应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2016, 53(2): 347−356. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2016.046

马铃薯甲虫两个系统性 RNA 干扰缺失基因 cDNA 的克隆、序列分析和时空表达*

杨 帅[1**] 付开赞[2] 吴家和[3] 李国清[4] 吐尔逊[2] 郭文超[2***]

（1. 石河子大学农学院，石河子 832003；2. 新疆农业科学院植物保护研究所，乌鲁木齐 830091；
3. 中国科学院微生物研究所植物基因组学国家重点实验室，北京 100101;
4. 南京农业大学植物保护学院农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室，南京 210095）

摘 要 **【目的】** 克隆马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Say) 两条 Sid-1 基因的全长并分析其时空表达。**【方法】** 本研究通过 RT-PCR 和 5′/3′ RACE 等技术从马铃薯甲虫中克隆全长序列，通过序列多重比对和系统发育分析研究序列的保守性和基因起源，通过阶段收样，组织解剖和 qPCR 技术获得这两个基因的时空表达。**【结果】** 从马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的 4 龄幼虫中克隆得到 LdeSid-1a 和 LdeSid-1c，其 mRNA 全长为 2 887 和 3 733 bp，编码 759 和 782 个氨基酸，分子量为 86.19 和 90.27 ku，两条蛋白质序列的相似性为 59%。与其它昆虫的系统性 RNA 干扰缺失基因的比对结果显示，LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 分属于鞘翅目系统性 RNA 干扰缺失基因的两个分支，均具有典型的 11 个跨膜域结构，在蛋白质序列的 N 端具有 4 段高度保守的基序。qPCR 的时序分析表明 LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 的表达从初孵幼虫开始逐渐上升，而 LdeSid-1c 在卵中的表达也较高，组织中的分布结果表明，两个基因在所有组织中均表达，在前肠、中肠和后肠以及生殖系统中表达较高，在神经系统中为优势表达。LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 的 GenBank 登录号为 KR153284 和 KR153285。**【结论】** LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 具有典型的系统性 RNA 干扰缺失基因家族的结构，时空表达和系统发育的结果均表明这两条基因可能在幼虫的高龄阶段起到重要作用。

关键词 马铃薯甲虫，系统性 RNA 干扰缺失基因，时空表达，定量 PCR，mRNA 水平

Molecular cloning, sequence analysis and expression profiles of LdeSid-1a and LdeSid-1c genes in *Leptinotarsa decemlineata* (Say)

YANG Shuai[1**] FU Kai-Yun[2] WU Jia-He[3] LI Guo-Qing[4]
Tuerxun[2] GUO Wen-Chao[2***]

(1. College of Agronomy, Shihezhi University, Shihezi 832003, China; 2. Research Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China; 3. State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science; 4. Department of Entomology, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract **[Objectives]** To clone and analyze two Sid-1 full coding sequences and expression profiles in *Leptinotarsa decemlineata*. **[Methods]** Full coding sequences of two Sid-1s were amplified by RT-PCR and RACE-PCR, conserved motifs and origin of Sid-1s were analyzed by multiple alignment and construction of phylogenetic trees, and temporal and spatial expression levels detected by qPCR. **[Results]** A full Open Reading Frame (ORF) of LdeSid-1a and LdeSid-1c were cloned by RT-PCR and 5′/3′ RACE from 4th instar larvae of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. The respective mRNA fragments were 2 887 and 3 733 base pairs in length, encoding proteins comprised of 759 and 782 amino

* 资助项目 Supported projects：新疆维吾尔自治区援疆项目：马铃薯甲虫“自毁”基因鉴定和抗虫马铃薯培育（30270896）；农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室开放基金：基于体色相关基因的马铃薯甲虫 RNA 干扰效力研究（KFJJ20160101）；新疆农业科学院公益性基本科研业务：基于马铃薯甲虫蛋白酶体的 RNA 干扰高效致死基因挖掘及初步应用

**第一作者 First author，E-mail：1329547509@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：gwc1966@163.com

收稿日期 Received：2015-08-04，接受日期 Accepted：2015-12-28

acids with a predicted molecular mass of approximately 86.19 and 90.27 ku. Similarity of these two proteins was 59%. Alignment of LdeSid-1a and LdeSid-1a with Sid-1s of other insects indicates that LdeSid-1a and LdeSid-1c are members of Coleptera Sid-1s family. LdeSid-1a and LdeSid-1c possess 11 transmembrane structures and 4 highly conserved motifs at the N-terminal. The temporal expression pattern of LdeSid-1a and LdeSid-1c determined by qPCR shows that expression of these two genes gradually increases as larvae grow; LdeSid-1c is highly expressed in the egg stage. Spatial expression patterns indicate that these two genes were expressed in all tested tissues; moderately expressed in the digestive system, including the foregut, midgut and hindgut, and predominantly expressed in the nervous system. The LdeSid-1a and LdeSid-1c sequences have been deposited with GenBank under Accession Numbers KR153284 and KR153285. **[Conclusion]** LdeSid-1a and LdeSid-1c have typical Sid-1 structure and expression patterns, and phylogenetic analysis indicate these two genes may play key roles in larval development.

Key words *Leptinotarsa decemlineata*, Sid-1, spatial and temporal expression pattern, real-time quantitive PCR, mRNA transcrpt level

RNA 干扰（RNA inteference，RNAi）是一种最早在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 发现，被 dsRNA 触发并引起序列特异性表达沉默的现象（Fire *et al.*，1998）。目前 RNAi 在农业中用于植物保护防控害虫具有很强的应用前景（Burand and Hunter，2012；Mao *et al.*，2007；Price *et al.*，2008；Tian *et al.*，2009）。研究表明，一些物种具有系统性 RNAi（Systemic RNAi），即 dsRNA 或其它的 RNA 信号可以穿过细胞之间的屏障，在细胞水平使沉默效果在局部组织甚至整个个体中传播。Sid-1（Systemic RNA inteference defective-1）最初是在线虫中发现的第一个 Sid 家族成员，通过基因敲除的方法筛选到该基因的缺失会直接导致线虫系统性 RNAi 过程的缺失（Winston，2002）。随后，在线虫中陆续发现了 Sid-2，Sid-3 和 Sid-5 共 4 个与系统性干扰相关的基因（Andrea *et al.*，2012）。在昆虫的研究中，黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 等双翅目昆虫并不具有 Sid-1 的直系同源基因，也不具有系统性 RNAi 的效果（Miller *et al.*，2008），然而使黑腹果蝇的 S2 细胞表达线虫的 Sid-1，细胞就可以吸收 dsRNA 并表现系统性 RNAi 的效应。在线虫中，将 RNAi 不敏感的神经组织表达 Sid-1 可使线虫提高 RNAi 的效率（Winston，2002）。上述的种种实验结果表明线虫的 Sid-1 参与到细胞对 dsRNA 的吸收过程。

目前 Sid-1 除双翅目，也在许多昆虫中有所报道并且证明了 Sid-1 的功能（Aronstein *et al.*，2006；Hinas *et al.*，2012；Luo *et al.*，2012；Wang *et al.*，2014）。如赤拟谷盗具有 3 个 Sid-1（Tomoyasu *et al.*，2008）。鳞翅目的家蚕 *Bombyx mori* 对 RNAi 的敏感性较弱，但是具有 3 个 Sid-1 的同源基因（Tomoyasu *et al.*，2008）。然而，在双翅目昆虫的一些组织中 Sid-1 同源基因并不表达却能够吸收 dsRNA（Winston，2002），因此昆虫中的 Sid-1 和系统性 RNAi 可能并不具有直接联系（Tomoyasu *et al.*，2008）。目前对更多昆虫 Sid-1 基因的功能研究是了解昆虫系统性 RNAi 效应所必需的。

在本研究中，通过 RT-PCR 和 5′/3′ RACE（Rapid amplification of cDNA ends）克隆获得马铃薯甲虫的两条 Sid-1 的完整编码的 cDNA，LdeSid-1a 和 LdeSid-1c。序列比对和系统发育分析表明这两个基因属于鞘翅目类群的 Sid-1。qPCR 的时序分析表明 LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 的表达从初孵幼虫开始逐渐上升，而 LdeSid-1c 在卵中的表达也较高，组织中的分布结果表明，两个基因在所有组织中均表达，在前肠、中肠和后肠以及生殖系统中表达较高，在神经系统中为优势表达。

1 材料与方法

1.1 马铃薯甲虫的收集和饲养

马铃薯甲虫卵从新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市安宁渠试验地马铃薯苗上采集。虫卵孵化后用马铃薯叶片进行饲养。饲养条件为温度（26±1）°C、

相对湿度 50%~60%和光周期 16L∶8 D。

1.2　主要试剂

总 RNA 提取试剂为 TRIzol（货号 10296028，Invitrogen，美国）；反转录试剂为 SuperScript III 反转录酶（货号 18080-044，Invitrogen）、Oligo（dT）18 随机引物（货号 3805，Takara，日本）和 RNA 酶抑制剂（货号 2311A，Takara）；PCR 反应试剂为 La Taq DNA 聚合酶、2.5 mmol/L 和 10 mmol/L 的 dNTP mixture（货号 RR02MB，4030 和 4019，Takara），和 DL500 DNA Marker（货号 3590A，Takara）；基因的连接和转化反应的试剂盒为 pGEM-T easy vector system II（A1380，Promega，美国）和感受态细胞 TransB（DE3）（CD811-02，全式金，中国）；DNA 凝胶回收采用试剂盒提取（货号 AP-GX-50，AXYGEN，美国）；基因序列的全长通过 RACE 试剂盒（货号 18374-058，Invitrogen）获得；引物由南京金斯瑞公司合成。

1.3　马铃薯甲虫两个 Sid-1 cDNA 的获取

马铃薯甲虫的转录组数据获取自 Kumar 等（2014）提供的结果。马铃薯甲虫的基因组数据获取自 https://www.hgsc.bcm.edu/arthropods/colorado-potato-beetle-genome-Project，版本为 3.0，该数据为贝勒医学院人类基因组测序中心（Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center）公布的数据。利用 2009 年赤拟谷盗中报道的 3 条 Sid-1 序列（Tomoyasu *et al.*，2008），通过 tblastn 相似性搜索获得马铃薯甲虫 Sid 转录本片段，获得的序列再通过 NCBI 在线 blastp 搜索 nr 数据库分析鉴定转录本片段。随后依赖下述 1.4-1.7 的分子技术手段获得两条 Sid-1 基因的完整开放阅读框。

1.4　马铃薯甲虫总 RNA 的提取

1.4.1　用 TRIzol 试剂提取总 RNA　取大约 100 mg 马铃薯甲虫材料，液氮研磨至粉状，加 1 mL Trizol 试剂匀浆，转入 1.5 mL Eppendorf 管中，4°C 12 000 g 离心 15 min，上清液转入另一个洁净的 1.5 mL Eppendorf 管中，上清液 15~30°C 温育 10 min 后加入 0.2 mL 氯仿，用力摇匀，15~30°C 温育 10 min；2~8°C 条件下 12 000 g 离心 20 min，用枪头将上层水相转移到另一个洁净的 Eppendorf 管中，加入 0.5 mL 异丙醇沉淀 RNA，15~30°C 温育 10 min，2~8°C 条件下 12 000 g 离心 10 min；弃上清，用 1 mL 75%乙醇洗 1 次。涡旋振荡样品，2~8°C 条件下 7 500 g 离心 5 min；重复以上步骤。空气或真空干燥 5~10 min，加 30 μL 无 RNase 的水，用枪头吸几次，60°C 温育 10 min。－70°C 贮存备用。

1.4.2　去除 RNA 中的基因组 DNA　在 Eppendorf 管中配制反应液，其中包含总 RNA 20 μg，10× DNase I Buffer 5.0 μL，DNase I（RNase-free，5 U/μL）2 μL，RNase Inhibitor（40 U/μL）0.5 μL，最终补双蒸水至 50 μL。混合液于 37°C 反应 30 min；加入 50 μL 的 DEPC 处理 H_2O；加入 100 μL（等量）的苯酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1），充分混匀、离心，取上层（水层）移至另一微量离心管中；加入 100 μL（等量）的氯仿/异戊醇（24∶1），充分混匀、离心，取上层（水层）移至另一微量离心管中；加入 10 μL（1/10 量）的 3 mol/L NaOAC（pH5.2）；加入 250 μL（2.5 倍量）的冷无水乙醇，－20°C 放置 30~60 min；离心回收沉淀，用 70%的冷乙醇清洗沉淀，真空干燥；加入适量的 DEPC H_2O 溶解后，进行琼脂糖凝胶电泳确认是否除去基因组 DNA，并用 Nanodrop 核酸定量仪测定其纯度和浓度，符合标准的总 RNA 置于－70°C 超低温冰箱保存备用。

1.5　cDNA 第一链合成

混合足量总 RNA（1 μg）与 1 μL 的反转录引物 Oligo（dT）$_{18}$（50 μmol/L）共计 6 μL；70°C 水浴下保温 5 min，迅速急冷 2 min，离心数秒收集于 Eppendorf 管底；在上述的 Eppendorf 管加入反转录反应液，其中包含 5×M-MLV Buffer 2 μL，dNTP Mixture（10 mmol/L）0.5 μL，RNase Inhibitor（40 μ/μL）0.25 μL，RTase M-MLV （RNase H）0.25 μL，最后加入无 RNase dH_2O 补至 10 μL。短暂慢速离心后，收集于 Eppendorf 管底，42°C 水浴保温 1 h；70°C 水浴保温 15 min；置于－20°C 贮存备用。反应结束后使用持家基因 *RP18* 进行

验证，正向引物序列为 5′-GCCCTCAGATCGCCTACT-3，反向引物序列为 5′-TTCCTGCGTCCTCTTGCT-3′，阳性验证成功所得的 cDNA 模板原液用 ddH_2O 稀释 5 倍后存于 - 20°C 冰柜，备用。基因全长序列的模板利用 RACE 试剂盒，合成方法参考试剂盒说明书，合成的 5′和 3′RACE 模板稀释 10 倍后存于 - 20°C 冰柜，备用。

1.6 引物设计

采用 Premier Primer5.0 设计 PCR 引物，用 GenScript 在线网站提供的服务设计 qPCR 引物，网址为（https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer）。LdeSid-1a 的 qPCR 正向引物序列为：5′-AAACCGTCAACTTGAAAGGG-3′，反向引物序列为 5′-TCGCTGCAATCGAAGTTATC-3′；LdeSid-1c 的 qPCR 正向引物序列为 5′-TTTACGCTCTTCCTGTGGTG-3′反向引物序列为：5′-CAGCCAGCTGAACTTTCAAT-3′。LdeSid-1a 的 End-to-end 正向引物序列为：5′-ACGGCGAATCCATTTAGA-3′，反向引物序列为 5′-CATTGGGAGTTTCGCTTA-3′；LdeSid-1c 的 End-to-end 正向引物序列为 5′-TCAAGATGTAACCTTCCGTG-3′，反向引物序列为：5′-AGAGCGCACATTCTCATT-3′。LdeSid-1a 的 5′RACE 引物序列为：5′-TTTGCGGTGAAGACGTAGACAGGGA-3′，3′ RACE 引物序列为 5′-TTATGGACGGTAACTCCCGCAGAATC-3′；LdeSid-1c 的 5′RACE 引物序列为 5′-GCTGTTGCCACAGAAACAATGGGATT-3′，3′ RACE 引物序列为：5′-TTTTCTTCAGTCTGTGCCGTTTCAGC-3′。

1.7 分子克隆

RT-PCR 采用的试剂为 Takara 的 rTaq，反应体系为：模板 cDNA 1.0 μL，rTaq 缓冲液 2.5 μL，dNTP 2.0 μL，$MgCl_2$，2.0 μL，引物各 1.0 μL，rTaq 酶 0.25 μL，补双蒸水至总体积 25 μL。PCR 反应条件为：94°C 预变性 3 min；94°C 变性 30 s，55°C 退火 30 s，72°C 延伸 1 min，循环 35 次；72°C 延伸 10 min，4°C 条件下保存。

End-to-end PCR 的反应体系为：模板 cDNA 1.0 μL，LaTaq 缓冲液 2.5 μL，dNTP 2.0 μL，$MgCl_2$，2.0 μL，引物各 1.0 μL，LaTaq 酶 0.25 μL，补双蒸水至总体积 25 μL。End-to-end 反应条件为：94°C 预变性 3 min；94°C 变性 30 s，55°C 退火 30 s，72°C 延伸 5 min，循环 35 次；72°C 延伸 10 min，4°C 条件下保存。

RACE-PCR 反应体系为：5′或 3′RACE 模板 cDNA 1.0 μL，LaTaq 缓冲液 2.5 μL，dNTP 2.0 μL，$MgCl_2$，2.0 μL，通用引物 UPM 2.5 μL，5′或 3′特异性引物 1.0 μL，LaTaq 酶 0.25μL，补双蒸水至总体积 25 μL。RACE-PCR 反应条件为：94°C 3 min；94°C 30 s，72℃ 3 min，5 个循环；94℃ 30 s，70°C 30 s，72°C 3 min，5 个循环；94°C 30 s，68°C 30 s，72°C 3 min，25 个循环；72°C 10 min，12°C 30 min。反应结束后 4°C 条件下保存。

吸取上述 10 μL 的 PCR 产物至 1.5%琼脂糖凝胶孔道中，随后在电泳仪上进行电泳检测，并用溴化乙锭 EB（Ethidium bromide）染色。紫外灯下观察电泳结果，GeLdeoc2000 凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）拍照保存，目标条带切胶回收。凝胶回收的方法参照试剂盒说明书。

回收产物的连接载体和转化反应实验方法参考克隆载体的试剂说明书。最终挑取获得的阳性克隆送南京金斯瑞测序。

1.8 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 反应采用荧光染料 SYBR Green I，在 ABI 7300 Real-Time PCR System 上进行。使用 SYBR Premix Ex Taq（TIi RNaseH Plus）进行 PCR 反应，加入的参比染料为 Rox Reference Dye II。

时序表达分析是通过以下方法分析：cDNA 模板来自于 1 龄，2 龄和 3 龄幼虫，每个龄期间隔 1 d 取样，4 龄间隔 12 h 取样，进入漫游期的幼虫在幼虫停止取食后 1 d 取样。对于组织表达分析 cDNA 模板来源于 4 龄 3 d 幼虫的脑-咽侧体复合体，腹神经索，前肠，中肠，后肠，马氏管，脂肪体，表皮和血淋巴，另外卵巢和精巢组织也分别取自雌成虫和雄成虫。对于所有的样品，总 RNA 通过 Trizol 提取。每一组样品包含 5~30 的个体并且均有 3 次生物学重复，每个生物学重复

有 3 个技术性重复。定量的 mRNA 检测通过 qRT-PCR 检测，均有 3 次技术重复。基因的相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算，其中 $\Delta Ct_{靶标基因}$=处理组$_{靶标基因}$－对照组$_{靶标基因}$，$\Delta Ct_{内参基因}$=处理组$_{内参基因}$－对照组$_{内参基因}$，$2^{-\Delta\Delta Ct}=2^{-(\Delta Ct\ 靶标基因-\Delta Ct\ 内参基因)}$，内参基因通过先前在马铃薯甲虫中报导鉴定的两个内参基因 ARF 和 RP18 的几何平均进行计算。在龄期表达或组织表达的分析中，将相对表达量最低的处理组选为对照组。ARF 正向引物序列为 5′-CGGTGCTGGTAAAACGACAA-3′，反向引物序列为 5′-TGACCTCCCAAATCCCAAAC-3′，RP18 的正向引物序列为 5′-TAGAATCCTCAAAGC-AGGTGGCGA-3′，反向引物序列为：5′-AGCT-GGACCAAAGTGTTTCACTGC-3′。

1.9　基因组结构分析、序列比对和系统发育分析

测序结果和序列分析通过 DNAstar（http://www.dnastar.com）软件完成。系统发育分析所用的序列是通过本地化 BLAST 程序包（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）在 Genbank 的 NR 数据库中搜索其它物种的同源序列，选取了 NR 数据库中能搜索到的昆虫纲 12 个物种包括赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 TcaSid-1a（NP_001099012），TcaSid-1b（NP_001103253）和 TcaSid-1c（NP_001099128），地熊蜂 *Bombus terrestris* 的 BteSid-1（XP_003399893），东方雄峰 *Bombus impatiens* 的 BimSid-1（XP_003493581），意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的 AmeSid-1（XP_006565236），切叶蚁 *Acromyrmex echinatior* 的 AecSid-1（XP_011060636），东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 的 LmiSid-1（AFQ00936），体虱 *Pediculus humanus corpori* 的 PhuSid-1（XP_002430777），山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* 的 DpoSid-1（ERL87797），斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的 SliSid-1a（AHC98014），SliSid-1b（AHC98013）和 SliSid-1c（AHC98015），帝王蝶 *Danaus plexippus* 的 DplSid-1a（EHJ72579）和 DplSid-1c（EHJ72732），家蚕 *Bombyx mori* 的 BmoSid-1（NP_001106735）和秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的 CelSid-1（NP_504372），另外还有本研究中在马铃薯甲虫 *L. decemlineata* 转录组数据搜索到并克隆的两条 Sid-1，共计 13 个物种的 Sid-1 进行了研究。

在 1.3 中通过马铃薯甲虫转录组相似性搜索和 1.4 中分子技术获得的两条完整 Sid-1 序列，通过本地 blast 数据包的 blastn 程序，比对到马铃薯甲虫的基因组数据，赤拟谷盗的 3 条 Sid-1 序列通过检索 NCBI 的 Gene 数据库获得基因结构的基本信息。结合两个物种的 Sid-1 基因组信息，通过绘图软件根据比例绘制获得基因外显子-内含子结构图。

上述从 NCBI 下载的同源核苷酸序列和马铃薯甲虫两条 Sid-1 通过 Clustalx（版本 2.1）进行多序列比对，获得的比对结果导入 jModelTest 0.1 中检测最大似然法（Maximum likelihood，ML）的最优模型，得到最优模型为 GTR+G 模型，利用软件 PhyML 3.0 根据 GTR+G 的模型进行系统发育分析，其中自展重复检验，重复次数为 1 000 次。*Sid* 基因的跨膜域及信号肽的位点的分析通过在线软件进行分析，网址为 http://noble.gs.washington.edu/ proj/philius/。

2　结果与分析

2.1　序列的基因组结构，多重序列比对和系统发育分析

从马铃薯甲虫的转录组中克隆的两条 Sid-1，通过对 5′端和 3′端的非编码区的全长克隆，并没有发现两个 Sid-1 具有选择性剪切。两条 mRNA 的序列长度分别为 2 887 和 3 733 个核苷酸，编码的蛋白质长度分别为 759 和 782 个氨基酸。对昆虫纲的 12 个物种的 Sid-1 和秀丽隐杆线虫的 Sid-1 跨膜域和信号肽的预测结果表明，90%以上 Sid-1 具有信号肽，同时 Sid-1 具有数量为 11 个的跨膜域结构。Sid-1 的跨膜域位于蛋白质的后半段，在马铃薯甲虫中，LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 分别位于蛋白质序列的 303-759 和 298-782 的氨基酸位点，秀丽隐杆线虫的 CelSid-1 中位于蛋白质序列的 318-755。LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 的 N-端具有四段保守的基序（图 2）。

通过对马铃薯甲虫两个 Sid-1 和赤拟谷盗 3

个Sid-1基因组的外显子-内含子结构的分析(图1)，发现（1）马铃薯甲虫的基因序列更长：马铃薯甲虫的两个 Sid-1 分别为 13.1 kb 和 22.5 kb，而赤拟谷盗的 Sid-1a，Sid-1b，Sid-1c 依次为 8，5，4.2 和 15.7 kb；(2）马铃薯甲虫 Sid-1 的外显子数量更多：马铃薯甲虫的两个 Sid-1 分别为 14 个和 16 个，而赤拟谷盗的 3 个 Sid-1 依次为 9 个，10 个和 10 个；(3）外显子结构并没有发现具有类似的排布方式：赤拟谷盗的 Sid-1 分别位于 10 号，8 号和 6 号染色体，马铃薯甲虫的两个 Sid-1 也没有成簇排列。

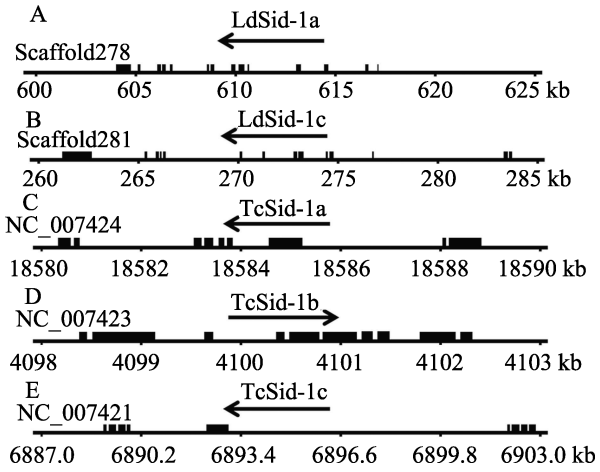

图 1　马铃薯甲虫 LdeSid-1a（A），LdeSid-1c（B）和赤拟谷盗的 TcSid-1a（XM_969743）（C），TcSid-1b（NM_001109783）（D），TcSid-1c（NM_001105658）（E）的外显子-内含子基因结构

Fig. 1　Exon-intron structure of LdeSid-1a(A), LdeSid-1c from *Leptinotarsa decemlineata* (B) and TcSid-1a(C), TcSid-1b(D), TcSid-1c from *Tribolium castaneum* (E)

序列名称下的箭头表示基因的转录方向。每张图的左上角标注了转录本序列比对上的马铃薯甲虫基因组的序列名或基因序列登录号。

Arrows under genes' name shows transcription direction. ScaffoLde number in *L. decemlineata* or gene accession number are marked on the upper left corner in each figure.

对上述 13 个物种的序列进行系统发育分析，结果表明昆虫的 Sid-1 与线虫的 Sid-1 分成两支。在昆虫的分支中，Sid-1 自上而下分成虱目，直翅目，鳞翅目，鞘翅目和膜翅目几个分支。鳞翅目中选取的 3 个物种均具有 3 个左右的 Sid-1，并且每个 Sid-1 均独自聚类。膜翅目分支中选取的物种均只有一个 Sid-1 同源蛋白。序列的系统发育关系基本符合物种的系统发育关系，同时 90%以上的分支自展值大于 50，70%以上的分支自展值大于 90，由此确定该系统发育树是可信的。

通过对马铃薯甲虫两条序列的分析，将这两条序列命名为 LdeSid-1a 和 LdeSid-1c，理由如下：(1）基因的命名通常根据模式物种已鉴定的序列随其后命名，以避免命名的混乱，由于双翅目中并未发现 Sid-1，由此以鞘翅目的模式物种赤拟谷盗命名；(2）根据序列比对的分析，马铃薯甲虫的两个 Sid-1 具有与秀丽隐杆线虫和赤拟谷盗的 Sid-1 一致的基本结构，包括 11 个跨膜域，和跨膜域前几段保守的基序；(3）赤拟谷盗中发现了 3 个 Sid-1 基因，根据序列的相似性和系统发育关系可以发现，马铃薯甲虫的 LdeSid-1a 与赤拟谷盗的 TcSid-1a 序列相似性最高，为 72%，而 LdeSid-1c 与赤拟谷盗的 TcSid-1c 的相似性最高，为 77%；(4) 根据系统发育的关系，LdeSid-1a 与赤拟谷盗的 TcSid-1a 以自展值 100 聚类，LdeSid-1c 与赤拟谷盗的 TcSid-1c 以自展值 99 聚类，赤拟谷盗的 TcSid-1b 处在 LdeSid-1a 和 TcSid-1a 的节点外聚类，并且在另一个已经基因组测序的鞘翅目物种山松大小蠹中也只发现了两个 Sid-1（数据未展示），说明这个基因是由于赤拟谷盗种内的基因复制产生，而在马铃薯甲虫中并没有发生如此的基因复制。

最后，将命名为 LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 的两条序列提交到美国国立生物技术信息中心（NCBI），返还的登录号分别为 KR153284 和 KR153285。

2.2　马铃薯甲虫两条 Sid-1 同源基因的龄期与组织表达

qPCR 分析马铃薯甲虫的 LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 的龄期和组织表达的结果表明，两个基因均随着幼虫生长发育表达量逐渐增加，当达到马铃薯甲虫 3 龄和 4 龄幼虫阶段时，相较于初孵幼虫 LdeSid-1a 表达量上调 10~425 倍，之后表达稳定在 425 倍这一高峰，而 *LdeSid-1c* 在 2 龄幼虫阶段表达量就开始上升，相比于初孵阶段

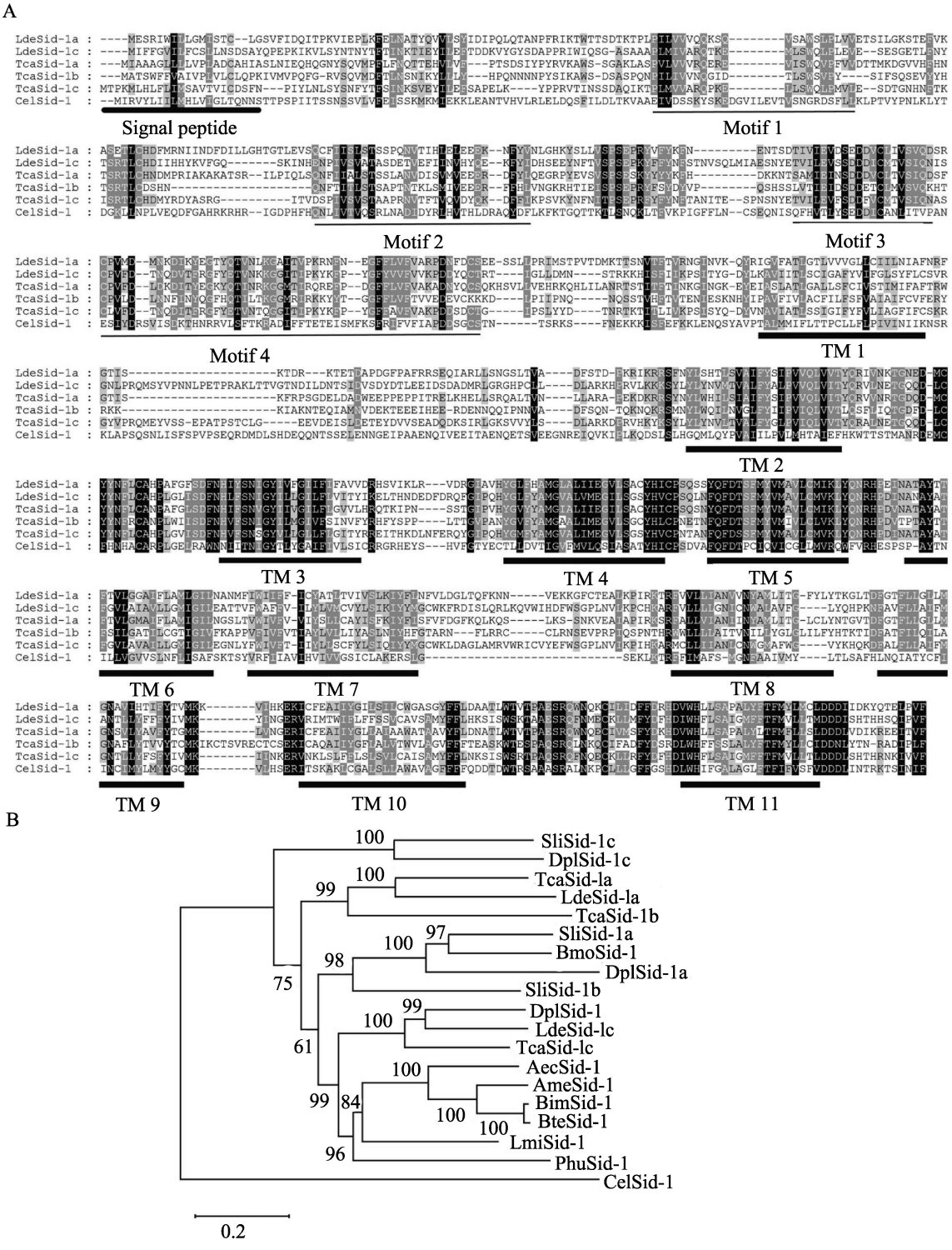

图 2　马铃薯甲虫 **LdeSid-1a** 和 **LdeSid-1c** 氨基酸序列的生物信息分析

Fig. 2　Bioinformatic analysis of LdeSid-1a 和 LdeSid-1c sequences in *Leptinotarsa decemlineata*

A. LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 序列比对结果，圆角矩形标注的是信号肽，直线标注的是 4 段基序，矩形标注的是 11 个跨膜域；B. Sid-1 序列的系统发育分析，自展值标注在节点处，50 以下的自展值已隐去。

A. Multiple alignment of LdeSid-1a and LdeSid-1c in *L. decemlineata*, rounded rectangles show signal peptide, lines show 4 motifs, rectangles show 11 transmembrane domain; B. Phylogenetic analysis of Sid-1 sequences, bootsrap values are marked at nodes, values below 50 have been hidden.

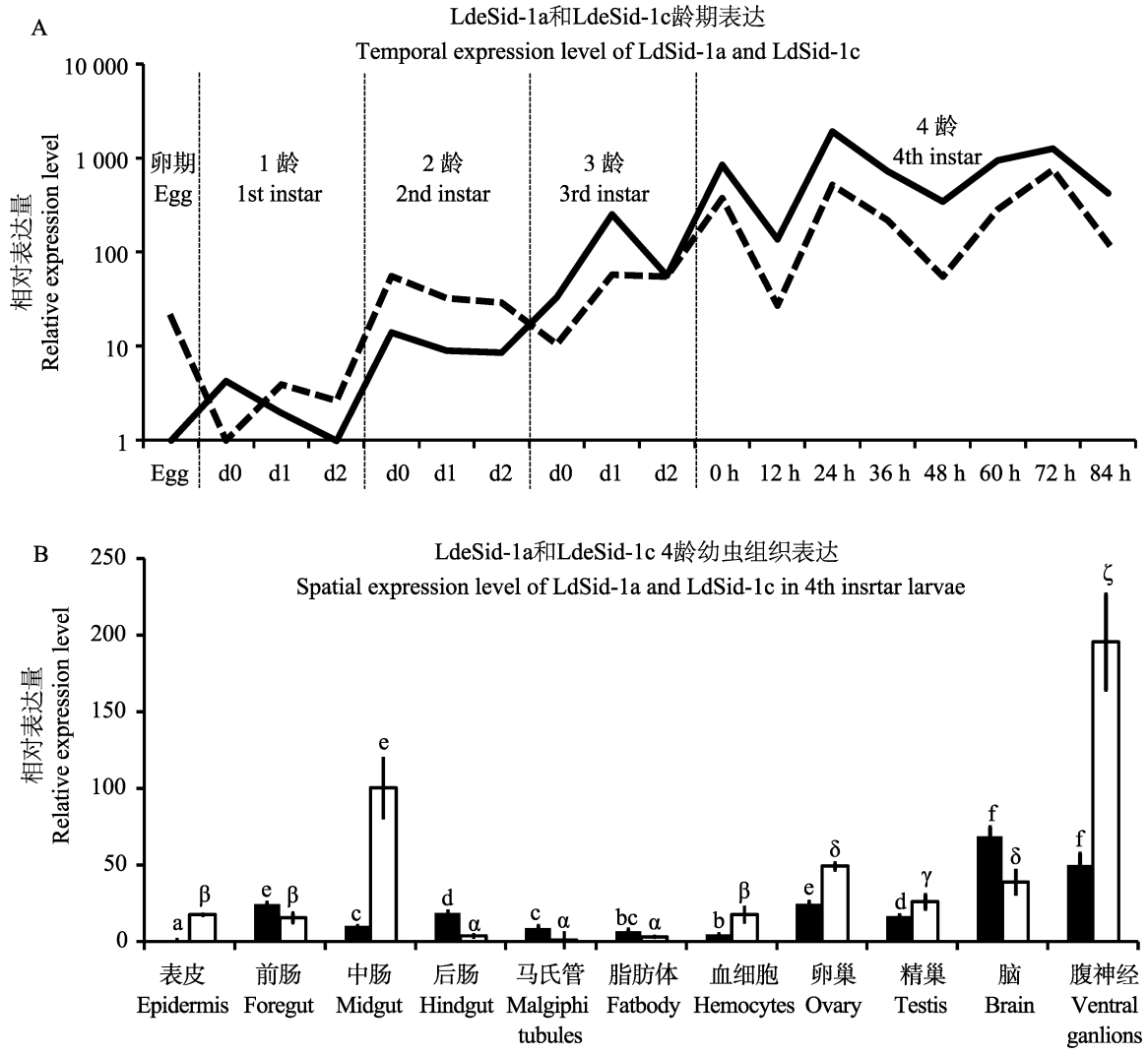

图 3　马铃薯甲虫 LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 的龄期表达和组织表达

Fig. 3　LdeSid-1a and LdeSid-1c temporal and spatial expression pattern in *Leptinotarsa decemlineata*

A. LdeSid-1a（实线）和 LdeSid-1c（虚线）的龄期表达在幼虫阶段进行了详细分析，取样的时期包括以 1 d 为间隔收样的 1 龄初孵（d0），1 龄 1 d（d1）和 1 龄 2 d（d2）幼虫；2 龄刚蜕皮（d0），2 龄 1 d（d1）和 2 龄 2 d（d2）的幼虫；3 龄刚蜕皮（d0），3 龄 1 d（d1）和 3 龄 2 d（d2）的幼虫；以 12 h 为间隔收样的 4 龄刚蜕皮（0 h），4 龄 12 h（12 h），4 龄 24 h（24 h），4 龄 36 h（36 h），4 龄 48 h（48 h），4 龄 60 h（60 h），4 龄 72 h（72 h）和 4 龄 84 h（84 h）的幼虫。B.LdeSid-1a（黑）和 LdeSid-1c（白）的组织表达收取的组织包括 4 龄末期幼虫的表皮，前肠，中肠，后肠，马氏管，脂肪体，血细胞，脑和腹神经节，生长 10 d 以上发育成熟的成虫的精巢和卵巢。柱上的直线表示均值的标准误（SE），相同的字母表示两组处理之间没有显著差异（P>0.05），LdSid-1a 和 LdSid-1c 相对表达量的差异分别用英文字母（a，b，c 等）和希腊字母（α，β，γ）表示。

A. Temporal expression pattern of LdeSid-1a (solid line) and LdeSid-1c (dashed line) is analyzed in fourth instar in detail, samples were collected from fresh new(d0), 1 day(d1) and 2 days(d2) old of the 1st instar larvae; fresh new(d0), 1 day(d1) and 2 days(d2) old of the 2nd instar larvae; fresh new(d0), 1 day(d1) and 2 days(d2) old of the 3rd instar larvae at the interval of one day; fresh new(0 h), 12(12 h), 24(24 h), 36(36 h), 48(48 h), 60(60 h), 72(72 h) and 84(84 h) hours old of the 4th instar larvae; B. Tissue expression pattern of LdeSid-1a (black) and LdeSid-1c (white) is tested in foregut, midgut, ileum, rectum, Malpighian tubules, haemocytes, epidermis, ventral ganglion and fat body from the 3 days old of fourth instar larvae, testis and ovaries from more than 10 days old of sex-mature male and female adults. The bars represent $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values (±SE). Histograms with the same letters indicate no significant difference (P>0.05), relative expression level of LdSid-1a and LdSid-1c are indicated by English letters(a, b ,c *et al*.) and Greek letters(α, β, γ *et al*.), respectively.

上调 10~748 倍（图 3：A）。

LdeSid-1a 和 LdeSid-1c 在肠道包括前肠，中肠和后肠以及生殖系统中表达较高，而在神经系统中表达量最高。LdeSid-1a 在脑中的表达量最高，是表皮的表达量的 68 倍，腹神经表达量是表皮的 50 倍；而 LdeSid-1c 是在腹神经中表达量最高，是表皮的 11 倍，马氏管中的 195 倍（图 3：B）。

3　讨论

线虫中目前共发现了 4 个系统性 RNAi 缺失基因：Sid-1，Sid-2，Sid-3 和 Sid-5。通过序列的多重比对结果发现，这 4 个基因的长度差异很大，彼此的结构也不具有相似性。本研究通过相似性搜索 NR 数据库的方法也并没有发现昆虫具有 Sid-2，Sid-3 和 Sid-5 这 4 个基因（结果未展示）。昆虫纲中 Sid-1 的基因除双翅目昆虫外，普遍具有一个以上的基因数量（Tomoyasu *et al.*，2008）。本研究克隆并分析了马铃薯甲虫中两个 Sid-1，序列比对结果表明两个 Sid-1 具有该家族基本的保守域结构，包括信号肽与 11 个跨膜域的结构，而目前对 N-端的接近 300 个氨基酸的功能尚不完全了解，但是可以发现其中具有多个保守基序；系统发育分析结果表明昆虫中 Sid-1 同源基因是相对保守的，两条马铃薯甲虫的 Sid-1 与赤拟谷盗的两条 Sid-1 分别聚类，由此根据序列比对，系统发育的综合结果，分别将马铃薯甲虫的两个 Sid-1 命名为 LdeSid-1a 和 LdeSid-1c。从生物信息的多方面分析可以得出马铃薯甲虫的两条 Sid-1 具有与赤拟谷盗的两条 TcaSid-1a 和 TcaSid-1c 一致的功能。

由马铃薯甲虫的两个 Sid-1 龄期表达的结果，发现这两个基因具有较为相似的表达方式，即幼虫初期表达量较低，随幼虫的生长发育逐渐升高，表明这两个基因在高龄阶段具有重要的作用。其次，组织表达结果表明这两个基因在所有组织中均有表达，其在神经系统和肠道优势表达，表明这两条 Sid-1 基因可能参与到肠道和神经系统中 dsRNA 的吸收。

本实验中定量 PCR 的结果在同一组实验中出现较大的差异，最大的表达差异可以达到 728 倍，然而这组数据仍旧是相对可信的，理由有以下三点：(1) 实验设计上，收集的样品具有 3 个生物学重复，且每个处理具有 3 个技术性重复，所以获得的数据是相对可信的；(2) 本实验采用的是相对定量 PCR 的方法，计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$，CT 值的选取范围为 15~30，而本实验中采用的数据均在该范围内；(3) 通过相对表达量计算，均需要对照处理组，本实验中分析的龄期表达和组织表达，都是以处理组中表达量最低的阶段或组织为对照组，并且每一个实验的组织表达和龄期表达分析的样品数量为 11 个和 18 个，样品检测范围较大也使差异加大。本文中克隆获得的两个 Sid-1 基因为以后研究马铃薯甲虫系统性 RNAi 的机理奠定了一定基础，并且为后续研究马铃薯甲虫中该基因的具体功能做了良好的铺垫。

致谢：感谢人类基因组测序中心（Baylor Medical College, Human Gemone Sequencing Center）提供了本文中所用到的马铃薯甲虫的基因组数据。感谢 Kumar 等提供的马铃薯甲虫转录组数据。

参考文献(References)

Andrea H, Wright AJ, Hunter CP, 2012. SID-5 is an endosome-associated protein required for efficient systemic RNAi in *C. elegans*. *Current Biology*, 22(20): 1938–1943.

Aronstein K, Pankiw T, Saldivar E, 2006. SID-I is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. *Journal of Apicultural Research*, 45(1): 20–24.

Burand JP, Hunter WB, 2012. RNAi: Future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112(S): 68–74.

Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806–811.

Hinas A, Wright AJ, Hunter CP, 2012. SID-5 is an endosome-associated protein required for efficient systemic RNAi in *C. elegans*. *Current Biology*, 22(20): 1938–1943.

Kumar A, Congiu L, Lindström L, Piiroinen S, Vidotto M, Grapputo, A, 2014. Sequencing, de novo assembly and annotation of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, transcriptome. *Plos ONE*, 9(1): e86012.

Luo Y, Wang X, Yu D, Kang L, 2012. The SID-1 double-stranded RNA transporter is not required for systemic RNAi in the

migratory locust. *RNA Biology*, 9(5): 663–671.

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.

Miller S, Brown S, Tomoyasu Y, 2008. Larval RNAi in Drosophila? *Development Genes and Evolution*, 218: 505–510.

Price DRG, Gatehouse JA, 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*, 26(7): 393–400.

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.

Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G, 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*, 9(1): R10.

Wang H, Gong L, Qi J, Hu M, Zhong G, Gong L, 2014. Molecular cloning and characterization of a SID-1-like gene in *Plutella xylostella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 87(3): 164–176.

Winston WM, 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295(5564): 2456–2459.

Xu W, Han Z, 2008. Cloning and phylogenetic analysis of Sid-1-Like genes from aphids. *Journal of Insect Science*, 8(30): 1–6.