

小菜蛾 *NanosO* 基因启动子的克隆及功能验证

王亚军^{1,2,3}, 黄宇萍^{1,2,3}, 于慧慧^{1,2,3}, 徐雪娇^{1,2,3},
杨 广^{1,2,3}, 艾倩倩^{1,2,3}, 尤民生^{1,2,3,*}

(1. 福建农林大学生命科学学院, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002; 2. 福建农林大学应用生态研究所, 福州 350002; 3. 福建农林大学, 教育部害虫生态防控国际合作联合实验室, 福州 350002)

摘要: 【目的】克隆小菜蛾 *Plutella xylostella* *NanosO* 基因 *PxnosO* 启动子, 并验证其具有生殖腺特异性活性, 以期应用于基因功能研究或转基因昆虫的构建, 为小菜蛾等农业害虫的综合治理提供新的研究思路。【方法】根据小菜蛾基因组序列信息, 利用 PCR 技术克隆 *NanosO* 的启动子并进行序列分析。构建 *PxnosO*-EGFP 表达质粒, 利用脂质体细胞转染技术将 *PxnosO*-EGFP 和 IE1-EGFP 表达质粒转入到小菜蛾胚胎细胞系 (Px-6) 和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞系 (Sf9) 中, 通过激光共聚焦荧光显微镜观察和 qRT-PCR 技术分别定性和定量分析 EGFP 基因的表达, 验证小菜蛾 *NanosO* 启动子的活性。【结果】克隆获得小菜蛾 *PxnosO* (Px004767) 启动子区序列, 长 1 743 bp。对启动子序列进行分析, 发现该序列不仅包含启动子共有核心元件 TATA box 以及上游启动子成分 CAAT box 和 GC box 等, 还包含有数十个转录因子结合位点。利用细胞转染技术, 在 *PxnosO* 启动子驱动下成功地在 Px-6 和 Sf9 细胞系中表达外源基因 EGFP。【结论】克隆了小菜蛾 *NanosO* 基因 *PxnosO* 启动子, 在细胞水平上验证其能驱动外源 EGFP 基因的表达, 为分析 *PxnosO* 在小菜蛾不同发育时期的表达模式和 *PxnosO* 启动子在体内的功能验证奠定基础。

关键词: 小菜蛾; *NanosO*; 生殖腺特异性启动子; 表达质粒; 细胞转染

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)12-1376-08

Cloning and functional characterization of the *NanosO* gene promoter in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Noctuidae)

WANG Ya-Jun^{1,2,3}, HUANG Yu-Ping^{1,2,3}, YU Hui-Hui^{1,2,3}, XU Xue-Jiao^{1,2,3}, YANG Guang^{1,2,3}, AI Qian-Qian^{1,2,3}, YOU Min-Sheng^{1,2,3,*} (1. State Key Laboratory for Ecological Pest Control of Fujian/Taiwan Crops, College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Joint International Research Laboratory of Ecological Pest Control, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: 【Aim】To clone the *NanosO* gene (*PxnosO*) promoter from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and to verify its gonad-specific activity, so as to further study the gene functions and develop transgenic insects for integrated management of *P. xylostella* and other agricultural pests. 【Methods】According to the sequence information of *NanosO* gene in the *P. xylostella* genome, the *NanosO* gene promoter was cloned by PCR and subjected to sequence analysis. The *PxnosO*-EGFP expression plasmid was constructed, and then the *PxnosO*-EGFP and IE1-EGFP expression plasmids were transfected into *P. xylostella* embryonic cell line (Px-6) and *Spodoptera frugiperda* ovary cell line (Sf9) by lipofection. The

基金项目: 国家自然科学基金项目(31320103922, 31230061)

作者简介: 王亚军, 男, 1989年5月生, 安徽亳州人, 硕士研究生, 研究方向为小菜蛾基因组学, E-mail: 1055498572@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: msyou@iae.fjau.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-08-04; 接受日期 Accepted: 2018-10-29

activity of the *NanosO* promoter in *P. xylostella* was confirmed by the qualitative and quantitative analysis of *EGFP* expression by laser confocal fluorescence observation and qRT-PCR, respectively. 【Results】 We cloned the *PxnosO* (*Px004767*) promoter (with the length of 1 743 bp) of *P. xylostella*. Sequence analysis showed that this promoter not only contains common core promoter elements like TATA box, and upstream promoter domains TATA box and GC box, but also contains dozens of transcription factor binding sites. Using cell transfection technology, we successfully expressed exogenous gene *EGFP* driven by this promoter in the Px-6 and Sf9 cell lines. 【Conclusion】 We cloned the *PxnosO* promoter of *P. xylostella* and verified that it can drive the expression of *EGFP* gene at the cellular level. This study provides a foundation for analyzing the expression pattern of *PxnosO* in different developmental stages of *P. xylostella* and the potential functions of the *PxnosO* promoter *in vivo*.

Key words: *Plutella xylostella*; *NanosO*; gonad-specific promoter; expression plasmid; cell transfection

NanosO 作为 *Nanos* 锌指蛋白转录因子中的一种,对昆虫生殖细胞的发育起到了重要的调控作用,同时也会影响生殖细胞的自我更新以及体细胞的分化(Ali *et al.*, 2010)。在发育生物学中,个体形态的形成以及性腺的形成是两个非常重要的过程。有许多基因在这些过程中起着非常关键的作用,它们相互作用调控着整个发育过程,其中 *Vasa* 和 *Nanos* 就是非常重要的两个基因(Extavour *et al.*, 2005; Dearden, 2006; Zhao *et al.*, 2008; Kranz *et al.*, 2010)。通过分析影响果蝇生殖细胞的自我更新和分化的因子,研究结果显示,*Nanos* 在果蝇的生殖腺中特异表达,能够抑制生殖细胞的分化(Murata and Wharton, 1995; Miles *et al.*, 2014)。在果蝇的卵母细胞和胚胎中,*Nanos* 只在生殖质中翻译,其蛋白最后整合到极细胞中,即果蝇的原始生殖细胞的前体(Wang *et al.*, 1994)。*Nanos* 缺陷型果蝇,其原始生殖细胞不能形成性腺,生殖细胞过早成熟,有异常的形态(Forbes and Lehmann, 1998; Deshpande *et al.*, 1999)。与果蝇相似,缺乏 *Nanos* 功能的线虫,其原始生殖细胞大部分会死亡(Kraemer *et al.*, 1999)。*Nanos* 相关基因在水蛭 *Helobdella robusta*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、蝗虫 *Schistocerca gregaria* 以及人 *Homo sapiens* 等物种中也有发现,其功能也都与生殖细胞或个体发育的成型相关(Kraemer *et al.*, 1999; Jaruzelska *et al.*, 2003; Calvo *et al.*, 2005; Agee *et al.*, 2006; D'Agostino *et al.*, 2006)。

Nanos 是最先在果蝇生殖颗粒中被鉴定出来的一个母源效应组分,它编码一种锌指结构蛋白,蛋白的 C 端含有两个典型的由 CCHC 组成的锌指结构。此蛋白可以特异性地结合 RNA,在昆虫胚胎的后部区域的特殊分化中起重要作用(Wang and Lehmann,

1991; Calvo *et al.*, 2005)。*Nanos* 蛋白在早期胚胎中有两个功能:第一,*Nanos* 蛋白与 RNA 结合蛋白 pumilio 一起抑制母源 mRNA *hunchback* 的翻译,这一功能在胚胎后腹部细胞的特异性分化过程中起着至关重要的作用(Hülskamp *et al.*, 1989; Irish *et al.*, 1989);第二,*Nanos* 蛋白对原始生殖细胞的发育是必不可少的,母源 *Nanos* 蛋白的缺失导致原始生殖细胞不能正常移动到性腺,从而产生无功能的生殖细胞(Kobayashi *et al.*, 1996; Forbes and Lehmann, 1998)。

在基因工程研究中,经常需要构建能够高表达外源蛋白的载体(Sunilkumar *et al.*, 2002),近年来,在小鼠和果蝇等一些研究中陆续报道了利用 *Nanos* 启动子来优化基因编辑的方法(Nakao *et al.*, 2008)。例如,Nakao 等(2008)在家蚕中分别克隆了 4 个 *Nanos* 同源基因,即 *NanosO*, *NanosP*, *NanosM* 和 *NanosN*,其中 *NanosO* 和 *NanosP* 能在生殖腺中特异表达,*NanosM* 和 *NanosN* 在家蚕大部分组织中均有表达;陈容梅(2016)首次开发和利用家蚕 *NosP* 启动子,利用细胞转染和转基因技术分别在家蚕细胞系和活体中表达外源基因,成功实现了外源基因在生殖腺中特异表达。

目前,有关小菜蛾 *Plutella xylostella* 生殖细胞发育相关基因及其启动子的研究则相对较少,生殖腺特异性启动子在小菜蛾中的研究应用也还未有相关报道。而生殖腺特异的启动子对应用昆虫不育技术(sterile insect technology, SIT)等进行害虫防治方面具有巨大潜能。为了突破传统的转基因小菜蛾遗传稳定性不高、生殖腺特异性启动子缺乏的障碍以及在小菜蛾防控方面寻求突破,寻找一种高效稳定的特异性启动子,我们克隆了小菜蛾 *NanosO* 基因 *PxnosO* 启动子序列,将其构建成为绿色荧光蛋白 *EGFP* 基因

为报告基因的转基因表达质粒,随后通过细胞转染验证 *PxnosO* 启动子驱动表达活性。通过 EGFP 的表达特征可为 *PxnosO* 在小菜蛾生殖细胞发育的调控提供参考,并最终为基于基因组编辑、功能基因组研究以及害虫防治等提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 细胞系及培养

实验所用细胞系为小菜蛾胚胎细胞系 (Px-6) (Ma *et al.*, 2017) 与草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞系 (Sf9), 小菜蛾胚胎细胞系为本实验室自有(福建农林大学应用生态研究所),草地贪夜蛾卵巢细胞系购买于美国 Thermo Fisher 公司。细胞在 25 cm² 培养瓶中培养,以 Grace's 昆虫细胞培养基单层贴壁培养。Grace's 昆虫细胞培养基中包含水解乳蛋白、酵母自溶液以及 10% 的胎牛血清(FBS), FBS 经 57℃ 灭活 30 min。细胞置于恒温培养箱中 27℃ 培养,细胞长至 35 000 ~ 40 000 cells/cm² 密度时进行传代培养,一般 2 ~ 3 d 传代一次。

1.2 小菜蛾基因组 DNA 的提取

取化蛹第 2 天的小菜蛾蛹,利用试剂盒 (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN) 提取小菜蛾基因组 DNA,具体步骤参照试剂盒说明书。

1.3 小菜蛾内源性 *NanosO* 启动子的鉴定及克隆

以家蚕 *NanosO* (GenBank 登录号: NM_001099844) 作为 query,在小菜蛾基因组中进行全基因组比对,获得小菜蛾中与 *NanosO* 同源的基因。根据该同源基因起始密码子上游 2 000 bp 序列,设计扩增引物,上游引物: 5'-TAGTGACGTCTCCTGGAGTG-3'; 下游引物: 5'-TTTGTAAAAAGTTAAAA TAAACAATGCAATCG-3'。以小菜蛾基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 采用 Vazyme 的 Phanta 高保真 DNA 聚合酶进行扩增,反应条件: 95℃ 3 min; 95℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min; 12℃ 保持。胶回收 PCR 扩增产物,并将其连接克隆载体 pJET1.2 (Fermentas, 美国)。将获得的阳性克隆送测序(伯尚,福州),测序得到的序列与小菜蛾基因组数据库中的序列进行比对,分析序列特征。

1.4 小菜蛾 *PxnosO* 启动子表达载体的构建

在质粒 *PXL-HR5-IE1-EGFP-SV40* (福建农林大学应用生态研究所) 的基础上,将 *IE1* 启动子替换为

PxnosO 启动子构建 *PxnosO-EGFP* 表达质粒 *PXL-HR5-PxnosO-EGFP-SV40*。选择限制性内切酶 *Bgl* II 与 *Not* I 进行酶切连接构建目标载体。将 *Bgl* II 与 *Not* I 分别引入到上下游引物中,上游引物: 5'-GAAGATCTTACTGACGTCTCCTGGAG-3'; 下游引物: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTTGTAAAAAGTTAAAA TAAA-3'。以 1.3 节测序正确的克隆载体质粒为模板进行 PCR 扩增,PCR 采用 Vazyme 的 Phanta 高保真 DNA 聚合酶进行扩增,反应条件: 95℃ 3 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min; 12℃ 保持。将 PCR 产物用 *Bgl* II 与 *Not* I 进行双酶切,将获得的 *PxnosO* 序列的胶回收 PCR 产物与同样用 *Bgl* II 与 *Not* I 进行双酶切的 *PXL-HR5-IE1-EGFP-SV40* 质粒的胶回收产物用 T4 连接酶 22℃ 连接 1 h, 构建表达质粒 *PXL-HR5-PxnosO-EGFP-SV40*。取连接产物转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆并测序。将测序验证后的阳性菌株 37℃ 过夜扩培,纯化表达质粒, -20℃ 储存备用。

1.5 细胞转染

将构建好的小菜蛾 *PxnosO* 启动子的表达质粒分别转染 Px-6 和 Sf9 细胞,采用转染试剂 Effectene Transfection Reagent (QIAGEN) 进行细胞转染,转染步骤参考试剂盒说明书。设 IE1-EGFP 表达质粒 (*PXL-HR5-IE1-EGFP-SV40*) 为阳性对照,将构建好的 *PxnosO-EGFP* 与 IE1-EGFP 表达质粒分别转染 Px-6 和 Sf9 细胞,观察转染 48 和 72 h 后,观察细胞内绿色荧光蛋白表达情况并拍照记录。

1.6 荧光定量 PCR 分析 *PxnosO* 启动子活性

使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, 德国) 试剂盒将 1.5 节转染 72 h 后的细胞提取总 RNA。根据绿色荧光蛋白 EGFP 报告基因的 cDNA 序列为模板,使用 Primer Premier 5 软件设计 qPCR 引物,上游引物: 5'-ACACCCTGGTGAACCGCATC-3'; 下游引物: 5'-AGTTCACCTTGATGCCGTTTC-3'。以 RPL32 基因为内参基因,上游引物: 5'-CAATCAGGCCAATTTA CCGC-3'; 下游引物: 5'-CTGGGTTTACGCCAGTTA CG-3'。将合成的 cDNA 产物用 Nuclease-free Water 稀释成 4 个不同浓度的 cDNA 模板(稀释 5, 10, 20 和 40 倍),使用试剂盒 SYBR Green Master Mix (Promega, 美国) 配好混合液后进行 qPCR,绘制标准曲线,计算扩增效率。将合成的 cDNA 产物用 Nuclease-free Water 稀释 5 倍,作为 qPCR 的模板,所用试剂盒为 SYBR Green Master Mix (Promega, 美

国)。qPCR 的过程在 C1000 Touch™ Thermal Cycler and CFX96 Real-Time PCR Systems (Thermo, 美国) 上进行, 反应条件: 95℃ 3 min; 95℃ 20 s, 58℃ 35 s, 44 个循环; 65℃ 15 s, 95℃ 15 s; 3 次重复。数据间的差异显著性均采用 SPSS21.0 软件进行分析, 两组数据间的对比采用独立样本 *t* 检验, 多组数据间则采用单因素方差分析方法。将所测数据用 Graphpad Prism5 软件作图。

2 结果

2.1 小菜蛾 *PxnosO* 启动子的克隆与序列特征

利用家蚕 *NanosO* 基因在小菜蛾基因组中进行全基因组扫描, 得到小菜蛾内 *NanosO* 同源基因。取该基因起始密码子上游约 2 000 bp 作为启动子区, 特异性引物扩增获得启动子区的单一条带, 约 1 800 bp (图 1)。将获得的条带进行测序, 得到

长度为 1 743 bp 的 *PxnosO* (*Px004767*) 启动子区序列 (图 2)。

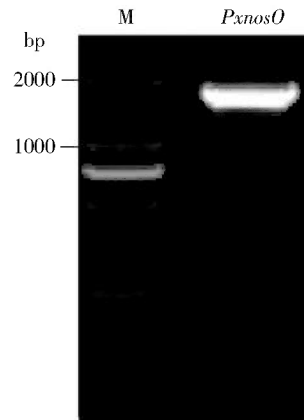


图 1 小菜蛾 *NanosO* 启动子序列 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of the promoter sequence of *NanosO* from *Plutella xylostella*

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; *PxnosO*: *NanosO* 启动子序列 PCR 产物 PCR product of the *NanosO* promoter sequence.

```

1      TAGTGACGTC TCCTGGAGTG AGGTAACACT TGAFTCTTCC TCGTGGCGCA CACCCGCGCC
61     AGTCAAAGAC TGATGCTAGT CTC AATGGCC AATCCTTAGG CCGCGGTGAC AAACCTATT
121    CTACTACCTA CTACCTAGTC AGGCTTACT CTAGTTGTAC TTTGGATTTT TAAAAGCTGT
181    AAGGCTTAGT ATACCTAAAC ACAGCTGGAG ATAATAATAT GTCCGTTTTC CATACTGATA
241    ATGGAATAA CTTTCATTTA AAACATGAC AATGGTCTAA GCAAATAAAA ATAAATGCTT
301    GACCTTACAA GAACAGATTT TGAAATTCG TTTAGTGCCA CCTAGTGCTA TTTAGTTGAA
361    CTATGTAAGT AGCAAACAC ACTACGGAAG TAAATTACGT GCATTGGCAT ATTTGGCACA
421    AAGTAGATGA ATAGGAAACT AAGTAATTTA ACGTAAGCCC GATAGATGGC AGTAAATACA
481    TTTTCAGGTT GGCATGGTAA ATTATTTCAA CTCATTCAAT ATGTGCAGAT TTTTAAACAA
541    TTTCTGCAAA CCAACAAACG AATTACATGT ATTTTGGAA TAAAGGATTT TTTGTCACTT
601    TTATTTGAAA CCATTTTCAC ACAACTATAC AATACCTATT TGCCTTATCC GTCCTAGGTT
661    GCCCTAGGTA GGTTAGGTAA GTACCTACTT AGTTATTTAG TTAGGTACTT ACACCTCGAT
721    CGTTTTTTTA CACTGAGACT GGTAAGTTGG TAACCGACTG TTTCAAATAA TTTTATGAAA
781    CTTTTTTTAA CTTTCAATAA CTACCTAGGT AAGTACTTAC CAACCTACTT GATTTTCGTTG
841    ACCTCAAAAAC TCCATTCAAC TCATTGATCA CAACGAGTTT TAAGTATTCC TCAAGTAGTT
901    AAAAACTCAA GCACTTAGAG GCCCTCACAA AGTTACTCCA CCATGGTGGC AACTGCCAAC
961    TGCCACCCAA CCACCCAAACA ATAAACAACA TAATTATTAT ACTCGACTTC ACTCGAGTTC
1021   ATCGAGCATA GTTGGTCTAA GTACCTACCT ATGTAGGTAG GATGTAAAAA ACTAACAGTA
1081   TGGAGTTAAC TTAATCCTCA AACTACAAAT AAATACATCT ACTTACAGAT ACTTGTTTGAT
1141   TAAGTATGTA GGTAGGTACT TAGTAAGCTA ACTAATATTA TTCGATCAGA TTACGATTTT
1201   AATTGGAACT CTTTGTTTAT GCCGGCTGGC GGCGGCGGCT GGTGTGGGCG CAGCGGCATC
1261   CATGAGATTA TGATACCTTA CATTACCTAT TGATATCCGA GTCTGAATTA TTAGTGTCAA
1321   ACAAAAATAT CAATGCAAAA GCACCGACTC AGCATTTAAT ATAATAAAAT TAACTAATTA
1381   CCCCAGGCCA CAGTGTTAGT TATTCCTATA ACCTACTCAT TTAATTATT TCTAACTAAC
1441   TATGTAGTAC TATGTAGTCT ATGTGTATGT ACCCTAAGTT TAGGTTCCGT TGATTAGATT
1501   TCGTTCGTCC AAGTTGATGT TGTTTTTGTA ACAACATTAT TGCCCTTTCT TTGCCGCTCG
1561   GCCCGGCTCT GATTTCAATT GTCGAAATTT CAACTAGAG ATTACGCTGT CCCATCGCCG
1621   GCCAATGAGC GAAAAGCATT CTCATTTCAA ATCCTGGCA GGGTGAGACC GTTCTGCTGT
1681   TCTAAATTTT TTATTAAAAA AAATCATCGA TCGATTGCAT TGTTTATTTT AACTTTTTAC
1741   AAA

```

图 2 小菜蛾 *PxnosO* 启动子序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of the *PxnosO* promoter of *Plutella xylostella*

蓝色框内序列表示 TATA box, 绿色框内序列表示 CAAT box, 红色框内序列表示 GC box。The blue box represents the TATA box, the green box represents the CAAT box, and the red box represents the GC box.

PxnosO 位于基因组 scaffold 181:第 439511 - 442895 位,在起始密码子 5' 端左侧克隆得到了 1 743 bp 的启动子序列,对测序获得的启动子序列进行分析,发现该序列不仅包含启动子共有核心元件 TATA box(-52 ~ -44),以及上游启动子成分 CAAT box(-123 ~ -118),GC box(-498 ~ -493) 等;还包含有数十个转录因子结合位点,如 SRY, HNF, NFY, AR, GAGA 等,调控基因的转录。SRY 基因是一种性别决定基因,在睾丸组织中高表达,而在卵巢中几乎不表达,具有表达的组织特异性;同时也是一种转录因子,活化后从细胞质转到细胞核,与靶基因 DNA 结合使 DNA 松散、弯曲,拉近调节序列与启动子之间的距离,从而调节基因的表达,通过对其他基因的表达的调节而对睾丸分化起着开关控制作用。AR 基因是雄激素受体、性别分化相关基因之一,决定着靶器官是否对雄激素产生反应,从而再影响其他转录因子调节靶基因的转录(蔡珍, 2011)。SRY 基因和 AR 基因缺失可能导致性别分化相关疾病,如性别转换、性别假象等。所以, SRY 和 AR 转录因子结合位点可能与 *NanosO* 启动子是生殖腺特异性启动子有关。

2.2 *PxnosO*-EGFP 表达质粒

基础质粒 *PXL-HR5-IE1-EGFP-SV40* 与 *PxnosO*



图 4 EGFP 表达质粒的结构示意图

Fig. 4 The diagram of EGFP expression plasmid

A: *PxnosO*-EGFP 表达质粒 *PxnosO*-EGFP expression plasmid; B: *IE1*-EGFP 表达质粒 *IE1*-EGFP expression plasmid.

2.3 细胞内验证小菜蛾 *PxnosO* 启动子的活性

将构建好的 *PxnosO*-EGFP 表达质粒(图 4: A) 和 *IE1*-EGFP 表达质粒(图 4: B) 分别转染 Px-6 和 Sf9 细胞。转染后 48 h, 可见 *PxnosO* 启动子在 Px-6 和 Sf9 细胞中均可以一定程度驱动 EGFP 的表达, 依稀可见绿色荧光表达的细胞, 但其驱动蛋白表达的效率较 *IE1* 启动子弱; 转染后 72 h, EGFP 在两种细胞中的表达都有所增强, 在 Px-6 细胞中, *PxnosO* 启动子的驱动效率较 *IE1* 启动子弱。而在 Sf9 细胞中, *PxnosO*-EGFP 在 Sf9 细胞中的转染效率较 Px-6 细胞中强, 这与阳性对照 *IE1*-EGFP 的结果相一致, 是细胞的转染效率差异导致了荧光细胞数量的差异(图 5)。

将转染 72 h 后的 Px-6 和 Sf9 细胞提取总 RNA

胶回收 PCR 产物分别用 *Bgl* II 和 *Not* I 进行双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明目的条带酶切完全(图 3)。将回收的载体序列与启动子序列连接, 测序确认所获得的重组质粒, 小菜蛾 *PxnosO* 启动子替代质粒中原始的 *IE1* 启动子, 最终获得 *PxnosO*-EGFP 表达质粒(图 4)。

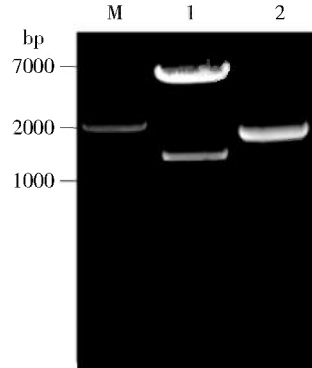


图 3 *PXL-HR5-IE1-EGFP-SV40* 表达质粒和 *PxnosO* PCR 产物的 *Bgl* II/*Not* I 双酶切鉴定

Fig. 3 Restriction digestion of *PXL-HR5-IE1-EGFP-SV40* expression plasmid and PCR products of *PxnosO* with *Bgl* II/*Not* I

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1: 质粒酶切产物 Restriction digestion product of plasmid; 2: *PxnosO* 启动子 *PxnosO* promoter.

并反转录, 通过 qRT-PCR 来定量分析两种启动子在 Px-6 和 Sf9 细胞中的活性, 并比较其差异性(图 6)。结果显示 *PxnosO* 启动子在 Px-6 和 Sf9 细胞中表达活性无显著性差异, 但在 Px-6 细胞中其活性较 *IE1* 启动子低。*IE1* 启动子在小菜蛾胚胎细胞中的表达活性较在 Sf9 细胞更强。

实验结果表明, *PxnosO* 启动子可以驱动 EGFP 基因的表达, 具有转录活性。*PxnosO* 启动子可以驱动外源基因 *EGFP* 在 Px-6 和 Sf9 细胞中的表达, 其在 Px-6 细胞中的活性较 *IE1* 启动子低。

3 讨论

Nanos 是一种重要的 RNA 结合蛋白, 它在生殖

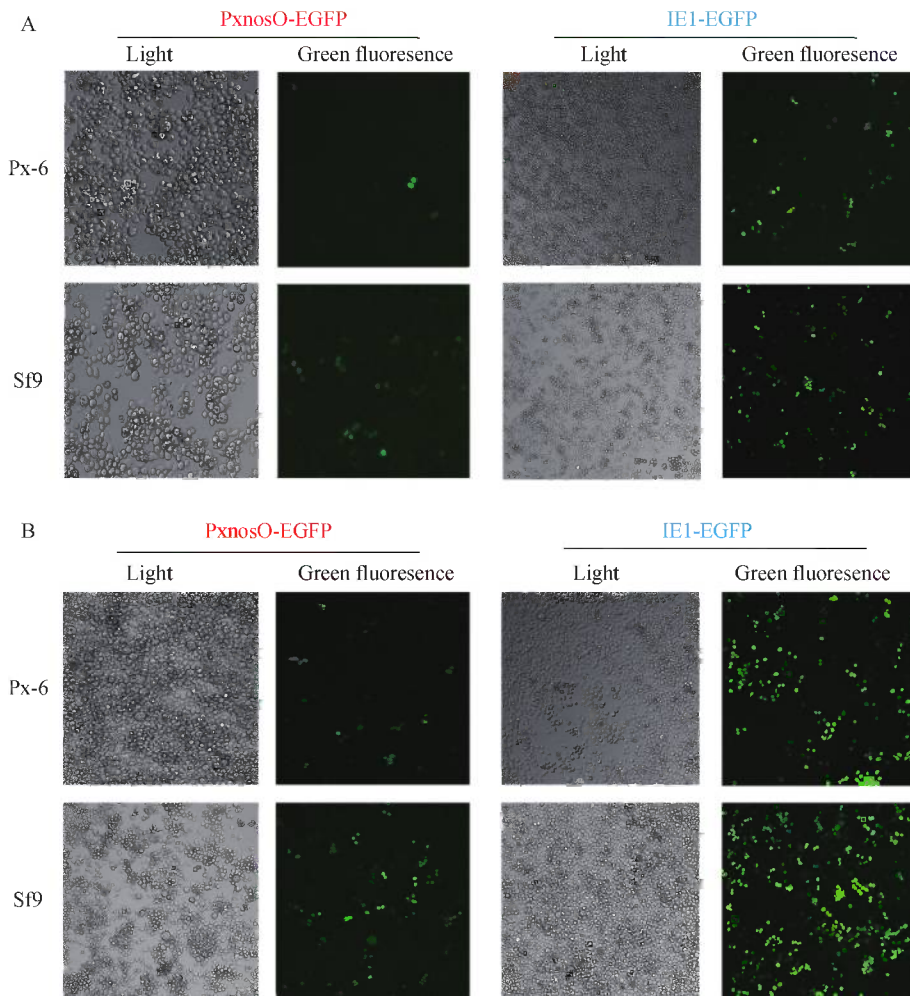


图5 *PxnosO* 启动子驱动 EGFP 基因在细胞中的瞬时表达

Fig. 5 Transient expression of EGFP gene driven by the *PxnosO* promoter in cells

A, B: 分别是转染小菜蛾胚胎细胞系(Px-6)和草地贪夜蛾卵巢细胞系(Sf9) 48 和 72 h EGFP 瞬时表达图, 照片曝光时间为 180 ms (Transient expression of EGFP in the transfected *Plutella xylostella* embryonic cell line (Px-6) and *Spodoptera frugiperda* ovary cell line (Sf9) at 48 and 72 h, respectively. The photo exposure time is 180 ms). Light: 明场条件成像 Bright field image; Green fluorescence: 绿色荧光条件下成像 Green fluorescence image.

干细胞的自我更新方面具有非常重要的作用。*Nanos* 在比如鳞翅目和双翅目(Nirmala *et al.*, 2011) 等很多昆虫中都很保守。*Nanos* 功能的缺失可能会导致机体出现一些异常现象(And and Wessel, 2014), 如生殖细胞迁移异常, 细胞周期与发育缺陷, 更严重可能会导致生殖腺无法形成正常功能的生殖细胞。*NanosO* 在家蚕等鳞翅目昆虫中的表达模式显示该基因具时空表达特异性, 仅在生殖腺中特异性表达(Nakao *et al.*, 2008)。

本研究克隆并分析了 *PxnosO* 启动子的序列特征, 通过驱动外源标记基因 *EGFP* 的表达, 在细胞内验证该启动子的转录活性。该启动子可以在 Px-6 和 Sf9 细胞中驱动 *EGFP* 基因的表达, 其在小菜蛾胚胎细胞 Px-6 中表达活性较 *IE1* 启动子低。基于

转录组数据库, *NanosO* 基因在卵期相对低表达, 且由于 *NanosO* 启动子是生殖腺特异性启动子, 具有驱动表达时空特异性, 这可能是其在小菜蛾胚胎细胞中活性相对于 *IE1* 启动子弱; 此外, 本实验并未对此段 *NanosO* 启动子序列转录调控核心区进行定位, 其启动子序列过长可能导致其活性降低; 再者, 本实验克隆的 *PxnosO* 启动子序列过长可能导致细胞转染效率的差异, 进而导致通过 qRT-PCR 定量分析来呈现两种启动子活性差异的不准确性。因此, 对 *NanosO* 启动子转录调控核心区进行定位, 并进行筛选验证可能提高其活性。

实验结果为分析 *PxnosO* 在小菜蛾不同发育时期的表达模式和 *PxnosO* 启动子在体内的功能验证奠定基础, 结合转录组数据的结果, 我们可以进一步

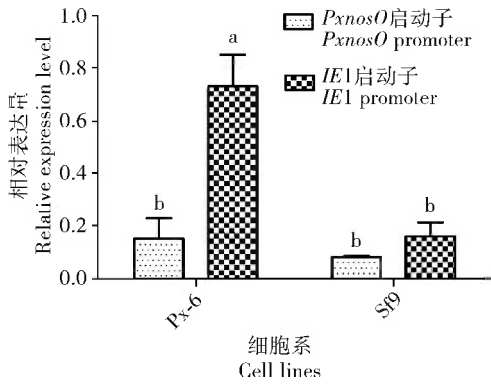


图6 不同启动子驱动下EGFP基因在细胞中相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of EGFP gene driven by different promoters in cells

Px-6: 小菜蛾胚胎细胞系 *Plutella xylostella* embryonic cell line; Sf9: 草地贪夜蛾卵巢细胞系 *Spodoptera frugiperda* ovary cell line. 图中数据为平均值 \pm 标准误, 不同细胞中的基因表达量以小菜蛾胚胎细胞 (Px-6) 中的 IE1 启动子驱动下 EGFP 基因的表达量为基准。不同小写字母表示数据经单因素方差分析后, 利用 Tukey 氏多重比较检验在 0.05 水平下存在显著差异 (ANOVA, $n = 3$, $P < 0.05$)。Data in the figure are mean \pm SE. The relative expression level of EGFP gene in different cells are normalized to that in *P. xylostella* embryonic cells (Px-6) driven by IE1 promoter. Different lowercase letters above bars indicate that the data were significantly different at the 0.05 level after Tukey's multiple comparison analysis (ANOVA, $n = 3$, $P < 0.05$).

分析 *PxnosO* 在小菜蛾不同组织的表达模式, 明确基因的时空表达特异性, 此外可利用该启动子构建转基因小菜蛾, 分析启动子的效率及表达模式。

生殖腺特异性启动子如 *NanosO* 启动子可以替代全身性表达的 IE1 启动子, 避免无时空表达差异的广谱表达型启动子驱动外源基因的表达对生物体本身的影响。*NanosO* 启动子可替换 IE1 启动子, 以减少外源基因持续性表达对昆虫自身的生长发育繁殖等方面的影响 (Zuo and Chua, 2000), 以及提高转基因昆虫的遗传稳定性 (Fraser, 2012)。

总之, 我们克隆了小菜蛾生殖腺特异性表达的 *PxnosO* 启动子, 在细胞水平上验证其能驱动外源基因的表达。今后我们将继续分析 *PxnosO* 在不同发育时期的表达模式, 以及其性别特异性的表达模式, 验证 *PxnosO* 启动子在体内的转录活性, 最终将其应用于基因功能研究或转基因昆虫的构建, 为小菜蛾等农业害虫的防治提供新的研究思路。

参考文献 (References)

- Agee SJ, Lyons DC, Weisblat DA, 2006. Maternal expression of a NANOS homolog is required for early development of the leech *Helobdella robusta*. *Dev. Biol.*, 298(1): 1–11.
- Ali I, Ur RM, Rashid F, Khan S, Iqbal A, Laixin X, Ud DAN, Swati AZ, 2010. Cis-regulatory elements affecting the *Nanos* gene promoter in the germline stem cells. *J. Biotechnol.*, 145(4): 323–329.
- And NO, Wessel GM, 2014. Every which way-nanos gene regulation in echinoderms. *Genesis*, 52(3): 279–286.
- Cai Z, 2011. Study on the Relationship between SRY, AR, RSP01 Gene and Disorders of Sexual Development. MSc Thesis, Shantou University, Shantou, Guangdong. [蔡珍, 2011. SRY, AR, RSP01 基因与性分化异常的相关研究. 广东汕头: 汕头大学硕士学位论文]
- Calvo E, Walter M, Adelman ZN, Jimenez A, Onal S, Marinotti O, James AA, 2005. Nanos (nos) genes of the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol.*, 35(7): 789–798.
- Chen RM, 2016. The Functional Research of Germ Cell Specific Promoter *Bmnosp* in *Bombyx mori* and the Application Research in *Ostrinia furnacalis*. MSc Thesis, Shanghai University, Shanghai. [陈容梅, 2016. 家蚕生殖细胞特异性特异启动子 *Bmnosp* 的功能研究及在亚洲玉米螟中的应用探索. 上海: 上海大学硕士学位论文]
- D'Agostino I, Merritt C, Chen PL, Seydoux G, Subramaniam K, 2006. Translational repression restricts expression of the *C. elegans* Nanos homolog NOS-2 to the embryonic germline. *Dev. Biol.*, 292(1): 244–252.
- Dearden PK, 2006. Germ cell development in the *Honeybee* (*Apis mellifera*); *Vasa* and *Nanos* expression. *BMC Dev. Biol.*, 6(1): 6–19.
- Deshpande G, Calhoun G, Yanowitz JL, Schedl PD, 1999. Novel functions of nanos in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline. *Cell*, 99(3): 271–281.
- Extavour CG, Pang K, Matus DQ, Martindale MQ, 2005. *Vasa* and *nanos* expression patterns in a sea anemone and the evolution of bilaterian germ cell specification mechanisms. *Evol. Dev.*, 7(3): 201–215.
- Forbes A, Lehmann R, 1998. Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development*, 125(4): 679–690.
- Fraser MJ, 2012. Insect transgenesis: current applications and future prospects. *Annu. Rev. Entomol.*, 57: 267–289.
- Hülskamp M, Schröder C, Pfeifle C, Jäckle H, Tautz D, 1989. Posterior segmentation of the *Drosophila* embryo in the absence of a maternal posterior organizer gene. *Nature*, 338(6217): 629–632.
- Irish V, Lehmann R, Akam M, 1989. The *Drosophila* posterior-group gene *nanos* functions by repressing hunchback activity. *Nature*, 338(6217): 646–648.
- Jaruzelska J, Kotecki M, Kusz K, Spik A, Firpo M, Reijo Pera RA, 2003. Conservation of a Pumilio-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells. *Dev. Genes Biol.*, 213(3): 120–126.

- Kobayashi S, Yamada M, Asaoka M, Kitamura T, 1996. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature*, 380(6576): 708 – 711.
- Kraemer B, Crittenden S, Gallegos M, Moulder G, Barstead R, Kimble J, Wickens M, 1999. NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.*, 9(18): 1009 – 1018.
- Kranz AM, Tollenaere A, Norris BJ, Degnan BM, Degnan SM, 2010. Identifying the germline in an equally cleaving mollusc: *Vasa* and *Nanos* expression during embryonic and larval development of the vetigastropod *Haliotis asinina*. *J. Exp. Zool. Part B*, 314(4): 267 – 279.
- Ma XL, He WY, Wang P, You MS, 2017. Cell lines from diamondback moth exhibiting differential susceptibility to baculovirus infection and expressing midgut genes. *Insect Sci.*, <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12533>.
- Miles WO, Korenjak M, Griffiths LM, Dyer MA, Provero P, Dyson NJ, 2014. Post-transcriptional gene expression control by NANOS is up-regulated and functionally important in pRb-deficient cells. *EMBO J.*, 33(19): 2201 – 2215.
- Murata Y, Wharton RP, 1995. Binding of *pumilio* to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell*, 80(5): 747 – 756.
- Nakao H, Matsumoto T, Oba Y, Niimi T, Yaginuma T, 2008. Germ cell specification and early embryonic patterning in *Bombyx mori* as revealed by nanos orthologues. *Evol. Dev.*, 10(5): 546 – 554.
- Nirmala X, Olson SR, Holler TC, Cho KH, Handler AM, 2011. A DsRed fluorescent protein marker under *polyubiquitin* promoter regulation allows visual and amplified gene detection of transgenic Caribbean fruit flies in field traps. *BioControl*, 56(3): 333 – 340.
- Sunilkumar G, Mohr LA, Lopata-Finch E, Emani C, Rathore KS, 2002. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Mol. Biol.*, 50(3): 463 – 479.
- Wang C, Dickinson LK, Lehmann R, 1994. Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Dev. Dynam.*, 199(2): 103 – 115.
- Wang C, Lehmann R, 1991. Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell*, 66(4): 637 – 647.
- Zhao G, Chen K, Qin Y, Wang W, Yong W, Mu R, Chen H, Yang H, Zhou H, 2008. The *nanos* gene of *Bombyx mori* and its expression patterns in developmental embryos and larvae tissues. *Gene Expr. Patterns*, 8(4): 254 – 260.
- Zuo J, Chua NH, 2000. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Curr. Opin. Biotech.*, 11(2): 146 – 151.

(责任编辑: 马丽萍)