

基因组步移法克隆小菜蛾 CYP9 G2 基因的上游序列

申本昌 江红 乔传令*

(广州医学院基础学院 医学遗传学与细胞生物学教研室 广州 510182;
中国科学院动物研究所 农业虫害与鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100101)

摘要: 利用 4 种产生平端切头的限制性内切酶消化小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 的基因组 DNA, 然后利用 DNA 连接酶的催化作用, 在 4 种不同平端切头的小菜蛾基因组 DNA 上连接一个氨基化的基因组步移衔接头序列, 针对衔接头及已克隆的 CYP9 G2 基因的序列, 设计两对 PCR 上、下游引物, 进行 PCR 扩增、T-A 克隆和阳性克隆的巢式 PCR 验证, 通过测序克隆到了小菜蛾 CYP9 G2 基因上游未知序列约 1.8 kb。通过对该基因的上游序列进行信息分析, 发现 1 个可能的节肢动物动物转录起始子 (Inr), 3 个 CAAT 样盒及 1 个抗氧化剂样反应因子, 共 5 个可能的顺式调控元件。研究还表明, 利用基因组步移方法可以快速克隆已知序列的上游未知序列, 实验操作经济、简便, 对于已知 cDNA 序列或部分基因组序列的基因, 其上游调控序列的克隆, 基因组步移具有较高的实用价值。

关键词: 小菜蛾; CYP9 G2; 顺式调控元件; 基因组步移; 聚合酶链反应

中图分类号: Q963 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)05-112-05

Cloning of the Upstream Untranslated Region of CYP9 G2 from *Plutella xylostella* by Genomic Walking

SHEN Bei-Chang JIANG Hong QIAO Chuan-Ling*

(Department of Medical Genetics and Cell Biology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182;
State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: To clone the upstream untranslated region of CYP9 G2 from diamondback moth, the genomic walking was performed according to the routine procedure based on PCR amplification using the outer adaptor primer (AP1) and CYP9 G2 specific primer (GSP1). After T-A cloning, positive clones were confirmed by nested PCR using the outer adaptor primer (AP2) and CYP9 G2 specific primer (GSP2) as forward and reverse primers. Analysis of the upstream DNA sequence of CYP9 G2 showed that 5 cis-acting elements existed in the upstream sequence of CYP9 G2. One of the elements was a putative initiator of arthropoda, three of them were CAAT-like boxes, and the other one was an antioxidant-response-like element. This kind of genome walking could be used in rapid cloning of the promoters and other upstream regulatory elements in genes that only cDNA sequence was available, mapping of intron/exon junctions, and walking bidirectionally from any sequence-tagged site or expressed sequence tag. The method is simple, reliable and efficient.

基金项目 中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (No. KSCX3-IOZ-05), 国科金外资助字第 30311120206 号项目和国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (No. 2002AA601160) 及广州医学院博士/留学归国人员启动基金项目 (No. 2006GD056);

* 通讯作者, E-mail: qiaocl@ioz.ac.cn;

第一作者介绍 申本昌, 男, 博士; 研究方向: 分子遗传学; E-mail: shenbc2000@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2008-11-26, **修回日期:** 2009-06-26

Key words: *Plutella xylostella*; *CYP9 G2*; Cis-acting elements; Genome walking; Polymerase chain reaction

小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 是一种世界性的危害十字花科蔬菜的主要害虫,该虫年发生代数多,繁殖系数高,世代重叠严重,长期以来,人们主要依赖大量使用各种杀虫剂来防治小菜蛾的危害,因此,不可避免地造成了小菜蛾对多种常用的有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯等杀虫剂产生不同程度的抗药性。研究表明,小菜蛾对多种杀虫剂的抗性机制可能与 P450 酶的活性增高有关^[1]。而 P450 单加氧酶对杀虫剂的代谢抗性是由其基因表达调控,尤其是转录调控的改变所致^[2],在我们已克隆的小菜蛾 P450 基因 (*CYP9 G2*, 全长 cDNA 2 143 bp, GenBank 登录号为 096739) 的基础上^[3],分离、鉴定参与小菜蛾 *CYP9 G2* 调控的顺式作用元件,将有助于揭示小菜蛾对杀虫剂产生抗性的机制。本研究利用一种特殊的基因组步移法,即利用 4 种限制性内切酶 *Dra*、*EcoR*、*Pvu* 和 *Stu* 消化小菜蛾的基因组 DNA,然后利用连接酶在平端切头的小菜蛾基因组 DNA 两端包括 *CYP9 G2* 的 5 端上游加上一个氨基化的基因组步移衔接头,使用针对 *CYP9 G2* 第一个外显子内部序列 (GSP1) 和针对步移衔接头的特异序列 (AP1) 作为正向及反向引物,进行第一轮 PCR,其产物进行 T-A 克隆,对阳性克隆的菌落通过反向引物 GSP2 (GSP1 的 5 上游序列) 和正向引物 AP2 (针对 AP1 3 的下游序列) 的巢式 PCR 扩增进行验证,对于巢式 PCR 阳性菌落,可将第一轮 PCR 产物的 T-A 阳性克隆进行测序,即可获得小菜蛾 P450 基因 *CYP9 G2* 基因的上游序列。对克隆的未知序列的生物信息学分析可能为了解该基因的顺式表达机制提供初步理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和材料 基因组步移试剂盒内包括 4 种限制性内切酶 *Dra*、*EcoR*、*Pvu* 和 *Stu* (美国 Clontech 公司),其中还包括基因组步移衔接头 (genome walker adaptor)、LA *Taq*

DNA 聚合酶、 T_4 DNA 连接酶及 PCR 试剂 [宝生物 (大连) 有限公司]。T-A 克隆 pGEM-T easy 试剂盒 (Promega 公司),PCR 胶回收试剂盒 (上海华舜公司)。从小菜蛾 cDNA 文库中克隆到的 *CYP9 G2* 基因 cDNA 序列 (GenBank 登录号 AB096739)^[3,4] 的第 1 外显子序列设计第一轮和第二轮 PCR 的两条下游引物,即 GSP1 (5'-GGT GAT GAG TCT GAT GAT GGA CGG G-3') 和 GSP2 (5'-CGG TGG TCC ACG AAG TGG TCG AAG T-3'),北京博雅生物工程公司合成。基因组步移试剂盒的 AP1 (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'),AP2 (5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3') 分别是第一轮 PCR 和阳性克隆鉴定用第二轮 PCR 的上游引物。DH5 为中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理国家重点实验室提供。

研究用小菜蛾系中国科学院动物研究所抗性分子遗传研究组 2000 年 7 月从南京田间采集,参照刘传秀等^[5]的方法饲养,抗性选育采用叶浸法进行,对马拉硫磷的致死中浓度为 $LC_{50} = 24\ 850.24\ \text{mg/L}$,与敏感种群相比,对马拉硫磷抗性倍数为 30.64。

1.2 实验方法

1.2.1 小菜蛾的基因组 DNA 提取 利用文献描述的方法^[6],提取小菜蛾的基因组 DNA,然后分别用 4 种限制性内切酶 *Dra*、*EcoR*、*Pvu* 和 *Stu* 对小菜蛾的基因组 DNA 进行酶切,37℃ 消化过夜,0.5% 琼脂糖凝胶电泳检查酶切是否完全,将酶切完全的基因组 DNA 用糖原沉淀后,进行乙醇沉淀、纯化,利用分光光度计法,在 260 nm 和 280 nm 处测定所获得基因组 DNA 的吸光值并计算出相应的 DNA 浓度。

1.2.2 酶切基因组 DNA 与衔接头的连接 将上述酶切处理并纯化的基因组 DNA 与试剂盒的上、下游基因组步移衔接头在 T_4 DNA 连接酶催化下,在 16℃ 水浴中进行连接反应,4 种不同限制性内切酶消化的基因组 DNA 及与衔接头连接后的产物即为小菜蛾基因组 DNA 的 *Dra*

、*EcoR*、*Pvu* 和 *Stu* 酶切亚文库。

1.2.3 PCR 反应 以 GSP1 和针对衔接头序列的引物 AP1 进行 PCR 扩增,反应体系为 50 μ l,包括 10 \times LA 聚合酶缓冲液 5 μ l,dNTPs 混合液 (dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 各 10 mmol/L) 1 μ l,LA Taq DNA 聚合酶 1 μ l,外侧引物 GSP1 和 AP1 (均为 10 mmol/L) 各 1 μ l,DNA 模板 (基因组文库 DNA) 1 μ l,加蒸馏水至 50 μ l。PCR 反应条件:95 预变性 5 min;94 30 s,65 5 min,32 个循环;最后 72 延伸 10 min。取 5 μ l PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.2.4 PCR 产物的 T-A 克隆 取 PCR 产物进行连接和转化。在 10 μ l 反应体系中加入 PCR 产物 1 μ l,2 \times 连接缓冲液 5 μ l,pGEM-T easy 载体 1 μ l,T₄ 连接酶 1 μ l,16 $^{\circ}$ C 水浴中进行连接过夜。将 5 μ l 连接产物加入到 200 μ l DH5 感受态细菌中,轻轻混匀,置冰中 30 min 后,在 42 $^{\circ}$ C 热休克 1 min,再置冰中静置 2 min 后加 LB 培养基至 1 000 μ l,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 1 h。离心后去上清,将 200 μ l 左右的培养物接种到含 X-Gal 和 IPTG 的氨苄青霉素 LB 半固体平板上,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。

1.2.5 巢式 PCR 反应鉴定阳性克隆和序列分析 取 T-A 克隆的蓝色菌落,接种于 5 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 250 r/min 培养过夜。取 20 μ l 培养物 95 $^{\circ}$ C 煮沸,取 1 μ l 作为 DNA 模板,利用 GSP2 和 AP2 引物进行巢式 PCR 扩增,反应体系和反应条件同 1.2.3。对于阳性克隆对应的第一轮 PCR 产物的 T-A 阳性克隆,使用 pGEM-T 载体多克隆位点的通用引物 M13F 和 SP6 对插入片段进行正、反测序。

2 结果

2.1 基因组步移 PCR 结果 4 种限制性内切酶 *Dra*、*EcoR*、*Pvu* 和 *Stu* 消化后的小菜蛾基因组 DNA 与步移衔接头连接,即建立了小菜蛾的 *Dra*、*EcoR*、*Pvu* 和 *Stu* 亚文库。对亚文库分别进行第一轮 PCR 扩增,电泳结果表明,*EcoR* 和 *Stu* 亚文库的第一轮

PCR 扩增结果为阳性(图 1 的 2、4 泳道),PCR 产物长度约 3.3 kb,而 *Dra* 和 *Pvu* 亚文库的第一轮 PCR 扩增无产物(图 1 的 1、3 泳道)。

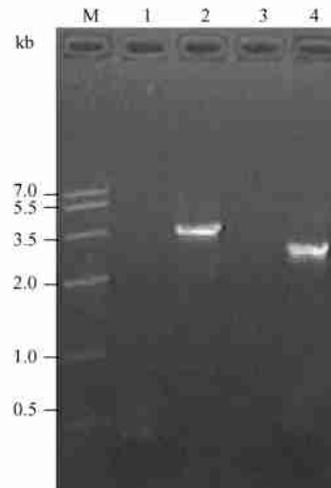


图 1 小菜蛾 *CYP9 G2* 基因上游序列克隆的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Electrophoresis of the amplification from the first round of PCR using *Dra*, *EcoR*, *Pvu* and *Stu* sublibraries as templates

M:DNA 分子量标准 (天根生化科技北京有限公司);1、2、3 和 4 分别是 *Dra*、*EcoR*、*Pvu* 和 *Stu* 消化基因组步移亚文库的第一轮 PCR 扩增结果。

M: DNA marker (Tiangen); Lane 1, 2, 3 and 4 show the PCR amplification of *Dra*, *EcoR*, *Pvu* and *Stu* sublibraries, respectively.

2.2 T-A 克隆及阳性克隆的巢式 PCR 鉴定 对 *EcoR* 消化基因组步移亚文库 PCR 扩增产物,进行 1% 琼脂糖电泳、胶回收、纯化,然后进行 T-A 克隆,随机挑取 4 个白色阳性菌落,用 AP1 和 GSP1 内侧的 *CYP9 G2* 特异引物 AP2 和 GSP2,对挑取的菌落进行菌落巢式 PCR,电泳结果(图 2)表明,所挑取的阳性克隆均含有 *CYP9 G2* 的上游序列。

2.3 序列测定及分析 对于巢式 PCR 鉴定为阳性的克隆所对应的第一轮 PCR 产物的 T-A 阳性克隆,使用 pGEM-T 载体多克隆位点的通用引物 M13F 和 SP6 对插入片段进行正、反测序,第二次测序以第一次测序的可靠信号区为基础,设计第二次测序的引物,再进行测序,依

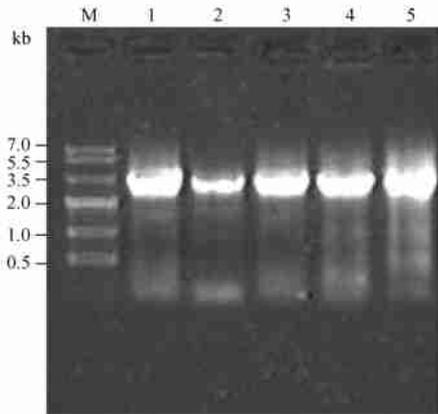


图2 *CYP9 G2* 基因上游调控序列 T-A 克隆后巢式 PCR 阳性克隆鉴定

Fig. 2 Confirmation of positive clones of the upstream untranslated region of *CYP9 G2* by nested-PCR

M: DNA 分子量标准 (天根生化科技北京有限公司); 1、2、3 和 4 分别是 4 个阳性白色菌落的菌落 PCR 电泳结果, 5 为 *EcoR* 亚文库扩增回收产物的巢式 PCR 电泳结果。

M: DNA marker (Tiangen); Lane 1, 2, 3 and 4 are PCR products of 4 positive clones, respectively; Lane 5: PCR product of DNA purified from the first PCR of the *EcoR* sublibrary.

次类推, 将插入到 pGEM-T 载体多克隆位点内的未知序列测通, 然后利用序列分析软件 DNAMAN 将多个测序结果进行拼接, 发现正、反测序结果一致且所得序列的 3 端与已知的 *CYP9 G2* 的 5 端重叠部分约 1.5 kb, 证实所克隆序列是 *CYP9 G2* 基因的上游序列, 其中 1.8 kb 为 *CYP9 G2* 基因的上游未知序列, 已登录 GenBank, 收录号为 AB458853。用 PC/GENE 软件对得到的 *CYP9 G2* 基因的上游序列进行分析, 发现该基因上游序列中, 可能存在转录起始子 (initiator, Inr) 或抗氧化剂样反应元件等转录顺式调控元件。在 -50 ~ -45 bp 处有一诱导性增强子或称诱导性元件, 序列为 TCAGT, -93 ~ -73 bp 处存在一个抗氧化剂样反应元件 (antioxidant-response element) (ATGACACGGG)。-85 ~ -89 bp 处存在 1 个可能的 CAAT 盒, 在 -104 ~ -99 bp、-261 ~ -256 bp 处存在 2 个可能的 CCAAT 盒。

3 讨论

昆虫的细胞色素 P450 酶在其生长、发育、取食和生殖中起重要作用, P450 酶通过代谢外源性化合物使昆虫对杀虫剂产生抗性及对植物有毒物质产生耐受性, 此外, 该酶还参与昆虫体内激素的合成与代谢^[7,8]。为了研究十字花科昆虫小菜蛾的抗药机制, 申本昌等^[3,4]从构建的小菜蛾 cDNA 文库中克隆了 *CYP9 G2* 的 cDNA 序列, 为了进一步研究该基因在转录水平的表达调控, 本研究使用基因组步移方法克隆了 *CYP9 G2* 的上游序列, 试图发现该基因的启动子、增强子等转录调控序列。在获得的序列中, 在 -50 bp 左右没有发现决定转录方向和精确起始点的 TATA 框, *CYP9 G2* 基因的转录方向及精确起始点的控制可能具有另外的机制, 这与昆虫细胞色素 P450 基因转录起始复杂性相一致^[9]。-50 ~ -45 bp 处的 TCAGT 序列, 为一诱导性增强子或称诱导性元件, 是节肢动物的转录起始子 Inr^[10], 目前已知 Inr 位于转录起始点附近, 本研究未发表的引物延伸实验结果表明紧邻 Inr 后的 -44 bp 处的 G 可能是转录开始位点 (transcription initiation site, TIS)*, 这也进一步表明, 该 TCAGT 序列是转录起始子。真核生物的基因主要由 GC 框和 CAAT 控制转录起始频率, 在 *CYP9 G2* 的上游序列中, 没有发现 GC 框, 但 -85 ~ -89 bp 处的 CAAT 样盒与 -104 ~ -99 bp、-261 ~ -256 bp 处的 CCAAT 样盒可能在决定 *CYP9 G2* 启动子的起始频率方面起重要作用, 具体哪个 CAAT 样盒的生物学功能或这些序列是否共同协调起作用, 是本课题有待深入研究之处。另外, -93 ~ -73 bp 处的抗氧化剂样反应元件 (ATGACACGGG), 也存在于鼠谷胱甘肽-S-转移酶基因中^[10], 该反应元件在抗性小菜蛾中的作用也有待深入研究。

在昆虫细胞色素 P450 研究领域, 已有多 P450 基因上游顺式调控序列被分离和鉴定。

* 申本昌, 小菜蛾 *CYP9 G2* 基因的克隆及其特征分析. 北京: 中国科学院研究生院博士学位论文, 2004.

如 CYP6B3、家蝇 (*Musca domestica*) 的 CYP6A1、果蝇 (*Drosophila*) 的 CYP6A2 上游的 Barbie 盒序列的鉴定, CYP6B1v3 上游的花椒毒素反应元件, CYP6B1v3、CYP6B3v2、CYP6B4v2 以及 CYP6B5v1 上游的外源化合物反应元件等的研究^[9], 揭示了昆虫接触到某种外源化合物时, 或通过特异诱导某种顺式作用元件而增加某个特异的 P450 基因, 或其等位基因变异体的转录活性, 或通过同时诱导一些相关元件而增加多个 P450 基因, 或其等位基因变异体的转录活性, 从而产生特异的或强大的分解代谢此种外源化合物的能力。本研究通过克隆 CYP9 G2 的上游序列及对该序列的分析, 为 CYP9 G2 基因在转录水平的表达调控提供了初步线索, 为揭示小菜蛾对杀虫剂产生抗性的分子机理奠定了初步的基础。

传统的获得基因上游调控序列的方法是通过构建和筛选基因组文库, 实验操作复杂、实验周期长, 另外, 许多基因的长度大于质粒文库的平均插入片段大小, 如果一个基因被分散到若干不同的克隆中, 对文库进行筛查时, 难度更大^[11]。相比较, 本实验采取的基因组步移实验具有操作简单、快捷、费用低、不使用同位素等优点, 在已知基因组某一部分 DNA 片段或 cDNA 序列的条件下, 即可扩增出上游未知序列, 对研究基因的上游表达调控有一定实用价值, 而且可以通过设计引物克隆基因 3 的下游序列和 mRNA 剪接序列, 对于克隆已知 cDNA 序列的基因的表达、调控序列的研究, 基因组步

移技术具有一定的推广和应用价值。

参 考 文 献

- [1] 赵怀玲, 尤民生. 小菜蛾抗性及其治理对策的研究. 华东昆虫学报, 2001, **10**(1): 81 ~ 88.
- [2] 邱星辉, 何凤琴, 李梅. 细胞色素 P450 介导的昆虫抗性. 生命的化学, 2003, **23**(4): 279 ~ 281.
- [3] Shen B C, Zhao D X, Qiao C L, et al. Cloning of CYP9 G2 from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *DNA Sequence*, 2004, **15**(3): 228 ~ 233.
- [4] 申本昌, 金治平, 赵德修等. 小菜蛾全长 cDNA 文库的构建及质量分析. 动物学研究, 2004, **24**(3): 215 ~ 219.
- [5] 刘传秀, 韩招久, 李凤良等. 应用蛭石萝卜苗法室内继代大量繁殖小菜蛾研究. 昆虫知识, 1994, **30**(6): 341 ~ 344.
- [6] 乔传令, 黄瑶, Raymond M. 不同地域有机磷杀虫药剂抗性库蚊复合组酯酶 B1 扩增的研究. 昆虫学报, 1996, **39**(3): 225 ~ 232.
- [7] 冷欣夫, 邱星辉编著. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景. 北京: 科学出版社, 2001, 140 ~ 171.
- [8] Sayyed A H, Mores G, Crickmore N, et al. Cross-resistance between a *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and non-Bt insecticides in the diamondback moth. *Pest Management Science*, 2008, **64**(8): 813 ~ 819.
- [9] 周国理, 黄炯烈, 姚其方等. 白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株基因组中 CYP6 基因片段的分离与鉴定. 中国人兽共患病杂志, 2000, **16**(1): 22 ~ 25.
- [10] Huang C F, Holzmacher R, Connolly E, et al. Conserved promoter elements in the CYP6B gene family suggest common ancestry for cytochrome P450 monooxygenases mediating furanocoumarin detoxification. *PNAS*, 1996, **93**(22): 12 200 ~ 12 205.
- [11] 戴灼华, 王亚馥, 栗翼玫编著. 遗传学(第二版). 北京: 高等教育出版社, 2008, 466 ~ 467.