

# MSAP 在水稻害虫白背飞虱中的应用研究<sup>\*</sup>

张梅, 陈佳林, 周晓穗, 梁士可, 李广宏, 王方海

(中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室//昆虫学研究所, 广东 广州 510275)

**摘要:** 甲基化敏感的扩增多态性分析方法 (MSAP) 是在扩增片段长度多态性技术基础上建立起来的主要用来检测样品基因组 DNA 甲基化情况的一种方法, 特别适用于全基因组范围内检测 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化情况, 在高等动物和许多植物上已广泛应用, 但尚未有在昆虫中应用该方法的报道。从 DNA 提取、酶切基因组 DNA 用量、酶切和接头连接时间、电泳图谱显影方法等方面对 MSAP 方法进行了改进, 并在水稻重要害虫白背飞虱上得到成功应用。这为将来在其它昆虫中使用该方法研究基因组 DNA 甲基化情况提供了一定借鉴和指导价值。且通过比较白背飞虱雌雄性别间和长短翅型间的 MSAP 图谱, 发现雌雄性别间和长短翅型间的基因组 DNA 甲基化样式都存在明显的差异, 说明 DNA 甲基化可能参与了性别和翅型分化的调节。

**关键词:** MSAP; DNA 甲基化; 白背飞虱; 性别分化; 翅二型

中图分类号: Q965 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2015)01-0098-05

## The Application of MSAP in *Sogatella furcifera* (Horvath)

ZHANG Mei, CHEN Jialin, ZHOU Xiaosui, LIANG Shike, LI Guanghong, WANG Fanghai

(State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique is an amplified fragment length polymorphism (AFLP) based method for detection of DNA methylation. It represents a reliable technique for the detection of cytosine methylation alterations at the site of CCGG in a genome-wide perspective. MSAP has been extensively applied in plants and some animals, but no application in insects has been reported yet. The method was improved from DNA extraction, the amount of genomic DNA used for restriction enzyme digestion, time for enzyme digestions and ligation of adapters, and electrophoresis imaging method. And the method was applied successfully in *Sogatella furcifera* (Horvath), an important rice pest in China. It will provide some references and guiding values for the study of genome DNA methylation in other insects by using this method in the future. By comparing MSAP maps between male and female or between long wing and short wing of *S. furcifera*, it was found that there were obvious differences in DNA methylation patterns. This indicates that DNA methylation may be involved in gender and wings type differentiation.

**Key words:** MSAP; DNA methylation; *Sogatella furcifera*; gender differentiation; wing dimorphism

甲基化敏感的扩增多态性分析方法 (MSAP) 主要用来检测样品 DNA 的甲基化情况, 它是在扩增片段长度多态性技术的基础上, 结合用甲基化敏

感的限制性内切酶消化处理样品基因组的技术建立起来的。该方法相对其它测定 DNA 甲基化程度的技术有如下优点: ①可在全基因组范围内检测

\* 收稿日期: 2014-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31171844); 广东省自然科学基金资助项目 (S2011010001353, 031628)

作者简介: 张梅 (1991年生), 女; 研究方向: 昆虫分子生物学; 通讯作者: 王方海; E-mail: lsswf@mail.sysu.edu.cn

CCGG 位点的胞嘧啶甲基化情况; ②不需知道被测样品的 DNA 序列信息, 因此可用于 DNA 序列未知的生物。在高等动物和许多植物上已大量应用<sup>[1-3]</sup>, 但在昆虫上尚未发现应用该方法的相关报道。

DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要形式, 在植物和高等动物上已有大量报道, 目前在果蝇、蚜虫、家蚕、甘蓝夜蛾等昆虫中也已发现基因组中存在 DNA 甲基化现象<sup>[4-5]</sup>。在蚂蚁基因组中, DNA 甲基化这种表观遗传修饰的现象也已得到证实, 且蚂蚁不同种属间在 DNA 甲基化谱上存在一定的差异<sup>[6]</sup>。Patalano 等<sup>[7]</sup>在 *Current Opinion in Cell Biology* 上曾撰文指出社会性昆虫的多型现象与 DNA 甲基化相关。因此, 昆虫中不仅存在大量 DNA 甲基化现象, 且在调控昆虫生长发育和多型性等方面发挥着重要作用。

白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horvath) 为水稻重要害虫, 其成虫有长翅型和短翅型两种类型。长翅型成虫具有远距离迁飞的能力, 可以大范围内迁移扩散; 短翅型成虫则具有产卵量大且产卵期长等特点, 可以使种群数量在短期内快速增长。因此, 成虫的长、短翅型比率发生动态是预测稻飞虱数量的一个重要参数<sup>[8-9]</sup>。长期以来人们一直致力于研究稻飞虱的性别分化和繁殖机理以及翅型分化, 一旦取得重要突破, 将有助于开发新的方法控制该种害虫的危害。

本研究首先对 MSAP 方法进行改进, 使其可以应用在身体较小的昆虫样品中, 并用白背飞虱为材料, 对雌雄性别和长短翅型个体分别进行了 DNA 甲基化式样检测, 结果发现无论是雌雄性别间还是长短翅型间, DNA 甲基化式样都存在一定的差异, 为今后进一步从 DNA 甲基化的角度探讨性别分化和翅型转换的机理打下良好的基础, 同时也为今后在其它昆虫中应用 MSAP 方法提供一定的借鉴和指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试昆虫

白背飞虱采自广州市华南农业大学水稻试验田内。挑选部分雌雄成虫及长翅型和短翅型雌成虫为供试昆虫。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

分别采集白背飞虱长翅型雄成虫、长翅型雌成虫和短翅型雌成虫各 20 头, 用微型玻璃匀浆器匀浆抽提基因组 DNA, 储存在 -20 °C 的冰箱中待用,

具体方法参照 TaKaRa 公司的基因组 DNA 提取试剂盒的方法和步骤。

### 1.3 基因组 DNA 的酶切

MSAP 方法主要参照 Xiong 等<sup>[10]</sup>的研究报道, 使用了两种对甲基化敏感性不同的限制性内切酶 *Hpa* II 和 *Msp* I, 以及内切酶 *EcoR* I, 并进行了部分修改。选取每样品基因组 DNA 100 ng, 分别用 *EcoR* I/*Msp* I 或 *EcoR* I/*Hpa* II 酶切组合 (TaKaRa 公司) 在 37 °C 下酶切 20 h, 随后在 66 °C 的恒温下处理 20 min 使酶灭活, 未甲基化的 CCGG 位点被切割成黏性末端, 而甲基化的位点则未被切割。具体酶切体系为 15 μL: 样品 DNA 100 ng, 10 倍缓冲液 1.5 μL, *EcoR* I 酶 (15 U/μL) 0.15 μL, *Msp* I 酶 (10 U/μL) 或 *Hpa* II 酶 (10 U/μL) 0.2 μL, 灭菌水补足体积至 15 μL。

### 1.4 接头及引物的配制

合成了 Elink1、Elink2 和 Hmlink1、Hmlink2 共 4 个单链序列 (见表 1), 分别将这些单链序列 DNA 配制成浓度为 500 pmol/μL 的溶液, 将互补的单链序列分别取 100 μL 配对混匀后于 56 °C 孵育 2 min, 然后以每 2 min 递降 2 °C 的速度逐步冷却到 10 °C, 使其自身退火形成 E 接头和 HM 接头备用。引物分为预扩增引物 E0、HM0 和选择性扩增引物 E1、HM1-HM3 (见表 1)。将预扩增引物配制成 500 ng/μL 的母液、选择性扩增引物配制成质量浓度为 300 ng/μL 的母液备用。分别取预扩增引物 and 选择性扩增引物的母液 4 μL, 加水 36 μL 配制成 50 ng/μL 和 30 ng/μL 的质量浓度待用。

表 1 MSAP 方法中所使用的接头和引物序列  
Table 1 Sequences of primers and adapters used for MSAP

接头名称	序列
Elink1	5' - CTCGTAGACTGCGTACC - 3'
Elink2	5' - AATTGGTACGCAGTCTAC - 3'
Hmlink1	5' - GACGATGAGTCTAGAA - 3'
Hmlink2	5' - CGTTCTAGACTCATC - 3'
预扩增引物	
E0	5' - GACTGCGTACCAATTCA - 3'
HM0	5' - GATGAGTCTAGAACGGT - 3'
选择性扩增引物	
E1	5' - GACTGCGTACCAATTCAC - 3'
HM1	5' - GATGAGTCTAGAACGGTTC - 3'
HM2	5' - GATGAGTCTAGAACGGTAC - 3'
HM3	5' - GATGAGTCTAGAACGGTAG - 3'

### 1.5 DNA 片段与接头连接

选取各样品的酶切产物 15 μL, 分别加入 E 接

头和 HM 接头各 1  $\mu\text{L}$ , 在 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa 公司) (350 U/ $\mu\text{L}$ ) 作用下, 16  $^{\circ}\text{C}$  连接 14 h, 随后于 65  $^{\circ}\text{C}$  下恒温处理 30 min 使 T4 DNA 连接酶失活。按照 DNA 片段纯化试剂盒 (TaKaRa 公司) 纯化上述连接产物。

### 1.6 连接产物的 PCR 扩增

将上述各样品连接产物用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 10 倍, 取 2  $\mu\text{L}$  作为模板, 加入 1  $\mu\text{L}$  质量浓度为 50 ng/ $\mu\text{L}$  的 E0 和 HM0 引物, 在 LA Taq 酶 (TaKaRa 公司) (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 作用下进行 PCR 预扩增。20  $\mu\text{L}$  的反应体系, 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 25 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  forever。

预扩增产物用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 20 倍后, 取 2  $\mu\text{L}$  作为模板, 加入 E1 引物和 HM1-3 中的任一引物各 1  $\mu\text{L}$ , 在 LA Taq 酶 (TaKaRa 公司) (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 作用下进行 PCR 选择性扩增。20  $\mu\text{L}$  的反应体系, 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  30 s (每个循环降 0.7  $^{\circ}\text{C}$ ), 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 13 循环; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 23 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 12  $^{\circ}\text{C}$  forever。

### 1.7 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

将最终得到的各样品选择性扩增产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶质量分数为 6%, 先

50 V 恒压电泳 20 min, 再经 130 V 恒压电泳 2.5 h。电泳完毕后, 小心分开两玻璃板, 将固着有聚丙烯酰胺凝胶的亲水玻璃板放入预先准备好的  $\varphi = 10\%$  的醋酸固定液中浸泡。随后进行银染, 具体银染方法参考文献<sup>[11]</sup>。

### 1.8 数据分析

在 MSAP 方法中, 常用到 DNA 内切酶 *Msp* I 和 *Hpa* II, 这 2 种酶虽然都能识别和分解同样的 5' - CCGG - 3' 位点, 但对 DNA 甲基化的敏感性不同。根据 *Eco*RI + *Msp*I 或 *Eco*RI + *Hpa*II 组合的酶切样品的扩增产物电泳图谱, 可以将 5' - CCGG - 3' 位点的甲基化式样分为以下 4 种类型 (表 2)。I: *Hpa*II (H) 和 *Msp*I (M) 泳道中均出现条带, 表明 2 条 DNA 链中的 1 条里面胞嘧啶被甲基化, 或没有甲基化发生, 通常被看作未甲基化; II: 条带只出现在 *Hpa*II 泳道中, 在 *Msp*I 泳道中没有条带, 表明 2 条 DNA 链中的 1 条外面胞嘧啶被甲基化, 通常被看作半甲基化; III: 条带只出现在 *Msp*I 泳道中, 在 *Hpa*II 泳道中没有条带, 表明 2 条 DNA 链中的里面胞嘧啶均被甲基化, 通常被看作全甲基化; IV: 在 *Msp*I 和 *Hpa*II 泳道中均没有条带出现, 表明 2 条 DNA 链中的外面胞嘧啶均被甲基化。

表 2 基因组 DNA 被 *Hpa* II 和 *Msp* I 酶切后呈现出的甲基化类型<sup>1)</sup>

Table 2 Methylation patterns of genomic DNA digested by *Hpa* II and *Msp* I

类型	甲基化状态		酶的敏感性		电泳带型	
			<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Eco</i> RI/ <i>Hpa</i> II	<i>Eco</i> RI/ <i>Msp</i> I
I	CCGG	C5mCCGG	有	有	+	+
	GGCC	GGCC				
II	5mCCGG		有	无	+	-
	GGCC					
III	C5mCCGG		无	有	-	+
	GGC5mC					
IV	5mCCGG		无	无	-	-
	GGCC5m					

1) “+” = 有电泳条带出现; “-” = 无电泳条带出现; 5m = 该位点被甲基化

## 2 结果与分析

### 2.1 MSAP 方法的改进

MSAP 方法主要由 Xiong 等<sup>[10]</sup> 于 1999 年发展起来, 该方法主要包括 DNA 提取、双酶切、接头连接、两轮 PCR、电泳等几个步骤。我们参照了 Xiong 等的方法, 对部分环节进行了适当改进, 使其适用于体型很小的昆虫, 并用白背飞虱具体进行了实验, 结果比较理想。我们主要在如下 5 个方面

进行了部分改进 (见表 3): ① DNA 提取采用了 Takara 基因组纯化试剂盒, 不仅提取时间大为缩短, 且获得的基因组 DNA 纯度较高; ② 酶切时基因组 DNA 用量从原方法的 2  $\mu\text{g}$  减少到 100 ng, 这样不但减少了酶的用量, 节约成本, 且更适合体形较小、难以收集大量样本材料的多数昆虫; ③ 酶切时间比原先增加了 14 h, 这样使得基因组 DNA 被酶解得更彻底; ④ 接头连接时间从原先的 4 h 增加到 14 h, 这样可以让多数相关 DNA 片段连上接头;

⑤电泳胶片的观察, 原先方法是利用放射性标记的引物进行 PCR 反应, 电泳胶片采用放射显影的方法进行观察。我们采用了银染方法观察胶片的条

带, 这样就不需要使用放射性标记的引物, 减少了放射性操作和污染。

表 3 MSAP 方法被改进的 5 个方面

Table 3 Five aspects of MSAP improved in our method

有改动的地方	Xiong 的方法 <sup>[10]</sup>	本文的方法	改动后的优点
DNA 提取	苯酚-氯仿抽提法	Takara 基因组纯化试剂盒	DNA 纯度较高
被酶切的 DNA 量	2 μg	100 ng	减少酶用量
酶切时间	6 h	20 h	酶切更彻底
接头连接时间	4 h	14 h	连接更充分
电泳胶片的观察	放射显影	银染	不需进行有关放射性操作实验

### 2.2 白背飞虱雌、雄成虫的 MSAP 图谱

利用改进后的方法, 对白背飞虱雌雄成虫的基因组 DNA 进行了 MSAP 分析, 利用 3 对引物组合 E1HM1、E1HM2 和 E1HM3, 扩增到很多条带, 多数介于 100 ~ 600 bp 之间 (图 1), 显示出的带型表明在白背飞虱雌雄成虫中既有全甲基化的 5' - CCGG - 3' 位点, 也有半甲基化的 5' - CCGG - 3' 位点。同时还发现白背飞虱雌雄成虫间的带型存在一定差异, 说明雌雄虫间基因组的甲基化式样应有所不同。那么基因组甲基化式样的差异会不会影响白背飞虱的雌雄性别分化? 还需今后进一步深入研究。

### 2.3 白背飞虱雌成虫长、短翅型的 MSAP 图谱

利用改进后的方法, 也对白背飞虱雌成虫长、短翅型的基因组 DNA 进行了 MSAP 分析, 利用 3 对引物组合, 扩增到的条带多数介于 100 ~ 300 bp 之间 (图 2), 显示出的带型既有全甲基化的 5' - CCGG - 3' 位点, 也有半甲基化的 5' - CCGG - 3' 位点。同时还发现长翅型样品和短翅型样品的带型存在明显差异, 说明不同翅型间虫体基因组的甲基化式样应有所不同。那么 DNA 的甲基化有没有参与白背飞虱翅型分化的调控? 如果参与的话, 其具体调控机制又是什么? 还有待今后深入研究。

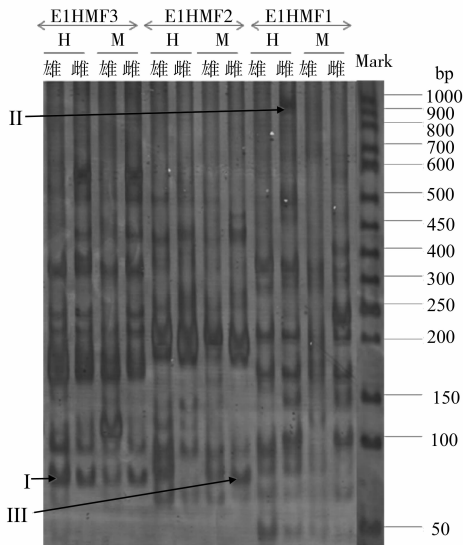


图 1 雌雄白背飞虱样品的 MSAP 电泳图

Fig. 1 MSAP electrophoretogram of male and female samples of *Sogatella furcifera*

引物组合为 E1HM1, E1HM2 和 E1HM3; H: 由 *EcoRI* + *HpaII* 酶解; M: 由 *EcoRI* + *MspI* 酶解; 雄: 雄虫样品; 雌: 雌虫样品; Mark: DNA 相对分子质量标准; I: 未甲基化条带; II: 半甲基化条带; III: 全甲基化条带

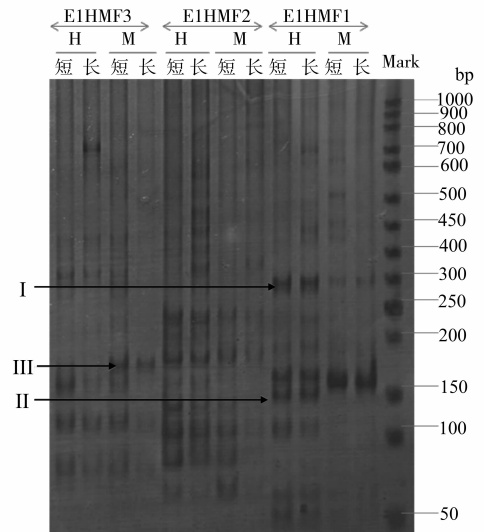


图 2 长、短翅白背飞虱样品的 MSAP 电泳图

Fig. 2 MSAP electrophoretogram of samples from macropterous and brachypterous female adults of *Sogatella furcifera*

引物组合为 E1HM1, E1HM2 和 E1HM3; H: 由 *EcoRI* + *HpaII* 酶解; M: 由 *EcoRI* + *MspI* 酶解; 短: 短翅型雌虫样品; 长: 长翅型雌虫样品; Mark: DNA 相对分子质量标准; I: 未甲基化条带; II: 半甲基化条带; III: 全甲基化条带

### 3 讨 论

MSAP 是在扩增片段长度多态性技术基础上建立起来的主要用来检测样品 DNA 甲基化情况的一种方法, 特别适用于全基因组范围内检测 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化情况, 在高等动物和许多植物上已广泛应用。DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要形式, 在脊椎动物和高等植物上已有大量研究成果<sup>[1,12]</sup>, 然而, 在无脊椎动物昆虫中甲基化的研究相对较晚, 文献报道主要集中于这几年<sup>[5]</sup>, 目前尚未有在昆虫中应用 MSAP 方法的报道。为了能将 MSAP 方法应用于体型较小的昆虫, 对该方法进行了部分改进: 采用 Takara 试剂盒提取样品 DNA、降低酶切时基因组 DNA 用量、增加酶切和接头连接时间、用银染方法取代放射显影技术 (具体见结果中的描述)。利用改进后的方法, 在白背飞虱中进行了具体实验, 成功获得了与性别或长短翅型相关联的 MSAP 图谱, 这为将来在其它昆虫中使用该方法研究基因组 DNA 甲基化情况提供了一定借鉴和指导价值。

本研究成功获得了白背飞虱雌雄性别和长短翅型的 MSAP 图谱, 发现无论是雌雄性别间, 还是长短翅型间, 其基因组 DNA 甲基化式样都存在一定的差异, 说明 DNA 甲基化可能参与了性别和翅型分化的调控。这为今后从 DNA 甲基化的角度研究白背飞虱性别和翅型分化的调控机制打下了良好的开端。

#### 参考文献:

- [1] XIAO J, SONG C, LIU S, et al. DNA methylation analysis of allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus* red var.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. PLoS ONE, 2013, 8: e56409.
- [2] KARAN R, DELEON T, BIRADAR H S, et al. Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes [J]. PLoS ONE, 2012, 7: e40203.
- [3] ZHANG X, GE X, SHAO Y, et al. Genomic change, retrotransposon mobilization and extensive cytosine methylation alteration in *Brassica napus* introgressions from two intertribal hybridizations [J]. PLoS ONE, 2014, 8: e56346.
- [4] XIANG H, ZHU J, CHEN Q, DAI F, et al. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map [J]. Nature Biotechnology, 2010, 28: 516 - 520.
- [5] DREWELL R A, LO N, OXLEY P R, et al. Kin conflict in insect societies: a new epigenetic perspective [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2012, 27(7): 367 - 373.
- [6] BONASIO R, LI Q, LIAN J, et al. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator* [J]. Current Biology, 2012, 22:1 - 10.
- [7] PATALANO S, HORE T A, REIK W. Shifting behaviour: epigenetic reprogramming in eusocial insects [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2012, 24: 367 - 373.
- [8] 张琼秀, 孙梓暄, 李广宏, 等. 外源激素对褐飞虱翅型分化的影响 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(3): 76 - 78.
- [9] 张琼秀, 孙梓暄, 李广宏, 等. 三种外源激素对白背飞虱翅型分化的影响 [J]. 生态学报, 2008, 28(12): 5994 - 5998.
- [10] XIONG L, XU C, SAGHAI M A, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique [J]. Molecular and General Genetic, 1999, 261: 439 - 446.
- [11] BASSAM B J, CAETANO-ANOLLES G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1991, 196: 80 - 83.
- [12] WANG H, FENG Q, ZHANG M, et al. Alteration of DNA methylation level and pattern in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) pure-lines and inter-line F1 hybrids following low-dose laser irradiation [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2010, 99: 150 - 153.