

白纹伊蚊 AGO2 和 Dcr-2 基因片段克隆及各发育期转录水平分析

蔡燕丽, 郑学礼*

【摘要】 目的 克隆白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)RNA 干扰通路相关 AGO2 和 Dcr-2 基因片段, 并分析该蚊种不同发育阶段这 2 个基因片段的转录水平。方法 根据埃及伊蚊 (*Ae. aegypti*) AGO2 和 Dcr-2 蛋白的氨基酸序列保守区设计简并引物, 经 RT-PCR 从白纹伊蚊雌蚊总 RNA 中分别扩增 AGO2 和 Dcr-2 cDNA, 并与载体 pMD18-T 连接, 转染大肠埃希菌(*E. coli*)后, 筛选阳性克隆, 测序并做 Blastx 分析。根据获得的白纹伊蚊 AGO2 和 Dcr-2 基因片段设计特异性引物, 采用半定量 RT-PCR 分析白纹伊蚊卵、I/II 龄幼虫、III/IV 龄幼虫、蛹、雄蚊和雌蚊中这 2 个基因的 mRNA 水平。结果 获得的 AGO2 和 Dcr-2 cDNA 片段大小分别为 326 bp 和 491 bp, 登录号分别为 JQ764670 和 JQ764671。Blastx 分析结果显示, 该 2 个序列编码的氨基酸序列与埃及伊蚊的 AGO2 和白纹伊蚊的 Dcr-2 氨基酸序列的同源性分别为 91% 和 98%。AGO2 和 Dcr-2 基因在白纹伊蚊不同发育阶段中均有转录, 于雌蚊中的 mRNA 水平最高, 分别为雄蚊中 mRNA 的 3.1 倍和 15.5 倍, 显著高于其他各阶段的 mRNA 水平 ($P < 0.05$)。结论 获得了白纹伊蚊 AGO2 和 Dcr-2 基因部分 cDNA 片段, 并发现这 2 个基因在雌蚊中转录水平最高。

【关键词】 白纹伊蚊; RNA 干扰; AGO2; Dcr-2

中图分类号: R384.113 文献标识码: A

Cloning of AGO2 and Dcr-2 Gene Fragments and Analysis of Their Transcription Level in Different Developmental Stages of *Aedes albopictus*

CAI Yan-li, ZHENG Xue-li*

(Department of Etiobiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 **Objective** To perform molecular cloning of the AGO2 and Dcr-2 gene fragments associated with RNA interference pathway of *Aedes albopictus* and characterize the transcription level of the two genes across all life stages of the mosquito. **Methods** The degenerate primers were designed based on the conserved regions of AGO2 and Dcr-2 amino acid sequences, and the AGO2 and Dcr-2 cDNA fragments were amplified from total RNA of a female mosquito by RT-PCR. The PCR products were cloned into pMD18-T vector and transformed into *E. coli* DH5 α strain, and the positive clones were selected and sequenced, with the results for homology analysis by Blastx. The specific primers were designed according to the sequences of AGO2 and Dcr-2 from *Ae. albopictus*, which were used to investigate the transcription levels of these two genes from eggs, I and II instars larvae, III and IV instars larvae, pupa, male and female mosquitoes by semi-quantitative RT-PCR. **Results** The AGO2 and Dcr-2 cDNA fragments obtained were 326 bp and 491 bp in length, with the Accession number of JQ764670 and JQ764671, respectively. The Blastx analysis showed that the AGO2 and Dcr-2 amino acid sequences shared 91% similarity to AGO2 of *Ae. aegypti* and 98% to Dcr-2 of *Ae. albopictus*. The transcription of AGO2 and Dcr-2 genes was detected in all life stages of *Ae. albopictus*, with the highest level of mRNA in female mosquitoes, which was 3.1 times and 15.5 times higher for AGO2 and Dcr-2 than in male mosquitoes, respectively, and significantly higher than other developmental stages ($P < 0.05$). **Conclusion** The AGO2 and Dcr-2 cDNA sequences have been partially obtained and the highest transcription level found in female *Ae. albopictus*, suggesting that AGO2 and Dcr-2 are the key genes of RNA interference in female mosquitoes.

【Key words】 *Aedes albopictus*; RNA interference; AGO2; Dcr-2

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30872198, No. 30972566)

作者单位: 南方医科大学公共卫生与热带医学学院病原生物学教研室, 广州 510515

* 通讯作者, E-mail: zhengxueli2001@hotmail.com

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30872198 and No. 30972566)

* Corresponding author, E-mail: zhengxueli2001@hotmail.com

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 指由双链 RNA 诱发的基因沉默现象, 即细胞中导入或产生与内源 mRNA 编码区同源的双链 RNA 时 mRNA 发生降解而导致基因表达沉默^[1], 在生物抗病毒感染、生物发育时序的控制、细胞生长和凋亡等过程中发挥着重要的作用^[2]。RNA 干扰产生 3 种类型的小 RNA 分子: 小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNA)、微小 RNA (microRNAs, miRNA) 和 PIWI 相关的干扰 RNA (PIWI-associated interfering RNAs, piRNA)^[3], 由 siRNA 介导的 RNA 干扰通路依赖于包括 AGO2 和 Dcr-2 等多种蛋白及蛋白复合体关键成分^[4]。目前编码 AGO2 和 Dcr-2 该 2 种剪切蛋白的 AGO2 和 Dcr-2 基因序列已在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 和致倦库蚊 (*Culex pipiens quinquefasciatus*) 中进行比较分析, 对不同物种的序列特征及其在抗病毒感染的 RNA 干扰通路的作用进行了初步的研究^[4-6]。白纹伊蚊 (*Ae. albopictus*) 是中国大部分地区登革病毒的重要传播媒介^[7], 其抗登革病毒的 RNAi 机制及关键因子作用的报道较少, 深入研究白纹伊蚊抗病毒 RNAi 通道的关键因子不仅有利于从分子水平认识虫媒病毒和蚊媒的相互关系, 而且对利用 RNA 干扰沉默机制防制蚊媒传染病具有积极的意义。本研究利用简并引物扩增出白纹伊蚊的 AGO2 和 Dcr-2 基因部分序列, 并分析其在白纹伊蚊不同发育时期的转录水平, 为获得白纹伊蚊 AGO2 和 Dcr-2 基因全序列及深入研究白纹伊蚊内源 RNAi 通道抗病毒机制奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 白纹伊蚊的来源 白纹伊蚊广州株, 由广东省疾病预防控制中心惠赠。在温度 (27±1) °C, 相对湿度 70%, 光照 14 h/d 的养蚊室常规饲养。

1.2 试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司产品, KOD-FX 酶购自东洋纺生物公司, RT-PCR 试剂盒、Oligo d(T)₁₈ 引物、pMD18-T 载体试剂盒、Taq DNA 聚合酶和 DNA 标志物均购自宝生物工程(大连)有限公司, 质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司, 大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5α 为本室保存。其余试剂为国产分析纯。

2 方法

2.1 简并引物扩增 AGO2 和 Dcr-2 基因片段 参照

Rose 等^[8]的方法, 采用 CODEHOP 软件 (<http://blocks.fhcr.org/blocks/codehop.html>) 设计简并引物。根据 AGO2 氨基酸序列保守区和埃及伊蚊 AGO2 的 mRNA 序列 (GenBank 登录号为 FJ979880.1) 设计的上、下游简并引物序列, 分别为 AGO2-F: 5'-GCTGAAGATCA-ACGCCAARACNAAYGG-3' (简并碱基 R=A 或 G, N=A、G、C 或 T, Y=C 或 T) 和 AGO2-R: 5'-CGGACACG-CCGTCGCKRTARTACAT-3' (简并碱基 K=G 或 T)。根据 Dcr-2 氨基酸序列保守区和埃及伊蚊 Dcr-2 的 mRNA 序列 (GenBank 登录号为 AY713296.1) 设计的上、下游简并引物, 分别为 DCR2-F: 5'-GCATTGACG-ACGAAATCATYGTNCGMTG-3' (简并碱基 M=A 或 C) 和 DCR2-R: 5'-ACCATGGCATCCGCCGGNGTYT-TRTCC-3'。引物均由上海生物工程有限公司合成。取羽化后 3~5 d 的白纹伊蚊雌蚊 10 只, 总 RNA 提取和逆转录参见 Trizol 试剂盒说明书, 紫外分光光度法检测 RNA 浓度和纯度。用高保真 KOD-FX 酶, 以 cDNA 为模板分别扩增 2 个目的基因。采用 50 μl 反应体系: ddH₂O 9 μl, 2×PCR 缓冲液 25 μl, 脱氧核苷三磷酸 (dNTPs, 2 mmol/L) 10 μl, 上、下游引物 (10 pmol/μl) 各 1.5 μl, KOD-FX 酶 (1.0 U/μl) 1 μl, 模板 (0.02 μg/μl) 2 μl。扩增 AGO2 基因片段的反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 50 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 7 min。扩增 Dcr-2 基因片段的反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的片段进行纯化。纯化产物经末端加 A 尾反应, 按照试剂盒说明书与载体 pMD18-T 连接, 并转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。菌落 PCR 法初步筛选阳性克隆, 送阳性克隆质粒测序。测序结果去掉载体序列, 登录 NCBI, 并通过 Blastx 检索 GenBank 进行同源性分析。

2.2 AGO2 和 Dcr-2 基因在蚊内各期转录水平分析 取若干白纹伊蚊的卵、I/II 龄幼虫、III/IV 龄幼虫、蛹、雄蚊和雌蚊提取总 RNA, 除去 DNA 污染后紫外分光光度法测定 RNA 的纯度和含量, 各期样品 RNA 浓度调整一致后逆转录成 cDNA。根据获得的 AGO2 和 Dcr-2 基因序列设计特异性引物。AGO2 引物序列为, 上游: 5'-ACAGACCAACATTCCCAGTG-3', 下游: 5'-CAGTTGCTGATTCGTTTTGCCTA-3', 扩增片段长 169 bp; Dcr-2 引物序列为, 上游: 5'-GCAACTTC-GCTGTATTTGATT-3', 下游: 5'-TGGTCTGCTGT-GAAAGATAGT-3', 扩增片段长 382 bp; 以白纹伊蚊 actin 基因 (GenBank 登录号为 DQ657949.1) 为内参

设计引物, 上游: 5'-CGATGAAGCCCAGAGCAAACG-3', 下游: 5'-GGTGGTGGTGAACGAGTAGCC-3', 扩增片段长 445bp。采用 25 μ l 反应体系: ddH₂O 17.25 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l, dNTPs (10 mmol/L) 2 μ l, 上、下游引物(10 pmol/ μ l)各 0.5 μ l, *Taq* 酶(5 U/ μ l)0.25 μ l, 模板 (0.02 μ g/ μ l) 2 μ l。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 50s, 退火 (AGO2: 58 $^{\circ}$ C、Dcr-2: 54 $^{\circ}$ C、内参: 60 $^{\circ}$ C) 50s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7min。扩增完后取 10 μ l PCR 产物做琼脂糖凝胶电泳分析, 拍照后用 ImageJ 软件分析目的基因及内参条带的灰度值。

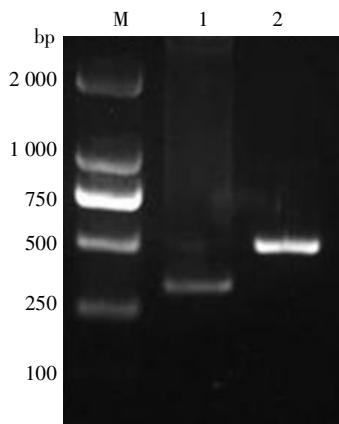
3 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件进行数据分析处理, 不同时期的条带灰度值比较采用 *t* 检验, 以 $P \leq 0.05$ 为检验水准。

结 果

1 白纹伊蚊 AGO2 和 Dcr-2 基因片段的扩增

简并引物扩增白纹伊蚊 AGO2 和 Dcr-2 基因片段, 结果显示, 条带位置分别与预期的 350 bp 和 500 bp 相近, 扩增效果好, 无杂带 (图 1)。



M: DNA 标志物; 1: AGO2 产物片段; 2: Dcr-2 产物片段。
M: DNA marker; 1: PCR product of AGO2; 2: PCR product of Dcr-2.

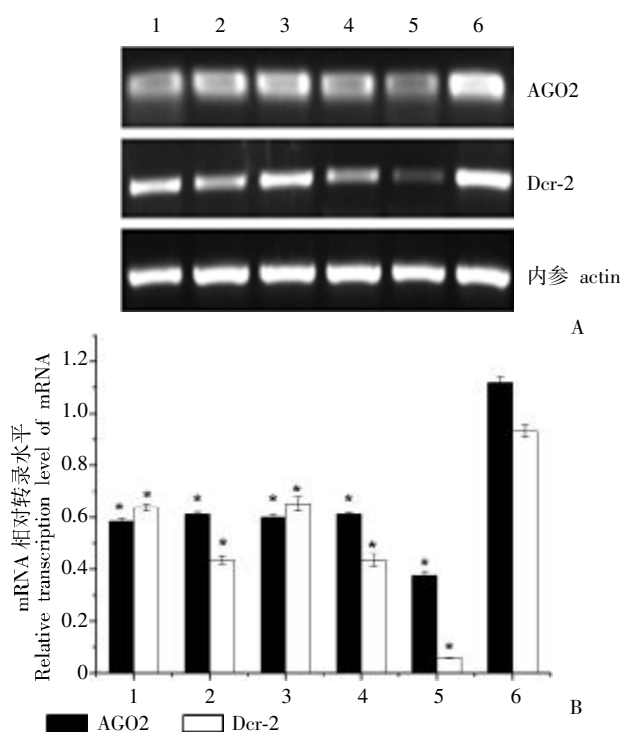
图 1 白纹伊蚊 AGO2 和 Dcr-2 基因片段
Fig.1 AGO2 and Dcr-2 gene fragments of *Ae. albopictus*

2 AGO2 和 Dcr-2 基因片段序列分析

阳性克隆测序后共获得 2 个片段序列。其中 AGO2 片段的实际大小为 326 bp, 编码 108 个氨基酸; Dcr-2 片段的实际大小为 491 bp, 编码 163 个氨基酸。通过 Blastx 检索 GenBank 进行同源性比对, 推测的 AGO2 编码的氨基酸序列与埃及伊蚊 AGO2 的氨基酸序列 (GenBank 登录号为 ACR56327.1) 同源性达到 91%; 推测的 Dcr-2 编码的氨基酸序列与白纹伊蚊 Dcr-2 的氨基酸序列 (GenBank 登录号为 AEX31249.1) 同源性达到 98%。AGO2 和 Dcr-2 序列提交到 GenBank, 登录号分别为 JQ764670 和 JQ764671。

3 白纹伊蚊 AGO2 和 Dcr-2 基因在蚊内各期转录水平变化

利用半定量 RT-PCR 分析 AGO2 和 Dcr-2 基因在白纹伊蚊卵、I/II 龄幼虫、III/IV 龄幼虫、蛹、雄蚊和雌蚊各个时期的转录水平 (图 2A), 结果发现白纹伊蚊 AGO2 和 Dcr-2 基因在卵、I/II 龄幼虫、III/IV 龄幼虫、蛹、雄蚊和雌蚊中均有转录, 其中雌蚊的相对转录水平最高。在雌蚊体内 2 个基因的相对转录水平均显著高于其他各期和雄蚊 (均 $P < 0.05$) (图 2B)。其中 AGO2 在雌蚊的相对转录水平为 1.12, 是雄蚊 (0.36) 的 3.1 倍, Dcr-2 在雌蚊的相对转录水平为 0.93, 是雄蚊 (0.06) 的 15.5 倍。



注: 与雌蚊组比较, * $P < 0.05$ 。
Note: Compared with female mosquito, * $P < 0.05$ 。
A: 半定量 RT-PCR 电泳图; B: AGO2 和 Dcr-2 的相对转录水平。1: 卵; 2: I/II 龄期幼虫; 3: III/IV 龄期幼虫; 4: 蛹; 5: 雄蚊; 6: 雌蚊。
A: Semi-quantitative RT-PCR electrophoresis; B: Relative transcription level of AGO2 and Dcr-2. 1: Egg; 2: I and II instars larvae; 3: III and IV instars larvae; 4: Pupa; 5: Male mosquito; 6: Female mosquito。
图 2 白纹伊蚊各个发育阶段 AGO2 和 Dcr-2 基因的 mRNA 相对转录水平
Fig.2 Relative transcription level of AGO2 and Dcr-2 in different developmental stages of *Ae. albopictus*

讨 论

RNA 干扰的生物内源抗病毒效应已经在许多真核生物中得到证实^[9], 并且成为研究病毒与宿主关系的有力工具之一^[10]。siRNA 介导的 RNA 干扰通过降解外源病毒双链 RNA (double-stranded viral RNAs) 产生抗 RNA 病毒效应, 即 Dcr-2/R2D2 复合物剪切双链 RNA 分子为 siRNA, 并与 AGO2 蛋白形成 RNA 诱导

沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), RISC 在单链 siRNA 引导下序列特异性结合并切断靶标 mRNA 序列, 引发靶序列的特异性降解^[2]。在 AGO2 和 Dcr-2 为关键蛋白的抗病毒 RNA 干扰通路中, AGO2 和 Dcr-2 影响了蚊媒对病毒的易感性及传播病毒给人类的能力^[4]。因此, 对白纹伊蚊 RNA 干扰途径中的关键组分的研究将有助于分析白纹伊蚊与病毒相互作用的关系, 为控制蚊媒传染病提供新的思路和方向。

目前对 AGO2 和 Dcr-2 的研究集中在 RNA 干扰对病毒及其宿主关系影响上, 采用基因敲除或者突变 RNA 干扰途径中关键基因的策略观察 siRNA 干扰对媒介抗病毒感染效应的作用。Keene 等^[11]发现将冈比亚按蚊的 AGO2 基因敲除后会提高对奥-奈氏病毒(O'nyong-Nyong virus)的易感能力。Wang 等^[12]用野生株和 Dcr-2 缺陷株果蝇分别感染 FHV 病毒(Flock House Virus, FHV), 发现野生株果蝇感染 15 d 后仍有 50% 的成活率, 而 Dcr-2 缺陷株果蝇感染 7 d 后成活率已降为 40%, 15 d 后成活率仅为 5%, 提示 Dcr-2 缺陷株果蝇对 FHV 的易感性更高。Campbell 等^[13]在埃及伊蚊体内注射 AGO2、Dcr-2 和 TSN mRNAs 同源的 dsRNA 后, 可短暂提高感染辛德毕斯病毒(Sindbis virus, SINV)后的滴度水平及感染率。Vargas 等^[14]通过 RNAi 沉默 AGO2、Dcr-2 和 R2D2 基因的表达后, 能增加登革 2 型病毒(Dengue virus type 2, DENV2)在埃及伊蚊体内的复制及缩短病毒传播的外潜伏期。值得一提的是对 AGO2 和 Dcr-2 突变或敲除后宿主对病毒的易感效应不完全一致, 宿主可启动其他 RNA 干扰途径参与抗病毒免疫反应。Zambon 等^[6]发现 Dcr-2 并非果蝇抗病毒 RNA 干扰反应的必需因子, 相对而言, AGO2 作为 RNA 诱导沉默复合体的关键成分被敲除后能显著提高宿主对病毒的易感性, 而 Dcr-2 突变后对果蝇 X 病毒(Drosophila X virus, DXV)的易感性并未出现明显变化。此外, 加上 RNA 沉默病毒抑制子(viral suppressors of RNAi, VSRs)、RNA 干扰密切相关的基因和其他 RNA 干扰途径的相互作用, 共同构成复杂的媒介宿主抗病毒免疫反应体系^[6,15]。

本研究利用简并引物对白纹伊蚊 AGO2 和 Dcr-2 基因的部分片段进行了克隆并对其在不同发育时期的转录水平进行分析。从白纹伊蚊雌蚊中扩增得到了 AGO2 和 Dcr-2 基因的部分片段, 其编码的蛋白分别与埃及伊蚊的 AGO2 蛋白和白纹伊蚊的 Dcr-2 蛋白具有较高的同源性。半定量 RT-PCR 分析结果表明, 白纹伊蚊的卵、I/II 龄幼虫、III/IV 龄幼虫、蛹、雄蚊和雌蚊阶段均出现 AGO2 和 Dcr-2 的转录, 推测

siRNA 介导的 RNA 干扰在白纹伊蚊的生长发育过程中具有调控作用。此外, 这两个基因在雌蚊体内的相对转录水平较雄蚊高, 说明作为病毒传播媒介的雌蚊, 其 siRNA 干扰途径的关键组分 AGO2 和 Dcr-2 在蚊媒感染病毒的过程中发挥着重要的作用。本研究为进一步揭示 RNA 干扰对病毒感染白纹伊蚊的分子免疫机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] Sanchez-Vargas I, Travanty EA, Keene KM, *et al.* RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquito[J]. *Virus Res*, 2004, 102(1): 65-74.
- [3] Hammond SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(26): 5822-5829.
- [4] Campbell CL, Black WT, Hess AM, *et al.* Comparative genomics of small RNA regulatory pathway components in vector mosquitoes [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 425.
- [5] Aliyari R, Wu Q, Li HW, *et al.* Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by virus-derived small RNAs in *Drosophila*[J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 4(4): 387-397.
- [6] Zambon RA, Vakharia VN, Wu LP. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster* [J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(5): 880-889.
- [7] Qiu FX, Gubler DJ, Liu JC, *et al.* Dengue in China: a clinical review[J]. *Bull World Health Organ*, 1993, 71(3-4): 349-359.
- [8] Rose T, Henikoff J, Henikoff S. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3763-3766.
- [9] Stram Y, Kuzntzova L. Inhibition of viruses by RNA interference [J]. *Virus Genes*, 2006, 32(3): 299-306.
- [10] Travanty EA, Adelman ZN, Franz AWE, *et al.* Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34(7): 607-613.
- [11] Keene KM, Foy BD, Sanchez-Vargas I, *et al.* RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(49): 17240-17245.
- [12] Wang XH, Aliyari R, Li WX, *et al.* RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*[J]. *Science*, 2006, 312(5772): 452-454.
- [13] Campbell CL, Keene KM, Brackney DE, *et al.* *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection [J]. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 47.
- [14] Sanchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, *et al.* Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(2): e1000299.
- [15] Lingel A, Simon B, Izaurralde E, *et al.* The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition [J]. *EMBO Rep*, 2005, 6(12): 1149-1155.

(收稿日期: 2011-12-14 编辑: 瞿麟平)