

研究报告

蚊虫细胞色素 P450 基因系列研究

黄炯烈, 周国理, 吴瑜, 葛春喜, 王玲

(中山医科大学寄生虫学教研室, 广东广州 510080)

摘要: 报告中山医科大学寄生虫学教研室医学昆虫学室近 5 年来有关蚊虫细胞色素 P450 基因 (CYP450) 系列研究结果, 包括: ① 通过简并引物 PCR 分别从致倦库蚊、白纹伊蚊及中华按蚊中获得 3 个、2 个、2 个 CYP4 家族成员基因片段; 通过简并引物 PCR 及 RT-PCR 从白纹伊蚊中获得 16 个 CYP6 家族成员基因片段; ② 利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 法获得了白纹伊蚊 CYP6 家族 3 个新的全长 cDNA 序列及 7 个超过其全长一半以上的 cDNA 序列。GenBank accession number 分别为 AF283836-AF283838 (全长 cDNA 序列) 和 AF284782-AF284783 (非全长 cDNA 序列), 被国际 P450 命名委员会正式命名为 CYP 6N3v1-v3 (全长 cDNA 序列) 和 CYP 6N3v4、CYP 6N4v1-v6 并证实这些新基因同时存在于白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株及敏感株中; ③ 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 3 076 bp 调控序列; ④ 对白纹伊蚊 CYP 6N3、CYP 6N4 非翻译区序列功能分析显示: 昆虫 CYP450 与其它真核 mRNA 翻译起始及终止机制相似, 但具有多态性的特点; ⑤ 对白纹伊蚊 CYP 6N3 上游启动子区序列特征与功能分析显示: 蚊虫中 CYP450 转录起始存在着复杂性; ⑥ 证实蚊虫中 CYP 6 存在多样性, 并分析讨论了此种多样性形成的可能机制; ⑦ 分析讨论了蚊虫细胞色素 P450 CYP 6 家族分子进化机制; ⑧ 阐明了下一步研究的目标。

关键词: 按蚊属; 伊蚊属; 库蚊属; 细胞色素 P450; 聚合酶链反应/方法; 基因扩增; 基因步移; 基因表达调控; 转录调控; 翻译调控; 异源表达

中图分类号: R384.1; Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)06-0401-05

A Series of Studies on Cytochrome P450 Genes in Mosquitoes

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

(Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: In this report, a series of research results of mosquito cytochrome P450 genes (CYP450) during the last 5 years were reviewed by the research group of medical arthropods in Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences. The content included: ① 7 CYP4 gene (CYP4) fragments were cloned from mosquitoes *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) and *Anopheles sinensis* by degenerated PCR technique, respectively; 16 CYP6 gene (CYP6) fragments were isolated from mosquitoes *Ae. albopictus* by degenerate PCR and degenerate RT-PCR techniques. ② 3 new full-length cDNAs and 7 new cDNA fragments (each more than half of the full-length cDNA) were obtained from *Ae. albopictus* by RACE method, which are submitted by GenBank Database (accession number: AF283836-AF283838 and AF284782-AF284783), and named as CYP 6N3v1-v3 (the full-length cDNA sequences) and CYP 6N3v4, CYP 6N4v1-v6 (the non-full length cDNA sequences) by International P450 Nomenclature Committee, respectively. ③ A 3 076 bp 5'-flanking nucleotide sequence were amplified from deltamethrin-resistant *Ae. albopictus* by genomic walking method. ④ The obtained 5'-UTR and 3'-UTR of CYP 6N3 and CYP 6N4 were analyzed. The results showed that the translation start and stop mechanisms of CYP450 in insects are similar to that of other eukaryo-

收稿日期: 2001-09-08

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: 黄炯烈(1959-), 男, 广东陆丰人, 教授。

tic mRNAs, but characterized by multiplicity. ⑤The analysis on the obtained promoter sequence of *CYP 6N3* suggested that the multiplicity also exist in transcriptional initiation of *CYP 6* in mosquitoes. ⑥The diversity of *CYP 6* in mosquitoes was verified and its possible causes were discussed. ⑦The molecular evolutionary mechanism of *CYP450* in mosquitoes was discussed. ⑧Our further research goals were introduced.

Key words: anopheles; aedes; culex; cytochrome P450; polymerase chain reaction methods; gene amplification; gene-walking; gene expression regulation; transcription control; translation control; heterologous expression

细胞色素 P450 酶又称为细胞色素 P450 单加氧酶,它位于某些细胞的光滑内质网上,是多功能氧化酶(MFO)的重要组成部分,具有底物广泛性和功能多样性的特点,它不仅参与了蜕皮激素、保幼激素、信息素及植物次生性化合物的代谢,而且在有机合成化合物如杀虫剂等的分解代谢中起着重要的作用,与昆虫对各种杀虫剂的抗性密切相关。细胞色素 P450 酶的此种功能上的多样性是由其结构多样性所决定的,过去 20 年中已分离、鉴定的昆虫 P450 家族成员约 600 个,但其中从蚊虫获得的细胞色素 P450 基因(*CYP450*)则很少,尤其是其全长 cDNA 序列则更少,而且有关蚊虫 *CYP450* 调控序列则国内外均未见报道。因此广泛而深入研究蚊虫中 *CYP450* 多样性与分子进化及其参与杀虫剂抗性的分子机制具有重要的理论和实际意义。本课题组正是基于上述背景,自 1995 年率先在国内开始研究蚊虫中 *CYP450*,现将我们的系列研究方法及结果报告如下。

1 简并引物 PCR 及简并引物 RT-PCR 在蚊虫 *CYP450* 研究中的应用

简并引物 PCR 主要用于当目的基因序列不明且仅知其一部分蛋白质序列时,或根据已知序列寻找一个基因家族中新的或未确定的成员时。本课题组用简并引物 PCR 或简并引物 RT-PCR 来寻找蚊虫中 *CYP450* 的原因一方面是因为暂不知道蚊虫细胞色素 P450 的基因序列,另一方面也是希望通过简并引物较一般引物广泛的适合性,从抗性蚊虫中找到与抗性有关的 *CYP450* 家族中的多个成员,使今后的研究更符合客观实际^[1]。本课题组通过简并引物 PCR 分别从致倦库蚊、白纹伊蚊及中华按蚊中获得 3 个、2 个、2 个 *CYP4* 家族成员基因片段^[2,3];通过简并引物 PCR 及 RT-PCR 从白纹伊蚊中获得 16 个 *CYP6* 家族成员基因片段^[4-7],为下一步深入研究其全长基因序列及其启动子区序

列奠定了良好的基础。

2 cDNA 末端快速扩增(RACE)法在蚊虫 *CYP450* 研究中的应用

cDNA 末端快速扩增(RACE)是用来分离和鉴定新全长 cDNA 的方法,它较传统的 cDNA 文库筛选法有以下几个主要优势:操作简便、快速,节省时间。一般地通过筛选 cDNA 文库获得单个 cDNA 克隆以及为确定是否有序列丢失进行的克隆分析,要花几个星期的时间,而用 RACE 法获得这些信息只需几天、甚至 1 天的时间;而且 RACE 法只需极少量的起始反应物质,就能迅速反馈是否有目的产物生成;能获得可能的启动子剪接和多聚腺苷化信号肽序列的信息,有助于选择适当的引物以用于从转录模型非常复杂的基因中扩增 cDNA 的亚群(如一些被选择性剪接或开始于很少使用的启动子的特殊转录物);能产生大量的独立克隆以检查稀有事件的发生。由于昆虫中细胞色素 P450 含量低且不稳定,易变性为无活性的 P420,因此若采用 cDNA 文库筛选法来获得昆虫 *CYP6*,很有可能会使某些 mRNA 丰度极低的 *CYP6* 成员筛选不到^[8]。目前从昆虫中分离获得的 *CYP6* 全长 cDNA 绝大多数是通过传统的文库筛选法而获得的。通过 RACE 法获得的昆虫 *CYP6* 家族成员为来自于棉铃虫的 *CYP 6B6*、*CYP 6B7*。但在蚊虫中还未见有相关内容报道^[8]。本课题组则在蚊虫细胞色素研究领域国内、外均为首次利用 RACE 法获得了白纹伊蚊 *CYP6* 家族 3 个新的全长 cDNA 序列及 7 个超过其全长一半以上的 cDNA 序列^[8,9],为下一步深入研究其基因结构及其功能奠定了坚实的基础。

3 基因步移法在蚊虫 *CYP450* 研究中的应用

基因步移 (gene-walking) 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。它较传统的基因组 DNA 文库筛选法最突出的优势表现在: 简便、快速。从基因组 DNA 的抽提、纯化到完成第二步 PCR, 一般只需 4~5 d; 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。根据 Clontech 公司 Genome Walker 适配子设计原理, 此种适配子具有以下 3 个特征: 它是一个向 5' 延伸的适配子, 没有 AP1 (外部适配子引物) 结合位点, AP1 结合位点只能通过基因特异性引物 (GSP1) 延伸而产生; 该适配子暴露的 3' 末端含有一氨基基团, 以防止其 3' 端延伸而产生 AP1 结合位点; 适配子引物比适配子本身要短, 可进一步有效地防止可能存在的因 AP1 3' 端延伸所形成的模板的扩增; 另外, 在 PCR 循环过程中, 还采取了降落 PCR (Touchdown PCR, 简称 TD PCR, 本课题系采用 2 个阶段的 PCR 循环) 和巢式 PCR (Nested PCR) 策略。上述这些设计与策略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^[10]。

在昆虫细胞色素 P450 研究领域, 虽已有多个 P450 基因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, 家蝇的 *CYP 6A1* 与果蝇的 *CYP 6A2* 上游的 Barbie Box 序列, *CYP 6B1v3* 上游的花椒毒素反应元件 (xanthotoxin-responsive elements), *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), *CYP 6B1v3*、*CYP 6B4v2* 和 *CYP 6B5v1* 上游的抗氧化剂反应元件 (antioxidant-responsive elements), *CYP 6D1* 开放读框上游 887 个核苷酸序列等, 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。因此, 本课题组在昆虫细胞色素 P450 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 3 076 bp 的调控序列^[10], 为下一步研究蚊虫细胞色素 P450 多样性及其参与杀虫剂抗性的分子机理奠定基础。

4 RACE 法获得的白纹伊蚊 *CYP 6*

家族新基因的鉴定与命名

通过 RACE 法获得的 3 个全长 cDNA 序列分别为 1 849 bp、1 856 bp 和 1 760 bp。在它们的 5' 端 47 位核苷酸处均有一翻译起始密码子 ATG, 在此上游均有一 46 个核苷酸非翻译区序列; 在 3' 端 1 537 位核苷酸处均发现一个 TAA 终止密码子; 其后则是长度不等的 3' 非翻译区, 分别为 316 bp、220 bp 和 309 bp, 其中 poly(A) 尾分别为 30 bp、81 bp 和 22 bp; 编码区均为 -1 491 bp 的开放读框 (open reading frame), 所推导的蛋白质序列长度均为 497 个氨基酸残基, 所推导的蛋白质相对分子质量 (MW) 分别为 56 570、56 579 和 56 544, 与大多数已报道的细胞色素 P450 蛋白相符合 (P450 蛋白相对分子质量一般为 46~60)^[9]。与其它微粒体蛋白一样, 该 3 个全长 cDNA 序列所推导的蛋白质序列氨基端均存在有一个高度疏水性的信号序列, 这是跨膜蛋白的特征; 在靠近羧基端一侧均存在有细胞色素 P450 血红素结合区域、P450 氧结合部位、螺旋 K (helix K)、CYP6 蛋白保守的 P * * F * P * * F 区^[9]。对 3 个全长 cDNA 序列及 7 个非全长 cDNA 序列所推导的氨基酸序列进行同源性分析显示: 与 *CYP 6N1* 及 *CYP 6N2* 同源性最高, 达 58.6%~64.4%, 应划分到 *CYP 6N* 亚家族。构建的系谱树显示出与同源性分析相一致的结果。目前这些序列已申请获得 GenBank accession numbers, 分别为 AF283836-AF283838 (全长 cDNA 序列) 和 AF284782-AF284783 (非全长 cDNA 序列), 同时报送国际 P450 命名委员会获正式命名: *CYP 6N3v1-v3* (全长 cDNA 序列) 和 *CYP 6N3v4*、*CYP 6N4v1-v6*^[9]。值得注意的是, 所获得的这些 *CYP 6N* 亚家族新基因 cDNA 序列相互间为等位基因变异体, 同时又分别来自于抗性株和敏感株, 提示: 这些新基因应同时存在于两株中。至于它们在两株中是否有表达量上的差异即是否与抗药性有关, 则有待于进一步研究^[9]。

5 获得的白纹伊蚊 *CYP 6N3*、*CYP 6N4* 非翻译区序列功能分析

比较本课题组所获得的 *CYP 6N3*、*CYP 6N4* 与其它已知的昆虫 P450 基因翻译起始点两侧基因序列, 显示: 昆虫 P450 翻译起始机制有部分是类似于脊椎动物 mRNA 翻译起始的, 但具有复杂性的

特点。昆虫 P450 翻译起始机制复杂性特点是否是其结构与功能多样性原因之一, 则有待于获得更多的昆虫 P450 家族成员并对它们翻译起始位点旁侧序列进行深入研究来加以证实^[11]。对所获得的 *CYP 6N3* 及 *CYP 6N4* 基因前导序列进行二级结构分析, 显示: *CYP 6N3v1*、*CYP 6N3v2*、*CYP 6N3v3* 及 *CYP 6N4v1* 的前导序列均无稳定性的发卡结构(茎环结构), 表明: 所获得的 *CYP 6N3*、*CYP 6N4* 均可进行有效翻译。进一步分析显示: 其第一个 ATG 是翻译起始点^[11]。对 *CYP 6N3*、*CYP 6N4* 与其它昆虫 *CYP450* mRNA 终止密码及其两侧核苷酸序列、mRNA 翻译产物羧基端氨基酸残基进行比较分析, 显示: 昆虫 *CYP450* 与其它真核 mRNA 翻译终止机制相似, 但具有多态性的特点^[11]。

6 获得的白纹伊蚊 *CYP 6N3* 上游启动子区序列特征与功能分析

对通过基因步移法获得的白纹伊蚊 *CYP 6N3* 5' 旁侧区启动子序列进行分析, 显示其起始密码子 ATG 上游-45 的 A 可能是其转录起始点(transcription initiation site, TIS)。在 *CYP 6N3* 5' 旁侧序列-47~-43 位有一节动物起始子(initiator, Inr)的特征性序列(TCAGT)。已知 TATA 盒决定转录的方向和精确的转录起始点, CAAT 盒及 GC 盒则主要控制转录起始频率。分析显示: 在 *CYP 6N3* ATG 上游-80 bp 处(即转录起始点上游-35 bp 处)有 1 个典型的 TATA 盒, 这与大多数真核生物转录起始机理相一致。此外, 其上游-1 071~-1 066 bp 及-611~-607 bp 处均有一 TATA 样序列, -2 754~-2 750 bp、-2 288~-2 284 bp 及-1 009~-1 005 bp 处均有一 CCAAT 盒, 但未发现 GC 盒。如此众多的启动子元件, 表明蚊虫中 *CYP450* 转录起始存在着复杂性。多个启动子造成转录产生的 mRNA 具有多个选择性 5' 端或具有各种不同的转录活性, 这是否与蚊虫 *CYP450* 多样性及其参与杀虫剂抗性有关则有待于进一步研究。

此外, 在-2 923~-2 909 bp、-2 349~-2 335 bp、-2 332~-2 318 bp、-1 717~-1 703 bp、-1 080~-1 066 bp、-1 043~-1 029 bp、-928~-914 bp、-781~-767 bp 及-90~-76 bp 9 处各有一潜在的 Barbie 盒(其共有序列为 15 bp 的 ATCAAAGCTGGAGG, 核心序列为 AAAG)。

它们均存在有共有序列中的核心序列, 15 个碱基中均有 7 个碱基与共有序列相同; 在-2 452~-2 446 bp 以及-1 827~-1 821 bp 则各有一完全互补于由 dioxin 诱导的外源化合物反应元件 XRE-AhR(TNGCGTG)的通用序列, 提示 *CYP6N3* 基因有受 dioxin 调控的可能。有关这些诱导性元件在蚊虫 *CYP450* 多样性及其参与杀虫剂抗性中的作用有待于进一步的研究。

7 蚊虫 *CYP450* 多样性分析

目前在昆虫中已发现的细胞色素 P450 *CYP6* 家族成员分布于 7 个亚家族, 每个亚家族中亦已鉴定出多个成员, 其中每个成员均存在有若干个等位基因变异体, 而且不同种属的昆虫存在有不同的昆虫 *CYP6* 亚家族成员及等位基因变异体, 使昆虫 *CYP6* 家族呈现广泛的多样性^[12]。本课题组也证实蚊虫 *CYP450* 在亚家族、同一亚家族不同成员、同一亚家族成员众多等位基因变异体 3 个层次上存在着多样性^[13]。通过分析, 认为此种多样性的原因可能是由于昆虫对各种外源性化合物的一种适应性表现。由于每一种昆虫所处的外部环境的不同, 通过几亿年以上的自然选择, 使得每一种昆虫体内产生了具有各自特点且足以应付其生存环境中各种外源性化合物的细胞色素 P450, 这也许也是迄今为止还未见在不同种昆虫中发现同一个 *CYP6* 家族成员的原因之一。因此, 从某种意义上说, 通过天然产物几亿年以上的选择所产生的 P450 多样性也许已使昆虫预适应了过去几十年中杀虫剂的选择^[12]。另外, 本文第 6 部分的分析表明蚊虫中 *CYP450* 转录调控存在着复杂性。同时, 本文第 5 部分通过比较 *CYP 6N3*、*CYP 6N4* 与其它已知的昆虫 P450 成员 5'-UTR 区和 3'-UTR 区, 显示出昆虫 P450 在翻译调控水平上的复杂性^[11]。正是由于昆虫 P450 在诱导或转录调控以及翻译调控方面的多态性, 从而使昆虫能够迅速地通过其体内 *CYP450* 的所有组成部分, 作出针对各种化学损害的保护性反应^[15]。

8 蚊虫 *CYP6* 家族分子进化分析

本课题组通过同源性分析及构建系统树显示: 所获得的 3 个全长 cDNA 序列(*CYP 6N3* 及其等位基因变异体)与来自鼠的 *CYP 3A1* 亲缘关系比

与来自昆虫的 *CYP28*、*CYP4* 和 *CYP12* 家族成员亲缘关系要近^[13]; 通过进一步分析哺乳动物 *CYP3* 家族与昆虫 *CYP6* 家族进化历史, 我们推测: 在进化上, 昆虫 *CYP6* 家族与哺乳动物中具有药物代谢功能的 *CYP3* 家族的亲缘关系可部分解释昆虫众多 P450 家族中 *CYP6* 家族与杀虫剂抗性较为密切的关系^[12~14]。根据传统的进化树, 在常见的 3 属蚊中, 按蚊在蚊科中处于相对原始的地位。而本实验所构建的细胞色素 P450 系谱树显示: 白纹伊蚊 *CYP 6N3* 基因与来自冈比亚按蚊的 *CYP 6N1*、*CYP 6N2* 亲缘关系比与来自致倦库蚊 *CYP 6E1*、*CYP 6F1* 基因亲缘关系要近, 提示: 白纹伊蚊 *CYP 6N3* 基因可能比致倦库蚊的 *CYP 6E1*、*CYP 6F1* 基因更为古老^[13]。基因家族 (gene family) 是从某个原祖基因通过重复和突变形成的一系列基因, 其产生的基本过程是基因复制。比较本课题组所获得的 3 个全长 cDNA 序列, 显示: *CYP 6N3v1* 与 *CYP 6N3v2*、*CYP 6N3v1* 与 *CYP 6N3v3*、*CYP 6N3v2* 与 *CYP 6N3v3* 之间的相似性在编码区均为 3/497 个或 4/497 个氨基酸差异, 在 5'-非翻译区 (UTR) 均为 100% 同源, 而且上述各序列之间的氨基酸差异均位于蛋白质功能非保守的区域。因此强烈提示这 3 个 *CYP 6N* 亚家族基因是通过整个 *CYP 6N3* 基因座的新近复制而产生^[13]。

9 今后进一步研究设想

研究昆虫细胞色素 P450 的结构、功能及其表达调控是了解昆虫 P450 参与生长、发育及抗药性机制的一个极其重要的环节。由于细胞色素 P450 蛋白是一个超家族, 而且昆虫中细胞色素 P450 含量低且不稳定, 易变性为无活性的 P420, 因此很难通过直接从昆虫中分离、纯化细胞色素 P450 蛋白重建单加氧酶代谢系统来研究昆虫细胞色素 P450 功能。目前广泛被采用的方法是将获得的昆虫 P450 全长 cDNA 进行异源表达, 然后纯化异源表达蛋白, 并在 P450 氧化还原配体存在的条件下重建催化活性^[15]。因此本课题组下一步工作设想包括: 将所获得的白纹伊蚊 *CYP 6N3* 进行异源表达, 体外重建杀虫剂代谢系统, 并结合 Southern 及 Northern 杂交分析结果, 确定白纹伊蚊 *CYP 6N3* 与抗药性的关系; 获得敏感株中 *CYP 6N3* 上游调

控序列, 并与抗性株进行比较, 构建报告基因系统, 以鉴定两株间上游调控序列活性差异; 运用各种 DNA-蛋白质及蛋白质-蛋白质相互作用研究方法, 获得其反式作用因子, 以研究蚊虫 *CYP 450* 多样性及其参与抗药性的转录调控机制。

参考文献:

- [1] 王 迅, 黄炯烈. 简并引物 PCR 在致倦库蚊细胞色素 P450 基因研究中的应用[J]. 广东寄生虫学会年报, 1996, 18: 11.
- [2] 黄炯烈, 王 迅. 致倦库蚊溴氰菊酯抗性株细胞色素 P450 基因的克隆、鉴定及同源性分析[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1998, 5(3): 166.
- [3] 肖 静, 王 玲, 黄炯烈. *CYP4* 基因表达量在致倦库蚊溴氰菊酯抗性株和敏感株生活史各期中的初步研究[J]. 广东寄生虫学会年报, 1998, 20: 24.
- [4] 周国理, 黄炯烈, 姚其方, 等. 白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株 *CYP6* 基因 cDNA 序列的克隆与鉴定[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(1): 1.
- [5] 周国理, 黄炯烈, 姚其方, 等. 白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株基因组中 *CYP6* 基因片段的分离与鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(1): 23.
- [6] 吴 瑜, 黄炯烈, 周国理, 等. 白纹伊蚊基因组中 *CYP6* 家族新成员基因片段的克隆与序列分析[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2001, 8(1): 23.
- [7] 葛春喜, 黄炯烈, 周国理, 等. 白纹伊蚊细胞色素 *CYP6* 家族新成员 cDNA 片段的克隆与鉴定[J]. 广东寄生虫学会年报, 2000, 22: 14.
- [8] 周国理, 黄炯烈, 吴 瑜. 白纹伊蚊溴氰菊酯抗性株 *CYP6* 基因全长 cDNA 的快速扩增[J]. 广东寄生虫学会年报, 1999, 21: 1.
- [9] Zhou G, Huang J, Wang L, et al. Molecular cloning and sequence analysis of three new full length cDNAs of cytochrome P450 from *Aedes albopictus*[J]. Entomol Sinica 2001, 8(2): 141.
- [10] 周国理, 黄炯烈, 吴 瑜, 等. 基因步移在分离白纹伊蚊细胞色素 P450 启动子中的应用及意义[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(6): 406.
- [11] 周国理, 黄炯烈, 吴 瑜, 等. 白纹伊蚊细胞色素 P450 *CYP6N* 亚家族新成员 5'-及 3'-非翻译区序列功能分析[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(4): 36.
- [12] Zhou G, Huang J, Wu Y, et al. Study on the diversity of cytochrome P450 genes from *Aedes albopictus*[J]. Entomol Sinica, 2001, 8(1): 39.

(下转第 422 页)

剂的缺点, 与传统疫苗比有如下优点: 不必纯化抗原, 不需佐剂, 避免了抗原在胃内降解和变性, 对所表达的外源抗原的免疫应答不随粘膜免疫途径的变化而变化, 并且能诱导细胞介导的、体液的和分泌型 IgA 抗体反应^[3, 9, 10]。尿素酶已被证实为一种有效的保护性抗原, 最终可望成为 *H. pylori* 疫苗的重要组分, 尿素酶 A, B 两个亚单位中 UreB 起主要作用。本实验将 *ureB* 表达完整蛋白的开放读框克隆入原核表达载体 pTrc99A 质粒, 构建成 pTrc99A-*ureB* 重组质粒。核苷酸测序显示, 所克隆 *ureB* 与基因文库中 *ureB* 的一致性为 97.42% (1 663 bp/1 707 bp), 进一步证实了该基因的保守性, 这也是筛选疫苗抗原的基本条件之一。重组质粒转化减毒鼠伤寒沙门氏疫苗菌也得以实现, 并且重组质粒不会因重组菌无选择压力转种而丢失, 可见 pTrc99A-*ureB* 可在 SL3261 宿主菌中稳定存在, 且对宿主无明显毒性。进一步研究表明, *H. pylori* UreB 能在疫苗菌中特异表达。

动物实验结果表明, SL3261 (pTrc99A-*ureB*) 对 C57BL/6 小鼠 *H. pylori* 感染有免疫保护作用, 但不能完全清除感染的 *H. pylori*, 只能显著降低 *H. pylori* 定植水平。这提示, 减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 有可能作为 *H. pylori* 疫苗的有效载体, 但应开发多组分(效价)活疫苗, 以提高免疫效果。

参考文献:

- [1] Cortesy-Theulaz I, Porta N, Glauser M, et al. Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against helicobacter infection in mice [J]. Gastroenterology 1995, 109(1): 115.
- [2] Marcetti M, Rossi M, Giannelli V, et al. Protection against *Helicobacter pylori* infection in mice by intragastric vaccination with *H. pylori* antigens is achieved using a

non-toxic mutant of *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT) as adjuvant [J]. Vaccine 1998, 16(1): 33.

- [3] Hopkins S, Kraehenbuhl J, Schodel F, et al. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization [J]. Infect Immun, 1995, 63(9): 3279.
- [4] Chen M, Lee A, Hazell S L. Immunisation against *Helicobacter* infection in a mouse/ *Helicobacter felis* model [J]. Lancet 1992, 339 (8801): 1120.
- [5] Lee A, Chen M. Successful immunization against gastric infection with *Helicobacter* species: use of a cholera toxin B-subunit-whole-cell vaccine [J]. Infect Immun, 1994, 62 (8): 3594.
- [6] Guy B, Hesler C, Fourage S, et al. Systemic immunization with urease protects mice against *Helicobacter pylori* infection [J]. Vaccine, 1998, 16(8): 850.
- [7] Lee C K, Soike K, Hill J, et al. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease decreases colonization levels following experimental infection of rhesus monkeys [J]. Vaccine, 1999, 17(11-12): 1493.
- [8] Novak M J, Smythies L E, McPherson S A, et al. Poliovirus replicons encoding the B subunit of *Helicobacter pylori* urease elicit a Th1 associated immune response [J]. Vaccine, 1999, 17(19): 2384.
- [9] Vancott J L, Staats H F, Pascual D W, et al. Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subunits, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella* [J]. J Immunol, 1996, 156(4): 1504.
- [10] Cortesy-Theulaz I E, Hopkins S, Bachmann D, et al. Mice are protected from *Helicobacter pylori* infection by nasal immunization with attenuated *Salmonella typhimurium phoP*⁰ expressing urease A and B subunits [J]. Infect Immun, 1998, 66(2): 581.

(编辑 黄小延, 张敏瑞)

(上接第 405 页)

- [13] 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.
- [14] 周国理, 黄炯烈, 詹希美. 昆虫 CYP6 家族与抗性及其转录调控 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2000, 7(4):

247.

- [15] 吴瑜, 周国理, 黄炯烈. 昆虫细胞色素 P450 的异源表达 [J]. 广东寄生虫学会年报, 1999, 21: 57.

(编辑 张敏瑞)