

褐飞虱 NADH 泛醌氧化还原酶 51kDa 亚基 cDNA 片段的克隆及表达分析

杨之帆¹, 何光存²

(1. 湖北大学生命科学学院, 湖北 武汉, 430062; 2. 武汉大学生命科学学院, 湖北 武汉, 430072)

摘要: NADH 泛醌氧化还原酶是动物体内呼吸链电子传递系统的第一个酶, 克隆水稻害虫褐飞虱的 NADH 泛醌氧化还原酶基因, 及研究其在褐飞虱与水稻互作中的表达变化, 将为科学防治褐飞虱提供新的线索。利用反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)技术克隆了褐飞虱 NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基基因的 cDNA 片段, 并进行了序列测定; 使用 Northern 杂交技术检测了该基因对两种不同抗性水稻的分子反应。分子杂交结果表明, 在取食抗性水稻品种 B5 后, 褐飞虱的 NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基基因表达水平明显升高, 而取食感虫水稻 TN1 后, 该基因的表达水平没有明显变化。

关键词: 褐飞虱; RT-PCR; NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基基因; Northern 杂交分析

中图分类号: Q966; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3090(2006)06-0611-04

Cloning and Expression of NADH-quinone Oxidoreductase 51kDa Subunit Gene from Brown Planthopper Nilaparvata Lugens

YANG Zhi-fan¹, HE Guang-cun²

(1. Huhe University, Wuhan 430062, China; 2. Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: NADH-quinone oxidoreductase is the first functional enzyme in the respiratory chain in animals. Cloning and expression analysis of this gene in brown planthopper *Nilaparvata lugens* will benefit the design of scientific programs for controlling the rice pest. A cDNA fragment of NADH-quinone oxidoreductase 51kDa subunit gene from brown planthopper was cloned by RT-PCR in this research. The expression alteration of the gene in response to two different rice varieties was examined by Northern blot hybridization. The results reveal that the length of the cDNA fragment is 538 bp in size, and the amino acid sequence deduced from the cDNA fragment has a high homology with parts of NADH-quinone oxidoreductase 51kDa subunits from *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Macaca fascicularis*, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Neurospora crassa*. Northern hybridization analysis shows that the expression of the gene rapidly increases after brown planthopper is fed with resistant rice B5, but there is no expression change of this gene in response to susceptible rice TN1.

Key words: brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Homoptera: Delphacidae); RT-PCR; NADH-quinone oxidoreductase 51kDa subunit gene; Northern hybridization analysis

褐飞虱(brown planthopper)是分布于全球稻作区的重要害虫之一,这种刺吸式口器的昆虫以吸食水稻韧皮部的汁液为生,严重影响水稻的生长发育及稻米的品质和产量^[1]。不同的水稻品

种对褐飞虱表现出不同的抗性水平。如 TN1 是一种典型的感虫品种,其抗性级别为 9,对褐飞虱不表现抗性;而 B5 是野生稻 *Oryza officinalis* Wall ex Watt 和栽培稻珍汕 97B (*O. sativa* L.) 杂交后

代的选育品种,抗性级别为3,对褐飞虱表现高抗性^[2]。NADH 泛醌氧化还原酶是动物和部分微生物体内呼吸链上参与传递电子的第一个功能酶。研究表明,一些人工杀虫剂、杀螨剂及来自微生物和植物的次生物质如鱼藤酮、粉蝶霉素 A 等可通过抑制 NADH 泛醌氧化还原酶活性而阻断电子传递链^[3,4]。观察发现,当褐飞虱若虫取食抗性水稻 B5 后,一定程度上表现出类似被毒杀的效应。这种效应是否与褐飞虱的呼吸链受阻有关,是一个值得探讨的问题。本研究旨在克隆褐飞虱 NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基基因的编码区 cDNA 片段,并研究褐飞虱取食 B5 过程中该基因表达水平的变化,为进一步揭示褐飞虱与抗性水稻互作的分子机制创造条件。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂与仪器

试验用褐飞虱在感虫水稻品种 TN1 植株上饲养繁殖。TN1 和抗虫水稻品种 B5 播种于直径 8 cm 的塑料杯中,待长至 3 叶期,将供试的 4 龄褐飞虱若虫投放到 TN1 和 B5 的幼苗上,平均密度为每株苗 10 只。按时间段 0, 6, 12, 24 h 同时从两种幼苗上取回适量若虫,迅速于液氮中深冻,然后置于 -80 °C 保存备用。

TRIzol 试剂为 Invitrogen 公司产品;RNA 酶抑制剂、RT-PCR 试剂盒、Taq DNA 聚合酶和 T 载体(I 型)均为 Promega 公司产品;PCR 引物由上海申能博彩公司合成;DNA 纯化试剂盒为 QIAGEN 公司产品;测序试剂盒(2.0 版本)和同位素 α -[³²P]dCTP 为 Perkin Elmer 公司产品;硝酸纤维素膜为 Amersham 公司产品;X 光片为富士公司产品;PCR 扩增仪(9700 型)和 DNA 自动测序仪(ABI377 型)为 Perkin Elmer 公司产品;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

按说明书分离褐飞虱若虫的总 RNA,溶于适量无 RNase 的水中,保存备用。

1.2.2 PCR 引物的设计及合成

根据已报道的昆虫 NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基的保守的氨基酸序列,设计合成了简并引物^[5]:

上游引物:5'- ATCTG (C/T) GG (A/G/C/T) GA (A/G) GA (A/G) AC -3';

下游引物:5'- TC (C/G) C (G/T) (A/G) CA (A/G/C/T) GG (C/G) C (G/T) CA (A/G) -3'

1.2.3 RT-PCR 反应

反应体系为 50 μ L,其中含有 26.5 μ L 无 RNase 的 H₂O,10 μ L 的 5 × PCR 缓冲液,2.5 μ L 的 10 mmol dNTP 混合物,2 μ L 的 25 mmol 的 Mg-SO₄,1 μ L 的 *TyL* DNA 聚合酶(5 U/ μ L),1 μ L 的 AMV 反转录酶(5 U/ μ L),1 μ L 的 RNA 酶抑制剂(20 U/ μ L),2.5 μ L 的上游引物(10 μ mol),2.5 μ L 的下游引物(10 μ mol),1 μ L 的总 RNA(1 μ g/ μ L)。反应条件为:48 °C × 45 min;94 °C × 2 min;94 °C × 30 s, 50 °C × 90 s, 68 °C × 120 s 循环 35 轮;68 °C 延伸 10 min。反应产物在 1% (W/V) 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.2.4 目标 cDNA 片段的克隆、测序及分析

从琼脂糖凝胶上回收大小约为 540 bp 的 DNA 片段,用 DNA 纯化试剂盒纯化后克隆到 T 载体上,转化大肠杆菌感受态细胞,随机挑取 36 个白色菌落,提取质粒 DNA,经 PCR 检测后,用 M13 和 M13(-) 通用引物进行双向测序。所得序列用 blast 搜索引擎在 NCBI 和 DDBJ 数据库中进行同源性查找,并用 DNAtools 6 分析软件和欧洲生物信息研究所的 Clustalw 在线工具进行序列比较和分析。

1.2.5 Northern 杂交分析

按文献[4]的方法进行 Northern 转膜和杂交。将来自各时间段褐飞虱的总 RNA(20 μ 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 α -[³²P]dCTP 标记的 cDNA 片段为探针进行分子杂交。杂交条件为 65 °C × 16 h;洗膜条件:用 1 × SSC, 0.2% (W/V) SDS 于 65 °C 洗 15 min,再用 0.5 × SSC, 0.1% (W/V) SDS 于 65 °C 洗 15 min;将洗好的膜与 X 光片夹于增感屏中,置于 -20 °C 曝光 7 d。

2 结果

2.1 NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基 cDNA 片段的序列分析

用 RT-PCR 方法扩增褐飞虱的 NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基基因 cDNA 片段,PCR 产物的电泳结果见图 1。第二泳道中约为 540 bp 的片段即为目标 DNA。回收后克隆于 T 载体上进行测序。测序结果表明,该片段长度为 538 bp,编码 179 个氨基酸残基(见图 2)。经 blast 在线工具查找发现,由 cDNA 推导的氨基酸序列与已知的几种生物的 NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基的部分序列具有高度的同源性。因此所克隆的 cDNA 片段确定为褐飞虱 NADH 泛醌氧化还原酶 51

参 考 文 献

- [1] Gomme P T, McCann K B, Bertolini J. Transferrin: Structure, Function and Potential Therapeutic Actions [J]. *Drug Discovery Today*, 2005, 10 (4): 267—273.
- [2] Harris W R, Messori L. A Comparative Study of Aluminum(III), Gallium(III), Indium(III), and Thallium(III) Binding to Human Serum Transferrin [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, 228 (2): 237—262.
- [3] Harris W R, Chen Y. Electron Paramagnetic Resonance and Difference Ultraviolet Studies of Mn^{2+} Binding to Serum Transferrin [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1994, 54(1): 1—19.
- [4] Smith T A D. Human Serum Transferrin Cobalt Complex: Stability and Cellular Uptake of Cobalt [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13(14): 4 576—4 579.
- [5] Kratz F, Messori L. Spectral Characterization of Ruthenium(III) Transferrin [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1993, 49(2): 79—82.
- [6] Messori L, Orioli P, Banholzer V, et al. Formation of Titanium(IV) Transferrin by Reaction of Human Serum Apotransferrin with Titanium Complexes [J]. *FEBS Letters*, 1999, 442(2—3): 157—161.
- [7] Kratz F, Hartmann M, Keppler B. The Binding Properties of Two Antitumor Ruthenium(III) Complexes to Apotransferrin [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(4): 2 581—2 588.
- [8] 冯佑民, 孙嘉琳, 童春香, 等. 转铁蛋白结构与功能的研究 I. 猪转铁蛋白的分离纯化及在无血清细胞培养中的应用 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 1987, 19(4): 322—327.
- [9] 候宪玉, 冯佑民, 张友尚. 转铁蛋白结构与功能的研究——鸭血清转铁蛋白含单一铁结合部位的结构域的制备和鉴定 [J]. *生物化学杂志*, 1988, 4(3): 244—251.
- [10] 冯敏杰, 周惠明, 钱海峰. 鹅血中转铁蛋白质的分离纯化及其性质 [J]. *无锡轻工大学学报*, 2004, 23(1): 94—98.

[责任编辑 徐前进]

(上接第 613 页) 鱼藤酮及粉蝶霉素 A 等毒物的毒害作用^[3]。通过这些反应, 昆虫就可以继续取食含毒素的植物以保证生长发育的需要^[8]。

笔者利用 RT-PCR 技术首次克隆了褐飞虱的 NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基基因的 cDNA 片段, 并证实了该基因受抗虫水稻的诱导。这表明, 具有高抗虫性的 B5 水稻汁液中可能含有类似鱼藤酮或粉蝶霉素 A 的物质, 一定程度上抑制了褐飞虱的呼吸链电子传递系统, 进而诱导了褐飞虱的 NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基基因的表达。下一步的工作就是证实 B5 水稻中存在与褐飞虱 NADH 泛醌氧化还原酶 51 kDa 亚基互作的毒蛋白, 并由单基因编码。如果该基因存在, 那么它将是基因工程改良水稻的一个理想的抗虫候选基因。克隆该基因并用于遗传育种, 将会对提高水稻的品质和产量及对褐飞虱的科学防治起到积极的推动作用。

参 考 文 献

- [1] Watanabe T, Kitagawa H. Photosynthesis and Translocation of Assimilates in Rice Plants Following Phloem Feeding by the Planthopper Nilaparvata Lugens (Homoptera: Delphacidae) [J]. *J Econ Entomol*, 2000, 93: 1 192—1 198.
- [2] Yang C J, Yang Z H, He G C, et al. On the Brown Planthopper Resistance in Introgressive Lines from Wild Rice [J]. *Acta Phytophylac Sin*, 1999, 26: 197—202.
- [3] Lümmer P. Complex I. Inhibitors as Insecticides and Acaricides [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1364: 287—296.
- [4] Brandt U, Kerscher S, Dröse S, et al. Proton Pumping by NADH: Ubiquinone Oxidoreductase. A Redox Driven Conformational Change Mechanism [J]. *FEBS Lett*, 2003, 545: 9—17.
- [5] Yano T, Chu S S, Sled V D, et al. The Proton-translocating NADH-Quinone Oxidoreductase (NDH-1) of Thermophilic Bacterium *Thermus Thermophilus* HB-8 [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 4 201—4 211.
- [6] Agrawal A A, Tuzun S, Bent E. Inducible Plant Defenses against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture [M]. St Paul, MN: American Phytopathological Society Press, 1999. 137—166.
- [7] Mullin C A. Molecular Aspects of Insect-plant Associations [M]. New York: Plenum Press, 1986. 346.
- [8] Glendinning J I. How do Herbivorous Insects Cope with Noxious Secondary Plant Compounds in Their Diet [J]. *Entomol Exp et App*, 2002, 104: 15—25.

[责任编辑 徐前进]