

白蜡虫 *ws* 基因 RNAi 载体构建及原核表达 dsRNA

王雪庆, 赵遵岭, 孙 涛, 陈晓鸣, 杨 璞*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要: [目的] 构建白蜡虫 (*Ericerus pela*) 蜡酯合酶 (wax synthase, WS) 基因干扰载体并建立其体外 dsRNA (double-stranded RNA, dsRNA) 原核表达体系, 低成本大量制备白蜡虫 *ws* 基因的 dsRNA。[方法] 克隆白蜡虫蜡酯合酶基因 *ws* 片段, 连入 L4440 载体, 将重组质粒转入大肠杆菌 HT115 感受态细胞, 经 IPTG 诱导获得与目的片段相对应的 dsRNA。[结果] 白蜡虫 *ws* 基因 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 载体成功构建, 重组质粒转入 HT115 感受态细胞经 IPTG 诱导后菌体成功表达 dsRNA, dsRNA 的平均获得量 $1\ 705\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。[结论] 该研究通过原核表达白蜡虫 *ws* 基因的 dsRNA, 为后续利用 RNAi 实验研究白蜡虫 *ws* 基因功能及作用机理奠定基础。

关键词: 白蜡虫; WS; L4440; 原核表达; dsRNA

中图分类号: S899.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)04-0070-05

Construction of RNA Interference Vector of *Ericerus pela* (Chavannes) *ws* Gene and Preparation of dsRNA by Prokaryotic Expression

WANG Xue-qing, ZHAO Zun-ling, SUN Tao, CHEN Xiao-ming, YANG Pu

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: [Objective] This study aims at construct the interference vector of *Ericerus pela* wax synthase gene and prokaryotic expression system in vitro, and prepare a large number of double-stranded RNA (dsRNA) of *E. pela ws* gene at low cost. [Method] The cloned *E. pela ws* gene fragment was inserted into L4440 vector to construct *E. pela ws*-L4440 gene interference vector. The recombinant plasmid was transformed into HT115 competent cell, then induced by IPTG to get the dsRNA corresponding to target fragment. [Result] The interference vector of *Ericerus pela ws* gene was successfully constructed in vitro, and the dsRNA can also be expressed by HT115 competent cell with transformed recombinant plasmid induced by IPTG. The average production of dsRNA was $1\ 705\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. [Conclusion] The expression of the dsRNA of *E. pela ws* gene by prokaryotic expression system may lay foundation for using RNAi technology to study the function and mechanism of *E. pela ws* gene.

Keywords: *Ericerus pela*; WS; L4440; prokaryotic expression; dsRNA

生物蜡酯普遍存在于自然界生物中, 蜡酯对生物生命活动具有储能、保护等诸多功能, 在生物生命活动中扮演的角色极为重要^[1-3]。昆虫和植物体表的蜡酯层能对抗有害细菌及真菌入侵, 同时还能减少体表水分蒸发、疏水御潮、防止紫外辐射、反射阳

光辐射、躲避天敌袭击^[4-7]。有些昆虫则特化了泌蜡的性状, 比如介壳虫, 这一类昆虫体表覆盖大量蜡分泌物形成的介壳^[8], 由于蜡酯的保护, 常规方法很难达到防治效果, 喷洒、涂抹等机械方法和化学治理方法也较为困难不容易操作, 且污染环境、耗资大、大

收稿日期: 2017-10-25

基金项目: 林业公益性行业科研专项 201504302; 国家自然科学基金 31572337; 中央级科研院所基金 CAFYBB2017ZB005

作者简介: 王雪庆(1993—), 女, 硕士研究生. 研究方向: 昆虫分子生物学. E-mail: wangxueqing1018@163.com

* 通讯作者: 杨 璞, 研究员, 主要从事分子生物学研究. E-mail: zjuyangpu@aliyun.com

量杀伤天敌,介壳虫已成为农林果树危害严重的害虫。如果对蜡酯进行破坏,则易达到介壳虫防治的效果。

不同物种的蜡酯合酶(wax synthase, WS)研究显示,在生物蜡酯合成过程中 WS 具有关键作用^[9-12]。笔者以我国历史悠久的特产资源昆虫—白蜡虫(一种介壳虫)为研究对象,鉴定出白蜡虫 WS,实验表明 WS 在白蜡虫泌蜡中发挥极其重要的作用^[13]。近年来,昆虫中对未知基因功能及作用机理研究主要是利用 dsRNA 诱导的 RNAi 实现^[14],由此本研究欲探索较低成本获取 dsRNA,以期建立一种通过原核菌体表达获取大量白蜡虫 *ws* 基因 dsRNA 的方法,从而为介壳虫防治提供一定参考。

用于昆虫实验研究的 dsRNA 合成方法,主要是试剂盒体外转录以及原核菌体表达获得,其中,dsRNA 合成试剂盒价格较高,合成 dsRNA 的量较少。因此,本研究将选取前期筛选的白蜡虫 *ws* 基因片段,采用原核菌体表达合成 dsRNA 的方法,利用原核表达系统制备 dsRNA,以期较低成本获取大量 dsRNA。

1 实验材料

本实验所用白蜡虫雄虫采自中国林业科学研究院资源昆虫研究所,载体 L4440 及菌株 HT115 均为新疆大学马纪教授赠送,*Escherichia coli* JM109 感受态细胞、Competent Cell Preparation Kit、琼脂糖凝胶电泳 Marker 及 Loading Buffer 购自大连宝生物工程有限公司;Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase、*Xba* I 及 *Hind* III 限制性核酸内切酶购自美国 NEB;M-MLV cDNA 合成试剂盒、RNaseOUT[™] 核酸酶抑制剂、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、RNase A、DNase I、Trizol 均购自 Thermo Fisher Scientific, Invitrogen[™] (美国);焦碳酸二乙酯(Diethyl pyrocarbonate, DEPC)、Luria-Bertani (LB) 固体和液体培养基、氨苄青霉素(Ampicillin, AMP)、四环素(Tetracyclines, TET)、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-糖苷(5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-α-D-galactopyranoside, X-gal)、溶菌酶、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;琼脂糖粉购自法国 Biowest; pGEM[®] T-Easy Vector System、T4 DNA 连接酶购自美国 Promega;无水乙醇、氯仿、异丙醇、甘油购自北京国药集团化学试剂有限公司。

2 研究方法

2.1 白蜡虫总 RNA 提取和引物设计

取适量白蜡虫雄虫于已灭菌离心管中,加入 Trizol 匀浆,提取白蜡虫雄虫总 RNA。用 M-MLV cDNA 合成试剂盒反转录得到单链 cDNA。利用软件 Primer 5.0 设计引物,在上游引物的 5' 端和下游引物 3' 端分别加上 *Hind* III、*Xba* I 酶切位点。

2.2 白蜡虫 *ws* 基因片段的克隆

以反转录获得的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增白蜡虫 *ws* 基因片段,利用未加酶切位点的引物组合进行扩增,反应体系分别为 10 μL: 5 × Q5 Reaction Buffer 2 μL、10 mmol · L⁻¹ dNTPs 0.2 μL、Q5 超保真 DNA 聚合酶 0.1 μL、模板 0.2 μL、上下游引物各 0.5 μL、ddH₂O 补足至 10 μL。扩增程序:98℃ 预变性 30 s;98℃ 变性 8 s,58℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 15 s,30 个循环;72℃ 延伸 2 min。

获得的 PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测鉴定,同时利用微量分光光度计(Thermo, 美国)初步测定其浓度。检测正确的 PCR 产物经稀释作为模版,用带酶切位点的引物进行 PCR 扩增,并对目的片段进行胶回收及纯化,与质粒 pGEM[®]T-Easy Vector 连接,重组质粒命名为 pGEM/EpelWS。重组质粒转化 JM109 感受态细胞,涂布于 LB 筛选平板(含有 100 μg · mL⁻¹ 氨苄青霉素、20 mg · mL⁻¹ X-gal 及 24 mg · mL⁻¹ IPTG)。

37℃ 恒温培养 12 h,挑取白色单菌落,培养后进行菌液 PCR 检测,同时提取重组质粒,将鉴定的阳性单克隆菌液送至昆明硕擎生物科技有限公司测序。

2.3 白蜡虫 WS RNA 干扰载体的构建

测序正确的 pGEM/EpelWS 重组质粒和 L4440 载体分别提取质粒,同时利用 *Xba* I 和 *Hind* III 37℃ 过夜双酶切,琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的片段和 L4440 载体,二者经 T4 连接酶(Promega, 美国)4℃ 过夜连接,重组质粒转入 JM109 感受态细胞,涂布于含有氨苄青霉素及四环素的 LB 固体培养基。37℃ 过夜培养,挑取白色单菌落,进行菌液 PCR 检测,将阳性重组质粒测序验证,重组质粒命名为 L4440/EpelWS。

利用 Competent Cell Preparation Kit 制备试剂盒,按照说明书操作制备 HT115 感受态细胞。将 L4440/EpelWS 重组质粒转入 HT115 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素和四环素抗性的 LB 固体培养

基。37℃过夜培养并挑取阳性单克隆,进行菌液PCR检测和双酶切检测。

2.4 dsRNA 的表达及纯化

将上述含有 L4440/EpelWS 的 HT115 菌液于 37℃ 条件下 100 mL 培养基中扩大培养 $OD_{600} = 0.4$ 左右,加入 IPTG 使其终浓度为 $0.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,继续培养过夜诱导表达 dsRNA。将菌液离心收集菌体,用浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶菌酶常温裂解菌体 5 min,Trizol 法提取 dsRNA,用灭菌的 DEPC 处理水溶解 dsRNA,并从溶解液中取出少量,利用超微量分光光度计测定其浓度,同时进行电泳检测。将获得的 dsRNA 进行 DNase I 和 RNase A 消化处理,除去其中的 DNA 和单链 RNA,以获得较纯的 dsRNA。

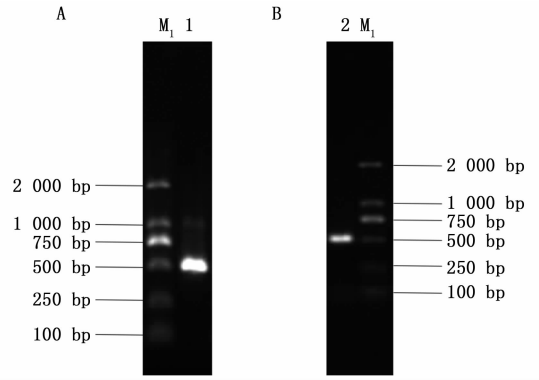
3 结果与分析

3.1 目的片段扩增及阳性单克隆筛选

以反转录获得的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增白蜡虫 *us* 基因片段约 500 bp,扩增的目的片段与预期片段基本相符(图 1 A)。以此 PCR 扩增产物为模板,采用带 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切位点的引物进行扩增,对所挑取的阳性重组单克隆 pGEM/EpelWS 菌液检测的结果也与预期片段基本相符(图 1 B),其测序结果正确。

3.2 重组载体的构建

利用酶 *Xba* I 和 *Hind* III 同时对 L4440 质粒和 pGEM/EpelWS 重组质粒进行双酶切,L4440 质粒双酶切的结果如图 2 A:第 1 个泳道是 *Xba* I 和



A: 为不含酶切位点的 pGEM/EpelWS 电泳检测结果; B: pGEM/EpelWS 菌液 PCR 检测; M₁: DL2000 DNA Marker

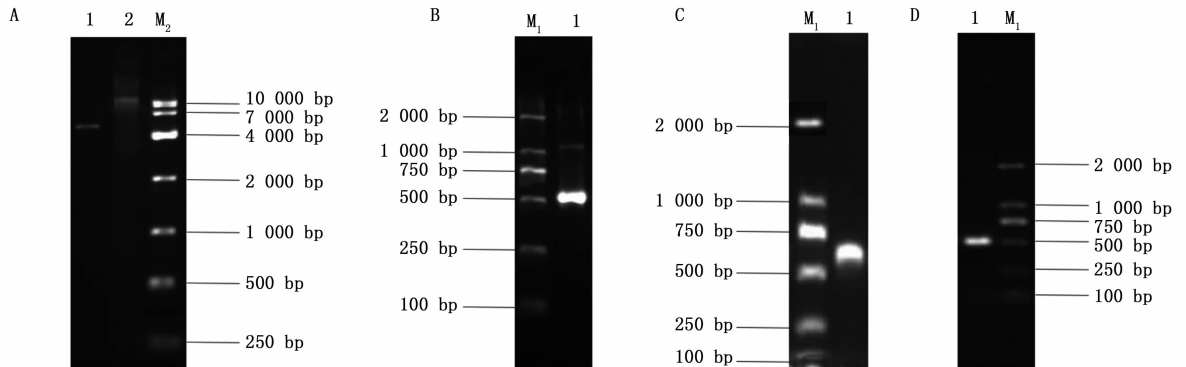
A. 1: the electrophoresis detection results of pGEM/EpelWS without restriction site; B. 2: PCR detection of pGEM/EpelWS bacterium liquid; M₁: DL2000 DNA Marker

图 1 目的片段克隆结果

Fig. 1 The cloning results of target fragment

双酶切之后的电泳结果,第 2 个泳道是 L4440 质粒电泳检测结果。pGEM/EpelWS 重组质粒双酶切的结果如图 2 B,即 pGEM/EpelWS 重组质粒经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切之后的电泳结果。二者经 T4 连接酶连接、转化,以白色单克隆的菌液为模版,特异性引物 PCR 扩增验证结果如图 2 C,检测结果与预期片段大小基本相符,菌液测序结果也正确。

上述测序正确的 L4440/EpelWS 菌液,对其提取质粒并转入 HT115 感受态细胞,挑取单克隆摇菌,菌液利用特异性引物检测,结果见图 2 D,也与预期片段基本相符。



A: 1 为载体 L4440 质粒经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切之后的结果,2 为 L4440 质粒电泳检测; B: 1 为带 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切位点的 pGEM/EpelWS 重组质粒经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切之后的结果; C: 1 为将目的片段连入 L4440 载体转化 JM109 感受态细胞后,菌液 PCR 检测结果; D: 1 为 L4440/EpelWS 质粒转入 HT115 感受态细胞,经特异性引物 PCR 扩增验证转化的菌液检测结果; M₁: DL2000 DNA Marker; M₂: DL10000 DNA Marker

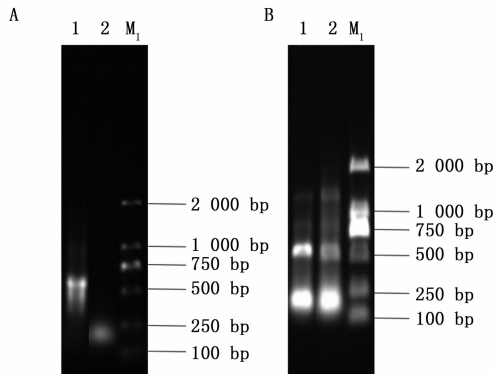
A. 1: the result of L4440 plasmid vector after double enzyme digestion with *Xba* I and *Hind* III; A. 2: the electrophoresis detection of L4440 plasmid; B. 1: The result of pGEM/EpelWS recombinant plasmid with *Xba* I and *Hind* III restriction site after double enzyme digestion with *Xba* I and *Hind* III; C. 1: PCR detection results of bacterium liquid after target fragment was inserted into L4440 and transformed the JM109 competent cell; D. 1: detection results of bacterium liquid transformed by L4440/EpelWS plasmid transferred into HT115 competent cell after specific primers PCR amplification and verification; M₁: DL2000 DNA Marker; M₂: DL10000 DNA Marker

图 2 载体构建

Fig. 2 The construction of the interference vector

3.3 原核诱导表达白蜡虫 *ws* 基因的 dsRNA

经 IPTG 诱导后表达的 dsRNA 电泳图(图 3)表明:转化 HT115 感受态细胞并经 IPTG 诱导后的 L4440/EpelWS 菌液成功表达了相应的 dsRNA,提取 dsRNA 的平均浓度为 $1\ 705\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,而未经 IPTG 诱导的 L4440/EpelWS 菌液未表达出相应 dsRNA;没有转化 HT115 感受态细胞的 L4440/EpelWS 菌液,在 IPTG 诱导前后均未表达出 dsRNA。对已经诱导表达的 dsRNA 进行 DNase I 和 RNase A 消化处理的电泳结果如图 3 B 所示。



A: 1 即 L4440/EpelWS 菌液经 IPTG 诱导后提取的 dsRNA, 2 即 L4440/EpelWS 菌液未经 IPTG 诱导提取 dsRNA 结果; B: 1 是经 DNase I 消化处理之后的电泳结果, 2 是经 RNase A 消化处理之后的电泳结果; M₁: DL2000 DNA Marker

A. 1: the dsRNA extracted from L4440/EpelWS bacterium liquid induced by IPTG; A. 2: the dsRNA extracted from L4440/EpelWS bacterium liquid without induction by IPTG; B. 1: extraction product of dsRNA treated by DNase I; B. 2: extraction product of dsRNA treated by RNase A; M₁: DL2000 DNA Marker

图 3 细菌中诱导表达 dsRNA *ws* 的鉴定

Fig. 3 Identification of dsRNA of *ws* gene produced in bacteria

4 讨论

目前,昆虫 RNAi 普遍利用注射法和饲喂法^[15],在昆虫中利用 RNAi 沉默特定基因的方法已经成熟,如通过显微注射胚胎和注射若虫或成虫血腔导致基因沉默^[16-18],但是注射法对昆虫有一定损伤甚至致死现象,如对黄粉虫 (*Tenebrio molitor*) 和 *Dendroides canadensis* 注射 dsRNA 后,注射 dsRNA 引起的昆虫死亡率在一定时间内呈上升趋势,同时抗冻蛋白(Antifreeze protein, AFP)基因 *afp* 表达量也有明显增加^[19-20];饲喂法最先是对 *Rhodnius prolixus* 和 *Epiphyas postvittana* 进行,其结果发现 RNAi 效果明显可有效降低目的基因转录^[21], Bilgi 等^[22] 对蚜

虫探索有效的饲喂 dsRNA 也明显达到蚜虫 RNAi 效果;此外,针对不同形态类型昆虫体表涂抹 dsRNA 也不失为较好的昆虫 RNAi 方法^[23],但是这种方法需要较多的 dsRNA。由于饲喂法的 RNAi 效果实现需用大量的 dsRNA,因此,如何获取大量 dsRNA 是降低成本广泛应用该方法的必要条件。

由于原核菌体表达获得 dsRNA 成本低、获取量较高等优点,现已用于鞘翅目、直翅目等昆虫及多种生物的基因功能研究^[24]。本研究采用原核菌体表达获得白蜡虫 WS 对应 dsRNA,与试剂盒合成 dsRNA 相比,其优点在于仅需少量菌液,即可在短时间内诱导获取大量目的基因的 dsRNA,同时其成本也大大降低。因 L4440 载体含有双向 T7 启动子和 lac 乳糖操纵子,大肠杆菌 HT115 为 RNase III 缺陷型菌株,所以菌液诱导表达目的基因 dsRNA 不会被 RNase III 酶切降解^[25],故 L4440 用于多种生物体外目的基因载体构建获取 dsRNA,如黄粉虫抗冻蛋白基因 *afp* 原核表达 dsRNA 重组载体构建,获得黄粉幼虫抗冻蛋白基因的 dsRNA,纯化后成功对黄粉幼虫进行 RNAi^[20];甘蔗二点螟 (*Chilo infuscatellus Snellen*) 蜕皮调节转录因子 *CiHR3* 的 RNAi 载体构建,利用获得的 dsRNA 饲喂甘蔗二点螟幼虫,可有效抑制 *CiHR3* 的正常表达^[26];中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) EsSox21b-like 基因利用原核表达制备 dsRNA^[27]。

5 结论

本研究利用原核表达系统通过细菌大量制备白蜡虫 *ws* 基因的 dsRNA, dsRNA 的平均获得量 $1\ 705\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,电泳检测显示拖尾现象不明显, dsRNA 的质量较好,仅需 50 mL 的菌液就可获得 $85.25\ \mu\text{g} \cdot \text{次}^{-1}$,与试剂盒 MEGAscript™ RNAi Kit with Manual 的 $50 \sim 100\ \mu\text{g} \cdot \text{次}^{-1}$ 获取量相当,可节省大量资金。后续将对研究对象白蜡虫进行 RNAi 操作,对白蜡虫 WS 功能展开深入研究,也为其他昆虫 dsRNA 合成提供参考和理论依据。

参考文献:

- [1] Cheng J B, Russell D W. Mammalian wax biosynthesis. II. Expression cloning of wax synthase cDNAs encoding a member of the acyltransferase enzyme family [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(36):37798-37807.
- [2] Stöveken T, Kalscheuer R, Malkus U, et al. The wax ester synthase/acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase from *Acineto-*

- bacter* sp. strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(4):1369–1376.
- [3] 孙涛, 王雪庆, 赵遵岭, 等. 越冬白蜡虫微生物多样性分析[J]. *林业科学研究*, 2017, 30(6):1009–1014.
- [4] 刘巍巍, 杨璞, 陈晓鸣. 白蜡虫热激蛋白基因在低温胁迫下的表达分析[J]. *林业科学研究*, 2013, 26(6):681–685.
- [5] Reiser S, Somerville C. Isolation of mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl coenzyme A reductase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(9):2969–2975.
- [6] 谢映平, 薛皎亮, 郑乐怡. 云南双蜡蚧蜡分泌物的超微形态与化学成分[J]. *昆虫学报*, 2004, 47(3):320–328.
- [7] 杨璞, 徐冬丽, 陈晓鸣, 等. 蜡酯合成途径及关键酶的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(7):695–703.
- [8] 谢映平, 薛皎亮, 张艳峰, 等. 蚧虫蜡分泌物的化学研究进展[J]. *应用昆虫学报*, 2004, 41(6):512–518.
- [9] 亓倩, 于淑惠, 孙涛, 等. 白蜡虫蜡酯合酶在昆虫细胞 S9 中的表达[J]. *林业科学研究*, 2016, 29(2):191–195.
- [10] 刘博文, 王雪庆, 孙涛, 等. 白蜡虫蜡酯合酶基因 cDNA 全长克隆及原核表达[J]. *林业科学研究*, 2016, 29(4):610–614.
- [11] Cheng J B, Russell D W. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-coenzyme a reductases with different substrate specificities and tissue distributions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(36):37789–37797.
- [12] Teerawanichpan P, Qiu X. Fatty acyl-CoA reductase and wax synthase from *Euglena gracilis* in the biosynthesis of medium-chain wax esters[J]. *Lipids*, 2010, 45(3):263–273.
- [13] Yang P, Zhu J Y, Gong Z J, et al. Transcriptome analysis of the Chinese white wax scale *Ericerus pela* with focus on genes involved in wax biosynthesis[J]. *Plos One*, 2012, 7(4):e35719.
- [14] Zhu F, Xu J, Palli R, et al. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*[J]. *Pest Management Science*, 2011, 67(2):175–182.
- [15] Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt J S, et al. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2011, 57(2):231–245.
- [16] Kennerdell J R, Yamaguchi S, Carthew R W. RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on *aubergine* and *spindle-E*[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(15):1884–1889.
- [17] Bucher, G, Scholten J, Klingler M, et al. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera)[J]. *Current Biology* Cb, 2002, 12(3):85–86.
- [18] Tomoyasu Y, Denell R E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development[J]. *Development Genes & Evolution*, 2004, 214(11):575–578.
- [19] Wang L. Identification and characterization of protein enhancers of antifreeze proteins from overwintering beetle larvae *Dendroides canadensis*[J]. *Dissertations & Theses-Gradworks*, 2005, 8(2):1120–1120.
- [20] 石萌, 刘小宁, 马纪, 等. 利用细菌表达 dsRNA 介导黄粉虫抗冻蛋白基因的 RNA 干扰[J]. *生物技术通报*, 2014, 46(8):113–119.
- [21] Araujo R N, Santos A, Pinto F S, 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 & Molecular Biology*, 2006, 36(9):683–693.
- [22] Bilgi V, Fosunyarko J, Jones M G. Using vital dyes to trace uptake of dsRNA by green peach aphid allows effective assessment of target gene knockdown[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(1):80.
- [23] Wang Y, Zhang H, Li H, et al. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control[J]. *Plos One*, 2011, 6(4):e18644.
- [24] Ratzka C, Gross R, Feldhaar H. Systemic gene knockdown in *Camponotus floridanus*, workers by feeding of dsRNA[J]. *Insectes Sociaux*, 2013, 60(4):475–484.
- [25] Newmark P A, Reddien P W, Cebrià F, et al. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(Suppl):11861–11865.
- [26] 张雨良, 黄启星, 张树珍, 等. 细菌介导 RNAi 研究甘蔗二点螟蜕皮调节转录因子 CiHR3 基因功能[J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50(05):1301–1310.
- [27] 刘志强, 陈洁, 邱高峰. 中华绒螯蟹 EsSox21b-like 基因干扰载体的构建及原核表达制备 dsRNA[J]. *生物技术通报*, 2014(6):134–138.

(责任编辑:张玲)