

约氏疟原虫感染后大劣按蚊血淋巴的初步分析

王英, 张锡林, 段建华, 许颖, 张健, 黄复生*

(第三军医大学基础部病原生物学教研室, 重庆 400038)

关键词: 大劣按蚊; 血淋巴; SDS-PAGE 电泳; BCA 法

中图分类号: Q969.44 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083 (2006) 01-0185-02

大劣按蚊 (*Anopheles dirus*) 是一种重要的虫媒, 尤其是对疟原虫的传播流行起着重要的作用, 为东南亚地区和我国疟疾的重要传播媒介^[1,2]。黄复生等^[3]研究发现, 对人疟原虫敏感的大劣按蚊可以通过卵囊黑化包被反应, 阻断对鼠疟原虫——约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii*) 的传播。因此, 大劣按蚊-约氏疟原虫是研究昆虫先天性免疫和蚊与疟原虫相互关系的理想模型。我室对大劣按蚊已开展了系列的研究。为能更加深入地展开对大劣按蚊的研究, 尤其是对其传疟相关蛋白的研究, 本研究拟对大劣按蚊的血淋巴进行初步的分析, 提供一些基本知识和数据, 为今后更深入地开展大劣按蚊的蛋白研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本的感染与采集

大劣按蚊成蚊饥饿 (停止糖水供应) 10 小时后, 将感染约氏疟原虫的小鼠固定后, 置于蚊笼中让大劣按蚊吸血。吸血后 24 小时开始取按蚊血淋巴。剪断蚊喙 (留约 1/3), 用镊子轻挤蚊胸部, 将蚊喙断面涌出的清亮液滴轻蘸于磷酸缓冲液 PBS (0.1 M, pH 7.3~7.4) 液滴, 进行虹吸。共分 4 组, 分别取 10、20、30 和 50 只按蚊的血淋巴。

1.2 试剂

SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质购自中科院上海生物化学研究所, Cocktail 蛋白酶抑制剂丙烯酰胺、过硫酸胺等均购自 Biorad 公司, BCA Protein Assay Kit 购自 PIERCE 公司, 考马斯亮蓝、Tris 碱等为国内分析纯。

1.3 方法

1.3.1 SDS-PAGE 检测不同数量的大劣按蚊血淋巴

(1) 样品处理 1500 r 离心 10 min, 将上清吸于另一 EP 管。重复 3 次。加裂解液 20 μ l、Cock-

tail 蛋白酶抑制剂 10 μ l, 混匀。100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后上样。

(2) 凝胶灌制 将 SDS-PAGE 电泳玻板固定后, 配制 12% 分离胶溶液, 混匀后灌胶 (整板高度的 2/3~3/4), 液面用双蒸水封顶, 垂直放置 30 min 以上。待胶凝固后, 制备浓缩胶溶液, 并进行灌注。立即插入干净的电泳梳, 注意勿入气泡。然后, 将凝胶小心移入电泳槽。在电泳液中小心拨下梳子, 用注射器冲洗加样孔数次。

(3) 电泳 将上述处理好的 4 组样品 (10 只、20 只、30 只和 50 只按蚊血淋巴组) 加样, 同时加样低分子量蛋白 Marker。电泳开始选择 80 V 电压, 待样品进入分离胶后, 电压升为 100 V, 直至电泳完毕。取出凝胶, 进行考马斯亮蓝染色, 于摇床上过夜。脱色液 (45% 甲醇 + 10% 冰乙酸) 中脱色, 直至条带清晰。

1.3.2 BCA 蛋白定量法检测大劣按蚊的血淋巴蛋白含量 取 50 只大劣按蚊雌蚊的血淋巴, 进行蛋白含量的测定。蛋白质定量采用紫外吸收法。设定蛋白质在 1 g/L 浓度时的吸收光系数为 1.0。具体方法按照 BCA Protein Assay Kit (PIERCE 公司) 使用说明。

2 结果

SDS-PAGE 结果如图。各组均见数量不等的条带, 10 只组和 20 只组条带明显少于 30 只组和 50 只组。但 30 只组和 50 只组间条带数无明显区别, 只是后者的低分子量蛋白条带稍多。所有组的结果均显示, 感染约氏疟原虫后, 大劣按蚊的血淋巴中以大分子量 (40 kDa 以上) 蛋白为多。蛋白 Marker 条带清晰。BCA 法测定蛋白含量结果显示, 50 只大劣按蚊的血淋巴蛋白含量为 6.81880 μ g, 故每只按蚊的血淋巴蛋白含量为 0.136 μ g。

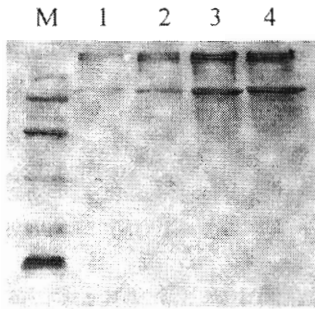


图 SDS-PAGE 检测感染约氏疟原虫后大劣按蚊血淋巴的结果
Fig. The result of SDS-PAGE to examin the hemolymph of *Anopheles dirus* infected with *Plasmodium yoelii*
M—蛋白 Marker, 1—10 只蚊组, 2—20 只蚊组, 3—30 只蚊组, 4—50 只蚊组

3 讨论

疟疾目前仍是严重危害人类健康的一种传染病。全世界每年约有 2~3 亿人感染, 其中疟疾患者死亡数高达 270 多万^[4]。尤其是在非洲, 每天约有 3000 人被疟疾夺走生命; 加上未上报的和难以确诊的死亡病例, 实际死于疟疾的人数可能更高 (Breman, 2001)。疟疾目前在我国南方的许多地区, 尤其山区, 在特殊的环境条件下仍有大规模流行的可能。而大劣按蚊是传播人疟的重要媒介^[5,6]。此外, 该蚊种对鼠疟 (约氏疟原虫) 具有先天的免疫力, 能够通过使其体内的约氏疟原虫卵囊黑化的方式, 杀伤疟原虫^[2]。这为疟疾和昆虫免疫的研究提供了一个很好的模型。因此, 近年来对大劣按蚊的研究日趋增多和深入。

目前对大劣按蚊的研究已由对其基因的研究逐

渐转向对其蛋白的研究^[7]。而对该按蚊蛋白的研究就必需了解这一蚊种的相关蛋白背景和基本知识。本研究基于这一考虑, 利用 SDS-PAGE 技术对大劣按蚊感染约氏疟原虫后的血淋巴蛋白进行了分析, 并利用 BCA 蛋白含量测定法对其血淋巴的蛋白含量进行了测定。研究结果提示, 感染后大劣按蚊的血淋巴中以大分子量蛋白为主, 每只按蚊的血淋巴蛋白含量为 0.136 μg , 若需通过 SDS-PAGE 进行大劣按蚊的分析, 则对蚊数量的要求是 30 只以上, 最好是在 50 只以上。若低于 30 只按蚊, 则无法保证试验结果的可信性。

4 参考文献

- [1] Trung HD, Van BW, Sochantha T, et al. Malaria transmission and major malaria vectors in different geographical areas of southeast Asia [J]. Trop Med Int Health, 2004, 9 (2): 230~237.
- [2] 陆宝麟. 50 年来我国蚊媒研究进展 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1999, 10 (3): 161~165.
- [3] 黄复生, 王兴相. 蚊血细胞对正常和退变之约氏疟原虫卵囊的反应及其在卵囊黑化中的作用 [J]. 第三军医大学学报, 1993, 15 (1): 8~10.
- [4] Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* [J]. Science, 2002, 298 (5591): 129~148.
- [5] Dev V, Bhattacharyya PC, Talukdar R. Transmission of malaria and its control in the northeastern region of India [J]. J Assoc Physicians India, 2003, 51: 1073~1076.
- [6] Oo TT, Storch V, Becker N. *Anopheles dirus* and its role in malaria transmission in Myanmar [J]. J Vector Ecol, 2003, 28 (2): 175~183.
- [7] Vararattanavech A, Ketterman AJ. Multiple roles of glutathione binding-site residues of glutathione s-transferase [J]. Protein Pept Lett, 2003, 10 (5): 441~448.

《四川省甘孜藏族自治州野生脊椎动物识别保护丛书》出版

四川省动物学会会员彭基泰、高正发退休之后编撰《丛书》，服务野生动物保护事业

[本刊讯] 经过两年多的努力, 由四川省动物学会会员彭基泰和高正发主编的四川省甘孜藏族自治州《爬行类、两栖类、鱼类野外识别保护手册》、《鸟类野外识别保护手册》和《哺乳类野外识别保护手册》最近由四川科技出版社出版发行。彭基泰先生长期在甘孜州从事林业和野生动物保护工作, 高正发先生从事生物学教育多年, 特别热爱两栖爬行动物, 为了把自己长期工作中积累的经验奉献给人民和社会, 在相关国际保护组织和国内有关单位及许多专家的支持和帮助下, 他们退休之后仍然孜孜不倦, 辛勤耕耘, 编撰了这套丛书。丛书把甘孜州现已调查发现的 652 种野生脊椎动物的野外鉴别特征、生物学、生态学、行为学特性、受威胁现状、保护管理和合理开发利用前景等作了全面、科学系统地论述, 图文并茂, 中英文对照, 还有每种的藏文名及其藏语译音, 是一套学术性和实用性兼容, 对开展野生动物保护管理、自然保护区建设、科研教学和科考旅游等有指导意义的工具书。四川省动物学会理事会肯定了彭基泰、高正发两位老先生的工作, 认为他们这种勤奋工作的精神值得广大会员学习。

附: 四川省甘孜藏族自治州《爬行类、两栖类、鱼类野外识别保护手册》、《鸟类野外识别保护手册》和《哺乳类野外识别保护手册》一套三册 (硬面精装) 定价 380 元 (个人购买可适当优惠)。四川动物编辑部有少量存书代销。