



肖淑婷,江新成,王萌,等.弓形虫表面抗原相关序列蛋白 *Tgsrs51* 基因的生物学功能研究[J].江西农业大学学报,2026,48(1):196–207.

XIAO S T,JIANG X C,WANG M,et al.Biological function study on surface antigen-related protein *Tgsrs51* of *Toxoplasma gondii*[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2026,48(1):196–207.

弓形虫表面抗原相关序列蛋白 *Tgsrs51* 基因的生物学功能研究

肖淑婷^{1,2},江新成^{1,2},王 萌²,邬向东¹,李谷月¹,陈小庆^{1*}

(1.江西农业大学 动物科学技术学院/江西省动物疫病诊断与防控重点实验室,江西 南昌 330045;2.中国农业科学院 兰州兽医研究所/动物疫病防控全国重点实验室/甘肃省动物寄生虫病重点实验室,甘肃 兰州 730046)

摘要:【目的】弓形虫是一种专性细胞内寄生的原虫,可感染包括人类在内的所有温血动物。目前,弓形虫病的治疗缺乏特效药物,传统药物治疗存在毒副作用大、疗效有限等问题。因此,开发安全有效的疫苗成为防控该病的重要策略。弓形虫表面抗原相关序列蛋白(SRSs)在虫体的毒力、入侵与黏附、免疫调节等方面均发挥着关键作用。其中,SRS51蛋白(TGME49_308840)作为SRS家族成员之一,具体生物学功能尚不明确,具有潜在的研究价值。旨在探究弓形虫SRS51蛋白的生物学功能及作用机制,为开发安全有效的弓形虫疫苗提供参考依据。【方法】以弓形虫II型 Pru株为研究对象,采用CRISPR-Cas9基因编辑和无缝克隆技术,构建 *Tgsrs51* 基因缺失株(PruΔ*srs51*),分别通过噬斑试验、细胞入侵与增殖试验、逸出试验、体外缓殖子转化试验以及小鼠毒力试验,系统评估弓形虫SRS51蛋白的生物学功能。【结果】*Tgsrs51* 基因缺失后,弓形虫的噬斑面积和数量显著减少($P<0.0001$),降低了微线体蛋白MIC2的表达,入侵和胞内增殖能力明显下降($P<0.001$),对小鼠的致病力也有所减弱($P<0.05$),但不影响虫体的逸出能力和体外缓殖子转化($P>0.05$)。【结论】SRS51蛋白缺失可显著削弱弓形虫的急性毒力及慢性包裹形成能力,可作为弓形虫弱毒疫苗候选基因。

关键词:弓形虫;SRS51蛋白;CRISPR/Cas9;基因敲除;毒力

中图分类号:S852.729;R382.5

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号:1000-2286(2026)01-0196-12

CSTR:32399.14.aauj.2026018



Biological function study on surface antigen-related protein *Tgsrs51* of *Toxoplasma gondii*

XIAO Shuting^{1,2},JIANG Xincheng^{1,2},WANG Meng²,WU Xiangdong¹,
LI Guyue¹,CHEN Xiaoqing^{1*}

收稿日期:2025-10-20 修回日期:2025-11-11 接受日期:2025-11-16

基金项目:国家自然科学基金青年项目(32202839)和江西省科技计划青年项目(S2024QNJL1431)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(32202839)and the Jiangxi Provincial Science Foundation for Youths(S2024QNJL1431)

作者简介:肖淑婷,硕士生,orcid.org/0009-0003-7883-4988,1806961062@qq.com;*通信作者:陈小庆,副教授,博士,主要从事畜禽寄生虫病研究,orcid.org/0000-0002-5181-3728,chenxiaqing2013jl@163.com。

©《江西农业大学学报》编辑部,开放获取CC BY-NC-ND协议

(1.Key Laboratory for Animal Health of Jiangxi Province, College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2.State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: [Objective] *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite that infects all warm-blooded animals, including humans. Currently, there is a lack of specific drugs for the treatment of toxoplasmosis, and traditional drug therapy faces issues such as significant toxic side effects and limited efficacy. Therefore, developing a safe and effective vaccine has become an important strategy for preventing and controlling the disease. Surface antigen-related sequence proteins (SRSs) of *T. gondii* play a crucial role in virulence, invasion and adhesion, and immune regulation of the parasite. Among them, SRS51 protein (TGME49_308840), as a member of the SRS family, has potential research value due to its unclear specific biological function. This study aims to explore the biological function and mechanism of action of *Toxoplasma gondii* SRS51 protein, providing a reference for the development of safe and effective *T. gondii* vaccines. [Method] With the *Toxoplasma gondii* type II Pru strain as the subject, CRISPR-Cas9 gene editing and seamless cloning techniques were employed to construct a *Tgsrs51* gene-deleted strain (Pru Δ srs51). The biological function of the *Toxoplasma* SRS51 protein was systematically evaluated through plaque assay, cell invasion and proliferation assay, escape assay, *in vitro* bradyzoite conversion assay, and mouse virulence assay. [Result] After the deletion of the *Tgsrs51* gene, the plaque area and number of *T. gondii* significantly decreased ($P < 0.0001$). The deletion of the *Tgsrs51* gene caused a decrease in MIC2 protein expression. The invasion and proliferation abilities were significantly reduced ($P < 0.001$). The pathogenicity to mice also weakened ($P < 0.05$), but it did not affect the escape ability and *in vitro* tachyzoite transformation of the parasite ($P > 0.05$). [Conclusion] SRS51 protein deletion significantly reduces acute virulence and chronic cyst formation. It can be considered as a candidate gene for a weakened *T. gondii* vaccine.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; SRS51 Protein; CRISPR/Cas9; gene knockout; virulence

【研究意义】刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种呈全球性分布的严格专性细胞内寄生原虫,属于顶复门(Apicomplexa)、球虫亚纲(Coccidiasina)、真球虫目(Eucoccidiorida)、肉孢子虫科(Sarcocystidae)、弓形虫属(*Toxoplasma*)^[1],是人兽共患病弓形虫病的病原体,可感染包括人类及所有的温血脊椎动物^[2-3]。据估计,全球约1/3人口为隐性携带者^[4],我国人群平均感染率为7.88%,感染者逾1亿,且呈逐年上升趋势^[5]。健康个体多呈无症状带虫状态,但免疫功能低下者(如艾滋病、器官移植及恶性肿瘤患者)可诱发致命性脑炎或全身播散性感染;孕妇感染则可通过胎盘垂直传播,造成流产、死胎或胎儿先天畸形^[4-6]。在我国孕妇的血清检测中,弓形虫感染的阳性检出率为4.3%~26.1%^[7]。我国畜禽感染弓形虫的情况也尤为严重,其中猪的平均感染率为7.19%~35.69%,羊为4.38%~39.13%。患病动物经常表现的临床症状是精神沉郁、食欲减退、呼吸困难、高热及神经症状等,孕畜被感染后可发生流产或死胎,严重威胁公共卫生与畜牧业生产安全^[4,6]。弓形虫生活史复杂,包括在猫科动物肠道内的有性生殖阶段和在多种宿主体内的无性增殖阶段。速殖子是其主要致病形态,可入侵所有有核细胞并在体内扩散,而缓殖子形成的组织包囊则是慢性感染和垂直传播的根源。目前临床首选的磺胺嘧啶-乙胺嘧啶联合疗法存在毒副作用大、耐药率上升、对包囊无效等缺陷,因此开发安全有效的疫苗被视为防控弓形虫病的根本策略^[8-10]。【前人研究进展】弓形虫表面抗原相关序列(surface antigen glycoprotein 1-related sequences, SRSs)超家族是弓形虫入侵宿主和免疫逃逸的关键分子^[11-12]。SRS29B(SAG1)是弓形虫在速殖子阶段表达最丰富、最重要的表面蛋白之一,在干扰素- γ (IFN γ)等免疫压力下,弓形虫对宿主细胞附着和生存能力至关重要^[13-14]。SRS57(SAG3)作为介导宿主细胞识别和附着的配体,缺失株与野生型株相比,毒力减弱,入侵率显著降低^[15]。弓形虫入侵宿主细胞的先决条件就是黏附到宿主细胞表面,在这个过程中,弓形虫表面抗原(SAGs)首先识别宿主细胞膜表面受体,随后大量分泌微线体蛋白(microneme proteins, MICs)至虫体顶

端或膜表面^[16]。微线体蛋白由多种跨膜蛋白和黏附蛋白组成,在寄生虫入侵宿主细胞及致病过程中发挥多重核心作用。目前已经鉴定出几种弓形虫中的微线体蛋白,包括MIC1、MIC2、MIC3、MIC4、MIC6、MIC11,都在一定程度上影响了弓形虫的入侵能力^[17-21]。MIC2是一个跨膜的黏附蛋白,该蛋白可以与宿主细胞受体和肌动-肌球蛋白骨架结合,产生入侵动力,当MIC2表达耗竭时,虫体的黏附、滑行运动能力、入侵效率,以及对小鼠的毒力均显著降低^[19,22]。

【本研究切入点】SRS51蛋白与经典毒力标志蛋白SAG1/SRS29B、BSR4具有高度序列同源性,其中41个氨基酸完全保守,三维结构预测显示其表面存在明显的黏附凹槽,可能作为宿主细胞结合位点参与侵袭^[23]。前期本实验室团队通过对不同基因型弓形虫虫株的基因组和转录组进行高通量测序^[24],并结合ToxoDB数据库发布的基因组序列比对分析,发现*Tgsrs51*基因相对于强毒株而言其在弱毒株中的表达存在显著差异,推测该蛋白表达水平可能对不同基因型弓形虫毒株差异毒力的形成有一定的贡献。然而,SRS51的生物学功能及其在致病机制中的作用迄今未见系统报道。【拟解决的关键问题】本研究利用CRISPR-Cas9技术构建II型Pru株的*Tgsrs51*基因缺失株,通过体外噬斑、入侵、增殖、逸出、缓殖子转化及小鼠毒力等试验,系统评估其缺失后的表型变化,旨在阐明SRS51蛋白在虫体入侵与毒力调控中的功能,为解析弓形虫不同基因型间毒力差异的分子机制提供新线索,也可作为新型疫苗和诊断靶点的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 虫株、细胞与实验动物

弓形虫II型Pru株和人包皮成纤维细胞(HFF)由兰州兽医研究所保存;SPF级6~8周龄昆明雌鼠60只,体质量(18.7 ± 0.89)g,购自兰州兽医研究所实验动物中心,生产许可号:SCXK(甘)2020-0002。饲养地点在寄生虫楼东侧动物房,环境温度为22~24℃,适应性饲养时间为1周,使用许可号:SCXK(甘)2020-0010,中国农业科学院兰州兽医研究所伦理审查编号:LVRIAEC-2024-105。

1.2 动物分组与处理

实验动物随机选取60只6~8周龄的雌性SPF级昆明小鼠,随机分成10组,每组6只,将弓形虫Pru野生型与*Tgsrs51*基因敲除株分别以 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 2×10^2 个速殖子的剂量进行腹腔注射感染小鼠。各组小鼠每日饲喂等量常规饲料,自由饮水。试验采用细胞破碎法收集处于逸出前状态的速殖子并经血球计数板计数后接种,每日观察记录小鼠发病与死亡情况。对感染30d后存活的低剂量组小鼠,采用颈椎脱臼法处死,采集脑组织研磨制成PBS匀浆,样品于4℃暂存或-80℃冻存备用。

1.3 主要试剂

DMEM高糖培养基、胎牛血清FBS和0.25%胰酶Trypsin-EDTA购自美国Gibco公司(Grand Island Biological Company);乙胺嘧啶购自美国Sigma公司(Sigma-Aldrich);青霉素G钠盐、硫酸链霉素、4%组织细胞固定液、PBS片剂购自北京索莱宝科技有限公司;DH-5 α 感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技有限公司;质粒小提试剂盒及细胞、组织、血液DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA纯化回收试剂盒购自美国Omega(Omega Engineering);其余试剂均为国产分析纯。

1.4 敲除株构建

参考Wang等^[16]报道的相关方法进行敲除株的构建。CRISPR-Cas9同源重组技术构建完全缺失株的原理如图1所示。在弓形虫数据库ToxoDB(<http://toxodb.org>)中录入*Tgsrs51*基因的ID编号,从而获取与之对应的基因序列。借助E-CRISPR网站对sgRNA进行设计,并挑选出评分最高的sgRNA。以pSAG1-Cas9-sgUPRT质粒作为模板,选取目的基因的sgRNA-F和sgRNA-R作为引物,运用PCR扩增技术,将pSAG1-Cas9-sgUPRT质粒中的sgUPRT替换成*Tgsrs51*基因的sgRNA。对上述PCR产物酶切、环化后利用DH5 α 感受态细胞进行转化操作,挑选单个菌落进行测序,测序结果比对正确的菌落即为阳性菌落。

以pUC19质粒为模板,用pUC19-F和pUC19-R引物扩增出pUC19载体片段。再通过用pUPRT-DHFR-D质粒作模板,用DHFR-F和DHFR-R引物扩增出DHFR片段。利用*srs51-U3-F*、*srs51-U3-R*和*srs51-U5-F*、*srs51-U5-R*引物,以Pru虫株DNA为模板,扩增目的基因*Tgsrs51*的U3、U5同源臂片段。扩增完成后,分别对同源臂片段、DHFR片段以及pUC19片段进行核酸凝胶电泳,再胶回收纯化。将胶回收

产物进行酶切,对酶切产物用 ClonExpress MultiS 一步克隆法进行无缝克隆连接,连接产物进行转化操作,挑选单个菌落进行测序,测序结果比对正确的菌落即为阳性菌落,将阳性菌落扩大培养后提取质粒。以获得的质粒为模板,再利用 *srs51*-KZ-F 和 *srs51*-KZ-R 引物扩增出 5'UTR-DHFR-3'UTR 同源臂片段,经胶回收纯化后置于-20℃保存备用。然后,将带有目的基因靶点序列的质粒与抗性同源臂片段混合,预热。随后通过电转染将二者导入弓形虫 Pru 速殖子中,用乙胺嘧啶筛选阳性虫株,单克隆筛选后提取虫株 DNA,用 *srs51*-PCR1-F 和 PCR1-R、*srs51*-KO-F 和 *srs51*-KO-R、PCR3-F 和 *srs51*-PCR3-R 3 对引物进行 PCR 验证,条带大小及测序结果正确的虫株即为缺失株。在构建该质粒过程中所使用的相应引物具体信息列于表 1。

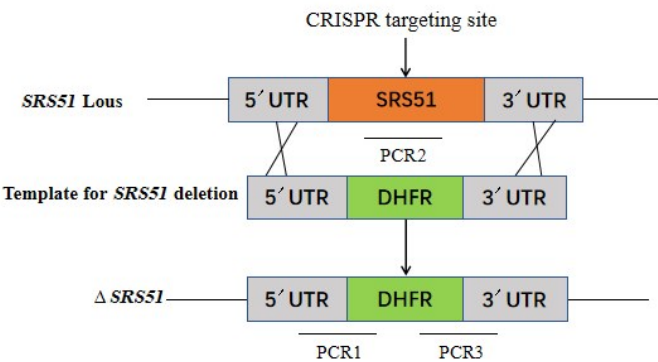


图 1 *Tgsrs51* 基因敲除示意
Fig.1 Schematic diagram of *Tgsrs51* gene knockout

表 1 用于构建敲除株的特异性引物

Tab.1 Specific primers used for constructing knockout strains

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
SgRNA- <i>srs51</i> -F	GGAGACCAGCAACCACGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
SgRNA-R	AACTTGACATCCCCATTTC
<i>srs51</i> -KZ-F	GAGGCACTCGTCTCACATTTC
<i>srs51</i> -KZ-R	CGTCTTTGTTTCCCGTATCC
pUC19-F	TGTGAAATTGTTATCCGCTC
pUC19-R	AACGTCGTGACTGGGAAAACC
DHFR-F	AAGCTTCGCCAGGCTGTAAATCC
DHFR-R	GAATTCATCCTGCAAGTGCATAG
<i>srs51</i> -KO-F	GTATGGAAGACTTTTGACACGC
<i>srs51</i> -KO-R	CCTGAGTACATCCGACAATGAAT
<i>srs51</i> -PCR1-F	AACGAGTGACGAAAACGGAAGTGG
PCR1-R	GCCAAAGTAGAAAGGAATTAGCAT
PCR3-F	TGACGCAGATGTGCGTGTATCCAC
<i>srs51</i> -PCR3-R	ACCGTTTGCTCCCCTTCTACCATT
<i>srs51</i> -U3-F	CTATGCACCTGCAGGATGAATTCACGAGCAGTAGTCCCAGTTCT
<i>srs51</i> -U3-R	GAGCGGATAACAATTTACACGTCTTTGTTTCCCGTATCC
<i>srs51</i> -U5-F	GGTTTTCCAGTCACGACGTTGAGGCACTCGTCTCACATTTC
<i>srs51</i> -U5-R	GGATTACAGCCTGGCGAAGCTTGTGTTTGTGTCAGTCATCGC

1.5 弓形虫 Pru 虫株 SRS51 蛋白的基因敲除株的生物学功能分析

1.5.1 噬斑试验

参考 Wang 等^[16]报道的相关方法进行噬斑试验。当弓形虫 Pru 野生型与 *Tgsrs51* 基因敲除株速殖子达

到即将逸出的状态时裂解细胞,随后用血球计数板对2种虫株的速殖子进行计数,按照每孔200个速殖子的密度接入12孔板中。7~8 d后在显微镜下进行观察,当出现大量虫斑时固定。固定30 min后,用0.5%结晶紫染色液染色,对染色完成的12孔板拍照记录,借助ImageJ软件、GraphPad Prism 9分析图片,测定噬斑面积及大小变化。

1.5.2 入侵试验

参考Wang等^[16]报道的相关方法进行入侵试验。当弓形虫Pru野生型与*Tgsrs51*基因敲除株速殖子达到即将逸出的状态时裂解细胞,随后用血球计数板对2种虫株的速殖子进行计数。每个共聚焦培养小皿接种 2×10^6 个速殖子,在37℃、5% CO₂环境下培养1 h后固定,PBS清洗后,加入160 μL鼠抗SAG1(1:1 000),37℃避光孵育2 h后PBS清洗。加160 μL Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG(H+L)(1:500),37℃避光孵育1 h后PBS清洗。加入400 μL 0.1% Triton-100室温下避光穿透30 min后PBS清洗。加入200 μL兔抗IMC1(1:500),37℃避光孵育2 h后用PBS清洗。加入160 μL Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(H+L)(1:500),37℃避光孵育90 min后PBS清洗。最后在共聚焦荧光显微镜下,观察记录绿色荧光和红色标记的虫体数量。全部弓形虫呈绿色,未入侵的呈红色,据此计算弓形虫入侵率(入侵率=入侵的弓形虫数/全部的弓形虫数 $\times 100\%$)。

1.5.3 微线体分泌试验

参考郑斌等^[16]报道的相关方法进行微线体分泌试验。当弓形虫Pru野生型与*Tgsrs51*基因敲除株速殖子达到即将逸出的状态时裂解细胞,随后用血球计数板对2种虫株的速殖子进行计数。取 2×10^7 个速殖子离心后弃上清,用1 mL DMEM培养基重悬速殖子沉淀。设置诱导组与对照组,诱导组:向200 μL速殖子中添加200 μL 37℃的DMEM培养液(含2%无水乙醇、6% FBS),混匀。对照组:向加入200 μL速殖子悬液中加入200 μL DMEM培养液,混匀。将2组样品置于37℃、5% CO₂培养箱孵育5 min后立即冰浴冷却5 min,离心收集虫体,弃去上清。向速殖子沉淀中加入100 μL RIPA裂解液、1 μL蛋白酶抑制剂及1 μL EDTA,冰上裂解1 h。裂解后离心,取上清和未裂解前的上清100 μL混合,加入33.3 μL 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液,100℃加热10~15 min,进行SDS-PAGE电泳,在浓缩胶阶段以80 V电压运行,待样品进入分离胶后,将电压调至120 V继续电泳。电泳结束后,按照蛋白胶的大小裁剪相应大小的PVDF膜,使用半干转印装置转膜10 min,迅速将转好的PVDF膜放入5%的脱脂奶粉(1 $\times$ PBST配制)中封闭2 h。封闭完成后用1 $\times$ PBST清洗3次,每次15 min,清洗后用1%脱脂奶粉,分别以1:500稀释兔抗弓形虫ALD内参抗体和1:1 000稀释兔抗MIC2抗体,4℃孵育过夜。将PVDF膜在PBST中清洗3次,每次15 min,再往抗体孵育盒中加山羊抗兔IgG(1:5 000)孵育1.5 h。时间结束后使用1 $\times$ PBST快速洗3~4次,每次洗10 min。清洗结束后加入提前配好的ECL发光液,避光放置一段时间后,于凝胶成像仪中进行显影。

1.5.4 增殖试验

参考Wang等^[16]报道的相关方法进行增殖试验。当弓形虫Pru野生型与*Tgsrs51*基因敲除株速殖子达到即将逸出的状态时裂解细胞,随后用血球计数板对2种虫株的速殖子进行计数。每个共聚焦培养小皿接种 2×10^5 个速殖子,37℃、5% CO₂条件下培养36 h后固定。PBS清洗后穿透30 min。再用PBS清洗,加入200 μL兔抗IMC1(1:500),37℃孵育2 h。孵育结束后,再用PBS清洗。加入160 μL Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG(H+L),37℃孵育1.5 h后用PBS清洗。于激光共聚焦显微镜下选取100个纳虫泡(PV),统计各PV内含有2,4,8,16,32个速殖子的占比。

1.5.5 逸出试验

参考Wang等^[16]报道的相关方法进行逸出试验。当弓形虫Pru野生型与*Tgsrs51*基因敲除株速殖子达到即将逸出的状态时裂解细胞,随后用血球计数板对2种虫株的速殖子进行计数。每个普通小皿接种 2×10^4 个速殖子,37℃、5% CO₂条件下培养48 h。当显微镜下观察到大量PV中有8个及以上速殖子时,倒掉原有培养基,加入含3 μmol/L钙离子载体A23187的培养基。当显微镜下看到速殖子逸出后加入固定液。显微镜下选取100个PV,并记录逸出和未逸出的PV数量。逸出率=逸出的纳虫泡数/总的纳虫泡数。

1.5.6 体外缓殖子转化试验

参考Wang等^[16]报道的相关方法进行体外缓殖子转化试验。当弓形虫Pru野生型与*Tgsrs51*基因敲除

株速殖子达到即将逸出的状态时裂解细胞,随后用血球计数板对 2 种虫株的速殖子进行计数。每个普通小皿接种 1×10^3 个速殖子(设 2 组), 37°C 、5% CO_2 条件下培养 4 h。其中一组倒掉原有培养基,加入 2 mL pH 8.2 的含 1% 胎牛血清的 DMEM 诱导培养基,置于 37°C 、无 CO_2 条件下继续培养 48 h(每 24 h 进行换液),另一组在原来培养箱中培养 36 h。培养完成后固定,30 min 后 PBS 清洗,加入 400 μL 0.1% Triton-100 穿透 30 min 后再次用 PBS 清洗。加入 160 μL 兔抗 IMC1(1:500), 37°C 避光孵育 2 h 后用 PBS 清洗,加入 160 μL Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG(H+L)(1:500)和 DBA(1:500), 37°C 避光孵育 90 min 后用 PBS 清洗,激光共聚焦显微镜下计算转化率(转化率=染上 DBA 的 PV 数/总 PV 数)。

1.5.7 小鼠致病性试验

参考 Wang 等^[6]报道的相关方法进行小鼠致病性试验。当弓形虫 Pru 野生型与 *Tgsrs51* 基因敲除株速殖子达到即将逸出的状态时裂解细胞,随后用血球计数板对 2 种虫株的速殖子进行计数。将 Pru 野生株和 *Tgsrs51* 基因敲除株分别以每只小鼠 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 2×10^2 个速殖子的剂量进行腹腔注射。试验期间,每天观察小鼠,详细记录其发病情况与死亡时间。对 5×10^2 和 2×10^2 组中感染 30 d 后存活的小鼠进行处死,取出脑组织研磨,加入 1 mL PBS 制成匀浆。轻轻吹打混匀后吸取 10 μL 混合匀浆在显微镜下记录脑包囊个数,计算出每只小鼠的脑包囊个数(小鼠脑包囊数=10 μL 中脑包囊数 $\times$ 稀释倍数)。

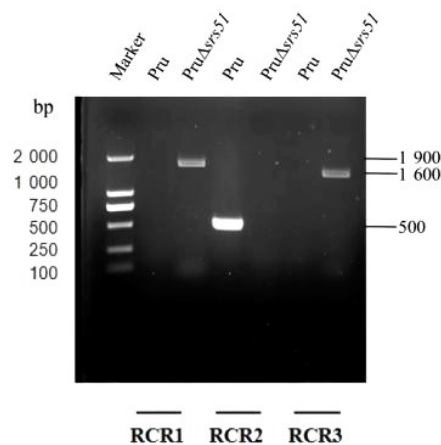
1.6 数据分析

所有试验设 3 次生物学重复,数据用 GraphPad Prism 9.5 分析,结果以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SD)表示。两组间差异用 Student's *t* 检验,多组间用单因素方差分析(one-way ANOVA),显著性标注分别为*表示 $P \leq 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$,****表示 $P < 0.0001$,ns 表示 $P > 0.05$ 。

2 结 果

2.1 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株的鉴定

相对于野生株而言,缺失株体内的 *Tgsrs51* 基因片段被抗性基因 DHFR 片段所替代,故野生型 Pru 株 PCR2 可扩出 500 bp 左右的条带,而敲除株则无。由于 DHFR 抗性基因片段被插入到野生株中,PCR1 和 PCR3 在敲除虫株中能够扩增出 1 900 bp 和 1 600 bp 左右的条带,野生株则无法扩增出条带(图 2),由此可以证实 *Tgsrs51* 基因缺失株构建成功。



M: Marker; 1: 野生株 PCR1; 2: 敲除株 PCR1; 3: 野生株 PCR2; 4: 敲除株 PCR2; 5: 野生株 PCR3; 6: 敲除株 PCR3。

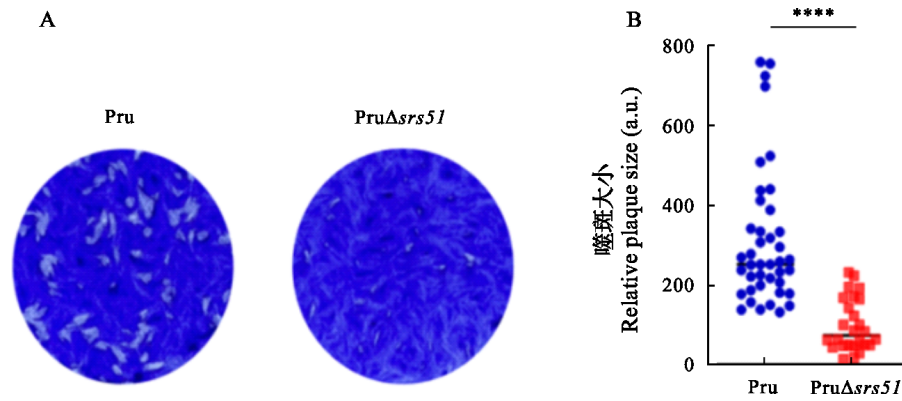
M: Marker; 1: Wild-type strain PCR1; 2: Knockout strain PCR1; 3: Wild-type strain PCR2; 4: Knockout strain PCR2; 5: Wild-type strain PCR3; 6: Knockout strain PCR3.

图 2 弓形虫 *Tgsrs51* 基因敲除株的 DNA 鉴定

Fig.2 DNA identification knockout strains of *Toxoplasma gondii* *Tgsrs51* gene

2.2 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株对噬斑形成的影响

噬斑试验结果显示, *Tgsrs51* 基因敲除株形成的噬斑面积显著低于野生株的噬斑面积($P < 0.0001$),表明敲除 *Tgsrs51* 基因后会抑制弓形虫体外生长的能力(图 3)。



A: Pru 和敲除株所形成的噬斑大小; B: Pru 和敲除株所形成的噬斑面积。****表示 $P < 0.0001$ 。

A: Plaque size formed by Pru and knockout strains; B: Plaque area formed by Pru and knockout strains. **** indicate $P < 0.0001$.

图3 Pru 和敲除株 Pru Δ srs51 对形成噬斑大小与面积的影响

Fig.3 The impact of Pru and the knockout strain Pru Δ srs51 on plaque size and area formation

2.3 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株对弓形虫入侵的影响

为探究 *Tgsrs51* 基因敲除对弓形虫体外生长的影响,本研究开展了入侵及后续表型试验。结果显示, *Tgsrs51* 基因敲除株的入侵率显著低于野生株 ($P < 0.01$),表明敲除 *Tgsrs51* 基因后会影响弓形虫的入侵能力,从而可能影响弓形虫的体外生长能力(图4)。

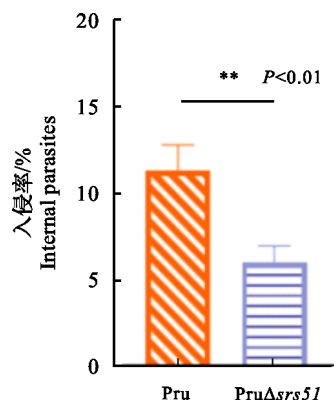


图4 Pru 和敲除株 Pru Δ srs51 对弓形虫入侵率的影响

Fig.4 The impact of Pru and knockout strain Pru Δ srs51 on the invasion rate of *Toxoplasma gondii*

2.4 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株对微线体 MIC2 分泌的影响

已有报道发现弓形虫入侵宿主细胞主要借助微线体蛋白 MIC2。本试验通过检测弓形虫 Pru 野生株及 *Tgsrs51* 基因敲除株中微线体蛋白的表达情况,进一步验证 *Tgsrs51* 基因缺失对弓形虫入侵能力的影响。结果(图5)显示, *Tgsrs51* 基因缺失会降低弓形虫微线体蛋白 MIC2 的表达。

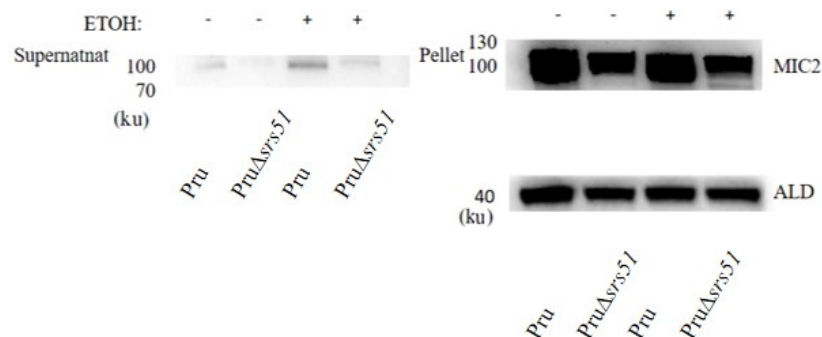


图5 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株对微线体 MIC2 分泌的影响

Fig.5 The effect of *Toxoplasma gondii* *Tgsrs51* gene-deficient strain on MIC2 secretion in microfilariae

2.5 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株对速殖子增殖与逸出的影响

为探究 *Tgsrs51* 基因对弓形虫体外生长的作用,本研究开展了增殖与逸出试验。由图6可知, *Tgsrs51* 基因的缺失会影响弓形虫速殖子在细胞内的增殖能力($P<0.01$),但对速殖子逸出能力的影响并不显著($P>0.05$),野生株与 *Tgsrs51* 基因敲除株的逸出率均达到90% 以上。

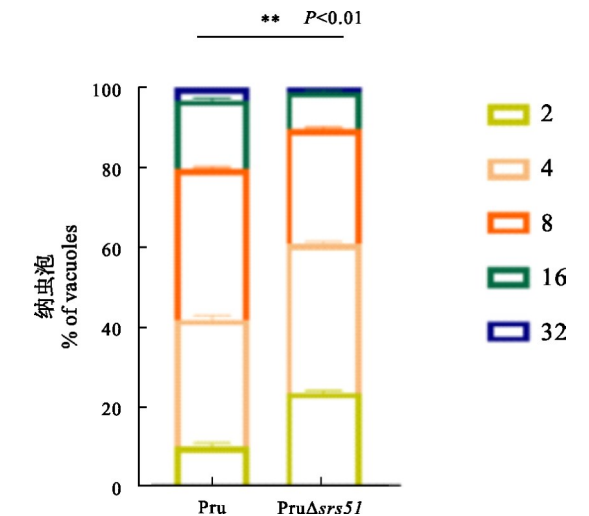


图6 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株对复制的影响
Fig.6 The impact of *Toxoplasma gondii* *Tgsrs51* gene-deficient strain on replication

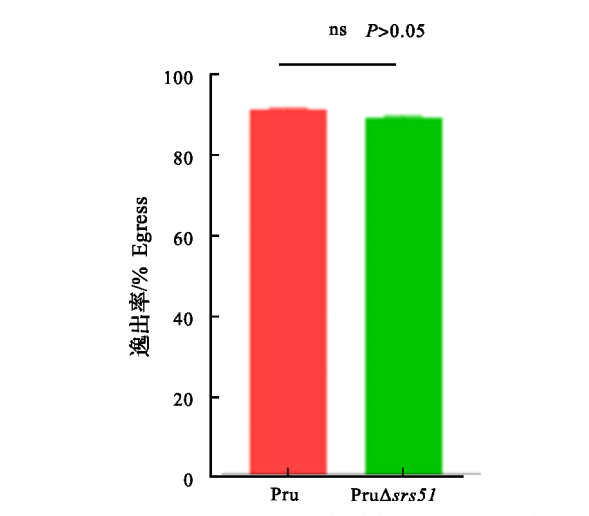


图7 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株对逸出的影响
Fig.7 The impact of *Toxoplasma gondii* *Tgsrs51* gene-deficient strain on escape

2.6 体外缓殖子转化试验

为研究 *Tgsrs51* 基因缺失后是否会对弓形虫体外缓殖子转化能力产生影响,本研究开展了体外缓殖子转化试验。结果显示,在 pH 7.4、5% CO₂ 条件下, *Tgsrs51* 基因的缺失不影响弓形虫速殖子向缓殖子的转化能力($P>0.05$,图8A)。在 pH 8.2、无 CO₂ 条件下, *Tgsrs51* 基因的缺失也不影响弓形虫速殖子向缓殖子的转化能力($P>0.05$,图8B)。

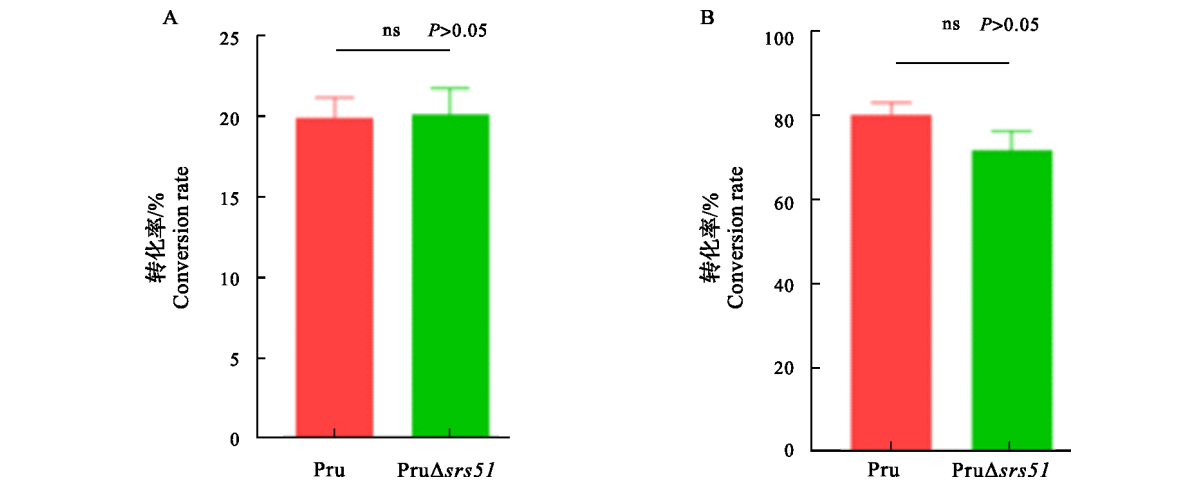
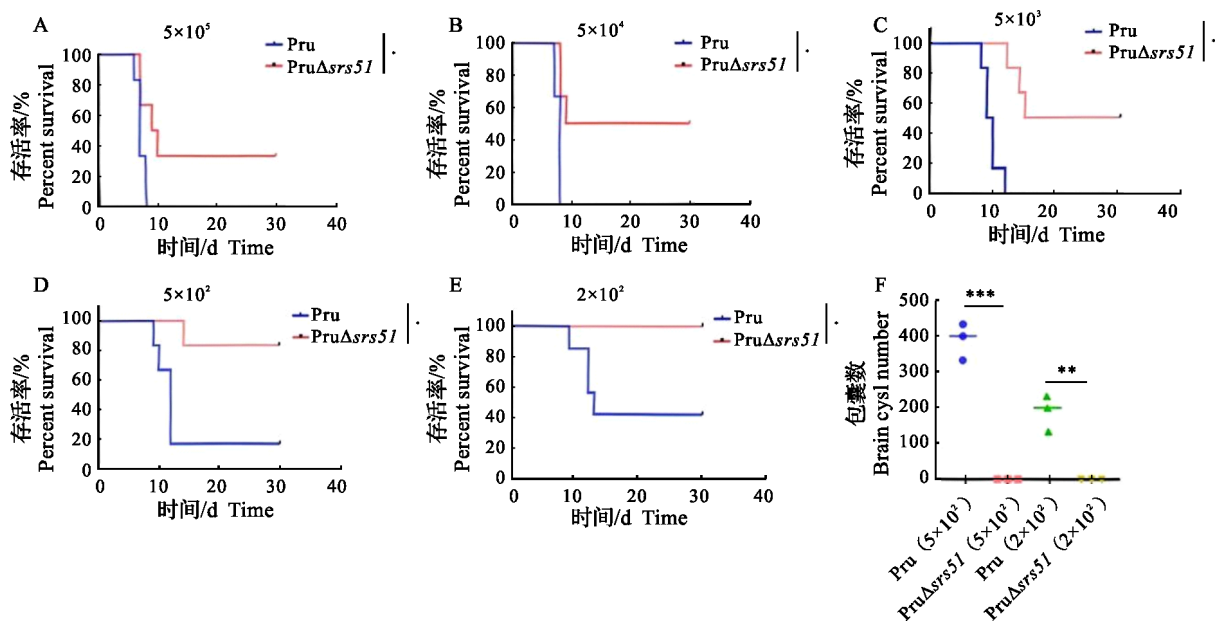


图8 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株对缓殖子的转化率的影响
Fig.8 The impact of *Toxoplasma gondii* *Tgsrs51* gene-deficient strain on the transformation rate of tachyzoites

2.7 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株对小鼠毒力的影响

为研究 *Tgsrs51* 基因缺失后对弓形虫 II 型虫株 Pru 株的毒力以及慢性感染的影响,将新鲜逸出的弓形虫速殖子通过腹腔注射感染小鼠,感染剂量分别为 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 2×10^2 个 Pru 野生株和 PruΔsrs51 缺失株速殖子,统计所有感染小鼠的存活率。结果显示 *Tgsrs51* 基因的缺失会显著减弱 II 型虫株 Pru 株对小鼠的致病性($P<0.05$,图9A~图9E)。将感染 5×10^2 和 2×10^2 个野生株和敲除株的 4 组小鼠 30 d 后处死,通过镜检脑组织研磨物,对脑组织内包囊进行计数。结果显示,无论是感染 5×10^2 还是

2×10^2 个速殖子,缺失株小鼠的脑包囊数量均显著低于野生株($P < 0.001$ 及 $P < 0.05$),且缺失株小鼠体内的脑包囊数量接近于零,证明 *Tgsrs51* 基因的缺失可以显著降低弓形虫对小鼠慢性感染的能力($P < 0.001$ 及 $P < 0.05$,图9F)。



A~E 分别为剂量 5×10^5 (A)、 5×10^4 (B)、 5×10^3 (C)、 5×10^2 (D) 和 2×10^2 (E) 的弓形虫和滋养体; F 为 5×10^2 组和 2×10^2 组存活小鼠脑囊虫计数比较。

A~E represent *Toxoplasma gondii* and tachyzoites at doses of 5×10^5 (A), 5×10^4 (B), 5×10^3 (C), 5×10^2 (D), and 2×10^2 (E), respectively; Figure F compares the cyst counts in the brains of surviving mice in the 5×10^2 group and the 2×10^2 group.

图9 弓形虫 *Tgsrs51* 基因缺失株对小鼠存活率的影响

Fig.9 The impact of *Toxoplasma gondii* *Tgsrs51* gene-deficient strain on mouse survival rate

3 讨论与结论

弓形虫病作为一种人兽共患的寄生虫病,因其感染方式和传播途径多样化、自身发育阶段复杂化的特点,对人类的健康、畜牧业的发展以及全球的公共卫生安全构成了极大的威胁^[25]。因此,研发出安全有效的针对弓形虫的疫苗是当前研究的一大重点^[26]。弓形虫能入侵包括人类及所有温血动物的有核细胞,其入侵需要自身分泌的表面抗原蛋白、微线体等许多蛋白共同完成^[27-28]。SRSs 超家族蛋白是一类在分布虫体表面的蛋白,因其具有众多家族成员,且成员之间结构与功能上具有多样性和特异性,使得 SRSs 超家族蛋白在识别、黏附、入侵宿主等过程中发挥重要作用^[29-31]。

CRISPR/Cas9 作为一种操作简便、高效的基因编辑工具,已经广泛被研究学者应用于基因功能研究^[32-33]。本试验利用 CRISPR-Cas9 技术成功构建弓形虫 II 型 Pru 虫株的 *Tgsrs51* 基因缺失株 PruΔsrs51,通过噬斑、入侵、增殖及微线体分泌等试验证实, *Tgsrs51* 基因缺失显著降低弓形虫的入侵效率、微线体分泌能力及速殖子胞内增殖速率,导致体外生长受限,但对其逸出和缓殖子转化无影响,提示其功能窗口集中于“入侵—增殖”阶段。体内试验进一步表明,感染 PruΔsrs51 的小鼠存活率显著提高,脑内包囊数量减少,提示该基因缺失通过削弱虫体入侵与胞内增殖能力降低急性毒力,并抑制慢性感染进程。弓形虫 SRS19D 敲除虫株形成的噬斑显著变小,增殖能力显著下降,甚至体外缓殖子转化率极显著降低^[34]。SRS29C 敲除株与野生株相比,虫体的细胞内生长复制能力减弱,且随着培养时间的延长,这种差异会变得更加明显,提示该基因与弓形虫的胞内增殖和入侵功能相关^[26]。SRS51 蛋白的功能特性与其他 SRS 家族蛋白(如 SRS29C^[35]、SRS47D^[36])的毒力调控作用一致,其潜在黏附结构域可能通过介导宿主细胞互作或免疫逃逸参与致病过程。SAG1 和 SAG2A 这 2 种速殖子特异性 SRS 抗原已被证实能主导血清免疫球蛋白 G(IgG)反应^[29,31],同样, SRS35 基因缺失也会降低弓形虫毒力,并增强宿主的免疫反应^[37]。本研究推

测, SRS51 蛋白未参与缓殖子转化或逸出的功能特异性可能是因为在作用阶段与分子机制方面具有“阶段特异性”, 这种特异性导致其在碱性 pH/低 CO₂ 条件下无法被转录激活。基于表型与机制关联性, 该基因可能具有药物靶点与疫苗候选潜力, 但需进一步通过表型回补、宿主互作蛋白鉴定及多虫株功能保守性分析等试验来验证其转化应用的可行性, 同时结合动态追踪技术与结构生物学解析其毒力调控网络。

本研究选择弱毒 II 型 Pru 虫株进行基因敲除, 是因为其慢性感染特性更利于表型观察, 且毒力温和可避免高毒虫株(如 I 型 RH 株)对试验结果的干扰。结合已有报道, SRS 蛋白家族成员多通过调控宿主黏附、入侵或免疫逃逸影响毒力, SRS51 蛋白的缺失表型也进一步验证 SRS 蛋白在弓形虫致病中的重要作用。SRS51 蛋白缺失后毒力显著衰减且遗传稳定, 揭示其具备构建弱毒活疫苗或亚单位疫苗的潜在价值, 为弓形虫病防控提供新策略。

综上所述, 本研究成功构建了以 Pru 株为载体的 SRS51 蛋白基因缺失株 Pru Δ srs51, 敲除株 Pru Δ srs51 和野生株 Pru 的噬斑试验、入侵试验、增殖试验以及小鼠毒力试验结果具有较显著差异, 逸出试验与体外转化试验无显著差异, 可见目的基因敲除后主要影响弓形虫的入侵与胞内增殖, 提示其可能是弓形虫弱毒株的毒力因子。

参考文献 References:

- [1] XIAO Y, YIN J G, JIANG N, et al. Seroepidemiology of human *Toxoplasma gondii* infection in China[J]. BMC infectious diseases, 2010, 10(1): 4.
- [2] KOCHANOWSKY J A, KOSHY A A. *Toxoplasma gondii*[J]. Current biology, 2018, 28(14): 770-771.
- [3] XIAO J C, YOLKEN R H. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases[J]. Acta physiologica, 2015, 213(4): 828-845.
- [4] JONGERT E, ROBERTS C W, GARGANO N, et al. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities[J]. Memorias do instituto oswaldo cruz, 2009, 104(2): 252-266.
- [5] ZHOU P, CHEN Z G, LI H L, et al. *Toxoplasma gondii* infection in humans in China[J]. Parasites & vectors, 2011, 4(1): 165.
- [6] ELSHEIKHA H M, MARRA C M, ZHU X Q. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and management of cerebral toxoplasmosis[J]. Clinical microbiology reviews, 2021, 34(1): 1-29.
- [7] GAO X J, ZHAO Z J, HE Z H, et al. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China[J]. Parasitology, 2012, 139: 139-147.
- [8] LI Y W, ZHOU H Y. Moving towards improved vaccines for *Toxoplasma gondii*[J]. Expert opinion on biological therapy, 2018, 18(3): 273.
- [9] 赖映梅, 卓润辉, 金子. 抗弓形虫药物研究进展: 现状、方向及挑战[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2025, 32(1): 52-59.
LAI Y M, ZHUO X H, JIN Z. Progress in anti-*Toxoplasma gondii* drug development: current status, direction, and challenges[J]. Journal of parasitology and medical entomology, 2025, 32(1): 52-59.
- [10] KONSTANTINOVIC N, GUEGAN H, STÄJNER T, et al. Treatment of toxoplasmosis: current options and future perspectives[J]. Food and waterborne parasitology, 2019, 15: 1-15.
- [11] BOOTHROYD J C. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field[J]. International journal for parasitology, 2009, 39(8): 935-946.
- [12] JUNG C, LEE C Y F, GRIGG M E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins[J]. International journal for parasitology, 2004, 34(3): 285-296.
- [13] WANG Y, YIN H. Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*[J]. Parasit & vectors, 2014, 7(1): 180.
- [14] COHEN O, MARU P, LIANG Q L, et al. Surface antigen SAG1 mediates *Toxoplasma gondii* fitness and host cell attachment in IFN γ -stimulated cells[J]. Infection and immunity, 2025, 93(8): 1-11.
- [15] DZIERSZINSKI F, MORTUAIRE M, CESBRON-DELAUW M F, et al. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces viru-

- lence in mice[J].Molecular microbiology,2000,37(3):574-582.
- [16] WANG J L, LI T T, ZHANG N Z, et al.The transcription factor AP2XI-2 is a key negative regulator of *Toxoplasma gondii* merogony[J].Nature communications,2024,15(1):793.
- [17] HUYNH M H, CARRUTHERS V B.*Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence[J].PLoS pathogens,2006,2(8):753-762.
- [18] 郑斌,尹志奎,詹希美.定点突变技术鉴定弓形虫微线体蛋白6与醛缩酶的作用位点[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2014,32(3):221-224.
- ZHENG B, YIN Z K, ZHAN X M.Protein interaction site of *Toxoplasma gondii* microneme protein 6 and aldolase determined by site-directed mutagenesis[J].Chinese journal of parasitology and parasitic diseases,2014,32(3):221-224.
- [19] XIA X, DU C Q, WANG Y, et al.Insights into the molecular interactions of MIC2 and M2AP: role of TSR6 and conservation across species[J].Proteins: structure, function, and bioinformatics,2024,93(3):620-628.
- [20] 谢滢.类泛素蛋白TgUBL5调控TgSART1影响弓形虫入侵的机制研究[D].泰安:山东农业大学,2025.
- XIE Y, Mechanism of the Ubiquitin-like Protein TgUBL5 regulating TgSART1 on *Toxoplasma gondii* invasion[D].Tai'an: Shandong Agricultural University,2025.
- [21] 千慧燕.弓形虫MIC11基因敲除株的构建及生物学功能研究[D].延边:延边大学,2022.
- QIAN H Y, Construction and biological characterization of *Toxoplasma gondii* dense granule proteins deletion strains[D].Yanbian: Yanbian University,2022.
- [22] BANDINI G, LEON D R, HOPPE C M, et al.O-Fucosylation of thrombospondin-like repeats is required for processing of microneme protein 2 and for efficient host cell invasion by *Toxoplasma gondii* tachyzoites[J].Journal of biological chemistry,2019,294(6):1967-1983.
- [23] CRUZ-MIRON R, RAMIREZ-FLORES C J, LAGUNAS-CORTES N, et al.Proteomic characterization of the pellicle of *Toxoplasma gondii*[J].Journal of proteomics,2021,15(237):104146.
- [24] 陈小庆.不同基因型弓形虫多组学分析及其对小鼠肝脾代谢组的影响[D].长春:吉林农业大学,2018.
- CHEN X Q, Multi-omics analyses of different *Toxoplasma gondii* genotypes and the impact of *T. gondii* infection on metabolomes of mice livers and spleens[D].Changchun: Jilin Agricultural University,2018.
- [25] MOLAN A, NOSAKA K, HUNTER M, et al.Global status of *Toxoplasma gondii* infection: systematic review and prevalence snapshots [J].Tropical biomedicine,2019,36(4):898-925.
- [26] DUNAY I R, GAJUREL K, DHAKAL R, et al.Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice[J].Clinical microbiology reviews,2018,31(4):1-33.
- [27] 王永亮,姚贵哲,杨帆,等.弓形虫入侵宿主细胞及其相关功能蛋白的研究进展[J].中国动物传染病学报,2022,30(3):213-217.
- WANG Y L, YAO G Z, YANG F, et al.Research progress of *Toxoplasma gondii* invasion into host cells and related functional proteins[J].Chinese journal of animal infectious diseases,2022,30(3):213-217.
- [28] FRÉNAL K, DUBREMETZ J F, LEBRUN M, et al.Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa[J].Nature reviews microbiology,2017,15(11):645-660.
- [29] SAEIJ J P, ARRIZABALAGA G, BOOTHROYD J C.A cluster of four surface antigen genes specifically expressed in bradyzoites, SAG2CDXY, plays an important role in *Toxoplasma gondii* persistence[J].Infection and immunity,2008,76(6):2402-2410.
- [30] HE X L, GRIGG M E, BOOTHROYD J C, et al.Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily[J].Nature structural & molecular biology,2002,9(8):606-611.
- [31] KIM S K, KARASOV A, BOOTHROYD J C.Bradyzoite-specific surface antigen SRS9 plays a role in maintaining *Toxoplasma gondii* persistence in the brain and in host control of parasite replication in the intestine[J].Infection and immunity,2007,75(4):1626-1634.
- [32] 王宝鑫,张文华,董霞,等.基于CRISPR/Cas9技术的SIRT3基因敲除猪肺泡巨噬细胞系的构建与鉴定[J].江西农业大学学报,2024,46(4):991-1000.
- WANG B X, ZHANG W H, DONG X, et al.Construction and identification of 3D4/21 cell line with *SIRT3* gene knockout

- based on CRISPR/Cas9 technology[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2024, 46(4):991-1000.
- [33] WANG J L, WANG M, ZHANG N Z, et al. The PP2A-2 holoenzyme orchestrates daughter cell emergence during cytokinesis in *Toxoplasma gondii*[J]. PLoS pathogens, 2025, 21(9): 1-31.
- [34] 牛水珠, 潘明, 葛层层, 等. 弓形虫 *srs19d* 基因敲除株的构建及其在宿主细胞中的生物学功能分析[J]. 中国兽医杂志, 2024, 60(8): 10-17.
- NIU S Z, PAN M, GE C C, et al. Construction of *Toxoplasma gondii srs19d* gene knockout strain and analysis of its biological functions in host cells[J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2024, 60(8): 10-17.
- [35] 田静. 弓形虫 SRS29C 基因敲除株的表型研究及转录组分析[D]. 天津: 天津农学院, 2024.
- TIAN J. Phenotypic study and transcriptome analysis of *T. gondii* SRS29C knockout[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural College, 2024.
- [36] 刘辉, 米荣升, 贾海燕, 等. 刚地弓形虫表面抗原糖蛋白相关序列 SRS47D 的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(10): 1147-1154.
- LIU H, MI R S, JIA H Y, et al. Bioinformatic analysis of *Toxoplasma gondii* surface antigen glycoprotein 1-related sequence SRS47D[J]. Journal of pathogen biology, 2019, 14(10): 1147-1154.
- [37] HAMIE M, TAWIL N, HAJJ R E, et al. P18(SRS35/TgSAG4) plays a role in the invasion and virulence of *Toxoplasma gondii* [J]. Frontiers in immunology, 2021, 12: 643292.

(责任编辑:熊淑琪)



第一作者简介:肖淑婷,江西农业大学2023级兽医专业在读硕士,在校期间获二等奖学金、学业奖学金及“优秀研究生”称号。具备丰富的科研与实习经历,曾担任实习兽医助理,负责母猪及仔猪的饲养管理与医疗协助。科研方面,参与编著《Gut Health, Microbiota and Animal Diseases》;作为第一主持人完成江西省研究生创新基金项目“针对犬、猫毛滴虫的快速准确检测测试纸条的研发”,并参与两项国家及省部级自然科学基金项目,在弓形虫分子机制研究中承担关键实验工作;参与两项发明专利(一项受理,一项获批)。熟练掌握细胞与寄生虫培养、分子生物学及动物实验等多项专业技能。



通信作者简介:陈小庆,1989年生,安徽人,博士,江西农业大学动物科学技术学院副教授、猪遗传改良与养殖技术国家重点实验室博士后。主要从事预防兽医学领域的研究与教学工作,聚焦于弓形虫、肠道原虫等人兽共患病的组学分析与CRISPR基因编辑技术应用。近年来主持国家自然科学基金青年项目、国家生物育种项目子课题、江西省自然科学基金等国家级、省部级课题多项,参与国家自然科学基金面上项目及国家重点实验室开放课题等。以第一作者或通讯作者在《Transboundary and Emerging Diseases》《Frontiers in Cellular and Infection Microbiology》等期刊发表论文12篇,其中多篇位于中国科学院一、二区。教学方面承担《动物寄生虫与寄生虫病学》等本科课程,并主持教改课题,致力于推动课程思政与学科融合。在科研中强调多组学技术整合与病原-宿主互作机制解析,形成以代谢调控与基因功能探索为核心的学术思路。