

DOI:10.13350/j.cjpb.220312

• 论著 •

## 白纹伊蚊唾液源 34ku-1 基因的克隆表达及鉴定\*

陈素素<sup>1,2</sup>, 吴家红<sup>1,2</sup>, 程金芝<sup>1,2</sup>, 赵久刚<sup>3</sup>, 商正玲<sup>3</sup>, 聂映<sup>1,2</sup>, 牟荣<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学基础医学院人体寄生虫学教研室, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州医科大学现代病原生物学特色重点实验室; 3. 贵州医科大学基础医学院免疫学教研室)

**【摘要】** 目的 克隆表达白纹伊蚊唾液腺 34ku-1 蛋白(Aalb\_34 ku-1), 并制备鼠抗 34ku-1 多克隆抗体, 用于蚊唾液 34ku-1 蛋白的检测。 方法 根据白纹伊蚊罗马株(GenBank: AY826117. 1) 34ku 去除信号肽后的基因序列设计特异性引物, 采用 RT-PCR 技术从白纹伊蚊安顺株雌蚊体内扩增获得 34ku-1 基因。利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)、瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统(ExPASy)等对该蛋白进行生物信息学分析。将该基因构建到原核表达质粒 pET-32a(+ )中, 转染大肠埃希菌 BL21(DE3)后经异丙硫代-β-D 半乳糖苷(IPTG)诱导表达目的蛋白, SDS-PAGE 电泳分析表达结果。镍柱纯化 34ku-1 重组蛋白, 采用 Western blot 验证纯化蛋白的免疫反应性。用纯化的 34ku-1 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 制备免疫血清, 采用间接 ELISA 法检测血清抗体效价, 采用 Western blot 方法对抗体的特异性进行鉴定。收集雌蚊唾液, 采用 Western blot 方法用制备的多克隆抗体检测蚊唾液 34ku-1 蛋白。 结果 成功克隆获得 34ku-1 基因, 生物信息学分析该基因全长 888 bp, 编码 295 个氨基酸。编码蛋白的理论分子质量单位为 33.6 ku, 等电点为 5.54。重组质粒 pET-32a(+)-34ku-1 经 PCR、双酶切及测序验证构建正确。经 IPTG 诱导的 BL21 重组菌表达产物主要以包涵体形式存在。经亲和层析法获得高纯度的 34ku-1 重组蛋白, 浓度为 0.71 mg/mL。Western blot 显示重组蛋白可被抗 6-His tag 抗体识别, 制备的鼠抗 34ku-1 血清抗体效价为 1:625 000, 且特异性良好, 用 34ku-1 多克隆抗体 Western blot 可检测到蚊唾液中的 34ku-1 蛋白。 结论 成功克隆并表达了白纹伊蚊 34ku-1 原核蛋白, 制备了高效价、高特异性的鼠抗 34ku-1 多克隆抗体, 应用该抗体可检测到雌蚊唾液中的 34ku-1 蛋白。

**【关键词】** 白纹伊蚊; 唾液腺; 34ku-1 重组蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

**【中图分类号】** R384.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)03-0308-06\*\*\*

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Mar;17(3):308-313.]

Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of salivary protein 34ku-1 from *Aedes albopictus*

CHEN Su-su<sup>1,2</sup>, WU Jia-hong<sup>1,2</sup>, CHENG Jin-zhi<sup>3</sup>, ZHAO Jiu-gang<sup>3</sup>, SHANG Zheng-ling<sup>1,2</sup>, NIE Ying<sup>1,2</sup>, MOU Rong<sup>1,2</sup> (1. Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Characteristic and Key Laboratory of Modern Pathogenic Biology, Guizhou Medical University; 3. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University)

**【Abstract】** **Objective** To detect 34ku-1 protein in saliva of *Aedes albopictus*, 34ku-1 gene was cloned and expressed and the mouse anti-34ku-1 polyclonal antibody was prepared. **Methods** Specific primers were designed according to the 34ku-1 gene sequence of *Aedes albopictus* Roman strain (GenBank: AY826117. 1) after removing the signal peptide, and the 34ku-1 gene was amplified from female *Aedes albopictus* Anshun strain by RT-PCR. Bioinformatics analysis of the protein was performed by using the National Center for Biotechnology Information (NCBI), the Expert Protein Analysis System (ExPASy) of the Swiss Institute of Bioinformatics, etc. The gene was constructed into the prokaryotic expression plasmid pET-32a (+) and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). Then after induced by isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG), the 34ku-1 recombinant protein was identified by SDS-PAGE and purified by nickel column. The immunoreactivity of the purified protein was verified by Western blot. The mouse anti-34ku-1 polyclonal antibody was prepared by immunizing BALB/c mice with the purified 34ku-1 recombinant protein, the antibody titer was detected by indirect ELISA and the specificity of the antibody was identified by Western blot. 34ku-1 protein in saliva of *Aedes albopictus* was detected by western blot. **Results** The 34ku-1 gene was successfully cloned. The full length of 34ku-1 was 888 bp, encoding a protein of 295 amino acids, with a theoretical molecular weight of 33.6 and PI of 5.54. The prokaryotic expression system of the recombinant plasmid PET32a (+)-34ku-1 was successfully constructed by PCR, double digestion and sequencing. The recombinant strain BL21 induced by IPTG mainly existed in the form of inclusion body. The protein expressed

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81971972); 贵州医科大学博士启动基金项目(No. 院博合J字[2018]012号)。

\*\* **【通讯作者】** 牟荣, E-mail: mourong77@163.com

**【作者简介】** 陈素素(1996-), 女, 浙江温州人, 硕士研究生, 主要研究方向: 病媒生物防控与虫媒病。E-mail: 809027833@qq.com

using liquid nitrogen urea had a high purity and its concentration was about 0.71 mg/mL. Western blot showed that the recombinant protein could be recognized by anti-6-His Tag antibody. The titer of mouse anti-34ku-1 serum was at 1 : 625000. Western blot showed that the polyclonal antibody could detect 34ku-1 protein in mosquito saliva. **Conclusion** The 34ku-1 prokaryotic protein of *Aedes albopictus* was cloned and expressed successfully. Polyclonal antibody 34ku-1 with high titer and specificity was obtained and used to demonstrate the presence of 34ku-1 protein in the saliva of female mosquitoes.

**【Key words】** *Aedes albopictus*; Salivary gland; 34ku-1 recombinant protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)又称亚洲虎蚊,因其具有密度高,白天吸血等生态习性而成为一种重要的医学媒介昆虫。在我国,该蚊是传播登革热及登革出血热的一类重要媒介<sup>[1]</sup>。在传播登革病毒(Dengue virus, DENV)过程中,其唾液是与病毒一起进入机体的。研究显示,蚊唾液组分有抑制血小板凝集<sup>[2]</sup>、舒张血管、抗炎、免疫调控<sup>[3-4]</sup>等多种生物学活性,在蚊虫吸血与传播疾病过程中<sup>[5]</sup>发挥重要作用。组学研究表明,蚊唾液组分蛋白大约由70~100个多肽或蛋白质组成<sup>[6]</sup>,这些蛋白或多肽在蚊虫吸血与传病中的作用尚不清楚。Cantillo等<sup>[7]</sup>采用Western blotting方法对10种蚊虫唾液组分中变应原的分析显示,白纹伊蚊唾液组分中变应原蛋白达16种,其中50%的蛋白分子质量在30~37 ku之间,表明这个分子质量范围的唾液蛋白在蚊虫吸血致敏中具有重要作用。

34ku蛋白属于34ku蛋白家族,是一组在伊蚊雌蚊唾液腺特异性高表达的蛋白,因其是一组功能未知,蛋白电泳大小在34ku左右的蛋白而被命名<sup>[5-8]</sup>。Ribeiro等<sup>[5]</sup>利用二维凝胶电泳在埃及伊蚊雌蚊唾液腺匀浆中发现该蛋白家族,其成员至少有3个基因(其中有2个互为等位基因)。随后,Ribeiro等<sup>[8]</sup>在白纹伊蚊雌蚊唾液腺cDNA文库中也筛选到34ku蛋白家族的两个成员,分别为34ku-1和34ku-2。马亚萍等<sup>[9]</sup>研究发现白纹伊蚊34ku-2重组蛋白可促进DENV2(MOI=0.1/1)在人角质形成细胞中增殖并促进感染细胞(MOI=1)凋亡,增强感染细胞表达IL-1 $\beta$ 炎症因子,调控IFN- $\alpha/\beta$ 的抗病毒反应。白纹伊蚊34ku-1是否有类似的生物学功能尚不清楚。本实验拟克隆和原核表达白纹伊蚊唾液腺34ku-1蛋白,制备抗34ku-1多克隆抗体,并对蚊唾液中的34ku-1蛋白进行检测,为该蛋白生物学活性及功能研究奠定基础。

## 材料与方 法

### 1 材料

**1.1 白纹伊蚊、实验动物、载体和宿主菌** 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,实验室饲养至成蚊)为本实验室饲养。蚊虫饲养条件:温度(26 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(75 $\pm$ 10)%,光照周期为14:10(L:D)。I~IV龄幼虫使用鸡肝粉饲养,

成蚊使用10%葡萄糖溶液喂食。BALB/c雌鼠,由贵州医科大学商正玲副教授提供。克隆载体PMD18-T,表达载体pET 32a(+),以及*E. coli* DH 5 $\alpha$ 和BL21(DE3)为本实验室保存。

**1.2 主要试剂** 逆转录试剂盒(PrimerScript RT Reagent Kit),限制性内切酶,BCA蛋白定量试剂盒,T4连接酶,Primer STARTM HS DNA Polymerase, DNA Marker, EcoR I和Kpn I限制性内切酶,以及Ex Taq酶均购自大连TaKaRa公司;彩虹180广谱蛋白Marker,十二烷基硫酸钠(SDS),考马斯亮蓝R-250及IPTG购于北京索莱宝科技有限公司;Ni-NAT His-Band Resin购于上海七海生物科技有限公司;His Band Purification Kit购于Novagen公司;Milli-Q超纯水仅为法国Millipore Pharmacia公司生产。PCR扩增仪为德国Eppendorf公司生产;紫外分光光度计为美国GE公司生产;凝胶成像系统IQant 400为美国Amersham Pharmacia公司生产;Allegera 64 R冷冻高速离心机为美国BECKMAN公司生产。

### 2 方法

**2.1 引物设计与合成** 根据白纹伊蚊罗马株34ku-1去除信号肽后的基因序列设计引物。上游引物34ku-1-F:5'-CAGCATATGCATCCTCTGCCAGAAGAAGCC-3';下游引物34ku-1-R:5'-CAGGAATTCTTATCCATAAGCTTTCGCGAT-3'。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

**2.2 白纹伊蚊34ku-1全长基因的克隆** 收集5日龄未吸血白纹伊蚊雌蚊,采用Trizol法提取总RNA,用1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计对RNA的纯度和浓度进行检测。将得到的RNA逆转录为cDNA,以此为模板,用设计的特异性Aalb\_34ku-1 F和34ku-1 R引物扩增34ku-1基因,PCR产物经胶回收后克隆入pMD18-T载体,将连接产物转化到*E. coli* DH5 $\alpha$ 克隆感受态细胞中,随机选取3个阳性克隆,摇菌12 h后进行PCR鉴定。

**2.3 生物信息学分析** 运用NCBI软件分析cDNA序列;运用Signal P 5.0分析信号肽;运用SMART分析coil;运用PredictProtein进行蛋白二级结构预测;运用ExPASy Proteomics Server(<http://cn.expasy.org/tools>)的相关软件分析蛋白的分子质量和等电点;

运用 MEGA 7.0 软件构建 34ku 蛋白系统发育树。

**2.4 重组原核表达质粒的构建及鉴定** 对鉴定正确的 PCR 产物行胶回收。提取 pMD18-T-34ku-1 和 pET-32a(+)质粒,用 KpnI 和 EcoRI 酶分别对上述质粒进行酶切,琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后与 pET-32a(+)载体经 T4-DNA 连接酶在 16 °C 的条件下进行过夜连接,连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞,加入含氨苄抗生素的 LB 培养基培养过夜。挑取单菌落提取质粒进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析、双酶切鉴定及测序鉴定。

**2.5 重组蛋白的诱导表达、纯化及鉴定** 将测序正确的重组质粒 pET-32a(+)-34ku-1 转化至 *E. coli* BL 21(DE3)中。挑取阳性单菌落,按 1 : 100 的比例接种于 LB 液体培养基中摇菌培养至对数生长期,加入 1 mmol/L IPTG,于 37 °C 以 220 r / min 诱导 5 h,SDS-PAGE 鉴定表达产物。离心收集菌体,按每克菌体加入 3~5 mL 的基础液重悬菌体,反复冻融 3 次后超声破碎(功率 160 w,工作 5 s,间隔 5 s,超声破碎 1 h),于 4 °C 以 12 000 r/min 离心 20 min。离心后取沉淀与上清分别进行 SDS-PAGE 电泳,鉴定判断诱导蛋白的表达。使用 8 mol/L 尿素对重组蛋白进行变性、复性。用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤杂蛋白,经镍柱纯化,250 mmol/L 咪唑洗脱,再将纯化蛋白用 PBS 透析。纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,250 mA 转膜 90 min,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,PBST 洗 3 次;加入一抗 (His-Tag, 1 : 2000 稀释)孵育 1 h,PBST 洗 3 次;加入二抗(辣根酶标记羊抗鼠-HRP, 1 : 5000)孵育 1 h,洗涤后进行 ECL 曝光。

**2.6 多克隆抗体的制备、鉴定及效价检测** 选取 BALB/c 小鼠进行免疫。第一次免疫:取 50  $\mu$ g 纯化的重组蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合,完全乳化后于四肢内侧及皮下多点注射。两周后进行第二次免疫:50  $\mu$ g 蛋白与弗氏不完全佐剂等体积混合,于背部皮下多点注射。第 3、4 次免疫同二次免疫,间隔时间为 2 周。末次免疫结束后一周摘眼球取血,分离血清,采用间接 ELISA 法检测抗体效价(A<sub>450</sub> 值)。

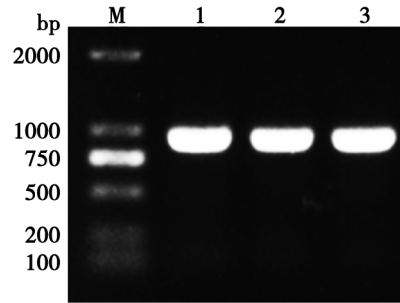
**2.7 蚊唾液 34ku-1 蛋白检测** 未吸血白纹伊蚊雌蚊糖剥夺 12 h 后,过夜收集雌蚊唾液,经 12% SDS-PAGE 电泳后转膜,以抗 34 ku-1 多克隆抗体(1 : 5000)及阴性血清为一抗,以辣根酶标记羊抗鼠-HRP (1 : 5000)为二抗进行 Western blot。

## 结 果

### 1 白纹伊蚊 34ku-1 基因克隆

白纹伊蚊安顺株雌蚊用 Trizol 法提取 RNA,测定浓度为 196.7 ng/ $\mu$ L,A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值为 1.94。以白纹伊

蚊雌蚊 RNA 逆转录为 cDNA 后作为模板,使用特异引物进行 RT-PCR 扩增,所得产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定大小约为 888 bp,与预期相符(图 1)。



M DNA 标志物(DL2000) 1~3 白纹伊蚊 34ku-1 基因 PCR 扩增片段

图 1 PCR 扩增 Aalb\_34ku-1 基因电泳图

M DNA marker(DL2000) 1-3 Amplified gene fragment of Aalb\_34ku-1

Fig. 1 Electrophoresis of the PCR product of Aalb\_34ku-1 gene

### 2 序列分析

运用 BLAST 将白纹伊蚊安顺株与 NCBI 罗马株 34 ku-1 基因序列进行比对分析,相似性为 97.97% (图 2)。测序分析显示有 6 处氨基酸发生改变:第 27 位由丝氨酸(S)突变为精氨酸(R),第 44 位由脯氨酸(P)突变为丝氨酸(S),第 75 位由丝氨酸(S)突变为甘氨酸(G),第 138 位由缬氨酸(V)突变为谷氨酸(E),第 196 位由赖氨酸(K)突变为谷氨酸(E),第 272 位由丙氨酸(A)突变为谷氨酸(E)。

Anshun34ku-1	(1)	HPLPEEATSDAAIKCTLSEEDLSLKSAISSAASAKSSDGIILPNETLTA	50
Luoma 34ku-1	(1)	HPLPEEATSDAAIKCTLSEEDLSLKRAISSAASAKSSDGIILSNETLTA	50
Anshun34ku-1	(51)	CPILANFTEMLKTVATDMEVLKTSVSNAEVELLRESFEERLNEITKND	100
Luoma 34ku-1	(51)	CPILANFTEMLKTVATDMEVLKTSVSNAEVELLRESFEERLNEITKND	100
Anshun34ku-1	(101)	IFERQAGQETSKEGQVMEKINRLQLEMASLKEEIEQVTKKMYEDMAEYI	150
Luoma 34ku-1	(101)	IFERQAGQETSKEGQVMEKINRLQLEMASLKEEIEQVTKKMYEDMAEYI	150
Anshun34ku-1	(151)	FQRLKMNDDAIDSYAQIMEFKTMHDLFMKLLKTRRWLVWKMMLNYVQKDD	200
Luoma 34ku-1	(151)	FQRLKMNDDAIDSYAQIMEFKTMHDLFMKLLKTRRWLVWKMMLNYVQKDD	200
Anshun34ku-1	(201)	KVIGKWVLTVINQVTSLNRNKPDLEIGKDSLNLNLLCWTSTAKTVYGVAV	250
Luoma 34ku-1	(201)	KVIGKWVLTVINQVTSLNRNKPDLEIGKDSLNLNLLCWTSTAKTVYGVAV	250
Anshun34ku-1	(251)	QEDQKMFYLTLLYFPAEKGCCTACKDVMRILCSNTYPRSIKAYG	295
Luoma 34ku-1	(251)	QEDQKMFYLTLLYFPAEKGCCTACKDVMRILCSNTYPRSIKAYG	295

图 2 白纹伊蚊安顺株与白纹伊蚊罗马株 34 ku-1 氨基酸序列比对分析

Fig. 2 BLAST result between Anshun strain of *Aedes albopictus* and Roman strain 34ku-1 of *Aedes albopictus*

### 3 Aalb\_34ku-1 基因生物信息学分析

生物信息学分析显示,扩增获得的 Aalb\_34ku-1 去除信号肽后基因全长 888 bp,编码 295 个氨基酸,预测蛋白的理论分子质量单位为 33.6 ku,等电点为 5.54。Motifscan 分析显示该蛋白有 3 个糖基化位点,6 个 CK2 位点,2 个酰基化位点,7 个 PKC 位点及 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点。二级结构预测主要以  $\alpha$ -螺旋,随机线圈和延伸链为蛋白最大量的结构元件。SignalP 4.0 信号肽预测该蛋白 1-20 号氨基酸为信号肽,属于分泌性蛋白。SMART 分析显示在 77-148

bp 处有一个 coiled coil region。

#### 4 聚类分析

用 MEGA7.0 软件的 Neighbor-Joining 法将 BLASTp 获得的 12 条蚊虫 34ku 氨基酸序列构建聚类树,结果见图 3。白纹伊蚊、埃及伊蚊及库蚊形成 3 个独立的分支,其中白纹伊蚊 34ku-1 安顺株与罗马株聚在一起,白纹伊蚊 34ku-1 安顺株与埃及伊蚊 34ku-1 (GenBank:ABF18017.1)具有 75% 的同源性。

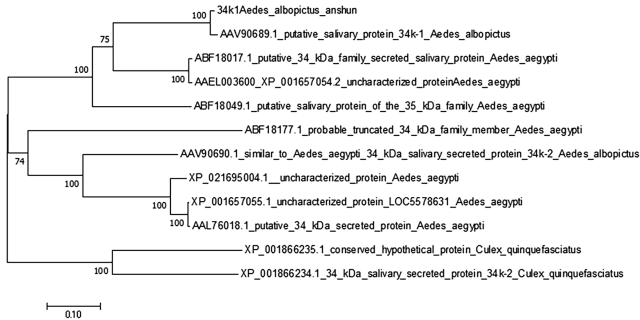
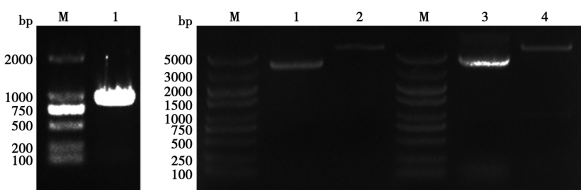


图 3 基于白纹伊蚊 34ku-1 氨基酸序列的聚类图  
Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on full-length amino acids sequence of Aalb\_34ku-1

#### 5 pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 重组表达质粒 PCR 及双酶切鉴定

目的基因片段经胶回收后构建到 pET-32a(+) 表达载体中,然后将重组质粒转入表达菌 BL21 中扩菌培养,提质粒进行 PCR 鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳显示(图 4A),重组质粒及重组表达菌为模板时扩增得到 888 bp 的目的片段。双酶切鉴定显示(图 4B),重组质粒中含有与预期大小一致的目的基因和载体片段。取阳性质粒进行双向测序,测序结果显示正确。pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 重组质粒构建成功。



A pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 重组表达质粒 PCR 鉴定 M DNA 标志物(DL 2000) 1 pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 重组质粒 B pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 重组表达质粒双酶切鉴定 M DNA 标志物(DL5000) 1 pET-32a(+)质粒 2 pET-32a(+)质粒 Kpn I+EcoR I 双酶切 3 pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 质粒 4 pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 质粒 Kpn I+EcoR I 双酶切

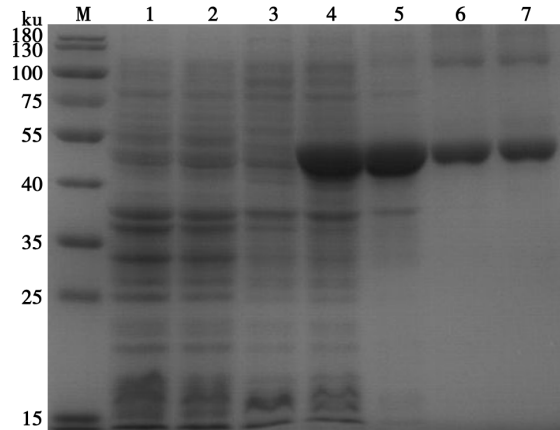
图 4 pET-32a(+)-34ku-1 重组质粒的 PCR 及双酶切鉴定

A Identification of pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 recombinant plasmid by PCR M DL2000 1 pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 Recombinant plasmid B Identification of pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 recombinant plasmid by restriction enzymes M DNA marker DL5000 1 Recombinant plasmid pET-32a(+) 2 Recombinant plasmid pET-32a(+) with Kpn I+EcoR I 3 Recombinant plasmid pET-32a(+) 4 Recombinant plasmid pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 with Kpn I+EcoR I

图 4 Identification of pET-32a(+)-Aalb\_34ku-1 recombinant plasmid by PCR and restriction enzymes

#### 6 Aalb\_34ku-1 重组蛋白的诱导表达及纯化

将阳性重组表达质粒导入表达菌 BL21(DE3)中,经终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 在 37 °C 诱导 5 h,收集菌体,超声破碎及纯化后进行 12% SDS-PAGE 电泳分析,重组蛋白主要存在于重组菌超声破碎沉淀中,镍柱亲和层析纯化后获得单一电泳条带的 50 ku 34ku-1 重组蛋白(图 5)。



M 彩虹 180 广谱蛋白标志物 1 pET-32a(+)-BL21 未诱导 2 pET-32a(+)-BL21 IPTG 诱导 5 h 3 诱导前重组菌总蛋白 4 诱导后重组菌总蛋白 5 诱导后重组菌超声破碎沉淀 6 复性后上清蛋白 7 纯化的重组蛋白

图 5 诱导表达的 Aalb\_34ku-1 重组蛋白 12% SDS-PAGE 分析

M Rainbow 180 broad-spectrum protein marker 1 pET-32a(+)-BL21 before induction 2 pET-32a(+)-BL21 after induction 3 The total proteins before induction 4 The total proteins after induction 5 precipitation after crushing 6 Supernatant after renaturation 7 Purified protein.

图 5 Identification of the Aalb\_34ku-1 recombinant protein by SDS-PAGE

#### 7 重组蛋白的反应原性和抗体的特异性及效价

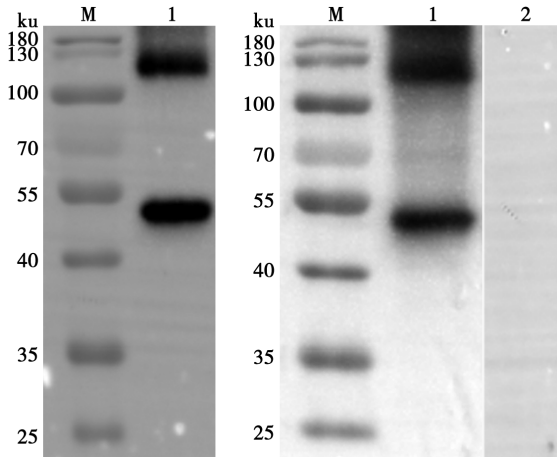
使用表达载体上的 His-Tag 标签抗体对所获取的纯化蛋白进行 Western blot,结果显示该蛋白能被相应抗体识别(图 6-A)。经 BCA 法(标准曲线公式: $y=0.0007x+0.1384, R^2=0.995$ )测得蛋白浓度为 0.71 mg/mL。用纯化的 Aalb\_34ku-1 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠,诱导产生的多克隆抗体能识别 Aalb\_34ku-1 蛋白,阴性血清对照无此反应条带(图 6-B)。采用间接 ELISA 检测免疫血清抗体效价为 1:625 000(表 1)。

表 1 抗 34ku-1 多克隆抗体效价

Table 1 Titer detection of anti-Aalb_34ku-1 polyclonal antibody			
稀释倍数 Diluted multiple	阴性血清 (A <sub>450</sub> 值) Negative serum	免疫血清 (A <sub>450</sub> 值) Immune serum	免疫血清/ 阴性血清比值 P/N Ratio
1:125000	0.063	2.924	46.40
1:625000	0.054	1.015	18.790
1:3120000	0.058	0.275	4.740
1:15600000	0.046	0.115	2.490
1:78000000	0.044	0.092	2.090

### 8 蚊唾液 34ku-1 蛋白检测

将过夜收集的白纹伊蚊唾液经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜,以抗 Aalb\_34ku-1 免疫小鼠血清(1 : 5000)为一抗进行 Western blot,检测到蚊唾液 34ku-1 蛋白,以阴性小鼠血清(1 : 5000)为一抗时无此反应条带(图 7)。

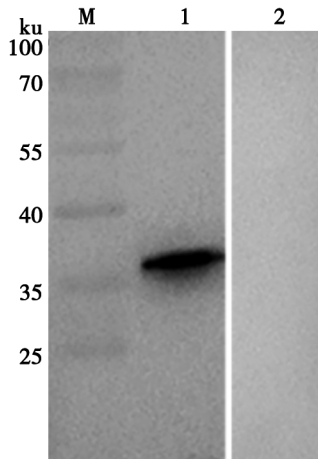


A 重组蛋白 Western blot M 彩虹 180 广谱蛋白标志物 1 重组蛋白与抗 His 标签抗体反应条带 B 多克隆抗体 Western blot M 彩虹 180 广谱蛋白标志物 1 抗 Aalb\_34ku-1 多克隆抗体(1 : 5000)与重组蛋白反应条带 2 阴性小鼠血清对照(1 : 5000)。

图 6 重组蛋白及多克隆抗体 Western blot 分析

A Western Blotting analysis of recombinant protein M Rainbow 180 broad-spectrum protein marker 1 Antibody against His tag B Western blotting analysis of polyclonal antibody M Rainbow 180 broad-spectrum protein marker 1 Reacted with mouse anti-Aalb\_34ku-1 immune serum(1 : 5000) 2 Reacted with preimmune mice serum(1 : 5000)。

Fig. 6 Western blot analysis of recombinant protein and polyclonal antibody



M 彩虹 180 广谱蛋白标志物 1 白纹伊蚊唾液 34ku-1 蛋白与抗 Aalb\_34ku-1 多克隆抗体(1 : 5000)反应条带 2 阴性小鼠血清对照(1 : 5000)

图 7 Western blot 检测白纹伊蚊唾液 34ku-1 蛋白

M Rainbow 180 broad-spectrum protein marker 1 Reacted with mouse anti-Aalb\_34ku-1 immune serum(1 : 5000) 2 Reacted with preimmune mouse serum(1 : 5000)

Fig. 7 Western blot determine the antiserum preparation of the *Aedes albopictus* saliva 34ku-1 protein

### 讨论

近年来,随着基因组学和蛋白质组学技术的高速发展,许多蚊虫唾液腺的 cDNA 文库已经构建完成,如白纹伊蚊<sup>[10]</sup>、埃及伊蚊<sup>[11]</sup> (*Asdes aegypti*)、冈比亚按蚊<sup>[12]</sup> (*Anopheles gambiae*)、致倦库蚊<sup>[13]</sup> (*Culex pipiens quinquefasciantus*) 等,使得大规模研究蚊唾液蛋白功能成为可能。蚊虫唾液腺分泌的唾液蛋白组分是一组具有抗凝、抗炎和免疫调控活性的蛋白复合物,尽管已陆续发现并证实了如 ADA、serpins、Aegyptin、D7 等<sup>[14-17]</sup> 唾液蛋白的生物学功能,但仍有大量唾液蛋白的生物学功能尚不清楚。

34 ku 蛋白家族是伊蚊属雌蚊唾液高表达蛋白,因此针对埃及伊蚊 34ku 蛋白肽的人 IgG 抗体已被用作埃及伊蚊叮咬暴露的生物标记<sup>[18-19]</sup>,随后被作为一种流行病学工具用于评估在基孔肯雅病毒和登革病毒传播地区针对伊蚊的病媒控制干预措施的有效性<sup>[20]</sup>。有研究发现埃及伊蚊 34ku-1 蛋白通过抑制 I 型 IFN 的表达从而减少抗菌肽产生,进而显著增强 DENV 在人皮肤角质形成细胞内的复制<sup>[18]</sup>。Sri-In 等<sup>[21]</sup> 报道埃及伊蚊 34ku-1 蛋白可促进 DENV2 在蚊唾液腺中复制并增强病毒向哺乳动物宿主传播。表明埃及伊蚊唾液源 34ku-1 具有生物学活性,并参与 DENV 对宿主的感染和传播。白纹伊蚊是我国登革热传播的重要媒介,在白纹伊蚊唾液腺 cDNA 文库中发现了与埃及伊蚊 34ku-1 同源的蛋白(75% 同源),因此推测白纹伊蚊同源 34ku-1 蛋白可能也参与登革病毒对宿主感染与传播。本研究采用 RT-PCR 技术从白纹伊蚊安顺株雌蚊中成功克隆并获得了 34ku-1 去信号肽编码基因,其全长为 888 bp,编码 295 个氨基酸。与 NCBI 中罗马株的序列相比,相似性为 97.97%,其中有六处核苷酸发生突变导致编码氨基酸改变,推测可能是同一基因在不同地理株的进化上存在序列多态性。李方站等<sup>[22]</sup> 的研究也出现类似情况。将扩增的 34ku-1 基因连接到表达载体 pET-32a(+) 上,转化到大肠埃希菌 BL21 (DE3) 后用 1mmol/L IPTG 37 °C、220 r / min 诱导 5 h 成功获得表达。pET-32a(+) 载体因在其 N-端有一个 14×10<sup>3</sup> 的 Trx-tag 标签,有助于提高蛋白的可溶性而被选择。然而获得的重组蛋白依旧以包涵体形式存在,推测尽管带有助溶标签,但由于原核表达的该蛋白过于大量和速度太快,最终只能以包涵体的形式存在<sup>[23]</sup>,降低表达温度和摇床速度仍然无法解决。包涵体经过变性、复性、纯化、透析后获得大量重组蛋白。将纯化的蛋白采用少量多次免疫的方法制备鼠抗 34ku-1 多克隆抗体,获得了高效且特异的鼠多克隆抗体,说明该重组蛋白具有良好的免疫原性。将

获得的多克隆抗体与体外收集的白纹伊蚊雌蚊唾液进行杂交,获得阳性信号,表明雌蚊唾液中有分泌性的34ku-1蛋白。白纹伊蚊34ku-1重组蛋白和多克隆抗体的获得为深入研究该蛋白在蚊虫吸血传病中的作用奠定了基础。

#### 【参考文献】

- [1] 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.
- [2] 吴家红.蚊虫唾液组分的抗凝血活性及其对宿主的免疫调控作用[J].中国媒介生物学及控制杂志,2008,19(5):481-483.
- [3] Cox J, Mota J, Sukupolvi-Petty S, et al. Mosquito bite delivery of dengue virus enhances immunogenicity and pathogenesis in humanized mice[J]. J Virol, 2012, 86(14):7637-7649.
- [4] Wanasen N, Nussenzveig RH, Champagne DE, et al. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*[J]. Med Vet Entomol, 2004, 18(2):191-199.
- [5] Conway MJ, Watson AM, Colpitts TM, et al. Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host[J]. J Virol, 2014, 88(1):164-175.
- [6] Peng ZK, Li H, Simons FES. Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens[J]. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101(4 Pt 1):498-505.
- [7] Cantillo JF, Fernandez-Caldas E, Puerta L. Immunological aspects of the immune response induced by mosquito allergens[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2014, 165(4):271-282.
- [8] Arca B, Lombardo F, Francischetti IM, et al. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2007, 37(2):107-127.
- [9] 马亚萍.白纹伊蚊唾液34K2重组蛋白在DENV2感染人角质形成细胞中的生物学功能初探[D].贵阳:贵州医科大学,2017.
- [10] Futahashi R, Sato J, Meng Y, et al. yellow and ebony are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori*[J]. Genetics, 2008, 180(4):1995-2005.
- [11] Claycomb JM, Benasutti M, Bosco G, et al. Gene amplification as a developmental strategy: isolation of two developmental amplicons in *Drosophila*[J]. Dev Cell, 2004, 6(1):145-155.
- [12] Patricia JW, Kathy V, Sean BC. Evolution of yellow gene regulation and pigmentation in *Drosophila*[J]. Curr Biol, 2002, 12(18):1547-1556.
- [13] Wittkopp PJ, True JR, Carroll S B. Reciprocal functions of the *Drosophila* yellow and ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns[J]. Development, 2002, 129(8):1849-1858.
- [14] Yogiara, Kim D, Hwang JK, et al. *Escherichia coli* ASKA clone library harboring tRNA-specific adenosine deaminase (tadA) reveals resistance towards Xanthorhizol[J]. Molecules, 2015, 20(9):16290-16305.
- [15] Wu JH, Cheng JZ, Chen L, et al. Expression of the genes of adenosine deaminase, C-lectin and serpin in the salivary gland of *Aedes albopictus*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2010, 28(3):190-193.
- [16] Calvo E, Tokumasu F, Marinotti O, et al. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin alpha2beta1, and von Willebrand factor[J]. J Biol Chem, 2007, 282(37):26928-26938.
- [17] Conway MJ, Londono-Renteria B, Troupin A, et al. *Aedes aegypti* D7 saliva protein inhibits Dengue virus infection[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(9):e0004941.
- [18] Surasombatpattana P, Ekchariyawat P, Hamel R, et al. *Aedes aegypti* saliva contains a prominent 34-kDa protein that strongly enhances dengue virus replication in human keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(1):281-284.
- [19] Elanga Ndille E, Doucoure S, Damien G, et al. First attempt to validate human IgG antibody response to Nterm-34kDa salivary peptide as biomarker for evaluating exposure to *Aedes aegypti* bites[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(11):e1905.
- [20] Ndille EE, Dubot-Peres A, Doucoure S, et al. Human IgG antibody response to *Aedes aegypti* Nterm-34 kDa salivary peptide as an indicator to identify areas at high risk for dengue transmission: a retrospective study in urban settings of Vientiane city, Lao PDR[J]. Trop Med Int Health, 2014, 19(5):576-580.
- [21] Sri-In C, Weng SC, Chen WY, et al. A salivary protein of *Aedes aegypti* promotes dengue-2 virus replication and transmission[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2019, 1(10):1-9.
- [22] 李方站,程金芝,王涛,等.白纹伊蚊唾液腺34ku-2基因克隆与原核表达[J].中国病原生物学杂志,2015,10(2):165-169.
- [23] 张磊,唐永凯,李红霞,等.促进原核表达蛋白可溶性的研究进展[J].中国生物工程杂志,2021,41(2):138-149.

【收稿日期】 2021-11-17 【修回日期】 2022-01-09