

文章编号: 1000-7423(2001)-04-0213-04

【论著】

用聚丙烯酰胺凝胶电泳和双向电泳分析 阴道毛滴虫滋养体抗原

高兴政¹ 谭荣安²

【摘要】 目的 研究阴道毛滴虫滋养体可溶性抗原。方法 用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、酶联免疫电转移印迹(EITB)和双向电泳等方法,对阴道毛滴虫滋养体全虫可溶性抗原进行分析。结果 SDS-PAGE 分离出 26 条蛋白带,其中主带 9 条,分子量 8 条为 15~62 kDa,1 条为 97 kDa。EITB 显示 24 条带,仅在 75 kDa 和 22 kDa 处缺如,其中主带 8 条。双向电泳分离出 43 个多肽斑点,多分布于 PI 3.65~5.84,分子量为 27~>100 kDa,其中有 9 个主要多肽斑点。结论 阴道毛滴虫滋养体可溶性抗原 26 条蛋白带中,有 8 条蛋白含量较高、免疫学反应较强。在 43 个多肽斑点中有 9 个多肽含量明显较高。

【关键词】 阴道毛滴虫; 抗原; SDS-PAGE; 双向电泳

中图分类号: R382.211, R392.11

文献标识码: A

Antigen Analysis of *Trichomonas vaginalis* Trophozoite by SDS-PAGE and Two-Dimensional Gel Electrophoresis

GAO Xing-zheng¹, Joseph Wing On Tam²

(1 Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100083;

2 Department of Biochemistry, University of Hong Kong, Hong Kong)

【Abstract】 **Objective** To analyze soluble antigens of *Trichomonas vaginalis*. **Methods** Soluble antigens of the parasite from a patient suffering from trichomonad vaginitis were analyzed by SDS-PAGE, immunoblotting and two-dimensional gel electrophoresis. **Results** A total of 26 distinct protein bands were demonstrated by using 10% resolution gel. Nine of them were main bands, eight with MWs 15-62 kDa, one with MW 97 kDa. By immunoblotting the specific anti-*T. vaginalis* antibodies raised in rabbit recognized 24 protein bands with 8 main bands in them. Two-dimensional gel electrophoresis revealed up to 43 individual trichomonad polypeptide spots, among which, 9 were main ones. The pI and MWs of these spots were 3.65-5.84 and 27->100 kDa respectively. **Conclusion** Eight protein bands out of 26 soluble antigen bands of the parasite showed high immunogenicity. There were 9 main polypeptide spots in 43 polypeptide spots of the parasite.

【Key words】 *Trichomonas vaginalis*, antigen, SDS-PAGE, two-dimensional gel electrophoresis.

阴道毛滴虫是常见病原体之一,主要引起滴虫性阴道炎。其抗原成分复杂,有关抗原性质和毒性以及致病机制,特别是对阴道毛滴虫特异多肽了解甚少。目前滴虫性阴道炎的诊断主要用显微镜检查,易漏诊,有些虫株用灭滴灵治疗困难,甚至产生抗药性,在滴虫防治工作中仍有许多问题亟待解决。鉴定阴道毛滴虫特异性抗原,对于分析滴虫与宿主的相互关系,建立敏感、特异的免疫诊断方法,以及寻找其他抗滴虫药物等具有重要的理论和实用意义。国外虽有报告但显不足^[1-6],国内资料也较少^[7]。本文用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、酶

联免疫电转移印迹(EITB)和双向电泳(two-dimensional gel electrophoresis)技术分析阴道毛滴虫滋养体全虫可溶性抗原,试图鉴别特异的、高免疫原性滴虫蛋白和多肽,以增加对阴道毛滴虫生物学和宿主免疫机制的理解,为开发特异、敏感的免疫学诊断方法、研制抗滴虫药物和疫苗提供参考资料。

材料与方法

1 虫种培养和全虫可溶性抗原的制备

阴道毛滴虫取自北京大学第三医院妇科门诊滴虫性阴道炎患者阴道分泌物,经肝浸汤培养基(培养前加 10% 灭活小牛血清)37℃ 无菌培养 24 h,选择活动力强的虫体置 0.15 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2) 200 g 离心 4 min,洗涤 3 次后取沉淀虫

作者单位: 1 北京大学基础医学院寄生虫学教研室,北京 100083;
2 香港大学生物化学系

体超声粉碎, 11 400 g 4 ℃ 离心 1 h, 取上清, 用液紫外分光光度计测其蛋白浓度为 0.8 mg/ml, 将抗原分装 Eppendorf 管中, -20 ℃ 保存备用。

2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

样品制备 取阴道毛滴虫滋养体可溶性抗原 20 μl 和标准分子量蛋白于 Eppendorf 管中, 加等量电泳样品液, 沸水浴 3 min。

凝胶制备 用 10% 分离胶混匀后立即加入两玻璃板的间隙中, 室温聚合 30 min 后, 加 4% 浓缩胶于分离胶上, 室温聚合。

电泳 用 SE250 小型垂直板电泳仪 (hoefer scientific instruments), 电泳槽中加 Tris-甘氨酸缓冲液, 样品加于样品槽中, 30 mA 稳压, 电泳 3 h, 直至指示剂跑出凝胶板底部, 停止电泳, 取下凝胶。

染色 凝胶用考马斯亮蓝液染色 30 min, 用脱色液脱色至本底无色止。

测定蛋白分子量 从标准蛋白分离胶起点到蛋白条带中线距离作横坐标, 标准分子量换算成对数值作纵坐标, 画标准曲线, 然后根据待测蛋白迁移率计算蛋白分子量。标准蛋白采用磷酸化酶 b (97400), 卵清蛋白 (46000), 碳酸酐酶 (carbonic anhydrase) (31000) 和溶菌酶 (14400)。

3 酶联免疫电转移印迹 (EITB)

用 SE250 小型垂直板电泳仪进行 SDS-PAGE, 方法同前。用 trans-blot SD 型半干转移电泳仪 (Bio-Rad Laboratory) 进行转移电泳。将凝胶、硝酸纤维素膜 (NC 膜 amersham life science) 和滤纸 (NC 膜和滤纸的大小应与胶相同) 浸入转移缓冲液至少 20 min, 在铂金阳极板依次铺上滤纸、NC 膜、凝胶和滤纸, 稳压 15 V, 转移 30 min。

Ponceau S 染色: 转移后的 NC 膜在 Ponceau S 中染色 10 min, 显示清晰蛋白带后, 空气干燥, 4 ℃ 保存或直接做酶联免疫染色。

酶联免疫染色: 裁成细条的 NC 膜置反应槽中, 用 1% 脱脂奶粉封闭后加滴虫免疫兔血清 (稀释度为 1:20), 37 ℃ 1 h, 用 0.05% 聚山梨酸 20-TBS 洗 3 次, 再加 1% 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记的驴抗兔 IgG, 37 ℃ 孵育 1 h, 洗涤同前, 然后加 DAB 和 H₂O₂, 15 min 后观察结果。

测定蛋白分子量, 同前。

4 双向电泳

使用管状电泳仪进行等电聚焦。圆柱胶长 7.5 cm, 7 ml 管胶中含两性电解质 (ampholytes) pH5~7 为 0.23 ml, pH3~10 为 0.12 ml, 聚焦前 250 V 恒压 30 min, 使 ampholytes 构成 pH 梯度。加样品 30 μl (样品量与 lysis 缓冲液各 15 μl) 于每管胶上, 其后, 恒压 500 V 3 h 以达到完全聚焦。

第 2 向电泳用 SE250 小型垂直板电泳仪。聚焦完成后, 取出圆柱凝胶, 放在 10% 分离胶上, 用 1% 琼脂糖封盖, 恒压 80 V, 直至指示剂达胶底部, 停止电泳, 取出凝胶, 用银染色。

测定多肽斑点分子量方法同前, 标准蛋白分子量为伴清蛋白 (76000)、清蛋白 (66200), 肌动蛋白 (43000), 三磷酸甘油醛脱氢酸 (36000), 碳酸酐酶 (31000)。

结果与讨论

1 SDS-PAGE

阴道毛滴虫全虫可溶性抗原 SDS-PAGE 电泳凝胶经考马斯亮蓝染色显示 26 条蛋白带。此结果明显多于张跃等^[7]报道的 14 条阴道毛滴虫全虫抗原蛋白带, 而接近 Aldcrete^[6]报告的 30~40 条蛋白带 (表 1)。

表 1 用 SDS-PAGE 和 EITB 分析阴道毛滴虫可溶性抗原
Table 1 Analysis of *T. vaginalis* soluble antigens with SDS-PAGE and EITB

编号 No.	SDS-PAGE 蛋白带 Protein bands in SDS PAGE		免疫原性蛋白带 Immunogenic protein bands	
	分子量 (kDa) MW	主带蛋白 分子量 (kDa) MW of main bands	分子量 (kDa) MW	主带蛋白 分子量 (kDa) MW of main bands
1~8	>100	-	>100	-
9	97	97	97	97
10	90	-	90	90
11	89	-	89	89
12	80	-	80	-
13	75	-	-	-
14	68	-	68	-
15	62	62	62	62
16	57	57	57	-
17	55	55	55	-
18	46	46	46	-
19	44	-	44	-
20	41	-	41	41
21	40	-	40	40
22	34	34	34	34
23	31	-	31	-
24	28	28	28	-
25	22	22	-	-
26	15	15	15	15

表 2 双向电泳分析阴道毛滴虫总蛋白中多肽点汇编
Table 2 Codification of individual polypeptide spots resolved by two-dimensional gel electrophoresis of total protein of *T. vaginalis*

多肽点 编号 Serial No. of spots	多肽特征 Polypeptide characteristics				多肽 密码 Assigned code for each polypeptide
	分子量(kDa) MW		等电点的 pH pI		
	主点 main spots	次点 minor spots	主点 main spots	次点 minor spots	
1	—	>100	—	4.35	>100-4.35
2	—	>100	—	2.85	>100-2.85
3	—	>100	—	7.65	>100-7.65
4	—	>100	—	2.85	>100-2.85
5	—	>100	—	2.85	>100-2.85
6	—	>100	—	7.65	>100-7.65
7	100	—	4.35	—	100-4.35
8	—	96	—	7.65	96-7.65
9	90	—	4.50	—	90-4.50
10	—	87	—	4.45	87-4.45
11	86	—	4.45	—	86-4.45
12	—	83	—	4.15	83-4.15
13	79	—	4.95	—	79-4.95
14	—	75	—	4.60	75-4.60
15	75	—	5.00	—	75-5.00
16	—	73	—	4.45	73-4.45
17	—	72	—	5.00	72-5.00
18	—	72	—	5.25	72-5.25
19	—	66	—	3.70	66-3.70
20	—	64	—	4.55	64-4.55
21	64	—	5.00	—	64-5.00
22	64	—	5.30	—	64-5.30
23	—	64	—	7.40	64-7.40
24	—	64	—	7.65	64-7.65
25	—	63	—	2.85	63-2.85
26	—	55	—	7.65	55-7.65
27	—	54	—	7.40	54-7.40
28	—	54	—	3.70	54-3.70
29	53	—	4.55	—	53-4.55
30	—	52	—	2.85	52-2.85
31	51	—	4.55	—	51-4.55
32	—	50	—	7.30	50-7.30
33	—	50	—	5.70	50-5.70
34	—	50	—	4.55	50-4.55
35	—	47	—	4.60	47-4.60
36	—	47	—	4.45	47-4.45
37	—	33	—	3.45	33-3.45
38	—	31	—	6.20	31-6.20
39	—	23.5	—	4.55	23.5-4.55
40	—	27.5	—	3.65	27.5-3.65
41	—	27	—	2.65	27-2.65
42	—	27	—	4.55	27-4.55
43	—	27	—	6.20	27-6.20

染色显示 43 个多肽斑点, 绝大部分分布于 PI 3.65~5.84, 其分子量范围为 27~100 kDa 及 100 kDa 以上。其中多肽点 7 (100 kDa PI 4.35)、9 (90 kDa pI 4.50)、11 (86 kDa pI 4.45)、13 (79 kDa pI 4.95)、15 (75 kDa pI 5.00)、21 (64 kDa pI 5.00)、22 (64 kDa pI 5.30)、29 (53 kDa pI 4.55) 和 31 (51 kDa pI 4.55) 着色深, 为主要抗原多肽点, 特别是多肽点 7、9、11、13 及 15 多肽含量较高。Alderete 等^[6]用双向电泳和放射自显影技术, 阴道毛滴虫显示 200 多个多肽点, 其多肽图谱与本实验结果也不尽相同, 这可能因实验条件不同所致。因而设计表 2, 以便在选择性分离特异的阴道毛滴虫基因和鉴别每个多肽中, 为有效、快速与国内外不同实验室比较其生物化学参数时提供具有重要价值的参考依据。

双向电泳多肽斑点图谱有利于鉴别阴道毛滴虫滋养体不同虫株, 有助于理解其抗原的性质及其复杂性, 对开发阴道毛滴虫免疫诊断和研制抗滴虫疫苗有重要意义。

参 考 文 献

[1] Alderete JF. Antigen analysis of several pathogenic strains of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*, 1983, 39:1041-1047.
 [2] Alderete JF. Identification of immunogenic and antibody-binding membrane proteins of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*, 1983, 40:284-291.
 [3] Torian BE, Connelly RJ, Stephens RS, et al. Specific and common antigens of *Trichomonas vaginalis* detected by monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 1984, 43(1):270-275.
 [4] Connelly RJ, Torian BE, Stibbs HH. Identification of a surface antigen of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*, 1985, 49(1):270-274.
 [5] Alderete JF, Suprun-Brown L, Kasmala L. Monoclonal antibody to a major surface glycoprotein immunogen differentiates isolates and subpopulations of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*, 1986, 52(1):70-75.
 [6] Alderete JF, Grarza G, Smith J, et al. *Trichomonas vaginalis*: Electrophoretic analysis and heterogeneity among isolates due to high-molecular weight trichomonad proteins. *Exp Parasitol*, 1986, 61:244-251.
 [7] 张跃, 王正祥, 吴练中, 等. 阴道毛滴虫致病株可溶性抗原的电泳分析. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1998, 16:296-299.

(收稿日期: 2000-06-26 编辑: 富秀兰)

表 2 双向电泳分析阴道毛滴虫总蛋白中多肽点汇编
Table 2 Codification of individual polypeptide spots resolved by two-dimensional gel electrophoresis of total protein of *T. vaginalis*

多肽点 编号 Serial No. of spots	多肽特征 Polypeptide characteristics				多肽 密码 Assigned code for each polypeptide
	分子量(kDa) MW		等电点的 pH pI		
	主点 main spots	次点 minor spots	主点 main spots	次点 minor spots	
1	—	>100	—	4.35	>100-4.35
2	—	>100	—	2.85	>100-2.85
3	—	>100	—	7.65	>100-7.65
4	—	>100	—	2.85	>100-2.85
5	—	>100	—	2.85	>100-2.85
6	—	>100	—	7.65	>100-7.65
7	100	—	4.35	—	100-4.35
8	—	96	—	7.65	96-7.65
9	90	—	4.50	—	90-4.50
10	—	87	—	4.45	87-4.45
11	86	—	4.45	—	86-4.45
12	—	83	—	4.15	83-4.15
13	79	—	4.95	—	79-4.95
14	—	75	—	4.60	75-4.60
15	75	—	5.00	—	75-5.00
16	—	73	—	4.45	73-4.45
17	—	72	—	5.00	72-5.00
18	—	72	—	5.25	72-5.25
19	—	66	—	3.70	66-3.70
20	—	64	—	4.55	64-4.55
21	64	—	5.00	—	64-5.00
22	64	—	5.30	—	64-5.30
23	—	64	—	7.40	64-7.40
24	—	64	—	7.65	64-7.65
25	—	63	—	2.85	63-2.85
26	—	55	—	7.65	55-7.65
27	—	54	—	7.40	54-7.40
28	—	54	—	3.70	54-3.70
29	53	—	4.55	—	53-4.55
30	—	52	—	2.85	52-2.85
31	51	—	4.55	—	51-4.55
32	—	50	—	7.30	50-7.30
33	—	50	—	5.70	50-5.70
34	—	50	—	4.55	50-4.55
35	—	47	—	4.60	47-4.60
36	—	47	—	4.45	47-4.45
37	—	33	—	3.45	33-3.45
38	—	31	—	6.20	31-6.20
39	—	23.5	—	4.55	23.5-4.55
40	—	27.5	—	3.65	27.5-3.65
41	—	27	—	2.65	27-2.65
42	—	27	—	4.55	27-4.55
43	—	27	—	6.20	27-6.20

染色显示 43 个多肽斑点, 绝大部分分布于 PI 3.65~5.84, 其分子量范围为 27~100 kDa 及 100 kDa 以上。其中多肽点 7 (100 kDa PI 4.35)、9 (90 kDa pI 4.50)、11 (86 kDa pI 4.45)、13 (79 kDa pI 4.95)、15 (75 kDa pI 5.00)、21 (64 kDa pI 5.00)、22 (64 kDa pI 5.30)、29 (53 kDa pI 4.55) 和 31 (51 kDa pI 4.55) 着色深, 为主要抗原多肽点, 特别是多肽点 7、9、11、13 及 15 多肽含量较高。Alderete 等^[6]用双向电泳和放射自显影技术, 阴道毛滴虫显示 200 多个多肽点, 其多肽图谱与本实验结果也不尽相同, 这可能因实验条件不同所致。因而设计表 2, 以便在选择性分离特异的阴道毛滴虫基因和鉴别每个多肽中, 为有效、快速与国内外不同实验室比较其生物化学参数时提供具有重要价值的参考依据。

双向电泳多肽斑点图谱有利于鉴别阴道毛滴虫滋养体不同虫株, 有助于理解其抗原的性质及其复杂性, 对开发阴道毛滴虫免疫诊断和研制抗滴虫疫苗有重要意义。

参 考 文 献

[1] Alderete JF. Antigen analysis of several pathogenic strains of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*, 1983, 39:1041-1047.
 [2] Alderete JF. Identification of immunogenic and antibody-binding membrane proteins of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*, 1983, 40:284-291.
 [3] Torian BE, Connelly RJ, Stephens RS, et al. Specific and common antigens of *Trichomonas vaginalis* detected by monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 1984, 43(1):270-275.
 [4] Connelly RJ, Torian BE, Stibbs HH. Identification of a surface antigen of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*, 1985, 49(1):270-274.
 [5] Alderete JF, Suprun-Brown L, Kasmala L. Monoclonal antibody to a major surface glycoprotein immunogen differentiates isolates and subpopulations of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*, 1986, 52(1):70-75.
 [6] Alderete JF, Grarza G, Smith J, et al. *Trichomonas vaginalis*: Electrophoretic analysis and heterogeneity among isolates due to high-molecular weight trichomonad proteins. *Exp Parasitol*, 1986, 61:244-251.
 [7] 张跃, 王正祥, 吴练中, 等. 阴道毛滴虫致病株可溶性抗原的电泳分析. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1998, 16:296-299.

(收稿日期: 2000-06-26 编辑: 富秀兰)