

# 溴氰菊酯胁迫下小菜蛾差异 表达基因的筛选与分析

刘白朵<sup>1</sup>, 李凤良<sup>2</sup>, 和碧蕾<sup>1</sup>, 于希忠<sup>1</sup>, 李忠英<sup>2</sup>, 程罗根<sup>1</sup>

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(2 贵州省农业科学院植物保护研究所, 贵州 贵阳 550006)

[摘要] 通过双向 cDNA RDA, 即分别以敏感品系为检测子 (tester)、抗溴氰菊酯品系为驱赶子 (driver) 和以抗溴氰菊酯品系为检测子 (tester)、敏感品系为驱赶子 (driver) 筛选 2 种品系中的差异表达基因, 初步分析小菜蛾敏感品系和抗性品系之间的遗传差异. 经过 3 轮消减杂交后, 将所得的差异片段克隆于 pMD 18-T 载体, 氨苄筛选阳性克隆, 经菌落 PCR 鉴定后送样测序. 得到 2 条序列与 GenBank 数据库中的部分已知序列有一定同源性, 其中 1 条序列与编码 S3a 蛋白基因有较高的同源性.

[关键词] 小菜蛾, 抗性遗传, 菌落 PCR, cDNA RDA

[中图分类号] S436.341 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)02-0091-05

## Screening and Analysis of the Differential Expressed Sequence of Diamondback Moth, *Plutella xylostella*

Liu Baiduo<sup>1</sup>, Li Fengliang<sup>2</sup>, He Bilei<sup>1</sup>, Yu Xizhong<sup>1</sup>, Li Zhongying<sup>2</sup>, Cheng Luogen<sup>1</sup>

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

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

**Abstract** We sifted the differential expressed sequence from *Plutella xylostella* susceptible strain and the deltamethrin-resistance strain by two-way cDNA representational difference analysis (cDNA RDA). The two-way cDNA RDA was performed respectively using cDNA from the *P. xylostella* susceptible strain as Tester amplicon and from the deltamethrin-resistance strain as Driver amplicon, and using cDNA from the deltamethrin-resistance strain as Tester amplicon and from the susceptible strain as Driver amplicon. The differential sequences between *Plutella xylostella* susceptible strain and the deltamethrin-resistance strain were analysed preliminarily. After three rounds of subtractive hybridization, the differential fragments were cloned with pMD18-T vector, then screening positive clone with ampicillin and sequenced after colony PCR. Comparisons between our sequencing result and data in GenBank showed that there were two sequences appearing relatively high homology to some known sequences. One of them had high homology with the sequence encoding s3a protein.

**Key words** *Plutella xylostella* (L.), inheritance of resistance, colony PCR, cDNA RDA

小菜蛾是世界性十字花科蔬菜主要害虫, 至今已有很多有关小菜蛾抗药性的研究报道<sup>[1]</sup>. 但大部分集中在田间抗性检测、生理生化机制及普通遗传学方面, 很少涉及其抗药性发生发展的遗传本质、抗性相关基因的表达与调控等分子水平的研究. 大量研究表明, 昆虫抗药性是可遗传的性状, 抗性个体的基因组与敏感个体基因组存在着一定差异. 这些差异是导致昆虫对杀虫剂产生抗性的根本原因.

cDNA 代表性差异分析 (cDNA Representational Difference Analysis) 于 1994 年由 Hubank 和 Schatz<sup>[2]</sup> 在 Lisitsyn 等<sup>[3]</sup> 建立的 RDA 方法的基础上改良而来, 是一种用于比较两组织间差异表达基因的较完善的技术. 由于该技术与其他基因克隆方法相比具有操作简单、快速、灵敏度高、假阳性低等优点, 目前该技术已

收稿日期: 2009-10-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30560085)、南京师范大学实践创新训练计划项目.

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

成功地应用于差异表达基因的克隆、缺失片段的分离、外源片段的检测、多态性探针的制备等领域的研究中,近年来各大实验室又对该方法的实验参数做了进一步改进<sup>[4]</sup>. C. Luo 等<sup>[5]</sup>以抗溴氰菊酯品系为检测子 (tester)、敏感品系为驱赶子 (driver), 从随机选择的 10 个克隆中, 发现一个与泛素基因高度同源序列. 本研究在前期工作基础上, 采用双向 cDNA RDA 方法分析在抗性品系和敏感品系中差异表达的基因序列, 为筛选抗性相关基因奠定基础.

# 1 材料与方法

## 1.1 小菜蛾

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.

## 1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

按 TRIzol<sup>TM</sup> 试剂盒 (Gibco BRL) 说明书操作提取成虫小菜蛾总 RNA. 用紫外分光光度计 (Eppendorf AG 22331 Hamburg) 测定 RNA 浓度, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳证明其完整性. 用 Universal RiboTome cDNA Synthesis System (Promega) 合成 cDNA.

## 1.3 特定接头及引物

序列设计参照 Hubank 等的文献<sup>[2]</sup>, 具体序列如下: R-Bgl+24 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'; R-Bgl+12 5'-GATCTGCGGTGA-3'; J-Bgl+24 5'-ACCGACGTGCGACTATCCATGAACA-3'; J-Bgl+12 5'-GATCTGTTTCATG-3'; N-Bgl+24 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'; N-Bgl+12 5'-GATCTTCCCTCG-3'. 接头及引物由上海生工生物工程技术服务公司合成.

## 1.4 cDNA RDA

主要参考 Hubank<sup>[2]</sup> 及王淑珍<sup>[6]</sup> 等方法. 取 1  $\mu$ g cDNA 用 Dpn II (NEB) 酶切, 苯酚/氯仿 (上海生工) 纯化, 与接头 R-Bgl+24 连接, 苯酚/氯仿纯化, PCR 扩增, 再经 Dpn II 酶切去除 R-Bgl+24 接头, 将 tester 连上 J-Bgl+24 接头, 制备代表性检测扩增子 (tester) 及驱赶扩增子 (driver). 第一轮消减杂交: 分别以敏感品系小菜蛾和抗性品系小菜蛾作为检测扩增子 (tester) 构建 2 个杂交系统, 取 5  $\mu$ g Driver cDNA 与 50 ng Tester cDNA 混匀, 加入 3  $\times$  EE 杂交缓冲液 [30 mmol/L EPPS (Amresco), pH 8.0 (20 $^{\circ}$ C); 30 mmol/L EDTA; ], 覆盖上矿物油, 98 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 加入 1  $\mu$ L 3 mol/L NaCl 67 $^{\circ}$ C 杂交 20 h 加 TE (pH 8.0) 稀释杂交后产物, PCR 扩增 15 个循环, 苯酚/氯仿纯化. 绿豆核酸酶 37 $^{\circ}$ C 消化 20 min, 苯酚/氯仿纯化. PCR 扩增 26 个循环, 条件为: 95 $^{\circ}$ C、3 min; 26 个循环 (95 $^{\circ}$ C、1 min; 70 $^{\circ}$ C、3 min), 72 $^{\circ}$ C、10 min 得到第一轮消减杂交产物, 产物经紫外分光光度计确定浓度. 按上述条件进行第二轮、第三轮消减杂交, 每轮反应中 Driver 都为 5  $\mu$ g Tester 与 Driver 的比例分别为 1:1000 1:200000 采用的接头分别为 N-Bgl+24 J-Bgl+24 最后的扩增循环数分别为 28、30

## 1.5 差异片段克隆、测序及同源性分析

1.3% 琼脂糖凝胶电泳回收第三轮差异片段, Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) 纯化. 用 pMD18-T Vector (Takara) 提供的载体, 转入 Top10 菌株, 氨苄筛选, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 送由上海生工生物工程有限公司 (ABI377) 测序.

# 2 结果

## 2.1 RNA 提取及 cDNA 合成

TRIzol 试剂提取总 RNA 后, 用紫外分光光度计测定显示 A260/A280 为 1.97, 琼脂糖凝胶电泳显示 28S 和 18S 条带清晰, 且比例合适. 反转录后, cDNA 经琼脂糖电泳显示在 200~750 bp 都有条带.

## 2.2 cDNA RDA 差异片段的获得

来自敏感和抗性品系小菜蛾的 cDNA, 经 Dpn II 酶切后, 在 T4 DNA 连接酶 (NEB) 的作用下两端连上 R 接头, PCR 扩增, 分别制备 Tester 和 Driver 电泳可见明显主带, 集中分布于 250~600 bp 琼脂糖凝胶电泳分析第一、二、三轮消减杂交的片段, 可见随着消减杂交次数的增加, 所获得的差异片段逐渐减少 (图 1, 图 2)

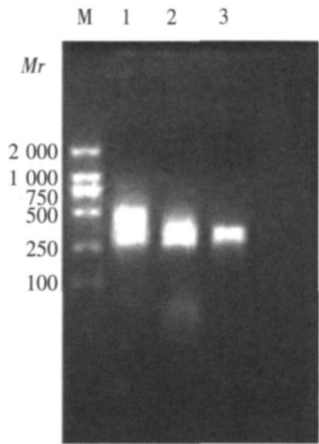


图1 琼脂糖凝胶(1.2%)电泳检测 cDNA RDA 差异产物

Fig.1 cDNA RDA difference production  
(1.2% agarose gel electrophoresis)  
以敏感品系作为 Tester, 抗溴氰菊酯品系为  
Driver 三轮杂交后的结果  
注: M; 2000 Marker; 1~3: 一、二、三轮差异产物

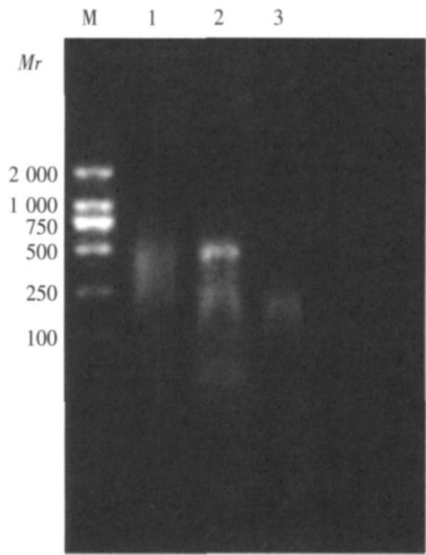


图2 琼脂糖凝胶(1.2%)电泳检测 cDNA RDA 差异片段

Fig.2 cDNA RDA difference production  
(1.2% agarose gel electrophoresis)  
以抗溴氰菊酯品系为 Tester, 敏感品系为  
Driver 三轮杂交后的结果  
注: M; 2000 Marker; 1~3: 一、二、三轮差异片段

2.3 测序分析和同源性比较

将差异扩增片段克隆于 pMD18-T Vector(Takara) 提供的载体上, 转入 Top10 菌株, 氨苄筛选, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 挑选克隆送交上海生工生物工程有限公司测序. 将测得的序列用 NCBI BLASTN 进行同源性比较, 得知其中以敏感品系为检测子的系统得到 2 条片段与 GenBank 数据库中的片段具有一定的同源性; 而以抗性品系为检测子的系统与 GenBank 数据库中已知序列无同源性, 可能为一些新的基因, 需通过其他方法来证实. 其中分别将 2 条有相似性的片段命名为 TS39 和 TS35. TS39 与已知的几种物种的编码 S3a 蛋白基因有一定的同源性, 而 TS35 与已知的几种物种的编码 S23 蛋白基因有一定的同源性. 利用 DNA CLUB 推导其氨基酸序列(图 3). 应用 ClustalX 1.83 软件对 TS39 与其他几种生物的相关核苷酸序列作同源性比较: 草地夜蛾为 89.8% 同源, 烟夜蛾为 90.5%. 用相同的方法得到, TS35 与其他几种生物的相关核苷酸序列的同源性为: 棕色家蚕为 93.3%, 白纹伊蚊为 91.4%, 嗜凤梨果蝇为 91.6%, 埃及伊蚊为 91.1%.

```
A GCCAG CGAA ACTTCAAATACA CG GTTCTTCAAA CCCTCAGAG GCG ATTTTGGTA CCCTGGG TCGCGT
S Q R N F K Y T V L Q T L R G D F G T L G A V
TGACAAGGGTGGTTCCC ACTTG TCTCTTGGTGAACATGGA CGGTGCCTTGA CATCGTACCAGTCTTTA
D K G G S H L S L G E H G R C L D I V P V F T
CGGGTGAAAGGCTCCACA ATCTTCTTCTTAA CACCCTTTTGTCCA CCCTTCGACAG CCTTATTTTT
G E R V H N L L L N T L F A T L R Q T F I F
GCCACCGCCATGA
A H R H
```

图3 TS39 的核苷酸序列和氨基酸序列  
Fig 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of TS39

|            |                                                                        |
|------------|------------------------------------------------------------------------|
| Spodoptera | G GCCAG CGA TACTTCAAAG ACA CG GCCCTTCAAA CCCTCAGAA GCGA TTTTGGTG CCCTG |
| Heliothis  | G GCCAG CGA GACTTCAAAAA CA CGG CCCTTCAA TCCTCAGAG GCAA TTTTGGTG CCCTG  |
| TS39       | A GCCAG CGAA ACTTCAAATACA CG GTT CTTCAAA CCCTCAGAG GCG ATTTTGGA CCCTG  |
|            | *****                                                                  |
| Spodoptera | A GTACGGTTGACAAGGG TGGTTCCCACTTG TCTCTTGGTGAACATAGA CG GAGCCTTGAC      |
| Heliothis  | A GTACGGTTGACAAGGG TGGTTCCCACTTG TCTCTTGGTGAACATAGA CG GTGCCTTGAC      |
| TS39       | G GTGCGGTTGACAAGGG TGGTTCCCACTTG TCTCTTGGTGAACATGGA CG GTGCCTTGAC      |
|            | *****                                                                  |
| Spodoptera | A TCGTACCAATCTTTACGGGTGA AGGGA TCGA CG ATCTTCTTCTTAACACCCCTTTTACC      |
| Heliothis  | A TCGTACCAGTCTTTACGGGTGA AGGGA TCGA CA ATCTTCTTCTTAACACCCCT ----       |
| TS39       | A TCGTACCAGTCTTTACGGGTGA AAGGG TCCA CAATCTTCTTCTTA ACA CCCTTTTGCC      |
|            | *****                                                                  |
| Spodoptera | G CCITTCGACAGGCCCTTATTTTACCAACCG CCATGT                                |
| Heliothis  | -----                                                                  |
| TS39       | A CCCTTCGA CAGACCTTTATTTTG CCCACCGCCATGA                               |

图 4 TS39与 GenBank中已知所有其他物种相关编码 s3a蛋白基因核苷酸序列的比对

Fig 4 The comparison between TS39 sequence and another nucleotide sequences known to encode S3a gene of all other species in GenBank

注: Spodoptera为草地夜蛾, Heliothis为烟夜蛾.

TCAGGA ACGTAAGA AGGTGACA GCG TTCGTG CCCCGTGACGGTTGCCTCAA CCA CGTTGAAGAG AACGACGAAGTGCT  
S G T V R R . Q R S C P V T V A S T T L K R T T K C .  
AGTGGCGGGATTGCGTTCGTAAG GGCCA CG CGT CGG TGACATTCCCGAGTCCGATTCAAGGTTGTCAAGGTGCGCCAAC  
W R D S V V R A T P S V T F P E S D S R L S R S P T  
GTTTCTCTTTGGCTCTGTACA AGGAAAA GAAGGAG AGGCCATGCTCTGTTCATG GATAGTGA CGTCCGGT  
F L F W L C T R K R R R G H G L F M D S R R R

图 5 TS35的核苷酸及其氨基酸序列

Fig 5 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of TS35

3 讨论

供试小菜蛾最初采自甘蓝地,与武汉市蔬菜研究所提供的小菜蛾敏感种群四龄幼虫的 LD<sub>50</sub>值比较,证明田间种群为敏感种群,将敏感的族系保留下来,培育为敏感品系;小菜蛾抗溴氰菊酯品系是在此基础上通过室内点滴法处理四龄幼虫,连续继代淘汰分离的敏感个体选育而成的.因此可以认为,抗性品系和敏感品系中基因表达的差异主要是由于溴氰菊酯的长期选择作用引起的.

程罗根、张晓飞、张海等<sup>[7,8]</sup>曾用 RDA (代表性差异分析)方法分析小菜蛾的基因组 DNA,之后王淑珍<sup>[6]</sup>和 C. Luo gen等<sup>[5]</sup>用改进的 cDNA RDA方法筛选出一个差异表达的序列,该序列与泛素基因有很高的同源性.本文首次通过构建一个双向的 cDNA RDA方法来鉴定敏感品系和抗性品系之间基因表达的差异,从随机选取的 30个克隆测序中,得到两个差异表达序列,经 Blast分析发现分别与编码 S3a蛋白基因和编码 S23蛋白基因有比较高的同源性.

目前已知, S3a蛋白位于大、小核糖体亚基的接触面上,该部位是核糖体结合翻译启动因子 2(eIF2), eIF3, eIF2, Met- tRNA, Phe- tRNA 以及 mRNA 的位置, S3a水平的变化影响到核糖体翻译的启动<sup>[9-11]</sup>.孙阿萍<sup>[12]</sup>等研究表明由于核糖体 S3a的降解抑制核糖体翻译功能的启动,阻碍了参与细胞生命活动的蛋白的合成,从而导致细胞凋亡. Song等<sup>[13]</sup>研究表明 S3a蛋白在细胞凋亡方面产生一定的作用.徐家萍<sup>[14]</sup>等通过家蚕抗药性研究也得到 S3a的确在抗性品系和敏感品系间存在一定的表达差异,但在小菜蛾的抗药性研究中还没有相关的报道.有关 S23蛋白的报道不多, Xian Li等<sup>[15]</sup>对青岛文昌鱼中的编码 S23蛋白基因有过简单的报道,在小菜蛾细胞中尚属首次报道,有待于进一步研究.

[参考文献]

- [ 1 ] Mohan M, Gujar G T. Local Variation in Susceptibility of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to Insecticides and Role of Detoxification Enzymes[ J]. Crop Protection, 2003, 22( 3): 495-504
- [ 2 ] Hubank M, Schatz D G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA [ J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22( 25): 5 640-5 648
- [ 3 ] Lisitsyn N A, Lisitsyn N M, W igler M H. Cloning the difference between two complex genomes[ J]. Science, 1993, 259: 946-951.
- [ 4 ] Elke Lammens, Pieter-Jan Ceysens, Marleen Voet, Kirsten Hertveldt, Rob Lavigne, Guido Volckaert. Representational Difference Analysis ( RDA ) of bacteriophage genomes[ J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77( 2): 207-213.
- [ 5 ] C Luogen, W Shuzhen, C Zhihao, et al. cDNA representational difference analysis of the deltamethrin-resistant and-susceptible populations in diamondback moth (*Plutella xylostella* L. ) [ J]. J Appl Entomol, 2005, 129 ( 9/10): 515-520.
- [ 6 ] 王淑珍, 程罗根, 陈之浩, 等. 小菜蛾溴氰菊酯抗性和敏感种群遗传差异的 cDNA RDA 分析 [ J]. 植物保护学报, 2005, 32( 1): 63-66
- [ 7 ] 张晓飞, 程罗根, 陈之浩, 等. 小菜蛾对杀虫双抗性遗传的 RDA 分析 [ J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2003, 26( 1): 78-82
- [ 8 ] 张海, 程罗根, 陈之浩, 等. 抗杀虫双品系小菜蛾抗药性的 RDA 分析 [ J]. 江苏农业科学, 2004, 5: 46-50
- [ 9 ] Westermann P, Heumann W, Bommer U A. Cross-linking of initiation factor eF-2 to proteins of the small subunit of rat liver ribosomes[ J]. FEBS Lett, 1979, 97: 101-104
- [ 10 ] Tushinski R J, Warner J R. Ribosomal proteins are synthesized preferentially in cells commencing growth[ J]. J Cell Physiology, 1982, 112: 128-135
- [ 11 ] Tolan D R, Hershey J W B, Taut R R. Cross-linking of eukaryotic initiation factor eIF-3 to the 40S ribosomal subunit from rabbit reticulocytes[ J]. Biochimie, 1983, 65( 7): 427-436
- [ 12 ] 孙阿萍, 吕晓平, 张秋迟, 等. 细胞凋亡过程中核糖体蛋白 S3a 水平变化的研究 (一) [ J]. 黑龙江医药科学, 2001, 24(3): 1-4
- [ 13 ] Song D, Sakanoto S, Taniguchi T. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activity by Bcl-2 in association with the ribosomal protein S3a[ J]. Biochemistry, 2002, 41 ( 3): 929-934
- [ 14 ] 徐家萍, 陈克平, 姚勤, 等. 利用荧光差异显示技术分离的家蚕抗 NPV 相关基因 S3a[ J]. 昆虫学报, 2005, 48( 3): 347-352
- [ 15 ] Li Xian, Zhang Shicui, Liu Zhenhui, et al. Ribosomal protein genes S23 and L35 from amphioxus branchiostoma belcheri tsingtauense: identification and copy number[ J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2005, 37( 8): 573-579

[责任编辑: 孙德泉]