

## 恶性疟原虫基因稳定转染方法的研究进展

李晓松<sup>1</sup>, 潘茂华<sup>2</sup>, 黄亚铭<sup>2</sup>, 杨照青<sup>1\*</sup>

1. 昆明医科大学病原生物学与免疫学系, 云南 昆明 650500; 2. 广西壮族自治区上林县人民医院, 广西 南宁 530599

**摘要:** 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)的转染有助于研究其基因的功能, 例如抗药性。但转基因操作一直都非常具有挑战性, 主要是由于疟原虫基因组的高 A/T 碱基序列结构(A+T 含量约为 82%)以及低转染效率。基于电穿孔的恶性疟原虫转染方法已成功应用于某些基因的研究中, 而预载法的电穿孔是目前将外源 DNA 引入恶性疟原虫的首选方法。疟原虫基因的定点编辑多采用双质粒转染的方法, 通常认为对疟原虫的成功转染需要大量高纯度质粒 DNA 以及精确的转染体系。本文除对目前常用的电转方法进行了评价外, 还介绍了一种新的转染方法, 即裂解-再密封红细胞转染(lyse-reseal erythrocytes for transfection), 并对质粒 DNA 浓度、转染试剂的使用、转染参数的设置、新鲜红细胞的添加以及转染成功的标记等因素在提高疟原虫转染成功率和效率方面的作用等进行综述, 为该领域研究提供参考。

**关键词:** 恶性疟原虫; 稳定转染; 效率; 质粒 DNA; 裂解-再密封红细胞转染

中图分类号: R382.3<sup>†</sup> 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2023)02-186-05

DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2023.02.16

Research progress on stable gene transfection methods of *Plasmodium falciparum*LI Xiao-song<sup>1</sup>, PAN Mao-hua<sup>2</sup>, HUANG Ya-ming<sup>2</sup>, YANG Zhao-qing<sup>1</sup>

1. Department of Pathogen Biology and Immunology, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China;

2. Shanglin County People's Hospital, Nanning, Guangxi 530599, China

Corresponding author: YANG Zhao-qing, E-mail: zhaopingy92@hotmail.com

**Abstract:** Transfection of *Plasmodium falciparum* is helpful to study the function of its genes, such as drug resistance. However, transgenic manipulation has been very challenging, mainly due to the high A/T base sequence structure (A+T content of about 82%) and low transfection efficiency of the *Plasmodium* genome. Electroporation-based transfection of *Plasmodium falciparum* has been successfully applied in the study of certain genes, and electroporation by preloading is currently the preferred method for introducing foreign DNA into *Plasmodium falciparum*. The site-directed editing of *Plasmodium* genes mostly adopts the method of two-plasmid transfection. It is generally believed that successful transfection of *Plasmodium* requires a large amount of high-purity plasmid DNA and an accurate transfection system. In addition to the evaluation of the current commonly used electrotransfection methods, this paper also introduces a new transfection method, namely lyse-reseal erythrocytes for transfection (LyRET). This paper also review the role of factors such as plasmid DNA concentration, the use of transfection reagents, the setting of transfection parameters, the addition of fresh red blood cells, and the markers of successful transfection in improving the success rate and efficiency of *Plasmodium* transfection, in the hope of providing a reference for study in this field.

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*; stable transfection; efficiency; plasmid DNA; lyse-reseal erythrocytes for transfection

## 1 疟原虫转染技术现状

恶性疟原虫是引起人类疟疾 5 种疟原虫中致死率最高、抗药性最强的虫种<sup>[1]</sup>。根据世界卫生组织最新发布的《2021 年世界疟疾报告》<sup>[2]</sup>, 随着 2019 年新型冠状病毒的大流行, 2020 年的疟疾病例增加了 1 400 万, 死亡人数增加了 4.7 万。在新冠大流行之前, 全球防治疟疾的进展已经趋于平稳, 疾病负担高的国家正在逐渐减少, 但新冠的出现使得 21 个疟疾流行国家

中有多达 1.22 亿人需要紧急救济<sup>[2]</sup>。2021 年, 世卫组织认证了中国和萨尔瓦多两个国家为无疟疾国家, 另外 25 个国家有望到 2025 年结束疟疾传播。因此, 未来的几年, 疟疾仍是威胁东南亚和非洲人民生命的重要议题<sup>[3]</sup>。由于针对恶性疟原虫的有效疫苗还有很长的一段路要走, 当前疟疾的治疗防控主要还是依赖于化学药物, 但是流行地区已经出现了对一线药物青蒿素的耐药性<sup>[4]</sup>, 因此, 迫切需要针对疟疾感染的对

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. U1802286; No. 31860604); 国际科技合作专项(No. 202003AE140004)

作者简介: 李晓松(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 疟原虫的抗药性。

\*通信作者: 杨照青, E-mail: zhaopingy92@hotmail.com

策<sup>[5-7]</sup>。虽然目前针对恶性疟原虫的基因组测序工作已全部完成,但对于某些关键致病基因以及有利于恶性疟原虫感染红细胞的蛋白质功能结构尚不清晰,提示进一步研究的必要性。在此过程中,基因编辑是快速、可靠的基因替换或剔除手段和工具<sup>[8]</sup>。

恶性疟原虫的基因编辑历来具有挑战性<sup>[9-13]</sup>,3种新的基因组编辑技术,即锌指核酸酶、转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)和成簇的规则间隔短回文重复序列(CRISPR-Cas9)<sup>[7,14]</sup>均使用核酸酶靶向特定的基因组位点并产生染色体断裂。但由于恶性疟原虫不具有非同源末端连接(NHEJ)通路的成分,当前研究仍是主要依靠同源重组来修复DNA断裂从而对疟原虫进行点突变、基因敲除等。再者,实现氨基酸功能的转变还需通过特定技术手段进行基因的转化和表达。因此,疟原虫的转染已经成为目前获得目标菌株过程中使用最广泛、最直接的工具。

## 2 转染技术的发展

研究表明<sup>[15]</sup>,首次瞬时转染在我国云南株恶性疟原虫获得成功,建立了一种有效的疟原虫转染系统,为疟原虫的基因表达调控和基因功能的研究,为我国恶性疟疾防治奠定了技术基础。但瞬时转染<sup>[16-17]</sup>的外源基因并没有真正整合到疟原虫的染色体上而是存在于游离的外源载体上,这样虽然可以在短时间内获得基因的表达产物,但是随着疟原虫的不断生长增殖,外源基因最终会丢失;如果需要研究特定的基因在修饰后是否可以改变蛋白质的功能而发挥作用,例如耐药性,就需要借助其他转染方法的支持,即稳定转染。稳定转染是将外源基因整合到疟原虫的染色体上,目的基因不会随着疟原虫的分裂而消失,编码的目标蛋白也会一直存在的一种转染方法,对研究疟原虫基因组内特定基因/蛋白质的功能机制非常有效。此外,瞬时转染效率被认为比稳定转染高约50倍,但对于恶性疟原虫进行转染的实验研究而言,其应用价值通常较小<sup>[7]</sup>。

基因转染是一项非常重要的研究技术,在细胞分子生物学研究领域中有不可替代的作用,在哺乳类及其他真核细胞的研究中已经非常成熟。恶性疟原虫的转染技术已经发展了近20年,但进展仍相对缓慢,究其原因主要是受到了技术以及时间上的限制:其一,使用构建的质粒和靶基因组位点之间的单或双交叉重组的寄生虫转染效率很低,通常需要数周或数月的体外培养,才能够采用PCR等检测到特定的整合事件<sup>[18]</sup>;其二,可用于恶性疟原虫转染的选择性标记数量很少;其三,恶性疟原虫的密码子高度偏向,会严重影响常规转染中交叉重组的长同源臂的分子克

隆<sup>[19-20]</sup>。针对以上问题,本文在构建质粒、转染条件等方面进行探索,提升恶性疟原虫的转染效率。

已知恶性疟原虫转染时能够吸收至少2个质粒,但整体的质粒吸收效率却非常低<sup>[21-22]</sup>。每个质粒都有独特的选择标记,但目前恶性疟原虫转染的动力学尚未使用允许准确定量载体摄取的多重性的技术进行研究<sup>[20]</sup>。红细胞期疟原虫的成功转染需要质粒DNA在运输之前穿过3层膜才能进入细胞核,但其成功穿透多个膜层递送质粒DNA的具体机制尚不清楚。恶性疟原虫在红细胞内通过携带血红蛋白和其他成分进行内吞作用,从环状体发育成裂殖体期这个过程宿主红细胞胞质中的DNA可以和这些分子共同进入疟原虫的细胞质完成基因整合。

## 3 稳定转染恶性疟原虫外源DNA的方法

### 3.1 Bio-Rad GenePulser Xcell™ 稳定转染恶性疟原虫

3.1.1 直接电穿孔环状体法 直接通过电穿孔方式将外源DNA转入到环状体(EiRBC method)<sup>[23-24]</sup>,即对早期环状体感染的红细胞(red blood cell, RBC)(5%~10%原虫感染率)培养物(100 μL)进行单次转染。用cytomix(10 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、120 mmol/L KCl、0.15 mmol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、25 mmol/L HEPES、2 mmol/L EGTA、5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, pH 7.6)悬浮洗涤,再混合含有100 μg质粒DNA(最终体积:400 μL)。将悬浮液转移到冷却的0.2 cm比色皿中,并使用Bio-Rad GenePulser Xcell™ 进行脉冲(0.31 kV、950 μF和无限Ω)。电穿孔后的疟原虫用完全培养基洗涤1次,然后置于标准条件中进行培养。

3.1.2 预加载法(preloading method) 预加载法<sup>[9,14,16,25-26]</sup>是通过电穿孔红细胞,把质粒转入到红细胞内,然后用此红细胞来培养疟原虫,即电转后,加入裂殖体期的疟原虫,让疟原虫感染这些DNA预加载的红细胞来提高转染效率。新鲜红细胞(150 μL)用cytomix洗涤,然后重新悬浮在含有50 μg质粒DNA(最终体积:420 μL)的cytomix中。将混合物转移到0.2 cm比色皿(Bio-Rad)中,在冰上冷却,并使用Bio-Rad GenePulser Xcell™ 进行脉冲(0.31 kV、950 μF和无限Ω)。然后用在4℃条件下预冷的培养基洗涤载有质粒DNA的红细胞,并与纯化的裂殖体期疟原虫(2%~3%的感染率)进行混合培养。

### 3.2 Lonza 4D-Nucleofector 细胞核转染恶性疟原虫<sup>[26]</sup>

3.2.1 电穿孔法:外源DNA转入环状体 直接将DNA通过电穿孔方式转入恶性疟原虫环状体的过程是采用Amaxa 4D电穿孔仪(Lonza)和P3原代细胞

4D-Nucleofector™ X Kit L (Lonza)进行的。每次转染时,在100  $\mu$ L补充的P3原代细胞溶液中加入10  $\mu$ L DNA (10  $\mu$ g/ $\mu$ L)。取100  $\mu$ L的红细胞(疟原虫环状体期感染率为10%)用cytomix洗涤,然后悬浮于DNA和P3原代细胞液中,使用FP158、CM150或CM162程序在4D-Nucleofector™ X Kit L比色皿(Lonza)中进行电穿孔。电穿孔后,立即用37  $^{\circ}$ C预热的完全培养基清洗疟原虫,去除破碎的红细胞,并加入10 mL完全培养基进行培养<sup>[26]</sup>。

**3.2.2 电穿孔法:外源DNA转入成熟裂殖体** 当培养物中绝大多数疟原虫发育到裂殖体阶段时,使用Percoll梯度溶液对其进行富集纯化。将10  $\mu$ L的DNA (10  $\mu$ g/ $\mu$ L)样品(即供体质粒和含有sgRNA的质粒)溶解在100  $\mu$ L Parasite Nucleofector II溶液(Lonza)和10~20  $\mu$ L纯化的裂殖体( $1.0 \times 10^8$ )中。并立即使用FP158、CM150或CM162程序在4D-Nucleofector™ X Kit L(Lonza)中进行电穿孔。电穿孔后立即将转染的疟原虫与0.1 mL完全培养基混合,然后在5 mL含有新鲜红细胞的完全培养基中培养<sup>[7,22,26-27]</sup>。

**3.3 化学法:裂解-再密封红细胞转染恶性疟原虫** 该方法不需要电转仪<sup>[23]</sup>,取50%压积的新鲜红细胞重悬于RBC储存介质中(1:2),离心洗涤。重复1次后再将沉淀重悬于等体积的RBC储存介质中,于4  $^{\circ}$ C放置。将上述RBC悬浮液(约200  $\mu$ L)用1 mL冰冷的PBS洗涤2次,并小心除去上清液。再将沉淀重悬于100  $\mu$ L预冷的RBC裂解缓冲液(含有100  $\mu$ g质粒DNA的预冷RBC裂解缓冲液)中,并在4  $^{\circ}$ C下温和旋转孵育1 h。估计RBC悬浮液的体积和再密封溶液储备(5 mol/L NaCl, 1 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol/L ATP, 100 mmol/L GSH)的体积,再密封溶液适当添加以达到重新密封缓冲液浓度(150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L ATP和1 mmol/L GSH)。将该悬浮液在37  $^{\circ}$ C、55 r/min摇动速度下孵育1 h。重新密封的RBC悬浮液10 $\times$ PCV的RBC储存介质(预热至37  $^{\circ}$ C)洗涤2次,将洗涤后的重新密封的RBC沉淀(重新密封的红细胞被称为裂解-重新密封红细胞)悬浮在等体积的RBC储存介质中以供后续使用或在4  $^{\circ}$ C下储存直至下次使用。最后加入纯化的滋养体/裂殖体阶段虫体以达到2%~3%的原虫血感染率,并在标准条件下进行培养<sup>[23]</sup>。

**3.4 转染方法的选择** GOVINDARAJALU等<sup>[23]</sup>为了研究转染方法是否对质粒的摄取效果产生影响,同时采取直接电穿孔环状体,预载法以及裂解-再封闭红细胞的方法对疟原虫进行稳定转染。研究发现直接电穿孔环状体和裂解-再密封红细胞法对质粒的转染几乎是100%转染且普遍适用,而预载法对一些虫株

的转染并未筛选成功,考虑可能是方法的局限性或者质粒DNA的不同导致转染失败。原因可能是恶性疟原虫的环状体期比裂殖体期被更多的红细胞胞质包围,前者占据相对较小的RBC胞质体积,而后者在消化大部分血红蛋白后填满细胞,因此直接电穿孔环状体法产生的转基因信号要比预载法更加强烈,成功率略高(Bio-Rad GenePulser Xcell™)。

此外,对于新的转染方法,GOVINDARAJALU等本着经济简单的原则,在原重新密封红细胞转染恶性疟原虫的方法上进行了改进,最大程度地掺入重新密封的红细胞中的裂解物蛋白含量。重新密封的红细胞中的蛋白质含量占RBC裂解物总蛋白质含量的约53%。结果表明,抗性疟原虫出现的时间相对直接电穿孔环状体而言有一定的延迟,考虑可能是新方法中的疟原虫必须从RBC胞质溶胶中吸收DNA,而不是直接将DNA分子电穿孔到疟原虫内<sup>[23]</sup>。

再者,WANG等<sup>[26]</sup>对疟原虫转染效率进行比较研究,发现采用Bio-Rad Gene Pulser Xcell™进行质粒预加载未感染红细胞的转染效率最高,是使用Lonza 4D-Nucleofector转染环状体疟原虫方法的2倍。采用Lonza 4D-Nucleofector方法分别对环状体和裂殖体期疟原虫进行转染,发现转染环状体比裂殖体效率更高。此外,该研究还评估了一种使用Nucleofector系统转染裂殖体的方法,考虑了完成药物筛选实验所需的效率和时间,证实了预加载方法效率更高,但Nucleofector对环状体期疟原虫的转染方法在CRISPR/Cas9编辑后完成药物选择实验所需的时间更少<sup>[26]</sup>。综上,就转染成功率、重组疟原虫的药物筛选时间(30 d左右)以及质粒的摄取效率综合来看,预载法仍是目前公认的最佳方法<sup>[9]</sup>。

尽管GOVINDARAJALU等<sup>[23]</sup>实验结果表明了使用Bio-Rad GenePulser Xcell™方法对疟原虫环状体直接进行电穿孔的成功率极高,但考虑到转染对细胞以及疟原虫的损伤程度以及重组疟原虫筛选的时间,大多研究员依旧以预载法作为首选方法,可能有以下几个原因:①有实验观察到疟原虫吸收多个质粒的倾向与预加载法和环状体阶段转染方法相似,可能是因为这两种方法最终都可能通过某种类似的机制将DNA递送到寄生虫中<sup>[20]</sup>;②预载法转染疟原虫相比直接电穿孔法可能降低了电流刺激对虫体的伤害,增加疟原虫的生存率而有利于基因的整合<sup>[22]</sup>。除了以上转染方法的选择会影响转染的成功率,转染条件的设置以及转染环境也是关键因素。

#### 4 疟原虫电穿孔稳定转染效率的影响因素

**4.1 转染质粒的质量选择** 大多数恶性疟原虫的转染实验需要50~100  $\mu$ g质粒DNA,若采用低质量的质

粒 DNA ( $\leq 2.5 \mu\text{g}$ ) 进行转染, 大多会产生不稳定的恶性疟原虫虫株并且在较高选择压力下被消除<sup>[23,26]</sup>。

4.2 转染试剂的精准使用 已经证实: 在电穿孔时, 细胞对介质的渗透压和离子组成都很敏感<sup>[28]</sup>, 精确的跨膜电压非常依赖转染试剂的盐浓度和缓冲条件<sup>[29]</sup>。

4.3 转染仪器的参数设置 疟原虫的转染效率对参数设置的微小变化极为敏感, 例如: 电压不足不能完全透化细胞膜, 从而降低转染效率; 而过高的电压又会导致不可逆的细胞损伤。对于 Bio-Rad GenePulser Xcell™ 常规电穿孔, 通常选择 0.31 kV、950  $\mu\text{F}$  (0.2 cm 比色皿) 作为最优电穿孔条件<sup>[30]</sup>。通过比较 Lonza 4D-Nucleofector 细胞核转染参数, 分别使用 CM150 和 CM162 程序进行转染, 发现原虫感染率没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )<sup>[26]</sup>; 而 FP158 程序对疟原虫的生长造成的损害更大, 存活率降低了至少 50%<sup>[26,31]</sup>。

4.4 转染后的药物筛选周期 构建的分别含有 WR99210 以及 BSD (Blasticidin S hydrochloride) 抗性基因的质粒, 在转染后需要根据标准方法在 37 °C 和气体 (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 和 90% N<sub>2</sub>) 条件下进行培养和药物筛选, 所使用的红细胞不应超过 6 周, 因为衰老红细胞中的疟原虫增殖通常会减少<sup>[25]</sup>。由于转染后的疟原虫对 BSD 和 WR99210<sup>[31]</sup> 的抗性增加了 4 000 倍, 以此可筛选出有抗性的重组虫株<sup>[9,23,31-33]</sup>。转染成功与否可通过报告基因的表达水平来衡量, 目前一般认为在药物选择后疟原虫持续生长, 转染才被视为成功<sup>[7]</sup>。但是, 在移除药物筛选后, 疟原虫培养 90 d 便可发生质粒丢失并恢复对 WR99210 和 BSD 的敏感性。

## 5 转染成功的标记方法

普通质粒转染成功的信号大多依靠 PCR 鉴定, 一旦发生混合培养, 就会大大降低转染的成功率<sup>[24]</sup>。因此, 针对这个问题研究者调整了 CRISPR/Cas9 系统, 将一些标签序列<sup>[34]</sup> 添加到恶性疟原虫的内源基因中, 构建含有标签序列<sup>[24]</sup> (血凝素 HA 或 HA-TY1) 或和 glmS 核酶编码序列 (条件性敲除蛋白质对红细胞内期疟原虫的增殖没有影响)、特定同源臂和 sgRNA 的重组质粒进行 3D7 等恶性疟原虫虫株的转染。药物筛选后存活的疟原虫被收集并通过 PCR、DNA 测序、蛋白质印迹和免疫荧光测定 (IFA) 等方法来检查标记<sup>[9,35-36]</sup>, 验证标签整合效率。为防止疟原虫蛋白因标签插入而出现功能障碍, 在疟原虫基因的标签和编码序列之间添加了氨基酸序列 GSGSGG (G 为甘氨酸, S 为丝氨酸) 作为软连接子<sup>[24]</sup>。这种方法普遍适用于不同株系恶性疟原虫基因的修改或完全敲除<sup>[9,37]</sup>。

## 6 疟原虫稳定转染的发展前景

疟疾是非洲等地区引起高死亡率的疾病之一, 而近几年疟原虫青蒿素耐药性的产生已成为全球疟疾

防治和消除的重大阻碍<sup>[4]</sup>。随着基因编辑技术不断发展, CRISPR 正在成为生物学研究中不可或缺的工具, Cas9 酶的可编程能力曾经被称为“抵抗入侵病毒的细菌免疫系统”, 现在正在彻底改变医学研究、生物技术和农业的各个领域<sup>[10-11,13,38]</sup>。CRISPR/Cas9 是一种有效的基因组编辑方法, 已在各类生物学研究中得到广泛应用<sup>[25]</sup>, 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术控制疟原虫染色体基因不同靶点的突变、插入或缺失等研究氨基酸改变对疟原虫的影响, 识别并验证合理干预的新靶点<sup>[12]</sup>, 不但可以辅助新抗疟药物靶点研究<sup>[13]</sup>, 还可以利用该技术进行相关疫苗的研究<sup>[39]</sup>。体外寄生虫培养物的 DNA 转染通常是解决这些问题和表征蛋白质靶标的最有效方法。通过不断调整优化 CRISPR/Cas9 系统来提高转染效率, 可以增加实验研究的确定性<sup>[14,19]</sup>。

综上所述, 恶性疟原虫 CRISPR/Cas9 系统的技术局限和问题以及稳定转染过程中的不确定因素尚未完全解决, 有待进一步完善。

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] ODUMA C O, KOEPFLI C. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* adjust investment in transmission in response to change in transmission intensity: a review of the current state of research[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 786317.
- [2] World Health Organization. World Malaria Report 2021[R]. Geneva: WHO, 2021.
- [3] SUMAM DE OLIVEIRA D, KRONENBERGER T, PALMISANO G, et al. Targeting SUMOylation in *Plasmodium* as a potential target for malaria therapy[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 685866.
- [4] STOKES B H, DHINGRA S K, RUBIANO K, et al. *Plasmodium falciparum* K13 mutations in Africa and Asia impact artemisinin resistance and parasite fitness[J]. eLife, 2021, 10: e66277.
- [5] NEVAGI R J, GOOD M F, STANISIC D I. *Plasmodium* infection and drug cure for malaria vaccine development[J]. Expert Rev Vaccines, 2021, 20(2): 163-183.
- [6] SU X Z, LANE K D, XIA L, et al. *Plasmodium* genomics and genetics: new insights into malaria pathogenesis, drug resistance, epidemiology, and evolution[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(4): e00019-e00019.
- [7] NISHI T, SHINZAWA N, YUDA M S, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9 system in *Plasmodium falciparum* using Cas9-expressing parasites and a linear donor template[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 18501.
- [8] ZHANG M, WANG C Q, OTTO T D, et al. Uncovering the essential genes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by saturation mutagenesis[J]. Science, 2018, 360(6388): eaap7847.
- [9] XIAO B, YIN S, HU Y, et al. Epigenetic editing by CRISPR/dCas9 in *Plasmodium falciparum*[J]. PNAS, 2019, 116(1): 255-260.
- [10] 付益修, 孔庆明, 陆绍红. CRISPR/Cas9 系统在寄生虫领域的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017, 35(3): 299-304.

- FU Y X, KONG Q M, LU S H. Research development of CRISPR/Cas9 system on parasitic studies[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2017, 35(3): 299–304.(in Chinese)
- [ 11 ] NG C L, FIDOCK D A. *Plasmodium falciparum* *in vitro* drug resistance selections and gene editing[J]. Methods Mol Biol, 2019, 2013: 123–140.
- [ 12 ] LEE M C S, LINDNER S E, LOPEZ–RUBIO J J, et al. Cutting back malaria: CRISPR / Cas9 genome editing of *Plasmodium*[J]. Brief Funct Genomics, 2019, 18(5): 281–289.
- [ 13 ] ADLI M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1911.
- [ 14 ] ZHAO Y M, WANG F, WANG C H, et al. Optimization of CRISPR/cas system for improving genome editing efficiency in *Plasmodium falciparum*[J]. Front Microbiol, 2021, 11: 625862.
- [ 15 ] 王宪锋, 穆士杰. 我国YN株恶性疟原虫红内期瞬时转染系统的初步建立[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(5): 447–449.
- [ 16 ] WANG X X, WANG J M, LIU J L, et al. Establishment of a transient transfection system for *Babesia* sp. Xinjiang using homologous promoters[J]. Parasitol Res, 2021, 120(10): 3625–3630.
- [ 17 ] STEPANENKO A A, HENG H H. Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off–target effects, artifacts[J]. Mutat Res Rev Mutat Res, 2017, 773: 91–103.
- [ 18 ] CEDROLA F, MARTINELE I, SENRA M V X, et al. Rediscovery of *Plasmodium* (*Huffia*) *huffi* (*Api complexa*, *Haemosporida*): a lost lineage from toucans[J]. Parasitol Res, 2021, 120(9): 3287–3296.
- [ 19 ] RIBEIRO J M, GARRIGA M, POTCHEN N, et al. Guide RNA selection for CRISPR–Cas9 transfections in *Plasmodium falciparum*[J]. Int J Parasitol, 2018, 48(11): 825–832.
- [ 20 ] CARRASQUILLA M, ADJALLEY S, SANDERSON T, et al. Defining multiplicity of vector uptake in transfected *Plasmodium* parasites [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 10894.
- [ 21 ] FONG M Y, CHEONG F W, LAU Y L. Erythrocyte–binding assays reveal higher binding of *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein to human Fya+/b+ erythrocytes than to Fya+/b– erythrocytes[J]. Parasit Vectors, 2018, 11(1): 527.
- [ 22 ] MORAES BARROS R R, GIBSON T J, KITE W A, et al. Comparison of two methods for transformation of *Plasmodium knowlesi*: direct schizont electroporation and spontaneous plasmid uptake from plasmid–loaded red blood cells[J]. Mol Biochem Parasitol, 2017, 218: 16–22.
- [ 23 ] GOVINDARAJALU G, RIZVI Z, KUMAR D, et al. Lyse–reseed erythrocytes for transfection of *Plasmodium falciparum*[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 19952.
- [ 24 ] KUANG D X, QIAO J C, LI Z, et al. Tagging to endogenous genes of *Plasmodium falciparum* using CRISPR / Cas9[J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1): 595.
- [ 25 ] KUDYBA H M, COBB D W, FLORENTIN A, et al. CRISPR/Cas9 gene editing to make conditional mutants of human malaria parasite *P. falciparum*[J]. J Vis Exp, 2018(139): 57747.
- [ 26 ] WANG S Q, ZENG W L, ZHAO W, et al. Comparison of *in vitro* transformation efficiency methods for *Plasmodium falciparum*[J]. Mol Biochem Parasitol, 2022, 247: 111432.
- [ 27 ] KAISER G, DE NIZ M, BURDA P C, et al. Generation of transgenic rodent malaria parasites by transfection of cell culture–derived merozoites[J]. Malar J, 2017, 16(1): 305.
- [ 28 ] SKINNER–ADAMS T S, LAWRIE P M, HAWTHORNE P L, et al. Comparison of *Plasmodium falciparum* transfection methods[J]. Malar J, 2003, 2: 19.
- [ 29 ] CARO F, MILLER M G, DERISI J L. Plate–based transfection and culturing technique for genetic manipulation of *Plasmodium falciparum*[J]. Malar J, 2012, 11: 22.
- [ 30 ] WANG J M, WANG X X, GUAN G Q, et al. Stable transfection system for *Babesia* sp. Xinjiang[J]. Parasit Vectors, 2021, 14(1): 463.
- [ 31 ] KNUEPFER E, NAPIORKOWSKA M, VAN OOIJ C, et al. Generating conditional gene knockouts in *Plasmodium* – a toolkit to produce stable DiCre recombinase–expressing parasite lines using CRISPR/Cas9[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3881.
- [ 32 ] JANIK E, NIEMCEWICZ M, CEREMUGA M, et al. Various aspects of a gene editing system–CRISPR–Cas9[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9604.
- [ 33 ] WALKER M P, LINDNER S E. Ribozyme–mediated, multiplex CRISPR gene editing and CRISPR interference (CRISPRi) in rodent–infectious *Plasmodium yoelii*[J]. J Biol Chem, 2019, 294(24): 9555–9566.
- [ 34 ] MACEDO–SILVA T, ARAUJO R B D, MEISSNER K A, et al. Knockdown of the *Plasmodium falciparum* SURFIN4.1 antigen leads to an increase of its cognate transcript[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183129.
- [ 35 ] TANG J Y, CHISHOLM S A, YEOH L M, et al. Histone modifications associated with gene expression and genome accessibility are dynamically enriched at *Plasmodium falciparum* regulatory sequences[J]. Epigenetics Chromatin, 2020, 13(1): 50.
- [ 36 ] GOHIL N, BHATTACHARJEE G, LAM N L, et al. CRISPR–Cas systems: challenges and future prospects[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2021, 180: 141–151.
- [ 37 ] KILIAN N, ZHANG Y D, LAMONICA L, et al. Palmitoylated proteins in *Plasmodium falciparum*–infected erythrocytes: investigation with click chemistry and metabolic labeling[J]. Bioessays, 2020, 42(6): e1900145.
- [ 38 ] 匡德宣, 王文广, 孙晓梅, 等. 恶性疟原虫动物模型及基因编辑研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(1): 65–71.  
KUANG D X, WANG W G, SUN X M, et al. Research progress of animal model establishment and gene editing on *Plasmodium falciparum*[J]. Lab Animal Comp Med, 2019, 39(1): 65–71.(in Chinese)
- [ 39 ] HOLLINGDALE M R, SEDEGAH M. Development of whole sporozoite malaria vaccines[J]. Expert Rev Vaccines, 2017, 16(1): 45–54.