

# 家蝇幼虫生态免疫 与利用研究

贵阳医学院病原生物学

汇报人： 吴建伟； e-mail: [wjw@gmc.edu.cn](mailto:wjw@gmc.edu.cn)

Te1: 0851-6909979, 13308501357

# 汇报纲要



研究背景和目的



详细研究内容



研究总体思路



成果意义



基金资助情况



目前工作





# 研究背景和目的

滋生地、传染源

媒介防制工作??

资源：昆虫，有机废物??



## 目的：

- 1、家蝇幼虫生态功能维持机理；
- 2、探索有机废物污染资源化治理能力
- 3、证实工业化应用可能性。





# 研究的总体思路

指导思想：动物生态免疫学与生态功能关系





# 基金资助情况

国家自然科学基金项目 ( 30960343、39260069、  
39970087、81160204, ) 国家博士点基金  
( 20105215120001 ) 。

国家发改委循环经济试点单位建设项目 ( 发改环资  
[2007]3420号)

科技部十一五支撑计划 ( 2011BAC06B12)

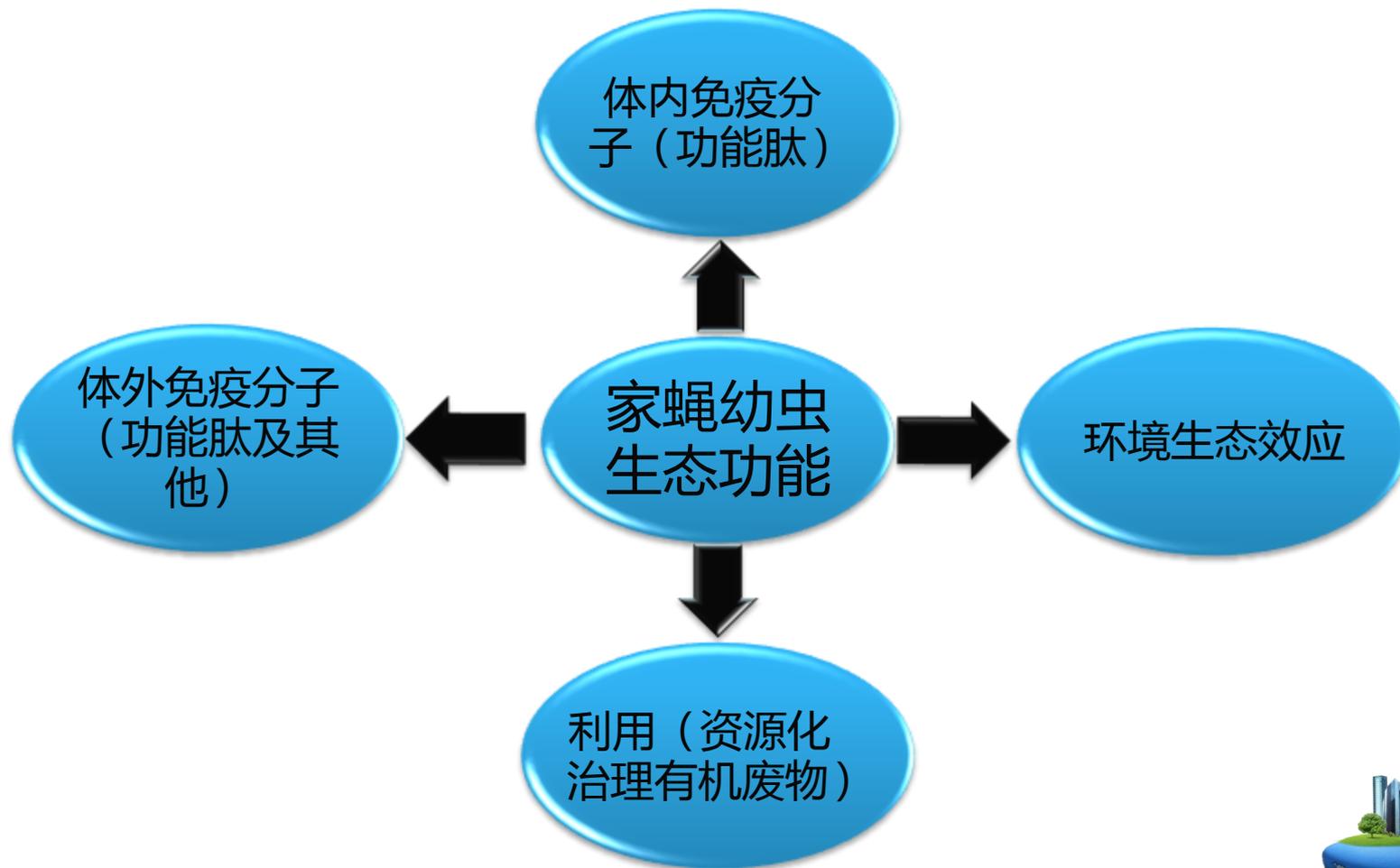
中国科学院 “西部之光” 项目 ( 科发人教字[2005]404 )

省部级基金【黔科通[2004]148-6,[2005]85-11 , 黔教  
科[2002109]、[2003108] , 黔科教办[2003]04-7 , 黔  
科教 ( 2009 ) 0137 , ( F2008 ) -6 ) )





# 详细研究内容



# 一、体内免疫活性物

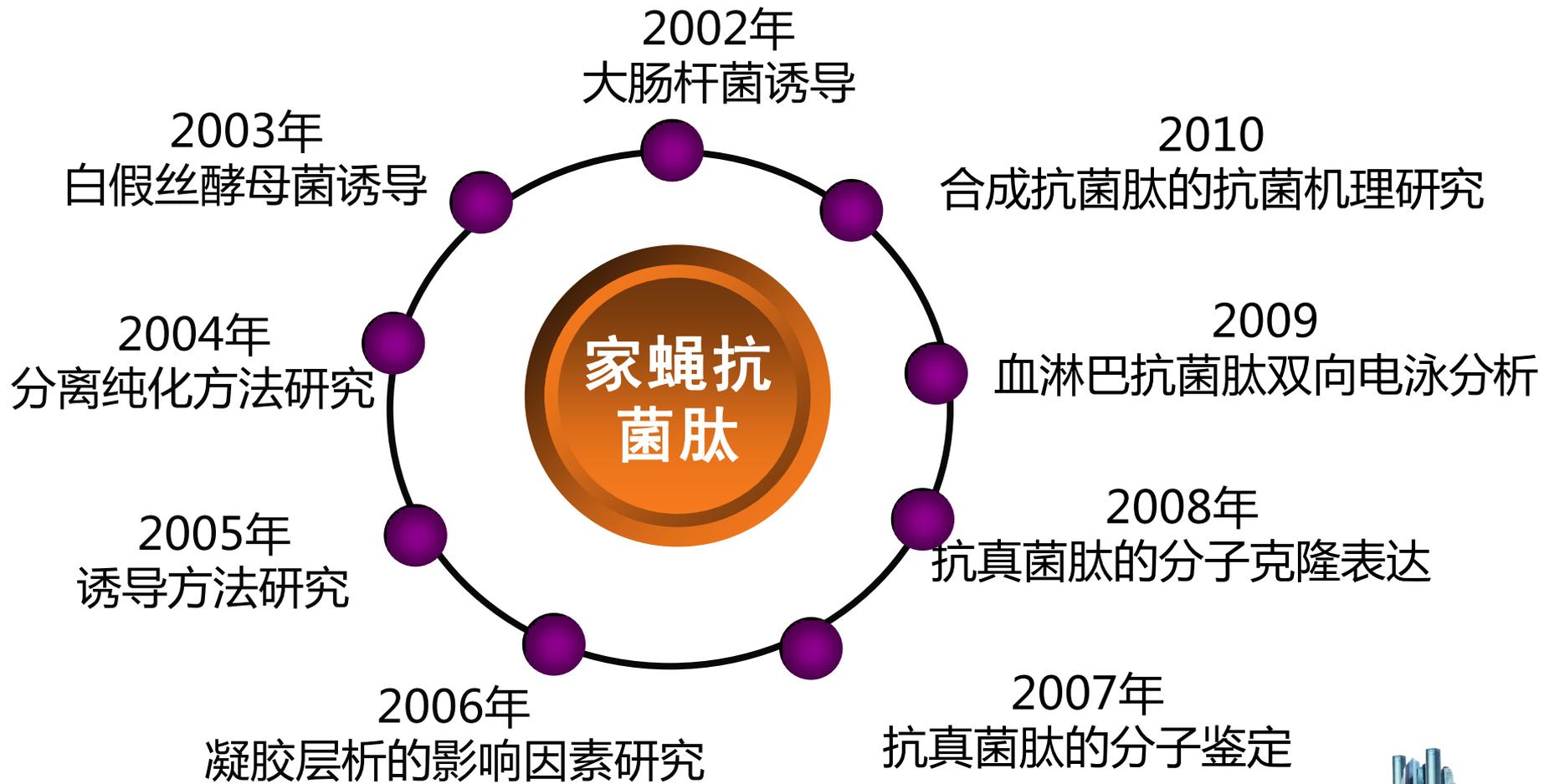
家蝇幼虫血淋巴

检测靶标：

细菌、真菌  
、病毒、肿  
瘤细胞、理  
化因子



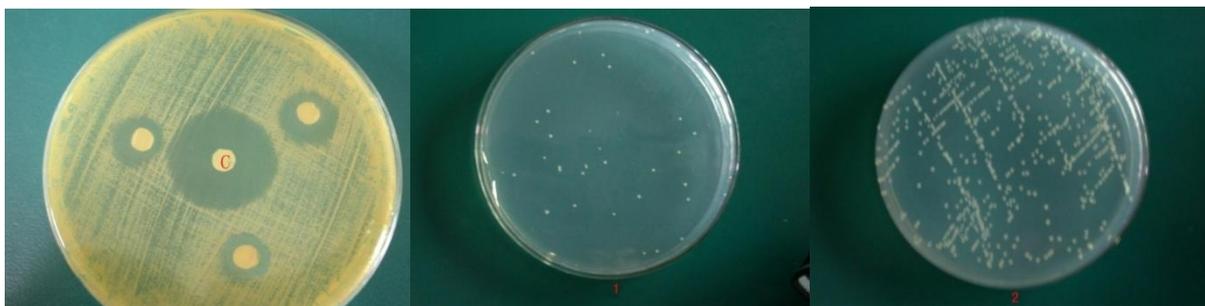
# (一) 抗菌肽研究



# 1、抗菌真菌肽的分离与检测

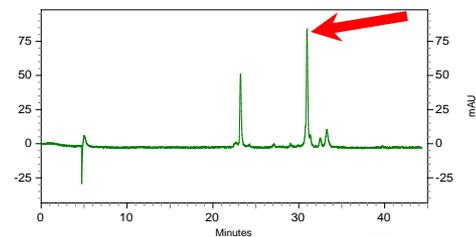
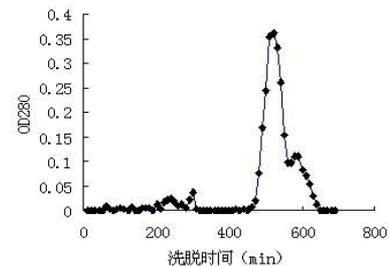
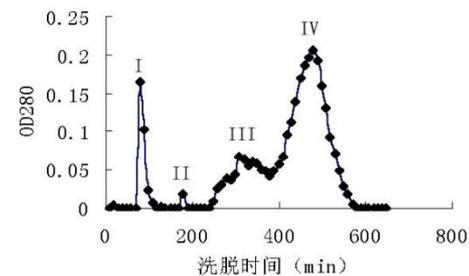
## 1) MAF-1获得研究

样品	浓度	菌落数 (个) * $P < 0.05$
MAF-1	72.92 $\mu\text{g/ml}$	40 $\pm$ 9 *
阴性对照	0	1258 $\pm$ 126
酮康唑	1mg/ml	90 $\pm$ 12 *



MAF-1

阴性对照



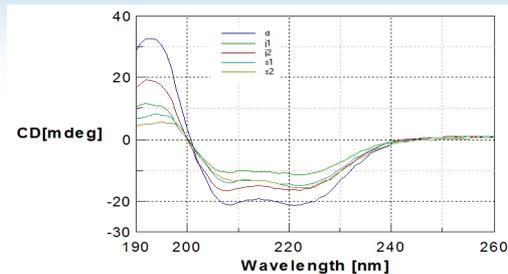
# 2) MAF-1的分子鉴定

分子量：16.7KDa

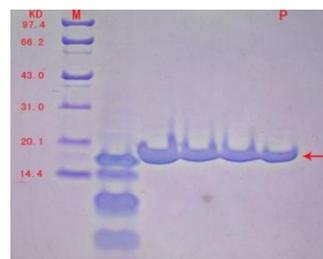
$\alpha$  螺旋，

国际数据库中尚未收录

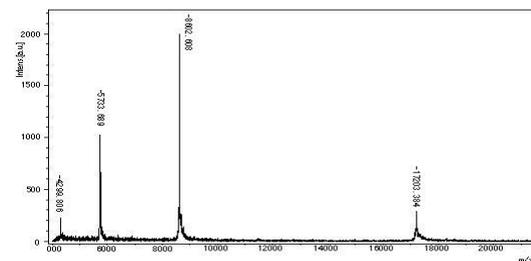
正在进行体外重组表达



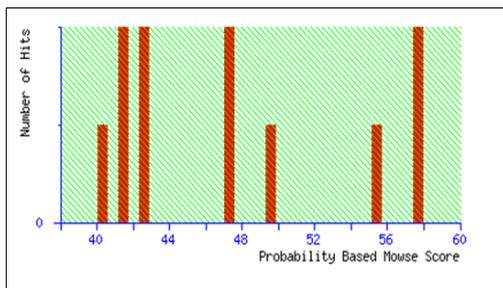
圆二色谱



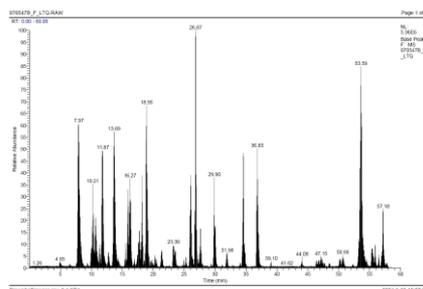
SDS-PAGE



MALDI-TOF质谱



肽肽指纹图谱鉴定



串联质谱基峰图

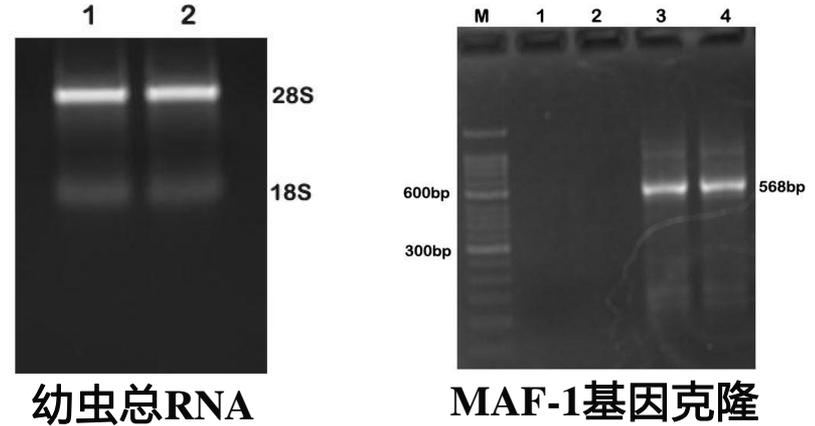
N-末端30个氨基酸序列



# 3 ) MAF-1的分子克隆与分析

## 全长MAF-1分析

成熟肽全长	156个氨基酸残基
赖氨酸	13.46%
丙氨酸	12.82%
谷氨酸	11.54%
半胱氨酸	0
二硫键	0
理论分子量	17181.2Da
精确分子量	17203.384Da
理论等电点	5.13
实际等电点	4.96



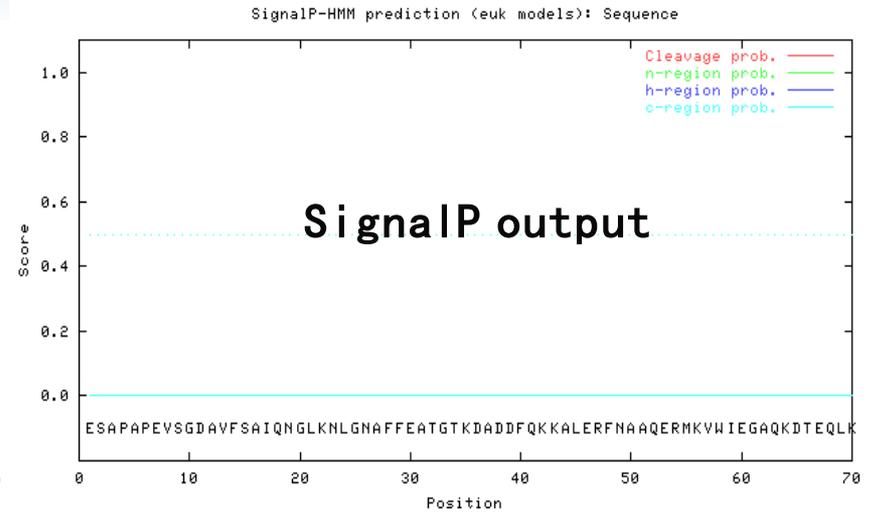
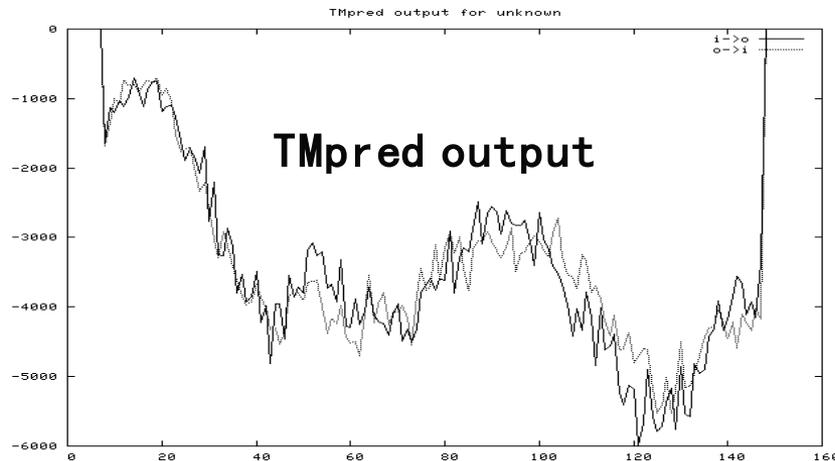
```

1      ACTTGTCTCGAAACTTCGAAGGCAAAAAGAACCCACAAATCAAATCTCGAAATGTT
1      L V S E T S K A K E P P Q I K M S K L F
61     CTTCCTTGTTGGCTTACCAATCTTGGCTGGCTGCTGCTGCGGTTCCCGTGAAATCTGC
21     F L V G L I T I L A A A S A R V P R E S A
121    CCCC GCCCTGAGGTGTCGGCGGATGCTGCTTTCAGTGCCATCCAAAATGGTTTGAAGAA
41     F A P E V S G D A V F S A I Q N G C L K N
181    TTGGGCAATGCTTCTTTGAGGCCACCGGCACCAAGGATGCTGATGATTCCAAAAGAA
61     L G N A P P E A T G T K D A D D F Q K K
241    GGCCCTCGAAGCTTTCAAATGCTGCCCAAGAAAGAAATGAAGGCTCGGATGAGGGTGCCCA
81     A L E R F N A A Q E R H K V W I E G A Q
301    AAAGGATACCGAACAAATTGAAGCAAAACCCCCCTCATAAGGATTTGCGCCGCCCTTGA
101    K D T E Q L K E T P V I K D L R A A L E
361    AAAGCTCGCAATGACTTCAAGACCGCCACCCCGGTTTGAGGCCAAGAAATCTCCCAACA
121    K L G N D F K T A H P G L S Q E V S Q
421    ATTGAAACAAGGTC AACGAAGGCGTTGAAGATGTTGCCAAGAAAATCAAGGCCITGGAAAA
141    L N K V N E G V E D V A K K I K A L E N
481    CTCCGACGAAGCAAGAAATCAAGGAAACCGCCGACAAAGTTGATCGAATCTGCCAAGCA
161    S D E S K K F K E T A D K L I E S A K Q
541    ACAACTCGAATCGTTGGCCAAAGGAAATGAAGCCCATGCCCATAATTTCATGAAGTATT
181    Q L E S L A K E H K P H A * I S H K Y F
601    TCAAAAAACAAACACAAAATCTAAAAATAAATGCCAAGGCTGATTTTTTGGTTTTGG
201    Q K N K H K N L K N K C Q G * F F G F G
661    CGATAAAAAAAAACCTATAGTGAATCACTAGTGGAGGATCCCGC
221    D K K K N L * * N H * W R I R
    
```

MAF-1 cDNA全长



## 4) MAF-1的生物信息分析



## Results of the $k$ -NN Prediction

$k = 9/23$

### The subcellular location prediction

78.3 %: nuclear  
8.7 %: cytoplasmic  
4.3 %: Golgi  
4.3 %: cytoskeletal  
4.3 %: mitochondrial

>> prediction for QUERY is nuc (k=23)



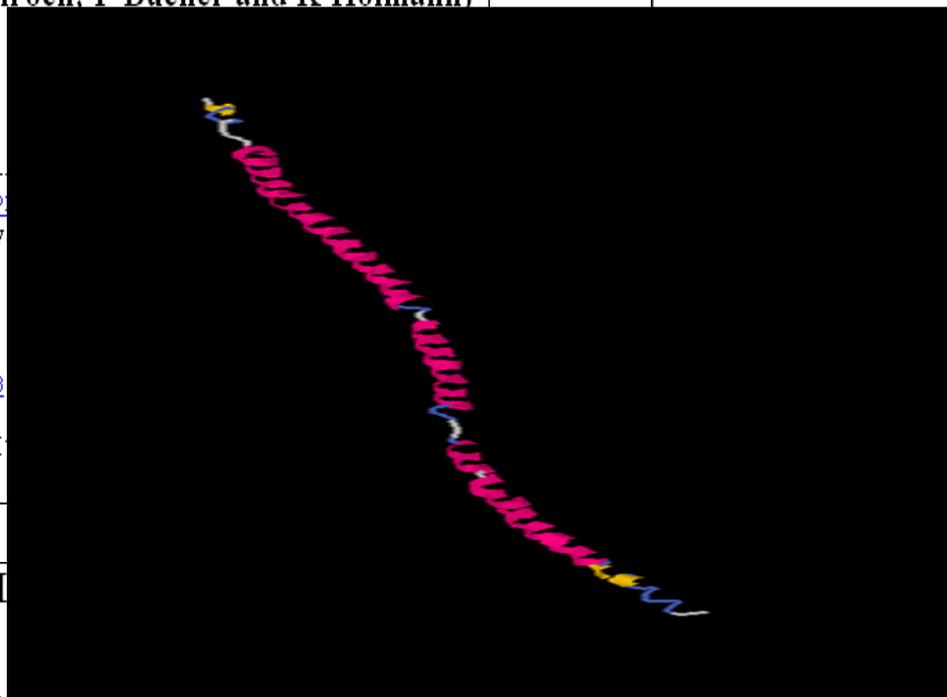


# 生物信息分析

PROSITE motif search (A Bairoch; P Bucher and K Hofmann)

## motif search

```
-----  
Pattern-ID: PKC_PHOSPHO_SITE PS00005 P  
Pattern-DE: Protein kinase C phosphory  
Pattern: [ST].[RK]  
127 SKK  
140 SAK  
  
Pattern-ID: MYRISTYL PS00008 PDOC00008  
Pattern-DE: N-myristoylation site  
Pattern: G[^EDRKHPFYW].(2)[STAGCN]  
33 GTKDAD
```



ESAPAPEVSGDAVFSAIQNGLNKLNIGNAFFEATGTKDADDF

```
-----P-----P-----  
protein-protein  
VWIEGAQKDTEQLKETPVIKDLRA  
-----P---P---PP-PP  
interaction sites  
SQEVSQQLNKVNEGVEDVAKKIKA  
-----PP-----P---  
  
LIESAKQQLLESLAKEMKPHA  
-----P-
```

GI

```
----  
---- GLOBE: prediction of protein globularity  
----  
---- nexp = 111 (number of predicted exposed residues)  
---- nfit = 74 (number of expected exposed residues)  
---- diff = 37.00 (difference nexp-nfit)  
---- =====> your protein appears to be globular  
----  
----  
---- GLOBE: further explanations preliminaryly in:  
---- http://rostlab.org/papers/1999\_globe/paper.html  
----  
---- END of GLOBE
```

## GLOBE prediction



# 生物信息分析结果

1

新抗菌肽，登录号HM178948

2

富含  $\alpha$  螺旋，有3个  $\alpha$  螺旋区

3

功能结构域可能位于第128至153位氨基酸残基处

4

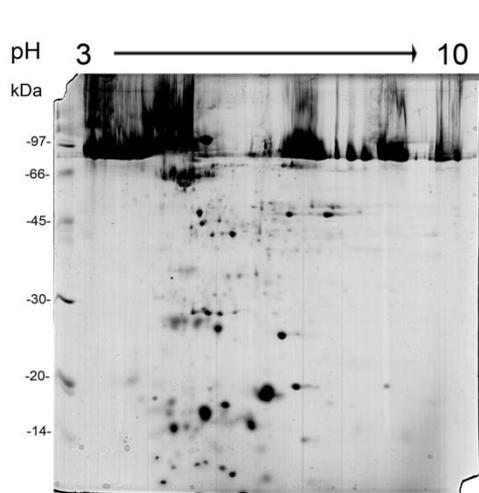
功能位点及蛋白质相互作用位点多

5

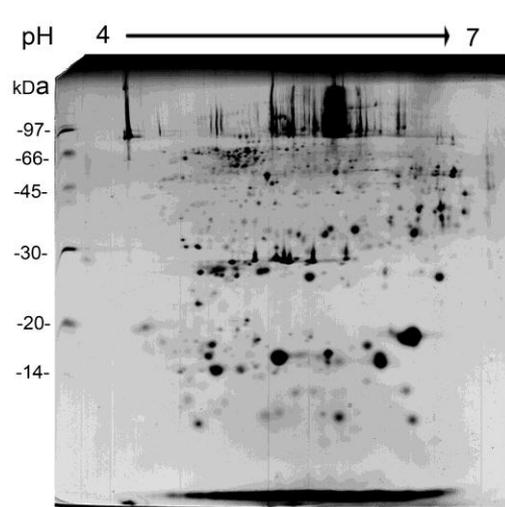
主要分布于细胞核内



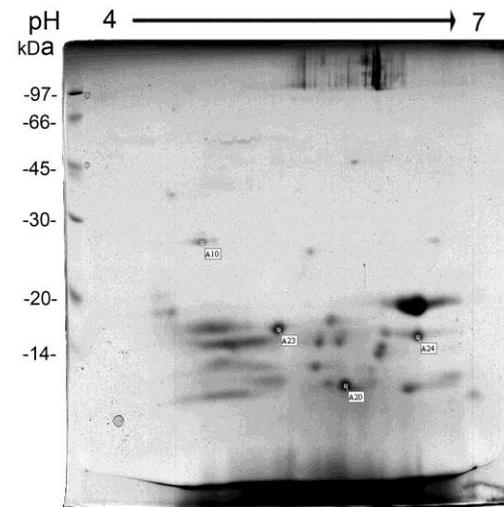
## 2、血淋巴免疫相关蛋白双向电泳分析



286个蛋白点



601个蛋白点

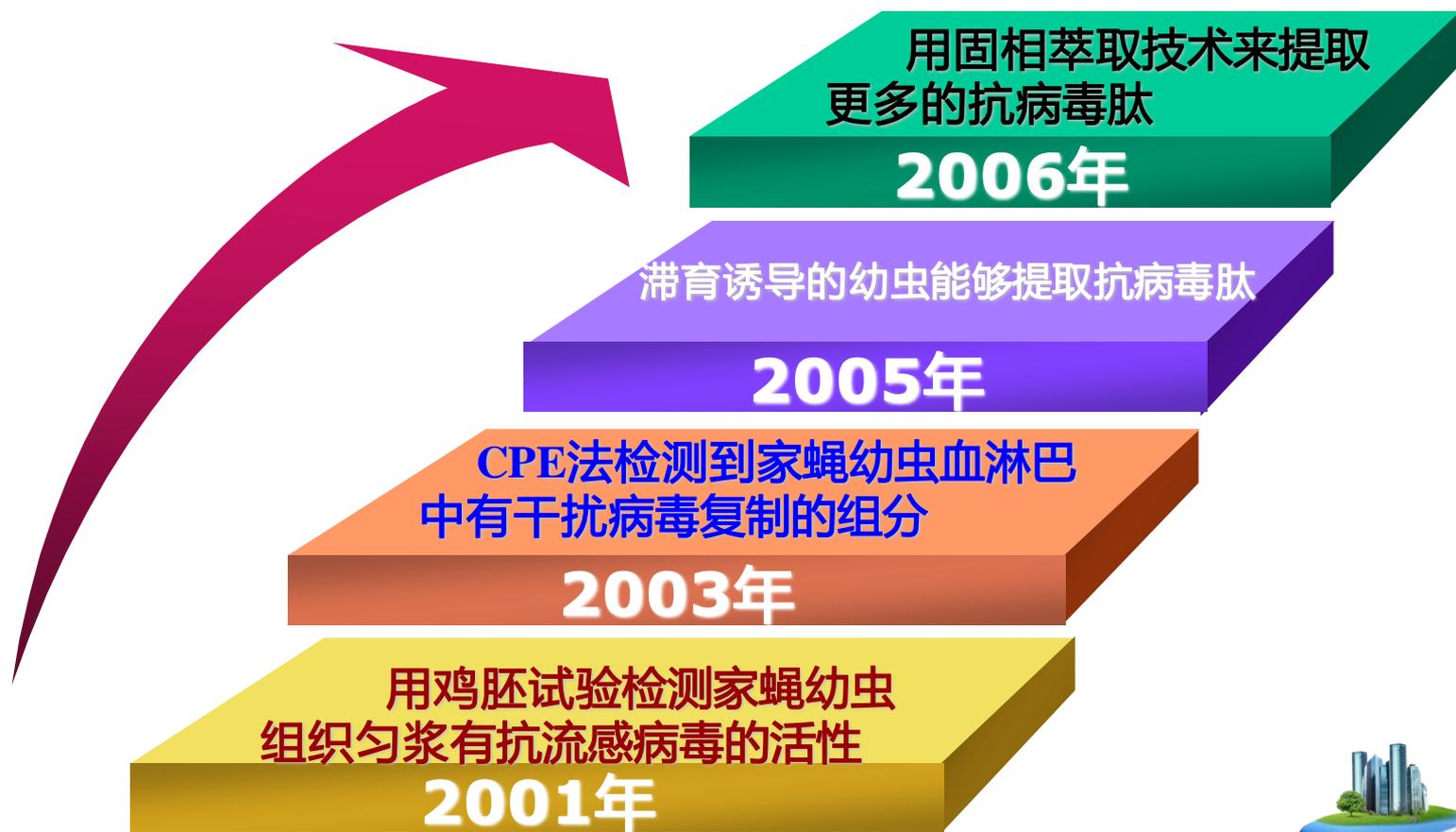


41个蛋白点

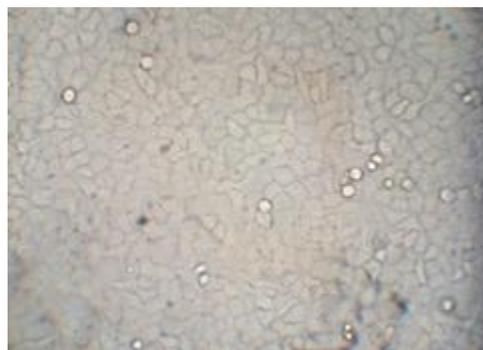
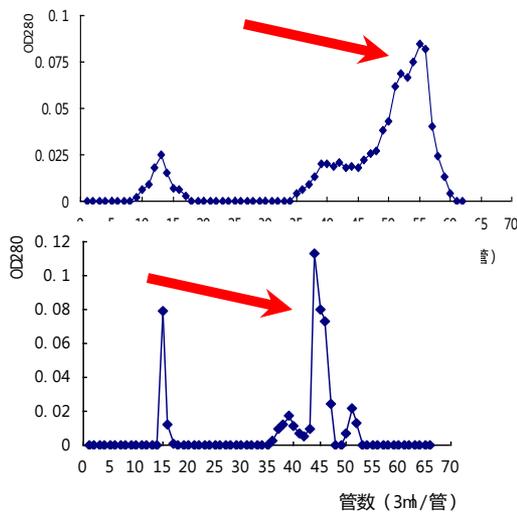
Spot No	Identification/homology	Accession No.	Observed Protein MW	Observed Protein PI	Protein Score C. I. %
A 10	larval hexamerin Hex-L	gi26891757	29084.10	4.47	100
A 20	odor binding protein 2	gi290782522	12454.70	5.94	100
A 23	putative ferritin heavy chain-like protein	gi298569366	14129.00	5.37	100
A 24	ferritin 2 light chain homolog	gi6409191	25482.80	5.90	100



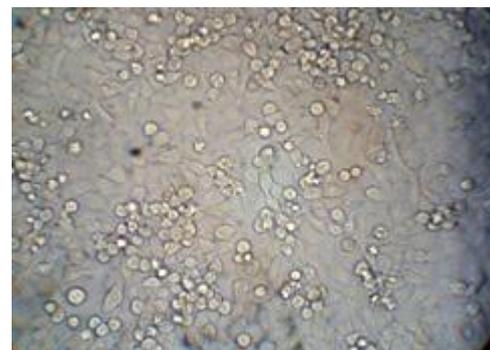
### 3、抗病毒肽研究



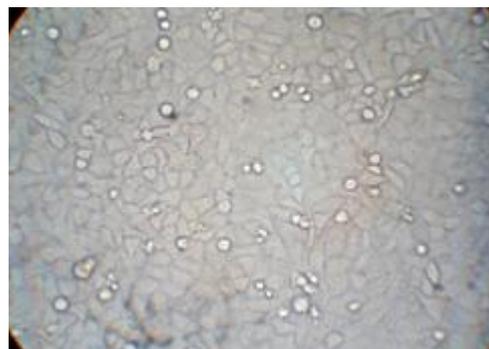
# 抗病毒肽的分离与检测



正常



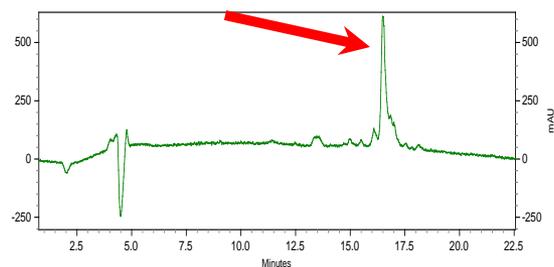
病毒组



阳药组



抗菌肽组



活性峰 →



# 体内免疫研究结论



## 二、体外免疫活性物

幼虫体外分泌物

检测靶标:

环境生物

体内功能分子  
关系



### 不同来源家蝇幼虫分泌物对猪蛔虫卵发育影响\*

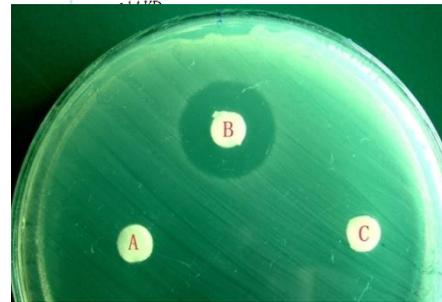
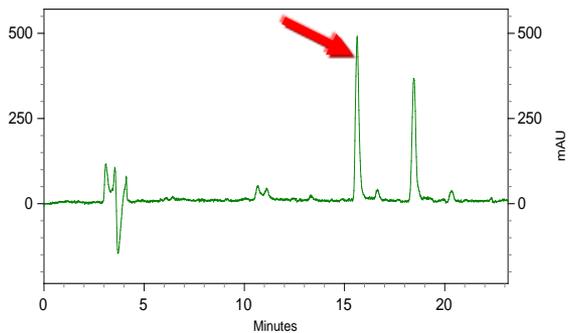
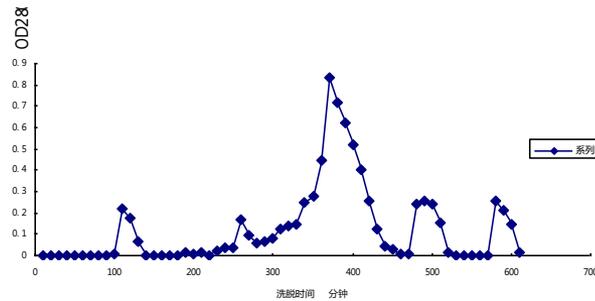
国果<sup>1</sup>, 吴建伟<sup>1</sup>, 付萍<sup>1</sup>, 覃容贵<sup>2</sup>, 张勇<sup>1</sup>

**摘要:**目的 分别从饲养家蝇幼虫的饲料残渣及幼虫浸液中提取家蝇幼虫分泌物,初步纯化后观察对猪蛔虫卵发育的影响。方法 将家蝇幼虫饲料残渣或 3 龄幼虫浸泡于适量蒸馏水中 4 h,吸取浸液用硫酸铵盐析或透析的方法分离分泌物,所得分泌物分别制成虫卵培养液,观察培养液中猪蛔虫卵发育情况。同时,设立不含家蝇幼虫分泌物的培养液为阴性对照。结果 从饲料残渣和幼虫浸液中提取的分泌物 0~30%,30%~50%的盐析蛋白液、盐析上清液对虫卵发育均无影响;50%~80%的盐析蛋白液、透析外液可明显阻碍虫卵的发育。结论 家蝇幼虫饲料残渣和幼虫浸液中提取的幼虫分泌物均可阻碍猪蛔虫卵的发育,活性物质主要集中在 50%~80%的盐析沉淀部分,其分子量

# 1) 抑制蛔虫卵研究

# 2) 分泌型抗菌肽研究

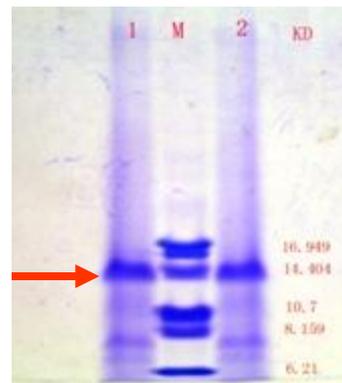
## A、分离、检测、分子鉴定



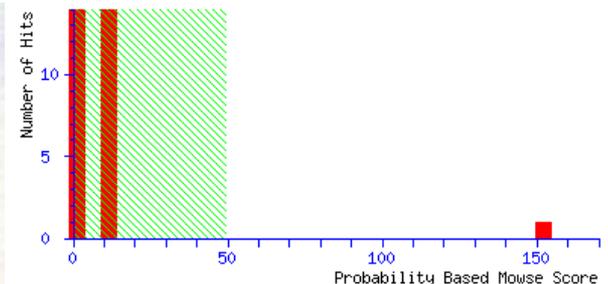
超滤组分抗菌活性



萃取洗脱组分抗菌活性



分子量: 14.16kDa

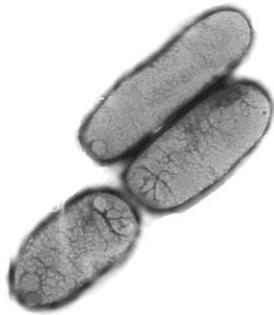


肽指纹图谱鉴定



## B、抗菌机制研究

### 透射电镜观察 ( × 15000 )



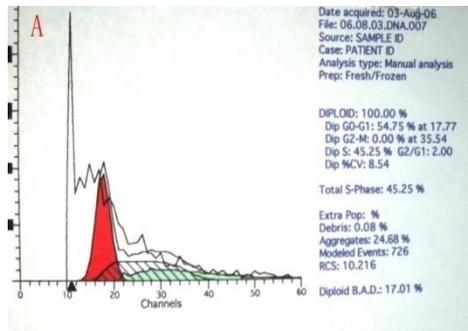
200620631

正常大肠杆菌

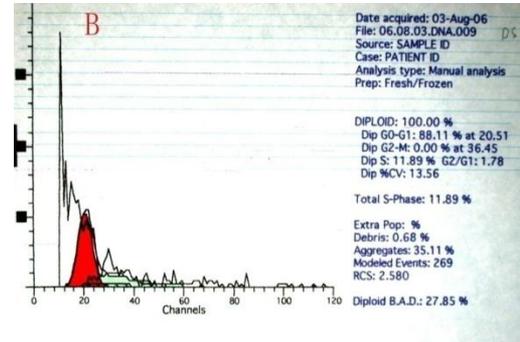


抗菌肽作用后大肠杆菌

### 流式细胞仪检测



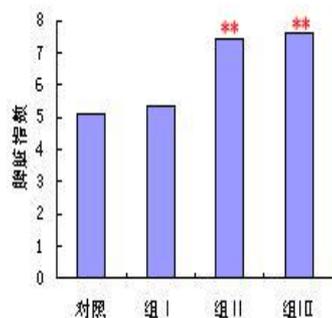
对照组



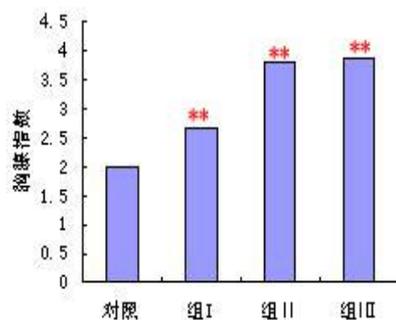
实验组



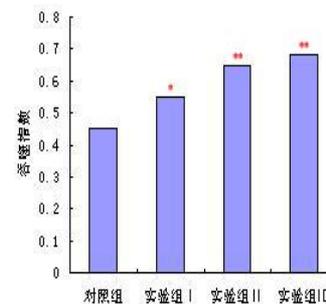
## C、正常小鼠免疫功能的影响



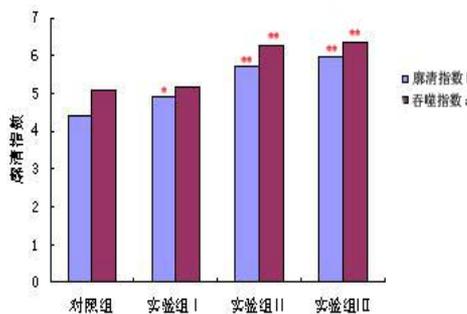
对脾脏指数的影响



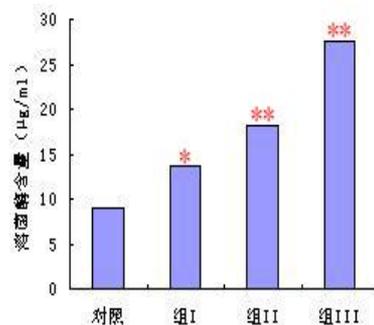
对胸腺指数的影响



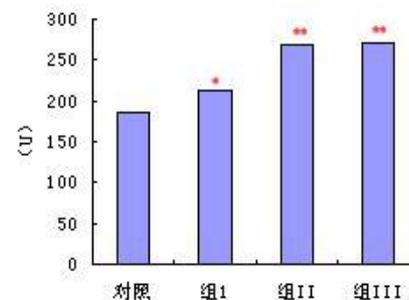
巨噬细胞吞噬指数



对碳粒廓清活性的影响



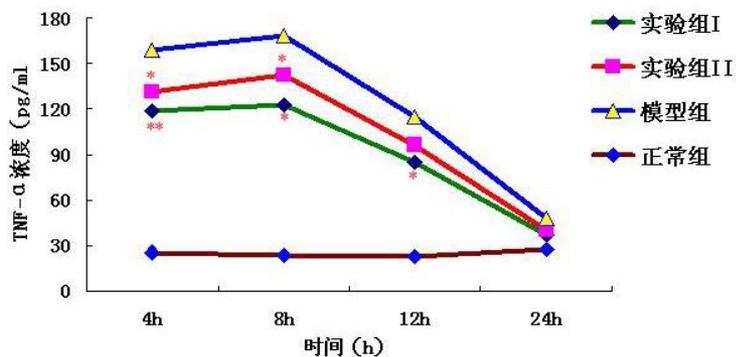
血清溶菌酶含量的影响



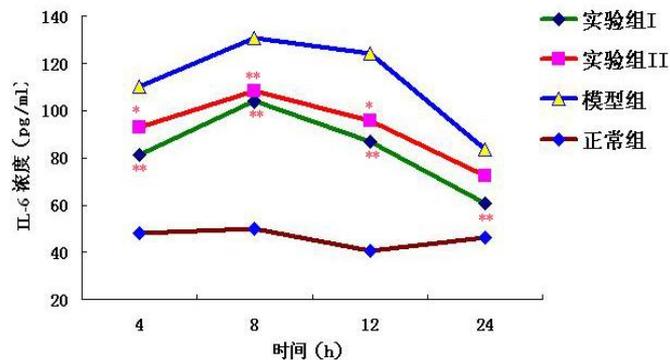
脾T淋巴细胞转化率



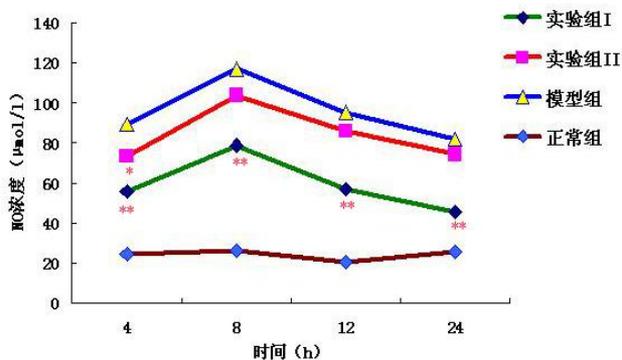
## D、细菌感染小鼠的干预作用



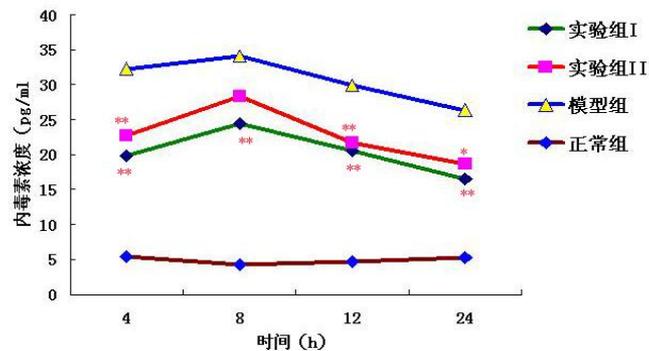
小鼠血清TNF-α含量的变化



小鼠血清IL-6含量的变化



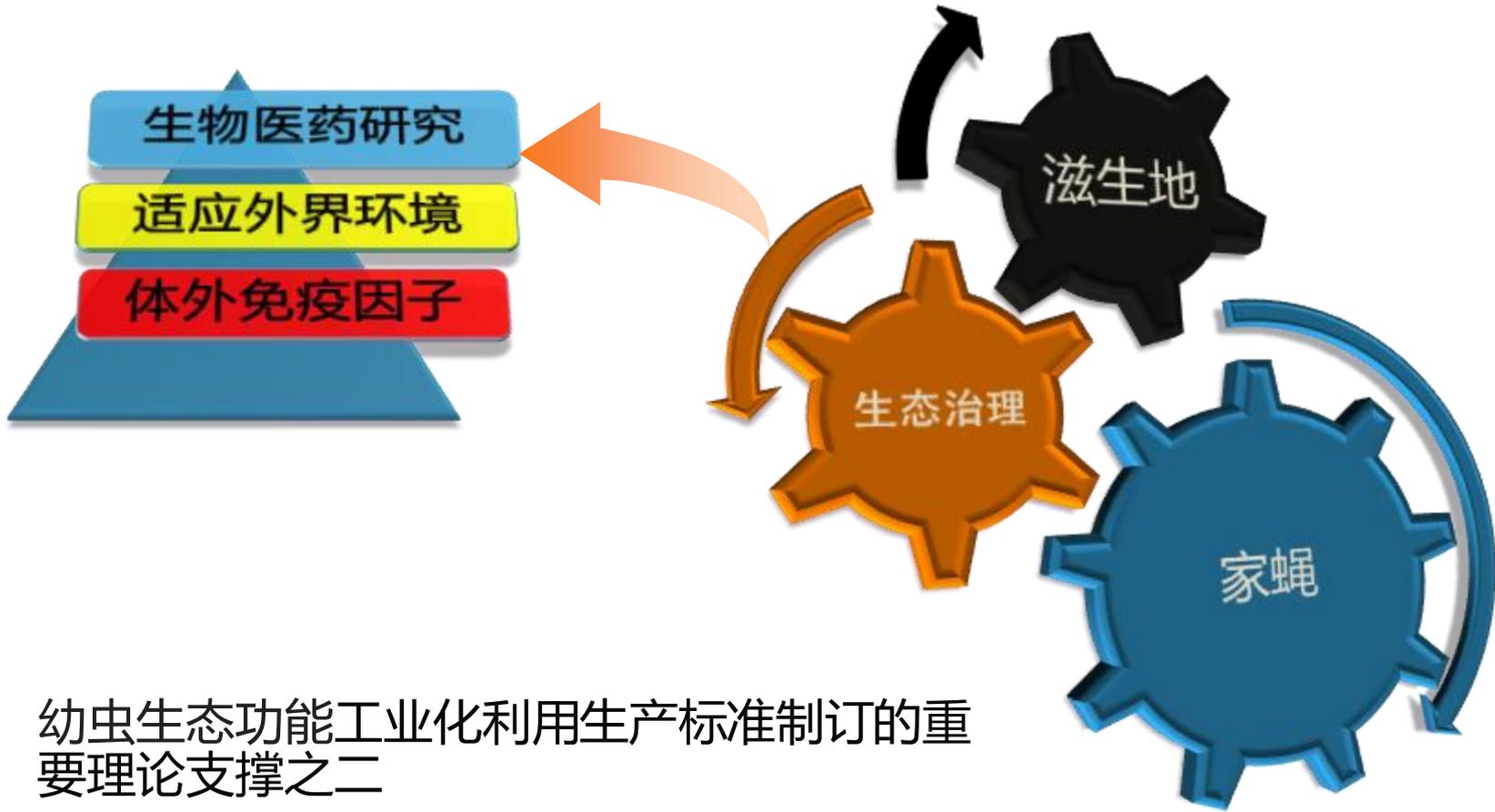
小鼠血清NO含量的变化



小鼠血清内毒素含量的变化



# 体外免疫活性物研究结论



幼虫生态功能工业化利用生产标准制订的重要理论支撑之二



# 三、幼虫治理猪粪的生态效应的研究



贵州医药 2002 年 9 月第 26 卷第 9 期

• 789 •

## 家蝇幼虫消化后猪粪的家蝇孳生能力研究

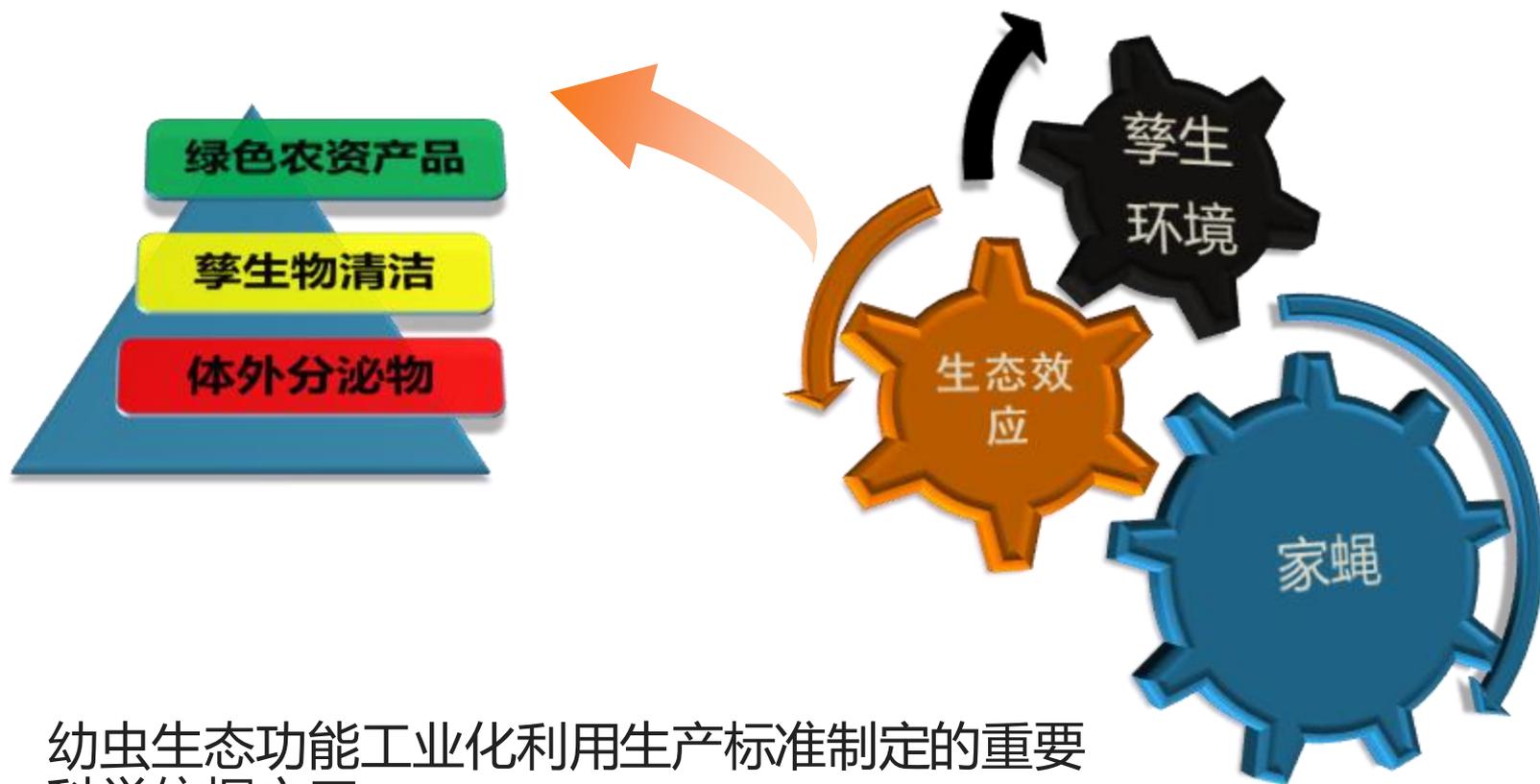
贵阳医学院寄生虫学教研室(550004) 吴建伟  
厦门大学生命科学院动物学科(361005) 陈美 彭文峰

**摘要** 目的 观察家蝇幼虫消化猪粪的家蝇孳生能力变化。方法 取家蝇幼虫消化猪粪置于猪舍中,观察家蝇的产卵量,幼虫、蝇蛹的发育和蛹的羽化率。设立新鲜猪粪对照,用 SPSS 统计软件统计分析。结果 家蝇幼虫消化猪粪上的产卵明显低于对照( $P < 0.01$ ),两组分别为  $93 \pm 49$  只和  $8700 \pm 2205$  只,蝇蛹的羽化率和未羽化蛹的胚胎形成率均明显低于对照( $P < 0.01$ )。对照猪粪氮含量高于家蝇幼虫消化组。结论 家蝇幼虫消化猪粪,可以明显降低猪粪对家蝇的孳生能力,具有消除猪粪作为家蝇孳生地的生态作用。

**关键词** 家蝇幼虫 猪粪 生态作用



# 幼虫治理猪粪的生态效应研究结论



幼虫生态功能工业化利用生产标准制定的重要科学依据之三



# 四、幼虫壳聚糖和整虫的生理及免疫活性研究

壳聚糖的  
降血脂活性

整虫对鸡  
免疫功能影响

体壁及整虫的  
生理及免疫活性

整虫对蛋鸡  
产蛋率的影响



# 1、壳聚糖的降血脂活性

474

中国公共卫生 2008 年 4 月第 24 卷第 4 期 Chin J Public Health Apr 2008 Vol. 24 No. 4

文章编号: 1001-0580(2008)04-0474-02 中图分类号: R 36 文献标志码: A

【实验研究】

## 蝇蛆壳聚糖对高脂血症大鼠降脂作用\*

贾宏鼎 吴建伟 国果 付彦

第 27 卷 第 3 期  
2002 年 6 月

贵阳医学院学报  
JOURNAL OF GUIYANG MEDICAL COLLEGE

Vol. 27 No. 3  
2002. 6

论著

## 鲜蛆替代国产鱼粉对海兰棕壳蛋鸡产蛋性能的影响

吴建伟<sup>1</sup>, 彭文峰<sup>2</sup>, 陈美<sup>2</sup>

(1. 贵阳医学院 寄生虫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 厦门大学生命科学学院动物学系, 福建 厦门 361005)

[摘要] 目的: 观察猪粪饲养的蝇蛆替代国产鱼粉作饲料对海兰棕壳蛋鸡产蛋性能的影响。方法: 用猪粪饲养蝇蛆, 收集 3 龄鲜蛆直接替代国产鱼粉饲养 40 周龄海兰棕壳蛋鸡, 设不同量鲜蛆替代组和鱼粉对照组, 观察蛋鸡的日平均产蛋率、日平均产蛋量和平均蛋重, 记录饲料消耗量和蛋鸡死亡数, 用 SPSS 统计软件分析结果。

中药材 Journal of Chinese Medicinal Materials 第 30 卷第 6 期 2007 年 6 月 • 635 •

• 动物药研究 •

## 蝇蛆蛋白粉对小鼠免疫功能的影响

覃容贵<sup>1</sup>, 傅平<sup>2</sup>, 吴建伟<sup>2\*</sup>, 国果<sup>1</sup>

(贵阳医学院 1. 药学院; 2. 基础医学院, 贵州贵阳 550004)

摘要 目的: 探讨蝇蛆蛋白粉对正常小鼠及免疫抑制小鼠免疫功能的调节作用。方法: 利用正常及环磷酰胺(Cy)所致免疫低下模型小鼠, 通过血清溶血素含量检测及碳粒廓清指数测定考察蝇蛆蛋白粉对巨噬细胞巨噬功能及体液免疫功能的影响。结果: 蝇蛆蛋白粉可显著提高正常小鼠半数溶血值(HC<sub>50</sub>), 对吞噬指数(α)无影响; 对免疫功能低下小鼠 HC<sub>50</sub>无影响, 但可显著提高其 α 值。结论: 蝇蛆蛋白粉可有效地增强正常小鼠体液免疫功能; 对 Cy 造成的免疫功能低下有一定的预防和治疗作用。

关键词 蝇蛆蛋白粉; 免疫活性; 小鼠

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2007)06-0635-03

Study on Immunological Effect of Housefly Protein in Mice

QIN Rong-gui<sup>1</sup>, FU Ping<sup>2</sup>, WU Jian-wei<sup>2\*</sup>, GUO Guo<sup>1</sup>

# 2、整虫对鸡的生理效应

## 1) 整虫对蛋鸡产蛋率的影响

## 2) 整虫对鸡的免疫效应



# 幼虫壳聚糖和整虫的生理及免疫活性研究结论



昆虫新型资源  
新型有机肥

幼虫生态功能工业化利用的重要科学依据之四  
产品方案制定



# 五、研究总结

## 1、结论

	体内免疫	体外免疫	生态效应	资源利用
结果	证明具多种特异的抗菌抗病毒多肽 获得新型MAF-1	具有分泌型的抗菌蛋白/ 多肽 获得新型1分泌型抗菌肽	具有降低孳生环境再次孳生蝇类能力	1、具有调节动物血糖血脂，增强免疫力功能  2、生物农药效应分子排泄物
意义	发现新的抗菌肽分子  制订工业化产品和工艺控制标准依据	发现新的抗菌肽分子  制订工业化产品和工艺控制标准依据	效应工业化治理有机废物 开发新型绿色农资品	新型优质中药/食品资源 新型生物有机肥等绿色有机农资产品



## 2、查新结果

报告单位：科学技术部西南信息中心查新中心2011年4月12日

序号	结 论
1	本项目所述同时对家蝇幼虫的血淋巴（体内）和体外分泌物（体外）抗菌肽进行研究，国内外未见文献报道。
2	本项目对家蝇幼虫血淋巴抗真菌肽进行分离纯化及生物学特性的研究，国内外未见文献报道。
3	本项目对家蝇幼虫体外分泌物抗菌蛋白/肽分离纯化和作用进行研究，国内外未见文献报道。
4	壳聚糖及其整虫的生理功能研究，综合本项目所述研究的内容和发表时间，国内外未见相同文献报道。
5	涉及本项目所述研究内容的猪粪家蝇幼虫处理后的家蝇孳生能力研究，国内外未见文献报道
6	综合本项目所述研究内容的家蝇幼虫生态免疫与利用研究，国内外未见文献报道



# 成果意义

## 1、关联领域

- 1、工农业有机废物资源化治理领域----  
针对有机废物资源化治理和循环经济建设
- 2、生物医药领域----  
针对细菌耐药等的新型抗生素研发
- 3、农产品安全生产领域----  
针对生态农业的绿色农资产品生产
- 4、免疫与健康领域----  
针对先天性免疫与疾病防治关系研究



## 2、社会效益

2008年以前文献收录、引用查询，学生培养

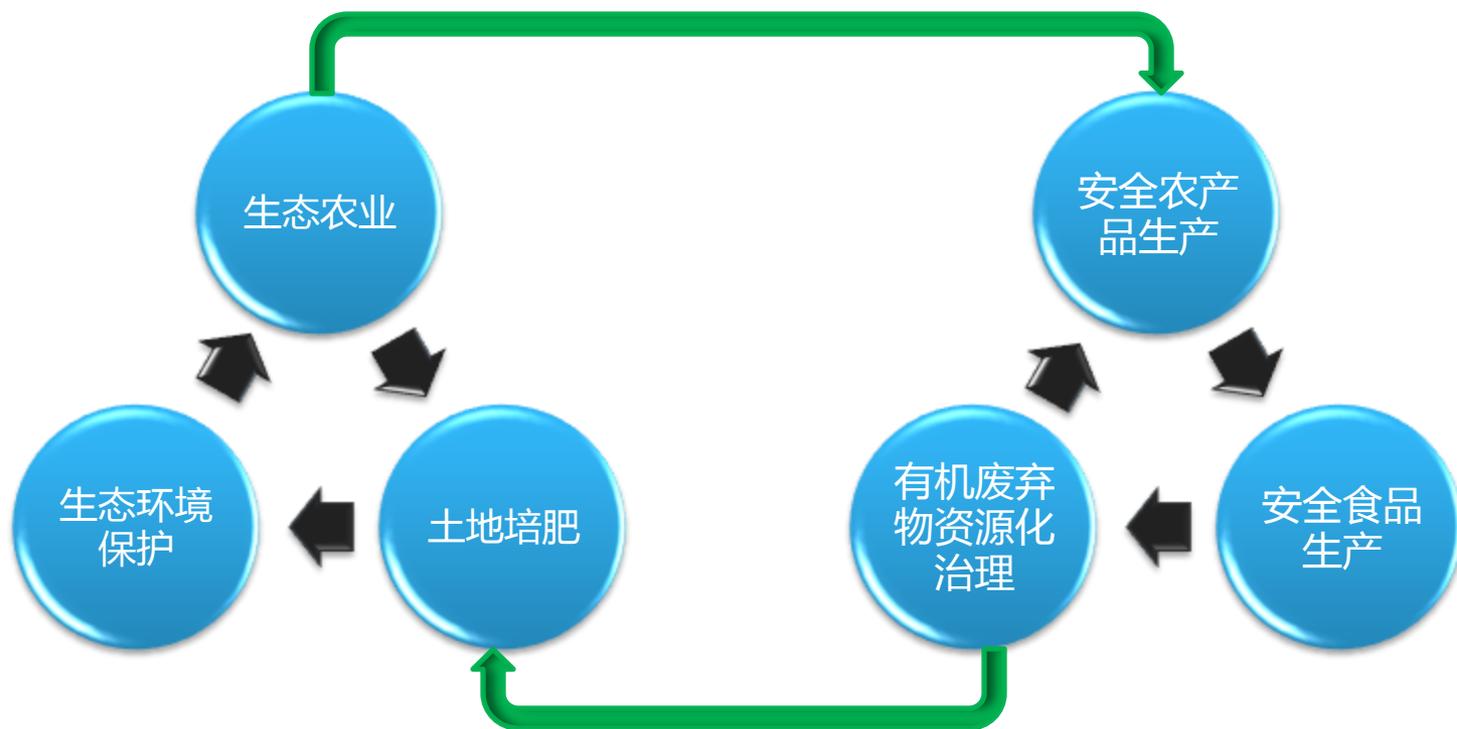
期刊论文	medline	核心期刊	会议交流/研究生论文	毕业硕士/博士
20篇	1篇	9篇	20篇	14/11(人)

引用频次	文章号
频次 < 10次	2、6、8、10、11、12、13、15、16
频次 > 10次	1、3、4、5、9
总计引用次数	112次



### 3、经济效益

1) 与安全食品工业---农业构建工农业协同可持续发展循环经济关键技术关联





### 3) 发明专利与高新技术认定

#### 蝇蛆壳聚糖调节血糖

#### 家蝇分泌型抗菌肽制备及应用

#### 家蝇幼虫生态治理猪

### 高新技术认定



**Thank You !**

