

昆虫分子生物学技术专题

昆虫 RNAi 技术与方法*

田宏刚¹ 刘同先¹ 张文庆^{2**}

(1. 西北农林科技大学 旱区作物逆境生物学国家重点实验室 杨凌 712100;

2. 中山大学 有害生物控制与资源利用国家重点实验室 广州 510275)

摘要 RNAi 技术已在昆虫基因功能研究中取得了广泛的应用。本文主要从 dsRNA 的设计、导入方法及 RNAi 结果分析方面作了概述,并对实验过程中存在的一些关键问题如 RNAi 特异性沉默、dsRNA 导入方法的选择及不同昆虫 RNAi 多样性方面进行了讨论。

关键词 昆虫, RNAi, 注射法, 饲喂法

RNAi technology and method in insects

TIAN Hong-Gang¹ LIU Tong-Xian¹ ZHANG Wen-Qing^{2**}

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology on the Arid Areas, and Key Laboratory of Northwest Loess Plateau Crop

Pest Management of Ministry of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. State Key

Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract RNAi technology has been applied widely to the study of insect gene function. We here summarize recent research on dsRNA design, delivery methods and RNAi result analysis, and also discuss some key issues in RNAi experiments, such as the specificity of gene silencing, methods of choice for dsRNA delivery and RNAi diversity in different insect taxa.

Key words insect, RNAi, injection method, feeding method

RNAi (RNA interference) 主要指的是由 dsRNA (或 siRNA) 诱导的对靶标基因 mRNA 进行沉默的技术,由于其作用方式的相对特异性以及操作简便、实验成本相对较低的特点,在昆虫特别是遗传操作比较难的非模式昆虫中已经取得了广泛的应用 (Bellés, 2010)。在昆虫之中利用 RNAi 技术进行的研究主要集中在基因功能、RNAi 介导的转基因抗虫植物以及益虫疾病控制等方面 (Baum *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2009; Hunter *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2010)。

目前在一般昆虫学 RNAi 研究中主要是由 dsRNA 诱导靶标基因的沉默,利用 siRNA 进行的研究只占极少数,而且在赤拟谷盗 *Tribolium*

castaneum 之中的研究发现小于 31 bp 的小分子 RNA 并不能诱导 RNAi 产生 (Miller *et al.*, 2012), 因此本文所述的 RNAi 技术主要指的是由 dsRNA 介导。根据研究目的及昆虫种类的不同, dsRNA 的导入方式主要包括注射法和饲喂法。在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中,由于注射或饲喂 dsRNA 均不能诱导 RNAi 产生,目前采用的是 GAL4/GUS 系统在其体内稳定表达 dsRNA 来抑制靶标基因的表达 (Miller *et al.*, 2008)。由于 GAL4/GUS 系统在普通昆虫 RNAi 研究中的应用还存在一定的困难,因此本文主要讲述注射法和饲喂法在昆虫 RNAi 技术中的应用。本文结合作者实验室应用 RNAi 技术在昆虫学研究中的方法和经验,主要从

* 资助项目:国家重点基础研究发展计划 (2013CB127600); 国家自然科学基金 (31101432); 西北农林科技大学博士科研启动基金 (2010BSJJ06)。

** 通讯作者, E-mail: lsszwq@mail.sysu.edu.cn

收稿日期:2013-07-19, 接受日期:2013-08-02

dsRNA 的设计与合成、导入方法及 RNAi 实验结果的分析方面做一概述,同时对昆虫 RNAi 方法和技术应用中的关键问题进行了讨论。

1 dsRNA 的设计与合成

1.1 dsRNA 的设计

在 RNAi 研究中 dsRNA 指的是相对于小片段 siRNA 的长的双链 RNA,它是诱导靶标基因 mRNA 沉默的关键分子。因为 dsRNA 进入昆虫细胞内被 Dicer 酶切割成 siRNA 后其作用靶标分子为 mRNA,所以要对特定基因进行功能研究,必须首先获得其 mRNA 序列。在获得感兴趣基因 mRNA 序列的基础上,我们就可以开始针对性的设计 dsRNA。RNAi 的特点之一就是可以特异抑制靶标 mRNA 表达,导致靶标基因沉默的关键分子 siRNA 一般长度为 19 ~ 25 bp,研究发现如果设计的 dsRNA 覆盖的 mRNA 序列中与其它基因比对分析没有发现连续 19 bp 的碱基完全相同,则基本可以保证特异的对靶标基因进行沉默(Sierant *et al.*, 2010)。

研究发现虽然比较短的 dsRNA 也可以诱导靶标基因的沉默,但是长链的 dsRNA 往往会更有效,在赤拟谷盗中的研究发现相同浓度的长链 dsRNA (520 bp) 比短链 dsRNA (69 bp) 抑制靶标基因表达的持续时间要长 63 d (Miller *et al.*, 2012)。在昆虫 RNAi 大多数研究中设计 dsRNA 的长度基本在 400 ~ 600 bp 左右即可有效诱导靶标基因的沉默。虽然按照这个原则设计的 dsRNA 可以保障大多数基因被特异性沉默,但是由于在非模式昆虫中许多基因的信息还是未知,因此也有可能产生非靶标基因沉默而产生脱靶效应 (off target effects, OTEs)。现在研究表明如果针对同一基因的不同区域设计不同的 dsRNA,则可以有效避免 OTEs (Seinen *et al.*, 2010; Booker *et al.*, 2011),因此对于基因信息不是很完整的昆虫而言针对基因的多个区域设计 dsRNA 是研究具体基因功能及避免假阳性结果干扰的有效方法。一般设计的 dsRNA 基本覆盖在 mRNA 的 ORF 区域,根据现有的研究经验,靠近 mRNA 3' 端设计的 dsRNA 有相对较高的沉默效率。

1.2 dsRNA 的合成

现在进行的 RNAi 实验所用的 dsRNA 一般均

可由商业化生物公司生产的 RNAi 试剂盒合成,现在应用较广泛的试剂盒有 T7 RiboMAX™ Express System (Promega)、MEGAscript RNAi Kit (Ambion) 和 MEGAscript T7 High Yield Transcript Kit (Ambion) 等。

根据要研究基因的不同,试剂盒合成时首先要根据靶标基因的 mRNA 序列设计引物以扩增目的片段,设计的用于 dsRNA 合成的引物在其 5' 端含有一段 T7 启动子序列 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') 来转录形成 ssRNA (single strand RNA)。然后就是利用设计的含有 T7 启动子的引物来扩增目的基因片段,得到用于 ssRNA 合成的模板。由于单个碱基的突变就会对 RNAi 效率产生极大的影响,为了避免 PCR 扩增获得的模版序列个别碱基的错误,必须对获得的模板进行测序确认目的基因序列的准确性。为了方便大量 dsRNA 的合成,可以将含有目的基因片段的载体放在大肠杆菌中保存,这样以后需要时只需要扩大培养提取质粒即可迅速获得目的基因片段,不仅缩短了实验时间且可以保证获得片段的一致性。在获得模板的基础上即可以按照 RNAi 试剂盒中提供的试剂在一定反应条件体外分别合成正义链和反义链 ssRNA,然后将两条互补的 ssRNA 混合退火即可形成 dsRNA。对上述获得的 dsRNA 纯化并电泳检测后即可用于 RNAi 研究。在对纯化的 dsRNA 干燥时要避免过度干燥,否则获得的 dsRNA 很难溶于 DEPC 水中,影响后续实验的准确性。

除了采用商业化的试剂盒可以合成 dsRNA 以外,利用可以表达 dsRNA 的质粒在特定的大肠杆菌中也可以获得所需的 dsRNA。采用大肠杆菌合成 dsRNA 的原理与试剂盒合成的相似。作者实验室采用的是含有双向 T7 启动子的 L4440 载体 (可从美国 Addgene 机构索取) (Timmons *et al.*, 2001),首先是将靶标基因选取合适的限制性内切酶位点连接进 L4440 载体中,构建 dsRNA 重组表达载体。构建好的载体要进行测序确认正确性,然后将连接正确的重组载体转入用于 dsRNA 表达的大肠杆菌菌株 HT115 (DE3) 之中,利用 IPTG 诱导表达。其中 HT115 (DE3) 为 RNase III 缺陷性的 Tet 抗性菌株,避免了在大肠杆菌中表达的 dsRNA 被在菌体内切割,有效提高了 RNAi 的效率。为了确保使用的诱导条件表达出了目的 dsRNA,需要

对表达后的 dsRNA 利用电泳检测,采用不含目的基因的空载体作为对照即可方便的查看表达的目的 dsRNA 片段。

2 昆虫 RNAi 的导入方法

2.1 注射法

要利用 RNAi 技术对昆虫靶标基因进行功能分析,采用有效的方式将 dsRNA 导入昆虫体内是实验的关键。在大部分昆虫 RNAi 研究之中,利用注射法导入 dsRNA 是常用且有效的方法之一。注射时首先要选取合适发育时期的昆虫,对于活动性强的昆虫进行适当的麻醉后(采用乙醚、CO₂ 或冰)再注射可以避免由于虫体扭动而使注射的 dsRNA 流出体外。注射幼虫时可以从腹足或体侧沿从头部向尾部方向注射,因为昆虫的血液流动在背血管以外是从头向尾,这样可以最大程度的避免 dsRNA 由于体液的流动而被排出体外。此外,通过适当降低合成 dsRNA 浓度并增加注射量的方法也是减少流出体外的 dsRNA 损失的有效方法。注射采用的工具可以是拉细的毛细管、手动或自动微量注射器等,这可根据试验虫体的大小及具体试验条件进行选择。根据在一般昆虫中进行的 RNAi 试验表明,相同的 dsRNA 浓度下龄期相对小的虫子诱导 RNAi 效果更佳一些。但不是对所有昆虫的所有基因都是这样,必须要根据自己的研究进行试验才能明确。

2.2 饲喂法

饲喂法是在注射法的基础上发展而来,对于一些难以采用注射导入 dsRNA 的昆虫而言是一种有效的研究方法。同时,因为采用饲喂导入 dsRNA 的方式与昆虫的自然取食方式非常相似,所以此方法也可以用作 RNAi 介导的转基因抗虫作用靶标基因的快速筛选。

由于不同昆虫的取食量及取食方式存在差异,因此通过饲喂导入 dsRNA 的具体方法也有所不同。对于取食量小且可用人工饲料饲养的昆虫而言,直接采用试剂盒合成的 dsRNA 即可。研究时可以将 dsRNA 与昆虫人工饲料混合在一起让昆虫取食,根据昆虫的取食量及研究目的 dsRNA 可以 2 d 进行一次更换(Chen *et al.*, 2010)。由于饲喂法诱导 RNAi 的效率较注射法低,因此通过一次饲喂往往很难看到效果,一般均要通过持续性的

饲喂才可以抑制靶标基因的表达,具体的时间要根据自己的研究来确定,饲喂的方式与该种类的昆虫人工饲养的方法相同。为了增加 dsRNA 的有效摄入量,也可以将昆虫饥饿适当时间后再进行饲喂。

对于一些幼虫期取食量较大的昆虫,如果采用试剂盒合成的 dsRNA 进行试验会极大的增加实验的成本。作者实验室利用大肠杆菌表达 dsRNA 的方法饲喂甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 也可有效抑制靶标基因的转录水平,并有效降低了实验的成本(Tian *et al.*, 2009)。如果采用表达 dsRNA 的大肠杆菌菌液直接进行试验浓度一般达不到要求,必须对菌液离心富集后才能进行实验。富集后的菌液用无菌水稀释后即可用于实验,我们的实验表明,高浓度的菌液可更有效降低靶标基因的表达。饲喂时将含 dsRNA 的菌液与昆虫的人工饲料混合,饲料的大小尽量要与昆虫的食量相适应,以使混合的 dsRNA 尽可能被昆虫吃完。由于混合菌液的饲料粘度相对较大,所以饲喂时菌液和饲料应当每天都进行更换,避免由于饲料过度干燥而使昆虫无法正常取食引起异常死亡。

除这两种方法以外,最近有报道可以通过将植物叶片浸泡在 dsRNA 溶液中,然后让供试昆虫取食植物叶片也可以诱导 RNAi 产生(Luan *et al.*, 2013)。这种方法的优点是对于一些没有合适人工饲料的昆虫可以利用这种饲喂的方式诱导靶标基因的沉默,此外相对于 RNAi 介导的转基因植物而言也可以快速模拟类似的基因沉默效果;缺点就是这种方式需要的 dsRNA 量比较高,会增加实验的成本。利用 RNAi 介导的转基因植物饲喂昆虫的原理与方法都与以上类似,不同点在于转基因植物中表达的是昆虫目标基因片段的 hpRNA (hairpin RNA),但会被体内的相关内切酶剪切形成 dsRNA,这种方法的关键是获得含有靶标基因的有效目标植物。

3 昆虫 RNAi 结果分析

在一种特定的昆虫中要明确 dsRNA 是否诱导了 RNAi 的产生,最关键的就是要看靶标基因的转录水平是否被抑制,同时为了确认 RNAi 的特异性,还应当对非靶标基因的表达进行检测。实验结果的初步检测可以采用半定量 PCR 的方法,要定量检测 mRNA 的表达情况,可以采用定量 PCR

的方法进行检测。利用 PCR 方法检测时为了避免提取的 RNA 混入导入的 dsRNA 对实验结果的准确性造成一定的影响,PCR 检测片段的区域最好选择在非 dsRNA 设计区域。

特定的基因在昆虫发育过程之中一般均具备一定的作用,因此 dsRNA 对昆虫的影响不仅表现在可抑制基因的表达,更重要的是揭示具体基因在昆虫发育之中的功能。这些影响在宏观方面一般表现在昆虫的表型,存活率、发育历期及产卵量等生物学参数,同时某些基因被抑制后还会对昆虫的行为造成的一定的影响,还应当从行为学方面分析这些基因的功能。在微观方面可能会对昆虫的组织器官、细胞产生一定的影响,这还应当利用相关技术从组织、细胞水平对基因的具体功能进行分析。

4 讨论

昆虫 RNAi 研究的核心目的之一是研究相关基因的功能,此外筛选合适的基因用于 RNAi 植物介导的害虫控制亦是研究的重要目标。特异性的基因沉默是 RNAi 的重要特点,但根据研究目的之不同所设计的 dsRNA 并非一定要沉默特定的基因。例如如果想同时研究同一家族几个基因的功能,则在这些基因的保守域设计 dsRNA 即可同时沉默多个基因以达到研究目的。但对于要特异性沉默的基因而言,设计恰当的 dsRNA 以避免 OTEs 对实验结果准确性的影响是成功的关键 (Booker *et al.*, 2011)。对于 RNAi 介导的转基因抗虫植物而言,不仅要筛选对昆虫发育有重要影响的基因,而且还要保证这些基因不会对天敌、哺乳动物和人等非靶标生物产生不良影响。

目前的研究表明在大多数昆虫之中通过注射或饲喂的方法均可以诱导 RNAi,但通过研究范围的不断扩大发现并不是在所有昆虫的任何基因中都可以采用这两种方法抑制靶标基因的转录水平。例如在果蝇幼虫和成虫之中通过这两种方式均不能诱导 RNAi (Winston *et al.*, 2002); 对于某些鳞翅目昆虫的一些基因 RNAi 也很难被诱导 (Terenius *et al.*, 2011); 在美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* 中通过注射 dsRNA 可以有效抑制相关基因的表达,但是通过饲喂的方法却不能诱导 RNAi,初步研究发现可能是其唾液中的某些物质将 dsRNA 降解使其无法进入细胞内 (Allen and

Walker Iii, 2012)。这些研究结果表明在不同昆虫之中 RNAi 存在多样性,在目前对于昆虫中多样的 RNAi 机制并不清楚的情况下唯有通过实验才能确认 RNAi 是否对于特定昆虫的特定基因有效。

通过上面的例子我们也发现并不是所有的昆虫通过饲喂 dsRNA 的方式均可诱导 RNAi,同时目前大多数研究的结果也表明与注射法相比饲喂法不仅需要较大量的 dsRNA 而且其诱导基因的沉默效率也相对较低。如果我们仅是研究感兴趣的昆虫相关基因的功能,那么在技术可行的情况下注射法即可满足要求;如果我们的目的是筛选感兴趣的可用于 RNAi 介导转基因植物的抗虫基因,则饲喂法是必须的选择。因此,选择何种 dsRNA 导入方法一定要根据自己的研究目的来确定。

我们知道昆虫种类繁多,类似的现象也表现在昆虫 RNAi 多样性之中。不同昆虫之中诱导 RNAi 所需的 dsRNA 量也存在较大的差异,即使针对同一种昆虫的不同基因诱导相应基因沉默的 dsRNA 量也存在差别,昆虫的某些组织例如神经组织往往很难诱导 RNAi 产生。一些与昆虫发育有密切关系的基因沉默可能会导致产生可见的表型,但是对于一些与昆虫行为相关的基因可能并不会产生任何表型,还需要通过行为学反应等方式才能阐明相应基因的功能。有的基因被抑制后在昆虫当代中并不会对其发育产生影响,然而其影响可能会表现在子代中。同时,由于 RNAi 只是从转录水平上一定程度的抑制了基因的表达,并不是将基因敲除,所以导入昆虫体内的 dsRNA 若被消耗完后相应基因的表达量还会回复到原来水平,因此 RNAi 的作用只是表现在一定时间内,这就要求我们必须通过相关实验选择合适的检测时期以分析基因被抑制时对昆虫的影响。在饲喂 RNAi 研究时,即使对同一批昆虫同时采用相同方法诱导 RNAi,一般也很难保证每个虫体内的相关基因均被沉默,所以选择合适的实验样本数量和重复次数是得到可靠研究结果的重要保障。RNAi 作为昆虫基因功能及功能基因组研究的一个重要技术,相信肯定会帮助我们揭示更多昆虫世界的基因奥秘,发展出更有效安全的害虫防治新技术。

参考文献 (References)

Allen ML, Walker Iii WB, 2012. Saliva of *Lygus lineolaris*

- digests double stranded ribonucleic acids. *J. Insect Physiol.*, 58(3):391–396.
- 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. *Nat. Biotech.*, 25(11):1322–1326.
- Bellés X, 2010. Beyond *Drosophila*: RNAi *in vivo* and functional genomics in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 55(1):111–128.
- Booker M, Samsonova A, Kwon Y, Flockhart I, Mohr S, Perrimon N, 2011. False negative rates in *Drosophila* cell-based RNAi screens: a case study. *BMC Gen.*, 12(1):50.
- Chen J, Zhang D, Yao Q, Zhang J, Dong X, Tian H, Zhang W, 2010. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol. Biol.*, 19(6):777–786.
- Hunter W, Ellis J, van Engelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, Glick E, Williams M, Sela I, Maori E, Pettis J, Cox-Foster D, Paldi N, 2010. Large-scale field application of RNAi technology reducing israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathog*, 6(12):e1001160.
- Luan JB, Ghanim M, Liu SS, Czosnek H, 2013. Silencing the ecdysone synthesis and signaling pathway genes disrupts nymphal development in the whitefly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(8):740–746.
- Miller S, Brown S, Tomoyasu Y, 2008. Larval RNAi in *Drosophila*? *Dev. Gen. Evol.*, 218(9):505–510.
- Miller SC, Miyata K, Brown SJ, Tomoyasu Y, 2012. Dissecting systemic RNA interference in the red flour beetle *Tribolium castaneum*: parameters affecting the efficiency of RNAi. *PLoS ONE*, 7(10):e47431.
- Seinen E, Burgerhof JGM, Jansen RC, Sibon OCM, 2010. RNAi experiments in *D. melanogaster*: solutions to the overlooked problem of off-targets shared by independent dsRNAs. *PLoS ONE*, 5(10):e13119.
- Sierant M, Kazmierczak-Baranska J, Padaszynska A, Sobczak M, Pietkiewicz A, Nawrot B, 2010. Longer 19-base pair short interfering RNA duplexes rather than shorter duplexes trigger RNA interference. *Oligonucleotides*, 20(4):199–206.
- Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An C, Aymeric JL, 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, Grimmekhuijzen CJP, 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, French-Constant RH, Herrero S, Gordon K, Swevers L, Smaghe G, 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.*, 57(2):223–245.
- Tian H, Peng H, Yao Q, Chen H, Xie Q, Tang B, Zhang W, 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS ONE*, 4(7):e6225.
- Timmons L, Court D, Fire A, 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1/2):103–112.
- Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP, 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295(5564):2456–2459.
- Yao Q, Zhang D, Tang B, Chen J, Chen J, Lu L, Zhang W, 2010. Identification of 20-hydroxyecdysone late-response genes in the chitin biosynthesis pathway. *PLoS ONE*, 5(11):e14058.