

## 用于遗传操作的日本血吸虫童虫体外培养方法的研究

汪章勋, 赵静, 邹膺, 潘卫庆\*

**摘要** :目的 建立日本血吸虫机械断尾尾蚴制备的童虫的体外培养,并用于相关的遗传操作。方法 采用常规 1640 培养基和添加激素等成分,建立日本血吸虫机械童虫的体外培养,并采用电穿孔技术将外源的小 RNA 分子导入到日本血吸虫机械童虫。结果 成功体外连续培养了 14d 的日本血吸虫机械童虫,并建立了电穿孔技术将小 RNA 分子导入到日本血吸虫机械童虫的方法。结论 建立的日本血吸虫机械童虫体外培养方法和转染小 RNA 分子的技术为血吸虫基因功能研究奠定了基础。

**关键词** :日本血吸虫;机械童虫;体外培养;电穿孔

中图分类号:R532.21 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)2-171-03

Study on culture for genetic manipulation of schistosomula of *Schistosoma japonicum*. WANG Zhang-xun, ZHAO Jin, ZOU Ying et al. (Institute of Infectious Disease and Vaccine Development, Tongji University, Shanghai 200092, P. R. China; Corresponding author: PAN Wei-qing, E-mail: wqpan0912@yahoo.com.cn)

**Abstract** Objective To establish in vitro cultivation of *Schistosoma japonicum* schistosomula transformed mechanically from cercariae and its application in genetic manipulation. Methods The schistosomula were mechanically transformed from cercariae and cultured using RPMI 1640 medium supplemented with hormone, etc. The transfection of small RNAs to schistosomula of *S. japonicum* was carried out by electroporation. Results The schistosomula were successfully maintained for 14 days in vitro. Methods for transfection of small RNAs were established for genetic manipulation in *S. japonicum*. Conclusion The methods established for in vitro culture of schistosomules and technique for transfection of small RNAs will provide a basis for study on the gene function of schistosome.

**Key words**: *Schistosoma japonicum*; Schistosomula; In vitro culture; Electroporation

最近,日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)和曼氏血吸虫(*S. mansoni*)基因组草图已经发布<sup>[1,2]</sup>,这使得分析这两种重要病原体相关基因的功能变得尤为紧迫。目前,由于血吸虫生活史复杂、缺乏连续的完整生活史体外培养以及尚无建立体外培养的细胞系等,这些已严重阻碍并影响了血吸虫基因功能的研究进展。

为了深入研究血吸虫相关基因的功能,已经有几个不同的生活史阶段(例如虫卵、胞蚴、童虫和成虫阶段)能够在体外短期或者长期地培养,并被应用于相关的遗传操作。例如,国外一些实验室已尝试了将 DNA 或 RNA 片段导入体外培养的不同生活史阶段的血吸虫,包括采用粒子炮轰、电转、转座子介导以及反转录病毒转基因等方法<sup>[3-5]</sup>,并且证明了曼氏血吸虫的虫卵、胞蚴、童虫和成虫阶段可以表达异源性基因<sup>[6]</sup>。此外,作为一种重要的探索基因功能的方法, RNA 干扰技术已经应用于研究多个血吸虫相关基因功能。在曼氏血吸虫中,有文献报道成功利用 siRNA (Short interfering RNAs, 20-30nt) 进行 RNA 干扰研究<sup>[7]</sup>。

本课题旨在建立分离和培养日本血吸虫机械童虫的方法,并进一步探索利用电穿孔的方法将外源的小 RNA 分子导入到体外培养的血吸虫童虫中以进行相关的遗传操作。

### 1 材料与方法

1.1 虫株及阳性钉螺 日本血吸虫(中国大陆株)尾蚴及日本血吸虫感染阳性钉螺由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所钉螺室提供。

1.2 主要试剂与仪器 RPMI 1640 培养基粉剂、谷氨酰胺、水解乳清蛋白、次黄嘌呤、氯化可的松和胰岛素均购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自 Gibco 公司。Genepluser Xcell 电转仪:Bio-Rad;倒置荧光显微镜:Nikon 公司。

主要培养成分如表 1 所示,其中某些成份是根据 Basch 的 M169 培养基,以利于较长时间的体外培养血吸虫童虫<sup>[8]</sup>。

以上按照 1L 的总体积配制,高压过滤器过滤上述培养基, 20℃ 保存备用。胎牛血清,用时按照 10% 添加。

基金项目 国家重点基础研究发展计划 - 973 项目基金资助(No.2007CB513100)

作者单位 同济大学传染病与疫苗研究所,上海 200092

作者简介 汪章勋,男,汉族,博士研究生,主要从事血吸虫分子生物学研究。

\* 通讯作者 E-mail: wqpan0912@yahoo.com.cn

表 1 部分修改的 M169 培养液配制

Table 1 Composition of modified M169 medium

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| 1640(固体)(Solid)         | 10.4g       |
| 谷氨酰胺 Glutamine          | 0.3g        |
| 碳酸氢钠 Sodium bicarbonate | 2.2g        |
| Hepes                   | 2.4g        |
| 水解乳清蛋白 Lactalbumin      | 1g          |
| 次黄嘌呤 Hypoxanthine       | 0.5ml(1mM)  |
| 5-羟色胺 Serotoni          | 1ml(1mM)    |
| 氢化可的松 Hydrocortisone    | 1ml(1mM)    |
| 胰岛素 Insulin             | 1ml(8mg/ml) |

### 1.3 方法

1.3.1 收集尾蚴 洗涤液的配制 0.5%水解乳蛋白的欧氏液加双抗,置 4℃冰箱待用。尾蚴用盖玻片粘贴法收集:由钉螺室提供的新鲜尾蚴,经贴片置于洗涤液中冰上放置 0.5h,然后经 3 000rpm 3min 反复数次离心后集中于 50ml 大离心管底,备用。

1.3.2 机械童虫的制备 根据 Basch 等的机械转变方法<sup>[8]</sup>。用吸管吸出已集中沉于大离心管底的尾蚴团,置于一新 Eppendorf 管中加入洗涤液重悬后,再离心洗涤数次,弃去上清液,将管底尾蚴加少量部分修改的 M169 培养液(其配方如表 1 所示)重悬,吸入 5ml 注射器中,排尽空气,套上连体针头,在其另一端也套上注射器,并来回反复推压尾蚴 20 次左右,镜检断尾率可达 99%以上,尾蚴经机械断尾方法转变成的童虫简称机械童虫(Schistosomula);将机械童虫置于部分修改的 M169 培养液,在 37℃培养箱内孵育 3h,即可用于电穿孔(Electroporation)。或者按照下述方法进行体外连续培养。

1.3.3 体外连续培养 6 孔板中置 2ml 的部分修改的 M169 培养液,每孔约 1000 条童虫,在 37℃、5%二氧化碳培养箱内进行培养,以后每周置换一次新鲜培养基,置换培养基前,将新鲜培养基置二氧化碳培养箱内预温半小时。

1.4 小 RNA 的化学合成 本实验中, FAM(Carboxy fluorescein, 羧基荧光素)标记的通用阴性对照小 RNA 由上海 GenePharma 公司合成,通过标记荧光,可以方便地在倒置荧光显微镜下观察转染情况并用作细胞内定位。

1.5 机械童虫电穿孔 经过 37℃培养 3h 的机械童虫,以部分修改的 M169 培养基洗涤 2 次后,重悬稀释至 2 000 条/50μl, 50μl 悬液全部转移至 4mm 电极杯中,同时加入 2.5μg 相应的小 RNA 分子,采用 Bio-Rad 的 Genepluser Xcell 电转仪,按以下条件进行电转: 50μl 电转体系,电压 125V,时间 20ms,电击一次。转

染后或者 1d 后用倒置荧光显微镜观察荧光在童虫体内的分布情况,或者以 M169 完全培养基(含 10%胎牛血清,及双抗),置 37℃培养箱进行体外连续培养。

## 2 结果

2.1 机械童虫体外连续培养观察 根据文献,结合本实验室的情况,选择部分修改的根据 Basch M169 培养液作为培养基,以较好模拟在宿主体内的环境条件。日本血吸虫机械童虫经由 1.3.3 所述方法连续培养,生长状态良好。在培养期间维持恒定的培养条件,并在平行一致的条件下进行连续体外培养。结果如图 1(见封 3)所示分别为在体外培养了 7d 和 14d 的日本血吸虫童虫;其中 7d 时基本没有明显可见的形态变化,14d 时体长增长了约 2 倍,具有显著的形态学特征变化,但存在个体发育不一致的情况。

2.2 用 FAM 荧光标记小 RNA 电转染血吸虫童虫 为了分析血吸虫对小 RNA 分子的摄入情况,本研究中我们采用电穿孔的方法,将 FAM 荧光标记的小 RNA 分子转染日本血吸虫机械童虫,结果如图 2(见封 3)所示:小 RNA 分子在虫体内广泛分布,主要分布于盲肠(Caecum)和吸盘腺体(Acetabular gland)。

## 3 讨论

本文吸取和综合了国内外不同实验室建立的日本血吸虫和曼氏血吸虫童虫体外培养的方法,通过在培养基中添加不同营养成分以及机械童虫制备与培养方法上的改进,成功连续地在体外培养了 14d 的日本血吸虫机械童虫。在为期 14d 的血吸虫生长发育状况连续观察中,童虫体长有明显的增长,这些结果一致于曼氏血吸虫体外培养的结果<sup>[9]</sup>,这表明本文报道的方法适合用于日本血吸虫童虫的体外短期连续培养。此外,我们发现电穿孔后小 RNA 分子在虫体内广泛分布,主要分布于盲肠和吸盘腺体;这与 Krautz-Peterson 等人的报道结果一致<sup>[7]</sup>。

我们选择通过机械断尾尾蚴制备而来的童虫(Schistosomula)用于进行 RNA 干扰技术研究分析血吸虫基因功能,主要是因为相对于成虫,它们更容易获得成百上千的数量,也更容易进行高通量的操作<sup>[10]</sup>。针对机械童虫,目前在体外童虫培养的培养基,转染小 RNA 策略以及时间、剂量依赖方面都有大量研究<sup>[11]</sup>,此外,机械童虫可以方便地提取总 RNA 和蛋白以分析 RNA 干扰前后目的基因在转录和翻译水平的变化;特别地,转染后的机械童虫可以通过注射的方法进入动物宿主体内以进一步进行体内功能研究。因此以机械童虫为研究对象,也就更加容易促进我们深入

利用 RNA 干扰技术进行血吸虫基因功能的研究。

目前, RNA 干扰技术在日本血吸虫中也已经成功地应用。例如, 国内学者程国峰等<sup>[12]</sup>根据日本血吸虫抱雌沟蛋白 mRNA 序列设计了 siRNA 分子, 化学合成了该分子后通过体表渗透法(soaking)成功地沉默了抱雌沟蛋白的表达, 并证明此干扰特征是剂量依赖型。为了进一步提高 siRNA 的干扰效果, Krautz-Peterson 等<sup>[7]</sup>以曼氏血吸虫组织蛋白酶 B1 为靶基因, 通过比较体表渗透法与电穿孔法 (Electroporation) 以研究最优的曼氏血吸虫 RNA 干扰条件, 结果表明电穿孔法比体表渗透法能更好地导入 siRNA 分子, 从而获得更好的基因沉默效果。因此, 本研究参照文献报道的电穿孔曼氏血吸虫童虫时的参数<sup>[3]</sup>, 我们选定 50 $\mu$ l 电转体系, 电压 125V, 时间 20ms 为本次实验的标准参数来进行实验。

本研究成功将日本血吸虫机械童虫在体外连续培养了 14d, 并将小 RNA 分子导入到血吸虫机械童虫体内, 为进一步深入研究血吸虫相关基因的功能奠定了重要的基础。

#### 参考文献:

- [1] Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni* [J]. *Nature* 2009 460(7253) :352–U365.
- [2] Zhou Y, Zheng HJ, Chen YY et al. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay [J]. *Nature* 2009 460(7253) :345–U356.
- [3] Correnti JM, Pearce EJ. Transgene expression in *Schistosoma mansoni*: introduction of RNA into schistosomula by electroporation [J]. *Mol*

*Biochem Parasit* 2004 137(1) :75–79.

- [4] Davis RE, Parra A, LoVerde PT et al. Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment [J]. *P Natl Acad Sci USA* 1999 96(15) :8687–8692.
- [5] Kines KJ, Mann VH, Morales ME et al. Transduction of *Schistosoma mansoni* by vesicular stomatitis virus glycoprotein-pseudotyped Moloney murine leukemia retrovirus [J]. *Exp Parasitol* 2006 112(4) :209–220.
- [6] Rinaldi G, Morales ME, Alrefaei YN et al. RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs [J]. *Mol Biochem Parasit* 2009 167(2) :118–126.
- [7] Krautz-Peterson G, Radwanska M, Ndegwa D et al. Optimizing gene suppression in schistosomes using RNA interference [J]. *Mol Biochem Parasit* 2007 153(2) :194–202.
- [8] Basch PF. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing [J]. *J Parasitol* 1981 67(2) :179–185.
- [9] Morales ME, Rinaldi G, Gobert GN et al. RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade [J]. *Mol Biochem Parasit* 2008 157(2) :160–168.
- [10] Stefanie S, Dvorak J, Horn M et al. RNA interference in *Schistosoma mansoni*: schistosomula selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening [J]. *PLOS Neglect Trop D* 2010 4(10) :e850.
- [11] Mann VH, Morales ME, Rinaldi G et al. Culture for genetic manipulation of developmental stages of *Schistosoma mansoni* [J]. *Parasitology* 2010 137(3) :451–462.
- [12] Cheng GF, Fu ZQ, Lin JJ et al. In vitro and in vivo evaluation of small interference RNA-mediated gynaecophoral canal protein silencing in *Schistosoma japonicum* [J]. *J Gene Med* 2009 11(5) :412–421.

收稿日期: 2012-01-11 编辑: 崔宜庆

## 关于本刊启用“科技期刊学术不端检测系统(AMLC)”的通知

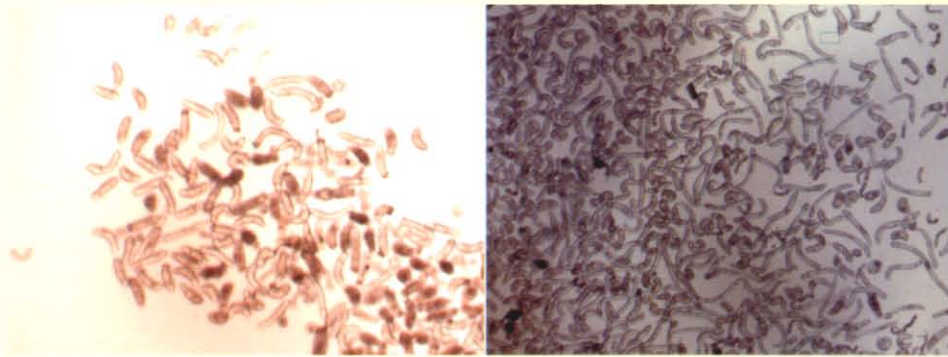
近年来, 抄袭、伪造、剽窃、不当署名、一稿多投等学术不端事件时有发生, 已引起社会各界的广泛关注。为规范学术行为, 维护学术道德, 保证稿件质量, 净化学术研究环境, 本刊编辑部已同意《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社提供的科技期刊学术不端检测系统(AMLC)对本刊已发表文献实行删除学术不端文献的办法, 对疑似学术不端文献的论文在数据库中删除。另本刊也将使用 AMLC 系统对来稿加强初审, 对检测出严重问题的稿件记录在案, 并记入黑名单, 望广大作者及读者照知, 维护良好学术环境。

AMLC 系统经国家新闻出版总署、国家科技部、全国科研诚信管理委员会等单位指导, 由《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社与清华同方知网(北京)技术有限公司共同研制开发。到目前为止, 国家知识基础设施(National Knowledge Infrastructure, CNKI)通过网络正式出版期刊 9135 种(国内正式期刊共 9541 种), 其中学术期刊 7460 种, 期刊全文文献 2480 万篇, 出版的 63 万篇优秀硕士学位论文, 8.7 万篇博士学位论文, 重要会议论文 94.7 万篇, 重要报纸 462 万篇, 重要年鉴 787 万篇, 学术引文索引数据 600 多万条, 可有效检测来稿学术不端行为。

本刊编辑部

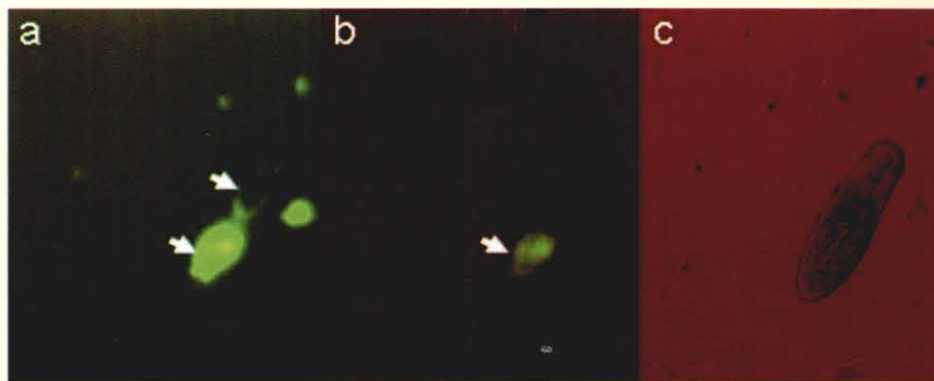


用于遗传操作的日本血吸虫童虫体外培养方法的研究  
Study on culture for genetic manipulation of schistosomula of *Schistosoma japonicum*  
(正文见171页, for text see page 171)



注: 尾蚴经机械断尾方法转变成的童虫, 分别在体外培养7d (A) 和14d (B) 时的生长发育情况。其中A和B均为100×。  
Note: The schistosomula were mechanically transformed from cercariae and cultured for 7 days (A) and 14 days (B) in vitro. Panels A to B: schistosomules viewed at 100× magnification.

图1 体外培养的日本血吸虫童虫  
Figure 1 Schistosomula of *Schistosoma japonicum* in vitro cultivation



注: 图中a和b分别代表不同曝光时间(其中a为20ms; b为5ms)所获得的荧光定位情况, 如箭头所示小RNA主要分布在盲肠和吸盘腺体; c代表白光所拍摄的童虫。  
Note: Two different exposures of the same schistosomula are shown a (20ms) and b (5ms), the arrow in a and b indicates the small RNA was mainly distributed in caecum and acetabular glands, the schistosomula screened by bright-field was shown in c.

图2 电转染FAM标记的小RNA转染效率及其血吸虫中的定位  
Figure 2 Localization of fluorescent-labeled small RNA following electroporation of schistosomula

海南省2008~2011年鲜水产品香港海鸥菌污染检测  
Survey of contamination of fresh aquatic products by *Laribacter hongkongensis* in Hainan Province in 2008~2011  
(正文见201页, for text see page 201)



图1 香港海鸥菌在血平板生长特点  
Fig.1 Growing characteristic of *Laribacter hongkongensis* in blood agar plate

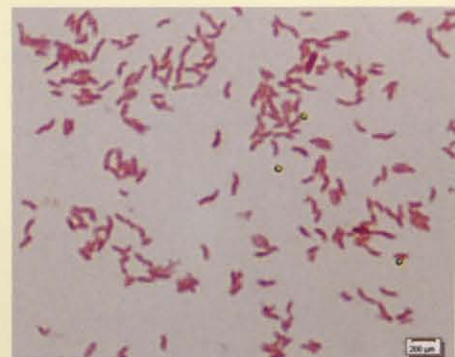


图2 香港海鸥菌在显微镜下的形态(10×100倍)  
Fig.2 Morphological characteristic of *Laribacter hongkongensis* under Microscope (10×100 double)



图3 香港海鸥菌在API 20NE和API 20E的生化反应特征  
Fig.3 Biochemical reaction characteristic of API20NE and API20E of *Laribacter hongkongensis*