

基因工程疟原虫 *P. bzoGFP* 的构建及其生物特性

范长一¹ 巩小惠¹ 魏延钊¹ 张雨琦² 王姗姗³ 杜峰⁴

(¹ 济宁医学院附属医院(临床医学院),² 济宁医学院口腔医学院,

³ 济宁医学院精准医学研究院,⁴ 济宁医学院基础医学院, 济宁 272000)

摘要 **目的** 构建动合子阶段表达绿色荧光蛋白的基因工程疟原虫,为该阶段相关的研究提供工具虫株。**方法** 构建含有 GFP 基因序列和 pb25 基因位点重组同源臂的打靶载体,线性化后电转染至伯氏疟原虫 *P. berghei*。经药物筛选后使用有限稀释法进行克隆,利用 PCR 进行基因型鉴定。通过观察记录感染小鼠的发病情况、疟疾血症、红内期各阶段和合子、动合子的形态发育,分析基因工程疟原虫的生物学特性。**结果** 基因工程伯氏疟原虫 *P. bzoGFP*,经 PCR 基因型鉴定与预期一致,且能在动合子阶段表达绿色荧光蛋白。*P. bzoGFP* 与野生型疟原虫在红细胞内的形态和体外培养合子、动合子的形态均无差异,感染小鼠的生存时间无统计学差异($\chi^2=0.309, P>0.05$),体外培养动合子的转化情况无显著差别($t=0.341, P>0.05$)。**结论** 成功构建基因工程疟原虫 *P. bzoGFP*,其生物学特性与野生型疟原虫无明显不同,能够在合子形成后有效表达 GFP,无需抗体标记,可直接用于疟疾传播阻断效果的评估等此阶段相关研究。

关键词 疟疾;GFP;基因工程;动合子

中图分类号:R382.31 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2025)02-012-07

Construction and biological characterisation of a genetically engineered *Plasmodium berghei* *P. bzoGFP*

FAN Changyi¹, GONG Xiaohui¹, WEI Yanzhao¹, ZHANG Yuqi², WANG Shanshan³, DU Feng⁴

(¹Affiliated Hospital of Jining Medical University (School of Clinical Medicine),²School of Stomatology,³Department of Pathology, Institute of Precise on Medicine,⁴School of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272000, China)

Abstract: Objective To construct a genetically engineered *Plasmodium berghei* strain that expresses green fluorescent protein at the ookinete stage, providing a tool for studies related to this stage. **Methods** A targeting vector comprising the GFP gene sequence and the recombinant homology arms of the pb25 gene locus was constructed, linearised and then electro-transfected into *Plasmodium berghei*. Following drug screening, cloning was carried out using limited dilution, and genotype of parasites was detected using PCR. The biological characteristics of the genetically engineered *Plasmodium berghei* were analyzed through observation of the morphological characteristics of the intra-erythrocytic phase, zygote and ookinete phase and by comparing the parasitemia and survival of mice infected with WT and genetically engineered parasites. **Results** Genetically engineered *Plasmodium berghei* *P. bzoGFP*, genotyped by PCR, exhibited consistent results with the predicted outcomes and demonstrated the capacity to express green fluorescent protein at the ookinete stage. *P. bzoGFP* did not display any significant deviations from the wild strain with respect to the morphology of the intra-erythrocytic phase, the zygote and ookinete phase. The survival curves of the two groups did not differ significantly ($\chi^2=0.309, P>0.05$). The number of ookinetes obtained from *in vitro* culture was not statistically significant ($t=0.341, P>0.05$). **Conclusion** The genetically engineered *Plasmodium berghei* strain *P. bzoGFP* has been successfully constructed, exhibiting biological characteristics that are not significantly different from

those of the wild-type parasite. This strain can effectively express GFP after zygote formation, enabling its direct use in studies related to this phase, such as evaluating the efficacy of malaria transmission blockade, without the need for antibody labeling.

Keywords: Malaria; GFP; Genetic engineering; Ookinete

疟疾是一种由疟原虫感染引起的威胁人类生命的蚊媒传染病。自 2015 年以来,全球每年约有 2 亿余人罹患疟疾,导致 40 余万人死亡,其中主要是 5 岁以下的儿童^[1]。疟原虫对包括青蒿素在内的多种药物的耐药性问题,为当前疟疾治疗带来了前所未有的重大挑战^[2]。加之全球气候变化、蚊虫抗药和缺乏安全、高效的疫苗使得全球疟疾的防控仍然艰巨^[3]。

疟疾发作主要由红细胞内期的裂体增殖所致,但病原体疟原虫的成功传播依赖于按蚊。当蚊媒摄取的血餐中含有疟原虫的有性阶段雌、雄配子体时,其可在蚊胃内发育为雌、雄配子,受精为合子,随后转化为能运动的动合子,穿过围营养基质和蚊胃上皮,停留在蚊胃的基底膜下,发育成圆球形的卵囊。卵囊内进行孢子增殖,形成的数以万计的孢子被释放到蚊血腔中,经血淋巴侵入唾液腺,随后当蚊虫再次叮咬吸血时随唾液进入新的宿主体内。一些靶向疟原虫有性阶段抗原和蚊胃壁抗原的抗体可有效阻断疟原虫在蚊体内的发育^[4]。因此,研发高效的传播阻断策略有助全球消除疟疾,但需要客观、可重复的评估方法来测量传播阻断疫苗及候选化合物的阻断效果。常用的体外传播阻断效果评价方法——动合子形成抑制试验,需对不同处理条件下的培养物进行染色或荧光标记,并在显微镜下计数动合子数量。整个操作过程繁琐,乏味,耗时较长,并且显微镜下的动合子计数多需要人工完成,存在一定的主观偏差。

基因工程技术为深入理解疟原虫的生物学特性、药物筛选、耐药基因研究和疫苗开发等相关领域的研究提供了一个可靠的平台^[5]。其中基因工程获得的荧光疟原虫可帮助我们深入认识其生物学特征并进行定量性的分析,如孢子期表达绿色荧光蛋白的基因工程疟原虫 CSP::GFP 能够对孢子感染的动物进行活体成像^[6]。在此,我们利用动合子表面蛋白 P25 (ookinete surface protein P25) 的阶段表达^[7],成功构建了一种可以在动合子阶段表达 GFP 的基因工程疟原虫 *P. bzoGFP*,具有野生型疟原虫相似的生物学特性,可应用于疟

原虫与蚊虫相互作用的研究,其用于动合子形成抑制试验时将不需要 IFA 的操作,能够简化实验流程,并可采用流式细胞仪或多功能酶标仪读取数值,增加数据的客观真实性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 疟原虫虫株及实验动物 伯氏疟原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA strain 2.34, *P. b*) 和裂体 PL0034 均由中国医科大学病原生物学教研室馈赠。雌性 KM、C57BL/6 小鼠 (5~6 周龄), SPF 级,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司。本研究已通过济宁医学院医学实验动物伦理委员会批准 (JNMC-2021-DW-074)。

1.1.2 主要试剂 实验所用引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;限制性内切酶 EcoR I、Xho I、Hind III、Pst I 购自 NEB 公司;高保真 PCR 酶 PrimeSTAR HS 和无缝克隆试剂盒购自 Takara 公司;质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;胎牛血清及含 HEPES 的 RPMI 1640 培养基购自 ThermoFisher 公司;荧光抗体 Anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor 555 Conjugate) 购自 CST 公司;乙胺嘧啶购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 打靶载体 PL0034-GFP-pb25 的构建 提取疟原虫基因组,以此为模板,使用引物 pb25-5uF/pb25-5uR 和 pb25-CDSF/pb25-CDSR PCR 扩增,获取同源臂 DNA 序列 5'pb25 和 pb25CDS。以本实验保存的质粒 pUC18-hDHFR-GFP 为模板,分别使用引物 GFP-25F/GFP-25R 和 Pbeef1 α -5UF/Pbeef1 α -5UR PCR 扩增,获取目的片段 GFP-3'HRP2 和 5'pbeef1 α 。再以 5'pb25 和 GFP-3'HRP2 为模板,使用引物 pb25-5uF/GFP-25R 进行重叠 PCR,获取目的 DNA 序列 5'pb25-GFP-3'HRP2。并以 5'pbeef1 α 和 pb25CDS 为模板,以 Pbeef1 α -5UF/pb25-CDSR 为引物,重叠 PCR 扩增目的 DNA 片段 5'pbeef1 α -pb25CDS。最后使用无缝克隆,将

5'pbef1α-pb25CDS 和 5'pb25- GFP-3'HRP2, 依次克隆至载体 PL0034 的 EcoR I/Xho I 和 Hind III/Pst I 双酶切位点处(图 1)。

1.2.2 疟原虫 *P. bzo*GFP 的构建及基因型鉴定

如前所述进行疟原虫的电转染^[8-9]。无内毒素质粒提取后使用 Hind III 线性化, 随后苯酚氯仿异戊醇抽提, 乙醇沉淀, ddH₂O 溶解并调整浓度为 1μg/μL。抗凝取疟原虫红细胞感染率约 10% 的 KM 小鼠血, 37℃ 过夜培养后梯度密度离心纯化疟原虫裂殖体, 计数, 取 1×10⁸ 个裂殖体, 离心去上清, 加入 90μL Cytomix 缓冲液和 10μg 线性化质粒, 使用伯乐电转仪 MicroPulser, 程序选择 SCR2

电转染 (1.5kv, 0.7ms)。电转染后立即加入 100μL 预冷的裂殖体培养基并随即小鼠尾静脉注射。24h 后给予小鼠 70μg/mL 的乙胺嘧啶饮用水 4~7d。

电转染后第 6 天起涂片观察, 并对感染疟原虫进行基因型的初步鉴定, 鉴定引物见表 1, 扩增区段见图 2。初步鉴定含有重组基因型的疟原虫后, 有限稀释法进行克隆, 即稀释至每 100μL PBS 含有 1 个疟原虫, 每只小鼠注射 100μL, 共注射 10 只。自第 5 天起涂片检测小鼠感染情况, 并提取感染小鼠体内疟原虫基因组, 进行 PCR 基因型鉴定。

表 1 载体构建及疟原虫基因型鉴定引物

引物名称	序列	目的
pb25-5uF	GCTTGACCATGATTACGCCAAGCTTTCATAGGGATATTTACATACT	同源臂 1 的 PCR 扩增
pb25-5uR	CTCCTTTACTCATTTTTAAATAAAATTTAAACGAA	同源臂 1 的 PCR 扩增
GFP-25F	ATTTATTTAAAAATGAGTAAAGGAGAAGAAGCT	GFP-3'HRP2 的 PCR 扩增
GFP-25R	CGAAAAGAATTAAGCTGGGCTGCAGTTTAATAAATATGTTCTTAT	GFP-3'HRP2 的 PCR 扩增
Pbef1α-5UF	TCCTTCAATTTTCGGGTACCCTCGAGCCAGCTTAATTCCTTTTCGA	5' pbef1-α 的 PCR 扩增
Pbef1α-5UR	ATAAGTATTCATCCCTATGTTTTATAAAAATTTT	5' pbef1-α 的 PCR 扩增
Pb25-CDSF	ATAAAACATAGGGATGAATACTTATTACAGTGT	同源臂 2 的 PCR 扩增
Pb25-CDSR	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCCTTAAATGATATTTGAAAATA	同源臂 2 的 PCR 扩增
P25GFP-P1	TGGATACGCTTGATAATTGAGGA	基因型鉴定
P25GFP-P2	CTATTATTAATTTATTTGTATAGTTTCATCCATGC	基因型鉴定
P25GFP-P3	AACTGCAGCCAGCTTAATTCCTTTTCGAG	基因型鉴定
P25GFP-P4	TGGTAGTTCGGTTGTAATGGTTC	基因型鉴定
hDHFR-F	GTTGCTAAACTGCATCGTC	基因型鉴定
yfcu-R	GTTTGAGGTAGCAAGTAGACC	基因型鉴定

1.2.3 疟原虫 *P. bzo*GFP 红细胞内期无性阶段的生物特性鉴定

C57BL/6 小鼠随机分成实验组和对对照组, 每组 5 只, 实验组小鼠腹腔注射 1×10⁶ 个寄生 *P. bzo*GFP 的红细胞, 对照组每只腹腔注射 1×10⁶ 个寄生 *P. bWT* 的红细胞。自感染后第 2 天开始, 每天小鼠尾静脉取血, 制备薄血膜, 吉姆萨染色, 油镜下观察比较疟原虫 *P. bWT* 和 *P. bzo*GFP 红细胞内无性阶段的形态, 并计数红细胞感染率以统计疟疾血症水平, 记录小鼠死亡情况, 使用 GraphPad 软件进行绘图及统计学分析。

1.2.4 疟原虫 *P. bzo*GFP 的有性阶段形态鉴定与生殖能力分析

取 6 只 C57BL/6 小鼠, 苯肼 1mg 每只预处理, 3d 后随机分为 *P. bWT* 组和 *P. bzo*GFP 组, 每组 3

只小鼠, *P. bWT* 组小鼠腹腔注射 5×10⁶ 个寄生 *P. bWT* 的红细胞, *P. bGFP* 组小鼠腹腔注射 5×10⁶ 个寄生 *P. bzo*GFP 的红细胞。感染第 4 天制备薄血膜, 吉姆萨染色观察小鼠感染情况, 并比较两组疟原虫雌、雄配子体的形态。同时取尾血 10μL 混入 90μL 动合子培养基中, 19℃ 培养 24h, 取 10μL 培养物制备涂片, 吉姆萨染色观察动合子的形态, 再取 0.5μL 均匀涂于 8 孔显微载玻片的 1 孔内, 做 3 个重复孔, 使用兔源 pb25 多克隆抗体和 Alexa Fluor® 555 标记的山羊抗兔的二抗进行间接免疫荧光染色, DIPA 细胞核染色后荧光显微镜下观察动合子的形态并计数各孔动合子数量。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad 软件对数据进行处理及分析, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 感染小鼠的生存分

析使用 Log-rank 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

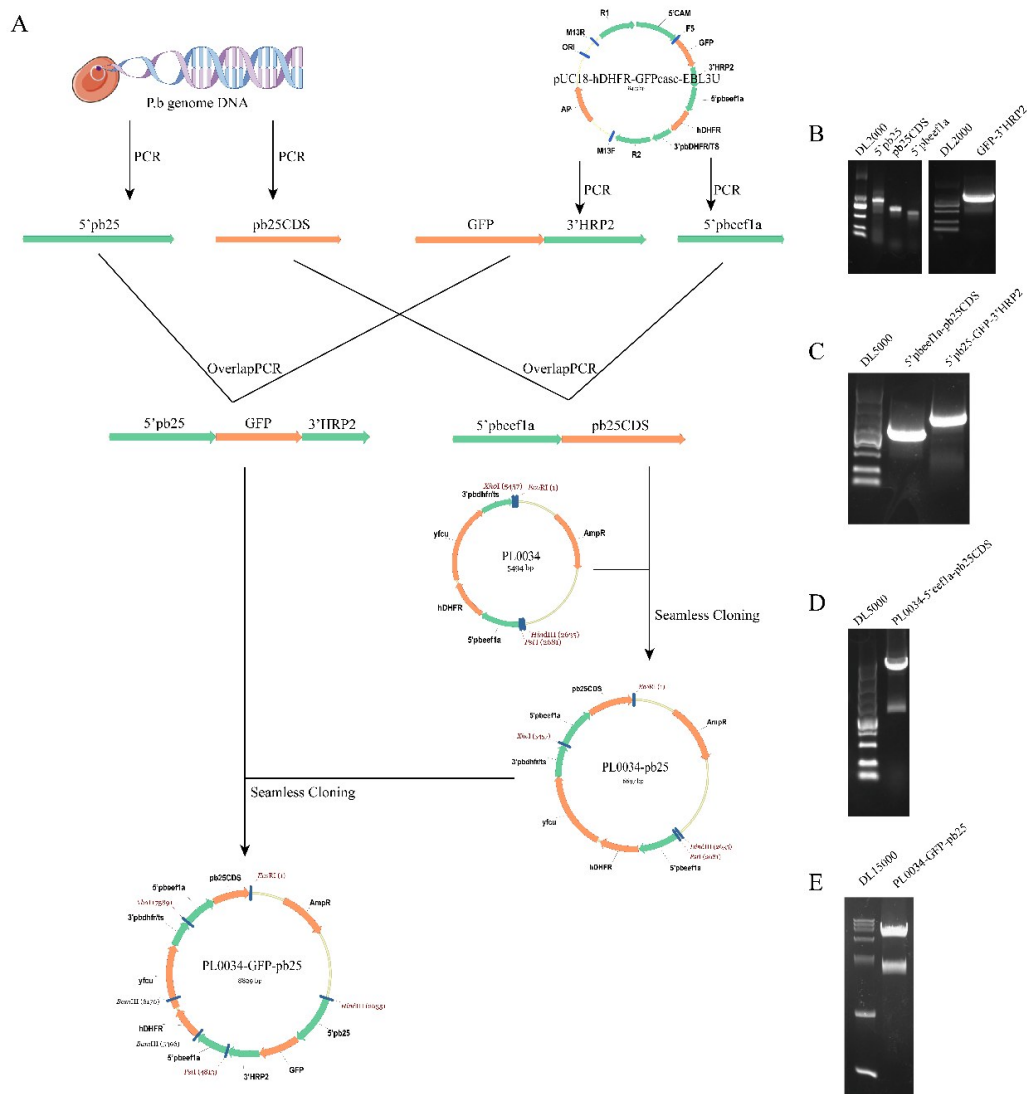
2 结果

2.1 基因工程疟原虫 *P. bzo*GFP 的构建

2.1.1 打靶载体 PL0034-GFP-pb25 的构建及鉴定

以 *P. b*WT 基因组为模板, 成功扩增出同源臂 DNA 序列 pb25CDS 和 5' pb25, 大小分别为 0.65kb 和 0.89kb。又以质粒 pUC18-hDHFR-GFP 为模板, 成功获取目的片段 GFP-3' HRP2 和 5' pbeef1 α , 长度与预期一致, 分别为 1.3kb 和

0.58kb。在已获取片段的基础上, 重叠 PCR 获取目的片段 5' pb25- GFP-3' HRP2 和 5' pbeef1 α -Pb25CDS, 大小与预期的 2.2kb 和 1.2kb 一致。通过无缝克隆依次将目的片段克隆至质粒 PL0034 的 Hind III/Pst I 和 Xho I/EcoR I 双酶切位点, 成功构建打靶载体 PL0034-GFP-pb25。Xho I/EcoR I 酶切质粒 PL0034-pb25 的条带为 5.5kb/1.2kb 和 Hind III/Pst I 酶切质粒 PL0034-GFP-pb25 的条带为 6.7kb/2.2kb, 均与预期大小一致(图 1)。对重组质粒测序, 其碱基序列无误。



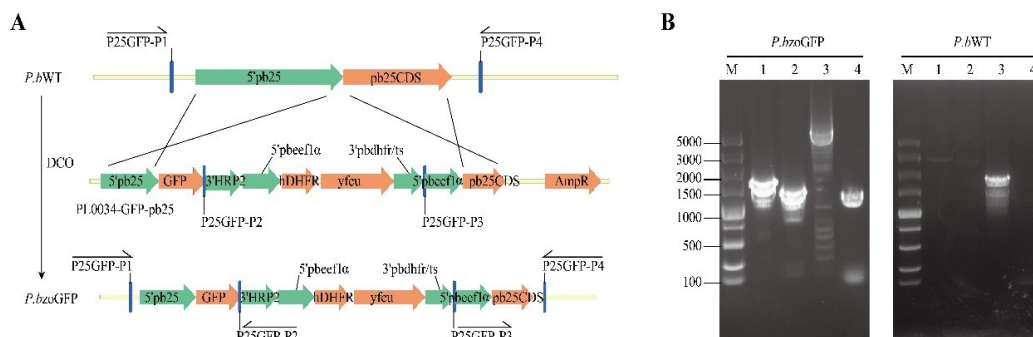
注: A. 载体构建示意图; B. 目的片段 pb25CDS、5'pb25、GFP-3'HRP2 和 5'pbeef1 α 的 PCR 产物电泳结果; C. 重叠 PCR 扩增 5'pb25- GFP-3'HRP2 和 5'pbeef1 α -pb25CDS 的电泳结果; D. 质粒 PL0034-pb25 的 Xho I/EcoR I 酶切鉴定结果; E. 质粒 PL0034-GFP-pb25 的 Hind III/Pst I 酶切鉴定结果。

图 1 打靶载体 PL0034-GFP-pb25 的构建及鉴定

2.1.2 疟原虫裂殖体的转染及鉴定

依据双交叉同源重组的基因工程技术,将 Hind III 线性化的载体成功电转染至疟原虫,并在靶位点 5' pb25 和 pb25CDS 处同源重组置入目的 DNA 序列,使得 GFP 可在 5' pb25 的调控下表达, pb25 通过 5' pbeef1 α 调控区控制其表达。有限稀释克隆获取重组疟原虫 *P. bzoGFP*, 提取基因组,用

引物 P25GFP-P1 和 P25GFP-P2 扩增出 1.8kb 条带,引物 P25GFP-P3 和 P25GFP-P4 扩增出 1.4kb 条带,引物 P25GFP-P1 和 P25GFP-P4 扩增条带为 6.5kb,引物 hDHFR-F 和 yfcu-R 扩增药物筛选基因内区段,片段长度 1.1kb。*P. bWT* 疟原虫仅引物 P25GFP-P1 和 P25GFP-P4 扩增出 1.9kb 条带。PCR 扩增基因型鉴定结果与预期一致(图 2)。



注:A. 重组疟原虫 *P. bzoGFP* 的构建示意图,其中 5' pb25 为 pb25 基因的 5' 非编码区, pb25CDS 为 pb25 基因的编码序列, GFP 为绿色荧光蛋白基因编码序列, 3'HRP2 为富组氨酸蛋白 II (histidine-rich protein II) 基因的 3' 非编码区, hDHFR 为人二氢叶酸还原酶基因编码序列, yfcu 为酵母胞嘧啶脱氨酶-尿嘧啶磷酸核糖转移酶融合蛋白基因序列, 5' pbeef1 α 为伯氏疟原虫真核翻译延伸因子 1- α 的 5' 非编码区, AmpR 为氨苄西林抗性基因编码序列, DCO (double cross-over, 双交叉); B. 基因型 PCR 鉴定结果, M 为 marker DL5000, 1、2、3、4 分别使用引物 P25GFP-P1 和 P25GFP-P2、P25GFP-P3 和 P25GFP-P4、P25GFP-P1 和 P25GFP-P4、hDHFR-F 和 yfcu-R 以 *P. bzoGFP* 和 *P. bWT* 基因组为模板 PCR 扩增并 DNA 琼脂糖凝胶电泳。

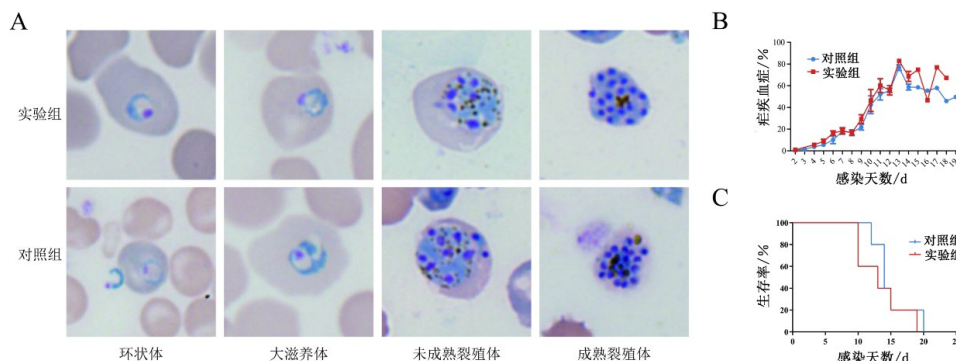
图 2 重组疟原虫 *P. bzoGFP* 的构建及鉴定

2.2 疟原虫 *P. bzoGFP* 的表型分析

2.2.1 红细胞内期的形态及感染情况

红内期疟原虫的形态观察和疟原虫无性增殖能力分析表明疟原虫 *P. bzoGFP* 与 *P. bWT* 的表型无明显不同。制备薄血膜, 吉姆萨染色对疟原虫寄生红细胞内的发育及裂体增殖阶段的形态进行观察, 疟原虫 *P. bzoGFP* 的滋养体、裂殖体形态均与 *P. bWT* 无明显

不同。感染 *P. bzoGFP* 和 *P. bWT* 疟原虫小鼠均在感染后的第 2 天检测到感染的红细胞, 并在第 13 天红细胞感染率达到峰值, 约为 80%。两组小鼠自感染后第 10 天开始陆续出现死亡, 至 20 日均无存活小鼠, 两组小鼠感染后的生存曲线相似, Log-rank 检验分析无统计学差异 ($\chi^2 = 0.309, P > 0.05$)。见图 3。

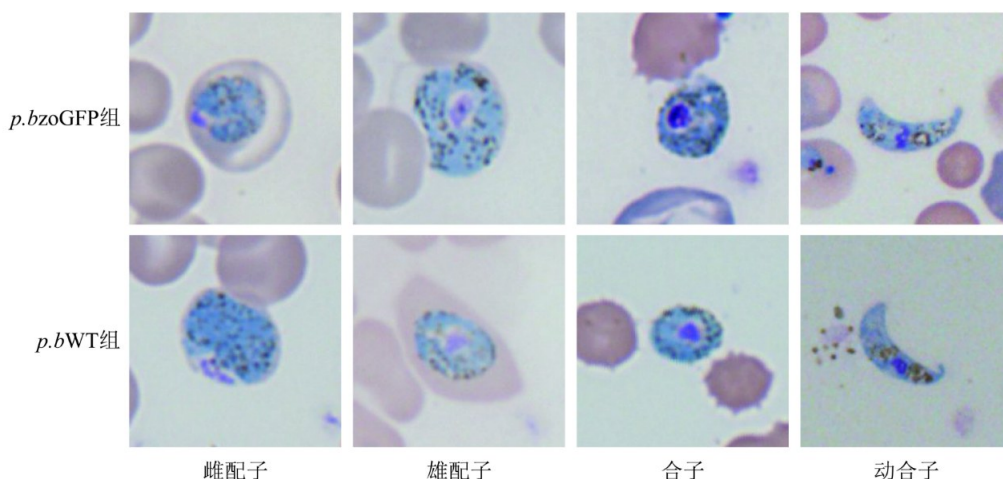


注:A. 疟原虫红细胞内发育增殖情况的形态观察, 吉姆萨染色, 放大倍数 1000; B. 疟原虫感染后小鼠红细胞感染率变化情况; C. 小鼠感染疟原虫后的生存曲线。

图 3 疟原虫红内期的形态及感染情况

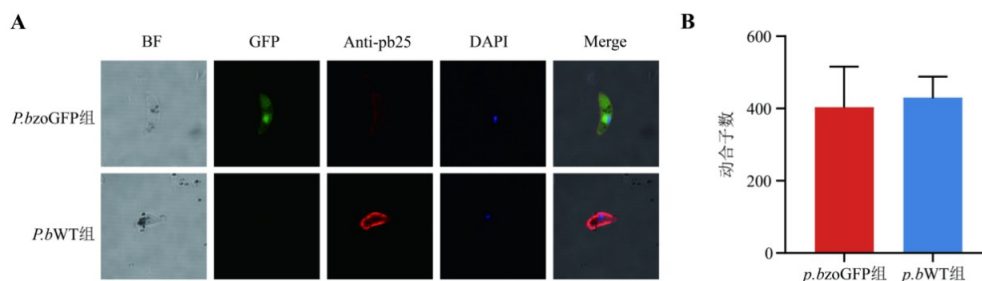
2.2.2 有性阶段形态及动合子转化分析 疟原虫 *P. bzoGFP* 具有 *P. bWT* 相同的有性生殖能力。疟原虫 *P. bzoGFP* 的雌雄配子体、合子、动合子经吉姆萨染色油镜下观察,其形态与 *P. bWT* 相比,无明显不同之处(图 4)。*P. bzoGFP* 可在动合子阶段表达 GFP,具有较明亮的绿色荧光(图 5)。感染相同

数量疟原虫的小鼠,在感染第 4 天各取相同体积鼠疟血液培养,取 0.5 μ L 培养物计数动合子,*P. bzoGFP* 组为 403.7 \pm 113.2,*P. bWT* 组为 428.0 \pm 60.06,相同培养条件下两组形成的动合子数无统计学差异($t=0.341, P>0.05$)。



注:疟原虫雌、雄配子体、合子、动合子吉姆萨染色,油镜下观察,未见明显的形态学差异。

图 4 疟原虫有性阶段的形态



注:A. 荧光显微镜下观察动合子,抗 pb25 抗体作为一抗进行间接免疫荧光检测与 GFP 对比,放大倍数 1000;B. 疟原虫动合子转化情况。

图 5 动合子的荧光成像及动合子转化分析

3 讨论

疟疾作为一种全球性公共卫生问题,其防控面临着诸多挑战^[2]。本研究通过基因工程技术构建的疟原虫 *P. bzoGFP* 可在动合子阶段特异性表达绿色荧光蛋白,且生物学特性与野生型相似,能够为疟疾传播阻断策略等相关领域的研究提供新的工具虫株。

荧光报告寄生虫作为研究疟原虫整个生活史周期中复杂的发育过程、寄生虫与宿主关系的重要

工具,可对疟原虫在哺乳动物和无脊椎动物宿主的宿主细胞入侵、组织移行、细胞内生长、增殖和宿主细胞排出等过程中进行持续有力的监测,拓展我们对寄生虫生活史阶段转换和适应新环境等基本方面的认识^[10-11]。同时还可利用荧光对疟原虫进行计数、分选及荧光值的定量分析^[12-14]。例如,疟原虫 *Pbred* 利用热休克蛋白 HSP70 的 5'调控区实现红色荧光蛋白在疟原虫红内期、蚊和肝脏感染阶段的高水平表达,用于寄生虫与宿主的相互作用和全生命周期的研究^[11]。基因工程疟原虫 CTRpp.

GFP 被成功地应用于传播阻断药物的高通量筛选,一定程度上取代标准膜饲试验^[12]。疟原虫 Pb-GFPCON 实现了蚊胃荧光卵囊计数的半自动化,提高了传播阻断研究的效率^[14]。

本研究巧妙地将 GFP 基因置于 P25 基因的 5' 调控区,实现了 GFP 在疟原虫动合子阶段的特异性表达。P25 是表达在合子和动合子表面的受精后抗原,已从多种疟原虫中克隆出来,可与层粘连蛋白和胶原蛋白 IV 结合,参与动合子至卵囊的转化,靶向 P25 的传播阻断抗体可以抑制这一过程^[15-16]。虽然在实验过程中我们发现因 pb25 基因的 5' 调控区替换为 5' pbef1 α , 导致其在动合子时期的表达有所降低,但与野生型寄生虫相比,在红细胞内期, *P. bzoGFP* 的滋养体和裂殖体形态与 *P. bWT* 无明显差异,小鼠感染后生存曲线也无统计学差异,表明 *P. bzoGFP* 在脊椎动物宿主体内的生长和繁殖能力与野生型疟原虫相当。在有性阶段, *P. bzoGFP* 的雌雄配子体、合子和动合子形态与 *P. bWT* 一致,相同培养条件下所形成的动合子数亦无统计学意义,表明 *P. bzoGFP* 具有与野生型疟原虫同等的有性生殖能力。

综上所述,本研究构建的 *P. bzoGFP* 是一种可在动合子阶段特异性表达绿色荧光蛋白的基因工程虫株,能应用于蚊体内疟原虫有性发育的研究及体内外传播阻断效果的评价等,在传播阻断效能的评价上,将简化实验操作,并可与流式细胞仪或多功能酶标仪相结合,读取更客观的 GFP 荧光信号,有望快速、准确地评估传播阻断疫苗及候选化合物对疟原虫动合子形成的影响,从而筛选出具有高效传播阻断效果的疫苗和药物。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] WHO, World malaria report 2024[R]. Geneva: World Health Organization, 2024.
- [2] Jagannathan P, Kakuru A. Malaria in 2022: Increasing challenges, cautious optimism [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2678. DOI: 10.1038/s41467-022-30133-w.
- [3] Venkatesan P. The 2023 WHO World malaria report [J]. Lancet Microbe, 2024, 5(3): e214. DOI: 10.1016/S2666-5247(24)00016-8.
- [4] 王姗姗, 赵会丽, 邓舒, 等. 疟疾传播阻断疫苗的研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(10): 1229-1236. DOI: 10.13350/j.cjpb.221024.
- [5] Thiam LG, Mangou K, Ba A, et al. Leveraging genome editing to functionally evaluate *Plasmodium* diversity [J]. Trends Parasitol, 2022, 38(7): 558-571. DOI: 10.1016/j.pt.2022.03.005.
- [6] Natarajan R, Thathy V, Mota MM, et al. Fluorescent *Plasmodium berghei* sporozoites and pre-erythrocytic stages: a new tool to study mosquito and mammalian host interactions with malaria parasites [J]. Cell Microbiol, 2001, 3(6): 371-379. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2001.00117.x.
- [7] Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G, et al. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions [J]. EMBO J, 2001, 20(15): 3975-3983. DOI: 10.1093/emboj/20.15.3975.
- [8] 王姗姗, 赵会丽, 邓舒, 等. 约氏疟原虫基因条件修饰体系的构建及其应用分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(6): 621-626, 633. DOI: 10.13350/j.cjpb.200601.
- [9] Espinosa DA, Radtke AJ, Zavala F. Development and assessment of transgenic rodent parasites for the preclinical evaluation of malaria vaccines [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1403: 583-601. DOI: 10.1007/978-1-4939-3387-7_33.
- [10] Thiele PJ, Mela-Lopez R, Blandin SA, et al. Let it glow: genetically encoded fluorescent reporters in *Plasmodium* [J]. Malar J, 2024, 23(1): 114. DOI: 10.1186/s12936-024-04936-9.
- [11] Hliscs M, Nahar C, Frischknecht F, et al. Expression profiling of *Plasmodium berghei* HSP70 genes for generation of bright red fluorescent parasites [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72771. DOI: 10.1371/journal.pone.0072771.
- [12] Delves MJ, Ramakrishnan C, Blagborough AM, et al. A high-throughput assay for the identification of malarial transmission-blocking drugs and vaccines [J]. Int J Parasitol, 2012, 42(11): 999-1006. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.08.009.
- [13] Janse CJ, Franke-Fayard B, Waters AP. Selection by flow-sorting of genetically transformed, GFP-expressing blood stages of the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei* [J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 614-623. DOI: 10.1038/nprot.2006.88.
- [14] Delves MJ, Sinden RE. A semi-automated method for counting fluorescent malaria oocysts increases the throughput of transmission blocking studies [J]. Malar J, 2010, 9: 35. DOI: 10.1186/1475-2875-9-35.
- [15] Arrighi RB, Hurd H. The role of *Plasmodium berghei* ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts [J]. Int J Parasitol, 2002, 32(1): 91-98. DOI: 10.1016/s0020-7519(01)00298-3.
- [16] Patel PN, Tolia N. Structural vaccinology of malaria transmission-blocking vaccines [J]. Expert Rev Vaccines, 2021, 20(2): 199-214. DOI: 10.1080/14760584.2021.1873135.

(收稿日期 2024-11-07)

(本文编辑:石俊强)