

褐飞虱组织解剖及 *NIEF7* 基因的雄虫组织特异性表达研究*

王渭霞** 何佳春 魏 琪 赖凤香 万品俊 傅 强***

(中国水稻研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 311401)

摘 要 【目的】探究褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 雄虫特异基因 *NIEF7* 的组织表达特性, 为褐飞虱多组织的解剖分离以及基因表达的组织原位杂交提供参考。【方法】选择不同发育时期的褐飞虱雌成虫和雄成虫, 在显微镜下解剖获取唾液腺、肠、雌虫生殖器和雄虫生殖器等组织并提取 RNA 利用定量 PCR 进行 *NIEF7* 表达分析。利用地高辛标记 *NIEF7* 探针, 通过多聚甲醛固定样本和 NBT/NBCT 显色, 进行了组织 RNA 原位杂交检测。【结果】获得了唾液腺、肠道、内生殖器的细致解剖显微实图, 展示了褐飞虱内生殖器的形态变化, 据此可确认雌虫的交配状况。定量 PCR 和原位杂交分析结果表明, *NIEF7* 基因在雄虫内生殖器和脂肪体中特异性表达, 且在睾丸中表达量最高。利用完整的虫体进行固定和原位杂交后解剖观察, 几乎没有杂交信号。对虫体进行破坏性处理或分离组织样本再进行固定和杂交有助于提高杂交信号的强度。【结论】*NIEF7* 基因在褐飞虱雄虫内生殖器和脂肪体中特异性表达。

关键词 褐飞虱; 内生殖器; 消化道; 唾液腺; 显微解剖; 原位杂交

Male tissue-specific expression of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål), *NIEF7* gene

WANG Wei-Xia** HE Jia-Chun WEI Qi LAI Feng-Xiang WAN Pin-Jun FU Qiang***

(State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 311401, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the tissue-specific expression of the male-specific gene *Nilaparvata lugens NIEF7* and thereby provide a reference for multi-tissue dissection and *in situ* hybridization techniques for this species. 【Methods】Female and male adult *N. lugens* of different developmental stages were selected and dissected under a microscope to obtain salivary glands, intestines, female and male genitalia and other tissues. RNA was then extracted to analyze *NIEF7* expression in different tissues with quantitative PCR. After fixing samples with paraformaldehyde, RNA *in situ* hybridization detection was then performed using a digoxigenin-labeled *NIEF7* probe and NBT/NBCT color development technology. 【Results】Detailed anatomical microscopic images of salivary glands, intestines and internal genitalia were obtained. The latter show morphological changes in the internal genitalia of female *N. lugens* that can confirm a female's mating status. The results of quantitative PCR and *in situ* hybridization indicate that the *NIEF7* gene was specifically expressed in the internal genitalia and fat body of males, and that expression was highest in the testis. There was almost no hybridization signal after fixation and *in situ* hybridization of the intact body. Destructive treatment of insects, or separation of tissue samples, followed by fixation and hybridization can help increase the intensity of the hybridization signal. 【Conclusion】The *NIEF7* gene is specifically expressed in the internal genitalia and fat body of adult male *N. lugens*.

Key words *Nilaparvata lugens*; internal genitalia; alimentary canal; salivary glands; microdissection; *in situ* hybridization

*资助项目 Supported projects: 水稻生物学国家重点实验室开放课题 (20210302); 稻飞虱灾变机制与可持续防控技术研究 (2021YFD1401100)

**第一作者 First author, E-mail: wangweixia@caas.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: fuqiang@caas.cn

收稿日期 Received: 2022-06-07; 接受日期 Accepted: 2022-07-01

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 通过刺吸式口器取食汁液为害水稻,并具有繁殖速度快、适应性强、远距离迁飞等特征 (Horgan *et al.*, 2020),是我国和东南亚水稻生产中的首要害虫。近年来,有关褐飞虱的研究已经深入到组学水平甚至是不同组织(如唾液腺、肠道以及肠道微生物)的转录组、蛋白组和代谢组水平 (Konishi *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2011; 陈鹏宇等, 2013; Ji *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2019; 王天召等, 2019),涉及褐飞虱与水稻互作中唾液腺中各种激发子、效应子的筛选和功能解析、与生殖相关基因的挖掘和应用以及褐飞虱抗药性产生的分子机制等 (Ge *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2020)。在褐飞虱功能基因、致害机理和预测预报等研究中,精细的组织解剖、准确的显微观察鉴定以及基因表达的精准定位已成为最重要的实验技术,但较为完整的多组织解剖及基因的组织特异性表达原位杂交技术鲜见报道。

关于昆虫组织的解剖主要集中于雌虫内生殖器的解剖、构造分析、分级以及在预测预报中的应用,研究展示的是组织器官结构的示意图,如灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (徐秀媛和丁锦华, 1990)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (王宪辉等, 2003) 和褐飞虱 (卢芳等, 2011) 等。关于褐飞虱雄虫内生殖器、唾液腺及肠道这些组织的认识,早期有示意图 (李如泽等, 1996)。最近, Wang 等 (2021) 使用大尺度三维电镜和计算机处理技术重构出褐飞虱纳米分辨率的三维结构,可模拟观测该昆虫内部结构及互相之间的关系。但是,目前尚缺乏详细的解剖方法及实图的展示。在基因表达的组织定位技术方面,大部分昆虫组织采用的是繁琐的组织切片、激光共聚焦观察等方法,仅有少数几篇组织整体的原位杂交研究,如对分离的果蝇翅膀 (陈敏等, 2016)、完整的叶螨 (Villarreal *et al.*, 2016) 以及分离的褐飞虱肠道组织 (杨之帆等, 2010) 等。本研究通过细致的组织解剖提供了褐飞虱唾液腺、肠道、内生殖器的解剖显微实图,在结合前人 (陈敏等, 2016; Villarreal *et al.*, 2016) 的组织原位

杂交技术的基础上,对比了完整褐飞虱虫体、破坏性处理后的褐飞虱残体以及解剖分离的雄虫内生殖器的杂交结果,详尽展示了褐飞虱基因的组织表达原位杂交技术,为相关研究者提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源和主要试剂

本研究所用褐飞虱为饲养于感虫水稻品种 Taichung Native 1 (TN1) 上的实验室种群,饲养于温度为 (26±1) °C、相对湿度为 75%±5%、光周期为 16L:8D 的养虫室中。选择羽化不同天数的褐飞虱雌成虫和雄成虫,其中,一部分雌虫和雄虫混合让其交配,另一部分雌虫和雄虫分开单独饲养,确保未交配。

1×PBS RNase free (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na₂HPO₄, 1.4 mmol/L KH₂PO₄, pH=7.2-7.4)、20×SSC (3.0 mmol/L NaCl, 0.3 mmol/L 柠檬酸钠, pH=7.0)、固相 RNase 清除剂和 4%多聚甲醛组织固定液购自杭州昊鑫生物科技股份有限公司。*rTaq* DNA 扩增酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司, RNA 提取试剂盒 RNase Mini kit 购自德国 Qiagen 公司, cDNA 合成试剂盒, 2×SYBR® 定量 PCR 扩增试剂购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司。胶回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。pGEM-T 载体购自 Promega (北京) 生物技术有限公司。地高辛标记的 Northern 杂交试剂盒 (DIG Northern starter kit) 和显色剂 BCIP/NBT (对甲苯胺兰 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP)/氯化硝基四氮唑蓝 (Nitroblue tetrazolium chloride, NBT)) 购自 Roche 诊断产品 (上海) 有限公司。探针纯化试剂 Simgaspin™ sequencing reaction clean-up 购自 Sigma 公司。引物合成和测序由浙江尚亚生物技术有限公司提供服务。

杂交缓冲液: 64 mL 无菌双蒸水加入到 Northern 杂交试剂盒提供的 DIG Easy Hyb Granule 中, 37 °C 下搅拌 5 min 至完全溶解。

PBST: 含 0.1% (V/V) Tween-20 的 PBS。

清洗液: 50% 甲酰胺, 2×SSC, 0.1% Tween-20。

AP 缓冲液: 100 mmol/L Tris, pH 9.5, 100 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20。

1.2 褐飞虱组织的解剖和分离

取准备好的雌成虫和雄成虫, 用 CO₂ 麻醉 2 min 后, 用 75%乙醇处理 1 min, 1×PBS 清洗后置于含有 1×PBS 的缓冲液的培养皿中。培养皿提前经固相 RNase 清除剂擦拭处理。

在立体显微镜下左手用解剖针从外生殖器的部位插入固定虫体, 右手用镊子从背部揭开体壁后, 小心分离出雌虫内生殖器、雄虫内生殖器和肠道。虫体固定后用镊子沿着胸部第一足和第二足之间将褐飞虱头胸部和腹部分离, 进一步用解剖针固定头部, 镊子从头部慢慢剥离第一足及与其相连的胸部体壁暴露出唾液腺, 再用镊子夹住喙及其相连的前后唇基用解剖针缓慢剥离出唾液腺。去除体壁、头部和其它内部组织后剩余的即为脂肪体。脂肪体可用移液枪转入离心管中。

1.3 RNA 的提取和定量 PCR 分析

用于提取 RNA 的组织经分离后置于装有提取 RNA 缓冲液的 1.5 mL 离心管中, 包括 50 头雄虫和雌虫内生殖器, 100 头雄虫内生殖器的睾丸、输精管、附腺和脂肪体。按照 RNA 提取试剂盒操作说明提取 RNA。经浓度测定后利用 cDNA 合成试剂盒反转录为 cDNA, cDNA 稀释 10 倍后用于后续 PCR 扩增模板。检测的目的基因为本实验室前期从褐飞虱转录组数据库中筛选获得的一个仅在雄虫中特异表达的基因 (*NIEF7*), 该基因与 NCBI 数据库中 XM_022338437.1 序列一致。其开放读码框 ORF 长度为 1 884 bp, 编码一个含有 EF-hand 结构域的长度为 628 个氨基酸的蛋白。依据 *NIEF7* 基因序列设计并合成特异的荧光定量 PCR 检测用引物 qNIEF7-F: GCCTTGTTTCGACCGCATTT; qNIEF7-R: GCCTTGAGGAAGACCGCAG。该引物扩增产物长度为 198 bp, T_m 分别为 60.04 和 60.74, 扩增效率为 102%。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 反应体系 (20 μL): 10 μL 2×SYBR® 定量 PCR 扩增试剂, 正反向引物各 0.4 μL (10 μmol/L), cDNA 模板 2 μL。循环条件: 95 °C 30 s, 40 次

循环 (95 °C 5 s, 60 °C 30 s), 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。褐飞虱的 *Nlactin* 基因作为内参基因 (Wang *et al.*, 2014)。试验采用 3 个生物学重复, 每个生物学包含 3 个技术重复。用 2^{-ΔΔC_t} 法分析基因的相对表达量 (Livak and Schmittgen, 2001)。试验数据为 3 个生物学重复的平均值±标准差。用 DPS 统计学软件包进行单因素 ANOVA 检验, 采用多范围检验 (Duncan's 检验) 分析差异显著性 ($P < 0.05$)。

1.4 组织的 RNA 原位杂交

1.4.1 探针的设计和合成 本研究在前期基因表达分析中获得了一个在雄虫中特异表达基因 *NIEF-7*, 通过转录组和基因组数据库的结合分析, 设计探针合成用引物 pGEMT-EF7-F: TTTACTGAGCCAGGGCAT; pGEMT-EF7-R: GATCACGTCCGCTATTTCACCT。扩增长度为 296 bp。PCR 扩增反应体系为 25 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL, 正反向引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 雄虫 cDNA 模板 2.0 μL, 5×10⁶ U/L *rTaq* DNA 扩增酶 0.125 μL。扩增程序为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 次循环; 72 °C 10 min。扩增产物经 2.0% 琼脂糖胶电泳切取目标片段, 利用胶回收试剂盒回收纯化目标片段。将目标片段连接到载体 pGEM-T 上并转入大肠杆菌。筛选出阳性克隆提取质粒并送浙江尚亚生物技术公司测序并确认插入方向。

提取阳性克隆的质粒, 以质粒 DNA 为模板利用 M13 通用引物扩增获得作为 RNA 探针合成的 DNA 模板。扩增反应体系和程序同上。扩增产物经 2.0% 琼脂糖胶电泳切取并回收纯化目标片段。测定浓度后 -20 °C 保存。

利用 DIG Northern starter kit 试剂盒合成地高辛标记的 RNA。探针合成体系为 20.0 μL, 3.0 μL DNA 模板 (100-200 ng), 4.0 μL 5×Labeling mix, 4.0 μL 5×Transcription buffer, 2.0 μL SP6 RNA 聚合酶。混合后 42 °C 水浴 1 h。加入 2.0 μL DNase I 37 °C 水浴 15 min 酶解多余 DNA 模板。加入 2.0 μL 0.2 mol/L EDTA 终止转录反应。合成的 RNA 探针进一步用探针纯化试

剂纯化后测定浓度并保存于 -80°C 。

1.4.2 组织的固定及杂交 用于原位杂交样本包括完整雄虫、在显微镜下剔除头部的雌虫、雄虫以及解剖分离的雄虫内生殖器,样本经分离后立即放入装有 1.0 mL 固定液的 2.0 mL 离心管中, 6°C 固定 16-24 h。

吸出固定液,沿离心管壁缓慢加入 500 μL PBST 清洗 2-3 次。每次 20 min。

用 40 kHz 的超声处理 3 min,吸出 PBST 缓冲液,加入 200 μL 的蛋白酶 K 溶液 (50 mg/L, 37°C 孵育 5 min)。

吸出蛋白酶 K 溶液并加入 200 μL 甘氨酸溶液 (2 g/L, 2 min 后吸出)。

用 500 μL 的 PBST 洗 3 次,加入固定液再次固定 20 min。

用 PBST 洗 3 次。加入 500 μL 预杂交液 (不含探针的杂交液), 52°C 孵育 1 h。

吸出原有溶液,加入 500 μL 含有探针的杂交液。探针在加入前 80°C 处理 5 min。探针使用浓度 300 $\mu\text{g/L}$, 52°C 温浴杂交过夜。

吸出杂交液在样本离心管中加入 500 μL 清洗液, 53°C 清洗 6 次,每次 25 min。再用含有 0.1% BSA 的 PBST 溶液室温清洗 1 次。

在偶联碱性磷酸酯酶 (Alkaline phosphatase, AP) 的抗地高辛的抗体 (用含有 0.1% BSA 的 PBST 溶液稀释 1:1 000 倍) 溶液中,室温孵育 2 h。

用 500 μL PBST 清洗 5 次,每次 20 min。吸出原有溶液用 500 μL AP 缓冲液清洗数次。

在每次清洗和更换下一试剂前,利用缓慢置换的办法,保留部分原试剂,逐步替代原试剂。并尽量避免用移液枪对组织的反复吹打导致组织破碎或被吸出。

1.4.3 组织的显色和观察 利用 BCIP/NBT 显色剂对杂交组织进行显色。显色剂用 AP 缓冲液按 1:50 稀释后加入样本组织中在 4°C 黑暗中显色。有蓝色显出后用甲醇逐步替换去除背景色,最后将组织用 PBST 清洗后显微观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 唾液腺、消化道和内生殖器的形态与结构

2.1.1 唾液腺 褐飞虱的唾液腺位于胸腔前部消化道两侧 (图 1:A),由主腺、附腺和一些管状结构组成。其中主腺是分泌唾液的主要腺体,由大小不一的 8 个分开的小囊组成。附腺是唾液腺中最大的分泌组织 (图 1:B)。

2.1.2 消化道 褐飞虱的消化道从口器开始,主要包括食道、中肠和后肠并以肛门结束。作为食物通道的食道贯穿于褐飞虱的胸腔,是一段狭窄细长的管道,最前端为唾液腺。中肠的后半部分在腹部盘绕成一簇环并终止于两侧对称的一对马氏管 (图 2:A)。马氏管是中肠和后肠的分隔,每根马氏管末端分二,颜色通常为淡黄色 (图 2:

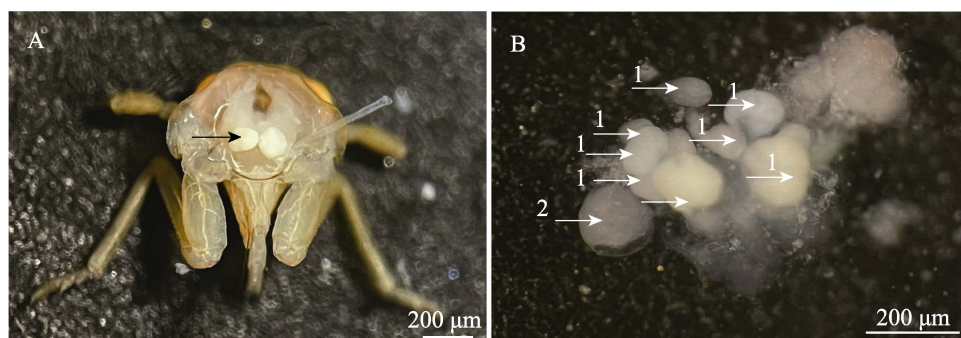


图 1 褐飞虱唾液腺解剖形态

Fig. 1 Anatomical morphology of salivary gland of *Nilaparvata lugens*

A. 唾液腺所在位置图; B. 唾液腺形态。1: 由 8 个小囊组成的主腺; 2: 附腺。

A. Location of salivary gland highlighted with black arrow; B. Morphology of salivary gland.

1: Principal glands composed of 8 follicles; 2: Accessory glands.

B, C)。中肠在消化道中最长, 是分泌消化液、消化食物和吸收养分的消化器官。后肠通常较中肠肥大, 接近肛门处膨大形成直肠(图 2: D)。

2.1.3 雄虫内生生殖器 褐飞虱雄虫内生生殖器包

括一对睾丸、6 条睾丸小管、一对输精管、一对附腺和 1 根中射精管(图 3)。睾丸小管随着发育顶端向下逐渐变黄色至暗色, 输精管由白色变黄色, 并逐渐变粗。

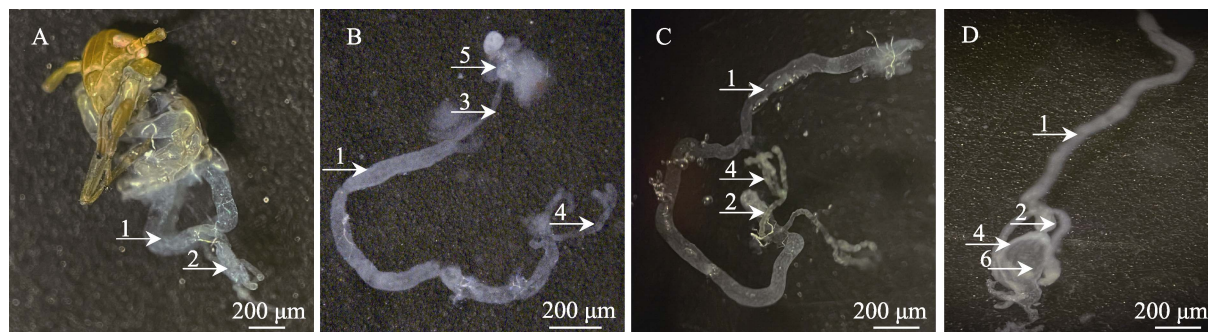


图 2 褐飞虱消化道解剖形态

Fig. 2 Anatomical morphology of alimentary canal of *Nilaparvata lugens*

A. 消化道所在位置。B, C, D. 肠道形态。1: 中肠; 2: 后肠; 3: 食道; 4: 马氏管; 5: 唾液腺; 6: 直肠。
A. Location of alimentary canal; B, C, D. Morphology of alimentary canal. 1: Midgut; 2: Hindgut; 3: Esophagus; 4: Malpighian; 5: Salivary gland; 6: Rectum.

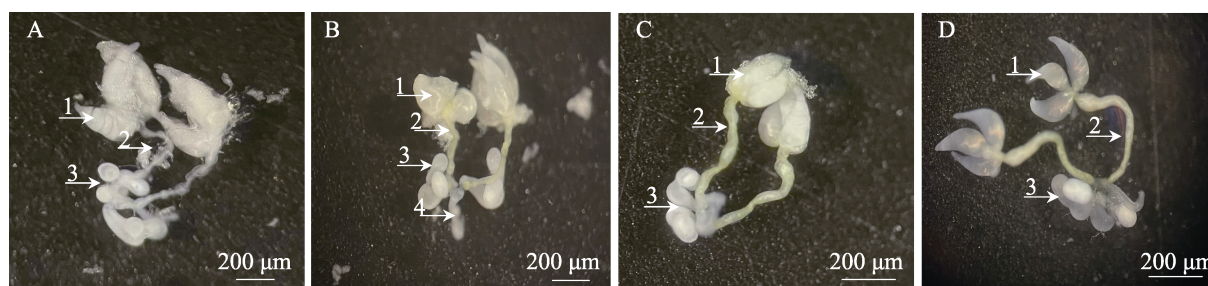


图 3 雄虫内生生殖器发育的形态变化

Fig. 3 Morphological changes in the development of male internal genitalia

A. 羽化 24 h 内雄虫; B, C. 羽化后 2-3 d 的雄虫; D. 羽化后 4 d 雄虫。1: 睾丸; 2: 输精管; 3: 雄性附腺; 4: 中射精管。
A. Male within 24 hours after eclosion; B, C. Males 2-3 days after eclosion; D. Males 4 days after eclosion.
1: Testis; 2: Vas deferens; 3: Paragonia gland; 4: Ejaculatory.

2.1.4 雌虫内生生殖器 实验解剖了不同发育时期的雌虫内生生殖器, 并对解剖的卵巢进行了 I - V 级的分级(图 4: A-H)。雌虫内生生殖器包括一对卵巢、一对侧输卵管、1 根中输卵管、受精囊和交配囊。卵巢为端滋式, 每侧有 24-33 根卵巢小管组成, 每根卵巢小管顶端着生 1 根端丝, 将左右两侧卵巢集合在一起。卵巢小管末端为卵巢小管柄, 卵巢小管柄汇合形成侧输卵管。左右两侧侧卵巢管汇合于 1 根中输卵管。受精囊开口于中输卵管末端, 呈弯钩状, 一般为黄色, 其顶端

有一根细而短的管道连接于一个膜纸囊状腺体。交配囊为圆球形囊状体, 其管道与中输卵管末端连通(图 4: B)。交配后不久, 交配囊内可见乳白色精包(图 5)。

2.2 雄虫特异表达基因的原位杂交

2.2.1 cDNA 序列在载体中插入方向的确认 用于原位杂交检测的探针是与体内 mRNA 互补的 RNA, 称为反义 RNA; 用于阴性对照的探针是与体内 mRNA 方向相同的, 称为正义 RNA。

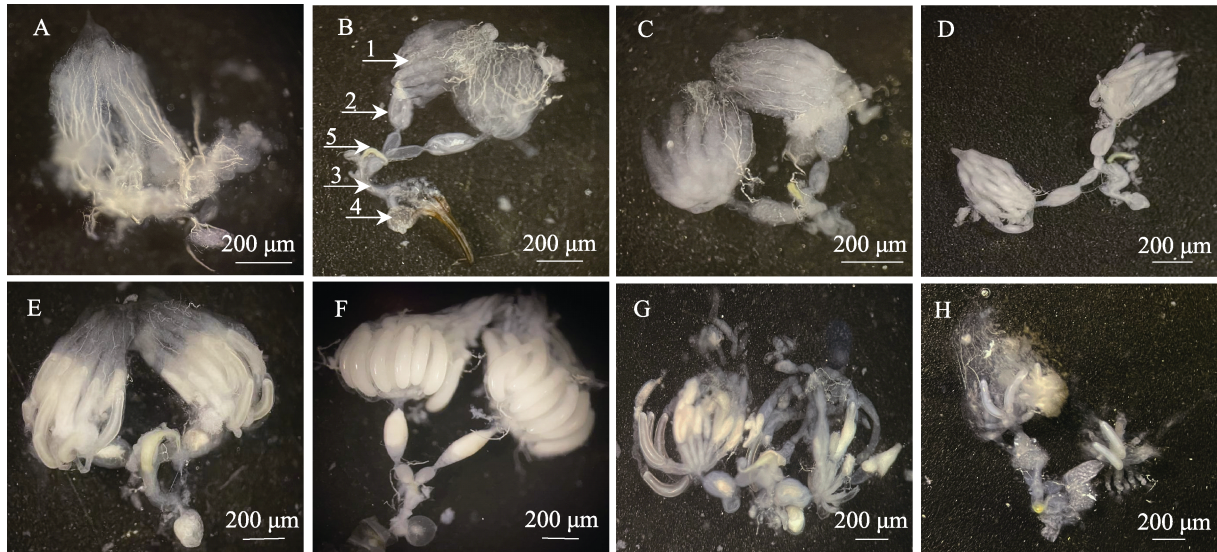


图 4 雌虫内生殖器发育形态

Fig. 4 Morphological changes in the development of female internal genitalia

A, B. I 级, 乳白透明期; C, D. II 级, 卵黄沉积期; E, F. III 级, 成熟待产期; G. IV 级, 产卵盛期; H. V 级, 产卵末期。1: 卵巢; 2: 侧输卵管; 3: 中输卵管; 4: 交配囊; 5: 受精囊。

A, B. Grade I, transparent stage; C, D. Grade II, vitellogenesis stage; E, F. Grade III, matured stage;

G. Grade IV, egg-laying stage; H. Grade V, late egg-laying stage.

1: Ovary; 2: Lateral oviduct; 3: Common oviduct; 4: Bursa compulatrix; 5: Spermatheca.

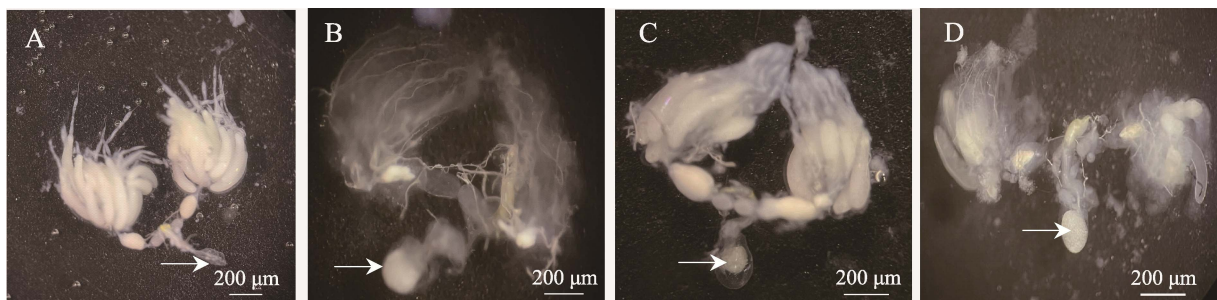


图 5 褐飞虱交配前后交配囊的变化

Fig. 5 Changes of bursa compulatrix before and after mate

A. 产卵期未交配的卵巢; B. 乳白透明期已交配卵巢; C. 卵黄沉积期已交配卵巢; D. 产卵期已交配卵巢。

箭头: 交配囊。未交配的交配囊透明, 空瘪。交配后交配囊内膨大有乳白色填充物。

A. Unmated ovaries in egg-laying stage; B. Mated ovaries in transparent stage; C. Mated ovaries in vitellogenesis stage;

D. Mated ovaries in egg-laying stage.

Arrow: Bursacompulatrix. The unmated bursa compulatrix is transparent and hollow, and the bursa compulatrix with milky white contents after mating.

连接入 pGEM-T 载体的 cDNA 方向决定了探针的方向, 即 cDNA 方向为 T7-SP6 或 SP6-T7 (图 6: A)。根据测序结果克隆 NIEF7-5 插入方向为 SP6-T7 (图 6: B), 即用 SP6 聚合酶可催化合成 NIEF7 基因的正义链, 与该基因转录的 mRNA 不能互补杂交, 可作为实验的阴性对照。克隆

NIEF7-1 插入方向 T7-SP6 (图 6: C), 即用 SP6 聚合酶可催化合成 NIEF7 基因的反义链, 可与该基因转录的 mRNA 互补杂交。用 M13-F/M13-R 引物对阳性克隆的质粒进行扩增, 可获得含有载体骨架的 PCR 产物作为合成 RNA 探针的 DNA 模板。

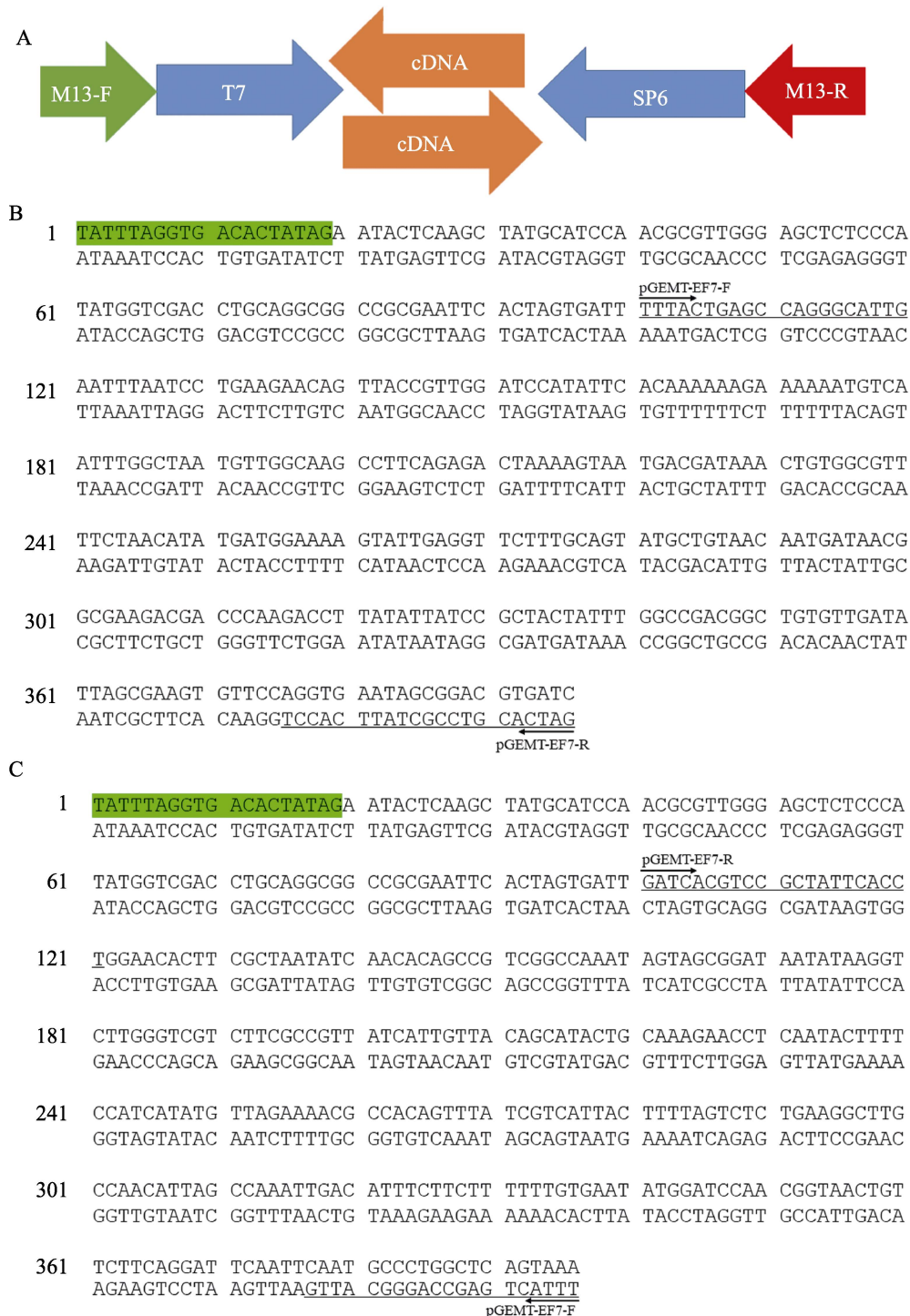


图 6 pGEM-T 载体中 cDNA 插入方向示意图 (A)、阳性克隆 NIEF7-5 (B) 和 NIEF7-1 (C) 中 cDNA 的插入方向

Fig. 6 Schematic diagram of cDNA insertion direction in pGEM-T vector (A), cDNA insertion direction in positive clone NIEF7-5 (B) and NIEF7-1 (C)

箭头方向表示了引物、启动转录或 cDNA 的方向。绿色碱基显示 SP6 聚合酶启动子序列，下划线序列为 *NIEF7* 基因的正向和反向引物位置。

The direction of the arrows indicates the orientation of primers, initiating transcription or cDNA. The SP6 polymerase promoter sequence is highlighted in green. The forward and reverse primer positions of the *NIEF7* gene are marked with the underline.

2.2.2 基因的定量分析和原位杂交 利用荧光定量 PCR 技术分析了褐飞虱 *NIEF7* 基因的表达模式,以雄虫脂肪体部位的表达量作为参照。结果显示 *NIEF7* 基因在雄虫内生殖器和脂肪体中表达,且在睾丸中的表达量显著高于其他部位,而在肠道和雌虫内生殖器中无表达(图 7)。

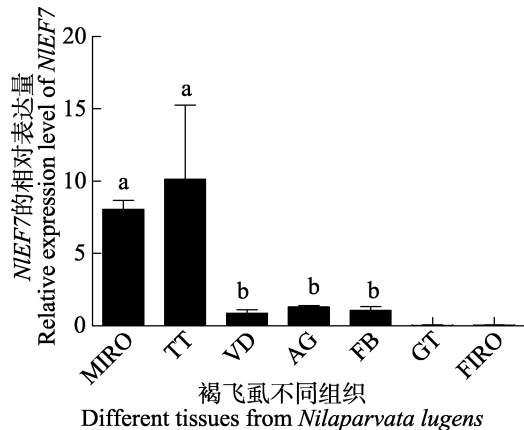


图 7 *NIEF7* 基因在雄虫不同组织中的定量 PCR 分析

Fig. 7 Quantitative PCR analysis of *NIEF7* gene in different tissues of male insects

图中数据为平均值±标准差,所有数据均为 3 次生物学重复,每个重复 3 次技术重复。*NIEF7* 基因表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法,以 *Nlactin* 基因为内参基因。柱上标有不同小写字母表示经 Duncan's 新复极差法检验在 0.05 水平上 *NIEF7* 基因的表达具有显著差异。MIRO: 雄虫内生殖器; TT: 睾丸; VD: 输精管; AG: 附腺; FB: 脂肪体; GT: 肠道; FIRO: 雌虫内生殖器。

Data are mean±SD, all data are 3 biological replicates with 3 technical replicates. The expression level of *NIEF7* gene was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, and the *Nlactin* was used as the internal reference gene. Histograms with different lowercase letters indicate significant differences between expression of *NIEF7* at the 0.05 level by Duncan's new multiple range test. MIRO: Male internal reproductive organs; TT: Testis; VD: Vas deferens; AG: Accessory glands; FB: Fatbody; GT: Gut; FIRO: Female internal reproductive organ.

原位杂交的结果显示,作为阴性对照雄虫用 *NIEF7* 正义链探针杂交后,无明显的杂交信号(图 8:A)。去头后雌虫用 *NIEF7* 反义链杂交后,无明显的杂交信号(图 8:B),表明该基因在雌虫中不表达。在未做破坏性处理的雄虫样本中也无明显杂交信号(图 8:C),而在去头后的雄虫胸部和腹部中均有了明显的蓝色杂交信号(图 8:

D)。结果表明,长度在 300 bp 左右的探针是无法通过体壁进入褐飞虱体内,褐飞虱的去头处理有助于探针的进入。杂交后解剖雄虫阴性对照的内生殖器无杂交信号(图 8:E),而在用反义链杂交的雄虫脂肪体(图 8:F)和雄虫内生殖器的精巢和附腺部位(图 8:G)有明显蓝色信号。分离出雄虫内生殖器后再进行固定和反义链探针的杂交,结果发现在精巢、附腺和输精管处均有杂交信号,且在精巢部位颜色变为深紫色(图 8:H)。结果表明,*NIEF7* 在雄虫脂肪体和内生殖器中特异性表达并在精巢部位表达量最高。利用解剖后组织进行固定和杂交有助于提高杂交信号。

3 讨论

本研究以褐飞虱雄虫特异表达的一个编码含 EF-hand 结构域蛋白的基因为研究对象,利用定量 PCR 技术和原位杂交技术对该基因在褐飞虱不同组织中的表达进行分析。在显微镜下对褐飞虱的不同器官组织进行分离,并对比分析了样本的不同处理对基因表达原位杂交检测的影响,在此基础上建立了详尽的褐飞虱雄虫内生殖器的基因表达原位杂交技术,展示了不同组织的分离解剖的显微实图。

组织原位杂交的过程涉及繁琐的步骤。本研究采用了地高辛标记 RNA 探针,因大多数生物体内不含该物质,标记的探针用于原位杂交检测目标 RNA 时,无背景干扰问题(何世斌等, 2014)。本实验在制备 RNA 原位杂交探针时,主要采用体外转录的方法获得探针。首先将目标基因克隆至载体的多克隆位点上,其中目标基因的两侧含有 T7 和 SP6 的 RNA 聚合酶启动子序列。之后通过载体通用引物扩增以获得含有载体骨架的线性化 DNA 模板。再应用 T7 和 SP6 RNA 聚合酶以及带有地高辛标记的三磷酸尿苷(Uridine triphosphate, UTP)进行体外转录获得含有地高辛标记的正义和反义 RNA 探针。以线性化的 DNA 为模板经过反复转录可以合成数量多、活性高 RNA 探针,用以检测组织中表达量相对较低的 mRNA,并与之形成稳定的二聚体

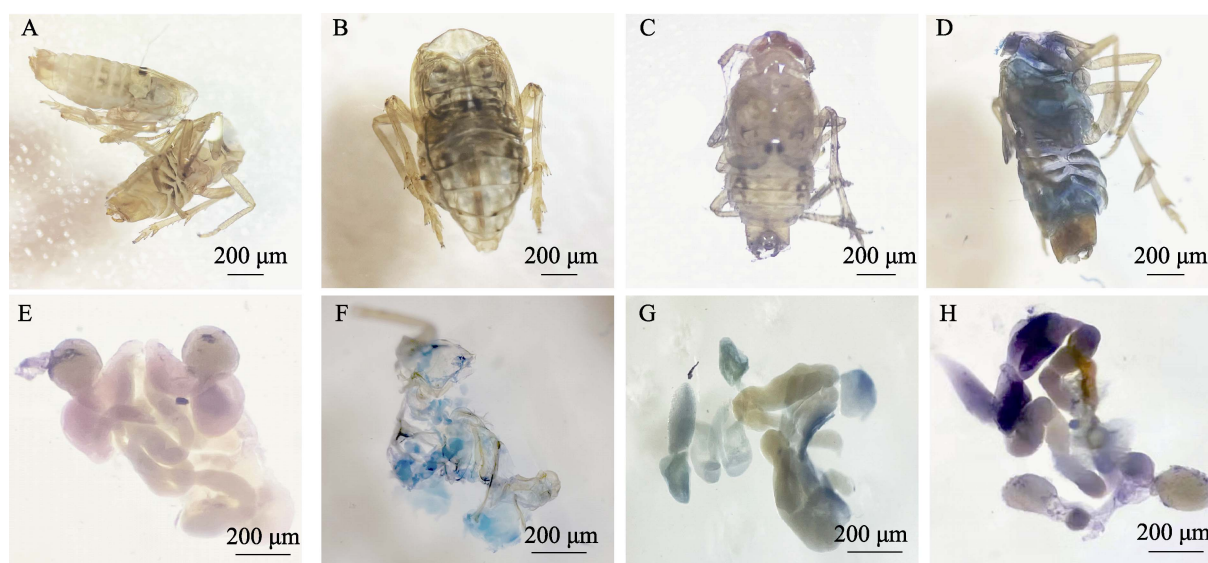


图 8 原位杂交技术检测基因 *NIEF7* 在雄虫内生殖器中的表达模式

Fig. 8 *In situ* hybridization of *NIEF7* in male internal genitalia

A. 阴性对照, 与正义探针杂交的去掉头部的雄虫; B. 与反义探针杂交的去掉头部的雌虫; C. 与反义探针杂交的雄虫整虫; D. 与反义探针杂交的去掉头部的雄虫; E. 阴性对照, 从与正义探针杂交的去头雄虫中分离的内生殖器; F. 从与反义探针杂交的去头雄虫中分离的脂肪体; G. 从与反义探针杂交的去头雄虫中分离的内生殖器; H. 与反义探针杂交的雄虫内生殖器。杂交信号可在雄虫脂肪体和内生殖器尤其是精巢和附腺中观察到。

A. Negative control, head-removed males hybridized with sense probe; B. Head-removed females hybridized with anti-sense probe; C. Whole males hybridized with anti-sense probe; D. Head-removed males hybridized with anti-sense probe; E. Negative control, internal genitalia isolated from head-removed males hybridized with sense probes; F. Fat body isolated from head-removed males hybridized with antisense probes; G. Internal genitalia isolated from head-removed males hybridized with antisense probes; H. Internal genitalia hybridized with antisense probes. Signal development can be observed in fat body and internal genitalia in males, especially in testes and paragonia gland.

(Xu *et al.*, 2017)。用偶联 AP 的抗地高辛抗体可特异性识别被标记的 RNA 探针。利用 AP 和底物 BCIP/NBT 构成的显色系统实现显色观察。BCIP 在 AP 的作用下会被水解, 其产物会和 NBT 发生反应, 形成不溶性的深蓝色至蓝紫色沉淀。组织经原位杂交显色后可使用普通的显微镜镜检, 且显色可永久保留。该检测手段能满足大部分研究的灵敏度需求。另外, AP 也可用于荧光检测的底物 HNPP/Fast Red TR (罗氏公司), 杂交信号用激光共聚焦显微镜检测, 可进一步提高检测的灵敏度 (何丽云等, 2021)。实验通过完整虫体, 破坏性处理 (去头后) 样本以及解剖出雄虫内生殖器后样本的固定杂交 3 种处理, 发现破坏性处理有助于探针的进入, 解剖后的组织杂交有助于提高杂交信号。但解剖后褐飞虱组织在

固定等后续不断的清洗和换液处理中, 组织颜色会变得透明, 且因组织小, 在处理中很容易被破坏或吸出。所以在每次清洗和更换下一试剂前, 建议利用缓慢置换的办法, 保留部分原试剂, 逐步替代原试剂, 并尽量避免用移液枪对组织的反复吹打导致组织破碎或被吸出。如果在反复换液清洗等过程中, 采取离心的手段将组织样本进行浓缩则会导致显色后组织的黏连, 后期在观察时不易分割。若用破坏性处理后的样本固定、杂交、显色再解剖观察, 会因组织柔韧性降低, 难以获得完整的组织。因此, 在褐飞虱原位杂交中建议首选将褐飞虱头部和腹部分离成两部分, 而后进行固定和杂交显色初步确定基因表达的位置。在触角、足、翅、外生殖器和体壁等有色素沉积的组织中表达的基因可直

接解剖后固定杂交、显色再观测,而内部组织如内生殖器、唾液腺及脂肪体等表达的基因,建议选择分部位分离后固定杂交,在显色观察的时候再对组织进行分离。

褐飞虱生殖系统、唾液腺和肠道等组织在褐飞虱繁殖、取食、消化、吸收和抗逆解毒等方面具有重要的作用。为了解析褐飞虱繁殖、致害水稻、抗药性产生等的分子机制,准确的认识和解剖分析各种组织器官如唾液腺、肠道、内生殖器 etc 等尤为关键。本研究通过解剖分离直观地展示了唾液腺等组织器官所在位置和形态,并建立了基因组织表达的原位杂交方法。该方法利用化学显色技术结合光学显微镜解剖实现了组织水平上基因表达定位,简易、可靠,无需特殊、昂贵的设备,实用性强。

参考文献 (References)

- Chen M, Tang WQ, Shen J, Wang D, 2016. *In situ* fluorescent RNA hybridization in insect small organs. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(6): 1401–1406. [陈敏, 唐文倩, 沈杰, 王丹, 2016. 昆虫小器官 RNA 荧光原位杂交技术. 应用昆虫学报, 53(6): 1401–1406.]
- Chen PY, Liu SZ, Wang XL, 2013. Isolation of genes adapted to insect-resistant rice in the salivary glands of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(11): 1235–1243. [陈鹏宇, 刘顺枝, 王小兰, 2013. 褐飞虱唾液腺中水稻抗性适应基因的分离. 昆虫学报, 56(11): 1235–1243.]
- Ge LQ, Xia T, Huang B, Song QS, Zhang HW, Stanley D, Yang GQ, Wu JC, 2016. Suppressing male spermatogenesis-associated protein 5-like gene expression reduces vitellogenin gene expression and fecundity in *Nilaparvata lugens* Stål. *Scientific Reports*, 6: 28111.
- He LY, Wang F, Lin T, 2021. Application of RNA *in situ* hybridization in the locating of insect olfactory genes. *Journal of Shanghai Normal University*, 41(6): 66–72. [何丽云, 王帆, 林涛, 2021. RNA 原位杂交技术在昆虫嗅觉相关基因定位中的应用. 上饶师范学院学报, 41(6): 66–72.]
- He SB, Chai LQ, Tan JJ, Shen Y, Zhou P, Ma YF, Li LJ, 2014. Recent advances in fluorescence *in situ* hybridization. *Plant Science Journal*, 32(2): 199–204. [何世斌, 柴连琴, 谭珺隽, 沈尧, 周萍, 马云峰, 李立家, 2014. 荧光原位杂交技术的研究进展. 植物科学学报, 32(2): 199–204.]
- Horgan FG, Garcia CPF, Haverkort F, de Jong PW, Ferrater JB, 2020. Changes in insecticide resistance and host range performance of planthoppers artificially selected to feed on resistant rice. *Crop Protection*, 127: 104963.
- Huang J, Zhang N, Shan JH, Peng YX, Guo JP, Zhou C, Shi SJ, Zheng XH, Wu D, Guan W, Yang K, Du B, Zhu LL, Yuan LP, He GC, Chen RZ, 2020. Salivary protein 1 of brown planthopper is required for survival and induces immunity response in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11: 571280.
- Ji R, Ye WF, Chen HD, Zeng JM, Li H, Yu HX, Li JC, Lou YG, 2017. A salivary endo- β -1,4-glucanase acts as an effector that enables the brown planthopper to feed on rice. *Plant Physiology*, 173(3): 1920–1932.
- Ji R, Yu HX, Fu Q, Chen HD, Ye WF, Li SH, Lou YG, 2013. Comparative transcriptome analysis of salivary glands of two populations of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, that differ in virulence. *PLoS ONE*, 8(11): e79612.
- Konishi H, Noda H, Tamura Y, Hattori M, 2009. Proteomic analysis of the salivary glands of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 44 (4): 525–534.
- Li RZ, Ding JH, Hu GW, Su DM, 2016. Rice Brown Planthopper and Its Population Management. Shanghai: Fudan University Press. 36–81. [李如泽, 丁锦华, 胡国文, 苏德明, 2016. 褐飞虱及其种群管理. 上海: 复旦大学出版社. 36–81.]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Lu F, Qi GJ, Qin RR, Hu G, Wang Z, Zhang XX, Cheng XN, Zhai BP, 2011. The processes of morphological change and grading criteria development in the brown planthopper. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(5): 1394–1400. [卢芳, 齐国君, 秦冉冉, 胡高, 王政, 张孝义, 程遐年, 翟保平, 2011. 褐飞虱卵巢发育的形态变化及分级标准. 应用昆虫学报, 48(5): 1394–1400.]
- Peng X, Zha W, He R, Lu T, Zhu L, Han B, He GC, 2011. Pyrosequencing the midgut transcriptome of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 20(6): 745–762.
- Qiu J, He Y, Zhang J, Kang K, Li T, Zhang WQ, 2016. Discovery and functional identification of fecundity-related genes in the brown planthopper by large-scale RNA interference. *Insect*

- Molecular Biology*, 25(6): 724–733.
- Rao WW, Zheng XH, Liu BF, Guo Q, Guo JP, Wu Y, Shanguan XX, Wang HY, Wu D, Wang ZZ, Hu L, Xu CX, Jiang WH, Huang J, Shi SJ, He GC, 2019. Secretome analysis and in planta expression of salivary proteins identify candidate effectors from the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 32(2): 227–239.
- Wang TZ, Wang ZL, Zhu HF, Wang ZY, Yu XP, 2019. Analysis of the gut microbial diversity of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) by high-throughput sequencing. *Acta Entomologica Sinica*, 62(3): 51–61. [王天召, 王正亮, 朱杭锋, 王紫晔, 俞晓平, 2019. 基于高通量测序的褐飞虱肠道微生物多样性分析. *昆虫学报*, 62(3): 51–61.]
- Wang WX, Lai FX, Li KL, Fu Q, 2014. Selection of reference genes for gene expression analysis in *Nilaparvata lugens* with different levels of virulence on rice by quantitative real-time PCR. *Rice Science*, 21(6): 305–311.
- Wang XH, Xu HF, Xu YY, Liu Y, Zhou Z, 2003. The structure and developmental progress of reproductive system of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Acta Phytophylacica Sinica*, 30(3): 261–266. [王宪辉, 徐洪富, 许永玉, 刘勇, 周真, 2003. 甜菜夜蛾雌性生殖系统结构、发育分级及在测报上的应用. *植物保护学报*, 30(3): 261–266.]
- Wang XQ, Guo JS, Li DT, Yu Y, Hagoort J, Moussian B, Zhang CX, 2021. Three-dimensional reconstruction of a whole insect reveals its phloem sap-sucking mechanism at nano-resolution. *eLife*, 10: e62875.
- Xu X, You YW, Zhang L, 2017. Localization of odorant receptor genes in locust antennae by RNA *in situ* hybridization. *Journal of Visualized Experiments*, 125: 55924
- Xu XY, Ding JH, 1990. Structure of female reproductive system and ovarian development grading of *Laodelphax striatellus*. *Entomological Knowledge*, 27(6): 365–366. [徐秀媛, 丁锦华, 1990. 灰飞虱雌性生殖系统的构造和卵巢发育分级. *昆虫知识*, 27(6): 365–366.]
- Yang ZF, Liu XL, Zhang YY, 2010. Molecular cloning and expression profiling of cytochrome P450 monooxygenase gene CYP4CE1 in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(3): 257–268. [杨之帆, 刘晓黎, 张艳艳, 2010. 褐飞虱细胞色素 P450 单加氧酶基因 CYP4CE1 的克隆及表达谱. *昆虫学报*, 53(3): 257–268.]
- Villarreal CA, Jonckheere W, Alba JM, Glas JJ, Dermauw W, Haring MA, van Leeuwen T, Schuurink RC, Kant MR, 2016. Salivary proteins of spider mites suppress defenses in *Nicotiana benthamiana* and promote mite reproduction. *The Plant Journal*, 86(2): 119–131.