

转基因伯氏疟原虫的建立及报告基因表达的初步研究

曹毅, 张冬梅, 李树玲, 潘卫庆*

(第二军医大学基础医学部病原生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**通过转染含有绿色荧光蛋白(GFP)和PbfMSP1片段的重组质粒,建立伯氏疟原虫转染技术和表达恶性疟原虫MSP-1 19 000片段(PfMSP1-19)的转基因伯氏疟原虫。**方法:**构建重组转染质粒PyrFlu/PbfMSP1。伯氏疟原虫ANKA株经培养和分离后用电转化方法转入重组转染质粒,药物筛选转化原虫后进行PCR检测,并于荧光显微镜下检测报告基因GFP的表达。**结果:**构建了重组转染质粒PyrFlu/PbfMSP1。荧光显微镜下观察到呈绿色荧光的伯氏疟原虫。PCR检测显示转染伯氏疟原虫存在GFP和PbfMSP1基因。**结论:**重组质粒已成功转染伯氏疟原虫并表达了GFP报告基因,建立了伯氏疟原虫转染技术。

[关键词] 伯氏疟原虫;转基因;绿色荧光蛋白

[中图分类号] Q 78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0025-04

Development of transgenic *Plasmodium berghei* and reporter gene expression

CAO Yi, ZHANG Dong-Mei, LI Shu-Ling, PAN Wei-Qing* (Department of Etiological Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To develop transgenic *Plasmodium berghei* expressing PbfMSP1-19 gene with recombinant plasmid containing green fluorescence protein (GFP) and PbfMSP1 fragment. **Methods:** The recombinant plasmid PyrFlu/PbfMSP1 was constructed; the *P. berghei* ANKA parasites were cultured *in vitro* and separated by density gradient method. The malaria parasites were transfected with the plasmid by electroporation and selected by injection of anti-malaria drug (pyrimethamine). The parasites were examined by PCR of the target gene and the expression of the GFP gene was detected by fluorescence microscopy. **Results:** The recombinant plasmid of PyrFlu/PbfMSP1 was successfully constructed. The expression of GFP gene was detected in transfected parasites. The genes encoding GFP and PbfMSP1 were amplified by PCR in the transfected parasites. **Conclusion:** Transgenic *Plasmodium berghei* is established and the reporter gene is expressed in the transfected parasites.

[KEY WORDS] *Plasmodium berghei*; transfection; green fluorescent protein (GFP)

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 25-28]

疟疾是一种古老的传染病,其病原体——疟原虫早在一百多年前已被鉴定。但人们至今对这种疾病防治仍缺乏有效的方法,对疟原虫生物学特性及其规律尚须深入研究。疟原虫转染技术的产生和应用,为我们进一步了解疟原虫生物学,特别是蛋白质结构与功能提供有用的实验手段^[1,2]。

裂殖子表面蛋白1(MSP1)C末端的19 000(MSP1-19)片段是重要的红内期候选疫苗抗原。该片段的单抗和抗血清在体内和体外实验中都可有效的抑制疟原虫的生长。虽然,此片段的功能未知,但通过等位替换实验证明,不同种间的MSP1-19在功能上可能是保守的^[3,4]。此外,由于疟原虫寄生在红细胞内,所以转染和筛选较为复杂,实验难度大,成功率低。为在本实验室建立疟原虫转基因技术,本研究构建了一个既表达绿色荧光蛋白(GFP),又含有伯氏疟原虫(Pb)和恶性疟原虫(Pf)杂合MSP1基因序列的重组质粒,旨在定向插入伯氏疟原虫

MSP1基因,产生携带恶性疟原虫MSP1-19片段的转基因伯氏疟原虫。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 含有GFP基因的质粒PyrFlu^[5]由美国纽约大学Menard R教授惠赠。Pb ANKA株从上海市寄生虫病防治研究所引种后,由本实验室保种、传代。恶性疟原虫海南株(Pf FCC1/HN)由本实验室体外培养。

1.2 重组表达质粒的构建和检测引物的设计 设计一对引物(Pb # 3: 5' -GCG GAT CCT TAA CAA AAG AAG AGA AGC-3'和Pb # 2: 5' -ATC

[基金项目] 国家自然科学基金(30170838); 国家杰出青年科学基金(30225041)。

[作者简介] 曹毅(1977-),男(汉族),博士生。

*Corresponding author. E-mail: malaria@guomai.sh.cn

ACG CGT ATT AAT ACA TAC ATG CTT AG-3') 利用 PCR 法扩增获得伯氏疟原虫 MSP1 第 3 626 位至第 5 055 位 1 430 bp 片段。再设计一对引物(Pf #1: 5'-GTA ACG CGT CAA TGT CCA G-3'和 Pf # 4: 5'-GCG GAT CCG AAT TCC TAT TAA ATG AAA CTG-3') PCR 扩增产生恶性疟原虫 330 bp 的 Pf MSP1-19 片段。这 2 个片段通过 *Mlu* I 位点连接产生融合基因片段。并与从质粒 PyrFlu 中用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 切出 470 bp 的 3' UTR 片段连接。3 个片段连接产生 2.2 kb 片段通过 *Bam*H I 插入 PyrFlu 质粒产生重组表达质粒 PyrFlu/PbfMSP1。重组表达质粒在转化前以位于 1.4 kb PbMSP1 片段之上的单酶切位点 *Mva*1269 I 酶切线性化(图 1)。

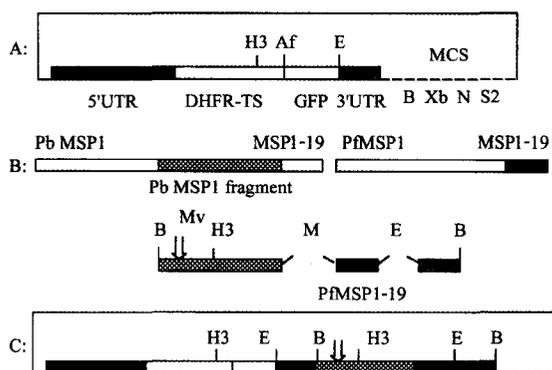


图 1 质粒 PyrFlu 和重组质粒 PyrFlu/PbfMSP1 的构建
Fig 1 Construction of recombinant plasmid PyrFlu/PbfMSP1

A: Plasmid PyrFlu; B: Generation of PbfMSP1 fusion fragment; C: Generation of recombinant plasmid PyrFlu/PbfMSP1; Af: *Afl* II; B: *Bam*H I; E: *Eco*R I; H3: *Hind* III; Mv: *Mva*1269 I; N: *Not* I; S2: *Sac* II; Xb: *Xba* I; MCS: Multiple cloning sites; ◊: Linear site of PyrFlu/PbfMSP1

为了检测伯氏疟原虫转化子,我们设计了一对扩增绿色荧光蛋白基因的特异引物(5'-ATG AGT AAA GGA GAA GAA C-3'和 5'-TTA TTT GTA TAG TTC ATC C-3')。另一对引物(Tb: 5'-CAT CGA CAC CAG AAG AAG TAG CAA G-3'和 Tf: 5'-CCG TTG CTA CCT GAA TCT TCT TCG-3'),其中 Tb 位于 1.4 kb 的 Pb MSP1 片段中,Tf 位于 PfMSP1-19 中。还有位于 1.4 kb Pb MSP1 片段 5'端的上游序列中的引物 Tb'(5'-TAA AAG CAC GAT TAT TAA AAA GAA AAC AA-3')。

1.3 *P. berghei* ANKA 株短期培养 远交系的昆明株(KM)小鼠,购自中国科学院上海实验动物中心。小鼠饲养于严格的昼夜规律之下(12 h 昼/12 h

夜)。液氮中保种的伯氏疟原虫 ANKA 经腹腔接种 1 只昆明小鼠,待原虫率达 5%~15%,心脏穿刺取血。腹腔转种新的昆明小鼠,10~20 μ l 血/只。4~5 d 后,原虫率达 3%~10%,且大部分原虫处于环状体和早期滋养体时,心脏穿刺取血。鼠血经不含血清的 RPMI 1640 培养液洗涤 2 次(1 500 r/min, 8 min, RT)。原虫培养前加入胎牛血清(美国 Invitrogen 公司)至 20%。将洗涤后的含伯氏疟原虫的鼠血红细胞加入含胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液中,细胞压积为 1%~4%,置 37 C 5% CO₂ 孵箱中静置培养 20~22 h。

1.4 成熟裂殖体的分离 原虫培养完毕后,在 50 ml 离心管中,加 15 ml 细胞分离液 Nycoprep(挪威 Axis-Shield 公司),其液面上小心加入 30 ml 的虫血培养液,使分层明显。水平式离心机离心 1 200 r/min, 25 min, 4 C。小心吸取位于两层液体界面上含有成熟裂殖体的红细胞。用等体积不含血清的培养液离心洗涤所获细胞(1 500 r/min, 8 min, 4 C)。

1.5 电穿孔转化 2~2.5 ml 鼠血经培养分离获得的成熟裂殖体细胞可作一次电转化。用不含血清的 RPMI 1640 培养液将细胞混悬为 50 μ l 或 100 μ l。25~50 μ g 线性化重组质粒 DNA 以 cytomix 缓冲液溶解(120 mmol/L KCl, 0.15 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L MgCl₂, 25 mmol/L Hepes, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.6)用于一次电转化^[6]。由于转化体积对转化效率影响甚大,我们将细胞悬液和 DNA 溶液混合后,用 cytomix 调整成 100~400 μ l 的一系列转化体系进行转化。电转化参数:1 000 V, 200 Ω , 25 μ F, 0.4 cm Bio-Rad 电击杯。电击后每个体系分别经尾静脉注射 2 只昆明小鼠。

1.6 药物筛选 伯氏疟原虫 ANKA 转化子的筛选药物是乙胺嘧啶粉剂(美国 Sigma 公司)。将 4 C 保存的乙胺嘧啶溶解于 DMSO 中,分别配制成浓度 2 mg/ml 或 5 mg/ml,经 0.2 μ m 的滤膜过滤除菌。电转化体系经尾静脉注射昆明小鼠 30 h 后开始药物筛选,伯氏疟原虫 ANKA 株的乙胺嘧啶筛选剂量 10 mg/(kg·d),经腹腔注射,连续 4~5 d。伯氏疟原虫转化子一般在药物筛选后 3~5 d,可经鼠尾采血检测到。待原虫率达到 1%,取血转种新的昆明小鼠,以同样的药物剂量进行第 2 次的筛选,也可提高药物剂量进行筛选。

1.7 红细胞内期疟原虫转化子的检测 经过 2 次药物筛选后,经鼠尾采血作薄血片,自然晾干。在 Nikon Eclipse E400 型荧光显微镜下(激发光波长

450~490 nm), 观察红细胞内期原虫的荧光情况, 并在校电镜室共聚焦荧光显微镜下观察、检测并摄片。抽取伯氏疟原虫转化子基因组 DNA, 以此为模板进行 PCR 检测。

2 结果

2.1 重组表达质粒的设计和构建 用于伯氏疟原虫转化的 PyrFlu 质粒含有一个表达单位, 由伯氏疟原虫二氢叶酸还原酶胸苷合成酶 (DHFR-TS) 基因 2.5 kb 的 5' UTR、伯氏疟原虫抗乙胺嘧啶株 DHFR-TS 和绿色荧光蛋白突变体 (GFPmut2)^[5,7] 组成的融合蛋白基因及 DHFR-TS 0.5 kb 的 3' UTR 序列构成。该表达单位产生的 DHFR-TS-GFPmut2 融合蛋白可使转染疟原虫产生 2 种表型, 即对乙胺嘧啶抗性和转染疟原虫呈绿色荧光。在该表达单位的下游, 插入一段由伯氏疟原虫 MSP1 1.4 kb 和恶性疟原虫 MSP1 C 末端 330 bp 组成的融合基因, 其目的在于靶向插入在 MSP1 基因, 并产生一个携带 Pf MSP1-19 基因的转基因伯氏疟原虫。所构建的重组质粒经酶切鉴定与理论大小一致, 对酶切鉴定为正确的质粒进行序列分析, 结果均为正确。

2.2 伯氏疟原虫的转化与筛选 电穿孔转化伯氏疟原虫结果显示: 经第 1 轮药物筛选, 只有转化体系为 100 μ l 组的 2 只小鼠有原虫生长, 200、300、400 μ l 组都未检测到原虫生长。经过第 2 轮药物筛选后, 所有转种的小鼠均有原虫生长, 最高药物筛选剂量达到 20 mg/(kg·d)。

2.3 红内期伯氏疟原虫转化子的检测 荧光显微镜下可清楚地观察到呈绿色荧光的伯氏疟原虫 (图 2)。

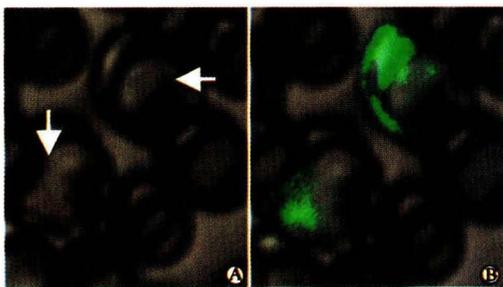


图 2 转染伯氏疟原虫表达荧光蛋白

Fig 2 Expression of GFP in transfected parasites

A: Arrows indicating infected erythrocyte under optical microscopy; B: Green fluorescence under fluorescent microscopy in combination with optical microscopy

一样。用绿色荧光蛋白基因的特异检测引物 PCR 扩增得到了 714 bp 的片段, 与预期大小一致。另一对检测引物 Tb 和 Tf, PCR 扩增得到了 1.1 kb 的片段, 与预期相符。而以未经转化伯氏疟原虫基因组为模板, 用以上 2 对引物扩增都为阴性结果 (图 3)。但是, 以位于 1.4 kb Pb MSP1 片段 5' 端上游序列中的引物 Tb' 和 Tf 作 PCR 扩增却未得到预期的 1.7 kb 的片段。

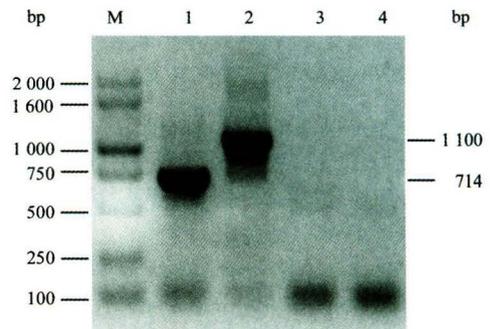


图 3 转化后伯氏疟原虫 PCR 检测

Fig 3 PCR of transfected parasites

1: GFP gene; 2: PbfMSP1 fragment; 3: No GFP gene detected in normal Pb (negative control); 4: No PbfMSP1 fragment detected in normal Pb (negative control); M: DGL-2000 marker

3 讨论

疟原虫转基因技术和基因打靶技术是研究疟原虫蛋白质结构、功能、胞内运输等的重要方法, 该技术流程的建立对研究多种疟原虫蛋白有十分重要的意义。

本研究采用重组质粒 PyrFlu/PbfMSP1 电穿孔转化伯氏疟原虫, 经乙胺嘧啶筛选后, 在荧光显微镜下可观察到了呈绿色荧光的伯氏疟原虫, 且发出荧光的原虫处于晚期滋养体、裂殖体和配子体期, 未发现环状体和早期滋养体原虫发出荧光。这与伯氏疟原虫 DHFR-TS 基因的启动子调控基因表达的时期完全相符^[8]。这说明经前述原虫培养、电转化和药物筛选后, 线性化的重组质粒已经进入了伯氏疟原虫中, 而且 DHFR-TS-GFPmut2 融合蛋白得以正常地在原虫细胞中表达。

在本研究前期实验中, 经多次转化均未能筛选到疟原虫转化子。这显然是由于转化效率低所致。根据我们在哺乳动物细胞的转染经验, 电极杯中的转染体积和转化效率有关。对此我们改变以往固定的 300 μ l 的转化体积, 采用 100~400 μ l 系列体积转化, 结果只在 100 μ l 转化体积中筛选到了转化子, 而其它体积组中均未获得阳性转化子。通过此实验

同时也观察到仍存在一些不发出荧光的疟原虫, 而且在有绿色荧光的原虫中荧光强度也不完全

我们已经建立伯氏疟原虫转染方法并能有效地对伯氏疟原虫进行基因转染。

从转染的疟原虫中已扩增到 GFP 基因及由 PbMSP1 1.4 kb 和 Pf 330 bp 组成的杂合片段,这表明转染质粒确已插入伯氏疟原虫基因组。但我们采用 PbMSP1 内源性序列的引物(Tb')与 Tf 进行 PCR 扩增,结果未能产生扩增条带。这可能是由于重组质粒没有整合入 PbMSP1 中,而是通过同源重组插入 Pb DHFR-TS 基因或随机插入染色体中。

[参考文献]

[1] Waters AP, Thomas AW, van Dijk MR, et al. Transfection of malaria parasites[J]. *Methods*, 1997, 13(2):134-147.

[2] Ménard R, Janse C. Gene targeting in malaria parasites[J]. *Methods*, 1997, 13(2):148-157.

[3] O'Donnell RA, Saul A, Cowman AF, et al. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-1₁₉ across distantly

related *Plasmodium* species[J]. *Nat Med*, 2000, 6(1):91-95.

[4] O'Donnell RA, de Koning-Ward TF, Burt RA, et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1₁₉ are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria[J]. *J Exp Med*, 2001, 193(12):1403-1412.

[5] Sultan AA, Thathy V, Nussenzweig V, et al. Green fluorescent protein as a marker in *Plasmodium berghei* transformation[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(5):2602-2606.

[6] Wu Y, Sifri CD, Lei HH, et al. Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(4):973-977.

[7] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)[J]. *Gene*, 1996, 173(1 Spec No):33-38.

[8] de Koning-Ward TF, Thomas AW, Waters AP, et al. Stable expression of green fluorescent protein in blood and mosquito stages of *Plasmodium berghei* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1998, 97(1-2):247-252.

[收稿日期] 2003-11-27 [修回日期] 2003-12-16
[本文编辑] 尹 茶

• 研究简报 •

卡介苗对哮喘小鼠淋巴细胞凋亡的影响

Effect of BCG on lymphocytes apoptosis in athmatic BALB/c mice

余衍亮¹, 孙秀明¹, 李翠莉¹, 雷亿群¹, 黎露刚²

(1. 解放军第 414 医院呼吸内科, 南京 210015; 2. 南京军医科学院预防医学教研室, 南京 210049)

[关键词] 卡介苗; 哮喘; 淋巴细胞; 凋亡

[中图分类号] R 562.25 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2004)01-0028-01

变应性哮喘的主要特征是嗜酸粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞在肺内募集导致的气道慢性炎症,其中 CD4⁺ 辅助细胞在哮喘气道炎症的发生发展中起关键作用。研究^[1,2]证明,卡介苗(BCG)有明显的防治哮喘的作用。本研究就哮喘小鼠淋巴细胞的凋亡与 BCG 之间的关系进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 10 周龄 BALB/c 小鼠 30 只,雌雄不限,体质量(10±2)g,南京大学动物部提供。722 型分光光度仪(上海光学分析仪器厂);自制小鼠雾化吸入箱;卵蛋白干粉(OVA,美国 Sigma 公司);BCG(上海生物制药厂);荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 哮喘模型制作 30 只小鼠随机分为 3 组(每组 10 只),分别为阴性对照组(N)、阳性对照组(C)、BCG(B)组。N 组小鼠腹腔注射生理盐水 0.1 ml,14 d 后用 37℃ 生理盐水雾化吸入,共 3 d,1 次/d,每次 30 min;C 组小鼠腹腔注射 10% OVA 0.1 ml,14 d 后以 1% OVA 超声雾化吸入(通过雾化吸入箱 15 min 后再放入小鼠持续雾化 30 min 激发),连续 3 d,观察小鼠反应,以烦躁不安、呼吸急促、腹肌抽搐、两便失禁

为阳性反应;B 组哮喘模型制作同 C 组,但每次雾化吸入前 30 min 每只分别腹腔注射 BCG 0.04 mg。

1.3 淋巴细胞凋亡率及 DNA 损伤率的检测 激发 3 次后用 25% 乌拉坦 0.15 ml 肌注麻醉并处死小鼠,取外周血 1 ml,以淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,用 Comet 法查淋巴细胞凋亡率^[3](即呈彗星状的凋亡淋巴细胞在 100 个淋巴细胞中所占的百分率),用二甲苯胺法^[4]计量 DNA 损伤率(即裂解的 DNA 与完整的 DNA 和裂解的 DNA 之和的比值);同时游离气管,横切环状软骨,置入连接注射器的硅胶管,分 3 次分别缓慢注入 37℃ 去钙、镁离子的 Hank 平衡液 0.7、0.6、0.5 ml,每次灌注后立即抽吸,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)1 ml,离心后沉淀物加入淋巴细胞分离液提取淋巴细胞,测淋巴细胞凋亡率及 DNA 损伤率。

1.4 统计学处理 用 SPSS 统计软件。

(下转第 33 页)

[作者简介] 余衍亮(1962-),男(汉族),主治医师。
E-mail: yutong32@sina.com