虫几丁质表达通路,阻止昆虫的蜕皮、围食膜再生等生理过程,可达到害虫防治的目的^[19]。本文以 L4440 质粒为载体,构建了利用大肠杆菌 HT115 表达美国白蛾几丁质酶 dsRNA 的体系,通过对美国白蛾幼虫饲喂细菌表达的 dsRNA,检测该方法介导的 RNAi 在美国白蛾中的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株与载体:大肠杆菌 HT115 (DE3)由中国林科院资源昆虫研究所杨璞副研究员提供;L4440 质粒购自美国 Addgene 机构。DH5 α 感受态细胞和 T4 DNA 连接酶购自北京天根生化科技公司,pMD 19-T 质粒购自宝生物(大连)公司。

试虫:供试美国白蛾幼虫由中国林科院昆虫病毒研究中心提供,饲喂人工饲料,全气候温室培养:温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光周期 14L:10D,相对湿度 60%~80%。

1.2 RNA 提取及引物设计

美国白蛾四龄幼虫个体总 RNA 提取参照 RNeasy Mini Kit (QIAGEN)说明书进行,GoScript Reverse Transcription System (Promega)试剂盒反转录得到 cDNA 第一条链,该产物可作为 *HcChi* 基因扩增的模板用于后续实验。根据 NCBI 公布的美国白蛾 *HcChi* 基因序列全长 (GenBank: U86877.1)^[20],用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增 RNA 干扰片段的引物序列,并在正反引物两端各加入一种酶切位点用于后续双酶切步骤。dsRNA 目的片段大小为 388 bp,位于几丁质酶基因编码区的前部,干扰该片段的转录可影响 *HcChi* 的转录及表达,在本实验室的前

期试验中,已证明该 dsRNA 片段能显著抑制 *HcChi* 的表达。图 1 展示了 dsRNA 及 qPCR 试验基因片段在几丁质酶基因中的位置示意。

F1: 5'-ATTTCGGCCGCCACGCATCTCATC-TACTCA-3' (下划线为 Not I 酶切位点)

R1: 5'-CGGCTAGCCGAACCTTTACCGACCCT-3' (下划线为 Nhe I 酶切位点)

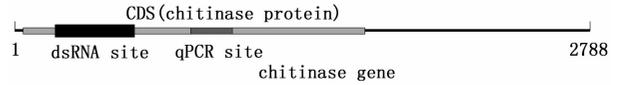


图 1 dsRNA 及 qPCR 片段在美国白蛾几丁质酶基因中的示意图

Fig.1 Schematic diagram of dsRNA and qPCR site in *HcChi* gene

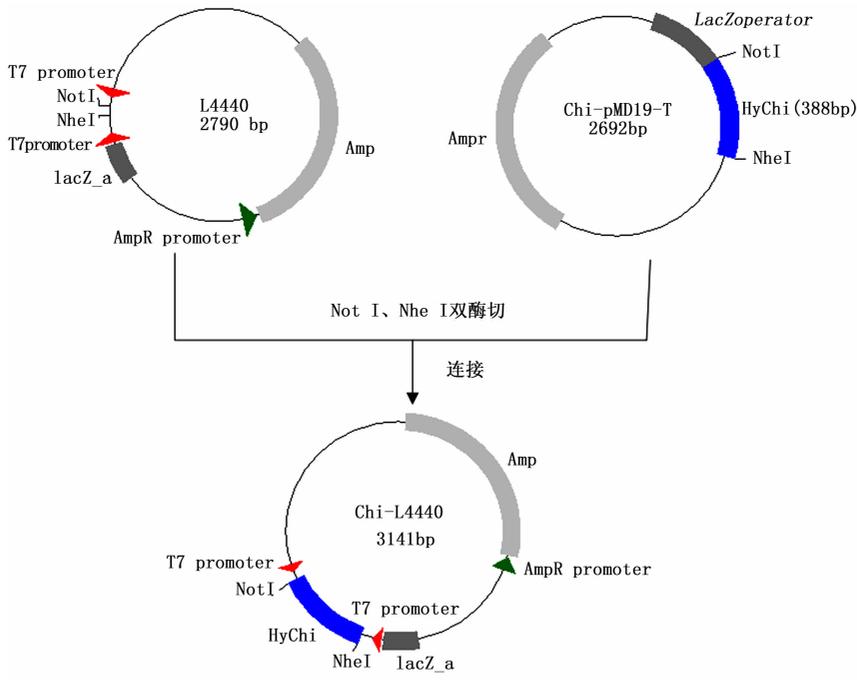
1.3 美国白蛾 *HcChi* 基因片段克隆及干扰载体构建

以上述 cDNA 为模板,F1/R1 引物进行 PCR 扩增,反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 3 min 预变性,95 $^\circ\text{C}$ 30 s,58 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 60 s,40 个循环,72 $^\circ\text{C}$ 5 min 终延伸。PCR 产物按 Omega 公司试剂盒说明胶回收,回收片段与 pMD 19-T 载体 (TaKaRa) 连接,连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞后,涂布于加有 Amp、IPTG、Xgal (均购自天根公司)的固体 LB 培养基平板上,37 $^\circ\text{C}$ 过夜培养,挑取白色单菌落于含 Amp 的 LB 液体培养基中培养,菌液 PCR 筛选阳性克隆,确认阳性克隆取菌液交由上海生工公司测序。

构建好的重组质粒 *HcChi*-pMD 19T 与 L4440 载体分别同时用 Nhe I 和 Not I (购自 NEB)进行双酶切,分别回收酶切产物。用 T4 连接酶将回收的 *HcChi* 基因片段和 L4440 质粒 16 $^\circ\text{C}$ 过夜连接 (反应体系:*HcChL* 片段 1 μL 、L4440 质粒 7 μL 、10 \times Buffer 1 μL 、T4 DNA 连接酶 1 μL),连接产物命名为 *HcChi*-L4440。将该重组干扰载体转入 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 Amp 的固体 LB 培养基平板上,37 $^\circ\text{C}$ 过夜培养,挑取白色单菌落于 LB 液体培养基中培养,菌液 PCR 及测序筛选阳性克隆。干扰表达载体构建过程如图 2 所示。

1.4 HT115 感受态细胞制备与转化

将 -80 $^\circ\text{C}$ 保存的 HT115 菌液在 LB 固体培养基中进行划线过夜培养,挑取单菌落转入 LB 液体培养基,37 $^\circ\text{C}$ 振荡培养过夜。以 1:10 比例将菌液转入新的 LB 培养基中,继续培养至菌液 OD₆₀₀ = 0.3~0.5 后置于冰上 10 min,待菌液冷却后 4 $^\circ\text{C}$ 5 000 r \cdot min⁻¹ 离心收集细胞沉淀。加入预冷的 0.1 mol \cdot

图2 *HcChi* 基因干扰表达载体的构建Fig. 2 Construction of RNA interference vector of *HcChi* gene

L^{-1} $CaCl_2 - MgCl_2$ 溶液重悬,冰浴 30 min, $4^{\circ}C$ $5\ 000\ r \cdot min^{-1}$ 离心收集细胞沉淀,加入预冷的 $0.1\ mol \cdot L^{-1}$ $CaCl_2$ 溶液重悬,得到 HT115 感受态细胞,用于后续转化。

用热激法将 *HcChi*-L4440 表达载体转入制备好的 HT115 感受态细胞中,涂布于 LB 固体培养基上,过夜培养后挑取单菌落接种到含 $50\ mg \cdot mL^{-1}$ Amp 和 $12.5\ mg \cdot mL^{-1}$ 四环素的 LB 液体培养基中,菌液 PCR 筛选含有重组质粒的表达。

1.5 dsRNA 在大肠杆菌中的表达

将带有 *HcChi*-L4440 的 HT115 菌液接种于 Amp 和四环素抗性的 LB 液体培养基中, $37^{\circ}C$ 过夜振荡培养, 1:100 比例将菌液转入新的 LB 培养基中, $37^{\circ}C$, $200\ r \cdot min^{-1}$ 培养至菌液 $OD_{600} = 0.6$ 左右,加入 IPTG 终浓度至 $1.0\ mmol \cdot L^{-1}$ 进行诱导表达,相同条件继续培养 4 h 后收集菌液。参照细菌总 RNA 提取试剂盒(天根)说明书提取细菌总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。RNase A(天根)消化总 RNA, 去除单链 RNA, 获得 *HcChi*-dsRNA。

1.6 细菌表达 *HcChi* 基因 dsRNA 的饲喂试验

取 180 头正常饲养至 2 龄的美国白蛾幼虫, 均分为两组。处理组饲喂含有经 IPTG 诱导后的 HT115 菌液浓缩液的人工饲料, 对照组的人工饲料中添加未经过 IPTG 诱导的菌液, 每天更换新鲜饲料

和菌液, 连续饲喂直到化蛹。饲喂后第 5 天和第 10 天, 每组随机取 4 头幼虫分别提取总 RNA, qPCR 检测 *HcChi* 基因的表达变化, 并持续监测幼虫的生长状态。*HcChi* 基因和内参基因 *Actin* 的 qPCR 引物如下:

F2: $5' - TCGGTCGTTCACTTTAGCAG - 3'$

R2: $5' - TTTGTAAGCGTAGGGGCAT - 3'$

Actin-F: $5' - GGTTACTCTTTCACCACCACAG - 3'$

Actin-R: $5' - GGACTTCTCAAGGGAAGTGC - 3'$

qPCR 试验在定量 PCR 仪(Roche)上进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析结果。

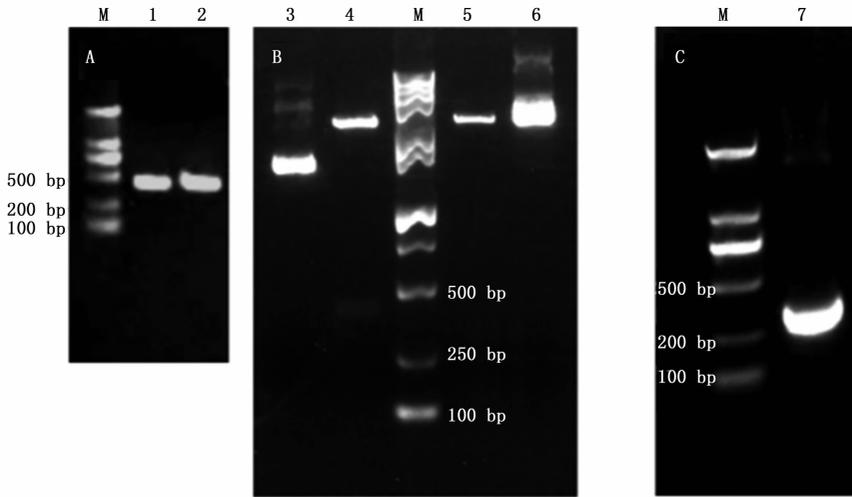
1.7 数据统计与分析

运用 SPSS 统计分析软件进行数据处理。统计美国白蛾取食细菌表达的 dsRNA 后不同时间 *HcChi* 基因表达水平的差异性(平均值 + 标准误), 并进行单因素方差分析($n = 5$), 显著性检验水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 目的条带的 PCR 扩增、重组与克隆

提取 4 龄美国白蛾幼虫总 RNA, 反转录为 cDNA, 以 F1/R1 引物进行 PCR 扩增, 扩增片段电泳结果显示介于 $250 \sim 500\ bp$ 之间(图 3 A), 与预期大小 388 bp 相符。回收目的条带与 pMD 19-T 载体连接, 命名为 *HcChi*-pMD 19-T 重组质粒, 转入 DH5 α 菌株并测序验证。



A: F1/R1 引物扩增产物; B: Chi-pMD19T 和 L4440 双酶切; C: Chi-L4440 表达载体 PCR 验证;
M: DNA marker; 1-2: dsRNA 引物扩增片段; 3: Chi-pMD19T 重组质粒; Chi-pMD19T 双酶切;
5: L4440 双酶切产物; 6: L4440 质粒对照; 7: Chi-L4440 表达载体 PCR 产物

图 3 *HcChi* 基因干扰片段的克隆及干扰载体的构建

Fig. 3 Cloning of RNAi fragment and construction of RNAi vector of *HcChi*

2.2 dsRNA 表达载体的构建和诱导表达

用 *Nhe* I 和 *Not* I 分别双酶切 *HcChi*-pMD 19-T 和 L4440 质粒, 凝胶电泳回收目的 DNA 片段和目标载体片段(图 3 B)。T4 DNA 连接酶将 *HcChi* 基因片段与 L4440 连接, 并转入 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 进行 PCR 和测序验证(图 3 C)。测序正确的菌株提取质粒 *HcChi*-L4440, 转入大肠杆菌 HT115 感受态细胞中, 平板筛选, 菌液 PCR(图 4) 和测序双重验证获得表达菌株。

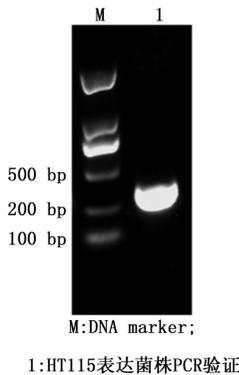


图 4 HT115 表达菌株的 PCR 验证

Fig. 4 PCR identification of HT115 expression strain

HT115 菌株中提取的重组质粒 *HcChi*-L4440 测序结果与原始序列用 MEGA7.0 软件进行比对, 相似度 99.23% (图 5), 表明美国白蛾几丁质酶基因 dsRNA 片段成功转入 L4440 质粒中, 与预期设计一致。

dsRNA_fragment	CACGCATCTCATCTACTCATTCATCGGAGTCACGGAGAAG	40
Chi-L4440	CACGCATCTCATCTACTCATTCATCGGAGTCACGGAGAAG	40
Consensus	ca cgc at ct cat ct act cat ttc at cg g ag tc ac gg aga ag	
dsRNA_fragment	AGTAACGPAAGTCCTCATIATTTGATCCTGAGCTAGACGTTG	80
Chi-L4440	AGTAACGPAAGTCCTCATIATTTGATCCTGAGCTAGACGTTG	80
Consensus	ag ta ac g pa ag tc ct cat i at ttt g at c ct g ag ct ag ac g tt g	
dsRNA_fragment	AGPAAATGGGTTCPACPACTTCACGGCTCTTCGCAAGAC	120
Chi-L4440	AGPAAATGGGTTCPACPACTTCACGGCTCTTCGCAAGAC	120
Consensus	ag a a a at gg g tt c pa c pa ct tc ac gg ct ct tc g ca ag ac	
dsRNA_fragment	TCATCCTCATGTCAAGTTCATGTTGGCCGTAAGAGGCTGG	160
Chi-L4440	TCATCCTCATGTCAAGTTCATGTTGGCCGTAAGAGGCTGG	160
Consensus	tc at c ct ca t gt ca ag tt ca t g tt gg cc g ta ag ag g ct gg	
dsRNA_fragment	GCAGPAGCGGCTCTAAGTACTCTCATATGGTTGCCACA	200
Chi-L4440	GCAGPAGCGGCTCTAAGTACTCTCATATGGTTGCCACA	200
Consensus	gc ag a ag cg g ct ct a ag t act ct ca t at gg tt g cc ca ga	
dsRNA_fragment	PACAATCACCATTTGACTTTCGTGAGGCTCTGCTGACTT	240
Chi-L4440	PACAATCACCATTTGACTTTCGTGAGGCTCTGCTGACTT	240
Consensus	a ca at ca c ca t tt g act tt t c gt g ag g ct ct g ct g act t	
dsRNA_fragment	CATGPAAPATATGACTTTGATGGTTTGGATCTTGACTGG	280
Chi-L4440	CATGPAAPATATGACTTTGATGGTTTGGATCTTGACTGG	280
Consensus	ca t g pa a pa at at g act tt t g at gg tt t gg at ct t g act gg	
dsRNA_fragment	GAGTACCCTGGTGTGCTGAGCCTGGTGGCTCTCTCTG	320
Chi-L4440	GAGTACCCTGGTGTGCTGAGCCTGGTGGCTCTCTCTG	320
Consensus	g ag t acc ct gg t gt g ct g ag c ct gg t gg ct ct ct ct g	
dsRNA_fragment	ACPAAGATAGATTCCTCTTCTTGTGCAAGAAGTCAAGAG	360
Chi-L4440	ACPAAGATAGATTCCTCTTCTTGTGCAAGAAGTCAAGAG	360
Consensus	ac pa ag at ag at tc ct ct t ct t gt g ca aga ag t ca ag ag	
dsRNA_fragment	GGCCTTCATCAGGGTCGCTTAAAGGTTTC	387
Chi-L4440	GGCCTTCATCAGGGTCGCTTAAAGGTTTC	387
Consensus	gg c ct t ca t c ag gg t c g ct t aa ag g tt t c	

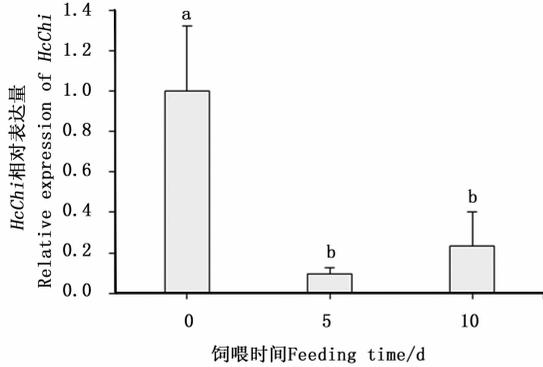
图 5 *HcChi*-L4440 重组载体测序结果比对图

Fig. 5 Sequences comparison of *HcChi*-L4440 recombinant vector

2.3 饲喂试验后美国白蛾幼虫 *HcChi* 基因的表达变化及其生长状态

为检测持续饲喂细菌表达的 dsRNA 后是否会

引发美国白蛾幼虫 *HcChi* 基因的沉默,我们分别在饲喂第 5 天和第 10 天取样进行荧光定量 PCR 检测。结果显示(图 6),饲喂 5 天和 10 天后 *HcChi* 基因 mRNA 水平相对表达量分别下降了 90.3 % 和 76.7 %,表明饲喂表达 dsRNA 的细菌可显著抑制美国白蛾幼虫 *HcChi* 基因的表达。



注:图中不同字母表示差异性显著($P < 0.05$)

Note: Different letters in the picture indicate significant differences($P < 0.05$)

图 6 饲喂细菌表达的 dsRNA 后美国白蛾幼虫 *HcChi* 基因的表达水平

Fig. 6 Expression levels of *HcChi* after feeding dsRNA expressed by HT115

美国白蛾幼虫取食表达 dsRNA 的细菌后,生长发育显著滞后于对照。饲喂 10 天、15 天、20 天后,幼虫平均体重分别为 63.5 ± 5.30 mg、 76.2 ± 12.92 mg 和 45.9 ± 7.69 mg,与对照相比分别减小了 19.0%、36.2% 和 40.7%,且均有显著差异($P < 0.05$)(图 7)。图 7 显示,饲喂试验 20 天后,对照组和处理组美国白蛾幼虫体重均显著下降,这可能由于试验用美国白蛾种群长期在室内无菌环境下人工饲养,对添加进人工饲料的 HT115 大肠杆菌敏感性较高,加之连续高浓度的菌液饲喂,影响了幼虫的取食消化,造成试验后期体重显著下降的现象。但与对照相比,取食经 IPTG 诱导生产 *HcChi*-dsRNA 的幼虫,在整个饲喂试验中都表现出较差的生长状态,该结果表明,随着饲喂天数的增加,美国白蛾幼虫受细菌表达的 dsRNA 干扰效应累加,导致取食困难、生长减缓、体重下降。

3 讨论

鳞翅目是昆虫纲中的第三大目,多数种类的幼虫为害农林植物。鳞翅目昆虫属全变态型,体内几丁质的正常合成和降解是昆虫生长发育的关键,因

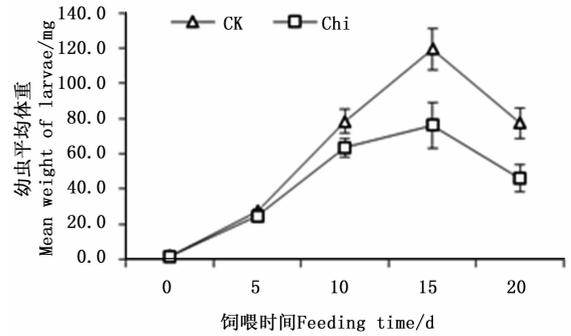


图 7 饲喂细菌表达的 dsRNA 后对美国白蛾幼虫生长的影响

Fig. 7 The effect of feeding dsRNA expressed by HT115 on the growth of *H. cunea* larvae

此与之相关的酶类成为利用生物技术防治害虫的重要研究方向^[21]。RNAi 技术的快速发展,使研究者更多地利用该方法研究昆虫几丁质酶系的功能,并试图得到新的害虫防治策略。通过 RNAi 对赤拟谷盗 10 个几丁质酶基因功能进行分析,发现 *TcCht5*、*TcCht10* 和 *TcCht7* 分别在虫态转化和翅原基的发育过程中起到关键作用,说明不同几丁质酶基因具有不同的生物学功能^[22]。云杉卷叶蛾中有两种几丁质脱乙酰基酶 *CfCDA2* 的剪切体,幼虫期及预蛹期分别注射相应 dsRNA 均使其丧失蜕皮功能,导致畸形和高死亡率^[23]。分别用注射和细菌表达几丁质合成酶 A dsRNA 处理甜菜夜蛾,可干扰幼虫蜕皮、破坏气管及中肠结构,导致其生长异常、死亡率显著提高^[24-25]。上述研究表明与几丁质代谢相关的酶类为害虫防治研究提供了合适的靶标基因,具有很大的研究潜力。

dsRNA 导入昆虫体内的主要方式包括注射法^[26]和饲喂法^[27]等。微注射法可将精确剂量的 dsRNA 注入昆虫血腔中,但会对昆虫造成不可逆的损伤,多用于实验室内的基因功能分析。饲喂法操作简单、对昆虫无机械损伤,昆虫可直接取食 dsRNA 溶液^[27]、转基因植物^[4]、纳米材料结合的 dsRNA^[6]和可表达 dsRNA 的细菌^[14]等。其中,利用大肠杆菌表达 dsRNA 成本低廉、操作相对简便,可用于大规模的靶标基因筛选和干扰试验^[28]。该方法中的表达载体一旦构建成功,可长期保存或利用注射和饲喂法研究昆虫的基因功能。王根洪等对家蚕注射细菌表达的 *FTZ-F1* 基因 dsRNA,获得预期干扰表型,成功干扰了靶基因的表达^[29]。石萌等构建了表达黄粉虫抗冻蛋白基因 dsRNA 的大肠杆菌 HT115 菌

株,提纯后注射黄粉虫,对其抗冻蛋白基因的表达具有明显的抑制作用^[30]。饲喂细菌表达的 dsRNA 对甘薯象鼻虫的毒性略低于注射,可能是由于 dsRNA 在其消化系统中被部分降解^[14]。在小菜蛾、棉铃虫、大草蛉等鳞翅目害虫中,该方法也用于基因功能的研究^[31-33]。

本研究利用大肠杆菌表达的几丁质酶 dsRNA 持续饲喂美国白蛾幼虫,没有造成幼虫蜕皮过程中的畸形表型,以及发育后期化蛹率和死亡率的显著降低,但与对照相比,幼虫的取食量显著减小,影响了幼虫的正常发育。这可能由于幼虫摄取混有 dsRNA 的人工饲料后,经消化系统转运到中肠,由于昆虫围食膜具有选择透过性,允许酶和小分子的通过^[34],因此 dsRNA 可通过围食膜进入中肠细胞,导致中肠细胞中几丁质合成通路紊乱,影响围食膜的再生,从而降低围食膜的保护和吸收功能,使幼虫不能正常消化食物或更容易被食物中的病毒感染,最终导致幼虫的生长减缓。而在多种鳞翅目昆虫肠道中都发现一种专性降解 dsRNA 的核酸酶 dsRNase^[35-37],这种酶的存在能快速降解进入肠道的大部分 dsRNA,因此除了作用在中肠及围食膜细胞上,可能仅有极少量的 *HcChi*-dsRNA 能经过组织间的转运作用于幼虫表皮,不能反应在个体水平的蜕皮过程中,这或可解释没有造成幼虫蜕皮过程中的畸形表型。干扰褐飞虱几丁质酶家族中 10 个基因的表达,其中有 5 个基因未出现明显的形态、存活率异常,可能由于这几个基因的功能与其它几丁质酶相比起辅助作用,当表达受到抑制时,其功能可被其它家族基因替代或弥补^[38]。本研究中干扰 *HcChi* 基因表达后,可能刺激了其他相关基因的表达,弥补了该基因沉默对美国白蛾幼虫形态发育、存活能力的影响,因此未造成化蛹率和死亡率的显著降低。欧洲玉米螟中发现一种肠道特异性几丁质酶,饲喂幼虫 dsRNA 后,与对照相比幼虫围食膜上的几丁质含量增加 26%,体重减少 54%,说明几丁质含量的变化可能改变了围食膜的通透性,影响消化酶的转运和营养吸收^[39]。用大肠杆菌表达的两种几丁质酶剪切体 dsRNA 饲喂粘虫 (*Mythimna separate* (Walker)) 四龄幼虫,可导致其生长减缓、死亡率上升,但同样没有得到畸形表型^[40]。

4 结 论

本研究构建了美国白蛾几丁质酶基因 dsRNA

的表达载体,在大肠杆菌 HT115 菌株中通过 IPTG 诱导表达 dsRNA。对美国白蛾幼虫饲喂浓缩菌液,成功抑制几丁质酶基因在白蛾幼虫体内的表达,并导致幼虫生长发育迟缓。该体系在美国白蛾中首次建立,证实基于细菌表达 dsRNA 的策略能在美国白蛾中得到应用,也为美国白蛾的功能基因研究和生物防治提供了新的思路。同时,美国白蛾及其他昆虫几丁质酶基因的 RNAi 干扰机制尚不明确,具体机理还有待深入研究。

参 考 文 献:

- [1] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806.
- [2] Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, *et al.* Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi[J]. *Cell*, 2002, 110(5):563-574.
- [3] Fraser A G, Kamath R S, Zipperlen P, *et al.* Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference [J]. *Nature*, 2000, 408(6810):325.
- [4] Mao Y B, Cai W J, Wang J W, *et al.* Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(11):1307.
- [5] Miguel K S, Scott J G. The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar applied insecticide[J]. *Pest Management Science*, 2016, 72(4):801-809.
- [6] Shen D, Zhou F, Xu Z, *et al.* Systemically interfering with immune response by a fluorescent cationic dendrimer delivered gene suppression[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(29):4653-4659.
- [7] Baum J A, Bogaert T, Clinton W, *et al.* Control of coleopteran insect pests through RNA interference [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(11):1322-1326.
- [8] Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA[J]. *Nature*, 1998, 395(6705):854.
- [9] Timmons L, Court D L, Fire A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Gene*, 2001, 263(1-2):103.
- [10] Dasgupta S, Fernandez L, Kameyama L, *et al.* Genetic uncoupling of the dsRNA-binding and RNA cleavage activities of the *Escherichia coli* endoribonuclease RNase III-the effect of dsRNA binding on gene expression[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 28(3):629-640.
- [11] Studier F W, Moffatt B A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1986, 189(1):113-130.
- [12] Gan D F, Jiao Z, Jiang H B, *et al.* Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection [J]. *Plant Cell Reports*,

- 2010, 29(11):1261-1268.
- [13] Tian H, Peng H, Yao Q, *et al.* Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene[J]. *Plos One*, 2009, 4(7):e6225.
- [14] Prentice K, Christiaens O, Pertry I, *et al.* RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae)[J]. *Pest Management Science*, 2016, 73(1).
- [15] Yang Z Q, Zhang Y A. Researches on techniques for biocontrol of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, a severe invasive insect pest to China[J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2007, 44(4):465-471.
- [16] Yamanaka T, Tatsuki S, Shimada M. Flight Characteristics and Dispersal Patterns of Fall Webworm (Lepidoptera: Arctiidae) Males [J]. *Environmental Entomology*, 2001, 30(6):1150-1157.
- [17] 闫家河, 刘芹, 王文亮, 等. 美国白蛾发生与防治研究综述[J]. *山东林业科技*, 2015, 45(2):93-106.
- [18] Kramer K J, Hopkins T L, Schaefer J. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 1995, 25(10):1067-1080.
- [19] 李瑶, 范晓军. 昆虫几丁质酶及其在害虫防治中的应用[J]. *应用昆虫学报*, 2011, 48(5):1489-1494.
- [20] Kim M G, Shin S W, Bae K S, *et al.* Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, *Bombyx mori* and the fall webworm, *Hyphantria cunea*[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 1998, 28(3):163.
- [21] Kramer K J, Muthukrishnan S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 1997, 27(11):887.
- [22] Zhu Q, Arakane Y, Beeman R W, *et al.* Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(18):6650.
- [23] Quan G, Ladd T, Duan J, *et al.* Characterization of a spruce budworm chitin deacetylase gene: stage-and tissue-specific expression, and inhibition using RNA interference[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2013, 43(8):683-691.
- [24] Chen X, Tian H, Zou L, *et al.* Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference[J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2008, 98(6):613-619.
- [25] Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, *et al.* Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(49):46849.
- [26] Turner C T, Davy M W, Macdiarmid R M, *et al.* RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding[J]. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(3):383.
- [27] Bautista M A, Miyata T, Miura K, *et al.* RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2009, 39(1):38.
- [28] Hunter W, Ellis J, Vanengelsdorp D, *et al.* Large-Scale Field Application of RNAi Technology Reducing Israeli Acute Paralysis Virus Disease in Honey Bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae) [J]. *Plos Pathogens*, 2010, 6(12):e1001160.
- [29] 王根洪, 祝慧敏, 罗会松, 等. 细菌表达 dsRNA 介导的家蚕 FTZ-F1 基因的 RNA 干扰[J]. *昆虫学报*, 2011, 54(5):596-601.
- [30] 石萌, 刘小宁, 马纪. 利用细菌表达 dsRNA 介导黄粉虫抗冻蛋白基因的 RNA 干扰[J]. *生物技术通报*, 2014, 46(8):113-119.
- [31] 徐秀凤. 小菜蛾精氨酸激酶基因 dsRNA 在大肠杆菌中的表达及其效应[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [32] 韩国英. 棉铃虫和 HaCHS 和 CDA 基因的克隆、表达及 Feeding RNAi 分析[D]. 保定: 河北大学, 2015.
- [33] 刘昌燕. 大草蛉卵黄原蛋白基因功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [34] Martin M M, Barbehenn R V. Permeability of the Peritrophic Envelopes of Herbivorous Insects to Dextran Sulfate: a Test of the Polyanion Exclusion Hypothesis[J]. *Journal of Insect Physiology*, 1997, 43(3):243.
- [35] Arimatsu Y, Kotani E, Sugimura Y, *et al.* Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2007, 37(2):176.
- [36] Garbutt J S, Bellés X, Richards E H, *et al.* Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: Evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2013, 59(2):171-178.
- [37] Liu J, Swevers L, Iatrou K, *et al.* *Bombyx mori* DNA/RNA non-specific nuclease: expression of isoforms in insect culture cells, subcellular localization and functional assays[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58(8):1166.
- [38] Xi Y, Pan P L, Ye Y X, *et al.* Chitinase-like gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2015, 24(1):29-40.
- [39] Khajuria C, Buschman L L, Chen M S, *et al.* A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2010, 40(8):621-629.
- [40] Ganbaatar O, Cao B, Zhang Y, *et al.* Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors[J]. *Bmc Biotechnology*, 2017, 17(1):9.

Construction of the Expression Vector and RNAi Mediated by Bacteria Expressed dsRNA of Chitinase Gene from *Hyphantria cunea*

WANG Yue, ZHANG Su-fang, XU Yao, FANG Jia-xing, KONG Xiang-bo, LIU Fu, ZHANG Zhen

(Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [**Objective**] To explore the feasibility of dsRNA expressed by HT115-mediated RNAi in *Hyphantria cunea*. [**Method**] *Hyphantria cunea* chitinase gene (*HcChi*) was chosen as the target gene. An interference fragment was designed and inserted into the expression vector L4440, and then transformed into the *Escherichia coli* strain HT115. The *H. cunea* larvae were fed on bacteria solution which was induced by IPTG. The growth of larvae were observed, and the mRNA level of *HcChi* was detected using qPCR. [**Result**] The HT115 strain containing *HcChi*-L4440 expression vector can express *HcChi*-dsRNA by IPTG induction. After fed on bacteria solution, the expression level of *HcChi* in *H. cunea* decreased significantly by 76.7 % – 90.3 %. The body weight growth decreased about 40.7% compared with the control. [**Conclusion**] The RNA interference vector was constructed successfully. The effect of RNAi was observed in *H. cunea* by feeding method. This is the first time that developing a method of RNAi based on bacteria expressed dsRNA in *H. cunea*, which provides a new idea on the study of gene function and biological control of *H. cunea*.

Keywords: *Hyphantria cunea*; HT115 strain; L4440; chitinase; RNAi

(责任编辑:崔 贝)