

文章编号 1006-8147(2022)02-0135-05

论著

伯氏疟原虫红细胞膜相关蛋白1缺失突变体的构建和鉴定

魏超, 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: 研究伯氏疟原虫输出蛋白——红细胞膜相关蛋白1(EMAP1)在疟原虫生长发育和侵染中的作用, 构建 EMAP1 缺失的伯氏疟原虫突变体。方法: 以 pL0035 质粒为载体, PCR 扩增 EMAP1 编码区上游和下游序列作为同源臂, 用酶切连接和无缝克隆的方法将两条同源臂分别插入 pL0035, 获得重组质粒 pL0035-ΔPbEMAP1; 利用疟原虫转染技术在伯氏疟原虫中敲除 EMAP1, 有限稀释法筛选 EMAP1 基因敲除的单克隆虫株, PCR 和 Southern 印迹鉴定基因型; 定制抗 PbEMAP1 多克隆抗体, 利用 Western 印迹鉴定 EMAP1 缺失疟原虫。结果: (1) 成功构建用于敲除 PbEMAP1 的重组质粒 pL0035-ΔPbEMAP1。(2) 获得能有效识别 PbEMAP1 蛋白的抗体。(3) 基因型和蛋白水平鉴定重组疟原虫为 PbEMAP1 缺失的伯氏疟原虫单克隆虫株。结论: 本研究构建的 PbEMAP1 缺失伯氏疟原虫突变体, 为研究 PbEMAP1 在疟原虫发育和侵染中的作用提供了必要的工具。

关键词 伯氏疟原虫; 输出蛋白; 红细胞膜相关蛋白1

中图分类号 R382.3+1

文献标志码 A

Construction and identification of *Plasmodium berghei* erythrocyte membrane associated protein 1 deletion mutant

WEI Chao, SHI Xiao-yu, WANG Qian

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

Abstract **Objective:** To investigate the role of *Plasmodium berghei* exported protein PbEMAP1 in the development and invasion of malaria parasites, to construct PbEMAP1-deleted parasite strain. **Methods:** The upstream and downstream non-coding sequences of PbEMAP1 coding region were amplified as the homologous recombination arms using pL0035 plasmid as vector. The two homologous arms were inserted into pL0035 vector by T4 DNA ligase and HiFi DNA Assembly kit in order to obtain the recombinant plasmid pL0035-ΔPbEMAP1. The plasmid pL0035-ΔPbEMAP1 was transfected into *Plasmodium berghei*, by electro-transfection, and the single clone of ΔPbEMAP1 parasite strain were screened by limiting dilution. The genotype of ΔPbEMAP1 parasite was determined by PCR and Southern blotting, and the protein expression level was detected by Western blotting using the customized polyclonal antibody against PbEMAP1. **Results:** (1) The recombinant plasmid pL0035-ΔPbEMAP1 for knocking out PbEMAP1 was successfully constructed. (2) Antibodies that could effectively recognize PbEMAP1 were obtained. (3) The recombinant *Plasmodium* was identified as a single clone of ΔPbEMAP1 deletion parasite of *Plasmodium berghei* by genotype and protein level. **Conclusion:** The PbEMAP1 deletion mutant of *Plasmodium berghei* constructed in this study provides a necessary tool for studying the role of PbEMAP1 in the development and infection of *Plasmodium*.

Key words *Plasmodium berghei*; exported protein; erythrocyte membrane associated protein 1

疟疾是一种由疟原虫(*Plasmodium*)感染引起的以按蚊为媒介传播的感染性疾病, 主要流行于热带和亚热带地区^[1]。虽然我国在 2019 年获得消除疟疾认证, 但根据世界卫生组织不完全统计, 2019 年全球仍有大约 2.29 亿人感染疟疾, 其中 40.9 万人死于该疾病^[2]。鉴于目前仍无有效的疟疾疫苗, 因此对疟原虫输出到宿主细胞表面蛋白的研究就显得尤为重要。

疟原虫入侵的成熟红细胞是终末分化细胞, 缺

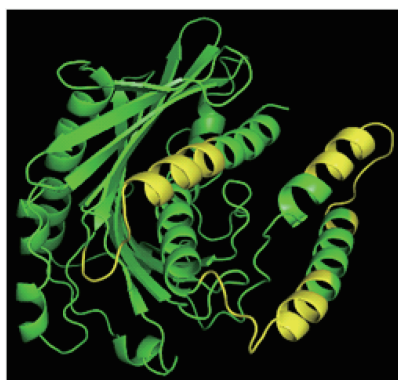
乏细胞器和主要的生物合成过程。当疟原虫侵染红细胞后, 会分泌输出大量蛋白质进入宿主红细胞胞浆和胞膜, 导致红细胞重塑, 变形能力降低, 促进感染红细胞与血管内皮细胞的黏附, 从而使疟原虫感染红细胞逃避脾脏的免疫清除^[3-5]。因此, 研究疟原虫输出蛋白可以更好地探究宿主红细胞的免疫原性及免疫逃逸机制, 为研制疫苗提供潜在的抗原靶点。红细胞膜相关蛋白1(erythrocyte membrane associated protein -1, EMAP1)蛋白是目前在伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*, Pb)中发现的被运输到红细胞膜的蛋白质^[6]。本课题组前期研究发现, 敲除内质网塑形蛋白 PbYop1(*P.berghei*Yop1), 红内期伯氏疟

基金项目 国家自然科学基金面上项目(32070701)

作者简介 魏超(1996-), 女, 硕士在读, 研究方向: 免疫学; 通信作者: 王倩, E-mail: wangq@tmu.edu.cn。

CATC),按照 Roche DIG High Prime DNA 标记及杂交检测试剂盒 II 说明书的方法制备地高辛标记的探针;WT 和 $\Delta PbEMAP1$ 疟原虫基因组 DNA 经限制性内切酶 *EcoR* V 和 *Hind* III 消化过夜后,在 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳分离;通过毛细管虹吸印迹法将凝胶中的 DNA 片段转移至尼龙膜上;转膜完成后将尼龙膜上的 DNA 变性、中和;通过紫外交联法将 DNA 固定于膜上,预杂交 4~6 h;将标记好的探针经高温变性为单链后加入杂交瓶中杂交过夜;次日,洗膜后于室温封闭 1 h;加入地高辛抗体(1:10 000)室温孵育 45 min,洗膜后加检测液孵育 5 min,均匀滴加 CSPD 显色液后曝光。

1.2.5 多克隆抗体制备 对 *PbEMAP1* 蛋白的序列和结构进行预测分析^[8],避开有二级结构的区域,挑选 3 个肽段(图 2),混合后免疫家兔;然后分别用 3 个肽段对免疫血清进行亲和纯化,获得抗 *PbEMAP1* 蛋白的多克隆抗体。



注:黄色标记部位为选择的 3 个肽段 EHASSDTINEDEK,SS-NDVSQNNSTDIDST,GDSFPKDFCDKQFRVKNM

图 2 预测的 *PbEMAP1* 蛋白三维结构

Fig 2 The predicted three-dimensional structure of the *PbEMAP1* protein

1.2.6 蛋白提取和免疫印迹实验 取 20 μ L 感染红细胞,加入 200 μ L 蛋白裂解液,充分裂解后离心,4 $^{\circ}$ C,10 000 r/min,10 min。取上清至新的 EP 管中即疟原虫感染红细胞蛋白样品。用 BCA 法对蛋白样品进行定量。调节蛋白上样量后与上样缓冲液混合,65 $^{\circ}$ C,15 min;进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,通过湿转的方法将蛋白转印至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h;孵育抗 *PbEMAP1* 抗体(1:500 稀释),4 $^{\circ}$ C 过夜;次日 PBST 洗膜 3 次,10 min/次;室温孵育第二抗体(1:3 000),1 h;PBST 洗膜 3 次,10 min/次;加化学发光显色液后曝光。

2 结果

2.1 构建 *PbEMAP1* 缺失疟原虫的策略 首先在

pL0035 质粒耐药标签 hDHFR-yFCU 两端分别插入 *PbEMAP1* 基因编码区上、下游 Up HR arm 和 Down HR arm 非编码区片段,得到重组质粒 pL0035- $\Delta PbEMAP1$ 。基于同源重组的原理,疟原虫基因组中 *EMAP1* 被质粒上的耐药标签替换,即可通过药物筛选获得 *PbEMAP1* 敲除的疟原虫(图 3)。

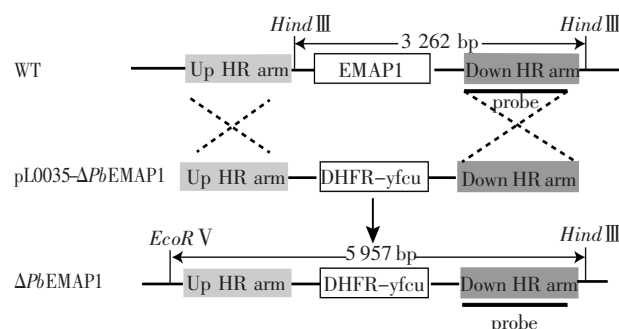
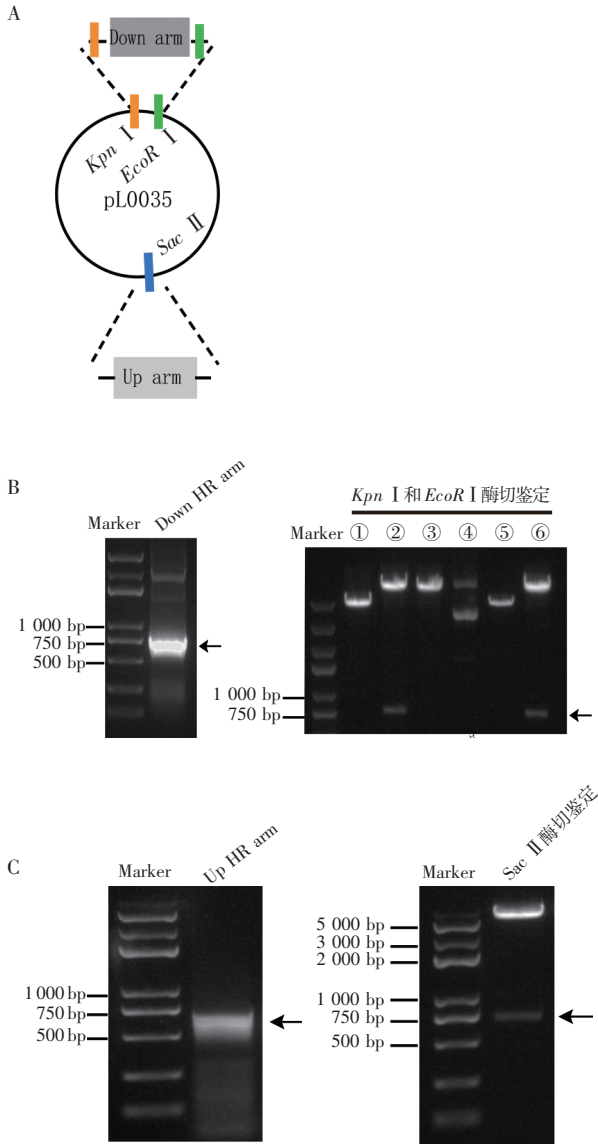


图 3 伯氏疟原虫 *PbEMAP1* 敲除策略

Fig 3 Strategy of *PbEMAP1* knockout in *Plasmodium berghei*

2.2 重组质粒 pL0035- $\Delta PbEMAP1$ 的构建和鉴定 重组质粒 pL0035- $\Delta PbEMAP1$ 的构建分为两步(图 4A)。第一步,以 WT 疟原虫基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 Down HR arm,同时引入 *Kpn* I 和 *EcoR* I 两个酶切位点,PCR 产物胶回收(图 4B 左),经双酶切后纯化,与 *Kpn* I 和 *EcoR* I 酶切处理的 pL0035 质粒在 T4 连接酶的作用下连接、转化,从而将 Down HR arm 插入 pL0035,得到质粒 pL0035-Down HR arm,酶切鉴定显示克隆②和⑥成功插入目的片段(图 4B 右),测序正确。第二步,以 WT 疟原虫基因组 DNA 为模板扩增 Up HR arm,并按照无缝克隆的要求在两段引入 overlap 序列(图 4C 左);将经 *Sac* II 酶切的 pL0035-Down HR arm 通过 HiFi DNA Assembly 试剂盒插入 Up HR arm 片段,转化后得到重组质粒 pL0035- $\Delta PbEMAP1$,经 *Sac* II 酶切鉴定插入片段大小正确(图 4C 右),测序无误。

2.3 伯氏疟原虫转染子基因型鉴定 对转染后的疟原虫进行乙胺嘧啶筛选,获得重组疟原虫杂合子,进一步经单克隆筛选,最终获得突变虫株 C4。提取 C4 疟原虫基因组 DNA 进行 PCR 初步鉴定(表 2),结果显示 C4 仅有重组子条带而无野生型条带(图 5A)。Southern 印迹对 C4 疟原虫的基因型进行确证,WT 和 $\Delta PbEMAP1$ 疟原虫基因组 DNA 经 *EcoR* V 和 *Hind* III 酶切后,探针所检测片段大小分别为 3 262 bp 和 5 975 bp(图 3)。结果显示 C4 为 *PbEMAP1* 缺失的单克隆虫株,仅检测到 6 kb 的条带,而无 3 kb 条带(图 5B)。



注:A. 重组质粒 pL0035- Δ PbEMAP1 构建示意图;B. 目的片段 Down HR arm 的获取及双酶切鉴定 Down HR arm 插入 pL0035;C. 目的片段 Up HR arm 的获取及 *Sac* II 酶切鉴定 Up HR arm 插入 pL0035-Down HR arm;箭头所指表示目的条带

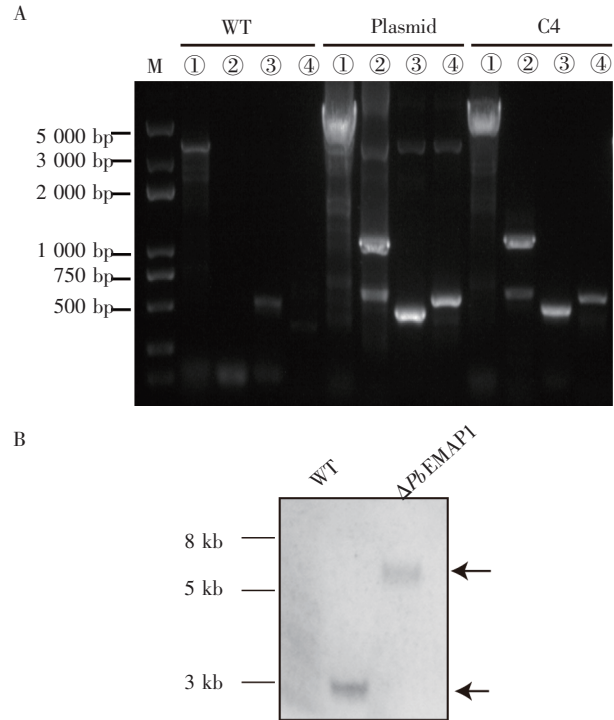
图 4 重组质粒 pL0035- Δ PbEMAP1 的构建和鉴定

Fig 4 Construction and identification of recombinant plasmid pL0035- Δ PbEMAP1

表 2 鉴定重组疟原虫基因型引物序列

Tab 2 Primers of genotype identification of recombinant *Plasmodium*

	引物名称	引物序列(5'→3')	片段大小	
			重组子	野生型
①	P33	CACCTCGACATCAAGG	4 761 bp	3 576 bp
	P34	GCGCTACCATAATTGTATG		
②	P35	GGTAATAGCAACATTG	1 184 bp	/
	P36	CGATGCAGTTTACGGAACC		
③	P37	GGAGGAGGTGGATCTGG	508 bp	/
	P38	CCTCACCAATATCTTCAAACC		
④	P39	GGGTTGGGTGACTTTTG	633 bp	/
	P40	GGCAATTTAAATAAGC		

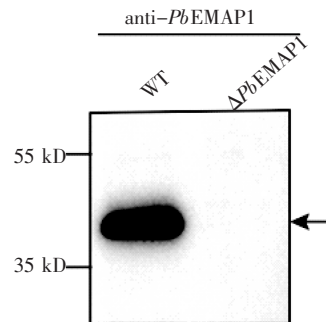


注:A:PCR 鉴定 Δ PbEMAP1 疟原虫基因型;B:Southern 印迹鉴定 Δ PbEMAP1 疟原虫基因型;M:Marker;WT: 野生型疟原虫基因组 DNA;Plasmid:重组质粒 pL0035- Δ PbEMAP1;C4:单克隆重组疟原虫基因组 DNA;①表示引物 P33+P34;②表示引物 P35+P36;③表示引物 P37+P38;④表示引物 P39+P40;箭头所指条带为目的条带

图 5 单克隆疟原虫 Δ PbEMAP1 基因型鉴定

Fig 5 Genotype identification of single clone of Δ PbEMAP1 *Plasmodium*

2.4 免疫印迹法验证 *PbEMAP1* 的敲除 提取 WT 和 Δ PbEMAP1 疟原虫蛋白, 利用制备的抗 *PbEMAP1* 抗体检测疟原虫 EMAP1 蛋白表达水平。结果显示野生型蛋白样品可检测到 38 kD 目的条带, 与 EMAP1 蛋白预期分子量相符; Δ PbEMAP1 蛋白样品在 38 kD 处未检测到信号(图 6), 提示制备的抗 *PbEMAP1* 抗体可用于 Western 印迹检测, *PbEMAP1* 缺失疟原虫构建成功。



注:WT:野生型疟原虫; Δ PbEMAP1:*PbEMAP1* 缺失疟原虫;箭头所指条带为目的条带

图 6 免疫印迹法鉴定 Δ PbEMAP1 疟原虫

Fig 6 Identification of Δ PbEMAP1 *Plasmodium* by Western blotting

3 讨论

在感染人的恶性疟原虫中,红细胞膜蛋白-1(erythrocyte membrane protein 1,EMP1),以依赖疟原虫输出基因(*Plasmodium* export element,PEXEL)的方式运输到红细胞膜,促进感染红细胞与内皮细胞表面各种受体结合,如CD36、细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate A,CSA)等,从而避免脾脏的清除,导致多器官功能障碍^[9-12],是疟原虫致病的主要因素。

伯氏疟原虫和恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*, *Pf*)类似,采用高度相似的转运机制将自身蛋白输送到宿主红细胞^[13]。因此,*Pb*可以作为研究疟原虫蛋白质输出机制以及相关表型的模型。然而,在*Pb*中尚未发现*Pf*EMP1的同源蛋白或具有相同结构域的蛋白^[14]。*Pf*EMP1如何运输到红细胞膜上的具体机制尚未完全清楚。*Pb*EMAP1和*Pf*EMP1一样,被运输到红细胞膜上^[6]。由于*Pb*和*Pf*具有相似的蛋白运输机制,因此研究*Pb*EMAP1蛋白运输机制可能为研究*Pf*EMP1如何运输到红细胞膜上提供新的思路;*Pb*EMAP1作为分泌到红细胞膜上的主要蛋白,推测其可能同*Pf*EMP1一样,与疟原虫致病性相关;另外还可以将*Pf*EMP1和内皮细胞结合的肽段嵌合到*Pb*EMAP1基因上,即可在体内研究*Pf*EMP1的具体功能,从而为研发针对*Pf*EMP1靶点的药物提供帮助^[15]。

此外,目前构建的*Pb*EMAP1缺失疟原虫含有耐药标签DHFR-yFCU,该耐药标签两端分别具有一段相同的序列3'*pbdhfr*/ts,对该疟原虫给予5-氟胞嘧啶可进行第二次药物筛选,即发生第二次同源重组。再次重组的*Pb*EMAP1缺失疟原虫可因删除耐药标签而存活。在此基础上可在疟原虫常用基因组改造位点230p(*Pb*ANKA_0306000)插入*Pb*EMAP1,用于后续的回补实验。

综上所述,本研究基于同源重组的原理获得*Pb*EMAP1缺失的伯氏疟原虫,从DNA和蛋白水平对筛选的单克隆重组疟原虫进行验证,并获得抗*Pb*EMAP1多克隆抗体,为今后研究*Pb*EMAP1对疟原虫生长发育及致病力的影响、挖掘潜在的抗疟药物靶点提供了必要的分子工具。

参考文献:

[1] VARO R, CHACCOUR C, BASSAT Q. Update on malaria[J]. Med Clin(Barc), 2020, 155(9):395-402.

- [2] WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria report 2020[R]: Geneva: World Health organization, 2020.
- [3] MATTHEWS K M, PITMAN E L, KONING WARD T F. Illuminating how malaria parasites export proteins into host erythrocytes [J]. Cell Microbiol, 2019, 21(4):e13009.
- [4] MAIER A G, RUG M, O'NEILL M T, et al. Exported proteins required for virulence and rigidity of plasmodium falciparum-infected human erythrocytes[J]. Cell, 2008, 134(1):48-61.
- [5] SARGEANT T J, MARTI M, CALER E, et al. Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites[J]. Genome Biol, 2006, 7(2):R12.
- [6] PASINI E M, BRAKS J A, FONAGER J, et al. Proteomic and genetic analyses demonstrate that plasmodium berghei blood stages export a large and diverse repertoire of proteins [J]. Mol Cell Proteomics, 2013, 12(2):426-448.
- [7] SHI X, HAI L, GOVINDASAMY K, et al. A plasmodium homolog of ER tubule-forming proteins is required for parasite virulence[J]. Mol Microbiol, 2020, 114(3):454-467.
- [8] ROBIN X, HAAS J, GUMIENNY R, et al. Continuous automated model evaluation(CAMEO)—perspectives on the future of fully automated evaluation of structure prediction methods [J]. Proteins, 2021, 89(12):1977-1986.
- [9] JENSEN A R, ADAMS Y, HVIID L. Cerebral Plasmodium falciparum malaria: the role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it [J]. Immunol Rev, 2019, 293(1):230-252.
- [10] MCMILLAN P J, MILLET C, BATINOVIC S, et al. Spatial and temporal mapping of the PfEMP1 export pathway in Plasmodium falciparum[J]. Cell Microbiol, 2013, 15(8):1401-1418.
- [11] AVRIL M, TRIPATHI A K, BRAZIER A J, et al. A restricted subset of var genes mediates adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to brain endothelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(26):E1782-E1790.
- [12] BARUCH D I, GORMELY J A, MA C, et al. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(8):3497-3502.
- [13] DE NIZ M, ULLRICH A, HEIBER A, et al. The machinery underlying malaria parasite virulence is conserved between rodent and human malaria parasites[J]. Nat Commun, 2016, 7(1):1-12.
- [14] HALL N. A Comprehensive survey of the plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses [J]. Science, 2005, 307(5706):82-86.
- [15] DE MORAES L V, DECHAVANNE S, SOUSA P M, et al. Murine model for preclinical studies of Var2CSA-mediated pathology associated with malaria in pregnancy [J]. Infect Immun, 2016, 84(6):1761-1774.

(2021-09-22 收稿)