

1. 一种白背飞虱SfDpp基因,其特征在于,所述白背飞虱SfDpp基因的序列含有:
 - 1) 序列表中序列1所示的基因编码区序列,或
 - 2) 在序列表中序列1所示的序列中经取代、缺失或添加一个或几个核苷酸且具有同等或差异活性的由2)衍生的核苷酸序列。
2. 一种权利要求1所述白背飞虱SfDpp基因的dsRNA,其特征在于,所述dsRNA为序列表中序列2所示的核苷酸组成的RNA。
3. 含有权利要求1所述白背飞虱SfDpp基因的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。
4. 权利要求1所述的白背飞虱SfDpp基因或权利要求2所述的dsRNA或权利要求3所述的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系在如下a1) -a4)中任一种中的应用:
 - a1) 防治白背飞虱;
 - a2) 抑制白背飞虱翅膀发育;
 - a3) 抑制白背飞虱翅膀的成熟和伸展;
 - a4) 抑制白背飞虱复眼的增殖。
5. 一种抑制白背飞虱翅膀发育的方法,将抑制白背飞虱翅膀发育基因SfDpp表达的物质导入白背飞虱,从而实现抑制白背飞虱翅膀发育。
6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述抑制白背飞虱翅膀发育基因SfDpp表达的物质为权利要求2所述的dsRNA。

白背飞虱SfDpp基因、dsRNA及其在害虫防治中的应用

技术领域：

[0001] 本发明属于基因工程技术领域，具体涉及一种白背飞虱SfDpp基因、dsRNA及其在害虫防治中的应用。

背景技术：

[0002] 白背飞虱Sogatella furcifera (Horvath) 是亚洲水稻上的重要迁飞性害虫之一。其成虫和若虫均可直接刺吸水稻韧皮部汁液，导致植株黄化甚至枯死。此外，它们在取食过程中还可传播病毒并诱发多种水稻病害，如南方水稻黑条矮缩病(South rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV) 等，严重发病时能导致水稻减产甚至绝收。作为迁飞性害虫，翅的完整发育对于成功迁飞具有重要的意义。

[0003] 昆虫的翅膀多态性和发育机制在昆虫中普遍研究的非常透彻，稻飞虱的翅型及其发育机制也被完整的解析。诸多调控翅伸展的差异表达基因也相继被鉴定出来，但对于重要水稻害虫白背飞虱的有关翅发育基因的相关报道还较少见到，对于白背飞虱体内哪些基因能够参与调控其翅的发育过程，还需要进一步证实。

发明内容：

[0004] 针对现有技术中存在的不足，本发明提供了一种白背飞虱SfDpp基因、dsRNA及其在害虫防治中的应用。

[0005] 具体的，本发明第一方面提供了一种白背飞虱SfDpp基因，所述白背飞虱SfDpp基因的序列含有：

[0006] 1) 序列表中序列1所示的基因编码区序列，或

[0007] 2) 在序列表中序列1所示的序列中经取代、缺失或添加一个或几个核苷酸且具有同等或差异活性的由2) 衍生的核苷酸序列。

[0008] 本发明还提供了一种上述白背飞虱SfDpp基因的dsRNA，所述dsRNA为序列表中序列2所示的核苷酸组成的RNA。

[0009] 本发明还提供了含有上述白背飞虱SfDpp基因的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。

[0010] 本发明还提供了上述的白背飞虱SfDpp基因或上述的dsRNA或上述的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系在如下a1) -a4) 中任一种中的应用：

[0011] a1) 防治白背飞虱；

[0012] a2) 抑制白背飞虱翅膀发育；

[0013] a3) 抑制白背飞虱翅膀的成熟和伸展；

[0014] a4) 抑制白背飞虱复眼的增殖。

[0015] 本发明还提供了一种抑制白背飞虱翅膀发育的方法，将抑制白背飞虱翅膀发育基因SfDpp表达的物质导入白背飞虱，从而实现抑制白背飞虱翅膀发育。

[0016] 进一步的，所述抑制白背飞虱翅膀发育基因SfDpp表达的物质为上述的dsRNA。

[0017] 与现有技术相比,本发明具有以下有益的技术效果:

[0018] 本发明发现SfDpp基因在调控白背飞虱翅发育过程具有重要作用,其表达能够抑制白背飞虱翅的成熟和伸展,并且抑制白背飞虱复眼的增殖,从而为白背飞虱的可持续治理提供参考。

附图说明:

[0019] 图1为白背飞虱SfDpp基因序列及推导的氨基酸序列,下划线表示起始密码子和终止密码子。

[0020] 图2为SfDpp基因在白背飞虱不同发育阶段的表达模式,图中误差线表示标准误。eggs:卵;N1-1d-N5-3d:1龄1天若虫5龄3天若虫,AN:初羽化成虫,A20-60:羽化20min-60min的成虫,A12 h-48h:羽化12h-48h的成虫。柱形图上不同小写字母表示显著差异($\alpha=0.05$)。

[0021] 图3为SfDpp基因在白背飞虱不同组织的表达模式,图中误差线表示标准误。柱形图上不同小写字母表示显著差异($\alpha=0.05$)。

[0022] 图4为白背飞虱Dpp基因干扰效率及表型,图中误差线表示标准误。柱形图上不同小写字母表示显著差异($\alpha=0.05$)。

具体实施方式:

[0023] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0024] 为研究Hedgehog信号通路关键基因对白背飞虱翅展的调控作用,本发明克隆了Sogatella furcifera Decapentaplegic (SfDpp) 基因,解析它们在白背飞虱体内的时空表达模式,并通过RNAi技术,研究了它们在调控白背飞虱翅展过程中的作用。

[0025] 实施例1白背飞虱SfDpp基因的dsRNA的获得

[0026] 1.1供试昆虫

[0027] 本发明所用的白背飞虱为采自贵阳花溪贵州大学教学实验场水稻田,置于人工气候箱内,于16:8(L:D),温度 $25\pm 1^\circ\text{C}$,湿度 $75\%\pm 5$ 的条件下,使用TN1水稻饲养繁殖多代,备用。

[0028] 1.2主要仪器和试剂

[0029] 1.2.1主要仪器

	仪器 Instrument	生产厂家 Manufacturer
	人工气候箱	宁波江南仪器制造厂
	离心机	生工生物工程（上海）股份有限公司
	T100™ Thermal Cycler	BIO-RAD
	移液枪	Eppendorf
[0030]	FastPrep-24 样品快速处理系统	MP 生物医疗公司（MP Biomedicals LLC）
	SW-CJ-1F 单人双面净化工作台	苏州净化设备有限公司
	凝胶成像系统	BIO-RAD
	Thermo MaxQ6000 恒温/低温摇床	Thermo Fisher Scientific Inc.
	HVE/HVA 系列立式压力蒸汽灭菌器	Thermo Fisher Scientific Inc.
	NanoDrop 2000 紫外-可见分光光度计	Thermo Fisher Scientific Inc.
[0031]	IM-31 微型注射器	Narishige
	SMZ25 体视显微镜	Nikon
[0032]	1.2.2 主要试剂	

	试剂 Reagent	生产厂家 Manufacturer
	HP Total RAN Kit	Omega Bio-Tek
	β-巯基乙醇	Solarbio
	无水乙醇 (分析纯)	重庆川东化工 (集团) 有限公司
	2000 DNA Maker	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
	HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒	北京康为世纪生物科技有限公司
	EasyPure QuiControl Gel Extraction Kit	北京全式金生物技术 (TransGen Biotech) 有限公司
	Taq PCR Mix	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
[0033]	E.coli DH5α Competent Cells	Takara 公司
	pMD™18-T Vector Cloning Kit	Takara 公司
	TRYPTONE (胰蛋白胨)	OXOID
	YEAST EXTRACT (酵母粉)	OXOID
	TranscriptAid T7 高产率转录试剂盒	ThermoFisher Scientific
	GeneJET RNA Purification Kit	ThermoFisher Scientific
	HiFiScript cDNA Synthesis Kit	康为世纪生物科技股份有限公司
	琼脂糖	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
	氯化钠 (分析纯)	成都金山化学试剂有限公司
	50×TAE concentrate Solution	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
	DEPC 水	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
	4S Green Nucleic Acid Stain 4S Green	BBI Life Sciences

[0034] 1.3 试验方法

[0035] 1.3.1 TN 1 水稻苗的培育

[0036] 1) 浸种催芽: 取出适量 TN1 水稻种子装入内径为 32cm×24cm×12cm 的塑料盒中, 加水浸没种子, 淘掉浮在水面上的瘪粒, 倒掉多余的水, 再将其置于人工气候箱中进行催芽, 每 24h 清洗更换一次水, 直到水稻种子开始露白。

[0037] 2) 育苗: 在 45cm×30cm×10cm 的不锈钢托盘内铺一层约 5cm 厚的腐殖土, 洒水淋湿后, 再将露白的水稻种子均匀的撒在腐殖土上, 再盖一层约 1cm 的腐殖土, 用保鲜膜将托盘覆盖以保持水分, 避免蒸发太快。待苗出土后, 揭开保鲜膜, 灌上水, 每天观察及时浇水直到移栽。

[0038] 3) 移栽: 待托盘中的水稻苗长直 20cm 左右, 即可将其移栽至装有一半泥土的塑料桶内, 返青后施复合肥一次, 每天观察及时浇水, 待其长至分蘖盛期再用。

[0039] 1.3.2 白背飞虱的饲养

[0040] 1) 养虫笼饲养: 将分蘖盛期的水稻苗搬入到 70cm×70cm×70cm 的尼龙纱网养虫笼内, 吸取白背飞虱置于养虫笼内, 每笼 50-100 头, 使其自由繁殖, 待其孵出若虫, 长至 5 龄时,

拍到塑料盆内,吸入到养虫管内饲养,待其羽化。

[0041] 2) 试管饲养:拔出分蘖盛期的水稻苗,清水洗净根部泥土,剪去顶端的叶子,再用脱脂棉浸湿包裹根部,放入到3cm×30cm的两通卷口玻璃试管内,再吸取羽化24h左右的白背飞虱置于养虫管内,每管10-30头,以尼龙纱网盖住,再用橡皮筋扎紧,置于气候箱内让其繁殖,每2-3天更换一次新鲜水稻苗,在水稻苗更换水稻苗时,先用自制吸虫器将白背飞虱吸入到新的养虫管中,换上新鲜的水稻苗,再置于人工气候箱中饲养。更换下来的水稻苗,再重新放入原来的试管内,用纱网封口,置于人工气候箱内,待若虫孵出,期间,每24h检查一次,若有若虫浮出,及时吸取到新的养虫管内,用TN1水稻苗饲养,每3-4天更换一次新鲜水稻苗。待其长至3-5龄时,拍到塑料盆内,分龄期开展相关试验。

[0042] 1.3.3白背飞虱样品的处理

[0043] 从试管饲养的白背飞虱中,挑选4龄、5龄若虫和羽化后1-3天的成虫混合样品,吸取到1.5mL的离心管(EP管)中,液氮速冻以后,置于-80℃冰箱内保存备用。

[0044] 1.3.4白背飞虱总RNA提取

[0045] 白背飞虱RNA提取方法根据HP Total RNA Kit总RNA提取试剂盒进行,具体操作流程如下:

[0046] 1) 放适量磁珠于磨样管中,向管内放入10-20头白背飞虱;

[0047] 2) 吸取500μL buffer GTC于磨样管内,每管加10μLβ-Mercaptoethanol;

[0048] 3) 将加好GTC和β-Mercaptoethanol的磨样管盖好,放到自动磨样机中研磨;

[0049] 4) 将磨好的样品取出,14000×g室温离心5min;

[0050] 5) 把gDNA离心柱装到收集管中,将4中离心的上清液转移到gDNA柱中,14000×g室温离心2min,把流出液转移到新的1.5ml离心管中;

[0051] 6) 向离心管中加入250ul无水乙醇,震荡混匀;

[0052] 7) 取出HiBind®RNA Mini Column装在收集管中,将上述离心管的混合液吸入HiBind®RNA柱中,10000×g室温离心60s,弃流出液;

[0053] 8) 加300μL RNAWash Buffer I,10000×g室温离心60s,弃流出液;

[0054] 9) 加400μL RNAWash Buffer I,静置5min,10000×g室温离心60s,弃流出液;

[0055] 10) 加500μL RNA Wash Buffer II,10000×g室温离心60s,弃流出液;

[0056] 11) 12000×g空离心2min,去除残留的Buffer II,开盖静置2min;

[0057] 12) 把离心柱转移到新的1.5mL离心管中,向柱中央加入30μL DEPC处理水,静置2min,10000×g离心1min;

[0058] 13) 分别吸取1μL和2μL检测浓度和纯度;-20℃保存待用,-80℃保存。

[0059] 1.3.5白背飞虱cDNA第一链合成

[0060] 以提取的白背飞虱总RNA为模板,采用HiFiScript cDNA第一链合成试剂盒将RNA逆转录为cDNA,逆转录反应体系如下:

	组分	体积
	RNA 样品	3 μ L
	dNTP Mix, 2.5 mM Each	4 μ L
[0061]	Primer Mix	2 μ L
	5 \times RT Buffer	4 μ L
	DTT, 0.1 M	2 μ L
	HiFiScript, 200 U/ μ l	1 μ L
	RNase-Free Water	2 μ L
	Total	20 μ L

[0062] 涡旋震荡混匀,短暂离心,使管壁上的溶液收集到管底。42 $^{\circ}$ C孵育50分钟,85 $^{\circ}$ C孵育5分钟。反应结束后,短暂离心,置于冰上冷却。-20 $^{\circ}$ C长期保存。

[0063] 1.3.6引物设计

[0064] 基于白背飞虱基因组和转录组信息,本发明从中筛选SfDpp基因(Gene ID: Scaffold-34.12),从美吉生物云系统中导出该基因的核苷酸序列,并在NCBI数据库中进行BLAST,比对验证序列的正确性以后,用Primer Premier 6.0软件从SfDpp基因的编码区分别设计RNAi和RT-qPCR引物(表1.3.6),送上海生工生物有限公司合成。

[0065] 表1.3.6白背飞虱SfHh和SfDpp基因RNAi片段克隆和RT-qPCR引物

	Primer name	Primer sequences (5'-3')	Size (bp)
	<i>SfDpp</i> -F1	CGCAGTCGTGTCGTTGTTTCCT	
	<i>SfDpp</i> -R1	TCGTCAAGGTAGACCAGCAACAAC	582
	<i>SfDpp</i> -F2	AGGTGGAAGTGGAAAGAGAATGA	
	<i>SfDpp</i> -R2	GGTGGAGAGAAAAGTTGACTAGGTAGATTTAGAG	572
	ds <i>Dpp</i> -F	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> AAGGTGGAAGTGGAAAGAGAATGA	
	ds <i>Dpp</i> -R	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAG</u> AGGTGGAGAGAAAAGTTGACTAGGTAGATT TAGAG	618
	ds <i>GFP</i> -F	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> AATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	
	ds <i>GFP</i> -R	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> TACTTGTACAGCTCGTCCATGC	720
[0066]	RT- <i>SfDpp</i> -F	CGCAGTCGTGTCGTTGTTTCCT	159
	RT- <i>SfDpp</i> -R	TCTGGTTCGATGTCGCTCTCCTTAT	
	RT- <i>SfWg</i> -F	CAAGAAGAACCCTACAAC	273
	RT- <i>SfWg</i> -R	GATGACTTCACAGCACCAG	
	RT- <i>SfHh</i> -F	GCGACAGCCAGGTGACAACAT	219
	RT- <i>SfHh</i> -R	CGTAGAAGGAGATGCGAGGGTGT	
	RT- <i>Sfvg</i> -F	AAACGCCCTCATCACCTAACTCAG	215
	RT- <i>Sfvg</i> -R	GGTGGTATTCGTGGACGGCTCTA	
	RT- <i>Sfspal</i> -F	CAATGGCAACTGGAGATGAGGATGAA	154
	RT- <i>Sfspal</i> -R	CTCAGCATCAGCGTCCACTTCAG	
	RT- <i>SfPRL9</i> -F	GTGAACAAGTGC GAAGGA	123
	RT- <i>SfRPL9</i> -R	TCATAGCAGTGC GTCAAC	
	RT- <i>Sf18S</i> -F	CGGAAGGATTGACAGATTGAT	151
	RT- <i>Sf18S</i> -R	CACGATTGCTGATACCACATAC	

[0067] 1.3.7白背飞虱SfDpp基因克隆PCR扩增

[0068] 以逆转录获得的cDNA为模板,采用Taq PCR Master Mix进行PCR扩增,扩增PCR反

应体系如下:

	组分	体积
	Taq PCR Master Mix	12.5 μ L
	cDNA	2.5 μ L
[0069]	Primer F (10 μ mol/L)	1.0 μ L
	Primer R (10 μ mol/L)	1.0 μ L
	Sterilized ddH ₂ O	8.0 μ L
	Total	25.0 μ L

[0070] 离心机中离心30s,置于PCR仪中进行如下反应:

	Pre-Duration	94 $^{\circ}$ C	3min	} 30cycle
	Duration	94 $^{\circ}$ C	30s	
[0071]	Anneal	60 $^{\circ}$ C	30s	
	Extend	72 $^{\circ}$ C	1min	
	Post-Extend	72 $^{\circ}$ C	10min	

[0072] 1.3.8胶回收

[0073] 胶回收步骤参考EasyPure[®] QuiControl Gel Extraction kit试剂盒说明书进行。

[0074] 1). 配制1%的琼脂糖凝胶电泳胶板;

[0075] 2). 把PCR产物在电泳仪中采用120V, 30min进行检测;

[0076] 3). 装配好切胶用的刀片,并在酒精灯上灼烧至刀片发红以灭菌;

[0077] 4). 称量空离心管重量,写好标签并记录,打开水浴锅设置水温55 $^{\circ}$ C;

[0078] 5). 将跑好的凝胶板置于凝胶成像系统中,用准备好的刀片切割目的条带;

[0079] 6). 再次称量装了目的条带的离心管重量,计算胶块重量。

[0080] 7). 向放有目的条带的离心管中加入3倍体积的溶液GSB(凝胶重100mg可视为100 μ l,以此类推),置于55 $^{\circ}$ C水浴锅中融胶6~10min(以管内胶块完全融化为准),间隔2min颠倒混匀一次,使其充分融化,取出静置;

[0081] 8). 取出离心柱置于收集管内,写好标签,待融化的凝胶液降至室温后,降其吸入到离心柱中,静置1min,12500r离心1min,弃流出液;

[0082] 9). 加入650 μ l的WB,静置1min,12500r离心1min,弃流出液;

[0083] 10). 12500r离心2min,去除残留的WB;将离心柱取出,置于新的离心管中,开盖静置2min,使酒精挥发干净;

[0084] 11). 向离心柱中加入30 μ l的EB(提前55 $^{\circ}$ C预热效果更好),静置2min;12500r离心1min,弃离心柱,流出液-20 $^{\circ}$ C保存,待用。

[0085] 1.3.9连接

[0086] 将带有目的片段的胶回收产物与pMD-18T载体连接,体系如下:

	组分	体积
	Solution I	3.5 μL
[0087]	胶回收产物	3 μL
	pMD-18T Vector	0.5 μL
	ddH ₂ O	3 μL
	Total	10 μL

[0088] 充分混匀后,16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接。

[0089] 1.3.10转化

[0090] 把连接产物转入到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,转化步骤如下:

[0091] 1) 按以下体系配制液体和固体培养基;

[0092] 液体培养基配制方法:

	组分	50 ml	100 ml	200 ml	500 ml
[0093]	胰蛋白胨 (g)	0.5	1.0	2.0	5.0
	酵母膏 (g)	0.25	0.5	1.0	2.5
	氯化钠 (g)	0.5	1.0	2.0	5.0

[0094] 固体培养基配制方法:

	组分	75 ml	100 ml	150 ml
[0095]	胰蛋白胨 (g)	0.75	1.0	1.5
	酵母膏 (g)	0.375	0.5	0.75
	氯化钠 (g)	0.75	1.0	1.5
	琼脂粉 (g)	1.125	1.5	2.25

[0096] 2) 把连接产物吸取注入到250 μl 的未加氨苄 (Amp⁻) 液体培养基中,置于摇床中,180r/min转速下摇菌1-2h;

[0097] 1.3.11TA克隆测序

[0098] 1). 将菌液在8000g条件下短暂离心30s,弃上清,转移到超净工作台中;

[0099] 2). 用移液枪将管底的菌株吸取到加了氨苄 (Amp⁺) 的固体培养基上,点燃酒精灯,用涂菌棒在燃烧的酒精灯旁把菌液均匀的涂抹在固体培养基上;

[0100] 3). 涂好后,用封口膜封好,并写上标签,倒置于37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱内培养8-12h;

[0101] 4). 待培养的菌株长出菌落后,取到超净工作台中,用10 μl 的移液枪,挑取单一菌落溶于10 μl DEPC处理水中,并使用通用引物M13-47,M13-48进行PCR验证克隆的正确性;

[0102] 5). 将PCR跑出目的条带的菌株吸入到800 μl Amp⁺的液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中震荡过夜培养。

[0103] 6). 将过夜培养的菌液送上海生工生物程有限公司进行测序。

[0104] 1.3.12.dsRNA合成

[0105] 为了准确的合成靶标基因的dsRNA,需对用以合成dsRNA的模板进行测序。通过设计、合成的dsRNA引物(表1.3.6)进行PCR扩增,并将其进行TA克隆,将测序正确的菌液进行

扩大培养,并提取质粒,用以进一步的实验。使用PrimerSTAR Max DNA Polymerase进行PCR反应,具体反应体系如下:

	试剂 Reagent	体积 Volume (μL)
[0106]	dsRNA-FT7 (10 μM)	1
	dsRNA-RT7 (10 μM)	1
	PrimerSTAR Max DNA Polymerase	12.5
	cDNA	2
	ddH ₂ O	up to 25

[0107] 将上述试剂依次加入PCR管内,轻弹混匀后瞬时离心,然后置于PCR仪上进行反应。PCR扩增条件为:

[0108]	Pre-Duration	94 $^{\circ}\text{C}$	3min	} 30cycles
	Duration	94 $^{\circ}\text{C}$	30s	
	Anneal	65 $^{\circ}\text{C}$	30s	
	Extend	72 $^{\circ}\text{C}$	1min	
[0109]	Post-Extend	72 $^{\circ}\text{C}$	10min	

[0110] 退火温度参考公司返回的引物合成报告单的T_m值。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检验扩增片段的正确性,之后进行TA克隆,并送公司测序。

[0111] 将测序正确的预留菌液加入到5mL含有Amp的LB液体培养基中,置于摇床上37 $^{\circ}\text{C}$ 、180rpm震荡过夜培养。利用EasyPure[®] Plasmid MiniPrep Kit进行质粒的提取,具体操作步骤参照说明书进行。以提取的质粒为模板,采用引物列表中的引物进行PCR扩增,反应体系及条件同上述的基因克隆PCR扩增。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检验扩增片段的正确性,之后采用EasyPure[®] QuiControl Gel Extraction Kit进行PCR产物回收与纯化,并以Nanodrop 2000核酸浓度分析仪检测纯化产物的浓度,确保纯化产物浓度至少达到300ng/ μL 。

[0112] 以回收得到的高浓度dsDNA作为模板,采用TranscriptAid T7High Yield Transcription Kit试剂盒体外合成dsRNA。在使用之前,需将5X TranscriptAid Reaction Buffer在室温下进行解冻,其它试剂均在冰上进行解冻。待所有试剂解冻后,需轻弹混匀,并进行短暂离心。并按照以下反应体系进行加样:

	试剂 Reagent	体积 Volume (μL)
[0113]	ATP	2
	GTP	2
	UTP	2
	CTP	2

	5X TranscriptAid Reaction Buffer	4
[0114]	dsDNA 模板	1 μ g
	T7 Enzyme Mix	2
	Nuclease-free Water	up to 20

[0115] 在200 μ L PCR管依次加入上述溶液,轻弹混匀后进行短暂离心,随后将其置于PCR仪上37 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0116] 待其反应完后,在上述反应体系中加入2 μ L DNase I,轻弹混匀后进行短暂离心,随后将其置于PCR仪上37 $^{\circ}$ C孵育30min。之后在反应体系中加入2 μ L EDTA,轻弹混匀后进行短暂离心,随后将其置于PCR仪上37 $^{\circ}$ C孵育30min,终止反应。

[0117] 1.3.13dsRNA纯化

[0118] 利用GeneJET RNA Purification Kit纯化dsRNA进行,具体步骤如下:

[0119] 1) 将上述合成的dsRNA转移至无酶的1.5mL的离心管中,并加入DEPC水稀释至100 μ L,并加入300 μ L Lysis Buffer,用移液枪吹打混匀;

[0120] 2) 加入180 μ L无水乙醇,吹打混匀;

[0121] 3) 将上述混合液转移至吸附柱中,室温下12000g离心1min,弃废液,将吸附柱转入新的2mL收集管中;

[0122] 4) 加入700 μ L Wash buffer 1,室温下12000g离心1min,弃废液;

[0123] 5) 加入600 μ L Wash buffer 2,室温下12000g离心1min,弃废液;

[0124] 6) 加入250 μ L Wash buffer 2,室温下12000g离心1min,弃废液;7) 室温下12500g空管离心2min,去除残留液体,将吸附柱转入到1.5mL无酶的离心管中;

[0125] 8) 向吸附柱中央滤膜上加入50-100 μ L DEPC水,室温下12000g离心1min,纯化的dsRNA使用Nanodrop 2000核酸浓度分析仪测定其浓度,-80 $^{\circ}$ C保。

[0126] 实施例2SfDpp基因在抑制白背飞虱翅膀发育中的应用

[0127] 2.1显微注射

[0128] 选取白背飞虱5龄第1天和3龄第1天若虫置于试管中,用CO₂处理约90s使其暂时昏迷,将试虫置于带凹槽的3%琼脂糖凝胶板上;使用IM-31微型注射器将dsRNA注射到白背飞虱若虫体内。使用之前,需使用1 μ L的标准毛细玻璃管对每次泵出的体积进行定量。每头试虫注射约0.1 μ L,同时注射等体积的GFP基因dsRNA作为阴性对照。每处理设置3个生物学重复,每个重复注射50头。注射完成后,将试虫放入装有新鲜TN1水稻苗的两通玻璃试管中,置于温度25 \pm 1 $^{\circ}$ C、相对湿度70 \pm 5%、光周期16L:8D的人工气候箱中饲养至羽化。

[0129] 2.2干扰效果RT-qPCR检测

[0130] 在注射靶基因的dsRNA 24h后,于各处理组随机挑取存活的虫体(10头),液氮速冻处理,提取RNA,并反转录成cDNA,分别检测目的基因表达量变化情况。

[0131] 2.3表型拍照观察

[0132] 羽化24h后,观察各处理组白背飞虱个体的翅伸展情况,吸取成虫,液氮速冻以后,使用Nikon SMZ25体视显微镜进行拍照。

[0133] 2.4数据分析

[0134] 白背飞虱SfDpp基因序列的生物信息学分析参照利用SeqMan软件对测序结果进行

校对及序列拼接,获得的基因序列采用DNAMAN 7.0软件进行编辑和氨基酸序列推导。采用BLAST工具进行序列同源性比对,使用ORF Finder工具查找开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)。用ProtParam预测编码蛋白质的氨基酸分子组成、相对分子量及等电点等理化性质;用SignalP 4.1Server预测信号肽;用SMART进行结构域分析;MEGA 6.06中的邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,各分支均采用1000次重复抽样进行氨基酸序列聚类分析。

[0135] 本节中所得数据先使用Microsoft Excel 2019整理,再使用SPSS 22.0软件进行统计分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对白背飞虱不同龄期 and 不同组织的SfDpp基因相对表达量进行分析。实时荧光定量PCR数据(RT-qPCR)以平均值 \pm 标准误表示,处理间比较采用单因素方差分析(ANOVA)和Duncan氏新复极差法(Duncan's multiple range test)进行多重比较分析($\alpha=0.05$)。

[0136] 2.5结果与分析

[0137] 2.5.1白背飞虱SfDpp基因的克隆与序列分析

[0138] 克隆获得了一条长为1034bp的序列,经NCBI Blast比对鉴定,确定该基因片段为decapentaplegic基因,命名为SfDpp, Open Reading Frame (ORF) 分析结果(图1)表明, SfDpp基因包含一个长度为954bp的开放阅读框(ORF),编码317个氨基酸。

[0139] 2.5.2白背飞虱SfDpp基因的时空表达分析

[0140] 通过RT-qPCR,使用引物列表1中所述的引物检测了SfDpp的相对表达水平。从收集的白背飞虱19个发育阶段,包括卵期、1-5龄若虫和0-48小时成虫的相对表达量结果来看, SfDpp在白背飞虱所有发育阶段都有表达。与5龄若虫和成虫相比,幼龄若虫(1-3龄若虫)的SfDpp mRNA水平相对较低。SfDpp的表达从4龄若虫的第2天开始上调,然后在蜕皮后观察到显著升高的表达水平,在40min(2/3小时)的成虫时达到峰值,随后转录丰度逐渐降低(图2)。本发明观察到白背飞虱通常在40min内完成伸展过程,这表明该基因在翅伸展发育阶段起着不可或缺的作用。

[0141] 为了检测SfDpp基因在白背飞虱不同组织部位中的表达水平,本发明解剖了羽化24小时成虫的头部、胸部、腹部、翅膀、腿部和表皮,并通过RT-qPCR检测了这6个组织中SfDpp的mRNA水平。结果表明(图3),该基因在不同组织中的表达量不同。SfDpp基因在头部和翅膀中表现出高转录丰度,而在胸部、足和表皮中转录水平较低,但在腹部观察到最低水平。这表明它主要在头部和翅膀中表达,并在眼睛和翅膀的发育中发挥重要作用。

[0142] 2.5.3白背飞虱SfDpp基因调控翅伸展的功能分析

[0143] 把SfDpp的dsRNA注射到4龄1天若虫体内后,每24h取样检测干扰效率,结果表明(图4A),干扰后24h, SfDpp的表达量降低了70%,48h的干扰效率达到了91.3%;检测SfDpp干扰后成功羽化的不同表型白背飞虱成虫SfDpp基因mRNA相对转录水平结果显示(图4B),翅畸形和死亡的白背飞虱SfDpp基因mRNA表达量均比对照(Control)的低,差异显著,而表型正常的白背飞虱成虫体内的SfDpp基因表达水平与对照相比差异不明显。对照组除了死亡的个体外,75%的若虫能成功羽化为表型正常的成虫(图4C),SfDpp基因干扰后,死亡和不能成功羽化死亡的个体占总数的29.2%;74.1%的个体翅完全褶皱、末端卷曲或弯折等翅不展(图4D)。

[0144] 综上,SfDpp在白背飞虱不同发育阶段和不同组织的表达水平不同。白背飞虱

SfDpp基因的表达模式表明,其与翅的伸展有关。本发明比较SfDpp在不同龄期的表达量,发现以翅展期表达量最高,这表明Dpp参与了调控翅的成熟和伸展。初羽化的成虫,他们的翅在背部折叠成团,因此需要顺利的伸展开来以便于获得飞行的能力来进行迁飞、觅食等生理活动。本发明发现,白背飞虱一般在40min完成翅的伸展,SfDpp的相对转录水平也在这一时期最高,而成虫在羽化1小时以后,翅已经展开完全覆盖住其腹部,SfDpp的表达量也随之降低。在本发明中,SfDpp在不同组织的表达量以头部和翅的最高,这表明,SfDpp在调控复眼的增殖和模式方面起着至关重要的作用。

[0145] 需要说明的是,在本文中,诸如术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。

[0146] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

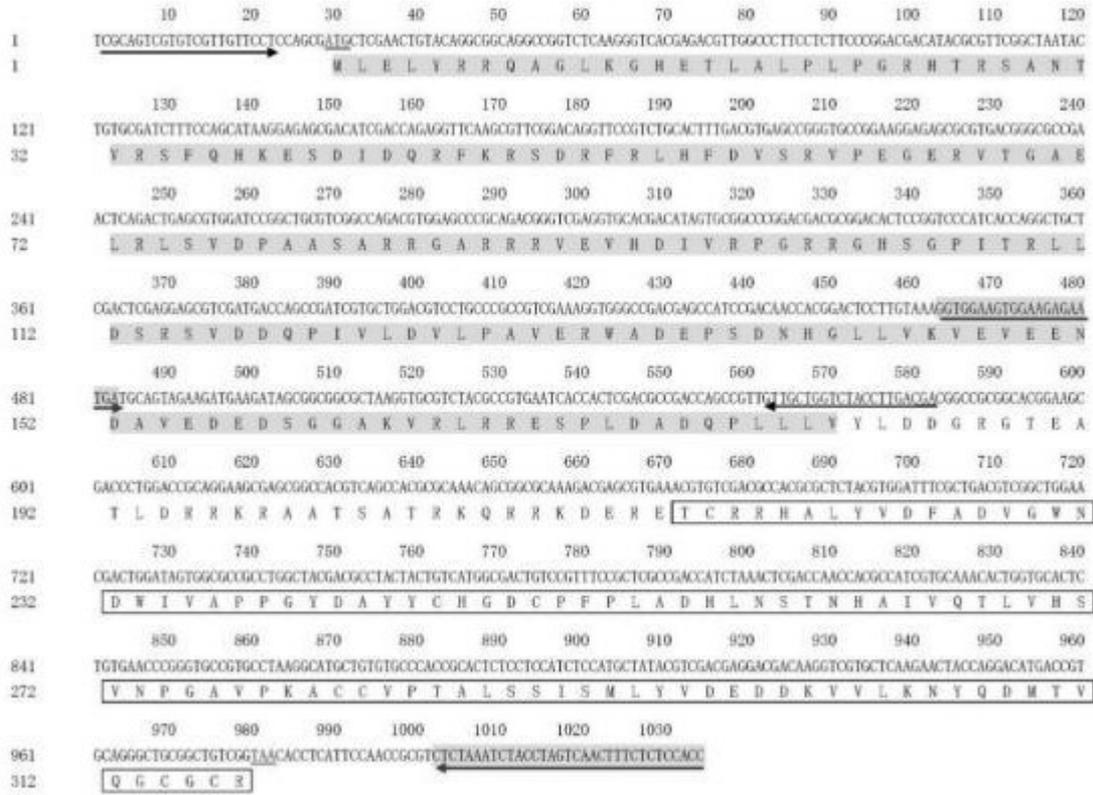


图 1

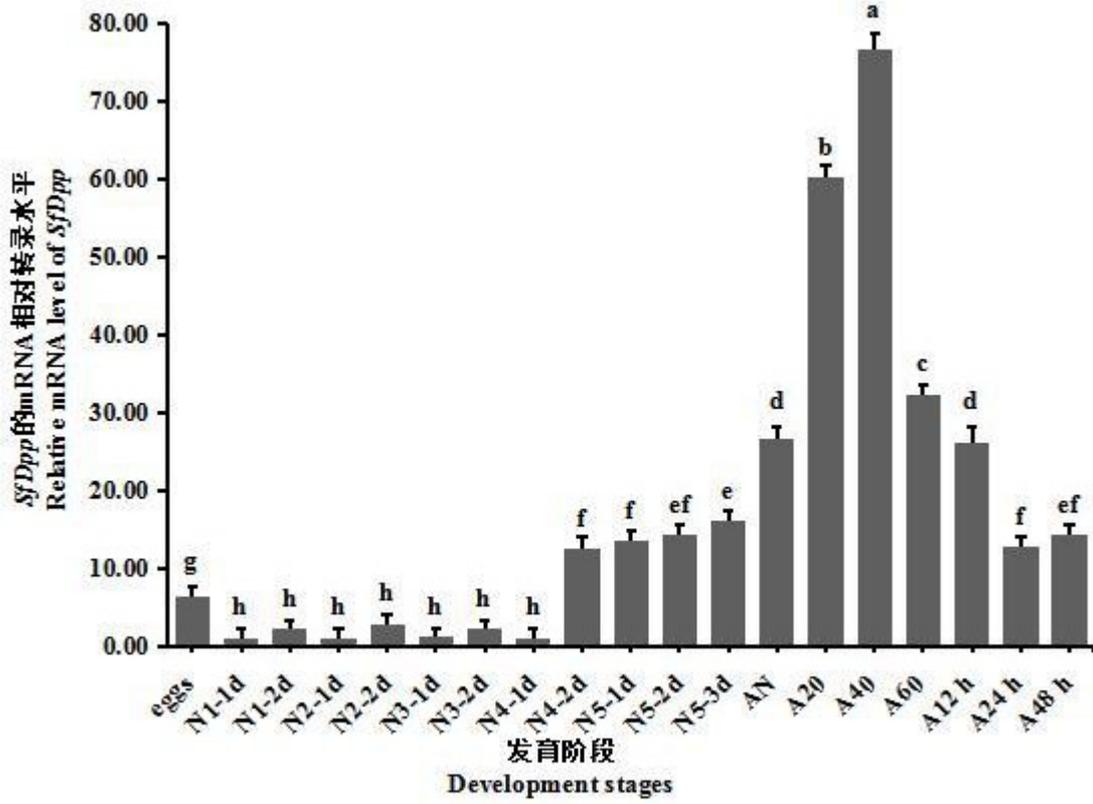


图 2

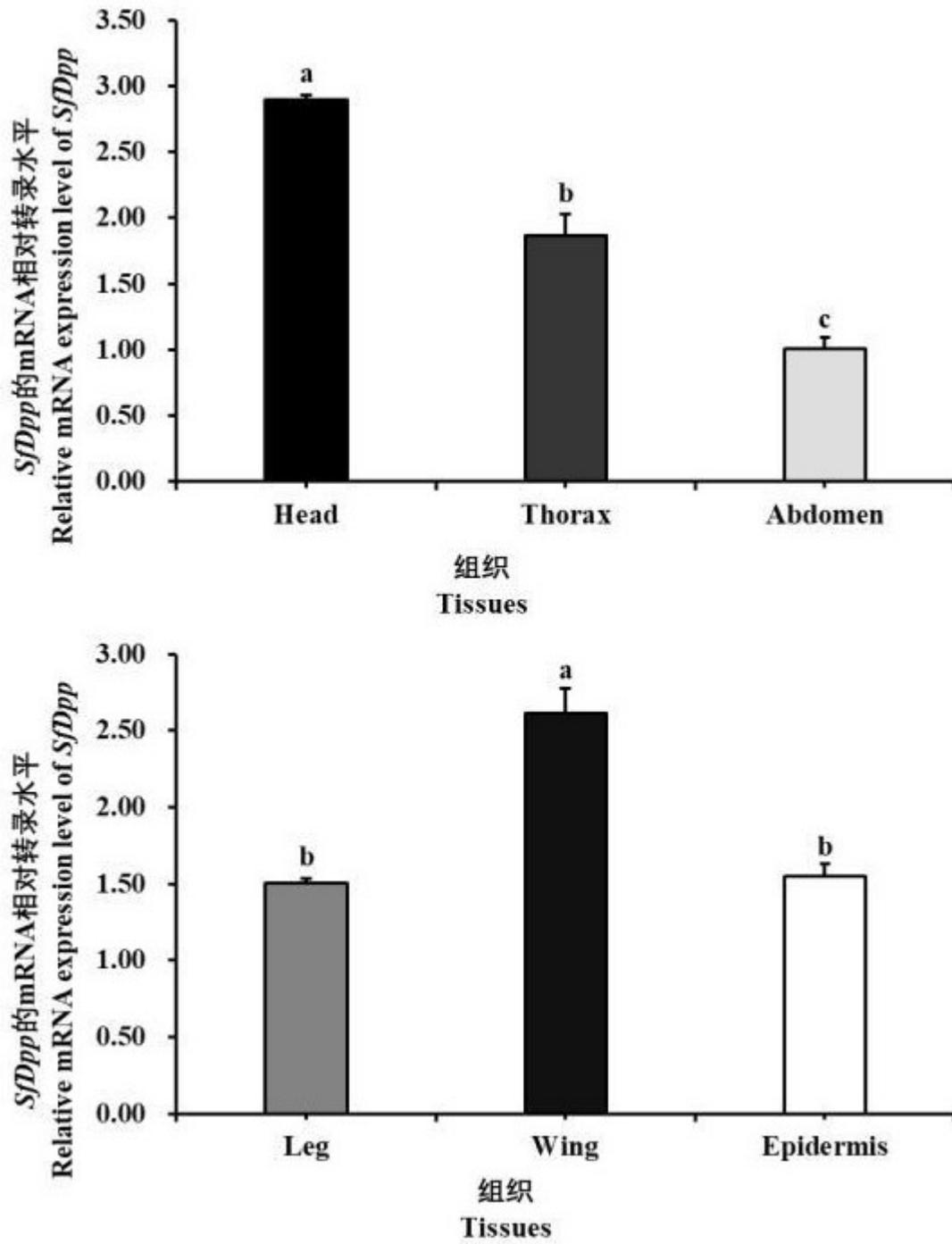


图 3

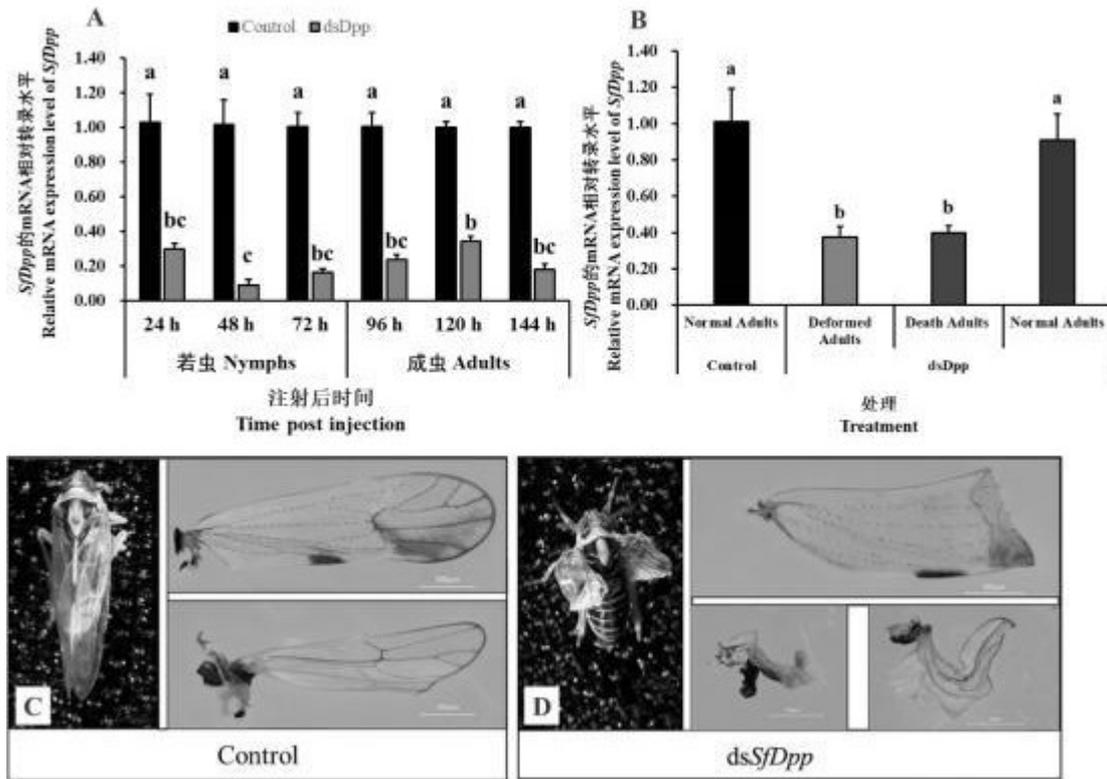


图 4