DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.005
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
476 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0476-03

# 大劣按蚊AdS7基因的克隆及分析

郝宏兴,黄复生,段建华,况明书,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AdS7基因cDNA序列,为大劣按蚊基因定量研究提供内参照。方法 采用RT-PCR扩增、TA克隆技术获得AdS7 cDNA部分序列,标记地高辛AdS7探针,从大劣按蚊cDNA文库中筛选得到AdS7全长克隆,以半定量RT-PCR方法研究血餐和约氏疟原虫感染对其表达水平的影响。结果 从大劣按蚊cDNA克隆得到长464 bp的AdS7基因cDNA部分序列,从大劣按蚊cDNA文库筛选获得了长871 bp的AdS7基因全长克隆,大劣按蚊吸血和感染约氏疟原虫后24 h,AdS7表达水平没有显著变化。结论 AdS7基因可作为大劣按蚊基因定量研究的内参照。

关键词:AdS7;基因克隆;半定量RT-PCR
中图法分类号:Q554;Q785;R384.1 文献标识码:A

# Cloning and analysis of AdS7 gene of *Anopheles dirus*

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

**Abstract**: Objective To clone the cDNA sequence of ribosomal protein S7 of *Anopheles dirus* (AdS7) gene for providing an internal control gene for quantitative study of genes of *Anopheles dirus*. Methods Partial cDNA sequences of AdS7 were obtained by RT-PCR and TA cloning. The full-length clone of AdS7 was obtained by screening of the cDNA library of *Anopheles dirus* using digoxin-labeled AdS7 probe. The effects of blood feeding and *Plasmodium* infection on the AdS7 expression were analyzed by semi-quantitative RT-PCR method. Results A cDNA sequence of AdS7 (464 bp) was cloned from the cDNA of adults of *Anopheles dirus*. The full-length clone of AdS7 gene (871 bp) was obtained by screening of the cDNA library of *Anopheles dirus*. No change of AdS7 expression was observed at 24 h after blood feeding and *Plasmodium* infection. Conclusion AdS7 gene is a suitable internal control gene in the quantitative study of genes of *Anopheles dirus*.

**Key words**: AdS7; gene cloning; semi-quantitative RT-PCR

大劣按蚊(*Anopheles dirus*, *An. dirus*)是东南亚地区和我国南方山区,主要是海南及云南西部和广西南部地区的主要传疟媒介[1]。黄复生等[2]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—约氏疟原虫是研究按蚊抵御疟原虫感染机制较好的模型。为了进行大劣按蚊免疫相关基因的定量研究,需要一种看家基因作为内参照。许多昆虫基因定量研究采用核糖体蛋白S7作为内参照基因[3,4],然而,大劣按蚊核糖体蛋白S7基因(ribosomal protein S7 of *Anopheles dirus*, AdS7)尚未得到克隆,为此,本研究首次克隆了AdS7基因并对血餐和约氏疟原虫感染对其表达水平的影响进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 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。约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)约氏疟原虫BY265株,保种于昆明株小鼠体内,每周血传1次,至少每5周蚊传1次。

### 1.2 载体和菌株

pMD-18 T载体(Takara公司),XL1-Blue大肠杆菌、XLOLR大肠杆菌、ExAssit辅助噬菌体(Stratagene公司)。

### 1.3 主要试剂、试剂盒

Tripure RNA抽提试剂盒、10× PCR DIG probe synthesis mix、DIG Easy Hyb、封闭液、Anti-DIG-AP、尼龙膜(Roche),MMLV逆转录酶、Oligo dT、*Eco*RⅠ、*Hind*Ⅲ内切酶(Promega),DNA凝胶回收、质粒小抽试剂盒(上海申友生物技术公司),*Xba*、*Sal*Ⅰ内切

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:2004-01-17

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

酶(Takara 公司)。

### 1.4　蚊虫饲血和感染

选取羽化后 3~5 d 大劣按蚊雌蚊约 150 只, 分为吸糖水组(N)、吸正常小鼠血组(NB)和吸感染小鼠血组(IB)3 个组, 每组 50 只。NB 和 IB 组大劣按蚊停糖水 12 h 后分别以正常小鼠和感染小鼠饲血 1 h, 饲血完成 24 h 后分别抽提 3 组蚊的总 RNA。

### 1.5　S7 简并引物设计

通过对人、黑家鼠(*Rattus rattus*)和多种昆虫核糖体蛋白 S7 氨基酸序列进行多序列对比分析, 从中抽提出两个保守区域: "ELE(M/T)NSDLK"和"SVYKKLTG", 以此为基础设计的 S7 简并引物序列为: P1: 5′-CTGGAGCTGGAGA(T/C)(G/A)AACTC(G/C/T)GA-3′, P2: 5′-CACC(T/C)GTCAGCTTCTT(G/A)TA(C/G)AC-3′, 引物委托上海申友生物技术公司合成。

### 1.6　RT-PCR 扩增

取雌蚊 15 只, 去头, 按 Tripure 试剂盒说明抽提大劣按蚊成蚊总 RNA, 以 Oligo(dT)15 为引物, 常规反转录以合成 cDNA 第一链。PCR 反应体系为: 以 10 倍稀释的 cDNA 2 μl 为模板, 加入 5 μl 10× PCR 缓冲液, 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, 用水补充到总体积为 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, 对目的片段进行切胶回收、纯化。

### 1.7　TA 克隆和 DNA 测序

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, 重组质粒转化入 XL1-Blue 感受态细菌, 从 AMP 选择平板上随机挑取几个白斑, 用碱裂解法抽提质粒。阳性重组子质粒经 *Eco*RⅠ、*Hind* Ⅲ双酶切和 PCR 鉴定后送上海申友生物技术公司进行 DNA 序列测定, 将测序结果送入美国国立生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov, NCBI)网站, 用 Blast 在线程序进行序列相似性检索、分析。

### 1.8　地高辛标记 AdS7 探针的制备

AdS7 质粒先后经 *Xba*Ⅰ和 *Sal*Ⅰ酶切后, 切胶纯化回收目的片段, 以 1∶1 000 倍稀释的纯化产物为模板, 用 PCR 方法制备地高辛标记的 AdS7 探针, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳和点杂交实验检测标记效率。

### 1.9　cDNA 文库筛选及阳性克隆的鉴定

噬菌斑原位杂交方法参照 Roche 尼龙膜说明和文献[5], 并略为改进。以地高辛标记 AdS7 探针对大劣按蚊成蚊 cDNA 文库进行筛选[6], 阳性噬菌斑经 PCR 鉴定和内切除转化为噬菌粒后送上海申友生物技术公司进行 DNA 序列测定。

### 1.10　序列分析和同源性比较

测序所得结果送入 NCBI 网站, 用 Blastn 在线程序进行序列相似性检索, 用 DNA Star 软件包中的 EditSeq 软件进行 ORF 分析, 然后将 ORF 编码的氨基酸序列再次送入 GenBank 进行 Protein Blast 检索。用 Vector NTI version7.1 软件的 AlignX 模块进行 S7 核糖体蛋白的系统进化分析, 以考察 AdS7 与其它 S7 基因的亲缘关系。

### 1.11　RT-PCR 半定量分析

参照 Tripure 试剂盒说明按前述方法分别抽提 3 组蚊虫的总 RNA, 常规进行反转录以制备 cDNA, PCR 反应体系如下: 以 10 倍稀释的 cDNA 1 μl 为模板, 加入 2.5 μl 10× PCR 缓冲液、0.5 μl 10 mmol/L dNTP、1 μl 25 mmol/L $MgCl_2$、AdS7 特异引物各 1 μl、Taq 酶 2.5U, 用水补充总体积至 25 μl。反应条件: 94 ℃预变性 3 min, 94 ℃变性 1 min, 58 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 共 28 个循环, 最后 72 ℃再延伸 5 min。PCR 反应结束后, 精确吸取 10 μl 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 用凝胶成像系统扫描分析, 记录各带吸光度。

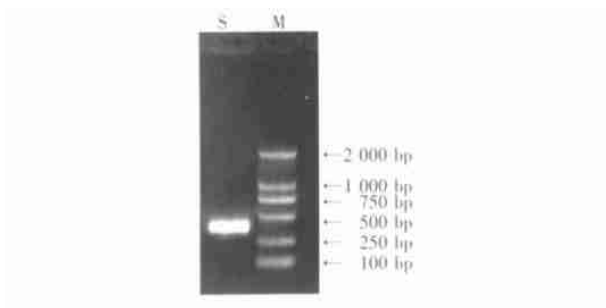
### 1.12　统计学处理

实验结果采用 Microsoft Excel 软件进行 *t* 检验。AdS7 特异引物序列为: S7-A, 5′-GATCATCATCTACGTGCCGGTG-3′; S7-B, 5′-TGGTGGTCTGCTGGTTCTTGTC-3′。

## 2　结果

### 2.1　AdS7 cDNA 部分序列克隆

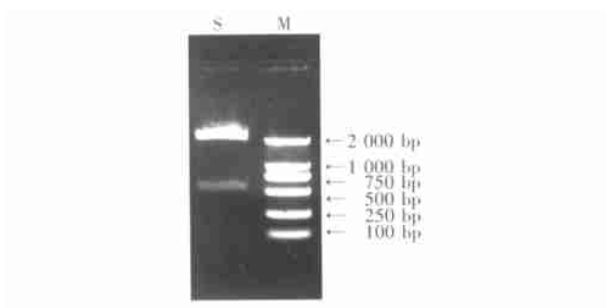
用 S7 简并引物从大劣按蚊 cDNA 成功地扩增出约 460 bp 的目的片段(图 1)。PCR 产物经 TA 克隆后获得约上百个转化菌落。阳性重组子经 PCR 鉴定为阳性; 经 *Eco*RⅠ、*Hind* Ⅲ双酶切鉴定切出约 520 bp 的片段, 与理论值相符(图 2)经 DNA 序列测定后获得长 464 bp 的目的序列, Blast 检索发现, 该 cDNA 序列与冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)S7 核酸序列有 93%(427/458)相同, 证明克隆所得确为大劣按蚊 S7 基因 cDNA 部分序列。




S: Sample; M: Marker

图 1　S7 RT-PCR 扩增产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

**Fig 1　Analysis of RT-PCR products of S7 by 1% agarose electrophoresis**




S: Sample; M: Marker

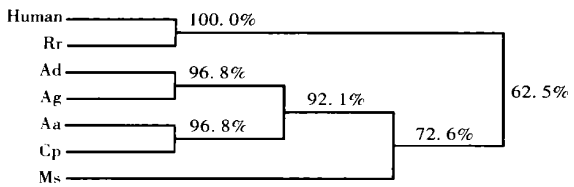
图 2　S7 可疑阳性重组子的酶切鉴定

**Fig 2　Restriction enzyme analysis of S7 recombinant plasmids**

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

### 2.2 AdS7 cDNA 全序列克隆及序列分析

经过三轮噬斑杂交和 PCR 鉴定为阳性的克隆经内切除转化为噬菌粒，用载体两端的 T3、T7 启动子序列为引物进行 DNA 序列测定，结果获得 871 bp 长的 cDNA 序列，经 EditSeq 软件进行开放阅读框（open reading frame，ORF）分析，发现一个 576 bp 长的开放阅读框，其位置在 69～647 bp，起始密码为 ATG，终止密码为 TAA，编码由 192 个氨基酸组成的多肽，其推导分子量为 22 185.81Da，等电点为 9.905。在 791～796 bp 处为多聚腺苷酸加尾信号基序："AATAAA"，据此信号基序 24 碱基后为由 51 个 A 组成的 Poly A 尾。对 AdS7 cDNA 全序列和推导氨基酸序列进行 Blast 检索，结果显示，AdS7 全序列与冈比亚按蚊 S7 核酸序列有 94%相同（596/629），而二者的氨基酸序列有 96%相同（186/192）。系统进化分析显示，AdS7 与冈比亚按蚊 S7 亲缘关系最近，其次是和埃及伊蚊（*Aedes aegypti*）和尖音库蚊（*Culex pipiens*），与烟草天蛾（*Manduca Sexta*）和草地夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）S7 的亲缘关系次之，而与人的 S7 仍然有较高的同源性（图 3）。



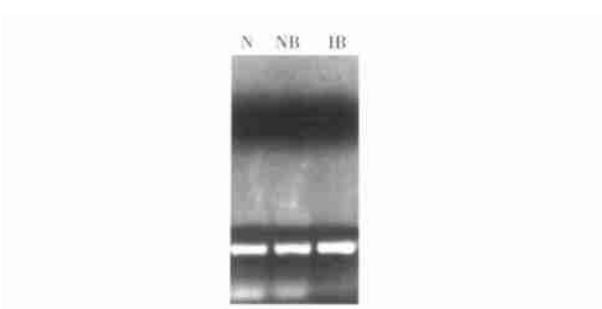

Rr：*Rattus rattus*；Ad：*Anopheles dirus*；Ag：*Anopheles gambiae*；Aa：*Aedes aegypti*；Cp：*Culex pipiens*；Ms：*Manduca Sexta*

图 3 核糖体蛋白 S7 系统进化分析

**Fig 3 Phylogenetic analysis of ribosomal protein S7**

### 2.3 血餐和约氏疟原虫感染对 AdS7 表达水平的影响

吸糖水组、吸正常小鼠血组和吸感染约氏疟原虫小鼠血组之间 AdS7 基因 RT-PCR 扩增产物信号强度没有显著差异（$P>0.05$），提示血餐和约氏疟原虫感染 24 h 后 AdS7 的表达水平没有受到影响（图 4）。




N：Non-blood feeding；NB：Normal blood feeding；IB：Infected blood feeding

图 4 吸血和感染疟原虫对 AdS7 基因 mRNA 表达水平的影响

**Fig 4 Effects of blood feeding and *Plasmodium* infection on the AdS7 mRNA expression**

## 3 讨论

本研究首次克隆了大劣按蚊核糖体蛋白 S7 基因的 cDNA 全序列（GenBank 序列号：AY369135），该序列具有完整的 5′端和 3′端非翻译区和完整的 ORF，序列相似性分析显示，AdS7 与其它昆虫，特别是冈比亚按蚊 S7 具有非常高的相似性，二者的核酸序列有 94%相同，氨基酸序列有 96%相同，亲缘关系较近的还有埃及伊蚊，尖音库蚊及烟草天蛾和草地夜蛾，即使与人 S7 和鼠的 S7 也有 63%的同源性，说明 S7 蛋白分子的古老性和高度保守性，RT-PCR 半定量分析结果也证实了 AdS7 作为一种看家基因，其表达水平不受大劣按蚊吸血和疟原虫感染的影响，是一种合适的基因定量研究的内参照。

对核糖体蛋白的研究具有多方面的意义。例如，研究核糖体蛋白可为阐明核糖体的结构与功能进而理解蛋白质合成的机制提供有价值的线索[7]。作为最古老和保守的生物大分子之一，核糖体蛋白的一级结构可为分析各物种间的进化关系提供十分有用的信息，这在生物进化、系统发育和分类研究方面意义重大[8]。因此，AdS7 基因的克隆成功不但为大劣按蚊基因定量实验提供了内参照，更重要的是为以后有关大劣按蚊核糖体结构与功能以及大劣按蚊发育、进化和分类方面的研究奠定了基础。

参考文献：

[1] 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.

[2] 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.

[3] Gare D C，Piertney S B，Billingsley P F. *Anopheles gambiae* collagen Ⅳ genes：cloning，phylogeny and midgut expression associated with blood feeding and plasmodium infection[J]. Int J Parasitol，2003，33(7)：681－690.

[4] Zheng L. Molecular approaches to mosquito parasite interactions[J]. Arch Insect Biochem Physiol，1996，34(1)：1－18.

[5] 萨姆布鲁克 J，弗里奇 E F，曼尼阿蒂斯 T 著. 金冬雁，黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1992. 55－56.

[6] 郝宏兴，徐文岳，段建华，等. 大劣按蚊成蚊 cDNA 文库的构建与质量鉴定[J]. 第三军医大学学报，2003，25(11)：971－973.

[7] Salazar C E，Hamm D M，Kumar V，*et al*. Sequence of a cDNA from the mosquito *Anopheles gambiae* encoding a homologue of human ribosomal protein S7[J]. Nucleic Acids Res，1993，21(17)：4147.

[8] 王 宁，陈润生，王永雄. 16 个完整基因组中核糖体蛋白基因排列顺序保守性的研究[J]. 中国科学 C 辑，2000，30(1)：99－107.

（编辑 冯崇英）

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