

杆状病毒介导 RNAi 抑制棉铃虫 细胞色素 P450 CYP9A14 基因的转录

陈爱华¹ 孙修炼² 赵秀云¹

1. 华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;

2. 中国科学院武汉病毒研究所/农业与环境微生物学重点实验室, 武汉 430071

摘要 采用实时荧光定量 PCR, 测定棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 细胞色素 P450 CYP9A14 基因在氯氰菊酯抗性棉铃虫中肠里的表达量, 结果表明抗性棉铃虫中肠表达量的 17 倍。将棉铃虫中肠 P450 CYP9A14 基因的一个 490 bp 反向重复片段以双链 RNA 干扰 (double-stranded RNA interference, dsRNAi) 的方法重组到棉铃虫核型多角体病毒 (helicoverpa nuclear polyhedrosis virus, HaNPV) 中, 结果表明以该重组病毒注射氯氰菊酯抗性棉铃虫体内后, 幼虫中肠 CYP9A14 基因的转录水平显著下降。

关键词 棉铃虫; 杆状病毒; 基因转录; 抗药性

中图分类号 Q 965.9; S 435.622⁺.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)04-0450-07

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 是世界性农业害虫, 寄主范围广泛, 能为害棉花、玉米、小麦、大豆、花生、蔬菜、水稻等多种作物。长期以来, 由于化学农药的大量使用, 一些主要农业害虫对化学农药的抗性越来越严重。1989 年以后, 许多国家各棉区的棉铃虫对拟除虫菊酯类杀虫剂都产生了不同程度的抗药性^[1-2]。细胞色素 P450 是生物体中的一类重要的代谢酶类, 在昆虫中不仅参与激素和脂肪酸等具重要生理功能的物质代谢, 而且对杀虫剂和植物次生物质具有降解作用, 该酶活性的增强与害虫抗药性的产生有关。研究表明, 由细胞色素 P450 介导的杀虫剂代谢作用的增强是昆虫产生抗药性的主要机制^[3-4]。

氯氰菊酯是防治害虫时常用的拟除虫菊酯类杀虫剂。棉铃虫细胞色素 P450 CYP9A14 基因在氯氰菊酯抗性棉铃虫的中肠和脂肪体中都有超量表达, 在酵母细胞表达系统中进行 CYP9A14 异源表达的研究结果表明, CYP9A14 基因的表达产物对拟除虫菊酯类杀虫剂有明显的氧化代谢活性, 说明 CYP9A14 的超量表达与棉铃虫对拟除虫菊酯类农药产生的抗性有关^[5]。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指内源性或外源性双链 RNA 在细胞内特异性地诱导与

之同源互补的 mRNA 的降解, 导致靶基因的表达沉默, 产生相应功能表型的缺失^[6]。双链 RNA 介导的干扰作用 (dsRNAi) 是近年来产生的一项新兴生物技术, 能直接有效地抑制基因的表达。RNAi 已经成为一种反向遗传学工具被应用于多种生物的研究, 包括真菌、植物、线虫等^[7-9]。

杆状病毒 (baculovirus) 是专一感染节肢动物的病原微生物, 是一种单分子环状双链 DNA 病毒, 并可在昆虫细胞核中复制和转录, 其自然宿主主要为鳞翅目、膜翅目和双翅目昆虫^[10-11]。杆状病毒对宿主昆虫具有高度的致病性, 对非靶生物无害, 对人、畜及其他脊椎动物安全, 不污染环境, 不易引起大规模生态平衡的破坏, 还可与化学农药混合使用, 且防效时间长, 作为一种生物杀虫剂, 有良好的应用前景, 并日益受到人们的高度重视^[12-15], 但因野生型杆状病毒杀虫速度较慢, 故有必要进行重组改造。笔者构建了一个含有反向重复的棉铃虫细胞色素 P450 CYP9A14 基因 490 bp 片段的重组杆状病毒, 并通过该重组病毒的感染实现对棉铃虫中肠 CYP9A14 基因的转录抑制, 旨在通过这类重组病毒与拟除虫菊酯类农药的联合应用控制抗性棉铃虫, 为研究棉铃虫基因的功能和棉铃虫的生物防治提供科学依据。

收稿日期: 2011-12-15

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2008CDA072)

陈爱华, 硕士研究生。研究方向: 昆虫病毒基因工程。E-mail: chenaihua728@126.com

通讯作者: 赵秀云, 博士, 副教授。研究方向: 生物防治。E-mail: xiuyunzh@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 供试材料

大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 、含 Hz8 Bacmid(杆状病毒质粒)和 Helper 质粒的 DH10B 菌株、含 polyhedrin 及启动子和绿色荧光蛋白(EGFP)基因的重组质粒均由笔者所在实验室保存并提供。含 50 bp Spacer 序列的 pFastBacR 质粒由中国科学院武汉病毒研究所王汉中老师惠赠。

美洲棉铃虫卵巢细胞系 HzAM1 由中国科学院武汉病毒研究所胡志红老师惠赠。将 HzAM1 细胞置于 28 °C 下培养,生长培养基为 Grace's 昆虫细胞培养基,并添加 10% 胎牛血清(FBS)(购自 Invitrogen 公司)。Grace's 培养基和含 20% FBS 的 Grace's 培养基在病毒基因组 DNA 转染昆虫细胞时使用。含 10% FBS 的 Grace's 培养基用于所有昆虫细胞的培养。

敏感棉铃虫由中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心饲养,用人工饲料在实验室连续培养 30 代以上,生长环境:湿度 60%,光照昼夜比 16 h/8 h,培养温度 28 °C。经抗性测定,从河南安阳采集的棉铃虫对氯氰菊酯的抗性约是敏感棉铃虫的 100 倍。

高保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA 分子质量标准、SYBR Premix ExTaqTM 购自 TaKaRa 公司; DEPC 购自 Amresco 公司; M-MLV 逆转录酶、柱离心式胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、Cellfectin、SV Total RNA Isolation System 购自 Promega 公司; 倒置荧光显微镜,IBE 2000,北京科普顺科技有限公司产品; PCR 仪,PTC-100,Bio-Rad 公司产品; 荧光定量 PCR 仪,iQ5,Bio-Rad 公司产品; 分光光度计,Nanodrop 2000/2000C,Thermo Scientific 公司产品; 凝胶成像系统,Gbox,Syngene 公司产品。

1.2 基因在棉铃虫中肠的转录

氯氰菊酯抗性和敏感棉铃虫培养至 5 龄中期后,分别取 3 头体质量相近幼虫的中肠为一组,用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒提取 RNA,并用琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 的完整性。取 1 μ g RNA 反转录成 cDNA,用实时定量 PCR 和 RT-PCR 检测 CYP9A14 的转录水平。实时定量 PCR 的引物为 CYP9A14-F: 5'-GAGTATCTATC GTGTTTTTCAGCCG-3',CYP9A14-R: 5'-CATGATGACAATACTGCAAGTTCAT-3'。以看家基因

β actin 作为内参,引物为 *β actin*-F: 5'-GTATTGCTGACCGTATGCAGAA-3', *β actin*-R: 5'-AGATCCACATCTGTTGGAAGGT-3'。

用 SYBR Premix ExTaqTM 试剂盒与 Bio-Rad iQ5 荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR。首先将 cDNA 模板进行系列稀释,计算出目标基因 CYP9A14 和内参基因 *β actin* 的平均 Ct 值和 Δ Ct 值,然后通过 cDNA 浓度梯度值对 Δ Ct 值作图。如果所得直线斜率绝对值接近于 0,说明目标基因和内参基因的扩增效率相同,随后可以通过 $\Delta\Delta$ Ct 的方法进行相对定量。

以 *β actin* 为内参,25 μ L 体系中以 2 μ L cDNA 为模板,进行实时定量 PCR 检测 CYP9A14 的转录水平,每组试验均完成 3 个生物学重复,每个生物学重复进行 3 次技术重复。

利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量,其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{抗性组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{敏感组}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 即为抗性组目的基因相对敏感组的变化倍数,并使用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析(ANOVA)。在 RT-PCR 中,以看家基因 *β actin* 引物作为内参,进行 26 个循环数的扩增,重复 3 次。

1.3 重组质粒的构建

PCR 扩增 490 bp 的 CYP9A14,其正向引物为 CYP9A14-1: 5'-GGATCCGAGGGAAACACGCA GATATTG-3'(下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点),CYP9A14-2: 5'-GAATTCTAGCCAGCAACGAA GAACAG-3'(下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点);反向引物为 CYP9A14-3: 5'-AAGCTTGAGGGAAA CACGCAGATATTG-3'(下划线部分为 *Hind*III 酶切位点,CYP9A14-4: 5'-CTGCAGTAGCCAGCA ACGAAGAACAG-3'(下划线部分为 *Pst* I 酶切位点)。PCR 产物克隆至 pMD-18T 载体,测序检测扩增产物的正确性。在 pFastBacR 质粒的极早期启动子 hsp70 启动下,在 Spacer 两端分别插入 CYP9A14 的正向(Forward CYP9A14)和反向(Reverse CYP9A14)片段进行酶切鉴定。酶切鉴定后的阳性克隆命名为 pFastBac-CYP9A14FR,Spacer 为 AATTCAAAGCCTACGTCGACGAGCTCAC TAGTCGCGCCGCTTTCGAAT。在合适的细胞内,CYP9A14 的正向和反向的序列可以转录形成长链发夹 RNA。再将多角体蛋白基因及其启动子(pPh+polyhedrin)和绿色荧光蛋白(EGFP)基因分

别插入 pFastBac-CYP9A14FR 和 pFastBacR (对照)的 p10 基因启动子下游。将酶切鉴定后的阳性克隆转座含有野生型 HaNPV Bacmid 和 Helper 质粒的 *E. coli* DH10B 感受态细胞,之后涂布于 LA 培养基平板上,37 °C 下培养 36~48 h。检查平板上的蓝白斑,白斑为重组 Bacmid 菌落。将白色菌落划线重新移至新鲜的 LA 培养基平板上,37 °C 下

培养 36~48 h,以证实其为白色菌落。

以载体 pFastBacR 上的引物 M13-R 和 CYP9A14-4 对重组 Bacmid HaBac-CYP9A14 进行 PCR 检测,引物为 M13-R: 5'-CAGGAAACAGC-TATGAC-3'。将阳性克隆子分别命名为 HaBac-CYP9A14 和 HaBac-EGFP。重组 Bacmid 构建的模式见图 1。

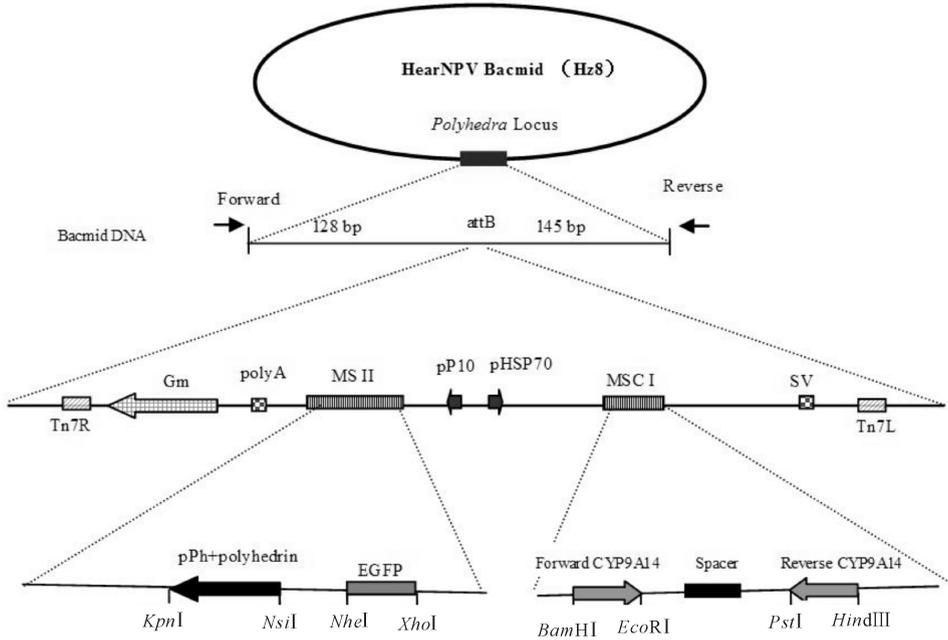


图 1 重组 Bacmid HaBac-CYP9A14 结构模式

Fig. 1 Scheme for constructing recombined Bacmid HaBac-CYP9A14

1.4 HzAM1 细胞的转染和感染

在小皿中接种 HzAM1 细胞,27 °C 下培养过夜,在生物安全柜中弃去上层 Grace's 培养基,加入 1 mL Grace's 培养基,并置于室温下放置 1 h。取 5 μ g 重组的 Bacmid DNA 和 10 μ L Cellfectin,分别用 Grace's 培养基稀释至 100 μ L,将两者混合,每隔 7 min 混匀 1 次,45 min 后往脂质体和 DNA 的混合液中加入 400 μ L 培养基混匀,移去小皿中的培养基,加入含 HaBac-CYP9A14 和 HaBac-EGFP 并分别与脂质体混合物的培养基,27 °C 下培养 30 min,每 15 min 摇匀小皿 1 次,30 min 后加入 400 μ L 培养基混匀,培养 6 h 后加入 1 mL 含 20% FBS 的培养基混匀,培养 72 h 后每天在荧光倒置显微镜下观察绿色荧光的生成情况。在 27 °C 下培养 6 d,收取上清病毒液获得第 1 代病毒。在一次性细胞培养瓶中加入重组病毒,27 °C 温箱培养,当重组病毒的产量达到最高峰时(96 h)收集上清,此为第

2 代病毒。用第 2 代病毒感染细胞获得第 3 代病毒。将所有病毒置于 4 °C 下避光保存备用。得到的重组病毒命名为 vHaBac-CYP9A14 和 vHaBac-EGFP (与 vHaBac-CYP9A14 相比,缺乏 Forward CYP9A14、spacer 和 Reverse CYP9A14 部分)。

采用终点法测定病毒样品的感染滴度,重复测定 3 次后取平均值。

1.5 感染病毒后基因的转录

将氯氰菊酯抗性棉铃虫养至 3 龄末,置于冰上冻僵,用无菌微量注射器分别取 10 μ L 效价均为 1×10^7 pfu/mL 的 vHaBac-CYP9A14 (处理组)和 vHaBac-EGFP (对照组)以及无菌 H₂O 注射幼虫,在倒数第 2 和第 3 腹足之间注射入血淋巴中。48 h 后每个处理选 3 头体质量相近幼虫的中肠为一组提取 RNA,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,进行实时定量 PCR 和 RT-PCR 检测 CYP9A14 和 EGFP 基因的转录水平。

EGFP 的实时定量 PCR 引物为 *EGFP-F*: 5'-GAGTATCTATCGTGTTCAGCCG-3', *EGFP-R*: 5'-GATGGGGGTGTTCTGCTGGT-3'。以上述同样方法检测 *EGFP* 基因与内参基因 β -*actin* 的扩增效率是否相同。

以 β -*actin* 为内参,分别对处理组 and 对照组的样品进行实时定量 PCR 反应。每组试验均完成 3 个生物学重复,每个生物学重复进行 3 次技术重复。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量,其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{对照组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{处理组}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 即为对照组目的基因相对处理组的变化倍数,并使用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析(ANOVA)。

在 RT-PCR 中,25 μ L 体系中各以 2 μ L 对照组和处理组棉铃虫中肠 RNA 转录的 cDNA 为模板,分别以 *CYP9A14-F* 与 *CYP9A14-R* 和 *EGFP-F* 与 *EGFP-R* 为引物,并以看家基因 β -*actin* 为内参。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s,进行 26 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 5 min。1%琼脂糖凝胶电泳分别检测 RT-PCR 产物。重复 3 次。

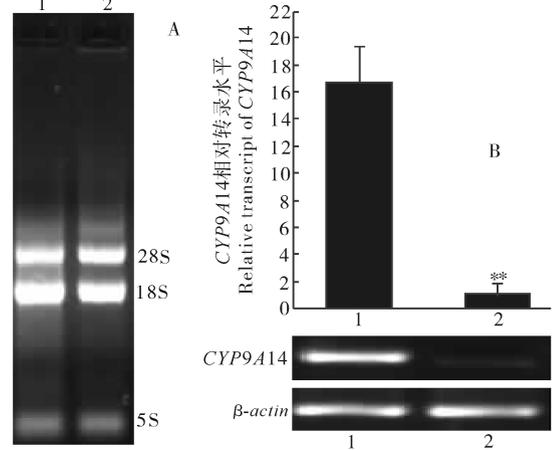
2 结果与分析

2.1 基因的转录水平

分别从 5 龄中期氯氰菊酯抗性和敏感棉铃虫的中肠里提取 RNA,用琼脂糖凝胶电泳检测完整性。检测结果显示,提取的 RNA 样品有 3 个条带,即 5S、18S 和 28S(图 2-A),说明 RNA 完整且纯度较高,分离的 RNA 质量很好,可以用于后续的反转录。采用 SYBR Green 荧光染料法,需要通过融解曲线分析确定 PCR 反应的特异性,防止在进行 PCR 反应的时候,扩增出非目的片段或在引物之间形成二聚体影响试验。试验中 *CYP9A14* 和 β -*actin* 基因的融解曲线都对应着单一的峰,其余地方没有杂峰,而且不加模板的对照没有荧光信号,表明没有污染、引物二聚体和假阳性现象。

在扩增效率的检测中,以 cDNA 浓度梯度值对基因表达量 ΔCt 值作图,所得直线斜率绝对值接近于 0,说明目标基因 *CYP9A14* 和内参基因 β -*actin* 的扩增效率大致相等。在实时定量 PCR 与 RT-PCR 检测中,检测到氯氰菊酯抗性棉铃虫中肠 *CYP9A14* 的转录水平约是敏感棉铃虫的 17 倍(图 2-B),有极显著差异($df = 17, F = 144.7, P <$

0.01),说明 *CYP9A14* 基因在氯氰菊酯抗性棉铃虫中有超量表达。在 RT-PCR 中,从琼脂糖凝胶电泳图可以清楚看出,与内参基因 β -*actin* 相比,氯氰菊酯抗性棉铃虫 *CYP9A14* 基因的条带亮度明显高于敏感棉铃虫(图 2-B)。



1. 抗性 Resistant; 2. 敏感 Sensitive; * * : 在 0.01 水平上差异显著 Indicate significant difference at $P < 0.01$.

图 2 RNA 样品的琼脂糖凝胶电泳分析和实时定量 PCR 与 RT-PCR 检测

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RNA samples and real-time PCR and RT-PCR

2.2 重组质粒的构建

棉铃虫中肠 RNA 反转录为 cDNA 后,以 cDNA 为模板,扩增 *CYP9A14* 的 490 bp 片段,克隆到 pMD-18T 载体,测序结果与 GenBank 收录的 *CYP9A14* 基因序列(AF031468)一致,没有突变和缺失。将该正向片段插入载体 pFastBacR 的 *Bam*H I 与 *Eco*R I 酶切位点之间,再将反向片段插入 *Pst* I 与 *Hind* III 酶切位点之间,酶切鉴定正确,命名为 pFastBac-*CYP9A14FR*。然后将 pPh + polyhedrin 和 *EGFP* 分别插入 pFastBac-*CYP9A14FR* 和 pFastBacR 的 p10 基因启动子下游,酶切鉴定正确。将 2 个重组质粒分别转化含有野生型 HaNPV Bacmid 和 Helper 质粒的 *E. coli* DH10B 感受态细胞,白斑为含重组 Bacmid 的菌落。阳性菌落经扩大培养后,提取重组 Bacmid。以引物 M13-R 和 *CYP9A14-4* 对重组 Bacmid HaBac-*CYP9A14* 进行 PCR 检测,结果与预期的结果相符。

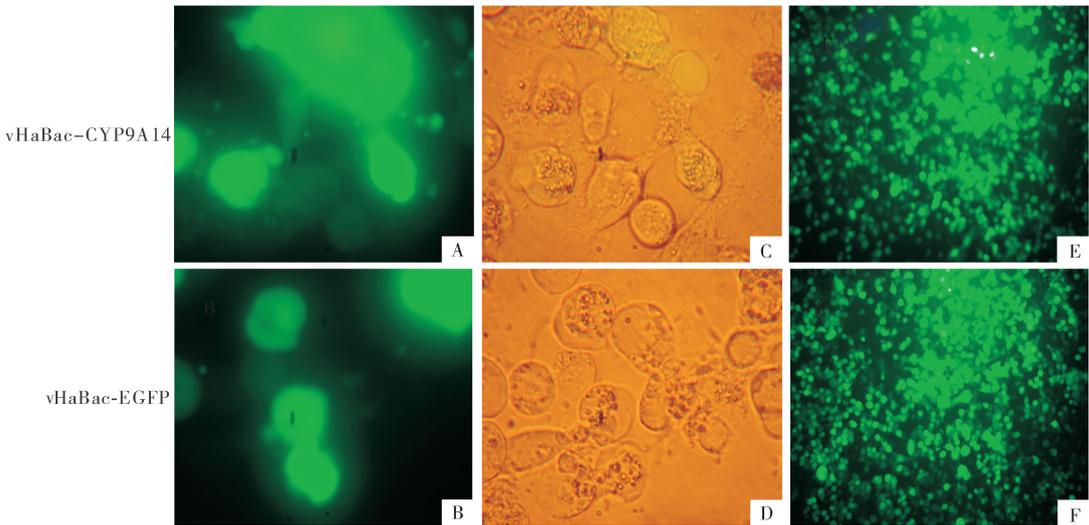
2.3 转染和感染 HzAM1 细胞

将重组 Bacmid HaBac-*CYP9A14* 和 HaBac-*EGFP* 分别转染 HzAM1 细胞,96 h 后用荧光倒置

显微镜观察细胞,可以观察到绿色荧光蛋白(图 3-A,B)和多角体(图 3-C,D),说明绿色荧光蛋白和多角体基因已经重组到病毒的基因组中,同时也表明 2 种感染性的重组病毒能在 HzAM1 细胞中产生。

收集上清,感染 HzAM1 细胞,在感染 72 h 后会产生较多的绿色荧光蛋白和多角体(图 3-E,F),

重组病毒分别命名为 vHaBac-CYP9A14 和 vHaBac-EGFP。采用终点法测定病毒样品的感染滴度,vHaBac-CYP9A14 和 vHaBac-EGFP 的平均效价分别为 1.6×10^7 pfu/mL 和 6.5×10^7 pfu/mL,用 Grace's 培养基稀释成效价均为 1×10^7 pfu/mL。



A,B: HaBac-CYP9A14 和 HaBac-EGFP 转染细胞 96 h 后荧光倒置显微镜图(400 \times); C,D: HaBac-CYP9A14 和 HaBac-EGFP 转染细胞 96 h 后光学倒置显微镜图(400 \times); E,F: vHaBac-CYP9A14 和 vHaBac-EGFP 感染细胞 72 h 后荧光倒置显微镜图(40 \times)。

A,B: Fluorescent microscopy of HzAM1 cells transfected with HaBac-CYP9A14 and HaBac-EGFP at 96 h post-transfection under 400 \times microscope; C,D: Light microscopy of HzAM1 cells transfected with HaBac-CYP9A14 and HaBac-EGFP at 96 h post-transfection under 400 \times microscope; E,F: Fluorescent microscopy of HzAM1 cells infected with vHaBac-CYP9A14 and vHaBac-EGFP at 72 h post-infection under 40 \times microscope.

图 3 绿色荧光蛋白的表达和多角体的产生

Fig. 3 Expression of green fluorescent protein and production of polyhedra

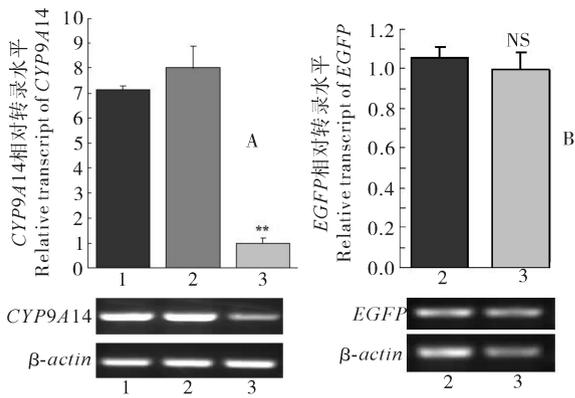
2.4 感染病毒后基因的转录水平

氯氰菊酯抗性棉铃虫养至 3 龄末后,分别注射 10 μ L 效价均为 1×10^7 pfu/mL 的 vHaBac-CYP9A14 和 vHaBac-EGFP 以及无菌 H₂O,48 h 后取棉铃虫幼虫的中肠提取 RNA,进行实时定量 PCR 和 RT-PCR 检测 CYP9A14 基因的转录水平。在扩增效率的检测中,以 cDNA 浓度梯度值对基因表达量 Δ Ct 值作图,所得直线斜率绝对值接近于 0,说明目标基因 EGFP 和内参基因 β -actin 的扩增效率大致相等。

在实时定量 PCR 和 RT-PCR 检测中,注射无菌 H₂O 和 vHaBac-EGFP 样品的 CYP9A14 相对转录水平分别是注射 vHaBac-CYP9A14 样品的 7.4 倍和 8.0 倍,有极显著差异(df = 23, $F = 1\ 306.4$, $P < 0.01$)。注射无菌 H₂O 样品的 CYP9A14 基因相对转录水平是注射 vHaBac-EGFP 样品的 0.9 倍,

无显著差异($P > 0.05$),说明在注射 vHaBac-CYP9A14 之后,CYP9A14 基因的转录水平受到抑制。在 RT-PCR 中可以看出,与内参基因 β -actin 相比,注射 vHaBac-CYP9A14 样品后的 CYP9A14 基因条带亮度明显下降(图 4-A)。

注射了 vHaBac-EGFP 样品的 EGFP 基因相对转录水平与注射 vHaBac-CYP9A14 的样品大致相等,没有显著差异(df = 17, $F = 2.0$, $P > 0.05$)。注射了无菌 H₂O 的样品用 EGFP 引物没有扩增出目的条带,说明 vHaBac-EGFP 和 vHaBac-CYP9A14 能把外源基因带到棉铃虫中肠里,并在其上进行扩增,表明注射 vHaBac-EGFP 和 vHaBac-CYP9A14 之后 EGFP 的转录水平一致。在 RT-PCR 中,从琼脂糖凝胶电泳图可以看出,与内参基因 β -actin 相比,注射了 vHaBac-CYP9A14 样品的 EGFP 基因条带亮度与对照相同(图 4-B)。



1: H₂O; 2: vHaBac-EGFP; 3: vHaBac-CYP9A14;
 * *: 在 0.01 水平上差异显著 Indicate significant difference at $P < 0.01$; NS: 在 0.05 水平上没有显著差异 No significant difference at $P > 0.05$ level.

图 4 感染病毒后的实时定量 PCR 和 RT-PCR 检测

Fig. 4 Real-time PCR and RT-PCR after injected the virus

3 讨论

P450 酶系介导的杀虫剂代谢解毒作用的增强是昆虫产生抗药性的主要机制。唐涛等^[16]以氰戊菊酯抗性棉铃虫 6 龄幼虫中肠组织总 RNA 为模板,通过反转录克隆出 P450 CYP6B7 基因片段,并通过 Northern 杂交分析表明,抗性棉铃虫中肠组织中 CYP6B7 mRNA 的表达量明显高于敏感棉铃虫,表明 CYP6B7 基因在棉铃虫对氰戊菊酯的抗性中起着重要作用。本试验检测到氯氰菊酯抗性棉铃虫 CYP9A14 mRNA 的表达量明显高于敏感棉铃虫,说明 CYP9A14 基因在棉铃虫对氯氰菊酯的抗性中起着重要作用。基于此,本试验构建了一个含有反向重复 CYP9A14 基因保守片段的重组棉铃虫病毒,并通过该病毒感染棉铃虫幼虫后转录形成长链发夹 RNA,从而实现了对幼虫 CYP9A14 基因转录的沉默,达到抑制抗性棉铃虫对氯氰菊酯的抗性,增强拟除虫菊酯类农药的杀虫效果。

茎环结构的 mRNA 提能够在哺乳动物细胞中被加工成有功能的 siRNA 分子(长度为 21~23 个碱基)^[17],因此,推测具有同样发夹结构的长链 dsRNA 在昆虫细胞中也能被 Dicer 等 RNAi 效应相关酶复合物加工成有效的 siRNA 分子。RNAi 作为一种有效的基因沉默手段已得到广泛应用。用于 RNAi 技术的 RNA 可以是 dsRNA,也可以是单链茎环结构的短发夹状 RNA(short hairpin RNAs,

shRNAs)。虽然有多种方法可以得到 dsRNA 和 siRNA,如 dsRNA 的合成,包括化学合成法、体外转录法、转录载体体内转录法等^[18],但用杆状病毒载体产生 dsRNA 不失为一种简便而可靠的方法。

利用 Bac-to-Bac 系统,可以构建含有 siRNA 的重组杆状病毒,并能对导入的外源 GFP 基因进行沉默^[15]。用通过生物技术改造获得的含细胞色素 P450 CYP6AE14 相应序列的 dsRNA 转基因植物饲喂棉铃虫后,棉铃虫 CYP6AE14 基因的表达显著降低^[19]。本试验结果也表明,含 CYP9A14 的正向和反向 DNA 序列重组棉铃虫病毒的感染,能明显抑制被感染棉铃虫 CYP9A14 基因的表达,但这只是利用重组杆状病毒介导 RNAi 抑制 CYP9A14 基因表达的初步结果。通过饲喂病毒多角体来抑制 CYP9A14 基因表达以及重组病毒与拟除虫菊酯类农药联合作用的试验正在进行中,相关研究结果将另文发表。

参 考 文 献

- [1] MUSHTAQ A M, IQBAL A, ZAHOOR A. Resistance to carbamate insecticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan [J]. *Cro Prot*, 2001, 20: 427-432.
- [2] ALAN R M. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view [J]. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1998, 353: 1735-1750.
- [3] YANG Y, WU Y, CHEN S, et. al. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34: 763-773.
- [4] LIU N, SCOTT J G. Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in housefly [J]. *Insect Mol Biol*, 1998, 28: 531-535.
- [5] CHEN S, YANG Y H, WU Y D. Correlation between fenvalerate resistance and cytochrome P450-mediated O-demethylation activity in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *J Econ Entomol*, 2005, 98: 943-946.
- [6] MARJORI M, ANTONIUS J M M, JAN M K. RNA: guiding gene silencing [J]. *Science*, 2001, 293: 1080-1083.
- [7] MISAKO H, KENSAKU M, KEN K, et al. Significantly low level of small RNA accumulation derived from an encapsidated mycovirus with dsRNA genome [J]. *Virology*, 2010, 396: 69-75.
- [8] 柴晓杰, 王丕武, 关淑艳, 等. 应用 RNA 干扰技术降低玉米支链淀粉含量 [J]. *植物生理与分子生物学报*, 2005, 31(6): 625-630.
- [9] 黄文坤, 彭德良, 彭焕. RNA 干扰技术在植物寄生线虫中的应用 [J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(1): 170-175.
- [10] MILLER L. Introduction to the baculovirus [M]. New York

- and London; Plenum Press, 1997; 1-6.
- [11] FEDERICI B A. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control; biopesticides use and delivery [M]. New York and London: Humana Press, 1999; 301-320.
- [12] BLACK B C, DIERKS L A. Commercialization of baculoviral insecticides; the baculoviruses [M]. New York and London: Plenum Press, 1997; 341-387.
- [13] SUN X L, WANG H L, SUN X C, et al. Biological activity and field efficacy of a genetically modified *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus expressing an insect-selective toxin from a chimeric promoter [J]. Biol Control, 2004, 29(1): 124-137.
- [14] 万成松, 孙修炼, 张光裕, 等. 棉铃虫核型多角体病毒与化学杀虫剂和卵磷脂混用的增效作用[J]. 昆虫学报, 2000, 43(4): 346-355.
- [15] HUANG Y, DENG F, HU Z H, et al. Baculovirus-mediated gene silencing in insect cells using intracellularly produced long double-stranded RNA [J]. J Biotechnol, 2007, 128: 226-236.
- [16] 唐涛, 成玉红, 王成菊, 等. 抗氰戊菊酯棉铃虫细胞色素 P450 CYP6B7 基因的克隆及分析[J]. 农药学报, 2007, 9(4): 370-375.
- [17] BRUMMELKAMP T R, BERNARDS R, AGAMI R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002, 296: 550-553.
- [18] 唐盛高, 尹隽, 钟江. 几种诱导昆虫细胞 RNA 干扰质粒的构建和效果比较[J]. 复旦学报, 2006, 45(6): 790-795.
- [19] MAO Y B, WEN J C, JIA W Y, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol [J]. Nature Biotechnol, 2007, 25(11): 1307-1313.

Inhibition of the transcription of P450 monooxygenase gene *CYP9A14* in *Helicoverpa armigera* (Hübner) by baculovirus-mediated RNAi

CHEN Ai-hua¹ SUN Xiu-lian² ZHAO Xiu-yun¹

1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University / State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China;

2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences / Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, Wuhan 430071, China

Abstract Cytochrome P450 monooxygenases of insects play an important role in the detoxification of both phytotoxin and chemical insecticide, which are considered to be related to the resistance of insects. In this study, a P450 monooxygenase gene *CYP9A14* of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner), was found to be 17-fold overexpressed in a cypermethrin resistant strain compared to the sensitive strain by real-time PCR. A 490 bp *CYP9A14* gene from *H. armigera* midgut was cloned and used to construct a recombinant *Helicoverpa* nuclear polyhedrosis virus (HaNPV) by a double-stranded RNA interference (dsRNAi) manner. When *H. armigera* cypermethrin resistant larvae were injected with the recombinant HaNPV, level of the *CYP9A14* transcript in the midgut significantly decreased in comparison with the control construction.

Key words *Helicoverpa armigera* (Hübner); baculovirus; gene transcription; insecticide resistance

(责任编辑:陈红叶)