昆虫知识 *Chinese Bulletin of Entomology* 2010,47(6):1095 ~ 1103

麦蚜 *Cdc42* 基因的准确组织定位和定量分析方法研究*

于文娟** 陈巨莲*** 程登发 孙京瑞

(中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

The method of *Cdc42* gene accurate tissue location and quantitative analysis in the wheat aphids. YU Wen-Juan**, CHEN Ju-Lian***, CHENG Deng-Fa, SUN Jing-Rui (*The State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases of Insect Pests*, *Institute of Plant Protection*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, Beijing 100193, China)

Abstract To determine the temporal and tissue - specific profile of *Cdc42* gene expression, we performed *in situ* hybridization (ISH) on different tissues from different nymph instars and adults of alate and apterous English grain aphids, *Sitobion avenae* (Fabricius). After dipping in the hybridization solution, some tissue biopsies stained brown indicating *Cdc42* gene expression, but no staining was apparent on the negative control. Staining indicated the presence of the *Cdc42* gene transcript in multiple tissues in different life stages, including the head region and abdomen of both alate and apterous adults and between the compound eyes on the head region. In embryos, staining was mainly evident on the abdomen. There was faint staining on the thorax of alate aphids, but hardly any staining in apterous aphids. Tissue and stage specific transcriptive levels were determined by Real Time fluorescence quantitative RT - PCR. This showed that the level of transcription was higher in the first and forth instar than in others, in adults than nymphs in general, and in alate than apterous aphids. We conclude that *in situ* hybridization and real - time fluorescence quantitative PCR can determine the location and degree of expression of the *Cdc42* gene in wheat aphids

Key words *Sitobion avenae*, *Cdc42*, *in situ* hybridization, real time fluorescence quantitative RT-PCR

摘 要 本文采用原位杂交方法,对 *Cdc42* 在麦长管蚜 *Sitobion avenae* (Fabricius) 不同组织分布进行定位,结果表明在滴加杂交液的组织切片被特异性的染成棕褐色,而阴性对照不着色;有、无翅蚜的头部和腹部均有特异性着色点,头部的着色点集中在两复眼之间,腹部的着色点几乎全集中在伪胚胎;有翅蚜的胸部几乎全部被着色,而无翅蚜的胸部几乎没有特异着色点。再运用实时荧光定量 RT-PCR 技术,进行了该基因的相对表达量测定,结果表明麦长管蚜 *Cdc42* 基因在不同组织及各虫期均能表达,若蚜期高于成蚜期,有翅蚜高于无翅蚜,且伪胚胎就有较高的转录水平。由此得知,基于原位杂交与实时荧光定量 RT-PCR 的技术相结合的方法,可有效进行麦蚜 *Cdc42* 基因的准确组织定位和定量分析,为 *Cdc42* 基因在麦蚜的翅型分化调控上的功能研究奠定了分子检测基础。

关键词 麦长管蚜, *Cdc42*, 原位杂交, 荧光定量 RT-PCR

麦长管蚜 *Sitobion avenae* (Fabricius), 是世界性的小麦重要害虫。蚜虫翅型分化是迁飞特

* 资助项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(课题名称:害虫与寄主植物的协同进化(2006CB102004)、现代农业产业技术体系建设专项基金(nycytx-03)、转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08012-007B)。

** E-mail: ywj19830906@163.com

*** 通讯作者, E-mail: jlchen@ippcaas.cn

收稿日期:2010-01-25,修回日期:2010-04-07

性的一个重要因素，掌握其翅型分化机理和规律，对明确虫源性质和准确地预测预报具有重要意义。

有关蚜虫翅型分化的研究，从 20 世纪 60 年代开始至今主要集中在外部环境因素和虫体内部的激素调节两个方面，已经明确温度、光周期、拥挤度、寄主营养条件等对翅型分化有显著影响[1]，同时虫体内的保幼激素对有翅/无翅起着重要的调控作用[2,3]。多年研究发现从亲代获得的遗传物质是翅型分化的基本要素，但在相同的遗传基础条件下，翅型表型仍可因外界的环境条件不同而发生不同的变化[4]。这意味着翅型分化是一个受多因子影响的调控体系决定的。人们尝试利用现代分子生物学手段寻找相同基因型的有翅和无翅蚜基因表达的差异，从分子水平上探明翅型分化的相关基因。曹敏用抑制消减杂交研究禾谷缢管蚜相同基因型的有翅蚜和无翅蚜的差异表达基因时，得到在有翅蚜中特异表达的基因 *Cdc42*，克隆了禾谷缢管蚜 *Cdc42* 基因[5]；蒋红玲利用半定量法研究麦长管蚜 *Cdc42* 在不同组织及发育阶段的转录水平时发现该基因在有翅蚜中特异表达，并在 GenBank 比对，推测 *Cdc42* 基因编码的小 G 蛋白 Cdc42 与麦蚜的翅型分化相关[6]。

本文在以麦长管蚜 *Cdc42* 基因为材料，采用原位杂交技术进行基因的准确组织定位，再利用实时荧光定量 RT-PCR 的技术探讨建立该基因的定量分析方法，以期建立麦蚜 *Cdc42* 基因准确组织定位和定量，为深入开展该基因与翅型分化的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

麦长管蚜：在饲养室盆栽麦苗上饲养，饲养室温度(20 ± 1)℃；相对湿度 60% ~70%；光周期 L∶D = 16∶8。

原位杂交试剂盒，4% 多聚甲醛/0.1M PBS (pH7.0 - 7.6) 固定液，PBS 粉剂，SSC 粉剂，DAB 显色试剂盒，苏木素显色剂等购自武汉博士德公司；RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司；pEASY - T3 克隆载体，TOP10 感受态细胞，反转录试剂盒 *TransScript* Ⅱ First - Strand cDNA Synthesis Kit 购自北京全式金生物技术有限公司；PCR 扩增试剂，Mix Buffer，SYBY *Premix Ex Taq*™ 购自 TaKaRa 公司。PCR 引物有北京三博远志生物工程有限公司合成。

ERM3000 切片机为常州市郝思琳医用仪器有限公司制造；Olympus BH-2 万能显微镜；ECP3000 三恒电泳仪为北京六一仪器厂生产；微量恒温器 HW-8C 购自绍兴市卫星医疗设备制造有限公司；恒温培养箱 DHP120 购自上海实验仪器厂；台式 5145 型离心机和台式冷冻 5804R 型离心机购自德国 Eppendorf 公司；536-TouchGene Gradient PCR 仪，TC-412 PCR 仪购自英国 EDVOTEK 公司；凝胶成像系统 EagleEye System 购自美国 STRAGENE 公司；MyiQTM 实时定量 PCR 仪购自美国伯乐公司。

1.2 试验方法

1.2.1 原位杂交

1.2.1.1 探针的设计 针对麦长管蚜 *Cdc42* 基因的 mRNA，设计的特异性的多项寡核苷酸探针，其序列为：

(1) 5′-TACAC GACAA ACAAG TTTCC TTCAG AATAT GTACC-3′

(2) 5′-GAGCC ATATA CATTG GGTTT ATTTG ATACA GCAGG-3′

(3) 5′-ACTGA TGTGT TTCTT GTTTG TTTCT CCGTG GTTTC-3′

1.2.1.2 石蜡切片的制备 分别取麦长管蚜的有翅和无翅的 3 龄、4 龄、成虫，用 4% 多聚甲醛/0.1M PBS(pH7.0 - 7.6) 固定 60 min；然后依次置于 75%、95%、100%、100% 各级酒精中进行脱水，每级处理时间为 60 min；脱水后，样本用 100% 二甲苯进行透明，处理 60 min，重复 2 次。把透明处理后的蚜虫放入 52 ~ 54℃ 的软蜡内进行第 1 次浸蜡，时间为 60 min；待第 1 次浸蜡后，将蚜虫转移到 54 ~ 56℃ 的软蜡进行第 2 次浸蜡，时间为 60 min；然后放入 58 ~ 60℃ 硬蜡进行包埋。待硬蜡凉透后，对石蜡标本进行切片，切片厚度为 6 μm。

1.2.1.3　原位杂交　1)经展片、烤片、脱蜡、复水后的组织切片用于原位杂交;2)100 mL 蒸馏水加入 10 mL 的 30% H_2O_2 在室温下浸泡玻片 5 min,以灭活内源酶活性;3)经 DEPC 水清洗后的玻片,每张切片滴加 20 μL 胃蛋白酶(1 mL 3% 柠檬酸 + 2 滴浓缩型胃蛋白酶,混匀),室温消化 10 min,暴露 mRNA 核酸片段,然后使用原位杂交专用 PBS 清洗 5 min × 3 次,再用 DEPC 水洗 1 次 × 3 min;4)胃蛋白酶消化后,再用 1% 多聚甲醛/0.1 m PBS 在室温下后固定 10 min;5)经 DEPC 水充分清洗的玻片,按每张切片 20 μL 加预杂交液(阴性对照使用 DEPC 水),放在湿盒(在底部加 20% 甘油 20 mL以保持湿度)内,置于 38℃ 下反应 3 h;6)吸取多余液体,按每张切片 20 μL 探针杂交液加入在切片上,然后用原位杂交专用盖玻片盖在切片上,于 38℃ 杂交过夜(不要超过10 h);阴性对照为不滴加杂交液;7)杂交后,揭掉盖玻片,在 37℃ 水温,用 2 × SSC 洗涤 5 min × 2 次,0.5 × SSC 洗涤 15 min × 1 次,0.2 × SSC 洗涤 15 min × 1 次(注*　如有非特异性染色,重复 0.2 × SSC 洗涤 15 min 1 ~ 2 次);8)将玻片放置湿盒中每张切片滴加 20 μL 封闭液,37℃ 温育反应 30 min;9)吸干封闭液,每张切片滴加 20 μL 生物素化鼠抗地高辛,37℃ 温育 60 min,后用 PBS 浸洗切片 5 min × 4 次;10)每张玻片滴加 20 μL SABC,放置湿盒中,37℃ 温育 20 min 后,用 PBS 浸洗 5 min × 3 次;11)每张切片加 20 μL 生物素化过氧化物酶,放置湿盒中 37℃ 温育 20 min,后用 PBS 浸洗切片5 min × 4 次;12)用 DAB 显色试剂盒配显色液(1 mL 蒸馏水 + 显色剂 A. B. C 各 1 滴混匀),加至标本上,显色 20 min。若无背景出现可持续显色;充分洗净 DAB 显色液,每个玻片加入苏木素 20 μL 显色,最多 60 s;充分清洗后用 Na_2HPO_4 浸洗 2 min,充分显色;13)充分水洗后,玻片依次放入 75%、95%、100%、100% 各级酒精中进行脱水及二甲苯透明 2 次;14)用中性树胶封片,镜检。

1.2.2　实时荧光定量 RT-PCR

1.2.2.1　引物设计　根据 GenBank 登录号为 AY581120 的麦长管蚜 *Cdc42* 的基因序列,应用引物设计软件 Primer 3 设计该基因的实时荧光 PCR 引物。内参引物选用蒋红玲[6]设计的 18*srRNA*。荧光定量 PCR 引物:正向引物:QPS3:5′-TGG TGA TGG AGC TGT TGG TA-3′

反向引物:QPA3:5′-CAA AGG TCT GAG GCG ATC AT-3′

内参引物为:正向引物:18ss:5′-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3′

反向引物:18sa:5′-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3′

1.2.2.2　实时荧光定量 RT-PCR 扩增　分别取有翅和无翅蚜的各龄若蚜及成虫的头、胸、腹部、伪胚胎及不同龄期的整蚜,立即置于液氮中冻存,或转入 -70℃ 冰箱中保存备用。采用 TRIzol 方法提取有翅和无翅麦长管蚜不同龄期的整虫(含伪胚胎和去除伪胚胎)和各部位(头、胸、腹、伪胚胎)的 RNA。测定 RNA 的 OD260/OD280,对 RNA 进行定量。

不同处理的 RNA 定量至 500 ng/μL,按照反转录试剂盒 *TransScript* Ⅱ First-Strand cDNA Synthesis Kit 的操作手册进行反转录。反应体系为:Total RNA 2 μL, Random Primer(N9)(0.1 μg/μL) 1 μL, 2xTS Ⅱ Reaction Mix 10 μL, *TransScript* Ⅱ RT/RI Enzyme Mix 1 μL, RNase-free Water 6 μL;轻轻混匀,在室温孵育 5 ~ 10 min 后,置于 50℃ 孵育 50 min,然后在 70℃ 加热 15 min 以失活 *TransScript* Ⅱ RT;最后在 -20℃ 中保存备用。

反转录后进行 RT-PCR 检测。反应体系为:Mix Buffer 5 μL,正向引物(10 pmol/μL) 0.2 μL,反向引物(10 pmol/μL) 0.2 μL,模板(cDNA 第一链) 0.4 μL;加双蒸水至 10 μL;反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,55 ~ 65℃(设置 12 个温度梯度) 18 s,72℃ 12 s,35 个循环。72℃ 7 min;4℃ 保存。经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,选择最佳退火温度。PCR 产物再经电泳回收纯化后,克隆到 pEASY-T3 载体上,然后转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,挑取阳性克隆

并用 PCR 鉴定、序列测定。

荧光定量 RT-PCR，反应体系为：SYBY Green Mix 10 μL，正向引物（10 pmol/μL）0.4 μL，反向引物（10 pmol/μL）0.4 μL，模板（cDNA 第一链）2 μL；加双蒸水至 20 μL；每个样品设置 3 个重复。反应程序为：95℃ 30 s；95℃ 30 s，95℃ 10 s，2 个循环；95℃ 5 s，58℃ 18 s，72℃ 12 s，45 个循环；95℃ 1 min；58℃ 10 s；50℃ 10 s，90 个循环，并且从 50℃开始，每增加一个循环温度上升 0.5℃绘制融解曲线。

1.3 数据处理

参照 Livak 和 Schmittgen[7] 相对定量方法进行数据处理。以管家基因 18*srRNA* 为内参照，利用比较阈值法来测定目的基因的相对表达，即目的基因相对表达量 $=2^{-\triangle\triangle Ct}$（其中，Ct 是热循环仪检测到反应体系中荧光信号的强度值），$\triangle\triangle C_t=(Ct_{目的基因}-Ct_{管家基因})_{实验组}-(Ct_{目的基因}-Ct_{管家基因})_{对照组}$，所以，$2^{-\triangle\triangle Ct}$为实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数，以麦长管蚜有翅成虫的整虫为对照，设为 1，使用这一方法可以直接得到目的基因相对于管家基因的相对定量。

2 结果与分析

2.1 原位杂交检测结果

经镜检观察后可见，滴加杂交液的组织切片被特异性的染成棕褐色，而阴性对照的组织切片没有被特异染色，组织呈现蓝色（图 1）。

如图 2 所示，有翅蚜的胸部几乎全部被着色，而无翅蚜的胸部没有特异着色点，这是因为胸部是有翅蚜翅的位置所在；有翅蚜和无翅蚜的头部和腹部均有特异性着色点，头部的着色点集中在两复眼之间；腹部的着色点几乎全集中在伪胚胎，由此初步推断，蚜虫翅的分化可能从伪胚胎开始。

2.2 实时荧光定量 RT-PCR 检测结果

2.2.1 RNA 质量检测及引物的筛选 提取的麦长管蚜各部分 RNA，经分光光度计检测，OD260/280 值均在 1.8 ~ 2.1 之间，经 2% 琼脂糖变性凝胶电泳显示（图 3），所提取总 RNA 在 4.5 kb 和 1.9 kb 处分别有两条亮带（28sRNA 和 18sRNA），表明 RNA 相对分子量分布正常，未发生降解和基因组 DNA 的污染现象。

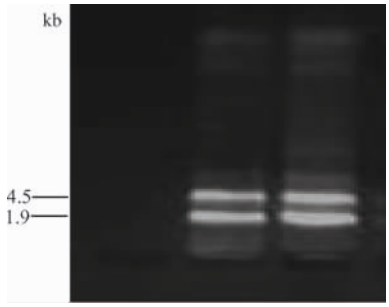


图 3 麦长管蚜胸部 RNA 的检测

在同一 PCR 扩增条件下，5 对引物 QPS1/QPA1、QPS2/QPA2、QPS3/QPA3、QPS4/QPA4、QPS5/QPA5 扩增的产物检测结果显示（图 4），除了第 1 对引物 QPS1/QPA1 以外，其余 4 对引物都获得了扩增片段，长度分别为 236、184、215、148 bp。以 18ss/18sa 为引物，获得了内参基因 18*srRNA* 一个 186 bp 的片段。经胶回收测序后发现，QPS3/QPA3 的扩增序列与 *Cdc42* 对应序列的同源性为 99%。

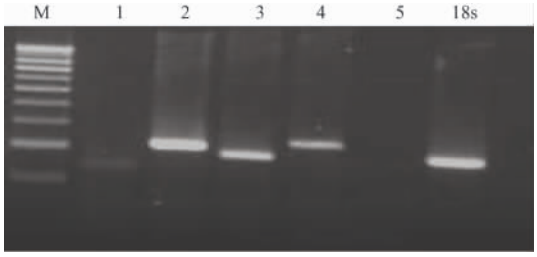


图 4 荧光定量 RT-PCR 的 *Cdc42* 基因和 *18*srRNA 片段扩增的引物筛选

18s：为引物 18ss/18sa 扩增的内参基因片段；1 ~ 5：分别表示 5 对引物 QPS1/QPA1、QPS2/QPA2、QPS3/QPA3、QPS4/QPA4、QPS5/QPA5 扩增 *Cdc42* 基因的目的片段；M：为 100 bp Mark 片段；M 为 100 bp DNA Marker。

筛选获得扩增目标基因和内参基因片段的引物 QPS3/QPA3 和 18ss/18sa，扩增片段分别为 184 bp 和 186 bp，适于荧光定量 RT-PCR 要求。

分别以 18ss/18sa 和 QPS3/QPA3 为引物，在 55 ~ 65℃ 范围内的 12 个退火温度条件下，

扩增的内参基因(图 5)和目标基因(图 6)条带清晰,且无杂带,其中在 58℃ 时条带最清晰,为最适退火温度。

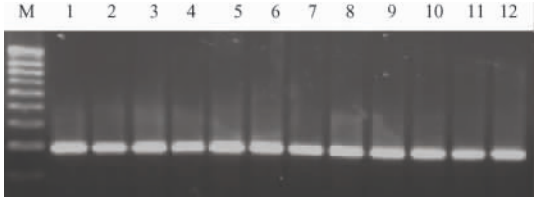


图 5　不同退火温度下内参基因 18*srRNA* 的目的片段的扩增

以 18ss/18sa 引物,在 55 ~ 65℃ 退火梯度下内参基因 18*srRNA* 片段的扩增结果。1 ~ 12 分别表示为 55 ~ 65℃ 退火梯度:55.0、55.5、56.0、57.0、58.0、59.4、60.6、61.8、63.0、64.0、64.5、65.0℃;M 为 100 bp DNA Marker。(图 6 同)

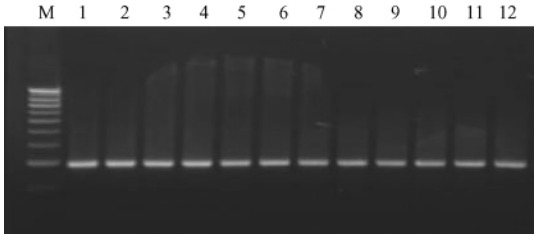


图 6　不同退火温度下 *Cdc42* 基因片段的扩增结果

以 QPS3/QPA3 为引物,在 55 ~ 65℃ 退火梯度下 *Cdc42* 基因片段的扩增结果。

2.2.2　不同龄期两型蚜虫整虫 *Cdc42* 基因荧光定量熔解曲线　麦长管蚜有翅和无翅型不同组织部位的荧光定量 RT-PCR 熔解曲线如图 7 所示,18*srRNA* 和 *Cdc42* 基因的熔解曲线均为单一峰。通过 Ct 数值用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 处理后获得 *Cdc42* 基因的相对表达。

2.2.3　同型蚜虫不同组织部位的 *Cdc42* 基因表达量　在相同龄期的无翅蚜中(图 8: A),头部 *Cdc42* 的表达量明显高于胸部和腹部(去伪胚胎),可达 3 倍以上,头部、胸部、腹部的表达量随着龄期的增长呈递减趋势;伪胚胎的表达量最高,可达胸部和腹部 3.5 ~ 12 倍,且随着龄期的增长表达量呈递增趋势。

在相同龄期的有翅蚜中(图 8: B),胸部的表达量明显高于头部和腹部(去伪胚胎),头部、胸部、腹部的相对表达量随着龄期的递增呈递减趋势;伪胚胎的表达量也很高,随龄期增长呈递增趋势。

由此可见,应用原位杂交和荧光定量 RT-PCR 方法能检测到 *Cdc42* 基因在麦长管蚜有翅和无翅两型的不同发育阶段、不同组织部位都能表达,而且能精确确定表达量的差异。研究结果表明有、无翅蚜中表达量存在差异;相同龄期同一组织部位的两型蚜 *Cdc42* 表达量有翅型高于无翅型;有翅若蚜高于成蚜期;有翅型的头部和胸部 *Cdc42* 基因的表达水平远高于腹部,且伪胚胎就检测到。因此原位杂交和荧光定量 RT-PCR 方法可用于蚜虫等微型昆虫基因的定位和定量研究。

3　结论与讨论

Cdc42 属于小 G 蛋白质 RhoGTP 酶家族中一类结构和功能相对保守的蛋白,它们之间的氨基酸同源性在 75% ~ 100%。*Cdc42* 像一个开关,对外源和内源信号发生响应并能够传递信号、激活生物途径的下游分子,能将信号传递到肌动蛋白细胞骨架[8]。小 G 蛋白 Cdc42 具有 GTP 酶活性,能够通过不同的效应器调控许多生物过程,调控肌动蛋白的重组、细胞极性的形成和细胞的增殖及 JNK/MAPKA 途径等[9]。在对果蝇的研究过程中发现 *Cdc42* 参与调节肌动蛋白的分布和功能[10],在 Marcus 提出的果蝇翅脉发育新模型中,*Cdc42* 与 Jun-N-端激酶信号途径调控第一阶段决定着翅脉的数量和位置[11]。

原位杂交(ISH)技术采用特异性探针在组织切片与细胞内特定的基因进行分子杂交,从形态学角度对组织细胞内某特定基因通过光镜进行时空表达研究[12],该技术使用 Digoxin 标记探针,具有高敏感性和特异性、操作简便、无同位素污染等优点。从基因定位的准确性来看,原位杂交方法可以将基因定位在某一染色的特定区段上,这是其他方法无法比拟的。因此,原位杂交是目前比较理想的一种基因定位法,被广泛应用。例如,Yerle 等将猪 *LHCGR* 基因定位在3q22 ~ q23[13]。本实验针对麦长管

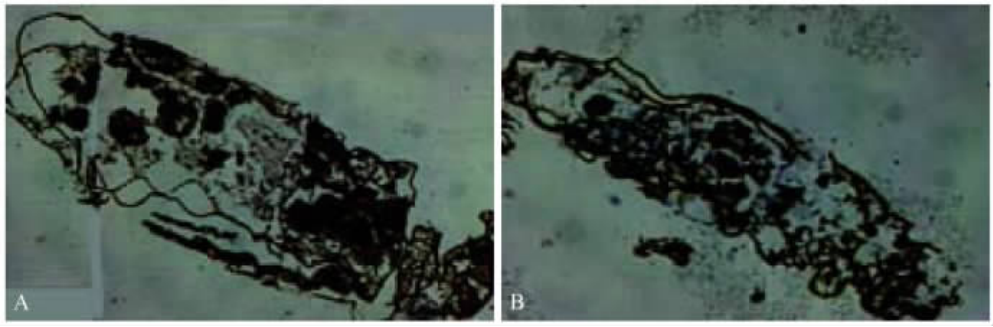


图 1　原位杂交探针的检测(×400)

A:特异性染色的组织切片;B:阴性对照

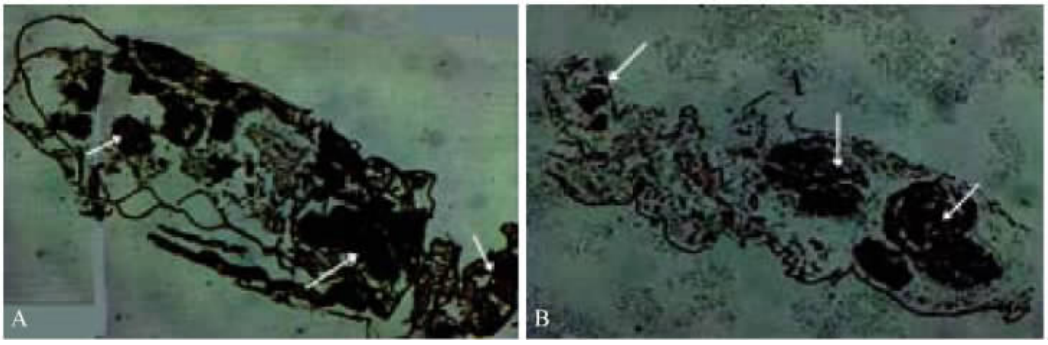
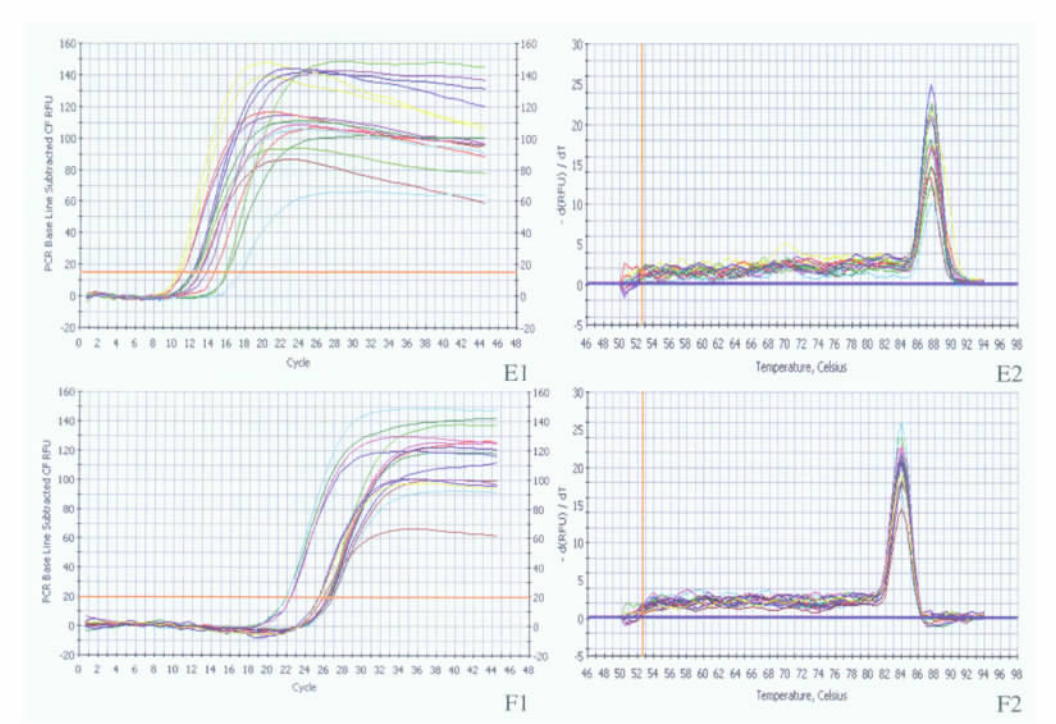


图 2　有翅和无翅成蚜的特异染色(×400)

A:有翅成蚜;B:无翅成蚜;图中的箭头所示为被特异染色的部位



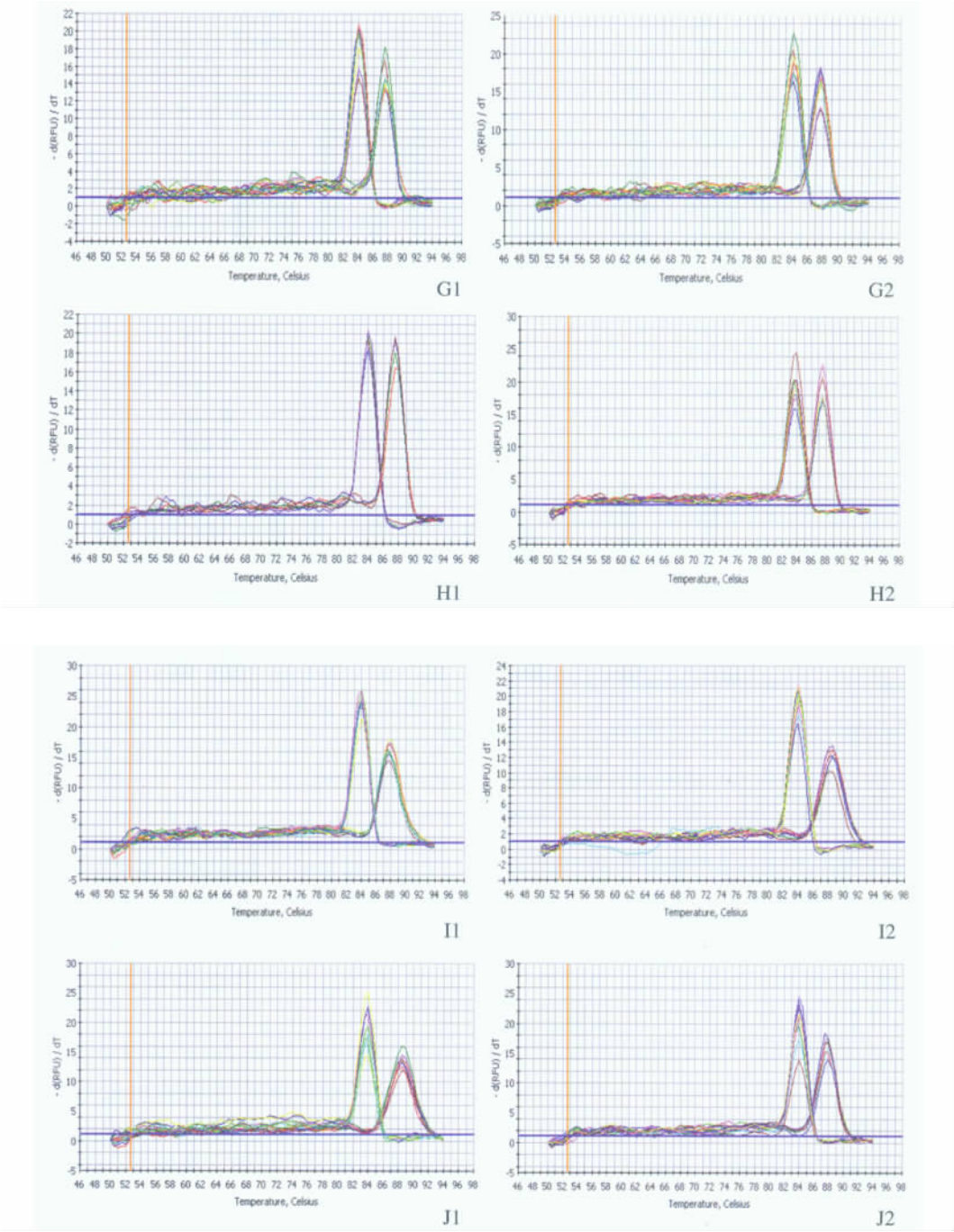


图 7　麦长管蚜有翅成蚜与无翅成蚜不同组织部位实时荧光定量 RT-PCR 熔解曲线

E1,E2:18*sRNA*;F1,F2:*Cdc42*;G1:有翅蚜整虫的 18*sRNA* 和 *Cdc42*,G2:无翅蚜整虫的 18*sRNA* 和 *Cdc42*;H1:有翅蚜头部的 18*sRNA* 和 *Cdc42*;H2:无翅蚜头部的 18*sRNA* 和 *Cdc42*;I1:有翅蚜胸部的 18*sRNA* 和 *Cdc42*;I2:无翅蚜胸部的 18*sRNA* 和 *Cdc42*;J1:有翅蚜腹部的 18*sRNA* 和 *Cdc42*;J2:无翅蚜腹部的 18*sRNA* 和 *Cdc42*。

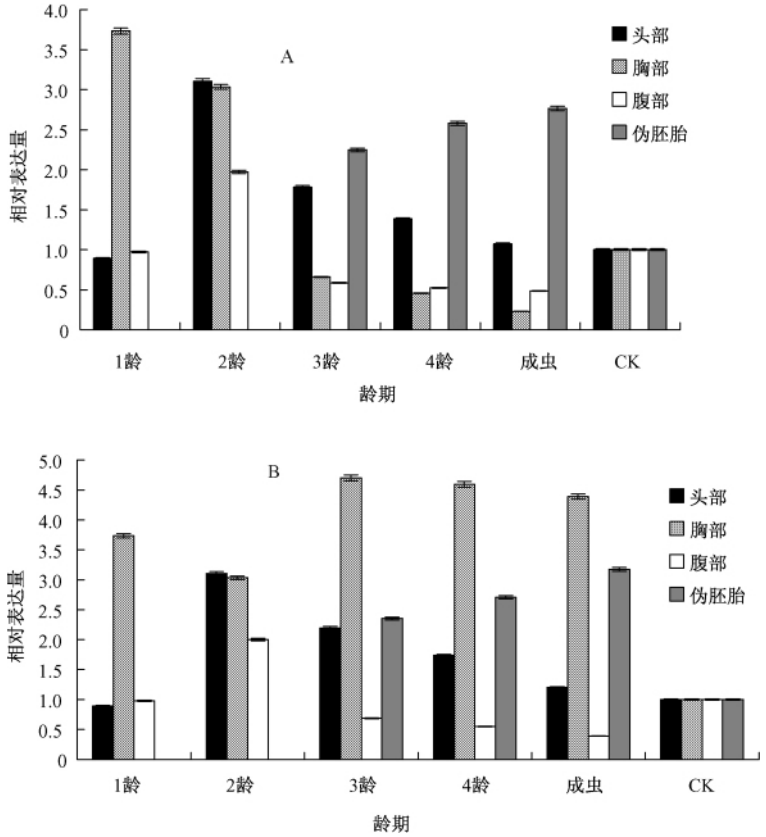


图 8 不同龄期麦长管蚜 *Cdc42* 相对表达量比较

A:无翅;B:有翅

蚜 *Cdc42* 基因的 mRNA,设计特异性的多相寡核苷酸探针序列,再经地高辛标记。由于采用多相寡核苷酸探针和高敏感标记技术,并配合使用敏感性加强型的原位检测方法,具有敏感性特别高,背景清晰,结果准确可靠,能够明确 *Cdc42* 基因在麦长管蚜中的组织定位:有翅蚜的胸部几乎全部被特异性着色,而无翅蚜的胸部没有特异着色点,说明该基因在有翅蚜的胸部特异表达,这是因为胸部是翅的位置所在;有翅蚜和无翅蚜的头部和腹部均有特异性着色点,头部的着色点集中在两复眼之间,这是因为头部是细胞信号传导的中枢,分布着接受来自体内外信息的重要感觉器官;腹部的着色点几乎全集中在伪胚胎。由此初步推断,蚜虫翅的分化可能从伪胚胎开始。

实时荧光定量 RFPCR 技术是目前核酸定量较为准确的方法,具有效率高、灵敏度大、可实现高通量及进行多重 PCR 等优点,已在多个领域得到相当广泛的应用,如基因组 DNA 的定量、基因表达的研究、基因芯片分析结果的复证、转基因品种中外源基因拷贝数的检测等[14,15]。

为了进一步明确 *Cdc42* 基因在麦长管蚜中转录水平表达的情况,应用实时荧光定量 PCR 技术对该基因进行相对表达量的确定。通过 Ct 数值用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 处理后获得 *Cdc42* 基因的相对表达量为:在各龄期的有翅及无翅蚜中,头部 *Cdc42* 的表达量很高,在无翅蚜中高于胸部和腹部(去伪胚胎)3 倍以上;在相同龄期的有、无翅蚜中,有翅蚜胸部的表达量明显高于无翅蚜;伪胚胎的表达量很高,可达腹部 3.5 ~ 12 倍,且随着龄期的增长表达量呈递增趋势。由此,进一步推断翅型的分化可能从伪胚胎开始,且在翅型的分化和发育过程中起到正调控作用。

通过原位杂交技术能够明确该基因在麦长管蚜中的组织定位;实时荧光定量 RT-PCR 能够确定该基因在麦长管蚜不同龄期和不同组织中相对表达量,初步检测出该基因的表达差异。研究结果为进一步精确比较有翅和无翅蚜的该基因表达的差异,以及该基因与蚜虫翅型分化的关系奠定有效分子检测技术,也为建立微型昆虫基因的准确组织定位和定量分析方法奠定基础。

参 考 文 献

1 刘光杰. 褐飞虱成虫翅型分化研究. 昆虫知识,2000,**37**(3):186 ~ 190.

2 王健,吴振廷,张一九,等. 外源激素对褐飞虱翅型分化的影响. 昆虫学报,1998,**41**(4):371 ~ 374.

3 李红梅,程登发,田喆,等. 禾谷缢管蚜体内保幼激素的变化趋势. 植物保护学报,2004,**31**(4):371 ~ 376.

4 戴华国,吴晓毅,武淑文. 褐飞虱体内保幼激素滴度变化及其与翅型分化的关系. 昆虫学报,2001,**44**(1):27 ~ 32.

5 曹敏. 禾谷缢管蚜翅型分化相关基因的 cDNA 克隆及分析. 硕士学位论文. 北京:中国农业大学,2004.

6 蒋红玲. 麦长管蚜 G 蛋白 β、γ 亚基的基因克隆及相互作用蛋白的筛选. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院,2004.

7 Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delte C (T)) Method. *Methods*, 2001, **25**(4): 402 ~ 408.

8 Johnson D. I. *Cdc42*: An essential rho-type gTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, **63** (1): 54 ~ 105.

9 Luo L. Q., Lee T., Tsai L., *et al*. Genghis Khan (Gek) as a putative effector for *Drosophila Cdc42* and regulator of actin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1997, **94** (24): 12 963 ~ 12 968.

10 Harden N., Lee J., Loh H. Y., *et al*. *Drosophila* homolog of the Rac-and Cdc42-activated serine/threonine kinase PAK is a potential focal adhesion and focal complex protein that colocalizes with dynamic actin structures. *Mol. Cell Biol.*, 1996, **16** (5): 1 896 ~ 1 908.

11 Marcus J. M. The development and evolution of crossveins in insect wings. *J. Anat.*, 2001, **199** (1/2): 211 ~ 216.

12 Morris R. G., Arends M. J., Bishop P. E., *et al*. Sensitivity of digoxigenin and biotin labeled probes for detection of human papilloma virus by in situ hybridization. *J. Clin. Pathol.*, 1990, **43**(10): 800 ~ 805.

13 Yerle M., Pinton P. A., Robic A., *et al*. Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-recolution gene mapping in pigs. *Cytogenet Cell Genet.*, 1998, **82** (3/4): 182 ~ 188.

14 于国龙. 实时荧光定量 PCR 在医学遗传学方面的应用. 国外医学. 遗传学分册. 2003,**26**(3):125 ~ 129.

15 张蓓. 实时荧光定量 PCR 的研究进展及其应用. 国外医学. 临床生物化学与检验学分册,2003,**24**(6):327 ~ 329.