DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.012
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)01-0029-03

论著

斯氏按蚊黑化包被约氏疟原虫卵囊时血淋巴蛋白的二维电泳分析

杨 松[1],黄复生[1],吴玉章[2],况明书[1],牟芝蓉[2],魏 斌[2] (第三军医大学基础医学部:[1]病原生物学教研室,重庆市微生物工程实验室;[2]全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 以斯氏按蚊-约氏疟原虫为模型,用二维电泳技术分析比较约氏疟原虫感染后雌性斯氏按蚊吸饲硝喹蔗糖水和蔗糖水蚊血淋巴蛋白差异。方法 用挤压法分别收集吸硝喹糖水3 d、吸感染血和吸蔗糖水雌斯氏按蚊成蚊血淋巴,Bradford法检测血淋巴蛋白浓度,继而对血淋巴进行双向电泳,凝胶考马斯亮蓝染色,ImageMaster VDS-CL对二维电泳凝胶蛋白斑点扫描和用ImageMaster 2D Elite软件进行蛋白质斑点自动分析。结果 用药组血淋巴蛋白浓度总是低于吸感染血组和吸糖水组,用药组蚊血淋巴蛋白点有101个,对照组有115个,有51个蛋白点相同。50个仅在用药组中检测到,64个仅在对照组中检测到;蛋白点的分子量和等电点主要位于(40~60)×10^3和碱性端。结论 二维电泳技术可直接反映蛋白质的差异,其蛋白浓度和白点的差异与硝喹诱导疟原虫卵囊黑化有关。

关键词:二维电泳;硝喹;斯氏按蚊;血淋巴;约氏疟原虫
中图法分类号:R382.31;R384.1;R446 文献标识码:A

Analysis of the protein in hemolymph from *Anopheles stephensi* during melanotic encapsulation of *Plasmodium yoelii* oocysts by two-dimensional electrophoresis

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

Abstract: **Objective** To analyze the protein in hemolymph from adult female *Anopheles stephensi* (*An. Stepheni*) infected by *Plasmodium yoelii* after feeding with sucrose solution containing nitroquine or simple sucrose solution with two-dimensional gel electrophoresis technique. **Methods** Hemolymphs from nitroquine-fed, infected-blood-fed, and sucrose solution-fed adult female *An. stephensi* were collected using the expulsion method on the third day after the feeding. Hemolymph protein concentration was examined with Bradford method. Then the hemolymph protein was analyzed by two-dimensional electrophoresis. The protein spots were visualized by Coomassie brilliant blue staining. The spots were scanned and automatically analyzed by the ImageMaster VDS-CL (Amersham Pharmacia) and ImageMaster 2D Elite software (Amersham Pharmacia). **Results** The protein concentration in the nitroquine-fed group was always lower than that in the infected-blood-fed and sucrose solution-fed groups. Two-dimensional gel electrophoresis revealed 101 protein spots in nitroquine-fed and 115 protein spots in the control with 51 matched, but unmatched 50 and 64 protein spots were detected in the treatment group and the control group, respectively. Different protein spots were mainly located at the molecular weight of (40—60)×10^3 and at the isoelectric points of basic end. **Conclusion** Two-dimensional gel electrophoresis may directly reflect the difference of the protein. Both the difference of protein concentration and the protein spots may be involved in nitroquine-induced melanotic encapsulation of *Plasmodium yoelii* oocysts.

Key words: two-dimensional electrophoresis; nitroquine; *Anopheles stephensi*; hemolymph; *Plasmodium yoelii*

疟疾仍是当今全球危害性极大和最重要的寄生虫病,每年罹患疟疾者依然高达500多万,死亡数达270多万[1]。随着抗疟药和灭蚊剂抗性的出现,目前还没有有效的、完全根治的措施,于是转向疟原虫在蚊体内发育差异的分子识别的基础性研究,这可能是根除疟疾的一种合理策略和方法[2]。黑化包裹是按蚊一种特

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,主要从事疟原虫、肾综合征出血热病毒及其媒介生物学与免疫学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752243
通信作者:黄复生,电话:(023)68752243
收稿日期:2003-02-24;修回日期:2003-07-10

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

异的抗疟机制[3]，某些关键成分来源于血淋巴，由这些血淋巴成分引起的黑化包被反应可能是由可溶性模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)首先诱发，疟原虫表面分子可能与这些受体结合后激发丝氨酸蛋白酶级联反应，最终引起与疟原虫相关蛋白质的交联和卵囊黑化。但是目前对识别和黑化通路的分子机制的了解还较肤浅[4]，蚊-疟原虫相互作用研究和被发现的模式识别受体/蛋白很少，这些模式识别蛋白结合微生物后是如何引发丝氨酸蛋白酶级联反应更不清楚[5]。而抗性株和易感株冈比亚按蚊黑化包被反应存在差异，其抗性差异与血淋巴蛋白差异相关。

二维凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)技术建立于20世纪70年代、90年代又重新兴起，乃因二维电泳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[6]。本研究利用斯氏按蚊-约氏疟原虫模型，应用2DE分析比较硝喹处理前后感染约氏疟原虫的斯氏按蚊血淋巴蛋白差异，为黑化包被反应相关多肽的筛选和鉴定奠定基础。

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)，标准低分子量蛋白(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(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)。

1.1.3 主要仪器和分析软件 Ultrospec 2100 UV/visible spectrophotometer(英国)；IPGphor等电聚焦仪、SE600电泳仪、ImageMaster VDS-CL二维凝胶扫描仪和ImageMaster 2D Elite软件(均为Amersham Pharmacia公司提供)。

1.2 方法

1.2.1 按蚊分组、感染及给药 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50～100只，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%硝喹的蔗糖水，后者喂蔗糖水。另外设吸糖水组。3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[7]的方法并加以改进。将3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。血淋巴加入冰浴封口膜上的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。

1.2.3 Bradford比色法检测蛋白浓度 按文献[8]的方法进行。

1.2.4 二维电泳试验 根据Chun[9]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 pH3～10 IPG缓冲液、171 μl重涨液和2 mgDTT混合，总体积250 μl吸入IPG胶槽，IPG干胶条(pH 3～10 L，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2×10^4 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%的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，然后改变参数为25 mA/gel，直到溴酚蓝达到胶底时终止电泳。

1.2.5 凝胶染色、扫描和分析 考马斯亮蓝R250染色。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。

1.3 统计学分析

感染率和黑化率的分析采用χ^2检验。

2 结果

2.1 用药组、吸感染血组和吸糖水组蚊血淋巴蛋白浓度

用药第1～3天用药组、吸感染血组和吸糖水组蚊血淋巴蛋白浓度分别为(2.264±0.716)、(4.4360±1.665)、(3.092±0.580) μg/μl。用药组血淋巴蛋白浓度总是低于感染组和吸糖水组，而感染组高于吸糖水组。

2.2 二维电泳

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。蛋白质点主要位于MW(40～60)×10^3，pI7附近。差异蛋白质点MW主要位于60×10^3左右，pI偏碱性端(图1A、B，2A、B)。

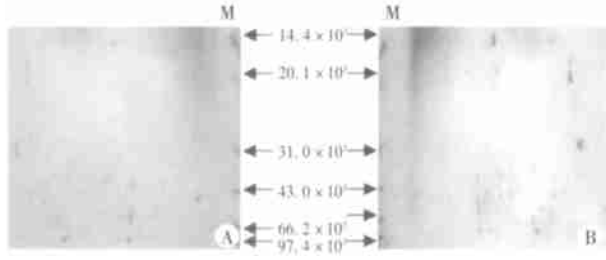


图1 吸感染血组(A)和用药组(B)血淋巴蛋白二维电泳图(考马斯亮蓝染色)

Fig 1 Two-dimensional electrophoresis of hemolymph proteins in infected-blood fed group and nitroquine-fed group (Coomassie brilliant blue staining)

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

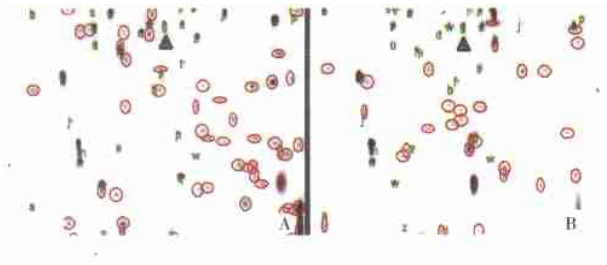


图 2　吸感染血组(A)和用药组(B)蚊血淋巴蛋白的二维凝胶电泳模式图(图中红色示匹配点, 绿色示非匹配点)

Fig 2　Schematic diagram of two-dimensional gel electrophoresis of hemolymph proteins from both infected-blood-fed group and nitroquine-fed group (red circle: the matched protein spots; green circle: the unmatched spots)

2.3　感染率和黑化率比较

用药 3 d 后用药组蚊与感染组蚊感染率均为 70.0%。继续观察用药 7 d 后, 用药组蚊黑化率达 61.3%, 而对照蚊黑化率约 3.0%。两组间黑化率有非常显著性差异($\chi^2=6.696$, $P<0.01$)。

3　讨论

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。目前蚊与疟原虫关系的研究多按"差异基因策略"入手, 寻找蚊媒疟原虫感染/耐受相关基因。虽然"差异基因策略"可直接扩增获得目标基因, 但是具有固有缺陷, 难以发现参与黑化的新蛋白, 而"差异蛋白策略"即"二维电泳策略"(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)可有利于发现易感和抗性蚊株间的任何差异蛋白, 尤其是高分辨率和重复性较好的二维凝胶电泳为黑化相关多肽的细致分析提供了很好的手段[7]。随着冈比亚按蚊[1]、恶性疟原虫[10]和约氏疟原虫基因组[11]测序工作的完成, 功能基因组学从根本上改变了传统的前基因组时代的"gene-by-gene"方法, 差异基因表达实际上是蛋白质表达的代名词(surrogate)。蛋白质组学分析是后基因组时代蛋白质组和蛋白质功能研究的一种重要方法, 从 2-DE 图谱中可筛检到用传统生化技术不能发现的基因表达的蛋白质。二维电泳系统是将高分辨率的等电聚焦和 SDS-PAGE 电泳的联合应用, 二维电泳后, 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[6]。Chun 等[7]应用生理盐水、磁珠注射和损伤为模型, 采用 2-DE 和银染法发现 8 种易感株冈比亚按蚊特异性血淋巴蛋白, 12 种抗性株特异性血淋巴蛋白, 抗性株中 12 个电泳斑点测序证实有 1 种是与前酚氧化酶活化酶有较高同源性的 Sp14D1 基因表达的丝氨酸蛋白酶 AgSp14D1。

本研究结果显示, 感染疟原虫后斯氏按蚊血淋巴蛋白表达明显增强, 而硝喹诱导约氏疟原虫卵囊黑化后, 斯氏按蚊血淋巴蛋白浓度明显下降。本研究 2-DE 获得了较好的二维电泳图谱和较多的差异蛋白点, 而且用药后蛋白质点数量少于感染组蚊血淋巴蛋白质点, 由此提示用药后血淋巴蛋白质浓度下降及蛋白质点的减少可能与黑化包被疟原虫期间某些蛋白质大量消耗有关。本研究为进一步筛选和鉴定与硝喹药物引起黑化的相关蛋白奠定了基础。

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] Shahabuddin M, Costero A. Spatial distribution of factors that determine sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31(3): 231—240.

[3] 徐文岳, 黄复生, 张锡林, 等. 大劣按蚊血淋巴酚氧化酶与约氏疟原虫卵囊黑化关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(4): 440—442.

[4] Yu X Q, Jiang H B, 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.

[5] Dimopoulos G, Muller H M, Levashina E A, *et al*. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito[J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13(1): 79—88.

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

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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: 248—254.

[10] Gardner M J, Hall N, Fung E, *et al*. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. Nature, 2002, 419(6906): 498—511.

[11] Carlton J M, Angiuoli S V, Suh B B, *et al*. Genome sequence and compara-tive analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*[J]. Nature, 2002, 419(6906): 512—519.

(编辑　张　宁)

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