

# 棉铃虫滞育解除的相关基因鉴定

朱佳<sup>1</sup>, 杨靖<sup>2</sup>, 徐卫华<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学技术大学生命科学学院, 安徽合肥 230027;

2. 中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东广州 510275)

**摘要:**运用差异显示 PCR(DD-PCR)方法分析棉铃虫滞育解除蛹差异表达的基因, 结果得到了 56 个差异片段. 通过 RT-PCR 和 Real-time PCR 的方法, 鉴定了滞育解除过程中有 3 个基因表达量在下调, 有 4 个基因表达量在上调. 这 7 个差异表达基因中有 3 个和已知的基因有较高的同源性: FKBP12, *esr16* 和 NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 6. 这些差异基因为今后研究滞育解除的分子机制提供了新的线索.

**关键词:**滞育; 20-羟基蜕皮酮; 差异显示 PCR; 棉铃虫

**中图分类号:** Q963 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.0253-2778.2010.01.008

## Identification of the related genes at diapause termination in *Helicoverpa armigera*

ZHU Jia<sup>1</sup>, YANG Jing<sup>2</sup>, XU Weihua<sup>1,2</sup>

(1. School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;

2. State Key Laboratory of Biocontrol, and School of Life Sciences, Sun Yat-Sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** By means of mRNA differential display PCR(DD-PCR), 56 cDNA fragments have been identified from the *Helicoverpa armigera* brain that are expressed differentially between the diapausing pupae and the pupae of diapause termination by injecting 20-hydroxyecdysone. RT-PCR and Real-time PCR analysis revealed that mRNA levels of the FK506-binding protein 12(FKBP12) and two unknown genes were higher in the diapausing pupae, whereas the ecdysteroid-regulated 16 kDa protein(*esr16*), NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 6, and two unknown genes were higher in the pupae of diapause termination. These results provide new clues to researches on the molecular mechanism of diapause.

**Key words:** diapause; 20-hydroxyecdysone; differential display PCR; *Helicoverpa armigera*

## 0 引言

棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)是重要农业害虫, 以蛹滞育的形态越冬. 昆虫滞育是指其接收到环境信号后, 在不良环境到来之前程序性地进入一种发育极其缓慢, 代谢强度低, 抗逆性强的状态<sup>[1]</sup>. 对昆虫滞育

的研究不但有助于我们了解昆虫的抗逆性, 为害虫防治提供一种可能性, 而且昆虫滞育本身也是研究动物发育调节的一个理想模型. 根据不同发育阶段, 昆虫的滞育可分为卵滞育、蛹滞育、幼虫滞育和成虫滞育, 目前的研究结果认为它们分别具有不同的作用机制<sup>[2]</sup>. 蛹滞育是由于幼虫期接收了短光照和低温, 导致蛹期

收稿日期: 2009-03-24; 修回日期: 2009-04-22

基金项目: 国家自然科学基金(30730014)资助.

作者简介: 朱佳, 男, 1981年生, 硕士. 研究方向: 昆虫遗传学. E-mail: zhuj@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 徐卫华, 博士/教授. E-mail: xuweihua@mail.sysu.edu.cn

的脑缺乏促前胸腺激素 (prothoracicotropic hormone, PTH), 使得前胸腺产生的蜕皮激素 (ecdysone) 减少, 不能进一步发育, 于是形成了蛹滞育<sup>[3-5]</sup>。

关于棉铃虫的滞育, 前人在生理和生态水平上做了比较多的工作, 但是对调节蛹滞育形成、维持和解除的信号机制了解不多。前人研究表明对棉铃虫滞育蛹的前、中、后期注射蜕皮激素都可使其解除滞育<sup>[6]</sup>, 本实验的前期工作也证明了蜕皮激素的类似物 20-羟基蜕皮酮 (20E) 可以打破蛹滞育, 为了进一步阐明蛹滞育的分子机制, 我们采用差异显示 PCR (Differential Display PCR, DD-PCR) 的方法研究滞育解除过程中的基因表达变化, 为今后进一步深入研究滞育解除的分子机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 棉铃虫的饲养

棉铃虫 SUS2 品系来源于南京农业大学沈晋良教授的惠赠, 幼虫在 20 °C、光周期 10 L:14 D、相对湿度 60% 条件下饲养, 蛹滞育与否通过观察眼点特征来确定<sup>[7]</sup>。

### 1.2 滞育棉铃虫的处理

20-hydroxyecdysone (20E) 购自 Sigma 公司。20E 用无水乙醇溶解, 再用纯水稀释到 0.4 g/L, 最终溶液中含乙醇浓度为 0.05%<sup>[8]</sup>。

滞育棉铃虫化蛹 20 d 后检查滞育状态, 化蛹 20 d 后眼点清晰的棉铃虫完全进入滞育, 取此时的蛹作为实验材料, 实验组每头蛹腹部注射 5  $\mu$ L 20E, 对照组注射 5  $\mu$ L 纯水。处理完毕后蛹置于 25 °C, 14 L:10 D 光照下, 1 d 后解剖蛹, 取脑组织<sup>[9]</sup>。

### 1.3 RNA 样品制备和 RT-PCR

分别取实验组和对照组的棉铃虫蛹 30 头的脑, 按照 Chomczynski 等<sup>[10]</sup>的一步法抽提总 RNA, 并用 DNase I 处理总 RNA, 最终 RNA 溶于 30  $\mu$ L DEPC 处理的纯水, 在 OD<sub>260</sub> 下测 RNA 浓度。用 1  $\mu$ g 总 RNA 和 3 条锚定引物 HT<sub>11</sub>A, HT<sub>11</sub>G 和 HT<sub>11</sub>C 分别进行反转录, 反转录参照 reverse transcriptase MMLV (Invitrogen) 说明书。合成的 cDNA 模板分别用相应的锚定引物和随即引物 (HAP1-HAP16) 配对进行 PCR 反应, 扩增条件为: 94 °C, 30 s; 42 °C, 2 min; 72 °C, 30 s, 共 40 个循环, 再 72 °C, 5 min<sup>[11-12]</sup>。PCR 引物见表 1<sup>[13]</sup>。

表 1 引物序列

Tab. 1 The sequence of primers used in the experiment

Anchor primers	
HT <sub>11</sub> A	AAGCTTTTTTTTTTTA
HT <sub>11</sub> C	AAGCTTTTTTTTTTTC
HT <sub>11</sub> G	AAGCTTTTTTTTTTTG
arbitrary primers	
HAP1	AAGCTTGATTGCC
HAP2	AAGCTTCGACTGT
HAP3	AAGCTTTGGTCAG
HAP4	AAGCTTCTCAACG
HAP8	AAGCTTTTACCGC
HAP6	AAGCTTGCACCAT
HAP7	AAGCTTAACGAGG
HAP5	AAGCTTAGTAGGC
HAP9	AAGCTTCATFCCG
HAP10	AAGCTTCCACGTA
HAP11	AAGCTTCGGGTAA
HAP12	AAGCTTGAGTGCT
HAP13	AAGCTTCGGCATA
HAP14	AAGCTTGGAGCTT
HAP15	AAGCTTACGCAAC
HAP16	AAGCTTTAGAGCG
Identified primers	
DD9F	GGGAAAGCACAAACGGAGAG
DD12F	GGCGTTGCTGGTCTCAGTTG
DD15F	GGAGAGGCTAGAATGCGAG
DD17F	CTGCCGGTGCCTTCCCTC
DD22F	CTGTATGTCGACATGGCAGTC
DD23F	GGGTATAGGAATCTTTGTGCTG
DD26F	ATCGGGAACAGGGGCCTG
DD28F	GTGCAACAGAGACACGCTC
DD30F	AGAGGGAATACAGGGTTGG
DD31F	GCAGAGAGTGGCAATAGCG
DD36F	CCGGCCAAGTGGCAGTC
DD38F	CAAGTTGATACTAACTTGAATGG
DD41F	CGGGTTTCAAAGAGGGCG
DD42F	CCGCTAGGTTTACTGGAG
DD43F	GGGCAACATCACAGGGC
DD44F	GCATTGCATGGCCCTCGCG
DD53F	CGTCTTGTTCCTACTCGTAG
DD9R	GCCCATCTGCAAAGCCTTG
DD12R	CGGAAAGATTGATGGGGAAG
DD15R	GGTTCTCAGTTGGCTTG
DD17R	GGATGGGCATCGTCTGTG
DD22R	CCTACAGTTGAGTAAGCATTAG
DD23R	GACAAGTGAGACGCGTCAAG
DD26R	GTCTTGGCGAGTGATGTGC
DD28R	CTGTGAGGAGGATGTGACG
DD30R	CTTCGGATTCTTCGGAGATC
DD31R	GTCCCTTGGCGATCACACAG
DD36R	CCGTGTGGGATATCAATGG
DD38R	CCTTACCTACCACATCCAG
DD41R	TGCGTTGGAGCCAAATGTC
DD42R	GCACGATTCCATACTATGTATG
DD43R	ACGGCGCGCAGCGTAC
DD44R	CGTTGACATTAGAGCACTGG
DD53R	CGGGTTCGCAAATACACATCTC

## 1.4 电泳和银染

电泳:6%的测序胶的制备参考分子克隆实验指南<sup>[14]</sup>,电泳时电压 600 V.

银染:10%乙酸固定凝胶 20 min;Milli-Q 水洗胶三次,每次 2 min;0.1%硝酸银和 0.3%甲醛染色 30 min;Milli-Q 水洗胶 20 s;30%碳酸钠,0.3%甲醛和 2 mg/L 硫代硫酸钠显影 5 min;10%乙酸固定 5 min;Milli-Q 水洗胶<sup>[15]</sup>.

## 1.5 差异条带的克隆测序

将测序胶上的差异条带切下并置于 1.5 mL 离心管中捣碎,加入 100  $\mu$ L 纯水,沸水浴 15 min,12 000 g 离心 5 min,取上清.加入 10  $\mu$ L 3 mol/L 乙酸钠(pH5.2),300  $\mu$ L 无水乙醇,-20  $^{\circ}$ C 沉淀 1 h,12 000 g 离心 10 min,弃去上清,用 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀,真空干燥,DNA 沉淀用 20  $\mu$ L 纯水溶解.

用回收的 DNA 作模板,相应引物来进行 PCR 扩增,并将反应产物连入 pMD18-T 载体(TaKaRa),转化 DH-5 $\alpha$  感受态细胞,并进行蓝白斑筛选,挑选阳性克隆测序.

## 1.6 鉴定差异

根据测序结果,设计特异性引物(见表 1),以  $\beta$ -actin 基因做内源对照进行 PCR 扩增,验证 DD-PCR 结果,剔除假阳性的结果.半定量 RT-PCR 反应条件为 94  $^{\circ}$ C,30 s;58  $^{\circ}$ C,30 s;72  $^{\circ}$ C,30 s,共 25~33 个循环.

SYBR *Premix Ex Tag*<sup>TM</sup> 试剂盒购自 TaKaRa,使用的仪器为 Roche 公司的 LightCycler480. Real-time PCR 方法参考产品说明书,每个反应重复三次,每次反应做三个平行.

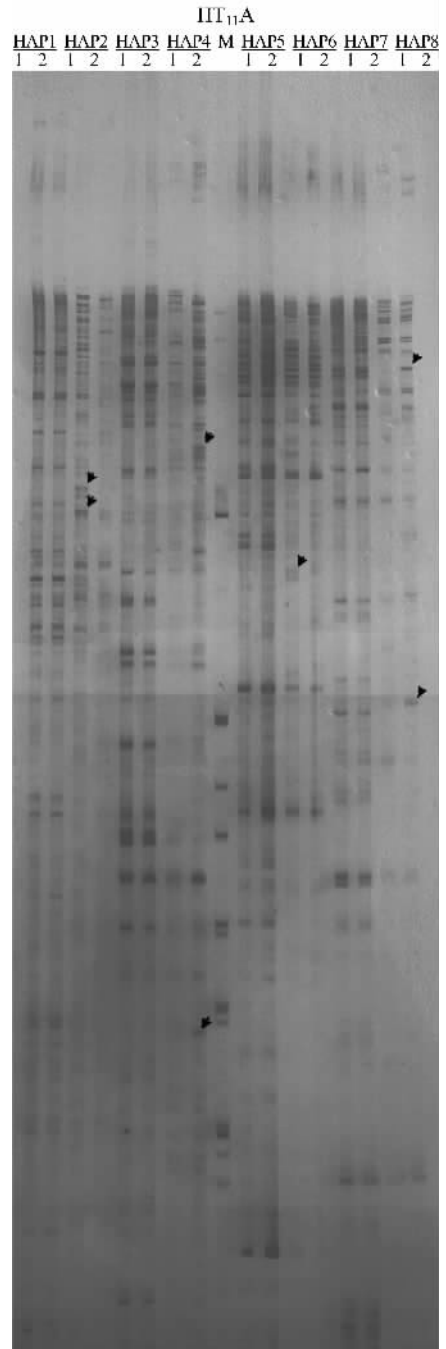
# 2 实验结果

## 2.1 差异显示结果

采用 3 种锚定引物和 16 种随机引物进行组合,PCR 反应后电泳,通过银染进行 mRNA 的差异显示,见图 1 箭头所指(仅列出部分实验结果).每个反应都至少做两次重复,以减少实验误差,通过凝胶成像分析比较,最终获得了 56 个差异克隆.

## 2.2 差异片段的序列分析

对 56 个差异片段进行克隆测序,得到的 56 个序列与 GenBank 数据库比较,其中 15 个克隆有很高的同源性(表 2),16 个克隆同源性低,其余的克隆没有找到同源性.从得到基因序列来看,这些基因涉



分组:1为滞育组,2为注射 20E 滞育解除组

图 1 滞育蛹和滞育解除蛹差异显示(箭头标出差异条带)

Fig. 1 The results from differential display PCR in diapausing pupae and the pupae of diapause termination

及核酸的结合、蛋白的合成转运以及降解、信号传导、能量代谢、压力应答等生理过程,显示出滞育的解除是一个复杂的调控.

## 2.3 RT-PCR 鉴定差异基因的表达

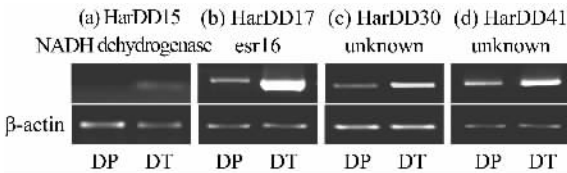
从测序结果中挑选部分感兴趣的基因片段,设计特异鉴定引物(表 1),应用半定量 RT-PCR 方法

表 2 差异显示结果同源比较和分析

Tab. 2 Homology search in identified genes from *Helicoverpa armigera* pupae

Fragment ID	Putative Genes(%identity)	Classification
HarDD5	mitochondrial ribosomal protein L24(64%, <i>Ixodes scapularis</i> )	Protein synthesis
HarDD6/HarDD7	ribosomal protein L7A(97%, <i>Spodoptera exigua</i> )	Protein synthesis
HarDD8	SAICAR synthetase(93%, <i>Bombyx mori</i> )	nucleic acid synthesis
HarDD9	Heat shock protein 67B2 (43%, <i>Pediculus humanus corporis</i> )	stress response
HarDD15	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 6 (60% <i>Culex quinquefasciatus</i> )	Metabolism
HarDD17	Ecdysteroid-regulated 16 kDa protein(62%, <i>Manduca sexta</i> )	signal transduction
HarDD28	Rho GTPase activating protein 27(61%, <i>Acyrtosiphon pisum</i> )	signal transduction
HarDD31	Multidrug resistance protein homolog 65(77%, <i>Tribolium castaneum</i> )	transporter
HarDD38	FKBP12(96%, <i>Bombyx mori</i> )	signal transduction
HarDD46	FAD synthetase(41%, <i>Xenopus laevis</i> )	Metabolism
HarDD47	Transmembrane protein LOC124446(42%, <i>Homo sapiens</i> )	membrane protein
HarDD50	putative proteasome 26S subunit(88%, <i>Maconellicoccus hirsutus</i> )	Proteolysis
HarDD51	nucleolysin TIAR protein(94%, <i>Bombyx mori</i> )	RNA-binding protein
HarDD55/HarDD56	26S protease regulatory subunit 6B(95%, <i>Bombyx mori</i> )	Proteolysis
HarDD54	ribonuclease L inhibitor homolog(97%, <i>Bombyx mori</i> )	RNA processing

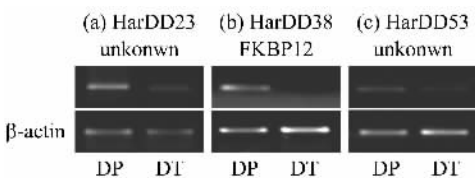
对滞育解除差异表达的基因进行鉴定. 根据 RT-PCR 结果确定了 7 个差异表达的基因, 其中 4 个基因在滞育解除过程中表达量上调: HarDD15, HarDD17, HarDD30 和 HarDD41(图 2); 3 个基因在滞育解除过程中表达量下降: HarDD23, HarDD38 和 HarDD53(图 3); 其余 10 个克隆包括 HarDD22 没有显著性差异, 结果没有列出. 应用快速扩增 cDNA 末端的方法获得了上述几个差异基因的全长 cDNA, 通过核苷酸和氨基酸序列比较, 发现 HarDD15 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 1 $\alpha$  亚基 6(NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 6)基因同源, HarDD17 和蜕皮激素调节蛋白 16(Ecdysteroid-regulated 16 kDa protein, *esr16*)



DP: diapausing pupae, DT: pupae of diapause termination

图 2 滞育解除上调基因

Fig. 2 Up-regulated genes in diapause termination



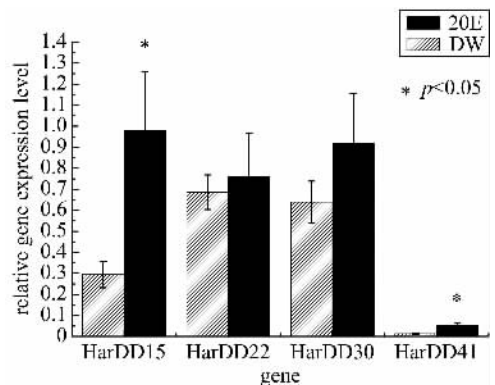
DP: diapausing pupae, DT: pupae of diapause termination

图 3 滞育解除下调基因

Fig. 3 Down-regulated genes in diapause termination

基因同源, HarDD38 和 FK506 结合蛋白(FK506-binding protein 12, FKBP12) 基因同源.

实时荧光定量 PCR 近年来被广泛使用, 是目前检测基因表达的一种灵敏方法, 特别是低丰度的基因. 为了进一步验证 RT-PCR 结果的准确性, 我们选取 HarDD15, HarDD22, HarDD30 和 HarDD41 四个基因做 Real-time PCR. 数据处理参考 Pfaffl<sup>[16]</sup> 的方法, 每个反应做三个平行, 求平均值, 以  $\beta$ -actin 作为内源参照, 将待测样品的 Ct 值与参照物  $\beta$ -actin 的 Ct 值进行对比, 然后通过数学公式推导待测样品的量. 结果如图 4 所示, 通过差异显著性分析我们发现 HarDD22 没有显著性差异, HarDD30 虽然有上调, 但是差异不显著, 而 HarDD15 和 HarDD41 有明显的上调, 与之前的 RT-PCR 结果基本一致.



用内参  $\beta$ -actin 校正, 标 \* 为显著性差异

图 4 基因的相对表达量

Fig. 4 Relative amounts of gene expression

### 3 讨论

本实验所使用的 DD-PCR 方法参照 Liang P 等<sup>[11-12]</sup>的方法加以两个方面的简化处理。其一,之前报道的 DD-PCR 大多采用放射性探针标记检测,这增加了对环境的污染。近来有人采用荧光标记,虽然没有了放射性的危害,但提高了实验成本。本实验采用银染来代替,从结果来看,也有较好的检测效率。其二,采用 RT-PCR 和 Real-time PCR 相结合的方法,进一步确保鉴定结果的准确性。

本实验的结果为蛹滞育的分子机制研究提供了一些新的线索。我们通过 DD-PCR 克隆了 56 个差异片段,目前已经找到多个差异表达的基因,这些基因有些在滞育解除过程中表达量上调,有些在滞育解除过程中表达量下降,暗示这些基因相关于滞育维持和滞育解除。同源性比较发现这些差异表达的基因中有 3 个与已知的其他物种基因有很高的同源性,它们是:FKBP12, esr16 和 NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 6。

FKBP12(FK506-binding protein 12)是高度保守的分子伴侣,属于 FK506-binding protein 家族,具有肽基脯氨酸异构酶(PPIase)活性。FK506-binding protein 家族目前发现了很多成员,参与了多种生物过程,例如转运蛋白<sup>[17]</sup>、Ca<sup>2+</sup>释放<sup>[18]</sup>、结合核酸<sup>[19]</sup>、细胞凋亡<sup>[20]</sup>、细胞周期调控<sup>[21]</sup>等。FKBP12 最初发现能够抑制 T 细胞<sup>[22]</sup>,从而在医学上有重要的应用前景,最近发现 FKBP12 通过作用于 TOR 参与了细胞周期<sup>[23-24]</sup>。

esr16 研究很少,目前只在少数物种中找到,功能未知。最初是在 *Manduca sexta*<sup>[25]</sup> 中发现,它受蜕皮激素调控,可能是应答蜕皮激素的一个蛋白。

NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 6 作为 NADH 脱氢酶(NADH dehydrogenase)复合体的一个亚基,该酶是线粒体电子传递链的一个重要环节,参与了代谢反应。

从目前的结果看,滞育的解除涉及代谢的改变、细胞周期的调控、受体表达、信号传导等多个方面,初步的结果显示 FKBP12, esr16 和 NADH dehydrogenase 参与了滞育的解除。下一步将围绕这些基因,研究它们的发育表达和调控机制,相信这些将能帮助我们进一步了解昆虫滞育的分子机制。

#### 参考文献(References)

[1] 徐卫华. 昆虫滞育的研究进展[J]. 昆虫学报, 1999, 42

(1):100-107.

- [2] Nijhout H F. Insect Hormone [M]. Princeton: Princeton University press, 1994:170-172.
- [3] Denlinger D L. Hormone control of diapause[M]// Kerkut G A, Gilbert L I. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford: Pergamon Press, 1985:353-412.
- [4] Denlinger D L, Yocum G D, Rinehart J P. Hormonal control of diapause[M]// Gilbert L I, Iatrou K, Gill S S. Comprehensive Molecular Insect Science: vol 7. Amsterdam: Elsevier, 2004: 615-650.
- [5] Denlinger D L. Regulation of diapause[J]. Annu Rev Entomol, 2002, 47: 93-122.
- [6] 王方海, 龚和. 滞育和非滞育棉铃虫血淋巴类固醇蜕皮素含量变化的比较[J]. 昆虫学报, 1997, 40(3): 261-264.
- [7] Phillips J R, Newsom L D. Diapause in *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Annals of the Entomological Society of America, 1966, 59(6):154-159.
- [8] Thompson D M, Khalil S M S, Jeffers L A, et al. In vivo role of 20-hydroxyecdysone in the regulation of the vitellogenin mRNA and egg development in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say)[J]. Journal of Insect Physiology, 2005, 51(10): 1 105-1 116.
- [9] Zhang Tianyi, Sun Jiusong, Zhang Liubin, et al. Cloning and expression of the cDNA encoding the FXPRL family of peptides and a functional analysis of their effect on breaking pupal diapause in *Helicoverpa armigera*[J]. Journal of Insect Physiology, 2004, 50(1):25-33.
- [10] Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction; twenty-something years on[J]. Nature Protocols, 2006, 1(2):581-585.
- [11] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science, 1992,257:967-971.
- [12] Liang P, Meade J D, Pardee A B. A protocol for differential display of mRNA expression using either fluorescent or radioactive labeling [J]. Nature Protocols, 2007, 2(3):457-470.
- [13] Boye K, Hougaard D M, Ebbesen P, et al. Novel feto-specific mRNA species suitable for identification of fetal cells from the maternal circulation[J]. Prenatal Diagnosis, 2001, 21(10):806-812.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual [M]. 2nd ed . Cold

(下转第 57 页)