

文章编号: 1000-7423(2011)-05-0321-06

【论著】

蓝氏贾第鞭毛虫 α -8 贾第素特异性锤头状核酶-GCV 重组载体的构建

魏超君^{1,2}, 卢思奇¹, 曹利静³, 田喜凤^{4*}

【摘要】 目的 构建蓝氏贾第鞭毛虫 α -8 贾第素(α -8 giardin)特异性锤头状核酶-GCV 重组载体。方法 采用 RNA draw 软件对蓝氏贾第鞭毛虫 α -8 贾第素基因序列(GenBank 登录号为 AY781323)的二级结构进行模拟分析, 按照 G:C 比例和锤头状核酶设计原则, 选取合适的核酶切割靶点, 设计特异性锤头状核酶(H8)序列, 并将其与犬贾第虫病毒(GCV)连接, 获得 α -8 贾第素特异性锤头状核酶-GCV 重组载体(pGCV634/H8/1423)。将载体线性化体外转录产物电击转染至贾第虫滋养体细胞内。提取转染后 24 h 的各虫体总 RNA, 并以其为模板采用 RT-PCR 验证转染效果及对靶 mRNA 的切割效果。结果 成功设计、合成了蓝氏贾第鞭毛虫 α -8 贾第素 mRNA 锤头状核酶序列 (H8), 将其与犬贾第虫病毒载体(GCV)连接, 成功构建了 pGCV634/H8/1423; RT-PCR 实验结果表明, 重组载体 pGCV634/H8/1423 转染贾第虫细胞后 24 h 可检测到核酶 RNA 的存在, 并实现了对 α -8 贾第素 mRNA 高效、特异的切割作用。结论 构建的 pGCV634/H8/1423 能有效转染至贾第虫细胞内, 并在其细胞内对 α -8 贾第素基因的 mRNA 具有高效、特异的切割作用。

【关键词】 蓝氏贾第鞭毛虫; 贾第素; α -8 贾第素; 锤头状核酶; 犬贾第虫病毒

中图分类号: R382.213

文献标识码: A

Construction of GCV-Specific Hammerhead Ribozyme Recombinant Vector of Alpha-8 Giardin in Giardia lamblia

WEI Chao-jun^{1,2}, LU Si-qi², CAO Li-jing³, TIAN Xi-feng^{4*}

(1 Clinical Laboratory, Gansu Provincial People Hospital, Lanzhou 730000, China; 2 Department of Pathogen Biology, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3 Pediatric Intensive Care Unit, Hebei Children's Hospital, Shijiazhuang 050031, China; 4 College of Life Science, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

【Abstract】 Objective To construct a GCV-ribozyme recombinant vectors of α -8 giardin in Giardia lamblia. Methods The secondary structure of α -8 giardin mRNA (GenBank Accession No. AY781323) was analyzed with the RNA draw software. According to the proportion of G:C and principles of designing hammerhead ribozyme, suitable ribozyme cleavage points were chosen. A specific antisense-hammerhead ribozyme(H8)was designed and synthesized. The ribozyme was cloned into Giardia canis virus (GCV) vector to construct a recombinant viral vector-pGCV634/H8/1423. The vector was linearized and transcribed into the trophozoites of G. lamblia by electroporation method. The α -8 giardin mRNA level of the transfectants and normal trophozoites were analyzed 24 h after electroporation by RT-PCR. Results The recombinant vector of GCV-specific hammerhead ribozyme of α -8 giardin in Giardia lamblia(pGCV634/H8/1423) was constructed. RT-PCR assays showed the ribozyme (H8) mRNA can be detected 24h after transfection and α -8 giardin mRNA was cleaved effectively by ribozyme (H8) intracellularly. Conclusion pGCV634/H8/1423 can transfect Giardia trophozoites and cleave mRNA of α -8 giardin intracellularly.

【Key words】 Giardia lamblia; Giardin; α -8 giardin; Hammerhead ribozyme; Giardia canis virus (GCV)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30970313)

* Corresponding author, E-mail: jean1957@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30970313)

作者单位: 1 甘肃省人民医院临床检验中心, 兰州 730000; 2 首都医科大学病原生物学系, 北京 100069;

3 河北省儿童医院重症监护科, 石家庄 050031; 4 河北联合大学生命科学学院, 唐山 063000

* 通讯作者, E-mail: jean1957@sina.com

蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*, 简称贾第虫)呈世界性分布^[1,2], 是一种重要的机会性致病原虫。贾第虫寄生于人体小肠, 引起以腹泻和消化不良为主的贾第虫病(*giardiasis*)^[2]。

贾第虫是生物进化过程中最早分化出来的真核生物之一^[3]。它虽然是一种原始的真核生物, 但具有与高等真核生物相似的高度发达而精细的细胞骨架系统。组成细胞骨架的微管、微丝和相关蛋白主要构成虫体的 4 对鞭毛、腹吸盘、中体^[4]和 funis (由尾鞭毛的轴丝发出的一种短阵列微丝) 等^[5]。

贾第虫的细胞骨架(包括构成骨架的各种骨架蛋白)不但参与虫体形态的维持、运动和细胞分裂等活动, 还与虫体的致病力密切相关^[6-8]。1983 年, Crossley 等^[9]首次提出贾第素(*giardin*)是贾第虫细胞骨架的特有成分。贾第素种类繁多, 功能复杂, 其中 α (α -贾第素(α -*giardin*))是一组重要的骨架蛋白, 其性质为钙结合蛋白^[10-13], 由 21 个成员组成, 相对分子质量(M_r)为 29 000~38 000。至今, 多数 α -贾第素在贾第虫滋养体细胞内的定位和功能并不十分清楚。根据初步研究结果推测, 在 21 种 α -贾第素中有 17 种可能分布于胞膜、吸盘(*disk*)、鞭毛(*flagella*)和胞质等处^[14]。然而, α -4、 α -7.1、 α -8 和 α -11 的细胞定位尚未见报道。

核酶(*ribozyme*)是一种具有催化功能和高度特异性内切核酸酶活性的 RNA 分子^[15]。其类型有 3 种, 其中以锤头状核酶(*hammerhead ribozyme*)最为常见, 因其活性区域碱基序列的二级结构呈“锤头”状而得名。随着对核酶结构和催化动力学的深入了解, 将其用于阻断特异基因表达的研究日趋广泛^[12,16]。锤头状核酶的单个分子可与多个 RNA 分子结合并使靶序列在特定部位断裂, 从而高效率的切割靶 mRNA 分子, 达到抑制基因表达的目的。它是目前基因功能研究的重要工具酶之一^[17]。

本研究从 α -8 贾第素入手, 设计了一种能够特异性切割其 mRNA 的特异性锤头状核酶序列, 将之与犬贾第虫病毒 (*Giardia canis virus*, GCV) RNA 连接, 构建 α -8 贾第素特异性锤头状核酶-GCV 重组载体, 旨在为该贾第素的细胞内定位和功能研究提供先期实验资料。

材料与方法

1 材料

1.1 蓝氏贾第鞭毛虫 贾第虫 C2 株, 系从四川省农村一名腹泻患者分离的虫体建立的纯培养虫株^[18], 由本室保存, 复苏后用改良 TY1-S-33 培养基^[19]培养、

传代。

1.2 培养基、载体和主要试剂 TY1-S-33 培养基成分购自美国 Sigma 公司, 载有绿色荧光蛋白基因的犬贾第虫病毒载体质粒(*pGCV-GFP*)由吉林大学畜牧兽医学院张西臣教授惠赠, 感受态大肠埃希菌 (*E. coli*)TOP10、RNAClean 和 RNA 纯化试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, 限制性内切酶和 *pMD18-T* 载体均购自北京六合通技术发展有限公司, Trizol 试剂、电击杯(0.4 cm)均购自美国 Invitrogen 公司, DNA 片段快速纯化回收试剂盒、*T₇* RiboMAX 快速大量 RNA 制备系统(*T₇* RiboMAXTM Express Large Scale RNAProduction System)均购自美国 Promega 公司。

2 方法

2.1 α -8 贾第素锤头状核酶 H8 及其引物设计 采用 RNA draw 软件对贾第虫 α -8 *giardin* 基因序列(GenBank 登录号为: AY781323)的二级结构进行模拟分析, 筛选每个序列中核酶可能的作用位点。选择该基因开放阅读框 mRNA 的 600~602 bp GUC 为核酶作用靶点。核酶催化活性中心选择由 22 个核苷酸组成的保守序列, 即 CTGATGAGTCCGTGAGGACGAA。在此序列前后两端各添加与底物互补的 22 和 24 个核苷酸。经计算机联机检索, 未检索到与之相同的其他基因序列。在此序列 5'端加 *Pst*I 酶切位点(斜体部分), 将上述组合的整个序列命名为 H8R。以 H8R 作为扩增核酶序列的下游引物, 其序列为 5'-CTGCAGCATGCAGATAGCTGTCTCCAAGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAACTTGTGGTGTGCTCCTCGTAAG-3'。另在 α -8 *giardin* 基因开放阅读框的 300~325 bp 处设计上游引物 H8F, 在其 5'端加 *Sal*I 酶切位点(斜体部分)其序列为 5'-GTCGACTGTGATTCTGTGCAGCACAGATGACT-3'。以 H8F 和 H8R 作为扩增核酶 H8 的特异性引物。

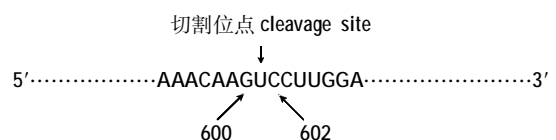


图 1 H8 核酶设计示意图

Fig. 1 The design of hammerhead ribozyme H8

2.2 GCV、内参和对照(α -8 *giardin*)引物设计 根据 GCV 序列特点, 分别设计扩增 GCV 载体 5'端长为 634 bp(命名为 634)和 3'端长为 1 423 bp(命名为 1423)两个片段所需的两对特异性引物。另外, 为半定量观

察干扰效果,选择贾第虫丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 基因片段作为 RT-PCR 的内参。为此,设计扩增 PK 基因的 1 对特异性引物 PKF 和 PKR。为对比观察核酶对目的基因的切割效果,设计特异性扩增 α -8 giardin 基因的引物 α 8F 和 α 8R。上述引物由上海英骏生物工程有限责任公司合成,并经 HAP 纯化。F 为正向引物, R 为反向引物,斜体部分为酶切位点,下划线部分为 T₇ 启动子(表 1)。

2.3 核酶和各目的片段的 PCR 扩增 取处于对数生长期的贾第虫滋养体,用蛋白酶 K-酚-氯仿法抽提基因组 DNA,置 -20 °C 保存备用。用上述引物对各目的片段进行 PCR 扩增。PCR 反应的总体积均为 25 μ l,包括 buffer 2.5 μ l, MgCl₂ 2.5 μ l, 三磷酸脱氧核糖核苷酸 (dNTPs, 215 mmol/L) 1 μ l, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ l, Taq 酶 (5 U/ μ l) 0.5 μ l, ddH₂O 13.5 μ l, 模板 3 μ l。反应条件为: 95 °C 3 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min; 共 35 个循环; 72 °C 5 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外透射灯下观察并拍照记录。

2.4 克隆测序和序列分析 用 DNA 片段快速纯化回收试剂盒纯化各目的片段,并将其分别与 pMD18-T 载体连接,将连接产物转化感受态 E. coli TOP10。将转化菌涂于含 100 mg/ml 氨苄青霉素的 LB 固体培养板上, 37 °C 培养 12~16 h。挑取白色克隆,分别溶于 10 μ l 无菌 ddH₂O 中。各取 2 μ l 为模板分别用各自的引物 M13F 和 634-R、M13F 和 1423-R、M13F 和 H8F 进行 PCR 扩增。PCR 的反应体系、反应条件同上。将经 PCR 鉴定正确的阳性菌送北京六合通技术发展有限公司测序。用 Blastn 软件将所测序列与 GenBank 中相应序列及所设计的核酶序列进行一致性比对。

2.5 目的片段的获得与连接 分别各取 1 株序列正确的菌液,提取质粒 DNA。将重组质粒 pMD18T-634 以 Hind III/Sal I 双酶切,回收 GCV 5'端的 634 片段;将质粒 pMD18T-H8 用 Sal I/Xba I 双酶切,回收 H8

片段;将质粒 pMD18T-1423 用 Hind III/Xba I 双酶切,回收带有 GCV 3'端 1423 的载体片段。将回收得到的 634 片段、核酶 H8 片段和带有 1423 的载体片段以 3:3:1 的比例混合,组成一个连接体系,16 °C 连接过夜,即得 α -8 贾第素特异性锤头状核酶-GCV 重组载体(pGCV634/H8/1423)。

2.6 连接产物的转化和克隆的筛选鉴定 将全部连接产物转化 E. coli TOP10,将转化菌液涂布于含 100 mg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上,37 °C 倒置培养过夜,至菌落长出。挑取单个阳性克隆,接种于 10 ml LB 液体培养基(含 100 μ g/ml 氨苄青霉素)中,37 °C,180 r/min 震荡过夜。收集菌液后抽提重组质粒 DNA,分别用 Pst I/Sal I、Sal I/BamH I、Sal I/Sma I 和 BamH I/Sma I 对 PCR 鉴定为阳性的重组质粒 pGCV634/H8/1423 进行双酶切鉴定,酶切结果与预计大小一致者,即为阳性重组质粒,并进一步测序鉴定。

2.7 体外转录与电击转染

2.7.1 体外转录 重组质粒 pGCV634/H8/1423 经 Sma I 酶切线性化,质粒 pGCV-GFP 经 Not I 线性化。用 DNA 片段快速纯化回收试剂盒分别对两者进行回收、定量。各取约 1.5 μ g 线性化质粒作为模板,用 T₇ RiboMAX 快速大量 RNA 制备系统对两种线性模板进行体外转录。反应在室温下进行,反应体系均为 20 μ l,其中包括 T₇ RiboMAX 缓冲液 10 μ l,线性 DNA 模板 3 μ l,酶混合液 2 μ l,无 RNase 无菌水 (RNase free ddH₂O) 5 μ l。轻柔混匀后,37 °C 孵育 45 min。加 1 μ l 无 RNase 的 DNase,37 °C 孵育 15 min,对转录产物分别进行回收,电泳观察转录结果。

2.7.2 电穿孔转染 取培养至对数生长期的贾第虫滋养体,367 \times g 离心 10 min,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,再用预冷的电击缓冲液(cytomix)悬浮虫体,经伊红染色后计数活虫数,将虫液终浓度调至 1 \times 10⁷/ml。在 3 个电击杯中各加入 0.3 ml 上述虫体悬浮液,向 A 杯中加入线性质粒 pGCV-GFP 体外转录子 RNA 200 μ g,

表 1 引物序列

Table 1 Nucleotide sequence of the primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
H8F	5'-GTCGACTGTGATTCTGTGCAGCACAGATGACT-3'
H8R	5'-CTGCAGCATGCAGATAGCTGTCTCCAAGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACTTGTTGTGTGCTCCTCGTAAG-3'
634F	5'-GAGCTCTAATACGACTCACTATAGGAAGAAGTGCCAGGCCATTACC-3'
634R	5'-CTGCAGCGCTGCCGCCAGCGCGTGATTATC-3'
1423F	5'-GTCGACGTCGCGGGTACCCAGCTAGAATGATG-3'
1423R	5'-GATATCCGACCCCTCGTACGCTGCCTCCTAC-3'
PKF	5'-ATGTTCTCTGACGCCGTGCAGCGTA-3'
PKR	5'-ATTCCATTGCCTTGTTGAACATGAT-3'
α 8F	5'-GACGCATTGGTGGACCTTGT-3'
α 8R	5'-GAGTGGGATGGCGGTGTTAT-3'

B杯中各加入线性重组质粒 pGCV634/H8/1423 体外转录子 RNA 200 μg, C 杯中不加任何 RNA。加样完毕后, 将各杯充分混匀, 各以 1 000 V/cm 电压和 8 ms 脉冲时间行单次电击反应。电击后冰浴 15 min, 将杯中虫液分别转入培养管内, 加满新鲜 TY1-S-33 培养基培养。将转染后的虫体培养 24 h, 再用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况。收集转染后 24 h 虫体提取总 RNA, 以核酶合成所需的引物, RT-PCR 检测转染后贾第虫体内核酶的 RNA。

2.7.3 转染后核酶切割效率的 RT-PCR 检测 采用 Trizol 试剂一步法抽提分别经质粒 pGCV634/H8/1423 转染后 24 h 虫体的总 RNA, 以及相应时段电击对照虫体和正常虫体的总 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。紫外分光光度计测定各组总 RNA 的纯度和浓度。对同一时段的 3 种 RNA 样品各采用以下程序进行 RT-PCR 反应: ① 逆转录合成 cDNA: 反应体积为 10 μl, 其中含 MgCl₂ 2 μl、10×RT buffer 1 μl、无 RNase 无菌水 3.75 μl、dNTPs 1 μl、RNase 抑制剂 0.25 μl、AMV 逆转录酶 0.5 μl、随机引物 9 (Random primer 9) 0.5 μl、RNA 模板 1 μl。反应程序: 30 °C 10 min, 55 °C 2 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min。② RT-PCR 扩增: 分别以每一种反转录 cDNA 为模板同时以 634F 和 634R, 1423F 和 1423R, α8F 和 α8R 与 PKF 和 PKR 4 对引物分别扩增 634 片段、1423 片段、alpha-8 giardin 和内参 PK 的 DNA 片段。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

结 果

1 核酶目的片段的扩增及测序结果

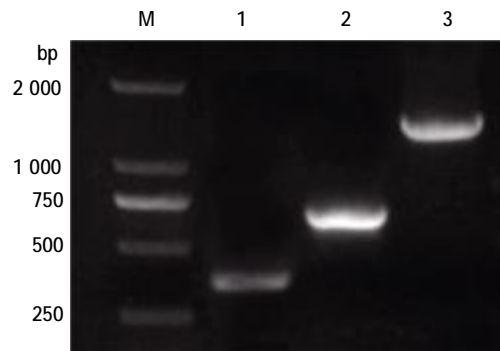
扩增和测序结果均显示, 核酶 H8、GCV 3' 端 1423 和 5' 端 634 片段长度分别为 358 bp、1 423 bp 和 634 bp, 与预计的结果一致(图 2)。

2 重组质粒的双酶切鉴定结果

重组质粒 pGCV634/H8/1423 双酶切鉴定结果显示, 各获得 634 bp 和 4 679 bp、358 bp 和 4 755 bp、1 781 bp 和 3 332 bp、1 423 bp 和 3 790 bp 等片段(图 3)。长度均与预期大小一致, 表明重组质粒构建正确。

3 体外转录结果

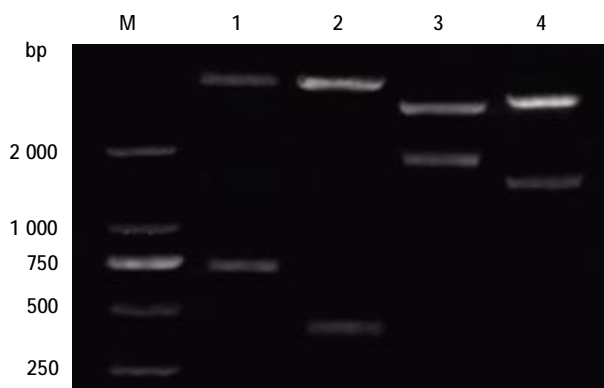
线性重组质粒 pGCV634/H8/1423、pGCV-GFP 和阳性对照线性模板的体外转录产物大小分别为 2 410 bp、2 770 bp 和 2 300 bp, 与预期大小一致(图 4)。说明转录 RNA 较完整, 符合转染条件。



M: DNA 标志物; 1: H8 片段; 2: GCV 5'端 634 片段; 3: GCV 3'端 1423 片段。

M: DNA marker; 1: H8; 2: 634 of 5'-end of the GCV; 3: 1423 of 3'-end of the GCV.

图 2 核酶目的片段的 PCR 扩增结果
Fig. 2 Amplification of H8 by PCR



M: DNA 标志物; 1: Pst I/Sal I 双酶切; 2: Sal I/BamH I 双酶切; 3: Sal I/Sma I 双酶切; 4: BamH I/Sma I 双酶切。

M: DNA marker; 1: Digested by Pst I/Sal I; 2: Digested by Sal I/BamH I; 3: Digested by Sal I/Sma I; 4: Digested by BamH I/Sma I.

图 3 重组质粒 pGCV634/H8/1423 双酶切鉴定结果

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pGCV634/H8/1423 by restriction endonucleases

4 荧光显微镜检测结果

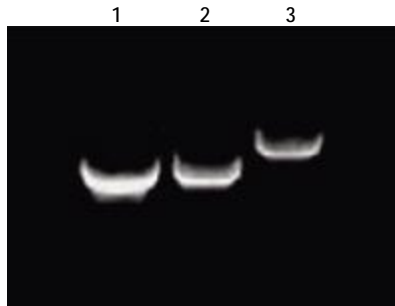
转染后 24 h 的荧光显微镜观察结果显示, 经质粒 pGCV-GFP 体外转录产物转染的虫体出现绿色荧光(图 5A), 而电击对照虫体未显示绿色荧光(图 5B)。表明带有荧光基因的 pGCV-GFP 已成功转入贾第虫细胞内, 该基因表达了荧光蛋白。

5 核酶的 RT-PCR 检测结果

结果显示, 在转染后 24 h 可检测到核酶 RNA 的存在, 说明携有核酶的载体已被成功导入贾第虫体内(图 6)。

6 核酶切割效果的 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 检测结果表明(图 7), 以重组质粒 pGCV634/H8/1423 转染虫体总 RNA 为模板, 扩增出

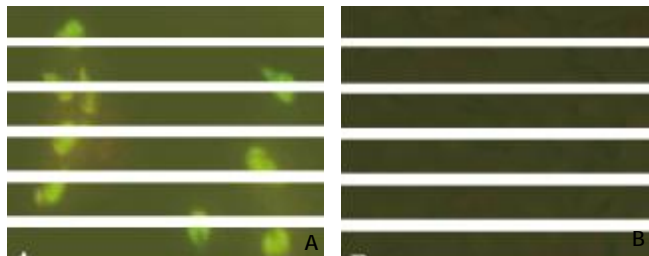


1: 阳性对照; 2: 线性重组质粒 pGCV634/H8/1423; 3: 线性重组质粒 pGCV634/GFP/1423。

1: Positive control template; 2: pGCV634/H8/1423; 3: pGCV634/GFP/1423.

图 4 线性化体外转录产物和阳性对照电泳结果

Fig. 4 Transcripts of linearized pGCV634/H8/1423 and positive control template



A: 接受 pGCV-GFP 体外转录产物转染后的虫体; B: 接受电击的正常虫体。

A: Trophozoites transfected by transcript of pGCV-GFP; B: Normal electroporated trophozoites.

图 5 GFP 基因在贾第虫细胞内表达荧光的检测结果 (×400)

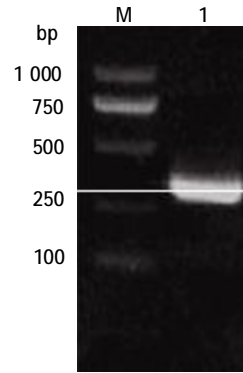
Fig. 5 GFP gene expression in Giardia detected by fluorescent microscope (×400)

634 片段(634 bp)和 1423 片段(1 423 bp), 但未能扩增出 α -8 giardin 基因片段。以正常虫体和电击虫体总 RNA 为模板, 均未能扩增出 634、1423 片段, 但可扩增出 α -8 giardin 基因片段(936 bp)。在同等上样量的情况下, 三者均能扩增出亮度一致的 PK (412 bp) 基因片段。表明构建的特异性核酶载体 pGCV634/H8/1423 已成功转入贾第虫体内, 并对贾第虫体内编码的 α -8 giardin mRNA 进行了有效切割, 结果与预期一致。

讨 论

贾第虫的细胞骨架, 通过它们精细的协调作用, 使蓝氏贾第鞭毛虫得以完成复杂的“落叶式”运动和其他重要的生理功能^[20,21]。因此, 对贾第虫细胞骨架(包括构成骨架的各种骨架蛋白成分)的研究对深入探讨贾第虫细胞骨架的功能及新药靶点的筛选具有极其重要的意义。

基因转染技术在贾第虫分子生物学研究中占有重要的地位。本研究选用 RNA 病毒介导的转染系统, 其病毒载体 GCV, 虽然分离自犬贾第虫, 但因其无

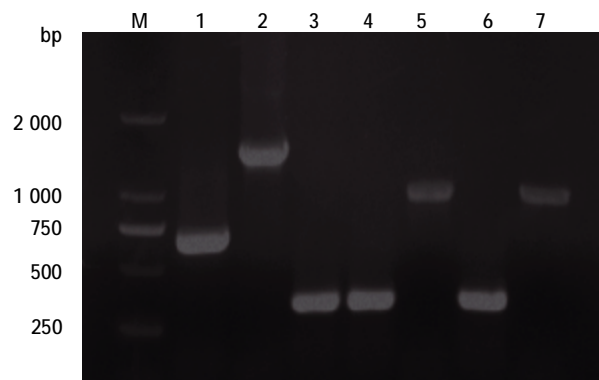


M: DNA 标志物; 1: 核酶 H8。

M: DNA maker; 1: α -8 giardin antisense transcript.

图 6 pGCV634/H8/1423 转染后 24 h 虫体细胞内核酶(H8)的 RT-PCR 检测结果

Fig. 6 RT-PCR detection of H8 24 h after pGCV634/H8/1423 transfection



M: DNA 标志物; 1: 核酶转染后虫体的 634 片段; 2: 核酶转染后虫体的 1423 片段; 3: 核酶转染后虫体的 PK 片段; 4: 电击虫体的 PK 片段; 5: 电击虫体的 α -8 giardin 片段; 6: 正常虫体的 PK 片段; 7: 正常虫体的 α -8 giardin 片段。

M: DNA marker; 1: 634 fragment in trophozoites transfected with H8; 2: 1423 fragment in trophozoites transfected with H8; 3: PK fragment in trophozoites transfected with H8; 4: PK fragment in normal electroporated trophozoites; 5: α -8 giardin fragment in normal electroporated trophozoites; 6: PK fragment in normal unelectroporated trophozoites; 7: α -8 giardin fragment in normal unelectroporated trophozoites.

图 7 转染后核酶载体的 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 7 RT-PCR assay after transfection

严格的宿主细胞特异性, 可用于感染本实验分离自人体的贾第虫滋养体。由于病毒具有体积小、性质稳定, 易于纯化、感染率高和无毒性(即使每个滋养体感染 10^5 个病毒, 其生长和形态也不受影响)等特点, 且其 cDNA 体外转录体亦具有感染性, 因而可将之作为一种新型转染载体或表达载体用于贾第虫的基因干扰研究^[16,22]。本实验即利用 GCV 的上述特点, 以其作为转染载体, 通过电击的方法, 将其瞬间大量导入贾第虫细胞内。实验结果表明, 将携带 GFP 片段的 GCV 重组质粒 pGCV-GFP 导入滋养体细胞, 24 h 后即可在荧光显微镜下观测到受染细胞显示绿色荧光且未见虫体形态的改变, 这一结果进一步验证了

GCV作为将外源基因导入贾第虫细胞的转染载体的可行性。本室以往曾成功用该病毒构建了贾第虫丙酮酸激酶(PK)和丙酮酸双激酶(pyruvate phosphate dikinase, PPK)特异性锤头状核酶载体,并用于两者功能的研究^[23]。这些研究结果也证实了犬贾第虫病毒是构建核酶的良好载体。

本研究通过核酶干扰的手段,成功的将重组载体转染至贾第虫滋养体细胞内并对靶 mRNA 进行了有效的切割,为进一步探讨贾第虫滋养体内基因功能的研究提供了有效的手段。重组载体的成功构建为进一步实现对 α -8 贾第素基因表达的抑制,并在此基础上深入探讨 α -8 贾第素的功能提供了有价值的实验资料。

参 考 文 献

- [1] Hunter PR, Thompson RC. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* [J]. *Int J Parasitol*, 2005, 35 (11-12): 1181-1190.
- [2] Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1996, 50(1): 679-705.
- [3] Adam RD. Biology of *Giardia lamblia* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(3): 447-475.
- [4] Piva B, Benchimol M. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study [J]. *Biol Cell*, 2004, 96(9): 735-746.
- [5] Benchimol M, Piva B, Campanati L, et al. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy—new insight [J]. *J Struct Biol*, 2004, 147(2): 102-115.
- [6] Campanati L, Monteiro-Leal LH. The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia*(P1 strain) [J]. *Parasitol Res*, 2002, 88(1): 80-85.
- [7] Campanati L, Holloschi A, Troster H, et al. Video-microscopy observations of fast dynamic processes in the protozoan *Giardia lamblia* [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2002, 51(4): 213-224.
- [8] Cruz A, Sousa MI, Azeredo Z, et al. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: in vitro susceptibility to metronidazole and albendazole [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51(4): 1017-1020.
- [9] Crossley R, Holberton DV. Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia* [J]. *J Cell Sci*, 1983, 59(1): 81-103.
- [10] Baker DA, Holberton DV, Marshall J. Sequence of a giardin subunit cDNA from *Giardia lamblia* [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(14B): 71-77.
- [11] Bauer B, Engelbrecht S, Bakker-Grunwald T, et al. Functional identification of alpha 1-giardin as an annexin of *Giardia lamblia* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 173(1): 147-153.
- [12] Pathuri P, Nguyen ET, Ozorowski G, et al. Apo and calcium-bound crystal structures of cytoskeletal protein alpha-14 giardin (annexin E1) from the intestinal protozoan parasite *Giardia lamblia* [J]. *J Mol Biol*, 2009, 385(4): 1098-1112.
- [13] Szkodowska A, Muller MC, Linke C, et al. Annexin XXI (ANX21) of *Giardia lamblia* has sequence motifs uniquely adhered by giardial annexins and is specifically localized in the flagella [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(28): 25703-25706.
- [14] Weiland ME, Palm JE, Griffiths WJ, et al. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity [J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33(12): 1341-1351.
- [15] Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, et al. Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi [J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1146-1150.
- [16] Chen L, Li J, Zhang X, et al. Inhibition of krr1 gene expression in *Giardia canis* by a virus-mediated hammerhead ribozyme [J]. *Vet Parasitol*, 2007, 143(1): 14-20.
- [17] Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1 [J]. *Science*, 2002, 295(5564): 2456-2459.
- [18] Lu SQ, Wang ZY, Yan G, et al. Four isolates of *Giardia lamblia* cultivated axenically in China and the restriction endonuclease analysis of their DNA [J]. *J Parasitol*, 1996, 82(4): 659-661.
- [19] Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1983, 77(4): 487-488.
- [20] Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM. The cytoskeleton of *Giardia lamblia* [J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33(1): 23-28.
- [21] Correa G, Morgado-Diaz JA, Benchimol M. Centrin in *Giardia lamblia*-ultrastructural localization [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 233(1): 91-96.
- [22] Dan M, Wang AL, Wang CC. Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36(2): 447-456.
- [23] Feng XM, Cao LJ, Adam RD, et al. The catalyzing role of PPK in *Giardia lamblia* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(2): 394-398.

(收稿日期: 2011-06-23 编辑: 衣凤芸)