

# 利用抑制差减杂交技术分离受水稻 抗性调控的褐飞虱基因

杨之帆\*, 陈永勤, 李春华, 蒋思婧

(湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

**摘要:**为分离受水稻抗性调控的褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 基因, 以取食感虫水稻台中 1 号和高抗水稻 B5 的 2 叶 1 芯秧苗 24 h 的褐飞虱 4 龄若虫为起始材料, 采用抑制差减杂交技术构建了两个群体间的正反向差减 cDNA 文库。通过斑点杂交从差减文库中筛选代表受水稻抗性调控的基因的 cDNA 克隆, 进行测序和功能分析, 挑选具功能的基因进行 Northern 杂交验证。结果表明, 通过斑点杂交筛选到的 98 个阳性克隆代表 92 个互不重复的单基因, 其中 25 个与动物的已知蛋白基因存在较高的同源性。Northern 杂交表明, 这 25 个基因有 11 个表达上调, 8 个表达下调, 提示它们可能在褐飞虱适应抗性水稻过程中发挥了重要作用。本研究结果为克隆上述新基因的全长 cDNA 序列及进一步研究其在褐飞虱与水稻互作中的功能奠定了基础。

**关键词:**褐飞虱; 水稻品种抗性; 抑制差减杂交 (SSH); 斑点杂交; 差异表达基因

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2009)10-1059-09

## Application of suppression subtractive hybridization (SSH) to clone differentially expressed genes in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) responding to rice resistance

YANG Zhi-Fan\*, CHEN Yong-Qin, LI Chun-Hua, JIANG Si-Jing (School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** To isolate the differentially expressed genes in brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) responding to host rice resistance, suppression subtractive hybridization (SSH) was carried out using the 4th instar larvae of brown planthopper feeding on the susceptible rice Taichung Native 1 (TN1) and the highly resistant rice B5 seedlings at the 3rd leaf stage for 24 h. A forward and a reverse subtracted cDNA libraries specific to host rice resistance were constructed, followed by differential screening by dot blot hybridization. The clones representing the regulated genes were sequenced and evaluated by nucleotide blast analysis in the GenBank. Expression of the clones highly homologous to the known genes in the database was further verified by Northern blot hybridization. The results showed that 92 out of 98 clones were identified as non-redundant expressed sequence tags (ESTs) by dot blot analysis, among which 25 ESTs had high homology (E value < 0.01) to known genes in the GenBank. Northern blot hybridization analysis demonstrated that 11 of the 25 genes were induced and 8 were repressed by rice resistance, suggesting that these genes may play an important role in response of brown planthopper to resistant rice. The data obtained in this work will help to clone the full-length cDNA sequences of the novel genes and reveal their functions involved in rice resistance.

**Key words:** Brown planthopper (*Nilaparvata lugens*); host rice resistance; suppression subtractive hybridization (SSH); dot blot hybridization; differentially expressed gene

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) 是亚洲稻区的重要害虫之一。它通过吸食水稻韧皮部汁液及传播病毒病而危害水稻

(Rubia-Sanchez *et al.*, 1999)。传统的防治方法是向田间喷施杀虫剂, 由此带来的负面影响是环境污染及褐飞虱产生抗药性。近年来种植抗性水稻品种

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500328)

作者简介: 杨之帆, 男, 1971 年生, 博士, 副教授, 主要从事昆虫分子生物学、植物分子生物学研究, E-mail: sailyangzhf@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: sailyangzhf@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2009-04-21; 接受日期 Accepted: 2009-08-11

已成为控制褐飞虱为害的重要措施之一,但由于品种抗性的选择压力导致褐飞虱的致害性发生变化,加上目前所种植的水稻品种所带的抗性位点往往较少或较弱,使得褐飞虱在 2~3 年时间内就能适应这类水稻品种 (Watanabe and Kitagawa, 2000; Matteson, 2000)。因此,一方面需要培育具有高抗水平的水稻新品种,另一方面还要研究褐飞虱对水稻品种抗性的反应机理,并揭示褐飞虱与水稻的互作机理,这将为我们制定科学有效的防治措施提供新的线索。

抑制差减杂交 (SSH) 技术被广泛用于分离差异表达的基因,该技术因结合了不同基因转录本均一化及差减的特点,因而能非常有效地分离各种差异表达的包括低水平转录的基因 (Diatchenko *et al.*, 1996)。本研究利用 SSH 技术从取食不同抗性水稻的褐飞虱中分离差异表达的基因,这些基因受水稻抗性诱导或抑制,在褐飞虱适应抗性水稻过程中可能发挥了重要作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 水稻品种与褐飞虱

褐飞虱(生物型 II)饲养于感虫水稻品种台中 1 号(TN1)上,条件是 25℃ 恒温、光周期 16L: 8D、相对湿度 80%。TN1 和高抗性的水稻品种 B5 (杨长举等, 1999)播种于塑料杯中,每杯 10 粒,待秧苗长至 2 叶 1 芯时,将褐飞虱 4 龄若虫分别投放于两种秧苗上,密度为每株秧苗 10 头虫。为防止褐飞虱逃逸,罩以纱网,24 h 后分别回收活体若虫。

### 1.2 褐飞虱总 RNA 的提取

使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, USA) 提取总 RNA。利用紫外分光光度计 (UV2501, 岛津, 日本) 测定总 RNA 样品在 260 和 280 nm 处的吸光值,以评价总 RNA 的纯度并计算其浓度。进一步在甲醛变性琼脂糖凝胶和 MOPS 缓冲液中电泳检测,以确定总 RNA 的质量。

### 1.3 抑制差减杂交 (SSH) 构建差减文库

两种处理各取 2 μg 的总 RNA 作为起始材料。首先使用 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, USA) 进行全长 cDNA 合成及扩增。合成 cDNA 的第一、二链的引物分别为 3' BD SMART CDS Primer II A (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGACT(30)VN-3') (N = A, C, G, T; V = A, G, C) 和 BD SMART™ II A Oligonucleotide (5'-AAGCA

GTGGTATCAACGCAGACTACGCGGG-3')。因合成的 cDNA 的两端带有一段相同的序列,所以扩增 cDNA 时使用一条引物即可,即 5' PCR Primer II A (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGACT-3')。通过预实验并参考说明书要求,确定能扩增出足够的 cDNA 的最少的循环次数。经离子交换层析去掉 cDNA 样品中的短片段及杂质,用 *Rsa* I 酶切获得片段化 cDNA。

用 Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, USA) 进行正反向抑制差减杂交操作。正向抑制差减杂交是以取食 B5 的褐飞虱若虫提取的总 RNA 作为 Tester,以取食 TN1 的若虫总 RNA 作为 Driver,主要目的是富集受宿主抗性诱导表达的褐飞虱相关基因。反向抑制差减杂交以正向的 Driver 作为 Tester,正向的 Tester 作为 Driver,以富集受宿主抗性抑制的基因。实验步骤主要有:在片段化的 cDNA 两端连接接头 Adaptor 1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCA GGT-3') 和 Adaptor 2R (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCCTGCTCGCGGCCGAGGT-3')、第 1 轮差减杂交、第 2 轮差减杂交。杂交后将 cDNA 两端补平。首先使用外侧引物 PCR Primer 1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3') 对差减杂交产物进行第 1 轮扩增。将 PCR 产物稀释 10 倍,使用巢式引物 Nested PCR Primer 1 (5'-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3') 和 Nested PCR primer 2R (5'-AGCGTGCTCGCGGCCGAGGT-3') 进行第 2 轮选择性扩增。最后得到正向的抑制差减池 (T1) 和反向的抑制差减池 (T2)。

通过 PCR 扩增差减前及差减后的总 cDNA 中的管家基因 *actin* (AM931964) 来评价差减效率,使用 Advantage2 PCR Kit (Clontech, USA) 进行 PCR 扩增,循环次数分别为 15, 20, 25 和 30 轮,反应条件为: 94℃ 30 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min。如果差减效率达到要求,进行下面的实验。

取 50 ng 抑制差减杂交后的 PCR 选择性扩增产物,克隆到 T/A 载体 (pMD18-T Cloning Kit; TaKaRa, USA)。转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。用涂有 IPTG 和 X-gal 的平板对重组克隆进行蓝白斑筛选。如果阳性率达到 80% 以上,将剩余的连接产物转化,将白色菌落挑到含液体培养基的 384 孔板内,置于 37℃ 培养过夜,每孔加灭菌甘油至终浓度 20%,混匀后保存于 -80℃。其中正向文库含 2 500 个克隆,反向文库含 1 200 个克隆。

#### 1.4 SSH 文库中克隆的 PCR 扩增及点膜

从文库中随机挑选 26 个克隆, 使用通用引物 M13(+) 和 M13(-) 进行菌液 PCR 检测。如果指标达到 SSH 文库的要求, 则对正反向文库中的克隆进行 PCR 扩增, 剔除少数假阳性及大小相同的克隆。确定 2 000 个正向克隆和 1 000 个反向克隆。用 96 孔深孔板纯化 PCR 产物, 溶于 10  $\mu$ L TE (100 ng/ $\mu$ L) 中, 与中间对照 *actin* (AM931964), 及阴性对照 *CHS* (AB058397) 一起, 按次序用灭菌 tip 以高密度 1  $\times$  1 的形式点两套相同的硝酸纤维素膜 (NC 膜)。点样量为 2  $\mu$ L (200 ng DNA)。将膜置于变性液 (0.5 mol/L NaOH, 1.5 mol/L NaCl) 中变性 5 min, 中和液 (1 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Tris-Cl, pH 7.0) 中和 5 min, 再在 6  $\times$  SSC 溶液中平衡 10 min, 最后于 80 $^{\circ}$ C 烤膜 2 h。

#### 1.5 斑点杂交

将膜装入杂交袋, 加入适量杂交缓冲液, 65 $^{\circ}$ C 预杂交约 10 h。在将 Tester 和 Diver 总 RNA 反转录成 cDNA 的过程中进行放射性探针标记, 将探针分别与两套相同的 NC 膜杂交, 杂交条件为 65 $^{\circ}$ C 12 h。取出膜, 用冷的 1  $\times$  SSC、0.1% SDS 洗膜液漂洗一遍, 再用 1  $\times$  SSC、0.1% SDS 洗膜液于 65 $^{\circ}$ C 保温摇床上洗脱未杂交于膜上的探针约 15 min。洗脱好的膜晾至半干, 夹于 X 光片 (FUJI Film, Japan) 和增感屏之间, 置于 -20 $^{\circ}$ C 7 d 后进行放射自显影。实验重复 3 次。

#### 1.6 差异表达基因的挑选和测序

扫描 X 光片后, 挑取面积密度总和之比在 2 倍以上的克隆 (代表差异表达的基因) 送北京华大公司测序。测序结果在 GenBank 中进行同源性查找, 将与动物的已知基因同源的差异表达的基因 (ESTs) 登录到 EMBL 数据库, 并获取相应的序列号 (accession number)。

#### 1.7 Northern 印迹杂交鉴定

为进一步确证初步筛选的受调控基因的表达模式, 以各 EST 为探针进行 Northern 印迹杂交分析。将取食 B5 和 TN1 的褐飞虱的总 RNA (20  $\mu$ g) 在 1.5% (w/v) 的变性琼脂糖胶上电泳分开, 转到硝酸纤维素膜上, 以  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]dCTP 标记的各 DNA 片段为探针, 进行分子杂交。杂交条件为 65 $^{\circ}$ C 16 h; 洗膜条件: 用 1  $\times$  SSC, 0.2% (w/v) SDS 于 65 $^{\circ}$ C 洗 15 min, 再用 0.5  $\times$  SSC, 0.1% (w/v) SDS 于 65 $^{\circ}$ C 洗 15 min; 将洗好的膜与 X 光片夹于增感屏中, 置于 -20 $^{\circ}$ C 曝光 7 d。

## 2 结果

### 2.1 RNA 的提取及电泳分析

用紫外分光光度计分别测定褐飞虱总 RNA 样品的 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 的值, 经计算可知 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值为 1.87, 表明总 RNA 的纯度较高; 总 RNA 的浓度为 0.97  $\mu$ g/ $\mu$ L。电泳后在紫外灯下观察结果并照相。结果显示, 18S、28S rRNA 带型完整, 边沿清晰锐利, 表明提取的总 RNA 没有发生降解 (图 1)。

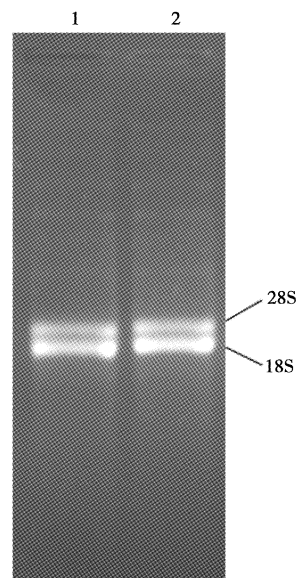


图 1 褐飞虱总 RNA 的提取和电泳

Fig. 1 Isolation and electrophoresis of total RNA from *Nilaparvata lugens*

1: 取食 TN1 水稻的褐飞虱若虫的总 RNA (Total RNA extracted from larvae fed with TN1 rice); 2: 取食 B5 水稻的褐飞虱若虫的总 RNA (Total RNA extracted from larvae fed with B5 rice).

### 2.2 抑制差减杂交文库构建及检测

使用 SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit 可以将少至 50 ng 的总 RNA 反转录成全 cDNA, 经 PCR 扩增的产物足够用于构建全长 cDNA 文库或构建抑制差减杂交 cDNA 文库。本研究中使用 2  $\mu$ g 总 RNA 作为起始材料, 经反转录获得总 cDNA, 进一步进行 PCR 扩增。根据预实验的结果确定 PCR 最佳循环次数为 19 轮, 过多的循环次数将导致产生非特异性的 PCR 产物。PCR 产物电泳检测结果见图 2。从图 2 可以看出, 两种处理样品的 PCR 产物的大小覆盖了 0.2 ~ 5.0 kb 的范围, 其间有 5 条明显的 DNA 亮带, 对应的是几个高丰度的转录本。该结果与说明书提供的参考样图一致, 表明扩增产物符合进一步进行酶切及连接接头的要求。

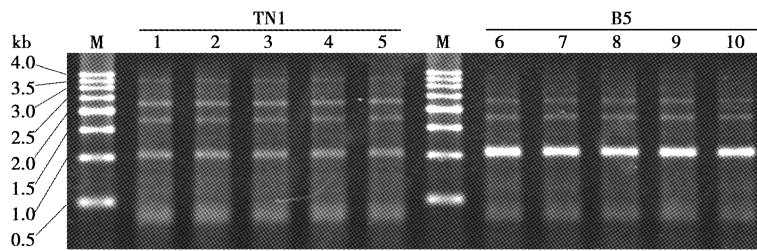


图2 cDNA 扩增结果

Fig. 2 Amplification of cDNA

TN1: 取食 TN1 水稻的褐飞虱若虫 Larvae fed with TN1 rice; B5: 取食 B5 水稻的褐飞虱若虫 Larvae fed with B5 rice. 1-5, 6-10: 分别为两种处理样品 5 个 PCR 反应管中的产物 The amplification products from the two sets of five PCR tubes of the two sample cDNAs; M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight standards.

cDNA 经 *Rsa* I 酶切后才能有效地连接接头。图 3 显示, 酶切之前 cDNA 的大小分布为 0.2 ~ 5.0 kb; 酶切后的 cDNA 的大小为 0.1 ~ 2.0 kb。表明 cDNA 经 *Rsa* I 酶切后已被完全片段化, 可以进行接头连接。

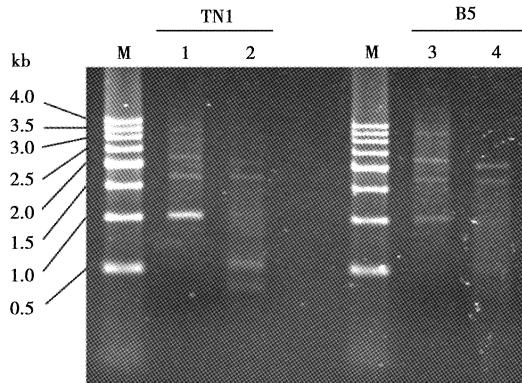


图3 经 *Rsa* I 酶切后的 cDNA 电泳检测结果

Fig. 3 Electrophoresis analysis of the cDNA digested with *Rsa* I 1, 2: 酶切前后的取食 TN1 的褐飞虱若虫的 cDNA Undigested and digested cDNA prepared from larvae fed with TN1 rice; 3, 4: 酶切前后的取食 B5 的褐飞虱若虫的 cDNA Undigested and digested cDNA prepared from larvae fed with B5 rice; M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight standards.

用 Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 进行抑制差减杂交操作。首先在片段化的 cDNA 两端加接头。随后进行两轮差减杂交, 再依次进行第一、第二轮 PCR 扩增。在第一轮扩增中, 只有两端连接上了不同接头的 cDNA 片段才能以指数级获得扩增; 在第二轮扩增中, 使用巢式引物对第一轮 PCR 的产物进行扩增, 以降低非特异性产物造成的背景, 并进一步富集代表差异表达基因的 cDNA。第一、第二轮 PCR 结果见图 4。图中第二轮的 PCR 产物(2,4 泳道)的分布范围为 0.2 ~ 2.0 kb, 且其迁移速度稍快于第一轮 PCR 产物, 这是因为巢式 PCR 的产物比作为模板的第一轮 PCR 产物的长度稍短的缘故(相差 44 bp)。电泳结果表明扩增产

物符合下一步建库的要求。

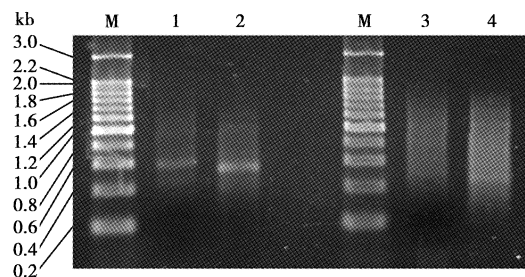


图4 正向及反向差减池的第一轮、第二轮 PCR 扩增结果

Fig. 4 Electrophoresis analysis of the first and second round PCR products of the forward and reverse SSH pools

1, 2: 以正向杂交池为模板进行第 1 轮 PCR (27 轮循环) 和第 2 轮 PCR (12 轮循环) 扩增产物 The first round PCR (27 cycles) and the second round PCR (12 cycles) products of the forward SSH pool, respectively; 3, 4: 以反向杂交池为模板进行第 1 轮 PCR (27 轮循环) 和第 2 轮 PCR (12 轮循环) 扩增产物 The first round PCR (27 cycles) and the second round PCR (12 cycles) products of the reverse SSH pool, respectively; M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight standards.

为进一步检测差减的效率, 分别以差减及未差减 PCR 产物为模板, 用褐飞虱的看家基因 *actin* 引物进行 PCR 扩增, 分别在 15, 20, 25 和 30 次循环结束时从反应体系中吸取 5 μL 电泳检测。电泳结果显示: 与未差减组 PCR 产物相比, 差减 cDNA 的第 2 轮 PCR 产物在扩增 30 个循环后才可见较弱的条带, 表明差减产物中组成型表达基因的丰度已大大下降, 说明具有很高的差减效率(图 5), 达到建库的要求。

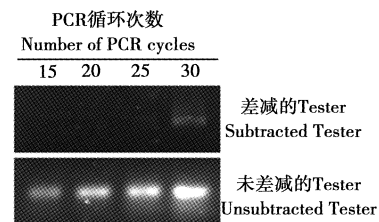


图5 RT-PCR 扩增 *actin* 基因以评估差减效率

Fig. 5 Estimation of subtraction efficiency by amplification of *actin* gene using RT-PCR method

构建好差减杂交文库后, 从正反向文库中随机挑选 26 个克隆进行 PCR 检测。结果表明, 差减文库中克隆的插入片段长度分布范围在 200 ~ 1 000 bp (图 6)。这说明, cDNA 片断与载体的连接效率高, 文库中阳性克隆所占比例较高。

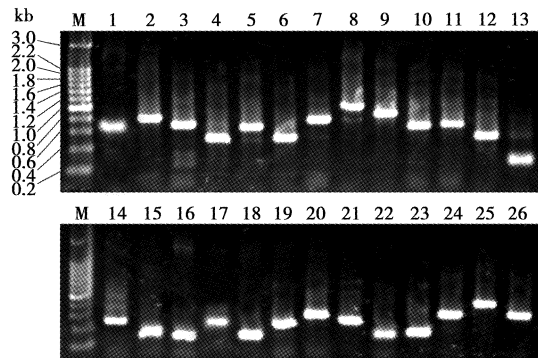


图 6 抑制差减杂交文库随机克隆的插入片段长度分析

Fig. 6 Insert length analysis of clones selected randomly from suppression subtractive libraries

图中数字代表随机挑选的克隆号 Numbers in the figure represent clone number selected randomly from the two libraries; M: 分子量标准 DNA molecular weight standards.

### 2.3 斑点杂交法初步筛选差异表达的基因

以标记的 Tester 和 Driver 总 cDNA 作探针, 对两套完全相同的膜进行杂交。使用中间对照 *actin* 基因的目的在于消除两次杂交探针的强弱差异; *CHS* 基因用作负对照, 主要为了平衡由于洗膜带来的膜与膜之间背景差异。杂交的两个代表性结果见图 7。根据 Schenk 等(2000)的经验, 用 Tester RNA 作探针检测出的信号高于用 Driver RNA 检测出信号的两倍甚至以上的, 被认为是表达上调的基因; 反之, 被认为是表达下调的基因。结果共有 54 个克隆表现为上调, 44 个下调。

### 2.4 宿主抗性相关基因的分类及功能分析

所测序列在 GenBank 数据库中进行同源性查找。结果表明, 98 个阳性克隆代表 92 个互不重复的单基因。在这 92 个单基因中, 25 个与昆虫或动物的已知蛋白基因存在一定的同源性; 14 个与昆虫或动物的基因组 DNA 序列存在同源性; 另外有 53 个与已知基因、EST 或基因组序列没有明显同源性, 认为是新基因。

25 个已知功能的基因可分为 8 类: 第 1 类为 3 个基因表达调控相关基因, 主要是参与基因表达过程的相关蛋白因子基因; 第 2 类基因为 1 个电子

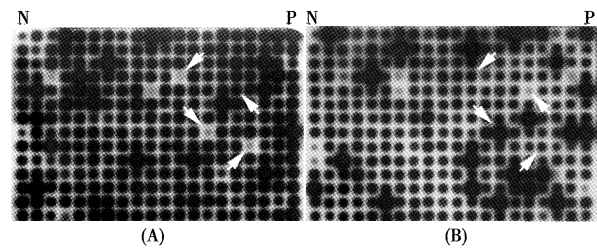


图 7 用 Tester 和 Driver cDNA 对差减杂交文库进行斑点杂交筛选的结果

Fig. 7 Differential screening of suppression subtractive hybridization

library with Tester and Driver cDNA by dot blot hybridization

A: 用正向 Driver 探针与正向文库杂交结果 Screening of positive library with positive Driver probes; B: 用正向 Tester 探针与正向文库杂交结果 Screening of positive library with positive tester probes; N: 负对照 Negative control; P: 正对照 Positive control. 左下指向的箭头标识克隆 HRi090 (CYP6AX1); 左上指向的箭头标识克隆 HRr186 (多聚核苷酸酶 3'-磷酸酶); 右下指向的箭头标识克隆 HRi112 (羧酸酯酶); 右上指向的箭头标识克隆 HRi107 (磷酸载体蛋白)。The arrow pointing to bottom-left indicates clone HRi090 (CYP6AX1); the arrow pointing to top-left indicates clone HRr186 (polynucleotide kinase 3'-phosphatase); the arrow pointing to bottom-right indicates clone HRi112 (carboxylesterase); the arrow pointing to top-right indicates clone HRi107 (phosphate carrier protein).

传递相关基因; 第 3 类为信号传导相关基因, 均编码蛋白激酶或磷酸化酶; 第 4 类是与生物和非生物胁迫相关基因, 包含解毒基因如 P450 基因、羧酸酯酶基因, 和热休克蛋白基因在内; 第 5 类是蛋白质合成相关基因, 包括核糖体蛋白基因和 rRNA 基因; 第 6 类是参与大分子转运、大分子代谢的相关基因; 第 7 类是细胞分化相关基因。此外还有两个功能未知的蛋白基因。这些 EST 的克隆编号、长度、登录号、E 值、与之同源的基因所编码的蛋白质及 Northern 印迹杂交中的表达模式见表 1。

### 2.5 Northern 印迹杂交鉴定差异表达的基因

分别以 25 个功能基因的 EST 为探针进行 Northern 印迹杂交检测。总共进行 3 次重复实验。代表性结果见图 8。结果表明共有 11 个上调的基因, 编号分别是: HRi008, HRi020, HRi026, HRi033, HRi053, HRi087, HRi090, HRi103, HRi107, HRi110, HRi112; 8 个下调的基因, 分别是: HRr155, HRr165, HRr170, HRr182, HRr183, HRr186, HRr188, HRr195。这些基因的表达模式在 Northern 印迹杂交及斑点印迹杂交中表现完全一致, 说明两种杂交结果可以互相验证。

表 1 25 个宿主抗性相关基因的特性  
 Table 1 Characters of the twenty-five host-resistance regulated ESTs

基因编号 Clone	长度 (bp) Length	GenBank 登录号 GenBank accession no.	E 值 E value	同源蛋白质或 RNA Homologous protein or RNA	表达模式 Expression pattern
基因表达调控 Gene expression regulation					
HRi008	420	AM418883	1e-13	锌指蛋白 Zinc finger protein	上调 Up-regulated
HRi026	729	AM418892	2e-12	增强子结合因子 1 Adult enhancer factor 1	上调 Up-regulated
HRr183	359	AM418868	5e-08	整合酶 Integrase	下调 Down-regulated
电子传递 Electron transport					
HRi053	456	AM418902	0.006	线粒体蛋白 Mitochondrion	上调 Up-regulated
信号转导 Signal transduction					
HRr156	391	AM418844	3e-07	丝氨酸/苏氨酸激酶 Protein serine/threonine kinase	-
HRr186	644	AM418871	7e-59	多聚核苷酸激酶 3'-磷酸酶 Polynucleotide kinase 3'-phosphatase	下调 Down-regulated
抗逆及解毒 Stress resistance and detoxification					
HRi090	276	AM418917	0	CYP6AX1 蛋白 CYP6AX1 protein	上调 Up-regulated
HRi112	363	AM418929	3e-63	羧酸酯酶 Carboxylesterase	上调 Up-regulated
HRr155	532	AM418843	0.007	DNA 甲基化酶 Mod Mod protein	下调 Down-regulated
HRr182	487	AM418867	6e-28	70 kDa 的热休克蛋白 Heat shock protein 70 kDa	下调 Down-regulated
蛋白质合成 Protein synthesis					
HRi020	500	AM418888	4e-94	16S 核糖体 RNA 16S ribosomal RNA	上调 Up-regulated
HRi087	508	AM418914	9e-30	核糖体蛋白 S25 Ribosomal protein S25	上调 Up-regulated
代谢 Metabolism					
HRi033	532	AM418895	1e-52	腺苷酸琥珀酸裂解酶 Adenylosuccinate lyase	上调 Up-regulated
HRi103	259	AM418923	8e-34	伴侣蛋白复合体 Chaperonin	上调 Up-regulated
HRi107	406	AM418925	7e-06	磷酸载体蛋白 Phosphate carrier protein	上调 Up-regulated
HRi110	771	AM418928	0.002	异构体 B 蛋白 Isoform B protein	上调 Up-regulated
HRr190	958	AM418875	2e-107	CG9088-PA 异构体 A CG9088-PA isoform A	-
HRr195	349	AM418880	1e-24	肌钙蛋白 T Troponin T-3	下调 Down-regulated
细胞分化 Cell differentiation					
HRi057	549	AM418904	2e-21	反转录酶 Reverse transcriptase	-
HRi089	591	AM418916	2e-05	反转录酶 Putative reverse transcriptase	-
HRr165	226	AM418852	9e-08	网格蛋白轻链 Clathrin light chain	下调 Down-regulated
HRr170	653	AM418857	5e-97	回力球蛋白 Pelota	下调 Down-regulated
HRr178	728	AM418864	2e-11	反转录酶 Reverse transcriptase	-
功能未知 Unknown function					
HRi092	736	AM418918	2e-07	假定的蛋白 Hypothetical protein	-
HRr188	244	AM418873	2e-05	未命名蛋白 Unnamed protein	下调 Down-regulated

- : 未检测到 Not detectable.

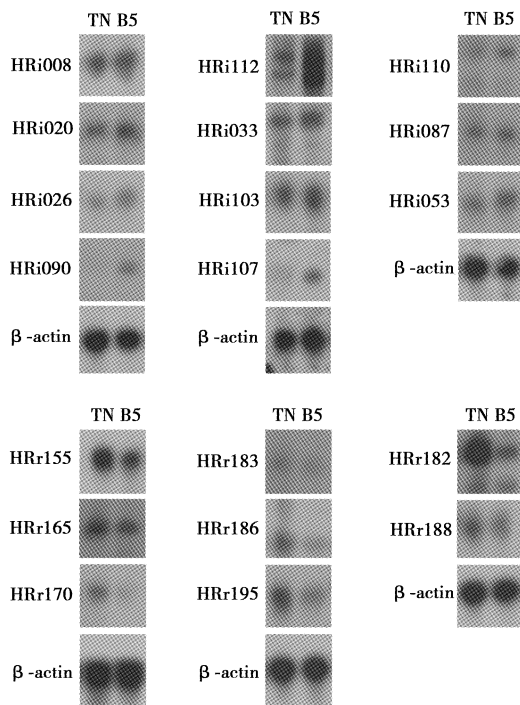


图 8 Northern 印迹杂交结果

Fig. 8 Northern blot hybridization of ESTs

TN: 取食 TN1 水稻的褐飞虱若虫 Larvae fed with TN1 rice; B5: 取食 B5 水稻的褐飞虱若虫 Larvae fed with B5 rice. 所用探针的名称分别标于各图左侧 The probe names are labeled on the left.

### 3 讨论

抑制性差减杂交最显著的优点在于消除了 cDNA 群体内部各分子间丰度的差异, 这种均衡化作用使得分离与低丰度 mRNA 对应的 cDNA 克隆成为可能。经过 SSH, 稀有丰度 cDNA 能富集 1 000 ~ 5 000 倍, 这使得低至每细胞一个拷贝的分子也有可能被检出, 从而使分离低丰度 mRNA 的可能性大大提高 (Diatchenko *et al.*, 1996)。Diatchenko 等 (1996) 首先发展了抑制差减杂交技术, 他们使用该技术构建了一个人睾丸特异性 cDNA 差减文库, 并以差减的 cDNA 混合物为探针从人 Y 染色体黏粒文库中分离特异性克隆, 该克隆中所含基因被进一步证实是睾丸特异表达的基因。此后该技术被广泛用于构建各种生物的 cDNA 差减文库, 使得人们能非常有效地分离差异表达的基因。如 Yuan 等 (2005) 利用该技术构建了褐飞虱取食后的水稻的 cDNA 差减文库, 通过斑点杂交以及 Northern 印迹杂交获得了 27 个对褐飞虱取食起响应的水稻基因。本结果也证实了差减杂交的方法分离差异表达基因是非常有效的。

本研究所克隆的 8 类受抗性调控的基因中, 与

信号传导相关的基因包括丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶和激酶基因 (表 1), 前者主要负责使活化状态的蛋白激酶活性下调, 因而在细胞中参与多种调控过程 (Zolnierowicz, 2000)。而丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶则是细胞信号传导途径中的重要成员, 它们能够从上游接受信号, 通过将下游成员磷酸化将信号传至下游成员, 最终将影响细胞的生理状态, 或将信号向细胞核转移并激活一系列基因的表达, 引起细胞的生理反应 (Silverman and Maniatis, 2001)。因此丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶和激酶的数量及活性变化是多细胞生物感受并传递外界信号的重要分子, 是生物适应环境的重要手段之一。本文使用的两种水稻对褐飞虱的抗性不同, 其中 B5 具有高抗性, 而 TN1 是典型的感虫品种。推测取食 B5 后, 来源于 B5 的有毒次生物质引起褐飞虱体内基因表达的变化及细胞生理状态的改变均是通过磷酸酶和激酶的信号通路完成的, 这种改变有助于褐飞虱在短期内调整生理状态以适应抗性水稻品种。

在分离到的受抗性诱导的基因中, 有一类与生物和非生物胁迫相关。如克隆到的一个细胞色素 P450 单加氧酶基因, 属于 CYP6 家族, 该家族的成员在昆虫体内起解毒作用。在我们此前的工作中也曾克隆到该家族的其他成员, 并证明了它们受宿主抗性诱导 (Yang *et al.*, 2007)。在昆虫中, P450s 能代谢生长激素和信息素, 但更重要的是解除环境的杀虫剂或食物中的有毒物质的毒性, 如氨基甲酸酯类、有机磷类农药和来自植物的次生物质如呋喃香豆素、东莨菪苷原、泽兰内酯、银松素和赤松素等 (Feyereisen, 1999; Li *et al.*, 2007)。大部分植食性昆虫往往只以有限的几个科的植物为食 (Bernays and Graham, 1988), 这些植物中存在大量的但可预知的化合物, 昆虫体内则有起解毒作用的 P450 等代谢系统 (Berenbaum, 1999)。比如虎凤蝶的 P450 基因之一 *CYP6B1*, 能被植物中的呋喃香豆素诱导并参与降解这种化合物 (Prapaipong *et al.*, 1994)。此外, 烟草天蛾 *Manduca sexta* 中的 CYP4 家族成员 (Snyder *et al.*, 1995)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和玉米螟的 CYP6 家族成员 (Li *et al.*, 2000)、果蝇中的 CYP28 家族成员 (Danielson *et al.*, 1997) 都受植物化合物的诱导。本研究中分离到的 *CYP6AX1*, 此前我们已克隆到该基因的全长序列, 并经 Northern 印迹杂交证实该基因受宿主抗性诱导 (Yang *et al.*, 2007), 证实了该基因可能直接参与解除来自抗性水稻 B5 植株中化合物的毒性 (图 8)。

另一类受诱导的解毒基因是羧酸酯酶基因, 羧酸酯酶的底物非常广泛, 研究表明昆虫中的羧酸酯酶活性在取食宿主植物后往往会升高。如 Mullin 等(1986)报道, 蚜虫中的羧酸酯酶的活性受取食宿主植物的诱导; Hemming 和 Lindroth(2000) 研究后发现, 吉普赛蛾在取食含酚糖基化合物的白杨叶子后, 其体内的羧酸酯酶的活性会明显上升。经 Northern 印迹杂交证实褐飞虱的羧酸酯酶基因的表达水平在取食 B5 后明显上升, 这表明褐飞虱体内的羧酸酯酶的分子数可能会大幅度增加, 有助于褐飞虱解除来自抗性水稻 B5 的次生化合物的毒性(图 8)。这一结果也表明羧酸酯酶是褐飞虱体内最早对宿主抗性起反应的酶系统之一。

另外 5 类受水稻抗性调控的褐飞虱基因包括参与基因表达调控、电子传递、蛋白质合成、大分子转运及代谢、细胞分化等的基因。还有一类功能未知的基因也受抗性调控。这表明在水稻抗性胁迫下褐飞虱体内转录组水平发生了深刻变化, 增强了褐飞虱适应抗性水稻的能力。如果长期取食抗性水稻, 褐飞虱的致害性会逐渐发生改变, 最终产生适应该水稻品种的新生物型(王桂荣等, 1999; 乌慧玲和许晓风, 2004)。推测抗性胁迫是导致褐飞虱致害性改变的重要外因, 而褐飞虱体内基因表达水平的广泛变化可能是导致致害性改变的重要内因之一。

本研究利用 SSH 技术克隆到与宿主抗性相关的基因, 经斑点杂交和 Northern 印迹杂交证实了其表达水平的变化, 表明这些基因在褐飞虱适应抗性水稻过程中可能发挥了重要作用。本研究结果为全面揭示褐飞虱与水稻互作的分子机理提供了重要参考数据。我们将在后续工作中克隆这些基因的全长序列, 并研究其功能; 此外针对功能未知但受水稻抗性调控的基因也将做进一步的研究。

### 参 考 文 献 (References)

- Berenbaum MR, 1999. Animal-plant warfare: Molecular basis for cytochrome P450-mediated natural adaptation. In: Puga A, Wallace KB eds. *Molecular Biology of the Toxic Response*. Taylor & Francis Press, Philadelphia. 553–571.
- Bernays E, Graham M, 1998. On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. *Ecology*, 69: 886–892.
- Danielson PB, Macintyre RJ, Fogleman JC, 1997. Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome P450s: Evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10 797–10 802.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD, 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6 025–6 030.
- Feyereisen R, 1999. Insect P450 enzymes. *Ann. Rev. Entomol.*, 44: 507–533.
- Hemming JDC, Lindroth RL, 2000. Effects of phenolic glycosides and protein on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) performance and detoxication activities. *Environ. Entomol.*, 29(6): 1 108–1 115.
- Li XC, Berenbaum MR, Schuler MA, 2000. Molecular cloning and expression of *CYP6B8*: a xanthotoxin-inducible cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 75–84.
- Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Ann. Rev. Entomol.*, 52: 231–253.
- Matteson PC, 2000. Insect pest management in tropical Asian irrigated rice. *Ann. Rev. Entomol.*, 45: 549–574.
- Mullin CA, 1986. *Molecular Aspects of Insect-plant Associations*. Plenum Press, New York. 346 pp.
- Prapaipong H, Berenbaum MR, Schuler MA, 1994. Transcriptional regulation of the *Papilio polyxenes CYP6B1* gene. *Nucl. Acids Res.*, 22: 3 201–3 217.
- Rubia-Sanchez E, Suzuki Y, Miyamoto K, Watanabe T, 1999. The potential for compensation of the effects of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae) feeding on rice. *Crop Prot.*, 18: 39–45.
- Silverman N, Maniatis T, 2001. NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.*, 15: 2 321–2 342.
- Snyder MJ, Stevens JL, Andersen JF, Feyereisen R, 1995. Expression of cytochrome P450 genes of the CYP4 family in midgut and fat body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 321: 13–20.
- Wang GR, Lai FX, Fu Q, Zhang ZT, Guo LF, 1999. Virulent shift in populations of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Chinese J. Rice Sci.*, 13(4): 229–292. [王桂荣, 赖凤香, 傅强, 郭兰芳, 1999. 稻褐飞虱致害性变异的研究. *中国水稻科学*, 13(4): 229–232]
- Watanabe T, Kitagawa H, 2000. Photosynthesis and translocation of assimilates in rice plants following phloem feeding by the planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *J. Econ. Entomol.*, 93: 1 192–1 198.
- Wu HL, Xu XF, 2004. Recent advances in molecular biology of rice brown planthopper biotypes. *Plant Prot.*, 30(4): 11–14. [乌慧玲, 许晓风, 2004. 褐飞虱生物型的分子生物学研究进展. *植物保护*, 30(4): 11–14]
- Yang CJ, Yang ZH, Hu JF, He GC, Shu LH, 1999. Study on the brown planthopper resistance in introgressive lines from wild rice. *Acta Phytophylacica Sinica*, 26: 197–202. [杨长举, 杨志慧, 胡建芳, 何光存, 舒理慧, 1999. 野生稻转育后代对褐飞虱抗性的研究. *植物保护学报*, 26: 197–202]



Yang ZF, Yang HY, He GC, 2007. Cloning and characterization of two cytochrome P450 CYP6AX1 and CYP6AY1 cDNAs from *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 64: 88-99.

Yuan HY, Chen XP, Zhu LL, He GC, 2005. Identification of genes responsive to brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål

(Homoptera: Delphacidae) feeding in rice. *Planta*, 221: 105-112.

Zolnierowicz S, 2000. Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.*, 60: 1 225-1 235.

(责任编辑:赵利辉)

## 第 17 届摇蚊学国际会议在南开大学召开

2009 年 7 月 5 - 10 日第 17 届摇蚊学国际会议 (The 17th International Symposium on Chironomidae) 在南开大学召开。会议由南开大学生命科学学院主办,天津市动物学会和天津市科学技术协会协办。会议得到国家自然科学基金委员会和南开大学生命科学学院的经济资助。本届会议同时列入南开大学百年校庆活动之一。南开大学教授、天津动物学会副理事长王新华博士担任组委会主席并主持了本届会议。

出席本届会议的国际代表汇集了世界各个地区主要摇蚊学工作者。来自亚洲、非洲、北美、南美、欧洲和澳洲计 20 个国家 70 余位摇蚊学工作者出席了本届会议。本届会议共收到 60 余篇研究论文。与会代表交流了摇蚊学近年来的研究成果。大会期间共有 30 个大会口头发言以及 31 个墙报展示。会议组委会包括来自 8 个国家的 10 位专家。并共有 10 名专家主持了学科分会交流。

本届会议交流的研究成果涉及与摇蚊科昆虫有关的形态学、系统学、细胞学、行为学、生态学、区系和生物地理学、环境生物学和古湖沼学等学科领域。部分研究涉及各类水生昆虫以及大型底栖无脊椎动物。

澳大利亚墨尔本大学 Jon Martin 教授作了题为“从染色体带型到碱基对:解决摇蚊属种类鉴定问题”的传统开幕式特约报告 (Thienemann Honorary Lecture)。国际代表除了工作在高等院校和科研单位者外,同时包括环境保护部门以及与摇蚊学相关的科普工作者。

经过讨论确定下一届(第 18 届)摇蚊学国际会议将于 2011 年在挪威的 Trondheim 召开,第 19 届会议将在 2014 年在意大利的 Trento 召开。

(南开大学生命科学学院王新华供稿)