DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.014
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
506 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0506-03

约氏疟原虫感染斯氏按蚊后血淋巴 PPO 的酶解激活

杨 松[1],时超美[1],黄复生[1],吴玉章[2],张锡林[1] (第三军医大学基础医学部:[1]病原生物学教研室,[2]全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 了解约氏疟原虫感染雌斯氏按蚊成蚊是否发生黑化相关性酶级联反应。方法 挤压法收集雌斯氏按蚊成蚊血淋巴,Bradford 法检测血淋巴蛋白浓度,然后对血淋巴进行一维和二维 SDS-PAGE,继而利用 Western 印迹分析比较PPO 蛋白点的差异。结果 约氏疟原虫感染雌斯氏按蚊成蚊之前的血淋巴蛋白二维凝胶电泳后的 Western 印迹的 PVDF 膜上出现 2 个分子量均约为 64×10^3、等电点分别约为 7.4 和 7.6 的两个 PPO 蛋白点,感染后发现 8 个蛋白点,36×10^3 分子量处 3 个,等电点分别约为 7.2、7.4 和 8.0;30×10^3 分子量处 5 个,等电点分别约为 7.0、7.2、7.5、7.6 和 7.8。结论 约氏疟原虫感染雌斯氏按蚊成蚊之前的血淋巴 PPO 以异二聚体形式结构性表达于血淋巴内,感染后 PPO 发生免疫激活反应和酶学分解过程,提示 PPO 参与疟原虫卵囊黑化包被反应。

关键词:斯氏按蚊;约氏疟原虫;血淋巴;前酚氧化酶;双向电泳;Western 印迹
中图法分类号:R382.31;R384.1;R446.11 文献标识码:A

Proteolytic activation of prophenoloxidase in the hemolymph of *Anopheles stephensi* after *Plasmodium yoelii* infection

YANG Song[1], SHI Chao-mei[1], HUANG Fu-sheng[1], WU Yu-zhang[2], ZHANG Xi-lin[1] ([1]Department of Pathogenic Biology, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore occurrence or not of the cascade reaction related with melanization in *Anopheles stephensi* adult females infected with *Plasmodium yoelii*. **Methods** The hemolymph of *Anopheles stephensi* adult females was collected by expulsion method. The concentration of hemolymph protein was examined by Bradford method, and then the hemolymph was analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The differential PPO spots were identified and compared by Western blotting. **Results** Western blot analysis after 2-DE revealed that there were two specifically separated PPO protein spots (molecular weight: 64×10^3, isoelectric points: 7.4 and 7.6) in the polyvinyl difluoride membrane before *Plasmodium yoelii* infection. After infection, however, there were 8 PPO spots (3 spots with molecular weight of 36×10^3, isoelectric points at 7.2, 7.4, and 8.0; 3 spots with molecular weight of 30×10^3, isoelectric points at 7.0, 7.2, 7.5, 7.6, and 7.8). **Conclusion** PPO is constitutively expressed in the hemolymph of *Anopheles stephensi* adult females and exists as heterodimers *in vivo* before infection. After *Plasmodium yoelii* infection, however, immunological activation response and zymolysis of PPO in the hemolymph of *Anopheles stephensi* suggests that PPO participates in the melanotic encapsulation of oocysts of *Plasmodium yoelii*.

Key words: *Anopheles stephensi*; *Plasmodium yoelii*; prophenoloxidase; hemolymph; two-dimensional gel electrophoresis; Western blotting

前酚氧化酶(prophenoloxidase, PPO)是昆虫黑化防御反应的一种关键酶。黑化包裹是昆虫最重要的防御机制[1],也是按蚊抵御疟原虫感染免疫的最重要免疫机制[2],其主要成分来自血淋巴。国外主要是利用鳞翅类昆虫烟草天蛾[3]和双翅目昆虫冈比亚按蚊[4]易感株和抗性株与葡聚糖小珠和细菌作模型进行昆虫的识别和黑化包被反应研究,但葡聚糖小珠(无生命的化合物)、细菌与疟原虫(极富生命力的单细胞动物)对蚊免疫系统是完全不同的免疫刺激物,蚊基因对不同病原体表达、转录影响不完全相同,这直接影响了按蚊识别和黑化疟原虫机制的研究。二维凝胶电泳(two-dimen-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300292)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300292)
作者简介:杨 松(1970-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事疟疾、肾综合征出血热的分子流行病学和防治方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752243
通信作者:黄复生,电话:(023)68752244
收稿日期:2003-10-30;修回日期:2004-01-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

sional gel electrophoresis, 2-DE)可分离单个蛋白质, 是生命科学领域研究前沿技术之一[5]。而 Western blotting 具有凝胶高电泳分辨率和固相免疫反应高特异性、高敏感性等优点[6]。约氏疟原虫感染雌斯氏按蚊成蚊是否发生黑化相关性酶级联反应还缺乏足够依据, 本研究欲利用斯氏按蚊—约氏疟原虫为模型, 应用一维和二维 SDS-PAGE 及 Western blotting 技术阐明约氏疟原虫感染前后雌斯氏按蚊成蚊血淋巴 PPO 的变化规律, 为按蚊识别和黑化疟原虫的分子机制研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　按蚊和疟原虫感染　　斯氏按蚊 Hor 株为我室常规饲养, 选择 3～5 d 龄雌斯氏按蚊为对照组。正常昆明株小鼠 6 只(本校实验动物中心提供, 体质量 16～20 g)按常规腹腔接种约氏疟原虫 BY265 株, 3 d 后, 选择有 10%～20%原虫血症的小鼠供 3～5 d 龄雌蚊吸饲 3 h, 扣出饱血雌蚊并作为免疫攻击感染组。两组常规饲养 5 d 于 22～24 ℃、相对湿度 70%～80%的养蚊室内。

1.1.2　主要试剂　97.4×10^3 磷酸化酶 B、66.2×10^3 牛血清白蛋白、43.0×10^3 兔肌动蛋白、31.0×10^3 牛碳酸酐酶、20.1×10^3 胰蛋白酶抑制剂、14.4×10^3 鸡蛋清溶菌酶等标准分子量蛋白(中国科学院上海生物化学研究所), 十二烷基硫酸钠、甘氨酸、丙烯酰胺、双甲叉丙烯酰胺、2-β 巯基乙醇和四甲基乙二胺(Promega)。

1.1.3　主要仪器和分析软件　　Ultrospec 2 100 UV/visible spectrophotometer(英国), IPGphor 等电聚焦仪、SE600 电泳仪(均为 Amershan Pharmacia 公司提供), Western blot 试剂盒(博士德), 兔抗烟草天蛾 PPO 多克隆抗体(美国蒋浩波博士惠赠), BIO-RAD POWER/PAC1000 电转仪(美国)。

1.2　方法

1.2.1　蚊血淋巴采集及处理　　用对照和感染的雌斯氏按蚊成蚊为样品源。参照 Han 等[7]的方法并加以改进。2-DE 样品: 将 400 只雌蚊冷冻麻醉后, 剪去口器, 挤压蚊胸, 取第 1 滴清亮的液体即为血淋巴, 血淋巴加入冰浴封口膜上的 20 μl 2-DE 凝胶缓冲液(60 mmol/L Tris HCl pH 6.8, 10%甘油和 50%蛋白酶混合抑制剂: 1 mol/L 乙二胺四乙酸、苯甲基磺酰氟、苯硫脲、亮肽素和抑胰肽酶)内, 最后将收集的血淋巴移入 0.5 mL 微管中, −70 ℃ 保存备用。

1.2.2　Bradford 比色法检测蛋白浓度, 按文献[8]进行。

1.2.3　一维 SDS-PAGE　　采用 12%分离胶, 5%浓缩胶。每组样品及低分子量标准蛋白上样量均为 20 μl。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, 按文献[9]进行操作。

1.2.4　双向电泳试验　　根据 IPGphor 等电聚焦仪操作指南等方法并对样品处理加以改进后进行。具体为: 将 40 μl 样品加重涨液(8 mol/L 尿素, 2%CHAPS)、1.5 μl pH 3～10 IPG buffer、208.5 μl 重涨液和 2 mg DTT 混合后缓慢注入 13 cm IPG 胶槽, IPG 干胶条(pH 3～10, 13 cm)胶面朝下放入胶槽, 排除气泡, 约加 800 μl 2DE 覆盖液。置于 IPGphor 等电聚焦仪电极板上, 水化和等电聚焦在 20 ℃自动进行, 总电压时间积约 3×10^4 V·h, 其中水化为 12 h。等电聚焦后于平衡液 I (10 mg/ml DTT、1.5 mmol/L pH 8.8 Tris base、6.0 mmol/L 尿素、30%甘油、2%SDS 和痕量溴酚蓝)平衡 15 min, 再于平衡液 II(25 mg/ml 碘乙酰胺代替平衡液 I 中的 DTT)平衡 15 min。将平衡好的胶条放于 12.5%均匀 SDS-PAGE 上, 同时在 SDS-PAGE 的一个末端放浸有 10 μl 标准低分子量蛋白的加样纸片, 约 800 μl 0.5%琼脂糖封固胶条。SDS-PAGE 在 SE600 电泳仪中进行 15 mA/gel 电泳 20 min, 然后改变参数为 25 mA/gel 电泳约 5 h。取下板胶进行蛋白质电转移。

1.2.5　Western 印迹　　参照文献[10]并加以改进进行。具体为: 将 10×10 cm^2 PVDF 膜预先浸于 100%甲醇中活化 5 min, 然后按次序放滤纸和 SDS-PAGE, 加入转移缓冲液电转移条件为 200 mA、26V、5W 过夜。转移完毕后进行 0.4%丽春红染液染膜 1 min, dH_2O 脱色。随后将标准蛋白 Marker 剪下, 换氨基黑染色 5 min, 10%乙酸脱色, 电吹风吹干保存。2 张 PVDF 膜背靠背进行 1%脱脂奶粉封闭, 4 ℃过夜。PBS(0.1 mol/L, pH 7.4)洗膜 5 min×3 次, 加兔抗烟草天蛾 PPO 多克隆抗体(1∶2 000)稀释液 80 ml, 室温 3 h, 37 ℃ 2 h。PBS 洗膜 10 min×3, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1∶200) 10 ml, 37 ℃作用 1 h。PBS 洗膜 10 min×3, 加 DAB 显色, dH_2O 终止显色。

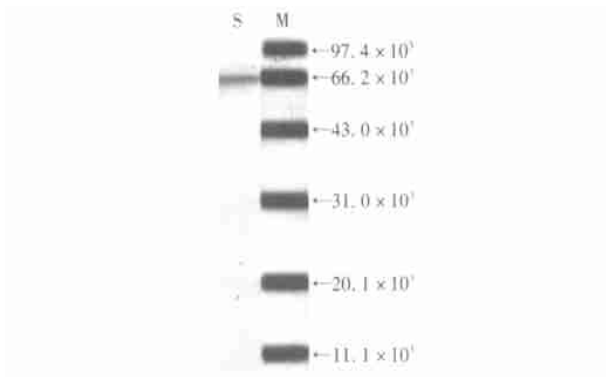
2　结果

2.1　雌斯氏按蚊成蚊血淋巴蛋白浓度

对照雌斯氏按蚊成蚊血淋巴蛋白 A_{595} 吸光值为 0.127, 浓度为 2.980 μg/μl; 约氏疟原虫感染后的雌斯氏按蚊成蚊血淋巴蛋白 A_{595} 吸光值为 0.328, 浓度为 6.688 μg/μl。

2.2　一维 SDS-PAGE 电转移结果

吸糖水组(S)斯氏按蚊血淋巴 SDS-PAGE 后进行 Western blot 发现 1 条 PPO 带, 分子量约为 66×10^3(图 1)。



S: Sucrose solution-feeding group; M: Protein marker

图 1　吸糖水组斯氏按蚊血淋巴 PPO 的一维 SDS-PAGE 后的 Western blot 图

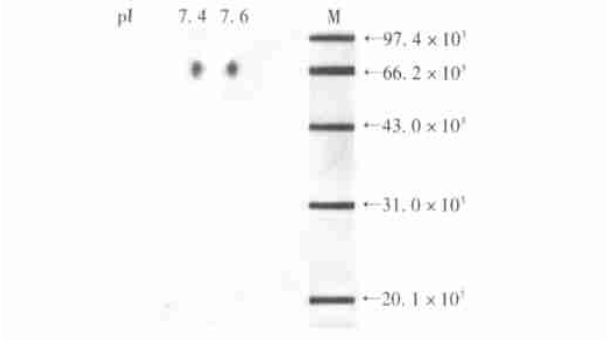
Fig 1　Western blot analysis after one-dimensional SDS-PAGE of PPO in the hemolymph of sucrose solution-feeding *Anopheles stephensi* adult females

2.3　二维凝胶电泳蛋白质电转移结果

吸糖水对照组 PVDF 膜上显示 2 个分子量均约为 64×10^3、

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

等电点分别约为 7.4、7.6 的两个分离的蛋白点(图 2)。

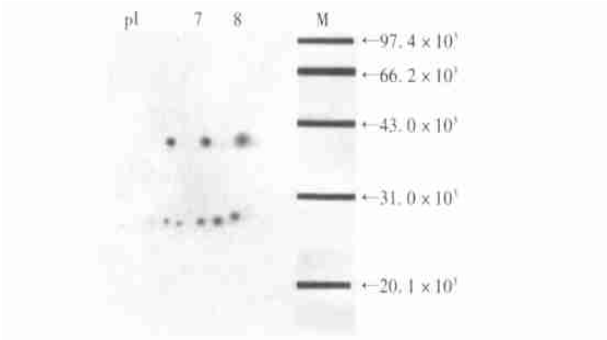


pI: Isoelectric points; M: Low molecular protein marker

图 2 雌斯氏按蚊血淋巴 PPO 二维凝胶电泳和 Western blot

Fig 2 Western blot analysis after two-dimensional gel electrophoresis of PPO in the hemolymph of *Anopheles stephensi* adult females

约氏疟原虫免疫攻击感染后 PVDF 膜上显示 8 个 PPO 特异点,分子量均约为 36×10^3 分子量处发现 3 个,等电点分别约为 7.2、7.4 和 8.0;30×10^3 分子量处发现 5 个,等电点分别约为 7.0、7.2、7.5、7.6 和 7.8(图 3)。



pI: Isoelectric points; M: Low molecular protein marker

图 3 雌斯氏按蚊血淋巴 PPO 双向电泳和 Western blot

Fig 3 Western blot analysis followed by two-dimensional gel electrophoresis of PPO in the hemolymph of *Anopheles stephensi* adult females infected with *Plasmodium yoelii*

3 讨论

目前多从基因水平进行按蚊免疫反应研究[11],蛋白质水平研究较少。本研究以约氏疟原虫为免疫刺激物,利用二维凝胶电泳技术对斯氏按蚊血淋巴蛋白进行了二维凝胶电泳分离和蛋白质电转移技术对血淋巴 PPO 进行了鉴定比较研究,结果显示被约氏疟原虫感染后的雌斯氏按蚊成蚊血淋巴蛋白浓度增加了,提示斯氏按蚊免疫相关蛋白质表达增加并分泌入血淋巴。约氏疟原虫感染斯氏按蚊之前采集的血淋巴经过一维 SDS-PAGE 及 Western blot 后,PVDF 膜上 PPO 呈现一条带,分子量均约为 64×10^3,此结果提示雌斯氏按蚊成蚊血淋巴中存在 PPO 分子,目前众多文献提到 PPO 是单聚体,为进一步了解其结构形式,本研究首次利用 2-DE 和 Western blot 后表明,吸糖水斯氏按蚊血淋巴 PPO 为分子量均约为 64×10^3、等电点分别约为 7.4 和 7.6 的两个点,提示 PPO 可能以异二聚体形式结构性表达于血淋巴中。约氏疟原虫感染后血淋巴 PPO 出现了多个低分子量和等电点介于 7~8 的蛋白点,其意义可能为疟原虫感染后斯氏按蚊血淋巴内 PPO 发生了酶学级联降解反应。已知 PPO 由血细胞合成和分泌入血淋巴中,构成按蚊免疫反应的细胞成分之一,在丝氨酸蛋白酶和蛋白辅助因子的协同,通过限制性蛋白水解作用,使 PPO 裂解释放一个小分子肽后转变成有活性的 PO[12],而参与黑化包被疟原虫反应。本研究首次表明斯氏按蚊血淋巴 PPO 很可能为二聚体,疟原虫感染后 PPO 级联反应可能发生激活。

参考文献:

[1] Lavine M D, Strand M R. Insect hemocytes and their role in immunity[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(10): 1295-1309.

[2] Cui L, Luckhart S, Rosenberg R. Molecular characterization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria mosquito *Anopheles stephensi*[J]. Insect Mol Biol, 2000, 9(2): 127-137.

[3] Yu X Q, Zhu Y F, Ma C, *et al*. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(10): 1287-1293.

[4] Chun J, Mcmaster J, Han Y S, *et al*. Two dimensional gel analysis of haemolymph proteins from Plasmodium-melanizing and *non-melanizing* strains of *Anopheles gambiae*[J]. Insect Mol Biol, 2000, 9(1): 39-45.

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

[6] 董 燕, 张 枫, 梅柱中, 等. 电转移中蛋白质的透膜现象及其对蛋白质印迹结果的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(3): 449-453.

[7] Han Y S, Chun J, Schwartz A, *et al*. Induction of mosquito hemolymph proteins in response to immune challenge and wounding[J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23(7-8): 553-562.

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

[9] 时超美, 黄复生, 况明书, 等. 斯氏按蚊血淋巴酚氧化酶与约氏疟原虫卵囊黑化的关系[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(1): 11-13.

[10] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 400-403.

[11] Christophides G K, Zdobnov E, Barillas M C, *et al*. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*[J]. Science, 2002, 298(5591): 159-165.

[12] Hall M, Scott T, Sugumaran M, *et al*. Proenzyme of *Manduca sexta* phenoloxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning[J]. Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92(17): 7764-7768.

(编辑 冯崇英)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net