

彭雷,赵艳,马银花. 褐飞虱组蛋白 H3 与 H2A 基因启动子克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):30-32.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.008

褐飞虱组蛋白 H3 与 H2A 基因启动子克隆与序列分析

彭雷¹, 赵艳², 马银花²

(1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550001; 2. 武汉大学生命科学院, 湖北武汉 430072)

摘要:褐飞虱是对水稻危害最严重的害虫之一,目前缺少对褐飞虱内源高效启动子的研究。以褐飞虱的组蛋白 H3 与 H2A 基因为研究对象,通过已知的果蝇 H3 与 H2A 序列搜寻 Genbank 上褐飞虱表达序列标签(expressed sequence tags,简称 EST)数据库,从而获得同源序列来设计嵌套引物。然后通过染色体步移的交错式热不对称 PCR(thermal asymmetric interlaced PCR,简称 Tail-PCR)技术获得 H3 与 H2A ATG 前侧翼序列,分别为 1 664、538 bp。PLACE 软件在线分析 TATA 框、CAAT 框、GATA 框。为外源基因在褐飞虱细胞内高效表达以及褐飞虱转基因相关研究奠定基础。

关键词:褐飞虱;组蛋白 H3;组蛋白 H2A;启动子;Tail-PCR;基因工程

中图分类号: S435.112+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0030-03

在基因工程研究中常常需要目的基因高效表达,于是分离强启动子已成为目前基因工程的基础工作之一。高等动植物的基因调控主要是在转录水平上进行的,受各类顺式调控元件与反式调控元件协同调控。高等生物启动子主要分为 3 类,第 1 类为组成型表达启动子,这类启动子一般调控看家基因表达。组成型启动子在所有组织中都能启动基因的表达,具有持续性,不表现时空特异性;第 2 类为组织特异型启动子,一般调控基因在特定组织和器官中表达;第 3 类为诱导型启动子,一般受某种信号诱导开启基因表达,让基因在特定发育时期或特定组织器官、特定生长环境下表达^[1]。其中组成型表达启动子应用比较广泛,主要应用于目的基因超量表达以及转基因研究中。看家基因别称持家基因(house-keeping genes),是指所有细胞中组成型表达的一类基因,其产物是维持细胞各种基本生命活动所必需的^[2]。褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stål)是危害水稻最大的害虫之一,我国目前有 1 300 万~2 000 万 hm² 水稻受到褐飞虱危害^[3],对褐飞虱的研究成为农业病虫害防治重要课题之一。目前在褐飞虱分子生物学中缺少对其自身基因内源启动子的研究,相关研究也较少。以分离褐飞虱看家基因启动子序列为目的,用染色体步移技

术得到组蛋白 H2A 与 H3 基因 ATG 前启动子序列,并对启动子序列进行结构与特征分析。本研究以分离组成型表达基因启动子为目的,为外源基因在褐飞虱细胞内高效表达以及褐飞虱转基因相关研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

供试褐飞虱饲养在温室,温室的温度条件为 22~28 ℃,保持合适的光照和湿度条件,以保证水稻和褐飞虱在良好环境下生长。Top 10 感受态细胞为笔者所在实验室保存。Genome walking 试剂盒、PMD18-T Simple Vector、DNA solution I 均购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR 产物胶回收试剂盒购自美国 Omega 仪器仪表有限公司;其他试剂为国产或进口分析纯。

1.2 褐飞虱 DNA 提取

褐飞虱基因组 DNA 提取皆为单头虫提取。所用方法为十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium ammonium bromide,简称 CTAB)法参照文献[4-5],并略有改动。将采集的单头褐飞虱放入装有 400 μL 质量分数为 2% CTAB 的 1.5 mL 离心管中,用匀浆小棒捣碎匀浆,将匀浆液放入 60 ℃ 水浴锅水浴裂解 60 min,向裂解后的匀浆液中加入 200 μL 三氯甲烷/异戊醇(体积比为 24:1)抽提 2 次,加入 2 倍体积无水乙醇,-20 ℃ 条件下沉淀;最后将风干后的 DNA 溶于 50 μL TE 中,置于 -20 ℃ 条件下保存备用。

收稿日期:2016-06-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:31230060)。

通信作者:彭雷(1980—),男,四川南充人,博士,实验师,主要从事水稻与褐飞虱互作研究。E-mail:daylight898@sina.com。

[6] Huisman M J, Linthorst H J M, Bol J F, et al. The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses[J]. *Journal of General Virology*, 1988, 69(8): 1789-1798.

[7] 雷尊国. 贵州马铃薯产业的发展及其科技支撑体系的建设初探[J]. *贵州农业科学*, 2008, 36(6): 11-13.

[8] 郑世玲,刘作易. 贵州 3 种马铃薯病毒的 DAS-ELISA 检测与分析[J]. *贵州农业科学*, 2006, 34(6): 42-44.

[9] 颜谦,黄萍,宋吉轩,等. 贵州不同海拔地区马铃薯病毒病初步调查及检测鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(29): 14262-

14263.

[10] 姚东校,洪鲲,杨立昌,等. 马铃薯 X 病毒贵州分离物的分子鉴定[J]. *广东农业科学*, 2013, 40(13): 139-141.

[11] 徐宜为. 免疫检测技术[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1991: 158-183.

[12] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T,等. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2002.

[13] Chapman S, Hills G, Watts J, et al. Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X; effects on virion morphology and viral pathogenicity[J]. *Virology*, 1992, 191(1): 223-230.

1.3 扩增引物

目前褐飞虱 *H3*、*H2A* 序列还没有被公布,用果蝇的 *H3*、*H2A* mRNA 序列在 NCBI 的褐飞虱 EST 数据库中进行 Blast 比对,这样就获得与果蝇 *H3*、*H2A* 高度同源的 EST 片段,以 EST 片段序列为模板来设计引物(表 1)。

表 1 各个引物信息

引物用途	引物名称	碱基序列(5'→3')
H3 walking 第 1 次	H3W1-1	GGTTTCTTGACACCACCAAGTTG
	H3W1-2	CTTTTACGTGCGGCCTTAGTG
	H3W1-3	GGGCTTTTCTCCGGTGGACT
H3 walking 第 2 次	H3W2-1	AATAACGACAGAACAGACAATCA
	H3W2-2	ATCATCAACAGAAGCGGAGCGTCT
	H3W2-3	CGCTCTTGATCGAAAGTGTAAGC
H2A walking	H2AW1	ATGACTTGTCTTCTGTTTTTCAG
	H2AW2	ATGCTGTGTATTCTTCCAACGGG
	H2AW3	TCCAACGGGAAACTGTAGACCAG

1.4 Tail-PCR 扩增

3 轮反应总体系 50 μ L, 包括 1 μ L 模板; 2.5 mmol/L dNTPs 8 μ L; 10 \times LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) 5 μ L; LA *Taq* (5 U/ μ L) 0.5 μ L; 随机引物与特异引物(100 pmol/ μ L) 各 1 μ L; 加入 dH₂O 至总体积 50 μ L。以 *H3* 第 1 次 Tail-PCR 为例,试剂盒的 AP2、AP3、AP4 引物分别首先与 H3W1-1 引物进行第 1 轮扩增,扩增产物为模板再加入各自对应 AP 简并引物和 H3W1-2 进行第 2 轮,同理以 H3W1-2 和 AP 引物进行第 3 轮扩增,第 3 轮扩增结束后电泳跑胶并选取扩增带型效果好的一组组合。PCR 反应条件参照 Genome Walking 试剂盒说明书。

1.5 PCR 产物测序与序列分析

将扩增产物用 DNA 胶回收试剂盒回收后和 PMD18-T 载体按浓度比为 3:1 混合,加入等体积 DNA solution I, 16 $^{\circ}$ C 连接 5 h。将连接片段转化 Top10 感受态细胞,涂布含氨苄青霉素的固体培养基平板,37 $^{\circ}$ C 条件下培养过夜,挑取白色菌落。以载体通用测序引物 M13-47 和 RV-M 进行菌落 PCR 扩增,1% 琼脂糖电泳检测插入片段大小,将阳性克隆的菌液送出测序。序列先在 Genbank Blastn 上进行比对,确定是否为目的序列。通过 PLACE 在线启动子预测工具分析启动子功能元件。

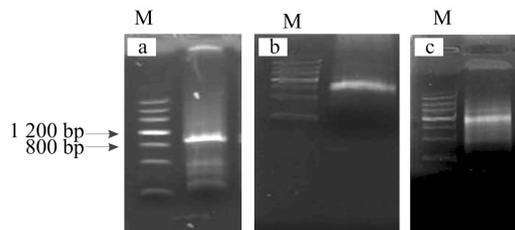
2 结果与分析

2.1 Tail-PCR 扩增结果

对于 *H3* 基因和 *H2A* 基因各自 3 条特异引物和试剂盒 AP2、AP3、AP4 简并引物组合,3 轮热不对称 PCR 后,*H3* 基因的 AP3 的组合能扩增到 1 条约 900 bp 的片段(图 1-a),*H2A* 基因的 AP3 组合能扩增到 1 条约 800 bp 的片段(图 1-b)。将扩增到的片段 T-A 克隆测序后在 Genbank 上进行 Blastn 比对,证实为褐飞虱 *H3*、*H2A* 基因 ATG 前端序列。根据测序结果,又设计 3 条特异性引物继续对 *H3* 向前 walking,交错式热不对称 PCR(thermal asymmetric interlaced PCR,简称 Tail-PCR)获得约 1.1 kb 片段(图 1-c),测序后将其与前面测序结果拼接。根据测序结果,获得 *H3* ATG 前端 1 664 bp 序列,获得 *H2A* ATG 前端 538 bp 序列。

2.2 启动子序列分析

将得到 *H3* 与 *H2A* ATG 上游序列与 Genbank 上的褐飞虱



a—第 1 次 Tail-PCR 扩增到的 *H3* ATG 前端序列产物;
b—Tail-PCR 扩增到的 *H2A* ATG 前端序列产物;
c—*H3* 第 2 次 Tail-PCR 扩增得到的产物; M—DNA Marker III
图 1 TAIL-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

EST 数据库进行比对发现, *H3* 5' 非翻译区(untranslated region, 简称 UTR)有 1 条 549 bp 的内含子(图 2), *H2A* 起始密码子 ATG 后有一段 143 bp 的内含子序列(图 3)。PLACE 软件在线分析预测 TATA 框、GAAT 框、CAAT 框等启动子核心原件(图 2、图 3)。

3 讨论

真核生物 DNA 是以染色质形式存在的,而染色质的基本组成单位为核小体,核小体则由核心组蛋白组成,其组成方式为以组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 各 2 个分子形成八聚体, DNA 则缠绕在此八聚体上形成核小体^[6]。茅卫峰等克隆了虹鳟鱼 *H3* 的启动子序列并将 *H3* 启动子插入启动子缺失的增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, 简称 EGFP)表达载体 pEGFP-1 中,通过显微注射法注射重组载体,结果表明,*H3* 启动子能启动报告基因 *EGFP* 在各组织中的高效表达^[7]。DNA 未知区域序列克隆一般采用染色体步移技术,染色体步移技术主要基于 2 种方法,1 种是基于基因组文库为主要手段的染色体步移技术,另 1 种是基于 PCR 技术的染色体步移技术。基于 PCR 的染色体步移技术又主要以连接成环 PCR、外源接头介导 PCR 和半随机引物 PCR 技术为主^[8]。基于随机引物的 PCR 技术的热不对称交错 PCR(Tail-PCR)是比较常用的获得侧翼序列的方法,由 Liu 等最早设计^[9],其原理是基于巢式 PCR,利用 3 个嵌套的特异引物和 1 个较短的随机简并引物进行 3 次热不对称 PCR 扩增,逐渐扩增到特异性的目的基因产物。本研究首先通过果蝇的组蛋白 *H3* 基因和 *H2A* 基因序列在褐飞虱 EST 数据库中搜寻同源序列,以此获得褐飞虱 *H3*、*H2A* 基因的部分序列,然后设计嵌套特异引物,通过 Tail-PCR 技术获得 *H3*、*H2A* 基因 ATG 前端序列,分别为 1 664、538 bp,并对获得的 ATG 前端侧翼序列运用 PLACE 软件在线分析其启动子元件。本研究为外源基因在褐飞虱细胞内高效表达以及褐飞虱转基因相关研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 李杰,张福城,王文泉,等. 高等植物启动子的研究进展[J]. 生物技术通讯,2006,17(4):658-661.
- [2] 张积森,李伟,阙友雄,等. 斑茅两个看家基因片段的克隆及其在基因芯片中的应用[J]. 热带亚热带植物学报,2007,15(4):277-283.
- [3] 冯冉冉,高晓,刘丕庆. 褐飞虱抗性基因及其在籼型杂交水稻育种上的应用[J]. 安徽农业科学,2015,43(15):107-110.

```

1   ATTAGAGAAGTAGCAAAGGCAGAGAATTGGCAACGCTGTTTTTCGTATCTTTCTTTTCAGCAATTAGAATGTAGCGTAGAT
81  CACTCTACAGTAAGTAGTGGGAATTTGTGGGAACAAAAAATCTGATCAATGCTAGGTATTCAAATGAATGTAACATTGGA
161 GAATAAGCGTTATTAATAATACCAGATTATTTCTATTTGTAATAACAAAATAGATAATTATTAATTTGGATTAAATTCCT
241 TGCCAAAATGCATACGCAATGATTTTGAGGTTAATTTGCTATTTGCAGACAATAACATTAATTTGCATCCTTTTCATTA
321 CTATGCTATTATTACACAATTATTATGATCTTAACAAAATTTTCTGAAGATTTTTATTATAACATTATTGGGATGATAA
401 TCAAAATGCTTTTAATACTAATTTAAAAAATGTACATTAATCAGTAAAAAATGGTAACATACTTACAGAATACGCTAGA
481 TAAGAATGCTCAAAATTCAGTCTTGAGGGAATTTACTACTTTTCTAAAATACTTTCTTGTTAAATTATCAATTTATTA
561 AATTTAACAGTTTGATTAGTTTGTTCGTTGTTGTTTACAATGCCTTACAAGTTGCAACCATGCCACGCGCTTCCAGA
641 GTCTACGACAACCTACAGCTACAATTTGCGTCTTACTAATCTCCATTTTCTATTATTATTTTCAACTGGTACA
                                     TATA BOX
721 TTTCTC[CAAT]CAGTTATAATACTAACTTTTACTTAAAAATTTAACAAAAATGTATATTTTTTACCTTAATAAGTTTAT
      CAATBOX
801 TTT[GATA]ATTTTTTATATTTTATTGAT[GATA]GTTTTTGAATCTTAGGTTGACTGCCTTGAATTTTCAACTGACCAATA
      GATABOX      TATA BOX      GATABOX
881 AAATGAAGTATTATTCCTGCAAATAGTAGAAGAGAATATCAGCTCTGCACGAATCGGAGTGAGTCTTATTATGACCAATC
961 ACATTCAACTATCAACGGATTTTACCAATAGAATGATTTTCAGCTTACACTTTTCGATCAAGACGCTCGCCTTCTGTTGA
      TSS
1041 TGATTGTCGTTCTGTCGTTATTCTGATATTTTGAATGAAATATTTAAAATACTTGTGTAAAGGTATGTATTATTGT
      GT
1121 GATTATGATACGTATGTTCTTGTCTTATACTTGTTTTACTTTGAGTAGCTATGATTCAATCAATCAAATACGCATATTT
1201 TTGCTGTTACTATGAATGTTTTGTTTTGATAGGCCTAATTTGTTCAATGCAATTAGGTAACATGACCATTGTTCTAGAT
1281 TTTTCTCACGCTTGAAGCATGTATTTCAAAAATATTCATGTTCTGCATCAACTGAGCAACTAGTTGCTCATTATTTTTT
1361 AATAAAAATGGTAAAAATGTATACACAATTTGGAGGAAAGTGTATATGTATGCTACTAGCATAGCAGTTACTAATGCCAC
1441 ATCAAATTCATGATTTGTGTGTAGTTTCTAATTACATTTTTTATCCCACTAATCCTTTTTTTTCAATTTGGATTCCCTA
1521 CCTGATAACATAGTGGGTAGCATTACTAGCATTGTAATAGGTAGGTAGCAATGGTAGCATGATGTCTCAATAGCTCAA
1601 TTGGATTTTTTCAGTTGATTTTTATTATGTATTACAATGATTGGTTTTTTTTTCAGTGATTAATAAATGCGCAAGAACCAAGC
      AG      ATG
1681 AGACCGCTCGTA[AGTCCACCGGAGGAAAAGCCC]
      primer H3W1-3

```

虚线框内表示5'UTR序列；灰色背景表示内含子序列，下图同
 图2 褐飞虱组蛋白H3基因启动子区序列分析

```

1   GTAGCAGGCGCATGATTCTCAATTTATCTTATCTAA[CGGATA]GCTTATCAGTC[CAATTT]GCAGACAAATTAGATTGCAGA
      GAAT BOX      CAAT BOX
81  CAAAAAAGATTTTAAAGTTAATAAGCAATCGTGAAGTAATGATGAATTTCTCAAAGTTCTATACATAATAATAATATCG
161 AGTGACCTGGCTGGCTCAGATCTGGTGTTAGAGTTTTCAGGTGCAACTGAT[CAATTT]CAGGGCCTCTGACATGACCCAA
      CAAT BOX
241 CGACTGCTTTTTTAGGCAGCCGGACCGACGAGAAACGTGCCATTGCAAACACGGGACATGAATCTATTTCTTAAGAAATG
321 GTATGCTATGTTTTATAAACATCTACAAGATGTAGAAAAACCTTACATTTGTATGTATCATGTATAATATCTTCCCTCAG
401 TGAAAATCAAAATATCTTCCCATGAGTTATAATGGAATATTCCCATAGAAAAGTAGAAAATGTCGTTGGTTGTTGTA
481 GCGTTGGTTTCTTGTTCGTTGTGTACGTTGGACGTTGTGTATTCTAAAAGATCAAGATGTAAGTTGAAAATAAAACTA
      ATG GT
561 TTATTCATCAAATATGTGTGTTATTACACAATTTCAAAGATTATTTTGATAGTAAATTTAGATCTTACGAAATGGTGT
641 GATTTTATGATATTTGATCGTTCTTTCTTGGTTTACAG GCTGGTGGTAAAGCTGGTAAAGATTCACGCAAAGCAAAGCT
      AG
721 AAAGCAGTCTCAAGATCCGCGAGAC[CTGGTCTACAGTTTCCCGTTGGA]
      primer H2AW3

```

图3 褐飞虱组蛋白H2A基因启动子区序列分析

[4] Maguire T L, Collins G G, Sedgley M. A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family Proteaceae [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1994, 12(2) : 106 - 109.

[5] Tang M, Lv L, Jing S L, et al. Bacterial symbionts of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6) : 1740 - 1745.

[6] 徐龙勇, 陈德桂. 组蛋白去甲基化酶研究进展 [J]. 生命科学, 2010, 22(2) : 109 - 114.

[7] 茅卫锋, 汪亚平, 孙永华, 等. 虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 组蛋白 H3 启动子的分子克隆及在稀有鮎鲫 (*Gobiocypris rarus*) 中的表达活性分析 [J]. 自然科学进展, 2004, 14(1) : 46 - 50.

[8] 刘 博, 苏 乔, 汤敏谦, 等. 应用于染色体步移的 PCR 扩增技术的研究进展 [J]. 遗传, 2006, 28(5) : 587 - 595.

[9] Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T - DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR [J]. The Plant Journal, 1995, 8(3) : 457 - 463.