

斜纹夜蛾取食诱导棉花抑制性消减文库的初步构建及生物信息学分析

许冬, 张永军*, 曹广春, 陈洋, 吴孔明, 郭予元

(中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:为了筛选棉花抗逆基因,实验室构建了棉花被斜纹夜蛾幼虫取食诱导的正、反向抑制性消减文库。文库随机各挑取 1000 个克隆进行 PCR 鉴定,发现插入片段长度主要集中在 200~1000 bp 之间。经反向 Northern 杂交筛选,正向文库随机挑取 250 个克隆测序,得到了 35 条非重复序列 ESTs,反向挑取 150 个克隆,得到 24 条 ESTs。GenBank 数据库 BLAST 序列相似性比对功能分析表明,斜纹夜蛾幼虫取食胁迫棉花的应答过程涉及信号传导、基因调控、抗胁迫、防御反应、能量合成代谢、细胞生长延伸等多个生物途径。诱导表达的基因对斜纹夜蛾取食胁迫功能表现为一定的直接或间接保护作用。

关键词:抑制性消减杂交;表达序列标签;棉花;斜纹夜蛾

中图分类号:S562.035 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2009)06-0474-06

Construction and Bioinformatics Analysis of Suppression Subtractive Hybridization Library for Cotton Induced by *Spodoptera litura* (Fabricius)

XU Dong, ZHANG Yong-jun*, CAO Guang-chun, CHEN Yang, WU Kong-ming, GUO Yu-yuan
(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: To explore insect resistant genes induced by *Spodoptera litura* (Fabricius) larvae from cotton, forward and reverse suppression subtractive hybridization (SSH) libraries were constructed. 1000 clones were selected from each library, the inserted fragment sizes ranged between 200 bp and 1000 bp, which meet the requirements of a plant cDNA library. 250 positive clones from the forward library were screened by using the Reverse Northern Dot-blotting technique, then sequenced and analyzed, and 35 expressed sequence Tags (ESTs) were obtained, in which 24 ESTs were obtained from the positive clone in reverse library. Based on BLASTx in GenBank analysis, it was found that those ESTs make important roles in signaling pathway regulation, gene regulation, anti-stress ability, defense responses, energy synthesis and metabolism, proliferation of cells, and so on. Those genes play an important role in regulating and defending against *S. litura* larvae directly and indirectly.

Key words: suppression subtractive hybridization (SSH); expressed sequence Tags (ESTs); cotton; *Spodoptera litura*

植物在与害虫长期协同进化的过程中,其在抵御害虫的同时也演化形成一套复杂的防卫体系。当植物被害虫危害时,可通过调节自身的生理反应去影响或调控害虫的分布及其行为来避免

或减轻害虫危害^[1]。植物体内蕴藏着大量的抗逆基因,它们在昆虫与植物的互作过程中承担着重要的防御功能,所以对植物自身抗逆基因的发掘或选育转基因新品种,可以让害虫治理更加符合

收稿日期: 2009-02-18 **作者简介:** 许冬(1981-),男,硕士研究生; *通讯作者, yjzhang@ippcaas.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(No. 2007CB0902),国家自然科学基金项目(30871640, 30330410)和植物病虫害生物学国家重点实验室项目(SKI.2007SR01)

生态调控规律。

斜纹夜蛾(*Prodenia litura Fabricius*)是一类杂食性和暴食性害虫,当前商业化的转基因抗虫棉对其控制效果较差,在某些年份呈现间歇式暴发,导致棉花大面积减产^[2]。随着现代分子生物学的发展,利用基因调控提升棉花抗逆性的筛选和培育工作越来越受到重视。筛选斜纹夜蛾取食诱导棉花的抗逆基因,不仅有助于解析斜纹夜蛾胁迫棉花抗性的分子机制,也可为利用基因工程培育抗虫新品种打下基础。本文构建了棉花被斜纹夜蛾幼虫取食后的抑制消减杂交 cDNA 文库,并初步进行了生物信息学分析,以期对棉花抗逆基因表达分析及相关转基因抗虫选育工作提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫和棉花

斜纹夜蛾于 2007 年采自湖北省黄冈地区棉田,室内人工饲料饲养,未接触任何杀虫剂,选取处于旺盛取食生长阶段的 2 龄幼虫用于试验。棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品种为中棉所 12。人工气候箱(25℃,L:D=16:8)培养,每盆留苗 3 株,生长期控制棉花长势,基本保证生长一致。待棉花长至 6 叶期时,将棉花材料分别处理,一部分接 2 龄斜纹夜蛾幼虫危害,另一部分不接虫为对照。每盆接 10 头幼虫,分别胁迫诱导 12 h、24 h、48 h,剪取收集各处理的棉花叶片,液氮速冻密封保存于-70℃冰箱中备用。

1.2 供试试剂

Plant RNA Extraction Kit 购于北京百泰克生物技术有限公司;QIAGEN Oligotex mRNA mini Kit 购自 QIAGEN 公司;CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 购买自 CLONTECH 公司;QIAquick PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司;DIG High prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 购自 Roche 公司;DH5 α 菌株购自 Invitrogen 公司;pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;其它生化试剂均为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 棉株叶片总 RNA 提取及 mRNA 纯化。棉花总 RNA 提取按照 Plant RNA Extraction Kit 说明书操作。利用紫外分光光度计对 RNA 进行定量和纯度检测,1.2%变性琼脂糖凝胶电泳检测

总 RNA 质量。mRNA 的纯化按照 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Mini Kit 说明书操作。

1.3.2 棉花抑制性消减杂交 cDNA 文库的构建。按 CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 操作说明书将诱导处理和正常处理的棉花叶片的 mRNA 逆转录为双链 cDNA,将 tester cDNA 用限制性内切酶 Rsa I 酶切后分成两份,分别与接头 I 和接头 2R(Adaptor I 和 Adaptor 2R)16℃连接过夜,然后将它们分别与 Rsa I 酶切的 driver cDNA 进行第一次杂交,68℃杂交 8 h,然后向两组第一次消减杂交体系混合物中加入过量的变性 driver cDNA 进行第二次杂交,68℃过夜。PCR 仪中,75℃,5 min 延伸 adaptor,按照 94℃、25 s,94℃、10 s,66℃、30 s,72℃、1.5 min 的程序运行 27 个循环进行扩增。然后再按照 94℃、10 s,68℃、30 s,72℃、1.5 min 的程序运行 12 个循环扩增。将消减杂交的产物纯化后与 pGEM-T 载体在 4℃连接过夜,电转大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布 LB 培养基,37℃过夜培养后,挑取单个白斑,接种于备好的 96 孔 PCR 板中,37℃静止过夜。PCR 鉴定为阳性的菌液加入 15%甘油,-70℃保存菌种。

1.3.3 插入片段 PCR 检测。挑取白色克隆,备份保存之后利用巢式引物进行 PCR 扩增,观察是否有插入片段以及片段大小。取 96 孔 PCR 板,每孔配置 25 μ L PCR 反应体系,挑取菌液作为模板进行扩增。取 PCR 产物 10 L 在 2%的琼脂糖凝胶上电泳(1 \times TAE 电泳缓冲液),观察特异性扩增片段的大小。

1.3.4 消减文库质量鉴定。从阳性克隆率(PCR 扩增阳性克隆数/挑取的克隆总数 \times 100%)和插入片段大小两个方面鉴定文库质量,利用巢式引物对阳性克隆子菌液进行 PCR 扩增,电泳判断各克隆插入片段大小。

1.3.5 反向 Northern 斑点杂交筛选阳性克隆及生物信息学分析。按照 DIG High prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 操作说明制备地高辛标记探针,将阳性克隆 PCR 产物变性后点阵于尼龙膜上,分别与杂交后第二次 PCR 产物标记的探针杂交筛选消减文库。获得的阳性克隆送至北京诺赛公司测序,序列经去除载体序列和引物序列后,利用 BLAST 软件进行序列比对,分析得到的 EST 序列相似性和生物信息学数据。

2 结果与分析

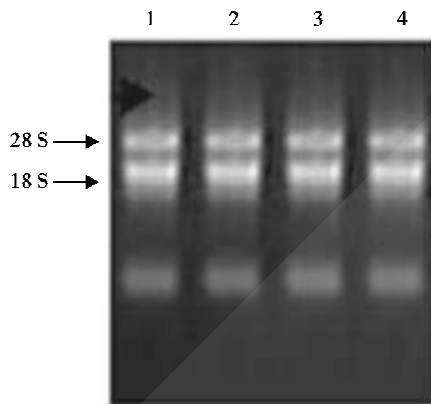
2.1 棉花总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化

高质量的总 RNA 和 mRNA 是构建 cDNA 文库的前提条件。试验中获得的棉花各处理叶片总 RNA, 1% 的变性琼脂糖凝胶电泳检测可以观察到两条典型的 18 S 和 28 S 条带(图 1)。用紫外分光光度计进行质量评价, A_{260}/A_{280} 的比值为 1.907, 能够满足下一步试验要求。

正向文库将斜纹夜蛾幼虫取食诱导的 3 个处理棉花叶片的总 RNA 等量混合作为 tester, 对照棉花的总 RNA 作为 driver; 反向文库则相反。用 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Mini Kit 分别纯化获得 tester mRNA 和 driver mRNA, 1% 的变性琼脂糖凝胶电泳检测呈现一条弥散的拖尾长带(图 2), 满足文库需求。

2.2 消减杂交及转化阳性菌落检测

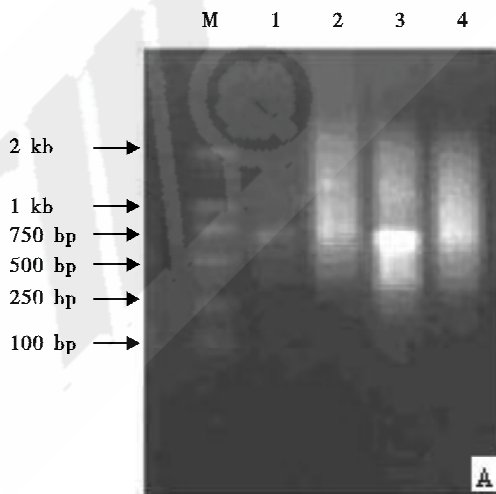
图 3-A、图 3-B 分别为正、反向文库消减杂交



1. 对照; 2. 诱导 12 h; 3. 诱导 24 h; 4. 诱导 48 h。

图 1 对照及不同处理时间棉花总 RNA 检测

Fig. 1 Total RNA from different treatments of cotton leaves



A. 正向文库; B. 反向文库; M. DNA 分子量标准 DL2000;

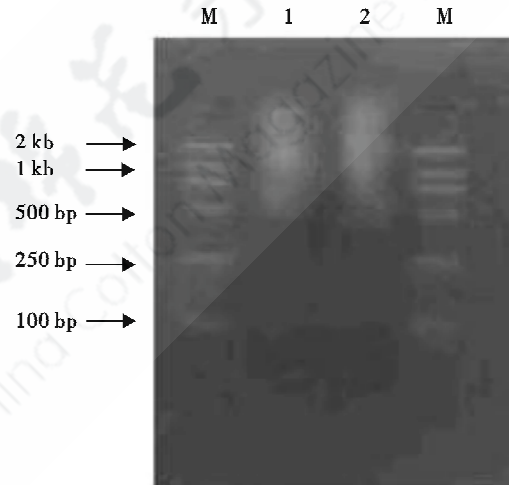
1. 消减杂交后第一次 PCR 产物; 2. 对照第一次 PCR 产物; 3. 消减杂交后第二次 PCR 产物; 4. 对照第二次 PCR 产物。

图 3 抑制性消减杂交后第一次、第二次 PCR 扩增

Fig. 3 Result of 1st and 2nd PCR amplification after SSH

后第一次和第二次 PCR 产物凝胶电泳结果, PCR 产物长度主要集中在 300~1000 bp 之间。图中可以看出, 第二次 PCR 扩增产物明显比第一次 PCR 扩增产物条带亮, 表明消减基因得到有效富集。

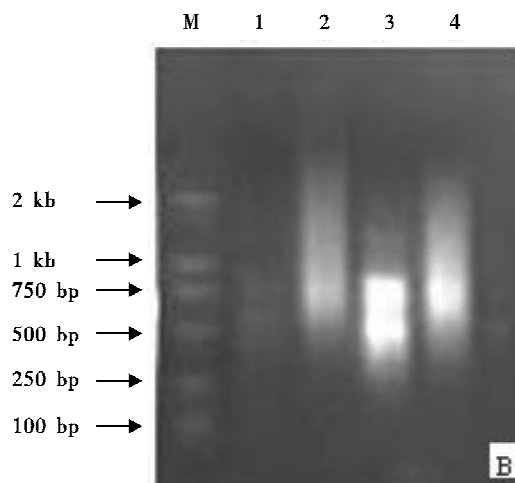
从正、反向 SSH 文库中各随机挑取白色克隆 1000 个, 分批进行 PCR 检测。从克隆插入片段 PCR 扩增结果(图 4)来看, 插入片段的大小不等, 范围在 150~1000 bp 之间。正向文库插入单个片段的克隆有 937 个, 插入两条以上片段的有 18 个, 有效阳性克隆率 93.7%; 反向文库插入单个片段的克隆 932 个, 插入两条以上条带的 22 个, 有效阳性克隆率 93.2%。所建文库克隆大多能扩增出有效产物, 插入片段大部分集中在 500 bp 左右。



M. DNA 分子量标准 DL2000; 1. 对照; 2. 处理。

图 2 对照和斜纹夜蛾处理棉花叶片 mRNA 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of mRNA from different treatments of cotton leaves



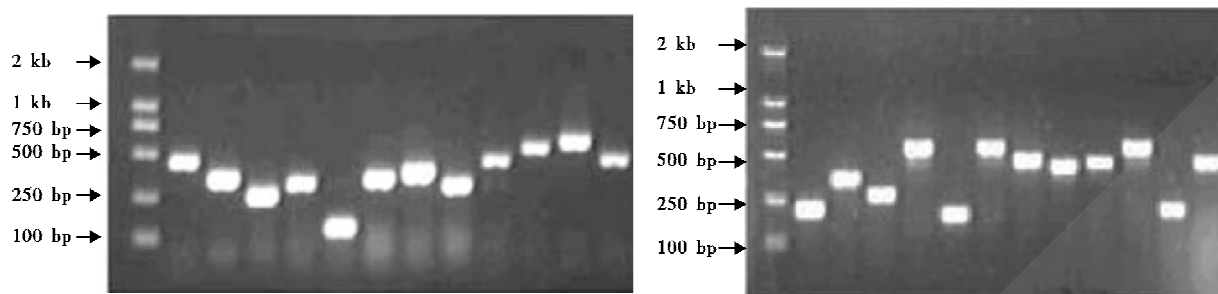


图 4 PCR 筛选含有插入片段的部分克隆

Fig. 4 Clone carrying inserts screened by PCR amplification

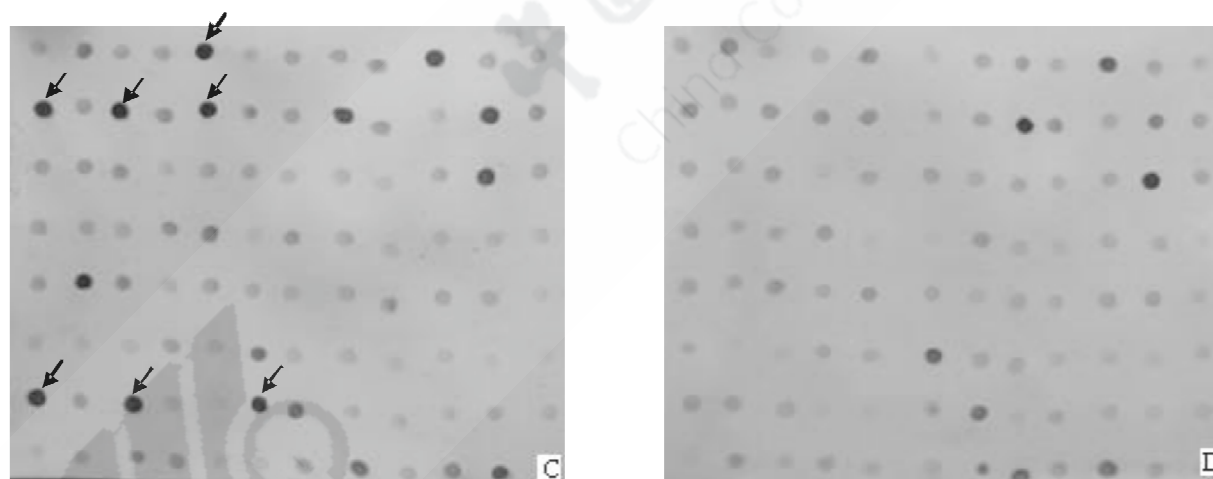
2.3 反向 Northern 斑点杂交筛选及生物信息学分析

PCR 阳性鉴定后,剩余的 PCR 产物加热变性制备成两张相同的尼龙膜,用等量的正向探针和反向探针分别与制备的尼龙膜进行反向 Northern 杂交。选取文库与 tester cDNAs 探针杂交信号强于与 driver cDNAs 探针至少 3 倍以上的克隆为阳性克隆(图 5-C、图 5-D)。

记录正、反向文库中差异表达基因,包括上调和下调基因,杂交筛选后,正向文库获得 562 个差异表达的阳性克隆子,反向文库获得 329 个差异

表达的阳性克隆子。

将杂交筛选出的克隆子送去测序,获得代表不同基因的非重复 ESTs 序列。正向文库随机挑取 250 个,反向挑取 150 个,经测序和 BLAST 比对数据分析,发现正向文库中有 23 条序列(66%)能在数据库中找到相似已知基因,12 条序列(34%)在数据库中未发现相似序列,可能代表一些未知的新基因;反向文库中有 18 条序列(75%)在数据库中找到相似基因,6 条序列(25%)在数据库中未发现相似序列(表 1)。



C. 克隆与正向消减产物探针杂交结果;D. 克隆与反向消减产物探针杂交结果。

图 5 Northern 斑点杂交结果

Fig. 5 Results of Northern dot blot

3 讨论

植物在进化过程中受遗传信息和外界环境因素的调控,体内逐渐演化形成一个胁迫反应的中心系统,它可以被多种环境胁迫如营养匮乏因子所激活,从而通过某种机制来调控植物的生长速率和物质分配。在环境胁迫的刺激下,植物可能会激发体内的某种信号系统,在代谢水平上做出响应并激发植物的防御潜力。目前,国内对植物在非生物胁迫下基因差异表达的研究较多,而对

生物胁迫研究较少。本研究利用消减杂交技术构建了斜纹夜蛾取食胁迫常规陆地棉文库,正向 SSH-cDNA 文库得到 35 个上调表达的基因,反向文库得到 24 个下调表达的基因,初步构建了胁迫诱导下的基因表达模式,为从基因水平阐明棉花在鳞翅目害虫危害胁迫下的抗逆反应机理提供了一定的理论依据。

本研究发现,棉花在斜纹夜蛾胁迫下会大量表达一些有保护作用的功能性蛋白,如细胞色素 P450、类金属硫蛋白和多聚泛肽等,这些功能蛋

白与病虫害诱导或者抗逆性相关^[3-5]。P450 在植物一些重要的次生代谢物产生过程中起催化作用,抵抗病虫害及逆境胁迫^[6-7]。植物在盐、干旱、

低温等非生物胁迫下,金属硫蛋白在一定范围内可提高其耐非生物胁迫的能力。

表 1 文库部分 ESTs 序列 BlastX 比对结果

Table 1 Homologous analysis of ESTs from the forward and reverse libraries by BlastX

序列号	分析结果	期望值	相似性
FE659328	衰老相关蛋白	4E-40	72/75 (96%)
FE659330	细胞色素 P450	2E-48	80/91 (87%)
FE659332	羧基丙酮酸还原酶	4E-28	60/68 (88%)
FE659333	L-抗坏血酸过氧化酶	6E-33	68/68 (100%)
FE659334	NBS-LRR 抗性基因蛋白	3E-99	221/230 (96%)
FE659335	F-box/LRR 受体蛋白 15	1E-27	61/92 (66%)
FE659336	甘氨酸脱氢酶 P	9E-83	164/165 (99%)
FE659337	泛素家族蛋白	2E-23	57/72 (79%)
FE659338	丝氨酸羟甲基转移酶	1E-24	58/58 (100%)
FE659341	镁螯合酶 H 亚基家族蛋白	6E-52	101/102 (99%)
FE659345	遍在蛋白	3E-23	55/55 (100%)
FE659346	Smr 包含蛋白	2E-27	63/76 (82%)
FE659347	铜锌-过氧化物歧化酶	2E-05	23/23 (100%)
FE659348	gag/pol 聚合蛋白	6E-124	216/325 (66%)
FE659349	硫氧还蛋白	5E-39	80/80 (100%)
FG234927	丝氨酸;乙醛酸转氨酶	3E-95	194/195 (99%)
FE896837	高迁移率族蛋白 B3	9E-34	68/81 (83%)
FE896838	脂质转移蛋白前体	3E-06	23/26 (88%)
FE896839	休眠/生长素家族蛋白	7E-35	95/126 (75%)
FE896840	果胶甲酯酶抑制子	1E-30	64/96 (66%)
FE896843	组蛋白 3.2	2E-70	137/137 (100%)
FE896844	叶绿素 II A/B 结合蛋白	5E-74	132/135 (97%)
FE896845	光合系统 1 PsaD 亚基	2E-42	102/135 (75%)
FE896846	非特异性脂质转移蛋白前体	0	404/427 (94%)
FE896849	抑制生长素蛋白	4E-22	51/81 (62%)
FE896851	二磷酸核酮羧化酶小亚基	5E-32	62/63 (98%)
FE896852	原叶绿素酯还原酶 b	2E-28	61/70 (87%)
FE896853	内在膜 Hpp 家族蛋白	9E-49	80/105 (76%)
FE896854	叶绿体内被膜蛋白	2E-05	22/31 (70%)

棉花在斜纹夜蛾胁迫下,与蛋白降解相关的一些基因呈上调表达,如多聚遍在蛋白 (polyubiquitin)、泛素蛋白 (ubiquitin protein) 等,此类蛋白参与降解变性不能正常发挥功能的蛋白的过程^[8]。多聚遍在蛋白在生物体的转录调节、蛋白质降解、蛋白质稳定状态调节、程序性细胞死亡、细胞周期控制和胁迫应答等过程中都起着重要作用^[9]。棉花被斜纹夜蛾取食后,植株体内一些蛋白质的结构受到破坏变性,不能发挥正常功能,需要将这些异常蛋白降解减少因积累所造成的伤害。当然,降解蛋白的产生也可能与茉莉酸途径、植物衰老相关^[10]。

胁迫过程涉及一些信号转导基因,比如 F-box 蛋白质、镁螯合酶 H 亚基、乙醇脱氢酶等,这与一些报道基本一致^[11]。F-box 蛋白质介导的泛素化蛋白质降解途径可能是植物基因表达调控的重要机制,而且还参与水杨酸途径和茉莉酸途径^[12-13]。镁螯合酶 H 亚基作为脱落酸受体参与叶绿素生物合成,并且是植物质体向细胞核信号转导的重要组

分^[14]。试验结果表明,斜纹夜蛾取食胁迫过程涉及棉花叶片气孔行为以及 ABA 的合成,镁螯合酶 H 亚基可能参与植物抗虫、抗伤害等胁迫过程,可能在伤害信号转导过程中作为一个主要组分激活防御基因表达^[12]。斜纹夜蛾胁迫引起棉花植株体内信号转导,某些基因调控表达,引起植物相应生理生化的变化应对环境胁迫。

据报道,斜纹夜蛾取食水稻后,后者会释放大量的萜烯类、水杨酸甲酯和吲哚等物质,表达水平显著高于健康植株或机械损害植株^[15]。棉贪夜蛾幼虫取食玉米,后者也大量释放萜烯类物质等可引诱天敌的挥发性物质,而且已筛选出一些调控萜烯产物的萜烯合成相关基因 *tps4*、*tps5*、*tps10* 等^[16-18]。本试验未能筛选到上述有关植物挥发信息化合物代谢途径的关键调控基因,可能诱导处理时间过长,也可能基因库中的一些低丰度信息需要采取新手段进行信号放大和发掘。

害虫诱导植物防御反应过程中的信号转导和挥发物代谢机理已受到广泛关注,明确棉花被斜

纹夜蛾取食后被激发的内在防御机制,将有助于我们掌握生物因子和其它条件诱导棉花化感防御的规律。

参考文献:

- [1] 秦秋菊,高希武.昆虫取食诱导的植物防御反应[J].昆虫学报,2005,48(1):125-134.
QIN Qiu-ju, Gao Xi-wu. Plant defense responses induced by insect herbivory[J]. Acta Entomologica Sinica, 2005, 48 (1):125-134.
- [2] 林华峰,杨新军,高亿波,等.几种虫生真菌对斜纹夜蛾的致病性[J].应用生态学报,2007,18(4):937-940.
LIN Hua-feng, Yang Xin-jun, Gao Yi-bo, et al. Pathogenicity of several fungal species on *Spodoptera litura* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18 (4):937-940.
- [3] 秘彩莉,刘旭,张学勇.F-box蛋白质在植物生长发育中的功能[J].遗传,2006,28(10):1337-1342.
BI Cai-li, Liu Xu, Zhang Xue-yong. The function of F-box protein in plant growth and development[J]. Hereditas, 2006, 28 (10): 1337-1342.
- [4] 张映霞,杨郁文,倪万潮,等.陆地棉黄萎病菌诱导抑制消减杂交cDNA文库的构建与分析[J].江苏农业学报,2008,24(1):17-21.
ZHANG Ying-xia, Yang Yu-wen, Ni Wan-chao, et al. Construction and analysis of a SSH library of upland cotton upon infection with *Verticillium dahliae*[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2008, 24 (1):17-21.
- [5] 张玉刚,许雪峰,李天忠,等.抑制性消减杂交分离苹果缺铁诱导的相关基因[J].园艺学报,2007,34(3):555-560.
ZHANG Yu-gang, Xu Xue-feng, Li Tian-zhong, et al. Isolation of Fe deficiency induced genes by suppression subtractive hybridization in *Maus xiaojinensis*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34 (3):555-560.
- [6] 赵剑,杨文杰,朱蔚华.细胞色素P450与植物的次生代谢[J].生命科学,1999,11(3):127-131.
ZHAO Jian, Yang Wen-jie, Zhu Wei-hua. Cytochrome P450 and plant secondary metabolism[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 1999, 11(3):127-131.
- [7] 王省芬,田海燕,马峙英,等.黄萎病菌诱导下陆地棉抗病品种SSH文库的构建[J].棉花学报,2008,20(1):3-8.
WANG Xing-fen, Tian Hai-yan, Ma Zhi-ying, et al. SSH library construction of upland cotton resistant cultivar under the stress of *Verticillium dahliae*[J]. Cotton Science, 2008, 20 (1):3-8.
- [8] BELKNAP W R, Garbarino J E. The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses [J]. Trends Plant Sci, 1996, 1: 331- 335.
- [9] CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome pathway on protein death and cell life[J]. The EMBO Journal, 1998, 17: 7151-7160.
- [10] STIRNBERG P, Sande K, Leyser H M. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis* [J]. Development, 2002,129:1131-1141.
- [11] CHRISTIE P J, Hahn M, Walbot V. Low-temperature of alcohol dehydrogenase-1 mRNA and protein activity in maize and rice seedlings[J]. Plant Physiology, 1991,95:699-706.
- [12] BIRKENMEIER G F, Ryan C A. Wound signaling in tomato plants, evidence that ABA is not a primary signal for defense gene activation[J]. Plant Physiology, 1998, 117: 687-693.
- [13] KIM H S, Delaney T P. *Arabidopsis* SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance[J]. Plant Cell, 2002, 14 (7): 1469-1482.
- [14] SHEN Yuan-yue, Wang Xiao-fang. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor[J]. Nature, 2006,443: 823-826.
- [15] XU Ling-hui, Liu Fu-quan, Lechner E, et al. The SCFCOII ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2002, 14:1919-1935.
- [16] SCHMELZ E A, Alborn H T, Tumlinson J H. Synergistic interactions between volicitin, jasmonic acid and ethylene mediate insect-induced volatile emission in *Zea mays* [J]. Physiologia Plantarum, 2003,117: 403-412.
- [17] TOBIAS K L, Christiane S, Jonathan G. The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes[J]. The Plant Cell, 2004, 16: 1115-1131.
- [18] 刘悦霞,梁卫红.水稻 QsAQP 基因的生物信息学分析[J].河南师范大学学报:自然科学版,2008,36(2):117-119.
LIU Yue-xia, Liang Wei-hong. Bioinformatical analysis of QsAQP gene from rice[J]. Journal of Henan Normal University: Natural Science, 2008, 36 (2): 117-119.