技术方法

文章编号:1000-5404(2005)05-0458-03

改进的一维二维电泳法分析疟原虫子孢子蛋白质的差异表达

Modified protein analysis of different stages of Plasmodium sporozoite by SDS-PAGE and two-dimensional gel electrophoresis

许 颖,张锡林,段建华,黄复生 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 建立及优化一维和二维凝胶电泳技术显示不同时期约氏疟原虫子孢子的蛋白差异表达的实验条件,为进一步研究疟原虫具有感染性的唾液腺子孢子和不具感染性的卵囊成熟子孢子间的差异表达蛋白研究奠定基础。**方法** 采用优化的蛋白质抽提试剂、方法分别获得疟原虫具有感染性的唾液腺子孢子和不具感染性的卵囊成熟子孢子蛋白。采用一维和二维蛋白电泳技术对不同时期约氏疟原虫子孢子蛋白进行分析比较,建立约氏疟原虫子孢子蛋白质一维、二维电泳图谱。**结果** 采用一维和二维蛋白电泳技术能够有效显示疟原虫具有感染性的唾液腺子孢子和不具感染性的卵囊成熟子孢子蛋白,为以后进一步研究子孢子侵入相关蛋白,进行功能学的分析奠定基础。**结论** 所采用的一维和二维蛋白电泳相结合的方法对分离斯氏按蚊中约氏疟原虫唾液腺子孢子和卵囊成熟子孢子蛋白质具有较好的重复性和分辨率。

随着恶性、约氏疟原虫全基因组图谱的顺利完成,研究重点已逐渐从结构基因研究转向生物功能蛋白质的研究[1]。由于寄生虫基因表达的调节与真核生物相比具有非典型性,在转录起始和稳定的RNA水平调控之上的转录后调节机制不足以反映个体的蛋白水平[2]。而可重复的蛋白分析方法在理论上需要达到细胞的同种同期和高密度,严重限制了具有复杂生活史的疟原虫的研究。因其本身量少和宿主蚊组织的高背景,使用现有的技术,很难将其分离、进行蛋白组学的比较。因此,我们以斯氏按蚊-约氏疟原虫为模型,采用一维(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和二维凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)相结合的方法研究不同时期疟原虫子孢子的蛋白差异表达,为进一步研究疟原虫具有感染性的唾液腺子孢子和不具感染性的成熟卵囊子孢子之间的差异表达蛋白和功能学分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 疟原虫和按蚊 约氏疟原虫BY265株,每周用昆明株小鼠血传1次,每5周蚊传1次。斯氏按蚊Hor株在24~26 ℃、相对湿度为70%~80%的养蚊室中饲养,饲10%蔗糖水;以2~3 d龄成蚊吸感染约氏疟原虫的小鼠血,感染后的蚊置23~24 ℃、相对湿度为70%~80%的恒温室饲养。昆明株小鼠由本校实验动物中心提供,体质量16~20 g,雌雄不限。

1.1.2 主要试剂 甘氨酸、丙烯酰胺,双甲叉丙烯酰胺,DTT,硫脲,过硫酸铵,TEMED,低分子量Marker包括兔磷酸化酶B、牛血清白蛋白、兔肌动蛋白、牛碳酸酐酶、胰蛋白酶抑制剂、鸡蛋清溶菌酶,蛋白酶抑制剂,尿素,Bio-Lyte,CHAPS,碘乙酰胺,IPG干胶条(pH 3~10),Bio-Safe™ Coomassie染液(BIO-RAD生产)。

1.1.3 主要仪器和分析软件 Ultrospec 2100UV/visible spectrophotometer, Milipore Simiplicy 185超纯水仪,BIO-RAD等电聚焦仪,BIO-RAD电泳仪(POWERPAC 1000),BIO-RAD凝胶扫描仪,QUANTITY ONE图像分析软件,PDQUEST图像分析软件。

1.2 方法

1.2.1 SDS-PAGE

1.2.1.1 标本采集及处理 解剖收集未感染和感染后8 d含有成熟卵囊子孢子的斯氏按蚊中肠(显微镜下观察卵囊80%以上为成熟卵囊)。分别将未感染和感染后的50只雌蚊用乙醚麻醉后,解剖镜下从蚊腹部末端将消化道拉出,弃去马氏管和前肠,收集于含50 μl MilliQ水和50 μl 50%蛋白酶抑制剂的1.5 ml的Eppendorf管内(置冰上)。15 000 r/min,4 ℃,离心5 min,弃上清。再加入100 μl MilliQ水振荡漂洗,15 000 r/min,4 ℃,离心5 min,弃上清,加入20 μl 50%蛋白酶抑制剂,将沉淀移入匀浆器,冰上研磨,移入0.5 ml的Eppendorf管内。15 000 r/min,4 ℃,离心10 min,移上清于0.5 ml的Eppendorf管,加入等体积(约15 μl)2×样品缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)、200 mmol/L DTT、4% (m/V) SDS、0.2% 溴酚蓝、20% (V/V)甘油],4 ℃备用。挤压法收集未感染和感染后14 d含有成熟子孢子的斯氏按蚊唾液腺(显微镜下观察子孢子入腺)。将未感染和感染后的100只雌蚊用乙醚麻醉后,解剖镜下去头,将唾

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371261, 30271163)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371261, 30271163)

作者简介:许 颖(1977-),女,重庆市人,硕士研究生,讲师,主要从事疟原虫侵入相关分子方面的研究。电话:(023)68752243

收稿日期:2004-06-08;修回日期:2004-12-18

液腺从胸部挤出,去除其它组织,处理同蚊中肠,4 ℃备用。

1.2.1.2　Bradford 比色法检测蛋白浓度　　按文献[3]进行。

1.2.1.3　SDS-PAGE,考马斯亮蓝和银染　　方法参照文献[4]进行,并稍加以改进,采用 10% 分离胶,5% 浓缩胶。4 组样品及标准低分子量蛋白上样量均为 15 μl,100 ℃煮 3 min。起始电压 60 V,待样品前沿到分离胶后将电压调至 110 V,当溴酚蓝达凝胶底部时停止电泳,凝胶分别进行考马斯亮蓝和银染色。

1.2.1.4　凝胶扫描　　使用 BIO-RAD 凝胶扫描仪和 QUANTITY ONE 图像分析软件进行扫描和蛋白带分析。

1.2.2　2-DE

1.2.2.1　标本采集及处理　　解剖收集感染后 8 d,含有成熟卵囊子孢子的斯氏按蚊中肠 50 只(显微镜下观察卵囊 90% 以上为成熟卵囊)。具体见前,将沉淀移入匀浆器,加入 200 μl 上样缓冲液[48.05% 尿素(w/v),4% CHAPS (w/v),0.2% Bio-Lyte (w/v),0.001% 溴酚 蓝(w/v), 0.98% DTT (w/v)],冰上研磨,移入 0.5 ml 的 Eppendorf 管内,15 000 r/min,4 ℃,离心 10 min,移上清于 0.5 ml 的 Eppendorf 管,4 ℃备用。挤压法收集感染后14 d,含有成熟子孢子的斯氏按蚊唾液腺 100 只(显微镜下观察子孢子入腺)。处理同蚊中肠,4 ℃备用。

1.2.2.2　Bradford 比色法检测蛋白浓度　　按文献[3]进行。

1.2.2.3　实验过程　　根据 BIO-RAD 等电聚焦操作指南和文献[5],并稍加以改进。具体为:样品总体积 150 μl 加入 IPG 聚焦盘中槽的边缘自左而右线性加入样品,在槽两端各 1 cm 左右不加样,中间的样品液一定要连贯(注意不要产生气泡)。将在室温平衡 10 min 后的 IPG 预制胶条(pH 3 ~ 10,7 cm)用镊子去除胶条的保护层,胶面朝下,放入胶槽,使胶条的正极对应于聚焦盘的正极(注意不要产生气泡)。在每根胶条上覆盖约 1 ml 液体石蜡油。水化和等电聚焦在 17 ℃自动进行,水化时间为 12 h,聚焦最高电压4 000 V,聚焦为25 000 V·h,每根胶条的极限电流为 30 μA。等电聚焦后立即于平衡液缓冲液 Ⅰ[36% 尿素(w/v),2% SDS (w/v),0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8,20% 甘油(v/v), 2% DTT (w/v)] 2.5 ml 中平衡 12 min,再于平衡缓冲液 Ⅱ[36% 尿素(w/v),2% SDS (w/v),0.375 mol/LTris-HCL pH 8.8,20% 甘油(v/v),2.5% 碘乙酰胺] 2.5 ml 中平衡 12 min。将平衡后的胶条置于 10% SDS-PAGE 胶上,加入低熔点琼脂糖溶液[0.5% 低熔点琼脂糖(w/v),0.303% Tris (w/v),1.44% 甘氨酸(w/v),0.1% SDS (w/v),0.001% 溴酚蓝(w/v)],使其与 SDS-PAGE 胶紧密接触。SDS-PAGE 在 BIO-RAD 电泳仪中进行 50 V 电泳 15 min,然后改变电压为 150 V,直到溴酚蓝达凝胶底部时停止电泳。

1.2.2.4　凝胶考马斯亮蓝染色　　将凝胶浸入足够体积的 Bio-Safe™ Coomassie 染液中,轻微摇荡 60 min。然后在足够体积的 MilliQ 水中清洗凝胶,轻摇,直到背景颜色脱去。

1.2.2.5　凝胶扫描和分析　　用 BIO-RAD 凝胶扫描仪对二维电泳凝胶扫描,PDQUEST 对图像进行分析。

2　结果

2.1　蛋白浓度

2.1.1　SDS-PAGE 蛋白浓度　　未感染 50 只雌蚊中肠蛋白 A_{595} 值为 0.278,浓度为 5.521 μg/μl;感染后 50 只雌蚊中肠蛋白 A_{595} 值为 0.296,浓度为 6.108 μg/μl。未感染 100 只雌蚊唾液腺蛋白 A_{595} 值为 0.265,浓度为 5.129 μg/μl;感染 100 只雌蚊唾液腺蛋白 A_{595} 值为 0.270,浓度为 5.654 μg/μl。

2.1.2　2-DE 蛋白浓度　　感染后 50 只雌蚊中肠 A_{595} 值为 0.318,蛋白浓度为 6.113 μg/μl;感染 100 只雌蚊唾液腺蛋白 A_{595} 值为 0.274,浓度为 5.693 μg/μl。

2.2　SDS-PAGE 结果

2.2.1　考马斯亮蓝染色　　将未感染和感染后 8 d 含有成熟子孢子卵囊的斯氏按蚊中肠组织,未感染和感染后 14 d 含有成熟子孢子的斯氏按蚊唾液腺进行 SDS-PAGE 后进行考马斯亮蓝染色。可见正常蚊中肠组织蛋白主要分布在(15 ~ 97) × 10^3 之间,主带有 26 条;感染蚊中肠组织蛋白主要分布在(28 ~ 90) × 10^3,主带有 18 条;正常蚊唾液腺蛋白主要分布在(18 ~ 90) × 10^3,主带有 29 条;感染蚊唾液腺蛋白主要分布在(18 ~ 97) × 10^3,主带有 30 条。

2.2.2　银染色　　将未感染和感染后 8 d 含有成熟子孢子卵囊的斯氏按蚊中肠组织,未感染和感染后 14 d 含有成熟子孢子的斯氏按蚊唾液腺进行 SDS-PAGE 后进行银染。可见正常蚊胃中肠组织蛋白主要分布在(15 ~ 97) × 10^3,主带有 30 条;感染蚊中肠组织蛋白主要分布在(15 ~ 95) × 10^3,主带有 27 条;正常蚊唾液腺蛋白主要分布在(15 ~ 85) × 10^3,主带有 32 条;感染蚊唾液腺蛋白主要分布在(18 ~ 97) × 10^3,主带有 33 条。

2.3　2-DE 结果

将感染后 8 d 含有成熟子孢子卵囊的斯氏按蚊中肠组织蛋白和感染后 14 d 含有成熟子孢子的斯氏按蚊唾液腺蛋白进行 2-DE、SDS-PAGE 后进行考马斯亮蓝染色。斯氏按蚊含成熟子孢子中肠蛋白凝胶扫描结果显示有 135 个蛋白点,pI 偏酸性(pH 4.0 ~ 5.5),分子量大小主要集中在(14 ~ 90) × 10^3(图 1)。含有成熟子孢子的斯氏按蚊唾液腺蛋白凝胶扫描结果发现有 156 个蛋白点,pI 分布较均匀,分子量大小主要集中在(14 ~ 60) × 10^3(图 2)。

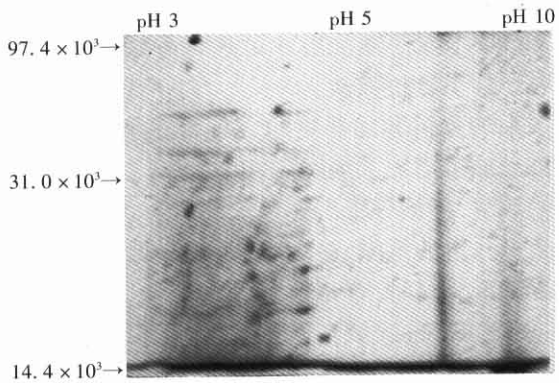


图 1　感染后 8 d 含有成熟子孢子卵囊的斯氏按蚊中肠组织蛋白 2-DE (Bio-Safe™ Coomassie 染色)

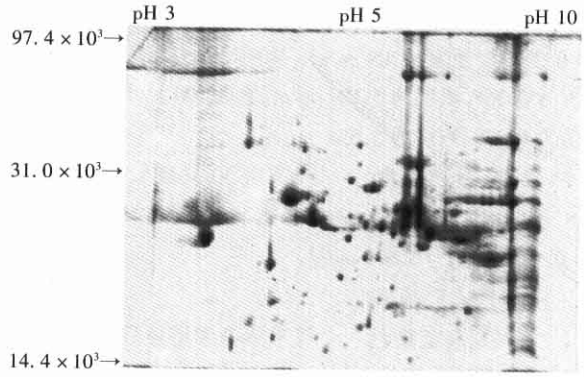


图2 感染后14 d含有成熟子孢子的斯氏按蚊唾液腺蛋白2-DE
(Bio-Safe™ Coomassie 染色)

3 讨论

子孢子感染肝细胞机制的研究一直是疟原虫红外期阻断疫苗研究的热点,寻找与子孢子侵入肝细胞相关蛋白是疟原虫研究的一个重要目标。而目前的研究多从基因水平进行,蛋白水平研究较少,尤其是差异表达蛋白。本研究利用斯氏按蚊-约氏疟原虫为模型,采用SDS-PAGE和2-DE相结合的方法显示约氏疟原虫子孢子蛋白质表达谱,表明SDS-PAGE和2-DE的方法具有高重复性、敏感性。2-DE技术是当前用于分离组织、细胞蛋白质最有效的分离手段[6],其从理论到技术的完善以及结合质谱、N-端测序等下游技术,更适应蛋白质组研究发展的要求[7]。

由于蚊期疟原虫纯化分离困难、虫体数量少而致的提取疟原虫蛋白量低和宿主蚊组织蛋白的高背景等因素影响实验的结果多,因此蚊期虫体蛋白质提取和分离时应注意以下方面:样品处理的特殊性是样品的复杂性所决定。需要处理的蛋白既包含疟原虫子孢子,也包含蚊组织。蚊组织中盐含量较高,因此样品必须在MilliQ水振荡漂洗后才可进行聚焦,并且在等电聚焦时要加上盐桥除盐。

结果的分析和加样量的大小始终是2-DE中的一对矛盾。如果增加了加样量,可以提高2-DE图谱上蛋白点的数量,能够分析出含量较低的蛋白,但是一旦加样量超过一定的范围,在2-DE图谱上就会出现大量重叠的蛋白点。同时,含量高的蛋白会掩盖含量低的蛋白,在蛋白点多的区域甚至相互连接,不利于接下来的软件分析。如果为了2-DE图谱的清楚而降低加样量,那么就有很多低含量的蛋白无法在最后的图谱上体现出来,同样也无法得到满意的结果。在本实验中,用pH为3~10的11 cm的IPG胶条比较了不同加样量对2-DE图谱的影响,确定在感染后50只雌蚊中肠蛋白蛋白上样量为6.113 μg/μl,125 μl;感染后100只雌蚊唾液腺蛋白蛋白上样量为5.693 μg/μl,150 μl时得到较为清晰而且蛋白数量较多的2-DE图谱。获得较好的2-DE图谱质量和重复性所需最佳时间是IEF分离达到稳定态所需时间,聚焦时间太短,则蛋白质分离效果不好,但也应避免聚焦时间过长。最佳的聚焦时间根据蛋白质样品、上样量、pH范围及胶条的长度不同而定,我们进行聚焦的条件是聚焦最高电压4 000 V,聚焦为25 000 V·h,每根胶条的极限电流为30 μA。

SDS-PAGE和IPG等电聚焦二维凝胶电泳从理论到技术的完善适应了蛋白质组研究发展的要求,也为斯氏按蚊中约氏疟原虫子孢子侵入相关蛋白分析研究提供了较好的技术平台。但是还需要进一步优化该技术在分离、鉴定蚊表达蛋白的实验条件。因此,我们需要进一步用二维电泳比较正常斯氏按蚊中肠组织蛋白与含有成熟子孢子卵囊的斯氏按蚊中肠组织蛋白,正常斯氏按蚊唾液腺蛋白与含有成熟子孢子的斯氏按蚊唾液腺蛋白,以找出具有感染性的唾液腺子孢子和不具感染性的卵囊成熟子孢子之间的差异蛋白,并进行后续的质谱、N-端测序工作[8]。

关键词:斯氏按蚊;约氏疟原虫;子孢子;SDS-PAGE;二维电泳

中图法分类号:R34-33 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Breman J G, Egan A, Keusch G T. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers[J]. Am J Trop Med Hyg, 2001, 64(1-2 Suppl): iv - vii.

[2] Clayton C E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again[J]. EMBO J, 2002, 21(8): 1881 - 1888.

[3] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(7): 248 - 254.

[4] Khah E M, Kouretas D. Influence of storage conditions on protein profile of pepper seeds, analyzed by SDS-PAGE[J]. *In Vivo*, 2003, 17(3): 259 - 260.

[5] Wang W, Scali M, Vignani R, *et al*. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds[J]. Electrophoresis, 2003, 24(14): 2369 - 2375.

[6] Rosenkrands I, King A, Weldingh K, *et al*. Towards the proteome of mycobacterium tuberculosis[J]. Electrophoresis, 2000, 21(17): 3740 - 3756.

[7] James P. Protein expression analysis: from "tip of the iceberg" to a global method[J]. Dis Markers, 2001, 17(4): 235 - 246.

[8] Rappsilber J, Moniatte M, Nielsen M L, *et al*. Experience and perspectives of MALDI MS and MS/MS in proteomic research[J]. Int J Mass Spectrometry, 2003, 226(1): 223 - 237.

(编辑 汪勤俭)