文章编号:1000-5404(2005)17-1735-04

论著

感染约氏疟原虫前后大劣按蚊血淋巴的差异表达蛋白分析

王 英[1],张锡林[1],段建华[1],许 颖[1],张艳玲[2],张 健[1],黄复生[1] (第三军医大学:[1]基础医学部病原生物学教研室,[2]西南医院神经内科,重庆 400038)

提 要:目的 获得并分析感染约氏疟原虫前后大劣按蚊血淋巴的差异表达蛋白。**方法** 利用二维电泳方法分别分离感染约氏疟原虫前后的大劣按蚊血淋巴蛋白,进行考马斯亮蓝染色,并利用PDQuest 2D Elite软件分析和比较凝胶结果;对感染约氏疟原虫前后的差异表达蛋白进行质谱分析,获得肽质量指纹图谱;利用Mascot软件系统,在Swiss-Prot等数据库中检索和分析所获得的肽质量指纹图谱。预测差异表达蛋白的生物学特性和在卵囊黑化中的功能。**结果** 获得了分辨率和重复性均较好的二维电泳图,感染组凝胶可见120个蛋白点,正常组凝胶可见95个蛋白点,二者比较分析后发现有37个差异蛋白点;质谱分析获得3个肽质量指纹图谱,于蛋白数据库检索后未发现匹配分值很高的相关蛋白,其中差异蛋白点1与冈比亚按蚊一蛋白具有较高的同源性。**结论** 获得了感染约氏疟原虫前后大劣按蚊血淋巴的差异蛋白和部分差异蛋白的相关信息,这为从蛋白水平认识蚊媒和疟原虫的相互关系和更深入地利用大劣按蚊-约氏疟原虫模型开展卵囊黑化的相关研究奠定了基础。

关键词: 二维电泳;差异表达蛋白;约氏疟原虫;大劣按蚊
中图法分类号: R382.31; R384.1; R394-33 **文献标识码:** A

Analysis of differentially expressed proteins from hemolymph of *Anopheles dirus* infected and uninfected with *Plasmodium yoelii*

WANG Ying[1], ZHANG Xi-lin[1], DUAN Jian-hua[1], XU Ying[1], ZHANG Yan-ling[2], ZHANG Jian[1], HUANG Fu-sheng[1] ([1]Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, [2]Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the differentially expressed proteins from hemolymph of *Anopheles dirus* infected and uninfected with *Plasmodium yoelii*. **Methods** Proteins from hemolymph of *Anopheles dirus* infected and uninfected with *Plasmodium yoelii* were separated with two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) respectively. Then the gel were stained by Coomassie brilliant blue and analyzed by PDQuest 2D Elite analysis software. Mass spectrometry and NCBInr database searching were carried out to analyze and forecast the biologic character and function in oocyst melanization of the differentially expressed proteins. **Results** The 2-DE patterns with higher resolving power and reproducibility were obtained. There were 120 protein spots in the gel of infected group and 95 protein spots in the gel of uninfected group. A total of 37 differentially expressed protein spots were found by comparing the two gels. We got 3 peptide mass fingerprints (PMF) by mass spectrometry. There was no protein matching highly with the 3 analyzed proteins in the NCBInr database. However, an unknown protein of Anopheles gambiae homologous with the differentially expressed protein spot 1 was found in the database. **Conclusion** We got the differentially expressed proteins from hemolymph of *Anopheles dirus* infected and uninfected with *Plasmodium yoelii*. Some of their information were also obtained. Our study will help to understand the relationship between *Anopheles* and *Plasmodium* on protein level and carry out the further study on oocyst melanization using the model of *Anopheles dirus-Plasmodium yoelii*.

Key words: two-demension electrophoresis; differentially expressed protein; *Plasmodium yoelii*; *Anopheles dirus*

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300292);第三军医大学校管课题(2003008)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30300292) and the Research Project Sponsored by Third Millitary Medical University(2003008)
作者简介: 王 英(1973-),男,河北省邢台市人,博士研究生,讲师,主要从事寄生虫免疫和疟疾蚊期方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752243
通讯作者: 黄复生,电话:(023)68752244
收稿日期: 2005-05-21;**修回日期:** 2005-06-13

疟疾目前仍是严重危害人类健康的一种寄生虫病。近年来,虽然对疟原虫已开展了广泛和深入的研究,但疟疾防治的效果仍不理想,每年的疟疾感染人数和死亡人数仍然高居不下[1]。因此,对疟疾防治的研究必需开拓新的思路。疟原虫与蚊媒的关系是近年来研究的一个新热点。黄复生等[2]研究发现,对人疟原虫易感的大劣按蚊,能够通过卵囊黑化包被的方式杀伤其体内的约氏疟原虫(一种鼠疟),从而阻断对该疟原虫的传播。因此,大劣按蚊-约氏疟原虫是一个很好的研究模型,利用该模型可以开展疟疾蚊媒阻断的研究和昆虫免疫的相关研究。黑化包被反应是按蚊的一种特异性抗疟机制,反应的某些关键成分来源于血淋巴[3]。本研究即是利用大劣按蚊-约氏疟原虫模型,通过二维电泳分离感染约氏疟原虫前后的血淋巴蛋白,并进行比较,对感染前后的差异蛋白进行质谱分析和蛋白质数据库的检索,分析和预测差异蛋白的生物学特性。本研究旨在寻找卵囊黑化相关蛋白,这将为从蛋白水平认识疟原虫和蚊媒的相互关系及进一步明确卵囊黑化机制、探索疟原虫防治新策略奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物与虫种

研究中所用小鼠为昆明株小鼠,由我校实验动物中心提供。约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)BY265 株,为我室常规保种,每周用昆明株小鼠血传 1 次,每 5 周蚊传 1 次。大劣按蚊(*Anopheles dirus*)海南株为我室常规饲养。

1.2 试剂和仪器

蛋白 Marker 购自中科院上海生物化学研究所,IPG 胶条(pH 3 ~ 10,7 cm)、Cocktail 蛋白酶抑制剂、丙烯酰胺、尿素、Bio-Lyte、CHAPS、碘乙酰胺、过硫酸胺和 DTT 等均购自 Biorad 公司。所用仪器和分析软件有 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, PDQUest 图像分析软件。

1.3 疟原虫感染和标本的采集与处理

大劣按蚊成蚊停止糖水 10 h 后,将感染约氏疟原虫的小鼠和正常小鼠固定后,分别置于不同的蚊笼中进行吸血(分别为感染组和正常对照组)。吸血后 24 h 开始取按蚊血淋巴,感染组和正常组各取 500 只按蚊。剪断蚊喙(留约 1/3),用镊子轻挤蚊胸部,将蚊喙断面涌出的清亮液滴轻蘸于磷酸缓冲液 PBS(0.1 mol/L, pH 7.3 ~ 7.4)液滴,进行虹吸,最后收集液滴于 Ependorf(EP)管中。1 500 × *g* 离心 10 min(去细胞),将上清移至另一 EP 管中,感染组和正常组各加 Cocktail 蛋白酶抑制剂储存液 5 μl。

1.4 二维电泳试验

将上述样品加入 5 倍体积的水化上样缓冲液(8 mol/L 尿素、4% CHAPS、65 mmol/L 的 DTT、0.2% Bio-Lyte、0.001% 溴酚蓝)中,混匀后离心(1 500 × *g* 离心 5 min)。将上清加样至聚焦盘中。将在室温平衡 10 min 后的 IPG 预制胶条(pH 3 ~ 10,11 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。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,每根胶条的极限电流为 30 μA。程序为:被动水化 12 h,250 V 线性升压,500 V 快速升压,4 000线性升压,4 000 V 快速达 20 000 V/h 聚焦,500 V 保持。等电聚焦结束后,取出胶条进行平衡。将平衡后的胶条置于 10% SDS-PAGE 胶上,同时在胶条两端分别放置浸有 5 μl 低分子质量和次高分子质量的蛋白 Marker 的滤纸条,加入低熔点琼脂糖溶液。电泳电压选择 50 V,待样品进入浓缩胶后改为 150 V。溴酚蓝达凝胶底部时停止电泳。

1.5 凝胶染色、扫描和分析

电泳结束后,取出凝聚,置于考马斯亮蓝染液中,于摇床上进行过夜染色。然后,在脱色液中(30% 甲醇 + 8% 冰乙酸 + 62% 水)进行振摇脱色。脱色至蛋白点清晰后,用 BIO-RAD 凝胶扫描仪对凝胶进行扫描,用 PDQuest 软件对感染组和正常组的凝胶进行对比分析。

1.6 质谱分析

选择明显的差异蛋白点,用干净的解剖针取出胶点,去离子水清洗数次后,用 50% 乙腈 25 mmol/L 的 NH_4HCO_3 溶液浸泡胶点使蓝色褪尽后,用胰蛋白酶对蛋白进行酶切。进行肽提取,并用质谱分析仪进行检测。获得差异蛋白的肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprint, PMF)。

1.7 数据库检索和分析

利用 movers 软件进行分析,并通过 Mascot(http:// www.Matrixscience.Com)系统在 NCBI、Swiss-Prot 等数据库中,对获得的差异蛋白的肽质量信息进行检索。寻找相似的蛋白,分析差异蛋白的可能生物学特性和功能。

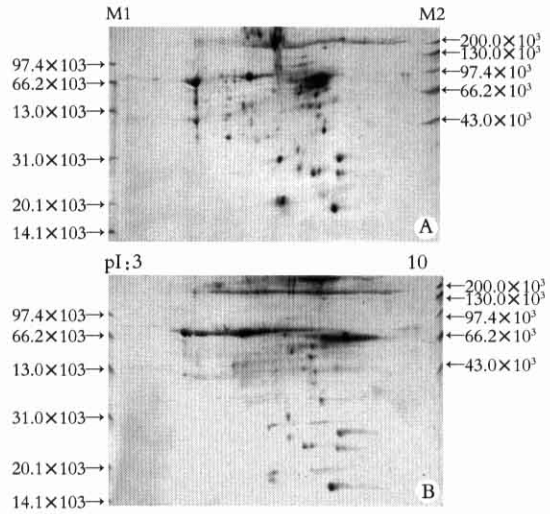
2 结果

2.1 二维电泳结果

获得了清晰的二维电泳凝胶图(图 1)。蛋白质点集中在 pH 4 ~ 8 之间,即大劣按蚊血淋巴蛋白的等电点(pI)主要集中于 4 ~ 8 之间。分子质量在 20×10^3 ~ 200×10^3 之间均有蛋白质点。扫描后,利用 PDQuest 软件进行分析,结果感染组有 120 个蛋白质点,正常对照组有 95 个蛋白质点。其中,相同的蛋白点有 89 个,获得 37 个差异蛋白质点。与对照组相比,感染组的血淋巴蛋白新增蛋白点 31 个。

2.2 质谱分析结果

对 3 个差异明显的蛋白质点进行了质谱分析,获得了 3 张肽指纹图谱(PMF)。图 2 是差异蛋白质点 1 的肽指纹图谱。可见该质谱的结果质量较高,其 PMF 数据中共有大小 58 个峰值。另外两个蛋白点的肽指纹图质量稍差,部分 PMF 的肽片段峰信号较弱。这可能与质谱检测中的操作或标本的样品量太低有关。



A: Infected; B: Uninfected; M1: Marker 1; M2: Marker 2; pI: isoelectric point

图 1　感染组和正常组大劣按蚊血淋巴二维电泳结果(考马斯亮蓝染色)

Fig 1　Two-dimensional gel electrophoresis of the hemolymph from infected and uninfected groups (Coomassie brilliant blue staining)

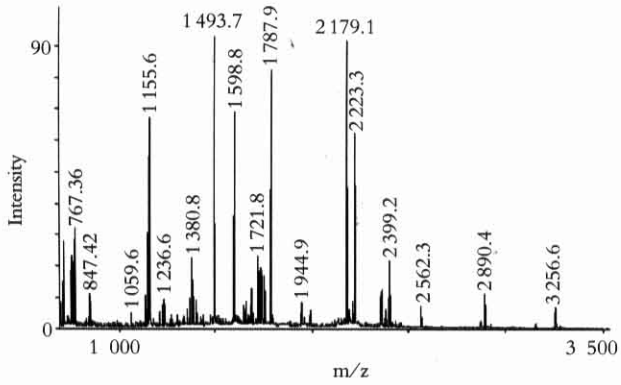


图 2　大劣按蚊血淋巴差异蛋白肽指纹图谱

Fig 2　Peptide mass fingerprint map of a differential hemolymph protein in *Anopheles dirus*

2.3　数据库检索结果

把 3 个差异蛋白质点的质谱分析结果分别在 NCBInr、Swissprot、OWL 等数据库中进行检索,检索参数为:Type of Search- Peptide Mass Fingerprint, Database- NCBInr (Swissprot、OWL 等), Taxonomy- All entries, Enzyme- Trypsin, Mass values- Monoisotopic, Protein mass- Unrestricted, Peptide mass tolerance- ±1.0, Max missed cleavages- 1, Number of queries- 3。结果均未找到分值很高的相关蛋白信息。所幸的是,对差异蛋白点 1 的检索发现,其匹配分值最高的是一种粘质沙雷菌(Serratia marcescens)的碲抗性蛋白(gi|38347891),分值为 78(高于 76 分有意义)。匹配肽段有 8 个,相同序列占 31%。检索结果见表 1。此外,对蛋白点 1 的检索还发现,该蛋白与数据库中的冈比亚按蚊一种未知蛋白(gi|55247302)相似,分值虽不高(仅 56 分),但匹配的肽段有 7 个,相同序列占 45%。检索结果见表 2。

表 1　差异蛋白 1 与 NCBI 数据库中的沙雷氏菌属的碲抗性蛋白的匹配情况

Tab 1　Matching of spot 1-PMF data with the tellurium resistance protein of Serratia marcescens in NCBI database

Position	Observed	Mr (expected)	Mr (calculated)	Sequence
1 – 7	767.36	766.35	766.39	MSVSLSK
1 – 14	1 436.66	1 435.66	1 435.77	MSVSLSKGQGVSLK
128 – 139	1 422.89	1 421.89	1 421.79	IVFIVQIYNGEK
140 – 153	1 686.05	1 685.04	1 684.92	LQQHFGKVQNAFIR
147 – 153	847.42	846.42	846.47	VQNAFIR
165 – 177	1 352.54	1 351.54	1 351.65	FDLSGGPAFASQR
165 – 186	2 399.17	2 398.16	2 398.21	FDLSGGPAFASQRSMVFAELIR
178 – 192	1 737.84	1 736.83	1 736.89	SMVFAELIREATGWK

表 2　差异蛋白 1 与 NCBI 数据库中的冈比亚按蚊相关蛋白的匹配情况

Tab 2　Matching of spot 1-PMF data with the relative protein of Anopheles gambiae in NCBI database

Position	Observed	Mr (expected)	Mr (calculated)	Sequence
90 – 07	2 179.09	2 178.08	2 178.09	LQARPEIAEWSQMTYSIR
90 – 107	2 195.08	2 194.07	2 194.08	LQARPEIAEWSQMTYSIR
117 – 129	1 646.82	1 645.82	1 645.77	GFNYEQDDRVYLK
126 – 147	2 562.32	2 561.30	2 561.30	VYLKVNVTDWSQQIGDHTVGFR
148 – 166	2 399.17	2 398.16	2 398.08	WFTMSGNYSQFSDRFEQIR
169 – 183	1 737.84	1 736.83	1 736.98	DILPVVERDLVQSVR
196 – 206	1 380.76	1 379.73	1 379.73	LAPFERFFPTR

3　讨论

人类基因组完成后,恶性疟原虫、冈比亚按蚊等基因组也相继完成。随着后基因组时代的到来,蛋白质组学研究开始逐渐受到广泛的关注和重视[4]。二维电泳和质谱分析的诞生与逐渐成熟,使得蛋白质组学研究在近几年得以迅速开展和深入[5,6]。本研究即首先利用二维电泳技术分别对感染约氏疟原虫和未感染的大劣按蚊血淋巴蛋白进行分离和比较,再利用质谱分析技术对差异蛋白进行分析,并利用生物信息学技术,在蛋白质数据库中进行检索,从而预测差异蛋白的生物学特性和在卵囊黑化中的作用。研究结果显示,通过二维电泳对大劣按蚊血淋巴蛋白进行了较好地分离。从 2DE 结果上看,血淋巴蛋白多为中性或接近中性的蛋白质,分子质量在 20×10^3 ~ 200×10^3。将感染约氏疟原虫前后的大劣按蚊血淋巴的 2DE 结果进行比较,共找到 37 个差异蛋白点,其中感染组新增蛋白

点31个,沉默蛋白点6个。这说明在约氏疟原虫感染后,大劣按蚊的血淋巴蛋白表达发生明显变化,启动了多种蛋白的表达,同时,也使部分蛋白表达受到抑制。在这些表达发生变化的蛋白质中,有些可能参与了疟原虫入侵后的卵囊黑化反应,有些则参与了代谢、消化等过程。能否从这些差异蛋白中找到与卵囊黑化有关的蛋白,是下一步工作的关键内容。

为此,本研究对其中差异最为明显的3个蛋白点进行了进一步研究。质谱分析和蛋白质数据库的检索结果显示,差异蛋白1分子质量约为38×10^3,等电点为5.5,与沙雷粘质菌的碲抗性蛋白有较高的相似性。沙雷粘质菌是最小的一种细菌,属肠杆菌科沙雷菌属。碲化合物在抗生素发现之前曾大量用于治疗麻风、结核、皮炎和眼部感染等疾病[7]。然而,许多细菌对碲化合物有耐药性,沙雷菌的碲抗性蛋白除了参与对碲化合物的耐药性外,还和宿主菌对噬菌体的抑制性有关[8]。由此,推断本研究获得的差异蛋白1可能参与了对入侵体内的疟原虫的抑制杀伤作用。对另外两个差异蛋白的肽质量指纹图谱分析和蛋白质数据库检索均未找到匹配分值很高的相关蛋白。这可能与目前对按蚊蛋白的研究较少,蛋白质数据库中的按蚊蛋白数据不全有关;也可能与肽质量指纹图谱的质量不高有关。因此,通过质谱分析和数据库检索,尚无法准确预测这两个差异蛋白的生物学特性。

目前,对按蚊与疟原虫的相互关系研究已经成为了一个新的热点。然而,冈比亚按蚊基因组刚刚完成,很多研究尚处于起步阶段,研究盲区多(尤其是蛋白质研究方面)。对其它按蚊的研究则更为少见。此外,虽然大劣按蚊与冈比亚按蚊同属按蚊属,但由于大劣按蚊是亚洲东南亚地区重要的媒介,而冈比亚按蚊是非洲地区最重要的媒介,两种按蚊物种的差异,使得抗疟原虫蛋白可能也会有差异。这为本研究的深入开展增加了难度,同时也为本研究提供了创新的空间,并使得对大劣按蚊与疟原虫的相互关系研究显得尤为重要(对我国乃至东南亚地区的疟疾防治研究具有重要意义)。考虑到大劣按蚊与冈比亚按蚊的生物亲缘性关系,本研究中发现的差异蛋白1与冈比亚按蚊蛋白的相似性信息,可能有助于下一步的研究。总之,本研究获得的3种差异蛋白可能均为新发现的蛋白质,对其功能的鉴定以及明确该蛋白是否参与了按蚊对疟原虫的免疫杀伤作用和卵囊黑化反应,尚需进一步获得其氨基酸序列并需进行更深入的研究。

参考文献:

[1] Holt R A, Subramanian G M, Halpern A, *et al*. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*[J]. Science, 2002, 298(5591): 129-149.

[2] 黄复生, 王兴相. 大劣按蚊血细胞对约氏疟原虫卵囊黑化作用的观察[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1995, 8(4): 284-285.

[3] Yu X Q, Jiang H, Wang Y, *et al*. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, Manduca sexta[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2003, 33(2): 197-208.

[4] Pike L J, Sadler J E. Proteomics, genomics and the future of medical education[J]. Mo Med, 2004, 101(5): 496-499.

[5] Honore B, Ostergaard M, Vorum H. Functional genomics studied by proteomics[J]. Bioessays, 2004, 26(8): 901-915.

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

[7] Taylor D E. Bacterial tellurite resistance[J]. Trends Microbiol, 1999, 7(3): 111-115.

[8] Whelan K F, Colleran E, Taylor D E. Phage inhibition, colicin resistance, and tellurite resistance are encoded by a single cluster of genes on the IncHI2 plasmid R478[J]. J Bacteriol, 1995, 177(17): 5016-5027.

(编辑 张大春)

欢迎订阅2005年《广州中医药大学学报》

《广州中医药大学学报》(ISSN 1007-3213/CN44-1425/R)是一份中医药学术类刊物,一直是中国科技论文统计源期刊,被中国核心期刊(遴选)数据库、美国化学文摘(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等22个国内外权威检索系统收录。主要栏目有中医基础理论探讨、临床研究、实验研究、中药药理、中药鉴定、中药制剂与工艺、经络与针灸和疑难病案分析等栏目。本刊为双月刊,大16开本,单月20日出版。定价:8.00元/期,48.00元/全年。邮发代号:46-275。全国各邮局均可订阅。

地 址:广州市机场路12号《广州中医药大学学报》编辑部 邮 编:510405

联系人:贺小英 袁书慧 电 话:(020)36585268,36585697

传 真:(020)36585697 E-mail:gzzyxb@gzhtcm.edu.cn