应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2017, 54(5): 780−790. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2017.094

不同 RNAi 方法对飞蝗触角高表达基因沉默效率的比较*

史学凯[1, 2, 3**] 张艺伟[1, 3] 朱坤炎[4] 马恩波[1, 3]
张建珍[1, 3] 刘晓健[1, 3] 吴海花[1, 3***]

（1. 山西大学应用生物学研究所，太原 030006；2. 山西大学生命科学学院，太原 030006；
3. 农业有害生物综合治理山西省重点实验室，太原 030006；4. 美国堪萨斯州立大学，曼哈顿，KS 66506–4004）

摘 要 **【目的】** RNAi 技术在研究飞蝗功能基因组学方面已经日趋成熟，飞蝗触角中富含有丰富的气味结合蛋白、转运蛋白以及气味降解酶等，这些蛋白在昆虫嗅觉信号传导中发挥着重要的作用，但是关于高效降解这些基因的相关 RNAi 方法还未知，因此本文通过分析不同 RNAi 方法对飞蝗触角高表达基因的沉默效率差异变化，以此探索一种高效降解飞蝗触角高表达基因的方法，为后续研究基因功能提供理论依据与技术指导，为从飞蝗嗅觉机制方向设计防控蝗灾的分子靶标奠定基础。**【方法】** 以 *LmCYP3117C1* 基因为目标基因，飞蝗为实验材料，选取飞蝗 5 龄若虫解剖触角、下颚须、翅、跗足、中肠、马氏管 6 个组织部位，利用实时荧光定量 PCR 技术分析基因不同组织部位的表达特异性。用不同溶剂溶解 dsRNA（DEPC 水，丙酮和 DEPC 水（1∶1）混合溶剂，0.1% Triton X-100），分别采用注射法（触角窝注射和腹部注射），浸泡法和涂抹法 3 种方法干扰靶标基因，利用实时荧光定量 PCR 技术分析基因表达抑制情况，研究不同 RNAi 方法对基因表达量变化的影响。**【结果】** *LmCYP3117C1* 基因在飞蝗若虫 6 个组织部位均有表达，在触角的表达量最高，分别是下颚须、翅、跗足、中肠、马氏管的 3.78 倍、2.10 倍、10.84 倍、363.48 倍、365.16 倍。通过在两边的触角窝注射 ds*CYP3117C1*，24 h 后飞蝗雌雄虫触角 *LmCYP3117C1* 表达量显著降低，雌虫和雄虫沉默效率分别为 76.84%和 87.51%，但在其他组织部位（下颚须、翅、跗足、其余整虫）基因表达量没有发生显著变化；飞蝗腹部注射 ds*CYP3117C1*，24 h 后雌雄虫触角的基因表达水平均发生显著降低，其中雌虫触角沉默效率达 68.60%，雄虫沉默效率达 61.10%，另外，飞蝗雌虫跗足 *LmCYP3117C1* 基因表达量也发生显著降低，但下颚须、翅和其余整虫没有明显变化；飞蝗雄虫下颚须，其余整虫 *LmCYP3117C1* 基因表达有显著降低，翅和跗足没有发生明显变化；将飞蝗触角浸泡于溶于不同溶剂的 ds*CYP3117C1* 溶液中（DEPC 水、丙酮和 DEPC 水（1∶1）混合溶剂、含 0.1% Triton X-100 的 DEPC 水），分别浸泡 1，3，5 min，24 h 后检测雌雄虫触角 *LmCYP3117C1* 基因表达情况，结果显示没有发生明显变化；将 ds*CYP3117C1* 分别溶于 DEPC 水和含 0.1% Triton X-100 的 DEPC 水中涂抹飞蝗触角，24 h 后发现飞蝗雌雄虫触角 *LmCYP3117C1* 基因表达水平无显著变化。**【结论】** 飞蝗触角浸泡法和涂抹法干扰 *LmCYP3117C1* 没有显著效果，腹部注射法对飞蝗触角 *LmCYP3117C1* 的沉默效率较低，触角窝注射法可以高效降解 *LmCYP3117C1*，可作为飞蝗触角高表达基因 RNAi 的主要干扰方法。

关键词 触角，RNAi 技术，注射法，浸泡法，涂抹法

Comparison of the efficacy of different dsRNA delivery methods to silence antenna-rich genes in *Locusta migratoria*

SHI Xue-Kai[1, 2, 3**] ZHANG Yi-Wei[1, 3] ZHU Kun-Yan[4] MA En-Bo[1, 3]
ZHANG Jian-Zhen[1, 3] LIU Xiao-Jian[1, 3] WU Hai-Hua[1, 3***]

(1. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. College of Life Sciences Shanxi University, Taiyuan

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金重大国际合作项目（31320103921）；国家自然科学基金项目（31201548）；山西省自然科学基金项目（2013011028-3）

**第一作者 First author，E-mail：xuekaishi@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：wuhaihua04@163.com

收稿日期 Received：2016-11-15，接受日期 Accepted：2016-12-12

030006, China; 3. Modern Research Center for Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;
4. Kansas State University, Manhattan KS 66506–4004, America)

Abstract **[Objectives]** RNAi has been widely used in functional genomic studies of *Locusta migratoria*. The antennae of locusts have a large number of the odor binding proteins, transporter proteins and odor degradation enzymes, which play important roles in olfactory signal transduction. The optimal dsRNA delivery methods for the corresponding genes have not, however, been well established. We compared the effectiveness of different dsRNA delivery methods using RT-qPCR to measure the gene expression levels obtained by each method. The results provide a theoretical basis for the future functional study of antenna-rich genes in locusts and a foundation for developing a new method for controlling locust plagues based on the molecular targets in the olfactory mechanism. **[Methods]** *LmCYP3117C1* was chosen as the target gene. mRNA expression of this gene was measured in six tissues; antennae, maxillary palp, wing, tarsus, midgut, and Malpighian tubule, dissected from the fifth-instar *L. migratoria*. Double-stranded *LmCYP3117C1* RNA was dissolved in different solvents (DEPC water, acetone and DEPC water (1∶1) mixed solvent, 0.1% Triton X-100). Three methods; injection (antennal socket and abdominal injection), soaking, and brushing, were tested and the expression levels of the *LmCYP3117C1* gene measured with RT-qPCR after each method. **[Results]** The *LmCYP3117C1* gene was expressed in all six tissues. Expression was highest in the antennae, which was 3.78, 2.10, 10.84, 363.48, and 365.16-fold that in the maxillary palps, wings, tarsi, midgut, and Malpighian tubules, respectively. Expression levels of *LmCYP3117C1* were significantly reduced 24 h after injecting ds*CYP3117C1* into both antennal sockets. This technique reduced target gene expression in female and male nymphs by 76.84% and 87.51%, respectively, whereas expression in other tissues (maxillary palp, wing, tarsus, and other parts of the whole body) did not change significantly. Injecting ds*CYP3117C1* into the abdomen of females and males reduced expression of the target gene by 68.60% and 61.10%, respectively. In addition, this technique significantly reduced expression of the target gene in the tarsi, whereas that in the maxillary palps, wings and other parts of the whole body did not obviously change in females. *LmCYP3117C1* gene expression levels decreased in the maxillary palps and other parts of whole body, and did not undergo obvious change in the wings and tarsi of males. In addition, gene expression was not significantly different in males and females 24 h after soaking antennae in ds*CYP3117C1* dissolved in different solvents (DEPC water, acetone and DEPC water (1∶1) mixed solvent, 0.1% Triton X-100) for 1, 3, 5 min, respectively. Gene expression levels did not significantly changes in male and female antennae 24 h after brushing them with ds*CYP3117C1* dissolved in DEPC water and 0.1% Triton X-100, respectively. **[Conclusion]** Injection of dsRNA into the antennal socket significantly reduced *LmCYP3117C1* gene expression but soaking and brushing antennae with dsRNA did not.

Key words antennae, RNAi technology, injection method, soaking method, brushing method

随着生物技术的飞速发展，越来越多的生物技术被应用到昆虫基因功能研究中。Fire 等（1998）首次于秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中证实 dsRNA 可特异性降解同源目标 mRNA，阻断基因的表达，并将这种现象称为 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）。由于该技术对靶基因的高特异性、系统性及易操作性等特点，现已成为研究昆虫基因功能的主要生物技术之一，且在害虫防治等领域具有潜在的应用价值（Li *et al.*，2014），特别是在非模式昆虫中（Terenius *et al.*，2011）。昆虫触角在适应环境的过程中发挥着十分重要的作用，利用触角完成取食、求偶、繁殖等行为。触角中含有高表达的或特异表达的气味结合蛋白或气味降解酶等，这些蛋白在害虫嗅觉信号传导中发挥着重要的作用。通过对害虫触角相关基因及其功能的研究，不仅可以阐明昆虫感受化学信号的机制，找到气味分子的作用靶标，而且可以为设计和开发基于嗅觉的害虫高效行为调控技术提供靶标基因和理论指导。飞蝗 *Locusta migratoria* Meyen 隶属于直翅目，蝗总科，斑翅蝗科，是世界性的重要农业害虫，主要取食禾本科植物，对农业生产造成很大的威胁。蝗虫大规模的聚集行为和迁飞活动均与触角对化学信息物质的感受密切相关，因此，以飞蝗为对象通过应用不同 RNA 干扰方法研究其对飞蝗触角高表达基因的沉默效率差异，

旨在筛选一种高效率降解飞蝗触角高表达基因的方法，为之后基因功能研究提供技术手段，为研究飞蝗触角高表达基因的功能奠定基础，不仅具有理论意义，也具有害虫防治的实际应用价值。

RNAi 技术广泛应用于昆虫基因功能研究中，由于物种多样性、基因多样性以及 RNA 干扰方法多样性导致基因的沉默效率存在差异（Terenius *et al.*，2011；Scott *et al.*，2013）。前期学者通过使用不同的方法将外源的 dsRNA 导入昆虫体内，如：转基因法、注射法、喂食法和浸泡法等。注射法是对许多昆虫 RNAi 研究行之有效的方法，主要是将体外合成的 dsRNA 注射到昆虫体内，如：豌豆长管蚜 *Acyrthosiphon pisum*（Christiaens *et al.*，2014），非洲甘薯象甲（Prentice *et al.*，2016），大麦虫 *Zophobas atratus*（Wang *et al.*，2016），美洲大蠊 *Periplaneta americana*（Wang *et al.*，2016）和飞蝗（Wang *et al.*，2016）等。浸泡法是在体外合成 dsRNA，经过与一定的试剂相混合直接浸泡实验材料以实现 RNA 干扰，浸泡法在昆虫细胞系研究中应用广泛，也有少量应用于水生昆虫 RNAi 的研究中（Whangbo *et al.*，2008），例如果蝇 S2 细胞 cyce 和 Ago（March and Bentley，2007）、日本血吸虫 *Schistosoma japonicum*（刘艳涛，2015）、线虫（Fire *et al.*，1998）等。还可以通过饲喂 dsRNA 的方法实现昆虫 RNAi，如豌豆长管蚜（Christiaens *et al.*，2014），线虫（Timmons *et al.*，2001），非洲甘薯象甲（Prentice *et al.*，2016），棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 等（Mao *et al.*，2007），Zhang 等（2010）使用壳聚糖包裹 dsRNA 制成纳米颗粒，将 ds*AgCHS1* 和 ds*AgCHS2* 与食物混合饲喂冈比亚按蚊，检测发现目标基因的沉默效率达 40%~60%。另外，Baum 等（2007）报道了具有突破性的研究工作，即通过使昆虫取食表达 dsRNA 的植物来沉默体内目的基因以此防控虫害。例如，在玉米叶中导入 dsRNA，这种转基因玉米的液泡中可以产生 H^+-*ATPase* dsRNA，由此可降低玉米根叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 的危害（景天忠等，2012）。Zhang 等（2015）使用喷雾法将 ds*OfSP-C* 喷到亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 和棉铃虫虫体，可导致其产生高致死率，另外，将 ds*OfSP-N* 和 ds*OfSP-M* 喷到亚洲玉米螟和棉铃虫上，发现玉米螟死亡率明显提高，但棉铃虫致死率无变化。目前，在蝗虫腹部注射目的基因 dsRNA 是国内外学者研究飞蝗基因功能普遍采用的方法，但是由于候选基因的差异表达特别是组织部位的差异表达导致 RNAi 沉默效率存在差异。Ren 等（2014）发现在飞蝗腹部注射 dsRNA 不能有效地干扰卵巢高表达的基因。本课题组发现了在飞蝗触角中高表达的细胞色素 P450 基因，对于距离腹部较远的触角来说，能否在腹部注射少量 dsRNA 实现有效的沉默触角高表达基因，或是通过其它的 RNA 干扰方法实现 dsRNA 用量少而沉默效率高且易操作的目的，未见报道。*LmCYP3117C1*（GenBank 检索号为 KY009922）是飞蝗触角高表达的基因，且在其它含有感器的组织如下颚须、跗足、翅等表达量较高（图 2），我们推测该基因与飞蝗对气味物质的代谢密切相关，因此，本文选择 *LmCYP3117C1* 为目的基因，采用不同的 RNAi 方法，通过实时荧光定量 PCR 检测不同干扰方法对目的基因的沉默效率。本实验采用飞蝗 5 龄若虫为实验对象，以触角高表达的 *LmCYP3117C1* 基因为目标基因，基于本实验室之前构建的 RNA 干扰方法体系，采用不同 RNAi 方法干扰目标基因，筛选一种更为高效便捷的飞蝗触角高表达基因 RNA 干扰方法，以期为后续研究触角高表达基因功能提供技术平台及依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

飞蝗虫卵于 2015 年 10 月购自河北沧州飞蝗养殖公司，置于实验室人工气候箱中孵化，温度为（30±2）℃，相对湿度为（40±5）%，光照时间：黑暗时间=14：10。选择同一时间孵化的蝗蝻移至纱笼内置于人工气候箱中，以新鲜小麦苗饲喂，每天更换一次新鲜麦苗。待蝗蝻长到 4 龄

开始辅以麦麸饲喂，直至其发育至 5 龄末期。选取大小均一、活力旺盛、同等数量 5 龄第 5 天（N5D5）的雌虫和雄虫分别进行处理。

1.2　主要试剂与仪器

试剂：*LmCYP3117C1* 全长菌液为本实验室保存, GenBank 检索号为 KY009922。RNAisoTM Plus、RNase Inhibitor 和 Reverse Transcriptase M-MLV 反转录酶均购自 TaKaRa 公司；SYBR® Green Real-time PCR Master Mix 购自 TOYOBO 公司；PCR Master Mix 购自天根公司；E.Z.N.A.® Gel ExtractionKit 试剂盒购于 Omega 公司；T7 RiboMAXTM Express RNAi System 试剂盒购于 Promega 公司；其他试剂主要购自 Sigma、TaKaRa、Solarbio 和上海生工生物公司。

仪器：Applied Biosystems 7300 Real-time PCR System（Applied Biosystems），3K15 型离心机（Sigma），GenePro 基因扩增仪（杭州博日科技有限公司），NanoDrop 2000 spectrophotometer（Thermo），凝胶成像系统（Bio-Rad）。

1.3　引物设计

根据 *LmCYP3117C1* 基因 cDNA 全长序列，通过 E-RNAi webservice 网站（http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/）设计 *LmCYP3117C1* 基因 dsRNA 合成引物（表 1），采用 Primer5.0 软件设计特异性表达引物（表 1）。所有引物由上海生工公司合成。

表 1　***LmCYP3117C1* dsRNA 合成及 RT-qPCR 分析所用引物**
Table 1　Primers of *LmCYP3117C1* for dsRNA synthesis and RT-qPCR analysis

引物用途 Application of primers	基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	产物长度 Length of product (bp)
dsRNA 合成引物	*LmCYP3117C1*	F:taatacgactcactatagggAGACATCGGAAAACTCACCG	506
		R:taatacgactcactatagggGGACTGTTCTTTCCGAGCAC	
	ds*GFP*	F:taatacgactcactatagggGTGGAGAGGGTGAAGG	571
		R:taatacgactcactatagggGGGCAGATTGTGTGGAC	
RT-qPCR 分析引物	*LmCYP3117C1*	F: CTGCCAAAAGCTGAGTTTAACA	122
		R:AACGACTAGAAGAGCGCAAGGG	
	EF1a	F:AGCCCAGGAGATGGGTAAAG	155
		R:CTCTGTGGCCTGGAGCATC	

1.4　飞蝗 *LmCYP3117C1* 不同组织部位的表达特性

选取飞蝗 5 龄 3~4 d 若虫解剖触角、下颚须、翅、跗足、中肠、马氏管 6 个组织部位，每个样本取 6 个生物学重复，每个重复 5 头虫体。收集各组织部位，立即冻存于液氮中备用。

使用 TaKaRa 公司的 Trizol Plus reagent 试剂按照说明书提取总 RNA。用 Thermo 公司的 NanoDrop 2000 spectrophotometer 检测总 RNA 纯度并进行定量，采用 2% 琼脂糖凝胶电泳对所提取的总 RNA 完整性进行检测。使用 M-MLV Reverse Transcriptase（Promega，USA）进行 cDNA 第一链反转录，详细步骤参考说明书。采用实时荧光定量 PCR 技术检测各个组织部位的表达。反应体系为 20 μL：4 μL 20 倍稀释的 cDNA 模板，10 μL SYBR® Green Real-time PCR Master Mix，上下游引物各 0.8 μL（10 μmol·L^{-1}）；4.4 μL ddH_2O。扩增条件为 94℃预变性 15 s，94℃变性 15 s，60℃退火并延伸 31 s，40 个循环。实验设置 6 个生物学重复，两个技术重复。使用 ABI Prism 7300 SDS 1.1 软件记录数据。以 *EF1a* 为内参基因（引物序列见表 1）。

1.5　dsRNA 的合成

本实验室采用由酶促反应体外转录制备的长 dsRNA 来进行 RNAi。通过 PCR 扩增获得的 DNA 片段作为模板，在 dsRNA 合成引物的 5′端加上

噬菌体 T7 启动子序列，然后使用 Promega T7 试剂盒并根据试剂盒的操作说明体外合成 dsRNA。

1.6 注射法

1.6.1 腹部注射 dsRNA 使用微量注射器将 2 μL（4 μg）基因特异性的 dsRNA 沿 2、3 腹节节间膜处注射入飞蝗体内作为处理组，不可扎入过深，对照组注射等量 ds*GFP*（绿色荧光蛋白）。雌雄分开，每组 6 头若虫为一个生物学重复，设 3 个生物学重复。24 h 后，收集触角，立即冻存于液氮中备用。

1.6.2 触角窝注射 dsRNA 使用微量注射器分别向飞蝗头部两边触角窝膜处（图 1）注射 2 μg dsRNA，对照组注射等量 ds*GFP*。雌雄分开，每组 6 头若虫为一个生物学重复，设 3 个生物学重复。24 h 后，收集触角，立即冻存于液氮中备用。

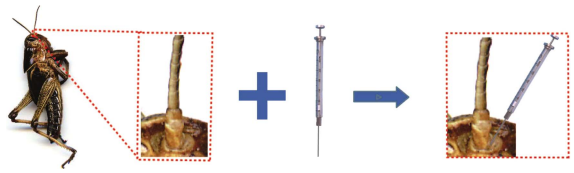

图 1 触角窝注射示意图
Fig. 1 Antennal socket injection diagram

1.7 浸泡法

浸泡法是活体实验，先将体外合成的 dsRNA 溶解于不同的溶剂中，然后置于毛细管中，选取活力良好，大小均一的蝗虫，将其触角浸泡于毛细管的 dsRNA 溶液中，分别浸泡 1，3，5 min 后将蝗虫再放入人工气候箱中养殖，24 h 后收集蝗虫触角并迅速冻存于液氮中备用。处理组将其触角浸泡于目标基因的 dsRNA 中，对照组将触角浸泡于等浓度的 ds*GFP* 溶液中。雌雄虫分开，6 头若虫为一个生物学重复，共设 3 个生物学重复。

1.7.1 DEPC 水作为 dsRNA 溶剂 将 dsRNA 溶解于 DEPC 水中（浓度为 2 μg·μL^{-1}），其余操作不变。

1.7.2 丙酮：DEPC 水（1∶1）混合溶剂作为 dsRNA 溶剂 将 dsRNA 溶解于 DEPC 水和丙酮各半的溶液中，丙酮：DEPC 水为 1∶1（浓度为 2 μg· μL^{-1}），其余操作不变。

1.7.3 Triton X-100 作为 dsRNA 溶剂 将 dsRNA 溶解于含 0.1% Triton X-100 的 DEPC 水中（浓度为 2 μg·μL^{-1}），其余操作不变。

1.8 涂抹法

在体外合成 dsRNA，经过与一定的试剂相混合，将处理组飞蝗触角表面均匀涂抹目标基因的 dsRNA，对照组均匀涂抹 ds*GFP*，雌雄分开，设 3 个生物学重复，每 6 头作为一个生物学重复，24 h 后收集触角并迅速冻存于液氮中备用。

1.8.1 DEPC 水作为 dsRNA 溶剂 将 dsRNA 溶解于 DEPC 水中，浓度为 2 μg·μL^{-1}，其余操作不变。

1.8.2 Triton X-100 作为 dsRNA 溶剂 将 dsRNA 溶解于含 0.1% Triton X-100 的 DEPC 水中，浓度为 2 μg·μL^{-1}，其余操作不变。

1.9 飞蝗 *LmCYP3117C1* 不同处理方法沉默效率检测

采用实时荧光定量 PCR 技术检测引物扩增效率以及飞蝗 *LmCYP3117C1* 在不同处理方法的表达水平变化。以 *EF1a* 为内参基因（引物序列见表 1）。反应体系为 20 μL：10 μL SYBR® Green Real-time PCR Master Mix；5 倍稀释的 cDNA 模板 4 μL；上下游引物各 0.8 μL（10 μmol·L^{-1}）；4.4 μL ddH_2O。扩增条件为 94℃预变性 15 s，94℃变性 15 s，60℃退火并延伸 31 s，40 个循环。所有实验均设置 3 个生物学重复，每个生物学重复设 2 个技术重复。使用 ABI Prism 7300 SDS 1.1 软件记录数据。

1.10 数据统计与分析

数据结果采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法进行处理，结果用平均值±标准差表示，用 SPSS 16.0 软件选择 *t*-检验分析沉默效率间的差异显著性，选择 Tukey's 检验分析不同组织部位的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 *LmCYP3117C1* 基因在不同组织部位的表达

从图 2 可以看出，*LmCYP3117C1* 基因在 5

龄若虫 6 个不同组织部位均有表达，其中触角表达最高，下颚须、翅、跗足次之，中肠、马氏管表达最低。*LmCYP3117C1* 基因在触角的表达量分别是下颚须、翅、跗足、中肠、马氏管的 3.78 倍、2.10 倍、10.84 倍、363.48 倍、365.16 倍。

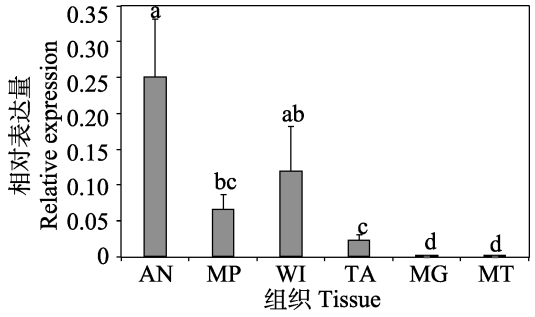

图 2　*LmCYP3117C1* 基因在 5 龄若虫不同组织部位的表达

Fig. 2　The mRNA expression levels of *LmCYP3117C1* gene in different tissues of *the fifth-instar Locusta migratoria*

AN：触角 Antenna；MP：下颚须 Maxillary palp；WI：翅 Wing；TA：跗足 Tarsus；MG：中肠 Midgut；MT：马氏管 Malpighian tubules。每个组织部位取 6 个生物学重复，*EF1α* 为内参基因。柱上标有不同字母代表样本之间基因表达具有显著差异（$P \leqslant 0.05$）。

Results are mean and standard errors (SE) of six biological replications (n=6). The mRNA level in each tissue is normalized by *EF1α* as reference genes. Histograms with different letters indicate significant difference among the tissues ($P \leqslant 0.05$).

2.2　触角窝注射双链 ds*CYP3117C1* 对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

图 3 为飞蝗两边触角窝同时注射双链 ds*CYP3117C1* 对 *LmCYP3117C1* 基因表达量的影响。从图 3 中可以看出，在两端触角窝注射 ds*CYP3117C1*，24 h 后飞蝗雌虫和雄虫触角 *LmCYP3117C1* 基因表达量显著降低，雌虫和雄虫沉默效率分别为 76.84%和 87.51%，但在其他组织部位（下颚须、翅、跗足、其余整虫）*LmCYP3117C1* 基因表达量没有显著变化。

2.3　腹部注射双链 ds*CYP3117C1* 对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

图 4 为注射双链 ds*CYP3117C1* 于飞蝗腹部对 *LmCYP3117C1* 基因表达量的影响。从图 4 中可以看出，腹部注射 ds*CYP3117C1* 24 h 后飞蝗雌雄虫触角的 *LmCYP3117C1* 基因表达量均显著降低，其中雌虫触角沉默效率达 68.60%，雄虫沉默效率达 61.10%。另外，飞蝗雌虫跗足 *LmCYP3117C1* 基因也显著降低，但下颚须、翅、其余整虫目的基因表达量没有显著变化；飞蝗雄虫下颚须，其余整虫 *LmCYP3117C1* 基因有显著降低，但翅和跗足目的基因表达量没有显著变化。

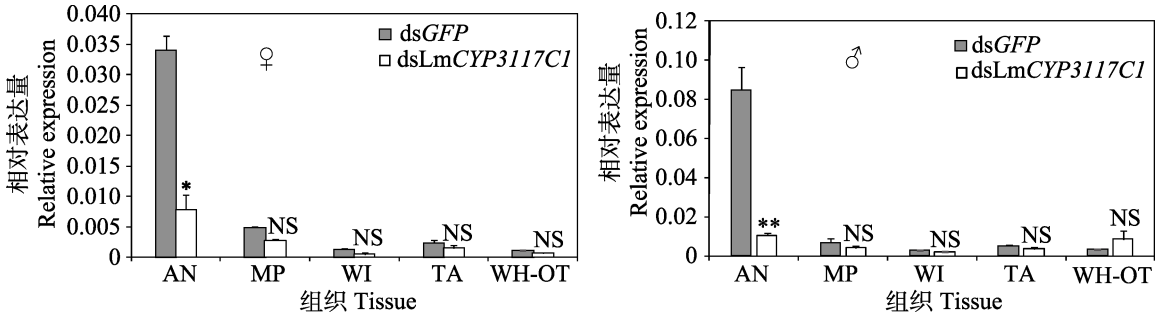

图 3　触角窝两边注射 ds*CYP3117C1* 对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

Fig. 3　The effects of injecting ds*CYP3117C1* in both antennal sockets on the expression levels of *LmCYP3117C1* gene in *Locusta migratoria*

AN：触角 Antenna；MP：下颚须 Maxillary palp；WI：翅 Wing；TA：跗足 Tarsus；WH-OT：其余整虫 Other parts of the whole body；每个组织部位取 3 个生物学重复，2 个技术重复。*EF1α* 为内参基因。*代表基因表达具有显著差异（P<0.05），**代表基因表达具有极显著差异（P<0.01），NS 代表没有显著差异。下图同。

Results are mean and standard errors (SE) of the three biological replications (n=3), each with two technical replications. The mRNA level in each tissue is normalized by *EF1α* as reference genes. * indicates significant difference between the treatments and the control (P< 0.05). **indicates extremely significant difference between the treatments and the control (P< 0.01). NS indicates no significant difference between the treatments and the control. The same below.

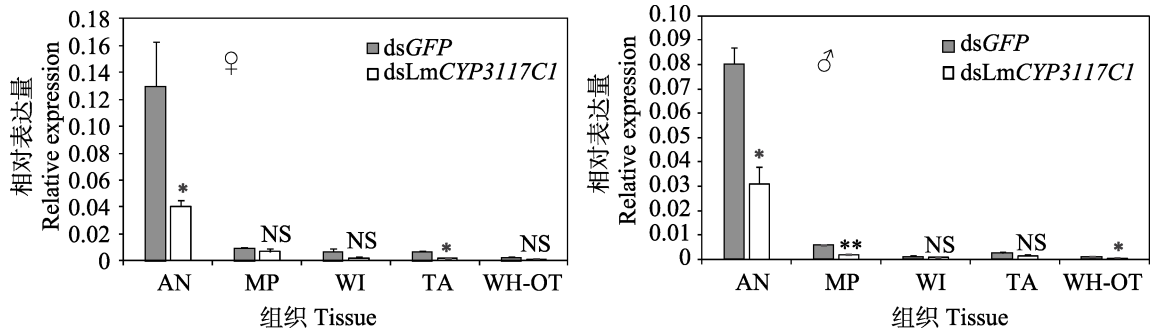

图 4　腹部注射 ds*CYP3117C1* 对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

Fig. 4　The effects of injecting ds*CYP3117C1* in abdomen on the expression levels of *LmCYP3117C1* gene in *Locusta migratoria*

2.4　不同溶剂溶解 ds*CYP3117C1* 浸泡飞蝗触角对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

图 5 是将双链 ds*CYP3117C1* 溶于 DEPC 水中浸泡飞蝗触角对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响。可以看出，雌虫和雄虫触角分别浸泡 1，3，5 min 后 *LmCYP3117C1* 基因表达均没有发生显著变化。

图 6 是将双链 ds*CYP3117C1* 溶于丙酮与水的混合溶剂中（丙酮：DEPC 水（1：1）），浸泡飞蝗触角不同时间对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响。可以看出，不同时间浸泡雌雄虫触角对 *LmCYP3117C1* 基因表达水平均无显著差异。

图 7 是将双链 ds*CYP3117C1* 溶于含 0.1% Triton X-100 的 DEPC 水中，不同时间浸泡飞蝗触角对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响。可以看出，雌虫和雄虫触角中 *LmCYP3117C1* 基因表达没有发生明显变化，且没有随着浸泡时间的变化而变化。

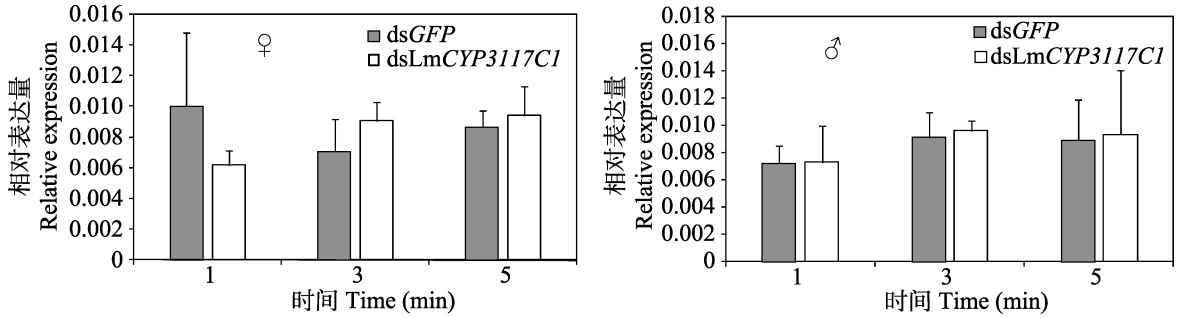

图 5　ds*CYP3117C1* 溶于 DEPC 水中浸泡飞蝗触角对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

Fig. 5　The effects of soaking antennae into ds*CYP3117C1* dissolved in DEPC water on the expression levels of *LmCYP3117C1* gene in *Locusta migratoria*

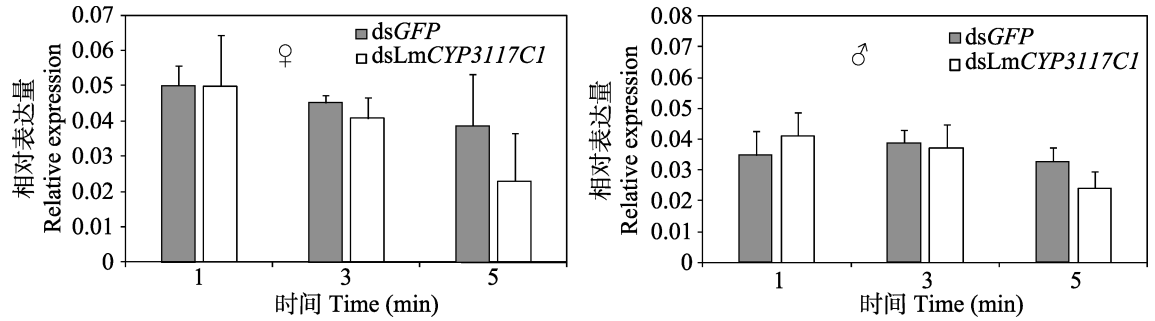

图 6　ds*CYP3117C1* 溶于丙酮与水（1：1）的混合溶剂中浸泡飞蝗触角对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

Fig. 6　The effects of soaking antennae into ds*CYP3117C1* dissolved in DEPC water and acetone (1：1) on the expression levels of *LmCYP3117C1* gene in *Locusta migratoria*

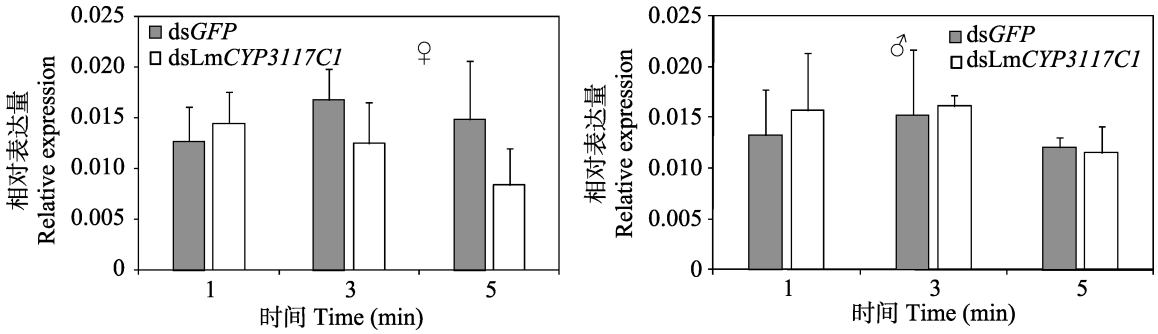

图 7　ds*CYP3117C1* 溶于含 0.1% Triton X-100 的 DEPC 水中浸泡触角对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

Fig. 7　The effects of soaking antennae into ds*CYP3117C1* dissolved in DEPC water including 0.1% Triton X-100 on the expression levels of *LmCYP3117C1* gene in *Locusta migratoria*

2.5　不同溶剂溶解双链 ds*CYP3117C1* 涂抹飞蝗触角对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

图 8 将双链 ds*CYP3117C1* 溶解于 DEPC 水中，并将双链涂抹于飞蝗触角表面检测其对 *LmCYP3117C1* 基因表达量的影响。从图 8 中可以看出，飞蝗雌虫和雄虫触角 *LmCYP3117C1* 基因表达水平均无显著变化。

图 9 将双链 ds*CYP3117C1* 溶解于含 0.1% Triton X-100 的 DEPC 水中，并将双链涂抹于飞蝗触角表面检测其对 *LmCYP3117C1* 基因表达量的影响。从图 9 中可以看出，飞蝗雌雄虫触角 *LmCYP3117C1* 基因表达量没有显著变化。

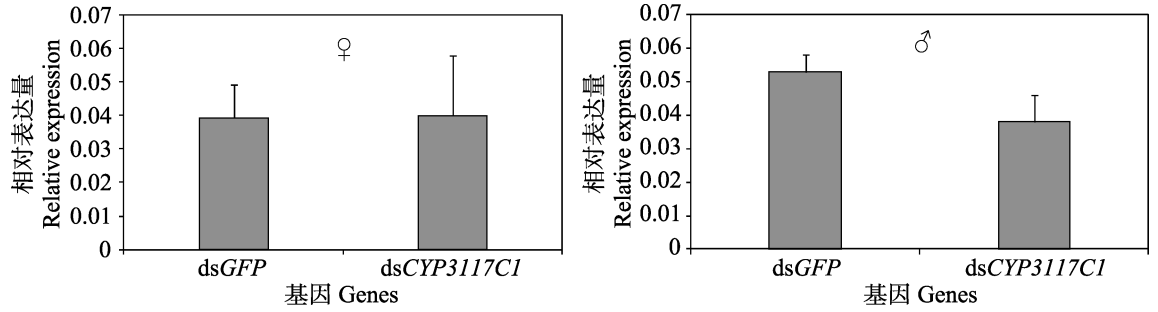

图 8　ds*CYP3117C1* 溶于 DEPC 水中涂抹飞蝗触角对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

Fig. 8　The effects of brushing ds*CYP3117C1* dissolved in DEPC water on antennae on the expression levels of *LmCYP3117C1* gene in *Locusta migratoria*

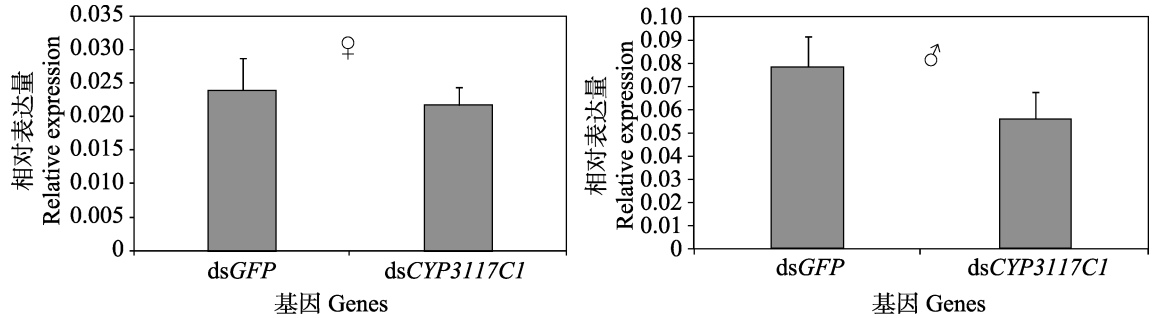

图 9　ds*CYP3117C1* 溶于含 0.1% Triton X-100 的 DEPC 水中涂抹触角对 *LmCYP3117C1* 基因表达的影响

Fig. 9　The effects of brushing ds*CYP3117C1* dissolved in DEPC water including 0.1% Triton X-100 on antennae on the expression levels of *LmCYP3117C1* gene in *Locusta migratoria*

3　讨论

RNAi 技术越来越广泛的应用到昆虫基因功能研究中，RNAi 优势在于特异性强，能带来经济效益，对环境相对友好，因此目前已逐渐成为防治害虫和种群保护方面新的研究热点 (赵洁和

刘小宁，2015）。将 RNAi 应用于害虫防控领域，首先是选择合适的靶基因，这些基因有些是与能量代谢相关的酶，有些是生长发育相关的激素，还有一些是与神经调控相关的蛋白等，例如：Fishilevich 等（2016）沉默了西部玉米根虫 *Diabrotica virgifera virgifera* 和新热带区的褐蝽 *Euschistus heros* 染色质重组 ATP 酶基因，结果显示西部玉米根虫和新热带区的褐蝽繁殖率显著降低。王晖等沉默了麦长管蚜 *Sitobion avenae* 和桃蚜 *Myzus persicae* 体内细胞色素 P450，结果随着 dsRNA 浓度的增大和时间的推移，麦长管蚜和桃蚜的死亡率可分别达到 75.56%和 64.44%（Wang *et al.*，2012）。

将 dsRNA 导入昆虫体内鉴定和分析靶基因功能是对昆虫基因进行 RNAi 研究和 RNAi 靶标基因筛选的主要手段。其中，dsRNA 导入方法、靶标基因 RNAi 作用区域选择、dsRNA 长度、浓度以及 dsRNA 溶剂的选择对靶标基因沉默效率高低起关键作用（Wang *et al.*，2016）。目前，常用的导入方法有以下几种：注射法、浸泡法、饲喂法和转基因法等。研究表明同一物种由于 RNA 干扰方法不同导致基因沉默效率不同，Wang 等（2016）分别用注射法和饲喂法沉默飞蝗 *CHI* 基因，将 1 μg ds*CHI* 注射进飞蝗腹腔中基因沉默效率可达 76%，然而饲喂飞蝗 36 μg ds*CHI* 靶基因却没有显著降低。RNAi 的沉默效率也与昆虫的组织部位密切相关。Telang 等（2013）发现在埃及伊蚊中，与脂肪体、中肠和腹部相比，头部和卵巢对 RNA 的干扰极不敏感。本文选择在飞蝗触角高表达的 *LmCYP3117C1* 基因作为靶基因，旨在筛选一种高效便捷的 RNAi 方法进一步研究其功能。通过在腹部注射 ds*LmCYP3117C1*，雌雄虫沉默效率达到 68.60%和 61.10%。当选择从触角窝进行注射时，沉默效率达 85%~95%，可以看出，注射法可以有效地沉默 *LmCYP3117C1*。尽管 *LmCYP3117C1* 基因在触角高表达，在腹部表达量较低，但是腹部注射仍能使触角中基因的沉默效率达 60%左右，且能引起下颚须及跗足中目的基因的有效沉默，这与 RNAi 具有系统性的特性密切相关。Zhang 等表示 RNAi 可分为细胞自主性和非细胞自主性两种 RNAi，后者又包括系统性 RNAi 和环境 RNAi，系统性 RNAi 是指 dsRNA 输送进昆虫某个组织部位，通过血液循环使 dsRNA 进入体内其他组织以及后代导致目的基因被沉默（Zhang *et al.*，2011）。在一些昆虫中通过注射 dsRNA 可实现系统性 RNAi，例如在刻克罗普斯蚕蛾 *Hyalophora cecropia* 蛹期注射 dsRNA，最终影响了下一代的胚胎发育，这可以说明 dsRNA 进入正在发育的蛹的性腺中（Terenius *et al.*，2011）。本次实验结果证明飞蝗腹部注入 dsRNA 可以实现系统性 RNAi。但是，从触角窝注射和腹部注射沉默效率的比较可以发现触角窝注射 dsRNA 用量更少、沉默效率更高，因此，触角窝注射 dsRNA 进行 RNAi 是一种高效便捷的干扰飞蝗触角高表达基因的方法。

除注射法外，浸泡法也是一种常用的干扰方法。本文通过浸泡法和涂抹法进行 RNAi 实验，浸泡法通过设置不同溶剂溶解双链，分别选择 1，3，5 min 时间梯度浸泡触角，但 24 h 后检测 *LmCYP3117C1* 沉默效率却发现基因水平表达均没有差异，涂抹法也未引起目标基因的表达量变化，这可能与蝗虫触角这一组织不易从溶液中吸收 dsRNA 有关。杨广等（2009）认为浸泡法主要适用于易从溶液中吸收 dsRNA 的特定昆虫发育阶段的组织和特殊昆虫细胞。如：赵璐等（2015）通过 dsRNA 浸泡法共干扰日本血吸虫 3 个 *S.j-pp1* 基因，结果显示该方法可有效抑制 3 个 *S.j-pp1* 基因的表达，干扰效率可达 80%~90%。杨广等将果蝇 S2 细胞浸泡于细胞循环基因 *CycE* 和 *ago* 的 dsRNA 溶液中，基因表达得到有效抑制（杨广等，2009）。浸泡法和涂抹法在飞蝗中干扰效果不明显可能与蝗虫触角结构相关。蝗虫触角表面富有表皮层（刘玉素和卢宝廉，1960），表皮层由上表皮、内表皮和外表皮组成，上表皮由护蜡层、蜡层、角质精层、多元酚层组合而成，其中蜡层的蜡质分子和角质精层形成结合，对表皮的疏水性起到很大作用，质地坚硬；表皮层主要由表皮蛋白和几丁质组成，几丁质的结构具有高度的稳定性和不溶性，几丁质和表皮蛋白以共

价键的方式结合形成糖蛋白或脂蛋白并在外表皮中经鞣化后形成坚固稳定的结构，以此抵御外来不良环境侵害（王燕等，2015），由此导致 dsRNA 不容易进入蝗虫触角内部发挥作用。因此用 dsRNA 浸泡或涂抹触角去抑制触角中基因的表达并不可行。

4　结论

本实验室以飞蝗 5 龄若虫为注射对象，以 *LmCYP3117C1* 为目标基因，通过不同 RNAi 方法的摸索，分析不同方法 RNAi 对飞蝗触角高表达基因 *LmCYP3117C1* 的沉默效率，成功筛选出一种高效便捷的 RNAi 方法—触角窝注射法，研究结果可为飞蝗触角高表达基因功能的研究和验证提供理论依据和方法，为从为飞蝗嗅觉分子机制设计特异的分子靶标奠定基础。

参考文献 **(References)**

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J, 2007. Control of *Coleopteran* insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1322–1326.

Christiaens O, Swevers L, Smagghe G, 2014. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides*, (53): 307–314.

Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabtidis elegans*. *Nature*, 1998(391): 806–807, 811.

Fishilevich E, Vélez AM, Khajuria C, Frey ML, Hamm RL, Wang H, Schulenberg GA, Bowling AJ, Pence HE, Gandra P, Arora K, Storer NP, Narva KE, Siegfried BD, 2016. Use of chromatin remodeling ATPases as RNAi targets for parental control of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) and Neotropical Brown stink bug (*Euschistus heros*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (71): 58–71.

Jing TZ, Dong YQ, Zhang HX, Liu X, 2012. Progress in pest insect control with RNAi technique. *Forest Pest and Disease*, 31(2): 19–22. [景天忠, 董瀛谦, 张海侠, 刘璇, 2012. RNAi 技术防治害虫的研究进展. 中国森林病虫, 31(2): 19–22.]

Li T, Liu L, Zhang L, Liu N, 2014. Role of G-protein-coupled receptor-related genes in insecticide resistance of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Scientific Reports*, 4(6474): 1–9.

Liu YS, Lu BL, 1960. Histological studies on the sense organs and the appendages of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* Meyen. *Acta Entomologica Sinica*, 10(3): 243–272. [刘玉素, 卢宝廉, 1960. 东亚飞蝗的感觉器官和附肢的组织构造. 昆虫学报, 10(3): 243–272.]

Liu YT, 2015. The preliminary study on *Schistosoma japonicum* tegumental protein SIOST48. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [刘艳涛, 2015. 日本血吸虫表膜蛋白 SjOST48 的初步研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]

Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1307–1313.

March JC, Bentley WE, 2007. RNAi-based tuning of cell cycling in *Drosophila* S2 cells-effects on recombinant protein yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(5): 1128–1135.

Prentice K, Christiaens O, Pertry I, Bailey A, Niblett C, Ghislain M, Gheysen G, Smagghe G, 2016. RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweetpotato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae). *Pest Management Science*, doi: 10.1002/ps.4337.

Ren D, Cai Z, Song J, Wu Z, Zhou S, 2014. dsRNA uptake and persistence account for tissue-dependent susceptibility to RNA interference in the *migratory locust*, *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology*, 23(2): 175–184.

Scott JG, Michel K, Bartholomay LC, Siegfried BD, Hunter WB, Smagghe G, Zhu KY, Douglas AE, 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*, 59(12): 1212–1221.

Telang A, Rechel JA, Brandt JR, Donnell DM, 2013. Analysis of ovary-specific genes in relation to egg maturation and female nutritional condition in the mosquitoes *Georgecraigius atropalpus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Physiology*, 59(3): 283–294.

Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Hanneke H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An C, Aymeric J, Barthel A, Bebas P, Bitra K, Bravo A, Chevalier F, Collinge DP, Crava CM, de Maagd RA, Duvic B, Erlandson M, Faye I, Felföldi G, Fujiwara H, Futahashi R, Gandhe AS, Gatehouse HS,Gatehouse LN, Giebultowicz JM, Gómez I, Grimmelikhuijzen CJ, Groot AT, Hauser F, Heckel DG, Hegedus DD, Hrycaj S, Huang L, Hull JJ, Iatrou K, Iga M, Kanost MR, Kotwica J, Li C, Li J, Liu J, Lundmark M, Matsumoto S, Meyering-Vos M, Millichap PJ, Monteiro A,

Mrinal N, Niimi T, Nowara D, Ohnishi A, Oostra V, Ozaki K, Papakonstantinou M, Popadic A, Rajam MV, Saenko S, Simpson RM, Soberón M, Strand MR, Tomita S, Toprak U, Wang P, Wee CW, Whyard S, Zhang W, Nagaraju J, Ffrench-Constant RH, Herrero S, Gordon K, Swevers L, Smagghe G, 2011. RNA interference in *Lepidoptera*: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57(2): 231–245.

Timmons L, Court DL, Fire A, 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1/2): 103– 112.

Wang H, Zhang M, Zhang XH, Xia LQ, 2012. Silencing of cytochrome P450 in *Sitobion avenae* and *Myzus persicae* through RNA interference. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(17): 3463–3472. [王晖, 张珉, 张小红, 夏兰琴, 2012. 利用 RNAi 技术沉默麦长管蚜与桃蚜细胞色素 P450. 中国农业科学, 45(17): 3463–3472.]

Wang K, Peng Y, Jian P, Fu W, Wang J, Han Z, 2016. Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation *in vivo*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology,* 77: 1–9.

Wang Y, Li DQ, Liu XJ, Li T, Ma EB, Fan RJ, Zhang JZ, 2015. Molecular characterization and RNAi-based functional analysis of Obstructor family genes in *Locusta migratoria*. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(1): 73–82. [王燕, 李大琪, 刘晓健, 李涛, 马恩波, 范仁俊, 张建珍, 2015. 飞蝗表皮蛋白 Obstructor 家族基因的分子特性及基于 RNAi 的功能分析. 中国农业科学, 48(1): 73–82.]

Whangbo JS, Hunter CP, 2008. Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*, 24(6): 297–305.

Yang G, You MS, Zhao YY, Liu CH, 2009. RNA interference in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 52(10): 1156–1162. [杨广, 尤民生, 赵伊英, 刘春辉, 2009. 昆虫的 RNA 干扰. 昆虫学报, 52(10): 1156–1162.]

Zhang H, Li H, Guan R, Miao X, 2015. Lepidopteran insect species-specific, broad-spectrum, and systemic RNA interference by spraying dsRNA on larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 155(3): 218–228.

Zhang X, Zhang JZ, Zhu KY, 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, 19(5): 683–693.

Zhang X, Zhang JZ, Zhu KY, 2011. Advances and prospects of RNAi technologies in insect pest management.// Liu T, Kang L (eds.). Recent Advances in Entomological Research. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 347–358.

Zhao J, Liu XN, 2015. Research progress on RNAi technology application in insect control. *China Plant Protection*, 35(1): 17–23. [赵洁, 刘小宁, 2015. RNAi 在昆虫控制领域的研究进展. 中国植保导刊, 35(1): 17–23.]

Zhao L, He X, Zhao JL, Ye Q, Hu M, 2015. Identification and function study of serine-threonine specific protein phosphatase SjPP of *Schistosoma japonicum*. Proceedings of the Thirteenth Symposium of Veterinary Medicine of the Chinese Academy of Animal Husbandry and Veterinary Medicine. Heilongjiang. 133. [赵璐, 何欣, 赵俊龙, 叶青, 胡敏, 2015.日本血吸虫丝/苏氨酸蛋白磷酸酶 1（PP1）编码基因的鉴定及其功能的研究. 中国畜牧兽医学会兽医寄生虫学分会第十三次学术研讨会论文集. 黑龙江. 133.]