

白背飞虱、灰飞虱 mariner 转座子的初步研究

黄立华, 杜建光, 程遐年, 洪晓月

(南京农业大学昆虫学系, 南京 210095)

摘要: 根据毛里塔尼亚果蝇 *Drosophila mauritania* 的 mariner 转座子序列设计简并引物, 以白背飞虱 *Sogatella furcifera* 和灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 反应扩增出了约 500 bp 的条带, 经回收、克隆、测序, 获得其核苷酸序列, 与毛里塔尼亚果蝇 mariner 序列相比, 核苷酸同源性均为 71.3%, 氨基酸同源性分别为 69.5% 和 72%, 证明白背飞虱和灰飞虱体内确实存在 mariner 转座子。

关键词: mariner; 转座子; 白背飞虱; 灰飞虱

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2001) 04-0402-06

20 世纪 50 年代初期, 美国著名植物育种学家 McClintock 通过对玉米籽色斑的遗传研究, 首先发现了能在基因组内移动的控制成分 (controlling element)。这种可转移的成分, 现在一般称为转座子 (transposon)。目前, 人们对转座子的利用主要集中在两个方面: 一是用于分离基因, 利用转座子来分离基因的技术称为转座子标签法 (transposon tagging); 二是作为一种转基因载体, 广泛用于转基因植物或动物的研究^[1-3]。

Mariner 转座子是一类由 DNA 介导的转座子, 其末端为一小段反向重复序列, 全长约 1 300 bp, 编码 346 个氨基酸。Mariner 转座子首先在一种毛里塔尼亚果蝇 *Drosophila mauritania* 中发现^[4]。现在人们已在昆虫纲的鳞翅目、双翅目、鞘翅目、革翅目、缨尾目、蚤目等中发现了 mariner 转座子^[5], Oosumi 等^[7] 在人类基因组中也鉴定出了两类 mariner 转座子。Robertson^[6] 发现 mariner 转座子不仅可以在前后代中遗传, 而且可以在不同种的昆虫中水平转移。Mariner 转座子具有一个开放阅读框, 意味着它可以携带可转移的功能因子。因此, 对于非果蝇属的其它昆虫, 甚至一些节肢动物来说, mariner 转座子将是一种非常优秀的转基因载体^[5]。Mariner 转座子在昆虫中不仅具有非常广泛的分布, 而且其同源性也很高, 与毛里塔尼亚果蝇的 mariner 碱基序列相比, 土栖熊蜂 *Bombus terrestris* 和皱红蚁 *Myrmica ruginodis* 的相似性高达 75%^[7], 金星栉叶槭大蚕蛾 *Hyalophora cecropia* 为 48%^[5], 家蚕 *Bombyx mori* 为 34%^[8]。

鉴于 mariner 转座子在昆虫中广泛分布, 作者利用 PCR 技术找出了白背飞虱 *Sogatella furcifera*、灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 中的部分 mariner 转座子序列, 并分析了它们与毛里塔尼亚果蝇 mariner 转座子的同源性, 希望能为飞虱乃至其它昆虫的转基因研究提供一些帮助。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

1999年9月从南京农业大学江浦实验农场采集白背飞虱和灰飞虱成虫,带回室内扩大繁殖,成虫期取样。

1.2 基因组DNA提取

参照杨效文^[9]和王智^[10]的方法,略作改进。实验步骤如下:(1)取10头飞虱成虫,放入1 mL 65℃预热的提取缓冲液(1% SDS、50 mmol/L Tris-HCl pH8.0、25 mmol/L NaCl、25 mmol/L EDTA)中,充分匀浆后65℃水浴45 min;(2)加入1/10体积3 mol/L NaAc (pH 5.2),冰浴1 h;(3)4℃,10 000 × g 离心10 min,取上清液,加入等体积的酚/氯仿(1:1)抽提;(4)4℃,10 000 × g 离心5 min,取上层水相,加入2倍体积冰冷的无水乙醇,-20℃放置30 min,可见白色絮状DNA沉淀;(5)用玻棒勾出絮状DNA沉淀,于70%乙醇中漂洗;(6)倒去70%乙醇,待DNA沉淀干燥后,加入30~50 μL TE(含20 μg/L RNA酶),-20℃保存备用。

1.3 引物

参照Robertson^[5]设计简并引物:

MAR124F 5'-TGGGTNCCNCAYGARYT-3' (17-mer, 简并度:128)

MAR276R 5'-GGNGCNARRTCNGGNSWRTA-3' (20-mer, 简并度:4096)

Y=C或T; R=A或G; S=C或G; W=A或T; N=A、C、G或T。

1.4 PCR扩增

扩增反应的总体积为50 μL,其中含0.2 mmol/L dNTP,3.0 mmol/L MgCl₂,10倍缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 9.0,50 mmol/L KCl,0.1% Triton® X-100),0.8 μmol/L引物,8 ng DNA,0.4 U Taq DNA聚合酶(Promega公司),30 μL石蜡油。扩增反应在PCR扩增仪(HYBAID PCR Express)上进行。反应参数设置为:94℃先变性3 min,然后94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,共35个循环,随后72℃延伸10 min。反应结束后,取10 μL样用2%琼脂糖凝胶电泳,电压降为5 V/cm。电泳1 h后EB染色,紫外照射下拍照。

1.5 PCR产物的回收与纯化

PCR产物用2%低熔点琼脂糖凝胶电泳,切下目的片段,参照Wizard® PCR Preps DNA纯化系统(Promega)试剂盒的推荐步骤进行回收和纯化。

1.6 PCR产物克隆

参照李德葆^[11]的方法,制备大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α感受态细胞。将10 ng PCR产物连接入pGEM®-T Easy载体(Promega),用热击法转化入大肠杆菌 DH5α感受态细胞,在含有氨苄青霉素-IPTG-X-gal的SOC琼脂平板上挑选白色的阳性菌落。用碱裂解法^[13]提取质粒DNA,并用EcoR I做酶切鉴定。

1.7 PCR产物测序

把含有目的片段的重组大肠杆菌送至宝生物工程(大连)有限公司测序。

2 结果

2.1 白背飞虱和灰飞虱 mariner 片段的扩增、克隆和鉴定

以白背飞虱、灰飞虱基因组 DNA 为模板, 以 MAR124F 和 MAR276R 为上、下游引物, 通过 PCR 反应可以扩增出约 500 bp 大小的特异性片段 (图 1: A)。回收 PCR 得到的 500 bp 的 DNA 片段, 克隆进 T-Easy 质粒载体, 用 *Eco*R I 酶切, 上面的条带为质粒 DNA, 下面的条带为插入片段 (图 1: B)。从图 1 (B) 可看出, *Eco*R I 酶切后得到的片段大小约为 500 bp, 表明克隆成功, 可进行下一步测序。

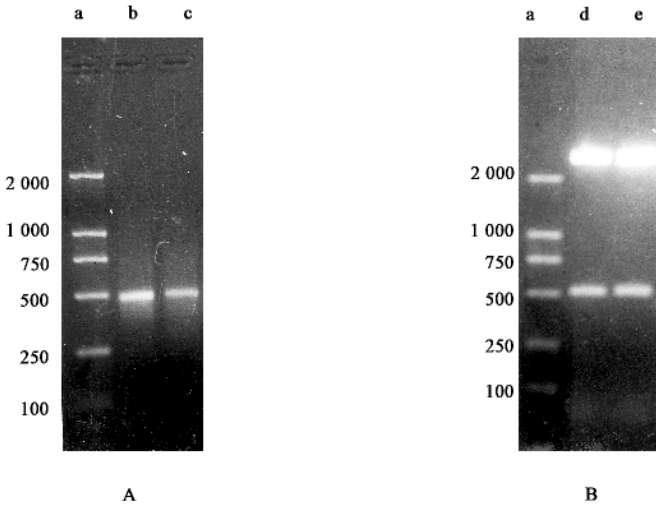


图 1 白背飞虱和灰飞虱 mariner 转座子的 PCR 扩增 (A) 和克隆 (B)

Fig. 1 PCR amplification (A) and cloning (B) of mariner transposable element of *S. furcifera* and *L. striatellus*

- a. 标准分子量对照 molecular weight marker; b. 白背飞虱 mariner 转座子的 PCR 产物 PCR product of mariner transposable element of *S. furcifera*; c. 灰飞虱 mariner 转座子的 PCR 产物 PCR product of mariner transposable element of *L. striatellus*; d. 白背飞虱 mariner 转座子的克隆 cloning of mariner transposable element of *S. furcifera*; e. 灰飞虱 mariner 转座子的克隆 cloning of mariner transposable element of *L. striatellus*

2.2 白背飞虱、灰飞虱、毛里塔尼亚果蝇 mariner 核苷酸序列、氨基酸序列同源性比较

将白背飞虱、灰飞虱 490 bp 的 PCR 产物的测序结果与毛里塔尼亚果蝇的 mariner 序列^[4]相比较 (图 2: A), 并根据已知的毛里塔尼亚果蝇氨基酸序列将白背飞虱和灰飞虱的核苷酸序列转换为氨基酸序列 (图 2: B)。从图 2 (A) 和图 2 (B) 的比较可看出, 白背飞虱和灰飞虱的核苷酸序列与毛里塔尼亚果蝇具有非常高的同源性, 均高达 71.3%, 比金星柃叶槭大蚕蛾 (与毛里塔尼亚果蝇同源性为 48%) 和家蚕 (与毛里塔尼亚果蝇同源性为 34%) 的 mariner 序列具有更高的同源性。转换后的氨基酸序列同源性也很高, 分别达 69.5% 和 72%。从而可推断, 白背飞虱和灰飞虱中也存在 mariner 转座子。

<i>S. furcifera</i>	<u>TGGG</u> TCCGCATGAGCTAACTGAGAGACAGATGAAAAACCGAAAAACCCCTGTGAAATTTGCCTGAAA
<i>L. striatellus</i>	<u>TGGG</u> TCCGCACGAACTAACTGAGAGACAGATGTTAAACCGACAAACAACCTGTGAAATTTGCCTGAAA
<i>D. mauritania</i>	TGGGTGCCACATGAGTTGACGAGAGGCAGATGGAGAGCGCCAAAAACACATGCGAAATTTGCTTTCAC **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>S. furcifera</i>	CACACCAGAAAAATCAGCITTCATCGAACTGTACTGCGATGAAAAATGGATTTATTTAAGAA-CC
<i>L. striatellus</i>	GACACCAGAAAAATCAGITTTTCATCGAATGTACTGCGATGAAAAATGGATTCATTTTGGAAATCC
<i>D. mauritania</i>	GATACAAAACGAAGTCGTTTTCATCGTATCGTTACTGGAGATGAAAAATGGATCTTTTTTGTAAATCC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>S. furcifera</i>	TAAACGTAGAAGATCCCTGGCTTAATCCGGGACAACCATCAACATCGACTGCAAAAACAGATCGATTGGC
<i>L. striatellus</i>	TAAACGTAGAAGATCATGGGTAAATCCGGGACAACCATCAACATCGACTGCAAAAACAGATCAATTCGGC
<i>D. mauritania</i>	TAAACGTAAAAAGTCATACGTTGATCCGGGACAACCGCCACATCGACTGCTCGACCAGATCGCTTTGGC ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>S. furcifera</i>	AAGAAGCAATGCTCTGGCTTTGGTGGGACCAGAAAGGTGTAGTGATCATGAGCTTCTAAAACCTAGTG
<i>L. striatellus</i>	AAGAAGCAATGCTCTGTGTTTGGTGGGACCAGAAAGGTGTACTGCATCATGAGCTTCTAAAACCTAGTG
<i>D. mauritania</i>	AAGAAGCATGCTCTGTGTTGGTGGGATCAGAGCGGTGTCAATTAATATGAGCTCTTGAACCCGGCG ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>S. furcifera</i>	AG CGGTTAATACTATTCCGTACAAACAACAAATGATCAATTTGAATCATGCGT-AA*CGAAAAACGACC
<i>L. striatellus</i>	AAACCGTTAA*ACTATTCCGTACAAACAACAAATGATCAATTTGCATCATGCGTTGATCGAAAAACGACC
<i>D. mauritania</i>	AAACCGTGAATACCGCACGCTACCAACAACAATTCATCAATTTGAACCGTCCGCTTCAGAGAAAAACGACC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>S. furcifera</i>	AGAATGGGCCAAAAGACACGGAAAAGTCATTTTGTACACGACAATGCACCTGCACACAAAGCGAAACCG
<i>L. striatellus</i>	AGAATGGCCAGACAGCAT--AAAAGTCATTTTGTACACGACAATGCACCTGCACACAAAGCGAAACCG
<i>D. mauritania</i>	CGAATATCAAAAAGACAAACACAGCGTCAATTTTCTCCATGACAACCGTCCATCACAACCGCAAGAGCG **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>S. furcifera</i>	GTTCCAGGATACAATAAAACACTCGGCTGGGAGCTGCTACCCACCOCGGTACTCCCCAGACTTCGGTCC
<i>L. striatellus</i>	GTTCCAGGATACAATAAAACACTTGGCTGGGAGCTGCTACCCACCOCGGTATATCTCCAGACTTCGGCCC
<i>D. mauritania</i>	GTTCCGACACGTTGGAAACACTCAATTTGGAAGTGTCTCCGATCGGGCTTACTCACCAGACTGGCCCC **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
(A)	
<i>S. furcifera</i>	WYPHELTERQMNRRKTTCEITLQRHQKKSGLHRTVTGDEKWIAFKNPKRRRCWVNPQPSTSTAKPDRFG
<i>L. striatellus</i>	WYPHELTERQMVNRQTCEITLQRHQKKSGLHRTVTGDEKWIHFENPKRRRCWVNPQPSTSTAKPDRFG
<i>D. mauritania</i>	WYPHELNERQMBRRKNTCEITLSRYKRKSLHRTVTGDEKWIFFVNPKRKRCVDPGPATSTARP*NRFG **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>S. furcifera</i>	KKAMLCVWWDQKGVVYIHELKPSBTVNTIRYKQQM*INLHALIEKRPEWAKRHGKIVILLHDNAPAHKAKP
<i>L. striatellus</i>	KKAMLCVWWDQKGVVHHEILKPSBTVNTIRYKQQM*INLHALIEKRPEWARAIHGRVILLHDNAPAHKAKP
<i>D. mauritania</i>	KKTMLCVWWDQSGVTYHIELKPGBTVNTARYEQQL*INLNRALQKRP*EYKQRHRTIFLHDNAPSHTARA * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
<i>S. furcifera</i>	VQDTIKTLGWELLPHP*VSPDFA*
<i>L. striatellus</i>	VQDTIKTLGWELLPHP*YTPDLAP
<i>D. mauritania</i>	V*RDTKETLNWEVLP*HAA*YSPDLAP * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
(B)	

图 2 白背飞虱、灰飞虱、毛里塔尼亚果蝇部分 mariner 转座子的核苷酸 (A) 和氨基酸 (B) 序列
Fig. 2 Nucleotide (A) and amino acid (B) sequence of *S. furcifera*, *L. striatellus* and *D. mauritania*
* 表示 3 种昆虫均相同的碱基或氨基酸，下划线示 PCR 引物
the same nucleotide and amino acids are denoted with “*”, and the primers for PCR are underlined

3 讨论

目前, 利用转座子来进行转基因植物的研究很多^[13, 14], 然而在昆虫中却很少应用。这主要是因为转基因昆虫在技术和管理策略上的难度要比转基因植物和其它转基因动物大^[15]。除转基因果蝇^[2]获得成功外, 其它昆虫的转基因工作多数还在做上游工作, 这其中的关键之一是要选择能适用于不同种昆虫的转座子。mariner 转座子在昆虫中分布广泛, 同源性高, 且全基因序列很短, 仅 1 300 bp, 不仅可以在后代间遗传, 而且可以在不同种的昆虫中水平转移, 是一种非常适合的转基因载体。昆虫转基因研究表明, 果蝇热休克基因启动子 hsp70 可有效地调控多种昆虫基因的表达, 广泛应用于转基因果蝇和转基因昆虫细胞系。我们可将一些对昆虫有害的基因, 如毒素蛋白基因、激素基因等插入转座子转座酶位点, 体外连接 hsp70 等启动子, 从而构建一种复合转座单元 (transposons with armed cassettes), 通过显微注射等方法注射入受体昆虫早期胚胎细胞中, 或连接到核型多角体病毒的 DNA 中, 通过核型多角体病毒感染昆虫, 利用转座子的转座功能, 使外源有害基因整合入受体昆虫, 得到转基因昆虫, 从遗传学角度来防治害虫。另有研究表明, 昆虫翅型多态现象是受肌动蛋白基因控制的^[16]。我们也可以将控制昆虫短翅型分化的肌动蛋白基因插入 mariner 转座酶位点, 组建转基因昆虫, 使经遗传改造的昆虫均表达短翅型基因而不能迁飞。这样, 一方面可使昆虫不能迁移至合适的越冬场所而死亡; 另一方面也便于虫源地集中防治, 减少迁入地虫量。当然, 做到这一步还需要很多的工作, 但确实具有非常广阔的应用前景。

另外, 作者近期的研究还表明, mariner 转座子是一种活跃的转座子, 这对于其携带的外源基因的表达是必需的。这一工作及其全基因序列的获得正在进行中。

致谢 研究过程中得到中国科技大学徐卫华教授的帮助, 并承蒙南京农业大学植物保护学院昆虫学系韩召军教授指正, 特此致谢。

参 考 文 献 (References)

- [1] Rubia G M, Spradling A C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vector. *Science*, 1982, 218: 348 ~ 352
- [2] Halder G, Callaerts P, Gehring W J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science*, 1995, 267: 1 788 ~ 1 792
- [3] Bonini N M, Bui Q T, Gray-Board G L *et al.* The *Drosophila* eyes absent gene direct ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development*, 1997, 124: 4 819 ~ 4 826
- [4] Jacobson J W, Medhora M M, Hardt D L. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83: 8 684 ~ 8 688
- [5] Robertson H M. The mariner transposable element is wide spread in insects. *Nature*, 1993, 362: 241 ~ 245
- [6] Oosumi T, Belknap W R, Garlick B. Mariner transposons in humans. *Nature*, 1995, 378: 672
- [7] Bigot Y. Mariner-like element in Hymenoptera species: insertion site and distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 3 408 ~ 3 412

- [8] Yonita S. Cloning and characterization of a mariner-like element in silkworm, *Bombyx mori*. *Genes Genet. Syst.*, 1997, 72: 229 ~ 238
- [9] 杨效文, 张孝羲, 陈晓峰等. 我国烟蚜种群分化的 RAPD 分析. *昆虫学报*, 1999, 42 (4): 372 ~ 380
- [10] 王 智, 颜亨梅, 唐 果等. 一种供 RAPD 分析用蜘蛛模板 DNA 的快速提取方法. *生命科学研究*, 1999, 3 (3): 268 ~ 270
- [11] 李德葆, 周雪平. 基因工程操作技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. 71 ~ 77
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 19 ~ 22
- [13] Lucas H, Feuerbach F, Kunet K *et al.* RNA-mediated transposition of the tobacco retrotransposon Tnl in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.*, 1995, 14: 2 364 ~ 2 373
- [14] Izawa T, Ohnishi T, Nakano T *et al.* Transposon tagging in rice. *Plant Mol. Biol.*, 1997, 35: 219 ~ 229
- [15] 龚 和. 我国昆虫分子生物学研究的回顾和展望. *昆虫知识*, 2000, 37 (1): 32 ~ 36
- [16] Christine C *et al.* A nonsense mutation within the act88F actin gene disrupts myofibril formation in *Drosophila* flight muscles. *Cell*, 1984, 38: 711 ~ 719

The mariner transposable element of *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus*

HUANG Li-hua, DU Jian-guang, CHENG Xia-nian, HONG Xiao-yue

(Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: About 500 bp DNA fragment is amplified by PCR with the degenerated primers designed according to the mariner sequence of *Drosophila mauritiana*, the genomic DNA of either *Sogatella furcifera* or *Laodelphax striatellus* as the template. Sequence analysis shows that the fragment similarity of both the DNA to that of *D. mauritiana* is 71.3%, and the similarity of the amino acid is 69.5% and 72% respectively. This indicates that the mariner element may exist in *S. furcifera* and *L. striatellus*.

Key words: mariner; transposable element; *Sogatella furcifera*; *Laodelphax striatellus*