

# 白背飞虱 DNMT1 基因的结构特点 及在雌雄成虫中的差异表达\*

何静怡, 杨梅, 林佳, 梁安文, 李广宏, 王方海

有害生物控制与资源利用国家重点实验室 / 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275

**摘要:** DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 是基因组 DNA 甲基化关键酶之一, 在生物的生长发育过程中起到重要的调控作用。本研究在白背飞虱 (*Sogatella furcifera*) 转录组测序结果中找到一条带有起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA 的 DNMT1 基因的 cDNA 序列, 全长为 4 524 bp, 编码的蛋白质具有 DNMT1 的典型结构: 位于 N 端的 DNMT 相关蛋白结合结构域, 复制灶靶向序列, 富含半胱氨酸的锌指结构域和聚溴同源结构域, 以及位于 C 端的催化结构域。进一步与白背飞虱全基因组序列进行比对, 发现白背飞虱 DNMT1 基因位于白背飞虱第 3 号染色体上, 全长为 22 567 bp, 含有 18 个外显子和 17 个内含子。该基因主要在白背飞虱腹部表达, 且在雌成虫中的表达量明显高于雄成虫, 达 4.3 倍。本研究将增进对昆虫 DNMTs 的具体结构和生物学功能的认识, 并为探索新的防治稻飞虱的方法或途径提供理论基础。

**关键词:** DNMT1; 白背飞虱 (*Sogatella furcifera*); 开放阅读框; 基因表达

**中图分类号:** Q966 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137 (2022) 02-0076-06

## Structural features of DNMT1 gene and its differential expression between male and female adults of *Sogatella furcifera*

HE Jingyi, YANG Mei, LIN Jia, LIANG Anwen, LI Guanghong, WANG Fanghai

State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology / School of Life Sciences,  
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

**Abstract:** DNA methyltransferase 1 (DNMT1) is one of the key enzymes for genomic DNA methylation and plays an important regulatory role in the growth and development of organisms. We obtained a cDNA sequence of DNMT1 from the transcriptome of *Sogatella furcifera*, and then analyzed its structure. The transcript has an open reading frame of 4 524 bp in length containing an initiation codon ATG and a termination codon TGA. The protein encoded has the typical structure of DMAP binding domain, replication foci targeting sequence, CXXC zinc finger domain and Polybromo homology domain located at the N-terminal and Dcm domain located at the C-terminal. Comparing the sequence with the whole genome sequence of *S. furcifera*, the DNMT1 gene was found locating on chromosome 3 of *S. furcifera*, with a full length of 22 567 bp, containing 18 exons and 17 introns. The gene was mainly expressed in the abdomen of the white-backed planthopper, and the expression level in female adults was significantly higher than that in male adults, up to 4.3 times. This study could enhance the understanding of the specific structure and biological function of insect DNMTs and provide a theoretic-

\* 收稿日期: 2020-11-29

录用日期: 2021-01-19

网络首发日期: 2021-04-23

基金项目: 广州市科技计划项目 (202002030019); 广东省自然科学基金 (2019A1515010091)

作者简介: 何静怡 (1996年生), 女; 研究方向: 昆虫生物化学与分子生物学; E-mail: hejy69@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 王方海 (1965年生), 男; 研究方向: 昆虫生物化学与分子生物学; E-mail: lsswf@mail.sysu.edu.cn

cal basis for the exploration of new methods or pathways for the control of planthopper.

**Key words:** DNMT1; *Sogatella furcifera*; open reading frame; gene expression

水稻是我国重要粮食作物, 而白背飞虱是危害水稻的主要害虫之一。白背飞虱 (*Sogatella furcifera*) 属昆虫纲 (Insecta), 半翅目 (Hemiptera), 飞虱科 (Delphacidae)<sup>[1]</sup>。雄性成虫黑褐色, 雌性成虫黄褐色, 因其前胸背板和中胸背板呈白色而得名<sup>[2]</sup>。白背飞虱生活周期包括卵期、若虫期和成虫期, 成虫有长翅和短翅两种翅型<sup>[3]</sup>。长翅型成虫擅长迁飞, 可以逃避恶劣的环境; 短翅型雌虫多为留居型, 具有较高的繁殖力, 其产卵量是长翅雌虫的2~4倍<sup>[4]</sup>。长、短翅型的比例是预测飞虱危害的重要参数<sup>[5-6]</sup>。

表观遗传是在基因组DNA没有改变的前提下, 通过化学修饰影响基因表达, 从而造成表型变化, 可以稳定遗传给后代。表观遗传参与生物体多种重要的生命活动, 也是生物体应对外界胁迫和环境变化的重要机制<sup>[7]</sup>。DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶 (DNMTs, DNA methyltransferases) 的催化下, 给DNA添加甲基修饰的过程, 是一种重要的表观遗传修饰<sup>[8]</sup>。根据结构和功能的不同可将DNMTs分为DNMT1、DNMT2和DNMT3。DNMT1主要负责在半保留复制中, 以亲代甲基化位点为模板, 催化子链甲基化。虽然传统概念认为DNMT1只有维持甲基化功能, 但近年来研究表明, DNMT1在DNA从头甲基化中同样起着非常重要的作用<sup>[9-10]</sup>。DNMT2主要催化tRNA甲基化, 但不具备催化CpG岛甲基化的特性<sup>[11]</sup>。DNMT3是从头甲基化转移酶, 负责在细胞分裂初期催化未甲基化的DNA生成新的甲基化位点<sup>[12]</sup>。

在昆虫中, 通常都存在DNMT1和DNMT2; 而DNMT3仅在少数昆虫 (如膜翅目昆虫) 中被发现<sup>[12-13]</sup>。

我们研究发现, 飞虱雌性和雄性成虫体内的基因组甲基化式样和水平存在明显差异, 同时发现在不同翅型个体中的基因组甲基化式样和水平也存在明显差异<sup>[14-17]</sup>。而DNMT1是导致基因组甲基化式样和水平发生变化的关键因子之一, 故DNMT1基因在白背飞虱性二型和翅二型分化过程中应发挥着一定的调控作用。

本研究通过建立白背飞虱转录组数据库, 结合已经公开发表的白背飞虱基因组数据库, 利用生物信息学的方法首先重点阐明白背飞虱DNMT1

基因的结构特点, 然后利用荧光定量PCR具体测定了DNMT1基因在雌雄成虫个体中的头、胸、腹等部位的表达。该研究将增进对稻飞虱DNMTs的具体结构和生物学功能的认识, 并为探索新的防治稻飞虱的方法或途径提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白背飞虱采自华南农业大学试验田, 在实验室已连续饲养多代, 饲养条件: 温度(28±2)℃、相对湿度70%、光周期为16h光照: 8h黑暗。选取羽化后24h内的雌雄成虫各10头, 冷冻后用刀片将虫体头、胸、腹3部分分离, 并分别收集头、胸、腹3部分作为待检测样品。

本实验室已测得白背飞虱转录组数据。根据注释, 在转录组数据中找到包含有白背飞虱DNMT1基因的序列片段, 序列号为c88319.graph\_c0, 片段长度为4524bp。GenBank登录号为MW291509。白背飞虱基因组序列来自NCBI的Genome数据库 (ID 18187)。

### 1.2 开放阅读框分析

使用NCBI的ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对白背飞虱DNMT1基因的开放阅读框序列进行分析。

### 1.3 同源序列验证

使用NCBI的在线BLAST工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行白背飞虱DNMT1的同源序列寻找, 并使用DNAMAN软件构建系统发育树, 建树的物种序列信息均来自NCBI。

### 1.4 保守结构域预测

使用NCBI的保守结构域数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对白背飞虱DNMT1基因进行结构预测。

### 1.5 外显子和内含子的分布

将白背飞虱DNMT1基因的开放阅读框与白背飞虱全基因组序列进行比对分析。能比对上的序列是白背飞虱DNMT1基因的外显子, 位于外显子中间的非编码基因序列则是白背飞虱DNMT1基因的内含子。

### 1.6 蛋白质的理化性质分析

在ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>).

html) 上对白背飞虱 DNMT1 蛋白的理化性质进行分析。

### 1.7 蛋白糖基化位点分析

应用 NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 软件分析蛋白 N 型糖基化位点。应用 YinOYang (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) 软件分析蛋白 O 型糖基化位点。

### 1.8 实时荧光定量 PCR

首先用 Trizol (Invitrogen, 美国) 抽提法从白背飞虱各样品中提取总 RNA, 然后按照反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix (TaKaRa, 日本) 的操作说明将得到的总 RNA 反转录合成 cDNA, 接着使用软件 Primer Premier 6.0 设计出 DNMT1 基因的引物为 (F: ACGCCCAAGACGACAAC; R:

CATGACAATGCCGACCAG)。内参基因为 Alpha 1-tubulin (NCBI 登录号为 KP735521), qRT-PCR 实验采用 SYBR green 法, 3 次重复。实验结果使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行处理, SPSS 20.0 软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 白背飞虱 DNMT1 基因的开放阅读框分析

对包含白背飞虱 DNMT1 基因的测序片段 c88319.graph\_c0 进行开放阅读框在线分析。结果表明, 位于序列首端的 ATG 和序列尾端的 TGA 组成了最大的开放阅读框 (图 1)。说明 c88319.graph\_c0 的全长即为白背飞虱 DNMT1 基因的开放阅读框, 长度为 4 524 bp, 编码由 1 507 个氨基酸组成的蛋白质。

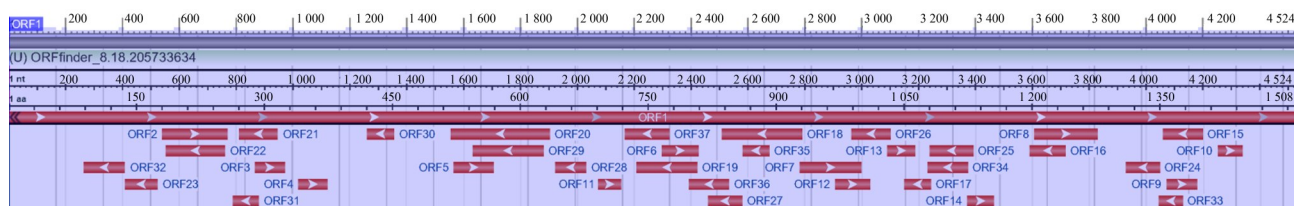


图 1 转录组片段 c88319.graph\_c0 的开放阅读框

Fig. 1 The open reading frame of c88319.graph\_c0

### 2.2 同源序列验证

将白背飞虱 DNMT1 基因的开放阅读框序列通过 NCBI 的在线 BLAST 进行同源序列寻找, 发现该序列与多种生物的 DNMT1 基因高度同源, 和褐飞虱的同源性最大。这进一步验证了我们所获得的白背飞虱 DNMT1 基因的开放阅读框序列是正确的。

利用 NCBI 获取不同昆虫的 DNMT1 蛋白序列 (表 1), 用 DNAMAN 进行同源度分析, 白背飞虱与褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*)、茶翅蝽 (*Halyomorpha halys*)、意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*)、收获蚁 (*Pogonomyrmex barbatus*)、红火蚁 (*Solenopsis invicta*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、丽蝇蛹集金小蜂 (*Nasonia vitripennis*) 的蛋白序列同源度分别为 83.65%、53.02%、50.56%、46.35%、46.12%、42.96%、42.72%、35.67% 和 28.75%。将以上不同物种构建进化树 (图 2), 从图 2 中可以看到 DNMT1 在各种昆虫之间高度保守, 白背飞虱的 DNMT1 和褐飞虱的亲缘关系最近, 并与同为半翅目的茶翅蝽聚为一支, 但与鳞翅目和鞘翅目的亲缘关系则相对较远。

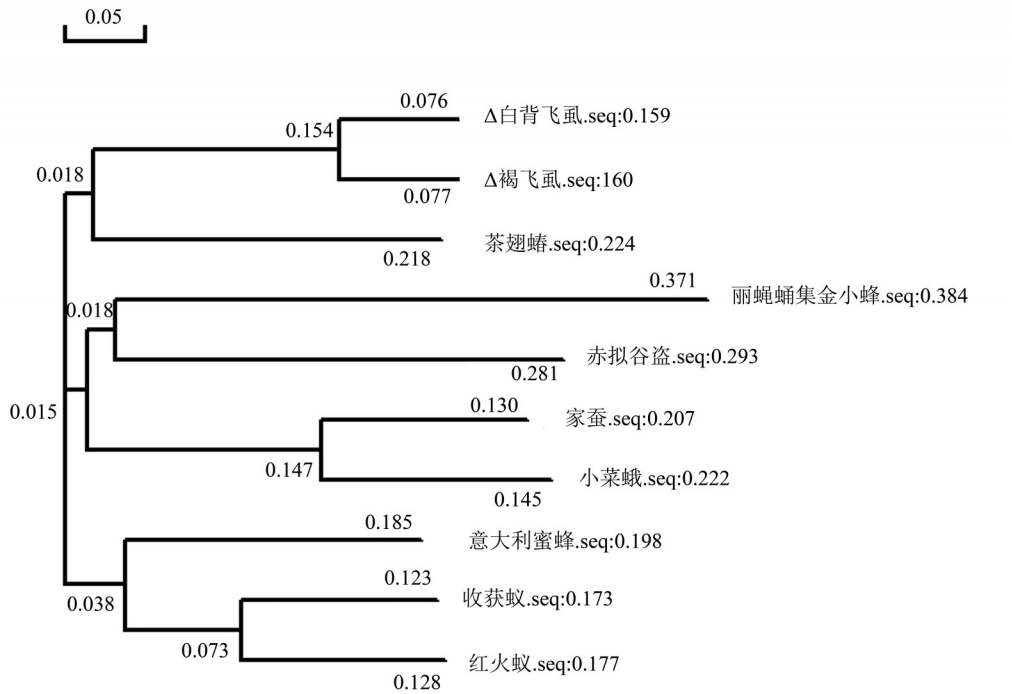
表 1 不同物种 DNMT1 的氨基酸登录号

Table 1 Amino acid accession numbers of DNMT1 in different species

物种	序列号
意大利蜜蜂	XP 006562865.1
家蚕	NP 001036980.1
茶翅蝽	XP 014281484.1
丽蝇蛹集金小蜂	XP 008202943.1
褐飞虱	AHZ 08393.1
小菜蛾	AWI 66421.1
收获蚁	ASM 42030.1
红火蚁	XP 025996916.1
赤拟谷盗	KYB 29654.1

### 2.3 保守结构域分析

使用 NCBI 的保守结构域数据库对白背飞虱 DNMT1 基因进行结构预测。结果如图 3 所示, 白背飞虱 DNMT1 的结构具有典型的 DNMT1 特征, 包括一个 DNMT1 相关蛋白结合结构域 (DMAP binding domain)、一个复制灶靶向序列 (RFTs, replication foci targeting sequence)、一个富含半胱氨酸的锌指结构域 (CXXC zinc finger domain)、聚溴同



白背飞虱 DNMT1 所在位置用 Δ 标识。

图 2 白背飞虱 DNMT1 系统发育树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of DNMT1 of *Sogatella furcifera* and other homologous sequences from insects

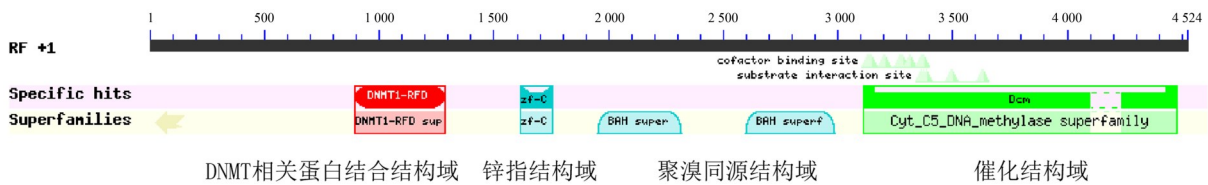


图 3 白背飞虱 DNMT1 的保守结构域

Fig. 3 The conserved domains of DNMT1 gene of *Sogatella furcifera*

源结构域 (PBHD, polybromo homology domain) 和一个催化结构域 (dcm domain)。

### 2.4 外显子和内含子的分布

将白背飞虱 DNMT1 基因的开放阅读框与白背飞虱全基因组序列进行比对分析, 发现白背飞虱 DNMT1 基因位于白背飞虱第 3 号染色体上。白背飞虱 3 号染色体 (CM025292. 1) 全长 67 498 134 bp, 而白背飞虱 DNMT1 基因位于 3 号染色体的第 53 720 184 ~ 53 742 750 bp 处 (图 4), 是断裂基因, 被许多非编码区域序列隔开, 基因全长为 22 567 bp, 含有 18 个外显子 (长度分别为 55、156、140、351、226、123、249、200、141、194、141、465、214、78、92、139、236、1 696 bp) 和 17 个内含子 (长度分别为 73、2833、642、508、631、443、675、805、122、805、1 179、1 608、343、711、2 977、613、2 043 bp)

(图 5)。外显子在图中用阿拉伯数字 1~18 标注, 内含子在图中用大写字母 A~Q 标注。



图 4 DNMT1 基因在白背飞虱 3 号染色体上的位置

Fig. 4 The location of DNMT1 gene on chromosome 3 of *Sogatella furcifera*

### 2.5 白背飞虱 DNMT1 蛋白质的理化性质分析

白背飞虱 DNMT1 蛋白分子式为  $C_{7466}H_{11720}N_{2098}O_{2317}S_{82}$ , 相对分子质量为 170 572. 77, 其中丝氨酸含量最高, 占序列的 7. 8%。蛋白理论

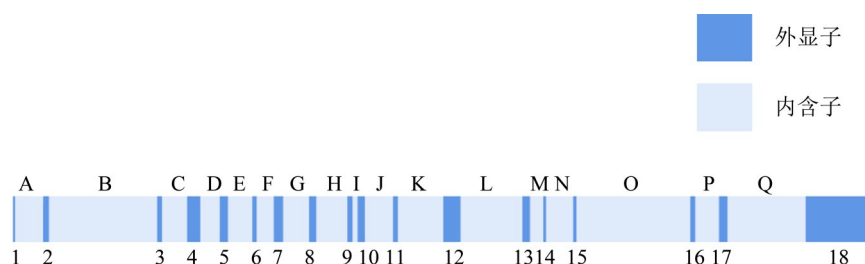


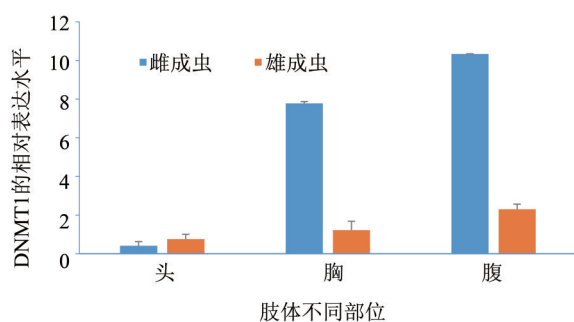
图5 白背飞虱 DNMT1 基因的外显子和内含子分布

Fig. 5 Exons and introns of DNMT1 gene of *Sogatella furcifera*

等电点为 6.15, 属于负电性的酸类有 212 个, 阳性碱类的有 196 个, 所以蛋白基本上可以被认为是酸类蛋白。其网织红细胞存在时间大约几十小时。

### 2.6 DNMT1 在雌雄成虫中的表达

我们分别检测了 DNMT1 在雌雄成虫身体各部位的表达, 发现 DNMT1 主要在腹部表达, 其次胸部、头部表达量很低。同时发现雌虫中的整体表达量明显高于雄虫, 高达 4.3 倍 (图 6)。



数值以平均值±标准误表示( $n=3$ )。

图6 DNMT1 在白背飞虱雌雄成虫中的表达

Fig. 6 DNMT1 expression in male and female adults

## 3 讨论

本文通过白背飞虱转录组数据中找到白背飞虱 DNMT1 的 cDNA 序列, 并通过 NCBI 的 ORF finder 网站对序列进行开放阅读框在线分析, 得到了全长 4 524 bp 的开放阅读框序列, 该序列编码由 1 507 个氨基酸组成的蛋白质, 具有 DNMT1 的典型结构: 位于 N 端的 DNMT 相关蛋白结合结构域, 复

制灶靶向序列, 富含半胱氨酸的锌指结构域, 聚溴同源结构域, 以及位于 C 端的催化结构域。再将开放阅读框序列同白背飞虱全基因组序列进行比对, 发现 DNMT1 基因位于白背飞虱第 3 号染色体上, 长度为 22 567 bp, 含有 18 个外显子和 17 个内含子。这是首次有关白背飞虱 DNMT1 基因结构的详细报道, 为该基因进一步的体外表达和功能研究打下了基础, 有利于探索该酶在稻飞虱生长发育中的具体调控作用, 丰富昆虫 DNA 甲基化现象的研究。

已经观察到昆虫与人类 DNMT1 基因存在 C 端结构保守、N 端结构不同的特点<sup>[18-19]</sup>, 比如家蚕和蜜蜂 DNMT1 缺乏 DMAP1 结合位点、增殖细胞核抗原 (PCNA, proliferating cell nuclear antigen) 结合结构域和核定位序列, 金小蜂 DNMT1c 以及豌豆蚜的 DNMT1a 和 DNMT1b 中缺少锌离子结合域<sup>[12-13]</sup>。我们对于白背飞虱 DNMT1 基因的研究也证明了这一结论, 与人类 DNMT1 相比, 白背飞虱 DNMT1 缺乏 PCNA 结合位点和核定位序列, 说明 DNMT1 在昆虫中的作用模式可能与人类中的作用模式有所不同。

DNMT1 在雌成虫中的整体表达量明显高于雄成虫, 达 4.3 倍, 推测雌成虫的基因组 DNA 甲基化率应该高于雄成虫。而之前的全基因组的 DNA 甲基化分析发现白背飞虱雌成虫的全甲基化率 (fully-methylated ratio) 为 7.64%, 高于雄成虫的 6.88%<sup>[16]</sup>, 与我们的分析结果基本一致。

### 参考文献:

- [1] ALI E, LIAO X, YANG P, et al. Sublethal effects of buprofezin on development and reproduction in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 16913.
- [2] 唐楠. 白背飞虱基因组测序及其受南方水稻黑条矮缩病毒侵染的转录组分析 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2017.
- [3] LIN X D, LAVINE L C. Endocrine regulation of a dispersal polymorphism in winged insects: a short review

- [J]. *Curr Opin in Insect Sci*, 2018, 25: 20–24.
- [4] HU C X, FU X W, WU K M. Seasonal migration of white-backed planthopper *Sogatella furcifera* Horvath (Hemiptera: Delphacidae) over the Bohai Sea in northern China [J]. *J Asia-Pac Entomol*, 2017, 20: 1358–1363.
- [5] 梁安文, 梁梓强, 刘婷婷, 等. 褐飞虱胰岛素酶基因的结构特点研究 [J]. *环境昆虫学报*, 2018, 40(2): 398–402.
- [6] XU H J, XUE J, LU B, et al. Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers [J]. *Nature*, 2015, 519: 464–467.
- [7] 邢艳茹. 褐飞虱 DNMT1 和 N6amt2 的表达和功能分析及甜菜夜蛾 RNA 干扰致死基因的克隆 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [8] BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory [J]. *Genes & Development*, 2002, 16 (1): 6–21.
- [9] 黄滔, 周兴路, 毛曦轲, 等. DNA 甲基化基因 DNMT1 的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(14): 2595–2600.
- [10] ARAND J, SPIELER D, KARIUS T, et al. *In vivo* control of CpG and Non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases [J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8 (6): 1–5.
- [11] LYKO F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19: 81–92.
- [12] 陈玮, 徐雪娇, 陈楠菁, 等. 昆虫 DNA 甲基化的研究进展 [J]. *应用昆虫学报*, 2015, 52(5): 1082–1093.
- [13] 梁士可, 张梅, 梁梓强, 等. 昆虫 DNA 甲基化的特点和功能 [J]. *昆虫学报*, 2014, 57(12): 1439–1446.
- [14] 周晓穗, 陈佳林, 张梅, 等. MS-RDA 的改进及在白背飞虱的应用研究 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2013, 52(5): 118–122.
- [15] ZHOU X S, CHEN J L, ZHANG M, et al. Differential DNA methylation between two wing phenotypes adults of *Sogatella furcifera* [J]. *Genesis*, 2013, 51 (12): 819–826.
- [16] ZHANG M, CHEN J L, ZHOU X S, et al. Different genomic DNA methylation patterns between male and female adults of white-backed planthoppers *Sogatella furcifera* [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2014, 17(4): 917–921.
- [17] 张梅, 陈佳林, 周晓穗, 等. MSAP 在水稻害虫白背飞虱中的应用研究 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2015, 54(1): 98–102.
- [18] MITSUDOME T, MON H, XU J, et al. Biochemical characterization of maintenance DNA methyltransferase DNMT-1 from silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2015, 58: 55–65.
- [19] GLASTAD K M, HUNT B G, YI S V, et al. DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era [J]. *Insect Molecular Biology*, 2011, 20 (5): 553–565.

(责任编辑 张冰)