细菌表达dsRNA抗马铃薯甲虫

Expressing dsRNA in bacteria against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*

何弯弯　许文博　徐世静　卢　欢　张　江*

（湖北大学生命科学学院，武汉 430062）

He Wanwan　Xu Wenbo　Xu Shijing　Lu huan　Zhang Jiang*

（College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei Province, China）

马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 是国际上公认的一种马铃薯毁灭性检疫害虫，起源于墨西哥，寄主主要包括马铃薯、刺萼龙葵、茄子等茄科植物。20世纪90年代传入我国并被列为重要外来入侵物种之一，在生物防治研究领域引起了极大的关注。RNA干扰（RNA interference，RNAi）是dsRNA介导的特异沉默靶基因转录后的基因沉默现象。Zhang & Khan（2015）和Fu & Zhu（2016）发现马铃薯甲虫对RNAi很敏感。因此，本研究利用大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达针对马铃薯甲虫 *actin* 基因的dsRNA并对马铃薯甲虫进行喂食，测定菌液的抗虫效果，评估该方法抗马铃薯甲虫的可行性，以期为开发相应的抗虫策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫及菌株：马铃薯甲虫由新疆农业科学院植物保护研究所提供。大肠杆菌菌株HT115感受态细胞和L4440载体来自湖北大学生命科学学院质体技术创新团队。

试剂及仪器：M-MLV反转录酶、限制性核酸内切酶、反转录试剂盒、TB Green Premix Ex *Taq* II，日本Takara公司；RNA提取试剂盒，北京全式金生物技术有限公司；金牌MIX（green），北京擎科新业生物技术有限公司。T7 RiboMAX Express RNAi System，美国Promega公司；CFX96 Touch荧光定量PCR仪，美国Bio-Rad公司。

培养基：LB（Luria-Bertani）液体培养基：蛋白胨10 g/L、氯化钠10 g/L、酵母提取物5 g/L，pH 7.0，蒸馏水定容至1 L。在LB液体培养基中加入10~15 g/L琼脂粉即为LB固体培养基。

1.2 方法

采用RNA提取试剂盒提取马铃薯甲虫总RNA，经反转录得到cDNA并作为模板进行扩增。参考Zhang & Khan（2015）序列设计引物：*actin*-F：5′-ACTATAGGGAGACCGGCAGATCTGAGCACG-AGGTTTTTCTGTCTA-3′；*actin*-R：5′-GGTACCGG-GCCCCCCCTCGAGGTCGATGTCATCCCAGTTG-GTGAT-3′，由武汉金开瑞生物工程有限公司合成，PCR反应体系：cDNA取2 μL、*actin*-F/R各4 μL、金牌MIX（green）140 μL。PCR反应条件：95℃预变性5 min；95℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸20 s，35个循环；72℃延伸5 min；10℃保存。回收PCR片段。将L4440载体和PCR片段利用*Bgl* II和*Xho* I进行酶切连接构建dsRNA表达载体。测序验证后，将表达载体转入菌株HT115感受态细胞中，并命名为dsACT菌液。dsACT菌液于LB液体培养基中以37℃、转速150 r/min摇培约14 h后，取新鲜菌液按体积比1∶100在含有氨苄青霉素和四环素的LB液体培养基中扩大培养，当菌液$OD_{600\ nm}$为0.4时加入0.4 mmol/L IPTG，约5 h后收集菌液，取少量菌液用RNA提取试剂盒提取RNA，并用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测，其余菌液涂抹用于喂食试验。

马铃薯甲虫喂食试验及基因表达水平检测：将生长状态良好一致的2龄马铃薯甲虫幼虫和均匀涂抹50 μL dsACT菌液的叶片放入直径9 cm的培养皿中，在温度25±1℃、相对湿度70%、光周期16 L∶8 D的条件下饲养。每个处理选10头，重复3次。以ddH_2O作空白对照组，阴性对照为含L4440的细菌。为防止dsRNA在体外环境下降解需每天更换叶片及新鲜细菌，并记录试虫的体重和存活率。参照Zhu & Xu（2011）方法，选取喂食5 d后的幼虫利用RNA提取试剂盒提取RNA并进行反转录得到cDNA，将其作为模板进行实时荧光定量qRT-PCR检测。参考Zhu & Xu（2011）方法选择*RP18*为内参基因，*actin*为靶标基因，设计引物序列ACT-qRT-F/R（5′-CCAGTCCTCCTCACTGAAGC-3′/5′-ACGACCAG-

基金项目：国家自然科学基金（31572071），国家重点研发计划（2017YFD0600101），湖北省自然科学基金（2016CFA052）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：zhangjiang@hubu.edu.cn；收稿日期：2018-11-05

AAGCGTACAAGG-3′)和 RP18-qRT-F/R(5′-TAGA-ATCCTCAAAGCAGGTGGCGA-3′/5′-AGCTGGAC-CAAAGTGTTTCACTGC-3′)。10 μL qRT-PCR反应体系:cDNA 2 μL、10 μmol/L正反向引物各0.25 μL、2×TB Green Premix Ex *Taq* II 5 μL,补 ddH_2O 至10 μL。反应条件:95℃预变性2 min;95℃变性15 s,55℃退火30 s,72℃延伸20 s,40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *actin* 基因相对表达量。

1.3 数据分析

数据采用SPSS 19.0进行分析,用单因素方差分析,用Bonferroni法对不同处理组间体重差异及组间 *actin* 基因相对表达量差异进行检验。采用Kaplain-Meier曲线对马铃薯甲虫存活率进行分析。

2 结果与分析

2.1 细菌表达dsRNA载体构建及诱导表达

actin 基因片段成功连入了L4440载体中,通过琼脂糖凝胶电泳检测表明在细菌中成功地诱导表达了dsRNA。

2.2 细菌喂食存活率与体重变化

喂食 ddH_2O 与含L4440的细菌后,马铃薯甲虫取食量、体重、存活率均无显著差异,说明单独喂食含L4440的细菌并不会对马铃薯甲虫产生影响。进一步比较喂食dsACT菌液和含L4440的细菌,结果显示,取食涂有dsACT叶片的马铃薯甲虫在第3天后出现明显的拒食现象。与阴性对照组相比,dsACT组马铃薯甲虫存活率显著降低,第7天存活率为13%(阴性对照组为97%)($P<0.001$,图1-A)。此外,dsACT组的马铃薯甲虫体重在第5天与阴性对照组相比下降了81%($P<0.001$,图1-B)。

2.3 qRT-PCR检测 *actin* 基因的表达水平

选取喂食5 d后的马铃薯甲虫,利用qRT-PCR检测 *actin* 基因的表达水平,发现与阴性对照组相比,喂食表达dsACT菌液后 *actin* 的表达水平下降了97%($P<0.001$,图1-C)。

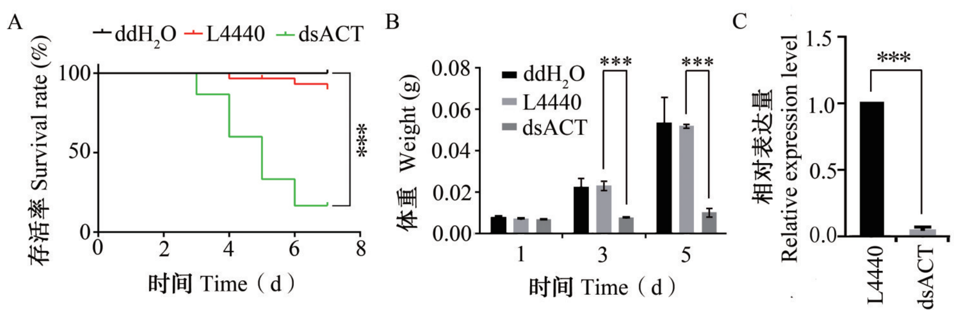

图1 喂食dsACT对马铃薯甲虫的生存曲线(A)、体重(B)及其体内 *actin* 基因表达水平(C)的影响

Fig. 1 The survival curve (A), weight (B) and the relative expression level of *actin* (C) of Colorado potato beetle after feeding dsACT

图中数据为平均数±标准误。***表示不同处理间经Bonferroni法检验在 $P<0.001$ 水平差异显著。Data are mean±SE. *** indicate significant difference among different treatments at $P<0.001$ by Bonferroni test.

3 讨论

本试验构建了靶向马铃薯甲虫 *actin* 基因的dsRNA的细菌表达载体,并在大肠杆菌HT115感受态细胞中通过IPTG诱导表达产生了dsRNA。喂食dsACT菌液后马铃薯甲虫在第7天的存活率下降为13%,这与Zhu & Xu(2011)的结论相近。另外,本研究通过细菌表达dsRNA并将菌液喷洒于马铃薯叶片,被马铃薯甲虫取食后能降低其靶标基因的转录水平,使马铃薯甲虫产生拒食并迅速死亡,说明dsRNA对马铃薯甲虫有良好的干扰效果。杨静和韩召军(2014)利用细菌表达dsRNA对棉铃虫进行喂食后比较几种靶标基因RNAi效果,发现RNAi效率与靶标基因的选择密切相关。因此,推测靶标基因的功能不同对利用RNAi防治马铃薯甲虫的效果也会不同。在下一步研究中应该选取更多基因、更多虫龄进行RNAi效果比较,以期筛选出致死效率更高的靶标基因和更敏感的虫龄。

参 考 文 献(References)

Fu K, Zhu T. 2016. Knockdown of a putative insulin-like peptide gene *LdILP2* in *Leptinotarsa decemlineata* by RNA interference impairs pupation and adult emergence. Gene, 581(2): 170−177

Yang J, Han ZJ. 2014. Comparison of silencing effect of three ecdysis involved genes in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Journal of Nanjing Agricultural University, 37(1): 81−86 (in Chinese) [杨静, 韩召军. 2014. 棉铃虫3种蜕皮相关基因的RNA干扰效应比较. 南京农业大学学报, 37(1): 81−86]

Zhang J, Khan SA. 2015. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. Science, 347 (6225): 991−994

Zhu F, Xu J. 2011. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Pest Management Science, 67(2): 175−182

(责任编辑:王 璇)