

MS-RDA 的改进及在白背飞虱的应用研究*

周晓穗, 陈佳林, 张 梅, 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: 甲基化敏感性代表性差异分析方法 (MS-RDA) 适用于特异、低丰度基因组 DNA 甲基化的筛查与鉴定, 已大量应用于哺乳动物的疾病发生和植物发育机理方面的研究, 但昆虫中尚未发现该方法的应用。从 DNA 提取、酶切、扩增子制备、消减杂交等方面对该方法进行了改进, 并在水稻重要害虫白背飞虱上得到成功应用, 获得了 4 条与雌、雄性别相关联的特异性甲基化差异条带, 其中有 3 条序列已被 GenBank 收录, 登陆号分别为 JX847621、JX624161、JX472453, 经 BLAST 比对, 有 3 条未发现同源性序列, 属于功能未知的新基因; 同时还获得了 2 条与长短翅型相关联的特异性甲基化差异条带, 也已被 GenBank 收录, 登陆号分别为 JX514031、JX472454, 同源性分析发现与多种动物的 18S 核糖体和 28S 核糖体 RNA 基因序列高度相似, 因此有关核糖体基因的甲基化可能对白背飞虱的翅型分化起到一定的调控作用。

关键词: MS-RDA; DNA 甲基化; 白背飞虱; 翅二型

中图分类号: Q965 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2013) 05-0118-05

The Improvement of MS-RDA and Its Application in *Sogatella furcifera* (Horvath)

ZHOU Xiaosui, CHEN Jialin, ZHANG Mei, WANG Fanghai

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

Abstract: Methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA) is suitable for screening and identification of specific and low abundances genomic DNA methylation. It has been applied in many researches on mammal disease occurrence and plant developmental mechanism, but no application was reported in insects. In this study, we developed a MS-RDA method for insects, which was improved from DNA extraction, restriction enzyme digestion, amplicon preparation, and competitive hybridization. The method was further applied successfully in *Sogatella furcifera* (Horvath), an important rice pest in China. Four differentially methylated DNA sequences related with female and male were obtained. Three of them had been accepted by GenBank, the accession numbers were JX847621, JX624161, JX472453, respectively. Three of them were not found homologous sequences by BLAST and should be belonging to the new genes with functions unknown. Meanwhile, two differentially methylated DNA sequences related with long and short wing were obtained. Their accession numbers of GenBank were JX514031, JX472454, respectively. They were found highly similar with the 18S ribosomal or 28S ribosomal RNA gene sequences of many kinds of animals by homology analysis, therefore ribosomal RNA gene methylation maybe play some roles on wing dimorphism of *S. furcifera*.

Key words: MS-RDA; DNA methylation; *Sogatella furcifera*; wing dimorphism

* 收稿日期: 2013-03-16

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); 有害生物控制与资源利用国家重点实验室资助的创新课题资助项目 (SKLBC10B03)

作者简介: 周晓穗 (1987 年生), 女; **研究方向:** 昆虫生理生化; **通讯作者:** 王方海; E-mail: lsswfh@mail.sysu.edu.cn

甲基化敏感性代表性差异分析方法 (MS-RDA) 由 Ushijima 等^[1]于 1997 年建立, 即通过将甲基化敏感的限制性内切酶消化处理样品基因组的方法和代表性差异分析方法结合起来, 优化检测子与驱赶子比例, 从而检测甲基化差异区域片段的一种方法。该方法适用于特异、低丰度基因组 DNA 甲基化的筛查与鉴定, 在疾病发生、机体发育、相关病原株系 DNA 甲基化差异分析以及新遗传标记的分离等方面显示出较大潜力。在高等动物^[2-3]、植物^[4]上已大量应用, 但在昆虫上尚未发现应用该方法的报道。

DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要形式, 早在果蝇、蚜虫、家蚕、甘蓝夜蛾、粉蚧等昆虫中均已发现基因组中存在 DNA 甲基化现象^[5-6]。在蚂蚁基因组中也已发现存在 DNA 甲基化这种表观遗传修饰^[7], Bonasio 等^[8]2012 年发表在 *Current Biology* 的论文进一步阐明蚂蚁不同种属间在 DNA 甲基化谱上存在一定的差异。最近 Patalano 等^[9]在 *Current Opinion in Cell Biology* 上撰文指出社会性昆虫的多型现象与表观遗传修饰、特别是 DNA 甲基化相关。这些都说明昆虫中也存在大量甲基化现象, 在调控昆虫生长发育和多型性等方面应发挥着一定的调控作用。

白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horvath) 体型小, 易迁飞, 繁殖力强, 是水稻的重要虫害之一。其成虫有长翅型、短翅型两种类型。长翅型为迁飞型, 具有远距离迁飞的能力; 短翅型属于定居繁殖型, 产卵期长且产卵量大。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^[10-11]。研究稻飞虱性别分化和繁殖机理及翅型分化是近几年的研究热点, 将有助于探索新的方法控制该种害虫的危害。

已有研究表明, 白背飞虱的翅型分化在发育过程中并未牵涉到基因组的改变, 而是涉及到基因表达的可遗传改变, 属于典型的表观遗传现象, 据此推测, 在稻飞虱翅型分化过程中可能存在 DNA 甲基化修饰现象。我们具体测定了长、短翅型白背飞虱成虫中 DNA 甲基化情况, 发现确实存在 DNA 甲基化现象。本研究重点对 MS-RDA 方法进行改进, 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 甲基化差异片段筛选, 结果成功筛选到与雌雄性别或长短翅型相关联的特异 DNA 甲基化差异片段, 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 MS-RDA 方

法提供一定的借鉴和指导。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

稻纵卷叶螟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成虫为供试昆虫。

1.2 基因组 DNA 的提取

分别选取白背飞虱长翅型雄成虫、长翅型雌成虫和短翅型雌成虫各 10 头, 分别加入适量的缓冲液后用微型玻璃匀浆器匀浆抽提 DNA, 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

选取每样品基因组 DNA 2 μg , 加入 1.5 μL 的甲基化敏感性限制性内切酶 Hpa II (TaKaRa 公司), 混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下酶切 20 h, 随后在 66 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温下处理 30 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。

1.4 接头的配制

共合成了 6 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 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min, 然后以每 2 min 递降 2 $^{\circ}\text{C}$ 的速度逐步冷却到 10 $^{\circ}\text{C}$, 使其自身退火形成如下 3 个接头: RHpa II_{24/11}、JHpa II_{24/11}、NHpa II_{24/11}, 备用。

表 1 MS-RDA 方法中所使用的接头序列

Table 1 The sequences of adaptors used in MS-RDA

接头名称	序列
RHpa II ₂₄	5'-AGC ACT CTC CAG CCT CTC ACC GAC-3'
RHpa II ₁₁	5'-CGG TCG GTG AG-3'
JHpa II ₂₄	5'-ACC GAC GTC GAC TAT CCA TGA AAC-3'
JHpa II ₁₁	5'-CGG TTT CAT GG-3'
NHpa II ₂₄	5'-AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAC-3'
NHpa II ₁₁	5'-CGG TCC CTC GG-3'

1.5 扩增子的制备

将上述酶切产物两端加入 RHpa II_{24/11} 接头, 在 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa 公司) 作用下, 16 $^{\circ}\text{C}$ 下连接 15 h, 采用 DNA 片段纯化试剂盒 (TaKaRa 公司) 纯化连接产物。取部分连接产物作为模板, 以接头中的 RHpa II₂₄ 为引物, 在 LATaq 酶 (TaKaRa

公司) 作用下进行 PCR 扩增, 使连接有 R 接头的 DNA 片段即扩增子得到有效富集。 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳观察扩增子。PCR 扩增条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 2 min , 28 个循环后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。

1.6 消减杂交

将各样品的扩增子在甲基化敏感性限制性内切酶 Hpa II 酶切作用下除去 R 接头, 酶切产物用 DNA 片段纯化试剂盒纯化。分别将白背飞虱长翅型雄成虫和短翅型雌成虫扩增子去 R 接头纯化后的产物连上 JHpa II_{24/11} 接头, 作为检测子, 采用长翅型雌成虫扩增子去 R 接头纯化后的产物作为驱赶子进行的杂交称为正交, 反之叫做反交。检测子和驱赶子按 $1:40$ 的比例混合溶于 $4\text{ }\mu\text{L}$ 的杂交缓冲液, $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min , $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交 23 h 。杂交反应完成后, 用杂交产物为模板, 以 JHpa II₂₄ 为引物进行 PCR 反应。 17 个循环后加入 Mung Bean Nuclease (TaKaRa 公司) 消化单链核苷酸, 消化产物经 DNA 片段纯化试剂盒纯化后继续 PCR 反应 30 个循环, 使检测子中靶序列得到大量扩增。 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测结果。将上述第 1 轮正交和反交的产物分别用 Hpa II 酶消化除去 J 接头, 经 DNA 片段纯化试剂盒纯化后换上 N 接头, 随后进行第 2 轮杂交和扩增, 根据具体情况检测子和驱赶子由第一轮的 $1:40$ 改为 $1:400$ 到 $1:10\text{ }000$ 之间。

1.7 克隆、测序及相似性分析

将最终得到的消减杂交产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (TaKaRa 公司) 回收后, 与 pGEM-T 载体 (Promega 公司) 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下连接 12 h , 将连接产物加入 JM109 感受态细菌 (Fermentas 公司制备) 进行转化复苏后, 涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 14 h , 挑取阳性克隆, 培养扩增后, 取部分菌液送 TaKaRa 公司测序, 所测得的序列经 BLAST 比对进行相似性分析。

2 结果与分析

2.1 MS-RDA 方法的改进

MS-RDA 方法最早由 Ushijima 等^[1] 于 1997 年建立, 该方法主要包括 DNA 提取、酶切、扩增子制备和消减杂交等几大步骤。我们参照了 Ushijima 等的方法, 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, 取得了与性别或长短翅型相关联的甲基化差异显示 DNA 片段 (详见后 2 部分的描述), 结果比较理想。我们的方法主要在如下 4 个方面进行了改进 (见表 2):

①样品 DNA 的提取, 原方法采用了比较经典的苯酚-氯仿抽提法, 而我们采用了 Takara 基因组纯化试剂盒, 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 $20\text{ }\mu\text{g}$ 减少到 $2\text{ }\mu\text{g}$, 这样不但可以减少酶的用量, 节约成本, 且非常适合体形较小、难以收集大量样本材料的多数昆虫; ③扩增子制备时的 PCR 比原先增加了 3 个循环, 这样解决了起初模板量较低的问题; ④消减杂交从原先的 3 轮降为 2 轮, 若第 2 轮时, 使用 $1:400$ 的比例, 未能出现清晰条带, 而是弥散条带的话, 根据具体结果, 再改为 $1:4\text{ }000$ 或更高的比例重新进行, 这样就不需要繁琐的第 3 轮消减杂交过程, 使整个方法变得相对简单、更易实施。

表 2 MS-RDA 方法被改进的 4 个方面

Table 2 Four aspects of MS-RDA improved in our method

有改动的地方	原创方法 ^[1]	本文方法	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	所得 DNA 纯度较高
被酶切的基因组 DNA 量	$20\text{ }\mu\text{g}$	$2\text{ }\mu\text{g}$	减少酶用量
扩增子制备时的 PCR 循环数	25	28	解决了模板量较低的问题
消减杂交轮数	3	2	较简洁方便

2.2 白背飞虱长翅型雄成虫和长翅型雌成虫甲基化差异 DNA 片段

将白背飞虱长翅型雄成虫作为检测子, 长翅型雌成虫作为驱赶子, 经过 2 轮的正交反应后得到 1 条 200 bp 左右的清晰的差异性条带。以长翅型雌成虫作为检测子, 长翅型雄成虫作为驱赶子, 经过两轮的反交后则得到可见的 3 条清晰明亮的差异性条带, 大小分别为 250 , 400 , 450 bp 左右 (见图 1)。这些甲基化差异性 DNA 片段经 pGEM-T 载体克隆测序后, 核苷酸序列分别为 207 、 260 、 396 、 462 bp , 去掉接头序列后则分别为 169 、 212 、 347 、 414 bp (见表 3)。后 3 个序列已被 GenBank 收录, 登录号分别为: JX847621、JX624161、JX472453。经 BLAST 比对分析后, 发现相对分子质量为 414 的片断序列与白背飞虱 28S 核糖体 RNA 基因高度相似, 相似度达 99% , 因此推断该序列就是白背飞虱 28S 核糖体 RNA 基因的部分序列。而其余 3 个序列未发现相似性序列存在, 应属于未发现的新基因, 其具体功能等方面还有待进一步研究。

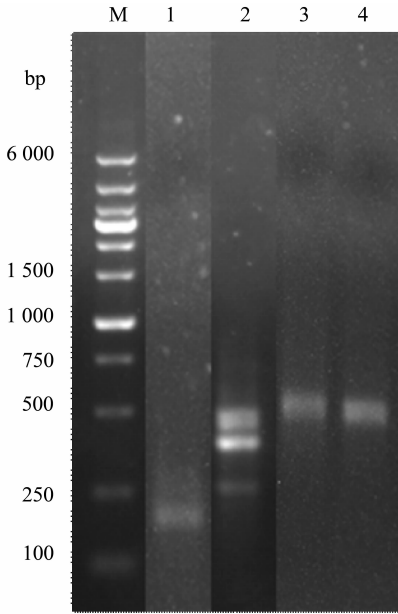


图 1 两轮消减杂交后的电泳图

Fig. 1 Two electrophoretogram after the second cycle of competitive hybridization

M: DNA 相对分子质量标准; 1: 雄成虫作为检测子, 雌成虫作为驱赶子; 2: 雌成虫作为检测子, 雄成虫作为驱赶子; 3: 短翅型雌成虫作为检测子, 长翅型雌成虫作为驱赶子; 4: 长翅型雌成虫作为检测子, 短翅型雌成虫作为驱赶子

表 3 白背飞虱雌、雄成虫间的 4 个甲基化差异 DNA 片段
Table 3 Four differentially methylated DNA sequences from females and males of *Sogatella furcifera*

DNA 片段大小/bp	GenBank 登记号	序列比对结果
169	无	无相似序列
212	JX847621	无相似序列
347	JX624161	无相似序列
414	JX472453	与白背飞虱 28S 核糖体 RNA 基因高度相似

2.3 白背飞虱短翅型雌成虫和长翅型雌成虫甲基化差异 DNA 片断

将白背飞虱短翅型雌成虫作为检测子, 长翅型雌成虫作为驱赶子, 经过 2 轮的正交反应后得到 1 条相对分子质量略大于 500 bp 的差异性条带。以长翅型雌成虫作为检测子, 短翅型雌成虫作为驱赶子, 经过两轮的反交后则得到 1 条相对分子质量 500 bp 左右的差异性条带 (见图 1)。分别对这 2 条差异性条带进行切胶纯化回收, 并用 pGEM-T 载体进行克隆测序, 测序后所得其大小分别为 512、501 到 bp, 去掉接头序列后则分别为 464、453 bp (见表 4)。这 2 个序列均已被 GenBank 收录, 登录号分别为: JX514031、JX472454。经 BLAST 比对分析后, 发现 464 bp 的片段序列与多种动物的 18S 核糖体高度相似, 如与一种两索属动物 *Amphimermis* sp. A-2007 的 18S 核糖体高达 99% 相似; 与索科线虫 *Mermithidae* sp. TB-2009 的 18S 核糖体相似度达 97%; 与食蚊罗索线虫 *Romanomermis culicivorax* 的 18S 核糖体相似度也达到了 88% (图 2)。另一片段序列则与白背飞虱 28S 核糖体 RNA 基因部分序列高度相似, 相似度达 99%, 因此该序列应是白背飞虱 28S 核糖体 RNA 基因的部分序列。

表 4 白背飞虱长、短翅型间的 2 个甲基化差异 DNA 片段
Table 4 Two differentially methylated DNA sequences from long wing and brachypterism of *Sogatella furcifera*

DNA 片断大小/bp	GenBank 登记号	序列比对结果
464	JX514031	与多种动物的 18S 核糖体高度相似
453	JX472454	与白背飞虱 28S 核糖体 RNA 基因高度相似

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Sogatella furcifera Sf-msrda464 genomic sequence	857	857	100%	0.0	100%	JX514031.1
Amphimermis sp. A-2007 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	74%	9e-177	99%	EF617354.1
Amphimermis sp. B-2007 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	551	551	64%	2e-153	99%	EF617355.1
Mermithidae sp. TB-2009 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	477	477	60%	4e-131	97%	FJ605514.1
Nematoda sp. MQ26 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	459	459	60%	1e-125	96%	JQ894731.1
Romanomermis culicivorax 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	388	388	71%	2e-104	88%	DQ418791.1

图 2 长度 464 bp 的序列经 BLAST 比对进行相似性分析的部分截图

Fig. 2 The partial screenshot of similarity analysis of the 464 bp sequence by BLAST

3 讨 论

MS-RDA 是用来检测某些生物样品间的甲基化差异区域片段的一种方法, 特别适用于特异、低丰度基因组 DNA 甲基化的筛查与鉴定, 在哺乳动物和植物研究领域已得到广泛应用。DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要形式, 在哺乳动物和植物上已有大量研究和报道^[2-4], 然而, 在昆虫中关于甲基化的研究较晚, 报道相对较少, 主要集中于这几年^[6], 目前在昆虫上尚未发现应用 MS-RDA 方法的报道。为将 MS-RDA 方法应用于体型较小的昆虫, 本研究对该方法进行了如下改进: 采用试剂盒提取样品 DNA、降低被酶切时基因组 DNA 用量、增加扩增子制备时的 PCR 循环数、将消减杂交降为 2 轮 (具体见前面描述)。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清晰的甲基化差异显示 DNA 片段, 这为将来在其它昆虫有关甲基化研究中应用该方法提供了一定借鉴和指导价值。

本研究成功获得 4 条与白背飞虱雌雄性别相关联的甲基化差异显示片段, 其中有 3 个序列未发现同源性序列, 属于新基因, 它们的具体功能还有待进一步研究。这为今后从 DNA 甲基化的角度研究白背飞虱的性别分化打下了良好的开端。

同时我们还获得了与白背飞虱长短翅型相关联的 2 个基因条带, 1 条与多种动物的 18S 核糖体高度相似, 另一条与白背飞虱 28S 核糖体 RNA 基因序列同源, 据此推测, 白背飞虱的翅型分化可能与核糖体基因的某些位点的甲基化有关。

参考文献:

[1] USHIJIMA T, MORIMURA K, HOSOYA Y, et al. Establishment of methylation-sensitive - representational difference analysis and isolation of hypo-and hypermethyl-

ated genomic fragments in mouse liver tumors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 2284 - 2289.

[2] SCHILLING E, REHLI M. Global, comparative analysis of tissue-specific promoter CpG methylation [J]. Genomics, 2007, 90: 314 - 323.

[3] ZHANG W, JI W, YANG L, et al. Comparison of global DNA methylation profiles in replicative versus premature senescence [J]. Life Sciences, 2008, 83: 475 - 480.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

[7] BONASIO R, ZHANG G, YE C, et al. Genomic Comparison of the Ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator* [J]. Science, 2010, 329: 1068 - 1071.

[8] 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.

[9] PATALANO S, HORE T A, REIK W. Shifting behaviour: epigenetic reprogramming in eusocial insects [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2012, 24: 367 - 373.

[10] 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.

[11] 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.