

中华紫胶虫 *FAD* 基因 RNA 干扰载体构建 与功能初步分析

王伟伟¹, 凌晓霏¹, 陆沁¹, 柳鹏飞¹, 张金稳¹, 陈航^{1,2*}

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224; 2. 国家林业与草原局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要: [目的] 引入细菌表达 dsRNA 干扰系统对中华紫胶虫 *FAD* 基因进行 RNA 干扰, 通过检测干扰后 *FAD* 基因表达量与个体泌胶量动态变化, 对 *FAD* 基因功能进行初步分析, 为验证紫胶合成相关基因功能提供科学基础。 [方法] 中华紫胶虫 *FAD* 基因和 L4440 载体经双酶切之后, 利用 T4 连接酶连接, 构建 *FAD*-L4440 重组质粒, 并转入 HT115 感受态细胞中, IPTG 诱导表达 dsRNA 后, 通过虫体涂抹法将 dsRNA 转染到紫胶虫体内。用 RT-qPCR 检测干扰后 *FAD* 基因的表达量并测定干扰后个体泌胶量的变化。 [结果] RNA 干扰后 *FAD* 基因表达量明显降低, 其中, 以低浓度菌液处理后 12 h 和中浓度菌液处理后 24 h 相对于对照组有显著差异, 分别降低了 90.90% 和 86.52%, 中浓度在 72 h 时干扰效率高于其他两个组, 个体泌胶量与对照组比较有显著下降。 [结论] 本研究构建了中华紫胶虫 *FAD* 基因的 RNA 干扰载体, 在基因功能验证中引入了细菌表达 dsRNA 的 RNAi 系统, 使用虫体涂抹法将其导入虫体内引起 *FAD* 基因表达量与紫胶虫个体泌胶量显著下降, 为 RNAi 转染过程中不适用注射法、喂食等转染方法的昆虫提供技术参考, 为后续解析紫胶合成的分子机理提供技术基础与科学依据。

关键词: 中华紫胶虫; RNA 干扰; *FAD* 基因; L4440

中图分类号: S759.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2019)06-0014-07

中华紫胶虫 (*Kerria chinensis* Mahdihassan) 隶属于半翅目 (Hemiptera)、胶蚧科 (Tachardiidae)、胶蚧属 (*Kerria*), 是一种具有重要经济价值的资源昆虫, 主要寄生于交趾黄檀 (*Dalbergia cocorinchinensis* Pierre ex Laness)、光叶合欢 (*Aibizia lucida* (Steud.) Nielsen) 等植物上, 通过吸取植物韧皮部的汁液生长繁殖。紫胶是雌虫通过腺体分泌出的一种纯天然的树脂, 主要成分由紫胶树脂、紫胶蜡、紫胶色酸等组成。紫胶是重要天然林产化工原料, 加工后被广泛应用于军工、日用化工、电子等行业, 因而具有重要的经济价值^[1-2]。前人在紫胶虫研究方面已做了大量的工作, 但主要是围绕紫胶虫生物学特征、生态适应性、寄主植物、遗传多样性等方面展开的, 在紫胶合成的分子机理、泌胶相关基因的验证等方面的研究尚未见报道^[3-6]。

紫胶树脂是由羟基脂肪酸和倍半萜烯酸酯相互形成的内酯及交酯混合而成, 结构比较复杂^[2]。羟

基脂肪酸是紫胶树脂的主要组成部分, 与之相关的脂肪酸合成代谢途径, 其主要由脂肪酸合成酶 (FAS)、超长链脂肪酸延伸酶 (ELO)、脂肪酸去饱和酶 (FAD) 等参与完成, 其中, 脂肪酸去饱和酶 (FAD) 在脂肪酸代谢过程中发挥着重要作用。FAD 在卷叶蛾、烟草蛾、小菜蛾等蛾类以及意大利蜜蜂、家蚕等昆虫中已有广泛的研究^[7-10], 研究发现, 脂肪酸去饱和酶 $\Delta 6$ (FAD 6) 是合成长链多不饱和脂肪酸 (LC-PUFAs) 的限速酶, 在近十几年的研究中引起了广泛的关注^[11], 而在果蝇中对 FAD 研究的比较系统, 其中果蝇的 *fad1* 为第一个报道的昆虫 FAD^[12], *fad1* 具有 $\Delta 9$ 功能特性, 最优底物为棕榈酸, 能通过激素来调控果蝇的脂质代谢^[13]。在紫胶树脂中紫胶桐酸 (9, 10, 16-三羟基棕榈酸) 是其主要成分^[2], 因此, 推测 *FAD* 基因在紫胶合成通路中起着重要的调控作用。

RNA 干扰 (RNAi) 是指在真核生物中, 由双链

收稿日期: 2019-01-15 修回日期: 2019-08-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31772542); 国家林业与草原局 948 项目 (2014-4-66)

* 通讯作者: 陈航, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 资源昆虫学. E-mail: stuchen6481@gmail.com

RNA(dsRNA) 诱发同源 mRNA 降解,使靶基因表达沉默的现象^[14]。RNAi 转染有注射、喂食、浸泡、病毒感染和转基因等方法,较常用的是注射法和喂食法。在 RNA 干扰研究的初期,注射最初主要应用于线虫^[14],并随着在果蝇中运用的开展^[15],目前已在小菜蛾(*Plutella xylostella* Linnaeus)、褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stal)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum* Herbst)等研究对象中建立了注射 dsRNA 诱导 RNAi 的体系^[16-20];但当研究对象个体过小时,注射难度增大且成活率降低这一问题仍无法得到有效解决。喂食法诱导 RNAi 因其操作简单方便,对研究对象危害性小等特点已在马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata* Say)、麦长管蚜(*Sitobion avenae* Fabricius)等昆虫中得到应用^[21-22],但喂食法存在作用较慢、效率较低的缺点^[23-24]。中华紫胶虫体型较小,幼虫在寄主植物上寻找适宜的枝条将口针刺入树皮下固定取食后将终生不动。由于注射法和喂食法各自存在缺点,在中华紫胶虫个体过小且不能喂食时,使用哪种转染方法将 dsRNA 转染到其体内显得至关重要。涂干法一般用于蛀干害虫的防治,具体方法为将药剂通过毛刷等工具直接涂抹于树干上。选择性的给药方法使药剂更有效的接触虫体,并避免了大量无选择性给药给环境带来的影响。这样的给药方法恰好适用于本实验寄生于树干上的紫胶虫。前人研究发现,dsRNA 在体外有高稳定特性,将其喷洒在植物叶片上,几天之后仍然可以保持相对较高的稳定性^[25]。鉴于上述原因,本实验拟采用虫体涂抹法将 dsRNA 转染到紫胶虫体内,对其 *FAD* 基因的功能进行验证。

在野外对中华紫胶虫进行 RNAi 实验时,dsRNA 的需求量很大,所以需要选择一种可大量较低成本获得的 dsRNA 的方法。目前,dsRNA 的制备主要方法有试剂盒法、大肠杆菌诱导法和转基因植物法等,其中,用试剂盒法实验操作简单、耗时少等特点,但其成本高且产量低,不易长时间保存,不适用野外大用量实验;转基因植物法操作周期长,而且得到目的植株概率低;利用原核表达系统制备 dsRNA,有较低的成本并能够获得大量 dsRNA。基于大肠杆菌诱导法的优势,其制备 dsRNA 的方法已在家蚕(*Bombyx mori* Linnaeus)、棉铃虫(*Helicoverpa armigera* Hubner)、线虫等物种中广泛应用^[26-28]。为了能够较低成本获得 dsRNA 用于中华紫胶虫 RNAi 实验,本研究通过采用大肠杆菌诱导法构建中华紫胶虫 *FAD*

基因 RNAi 载体,采用菌液涂抹的方式将 dsRNA 转染到紫胶虫体内,检测 *FAD* 基因对紫胶泌胶量的影响,从而为在分子水平上验证紫胶合成相关基因功能提供科学依据,也为进一步研究紫胶虫泌胶机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华紫胶虫采自中国林业科学研究院资源昆虫研究所元江试验站(102°00'46" E, 23°36'11" N)。DH5 α 感受态细胞购买于天根生化科技(北京)有限公司,载体 L4440 购自 Addgene 公司,菌株 HT115 由 BioVector 质粒载体菌种细胞基因保藏中心提供。

1.2 RNA 的提取和引物设计

利用 RNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)提取中华紫胶虫总 RNA,用 Prime-Script™ RT reagent Kit 试剂盒(Takara 公司)反转录得到 cDNA 第一链。根据转录组测序得到的 *FAD* 基因片段,通过 siDirect version 2.0 分析 *FAD* 碱基序列,找到干扰位点较多的片段,从而尽可能的避免脱靶效应。使用 Primer-Premier 6.0 设计引物,并通过对引物的特异性检测等预实验筛选,最终确定一条 266 bp 片段作为 RNA 干扰片段。在合成引物的正反向引物中添加限制性内切酶(*Sal* I 和 *Sac* I, 下划线标记)位点(表 1)。所有的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 dsRNA 和 RT-qPCR 的引物

Table 1 Primers used for dsRNA synthesis and RT-qPCR

基因 Gene	引物 Primers	引物序列 Sequence of primer(5'→3')	长度 Product/bp
<i>FAD</i>	ds-f	ATGAGCTCGCAATGATACAACGAACCA	266
	ds-R	ATGTCGACGAACGATGTGACCATAAGC	
	RT-F	CATCGTCTTACAAGGCTAA	142
	RT-R	TATGTGGATCGGCATTCC	
β -actin	RT-F	ATCGTGCTGAGTGAGGAA	143
	RT-R	CGCTTCGCTGATTATCGTA	

1.3 *FAD* 基因的扩增

以制备好的 cDNA 为模板,使用引物对 *FAD* 基因进行扩增,反应条件为 95℃, 2 min 预变性后, 95℃, 30 s 变性, 50℃, 30 s 退火, 72℃, 1 min 延伸, 共 34 个循环, 72℃ 终延伸 10 min 后, 4℃ 保存。获得的 PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳并割胶回收。

1.4 干扰载体的构建

将 *FAD* 回收的产物和 L4440 载体用 *Sac* I 和

Sal I(NEB(北京)有限公司)进行双酶切,酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳检测之后利用 T4 连接酶连接过夜。将其连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞后,涂布于含有氨苄青霉素的 SOC 固体培养基上,培养 14 h 左右,挑取单菌落于 SOC 液体培养基中培养。对其构建的 FAD-L4440 重组质粒做菌液 PCR 验证并提取质粒进一步通过测序进行验证。

1.5 dsRNA 的诱导表达

将构建好的 FAD-L4440 重组质粒转化到 HT115 感受态菌株中,涂布于含有氨苄青霉素和四环素的 SOC 固体培养基上,培养 14 h 左右,挑取单菌落转入液体培养基 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,然后将过夜培养液加入 2 \times YT 液体培养基中培养至 $OD_{600} = 0.4$,加入 IPTG 进行诱导,继续摇床培养 4 h 后收集菌体。

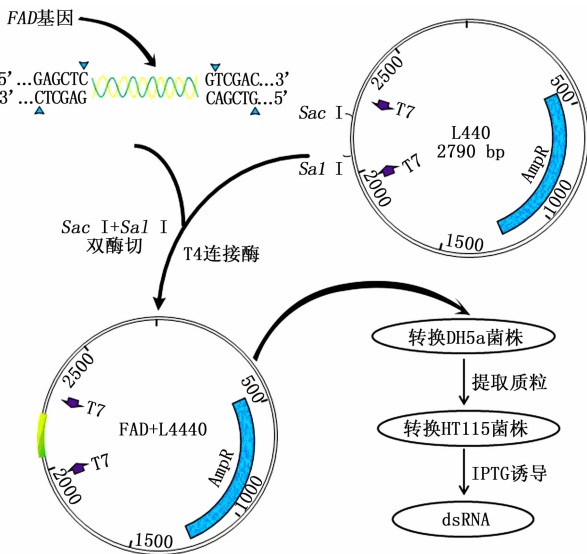


图1 干扰载体构建及 dsRNA 诱导表达流程

Fig.1 Schematic presentation of RNAi plasmid construction and dsRNA producing process

1.6 dsRNA 转染

用无菌水稀释菌体,配制成高(620 ng \cdot mL $^{-1}$)、中(62 ng \cdot mL $^{-1}$)、低(6.2 ng \cdot mL $^{-1}$)不同浓度的测试菌液,并以不做任何处理的自然组(ck)和 L4440-HT115 菌液作为实验对照组。转染时期选择紫胶虫幼虫期,在幼虫期其少量泌胶,虫体表面没有紫胶包被,菌液可以直接作用于虫体表面,通过紫胶虫表面的蜡腺和气孔进入体内,每天将不同浓度的测试液和对照液涂抹在中华紫胶虫幼虫体表面,每天涂抹 2 次,连续处理 3 d 后收集 12、24、48、72 h 的实验样品,1 个月后收集实验组和对照组的样品对其个体泌胶量进行测定。

1.7 实时荧光定量 PCR 验证

使用 Primer-Premier 6.0 设计荧光定量引物(表 1),利用 RNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司、上海)提取实验组和对照组的总 RNA,使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit 试剂盒(Takara 公司)进行反转录;之后以相对定量的方法进行基因表达量检测。选择 β -actin 基因作为内参,并对每个样进行 3 次独立的生物学重复,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量^[29]。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增

提取中华紫胶虫中总 RNA 并反转录为 cDNA 后进行 PCR 扩增,根据 FAD 基因序列,预期扩增片段大小为 266 bp,扩增片段的电泳检测结果显示介于 250~500 bp 之间(图 2-A),与预期相符。

2.2 重组载体的构建

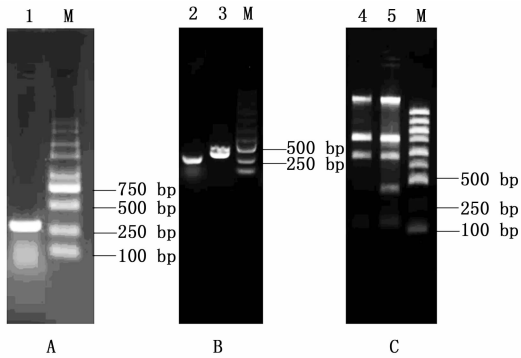
根据图 1 载体构建的流程,FAD 基因胶回收产物和 L4440 载体经 *Sac* I 和 *Sal* I 双酶切,分别回收酶切产物,利用 T4 连接酶连接过夜。将 FAD-L4440 连接好后转入到 50 μ L DH5 α 感受态细胞中,涂平板培养 12 h,挑取单菌落在液体培养基中培养。经 T7 单引物菌液 PCR 扩增后,获得预期的目的条带(图 2-B),并送公司测序,结果显示与目的片段吻合,验证 FAD-L4440 重组质粒已成功构建。

2.3 dsRNA 的诱导表达

将 FAD-L4440 重组质粒转入到 HT115 感受态细胞中,扩大培养至菌液 OD_{600} 为 0.4,加入 IPTG 诱导 4 h。诱导后的菌液提总 RNA 检测,结果见图 2-C。凝胶电泳结果显示:诱导后 FAD-L4440-HT115 菌液提取的 RNA 含有 1 条目的基因的 RNA 条带,而诱导前 FAD-L4440-HT115 菌液提取的 RNA 不含此条带,据此可以判定诱导后的 FAD-L4440-HT115 特异条带为 FAD 的 dsRNA 条带,证明 FAD 基因 dsRNA 的诱导表达成功。

2.4 RT-qPCR 检测

采用虫体涂抹法将不同浓度的测试液和对照液分别涂抹在虫体上,每天 2 次,连续 3 d 后,收集不同时间段的样品,利用 RT-qPCR 检测干扰效果。以 12 h 的 L4440-HT115 菌液组的 mRNA 表达水平为对照,以中华紫胶虫细胞质肌动蛋白(β -actin)的 mRNA 表达水平作为内参。结果表明:使用涂抹 FAD-L4440-HT115 菌液处理组的 FAD 基因表达量明显

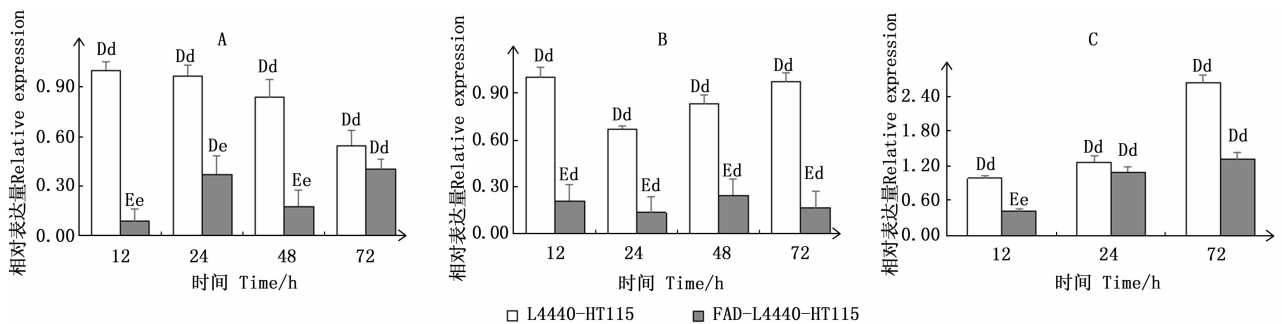


注: M, DNA Marker; 1, *FAD* 基因片段 PCR 产物; 2, *FAD-L4440* 质粒经过 ds-F 和 ds-R 扩增的 PCR 产物; 3, *FAD-L4440* 经过 T7 单引物扩增的 PCR 产物; 4, *FAD-L4440-HT115* 菌液诱导前 RNA 电泳; 5, *FAD-L4440-HT115* 菌液诱导后 RNA 电泳。

Notes: M, DNA Marker; 1, PCR products of *FAD* gene fragment; 2, PCR products of *FAD-L4440* plasmid amplified with ds-F and ds-R primer; 3, PCR products of *FAD-L4440* plasmid amplified with T7 primer; 4, The RNA extract of *FAD-L4440-HT115* after IPTG induction; 5, The RNA extract of *FAD-L4440-HT115* before IPTG induction.

图2 干扰载体构建和 dsRNA 诱导表达

Fig.2 The construction of RNAi plasmid and the induction dsRNA



注: A 低浓度菌液处理后的基因表达量; B 中浓度菌液处理后的基因表达量; C 高浓度菌液处理后的基因表达量。大写字母表示同一时间段两种菌液处理的基因表达量差异分析 ($P < 0.05$); 小写字母表示同一处理下不同时间段的基因表达量差异分析 ($P < 0.05$)。

Notes: A, Gene expression after treatment with low-concentration *E. coli*; B is mid-concentration and C is high-concentration. Capital letters mean that the significant difference of the expression of gene that treated by the two *E. coli* at the same time period ($P < 0.05$); Small letters mean that the analysis of the significantly different of gene expression at different time period under the same treatment ($P < 0.05$).

图3 不同浓度菌液涂抹对中华紫胶虫 *FAD* 基因的影响

Fig.3 The effects of smearing stem different *E. coli* on the *FAD* gene of *K. chinensis*

难被虫体吸收,所以本实验选择在紫胶虫幼虫期对其进行转染。

在昆虫 RNAi 研究中,选择一种合适的转染方法将其导入到昆虫体内是实验成功的前提,目前主要的转染方法有注射法、喂食法、浸泡法和转基因等方法。在紫胶虫的 RNAi 实验中,笔者发现常规的转染方法对紫胶虫并不适用,主要原因是中华紫胶虫雌成虫虫体长只有 6 mm 左右,体宽 4 mm 左右,

降低,其中,低浓度在 12 h 和中浓度在 24 h 时相对于对照组有显著差异,分别降低了 90.90% 和 86.52%,中浓度在 72 h 时干扰效率高于其他两个组(图 3)。

2.5 个体泌胶量测定

采集不同处理的紫胶,剥取新鲜胶块称质量,用 95% 酒精浸泡胶块,待胶完全溶解后,过滤取虫体统计个体数并称质量,然后计算其个体泌胶量。结果表明,虫体涂抹法的低浓度和中浓度处理组相比 ck 组个体泌胶量有显著性差异 ($P < 0.05$),分别降低了 14.89% 和 12.73% (图 4)。

3 讨论

中华紫胶虫一年两代,雌虫通过腺体分泌紫胶,其幼虫期泌胶量较少,成虫期大量分泌紫胶逐渐形成胶壳将虫体和寄主植物枝条覆盖起来,中华紫胶虫成虫中后期个体泌胶速率最大,整个生活周期个体泌胶量在 17 ~ 30 mg^[2]。为了能够让 dsRNA 菌液直接作用于虫体表面从而通过其体表的紫胶腺体、蜡腺和气孔进入体内,选择合适的虫期进行干扰试验是整个实验设计中关键的一步。由于紫胶虫大量泌胶时期虫体已完全被紫胶包被,dsRNA 菌液很

个体较小^[1]。紫胶虫寄生于寄主植物树干,幼虫以口针刺入寄主植物韧皮部,吸食寄主植物汁液,口针一旦刺入寄主植物,便不再拔出,终生不动,如果将紫胶虫从树干上取下,造成的机械伤害会使紫胶虫很快死亡;且随着紫胶虫的生长发育,紫胶虫可分泌少量蜡丝及大量紫胶,蜡丝及大量的紫胶将紫胶虫虫体完全覆盖,且紫胶致密坚硬,对紫胶虫有很好保护作用^[1]。因此,选择适合的转染方式对紫胶虫进

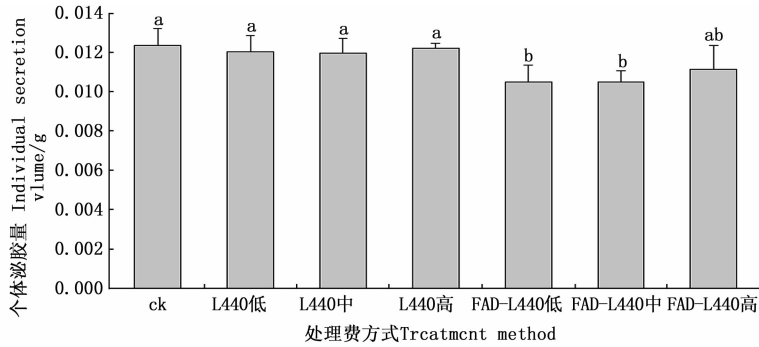


图4 RNAi后个体泌胶量测定

Fig. 4 The average amount of lac secret after RNAi treatment

行 RNAi 至关重要。本课题组前期已使用涂干法将外源保幼激素类似物 (JHA) 涂抹在白蜡虫体表, 结果表明, 外源激素可通过白蜡虫体表的腺体进入体内, 提高白蜡虫 2 龄雄幼虫的个体泌蜡量和羽化率^[30]。根据涂干法在外源激素导入白蜡虫中的成功运用及 dsRNA 在体外有较高的稳定性的特点, 结合紫胶虫体小且不能喂食不适用注射和喂食等方法, 本实验采用虫体涂抹法将 dsRNA 以不同浓度配比施于虫体表面, 成功的将目的基因导入虫体, 为 RNAi 转染过程中不适用注射法、喂食等转染方法的昆虫提供技术参考。

适合的菌液浓度是 RNAi 实验得以顺利进行的重要保障, 不同的昆虫发生显著的 RNAi 干扰效应时, 所需要的 dsRNA 的剂量不同。如在给烟草天蛾 (*Manduca sexta* Linnaeus) 注射少量的 dsRNA 就有明显的沉默效果^[31], 在甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Hi-bner) 中需要大量的 dsRNA 才有较为显著的干扰效果^[32]。是本实验表明, 当菌液浓度为 $6.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 对紫胶虫的基因表达量及泌胶量影响最为明显。本实验对需要以虫体涂抹法进行 RNAi 实验的浓度阈值提供了参考。

RNAi 的时效性一直备受关注, 不同的物种其 RNAi 持续的时间也不尽相同, 因而检测 RNAi 效果的时间点就显得尤为重要^[31]。检测的时间过早, 很有可能 RNAi 效应还未开始, 则检测不到预期的干扰效果; 检测时间过晚, 则可能由于 mRNA 恢复至正常水平, 干扰效果可能大幅度降低, 也不能检测到 RNAi 的效果^[33]。本实验在大量重复预实验的基础上, 发现 *FAD* 基因最佳干扰效果出现在干扰之后 12 h 左右。

紫胶树脂是紫胶的主要成分, 由于其本身的复

杂性, 对于树脂的各组份酸含量不同的研究者所得的结果不同, 但大多数研究者认为紫胶酮酸 (9, 10, 16-三羟基棕榈酸) 和壳脑醛酸是树脂的主要成分^[2]。脂肪酸去饱和酶 (*FAD*) 被认为是长链多不饱和脂肪酸合成的关键酶, 在脂肪酸代谢过程中发挥了重要作用^[34]。Dallerac 等的研究结果表明, *fad1* 具有 $\Delta 9$ 功能特性, 能通过激素来调控果蝇的脂质代谢^[13], 其最优底物为棕榈酸, 而在紫胶树脂中紫胶酮酸 (9, 10, 16-三羟基棕榈酸) 是棕榈酸的主要成分, 因此, 我们推测 *FAD* 基因对紫胶合成通路起着重要的调控作用。为了验证这一猜想, 通过构建 *FAD* 基因 RNA 干扰载体并将其转染到紫胶虫体内, 从而对其功能进行初步验证, 实验结果表明, 干扰后 *FAD* 基因表达量明显降低, 其中低浓度在 12 h 和中浓度在 24 h 时相对于 L4440-HT115 菌液对照组有显著差异, 分别降低了 90.90% 和 86.52%。不同处理组的个体泌胶量相比 ck 组个体泌胶量有所差异, 其中, 低浓度处理对紫胶虫个体泌胶量有明显影响。表明 *FAD* 基因对紫胶虫泌胶有直接的调控作用。

4 结论

本研究在中华紫胶虫 *FAD* 基因功能验证中引入了细菌表达 dsRNA 的 RNAi 系统, 并利用虫体涂抹法将其成功导入虫体内, 为探索高效、便捷的昆虫功能基因的研究方法提供参考, 将为后续解析紫胶合成的分子机理提供技术基础与科学依据。

参考文献:

- [1] 陈晓鸣. 紫胶虫生物多样性研究 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2005, 1 - 109.
- [2] 陈晓鸣, 陈又清, 张弘, 等. 紫胶虫培育与紫胶加工 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2008, 170 - 179.

- [3] 陈航,陈晓鸣,冯颖,等. 紫胶虫主要生产种的 RAPD 分子标记分析[J]. 林业科学研究, 2006, 19(4): 423-430.
- [4] 刘凤书,易鹏,李绍家. 紫胶虫的泌胶性能与寄主植物化学成分的关系[J]. 林业科学, 1988, 24(1): 106-112.
- [5] Chen H, Chen X M, Feng Y, et al. Molecular phylogeny and biogeography of lac insects (Hemiptera: Kerriidae) inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(10): 5943-5952.
- [6] Ranjan S K, Mallick C B, Saha D, et al. Genetic variation among species, races, forms and inbred lines of lac insects belonging to the genus Kerria (Homoptera, Tachardiidae) [J]. Genetics & Molecular Biology, 2011, 34(3): 511-519.
- [7] Ding B J, Carraher C, Löfstedt C. Sequence variation determining stereochemistry of a $\Delta 11$ desaturase active in moth sex pheromone biosynthesis [J]. Insect Biochem Molecular Biology, 2016, 74: 68-75.
- [8] Matoušková P, Pichová I, Svatoš A. Functional characterization of a desaturase from the tobacco hornworm moth (*Manduca sexta*) with bifunctional Z11-and 10,12-desaturase activity [J]. Insect Biochem Molecular Biology, 2007, 37(6): 601-610.
- [9] Lee D W, Kim Y, Koh Y H. RNA interference of PBAN receptor suppresses expression of two fatty acid desaturases in female *Plutella xylostella* [J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2011, 14(4): 405-410.
- [10] Wang Y, Da Cruz T C, Pulfemuller A, et al. Inhibition of fatty acid desaturases in *Drosophila melanogaster* larvae blocks feeding and developmental progression [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2016, 92(1): 6-23.
- [11] Alonso D L, Maroto F G, Ruiz J R, et al. Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2003, 31(10): 1111-1124.
- [12] Wicker-Thomas C, Henriët C, Dallerac R. Partial characterization of a fatty acid desaturase gene in *Drosophila melanogaster* [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 1997, 27(11): 963.
- [13] Dallerac R, Labeur C, Jallon J M, et al. A delta 9 desaturase gene with a different substrate specificity is responsible for the cuticular diene hydrocarbon polymorphism in *Drosophila melanogaster* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(17): 9449-9454.
- [14] 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): 806-811.
- [15] Kennerdell J R, Carthew R W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway [J]. Cell, 1998, 95: 1017-1026.
- [16] Hu Z, Lin Q, Chen H, et al. Identification of a novel cytochrome P450 gene, CYP321E1 from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and RNA interference to evaluate its role in chlorantraniliprole resistance [J]. Bulletin of Entomological Research, 2014, 104: 716-723.
- [17] Guo Z J, Kang S, Zhu X, et al. The novel ABC transporter ABC11 is a potential target for RNAi based insect pest control and resistance management [J]. Scientific Reports, 2015, 10.1038/srep13728.
- [18] Xu H J, Xue J, Lu B, et al. Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers [J]. Nature, 2015, doi:10.1038/nature14286.
- [19] Yang M M, Zhao L N, Shen Q D, et al. Knockdown of two trehalose-6-phosphate synthases severely affects chitin metabolism gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* [J]. Pest Management Science, 2017, 73: 206-216.
- [20] Tang B, Wei P, Zhao L N, et al. Knockdown of five trehalase genes using RNA interference regulates the gene expression of the chitin biosynthesis pathway in *Tribolium castaneum* [J]. BMC Biotechnology, 2016, 16: 67.
- [21] Kong Y, Liu X P, Wan P J, et al. The P450 enzyme Shade mediates the hydroxylation of ecdysone to 20-hydroxyecdysone in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* [J]. Insect Molecular Biology, 2014, 23: 632-643.
- [22] Xu L, Duan X, Lv Y, et al. Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs Sitobion avenae tolerance of *Phoxim insecticides* [J]. Transgenic Research, 2014, 23(2): 389-396.
- [23] 刘吉升,朱文辉,廖文丽,等. 昆虫 RNA 干扰中双链 RNA 的转运方式 [J]. 昆虫学报, 2016, 59(6): 682-691.
- [24] 王伟伟,刘妮,陆沁,等. RNAi 技术的最新研究进展 [J]. 生物技术通报, 2017(11): 41-46.
- [25] Tenllado F, MartínezGarcía, Belén, Vargas M, et al. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections [J]. BMC Biotechnology, 2003, 3(1): 3.
- [26] 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.
- [27] 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): 103-112.
- [28] Zhang X, Liu X, Ma J, et al. Silencing of cytochrome P450 CYP6B6 gene of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) by RNAi [J]. Bulletin of entomological research, 2013, 103(5): 1-8.
- [29] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] 刘妮,陆沁,张金稳,等. 外源保幼激素类似物对白蜡虫泌蜡和发育的影响 [J]. 林业科学研究, 2018, 31(2): 118-123.
- [31] Levin D M, Breuer L N, Zhuang S, et al. A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2005, 35(5): 0-380.
- [32] Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt J S, et al. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design [J]. Journal of Insect Physiology, 2011, 57(2): 231-245.
- [33] 刘婷,秦国华,张建珍,等. 东亚飞蝗谷胱甘肽 S-转移酶 RNA 干扰效率研究 [J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(4): 820-825.
- [34] 曾硕士,江黎明,元冬娟. 脂肪酸去饱和酶的研究进展 [J]. 生命科学, 2008, 20(5): 816-820.

Construction of RNA Interference Vector and Function Analysis of *FAD* Gene in *Kerria chinensis*

WANG Wei-wei¹, LING Xiao-fei¹, LU Qin¹, LIU Peng-fei¹, ZHANG Jin-wen¹, CHEN Hang^{1,2}

(1. Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China;

2. Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects, National Forestry and Grassland Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: [**Objective**] In order to verify the function of *FAD* gene of *Kerria chinensis*, the RNAi system by bacterial expression of dsRNA was used and the function of *FAD* gene was preliminarily analyzed to provide references for verifying the function of genes related to lac synthesis. [**Method**] The *FAD* gene of *K. chinensis* and L4440 vector were digested by double enzymes primarily, then the FAD-L4440 recombinant plasmid was constructed by T4 ligase ligation and transferred into HT115 competent cells as well. After the expression of dsRNA induced by IPTG, the dsRNA was transfected into lac insect by spreading it to the trunks. Detected the *FAD* gene expression after RNAi by RT-qPCR and the amount of individual lac secreted was also measured timely. [**Result**] The expression of *FAD* gene significantly decreased. There was a significant difference between the control group and the low concentration bacterial solution treated for 12 hours and the medium concentration bacterial solution treated for 12 hours, which decreased by 90.79% and 85.46% respectively. The interference efficiency of medium concentration at 72 hours was higher than that of the other two groups and there was a significant difference in the amount of individual lac secretion in comparison with the control group. [**Conclusion**] In this study, the RNAi vectors of *FAD* gene of *K. chinensis* were successfully constructed. In the verification of gene function, the RNAi system was used for bacterial expression of dsRNA. The expression of *FAD* gene and the amount of individual lac secretion decreased significantly after imported into the insect body. It provides a new technical reference for insects which not suitable for injection and feeding for RNAi transfection and it also provides a technical and scientific basis for the verification of molecular mechanism related to lac biosynthesis.

Keywords: *Kerria chinensis*; RNA interference; *FAD* gene; L4440

(责任编辑:张 研)