



阚雯俊, 李三和, 周雷, 陈志军, 刘凯, 杨国才, 徐华山, 李培德, 游艾青. 褐飞虱 ABCB 基因的克隆与表达分析 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (2): 419–425.

褐飞虱 ABCB 基因的克隆与表达分析

阚雯俊¹, 李三和¹, 周雷¹, 陈志军¹, 刘凯¹, 杨国才¹,
徐华山¹, 李培德¹, 游艾青^{1,2*}

(1. 湖北省农业科学院粮食作物研究所, 粮食作物种质创新与遗传改良湖北省重点实验室, 武汉 430064;
2. 长江大学, 主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心, 荆州 434025)

摘要: 三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 (ATP-binding cassette, ABC) 广泛分布于各种生物体中, 是最大的膜蛋白家族之一。在昆虫中, ABC 转运子不仅在分子转运过程中有重要的功能, 同时在杀虫剂抗性、代谢和发育中都起到重要的作用。本研究克隆和鉴定了褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål ABCB 基因 (*NIABCB*), 结果表明 *NIABCB* 基因全长 1 468 bp, 含有一个长度为 459 bp 的开放阅读框, 编码 153 个氨基酸。利用定量 PCR 检测 *NIABCB* 基因在褐飞虱体内的表达, 发现 *NIABCB* 转录本在褐飞虱的所有发育阶段都有表达, 在 1 龄若虫中表达量最低, 随着生长发育表达量逐渐升高。*NIABCB* 在褐飞虱 5 龄若虫的中肠中表达量最高。研究发现该基因与褐飞虱的生理活动有关。构建 *NIABCB*-dsRNA 载体, 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* HT115 后, 经 IPTG 诱导, 形成 *NIABCB*-dsRNA, 喂养褐飞虱取食含 *NIABCB*-dsRNA 人工饲料, 发现褐飞虱的存活率明显降低。因此该基因的克隆和功能鉴定, 对于作物的抗虫育种, 尤其对水稻害虫的生物防治将起到重要的促进作用。

关键词: 褐飞虱; *NIABCB*; 克隆; dsRNA

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 02-0419-07

Genecloning and expression of ABCB in *Nilaparvata lugens*

ZHA Wen-Jun¹, LI San-He¹, ZHOU Lei¹, CHEN Zhi-Jun¹, LIU Kai¹, YANG Guo-Cai¹, XU Hua-Shan¹, LI Pei-De¹, YOU Ai-Qing^{1,2*} (1. Institute of Food Crops, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Hubei Key Laboratory of Food Crop Germplasms and Genetic Improvement, Wuhan 430064, China; 2. Yangtze University, Hubei Collaborative Innovation Center for Grain Industry, Jingzhou 434025, Hubei Province, China)

Abstract: ATP-binding cassette (ABC) transporter protein is one of the largest protein superfamilies and widely exists in all organisms. In insects, ABC transporter has important functions in molecule transport and insecticide resistance, metabolism and development. The *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) ABCB (*NIABCB*) gene was identified and cloned. The complete mRNA sequence of *NIABCB* was 1 468 bp with an open reading frame of 459 bp encoding a protein of 153 amino acids. The developmental expression analysis using quantitative real-time reverse transcriptase PCR showed that the *NIABCB* transcript was expressed at all developmental stages of *N. lugens*. The relative expression level of *NIABCB* was the lowest in 1st instar and increased with larval growth. The transcript profiles of *NIABCB*

基金项目: 国家转基因重大专项 (2018ZX0800101B); 国家重点研发计划 (2018YFD0100806); 国家基金项目 (31501654); 杂交水稻国家重点实验室基金 (KF201801)

作者简介: 阚雯俊, 女, 1985 年生, 湖北武汉人, 博士, 副研究员, 研究方向为水稻抗虫, E-mail: zwj_19850202@whu.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence: 游艾青, E-mail: aq_you@163.com

收稿日期 Received: 2019-03-10; 接受日期 Accepted: 2019-07-22

were analyzed in different tissues of 5th instar nymph. The highest expression was observed in the midgut. It was found that the gene was related to the digestive feeding and survival of brown planthopper. After transforming L4440 - *NIABCB* dsRNA into *Escherichia coli* HT115, *NIABCB*-dsRNA was induced by IPTG. The survival rate of brown planthopper was significantly reduced by feeding artificial diet containing *NIABCB*-dsRNA. Therefore, the isolation and cloning of this gene will play an important role in insect resistance breeding of crops, especially in biological control of rice.

Key words: *Nilaparvata lugens* Stål; BPH; *NIABCB*; cloning; dsRNA

所有的细胞和细胞器都是通过脂质膜与外界环境分离的,需要转运蛋白来转运这些膜上的多种化合物 (Higgins CF, 1992)。以下事实证明了膜转运的重要性:在大肠杆菌和人类中,约 10% 和 4% 的基因编码转运相关的蛋白 (Blattner *et al.*, 1997)。大多数 ABC 蛋白作为主要的活性转运蛋白发挥作用,需要结合和水解 ATP 来转运脂质膜上的底物,其转运的底物包括糖、氨基酸、金属离子、多肽、蛋白质、细胞代谢产物和药物等 (王华丙等, 2007)。ABC 转运蛋白最早发现于细菌,是细菌质膜上的一种具有运输功能的 ATP 酶,由两个结合和水解 ATP 的胞质核苷酸结合域 (NBD) 和两个完整的跨膜域 (TMD) 组成。NBD 域包含几个保守序列,如 Walker A (P-loop)、Walker B 和特征基序 C (吴转斌和吴金美, 2008)。跨膜结构域由 5~6 个跨膜螺旋组成,并提供底物特异性。功能性转运体的 4 个结构域可以存在于一种蛋白质中,也可以分布在多种蛋白质上。在后者的情况下,ABC 蛋白需要同二聚体或异二聚体来形成功能性 ABC 转运体 (Higgins and Linton, 2004)。根据 NBD 的序列相似性,ABC 蛋白家族被分为 8 个亚家族,用字母 a~h 表示。

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 属同翅目飞虱科昆虫,又称褐稻虱。褐飞虱是水稻主要害虫之一,在中国长江流域和华南及西南广大稻区发生频繁、危害严重 (王传之等, 2008)。本研究从褐飞虱体内分离得到 *ABCB* 基因,分析了 *ABCB* 基因的全长、结构,为研究褐飞虱 *ABCB* 基因的功能奠定了基础。

RNA 干扰是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。高浓度的 dsRNA 才能保证靶标基因的连续抑制,利用体外合成的 dsRNA 来喂养昆虫成本相对昂贵。HT115 (DE3) 菌株是一类特殊的 RNase III 缺陷型大肠杆菌菌株,可以饲喂线虫,主要用于秀丽

隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的 RNAi 干扰试验。该菌株可以在 LB 或 2YT 培养基中正常生长, Tn10 转座子的存在使其具有四环素抗性。该菌株染色体整合了 λ 噬菌体 DE3 区 (DE3 区含有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶,在 IPTG 存在时可诱导 T7 RNA 聚合酶大量表达,进而启动线虫 dsRNA 的表达),可同时表达 T7 RNA 聚合酶和大肠杆菌 RNA 聚合酶,除了用于线虫 RNAi 干扰试验,也可用于 pET 系列、pGEX、pMAL 等质粒的蛋白表达。利用大肠杆菌表达 dsRNA 已在粘虫 *Mythimna separate* (Ganbaatar *et al.*, 2017) 中得以实现。

利用 dsRNA 喂养是目前最方便的方法之一,这种方法已经在从属于 7 个目 15 种的昆虫物种中实现了。通过喂养,对于肠道的靶标基因表现出极高的沉默效率。对于其他组织的靶标基因而言, RNAi 的效率会因为靶标基因的不同和昆虫种属的不同而差别很大。例如蜜蜂 *Apis mellifera* 脂肪体的基因,通过喂养会诱导 90% 的卵黄蛋白原表达下降 (Nunes and Simoes, 2009); 以及美洲散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 调控 Hexamerin 储存蛋白表达下降 50%~70% (Zhou *et al.*, 2008); 但是对于刺舌蝇 *Glossina morsitans* 的铁转运蛋白没有任何的效果 (Walshe *et al.*, 2009)。同时喂养效率也受昆虫生长发育的影响。例如利用 nitrophenol 2 dsRNA 处理长红锥蝽 *Rhodnius prolixus* 的 4 龄若虫没有效果,但利用 2 龄若虫产生了 42% 的沉默效果 (Araujo *et al.*, 2006)。虽然利用 dsRNA 喂养的方法是非侵入性和方便的方法,不过喂养时 dsRNA 的摄取量和 RNAi 的效率会因为个体之间的差异而变得困难 (Turner *et al.*, 2006)。

因此,利用此技术通过人工喂养 dsRNA 沉默靶标而达到控制褐飞虱的目的。本研究通过构建 *NIABCB*-dsRNA 载体,转化 *E. coli* HT115 后,经 IPTG 诱导,形成 *NIABCB*-dsRNA,喂养褐飞虱后,褐飞虱靶标基因抑制,存活率下降。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料

褐飞虱品种为武汉大学饲养, 饲养在感虫水稻品种台中 1 号 TN1 植株上, 环境条件为 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 80%, 光照周期为 L:D = 16:8。

1.1.2 试剂

试验所用大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , ExTaq 酶, 逆转录试剂盒和 pMD18-T 克隆载体, 5'-Full RACE 和 3'-Full RACE 试剂盒购自 Takara 公司。引物合成及序列测定由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

采用 TRIzol 法抽提褐飞虱样品的总 RNA, 具体操作参考 Invitrogen 公司 TRIzol[®] reagent 试剂说明书。

1.2.2 cDNA 克隆

利用赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 ABC transporter 蛋白 (GenBank 登录号: XP_971735.1) 褐飞虱的 ESTs 数据库 (<http://bphest.dna.affrc.go.jp/>) 中进行 TBLASTN 查询, 得到相应的相应 EST 片段。设计 RACE 外围引物 3'RACE outer 和 5'RACE outer 以及内围引物 3'RACE inner 和 5'RACE inner。3'RACE 和 5'RACE 模板的合成具体按照 BDSMART RACE cDNA Amplification Kit User Manual 说明书步骤操作。利用巢式 PCR 技术分别扩增褐飞虱基因 3'端和 5'端。或查询褐飞虱基因组, 结合 Augustus、FgeneSH 等基因预测软件分析, 设计引物直接从两端扩增全长 cDNA。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 NIABCB 转录差异

取 -80°C 保存不同生长发育时期褐飞虱和褐飞虱不同组织总 RNA 定量, 按照反转录试剂盒说明书进行反转录获得褐飞虱的 cDNA。在 Roteogene 6000TM 定量 PCR 仪 (Corbett research) 上进行 $10 \mu\text{L}$ 体系的 PCR 反应, 反应条件如下: 94°C 预变性 2 min, 然后以 30 ~ 40 个循环进行 PCR 扩增 (94°C 20 s, 55°C 15 s, 72°C 20 s) 每个样品 3 个重复, 取平均值。以褐飞虱 Actin 作为参照基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法 (Livak and Schmittgen, 2001), 比较不同样品基因表达水平。

1.2.4 生物信息学分析

测序拼接获得 cDNA 全长后, 利用 ExPASy

Translate tool 软件 (<http://web.expasy.org/translate/>) 对翻译得到相应 cDNA 编码框进行预测, 再利用下列在线工具进行蛋白质序列的功能域及结构域的预测: 同源序列比对利用 Clustalw (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>); 进化树图的绘制利用 MEGA 7.0 软件; 分子量和等电点分析利用 ExPASy Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/); 二级结构的预测利用 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>)。

1.2.5 人工喂养 dsRNA

取 2 龄褐飞虱若虫用人工饲料作适应性预饲养, 待若虫发育至目标基因高表达阶段, 向人工饲料中添加 dsRNA, 每头幼虫喂养 $10 \mu\text{g}$ ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) dsRNA。RNA 干扰设置 2 ~ 3 个浓度, 同时设置空白对照组 (纯人工饲料) 和 dsGFP 对照组 (含 dsGFP 的人工饲料)。处理时, 每饲喂装置接入 20 头发育一致的褐飞虱, 设置 3 个重复。考察指标包括靶标基因表达量、个体存活率、生长发育状况等。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱 NIABCB 基因的克隆

以该 EST 序列为模板设计 RACE 引物, 克隆得到 NIABCB 基因的 5'cDNA 片段和 3'cDNA 片段。5'cDNA 序列长度约为 0.9 Kb, 3'cDNA 序列长度约为 0.8 Kb。全长序列经过测序拼接后, 全长为 1 468 bp, 含有一个编码 153 个氨基酸的开放阅读框 (图 1)。

2.2 NIABCB 蛋白分析鉴定

NIABCB 基因编码 153 个氨基酸。应用 Computer pI/Mw Tool 软件 (http://web.expasy.org/compute_pi/) 分析预测 NIABCB 蛋白的分子量为 16.8 kDa, 等电点为 8.8。二级结构预测分析发现, NIABCB 蛋白 α 螺旋占 44.08%, 延伸链占 21.05%, β 折叠占 9.87%, 随机卷曲占 25% (图 2)。

通过 NCBI 的 Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 程序进行在线蛋白质序列比对, 结果表明该基因与其它昆虫的 ABCB 蛋白序列相似性大于 72.54% (表 2)。例如与灰飞虱 *Laodelphax striatella* 的同源性为 93.42%, 最高; 与美洲蜚 *Limulus polyphemus* 的同源性为 72.54%, 最低。由此可以看出褐飞虱 NIABCB 与其它昆虫的 ABC 转运蛋白序列相似性较高, 其序列相当保守。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物 Primer	序列 5'-3' Sequence 5'-3'
5' RACE		
<i>NIABCB</i>	下游外侧特异性引物 gsp	CCAATTCAACCTTTTCGTCCT
	下游内侧特异性引物 ngsp	TCCCTTTCTCCACAATGACA
	外引物 Outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
	内引物 Inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCCGATG
3' RACE		
<i>NIABCB</i>	上游外侧特异性引物 gsp	GCCAGAAGCAGAGGATAGCA
	上游内侧特异性引物 ngsp	ACAAGTGCATTGGATGCTGA
	外引物 Outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
	内引物 Inner primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
Real - time PCR		
<i>NIABCB</i>	正向 Forward	ACAAGTGCATTGGATGCTGA
	反向 Reverse	TCCCTTTCTCCACAATGACA
β -Actin	正向 Forward	TGGACTTCGAGCAGGAAATGG
	反向 Reverse	ACGTCGCACTTC - ATGATCGAG
dsRNA 原核表达		
<i>NIABCB</i>	正向 Forward	GGAGGAGGTAACCATCAGCA
	反向 Reverse	TCCG ATTG ACCTAATCGTCT

GAAACTTCTCTAAAAATGGTGGCTGGCTATGGAAAAGTGTGTTGTGCTCTCTGAATATTTTTCTGTTTGATTGAAATTT 80
ATAATGTTTTAATTTGAGATTTGAACAGTTTTATGGTGTCTAATTTTGTATAATTTGATTTGTGTCTACAAGCCTAT 160
AGCCATTGTTTTCAACTATATAAATGGATAAGTATTTTAGCTTGTAAATGATGCTATATGTTTAAAGTGTGTAAAGGTATTG 240
TTTTGTGGATTTGTGTTGTATATTGCCAAAATCTTATGAAGATTATAAGTTGATTTGCTCTGAAAGCTGGATTTCTTAT 320
TCATTAGCAATAGATCCATTCATAATTTATCAAGAATTTACCATTTTGGAGCCGATAACTTCTTTAGGTTAATAGGTGA 400
AAAATGCTATTCAACCTATTTAGGATAAATTGGTAGCACGGCAGAGCTAATTCACCTGAATAAGAAATTTAGAATACATA 480
TAGTCTAATGTCACCTTCATATGAACGGTAATGTGAGTTTTTCAGTGTGAATAGAAGTACAGTAATATCAATATTGGTAGC 560
CAAAATAGACAGGAACCTTTTCGAACATCAACATTTGGCACAAATTTGGCAGTCAACAGTTGAAGTTGGCAGTACTAGTAGT 640
ACTATATAGTCTTGGCTCTTACCAAGAGTAGTCATTTGGACCAAATATTTGAAAATATGGATTATTTGAAAATCGAGAAC 720
GCGACATTTTCGTGATAAAGAAATCAACTACCTGGAATGCTGGCGATCTACCTAGTTGTTTTTAACAATATTGTTTCTTTT 800
CAACCAGATTTTACGATGTGGATGAAGGTTGTATCACGGTTGGAGGTGTGGATATACGTGAATTGGATCCAAAGTGGCTG 880
AGGGGCAGAGTCATTGGTTTTGATCAATCAGGAGCCTATTCTATTGCCACATCAATCATGGAGAATATTCGCTATGGAAA 960
M E N I R Y G K 8
ACCAACAGCGAGTGATGAAGAGGTTTCAAATGAAGCAGGAAGGCCAACGCTGATGGCTTTATTAGTAAATTTCCCTCAGG 1040
P T A S D E E V F E A A K K A N A D G F I S K F P Q G 35
GCTACAATACAGTGTTGGGGAACGTGGAATTACTGTATCGGGAGGCCAGAAAGGATAGCAATAGCTAGAGCTCTT 1120
Y N T V V G E R G I T V S G G Q K Q R I A I A R A L 61
CTGAAGAATCCTTCCATCTTGATTCTGGATGAAGCCACAGTGCATCGGATGCTGAATCCGAAAAAGTTGTACAGAAAGC 1200
L K N P S I L I L D E A T S A S D A E S E K V V Q K A 88
TTTGGATGAGGTTTCAAAAATGAAGACAGTGTGTTGCTATAGCCACCGGCTCAGTACTATTGAGAATGCAGATTGATAG 1280
L D E V S K M K T V L V I A H R L S T I Q N A D L I V 115
TAGTCTGAAGAATGGTGTCTTGTGGAGAAAGGGAATCATGAAGAAGTATCAGGAGAAAAGGACATTACTGGAATTTG 1360
V L K N G V I V E K G N H E E L I R R K G H Y W N L 141
ATGAACCAACAAGATGATCAAGGACGAAAGGTTGAATTGGTTCATCAACTGTTAGATTTTGTACAGAATTTAGTAAATA 1440
M N Q Q D D Q R T K G * 152
GAACGTTATTTTACTTAAAAAATAA 1468

图 1 *NIABCB* 的核苷酸和推测氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *NIABCB*

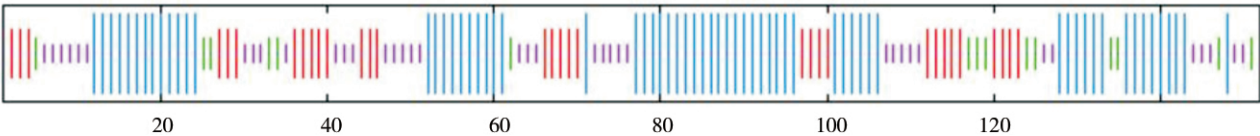


图2 NIABCB 推测氨基酸的二级结构

Fig.2 Amino acid secondary structure of NIABCB

注: 紫色代表随机卷曲, 蓝色代表 α 螺旋, 红色代表延伸链, 绿色代表 β 折叠。Note: Purple represents random curl , blue represents alpha helix , red represents extension chain , and green represents beta folding.

表2 褐飞虱 *NIABCB* 基因与其它昆虫 *NIABCB* 基因氨基酸相似性比较

Table 2 Amino acid similarities of *NIABCB* gene of *Nilaparvata lugens* and other insects

物种 Species	登录号 GeneBank	同源性 (%) Identities	E 值 E value
灰飞虱 <i>Laodelphax striatella</i>	AIN44100. 1	93. 42	2. 00E - 93
湿木白蚁 <i>Zootermopsis nevadensis</i>	XP_021917196. 1	76. 71	2. 00E - 70
棉蚜 <i>Aphis gossypii</i>	XP_027842825. 1	72. 48	2. 00E - 70
干木白蚁 <i>Cryptotermes secundus</i>	PNF13674. 1	76. 03	3. 00E - 70
圣甲虫 <i>Oryctes borbonicus</i>	KRT82823. 1	74. 48	4. 00E - 69
赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XP_008195551. 1	72. 79	6. 00E - 69
美洲蚶 <i>Limulus polyphemus</i>	XP_022257586. 1	72. 54	2. 00E - 68

2.3 褐飞虱 *NIABCB* 基因不同生长发育时期和组织

的分析
为了解 *NIABCB* 基因在褐飞虱不同生长发育阶段虫体中和虫体不同组织中的转录情况, 分别提取 1 龄至 5 龄发育至 24 h 的若虫和雌雄成虫虫体的总 RNA 以及 5 龄若虫的中肠、唾液腺、脂肪体、

表皮、腿和头部组织的总 RNA, 利用实时荧光定量 PCR 法检测该基因在褐飞虱不同发育阶段虫体中和不同组织的表达情况。试验结果表明, 该基因在雄成虫的表达量较高 (图 3)。在不同组织中, 在中肠的表达量最高 (图 4)。

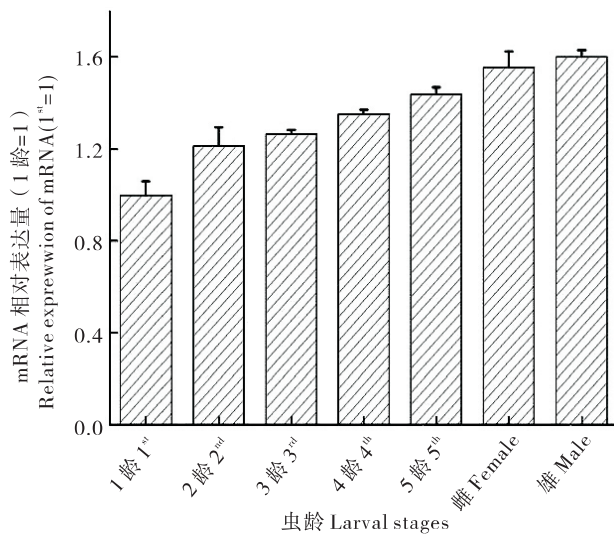


图3 *NIABCB* 基因在不同生长发育时期的表达

Fig.3 Expression of *NIABCB* at different growth and development stages

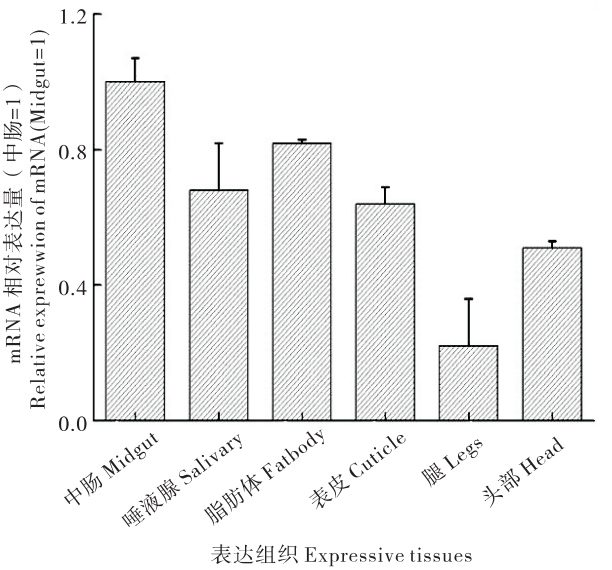


图4 *NIABCB* 基因在不同组织的表达分布

Fig.4 Expression and distribution of *NIABCB* in different tissues

2.4 褐飞虱 *L4440-NIABCB*-dsRNA 的表达及其 RNAi 效果

以褐飞虱 cDNA 为模板, 扩增褐飞虱 *ABCB* 基因片段。Nco I 和 Sma I 双酶切 L4440 载体后, 转入菌株 HT115 后, IPTG 便可表达 dsRNA (图 5)。分别让褐飞虱取食 *NIABCB*-dsRNA 进行 RNAi。首先检测褐飞虱取食 dsRNA 后, 对其体内 *NIABCB* mRNA 表达水平的影响。结果发现: 褐飞虱取食 dsRNA 后, 第 2 天和第 4 天分别抑制了 25% 和 48%。因此, 人工喂养 dsRNA 可以抑制靶基因表达, 效果显著 (图 6)。同时, 褐飞虱取食 dsRNA 后, 致死效果明显。取食 *NIABCB*-dsRNA 后, 其存活率显著低于对照组, 对照组和试验组 1 d、2 d、3 d、4 d 的存活率分别为 88.77% 和 86.67%、76.9% 和 70.78%、65.75% 和 55.67%、56.72% 和 46.69%。因此 *NIABCB* 基因可以进一步应用于褐飞虱抗虫 (图 7)。

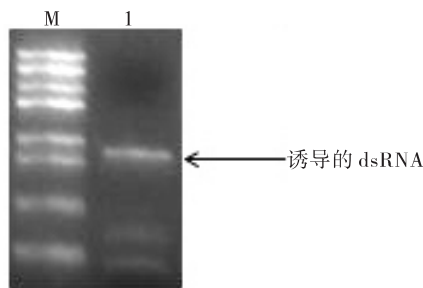


图 5 褐飞虱 *NIABCB* 的 dsRNA 电泳图

Fig. 5 The dsRNAs produced by the BPH *NIABCB* gene

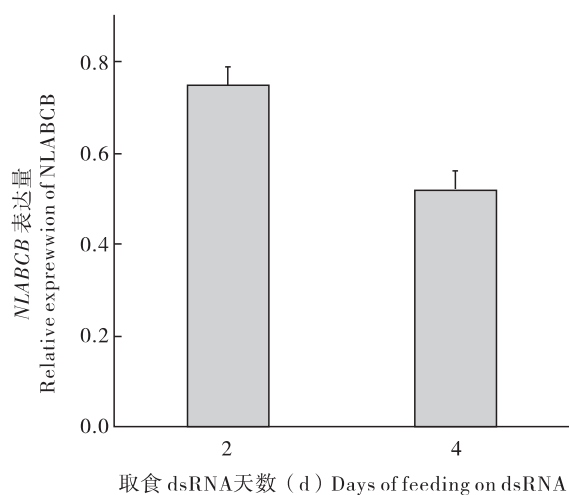


图 6 褐飞虱取食 dsRNA 后 *NIABCB* mRNA 的表达

Fig. 6 Expression of *NIABCB* mRNA in *Nilaparvata lugens* after feeding on dsRNA

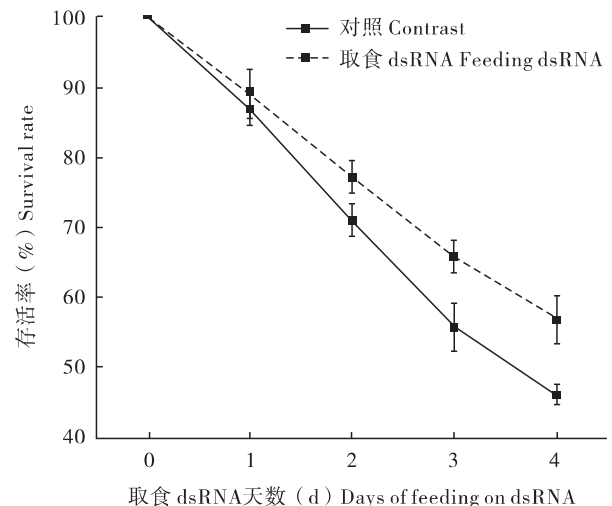


图 7 褐飞虱取食 dsRNA 后存活率

Fig. 7 Survival rate of brown planthopper after feeding on dsRNA

3 结论和讨论

ABCB 亚家族由半个 (HTS) 和整个转运体 (FTS) 组成。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中的 *ABCB*-FTS 已经被广泛研究, *MDR65* (*ABCB*) 通过创建血红素屏障来对果蝇大脑进行化学保护 (Mayer *et al.*, 2009), *MDR49* (*ABCB*) 在生殖细胞迁移中起着至关重要的作用 (Ricardo and Lehmann, 2009)。此外, 研究表明果蝇接触到多环芳烃会诱导体内的 *ABCB* FT/P-gfp 表达 (Vach *et al.*, 2006)。同时给果蝇食物中添加含有 0.1 mmol 的抗叶酸药物甲氨蝶呤后, 在果蝇成虫的马氏管和肠道中, *MDR49* (*ABCB*)、*MDR50* (*ABCB*) 的表达会显著上调。另一方面, Broehan 等人发现给蛹前期的赤拟谷盗注射 *ABCB*-dsRNA 后, 赤拟谷盗的蛹成虫期会有严重的发育缺陷, 从而致死; 同时卵巢不能产卵导致雌性不育 (Broehan *et al.*, 2013)。

最近的一些成功的例子表明 dsRNA 喂养可用于作为一种潜在的防治害虫方式。Baum 等通过筛选玉米根虫 *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte 的 cDNA 文库鉴定了 290 个编码重要蛋白的靶标基因, 发现 52 ng/cm² 浓度的 dsRNA 可以产生明显的死亡率和发育迟缓 (Baum *et al.*, 2007)。通过取食获得 RNAi 的效果已在多种昆虫中得以实现, 如苹果褐卷蛾 *Pandemis heparana* (Turner *et al.*,

2006), 美洲散白蚁 (Zhou *et al.*, 2008), 长红锥蟥 (Araujo *et al.*, 2006) 等当中都有发现, 所以这已经成为一种控制害虫的新方法。

本研究克隆得到 *NIABCB* 基因的全长, 并且将氨基酸序列与其他昆虫的 ABCB 进行序列比对, 发现与灰飞虱、湿木白蚁的 ABCB 蛋白在进化上亲缘关系较近。并且对褐飞虱 ABCB 蛋白序列分析发现, 该蛋白 α 螺旋占 44.08%, 延伸链占 21.05%, β 折叠占 9.87%, 随机卷曲占 25%。同时鉴定了 *NIABCB* 基因在褐飞虱不同生长发育阶段虫体中和虫体不同组织中的转录情况, 该基因在雌性成虫的表达量较高。在不同组织中, 在中肠的表达量最高。中肠组织是昆虫肠道组织中唯一与细胞表面直接接触的。同时有研究表明家蚕 *Bombyx mori* 中的 ABCB 基因是特异表达的, 在蜕皮和化蛹期间受 20E 正调节 (Liu *et al.*, 2011)。同时构建 L4440-*NIABCB* 的 dsRNA 载体, 转化 *E. coli* HT115 后, 经 IPTG 诱导, 形成 *NIABCB*-dsRNA, 喂养褐飞虱取食含 *NIABCB*-dsRNA 人工饲料, 发现褐飞虱的存活率明显降低。

因此, 褐飞虱 *NIABCB* 基因的表达特征表明, 利用农药防治褐飞虱的最佳时期是在早龄期。这些结果可能有利于开发一些以 *NIABCB* 基因为靶标的安全有效的杀虫剂, 同时可以利用 RNA 干扰的方法来抑制 ABC 转运蛋白的表达, 达到控制害虫的目的。

参考文献 (References)

- Aranjo RN, Santos A, Pinto FS, *et al.* RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 36 (9): 683 – 693.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, *et al.* Control of coleopteran insect pests through RNA interference [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25 (11): 1322 – 1326.
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K – 12 [J]. *Science*, 1997, 277: 1453 – 1462.
- Broehan G, Kroeger T, Lorenzen M, *et al.* Functional analysis of the ATP – binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 6 – 25.
- Ganbaatar O, Cao B, Zhang Y, *et al.* Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes *via* bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors [J]. *BMC Biotechnology*, 2017, 17 (1): 9 – 20.
- Higgins CF. ABC transporters from microorganisms to man [J]. *Annual Review of Cell Biology*, 1992, 8: 67 – 113.
- Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters [J]. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2004, 11: 918 – 926.
- Liu S, Zhou S, Tian L, *et al.* Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 491 – 506.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($-\Delta\Delta C_T$) Method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402 – 408.
- Mayer F, Mayer N, Chinn L, *et al.* Evolutionary conservation of vertebrate blood-brain barrier chemoprotective mechanisms in *Drosophila* [J]. *Journal of Neuroscience*, 2009, 29: 3538 – 3550.
- Nunes FM, Simoes ZL. A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39 (2): 157 – 160.
- Ricardo S, Lehmann R. An ABC transporter controls export of a *Drosophila* germ cell attractant [J]. *Science*, 2009, 323: 943 – 946.
- Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, *et al.* RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding [J]. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15 (3): 383 – 391.
- Vaché C, Camares O, De Graeve F, *et al.* *Drosophila melanogaster* P-glycoprotein: A membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25: 572 – 580.
- Walshe DP, Lehane SM, Lehane MJ, *et al.* Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA [J]. *Insect Molecular Biology*, 2009, 18 (1): 11 – 19.
- Wang HB, Zhang ZY, Bao R, *et al.* The structure and transport mechanism of ABC transporter [J]. *Chemistry of Life*, 2007, 27 (3): 208 – 210. [王华丙, 张振义, 包锐, 等. ABC 转运蛋白的结构与转运机制 [J]. 生命的化学, 2007, 27 (3): 208 – 210]
- Wang CZ, Yu J, Pei QL, *et al.* Advances in the breeding of rice varieties resistant to Rice Brown Planthopper [J]. *Agricultural Science of Anhui Province*, 2008 (8): 3170 – 3173. [王传之, 于洁, 裴庆利, 等. 水稻品种抗稻褐飞虱育种的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008 (8): 3170 – 3173]
- Wu ZB, Wu JM. ABC transporter G subgroup and human diseases [J]. *Journal of Jiangsu University*, 2008, 18 (3): 861 – 866. [吴转斌, 吴金美. ABC 转运子 G 亚族与人类疾病 [J]. 江苏大学学报, 2008, 18 (3): 861 – 866]
- Zhou X, Wheeler MM, Oi FM, *et al.* RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double – stranded RNA [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38 (8): 805 – 815.