

小菜蛾肌球蛋白重链部分 cDNA 序列克隆、表达概况及分析

龚亮, 钟国华, 任珍珍, 胡美英*

(华南农业大学 农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:肌肉肌球蛋白重链在生物运动过程中具有至关重要的作用,但在昆虫中此类基因极少被报道。首次克隆和分析小菜蛾肌球蛋白重链部分 cDNA 序列, GenBank 登录号为 FJ462712, 其长 408 个碱基, 推测编码 135 个氨基酸。同源分析表明: 此多肽序列与凤蝶、家蚕、果蝇的同源性分别为 95%、93%、82%。半定量 RT-PCR 研究表明: 小菜蛾 *MHC* 基因在不同的生长发育阶段的表达皆不相同, 在老熟幼虫和成虫中的表达量显著高于低龄幼虫和蛹。为进一步鉴定小菜蛾肌球蛋白重链的生理特征提供基因序列信息。

关键词:小菜蛾;肌球蛋白重链;cDNA 克隆;序列分析;表达概况

中图分类号:Q963 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0085-05

Cloning, Expression Profile and Sequence Analysis of Partial cDNA Coding for Myosin Heavy Chain from the Diamondback Moth *Plutella xylostella*

GONG Liang, ZHONG Guo-hua, REN Zhen-zhen, HU Mei-ying*

(Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Myosin heavy chain plays a central role in a molecular motor in biological motility but little work has been reported on this gene in insects. In this study *Pxyl-MHC*, a partial cDNA (GeneBank accession NO: FJ462712) encoding myosin heavy chain of diamondback moth *Plutella xylostella* was cloned, sequenced and analyzed. The cDNA is 408 bp that encodes 135 putative amino acids. The amino acid sequence exhibited a significant similarity to myosin heavy chain of *Papilio xuthus* (95%), *Bombyx mori* (93%) and *Drosophila melanogaster* (82%). Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that *Pxyl-MHC* has different expression patterns in the examined developmental stages, and the results showed that older larval stages and adults have higher expression levels than early instars and pupal stage. This study will help to understand better the physiological role of myosin heavy chain in *P. xylostella* and related insects.

Key words: *Plutella xylostella*; myosin heavy chain (MHC); cDNA clone; sequence analysis; expression profile

运动是动物赖以生存的必要条件,从简单的类肌细胞运动到高度特化的肌纤维收缩活动,均是肌动蛋白丝(细丝)和肌球蛋白丝(粗丝)间相互作用的结果^[1]。研究表明:肌球蛋白是由 2 条重链和 4 条

收稿日期:2009-10-13 修回日期:2009-11-05

基金项目:国家自然科学基金项目(30671387、30770291)和教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金项目(2004061)

作者简介:龚亮(1982-)男,硕士生,主要从事农药分子毒理学研究, E-mail:lxian82@163.com; * 通讯作者:胡美英, E-mail:humy@scau.edu.cn。

轻链构成的六聚体,其分子质量约 460 ku,长肽链的分子质量约 240 ku,称重链(myosin heavy chain MHC);短肽链称轻链,又分为必需轻链(essential light chain ELC)和调节轻链(regulatory light chain RLC)^[2,3]。相对于高等哺乳动物 MHC 基因的研究,昆虫此类基因的研究极少见于报道。目前已做全基因序列克隆分析的仅有果蝇^[4]和凤蝶^[5],在果蝇中,其肌球蛋白重链由一个单基因产生。该基因通过信使 RNA 的可变剪接,可产生 480 种不同的 MHC,它的第 2 个转录单元,始于第 12 个内含子,编码包括 MHC 杆状区域和 N-端一个独特的由 77 个氨基酸残基组成的区域。

小菜蛾属鳞翅目(Lepidoptera)菜蛾科(Plutella),是一种世界性害虫,寄主多达 40 种以上,主要危害十字花科蔬菜,如:甘蓝、花椰菜、大白菜、萝卜、芥菜、油菜、雪菜、菜心等。据估计,全世界每年用于防治小菜蛾的费用高达 10 亿美元^[6,7]。然而在分子水平上揭示小菜蛾运动及行为特性的研究极少见于报道。

本研究首次克隆了小菜蛾 MHC 基因的部分序列,并且采用半定量 RT-PCR 技术,明确了 MHC 基因在小菜蛾整个发育过程的相对表达量,这将为解析小菜蛾 MHC 基因的生理功能提供基础。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫及试剂

供试小菜蛾(*P. xylostella*)为野生品系,收集于未施农药的甘蓝田,由本实验室长期饲养供试。饲养条件:温度(25±1)℃,相对湿度 70%~85%,光周期 L:D=16:8。幼虫饲养于菜心苗,大肠杆菌感受态细胞(DH_{5α})由本课题组制备和保存。总 RNA 提取试剂盒为 OMEGA 公司产品,货号为:R6827-01。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为 TIANGEN 公司产品。pMD20-T 载体、AMV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

参照 OMEGA 公司总 RNA 提取试剂盒的说明书提取供试昆虫小菜蛾的总 RNA,直接用于 RT-PCR 扩增或-80℃,参照 TaKaRa 的 AMV 反转录酶使用说明书合成 cDNA 第一链,用于 PCR 扩增或-20℃保存。

1.3 引物设计和合成

根据昆虫 MHC 基因的保守区域,设计兼并引物 MHC-F₁和 MHC-R₁。得到小菜蛾 MHC 基因中间序列后,根据此部分序列设计半定量 RT-PCR 引物。所用引物由上海英骏生物技术有限公司合成,PCR 反应引物见表 1。

表 1 用于扩增小菜蛾 MHC 基因的兼并引物和半定量 RT-PCR 引物

Tab.1 The degenerate primers and semi-quantitative RT-PCR for cloning MHC gene of *Plutella xylostella*

引物 Promers	序列 Sequence(5'-3')
兼并引物 Degenerate primers	MHC-F ₁ :5'-CCAGCACGAGWCCACGCTCG CCAAC-3' MHC-R ₁ :5'-CGAGCCTCTTGGTGTCTCAGCTG-3'
半定量 RT-PCR 引物 Semi-quantitative RT-PCR primers	SP-1:5'-CAGCTCGACCAGCTCAACAAGCTCA-3' SP-2:5'-GGACAGCTGAGACACCTGGGGCTCG-3'
内参基因引物 Actin gene primers	18S-F:5'-CCGATTGAATGATTTAGTGAGGCTCTT-3' 18S-R:5'-TCCCCTACGGAAA CCTTGTTACGACTT-3'

1.4 PCR 扩增和测序

以反转录的 cDNA 为模板,通过兼并引物 MHC-F₁和 MHC-R₁组合进行 PCR,以得到小菜蛾 MHC 基因的中间片段。反应程序为:94℃ 预变性 3 min;接着 35 个循环 94℃ 30 s;52℃ 45 s;72℃ 1 min;最后 72℃ 延伸 10 min 4℃ 保存。

上述 PCR 反应结束后,用 12 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 产物经过 TIANGEN 凝胶回收试剂盒纯化回收。参照 PMD20-T 载体说明书连接到此克隆载体,然后转入大肠杆菌(DH_{5α})感受态细胞,挑取白色菌落,培养后参照 Sambrook 等^[8]的方法提取质粒,用 PCR 的方法进行重组质粒的鉴定。选择 3 个经过 PCR 鉴定为阳性的菌液送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

1.5 序列分析

应用 DNASTar 软件推测小菜蛾 *MHC* 基因的氨基酸序列,并通过 NCBI 的 Blastx 程序,对推测的氨基酸序列与 GenBank 公布序列进行比较分析,应用在线软件(<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>)进行多序列比对分析。

1.6 小菜蛾 *MHC* 基因表达的半定量分析

分别提取小菜蛾 1 龄、2 龄、3 龄、4 龄、蛹和雌、雄成虫的总 RNA,反转录后 -20 °C 保存,备用。选择小菜蛾 18 S rRNA 作为半定量分析的内参基因。以各个样品内参基因 PCR 产物表达亮度相同,来确定扩增各虫态目的基因的模板量。

以反转录的 cDNA 为模版,SP-1 和 SP-2 为上下游引物。反应程序如下:94 °C,变性 3 min;接着 27 个循环,循环条件为 94 °C 30 s,58 °C 45 s;72 °C 2 min;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。使用软件 Sinsiansys1.0.3 对琼脂糖凝胶电泳条带进行灰度扫描,以确定相对表达量,每个样品重复 3 次,数据用 SAS 软件进行统计学分析。

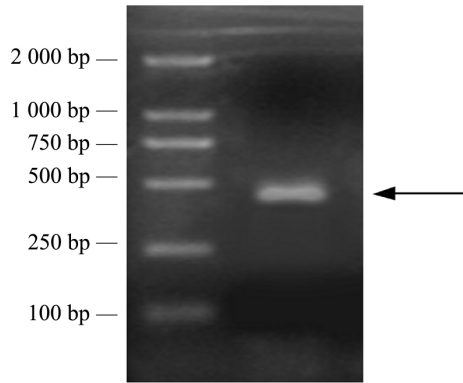


图 1 小菜蛾 *MHC* 基因部分 cDNA 序列的凝胶电泳检测
Fig. 1 Gel electrophoresis was used to test the partial cDNA sequence of *MHC* gene of *Plutella xylostella*

2 结果与分析

2.1 小菜蛾 *MHC* 基因 cDNA 部分序列的克隆及推测的氨基酸序列分析

以小菜蛾蛹的 cDNA 为模版,以 *MHC-F₁* 和 *MHC-R₁* 为上下游引物对小菜蛾 *MHC* 基因进行 PCR 扩增,结果得到 1 条约 450 bp 的片段(图 1)。回收纯化后,与 pMD20-T 载体连接,构建重组质粒,转化大肠杆菌 DH_{5α} 后,挑取白色菌落,进行培养,之后以 *MHC-F1* 和 *MHC-R1* 为引物,送经 PCR 鉴定为阳性的菌株进行测序测定。测序后发现该序列长 408 bp,编码 135 氨基酸。多序列比对分析表明昆虫间 *MHC* 基因非常保守,此克隆的小菜蛾 *MHC* 与凤蝶、家蚕和果蝇的 *MHC* 具有极高的相似性,分别达到 95%、93% 和 82%。在 GenBank 登录后,获得 cDNA 序列号为 FJ462712,氨基酸序列号为 ACK38260。

```

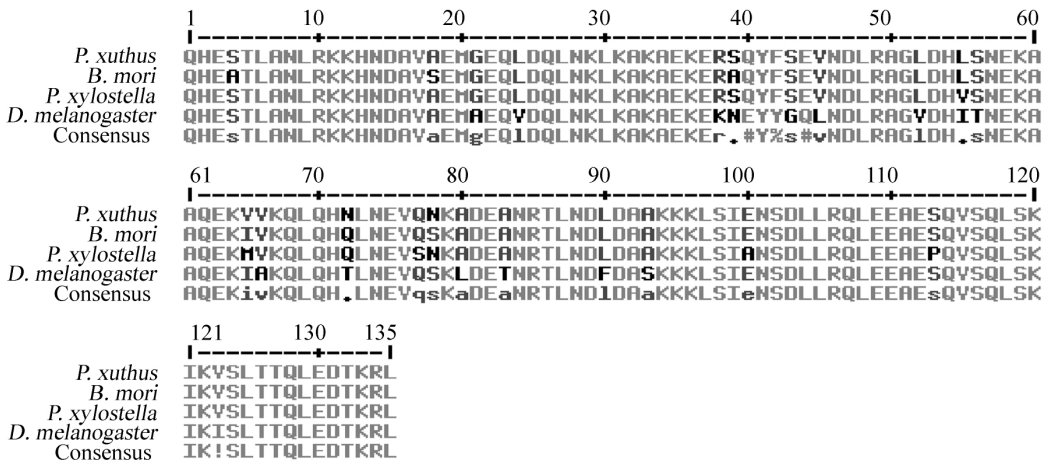
C CAG CAC GAG TCC ACG CTC GCC AAC CTG CGC AAG AAG CAC AAC GAC GCC
  Q   H   E   S   T   L   A   N   L   R   K   K   H   N   D   A
GTC GCC GAG ATG GGC GAG CAG CTC GAC CAG CTC AAC AAG CTC AAG GCT AAG
  V   A   E   M   G   E   Q   L   D   Q   L   N   K   L   K   A   K
GCT GAG AAG GA A CG T TCT CA A TAC TTT AGC GA A GTC AAT GAC CTC CGC GCT
  A   E   K   E   R   S   Q   Y   F   S   E   V   N   D   L   R   A
GGT CTC GAC CAC GTG TCC AAC GAA AAG GCT GCC CAA GAG AAG ATG GTG AAG
  G   L   D   H   V   S   N   E   K   A   A   Q   E   K   M   V   K
CAG CTG CAG CAC CAG CTC AAC GAG GTG TCC AAC AAG GCC GAC GAG GCC AAC
  Q   L   Q   H   Q   L   N   E   V   S   N   K   A   D   E   A   N
CGC ACC CTC AAC GAC CTG GAC GCC GCC AAG AAG AAG CTC TCC ATC GCG AAC
  R   T   L   N   D   L   D   A   A   K   K   K   L   S   I   A   N
TCC GAC CTG CTG CGC CAG CTC GAG GAG GCC GAG CCC CAG GTG TCT CAG CTG
  S   D   L   L   R   Q   L   E   E   A   E   P   Q   V   S   Q   L
TCC AAG ATC AAG GTG TCG CTC ACC ACC CAG CTC GAG GAC ACC AAG AGG CTC G
  S   K   I   K   V   S   L   T   T   Q   L   E   D   T   K   R   L
    
```

兼并引物所在位置由下划线标示。

The locations of the degenerate primers are represented by underline.

图 2 小菜蛾 *MHC* 基因部分 cDNA 和推测的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA and predicted amino acid sequence of *Pxyl-MHC* gene



P. xuthus:凤蝶 (*Papilio xuthus*) (GenBank 登录号: BAG30740); *B. mori*:家蚕 (*Bombyx mori*) (GenBank 登录号: ACH69160); *D. melanogaster*:果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (GenBank 登录号: CAA37309)。

图 3 昆虫 MHC 多序列比对分析

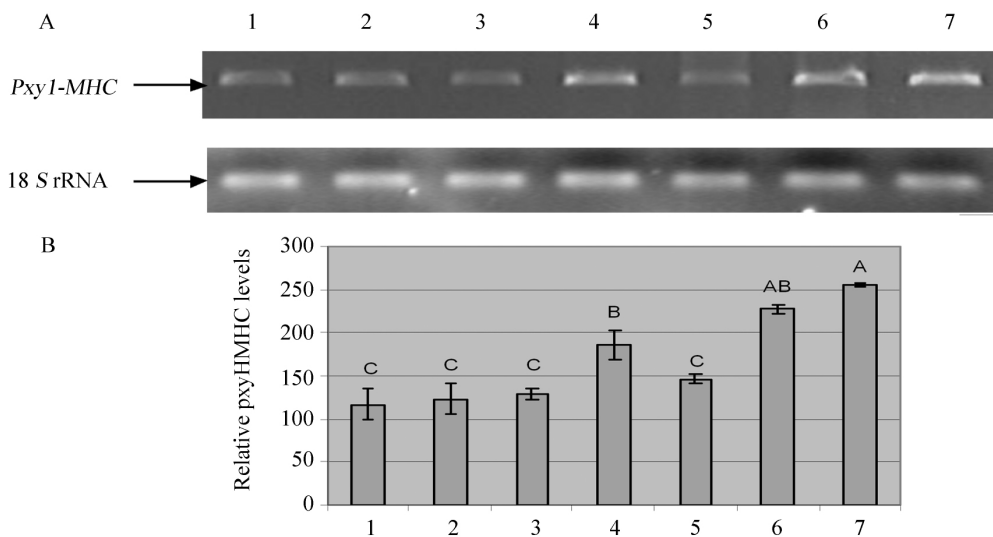
Fig. 3 Multiple alignments of *PxyI* - MHC with other insect MHC

2.2 小菜蛾 MHC 基因表达的半定量分析

用小菜蛾 18 S rRNA 为内参基因 根据内参基因模板量确定小菜蛾各个虫态的模板量 分别对目的基因进行 PCR 特异扩增 27 个循环数 每个 PCR 产物取 6 μL 进行电泳检测 结果如图 3 所示。用 *Sin-siAnsys* 1.0.3 软件进行灰度扫描后 确定了小菜蛾 MHC 基因的相对表达量。结果表明小菜蛾 MHC 基因在所有检测的发育阶段都有表达 但在不同虫态中差异表达明显 在 4 龄幼虫和雌雄成虫中的表达量明显高于低龄幼虫和蛹 ($P < 0.05$)。其中雄性成虫 MHC 基因的灰度值最高 其值达到 255 而 1 龄幼虫的最低 其值为 117。

3 讨 论

昆虫具有非常发达的飞行肌 是无脊椎动物中惟一有翅、能飞行的一类。肌球蛋白重链 (myosin



A:小菜蛾 MHC 基因与内参基因 18 S rRNA 的相对表达量; B:小菜蛾 MHC 基因相对表达量灰度值的统计学分析; 1~7: 1 龄幼虫 2 龄幼虫 3 龄幼虫 4 龄幼虫 5、6 蛹、雌性成虫 7 雄性成虫。

A: The expression of *PxyI* - MHC relative to 18S rRNA ; B: Vertical scales show the relative grey value of *PxyI* - MHC relative to 18S rRNA ; Horizontal data 1 ~ 7 represents the seven development stages of *Plutella xylostella* , first instar , second instar , third instar , fourth instar larvae , pupae , female and male adults , respectively.

图 4 小菜蛾 MHC 基因表达的半定量分析

Fig. 4 Semi - quantitative RT - PCR analysis showed the expression of *PxyI* - MHC

heavy chain, *MHC*) 是昆虫飞行肌肌原纤维粗丝的重要组成部分,是昆虫飞行运动不可缺少的收缩性蛋白^[9]。遗憾的是昆虫此类基因序列极少见于报道,本研究利用同源克隆的方法,首次鉴定了小菜蛾 *MHC* 基因的部分序列,推测的氨基酸序列分析证实了该蛋白在不同昆虫间高度保守,此研究丰富了昆虫 *MHC* 基因的研究内容,为小菜蛾 *MHC* 基因的功能研究提供了序列信息。

肌球蛋白重链分子在系统发生、个体发育过程中有明显变化,在不同的生理或病理条件下也会发生表达的变化。如:在模拟海拔 5 000 m 高原低氧条件下的大鼠心室肌 *MHC_α* 含量下降,而 *MHC_β* 上升,这种变化可能在低氧适应过程中具有一定的功能意义^[10]。另据报道,果蝇 *MHC* 基因的第 2 个转录单元,编码 MRP,其与 *MHC* 在飞行肌中成 3:1 的比率^[11],它们表达量的差异,也许是一种功能适应性的反映。本研究发现小菜蛾 *MHC* 基因在老熟幼虫和成虫中的表达量显著高于低龄幼虫和蛹。据此,我们认为老熟幼虫和成虫之所以具有强的运动或是飞行能力,是因为 *MHC* 在这些发育阶段有大量的表达。然而 *MHC* 基因在小菜蛾运动和行为中的具体功能尚有待深入研究。

参考文献:

- [1] 陈明,李爱媛. 肌肉肌球蛋白、粗肌丝和 Ca^{+} - 调节机制的多样性[J]. 生理科学进展, 1993, 24(1): 6 - 9.
- [2] 杨璞,余海忠,程家安,等. 昆虫飞行肌蛋白质[J]. 昆虫知识, 2005, 42(6): 726 - 731.
- [3] Pette J B, Staron R S. Myosin isoforms, muscle fiber types and transitions[J]. Microsc Res Tech, 2000, 50(27): 500 - 509.
- [4] Polyak E, Standiford D M, Yakopson V, et al. Contribution of myosin rod protein to the structural organization of adult and embryonic muscles in *Drosophila* [J]. J Mol Biol, 2003, 31(5): 1077 - 1091.
- [5] Futahashi R, Fujiwara H. Identification of stage - specific larval camouflage associated genes in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* [J]. Dev Genes Evol, 2008, 218(9): 491 - 504.
- [6] Talekar N S, Shelton A M. Biology, ecology and management of the diamondback moth [J]. Ann Rev Entomol, 1993, 48(12): 275 - 301.
- [7] 何玉仙,杨秀娟,翁启勇. 小菜蛾抗药性研究及其治理[J]. 江西农业大学学报, 2001, 23(3): 321 - 324.
- [8] Sambrook J, Ritsch E F, Aniat T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 许宝红,葛熹凯,肖调义,等. 鱼类肌球蛋白重链基因的研究进展[J]. 内陆水产, 2008(4): 27 - 28.
- [10] Standiford D M, Davis M B, Miedema K, et al. Myosin rod protein: A novel thick filament component of *Drosophila muscle* [J]. J Mol Biol, 1997(1): 40 - 55.
- [11] Chen M, Li A Y, Zhou N H, et al. The effects of hypoxia simulated altitude of 5 000 m on the isomyosin pattern, lactate dehydrogenase activity and ultrastructure in rat ventricles [C] // Bureau of Bio - sciences & Biotechnology. Annual reports of bio - science laboratories *Academia sinica*. Beijing: Science Press, 1990: 173 - 177.