

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.11.009

# 豌豆蚜可溶型海藻糖酶基因克隆 及 RNA 干扰效应

许静静, 常永梅, 任梦圆, 董艳玲, 李永强

西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100

**摘要:** 为了明确豌豆蚜可溶型海藻糖酶基因在基于 RNA 干扰技术的害虫防治中的应用潜力, 该研究根据豌豆蚜基因组数据克隆获得了可溶型海藻糖酶基因(*ApTre-1*), 通过在线软件对其氨基酸序列进行了分析, 并利用实时荧光定量 PCR 技术分析了 *ApTre-1* 基因在豌豆蚜不同龄期的表达水平变化; 设计合成了 2 种 dsRNA 片段(*dsApTre-1-1* 和 *dsApTre-1-2*), 采用显微注射法测定了其靶基因 *ApTre-1* 的 RNA 干扰效率; 选取干扰效率较高的 dsRNA 片段与人工饲料混合后, 进一步采用饲喂法测定其对豌豆蚜生长的影响和致死效应。研究表明: 豌豆蚜 *ApTre-1* 基因的开放阅读框全长为 1 770 bp, 编码 589 个氨基酸, 在 DNA 水平上由 9 个外显子和 8 个内含子组成; *ApTre-1* 蛋白的 N 端含有一段长为 20 aa 的信号肽序列, 具有典型的昆虫海藻糖酶标签序列。荧光定量 PCR 检测结果表明: *ApTre-1* 基因在豌豆蚜 1 龄若虫阶段的相对表达量最高。显微注射法测定结果表明: *dsApTre-1-1* 对靶基因 *ApTre-1* 具有相对较高的干扰效率。进一步采用饲喂法测定结果表明: 豌豆蚜取食 *dsApTre-1-1* 后, 靶基因表达水平显著下降, 豌豆蚜的生长也受到较为明显的抑制, 但死亡率较低(17.5%)。

**关键词:** 豌豆蚜; 海藻糖酶基因; 表达水平; RNA 干扰技术;

害虫防治

中图分类号: S435.24

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2022)11-0088-11

## Gene Cloning and RNA Interference Effects of Soluble Trehalase Gene of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*

XU Jingjing, CHANG Yongmei, REN Mengyuan,  
DONG Yanling, LI Yongqiang

College of Plant Protection, Northwest A &amp; F University, Yangling Shaanxi 712100, China

**Abstract:** To understand whether the soluble trehalase gene of pea aphid has the potential to apply in RNA interference (RNAi) technology based pest control in future, in this study, the soluble trehalase gene

收稿日期: 2021-12-19

基金项目: 国家重点研发计划专项(2021YFD1000204); 陕西省重点研发计划项目(2022NY-134); 中央高校基本科研业务费专项资金(2452018109)。

作者简介: 许静静, 硕士研究生, 主要从事害虫防治研究。

通信作者: 李永强, 副教授。

(*ApTre-1*) was obtained by PCR amplification based on the genomic data of *Acyrtosiphon pisum*. The characteristics and the organization of *ApTre-1* gene were analyzed with the bioinformatics software online. The expression profiles of *ApTre-1* gene in different developmental stages of pea aphid were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) technology. Furthermore, two types of dsRNA (*dsApTre-1-1* and *dsApTre-1-2*) targeting to the *ApTre-1* gene were designed and synthesized to determine the RNA interference (RNAi) efficiency by microinjection into the fourth instar nymphs of pea aphid. The dsRNA fragment with higher interference efficiency was further used to mix with artificial diet to investigate the effects of RNAi on the growth and lethal effects of pea aphid by feeding. The results showed that the open reading frame (ORF) of *ApTre-1* gene consists of 1 770 nucleotides, encoding 589 amino acid residues. Genomic DNA sequences of *ApTre-1* gene is comprised of 9 exons and 8 introns. The *ApTre-1* protein has a signal peptide of 20 amino acids at its N-termini, and also has the commonly typical trehalase tag sequences of insects. The results of qRT-PCR showed that the *ApTre-1* gene was predominantly expressed in the first instar nymph. The results of microinjection suggested that the *dsApTre-1-1* fragments had relatively higher RNAi efficiency compared to the *dsApTre-1-2* fragments. After feeding pea aphid with the diet containing *dsApTre-1-1* fragments, the expression level of *ApTre-1* was significantly decreased, and the growth of pea aphids was also significantly inhibited, but the mortality rate was relatively low, which was just 17.5 percent.

**Key words:** *Acyrtosiphon pisum*; soluble trehalase gene; expression level; RNA interference technology; pest control

海藻糖是一种非还原性双糖, 广泛存在于细菌、真菌、昆虫和植物等许多生物体内<sup>[1]</sup>. 海藻糖酶能将一分子海藻糖水解释为两分子葡萄糖, 通过糖酵解为各个组织器官提供能量, 或为几丁质合成提供原料, 因而海藻糖酶在昆虫体内起着非常重要的作用<sup>[2]</sup>. 根据是否含有跨膜结构域将昆虫海藻糖酶基因分为两类: ① 可溶型海藻糖酶(Tre1), 主要分解细胞内的海藻糖; ② 膜结合型海藻糖酶(Tre2), 主要水解食物中的海藻糖<sup>[3-4]</sup>. 海藻糖酶是海藻糖分解代谢的关键酶, 广泛参与并调控昆虫的生长发育、非生物胁迫以及激素反应等, 与昆虫能量代谢、几丁质合成和诱导滞育密切相关. 目前, 已经在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*<sup>[5]</sup>、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*<sup>[6]</sup>、飞蝗 *Locusta migratoria*<sup>[7]</sup> 和灰飞虱 *Laodelphax striatellus*<sup>[8]</sup> 等昆虫中, 通过 RNAi 技术证实了海藻糖酶基因在能量代谢和几丁质合成方面发挥着重要作用. Chen 等<sup>[5]</sup> 通过显微注射法对甜菜夜蛾海藻糖酶基因 *SeTre1* 和 *SeTre2* 进行 RNAi 研究发现, 基因转录水平及几丁质含量均显著降低, 且 *SeTre1* 和 *SeTre2* 分别在昆虫的表皮和中肠的几丁质合成中起重要作用. 张倩等<sup>[8]</sup> 通过饲喂法干扰灰飞虱海藻糖酶基因 *LSTre1* 和 *LSTre2*, 发现基因转录水平分别降低 49% 和 41%, 并导致昆虫体质量减轻、死亡率显著升高. 由于哺乳动物没有海藻糖代谢系统, 以海藻糖酶为靶标的新农药对人畜等非靶标生物可能不存在毒害作用<sup>[8-9]</sup>, 因此海藻糖酶便成为新型高效杀虫剂设计和开发的潜在优良靶标.

豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 是影响粮食生产的重要害虫之一, 主要通过取食植物汁液、诱发煤污病和传播植物病毒的方式<sup>[10-12]</sup> 为害农作物. 目前, 关于豌豆蚜海藻糖酶的 RNA 干扰研究尚未见相关报道. 本研究以豌豆蚜为试虫, 通过基因克隆得到可溶型海藻糖酶基因 *ApTre-1* 的全长编码序列, 运用生物信息学方法对 *ApTre-1* 基因和蛋白氨基酸序列进行序列特征分析, 构建系统进化树分析豌豆蚜海藻糖酶 *ApTre-1* 的进化关系, 利用荧光定量 PCR (qPCR) 技术明确 *ApTre-1* 基因在豌豆蚜不同生长发育阶段的表达水平; 在上述基础上, 进一步通过显微注射法和饲喂法测定两种 dsRNA 片段对海藻糖酶 *ApTre-1* 基因的干扰效率, 以及对试虫生长发育的影响和致死效应. 本研究对基于 RNAi 技术的海藻糖酶基因在害虫防治中的应用进行了初步探索, 可为今后深入研究提供有价值的前期参考.

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

豌豆蚜由西北农林科技大学应用昆虫学重点实验室提供,饲养于人工气候培养箱内的盆栽蚕豆(“晋农”精选蚕豆)上,饲养条件:温度(21±1)℃,相对湿度70%~75%,光照周期L(光照):D(黑暗)=16:8.

1.2 豌豆蚜海藻糖酶基因的克隆

按照 TRNzol Universal Reagent 试剂盒(天根)说明书,对豌豆蚜3龄若虫进行总RNA提取.取1 μg总RNA作为模板,按照 HiFiScript gDNA Removal cDNA Synthesis Kit 试剂盒(康为世纪)说明书,去除基因组DNA后,反转录合成cDNA第一条链.

基于 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中豌豆蚜的基因组序列,本研究利用大豆蚜 *Aphis glycines* 海藻糖酶基因(GeneBank 登录号:JQ246351.1)进行 BLAST 搜索,获得豌豆蚜全基因组数据中编号为 Contig13577 的序列(GeneBank 登录号:ABLF02013269.1).通过软件进一步分析找到豌豆蚜海藻糖酶编码基因阅读框后,利用 Primer Premier 5 软件设计特异性引物(表1),以豌豆蚜 cDNA 第一链为模板,扩增豌豆蚜的海藻糖酶编码基因. PCR 反应条件:98℃预变性1 min,98℃变性10 s、55℃退火30 s、72℃延伸3 min,共35个循环.扩增产物经1%琼脂糖凝胶检测后,进行回收纯化.纯化后的DNA通过DNA A-Tailing Kit(TaKaRa)加“A”反应后,与pMD 19-T Vector(TaKaRa)连接,构建重组质粒.将重组质粒转入大肠杆菌感受态细胞 *Escherichia coli* DH5α,菌落PCR鉴定正确后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司(Sangon Biotech)测序.

表 1 引物名称与序列

| 引物名称                 | 引物序列(5'-3')                | 引物用途          |
|----------------------|----------------------------|---------------|
| <i>ApTre</i> -F      | TGAAGGAGTCTCAGGGT          | 扩增引物          |
| <i>ApTre</i> -R      | CGTTTGACGCATGGT            |               |
| <i>qEF-1a</i> -F     | CTGTGCTTATTGTCGCTGCT       | 实时荧光定量 PCR 引物 |
| <i>qEF-1a</i> -R     | TCGCTGTATGGTGGTTCAGT       |               |
| <i>qRPS-20</i> -F    | AAGTGTGTGCTCCGAGATGA       | dsRNA 合成引物    |
| <i>qRPS-20</i> -R    | CAGCAATGACACCGGGTTC        |               |
| <i>qApTre-1</i> -F   | CTAACTTACTGGTCGTGTGTCT     |               |
| <i>qApTre-1</i> -R   | CACTACACCGTTGTTACCGT       |               |
| <i>dsGFP</i> -F      | <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> |               |
|                      | TGCTTCAGCCGCTACCCGA        |               |
| <i>dsGFP</i> -R      | <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> |               |
|                      | CCATGCCGAGAGTGATCCCG       |               |
| <i>dsApTre-1</i> -1F | <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> |               |
|                      | CCTTCCGACTTTAATGAATC       |               |
| <i>dsApTre-1</i> -1R | <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> |               |
|                      | CTTGACGGTGCGTAGTATC        |               |
| <i>dsApTre-1</i> -2F | <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> |               |
|                      | ACAAGAAGTTATGTGGAGACC      |               |
| <i>dsApTre-1</i> -2R | <u>TAATACGACTCACTATAGG</u> |               |
|                      | TGTATCGCCCCATCTATTT        |               |

注:带下划线部分序列为 T7 启动子序列.

1.3 豌豆蚜海藻糖酶蛋白 ApTre-1 生物信息学分析

利用在线软件 Softberry(<http://www.softberry.com>)分析豌豆蚜基因组中海藻糖酶基因的内含子和外显子组成; 利用在线软件 ExPASy(<https://web.expasy.org/protparam>)预测蛋白质的相对分子质量和理论等电点; 通过在线软件 Signal P(<https://services.healthtech.dtu.dk/>)和 TMHMM(<https://services.healthtech.dtu.dk/>)分别对蛋白质的信号肽和跨膜区域进行分析; 通过 NCBI 在线工具 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行蛋白质同源搜索, 应用 MEGA 6 软件中的 Clustal W 进行多重序列比对, 采用邻位相连法(Neighbor-joining)进行聚类分析, 构建系统进化树. 重复次数为 1 000 次, 树枝上的数字表示 bootstrap 验证中该树枝可信度百分比大于 50%的数值(图 1).

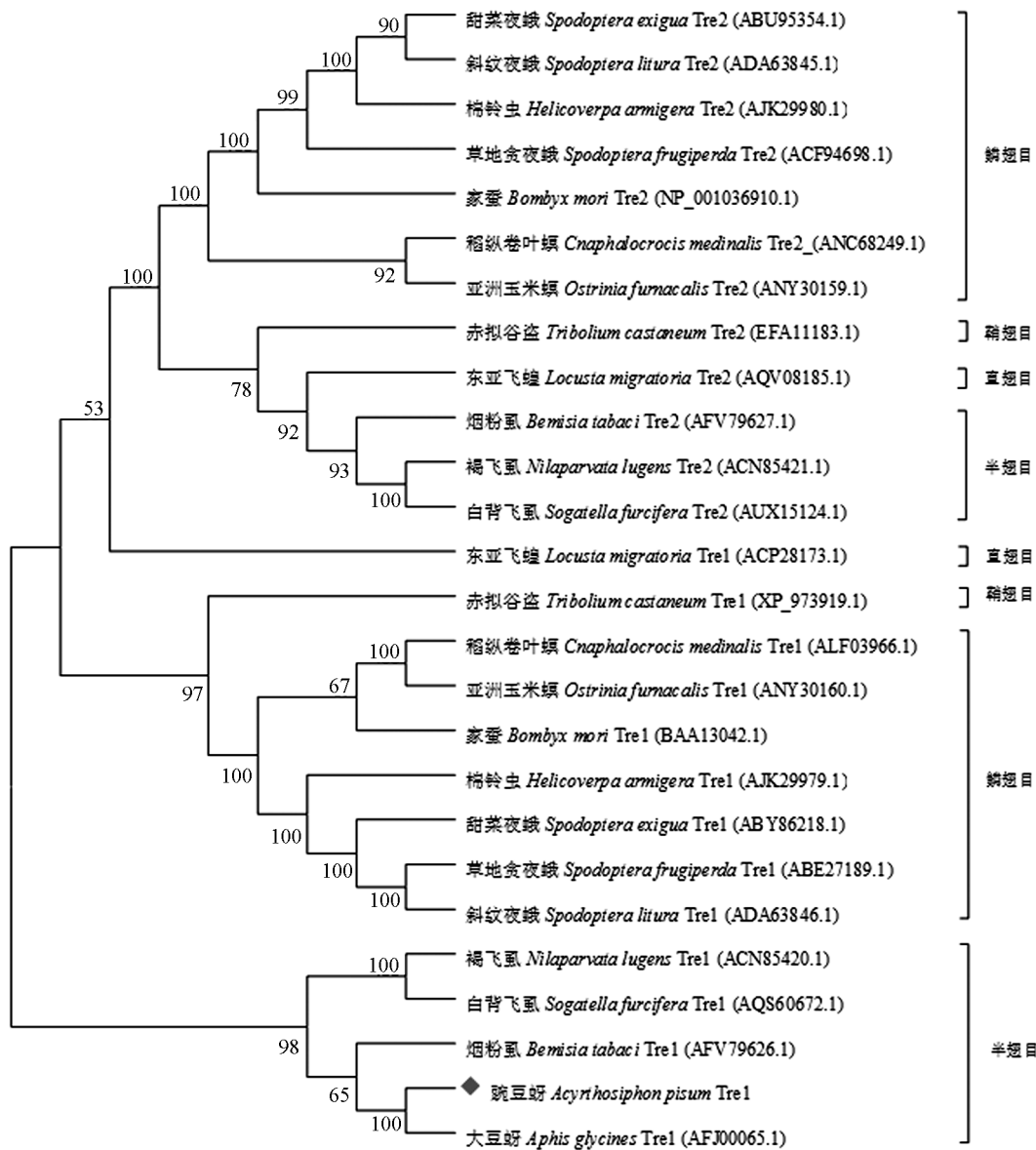


图 1 豌豆蚜 ApTre-1 蛋白与其他昆虫海藻糖酶系统进化树

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 ApTre-1 基因在不同龄期的表达水平

采用 qPCR 技术分析 ApTre-1 基因在豌豆蚜不同龄期(1 龄、2 龄、3 龄、4 龄若蚜和无翅成蚜)的表达水平. 根据获得的豌豆蚜 ApTre 基因序列设计 qRCP 特异性引物(表 1), 选择 EF-1 $\alpha$  和 RPS-20 作为双内参基因<sup>[13]</sup>. 以豌豆蚜 1 龄若虫的相对表达量为基准, 以无核酸酶水代替 cDNA 为阴性对照, 以不加反转录酶的核酸代替 cDNA 排除核酸样品中基因组 DNA 污染的可能性. qPCR 反应体系(20  $\mu$ L)为:

5 倍稀释的 cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ (10 mmol/L),  $2\times\text{TB Green Premix Ex Taq II}$  10  $\mu\text{L}$ , 无核酸酶水 6.4  $\mu\text{L}$ . 反应于 Roche Light Cycler 480 实时荧光定量 PCR 仪(德国 Roche Diagnostics GmbH)上进行. qPCR 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 40 个循环. 根据熔解曲线, 确定引物及扩增特异性. 实验设置 3 个生物学重复, 每个生物学重复设置 3 个技术重复. 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算基因的相对表达量<sup>[14]</sup>.

### 1.5 体外合成 dsRNA

以序列验证无误的 *ApTre* 为模板进行 PCR 扩增, 引物见表 1. 使用 Gel Extraction Kit 试剂盒(天根)对 PCR 产物进行纯化回收. 根据 T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express RNAi System 试剂盒(Promega)说明书, 进行体外 dsRNA 合成. 取 2  $\mu\text{L}$  dsRNA 稀释 10 倍后, 使用分光光度计测定 dsRNA 的浓度, 并通过 1% 的琼脂糖凝胶进行检测, 置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存.

### 1.6 显微注射法测定 *ApTre-1* 基因不同 dsRNA 片段的 RNAi 效率

参照叶超<sup>[15]</sup>的方法, 选择生长健康、状态一致的 4 龄若蚜, 使用显微注射器分别注射 2 种不同的 *dsApTre-1* 片段, 以 dsGFP 为对照. 每只蚜虫注射 dsRNA(1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 60 nL, 每个处理 10 只蚜虫, 设 6 个生物学重复. 注射完成后, 将豌豆蚜放入培养皿中新鲜的蚕豆叶片上饲养. 采用 qPCR 技术检测注射试虫 2 d 后的 *ApTre-1* 基因相对表达水平.

### 1.7 饲喂法测定 *ApTre-1* 基因 dsRNA 片段的 RNAi 效应检测

根据 Auclair 等<sup>[16]</sup>蚜虫人工饲料配方配置豌豆蚜的人工饲料, 采用饲蚜器进行饲喂. 饲蚜器为两端开口的玻璃管, 将封口膜(美国 Parafilm)拉至最薄, 附于玻璃管的一端, 使用移液枪将 40  $\mu\text{L}$  的人工饲料滴加至封口膜中央(dsRNA 的浓度为 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 然后再拉伸一张封口膜盖在人工饲料上, 使人工饲料均匀平铺于两膜之间. 将饲蚜器置于智能人工光照气候培养箱中, 每 2 d 更换 1 次人工饲料. 每个处理 10 头若蚜, 重复 6 次. 每天观察并统计存活数, 每 2 d 称质量记录 1 次豌豆蚜体质量. 采用 qPCR 技术检测饲喂 2 d 后 *ApTre-1* 基因的相对表达水平.

## 2 结果与分析

### 2.1 豌豆蚜海藻糖酶基因 *ApTre-1* 克隆及序列分析

利用特异性引物对豌豆蚜海藻糖酶基因进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得 1 条大小约为 2 300 bp 的电泳条带(图 2). 将目的条带回收纯化后, 经连接、转化和测序, 筛选阳性克隆, 得到海藻糖酶基因(*ApTre-1*)的 cDNA 序列. 通过 Vector NT 软件对 PCR 扩增序列进行分析, 确定了豌豆蚜海藻糖酶基因的开放阅读框. 该基因的开放阅读框(ORF)为 1 770 bp, 编码 589 个氨基酸. 在基因组中 DNA 水平上该基因由 9 个外显子和 8 个内含子组成(图 3). 其编码的氨基酸序列与 NCBI 中注释和预测的豌豆蚜海藻糖酶氨基酸序列(GenBank 登录号: XM001950229.4)完全一致.

使用在线软件 ExPASy 预测豌豆蚜海藻糖酶 *ApTre-1* 蛋白的相对分子质量为  $6.83\times 10^4$ ; 理论等电点(PI)为 6.10. 利用 Signal P 在线预测该蛋白的信号肽, 结果表明 *ApTre-1* 蛋白的 N 段含有一段长为 20 aa 的信号肽序列. 利用 TMHMM 预测该蛋白的跨膜结构域, 结果表明 *ApTre-1* 蛋白同其他已知昆虫的可溶型海藻糖酶一样无跨膜区域. 通过 NetNGlyc 软件预测, 发现 *ApTre* 蛋白含有 4 个糖基化位点, 分别位于

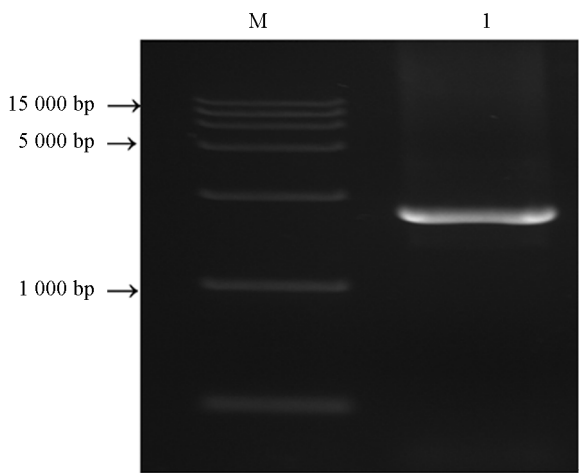


图 2 *ApTre-1* 基因 PCR 扩增产物



124,234,346 和 473 位氨基酸. 通过 GeneDoc 软件进行蛋白质同源序列比对, 发现 ApTre-1 蛋白含有“PG-GRFRELYYWDTY”“QWDFPNAWPP”2 个标签序列和一个富甘氨酸区域“GGGGEY”. 并且, 发现在蚜虫等半翅目昆虫中还含有“YYLNRSQPP”“PRPESYREDY”“IIPVDLN”“MFEKYD”和“GFGWXNG”共 5 个高度保守区域(图 4).

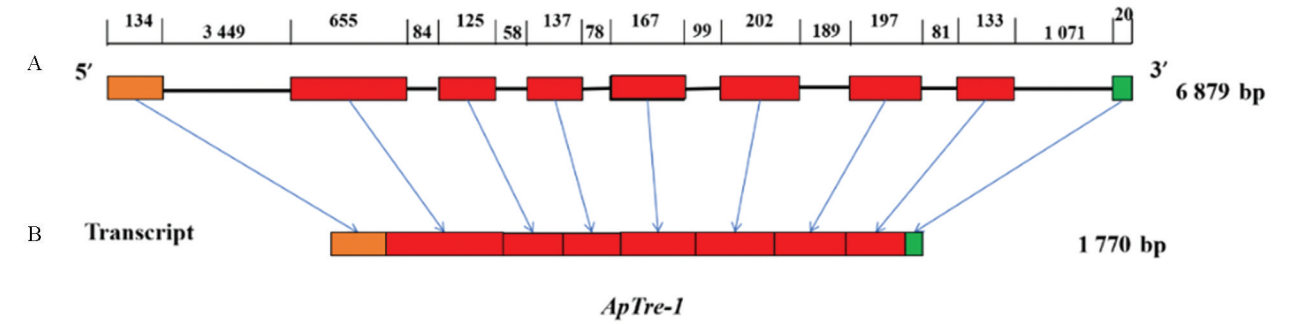
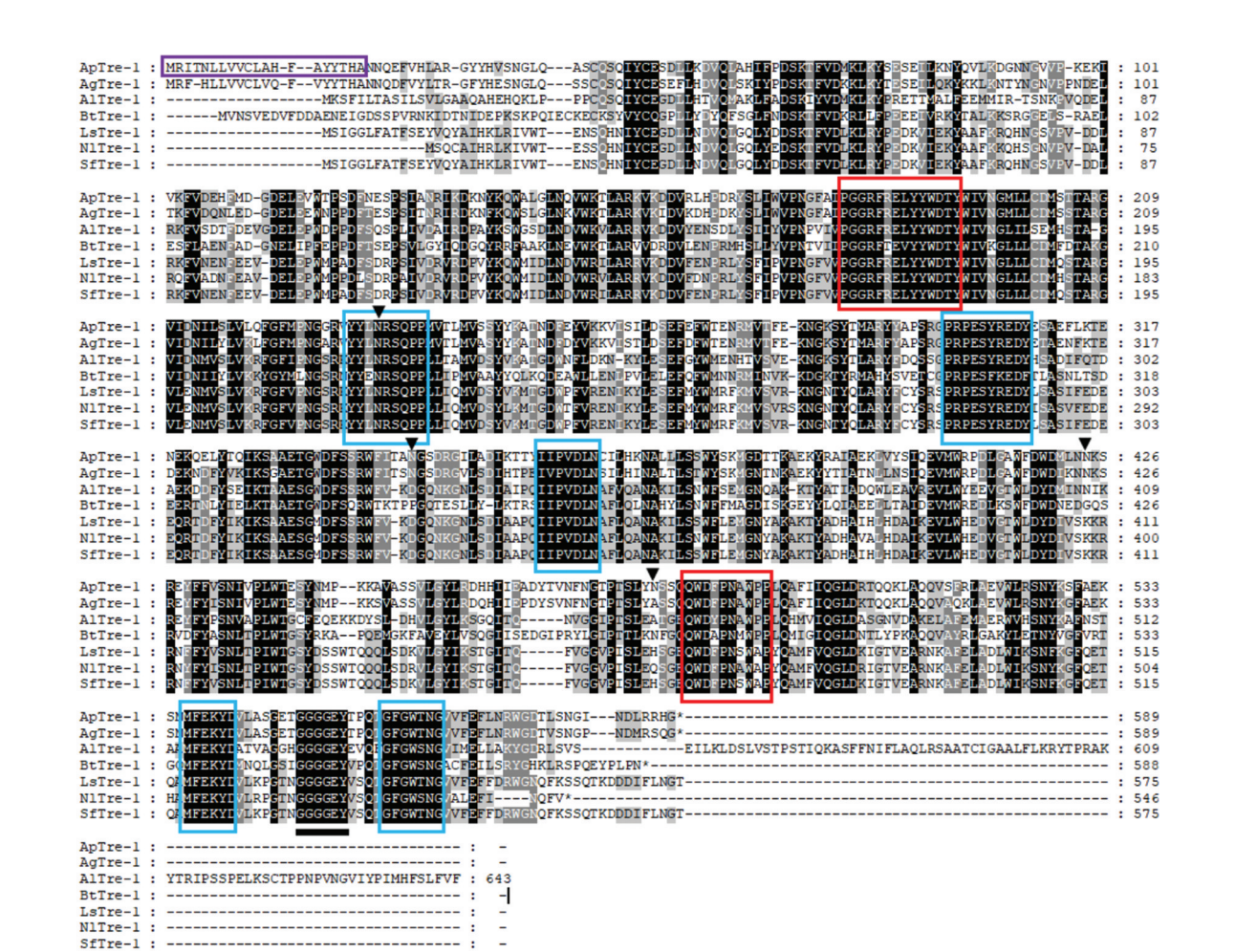


图 A 中实心矩形框表示 *ApTre-1* 基因的外显子, 矩形框之间的短线段表示 *ApTre-1* 基因的内含子; 图 B 表示 *ApTre-1* 基因转录后不含内含子的编码序列.

图 3 *ApTre-1* 基因 DNA 结构图



半翅目昆虫可溶型海藻糖酶 GeneBank 登录号: 大豆蚜 AgTre-1(AFJ00065.1)、绿盲蝽 AlTre-1(AGK89798.1)、烟粉虱 BtTre-1(JX024261.1)、灰飞虱 LsTre-1(AFL03409.1)、褐飞虱 NlTre-1(ACN85420.1)、白背飞虱 SfTre-1(AQS60672.1). 标签序列用红色方框标注, 高度保守区域用蓝色方框标注, 富甘氨酸区域用下划线标注, 信号肽用紫色矩形框标注, 糖基化位点用黑色三角形标注.

图 4 *ApTre-1* 蛋白与其他半翅目昆虫 Tre-1 氨基酸序列多重比较结果

2.2 豌豆蚜 *ApTre-1* 蛋白的分子进化分析

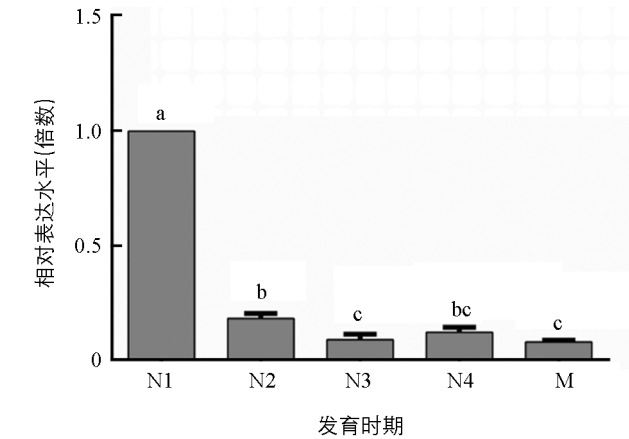
通过 ClustalW 软件将豌豆蚜 *ApTre-1* 蛋白与其他已知的 13 种昆虫海藻糖酶蛋白氨基酸序列进行同源比对, 利用 MEGA 6 软件中的 Neighbor-Joining 方法进行分子系统进化分析, 得到昆虫海藻糖酶蛋白分子进化树(图 1)。从该系统发育树可以看出, 海藻糖酶分为可溶型海藻糖酶和膜结合型海藻糖酶两大类, 在分类上属于同一目的昆虫均单独形成一个亚分支, 这与传统的分类结果一致。本实验克隆得到的豌豆蚜 *ApTre-1* 蛋白与大豆蚜、飞虱等可溶型海藻糖酶归为一个亚分支, 其中豌豆蚜 *ApTre-1* 蛋白与大豆蚜 *Aphis glycines* 的可溶型海藻糖酶(*AgTre-1*)聚在更小的一个分支内, 表明其氨基酸序列相似性较高, 与烟粉虱 *Bemisia tabaci*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 及白背飞虱 *Sogatella furcifera* 可溶型海藻糖酶的氨基酸序列相似性则相对较低。

2.3 豌豆蚜海藻糖酶基因 *ApTre-1* 在不同发育时期的表达分析

通过 qPCR 技术, 对 *ApTre-1* 基因在豌豆蚜 1~4 龄若虫和成虫中的表达水平进行检测分析(图 5)。结果表明: *ApTre-1* 基因在豌豆蚜整个生长发育期间均有表达, 但不同发育阶段表达量具有明显差异, 其 mRNA 在 1 龄若蚜中表达水平最高, 显著高于其他各阶段, 约为 2 龄若蚜的 5 倍、成虫的 12 倍。

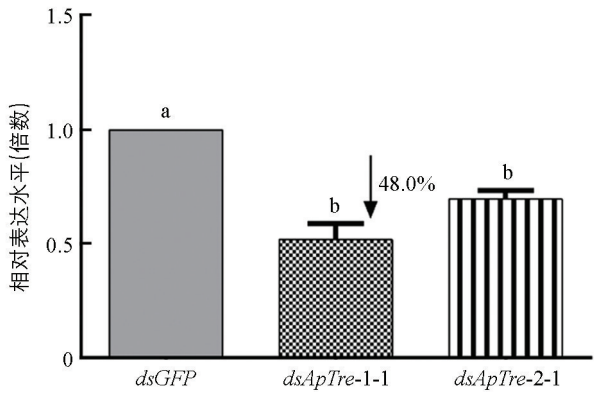
2.4 豌豆蚜海藻糖酶基因 *ApTre-1* 的 RNA 干扰效率

对 4 龄若蚜进行显微注射 dsRNA 后, 放入培养皿中用新鲜蚕豆叶片进行饲喂, 2 d 后采用 qPCR 技术检测蚜虫体内 *ApTre-1* 基因表达量的变化(图 6), 以绿色荧光蛋白(GFP)的 *dsGFP* 为对照。由图 6 可见, 经过显微注射两种 dsRNA 后, 蚜虫体内 *ApTre-1* 基因转录水平均受到不同程度的抑制。在分别注射 *dsApTre-1-1* 和 *dsApTre-1-2* 片段 2 d 后, *ApTre-1* 基因的相对表达量分别降低了 48.0% 和 30.3%。



N1,N2,N3,N4 和 M 分别代表 1,2,3,4 龄若蚜和成蚜; 不同小写字母表示差异具有统计学意义( $p<0.05$ )。

图 5 *ApTre-1* 基因在豌豆蚜不同发育阶段的相对表达量



不同小写字母表示差异具有统计学意义( $p<0.05$ )。

图 6 不同 dsRNA 注射 2 d 后豌豆蚜 *ApTre-1* 基因的相对表达量

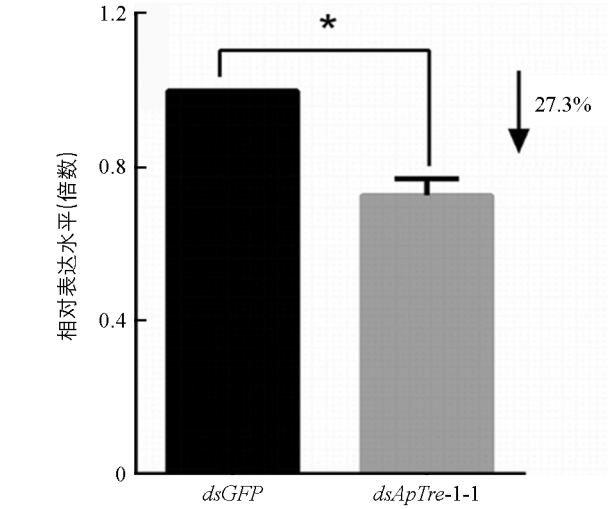
2.5 饲喂 *dsApTre-1-1* 片段对豌豆蚜 RNA 干扰效率及生长的影响

2.5.1 饲喂 *dsApTre-1-1* 片段对豌豆蚜 *ApTre-1* 基因的 RNA 干扰效率

根据以上结果, 选择其中干扰效率较高的 *dsApTre-1-1* 片段与人工饲料混合, 进一步采用饲喂法测定其对靶基因 *ApTre-1* 的 RNA 干扰效率。以取食含 *dsGFP* 饲料的蚜虫为对照, 检测取食含 *dsApTre-1-1* 饲料 2 d 后的蚜虫体内可溶型海藻糖酶基因表达量的变化(图 7)。从图 7 中可以看出, 蚜虫取食含 *dsApTre-1-1* 的饲料后与对照组(含 *dsGFP* 饲料)试虫相比, *ApTre-1* 基因表达量降低了 27.3%, 差异具有统计学意义( $p<0.05$ )。

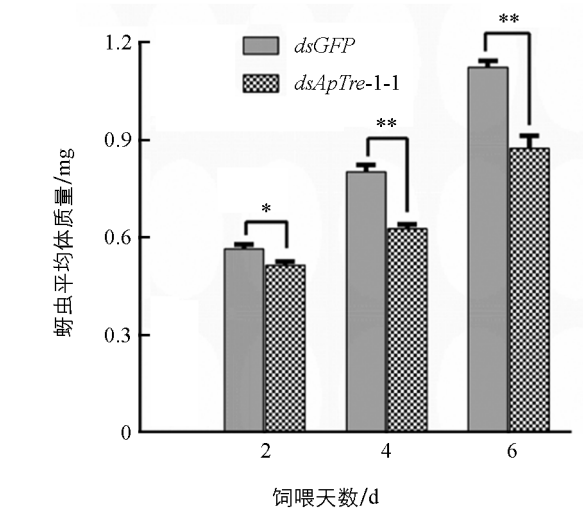
2.5.2 饲喂 *dsApTre-1-1* 片段对豌豆蚜生长的影响

以饲喂含有质量浓度为  $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$  *dsGFP* 和 *dsApTre-1-1* 的饲料分别作为非靶标对照组和处理组, 统计第 0, 2, 4, 6 d 存活豌豆蚜的平均体质量(图 8). 从图 8 中可以看出, 连续饲喂含有 *dsApTre-1* 的饲料 2 d 后, 试虫平均体质量与对照组相比开始显著降低. 到第 6 d 时, 蚜虫实验组平均体质量为  $0.88\text{ mg}$ , 与对照组的平均体质量( $1.13\text{ mg}$ )差异具有统计学意义( $p<1\%$ ), 表明试虫取食 *dsApTre-1-1* 片段后, 生长发育受到明显抑制.



\* 表示差异具有统计学意义( $p<0.05$ ).

图 7 *dsApTre-1-1* 饲喂 2 d 后豌豆蚜 *ApTre-1* 基因的相对表达量

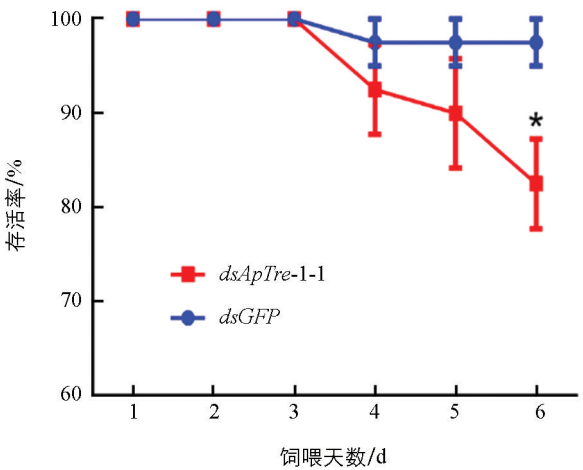


\* 表示差异具有统计学意义  $p<0.05$ , \*\* 表示差异具有统计学意义  $p<0.01$ .

图 8 *dsApTre-1-1* 饲喂后豌豆蚜平均体质量

2.5.3 饲喂 *dsApTre-1-1* 片段对豌豆蚜的致死率

以饲喂含有质量浓度为  $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$  *dsGFP* 和 *dsApTre-1-1* 的饲料分别作为非靶标对照组和处理组, 统计 2 龄若蚜取食 dsRNA 后 1~6 d 的存活率(图 9). 由图 9 可以看出, 连续饲喂含有 *dsApTre-1-1* 饲料 3 d 后, 蚜虫的存活率开始降低, 到第 6 d 时蚜虫的存活率为  $82.5\%$ , 与对照组之间差异具有统计学意义( $p<0.05$ ).



\* 表示差异具有统计学意义  $p<0.05$ .

图 9 *dsApTre-1-1* 饲喂后豌豆蚜 *ApTre-1* 基因的存活率

3 讨论与结论

海藻糖酶是昆虫体内重要的调控酶, 自从 1992 年和 2005 年分别鉴定出黄粉虫 *Tenebrio molitor* 的可溶型海藻糖酶<sup>[17]</sup> 和家蚕的膜结合型海藻糖酶<sup>[3]</sup> 后, 学者们很快就发现昆虫普遍具有这两种类型的海藻糖酶. 本研究基于已公布的豌豆蚜基因组数据库, 扩增获得了豌豆蚜可溶型海藻糖酶基因 *ApTre-1*, 其全长为  $1\,770\text{ bp}$ , 编码 589 个氨基酸, 与 NCBI 中预测的豌豆蚜海藻糖酶基因(GenBank 登录号: XM001950229.4)氨基酸序列完全一致, 揭示了海藻糖酶氨基酸序列在不同地域豌豆蚜中的高度保守性. 序列分析表明 *ApTre-1* 氨基酸序列具有典型的标签序列和富甘氨酸序列, 系统进化树揭示其与大豆蚜海藻糖酶基因序列相似性最高, 并且与其他半翅目昆



虫,包括褐飞虱、白背飞虱以及烟粉虱的可溶型海藻糖酶聚为一类。

海藻糖酶基因在豌豆蚜体内的表达水平处于动态变化过程。Bansal 等<sup>[18]</sup>研究发现,海藻糖酶基因在大豆蚜 1,2 龄若蚜期的表达水平较高,随后其表达水平持续降低,在成蚜中表达水平最低。本研究中,可溶型海藻糖酶基因 *ApTre-1* 在豌豆蚜不同龄期表达水平差异具有统计学意义,其在 1 龄若蚜期的表达量最高,且显著高于其他各生长发育阶段。与文献数据相比,本研究中 *ApTre-1* 基因在豌豆蚜不同龄期的表达模式与其在大豆蚜不同龄期的表达模式较为一致,均在 1,2 龄若蚜期表达水平最高。此外,在飞蝗研究中发现,海藻糖酶基因 *LmTre-1* 在卵发育前期和中期表达量极低,在末期表达量显著增加,在卵期最后 1 天表达量最高且显著高于其他时期<sup>[7]</sup>。结合本研究,推测 *ApTre-1* 基因在豌豆蚜 1 龄若虫中的高表达,可能是因为 1 龄若蚜刚开始取食且处于快速生长发育阶段,与需要大量的能量有关。但是,该推测尚需进一步开展相关研究工作去证实。

RNAi 的效率与试虫体内靶基因的选择密切相关,因此在利用 RNAi 技术防治害虫的研究中需要从害虫体内筛选和鉴定高效靶标基因<sup>[19-20]</sup>。目前研究较多的靶基因主要包括致死基因、抗性和免疫基因、生长发育相关基因和产卵相关基因等<sup>[21]</sup>。例如, Terenius 等<sup>[22]</sup>通过对鳞翅目昆虫 RNAi 研究结果进行比较发现,免疫相关基因的干扰效率显著高于其他类型的基因。此外,基于已发现的害虫体内的高效靶基因,学者们利用植物表达这些靶基因的 dsRNA 来防治害虫已经取得了较大进展。例如,植物介导针对几丁质合成酶基因(*CHS*)的 RNA 干扰技术已经在麦长管蚜 *Sitobion avenae*<sup>[23]</sup>中进行了较为深入的研究,发现试虫取食表达 dsRNA 的第 3 代转基因小麦后,其体内的靶基因 *CHS1* 表达水平下降了 45%~50%,试虫总蜕皮率也显著下降。在褐色橘蚜 *Toxoptera citricida*<sup>[24]</sup>的研究中,也发现取食植物传导的 dsRNA 后,试虫体内 *CHS* 的表达水平下降了 48%,且多数试虫不能蜕皮进入到下一个龄期。Mao 等<sup>[25]</sup>研究发现,桃蚜 *Myzus persicae* 连续取食植物表达的间隙基因(*Mphb*)dsRNA 后,降低了靶基因的表达量,抑制了桃蚜的繁殖。

针对靶基因不同区域设计的 dsRNA 片段也会导致干扰效率的显著差异性。本研究首先采用显微注射法针对靶标基因 *ApTre-1* 不同区域进行 RNAi 效率分析,发现 *dsApTre-1-1*, *dsApTre-1-2* 对靶基因 *ApTre-1* 沉默效率分别为 47.7%和 30.3%。Chen 等<sup>[5]</sup>针对甜菜夜蛾 2 种海藻糖酶的 RNAi 研究发现, *dsSeTre-1* 和 *dsSeTre-2* 片段注射试虫 24 h 后,2 种海藻糖酶靶基因的沉默效率从 50%逐渐上升,至 72 h 时达到最高(近 80%)。相较而言,本研究中针对豌豆蚜海藻糖酶基因 *ApTre-1* 的 RNAi 效率相对较低,主要原因可能是本研究中所设计的 2 种 dsRNA 片段长度或位置不是最佳所致,其他原因尚需进一步分析研究。

目前,实验室研究中 dsRNA 导入昆虫体内的方法主要为显微注射法和饲喂法。由于显微注射法过程较为繁琐、处理样本量少,较适用于昆虫基因功能的研究;而饲喂法过程较为简单,更接近昆虫的自然取食过程,有助于最终在实践生产中应用。因此,饲喂法的应用实践性显著优于显微注射法。在采用显微注射法分析的基础上,本研究选用其中 RNA 干扰效率较高的片段 *dsApTre-1-1* 进一步通过饲喂法测定其对豌豆蚜的 RNA 干扰效应,结果发现 *dsApTre-1-1* 对靶基因 *ApTre-1* 的沉默效率较注射法有较明显下降,靶基因的表达水平下降了 27.3%,试虫第 6 d 时死亡率为 17.5%。张倩等<sup>[8]</sup>采用饲喂法对灰飞虱的 2 种海藻糖酶基因(*LSTre-1* 和 *LSTre-2*)进行 RNA 干扰效应研究,发现 *dsTre-1* 和 *dsTre-2* 对靶基因的干扰效率分别为 49.1%和 41.5%,在第 2 d 时致死率为 10%~15%,以后逐渐上升,到第 5 d 时试虫死亡率为 20%~40%。二者相比,采用饲喂法测定的 dsRNA 干扰效率及致死率略高于本实验结果,但总体上致死率也相对较低。上述研究结果说明在不同种类的试虫中,与显微注射法相比,昆虫取食 dsRNA 后对靶基因的

干扰效率及致死率均相对较低很可能是一种普遍现象. 已有诸多研究表明, 昆虫肠道中含有丰富的核酸酶, 能够降解 dsRNA, 从而影响 RNAi 效率, 并对通过饲喂方式让 dsRNA 进入试虫体内后保持稳定和传递极为不利<sup>[26-27]</sup>, 这可能是导致上述研究中通过饲喂法测定 dsRNA 的 RNAi 效率降低和致死率较低的重要原因之一. 据文献报道, 针对靶基因不同长度的 dsRNA 片段也可能导致不同的 RNA 干扰效应, 包括靶基因沉默效率、试虫生长发育、死亡与繁殖率等. 因此, 在本实验的后续研究中, 仍需针对靶基因设计合成更多不同类型的 dsRNA 片段, 以便能筛选出对靶基因干扰效率更高的 dsRNA 片段, 为针对海藻糖酶的 RNAi 技术应用于害虫防治提供有价值的参考.

本研究获得了豌豆蚜可溶型海藻糖酶基因(*ApTre-1*)序列, 明确了其基因结构特点及在豌豆蚜不同生长发育阶段的表达差异, 探索了显微注射和饲喂 *ApTre-1* 基因的 dsRNA 片段对豌豆蚜 RNA 的干扰效应, 为今后以 *ApTre-1* 基因为靶标的 RNA 干扰技术在害虫综合防治中的应用奠定了基础.

参考文献:

[1] ELBEIN A D, PAN Y T, PASTUSZAK I, et al. New Insights on Trehalose: a Multifunctional Molecule [J]. Glycobiology, 2003, 13(4): 17-27.

[2] 秦加敏, 罗术东, 和绍禹, 等. 昆虫海藻糖与海藻糖酶的特性及功能研究 [J]. 环境昆虫学报, 2015, 37(1): 163-169.

[3] MITSUMASU K, AZUMA M, NIIMI T, et al. Membrane-Penetrating Trehalase from Silkworm Bombyx Mori. Molecular Cloning and Localization in Larval Midgut [J]. Insect Molecular Biology, 2005, 14(5): 501-508.

[4] 唐斌, 魏苹, 陈洁, 等. 昆虫海藻糖酶的基因特性及功能研究进展 [J]. 昆虫学报, 2012, 55(11): 1315-1321.

[5] CHEN J, TANG B, CHEN H X, et al. Different Functions of the Insect Soluble and Membrane-Bound Trehalase Genes in Chitin Biosynthesis Revealed by RNA Interference [J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10133.

[6] 唐斌, 肖仲久, 曾伯平, 等. 赤拟谷盗 TRE 基因家族特性及 RNAi 抑制表达效果分析 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 41(6): 1311-1320.

[7] 刘晓健, 张欢欢, 李大琪, 等. 飞蝗可溶型海藻糖酶基因的序列分析及 mRNA 表达特性 [J]. 昆虫学报, 2012, 55(11): 1264-1271.

[8] 张倩, 鲁鼎浩, 蒲建, 等. 灰飞虱海藻糖酶基因的克隆及 RNA 干扰效应 [J]. 昆虫学报, 2012, 55(8): 911-920.

[9] 范柯琴, 金利群, 郑裕国. 海藻糖酶的酶学特性及其作为新农药靶标的开发应用 [J]. 化学与生物工程, 2009, 26(4): 7-11.

[10] GIORDANENGO P, BRUNISSEN L, RUSTERUCCI C, et al. Compatible Plant-Aphid Interactions: How Aphids Manipulate Plant Responses [J]. Comptes Rendus Biologies, 2010, 333(6/7): 516-523.

[11] BRAULT V, UZEST M, MONSION B, et al. Aphids as Transport Devices for Plant Viruses [J]. Comptes Rendus Biologies, 2010, 333(6/7): 524-538.

[12] BRISSON J A, STERN D L. The Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*: an Emerging Genomic Model System for Ecological, Developmental and Evolutionary Studies [J]. BioEssays, 2006, 28(7): 747-755.

[13] YE C, JIANG Y D, AN X, et al. Effects of RNAi-Based Silencing of Chitin Synthase Gene on Moulting and Fecundity in Pea Aphids (*Acyrtosiphon pisum*) [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 3694.

[14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCT Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[15] 叶超. 豌豆蚜点滴与注射法递送 dsRNA 介导的 RNAi 效率及其摄取机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2019.

[16] AUCLAIR J L, CARTIER J J. Pea Aphid: Rearing on a Chemically Defined Diet [J]. Science, 1963, 142(3595): 1068-1069.

[17] TAKIGUCHI M U, NIIMI T, SU Z H, et al. Trehalase from Male Accessory Gland of an Insect, Tenebrio Molitor.

- cDNA Sequencing and Developmental Profile of the Gene Expression [J]. *Biochemical Journal*, 1992, 288(1): 19-22.
- [18] BANSAL R, MIAN M A R, MITTAPALLI O, et al. Molecular Characterization and Expression Analysis of Soluble Trehalase Gene in Aphis Glycines, a Migratory Pest of Soybean [J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2013, 103(3): 286-295.
- [19] LI K Q, XING C H, YAO Z H, et al. PbrMYB21, a Novel MYB Protein of Pyrus Betulaefolia, Functions in Drought Tolerance and Modulates Polyamine Levels by Regulating Arginine Decarboxylase Gene [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(9): 1186-1203.
- [20] MAMTA B, RAJAM M V. RNAi Technology: a New Platform for Crop Pest Control [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants: an International Journal of Functional Plant Biology*, 2017, 23(3): 487-501.
- [21] 齐江卫, 龚亮, 王会冬, 等. RNAi 及其在害虫防治中的应用 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(7): 148-156.
- [22] 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.
- [23] ZHAO Y J, SUI X Y, XU L J, et al. Plant-Mediated RNAi of Grain Aphid CHS1 Gene Confers Common Wheat Resistance Against Aphids [J]. *Pest Management Science*, 2018, 74(12): 2754-2760.
- [24] SHANG F, XIONG Y, XIA W K, et al. Identification, Characterization and Functional Analysis of a Chitin Synthase Gene in the Brown Citrus Aphid, Toxoptera Citricida (Hemiptera, Aphididae) [J]. *Insect Molecular Biology*, 2016, 25(4): 422-430.
- [25] MAO J J, ZENG F R. Plant-Mediated RNAi of a Gap Gene-Enhanced Tobacco Tolerance Against the Myzus Persicae [J]. *Transgenic Research*, 2014, 23(1): 145-152.
- [26] COOPER AM, SILVER K, ZHANG J, et al. Molecular Mechanisms Influencing Efficiency of RNA Interference in Insects [J]. *Pest Management Science*, 2019, 75(1): 18-28.
- [27] SPIT J, PHILIPS A, WYNANT N, et al. Knockdown of Nuclease Activity in the Gut Enhances RNAi Efficiency in the Colorado Potato Beetle, Leptinotarsa Decemlineata, but not in the Desert Locust, Schistocerca Gregaria [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2017, 81: 103-116.

责任编辑 夏娟