

文章编号: 1007- 2985(2008) 05- 0104- 04

黑胸大蠊免疫兔血清的制备与应用*

吴仕筠¹, 汪世平^{1,2}, 徐绍锐², 钟 飞¹, 李文凯²

(1. 吉首大学医学院, 湖南 吉首 416000; 2. 中南大学湘雅基础医学院病原生物学系, 湖南 长沙 410078)

摘 要: 按常规动物免疫方法用黑胸大蠊不同发育阶段可溶性抗原对新西兰兔进行免疫, 并通过 SDS- PAGE 和酶联免疫印迹(ELIB) 技术分析黑胸大蠊不同发育阶段抗原的免疫学特性, 同时用黑胸大蠊若虫和雄虫免疫兔血清筛选美洲大蠊若虫 cDNA 文库, 对阳性克隆进行 PCR 鉴定和序列测定, 结果显示: 卵抗原、若虫抗原、雄成虫抗原、雌成虫抗原分别可见 13, 28, 26 和 41 条蛋白区带, 4 种抗原组分相互之间有交叉抗原存在, 用黑胸大蠊若虫免疫兔血清筛选出 1 个新基因, 用黑胸大蠊雄虫免疫兔血清筛选出 6 个新基因。

关键词: 黑胸大蠊; 免疫兔血清; 制备; ELIB; cDNA 文库筛选

中图分类号: R384. 9

文献标识码: B

德国小蠊(*Blattella germanica*)、美洲大蠊(*Periplaneta americana*)、黑胸大蠊(*Periplaneta fuliginosa* L, Pf) 是中国常见的室内 3 大蜚蠊目害虫。目前国内外对蜚蠊的研究主要集中在种群分布及防制上, 作为药用及过敏原的研究也主要针对美洲大蠊和德国小蠊, 对黑胸大蠊研究甚少。本研究以黑胸大蠊为材料, 目的是制备黑胸大蠊不同发育阶段免疫兔血清, 应用 SDS- PAGE 和 ELIB 技术对黑胸大蠊可溶性蛋白组分及抗原成分进行分析, 并用黑胸大蠊若虫和雄虫免疫兔血清为抗体探针对美洲大蠊若虫文库进行免疫筛选, 以期筛选、鉴定黑胸大蠊入药中具有免疫调理作用的药效成分及有潜在药用价值的蛋白或多肽成分, 同时为丰富黑胸大蠊发育生物学和生理生化方面的知识以及黑胸大蠊的基因组学及蛋白质组学的研究提供具有一定参考价值的实验资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

健康新西兰兔 4 只, 雌性, 体重 2 kg 左右, 由中南大学湘雅二医院实验动物学部提供。黑胸大蠊系本室饲养。

1.2 主要试剂

Freund's 完全佐剂为 S gmag 公司产品; 丙烯酰胺、N, N- 亚甲基双丙烯酰胺为 Fluka 公司产品, 十二烷基磺酸钠(SDS) 为日本进口分装; 低分子量标准蛋白质(14. 4- 97. 4kDa) 购自上海生化所西巴斯生物技术公司; 辣根过氧化酶标记的葡萄球菌 A 蛋白(HRP- Prote n A) 冻干纯品购自上海科欣生物技术研究所; 美洲大蠊若虫 cDNA 文库及重组体转染宿主菌 E. Coli NM522 由深圳大学生命科学学院刘志刚教授馈赠。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 黑胸大蠊不同发育阶段可溶性抗原的制备

挑选黑胸大蠊雌、雄成虫各 30 只, 3~ 4 龄期若虫 40 只, 隔离饲养, 禁食、供水 5~ 6 d, 使其排尽胃肠

* 收稿日期: 2008- 06- 02

基金项目: 湖南省科技厅科技计划重大专项(2006SK1001); 湖南省教育厅科学研究项目(07C516); 湖南省卫生厅科研基金项目(B2007192); 湘西自治州指导性科技计划项目(2006CXZ08) 基金联合资助

作者简介: 吴仕筠(1963-), 女, 吉首大学医学院副教授, 医学硕士, 主要从事医药昆虫生化与分子生物学研究

通讯作者: 汪世平, wsp4373383@126.com

道内容物, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻处死。75%酒精短时间清洗虫体表面, 蒸馏水淋洗 2 遍, 剪去触须、足、翅, 晾干备用。取卵荚 40 枚, 按上法用 75% 酒精和蒸馏水清洗处理, 晾干。分别将上述各类材料置于研钵中, 加入适量 pH 值为 7.4 的磷酸缓冲液, 研磨成匀浆。用冻融法于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行 4~5 次反复冻融, 使可溶性抗原充分释出, 纱布过滤去粗渣。再用超声破碎法, 以 4 000 r/ m n 离心 15 m n; 吸出上层溶液, 10 000 r/ m n 离心 20 m n, 取上清液, 此即黑胸大蠊不同发育阶段可溶性抗原。测定其蛋白含量^[1], 调整至含蛋白质 15 g/ L, 分装后置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.4 免疫兔血清的制备

1.4.1 免疫用抗原的制备 取石蜡油 3 份, 羊毛脂 1 份, 充分混匀, 高压灭菌, 制成 Freund' s 不完全佐剂 (IFA)^[2]; 将各种黑胸大蠊不同发育阶段可溶性抗原以 1: 1 的比例与 IFA 混匀, 形成稳定的油包水乳剂, 即可用于动物免疫。

1.4.2 正常兔血清的制备 健康、雌性新西兰兔 4 只, 于免疫前自耳静脉采血, 分离血清, 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.4.3 免疫兔血清的制备 将 4 只兔做好标记, 用 0.5 mL/ 只 Freund' s 完全佐剂分别注射于每只兔 2 后足掌肉垫, 进行基础免疫。2 周后用黑胸大蠊雌、雄成虫、若虫以及卵蛋白抗原 400 μg / 次/ 只分别于 4 只兔的颈、背部进行多点皮内注射免疫^[3]。以后每 2 周加强免疫 1 次, 抗原的制备、用量、注射途径及方法同前。免疫期间用对流免疫电泳法检测血清抗体效价, 待效价达 1: 16 时采血, 分离、收集血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 SDS- PAGE、ELIB 和银染色

参照文献[4]方法。电泳缓冲液为 Tris- 甘氨酸缓冲液(含 Tris 1.5 g/ L, 甘氨酸 14.4 g/ L, SDS 0.1%)。上样量为每孔 10 μg 。转印采用低压大电流(30~ 32 V, 100 mA)转印 2 h, 丽春红染色证明转印效果完全。银染色参照文献[5]方法进行。

1.6 黑胸大蠊若虫及雄虫免疫兔血清对美洲大蠊若虫 cDNA 文库的筛选

1.6.1 抗体探针的制备 将上述制备的免疫兔血清用 E. col NM522 裂解液按 1: 8 的比例反复吸附, 制成 1: 25 稀释的吸附血清, 作为文库筛选的抗体探针。

1.6.2 cDNA 文库的免疫学筛选 筛选方法参照文献[6]方法进行。

2 结果

2.1 免疫兔血清的制备

用 4 种不同发育时期及不同性别的黑胸大蠊可溶性抗原对新西兰兔进行免疫, 雄虫与若虫抗原经 4 次免疫后, 对流免疫电泳检测抗体效价达 1: 16; 雌虫与卵抗原则经 6 次免疫后对流免疫电泳检测抗体效价达 1: 16, 制得 4 种免疫兔血清。

2.2 SDS- PAGE 和 ELIB 结果

4 种抗原蛋白经 SDS- PAGE 银染色后均可得到较清晰蛋白显色条带, 卵抗原、若虫抗原、雄成虫抗原、雌成虫抗原分别可见 13, 28, 26, 41 条蛋白区带。根据标准分子量蛋白迁移率(Rf 值), 用半对数坐标纸绘制分子量标准曲线, 测算出样品蛋白组分的分子量^[7]。各抗原蛋白组分的分子量及分布(表 1) 参见文献[8]。结果表明不同发育阶段黑胸大蠊的蛋白质组分从卵—若虫—成虫逐渐增多并趋于复杂化。

表 1 黑胸大蠊不同发育时期可溶性蛋白组分的分子量分布情况

蛋白组分	主带	次带
卵	90	80, 76, 63, 52, 38, 23, 14
若虫	82, 76, 63, 58, 54, 41, 38, 30, 18, 13	70, 67, 43, 40, 39, 36, 29, 23.5, 22, 20, 15
雄虫	71, 57, 39, 33, 28.5, 21.5, 20, 17.5, 14, 12	85, 81, 79, 61, 59, 48, 41, 37, 24, 22.5, 10
雌虫	85, 79, 64, 58, 50, 39, 33, 21.5, 17.5, 14, 12	83, 72, 68, 61, 57, 54, 41, 37, 31, 30, 28.5, 25, 24, 22.5, 20, 16, 10

注 > 97.4kDa 和 < 10kDa 的蛋白未记入

用正常兔血清为对照, 用抗卵抗原免疫兔血清、抗若虫抗原免疫兔血清及抗雌成虫抗原免疫兔血清为

一抗, 分别与卵抗原、若虫抗原、雄成虫抗原、雌成虫抗原硝酸纤维素膜共同温育; 以 HRP-Protein A 为酶标二抗, DAB 显色, 观察识别抗原情况. 可见正常兔血清不识别以上 4 种抗原组分的任何区带, 3 种免疫血清均能程度不同地识别各类抗原组分, 提示在黑胸大蠓各发育阶段间有交叉抗原存在, 但抗若虫抗原免疫血清不能识别卵抗原. 各抗血清所识别的主要抗原区带分子量分布范围如表 2 所示.

表 2 黑胸大蠓不同抗血清所识别的各抗原组分的分子量分布情况

血清种类	雌成虫抗原	雄成虫抗原	卵抗原	若虫抗原
抗雌虫抗原免疫血清	> 97, 79, 72, 50, 39, 21.5, 17.5	> 97, 85, 81, 79, 39, 21.5	> 97, 80, 76, 52, 38	> 97, 82, 76, 63, 58, 54
抗卵抗原免疫血清	> 97, 79, 72	> 97, 85, 79	> 97, 90, 80, 76, 63, 52, 38, 35	> 97, 82, 76, 67, 54
抗若虫抗原免疫血清	> 97, 79, 72,	> 97, 85, 81, 79	—	> 97, 82, 76, 67, 63, 58, 54, 41

2.3 对美洲大蠓若虫 cDNA 文库的筛选

2.3.1 黑胸大蠓若虫对美洲大蠓若虫 cDNA 文库的筛选 用黑胸大蠓若虫免疫血清筛选美洲大蠓若虫 cDNA 文库, 对阳性克隆进行 PCR 鉴定和序列测定, 通过国际互联网进行核苷酸序列的同源性分析及编码蛋白质的结构分析和功能预测. 结果经 3 轮复筛, 从多个持续阳性克隆中挑选出 3 个进行测序、分析, 其中 N1 克隆为新基因, Score < 50, 命名为 Parcxpwnx01, GenBank 登录号为 AY838802. 该基因编码 231 个氨基酸, 初步预测该蛋白可能为一具信号转导功能的跨膜蛋白. N2 克隆与美洲大蠓核蛋白体 16S RNA 基因高度同源, N3 与黑胸大蠓线粒体 DNA 高度同源.

2.3.2 黑胸大蠓雄虫对美洲大蠓若虫 cDNA 文库的筛选

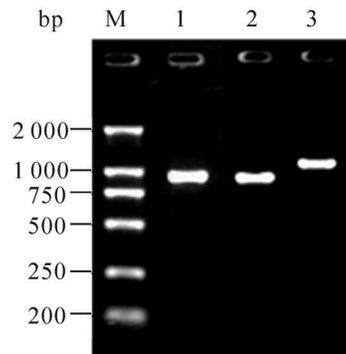
初筛获数 10 个阳性克隆, 随机挑选 12 个阳性克隆噬菌斑做第 2、3 轮复筛, 最后获 10 个持续阳性、反应信号良好的克隆. 经 PCR 初步鉴定, 从中选出 6 个进行测序. 核苷酸序列同源性分析显示, 6 个克隆与其他已知基因无显著同源性, Score 在 33.5~149 之间, 为新基因, 分别命名为 Parcxpwmw01, Parcxpwmw02, Parcxpwmw03, Parcxpwmw04, Parcxpwmw05, Parcxpwmw06. 将有关信息提交 GenBank, 获得相应登录号 DQ256397, DQ256398, DQ256399, DQ256400, DQ256401, DQ256402.

3 讨论

抗原可分为细胞性抗原(又称颗粒性抗原)和可溶性抗原 2 大类. 用细胞性抗原免疫时, 通常不用佐剂, 一般均可获得满意结果, 使用可溶性抗原时, 通常要加佐剂, 而且要充分乳化, 才能得到较满意的结果^[9]. 本实验采用的是经冻融法和超声破碎法制备而成的可溶性抗原, 在动物免疫前与弗氏不完全佐剂等比混合、乳化, 制成油包水乳剂. 用常规免疫法对新西兰兔进行免疫, 黑胸大蠓雄虫与若虫抗原经 4 次免疫、雌虫与卵抗原经 6 次免疫后对流免疫电泳检测抗体效价达 1:16, 得到免疫血清, 说明免疫效果较好. 但从免疫结果看不同发育时期的可溶性抗原达到效价的时间不同, 这能否说明黑胸大蠓不同发育时期的可溶性抗原免疫原性不同, 需在排除动物的个体差异的同时作进一步探讨.

免疫学筛库的最佳探针应当是高滴度多克隆抗体或能同目的蛋白不同表位反应的一组单克隆抗体混合物^[10]. 因此, 将所制的高滴度黑胸大蠓不同发育时期的免疫血清用超声处理的 NM522 大肠杆菌裂解液进行充分吸附, 得到了既敏感又特异的抗体探针, 运用此抗体探针对美洲大蠓若虫 cDNA 文库进行筛选.

从 SDS-PAGE 电泳结果可以发现, 4 种蛋白组分的条带数目、位置以及染色深浅均有较大差异, 提



M—DNA Marker; 1—N1 阳性克隆; 2—N2 阳性克隆; 3—N3 阳性克隆

图 1 黑胸大蠓若虫免疫血清筛库阳性克隆 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

示在不同发育阶段,虫体的蛋白质种类、组成和含量有较大的变化.这可能与蜚蠊生活史中要经历卵孵化、蜕皮、羽化、交配产卵等不同生理过程有关,各生理过程需要各种不同种类的酶和蛋白质参与.从ELIB的结果看,具免疫原性的蛋白质大部分分布在43kDa以上分子量范围;4种抗原组分相互之间有交叉抗原的存在,但同一抗原组分被不同抗血清所识别时,其反应强弱各有差异.若虫抗原能被抗卵抗原血清识别,但是卵抗原不能被抗若虫抗原的免疫血清所识别,这一现象有待进一步研究分析.此项研究对黑胸大蠊的发育生物学和生理生化方面以及不同发育阶段蛋白质抗原免疫生化特性的研究奠定了基础.

通过利用黑胸大蠊若虫、雄虫免疫兔血清对美洲大蠊若虫cDNA文库的进行筛选,共发现7个新基因,新基因的生物信息学分析将在另外的文章中介绍,其功能有待进一步研究.通过文库筛选,发现黑胸大蠊与美洲大蠊之间存在许多交叉抗原,这可以使人们了解2种蜚蠊种群间基因及蛋白的异同,也使得人们能利用美洲大蠊基因组及蛋白质组学的相关信息获取黑胸大蠊的相应信息,为黑胸大蠊的基础研究及药用成分的研究提供了有效途径和重要的数据.

参考文献:

- [1] BRADFORD M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding [J]. *Ann. Biochem.*, 1975, 72: 248-254.
- [2] 朱立平,陈学清.免疫学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社,2000:15-22.
- [3] 沈关心,周汝麟.现代免疫学实验技术[M].武汉:湖北科学技术出版社,1998:17.
- [4] 李允鹤.寄生虫病免疫学及免疫诊断[M].南京:江苏科学技术出版社,1991:1410-1417.
- [5] 陈主初,梁宋平.肿瘤蛋白质组学.长沙:湖南科学技术出版社,2002:33-34.
- [6] 吴仕筠,汪世平,徐绍锐,等.黑胸大蠊若虫免疫兔血清对美洲大蠊若虫cDNA表达文库的筛选及克隆分析[J].热带医学杂志,2006,6(2):127-130.
- [7] 郭晓君.SDS电泳技术的实验考虑及最新进展[J].生物化学与生物物理进展,1991,18:32-39.
- [8] 徐绍锐,汪世平,吴仕筠,等.黑胸大蠊不同发育阶段可溶性抗原特征分析[J].中国人兽共患病杂志,2004,20(4):291-294.
- [9] 尹家祥,于国林,陈平,等.鼠疫F1单克隆抗体建株过程中的动物免疫[J].地方病通报,2005,20(4):4-6.
- [10] 凌家俭,章子豪,张耀娟.卫氏并殖吸虫成虫cDNA文库的单抗筛选[J].中国人兽共患病杂志,2002,18(3):48-53.

Preparation and Application of *Periplaneta Fuliginosa* Immunized Rabbit Sera

WU Sh-jun, WANG Sh-ping, XU Shao-ru, ZHONG Fei, LI Wen-ka

(1. Medical College, Jishou University, Jishou 416000, Hunan China; 2. Department of Parasitology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Soluble protein antigens from different developmental stages of *Periplaneta fuliginosa* were used to immunize rabbits. The immunological characteristics of antigens from different stages of *Periplaneta fuliginosa* were analyzed with SDS-PAGE and enzyme-linked immunoblotting (ELIB). Rabbit antisera against nymph and adult antigens were used to screen the cDNA library of *Periplaneta americana* nymph, and the positive clones were identified by PCR. Results showed that the egg antigens, nymph antigens, male and female adult antigens revealed 13, 28, 26, 41 bands, respectively. The results also showed that there were cross-reactive antigen components among these groups. One and 6 new genes were screened with nymph and adult antigen immunized rabbit sera, respectively.

Key words: *Periplaneta fuliginosa*; immunized rabbit serum; preparation; ELIB; cDNA library screening

(责任编辑 易必武)