

文章编号:1000-7423(2010)-03-0190-04

【论著】

腺苷脱氨酶、C 型凝集素及丝氨酸蛋白酶抑制剂基因在白纹伊蚊唾液腺中的表达

吴家红, 程金芝, 陈璐, 孙宇

【摘要】 目的 了解腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)基因、C 型凝集素(C-lectin)基因和丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor, serpin)基因在白纹伊蚊唾液腺中的表达情况。方法 分别制备未吸血雌蚊唾液腺(SG 组)和吸血雌蚊唾液腺(BSG 组)、雌蚊躯体(无头无唾液腺, C 组)和雄蚊组织(无头含唾液腺, M 组)的总 RNA, 采用实时荧光定量 RT-PCR 技术, 以 β 肌动蛋白(β -actin)基因作为内参, 根据 GenBank 公布的 ADA、C-lectin 和 Serpin 基因序列设计特异性引物进行 RT-PCR, 分析以上基因在不同组织中的表达情况。结果 与雌蚊躯体和雄蚊组织中相对表达量相比, ADA 基因在雌蚊唾液腺中的表达分别提高了 545 倍和 123 倍($P<0.01$); C-lectin 基因在雌蚊唾液腺中的表达分别提高了 3 929 倍和 4 973 倍($P<0.01$); Serpin 基因在雌蚊唾液腺中的表达分别提高了 1 911 倍和 2 978 倍($P<0.01$)。吸血前后雌蚊唾液腺中 ADA、C-lectin 和 Serpin 等 3 个基因的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 ADA 在蚊虫组织中均有表达, 在雌蚊唾液腺中高表达; C-lectin 和 serpin 基因在雌蚊唾液腺中特异高表达。

【关键词】 白纹伊蚊; 实时荧光定量 RT-PCR; 腺苷脱氨酶; C 型凝集素; 丝氨酸蛋白酶抑制剂

中图分类号: R384.113

文献标识码: A

Expression of the Genes of Adenosine Deaminase, C-lectin and Serpin in the Salivary Gland of *Aedes albopictus*

WU Jia-hong, CHENG Jin-zhi, CHEN Lu, SUN Yu

(Department of Parasitology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

【Abstract】 **Objective** To express the genes of adenosine deaminase(ADA), C-lectin and serpin (serine protease inhibitor) in the salivary gland of *Aedes albopictus*. **Methods** Total RNA was extracted respectively from salivary glands of unfed (group SG) and engorged adult female *Ae. albopictus* mosquitoes (group BSG), female carcasses without head and salivary gland (group C), and male bodies without heads but with salivary glands (group M). After the primers for the genes of ADA, C-lectin and serpin were designed respectively according to the reported *Ae. albopictus* gene sequences in GenBank, real-time fluorescent quantitative RT-PCR was performed to detect expression level of these genes in different tissues of *Ae. albopictus* using β -actin as internal reference. **Results** The mRNA expression level of ADA gene in the salivary glands from unfed adult female mosquitoes (group SG) was 545 and 123 times higher than those of female carcasses without head and salivary gland (group C) and male bodies without heads but with salivary glands (group M) ($P<0.01$). In group SG, C-lectin was 3 929 and 4 973 times higher than that in group C and M ($P<0.01$). High level of mRNA coding for serpin was detected in group SG, being 1 911 and 2 978 times higher than that in group C and M ($P<0.01$). There was no significant difference in ADA, C-lectin and serpin mRNA levels between unfed and engorged salivary glands ($P>0.05$). **Conclusion** ADA gene can be expressed in various mosquito tissues, but higher in salivary glands. The genes of C-lectin and serpin have been highly expressed specifically in salivary gland of female mosquito.

【Key words】 *Aedes albopictus*; Real-time fluorescent quantitative RT-PCR; Adenosine deaminase; C-lectin; Serpin

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30600515) and a Governor Fund of Guizhou Province

白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)是一种重要的医学昆虫, 不仅可传播登革热、西尼罗热、黄热病和基孔肯雅热(Chikungunya)等虫媒病毒病^[1,2], 而且在白纹伊

蚊刺叮宿主时, 注入宿主的唾液组分可导致宿主局部发生强烈的变态反应性炎症, 表明其唾液组分是强烈的过敏原^[3]。研究证实蚊虫唾液组分是一种具有潜在药理活性的液体, 对脊椎动物宿主有抗凝血、抗炎和调节宿主免疫功能的作用, 在促进蚊媒吸血及传播疾

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30600515); 贵州省省长基金
作者单位: 贵阳医学院人体寄生虫学教研室, 贵阳 550004

病方面具有重要意义^[4], 因此对蚊虫唾液腺转录组学和蛋白质组学的研究非常重要。Arca 等^[2]率先采用分子生物学方法构建了白纹伊蚊唾液腺 cDNA 全长文库, 其中腺苷脱氨酶基因(adenosine deaminase, ADA)、C 型凝集素基因(C-type lectin, C-lectin)和丝氨酸蛋白酶抑制剂基因(serine protease inhibitor, Serpin)是从该文库中获得的全长基因。生物信息学分析提示 ADA、C-lectin 和 Serpin 这 3 个基因具有信号肽序列, 说明它们可能参与构成蚊唾液的组分。为了进一步明确它们是否在雌蚊唾液腺中特异性高表达, 本研究采用实时荧光定量 RT-PCR 技术从 mRNA 水平进行探讨。

材料与方 法

1 材 料

1.1 蚊 虫 白纹伊蚊广州株, 引自军事医学科学院微生物流行病学研究所媒介生物学与控制研究室, 由本室常规养殖, 温度(25±2)℃, 相对湿度(80±5)%, 光照 14 h/d, 羽化后喂食糖水。

1.2 主要试剂和仪器 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit)和荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR® Premix Ex Taq™)购自日本 Takara 公司, DNA 酶 I 试剂盒(Deoxyribonuclease I) 购自美国 Invitrogen 公司, 其他试剂均为国产分析纯。荧光定量 PCR 仪 (ABI 7300 型)为美国 ABI 公司产品。

2 方 法

2.1 总 RNA 制备 按文献[5]的方法解剖唾液腺, 获得 5 日龄未吸血雌蚊唾液腺(SG 组), 饱血雌蚊唾液腺(吸血 2 h, 腹部饱胀者; BSG 组), 去除唾液腺后剩余雌蚊组织(即雌蚊躯体组, C 组), 羽化后 5 日龄的雄蚊组织(无头含唾液腺, M 组)与雌蚊组织(无头含唾液腺, F 组)。SG 组与 BSG 组各取 100 对唾液腺, C 组、M 组和 F 组各取 5 个组织, 分别加入 0.5 ml Trizol 试剂, 按操作说明进行总 RNA 提取。通过 1.2%琼

脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量, 使用紫外分光光度计检测总 RNA 的吸光度 (A_{260} 、 A_{280}), 计算浓度。使用 DNA 酶 I 试剂盒去除 DNA, 去除 DNA 后的总 RNA 直接用于反转录。

2.2 cDNA 的合成 按照逆转录试剂盒的说明操作。每组 3 个样品, 反应体系为总 RNA 500 ng, 5×PrimeScript 缓冲液 2 μl, PrimeScript 酶混合物 0.5 μl, 寡核苷酸多聚 T 引物 (Oligo dT) 和随机 6 碱基引物 (random 6mers)引物各 0.5 μl, 加无 RNA 酶水至 10 μl。反应条件: 37℃ 30 min, 85℃ 5 s。产物于-20℃保存备用。

2.3 荧光定量 PCR 参考 GenBank 中白纹伊蚊相应基因的核苷酸序列设计特异引物(表 1), 引物由宝生物工程(大连)有限公司设计、合成。将 F 组 cDNA 进行 10 倍倍比稀释作为模板, 分别对 4 个基因进行荧光定量 PCR, 构建标准曲线, 计算 PCR 效率。取约 5 ng 各组逆转录产物 (cDNA)为模板进行 PCR, 按照荧光定量 PCR 试剂盒的说明书进行, 每个样品重复 3 次, 每组 3 个样品。反应体系为 2×预混合 Ex DNA 聚合酶 (Premix Ex Taq™) 10 μl, 10 μmol/L 上、下游引物各 0.8 μl, 50×ROX 参考染料 0.4 μl, 模板 5 ng, 加无 RNA 酶水至 20 μl。反应条件: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 共 40 个循环。反应结束后确认实时 PCR 反应的扩增曲线和熔解曲线。

2.4 定量 PCR 数据分析 采用比较 CT 值法^[6], 确定特定荧光域值对应循环数的 CT 值, 对目标基因定量。采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析, 各组数据采用析因方法分析。

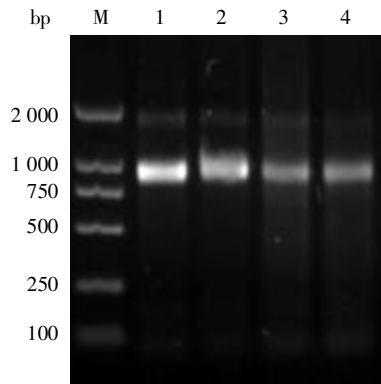
结 果

1 总 RNA 浓度及完整性鉴定结果

所有样品的 A_{260}/A_{280} 值均在 1.8~2.0 之间。经琼脂糖凝胶电泳, 可见 18S rRNA 和 28S rRNA 两条明亮清晰的条带, 其中 18S rRNA 的亮度是 28S rRNA 的两倍, 说明总 RNA 未降解 (图 1)。

表 1 白纹伊蚊相关基因引物
Table 1 Specific primer of related genes in *Ae. albopictus*

靶基因 Target gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物(bp) Product	参考序列 Reference sequence	PCR效率 PCR efficiency
β-肌动蛋白 β-actin	正向 Forward: GCTACGTCGCCCTGGACTT	151	DQ657949	98%
	反向 Reverse: AGGAACGACGGCTGGAAGA			
C 型凝集素 C-lectin	正向 Forward: GCTATCTCTCTCGCAGACCTGAC	130	AY826070	92%
	反向 Reverse: CCAATCCCAGCCGTTCT			
腺苷脱氨酶 ADA	正向 Forward: CGGAGGTTTACGACTTGGATG	122	AY826088	96%
	反向 Reverse: GTAGATGAACCTGACGCCGATG			
丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpin	正向 Forward: AAAGGGATTGACCGCACTACA	129	AY826096	97%
	反向 Reverse: TTGGAGAAAAGGGAACCTGAACAC			



M: DNA 标志物; 1: 未吸血雌蚊唾液腺组; 2: 饱血雌蚊唾液腺组; 3: 雌蚊躯体组 (无头无唾液腺); 4: 雄蚊组织组 (无头含唾液腺)。
M: DNA marker; 1: Salivary glands from unfed adult female mosquitoes; 2: Salivary glands from blood-fed adult female mosquitoes; 3: Female carcasses without head and salivary gland; 4: Male bodies without heads but with salivary glands.

图 1 各组样品的总 RNA 电泳图谱
Fig1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

2 C-lectin, ADA 和 Serpin 相对定量检测

以 β -actin 基因作为内参, 采用比较 CT 值法对 3 个基因在不同组织中及吸血前后雌蚊唾液腺中的表达情况进行分析 (表 2)。结果显示, C-lectin 基因在雌蚊唾液腺组中相对表达量是雌蚊躯体组的 3 929 倍, 是雄蚊组织组的 4 973 倍; 未吸血雌蚊唾液腺组 C-lectin 基因表达与雌蚊躯体组、雄蚊组织组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Serpine 基因在雌蚊唾液腺组中相对表达量是雌蚊躯体组的 1 911 倍, 是雄蚊

组织组的 2 978 倍, 未吸血雌蚊唾液腺组 Serpin 基因表达与雌蚊躯体组、雄蚊组织组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。ADA 基因在雌蚊唾液腺组中相对表达量是雌蚊躯体组的 545 倍, 是雄蚊组织组的 123 倍; 而且 ADA 基因在雄蚊组织组中的相对表达量是雌蚊躯体组的 4.44 倍, 说明 ADA 基因在 3 种组织中均有表达, 但在雌蚊唾液腺中属高丰度表达。

讨 论

近年来, 蚊虫唾液腺组学的研究结果表明, 唾液组分以蛋白为主, 一种蚊虫唾液组分约有 70~100 种蛋白, 它们可能参与唾液组分的抗凝血、抗炎及调节宿主免疫功能, 促进病原传播^[7]。然而, 多数蛋白分子参与抗凝血与传播疾病的具体情况尚不清楚。因此, 进一步阐明它们的表达特征及功能对于发现新的药理活性分子或开发疫苗以阻断虫媒病的传播具有重要意义。为此, 本研究利用实时荧光定量 RT-PCR 技术初步获得了 C-lectin, ADA 和 Serpin 基因在蚊虫组织中差异表达的特征。

C-lectin 是一类能选择性地识别糖并与之非共价可逆结合的非酶、非抗体蛋白质。在结构上均具有一个共同的结构特征, 即含有一个或多个糖识别域。活性依赖于 Ca^{2+} 者称为 C 型凝集素, 其种类繁多, 是一个庞大的超家族^[8]。有研究显示, 昆虫体内的 C-lectin 是一类免疫相关的蛋白, 参与昆虫先天性免疫^[1]。本

表 2 C-lectin、ADA 和 serpin 基因在不同组织中的表达差异 ($n=3$)
Table2 Variation in expression of the C-lectin, ADA, serpin genes in different tissues ($n=3$)

组别 Group	β -actin CT 值 CT value	C-lectin		ADA		Serpine	
		CT 值 CT value	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	CT 值 CT value	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	CT 值 CT value	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
雌蚊躯体组 (C 组) Female carcasses without head and salivary gland (Group C)	17.23±0.02	26.56±0.08	1	24.11±0.20	1	24.56±0.06	1
未吸血雌蚊唾液腺组 (SG 组) Salivary glands from unfed adult female mosquitoes (Group SG)	19.44±0.20	16.83±0.05	3 929*	17.23±0.26	545*	15.87±0.05	1 911*
雄蚊组织组 (M 组) Male bodies without heads but with salivary glands (Group M)	17.57±0.09	27.24±0.01	0.79	22.30±0.07	4.44*	25.54±0.00	0.64

注: 与 C 组相比, * $P < 0.01$ 。Note: Compared with group C, * $P < 0.01$.

表 3 吸血前后 C-lectin、ADA 和 serpin 基因在唾液腺组织中的表达差异 ($n=3$)
Table3 Variation in expression of the C-lectin, ADA, serpin genes in salivary glands from unfed and blood-fed mosquitoes ($n=3$)

组别 Group	β -actin CT 值 CT value	C-lectin		ADA		Serpine	
		CT 值 CT value	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	CT 值 CT value	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	CT 值 CT value	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
未吸血雌蚊唾液腺组 (SG 组) Salivary glands from unfed adult female mosquitoes (Group SG)	19.44±0.20	16.83±0.05	1	17.23±0.26	1	15.87±0.05	1
饱血组雌蚊唾液腺组 (BSG 组) Salivary glands from engorged adult female mosquitoes (Group BSG)	19.69±0.05	17.10±0.07	0.98	17.99±0.04	0.71*	15.80±0.06	1.25

注: 与 C 组相比, * $P < 0.01$ 。Note: Compared with group C, * $P < 0.01$.

研究的结果显示, C-lectin 基因在雌蚊唾液腺中的表达较雌蚊躯体(无唾液腺)和雄蚊组织(含唾液腺)的表达水平高 3 929 倍和 4 973 倍, 说明 C-lectin 基因在雌蚊唾液腺中特异性高表达。

Serpin 是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族, 广泛存在于动、植物体内。有研究显示昆虫体内也有 Serpin 的多个成员。对冈比亚按蚊丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员之一 SRPN2 的研究显示, 当 SRPN2 基因被敲除, 伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)入侵蚊胃壁受阻^[9]。本研究的结果显示, Serpin 基因在雌蚊唾液腺中的表达是雌蚊躯体(无唾液腺)和雄蚊组织(含唾液腺)的 1 911 倍和 2 978 倍, 说明 Serpin 基因在雌蚊唾液腺中特异性高表达。

此外, C-lectin 和 Serpin 基因在雄蚊组织中的表达分别是雌蚊躯体的 0.79 倍和 0.64 倍, 差异无统计学意义($P>0.05$), 进一步说明 C-lectin 和 Serpin 基因主要参与雌蚊唾液组分的构成, 可能在雌蚊吸血与传播疾病方面有重要作用, 可作为研究其参与蚊虫吸血与传播疾病的靶标基因。

ADA 是一种腺苷脱氨酶, 在嘌呤核苷代谢中具有重要作用。吸血节肢动物唾液中的 ADA 伴随吸血过程进入宿主, 降低宿主局部皮肤的腺苷浓度, 解除宿主的不适感受, 有利于吸血节肢动物吸血, 具有明显的抗炎作用。此外, 有研究显示, ADA 可促进病原体在宿主体内的定殖, 改变表皮的血管通透性, 促进病原体进入宿主的血液循环^[10]。本研究的结果显示, 与雌蚊躯体(无唾液腺)中表达水平相比, ADA 基因在雌蚊唾液腺和雄蚊组织(含唾液腺)中的表达量分别上升了 545 倍和 4.44 倍, 说明 ADA 基因不仅在雌蚊唾液腺中有高丰度表达, 而且在雄蚊唾液腺中也有表达。

吸血行为是雌蚊的一个重要生态习性。Kato 等^[11]发现巴浦白蛉(*Phlebotomus duboscqi*)唾液腺中 ADA 酶活性在吸血后显著降低。Riberio 等^[10]也发现埃及伊蚊唾液腺组织中 ADA 酶活性在吸血后显著降低。然而本研究显示, C-lectin、Serpin 和 ADA 在饱血雌蚊唾液腺中 mRNA 相对表达量分别是未吸血雌蚊的 0.98、0.71 和 1.25 倍, 差异无统计学意义, 提示吸血行为不能诱导这 3 个基因在转录水平上发生变化。然

而, 蚊虫是一类瞬时吸血的昆虫, 可能是吸血的时间太短, 未能诱导蚊虫发生相应的应对策略。本研究选择的时相恰好是饱血零时, 如将饱血后的时间向后延伸, 或许会有新的发现。本研究的结果显示, C-lectin 和 Serpin 基因是白纹伊蚊雌蚊唾液腺特异表达基因, ADA 基因是白纹伊蚊雌蚊唾液腺高表达基因。这一结果为进一步研究这 3 种基因结构特征及其在蚊虫吸血、传播疾病中的作用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Arca B, Lombardo F, Francischetti IM, *et al.* An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, 37 (2): 107-127.
- [2] Lahariya C, Pradhan SK. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years; a review[J]. *J Vect Borne Dis*, 2006, 43(4): 151-160.
- [3] Peng Z, Beckett AN, Engler RJ, *et al.* Immune responses to mosquito saliva in 14 individuals with acute systemic allergic reactions to mosquito bites[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114 (5): 1189-1194.
- [4] Wu JH. Antihemostatic and immuno-modulation of mosquito saliva [J]. *Chin J Vect Bio Control*, 2008, 19(5): 481-483. (in Chinese)
(吴家红. 蚊虫唾液组分的抗凝血活性及其对宿主的免疫调控作用 [J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2008, 19(5): 481-483.)
- [5] Strome CPA, DeSantis PL, Leef JL, *et al.* A convenient technique for the dissection of mosquito salivary glands[J]. *Methods Cell Sci*, 1980, 6 (1): 9-11.
- [6] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. *Nature Protocol*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [7] Calvo E, Sanchez-Vargas I, Favreau AJ, *et al.* An insight into the sialotranscriptome of the West Nile mosquito vector, *Culex tarsalis* [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 51. [Epub ahead of print]
- [8] Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.* *Essentials Glycobiology* [M]. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=books&term=C-type+Lectins+AND+glyco2%5Bbook%5D>
- [9] Michel K, Budd A, Pinto S, *et al.* *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei* [J]. *EMBO Rep*, 2005, 6(9): 891-897.
- [10] Ribeiro JMC, Charlab R, Valenzuela JG. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* [J]. *J Exp Biol*, 2001, 204(Pt11): 2001-2010.
- [11] Kato H, Jochim RC, Lawyer PG, *et al.* Identification and characterization of a salivary adenosine deaminase from the sand fly *Phlebotomus duboscqi*, the vector of *Leishmania major* in sub-Saharan Africa [J]. *J Exp Biol*, 2007, 210(5): 733-740.

(收稿日期: 2009-06-19 编辑: 杨频)