

二化螟 dsRNA 降解酶基因的克隆与表达分析



彭英传¹ 江 婷¹ 朱玉麟¹ 张万娜¹ 张 晶¹
韩召军² 肖海军^{1,3*}

(1. 江西农业大学昆虫研究所, 南昌 330045; 2. 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; 3. 北京林业大学草业与草原学院, 北京 100083)

摘要: 为解析二化螟 *Chilo suppressalis* 体内参与降解双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 的关键核酸酶的功能, 克隆二化螟不同的非专一性核酸酶 (non-specific nuclease, NUC) 基因, 并对这些基因进行生物信息学分析和组织定量表达分析, 同时对 dsRNA 降解酶 (dsRNA degrading nuclease, dsRNase) 活力的组织分布进行研究。结果显示, 共克隆获得 5 个 NUC 基因, 其中有 4 个编码 dsRNase 亚家族基因 (*CsdsRNase1*~*CsdsRNase4*) 和 1 个编码 Endonuclease G 亚家族基因 (*CsEndoG*)。5 个 NUC 基因的开放阅读框核苷酸序列长度范围为 828~1 338 bp, 编码 275~445 个氨基酸残基, 其分子量大小为 31.68~49.57 kD, 预测等电点为 5.48~9.42。*CsdsRNase1* 和 *CsdsRNase2* 含有信号肽序列, 两者相似度极高, 且与家蚕 *Bombyx mori* 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 中具有 dsRNA 降解酶活力的 dsRNase 同源聚类; *CsdsRNase1* 和 *CsdsRNase2* 均在二化螟中肠中高表达, 这与中肠组织超高的 dsRNA 降解酶活力分布模式一致, 表明这 2 个基因可能是中肠参与降解 dsRNA 的关键核酸基因。二化螟体内存在多条 dsRNase 基因序列, 尤其是中肠中高表达的 *CsdsRNase1* 和 *CsdsRNase2* 可影响二化螟体内 dsRNA 的稳定性, 从而影响 RNA 干扰效率。

关键词: 二化螟; 非专一性核酸酶; 基因克隆; RNA 干扰; dsRNA 降解酶

Cloning and expression analysis of double-stranded RNA degrading enzyme genes in the rice stem borer *Chilo suppressalis*

Peng Yingchuan¹ Jiang Ting¹ Zhu Yulin¹ Zhang Wanna¹ Zhang Jing¹ Han Zhaojun² Xiao Haijun^{1,3*}

(1. Institute of Entomology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi Province, China; 2. Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education; College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China; 3. School of Grassland Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: To elucidate the function of the key nucleases involved in the degradation of double-stranded RNA (dsRNA) in rice stem borer *Chilo suppressalis*, different non-specific nuclease (NUC) genes were cloned and subjected to bioinformatics analysis and tissue-specific expression analysis. The distribution of the activity of dsRNA degrading nucleases (dsRNase) in different tissues was also investigated. Five NUC genes were cloned, including four genes encoding the dsRNase subfamily (*CsdsRNase1*~*CsdsRNase4*) and one gene encoding the endonuclease G subfamily (*CsEndoG*). The open reading frames of the five NUC genes ranged from 828 to 1 338 bp, encoding 275 to 445 amino acid residues, with molecular weights ranging from 31.68 to 49.57 kD and predicted isoelectric points ranging from 5.48 to 9.32. *CsdsRNase1* and *CsdsRNase2* contained putative signal peptide sequences, and they shared high

基金项目: 国家自然科学基金 (32102223), 江西省自然科学基金 (20224BAB215019), 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ180216)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: hjxiao@jxau.edu.cn

收稿日期: 2021-09-29

sequence identity. *CsdsRNase1* and *CsdsRNase2* were clustered in the same clade with dsRNase enzymes that showed dsRNA-degrading activity in *Bombyx mori* and *Spodoptera litura*. *CsdsRNase1* and *CsdsRNase2* were predominantly expressed in the midgut, consistent with the high distribution of dsRNA degrading activity in this tissue, indicating that these two genes might be key nucleases involved in dsRNA degradation in the midgut. The presence of multiple dsRNase gene sequences in *C. suppressalis*, especially *CsdsRNase1* and *CsdsRNase2*, which were highly expressed in the midgut, might affect the stability of dsRNA, thereby affecting RNA interference efficiency.

Key words: *Chilo suppressalis*; non-specific nuclease; gene clone; RNA interference (RNAi); dsRNase

二化螟 *Chilo suppressalis* 是我国水稻上为害最为严重的常发性害虫之一,目前仍主要以化学防治控制其为害(徐刚和叶恭银,2018),但是由于长期连续使用单一杀虫剂,二化螟对杀虫剂逐渐产生了抗性,一些地区的杀虫剂田间防治效果明显下降(张帅等,2017),亟需开发新型防治技术。其中,RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术可以利用双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)沉默害虫体内特定的基因,使其生长发育紊乱而致死,从而达到害虫防控的目的(Price & Gatehouse, 2008; Zotti et al., 2018)。与传统方法相比,由于 RNAi 的保守性,使得 RNAi 技术适用于防治不同种类的害虫,具有一定广谱性;由于 dsRNA 靶标序列的多样性,还可以通过改变 dsRNA 的序列设计特异性杀虫剂,具有一定的物种专一性(Zhang et al., 2017)。因此,dsRNA 作为新型核酸杀虫剂在害虫防治领域具有优越性(肖瑶等,2020;付淑笙等,2021)。核酸农药的专一性、无残留等理念符合公众对绿色食品的要求,因此,具有比传统农药更加广阔的发展空间(王治文等,2019)。然而,RNAi 效率及其稳定性在不同昆虫间差异巨大,系统性 RNAi 对赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等鞘翅目昆虫有着极高的效率和稳定性,但二化螟等鳞翅目昆虫的 RNAi 效率普遍比较低,严重阻碍了基于 RNAi 的害虫控制技术的应用(Terenius et al., 2011; Wang et al., 2016)。

对于昆虫来说,RNAi 的发生首先需要从外界摄入 dsRNA 分子,然后经过消化系统被中肠细胞吸收,再进一步扩散到体内其他部位,从而引发系统性 RNAi 效应(Joga et al., 2016)。在这个过程中,dsRNA 和小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 作为 RNAi 沉默复合体的靶向引导元件,其顺利进入细胞内乃至跨越组织的传递在 RNAi 发挥其系统性沉默效应中有着至关重要的作用(Cooper et al., 2019)。dsRNA 分子被害虫摄入体内即可发挥沉默效果,但在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 等鳞翅目

昆虫中,通过喂食 dsRNA 的方法不能有效地引起目的基因沉默,这可能与 dsRNA 分子在摄入过程中被核酸酶降解有关(Cooper et al., 2019)。有研究表明,昆虫体内 dsRNA 降解酶(dsRNA degrading nuclease, dsRNase)是昆虫体内主导 dsRNA 降解的主要核酸酶(Song et al., 2017; Peng et al., 2018)。dsRNase 属于非专一性核酸酶(non-specific nuclease, NUC)家族,NUC 是一类催化核苷酸链水解较广泛的核酸酶,既能水解 ssDNA 和 dsDNA,又能水解 ssRNA 和 dsRNA (Friedhoff et al., 1996)。已有研究表明,赤拟谷盗(Peng et al., 2021)、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Spit et al., 2017)、东亚飞蝗 *Locusta migratoria* (Song et al., 2017)、甘薯小象甲 *Anthonomus grandis* (Garcia et al., 2017) 和烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Luo et al., 2017) 等昆虫体内的 dsRNase 可参与降解 dsRNA,通过 RNAi 抑制 dsRNase 的表达后,能够显著降低 dsRNA 的降解,从而提升 dsRNA 在昆虫体内的稳定性和持续性,增强 RNAi 效应。

为研究二化螟体内 dsRNA 的降解对 RNAi 效率的影响,本研究通过基因克隆、组织表达分析,结合酶活力分析鉴定二化螟体内可能参与 dsRNA 降解的关键核酸酶,以期为阐明核酸酶影响 dsRNA 稳定性的机制及其对 RNAi 效率的影响,为开发害虫 RNAi 防控技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:本研究供试的二化螟为本实验室内长期饲养多代种群,取 5 龄幼虫供试。饲养条件为温度(28±1)℃,相对湿度 70%~80%,光周期 L 16 h : D 8 h。

试剂及仪器:RNA 提取试剂 TRIzol,美国 Invitrogen 公司;反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser、荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ Reagent,日本 TaKaRa 公司;

SMARTer RACE cDNA Amplification Kit RACE 扩增试剂盒, 美国 Invitrogen 公司; $2\times$ Taq Master Mix DNA 聚合酶, 南京诺唯赞公司; *pEASY-T3* 载体和 *Trans1-T1* 大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞, 北京全式金公司; 其余试剂均为国产分析纯。Nano-Drop ND-2000 分光光度计, 美国 Thermo 公司; T100™ Thermal cycler PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; Applied Biosystems 7500 System 荧光定量 PCR 仪, 美国 Invitrogen 公司; DYY-6C 型核酸电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; SpectraMax M5 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 聚苯乙烯 384 微孔板, 美国 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 二化螟总 RNA 的提取、cDNA 合成

解剖二化螟 5 龄幼虫得到头、血淋巴、中肠、马氏管、丝腺、脂肪体和表皮组织, 利用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 然后利用分光光度计检测提取的 RNA 浓度, 再利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 利用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒, 以 1 μ g 总 RNA 为模板, 反转录合成第一链 cDNA 模板, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.2 二化螟非专一性核酸酶基因的克隆

根据已经报道的家蚕 *Bombyx mori* dsRNase 基因的 cDNA 序列或氨基酸序列 (GenBank 登录号: XP_004922835.1), 利用本地 BLAST 搜索二化螟基因组和转录组数据库, 获得潜在的 NUC 基因片段, 然后利用 Primer Premier 5.0 软件根据获得的目标片段设计用于 RACE 的 GSP 基因特异性引物 (表 1), 通过 RACE-PCR 获得全长拼接序列, 50 μ L RACE-PCR 反应体系: $2\times$ LA Taq Master Mix 25 μ L, UPM 通用引物 5 μ L, GSP 基因特异性引物 1 μ L, RACE cDNA 模板 2.5 μ L, 加无核酸酶水至 50 μ L。RACE-PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 退火和延伸 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 70 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 退火 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 27 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。再设计对应的全长验证引物 (表 1), 验证 NUC 基因的全长序列。50 μ L PCR 反应体系: $2\times$ LA Taq Master Mix 25 μ L, 上下游引物各 2 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 加无核酸酶水至 50 μ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 34 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。本试验所用引物均由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成。

1.2.3 二化螟非专一性核酸酶基因的生物信息分析
将获得的 NUC 基因序列翻译成氨基酸序列后,

利用 NCBI BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 或 Pfam (<http://pfam.xfam.org/search/sequence>) 搜索确定目标基因含有 NUC 基因家族中 DNA/RNA non-specific endonuclease (NUC) 或 Endonuclease_NS 保守域结构。利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测相应蛋白的信号肽序列。利用 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白的分子量和等电点。利用 Clustal X 2.0 软件进行氨基酸多序列比对 (Chenna et al., 2003)。在 NCBI 上搜索并下载不同物种的已知的 NUC 基因蛋白序列, 经过多重序列比对分析后, 通过 MEGA-X 软件利用邻接法构建 NUC 的系统发育树, 设置 1 000 次 bootstrap 值 (Kumar et al., 2018)。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 NUC 基因的组织表达谱

采用实时荧光定量 PCR 检测二化螟 5 龄幼虫不同组织中 dsRNase 的 mRNA 相对表达水平。利用 Beacon Designer 8.0 软件设计不同 dsRNase 基因的实时荧光定量 PCR 引物 (表 1), 利用 SYBR® Premix Ex Taq™ Reagent 试剂盒进行 PCR 反应, 20 μ L PCR 反应体系: SYBR 混合物 10 μ L、正反向引物各 0.4 μ L、ROX 染色试剂 0.4 μ L、cDNA 模板 1 μ L、无核酸酶水 7.8 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 34 s, 共 40 个循环。每个样品采用 3 个模板作为生物学重复。最后收集数据, 以持家基因 *EF1* 和 *RP49* 作为内参基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目标基因的 mRNA 相对表达水平 (Taylor et al., 2010)。

1.2.5 dsRNA 降解酶活力检测和最适反应条件筛选

为制备荧光标记的 dsRNA, 以绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因 (GenBank 登录号: DQ389577.1) 的核苷酸序列为模板设计了一段长度为 24 bp 的 dsRNA 分子 (正义链: 5'-ACUUAGCUUAGCACAAACAACCCG-3', 反义链: 5'-CGGGUUGUUUGUGCUAAGCUAAGU-3'), 以上 2 条单链 RNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成, 并在正义链的 5' 端加上 1 个激发荧光基团 (5-FAM), 反义链的 3' 端加上 1 个淬灭荧光基团 (3-BHQ1), 最后通过 2 条链的退火形成荧光标记的 dsRNA。

以荧光标记 dsRNA 为底物, 采用荧光法检测 dsRNA 降解酶的活力 (Peng et al., 2018)。为确定二化螟 dsRNA 降解酶的最适 pH, 配制 Glycine-KOH 缓冲液 (含有 0.1 mol/L 甘氨酸、0.1 mol/L NaCl、1 mmol/L $MgCl_2$ 、1 mmol/L 苯基硫脲、1 mmol/L 二

硫苏糖醇、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟和 10% 甘油), 用 KOH 调节 pH 分别至 6.5、7.4、8.0、9.0、10.0 和 11.0。向玻璃匀浆器中加入不同 pH 的 0.1 mol/L Glycine-KOH 缓冲液, 在冰上对二化螟 5 龄幼虫匀浆, 匀浆完全后, 将匀浆液在 16 000 g、4 ℃ 离心 10 min, 取上清液, 按照上述条件再离心 20 min, 取上清液, 即为粗

酶液, 利用多功能酶标仪检测酶活力。取 19 μL 粗酶液, 加入 10 μmol/L 荧光标记 dsRNA 1 μL 作为反应底物, 总反应体系为 20 μL。反应体系在黑色平底的聚苯乙烯 384 微孔板中进行, 设置反应温度 37 ℃, 设置激发波长和发射波长为 494 nm 和 519 nm, 每 30 s 读取荧光信号强度 1 次。

表 1 本研究所用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	引物用途 Purpose
CdsRNase1	GGAACCTTGACGAGTATTCCCCGATTC	5' RACE
	TACCTTCCGTGTCACTCAACTCCG	3' RACE
CdsRNase2	TGAACCGGAGACGCTACGTTTGTG	5' RACE
	CGTAGCGTCTCCGGTTCAGACTGC	3' RACE
CdsRNase3	GATCCCAACTTAGCCAAGAGAAAGCG	5' RACE
	GGGGTAACACCGCTTTCTCTTGCTAA	3' RACE
CdsRNase4	CCGCCAGCGTCACCACTCCA	5' RACE
	GACGGCAACTCAGACTTCAACTGGTT	3' RACE
CsEndoG	CCCCTGCCACTGTGTTAGCACCTAT	5' RACE
	CGCTGCTGGCAACCACCGA	3' RACE
CdsRNase1-ETE-F	ATGGGTGTAGTGTTTACTTG	全长验证引物
CdsRNase1-ETE-R	TTATGTCAAAAAGCCGTTGACG	Full-length verification
CdsRNase2-ETE-F	ATGCGTTTTTAATCGTATTTGC	
CdsRNase2-ETE-R	TTATGTAAAGAGGTCTATGG	
CdsRNase3-ETE-F	ATGTTTCAACGGTTGTTACG	
CdsRNase3-ETE-R	TCATATTAAATATCTCTCACTTCC	
CdsRNase4-ETE-F	ATGAATCCTTGGTATTTAACTTCTAG	
CdsRNase4-ETE-R	TCAATAAAATACTCCAGCAAC	
CsEndoG-ETE-F	ATGTTTCGTAAAAAATATCGTAC	
CsEndoG-ETE-R	TCATATTTTTTTACCATTATTCT	
CdsRNase1-qPCR-F	GCTTGCTATGGAAGAACAG	荧光定量 PCR
CdsRNase1-qPCR-R	AATTATTGCCGAGGAGGTA	Quantitative real-time
CdsRNase2-qPCR-F	ATAGTGCTGGCTGTGTTA	PCR
CdsRNase2-qPCR-R	AAGAAGATAGACTGGCTGAG	
CdsRNase3-qPCR-F	GATTCTGTGCGTGTTCAA	
CdsRNase3-qPCR-R	TTCATCCGTTGGCTCTAA	
CdsRNase4-qPCR-F	GGCAACTCAGACTTCAAC	
CdsRNase4-qPCR-R	GTAGCTGTCCAACCTTCCT	
CsEndoG-qPCR-F	GGATATGCGTTAGGACAGTA	
CsEndoG-qPCR-R	ACCATCAGTATAAGGAGCC	
CsEF1-qPCR-F	TGAACCCCATACAGCGAATCC	
CsEF1-qPCR-R	TCTCCGTGCCAACCAGAAATAGG	
CsRP49-qPCR-F	TGTTAGACACCATTCAGATAGG	
CsRP49-qPCR-R	GACCACAAGGAAGAAGATGC	

为确定 dsRNA 降解酶的最适 Mg²⁺ 浓度, 在最适 pH 条件下, 利用不含 Mg²⁺ 的 0.1 mol/L Glycine-

KOH 缓冲液将虫体在冰上匀浆,向反应体系中分别加入不同浓度的 $MgCl_2$ 溶液,使 Mg^{2+} 终浓度分别为0、0.5、1、2、4、8、16、32和64 mmol/L,测定 dsRNA 降解酶的活力,试验方法同上。为确定不同昆虫中 dsRNA 降解酶的最适反应温度,在所测得最适 pH 和 Mg^{2+} 浓度条件下,分别在22、27、32、37、42、47、52和57℃不同反应温度下检测 dsRNA 降解酶的活力,试验方法同上。

1.2.6 二化螟不同组织中 dsRNA 降解酶的活力检测

为检测二化螟不同组织中 dsRNA 降解酶的活力,解剖二化螟5龄幼虫,获得其血淋巴、中肠及虫体其他组织,利用0.1 mol/L Glycine-KOH 缓冲液研磨上述组织,用玻璃匀浆器在冰上匀浆,匀浆完全后,将匀浆液在16 000 g、4℃下离心10 min,取上清液,按照上述条件再离心20 min,取上清液,即为反应粗酶液。基于本研究筛选出的适反应条件,参照1.2.5方法检测不同组织中 dsRNA 降解酶的活力,每个样品取3个生物学重复。利用 Bradford 法,以牛血清蛋白为蛋白溶液标准品,考马斯亮蓝为染色液测定粗酶液中的蛋白含量,利用蛋白含量计算不同

组织的相对酶活力。

1.3 数据分析

试验数据利用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,通过单因素方差(ANOVA)分析,采用 Tukey 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 NUC 基因的全长 cDNA 克隆

利用基因组和转录组搜索得到的二化螟 NUC 基因片段序列,分别设计 RACE 引物和全长 cDNA 克隆验证引物,最终通过 PCR 扩增和测序得到了5个 NUC 基因的全长 cDNA 序列,分别是4个 dsRNase 亚家族的基因(*CsdsRNase1*~*CsdsRNase4*)和1个 Endonuclease G 亚家族基因(*CsEndoG*) (Genbank 登录号:KM229544~KM229548)。全长 cDNA 的开放阅读框由828~1 338 bp 核苷酸组成,编码275~445个氨基酸残基,分子量为31.68~49.57 kD,预测等电点为5.48~9.42。*CsdsRNase1*和*CsdsRNase2*在N端有一个由16个氨基酸残基编码的信号肽序列(表2)。

表2 二化螟 NUC 基因的氨基酸序列特征分析

Table 2 Properties of CsNUC proteins based on deduced amino acid sequences

基因名 Gene name	核苷酸长度 Nucleotide length/bp	氨基酸长度 Amino acid length/aa	分子量 Molecular weight/ kD	等电点 Isoelectric point	信号肽位置 Signal peptide position	保守结构域位置 Endonuclease_NS position
<i>CsdsRNase1</i>	1 338	445	49.57	8.79	1-16	186-427
<i>CsdsRNase2</i>	1 263	420	47.07	9.42	1-16	164-402
<i>CsdsRNase3</i>	1 206	401	46.30	5.48	—	141-383
<i>CsdsRNase4</i>	828	275	31.68	9.31	—	18-254
<i>CsEndoG</i>	933	310	35.07	9.32	—	90-298

—: 无信号肽。—: No signal peptide.

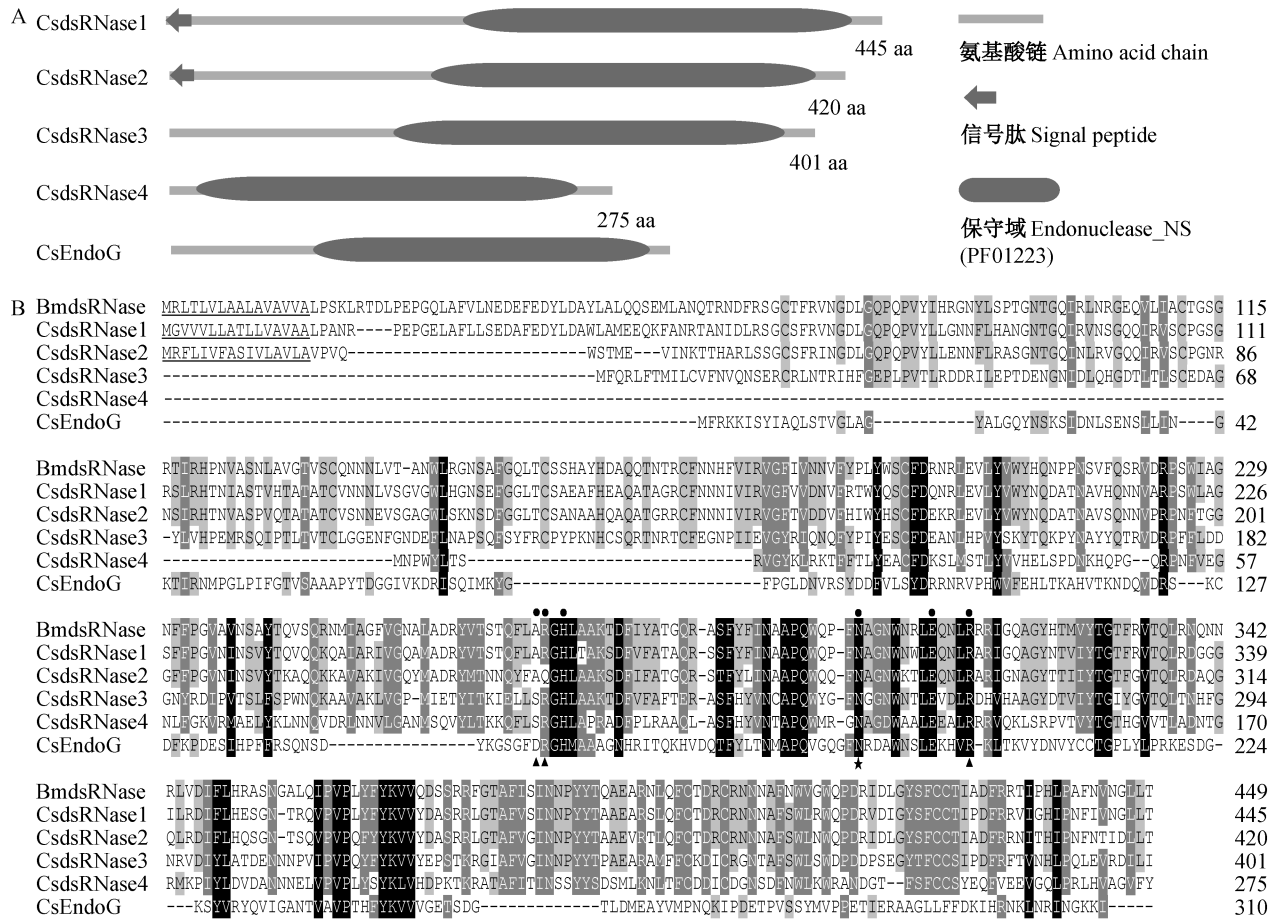
所有基因的蛋白序列经 Pfam 匹配预测均含有单个保守的 Endonuclease_NS 结构域(PF01223)(图1-A)。氨基酸多序列比对结果显示,除了第1个活性位点变异较大之外,其他的活性位点、底物结合位点和镁离子结合位点均具有一定的保守性(图1-B)。

通过氨基酸序列相似度分析发现,*CsdsRNase1*和*CsdsRNase2*的氨基酸序列同源性最高,达到80%。*CsdsRNase3*与*CsdsRNase1*和*CsdsRNase2*的氨基酸序列相似度分别为50%和54%。*CsdsRNase4*与*CsdsRNase1*、*CsdsRNase2*和*CsdsRNase3*的氨基酸相似度分别为35%、35%和40%。*CsEndoG*与

CsdsRNases 的相似度最低,为23%~26%。

2.2 NUC 基因的系统发育分析

系统发育分析结果显示,NUC 基因家族可以分为2个亚家族,即 dsRNase 和 Endonuclease G。原核生物和真核生物的不同物种分别聚集在不同的分支上。*CsdsRNase1*~*CsdsRNase4* 与鳞翅目昆虫 dsRNase 聚类在一起,且*CsdsRNase1*和*CsdsRNase2*与具有 dsRNA 降解酶活力的家蚕 *BmdsRNase* (*dsRNase-1*)以及斜纹夜蛾 *dsRNase* (*dsRNase-1*和*dsRNase-2*)聚类在一起。*CsEndoG*与昆虫 *EndoG* 聚类在一起,属于线粒体 Endonuclease G 亚家族(图2)。



A: 二化螟 NUC 氨基酸序列保守域结构示意图。B: 二化螟 NUC 氨基酸序列与家蚕 BmdsRNase 的多重序列比对结果; 黑色和灰色背景分别表示蛋白序列间保守和相似氨基酸残基; 下划线表示信号肽序列; 黑色圆点表示活性位点; 五角形表示 Mg^{2+} 结合位点天冬酰胺; 三角形表示底物结合位点; Bm: 家蚕; Cs: 二化螟。A: Conserved domain architecture of CsNUC proteins. B: Multiple sequence alignment of CsNUC proteins with BmdsRNase; black and gray backgrounds represent the conserved and similar amino acid residues, respectively; black line indicates signal peptide sequence; black dots indicate active sites; pentagon indicates Mg^{2+} binding site of Asn, and triangles indicate key amino acid residues for substrate binding site; Bm: *Bombyx mori*; Cs: *Chilo suppressalis*.

图1 二化螟 NUC 氨基酸序列保守域结构和氨基酸多序列比对

Fig. 1 Multiple amino acid sequence alignment of CsNUCs and conserved domain architecture

2.3 dsRNase 基因在不同组织中的相对表达量分析

本研究对不同组织中 dsRNase 基因的 mRNA 表达水平进行了比较分析,结果显示 *CdsRNase1* 和 *CdsRNase2* 主要在二化螟幼虫中肠中高表达,而在其余 6 个组织中的转录水平都较低;*CdsRNase3* 在幼虫表皮和马氏管中的转录水平显著高于其他组织;*CdsRNase4* 在幼虫头和丝腺中的转录水平显著高于其他组织(图 3)。

2.4 二化螟体内 dsRNA 降解酶活力分析

2.4.1 dsRNA 降解酶的生化特性

二化螟 dsRNA 降解酶活力随着 pH 的升高而增强,当 pH 为 11.0 时酶活力最大,说明二化螟 dsRNA 降解酶的最适 pH 为极碱性环境(图 4-A)。低浓度

Mg^{2+} 能够刺激二化螟 dsRNA 降解酶活力,而过高浓度的 Mg^{2+} 会抑制 dsRNA 降解酶活力,其最适合 Mg^{2+} 浓度范围是 0.5~8.0 mmol/L,考虑 Mg^{2+} 浓度的变化对酶活力影响比较小,因此选择 8.0 mmol/L Mg^{2+} 浓度作为最适反应浓度(图 4-B)。二化螟 dsRNA 降解酶活力在 17~47 °C 之间随着温度升高,其初始反应速率也平滑升高,但是在较高温度条件下,其初始反应速率增长随着温度升高受到轻微抑制(图 4-C)。为了保持反应体系的稳定,选择 37 °C 作为最适反应温度。

2.4.2 dsRNA 降解酶活力的组织分布

测定二化螟 5 龄幼虫中肠、血淋巴和虫体其他组织的 dsRNA 降解酶活力情况,结果显示,二化螟中肠组织的 dsRNA 降解酶活力远高于血淋巴和其

他组织部位,血淋巴酶活力高于其他组织部位。中肠组织部位的20.3倍和53.8倍(图5)。肠组织中的相对酶活力分别是血淋巴和虫体其他组

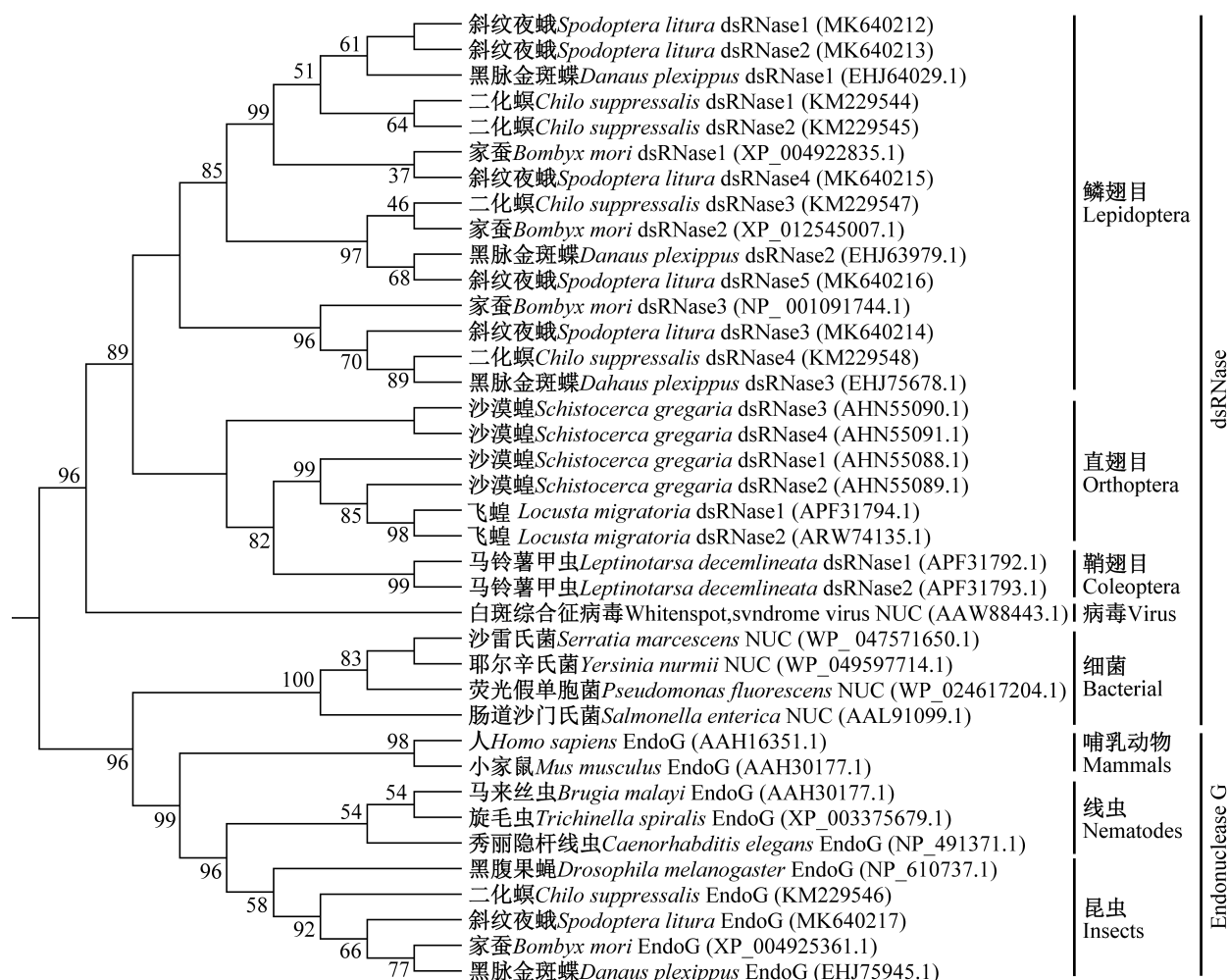


图2 基于邻接法的二化螟与其他物种的NUC基因系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of NUCs from *Chilo suppressalis* and other organisms by using neighbor-joining method

3 讨论

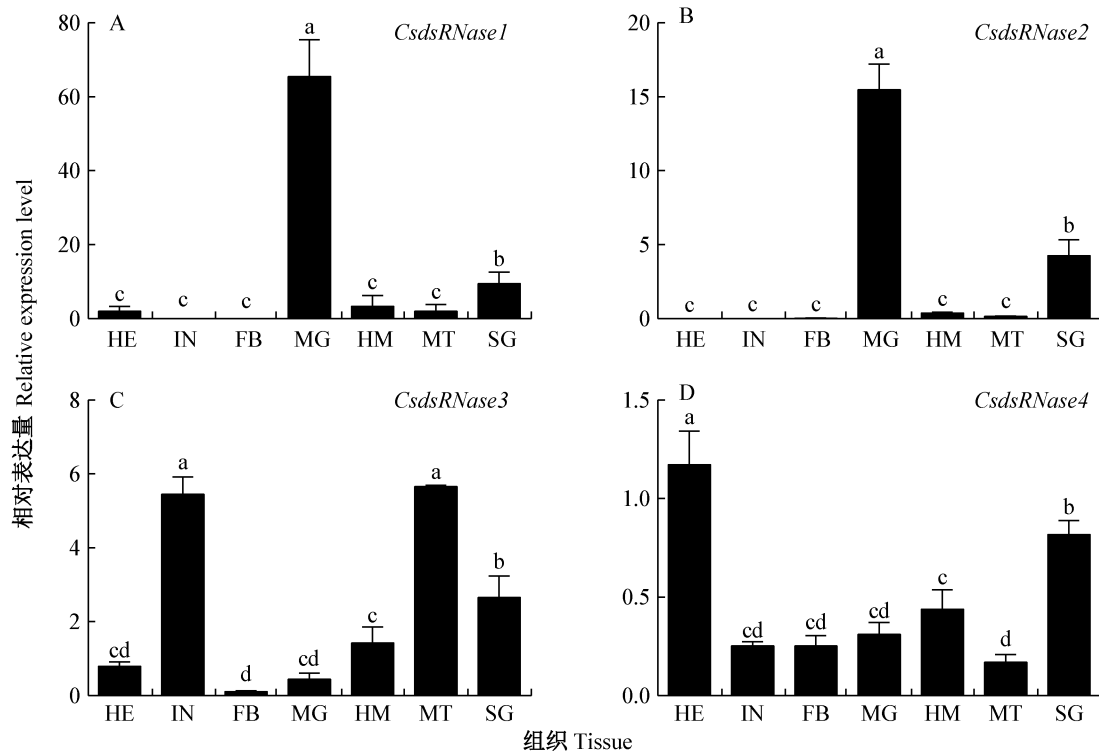
NUC基因广泛分布于不同的物种中,经过长期的进化导致昆虫NUC基因家族分化出了多个同源基因亚家族(Rangarajan & Shankar, 2001)。在昆虫中,目前研究仅报道了dsRNase和Endonuclease G两个亚家族,其中Endonuclease G为单基因亚家族,在不同生物中,通常仅有1个同源基因(Büttner et al., 2007)。本研究利用二化螟基因组和转录组数据,以已报道的昆虫dsRNase和Endonuclease G基因特征进行筛选克隆,发现二化螟体内有5个NUC基因,分别是4个dsRNase亚家族基因(*CsdsRNase1~CsdsRNase4*)和1个Endonuclease G亚家族基因(*CsEndoG*)。真核生物EndoG通常位于线粒体上,参与线粒体DNA的复制与修复,并且可以进一步分泌到细胞质,再转移至细胞核中参与细胞凋

亡时基因组DNA的降解(Büttner et al., 2007)。然而,研究分析发现昆虫体内的EndoG都缺少胞外分泌所需的信号肽序列(Wynant et al., 2014),这意味着该基因只能在细胞内发挥作用。因此,可以推断EndoG很有可能不参与胞外核酸的代谢。因此本研究在后续研究集中于分析dsRNase对dsRNA的降解功能验证。

昆虫体内的dsRNase基因数量存在多个拷贝,不同目昆虫的dsRNase基因存在比较明显的分化聚类,这意味着它们对不同核酸底物的降解功能以及特性可能存在分化,使得昆虫体内dsRNA的降解机制变得更为复杂。此外,诸多研究证实昆虫中肠中dsRNA降解酶的活力远高于其他组织(Peng et al., 2018; 2020a; Cooper et al., 2019),所以中肠特异性表达的dsRNase基因才是dsRNA降解酶活力的主要来源。在已研究过的大多数昆虫体内均鉴定到了

在中肠特异性表达的 dsRNase 基因。Arimatsu et al. (2007b) 在家蚕消化液中分离纯化得到了大小约为 41 kD 的 dsRNase 蛋白, 通过组织表达和免疫组化分析发现其在中肠中高度表达并定位于中肠顶端的上皮细胞, 然后分泌到中肠腔; 同时其他研究学者在沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* (Wynant et al., 2014)、东亚飞蝗 (Song et al., 2017)、马铃薯甲虫 (Spit et al., 2017)、烟粉虱 (Luo et al., 2017)、甘薯小象甲 (Garcia

et al., 2017)、斜纹夜蛾 (Peng et al., 2020b) 和赤拟谷盗 (Peng et al., 2020a) 中分别发现了 4、2、2、1、2、3 和 2 个 dsRNase 基因在中肠中高表达。本研究发现二化螟中肠组织的 dsRNA 降解酶活力远高于其他组织部位, 且有 2 个中肠高表达 dsRNase 基因 *CsdsRNase1* 和 *CsdsRNase2*, 意味着它们可能具有 dsRNA 降解酶活力, 可参与降解中肠组织中 dsRNA 分子, 不利于中肠体内 dsRNA 的稳定性, 从而降低 RNAi 效率。

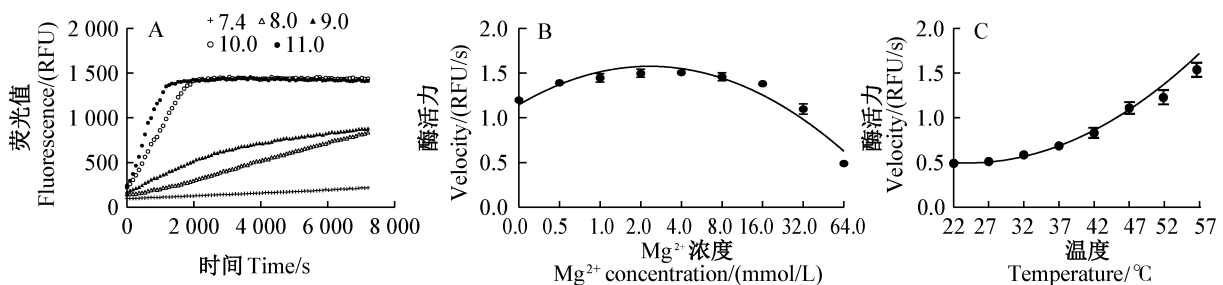


HE: 头; IN: 表皮; FB: 脂肪体; MG: 中肠; HM: 血淋巴; MT: 马氏管; SG: 丝腺。HE: Heads; IN: integuments; FB: fat body; MG: midgut; HM: hemolymph; MT: Malpighian tubule; SG: silk gland.

图3 二化螟 dsRNases 在不同组织中的 mRNA 转录表达谱

Fig. 3 Transcript profiles of CsdsRNases in different tissues of *Chilo suppressalis*

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示不同组织间经 Tukey 法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference among different tissues by Tukey test ($P < 0.05$).

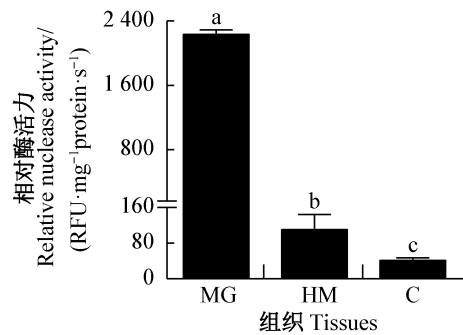


A: pH 对酶活力的影响; B: 最适 pH 反应条件下 Mg^{2+} 浓度对酶活力的影响; C: 最适 pH 和 Mg^{2+} 浓度反应条件下温度反应曲线。A: Effect of pH on the nuclease activity; B: effect of Mg^{2+} concentration on the nuclease activity under optimal pH value; C: effect of temperature on the nuclease activity under optimal pH value and Mg^{2+} concentration.

图4 二化螟 dsRNA 降解酶的生化特性

Fig. 4 Biochemical properties of dsRNA degrading nucleases in *Chilo suppressalis*

图中数据为平均数±标准误。Data are mean±SE.



MG: 中肠; HM: 血淋巴; C: 虫体其他组织。

MG: Midgut; HM: hemolymph; C: carcass.

图5 二化螟不同组织部位的dsRNA降解酶活力

Fig. 5 DsRNA degrading activity in different tissues or body parts of *Chilo suppressalis*.

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示经Tukey法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference by Tukey test ($P<0.05$).

昆虫体内生理环境差异较大,且不同昆虫dsRNA降解酶的生化特性存在差异,不同昆虫的最适pH和 Mg^{2+} 浓度乃至温度均有差异(Peng et al., 2018)。在已报道的多种昆虫中,dsRNA降解酶都是嗜碱的(Peng et al., 2018)。然而,大多数昆虫血淋巴pH中性偏酸性(Wyatt, 1961),不适合dsRNA降解酶活力的发挥。不同昆虫中肠液的pH则差别比较大,其范围从酸性到碱性均有分布,大部分鳞翅目昆虫中肠液pH偏碱性(Johnson & Felton, 1996),例如斜纹夜蛾中肠液pH达到8.72,有利于dsRNA降解酶发挥较高的活力(Peng et al., 2018)。本研究发现,二化螟dsRNA降解酶与家蚕消化系统中纯化得到的BmdsRNase特性一致,其dsRNA的降解活力随着pH的升高而增强(Arimatsu et al., 2007a),其肠道的碱性环境有利于dsRNA降解酶活力的发挥。因此,在二化螟中肠中高表达的CsdsRNase1和CsdsRNase2是否均在肠道内起作用,还需考虑它们的dsRNA降解酶活力与pH的适应性关系。

综上所述,二化螟体内存在多条dsRNase基因序列,这些基因可能具有dsRNA降解能力,会影响二化螟体内dsRNA的稳定性,进而影响二化螟的RNAi效率。通过克隆得到这些基因序列,有助于进一步通过功能验证分析其dsRNA降解能力,对于阐明二化螟体内dsRNA稳定性的关键控制因素具有重要意义,对RNAi技术在昆虫学研究和害虫防治中的推广应用具有积极作用。

参考文献 (References)

Arimatsu Y, Furuno T, Sugimura Y, Togoh M, Ishihara R, Tokizane M,

Kotani E, Hayashi Y, Furusawa T. 2007a. Purification and properties of double-stranded RNA-degrading nuclease, dsRNase, from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Biotechnology and Sericulture, 76(1): 57–62

Arimatsu Y, Kotani E, Sugimura Y, Furusawa T. 2007b. Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37(2): 176–183

Büttner S, Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Ruli D, Knauer H, Ruckentstahl C, Sigris C, Wissing S, Kollroser M, Fröhlich KU, et al. 2007. Endonuclease G regulates budding yeast life and death. Molecular Cell, 25(2): 233–246

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. 2003. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. Nucleic Acids Research, 31(13): 3497–3500

Cooper AM, Silver K, Zhang JZ, Park Y, Zhu KY. 2019. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. Pest Management Science, 75(1): 18–28

Friedhoff P, Meiss G, Kolmes B, Pieper U, Gimadutdinow O, Urbanke C, Pingoud A. 1996. Kinetic analysis of the cleavage of natural and synthetic substrates by the *Serratia* nuclease. European Journal of Biochemistry, 241(2): 572–580

Fu SS, Jiang YZ, Jiang QH, Shen J, Yan S. 2021. Research progress in nano-delivery system-based RNA pesticides and transgenic plants. Journal of Plant Protection, 48(2): 267–274 (in Chinese) [付淑笙, 江奕舟, 蒋沁宏, 沈杰, 闫硕. 2021. 基于纳米递送系统的RNA农药及转基因植物研究进展. 植物保护学报, 48(2): 267–274]

Garcia RA, Macedo LLP, do Nascimento DC, Gillet FX, Moreira-Pinto CE, Faheem M, Basso AMM, Silva MCM, Grossi-de-Sa MF. 2017. Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. PLoS ONE, 12(12): e0189600

Joga MR, Zotti MJ, Smagghe G, Christiaens O. 2016. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. Frontiers in Physiology, 7: 553

Johnson KS, Felton GW. 1996. Potential influence of midgut pH and redox potential on protein utilization in insect herbivores. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 32(1): 85–105

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6): 1547–1549

Luo Y, Chen Q, Luan J, Chung SH, Van Eck J, Turgeon R, Douglas AE. 2017. Towards an understanding of the molecular basis of effective RNAi against a global insect pest, the whitefly *Bemisia tabaci*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 88: 21–29

Peng Y, Wang K, Chen J, Wang J, Zhang H, Ze L, Zhu G, Zhao C, Xiao H, Han Z. 2020a. Identification of a double-stranded RNA-degrading nuclease influencing both ingestion and injection RNA interference efficiency in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 125: 103440

Peng YC, Wang K, Zhu G, Han Q, Chen J, Elzaki MEA, Sheng C, Zhao C, Palli SR, Han Z. 2020b. Identification and characterization of multiple dsRNases from a lepidopteran insect, the tobacco

- cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 162: 86–95
- Peng YC, Wang KX, Fu WX, Sheng CW, Han ZJ. 2018. Biochemical comparison of dsRNA degrading nucleases in four different insects. *Frontiers in Physiology*, 9: 264
- Peng YC, Zhu GH, Wang KX, Chen JS, Liu XL, Wu M, Zhao CQ, Xiao HJ, Palli SR, Han ZJ. 2021. Knockout of *SldsRNase1* and *SldsRNase2* revealed their function in dsRNA degradation and contribution to RNAi efficiency in the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Pest Science*, 94(4): 1449–1460
- Price DRG, Gatehouse JA. 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*, 26(7): 393–400
- Rangarajan ES, Shankar V. 2005. Sugar non-specific endonucleases. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(5): 583–613
- Song HF, Zhang JQ, Li DQ, Cooper AMW, Silver K, Li T, Liu XJ, Ma EB, Zhu KY, Zhang JZ. 2017. A double-stranded RNA degrading enzyme reduces the efficiency of oral RNA interference in migratory locust. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 86: 68–80
- Spit J, Philips A, Wynant N, Santos D, Plaetinck G, vanden Broeck J. 2017. Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 81: 103–116
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. 2010. A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4): 1–5
- Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An CJ, Aymeric JL, Barthel A, et al. 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57(2): 231–245
- Wang K, Peng Y, Pu J, Fu W, Wang J, Han Z. 2016. Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation *in vivo*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 77: 1–9
- Wang ZW, Gao X, Ma DJ, Zhong S, Liu XL, Xi Z. 2019. Nucleic acid pesticides—the new plant protection products with great potential. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 21(Z1): 681–691 (in Chinese) [王治文, 高翔, 马德君, 钟珊, 刘西莉, 席真. 2019. 核酸农药——极具潜力的新型植物保护产品. *农药学报*, 21(Z1): 681–691]
- Wyatt GR. 1961. The biochemistry of insect hemolymph. *Annual Review of Entomology*, 6(1), 75–102
- Wynant N, Santos D, Verdonck R, Spit J, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J. 2014. Identification, functional characterization and phylogenetic analysis of double stranded RNA degrading enzymes present in the gut of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 46: 1–8
- Xiao Y, Wang JY, Li L, Wang YL, Zhang CQ, Sun GC. 2020. Advances in the researches and applications of host-induced gene silencing technology. *Journal of Plant Protection*, 47(1): 11–17 (in Chinese) [肖瑶, 王教瑜, 李玲, 王艳丽, 张传清, 孙国昌. 2020. 寄主诱导的基因沉默技术研究和应用进展. *植物保护学报*, 47(1): 11–17]
- Xu G, Ye GY. 2018. Research progress of physiology, biochemistry and molecular biology of *Chilo suppressalis*. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 59(12): 2161–2166, 2170 (in Chinese) [徐刚, 叶恭银. 2018. 二化螟生理生化与分子生物学研究进展. *浙江农业科学*, 59(12): 2161–2166, 2170]
- Zhang J, Khan SA, Heckel DG, Bock R. 2017. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends in Biotechnology*, 35(9): 871–882
- Zhang S, Shu KY, Huang XY, Wang X. 2017. Field experimental study on drug resistance control of rice stem borer. *China Plant Protection*, 37(8): 61–64 (in Chinese) [张帅, 舒宽义, 黄向阳, 王希. 2017. 水稻二化螟抗药性治理的田间试验研究. *中国植保导刊*, 37(8): 61–64]
- Zotti M, dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CNT, Smaghe G. 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*, 74(6): 1239–1250

(责任编辑:王璇)