

文章编号:1000-7423(2003)-06-0330-03

日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 的虫体免疫定位

刘庆中* 沈继龙** 汪学龙

【摘要】 目的 研究抗重组日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 (rSj14-3-3) 单克隆抗体对天然 Sj14-3-3 的结合活性, 观察 Sj14-3-3 在虫体内的定位。方法 从阳性钉螺体内逸出尾蚴, 感染家兔, 分别于感染后 15 d 和 42 d 剖杀, 静脉灌注法收集童虫和成虫制备冰冻切片。利用 rSj14-3-3 单克隆抗体, 间接免疫荧光法探讨信号蛋白 14-3-3 虫体内的分布。结果 免疫荧光染色结果显示, rSj14-3-3 单克隆抗体可特异性地结合天然 Sj14-3-3 抗原表位, 背景清晰, Sj14-3-3 广泛分布在雌、雄成虫的皮层、皮下层、肌层和实质层, 前三种组织中特异性荧光呈线状分布, 实质中特异性荧光弥散; 童虫中 Sj14-3-3 也广泛的分布在皮层、皮下层、肌层和实质层。结论 免疫荧光染色成功地确定了 Sj14-3-3 蛋白在成虫和 15d 童虫体内的分布。

【关键词】 Sj14-3-3; 克隆抗体; 间接免疫荧光; 定位

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

Immunolocalization of the Signaling Protein 14-3-3 of *Schistosoma japonicum*

LIU Qing-zhong*, SHEN Ji-long**, WANG Xue-long
(Department of Pathobiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

【Abstract】 Objective To study the localization of the signaling protein 14-3-3 of *Schistosoma japonicum* (Sj14-3-3) in the parasite. **Methods** Cercariae were collected from the infected *Oncomelania hupensis* for the infection of rabbits. Fifteen-day-old schistosomula and adult worms obtained from infected rabbits 15 and 42 days post-infection were used for frozen sections and indirect immunofluorescence staining with monoclonal antibody to rSj14-3-3. **Results** The results showed that the Sj14-3-3 distributed mainly in the tegument, subtegument, muscle, and parenchyma of both adult worms and 15-day-old schistosomula. **Conclusion** The wide distribution and large sites of Sj14-3-3 in the parasite were clearly demonstrated, which established a significant clue for further studies of biologic actions and application of 14-3-3 protein.

【Key words】 *Schistosoma japonicum* Sj14-3-3, monoclonal antibody, indirect immunofluorescence, localization

Supported by the National Natural Science Foundation of China (NO. 3017084) and the Natural Science Foundation of Anhui Province (NO. 0044547)

* Master postgraduate student, Anhui Medical University

** Corresponding author E-mail: jlshen@ahmu.edu.cn

高等动物的 14-3-3 能够发挥多种生物学功能, 成为当前研究热点。在寄生物中, 14-3-3 也是维持细胞周期和虫体生殖发育的主要信号转导分子。日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 (Sj14-3-3) 也因功能重要并具有抗血吸虫病潜能而成为研究重点。为阐明 Sj14-3-3 蛋白的功能, 本研究在获得其重组蛋白^[1]及其单克隆抗体的基础上, 进一步探讨单抗对天然 Sj14-3-3 的结合活性, 利用免疫荧光染色观察 Sj14-3-3 在成虫、童虫体内的分布。

材料与方法

1 实验动物

1.5 ~ 2 kg 的家兔和 5 ~ 8 wk 龄雌性 BALB/c 小鼠由安徽医科大学实验动物中心提供。

2 阳性钉螺

含日本血吸虫 (中国大陆株) 尾蚴的阳性钉螺取自江苏省血吸虫病防治研究所。

3 重组信号蛋白 14-3-3 单克隆抗体的制备和纯化

将纯化的重组日本血吸虫 14-3-3 (rSj14-3-3) 抗原液与等体积的福氏完全佐剂充分乳化, 经雌性 BALB/c 小鼠腹腔注射抗原 100 μg/只, 两周后再用抗原加福氏不完全佐剂加强免疫, 重复 2 次。当小鼠血清效价达到 1:32 以上时取其脾细胞与骨髓瘤细胞 (SP2/0) 融合, 1 周后筛选阳性克隆。将筛选得到的单克隆细胞株经实验室培养后注射到小鼠腹腔, 以诱导单克隆抗体。收集小鼠腹水, 测得其效价为 1 × 10⁶。单克隆抗体亚类为 IgG1 型 (试剂盒为 Sigma 公司产品)。然后, 将腹水经 50% 饱和硫酸铵沉淀 1 次, 33% 硫酸铵

基金项目: 国家自然科学基金 (No: 3017084) 和安徽省自然科学基金 (No: 0044547) 资助项目

作者单位: 安徽医科大学病原生物学教研室, 安徽省基因重点实验室, 合肥 230032

* 安徽医科大学病原生物学硕士研究生, 现在温州医学院附属第一医院检验科, 温州 325000

** 通讯作者 E-mail: jlshen@ahmu.edu.cn

沉淀 2 次纯化并透析后备用。

4 日本血吸虫成虫和 15 日龄童虫的收集

按常规方法从钉螺体内逸出尾蚴,重感染 2 只家兔,分别于感染后 15 d 和 42 d 剖杀,经门静脉灌注收集成虫和童虫, -80℃ 储存备用。

5 冰冻切片的制作与处理

将日本血吸虫雌虫、雄虫和童虫分别以 OCT 包埋, -18℃ ~ -30℃ 下作 4~6 μm 厚的冰冻切片。切片用冰冻丙酮固定 10 min, PBS 洗涤, 室温凉干, 储存于 -80℃ 冰箱或液氮内备用。

6 FITC 标记的羊抗鼠 IgG

FITC-IgG 购自华美公司 (Lot No: GMF30402)。

7 间接免疫荧光法检测 Sj14-3-3 在虫体内的定位

间接免疫荧光染色的具体操作如下:①取雌雄虫、童虫冰冻切片,加 5% 脱脂牛奶置湿盒内于 4℃ 封闭过夜,同时设雌雄虫和童虫阴性对照;②倾去奶液,加 5% 脱脂奶液稀释的鼠源 Sj14-3-3 单克隆抗体 (1:

200), 阴性对照用正常鼠腹水代替,室温避光置湿盒内 1h;③5% Tween-PBS 洗 3 次,再用 PBS 洗 1 次,用滤纸吸去多余的液体;④加 0.05% Tween-PBS 稀释的 FITC-IgG 第二抗体,室温,避光置湿盒内 30 min;⑤ 0.05% Tween-PBS 洗 2 次,再用 PBS 洗 1 次,用滤纸吸去多余的液体;⑥加一小滴 mounting 封闭液,盖上盖玻片封闭,荧光显微镜下观察拍照。

结 果

1 Sj14-3-3 在雌雄成虫和 15 日龄童虫体内的定位

用纯化的鼠源 rSj14-3-3 单克隆抗体和 FITC 标记的羊抗鼠抗 IgG 二抗进行的间接免疫荧光染色结果显示,天然 Sj14-3-3 主要分布在雌雄虫成虫的皮层、皮下层和肌层,特异性荧光呈线状分布,实质中特异性荧光弥散,虫体内部组织器官中特异性荧光较强;童虫中 Sj14-3-3 也比较广泛的分布在皮层、皮下层、肌层和实质层。

雌雄成虫和童虫的阴性对照只有微弱的非特异性荧光反应 (图 1、2、3、4、5、6)。



图 1 Sj14-3-3 在雄虫体内的定位 (20×)
Fig. 1 Localization of the 14-3-3 protein in adult male (20×)



图 2 Sj14-3-3 在雌虫体内的定位 (20×)
Fig. 2 Localization of the 14-3-3 protein in adult female (20×)



图 3 Sj14-3-3 在 15 日龄童虫体内的定位 (20×)
Fig. 3 Localization of the 14-3-3 protein in the 15-day-old schistosomulum (20×)



图 4 雄虫阴性对照 (20×)
Fig. 4 Male negative control (20×)

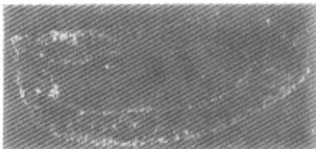


图 5 15d 童虫阴性对照 (20×)
Fig. 5 15-day-old schistosomulum negative control (20×)



图 6 雌虫阴性对照 (20×)
Fig. 6 Female negative control (20×)

讨 论

虽有研究资料间接表明,血吸虫信号蛋白 14-3-3 能和不同的蛋白质相互作用发挥调节功能^[2],但这对深入研究其复杂的生物学功能是远远不够的。为进一步说明血吸虫 14-3-3 的生物学功能,本文对日本血吸虫 14-3-3 在虫体内的分布作了初步探讨。

Schechtman 等^[3]用免疫组化技术确定曼氏血吸虫 14-3-3 (Sml4-3-3) 分布于成虫排泄系统和雌雄成虫生殖系统,也存在于雌雄虫的实质层、肌层;用免疫电镜技术证明,皮层、皮下层、肌层、实质及雌虫生殖系统卵黄细胞和卵母细胞的胞浆和胞核都有 14-3-3 的分布。尾蚴的皮下层、肌层和实质层也有分布。本研究利用 rSj14-3-3 蛋白的单克隆抗体通过免疫荧光染色探讨了天然 Sj14-3-3 在日本血吸虫虫体中的分布。结果表明,14-3-3 存在于雌雄成虫的皮层、皮下层、肌层和实质层;童虫的皮层、皮下层、肌层和实质层分布也非常广泛。

已有研究资料表明,存在于皮层的 Sj14-3-3 可能参与 MAP 激酶信号级联,从宿主环境或异性虫体获取信号。血吸虫从尾蚴向童虫的转化阶段,蛋白激酶 C (PKC) 从体内转移到表膜,活性升高了 9 倍^[4]。PKC 激活后不仅使血吸虫表膜受到损害,出现空泡样变化^[6],还可影响血吸虫细胞骨架蛋白质的合成,阻断由尾蚴向童虫的发育,而 14-3-3 的一段氨基酸序列则与 PKC 相似,可竞争性抑制 PKC 的活性^[5]。血吸虫有一个活泼的神经肌肉系统,色氨酸和多巴胺物质是虫体重要的神经传递介质,分布于中枢神经节、神经干和邻近组织,具有兴奋作用。分布于成虫肌层的 14-3-3 则可通过其酸性 C-末端的调节作用活化酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH), 产生儿茶酚胺类如多巴胺等,激活色氨酸羟化酶 (tryptophan hydroxylase,

TPH) 产生 5-羟色胺^[7], 5-羟色胺不仅刺激虫体的糖酵解,而且也刺激虫体的呼吸。另外,14-3-3 在肌肉中起的作用也与表皮生长因子 (EGF) 诱导的促有丝分裂和调节肌肉收缩等反应一致^[8]。

本研究表明,利用基因克隆和原核表达技术所获取的 rSj14-3-3 免疫小鼠而制备的抗 rSj14-3-3 单克隆抗体,同样具有识别天然 Sj14-3-3 的活性,这为研究血吸虫信号转导通路及其干预提供了重要手段。但本文仅对 Sj14-3-3 进行了在成虫和 15 日龄肝期童虫体内的定位,其在各系统器官、细胞和亚细胞、虫卵、尾蚴、皮期童虫和肺期童虫中的定位正在进一步研究,以便更准确地阐述 14-3-3 的生物学功能。

参 考 文 献

- [1] 李德发,沈继龙,祖莹,等. 日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 在原核细胞的高效融合表达及鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(2): 50-53.
- [2] Boston P F, Jackson P, Kynoch PA, et al. Purification, properties, and immunohistochemical localization of human brain 14-3-3 protein[J]. Neurochem, 1982, 38, 1466-1474.
- [3] Schechtman D, Winnen R, Tarrab-Hazdai R, et al. Expression and immunolocalization of the 14-3-3 protein of *Schistosoma mansoni* [J]. Parasitology, 2001, 123: 573-582.
- [4] Wiest PM, Daniel C, Burnham F, et al. Developmental expression of protein kinase C activity in *Schistosoma mansoni* [J]. Am J Trop Med Hyg, 1992, 46: 358-365.
- [5] Aitken A. 14-3-3 protein on the MAP [J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20(3): 95-97.
- [6] Wiest PM, Kunz SS, Miller KR. Activation of protein kinase C by phorbol esters disrupts the tegument of *Schistosoma mansoni* [J]. Parasitology, 1994, 109: 461-468.
- [7] Ichim T, Isobe T, Okuyama T, et al. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1998, 85: 7084-7088.
- [8] Ramachandran H, Skelly YP, Shoemaker CB, et al. Conserved role for 14-3-3 epsilon downstream of TGF beta receptors [J]. FEBS Letters, 2001, 490, 65-69.

(收稿日期: 2003-03-31 编辑: 伯韦)

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》由邮局向国内外公开发行人。邮发代号 4-362。

欲订阅者,可向当地邮局直接订阅。漏订者可直接与本编辑部联系。

欢迎来稿

欢迎订阅