广东农业科学 2020，47（2）：118-123
Guangdong Agricultural Sciences doi：10.16768/j.issn.1004-874X.2020.02.016

袁瑞玲，郑传伟，冯丹，王艺璇，杜春花，陈鹏 . 细菌表达 dsRNA 介导桔小实蝇 *flightin* 基因的 RNA 干扰［J］. 广东农业科学，2020，47（2）：118-123.

细菌表达 dsRNA 介导桔小实蝇 *flightin* 基因的 RNA 干扰

袁瑞玲[1,2]，郑传伟[2,3]，冯　丹[1,2]，王艺璇[2]，杜春花[2]，陈　鹏[2]
（1. 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室，云南 昆明 650201；
2. 云南省林业和草原科学院，云南 昆明 650201；3. 兴义市林业局，贵州 兴义 562400）

摘　要：【目的】探索饲喂细菌表达目标基因 dsRNA 介导桔小实蝇 *flightin* 基因 RNAi 的可行性。【方法】将桔小实蝇 *flightin* 基因的相应干扰片段构建至 L4440 干扰载体，并转化大肠杆菌 HT115（DE3）菌株，利用 IPTG 诱导表达 *flightin* 基因对应的 dsRNA，命名为 flightin-dsRNA。【结果】通过饲喂表达 *flightin*-dsRNA 的大肠杆菌 10 倍浓缩菌液，桔小实蝇 *flightin* 基因的表达普遍出现了不同程度的上调，其中，雌虫饲喂后 5、10、20 d，雄虫饲喂后 5 d 与对照差异显著，雄虫饲喂后 15 d 诱发约 43% 的下调；该方法对桔小实蝇飞行能力及胸部肌肉发育未产生明显影响。【结论】通过饲喂表达 *flightin*-dsRNA 的大肠杆菌对桔小实蝇 *flightin* 基因进行 RNA 干扰不可行或干扰效果不明显。

关键词：桔小实蝇；*flightin* 基因；HT115(DE3) 菌株；荧光定量 PCR；RNA 干扰
中图分类号：S476　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1004-874X（2020）02-0118-06

RNA Interference of *Flightin* Gene Mediated by Bacterially Expressed dsRNA in *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

YUAN Ruiling[1,2], ZHENG Chuanwei[2,3], FENG Dan[1,2], WANG Yixuan[2], DU Chunhua[2], CHEN Peng[2]
（1. *Key Laboratory of Forest Plant Cultivation & Utilization, Kunming* 650201, *China;*
2. *Yunnan Academy of Forestry and Grassland, Kunming* 650201, *China;*
3. *Xingyi City Forestry Bureau, Xingyi* 562400, *China*）

Abstract:【Objective】The study was to explore the feasibility of feeding target gene dsRNA expressed by HT115-mediated RNAi in *Bactrocera dorsalis*(Hendel) *flightin* gene.【Method】The RNAi fragment of *flightin* from *B.dorsalis* was inserted into L4440 dsRNA interference vector, and transformed into *E.coli* HT115 (DE3). The dsRNA corresponding to *flightin*, designated as *flightin*-dsRNA, was expressed by IPTG induction.【Result】Real-time quantitative PCR analysis revealed that the expression of *flightin* in *B.dorsalis* was generally up-regulated in different degrees by feeding 10-fold concentrated bacterial solution expressing *flightin*-dsRNA to *B.dorsalis*. Among which, there were significant differences between females after feeding for 5, 10 and 20 days, males after feeding for 5 days and the control, and about 43% down-regulation was induced in males after feeding for 15 days. The flight ability and chest muscle development of *B.dorsalis* were not affected significantly.【Conclusion】The feasibility by feeding *E.coli* HT115(DE3) expressing *flightin*-dsRNA to interfere with the *flightin* gene of *B.dorsalis* needs to be further confirmed.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; *flightin* gene; HT115(DE3); Real-Time Quantitative PCR; RNA interference

收稿日期：2019-12-14
基金项目：国家自然科学基金（31660208）
作者简介：袁瑞玲（1982—），女，硕士，助理研究员，研究方向为森林保护与病虫害，E-mail: yuan.office@aliyun.com
通信作者：陈鹏（1975—），男，博士，研究员，研究方向为森林保护，E-mail: chenpengkunming@aliyun.com

【研究意义】RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是一种广泛存在于真核生物中高度保守的、由 dsRNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解，使相应基因不能表达，从而引发基因转录后水平基因沉默的现象[1-3]。dsRNA 导入生物体内后，被细胞中称为 Dicer 的 RNase Ⅲ分解成 21~23 bp 的小干扰 RNA（siRNA），siRNA 在沉默复合体（RISC）的作用下与目标 mRNA 结合，序列特异性地降解靶 mRNA，阻止相应蛋白产物的合成，导致靶标基因的功能丧失。【前人研究进展】RNAi 技术已被广泛应用在基因功能研究、高通量靶标基因筛选、基因治疗、药物靶标预测等领域，对多种农林害中的成功试验，也证实了利用 RNAi 进行害虫防治的可能性和广泛性[4-5]。RNAi 技术在害虫防治领域的应用需要大剂量 dsRNA，目前最常用的试剂盒合成方法价格昂贵、不能持续生产。利用转基因寄主植物表达昆虫源 dsRNA 对害虫有一定防效，但植物转基因难度高、研究周期长，具有很大的局限性。用细菌（如大肠杆菌）表达 dsRNA 的方法操作简单，具有成本低且表达产物量大等特点，是基因工程四大表达系统之一[6]。饲喂或注射细菌表达的 dsRNA 能显著干扰甜菜夜蛾[7]、非洲甘薯象鼻虫[8]等害虫的生长，证明该技术在植物保护方面的应用潜力。桔小实蝇［（*Bactrocera dorsalis*（Hendal））］，又名东方果实蝇（oriental fruit fly），属双翅目（Diptera）实蝇科（Trypetidea）、果实蝇属（Bactrocera），是我国二类进境检疫性害虫[9-11]，超强的飞行能力使得对桔小实蝇的防治变得困难[12-13]。目前对该害虫的防治手段主要有人工防治、化学防治及性诱剂的生物防治等，这些手段具有一定的防治效果，但总体存在效率低、成本高、对生态环境不友好的问题。因此 RNA 干扰这种靶标性强、环境友好型的技术在害虫防控领域展现出较大的应用潜力。

【本研究切入点】飞行蛋白 flightin 是一种大小在 20 ku 的多磷酸化肌原纤维蛋白，最早是在黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）间接飞行肌中被发现[14]。flightin 对昆虫肌肉伸展活化具有重要作用，在间接飞行肌的粗肌丝上与肌球蛋白高度融合，调控和指导粗肌丝的准确组装和收缩等[14]。选择飞行蛋白 flightin 基因作为 RNA 干扰靶标，破坏昆虫飞行肌表达通路，阻止昆虫肌肉伸展活化及肌丝的组装和收缩等生理过程，可达到害虫防治的目的。【拟解决的关键问题】本研究以 L4440 质粒为载体，构建了利用大肠杆菌 HT115 表达桔小实蝇 flightin-dsRNA 的体系，通过对桔小实蝇新羽化成虫饲喂细菌表达的 dsRNA，检测该方法介导的 RNAi 在桔小实蝇中的可行性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 *供试昆虫* 供试虫源为云南省林业科学院森保所室内饲养的桔小实蝇种群。饲养条件为：温度 25~30 ℃，湿度 60%~70%，光周期 L16 ∶ D8。

1.1.2 *菌株及质粒载体* 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自天根生化科技（北京）有限公司，大肠杆菌 HT115（DE3）购自北京华越洋生物科技有限公司，L4440 质粒购自美国 Addgene 机构，含 *egfp* 基因的质粒由西南林业大学徐进研究员惠赠。

1.1.3 *酶及有关试剂* 总 RNA 提取试剂盒 Trizol-A+、FastKing cDNA 第一链合成试剂盒、SYBR Premix *Ex Taq* 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司，TSINGKE Master Mix DNA Polymerase 购自北京擎科新业生物技术有限公司，T4 DNA 连接酶、DNase I、RNaseA、限制性内切酶 *Sac*I、*Xho*I 购自 thermofisher 公司，氨苄青霉素（Amp）、X-gal、IPTG 购自 Amresco 公司，盐酸四环素（Tet）购自 solarbio 公司，DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司，异丙醇、氯仿、无水乙醇等其他分析纯试剂购自利安隆博华（天津）医药化学有限公司，引物合成及测序委托北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 *RNA 的提取及反转录* 桔小实蝇总 RNA 的提取按照 Trizol- A+ 试剂盒说明书进行。FastKing cDNA 第一链合成试剂盒反转录得到 cDNA，20℃保存备用，以此作为后续实验 PCR 模板。

1.2.2 *引物设计* 根据桔小实蝇 flightin 基因转录组序列（GenBank 登录号：XM_011210668），用 siDirect（http://design.RNAi.jp/）在线预测可能存在的 siRNA 位点，选择其中 678 bp 序列作为

RNA 干扰片段。用 Primer5.0 和 Oligo6，结合含有 T7 聚合酶的 L4440 干扰载体的多克隆位点以及桔小实蝇 *flightin* 基因和 *egfp* 序列的限制性内切酶位点设计上游和下游引物。上、下游引物的 5' 端分别加入 SacI 和 XhoI 酶切位点。

flightin-F：5'-CGAGCTCACTCGTATAATGGCTGATG-3'（下划线为 *Sac*I 酶切位点）；

flightin-R：5'-CCTCGAGATAGCGACAAGCTCCCAC-3'（下划线为 *Xho*I 酶切位点）；

egfp-F: 5'-CGAGCTCACGTAAACGGCCACAAGTTC-3'（下划线为 *Sac*I 酶切位点）；

egfp-R：5'-CCTCGAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTG-3'（下划线为 *Xho*I 酶切位点）。

1.2.3 桔小实蝇 *flightin* 基因及对照 *egfp* 基因片段的克隆　分别以桔小实蝇 cDNA 和含 *egfp* 基因的质粒为模板，按照 TSINGKE Master Mix DNA Polymerase 说明书进行 PCR 扩增，克隆桔小实蝇 *flightin* 及 *egfp* 基因干扰片段。PCR 扩增体系：TSINGKE Master Mix DNA Polymerase 12.5 μL，上、下游引物和模板各 1 μL，加灭菌 ddH_2O 至总体积 25 μL。扩增条件：95 ℃预变性 3 min；95 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min，35 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。反应结束后，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并用 DNA 回收试剂盒纯化回收目的片段送测序。

1.2.4 桔小实蝇 *flightin* 及 *egfp* 基因的 RNA 干扰表达载体构建　将 L4440 质粒与胶回收的桔小实蝇 *flightin* 和 *egfp* 基因片段分别同时用 *Sac*I 和 *Xho*I 进行双酶切，37 ℃，1 h，分别回收酶切产物。用 T4 连接酶将回收的 L4440 载体分别与 *flightin*、*egfp* 基因片段以 1 ∶ 3 比例室温连接 10 min。连接产物命名为 L4440–*flightin*、L4440–*egfp*，分别转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。

将转化的感受态细胞涂布在含 Amp、IPTG、Xgal 的固体 LB 平板培养基上，37 ℃过夜培养，挑取白色单菌落于含 Amp 的 LB 液体培养基中培养，菌液 PCR 检测阳性后，提取重组质粒 L4440–flightin 和 L4440–egfp，用 SacI 和 XhoI 双酶切鉴定，筛选阳性克隆，取阳性克隆菌液送测序。

1.2.5 重组质粒转化大肠杆菌 HT115　用热激法将 L4440–*flightin* 和 L4440–*egfp* 表达载体转入 $CaCl_2$ 法制备的 HT115 感受态细胞中，涂布于含 50 μg/mL Amp 和 12.5 μg/mL Tet 的 LB 固体培养基上，过夜培养后挑取单菌落接种到 Amp 和 Tet 抗性的 LB 液体培养基中，提取质粒并通过 PCR 及双酶切鉴定阳性克隆，重组质粒进一步通过测序进行验证。

1.2.6 dsRNA 在大肠杆菌 HT115 中的表达　将带有 L4440–*flightin* 和 L4440–*egfp* 的 HT115 菌液接种于 Amp 和 Tet 抗性 LB 液体培养基中，37 ℃振荡培养过夜，1 ∶ 25 比例将菌液转入新的 LB 培养基中，37 ℃，200 r/min 培养至菌液 OD_{600} =0.4 左右，加入 IPTG 终浓度至 1.0 mmol/L 进行诱导表达，诱导培养 4 h 后收集菌液。采用 TRIzol 法提取细菌总 RNA，DNase I 和 RNase A 溶液消化纯化总 RNA，获得 *flightin*–dsRNA 和 *egfp*–dsRNA。

1.2.7 饲喂细菌表达 dsRNA 的菌液后桔小实蝇 flightin 基因的 RNA 干扰　从桔小实蝇羽化开始饲喂 IPTG 诱导表达靶标 dsRNA 的大肠杆菌 HT115 的 10 倍浓缩菌液，处理组（饲喂 flightin–dsRNA 菌液）和对照组（饲喂 egfp–dsRNA 菌液）各 3 个重复，每个重复 200 头虫（雌雄比 1 ∶ 1）。将浓缩菌液拌进成虫饲料，每天更换一次新鲜饲料，连续饲喂 25 d，处理组和对照组雌、雄虫分开。

RT-qPCR 检测 RNAi 效果：采集 1、5、10、15、20 日龄虫样品，3 次重复，每个重复各取 50 头虫，分别提取总 RNA。荧光定量 PCR（RT-qPCR）检测 RNAi 后 flightin 基因的表达情况，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法计算靶标基因相对表达量。*flightin* 和 *egfp* 基因及 16S 内参基因的 qPCR 引物如下：

qPCR-flightin-F：
TGGATAAGAAGCAAGTTGGCGTTT

qPCR-flightin-R：
AGGCAGCCAGAGTTTGAACAAGAT

16S-F：GCTTATACCTCGTCCAACCGTTCA

16S-R：TTAAAGTCTGACCTGCCCACTGAAGT

通过飞行能力测试检测 RNAi 效果：经过持续饲喂后，分别在 5、10、15、20 日龄利用佳多飞行磨系统进行雌、雄虫飞行能力测试，参照袁瑞玲等[15]的方法。

整虫与胸部组织质量测定：随机选取待测桔小实蝇各 20 头，使用乙醚轻微麻醉后迅速称量整虫质量，然后迅速在解剖镜下去除翅、足、头、腹等组织，仅留下胸部肌肉组织快速称量其质量。

试验数据用 SPSS19.0 统计软件进行方差分

析，用 *Duncan* 氏新复极差法进行多重比较。

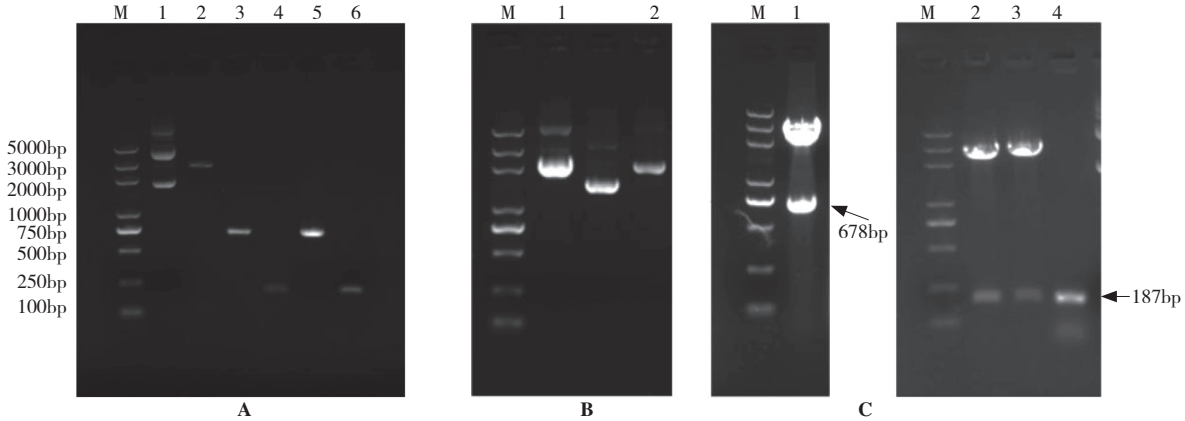
2 结果与分析

2.1 桔小实蝇 *flightin* 及对照 *egfp* 基因干扰片段的克隆

PCR 扩增得到含 *Sac*I 和 *Xho*I 酶切位点的桔小实蝇 *flightin* 和 *egfp* 基因片段，结果为，桔小实蝇 *flightin* 基因片段介于 500~750 bp 之间，对照 *egfp* 基因片段介于 100~250 bp 之间分别与预期添加了酶切位点和保护碱基后的大小 692 bp 和 201 bp 相符（图 1 A 3、4 泳道）。测序结果与 GenBank 报道的序列进行比对，无碱基差异，同源性达 100%，桔小实蝇 *flightin* 基因及 *egfp* 基因干扰片段克隆成功。

把载体质粒 L4440 和胶回收得到的目的片段分别经限制性内切酶 *Sac*I 和 *Xho*I 双酶切后，2 790 bp 的 L4440 质粒线性化单一条带约 2 755 bp，桔小实蝇 *flightin* 及对照 *egfp* 基因大小正确（图 1 A 2、5、6 泳道）。

2.2 dsRNA 表达载体的构建



M：DNA Marker（AL5000）
1：L4440 质粒对照
2：L4440 双酶切产物
3：*flightin* PCR 产物
4：*egfp* PCR 产物
5：胶回收后 flightin 双酶切产物
6：胶回收后 egfp 双酶切产物

M：DNA Marker（AL5000）
1：L4440–*flightin* 重组质粒
2：L4440–*egfp* 重组质粒

M：DNA Marker（AL5000）
1：L4440–*flightin* 双酶切产物
2、3：L4440–*egfp* 双酶切产物
4：L4440–*egfp* PCR 验证

图 1 *flightin* 和 *egfp* 基因干扰片段的克隆及干扰载体的构建

Fig. 1 Cloning of RNAi fragment of *flightin* and *egfp* and construction of RNAi vector

HT115菌株中提取的重组质粒L4440–*flightin*和L4440–*egfp*（图1 B）经*Sac*I和*Xho*I双酶切后，1%琼脂糖凝胶电泳20 min检测均分别得到两条带，2 755 bp的线性化L4440质粒载体，及678 bp和187 bp左右的*flightin*和*egfp*目的片段（图1 C），表明桔小实蝇*flightin*基因和对照*egfp*基因片段成功转入L4440质粒中，与预期设计一致。双向测序结果与目的基因序列完全一致，阅读框正确，说明已经成功构建了L4440–*flightin*和L4440–*egfp*干扰表达载体。

2.3 饲喂表达目的 dsRNA 菌液后 flightin 表达水平

通过连续饲喂表达 *flightin*–dsRNA 和 *egfp*–dsRNA 的菌液后，处理组与对照组相比，在雌、雄虫中均未产生预期的下调效果，反而出现了不同程度的上调现象。雌虫在饲喂后 1、5、10、15、20 d 时全部产生上调，与对照相比分别上调 1.15、2.70、2.27、1.02、3.50 倍，其中，饲喂后 5、10、20 d 与对照差异显著，饲喂后 1、15 d 与对照无显著差异。雄虫饲喂后 15 d 诱发约 43% 的下调，而在饲喂后 1、5、10、20 d 分别诱发 1.38、2.77、1.57、2.98 倍的上调，其中饲喂后 5 日龄与对照差异显著，其余差异不显著。结果表明，雌、雄虫均在饲喂后 5 d 诱发的上调幅度最大。

2.4 饲喂表达 *flightin*–dsRNA 菌液后对飞行能力的影响

连续饲喂表达 *flightin*–dsRNA 和 *egfp*–dsRNA 的菌液后，5、10、15、20、25 日龄的雌、雄虫飞行能力测试结果（图 3）显示，在飞行距离上各日龄处理组与对照组差异不明显。结果表明，

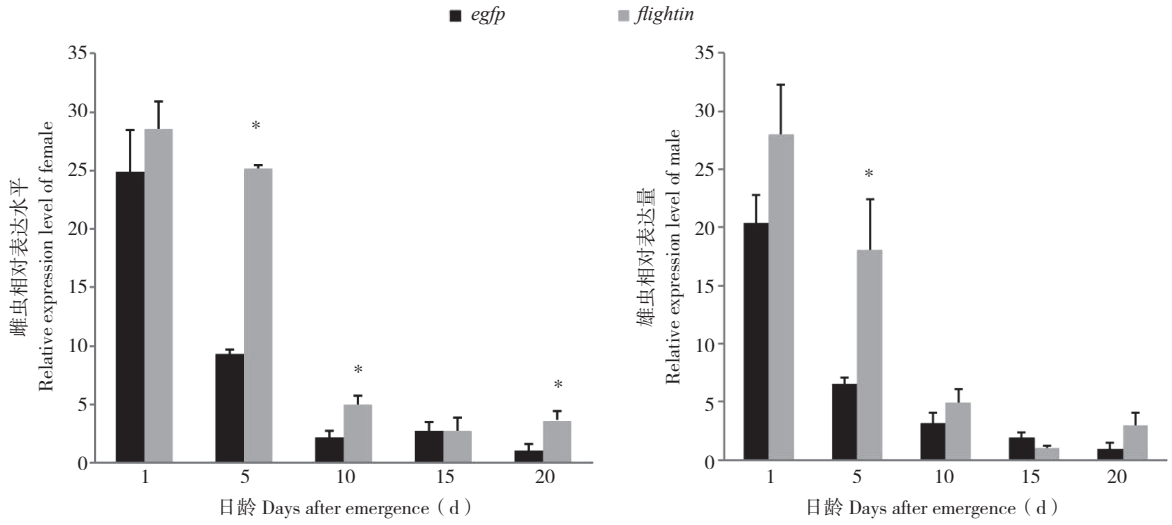


图 2　荧光定量 PCR 分析桔小实蝇 *flightin* 基因表达水平

Fig. 2　Expression level of *flightin* from *Bactrocera dorsalis* by real-time quantitative PCR

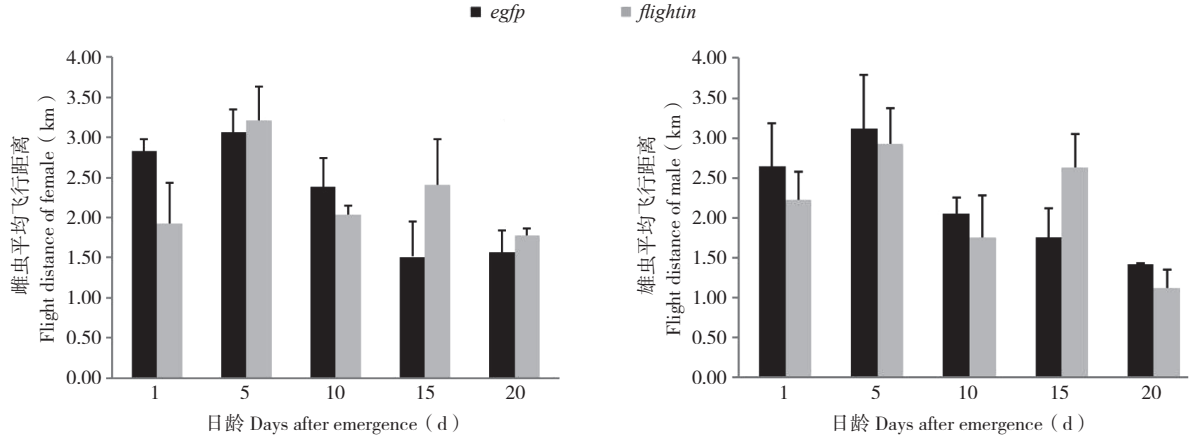


图 3　饲喂表达 dsRNA 菌液后桔小实蝇飞行距离

Fig. 3　Flight distance of *Bactrocera dorsalis* after feeding bacterial expressing dsRNAs

饲喂表达 *flightin*–dsRNA 的大肠杆菌菌液对桔小实蝇进行 RNA 干扰，对其飞行能力没有明显影响。

2.5　饲喂表达 *flightin*–dsRNA 菌液后胸部组织与整虫鲜重比

根据桔小实蝇饲喂菌液进行 RNAi 后 *flightin* 基因的表达量测定结果，选取上调幅度较大的 5 日龄雌、雄虫称量其整虫与胸部组织的鲜重，得到胸部与整虫的鲜重比。结果显示，处理组雌、雄虫鲜重比分别为 34.64% 和 36.53%，与对照组雌、雄虫鲜重比的 34.39% 和 35.99% 没有差异，认为饲喂菌液进行RNAi对胸部肌肉发育无影响。

3　讨论

诸多研究报道，利用大肠杆菌 HT115（DE3）工程菌表达 dsRNA 是经济、高产的方法。早在 1998 年，Timmons 等[16]就开始利用 HT115 表达的 dsRNA 喂食线虫，结果靶标基因的表达受到抑制。RNaseIII 是细菌中普遍存在的 dsRNA 特异性核酸内切酶，由 *rnc* 基因编码，HT115 菌株为 *rnc*⁻ 突变不能降解自身合成的 dsRNA。HT115 经过修饰，插入一个 λ DE3 噬菌体衍生物，可通过 IPTG 诱导表达 T7 RNA 聚合酶。HT115 的四环素和 Amp 抗性，可在培养过程中分别排除 *rnc*⁺ 反突变体和空载质粒。L4440 载体序列的多克隆位点两侧各有 1 个相反方向的 T7 聚合酶启动子，转入 HT115 菌株后，可经 IPTG 诱导表达 dsRNA。

随着细菌表达 dsRNA 技术的不断成熟，该技术在包括桔小实蝇在内的多种昆虫研究中得以实现，有效沉默了目的基因表达[6-7,17-20]。在玉米上喷施表达菌液可抑制花叶病毒的感染[21]，在桔小实蝇精子形成相关基因 *lola*、*topi*、*rac*、

rho、*upd* 和 *magu* 研究中，饲喂表达 dsRNA 的大肠杆菌干扰后，成功降低了基因表达水平并导致精子质量和数量的下降，产卵量及孵化率受干扰而降低[22]。利用该质粒构建的重组质粒可以在大肠杆菌 HT115（DE3）中表达大量所需的外源目的 dsRNA，在 RNAi 研究中，该方法比利用试剂盒体外转录和化学合成，能够大大降低实验成本，而且通过诱导表达目的 dsRNA 饲喂昆虫达到 RNAi 的操作相对简单易行[6,18]。然而，直接饲喂也存在一些问题，Li 等[6]直接喂食桔小实蝇 *Noa*、*Rab*11、*V-ATP-D* 和 *Rpl*19 基因表达 dsRNA 的大肠杆菌后，成功降低了基因的表达水平，但部分出现上调现象。Liu 等[23]研究表明，桔小实蝇成虫长期饲喂 dsRNA 或表达 dsRNA 的大肠杆菌菌液，靶标基因均会出现表达上调现象，导致该现象的机制尚不明确。在其他昆虫中不能成功干扰靶标基因的例子也鲜有报道，如黑腹果蝇饲喂表达 dsRNA 的酵母未能沉默靶标基因表达，对果蝇 3 种亚种饲喂 RNAi 体系同样未实现目的基因的沉默等[24-25]。

本研究结果表明，桔小实蝇饲喂表达 *flightin* 基因 dsRNA 的大肠杆菌未造成预期的目的基因转录水平的下调，也未造成飞行能力的减弱或影响发育等，分析认为，未能成功沉默靶标基因的原因可能有：饲喂法对于桔小实蝇存在对 RNAi 的非基因特异性免疫耐受机制，有关桔小实蝇 RNAi 免疫耐受研究发现，dsRNA 摄取由胞吞机制调控，其间会受到阻遏而无法进入细胞[26]；饲喂表达 dsRNA 大肠杆菌后导致靶标基因上调，存在应激机制及抗性可能是造成这一现象的原因之一[27-28]，很多刺激源（包括大肠杆菌）会激发桔小实蝇 siRNA 通路；Zambon 等[29]发现果蝇在抗病毒过程中，出现基因表达上调，结果证实病毒激发了 IMD、Toll-way 和 Jak-STAT 的信号通路；不同物种中肠环境差异导致 RNAi 效率也不尽相同；摄取 dsRNA 剂量不合适，饲喂法由昆虫自主取食，无法保证其摄取量而影响 RNAi 效率，也无法确定引发 RNAi 的 dsRNA 剂量；桔小实蝇 *flightin* 基因在饲喂后 1 日龄时表达最高，成虫开始饲喂 RNAi 基本已经过了该基因表达高峰，饲喂法错过最佳干扰时间；有研究表明基于饲喂法的 RNAi 效率普遍低于注射法[30]，本课题组已通过体外转录合成 *flightin*-dsRNA 注射桔小实蝇，成功下调了 *flightin* 基因的表达，降低了成虫的飞行能力（待发表）；也有大量研究表明 dsRNA 介导的 RNAi 在双翅目中具有效率不高和持效性差等诸多问题[28]。

4 结论

采用 RT-PCR 技术克隆桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*（Hendel）*flightin* 基因片段，并以此为靶标，设计有效的干扰片段，以线虫 RNAi 干扰载体 L4440 为载体，成功构建了桔小实蝇 *flightin* 基因 RNAi 载体。转化大肠杆菌 HT115（DE3）菌株，利用 IPTG 诱导表达 flightin 基因对应的 dsRNA。通过饲喂表达 *flightin*-dsRNA 的大肠杆菌，桔小实蝇 flightin 基因的表达出现了不同程度的上调；该方法对桔小实蝇飞行能力及胸部肌肉发育未产生明显的影响。未能成功沉默 *flightin* 靶标基因的具体原因有待后续研究进一步探明，利用饲喂表达 *flightin* 基因 dsRNA 的大肠杆菌方法对桔小实蝇 *flightin* 基因进行 RNA 干扰的可行性还需进一步确认。

参考文献（References）：

[1] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, KOSTAS S A, DRIVER S E, MELLO C C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811. doi:10.1038/35888.

[2] TUSCHL T, ZAMORE P D, LEHMANN R, BARTEL D P, SHARP P A. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*[J]. *Genes Development*, 1999, 13: 3191-3197. doi:10.1101/gad.13.24.3191.

[3] BENMSTEIN E, CAUDY A A, HAMMOND S M, HANNON G J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. *Nature*, 2001, 409: 363-366. doi:10.1038/35053110.

[4] DORNER S, LUM L, KIM M, PARO R, BEACHY P A, GREEN R. A genomewide screen for components of the RNAi pathway in *Drosophila* cultured cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(32): 11880-11885. doi:10.1073/pnas.0605210103.

[5] COLLINS C S, HONG J, SAPINOSO L, ZHOU Y Y, LIU Z, MICKLASH K, SCHULTZ P G, HAMPTON G M. A small interfering RNA screen for modulators of tumor cell motility identifies MAP4K4 as a promigratory kinase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(10): 3775-3780. doi:10.1073/pnas.0600040103.

[6] LI X X, ZHANG M Y, ZHANG H Y. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17788. doi:10.1371/journal.pone.0017788.

[7] TIAN H G, PENG H, YAO Q, CHEN H X, XIE Q, TANG B, ZHANG W Q. Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene[J].

PLoS One, 2009, 4 (7): e6225. doi:10.1371/journal.pone.0006225.

[8] PRENTICE K, CHRISTIAENS O, PERTRY I, BAILEY A, NIBLETT C, GHISLAIN M, GHEYSEN G, SMAGGHE G. RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae) [J]. *Pest Management Science*, 2017, 73: 44-52. doi:10.1002/ps.4337. .

[9] 陈鹏, 叶辉, 母其爱. 基于荧光标记的怒江流域桔小实蝇(*Bactrocera dorsalis*)的迁移扩散[J]. 生态学报, 2007, 27(6): 2468-2476.
CHEN P, YE H, MU Q A. Migration and dispersal of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* in regions of nujiang river based on fluorescence mark [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(6): 2468-2476. doi:10.3321/j.issn:1000-0933.2007.06.040.

[10] 李伟丰, 杨朗, 唐侃, 曾玲, 梁广文. 中国桔小实蝇种群的微卫星多态性分析[J]. 昆虫学报, 2007, 50(12): 1255-1262.
LI W F, YANG L, TANG K, ZENG L, LIANG G W. Microsatellite polymorphism of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) populations in China [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2007, 50(12): 1255-1262. doi:10.3321/j.issn:0454-6296.2007.12.009.

[11] SHI W, CAROLE K, YE H. Population genetic structure of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) from Yunnan province (China) and nearby sites across the border [J]. *Genetica*, 2010, 138(3): 377-385. doi:10.1007/s10709-009-9429-0.

[12] CHEN P, YE H. Relationship among five populations of *Bactrocera dorsalis* based on mitochondrial DNA sequences in western Yunnan, China [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2008, 132(7): 530-537. doi:10.1111/j.1439-0418.2008.01302.x.

[13] 叶辉, 陈鹏. 桔小实蝇在中国的扩张趋势//万方浩. 中国生物入侵研究[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 90-96.
YE H, CHEN P. Historically geographical expansion and potential spread of *Bactrocera dorsalis* Hendel in China//WAN F B. Research on biological invasions in China [M]. Beijing: Science Pres, 2009: 90-96.

[14] CONTOMPASIS J L, NYLAND L R, MAUGHAN D W, VIGOREAUX J O. Flightin is necessary for length determination,structural integrity, and large bending stiffness of insect flight muscle thick filaments [J]. *Journal of molecular biology*, 2010, 359:340-348. doi:10.1016/j.jmb.2009.11.021.

[15] 袁瑞玲, 杨珊, 王晓渭, 陈鹏. 桔小实蝇飞行能力测试[J]. 西部林业科学, 2014, 43(6):66-71.
YUAN R L, YANG S, WANG X X, CHEN P. Test on Flight Ability of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2014,43(6):66-71. doi:10.16473/j.cnki.xblykx1972.2014.06.007.

[16] TIMMONS L, FIRE A. Specific interference by ingested dsRNA [J]. *Nature*, 1998, 395(6705): 854.doi: https://doi.org/10.1038/27579.

[17] 王根洪, 祝慧敏, 罗会松, 王轲轲, 杨小波, 蒋亮, 夏庆友. 细菌表达 dsRNA 介导的家蚕 *FTZ-F1* 基因的 RNA 干扰[J]. 昆虫学报, 2011, 54(5): 596-601.
WANG G H, ZHU H M, LUO H S, WANG K K,YANG X B, JIANG L, XIA Q Y. RNA interference of *FTZ-F1* gene mediated by bacterially expressed dsRNA in the silkworm, *Bambyxmori* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2011, 54(5): 596-601. doi:10.16380/j.kcxb.2011.05.015.

[18] 林霞. 昆虫几丁质脱乙酰基酶 BmCDA1 的生化表征[D]. 大连: 大连理工大学, 2017.
LIN X. Biochemical characterization of the chitin deacetylase *Bm*CDA1 [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2017.

[19] 徐秀凤. 小菜蛾精氨酸激酶基因 dsRNA 在大肠杆菌中的表达及其效应[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
XU X F. Recombinant *Escherichia coli* expressing dsRNA of arginine kinase gene of *Plutella xylostella* and its RNA-interference effect [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012.

[20] 李晓雪. 橘小实蝇 RNAi 及其对 RNAi 的免疫耐受机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
LI X X. RNA interference in *Bactrocera dorsalis* and the mechanism of its refractoriness to RNA interference [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University,2015.

[21] GAN D F, JIAO Z, JIANG H B, JIANG T, ZHU S W, CHENG B J. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(11): 1261 – 1268. doi:10.1007/s00299-010-0911-z.

[22] DONG Y C, WANG Z J, CHEN Z Z, CLARKE A R, NIU C Y. *Bactrocera dorsalis* male sterilization by targeted RNA interference of spermatogenesis: empowering sterile insect technique programs [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1). doi:10.1038/srep35750. doi:10.1038/srep35750

[23] LIU G, WU Q, LI J, ZHANG G, WAN F. RNAi-Mediated Knock-Down of transformer and transformer 2 to Generate Male-Only Progeny in the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128892. doi:10.1371/journal.pone.0128892.

[24] GURA T. A silence that speaks volumes[J]. *Nature*, 2000, 404(6780): 804-808. doi:10.1038/35009245.

[25] WHYARD S, SINGH A D, WONG S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39(11): 824-832. doi:10.1016/j.ibmb.2009.09.007.

[26] LI X X, DONG X L, ZOU C, ZHANG H Y. Endocytic pathway mediates refractoriness of insect *Bactrocera dorsalis* to RNA interference [J]. *Scientific reports*, 2015, 5: 8700. doi:10.1038/srep08700.

[27] XIE Y F, NIU J Z, JIANG X Z, YANG W J, SHEN G M, DONG W, SMAGGHE G, WANG J J. Influence of various stressors on the expression of core genes of the small interfering RNA pathway in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*[J]. *Insect science*, 2017, 24(3): 418-430. doi:10.1111/1744-7917.12311.

[28] 胡浩. 桔小实蝇注射法 RNAi 效率提升方法的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
HU H. Study on the methods to improve RNAi efficiency through dsRNA-injection into *Bactrocera dorsalis* [D]. Chongqin:Xinan University, 2017.

[29] ZAMBON R A, NANDAKUMAR M, VAKHARIA V N, WU L P. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila* [J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 2005, 102(20): 7257-7262. doi:10.1073/pnas.0409181102.

[30] HUNTER C P. Genetics: a touch of elegance with RNAi [J]. *Current Biology*, 1999, 9(12): R440-442. doi:10.1016/s0960-9822(99)80276-0.

(责任编辑　杨贤智)