舞毒蛾 *Ldcht10* 基因序列的克隆及其功能分析*

刘建红** 张 常 赵秋勇 范晓军***

（太原理工大学化学化工学院生物与制药工程系，太原 030024）

摘 要 **【目的】** 研究舞毒蛾 *Lymantria dispar* 几丁质酶基因的时空表达特性及其在蜕皮发育过程中的生物学功能，筛选在舞毒蛾发育过程中致死性的几丁质酶基因，为实现基于 RNAi 的舞毒蛾有效控制提供重要的基础数据。**【方法】** 设计简并引物克隆舞毒蛾几丁质酶基因 *Ldcht10* 关键序列，通过使用实时荧光定量 PCR 方法检测该基因在舞毒蛾不同龄期与组织中的相对表达量，选取部分序列的双链 RNA（dsRNA）研究该基因功能。**【结果】** 本研究克隆了长度为 2 057 bp 的舞毒蛾几丁质酶基因 *Ldcht10* 序列；各组织与不同龄期 RT-PCR 结果表明 *Ldcht10* 的时空表达特性存在明显差异，*Ldcht10* 在各个龄期均表达活跃且在前肠与后肠中的表达水平最高；*Ldcht10* 的 RNA 干扰试验表明：注射 *Ldcht10* dsRNA 后 *Ldcht10* 的表达受到极大抑制，该基因被沉默后 24.3%的舞毒蛾幼虫因无法完成蜕皮或化蛹而死亡。**【结论】** 舞毒蛾中几丁质酶基因 *Ldcht10* 在各个龄期与组织中的表达存在差异，且在舞毒蛾蜕皮过程中具有十分重要的生物学功能，该基因被沉默后部分舞毒蛾因无法完成蜕皮而导致死亡。

关键词 舞毒蛾，几丁质酶，实时荧光定量 PCR，RNA 干扰

Cloning and functional analysis of the *Ldcht10* gene sequence in *Lymantria dispar* larvae

LIU Jian-Hong** ZHANG Chang ZHAO Qiu-Yong FAN Xiao-Jun***

(Department of Biological and Pharmaceutical Engineering, College of Chemical Engineering and Technology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract **[Objectives]** In order to provide a basis for effective pest control based on RNAi, the temporal and spatial expression, and the biological functions of the chitinase family of genes in *Lymantria dispar* were investigated and chitinase genes causing death during development were screened. **[Methods]** Degenerate primers were designed to clone the critical sequence of *LdCht10* and the real-time quantitative PCR method was used to detect the relative expression level of *LdCht10* in different instars and tissues of *Lymantria dispar* larvae. A fragment of the cloned sequence was chosen to study gene function using the RNA interference method. **[Results]** A critical sequence of *LdCht10* of 2 057 bp in length was successfully cloned. The RT-PCR results show that the temporal and spatial expression patterns of *LdCht10* were significantly different, and that the *LdCht10* gene was expressed in all instars and tissues, with the highest expression occurring in the foregut and hindgut. RNA interference showed that 24.3% of test larvae died as a result of not completing molting and pupation after the gene was silenced. **[Conclusion]** The temporal and spatial expression profiles of *LdCht10* were distinct in different instars and tissues. Based on the RNAi results, *LdCht10* could play an important role in the molting process of *L. dispar*, and gene silencing can block ecdysis causing death in some larvae.

Key words *Lymantria dispar*, chitinases, qRT-PCR, RNAi

* 资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目(31101490)

**第一作者 First author，E-mail：liu15513079014@163.com

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

收稿日期 Received：2014-09-03，接受日期 Accepted：2015-04-14

几丁质由 N-乙酰-D 葡萄糖胺通过 β-1,4 糖苷键聚合而成的直链多糖，在昆虫体内，几丁质是表皮和围食膜的关键组成部分。几丁质酶可以参与几丁质的代谢，降解几丁质。在昆虫体内，几丁质酶可以从几丁质长链内部随机切割生成几丁寡糖（Merzendorfer，2013），几丁质酶与胚后发育和旧表皮的降解有关（Graham and Sticklen，1994）。基于其重要功能，研究其生物学功能具有重要的意义。

昆虫几丁质酶基因的首次克隆并测序是由 Kramer 等（1993）完成的烟草天蛾 *Lymantria dispar* 的几丁质酶基因，随后更多的昆虫几丁质酶及几丁质酶类似蛋白基因在昆虫体内被发现，包括鳞翅目（Fitches *et al.*，2004）、双翅目（Zhu *et al.*，2008a）、鞘翅目（Genta *et al.*，2006）、半翅目（Nakabachi *et al.*，2010）等，这些基因编码的蛋白质在分子量、结构域、理化性质及酶学特性方面各不相同。随着基因测序技术及生物信息学的不断发展，果蝇、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Herbst 等模式生物的基因组测序的完成，Arakane 和 Muthukrishnan（2010）以赤拟谷盗的几丁质酶和几丁质酶类蛋白为例，根据序列结构的不同将其分为八组。Zhang 等（2011）通过比较基因组学的研究，对按蚊 *Culicidae*、果蝇 *Drosophila melanogaster* 和赤拟谷盗的命名进行了补充和完善。鉴于昆虫几丁质酶在昆虫生长发育阶段的重要作用，通过破坏昆虫体内几丁质酶的正常代谢来防治害虫可以作为一种新型的生物防治策略。Dubois 等（1977）研究发现舞毒蛾 *Lymantria dispar* 在喂食 Bt 与几丁质酶混合物后的死亡速率明显高于单独使用几丁质酶或 Bt 的死亡速率。

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是外源性或内源性双链 RNA（double- strandedRNA，dsRNA）介导的特异性的对同源 mRNA 降解并且导致靶基因的表达沉默，从而产生相应的功能表型缺失的现象（Hannon，2002）。双链 RNA 介导的 RNAi 现象陆续在真菌（Cogoni and Macino，1999）、果蝇（Pal-Bhadra *et al.*，1999）、植物（Waterhouse *et al.*，1998）、大小鼠（Hasuwa *et al.*，2002）等多种生物中被发现。RNAi 技术也被用于研究昆虫几丁质酶的功能，Mi 等（2012）通过使用 RNAi 技术研究发现在赤拟谷盗中几丁质酶与赤拟谷盗表皮降解有关，李大琪等（2011）通过使用 RNAi 技术研究了东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 几丁质酶家族基因发现东亚飞蝗拥有多个几丁质酶基因，该基因被沉默后飞蝗无法完成蜕皮而导致死亡，Khajuria 等（2010）通过饲喂法对欧洲玉米螟 IV 型几丁质酶的 RNAi 研究表明该酶对调节幼虫围食膜几丁质含量起重要作用。

舞毒蛾是一种危害森林和行道树的世界性害虫，国外主要分布于北美洲、欧洲、日本及朝鲜等地；国内舞毒蛾分布北起东北南至台湾省，西起新疆东至江苏省，几乎遍布全国各省（方三阳，1988；肖刚柔，1992）。舞毒蛾食性杂，寄主植物多达 500 余种，由于其巨大的危害性，舞毒蛾已成为美国农业部国内检疫法规中被检疫的森林害虫。在我国目前对舞毒蛾的防治方法主要有烟剂防治、人工采集幼虫法、人工采集卵块法、性引诱剂诱杀及灯光诱杀等方法。生物防治方法具有长效性和不容易产生抗性等优点，越来越受到科研工作者的关注。本研究根据昆虫几丁质酶研究现状，对舞毒蛾 Ⅱ 型几丁质酶基因 10（*LdCht10*）片段进行了克隆，通过实时荧光定量 PCR 方法检测分析了该基因的时空表达特征，并采用 RNAi 技术研究其功能，为舞毒蛾的生物防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

舞毒蛾虫卵购置于中国林业科学研究院森林生态环境与保护所，放置在生化培养箱内孵育与饲养，温度保持在（26±1）℃，相对湿度在 50%±10%，每天光照时间为 16 h，用人工饲料喂养。

1.2 舞毒蛾 *LdCht10* 的克隆

舞毒蛾幼虫总 RNA 的提取使用 RNAiso 试剂，具体提取操作见 TaKaRa 公司总 RNA 提取说明书。cDNA 合成步骤参照 PrimeScript™ RT

reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书，制备好后置于－80℃备用。

通过 NCBI 搜索已经报道的 II 型几丁质酶基因序列，并使用 MEGA6.0 进行同源性分析，从中找出相对保守的氨基酸序列并设计兼并引物（表 1）扩增保守区。

PCR 扩增体系为：以 2 μL 的 cDNA 做为模板，正反向简并引物各 1 μL，dNTP 2 μL，10× buffer 2.5 μL，TaqDNA 聚合酶 0.3 μL，补充 dd H_2O 16.2 μL。

PCR 扩增条件：94℃预变性 3min，94℃变性 1 min，55℃复性 30 s，72℃延伸 40 s，32 个循环，72℃总延伸 10 min，4℃保存。

PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，然后在紫外凝胶成像仪中观测目的条带。获得清楚目的条带后进行胶回收，具体操作见生工 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明书，然后连接到 pMD^{TM}18-T Vector 上，具体操作见 TaKaRa 公司 pMD^{TM}18-T Vector Cloning Kit 试剂盒说明书，然后转化到感受态细胞 DH5α 中，氨苄抗性筛选，然后挑取阳性菌落进行 PCR 鉴定与测序。

1.3　*LdCht10* 的时空表达分析

采用 RT-PCR 的方法来研究 *LdCht10* 在不同龄期与不同组织中的转录水平。采用在昆虫体内具有高度的保守性并且在各组织内表达量大且稳定的 β-actin 基因作为 RT-PCR 的内参基因，采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 在已获得的 *LdCht10* 上自行设计定量 PCR 引物（表 1），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。选取从第 1 龄期到第 3 龄期的第 2 天、第 4 龄期到第 6 龄期的第 3 天舞毒蛾幼虫经液氮研

表 1　试验所用的引物及其序列

Table 1　Sequence of primers in this experiment

引物用途 Primer application	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of primers (5′–3′)
克隆 *LdCht10* Cloning *LdCht10*	LdCH10-1F	TACGATTACCACGG**Y**CA**R**TGGGA**Y**AAG
	LdCH10-1R	GTCTTC**R**AA**V**GAHACCCATTG**R**TC
	LdCH10-2F	GACCTBGA**Y**TGGGA**R**TA**Y**CC
	LdCH10-2R	GTCTTCAAAAGATACCCATTGATCGTC
	LdCH10-3F	G**S**TGGTGG**D**ATG**R**T**Y**TGGGC
	LdCH10-3R	TGCAGACACAGCGGCGGAAAGCA
	LdCH10-4F	G**S**TGGTGG**D**ATG**R**T**Y**TGGGC
	LdCH10-4R	CGACCACCTGGATCACGAGT
	LdCH10-5F	GAGTCATATGCTGGAGGAGAAGC
	LdCH10-5R	TAGAY**R**ATGTG**R**GT**R**CA**V**AG
q-PCR	β-actin F	GCGACTTGACCGACTACCT
	β-actin R	TTGATGTCACGCACGATTT
	LdCht10 F	CGAGACCAGGGCTAGAGGA
	LdCht10 R	AGGGACCCATTCGACCA
dsRNA 合成 dsRNA synthesis	dsLdCht10-1F	*TAATACGACTCACTATAGGG*GAGAACTACGTGCATCATTC
	dsLdCht10-1R	*TAATACGACTCACTATAGGG*CGACCACCTGGATCACGAGT

黑色加粗的字母代表简并碱基，R=A/G，Y=C/T，K=G/T，S=C/G，W=A/T，H=A/C/T，B=C/G/T，V=A/C/G，D=A/G/T；斜体字母表示 T7 启动子序列。

The black bold letters represent the degenerate bases, R=A/G, Y=C/T, K=G/T, S=C/G, W=A/T, H=A/C/T, B=C/G/T, V=A/C/G, D=A/G/T. The italic letters represen the T7 promoter sequences.

磨，使用 RNAiso 试剂提取其总 RNA，使用 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real Time）试剂盒反转录成 cDNA 模板。

选取第 6 龄期幼虫解剖，分离出前肠、中肠、后肠、表皮与马氏管经液氮研磨，使用 RNAiso 试剂提取其总 RNA，使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒反转录成 cDNA 模板。

PCR 反应体系：2 μL cDNA（10×）；10 μL SYBR. Select Master Mix（2×）；0.15 μmol/L 上游/下游引物各 0.8 μL；ddH_2O 6.4 μL。

扩增条件为：UDG 激活 50℃ 2 min；95℃ 预变性 2 min；95℃ 15 s，60℃ 1min，40 个循环。Real-time PCR 自动生成熔解曲线，使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 的方法分析 *Cht10* 在舞毒蛾幼虫不同龄期与不同组织中的相对转录水平。

1.4 体外转录合成 *LdCht10* dsRNA

根据 *LdCht10* 序列设计含有 T7 启动子序列（斜体）的 RNA 干扰引物（表 1），以构建好的 *Blunt-LdCh10*（部分片段）质粒为模板进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系为：质粒 DNA 模板 0.5 μL；10 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μL；10×Taq Plus Buffer 2.5 μL；dNTP Mixture（2.5 mmol/L）2 μL；Taq Plus（2.5 U/μL）0.3 μL；ddH_2O 补充至 18.7 μL。

扩增条件为：94℃预变性 3 min，变性 94℃ 30 s，复性 55℃ 30 s，延伸 72℃ 50 s，35 个循环，最后 72℃延伸 10 min，4℃保存。PCR 产物用上海生工 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行胶回收纯化。纯化后用酶标仪测量 DNA 的浓度。

dsRNA 的体外合成按照 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒（Promega），具体操作见说明书。dsRNA 浓度采用美国 Thermo Fisher 1510 酶标仪测定，并调至终浓度 1 μg/μL。

1.5 *LdCht10* 功能研究

分别选取 4 龄、5 龄、6 龄蜕皮第 1 天幼虫及预蛹第 1 天，采取微量注射器将 5 μL dsRNA 从舞毒蛾侧面腹节的连接处注射。注射时避开气门，另外注射 DEPC 处理过的水和无注射的幼虫设置为对照组，每组 15 头，设置 3 个生物学重复，共计 45 头。将处理后的舞毒蛾和对照组置于培养箱进行饲养，饲养条件与方法参照 1.1。为了从分子水平检测 RNAi 效果，将致死的幼虫单头提取 RNA 进行 qPCR 实验检测基因的表达情况（方法同 1.4）。

2 结果与分析

2.1 *LdCht10* 序列的拼接及生物信息学分析

本研究共获得 5 个 DNA 片段（A、B、C、D 和 E），依次得到 381、604、891、1 298 和 881 bp 的条带（图 1），扩增得到片段位置示意图见图 2（以赤拟谷盗 *TcCHT10* 为模型）。并将测序后的片段根据重叠区域进行拼接，获得核苷酸序列共计 2 057 bp，编码 685 个氨基酸。将拼接后获得的序列翻译成氨基酸序列，然后使用 NCBI 的 BLAST 进行序列同源性分析，结果显示与目前唯一登录至 NCBI 的鳞翅目的大红斑蝶 *Danaus plexippus* 同源性最高，达到 62%，其中包括一个完整的催化区和几丁质结合区（图 3）。

2.2 *LdCht10* 的时空表达

用 qPCR 方法检测 *LdCht10* 基因在幼虫发育过程中不同龄期与组织的相对表达量，结果见图 4

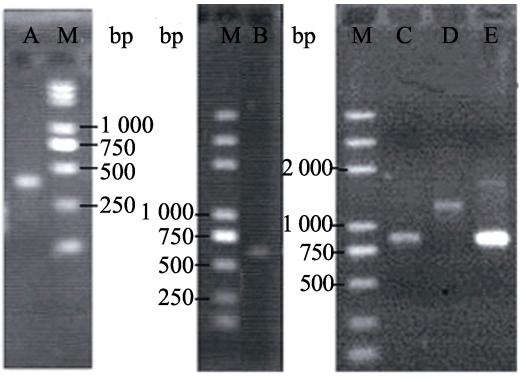

图 1 *LdCht10* 的保守区扩增结果

Fig. 1 Amplification of conserved region of *LdCht10*

A 泳道：片段 A，381 bp；B 泳道：片段 B，604 bp；C 泳道：片段 C，891 bp；D 泳道：片段 D，1 298 bp；E 泳道：片段 E，881 bp；M 泳道：DNA marker。

Lane A: Fragment A, 381 bp; Lane B: Fragment B, 604 bp; Lane C: Fragment C, 891 bp; Lane D: Fragment D, 1 298 bp; Lane E: Fragment E, 881 bp; Lane M: DNA marker.

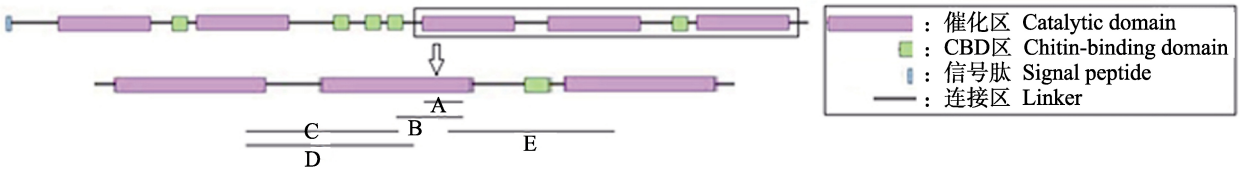

图 2　*LdCht10* 片段调取示意图

Fig. 2　The diagrams of PCR products of *Lymantria dispar* chitinase genes *LdCht10*

A~E 表示分段获得的序列，A：381 bp；B：604 bp；C：891 bp；D：1 298 bp；E：881 bp.

A-E represents the sequence of fragments obtained, A: 381 bp; B: 604 bp; C: 891 bp; D: 1 298 bp; E: 881 bp.

AGGMVWALDLDDFRNRCGQGKHPLINAIKNSLLESNVDEDDLLTIPLADPGNGIDDDDILILPPKTTTQ
KPIYRPTTQRPVYRPTTQRPTTRPTARPTTQRPTQLTTLMDEIVHTTKKPATTVSSTLEERYKVVCYYTN
WAWYRPGPGKFTPSDIDPSLCTHIVYAFAVLDTKRLVIKPHDIWLDVENKFYEKVVALKSKGVKVLLGLG
GWDDSASDKYSRMVNSASARRKFIIHALDFIDQYEFDGLDLDWEYPKCWQVNCEKGPSSDKQGFANLV
RELRASFKSRGLLLSAAVSASKRVIDAGYDVATLSRNLDWISLMTYDYHGQWDKKTGHVAPMYASDYN
DDSTLNTHFTVHYWIQKGASPEKLILGVPFYGQSFSLVENAGTGLGVESYAGGEAGDETRARGFLSFYEI
CERIKVSGWSVTRDPGGRMGPYASFDDQWVSFDDDFMIRHKAEYVRAMGLGGSMAWALDLDDFSGK
YCGCGKSPLLATINHVLRGLKEPPRCVLEEIQEPDRPETPDMNDTPDKDQIPTMPDAPDTEVDVTNIEPE
PEVEDTDVHVHPSHETDTDLDSSSFEGMSCTGNVFKGDTSDCSKYYLCLNGHWRELKCPEPLHWAKNH
CDWPEKARCRAKAALRLTGLQQDEEPVEDRPIVGCYFTNWAFYRPGKGAYGPEQLDTVSNLCTHII

图 3　*LdCht10* 氨基酸序列分析

Fig. 3　Deduced amino acid sequence of *LdCht10*

红色标记的区域为预测的 *LdCht10* 的催化区，绿色标记的区域为预测的 *LdCht10* 的几丁质结合区。

Deduced catalytic domain is shown in red and chitin binding domain is shown in green.

和图 5。在不同龄期的表达检测中，*LdCht10* 均有表达，尤以第 2 龄期与第 4 龄期表达水平高，第 5 龄期表达水平少。在不同组织的表达检测中，*LdCht10* 在前肠与后肠中的表达水平明显要高于在其他组织中的表达水平，推测 *LdCht10* 可能在前肠与后肠中发挥降解表皮几丁质的主导作用。

2.3　*LdCht10* RNAi 对舞毒蛾的影响

注射 *LdCht10* dsRNA 后 2~3 d，4 龄、5 龄和 6 龄幼虫实验组与对照组均能正常发育，实验组预蛹期幼虫出现不能化蛹而死亡（图 6：A），而对照组幼虫均化蛹；待发育 4~5 d 后，实验组 4 龄、5 龄和 6 龄幼虫出现无法蜕皮而死亡的现象（图 6：B），死亡率达到 24.3%，还有部分幼虫出现蜕皮延迟现象，而对照组幼虫几乎全部

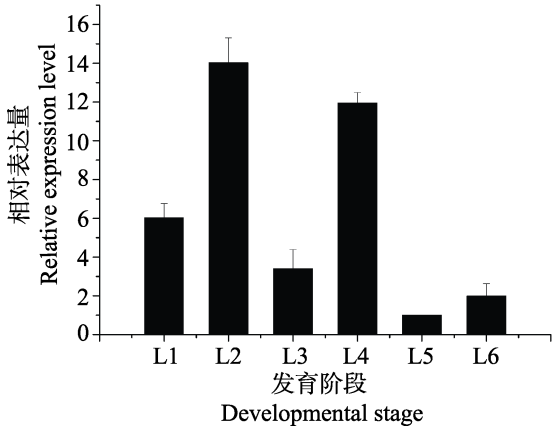

图 4　*LdCht10* 在舞毒蛾幼虫不同龄期的相对表达量

Fig. 4　Relative expression of *LdCht10* in various instar larvae

L1~L6：舞毒蛾幼虫 1 龄至 6 龄。误差棒为 3 次平行实验误差。

L1-L6: First-instar to sixth-instar larvae. Each bar represents the means ± SD of three independent experiments.

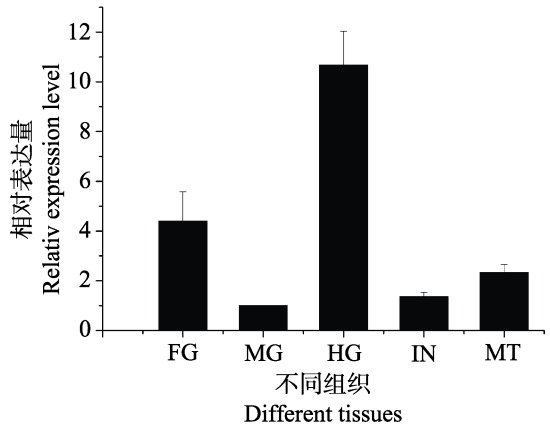

图 5 *LdCht10* 在舞毒蛾 6 龄幼虫不同组织的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *LdCht10* in different tissues of sixth-instar larvae

FG：前肠；MG：中肠；HG：后肠；IN：表皮；MT：马氏管。误差棒为 3 次平行实验误差。

FG: Foregut; MG: Midgut; HG: Hindgut; IN: Integument; MT: Malpighian tubules. Each bar represents the means ± SD of three independent experiments.

图 6 *LdCht10* 的干扰结果

Fig. 6 Effect of *LdCht10* dsRNA on *Lymantria dispar*

A. 不能化蛹幼虫；B. 无法蜕皮幼虫。

A. The result of not completing pupation; B. the result of not completing molting.

蜕皮正常生长且活动力强，只有极少数几只死亡，可能是因为注射的时候造成的物理性损伤。

实时荧光定量 PCR 结果（图 7，图 8）表明，注射 *LdCht10* dsRNA 后致死幼虫体内 *LdCht10* 的表达水平相比注射 DEPC 处理过的水和无注射的幼虫体内 *LdCht10* 的表达水平明显降低。

3 讨论

昆虫几丁质酶是调节昆虫蜕皮、食物消化和

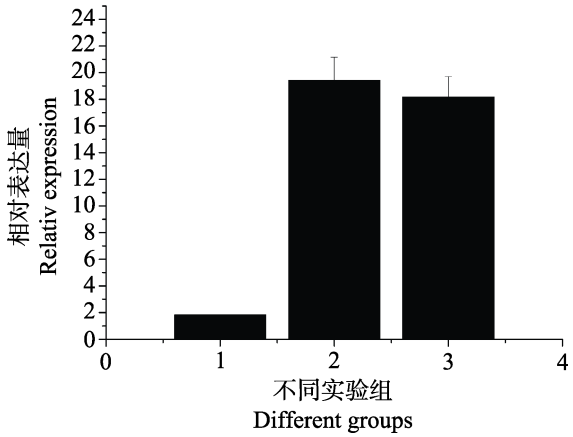

图 7 *LdCht10* 在舞毒蛾幼虫实验组与对照组的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *LdCht10* between experimental group and control group

1、2 和 3 分别代表注射 *LdCht10* dsRNA 幼虫、注射 DEPC 处理水幼虫与无注射幼虫

1, 2 and 3 represent the larvae *LdCht10* dsRNA, the larvae injected with DEPC treated water and blank control, respectively.

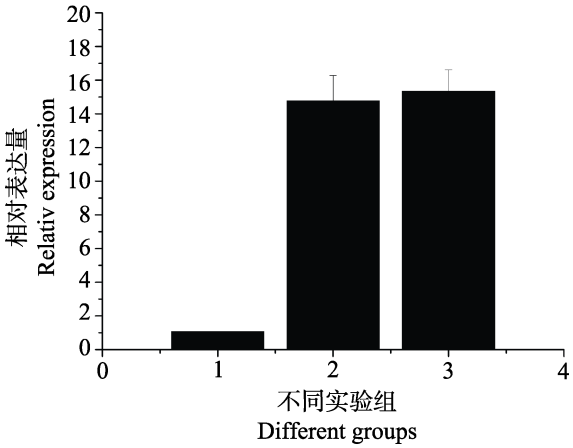

图 8 *LdCht10* 在预蛹舞毒蛾幼虫实验组与对照组的相对表达量

Fig. 8 Relative expression between experimental group and control group of *LdCht10*

1、2 和 3 分别代表注射 *LdCht10* dsRNA 预蛹幼虫、注射 DEPC 处理水预蛹幼虫与无注射预蛹幼虫。

1, 2 and 3 represent *LdCht10* dsRNA injected prepupa, the prepupa inject DEPC treated water and blank control, respectively.

新器官形成的一种重要酶类，Zhu 等（2008）用 RNAi 技术研究证实昆虫几丁质酶包括 8 种类型。本论文通过设计简并引物克隆了 *LdCht10* 部分序列，共计 2 057 bp，全部位于编码区，共编

码氨基酸 685 aa，包括一个完整的催化区与 CBD 区，研究表明与其他昆虫 Cht10 之间有较高的同源性，特别与鳞翅目昆虫大红斑蝶最为接近，这表明了昆虫体内的 Cht10 的生物活性对其正常的生长发育具有不可替代的作用。

LdCht10 的表达模式显示 *LdCht10* 在昆虫各个龄期均有表达，但在不同龄期表达水平并不相同，其中在第 2 龄期与第 4 龄期相对表达水平达到最高，这可能与几丁质在舞毒蛾蜕皮过程中周期性的合成与降解有关，它们为昆虫每次蜕皮所必需（Gu *et al.*，2013），在蜕皮前参与内表皮几丁质的降解，在蜕皮后可能会仍有部分残留的几丁质需要进一步降解，且其在前肠与后肠等由外胚层发育的器官中的转录水平达到最高，推测其主要参与肠道中几丁质的降解，与舞毒蛾蜕皮发育有关，这与中华稻蝗 *Oxya chinensis* 上得到的结果基本一致（李大琪等，2014）。以上分析表明虽然 *LdCht10* 在舞毒蛾体内的功能相对保守，但是它在幼虫不同龄期与组织中相对表达水平的不同显示几丁质代谢程度在舞毒蛾每个龄期和各组织中存在差异。

RNA 干扰（RNAi）是一种由双链 RNA 分子引起的特异性转录后基因沉默现象。这一发现为基因功能的研究提供了一个有效方法，与此同时也为作物害虫防治提供了新思路。2008 年，Price 等（2008）提出了基于 RNAi 技术的一种害虫防治新方法。Tian 等（2009）报道了通过饲喂甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 几丁质合成酶 dsRNA 也可以有效防治害虫。上述研究探索了将 RNAi 技术应用于害虫防治的有效的方法及该方法在害虫防治方面拥有的广泛前景。本研究运用 RNAi 方法研究 *LdCht10* 生物学功能，RNAi 结果表明 *LdCht10* 在舞毒蛾蜕皮过程中发挥着极为重要的作用。*LdCht10* 被沉默后，舞毒蛾新旧表皮不能完全分离，蜕皮无法完成，最终导致实验组部分舞毒蛾死亡。此外，ds*LdCht10* 注射组舞毒蛾幼虫发育出现延迟现象，进入蜕皮时间平均推迟 1 d。这可能与几丁质的代谢相关，旧表皮因缺少几丁质酶未能及时降解，导致合成新表皮的几丁质来源匮乏，无法短时期内合成新的表皮，导致幼虫推迟蜕皮时间。ds*LdCht10* 注射组的舞毒蛾死亡率达到 24.3%，说明该基因是舞毒蛾发育过程中重要的致死性功能基因。但是 *LdCht10* dsRNA 注射组的舞毒蛾并没有达到 100%致死效果，可能是注射液进入昆虫体内被体液消化所致。

本研究克隆了 *LdCht10* 基因序列，并通过 RT-PCR 方法证实了 *LdCht10* 在昆虫各个龄期均有表达，参与昆虫蜕皮的调控，当其正常表达被抑制后，部分发育阶段昆虫显示出发育延缓，无法正常蜕皮，甚至出现死亡现象。本研究表明 *LdCht10* 基因在昆虫发育过程中起重要作用，将其应用于 RNAi 技术在昆虫学研究领域具有潜在的应用前景，也为农业害虫的综合治理提供了新思路。

参考文献 (References)

Arakane Y, Muthukrishnan S, 2010. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67(2): 201–216.

Cogoni C, Macino G, 1999. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 399(6732): 166–169.

Dubois NR, 1977. Pathogenicity of selected resident microorganisms of *Lymantria dispar* (L.) after induction for chitinase. Doctoral dissertation. Massachusetts: University of Massachusetts.

Fitches E, Wilkinson H, Bell H, 2004. Cloning, expression and functional characterisation of chitinase from larvae of tomato moth (*Lacanobia oleracea*): a demonstration of the insecticidal activity of insect chitinase. *Insect Biochem. Mol. Biol.,* 34(10): 1037–1050.

Fang SY, 1988. Forest Entomology. Harbin: Northeast Forestry University Press. 121–125. [方三阳, 1988. 森林昆虫学. 哈尔滨: 东北林业大学出版社. 121– 125.]

Genta FA, Blanes L, Cristofoletti PT, 2006. Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.,* 36(10): 789–800.

Graham LS, Sticklen MB,1994. Plant chitinases. *Can. J. Bot.,* 72(8): 1057–1083.

Hannon GJ, 2002. RNA interference. *Nature*, 418(6894): 244–251.

Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, 2002. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Letters,* 532(1): 227–230.

Gu J, Huang LX, Gong YJ, Zheng SC, 2013. De novo

characterization of transcriptome and gene expression dynamics in epidermis during the larval-pupal metamorphosis of common cutworm. *Insect Biochem. Mol. Biol.,* 43(9): 794–808.

Khajuria C, Buschman LL, Chen MS, 2010. A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(8): 621–629.

Kramer KJ, Corpuz L, Choi HK, 1993. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.,* 23(6): 691–701.

Li DQ, Du JZ, Zhang JQ, Hao YS, Liu XJ, Zhang JZ，2011. Study on expression characteristics and functions of chitinase family genes from *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Scientia Agricultura Sinica*, 44(3): 485–492. [李大琪, 杜建中, 张建琴, 郝耀山, 刘晓健, 张建珍, 2011. 东亚飞蝗几丁质酶家族基因的表达特性与功能研究. 中国农业科学, 44(3): 485–492.]

Li DQ, Wang Y, Zhang JQ, Li T, Sun Y, Zhang JZ，2011. Molecular characterization and function of chitinase 10 gene (*OcCht10*) from *Oxya chinensis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(7): 1313–1320. [李大琪, 王燕, 张建琴, 李涛, 孙毅, 张建珍, 2014. 中华稻蝗几丁质酶基因 10（OcCht10）的分子特性及功能. 中国农业科学, 47(7): 1313–1320.]

Merzendorfer H, 2013. Insect-derived chitinase// Yellow Biotechnology II. Springer Berlin Heidelberg. 19–50.

Mi YN, Beeman RW, Arakane Y, 2012. RNAi-based functional genomics in *Tribolium castaneum* and possible application for controlling insect pests.*Entomol. Res.,* 42(1): 1–10.

Nakabachi A, Shigenobu S, Miyagishima S, 2010. Chitinase-like proteins encoded in the genome of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Insect. Mol. Biol.,* 19(s2): 175–185.

Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler JA, 1999. Cosuppression of nonhomologous transgenes in *Drosophila* involves mutually related endogenous sequences. *Cell,* 99(1): 35–46.

Price DRG, Gatehouse JA, 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Cell,* 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.

Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB, 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *PNAS,* 95(23): 13959–13964.

Xiao GR, 1992. Forest Insects of China. Beijing: China Forestry Publishing House. 1086–1087. [肖刚柔, 1992. 中国森林昆虫. 北京: 中国林业出版社. 1086–1087.]

Zhang J, Zhang X, Arakane Y, 2011. Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *PLoS ONE*, 6(5): e19899.

Zhu Q, Arakane Y, Beeman RW, 2008a. Characterization of recombinant chitinase-like proteins of *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.,* 38(4): 467–477.

Zhu Q, Arakane Y, Beeman RW, 2008b. Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. *PNAS,* 105(18): 6650–6655.