

小菜蛾泛素基因的克隆与分析

张 宏¹, 杜亚琼¹, 李凤良², 周 洲¹, 顾曙余¹, 程罗根¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)
(2. 贵州省农业科学院植物保护研究所, 贵州 贵阳 550006)

[摘要] 运用 RT-PCR 技术,从小菜蛾幼虫总 RNA 反转录产物中扩增出泛素基因的 cDNA 序列. 利用 RNA 干扰 (RNAi) 技术将一段体外合成的与小菜蛾泛素延伸蛋白基因 UBA52 同源的 dsRNA 注入四龄幼虫体内,以抑制小菜蛾 UBA52 基因的表达. 半定量 RT-PCR 结果显示,72 h 后沉默组小菜蛾幼虫体内 UBA52 基因的 mRNA 表达量显著下调. 本实验成功沉默小菜蛾泛素基因,此 RNAi 干扰体系的建立为利用此技术分析小菜蛾及其他昆虫基因的功能提供了参考.

[关键词] 小菜蛾,泛素基因家族, RNA 干扰, 基因沉默

[中图分类号] S481+4 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)03-0116-04

Cloning and Analysis of Ubiquitin Genes of *Plutella Xylostella*(L.)

Zhang Hong¹, Du Yaqiong¹, Li Fengliang², Zhou Zhou¹, Gu Shuyu¹, Cheng Luogen¹

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)
(2. Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agriculture Science, Guiyang 550006, China)

Abstract: The cDNA sequences of ubiquitin genes were isolated from *Plutella xylostella* by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Using RNA interference (RNAi), the *in vitro* synthesized double-stranded RNA (dsRNA) homologous to the UBA52 gene was microinjected into 4th instar larvae of *P. xylostella* to suppress the gene expression. The results of semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) demonstrated that UBA52 gene expression was reduced sharply at 72h after injection. The ubiquitin gene was silenced successfully in this experiment, and the establishment of RNAi technique can help reveal the gene function of *P. xylostella* and other insects.

Key words: *Plutella xylostella*, ubiquitin gene family, RNAi, gene silencing

1975 年 Goldstein 等从牛胸腺中分离到一种小分子蛋白质^[1],由 76 个氨基酸残基组成,相对分子量为 8.6 kDa,随后发现这种蛋白质普遍存在于各种真核生物中,故命名为泛素(Ubiquitin, Ubi). 泛素游离于细胞内或共价缀合到各种胞浆、核和膜蛋白上,从不同种属真核生物中得到的泛素的结构几乎相同. 实验证明,真核生物的泛素基因家族分为两类:第一类为泛素延伸蛋白(Ubiquitin extension protein)^[2,3],表达产物为泛素分子的 C-末端连接 52~53 或 76~80 个氨基酸组成的核糖体蛋白,分别称之为 UBA52(U1、U2)或 UBA80(U3),核糖体蛋白被特殊的酶切下,成为 80S 核糖体的组分;第二类为多聚泛素基因(Polyubiquitin, U4),由多个泛素基因首尾串联而成^[4],这类基因的表达受环境胁迫、胞内代谢状况和细胞分裂周期等多种因素的调节^[5].

泛素不仅通过泛素-蛋白酶体途径(Ubiquitin-proteasome pathway, UPP)参与蛋白质的降解和细胞周期调控,而且还参与基因转录调控、信号转导、细胞凋亡等. 泛素的研究主要集中在高等动植物中,昆虫泛素基因的研究相对较少. 目前国内外仅报道了斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)^[6]、德国小蠊(*Blattella germanica*)^[7]、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)^[8]和小菜蛾(*Plutella xylostella*)等几种昆虫的泛素基因序列. 本课题组根据已经报道的真核生物泛素基因设计兼并引物,克隆了小菜蛾的一个序列^[9],本文对小菜蛾

收稿日期:2012-10-30.
基金项目:国家自然科学基金(31071974)、江苏省研究生科研创新计划项目.
通讯联系人:程罗根,博士,教授,研究方向:分子遗传学,遗传毒理学. E-mail:chengluogen@njnu.edu.cn

泛素基因家族的其他基因进行克隆和分析,并合成各成员的 dsRNA 序列,对相关基因进行干扰测试,为进一步研究小菜蛾泛素基因的功能奠定基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

小菜蛾品系由贵州省农业科学院提供.

Taq 酶、载体、核酸 Marker、cDNA 合成试剂盒和感受态细胞 DH5 α 均购自 TaKaRa 公司(日本),PCR 产物纯化试剂盒购自 Axygen(美国),RNA 提取试剂盒购自 Qiagen, RNAi 试剂盒购自 Ambion 公司(美国);OneDorp 分光光度计,其他试剂为国产分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

随机取 10 只小菜蛾四龄幼虫,放入到预冷的研钵,用液氮充分研磨,再按照试剂盒说明书操作.提取的 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性,A260 吸光度检测其浓度,A260/280 检测其纯度.

1.2.2 PCR 扩增

根据已知的昆虫等泛素基因家族成员 UBA52、UBA80 和 Polyubiquitin 的氨基酸序列的高度保守性,分别设计一对简并引物.引物合成由上海生工合成,使用前用 ddH₂O 稀释至 10 μ mol/L. PCR 反应条件为:50 μ L 反应体系含 5 μ L 10 \times PCR 反应 Buffer,0.04 μ mol dNTP,引物各 50 pmol,3 units Taq 酶,约 4 ng DNA. 样品先 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,然后按下列条件进行 PCR 扩增反应:95 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,15 $^{\circ}$ C 终止反应.

1.2.3 PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物分别经琼脂糖凝胶电泳,目的 DNA 条带回收、纯化.纯化后的产物与 pMD-19T 载体相连接,重组质粒转染大肠杆菌 DH5 α ,随机挑选单克隆,送上海生工代为测序.

1.2.4 dsRNA 制备

将已测序的 UBA52、UBA80 和 Polyubiquitin 序列送 NCBI 数据库进行同源性比较,确认产物序列正确.选择 UBA52、UBA80 和 Polyubiquitin 的序列保守区设计特异性引物进行 PCR(引物两端加上 20 bp 的 T7 启动子序列 TAATACGACTCACTATAGGG,以利于转录起始).以纯化回收的双链 DNA 为模板,用 MEGAscript RNAi Kit 体外转录试剂盒转录制备 dsRNA,与紫外分光光度计下检测 dsRNA 浓度和纯度,并取 dsRNA 总量的 1/400 于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其长度,于-80 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.2.5 dsRNA 注射

选择同一批龄期相同、发育良好的小菜蛾,用微量操纵仪(WPI,USA)于小菜蛾的前胸背面注射与 U1/U2(UBA52)相对应的 dsRNA.处理组注射 160 ng dsRNA,对照组注射相应体积的无菌水.注射后大量出血的幼虫弃之不用.幼虫注射后放入与对照组相同的培养箱中饲养,每隔 12 h 观察幼虫生长状况,注射 3 d 后检测 RNA 干扰效率.

1.2.6 RNAi 效率的检测

半定量 RT-PCR:3 d 后分别取对照及处理组的幼虫各 10 只,提取 RNA,反转录成 cDNA,调节对照组和处理组的 cDNA 浓度使其相同,并以此 cDNA 作为 RT-PCR 模板扩增对照组和处理组的目的基因 UBA52,由表达量变化检测 RNAi 的效率.根据已报道小菜蛾的 GAPDH 内参基因序列设计一对特异性引物(上游引物:5'-TGGAAGGTGGTGCCAAGAA-3';下游引物:5'-AAGGGGAGCGAGGCAGTTAG-3').RT-PCR 的扩增循环数为 25.

2 结果与分析

2.1 小菜蛾幼虫总 RNA 的提取

小菜蛾幼虫 RNA 的提取结果见图 1.紫外分光光度计测得 RNA 的 A260/A280 值为 1.94,在 1.8 ~ 2.0 之间,证明总 RNA 质量合格.

2.2 泛素基因的 PCR 扩增结果

PCR 扩增得到清晰的目的条带分别为 387 bp、468 bp 和 1 573 bp,片段长度符合预期片段大小(图 2). 对该片段克隆测序并经过 NCBI 序列比对分析,证实分别与其他物种的 UBA52、UBA80 和 polyubiquitin 的序列均具有 90% 以上的相似性. 证明此 PCR 体系可以正确扩增出目的片段,此序列即可依此体系大批量扩增用以合成相应的 dsRNA.

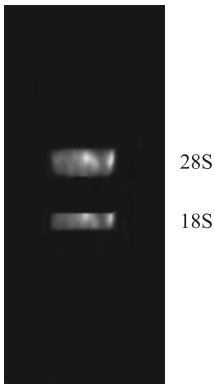
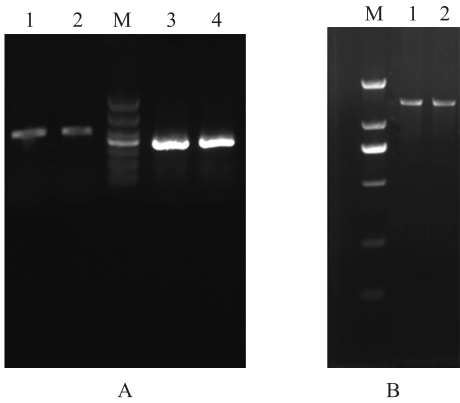


图 1 小菜蛾幼虫总 RNA 提取电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of total RNA of *P. xylostella* larva



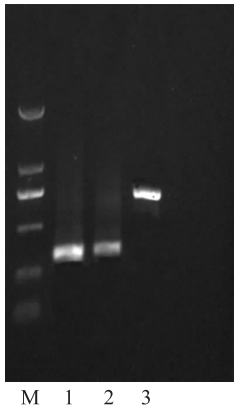
A:UBA52 和 UBA80 的 PCR 扩增,1、2:UBA80,M:DNA marker 1 000, 3、4:UBA52;B:多聚泛素基因的 PCR 扩增,M:DNA marker 2000
图 2 小菜蛾泛素基因的扩增
Fig. 2 PCR amplification of ubiquitins from *Plutella xylostella*

2.3 dsRNA 的合成

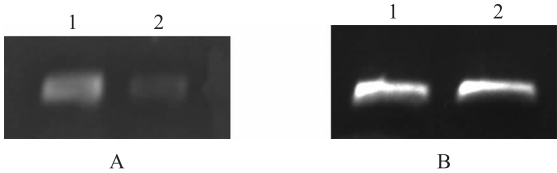
测序正确且高度纯化的泛素基因即可用于 dsRNA 的合成. 按照 Ambion 的 MEGAscript RNAi 试剂盒操作步骤合成相应泛素基因的 dsRNA,与 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 大小,得到清晰的目的带(图 3),长度分别为 316 bp,318 bp 和 698 bp,经分光光度计测定后发现产物纯度和浓度符合要求.

2.4 RNAi 对小菜蛾泛素基因 mRNA 表达量的影响

在注射 160 ng 的 dsRNA 经过 72 h 后,分别提取对照组和处理组小菜蛾幼虫总 RNA,进行半定量 RT-PCR 检测泛素基因 UBA52 的 mRNA 表达量,RT-PCR 结果如图 4. 本次对照组为 DEPC 水. 聚合酶链式反应 25 个循环时,结果明显可见对照组 mRNA 的表达量高于 dsRNA 注射的处理组(图 4A),表明 RNAi 已经达到了较为满意的结果. 对照组和处理组的内参基因表达量相同,说明两组 cDNA 的起始量相同.



M:DNA marker 2000;1:UBA52 的 dsRNA; 2:UBA80 的 dsRNA;3:多聚泛素基因的 dsRNA
图 3 泛素基因 dsRNA 电泳图
Fig. 3 Electrophoresis of dsRNA



A:UBA52 基因表达;B:GAPDH 基因表达;1:注射 DEPC 水;2:注射 UBA52 的 dsRNA
图 4 dsRNA 处理后小菜蛾幼虫泛素基因 mRNA 的表达量变化
Fig. 4 mRNA expression changes of *P. xylostella* larva after dsRNA treatment

3 讨论

泛素基因家族成员包括 U1、U2、U3 (UBA80) 和 U4 (Polyubiquitin). 其中 U1 和 U2 的编码区序列完全相同,为一个泛素基因的 C 末端连接 52 个氨基酸组成的核糖体蛋白(大亚基 L40),U1 和 U2 只有内含子长度的差别,统称为 UBA52. 在酵母中 4 个泛素基因分别称为 UBI1 ~ 4,哺乳动物中的 4 个泛素基因称为

UbA52、UbA80、UbB、UbC. 泛素延伸蛋白基因(U1、U2、U3)主要在细胞快速生长时表达^[10];多聚泛素基因(U4)在环境胁迫、胞内代谢和细胞分裂周期旺盛的调节下表达量增加. 本文在前期研究基础上对泛素基因家族成员作了进一步的研究,克隆并分析了小菜蛾泛素基因家族各成员的编码区序列,并对泛素基因UBA52进行了RNAi,干扰结果与预期相符.

对昆虫进行RNAi的技术已经较为成熟,dsRNA导入虫体的方法主要有注射法和饲喂法. 注射法目前流行的导入方法是用微量操作仪注射到昆虫体内^[11]. 饲喂法是通过饲喂含有dsRNA的饲料或菌株使得昆虫连续摄入dsRNA,达到抑制靶基因的目的^[12]. 研究表明,RNAi达到效果所需dsRNA的剂量因物种的不同而不同. 鞘翅目中达到干扰效果的剂量用于鳞翅目中未见效果出现,必须加大剂量^[13]. RNAi的时效性也是一个备受关注的问题. 不同物种RNAi效应持续时间也不同,因此确定RNAi产生效应的时间点尤为重要. 时间过早,干扰效应未产生;时间过久,RNAi效果则降低,最终mRNA水平逐渐恢复到正常水平. 本次研究在大量预实验的基础上发现注射后约72 h是一个较为理想的检测时间点. 同时,不同的注射剂量也会影响干扰效果. 注射剂量过小收不到干扰效果;相反,注射过多则会导致死亡率加大,严重影响其存活率.

本研究多次重复试验发现虫体注射160 ng的剂量时可以达到满意的效果. 同时实际操作中,应减少注射对虫体造成的物理损伤. 注射法可使dsRNA迅速到达靶标,提高了效率,但对微量注射仪的操作技术要求较高,而且容易造成幼虫创伤. 相反饲喂法对操作人员的技术要求不高,显著增加目标昆虫的成活率,但摄取的dsRNA容易被降解,dsRNA到达靶标的效率较低.

虽然Cheng等^[9]发现小菜蛾抗溴氰菊酯品系和敏感品系的泛素基因表达量存在显著差异. 但是泛素基因与小菜蛾的耐药性有什么样的联系目前仍不清楚. 本文克隆了小菜蛾的泛素基因家族,并且建立了小菜蛾泛素基因的RNA干扰体系,为进一步研究泛素基因在小菜蛾抗胁迫和应急反应等方面的作用提供了研究基础.

[参考文献]

- [1] Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, et al. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72(1): 11–15.
- [2] Cabrera H, Barrio R, Arribas C. Structure and expression of the *Drosophila* ubiquitin–52–amino-acid fusion-protein gene[J]. Biochem J, 1992, 286(1): 281–288.
- [3] Barrio R, Arco A D, Cabreia H L, et al. Structure and expression of the *Drosophila* ubiquitin–80–amino-acid fusion-protein gene[J]. Biochem J, 1994, 302(1): 237–244.
- [4] Pfeifer K, Frank W, Schroder H C, et al. Cloning of the polyubiquitin cDNA from the marine sponge *Geodia cydonium* and its preferential expression during reaggregation of cells[J]. J Cell Sci, 1993, 106: 545–553.
- [5] Von Kampen J, Nielander U, Wettern M. Expression of ubiquitin genes in *Chlamydomonas reinhardtii*: involvement in stress response and cell cycle[J]. Planta, 1995, 197: 528–534.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 李朝飞, 于航, 潘丽晶, 等. 棉铃虫泛素基因的克隆及序列分析[J]. 中山大学学报, 2005, 44(1): 61–64.
- [9] Cheng L G, Xu J N, Xue J, et al. Downregulation of ubiquitin gene expression in the deltamethrin-resistant diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) [J]. J Appl Entomol, 2009, 133: 533–538.
- [10] Pickart C M. Back to the future with ubiquitin[J]. Cell, 2004, 116(2): 181–190.
- [11] Ober K A, Jockusch E L. The roles of wingless and decapentaplegic in axis and appendage development in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. Dev Biol, 2006, 294(2): 391–405.
- [12] Zhou X G, Wheeler M M, Oi F M, et al. RNA interference in the termite *reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA[J]. Insect Biochem Molec, 2008, 38: 805–815.
- [13] Zhuang S F, Lisha K, James B N. Multiple alpha subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the *Manduca* immune system[J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32(4): 365–379.