

·基础研究·

基因步移在分离蚊虫细胞色素 P450 启动子中的应用及意义

周国理, 黄炯烈, 吴瑜, 王玲

(中山医科大学寄生虫学教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 【目的】快速扩增出白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株 *CYP 6N3* 基因 (*CYP 6N3*) 上游启动子区序列。【方法】根据本室已获得的白纹伊蚊 *CYP 6N* 亚家族新成员 *CYP 6N3* 全长 cDNA 的 5'-末端核苷酸序列, 设计 2 个反向特异引物 (GSP1 和 GSP2), 利用 4 种限制性内切酶 *Dra I*、*EcoRV*、*Pvu II* 和 *Stu I* 分别消化白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株高分子量基因组 DNA, 消化产物与适配子连接产生 4 种消化的 DNA 库 (DL1、DL2、DL3 及 DL4), 并分别以此为模板, 进行基因步移。用特异引物 GSP1 与适配子引物 AP1 进行第 1 步 PCR 扩增, 然后再以第 1 步 PCR 产物为模板、用内部特异引物 GSP2 与内部适配子引物 AP2 进行第 2 次 PCR 扩增。【结果】第 1 步 PCR 结果显示: 在上述 4 种消化文库中分别扩增出约 806、2 190、2 206 和 3 076 bp 的特异条带; 第 2 步 PCR 结果与第 1 次 PCR 相类似, 但各泳道主带扩增效率明显升高。【结论】本实验已成功地获得了白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株 *CYP 6N3* 上游启动子区核苷酸序列及其 4 种限制性内切酶图谱。此外还对基因步移法在昆虫细胞色素 P450 多样性及其参与杀虫剂抗性分子机理研究中的意义进行了讨论。

关键词: 基因步移; 伊蚊属; 细胞色素 P450; *CYP 6N3*; 启动区 (遗传学); 杀虫药抗药性

中图分类号: R384.1; Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)06-0406-04

The Application and Significance of Gene-walking in Isolating the Promoter of Cytochrome P450 from Mosquitoes

ZHOU Guo-li, HUANG Jiong-lie, WU Yu, WANG Ling

(Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To rapidly amplify the promoter of *CYP6N3* gene (*CYP 6N3*) from deltamethrin-resistant *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*). 【Methods】Two reverse specific primers (GSP1 and GSP2) were designed based on the 5'-end nucleotide sequence of the previous obtained *CYP 6N3* from *Ae. albopictus*. The genomic DNA purified from deltamethrin-resistant *Ae. albopictus* were digested by *Dra I*, *EcoRV*, *Pvu II* and *Stu I*, then ligated with adaptors to produce 4 digested libraries, respectively. The primary PCR was performed from the 4 digested libraries by the use of GSP1 and AP1, and its products were used for the second PCR with GSP2 and AP2. 【Results】Four major bands of 806, 2 190, 2 206 and 3 076 bp were obtained from the 4 digested libraries, respectively. The second PCR showed a similar result to the first one, but had a stronger major band in all lanes. 【Conclusions】The promoter of *CYP 6N3* from deltamethrin-resistant *Ae. albopictus* and its restriction map containing 4 restriction sites were successfully obtained. The significance of gene-walking method in studying the diversity of insect P450s and the molecular mechanism of insecticide resistance mediated by insect P450 enzymes was discussed.

收稿日期: 2001-07-30

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(970092); “211 工程”重点学科建设基金资助项目(98124)

作者简介: 周国理(1964-), 男, 安徽枞阳人, 讲师, 博士。

Key words: gene-walking; *Aedes albopictus*; cytochrome P450; CYP6N3; promoter regions (genetics); insecticide resistance

已知昆虫细胞色素 P450 CYP6 家族在亚家族、亚家族成员及各成员等位基因变异体三个水平上存在着多样性,其形成原因可能与其基因转录及翻译调控的多态性有关^[1]。此外, P450 单加氧酶对杀虫剂的代谢抗性是由于其基因表达调控尤其是转录调控的改变所致^[2]。因此,有关分离、鉴定参与细胞色素 P450 调控的顺式作用元件及反式作用因子已成为目前国际上在 P450 研究领域的一个新的热点。CYP 6N3 是本文作者最近从白纹伊蚊中获得的一个新的细胞色素 P450 基因 (CYP450),它至少存在有 4 个等位基因变异体即 CYP 6N3v1-v3 (全长 cDNA 均为 1 491 bp, GenBank accession number: AF283836-AF283838) 和 CYP 6N3v4 (669 bp, GenBank accession number: AF284783),并同时存在于白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株及敏感株中^[3]。本文则是根据 CYP 6N3 全长 cDNA 5'-末端编码的核苷酸序列设计了 2 个反向特异引物,运用基因步移的方法,以获得其上游启动子区域内各顺式作用元件,为下一步深入研究蚊虫中 CYP450 多样性形成的分子机制或参与杀虫剂抗性分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验蚊株

白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株由广东药学院寄生虫学教研室惠赠,采自广州市区并以 LC₅₀的剂量连续筛选 105 代,抗性倍数达 50 倍,蚊虫培养室内恒温(25±1)℃,光照时间每天 16 h。

1.2 引物设计

根据 CYP 6N3 5'-末端 cDNA 序列^[4],设计 2 个反向特异引物 GSP1: 5'-TTACGCACCCACA-GAACCGCCAAGGTC-3'和 GSP2(Nested Primer): 5'-AGCGCCAGCACCGTCAAATAAATCAAC-3'。

1.3 试剂

蚊组织高分子量基因组 DNA 抽提试剂盒为 Qiagen 公司产品; Universal Genome Walker™ Kit 为 Clontech 公司产品; Advantage® Genomic PCR Kit 为 Clontech 公司产品; DNA Marker(2 392~48 502 bp)为 BM 公司产品;其它常规试剂均购自华

美公司及基因公司。

1.4 成蚊基因组 DNA 抽提、纯化与鉴定

取 100 只成蚊(约 200 mg),加入适量含有终质量浓度为 200 mg/L RNase A 的组织裂解缓冲液,电动匀浆 3~5 min 后,加入足量蛋白酶 K(终质量浓度为 1 g/L),充分混匀,50℃孵育 2 h。然后按照 Qiagen 公司基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行分离和纯化。取 1 μL 纯化的蚊基因组 DNA,并以 Marker 为参照,进行 5 g/L 琼脂糖凝胶电泳,以鉴定其完整性。取 5 μL 纯化的蚊基因组 DNA,加入 1.6 μL *Dra* I (1×10⁻⁵ U/L)、2 μL 10×*Dra* I 缓冲液和 11.4 μL ddH₂O,轻轻混匀,37℃孵育 16~18 h 后,以 Marker 及未酶切的蚊基因组 DNA 为参照,进行 5 g/L 琼脂糖凝胶电泳,以鉴定其纯度。取 5 μL 纯化的蚊基因组 DNA,在 752 型紫外分光光度计上测定其 A₂₆₀,计算其浓度,并将其终浓度调整至 0.1 g/L, -20℃保存备用。

1.5 蚊基因组 DNA 4 种限制性内切酶的消化

取 4 个 1.5 mL Eppendorf 管,做好标记(DL1、DL2、DL3、DL4),依次加入 8 μL *Dra* I、*Eco*R V、*Pvu* II、*Stu* I 及 10 μL 各自的 10×缓冲液;然后每管均分别加入 25 μL 纯化的蚊基因组 DNA(0.1 g/L)和 57 μL ddH₂O,使反应总体积达 100 μL。轻轻混匀,37℃孵育 16~18 h 后,每管取 5 μL 进行 5 g/L 琼脂糖凝胶电泳,鉴定其是否消化完全。上述酶切消化产物先后用等体积酚、氯仿进行抽提,以除去蛋白质等污染物;加入 2 倍体积预冷的体积分数 95%乙醇进行离心沉淀,去上清后加入足量的预冷的体积分数 80%乙醇洗涤、离心,去上清后空气干燥 10 min,加入 20 μL TE(10/0.1, pH7.5)缓冲液溶解沉淀的 DNA 片段, -20℃保存备用。

1.6 酶切消化产物与适配子的连接

取 4 个 0.5 mL Eppendorf 管,做好标记,依次加入 4 μL 上述 4 种已纯化的酶切消化产物;然后每管中均分别加入 1.9 μL Genome Walker 适配子(25 μmol/L)、1.6 μL 5×T4 连接酶缓冲液和 0.5 μL T4 DNA 连接酶(1×10⁻⁶ U/L),轻轻混匀,16℃孵育 16~18 h,70℃5 min 以终止反应,并加入 72 μL TE(10/1, pH7.5)缓冲液,轻轻混匀,

至此构建了4种连接有适配子的DNA库,置-20℃保存备用。

1.7 第1步PCR反应及其产物的鉴定

取4个0.2 mL PCR管,做好标记,依次加入1 μL上述4种连接有适配子的DNA库,作为PCR反应的模板;然后每管中均分别加入5 μL 10×Tth PCR缓冲液(由试剂盒提供,用于热启动PCR反应)、1 μL dNTP混合物(10 mmol/L)、2.2 μL Mg(OAc)₂(25 mmol/L)、1 μL 适配子引物1(AP1, 10 μmol/L, 5'-GTAATACGACTCACTAT-AGGGC-3'),1 μL GSP1(10 μmol/L)、1 μL Advantage Genomic Polymerase Mix (50×)和37.8 μL ddH₂O,反应总体积为50 μL。PCR条件:94℃25 s,72℃3 min 7个循环;94℃25 s,67℃3 min 32个循环;67℃7 min;4℃终止反应。每管取8 μL扩增产物进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.8 第2步PCR反应及其产物的鉴定

同1.7中操作步骤,但每个PCR管中的模板则均为1 μL第一步PCR产物,1 μL 适配子引物2(Nested AP2, 10 μmol/L, 5'-ACTATAGGGCACG-CGTGGT-3')和1 μL GSP2(10 μmol/L);PCR条件则为:94℃25 s,72℃3 min 5个循环;94℃25 s,67℃3 min 20个循环;67℃7 min;4℃终止反应。每管取5 μL扩增产物进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果

2.1 白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株DNA分离与鉴定

分离纯化的成蚊基因组DNA经5 g/L琼脂糖凝胶电泳显示出一条边缘整齐清晰DNA条带(图1中Lane 2),与Marker最大的一条电泳条带(48.5 kb)在同一个水平线上、比对照的人类基因组DNA(大于50 kb)(图1中Lane 1)略小,表明所抽提的蚊虫基因组DNA较完整,已满足下一步基因步移(gene-walking)的需要。

图2显示分离纯化的蚊基因组DNA纯度鉴定结果:经Dra I酶切消化的蚊基因组DNA(Lane 1)呈均匀涂布状,其上缘小于50 kb,表明所抽提的蚊基因组DNA纯度已满足限制性内切酶消化的需要,可以进行下一步的大量酶切反应。

2.2 第1步PCR反应产物的鉴定

图3为由外部适配子引物(AP1)与外部特异

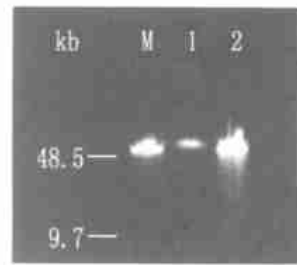


图1 蚊基因组DNA 5 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig. 1 5 g/L agarose gel electrophoresis of the high molecular genomic DNA extracted from deltamethrin-resistant *Aedes albopictus*

M: Markers, 2 392~48 502 bp; Lane 1: control human genomic DNA; Lane 2: genomic DNA from mosquitoes

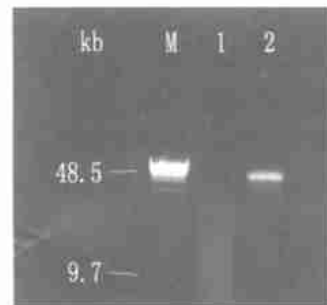


图2 蚊基因组DNA纯度鉴定

Fig. 2 Identification of purity of the mosquito genomic DNA

M: Markers, 2 392~48 502 bp; Lane 1: the mosquito genomic DNA digested by *Dra* I; Lane 2: the mosquito genomic DNA



图3 由GSP1和AP1获得的第1步PCR产物的鉴定

Fig. 3 15 g/L agarose gel electrophoresis of the primary PCR products

M: 1 kb ladder, 0.5~10.0 kb; Lane 1~4: the primary PCR products from 4 libraries digested by *Dra* I, *Eco*R V, *Pvu* II and *Stu* I, respectively; Lane 5, 7: negative control; Lane 6, 8: positive control

引物(GSP1)所进行的第1步PCR扩增产物电泳结果: Lane 1~4分别为以Dra I、EcoR V、Pvu II和Stu I消化文库为模板的PCR产物,其中Lane 1有一条806 bp清晰特异的主带; Lane 2中的一条主带为2 190 bp; Lane 3中的一条主带为3 076 bp; Lane 4中的主带为2 206 bp。

2.3 第2步 PCR 反应产物的鉴定

由内部适配子引物(nested adaptor primer2, AP2)与内部特异引物(GSP2)所进行的第2步 PCR 扩增产物电泳结果(图4)与图3相类似,但各泳道中的主带则明显增强。

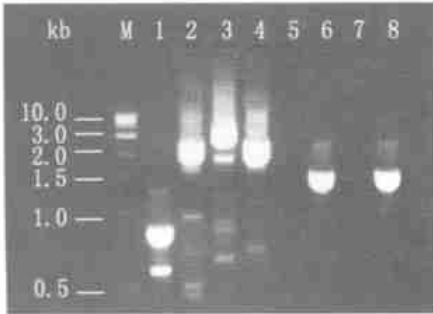


图4 由 GSP2 和 AP2 获得的第2步 PCR 产物的鉴定

Fig. 4 15 g L agarose gel electrophoresis of the second PCR products by the use of GSP2 and AP2

M: 1 kb ladder; 0.5~10.0 kb; Lane 1~4: the second PCR products from the 4 primary PCR products, respectively; Lane 5, 7: negative control; Lane 6, 8: positive control

3 讨论

用 AP1 与 GSP1 进行的第1步 PCR 结果显示:4种内切酶消化所产生的库(digested library)中分别扩增出一特异的主带(图3),而用 AP2 与 GSP2 进行的第2步 PCR 亦显示出相类似的结果,但各泳道中的主带显著增强(图4)。由于我们在 PCR 循环过程中,采取了降落 PCR(touchdown PCR,简称 TD PCR,本实验系采用2个阶段的 PCR 循环)和巢式 PCR(nested PCR)策略,从而有效地消除了非特异性扩增,极大地提高了对特异靶标的扩增。因此上述结果一方面表明本实验已成功地获得白纹伊蚊 *CYP 6N3* 上游启动子序列,另一方面也表明所获得的启动子序列中包含有 *Dra I*、*EcoRV*、*Stu I* 和 *Pvu II* 这4种限制性内切酶位点,它们的相对位置为:*Dra I* 酶切位点距 *CYP 6N3* cDNA 5'-末端是最近的,为 806 bp;其次是 *EcoRV*,为 2 190 bp;再次是 *Stu I*,为 2 206 bp;最远的是 *Pvu II*,为 3 076 bp(图3,4)。

基因步移是一种利用 PCR 技术来分离与已知序列毗邻的未知 DNA 序列的方法^[4]。它较传统的基因组 DNA 文库筛选法最突出的优势表现在:① 简便、快速:从基因组 DNA 的抽提、纯化到完成第2步 PCR,一般只需 4~5 d;② 若结合 cDNA 末端

快速扩增(RACE)法,则可定位基因内含子/外显子连接点、获得基因 5'-端及 3'-端上下游顺式调控元件;或通过多步骤的基因步移而获得某一 EST 或 STS 全长基因序列。因此在填补基因组图谱之间的空隙、尤其是获得由传统文库筛选法所丢失的克隆等方面具有极其重要的意义。目前,在昆虫 *CYP450* 研究领域,已有多个 *CYP450* 上游顺式调控序列被分离、鉴定,如 *CYP 6B3* 上游-1~-838 核苷酸序列^[5],家蝇的 *CYP 6A1*^[6]与果蝇的 *CYP 6A2*^[7]上游的 Barbie Box 序列,*CYP 6B1v3* 上游的花椒毒素反应元件(xanthotoxin-responsive elements)^[8],*CYP 6B1v3*、*CYP 6B3v2*、*CYP 6B4v2* 以及 *CYP 6B5v1* 上游的外源化合物反应元件(xenobiotic-responsive elements)^[8],*CYP 6B1v3*、*CYP 6B4v2* 和 *CYP 6B5v1* 上游的抗氧化剂反应元件(antioxidant-responsive elements)^[8],*CYP 6D1* 开放读框上游 887 个核苷酸序列^[9]等,但上述这些调控序列无一例外地都是通过传统的基因组文库筛选方法而获得的。另外,有关蚊虫 *CYP450* 基因调控序列则国内外均未见报道。因此,本实验在昆虫 *CYP450* 研究领域首次运用基因步移方法从白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株中扩增出 *CYP 6N3* 上游调控序列,为下一步研究蚊虫 *CYP450* 多样性及其参与杀虫剂抗性的分子机理奠定基础。

参考文献:

- [1] 周国理,黄炯烈,吴瑜,等.白纹伊蚊细胞色素 P450 *CYP 6N3* 基因分子进化机制初探[J].广东寄生虫学会年报,2000,22:4.
- [2] 周国理,黄炯烈,詹希美.昆虫 *CYP6* 家族与抗药性及其转录调控[J].寄生虫与医学昆虫学报,2000,7(4):247.
- [3] Zhou G L, Huang J L, Wu Y, et al. Molecular cloning and sequence analysis of three new full-length cDNAs of cytochrome P450(*CYP 6N3v1-v3*) from *Aedes albopictus*[J]. Entomol Sin, 2001, 8(2): 141.
- [4] Dominguez O, Lopez-Larrea C. Gene-walking by unpredictably primed PCR[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(15): 3247.
- [5] Prapaipong H, Berenbaum M R, Schuler M A. Transcriptional regulation of the papilio polyxenes *CYP 6B1* gene[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(15): 3210.

(下转第413页)

肯尼亚 KEN 株, 巴布亚新几内亚 PNG 株和巴西 BRA 株恶性疟 LSA-1 抗原 N-和 C-端非重复区的序列, 结果表明上述 3 个分离株的 LSA-1 非重复区序列只有几个位点的氨基酸不同。本文测定了 FCC1/HN LSA-1 3'端序列, 推导出编码的氨基酸序列, 并对恶性疟 FCC1/HN 株与 NF54^[4], T9/96^[3], KEN, PNG, BRA^[6] 株 LSA-1 的 C-端氨基酸序列进行了同源性比较。结果表明 6 个不同分离株的 LSA-1 抗原 C-端序列只在 3 个位点有氨基酸替换。本文的结果与 Fidock^[3], Yang 等^[6] 的报道一致, 进一步证明了恶性疟不同分离株 LSA-1 3'序列的高度保守性。

LSA-1 抗原序列在不同恶性疟原虫分离株间是高度保守的, 免疫学实验表明它在诱导宿主免疫保护作用方面亦起重要作用。LSA-1 中间重复区的 17 肽单元是可被人体 B 细胞识别的表位^[2]; C-端的保守序列 KPIVQYDNF 可被能抑制危型疟的 HLA-B53 限制性的 CTL 识别^[8]。根据 LSA-1 抗原 C-端序列合成的多肽可引起广泛的免疫反应, 包括产生特异抗体, T 细胞增生, 分泌 IFN- γ 等, 这表明 LSA-1 抗原 C-端包含多个潜在的 B 和 T 细胞表位^[3, 5]。本文克隆了恶性疟 FCC1/HN LSA-1 3'端序列, 并进行了测序和序列分析, 为研究 LSA-1 抗原诱导免疫应答机制及研制肝期疟疾疫苗增添了基础资料。

参考文献:

[1] Guerin-Marchand C, Druilhe P, Galey B, *et al.* A liver-

stage specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning[J]. *Nature*, 1987, 329(6135): 164.

[2] Hollingdale M R, Aikawa M, Atkinson C T, *et al.* Non-CS preerythrocytic protective antigens[J]. *Immunol Lett*, 1990, 25(1-3): 71.

[3] Fidock D A, Gras-Masse H, Lepers J P, *et al.* *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1 is well conserved and contains potent B and T determinants[J]. *J Immunol*, 1994, 153(1): 190.

[4] Zhu J, Hollingdale M R. Structure of *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, 48(2): 223.

[5] Joshi S K, Bharadwaj A, Chatterjee S, *et al.* Analysis of immune responses against T- and B-cell epitopes from *Plasmodium falciparum* liver-stage antigen 1 in rodent malaria models and malaria-exposed human subjects in India[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(1): 11.

[6] Yang C F, Shi Y P, Udhayakumar V, *et al.* Sequence variations in the non-repetitive regions of the liver stage-specific antigen-1 (LSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1995, 71(2): 291.

[7] Trager W, Jensen J B. Human malaria parasites in continuous culture[J]. *Science*, 1976, 193(4254): 673.

[8] Hill AV, Elvin J, Willis A C, *et al.* Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria[J]. *Nature*, 1992, 360(6403): 434.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 409 页)

[6] Cohen M B, Koener J F, Feyereisen R. Structure and chromosomal localization of *CYP6A1*, a cytochrome P450-encoding gene from the house fly[J]. *Gene*, 1994, 146(2): 267.

[7] Dunkov B C, Guzov V M, Mocelin G, *et al.* The *Drosophila* cytochrome P450 gene *CYP6A2*: structure, localization, heterologous expression, and induction by phenobarbital[J]. *DNA Cell Biol*, 1997, 16(11): 1345.

[8] Hung C F, Hoizmacher R, Connolly E, *et al.* Conserved

promoter elements in the *CYP6B* gene family suggest common ancestry for cytochrome P450 monooxygenases mediating furanocoumarin detoxification[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(22): 12200.

[9] Scott J G, Liu N, Wen Z, *et al.* House fly cytochrome P450 *CYP6D1*: 5' flanking sequences and comparison of alleles[J]. *Gene*, 1999, 226(2): 347.

(编辑 张敏瑞)