DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.002

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0470-03

大劣按蚊AdPPO2、AdPPO3基因cDNA克隆与组织定位

郝宏兴,邱宗文,段建华,况明书,黄复生,王 英 (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PPO基因家族新成员的cDNA部分序列,并对所克隆基因进行蚊体组织定位研究。方法 根据已报道的多种昆虫PPO的保守氨基酸序列设计简并引物,以大劣按蚊总RNA为模板进行RT-PCR扩增、目的片段克隆入T载体,然后,用PCR方法筛选新的PPO克隆并测序;以RT-PCR方法分析AdPPO2和AdPPO3在蚊血淋巴、蚊胃和唾液腺的分布情况。结果 AdPPO2和AdPPO3基因cDNA部分序列长均为597 bp,编码199个氨基酸;它们在血淋巴、蚊胃和唾液腺均有分布。结论 从大劣按蚊成功克隆获得2种新的PPO基因家族成员的cDNA部分序列,为进一步克隆其全序列奠定了基础。

关键词:大劣按蚊;前酚氧化酶;基因克隆
中图法分类号:Q55;Q785;R384.1 文献标识码:A

Molecular cloning and localization of cDNAs of AdPPO2 and AdPPO3 of *Anopheles dirus*

HAO Hong-xing, QIU Zong-wen, DUAN Jian-hua, KUANG Ming-shu, HUANG Fu-sheng, WANG Ying (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone the partial cDNA sequences of new members of prophenoloxidase (PPO) gene family from *Anopheles dirus* and to localize their mRNA in the mosquitoes. Methods Degenerative primers were designed according to the conserved amino acid sequence within PPOs of insects. RNA sequence of adults of *Anopheles dirus* was reversely transcripted and amplified. The obtained PPO cDNA was cloned into T vector. The new AdPPOs were obtained by screening of the positive clones using PCR and sequencing. The localization of their mRNA in the hemolymph, midguts, and salivary glands was analyzed by RT-PCR. Results The partial cDNA sequences of AdPPO2 and AdPPO3 were 597 bp and their deduced amino acid sequences were 199aa. Their mRNA could be found in the hemolymph, midguts, and salivary glands. Conclusion The partial cDNA sequences of the two AdPPO members from *Anopheles dirus* have been successfully cloned, providing the foundation for cloning their full-length sequences.

Key words: *Anopheles dirus*; prophenoloxidase; cloning

控制蚊媒是疟疾防治中的重要手段,然而,按蚊对杀虫剂抗性的不断扩散使疟疾的防治面临新的挑战。WHO于20世纪90年代初提出了遗传改造蚊媒的疟疾防治新策略,就是把蚊虫抵抗疟原虫感染的相关基因导入按蚊基因组,使其稳定遗传并在自然种群中扩散,从而起到阻断疟疾传播的目的[1]。黑化包被反应是按蚊抵御疟原虫感染的最主要机制,前酚氧化酶(prophenoloxidase, PPO)在其中起关键的作用[2]。大劣按蚊(*Anopheles dirus*, *An. dirus*)是东南亚地区和我国地区疟疾的重要传播媒介[3]。黄复生等[4]研究发现,对人疟原虫敏感的大劣按蚊可以黑化包被感染的鼠疟原虫—约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)卵囊,因此,大劣按蚊—约氏疟原虫模型是研究按蚊抵抗疟原虫感染机制较好的模型。为进一步研究PPO在大劣按蚊抵抗约氏疟原虫免疫中的作用,本研究在从大劣按蚊成蚊克隆获得AdPPO1[5]基因cDNA部分序列的基础上再次尝试克隆PPO基因家族新成员的cDNA部分序列,以便为研究不同PPO基因在按蚊免疫反应特别是黑化包被疟原虫中的作用奠定基础。

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:郝宏兴(1967—),男,山西省平定县人,博士,讲师,主要从事蚊与疟原虫相互关系的分子生物学及免疫学方面的研究。电话:(023)68752243
通信作者:黄复生,电话:(023)68752244;E-mail:fushengh@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-11-18;修回日期:2004-01-14

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

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　蚊虫　　大劣按蚊(*Anopheles dirus*)由本实验室在 24～26 ℃、相对湿度 70%～80%的养蚊室饲养提供。

1.1.2　试剂　　Trizole RNA 抽提试剂、*Taq* 酶、质粒小量抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒为上海申友公司产品, MMLV 逆转录酶(Promega), pMD18-T 载体(Takara)。

1.2　引物

PPO 简并引物

正向: 5′-AACCTGCA(CT)CA(CT)TGGCA(CT)TGGCA-3′

反向: 5′-CCAGCGGTAGAA(ACG)(AG)(ATC)(ATCG)GG(AG)TC-3′

AdPPO1 特异引物

正向: 5′-ATCGTCGTGGTCAAATCTC-3′

反向: 5′-CTACTCCTGTCGCTATCCC-3′

AdPPO2 特异引物

正向: 5′-GCGTACTTCCCCGAAGATGATCCG-3′

反向: 5′-ATGTTGTGCAGGCTGCCGTACAG-3′

AdPPO3 特异引物

正向: 5′-TGCGTCCGCTCACGAGTCTG-3′

反向: 5′-CCCACCACACCGTATCCCTCC-3′

1.3　方法

1.3.1　RT-PCR 取雌蚊 30 只, 去头, 加 1 ml Trizole 试剂, 按 Trizole 试剂说明抽提大劣按蚊成蚊总 RNA, 以 oligo (dT) 15 为引物, 常规反转录制备 cDNA。以 PPO 简并引物进行 PCR 扩增, 具体反应体系为: 1 μl cDNA 为模板, 5 μl 10× PCR Buffer, 1 μl 10 mmol/L dNTP, 2 μl 25 mmol/L $MgCl_2$, 上、下游引物各 2 μl, Taq 酶 2.5 U, 用 ddH_2O 补充到总体积为 50 μl。反应条件: 94 ℃预变性 3 min 后 94 ℃变性 1 min, 55 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 ℃再延伸 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 选取约 600 bp 的目的片段进行切胶回收、纯化。

1.3.2　TA 克隆与筛选　　按 pMD18 T 载体试剂盒说明将纯化的目的片段与 pMD18 T 载体连接, 转化至 XL1-Blue 菌株, 在含氨苄青霉素的平板上培养过夜, 随机挑取数个白斑, 常规抽提质粒, 用简并引物和 AdPPO1 特异引物经 PCR 方法筛选所得克隆, 对简并引物扩增阳性而特异引物扩增阴性的克隆进行插入片段的核甘酸序列测定。获得第 2 种 PPO 基因克隆后, 根据其核酸序列设计特异引物用于第 3 种 PPO 基因克隆的筛选, 以此类推, 直到一次筛选数十个克隆仍没有新的 PPO 克隆获得为止。

1.3.3　核酸、氨基酸序列的分析　　对克隆所得 PPO 基因 cDNA 部分序列进行 BLAST 相似性检索、推导氨基酸序列分析、多重序列比较和系统进化分析。

1.3.4　组织定位分析　　按文献[6]方法采集大劣按蚊血淋巴, 常规解剖蚊胃和唾液腺, 然后分别制备其总 RNA, 以 AdPPO2、AdPPO3 特异引物进行 RT-PCR 分析, 实验设置以阳性质粒为模板的阳性对照和不加模板的阴性对照。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增、TA 克隆

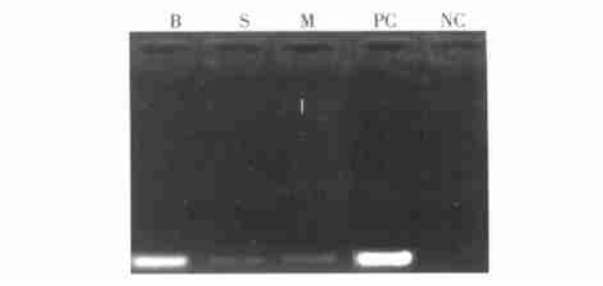
以大劣按蚊总 RNA 逆转录所得 cDNA 为模板, 用 PPO 简并引物经 PCR 扩增出约 600 bp 的条带, 与目的片段的理论值相符。将该片段切胶纯化后与 pMD18 T 载体连接, 氯化钙法制备感受态细菌, 转化后在选择平板上共获得近百个白斑。

2.2　AdPO2、AdPO3 筛选和序列分析

利用 PCR 方法从转化获得的阳性克隆中筛选得到了 2 种新的 PPO 基因克隆, 分别命名为 AdPPO2 和 AdPPO3。测序结果显示, AdPPO2 和 AdPPO3 基因 cDNA 部分序列长均为 597bp, 推导氨基酸序列为 199 个氨基酸。BLAST 查询结果显示, AdPPO2 cDNA 部分序列与冈比亚按蚊 PPO 亚单位 I 基因具有 83.98% 的序列相似性(498/593 bp), 氨基酸序列相似性达 84.42%(168/199 aa)。AdPPO3 与斯氏按蚊 PPO 基因的序列相似性最高, 核酸序列和氨基酸序列的相似性分别为 83%和 93%, 而与冈比亚按蚊 PPO6 的核酸序列和氨基酸序列的相似性分别为 82%和 93%。两种 PPO 的推导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, 位于这两个保守区域内的 6 个组氨酸残基也呈高度保守性。因此, 所得克隆确为新的大劣按蚊 PPO 基因的部分序列。目前, AdPPO2、AdPPO2 cDNA 部分序列已提交 GeneBank 数据库注册(Accession Number: AdPPO2: AY344480; AdPPO3: AY365024)

2.3　组织定位分析

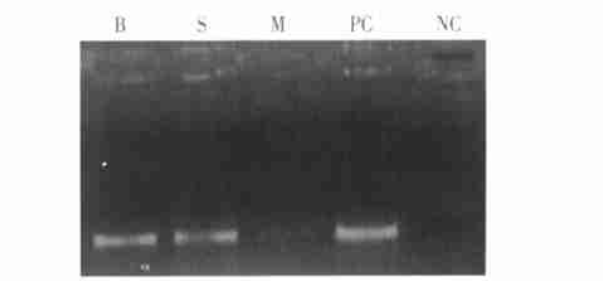
分别使用 AdPPO2 和 AdPPO3 特异引物, 通过对血淋巴、蚊胃和唾液腺 cDNA 进行 PCR 扩增, 结果显示, 2 种 PPO 基因在大劣按蚊血淋巴、蚊胃和唾液腺均有表达(图 1、2)。



B: Hemolymph; S: Salivary gland; M: Midgut; PC: Positive control; NC: Negative control

图 1　AdPPO2 组织定位结果

Fig 1　Localization of AdPPO2 transcripts in the mosquitoes



B: Hemolymph; S: Salivary gland; M: Midgut; PC: Positive control; NC: Negative control

图 2　AdPPO3 组织定位结果

Fig 2　Localization of AdPPO3 transcripts in the mosquitoes

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

3 讨论

按蚊有多种PPO，尚不知是哪种或哪几种PPO参与黑化包被疟原虫的反应。目前，从冈比亚按蚊已克隆到9种PPO基因[7~9]，从斯氏按蚊[10]、库态按蚊均只克隆到一种PPO基因。大劣按蚊是东南亚和我国海南地区重要的传疟蚊媒，但对大劣按蚊抗疟免疫反应的研究较少，我们在首次克隆获得大劣按蚊AdPPO1基因(Gene Bank Accession Number：AY221946)部分序列的基础上又克隆得到了2种新的PPO基因cDNA部分序列：AdPPO2、AdPPO3。序列相似性分析显示，AdPPO2与AdPPO1之间有33.8%的同源性，AdPPO3与AdPPO1的同源性为28.8%，而AdPPO2和AdPPO3间同源性为32.6%，说明确为大劣按蚊PPO家族不同的成员，大劣按蚊还可能存在更多的PPO类型，AdPPO2、AdPPO3的克隆为进一步克隆其它PPO和研究PPO家族不同成员在黑化包被疟原虫反应中的作用奠定了基础。

昆虫PPO主要由血细胞合成[11,12]，然而，由血细胞合成的PPO可以被运输到昆虫的其它器官或组织[13,14]。例如，家蚕(*Bombyx mori*)PPO可以从血细胞转运到角皮[15]。甲壳纲节肢动物的PPO主要分布于血细胞，但是，最近对龙虾(*Panulirus interruptus*)的研究发现，86.3%的PPO酶活性存在于血浆而不是血细胞本身[16]。研究表明，冈比亚按蚊蚊胃和唾液腺也有PPO存在[17]，但是，并不清楚这些PPO是由蚊胃和唾液腺本身合成还是由血细胞合成后转运到蚊胃和唾液腺的。由于在蚊胃检测到了PPO的mRNA，特别是PPO1 mRNA的水平在蚊胃相对较高，因此，Muller等[9]认为蚊胃和唾腺也可能可以合成PPO。果蝇体内有关黑色素合成的相关基因定位于晶体细胞，但是，应用多米诺突变幼虫(domino mutant larvae)的研究结果提示，不能排除血细胞以外的其它细胞可以合成PPO的可能，因为这种完全没有血细胞的突变幼虫仍然可以检测到明显的PPO的活性，推测这些PPO可能由异常的淋巴腺细胞合成[18]。本研究表明，AdPPO2和AdPPO3在大劣按蚊蚊胃和唾腺均有表达，提示大劣按蚊蚊胃和唾液腺本身可以合成部分PPO，因此，除了血细胞以外，按蚊PPO的来源可能还包括蚊胃和唾液腺等上皮组织。不过，大劣按蚊蚊胃和唾液腺是否可以合成PPO还需要原位杂交、Northern杂交等更为准确的实验结果的验证。

参考文献：

[1] Crampton J M, Comley J, 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.

[2] Soderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. Curr Opin Immunol, 1998, 10(1): 23-28.

[3] 陆宝麟. 50年来我国蚊媒研究进展[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1999, 10(3): 161-165.

[4] 黄复生, 王兴相. 蚊血细胞对正常和退变之约氏疟原虫卵囊的反应及其在卵囊黑化中之作用[J]. 第三军医大学学报, 1993, 15(1): 8-10.

[5] 郝宏兴, 黄复生. 大劣按蚊前酚氧化酶基因部分序列的克隆与序列分析[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003, 16(3): 129-130.

[6] Han Y S, Chun J, Schwartz A, *et al*. Induction of mosquito hemolymph proteins in response to immune challenge and wounding. Dev Comp Immunol, 1999, 23(7-8): 553-562.

[7] Lee W J, Ahmed A, Della Torre A, *et al*. Molecular cloning and chromosomal localization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria vector *Anopheles gambiae*[J]. Insect Mol Biol, 1998, 7(10): 41-50.

[8] Jiang H B, Wang Y, Konochkina S E, *et al*. Molecular cloning of cDNAs for two pro-pehnol oxidase subunits from the malaria vector *Anopheles gambiae*[J]. Insect Mol Biol, 1997, 27(7): 693-699.

[9] 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.

[10] Cui L, Luckhart S, Rosenberg R. Molecular characterization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria mosquito *Anopheles stephensi*[J]. Insect Mol Biol, 2000, 9(2): 127-137.

[11] Aspan A, Huang T S, Cerenius L, *et al*. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(4): 939-943.

[12] Cho W L, Liu H S, Lee C H, *et al*. Molecular cloning, characterization and tissue expression of prophenoloxidase cDNA from the mosquito *Armigeres subalbatus* inoculated with *Dirofilaria immitis* microfilariae[J]. Insect Mol Biol, 1998, 7(1): 31-40.

[13] Li J, Tracy J W, Christensen B M. Phenol oxidase activity in hemolymph compartments of *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae[J]. Dev Comp Immunol, 1992, 16(1): 41-48.

[14] Ashida M. A cane sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Insect Biochem, 1981, 11(1): 57-65.

[15] Asano T, Ashida M. Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and demonstration of its transport from hemolymph [J]. J Biol Chem, 2001, 276(14): 11100-11112.

[16] Hernandez L J, Gollas G T, Gomez J, *et al*. In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxidase is located in plasma not in haemocytes[J]. Fish & Shellfish Immunol, 2003, 14(2): 105-114.

[17] Brey P T, Ahmed A, Lee W, *et al*. Tyrosinase-type prophenoloxidase distribution in the alimentary canal of strains of *Anopheles gambiae* refractory and susceptible to Plasmodium infection[J]. Exp Parasitol, 1995, 80(4): 654-664.

[18] Braun A, Hoffmann J A, Meister M. Analysis of the Drosophila host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(24): 14337-14342.

(编辑 冯崇英)

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