

犬贾第虫病毒转染载体介导的绿色荧光蛋白在犬贾第虫体内的表达

陈丽凤^{1,2}, 李建华¹, 刘全³, 赵月平¹, 曹利利¹, 张西臣^{1*}

【摘要】 目的 构建犬贾第虫病毒 (*Giardia canis* virus, GCV) 转染载体。方法 根据 GCV 基因组 (DQ238861) 的转录起始位点、复制起始位点及包装位点的序列特征和表达外源基因的顺式作用元件, 将绿色荧光蛋白 (GFP) 基因替换 GCV 基因部分编码区, 构建 GCV 基因与 GFP 基因的嵌合体, 并置 T7 启动子之下。用 T7 RNA 聚合酶体外转录后经电穿孔转染犬贾第虫滋养体, 并用荧光显微镜检测 GFP 表达情况, 间接 ELISA 测定转染后 GFP 的表达量。结果 构建了犬贾第虫病毒重组质粒 pGCV634/GFP/GCV2174, 经 *Sac* I 和 *Not* I 双酶切得到约 2.0 和 3.5 kb 两条带, 与预计值相符。由其介导的绿色荧光蛋白在犬贾第虫体内得到了高效表达, 其表达量在转染后第 1 天达高峰 ($A_{490}=1.8$); 以后随着时间的延长而逐渐下降, 14 d 后绿色荧光信号基本消失。结论 成功构建了犬贾第虫病毒转染载体, 为贾第虫细胞基因表达调控的研究提供了方法。

【关键词】 犬贾第虫病毒; 转染载体; 绿色荧光蛋白

中图分类号: R382.213, R392.11

文献标识码: A

Giardia canis Virus Transfection Vector-Mediated Expression of Green Fluorescent Protein in the Parasite

CHEN Li-feng¹, LI Jian-hua¹, LIU Quan², ZHAO Yue-ping¹, CAO Li-li¹, ZHANG Xi-chen^{1*}

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;

2 Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066000, China; 3 Veterinary

Institute, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China)

【Abstract】 **Objective** To construct *Giardia canis* virus (GCV) transfection vector. **Methods** According to transcriptional start site, replication origin and packaging site of GCV genome (DQ238861), a system was developed for the expression of a foreign gene in this organism by flanking the green fluorescent protein (GFP) gene with the fragments of GCV positive-strand RNA. The transcript of the construct was synthesized *in vitro* with T7 RNA polymerase and used to transfect GCV-infected trophozoites by electroporation. **Results** The recombinant plasmid pGCV634/GFP/GCV2174 was constructed. The expression of green fluorescent protein mediated by GCV transfection vector in *Giardia canis* peaked at 1 d after electroporation ($A_{490}=1.8$), and slowly decreased until 14 d post-transfection. **Conclusion** The engineered GCV vector can be successfully used to introduce and efficiently express a heterologous gene in the eukaryotic microorganism.

【Key words】 *Giardia canis* virus; Transfer vector; Green fluorescent protein

Supported by the National Natural Science Foundation of China No.30300260

* Corresponding author, E-mail: zhangxic@public.cc.jl.cn

贾第虫病毒 (*Giardia lamblia* virus, GLV) 是专性寄生于犬贾第虫体内的病毒, 具有宿主特异性^[1]。GLV 及其 cDNA 体外转录体均具有感染性, 小而稳定、易于纯化、感染效率高、对细胞生长无毒性, 因此以 GLV 建立一种 RNA 病毒转染系统, 用于外源基因的表达具有明显的优点^[2,3]。目前以贾第虫病毒 GLV

改造的载体系统已成功的应用于外源基因的表达、基因结构和功能分析、蛋白质功能性研究等各个领域, 显示出广泛的应用前景^[4-7]。本研究根据犬贾第虫病毒 (*Giardia canis* virus, GCV) 基因组结构特点^[8], 构建犬贾第虫病毒转染载体, 并在犬贾第虫细胞中进行 GFP 的表达。

材料与方法

1 犬贾第虫携病毒株滋养体体外培养

虫株系本室原代培养并保存于液氮中^[9]。将冷冻管自液氮取出后, 立即置于 40 °C 水中轻摇。融化后,

基金项目: 国家自然科学基金(30300260)

作者单位: 1 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062;

2 河北科技师范学院, 秦皇岛 066000;

3 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062

* 通讯作者, E-mail: jianhuali7207@163.com

将培养物移至含适量新鲜培养基的培养管内，500×g 离心 5 min，洗去保护液。在管内加满新培养基，置 37 °C 培养。第 2 天吸除 1/3~2/3 培养基，再加入等量新培养基继续培养。将虫移至含新鲜培养基的硅玻璃培养管于 37 °C 培养。每天用倒置显微镜观察并记录虫体生长情况。连续培养 3 d，每天将管内培养基吸除 1/3，再补充等量的预热 (37 °C) 的新鲜培养基。此后，每隔 2~3 d 重复 1 次，直至虫体在管壁上形成密集的细胞单层。

2 质粒与载体

质粒 pGCV 含有 GCV 全长 cDNA，由本室构建^[9]。质粒 pGFP-C1 由军事医学科学院军事兽医研究所涂长春研究员馈赠，载体 pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。

3 主要试剂及溶液配制

酪蛋白水解物、L-半胱氨酸盐酸盐、维生素 C、柠檬酸铁铵均为美国 Sigma 公司产品，基因转移仪 (Baeron 6000) 为美国 DRL 公司产品，GFP 标记的兔抗血清购自美国 Invitrogen 公司，羊抗兔 HRP-IgG 血清购自长春华美生物工程公司；T7 体外转录试剂盒 (P1320) 为美国 Promega 公司产品。改良 TY1-S-33 完全培养基，参照文献^[10]方法配制。电击缓冲液，参照文献^[4]方法配制。pH 7.4 PBS(150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) 用于过滤除菌。

4 引物

根据 GCV 和 GFP 序列特征，设计下列引物，由宝生物工程(大连)有限公司合成。

634-F: 5'-GAGCTC TAATACGACTCACTATAGGAAGGAGTGCCAGGCC ATTACC-3';

634-R: 5'-CTGCAG CGCTGCCGCCAGCCGCTGATTATC-3';

GCV3F: 5'-TCTAGA GTCGCGGGTACCCAGCTAGAATGATG-3';

GCV3R: 5'-GCGGCCGC CGACCCCTCGTACGCTGCCCTCTAC-3';

GFP-F: 5'-CTGCAG TAAAGGAGAAGAACITTTCA-3';

GFP-R: 5'-TCTAGA ATTCTTAATCCATGCCATGTGTAATC-3'。

其中有下划线部分为 T7 启动子，黑斜体字部分为新加的酶切位点。

5 重组质粒的构建

5.1 重组质粒 pGCV634、pGCV2174 和 pGFP 的构建 以质粒 pGCV 为模板，分别以 634-F 和 634-R、GCV3F 和 GCV3R 为两对引物，PCR 扩增出 GCV 的 5'端 634 bp 和 3'端 2 174 bp 两个片段，以 GFP-F 和 GFP-R 为

引物，以质粒 pGFP-C1 为模板扩增出 GFP 编码区，并分别克隆于 pMD18-T 载体，获得重组质粒 pGCV634、pGCV2174 和 pGFP，鉴定阳性的质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行测序。

5.2 重组质粒 pGCV634/GFP 的构建 将重组质粒 pGCV634 以 Sac I /Pst I 双酶切，回收 GCV 5'端 634 bp 片段；将质粒 pGFP 用 Pst I /Xba I /双酶切，回收 GFP；将载体 pPoy II /sfinot 用 Sac I /Xba I 双酶切，回收线性化载体。将这 3 个片段以 3 : 3 : 1 的比例混合，16 °C 连接过夜，得重组质粒 pGCV634/GFP，鉴定阳性的质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行测序验证。

5.3 重组质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 的构建 将重组质粒 pGCV634/GFP 用 Sac I /Xba I 双酶切，回收目的片段 634/GFP；将质粒 pGCV2174 用 Xba I /Not I 双酶切，回收 GCV3'端 2 174 bp 片段；载体 pPoy II /sfinot 用 Sac I /Not I 双酶切，回收线性化载体。将这 3 个片段按 3 : 3 : 1 的比例混合，16 °C 连接过夜，得重组质粒 pGCV634/GFP/GCV2174(图 1)，最后鉴定为阳性的质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行测序验证。

6 转化

将连接产物 pGCV634/GFP 和 pGCV634/GFP/GCV 2174 加入到 100 μl 感受态大肠埃希菌 DH5α 株中，轻轻混匀后冰浴 30 min，42 °C 水浴热冲击 90 s，冰浴

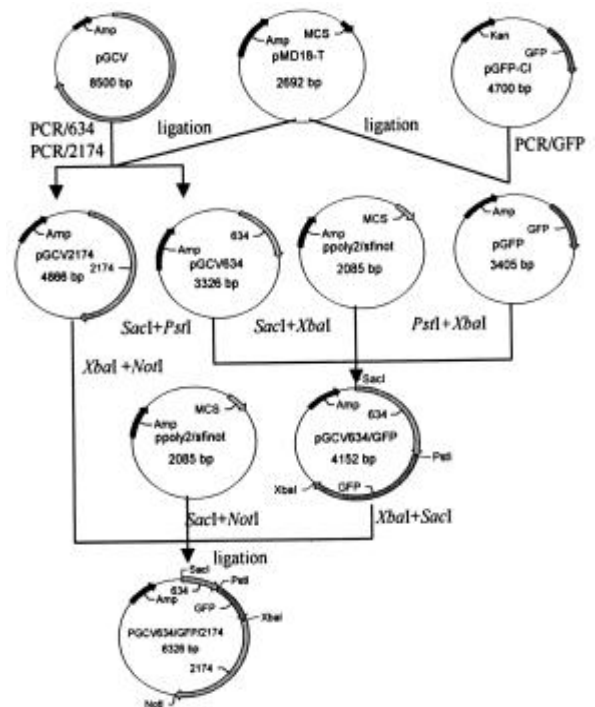


图 1 犬贾第虫病毒转染载体构建图

Fig.1 Construction of *Giardia canis* virus transfection vector

2 min, 加入 400 μ l 预热 37 $^{\circ}$ C 的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 200 rpm 振荡培养 50 min。取 200 μ l 培养液涂布于含相应抗生素的 LB 琼脂平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 14~16 h, 出现白色转化菌落。

7 重组质粒鉴定

7.1 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳 挑取转化菌落, 接种于 5 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 提取少量质粒 DNA 为模板, 用上述特异性引物进行 PCR 扩增, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

7.2 酶切鉴定 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳鉴定为阳性的重组质粒 pGCV634、pGCV2174、pGFP、pGCV634/GFP 及 pGCV634/GFP/GCV2174, 分别用内切酶 *Sac* I、*Pst* I、*Xba* I 和 *Not* I 进行双酶切鉴定, 酶切结果与预计大小一致者, 即为阳性。

8 体外转录

重组质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 经 *Not* I 酶切线性化后, 用凝胶回收试剂盒回收、定量。取约 1.5 μ g 线性化质粒作为模板, 应用 T7 体外转录试剂盒进行体外转录, 每管 20 μ l 反应液[包括: 6 μ l NTPs [25 mmol/L 腺苷三磷酸(ATP)、胞苷三磷酸(CTP)、尿苷三磷酸(UTP)、鸟苷三磷酸(GTP), T7RNA 聚合酶预混液 2 μ l, 加不含核酸酶的水至 20 μ l], 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后电泳观察结果。

9 电穿孔转染

取培养至对数生长期的虫体培养基置于冰浴 30 min, 500 \times g 离心 10 min, 用冷 PBS(4 $^{\circ}$ C)洗 2 次后再用致冷电击缓冲液悬浮至虫体浓度为 1×10^7 个/ml, 向电击杯中加入 0.8 ml 悬浮虫体液及 200 μ g 体外转录体 RNA, 以 1 000 V/cm、8 ms 脉冲进行电击反应, 冰浴 15 min, 转入装有培养基的培养管进行培养。转染后每天用荧光显微镜检测 GFP 的表达情况。

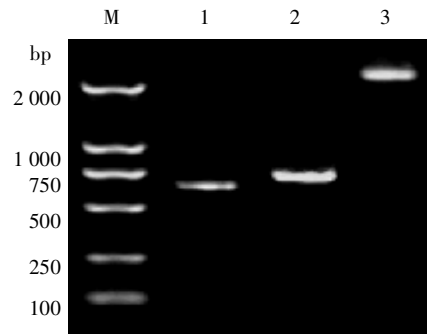
10 GFP 表达量的测定

ELISA 测定转染后犬贾第虫 GFP 基因表达量。取转染后犬贾第虫滋养体 2×10^6 个, 离心弃上清。以 2 ml PBS 悬浮虫体, 经超声裂解后作为 ELISA 检测抗原。ELISA 反应条件, 10% 正常胎牛血清为封闭剂, GFP 标记的兔抗血清为一抗(稀释度为 1:3 200), 羊抗兔 HRP-IgG 血清为酶标二抗(稀释度为 1:1 600), 测定样品吸光度(A_{490} 值)。

结 果

1 重组质粒 pGCV634、pGCV2174 和 pGFP 的构建

以质粒 pGCV 为模板, 扩增 GCV 的 5'端 634 bp 和 3'端 2 174 bp 两个片段, 以质粒 pGFP-C1 为模板扩增 GFP 编码区, 均得到了与预期大小相符的 3 个 DNA 片段(图 2)。3 个片段分别克隆于 pMD18-T 载体后经双酶切鉴定亦分别得到了约 634 bp、716 bp 和 2 174 bp 目的片段, 与预计结果一致。经测序证明构建的重组质粒 pGCV634、pGFP 和 pGCV2174 完全正确(图 3)。

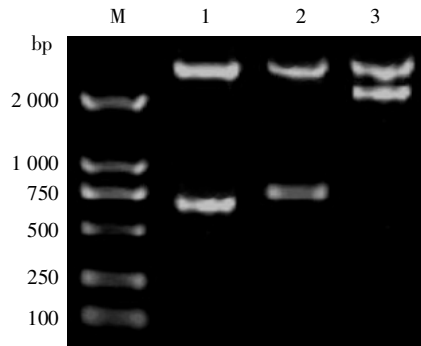


M: DNA 标志物(DL2000), 1,2,3: 分别为 GCV 的 5'端 634 bp、GFP 和 GCV 的 3'端 2174 bp 片段的 PCR 扩增产物。

M: DNA marker(DL2000), 1,2,3: PCR products—5'terminus 634 bp fragment of GCV, GFP and 3'terminus 2 174 bp fragment of GCV respectively.

图 2 GCV 5'端 634 片段、GFP 和 GCV 3'端 2 174 片段 PCR 扩增结果

Fig.2 The PCR product of 5'terminus 634 bp fragment of GCV, GFP, 3'terminus 2 174 bp fragment of GCV



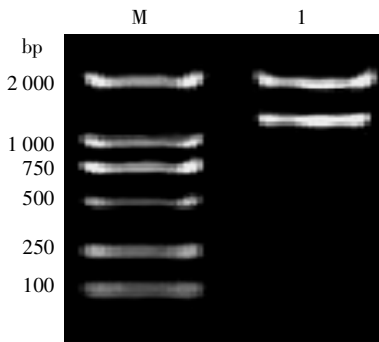
M: DNA 标志物(DL2000), 1: pGCV634 用 *Sac* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定, 2: pGFP 用 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定, 3: pGCV2174 用 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切鉴定。

M: DNA marker(DL2000), 1: Identification of pGCV634 digested by *Sac* I and *Pst* I, 2: Identification of pGFP digested by *Pst* I and *Xba* I, 3: Identification of pGCV2174 digested by *Xba* I and *Not* I.

图 3 重组质粒 pGCV634、pGFP 和 pGCV2174 的酶切鉴定结果
Fig.3 Enzyme-digestion profile of the recombinant plasmids pGCV634 pGFP and pGCV2174

2 重组质粒 pGCV634/GFP 的构建

将重组质粒 pGCV634/GFP, 经 *Sac* I、*Xba* I 双酶切, 得到约 2.0 kb 的载体片段和 1.4 kb 的插入片段的两条带, 与预期结果大小一致, 测序结果显示构建的重组质粒 pGCV634/GFP 完全正确(图 4)。



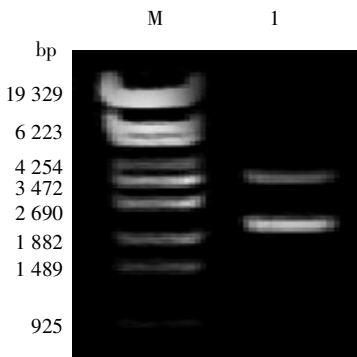
M: DNA标志物(DL2000), 1: pGCV634/GFP用 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定。

M: DNA marker(DL2000), 1: Identification of pGCV634/GFP digested by *Sac* I and *Xba* I.

图4 重组质粒 pGCV634/GFP 的酶切鉴定结果
Fig.4 Enzyme-digestion profile of pGCV634/GFP

3 重组质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 的构建

将重组质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 经 *Sac* I 和 *Not* I 双酶切, 得到约 2.0 kb 的载体片段和 3.5 kb 的插入片段两条带, 与预计值相符, 测序结果表明各片段连接顺序正确, 成功构建了重组质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 (图 5)。



M: λ DNA/*Eco*T14 标志物, 1: pGCV634/GFP/GCV2174 用 *Sac* I 和 *Not* I 双酶切鉴定。

M: λ DNA/*Eco*T14 marker, 1: Identification of pGCV634/GFP digested by *Sac* I and *Not* I

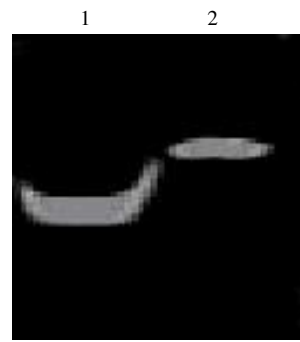
图5 重组质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 的酶切鉴定结果
Fig.5 Enzyme-digestion profile of pGCV634/GFP/GCV2174

4 体外转录

重组质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 线性化后, 应用 T7 体外转录试剂盒进行体外转录, 电泳观察转录结果如图 6 所示, 转录的 RNA 较完整, 符合转染条件。

5 荧光显微镜检测

转染后用荧光显微镜检测 GFP 基因表达情况, 见转染虫体发出较强的荧光, 表明 GFP 在犬贾第虫体内得到高效表达 (图 7)。



1: 质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 体外转录 RNA, 2: 质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 阴性对照。

1: *In vitro* transcription of pGCV634/GFP/GCV2174, 2: Negative control of pGCV634/GFP/GCV2174.

图6 质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 体外转录结果
Fig.6 *In vitro* transcription of pGCV634/GFP/GCV2174

6 转染后犬贾第虫存活率

电穿孔转染犬贾第虫滋养体后 1 d, 显微镜下用血细胞计数板计数, 计算犬贾第虫存活率为 43%。

7 GFP 基因表达量

取犬贾第虫滋养体 2×10^6 个, 离心沉淀分离虫体, 以间接 ELISA 法测定转染后 GFP 基因表达量。转染后第 1 天 GFP 的表达量最高 ($A_{490}=1.8$), 与对照组差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 8)。以后随着时间的延长而逐渐下降, 14 d 后荧光几乎完全消失。

讨 论

贾第虫被称为“生物活化石”, 它是从原核生物演化而来最保守的真核生物, 在生物学分类上处于重要地位, 是真核生物分子生物学的理想模型^[1]。该虫为二分裂无性繁殖, 在细胞分裂过程中既没有不同基因的融合, 也没有基因互换, 外源基因无法导入, 不易产生基因变异, 因而制约了贾第虫遗传学研究, 对其细胞学及分子生物学研究困难较大。寄生性原虫病毒的发现为深入研究贾第虫开辟了新的途径。GLV 是专性寄生于贾第虫体内的 dsRNA 病毒, 见于感染的滋养体的核内、细胞质, 最终可释放至培养基。该病毒也可感染某些未受病毒感染的虫株。大量病毒感染不会溶解贾第虫滋养体, 对细胞生长无毒性, 贾第虫有相当一部分虫株对 GLV 感染耐受, 这可能与这些虫体表面缺少病毒受体有关, 但经电穿孔感染 GLV 后, 在细胞中出现病毒蛋白和病毒 RNA, 病毒颗粒被释放到培养基, 又能感染对 GLV 敏感的贾第虫, 因此以 GLV 建立一种 RNA 病毒转染系统具有明显的优点^[23]。

Wang 等^[12]构建了人源蓝氏贾第虫病毒(WB 株)全长 cDNA 克隆, 制备了 GLV 和荧光素酶基因的嵌合

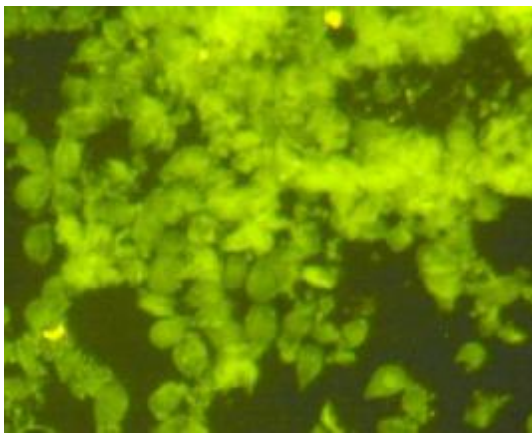


图 7 绿色荧光蛋白在犬贾第虫体内的表达
Fig.7 GFP expressed in *Giardia canis*

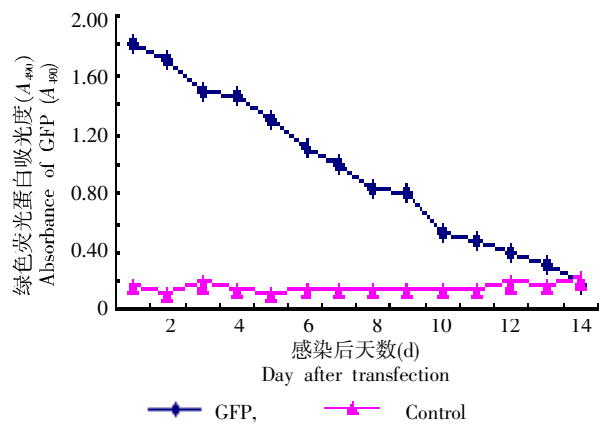


图 8 ELISA 检测转染虫体 GFP 基因表达量的动态变化
Fig.8 Dynamic change of GFP expression in the transfected parasites by ELISA

体, 通过体外转录及电穿孔技术在贾第虫体内表达了荧光素酶基因, 但只持续 4 d。Yu 等^[4] 通过优化 GLV 的顺式作用元件, 使荧光素酶基因的表达在没有选择压力时能持续到 30 d, 这为贾第虫病毒载体系统的建立奠定了基础。本研究根据 GCV 基因组(DQ238861) 的转录起始位点、复制起始位点及包装位点的序列特征构建了 GCV 与 GFP 的嵌合体, 通过荧光显微镜检测和间接 ELISA 检测 GFP 的表达量, 发现其体外转录体转染贾第虫后, GFP 在贾第虫体内得到高效表达, 表明成功构建了犬贾第虫病毒转染载体。本研究结果为贾第虫细胞基因表达调控研究提供了相关的实验资料。

参 考 文 献

[1] Wang AL, Wang CC. Discovery of a specific double-stranded RNA virus in *Giardia lamblia*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1986, 21: 269-276.
 [2] Furfine ES, Wang CC. Transfection of *Giardia lamblia* double-stranded RNA virus into *Giardia lamblia* by electroporation of a single-stranded RNA copy of the viral genome [J]. Mol Cellular Biol, 1990, 10: 3659-3663.
 [3] Miller RL, Wang AL, Wang CC. Identification of *Giardia lamblia* strains susceptible and resistant to infection by the double-stranded RNA virus[J]. Exp Parasitol, 1988, 6: 118-123.
 [4] Yu DC, Wang AC, Wu CH, et al. Virus-mediated expression of firefly luciferase in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*[J]. Mol Cell Biol, 1995, 15: 4867-4872.
 [5] Yu DC, Wang AL, Wang CC. Amplification, expression and pack-

aging of a foreign gene by giardiavirus in *Giardia lamblia* [J]. J Virol, 1996, 70: 8752-8757.
 [6] Dan M, Wang CC. Role of alcohol dehydrogenase E (ADHE) in the energy metabolism of *Giardia lamblia* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 109: 25-36.
 [7] Dan M, Wang AL, Wang CC. Inhibition of pyruvate-ferrodoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme[J]. Mol Microbiol, 2000, 36: 447-456.
 [8] Chen LF, Li JH, Zhang XC, et al. The analysis of full-length cDNA sequence of *Giardia canis* virus Changchun isolate [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2006, 37: 408-411. (in Chinese)
 (陈丽凤, 李建华, 张西臣, 等. 犬贾第虫病毒(长春株)全基因组序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37: 408-411.)
 [9] Chen LF, Li JH, Zhang XC, et al. Establishment of *in vitro* cultivation of *Giardia canis* trophozoites infected with *Giardia canis* virus[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24: 261-265. (in Chinese)
 (陈丽凤, 李建华, 张西臣, 等. 犬贾第虫携病毒株体外纯培养的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24: 261-265.)
 [10] Lu SQ, Wang ZY, Zhu H, et al. Axenic cultivation of *Giardia lamblia* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1990, 8: 199-201. (in Chinese)
 (卢思奇, 王正仪, 祝虹, 等. 贾第鞭毛虫纯培养的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1990, 8: 199-201.)
 [11] Wen JF, Li JY. Nuclear matrix of the most primitive eukaryote Archezoa [J]. Science China (Series C), 1998, 28: 423-430. (in Chinese)
 (文建凡, 李靖炎. 最原始的真核生物-原真核生物的核骨架[J]. 中国科学(C辑), 1998, 28: 423-430.)
 [12] Wang AL, Wang CC. Giardiavirus double-stranded RNA genome encodes a capsid polypeptide and a gag-pol-like fusion protein by a translation frame shift[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 8595-8599.

(收稿日期: 2006-03-03 编辑: 富秀兰)