

伯氏疟原虫 PbPH 表达特点和单克隆抗体传播阻断效应研究

张耀文¹, 刘鹏波², 寇旭¹, 郑文琪¹, 刘飞², 王美莲^{1*}

(1. 中国医科大学基础医学院 病原生物学教研室, 辽宁 沈阳 110021;

2. 中国医科大学基础医学院 免疫学教研室, 辽宁 沈阳 110021)

摘要 制备抗 PbPH 单克隆抗体 (mAb), 检测伯氏疟原虫 (*Plasmodium berghei*) PbPH 的表达特点和传播阻断能力。主要通过蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 和间接免疫荧光法 (Indirect immunofluorescent assay, IFA), 确定 PbPH 的表达阶段以及抗 PbPH 单克隆抗体的特异性。1 × 10⁶ 个 *P. berghei* 感染雌性 BALB/c 小鼠 3 d 后, 尾静脉收集感染小鼠的血液, 与鼠源的抗 PbPH 单克隆抗体/PBS 对照, 按照不同的稀释倍数 (1 : 5、1 : 10、1 : 50) 进行混合培养, 观察 15 min 后, 伯氏疟原虫配子体出丝中心数及 24 h 后动合子形成数的变化。WB 和 IFA 检测抗 PbPH 单克隆抗体可以识别雌雄配子体、雄配子、雌配子/合子、retort 和动合子的表面抗原。体外传播阻断实验中, 与 PBS 对照组相比, 在加入不同浓度 (1 : 5、1 : 10) 的抗 PbPH 单克隆抗体培养后, 配子体出丝中心数分别减少了 41.7%、32.7%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 动合子形成数分别减少了 45.1%、14.8%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。抗 PbPH 单克隆抗体可以有效阻断体外配子体出丝中心和动合子的形成, 从而影响伯氏疟原虫在蚊体内的进一步发育和继续传播。

关键词 伯氏疟原虫; PbPH; 动合子; 配子体; 单克隆抗体; 传播阻断疫苗

中图分类号 Q939.93 文献标识码 A 文章编号 1005-7021 (2021) 02-0067-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2021.02.009

Characteristics and Transmission Blocking Effect of Monoclonal Antibodies against PbPH on *Plasmodium berghei*

ZHANG Yao-wen¹, LIU Peng-bo², KOU Xu¹, ZHENG Wen-qi¹, LIU Fei², WANG Mei-lian^{1*}

(1. Teach. & Res. Div. of Pathogen Biol.,

2. Teach & Res. Div. of Immunol., Coll. of Basic Med. Sci., China Med. Uni., Shenyang 110021)

Abstract Characteristics and transmission blocking ability of PbPH were studied by preparing monoclonal antibodies (mAb) against PbPH. The expression phase and the specificity of mAb of PbPH were mainly detected by Western blot (WB) and indirect immunofluorescent assay (IFA). *In vitro* assays, 3 days after *Plasmodium berghei* infected female BALB/c mice, the blood of the infected mice was obtained from the tail vein, and mixed culture with the anti-PbPH mAb/PBS at different dilution concentrations (1 : 5, 1 : 10, 1 : 50), and the number of exflagellation centers of male gametocytes and the number of ookinete were observed and counted 15 min after. Anti-PbPH mAb can identify the surface antigens of male and female gametocytes, male gametes, female gametes/zygotes, retort and ookinetes by WB and IFA. *In vitro* experiment of transmission blocking, compared with the PBS control group, after adding different concentrations (1 : 5, 1 : 10) of anti-PbPH mAb, the exflagellation centers of male gametocytes were significantly decreased by 41.7% and 32.7% respectively with difference possessing statistic significance ($P < 0.05$). The number of ookinete was significantly reduced by 45.1% and 14.8%, respectively with difference possessing statistic

基金项目: 辽宁省科技厅项目 (QN2019023)

作者简介: 张耀文 女, 硕士研究生。从事疟疾传播阻断疫苗研究。E-mail: zyw18004012010@163.com

* 通讯作者。女, 副教授, 博士, 硕士生导师。从事疟疾传播阻断疫苗研究。E-mail: bigwangfei@qq.com

收稿日期: 2020-09-29

significance ($P < 0.05$). Anti-PbPH mAb can effectively block the exflagellation centers and ookinetes *In vitro*, thereby affecting further development and continuous transmission of plasmodium in mosquito's bodies.

Keywords *Plasmodium berghei*; PbPH; Ookinete; Gametocytes; Monoclonal antibodies (mAb); Transmission-blocking vaccines

雌性按蚊传播的疟疾是一种虫媒传染病,其病原体为疟原虫。尽管人类在控制疟疾方面取得了一定的进展,但是2019年WHO世界卫生组织报告的数据显示,2018年全球仍有约2.28亿疟疾病例,其中死亡约40.54万人^[1]。因此,世界卫生组织提出区域疟疾消除计划,以2030年实现“最少35个国家完全消除疟疾”为目标。然而,这一目标的实现却面临着若干技术的挑战,包括间日疟原虫和恶性疟原虫共同流行的许多地区间日疟原虫的发病率或比例的增加。目前,治疗疟疾依然主要依靠以青蒿素为基础的复方药物或药浸蚊帐。然而,疟原虫和按蚊分别对抗疟药物和杀虫剂耐药性的日益增加,严重阻碍了对疟原虫传播的有效控制,因此,开发高效的传播阻断疫苗迫在眉睫^[2-3]。传播阻断疫苗(transmission blocking vaccine, TBV)是通过阻断蚊中疟原虫的发育阻止疟疾的传播。基本原理是通过有性阶段或蚊阶段寄生虫的表面抗原免疫人类,从而在人体内诱导相应抗原的抗体,阻止疟原虫在蚊中肠内的进一步发育,从而阻断疟疾的传播^[4]。然而到目前为止,针对疟原虫有性阶段传播阻断疫苗候选抗原的筛选却不太理想,目前主要包括候选抗原Pfs25、Pfs48/45和Pfs230。针对Pfs25产生的抗体主要抑制合子在蚊子肠道内的发育^[5-6]; Pfs48/45是配子体细胞膜蛋白,其在配子出现后从红细胞中释放出来,其抗体可阻断疟原虫卵囊的形成,从而阻断恶性疟原虫的传播^[7]; Pfs230在恶性疟原虫有性期表面形成复合物参与雄配子和雌配子的受精过程,以补体依赖的方式阻断恶性疟原虫的传播^[8-9],其产生的抗体也可以阻止恶性疟原虫卵囊发育^[10]。根据中国医科大学基础医学院病原生物学教研室之前发表的数据,筛选出受精前后均有表达的PbPH作为研究对象^[11]。因此,本研究制备了抗PbPH单克隆抗体,通过WB和IFA检测PbPH的表达阶段和抗PbPH单克隆抗体的特异性,并通过体外

配子体出丝和动合子形成实验检测抗PbPH单克隆抗体的传播阻断效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*) ANKA株,为中国医科大学基础医学院免疫学教研室保存;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。

1.1.2 培养基 裂殖体培养基: RPMI1640, 50 mg/L青霉素, 50 mg/L链霉素, 20% (体积分数)热灭活胎牛血清, 50 mL/0.5 mL血液; 动合子培养液: RPMI1640, 50 mg/L青霉素, 50 mg/L链霉素, 100 mg/L新霉素, 20% (体积分数)热灭活FCS, 1 mg/L肝素钠, pH 8.0; HAT培养基; HT培养基。

1.1.3 试剂 苯肼、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG、Alexa-488标记的羊抗鼠IgG、Hoechst33258 (美国Invitrogen公司); Alexa-555标记的羊抗兔IgG (英国Abcam); 抗Pbs21单克隆抗体由日本自治大学Hiroyuki Matsuoka教授赠予; RPMI 1640、胎牛血清 (美国Thermo公司); 肝素钠及其他化学试剂 (鼎国昌盛生物技术有限责任公司)。

1.1.4 仪器与设备 移液器 (QZ07508, Thermo公司); 垂直电泳槽 (EPM-7552, 上海天能科技有限公司); 电转槽 (Bio-Pad, 美国); 分析天平 (L-1660DTP, 日本Shimadzu); 电热恒温培养箱 (HH-B11-420, 上海跃进医疗器械厂); OLYMPUS显微镜及成像系统 (BX53, 日本OLYMPUS公司); 涡旋振荡器 (VORTEX-5, 海门其林贝仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 抗PbPH单克隆抗体的制备 利用已纯化的rPbPH重组蛋白对BALB/c雌性小鼠进行免疫, 免疫过程和方法与文献[11]基本相同, 于末次免

疫后 3~4 d, 分离出小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合培养。经过聚乙二醇处理后, 将融合培养的细胞适当稀释, 分置于 96 孔培养板中, 培养 24 h 后加入 $4 \times \text{HAT}$ 选择培养基, 每隔 2~3 d 更换一次培养基 ($1 \times \text{HAT}$), 定期观察其生长状况。2 周左右更换为 HT 培养基, 待杂交瘤细胞长至孔底面积 $1/3$ 时, 取其培养上清用间接 ELISA 法检测抗体含量, 经 2 次检测阳性的细胞, 按照有限稀释法进行克隆, 至阳性率达到 100%, 且抗体滴度基本一致时, 筛选出克隆株^[12-13]。

1.2.2 抗 PbPH 单克隆抗体的收集 将筛选出的杂交瘤细胞用含 5% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基进行大量培养, 待细胞生长旺盛时, 离心收集上清液, 提纯备用。预先给小鼠腹腔注射液体石蜡, 1 周后将杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中, 10 d 后采集腹水离心后, 取上清液进行纯化。

1.2.3 *P. berghei* 裂殖体/配子体/动合子的收集及其疟原虫抗原的提取 收集裂殖体, 雌性 BALB/c 小鼠经尾静脉注射 1×10^6 个 *P. berghei* 感染的红细胞, 待感染率达到 3% 时, 乙醚麻醉小鼠, 收集肝素化血液置于裂殖体培养基中, 然后于 37 °C 的 10% O_2 、5% CO_2 和 85% N_2 温箱中孵化 20 h^[11]。培养物经 58% (体积分数) 的 Nycodenz 密度梯度进行分级分离, 收集中间灰白层的裂殖体, 经 PBS 清洗 2 次, 取 1 μL 进行 Giemsa 染色, 光学显微镜下检测裂殖体含量与纯度。收集配子体, 苯胍处理过的雌性 BALB/c 小鼠尾静脉注射 1×10^7 个 *P. berghei* 感染的红细胞, 于感染第 4 天, 给小鼠饮用磺胺嘧啶 (20 mg/L 饮水) 2 d。乙醚麻醉小鼠, 心脏采血并将血液保存在冰上以避免过早活化配子体, 经 48% (体积分数) 的 Nycodenz 分离, 收集中间灰白层配子体, PBS 洗涤 2 次, 取 1 μL 进行 Giemsa 染色, 光学显微镜下检测配子体含量与纯度^[11]。收集动合子, 用 1×10^7 个 *P. berghei* 感染的红细胞感染苯胍处理过的雌性 BALB/c 小鼠, 于感染第 3 天, 乙醚麻醉小鼠, 心脏采血, 1 mL 血液置于 9 mL 动合子培养液中。19 °C 培养 24 h, 然后用 62% (体积分数) Nycodenz 密度梯度离心, 收集中间灰白层动合子, PBS 清洗 2 次, 取 1 μL 进行 Giemsa 染色, 光学显微镜下检测动合子含量与纯度。收集纯化的伯氏疟原虫, 用

0.2% 的皂角苷裂解去除红细胞。伯氏疟原虫抗原经裂解液 (1% TritonX-400、2% SDS、PBS 溶解, 含有蛋白酶抑制剂) 裂解 30 min。10 000 r/min 离心 10 min, 取上清 BCA 定量, -80 °C 保存。

1.2.4 Western Blot 检测抗 PbPH 单克隆抗体的特异性 将等量的伯氏疟原虫抗原 (30 μg /泳道) 于 10% SDS-PAGE 凝胶上进行分离, 电泳结束后, 4 °C 45 V 恒压转膜 3 h 后, 先用 5% (质量分数) TBST 溶解的脱脂奶粉 4 °C 封闭 2 h, 然后 TBST 清洗 3 次。清洗后的膜分别与 TBST 稀释的抗 PbPH 单克隆抗体 (1:500) 和抗 rH-SP70 鼠血清 (1:500) 于 4 °C 结合过夜。再次用 TBST 将膜清洗 3 次, 每次 5 min, 再用 TBST (1:5 000) 稀释的辣根过氧化物酶 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体在 37 °C 孵育 2 h, 用 TBST 将膜清洗 3 次。最后进行 ECL 发光, 在荧光图像分析系统中对其进行检测。

1.2.5 间接免疫荧光实验检测 PbPH 的表达阶段 为确定抗 PbPH 单克隆抗体是否能检测到 PbPH 天然构象蛋白, 将苯胍处理过的雌性 BALB/c 小鼠经尾静脉注射 1×10^7 个 *P. berghei* 感染的红细胞, 感染后第 3 天, 取 10 μL 感染小鼠尾血制备雌雄配子体、雄配子出丝 (25 °C 孵育 15 min)、雌配子/合子 (25 °C 孵育 2 h)、动合子 (19 °C 孵育 24 h) 样品, 用 4% 多聚甲醛和 0.007 5% 戊二醛室温条件下固定 30 min, 经 PBS 洗 1 次后, 透膜组用 0.1% Triton X-400 透膜 10 min, 透膜组和不透膜组均加入 5% 脱脂奶粉/PBS 封闭 1 h。经 PBS 洗 1 次后, 透膜组加入 1:500 倍稀释的抗 rPbPH 单克隆抗体和 Marker (雌配子体: 兔源抗-Pbg377 多抗; 雄配子体: 兔源抗- α -tubulin 多抗; 合子及动合子: 兔源抗-Pbs21 多抗) 孵育 1 h。不透膜组加入 1:500 倍稀释的抗 rPbPH 单克隆抗体孵育 1 h 后, PBS 洗涤 3 次, 0.1% Triton X-400 透膜 10 min, 5% 脱脂奶粉/PBS 封闭 1 h 后, 再加入 1:500 倍稀释的 Marker 混合液孵育 1 h。PBS 漂洗后, 加入 1:500 倍稀释的 Alexa-488 标记的羊抗鼠 IgG 和 Alexa-555 标记的羊抗兔 IgG 孵育 1 h。PBS 漂洗后, 加入 1:1 000 倍稀释的 Hoechst33258 进行细胞核染色 15 min 后, 荧光显微镜观察结果^[14]。

1.2.6 体外配子体出丝数的检测 为确定抗 Pb-

PH 单克隆抗体是否影响配子体出丝, 将苯胍处理过的雌性 BALB/c 小鼠经尾静脉注射 1×10^6 个 *P. berghei* 感染的红细胞, 感染后第 3 天, 取 10 μ L 感染小鼠的尾血与 40 μ L 动合子培养基稀释的抗 PbPH 单克隆抗体/PBS (1:5、1:10、1:50) 混合, 25 $^{\circ}$ C 培养 15 min, 光学显微镜计数配子体出丝数。

1.2.7 体外动合子形成的检测 为确定抗 PbPH 单克隆抗体是否影响动合子形成, 将苯胍处理过的雌性 BALB/c 小鼠经尾静脉注射 1×10^6 个 *P. berghei* 感染的红细胞, 感染后第 3 天, 取 10 μ L 感染小鼠的尾血与 90 μ L 动合子培养基稀释的抗 PbPH 单克隆抗体/PBS (以 1:5、1:10、1:50) 混合, 19 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 固定培养物, 以抗-Pbs21 单克隆抗体 (1:500) 标记, 染色方法同文献 [11], 荧光显微镜下计数动合子形成数。

1.2.8 统计方法 采用 SPSS 23.0 软件进行 *t* 检验的统计学分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 抗 PbPH 单克隆抗体的获取

利用细胞融合技术、有限稀释法、间接 ELISA 等实验方法, 从 30 株单克隆杂交瘤细胞株中筛选出 1 株能够稳定分泌抗 PbPH 单克隆抗体的杂交瘤细胞, 并在扩大培养后, 通过相应的实验技术获取了抗 PbPH 单克隆抗体。

2.2 Western blot 检测抗 PbPH 单克隆抗体的特异性

为了确定抗 PbPH 单克隆抗体是否识别伯氏疟原虫蛋白, 对纯化后的裂殖体、配子体和动合子的裂解物进行 Western blot (WB) 分析。抗 PbPH 单克隆抗体主要识别配子体和动合子, 条带大小约 33 kDa, 与预测的蛋白大小一致, 在裂殖体抗原中未检测到相应条带 (图 1)。这与本教研室之前的研究结果相符合^[11], 证实了抗 PbPH 单克隆抗体可以识别疟原虫配子体和动合子。

2.3 IFA 检测 PbPH 的表达阶段

利用 IFA 对 WB 的结果进行进一步验证。抗 PbPH 单克隆抗体可以识别雌雄配子体及雄配子、雌配子/合子、retort、动合子的表面抗原。透膜时, 在配子体及其以后的阶段均检测到荧光信

号; 不透膜时, 只在配子及其以后的阶段能检测到荧光信号; PBS 对照组在这些阶段均未检测到荧光信号 (图 2)。与之前的研究相一致, 表明 PbPH 可分泌到疟原虫有性阶段的膜表面, 同时抗 PbPH 单克隆抗体可以有效识别分泌到疟原虫膜表面的蛋白。

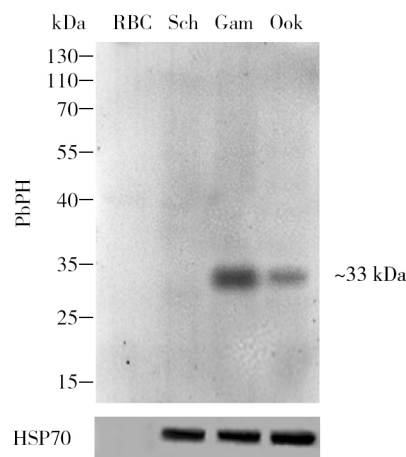


图 1 WB 检测抗 PbPH 单克隆抗体的特异性

Fig. 1 The specificity of anti-PbPH mAb by WB

RBC: 红细胞裂解液 (阴性对照); Sch: 裂殖体; Gam: 配子体; Ook: 动合子。用抗 PbPH 单克隆抗体 (1:500) 孵育纯化后的裂殖体、配子体和动合子的裂解物 (30 μ g/泳道), HSP70 为阳性对照, 33 kDa 为 PbPH 抗原的分子量

RBC: red blood cell lysate (negative control); Sch: schizonts; Gam: gametocytes; Ook: ookinetes. The purified lysates of schizonts, gametocytes and ookinetes (30 μ g/lane) were incubated with anti-PbPH monoclonal antibody (1:500), HSP70 was used as a positive control, PbPH antigen had a molecular weight of approximately 33 kDa

2.4 抗 PbPH 单克隆抗体对配子体出丝的影响

与 PBS 对照组相比, 在加入不同释放倍数 (1:5、1:10、1:50) 的抗 PbPH 单克隆抗体共同培养 15 min 后, 配子体出丝数分别减少了 41.7%、32.7% 和 8.3%。在抗 PbPH 单克隆抗体浓度为 1:5 和 1:10 时, 差异具有统计学意义 ($t = 2.14$ $P = 0.038$; $t = 3.05$, $P = 0.0039$) 表明 1:5 和 1:10 稀释情况下的抗 PbPH 单克隆抗体可以有效抑制配子体出丝 (图 3)。

2.5 抗 PbPH 单克隆抗体对动合子形成的影响

与 PBS 对照组相比, 在加入不同稀释倍数 (1:5、1:10、1:50) 的抗 PbPH 单克隆抗体共同

培养 24 h 后, 动合子形成数分别减少了 45.1%、14.8% 和 7.8%。在抗 PbPH 单克隆抗体稀释倍数为 1:5 和 1:10 时, 差异具有统计学意义 ($t=2.73$,

$P=0.013$; $t=7.62$, $P<0.0001$), 表明 1:5 和 1:10 稀释情况下的抗 PbPH 单克隆抗体可以有效抑制动合子的形成 (图 4)。

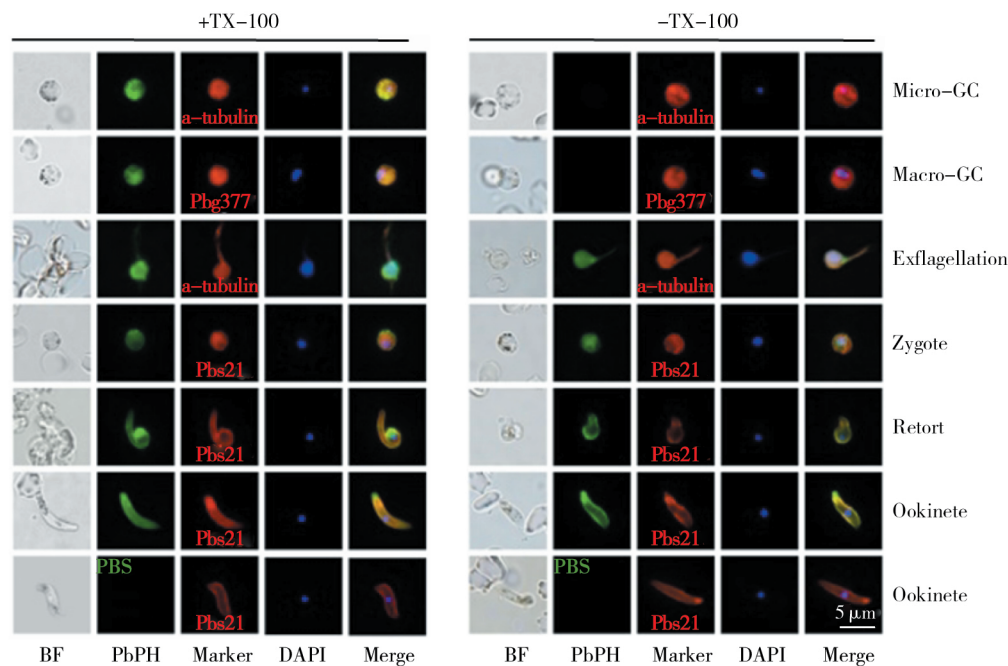


图 2 IFA 检测 PbPH 的表达阶段

Fig. 2 Location of PbPH in the parasites by IFA

BF: 明视野; PbPH: 抗 PbPH 单克隆抗体与 Alexa-488 标记的羊抗鼠 IgG 结合 (绿色); Marker: 雌配子体: 兔源抗-Pbg377 多抗, 雄配子体: 兔源抗- α -tubulin 多抗, 合子、retort 及动合子: 兔源抗-Pbs21 多抗 (红色); DAPI: Hoechst33258, 疟原虫核染料 (蓝色); Merge: 第二、三、四列合成图。PBS 为阴性对照

BF: bright field; PbPH: anti-PbPH monoclonal antibody binds to Alexa-488-labeled anti-mouse IgG antibody (green); Marker: female gametocytes: rabbit anti-Pbg377 polyanitbody, male gametocytes: rabbit anti- α -tubulin polyanitbody, zygote, retort and ookinets: rabbit anti-Pbs21 polyanitbody (red); DAPI: Hoechst33258, *Plasmodium* nuclear dye (blue); Merge: PbPH + Marker + Hoechst33258. PBS was negative control

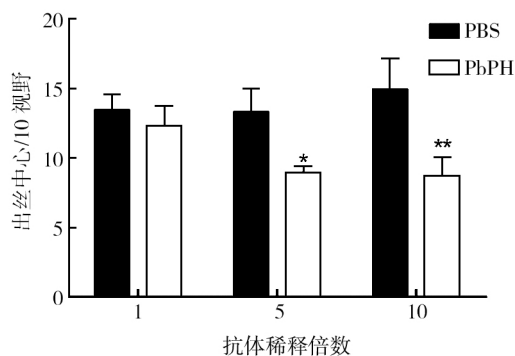


图 3 体外培养检测抗 PbPH 单克隆抗体对配子体出丝的影响

Fig. 3 Effect of anti-PbPH mAb on exflagellation of male gametocytes

* $P<0.05$; ** $P<0.01$, 下图同

* $P<0.05$; ** $P<0.01$, the same below

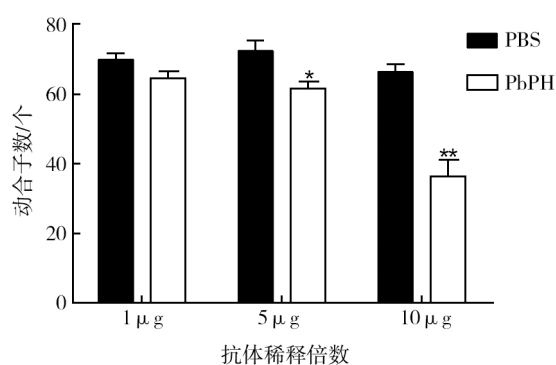


图 4 体外培养检测抗 PbPH 单克隆抗体对动合子形成的影响

Fig. 4 Effect of anti-PbPH mAb on ookinete conversion in vitro

3 讨论

高效的 TBV 候选疫苗可能需要结合受精前后表达的抗原,以达到完全阻断传播的目的^[15-16]。PbPH 为受精前和受精后抗原,针对这种蛋白的抗体可能会在多个时期阻断疟原虫的传播。首先,本研究制备了抗 PbPH 单克隆抗体;然后通过 WB 和 IFA 验证了抗 PbPH 单克隆抗体的特异性,即抗 PbPH 单克隆抗体能有效地识别雌雄配子体、雄配子、雌配子/合子、retort 和动合子。最后利用抗 PbPH 单克隆抗体进行了体外实验,结果表明,其单克隆抗体(1:5、1:10)对配子体出丝中心以及动合子的形成有明显地抑制作用,表明抗 PbPH 单克隆抗体具有一定的传播阻断能力。

针对候选抗原,利用不同的实验方法可以制备相应的多克隆抗体与单克隆抗体。多克隆抗体可以识别一个抗原上的多个抗原表位,利于放大抗原抗体反应,且其制备方法相较单克隆抗体简单。但是单克隆抗体只识别一个抗原上一个抗原表位的特性,使其具有极高的特异性,能在混合物中高效的结合靶标抗原,降低交叉反应的出现,产生的背景信号也明显低于多克隆抗体,并且制备的杂交瘤细胞可作为单克隆抗体持续的再生源。近年来,单克隆抗体在抗感染疾病作用上也取得了较大的进步^[17]。并且在标准膜饲实验中单克隆抗体对疟原虫传播的有效阻断也清楚地证明了单克隆抗体在传播阻断免疫中的重要性^[18-19]。因此,本研究利用教研室已经完成表达纯化的 rPbPH 蛋白^[11],制备了针对该蛋白的特异性单克隆抗体。

在教研室之前的研究基础上,本研究的实验结果进一步证明了 PbPH 有成为 TBV 候选疫苗的潜能。

参考文献:

- [1] World Health Organization. World malaria report 2019 [R]. Geneva: WHO, 2019
- [2] Thanh NV, Thuy-Nhien N, Tuyen NT, et al. Rapid decline in the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to dihydroartemisinin-piperaquine in the south of Vietnam [J]. Malar J, 2017, 16 (1): 27.
- [3] MalERA RCPOI, Drug R. malERA: An updated research agenda for insecticide and drug resistance in malaria elimination and eradication [J]. PLoS Med, 2017, 14 (11): e1002450.
- [4] Ishino T, Tsuboi T. Progress toward a transmission-blocking vaccine against malaria [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18 (9): 927-928.
- [5] Saxena AK, Wu Y, Garboczi DN. *Plasmodium* p25 and p28 surface proteins: potential transmission-blocking vaccines [J]. Eukaryot Cell, 2007, 6 (8): 1260-1265.
- [6] Sagara I, Healy SA, Assadou MH, et al. Safety and immunogenicity of Pf25H-EPA/Alhydrogel, a transmission-blocking vaccine against *Plasmodium falciparum*: a randomised, double-blind, comparator-controlled, dose-escalation study in healthy Malian adults [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18 (9): 969-982.
- [7] Cao Y, Hart RJ, Bansal GP, et al. Functional conservation of P48/45 proteins in the transmission stages of *Plasmodium vivax* (Human Malaria Parasite) and *P. berghei* (Murine Malaria Parasite) [J]. mBio, 2018, 9 (5): e01627-18.
- [8] Gerloff DL, Creasey A, Maslau S, et al. Structural models for the protein family characterized by gamete surface protein Pf230 of *Plasmodium falciparum* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (38): 13598-13603.
- [9] Lee SM, Plieskatt J, Krishnan S, et al. Expression and purification optimization of an N-terminal Pf230 transmission-blocking vaccine candidate [J]. Protein Expr Purif, 2019 (160): 56-65.
- [10] Tachibana M, Wu Y, Iriko H, et al. N-terminal prodomain of Pf230 synthesized using a cell-free system is sufficient to induce complement-dependent malaria transmission-blocking activity [J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18 (8): 1343-1350.
- [11] Kou X, Zheng W, Du F, et al. Characterization of a *Plasmodium berghei* sexual stage antigen PbPH as a new candidate for malaria transmission-blocking vaccine [J]. Parasit Vectors, 2017, 10 (1): 84.
- [12] 黄强. 时空聚集性探测及贝叶斯模型在疟疾中的应用及寨卡病毒 rZED III 蛋白单克隆抗体的制备 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [13] 孙莉. 间日疟原虫乳酸脱氢酶的表达、纯化及单克隆抗体的制备 [D]. 广州: 南方医科大学, 2008.
- [14] Liu F, Li L, Zheng W, 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.
- [15] De Jong RM, Tebeje SK, Meerstein-Kessel L, et al. Immunity against sexual stage *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites [J]. Immunol Rev, 2020, 293 (1): 190-215.
- [16] Zheng J, Pan H, Gu Y, et al. Prospects for malaria vaccines: Pre-erythrocytic stages, blood stages, and transmission-blocking stages [J]. Biomed Res Int, 2019 (2019): 9751471.
- [17] Desoubeaux G, Pelegrin M. [Monoclonal antibodies in infectious diseases: new partners in the therapeutic arsenal] [J]. Med Sci (Paris), 2019, 35 (12): 1008-1013.
- [18] Stone W, Bousema T, Sauerwein R, et al. Two-faced immunity? The evidence for antibody enhancement of malaria transmission [J]. Trends Parasitol, 2019, 35 (2): 140-153.
- [19] Acquah FK, Adjah J, Williamson KC, et al. Transmission-blocking vaccines: old friends and new prospects [J]. Infect Immun, 2019, 87 (6): e00775-18.