DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.013
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

文章编号:1000-5404(2004)06-0501-05

论著

二维电泳-质谱分析斯氏按蚊中约氏疟原虫卵囊黑化相关的差异表达蛋白

杨 松[1],黄复生[1],吴玉章[2],况明书[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 用2-DE和PMF分离和鉴定约氏疟原虫卵囊黑化相关的斯氏按蚊中肠和血淋巴差异表达蛋白。方法 用固相pH梯度二维电泳分离中肠和血淋巴差异表达蛋白,考马斯亮蓝染色,Image Master VDS-CL凝胶扫描和PDQuest 2D Elite软件分析,差异蛋白质点用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱测定其胶内酶解后的肽质指纹图谱,用PeptIdent软件查询SWISS-PROT数据库。结果 获得了分辨率和重复性均较好的2-DE考马斯亮蓝图谱,吸硝喹糖水组蚊血淋巴和中肠蛋白点分别有101个和104个,感染组分别有115个和162个,匹配点分别为51个和44个。斯氏按蚊血淋巴和中肠蛋白质组中蛋白点分别主要分布于酸性端和碱性端,血淋巴和中肠差异蛋白也分别主要分布于酸性端和碱性端。随机取25个差异蛋白点进行胶内原位酶解-肽质指纹图谱分析得到了16个蛋白质肽质指纹图,查询数据库初步鉴定了8个蛋白质,分别为与抗疟免疫、黑化、结构、糖代谢、细胞通讯等相关蛋白。结论 建立了一套重复性和分辨率较好的斯氏按蚊蛋白质分离和鉴定的二维凝胶电泳-肽质谱指纹分析法,约氏疟原虫卵囊黑化前后,斯氏按蚊血淋巴和中肠伴随大量差异表达蛋白,部分蛋白可能与黑化有关。

关键词:斯氏按蚊;蛋白质组;二维电泳;基质辅助激光解析电离飞行时间质谱;黑化
中图法分类号:Q51;R384.1;R446.9 文献标识码:A

Analysis of differentially expressed proteins from *Anopheles stephensi* related with *Plasmodium yoelii* oocyst melanization by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF-mass spectrometry

YANG Song[1], HUANG Fu-sheng[1], WU Yu-zhang[2], KUANG Ming-shu[1] ([1]Department of Pathogenic Biology; [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To separate and identify the differentially expressed proteins in the midguts and hemolymph from *Anopheles stephensi* adult females by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting (PMF). **Methods** A series of methods, including immobilized pH gradient two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, Coomassie brilliant blue staining, scanning by the Image Master VDS-CL apparatus, PDQuest 2D Elite analysis software, peptide mass fingerprinting based on matrix-assisted laser desorption/ionization time of flying mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) by in-gel enzymologic extract, and SWISS-PROT database searching, were used to separate and identify the differentially expressed proteins in the midguts and hemolymph. **Results** The 2-DE pattern with higher resolution and reproducibility was obtained. After Coomassie brilliant blue staining, the 2-DE image analysis by PDQuest 2-DE software detected 101 spots in the hemolymph and 104 spots in the midgut from the nitroquine acetate-feeding group, respectively, and 115 spots in the hemolymph and 162 spots in those from infected blood-feeding group, respectively. Fifty-one matched spots in the hemolymph and 44 matched spots in the midgut were shared between the two groups. Differentially expressed proteins spots in the hemolymph were mainly located at isoelectric points of the basic end, but the differential spots in the midgut at the acidic end. Twenty-five spots were incised from Coomassie brilliant blue staining gel randomly and digested in-gel by TPCKtrypsin. Sixteen peptide mass fingerprint maps were obtained by MALDI-TOF-MS. The typical peptide masses were searched in the SWISS-PROT database by PeptIdent software. Eight proteins or proteinases, related with anti-malarial

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:2003-10-11;修回日期:2004-01-05
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

immunity, melanization, structure, carbohydrate metabolism, and cell-communication, were identified in the database. **Conclusion** We have established an analytic method of protein separation by 2-DE and identification by PMF with the advantages of higher resolution and better reproducibility. Our results show that markedly differentially expressed proteins can be observed in the midgut and the hemolymph before and after melanization of *Plasmodium yoelii* oocysts. Partial differential protein spots might be related with melanization.

Key words: *Anopheles stephensi*; proteome; two-dimensional gel electrophoresis; matrix-assisted laser desorption/ionization time of flying mass spectrometry; melanization

二维凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)从理论到技术的完善及其与质谱、N-端测序等下游技术的结合适应了蛋白质组研究发展的要求[1]。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flying mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)可实现2-DE分离后蛋白质的快速、灵敏和高通量鉴定,而肽质指纹图谱(peptide mass fingerprint, PMF)是MALDI-TOF-MS鉴定蛋白质的一种主要技术,即对酶解蛋白质进行MS测定肽片段的质量,获得一系列肽片段质量,结合其等电点、分子量、物种来源、修饰情况等参数即可查询蛋白质数据库实现蛋白质的鉴定[2,3]。黑化包被反应是按蚊抵御疟原虫感染免疫的最重要免疫机制,按蚊中肠和血淋巴蛋白成分可能在识别和黑化包被疟原虫中起重要作用,而抗性株和易感株冈比亚按蚊黑化包被反应存在差异[4]。本研究利用斯氏按蚊-约氏疟原虫为模型,欲应用2-DE和PMF分离和鉴定约氏疟原虫卵囊黑化相关的斯氏按蚊中肠和血淋巴的差异表达蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 疟原虫、小鼠和按蚊 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。昆明株小鼠6只由本校实验动物中心提供,体质量16~20 g。斯氏按蚊Hor株于我室常规饲养。

1.1.2 主要试剂 硝喹(上海医药工业研究院),高分子量Marker包括200×10³肌球蛋白重链、130×10³钙调结合蛋白、97.4×10³磷酸化酶B、66.2×10³牛血清白蛋白、43.0×10³兔肌动蛋白(北京中山公司),十二烷基硫酸钠、甘氨酸、丙烯酰胺、双甲叉丙烯酰胺(Biomol),2-β 巯基乙醇(华美)和四甲基乙二胺(Promega),蛋白酶抑制剂(Boehringer Mannhein),TPCK处理的胰蛋白酶(TPCKtrypsin)和三氟乙酸(Sigma),碘乙酰胺(Acros),乙腈(天津市四友生物医学技术有限公司)。

1.1.3 主要仪器和分析软件 Millipor超纯水仪(法国),JY92-Ⅱ型超声波细胞粉碎仪(宁波新芝科器研究所),Ultrospec 2100 UV/visible spectrophotometer(英国),IPGphor等电聚焦仪、SE600电泳仪、ImageMaster VDS-CL双向凝胶扫描仪和ImageMaster 2D Elite软件(均为Amershan Pharmacia公司提供),Reflex Ⅲ MALDI-TOF-MS质谱仪(德国Bruker公司),PeptIdent软件(国家生物医学中心提供,http://www.proteomics.com.cn)。

1.2 方法

1.2.1 按蚊感染、分组及给药 正常小鼠按常规腹腔接种约氏疟原虫,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,分成2组。常规饲养5 d后分为用药组和对照组,前者喂饲含0.1%硝喹[5](nitroquine acetate, NA)蔗糖水,后者喂蔗糖水。两组蚊均在24~25 ℃,相对湿度70%~80%的养蚊室饲养。

1.2.2 蚊血淋巴采集及处理 参照Han等[6]的方法并加以改进。将2组雌蚊(各取750只)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)(冰上操作),最后将收集的血淋巴移入0.5 ml微管中,-70 ℃保存备用。

1.2.3 蚊胃组织的采集及处理 牵拉法收集用药3 d蚊中肠组织。具体为将2组雌蚊(各取69只)冷冻麻醉后,剪去头部,从蚊腹部末端将消化道拉出,弃去马氏管和前肠,将在胃放入含冷冻的PBS(0.1 mol/L, pH 7.4)缓冲液的1.5 ml的Eppendorf管内漂洗1次,重蒸馏水洗3次去除盐离子,然后各加110 μl组织裂解液(8 mol/L尿素+4% CHAPS+40 mmol/L Tris-base)和10 μl 50%蛋白酶混合抑制剂(1 mol/L的乙二胺四乙酸、苯甲基磺酰氟、苯硫脲、亮肽素和抑胰肽酶),超声波粉碎5 min提取组织蛋白,15 000 r/min离心30 min,移上清于0.5 ml的Eppendorf管中,-70 ℃保存备用。

1.2.4 Bradford比色法检测蛋白浓度,基本按文献[7]进行。

1.2.5 二维电泳试验 根据Chun[4]、牟芝蓉[8]和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:75 μl样品加重涨液(8 mol/L尿素,2% CHAPS)室温作用1 h以上,然后与4 μl pH 3~10 IPG缓冲液、171 μl重涨液和2 mg DTT混合,总体积250 μl吸入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1 000 μl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20×10³ 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-PAG上,同时在SDS-PAG的一个末端放浸有20 μl标准低分子量蛋白的加样纸片,约800 μl 0.5%琼脂糖封胶。SDS-PAGE在SE600电泳仪中进行10 mA/gel电泳30 min,然后改变电流为25 mA/gel,直到溴

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

酚蓝指示剂达到胶底线。

1.2.6　凝胶染色、扫描和分析　　考马斯亮蓝染色(甲醇∶水∶冰乙酸=45∶45∶10, 0.25%考马斯亮蓝 R250)。ImageMaster VDS-CL对二维电泳凝胶扫描, 数字化图像文件采用 ImageMaster 2D Elite 软件分析。图像分析包括蛋白质点的检测、背景扣除和点的匹配, 蛋白匹配以对照组的凝胶图像作为参考胶。

1.2.7　质谱样品制备　　凝胶脱色: 随机选取较浓的差异点在图象上做好标记, 用干净的解剖刀将所确定的考马斯亮蓝染色后凝胶中的蛋白点切下, 并细切成 1~2 mm^2 大小的胶片, 然后置于 1.5 ml Eppendorf 管中, 用水清洗几次后用 50%乙腈 25 mmol/L NH_4HCO_3 的溶液 50~100 μl 浸泡胶片, 振荡 20 min, 弃去溶液, 再重复 1~2 次, 至胶片中的蓝色褪尽。酶切: 真空离心干燥或 37 ℃烤箱中放置 20 min, 使胶片完全脱水, 凝胶体积缩小, 加 5~10 μl 胰蛋白酶液(0.01 μg/μl, 25 mmol/L NH_4HCO_3 配制), 4 ℃冰箱放置 20~30 min, 待酶液完全被吸收后, 补充 5~10 μl 25 mmol/L NH_4HCO_3, 37 ℃保温 15 h。肽提取: 加 5% TFA, 50~100 μl 于 40 ℃保温 1 h, 吸去上清液后, 加 2.5%TFA、50%乙腈于 30 ℃保温 1 h, 吸出上清, 合并上清液, 冷冻干燥, 待鉴定(PMF)。

1.2.8　肽质指纹图谱分析　　制备好的样品置于 pro-FlexTM-MALDI-TOF-MS 仪上进行分析, 采用线性模式、正离子谱测定, 离子源加速电压 1 为 20 kV, 加速电压 2 为 18.85 kV, N_2 激光波长 337 nm, 脉冲宽度为 3 ns, 离子延迟提取 500 ns, 真空度 4×10^{-7} Torr; 质谱信号单次扫描累加 50 次, 并用基质峰和胰蛋白酶自动降解离子峰为内标校正质谱峰, 获得肽质指纹图谱。

1.2.9　数据库查询　　直接通过中国国家生物医学中心的蛋白质组学网站(http://www.proteomics.com.cn), 利用 PeptIdent 软件进行查询。查询条件: PMF 中的肽片段质量控制在 800~4 000, 表观 pI 的误差范围为±0.5, 表观 MW 的误差范围为±20%, 肽片段分子量最大容许误差控制在±0.5, 胰蛋白酶解片段不完全选择为 1 个, 物种来源选择昆虫, 离子选择[M+H]+和 AVERAGE, 最少匹配肽片段数规定为 4, 碘乙酰胺处理的半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸(carbamidomethyl-Cys, Cys-CAM), 被选择的片段峰信号均应较强, 为基线宽度的 1 倍以上。

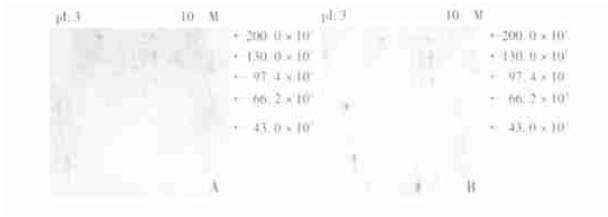
2　结果

2.1　用药组和对照组血淋巴蛋白浓度和含量

用药组和感染对照组蚊血淋巴蛋白浓度分别为 2.449 μg/μl 和 3.760 μg/μl, 蛋白质含量分别为 183.690 μg 和 281.985 μg。用药组和对照组蚊中肠蛋白浓度分别为 6.006 μg/μl 和 6.522 μg/μl, 蛋白质含量分别为 782.6 μg 和 720.7 μg。

2.2　二维电泳结果

斯氏按蚊血淋巴蛋白凝胶扫描结果发现用药组有 101 个蛋白质点, 对照组有 115 个蛋白质点, 相同有 51 个, 不相同的分别有 50 个和 64 个。与对照组相比, 用药后大多数中肠蛋白质表达水平下调, 个别点表达上调。蛋白质点主要位于 MW (40~60)×10^3 之间, pI 7 附近。差异蛋白质点 MW 主要位于 60×10^3 左右, pI 偏碱性端(图 1)。



pI: Isoelectric points; M: Protein marker

图 1　感染组(A)和硝喹组(B)斯氏按蚊血淋巴二维电泳(考马斯亮蓝染色)

Fig 1　Two-dimensional gel electrophoresis of the hemolymph from infected blood-feeding (A) or NA-feeding (B) groups (Coomassie brilliant blue staining)

斯氏按蚊中肠蛋白凝胶扫描结果发现用药组有 104 个蛋白质点, 对照组有 162 个蛋白质点, 匹配点 44 个, 非匹配点分别为 60 个和 118 个。差异蛋白质点 MW 主要位于 60×10^3 左右, pI 偏酸性端(图 2)。



pI: Isoelectric points; M: Protein marker

图 2　感染组(A)和硝喹组(B)斯氏按蚊中肠蛋白二维电泳(考马斯亮蓝染色)

Fig 2　Two-dimensional gel electrophoresis of the midgut proteins from the infected blood-feeding (A) or NA-feeding (B) groups (Coomassie brilliant blue staining)

2.3　部分差异蛋白质点的 PMF

选择肉眼很明显的差异蛋白质点, 经切割、脱色、还原、烷基化、胰酶降解、肽提取 25 个点后, 用 MALDI-TOF-MS 获得 16 张肽质指纹图。图 3 是差异蛋白质点的肽质指纹图, 其中部分质谱的质量较高, 部分 PMF 的肽片段峰信号较弱。

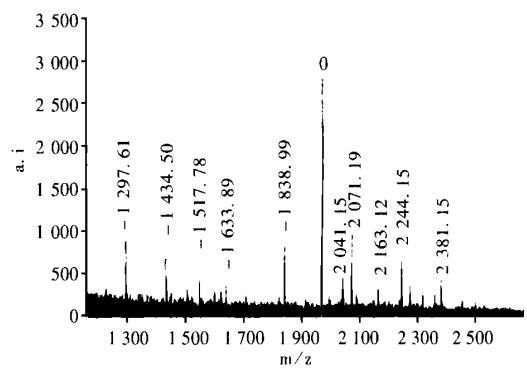


图 3　斯氏按蚊血淋巴差异蛋白肽质指纹图谱

Fig 3　Peptide mass fingerprint map of a differential hemolymph protein in *Anopheles stephensi*

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

2.4 MALDI-TOF-MS-PMF 数据的数据库查询结果

通过 ExPASY 中的 PeptIdent 查询软件应用 MALDI-TOF-MS-PMF 数据在限制相应的查询条件下搜索 SWISS-PROT，将查询到的结果再结合双向电泳相应点的表观等电点、分子量、匹配片段的多少和覆盖率等进行综合分析，在获得的 16 张 PMF 数据中的搜索结果有 3 种：①没有匹配数据库中的任何记录，有 9 个；②匹配到数据库中蛋白质，蛋白只有其部分序列被测定，尚需进一步鉴定，有 8 个；③在数据库中匹配到符号结果要求的已知蛋白质有 8 个（表 1）。这些蛋白与斯氏按蚊抗疟免疫、黑化、结构、糖代谢和细胞通讯等有关。

质谱测得第 1 蛋白质点得 PMF 数据是 1 036.35，1 146.41，1 526.65，1 890.62，1 982.77，2 137.79，2 272.99，2 382.93，2 749.15，2 768.07，在前述限定下查询 SWISS-PROT，肽片段匹配数在 4 个以上的有 2 个蛋白质，再结合该点在 2-DE 图谱上的表观 pI 和 MW 及序列覆盖率，认为查询到的 Q27571 蛋白质符合结果要求，该蛋白质的匹配和序列覆盖情况见表 2。

表 1 用 **PeptIdent** 软件在 **SWISS-PROT** 数据库中搜索到有意义的蛋白质点

Tab 1 Matched protein spots in the midgut of *Anopheles stephensi* searched by PeptIdent software in the SWISS-PROT database

Spot ID	SWISS-PROT ID	Peptide matched	Theoretical MW	Theoretical pI	Name of protein	Sourse of samples
1	Q27571	4/10	151 783.85	8.08	Nitric-oxide synthase	Midgut
2	Q03376	10/21	184 024.69	8.07	Balbiani ring protein	Midgut/hemolymph
3	P98159	4/14	287 244.56	5.57	Serine protease Nudel.	Hemolymph
4	P41825	5//24	70 251.41	5.55	Heat shock protein 70A1	Midgut
5	Q01604	4/22	43 861.76	7.01	Phosphoglycerate kinase	Midgut
6	Q9XIL9	4/7	96 996.65	6.09	Glycogen phosphorylase	Midgut
7	P40589	4/13	56 485.72	9.31	WNT4-protein	Midgut
8	Q95SK3	4/9	57 742.14	4.98	CDK5RAP-like protein	Hemolymph

表 2 **Spot 2-PMF** 数据在 **SWISS-PROT** 中查询到的 **Q03376** 蛋白的匹配情况

Tab 2 Matching of spot 2-PMF data with protein Q03376 in SWISS-PROT database

User mass	Matching mass	Δmass (Dalton)	#MC	Modification	Position	Peptide sequence
1036.35	1036.4815	0.1315	1		213-220	IWCKNNCR
1146.41	1146.5572	0.1472	1		389-399	DAPVCTAGKER
1526.65	1526.6436	−0.0063	0	1xCys-CAM	810-822	FIENICDCACPNK
1890.62	1890.8183	0.1983	2	1xCys-CAM	1563-1577	YWIDKEDCACQCLKIK
1982.77	1982.8227	0.0527	1		1539-1555	IWCQETCKCECASEPPR
1982.77	1982.8881	0.1181	1	3xCys-CAM	1447-1463	VFIPTTCGCKCGNKPNK
2137.79	2137.9286	0.1386	1		129-148	SCACVCPNADKCTAP QVWNK
2272.99	2272.909	−0.0809	2	2xCys-CAM	394-1412	KCDSPKTWDENSCSC QCPK
2382.93	2383.0661	0.1361	2	3xCys-CAM	803-822	SCKAPQKFIENICDC ACPNK
2749.15	2749.2499	0.0999	2	2xCys-CAM	213-237	IWCKNNCRCICPTAE PAGGCSAPIK
2768.07	2768.183	0.113	2	2xCys-CAM	1052-1074	TCEGPQRWCDNQCKC ICPQVNTK

3 讨论

IPG 等电聚焦二维凝胶电泳和质谱法 PMF 胶内酶切法分离和鉴定蛋白质方法的建立和应用，为黑化相关蛋白表达差异研究提供了好的技术平台，为按蚊蛋白质组研究奠定了基础。但是还需进一步确证。由于银染法的敏感性是考马斯亮蓝 R-250 的 50～100 倍，有利于蛋白质组复杂而微量蛋白成分的显示[9]，而本研究也表明按蚊血淋巴蛋白含量很低，有必要将银染法代替考马斯亮蓝 R-250 染色法，这是今后值得注意的问题。

昆虫黑化机制研究一直是昆虫先天性免疫反应研究热点，寻找引起疟原虫黑化包被的识别分子是媒介生物学的一个重要目标。Chun 等[4] 应用生理盐水、磁株注射和损伤为模型，采用 2-DE 对两株冈比亚按蚊血淋巴蛋白表达差异进行分析发现了丝氨酸蛋白酶 Ag-Sp14D1。2-DE 系统是将高分辨率的等电聚焦和 SDS-PAGE 电泳的联合应用，2-DE 后，可在凝胶上形成无数的圆形或椭圆形的彼此分离的斑点，敏感性远远高于传统的 SDS-PAGE，迄今，2-DE 仍是蛋白质组和蛋白质表达分析研究的核心技术之一[11]。本研究表明 2-DE 和 PMF 方法的确重复性高而敏感，但是由于按蚊个体小，中肠尤其是血淋巴来源非常有限，给实验带来了困难。如以细胞为样品进行蛋白的 2-DE，一般要求 10^7 细胞数量，而本实验显示 1 只蚊血淋巴中约有 10^3 细胞，即使取 10^3 只蚊，也仅仅才 10^6 细胞，所以图像效果未必好于鼠等哺乳动物。以组织为材料则要求至少提取 1 mg 蛋白，而因材料来源问题本实验也未达到。但是我们在实验中严格控制实验组和对照组间条件，初步筛选了疟原虫卵囊黑化过程中相关蛋白表达的变化，黑化过程中伴随抗疟免疫、代谢及结构蛋白等改变。已知一氧化氮由氮氧化物酶合成（nitric oxide synthase，NOS），参与了抗疟感染和抑制按蚊胃内卵囊的形成[10]，伯氏疟原虫感染后可引起斯氏按蚊[11] 和冈比亚按蚊[12] 中肠 NOS 表达，我们发现用药引起约氏疟原

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

虫卵囊黑化后, 斯氏按蚊中肠 NOS 表达下调, 提示硝喹降低了抗疟反应, 可能有其它更强的抗疟反应和黑化机制存在。我们发现中肠结构蛋白(如 Balbiani ring protein)表达呈下调趋势。血淋巴 SP 表达下降可能与黑化反应过程中消耗增加有关。Jiang 等[13] 已经从烟草天蛾血淋巴中纯化了 SP, 并认为它通过粘附入侵病原体表面, 在 PPO 激活过程中发挥重要作用。虽然 NA 可部分抑制按蚊非黑化免疫反应, 但可干扰疟原虫的正常发育和/或囊内子孢子活动力, 其机制可能为抑制约氏疟原虫蛋白或/和斯氏按蚊中肠蛋白的合成, 致疟原虫逃避宿主免疫反应的能力减弱, 而且非常可能的是 NA 破坏中肠的完整结构, 以使血腔 PPO 级联成分参与黑化过程。因此, 黑化很可能发生于 NA 的间接作用, NA 通过某种血淋巴模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRR)如 PGRP 促使斯氏按蚊识别约氏疟原虫[14], NA 作用后约氏疟原虫囊内子孢子便不能发育或逃离进入下一站血腔。Han 等[15] 认为: 伯氏疟原虫感染斯氏按蚊和冈比亚按蚊后, 中肠上皮释放一种蛋白酶和表面蛋白, 如果动合子不能迅速逃离入侵中肠上皮细胞, 便可引起动合子物理和/或化学性损害, 受损的中肠细胞很快以"出芽"方式得以修复并保持中肠上皮完整性, 如果动合子不能在中肠上皮修复之前逃离则可引发 PPO 级联反应。本研究提示, NA 致约氏疟原虫和/或斯氏按蚊中肠上皮细胞上皮的化学损伤可能是黑化的始因, 但不排除 NA 还通过增强斯氏按蚊的黑化反应而诱导约氏疟原虫卵囊黑化, 这有待进一步研究。

参考文献:

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

[2] Landry F, Lombardo C R, Smith J W. A method for application of samples to Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight targets that enhances peptide detection[J]. Anal Biochem, 2000, 279(1): 1－8.

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

[4] Chun J, Mcmaster J, Han Y, *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] 黄复生, 王兴相. 硝喹对约氏疟原虫卵囊和子孢子作用的观察[J]. 第三军医大学学报, 1991, 13(1): 1－4.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 牟芝蓉, 吴玉章, 李晋涛. 双向电泳分析比较维甲酸诱导 HL60 细胞分化的蛋白表达差异[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(10): 1153－1155.

[9] 詹显全, 陈主初, 关勇军, 等. 双向电泳－飞行时间质谱法分析人肺鳞癌细胞 NCI-H520 蛋白质组成分[J]. 癌症, 2001, 20(6): 575－582.

[10] Montard A, Landau I, Nussler A, *et al*. The role of reactive nitrogen intermediates in modulation of gametocyte infectivity of rodent malaria parasites[J]. Parasite Immunol, 1993, 15(1): 21－26.

[11] Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L, *et al*. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(10): 5700－5705.

[12] Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A, *et al*. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle[J]. EMBO J, 1998, 17(21): 6115－6123.

[13] Jiang H, Wang Y, Yu X Q, *et al*. Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca Sexta*. A bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains[J]. J Biol Chem, 2003, 278(6): 3552－3561.

[14] 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.

[15] Han Y S, Barillas M C. Implications of Time Bomb model of ookinete invasion of midgut cells[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(10): 1311－1316.

(编辑　冯崇英)

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中, 引用英文文献的比例很高, 但有不少作者将英、美人的姓名搞错, 以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是: 名-名-姓, "名"可以有 1 个、2 个或 3 个; 但"姓"只有 1 个。因此, 从书籍或期刊中的姓名转录到文献时, 要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的; "名"可以缩写, 用第一个字母大写, 不用缩写点。数据库在著录作者姓名时, 已经调整为姓-名-名, 可照录。

例如: John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部

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