

doi : 10. 16473/j. cnki. xblykx1972. 2020. 04. 026

## 桔小实蝇 *flightin* 基因 RNAi 载体构建\*

袁瑞玲<sup>1</sup>, 郑传伟<sup>1,2</sup>, 冯丹<sup>1,3</sup>, 王艺璇<sup>1</sup>, 杜春花<sup>1</sup>, 陈鹏<sup>1</sup>

(1. 云南省林业和草原科学院, 云南 昆明 650201; 2. 贵州省兴义市林业局, 贵州 兴义 562400;  
3. 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 云南 昆明 650201)

**摘要:** 以云南省林业和草原科学院森保所室内饲养的桔小实蝇为材料, 采用 RT-PCR 技术, 克隆桔小实蝇 (*Bactrocera dorsalis* Hendel.) *flightin* 的基因片段, 并以此为靶标, 设计有效的干扰片段, 以线虫 RNAi 干扰载体 L4440 为载体, 构建桔小实蝇 *flightin* 基因 RNAi 载体。通过 PCR、酶切检测及测序, 证明表达载体构建正确。本研究为通过 RNAi 研究桔小实蝇 *flightin* 的基因功能奠定了基础。

**关键词:** 桔小实蝇; *flightin* 基因; L4440 载体; RNA 干扰

中图分类号: Q 966 文献标识码: A 文章编号: 1672-8246 (2020) 04-0171-05

## Construction of Interference Vector of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) *flightin* Gene

YUAN Rui-ling<sup>1</sup>, ZHENG Chuan-wei<sup>1,2</sup>, FENG Dan<sup>1,3</sup>, WANG Yi-xuan<sup>1</sup>, DU Chun-hua<sup>1</sup>, CHEN Peng<sup>1</sup>

(1. Yunnan Academy of Forestry and Grassland, Kunming Yunnan 650201, P. R. China; 2. Xingyi City Forestry Bureau, Xingyi Guizhou 562400, P. R. China; 3. Key Laboratory of Forest Plant Cultivation & Utilization, Kunming Yunnan 650201, P. R. China)

**Abstract:** The sequence of *flightin* in *Bactrocera dorsalis* (Hendel) was cloned in this study by RT-PCR. This *flightin* sequence was chosen as the target gene. An interference fragment was designed and inserted into the expression vector L4440. Restriction enzyme analysis and DNA sequencing showed that all the recombinant plasmids were according with our design. Our study laid a foundation for the study of the function of *flightin* gene in *B. dorsalis* by RNAi.

**Key words:** *Bactrocera dorsalis*; *flightin* gene; L4440 vector; RNA interference

桔小实蝇 (*Bactrocera dorsalis* Hendel.), 属双翅目 (Diptera) 实蝇科 (Tephritidae) 昆虫, 是全球检疫性、危害果蔬的害虫, 善飞行, 被称为“水果杀手”, 其具有极强的迁飞能力, 是造成其分布地和发生区不断扩张, 以及根除后又再次发生的重要原因<sup>[1-3]</sup>, 桔小实蝇超强的飞行能力使得对其防治变得困难<sup>[4-5]</sup>。截至目前, 国内外对其飞行行为发生的分子机制仍缺乏了解, 仅见于申建梅等<sup>[6]</sup>克隆了桔小实蝇肌球蛋白轻链 2 基因 (BdorMLC2), 并对其表达谱进行了分析, 肌球蛋白轻链在生物的运动过程中具有重要作用, 其研究

结果提示, 肌球蛋白轻链 2 基因可能与桔小实蝇的肌肉收缩运动密切相关。而关于 *flightin* 对桔小实蝇飞行活动影响的研究未见报道。

昆虫的飞行活动受到一系列与肌肉组成相关的飞行肌蛋白质的调控<sup>[7-8]</sup>。*flightin* 是一种多磷酸化的肌原纤维蛋白, 最早在果蝇 (*Drosophila* spp.) 间接飞行肌 (indirect flight muscle, IFM) 上被发现, 大小为 20kDa, 位于肌肉组织中的粗肌丝外侧, 与肌球蛋白紧密结合<sup>[9]</sup>, *flightin* 对昆虫飞行能力的影响至关重要<sup>[8]</sup>。研究表明, 果蝇和褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 的 *flightin* 被干扰后, 该基

\* 收稿日期: 2019-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31660208)。

第一作者简介: 袁瑞玲 (1982-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事森林保护研究。E-mail: yuan.office@aliyun.com

通讯作者简介: 陈鹏 (1975-), 男, 研究员, 博士, 主要从事森林保护研究。E-mail: chenpengkunming@aliyun.com

因表达量降低,粗肌丝、肌节长度增长,飞行能力严重下降<sup>[8~10]</sup>。说明 *flightin* 能够决定飞行肌的肌丝长度,对飞行能力有直接调控作用<sup>[8]</sup>。目前,有关 *flightin* 在昆虫方面的研究基本局限于果蝇、褐飞虱、家蚕 (*Bombyx mori*) 等少数几种模式或重要经济价值昆虫,就 *flightin* 对于昆虫飞行能力的关联性研究尚欠深入。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种广泛存在于真核生物中高度保守的、由 dsRNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解,使相应基因不能表达,从而引发基因转录后水平基因沉默的现象<sup>[11~13]</sup>。少量的 dsRNA 分子就可以使大量的内源性 mRNA 降解,使目标基因得到有效沉默<sup>[14~15]</sup>。RNAi 技术已被广泛应用在基因功能研究、高通量靶标基因筛选、基因治疗、药物靶标预测和农业病虫害防治等领域<sup>[16~17]</sup>。利用 RNAi 技术控制迁飞昆虫的危害,已有了一些成功的范例<sup>[18~20]</sup>。研究表明,褐飞虱 *flightin* 被干扰后,该基因表达量为零,飞行能力严重降低,甚至丧失了飞行能力<sup>[8,21~23]</sup>。因此,采用 RNAi 技术抑制桔小实蝇飞行行为的关键基因的表达,降低其飞行能力,对桔小实蝇的迁飞预警和防治将具有重大意义。

本研究采用 RT-PCR 技术,设计克隆得到桔小实蝇 *flightin* 的基因干扰片段,同时选增强型绿色荧光蛋白 (*egfp*) 作为对照,通过构建体外表达靶标 dsRNA 的 RNAi 载体,为下一步通过 RNAi 研究桔小实蝇 *flightin* 的基因功能奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试昆虫

本研究所用的虫源均为云南省林业和草原科学院森保所室内饲养的桔小实蝇种群。饲养条件为:温度 25~30℃,湿度 60%~70%,光周期 16h (L)/8h (D)。

#### 1.1.2 菌株及质粒载体

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞购自天根生化科技 (北京) 有限公司; L4440 质粒 (美国 Addgene 机构), 含 *egfp* 基因的质粒 (西南林业大学徐进研究员惠赠)。

#### 1.1.3 酶及有关试剂

TSINGKE Master Mix DNA Polymerase (北京擎科新业生物技术有限公司); T4 DNA 连接酶、

RNaseA、限制性内切酶 SacI、XhoI (美国 ther-mofisher 公司); 氨苄青霉素 (Amp)、X-gal、IPTG (美国 Amresco 公司); 盐酸四环素 (Tet) (北京索莱宝科技有限公司); DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司); 总 RNA 提取试剂盒 Trizol-A+, FastKing cDNA 第一链合成试剂盒、RNase-Free ddH<sub>2</sub>O [天根生化科技 (北京) 有限公司]; 异丙醇、氯仿、无水乙醇等分析纯 [利安隆博华 (天津) 医药化学有限公司]; 引物合成及测序委托北京擎科新业生物技术有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 桔小实蝇总 RNA 的提取及反转录

桔小实蝇总 RNA 的提取按照 Trizol-A+ 试剂盒说明书进行。使用超微量核酸蛋白测定仪 (Nano-Drop 2000) 进行浓度和纯度的测定,选取 OD<sub>260/280</sub> 在 1.9~2.1 之间的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。将质量较好的总 RNA 存于 -70℃ 冰箱备用。用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 将 RNA 稀释成 500ng/ $\mu$ L 工作浓度,参照 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒说明书将提取的总 RNA (约 1 $\mu$ g) 反转录成 cDNA, -20℃ 保存备用,以此作为 PCR 模板。

#### 1.2.2 桔小实蝇 *flightin* 基因片段及对照 *egfp* 的克隆

用 Primer 5.0 和 Oligo 6, 结合含有 T<sub>7</sub> 聚合酶的 L4440 干扰载体的多克隆位点以及桔小实蝇 *flightin* 基因转录组序列 (GenBank 登录号: XM\_011210668) 和 *egfp* 序列的限制性内切酶位点设计上游和下游引物。*flightin* 基因 dsRNA 目的片段大小为 678bp, 包含完整的基因编码区; *egfp* 基因 dsRNA 目的片段大小为 187bp。

*flightin*-F 5'-C GAGCTCACTCGTATAATG-GCTGATG-3' (下划线为 SacI 酶切位点);

*flightin*-R 5'-C CTCGAGATAGCGACAAGCTC-CCAC-3' (下划线为 XhoI 酶切位点);

*egfp*-F 5'-C GAGCTCACGTAACGGCCA-CAAGTTC-3' (下划线为 SacI 酶切位点);

*egfp*-R 5'-C CTCGAGAAGTCGTGCTGCT-TCATGTG-3' (下划线为 XhoI 酶切位点)。

分别以桔小实蝇 cDNA 和含 *egfp* 基因的质粒为模板,按照 TSINGKE Master Mix DNA Polymerase 说明书进行 PCR 扩增,克隆桔小实蝇 *flightin* 及 *egfp* 基因干扰片段。PCR 扩增体系: TSINGKE Master Mix DNA Polymerase 12.5 $\mu$ L, 上下游引物和模板各

1  $\mu$ L, 加灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 25  $\mu$ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。反应结束后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并用 DNA 回收试剂盒纯化回收目的片段送测序。

### 1.2.3 桔小实蝇 *flightin* 基因及 *egfp* 的 RNA 干扰表达载体构建

(1) 连接与转化 将 L4440 质粒与胶回收的桔小实蝇 *flightin* 和 *egfp* 片段分别同时用 *Sac*I 和 *Xho*I 进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C, 酶切 1h, 分别回收酶切产物。用 T4 连接酶将回收的 L4440 载体和 *flightin*、*egfp* 基因片段以 1 : 3 比例室温连接 10min。连接产物命名 (10  $\mu$ L) 分别转化 50  $\mu$ L 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。

(2) 重组质粒的筛选与鉴定 将转化的感受态细胞涂布在含 Amp、IPTG、Xgal 的固体 LB 平板培养基上, 37 $^{\circ}$ 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 检测阳性后, 提取重组质粒 L4440-*flightin* 和 L4440-*egfp*, 用 *Sac*I 和 *Xho*I 双酶切鉴定, 筛选阳性克隆, 取阳性克隆菌液送北京擎科生物科技有限公司昆明分公司测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 桔小实蝇总 RNA 的提取

提取的桔小实蝇总 RNA 用 NanoDrop 2000 检测, 浓度均超过 1 000ng/ $\mu$ L, OD<sub>260/280</sub> 在 1.9 ~ 2.1 之间, 说明 RNA 纯度较高; 琼脂糖凝胶电泳显示所提 RNA 的 28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA 条带清晰可见 (图 1), 条带具有较好的完整性。提取的 RNA 质量高, 保障后续试验顺利进行。

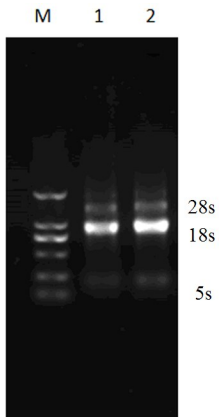


图 1 桔小实蝇总 RNA 提取结果

注: M 为 DNA Marker (AL2000); 1、2 为桔小实蝇总 RNA。

Fig. 1 Total RNA of *Bactrocera dorsalis*

### 2.2 桔小实蝇 *flightin* 基因及 *egfp* 基因干扰片段的检测

以桔小实蝇 cDNA 和 *egfp* 质粒为模板, 通过 PCR 扩增, 产物回收, 得到含 *Sac*I 和 *Xho*I 酶切位点的桔小实蝇 *flightin* 和 *egfp* 基因片段 (图 2)。从图 2 泳道 3、4 可以看出, 桔小实蝇 *flightin* 基因片段介于 500 ~ 750bp 之间, 对照 *egfp* 基因片段介于 100 ~ 250bp 之间, 分别与预期添加了酶切位点和保护碱基后的大小 692bp 和 201bp 相符。测序结果与 Genebank 中报道的序列进行比对, 无碱基差异, 同源性达 100%, 证明, 桔小实蝇 *flightin* 基因及 *egfp* 基因干扰片段克隆成功。

把载体质粒 L4440 和胶回收得到的目的片段分别经限制性内切酶 *Sac*I 和 *Xho*I 在 37 $^{\circ}$ C 下, 双酶切 1h 后, 电泳检测结果见图 2 的 2、5、6 泳道。L4440 质粒大小为 2 790 bp, 经 *Sac*I 和 *Xho*I 双酶切后, 得到的线性化载体片段约为 2 755 bp (图 2 的 2 泳道), 大小正确。桔小实蝇 *flightin* 基因及对照 *egfp* 基因经双酶切后位置同 3、4 泳道的 PCR 产物。

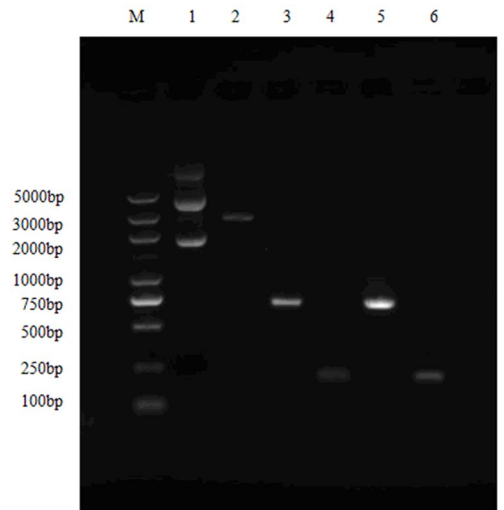


图 2 载体 L4440 和目的基因 PCR 扩增及双酶切回收产物  
注: M 为 DNA Marker (AL5000); 1 为 L4440 质粒对照; 2 为 L4440 双酶切产物; 3 为 *flightin* PCR 产物; 4 为 *egfp* PCR 产物; 5 为胶回收后 *flightin* 双酶切产物; 6 为胶回收后 *egfp* 双酶切产物。

Fig. 2 L4440, *flightin* and *egfp* PCR amplification and double digestion of the recovered product

### 2.3 桔小实蝇 *flightin* 基因及对照 *egfp* 基因干扰表达载体检测

重组质粒 L4440-*flightin* 和 L4440-*egfp* 经双酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳 20min 检测均分别得到两条带, 2 755bp 的线性化 L4440 质粒载体, 及

678bp 和 187bp 左右的目的片段 (图 3), 表明桔小实蝇 *flightin* 基因和 *egfp* 基因片段成功转入 L4440 质粒中, 与预期设计一致。将鉴定为阳性克

隆的菌液送测序, 双向测序结果与目的基因序列完全一致, 阅读框正确, 说明已经成功构建了 L4440-*flightin* 和 L4440-*egfp* 干扰表达载体。

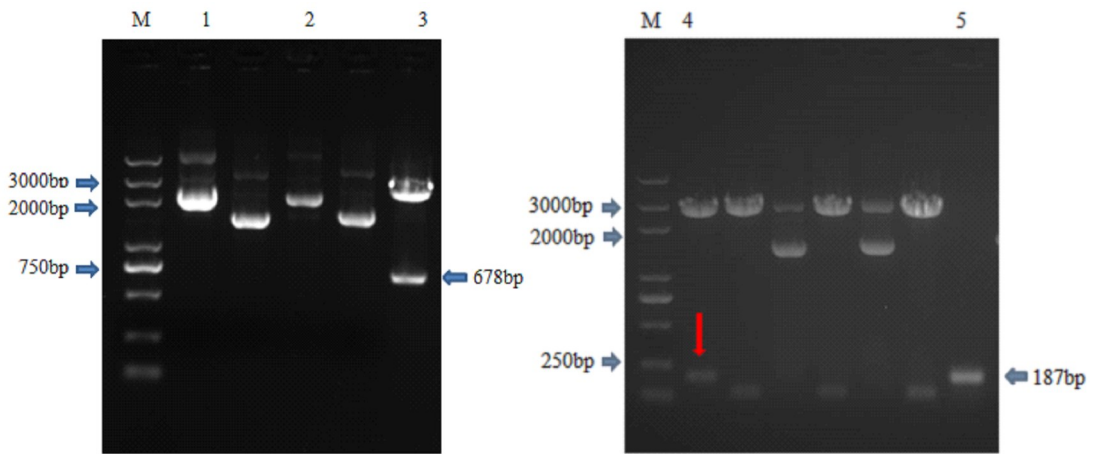


图 3 构建于 DH5 $\alpha$  中的重组质粒及双酶切验证

注: M 为 DNA Marker (AL5 000); 1 为 L4440-*flightin* 重组质粒; 2 为 L4440-*egfp* 重组质粒; 3 为 L4440-*flightin* 双酶切产物; 4 为 L4440-*egfp* 双酶切产物; 5 为 L4440-*egfp* PCR 对照。

Fig. 3 Recombinant plasmid constructed in DH5 $\alpha$  and double enzyme digestion verification

### 3 结论与讨论

高质量的 RNA 是反转录 cDNA 的关键。28S rRNA 和 18S rRNA 是真核生物 rRNA 两个主要亚基, 根据理论, 琼脂糖凝胶电泳 28S 的亮度是 18S 的两倍来确定 RNA 的完整性。但不是所有物种都如此, 昆虫的 28S 存在隐裂现象, 28S 容易断裂开, 且断裂产物大小与 18S 相当, 导致 28S 含量的减少或缺失而 18S 含量相对偏多的情况<sup>[24]</sup>。试验中所提取的桔小实蝇总 RNA 电泳结果显示 28S 和 18S 条带清晰, 但 18S 比 28S 亮得多, 说明桔小实蝇存在 28S rRNA 隐裂现象。

RNA 干扰作用 (RNAi) 是近年来新发现的一种通过 dsRNA 介导的特异性高效抑制基因表达的途径, 其在基因功能研究及农业病虫害防治等领域中具有广阔应用前景<sup>[16-17]</sup>。L4440 质粒具有氨苄抗性, 含有两个反向对应的 T<sub>7</sub> 强启动子, 利用该质粒构建的重组质粒可以在大肠杆菌 HT115 (DE3) 中表达大量所需的外源目的 dsRNA。在 RNAi 研究中, 该方法比利用试剂盒体外转录和化学合成能够大大降低实验成本<sup>[25-26]</sup>, 是基因功能研究中应用较多的分子手段之一。迁飞是害虫繁衍和扩散为害的重要方式, 而飞行肌是其飞行的直接

动力来源, 研究害虫飞行肌蛋白调控机制及功能, 可以为害虫综合防治提供新思路和新途径。*flightin* 是昆虫飞行肌发育和行使功能的重要蛋白<sup>[9,27]</sup>。本课题组已经解析了 *flightin* 基因在桔小实蝇整个发育过程中, 以及不同日龄雌、雄成虫不同组织中的表达模式, 表明 *flightin* 与桔小实蝇的飞行相关 (待发表)。为了进一步探索桔小实蝇 *flightin* 基因的功能及其作用机制, 本研究应用基因工程手段, 根据桔小实蝇转录组预测序列 XM\_011210668 的 ORF 序列在线预测了可能存在的 siRNA 位点, 选择其中 678bp 序列作为 RNA 干扰片段, 并加入 SacI 和 XhoI 两个酶切位点, 以便构建至 L4440 干扰载体。桔小实蝇 *flightin* 基因及对照 *egfp* 基因的 RNAi 表达载体的成功构建, 为研究桔小实蝇 *flightin* 的基因功能和作用奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 陈鹏, 叶辉, 母其爱. 基于荧光标记的怒江流域桔小实蝇 (*Bactrocera dorsalis*) 的迁移扩散[J]. 生态学报, 2007, 27 (6): 2468-2476.
- [2] 李伟丰, 杨朗, 唐侃, 等. 中国桔小实蝇种群的微卫星多态性分析[J]. 昆虫学报, 2007, 50 (12): 1255-1262.
- [3] Shi W, Kerdelhué Carole, Ye H. Population genetic structure of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

(Diptera: Tephritidae) from Yunnan province (China) and nearby sites across the border [J]. *Genetica*, 2010, 138(3): 377-385.

[4] Chen P, Ye H. Relationship among five populations of *Bactrocera dorsalis* based on mitochondrial DNA sequences in western Yunnan, China [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2008, 132(7): 530-537.

[5] 万方浩, 叶辉, 陈鹏, 等. 中国生物入侵研究—桔小实蝇在中国的扩张趋势 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 90-94.

[6] 申建梅, 胡黎明, 宾淑英, 等. 桔小实蝇肌球蛋白轻链 2 基因的克隆及表达分析 [J]. *昆虫学报*, 2011, 54(5): 508-514.

[7] 杨璞, 余海忠, 程家安, 等. 昆虫飞行肌蛋白质 [J]. *昆虫知识*, 2005, 42(6): 726-731.

[8] Xue J, Zhang X Q, Xu H J, *et al.* Molecular characterization of the *flightin* gene in the wing-dimorphic planthopper, *Nilaparvata lugens*, and its evolution in Pancrustacea [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2013, 43(5): 433-443.

[9] Contompasis J L, Nyland L R, Maughan D W, *et al.* *Flightin* is necessary for length determination, structural integrity, and large bending stiffness of insect flight muscle thick filaments [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 359(2): 340-348.

[10] Vigoreaux J O. *Flightin*, a novel myofibrillar protein of *Drosophila* stretch-activated muscles [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1993, 121(3): 587-598.

[11] 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(6669): 806-811.

[12] Tuschl T, Zamore P D, Lehmann R, *et al.* Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro [J]. *Genes & Development*, 1999, 13: 3191-3197.

[13] Benmstein E, Caudy A A, Hammond S M, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [J]. *Nature*, 2001, 409: 363-366.

[14] Harmon G J. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.

[15] Vileinskas A. Insect biotechnology (Biologically-inspired systems, 2) [M]. London: Springer, 2011: 145-168.

[16] Dorner S, Lum L, Kim M, *et al.* A genome-wide screen for components of the RNAi pathway in *Drosophila* cultured cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006,

103(32): 11880-11885.

[17] Collins C S, Hong J, Sapinoso L, *et al.* A small interfering RNA screen for modulators of tumor cell motility identifies MAP4K4 as a promigratory kinase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(10): 3775-3780.

[18] Shen G M, Wang X N, Dou W, *et al.* Biochemical and molecular characterisation of acetylcholinesterase in four field populations of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) [J]. *Pest Management Science*, 2012, 68(12): 1553-1563.

[19] Shen G M, Dou W, Huang Y, *et al.* In silico cloning and annotation of genes involved in the digestion, detoxification and RNA interference mechanism in the midgut of *Bactrocera dorsalis* [Hendel] (Diptera: Tephritidae) [J]. *Insect Molecular Biology*, 2013a, 22(4): 354-365.

[20] Shen G M, Huang Y, Jiang X Z, *et al.* Effect of  $\beta$ -cypermethrin exposure on the stability of nine housekeeping genes in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) [J]. *Florida Entomologist*, 2013b, 96(2): 442-450.

[21] Tang B, Wang S, Fan Z. Two storage hexamerins from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: Cloning, characterization and the effect of gene silencing on survival [J]. *Bmc Molecular Biology*, 2010, 11(8): 573-578.

[22] 张小琴, 胡玉琼, 张传溪. 褐飞虱 *flightin* 的原核表达及其差异表达检测 [J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50(4): 1006-1012.

[23] Yu J L, An Z F, Liu X D. Wingless gene cloning and its role in manipulating the wing dimorphism in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* [J]. *Bmc Molecular Biology*, 2014, 15(1): 1-9.

[24] Fujiwara H, Ishikawa H. Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insect: Implication based on structural studies [J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(16): 6393-6401.

[25] Li X X, Zhang M Y, Zhang H Y. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17788.

[26] 林霞. 昆虫几丁质脱乙酰基酶 BmCDA1 的生化表征 [D]. 大连: 大连理工大学, 2017: 1-56.

[27] Barton B, Ayer G, Vigoreaux J O, *et al.* Flight muscle properties and aerodynamic performance of *Drosophila* expressing a *flightin* transgene [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2005, 208: 549-560.

(编辑: 胡光辉)