

DOI:10.13350/j.cjpb.230910

• 论著 •

伯氏疟原虫 Pbg63 蛋白的表达及其传播阻断活性评估

于鑫鑫, 姚桂香, 张迪, 张碧莹, 刘飞, 杨帆, 闵慧, 曹雅明*

(中国医科大学基础医学院, 辽宁沈阳 110122)

【摘要】 **目的** 研究 Pbg63 蛋白在伯氏疟原虫各期的表达情况和定位, 评估其作为疟疾传播阻断疫苗候选抗原的潜在效应。 **方法** 从 NCBI 数据库获得 Pbg63 基因同源序列, 并进行同源序列比对; 通过 SMART 在线网站预测其编码蛋白的结构域, 利用 Immunomedicine Group 工具预测蛋白抗原决定簇。利用双交叉同源重组的方法在 Pbg63 基因 C 端加入 HA 标签, 在获得阳性克隆虫株的基础上通过 Western blot 和间接免疫荧光试验检测该蛋白在虫体各期的表达特点和定位。用 rPbg63 蛋白免疫小鼠, 通过酶联免疫吸附试验检测小鼠血清特异性抗体滴度, 通过体外试验观察 Pbg63 抗血清对伯氏疟原虫雄配子体出丝中心和动合子形成的影响。 **结果** BLAST 同源序列比对显示 Pbg63 蛋白在不同疟原虫种属中较为保守。成功表达 rPbg63 蛋白, 免疫小鼠后用 ELISA 检测血清中抗 Pbg63 抗体滴度为 1 : 25 600, 表明该蛋白具有良好免疫原性。Western blot 检测 Pbg63 在疟原虫裂殖体、配子体和动合子阶段均有表达; IFA 检测 Pbg63 在雌、雄配子体的胞浆和细胞膜均有表达, 但在动合子主要表达在胞膜上。体外传播阻断试验表明, 抗 Pbg63 免疫血清对配子体出丝中心数以及动合子的形成与对照组相比无显著影响。 **结论** Pbg63 在疟原虫各种属中相对保守, 在无性期和有性期均有表达, 但抗 Pbg63 免疫血清无明显传播阻断作用, 表明 Pbg63 尚不能作为传播阻断疫苗候选抗原。

【关键词】 疟疾; 伯氏疟原虫; 传播阻断疫苗; Pbg63 蛋白

【中图分类号】 R382.31

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)09-1047-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Sep;18(9):1047-1052.]

Expression characteristics and evaluation of transmission blocking activity of candidate antigen Pbg63 in *Plasmodium berghei*

YU Xinxin¹, YAO Guixiang¹, ZHANG Di¹, ZHANG Biying¹, LIU Fei¹, YANG Fan¹, MIN Hui¹, CAO Yaming¹ (College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China)*

【Abstract】 **Objective** Evaluation of the expression and localization of Pbg63 protein in various stages of *Plasmodium berghei* and evaluation of its potential effect as a malaria transmission-blocking vaccine candidate antigen. **Methods** Homologous sequences of Pbg63 in different *Plasmodium* species were obtained from NCBI BLAST database, the domain was predicted using SMART online site, the protein antigenic determinants were predicted by Immunomedicine Group. Double crossover homologous recombination was used to achieve the C terminal HA-tag of Pbg63, positive strains obtained by drug screening with pyrimethamine. Characterization and localization of the protein expression in plasmodium berghei stages by Western blot and indirect immunofluorescence assay. Subcutaneous immunization of mice with rPbg63 protein three times, serum specific antibody titers of Pbg63 were determined by Enzyme linked immunosorbent assay. The effect of Pbg63 antiserum on the formation of exflagellation and ookinete was determined in vitro transmission blocking assay, the serum dilution ratio is 1 : 5, 1 : 10. **Results** The alignment results showed that the Pbg63 sequence was relatively conservative among different *Plasmodium* species. In this study, we successfully induced rPbg63 protein expression and the antibody titer of anti-rPbg63 sera was screened around 1 : 25 600, indicates that the protein has strong immunogenicity. The results of pbg63 localization by Western blot indicate that Pbg63 was expressed in schizont, gametocyte and ookinete stages. Further, the localization of Pbg63 was detected by IFA assay showed that Pbg63 was located on the cytoplasm and membrane of gametocyte, while it was mainly expressed in the membrane in ookinete stage. Compare to the control group, there was no significant effect on gametocyte exflagellation ($t=0.3508, P>0.05$) and ookinete formation ($t=0.3608, P>0.05$) when the parasites cultured with Pbg63 antiserum. **Conclusion** Pbg63 is a relatively conserved protein in *Plasmodium* and highly expressed in both asexual and sexual relatively conserved protein in *Plasmodium* and highly expressed in both asexual and sexual stages, however the weak transmission blocking activity of anti-rPbg63 sera can't support it as an antigen for malaria transmission blocking vaccine.

* **【通讯作者】** 曹雅明, E-mail: ymccmu@163.com

【作者简介】 于鑫鑫(1997-), 女, 辽宁庄河人, 博士, 主要从事疟疾传播阻断疫苗的研究。E-mail: yxx1961083683@163.com

【Key words】 Malaria; *Plasmodium berghei*; transmission blocking vaccine; Pbg63 protein

疟疾主要是由媒介按蚊传播疟原虫引起的严重危害人类健康的传染性疾病。世界卫生组织(WHO)最新疟疾报告显示,2020年全球有2.41亿疟疾病例,死亡62.7万例^[1]。尽管现在药浸蚊帐,杀虫剂以及抗疟药的使用使得疟疾的发病率和死亡率逐年下降,但在非洲等疟疾肆虐地区当前的防控措施仍不足以起到完全消除疟疾的效果^[2],目前疟疾仍然是该地区主要公共卫生问题之一。当前由于疟原虫对多种抗疟药耐药性的出现与增加,已严重影响疟疾的控制与消除^[3]。因此,开发安全有效的疟疾疫苗以及抗疟药物对于疟疾的防治具有重要意义。

为了有效控制疟疾的传播,人们已致力于传播阻断疫苗(Transmission blocking vaccines, TBVs)的研究。TBVs被设计用来在人类宿主中诱导产生针对疟原虫有性期或在成蚊中发现的候选抗原的抗体^[4]。该类抗体可中和按蚊摄入血液中的有性期疟原虫,从而干扰其宿主中的发育,阻断其传播给其他易感人群^[5]。目前已将传播阻断疫苗与RTS,S/AS01疫苗配合使用以消除疟疾^[6]。目前对于传播阻断疫苗候选抗原的研究主要集中在疟原虫有性发育阶段表达的受精前和受精后抗原^[7],其中受精前抗原P230、P48/45^[8]和HAP2,以及受精后抗原P25和P28^[9]备受关注,研究证明这些抗原具有良好的传播阻断活性,然而目前发现的TBVs候选抗原并不能完全阻断疟疾传播^[10]。因此,筛选并研究其他候选抗原有助于TBVs的开发。通常一个优势TBVs候选抗原需要满足以下几个条件:一,抗原在疟原虫有性阶段膜表面高表达,具有信号肽和/或跨膜区;二,有良好的免疫原性和抗原性,能诱导机体产生较高和持久的抗体滴度;三,抗原免疫机体后产生的抗体能显著影响疟原虫有性阶段的发育过程,具有明显的传播阻断活性。

本研究利用生物信息学方法分析疟疾传播阻断疫苗候选抗原Pbg63(PBANKA_070300)特性;用原核表达系统诱导表达重组Pbg63蛋白,并制备鼠源多克隆抗血清,评价该蛋白的免疫源性;利用Western blot和IFA试验检测Pbg63蛋白在疟原虫各期的表达及其细胞定位,并通过体外传播阻断试验评估Pbg63蛋白作为TBVs候选抗原的可能性。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 实验动物和虫株 6~8周龄的雌性BALB/c小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*, Pb)ANKA株,为中国医

科大学免疫教研室保存。

1.2 主要试剂 His标签单克隆抗体和Alexa-555标记羊抗兔IgG购自中国ABclonal公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG和Alexa-488标记羊抗鼠IgG购自美国Invitrogen公司;RPMI 1640和胎牛血清购自美国Hyclone公司;青、链霉素购自美国Genview公司;肝素购自鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

2 方法

2.1 Pbg63基因生物信息学分析 从NCBI数据库中获得疟原虫不同种属Pbg63基因同源序列,利用BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>)进行同源序列比对;使用SMART在线网站(<http://smart.emblheidelberg.de/>)预测Pbg63蛋白结构域;使用Immuonmedicine Group(<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>)工具进行蛋白抗原决定簇分析。

2.2 Pbg63基因重组质粒的构建及目的蛋白的表达与纯化 根据原核表达载体设计引物,从Pbg63基因组中扩增编码358-422 aa的片段,并将扩增片段克隆到原核表达载体pET32a上。将重组质粒转染至大肠埃希菌(*E. coli*)Rosetta-gami B(RGB),使用1 mmol/L IPTG于19 ℃条件下诱导表达8 h;收集菌液沉淀,加入His天然结合缓冲液(10 mmol/L咪唑,300 mmol/L NaCl,50 mmol/L Na₃PO₄, pH 8.0),吹打混匀后超声破菌;离心,弃沉淀,取上清(含可溶的rPbg63)上镍-琼脂糖凝胶6FF柱,使用His天然结合缓冲液竞争洗脱rPbg63蛋白。洗脱的rPbg63蛋白用0.1 mol/L PBS(pH 7.4)于4 ℃深度脱盐过夜,次日用聚乙二醇浓缩获得纯化的rPbg63蛋白。

2.3 鼠抗rPbg63抗血清的制备及其抗体滴度检测

用纯化的rPbg63重组蛋白于皮下免疫BALB/c小鼠,初次免疫使用50 μg重组蛋白辅以完全弗氏佐剂,两次增强免疫均使用25 μg重组蛋白辅以不完全弗氏佐剂。末次免疫后10 d摘眼球取血,分离血清,采用ELISA检测抗体滴度。rPbg63重组蛋白包被浓度为10 μg/mL,次日每孔加200 μL PBS(含0.05% Tween)洗3次后弃去,用含1% BSA(胎牛血清)的PBS于37 ℃封闭酶标板1 h;100 μL 1% BSA, Pbg63抗血清用1% BSA从1:200起作倍比稀释,辣根过氧化物酶标记的抗鼠IgG用PBS作1:5000,显色液为TMB。显色后加入终止液,用酶标仪测定各孔450 nm波长处的吸光度A值。试验设置健康小鼠阴性对照。

2.4 Pb裂殖体、配子体、动合子的培养及虫体抗原的

提取

2.4.1 裂殖体的培养与纯化 取雌性昆明小鼠,腹腔注射 5×10^6 Pbg63-HA 型 Pb 感染的红细胞,感染 3 d 后尾静脉取血涂片,瑞士-吉姆萨染色,于光学显微镜下观察小鼠原虫血症情况。当小鼠原虫血症达 3%~5% 时,取小鼠眼球血 1 mL 加至 49 mL 裂殖体培养基(含 74% RPMI 1640、25% 胎牛血清、1% 青链霉素)中,置于含 5% CO_2 、10% O_2 、85% N_2 的培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养 20 h。取 1 μL 培养物涂片,瑞士-吉姆萨染色,光学显微镜下观察裂殖体培养情况。用 58% Nycodenz 溶液梯度密度离心分离裂殖体,收集中间灰白色层,PBS 清洗后取 1 μL 涂片、染色,光学显微镜下观察纯化情况。

2.4.2 配子体的纯化 雌性昆明小鼠腹腔注射 0.2 mL 苯胂(6 mg/mL) 3 d 后,腹腔注射 1×10^7 个 Pbg63-HA 型 Pb 感染的红细胞。于感染后第 4 d 尾静脉取血,涂片,瑞士-吉姆萨染色,显微镜下观察小鼠原虫血症情况,待原虫血症达到 15%~20% 时给小鼠饮用磺胺嘧啶(20 mg/L) 2 d,筛选成熟配子体阶段原虫并进行涂片染色鉴定。当仅存有成熟配子体时,将小鼠置于冰上经眼球取血 1 mL 并与 10 mL PBS 混合,用 48% Nycodenz 分离纯化成熟配子体。

2.4.3 动合子的培养及纯化 用苯胂处理小鼠 3 d,经腹腔注射 1×10^7 个 Pbg63-HA 型 Pb 感染的红细胞,当感染率达 10% 左右时取小鼠眼球血 1 mL 置于 9 mL 动合子培养基中,19 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h,取 1 μL 培养物涂片染色,观察动合子培养情况,并用 62% Nycodenz 溶液进行密度梯度离心,分离动合子,经 PBS 清洗后取 1 μL 于显微镜下观察纯化情况。

2.5 Pbg63 在疟原虫中的表达与检测

2.5.1 Pbg63 HA 标签虫株的构建 从 NCBI 数据库中获得 Pbg63 目的基因序列及同源臂序列,以终止密码子 TAA 为界,分别设计 5'UTR、3'UTR 引物,通过双交叉同源重组法对 Pbg63 基因 C 端加 HA 标签。

2.5.2 Western blot 检测 Pbg63 的表达 将上述分离纯化的 3 个生活史阶段的疟原虫血分别用 2% 皂素裂解红细胞,离心收集疟原虫,用含蛋白酶抑制剂的 2% SDS 抽提疟原虫总蛋白。取等量(30 μg)裂殖体、配子体、动合子蛋白(或 5 μg Pbg63 重组蛋白),经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离寄生虫抗原/蛋白后,湿转法(45 V 2.5 h)转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜用 TBST 稀释的 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次;加入用 5% 封闭液 1:200 稀释的 anti-HA 一抗 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,洗涤;加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:5000)孵育 2 h,洗涤,ECL 发光后将条带可视化。

2.5.3 Pbg63 的间接免疫荧光(IFA)检测 雌雄配子体、雌雄配子以及动合子样品用 4% 多聚甲醛 + 0.0075% 戊二醛室温固定 30 min; 3 000 r/min(离心半径 9 cm)离心 3 min,弃上清,沉淀用 PBS 清洗一次;加入 500 μL 透膜液(含 0.1% Triton X-100)处理 10 min, 3% BSA 封闭 1 h;加入稀释的 Pbg63 抗血清以及 1:500 稀释的 Marker 一抗(雌配子体:兔源抗-Pbg377 多抗;雄配子体:兔源抗 α -tubulin 多抗;雌配子及动合子:兔源抗-Pbs21 多抗)孵育 1 h,不透膜组加入 1:500 稀释的 Pbg63 抗血清孵育 1 h, PBS 洗涤后用 0.1% Triton X-100 处理 10 min 以便 Marker 染色,洗涤;加入 Alexa-488 标记的羊抗鼠 IgG 或 Alexa-555 标记的羊抗兔 IgG(1:500)孵育 1 h,洗涤;用 Hoechst333528 对细胞核染色 15 min,使用荧光显微镜观察并记录各时期虫体形态及染色情况。

2.6 体外传播阻断试验 小鼠经腹腔注射苯胂 3 d 后,腹腔注射 5×10^6 个野生型 Pb 感染的红细胞,培养基按照 1:5、1:10 加入抗 rPbg63 血清,待小鼠原虫血症到达 8%~10% 时,分别取 10 μL 鼠尾血置于 40 μL 含抗血清的培养基中,记录各视野下出丝中心数量。同时分别取 10 μL 鼠尾血置于上述培养基中,19 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h,取 1 μL 涂片,使用 anti-Pbs21 抗体识别动合子,荧光显微镜下计数动合子形成数量。

2.7 统计学分析 采用 GraphPad prism 9.5.1 软件进行分析绘图和统计学分析。ELISA 抗体滴度差异分析,各组平均每 10 个视野出丝数量以及动合子数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 Pbg63 基因生物信息学分析

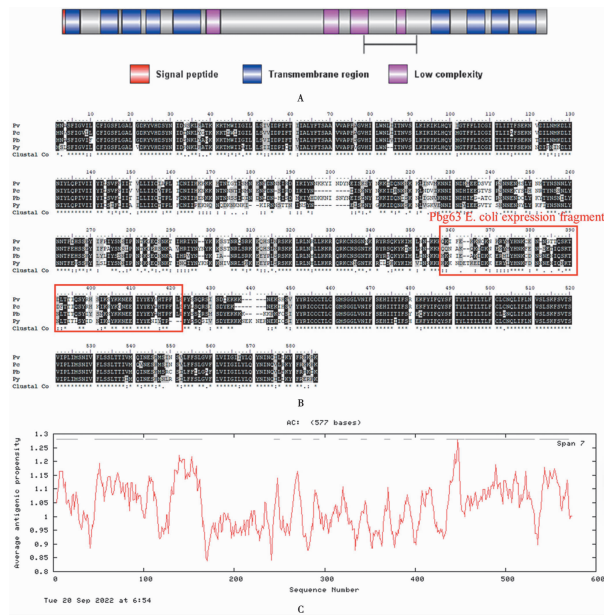
SMART 预测 Pbg63 蛋白具有 1 个 N 端信号肽, 9 个跨膜区(图 1A)。BLAST 同源序列比对分析显示,Pbg63 基因在疟原虫不同种属中较为保守(图 1B)。本研究选择的表达蛋白区域为 358-422aa,含有 3 个抗原簇(图 1C)。

2 Pbg63 重组蛋白的检测

利用 Western blot 对纯化的 Pbg63 重组蛋白进行检测,rPbg63 蛋白能被 anti-His 抗体识别,单一反应条带位于约 27 ku 处(图 2),与预期相符。

3 Pbg63 免疫鼠血清特异性抗体检测

ELISA 检测显示,Pbg63 重组蛋白 3 次免疫后小鼠血清特异性抗体水平与对照组相比显著升高($P < 0.001$);Pbg63 重组蛋白免疫小鼠所获得的抗体滴度达 1:25 600(图 3)。表明 Pbg63 重组蛋白具有良好的免疫原性。



A Pbg63 结构域示意图(红色代表信号肽,蓝色代表跨膜区,粉色代表低度复杂区) B Pbg63 基因同源序列比对示意图(*Pv*:间日疟原虫;*Pc*:夏氏疟原虫;*Pb*:伯氏疟原虫;*Py*:约氏疟原虫) C Pbg63 蛋白抗原决定簇分析

图 1 Pbg63 的生物信息学分析

A Schematic diagram of Pbg63 domain (The red is the signal peptide, the blue represents the transmembrane region, the pink represents low complexity) B Diagram of Pbg63 homologous sequence alignment (*Pv*:*P. vivax*; *Pc*:*P. chaudi*; *Pb*:*P. berghei*; *Py*:*P. yoelii*) C Analysis of antigenic determinants of Pbg63

Fig. 1 Bioinformatics analysis of Pbg63

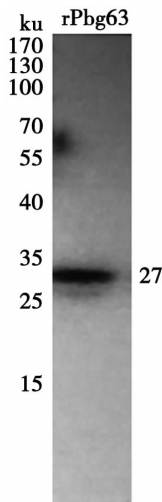


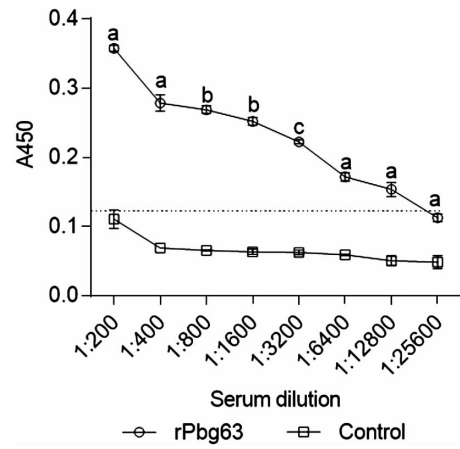
图 2 纯化重组 Pbg63 蛋白的 Western blot 检测

Fig. 2 The recombinant Pbg63 protein was detected by Western blot

4 Pbg63-HA 虫株的构建、鉴定及 Pbg63 的表达检测

利用双交叉同源重组方法获得 Pbg63-HA 型虫株,即将载体上的 HA 标签加入到 Pbg63 基因 C 端, hDHFR 和 yfcu 耐药基因加入到疟原虫基因组中(图 4A)。PCR 鉴定电转染结果,即以 WT 型虫株基因组为模板, P1、P2 为引物,扩增出特异性片段;以 Pbg63-HA 虫株基因组为模板,分别以 P1+P2, P1+P3, P4

+P5 为引物,分别扩增出 3 966、1 902 和 1 905 bp 片段(图 4B), Pbg63-HA 虫株构建正确。

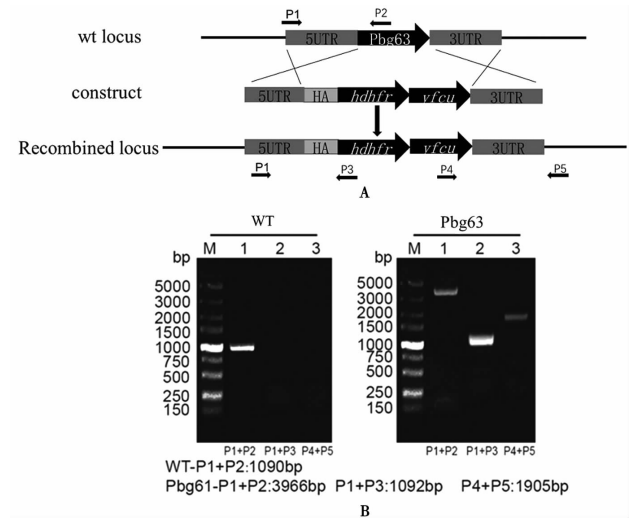


注:组间比较,^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.001$ 。

图 3 ELISA 检测 rPbg63 抗血清抗体滴度

Notes: Comparison between groups, ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.001$.

Fig. 3 The titer of rPbg63 antiserum antibody was detected by ELISA



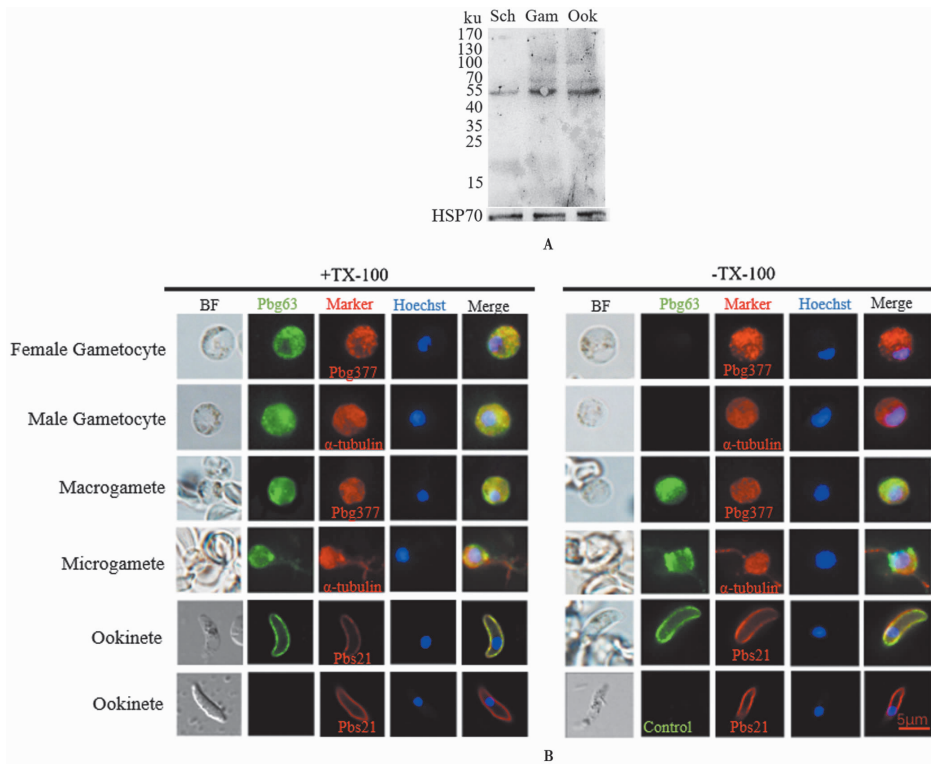
A Pbg63-HA 型标签虫株质粒构建模式图 B Pbg63-HA 型标签虫株 PCR 鉴定 M DNA 标志物 左图 1-3 WT 型虫株(1: P1+P2 扩增产物 1090 bp; 2: P1+P3; 3: P4+P5) 右图 1-3 Pbg63-HA 型虫株(1: P1+P2 扩增产物 3966 bp; 2: P1+P3 扩增产物 1092 bp; 3: P4+P5 扩增产物 1905 bp)

图 4 Pbg63-HA 型虫株 PCR 鉴定

A Strategy of HA tagging of Pbg63 at C-terminal B Verification of positive clone for Pbg63-HA by PCR M DNA Marker left panel 1-3 WT parasite (1: P1+P2 1069bp; 2: P1+P3; 3: P4+P5) right panel (1-3) Pbg63-HA transgenic parasite (1: P1+P2 3966bp; 2: P1+P3 1092bp; 3: P4+P5 1905bp)

Fig. 4 PCR identification of Pbg63-HA transgenic parasite

用分离纯化的 Pbg63-HA 裂殖体、配子体、动合子蛋白进行 Western blot,结果显示 Pbg63 在裂殖体、配子体、动合子均有表达(图 5A)。IFA 结果显示 rPbg63 抗血清可识别雌雄配子体、配子、合子以及动合子抗原。Pbg63 在雌雄配子体、雄配子以及雌配子的胞膜和胞质均有表达,但主要表达在胞浆内;动合子主要在胞膜上表达(图 5B)。



A Western blot 检测 Pbg63 的表达 Sch 裂殖体 Gam 配子体 Ook 动合子 HSP70 阳性对照 Control 空白对照 B IFA 检测 Pbg63 在伯氏疟原虫各期的定位 BF 明视野 +TX-100 透膜 -TX-100 不透膜 Pbg377 雌配子体及雌配子特异性表达 α -tubulin 雄配子体及雄配子特异性表达 Pbs21 动合子表面特异性表达(标尺为 5 μ m)

图 5 Pbg63 在 Pb 各期的表达检测与定位

A The expression of Pbg63 detected by Western blot Sch schizont Gam Gametocyte Ook Ookinete HSP70 Positive control Control blank control B IFA was used to detect the localization of Pbg63 in all stages of *P. berghei* BF Bright field +TX-100 Permeable membrane -TX-100 impermeable membrane Pbg377 Specific expression of female gametocyte and female gamete α -tubulin Specific expression of male gametocyte and male gamete Pbs21 Surface specific expression of the Ookinete

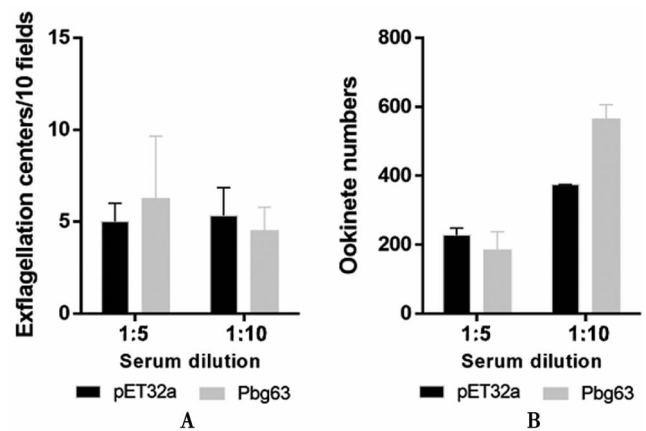
Fig. 5 The expression and subcellular localization of Pbg63 protein

5 Pbg63 抗血清传播阻断作用评价

为了评估 rPbg63 抗血清的传播阻断能力,将不同比例稀释的 rPbg63 抗血清与疟原虫于 25 $^{\circ}$ C 培养 15 min,雄性配子体出丝数量与对照组 pET32a 抗血清相比未受明显影响($t=0.3508, P>0.05$)(图 6A);将抗 rPbg63 的血清与疟原虫于 19 $^{\circ}$ C 共同培养 24 h 后,动合子形成较对照组未显著减少($t=0.3608, P>0.05$)(图 6B)。表明 rPbg63 抗血清无阻断疟疾传播作用。

讨论

疟疾传播阻断疫苗主要针对的是疟原虫有性发育阶段,区别于红前期疫苗与红内期疫苗。TBVs 是一类“利他”疫苗,其意义在于减少和阻断疟原虫经蚊媒介感染下一宿主^[11]。这类抗原主要分为三大类,即受精前的靶抗原、受精后的靶抗原及蚊阶段抗原^[12]。为了开发安全有效的 TBVs,传播阻断疫苗候选抗原的筛选至关重要。通常,选择的候选抗原在不同疟原虫种属中高度保守和低生物多态性,并在有性阶段膜表面表达。最重要的是候选抗原有较好的免疫原性和抗



A 抗 rPbg63 免疫血清对配子体出丝的影响 B 抗 rPbg63 免疫血清对动合子形成数的影响

图 6 Pbg63 抗血清对雄配子出丝和动合子形成的影响

A The effect of anti- rPbg63 serum on the gametocyte exflagellation B The effect of anti- rPbg63 serum on the ookinete numbers

Fig. 6 The effect of anti-Pbg63 serum on gametocyte exflagellation and ookinete formation

原性,在用抗原免疫机体后能诱导产生较高和持久的抗体滴度,并且产生的抗体能显著影响或干扰疟原虫有性阶段的发育过程,表现出明显的传播阻断活

性^[13]。TBVs 开发过程中的技术难点之一在于理想候选抗原的筛选。本研究在利用生物信息学分析的基础上筛选出 Pbg63 (PBANKA_070300) 蛋白, 并利用分子生物学方法探究其作为传播阻断疫苗候选抗原的可能性。

BLAST 同源序列比对显示, Pbg63 蛋白在疟原虫不同种属中较为保守。SMART 预测虽然未发现 Pbg63 蛋白含有特殊结构域, 但其具有 1 个 N 端信号肽, 9 个跨膜区, 推测可能为膜表面蛋白。在获得 Pbg63-HA 标签虫株的基础上, 通过 Western blot 以及 IFA 试验也证实 Pbg63 蛋白确实在疟原虫有性阶段高表达, 且定位于虫体的膜和胞浆中。

通常, 理想的 TBVs 候选抗原一般是相对较小的蛋白质或较大蛋白质的部分结构域。这是由于蛋白质结构中多个二硫键的存在可能影响蛋白质的正确折叠构象, 在利用原核表达系统表达时影响可溶性蛋白的形成。所以本实验选择表达截短蛋白 (358-422 aa) 而非全长蛋白进行研究。结果表明, 由 Pbg63 重组蛋白免疫小鼠所获得的抗体滴度达 1 : 25 600, 提示利用大肠埃希菌原核表达系统表达的 Pbg63 重组蛋白具有良好的免疫原性。在其他相关研究中, 为了克服重组蛋白免疫原性弱的缺点, 需要探索多种疫苗递送技术和免疫调节佐剂, 以提高现有候选抗原的免疫原性^[14]。

雄配子体出丝和体外动合子形成情况通常用来评估抗血清的传播阻断活性。前期研究发现的一些传播阻断候选抗原中的 Pbg37 重组蛋白免疫小鼠后的抗血清可使雄配子出丝数量显著减少, 并使动合子数量减少 75 %^[15]。本研究在不同血清稀释比例情况下, rPbg63 抗血清对雄配子出丝和动合子数量均无显著影响, 推测其原因可能是 Pbg63 蛋白不是疟原虫发育过程中所必需, 在有性阶段功能不显著。籍此认为 Pbg63 尚不能作为疟疾传播阻断疫苗候选抗原。

目前, 传播阻断疫苗仍是最具潜力的疟疾疫苗之一, 未来仍需积极寻找潜在的候选抗原。利用流行区患者血清筛选^[16], 或者数学建模等方法评估^[17]将有助于这一筛选过程。此外, 开发高效的疫苗递送系统或配伍佐剂将促进传播阻断疫苗的发展进程。

【参考文献】

[1] Bylicka-Szczepanowska E, Korzeniewski K. Asymptomatic malaria infections in the time of COVID-19 pandemic: experience from the Central African Republic [J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(6): 3544-3552.

[2] Ochomo EO, Gimnig JE, Bhattarai A, et al. Evaluation of the protective efficacy of a spatial repellent to reduce malaria incidence in children in western Kenya compared to placebo: study protocol for

a cluster-randomized double-blinded control trial (the AEGIS program) [J]. Trials, 2022, 23(1): 260-280.

[3] Chhibber-Goel J, Yogavel M, Sharma A. Structural analyses of the malaria parasite aminoacyl-tRNA synthetases provide new avenues for antimalarial drug discovery [J]. Protein Sci, 2021, 30(9): 1793-1803.

[4] Palatnik-de-Sousa CB, Nico D. The delay in the licensing of protozoal vaccines: A comparative history [J]. Front Immunol, 2020, 11: 204-219.

[5] Patel PN, Tolia N. Structural vaccinology of malaria transmission-blocking vaccines [J]. Expert Rev Vaccines, 2021, 20(2): 199-214.

[6] McCoy KD, Weldon CT, Ansumana R, et al. Are malaria transmission-blocking vaccines acceptable to high burden communities? Results from a mixed methods study in Bo, Sierra Leone [J]. Malar J, 2021, 20(1): 183-194.

[7] Zheng L, Peng W, Qi ZM, et al. Effects of transmission-blocking vaccines simultaneously targeting pre- and post-fertilization antigens in the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* [J]. Parasit Vectors, 2016, 9(1): 433-441.

[8] Theisen M, Jore MM, Sauerwein R. Towards clinical development of a Pfs48/45-based transmission blocking malaria vaccine [J]. Expert Rev Vaccines, 2017, 16(4): 329-336.

[9] Saxena AK, Wu Y, Garboczi DN. *Plasmodium* p25 and p28 surface proteins: potential transmission-blocking vaccines [J]. Eukaryot Cell, 2007, 6(8): 1260-1265.

[10] Sauerwein RW, Bousema T. Transmission blocking malaria vaccines: Assays and candidates in clinical development [J]. Vaccine, 2015, 33(52): 7476-7482.

[11] Kapulu MC, Da DF, Miura K, et al. Comparative assessment of transmission-blocking vaccine candidates against *Plasmodium falciparum* [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11193-111207.

[12] Tachibana M, Takashima E, Morita M, et al. *Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccines: Progress, challenges and innovation [J]. Parasitol Int, 2022, 87: 102525.

[13] Howard GP, Bender NG, Khare P, et al. Immunopotentiality by lymph-node targeting of a malaria transmission-blocking nanovaccine [J]. Front Immunol, 2021, 12: 729086-729096.

[14] Duffy PE. Transmission-blocking vaccines: harnessing herd immunity for malaria elimination [J]. Expert Rev Vaccines, 2021, 20(2): 185-198.

[15] Liu F, Zheng WQ, He YW, et al. Characterization of *Plasmodium berghei* Pbg37 as both a pre- and postfertilization antigen with transmission-blocking potential [J]. Infect Immun, 2018, 86(8): e00785-17.

[16] Artzy-Randrup Y, Dobson AP, Pascual M. Synergistic and antagonistic interactions between bednets and vaccines in the control of malaria [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(10): 3014-3019.

[17] Marini A, Zhou Y, Li YY, et al. A universal plug-and-display vaccine carrier based on HBsAg VLP to maximize effective antibody response [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2931-2942.