

东亚飞蝗谷胱甘肽 S-转移酶 RNA 干扰效率研究^{*}

刘 婷¹ 秦国华^{1,2} 张建珍¹ 马恩波^{1**}

(1. 山西大学应用生物研究所 太原 030006; 2. 山西大学环境与资源学院 太原 030006)

摘 要 东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 是我国主要的农业害虫之一,已发现东亚飞蝗对某些农药产生了抗性,其抗性机制可能与谷胱甘肽硫转移酶(GST)代谢解毒相关。本研究利用特异性引物合成东亚飞蝗 GST 4 个不同家族基因的双链 RNA(dsRNA),将 dsRNA 注射到东亚飞蝗幼虫体内,采用 Real time RT-PCR 技术测定了干扰不同时间后目的基因 mRNA 的表达水平。结果表明 4 个不同家族 GST 的沉默效应具有时间差异。来自 delta 家族的 *LmGSTd1* 和 sigma 家族的 *LmGSTs5* 基因在注射 dsRNA 后 12 h 时 mRNA 量就已显著下降;而来自 theta 家族的 *LmGSTt1* 和 unknown 家族的 *LmGSTu1* 基因在注射 24 h 后 mRNA 水平才呈现显著下降。本研究对后续东亚飞蝗 GST 功能及抗性机制研究提供了基础资料和依据,同时对其它昆虫 RNA 干扰研究具有一定的借鉴作用。

关键词 谷胱甘肽硫转移酶,东亚飞蝗, RNA 干扰, 时间效应

The RNA interference efficiency of glutathione S-transferases from *Locusta migratoria manilensis*

LIU Ting¹ QIN Guo-Hua^{1,2} ZHANG Jian-Zhen¹ MA En-Bo^{1**}

(1. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. College of Environment and Resource, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract The migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) (Orthoptera: Acridoidea), is one of the most important pests in our country. Resistance of this locust to some insecticides has been detected and the resistance mechanism hypothesized to involve glutathione S-transferases (GST). In this study, double-stranded RNA of four different classes of GST was synthesized using specific gene primers and injected into the 2nd instar nymphs of *L. m. manilensis*. The effects of silencing time on target GSTs mRNA expression was assayed by real time RT-PCR. The results show that the expression of *LmGSTd1* and *LmGSTs5* were reduced significantly 12 h after injection, whereas *LmGSTt1* and *LmGSTu1* were reduced significantly 24 h after injection. These results provide a foundation for further study of GST function and mechanisms in locusts.

Key words glutathione S-transferases (GSTs), *Locusta migratoria manilensis*, RNAi, time effect

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)指利用外源或内源的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)特异性地沉默基因表达。dsRNA 进入生物体内后,被一种称为 Dicer 的核酸酶切割,形成大约 21 ~ 25 nt 的干扰性小 RNA 片段(siRNA), siRNA 识别并且靶向切割同源性靶 mRNA 分子,从而引起特异基因的沉默(Misquitta and Paterson,

1999; Zamore *et al.*, 2000)。

自 1995 年研究者在对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的研究中发现了反义 RNA 沉默现象以来(Guo and Kemphues, 1995),作为一种新型的分子生物学技术, RNA 干扰在昆虫中主要用于对基因功能的研究,在害虫防治方面的研究还相对较少。Mao 等(2007)在棉铃虫的研究

^{*} 资助项目:国家自然科学基金重大国际合作项目(30810103907)、国家自然科学基金(30870302)、中国博士后科学基金(201003656 和 20090451359)。

^{**} 通讯作者, E-mail: maenbo2003@sxu.edu.cn

收稿日期: 2011-05-05, 接受日期: 2011-05-12

中,将与代谢解毒直接相关基因的 dsRNA 在拟南芥和烟草上成功表达,棉铃虫取食转基因植物后相关基因表达受到抑制,从而对棉子酚的抗性显著降低,从而成功地证实了通过 RNAi 进行害虫防治是切实可行的。

东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) 隶属于直翅目,蝗总科,斑翅蝗科,飞蝗属。东亚飞蝗以禾本科与莎草科植物为食,是农业生产中最为重要的害虫之一(朱恩林,1999)。作者所在课题组于 2004 年首次提出东亚飞蝗具有抗药性,且其抗药性机制可能与谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs) 代谢解毒相关 (Ma *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009)。GSTs 是生物体内的一类Ⅱ相代谢酶,能使有害的亲电物质与内源的还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 结合,使之更易于排出体外(刘小丽等,2003; 宣涛等,2009)。GSTs 也是涉及代谢抗性的重要解毒酶之一,主要介导有机磷、拟除虫菊酯和 DDT 等的抗性,昆虫杀虫剂抗性水平与 GSTs 活性水平相关(刘小丽等,2003; 宣涛等,2009)。作者最近已获得东亚飞蝗 10 个 GST 基因的全长,分别属于 delta、sigma、theta 和 unknown 4 个家族 (Qin *et al.*, 2011)。

本文利用 RNA 干扰技术沉默 4 个不同家族谷胱甘肽 S-转移酶基因,在 12、24、48、72 和 96 h 分别检测不同家族 GST 基因 mRNA 表达水平,探

索不同家族 GST 基因的干扰效率及最佳干扰时间,为进一步开展各 GST 基因功能及其在抗药性的作用提供研究基础,并为其它昆虫的 RNA 干扰研究提供参考和借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

东亚飞蝗:从广西南宁购买虫卵,人工气候箱进行孵化,光照 L:D = 14:10,温度 (30 ± 2) °C,相对湿度为 60%。选择同一时间孵化的若虫转移至纱笼中,给以新鲜小麦幼苗和适当的光照,喷水保持湿度。

试剂:RNA 提取试剂 RNAiso™ Plu 和 DNase I (RNase Free) 购于 Takara 公司; RevertAid™ H Minus M-MuLV 反转录酶购于 Fermentas 公司; 2 × Taq PCR MasterMix 购于天根公司; SYBR® Premix Ex Taq™ II 购于 TaKaRa 公司; Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒和 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒均购于 Promega 公司。

1.2 东亚飞蝗谷胱甘肽硫转移酶引物设计

根据已知的东亚飞蝗谷胱甘肽硫转移酶基因片段,使用 primer Express 3.0 软件设计 GST 基因的 dsRNA 合成引物和表达引物,所有引物均由上海英骏公司合成。

表 1 东亚飞蝗谷胱甘肽硫转移酶基因的 dsRNA 合成引物和表达引物
Table 1 Primers used for expression analysis and dsRNA synthesis of GSTs

GenBank	Gene	Primers	Sequence(5'-3')
HM131834	<i>LmGSTd1</i>	ds-F	TAATACGACTCACTATAGGGGCAAAGAAGAGAGCATTGGTGA
		ds-R	TAATACGACTCACTATAGGGGCTCCTGCGTGATTAGTTTCTTC
		RT-F	ACAGATGAAGCCAGAGTA
		RT-R	TCCTTAGGGTAAAGTGAGT
HM131840	<i>LmGSTs5</i>	ds-F	TAATACGACTCACTATAGGGACATGGCAGTTGACACAATATCAG
		ds-R	TAATACGACTCACTATAGGGTGGTCTCTTGCTAATCCACTCCTT
		RT-F	GGGAAGACGACGTGCAGTCT
		RT-R	CTGCAGATCTTCCCAGTCATTG
HM131843	<i>LmGSTt1</i>	ds-F	TAATACGACTCACTATAGGGTGGCAAATGACATCCCTTAT
		ds-R	TAATACGACTCACTATAGGGTGGCAAATGACATCCCTTAT
		RT-F	CCAGAACAGTGGCTAGGCGGGAACG
		RT-R	GTGGGACACCTCCATACTT
HM131835	<i>LmGSTu1</i>	ds-F	TAATACGACTCACTATAGGGCGCCTGGTCCGTTTAGTG
		ds-R	TAATACGACTCACTATAGGGTCCAGCCCTTCGTTCACTT
	β-actin	RT-F	GAACGAAGGGCTGGAAC
		RT-R	GACCGATGACAGGGAGAT

1.3 东亚飞蝗谷胱甘肽硫转移酶基因的干扰效果的检测

1.3.1 东亚飞蝗谷胱甘肽硫转移酶基因 dsRNA 的合成 根据已得到的东亚飞蝗谷胱甘肽硫转移酶的核苷酸序列,设计特异性 dsRNA 合成引物,引物信息见表 1。以克隆测序确认含有各基因全长序列的质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增条件为 95℃ 3 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,25 个循环,72℃ 10 min。所得 PCR 产物用 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) 试剂盒回收纯化。对纯化后的 PCR 产物进行定量,使所获产物满足进行 dsRNA 体外合成的量。dsRNA 合成参照 T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega) 试剂盒进行,最后得到的 dsRNA 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,酶标仪 (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA) 将其定量至终浓度为 1.5 μg/μL,保存至 -80℃ 备用。

1.3.2 dsRNA 的体外注射 选取东亚飞蝗 2 龄第 3 天大小均一、健康状况一致的若虫为实验用虫。使用微量注射器 (宁波三爱仪器厂) 自虫体腹部侧面第 2 至 3 腹节的侧膜处进行注射,处理组注射 dsRNA 的量为 3 μg,对照组注射相等体积的无菌水,每组均注射 50 头若虫,若虫注射后放入与 1.1 条件相同的人工气候箱内饲养,分别于 12、24、48、72 和 96 h 取样,每一时间点设 3 个生物学重复,每个生物学重复含 3 头若虫。样品在液氮中迅速冷冻后保存于 -80℃ 中备用。

1.3.3 不同时间点整虫 cDNA 第一链的合成 采用 RNAiso™ Plus (Takara) 提取各组若虫的总 RNA,并用 DNase I (RNase Free) 纯化所提取的 RNA,RNA 电泳与定量检测后,参照 RevertAid™ H Minus M-MuLV 反转录酶说明书以 0.5 μg 进行 cDNA 模板的合成。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 分析东亚飞蝗谷胱甘肽硫转移酶 mRNA 水平的表达 以上述 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增。反应采用荧光染料 SYBR Green I 在 ABI Prism 7300 进行,PCR 扩增条件为:95℃ 10 s,95℃ 5 s,55℃ 20 s,72℃ 31 s,40 个循环,95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。用 ABI Prism 7300 SDS 1.1 (Sequence detector system) 软件进行数据记录分析,阈值线由软件自动设定。采用标曲法计算谷胱甘肽硫转移酶基因在不同时间点的相对表达量。处理组和对照组均设 3 个生

物学重复,每个样品 2 次技术重复。

1.4 数据统计与分析

将 12 h 对照组目的基因与 β-actin 相对表达量比值标准化为 1,其余各组为目的基因与 β-actin 相对表达量比值与对照组的比值。采用 SPSS15.0 进行统计学检验,结果为平均值 ± 标准误 ($n=3$),采用 Fisher's LSD 多重比较检验, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

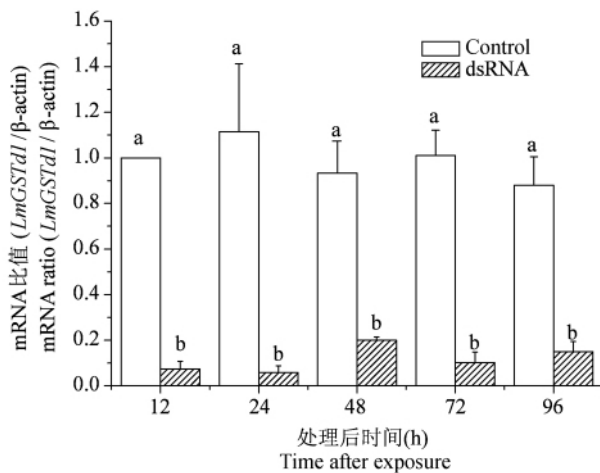
2 结果与分析

运用 Real-time qPCR 对东亚飞蝗注射不同家族 GST 基因 dsRNA 后不同时间点各基因的 mRNA 表达水平进行了分析,结果显示: *LmGSTd1* 在注射 dsRNA 后 12 h 时 mRNA 的表达量显著下降, mRNA 水平仅为对照组的 7.33%,在 48 h 后 mRNA 表达量有所回升,但干扰效率仍在 80% 以上 (图 1)。与 *LmGSTd1* 相似, *LmGSTs5* 也在注射 dsRNA 后 12 h 时 mRNA 量显著下降,为对照组的 7.9%,但高水平的干扰效率一直持续到 96 h 尚未恢复 (图 2)。*LmGSTt1* 和 *LmGSTu1* 虽在注射 dsRNA 后 12 h 时有所下降,但与对照组相比统计学检验并不显著,在 24 h 后 mRNA 量呈现显著下降 (图 3、4)。

3 讨论

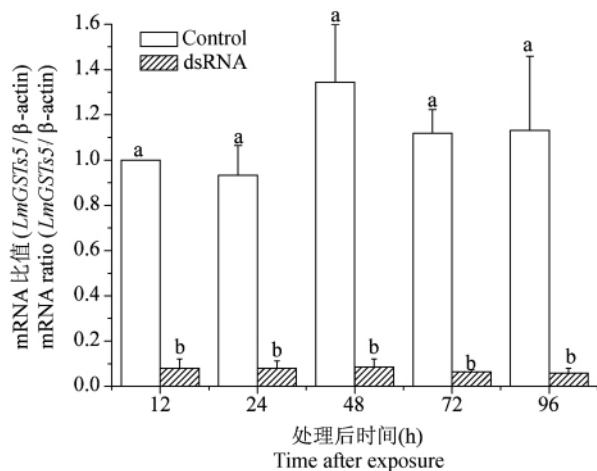
RNAi 即双链 RNA 介导的同源 mRNA 特异性降解的过程。具体来说,就是暴露在细胞内部的 dsRNA 首先被加工成 21~23 nt 的 siRNA,然后形成的 RNA 诱导沉默复合物介导了 mRNA 的特异性降解,导致转录后基因沉默。作为一种高效、特异的调节基因表达技术, RNAi 技术可以很容易地导致个体特定基因缺失表型,在研究基因功能时更加方便、快捷 (Napoli *et al.*, 1990)。

利用 RNAi 研究基因的主要特点有: (1) RNAi 特异性强,能够专一性地降解与序列相应的单个内源基因的 mRNA,但不影响其它基因的表达 (Fire *et al.*, 1998)。 (2) RNAi 抑制基因表达具有高效性,相对很少量的 dsRNA 分子 (远少于内源 mRNA 的数量) 就能完全抑制该基因的表达。 (3) RNAi 抑制基因表达的效应不受细胞限制,在不同细胞间可以长距离传递和维持。 (4) 使用范围广、成本低。综上所述, RNAi 能高效特异地抑

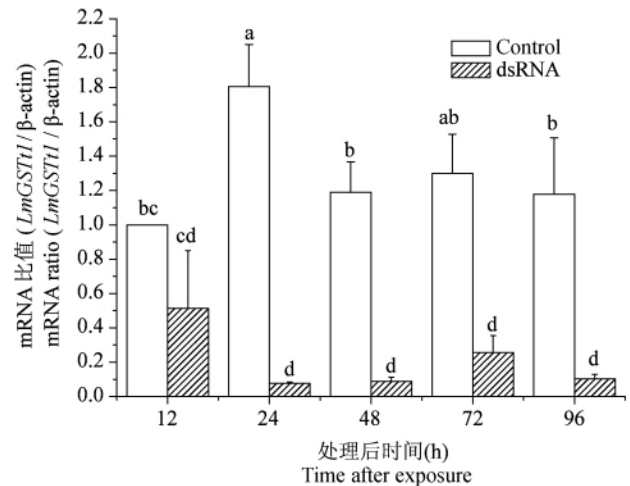
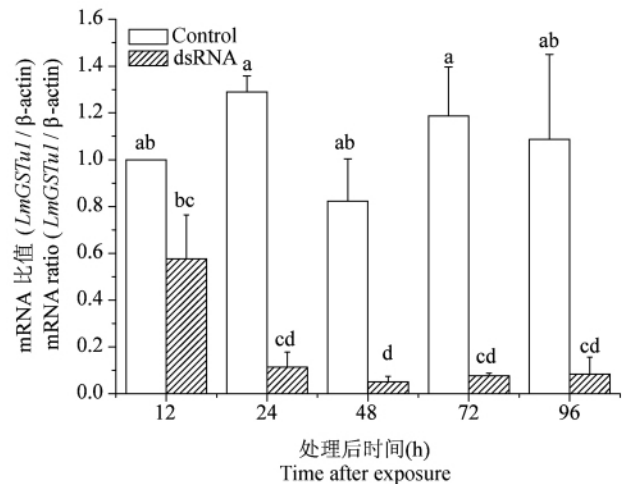
图 1 *LmGSTd1* 不同时间的干扰效率Fig. 1 Silencing effects of *LmGSTd1* at different time

注: 图中数值为平均值 $\pm$ 标准误, 将 12 h 对照组标准化为 1 (目的基因值/ β -actin), 其余各组数值为与对照组的比值 ($n=3$)。采用 Fisher's LSD 多重比较检验, 不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。下图同。

Averaged data from three independent experiments are given together with SE. Mean expression in each groups is shown as a fold increased compared to mean expression in control group at 12 h which has been ascribed an arbitrary value of 1 (target gene/ β -actin). Different letters represents significant difference at 0.05 level. (Fisher's LSD multiple comparison test). The same below.

图 2 *LmGSTs5* 不同时间的干扰效率Fig. 2 Silencing effects of *LmGSTs5* at different time

制基因的表达, 因而广泛应用于基因功能的研究 (Montgomery *et al.*, 1998)。

图 3 *LmGSTt1* 不同时间的干扰效率Fig. 3 Silencing effects of *LmGSTt1* at different time图 4 *LmGSTu1* 不同时间的干扰效率Fig. 4 Silencing effects of *LmGSTu1* at different time

在昆虫 RNAi 研究中, 主要的方法有注射、浸泡、喂食和转基因等方法。对于某种特定的昆虫来说, 选择一种合适的 dsRNA 导入方法是至关重要的。将体外合成的 dsRNA 通过微量操作器注射入体内后很容易在体内扩散, 引起 RNAi, 且干扰效果明显, 定量准确, 所以作者选择微量注射的方法。有研究表明, 在不同物种间达到明显 RNAi 效果所需要的 dsRNA 的有效剂量是不同的, 有的可以相差几个数量级。如在鞘翅目昆虫中, 某一基因达到明显 RNAi 效果的 dsRNA 剂量, 用于鳞翅目昆虫则没有效果而必须加大所使用剂量 (Zhuang *et al.*, 2008)。推测上述现象的原因是不同物种体内的 RNAi 体系及机理不尽相同。

(Arakane *et al.*, 2005)。本实验中采用 3 μg 对 2 龄东亚飞蝗若虫进行注射,得到了很好的干扰效果。

RNAi 的时效性是很受关注的问题,在众多方法中,注射法的 RNAi 效果最为直接,因为 dsRNA 可以直接进入生物体随开放式循环而迅速遍布全身,所以了解注射后何时开始出现干扰效应,何时干扰效果最好就显得非常重要。本实验中选择东亚飞蝗 2 龄第 3 天的若虫进行注射,若选择太小的虫体,因其腹节较短不易操作;若选择较大若虫,则需加大注射剂量造成伤口过大增加其死亡率。故 2 龄第 3 天是东亚飞蝗较为理想的注射时期。不同的物种其 RNAi 持续的时间也不尽相同,因此检测 RNAi 效果的时间点就显得尤为重要 (Levin *et al.*, 2005)。检测的时间过早,很有可能 RNAi 效应还未开始,则检测不到预期的干扰效果;检测时间过晚,则可能由于 mRNA 恢复至正常水平,干扰效果可能大幅度降低,也不能检测到 RNAi 的效果。本实验在大量重复预实验的基础上,发现不同家族 GST 基因最佳干扰效果出现的时间不同,delta 和 sigma 家族的 *LmGSTd1* 和 *LmGSTs5* 是在 12 h 出现,而 theta 和 unknown 家族的 *LmGSTt1* 和 *LmGSTu1* 则是在 24 h 出现,所有家族的 GST 在出现干扰效果之后较长的一段时间内都保持较好的干扰效果。

本文对后续进行东亚飞蝗 GST 的功能及抗药性研究有重要的指导意义,为进一步鉴定 GST 基因功能提供了基础资料,同时,本研究为基于 RNAi 技术对东亚飞蝗进行有效控制奠定了基础,对其它昆虫开展 RNA 干扰研究也有一定的借鉴意义。

参考文献 (References)

- Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, 2005. The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.*, 14(5): 453—463.
- Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, 1998. Potent and specific genetic interference mediated by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806—811.
- Guo S, Kemphues KJ, 1995. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81(4): 611—620.
- Levin DM, Breuer LN, Zhuang S, Anderson SA, Nardi JB, Kanost MR, 2005. A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(5): 369—380.
- 刘小丽, 廖祥儒, 赵立梅, 2003. GST 酶的提取纯化及特性分析. 河北大学学报(自然科学版), 23(2): 170—174.
- Ma EB, He YP, Zhu KY, 2004. Comparative studies of acetylcholinesterases purified from two field populations of the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*): implications of insecticide resistance. *Pest Biochem. Physiol.*, 78(1): 67—77.
- 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.
- Misquitta L, Paterson BM, 1999. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNAi): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(4): 1451—1456.
- Montgomery MK, Xu SQ, Fire A, 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(26): 15502—15507.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R, 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell*, 2(4): 279—289.
- Qin G, Jia M, Liu T, Xuan T, Yan Zhu K, Guo Y, Ma E, Zhang J, 2011. Identification and characterisation of ten glutathione S-transferase genes from oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Pest Manag. Sci.*, 67(6): 697—704.
- 宣涛, 吴海花, 郭亚平, 2009. 东亚飞蝗谷胱甘肽 S-转移酶分离纯化. 昆虫知识, 46(3): 480—484.
- Yang ML, Zhang JZ, Zhu KY, Xuan T, Liu XJ, Guo YP, Ma EB, 2009. Mechanisms of organophosphate resistance in a field population of oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 71(1): 3—15.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP, 2000. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1): 25—33.

朱恩林, 1999. 中国东亚飞蝗发生与治理. 北京: 中国农业出版社. 3—558.

Zhuang SF, Lisha K, James BN, 2008. Multiple alpha

subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the *Manduca* immune system. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(4): 365—379.