

网络出版时间:2020-04-17 16:27

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.10.012

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200417.1316.024.html

亚洲玉米螟 miR-1a-5p 表达与 Cry1Ab 蛋白敏感性的关系

徐丽娜¹, 胡 飞¹, 周子燕¹, 何康来², 胡本进¹

(1 安徽省农业科学院 植物保护与农产品质量安全研究所, 安徽 合肥 230031; 2 中国农业科学院 植物保护研究所, 北京 100193)

【摘 要】【目的】探索亚洲玉米螟 miR-1a-5p 表达与 Cry1Ab 蛋白敏感性的关系, 为揭示 miRNA 在昆虫 Bt 抗性产生过程中的作用提供依据。【方法】通过荧光定量 PCR, 研究亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性品系 (ACB-AbR) 和 Bt 敏感品系 (ACB-BtS) 表皮及中肠组织中 miR-1a-5p 的表达差异。以 Sf9 细胞为研究对象, 通过转染 miR-1a-5p 促进剂 (Mimics) 或抑制剂 (Inhibitor) 改变细胞中 miR-1a-5p 的表达量, 测定不同处理细胞对 Cry1Ab 蛋白的敏感性, 探讨 miR-1a-5p 表达量改变后 Sf9 细胞对 Cry1Ab 蛋白的敏感性变化。通过荧光素酶报告试验, 研究 miR-1a-5p 对潜在靶标基因 Unigene12370_All 的调控作用。【结果】ACB-AbR 表皮组织中 miR-1a-5p 的表达量显著高于 ACB-BtS 表皮组织, ACB-AbR 中肠组织中 miR-1a-5p 的表达量显著低于 ACB-BtS 中肠组织; ACB-AbR 和 ACB-BtS 幼虫表皮组织中 miR-1a-5p 的表达量均显著高于其中肠组织。Sf9 细胞 miR-1a-5p 表达量升高导致 Sf9 细胞对 Cry1Ab 蛋白的敏感性增强, 反之亦然。荧光素酶报告试验结果提示, miR-1a-5p 与靶标基因 Unigene12370_All 可以结合。【结论】亚洲玉米螟 miR-1a-5p 表达量的变化与其对 Cry1Ab 蛋白敏感性的改变有关。

【关键词】 亚洲玉米螟; microRNA; miR-1a-5p; Sf9; Cry1Ab 蛋白敏感性

【中图分类号】 S435.132

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2020)10-0099-09

Relationship between miR-1a-5p expression and sensitivity of Cry1Ab protein of *Ostrinia furnacalis*

XU Lina¹, HU Fei¹, ZHOU Ziyang¹, HE Kanglai², HU Benjin¹

(1 Institute of Plant Protection and Agro-Products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031, China; 2 Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Objective】This study explored the relationship between *Ostrinia furnacalis* miR-1a-5p expression and Cry1Ab sensitivity to provide basis for clarifying the mechanism of Bt resistance in insects. 【Method】The expression levels of miR-1a-5p in cuticle and midgut of ACB-AbR and ACB-BtS were determined by real-time quantitative PCR. The sensitivity of Sf9 cells to Cry1Ab protein was analyzed by cell transfected with miR-1a-5p mimics or inhibitor and Cry1Ab protein sensitivity bioassay. The regulatory effect of miR-1a-5p on target transcript Unigene12370_All was verified by the dual luciferase reporting test. 【Result】The expression level of miR-1a-5p in cuticle of ACB-AbR was significantly higher than that in cuticle of ACB-BtS. In midgut of ACB-AbR, the expression level of miR-1a-5p was significantly lower than that in midgut of ACB-BtS. The expression levels of miR-1a-5p in cuticle of ACB-AbR and ACB-BtS larvae were significantly higher than those in midgut. Transfection with miR-1a-5p mimics increased the ex-

【收稿日期】 2019-09-30

【基金项目】 安徽省农业科学院科研团队项目(2019YL075, 2019YL049)

【作者简介】 徐丽娜(1982—), 女, 河北蔚县人, 副研究员, 博士, 主要从事昆虫毒理与生物防治研究。E-mail: caasxln@163.com

【通信作者】 胡本进(1971—), 男, 安徽宿松人, 副研究员, 主要从事害虫综合防治研究。E-mail: hubenjin@126.com

pression of miR-1a-5p in Sf9 cells, resulting in increased sensitivity to Cry1Ab protein. Conversely, the transfection with miR-1a-5p inhibitor decreased the expression of miR-1a-5p in Sf9, and the sensitivity to Cry1Ab insecticidal protein decreased. Luciferase assay showed that miR-1a-5p could bind with the transcript Unigene12370_All. 【Conclusion】 The difference of miR-1a-5p in *O. furnacalis* were related to the changes of *O. furnacalis* to Cry1Ab.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; microRNA; miR-1a-5p; Sf9; Cry1Ab sensitivity

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Asian corn borer, ACB) 是影响我国玉米产量和品质的重要害虫, 常年为害导致玉米减产 10% 左右, 大发生年份玉米产量损失可至 30% 以上, 甚至绝收^[1]。研究发现, 转 Bt (*Bacillus thuringiensis*) 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟具有良好的控制效果^[2-5], 然而, 连续多代室内抗性筛选发现, 亚洲玉米螟对 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1F、Cry1Ie 等多种 Bt 蛋白均可产生抗性, 尤其是亚洲玉米螟中的 Cry1Ab 抗性品系, 不仅可以在表达 Cry1Ab 蛋白的转基因玉米 (Bt11) 上存活, 而且对 Cry1Ac、Cry1F、Cry1Ah 等多种 Bt 蛋白表现出交互抗性^[6-9]。因此, 研究亚洲玉米螟 Bt 抗性的产生机理, 对于 Bt 抗性早期监测、抗性治理策略制定、转基因玉米研发及其科学应用意义重大。

现有研究发现, 亚洲玉米螟中肠 Bt 受体蛋白基因表达量改变以及非结合蛋白酶活性差异, 均与其 Bt 抗性有关。与 Bt 敏感品系相比, 亚洲玉米螟 Cry1Ab、Cry1Ac 及 Cry1Ah 抗性品系体内均存在氨肽酶 N、ATP 转运蛋白、碱性磷酸酶、类钙黏蛋白、V-ATPase、热激蛋白、细胞色素 P450、谷胱甘肽 S-转移酶、类胰蛋白酶、羧酸脂酶等多种抗性相关基因差异表达的现象^[10-12]。酶活性分析发现, Cry1Ab 抗性种群的类胰蛋白酶酶活性强于 Bt 敏感品系^[13]。然而, 对这些 Bt 抗性相关基因的表达调控机理却并不清楚。

微小 RNA (MicroRNA, miRNA) 是一类高度保守、具有调控作用的非编码小分子 RNA^[14], 它可以靶向结合 mRNAs, 在转录后水平调控基因表达^[15]。自从首例线虫 (*Caenorhabditis elegans*) miRNAs 被报道以来, 许多研究发现, miRNAs 参与调控脊椎动物、无脊椎动物、植物、病毒等多种生物的细胞增殖、分化、凋亡和发展过程^[16]。近年来, 随着利用人工合成 miRNA 调节内源 miRNA 表达技术的日渐成熟, 对 miRNA 功能的研究也逐步深入。此类研究常会用到 miRNA 促进剂 (mimics) 或抑制剂 (inhibitor), 其中 miRNA mimics 是模拟生物体

内源的 miRNAs, 通过化学合成得到的、能够增强内源性 miRNA 沉默作用、降低细胞内蛋白表达量、进行功能获得性研究的人工 miRNA 分子; 而 miRNA inhibitor 是化学修饰的专门针对细胞中特异的靶 miRNA 的抑制剂, 可削弱内源 miRNA 的基因沉默效应, 提高蛋白表达量, 从而进行功能缺失性研究。

miR-1 是一类功能研究较为完善的 miRNA, 它可以调控哺乳动物肌肉的生长、分化^[17-18], 参与心脏的发育^[19], 还可调节许多致癌基因的表达^[20-21]。miR-1 还可调控昆虫的生长、发育等多种生理活动, 家蚕 (*Bombyx mori*) miR-1 通过调节卵黄膜蛋白基因 (BmVMP23) 的表达, 影响家蚕卵结构的完整性^[22]; 果蝇 (*Drosophila melanogaster*) miR-1 参与其免疫调节过程^[23]; 病菌感染的埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 体内 miR-1 表达量显著改变^[24]; miR-1 家族的 miR-1-3p 可以通过调控谷胱甘肽 S-转移酶基因 (TCGSTM4) 的表达, 影响朱砂叶螨 (*Tetranychus cinnabarinus*) 对丁氟螨酯的抗性水平^[25]。前期高通量测序发现, 属于 miR-1 家族的 miR-1a-5p 在亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性幼虫全虫中的表达量显著高于敏感品系, 提示亚洲玉米螟 miR-1a-5p 表达量与 Cry1Ab 蛋白敏感性有关^[10]。鉴于此, 本研究首先通过 qPCR, 分析了亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性品系 (ACB-AbR) 和 Bt 敏感品系 (ACB-BtS) 的表皮及中肠组织 miR-1a-5p 的表达量差异; 进而以草地贪夜蛾 Sf9 细胞为对象, 通过转染 miR-1a-5p 促进剂 (Mimics) 或抑制剂 (Inhibitor), 分析不同处理组细胞对 Cry1Ab 蛋白的敏感性变化, 以初步验证 miR-1a-5p 的功能; 最后, 通过双荧光素酶报告试验, 验证 miR-1a-5p 与潜在靶标转录本 Unigene12370_All 的结合关系, 以期为进一步解析亚洲玉米螟 Bt 抗性产生机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 昆虫材料制备及细胞培养

亚洲玉米螟 Bt 敏感品系 (ACB-BtS) 和 Cry1Ab 抗性品系 (ACB-AbR) 的初始虫源均采自陕西省常

规玉米田。ACB-BtS 在室内用无琼脂半人工饲料连续饲养多代,饲养过程中,不接触任何 Bt 产品和其他杀虫剂;ACB-AbR 是在 ACB-BtS 基础上用含 Cry1Ab 蛋白的无琼脂半人工饲料连续汰选多代的室内种群^[6]。取 ACB-BtS 和 ACB-AbR 品系 5 龄初期幼虫,饥饿处理 12 h 后,收集全虫,冰浴解剖,获得中肠和表皮组织,迅速存放于液氮,用于 RNA 提取。每部分组织各解剖 10 头幼虫为 1 个处理,每处理重复 3 次。

miR-1a-5p 转染所用草地贪夜蛾 Sf9 昆虫细胞,购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,在温度 28 ℃、pH 7.2~7.4 条件下,使用 Hyclone SH30809.01B 改良型 RPMI-1640 培养基(Hyclone,美国)培养。荧光素酶活性试验所用 293T 细胞(实验室保存)在 37 ℃、5%(体积分数)CO₂ 条件下,使用含有 10%(体积分数)胎牛血清、1%(体积分数)双抗的 DMEM 培养基(Thermo,美国)培养。

1.2 亚洲玉米螟总 RNA 提取及 cDNA 模板制备

取亚洲玉米螟各组织 0.2~0.3 g,加入液氮充分研磨至粉末状,转移到 1.5 mL 去 RNA 酶离心管中,加入 Trizol (Invitrogen, 美国),按说明书操作提取总 RNA。各处理细胞培养 48 h 后弃培养基,加入 1 mL PBS 清洗 1 min;弃去 PBS,加入 1 mL 0.25%(质量分数)胰蛋白酶消化 1 min;收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min;收集沉淀,向沉淀细胞中加入 Trizol 并提取总 RNA。

miR-1a-5p 分析所用 cDNA 模板,使用 GoScrip

Reverse Transcriptase (Promega, 美国)反转录总 RNA 获得。首先在去 RNA 酶离心管中,加入总 RNA 500 ng,随机引物 0.5 μL,miR-1a-5p 反转录引物 0.5 μL(表 1),RNase-Free H₂O 补充至 10 μL。70 ℃ 5 min,冰浴 5 min。然后取 GoScript™ 5×Reaction Buffer 4.0 μL,MgCl₂ 2.0 μL,PCR Nucleotide Mix 1.0 μL,Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL,GoScript™ Reverse Transcriptase 1.0 μL,RNase-Free H₂O 1.5 μL,加入上述 10 μL 混合物中。混匀后 25 ℃ 5 min,42 ℃ 60 min,70 ℃ 15 min。

基因扩增 PCR 所用 cDNA 模板,使用 Reverse Transcription System (Promega, 美国)反转录总 RNA 获得。反应体系包括 MgCl₂ 4 μL,Reverse Transcription 10×Buffer 2 μL,dNTP Mixture 2 μL,Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL,AMV Reverse Transcriptase 15 U,Random Primers 0.5 μg,总 RNA 1 μg,加 RNase-Free H₂O 补充至 20 μL。反应程序为:室温 10 min,42 ℃ 15 min,95 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min。

1.3 亚洲玉米螟不同组织 miR-1a-5p 表达量的测定

以 ACB-BtS 和 ACB-AbR 的表皮、中肠组织 cDNA 为模板,开展荧光定量 PCR (real-time PCR, qPCR)分析,U6 作为内参基因,qPCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,本试验所用引物信息见表 1。

表 1 试验所用引物信息
Table 1 Information of primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	用途 Application
miR-1a-5p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATA-CGACTATGGG	miRNA 反转录 miRNA transcription
miR-1a-5p-FQ	CACGCACCGTGCTTCCTT	miRNA 定量 PCR
miR-1a-5p-RQ	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA	miRNA real-time PCR
U6-F	TGGAACGATACAGAGAAG	内参基因 U6 扩增
U6-R	GAATTTGCGTGTCTACCTTG	U6 amplification reference gene
12370-F	GCAGTGATACATTTGCCAGAA	Unigene12370_All 扩增
12370-R	GTCAAGTTCATTCAGCTAATC	Unigene12370_All amplification
WT-3'UTR-F	AGATCGCCGTGTAATTCTAGAGCTACACTTACTCCTTCCAC	Unigene12370_All-WT-3'UTR 扩增
WT-3'UTR-R	GCCGGCCGCCCGACTCTAGACAAGATCAGTTTACACCAAC	Unigene12370_All-WT-3'UTR amplification
MU-3'UTR-F	TCCACGGATCAATTAGCAAC	Unigene12370_All-MU-3'UTR 扩增
MU-3'UTR-R	GTTGCTAATTGATCCGTGGATTTACATGTGTGGGCTGCAC	Unigene12370_All-MU-3'UTR amplification
miR-1a-5p-F	GTACCCCGTGCTTCCTTACTTCCCATCTCGAGATGGGAAG-TAAGGAAGCACGG	miR-1a-5p 扩增
miR-1a-5p-R	AATTCCTCGTGCTTCCTTACTTCCCATCTCGAGATGGGAAG-TAAGGAAGCACGG	miR-1a-5p amplification

qPCR 反应体系为:2×qPCR Mix (Promega, 美国)7.5 μL,10 μmol/L 正、反向引物各 1.0 μL,反转录产物 2.0 μL,ddH₂O 3.5 μL。qPCR 反应程序为:95℃预变性 2 min;95℃变性 15 s,60℃退火 1 min,循环 40 次。使用 2^{-ΔΔC_t} 方法,以 ACB-BtS 表皮和中肠组织中 miRNA-1a-5p 的表达量为标准,分析其在 ACB-AbR 表皮和中肠组织中的相对表达量;以 ACB-BtS 和 ACB-AbR 品系中肠中 miR-1a-5p 的表达量为标准,分析其在两品系表皮中的相对表达量。

1.4 Sf9 细胞转染及不同处理 miR-1a-5p 表达量的测定

分别设置转染 miR-1a-5p 促进剂(Mimics)、miR-1a-5p 抑制剂(Inhibitor)和无意义链(Control) 3 个处理,以未转染寡核苷酸链的正常细胞作为空白对照(Normal)。根据前期高通量测序获得的亚洲玉米螟 miR-1a-5p 序列,由上海吉玛制药技术有限公司合成 miR-1a-5p Mimics (5'-CCGTGCTTC-CTTACTTCCCAT-3')、Inhibitor (5'-TACCCTTCATTCCTTCGTGCC-3') 和 Control (5'-ACGU-GACACGUUCGGAGAAUU-3') 序列。以 2×10⁵ 个/mL 将 Sf9 细胞接种于 6 孔细胞培养板,每孔 1 mL,培养 24 h,待生长至 70% 融合时,使用转染剂 Lipofectamine[®] RNAi MAX Reagent (Thermo Fisher, 美国)进行转染,操作步骤参照试剂说明书。通过 qPCR,分析转染 24 和 48 h 后各处理 miR-1a-5p 的表达量,研究各处理 miRNA 表达被促进或抑制的效果。反应体系、程序和分析方法同 1.3 节。

1.5 Sf9 细胞对 Cry1Ab 蛋白敏感性的测定

将各处理 Sf9 细胞于 1 200 r/min 离心 3 min,弃上清后,加入 6 mL 完全培养基,28℃恒温培养箱中复苏。24 h 后观察细胞生长情况,细胞密度达到 80% 以上时进行传代。待细胞长满后调整细胞浓度为 5×10⁴ mL⁻¹,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL,28℃恒温培养箱中培养 24 h。

设置 Cry1Ab 蛋白(Envirologix,美国)质量浓度分别为 0(空白对照),100,200,300,400,500,800 μg/mL,每处理重复 3 次,放置 4 h 后在接种 Sf9 细胞的 96 孔培养板中,每孔加入 10 μL MTT,再于 28℃恒温培养箱中培养 4 h,吸取孔内液体,并加入 150 μL DMSO,于室温振荡 10 min。酶标仪 492 nm 波长下测 OD 值,利用 Excel 中 STDEV 函数计算各处理组的 OD₄₉₂ 均值及标准差,按照下述公式计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率=(空白对照组 OD₄₉₂ - 处理组 OD₄₉₂)/空白对照组 OD₄₉₂×100%。

1.6 miR-1a-5p 靶基因的预测

基于前期获得的转录组测序结果,以在 ACB-BtS 和 ACB-AbR 幼虫中差异表达的转录组测序数据(GenBank 登录号:SRP046207)^[10] 为基础,利用 RNAhybrid (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)在线预测 miR-1a-5p 的潜在靶标基因。根据潜在靶标基因的转录组测序信息设计引物 12370-F 和 12370-R (表 1),以 ACB-BtS 5 龄幼虫 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增获得靶标基因序列,测序验证后利用 NCBI Blast 进行序列信息分析。

1.7 荧光素酶活性试验

根据预测的 miR-1a-5p 与靶标基因的结合位置,设计靶标基因 3'-UTR 野生型和突变型扩增引物:WT-3' UTR-F、WT-3' UTR-R 和 MU-3' UTR-F、MU-3' UTR-R (表 1),通过重组 PCR 扩增获得靶标基因结合位点片段和结合位点突变片段,测序验证并经过 Xba I 酶切后,连接于 pGL3-Control 载体(Promega),形成 pGL3-WT 和 pGL3-MU。使用 5'端分别为 Kpn I、EcoR I 酶切位点的引物 miR-1a-5p-F 和 miR-1a-5p-R (表 1),PCR 扩增获得 miR-1a-5p 片段,测序验证后酶切,并与 pmR-mCherry (Clontech)载体相连接,形成 pmR-mCherry-miR-1a-5p,提取质粒备用。

待 96 孔板中 293T 细胞密度达到 70% 时,分别取 2 μg 质粒、125 μL Opti-MEN 培养基(Gibco, USA),使用 Lipofectamine 2 000 (Invitrogen, USA)转染细胞,48 h 后收集细胞进行荧光活性检测。其中 2 μg 质粒分别设置 1 μg pmR-mCherry-miR-1a-5p+1 μg pGL3-WT 质粒+0.001 μg Renilla (其中 Renilla 用于归一)、1 μg pmR-mCherry-miR-1a-5p+1 μg pGL3-MU 质粒+0.001 μg Renilla、1 μg pmR-mCherry 空载体+1 μg pGL3-WT 质粒+0.001 μg Renilla(对照)共 3 个处理,每处理重复 5 次。

1.8 数据统计与分析

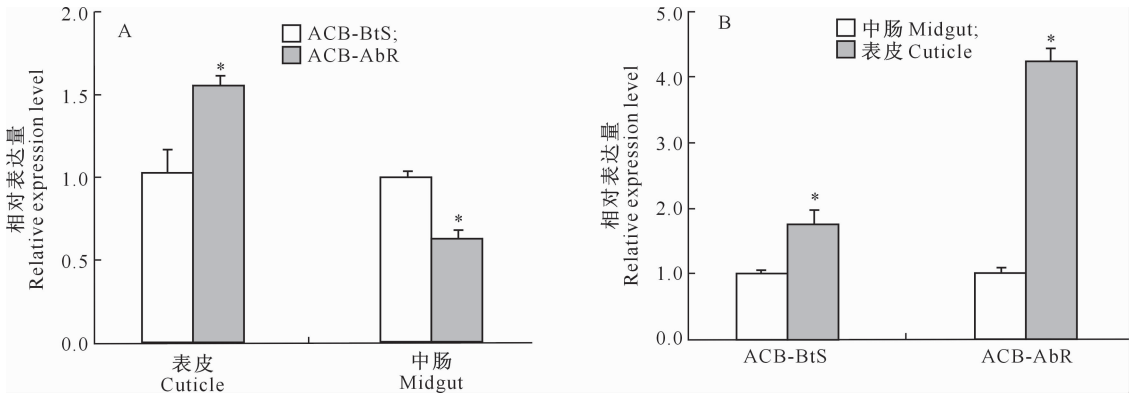
使用 SAS 软件,分析细胞增殖抑制率、直线回归方程,计算细胞增殖抑制中浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀),即细胞增殖抑制率为 50% 时对应的 Cry1Ab 蛋白质量浓度,以及 95% 置信限;并进行方差分析,对 2 组样本间的差异性进行 t 检验,2 组以上样本进行 LSD 多重比较。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 亚洲玉米螟不同组织中 miR-1a-5p 的表达量

为进一步明确亚洲玉米螟 Cry1Ab 敏感(ACB-BtS)和抗性(ACB-AbR)品系 miR-1a-5p 的表达特点,利用 qPCR 方法对两品系 5 龄幼虫表皮和中肠组织的 miR-1a-5p 表达量进行分析,结果(图 1-A)

显示,ACB-AbR 幼虫表皮中 miR-1a-5p 表达量显著高于 ACB-BtS 表皮,前者是后者的 1.51 倍;ACB-AbR 幼虫中肠中 miR-1a-5p 表达量显著低于 ACB-BtS 中肠,表达量仅为敏感品系 ACB-BtS 的 62%。由图 1-B 可知,ACB-BtS 和 ACB-AbR 幼虫表皮 miR-1a-5p 表达量均显著高于其中肠,表达量分别达到中肠组织的1.74和 4.20 倍。



图中数据为“平均值±标准误”,柱上星号表示经 t 检验差异显著($P<0.05$)

Data in the figure are “mean±SE”. The asterisk above bars indicate significant difference by t -test ($P<0.05$)

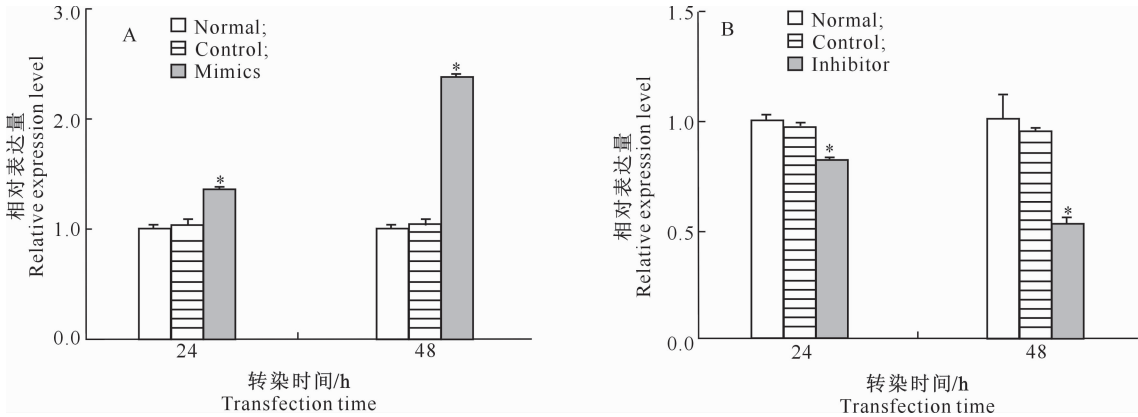
图 1 亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性和敏感品系幼虫 miR-1a-5p 的表达水平

Fig. 1 Expression level of miR-1a-5p in *Ostrinia furnacalis* larvae with susceptibility to Cry1Ab

2.2 miR-1a-5p 转染 Sf9 细胞的效果

使用 miR-1a-5p Mimics、Inhibitor 和 Control 分别转染 Sf9 细胞,结果(图 2-A)显示,与空白对照组(Normal)相比,Control 组 miR-1a-5p 表达量无显著差异;miR-1a-5p Mimics 转染组 miR-1a-5p 表

达量比 Normal 和 Control 组均显著上升,24 和 48 h 后分别达到 Normal 组的 1.36 和 2.38 倍;由图 2-B 可见,miR-1a-5p Inhibitor 转染组 miR-1a-5p 表达量比 Normal 和 Control 组均显著下降($P<0.05$),24 和 48 h 后分别为 Normal 组的 81%和 52%。



A. 转染 miR-1a-5p Mimics;B. 转染 miR-1a-5p Inhibitor;图中数据为“平均值±标准误”,柱上星号表示与 Normal 组比较具有显著性差异($P<0.05$)。Normal. 未转染寡核苷酸序列;Control. 转染无意义序列;Mimics. 转染 miR-1a-5p 模拟物序列;Inhibitor. 转染 miR-1a-5p 抑制物序列

A. Transfection with miR-1a-5p mimics;B. Transfection with miR-1a-5p Inhibitor. Data in the figure are “mean±SE”.

The asterisk above bars indicate significant difference from the Normal ($P<0.05$). Normal. Not transfected with oligonucleotide sequence;Control. Transfected with meaningless sequence;Mimics. Transfected with miR-1a-5p mimics sequence;Inhibitor. Transfected with miR-1a-5p inhibitor sequence

图 2 Sf9 细胞不同转染组的 miR-1a-5p 表达量

Fig. 2 Expression level of miR-1a-5p in Sf9 transfected with different treatments

2.3 miR-1a-5p 表达量对 Sf9 细胞 Cry1Ab 蛋白敏感性的影响

为了研究 miR-1a-5p 表达量变化与 Cry1Ab 蛋白敏感性的关系,以 Sf9 细胞为对象,通过转染 miR-1a-5p Mimics 或 Inhibitor,促进或抑制细胞中 miR-1a-5p 表达量,测定不同处理组 Sf9 细胞对 Cry1Ab 蛋白的敏感性。结果(表 2)显示,成功转染

miR-1a-5p Mimics 后,Sf9 细胞的 IC₅₀ 为 148. 6 μg/mL,显著低于 Control 组和 Normal 组;转染 miR-1a-5p Inhibitor 后,Sf9 细胞的 IC₅₀ 为 200. 95 μg/mL,显著高于 Control 组和 Normal 组。结果提示,miR-1a-5p 表达量升高导致 Sf9 细胞对 Cry1Ab 蛋白的敏感性增强。

表 2 亚洲玉米螟 miR-1a-5p 对 Sf9 细胞 Cry1Ab 蛋白敏感性的影响
Table 2 Effects of *Ostrinia furnacalis* miR-1a-5p on Cry1Ab sensitivity in Sf9 cells

组别 Group	Cry1Ab 质量浓度/(μg·mL ⁻¹) Concentration of Cry1Ab	平均值±标准差 (OD ₄₉₂) Mean±SE	细胞增殖抑制率/% Inhibition rate of cell proliferation	抑制中浓度(95%置信限)/ (μg·mL ⁻¹) IC ₅₀ (95% confidence interval)
Normal	0	0.937±0.013		181.1(111.6~282.3)
	100	0.514±0.010	45.13	
	200	0.380±0.004	59.43	
	300	0.342±0.004	63.49	
	400	0.322±0.008	65.62	
	500	0.317±0.004	66.16	
	800	0.303±0.005	67.69	
Control	0	0.894±0.008		175.3(100.6~289.4)
	100	0.473±0.011	47.04	
	200	0.336±0.004	62.37	
	300	0.328±0.008	63.34	
	400	0.321±0.003	64.12	
	500	0.303±0.008	66.06	
	800	0.289±0.003	67.70	
Mimics	0	0.837±0.024		148.6*(99.0~215.2)
	100	0.427±0.004	48.98	
	200	0.307±0.010	63.36	
	300	0.294±0.010	64.88	
	400	0.269±0.008	67.82	
	500	0.232±0.007	72.32	
	800	0.213±0.005	74.59	
Inhibitor	0	1.006±0.006		200.95*(137.85~292.94)
	100	0.583±0.017	42.08	
	200	0.507±0.014	49.57	
	300	0.493±0.019	50.99	
	400	0.389±0.015	61.37	
	500	0.374±0.020	62.86	
	800	0.337±0.018	66.53	

注: * 表示与 Control 组和 Normal 组相比具有显著性差异($P<0.05$)。
Note: * mean significant difference from the Control and Normal group ($P<0.05$).

2.4 miR-1a-5p 与靶标基因的结合关系

以 ACB-BtS 和 ACB-AbR 幼虫中差异表达的转录组测序数据为基础,利用 RNAhybrid 预测发现,Unigene12370_All 是 miR-1a-5p 的潜在靶标基因(图 3-A)。为了进一步明确二者的结合关系,首先以 ACB-BtS 5 龄幼虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得了长度为 1 113 bp 的 Unigene12370_All 序列,其中包括 281 bp 的 3'UTR。NCBI Blast 比对发现,该序列与亚洲玉米螟转位酶 *Ostrinia furnacalis* DNA translocase Ftsk (登录号: XM_

028300748)和丛林斜眼褐蝶蛹表皮蛋白 *Bicyclus anynana* pupal cuticle protein (登录号: XM_024091395)的相似度分别为 99.55%和 76.04%(图 3-B)。

构建表达 miR-1a-5p 和 Unigene12370_All 结合位点片段及结合位点突变片段的荧光素酶报告载体 pGL3-WT 和 pGL3-MU,以及表达 miR-1a-5p 的载体 pmR-mCherry-miR-1a-5p,进行细胞共转染。荧光素酶活性试验结果(图 3-C)显示,共转染 pmR-mCherry-miR-1a-5p 和 pGL3-WT 处理的荧光活性

显著低于 pmR-mCherry 和 pGL3-WT 共转染对照 (NC), 而共转染 pmR-mCherry-miR-1a-5p 和 pGL3-MU 处理的荧光活性与 NC 相比无显著性差异($P<0.05$)。说明 Unigenel2370_All 是 miR-1a-5p 的靶标基因。

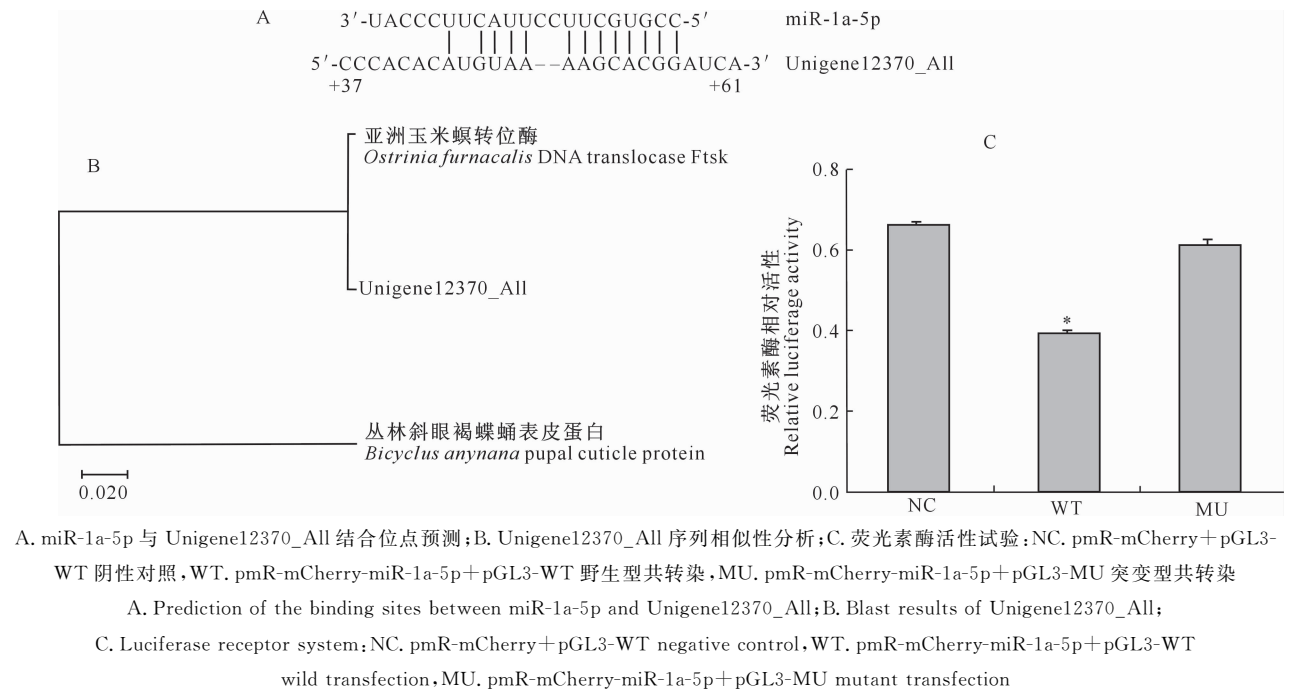


图 3 亚洲玉米螟 miR-1a-5p 与 Unigenel2370_All 结合关系的验证
Fig. 3 Verification of binding relationship between *Ostrinia furnacalis* miR-1a-5p and Unigenel2370_All

3 讨 论

亚洲玉米螟是我国玉米生产中的主要害虫之一,研究表明,转 Bt 基因玉米可以有效防控该虫危害^[2-5]。然而,室内抗性筛选发现,亚洲玉米螟可以对多种 Bt 蛋白产生抗性,而且在某些 Bt 蛋白间存在交互抗性^[6-9]。因此,探明亚洲玉米螟的 Bt 抗性产生机理,对于转 Bt 基因玉米在我国的推广和应用意义重大。

miRNA 是一类可以在转录后水平调控基因表达的小 RNA,它的差异化表达与多种肿瘤细胞及昆虫的抗药性相关。前期高通量测序发现,属于 miR-1 家族的 miR-1a-5p 在亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性品系幼虫中的表达量显著高于敏感品系^[26],为了进一步分析亚洲玉米螟 miR-1a-5p 与 Cry1Ab 蛋白敏感性的关系,本研究选择与昆虫生长发育紧密相关的表皮组织,以及对昆虫 Bt 抗性至关重要的中肠组织^[27],进行 miR-1a-5p 表达差异分析。qPCR 结果显示,Cry1Ab 抗性和敏感品系的亚洲玉米螟在表皮和中肠组织中 miR-1a-5p 的表达量均存在差异表达现象,其中 ACB-AbR 幼虫表皮中 miR-1a-5p 表达量显著高于 ACB-BtS 幼虫表皮组织;ACB-AbR

幼虫中肠中 miR-1a-5p 表达量显著低于 ACB-BtS 中肠组织。进一步提示 miR-1a-5p 的表达量改变可能与幼虫生长、Cry1Ab 敏感性改变等生命活动相关。

Sf9 细胞是生物学实验中常用的一种昆虫细胞,作为试验对象被广泛应用于昆虫各种基因、小分子、蛋白的功能研究中^[28-29]。本研究发现,miR-1a-5p 表达量上升导致 Sf9 细胞对 Cry1Ab 蛋白的敏感性显著降低,反之亦然。结合亚洲玉米螟表皮和中肠组织 miR-1a-5p 的表达量差异模式发现,Sf9 细胞呈现的 miR-1a-5p 和 Cry1Ab 蛋白敏感性的关系,与 Cry1Ab 抗性和敏感品系幼虫中肠组织的差异模式一致。说明亚洲玉米螟中肠组织 miR-1a-5p 表达量下降可能是导致其对 Cry1Ab 蛋白产生抗性的原因。

miRNA 具有显著的组织表达特异性,而且同一 miRNA 在不同组织中的功能也不尽相同^[30]。miR-1 是一类参与昆虫生长、发育等重要生命过程的调控因子,而与敏感品系相比,亚洲玉米螟 Bt 抗性品系存在发育历期延长的现象^[31-32],据此推测,ACB-AbR 幼虫表皮中 miR-1a-5p 高表达与其生长发育延迟有关,这可能是适应 Cry1Ab 蛋白表达变化的

一种表现。

本研究基于亚洲玉米螟转录组测序结果对 miR-1a-5p 的靶基因进行预测发现, Unigene12370_All 转录本可能是 miR-1a-5p 的靶标基因之一; 荧光素酶活性试验进一步证明, miR-1a-5p 可以结合 Unigene12370_All 转录本。今后, 课题组将进一步开展亚洲玉米螟 miR-1a-5p 在活体水平调控 Unigene12370_All 表达的作用, 及其对昆虫 Bt 蛋白敏感水平的影响, 探讨昆虫 Bt 抗性的形成机理, 为转 Bt 基因玉米的安全应用奠定基础。

[参考文献]

- [1] 王振营, 鲁新, 何康来, 等. 我国研究亚洲玉米螟历史、现状与展望 [J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(5): 402-412.
Wang Z Y, Lu X, He K L, et al. Review of history, present situation and prospect of the Asian maize borer research in China [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2000, 31(5): 402-412.
- [2] 何康来, 王振营, 文丽萍, 等. 转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟的抗性评价 [J]. 中国农学通报, 2004, 20(6): 240-242.
He K L, Wang Z Y, Wen L P, et al. Transgenic maize evaluated for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2004, 20(6): 240-242.
- [3] 王培, 何康来, 王振营, 等. 转 *cry1Ac* 玉米对亚洲玉米螟的抗性评价 [J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 395-400.
Wang P, He K L, Wang Z Y, et al. Evaluating transgenic *cry1Ac* maize for resistance to *Ostrinia furnacalis* (Guenée) [J]. Journal of Plant Protection, 2012, 39(5): 395-400.
- [4] 常雪, 王伟, 沈志成, 等. 转 *cry1Ab/cry2Aj* 玉米对亚洲玉米螟的抗性评价 [J]. 植物保护学报, 2013, 40(4): 339-344.
Chang X, Wang W, Shen Z C, et al. Evaluation of transgenic *cry1Ab/cry2Aj* maize for its resistance to *Ostrinia furnacalis* [J]. Journal of Plant Protection, 2013, 40(4): 339-344.
- [5] 王月琴, 何康来, 江帆, 等. Bt799 玉米对亚洲玉米螟抗性研究 [J]. 应用昆虫学报, 2014, 51(3): 636-642.
Wang Y Q, He K L, Jiang F, et al. Resistance of transgenic Bt corn variety Bt799 to the Asian corn borer [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2014, 51(3): 636-642.
- [6] Xu L, Wang Z, Zhang J, et al. Cross-resistance of Cry1Ab-selected Asian corn borer to other Cry toxins [J]. Journal of Applied Entomology, 2010, 134(5): 429-438.
- [7] Zhang T, He M, Gatehouse A M, et al. Inheritance patterns, dominance and cross-resistance of Cry1Ab- and Cry1Ac-selected *Ostrinia furnacalis* (Guenée) [J]. Toxins, 2014, 6(9): 2694-2707.
- [8] Wang Y, Yang J, Quan Y, et al. Characterization of Asian corn borer resistance to Bt toxin Cry1Ie [J]. Toxins, 2017, 9(6): 186.
- [9] Shabbir M Z, Quan Y, Wang Z, et al. Characterization of the Cry1Ah resistance in Asian corn borer and its cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* toxins [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 234.
- [10] Xu L N, Wang Y Q, Wang Z Y, et al. Transcriptome differences between Cry1Ab resistant and susceptible strains of Asian corn borer [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 173.
- [11] Zhang T, Coates B S, Wang Y, et al. Down-regulation of aminopeptidase N and ABC transporter subfamily G transcripts in Cry1Ab and Cry1Ac resistant Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. International Journal of Biological Sciences, 2017, 13(7): 83.
- [12] Shabbir M Z, Zhang T, Wang Z, et al. Transcriptome and proteome alternation with resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ah toxin in *Ostrinia furnacalis* [J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 27.
- [13] 徐艳玲, 王振营, 何康来, 等. 对 Bt 抗性和敏感亚洲玉米螟解毒酶和中肠蛋白酶的比较 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(6): 889-893.
Xu Y L, Wang Z Y, He K L, et al. Comparative analysis of detoxification enzyme and midgut proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and-susceptible *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 2006, 14(6): 889-893.
- [14] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431(7006): 350.
- [15] Lucas K, Raikhel A S. Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 43: 24e38.
- [16] Ameres S L, Zamore P D. Diversifying microRNA sequence and function [J]. Nature Review Molecular Cell Biology, 2013, 14: 475-488.
- [17] Chen J F, Mandel E M, Thomson J M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. Nature Genetics, 2006, 38: 228-233.
- [18] Heidersbach A, Saxby C, Carver-Moore K, et al. MicroRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart [J]. Elife, 2013, 2: 464-478.
- [19] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse [J]. Current Biology, 2002, 12: 735-739.
- [20] Leone V, D'Angelo D, Rubio I, et al. MiR-1 is a tumor suppressor in thyroid carcinogenesis targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1alpha [J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011, 96: 1388-1398.
- [21] Singh A, Happel C, Manna S K, et al. Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2013, 123: 2921-2934.
- [22] Chen A, Xia D, Qiu Z, et al. Expression of a vitelline membrane protein, BmVMP23, is repressed by bmo-miR-1a-3p in silkworm, *Bombyx mori* [J]. FEBS Letters, 2013, 587: 970-

975.

[23] Fullaondo A, Lee S Y. Identification of putative miRNA involved in *Drosophila melanogaster* immune response [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2012, 36: 267-273.

[24] Shrinet J, Jain S, Jain J, et al. Next generation sequencing reveals regulation of distinct Aedes microRNAs during chikungunya virus development [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2014, 8: 109-142.

[25] Zhang Y, Feng K, Hu J, et al. A microRNA-1 gene, tci-miR-1-3p, is involved in cyflumetofen resistance by targeting a glutathione S-transferase gene, TCGSTM4, in *Tetranychus cinnabarinus* [J]. Insect Molecular Biology, 2018, 27(3): 352-364.

[26] Xu L N, Ling Y H, Wang Z Y, et al. Identification of differentially expressed microRNAs between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab-resistant and susceptible strains of *Ostrinia furnacalis* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15461.

[27] Pigott C R, Ellar D J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007, 71: 255-281.

[28] Huang Y, Deng F, Hu Z, et al. Baculovirus-mediated gene silencing in insect cells using intracellularly produced long double-stranded RNA [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 128: 226-236.

[29] Koczka K, Ernst W, Palmberger D, et al. Development of a dual-vector system utilizing microRNA mimics of the autographa californica miR-1 for an inducible knockdown in insect cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3): 533.

[30] 郭志伟, 钟照华. microRNA 的组织特异性表达及其检测方法 [J]. 国际免疫学杂志, 2010, 33(5): 367-370.

Guo Z W, Zhong Z H. Tissue specific expression of microRNA and detection methods [J]. International Journal of Immunology, 2010, 33(5): 367-370.

[31] 何康来, 常雪, 常雪艳, 等. 亚洲玉米螟对 Cry1Ab 蛋白抗性的遗传规律与分子机理 [J]. 植物保护, 2007, 33(5): 92-93.

He K L, Chang X, Chang X Y, et al. Inheritance and molecular mechanism of the resistance of Asian corn borer to Cry1Ab [J]. Plant Protection, 2007, 33(5): 92-93.

[32] 黄东林, 周琼, 杨丽芬, 等. Cry1ac 毒蛋白对亚洲玉米螟生长发育和种群增长的影响 [J]. 植物保护学报, 2013, 40(1): 5-9.

Huang D L, Zhou Q, Yang L F, et al. Effect of artificial diet containing Cry1Ac toxin on growth, development and population increase of *Ostrinia furnacalis* (Güenée) (Lepidoptera: Crambidae) [J]. Journal of Plant Protection, 2013, 40(1): 5-9.

(上接第 98 页)

[29] 邵建果, 杨俊柱, 王军. 噻虫嗪在小麦中的残留消解动态及风险评估 [J]. 农药学报, 2013, 15(1): 98-102.

Shao J G, Yang J Z, Wang J. Residue decline study and risk assessment of thiamethoxam in wheat [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2013, 15(1): 98-102.

[30] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 化学农药环境安全评价试验准则: GB/T 31270—2014 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Test guidelines on environmental safety assessment for chemical: GB/T 31270—2014 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.

[31] World Health Organization, the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Joint Meeting on Pesticide Residues. Thiamethoxam [DB/OL]. [2019-09-30]. <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/lpe/en/>.