



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113308471 A

(43) 申请公布日 2021.08.27

(21) 申请号 202110575414.7

(22) 申请日 2021.05.26

(71) 申请人 江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所

地址 223000 江苏省淮安市淮海北路104号

申请人 云南省农业科学院农业环境资源研究所

(72) 发明人 陈澄宇 赵云霞 刘莹 曹凯歌

张凯

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 张梦泽

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/53 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

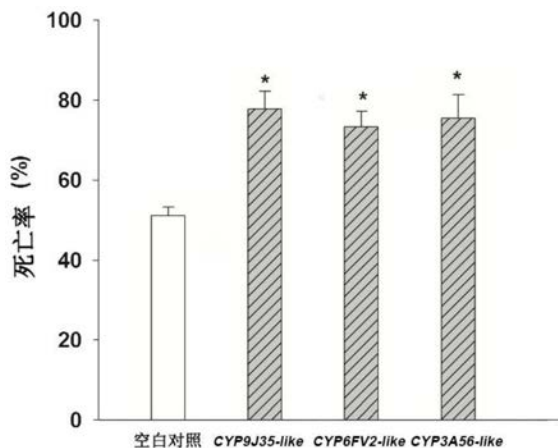
序列表6页 附图1页

(54) 发明名称

一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法及应用,属于分子生物学技术领域。本发明运用RNA干扰技术实现了对韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP9J35-like和/或CYP6FV2-like和/或CYP3A56-like的沉默,该方法准确可靠、操作简单、沉默效率高,为韭菜迟眼蕈蚊抗药性机制研究和抗性治理提供了研究基础。



1. 一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法,其特征在于,将细胞色素P450酶系基因的dsRNA与人工饲料混合后喂养韭菜迟眼蕈蚊。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述韭菜迟眼蕈蚊为幼虫,所述幼虫的龄期为1~4龄。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述细胞色素P450酶系基因的dsRNA由细胞色素P450酶系基因的cDNA体外转录得到。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述dsRNA与人工饲料的混合比例为(10~100)  $\mu\text{g}:\text{1g}$ 。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述喂养的时间为6~72h。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述细胞色素P450酶系基因包括CYP9J35-like、CYP6FV2-like和CYP3A56-like中的一种或多种;所述CYP9J35-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述CYP6FV2-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;所述CYP3A56-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,合成所述细胞色素P450酶系基因的cDNA的引物为:

当所述细胞色素P450酶系基因为CYP9J35-like时,所述CYP9J35-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;所述CYP9J35-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;

当所述细胞色素P450酶系基因为CYP6FV2-like时,所述CYP6FV2-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示;所述CYP6FV2-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;

当所述细胞色素P450酶系基因为CYP3A56-like时,所述CYP3A56-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示;所述CYP3A56-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示。

8. 权利要求1~7任一项所述的方法在韭菜迟眼蕈蚊防治中的应用。

9. 权利要求1~7任一项所述的方法在降低韭菜迟眼蕈蚊对杀虫剂的抗药性中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述杀虫剂包括吡虫啉、噻虫嗪、毒死蜱和氯氰菊酯中的一种或几种。

## 一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,具体涉及一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法及应用。

### 背景技术

[0002] 韭菜迟眼蕈蚊,其幼虫俗称韭蛆,是葱蒜等百合科蔬菜的重要害虫,尤其喜食韭菜。韭菜迟眼蕈蚊防治措施不当极易造成韭菜减产或农药残留超标。随着全球气候变暖和设施农业的迅速发展,韭蛆的为害愈加严重,已严重制约了韭菜种植业的发展。

[0003] 目前,韭菜迟眼蕈蚊的防治措施主要为化学防治,随水灌施毒死蜱、辛硫磷、高效氯氟氰菊酯、噻虫嗪等化学药剂。随着化学药剂的长期使用,韭菜迟眼蕈蚊的抗药性不断提高。

[0004] 细胞色素P450酶系,又称多功能氧化酶,广泛存在于细菌、真菌、植物和动物等生命体中,参与内源物质(如甾类化合物)和外源物质(如药物)的代谢,是药物代谢过程中的关键酶。昆虫细胞色素P450酶系与昆虫抗药性直接相关。抗性昆虫体内的P450酶系在质量或数量上增强,加快了杀虫剂的代谢和降解效率,使杀虫剂不能作用于其分子靶标,表现为抗药性增强。P450酶系的这种代谢解毒作用是P450介导抗性的化学本质。将细胞色素P450酶系基因进行沉默处理,是研究P450酶系与昆虫抗药性关系的重要手段。目前,缺少一种快速高效的针对韭菜迟眼蕈蚊的细胞色素P450酶系基因沉默的方法。

### 发明内容

[0005] 为了解决上述问题,本发明提供了一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法及应用。本发明提供的方法沉默效率高,可快速高效地在整个韭菜迟眼蕈蚊虫体中沉默目的基因。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法,将细胞色素P450酶系基因的dsRNA与人工饲料混合后喂养韭菜迟眼蕈蚊。

[0008] 优选的,所述韭菜迟眼蕈蚊为幼虫,所述幼虫的龄期为1~4龄。

[0009] 优选的,所述细胞色素P450酶系基因的dsRNA由细胞色素P450酶系基因的cDNA体外转录得到。

[0010] 优选的,所述dsRNA与人工饲料的混合比例为(10~100) $\mu\text{g}$ :1g。

[0011] 优选的,所述喂养的时间为6~72h。

[0012] 优选的,所述细胞色素P450酶系基因包括CYP9J35-like、CYP6FV2-like和CYP3A56-like中的一种或多种;所述CYP9J35-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述CYP6FV2-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;所述CYP3A56-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0013] 优选的,合成所述细胞色素P450酶系基因的cDNA的引物为:

[0014] 当所述细胞色素P450酶系基因为CYP9J35-like时,所述CYP9J35-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;所述CYP9J35-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;

[0015] 当所述细胞色素P450酶系基因为CYP6FV2-like时,所述CYP6FV2-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示;所述CYP6FV2-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;

[0016] 当所述细胞色素P450酶系基因为CYP3A56-like时,所述CYP3A56-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示;所述CYP3A56-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示。

[0017] 本发明提供了上述技术方案中所述的方法在韭菜迟眼蕈蚊防治中的应用。

[0018] 本发明提供了上述技术方案中所述的方法在降低韭菜迟眼蕈蚊对杀虫剂的抗药性中的应用。

[0019] 优选的,所述杀虫剂包括吡虫啉、噻虫嗪、毒死蜱和氯氰菊酯中的一种或几种。

[0020] 有益效果:

[0021] 本发明提供了一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法,将细胞色素P450酶系基因的dsRNA与人工饲料混合后喂养韭菜迟眼蕈蚊。本发明运用RNA干扰技术实现了对韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP9J35-like和/或CYP6FV2-like和/或CYP3A56-like的沉默,大大提高了韭菜迟眼蕈蚊对杀虫剂的敏感性,降低了韭菜迟眼蕈蚊对杀虫剂的抗药性;同时,该方法准确可靠、操作简单、沉默效率高,为韭菜迟眼蕈蚊抗药性机制研究和抗性治理提供了研究基础。

## 附图说明

[0022] 图1为dsRNA饲喂后韭菜迟眼蕈蚊幼虫体内P450酶系基因的qRT-PCR检测结果;

[0023] 图2为dsRNA饲喂后韭菜迟眼蕈蚊幼虫对杀虫剂噻虫嗪的敏感度变化。

## 具体实施方式

[0024] 本发明提供了一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法,将细胞色素P450酶系基因的dsRNA与人工饲料混合后喂养韭菜迟眼蕈蚊。

[0025] 本发明所述细胞色素P450酶系基因的dsRNA优选由细胞色素P450酶系基因的cDNA体外转录得到。本发明所述细胞色素P450酶系基因优选包括CYP9J35-like、CYP6FV2-like和CYP3A56-like中的一种或多种。在本发明中,所述CYP9J35-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述CYP6FV2-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;所述CYP3A56-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0026] 本发明合成所述细胞色素P450酶系基因的cDNA的引物优选为:

[0027] 当所述细胞色素P450酶系基因为CYP9J35-like时,所述CYP9J35-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示,具体为:taatacgactcactatagggCCAACAAAAAGCCAAATCGT;所述CYP9J35-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,具体为:taatacgactcactatagggAACATTGTGCGACAAGTTTCG。

[0028] 当所述细胞色素P450酶系基因为CYP6FV2-like时,所述CYP6FV2-like的正向引物

的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示,具体为:taatacactcactatagggATTTTTCATTGCCGGTTT TG;所述CYP6FV2-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示,具体为:taatacactcactatagggCAAGGCCAATTTTCGTTTGT。

[0029] 当所述细胞色素P450酶系基因为CYP3A56-like时,所述CYP3A56-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示,具体为:taatacactcactatagggCTATGACGTCGCGAAAA CA;所述CYP3A56-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示,具体为:taatacactcactatagggTTCGGTATAACAACGCCCTC。

[0030] 本发明以韭菜迟眼蕈蚊的cDNA为模板,以合成所述细胞色素P450酶系基因的cDNA的引物进行PCR扩增,得到细胞色素P450酶系基因的cDNA。当所述细胞色素P450酶系基因为CYP9J35-like时,所述PCR的扩增体系优选每50 $\mu$ L包括:10 $\times$ LAPCRbuffer 5 $\mu$ L,dNTPs (2.5mM) 8 $\mu$ L,CYP9J35-like的正向引物1 $\mu$ L,CYP9J35-like的反向引物1 $\mu$ L,cDNA模板2 $\mu$ L,LATaq (5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L和余量dd H<sub>2</sub>O。当所述细胞色素P450酶系基因为CYP6FV2-like时,所述PCR的扩增体系优选每50 $\mu$ L包括:10 $\times$ LA PCRbuffer 5 $\mu$ L,dNTPs (2.5mM) 8 $\mu$ L,CYP6FV2-like的正向引物1 $\mu$ L,CYP6FV2-like的反向引物1 $\mu$ L,cDNA模板2 $\mu$ L,LATaq (5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L和余量dd H<sub>2</sub>O。当所述细胞色素P450酶系基因为CYP3A56-like时,所述PCR的扩增体系优选每50 $\mu$ L包括:10 $\times$ LAPCRbuffer5 $\mu$ L,dNTPs (2.5mM) 8 $\mu$ L,CYP3A56-like的正向引物1 $\mu$ L,CYP3A56-like的反向引物1 $\mu$ L,cDNA模板2 $\mu$ L,LATaq (5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L和余量dd H<sub>2</sub>O。在本发明中,所述PCR扩增的反应条件优选为:预变性95 $^{\circ}$ C 3min;变性95 $^{\circ}$ C 30s,退火56 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C延伸45s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0031] 得到细胞色素P450酶系基因的cDNA后,本发明以细胞色素P450酶系基因的cDNA为模板进行体外转录,得到细胞色素P450酶系基因的dsRNA。本发明所述体外转录的体系优选为:5 $\times$ TranscriptAid reaction buffer 2 $\mu$ L,cDNA模板1 $\mu$ L,ATP/CTP/UTP/GTP各2 $\mu$ L,T7 Enzyme Mix 2 $\mu$ L,无核酸酶水补足至20 $\mu$ L。当所述细胞色素P450酶系基因为CYP9J35-like时,得到的dsRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO.16所示;当所述细胞色素P450酶系基因为CYP6FV2-like时,得到的dsRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO.17所示;当所述细胞色素P450酶系基因为CYP3A56-like时,得到的dsRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO.18所示。得到细胞色素P450酶系基因的dsRNA后,本发明优选将得到的细胞色素P450酶系基因的dsRNA进行纯化。本发明对纯化的方法没有特殊要求,采用本领域技术人员常规的纯化方法即可。

[0032] 得到细胞色素P450酶系基因的dsRNA后,本发明将细胞色素P450酶系基因的dsRNA与人工饲料混合喂养韭菜迟眼蕈蚊。在本发明中,所述dsRNA与人工饲料的混合比例优选为(10~100) $\mu$ g:1g;进一步优选为(20~40) $\mu$ g:1g;更进一步优选为30 $\mu$ g:1g。在本发明中,所述喂养的时间优选为6~72h;进一步优选为24~48h;更进一步优选为48h。本发明特定的混合比例和饲喂时间,既具有良好的基因沉默效率,又能最大限度地减少饲喂量,经济效益最高。在本发明中,所述喂养的韭菜迟眼蕈蚊优选为1~4龄,进一步优选为3~4龄,更进一步优选为4龄。

[0033] 喂养后,本发明优选使用qRT-PCR方法检测被沉默的韭菜迟眼蕈蚊的细胞色素P450酶系基因的沉默效率。

[0034] 当细胞色素P450酶系基因为CYP9J35-like时,所述qRT-PCR检测的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示,具体为:TCCATTGGGTATCTCGTT;反向引物的核苷酸序列如

SEQ ID NO.11所示,具体为:GGATGATCGGTATAGTCTCA。

[0035] 当细胞色素P450酶系基因为CYP6FV2-like时,所述qRT-PCR检测的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示,具体为:TCACCCACATTTACATCC;反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示,具体为:ATCGTGCAAACAAGTCCC。

[0036] 当细胞色素P450酶系基因为CYP3A56-like时,所述qRT-PCR检测的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.14所示,具体为:GTTGGTGCTGTGCCTGTT;反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示,具体为:AGAATCCCACGATTGGTC。

[0037] 喂养后,本发明优选检测韭菜迟眼蕈蚊的细胞色素P450酶系基因沉默后对杀虫剂敏感度的变化,进一步验证被沉默的细胞色素P450酶系基因的沉默效果。

[0038] 本发明运用RNA干扰技术实现了对韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP9J35-like和/或CYP6FV2-like和/或CYP3A56-like的沉默,大大提高了韭菜迟眼蕈蚊对杀虫剂的敏感性,降低了韭菜迟眼蕈蚊对杀虫剂的抗药性;同时,该方法准确可靠、操作简单、沉默效率高,为韭菜迟眼蕈蚊抗药性机制研究和抗性治理提供了研究基础。

[0039] 本发明提供了上述技术方案中所述的方法在韭菜迟眼蕈蚊防治中的应用。

[0040] 本发明提供了上述技术方案中所述的方法在降低韭菜迟眼蕈蚊对杀虫剂的抗药性中的应用。在本发明中,所述杀虫剂包括吡虫啉、噻虫嗪、毒死蜱和氯氰菊酯中的一种或几种;进一步优选为噻虫嗪。

[0041] 为了进一步说明本发明,下面结合实施例对本发明提供的一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法及应用进行详细地描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0042] 实施例1

[0043] 利用RNA干扰技术沉默韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP9J35-like

[0044] 一、试验材料及来源

[0045] 韭菜迟眼蕈蚊室内敏感品系,采自山东省寿光市韭菜田,未接触杀虫剂连续饲养超过80代;

[0046] Trizol Reagent总RNA提取试剂盒,购自美国Ambion公司;

[0047] rTaq聚合酶、LATAq聚合酶、DNase I、PrimeScript RT-reagent Kit反转录试剂盒、pMD18-T vector和荧光定量PCR试剂盒,均购自宝生物工程有限公司,dsRNA合成试剂盒购于Thermo Fisher Scientific,引物由华大基因合成。

[0048] 冷冻离心机,购自德国Eppendorf公司;

[0049] Nanodrop,购自美国Termo Scientific公司;

[0050] Agilent 2100生物分析仪器,购自美国Agilent Technologies Inc;

[0051] Illumina Hiseq 2500测序仪,购自美国Illumina公司;

[0052] Biosystems 7500Real-time PCRSytem,购自美国Applied Biosystems Inc;

[0053] 98%噻虫嗪原药(Thiamethoxam),购于江苏绿叶农化有限公司。

[0054] 二、试验步骤

[0055] 1.提取韭菜迟眼蕈蚊总RNA,纯化后反转录合成cDNA。

[0056] 取10头韭菜迟眼蕈蚊4龄幼虫,按照Trizol Reagent总RNA提取试剂盒的说明书提取总RNA,使用Agilent 2100检测RNA的完整性,同时制备1.0%的琼脂糖凝胶,于100V电压

20min后,电泳观察RNA完整性,符合标准的完整RNA样品用于后续操作。取1 $\mu$ g总RNA,按照PrimeScript RT-reagentKit反转录试剂盒的说明书合成cDNA。

[0057] 2. 设计引物,合成韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因CYP9J35-like的cDNA。

[0058] 根据韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因CYP9J35-like的基因序列,按照3/5-RACE kit说明书设计并合成引物。其中CYP9J35-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;CYP9J35-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示,具体为:taatacgactcactatagggCCAACAAAAAGCCAAATCGT;CYP9J35-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,具体为:taatacgactcactatagggAACATTGTGCGACAAGTTCG。以cDNA为模板,对CYP9J35-like基因进行PCR扩增。PCR反应体系为:10 $\times$ LAPCRbuffer 5 $\mu$ L,dNTPs (2.5mM) 8 $\mu$ L,CYP9J35-like的正向引物1 $\mu$ L,CYP9J35-like的反向引物1 $\mu$ L,cDNA模板2 $\mu$ L,LATaq (5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L,dd H<sub>2</sub>O补足50 $\mu$ L。PCR扩增反应条件为:预变性95 $^{\circ}$ C 3min,变性95 $^{\circ}$ C 30s,退火56 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C延伸45s;共循环35次,72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0059] 根据QIAEX公司胶回收试剂盒(QIAEX II Gel Extraction Kit)进行PCR产物的胶回收,试验步骤如下:

[0060] (1) 于紫外灯下切胶,将切下的胶块转入1.5mL离心管中,并秤量所切胶的重量;

[0061] (2) 向称量完成的离心管中加入3倍体积的Buffer QX I,并同时加入10 $\mu$ L Buffer QX II;

[0062] (3) 将混合完成的离心管转入50 $^{\circ}$ C水浴锅中,每隔2分钟摇晃离心管,待胶完全溶解后,于10,000 $\times$ g离心30s,用移液枪移除上清液;

[0063] (4) 将500 $\mu$ L Buffer QX I加入离心管中,充分混合后,离心30s去除上清液;

[0064] (5) 加入500 $\mu$ L Buffer PE,充分混匀后,离心30s去除上清液,重复一次;

[0065] (6) 于超净工作台干燥10~15min,待离心管底部Buffer QX II中的硅胶颗粒变白以后加入适量DEPC水,重新震荡混匀;

[0066] (7) 10,000 $\times$ g离心30s,将上清转移到新的离心管中,完成回收试验;

[0067] (8) 利用2%琼脂糖电泳检测回收效果。并将DNA贮存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中。回收获得的DNA作为接下来合成dsRNA的模板。

[0068] 3. 以步骤2制得的细胞色素P450酶系基因CYP9J35-like的cDNA为体外转录模板,制备CYP9J35-like基因的dsRNA。

[0069] 将步骤2扩增的目的片段回收,测定浓度,作为体外转录dsRNA的模板。dsRNA的体外转录体系为5 $\times$ TranscriptAid reactionbuffer 2 $\mu$ L,cDNA模板1 $\mu$ L,ATP/CTP/UTP/GTP各2 $\mu$ L,T7 Enzyme Mix 2 $\mu$ L,无核酸酶水补足至20 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C过夜孵育。向得到的反应液中加入2 $\mu$ L Dnase I,去除DNA模板,并于37 $^{\circ}$ C混合温育30min;随后加入2 $\mu$ L 0.5M EDTA,于65 $^{\circ}$ C温育10min,终止反应。

[0070] 反应结束后,使用苯酚氯仿抽提法纯化dsRNA。在20 $\mu$ L体系中加入115 $\mu$ L DEPC水,15 $\mu$ L (3M,PH=5.2)醋酸钠,再加入等体积的酚/氯仿(1:1)混合液,混合均匀。将混合液置于离心机中在4 $^{\circ}$ C,12,000rpm条件下离心5min;离心结束取上清,转移到在新的离心管中,随后加入等体积的氯仿混匀。并置于离心机中在4 $^{\circ}$ C,12,000rpm条件下离心10min,取上清。之后加入十分之一体积的醋酸钠(3M)和2.5倍体积的冷乙醇,于-80 $^{\circ}$ C存放至少60min。放置结束以后,4 $^{\circ}$ C,12,000rpm离心15min,弃上清,回收沉淀。向沉淀中加入70%冷乙醇,4 $^{\circ}$ C,12,

000rpm离心5min,弃上清。将得到的沉淀于超净台充分干燥后,用适量的DEPC水溶解。并通过电泳确认是否除去基因组cDNA,并测定dsRNA的浓度。

[0071] 4.将韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因CYP9J35-like的dsRNA与人工饲料按照一定比例混合后饲喂韭菜迟眼蕈蚊幼虫。

[0072] 将韭菜迟眼蕈蚊4龄幼虫饥饿2h后,将P450酶系基因CYP9J35-like的dsRNA混入人工饲料,最终饲喂的人工饲料浓度为30 $\mu$ g/g,饲喂韭菜迟眼蕈蚊幼虫。每个处理至少20头,共设三组独立的生物学重复,设混入相同体积的DEPC水的人工饲料为空白对照组。试虫置于正常条件下饲养。

[0073] 5.饲喂一段时间后,提取韭菜迟眼蕈蚊体内RNA,使用qRT-PCR方法检测被沉默的韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP9J35-like的沉默效率。

[0074] 48h后收集韭菜迟眼蕈蚊幼虫,运用Biosystems 7500Real-time PCR System,使用SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup> II kit的qRT-PCR技术检测基因沉默效率,CYP9J35-like检测用的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示,具体为:TCCATTGGGTATCTCGTT;CYP9J35-like检测用的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示,具体为:GGATGATCGGTATAGTCTCA。反应体系为:SYBR Green 10 $\mu$ L,CYP9J35-like检测用的正向引物0.4 $\mu$ L,CYP9J35-like检测用的反向引物0.4 $\mu$ L,R0X 0.4 $\mu$ L,cDNA模板1 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O补足至20 $\mu$ L。PCR循环程序为:初始95 $^{\circ}$ C 30s,之后进行95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 34s的40个循环。每个qRT-PCR检测试验设三个独立的生物学重复,每个生物学重复再设3个技术性重复。最终结果的计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Ct表示循环数)进行计算,即 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{(P450)} - Ct_{(actin)})_{\text{试验组}} - (Ct_{(P450)} - Ct_{(actin)})_{\text{对照组}}$ 。根据经过本方法的CYP9J35-like基因沉默处理后,目标基因CYP9J35-like的表达量的降低程度检验其沉默效率。

[0075] 6.检测韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP9J35-like沉默后对杀虫剂敏感度的变化,进一步验证被沉默的CYP9J35-like基因的沉默效果。

[0076] 为了验证基因沉默的效果,本发明检测CYP9J35-like基因沉默处理后,韭菜迟眼蕈蚊幼虫对杀虫剂噻虫嗪的敏感度的变化。按照步骤4的饲喂方法,用含有基因CYP9J35-like的dsRNA的人工饲料饲喂韭菜迟眼蕈蚊幼虫48h后,将噻虫嗪原药溶于丙酮中配成母液,再把母液使用0.1% (v/v) Triton X-100水溶液稀释成LC<sub>50</sub>浓度(10.91mg/L),分别将0.5cm的韭菜段和菜迟眼蕈蚊幼虫在LC<sub>50</sub>浓度的噻虫嗪中轻轻搅拌15s后,取出晾干后置于含有2%琼脂的9孔细胞培培养板内。每个处理20头,设3个重复,杀虫剂处理48h后检查死亡数。设饲喂混合相同体积DEPC水人工饲料的韭菜迟眼蕈蚊幼虫为空白对照组,空白对照组饲喂48h后,用LC<sub>50</sub>浓度(10.91mg/L)的噻虫嗪处理。

[0077] 实施例2

[0078] 利用RNA干扰技术沉默韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP6FV2-like

[0079] 试验材料及来源同实施例1。

[0080] 试验步骤同实施例1,不同之处在于:饲喂的dsRNA为CYP6FV2-like基因的dsRNA。

[0081] 其中,CYP6FV2-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;CYP6FV2-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示,具体为:taatacgaactcactatagggATTTTTCATTGCCGTTT TG;CYP6FV2-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示,具体为:taatacgaactcact atagggCAAGGCCAATTTTCGTTTGT。



[0082] qRT-PCR方法检测被沉默的韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP6FV2-like的沉默效率,使用的CYP6FV2-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示,具体为:TCACCCACATTTACATCC;CYP6FV2-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示,具体为:ATCGTGCAAACAAGTCCC。

[0083] 检测韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP6FV2-like沉默后对杀虫剂敏感度的变化的方案与实施例1相同。

[0084] 实施例3

[0085] 利用RNA干扰技术沉默韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP3A56-like

[0086] 试验材料及来源同实施例1。

[0087] 试验步骤同实施例1,不同之处在于:饲喂的dsRNA为CYP3A56-like基因的dsRNA。

[0088] 其中,CYP3A56-like的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;CYP3A56-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示,具体为:taatacgactcactatagggCTATGACGTCGCGAAAAACA;CYP3A56-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示,具体为:taatacgactcactatagggTTCGGTATAACAACGCCCTC。

[0089] qRT-PCR方法检测被沉默的韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP3A56-like的沉默效率,使用的CYP3A56-like的正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.14所示,具体为:GTTGGTGCTGTGCCTGTT;CYP3A56-like的反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示,具体为:AGAATCCCACGATTGGTC。

[0090] 检测韭菜迟眼蕈蚊P450酶系基因CYP3A56-like沉默后对杀虫剂敏感度的变化的方案与实施例1相同。

[0091] 试验结果与分析

[0092] 1.qRT-PCR检测dsRNA饲喂后韭菜迟眼蕈蚊幼虫体内P450酶系基因的表达量

[0093] 实施例1~3通过qRT-PCR检测dsRNA饲喂后韭菜迟眼蕈蚊幼虫体内P450酶系基因的表达量,检测结果见图1。由图1的结果可知,韭蛆取食含有dsRNA的人工饲料48h后,处理组韭蛆体内的P450酶系基因CYP9J35-like、CYP6FV2-like和CYP3A56-like的表达量显著低于对照组,表明本发明的方法,使用相应基因的dsRNA饲喂后韭菜迟眼蕈蚊幼虫后,成功实现了P450酶系相应基因的沉默,沉默效率高。

[0094] 2.dsRNA饲喂后韭菜迟眼蕈蚊幼虫对杀虫剂噻虫嗪的敏感度变化

[0095] 实施例1~3通过检测韭菜迟眼蕈蚊幼虫对杀虫剂噻虫嗪的敏感度变化来考察P450酶系基因的沉默效率,检测结果见图2。由图2的结果可知,韭蛆取食含有dsRNA的人工饲料48h后,用LC<sub>50</sub>剂量的噻虫嗪处理后,处理组韭蛆的死亡率显著高于对照组,这说明dsRNA饲喂后韭菜迟眼蕈蚊幼虫对杀虫剂噻虫嗪的敏感度明显提高,验证了本发明的方法的基因沉默效果良好。

[0096] 上述实施例的结果表明,本发明提供的韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法准确可靠、操作简单、沉默效率高,大大提高了韭菜迟眼蕈蚊对杀虫剂的敏感性,降低了韭菜迟眼蕈蚊对杀虫剂的抗药性,为韭菜迟眼蕈蚊抗药性机制研究和抗性治理提供了研究基础。

[0097] 尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述,但它仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部实施例,人们还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其它实施例,这些

实施例都属于本发明保护范围。

## 序列表

<110> 江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所

云南省农业科学院农业环境资源研究所

<120> 一种韭菜迟眼蕈蚊细胞色素P450酶系基因沉默的方法及应用

<160> 18

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 2340

<212> DNA

<213> 韭菜迟眼蕈蚊 (*Bradysia odoriphaga*)

<400> 1

```

gatcttttag cattgacttt gacttgtatc aagtgcgacg ttcgaatttt ggtattgagg 60
tataatacta cgccagattt tatttgttca atttgtttaa taagtgttaa acattccata 120
acagttcaaa agatacagcc aaccataatg ctcgatactc tactgcttcc attgggtatc 180
tcgttgatcc tgtatggaat ctacaaatgg attacactca acgatgacta tttcgaaaag 240
cgtggaattc aacatatgaa accgacattt gctttaggaa ataccggtgc ttttttcatg 300
agactatacc gatcatccga ctatttgcag actttgtaca aacaatttcc ggataaaaaa 360
atctttggaa tgttcgactt tcgcaaacct ttctacttca ttcgagatcc cgagatcatc 420
aaaaggttgg cggttaaaga ctttgatcat ttcgaaaacc atcgatcggt catcgatgaa 480
gatgtcgatt tacttttctg aaggatgtcc caattttcac ctaaattgga cagtcatatc 540
tcatcctgtc tatttccagg gcaacagttt gtttatgtta aaaggagaaa aatggagaga 600
catgcgagct actttatcac cggcctttac tggaagtaaa atgcgtcaaa tgtttgaact 660
ggtttagat aattccagtg atatggttca gcatttccaa caaaaagcca aatcgtcagg 720
aatcggcggc gttgacgttg aatgaagga tttgttctct agatatacca acgatgttat 780
cgcttccgcc gcgttcggtt gtaaggtcaa ttcattcgaa aatgaatcga acgactttta 840
catgaacggc aagaaaattt tgaatttca ttcaccgaaa gcggctttga aattgattgc 900
aatgaggact ttacctggcc taatgaaaat gatggacatc aatctaacag actcagcatt 960
gacgaaattt ttccgaaaaa tggttatgga caacataacc acaagagaaa aggagggcat 1020
attcaggccg gatatgatca acattttaat gaatgtgagg aaaggaaagt ctttagacaa 1080
tgtggacaag gatgaaaaac aatctggtga aggattcgct acagtggaag agtcacacat 1140
tggaactaaa caagttaaac gtcaatggac tgacgacgaa cttgtcgcac aatgtttcct 1200
attttttgca gcaggattcg acacttcate cacattgttg tcgtttgtcg ctcatgaact 1260
tgctgtgaat ccagatgtcc agcaaaaatt gtacgaagaa gtgtgcgaag ttgaaaaaac 1320
gttgaatggt aaaccacttc cttatgatgt tctgcaaaa atgaaataca tcgactgcgt 1380
catatccgaa acacttcggt attggcctcc ggccccaatg accgatcgag tgtgcgtaaa 1440
ggattacgaa tacgatgacg gtgtaacgaa attcaattt gagaaaggaa ttgccttctg 1500
gattcccatt tattcgttgc atcatgatga aaaatacttc ccgaatccgg agaaattcga 1560
tccggaacgg tttaacgatg aaaataagga caacatacaa ccaggaactt ttttgccgtt 1620

```

cggaacgggt ccccgcaatt gcattggcag ccgtttcgct ttaatggaag tcaaatccgt 1680  
 catttaccat ttgttgttga attttaaatt tgaacccaac gaaaacagtc aaattccaat 1740  
 caatctttcg aagcagccat tcggaatgac gtccgagaag ggagttaact taagactggc 1800  
 attaagaaaa tgaatagccc acattgattt ttggccaatg gtcagtgaca ttaatacaat 1860  
 ggaatgttta tctttcagaa aataaattta gttttcactt tttcttgtgg tgtgaggcct 1920  
 tcacaaggcc aataacaagt tcagtctgga cgaccaactt aacgtaaatt ccgaaccacg 1980  
 cctcgaagta tgcaaaatact ctttgaggaa agttacgtgc ttctaaatcg atcagtgcaa 2040  
 ttaactgggt tttccctctg tttttacact ctaaaagtgt aaaaacagtg gaaaaactaa 2100  
 tttattttatc tcatcccga gggatgatg tccacatgtg tacactctt taactactgta 2160  
 taccagggcc tattatttgt gaaatttgtg aaattgggtg attagcagtt catcattgtt 2220  
 gaatatagtg cgggcaccta ctcacacaac atcgtcagga cgccagttta aattacatga 2280  
 tgaagatttt gcgaaatcgt gtgaattatt ttcgttgaaa ggctcataat tataataaag 2340

<210> 2

<211> 1649

<212> DNA

<213> 韭菜迟眼蕈蚊 (*Bradysia odoriphaga*)

<400> 2

aagatgcgcc aacattctta ttcggcgaca tagctgatgt atttttcgga ggtaaaaaat 60  
 ccatgggaga aacgtttctc gaattctata atcgattcaa gcacaacaaa gtccatggac 120  
 tgtacttttc gtatcgacca tcgttgatag taaatgatcc tgaagtcac caagaaatta 180  
 tcattaaaga ctctcagagt ttccatgacc gaggaatgtt ctttgacgct gaagttgatc 240  
 cactcagtc acacctctt gcattgagtg gacagaaatg gagggatctg cgagttaaat 300  
 tgtcaccac atttaccatc ggcaagttga aggtcatgta tcccaccgtt cgggattgtg 360  
 ctaaaacatt gctggacat ttggtgaaaa acacacagaa cgtgaaatgc tgtgaattcg 420  
 attcgaggga cttgtttgca cgattcaca cgacggtaat ttcgtcgggt gctttcggaa 480  
 ttgaaaatga ttgcatcaac gaccggcata acattttccg taaaatggga gaaaggatct 540  
 tcgagagaaa ttggaaggag aaattagtgc aggtcttttc acttttcacg ccgaaaattt 600  
 tagaaaaatt gaagatcaaa cggatcagtc aagaagttga ggatttctt ttctcagttg 660  
 ttaaagagag tatcgatctt cgcgaaaagg gtggaagttc agcacaacgt aaagatttta 720  
 tgcagttgat ggttcagttg aaaaatcaag gctatgtgtc agtggacaag aacgaagagc 780  
 atgaagttca gaatcagaaa tcaagcgaaa caaagaagtt aacaatcgac gaaatcgccg 840  
 cccaagcttt tgtatttttc attgccggtt ttgaaacgtc aagctcaacg atgaattttt 900  
 gcatgtacga acttagcaaa aatccagaca ttcagaagaa ggtccatgaa gaactcgaca 960  
 atatctggaa atcgggtgat ctaaagatc ttacttatga cgttctgggc tcaatgaaat 1020  
 acctcgactg gtgtatcgac gaaactctgc gaaaatatec aattgtaccg ttctaaatc 1080  
 gagaaagtac cagagatcac caattctccg gaacgaatat gaaaatcgag aagggaattc 1140  
 tcatcacaat tccagtattg ggtattcatc gcgatcccga aatttatgat aatccgatgg 1200  
 aattccgacc agaacggttc gagaactcac caaccgtaa tccgaatgta cggggtattt 1260  
 gttacatgcc gttcggcagt ggtcctagaa attgtgtcgg ggaacgaatg ggaaaactac 1320

aaacgaaaat tggccttgca gcccttttgc agaaatttga atttgaattt gttgatcaga 1380  
 gtttgttgca caaagaaata acggaatttt atccagctca aatcactctc acaccaaaaa 1440  
 ctaactttat gctacgagct gctgccagac actagatttg ttaaccaaga gaaaaagtgg 1500  
 aaagtgttag aggccggatt gtagcgagtg ctgcaataac ccaagaaaac acaactttcc 1560  
 acttttatcg cagaggtaaa aatactattt tataagagaa agaagcttat gtctgaaaaa 1620  
 atgtttttga taattaaaaa aagtcagac 1649

<210> 3

<211> 1774

<212> DNA

<213> 韭菜迟眼蕈蚊 (*Bradysia odoriphaga*)

<400> 3

agtatagagt ctacagtacg agttcgttgt ttaaaaaaa cattttcgcg ttagtgaagc 60  
 tattcggttg tcgctgtttg aaggtttaac atcaaaaagt gatctcatac caataagaaa 120  
 atgttgattt taacgttggg gctgtgcctg ttgttttacg ttgtatacaa acgacagcaa 180  
 cagatgacaa tatttgaaag gtcacgcatt cccggcccga aaccgaattt cattcttggg 240  
 aatttactcg atattggccg taacggtctg accagcttat ttccgaagtg gacagagaaa 300  
 tatggaccaa tcgtgggatt ctatcttggg ggacgtcccc agttattgat taccgacttt 360  
 gaactgatgc gtcgtgttat ggtcaaagat ttacaaaaat tcagcaataa aagtcaaacc 420  
 ataccgggcg gtgttcaccc tactccagaa ctgcaaactt cgttactgtg ggctcgtgat 480  
 aatgcgtgga gacgcttgcg tgcttcgatg tcaccgtcat tttcatctta taagttgaac 540  
 gccatggagc cattgatgat gacttcattt aatacattgg ctgtggaact tgatgacaag 600  
 gccaaagagtg gcaaggaatt caatttaaag atgccgatat ccgagttgac attttccagt 660  
 ggtgctaaat gcatattcgg gcttgatttt tctactacgga aattgaccac cgaagctaaa 720  
 aatttttttag aagtcaccct attccgattg gacaattcaa tattagcaat gtcgatgctg 780  
 ttgtttccat cgctgacttt catagcttgg ccattacggt tactttggga acgaattcga 840  
 ttttatatgc tatggtcacc agaaggtgtc tgctatgacg tcgcgaaaaa catagtcaaa 900  
 attcgacggg aattaggaac gaaatcagtg gatttcttgc aattgttgat gaatacgaag 960  
 agaattgatt caacaactga tgtggatttg gagatgtcgt ctgacgacgt taagcaaagt 1020  
 aatcttatat cgagcaaaagc tggaaatggt gaacacattt cagagcacga gatcatatca 1080  
 aattcgatga ccttctaat tgcgtcttat gaaacaacat cggtcaccct tcagttttgt 1140  
 ctacataatt tgatcaatca tcaaaatgtc caagatgagc tgagaaatca acttcgaaaa 1200  
 gccatccccg agggcagcga ttccatttct tectccactt tggctgaaat tccattgatc 1260  
 aatcacatcg ttaaagaaac gctaaggatg ttccccccag cgtcaccgtt cgtaactaga 1320  
 gtggccaatg aggattacga atatgagggc gttgttatac cgaaaggatc agccatattt 1380  
 atcggagtca attcaatcca caatgatccg aaattgtggc ccgaaccgga aaagtttctg 1440  
 ccgcagagat ttgaaagtga ctttgataaa ttgtcgtttt tgccatttgg cgctggccct 1500  
 aggaactgca tcgggatgag gttcgcgtat atggagattc aattggttct tgccaatctc 1560  
 atcttgaaat accgctttga gcctggacca tcgacagaaa agaagattga aactttggaa 1620  
 tcggtcttaa cactggtacc gaagaatgga gtcttttcta aagtaaccaa actctaagaa 1680

taaataaatc aggtgagggt gaagctgacc tggctcttgt gtgatcacag gtgacactta 1740  
aatacaaaac atttaacaaa gaaatattct gaaa 1774  
<210> 4  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 4  
taatacgact cactataggg ccaacaaaaa gccaaatcgt 40  
<210> 5  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 5  
taatacgact cactataggg aacattgtgc gacaagttcg 40  
<210> 6  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 6  
taatacgact cactataggg atttttcatt gccggtttt 39  
<210> 7  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 7  
taatacgact cactataggg caaggccaat ttcgtttgt 40  
<210> 8  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 8  
taatacgact cactataggg ctatgacgtc gcgaaaaaca 40  
<210> 9  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 9  
taatacgact cactataggg ttcggtataa caacgcctc 40  
<210> 10

- <211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 10  
tccattgggt atctcggt 18  
<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 11  
ggatgatcgg tatagtctca 20  
<210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 12  
tcaccacat ttacatcc 18  
<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 13  
atcgtgcaaa caagtccc 18  
<210> 14  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 14  
gttggtgctg tgcctggt 18  
<210> 15  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 15  
agaatccac gattggtc 18  
<210> 16  
<211> 500  
<212> RNA  
<213> 韭菜迟眼蕈蚊 (*Bradysia odoriphaga*)

<400> 16

ccaacaaaaa gccaaaucgu caggaaucgg cggcguugac guugaaauga aggauuuguu 60  
 cucuagauau accaacgaug uuauvcguuc cgccgcguuc gguuguaagg ucaauucauu 120  
 cgaaaaugaa ucgaacgacu uuuaucgaa cggcaagaaa auuuugaauu ucgauucacc 180  
 gaaagcggcu uugaaaauuga uugcaaugag gacuuuaccu ggccuaauga aaaugaugga 240  
 caucaaucua acagacucag cauugacgaa auuuuuuccga aaaaugguua uggacaacau 300  
 aaccacaaga gaaaaggagg gcuaauucag gccggauaug aucaacauuu uaaugaaugu 360  
 gaggaaaagga aagucuuuag acaaugugga caaggaugaa aaacaucug gugaaggauu 420  
 cgcuacagug gaagagucac acauuggaac uaaacaaguu aaacgucaau ggacugacga 480  
 cgaacuuguc gcacaauguu 500

<210> 17

<211> 485

<212> RNA

<213> 韭菜迟眼蕈蚊 (*Bradysia odoriphaga*)

<400> 17

auuuuuucauu gccgguuuug aaacgucaag cucaacgaug auuuuuugca uguacgaacu 60  
 uagcaaaaau ccagacauuc agaagaaggu ccaugaagaa cucgacaaua ucuggaaauc 120  
 gggugaucua aaugaucuua cuuaugacgu ucugggcuca augaaaauacc ucgacuggug 180  
 uaucgacgaa acucugcgaa aaauaccaau uguaccguuc cuaaaucgag aaaguaccag 240  
 agaucaccaa uucuccggaa cgaauaugaa aaucgagaag ggaauucua ucacaauucc 300  
 aguauugggu auucaucgcg aucccgaau uuauugauuu ccgauggaau uccgaccaga 360  
 acgguucgag aacucaccaa ccgguaaucc gaauugacgg gguuuuuguu acaugccguu 420  
 cggcaguggu ccuagaaaau gugucgggga acgaauugga aaacuacaaa cgaaaauugg 480  
 ccuug 485

<210> 18

<211> 492

<212> RNA

<213> 韭菜迟眼蕈蚊 (*Bradysia odoriphaga*)

<400> 18

cuaugacguc gcgaaaaaca uagucaaaau ucgacgggaa uuaggaacga aaucagugga 60  
 uuucuugcaa uuguugauga auacgaagag aaugauuca acaacugaug uggauuugga 120  
 gaugucgucu gacgacguua agcaaagua ucuuauaucg agcaaagcug gaaugguga 180  
 acacauuuca gagcacgaga ucuaucaaa uucgaugacc uuccuaauug cgucuuuga 240  
 aacaacaucg gucacccuuc aguuuuugucu acauaauuug aucauauuc aaaaugucca 300  
 agaugagcug agaaaucaac uucgaaaagc caucuccgag ggcagcgauu ccuuuuuc 360  
 cuccacuug gcugaaaauuc cauugaucuu ucacaucguu aaagaaacgc uaaggauguu 420  
 cccccagcg ucaccguucg uaacuagagu ggccaauag gaaucgaau augagggcgu 480  
 uguuauaccg aa 492



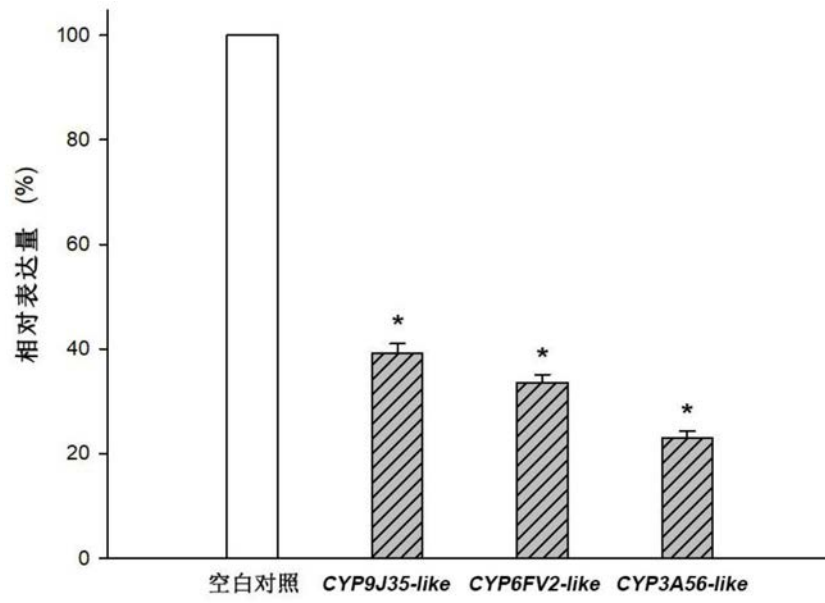


图1

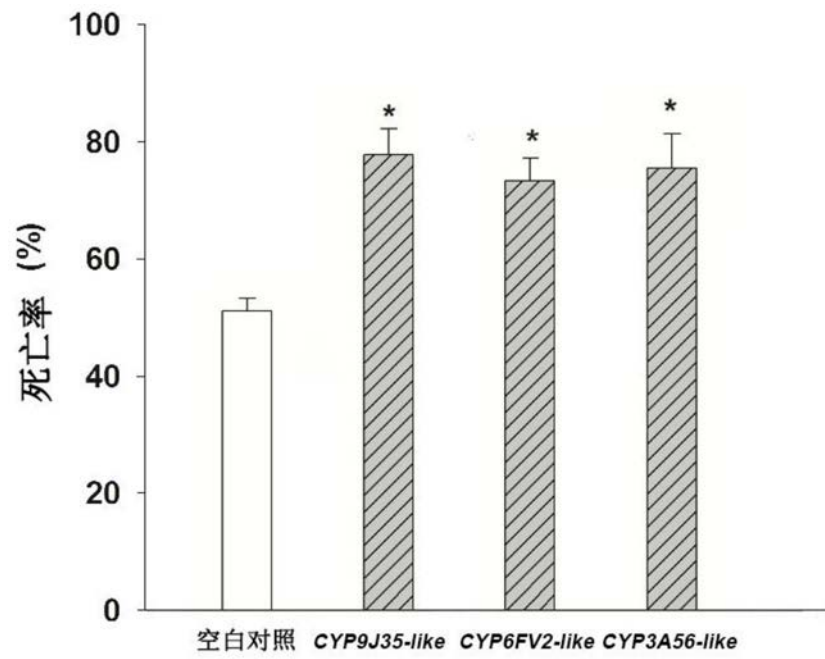


图2