

# 亚洲璃眼蜱 *P27* 基因的克隆和表达模式分析

王玉霞<sup>1,2</sup>, 周勇志<sup>1</sup>, 龚海燕<sup>1</sup>, 程天印<sup>2</sup>, 周金林<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院上海兽医研究所, 农业部寄生虫学重点开放性实验室, 上海 200232; 2. 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128)

**摘要:** 为了进一步研究蜱吸血时唾液腺的基因表达调控机制, 并为蜱疫苗的制备筛选功能性抗原, 本试验对从亚洲璃眼蜱雌蜱吸血前后唾液腺消减文库中筛选出的一个具有 Poly(A) 尾的 EST 序列 *P27* 进行了研究。首先运用 RACE 技术扩增出该基因的 5' 端, 在此基础上设计引物, 扩增出该基因全长, 此基因全长 827 bp, 其开放阅读框从第 35 个碱基始至第 706 个碱基止, 预测分子量为 27.28 ku, 等电点 4.22。生物信息学结构分析表明该基因含有跨膜区及多个活性位点, 可能与细胞内 DNA 的转录相关; 该基因与现有其他基因同源性很小, 为一新基因; RT-PCR 结果显示该基因在半饱血雌蜱的唾液腺、蜱壳、中肠均有表达, 但在壳中表达丰度稍低。本研究克隆的 *P27* 基因序列已登录 GenBank, 序列号为 EU180067。

**关键词:** 亚洲璃眼蜱; *P27*; 基因克隆; 表达模式

中图分类号: S852.74<sup>+</sup>6; Q785

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)02-0201-05

## Molecular Cloning and Expression Patterns Analysis of the *P27* Gene from *Hyalomma asiaticum* Ticks

WANG Yu-xia<sup>1,2</sup>, ZHOU Yong-zhi<sup>1</sup>, GONG Hai-yan<sup>1</sup>, CHENG Tian-yin<sup>2</sup>, ZHOU Jin-lin<sup>1\*</sup>

(1. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200232, China; 2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In order to explore the regulation mechanism of the tick salivary glands by blood feeding, and screen vaccine candidates, a EST with poly(A) tail from the subtractive cDNA library of the hard tick-*Hyalomma asiaticum* was further studied. 5' rapid amplification of cDNA ENDS (RACE) were used to clone the full length cDNA. The full length of the gene named *P27* is 827 bp and the coding region is from 35 bp to 706 bp. The putative protein of *P27* is 27 kDa, and the isoelectric point is 4.22. The structure analysis showed that it contain a cross-membrane region and many activated loci, which suggest its transcript action in cell. Comparison of deduced amino acid sequences showed low homology with reported protein in the database. Expression analysis by RT-PCR revealed that *P27* was expressed in salivary gland, shell and midgut of fed tick, but not in the unfed tick, which indicates *P27* is induced to express by tick blood feeding.

**Key words:** *Hyalomma asiaticum*; *P27*; gene cloning; expression patterns

蜱不仅是家畜重要的体外寄生虫, 更为重要的是, 它们是多个人和动物重要疾病的传播媒介, 经蜱传播的病原体有细菌、病毒、真菌、立克次体、螺旋体

以及原虫<sup>[1]</sup>。因此开展蜱和蜱病控制的研究非常必要。目前, 从分子水平上寻求有效抗原以实现免疫控蜱正成为研究的热点, 已经成功研制的抗蜱疫苗

收稿日期: 2007-03-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA10A207)

作者简介: 王玉霞(1979-), 女, 湖南常德人, 硕士, 主要从事寄生虫分子生物学研究

\* 通讯作者: 周金林, Tel: 021-54083188, Fax: 021-54081818, E-mail: jinlinzhou@hotmail.com

和相继发现的一批有开发潜力的功能分子为控蜚研究展示了美好的前景。

唾液腺是蜚最重要的生理器官,在蜚长时间的吸血过程中,唾液腺能分泌大量活性分子,并且呈现出吸血前后的差异表达,这些活性分子在维持蜚吸血和病原传播中发挥着巨大的作用,特别是其中的差异表达分子,了解其种类有助于阐明蜚吸血的机制,并且可能成为蜚疫苗的重要目标抗原。目前分离这些分子主要采用抑制消减技术,这种技术能缩小基因的筛选范围,提高基因的分选效率,对一些低丰度表达的分子也同样适用。

本试验选择亚洲璃眼蜚(*Hyalomma asiaticum*)雌蜚吸血前和吸血后的蜚唾液腺消减文库中一个具有 Poly(A)尾的 EST 序列进行全长基因克隆和该基因表达模式研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 病原及宿主动物

亚洲璃眼蜚采自新疆巴州绵羊,从自然感染的健康畜体采集蜚源,经鉴定后,兔体人工饲养得到单克隆成年蜚群;新西兰大白兔,购自中国科学院上海实验动物中心。

### 1.2 试剂

*E. coli* DH-5 $\alpha$  菌株,为本实验室保存。TRIZOL 试剂、DEPC 试剂和玻璃珠 DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程公司;Taq DNA 聚合酶购自 BioStar 公司;RACE 反应试剂盒和 Smart cDNA 文库消减试剂盒为 Invitrogen 公司产品;pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;质粒 DNA 提取试剂盒和合成引物购于赛百盛公司。

### 1.3 半饱血和未吸血亚洲璃眼蜚雌蜚唾液腺总 RNA 的提取

挑选饱血自然脱落的体大、无损伤雌蜚,兔体人工饲养孵化传代,发育至成蜚,先预留 20 只雌蜚;再将雄蜚和雌蜚各 15 只混养于兔耳,按文献[2]方法操作。待其吸血 5 d 后摘下雌蜚 10 只,分别分离半饱血和吸血前雌蜚的唾液腺,在液氮中充分研磨后,加入 TRIZOL 试剂,在匀浆器中充分匀浆,按 TRIZOL 试剂产品说明书分离唾液腺总 RNA。紫外分光光度计测 RNA 浓度,分装保存于 $-70^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.4 基因的获取

采用 Smart cDNA 文库消减试剂盒按说明书对获得的两种唾液腺总 RNA 进行消减、克隆和测序,

共测得 100 多个目的序列,选择其中一个目的序列,用 DNAMAN 和 Genetyx 分析其结构。

### 1.5 目的基因 5'端的扩增

根据目的序列在软件中的分析结果,设计 5'-RACE 引物,该 PCR 扩增特异性引物为 GSP1:5'-TGTACTGGAGCATGCAC-3',GSP2:5'-GAGCACACCGGGTCAGGTCCTTG-3', GSP3: 5'-CTTCATCTCGTTGGGTGATC-3', AUAP: 5'-TAATGGTCGTGCTCATGG-3'。按 5'-RACE 方法(见图 1),以亚洲璃眼蜚半饱血雌蜚唾液腺总 RNA 为模板进行反转录后,Nested-PCR 扩增 cDNA 的 5'端。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,回收目的条带,连入 pGEM-T Easy 载体,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  细胞,经 PCR 鉴定后,测序。

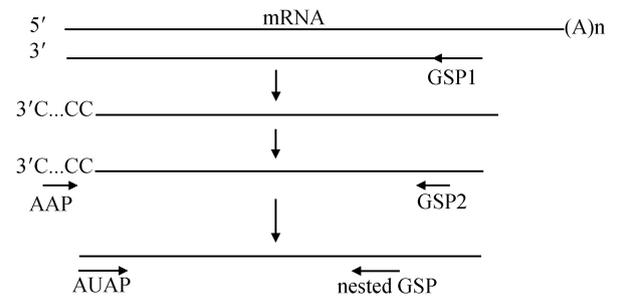


图 1 EST 5'端克隆示意

Fig. 1 Overview of cloning 5' ends of EST

### 1.6 RACE-PCR 克隆目的基因的全长 cDNA

根据 5'端的测序结果,拼接出长目的基因,再在该序列两端设计扩增全长基因的引物(上游引物:5'-CAATCCAGTGTCTCGAAACATGCGC-3',下游引物:5'-ACGCTACTTCTGCGAACGCC-3')。以亚洲璃眼蜚半饱血雌蜚唾液腺总 RNA 为模板,按 3'-RACE 方法(参照说明书)反转录出第 1 链 cDNA,再以此为 PCR 反应模板,Nested PCR 扩增该基因全长。扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$  40 s,54 $^{\circ}\text{C}$  1 min,72 $^{\circ}\text{C}$  1 min,共 35 个循环;循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。回收目的条带,连入 pGEM-T Easy 载体上,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  细胞,经 PCR 鉴定和内切酶(*EcoR* I + *Sac* I)鉴定后测序。最后,对比原拼接序列,综合分析获得全长 cDNA 序列。本研究克隆的 P27 基因序列已登录 GenBank,序列号为 EU180067。

## 1.7 重组蛋白的原核表达

在 cDNA 序列信号肽位点后设计特异性引物(上游引物:5'-CGG GAATTC GAGACCGCTTG-GCCCATAG-3';下游引物:5'-TCA CTCGAG CTAGGGCATGTACTGGAGCAT-3'),并使其分别带有 *EcoR* I 和 *Xho* I 位点,以 cDNA 为模板扩增编码蛋白质序列,克隆到 pGEM-T 载体,重组质粒酶切消化后,连接到 pET32a(+).经测序确证后,重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3),用 1 mol/L IPTG 诱导重组蛋白的表达。对照蛋白 22 ku 的 TRX 由空表达载体 pET32a(+ )诱导产生。

## 1.8 RT-PCR 分析目的基因的组织表达特异性

分离半饱血亚洲璃眼蜉雌蜉的蜉壳、中肠、唾液腺,分别提取 RNA,合成相应的 cDNA。再以这几个部位的 cDNA 为模板,用目的基因全长引物在全长 PCR 扩增条件下逐一扩增,1%琼脂糖凝胶电泳分析该基因的表达情况,将蜉 *actin* 基因作为 RT-PCR 内参基因,以保证模板 cDNA 的完整性。同法比较该基因在半饱血和未吸血状态的亚洲璃眼蜉雌蜉唾液腺内的表达。

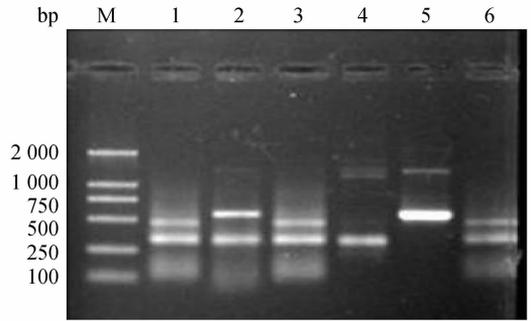
## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因全长 cDNA 的克隆

5'-RACE 方法 Nested PCR 扩增目的序列 cDNA 5'端,获得 500 bp 左右的基因片段(见图 2),鉴定后按 3'-RACE 的方法扩增全长基因,获得与预期大小基本一致的 750 bp 左右基因片段,经 PCR 鉴定后(见图 3),测序,拼接获得全长基因序列。

### 2.2 目的基因的全长序列及生物信息学分析

所克隆的 cDNA 全长序列及其推导氨基酸序列见图 4。此基因全长 827 bp,其开放性阅读框从第 35 个碱基始至第 706 个碱基止,预测分子量为 27.28 ku,等电点 4.22,故将其定名为 *P27* 基因。通过 Psor.org 网站分析其信号肽位置,发现在第 18 和 19 个氨基酸之间,存在 1 个可能的切割位点,其可能性为 79.3%;跨膜结构预测表明该序列所编码的前 50 个氨基酸内可能存在 1 个跨膜区,亚细胞定位有 43.5% 位于细胞核;此外,还利用 ExPasy 的 Scanprosite 软件对该基因进行了结构和功能域分析,结果表明,该基因具有 2 个酪氨酸硫酸化位点、5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、6 个酪蛋白激酶磷酸位点、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点、4 个 N-糖基化作用部位和 1 个 N-豆蔻酰化位点;再采用 NCBI 网站的

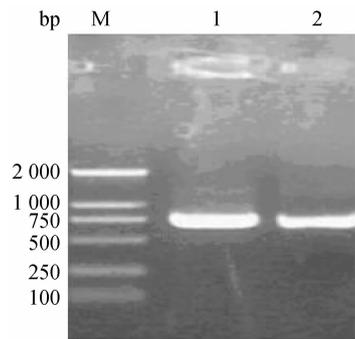


M. DNA 标准分子量;1,3,6. *P27*-5r 的 PCR 产物;2. *P27*-5r 的阴性对照(无模板);4. *P27*-5r 的阴性对照(AUAP+H<sub>2</sub>O);5. *P27*-5r 的阴性对照(GSP<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O)

M. 2 000 bp ladder;1,3,6. PCR products of *P27*-5r;2. Negative control of *P27*-5r(no template);4. Negative control of *P27*-5r(AUAP+H<sub>2</sub>O);5. Negative control of *P27*-5r(GSP<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O)

图 2 5'-RACE nested PCR 电泳结果

Fig. 2 Nested PCR fragments generated by 5'-RACE



M. DNA 标准分子量;1. *P27* 全长鉴定;2. *P27* 全长 M. 2 000 bp ladder;1. Identification of PCR products;2. Complete sequence of *P27*

图 3 *P27* 全长的克隆鉴定

Fig. 3 PCR product of *P27* from the recombinant plasmid contain pGEM-T- *P27*

BLAST 程序对该基因进行同源性搜索,由表 1 的结果可见,该基因与现有其他基因的同源性很低,最高仅 37%,为一新基因。

### 2.3 蛋白表达结果

该基因在 pET32a 原核表达系统中不能正常表达。后再尝试在 pGEX-4T 系统中也未成功。

### 2.4 组织表达特异性分析

以亚洲璃眼蜉半饱血和未吸血雌蜉唾液腺内 RNA 反转录的 cDNA 为模板扩增,仅能从前者中扩增出 750 bp 左右的特异条带,说明 *P27* 基因为唾

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
TGATTGCTGTGGGCTTTC AATCCAGTGTGCAAAACATGCGCCTTAGGGTTGGTCTGTGTTAATCACTGGCTATTCAAGTCTTTGTAGACGGGGA
      M R L G L V L L I T G Y S V F V D A E
100     110     120     130     140     150     160     170     180
GACCGCTGGCCCATAGATTATGACGACTATTCCGAAAGACCCCAACAACTGCACGAATAACTACAGCTCCCATTTCAAATAGCCAGCAAG
T A W P I D Y D D Y S E D P T T A R I T T A P I S N K P A R
190     200     210     220     230     240     250     260     270
GAAACCGAGCAAAAAGGACAAGGACGCTGTGGTGTACTCTATTGAACAGTTTCTTGACACGACAGAGGAAAATATGGGTGTACAACAGCAC
K P S K K D K D A V V Y S I E Q F L D T T E E I W V Y N S T
280     290     300     310     320     330     340     350     360
TGAAGAAAACCAATGTTACGTGTGCTGTGGACGTCATCGAAGGTGTAGACACGCTGTATGCCATTGTAACGATATCTTTGTCTAACGG
E E T N V T C R V D V I E G V D T L Y A I V K R Y S L S N G
370     380     390     400     410     420     430     440     450
TACAATCTCTACCATCGATGGCGATGCTGTCTCTCTCCATCCAAACCTTGCAACTGTACAGGATCCACCCACGAGATGAAGATAGA
T I S T I D G D A V L S S H P N L A T V Q D P P N E M K I E
460     470     480     490     500     510     520     530     540
AAGTCAAAGCAACAGCAATCCTTATGAAACTCTGATATATATGAATGAAAACCCACGATTGTGGAGTGTTTTACGTAAAATTACCATTCCGA
S Q S N S N P Y E T L I Y M N E N H D C G V F Y V N Y H S E
550     560     570     580     590     600     610     620     630
GACACATTTACTTTTGGGCACGTGGTTTGAATTGAGAATAAGAAAATTCCTTTTAGCCCAAGGACCTGACCCCGGTGTGCTCATATTACTT
T H L L L G T W F E L R I R N S S L A Q G P D P V C S Y Y F
640     650     660     670     680     690     700     710     720
CGAACAGTATTCCAGCAAGCAAAGTGTGACGTATTGTCACACCCCCATGCCTGTGCATGCCTCCAGTACATGCCTTAGTAAAAATCAATA
E Q Y S S K Q S V T Y S Y T P P C L C M L Q Y M P *
730     740     750     760     770     780     790     800     810
TTCAATACCTAGAAGAATCTACAGCAAAAATGGCGTTCGCAGAAGTAGCGTTAATAAAATACATTAGTGGAGAATGTTTCACGAAAAAAAAA
820     830
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

箭头所示为信号肽切割位点；\* . 终止子；AATAAA. 加尾信号

The arrow indicates the putative cleavage point for the release of the signal peptide;

\* . Stop codon ; AATAAA. Polyadenylation signal sequence

图 4 P27 的全长基因序列和推测的氨基酸序列

Fig. 4 Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of P27

表 1 P27 与其他物种基因的氨基酸序列同源性比较

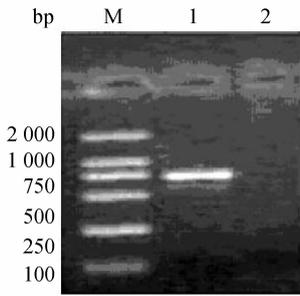
Table 1 Comparison of the amino acid homology among the deduced amino acid sequences of P27 from *Hyalomma asiaticum* tick and homologous genes from other species

物种 Species	同源基因 Homologous genes	基因登录号 Accession number	氨基酸同源性/% Amino acid homology
疥包涵体 <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Hypothetical protein	AAA584667.1	38
红螺菌 <i>Rhodospirillum rubrum</i>	dGTP triphosphohydrolase	AAC268758.1	38
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Oxidoreductase	AAB147750.1	27
爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	PCNA-like DNA checkpoint protein Rad9	AAP13339.1	26
小塔螺 <i>Pirellula</i>	Probable aggregation factor core protein MAFp3, isoform C	AAF870154.1	26

液腺吸血后差异表达的基因(见图 5)。以半饱血雌蜱蜱壳和中肠 cDNA 为模板,均能扩增出目的条带,但从中肠中扩增的条带稍亮(见图 6)。

### 3 讨论

差异表达基因常为重要的疫苗作用靶,是蜱功

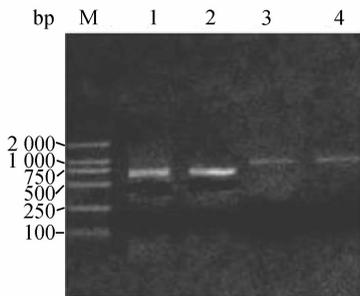


M. DNA 标准分子量; 1. 半饱血雌蜱唾液腺;  
2. 未吸血雌蜱唾液腺

M. DNA marker; 1. Salivary gland from partially engorged male ticks; 2. Salivary gland from unfed male ticks

图 5 *P27* 基因在半饱和和未吸血雌蜱唾液腺内的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *P27* gene in the salivary gland from fed and unfed *Hyalomma asiaticum* female tick



M. DNA 标准分子量; 1. 蜱壳 *P27* 基因; 2. 中肠 *P27* 基因; 3. 蜱壳 *actin* 基因; 4. 中肠 *actin* 基因  
M. DNA marker; 1. *P27* gene in the shell of partially engorged ticks; 2. *P27* gene in the gut of partially engorged ticks; 3. *Actin* gene in shell of partially engorged ticks; 4. *Actin* gene in the gut of partially engorged ticks

图 6 *P27* 基因在半饱血亚洲璃眼蜱雌蜱组织分布的 RT-PCR 分析

Fig. 6 Expression of *P27* in the tissues of partially engorged female *Hyalomma asiaticum* ticks

能基因研究的重要对象<sup>[3]</sup>, 运用抑制消减杂交技术建立 cDNA 文库, 分离同一遗传背景下的差异表达基因, 是行之有效的方法<sup>[4]</sup>。大量研究表明, 唾液腺与蜱的生理活动密切相关, 并且在蜱吸血前后呈现基因差异表达, 因此是蜱功能基因的主要来源。

本试验从亚洲璃眼蜱吸血前后唾液腺消减文库中分离到 *P27* 基因, 分析其结构表明, 该基因 N 端含一信号肽, 其基序包含豆蔻酰化等多个活性位点, 尤

其是磷酸化位点特别丰富, 这提示该基因编码蛋白对信号的传递非常敏感; 所含跨膜区提示其编码蛋白可能作为膜受体起作用, 也可能是定位于膜的锚定蛋白或离子通道蛋白; BLAST 分析表明, 此基因的预测氨基酸与红螺菌的 dGTP 三磷酸水解酶、小塔螺的膜孔蛋白激活因子等小肽有低度同源性, 这进一步提示该基因可能与基因的表达调控有关<sup>[5-7]</sup>。

RT-PCR 证实该基因在蜱的唾液腺中差异表达。将该基因先后连入 pGEM-4T-1、pET28a 和 pET32a 3 种载体系统中进行表达, 并探索了信号肽的取舍对表达的影响<sup>[8]</sup>, 但均未成功。这可能暗示了该基因在基因表达时的特殊作用, 也可能是所选表达系统不适宜, 有关其在蜱吸血中的生物学功能正在进一步研究中。

在蜱长时间的吸血过程中, 蜱的唾液腺能够发生许多利于吸血和病原传播的生理变化<sup>[9]</sup>, 这些变化的具体过程正在不断地被认知。研究吸血前后差异表达基因, 可为防治蜱及蜱传病原提供重要信息, 这些分子的分离, 除了可从分子水平了解蜱的生理活动外, 也是开发生物制剂的重要渠道<sup>[10]</sup>。

## 参考文献:

- [1] 邓国藩, 姜在阶. 硬蜱科 [M] // 中国经济昆虫志. 北京: 科学出版社, 1991: 333-336.
- [2] 周勇志, 周金林, 曹杰, 等. 四种硬蜱的实验室人工饲养和部分生物学特性的观察 [J]. 中国兽医寄生虫病, 2003, 11(2): 23-24.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2003: 87-93, 1 228-1 265.
- [4] 张兴会, 李平, 张宇清, 等. Lys<sub>10</sub>-PAI-1 融合蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化和凝胶组织实验 [J]. 中国生物化学与分子生物学, 2003, 19(4): 457-462.
- [5] SONENSHINE D E. Biology of ticks [M]. Oxford: Oxford university press, 1993.
- [6] MULENGA A. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens [J]. Microbes Infect, 2000, 2 (11): 1 353-1 361.
- [7] DIEFFENBACH H W, DVEKLER S. PCR primer: A Laboratory Manual (PCR 技术实验指南) [M]. 北京: Science Press, 2002: 276-277.
- [8] 张成岗, 贺福初. 生物信息学方法与实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 120-140.
- [9] 张维谊, 周金林, 周勇志, 等. 镰形扇头蜱 cDNA 文库的构建 [J]. 中国兽医学报, 2004, 24(5): 445-447.
- [10] 陈灵芝, 周金林, 周勇志, 等. 镰形扇头蜱两个组织蛋白酶 L 一样半胱氨酸蛋白酶新基因的克隆和序列分析 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(2): 203-208.