



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104263731 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201410529579. 0

A01N 57/16(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 10. 09

A01P 7/04(2006. 01)

(71) 申请人 南阳师范学院

地址 473061 河南省南阳市卧龙区卧龙路
1638 号

(72) 发明人 喻修道 夏兰琴 孙永伟 陈志勤
刘宗才 贾殿勇 段鹏飞

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

一种蚜虫共生菌基因的 dsRNA 及其在降低蚜虫存活率中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种蚜虫共生菌基因的 dsRNA 及其在抑制蚜虫生长中的应用。本发明所提供的 dsRNA, 为由序列表中序列 1 所示的核苷酸和其反向互补序列所示的核苷酸组成的双链 RNA。本发明所提供的 dsRNA, 采用体外饲喂 dsRNA 方法, 进行了利用 RNAi 技术沉默麦长管蚜体内共生菌 *Pseudomonas putida* 29698 基因, 导致麦长管蚜产生致死效应, 并且随着饲喂时间延长, 麦长管蚜的死亡率均逐渐增加。对饲喂后蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida* 29698 基因实时荧光定量 PCR 研究表明, 29698 基因的表达明显受到抑制。表明蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida* 29698 基因的保守序列可应用于通过植物介导的 RNAi 技术提高小麦抗蚜性的研究。

1. 一种 dsRNA, 为由序列表中序列 1 所示的核苷酸和其反向互补序列所示的核苷酸组成的双链 RNA。

2. 编码权利要求 1 所述 dsRNA 的 DNA 分子, 其核苷酸序列为序列表中序列 2。

3. 含有权利要求 2 所述 DNA 分子的表达盒、重组载体或重组菌。

4. 权利要求 1 所述的 dsRNA、或权利要求 2 所述的 DNA 分子、或权利要求 3 所述的表达盒、重组载体或重组菌, 在如下 (a1)-(a4) 任一中的应用:

(a1) 防治蚜虫或制备防治蚜虫的产品;

(a2) 降低蚜虫存活率或制备降低蚜虫存活率的产品;

(a3) 抑制蚜虫生长或制备抑制蚜虫生长的产品;

(a4) 抑制蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida* 29698 基因的表达或在制备抑制蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida* 29698 基因的表达产品。

5. 根据权利要求 4 所述的应用, 其特征在于: 所述应用为将权利要求 1 所述的 dsRNA 导入蚜虫, 从而实现防治蚜虫、降低蚜虫存活率、抑制蚜虫生长、或抑制蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida* 29698 基因表达。

6. 根据权利要求 5 所述的应用, 其特征在于: 所述导入的方式为饲喂。

7. 根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于: 所述饲喂为: 将所述 dsRNA 混合于液体饲料中, 得到混合液; 用所述混合液饲喂蚜虫;

所述 dsRNA 在所述混合液中的终浓度具体为 $7.5\text{ng}/\mu\text{L}$;

所述饲喂持续的时间具体为 2 天以上。

8. 根据权利要求 4-7 中任一所述的应用, 其特征在于: 所述蚜虫为麦蚜。

9. 产品, 其活性成分为如下 A-C 中任一种:

A、权利要求 1 所述的 dsRNA;

B、权利要求 2 所述的 DNA 分子;

C、权利要求 3 所述的表达盒、重组载体或重组菌;

所述产品具有如下 (a1)-(a4) 功能中的至少一种:

(a1) 防治蚜虫;

(a2) 降低蚜虫存活率;

(a3) 抑制蚜虫生长;

(a4) 抑制蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida* 29698 基因表达。

10. 抑制蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida* 29698 基因表达的物质, 在如下 (a1)-(a3) 任一中的应用:

(a1) 防治蚜虫或制备防治蚜虫的产品;

(a2) 降低蚜虫存活率或制备降低蚜虫存活率的产品;

(a3) 抑制蚜虫生长或制备抑制蚜虫生长的产品。

一种蚜虫共生菌基因的 dsRNA 及其在降低蚜虫存活率中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种蚜虫共生菌基因的 dsRNA 及其在降低蚜虫存活率中的应用。

背景技术

[0002] 蚜虫是危害作物生产的主要害虫之一,近年来全球气候变暖、耕作制度变化等因素使蚜虫的繁殖能力和适应性显著增强,其危害日趋严重。据统计,2010-2011 年间我国小麦、玉米、棉花、油菜、大豆等主要作物的蚜虫危害面积分别占当年种植面积的 62.5%、14%、90%、32%和 23%。以麦蚜为例,麦蚜以成若蚜聚集在小麦叶部、茎部、穗部等,吸食汁液造成叶片不规则皱缩、卷曲、失绿,严重时造成植株死亡。麦蚜分泌的蜜露附着在植株表面,降低植株的光合作用,并易诱发煤烟病等。同时,麦蚜还是黄矮病毒重要的传播载体,引起小麦黄矮病流行。据全国农作物病虫监测网预报,2013 年我国麦蚜危害面积高达 2.5 亿亩 (http://www.agri.gov.cn/V20/bchqb/201301/t20130123_3206134.htm)。危害我国小麦的麦蚜主要有 4 种,即麦长管蚜、麦二叉蚜、禾谷缢管蚜和麦无网长管蚜;其中麦长管蚜在全国麦区均有发生,且是危害我国小麦生产的主要蚜虫类型。目前,蚜虫防治以喷洒农药为主,但大量使用农药,不仅对人畜有害,而且造成了严重环境污染。培育抗虫作物品种是防止蚜虫为害的最有效途径,但由于农作物现有种质资源中缺乏有效的抗蚜基因,且抗性机制不明确,常规抗虫育种难以奏效。因此,利用转基因技术培育抗蚜新种质,对于保障我国粮食安全和环境安全具有重要意义。

[0003] 植物介导的 RNAi 技术能特异抑制昆虫特定基因的表达,使昆虫的生长发育受阻或致死,进而有效控制害虫危害,已成为农作物抗虫基因工程的热点之一。RNAi 现象是由 dsRNA(double-stranded RNA) 介导的一种序列特异性转录后基因沉默机制,dsRNA 进入生物体后被宿主细胞中的 Dicer 酶切割成 21 ~ 23nt 的 siRNA(small interfering RNA); siRNA 在 RNA 解旋酶的作用下解链成正义链和反义链,反义 siRNA 与体内一些酶(包括内切酶、外切酶、解旋酶等)结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),继之 RISC 以序列互补的方式与靶 mRNA 结合并使之降解,造成靶标基因表达量下降。利用 dsRNA 体外饲喂或注射来筛选 RNA 靶标基因,导致靶标基因表达和沉默,已经广泛应用于昆虫生长发育关键基因的鉴定和功能分析。孟山都公司通过植物介导的昆虫肠道特异基因 RNAi 技术成功获得了抗玉米根螟的转基因玉米,有效缓解了长期应用 Bt 转基因玉米诱发昆虫产生抗性等问题,目前已完成生产性试验。棉铃虫肠道中特异 P450 基因可提高棉铃虫幼虫对棉花次生代谢物质和棉酚的耐受性,试验表明,利用表达棉铃虫 P450 基因 dsRNA 的转基因烟草和棉花叶片饲喂棉铃虫幼虫,可导致幼虫体内 P450 基因的表达量下降,同时幼虫发育受阻,表现出抗棉铃虫性能。近年来,RNAi 技术在蚜虫防治方面也展示出很好的应用前景。Pitino 等分别在烟草和拟南芥中表达桃蚜 MpC002 和 Rack-1 基因的 dsRNA,桃蚜取食转基因植物后,导致桃蚜体内 MPC002 或 Rack-1 基因的表达量降低 60%,蚜

虫的产仔数目减少。同样,烟草和拟南芥中表达蚜虫 Mphb 基因或丝氨酸蛋白酶 MySP 基因的 dsRNA 均可显著降低蚜虫的繁殖率,进而减轻蚜虫危害。

[0004] 共生菌在昆虫体内的生长、繁殖过程中起着十分重要的作用,如营养功能、解毒作用、调控生殖及与寄主适应性等等。Pseudomonas putida 是蚜虫体内存在的一种次级共生细菌,存在于含菌体、肠道等部位。通过寄主植物表达相应昆虫寄生菌特异基因的 dsRNA,昆虫取食植物后沉默其体内相应的共生菌的基因,导致共生菌死亡或者数量下降,影响昆虫的正常生长,从而达到控制害虫危害的目的。通过 RNAi 技术沉默共生菌相关基因的方式,间接控制蚜虫的研究报道较少。此研究将为挖掘有效的 RNAi 靶标基因及利用其创制新型抗蚜转基因新种质奠定基础。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种蚜虫共生菌基因的 dsRNA 及其在降低蚜虫存活率中的应用。

[0006] 本发明提供的 dsRNA,具体为由序列表中序列 1 所示的核苷酸和其反向互补序列所示的核苷酸组成的双链 RNA。

[0007] 编码所述 dsRNA 的 DNA 分子也属于本发明的保护范围。

[0008] 所述 DNA 分子的核苷酸序列具体为序列表中序列 2。

[0009] 含有所述 DNA 分子的表达盒、重组载体或重组菌也属于本发明的保护范围。

[0010] 所述 dsRNA、或所述 DNA 分子、或所述表达盒、重组载体或重组菌,在如下(a1)-(a4)任一中的应用也属于本发明的保护范围:

[0011] (a1) 防治蚜虫或制备防治蚜虫的产品;

[0012] (a2) 降低蚜虫存活率或制备降低蚜虫存活率的产品;

[0013] (a3) 抑制蚜虫生长或制备抑制蚜虫生长的产品;

[0014] (a4) 抑制蚜虫体内共生菌 Pseudomonas putida29698 基因的表达或在制备抑制蚜虫体内共生菌 Pseudomonas putida29698 基因的表达产品。

[0015] 进一步,所述应用为将所述 dsRNA 导入蚜虫,从而实现防治蚜虫、降低蚜虫存活率、抑制蚜虫生长、或抑制蚜虫体内共生菌 Pseudomonas putida29698 基因表达。

[0016] 在本发明中,所述导入的方式具体为饲喂。

[0017] 更加具体的,所述饲喂为:将所述 dsRNA 混合于液体饲料中,得到混合液;用所述混合液饲喂蚜虫;所述 dsRNA 在所述混合液中的终浓度具体为 7.5ng/ μ L;所述饲喂持续的时间为 2 天以上(具体如 2-8 天)。

[0018] 在本发明中,所述蚜虫可为麦蚜,所述麦蚜为麦长管蚜,具体为 3 龄麦长管蚜。

[0019] 活性成分为如下 A-C 中任一种的产品也属于本发明的保护范围:

[0020] A、所述 dsRNA;

[0021] B、所述 DNA 分子;

[0022] C、所述表达盒、重组载体或重组菌;

[0023] 所述产品具有如下(a1)-(a4)功能中的至少一种:

[0024] (a1) 防治蚜虫;

[0025] (a2) 降低蚜虫存活率;

- [0026] (a3) 抑制蚜虫生长；
- [0027] (a4) 抑制蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因表达。
- [0028] 在本发明中,所述蚜虫可为麦蚜,所述麦蚜为麦长管蚜,具体为 3 龄麦长管蚜。
- [0029] 另外,抑制蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因表达的物质,在如下 (a1)-(a3) 任一中的应用同样属于本发明的保护范围：
- [0030] (a1) 防治蚜虫或制备防治蚜虫的产品；
- [0031] (a2) 降低蚜虫存活率或制备降低蚜虫存活率的产品；
- [0032] (a3) 抑制蚜虫生长或制备抑制蚜虫生长的产品。
- [0033] 在本发明中,所述蚜虫可为麦蚜,所述麦蚜为麦长管蚜,具体为 3 龄麦长管蚜。
- [0034] 在本发明中,所述蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因的核苷酸序列含有序列表中序列 2。
- [0035] 实验证明,本发明得到麦长管蚜的共生菌 *Pseudomonas putida*29698cDNA 的保守序列的 dsRNA,采用体外饲喂 dsRNA 方法,进行了利用 RNAi 技术沉默麦长管蚜体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因,导致麦长管蚜产生致死效应,并且随着饲喂时间延长,麦长管蚜的死亡率均逐渐增加。对饲喂后蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因实时荧光定量 PCR 研究表明,29698 基因的表达明显受到抑制。表明蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因的保守序列可应用于通过植物介导的 RNAi 技术提高小麦抗蚜性的研究。

附图说明

- [0036] 图 1 蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因和 GFP 的 PCR 扩增结果。

具体实施方式

- [0037] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0038] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0039] 下述实施例中麦长管蚜(钱幼亭,周广和,张淑香,张向才. 麦蚜有性世代的研究. 植物保护,1982,1:14-15. 公众可从南阳师范学院生命科学与技术学院获得)由中国农业科学院植物保护研究所提供,饲养蚜虫的小麦品种为科农 199,将蚜虫接种到小麦幼苗上,放入人工气候箱中(温度 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度 60% -80%,光周期 L : D = 16 : 8) 进行繁殖。
- [0040] 16318hGFP 质粒:“倪志勇,徐兆师,刘丽,李连城,柴岩,陈明,马有志. 小麦转录因子 TaDREB6 基因的克隆及鉴定. 麦类作物学报,2008,28:357-363”,公众可从南阳师范学院生命科学与技术学院获得。
- [0041] 质粒提取试剂盒购自 Biomega 公司,内切酶 BamH I、EcoR V 及 Hiscribe T7 体外转录试剂盒购自 NEB 公司,大肠杆菌菌株 DH5 α 、反转录试剂盒购自北京全式金公司,rTaq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司,MinElute PCR Cleaning Kit、MinElute Gel Extraction Kit、RNA Cleaning Kit 购自 Qiagen 公司,各种氨基酸及其它试剂均购自北京拜尔迪公司。
- [0042] 实施例 1、蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因的 dsRNA 的获得
- [0043] 1、麦长管蚜总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

[0044] 分别取约 20 头麦长管蚜,按照北京全式金公司的 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,用 RNA Cleaning Kit 进行纯化,反转录合成 cDNA 第一链,操作步骤均参考试剂盒说明书。

[0045] 2、引物设计与基因克隆

[0046] 根据麦长管蚜肠道转录组测序得到蚜虫共生菌相关基因 29698,利用 Primer Primer5.0 软件设计引物 P1-F 和 P1-R,由北京华大基因公司合成。绿色荧光蛋白基因 (GFP) 片段从南阳师范学院生命科学与技术学院实验室保存的 16318hGFP 质粒上扩增,利用 Primer Primer5.0 软件设计引物 P2-F 和 P2-R。

[0047] P1-F :5' -TAATACGACTCACTATAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTAC-3' (下划线后的序列为序列 2 的第 1-24 位) ;

[0048] P1-R :5' -TAATACGACTCACTATAGGGCGGCGGACGGGTGAGTAATG-3' (下划线后的序列为序列 2 的第 162-181 位的反向互补序列)。

[0049] P2-F :5' -TAATACGACTCACTATAGGGACGGGAACTACAAGACACG-3' (下划线后的序列为序列 4 的第 1-19 位) ;

[0050] P2-R :5' -TAATACGACTCACTATAGGGTTTGAAAGGGCAGATT-3' (下划线后的序列为序列 4 的第 304-320 位的反向互补序列)。

[0051] 各引物序列中下划线处为 T7RNA 聚合酶启动子序列。

[0052] PCR 反应体系为 :10×PCR Buffer5 μ L、dNTP (2.5mmol · L⁻¹) 4 μ L、rTaq0.5 μ L,正向引物 (20 μ mol · L⁻¹) 1 μ L、反向引物 (20 μ mol · L⁻¹) 1 μ L、cDNA/GFP 质粒 1 μ L,用 ddH₂O 补足至 50 μ L。

[0053] PCR 的反应条件为 :94℃ 4min ;94℃ 30s,54℃ 或 55℃ 30s,72℃ 30s,39 个循环 ;72℃ 10min ;4℃ 保存。(P1-F/P1-R 的退火温度为 54℃ ;P2-F/P2-R 的退火温度为 55℃)

[0054] 以麦长管蚜的 cDNA 为模板,用 P1-F/P1-R 作为引物进行扩增,得到 221bp PCR 产物 (含 40bp 的 T7 启动子序列),经过测序,该 221bp PCR 产物除去两端 T7RNA 聚合酶启动子序列外的序列为序列表中的序列 2 (可人工合成)。

[0055] 以 16318hGFP 质粒为模板,用 P2-F/P2-R 作为引物进行扩增,得到 360bp PCR 产物 (含 40bp 的 T7 启动子序列),经过测序,该 360bp PCR 产物除去两端 T7RNA 聚合酶启动子序列外的序列为序列表中的序列 4 (可人工合成)。

[0056] 将上述 PCR 电泳结果如图 1 所示, M :100bp marker ;1 :GFP,可以看出得到目的片段 ;2 :麦长管蚜 *Sitobion avenae*。

[0057] 将上述 221bp PCR 产物核苷酸序列去掉 T7 启动子序列提交到 NCBI 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 比对分析,BLAST 结果表明,与蚜虫体内次级共生菌 *Pseudomonas putida*16S rRNA 基因具有 100% 同源性,可确定该核苷酸序列为保守序列。

[0058] 3、蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因和 GFP 的 dsRNA 的制备

[0059] 分别回收由上述 2 得到的 2 种 PCR 产物,测定浓度,作为体外转录 dsRNA 的模板。dsRNA 的体外转录体系为 10×Transcription Buffer4 μ L、20×Ribonucleotide Solution Mix2 μ L、模板 (1 μ g) X μ L、20×HMW Mix2 μ L、T7RNA Polymerase (500units · μ L⁻¹) 2 μ L, RNase-Free ddH₂O 补足至 40 μ L。42℃ 过夜孵育。

[0060] 反应结束后,取 0.5 μ L 反应产物琼脂糖凝胶电泳检测,加入 DNaseI 和 RNaseA 消化残留的模板 DNA 和单链 RNA,用 MinElute PCR Cleaning Kit 纯化反应产物,操作过程参考试剂盒说明书,用无 RNase 水溶解 dsRNA,分光光度计(波长 260nm)定量,置于 -20°C 冰箱中保存,分别得到麦长管蚜蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida* 基因 29698 和 GFP dsRNA。

[0061] 将蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698dsRNA 和 GFP dsRNA 分别测序,结果如下:

[0062] 蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698dsRNA 为双链 RNA,由正义链和反义链组成,其正义链的核苷酸序列为序列表中的序列 1,其反义链的核苷酸序列为序列表中的序列 1 的反向互补序列。29698dsRNA 编码基因的核苷酸序列含有序列表中序列 2;

[0063] GFP dsRNA 为双链 RNA,由正义链和反义链组成,其正义链的核苷酸序列为序列表中的序列 3,其反义链的核苷酸序列为序列表中的序列 3 的反向互补序列。GFP dsRNA 编码基因的核苷酸序列为序列表中序列 4。

[0064] 当然,也可以直接人工合成序列 1 所示的麦长管蚜 29698dsRNA 和序列 3 所示的 GFP 基因 dsRNA 用于下述实施例。

[0065] 实施例 2、29698dsRNA 在抑制蚜虫生长中的应用

[0066] 1、蚜虫人工饲料的配制和饲养器的准备

[0067] 人工饲料配制和饲养器的准备过程参考文献(李彩霞,高丽锋,高玲玲,李润植.全纯人工营养液饲养蚜虫的研究.山西农业大学学报,1997,17(3):225-228. Li C X, Gao L F, Gao L L, Li R Z. Study on the rearing of aphids on a artificially holidic diets. Journal of Shanxi Agricultural University, 1997, 17(3):225-228. (in Chinese)) 进行,用 0.2 μ m 的细菌过滤器过滤人工饲料,分装到 2.0mL 灭菌的离心管保存于 -20°C 的冰箱中,避免反复冻融。

[0068] 2、dsRNA (29698dsRNA) 在抑制蚜虫生长中的应用

[0069] 蚜虫饲喂方法参照如下文献中记载:纠敏,刘树生.利用人工饲料饲养蚜虫的技术.华东昆虫学报,2004,13(2):102-109.。

[0070] 麦长管蚜共生菌 *Hamiltonella defensa*29698dsRNA 喂养组(29698):每个蚜虫饲养器中分别放入 15 头 3 龄麦长管蚜若蚜,按照每 100 μ L 人工饲料中依次分别加入 0 和 750ng 的麦长管蚜共生菌 *Pseudomonas putida*29698dsRNA 饲喂蚜虫;

[0071] 麦长管蚜 dsGFP 组:每个蚜虫饲养器中分别放入 15 头 3 龄麦长管蚜若蚜,按照每 100 μ L 人工饲料中依次分别加入 0 和 750ng 的 GFP dsRNA 饲喂蚜虫;

[0072] 上述各组设置 3 个重复,每两天统计各饲养器中蚜虫的存活数,并更换新的饲料和对应的 dsRNA,置于人工气候箱(温度为 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度为 60% -80%,光周期为 L:D = 16:8)。使用 Excel2003 软件对蚜虫死亡率进行统计学分析,计算每种处理的平均值与方差,并进行显著性差异的分析(t-test, $n = 3$, $P < 0.01$ 或 0.05)。

[0073] 统计各组每个饲养器中存活蚜虫的数目,计算死亡率,结果如表 1 所示。

[0074] 表 1 为麦长管蚜共生菌 *Pseudomonas putida*29698dsRNA 喂养组和麦长管蚜 dsGFP 组死亡率

[0075]

dsRNA 浓度 \ 饲喂时间		2 d	4 d	6 d	8 d
		平均值 (%) ± 标准差	平均值 (%) ± 标准差	平均值 (%) ± 标准差	平均值 (%) ± 标准差
0 ng/μL	ds29698	6.67±0.0667	15.56±0.0385	19.44±0.0385	19.44±0.0385
	dsGFP	8.89±0.1018	13.33±0.0667	17.78±0.0385	20.00±0.0667
7.5 ng/μL	ds29698	28.88±0.0385**	44.44±0.0770**	51.11±0.1018**	53.33±0.1388**
	dsGFP	8.89±0.0385	11.11±0.0769	15.56±0.0385	17.78±0.0385

[0076] 注：**表示与对照组 (0ng/μL) 相比, 试验组结果差异显著 (t-test, n = 3, P<0.01)。

[0077] 从表 1 可以看出, 麦长管蚜的死亡率均随着饲喂 29698dsRNA 的时间增加, 麦长管蚜的平均死亡率随之增加, 7.5ng · μL⁻¹29698dsRNA 饲喂 2 天、4 天、6 天和 8 天后, 麦长管蚜的平均死亡率为 28.88%、44.44%、51.11% 和 53.33%, 其中饲喂 4 天、6 天和 8 天后的处理与对照组 (0ng/μL) 相比均存在显著性差异 (P<0.05), 饲喂 GFP dsRNA 的试验组死亡率与对照组 (0ng/μL) 相比则没有显著性的差异。

[0078] 3、dsRNA (29698dsRNA) 抑制共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因的表达

[0079] 利用 Primer Primer5.0 软件设计扩增共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因的引物 P3-F 和 P3-R, 扩增片段大小为 181bp, 合成内参基因 (ACTIN) 引物 P4-F 和 P4-R。

[0080] P3-F : 5' -ATCGTCGCCTTGGTGAGCCTTTAC-3' (序列 2 的第 1-24 位);

[0081] P3-R : 5' -CGGCGGACGGGTGAGTAATG-3' (序列 2 的第 162-181 位的反向互补序列)。

[0082] P4-F : 5' -CCGAAAAGCTGTCATAATGAAGACC-3' ;

[0083] P4-R : 5' -GGTGAAACCTTGTCTACTGTTACATCTTG-3' 。

[0084] 收集上述步骤 2 中各组 7.5ng/μL dsRNAs 饲喂后存活的麦长管蚜 (2、4、6 和 8d), 提取蚜虫的 RNA, 反转录成 cDNA 稀释 10⁰、10¹、10²、10³、10⁴、10⁵ 倍, 作为荧光定量 PCR 的模板, 以 P3-F/P3-R 作为引物进行相对定量 RT-PCR 分析。内参引物为 P4-F/P4-R。

[0085] 实时荧光定量 PCR 体系为: 正向引物 (10 μmol · L⁻¹)0.5 μL、反向引物 (10 μmol · L⁻¹)0.5 μL、2×TransStart_{TM} Green qPCR SuperMix12.5 μL、Passive Reference Dye0.5 μL、模板 cDNA1 μL, 用 ddH₂O 至 25 μL。

[0086] PCR 循环程序为 95℃ 30s, 95℃ 5s, 54℃ 或 57℃ 15s, 72℃ 10s, 40 个循环, 每个样本 3 个重复。(P3-F/P3-R 的退火温度为 54℃ ;P4-F/P4-R 的退火温度为 57℃)

[0087] 最终结果的计算采用 2^{-ΔΔCt} 法 (Ct 表示循环数) 进行计算, 即 ΔΔCt = (Ct (29698)-Ct (actin))_{试验组} - (Ct (29698)-Ct (actin))_{对照组}, 使用 Excel2003 软件进行统计学分析, 计算每种处理的平均值与方差, 并进行显著性差异的分析 (t-test, n = 3, P<0.01 或 0.05)。

[0088] 统计在饲喂麦长管蚜共生菌 *Pseudomonas putida*29698dsRNA2、4、6 和 8d 后, 各组蚜虫体内 29698 表达量, 结果如表 2 所示。

[0089] 表 2 为饲喂共生菌 *Pseudomonas putida*29698dsRNA 和 GFP dsRNA 后麦长管蚜共生菌 *Pseudomonas putida*29698 基因相对表达量

[0090]

dsRNA 种类 \ 饲喂时间		麦长管蚜共生菌 <i>Pseudomonas putida</i> 29698 基因表达量				
		0 d	2 d	4 d	6 d	8 d
<i>ds29698</i>	平均值 (%) ± 标准差	96±0.01	85±0.015	79±0.063 [*]	68±0.032 ^{**}	54±0.055 ^{**}
<i>dsGFP</i>	平均值 (%) ± 标准差	101±0.043	93±0.037	114±0.056	98±0.077	103±0.068

[0091] 注：^{*}表示与对照组 (0d) 相比，试验组结果差异显著 (t-test, n = 3, P<0.05)，^{**}表示与对照组 (0d) 相比，试验组结果差异极显著 (t-test, n = 3, P<0.01)。

[0092] 可以看出，麦长管蚜共生菌 *Pseudomonas putida*29698 在 4、6 和 8d 的表达量，与对照 (0 天的表达量) 相比，依次降低了 17.7%、29.2% 和 43.8%，在统计学上表现为差异显著 (P<0.05 或 P<0.01)。饲喂 GFPdsRNA 的蚜虫体内共生菌 *Pseudomonas putida*29698 表达水平则没有显著性的变化，进一步说明通过饲喂 29698dsRNA 能够在麦长管蚜体内引起共生菌 *Pseudomonas putida*29698 的 RNAi 效应，致使共生菌 *Pseudomonas putida* 基因 29698 表达量明显降低甚至沉默，导致蚜虫死亡。

[0001]

序 列 表

-
- <110> 南阳师范学院
- <120> 一种蚜虫共生菌基因的 dsRNA 及其在降低蚜虫存活率中的应用
- <130> CGG:NAK142956
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
-
- <210> 1
- <211> 181
- <212> RNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223>
- <400> 1
- aucgucgccu uggugagccu uuaccccacc aacuagcuaa uccgaccuag gcucaucuga 60
- uagcgcaagg cccgaagguc ccugcuiuuc ucccguagga cguaugcggu auuagcguuc 120
- cuuucgaaac guuguceccc acuaccagge agauuccuag gcauuacuca cccgucgccc 180
- g 181
-
- <210> 2
- <211> 181
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>

[0002]

<223>

<400> 2

atcgtcgcct tggfgagcct ttaccccacc aactagctaa tcegacctag gctcatctga 60

tagegcaagg cccgaaggte cctgettttc tcecgtagga cgtatgcggt attagcgttc 120

ctttcgaaac gttgtceccc actaccagge agattcctag gcattactca cccgtccgce 180

g 181

<210> 3

<211> 320

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

acgggaacua caagacacgu gcugaaguca aguuugaagg ugauacccuu guuaauagaa 60

ucgaguuaaa agguauugau uuuaaagaag auggaaacau ucuuggacac aaaauggaau 120

acaacuauaa cucacauaau guauacauca ugggagacaa accaaagaau ggcaucaaag 180

uuacuucua aauuagacac aacauuaag auggaagcgu ucaauuagea gaccuuuauc 240

aacaaaauac uccaauuggc gauggcccug uccuuuuacc agacaaccu uaccugucca 300

cacaucugc ccuuuccaaa 320

<210> 4

<211> 320

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

acgggaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccett gttaatagaa 60

[0003]

tcgagttaa aggtattgat tttaaagaag atggaaacat tcttggacac aaaatggaat	120
acaactataa ctcacataat gtatacatea tgggagacaa accaaagaat ggcacaaaag	180
ttaacttcaa aattagacac aacattaaag atggaagcgt tcaattagca gaccattatc	240
aacaaaatac tccaattggc gatggecctg tccttttacc agacaacctat tacctgtcca	300
cacaatctgc cctttccaaa	320

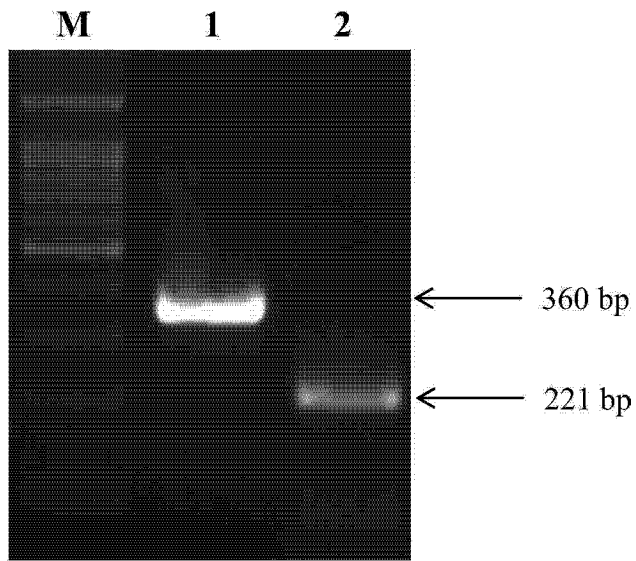


图 1