DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.010
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
862 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)10-0862-02

吸血和约氏疟原虫感染对大劣按蚊血细胞中 rpS7 转录的影响

张敬如,徐文岳,黄复生,段建华 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察血餐和约氏疟原虫感染对大劣按蚊血细胞中核糖体蛋白S7(Ribosomal protein, rpS7)转录的影响。方法 同批3~5 d龄大劣按蚊分为正常组(N)、吸正常血组(B)和感染约氏疟原虫组(I),分别在血餐后1、2、3、7 d,离心法同时收集3组各50只雌大劣按蚊血细胞总RNA,所有样品进行RT-PCR后,各吸取10ul PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析系统扫描并读取数据,并对所得数据进行统计学分析。结果 3组大劣按蚊血细胞rpS7 mRNA的RT-PCR扩增产物量无显著差异($P>0.05$)。结论 类似于人类和小鼠β-actin,以及冈比亚按蚊rpS7,大劣按蚊血细胞rpS7可作为从分子水平研究大劣按蚊抗约氏疟原虫感染防御相关因子的内参照。

关键词:大劣按蚊;约氏疟原虫;核糖体蛋白S7(rpS7)
中图法分类号:R382.31;R384.1;R394-33 文献标识码:A

Effect of blood-feeding and *plasmodium yoelii* infection on the transcript abundance of ribosomal protein S7 from *Anopheles dirus* hemocyte

ZHANG Jing-ru, XU Wen-yue, HUANG Fu-sheng, DUAN Jian-hua (Department of Pathogenic Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of blood-feeding and *plasmodium yoelii* infection on the transcript abundance of ribosomal protein S7 from *Anopheles dirus* hemocyte. Methods *Anopheles dirus* of 3~5 days old were divided into normal group (N), blood-feeding group(B) and *Plasmodium yoelii* infection group(I). Hemocytes of 50 *Anopheles dirus* from each group were collected by centrifuge method on days 1, 2, 3, 4, 7 and 11 after blood-feeding, respectively. Then, all hemocyte samples were used for total RNA isolation and analyzed by RT-PCR. Finally, the same volume (10 μl) of all the PCR products from each group was used for agarose gel electrophoresis and the data obtained were analyzed statistically. Results There was no significant difference in ribosomal protein S7 signal between the three groups. Conclusion Similar to *Anopheles gambiae* and human rpS7, *Anopheles dirus* rpS7 might be also used as an internal control for the studies of the role of *Anopheles dirus* related immune factors in attacking *Plasmodium* infection.

Key words: *Anopheles dirus*; *Plasmodium yoelii*; ribosomal protein S7

研究按蚊抗疟原虫感染免疫机制是发展昆虫免疫和遗传防治蚊媒的前提和基础。由于蚊虫个体很小,因此蛋白纯化、酶学分析等生物化学技术的应用严重受限。S7是组成核糖体小亚基的核糖体蛋白之一,是真核生物的看家基因。近年来利用PCR等分子生物学技术,以冈比亚按蚊rpS7为参照,研究冈比亚按蚊抗疟原虫感染免疫因子已取得了较好的成果[1,2]。然而,由于缺乏相应的分子参照,有关东南亚疟疾的传播媒介大劣按蚊抗感染分子机制的研究进展缓慢。本研究通过观察感染和吸血对已克隆的大劣按蚊核糖体蛋白S7cNDA转录的影响,希望建立类似的分子参照,从而为半定量、定量分析研究大劣按蚊抗约氏疟原虫感染免疫因子奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试蚊虫

约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)BY265株,每周用昆明株小鼠血传1次,每5周内蚊传1次。昆明株小鼠由本校实验动物中心提供,体质量16~20 g。大劣按蚊常规饲养。

1.2 试剂

Tripure™RNA提取试剂盒购自BOEHRINGER MANNHEIM,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200237)

作者简介:张敬如(1972-),女,河北省深泽县人,助理实验师,主要从事昆虫先天性免疫方面的研究。电话:(023)68752243

收稿日期:2002-11-10;修回日期:2003-03-21

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

Olig(dT)、RNase 抑制剂、二乙基焦碳酸酯(DEPC)、MMLV 反转录酶等均购自 RT-PCR 试剂 Promega 公司, ExTag 酶购自 Takala, PCR Marker 购自上海华美生物工程有限公司; 根据已获得的大劣按蚊血细胞核糖体蛋白 S7 部分 cDNA 序列, 即 Adsp7 (AF369932)[3] 序列, 设计 rpS7 特异引物(Forward primer: 5′-GCTGCTAGAACTCAACATCACC-3′; Reverse primer: 5′-AGAAAAAGTTACGACCTTGTGC-3′)由上海生物工程有限公司合成。

1.3　蚊虫饲养和血淋巴收集

大劣按蚊均置于 26~27 ℃, 相对湿度 70%~80%的养蚊室中常规饲养, 吸血后于 23~24 ℃进行饲养。

离心法收集血淋巴[4]。分别于血餐后第 1、2、3、4、7、11 天各取 3 组 50 只雌大劣按蚊, 冷冻麻醉后, 在解剖显微镜下用解剖针撕开腹部后两节, 置于冰预冷, 并已用 18 号针头在管盖和管底部打了孔的 0.5 ml EP 管(25 只雌大劣按蚊/管), 然后将 0.5 ml EP 管放入含 100 μl Tripure™ 的 1.5 ml EP 管中, 4 ℃ 375×*g* 离心 10 min, 用于总 RNA 的提取。

1.4　RNA 提取和 RT-PCR

按照 Tripure™ 试剂盒说明, 立即提取大劣按蚊血细胞总 RNA, 期间每个样本离心分相后均取 200 μl 上清液用于后续操作, 血餐后第 1、2、3、4、7 天样本总 RNA 储存于 75%乙醇可防止 RNA 的降解, 于血餐后 11 d 所有样本总 RNA 测定其浓度和纯度(A_{260}/A_{280})后, 同时进行逆转录。总体积 20 μl, 含 800 ng 总 RNA, 0.5 μg olig(dT)15, MMLV 反转录酶(200 U); 37 ℃ 60 min 逆转录, 70 ℃ 10 min 灭活 MMLV。

逆转录后所有样本同时进行 PCR 扩增。PCR 总体积为 25 μl, 含 3 μl 逆转录产物, 2.5 μl 1× buffer, 1.25 U *ExTaq* 酶, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 200 μmol/L dNTPs, 两条引物均为 0.1 μmol/L。94 ℃预变性 3 min 后; 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 ℃延伸 5 min。

1.5　凝胶图像分析系统分析 PCR 产物

PCR 结束后, 精确吸取 10 μl PCR 产物用 0.8%的琼脂糖电泳, 然后凝胶图像分析系统扫描并读取数据。

1.6　统计学方法

实验结果采用 *t* 检验。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增正常大劣按蚊血细胞中 AdS7

离心法收集 50 只 3~5 d 龄雌大劣按蚊血细胞的总 RNA 逆转录获得的 cDNA 为模板, 用所设计 AdS7 特异引物扩增出一条约为 400 bp 片段, 与理论值 402 bp 大小相符。采用 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 ℃延伸 5 min 的 PCR 扩增条件获得的 AdS7 信号较弱, 但可见, 可作为半定量 RT-PCR 分析感染约氏疟原虫前后大劣按蚊血细胞 rpS7 转录的条件。

2.2　半定量 RT-PCR 分析感染约氏疟原虫前后大劣按蚊血细胞 AdrpS7 转录

血餐后第 7 天, 分离解剖 20 只感染组雌大劣按蚊蚊胃, 发现感染率和感染度大约分别为 30%和 40%, 即约氏疟原虫感染大劣按蚊成功。RT-PCR 扩增血餐后第 1、2、3、4、7、11 天大劣按蚊血细胞中 AdS7 结果如图 1, 统计学分析显示正常组、吸正常血和吸感染血组 AdS7 信号之间无显著差异($P>0.05$)。



N: Normal group; B: Blood feeding group; I: Plasmodium yoelii infection group

图 1　RT-PCR 扩增血餐后第 1、2、3、4、7 和 11 天大劣按蚊血细胞中 Ads7 结果

Fig 1　Result of Ads7 signal at different time after infection by *plasmodium yoelii* using RT-PCR

3　讨论

本实验用于 RT-PCR 扩增 AdsP7 的 3 组大劣按蚊数量相同均为 50 只, 所用的 Tripure™ 和吸取的上清量一致, 所有样本同时进行 RT-PCR, 并均用 10 μl 的 PCR 产物同时进行电泳, 统计学分析显示正常组、吸正常血和吸感染血组 AdS7 信号之间无显著差异($P>0.05$), 因此, 可以认为大劣按蚊 AdS7 的转录不受吸血和约氏疟原虫感染的影响。研究发现, 冈比亚按蚊和烟草天蛾等的 S7 的转录也不受感染等因素的影响, 已被用于分析相关免疫因子的内参照, 因此, 认为大劣按蚊 S7 也可作为分析抗疟原虫免疫因子的内参照。例如, 利用 RT-PCR 技术, 以 AdS7 信号为参照, 通过观察感染和吸血前后已克隆获得 3 种丝氨酸蛋白酶和一种前酚氧化酶的转录情况, 判断上述因子是否与按蚊抗疟原虫感染有关, 对于发展昆虫先天性免疫理论和大劣按蚊抗疟原虫感染免疫机制的研究打下基础。

参考文献:

[1] Paskewitz S M, Reese-Stardy, Gorman M J. An easter-like serine protease from *Anopheles gambiae* exhibits changes in transcript abundance following immune challenge[J]. Insect Mol Biol, 1999, 8(3): 329—337.

[2] Gorman M J, Andreeva O V, Paskewitz S M. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30: 35—46.

[3] 徐文岳, 黄复生. 大劣按蚊核糖体蛋白 S7 部分 cDNA 克隆与序列分析[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(5): 400—401.

[4] Sidjanski S, Mathews G V, Vanderberg J P. Electrophoretic seperation and identification of phenol oxidase in haeolymph and midgut of adult *Anopheles Stephensi* mosquitoes[J]. J Parasitol, 1997, 83(4): 686—691.

（编辑　薛国文）

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