

文章编号: 1000-7423(2014)-04-0274-06

【论著】

森林革蜱半饱血雄蜱抑制消减杂交 cDNA 文库的构建及差异基因的分析

刘琪¹, 王伟琳², 孟庆峰², 徐展¹, 崔洁¹, 刘新欣¹, 王伟利^{2*}

【摘要】 目的 构建森林革蜱 (*Dermacentor silvarum*) 半饱血雄蜱抑制消减杂交 cDNA 文库, 分析差异基因。方法 以森林革蜱半饱血雄蜱为实验组 (tester), 未吸血雄蜱为对照组 (driver), 分别提取总 RNA, SMARTER PCR 合成双链 cDNA, *Rsa* I 酶切后连接接头并进行抑制消减杂交。巢式 PCR 扩增杂交产物, 经柱纯化后连接至 PMD-18T 中, 转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 进行蓝白斑筛选, 并计算文库滴度和重组率。随机挑选阳性克隆, 反向 Northern 杂交 (Northern blotting) 和 RT-PCR 法检测抑制消减杂交 cDNA 文库的消减效率。随机选取差异基因阳性克隆送测序, 利用 Blastn 和 Blastx 对测序结果进行核酸种类同源性和蛋白种类同源性的比对和功能预测。结果 电泳结果显示, 森林革蜱半饱血雄蜱和未吸血雄蜱的 ds cDNA 均呈弥散拖影, 大小在 500 bp 以上, 经 *Rsa* I 酶切后, 大小在 100~1000 bp; 接头连接效率大于 25%。巢式 PCR 结果显示, 消减的 ds cDNA 呈聚集条带, 大小在 250~500 bp。构建的森林革蜱半饱血雄蜱抑制消减杂交 cDNA 文库的滴度为 700 000 pfu/ml, 重组率为 88.5% (239/270)。反向 Northern blotting 检测结果显示, 当以森林革蜱半饱血雄蜱单链 cDNA 为探针时, 消减文库信号较强; 以未吸血雄蜱单链 cDNA 为探针时, 消减文库信号较弱。RT-PCR 结果显示, 随机选取的 8 个阳性克隆中, 有 5 个在半饱血状态下表达上扬, 抑制消减杂交 cDNA 文库消减效果较好。115 个阳性克隆测序得到 87 个差异表达序列标签 (ESTs), 大小为 200~800 bp。Blastn 分析结果显示, 87 个序列中, 与其他蜱基因有同源性的 53 个, 同源率为 70%~98%, 与库蚊、甲虫和果蝇等其他昆虫基因有同源性的 34 个, 同源率为 32%~65%。Blastx 预测结果显示, 序列中片段表达的蛋白包括参与吸血和血液消化的不同酶类, 主要功能为能量代谢、信号传导和转录调节等。结论 建立了森林革蜱半饱血雄蜱抑制消减杂交 cDNA 文库, 差异基因的功能预测与蜱的吸血和血液消化等有关。

【关键词】 森林革蜱; 抑制消减杂交; cDNA 文库; 差异基因

中图分类号: 383.4 文献标识码: A

Construction of Suppression Subtractive Hybridization cDNA Library of Half-blood Males of *Dermacentor silvarum* and Analysis of Differentially Expressed Genes

LIU Qi¹, WANG Wei-lin², MENG Qing-feng², XU Zhan¹, CUI Jie¹, LIU Xin-xin¹, WANG Wei-li^{2*}

(1 College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2 Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China)

【Abstract】 Objective To construct a suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA library of half-blood males of *Dermacentor silvarum*, and analyze the differentially expressed genes. **Methods** Total RNA was extracted from the half-blood males and unfed males of *D. silvarum*. cDNA was synthesized following the protocol of SMARTER cDNA synthesis kit. After *Rsa* I digestion, cDNA was ligated to adaptors. The cDNA from the half-blood males was used as the tester, and unfed males as the driver. The SSH library was constructed using TaKaRa PCR-select cDNA subtraction kit. Differentially expressed cDNAs were amplified by nested PCR, cloned into PMD-18T vector, transformed into *E. coli* DH5 α , and the white-blue plaque selection was used to get the positive clones. The titer of SSH library and the recombination efficiency were calculated. Individual colonies were randomly selected from library. Subtractive efficiency of the subtracted cDNA library was examined by reverse Northern blotting and RT-PCR. Positive clones with differentially expressed genes were sequenced. Homology comparison and function prediction were performed by Blastn and Blastx. **Results** The bands of double-stranded cDNAs from half-blood males and unfed males of *D. silvarum* were dispersed and

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局项目 (No. 2012IK010); 吉林省科技发展计划 (No. 201205052)

作者单位: 1 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 2 吉林出入境检验检疫局, 长春 130062

* 通讯作者, E-mail: wang-weili@163.com

longer than 500 bp. After *Rsa* I digestion, the ds cDNA-fragments were 100–1 000 bp. The ligation reaction efficiency of adaptor was more than 25%. Nested PCR showed that the bands of subtracted ds cDNA were gathered, ranging from 250 to 500 bp. The titer of SSH library was 700 000 pfu/ml, and the recombination efficiency was 88.5% (239/270). Reverse Northern hybridization revealed that the clones showed stronger signals in half-blood males cDNA probes than in unfed males cDNA probes. RT-PCR showed that among the eight random selected positive clones, 5 clones were up-expressed under half-blood condition. A total of 87 differentially expressed sequence tags (ESTs, 200–800 bp) were obtained from 115 positive clones. Among the 87 ESTs, 53 ESTs showed sequence similarities to genes from other tick species, and 34 were homologous with genes from other insects. The main biological function of obtained ESTs were related to blood sucking and digestion, such as energy metabolism, signal transduction, and transcription regulation.

Conclusion The SSH cDNA library of half-blood male *Dermacentor silvarum* is constructed. The differential expressed genes are related to blood sucking and digestion.

【Key words】 *Dermacentor silvarum*; Suppression subtractive hybridization; cDNA library; Differentially expressed gene

Supported by a project of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (No. 2012JK010) and Jilin Provincial Science and Technology Development Plan (No. 201205052)

* Corresponding author, E-mail: wang-weili@163.com

森林革蜱 (*Dermacentor silvarum*) 主要分布于中国北部、俄罗斯和蒙古等地区^[1,2], 是一种专性吸血节肢动物, 同时也是蜱传疾病的传播媒介, 可传播多种病原体, 如森林脑炎病毒 (*Encephalophilus silvestris*)、贝氏立克次体 (*Rickettsia burnetii*)、西伯利亚立克次体 (*Rickettsia sibirica*)、鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*) 和布鲁杆菌 (*Brucella*) 等。对蜱的防制经历了化学、生物学、遗传学和免疫学等 4 个阶段, 前三者在应用中取得了一定的成功, 但由于化学防制存在药物残留和环境污染, 生物学和遗传学防制手段存在不可控性等问题, 因此, 免疫学防制方法成为目前热门的研究方向。由于半饱血时期, 随血液的逐渐吸入, 蜱的体重会增加几倍或几十倍甚至几百倍, 体内各个器官必须随之发生改变, 呈现出在吸血前后基因的差异表达, 这些分子在抑制宿主免疫反应、抗凝血、延长吸血时间和血液吸收方面起着重要的作用^[3]。因此, 筛选并研究森林革蜱差异表达基因及其相应的活性分子是日后研制抗蜱疫苗最有效的途径之一。

抑制消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH) 是 1996 年由加州大学旧金山分校、俄国科学院和 CLONTECH 公司合作研发的一种用以筛选差异基因的技术^[4], 该技术以 PCR 为基础, 放大差异表达 cDNA (互补 DNA), 抑制共有的 cDNA 扩增, 同时根据杂交二级动力学原理, 高丰度的单链 cDNA 退火时同源杂交速度较低丰度的 cDNA 快, 分离出丰度趋于一致的差异基因, 目前该技术已广泛应用^[5,6]。本课题组于 2013 年 4 月 (成蜱活跃期为 3~5 月) 采集吉林省长白地区森林革蜱, 实验室吸血 5 d 后进行抑制消减杂交, 获得森林革蜱半饱血雄蜱抑制消减杂

交 cDNA 文库, 并对差异基因进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 森林革蜱的采集 2013 年 4 月采集自吉林省长白地区林地附近, 实验室叮咬家兔 5 d 后获得半饱血状态的森林革蜱^[7]。

1.1.2 主要试剂 cDNA 消减试剂盒、SMARTER PCR cDNA 合成试剂盒、Advantage[®] 2 PCR 试剂盒、CHROMA SPIN-100 柱、DNA *Taq* 聚合酶、DNA 标志物 DL2000、PMD[®]-18T 载体、大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞均购自日本 TaKaRa 公司, Trozol 裂解液和焦碳酸二乙脂 (DEPC) 均购自美国 Invitrogen 公司, 地高辛标记和检测试剂盒 (DIG DNA Labeling and Detection Kit) 和尼龙膜购自德国 RoChe 公司。

1.2 方法

1.2.1 蜱总 RNA 的提取 分别选取 10 只未吸血森林革蜱雄蜱和 10 只半饱血森林革蜱雄蜱, 用焦碳酸二乙脂 (DEPC) 清洗 2 次, 清除蜱体表所有残渣后放入研钵加液氮研磨, 根据 Trozol 法提取蜱总 RNA。分光光度计测定吸光度 (A_{260} 值/ A_{280} 值), 1.8~2.0 为合格; 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 28S rRNA 条带目测亮度高于 18S rRNA 一倍以上为合格。

1.2.2 cDNA 合成 参照 cDNA 合成试剂盒说明分别合成半饱血和未吸血森林革蜱 cDNA 第一条链, 以第一条链产物为模板合成双链 cDNA (ds cDNA), PCR 反应体系: cDNA 第一条链 10 μ l, 10 \times Advantage 2 PCR 缓冲液 10 μ l, 50 \times 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 2 μ l, 5' PCR 引物 II A 2 μ l, 50 \times Advantage 2 聚合酶 2 μ l, 去离子水 74 μ l。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 1 min;

95 °C 15 s, 65 °C 30 s, 68 °C 3 min, 共 27 个循环。用 CHROMA SPIN-100 柱纯化 PCR 产物, 取 5 μ l 纯化产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 ds cDNA 的 *Rsa* I 酶切消化 取上步合成的半饱血和未吸血森林革蜱双链 cDNA 各 43.5 μ l, 加入 10 \times *Rsa* I 缓冲液 5 μ l 和 *Rsa* I 酶 (10 U/ μ l) 1.5 μ l 混合, 37 °C 孵育 2 h 后, 用苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 纯化产物, 分别定容至 6.5 μ l。

1.2.4 接头 (adaptor) 连接和效率分析 以半饱血森林革蜱 ds cDNA 为实验组 (tester), 未吸血森林革蜱 ds cDNA 为对照组 (driver)。取 1 μ l 酶切后的 tester ds cDNA, 加 ddH₂O 5: 1 稀释后, 分为 tester 1 和 tester 2 两组, 各加入 tester ds cDNA 2 μ l、T₄ DNA 连接酶 1 μ l、5 \times 连接缓冲液 2 μ l 和 ddH₂O 3 μ l, 分别与接头 1 (adaptor 1) 和接头 2 各 2 μ l 于 16 °C 过夜。接头连接效率按 cDNA 消减试剂盒说明进行。

1.2.5 抑制消减杂交 参照 cDNA 消减试剂盒说明, 第 1 次消减杂交时, 取连好接头的 tester 1 ds cDNA 和 tester 2 ds cDNA 各 1.5 μ l, 分别加入 driver ds cDNA 1.5 μ l 和 4 \times 杂交缓冲液 1 μ l, 98 °C 加热 1.5 min、68 °C 杂交 8 h 后, 开始第 2 次消减杂交, 取 driver ds cDNA 1 μ l, 4 \times 杂交缓冲液 1 μ l, ddH₂O 2 μ l, 98 °C 温育 1.5 min 后, 加入第 1 次杂交产物, 68 °C 杂交过夜。

取杂交产物进行巢式 PCR 扩增, 第 1 轮引物为巢式 PCR 引物 1 (引物序列为: 5'-TCGAGCGGC-CGCCCCGGCAGGT-3'), 扩增 28 个循环, 第 2 轮巢式 PCR 的引物为巢式 PCR 引物 1 和巢式 PCR 引物 2R (引物序列为: 5'-AGCGTGGTCGCGCCGAGGT-3'), 共扩增 19 个循环。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。产物用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。

1.2.6 抑制消减 cDNA 文库的构建、扩增和鉴定 取纯化产物 3 μ l, 接入入 PMD18-T 载体中, 转化至 DH5 α 感受态细胞后, 涂布氨苄 LB 板 [含 0.024 mg/ml 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和 0.04 mg/ml β -半乳糖苷酶 (X-Gal)] 上, 37 °C 过夜培养。计数平板上的白色和蓝色菌落。挑选白色菌落繁殖后, 菌液以巢式 PCR 引物 1 和巢式 PCR 引物 2R 为引物进行扩增, 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。计算文库滴度 (文库滴度=克隆数 \times 稀释倍数 \times 1 000) 和重组率 (阳性克隆数/所有克隆数 \times 100%)。

1.2.7 反向 Northern 杂交 (Northern Blotting) 和 RT-PCR 检测抑制消减 cDNA 文库的消减效率 根据地高辛标记和检测试剂盒说明对差异的阳性克隆进行特异性检测, 分别以酶切消化好的未吸血和半饱血森林革蜱雄蜱单链 cDNA 为模板制备探针, 随机挑选部分阳

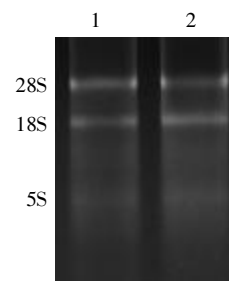
性克隆的巢式 PCR 第 2 轮产物为模板 (1 μ l), 点膜于 2 张尼龙膜上, 80 °C 固定 2 h 后, 分别装入 2 个含有地高辛杂交液 (DIG Easy Hyb) 的杂交袋中进行预杂交, 加入制备好的探针 (3 pg/ μ l), 40 °C 过夜杂交。用洗涤缓冲液洗涤 2 次后, 加入封闭液封闭 30 min, 洗涤 2 次, 加入试剂盒中的显色液进行显色, 检测文库的消减效率。

随机选取若干个阳性克隆, 分别以半饱血和未吸血森林革蜱雄蜱的总 RNA 反转录第一条 cDNA 为模板进行 RT-PCR, 分析抑制消减杂交 cDNA 文库的消减效率, 鉴定文库质量。

1.2.8 基因生物学分析 随机挑选部分阳性克隆送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 测序结果在 GenBank 中利用 Blastn 进行同源性分析, 同时检索 Blastx 找到相应同源性高的蛋白预测其功能。

2 结果

2.1 蜱的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 所提取的森林革蜱未吸血雄蜱和森林革蜱半饱血雄蜱 RNA 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 亮度比例适中 (图 1)。两者 RNA 浓度分别为 2 147.56 和 3 119.88 ng/ μ l, A₂₆₀ 值/A₂₈₀ 值分别为 1.98 和 1.97, RNA 质量良好。



1: 未吸血雄蜱总 RNA; 2: 半饱血雄蜱总 RNA。

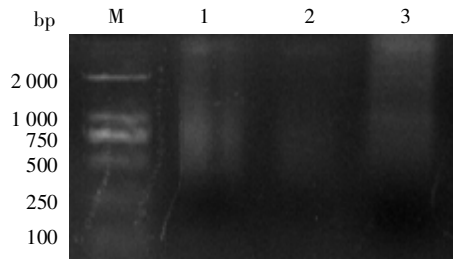
1: Total RNA of unfed males; 2: Total RNA of half-blood males.

图 1 森林革蜱总 RNA 电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA of *Dermacentor silvarum*

2.2 ds cDNA 质量和 *Rsa* I 酶切效率结果 琼脂糖电泳结果显示, 森林革蜱半饱血雄蜱和未吸血雄蜱的 ds cDNA 均呈弥散拖影, 大小均在 500 bp 以上 (图 2), 经 *Rsa* I 酶切后, 大小在 100~1000 bp (图 3)。说明合成的 ds cDNA 质量良好, *Rsa* I 酶切完全。

2.3 接头连接效率检测结果 因本研究所用 cDNA 消减试剂盒给出的引物 G3PDH3' Primer 和 G3PDH5' Primer 并不适用于蜱类, 故只能参照试剂盒给出的对照组进行实验操作分析, 从侧面来检测连接效率。通过条带亮度可判断接头连接效率较高, 大于 25% (图 4)。

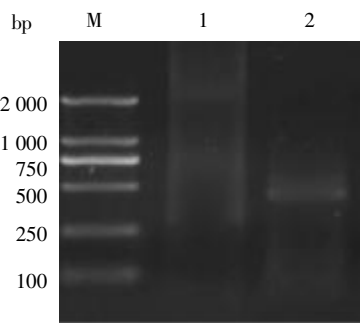


M: DNA 标志物; 1: 对照组双链 cDNA; 2: 实验组双链 cDNA; 3: 试剂盒对照双链 cDNA。

M: DNA marker; 1: Driver double strands cDNA; 2: Tester double strands cDNA; 3: Control double strands cDNA.

图 2 双链cDNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of double-stranded cDNA



M: DNA 标志物; 1: 未酶切的实验组 cDNA; 2: 酶切后实验组 cDNA。

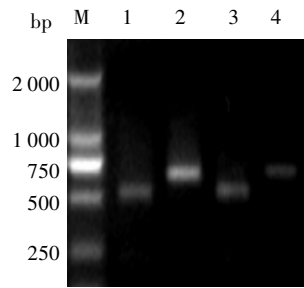
M: DNA marker; 1: Tester cDNA before digestion; 2: Tester cDNA after digestion.

图 3 实验组的 *Rsa* I 酶切效率检测

Fig. 3 *Rsa* I digestion products of Tester cDNA

2.4 抑制消减杂交结果 电泳结果显示, 消减杂交产物经过巢式 PCR 第 1 轮扩增后, 得到弥散且不清楚的条带, 第 2 轮扩增则大大富集了差异片段, 消减的 cDNA 片段多聚集在 250~500 bp, 未消减的 PCR 产物呈弥散带 (图5)。

2.5 cDNA 文库的构建 转化产物涂板培养后, 白色菌落清晰饱满, 均匀分布于平板上。文库重组率为

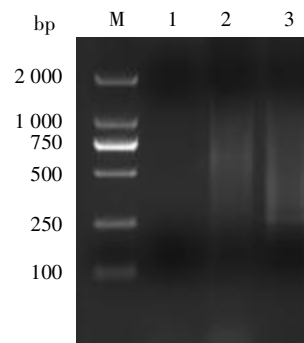


M: DNA 标志物; 1、3: G3PDH 的 3'和 5'引物扩增产物; 2、4: PCR 引物 1 和 G3PDI- I 的 3'引物扩增产物。

M: DNA marker; 1, 3: PCR products using G3PDH3' primer and G3PDH5' primer; 2, 4: PCR products using PCR primer 1 and G3PDH3' primer.

图 4 接头连接效率分析

Fig. 4 Ligation efficiency analysis of the adaptor



M: DNA 标志物; 1: 第 1 次杂交产物; 2: 未消减产物; 3: 第 2 次杂交产物。

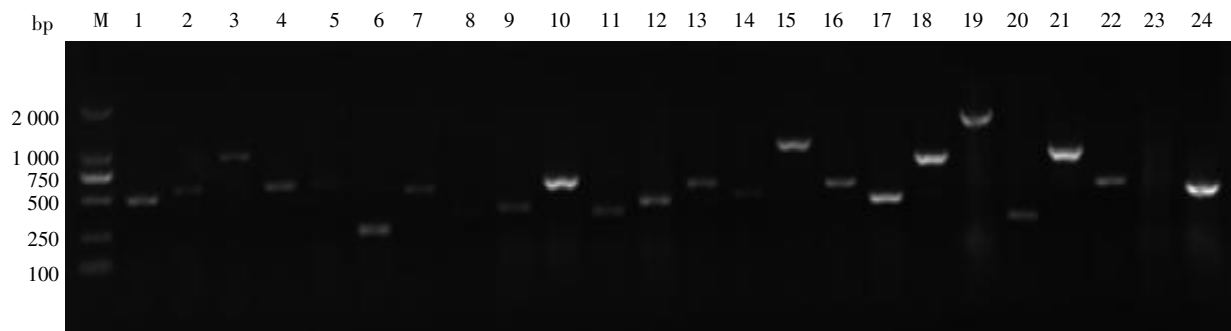
M: DNA marker; 1: Product of primary PCR amplification; 2: Secondary PCR amplification product of unsubtracted cDNA; 3: Secondary PCR amplification product of subtracted cDNA.

图 5 消减杂交后巢式 PCR 2 轮扩增产物的电泳结果

Fig. 5 Electrophoresis of products of nested PCR amplification

88.5% (239/270), 文库滴度为 700 000 pfu/ml。270 个阳性克隆菌液巢式 PCR 检测结果显示, 239 个克隆有 250~1000 bp 的特异片段插入, 与 cDNA 酶切结果相符 (图 6)。

2.6 DIG 反向 Northern blotting 和 RT-PCR 检测结果



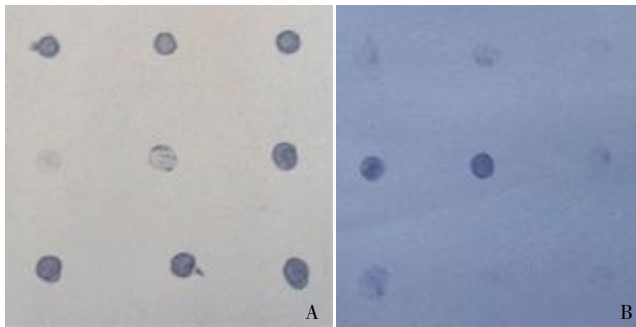
M: DNA 标志物; 1~23: 自消减 cDNA 文库中挑选出的阳性克隆巢式 PCR 产物。

M: DNA marker; 1-23: Clones from the SSH DNA library.

图 6 消减抑制 cDNA 文库中阳性克隆的 PCR 检测结果

Fig. 6 PCR results of clone picked randomly from subtracted library

Northern Blotting 结果显示, 当以森林革蜱半饱血雄蜱 cDNA 为探针时, 消减文库信号较强; 当以未吸血雄蜱 cDNA 为探针时, 消减文库信号较弱。说明消减效果良好, 文库具有特异性 (图 7)。随机挑选 8 条差异基因设计引物, 以森林革蜱半饱血和未吸血的总 RNA 反转录第一条 cDNA 为模板进行特异性扩增, 结果显示, 5 个样品在半饱血状态下表达上扬, 说明消减效果良好, 文库质量较好 (图 8)。



A; 半饱血 cDNA 为探针; B: 未吸血 cDNA 为探针。
A: Using DIG-labeled half-blood male cDNA as probe; B: Using DIG-labeled unfed male cDNA as probe.

图 7 反向 Northern Blotting 检测抑制消减 cDNA 文库的消减效率
Fig.7 Subtractive efficiency of the subtracted cDNA library by reverse Northern blotting

2.7 基因生物学分析 Blastn 分析结果显示, 115 个随机挑选的阳性克隆中共获得 87 个 EST, 大小主要分布于 200~800 bp, 具有 ACGCGGGG 或 Poly (A) 标志的 15 个, 说明差异基因大部分是不完整的, 且大部分较短。与其他蜱基因有同源性的 53 个, 同源率为 70%~98%, 与其他昆虫基因有同源性的 34 个, 同源率为 32%~65%。

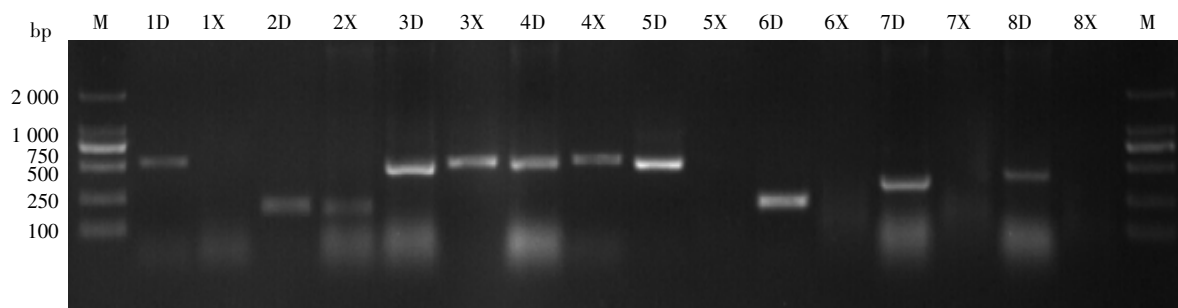
Blastx 分析结果显示, 差异的表达基因均与蜱吸血和血液消化等功能有关, 包括吸血后表达上扬的不同酶类以及与抗凝血、能量代谢和转录调节的相关基因等,

其中, 636bp 大小序列与参与抗凝血的天冬氨酰蛋白酶 (ASP) 同源性最高, 为 98%, 766 bp 大小序列与信号传导和抗凝血作用的镰形扇头蜱 (*Rhipicephalus haemaphysaloides*) 丝氨酸蛋白酶抑制剂同源性为 53%, 341 bp 大小序列与同源蛋白细胞色素 C 的同源性为 33%, 部分 EST 还与库蚊 (*Culex quinquefasciatus*)、果蝇 (*Drosophila*) 以及肩突硬蜱 (*Ixodes scapularis*) 和微小扇头蜱 (*R. microplus*) 的假定蛋白存在同源性。部分基因具有明确功能的序列, 但无完整的开放阅读框 (ORF), 部分基因具有 ORF 却无同源性。

3 讨论

以往研究差异基因时, 采用的技术有差异显示技术 (DD-PCR)、mRNA 差异显示 PCR 等, 通过这些方法分离得到的差异基因数量有限, 且不利于基因上调的分析^[7]。本研究采用 SSH 对森林革蜱半饱血雄蜱差异表达基因进行富集, 并全程监控抑制消减杂交过程, 保证了文库的质量。在连接接头时, 由于森林革蜱未能进行全基因测序, 尚未找到管家基因, 本研究所用试剂盒不能用于接头连接效率的检测, 因此只能间接使用试剂盒的对照组进行接头效率连接的分析。检测消减杂交效率时, 经过消减后的 DNA 片段富集并且片段较短, 明显区别于未经消减的样品。为确定筛选得到的基因片段是否出自森林革蜱半饱血雄蜱, 本研究采用了反向 Northern blotting 技术, 结果显示, 以森林革蜱半饱血雄蜱单链 cDNA 为探针, 消减文库信号较强, 说明消减效果较好。本研究所构建的森林革蜱半饱血雄蜱抑制消减杂交 cDNA 文库的文库滴度为 70 000 pfu/ml, 重组率为 88.5%, 基本符合实验要求。

本研究采用吸血 5 d 的森林革蜱雄蜱, 此时, 血液进入蜱体内的各个器官, 随着血的吸入, 蜱的体重和内部脏器发生剧烈变化, 出现基因的差异表达, 这



M: DNA 标志物; 1D~8D: 森林革蜱半饱血雄蜱扩增结果; 1X~8X: 森林革蜱未吸血雄蜱扩增结果。
M: DNA marker; 1D~8D: PCR products of half-blood males; 1X~8X: PCR products of unfed males.

图 8 RT-PCR 分析消减效率
Fig.8 Subtractive efficiency test of the SSH DNA library by RT-PCR

些表达基因对蜱的吸血过程至关重要。迄今为止,研究者已利用相关方法对长角血蜱饥饿雌蜱^[8]、镰形扇头蜱唾液腺^[9]、亚洲璃眼蜱^[10]、感染无形体的微小牛蜱雄蜱^[11]和篦子硬蜱^[12]等多种蜱类进行了研究,其中主要涉及差异表达基因的器官有唾液腺^[13]、血淋巴、中肠^[14]、生殖腺和卵^[15],根据不同器官分离出的差异基因研究疫苗,可为相应疫苗的研究提供对策。半饱血森林革蜱体内能量代谢旺盛,唾液腺中的线粒体成倍增长^[16],本研究所构建的文库中获得与线粒体代谢有关的细胞色素 C,说明吸血过程中,线粒体内部原有的或改变的基因正在大量上调表达以适应森林革蜱新陈代谢的高速运行。有研究表明,随着森林革蜱吸血时间的延长,信号传导变得强烈,丝氨酸蛋白酶抑制剂参与凝血、炎症反应、补体激活和组织重建等过程,识别外来微生物并激活相应的酶类来实现级联反应^[17]。Perrodou 等^[18]研究发现的 AgIMcr14 基因是第 1 个被发现来源于昆虫体内的蛋白酶抑制剂基因,昆虫血餐后,AgIMcr14 在中肠内表达上调,远高于其他部位的表达水平^[19]。Miyoshi 等^[20]从长角血蜱中肠内提取出长角血蜱丝氨酸蛋白酶抑制剂 1 (*Haemaphysalis longicornis* serine proteinase inhibitor-1, HLS1),经蛋白重组后免疫家兔,长角血蜱叮咬后,幼蜱死亡率为 43.9%,成蜱死亡率为 11.2%,表明该分子在蜱的免疫系统中意义重大。

本研究从已构建的森林革蜱半饱血雄蜱抑制消减杂交 cDNA 文库中克隆获得 636 bp 的 EST,经 Blastx 比对发现,其与果蝇的 ASP 具有 98% 的同源性。说明森林革蜱在吸血时该基因为了适应蜱消化血液和提高自身免疫发生了表达上扬。Zhao 等^[21]对弓形虫体内的 TgASP-1 基因进行了研究,结果显示,该蛋白酶在弓形虫感染过程中发挥着侵入宿主细胞、吸收营养、避免宿主产生保护性免疫源性和寄生虫分化等重要功能,表明该基因具有潜在研究价值。

本研究成功构建森林革蜱半饱血雄蜱 cDNA 文库并且筛选出一批具有重要价值的功能分子,其中部分序列与微小牛蜱和肩突硬蜱存在较高同源性,说明这些蜱种之间可能存在着免疫交叉反应型。所筛选的部分基因具有明确功能的序列,却没有完整的 ORF,部分基因具有 ORF 却无同源性,因此,要进一步明确森林革蜱半饱血雄蜱的差异基因功能,还需要更深入的研究。

参 考 文 献

[1] Kulik IL, Vinokurova NS. Range of the tick *Dermacentor silvarum* in the USSR[J]. Med Parazitol (Mosk), 1983, 52(3):

- 23-28. (in Russian)
- [2] Dash M, Biambaa B, Neronov VM. The ixodid tick fauna of the Mongolian People's Republic. I. The species distribution [J]. Med Parazitol (Mosk), 1988, (3): 37-42. (in Russian)
- [3] Valenzuela JG. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(10): 1199-1209.
- [4] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [5] 贝祝春, 王京燕. 伯氏疟原虫青蒿素抗性相关的消减 cDNA 文库构建 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22 (3): 139-143.
- [6] 吴家红, 赵彤言, 董言德. 溴氰菊酯抗性白纹伊蚊抑制消减 cDNA 文库的构建 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24 (4): 281-284.
- [7] 刘建刚. 长角血蜱半饱血雄蜱抑制性消减 cDNA 文库的构建及 MIF 基因的原核表达 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [8] 柴慧萍, 刘光远, 张林, 等. 长角血蜱饥饿雌蜱 cDNA 表达文库的构建及免疫学筛选[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(1): 6-10.
- [9] 向飞宇, 周金林, 周勇志, 等. 镰形扇头蜱唾液腺抑制消减杂交文库的构建和分析 [J]. 中国农业科学, 2006, 39 (11): 2347-2353.
- [10] 程天印, 周金林, 周勇志, 等. 亚洲璃眼蜱唾液腺差异表达基因文库的构建及分析[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(3): 261-266.
- [11] Zivkovic Z, Esteves E, Almazán C, et al. Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale* [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 186.
- [12] Valenzuel A. Exploring the messages of the salivary glands of *Ixodes ricinus* [J]. Am J Trop Med Hyg, 2002, 66(3): 223-224.
- [13] Kazimirová M, Štibrániová I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2013, 3: 43.
- [14] Narasimhan S, Perez O, Mootien S, et al. Characterization of Ixophilin, a thrombin inhibitor from the gut of *Ixodes scapularis* [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68012.
- [15] Karim S, Troiano E, Mather TN. Functional genomics tool: gene silencing in *Ixodes scapularis* eggs and nymphs by electroporated dsRNA [J]. BMC Biotechnol, 2010, 10: 1.
- [16] Dai SX, Zhang AD, Huang JF. Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in *Ixodes scapularis* [J]. BMC Evol Biol, 2012, 12: 4.
- [17] 俞燕芳. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpin-6 基因差异表达分析 [D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- [18] Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, et al. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(21): 11427-1432.
- [19] Tahar R, Boudin C, Thiery I, et al. Immune response of *Anopheles gambiae* to the early sporogonic stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. EMBO J, 2002, 21 (24): 6673-6680.
- [20] Miyoshi T, Tsuji N, Islam MK, et al. A Kunitz-type proteinase inhibitor from the midgut of the ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis*, and its endogenous target serine proteinase [J]. Mol Biochem Parasitol, 2010, 170(2): 112-115.
- [21] Zhao G, Zhou A, Lu G, et al. Identification and characterization of *Toxoplasma gondii* aspartic protease 1 as a novel vaccine candidate against toxoplasmosis [J]. Parasit Vectors, 2013, 6: 175.
- [22] Kim K. Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other *Apicomplexa* [J]. Acta Trop, 2004, 6(1): 69-81.

(收稿日期: 2013-12-04 编辑: 张争艳)