

文章编号:1000-7423(2001)06-0333-03

反义核酸抑制抗敌百虫淡色库蚊扩增酯酶 mRNA 体外翻译的研究

朱淮民¹ 邹亚丁²

【摘要】 目的 用反义核酸抑制抗敌百虫淡色库蚊扩增酯酶 mRNA 体外翻译。方法 人工合成互补于抗性库蚊酯酶 mRNA 翻译起始点 18 碱基,与淡色库蚊 mRNA 退火后加入无细胞翻译体系,进行体外翻译。翻译产物用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。结果 6 μmol/L ODNs 可抑制 50% 特异性酯酶翻译量,20 μmol/L ODNs 抑制 80% 特异性酯酶翻译量。电泳结果显示条带浓度接近敏感蚊虫所表达的酯酶量。结论 针对抗敌百虫淡色库蚊扩增酯酶 mRNA 翻译起始点的反义核酸在体外能有效地抑制其 mRNA 的翻译。

【关键词】 有机磷抗性; 酯酶; 反义核酸; 淡色库蚊

中图分类号:R384.112

文献标识码:A

Inhibition of *in vitro* Translation of Esterase mRNA of Dipterex-Resistant Mosquito (*Culex pipiens pallens*) by Antisense Nucleic Acids

ZHU Huai-min¹, ZOU Ya-ding²

(1 Department of Etiologic Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 2 Institute of Endemic Diseases, Guizhou Provincial Center for Disease Prevention and Control, Guiyang 550001)

【Abstract】 Objective To examine the inhibitory effect of antisense nucleic acid on the *in vitro* translation of esterase mRNA from dipterex-resistant *Culex pipiens pallens*. **Methods** 18-mer nucleic acid was synthesized and complementary to the translation initiation site of mRNA of dipterex-resistant mosquitoes. The ODNs were annealed to the corresponding mRNA molecules and they were added to rabbit reticulocyte cell-free system. The translation products were analyzed by SDS-PAGE. After fixing, the gel was exposed to X-ray film by autoradiography for analysis of protein synthesis. **Results** Six μmol/L of ODNs elicited a 50% reduction in specific protein expression, and 20 μmol/L of ODNs inhibited the expression of esterase by 80%. The SDS-PAGE showed that the band of reduced amounts of 65 kDa protein for resistant mosquito was almost the same as that for sensitive sample. **Conclusion** Antisense oligonucleic acids to the esterase mRNA of dipterex-resistant mosquito could effectively inhibit its *in vitro* translation.

【Key words】 organophosphorus-resistance, esterase, antisense nucleic acid, *Culex pipiens pallens*

Supported by the National Natural Science Foundation(No. 39670119)

蚊虫能够传播多种疾病。长期以来,预防这些疾病主要依靠化学杀虫剂控制媒介种群,杀虫剂抗性的出现,增加了虫媒病防治的难度。非羧酸酯酶基因扩增是尖音库蚊(*Culex pipiens*)对有机磷杀虫剂抗性的主要原因^[1],克服此类抗性一般是减少药剂的使用时间,轮用与换用杀虫剂等。新杀虫剂研制的巨资耗费以及杀虫剂对环境的不利影响等因素,使得寻找新的媒介控制手段成为紧迫问题^[2]。

反义核酸普遍存在于细胞中^[3]。近年来被广泛用于病毒性疾病及寄生虫病等治疗研究中^[4-7]。

本实验利用反义核酸技术特异性抑制与抗性有关的酯酶合成,探讨其对媒介昆虫抗性治理的意义。

材料与方法

1 蚊虫

淡色库蚊敏感品系(Sen)与抗敌百虫(dipterex)品系(RD)引自中国科学院上海昆虫研究所,在本室饲养传代,定期用 80% 致死浓度敌百虫对抗性品系筛选。Sen 品系和 RD 品系对敌百虫的 LC₅₀ 分别为 0.06 和 28 ppm。

2 分离总 RNA 及 mRNA

使用 Trizol(Gibico BRL)一步法抽提蚊虫总

基金项目:国家自然科学基金资助(No. 39670119)。

作者单位:1 第二军医大学病原生物学教研室,上海 200433; 2 贵州省疾病预防控制中心地方病防治所,贵阳 550001

RNA,按说明书操作。分别取 Sen 和 RD 幼虫与成虫按 5 ml/g 加 Trozol 试剂匀浆。所抽提总 RNA 溶于 70% 乙醇,用于分离 mRNA。

分离 mRNA 使用 Promega 公司 PolyAT tract mRNA 试剂盒,按说明书操作。测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 鉴定分离效果。

3 制备寡脱氧核苷酸 (oligodeoxynucleic acids, ODNs)

根据 Mouches 等^[8]报道的酯酶 B1 序列设计寡脱氧核苷酸 (ODNs) OEB (oligonucleotides for esterase B), 序列为: 5'-TAAGCTTTCCAAATCAT-3', 它互补于酯酶 B1 翻译起始点,由上海生工生物技术公司合成。

4 体外无细胞翻译

所抽提的 mRNA 用兔网织红细胞无细胞翻译系统 (Amersham) 进行体外翻译。首先将所抽提的 mRNA 与 OEB ODNs 溶解于 8 μl 10 μmol/L HEP-ES, pH 7.5, 于 65 °C 退火 5 min, 并于 1 h 内冷至 30 °C, 真空离心将液体挥发。每一反应混合物 (8 μl) 含 80% (v/v) 无细胞裂解物, 20 μg/ml mRNA, 3 mmol/L 醋酸镁, 200 mmol/L 醋酸钾, 每升 0.4 mBq/μmol [³⁵S] 甲硫氨酸。上述反应混合物于 30 °C 孵育 1 h。

5 反义 ODNs 加样量的确定

分别取 0, 2, 4, 8, 15, 20, 40 及 60 μmol/L ODNs 加入翻译体系。反应结束后分别取翻译产物包被 96 孔酶标反应板, 4 °C 过夜。鼠抗蚊虫酯酶多克隆抗体 (本实验室自制, 工作浓度 1:400) 与之反应, 洗涤后加入 1:1 000 羊抗鼠 IgG (华美生物工程公司产品), TMB 显色。用酶联检测仪 (DG-3022) 测定 OD₄₅₀ 读数。

6 分析反应产物

所有反应产物用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。凝胶经固定后于 -70 °C 放射自显影。

取抗性成蚊 mRNA 体外翻译产物凝胶电泳转移后, 用 Western blotting 法分析。用小鼠抗酯酶多克隆抗体 (1:200) 进行免疫反应, 二抗用同上羊抗鼠 IgG (1:50), DAB 显色。

结果

1 ODNs 作用位点和作用浓度

库蚊酯酶 B1 基因^[5]翻译起始点部分序列及反义核酸作用位点见图 1。由图 1 可见 ODNs 与 mRNA 的结合位点, 其互补于翻译起始点 AUG 密码子

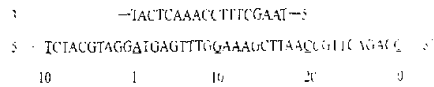


图 1 库蚊酯酶 B1 基因部分序列及反义核酸作用位点 上

行显示 18 碱基反义 ODNs 下行显示酯酶 B1 基因部分序列 Fig. 1 Partial sequence of esterase B1 and oligonucleotides complementary to the translation initiation site The upper group 18-mer antisense oligonucleotides The lower group partial sequence of esterase B1 gene

ODNs 浓度在 1 - 20 μmol/L 时, 随着浓度升高, 酯酶翻译产量逐渐减少; 特异性酯酶被抑制翻译 50% 所需的 ODNs 浓度约为 6 μmol/L, 在较高浓度时能有效地抑制约 80% 的酯酶翻译。ODNs 浓度约在 20 μmol/L 以上, 随着浓度增加, 抑制翻译作用无明显增加, 故取 20 μmol/L 为实验浓度。

2 酯酶 mRNA 体外翻译及与 ODNs 作用

敏感蚊虫与抗性蚊虫幼虫 SDS-PAGE 分离效果不佳, 故未选作翻译试验 (图 2)。RD 品系 mRNA 加 ODNs 翻译产物电泳结果表明, 加入反义核酸后明显抑制了抗性特异酯酶 (分子量约 65 kDa) 的翻译产量, 其条带显色接近敏感品系水平。Western blotting 结果 (图 3) 表明上述 65 kDa 条带可被特异性抗酯酶抗体识别, 与文献报道分子量一致^[9]。

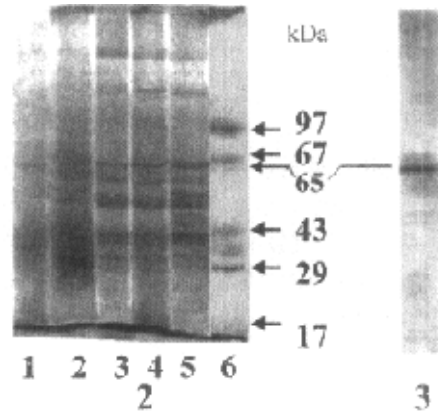


图 2 体外翻译产物 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果 凝胶浓度: 7.5% 1 Sen 幼虫 2 RD 幼虫 3 Sen 成虫 4 RD 成虫 (mRNA + OEB ODNs) 5 RD 成虫 6 蛋白质分子量标准 图 3 RD 成虫 mRNA 翻译产物 Western blotting 结果

Fig. 2 SDS-PAGE result after in vitro translation gel concentration: 7.5% Lane 1 Sen larvae Lane 2 RD larvae Lane 3 Sen adult Lane 4 RD adult (mRNA annealed with OEB ODNs) Lane 5 RD adult Lane 6 Protein molecular marker Fig. 3 Western blot analysis of protein after in vitro translation

讨 论

反义 ODNs 结合靶 RNA 按照 Watson-Crick 碱基配对原理,形成 RNA:DNA 互配,对核糖体的结合具有空间阻碍,或使 mRNA 对 RNA 酶 H 更敏感,易于被降解^[3]。反义核酸作为一些疾病治疗的替代方法有其潜在的优势,已引起国内外的重视。其最突出点在于可针对其靶作用基因设计特异性 ODNs,其结合具有高亲和性,这两者决定了该技术广阔的应用前景。在抗寄生虫病的治疗中具有独特的地位,常被选作靶基因的有:寄生虫代谢酶、药物抗性基因,以及某些致病基因等^[3,7]。

以往对反义核酸抗寄生虫病的作用多限于体内寄生虫病的治疗研究,如锥虫 mRNA 在 5' 端有 39 碱基保守序列^[10],针对这些微小外显子(miniexon)序列的反义核酸在体外可抑制其基因的翻译,甚至锥虫被杀死^[6,11]。此外,针对恶性疟原虫 DHFR-TS、P195 mRNA 翻译起始点或编码区的 ODNs 均有抗疟作用^[7]。在昆虫研究中仅有报道用反义核酸技术研究果蝇发育^[12]。医学昆虫防治中使用该技术尚未见报道。本实验设计针对抗有机磷库蚊扩增酯酶翻译起始点 18 碱基 ODNs,加入无细胞翻译体系进行体外翻译,能有效地抑制酯酶蛋白的翻译,在实验浓度(20 μmol/L)减少了 80% 翻译水平,凝胶电泳中显示其翻译产物量接近敏感蚊虫酯酶含量。该结果提示反义核酸技术在媒介昆虫对杀虫剂抗性治理中应用的可能性,为抗性昆虫防治开拓了新的研究途径,值得虫媒和虫媒病防治研究者重视。

提取蚊虫 mRNA 进行体外翻译可直观地反映反义核酸的作用效果。但反义核酸在体内的应用尚有许多实际困难,如 ODNs 迅速被降解,不易到达细胞内等。针对这些问题已有多种解决方法,如磷酸或硫代修饰 ODNs,甲基化 ODNs 及氨基吡啶 ODNs 等^[7,11]。此外,针对其它编码区或 5' 端帽的反义核酸亦是较理想的靶区。综合考虑这些因素,将使在

蚊体内的实验取得较为理想的结果

致谢 中国科学院上海昆虫研究所唐振华教授馈赠抗性蚊虫品系,谨致谢意

参 考 文 献

[1] Raymond M, Beysat-Arnoufy V, Siva-subramanian N, et al. Amplification of various esterase B's responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. *Biochem Genet*, 1989, 27: 417-423.

[2] Crampton JM, Warren G, Lycett J, et al. Genetic manipulation of insect vectors as a strategy for the control of vector-borne disease. *Ann Trop Med Hyg*, 1994, 88: 3-12.

[3] Green PJ, Pines O, Inouye M. The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann Rev Biochem*, 1986, 55: 569-597.

[4] Agrawal S. Antisense oligonucleotides as antiviral agents. *Trends Biotechnol*, 1992, 10: 152-158.

[5] Zemecnik PC, Coodechild J, Taguchi Y, et al. Inhibition of replication and expression of human T-cell lymphotropic virus type III in cultured cells by exogenous synthetic oligonucleotides complementary to viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 4143-4146.

[6] Verspieren P, Loreau N, Thuong NT, et al. Effect of RNA secondary structure and modified bases on the inhibition of trypanosomatid protein synthesis in cell free extracts by antisense oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 4711-4717.

[7] Rapaport E, Misiura K, Agrawal S, et al. Antimalarial activities of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 8577-8580.

[8] Mouches C, Paupin Y, Agarwal M, et al. Characterization of amplification core and esterase BI gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 2574-2578.

[9] 朱淮民, 滕逢伊, 刘维德. 馬拉硫磷抗性致倦片蚊酯酶单克隆抗体的制备及鉴定. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1995, 13: 42-45.

[10] Cornelissen AWCA, Verspieren P, Toulme JJ, et al. The common 5' terminal sequence on trypanosome mRNAs: a target for antimessenger oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res*, 1986, 14: 5605-5614.

[11] Verspieren P, Cornelissen AWCA, Thuong NT, et al. An arctic-linked oligodeoxynucleotide targeted to the common 5' end of trypanosome mRNA kills cultured parasites. *Gene*, 1987, 61: 307-315.

[12] Mukai M, Kashikawa M, Koyayashi S. Induction of uicaria expression in pola cells by the mesoderm is required for female germ-line development in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 1999, 126: 1023-1029.

(收稿日期: 2001-02-16 编辑: 李雅卿)

欢迎订阅 2002 年
《中国寄生虫学与寄生虫病》杂志