

小菜蛾泛素基因的克隆及序列分析

徐佳宁¹, 许 勤², 薛 静¹, 王 颖¹, 程罗根¹, 李忠英³

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(2 南京师范大学电气与自动化工程学院, 江苏 南京 210042)

(3 贵州省农业科学院植物保护研究所, 贵州 贵阳 550006)

[摘要] 设计了一对简并引物, 从小菜蛾 *Plutella Xylostella* (L.) 抗溴氰菊酯品系和敏感品系的雌雄成虫基因组中分别克隆了泛素基因的编码区, GenBank 登录号分别为 EU28778 EU28779, EU28780 EU28781 序列分析表明, 该基因的长度为 228 bp 编码的多肽由 76 个氨基酸组成. 不同品系和不同性别的小菜蛾泛素基因的核苷酸序列、氨基酸序列等均存在差异, 其中敏感品系雌雄成虫间差异较大, 序列相似性为 81.1%; 抗性品系雌雄成虫间差异较小, 序列相似性为 97.8%. 推测这些差异可能与小菜蛾抗药性的形成有关. 因而为进一步研究小菜蛾抗药性形成机制和遗传机理奠定了基础.

[关键词] 小菜蛾, 泛素基因, 克隆, 序列分析

[中图分类号] S481+.4 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)04-0104-04

Cloning and Sequence Analysis of an Ubiquitin Gene of *Plutella Xylostella* (L.)

Xu Jianing¹, Xu Qin², Xue Jing¹, Wang Ying¹, Cheng Luogen¹, Li Zhongying³

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2. School of Electrical and Automation Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210042, China)

(3. Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agriculture Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract The cloned ubiquitin gene coding sequence of *Plutella Xylostella* (L.) susceptible strain and the deltamethrin-resistance strain of the adult male and female, 228 bp in length, encodes a protein of 76 amino acids (GenBank Accession No. EU28778 EU28779, EU28780 EU28781). Multiple sequence alignment indicated that the nucleotide and amino acid sequences both have different sites among the four samples: the susceptible strain has larger differences between male and female adults with the sequence similarity of 81.1%; while the resistant strain has smaller differences, sequence similarity 97.8%, thus these differences may be related to the molecular mechanism of drug resistance in *Plutella Xylostella*, and lay a foundation for further study of its formation and genetic mechanisms.

Key words *Plutella Xylostella* (L.), ubiquitin gene, cloning, sequence analysis

泛素 (ubiquitin) 由 76 个氨基酸残基组成, 相对分子质量约为 8 600, 是真核生物内高度保守的一种多肽, 游离于细胞内或共价缀合到各种胞浆、核和整合的膜蛋白上. 从不同种属的真核生物得到的泛素的一级结构几乎相同, 对植物、酵母和动物的泛素分析表明, 它们的结构仅有 1~3 个氨基酸残基不同. 泛素要经过一系列步骤才能缀合到底物蛋白上. 其缀合途径在真核细胞的许多代谢过程中起作用, 包括参与核糖体生物形成、细胞周期调控、蛋白激酶活性的调节、受体胞吞的调控、基因表达等^[1-4].

目前, 国内外仅报道了草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*^[5]、烟草天蛾 *Manduca sexta*^[6]、果蝇 *Drosophila melanogaster*^[7]、家蚕 *Bombyx mori*^[8]、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*^[9]、德国小蠊 *Blattella germanica*^[8] 及棉铃虫 *Helioverpa armigera*^[10] 等昆虫的泛素基因序列. Cheng 等^[11] 在对小菜蛾 *Plutella Xylostella* (L.) 的抗溴氰菊

收稿日期: 2008-04-20

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2006219)、南京师范大学实践创新训练计划资助项目.

通讯联系人: 程罗根, 博士, 教授, 研究方向: 遗传学. E-mail: chengluogen@njnu.edu.cn

酯品系和敏感品系的 cDNA RDA 分析 (cDNA representational difference analysis) 中发现抗性品系和敏感品系存在序列差异, 其中一个序列与已知泛素基因有较高的同源性, 可能与小菜蛾的抗药性有关. 我们根据已知真核生物泛素蛋白氨基酸序列, 设计一对简并引物, 对小菜蛾的抗性品系和敏感品系雌雄成虫的泛素基因作了进一步的比较与分析, 从而为研究泛素与昆虫抗药性的关系奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

室内选育的抗溴氰菊酯品系和同步隔离饲养的敏感品系的小菜蛾成虫, 由贵州省农业科学院提供^[11].

Taq 酶和 pGEM-T 载体购自美国 Promega 公司; 感受态细胞和核酸相对分子质量标准物购自 TaKaRa 公司; 其它试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 小菜蛾基因组 DNA 的提取

DNA 的提取技术根据程罗根等^[12]的方法略作改进. 分别随机取 -70℃ 冻存的小菜蛾敏感品系雌雄成虫和抗溴氰菊酯品系雌雄成虫各 3 头, 每 3 头同品系同性个体加入 400 μL 裂解缓冲液 (10 mmol/L Tris-CI, pH 值 8.0, 0.1 mol/L EDTA, pH 值 8.0, 质量体积百分比 0.5% SDS) 和 1.5 μL RNase (10 mg/mL), 匀浆, 37℃ 温育 1 h 加入蛋白酶 K (20 mg/mL) 5 μL, 混匀, 50℃ 水浴 3 h 用等体积的酚抽提 1 次, 5 000 g 离心 15 min, 酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提 2 次, 5 000 g 离心 10 min. 将提取的 DNA 溶于 50 μL TE (pH 值 8.0). 用 1% 琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 的完整性.

1.2.2 简并引物设计与合成

根据 Li ZF 等^[9]和已知的人、果蝇、牛及鳞翅目昆虫等泛素蛋白氨基酸序列的高度保守性, 设计一对简并引物. 正向引物: 5'-ATGCA (AG) AT (CT) TT (CT) GTTAA (AG) AC, 反向引物: 5'-(AG) CCACC ICG (CGA) AG IC (TG) (CGA) A (GA) (CG) AC. 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 使用前用 ddH₂O 稀释至 10 μmol/L.

1.2.3 PCR 扩增

PCR 反应条件为: 50 μL 反应体系中含 5 μL 10×PCR buffer, 0.04 μmol dNTP, 引物各 50 pmol, 3 units Taq-Polymerase, 约 3 ng DNA. 样品先 95℃ 预变性 3 min, 然后按下述条件进行 PCR 扩增反应: 95℃ 1 min, 35℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环后 72℃ 10 min, 扩增完毕后置 4℃ 终止反应.

1.2.4 PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物克隆参照 Maniatis 等^[13]方法, PCR 产物琼脂糖凝胶电泳, 选择大小与所设计的小菜蛾泛素基因片段相符合的单一 DNA 条带回收、纯化; 纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接, 重组子转化 JM109 大肠杆菌; 随机挑取单克隆, 由上海生工生物工程技术有限公司代为测序 (ABI 730 测序仪, 测序试剂 BigDye terminator v3.1, 美国 ABI 公司).

1.2.5 序列分析

将测得的 4 个序列分别送入 NCBI BLAST 进行同源性比较. 蛋白质序列预测和多序列比较采用 Mega4 软件.

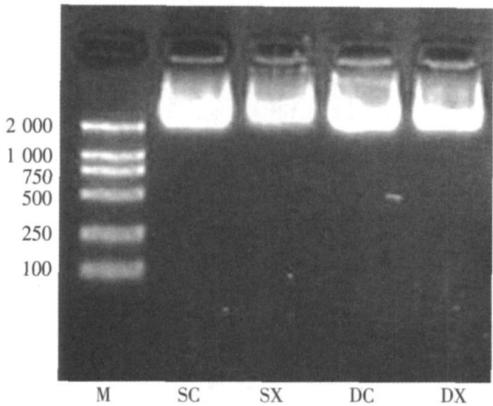
2 结果与分析

2.1 小菜蛾基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增

提取的小菜蛾基因组 DNA 电泳检测图谱如图 1. 以此基因组 DNA 为模板, 用所设计的一对引物进行 PCR 反应, 每个样品都得到一条与预计长度相当的约 230bp 的条带 (如图 2).

2.2 目的片段测序及序列分析

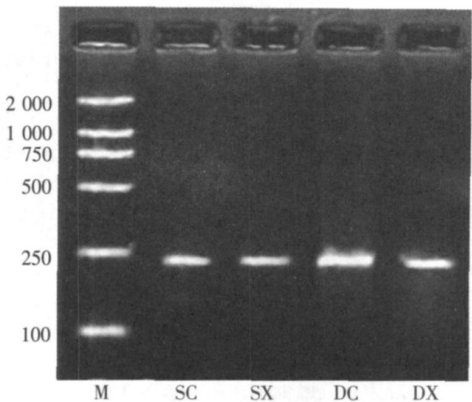
随机挑取的单克隆, 由上海生工生物工程技术有限公司代为测序. 序列测定表明, 克隆片段长 228 bp, 为一个开放阅读框, 编码 76 个氨基酸. 敏感品系雌性个体泛素基因预测编码蛋白相对分子质量为 8 510, 等电点为 5.73 (GenBank 登录号为 EU 28778); 敏感品系雄性个体泛素基因预测编码蛋白相对分子



SC:敏感品系雌性个体,SX: 敏感品系雄性个体,DC:抗溴氰菊酯品系雌性个体,DX: 抗溴氰菊酯品系雄性个体.

图 1 小菜蛾基因组 DNA

Fig1 *Plutella xylostella* L Genome DNA



M:2000 bpDNA Ladder, SC:敏感品系雌性个体 PCR 产物,SX:敏感品系雄性个体 PCR 产物,DC: 抗溴氰菊酯品系雌性个体 PCR 产物,DX:抗溴氰菊酯品系雄性个体 PCR 产物.

图 2 小菜蛾基因组 DNA PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of *Plutella xylostella* L Genome DNA

质量为 8 540,等电点为 6. 56(GenBank 登录号为 EU 428779); 抗溴氰菊酯品系雌性个体泛素基因预测编码蛋白相对分子质量为 8 550 等电点为 6. 56(GenBank 登录号为 EU428780); 抗溴氰菊酯品系雄性个体泛素基因预测编码蛋白相对分子质量为 8 550 等电点为 6. 56(GenBank 登录号为 EU428781). 用 GenBank 中的 BLAST 程序分析表明, 4 条片段与已报道的泛素基因序列均有 80% 以上的同源性. 运用 Mega4 软件对这 4 条小菜蛾泛素基因的核苷酸序列及氨基酸序列的比较结果见图 3 4 由图中可以看出, 小菜蛾不同品系间泛素基因核苷酸序列存在一定差异, 差异位点主要集中在密码子的第三位, 所以氨基酸序列极其相似, 仅有 2~ 4 个氨基酸的不同, 所有已知与泛素功能相关的位点在小菜蛾泛素蛋白序列中均保守存在. 其中, 小菜蛾抗溴氰菊酯品系雌性个体与雄性个体间的泛素基因含有的 5 个核苷酸差异序列相似性为 98. 7%, 差异位点均处于密码子的第三位, 所以其蛋白序列完全相同; 敏感品系雌性个体与雄性个体间泛素基因序列差异较大含有 43 个差异位点, 序列相似性为 81. 1%, 但差异位点也主要集中在密码子的第三位, 所以蛋白序列仅存在 4 个氨基酸差异.

DC	ATG	CAG	ATT	TTC	GTG	AAG	ACA	TTG	ACT	GGC	AAG	ACC	ATC	ACT	CTA	GAG	GTG	[51]
DXT	[51]
SCTCTCT	[51]
SXTTC	..TA	..T	..GA	...	[51]
DC	GAG	CCT	GCT	GAC	ACC	ATC	GAG	AAT	GTG	AAG	GCT	AAG	ATT	CAG	GAC	AAG	GAA	[102]
DX	[102]
SCT	..TCAA	..G	[102]
SX	..A	G..A	T..GT	..AA	..AAG	[102]
DC	GGG	ATT	CCC	CCA	GAC	CAG	CAG	CGT	TTG	ATC	TTC	GCC	GGC	AAA	CAG	TTG	GAA	[153]
DX	[153]
SC	..TGA	A..G	C..TG	[153]
SX	..TA	..TT	..TA	[153]
DC	GAC	GGC	CGC	ACT	CTT	TCT	GAC	TAC	AAC	ATT	CAG	AAG	GAA	TCT	ACT	CTT	CAC	[204]
DX	[204]
SC	..TG	..AC	..ACCG	...	[204]
SX	..TA	..CT	..TA	..A	[204]
DC	TTG	GTC	CTT	CGC	CTC	CGC	GGT	GGT										[228]
DXG	..CTC										[228]
SC	..A	...	T..C	A..C										[228]
SXCGC										[228]

SC:敏感品系雌性个体,SX: 敏感品系雄性个体,DC:抗溴氰菊酯品系雌性个体,DX: 抗溴氰菊酯品系雄性个体.

图 3 泛素基因核苷酸序列比对

Fig.3 Alignment of the nucleotide sequence of ubiquitin genes

```
DC MQIFVKLTG KTITLEVEPA DTIENVKAKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL ED [52]
DX ..... [52]
SC ..... [52]
SX .....AS ..... [52]

DC GRTLSDYNIQ KESTLHLVLR LRGG [76]
DX ..... [76]
SC .....FS ..... [76]
SX ..... [76]
```

SC:敏感品系雌性个体,SX: 敏感品系雄性个体,DC:抗溴氰菊酯品系雌性个体,DX: 抗溴氰菊酯品系雄性个体.

图 4 泛素基因氨基酸序列比对

Fig.4 Alignment of the amino acid sequence of ubiquitin prote

3 讨论

本研究在 Cheng等^[11]的基础上,对小菜蛾的泛素基因作了进一步的分析.应用一对简并引物分别克隆了小菜蛾敏感品系和抗性品系的泛素基因编码区,发现其核苷酸序列、蛋白序列等均存在差异,这可能与小菜蛾抗药性的形成有关;并且将同一品系中不同性别的小菜蛾分开进行研究,发现抗性品系雌雄个体间泛素基因的差异明显低于敏感品系个体间的差异,这可能与遗传异质性有关,敏感个体异质性高,经药剂汰选后异质性提高,由此引起抗性个体间泛素基因的差异减小,说明在抗药性形成的过程中药物可能对泛素基因的表达和遗传过程产生了一定的选择作用.虽然小菜蛾泛素基因核苷酸和氨基酸序列上的差异还不足以说明小菜蛾抗药性的形成与其泛素基因的关系,但这为进一步研究小菜蛾不同品系和性别间泛素基因表达量及其基因调控机制奠定了基础.

[参考文献]

[1] Xiao W, Lin S L, Broomfield S et al The products of the yeast MMS2 and two human homologs (hMMS2 and CROC-1) define a structurally and functionally conserved Ubc-like protein family [J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(17): 3 908-3 914

[2] Roest H P, van K laveren J, de W i J, et al Inactivation of the HR 6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification[J]. Cell, 1996, 86(5): 799-810

[3] Strous G J, van Kerkhof P, Govers R, et al Growth hormone- induced signal transduction depends on an intact ubiquitin system [J]. Journal of Biology Chemistry, 1997, 272(1): 40-43

[4] Spataro V, Norbury C, Harris A L. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer [J]. British Journal of Cancer, 1998, 77 (3): 448-455.

[5] Guarino LA. Identification of a viral gene encoding a ubiquitin-like protein [J]. Proc Natl Sci, 1990, 87(1): 409-413

[6] Bishoff S T, Schwartz L M. Characterization of a ubiquitin-fusion gene from the tobacco hawkmoth, Manduca sexta [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(20): 6 039-6 043

[7] Barrio R, de la Roca A, Cabrera H L, et al Structure and expression of the Drosophila ubiquitin-80-amino acid fusion protein-gene[J]. Journal of Biochemistry, 1994, 302(1): 237-244

[8] 于航,金丰良,许小霞,等.德国小蠊泛素基因的克隆及序列分析[J].昆虫学报,2004,47(4):522-525

[9] Li Z F, Pang Y, Yu J X. Cloning and sequencing of ubiquitin gene from Spodoptera litura[J]. Entomologia Sinica, 2003, 10(1): 27-34

[10] 李朝飞,于航,潘丽晶,等.棉铃虫泛素基因的克隆和序列分析[J].中山大学学报:自然科学版,2005,44(1):61-64

[11] Cheng L G, Wang S Z, Chen Z H, et al cDNA representational difference analysis of the deltamethrin-resistant and -susceptible populations in diamondback moth (*Plutella Xylostella* L.) [J]. Appl Entomol, 2005, 129(9/10): 515-520

[12] 程罗根,李凤良,韩招久,等.小菜蛾对杀虫双和杀螟丹抗药性遗传的 DNA 随机扩增多态性研究[J].昆虫学报,2001,4(1):15-19.

[13] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 68-105

[责任编辑:孙德泉]