文章编号:1000-5404(2008)01-0011-04

论著

大劣按蚊与烟草天蛾丝氨酸蛋白酶的交叉免疫活性

王 英,徐文岳,陈继德,段建华,周桃莉,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)

摘 要:目的 探讨大劣按蚊与烟草天蛾丝氨酸蛋白酶之间是否存在交叉免疫反应性。方法 首先利用生物信息学方法分析不同昆虫间丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列的保守性,尤其是大劣按蚊与烟草天蛾间丝氨酸蛋白酶的序列相似性;然后,PinPoint Xa-1 表达载体对大劣按蚊丝氨酸蛋白酶进行体外原核表达,利用 Western blot 方法检测表达产物与烟草天蛾丝氨酸蛋白酶抗血清之间的免疫反应性。结果 生物信息学分析结果显示,不同昆虫间(包括大劣按蚊与烟草天蛾)丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列具有较高保守性;成功进行了大劣按蚊丝氨酸蛋白酶的体外原核表达,western blot 结果显示,烟草天蛾丝氨酸蛋白酶抗血清能够能够识别表达产物。结论 大劣按蚊与烟草天蛾丝氨酸蛋白酶具有交叉免疫活性,利用烟草天蛾丝氨酸蛋白酶抗血清研究大劣按蚊丝氨酸蛋白酶是可行的。这将为下一步从蛋白水平研究大劣按蚊丝氨酸蛋白酶的生物学特性奠定基础。

关键词:大劣按蚊;丝氨酸蛋白酶;原核表达;交叉免疫活性
中图法分类号:R318.04;R384.1;R394.2 文献标识码:A

Cross-immunoreactivity between serine proteases from *Anopheles dirus* and *Manduca*

WANG Ying, XU Wen-yue, CHEN Ji-de, DUAN Jian-hua, ZHOU Tao-li, HUANG Fu-sheng (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the cross-immunoreactivity between the serine proteases derived from *Anopheles dirus* and *Manduca*. Methods Bioinformatic analysis were carried out to determine the conservation of serine protease amino acid sequences among different insects, especially its similarity of the 2 above-mentioned insects. Serine protease of *Anopheles dirus* was expressed in *E. coli* by PinPoint™ Xa-1 T-vector. Western blotting was used to examine the cross-immunoreactiviy between the expression product and the antiserum against serine protease of *Manduca*. Results High similarity was found in serine protease amino acid sequences of different insect, including *Anopheles dirus* and *Manduca*. Serine protease of Anopheles was successfully expressed in *E. coli*. Western blot analysis showed that the expression product was recognized by the antiserum. Conclusion There is cross-immunoreactivity between serine protease of *Anopheles* dirus and *Manduca*. So it is feasible to study serine protease of *Anopheles dirus* with antiserum against *Manduca* serine protease.

Key words: Anopheles dirus; serine protease; prokaryotic expression; cross-immunoreactivity

探讨蚊抗疟原虫感染的天然免疫机制,有助于阻断性疟疾疫苗的开发与治疗新靶点的发现。丝氨酸蛋白酶在蚊抗疟原虫感染机制中具有重要作用,尤其是该酶在黑化包被反应中的作用已在多种昆虫中得以证实[1]。目前已对冈比亚按蚊、果蝇、烟草天蛾等昆虫的丝氨酸蛋白酶级联反应开展了较为深入的研究,但对于我国及东南亚重要的传疟媒介大劣按蚊,其丝氨酸蛋白酶的研究尚少[2-4]。我室已利用 RT-PCR 技术成功克隆了大劣按蚊丝氨酸蛋白酶的部分 cDNA 序列并已进行原核表达[5],在尚未制备大劣按蚊丝氨酸蛋白酶抗体的情况下,我们拟利用烟草天蛾丝氨酸蛋白酶抗血清,进一步从蛋白水平对大劣按蚊丝氨酸蛋白酶生物学特性进行研究。为探讨这一研究思路的可行性,本研究将从试验和理论的不同角度分析利用烟草天蛾前酚氧化酶(prophenoloxidase activating proteinase, PAP)抗体鉴定大劣按蚊丝氨酸蛋白酶的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验中所用动物及菌株:大劣按蚊

基金项目:国家自然科学基金(30400363,30671826)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400363, 30671826)
作者简介:王 英,男,河北省邢台市人,博士,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
通信作者:黄复生,电话:(023)68752244
收稿日期:2007-05-17;修回日期:2007-08-10

(*Anophelesdirus*)为我国海南株,约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)为 BY265 株。原核表达所用菌株为 JM109 大肠杆菌(由本校微生物学教研室提供)。

1.1.2 主要试剂 DNA 标准和 DNA 胶纯化回收试剂盒购自 TaKaRa 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉公司。NC 膜购自 Bio-Rad 公司。*Taq* 酶、PinPoint™ Xa-1 T 表达系统试剂盒和碱性磷酸酶标记的链球菌亲和素购自 Promega 公司。NBT/BCIP 购自武汉博士德生物工程有限公司。预染蛋白 Marker 购自中科院上海生物化学研究所。烟草天蛾丝氨酸蛋白酶抗血清由堪萨斯州立大学蒋浩波博士馈赠。Pinpoint Xa-1/AdSP3 表达质粒由我室徐文岳等[5]构建。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 对大劣按蚊丝氨酸蛋白酶 3(Anopheles dirus 3, AdSP3)在 GenBank 数据库中进行 BLAST 检索,并对不同种属的丝氨酸蛋白酶进行同源性分析。在 GenBank 数据库中搜索烟草天蛾丝氨酸蛋白酶 PAP1、PAP2 和 PAP3 的氨基酸序列,利用 DNASIS 软件,进行 AdSP1、AdSP3 和 PAP1、PAP2、PAP3 等各种氨基酸序列的比对,分析其保守位点。

1.2.2 AdSP3 原核表达产物免疫反应性研究

1.2.2.1 鉴定构建的表达质粒和诱导表达 DNA 测序鉴定已构建的 Pinpoint Xa-1/AdSP3 表达质粒 利用构建的表达质粒对 AdSP3 进行诱导表达,并设阴性对照(同上);Western blot 和 NBT/BCIP 显色鉴定表达产物,具体参照徐文岳等[5]的方法。

1.2.2.2 检测表达产物与烟草天蛾丝氨酸蛋白酶抗血清间的交叉免疫反应性 将表达的菌液裂解后,进行 SDS-PAGE 电泳和转膜。PBS 漂洗 NC 膜,5 min×2 次。2% 脱脂奶粉封闭 NC 膜,4 ℃过夜。PBS 漂洗 NC 膜,5 min×1 次。加烟草天蛾丝氨酸蛋白酶 PAP2 抗血清(一抗),1∶500 稀释,4 ℃过夜。PBS 漂洗,5 min×4 次。加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(二抗),1∶500 稀释,37 ℃孵育 2 h。PBS 漂洗,5 min×4 次。DAB 显色,背景适度时,水洗终止显色。

2 结果

2.1 生物信息学分析

结果显示不同的昆虫之间丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列有着很高的保守性。大劣按蚊丝氨酸蛋白酶 AdSP1 与冈比亚按蚊的丝氨酸蛋白酶(emb,CAB90818.1)的氨基酸序列同源性高达 74%,大劣按蚊丝氨酸蛋白酶 AdSP3 与冈比亚按蚊的丝氨酸蛋白酶(gb,EAA08418.2)的同源性高达 85%。AdSP1 和 AdSP3 与烟草天蛾等其他昆虫的丝氨酸蛋白酶或 PAP/PPAE 也有很高的同源性。其中,AdSP1 与烟草天蛾 PAP3(GenBank:AAX18637.1)的氨基酸同源性为 47%,AdSP3 与烟草天蛾 PAP1(GenBank:AAX18636.1)的氨基酸同源性为 41%,与烟草天蛾 proPAP(GenBank:AAC64004.1)的氨基酸同源性为 42%。对 AdSP1、AdSP3 与烟草天蛾的 PAP1、PAP2 和 PAP3 进行氨基酸序列比对发现,它们不仅具有较高的同源性,而且在很多位点上都是高度保守的,包括组成其活性中心的催化三联体 serine(S)、histidine(H)和 aspartic acid(D)位点(图 1)。

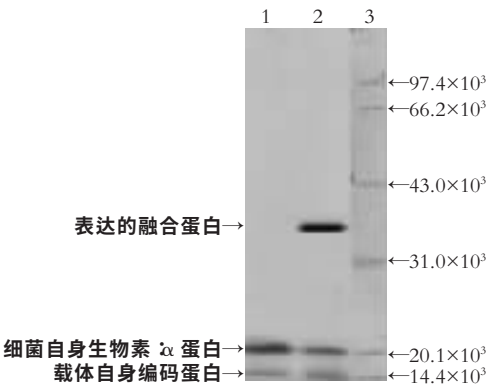
```
                 210         220         230         240         250
#5  201 ----------  ---YIVTAAH  CLANKKLDEG  ERLVNVRLGD  YNTATE-VDC  250
#4  201 ----------  ---YIVTAAH  CTVDKPNW--  -KLLYARFNE  FNASSTD-NC  250
#3  201 IKLLCGGVLI  SGKYVLTAGH  CLTGPVL-QI  GTPTNVRLGE  YNTKNDGADC  250
#2  201 IKLMCGGSLI  SAKYVLTAAH  CVKGPIL-EK  GTPKNVRLGE  YNTTNNGPDC  250
#1  201 TTYQCGGVLI  NQRYVLTAAH  CTIGAVEREV  GKLITVRLGE  YDTQNS-VDC  250
                 260         270         280         290         300
#5  251 E--DDSNTDC  ADPPQNFGIE  QQIVHSGYDK  NGPFQHHDIA  LIRLDRDVTM  300
#4  251 TILDDNSEYC  ---RVDYEVE  AIIPHPEYDK  NNVSRPNDIC  ILRLATDVEF  300
#3  251 VTVEAGGMDC  TEGAVIVPIE  KTIPHPEYNP  ISRTRRNDIG  LIRLKEMAPF  300
#2  251 VPSDAGSQDC  TEGMVLAPIE  QTIPHPEYKP  YSLNKQHDIA  LIRLRTFAPR  300
#1  251 V--DDV---C  ADPPQNIPIE  VAYPHSGYSD  NNKNRKDDIA  LVRLTRRAQY  300
                 310         320         330         340         350
#5  301 NNFVSPVCLP  -PDSFTPTTP  NV-NVAAVGF  GHTGQQ----  --RHSGIKKK  350
#4  301 TDELRPICLP  LELEVQELPI  INETFTVTGW  GETENK----  --RPSDIQLH  350
#3  301 TDFIRPICLP  -SLDLTQAPP  VNFTLYAAGW  G----AVSTS  Q-PSSNVKLH  350
#2  301 TDFISPICLP  -KIDYAQSPP  SAFSLYVAGW  GRYIQDVEAG  IYRSSKIKLH  350
#1  301 TYYVKPICLA  -NNN-ERLAT  GN-DVFVAGW  GKTLSG----  --KSSPIKLK  350
                 360         370         380         390         400
#5  351 AQFPVFAQEE  CDKKWRNV--  -----EIIQQQ  LCAGGVFGID  SCSGDSGGPL  400
#4  351 VDLPGLDNEA  CSSVYVVA--  --NVTLTDRQ  LCIGGLNGTD  SCRGDSGGPL  400
#3  351 VQLPFISYER  CQPSYAV--Q  NRQIELWEKQ  VCAGGEAGKD  SCKGDSGGPL  400
#2  351 VNVPFVDNER  CLGGVRKLRN  GENISLWKGQ  LCAGGVSGKD  SCKGDSGGPL  400
#1  351 LGMPIFDKSD  CASKYRNL--  --GAELTDKQ  ICAGGVFAKD  TCRGDSGGPL  400
```

#1 为 PAP1;#2 为 PAP2;#3 为 PAP3;#4 为 AdSP1;#5 为 AdSP3

图 1 AdSP1、AdSP3 与 PAP1、PAP2、PAP3 等氨基酸序列比对图

2.2　Pinpoint Xa-1/AdSP3 原核表达质粒的鉴定与诱导表达

DNA 序列测定显示,获得的克隆插入片段长 514 bp,与我室之前已经克隆的 AdSP3 的 cDNA 序列(GenBank :AY033140)比较,除上游增加了一个碱基 T 外,其序列一致。插入方向正确,开放阅读框无误。由此断定,我们利用的 Pinpoint Xa-1/AdSP3 重组表达克隆是正确的。在大肠杆菌 JM109 中经 IPTG 诱导表达后,并经 Western blot 及 NBT/BCIP 显色鉴定,提示表达成功(图 2)。

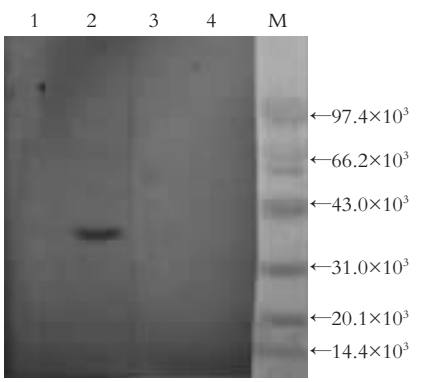


1 :对照组 ;2 :AdSP3 表达组 ;3 :蛋白标准

图 2　表达产物的鉴定结果

2.3　AdSP3 的原核表达产物免疫反应性研究结果

利用 PAP2 抗血清的识别,经 Western blot 方法的鉴定 :在 PAP2 抗血清存在的情况下,表达菌株组在 NC 膜上出现一 35 ×10³ 棕色条带,而其他 3 个泳道均未见阳性着色条带。结果提示 :原核表达产物相对分子质量在 35 ×10³ 左右,且能够与 PAP2 抗血清反应,即表达产物具有免疫反应性(图 3)。



1 :空菌株,1∶500 PAP2 抗血清(+) ;2 :表达组,1∶500 PAP2 抗血清(+) ;3 :空菌株阴性对照,抗血清(-) ;4 :表达组阴性对照,抗血清(-) ;M :预染蛋白标准

图 3　检测表达产物免疫反应性的 Western blot 结果

3　讨论

本研究中,对不同大劣按蚊与烟草天蛾丝氨酸蛋白酶生物信息学分析结果显示,虽然该两种昆虫在生物分类上属于不同的种类,具有较大的遗传距离,但大劣按蚊丝氨酸蛋白酶与烟草天蛾的 PAP 在氨基酸序列上具有较高的相似性,且在很多重要位点上高度保守,包括组成其活性中心的催化三联体(S、H、D)位点。而丝氨酸蛋白酶的催化功能主要取决于其活性中心,即由 S、H 和 D 组成的催化三联体[6]。这在理论上,支持了利用烟草天蛾丝氨酸蛋白酶抗血清研究大劣按蚊丝氨酸蛋白酶的可行性。

原核表达是分子生物学常用的方法之一,是通过分子克隆研究基因及其编码蛋白功能的简便而有效的手段。PinPoint 表达载体系统则是进行原核表达的一种常用载体,其表达蛋白的鉴定和纯化简便易行[7]。其表达产物带有一生物素化标签,可利用生物素与特异亲和素结合的原理,对表达产物进行 Western blot 鉴定和蛋白纯化。而 JM109 大肠杆菌产生内源性生物素化蛋白较少,采用 JM109 为宿主菌可减少内源性生物素蛋白对实验结果的干扰。本研究中利用已构建的 PinPointTM Xa-1/AdSP3 表达质粒,在 JM109 大肠杆菌中成功进行了原核表达。Western blot 检测表达融合蛋白的免疫反应性,结果证明此融合蛋白能够与烟草天蛾的丝氨酸蛋白酶抗血清反应。这一结果同时提示,烟草天蛾丝氨酸蛋白酶抗体与大劣按蚊丝氨酸蛋白酶存在交叉免疫反应。

丝氨酸蛋白酶是昆虫抗感染天然免疫中最为重要的成分之一,研究该酶在蚊抗疟原虫感染中的作用具有重要意义[8-10]。本研究首先对不同昆虫(尤其是大劣按蚊和烟草天蛾)的丝氨酸蛋白酶氨基酸序列进行生物信息学分析,以判断大劣按蚊与烟草天蛾丝氨酸蛋白酶在氨基酸序列上的相似性 ;然后对大劣按蚊丝氨酸蛋白酶 AdSP3 进行原核表达,检测表达产物与烟草天蛾丝氨酸蛋白酶抗血清之间的免疫反应性。这将从理论和实验两个层面探讨利用烟草天蛾抗血清研究大劣按蚊丝氨酸蛋白酶的可行性。综合上述生物信息学分析结果和表达产物免疫活性检测结果得知,烟草天蛾 PAP 与大劣按蚊丝氨酸蛋白酶在氨基酸序列上保守,在实验基础上证明二者存在交叉免疫反应。因此,利用烟草天蛾丝氨酸蛋白酶抗血清研究大劣按蚊丝氨酸蛋白酶在理论和实验上均是可行的。尽管利用抗交叉抗原抗血清研究蛋白功能具有一定的不确定性,但在尚无同种蛋白抗血清的情况下,这也不失为一种可行的研究思路。例如,烟草天蛾前酚氧化酶活化酶(PPO) IgG 和按蚊 PPO 之间也有较强的交叉反应,Jiang 等[11] 和徐文岳等[12] 便分别用烟草天蛾 PPO IgG 成功地检测出了冈比亚按蚊和大劣按蚊血淋巴中的 PPO ,而 PPO 在黑化包被反应中恰好是丝氨酸蛋白酶的下游蛋白和作用对象。这也进一步肯定了该思路的可行性。本研究为下一步从蛋白水平研究大劣按蚊丝氨酸蛋白酶的生物学特性奠定了基础。

参考文献：

[1] Levashina E A. Immune responses in Anopheles gambiae[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2004, 34(7):673 – 678.

[2] Gorman M J, Paskewitz S M. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31(3):257 – 262.

[3] Mulinari S, Hacker U, Castillejo-Lopez C. Expression and regulation of Spatzle-processing enzyme in Drosophila[J]. FEBS Lett, 2006, 580(22):5406 – 5410.

[4] Jiang H, Wang Y, Yu X Q, *et al*. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from Manduca sexta hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2003, 33(10):1049 – 1060.

[5] 徐文岳,黄复生,夏莉莎,等. 大劣按蚊丝氨酸蛋白酶 cDNA 克隆和表达[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(2):92 – 95.

[6] Perona J J, Craik C S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases[J]. Protein Sci, 1995, 4(3):337 – 360.

[7] Kosovsky J, Durmanova V, Kudelova M, *et al*. A simple procedure for expression and purification of selected non-structural (alpha and beta) herpes simplex virus 1 (HSV-1) proteins[J]. J Virol Methods, 2001, 92(2):121 – 129.

[8] Cerenius L, Soderhall K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates[J]. Immunol Rev, 2004, 198:116 – 126.

[9] Royet J, Reichhart J M, Hoffmann J A. Sensing and signaling during infection in Drosophila[J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(1):11 – 17.

[10] Kambris Z, Brun S, Jang I H, *et al*. Drosophila immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation[J]. Curr Biol, 2006, 16(8):808 – 813.

[11] Jiang H, Wang Y, Korochkina S E, *et al*. Molecular cloning of cDNAs for two pro-phenol oxidase subunits from the malaria vector, Anopheles gambiae[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1997, 27(7):693 – 699.

[12] 徐文岳, 黄复生, 况明书, 等. 约氏疟原虫卵囊黑化期间大劣按蚊血淋巴蛋白的分析[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9):1098 – 1100.

(编辑 薛国文)

(上接4页)

1.6 LAMS 对 LOVO 细胞 Bcl-2 基因蛋白影响

分别取增殖抑制试验实验组与对照组细胞,按常规提取全细胞蛋白,将蛋白浓度均调整为 3 mg/ml,经变性电泳、免疫印迹、化学发光法显示 Bcl-2 基因蛋白表达程度、经图像分析系统测采集、分析结果。

1.7 凋亡细胞测定

将 1×10^5/ml 浓度的 LOVO 细胞(一式三份),接种于内置盖玻片的六孔培养板,分别按细胞增殖抑制试验处理后,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 12 h,取出盖玻片按 TUNEL(POD)试剂盒说明书进行细胞固定、显色、封片。光镜 400 倍放大下计数细胞核呈棕黄色的细胞比例。

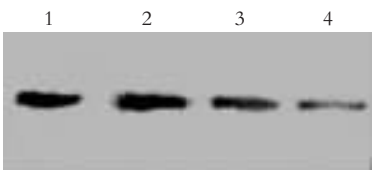
2 结果

2.1 LAMS 对 LOVO 细胞增殖的抑制程度

对照孔 D(600)值为(0.81 ± 0.12),加 3 μl LAMS 孔为(0.63 ± 0.08)低于对照孔($P<0.05$);加6、9 μl LAMS 孔的分别为(0.41 ± 0.09)、(0.18 ± 0.08),低于对照孔($P<0.01$)。

2.2 LAMS 对 LOVO 细胞 Bcl-2 基因蛋白的影响

加3、6、9 μl 的孔的积分光密度分别为 2 919、2 261、1 384,显著低于对照孔的 5 978($P<0.01$),见图 1。



1:对照孔;2:3 μl LAMS;3:6 μl LAMS;4:9 μl LAMS

图1 蛋白印记观察 LAMS 对 LOVO 细胞增殖的抑制程度

2.3 LAMS 促使 LOVO 细胞凋亡的效果

对照孔中棕黄色细胞比例为 5%,加入 LAMS 3 μl 后为 20%,高于对照组($P<0.05$)。加入 LAMS 6、9 μl 后,分别为 31%、59%,皆高于对照孔($P<0.01$)。

3 讨论

LAMS 是一具有多种生物功能的多糖酯。文献[3]报道体内、外实验证实 LAMS 具有抑制肿瘤细胞增殖的作用,但其分子机制少见报道。作者在不同剂量 LAMS 造成的 LOVO 细胞增殖抑制状态下,检测凋亡细胞数量变化,Bcl-2 基因蛋白含量变化。Bcl-2 是抗凋亡基因,且与肿瘤的发展密切相关[4]。它通过其转录翻译产物 Bcl-2 蛋白,参与细胞内抗氧化作用和抑制钙离子跨膜运动而调控细胞凋亡。它的表达增强或减少是影响肿瘤细胞凋亡和增殖状态的重要因素之一。本实验显示 LAMS 可导致 LOVO 细胞 Bcl-2 基因蛋白表达减少,减少程度随 LAMS 剂量的增加而加大,与此同时 LOVO 细胞株增殖受抑制的程度加大,凋亡细胞数量增加。说明 LAMS 抑制该 LOVO 细胞增殖、促进凋亡与降低 Bcl-2 基因蛋白有关。

关键词:昆布多糖硫酸酯 结肠癌细胞 增殖
中图法分类号:R73-361 文献标识码:B

参考文献：

[1] 邱莲女, 周永列. Bcl-2 与肿瘤关系的研究进展[J] 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 2000, 21(4):196 – 199.

[2] 范曼芳,陈琼华. 褐藻淀粉和褐藻淀粉硫酸酯的制取、分析及生物活性比较[J]. 中国药科大学学报, 1988, 19(1):30 – 34.

[3] Hoffman R, Paper D H, Donaldson J, *et al*. Inhibition of angiogenesis and murine tumour growth by laminarin sulphate[J]. Br J Cancer, 1996, 73(10):1183 – 1186.

[4] Baretton G B, Diebold J, Christoforis G, *et al*. Apoptosis and immunohistochemical Bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance[J]. Cancer, 1996, 77(2):255 – 264.

(编辑 邓强庭)