DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.003
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

文章编号:1000-5404(2004)06-0473-03

论著

AdPPO4基因部分序列的cDNA克隆与序列分析

邱宗文,郝宏兴,张锡林,徐文岳 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 克隆大劣按蚊(*An dirus*)前酚氧化酶(prophenoloxidase,PPO)基因部分序列。方法 根据已报道的多种昆虫以及冈比亚按蚊PPO基因编码的保守氨基酸序列设计简并引物,以大劣按蚊幼虫总RNA为模板进行RT-PCR扩增,目的片段经TA克隆后测定其核苷酸序列,然后进行序列查询与比对。结果 从大劣按蚊幼虫中获得的PPO4基因(AdPPO4)部分序列长597 bp,编码199个氨基酸;AdPPO4与冈比亚按蚊PPO4基因的核酸和氨基酸序列同源性分别达84%和90%。结论 从大劣按蚊幼虫中成功地克隆出了AdPPO4基因的部分序列,与冈比亚按蚊PPO4基因具有很高的同源性。

关键词:大劣按蚊;前酚氧化酶;基因克隆
中图法分类号:R554;Q785;R384.1 文献标识码:A

Cloning and analysis of partial cDNA sequence of prophenoloxidase 4 gene of *Anopheles dirus*

QIU Zong-wen, HAO Hong-xing, ZHANG Xi-lin, XU Wen-yue (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To clone the partial cDNA sequence of prophenoloxidase (PPO) gene of *Anopheles dirus*. **Methods** Degenerative primers were designed according to the conserved sequence blocks within the prophenoloxidase of insects. RNA sequence of the larva of *Anopheles dirus* was amplified by RT-PCR to get the prophenoloxidase cDNA which was then cloned into T vector and sequenced. The partial cDNA sequence of prophenoloxidase gene was analysed and compared with other prophenoloxidase gene of insects. **Results** The partial cDNA sequence of AdPPO4 was 597 bp, and its deduced amino acid sequence was 199aa. The cDNA sequence homology and amino acid sequence homology was 84% and 90%, respectively, as compared with the PPO4 gene of *Anopheles gambiae*. **Conclusion** The AdPPO4, with high sequence homology with the PPO4 gene of *Anopheles gambiae*, is successfully cloned from the larva of *Anopheles dirus*.

Key words: *Anopheles dirus*; prophenoloxidase; cloning

蚊媒传播的疟疾是危害严重的热带病之一,在全世界的人群中有很高的发病率和致死率,每年大约有2~3亿人感染,约100~200万人因感染而死亡,尤其多见于5岁以下的儿童。传统上的疟疾控制策略主要依赖于药物治疗患者,以及利用杀虫剂控制蚊媒种群。这些措施虽有一定的效果,但由于疟原虫多药抗性株的出现并迅速扩散[1],以及蚊媒对杀虫剂耐受性的增加[2],目前又无有效的抗疟疫苗,疟疾有可能在一些地区继续或再度流行。因此,迫切需要发展新的疟疾控制策略。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,也就是将蚊虫抵御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]。研究已证实黑化包被反应是按蚊抵御疟原虫感染的最主要免疫防御机制,而前酚氧化酶(prophenoloxidase,PPO)是介导黑化包被反应的一种最关键酶。由于蚊个体小,直接从蚊体内分离或纯化蛋白质受到严重限制,因此在分子水平上研究按蚊抵御疟原虫感染相关的基因显得尤为重要。如在冈比亚按蚊中已克隆出了6种不同的PPO基因[4],并证实在成蚊、卵、幼虫和蛹4个时期均有不同的PPO基因表达,其中PPO4基因主要在冈比亚按蚊幼虫中表达,而在成蚊中的表达量却很低,但当吸血感染疟原虫后表达量又明显增强,提示该基因可能与疟原虫感染相关。大劣按蚊(*Anopheles dirus*, *An. dirus*)是我国海南地区和东南亚地区疟疾传播的主要蚊媒,但有关大劣按蚊抗疟原虫感染相关的研究很少,目前还少见到大劣按蚊PPO基因cDNA

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200237)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200237)
作者简介:邱宗文(1968-),男,四川省泸县人,硕士研究生,主管技师,主要从事按蚊抗疟原虫感染免疫防御反应方面的研究。电话:(023)68752243
通信作者:张锡林,电话:(023)68752243,E-mail:jsczxl@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-10-18;修回日期:2004-01-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

克隆的相关报道,本实验从幼虫中成功克隆出了大劣按蚊 PPO4 基因(AdPPO4)的部分序列。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试蚊媒与实验动物 大劣按蚊海南株为本室长期饲养繁殖的稳定蚊种,由本教研室养蚊室提供;昆明株小鼠由本校实验动物中心提供,体质量 16~20 g,雌雄不限。

1.1.2 主要试剂 Tripure(Roche)、MMLV 逆转录酶、*Taq* 酶、*Hind* Ⅲ和 *Eco*RⅠ内切酶(Promega)、凝胶回收试剂盒(上海申友)、pMD18T 载体(大连宝生物)、质粒 DNA 抽提试剂盒(上海申友)。

1.2 方法

1.2.1 PPO 简并引物 根据冈比亚按蚊、烟草天蛾和天蚕等 9 种已知昆虫 PPO 的保守氨基酸序列 HHWHWHLVYP 和 MRDP(F/V/I/T)FYRWH 设计简并引物,上游引物序列为:5′-CCAGCG-GTAGAA(ACG)(AG)(ATC)(ATCG)GG(AG)TC-3′;下游引物序列为:5′-AACCTGCA(CT)CA(CT)TGGCA(CT)TGGCA-3′,委托上海申友生物技术公司合成,理论上预测扩增获得的目的 DNA 片段大约为 600 bp。

1.2.2 RT-PCR 收集大劣按蚊 3 龄幼虫 50 只,用 0.1% 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate,DEPC)清洗 3 次后置入匀浆器内,立即加入 1 ml Tripure 试剂进行匀浆,随后操作按 Tripure 试剂说明抽提幼虫总 RNA。以 Oligo(dT)15 为引物,常规逆转录制备 cDNA。PCR 反应体系如下:10 倍稀释的 cDNA 模板 4 μl,10× PCR Buffer 5 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μl,10 mmol/L 的 PPO 上、下游简并引物各 2 μl,*Taq* 酶 3.0 U,用 ddH_2O 补充到总体积为 50 μl,平行做 4 管;PCR 反应条件:94 ℃预变性 3 min 后,分别于 94 ℃变性、55 ℃退火和 72 ℃延伸各 1 min,共 35 个循环,最后在 72 ℃延伸 5 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,选择约 600 bp 的目的片段进行切胶回收、纯化。

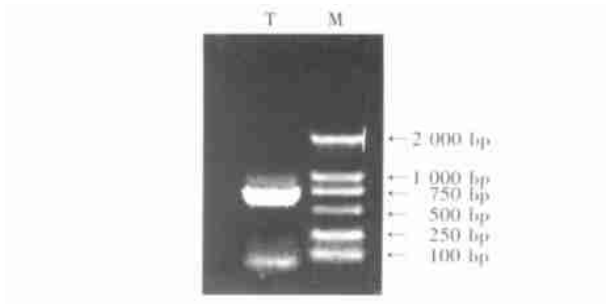
1.2.3 TA 克隆与测序 按 pMD18 T 载体试剂盒说明书进行操作,将纯化的目的片段与 pMD18 T 载体连接后,转化至 XL1-Blue 菌株(用 CaCl2 法制备感受态细菌),在含安苄青霉素的 LB 平板上培养过夜,随机挑取数个白斑,常规抽提质粒,以 *Eco*R Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切鉴定为阳性克隆的质粒为模板,再次用 PPO 简并引物在相同条件下进行 PCR 扩增出目的片段的克隆质粒送上海申友生物技术公司测定插入片段的序列。

1.2.4 核酸与氨基酸序列的分析 根据得到的核酸序列,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 PPO 基因编码的氨基酸序列进行比对;同时登录 GenBank 数据库 Blast 查询相似的其它 PPO 序列,并进行序列比对和分析。

2 结果

2.1 目的片段的扩增和克隆及鉴定

以大劣按蚊幼虫总 RNA 经逆转录合成的 cDNA 为模板,用自行设计的 PPO 简并引物经 PCR 扩增后获得 1 条约 600 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,并转化到氯化钙法制备的感受态细菌,在含安苄青霉素的 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*RⅠ和 *Hind* Ⅲ双酶切后可见切下一条约大于 600 bp 的 DNA 片段。利用 10 倍稀释的经双酶切鉴定为阳性克隆的质粒为模板,再次用 PPO 简并引物经 PCR 扩增后仍然获得一条约 600 bp 的条带,并与以 cDNA 为模板扩增出的条带大小一致。



T: PCR product; M: DNA marker

图 1 AdPPO4 RT-PCR 产物的 1%琼脂糖凝胶电泳分析

Fig 1 Results of AdPPO4 RT-PCR product by 1% agarose electrophoretic analysis

2.2 目的片段的序列测定与氨基酸分析

测序结果显示,所克隆基因的部分 cDNA 序列长 597 bp,推导的氨基酸序列为 199 个氨基酸。Blast 查询结果显示该 cDNA 序列与冈比亚按蚊 PPO4 基因序列的同源性达 84%(493/583),氨基酸序列的同源性为 90%(181/199 aa)。氨基酸序列两端分别为 PPO 基因的两个铜结合位点:CuA:HHWHWHLVYP;CuB:MRDP(F/V/I/T)FYRWH。由于该两个结合位点的氨基酸序列在各种昆虫的 PPO 基因中具有高度的保守性,也是 PPO 基因的重要标记,因此表明克隆所得的片段确为大劣按蚊 PPO 基因的部分序列,并命名为 AdPPO4 基因,已提交 GenBank 数据库(Access Number:AY347484)。

3 讨论

侵入按蚊体内的病原体可被按蚊识别并可激发其不同的免疫防御反应,如目前研究最清楚的细胞吞噬作用和细胞包被反应[5] 等。吞噬作用涉及一个复杂的细胞处理过程,通过特异性的受体识别、粘附和吞噬,并激活细胞内的级联反应来破坏吞噬的病原体[6]。细胞包被反应主要是针对入侵的较大病原体,大量的血细胞包围在病原体周围,并形成囊包裹病原体进行黑化反应并将其杀死,如疟原虫抗性蚊株对中肠内发育的疟原虫卵囊的黑化包被反应。目前已证实黑化包被反应是昆虫最重要的免疫防御机制之一[7],同时也是按蚊抵御疟原虫感染的最重要免疫机制。已知冈比亚按蚊抗性株可黑化包被中肠内发育的疟原虫晚期动合子和早期卵囊,大劣按蚊也可对侵入其中肠发育的约氏疟原虫卵囊进行黑化包被反应并表现出对约氏疟原虫感染的抗性。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PPO 是按蚊体内介导黑化包被反应的一种最关键酶, PPO 激活后可转变成具有活性的酚氧化酶(phenoloxidase, PO), 可催化酪氨酸羟基化为二羟基苯基丙氨酸, 二羟基苯基丙氨酸和多巴胺又可氧化为它们各自的苯醌, 这个活性的苯醌可介导蛋白交联和聚合成黑色素沉积于包被的病原生物表面。由于在黑化包被反应中生成的一些多醌物质和自由基等具有毒性, 因此当沉积到入侵的病原体周围时可直接将其杀死, 被包被的病原体也可因营养缺乏而死亡。此外, 黑化现象在昆虫中非常普遍, 除包被的入侵病原体外, 还包括卵壳和几丁质的硬化和色素沉积, 以及创伤愈合等, 因此根据黑化反应的多种功能提示在昆虫基因组中可能拥有大量的 PPO 基因。如在冈比亚按蚊中已克隆 6 种不同的 PPO 基因, 并已证实在按蚊不同的生长发育时期均有不同的 PPO 基因表达, 但至于具体是那种或几种 PPO 基因参与了黑化包被疟原虫的反应及其明确的分子机制尚未阐明, 还需有待于进一步研究。

克隆 PPO 级联反应中的关键分子是阐明该机制和构建转基因蚊的前提。迄今为止, 已克隆了多种昆虫的 PPO 基因, 如烟草天蛾和天蚕等, 并对它在昆虫免疫防御反应中的作用已进行了广泛研究[8]。大劣按蚊是东南亚和我国海南地区的重要传疟蚊媒, 但对大劣按蚊抵御疟原虫感染的免疫反应机制的研究较少。本实验从大劣按蚊幼虫中成功地克隆了 AdPPO4 基因的部分序列, 与冈比亚按蚊 PPO4 基因比较具有很高的同源性。已有研究提示冈比亚按蚊 PPO4 基因在幼虫中呈高丰度表达, 而在成蚊中表达很少, 但在吸血感染疟原虫后表达可明显增强, 在本实验中克隆的 AdPPO4 基因与疟原虫感染的相关性研究已在进行中。此外, 由于 AdPPO 大约有 2 200 多个碱基, 经 cDNA 克隆获得其全序列比较困难, 但 AdPPO 基因部分序列的克隆为下一步经 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 PPO 基因在黑化包被疟原虫反应中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] Ridley R G. Malaria: Dissecting chloroquine resistance[J]. Curr Biol, 1998, 8(10): 346—349.
[2] Curtis C F. Should DDT continue to be recommended for malaria vector control[J]? Med Vet Entomol, 1994, 8(2): 107—112.
[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(3): 43—49.
[4] Muller H M, Dimopoulos G, Blass C, *et al*. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11727—11735.
[5] Gillespie J P, Kanost M R, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity[J]. Annu Rev Entomol, 1997, 42: 611—643.
[6] Aderem A, Underhill D M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages [J]. Annu Rev Immunol, 1999, 17: 593—623.
[7] Lavine M D, Strand M R. Insect hemocytes and their role in immunity[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(10): 1295—1309.
[8] Beerntsen B T, James A A, Christensen B M. Genetics of mosquito vector competence[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(1): 115—137.

(编辑　冯崇英)

文章编号: 1000-5404(2004)06-0475-01

个案与短篇

新生儿缺氧缺血性脑病 CT 动态观察

Dynamic observation of CT in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy

覃世文[1], 张妹娟[1], 唐肇普[2], 龚水根[2], 史　源[1]　(第三军医大学大坪医院野战外科研究所: [1] 儿科, [2] 影像诊断科, 重庆 400042)

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是威胁新生儿生命的重要疾病, 也是导致婴幼儿神经系统后遗症的主要原因。我科自 1996 年 9 月至 2002 年 8 月, 对诊断为新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)的住院患儿, 进行了头颅 CT 动态随访观察, 现报告如下。

1　对象和方法

1.1　研究对象

研究对象为本科明确诊断为 HIE 的住院患儿, 诊断标准按照 1989 年全国新生儿座谈会纪要所制订的诊断及分度标准[1]。共观察并收集资料完整的 67 例, 男 42 例, 女 25 例。平均年龄 2.7 d。轻度 24 例, 中度 26 例, 重度 17 例。

1.2　方法

分别在发病早期(1～3 d)、中期(10～15 d)、恢复期(3、6 个月)进行 CT(GE9800 型, 美国)检查。均采用头颅平扫, 层厚间距为 10 mm, 扫描时间 4.8 s/层, 窗位 30～40 Hu。CT 值: 参照正常新生儿脑实质 CT 值, 确定脑实质低密度影的依据为 CT 值< 18 Hu, 脑出血 CT 值> 40 Hu。脑萎缩诊断依据: 脑室、脑池、脑沟均扩大为全脑萎缩; 仅有脑表面沟回增宽及脑池扩大为脑皮层萎缩。仅有脑室扩大为髓质萎缩。

作者简介: 覃世文(1963—), 男, 重庆市人, 主治医师, 主要从事新生儿疾病方面的研究。电话: (023)68757316

收稿日期: 2003-02-19; 修回日期: 2003-05-20

(下转 485 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net