文章编号:1000-5404(2009)11-0993-04

论著

大劣按蚊 TEP1 cDNA 的克隆和生物信息学分析

胡晓飞[1,2],王 英[2],潘春江[1],刘 涛[1],谢 佳[3],何 谐[2],姜晓梅[4],黄复生[2] (第三军医大学:[1]学员旅7队,[2]基础医学部病原生物学教研室,[3]学员旅20队,[4]学员旅21队,重庆 400038)

摘 要:目的 克隆大劣按蚊(*Anopheles dirus*)含硫酯键蛋白1(thioester-containing protein 1,TEP1)的cDNA,并分析其序列。**方法** 根据已报道的冈比亚按蚊等多种昆虫的TEP1氨基酸保守序列设计简并引物,以大劣按蚊血淋巴细胞总RNA为模板,进行RT-PCR扩增。对目的片段纯化回收,经TA克隆后测定其核苷酸序列。利用DNASIS程序分析该序列,并推导其氨基酸序列,最后利用BLAST和DNASIS等进行不同昆虫TEP1氨基酸序列的比对。**结果** RT-PCR扩增出一约770 bp的条带,TA克隆后DNA测序发现,阳性克隆的核苷酸序列长774 bp,推导其氨基酸序列长258 aa。生物信息学分析表明,该序列与冈比亚按蚊、阿拉伯按蚊、斯氏按蚊TEP1基因的氨基酸序列同源性分别达72%、72%和59%,与冈比亚按蚊的TEP4氨基酸序列同源性为59%。**结论** 从大劣按蚊血淋巴细胞中成功克隆出了TEP1的cDNA部分序列。

关键词: 大劣按蚊;TEP1;RT-PCR;生物信息学;天然免疫
中图法分类号: R318.04; R384.1; R394.3 **文献标识码:** A

Cloning and bioinformatic analysis of cDNA fragment of TEP1 gene of *Anopheles dirus*

HU Xiao-fei[1,2], WANG Ying[2], PAN Chun-jiang[1], LIU Tao[1], XIE Jia[3], HE Xie[2], JIANG Xiao-mei[4], HUANG Fu-sheng[2] ([1]7th Student Team; [2]Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medical University, [3]20th Student Team, [4]21st Student Team, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone the cDNA fragment of thioester-containing protein 1 (TEP1) of *Anopheles dirus* and analyze the sequence with bioinformatic methods. **Methods** The target cDNA fragment was amplified by RT-PCR with degenerated primers designated based on the conserved amino acid sequences of TEP1 of *Anopheles gambiae* and other insects. And total RNA from haemocytes of *Anopheles dirus* was used as the template of RT-PCR. The PCR product was purified and T/A cloned, followed by sequencing the positive clone. Then the sequence was analyzed with DNASIS software and the amino acid sequence was deduced. The obtained amino acid sequence was aligned with TEP1 amino acid sequences of the other insects with BLAST and DNASIS. **Results** A band of approximately 770 bp was amplified by RT-PCR. A nucleotide acid sequence with 774 bp in length was obtained by T/A cloning and sequencing. The deduced amino acid sequence was 258 aa in length, and had a sequence homology of 72%, 72% and 59% respectively when compared with the TEP1 sequences of *Anopheles gambiae*, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles stephensi*. **Conclusion** The cDNA fragment of TEP1 is successfully cloned from the haemocytes of *Anopheles dirus*, which provides a foundation for further study on function of the molecular.

Key words: *Anopheles dirus*; thioester-containing protein 1; RT-PCR; bioinformatics; innate immunity

蚊媒传播的疟疾是危害严重的传染病之一。每年有2~3亿人感染,100~200万人死于疟疾感染。近年来,由于疟原虫抗药株的出现和蚊媒对杀虫剂耐受性的增加,加之有效抗疟疫苗的缺如,发展新的疟疾控制策略已迫在眉睫。疟原虫在蚊体内的发育是疟疾传播的关键环节。通过蚊对疟原虫的抗性机制阻断蚊媒传播是有效控制疟疾的新策略[1]。研究显示,含硫酯键蛋白1(thioester-containing protein 1,TEP1)在蚊抗疟原虫的天然免疫机制中可能发挥了重要的作用[2]。大劣按蚊(*Anopheles dirus*)是我国南方地区和东南亚地区疟疾传播的主要蚊媒,对其抗疟机制的研究有助于我国疟疾防治工作的改进。然而,目前尚少见到关于大劣按蚊TEP1的相关报道。本研究拟利用RT-PCR等分子生物学技术和生物信息学分析,从大劣按

基金项目:国家自然科学基金(30800959);第三军医大学基础部学员创新基金(JCB007)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800959) and the Students' Innovation foundation of College of Basic Medical Sciences of Third Military Medical University(JCB007)
作者简介:胡晓飞,男,河北省沧州市人,学员,主要从事蚊抗疟原虫感染天然免疫机制方面的研究。E-mail: harryzonetmmu@yahoo.cn
通信作者:王 英,电话:(023)68752243,E-mail: wangyingtmmu@126.com
收稿日期:2008-10-07;修回日期:2008-12-03

蚊血淋巴细胞中克隆大劣按蚊 TEP1 基因,为进一步研究该分子的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 大劣按蚊海南株由本实验室常规饲养,常规饲养温度约 27 ℃,相对湿度为 70% ~80%。昆明株小鼠由本校实验动物中心提供,体质量 16 ~20 g。

1.1.2 主要试剂 Trizol RNA 提取液购自 Invitrogen 公司,MMLV 逆转录酶、*Taq* 酶、*Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ内切酶均购自 Promega 公司,DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 抽提试剂盒购自 Omiga 公司,TA 克隆试剂盒(包括 pMD18-T 载体及连接酶等)购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据果蝇、冈比亚按蚊和斯氏按蚊等昆虫 TEP1 基因保守氨基酸序列,利用 Primer 5.0 软件设计简并引物,委托 Invitrogen 生物技术有限公司合成。上游引物:5′-GGATGTGGNGARCAGAAYATG-3′,下游引物:5′-WAGRCCSAC-AAASGTGTCYTG-3′。

1.2.2 标本采集和总 RNA 的提取 利用挤压法采集 200 只 3 日龄大劣按蚊雌蚊成蚊血淋巴细胞于 Trizol 提取液中。采集方法为:乙醚麻醉按蚊后,剪断喙,轻轻挤压蚊胸部,喙断端出现的清亮液体即为血淋巴。总 RNA 的提取按照 Tripure RNA 抽提试剂盒方法操作。

1.2.3 反转录(RT) 以 $Oligo(dT)_{15}$ 为引物,常规逆转录制备 cDNA。MMLV-RT 进行的反转录体系:总 RNA 5 μl,$Oligo(dT)_{15}$ 1 μl,DEPC 水 9 μl,70 ℃水浴 5 min,冰上 5 min;然后加入 5 × Buffer 5 μl,dNTPs 2 μl,MMLV-RT 酶 1 μl,RNAi 1 μl,DEPC 水 1 μl,总体积 25 μl,42 ℃水浴 1 h。

1.2.4 PCR 扩增 PCR 反应体系如下:cDNA 2.0 μl,10 × Buffer 2.5 μl,*Taq* 酶 0.3 μl,$MgCl_2$ 1.5 μl,dNTP 1 μl,上游引物(10 μmol/L) 1 μl,下游引物(10 μmol/L) 1 μl,ddH_2O 15.7 μl。扩增条件为:94 ℃预变性 5 min;然后 94 ℃变性 1 min,48 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 ℃再延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

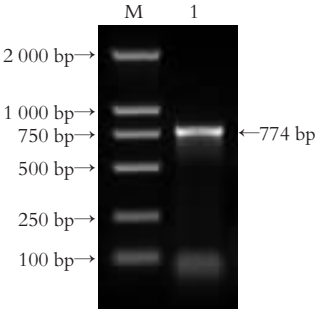
1.2.5 TA 克隆与测序 利用 Omiga 公司的 DNA 胶纯化回收试剂盒对 1% 琼脂糖凝胶电泳中的目的片段进行切胶纯化回收(按照试剂盒说明书进行)。利用 TaKaRa 公司的 TA 克隆试剂盒,将纯化回收的 PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接(操作按照试剂盒说明书进行),然后转化入感受态 DH5α 大肠杆菌,在含安苄青霉素的 LB 平板上培养过夜,随机挑取数个白斑,常规抽提质粒,*Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切鉴定阳性克隆,最后对阳性克隆进行 DNA 序列测定。

1.2.6 生物信息学分析 根据得到的核酸序列,利用 DNASIS 程序推导目的片段的氨基酸序列,并与已知的冈比亚按蚊和斯氏按蚊 TEP1 基因编码的氨基酸序列进行比对。同时,登录 GenBank 数据库进行 BLAST 查询。最后在 GenBank 中进行序列注册。利用 SignalP 3.0 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)分析该序列的分泌特性,检测其序列中有无信号肽序列,预测其是否为分泌型蛋白。利用 ISREC-Server 中的 TMpred 程序(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)分析该序列的跨膜区。

2 结果

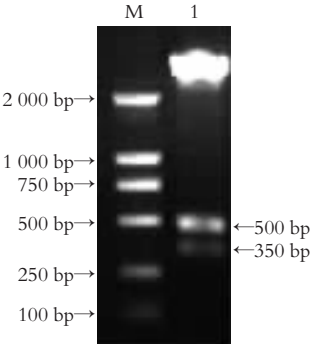
2.1 目的片段的扩增、克隆及鉴定

以大劣按蚊血淋巴 cDNA 为模板,用简并引物经 PCR 扩增后获得 1 条约 770 bp 的条带,与预测目的片段的理论值相符(图 1)。将该片段切胶回收、纯化后与 pMD18-T 载体连接,并转化到感受态细菌,在含氨苄青霉素的 LB 平板上共获得近 70 个菌落白斑。随机挑取单个菌落白斑进行培养并抽提质粒,经 *Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切后可见切下 2 条 DNA 片段,分别为 350 bp 和 500 bp(图 2)。分析可能是在目的片段中存在 *Eco*R Ⅰ或 *Hind* Ⅲ的酶切位点,导致酶切产生 2 个片段,并且 2 个片段的长度总和与目的片段连接载体后预测酶切总长度相符。测序结果显示,所克隆基因的部分 cDNA 序列长 774 bp,并且在正义链第 305 个碱基处存在 *Hind* Ⅲ酶切位点,与先前分析情况吻合。



M:DNA 标准(DL 2000);1:PCR 产物

图 1 琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 产物



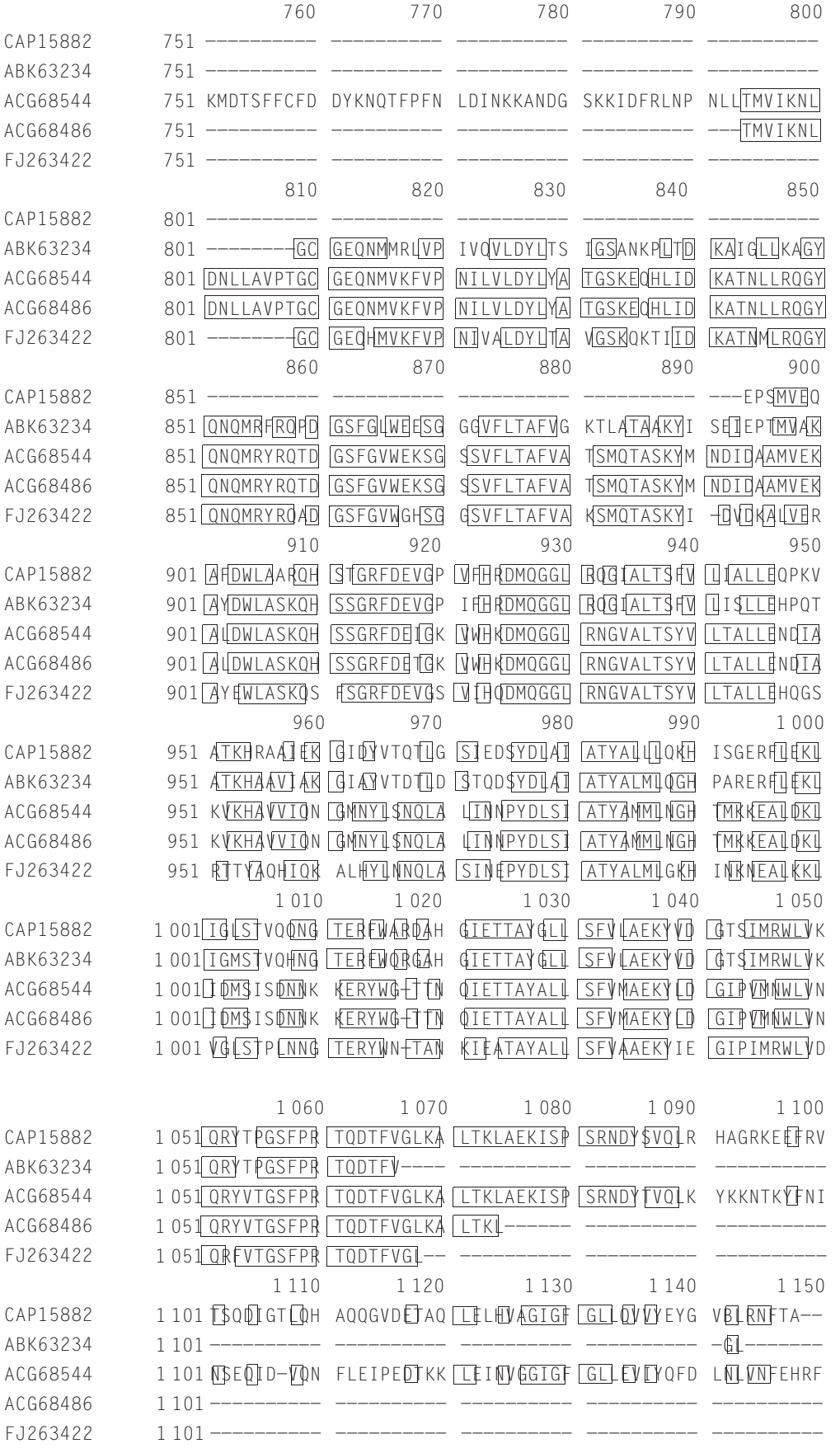
M:DNA 标准(DL 2000);1:经 *Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切产物

图 2 双酶切鉴定 PCR 产物

2.2 生物信息学分析

利用 DNASIS 分析所克隆的 TEP1 核苷酸序列,推导其氨基酸序列由 258 个氨基酸组成。利用所推导的氨基酸序列在 GenBank 中进行 BLAST 查询,结果显示所克隆的 cDNA 氨基酸序列与冈比亚按蚊 TEP1 氨基酸序列(ACG68486)和阿拉伯按蚊氨基酸序列(ACG68544)的同源性均高达 72%,与斯氏按蚊 TEP1 氨基酸序列(ABK63234)的同源性为 59%,与冈比亚按蚊的 TEP4 氨基酸序列(CAP15882)同源性为 59%(图 3)。在 GenBank 中进行核苷酸序列注册,获得序列注册号(FJ263422)。

利用其氨基酸序列对该蛋白的分泌特性进行预测,结果显示,该序列不包含信号肽序列,为非分泌型蛋白。对跨膜区的分析和预测结果显示,该序列含有 1 个跨膜区,位于第 53 ~72 个氨基酸,分值高达 1 024(>500 有意义),其跨膜方向可能为从外到内(图 4)。



方框部分代表不同序间的相同位点

图 3　不同按蚊的 TEP 蛋白序列多重排列

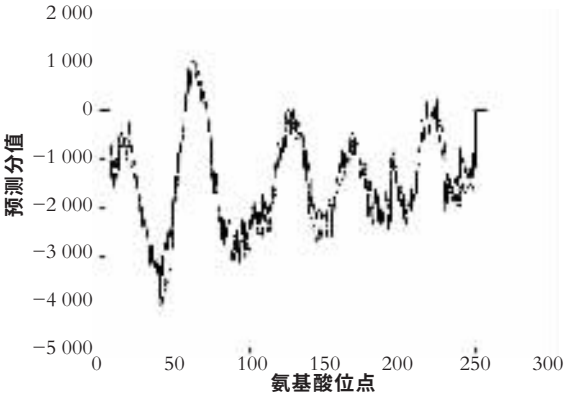


图4 利用 TMpred 程序预测大劣按蚊 TEP1 跨膜区

3 讨论

蚊与疟原虫的相互关系,尤其是蚊抗疟原虫的天然免疫机制,已成为近年来疟疾研究的热点。在20世纪90年代初 WHO 提出了遗传改造蚊媒的疟疾防治新策略,即将蚊抗疟原虫感染的相关基因导入按蚊基因组中,使其稳定遗传并在自然种群中扩散,从而达到阻断疟疾传播的目的[3],提示研究蚊抗疟原虫感染相关分子的基因及其作用具有重要意义。侵入按蚊体内的疟原虫首先需被按蚊识别,进而激活一系列的酶联反应,活化蚊抗疟原虫感染的各种天然免疫反应,如细胞吞噬作用、抗菌肽的产生和黑化包被反应等[4-6]。因此,蚊对入侵疟原虫的识别是启动其免疫反应的关键环节。研究表明,按蚊是通过模式识别机制完成对入侵病原体的识别,而 TEP1 可能作为模式识别机制中的重要分子,参与了蚊抗疟原虫感染的多种免疫反应[7]。

TEPs 在昆虫的天然免疫反应中起着重要的作用,其中 TEP1 被认为是一个重要的免疫诱导蛋白,参与了昆虫天然免疫反应中的免疫识别、诱导黑化和吞噬溶解以及直接杀伤过程[8]。迄今为止,已克隆了多种昆虫的 TEP1 基因,如烟草天蛾、天蚕、斯氏按蚊和冈比亚按蚊等,并对它在昆虫免疫防御反应中的作用进行了广泛研究。目前在冈比亚按蚊中已克隆出了19种不同的 TEP 基因,其中 TEP1 在冈比亚按蚊抗疟原虫感染中起着重要的作用[9]。研究结果显示,TEP1 在冈比亚按蚊对疟原虫的免疫反应中不但参与识别疟原虫,还参与对疟原虫的直接杀伤:疟原虫动合子在穿过中肠上皮以后,在基底膜中接触到溶解的血淋巴成分,之后 TEP1 附着到动合子上,一方面识别动合子,同时介导溶解和黑化包被反应;另一方面形成补体复合物直接攻击使疟原虫死亡[10];同时 TEP1 蛋白还和按蚊对疟原虫的易感性有关[11]。

本实验从大劣按蚊成功克隆了 TEP1 的部分 cDNA 序列。结果显示,克隆的 cDNA 序列长 774 bp,与冈比亚按蚊 TEP1 和斯氏按蚊的 TEP1 具有很高的同源性。同时实验过程也显示,目的片段中如果存在酶切位点,则会影响对构建的重组质粒的鉴定结果。生物信息学分析结果显示,所克隆的部分序列不包含信号肽序列,然而这并不能提示该蛋白为非分泌型蛋白,因为本研究所克隆的仅为 TEP1 的部分序列。对跨膜区的分析结果提示该序列中包含了1个跨膜区,且其大部分序列在细胞膜外。以往对冈比亚按蚊 TEP1 的研究结果也提示,该蛋白可能由血淋巴细胞合成并分泌后,通过与疟原虫的结合而触发蚊天然免疫的发生。大劣按蚊 TEP1 部分 cDNA 序列的成功克隆为下一步利用 RACE 法获得其全长序列或从大劣按蚊 cDNA 文库中筛选其全序列创造了条件,进而为研究 TEP1 分子在大劣按蚊抗疟原虫天然免疫反应中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] Strand M R. The insect cellular immune response[J]. Insect Science, 2008, 15(1):1-14.

[2] Blandin S A, Marois E, Levashina E A. Antimalarial responses in *Anopheles gambiae*: from a complement-like protein to a complement-like pathway[J]. Cell Host Microbe, 2008, 3(6): 364-374.

[3] Crampton J M, Comley I, Eggleston P, *et al*. Molecular biological approaches to the study of vectors in relation to malaria control[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992, 87(Suppl 3): 43-49.

[4] Chen Y, Weng Z H, Zheng L. Innate immunity against malaria parasites in *Anopheles gambiae*[J]. Insect Science, 2008, 15(1): 45-52.

[5] 王 英,张锡林,段建华,等.感染约氏疟原虫前后大劣按蚊血淋巴的差异蛋白分析[J].第三军医大学学报, 2005, 27(17): 1735-1738.

[6] 杨 松,时超美,周桃莉,等.大劣按蚊对约氏疟原虫卵囊黑化相关血细胞类型的初步鉴定[J].第三军医大学学报, 2004, 26(6): 498-500.

[7] Blandin S, Shiao S H, Moita L F, *et al*. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*[J]. Cell, 2004, 116(5): 661-670.

[8] Blandin S, Levashina E A. Thioester-containing proteins and insect immunity[J]. Mol Immunol, 2004, 40(12): 903-908.

[9] Levashina E A, Moita L F, Blandin S, *et al*. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*[J]. Cell, 2001, 104(5): 709-718.

[10] Aderem A, Underhill D M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages[J]. Annu Rev Immunol, 1999, 17: 593-623.

[11] Baxter R H, Chang C I, Chelliah Y, *et al*. Structural basis for conserved complement factor-like function in the antimalarial protein TEP1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(28): 11615-11620.

(编辑 张 维)