

· 论 著 ·

IRE- BP 1 基因在三种淡色库蚊体内表达量的比较分析

谭文彬^{1*}, 王霄¹, 袁常秀², 张凤霞², 刘建刚², 路海¹, 亚白柳¹, 刘永春¹, 李士根¹, 郭永和¹

摘要: 目的 进行不同品系淡色库蚊铁离子应答元件结合蛋白 1 基因表达量的分析。方法 据二维电泳获得肽段序列设计引物扩增基因片段, 荧光定量 PCR 检测在淡色库蚊抗性品系、敏感品系、现场采集品系蚊体内的表达水平差异。结果 成功扩增淡色库蚊铁离子应答元件结合蛋白 1 基因片段, 荧光定量 PCR 表明该基因在抗性品系蚊体内的表达量是敏感品系的 8.22 倍, 现场品系是敏感品系的 5.17 倍。结论 淡色库蚊铁离子应答元件结合蛋白 1 基因可做新的抗性检测及治理基因靶标。

关键词: 淡色库蚊; 铁离子应答元件结合蛋白 1; 荧光定量 PCR

中图分类号 R381.4 文献标识码 A 文章编号 :1009- 9727(2012)4- 421- 03

Comparison of expression level of IRE- BP 1 gene in 3 *Culex pipiens pallens* strains. TAN Wen-bin, WANG Xiao, YUAN Chang-xiu et al. (1. Jining Medical University, Jining 272067, Shandong P. R. China; Corresponding author: TAN Wen-bin, E-mail: 1392144@163.com)

Abstract Objective To compare the expression level of IRE- BP 1 gene in different *Culex pipiens pallens* stains. Methods Degenerate primers were designed on the basis of two-dimensional gel electrophoresis peptide fragment sequence, fluorescence quantitative PCR detect the expression level difference between resistant strain, sensitive strain and local strain of *Culex pipiens pallens*. Results The IRE- BP 1 gene of *Culex pipiens pallens* was cloned successfully. FQ-PCR proved the IRE- BP 1 gene expression level of resistant strain is 10.51 times higher than that of sensitive strain, while the expression level of local strain is 5.22 times higher than that of sensitive strain. Conclusion *Culex pipiens pallens* IRE- BP 1 gene can be used as a new gene target for resistance detection and treatment.

Key words: *Culex pipiens pallens*; IRE- BP 1; fluorescence quantitative PCR

杀虫剂的连续、大量使用导致了蚊媒抗药性的发生和发展^[1,2], 抗药性基因的分离与鉴定一直是媒介生物防治研究的热点。经溴氰菊酯抗性品系及敏感品系淡色库蚊二维电泳、分离并鉴定 14 个抗性品系高表达蛋白的肽段序列, 其中之一与铁离子应答元件结合蛋白 1 (IRE- BP 1) 基因高度同源^[3]。目前, 关于 IRE- BP 1 与蚊虫对杀虫剂抗药性的报道尚属空白, 故设计本实验予以探讨二者的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试蚊虫 淡色库蚊敏感品系已传 60 余代, 龄幼虫对溴氰菊酯 LC_{50} 为 0.04mg/L; 抗性品系由溴氰菊酯逐代汰选而成, LC_{50} 为 7.5mg/L, 现场淡色库蚊采自微山湖区, LC_{50} 为 3.9mg/L。

1.1.2 试剂 realtime-PCR、DNA marker、Taq 聚合酶购自 TaKaRa 公司, RNA 提取、凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, Rotor Gene 3000 Realtime PCR 仪购自

美国 Orbett Research 公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 RT-PCR 分别取 25mg 左右溴氰菊酯抗性品系淡色库蚊 龄幼虫, 加液氮研为粉末后匀浆, Trizol 提取总 RNA。合成 cDNA 第 1 链; PCR 扩增, 上游引物 5' - ttaggaacggctgaactagtgtgag-3', 下游引物 5' - ctatcggtattgcga tcgatcga -3'。94℃5min; 94℃1min、55℃1min、72℃1min, 32 循环, 72℃10min 终止反应。PCR 产物电泳后紫外线下观察。

1.2.3 目的基因的纯化、测序及序列分析 PCR 产物切胶回收, 纯化, 连接克隆载体, 转化感受态大肠埃希菌, 扩大培养后抽提质粒, 酶切鉴定送测序。序列比对 pubmed 核酸和蛋白数据库, Clustalw 软件聚类分析。

1.2.4 定量 PCR 据测序结果设计引物, 上游: 5' - A TACTGCACCCACTTA', 下游: 5' - GGACGTAGTTT CTTGAT-3'。内参 β -actin 上游 5' - AGCGTGTCTGTC TCITG-3', 下游 5' - ACTCTAGTATCCGC TGA-3'。

基金项目: 山东省教育厅课题 (No.J09LF04), 济宁市科委课题 (2009), 济宁市优秀中青年科研创新资金计划项目 (2010), 山东省自然科学基金 (No.ZR2011HL004)

作者单位: 1. 济宁医学院病原生物学教研室, 山东 济宁 272033; 2. 济宁市人民医院, 山东 济宁 272011

作者简介: 谭文彬 (1975~), 男, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 病原生物学。

* 通讯作者 E-mail: 1392144@163.com

2 结果

2.1 总 RNA 提取 见图 1。

2.2 DNA 扩增 获得的 PCR 产物长度为 489bp(图 2)。

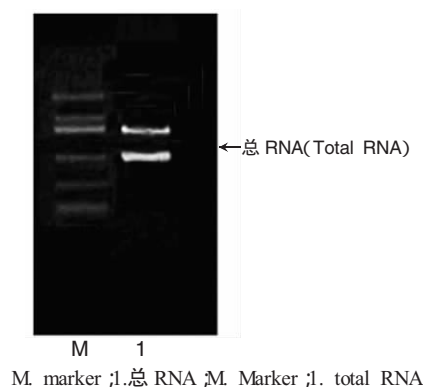
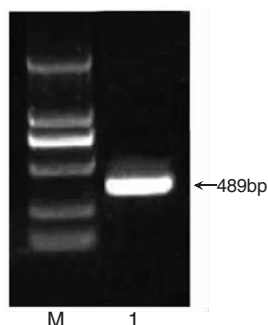


图 1 总 RNA 提取

Fig 1 Total RNA extraction



M. marker ;1. 扩增 DNA 片段 ;M. Marker ;1. amplified DNA fragment

图 2 PCR 扩增 DNA 片段 Figure

2 PCR amplified DNA fragment

2.3 聚类分析 比对数据库发现, 该基因片段与致倦库蚊同源性最高, 为 94%; 与埃及伊蚊同源性为 85%(图 3)。

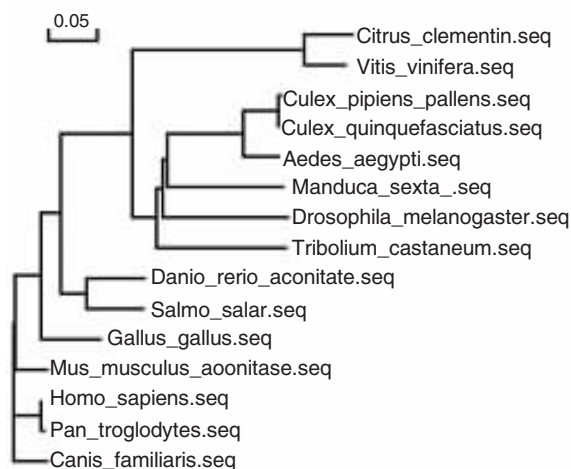
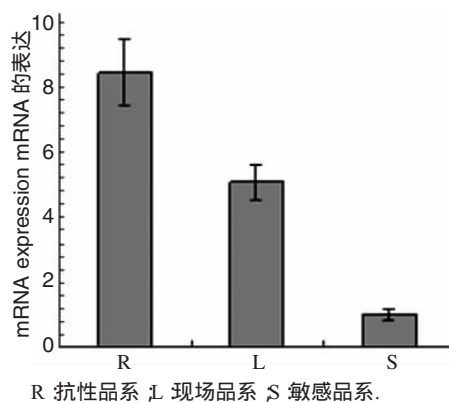


图 3 不同物种 IRE-BP 1 基因序列聚类分析

Fig 3 Sequence cluster analysis of different species of IRE-BP 1 gene

2.4 荧光定量 PCR 计算结果显示, IRE-BP 1 基因

在抗性品系中的表达量是敏感品系的 8.22 倍, 在现场品系中的表达量是敏感品系的 5.17 倍(图 4)。



R 抗性品系 L 现场品系 S 敏感品系.

R resistant strain L field strain S sensitive strain.

图 4 荧光定量 PCR 结果

Fig 4 The result of fluorescence quantitative PCR

3 讨论

系统进化树结果表明, 淡色库蚊 IRE-BP 1 基因与同属蚊科的致倦库蚊、埃及伊蚊的同源性最高, 与脊椎动物的基因同源性较低, 与传统分类地位相吻合。经比对数据库证实, 所扩增片段为 IRE-BP 1 蛋白基因序列。荧光定量 PCR 证明 IRE-BP 1 蛋白基因在抗性品系淡色库蚊表达量显著高于敏感品系, 现场品系也高于敏感品系, 说明该基因在蚊对杀虫剂产生抗药性的机制中有一定的作用。

作为动物生长发育及生殖的重要成分, 微量元素能直接或间接的调控多种编码基因的表达^[4], 例如锌离子可作为金属酶的辅助因子参与基因表达, 锌指结构可作为维持特殊构型的结构物质参与基因调控等^[5]。mRNA 往往是通过其结构元件与相应蛋白分子的相互作用而实现调控作用。铁蛋白和红细胞的 5-氨基乙酰丙酸合成酶 mRNA 的翻译受铁离子影响, 铁的营养状况可影响 5-氨基乙酰丙酸合成酶 mRNA 的稳定性以及铁蛋白 mRNA 的翻译速度。

铁离子应答元件结合蛋白 1(IRE-BP 1)是分子量 98kDa 的蛋白质^[6], 化学本质是脱辅基的顺乌头酸酶, 在线粒体中可催化柠檬酸转变为异柠檬酸。IREBP 的构型和功能由所结合的[Fe-S]簇中 Fe 含量决定。当细胞内铁耗竭时, IREBP 结合铁蛋白 mRNA 5'非翻译区 IRE, 形成有效抑制转录子翻译起始的高度稳定的茎环结构, 使原来为翻译正调元件的区域变为翻译负调元件。同时, IREBP 结合转铁蛋白受体 mRNA 3'端 IREBP, 增加其转录子的稳定性, 减缓 mRNA 的降解^[7,8]。目前国内外未见 IRE-BP 1 蛋白与肿瘤细胞抗药性相关的报道。本实验结 (下转第 426 页)

附作用,可使耐药细胞恢复对药物敏感性。

As₂O₃ 具有诱导肿瘤细胞分化、凋亡及细胞毒等作用,用于治疗急性早幼粒细胞白血病取得了突出的疗效,使急性早幼粒细胞白血病可以获得治愈。说明 As₂O₃ 可以靶向清除急性早幼粒细胞白血病患者体内的 LSCs,从而避免化疗后复发。还有学者提出 As₂O₃ 可通过降低 PML 基因而靶向清除 CML 的 LSCs^[9]。但在其他类型的白血病中,尚不明确 As₂O₃ 是否有协同清除 LSCs 的作用。

我们用分化程度低的 KG1a 细胞与骨髓基质细胞共培养模拟体外造血微环境。研究发现,来源白血病患者和正常人的骨髓基质细胞均可上调 KG1a 细胞 CD44 及 CD49d 的表达,这种上调作用不随时间的延长而增加;不同浓度 As₂O₃ 作用该共培养体系中,可明显下调 KG1a 细胞 CD44 和 CD49d 的表达率,并且表现时间剂量依赖性。

该研究为 As₂O₃ 加入其他化疗方案中,可能通过下调 LSCs 表面粘附分子,使更多白血病干细胞从 niche 中游离,提高常规化疗药物对白血病的治疗效果,减少化疗后白血病复发,提供了一定的实验基础。

参考文献:

- [1] Ten C B, de Bruyn M, Wei Y et al. Targeted elimination of leukemia stem cells; a new therapeutic approach in hemato-oncology[J]. Curr Drug Targets 2010, 11(1): 95-110.

- [2] Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I et al. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth[J]. Leukemia 2007, 21(2): 304-310.
- [3] Konopleva M Y, Jordan C T. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting [J]. J Clin Oncol 2011, 29(5): 591-599.
- [4] Timeus F, Crescenzo N, Basso G et al. Cell adhesion molecule expression in cord blood CD34+ cells[J]. Stem Cells 1998, 16(2): 120-126.
- [5] Li ZX, Jia XH, Li JC et al. Effects of bone marrow stromal cells and VLA-4 antibody on apoptosis of childhood leukemia cells [J]. Chinese Journal Of Contemporary Pediatrics 2010, 12 (11): 897-901. (In Chinese)
- (李仲霞, 贾秀红, 李建厂, 等. 骨髓基质细胞及 VLA-4 抗体对儿童白血病细胞凋亡影响的研究 [J]. 中国当代儿科杂志 2010, 12 (11): 897-901.)
- [6] Jin L, Hope K J, Zhai Q et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells [J]. Nat Med 2006, 12(10): 1167-1174.
- [7] Dias S, Choy M, Alitalo K et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4(VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival and resistance to chemotherapy [J]. Blood 2002, 99(6): 2179-2184.
- [8] Matsunaga T, Fukai F, Miura S et al. Combination therapy of an anticancer drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia[J]. Leukemia 2008, 22(2): 353-360.
- [9] Ito K, Bernardi R, Morotti A et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells [J]. Nature 2008, 453(7198): 1072-1078.

收稿日期 2012-03-03 编辑 符式刚

(上接第 422 页)

果提示铁离子应答元件结合蛋白 1 基因在淡色库蚊对杀虫剂产生抗性的机制中存在一定作用,可作为新的耐药性治理备选基因及耐药性检测靶标,为昆虫抗药性机理研究及抗药性的分子检测提供了新的研究方向。

参考文献:

- [1] Nauen R. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance[J]. Pest Manag Sci 2007, 63(7): 628-633.
- [2] Coelho S. Agriculture. European pesticide rules promote resistance, researchers warn[J]. Science 2009 Jan 23, 323(5913): 450.
- [3] Zhou M. the molecular mechanism progress of ferritin and transferrin receptor expression and regulation [J]. Foreign Medical Sciences (Blood transfusion and Hematology). 2002, 2 (25): 173-176. (In Chinese)
- (周密. 铁蛋白与转铁蛋白受体表达调控的分子机制研究进展[J]. 国外医学(输血及血液学分册) 2002, (25)2: 173-176.)

- [4] Leipuviene R, Theil EC. The family of iron responsive RNA structures regulated by changes in cellular iron and oxygen [J]. Cell Mol Life Sci 2007, 64(22): 2945-2955.
- [5] Langelier MF, Servent KM, Rogers EE, Pascal JMVA. Third Zinc-binding Domain of Human Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 Coordinates DNA-dependent Enzyme Activation [J]. J Biol Chem, 2008, 283(7): 4105-4114.
- [6] Wang B, Xu YJ, Qian ZM. The new progress of iron and bone metabolism[J]. Chinese Journal of osteoporosis 2007, 13(10): 743-745. (In Chinese)
- (王冰, 徐又佳, 钱忠明. 铁与骨代谢研究的新进展[J]. 中国骨质疏松杂志 2007, 13(10): 743-745.)
- [7] Wang J, Chen G, Filebeen C et al. Insights on Regulation and Function of the Iron Regulatory Protein 1 (IRP1)[J]. Hemoglobin 2008, 32(1): 109-15.
- [8] Bulvik B, Grinberg L, Eliashar R et al. Iron, ferritin and proteins of the methionine-centered redox cycle in young and old rat hearts[J]. Mech Ageing Dev 2009, Mar, 130(3): 139-44.

收稿日期 2012-02-10 编辑 崔宜庆