

文章编号 1006-8147(2020)04-0301-05

论 著

胞浆表达绿色荧光蛋白的伯氏疟原虫的构建和筛选

高健, 史小雨, 王倩

(天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津 300070)

摘要 目的: 为了追踪疟原虫发育及侵染的情况, 构建及筛选胞浆稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)的伯氏疟原虫。方法: 构建含有伯氏疟原虫 230p 基因和 GFP 基因的重组质粒 pL0035-GFP, 质粒线性化后通过电转染转入野生型伯氏疟原虫; 基于双交换同源重组原理, 利用乙胺嘧啶筛选获得在 230p 基因处插入 GFP 的重组疟原虫; 有限稀释法筛选表达 GFP 的单克隆重组伯氏疟原虫; PCR 鉴定重组疟原虫基因型, 荧光显微镜和流式细胞术检测 GFP 表达情况。结果: PCR 及 DNA 测序结果表明 GFP 基因成功整合到伯氏疟原虫基因 230p; 荧光显微镜可观察到重组疟原虫胞浆呈绿色荧光, 流式细胞术检测到绿色荧光信号。结论: 成功构建胞浆表达绿色荧光蛋白的伯氏疟原虫。

关键词 伯氏疟原虫; 绿色荧光蛋白; pL0035; 疟原虫转染

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

Construction of recombinant *Plasmodium berghei* expressing green fluorescent protein in cytoplasm

GAO Jian, SHI Xiao-yu, WANG Qian

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To construct a recombinant *Plasmodium berghei*(*P. berghei*) strain stably expressing green fluorescent protein (GFP) in cytoplasm to track the development and infection of *Plasmodium*. **Methods:** The recombinant plasmid pL0035-GFP containing *P. berghei* 230p gene and GFP gene sequences was constructed. The plasmid was linearized and transfected into wild-type *P. berghei* by electroporation. Based on the principle of double-crossover homologous recombination, the recombinant *P. berghei* was screened by pyrimethamine treatment. The single clone of the recombinant *Plasmodium falciparum* expressing GFP at 230p locus was selected by limiting dilution method. The genotype of recombinant parasites was identified by PCR and DNA sequencing, and the expression of GFP was detected by flow cytometry and fluorescence microscopy. **Results:** PCR and DNA sequencing results showed that the GFP gene was successfully integrated into the *P. berghei* 230p gene locus. Fluorescence microscopy showed that the recombinant parasites expressed green fluorescence in cytoplasm, and green fluorescence signal was also detected by flow cytometry. **Conclusion:** We successfully construct the recombinant *P. berghei* expressing green fluorescent protein in cytoplasm.

Key words *plasmodium*; green fluorescent protein; pL0035; *plasmodium* transfection

疟疾(malaria)是一种古老的传染病, 主要由受疟原虫(*Plasmodium*)感染的雌性按蚊叮咬人体所致。根据《2018 年世界卫生组织疟疾报告》显示, 2017 年全球共发生 2.19 亿例疟疾病例, 虽较 2010 年减少 2 000 万例, 但与 2016 年的 2.17 亿例相比却有所回升, 表明近年在减少全球疟疾病例方面进展有限^[1]。

反向遗传学技术广泛应用于疟原虫基因功能研究, 推动了疟原虫生物学及其与宿主相互作用的研究^[2]。基于同源重组原理, 可实现特定基因的敲除, 从而研究疟原虫基因功能; 还可在疟原虫基因组中表达标签蛋白, 更直观地探究疟原虫的感染过程。此外, 由于目前可用于疟原虫基因组改造的耐药筛选标签数量有限, 阻碍了对同一疟原虫基因组

的连续改造^[3]。为了避免这一问题, 可以将荧光蛋白用作筛选标记, 有利于快速直观地筛选发生基因改变的疟原虫^[4]。为了更直观地探究特定基因在疟原虫发育及侵染过程中的作用, 本研究构建并筛选出胞浆中表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的伯氏疟原虫。利用疟原虫敲除载体 pL0035, 构建 pL0035-GFP 重组质粒, 在伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*, *P. berghei*) 常用基因组改造位点 230p (PbANKA_0306000)中, 基于双交换(double crossover)的同源重组(homologous recombination, HR)原理, 将 GFP 引入到疟原虫基因组中, 构建表达 GFP 的疟原虫突变体并筛选单克隆突变株, 为本实验室后续探究特定基因在疟原虫发育和致病过程中的作用提供了必要工具。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和疟原虫株 感受态细胞 Mach1-T1

基金项目 天津市教科科研计划项目(2018KJ085)

作者简介 高健(1993-), 男, 硕士在读, 研究方向: 免疫学; 通信作者: 王倩, E-mail: wangq@tmu.edu.cn。

购自北京博迈德基因技术有限公司,大肠杆菌载体 pL0035 于本实验室保存,伯氏疟原虫 *P. berghei* ANKA 由罗格斯大学新泽西医学院 Purnima Bhanot 教授赠予。

1.2 主要材料和试剂 限制性内切酶 Sac II、Xho I、EcoR I、EcoR V、Apa I 及 NEBuilder® HiFi DNA Assembly 试剂盒购自 NEB 公司,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 纯化试剂盒、质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒均购自全式金生物技术有限公司。质粒中提试剂盒购自 Qiagen 公司。T4 DNA 连接酶购自 Thermo Scientific 公司,乙胺嘧啶购自 Sigma 公司,细胞核转染试剂盒购自 Lonza 公司。

1.3 质粒 pL0035-GFP 的构建

1.3.1 获取目的片段 以野生型伯氏疟 230p 基因的编码区(1~6 864 bp)为模板分别合成同源重组上、下游同源臂 Up HR arm(1 612~2 165 bp)和 Down HR arm(3 315~4 232 bp)。用本实验室保存的含有 GFP、eEF1A promoter 和 3'yop1/terminal sequence(ts)的质粒扩增 GFP(753 bp)、eEF1A(595 bp)和 GFP/ts(754 bp),并引入相应酶切位点(表 1)。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后切胶回收。

1.3.2 载体和目的片段连接 利用 In-Fusion 无缝克隆的方法(条件为 50℃,30 min)将 Down HR arm 插入经 Kpn I 和 EcoR I 酶切的质粒 pL0035,得到 pL0035-Down HR arm。将连接产物转化至感受态细胞 Mach1-T1 中,在含有氨苄的固体培养基上 37℃ 倒置培养 12 h,挑取单克隆菌株后,在含氨苄的液体培养液中扩增并提取质粒,酶切鉴定及 DNA 测序确认 Down HR arm 插入且序列正确。以 GFP 和 GFP/ts 为模板通过 overlap PCR 扩增得到片段 GFP-GFP/ts (1 477 bp),再将 Up HR arm 和 GFP-GFP/ts 通过 overlap PCR 扩增得到片段 Up HR arm-

表 1 载体构建引物序列

Tab 1 Primer sequences of vector construction

引物名称	引物序列(5'→3')
GFP-F	CTCGAGCGCCCGATATCATGCTGAGCAAGGGCGAGG
GFP-R	CAATTTATGTATAACTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
GFP/ts-F	GAGCTGTACAAGTAAGTTATACATAAATTGGCTAT
GFP/ts-R	AGAGCGCGCCGCCACCGCGATATGTCAAACATTGTGTATC
Up HR arm-F	CAAGCTTGGGCCCCCGCGGATGACATCATTTATAAATCATG
Up HR arm-R	ACCATGATATCGGGCCGCTCGAGTGTGTTTTATTTCGATGTGC
Down HR arm-F	TTCCITCAATTTTCGGGTACCTTCTCTTGAGCCCGTTAAT
Down HR arm-R	GACGGCCAGTGAATTCTAGGAAATTTGTTATTTTATA
eEF1A-F	CCGCTCGAGAGCTTAATTCTTTTCGAGCTC
eEF1A-R	CCCGATATCTTTTATAAAATTTTATTTATTTATAAGC

注:下划线部分表示酶切位点

GFP-GFP/ts(2 053 bp)。将经 Sac II 酶切的 pL0035-Down HR arm 质粒和片段 Up HR arm-GFP-GFP/ts,在 T4 DNA 连接酶的作用下 16℃ 连接 16 h,再将产物转化至感受态细胞 Mach1-T1 中进行氨苄筛选培养,挑取单克隆菌株并扩增提取质粒,酶切鉴定及测序确认序列正确。Xho I 和 EcoR I 酶切上述得到的质粒和片段 eEF1A,利用 T4 DNA 连接酶将二者连接,转入感受态细胞,固态培养基倒置培养后扩增单克隆菌株提质粒,测序验证,得到重组质粒 pL0035-GFP。大量制备重组质粒,经 Apa I 和 EcoR I 线性化后备用。

1.4 疟原虫转染 将实验室冻存的伯氏疟原虫 (*P. berghei* ANKA) 感染血液经尾静脉注射感染 Wistar 大鼠。尾尖取血制薄片, Giemsa 染色后油镜下观察计数虫血率。待虫血率增长至 3%~5%时,心脏取血(约 5 mL),体外同步化培养 16~23 h,直至 80%左右的疟原虫发育为成熟裂殖体^[9]。利用 Nycodenz/PBS 密度梯度溶液分离纯化裂殖体,置于冰上备用。取 100 μL Nucleofector 溶液、10 μg 线性化重组质粒 pL0035-GFP 及 30 μL 裂殖体轻柔混匀电击,迅速经尾静脉注入 BALB/c 小鼠。

1.5 重组疟原虫筛选与单克隆筛选 电转染次日,如感染小鼠虫血率为阳性,则在小鼠饮用水中加入乙胺嘧啶进行耐药疟原虫筛选。发生重组的疟原虫带有抗乙胺嘧啶的耐药标签,可在给药条件下存活,从而筛选出重组疟原虫,适时停药。待虫血率达 5%后,心脏取血并纯化疟原虫,提取疟原虫基因组 DNA,PCR 鉴定基因型。采用有限稀释法筛选单克隆虫株。

1.6 表达 GFP 的重组疟原虫的红内期成像与流式检测 表达 GFP 疟原虫感染小鼠,待虫血率较高时,尾尖取少许血,PBS 清洗 1 次,200 g 离心 1 min 弃上清,加入 20 μL DAPI 工作液避光孵育 10 min,再用

PBS 清洗 1 次,去上清,加少许 PBS 重悬,吸取 10 μ L 液体至载玻片,加盖盖玻片,荧光显微镜观察、拍摄。分别取 20 μ L 感染野生型和表达 GFP 的疟原虫小鼠外周血,以 5 mL PBS 稀释,300 目滤布过滤后用流式细胞仪检测绿色荧光。

2 结果

2.1 构建胞浆表达 GFP 伯氏疟原虫的策略 本研究在伯氏疟原虫基因组 230p 处插入 GFP,以产生表达 GFP 的疟原虫突变株。将重组质粒 pL0035-GFP 导入疟原虫基因组,转染后发生第 1 次同源重组(图 1),230p 基因部分编码区(2 166~3 314 bp)被质粒上的 GFP 及耐药标签替换,获得表达 GFP 的耐乙胺嘧啶的重组疟原虫(阳性筛选)。为了后续在此疟原虫突变株上进一步进行基因改造,需借助第二次同源重组在上述突变疟原虫中删除耐药标签,同源臂为质粒上的序列 3' pbdhfr/ts。在 5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine,5-FC)作用下,含有标签蛋白酵母双功能胞嘧啶脱氨酶和尿苷基磷酸核糖基转移酶(yeast enzyme cytosine deaminase and uridyl phosphoribosyl transferase,yFCU)的重组疟原虫可将 5-FC 转化为毒性化合物 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)而死亡;在 5-FC 的压力下发生第 2 次同源重组的疟原虫(图 1),即耐药标签 DHFR-yFCU 被删除的疟原虫可继续存活,从而删除耐药标签(阴性筛选),获得可用于再次基因改造的表达 GFP 的疟原虫。

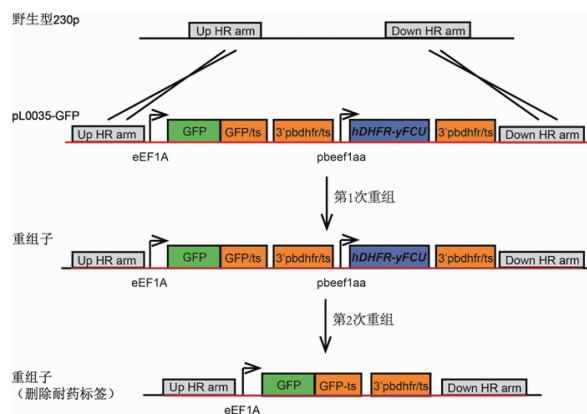


图 1 表达 GFP 伯氏疟原虫的构建策略

Fig 1 Strategy of GFP-expressing *P. berghei* construction

2.2 重组质粒 pL0035-GFP 的构建 重组质粒的构建分为 3 个步骤(图 2)。第一步,GFP 与 GFP/ts 片段通过 overlap PCR 连接得到 GFP-GFP/ts 片段(1 507 bp),并在 3'端引入 Sac II 酶切位点,PCR 产物胶回收测序正确(图 3A)。第二步,5'端引入 Sac II

酶切位点的 Up HR arm 片段与 GFP-GFP/ts 片段通过 overlap PCR 连接得到 Up HR arm-GFP-GFP/ts 片段,同时在 Up HR arm 与 GFP 之间引入 Xho I 和 EcoR V 两个酶切位点。片段 Up HR arm-GFP-GFP/ts 在 Sac II 酶切位点处插入质粒 pL0035-Down HR arm,经 Sac II 酶切鉴定显示插入片段大小正确(图 3B),质粒测序证明插入片段序列无误。第三步是借助上述引入的酶切位点 Xho I 和 EcoR V 将 eEF1A promoter 插入 Up HR arm 和 GFP 之间,最终获得 pL0035-GFP 重组质粒,经 Xho I 和 EcoR V 酶切鉴定片段大小正确(图 3C),测序无误。

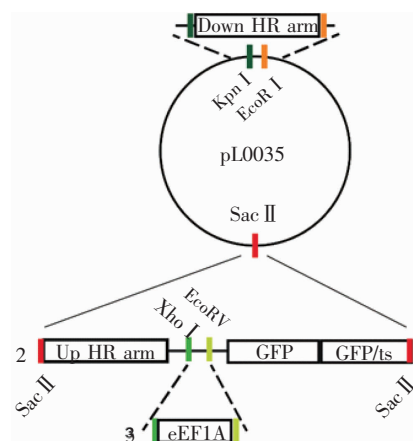
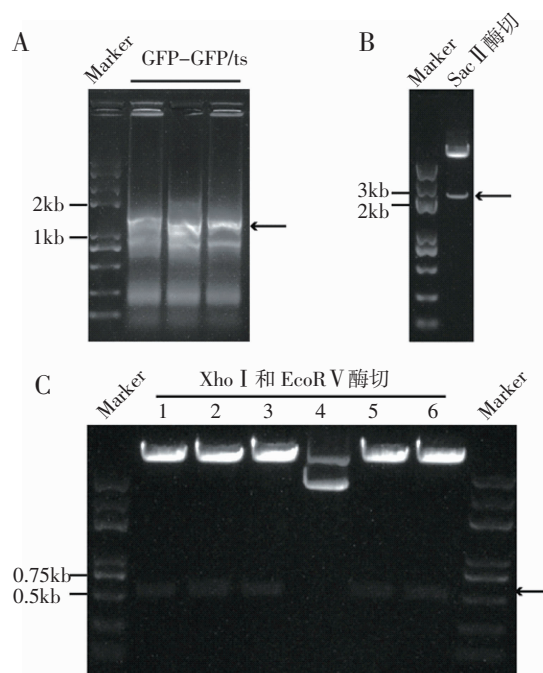


图 2 质粒 pL0035-GFP 的构建示意图

Fig 2 Schematic diagram of pL0035-GFP



注:A.Overlap PCR 获取 GFP-GFP/ts 片段的鉴定;B.Sac II 酶切鉴定片段 Up HR arm-GFP-GFP/ts 插入质粒 pL0035-Down HR arm 中;C.Xho I 和 EcoR V 酶切鉴定片段 eEF1A promoter 插入质粒;箭头表示目的条带

图 3 质粒 pL0035-GFP 的 PCR 鉴定

Fig 3 PCR identification of pL0035-GFP

2.3 伯氏疟原虫转染后重组子的鉴定 转染后经乙胺嘧啶药物筛选获得重组疟原虫。经单克隆筛选后共获得 4 个虫株 A1、B4、C2 和 C4,提取疟原虫基因 DNA 进行 PCR 鉴定基因型,A1、B4、C2 和 C4 均有重组条带而无野生型条带(图 4),为单克隆的重组子(基因型鉴定引物见表 2)。

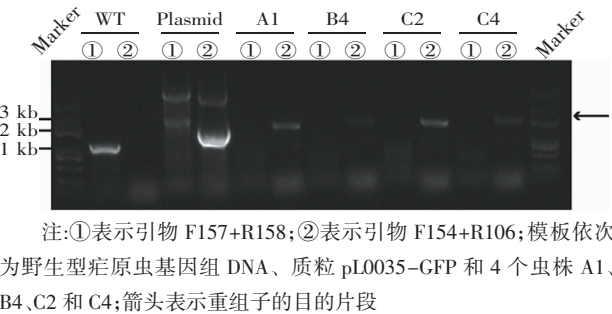


图 4 PCR 鉴定疟原虫转染重组子
Fig 4 Recombinant *Plasmodium* verified by PCR

2.4 转染重组质粒 pL0035-GFP 的疟原虫在红内期表达 GFP 单克隆重组疟原虫 DAPI 染核后荧光显微镜观察,可见疟原虫胞浆显示绿色荧光(图 5)。流式

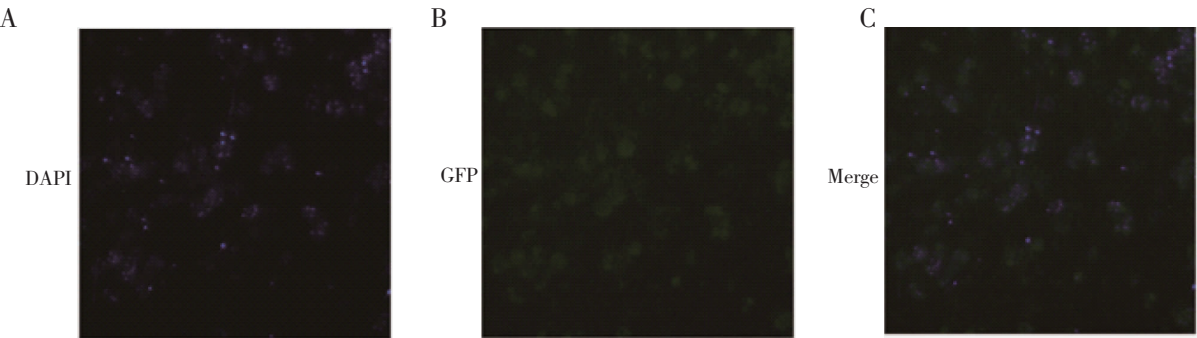


图 5 荧光显微镜观察重组疟原虫表达 GFP
Fig 5 Expression of GFP in recombinant *Plasmodium* observed by fluorescence

3 讨论

疟疾是由疟原虫感染引起的寄生虫病,主要传播媒介是按蚊^[6]。疟原虫的生活史复杂,其与宿主之间的相互作用是疟原虫在哺乳动物和按蚊体内寄生的基础^[6-8]。为了研究宿主-疟原虫间相互作用,基因修饰技术发挥了巨大的作用,包括对特定基因修改、删除和插入。基于同源重组原理的基因敲除技术在研究疟原虫特定蛋白功能方面发挥了重要的作用。此外,在改造特定基因序列的基础上,还可引入各种标签蛋白,特别是各种荧光蛋白,如将绿色荧光蛋白或生物荧光素酶(Luciferase)引入其基因组中,从而实现体内和体外实时追踪疟原虫及其与宿主之间的相互作用^[9-10]。在研究特定蛋白的定位、转运及其与宿主间的相互作用等方面均起重要作用^[11]。目前,绿色荧光蛋白应用较为广泛,除了可与特定蛋白融合表

表 2 PCR 鉴定疟原虫转染重组子基因型引物序列
Tab 2 PCR primers of genotype identification of integrated parasites

疟原虫株	名称	引物序列 (5'→3')	片段大小
野生型 ①	F157	GCACATCCAAATAAAACACA	1 188 bp
	R158	ATTAACGGGCTCAAGAGAA	
重组子 ②	F154	ATGGTGAGCAAGGGCGAGG	1 538 bp
	R106	TACATGCATGTGCATGCACA	

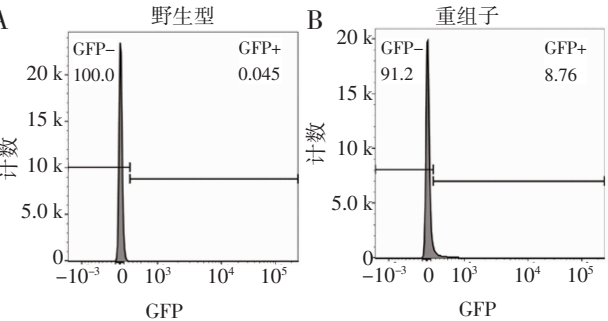


图 6 流式细胞术检测重组疟原虫的绿色荧光信号
Fig 6 Green fluorescent signal of recombinant *Plasmodium* detected by flow cytometry

细胞术也可检测到重组疟原虫的绿色荧光信号(图 6)。上述结果均提示表达 GFP 的伯氏疟原虫构建成功。

达研究该蛋白的定位等功能,还可以在疟原虫体内稳定持续表达,用于追踪疟原虫在各个阶段的寄生情况,例如用 GFP 标记环孢子蛋白可用于研究哺乳动物肝细胞和按蚊体内疟原虫-宿主间相互作用^[12];对于胞浆稳定持续表达 GFP 的疟原虫,可以直观地观察疟原虫发育和侵染的整个过程^[13-15]。

本研究构建胞浆中表达 GFP 的伯氏疟原虫。230p(*Pb*ANKA_0306000)是疟原虫基因组常用的一个改造位点,破坏疟原虫的 230p 不会产生任何表型^[6]。因此,在 230p 基因处插入并表达 GFP。本研究筛选获得的重组疟原虫可持续表达 GFP,且不含耐药标签,可用于后续研究特定蛋白功能时再次进行基因改造,并可直观的观察疟原虫的侵染过程。此外,还可通过流式细胞术等方法检测重组疟原虫感染小鼠的虫血率并进行感染红细胞的分选;还可以根据

荧光强度对疟原虫不同发育阶段进行分期,如滋养体、裂殖体和裂殖子等阶段,在模式识别软件的分析下实现自动化计数和分类。综上,本研究获得的胞浆表达 GFP 的伯氏疟原虫为后续研究疟原虫特定蛋白功能及其致病机制提供了一个有力的工具。

参考文献:

- [1] Aregawi M, Cibulskis R, Otten M, et al. World malaria report 2018[J]. Geneva Switzerland Who, 2018, 30(1): 189
- [2] Kirchner S, Power B J, Waters A P. Recent advances in malaria genomics and epigenomics[J]. Genome Med, 2016, 8(1): 92
- [3] de Koning-Ward T F, Fidock D A, Thathy V, et al. The selectable marker human dihydrofolate reductase enables sequential genetic manipulation of the Plasmodium berghei genome[J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 106(2): 199
- [4] Manzoni G, Briquet S, Risco-Castillo V, et al. A rapid and robust selection procedure for generating drug-selectable marker-free recombinant malaria parasites[J]. Sci Rep, 2014, 4(2): 4760
- [5] Janse C J, Ramesar J, Waters A P. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite Plasmodium berghei[J]. Nat Protoc, 2006, 1(1): 346
- [6] Meibalan E, Marti M. Biology of malaria transmission [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017, 7(3): 56
- [7] Warncke J D, Beck H P. Host cytoskeleton remodeling throughout the blood stages of plasmodium falciparum[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2019, 83(4): 49
- [8] Smith R C, Barillas-Mury C. Plasmodium oocysts: overlooked targets of mosquito immunity[J]. Trends Parasitol, 2016, 32(12): 979
- [9] Siciliano G, Alano P. Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent Plasmodium in fundamental and applied research[J]. Front Microbiol, 2015, 6(1): 391
- [10] Burda P C, Schaffner M, Kaiser G, et al. A Plasmodium plasma membrane reporter reveals membrane dynamics by live-cell microscopy[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9740
- [11] Chaudhari R, Dey V, Narayan A, et al. Membrane and luminal proteins reach the apicoplast by different trafficking pathways in the malaria parasite Plasmodium falciparum[J]. PeerJ, 2017, 5(1): e3128
- [12] Natarajan R, Thathy V, Mota M M, et al. Fluorescent Plasmodium berghei sporozoites and pre-erythrocytic stages: a new tool to study mosquito and mammalian host interactions with malaria parasites[J]. Cell Microbiol, 2001, 3(6): 371
- [13] Batinovic S, McHugh E, Chisholm S A, et al. An exported protein-interacting complex involved in the trafficking of virulence determinants in Plasmodium-infected erythrocytes[J]. Nat Commun, 2017, 8(2): 16044
- [14] Foth B J, Ralph S A, Tonkin C J, et al. Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite Plasmodium falciparum[J]. Science, 2003, 299(5607): 705
- [15] Borges-Pereira L, Meissner K A, Wrenger C, et al. Plasmodium falciparum GFP-E-NTPDase expression at the intraerythrocytic stages and its inhibition blocks the development of the human malaria parasite[J]. Purinerg Signal, 2017, 13(3): 267
- [16] van Dijk M R, van Schaijk B C, Khan S M, et al. Three members of the 6-cys protein family of Plasmodium play a role in gamete fertility[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(4): e1000853

(2019-09-26 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》关于“ppm、ppb、ppt”英文缩写的使用换算说明

在医学论文中,“ppm、ppb、ppt”这类英文缩写常常被作者作为单位符号使用,但“ppm、ppb、ppt”既不是数学符号,更不是单位符号,只是表示数量份额的英文名词缩写(英文全称分别为 parts per million、parts per billion、parts per trillion)。在实际研究中,仪器测量的数值可能会以“ppm、ppb、ppt”形式给出结果,作者在撰写文章进行数据描述时则需对“ppm、ppb、ppt”进行换算。

对溶液而言,换算前需了解体积比还是质量比。1 $\mu\text{g/mL}$ 是质量-体积比,如果溶液的密度是 1 g/mL ,则 1 $\mu\text{g/mL}$ 相当于 1 ppm;如果溶液密度不是 1 g/mL ,则需要进行换算。

对大气中的污染物而言,常用体积浓度和质量-体积浓度来表示其在大气中的含量。体积浓度是用每立方米大气中含有污染物的体积数来表示(如 cm^3/m^3 、 mL/m^3),换算关系是:1 ppm=1 $\text{cm}^3/\text{m}^3=10^{-6}$, 1 ppb=10⁻⁹, 1 ppt=10⁻¹²;质量-体积浓度是用每立方米大气中污染物的质量数来表示(如 mg/m^3 、 g/m^3),换算关系是:C=22.4 X/M,式中:X 为污染物以 mg/m^3 表示的浓度值,C 为污染物以 ppm 表示的浓度值,M 为污染物的分子质量。

在土壤、动植物、固体废弃物中“ppm、ppb、ppt”与质量含量的换算关系为:1 ppm=1 $\text{mg}/\text{kg}=1\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 1 ppb=1 $\mu\text{g}/\text{kg}=10^{-3}\ \text{mg}/\text{kg}$, 1 ppt=1 $\text{ng}/\text{kg}=10^{-6}\ \text{mg}/\text{kg}$ 。

本刊编辑部