

# 白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白基因的克隆及序列特征

郭秀霞,程鹏,刘丽娟,王海防,张崇星,王怀位,公茂庆

山东省寄生虫病防治研究所,山东第一医科大学(山东省医学科学院),山东省医药卫生媒介生物学重点实验室,  
山东 济宁 272033

**摘要:** **目的** 克隆白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白(UV-opsin)基因,分析该基因编码蛋白的序列特征,为研究视蛋白基因的生物学功能提供分子基础。**方法** 根据已报道蚊虫的UV-opsin的保守序列设计简并引物,通过反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增白纹伊蚊的UV-opsin基因,纯化PCR产物,经EcoR I酶和Xho I酶酶切,酶切产物连接至pET28a(+)载体构建原核表达质粒,阳性重组质粒经PCR鉴定后进行基因测序,利用Expasy、ProtParam、TmPred及ScanProsite等软件进行编码蛋白的结构特征分析及功能预测,利用Clustal X 1.81和MEGA 6.0软件进行序列同源性分析,构建系统进化树。**结果** 成功获得白纹伊蚊UV-opsin的cDNA序列。序列分析表明,该序列全长为1 146 bp(含终止密码子),编码381个氨基酸,理论蛋白相对分子质量为42 500,等电点为7.06。与白纹伊蚊(XP\_029730343)序列同源性为99.74%,与埃及伊蚊(ABF18478)序列同源性为96.85%。构建系统进化树发现不同属、不同目的昆虫为独立分支,伊蚊属与库蚊属聚成一簇,之后与按蚊属合并。该视蛋白具有7个跨膜拓扑结构,含有1个G蛋白偶联受体位点,4个N-豆蔻酰化位点、3个N-糖基化位点、1个酪氨酸激酶磷酸化位点、3个蛋白激酶C磷酸化位点以及2个酪氨酸激酶II磷酸化位点。该视蛋白含有保守的LRTPSN、DRY和QAKK基序,为视蛋白发挥重要作用的重要基序。**结论** 成功克隆获得了白纹伊蚊的UV-opsin序列,该序列具有典型的视蛋白结构特征,为进一步研究白纹伊蚊视蛋白的功能奠定了基础。

**关键词:** 白纹伊蚊; 紫外光敏感视蛋白; 基因克隆; 序列分析

中图分类号:R384.1;Q781 文献标识码:A 文章编号:1003-8280(2021)05-0553-07

DOI:10.11853/j.issn.1003.8280.2021.05.009

## Cloning and sequence features of ultraviolet sensitive opsin gene in *Aedes albopictus*

GUO Xiu-xia, CHENG Peng, LIU Li-juan, WANG Hai-fang, ZHANG Chong-xing, WANG Huai-wei, GONG Mao-qing  
Shandong Institute of Parasitic Diseases, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences,  
Shandong Province Key Laboratory of Health and Vector Biology, Jinan, Shandong 272033, China

Corresponding author: GONG Mao-qing, E-mail: maoqingg@yahoo.com

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81871685), Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2017YL004, ZR2020MC048) and the Innovation Project of Shandong Academy of Medical Sciences

**Abstract:** **Objective** To clone the ultraviolet sensitive opsin (UV-opsin) gene of *Aedes albopictus*, to characterize the sequences of UV-opsin gene and its encoded protein, and to provide a molecular basis for the study of its biological function. **Methods** The degenerate primers were designed according to the conserved sequences of the UV-opsin gene from mosquitoes, and the UV-opsin gene of *Ae. albopictus* was amplified by RT-PCR. The PCR product was purified and ligated into the pET28a(+) vectors with EcoR I digestion and Xho I to construct a prokaryotic expression plasmid. The positive recombinant plasmid was identified by PCR and sequenced. Structural features and function were analyzed and predicted using Expasy, ProtParam, TmPred, and ScanProsite. Sequence homology was analyzed by Clustal X 1.81 and a phylogenetic tree was constructed using MEGA 6.0 software. **Results** The cDNA sequence of *Ae. albopictus* UV-opsin was obtained, which was 1 146 bp in full length (including termination codon) and encoded 381 amino acid residues. The predicted molecular weight was 42 500 and the isoelectric point was 7.06. The homology was 99.74% with *Ae. albopictus* (XP\_029730343) and 96.85% with *Ae. aegypti* (ABF18478). The phylogenetic tree showed that insects from

基金项目:国家自然科学基金(81871685);山东省自然科学基金(ZR2017YL004, ZR2020MC048);山东省医学科学院医药卫生科技创新工程

作者简介:郭秀霞,女,硕士,助理研究员,主要从事病原生物学研究, E-mail: guoguoxia@163.com

通信作者:公茂庆, E-mail: maoqingg@yahoo.com

the same genera and orders clustered together. *Aedes* was clustered with the genus *Culex*, and then with *Anopheles*. This UV-opsin had 7 transmembrane topology domains, 1 G-protein-coupled receptor, 4 N-myristoylation sites, 3 N-glycosylation sites, 1 tyrosine kinase phosphorylation site, 3 protein kinase C phosphorylation sites, and 2 casein kinase II phosphorylation sites. The UV-opsin contained conserved motifs LRTPSN, DRY and QAKK, which were critical for its function. **Conclusion** The UV-opsin gene sequence of *Ae. albopictus* is cloned, which has the structural characteristics of opsins. The results provide a foundation for further research on the function of *Ae. albopictus* UV-opsin gene.

**Key words:** *Aedes albopictus*; Ultraviolet sensitive opsin; Gene cloning; Sequence analysis

蚊虫是重要的医学昆虫,不仅通过吸血骚扰人类,更是多种传染病的传播媒介。视觉是蚊虫感知周围视觉刺激,适应周围环境最重要的途径。研究发现,蚊虫在定位宿主进行吸血的过程中,是通过嗅觉和视觉的综合作用协调完成的<sup>[1]</sup>。蚊虫通过气味激发视觉反射,发现潜在宿主从而完成吸血过程。视觉在蚊虫吸血定位宿主、寻找配偶和栖息地、交配繁殖等有重要意义<sup>[2-3]</sup>。视蛋白是视觉系统中的重要蛋白分子,与发色团结合形成对特定光谱敏感的光色素。根据视蛋白所能感受的光谱范围,蚊虫的视蛋白主要分为 3 类,即长光波敏感视蛋白(long wavelength-sensitive opsin, LWS-opsin)、短光波敏感视蛋白(short wavelength-sensitive opsin, SWS-opsin)及紫外光敏感视蛋白(ultraviolet-sensitive opsin, UV-opsin)<sup>[4-6]</sup>。其中 UV-opsin 可能对于蚊虫的吸血行为、雌雄蚊的相互识别交配及信息传递等有重要作用<sup>[7-9]</sup>。白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)是我国常见的蚊种之一,攻击性强,能够传播多种病原体,是我国登革热的重要传播媒介<sup>[10]</sup>,对白纹伊蚊 UV-opsin 的研究有助于掌握蚊虫的视觉与吸血行为的关系,从而发现新的防治手段干扰蚊虫对宿主的吸血攻击。本研究通过提取白纹伊蚊雌蚊的核糖核酸,设计简并引物,进行反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR),克隆白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白基因的 cDNA 全长序列,对获得的基因序列及编码蛋白序列进行生物信息学分析,了解该蛋白的分子特征,为进一步研究白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白的生物学功能及视觉行为特征相关分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 蚊虫样本 白纹伊蚊(敏感种群)取自山东省疾病预防控制中心,在养蚊室内连续饲养。饲养条件为光照:黑暗=14 h:10 h,温度为 26~28 ℃,相对湿度为 75%~85%,用健康小白鼠饲喂来产卵传代。

1.1.2 试剂 RNeasy Mini Kit 和 Omniscript Reverse Transcription Kit 试剂盒购自 QIAGEN 公司;EcoR I 酶、Xho I 酶、DNA 连接试剂盒、DNA 分子质量标准(DL-2 000)和大肠埃希菌(*Escherichia coli*)感受态细

胞 DH5 $\alpha$  购自 TaKaRa 公司;pET28a(+)simple vector 购自 Novagen 公司;凝胶回收试剂盒和质粒小提取试剂盒购自 Axygen 公司;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 白纹伊蚊总 RNA 提取 取羽化后 3 d,生理状态良好,未经吸血和交配的白纹伊蚊成蚊雌蚊 10 只,在无 RNase 的匀浆器中,加入液氮后充分研磨。使用 RNeasy Mini Kit 按照说明书具体操作步骤提取白纹伊蚊总 RNA,测定 RNA 的吸光度(A)并计算 A260/A280 值及浓度。

1.2.2 反转录 以获得的总 RNA 为模板,使用 Omniscript Reverse Transcription Kit(购自 QIAGEN 公司),反转录合成 cDNA,实验同时设立无反转录酶的阴性对照。反应体系为:5 mmol/L dNTP Mix 2  $\mu$ l、10 $\times$ Buffer RT 2  $\mu$ l、Oligo(dT)<sub>15</sub> primer 2  $\mu$ l、10 U/ $\mu$ l RNase inhibitor 1  $\mu$ l、Omniscrypt Reverse Transcriptase 1  $\mu$ l、Total RNA 500 ng、RNase-free water 11  $\mu$ l。置于 37 ℃反应 60 min。

1.2.3 白纹伊蚊 UV-opsin 基因的克隆 根据 GeneBank 中收录的埃及伊蚊(*Ae. aegypti*)和白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白核苷酸序列设计简并引物,正向引物:5'-CGGAATTCATGCCTTTCSWAGAG-CATCTGA-3';反向引物:5'-TGCTCGAGTTAAGAA-GATYCTGGTGCCGA-3'。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 反应,反应体系为:模板 cDNA 1  $\mu$ l、正反向引物各 1  $\mu$ l、10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ l、10 $\times$ LA PCR Buffer 5  $\mu$ l、LA Taq 聚合酶 0.5  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 40.5  $\mu$ l。反应条件:94 ℃ 预热 3 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min 20 s,扩增 30 个循环;72 ℃ 5 min 延伸后产物在 4 ℃保存。取 2  $\mu$ l PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,观察目的条带。

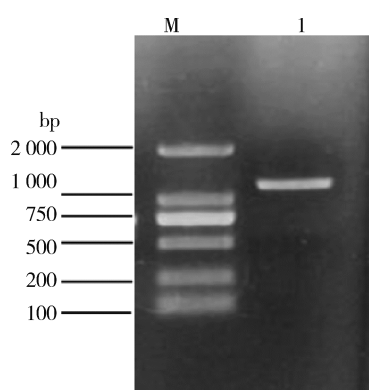
1.2.4 重组载体的构建及测序 对获得的目的片段进行凝胶回收纯化,用 EcoR I 和 Xho I 酶对目的片段和 pET28a(+)simple vector 进行双酶切,反应体系如下:10 $\times$ H Buffer 5  $\mu$ l、pET28a(+)simple vector 或目的片段 10  $\mu$ l、15 U/ $\mu$ l EcoR I 1  $\mu$ l、10 U/ $\mu$ l Xho I 1  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 33  $\mu$ l,37 ℃反应 16 h 后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳并切胶回收。将回收的 PCR 产物片段与载体片段通过 DNA 连接试剂盒进行连接,取连接产

物 1  $\mu\text{l}$  转化至大肠埃希菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 涂布到含有卡那霉素 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 的 LB 固体培养平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 阳性菌落摇菌提取质粒后送 Invitrogen 公司进行测序。

**1.2.5 白纹伊蚊 UV-opsin 基因的序列分析** 将测序结果在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 网站上进行 BLAST 比对, 搜集 GenBank 中收录的伊蚊属、库蚊属、按蚊属及其他昆虫的视蛋白氨基酸序列, 通过 DNAMAN 9.0、Clustal X 1.81 和 MEGA 4.0 软件进行序列同源性比对并用邻接法绘制生物进化树。利用 ProtParam 分析该蛋白的分子质量及稳定性等特征; 通过 Tmpred 进行蛋白的跨膜区分析; 利用在线软件 ScanProsite 分析视蛋白的结构域和功能位点, 通过在线软件 SOPMA 进行氨基酸序列的二级结构预测, 利用 SWISSMODEL 和 Deepview 4.1.0 软件对该蛋白的三级结构进行预测。

## 2 结果

**2.1 白纹伊蚊 UV-opsin 全长 cDNA 的克隆及测序** 将扩增获得的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 发现在 1 000 bp 与 2 000 bp 之间有 1 条显著条带, 与理论分子质量大小相符 (图 1)。将基因回收产物与经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切线性化的 pET28a (+) 载体相连接, 转化至大肠埃希菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 阳性克隆质粒进行测序, 与预期结果相一致。



注: M 表示 DL 2 000 DNA marker; I 白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白 RT-PCR 扩增产物。

**图 1** 白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白 RT-PCR 产物电泳结果  
**Figure 1** Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products of UV-opsin from *Aedes albopictus*

**2.2 氨基酸序列分析及系统进化树的构建** 测序结果显示, 白纹伊蚊 UV-opsin 基因片段全长 1 146 bp (含终止密码子), 其中 G+C 含量为 50.10%, A+T 含量为 49.90%。该基因可编码的氨基酸为 381 个, 理论蛋白相对分子质量为 42 500, 理论等电点为 7.06。体外半衰期为 30 h, 不稳定系数为 39.85, 性质

稳定。正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 和负电荷氨基酸残基 (Asp+Glu) 各有 27 个, 总平均亲水性为 0.33, 脂肪系数为 93.46。将该序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对, 发现白纹伊蚊 UV 视蛋白与其他昆虫的 UV 视蛋白具有较高同源性, 利用 DANMan 9.0 软件进行比对, 与白纹伊蚊 (XP\_029730343) 相似性高达 99.74%, 与埃及伊蚊 (ABF18478) 相似性为 96.85%, 与致倦库蚊 (*Culex pipiens quinquefasciatus*) (XP\_001851157) 相似性为 92.65%, 与 GenBank 中收录的不同蚊种及其他昆虫的紫外光敏感视蛋白序列进行同源性序列比对, 使用邻接法绘制系统进化树并进行分析, 结果显示这几类昆虫位于不同的分支, 其中白纹伊蚊与埃及伊蚊合并为一个分支, 之后与致倦库蚊合并, 按蚊属的冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*) 与斯氏按蚊 (*An. stephensi*) 合并后再与白魔按蚊 (*An. albimanus*) 合并为一大分支, 属于鞘翅目的粒步甲 (*Carabus granulatus*) 与烟草甲 (*Lasioderma serricorne*) 合并, 白蜡窄吉丁 (*Agrilus planipennis*) 与赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) 合并, 属于膜翅目的意蜂 (*Apis mellifera*) 与美洲东部熊蜂 (*Bombus impatiens*) 合并为一个分支, 烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 为独立分支。双翅目、膜翅目、鞘翅目和鳞翅目的昆虫形成不同的分支。见图 2、3。

**2.3 白纹伊蚊 UV-opsin 蛋白功能的生物信息学分析** 对获得的视蛋白序列进行二级结构预测, 白纹伊蚊 UV 视蛋白的  $\alpha$  螺旋约占 41.73%, 延伸链约占 17.06%,  $\beta$  转角约占 3.41%, 随机卷曲结构约占 37.80% (图 4)。通过 Tmpred 蛋白跨膜区分析发现, 该视蛋白在第 56~80、92~113、123~144、169~189、217~239、282~303、315~338 氨基酸位具有 7 个跨膜拓扑结构, 其中跨膜区第 56~80、123~144、217~239、315~338 氨基酸位为由外向内, 其他 3 个跨膜区为由内向外。该蛋白包括 1 个 G 蛋白偶联受体家族, 利用 NCBI 在线网站对视觉基因编码的氨基酸序列保守区进行分析, 白纹伊蚊 UV 视蛋白与已知的视蛋白结构域吻合, 包括 7 次跨膜螺旋和 GPCRs 结构。利用在线分析软件 ScanProsite 对白纹伊蚊视蛋白功能位点进行分析, 发现白纹伊蚊 UV 视蛋白含有 1 个 G 蛋白偶联受体家族 (第 140~156 氨基酸位), 4 个 N-豆蔻酰化位点 (第 134~139、138~143、140~145、220~225 氨基酸位), 3 个 N-糖基化位点 (第 10~13、272~275、374~377 氨基酸位), 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (第 20~27 氨基酸位), 3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (第 82~84、85~87、263~265 氨基酸位) 以及 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (第 273~276、366~369 氨基酸位), 具有 6 种



白纹伊蚊	MPFLEHLSDNFTAVLRPEARLSAET...RYLGWNVAPEDPHIPEHWLKYPEPEASLHLLGLLYIAFTVFALVGNGLVI	77
埃及伊蚊	MPFEEHLSDNFTAVLRPEARLSAET...RYLGWNVAPEDPHIPEHWLKYPEPEASLHLLGLLYIAFTVFALVGNGLVI	77
致倦库蚊	MPFLEHLSDNFTAVLRPEARLSAET...RYLGWNVAPEDPHIPEHWLKYPEPEASLHLLGLLYIAFTVFALVGNGLVI	77
冈比亚按蚊	MGLVQ...IDNCT.AYRPEALICADQSGRLYLGWNVPEELVHIPEHWLOFPEPEASLHLLGLLYIAFTVFALVGNGLVI	77
斯氏按蚊	MGLVQ...IDNCT.AYRPEALICADQSGRLYLGWNVPEELVHIPEHWLOFPEPEASLHLLGLLYIAFTVFALVGNGLVI	77
白魔按蚊	MGLVLEHAIIDNCT.AYRPEALICADQSGRLYLGWNVPEELVHIPEHWLOFPEPEASLHLLGLLYIAFTVFALVGNGLVI	79
实验所得一致序列	MPFEEHLSDNFTAVLRPEARLSAET...RYLGWNVAPEDPHIPEHWLKYPEPEASLHLLGLLYIAFTVFALVGNGLVI	77
	m dn t rpea a rylgnwv pe l hipecwl pepeasl hllglllyiaft f lvgnglvi	
白纹伊蚊	WFESSAKSLRTPSNVFNLAICDFELMMVKTPIFIYNSFTKGFSTCFLGCQIFAFIGSLSGIGASATNACIAYDRYNTIA	157
埃及伊蚊	WFESSAKSLRTPSNVFNLAICDFELMMVKTPIFIYNSFTKGFSTCFLGCQIFAFIGSLSGIGAGATNACIAYDRYNTIA	157
致倦库蚊	WFESSAKSLRTPSNVFNLAICDFELMMVKTPIFIYNSFTKGFSTCFLGCQIFAFIGSLSGIGAGATNACIAYDRYNTIA	157
冈比亚按蚊	WFIFIAAKSLRTPSNVFNLAICDFELMMVKTPIFIYNSFTKGFSTCFLGCQIFAFIGSLSGIGAGATNACIAYDRYNTIT	157
斯氏按蚊	WFIFIAAKSLRTPSNVFNLAICDFELMMVKTPIFIYNSFTKGFSTCFLGCQIFAFIGSLSGIGAGATNACIAYDRYNTIT	157
白魔按蚊	WFIFIAAKSLRTPSNVFNLAICDFELMMVKTPIFIYNSFTKGFSTCFLGCQIFAFIGSLSGIGAGATNACIAYDRYNTIT	159
实验所得一致序列	WFESSAKSLRTPSNVFNLAICDFELMMVKTPIFIYNSFTKGFSTCFLGCQIFAFIGSLSGIGASATNACIAYDRYNTIA	157
	w f akslrtpsn f nla cdf mm ktpifiynsft g g gcq f f gsl giga atna iaydrynti	
白纹伊蚊	RFPECKLTHTKAIFITCMVWYATFPAWLPMEIHWGRFVPEGLTSCFTDYLNTFDNRMFVGTIFTFSYVLPMSLIITY	237
埃及伊蚊	RFPECKLTHTKAIFITCMVWYATFPAWLPMEIHWGRFVPEGLTSCFTDYLNTFDNRMFVGTIFTFSYVLPMSLIITY	237
致倦库蚊	RFPECKLTHTKAIFITCMVWYATFPAWLPMEIHWGRFVPEGLTSCFTDYLNTFDNRMFVGTIFTFSYVLPMSLIITY	237
冈比亚按蚊	RFPECKLTHTKAIFITCMVWYATFPAWLPMEIHWGRFVPEGLTSCFTDYLNTFDNRMFVGTIFTFSYVLPMSLIITY	237
斯氏按蚊	RFPECKLTHTKAIFITCMVWYATFPAWLPMEIHWGRFVPEGLTSCFTDYLNTFDNRMFVGTIFTFSYVLPMSLIITY	237
白魔按蚊	RFPECKLTHTKAIFITCMVWYATFPAWLPMEIHWGRFVPEGLTSCFTDYLNTFDNRMFVGTIFTFSYVLPMSLIITY	239
实验所得一致序列	RFPECKLTHTKAIFITCMVWYATFPAWLPMEIHWGRFVPEGLTSCFTDYLNTFDNRMFVGTIFTFSYVLPMSLIITY	237
	rpfeg lt tka c w yt pw lpl e wgr vpeg ltscftdyl tfd r fv iftfsyvlpmsli yy	
白纹伊蚊	YSQIVSHVNVNHEKALREQAKKMNVSLRSNQNANTSVETRIAKAAITVCFLEVASWTPYAVLALIGAFGDKTLTTPGVT	317
埃及伊蚊	YSQIVSHVNVNHEKALREQAKKMNVSLRSNQNANTSVETRIAKAAITVCFLEVASWTPYAVLALIGAFGDKTLTTPGVT	317
致倦库蚊	YSQIVSHVNVNHEKALREQAKKMNVSLRSNQNANTSVETRIAKAAITVCFLEVASWTPYAVLALIGAFGDKTLTTPGVT	317
冈比亚按蚊	YSQIVSHVNVNHEKALREQAKKMNVSLRSNQNANTSVETRIAKAAITVCFLEVASWTPYAVLALIGAFGDKTLTTPGVT	317
斯氏按蚊	YSQIVSHVNVNHEKALREQAKKMNVSLRSNQNANTSVETRIAKAAITVCFLEVASWTPYAVLALIGAFGDKTLTTPGVT	317
白魔按蚊	YSQIVSHVNVNHEKALREQAKKMNVSLRSNQNANTSVETRIAKAAITVCFLEVASWTPYAVLALIGAFGDKTLTTPGVT	319
实验所得一致序列	YSQIVSHVNVNHEKALREQAKKMNVSLRSNQNANTSVETRIAKAAITVCFLEVASWTPYAVLALIGAFGDKTLTTPGVT	317
	ys iv hvvnhek lr qakkmnv slrsnq sve riakaaitvcflvaswtpyavlaligafgdk lltpgvt	
白纹伊蚊	MFPACACKFVACLDPVVYAISHPRYRVELQKRLPWLAIETSLSDSASTATDATTANTSAPVS	380
埃及伊蚊	MFPACACKFVACLDPVVYAISHPRYRVELQKRLPWLAIETSLSDSASNTDATTANTSAPAS	380
致倦库蚊	MFPACACKFVACLDPVVYAISHPRYRVELQKRLPWLAIETSLSDTASTTTEATTNATASS	379
冈比亚按蚊	MFPACACKFVACLDPVVYAISHPRYRVELQKRLPWLAIETSLAEENASTCTEQQDGNATTQS	379
斯氏按蚊	MFPACACKFVACLDPVVYAISHPRYRVELQKRLPWLAIETSLAEENASTCTEQQDGNATTQS	379
白魔按蚊	MFPACACKFVACLDPVVYAISHPRYRVELQKRLPWLAIETSLBAETSTTCTEPEGOTAT....	378
实验所得一致序列	MFPACACKFVACLDPVVYAISHPRYRVELQKRLPWLAIETSLSDSASTATDATTANTSAPVS	380
	mfpacackfvacldpyvyaishpryr elqkrlpwlaites lps dsastat dattants apvs	

注:根据同源序列>50.00%进行蓝黑色、粉色和蓝色的级别上色,其中蓝黑色为高度保守区域(保守性 100%);粉色和蓝色为相似区域。

图 2 不同蚊种紫外光敏感视蛋白的序列比对

Figure 2 Sequence alignment of UV-opsin from different mosquito species

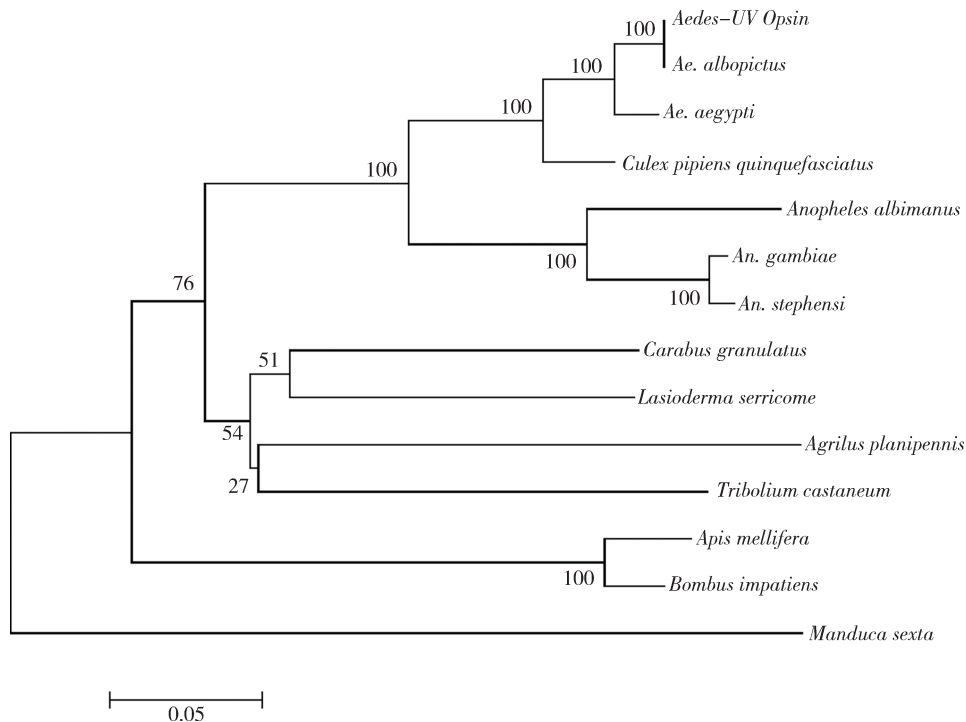


图 3 不同蚊种与多种昆虫的视蛋白生物进化分析

Figure 3 Phylogenetic tree of UV-opsin from different mosquito species and other insect species



图 4 白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白二级结构分析

Figure 4 Secondary structure analysis of UV-opsin of *Aedes albopictus*

不同模式(图 5)。该视蛋白含有昆虫视蛋白所具有的一些保守的基序,如 LRTPSN 基序(第 86~91 氨基酸位), DRY 基序(第 151~153 氨基酸位)和 QAKK 基序(第 255~258 氨基酸位),为视蛋白发挥作用的重要基序<sup>[11-12]</sup>。

应用 Swissmodel 对该蛋白进行结构建模,获得的三维结构如图 6 所示。该结构模型的构建基于模型 4ww3.1(2.80 Å)完成,序列一致性达到 35.11%,全局模型质量估计值为 0.60,定性模型能量分析值为 -3.45,运用拉马钱德兰图检测所模拟的结构模型具有合理性,符合 2 个二面角  $\phi$  和  $\psi$  分布的基本要求。见图 7。

### 3 讨论

视觉在动物体生命活动的很多方面有重要作用,比如搜寻食物、寻找配偶和栖息地,躲避天敌及不安全环境等,是感知周围生存环境及视觉刺激的最重要途径。昆虫对环境中视觉刺激的反应主要依靠于视蛋白,视蛋白与小分子的发色团共价结合,从而使昆虫对光线做出反应。发色团在光子的作用下发生光异构化,诱导视蛋白发生构象变化,并激活下游信号级联反应。大部分的视蛋白基因在光感受器中表达,发挥视觉功能,如觅食、寻找配偶和栖息地、躲避天敌等,也有少部分视蛋白在其他组织中表达,起到非视觉的功能,如生物节律和光周期调节<sup>[13-14]</sup>。视蛋白在进化中形成 3 个主要的家族:纤毛视蛋白,视杆视蛋白和 RGR/Go 视蛋白,昆虫中主要为视杆视蛋白,其中,紫外光敏感视蛋白的光谱敏感范围在雌性和雄性昆虫之间存在差异,对于雌性与雄性昆虫的相互识别、取食交配及信息传递等有重要的作用<sup>[7-9]</sup>。

本研究成功克隆得到白纹伊蚊紫外光敏感视蛋

白基因序列,序列分析显示,白纹伊蚊 UV 视蛋白基因的 cDNA 序列全长 1 146 bp,编码 381 个氨基酸,使用邻接法构建系统发育树,分析表明,白纹伊蚊 UV 视蛋白与其他蚊种的同源性较高,其中伊蚊属与库蚊属的同源性较高,不同蚊属合并为一大分支,蚊科所属的双翅目与鞘翅目昆虫形成的分支合并,不同目的昆虫为独立分支,可见 UV 视蛋白在不同的物种之间具有较高的保守性,在以后的工作中可以将该视蛋白基因作为亲缘关系鉴定及物种系统发育进化研究的靶基因<sup>[15]</sup>。

对白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白氨基酸序列分析发现,该序列具有视蛋白的典型结构,即包含 7 个跨膜拓扑结构和 1 个 G 蛋白偶联受体家族<sup>[16]</sup>。第 7 跨膜区 325 位的赖氨酸为视黄醛发色团结合的保守位点,该位点为视蛋白分子的重要特征,与视蛋白的紫外敏感性有关<sup>[17]</sup>,不同视蛋白所含有的赖氨酸位点位置不同,大部分赖氨酸位点位于视蛋白的第 7 个跨膜区内,以 Schiff 碱基的形式与视黄醛发色团结合<sup>[18-19]</sup>。该视蛋白具有昆虫视蛋白所具有的一些保守的基序,如细胞质膜的第 1 个环内的 LRTPSN 基序,在该视蛋白中为 LRTPSN(第 86~91 氨基酸位),该基序中的亮氨酸和天冬氨酸是视蛋白发挥功能所必需的氨基酸<sup>[11]</sup>。该视蛋白含有 1 个保守的 DRY(第 151~153 氨基酸位)基序和保守的 QAKK(第 255~258 氨基酸位)基序,DRY 基序与 QAKK 基序在视蛋白与 G-蛋白发生作用时发挥重要的作用,第 151~152 氨基酸位的 DR 与 G 蛋白偶联受体的活化作用有关<sup>[12]</sup>。

国内外对鳞翅目、膜翅目、鞘翅目等昆虫的视觉基因研究较多,而对双翅目蚊媒的视觉基因和视觉依赖行为机制的研究较少。蚊虫视蛋白是直接感受外界光环境的受体,对蚊虫的吸血定位、交配和繁殖

```

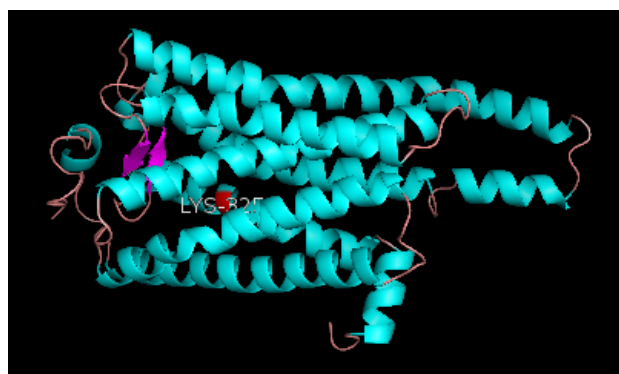
1      ATGCCTTTTGAAGAGCATCTGAGTGACAACCTTCACGGCTGTGCTTCGACCCGAGGCGCGGTTATCGGCCGAAACCCGCTACCTCGGATGG
1      M P F E E H L S D N F T A V L R P E A R L S A E T R Y L G W
91     AACGTGGCTCCCGAAGATCTGCCGCACATTCTGAGCACTGGCTCAAGTATCCGGAACCGAAGCCTCGCTACACTTTCTGCTCGGTTTG
31     N V A P E D L P H I P E H W L K Y P E P E A S L H F L L G L
181    CTGTACATCGCCTTTACGGTGTTCGCCCTGGTCGGAATGGGCTTGTCAATTGGGTGTTTTCTTCTGCCAAATCGCTGCGAACCCGCTCC
61     L Y I A F T V F A L V G N G L V I W V F S S A K S L R T P S
271    AACGTGTTTCGTCGTTAATCTAGCGGTTTTCGATTTCCTGATGATGGTTAAACGCCTATCTTCATCTACAATTCCTTCACCAAAGGCTTC
91     N V F V V N L A V C D F L M M V K T P I F I Y N S F T K G F
361    TCAACAGGTTTCTCGGGTGTCAAATTTTCGCCTTCATCGGGTCATTGTCTGGTATTGGTGCTAGCGCAACCAACGCATGCATTGCGTAC
121    S T G F L G C Q I F A F I G S L S G I G A S A T N A C I A Y
451    GACAGATAAATACCATCGCCGACCTTTCGAAGGAAACTTACCCATACAAAAGCCATCTTCATTACCTGCATGGTGTGGGCTACACT
151    D R Y N T I A R P F E G K L T H T K A I F I T C M V W A Y T
541    TTCCCTTGGGCCATCTTACCATTGATGGAATCTGGGACGCTTCGTACCTGAGGGTTACCTGACTTCATGCACCTTCGACTATCTGACC
181    F P W A I L P L M E I W G R F V P E G Y L T S C T F D Y L T
631    AACACATTCGACAATCGTATGTTTGGTACCATATTACATTACGCTACGTACTTCCGATGAGCCTGATTATCTATTACTACAGCCAA
211    N T F D N R M F V G T I F T F S Y V L P M S L I I Y Y Y S Q
721    ATCGTAAGTCATGTTGTAAATCAGAGAAGGCCCTACGCGAACAGGCCAAGAAATGAATGTAGATTTCATTCGCGATCGAACCACAAACCAA
241    I V S H V V N H E K A L R E Q A K K M N V D S L R S N Q N Q
811    GCCAACACTTCCGTTGAGGTGCGGATTGCCAAGGCCGCCATAACGGTCTGTTTCTGTTGCTGGCATCCTGGACGCCATATGCTGTGCTG
271    A N T S V E V R I A K A A I T V C F L F V A S W T P Y A V L
901    GCCTTGATTGGAGCGTTTGGAGATAAGACCTTGCTGACGCCGGGTGTTACTATGTTCCAGCTTGTGCATGTAATTCGTCGCGCTGTCTA
301    A L I G A F G D K T L L T P G V T M F P A C A C K F V A C L
991    GATCCGTACGTGTACGCCATCAGCCATCCGAGGTACCGAGTAGAACTACAGAAAAGGCTGCCTTGGTTAGCGATCAGAAATCGCTGCCA
331    D P Y V Y A I S H P R Y R V E L Q K R L P W L A I T E S L P
1081   TCCGATTCCGCTTCTACAGCTACTGACGCAACCACAGCCAACACGTCGGCACCAGTATCTTCTTAA
361    S D S A S T A T D A T T A N T S A P V S S *

```

注:跨膜拓扑结构(第56~80、92~113、123~144、169~189、217~239、282~303、315~338氨基酸位)涂黑标出,蛋白激酶C磷酸化位点(第82~84、85~87、263~265氨基酸位)用下划线标出,N-糖基化位点(第10~13、272~275、374~377氨基酸位)用实线框标出,酪蛋白激酶II磷酸化位点(第273~276、366~369氨基酸位)用双下划线标出,酪氨酸激酶磷酸化位点(第20~27氨基酸位)用虚下划线标出,N-豆蔻酰化位点(第134~139、138~143、140~145、220~225氨基酸位)用虚线框标出,G蛋白偶联受体家族(第140~156氨基酸位)用曲线标出。

图5 白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Figure 5 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the UV-opsin gene in *Aedes albopictus*



注:与视蛋白紫外敏感性相关的赖氨酸残基用红色标出。

图6 白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白三级结构预测

Figure 6 Prediction of the 3D structure of UV-opsin of *Aedes albopictus*

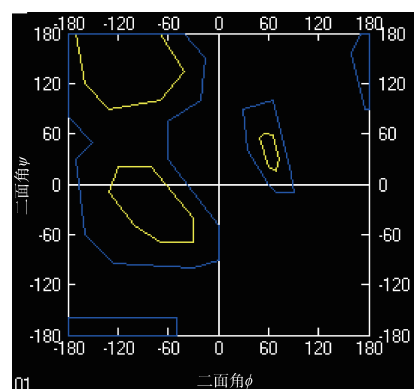


图7 白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白三维结构的拉马钱德兰图

Figure 7 Ramachandran plot of 3D structure of UV-opsin of *Aedes albopictus*

等有重要意义。目前,冈比亚按蚊和斯氏按蚊的视蛋白基因已有相关研究<sup>[20]</sup>,白纹伊蚊的抗药性相关视蛋白基因已被克隆鉴定<sup>[21]</sup>。白纹伊蚊是我国重要

的媒介蚊虫,是登革热的重要传播媒介。本研究成功克隆了白纹伊蚊紫外光敏感视蛋白基因并对其编码蛋白进行分析,为进一步研究视蛋白的功能奠定

了基础,对于根据蚊媒视觉行为特征进行蚊媒防治及蚊传播疾病的控制有重要意义。此次研究采用的白纹伊蚊是实验室饲养的敏感种群,对于抗性种群及不同地理株的白纹伊蚊,以及不同性别及生理状态的蚊虫,该基因的表达是否存在差异,还有待进一步研究。

利益冲突 无

## 参考文献

- [1] van Breugel F, Riffell J, Fairhall A, et al. Mosquitoes use vision to associate odor plumes with thermal targets [J]. *Curr Biol*, 2015, 25(16): 2123-2129. DOI: 10.1016/j.cub.2015.06.046.
- [2] Leung NY, Montell C. Unconventional roles of opsins [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33: 241-264. DOI: 10.1146/annurevcellbio-100616-060432.
- [3] Cardé RT. Multi-cue integration: how female mosquitoes locate a human host [J]. *Curr Biol*, 2015, 25(18): R793-R795. DOI: 10.1016/j.cub.2015.07.057.
- [4] Feuda R, Marlétaz F, Bentley MA, et al. Conservation, duplication, and divergence of five opsin genes in insect evolution [J]. *Genome Biol Evol*, 2016, 8(3): 579-587. DOI: 10.1093/gbe/evw015.
- [5] Henze MJ, Oakley TH. The dynamic evolutionary history of pancrustacean eyes and opsins [J]. *Integr Comp Biol*, 2015, 55(5): 830-842. DOI: 10.1093/ich/iev100.
- [6] Giraldo-Calderón GI, Zanis MJ, Hill CA. Retention of duplicated long-wavelength opsins in mosquito lineages by positive selection and differential expression [J]. *BMC Evol Biol*, 2017, 17(1): 84. DOI: 10.1186/s12862-017-0910-6.
- [7] Baik LS, Recinos Y, Chevez JA, et al. Multiple phototransduction inputs integrate to mediate UV light-evoked avoidance/attraction behavior in *Drosophila* [J]. *J Biol Rhythms*, 2019, 34(4): 391-400. DOI: 10.1177/0748730419847339.
- [8] Li LF, Chi H, Liu HN, et al. Retention and losses of ultraviolet-sensitive visual pigments in bats [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 11933. DOI: 10.1038/s41598-018-29646-6.
- [9] Arikawa K, Wakakuwa M, Qiu XD, et al. Sexual dimorphism of short-wavelength photoreceptors in the small white butterfly, *Pieris rapae crucivora* [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(25): 5935-5942. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1364-05.2005.
- [10] Gao J, Zhang HD, Guo XX, et al. Dispersal patterns and population genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in three different climatic regions of China [J]. *Parasit Vectors*, 2021, 14(1): 12. DOI: 10.1186/s13071-020-04521-4.
- [11] Senthilan PR, Helfrich-Förster C. Rhodopsin 7-the unusual rhodopsin in *Drosophila* [J]. *Peer J*, 2016, 4: e2427. DOI: 10.7717/peerj.2427.
- [12] Baldwin JM, Schertler GFX, Unger VM. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors [J]. *J Mol Biol*, 1997, 272(1): 144-164. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1240.
- [13] Katana R, Guan CL, Zanini D, et al. Chromophore-independent roles of opsin apoproteins in *Drosophila* mechanoreceptors [J]. *Curr Biol*, 2019, 29(17): 2961-2969. e4. DOI: 10.1016/j.cub.2019.07.036.
- [14] Yourick MR, Sandkam BA, Gammerdinger WJ, et al. Diurnal variation in opsin expression and common housekeeping genes necessitates comprehensive normalization methods for quantitative real-time PCR analyses [J]. *Mol Ecol Resour*, 2019, 19(6): 1447-1460. DOI: 10.1111/1755-0998.13062.
- [15] Pohl N, Sison-Mangus MP, Yee EN, et al. Impact of duplicate gene copies on phylogenetic analysis and divergence time estimates in butterflies [J]. *BMC Evol Biol*, 2009, 9(1): 99. DOI: 10.1186/1471-2148-9-99.
- [16] Zanini D, Giraldo D, Warren B, et al. Proprioceptive opsin functions in *Drosophila* larval locomotion [J]. *Neuron*, 2018, 98(1): 67-74. e4. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.02.028.
- [17] Salcedo E, Zheng LJ, Phistery M, et al. Molecular basis for ultraviolet vision in invertebrates [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(34): 10873-10878. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-34-10873.2003.
- [18] Wang T, Montell C. Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila* [J]. *Pflügers Arch-Eur J Physiol*, 2007, 454(5): 821-847. DOI: 10.1007/s00424-007-0251-1.
- [19] Owens GL, Rennison DJ. Evolutionary ecology of opsin gene sequence, expression and repertoire [J]. *Mol Ecol*, 2017, 26(5): 1207-1210. DOI: 10.1111/mec.14032.
- [20] Jenkins AM, Muskavitch MAT. Crepuscular behavioral variation and profiling of opsin genes in *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* (Diptera: Culicidae) [J]. *J Med Entomol*, 2015, 52(3): 296-307. DOI: 10.1093/jme/tjv024.
- [21] 孙艳. 视蛋白基因参与蚊抗药性机制的研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2012.

Sun Y. *Opsin*, involved in mosquito resistance to deltamethrin [D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2012.

收稿日期: 2021-01-20 本文编辑: 卢亮平