

DOI:10.13350/j.cjpb.230909

• 论著 •

# 白纹伊蚊唾液蛋白 Alb-AG5-3 的基因特征分析及真核表达\*

高敏<sup>1</sup>, 吴家红<sup>2,3</sup>, 程金芝<sup>2,3</sup>, 张霞<sup>2,3</sup>, 牟小会<sup>2,3</sup>, 聂映<sup>2,3</sup>, 彭哲慧<sup>2,3</sup>, 李志强<sup>4</sup>,  
赵久刚<sup>4</sup>, 商正玲<sup>4</sup>, 刘磊<sup>1</sup>, 蓝静<sup>1\*\*</sup>, 刘红美<sup>1</sup>

(1. 贵州医科大学生物与工程学院/健康医药现代产业学院生物技术教研室, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州医科大学基础医学院人体寄生虫学教研室; 3. 贵州医科大学现代病原生物学特色重点实验室; 4. 贵州医科大学基础医学院免疫学教研室)

**【摘要】** 目的 初探白纹伊蚊唾液蛋白 Antigen5-3 (Alb-AG5-3) 的结构与功能特征, 并采用果蝇 S2 真核表达体系表达 Alb-AG5-3。方法 采取同源比对的方式, 从 NCBI 数据库中钩取 Antigen5-3 序列, 根据白纹伊蚊分泌蛋白 Antigen5-3 基因参考序列 (GenBank: AY826105.1) 设计特异性引物, 从白纹伊蚊安顺株中扩增基因全长。经序列比对后利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 和瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统 (Expasy) 以及生物信息学在线软件 SignalP、TMHMM、SOPMA、SWISS-MODEL、AlphaFold 等对该蛋白进行生物信息学分析。Trizol 法提取白纹伊蚊雌蚊与雄蚊整蚊以及吸血前后雌蚊唾液腺 RNA, qRT-PCR 检测 Alb-AG5-3 在 RNA 相对表达量; 以白纹伊蚊整蚊 cDNA 为模板, 特异性扩增除信号肽外的 Alb-AG5-3 编码区, PCR 产物经切胶回收纯化后与昆虫真核表达载体 pMT/BiP/V5 连接, 构建真核重组质粒 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3。随后转入果蝇 S2 细胞中, 500 μmol/L CuSO<sub>4</sub> 诱导重组蛋白 Alb-AG5-3 的表达。收集上清, 采用 Western blot 鉴定 V5 表达标签, 镍柱亲和层析纯化重组蛋白 Alb-AG5-3。结果 生物信息学分析该基因 CDS (Coding sequence) 区扩增全长为 768 bp, 编码 255 个氨基酸, 二、三级结构预测以无规则卷曲和 α-螺旋为主, 具 CAP 超家族经典的 PR-1 结构域, 该基因编码的蛋白是一种强亲水性 (GRAVY: -0.864) 的富含半胱氨酸的分泌蛋白。Alb-AG5-3 mRNA 在雌蚊中表达量高于雄蚊且吸血后的表达量显著下调。成功构建了白纹伊蚊唾液蛋白 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 真核表达质粒并通过果蝇 S2 表达体系表达出真核蛋白, 镍柱亲和纯化后的 Alb-AG5-3 经 Western blot 检测能被 V5 标签蛋白抗体识别。结论 成功构建白纹伊蚊 Alb-AG5-3 真核质粒并在果蝇 S2 细胞中表达真核蛋白 Alb-AG5-3, 镍柱亲和纯化后获得单一的 Alb-AG5-3 蛋白以备后续分析。

**【关键词】** 白纹伊蚊; 唾液腺; Alb-AG5-3 蛋白; 真核表达

**【中图分类号】** R384.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)09-1039-08

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Sep;18(9):1039-1046.]

## Characteristic analysis and eukaryotic expression of *Aedes albopictus* saliva protein Alb-AG5-3

GAO Min<sup>1</sup>, WU Jiahong<sup>2,3</sup>, CHENG Jinzhi<sup>2,3</sup>, ZHANG Xia<sup>2,3</sup>, MU Xiaohui<sup>2,3</sup>, NIE Ying<sup>2,3</sup>, PENG Zhehui<sup>2,3</sup>, LI Zhiqing<sup>4</sup>, ZHAO Jiugang<sup>4</sup>, SHANG Zhengling<sup>4</sup>, LIU Lei<sup>1</sup>, LAN Jing<sup>1</sup>, LIU Hongmei<sup>1</sup>

(1. Department of Biotechnology School of Biology and Engineering (School of Modern Industry of Health Medicine), Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University; 3. Characteristic and Key Laboratory of Modern Pathogenic Biology, Guizhou Medical University; 4. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University) \*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the structural and functional characteristics of the saliva protein Antigen5-3 (Alb-AG5-3) of *Aedes albopictus*, and to express Alb-AG5-3 protein in Drosophila S2 eukaryotic expression system.

**Methods** Antigen5-3 sequences were extracted from NCBI database by homologous comparison. Specific primers were designed according to the reference sequence of the secreted protein Antigen5-3 gene (GenBank: AY826105.1), and the full length of the gene was amplified from *Aedes albopictus*. After sequence comparison, the National Center for Biotechnology Information (NCBI), the protein analysis expert system (Expasy) of the SWISS Bioinformatics Institute and the online bioinformatics software SignalP, TMHMM, SOPMA, Swiss-Model and AlphaFold were used for bioinformatics a-

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 32160185; 81971972); 贵州省科学技术基金项目 [黔科合基础-ZK(2021)一般 481; 黔科合基础 ZK(2022)一般 366]。

\*\* **【通讯作者】** 蓝静, E-mail: lanjing\_8@126.com

**【作者简介】** 高敏 (1996-), 女, 内蒙古通辽人, 硕士研究生。主要研究方向: 微生物基因组与基因功能研究。E-mail: 1243567623@qq.com

analysis of the protein. The total RNA was extracted by Trizol method from the whole body of the female and male *Aedes albopictus* and the sugar-feeding and the blood-feeding female mosquitoes salivary glands. Relative expressions of Alb-AG5-3 were detected by qRT-PCR. Using the cDNA as template, the Alb-AG5-3 coding region except the signal peptide was amplified specifically. The PCR products were purified and then ligated to the insect eukaryotic expression vector pMT/BiP/V5 to construct eukaryotic recombinant plasmid pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3. The recombinant plasmid subsequently transferred into *Drosophila* S2 cells. 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  were used to induced express the recombinant protein Alb-AG5-3. The cell supernatant was collected and the V5 expression label was identified by Western blot. The recombinant protein Alb-AG5-3 was purified by nickel column affinity chromatography. **Results** Bioinformatics analysis showed that the total length of CDS (Coding sequence) region of the gene was 768 bp, encoding 255 amino acids. The secondary and tertiary structure prediction showed that the protein was dominated by random curl and alpha-helix, with the classic PR-1 domain of CAP superfamily. The gene encodes a secreted protein with strong hydrophilia (GRAVY: -0.864) and richin cysteine. The expression of Alb-AG5-3 mRNA in female mosquitoes was much higher than that in male, and significantly down-regulated after blood feeding. The eukaryotic expression plasmid of pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 was constructed and the eukaryotic protein was successfully expressed through the S2 expression system of *Drosophila*. The purified Alb-AG5-3 with nickel column affinity could be detected by the V5 labeled protein antibody by Western blot. **Conclusion** *Aedes albopictus* Alb-AG5-3 eukaryotic plasmid was successfully constructed and the eukaryotic protein Alb-AG5-3 was expressed in *Drosophila* S2 cells. A single Alb-AG5-3 protein was obtained after affinity purification with nickel column for subsequent analysis.

**【Key words】** *Aedes Albopictus*; Alb-AG5-3; eukaryotic expression; inflammatory cytokines

白纹伊蚊又称亚洲虎纹,起源于东南亚热带森林,是乙脑、登革热、黄热病等多种蚊媒传染病的主要载体。白纹伊蚊主要适生区在热带及亚热带地区,但由于其适应性强,目前已经遍布全球<sup>[1]</sup>,在我国大多数地区皆有分布<sup>[2-3]</sup>。白纹伊蚊雌蚊叮咬人体吸血时会同时引起皮肤奇痒、红肿,局部或全身性皮炎等,抓破后更易引起溃疡感染<sup>[4]</sup>,这种反应主要是由蚊的唾液腺分泌物引起的。研究发现蚊唾液腺分泌物可引起宿主血管舒张、抗凝血、调控机体免疫应答<sup>[5]</sup>及促进蚊媒病毒感染<sup>[6]</sup>。目前,已有部分唾液蛋白及其发挥作用的通路被发现,但绝大多数的唾液蛋白的功能仍不清楚<sup>[7]</sup>。

Antigen5 蛋白家族属于 CAP 蛋白超家族的成员,是一类富含半胱氨酸的分泌蛋白(cysteine-rich secretory proteins, CRISPs)<sup>[8]</sup>。CAP 蛋白超家族广泛分布于多种生物腺体组织分泌液如哺乳动物精液、蛇毒液、节肢动物唾液及植物分泌液中,在哺乳动物体内被命名为 CRISPs 蛋白家族,在植物体内名为 Pr-1 蛋白家族,在非哺乳动物组织中被称作 Antigen5 蛋白家族<sup>[9]</sup>。到目前为止,关于哺乳动物 CRISPs 的研究主要集中在精子成熟、精卵融合以及人类疾病如前列腺癌等方面<sup>[10]</sup>。而在非哺乳动物中, Antigen5 蛋白被发现是毒液中强烈的变应原成分之一,也是刺叮昆虫毒液中表达较丰富的蛋白成分之一<sup>[11]</sup>,可对宿主造成严重的变态反应<sup>[12]</sup>。在蛇毒唾液腺中 CRISP 家族成员可通过阻断  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  及环核苷酸门控通道发挥阻断宿主与炎症反应的作用<sup>[13]</sup>。

本实验室前期研究运用 2 D 电泳技术构建了白纹伊蚊雌蚊吸糖(SF)与吸血(BF)后唾液腺蛋白谱,经过图谱比对,筛选到显著度大于 2 的蛋白点 26 个。通过质谱分析这些差异蛋白,发现其中一个蛋白多肽(编号:1181)与 Genbank 中命名为 Antigen5-3 蛋白(Accession No. :gi56417472)同源,并在吸血组蛋白谱中显著下调<sup>[14]</sup>。因此推测该蛋白可能被吸血调控,并可能会对宿主机体产生某种重要影响。通过对 NCBI 中白纹伊蚊 Antigen5 蛋白家族进行搜索比对分析,发现该家族在白纹伊蚊被注释的成员有 4 个,但其功能均还未被解析。本研究拟对已筛选的白纹伊蚊 Antigen5-3(Alb-AG5-3)蛋白的分子结构进行生物信息学分析,并检测其在白纹伊蚊雌蚊、雄蚊中的表达情况以及吸血前后的 mRNA 表达量;通过果蝇真核表达体系表达并纯化获得有活性的重组 Alb-AG5-3 蛋白,为进一步探索 Antigen5-3 蛋白及 Antigen5 蛋白家族在蚊唾液中的功能及其对宿主的作用奠定基础。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

**1.1 实验动物、载体、宿主菌和细胞** 白纹伊蚊安顺株(采用勺舀法采自贵州省安顺市地区的白纹伊蚊幼虫,实验室饲养成蚊)为本实验室饲养。ICR 小鼠由贵州医科大学实验动物中心提供。*Escherichia coli* DH 5a 由本实验室保存, pMD-18T Vector 载体购于日本 TaKaRa 公司; pMT/BiP/V5-HisA 载体购于美国 Invitrogen 公司;果蝇 S2 细胞购于上海傅恒细胞库,并由本实验室保存传代。

**1.2 主要试剂及仪器** PrimeScrip™ RT reagent kit with gDNA Eraser, TB Green™ Premix Ex Taq™ II, Bgl II、Not I 限制性内切酶, Gel Loading Dye, Purple (6×), Ex Taq, T4 DNA 连接酶, 以及 DNA 胶回收试剂盒均购于日本 TaKaRa 公司; 去内毒素质粒提取试剂盒采购于美国 Omega 公司; Trizol 和 XtremeGENE HP DNA Transfection Reagent 购于美国 Thermo Fisher 公司; ECL 化学发光检测试剂盒购于爱必信生物科技有限公司; Schneider 果蝇细胞培养基和胎牛血清 (FBS) 购于美国 Gibco 公司; Anti-V5-tag pAb-HRP-Direct 购于日本 Medical & Biological Laboratories 公司; 超滤管 (10 KD) 购于美国 Millipore 公司; His·Band Purification Kit 购于美国 Merck 公司。荧光定量 PCR 仪和多功能成像系统为美国 BIO-RAD 公司生产; PCR 扩增仪为德国 Eppendorf 公司生产; MCO-17AI 细胞培养箱购于日本三洋公司; HFsafe-1200 生物安全柜购于香港力康发展有限公司; Allegera 64 R 冷冻高速离心机为美国 BECKMAN 公司生产。

## 2 方法

**2.1 白纹伊蚊的饲养** 蚊虫饲养条件为温度 (25±2) °C, 相对湿度 (75±5)%, 光照周期为 14:10 (L:D)。I~IV 龄幼虫采用牛肝粉喂养, 成蚊采用 10% 的糖水喂养。

**2.2 引物设计与合成** 用筛选的蛋白多肽 (编号: 1181) 序列在 GenBank 数据库中进行 tblastn 比对。下载同源序列 (AY826105.1) 作为参考序列, 采用 Primer3 设计扩增全编码区序列的引物 Alb-AG5-3-F1 (5'-TAATTCAGCTCCTTCCTTCGGG-3') 和 Alb-AG5-3-R1 (5'-TGGGTTTGATAATCGACTGCA-3')。选择跨外显子且经验证无特异性扩增的引物作为荧光定量 PCR 引物检测 Alb-AG5-3 的表达量。引物 Alb-AG5-3-F2: 5'-CCAAGCATGGTGATGAAC-3'; Alb-AG5-3-R2: 5'-TTTGATAATCGACTGCCATTGC-3'。采用白纹伊蚊 RPS6 基因为定量内参基因。引物 RPS6-F: 5'-GAAGTTGAACGTATC GTTTC-3'; RPS6-R: 5'-GAGATGTCAGCGGTGATTT-3'。真核表达质粒构建引物设计为不包括信号肽及终止子, 并在上游加上 Bgl II 酶切位点 (AGATCT), 下游加上 Not I 酶切位点 (GCGGCCGC) 及移位密码子 (AC) 序列。引物 Alb-AG5-3-F: 5'-AGATCTAAAAGTAAAGACTACTGCAGTGC-3'; Alb-AG5-3-R: 5'-GCGGCCGCACATCACACAACGATTTGTAAG-3'。引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

**2.3 Alb-AG5-3 基因编码区全长序列的获得及生物**

信息学分析 以白纹伊蚊整蚊总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板, 用 Alb-AG5-3-F1、Alb-AG5-3-R1 为引物 PCR 扩增 Alb-AG5-3 的编码区全长序列, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收, 连接 pMD-18T 克隆载体, 取 PCR 鉴定片段大小正确的单克隆测序, 采用生物信息学在线分析软件 ExPasy 中 ProtParam 分析编码 Alb-AG5-3 蛋白的理化性质, Conservd Domains 分析 Alb-AG5-3 保守结构域; Protscale 软件分析 Alb-AG5-3 蛋白亲疏水性; SignalP 分析 Alb-AG5-3 蛋白的信号肽; TMHMM 分析 Alb-AG5-3 蛋白的跨膜结构。采用 ExPasy 中的 SOPMA 分析 Alb-AG5-3 蛋白二级结构; 运用 SWISS-MODEL 和 AlphaFold 分析 Alb-AG5-3 蛋白三级结构。

**2.4 Alb-AG5-3 mRNA 表达分析** 随机选择 5 日龄白纹伊蚊雌蚊与雄蚊各 5 只, Trizol 法提取整蚊总 RNA 并逆转录为 cDNA, 以 Alb-AG5-3-F2 和 Alb-AG5-3-R2 为引物进行荧光定量 PCR, RPS6 基因作为内参基因, 检测白纹伊蚊雌蚊与雄蚊中 Alb-AG5-3 mRNA 的相对表达量。同时随机选取吸糖和吸血后 (0 h) 的 5 日龄雌性白纹伊蚊各 10 只, 分离唾液腺, 提取总 RNA, 同法检测 Alb-AG5-3 mRNA 的相对表达量。

**2.5 Alb-AG5-3 克隆质粒的构建** 以 Alb-AG5-3-F、Alb-AG5-3-R 为引物, 以雌蚊整蚊 cDNA 为模板扩增 Alb-AG5-3 基因除信号肽以外的 CDS 序列, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定目的片段。切胶回收并纯化目的片段, 与 pMD-18T 载体 4 °C 连接过夜, 连接产物转化至感受态细胞 *E. coli* DH 5α 中, 加入无 Amp<sup>+</sup> 的 LB 液体培养基, 摇菌培养 1 h 后涂于含有 Amp<sup>+</sup> 抗性的 LB 固体平板上, 37 °C 培养 12 h, 挑选单克隆扩大培养后进行 PCR 鉴定。经鉴定片段大小正确的单克隆接种到含 Amp<sup>+</sup> 抗性的 5 mL LB 液体培养基中摇菌扩大培养 12 h, 收集菌液, 抽提质粒, 命名为 pMD-18T-Alb-AG5-3。

**2.6 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 真核表达质粒的构建** pMD-18T-Alb-AG5-3 质粒和昆虫真核表达载体 pMT/BiP/V5-HisA 分别使用限制性内切酶 Bgl II、Not I 进行双酶切后加入 Gel Loading Dye 和 Purple (6×) 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在正确位置切胶回收目的片段。用胶回收试剂盒分别纯化目的片段和载体, 在 T4 DNA 连接酶作用下连接, 构建表达载体, 转化至 *E. coli* DH 5α 中进行扩大培养 (37 °C 培养 12 h)。挑选单克隆进行 PCR 鉴定, 片段大小正确的单克隆委托华大基因公司测序, 测序正确的克隆按 1:100 接种到含 Amp<sup>+</sup> 的 50 mL LB 液体培养基中扩大培养 12 h, 采用去内毒素的质粒提取试剂盒提取得到真核

表达质粒 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3, 检测浓度后分装, 保存于-80 °C 备用。

**2.7 真核表达重组 Alb-AG5-3 蛋白** 果蝇 S2 细胞用含 10% FBS 的施耐德培养基 (SDM) 在 28 °C 培养至细胞铺板的 90%, 吸取培养基轻轻吹打皿底, 收集细胞, 1000 r/min (离心半径 14 cm) 离心 5 min, 去掉上清, 用新鲜培养基重悬细胞, 并调整细胞密度至  $5 \times 10^6$  个/mL 备用。预先在 6 孔板中每孔加入 2 mL 培养基, 将细胞吹打均匀后以每孔 200  $\mu$ L 加入至 6 孔板中, 轻轻摇晃使细胞铺匀, 待细胞生长至覆盖孔底部 70% 时开始转染。转染前以每孔 200  $\mu$ L SDM 培养基、2  $\mu$ g pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 质粒、6  $\mu$ L 的转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 制成混合液, 轻轻震荡混匀, 静置 30 min 后加入到 6 孔板中, 28 °C 培养 12~14 h, 更换为 500  $\mu$ mol/L 的 CuSO<sub>4</sub> 诱导培养基, 培养 72 h 后收集上清液。取含 Alb-AG5-3 蛋白的上清液, 经 12% SDS-PAGE 电泳后转膜, 使用 V5 标签抗体 (1:3000) 进行 Western blot, 使用 ECL 显色后拍照。

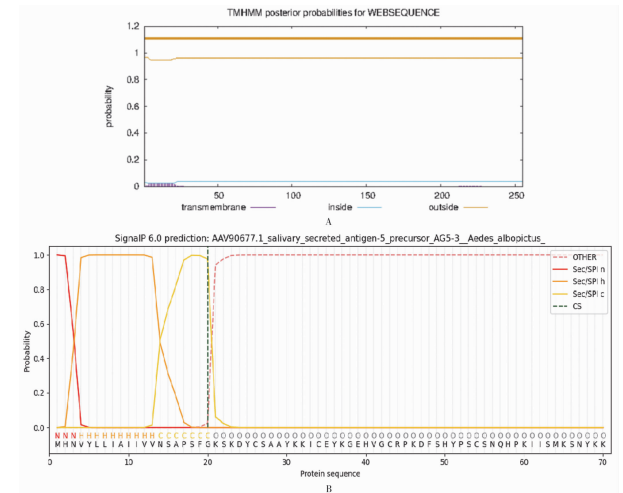
**2.8 真核表达重组 Alb-AG5-3 蛋白的纯化及鉴定** 使用 10 ku 超滤管将培养基上清浓缩至 5 mL 后上 Ni-IDA Agarose 蛋白纯化柱<sup>[15]</sup>, 依次用 100、150、200、250、300 mmol/L 咪唑洗脱蛋白, 并根据洗脱液中蛋白浓度调整咪唑浓度, 以确定 Wash Buffer 和洗脱液中咪唑的最佳浓度。使用 1×PBS 置换 10 ku 超滤管中由咪唑洗脱的蛋白, 此过程重复 3 次, 以充分去除蛋白中的咪唑, 最后再次使用 10 ku 超滤管将蛋白浓缩至 1 mL。用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定蛋白是纯化情况。纯化蛋白测定浓度后分装, 每管 50 mL, 保存于-80 °C。

**2.9 统计学分析** 计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 Alb-AG5-3 基因生物信息学分析

**1.1 Alb-AG5-3 基因编码蛋白的理化性质** 获得的 Alb-AG5-3 基因 CDS 区序列全长 768 bp, 编码 255 个氨基酸, 经与参考序列 (Genbank: AY826105.1) 比对, 一致性为 100%。利用生物信息学在线软件 TM-HMM 分析 Alb-AG5-3 蛋白的跨膜结构, 结果显示 Alb-AG5-3 无跨膜区域 (图 1A)。利用 SignalP 预测信号肽位置, 结果显示 Alb-AG5-3 中含有信号肽, 其信号肽剪切位置出现在 20-21 位氨基酸处 (图 1B), 故 Alb-AG5-3 属于分泌型蛋白。因此, 真核表达载体构建引物从第 21 位氨基酸位点开始。



A Alb-AG5-3 蛋白跨膜区预测 B Alb-AG5-3 蛋白信号肽预测  
图 1 Alb-AG5-3 蛋白跨膜区及信号肽预测

A Transmembrane region prediction of Alb-AG5-3 protein B Signal peptide prediction of Alb-AG5-3 protein

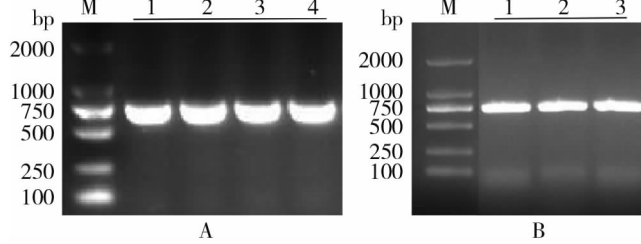
Fig. 1 Function prediction of Alb-AG5-3 protein

用于真核表达的序列为去信号肽、终止子后的序列, 全长为 705 bp, 编码 235 个氨基酸。利用生物信息学在线分析软件 ExPasy 分析 Alb-AG5-3 蛋白的理化性质。其分子质量为 27.225 01 ku, 原子总数为 3 739 个, 分子式为 C<sub>1198</sub>H<sub>1834</sub>N<sub>332</sub>O<sub>354</sub>S<sub>21</sub>, 碱基数 705 bp, 氨基酸数 235 个, 其中含赖氨酸 (Lys) 30 个、丝氨酸 (Ser) 23 个、酪氨酸 (Tyr) 15 个、天冬氨酸 (Asp) 15 个、丙氨酸 (Ala) 14 个、半胱氨酸 (Cys) 12 个。正电荷数 40 个, 带负电荷的残基总数 26 个, 带正电荷残基总数 38 个, 等电点 9.06, 为碱性蛋白。亲水性总平均值为 -0.852, 为亲水性氨基酸。在 280 nm 处的消光系数为 55 350, 在体外哺乳动物红细胞中的半衰期为 1.3 h, 不稳定系数 42.45 (>40), 属于不稳定蛋白 (图 2)。

**1.2 Alb-AG5-3 基因编码蛋白的二、三级结构** 利用 ExPasy 中 Conserved Domain 对 Alb-AG5-3 基因编码蛋白的保守结构域进行预测。结果显示, Alb-AG5-3 蛋白含有典型的 CAP 保守结构域 (图 3)。利用在线工具 SOPMA 对 Alb-AG5-3 基因的 CDS 编码蛋白的二级结构进行预测, 无规则卷曲 (c) 占 50.2%,  $\alpha$ -螺旋 (h) 占 36.47%, 延伸链 (e) 占 11.76%,  $\beta$ -转角 (t) 占 1.57% (图 4)。利用 SWISS-MODEL 及 AlphaFold 在线软件预测 Alb-AG5-3 基因编码蛋白的三维结构模型, 结果显示两种软件所预测的三维结构模型大致相同, 即由 3 个大的  $\alpha$ -螺旋和 3 个  $\beta$ -折叠组成, 具有 CAP 超家族经典的  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  三明治结构域。但在 N 端结构预测略有不同, AlphaFold 显示出在 N 端有两个小的  $\alpha$ -螺旋存在, 而 SWISS-MODEL 预测无此结构 (图 5)。



考序列(A Y826105.1) 比对, 相似性为 100% (图 8), 即在氨基酸水平上未发生突变, 重组克隆质粒 pMD-18T-Alb-AG5-3 构建正确。



A Alb-AG5-3 基因 PCR 扩增 M DNA 标志物(DL2000) 1~4 Alb-AG5-3 基因 PCR 产物 B pMD-18T-Alb-AG5-3 重组质粒 PCR 扩增 M DNA 标志物(DL2000) 1~3 pMD-18T-Alb-AG5-3 重组质粒 PCR 产物

图 7 Alb-AG5-3 编码基因 PCR 扩增与 pMD-18T-Alb-AG5-3 质粒的 PCR 鉴定

A PCR amplified fragment of Alb-AG5-3 gene M DNA marker(DL2000) 1-4 PCR amplified fragment of Alb-AG5-3 gene B PCR amplified fragment of MD-18T-Alb-AG5-3 recombinant plasmid M DNA marker(DL2000) 1-3 pMD-18T-Alb-AG5-3 recombinant plasmid PCR product

Fig. 7 Acquisition of Alb-AG5-3 target gene and pMD-18T-Alb-AG5-3 identification by PCR

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
608 bits(1569) 0.0()	Compositional matrix adj.		289/289(100%)	289/289(100%)	0/289(0%)
Query 1	MKLCILLAVAVFVGLSLGRSKSDYCSAAYKKICEYKGEHVGCRPKDFSHYSPSCSNQHPK				60
Sbjct 1	MKLCILLAVAVFVGLSLGRSKSDYCSAAYKKICEYKGEHVGCRPKDFSHYSPSCSNQHPK				60
Query 61	IISMKSNYKKFLLKRHNELRNKLASGTMSTHGMPFSAMNMPKLDWDELAKLAEHNVKQ				120
Sbjct 61	IISMKSNYKKFLLKRHNELRNKLASGTMSTHGMPFSAMNMPKLDWDELAKLAEHNVKQ				120
Query 121	CTMNHDRCRSTLKFDPDAGQNIYSSWSQKRPKDKTKLIGEAIQAWWDEHKDFYINEVDKY				180
Sbjct 121	CTMNHDRCRSTLKFDPDAGQNIYSSWSQKRPKDKTKLIGEAIQAWWDEHKDFYINEVDKY				180
Query 181	EQGSRGVLHFTAMAVDYQTHVGCASEYDYAGSGDTFLMTCNYSSWTWMSKPIYKGRAC				240
Sbjct 181	EQGSRGVLHFTAMAVDYQTHVGCASEYDYAGSGDTFLMTCNYSSWTWMSKPIYKGRAC				240
Query 241	SKCKCKDRTYKSLCDVRPLESRGPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH				289
Sbjct 241	SKCKCKDRTYKSLCDVRPLESRGPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH				289

图 8 白纹伊蚊 Alb-AG5-3 真核表达蛋白序列与参考序列比对  
Fig. 8 BLAST result between Alb-AG5-3 eukaryotic expression protein sequences of *A. albopictus* and the reference sequence

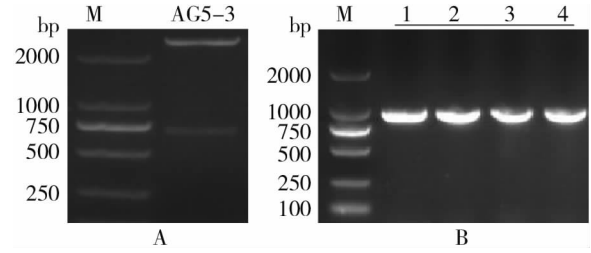
#### 4 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 真核质粒的鉴定

获得的 pMD-18T-Alb-AG5-3 重组克隆质粒用限制性内切酶 Bg1 II、Not I 进行双酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 片段大小在 750 bp 左右, 与目的片段大小相符 (图 9A)。获得的 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 重组表达质粒经 PCR 鉴定, 片段大小合适 (图 9B)。对 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 重新测序, 确证序列正确无突变后抽提质粒, 纯化去内毒素后分装, 2 mg/管。

#### 5 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 真核重组蛋白的诱导表达

将真核重组表达质粒 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 转染至果蝇 S2 细胞中, 经 CuSO<sub>4</sub> 诱导后收取上清液进行 SDS-PAGE 电泳, 在 25~35 ku 处无明显蛋白条带 (图 10A); 转膜采用 V5 标签抗体进行 Western blot

检测, 反应条带位于 30ku 处 (图 10 B), 表达蛋白与 Alb-AG5-3 的预期分子质量大小相同。



A pMD-18T-Alb-AG5-3 重组质粒双酶切鉴定 M DNA 标志物(DL2000) AG5-3 pMD-18T-Alb-AG5-3 质粒 Bg1 II + Not I 双酶切 B pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 重组表达真核质粒 PCR 鉴定 M DNA 标志物(DL2000) 1~4 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 重组表达真核质粒 PCR 产物

图 9 pMD-18T-Alb-AG5-3 克隆质粒的双酶切鉴定与 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 表达质粒的 PCR 鉴定

A Double digestion of PMD-18T-Alb-AG5-3 recombinant plasmid M DNA Marker (DL 2000) AG5-3 PMD-18T-Alb-AG5-3 plasmid was double digested by Bg1 II + Not I enzyme B The recombinant expression of pMT-BiP-V5-Alb-AG5-3 was identified by PCR M DNA Marker (DL2000) 1-4 pMT-BiP-V5-Alb-AG5-3 recombinant expressed eukaryotic plasmid identified by PCR

Fig. 9 Double digestion of pMD-18T-Alb-AG5-3 clone plasmid and PCR identification of pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3 expression plasmid

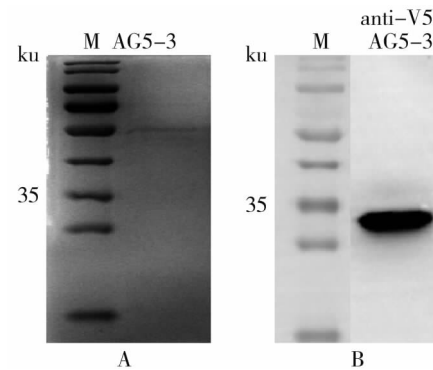


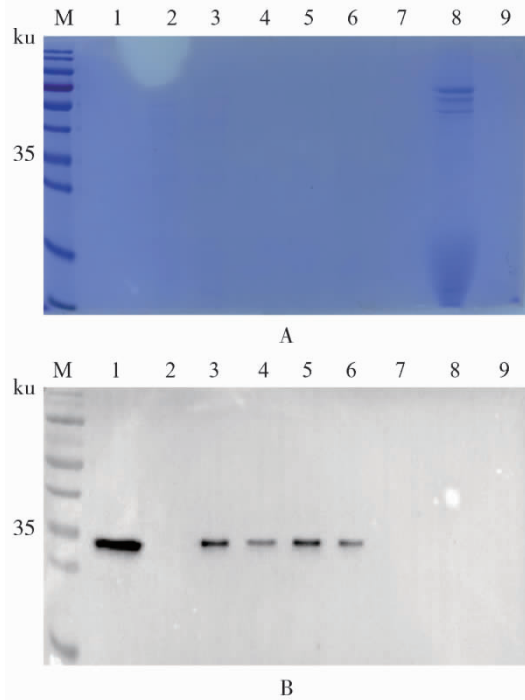
图 10 真核表达蛋白 Alb-AG5-3 的 SDS-PAGE 分析(A) 及 Western blot 鉴定(B)

Fig. 10 SDS-PAGE analysis(A) and Western Blot identification (B) of eukaryotic expression protein Alb-AG5-3

#### 6 Alb-AG5-3 真核重组蛋白的纯化

经鉴定后的 Alb-AG5-3 真核重组蛋白上清液采用 10 ku 超滤管浓缩后进行 Ni-IDA Agarose 柱层析纯化, 收集洗脱液进行 Western blot。结果显示, 纯化洗脱过程中的 Wash Buffer, 150、200、250、300 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液中都含有目的蛋白, 其中 Wash Buffer 中蛋白含量较高, 300 mmol/L 咪唑洗脱液中蛋白含量较低, 100 mmol/L 咪唑中未检测到目的蛋白 (图 11)。由于原 Wash Buffer 中含有 60 mmol/L 咪唑, 因此将 Wash Buffer 中咪唑浓度调整为 30、40、50 mmol/L 后检测流出液中目的蛋白的量。Western blot 显示, 当 Wash Buffer 中咪唑浓度稀释为 30

mmol/L 时反应条带较浅,即洗下的目的蛋白较少(图 12)。因此确定蛋白纯化均采用 Wash Buffer 咪唑浓度为 30 mmol/L,洗脱缓冲液采用 300 mmol/L。纯化收集的蛋白溶液经 10 ku U-tube 超滤浓缩管进行浓缩脱盐,测定蛋白浓度后分装,每管 50  $\mu$ L,保存于-80  $^{\circ}$ C。



M 彩虹 180 广谱蛋白标志物 1 Wash Buffer 2 洗脱缓冲液 (100 mmol/L 咪唑) 3 洗脱缓冲液 (150 mmol/L 咪唑) 4 洗脱缓冲液 (200 mmol/L 咪唑) 5 洗脱缓冲液 (250 mmol/L 咪唑) 6 洗脱缓冲液 (300 mmol/L 咪唑) 7 Binding Buffer 8 蛋白上纯化柱后的流出液 9 蛋白纯化前上超滤管后的流出液

图 11 纯化蛋白 Alb-AG5-3 的 SDS-PAGE 分析(A) 及 Western blot 鉴定(B)

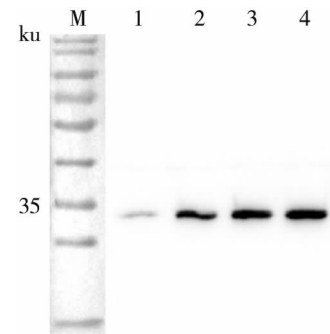
M Rainbow 180 broad-spectrum protein marker 1 Wash Buffer 2 Elution Buffer (100 mmol/L imidazole) 3 Elution Buffer (150 mmol/L imidazole) 4 Elution Buffer (200 mmol/L imidazole) 5 Elution Buffer (250 mmol/L imidazole) 6 Elution Buffer (300 mmol/L imidazole) 7 Elution Buffer (Binding Buffer) 8 Effluent from ultrafiltration tube before protein purification 9 Effluent after cell supernatant was loaded on Ultrafiltration tube

Fig. 11 SDS-PAGE analysis and Western blot identification of purified protein Alb-AG5-3

## 讨论

蚊唾液会引起宿主的炎症反应。宿主被除去唾液腺的蚊虫叮咬后,叮咬部位没有了皮肤反应<sup>[16]</sup>。蚊唾液是由复杂的生物活性物质组成,如埃及伊蚊唾液腺中鉴定出 1 208 种蛋白质,这些蛋白质绝大多数注释并不明晰,其中有 238 个蛋白质甚至没有归类到任何分子功能中<sup>[5]</sup>。本研究对前期发现的一个白纹伊蚊唾液腺蛋白 Alb-AG5-3 进行克隆,并采用生物信息学方法对白纹伊蚊唾液腺蛋白 Alb-AG5-3 进行分析,证实其是一种较不稳定的分泌型蛋白。该蛋白具有

CAP 保守结构域,蛋白结构主要以无规则卷曲、 $\alpha$  螺旋、 $\beta$  转角为主。构建的蛋白质三维结构模型可看出其具有典型的 CAP 超家族结构中的 N 端 PR-1 结构域,但缺少 C 端的 CRD 结构域。Alb-AG5-3 蛋白含半胱氨酸 12 个,比经典的 16 个保守半胱氨酸残基少 4 个。根据结构分析,该 4 个缺失的半胱氨酸残基正好分布于缺失的 CRD 结构域区域<sup>[17]</sup>。CRD 结构域是哺乳动物 CRISPs 蛋白家族所特有的保守结构域<sup>[18]</sup>,因此推测蚊唾液蛋白 Alb-AG5-3 在功能上与经典的 CAP 超家族成员会有所差别。



M 彩虹 180 广谱蛋白标志物 1 Wash Buffer(30 mmol/L 咪唑) 2 Wash Buffer(40 mmol/L 咪唑) 3 Wash Buffer(50 mmol/L 咪唑) 4 Wash Buffer(60 mmol/L 咪唑)

图 12 纯化蛋白 Alb-AG5-3 的 Wash buffer 浓度优化

M Rainbow 180 broad-spectrum protein marker 1 Wash Buffer (30 mmol/L imidazole) 2 Wash Buffer (40 mmol/L imidazole) 3 Wash Buffer (50 mmol/L imidazole) 4 Wash Buffer (60 mmol/L imidazole)

Fig. 12 Wash Buffer concentration of purified protein Alb-AG5-3 was investigated

Alb-AG5-3 mRNA 检测显示,该基因在吸血后表达量显著下调,这与 Alb-AG5-3 蛋白在吸血后蚊唾液腺中下调<sup>[14]</sup>的结果一致,说明白纹伊蚊唾液腺分泌蛋白 Alb-AG5-3 吸血后下降是由 Alb-AG5-3 mRNA 表达下调所致。Alb-AG5-3 mRNA 在雌蚊中表达量显著高于雄蚊,而吸血行为雌蚊所特有,因此推测 Alb-AG5-3 蛋白可能与吸血行为密切相关。Sun 等<sup>[19]</sup>报道,埃及伊蚊 Antigen5 家族成员 AaVA-1 可通过自噬促进登革和寨卡病毒对 THP-1 细胞的入侵,同时可加重由登革病毒引起的 AG6 免疫缺陷鼠的病毒血症。与吸血功能相关的白纹伊蚊 Alb-AG5-3 蛋白是否具有相似功能尚不清楚。

为了进一步探究 Alb-AG5-3 蛋白的功能,本研究利用 pMT/BiP/V5-HisA 载体构建了真核表达质粒 pMT/BiP/V5-Alb-AG5-3,并通过果蝇 S2 真核表达体系表达了带 His 标签的 Alb-AG5-3 重组蛋白。因 pMT/BiP/V5-HisA 载体含有 BiP 信号肽,可使重组蛋白以分泌型表达,因此直接收集细胞培养基上清并进行纯化即可获得目的蛋白。但同时发现在对真核表

达的蛋白量相对较少,因此需要对收集到的蛋白上清液进行浓缩后再纯化。

镍柱亲和层析是常用的活性蛋白纯化方法,通常通过一步处理就能获得高纯度的蛋白质。本研究对表达蛋白纯化过程中的各部分流出液进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,发现在柱前浓缩流出液中无目的蛋白,说明目的蛋白被截留在超滤管中浓缩。Wash Buffer 洗液及不同浓度咪唑洗脱液中均含有目的蛋白,且随着咪唑浓度的升高目的蛋白的洗脱效率也逐渐升高。由于 Wash Buffer 中含有 60 mmol/L 咪唑,推测可能该浓度的咪唑对目的蛋白来说较高,需要进一步优化。当 Wash Buffer 中咪唑浓度降低到 30 mmol/L 时,目的蛋白流出显著减少。

Cifuentes 等<sup>[20]</sup>发现在不同的吸血节肢动物中, Antigen5 相关蛋白能够调节宿主的免疫系统,诱导机体产生炎症反应。Wang 等<sup>[21]</sup>研究发现,富含半胱氨酸的分泌蛋白可激活 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路调节机体发生炎症反应,从而诱导细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管黏附分子 (vascular adhesion molecule-1, VCAM-1) 及 E-选择素 (E-selection) 表达。Tadokoro 等<sup>[17]</sup>报道在蛇及七鳃鳗等唾液腺中的 Antigen5 家族蛋白可通过与  $\text{Cu}^{2+}$  相互作用抑制胶原诱导血小板聚集,从而减少炎症作用。因此,当富含半胱氨酸的分泌蛋白 Alb-AG5-3 作为外源蛋白作用于宿主是否会诱导机体产生炎症反应、调控蚊媒病毒复制以及该基因在唾液腺中又是如何被调控的需要进一步去探究。Alb-AG5-3 蛋白属于分泌蛋白,而 S2 细胞具有独特的蛋白质分泌调节能力<sup>[22]</sup>,因此,该蛋白在果蝇 S2 细胞中真核表达,能够保留该蛋白原有的生物学性质。同时,去内毒素试剂盒提取的真核质粒表达后具有特异性且对细胞无毒性作用。镍柱亲和层析纯化后获得单一的 Alb-AG5-3 蛋白,为该蛋白的功能研究奠定了基础。

#### 【参考文献】

- [1] Benelli G, Wilke ABB, Beier JC. *Aedes albopictus* (Asian Tiger Mosquito)[J]. Trends Parasitol, 2020, 36(11): 942-943.
- [2] 杨舒然, 刘起勇. 白纹伊蚊的全球分布及扩散趋势[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(1): 1-4.
- [3] 吴凡. 中国白纹伊蚊的分布和影响因素及登革热的风险评估研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2009.
- [4] 郑学礼. 我国蚊媒研究概况[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(2): 183-187.
- [5] Schneider BS, Higgs S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008, 102(5): 400-408.
- [6] Briant L, Despres P, Choumet V, et al. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses[J]. Virology, 2014, 464-465: 26-32.
- [7] Almeras LFA, Belghazi M, Bourdon S, et al. Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2010, 10(4): 391-402.
- [8] Belardin L, Camargo M, Intasqui P, et al. Cysteine-rich secretory protein 3; inflammation role in adult varicocoele[J]. Andrology, 2019, 7(1): 53-61.
- [9] Vicens A, Trevino CL. Positive Selection in the Evolution of Mammalian CRISPs[J]. J Mol Evol, 2018, 86(9): 635-645.
- [10] 丹彤, 黄文强, 白雪, 等. 富含半胱氨酸的分泌蛋白 (CRISPs) 在哺乳动物授精过程中的作用[J]. 生物学杂志, 2014, 31(3): 69-73.
- [11] King TP SM. Structure and biology of stinging insect venom allergens[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2000, 123(2): 99-106.
- [12] Bohle B, Zwolfer B, Fischer GF, et al. Characterization of the human T cell response to antigen 5 from *Vespa vulgaris* (Ves 5)[J]. Clin Exp Allergy, 2005, 35(3): 367-373.
- [13] 刘宇, 肖蓉, 杨东辉, 等. 富含半胱氨酸分泌蛋白生物学功能的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(3): 122-128.
- [14] 孙宇. 白纹伊蚊唾液腺蛋白质组学初步分析[D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2012.
- [15] Liu SN, Han Y, Zhou ZJ. Fusion expression of pedA gene to obtain biologically active pediocin PA-1 in *Escherichia coli* [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2011, 12(1): 65-71.
- [16] Hudson ABL, Orr CW. Effects of absence of saliva on blood feeding by mosquitoes[J]. Science, 1960: 1730-1731.
- [17] Tadokoro T, Modahl CM, Maenaka K, et al. Cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) From venomous snakes: an overview of the functional diversity in a large and underappreciated superfamily[J]. Toxins (Basel), 2020, 12(3): 175.
- [18] Zhang Q, Xu J, Zhou X, et al. CAP superfamily proteins from venomous animals: Who we are and what to do? [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 221: 691-702.
- [19] Sun P, Nie K, Zhu Y, et al. A mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 260.
- [20] Cifuentes L, Vosseler S, Blank S, et al. Identification of hymenoptera venom-allergic patients with negative specific IgE to venom extract by using recombinant allergens[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 133(3): 909-910.
- [21] Wang YL, Kuo JH, Lee SC, et al. Cobra CRISP functions as an inflammatory modulator via a novel  $\text{Zn}^{2+}$  and heparan sulfate-dependent transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules[J]. J Biol Chem, 2010, 285(48): 37872-37883.
- [22] Coker JA, Katis VL, Fairhead M, et al. FAS2FURIOUS: Moderate-throughput secreted expression of difficult recombinant proteins in *Drosophila* S2 cells[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 871933.

【收稿日期】 2023-03-27 【修回日期】 2023-06-09