

赵永田,赵惠燕. 紫外线胁迫麦长管蚜 DNA 差异片段的克隆及序列功能分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):102-104 .
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.028

紫外线胁迫麦长管蚜 DNA 差异片段的克隆及序列功能分析

赵永田^{1,2}, 赵惠燕²

(1. 四川广播电视大学农林卫生学院,四川成都 610073; 2. 西北农林科技大学植物保护学院,陕西杨凌 712100)

摘要:应用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,简称 AFLP)技术对紫外线诱导的麦长管蚜基因组变异进行筛选,对获得的 63 个差异片段进行回收克隆测序。经 Blast 分析,发现 19 条同源性高的基因,按照基因功能可将差异序列划分为 5 类:防御基因、调节能量和信号基因、蛋白质合成基因、损害基因、未知功能基因。蚜虫对紫外线的响应机制涉及多种代谢过程的基因,如与能量代谢和信号传导、细胞凋亡等有关的基因,还涉及具有保守结构域的调控因子等。

关键词:紫外线;麦长管蚜;DNA 片段;克隆;序列分析

中图分类号: S435.122⁺.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0102-03

蚜虫是小麦上的主要害虫,其中麦长管蚜[*Sitobion avenae* (Fabricius)]作为麦蚜的优势种群,可通过传播病毒、刺吸汁液、分泌蜜露等方式为害,严重影响小麦的产量和品质。蚜虫作为 *r* 对策者,环境是导致种群分化的主要因素^[1-2]。近年来,臭氧层空洞导致紫外线辐射剂量增加,特别是 UV-B 波段^[3],不可避免地使蚜虫的遗传与进化产生巨大的选择压力。姚建秀等运用随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA,简称 RAPD)技术对麦长管蚜辐射诱导一代的 DNA 多态性进行分析表明,辐射条件下的遗传距离增大,紫外线可诱导产生种下分化^[4]。都二霞等通过设置不同时间和强度的紫外线照射桃蚜,运用 SSR(simple sequence repeats)技术研究发现,F₁ 代桃蚜产生可遗传变异致使 F₂ 代的 DNA 也发生变异,且各处理平均多态位点率之间差异显著^[5]。赵惠燕等对桃蚜设置不同时间的紫外线诱导,采用 SSH(spring struts hibernate)技术提取了产生的特异基因,进行克隆、测序,分析了差异基因的功能,得出 6 类相关基因参与紫外线胁迫^[6]。AFLP 结合了限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,简称 RFLP)的可靠性与 PCR 的便捷,具有重复性好、结果可靠等特点。AFLP 是较为理想的检测基因组差异的手段,原因在于它不需要提前知晓基因组序列,可直接用于检测。张根发等对低能离子诱导拟南芥引起的基因组 DNA 变异采用 AFLP 进行检测,并对差异片段进行克隆,测序发现突变可能存在突变热点^[7]。陈照立等应用 AFLP 成功回收了与二羟环氧苯并芘(BPDE)相互作用产生的 DNA 差异片段,经克隆测序及同源性比对发

现,9 条可能导致 BPDE 引发肺癌有关的基因片段^[8]。然而利用 AFLP 对紫外线诱导麦长管蚜的遗传变异分析尚未见报道。本研究选择麦长管蚜为试验材料,利用 AFLP 技术分析经紫外线处理和对照组之间的 DNA 变异,对差异基因进行筛选、克隆、测序,分析差异基因的功能,初步探索蚜虫对紫外线的响应机制,为蚜虫进化研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试虫

试验虫源由德国联邦农林生物研究中心提供。处理方法:取发育一致的成虫,分成对照组和试验组。试验组经紫外线照射时间为 1、2、3、4、6、8 h;对照组采用正常光照。光源高度统一为蚜虫上方 30 cm 处。处理后的当代成蚜标记为 F₀ 代,继续培养 2 代,均按照同样处理照射成虫,并依繁殖次序收集成虫标记为 F₁、F₂ 代。

1.2 方法

1.2.1 DNA 池的构建及 AFLP 反应体系 分别对不同处理时间的蚜虫构建 DNA 池。DNA 的提取方法及 AFLP 反应体系参考文献[9]。

1.2.2 差异表达片段的回收、克隆与测序 用刀片切取差异条带,用 ddH₂O 浸泡后,取上清液重新扩增,从琼脂糖凝胶上回收二次扩增差异片段。将回收产物连接于 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,复苏后 37 ℃ 培养过夜,挑取阳性(白斑)克隆进行菌落 PCR。经鉴定的阳性克隆送上海生工生物工程公司测序。

1.2.3 同源性比对 测序结果输入美国国家生物技术信息中心 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站,并应用 Blast 工具对差异片段序列同源性进行比对。

2 结果与分析

2.1 差异片段的 AFLP 分析

扩增的差异性主要体现为条带的增加或缺失(图 1)。通

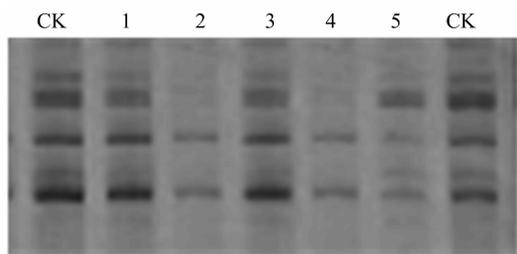
收稿日期:2016-05-18

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20130204110004)。

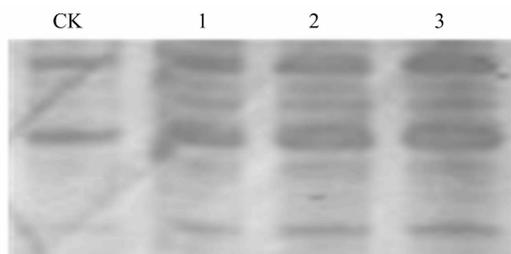
作者简介:赵永田(1982—),男,山东巨野人,博士研究生,讲师,主要从事昆虫生态与害虫综合治理研究。E-mail:zyttian@163.com。

过统计差异条带数目,计算不同处理的变异频率发现,变异频率随着处理时间的增加而增大,且二者之间存在着正相关,此

结论与文献[10]研究结果一致。



a. 引物组合 E-ACC/M-ATC



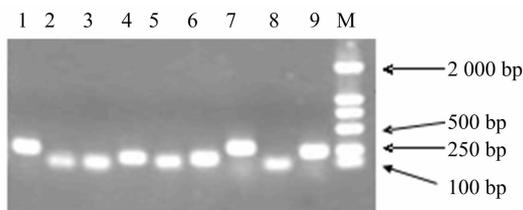
b. 引物组合 E-AGG/M-AGT

CK为对照组。a: 1—2 h; 2—3 h; 3—4 h; 4—6 h; 5—8 h。b: 1—4 h; 2—6 h; 3—8 h

图1 扩增产物多态性的差异

2.2 差异片段的克隆与菌落 PCR 鉴定

由图 2 可知,质粒的扩增片段大小与回收的差异片段一致,表明差异片段成功连接在质粒载体上。



1~9—差异片段; M—Marker 2000

图2 差异片段的菌落 PCR 检测结果

2.3 同源性功能分析

对 63 个克隆成功的序列经测序并通过 Blast 比对分析,发现有 19 个同源性高的基因序列,在比对的过程中发现,有 4 个序列经同源性检测都为 Fgd6 protein 鸟嘌呤核苷酸交换因子,2 个序列为 HSP15 热休克蛋白。主要可能参与胁迫响

应的基因功能如表 1 所示,未列出未知功能基因。进一步分析相关基因的功能,可以将 19 个序列分成 5 大类:防御基因,约占 21%;调节能量与信号基因,约占 37%;蛋白质合成基因,约占 5%;损害基因,约占 11%;未知功能基因,约占 26% (图 3)。

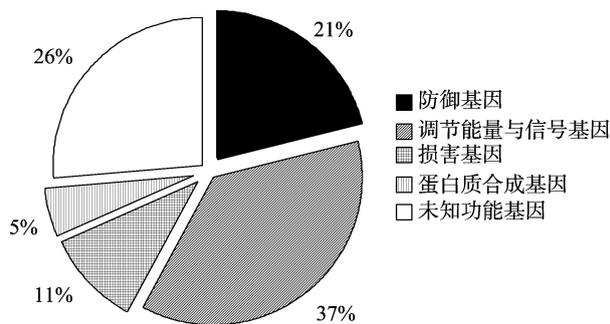


图3 差异片段功能分类及比例

表 1 部分差异片段的克隆序列分析

基因分类	长度	登录号	同源基因	来源物种	期望值	一致性 (%)
防御基因	136 bp	XM964248.2	AGAP009638 - PA 凝集素样蛋白	<i>Tribolium castaneum</i> (Herbst) 赤拟谷盗	4×10^{-7}	74
	284 bp	3BBX - B	HSP15 热休克蛋白	<i>Escherichia coli</i> 大肠杆菌	6×10^{-5}	100
调节能量和信号基因	172 bp	DY763003.1	4sin1 光系统 I P700 脱辅基蛋白	Sinpaldalkong <i>Glycine soja</i> 野生型大豆	3×10^{-4}	88
	320 bp	AJ890336.1	Hepicidin 铁调肽/铁调节激素	<i>Lateolabrax maculatus</i> 花鲈	2×10^{-10}	100
	73 bp	DQ173275.1	mpd1 质膜蛋白	<i>Burkholderia</i> sp. 伯克霍尔德氏菌	1×10^{-7}	84
蛋白质合成基因	105 bp	XM001945148.1	Fgd6 protein 鸟嘌呤核苷酸交换因子	<i>Acyrtosiphon pisum</i> 豌豆蚜	4×10^{-17}	91
	143 bp	1PN7 - C	S12, LI1 protein、ptRNA 核糖体蛋白、肽酰转移酶	<i>Escherichia coli</i> 大肠杆菌	4×10^{-8}	100
损害基因	176 bp	L36462.1	Alpha - haemolysin polypeptide genes α - 溶血素	<i>Aeromonas hydrophila</i> 嗜水气单胞菌	3×10^{-11}	89
	172 bp	DY763003.1	94sin1 硫酸糖基化蛋白	Sinpaldalkong <i>Glycine soja</i> 野生型大豆	3×10^{-4}	88

3 结论与讨论

通过 AFLP 技术,共有 63 个差异片段克隆并测序成功,结果表明,经紫外线诱导的蚜虫 DNA 变异可以采用 AFLP 技

术进行差异检测与筛选。本研究与赵惠燕等的研究结论^[6]一致,经紫外线胁迫后调节能量与信号基因和防御基因表达明显增多,表明蚜虫面对胁迫能积极作出应激反应。如 Hsp15,作为小分子应激蛋白热休克蛋白,可以与质膜结

合^[11],而质膜是细胞吸收外界物质的动态屏障,也是信息传递的通道,起到保护作用。同时小分子热激蛋白因为具有分子伴侣的作用,所以在不良条件下可以降低蛋白的合成折叠出现异常的概率和稳定性,在不良条件下提高生存率^[12]。部分热激蛋白在序列上与细胞脱水蛋白存在某种相似性,这种相似性可以抑制细胞脱水,使溶质不易发生渗透,从而减轻冷胁迫对细胞膜的损害,使组织的抗冷性增强^[13]。质膜蛋白家族成员众多,底物多样,功能也较多,包括对抗生素产生抗性、转换信号、表达抗原等^[14-15],但它们有共同的特点,能结合并水解 ATP,通过细胞膜转运各种物质^[16]。核糖体蛋白 L11 在蛋白质合成过程中必不可少,并且是高度保守的蛋白质^[17]。L11 的 N-末端具有分子开关功能,在 EF-G 依赖的迁移过程和 RF1 识别终止密码子 UAG 的过程中都是必须的。Harms 等研究表明,L11 在核糖体的翻译过程中起到分子开关的作用^[18]。在胁迫的过程中发现,有损害功能的基因参与其中,如硫酸糖基化蛋白(94sin1),对细胞的存活及增殖分化有负性调节作用^[19],但具体作用机制还不清楚。除了已知的功能基因外,本研究还得到许多同源性较高,但功能未知的基因,有待进一步研究其在紫外线耐受方面的功能。

研究表明,蚜虫对紫外线的胁迫响应机制非常复杂,涉及多途径多种基因协同作用。虽然本研究获得的差异基因反映的信息不够全面,但通过筛选鉴别这些特异基因,分析其功能,是阐明蚜虫对紫外线胁迫分子变异和响应机制的必要前提,同时为蚜虫的分子进化提供理论依据。

参考文献:

[1] Bensadia F, Boudreault S, Guay J F, et al. Aphid clonal resistance to a parasitoid fails under heat stress[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2006, 52(2): 146 - 157.

[2] Chen Z, Madden R D, Dillwith J W. Effect of precocene II on fatty acid metabolism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, under cold stress[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51(4): 411 - 416.

[3] Madronich S, Mckenzie R L, Björn L O, et al. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, 1998, 46(1/2/3): 5 - 15.

[4] 姚建秀, 赵惠燕. 紫外条件诱导下麦长管蚜 DNA 的变异研究[J]. *西北农业学报*, 2001, 10(1): 33 - 36.

[5] 都二霞, 郭剑文, 赵惠燕. 紫外辐射诱导桃蚜 DNA 变异[J]. *应用生态学报*, 2006, 17(7): 1245 - 1249.

[6] 赵惠燕, 都二霞, 郭剑文, 等. UV-B 辐射胁迫下桃蚜差异基因表达的分子生态初步研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2010(3): 132 - 138.

[7] 张根发, 聂艳丽, 石小明, 等. 低能离子注入拟南芥 DNA 变异的 AFLP 检测及差异片段的序列分析[J]. *遗传学报*, 2004, 31(9): 1021.

[8] 陈照立, 金敏, 郭向飞, 等. 用 AFLP 结合免疫纳米磁珠技术富集分离 BPDE-DNA 片段[J]. *解放军预防医学杂志*, 2007, 25(5): 324 - 327.

[9] 赵永田, 王兴娥, 赵惠燕, 等. 麦长管蚜 AFLP 银染分析体系的建立与优化[J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 28(1): 1 - 5.

[10] 赵永田, 赵惠燕. 紫外线胁迫麦长管蚜 DNA 变异的 AFLP 分析[J]. *生物技术通报*, 2009(10): 142 - 145, 155.

[11] Lin C Y, Chen Y M, Key J L, et al. Solute leakage in soybean seedlings under various heat shock regimes[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1985, 26(8): 1493 - 1498.

[12] Soto A, Allona I, Collada C, et al. Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(2): 521 - 528.

[13] 邵玲, 陈向荣. 热激蛋白与植物的抗逆性[J]. *北方园艺*, 2005(3): 73 - 74.

[14] Tachikawa H, Takeuchi Y, Funahashi W, et al. Isolation and characterization of a yeast gene, MPDI, the overexpression of which suppresses inviability caused by protein disulfide isomerase depletion[J]. *FEBS Letters*, 1995, 369(2/3): 212 - 216.

[15] Schneider E, Hunke S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, 22(1): 1 - 20.

[16] 吴丽娜, 林向民, 任海霞, 等. *Halomonas aquamarina* 盐敏感质膜蛋白组的研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2005, 44(增刊1): 139 - 141.

[17] 王玉瑶, 张志云, 梁爱华. 核糖体蛋白 L11 及其功能[J]. *生命的化学*, 2008, 28(1): 104 - 106.

[18] Harms J M, Wilson D N, Schluenzen F, et al. Translational regulation via L11: molecular switches on the ribosome turned on and off by thiostrepton and micrococin[J]. *Molecular Cell*, 2008, 30(1): 26 - 38.

[19] 蓝儒竹, 叶章群, 王齐襄, 等. 硫酸糖基化蛋白 2 在去势大鼠前列腺中的表达[J]. *中华实验外科杂志*, 2001, 18(5): 415 - 417.