

短寡核苷酸链高效转染体外培养恶性疟原虫的研究

周洪昌^{1*}, 高宇辉², 邵圣文¹, 张慧¹, 张婷¹

【提要】 5%山梨醇连续 2 次同步化恶性疟原虫培养物 (8 h 窗口), 培养 16 h 后, 直接孵育组 (A 组) 将 50 μl 含寡核苷酸培养基与 450 μl 恶性疟原虫培养物 (5%虫血率, 1%血体积) 混合孵育, Entraster-R 试剂转染组 (B 组) 将 50 μl 转染复合物 (含寡核苷酸链和转染试剂) 与 450 μl 恶性疟原虫培养物混合孵育, 培养 5 h 后重悬, 分别取出 250 μl , 1 500 $\times g$ 离心 3 min, 收集沉淀, 进行荧光显微镜观察和流式细胞术检测转染效率。剩余细胞经 RPMI 1640 培养基洗涤 1 次后, 加入 500 μl 含 2%新鲜红细胞的培养基, 继续培养 12 h 至第 2 个细胞周期, 再次进行流式细胞术检测。荧光显微镜观察结果显示, Entraster-R 试剂转染组可明显观察到感染红细胞中标记探针的绿色荧光, 而直接孵育组未观察到绿色荧光。流式细胞术检测结果表明, Entraster-R 试剂转染组小分子寡核苷酸转染疟原虫的效率可达 (47.40 \pm 3.39)%, 高于普通孵育法 [(0.60 \pm 0.27)%], 且该组在第 2 个周期中维持转染率约 (26.85 \pm 2.90)%, 而直接孵育组在第 2 个细胞周期则几乎检测不到。提示利用纳米转染试剂 Entraster-R 能提高寡核苷酸转染疟原虫的效率。

【关键词】 恶性疟原虫; Entraster-R 转染; 寡核苷酸链

中图分类号: R382.312

文献标识码: B

Evaluation of Transfection Effectiveness Using Fluorescein-labelled Oligonucleotides and Entraster-R siRNA Transfection into *Plasmodium falciparum*

ZHOU Hong-chang^{1*}, GAO Yu-hui², SHAO Sheng-wen¹, ZHANG Hui¹, ZHANG Ting¹

(1 Department of Pathogen Biology & Immunology, Faculty of Medicine, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000, China; 2 Department of Microbiology and Parasitology, School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

【Abstract】 The cultured *Plasmodium falciparum* parasites were synchronized twice by 5% sorbitol treatment twice (8-hour window), and then incubated at 37 °C for 16 h. Parasites were transfected with fluorescein-labelled oligonucleotides (group A) or fluorescein-labelled oligonucleotides+Entraster-R siRNA transfection reagent (group B). After 5 h a part of parasites was evaluated by fluorescence microscopy and flow cytometry. The rest of parasites were washed with RPMI 1640 medium, and then incubated with 500 μl new medium containing 2% fresh erythrocytes for another 12 h, and detected by flow cytometry. The fluorescein-labelled oligonucleotides were localized in erythrocytes in group B, but nearly no fluorescence was observed for group A. Flow cytometry analysis indicated that the transfection efficiency of group B [(47.40 \pm 3.39)%] was higher than that of group A [(0.60 \pm 0.27)%]. In the second cell cycle, the transfection efficiency in group B was (26.85 \pm 2.90)%, while that of group A was nearly zero. The results indicated that Entraster-R siRNA transfection reagent may increase the oligonucleotides transfection efficiency.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*; Transfection; Oligonucleotides

Supported by a grant of National Natural Science Foundation of China (No. 81000742)

* Corresponding author, E-mail: zhouhc529@hutc.zj.cn

疟疾是由疟原虫感染而引起的严重的寄生虫传染病, 据 2012 年 WHO 疟疾报告显示, 2010 年死亡病例约 66 万。感染

人类的几种疟原虫中, 恶性疟原虫危害最大^[1]。自 Gardner 等^[2]在 2002 年公布恶性疟原虫基因组数据以来, 疟原虫的基因功能研究取得很大进展。纵观近 10 多年的发展, 基因敲除技术是研究疟原虫基因功能的主要手段^[3], 但红内期基因敲除技术存在一定的限制, 如转染成功率低, 筛选时间长, 某些重要基因敲除后致死等^[4]。高通量测序技术的应用证明疟原虫中存在大量的正义和反义核酸序列及非编码序列, 并发挥重要的基因

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81000742)

作者单位: 1 湖州师范学院医学院病原生物与免疫学教研室, 湖州 313000; 2 中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院微生物与寄生虫学系, 北京 100005

* 通讯作者, E-mail: zhouhc529@hutc.zj.cn

表达调控功能^[59]。已有研究报道反义核酸技术在疟原虫基因功能研究中的作用^[10-15]，但大部分研究采用 Rapaport 等^[10]的方法，即采用 ³²P 和 ³H 标记技术，通过将反义核酸与疟原虫体外培养物共同孵育的方法进行，但未提及反义核酸进入疟原虫的效率。2006 年起，有报道纳米材料在该领域的应用，如 Foger 等^[16]采用阳离子纳米颗粒转染系统，利用反义核酸抑制疟原虫拓扑异构酶 II，最高抑制率可达 87%。Bruxel 等^[17]采用阳离子纳米乳转染系统可提高转染效率。本研究采用直接孵育法和纳米转染试剂法^[18,19]对寡核苷酸转染疟原虫的效率进行了比较，现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 虫株 恶性疟原虫 3D7 株由本实验室传代保种。

1.1.2 主要试剂 Albumax II 购自美国 Invitrogen 公司，含 25 mmol/L 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) 的 RPMI 1640 液体培养基 (Catalog Number 22400-089) 购自美国 Life Tech 公司；荧光染料 Hoechst 33342 购自美国 Sigma 公司，以双蒸水配成 10 mg/ml 作为储存液；山梨醇、葡萄糖、次黄嘌呤和 L-谷氨酰胺均购自上海生工生物工程有限公司；Entranster-R 转染试剂购自北京英格恩生物科技有限公司；硫代荧光标记探针 FITC-5'-CATCACCTTCACCCTCTCCA-3' 由宝生物工程 (大连) 有限公司合成，以 RPMI 1640 液体培养基配制成 20 mmol/L 的储存液，分装小管并于 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 恶性疟原虫培养和同步化 根据 Trager 等^[20]的方法，采用 0.5% Albumax II 替代人血清，进行常规培养。5% 山梨醇连续 2 次同步化之后 (窗口压缩在 8 h)，培养 16 h，恶性疟原虫基本处于大滋养体期，转移至 24 孔板中，虫血率控制在 5% 左右，血积为 1%。

1.2.2 实验分组 分为直接孵育组 (A 组) 和 Entranster-R 试剂转染组 (B 组)。A 组：10 μl 探针储存液加 40 μl RPMI 1640 培养基混匀，室温静置 30 min 后，滴加至 450 μl 恶性疟原虫培养物中，混合均匀后 37 °C 培养箱中培养 5 h。B 组：转染复合物根据 Entranster-R 转染试剂盒提供的说明书进行优化。将 10 μl 探针储存液加入 15 μl RPMI 1640 培养基，混匀；5 μl 转染试剂加入 20 μl RPMI 1640 培养基，混匀；将上述 2 种混合物合并，以加样器吹吸混匀 (≥10 次)，室温静置 30 min 后，滴加到 450 μl 恶性疟原虫培养物中，混匀后 37 °C 培养箱中继续培养 5 h。2 组重悬培养物后各取 250 μl 1 500×g 离心 3 min，收集沉淀，备用。剩余 250 μl 培养物经 RPMI 1640 培养基洗涤 1 次后，加入含 2% 新鲜红细胞的培养基 500 μl，继续培养 12 h 至第 2 个细胞周期再次收集，备用。

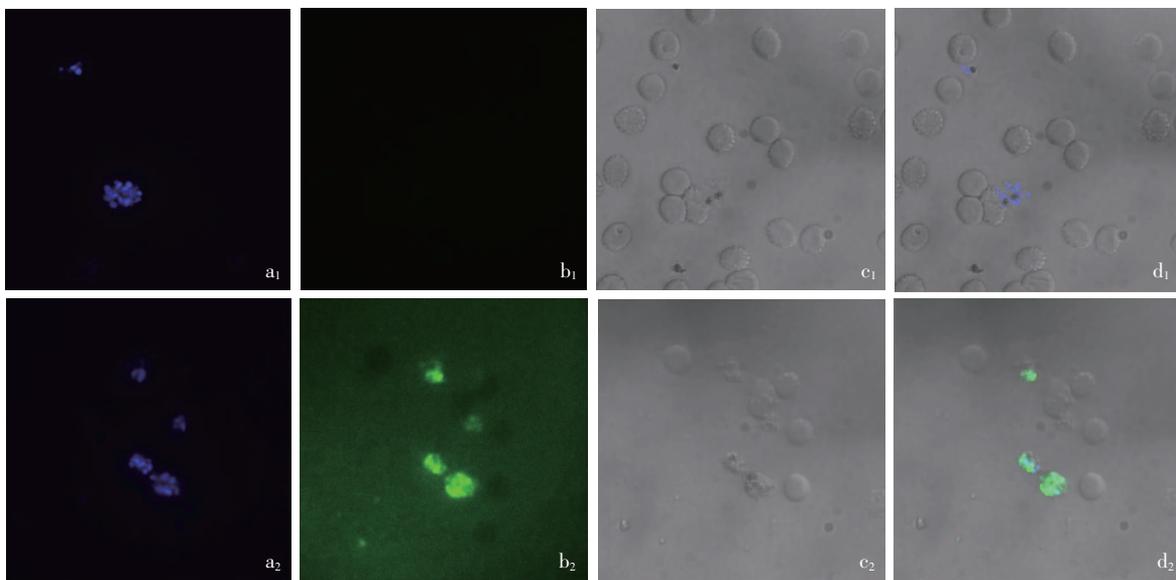
1.2.3 荧光显微镜观察 将第 1 次收集的培养物用 1×PBS 洗涤 3 次，加终浓度为 5 μg/ml Hoechst 33342 染色 5 min，取部分细胞进行荧光显微镜观察 (≥20 个视野)，拍照。

1.2.4 流式细胞仪检测转染效率 将 2 组 2 次收集的细胞分别进行流式细胞仪检测，以相同处理的红细胞作为基准，紫外激发 Hoechst 33342 检测虫血率，FITC 通道检测转染成功的感染红细胞。实验重复 3 次。

2 结 果

2.1 直接孵育法与试剂转染法对 FITC 标记探针进入感染红细胞的观察 荧光显微镜观察结果显示，直接孵育组感染红细胞中未见到 FITC 标记探针的绿色荧光，而试剂转染组感染红细胞中可见较强的绿色荧光 (图 1)。

2.2 流式细胞仪检测转染效率 实验结果显示，Entranster-R 试剂组的转染效率可达 (47.40±3.39)%，而直接孵育组约为 (0.60±0.27)%。试剂转染组在第 2 个细胞周期中仍能维持转染率约 (26.85±2.90)%。而直接孵育组在第 2 个细胞周期则几乎检测不到。



1: 直接孵育法组; 2: 试剂转染法组。

a: Hoechst 33342; b: FITC; c: 明场 (可见光下视野); d: 合并 (三图叠加效果)。

图 1 短链寡核苷酸转染恶性疟原虫 (×1000)

3 讨论

以往研究表明, 硫代反义核酸直接孵育可以抑制恶性疟原虫的生长, 但并没有直接证据表明这些反义核酸进入恶性疟原虫中, 对外源核酸分子转染疟原虫的效率、基因沉默效率等均没有定量分析^[10-17]。也有研究者认为, 在上述实验中, 硫代反义核酸抑制疟原虫生长主要是因为反义核酸的负电荷阻碍裂殖子再次入侵红细胞而引起的非特异性效果^[21]。如果反义核酸能有效地转入到感染红细胞中, 即可确定反义核酸是否直接影响疟原虫基因表达的作用、从而影响疟原虫的生长。

Entranster-R 转染试剂是一种新型的纳米转染试剂, 已广泛用于哺乳动物细胞的小分子 RNA 转染^[18,19]。研究发现, 同步化后直接进行转染, 即环期转染, 其转染效率较差 (未发表资料), 而在大滋养体期进行转染, 其转染效率较高。推测可能是因为恶性疟原虫感染红细胞后, 红细胞膜的通透性随疟原虫细胞周期的变化而逐步增大, 逐步形成一些非特异性的通道^[22], 到大滋养体时期时, 有利于转染复合物进入, 即转染效率的高低与恶性疟原虫的生长期密切相关。由于转染大滋养体, 反义核酸起作用的时间将较短, 因此, 本课题组又检测了第 2 个细胞周期, 发现还存在超过 25% 的感染红细胞被标记。因此, 在研究中可采取在连续 2~3 个周期中重复使用该方法来解决这一限制。此外, 用于小分子 RNA 转染的商品化转染试剂很多, 其中可能存在一些试剂也适合转染恶性疟原虫, 值得进行尝试。此类转染试剂的应用, 对于该领域的研究具有一定的促进作用。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. World Malaria Report 2012[R]. Geneva: WHO, 2012.
- [2] Gardner MJ, Hall N, Fung E, *et al.* Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. Nature, 2002, 419(6906): 498-511.
- [3] Limenitakis J, Soldati-Favre D. Functional genetics in Apicomplexa: potentials and limits[J]. FEBS Lett, 2011, 585(11): 1579-88.
- [4] Balu B, Adams JH. Advancements in transfection technologies for *Plasmodium*[J]. Int J Parasitol, 2007, 37(1): 1-10.
- [5] Bright AT, Winzeler EA. Noncoding RNA, antigenic variation, and the virulence genes of *Plasmodium falciparum*[J]. BMC Biol, 2011, 9: 50.
- [6] Lopez-Barragan MJ, Lemieux J, Quinones M, *et al.* Directional gene expression and antisense transcripts in sexual and asexual stages of *Plasmodium falciparum* [J]. BMC Genomics, 2011, 12: 587.
- [7] Raabe CA, Sanchez CP, Randau G, *et al.* A global view of the nonprotein-coding transcriptome in *Plasmodium falciparum*[J]. Nucl Acid Res, 2010, 38(2): 608-617.
- [8] Epp C, Li F, Howitt CA, *et al.* Chromatin associated sense and antisense noncoding RNAs are transcribed from the var gene family of virulence genes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. RNA, 2009, 15(1): 116-127.
- [9] Gunasekera AM, Patankar S, Schug J, *et al.* Widespread distribution of antisense transcripts in the *Plasmodium falciparum* genome [J]. Mol Biochem Parasitol, 2004, 136(1): 35-42.
- [10] Rapaport E, Misiura K, Agrawal S, *et al.* Antimalarial activities of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(18): 8577-8580.
- [11] Barker RH Jr, Metelev V, Rapaport E, *et al.* Inhibition of *Plasmodium falciparum* malaria using antisense oligodeoxynucleotides [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(1): 514-518.
- [12] Wanidworanun C, Nagel RL, Shear HL. Antisense oligonucleotides targeting malarial aldolase inhibit the asexual erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1999, 102(1): 91-101.
- [13] Gardiner DL, Holt DC, Thomas EA, *et al.* Inhibition of *Plasmodium falciparum* clag9 gene function by antisense RNA [J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 110(1): 33-41.
- [14] 余新炳, 方建民, 罗树红. 恶性疟原虫: 组氨酸富集蛋白基因反义寡脱氧核苷酸体外抗疟作用初步研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(4): 200-203.
- [15] Noonpakdee W, Pothikasikorn J, Nimitsantiwong W, *et al.* Inhibition of *Plasmodium falciparum* proliferation *in vitro* by antisense oligodeoxynucleotides against malarial topoisomerase II [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 302(4): 659-664.
- [16] Foger F, Noonpakdee W, Loretz B, *et al.* Inhibition of malarial topoisomerase II in *Plasmodium falciparum* by antisense nanoparticles[J]. Int J Pharm, 2006, 319(1-2): 139-146.
- [17] Bruxel F, Cojean S, Bochet A, *et al.* Cationic nanoemulsion as a delivery system for oligonucleotides targeting malarial topoisomerase II[J]. Int J Pharm, 2011, 416(2): 402-409.
- [18] Luan Y, Dai HL, Yang D, *et al.* Small interfering RNA against the 2C genomic region of coxsackievirus B3 exerts potential antiviral effects in permissive HeLa cells [J]. Virus Res, 2012, 163(1): 183-189.
- [19] Zhang MM, Liu QF, Mi SP, *et al.* Both miR-17-5p and miR-20a alleviate suppressive potential of myeloid-derived suppressor cells by modulating STAT3 expression [J]. J Immunol, 2011, 186(8): 4716-4724.
- [20] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture[J]. Science, 1976, 193(4254): 673-675.
- [21] Clark DL, Chrisey LA, Campbell JR, *et al.* Non-sequence-specific antimalarial activity of oligodeoxynucleotides [J]. Mol Biochem Parasitol, 1994, 63(1): 129-134.
- [22] Nyalwidhe J, Baumeister S, Hibbs AR, *et al.* A nonpermeant biotin derivative gains access to the parasitophorous vacuole in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes permeabilized with streptolysin O[J]. J Biol Chem, 2002, 277(42): 40005-40011.

(收稿日期: 2013-06-20 编辑: 张争艳)