

用电穿孔法将绿色荧光蛋白基因导入日本血吸虫童虫并表达

袁小松,沈继龙,汪学龙,胡元生,罗庆礼

【摘要】 目的 探讨增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因在日本血吸虫童虫体内异源表达,以及电穿孔技术在血吸虫基因转化中应用的可能性。方法 应用电穿孔技术将质粒 pEGFP-C1 导入机械转化的日本血吸虫童虫体内,提取分离体外培养 48 h 童虫的基因组 DNA、总 RNA 和全虫蛋白,分别用 PCR、逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blotting) 验证转基因在童虫体内的存在、转录和翻译。同时,使用激光共聚焦扫描显微镜对 EGFP 在童虫体内进行定位。结果 PCR 和 RT-PCR 分别成功扩增出 760 bp 和 276 bp 的预期大小的片段,Western blotting 证实了 EGFP 基因在童虫体内的表达;激光共聚焦显微镜观察表明 EGFP 主要定位在童虫的皮层和副皮层,虫体前端尤为明显。结论 电穿孔技术成功地将异源基因引入日本血吸虫童虫体内并获得表达。

【关键词】 日本血吸虫;电穿孔;荧光蛋白基因;转基因;基因表达

中图分类号:R383.24

文献标识码:A

Transformation of Schistosomulae by Electroporation and Transient Expression of the Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) Gene

YUAN Xiao-song, SHEN Ji-long, WANG Xue-long, HU Yuan-sheng, LUO Qing-li

(Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

【Abstract】 Objective To explore the possibility of heterogenous gene to express in juvenile *Schistosoma japonicum* and the application of electroporation in transformation of schistosomulae. **Methods** The plasmids of pEGFP-C1 were introduced into mechanically transformed schistosomula with electroporation. The presence, transcription and translation of the transgene in electroporated schistosomula were confirmed by PCR, RT-PCR and Western blotting analysis respectively using the genomic DNA, total RNA and protein extracted and isolated from schistosomula cultured *in vitro* for 48 hours. Meanwhile, localization of EGFP within electroporated schistosomula was performed with confocal laser scanning microscope. **Results** 760 bp and 276 bp amplified products by PCR and RT-PCR were found coincident with the expected size and expression of EGFP gene in electroporated schistosomula was confirmed by Western blotting. Fluorescence of EGFP was localized in tegument and subtegument of the electroporated schistosomula with confocal microscopy, especially in the anterior part of the worm. **Conclusion** The heterogenous gene of EGFP has been successfully introduced into juvenile *S. japonicum* by electroporation and the expression of transgene was confirmed with molecular and microscopical methods.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Electroporation; Fluorescent protein gene; Transgenes; Gene expression

在物种进化中,血吸虫向来被认为是低等生物。而基因组的研究发现,其结构的复杂性和功能的多样性高于线虫,或与节肢动物果蝇相当,某些重要基因(如蛋白水解酶类)与脊椎动物宿主具有高度的同源性,提示血吸虫可能存在与其宿主的共同进化 (co-evolution)^[1,2]。然而,由于血吸虫体外培养或建立细胞系尚无重大突破,基因调控研究也较少,不能利用转基因技术阐明已发现的基因在血吸虫的进化、发育及其与宿主相互关系中所起的作用。因此,探索新的基因调控技术对于当前血吸虫基因组研究尤为重要。近期研究发现,几个曼氏血吸虫基因的启动子可引导绿色荧光蛋白 (GFP) 基因和增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因在曼氏血吸虫成虫、母胞蚴体内表

达^[3-7]。本文利用电穿孔技术成功地将质粒 pEGFP-C1 导入日本血吸虫童虫体内,并获得表达,证实了日本血吸虫童虫阶段可以瞬时表达 EGFP 基因,电穿孔技术可用于血吸虫的基因转移。

材料与方法

1 材料

1.1 质粒 pEGFP-C1 表达载体 (美国 Clontech 公司) 由中国协和医科大学刘德培教授惠赠。

1.2 主要试剂和工具酶 质粒快速提取试剂盒及动物组织基因组提取试剂盒购自北京道普生物技术开发中心,用于提取总 RNA 的含硫氰酸胍和苯酚的混合试剂 (TRIzol Reagent), 购自美国 Invitrogen 公司,蛋白酶混合抑制剂 (complete mini) 购自美国 Roche 公司,小鼠抗 GFP 单克隆抗体 (JL-8) 购自美国 Clontech 公司,羊抗小鼠多克隆抗体购自武汉博士德生物

工程有限公司, Taq DNA 聚合酶、4 × 脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司, PCR 引物由上海生工生物工程公司合成, RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司。

1.3 主要仪器 电穿孔仪 (Bio-rad gene pulser II, 美国)、激光共聚焦扫描显微镜 (Carl zeiss LSM510, 德国)、倒置荧光显微镜 (Leica DMIL, 德国)、DNA 扩增仪 (techgene ftgene 2D, 英国)、电泳仪 (Bio-rad power Pac300, 美国)。

1.4 阳性钉螺 购自江苏省血吸虫病防治研究所。

2 方法

2.1 质粒 pEGFP-C1 的制备 质粒 pEGFP-C1 转化入感受态大肠埃希菌 (*E. coli* DH5a), 铺板, 经卡那霉素筛选后挑取阳性克隆大量培养。用质粒快速提取试剂盒抽提纯化质粒 pEGFP-C1, 无菌去离子水稀释至 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, -20 °C 备用。

2.2 童虫 取阳性钉螺, 常规方法逸出尾蚴, 冰上孵育 10 min, 用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 含青霉素 1 000 U/ml、链霉素 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、氟康唑 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 洗涤, 300 × g 离心 3 min, 共洗涤 4 次。再用不含抗生素的 PBS 同法离心洗涤 2 次。在更换离心管时, 用微量移液器反复吹打尾蚴, 大约 90% 的尾蚴可断尾人工转化为童虫, 备用。以上操作均在无菌环境进行。

2.3 童虫电穿孔 离心管中的童虫用 PBS 重悬, 取 10 μl 通过显微镜下计数将其稀释到 200 条/ml。取 500 μl 童虫悬液 (约含 100 条) 移入规格为 0.4 cm 的电击杯中, 并加入 100 μl (80 μg) 质粒 pEGFP-C1, 混匀, 置冰上孵育 15 min 后进行电穿孔。设定电容为 800 μF , 电压 120 ~ 320 V, 每升高 40 V 为 1 个试验组。比较不同电压 (脉冲) 下的童虫死亡率^[8]。同时, 设定两组对照, 分别为不加质粒童虫电穿孔组和加入质粒童虫不电穿孔组。电穿孔后的童虫移入预先加入 RPMI1640 培养基 (含 25% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素、6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氟康唑) 的培养皿。置 5% CO₂ 培养箱 37 °C 培养。

2.4 显微镜观察 分别取出培养至 30 min 及 12、24、48 和 72 h 的童虫, 用倒置显微镜观察。虫体腹吸盘侧翻、不活动则判为死亡^[9]。比较不同电压下童虫死亡率。同时, 分别取出培养至 24、48 和 72 h 童虫进行荧光显微镜和激光共聚焦扫描显微镜观察, 有特异性绿色荧光出现表明质粒 pEGFP-C1 已经表达。

2.5 基因组 DNA 和总 RNA 提取 上述培养至 48 h 童虫, 用冰浴的 PBS 同法离心洗涤 3 次收集童虫。按照基因组提取试剂盒说明书和含硫氰酸胍和苯酚的混合试剂说明书分别提取童虫 DNA 和总 RNA。

2.6 PCR、逆转录-PCR (RT-PCR) 鉴定 根据 EGFP 基

因序列, 利用 Primer 5.0 软件设计 2 对引物。

引物 1: 5'-GCAAAGCTTCAACAATGGTGA-3',

引物 2: 5'-GCAGATATCTTATCTAGATCC-3';

引物 3: 5'-CAGTGCTTCAGCCGCTACCC-3',

引物 4: 5'-TGCCGTTCTTCTGCTYGTG-3'。

引物 1、2 用于 PCR 检测, 以基因组 DNA 为模板, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min 后进入循环, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。引物 3、4 用于 RT-PCR 检测, 以提取的总 RNA 为模板, 用 RT 试剂盒内的寡聚脱氧胸苷酸 [Oligo (dT)] 为引物进行反转录。42 °C 水浴 1 h, 95 °C 变性 5 min 合成互补 DNA (cDNA), 再以 cDNA 为模板、以及引物 3 和引物 4 进行 PCR 扩增。反应条件: 95 °C 预变性 5 min 后进入循环, 94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 共进行 30 个循环。最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.7 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测 EGFP 的表达 培养 48 h 的童虫用冰浴的 PBS 洗 2 次后, 依次加入含 10% 蛋白酶混合抑制剂和 1% 苯甲酰磺酰氟 (PMSF) 的悬浮缓冲液 (0.1 mol/L, 0.01 mol/L Tris·HCl, pH 7.6) 及等体积的 2 × 十二烷基磺酸钠 (SDS) 上样缓冲液, 超声粉碎 (3 × 100 W) 5 min, 100 °C 水浴 10 min。将裂解物 10 000 × g 离心 10 min, 收集上清, 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 电转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜)。3% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, 与小鼠抗 GFP 单克隆抗体室温孵育 1 h, 洗膜, 与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠多克隆抗体孵育 1 h, 最后用二氨基联苯胺 (DAB) 显色。

结 果

1 电穿孔参数条件的优化

当电压脉冲时值 (20 ms)、脉冲次数 (1 次) 恒定时, 电场强度决定童虫电穿孔效率和死亡率。电击杯规格确定, 电压决定电场强度。电穿孔后童虫死亡率与电压之间的关系, 随着电压的升高童虫死亡率增加。电穿孔后培养 24、48、72 h 的童虫死亡率的差异无显著性。试验组与对照组童虫死亡率大致相同。由此认为电穿孔只能造成童虫瞬时损伤, 质粒 pEGFP-C1 进入童虫体内与否对其生存或死亡无显著影响。参照文献报道^[10, 11], 水蛭经电穿孔其死亡率达 50% 左右时转染效率最高, 以及多细胞组织在电穿孔时的参数条件, 作者认为电压为 200 V, 脉冲时值为 20 ms 的单一脉冲可有效的将质粒 pEGFP-C1 导入血吸虫童虫体内。后经激光共聚焦扫描显微镜观察、PCR 及

RT-PCR 检测结果得到验证。本研究即选用此参数。

2 EGFP 在童虫体内的表达及定位

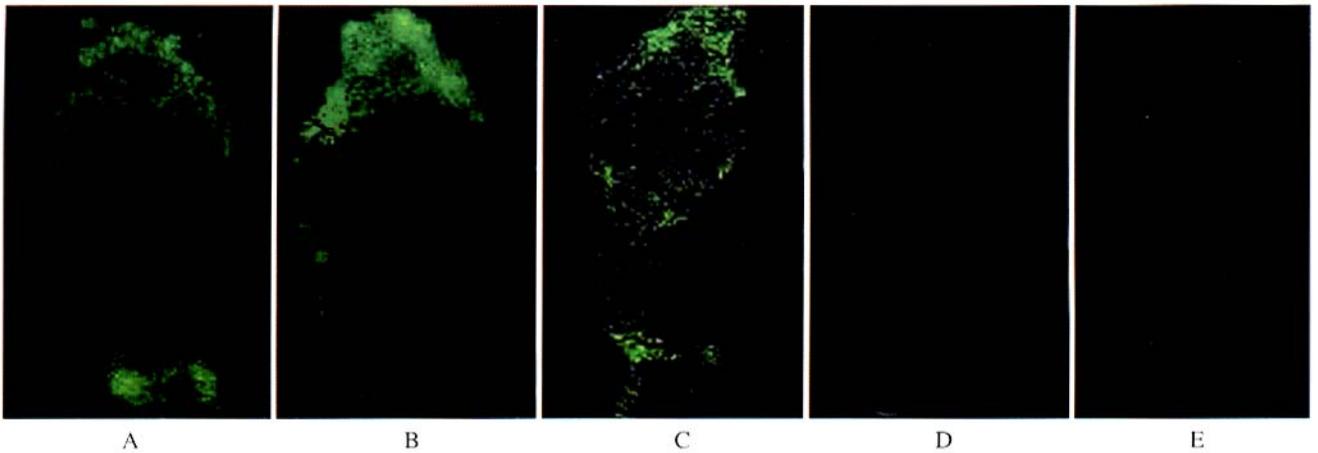
培养 24、48、72 h 的童虫，进行荧光显微镜检测。试验组各时间段的童虫均未见 EGFP 的表达。 ≥ 200 V，试验组，用激光共聚焦扫描显微镜检测，培养 48 h 童虫特异性绿色荧光亮度较强，表明有 EGFP 的表达；培养 72 h 后童虫荧光亮度减弱。EGFP 主要集中在童虫的皮层和副皮层，虫体前端尤为明显。这一结果与文献报道的荧光素酶基因 mRNA 在曼氏血吸虫童虫的表达部位一致^[12]。在 1 只（尚未转变为童虫的）尾蚴体内也见到了相同的表达（图 1）。

3 PCR 和 RT-PCR 检测结果

分别对试验组和对照组童虫的基因组 DNA 和用总 RNA 逆转录合成的 cDNA 进行检测，结果试验组成功的扩增出 760 bp 和 276 bp 片段，与理论值一致（图 2），而对照组则无。

4 Western blotting 检测 EGFP 的表达

结果显示，试验组童虫体内表达的 EGFP 能特异性结合小鼠抗 GFP 单克隆抗体，在 Mr30 000 处显示条带。而未加质粒 pEGFP-C1 及不经电穿孔童虫的平行对照组无此特异性条带出现（图 3）。

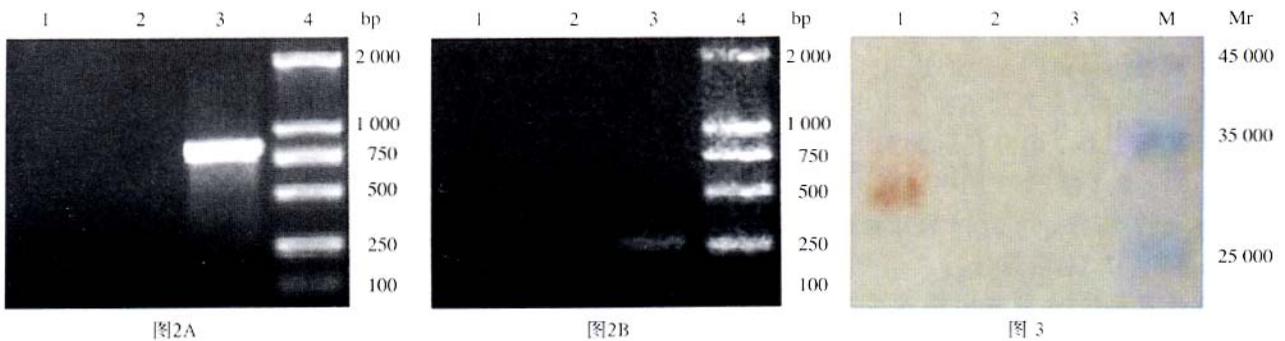


A, B: 2 只典型的表达 EGFP 基因的童虫($\times 200$)，C: 1 只表达 EGFP 基因的尾蚴($\times 100$)，D: 阴性对照童虫(不加质粒电穿孔组)($\times 200$)，E: 阴性对照童虫(加质粒未经电穿孔组)($\times 200$)。

A and B: Two typical schistosomulae with EGFP gene expressed ($\times 200$)，C: One cercaria with EGFP expressed($\times 100$)，D: Negative control(electroporated schistosomula in the absence of pEGFP-C1)($\times 200$)，E: Nngative contro(schistosomula mixed with pEGFP-C1 without electroporation)($\times 200$)。

图 1 EGFP 基因在童虫和尾蚴体内的表达与定位

Fig.1 Expression and localization of EGFP gene within schistosomula and cercaria



A: PCR 结果，B: RT-PCR 结果，1: 阴性对照(无质粒、电穿孔)，2: 阴性对照(有质粒、未电穿孔)，3: 试验组(有质粒、电穿孔)，4: DNA 标志物。

A: Results of PCR，B: Results of RT-PCR，1: Negative control (electroporated schistosomula in the absence of pEGFP-C1)，2: Negative control (schistosomula mixed with pEGFP-C1 without electroporation)，3: Experiment group(electroporated schistosomula with pEGFP-C1)，4: Marker.

图 2 PCR、RT-PCR 检测结果

Fig.2 Results of PCR and RT-PCR in detecting DNA and cDNA of schistosomula

1: 试验组，2: 阴性对照(无质粒、电穿孔)，3: 阴性对照(有质粒、未电穿孔)，M: 蛋白质标志物。

1: Experiment group(Lysates from electroporated schistosomulae with plasmids), 2: Negative control (Lysates from electroporated schistosomulae in the absence of pEGFP-C1), 3: Negative control (Lysates from schistosomulae mixed with pEGFP-C1 without electroporation), M: Maker.

图 3 Western blotting 鉴定 EGFP 基因的表达

Fig.3 Western blotting analysis of the expressed EGFP gene in schistosomulae

讨 论

参 考 文 献

1999 年, Davis 等^[13]报道萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase) 基因在曼氏血吸虫成虫体内的瞬时异源表达, 开创了转基因血吸虫研究之先河。之后, 又有研究表明几个血吸虫基因的启动子可引导 GFP 和 EGFP 基因在血吸虫成虫、母胞蚴体内表达^[3-7]。作为报告基因 GFP, 荧光性质稳定, 分子量小, 对细胞无毒、使用方便, 可进行定位观察, 已广泛用于转基因动物研究。但是, 无论 GFP 还是 EGFP 基因, 作为转基因血吸虫研究中的报告基因均有不足之处, GFP 和 EGFP 基因在血吸虫体内的表达水平远低于在其他物种体内的表达水平, 普通荧光显微镜下无法观测。本研究也证实了这一现象。血吸虫和其他动物一样, 消化系统存在自发性荧光, 这在一定程度上影响了对报告基因的观察。作者在用普通荧光显微镜观测童虫时发现, 半数以上童虫体内出现很强的自发性荧光, 且随着虫龄的增加自发性荧光由黄绿色变为黄色, 这与 Chaifie 等^[14]观察 GFP 基因在秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 体内表达时情况一致。为改变这种状况, 作者认为选用更强的启动子或者对 GFP 基因进行修饰或许是一种可行的方法。

以往报道, 关于转染工具均采用基因枪。2004 年 Correnti 等^[12]研究结果表明, 电穿孔也可将荧光素酶基因的 mRNA 引入曼氏血吸虫童虫体内并获得表达。电穿孔时细胞的转染效率除了与电压和脉冲时值有关外, 还与靶细胞和质粒密度有关。本文采用大剂量质粒, 增加了童虫与质粒的接触。由于使用高盐穿孔介质 PBS 及 800 μ F 电容, 使产生的脉冲时值达到 20 ms, 优化了实验条件。与基因枪法相比较, 电穿孔具有快速有效、对寄生虫损伤小的特点。电穿孔后的童虫, 可通过皮下或静脉注射进入宿主体内, 至于虫体能否继续存活并发育成熟, 有待进一步验证。最近的研究表明, 双链 RNA (dsRNA) 可以通过与血吸虫胞蚴和童虫一起浸泡进入其体内, 从而有效地抑制血吸虫内源性基因的表达^[15,16]。但本文作者证明, 质粒 DNA 无法用浸泡的方法转入童虫体内。本研究首次使用电穿孔技术将质粒 DNA 导入血吸虫童虫体内并获得表达, 为转基因血吸虫的研究提供了重要的参考资料。

- [1]Hu W, Yan Q, Shen DK, et al. Evolutionary and biomedical implication of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource[J]. Nature Genetics, 2003, 35 :139-147.
- [2]Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EA, et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*[J]. Nature Genetics, 2003, 35 :148-157.
- [3]Wippersteg V, Kapp K, Kunz W, et al. Hsp70-controlled GFP expression in transiently transformed schistosomes[J]. Mol Biochem Parasitol, 2002, 120 :141-150.
- [4]Wippersteg V, Kapp K, Kunz W, et al. Characterization of the cysteine protease ER60 in transgenic *Schistosoma mansoni* larvae[J]. Int J Parasitol, 2002, 32 :1219-1224.
- [5]Rossi A, Wippersteg V, Klinkert MQ, et al. Cloning of 5' and 3' flanking regions of the *Schistosoma mansoni* calcineurin A gene and their characterization in transiently transformed parasites[J]. Mol Biochem Parasitol, 2003, 130 :133-138.
- [6]Wippersteg V, Ribeiro F, Liedtke S, et al. The uptake of Texas Red-BSA in the excretory system of schistosomes and its colocalisation with ER60 promoter-induced GFP in transiently transformed adult males[J]. Int J Parasitol, 2003, 33 :1139-1143.
- [7]Heyers O, Walduck AK, Brindley PJ, et al. *Schistosoma mansoni* miracidia transformed by particle bombardment infect *Biomphalaria glabrata* snails and develop into transgenic sporocysts[J]. Exp Parasitol, 2003, 105 :174-178.
- [8]DL 斯佩克特, RD 戈德曼, LA 莱因万德. 细胞实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 793-800.
- [9]James ER, Taylor MG. Transformation of cercariae to schistosomula: A quantitative comparison of transformation techniques and of infectivity by different injection routes of the organisms produced [J]. J Helminthol, 1976, 50 :223-233.
- [10]Bosch TCG, Augustin R, Gellner K, et al. *In vivo* electroporation for genetic manipulations of whole *Hydra polyps*[J]. Differentiation, 2002, 70 :140-147.
- [11]Paul J, Canatell-Matthew M, Black-David M, et al. Tissue electroporation quantification and analysis of heterogeneous transport in multicellular environment[J]. Biophysical Journal, 2004, 86 :3260-3268.
- [12]Correnti JM, Pearce EJ. Transgene expression in *Schistosoma mansoni*: introduction of RNA into schistosomula by electroporation[J]. Mol Biochem Parasitol, 2004, 137 :75-79.
- [13]Davis RE, Parra A, Loverde PT, et al. Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96 :8687-8692.
- [14]Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263 :802-805.
- [15]Boyle JP, Wu XJ, Shoemaker CB, et al. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts [J]. Mol Biochem Parasitol, 2003, 128 :205-215.
- [16]Skelly PJ, Dadara A, Ham DA. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference[J]. Int J Parasitol, 2003, 33 :363-369.

(收稿日期: 2004-11-01 编辑: 富秀兰)