

蛋白质组及其在原虫领域中的研究进展*

谢 俐, 潘国庆

(西南大学 蚕学与生物技术学院 农业部蚕桑学重点开放实验室, 重庆 400715)

摘 要 近十几年来, 蛋白质组学的研究技术得到了很大发展。质谱技术, 比较蛋白质组方法, 研究蛋白质相互作用的酵母双杂交技术等的发展, 极大地推进了蛋白质组研究的进程。原虫作为单细胞的真核动物, 虽体积微小但能独立完成生命活动的全部生理机能, 其中近万种原虫为寄生性原虫, 它们常寄生在动物体内或体表使其致病, 从而对人类及牲畜造成极大的危害。因此, 原虫蛋白质组作为蛋白质组学研究的一个分支也迅速发展起来。到目前为止, 世界上已有 73 种原虫的基因组已完成或正在进行测序工作, 并且大部分已经进入了蛋白质组研究的工作。本文综述了一些具有代表性的原虫蛋白质组的研究情况, 如: 溶组织性阿米巴, 布氏锥虫, 间日疟原虫等, 同时阐述了它们的致病机理、诊断及疫苗等方面的蛋白质组研究。

关键词 原虫; 蛋白质组; 致病机理; 诊断; 疫苗

中图分类号: Q816

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2006)03-0005-05

Progress of the Research on Proteome and Proteome in Protozoan Area

XIE Li, PAN Guo-qing

(The Key Lab of Sericulture of Agricultural Ministry, College of Sericulture and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract Proteome has become the key part of functional genome research in post-genome era. Initially, its significant assignment is study of whole set proteins coded in the genome with technologies of 2D-electrophoresis, bioinformatics and protein-protein interaction. Recently, Proteomics technologies have been well improved, including Mass Spectrum, comparative proteome method and yeast two-hybrid technology. Protozoan is a unicellular eukaryote, its size is small but can accomplish all the life activities by itself. There are nearly 10,000 species of parasitical protozoan, which cause severe disease to animal or human. The sequence measuring of 73 protozoan genome is completed or in progress in the world, most of which step into proteomics research. Therefore, protozoan proteomics has achieved much advances. In this article, proteome research of representative protozoan, such as *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma bruce*, *Plasmodium vivax*, were reviewed, mainly their nosogenesis, diagnosis, vaccines and so on.

Key words protozoan; proteome; nosogenesis; diagnosis; vaccine

随着人类基因组计划的基本完成与数十种模式生物基因组全序列测定的完成, 基因组计划的重心已由结构基因组研究转移到功能基因组研究, 生命科学的研究已经进入了后基因组时代。这个时代生命科学的主要研究对象是功能基因组学, 蛋白质组学更是研究的重点。关于蛋白质组的研究可追溯到 20 世纪 80 年代, 在基因组计划提出之前, 有人就提出了类似的蛋白质组计划, 称为 Human Protein In-

dex^[1]。1994 年 Wilkins 和 Willian 提出了“蛋白质组”的概念, 指一个细胞或一个组织内所存在的全部蛋白质^[2]。现今, 蛋白质组学(proteomics)有了一个全新的概念: 它是一门以蛋白质为中心的研究学科, 这门学科最初是研究基因组中蛋白质的表达, 它利用双向电泳来分离和确定蛋白质, 利用信息技术来搜索相关的蛋白质数据, 以及研究“蛋白质—蛋白质”间相互作用和细胞蛋白质组^[3]。

* 收稿日期 2006-03-27

资助项目: 国家 973 项目(No. 2005CB12100); 国家蚕丝办项目(No. M012005 - 000Y - 00070)

作者简介: 谢俐(1981-) 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向为家蚕微孢子原虫。

蛋白质组学是大规模的蛋白质分析,它被分为3个主要的领域^[4]:一是针对大量蛋白质鉴定的蛋白微观特型学;二是潜在的应用于一大系列疾病的基于蛋白质表达水平比较的“差异展示”蛋白质组学;三是用质谱法或酵母双杂交等技术研究的蛋白质与蛋白质相互作用关系学。研究蛋白质组学能够极大地促进人们在后基因时代对基因功能的理解。

质谱技术是研究蛋白质组学的重要工具,它主要用于蛋白质的鉴定及研究蛋白质的修饰。质谱技术随着时间的推移也得到了很大的发展,出现较早的基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱检测法(matrix-assisted laser desorption/ionization MALDI-TOF)^[5]是将多肽成分转换成离子信息,并依据质量/电荷之比(mass/charge, M/z)来对该多肽进行分析,以判断该多肽源自哪一个蛋白。随之出现的液相色谱——质谱联用仪(LC-MS/MS)通过液相色谱仪纯化肽段样品,再用MS/MS将肽段的氨基酸成分检测出,从而更有效地鉴定蛋白质。线性离子阱-傅立叶变换-离子回旋共振质谱仪(Finnigan LTQ FT)作为新一代质谱仪比液质联用仪(LC-MS)和色质联用仪器(LC-MS/MS)具有极高的灵敏度,高度重复率,高超的质量分辨能力以及卓越的质量测量准确性,这种串联质谱仪是蛋白质组的飞跃,它“代表了蛋白质组学的一个里程碑式的进步”。

比较蛋白质组的方法是用双向电泳的方法,分析细胞在不同生理或病理条件下蛋白质表达的差异。此外,蛋白质芯片也是研究蛋白质组分析的好方法^[6],它能将许多“诱饵”蛋白如抗体以阵列的形式被固定在特殊处理的物体表面,然后用特定的样本探测,于是只有那些能与相关抗体吸附的蛋白能够吸附在芯片上,然后再与一个直接具有吸附材料的MALDI读出器结合起来。它的优点在于能够提供便利的蛋白质组分析。

对于一个蛋白质而言,它在什么时候,什么情况下表达,以及与其他蛋白质有什么样的作用,这对于研究蛋白质间的相互作用都是至关重要的。这种相互作用模型可以用于功能基因组的研究和开发潜在的药物治疗新方法。酵母双杂交是研究蛋白质间相互作用的经典模型,在基因组序列被了解的基础上,可以利用大规模双杂交技术全面地分析一种物种或细胞、组织的所有蛋白质之间的相互作用关系。类似的工作可针对其他物种开展,特别是基因组序列已被揭示的物种。噬菌体展示技术是一种用噬菌

体表达肽,或是表达融合到衣壳/外壳蛋白上的所感兴趣的蛋白质的技术^[7,8]。它可以被用来筛选肽的抗原决定簇,肽的配合基,酶作用底物或是单链抗体片段。是研究蛋白质组间相互作用的一个重要技术。

1 原虫蛋白质组的研究

原虫为单细胞真核动物,体积微小而能独立完成生命活动的全部生理功能^[9]。它在生物学分类隶属于原生生物界(Kingdom Protista),原生动亚界(Subkingdom Protozoa)之下的3个门,即肉足鞭毛门(Phylum Sarcostigmaphora),顶复门(Phylum Apicomplexa);纤毛门(Phylum Ciliophora)。原虫在自然界分布广泛,种类繁多,迄今已发现约65 000余种,多数营自生或腐生生活,分布在海洋、土壤、水体或腐败物内。约有近万种为寄生性原虫,生活在动物体内或体表。医学原虫是寄生在人体管腔、体液、组织或细胞内的致病及非致病性原虫,约40余种。其中的一些种类以其独特的生物学和传播规律危害人群或家畜,构成广泛的区域性流行。

目前,关于原虫的研究已经进入了一个新的时期,已有数十种原虫基因组测序完成。表1是一个有关原虫基因组及其蛋白质组相关研究近况的总结^[10]。

2005年《Nature》报道溶组织性阿米巴(*Entamoeba histolytica*)的基因组全序列测定工作^[11],溶组织性阿米巴的染色体基因密集区域可以编码大约12 500个预测的蛋白质,同时它的基因组中包含了很多聚酮合成酶和ABC转运体,这些酶和转运体形成了一个生产与输出小分子的次级代谢机制。基于蛋白质组的研究背景分析,推测阿米巴是在植物与动物分化后,才从人类与真菌的共同祖先中分离出来的。

现在比较蛋白质组的分析方法也广泛用于物种之间的研究。Lee GE^[12]等对两种原虫即:新包虫(*Neospora caninum*)和弓形虫(*Toxoplasma gondii*)进行了比较研究,通过双向凝胶电泳实验分析了新包虫约78%的蛋白质,运用Western-blotting检测了80%的蛋白质抗原点。同时利用兔抗血清在弓形虫的蛋白质双向电泳图上检测出了30个抗原点。通过比较发现了两种物种间有大量相同的同族蛋白质,如热激蛋白70,微管蛋白,二硫化物异构酶,肌动蛋白,烯醇酶,14-3-3蛋白质家族等。同时发现

NcSUB1, NcGRA2 和 NCDG1 是新包虫所特有的蛋白质的不同。通过蛋白质组比较发现了两个物种具有很大

表 1 原虫的基因组与蛋白质组研究近况

拉丁学名	中文名称	基因组大小 (MB)	ORF 数目	染色体数目	Swiss-Prot* 登陆蛋白质	TrEMBL* 登陆蛋白质
<i>Schistosoma mansoni</i>	曼氏血吸虫	270	15 000 ~ 25 000	8	83	516
<i>Leishmania major</i>	利什曼原虫	34	8 272	36	33	8 278
<i>Trypanosoma brucei</i>	布氏锥虫	26	9 068	22	165	9 977
<i>Trypanosoma cruzi</i>	枯氏锥虫	34	22 570	14	54	20 136
<i>Trichomonas Vaginalis</i>	阴道毛滴虫	60 ~ 80	ND [#]	ND [#]	15	292
<i>Giardia lamblia</i>	蓝氏贾第鞭毛虫	12	ND [#]	5	37	7005
<i>Entamoeba histolytica</i>	溶组织阿米巴	20	9 938	14	78	9 569
<i>Plasmodium falciparum</i>	恶性疟原虫	23	5 300	14	184	10 553
<i>Plasmodium vivax</i>	间日疟原虫	30	ND [#]	14	10	1 702
<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	约氏疟原虫	23	5 300	14	13	7 914
<i>Toxoplasma gondii</i>	刚地弓形虫	30	ND [#]	9	30	480
<i>Cryptosporidium hominis</i>	隐孢子虫	9.2	ND [#]	8	1	4 012
<i>Cryptosporidium parvum</i>	微小隐孢子虫	10	ND [#]	8	7	4 065
<i>Brugia malayi</i>	马来丝虫	110	ND [#]	6	66	950

注 :ND[#] not determine ;Swiss - Prot* 与 TrEMB* 为 Expaty 中的两个蛋白质数据库的网址 :http://www. expasy. ch/sprot/ 数据截至日期为 2006-02-21.

锥虫(*trypanosome*)是一种血鞭毛原虫,它能寄生鱼类,鸟类,哺乳动物及人类等,引起诸如淋巴结肿大,脾充血,脑膜炎等疾病^[9]。A Atwood^[13]等人在枯氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)的基因组测序完成后又对其蛋白质组进行了详细的研究。枯氏锥虫一生有 4 个发育时期:上鞭毛体(*Epimastigote*),亚循环的锥虫成虫期(*Metacyclic trypomastigote*),无鞭毛体(*Amastigote*)和锥虫成虫期(*Trypomastigote*)。通过分析发现了 1 168 个蛋白质家族中的 2 784 种蛋白质,其中鉴定了超过 1 000 种蛋白质,并且注释了一个新的基因家族 MASP(mucin - associate surface protein)。枯氏锥虫的 4 个发育时期的蛋白质表达都不尽相同,但约 30%(838/2784)的蛋白质在每个时期都有表达。从上鞭毛时期到亚循环的锥虫成虫期,蛋白质的表达产物发生了很大的变化,主要是一些重要的酶和抗氧化剂,同时核蛋白的表达也大大降低,50 个在上鞭毛时期高效表达的蛋白质中有 37 个在亚循环锥虫成虫期都很难检测到。对枯氏锥虫不同发育时期蛋白质的研究有助于发现新的靶蛋白和开发新的治疗药物。

Nugent PG^[14]等对利什曼虫(*Leishmania*)的 3 个不同发育时期:循环前鞭毛体(*procyclic promastigotes*),亚循环前鞭毛体(*metacyclic promastigotes*),无

鞭毛体(*amastigotes*)各自的蛋白质进行了双向电泳及硝酸银染色分析。经过对不同时期蛋白质的比较,发现了每个时期所特有的蛋白质有 47 种,有超过 100 种的蛋白质在每个时期都有明显的变化,这些在每个不同时期特异性表达的蛋白质,主要集中在亚循环前鞭毛体和无鞭毛体时期。利用 CapLC - QTOF 质谱分析鉴定了 47 种蛋白质,其中一些蛋白质只能在无鞭毛体时期才能检测到。这些已鉴定的蛋白质主要都与功能基因有关,其中一些很可能与传染、寄主与寄生虫之间的相互作用有关。

2 原虫的致病机理

蛋白质组学研究的一个明显的优势就是能够在整体水平上对原虫蛋白质质谱变化进行研究。由于绝大多数原虫为寄生性的且可以感染人体致病,原虫感染致病机理与生物病原的侵袭力和宿主应答水平之间的相互作用而导致的机械、生物和化学性质的损伤外,还有自身的一些特点:增殖、传播能力、机会致病等^[9]。不少宿主细胞与致病原虫之间发现的表面受体作用,是揭示虫体对亲和细胞或组织进行识别、粘附,进而入侵或吞噬的物质基础。

Marti M^[15]等研究疟原虫(*Plasmodium*)感染宿主时发现疟原虫将重构的毒力蛋白注入到红细胞

内,这些蛋白质能够穿过一系列的膜,包括寄生虫的膜、纳虫空泡膜,以及红细胞膜。在疟原虫中发现一段保守序列在蛋白质的输出中起到重要作用,确定了400个假定的红细胞靶向蛋白和225个毒力相关蛋白,以及与宿主红细胞重构有关的160个蛋白质。疟原虫属内物种间的这种信号传导的保守性对开发新的抗疟新药方面具有重要的利用价值。

寄生性原虫不是单纯的靠自身感染寄主,而是通常要借助其它的一些生物。Haddow JD^[16]等人研究锥虫(*trypanosome*)在寄主体内能够分化成为成熟的对哺乳动物有感染性的感染体,这一过程都离不开舌蝇中肠中的一种分子,因为这种分子对锥虫在寄主体内的定殖传播起到了重要作用。在研究中,Haddow JD等还分析了野生型舌蝇与具有鲑鱼眼色的突变种舌蝇两者之间的中肠蛋白质的表达谱,发现它们在非洲锥虫感染寄主的易感性上存在明显的不同。运用同位素编码亲和标签(Isotope coded affinity tag, ICAT)技术研究了207种蛋白质,其中包括鲑鱼突变种的7个正调控蛋白和9个负调控蛋白。这几种正调控的蛋白在以前都被认为是中肠蛋白质或唾液腺蛋白质。

棒状体是顶复体(*Apicomplexa*)门的原虫所特有的一种分泌型器官,这些专性细胞内寄生的原虫是引起人类疟疾和鸡球虫病的重要因素。这些棒状体在原虫感染宿主细胞后便释放到新生成的寄生泡中,它位于宿主与病原体的交界面上。Peter J. Bradley等人运用了一种方法可以高效的将刚地弓形虫(*Apicomplexa*门的最佳研究模式生物)的棒状体纯化出来,同时运用质谱法分析鉴定了38种新的蛋白质。前人的研究认为弓形虫和疟原虫的棒状体蛋白质组是不同源的,但通过Peter J. Bradley等人对弓形虫棒状体蛋白质组的分析发现它们是同一家族的。这项研究鉴定了第一个编码棒状体颈蛋白的基因RONs,并且证明Toxofilin与Rab11都是棒状体蛋白,也鉴定了一些新的激酶、磷酸酶和蛋白酶,它们可能在原虫寄生虫入侵到宿主体内并协同宿主细胞为自身的生长、繁殖过程中起到重要的作用。这项研究最具吸引的地方就是寄生虫的蛋白质瞬间入侵到宿主的过程,它们能够到达细胞核并协同宿主细胞的基因表达它们所需的产物。

3 诊断及疫苗研究

细胞内寄生的原虫如疟原虫、利什曼原虫,可以

逃避宿主抗体的杀伤。有些在血液中的寄生原虫如锥虫等,能定期更换表面的抗原(变异),使已产生的特异性免疫失败。有些寄生原虫可以诱发对宿主B细胞的多克隆刺激,或抑制宿主的细胞免疫功能,使宿主的特异性免疫能力降低。

Agranoff D^[17]等发现了一种可以用于针对非洲锥虫病(*African trypanosomiasis*)的蛋白质组血清信号法,他们联合运用SELDI-TOF质谱法和富集数据运算法则,这种方法利用了蛋白质的生化特性,为疾病的诊断和鉴别潜在靶药物提供了一种非常好的研究工具。

利什曼虫(*Leishmania*)所引起的黑热病一度给人类带来威胁,Rosario E Y^[18]等人将利什曼虫抗原和经重组改造后的抗原rK-39和rK-26与患黑热病的狗血清与狗体液进行酶联吸附免疫实验(enzyme-linked immunosorbent assay ELISA),结果发现有92.2%都产生的阳性反应;同时进一步证明了天然抗原和重组抗原可以用于黑热病不同时期的诊断,并且重组抗原的诊断优势略高于天然抗原。

随着疟原虫耐药性的不断增强,人们现急需开发一种新的方法来开发疫苗治疗疟疾^[19]。目前恶性疟原虫和约氏疟原虫等几种重要的疟原虫基因组的测序完成,蛋白质组学结合质谱分离得到的高纯度蛋白质以及计算机软件这几种工具,便能快速有效的建立疟原虫不同时期蛋白质的一个动态表达过程。而高通量的蛋白质组学研究方法又为蛋白质的表达提供了丰富的数据,特别是对疟原虫抗药性和药物作用机理的研究,比如:喹啉等,起到了极大的推动作用,而当前这些方面仅凭基因组数据是不能解决的。因此,蛋白质组学与疟原虫基因组信息和生物信息学方面结合,一定可以为开发抗疟疾的新药开辟新的前景。

当今,蛋白质组学已经成为功能基因组学研究的重点。随着各种蛋白质研究技术的不断发展,关于原虫蛋白质组的研究也将逐渐完善。原虫作为人类的一类主要寄生病原体,其蛋白质组学的研究将为阐明它们的致病机理,并开发其诊断方法和疫苗,为人类对抗疾病做出贡献。

参考文献:

- [1] 曾嵘,夏其昌. 蛋白质组学研究进展与趋势[J]. 中国科学院院刊, 2002(3): 166-169.
- [2] 孙伟,高友鹤. 蛋白质组研究进展[J]. 生理通讯, 2003, 22(3): 86-91.

- [3] R. J. 辛普森. 蛋白质与蛋白质组学实验指南[M]. 北京 : 科学出版社 , 2003.
- [4] PANDEY A , MANN M. Proteomics to Study Genes and Genomes[J]. Nature 2000 ,15(15) 837-845.
- [5] 罗治文. 质谱技术研究进展[J]. 国外医学(生物医学工程分册) 2005 , 28(3) :134-137.
- [6] LUEKING A , HORM M , EICKHOFF H , et al. Protein Microarrays for Gene Expression and Antibody Screening[J]. Anal. Biochem , 1999 , 270 :103-111.
- [7] ZOZULYA S , LIOUBIN M , HILL R J , et al. Mapping Signal Transduction Pathways by Phage Display[J]. Nature Biotechnol , 1999 , 17 :1193-1198.
- [8] HULTION S , E. Phage Display of cDNA Repertoires the pVI display System and Its Application for the Selection of Immunogenic ligands , [J]. J. Immunol. Methods. 1999 , 231 : 39-51.
- [9] 詹希美. 人体寄生虫学[M]. 第五版. 北京 : 人民卫生出版社 2001.
- [10] 赵蔚 , 郭晓奎. 病原微生物蛋白质组研究[J]. 微生物学免疫学进展 , 2004 , 32(1) 30-34.
- [11] EICHINGER L , PACHEBAT J A. GLOCHNER G , et al. The Genome of the Social Amoeba *Dictyostelium Discoideum*. [J]. Nature 2005 , 435(5) :43-57.
- [12] LEE E G. KIM J H. SHIN Y S. Application of Proteomics for Comparison of Proteome of *Neospora Caninum* and *Toxoplasma Gondii* Tachyzoites[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2005 , 815(5) 305-314.
- [13] ATWOOD A , WEATHERLY D B , MINNING T A. The *Trypanosoma Cruzi* Proteome[J]. Science , 2005 , 309(15) :473-476.
- [14] NUGENT P G , KARSANI S A , WAIT R. Proteomic Analysis of *Leishmania Mexicana* Different Differentiation [J]. Mol Biochem Parasitol 2004 , 136(10) 51-62.
- [15] MARITI M , GOOD R T , RUG M. Targeting Malaria Virulence and Remodeling Proteins to the Host Erythrocyte [J]. Science 2004 , 306(10) :1930-1933.
- [16] HADDOW J D , HAINES L R , GOODING R H. Identification of Midgut Proteins That are Differentially Expressed in Trypanosome-susceptible and Normal Tsetse Flies (*Glossina Morsitans Morsitans*) [J]. Insect Biochem Mol Biol 2005 , 35(5) :425-433.
- [17] AGRANOFF D , STICH A , ABEL P , et al. Proteomic Fingerprinting for the Diagnosis of human African *Trypanosomiasis*[J]. Trends Parasitol 2005 , 21(4) :154-157.
- [18] ROSARIO E Y , GENARO O , FRANCA-SILVA J C. Evaluation of Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Crude *Leishmania* and Recombinant Antigens as a Diagnostic Marker for Canine Visceral Leishmaniasis[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz , Rio de Janeiro , 2005 , 100(2) :197-203.
- [19] COOPER R A , CARUCCI D J. Proteomic Approaches to Studying Drug Targets and Resistance in Plasmodium[J]. Curr Drug Targets Infect Disord 2004 , 4(1) :41-51.

(责任编辑 许文昌)