

DOI:10.16781/j.0258-879x.2021.07.0731

· 论 著 ·

伯氏疟原虫静息巯基氧化酶表达阶段的确定

郑文琪^{1,2}, 冯学敏², 刘飞³, 曹雅明³, 韩艳秋¹, 王俊瑞^{1*}

1. 内蒙古医科大学附属医院检验科, 呼和浩特 010050
2. 内蒙古医科大学附属医院外科实验室, 呼和浩特 010050
3. 中国医科大学基础医学院免疫学教研室, 沈阳 110021

[摘要] **目的** 观察伯氏疟原虫静息巯基氧化酶 (*PbQSOX*) 的表达阶段及表达特点。**方法** 分别采用 SignalP-5.0 Server 与 TMHMM Server 2.0 在线软件对 *PbQSOX* 蛋白的信号肽与跨膜区进行预测分析。利用同源重组技术, 将 *PbQSOX*-HA 标签型打靶质粒经限制性内切酶 *Not I* 酶切使其线性化, 将线性化的质粒电转染至伯氏疟原虫株内并感染小鼠。经乙胺嘧啶筛选耐药型疟原虫血症小鼠, 取小鼠外周血进行 PCR 鉴定, 获取 *PbQSOX*-HA 标签型疟原虫。培养纯化裂殖体、配子体与动合子阶段的 *PbQSOX*-HA 标签型疟原虫, 采用蛋白质印迹法与间接免疫荧光实验检测 *PbQSOX* 蛋白在伯氏疟原虫中的表达阶段与表达特点。**结果** 生物信息学分析发现 *PbQSOX* 蛋白存在信号肽, 不存在跨膜区, 蛋白均在细胞膜外表达。经 PCR 鉴定, *PbQSOX*-HA 标签型打靶质粒与伯氏疟原虫同源重组正确, 并成功获得了 *PbQSOX*-HA 标签型疟原虫及纯化的 *PbQSOX*-HA 标签型裂殖体、配子体与动合子。蛋白质印迹法检测显示 *PbQSOX* 蛋白主要在配子体与动合子阶段表达, 间接免疫荧光实验结果显示 *PbQSOX* 表达于配子体、雄配子、合子、retort 与动合子表面。**结论** *PbQSOX* 是伯氏疟原虫在有性生殖阶段表达的蛋白, 主要表达于配子体、雄配子、合子、retort 与动合子表面。

[关键词] 伯氏疟原虫; 基因打靶; 表达阶段; 伯氏疟原虫静息巯基氧化酶

[中图分类号] R 382.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2021)07-0731-09

Expression stage analysis of *Plasmodium berghei* quiescin sulfhydryl oxidase

ZHENG Wen-qi^{1,2}, FENG Xue-min², LIU Fei³, CAO Ya-ming³, HAN Yan-qi¹, WANG Jun-rui^{1*}

1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China
2. Laboratory of Surgery, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China
3. Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110021, Liaoning, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression stages and characteristics of *Plasmodium berghei* quiescin sulfhydryl oxidase (*PbQSOX*). **Methods** SignalP-5.0 Server and TMHMM Server 2.0 were used to predict and analyze the signal peptide and transmembrane regions of *PbQSOX* protein. With homologous recombination, *PbQSOX*-HA tag plasmids were linearized by restriction enzyme *Not I*, and the linearized plasmids were electroporated into *Plasmodium berghei* strain and infected mice. The *PbQSOX*-HA tag *Plasmodium berghei* was obtained from the peripheral blood of pyrimethamine resistant mice and was identified by polymerase chain reaction (PCR). Schizonts, gametocytes and ookinetes of *PbQSOX*-HA tag *Plasmodium berghei* were purified. Western blotting and indirect immunofluorescence assay (IFA) were used to detect the expression stages and characteristics of *PbQSOX* protein in *Plasmodium berghei*. **Results** Bioinformatics analysis showed that *PbQSOX* protein had a signal peptide, but had no transmembrane region. All the proteins were expressed outside the cell membrane. *PbQSOX*-HA tag *Plasmodium berghei* was successfully obtained by homologous recombination of *PbQSOX*-HA tag targeting plasmid and *Plasmodium berghei* and confirmed by PCR. The purified schizonts, gametocytes and ookinetes of

[收稿日期] 2019-11-15 **[接受日期]** 2020-03-31

[基金项目] 国家自然科学基金(81760367), 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才计划”(NJYT-20-B14), 内蒙古自治区自然科学基金(2020MS08126)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81760367), Youth Science and Technology Talent Program of Colleges and Universities of Inner Mongolia Autonomous Region (NJYT-20-B14), and Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2020MS08126)。

[作者简介] 郑文琪, 博士, 副研究员. E-mail: zhengwenqi2011@163.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 0471-3451315, E-mail: wangjunrui123@yeah.net

PbQSOX-HA tag *Plasmodium berghei* were obtained. Western blotting revealed that *PbQSOX* protein was mainly expressed in the gametocyte and ookinete stages, and IFA showed that *PbQSOX* was expressed on the surface of gametocytes, male-gametes, zygotes, retorts and ookinetes. **Conclusion** *PbQSOX* is a protein expressed at sexual reproduction stage of *Plasmodium berghei*, and it is mainly expressed on the surface of gametocytes, male-gametes, zygotes, retorts and ookinetes.

[Key words] *Plasmodium berghei*; gene targeting; expression stage; *Plasmodium berghei* quiescin sulfhydryl oxidase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(7): 731-739]

疟疾是一种严重危害人类健康的虫媒传染病, WHO 疟疾报告指出, 2017 年全球仍有 43.5 万人死于疟疾^[1]。在疟疾的高密度流行区, 疟原虫对现有抗疟药物、按蚊对杀虫剂均逐渐产生了抗药性^[2-3], 耐药疟原虫和抗杀虫剂按蚊的增加与流行增大了疟疾的防控难度^[4]。我国自启动《中国消除疟疾行动计划(2010—2020)》以来, 疟疾发病率得到了有效控制^[5]。2018 年, 我国全国范围内虽无本地感染疟疾病例, 但仍有 2 671 例境外输入病例^[6]。因此, 研发安全、有效的疫苗对全球疟疾的防控尤为关键。疟疾疫苗主要分为红前期疫苗、红内期疫苗和传播阻断疫苗(transmission-blocking vaccine, TBV)三大类。红前期疫苗与红内期疫苗可分别降低疟疾的感染率及临床发病率, 但两者的候选抗原均暴露于人体的免疫系统, 存在广泛的基因多态性^[7], 有一定的缺陷; TBV 针对疟原虫的有性发育阶段发挥作用, 可阻止疟原虫在蚊体内的后续发育, 彻底切断疟原虫的传播^[8-9], 被认为是加速疟疾控制和最终根除疟疾的有效策略^[10]。但 TBV 的研发进展依然迟缓, 迄今为止, 已发现的候选抗原非常有限, 且现有的 TBV 候选抗原诱导的特异性抗体尚不能完全阻断疟疾的传播^[11]。因此, 筛选并增加新型疟原虫有性阶段候选抗原, 明确其分子结构、表达阶段、生物学功能及其免疫学特性, 将为 TBV 的研发提供必要的理论依据。

静息巯基氧化酶(quiescin sulfhydryl oxidase, QSOX)是促进生物体内蛋白质二硫键正确形成、促进蛋白质发挥生理活性的关键酶^[12-13], 其功能是催化二硫键的从头形成并产生过氧化氢。典型的 QSOX 蛋白由硫氧化还原蛋白 1(thioredoxin 1, Trx1)、硫氧化还原蛋白 2(thioredoxin 2, Trx2)、 ψ Erv(pseudo-essential for respiration and viability)与 Erv/ALR(essential for respiration and viability/augmenter of liver regeneration)结构域组成^[14], 原核生物(如锥虫)、绿色藻类和高等植物的 QSOX 部分或完全失去了 Trx2 结构域^[15-16]。

近年来, QSOX 因在肿瘤组织中过表达并与胰腺癌^[17]、心力衰竭^[18]、乳腺癌^[19]和前列腺肿瘤^[20]等疾病的发生密切相关而备受关注。氧化还原相关蛋白的折叠不仅对原生动物的生长调控与生命周期等发挥着至关重要的作用^[21], 还对宿主与寄生虫间的相互作用^[22]、寄生虫所致的病理进程^[15]等存在影响。然而, 目前关于 QSOX 在疟原虫属中的表达阶段及其发挥的相关生物学功能、QSOX 是否可以成为疟疾防控的新靶位等信息尚不清楚。

本研究应用生物信息学方法选取伯氏疟原虫 QSOX(*Plasmodium berghei* QSOX, *PbQSOX*), 采用基因打靶技术获取了 *PbQSOX*-HA 标签型疟原虫, 并通过蛋白质印迹法与间接免疫荧光实验(indirect immunofluorescence assay, IFA)观察 *PbQSOX* 的主要表达阶段及表达特点, 为研究抗疟原虫 QSOX 抗体的传播阻断潜能及 TBV 候选抗原的筛选提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 质粒、疟原虫株及实验动物 *PbQSOX*-HA 标签型打靶质粒由英国 PlasmogEM 机构提供, 伯氏疟原虫(ANKA 株)由中国医科大学免疫学教研室惠赠, 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠(体重 20~25 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK(京)2016-0006]。本研究的动物实验经内蒙古医科大学医学与实验动物伦理委员会审批(YKD2017243), 小鼠的饲养和免疫遵照内蒙古医科大学动物实验相关规范进行。

1.2 主要试剂 高保真 PCR 酶(PCR-Plus-Neo)购自日本 ToYoBo 公司; 限制性内切酶 *Not* I、DNA 分子量标准、蛋白质分子量标准、DNA 提取与质粒提取试剂盒、外周血 PCR 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司; 疟原虫电转液试剂盒 Nucleofector II 购自瑞士 Lonza 公司; 小鼠抗 HA 标签单克隆抗体、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 与

封片剂 ProLong[®] Gold Antifade Mountant 购自美国 Invitrogen 公司; 鼠抗伯氏疟原虫动合子表面抗原 (*Plasmodium berghei* ookinete surface antigen, Pbs21) 单克隆抗体由日本自治医科大学 Hiroyuki Matsuoka 教授赠送。其余化学试剂均为国产分析纯, 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.3 *PbQSOX* 蛋白信号肽、跨膜区及结构域预测 运用信号肽分析系统 SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析 *PbQSOX* 蛋白的信号肽, 运用跨膜区预测软件 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析 *PbQSOX* 蛋白的跨膜区, 应用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 与 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线工具对 *PbQSOX* 蛋白的结构域进行预测。

1.4 *PbQSOX*-HA 标签型质粒的获得 *PbQSOX*-HA 标签型打靶质粒由英国 PlasmogEM 机构提供 (ID: PbGEM-325531), 质粒的设计原理及构建流程等详细信息见 PlasmogEM 官方网站 (<http://plasmogem.sanger.ac.uk/>)。

1.5 *PbQSOX*-HA 标签型打靶质粒的线性化及电转染 *PbQSOX*-HA 标签型打靶质粒保存于 TSAG 宿主菌中, 将菌株扩增培养后提取 *PbQSOX*-HA 标签质粒, 质粒经限制性内切酶 *Not* I 在 37 °C 下酶切 6 h, 使其线性化。将线性化的质粒用 DNA 纯化试剂盒进行纯化。取 1×10^7 个培养并纯化的成熟裂殖体至 1.5 mL 离心管内, 低速离心弃上清。将 10 μg 线性化的 *PbQSOX*-HA 标签质粒加入到 100 μL 疟原虫电转液中, 与裂殖体混匀后转至电转杯内, 并使用 Lonza Nucleofector 的 U-033 程序进行电转染。电转染后将混合液中加入 50 μL RPMI 1640 培养基, 液体混匀后经尾静脉注射至 BALB/c 小鼠体内。

1.6 *PbQSOX*-HA 标签型疟原虫的筛选、克隆及 PCR 鉴定 小鼠感染经电转染的疟原虫 24 h 后, 给予乙胺嘧啶饮用水 (0.07 mg/mL), 第 6 天开始取尾静脉血, 通过 Giemsa 染色观察是否有疟原虫出现, 对疟原虫血症达到 0.5% 的电转染小鼠外周血用 PCR 方法进行基因型鉴定。利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性鉴定引物, 引物 P1 (5'-TGAAATGCTAAATGATGTTCCA-3') 和 P2 (5'-AGCCTTTTCGCTGCGCCAT-3') 扩

出的是野生型 *PbQSOX* 基因, 而引物 P1 和 P3 (5'-CATACTAGCCATTTTATGTA-3') 扩增出的是发生同源重组的序列。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 68 °C 1 min, 共 30 个循环; 68 °C 10 min。PCR 鉴定出重组正确的疟原虫基因型后, 在小鼠的疟原虫血症未达 3% 时, 取尾静脉血, 用生理盐水将小鼠血液稀释至每 100 μL 含 1~2 个伯氏疟原虫感染红细胞 (*Plasmodium berghei*-parasitized red blood cell, *PbRBC*)。将稀释的疟原虫血液经尾静脉注射至 BALB/c 小鼠 (每只 100 μL), 至少注射 10 只小鼠进行克隆。小鼠给予乙胺嘧啶饮用水 (0.07 mg/mL), 当小鼠外周血中出现耐药型疟原虫株后, 感染血液经上述 PCR 方法再次进行鉴定。将鉴定正确的疟原虫进行保存与传代。

1.7 *PbQSOX*-HA 标签型疟原虫裂殖体、配子体及动合子的培养与纯化 (1) 裂殖体: 雌性 BALB/c 小鼠经腹腔注射 1.2 mg 苯胂, 3 d 后腹腔注射 1×10^7 个 *PbRBC*。待疟原虫血症达 5%~10%, 用乙醚麻醉小鼠后, 经心脏采血并将血液置于裂殖体培养基中 (按 50 mL RPMI 1640 培养基和 0.5 mL 血液的比例配制, 培养基中含 20% FBS 和 50 mg/L 青霉素与链霉素), 在 5% CO₂、5% O₂、90% N₂ 培养箱中 36.5 °C 下培养 12~16 h。当 70%~80% 的疟原虫发育到成熟的裂殖体时, 培养物经 55% Nycodenz 密度梯度液离心分离, 收集中间灰白层裂殖体, 用 PBS 清洗 2 次, 吉姆萨染色后于显微镜下观察裂殖体。

(2) 配子体: 用上述同样的方法感染小鼠, 感染第 4 天, 给小鼠饮用磺胺嘧啶饮用水 (20 mg/L) 2 d。用乙醚麻醉小鼠后, 心脏采血并将血液置于 37 °C 预热的 PBS 中防止配子体活化。血液经 48% Nycodenz 密度梯度液 $1\ 300 \times g$ 离心 30 min 分离, 收集中间灰白层配子体, 用 RPMI 1640 培养基清洗 2 次, 吉姆萨染色后于显微镜下观察配子体。

(3) 动合子: 用上述同样的方法感染小鼠, 感染第 3 天, 用乙醚麻醉小鼠后, 心脏采血, 将 1 mL 小鼠血液置于 9 mL 动合子培养液 (RPMI 1640 培养基, 含 50 mg/L 青霉素、50 mg/L 链霉素、100 mg/L 新霉素、20% FBS、1 mg/L 肝素钠, pH 8.3) 中, 19~20 °C 培养 24 h。培养悬液经 62% Nycodenz 密度梯度液 $1\ 300 \times g$ 离心 30 min 分离,

收集中间灰白层动合子,用PBS清洗2次,吉姆萨染色后于显微镜下观察动合子。

1.8 蛋白质印迹法检测 *PbQSOX* 蛋白表达 将纯化的裂殖体、配子体与动合子分别用0.15%的皂角苷-PBS裂解去除红细胞,经裂解液(1% Triton X-100, 2% SDS, PBS溶解,含蛋白酶抑制剂)冰上裂解30 min提取疟原虫抗原。取等量的裂殖体、配子体与动合子疟原虫抗原进行10% SDS-PAGE,电泳完毕后转至NC膜。以5%脱脂奶粉溶液4℃封闭过夜。TBST漂洗3次,每次5 min。加入TBST稀释的小鼠抗HA标签抗体(稀释比例1:2000),室温孵育3 h。洗膜3次,每次5 min。加入TBST稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG(稀释比例1:5000),室温摇动孵育1 h, TBST洗膜3次。用ECL发光法在荧光图像分析系统中检测结果。

1.9 IFA检测 *PbQSOX* 蛋白表达 疟原虫经PBS洗1次后均匀涂布在玻片上,用4%多聚甲醛溶液室温固定20 min。用50 mmol/L甘氨酸/PBS漂洗后,加入(或不加)0.1% Triton X-100透膜10 min。用含5%脱脂奶粉的PBS 37℃封闭30 min。加入1:500稀释的小鼠抗HA标签单克隆抗体,37℃孵育2 h。以鼠抗 *Pbs21* 单克隆抗体

(稀释比例1:500)作为阳性对照。PBS洗3次,加入FITC标记的羊抗鼠IgG(稀释比例1:500),37℃孵育60 min。疟原虫细胞核经DAPI染色5 min,用抗淬灭封片剂封片,于荧光显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 *PbQSOX* 蛋白信号肽、跨膜区及结构域预测 *PbQSOX*在疟原虫数据库PlasmoDB中的登录号为PBANKA_145540,基因定位于伯氏疟原虫14号染色体2 148 296~2 149 846 bp之间,蛋白由516个氨基酸组成(分子量为61 537)。运用信号肽分析系统SignalP-5.0 Server对*PbQSOX*蛋白的信号肽进行分析,结果显示*PbQSOX*蛋白含有1个信号肽(图1);运用跨膜区预测软件TMHMM Server 2.0进行分析,结果显示*PbQSOX*蛋白无跨膜区,蛋白均在细胞膜外表达(图2);应用SMART与BLAST在线工具对*PbQSOX*蛋白的结构域进行预测,结果显示*PbQSOX*蛋白存在Trx1、 ψ Erv与Erv/ALR结构域,并含3个关键的Cys-X-X-Cys活化基序(X代表任意氨基酸),分别为CPAC、CRNC与CNYC(图3)。

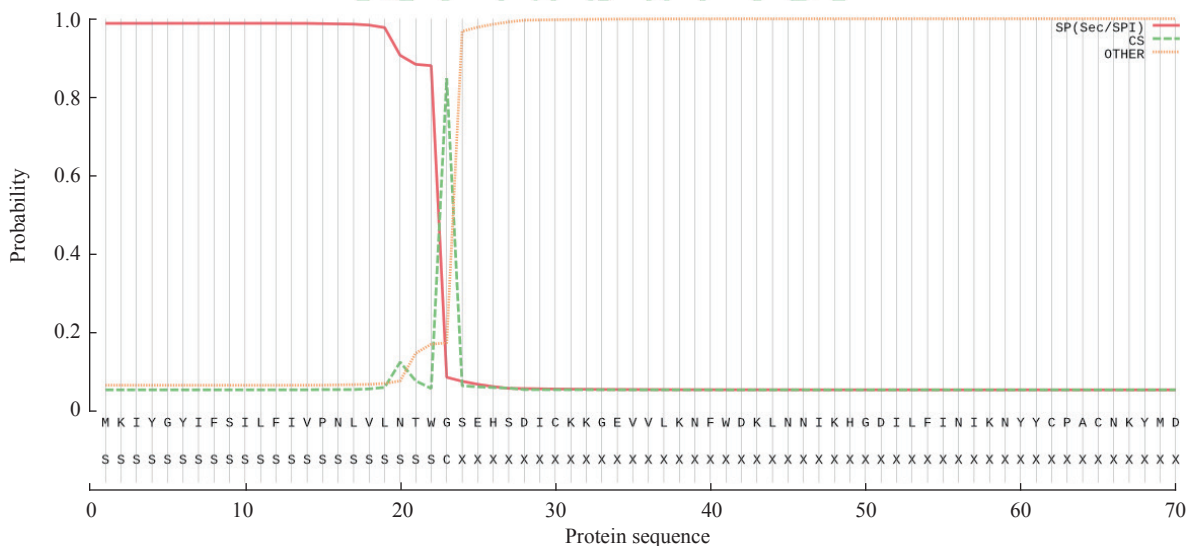


图1 SignalP-5.0 Server对 *PbQSOX* 蛋白的信号肽预测结果

Fig 1 Signal peptide of *PbQSOX* protein predicted by SignalP-5.0 Server

PbQSOX: *Plasmodium berghei* quiescinsulphhydryl oxidase; SP (Sec/SPI): “Standard” secretory signal peptides transported by the Sec translocon and cleaved by signal peptidase I; CS: Cleavage site; OTHER: The probability that the sequence does not have any kind of signal peptide.

2.2 *PbQSOX*-HA 标签型疟原虫株的获取及基因型鉴定 将线性化的 *PbQSOX*-HA 标签型打靶质粒

电转进入成熟的裂殖体后,经过24 h发育,线性化的质粒与疟原虫基因组进行了同源重组。*PbQSOX*

基因末端加入了HA 标签基因,同时基因组也整合了药物压力选择基因人二氢叶酸还原酶(human dihydrofolate reductase, *hDHFR*)等(图4A)。经

乙胺嘧啶药物选择后,我们获取了耐药型疟原虫。经克隆传代后,PCR结果显示在 *PbQSOX* 末端成功加入了HA 标签(图4B)。

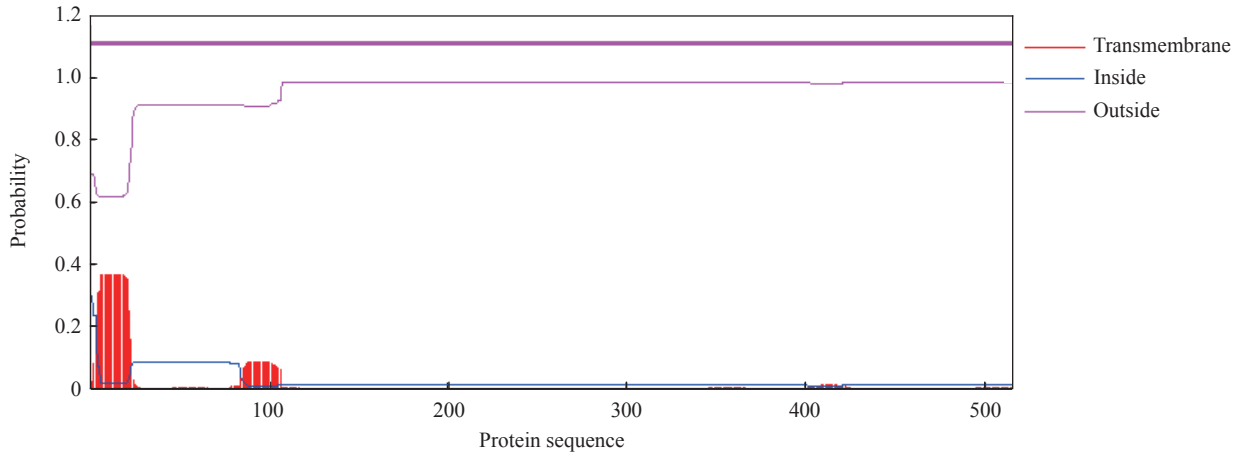


图2 TMHMM Server 2.0 对 *PbQSOX* 蛋白的跨膜区预测结果

Fig 2 Transmembrane domain of *PbQSOX* protein predicted by TMHMM Server 2.0

PbQSOX: *Plasmodium berghei* quiescin sulfhydryl oxidase.



图3 *PbQSOX* 蛋白的结构域及活化基序分布模式图

Fig 3 Domain and activation motifs of *PbQSOX* protein

The motifs were predicted by SMART and BLAST. Red, blue, green and yellow areas represent the signal peptide (Sig.), Trx1, Ψ Erv and Erv/ALR structure domains, respectively. *PbQSOX*: *Plasmodium berghei* quiescin sulfhydryl oxidase; Trx1: Thioredoxin 1; Ψ Erv: Pseudo-essential for respiration and viability; Erv/ALR: Essential for respiration and viability/augmenter of liver regeneration; aa: Amino acid; CPAC, CRNC and CNYC: Three Cys-X-X-Cys dithiol/disulfide motifs.

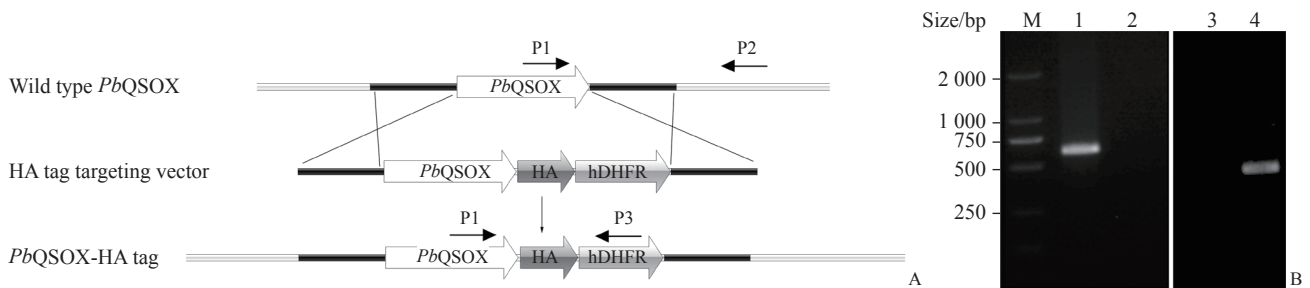


图4 *PbQSOX*-HA 标签位点特异性同源重组的 PCR 鉴定引物模式图及 PCR 鉴定结果

Fig 4 Schematic representation of PCR identification primers and PCR identification results for *PbQSOX*-HA tag site-specific homologous recombination

A: Schematic representation of PCR identification primers for *PbQSOX*-HA tag site-specific homologous recombination. Primers P1 and P2 were used for diagnostic PCR of the wild type locus, while primers P1 and P3 were used for confirming *PbQSOX*-HA tag of parasite. B: PCR identification results. M: DNA marker; 1: Wild type genomic DNA was amplified by primers P1 and P2 (668 bp); 2: Wild type genomic DNA was amplified with primers P1 and P3 (425 bp); 3: *PbQSOX*-HA tag genomic DNA was amplified with primers P1 and P2 (668 bp); 4: *PbQSOX*-HA tag genomic DNA was amplified with primers P1 and P3 (425 bp). *PbQSOX*: *Plasmodium berghei* quiescin sulfhydryl oxidase; PCR: Polymerase chain reaction; hDHFR: Human dihydrofolate reductase.

2.3 不同阶段 *PbQSOX*-HA 标签型疟原虫的分离纯化 将疟原虫血症达到 5%~10% 的小鼠血液进行培养, 培养后的 *PbQSOX*-HA 标签型疟原虫多处于裂殖体阶段, 经 55% Nycodenz 密度梯度液离心纯化后得到了较纯的成熟裂殖体; 给予疟原虫感

染后的小鼠磺胺嘧啶饮用水处理, 小鼠血液经 48% Nycodenz 密度梯度液离心后得到了纯化的配子体; 疟原虫经过 24 h 培养并经 62% Nycodenz 密度梯度液离心后, 获得了纯化的动合子。分离纯化后的疟原虫见图 5。

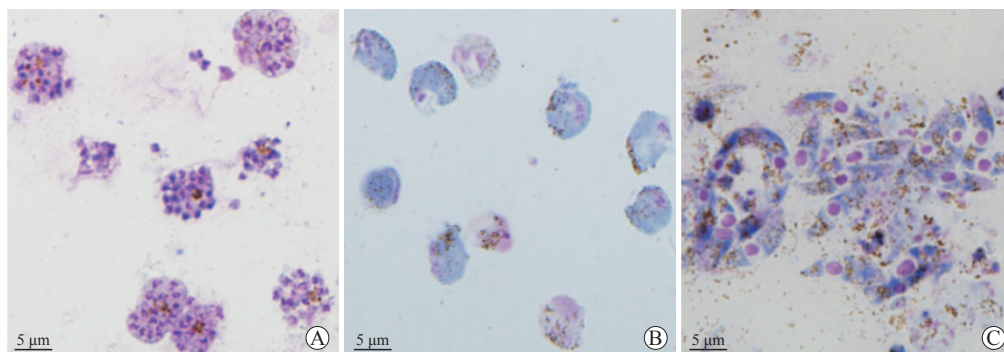


图 5 纯化后的 *PbQSOX*-HA 标签型裂殖体 (A)、配子体 (B) 与动合子 (C)

Fig 5 Purified schizonts (A), gametocytes (B) and ookinetes (C) of *PbQSOX*-HA tag parasites Giemsa staining. *PbQSOX*: *Plasmodium berghei* quiescin sulphydryl oxidase.

2.4 *PbQSOX* 蛋白表达阶段的鉴定 蛋白质印迹法检测结果显示, 抗 HA 标签抗体可以识别配子体与动合子阶段分子量为 60 000 左右的蛋白, 提示 *PbQSOX* 在疟原虫发育的配子体与动合子阶段表达 (图 6)。

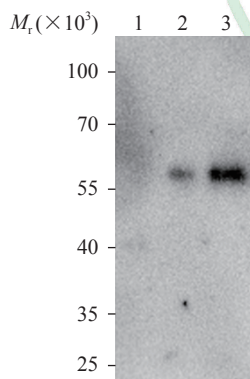


图 6 蛋白质印迹法分析 *PbQSOX* 蛋白的表达阶段

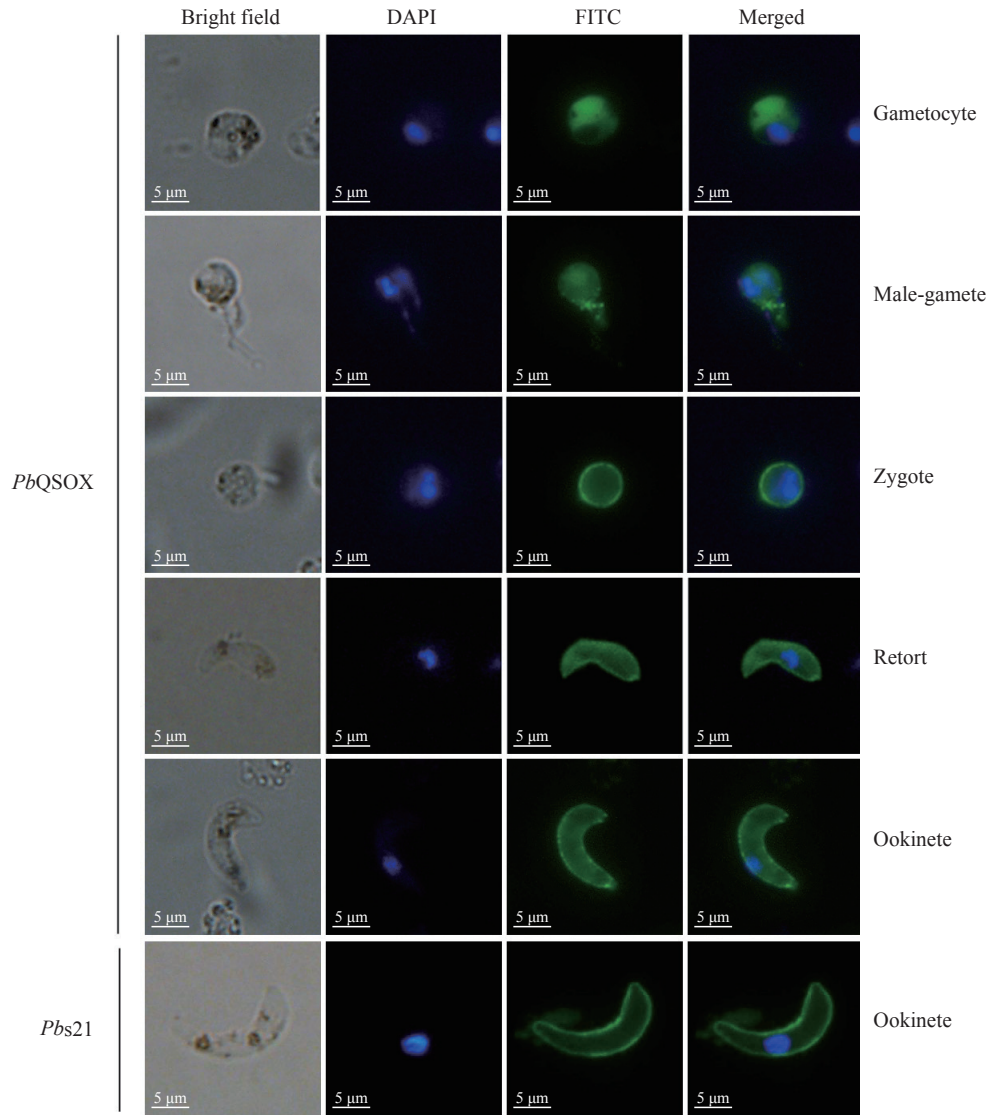
Fig 6 Western blotting analysis of *PbQSOX* protein expression stages

1: Schizonts; 2: Gametocytes; 3: Ookinetes. *PbQSOX*: *Plasmodium berghei* quiescin sulphydryl oxidase.

IFA 结果显示, 无论加入 (图片未展示) 或不加 0.1% Triton X-100 (图 7), 抗 HA 标签抗体可识别配子体、雄配子、合子、retort 与动合子表面抗原, 显示明显的绿色荧光。蛋白质印迹法与 IFA 的结果一致, 提示 *PbQSOX* 主要表达在配子体、雄配子、合子、retort 与动合子表面。

3 讨论

QSOX 可通过将还原性底物蛋白中的巯基氧化成二硫键来获得有活性的蛋白质, 是促进生物体内蛋白质二硫键正确形成、促进蛋白质发挥生理活性的关键酶之一^[12]。哺乳动物的 QSOX1 在不同的细胞中均有表达且功能各异。在胰腺癌和肾癌细胞系中过表达 QSOX1 可有效减少肿瘤细胞迁移^[23]。QSOX1 下调后可抑制血管平滑肌细胞的迁移和增殖^[24]。在成纤维细胞和间充质干细胞中, QSOX1 是一种免疫反应调节剂, 可预防肺组织炎症反应和纤维化^[25]。QSOX1 高表达是乳腺癌预后不良的重要因素^[19]。QSOX1 对人肺成纤维细胞、豚鼠子宫内膜细胞和大鼠精囊细胞也有重要的调节作用^[26]。此外, QSOX 可能在朊病毒的形成过程中起一定的作用^[27]。QSOX 也在各种细胞器内表达, 如线粒体、高尔基体、分泌颗粒、细胞核和细胞膜表面等^[28]。哺乳动物的 QSOX 多位于高尔基复合体上, 但在静止的成纤维细胞中表达上调并呈分泌模式, 可参与细胞外基质组装^[29]。此外, QSOX 也存在于细胞外, 如体外组织培养物^[30]、血液和腺体分泌物中^[31]。QSOX 对寄生虫生长发育的作用及相关酶活性等也相继被报道^[15,22]。但 QSOX 在疟原虫中的表达阶段、表达特点及生物学功能目前尚不清楚。

图7 间接免疫荧光实验分析 *PbQSOX* 的表达阶段Fig 7 Indirect immunofluorescence assay analysis of *PbQSOX* expression stages

Anti-*Pbs21* monoclonal antibody served as a positive control. *PbQSOX*: *Plasmodium berghei* quiescensulphhydryl oxidase; *Pbs21*: *Plasmodium berghei* ookinete surface antigen; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; FITC: Fluorescein isothiocyanate.

随着疟原虫基因序列的相继公布, 基因重组技术被广泛应用于疟原虫的基因功能、生物学行为及其与宿主的关系等方面的研究^[32]。但将外源DNA导入疟原虫的细胞核内需要穿过4层细胞膜, 常导致疟原虫的电转染效率较低。伯氏疟原虫成熟裂殖体中含有12~24个裂殖子, 纯化后的裂殖体可以积聚大量的裂殖子, 因此应用伯氏疟原虫纯化的成熟裂殖体进行电转染可明显提高基因敲除的效率^[33]。同时, 我们结合Amaza公司开发的核转染技术^[34], 使用Lonza Nucleofector的U-033程序进行电转染, 提高了转染效率, 并获得了乙胺嘧啶耐药型疟原虫。经PCR鉴定显示, 我们成功应用基因重组技术为*PbQSOX*蛋白加入了HA标签, 获取

了*PbQSOX*-HA标签型疟原虫, 这为研究QSOX在伯氏疟原虫中的表达阶段及表达特点奠定了良好的实验基础。蛋白质印迹法和IFA检测结果表明, *PbQSOX*蛋白主要表达于配子体、雄配子、合子、retort与动合子, 并不在裂殖体等无性生殖阶段表达; 且IFA实验无论是否进行透膜处理, 均可见细胞膜表面的绿色荧光, 表明*PbQSOX*在细胞膜表面表达, 这与信号肽和跨膜区预测的结果一致。

成为TBV候选抗原的疟原虫关键条件之一是抗原需在有性生殖阶段的疟原虫表面表达^[35], *PbQSOX*的表达特点提示其抗体可能具有传播阻断潜能, 使其有望成为TBV候选抗原, 这对于TBV疫苗的研发具有一定意义。同时, *PbQSOX*在配子

体、雄配子、合子、retort与动合子多个阶段表达,表明抗PbQSOX抗体可能有能力在多个阶段阻止疟原虫的发育。例如,PbQSOX在配子体与雄配子表面表达,提示抗PbQSOX抗体可能阻碍配子体与配子的发育,干扰雌雄配子的结合,从而降低合子的形成数量;其次,PbQSOX表达于合子与动合子表面,提示抗PbQSOX抗体可影响动合子的成熟。鉴于PbQSOX的表达模式与定位特征,后续可对其生物学功能及其产生的抗体进行传播阻断能力验证,以期深入探讨PbQSOX成为TBV候选抗原的可能性。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. World malaria report 2018[M]. Geneva: WHO Press, 2018: 14-15.
- [2] 刘怀鄂,苏品臻,陈熙,李翠英,吴艳瑞,孙乐,等.常用抗间日疟药物抗药性机制研究进展[J].中国病原生物学杂志,2018,13:1049-1051.
- [3] GATTON M L, CHITNIS N, CHURCHER T, DONNELLY M J, GHANI A C, GODFRAY H C, et al. The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa[J]. Evolution, 2013, 67: 1218-1230.
- [4] COWMAN A F, HEALER J, MARAPANA D, MARSH K. Malaria: biology and disease[J]. Cell, 2016, 167: 610-624.
- [5] 雷正龙,王立英.全国重点寄生虫病防治形势与主要任务[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2012,30:1-5.
- [6] 张丽,丰俊,张少森,夏志贵,周水森.2018年全国疟疾疫情特征及消除工作进展[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2019,37:241-247.
- [7] HALL N, KARRAS M, RAINE J D, CARLTON J M, KOOIJ T W, BERRIMAN M, et al. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses[J]. Science, 2005, 307: 82-86.
- [8] malERA Consultative Group on Vaccines. A research agenda for malaria eradication: vaccines[J/OL]. PLoS Med, 2011, 8: e1000398. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000398.
- [9] ALONSO P L, BROWN G, AREVALO-HERRERA M, BINKA F, CHITNIS C, COLLINS F, et al. A research agenda to underpin malaria eradication[J/OL]. PLoS Med, 2011, 8: e1000406. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000406.
- [10] HOFFMAN S L, VEKEMANS J, RICHIE T L, DUFFY P E. The march toward malaria vaccines[J]. Am J Prev Med, 2015, 49(6 Suppl 4): S319-S333.
- [11] TUJU J, KAMUYU G, MURUNGI L M, OSIER F H A. Vaccine candidate discovery for the next generation of malaria vaccines[J]. Immunology, 2017, 152: 195-206.
- [12] FREEDMAN R B, HIRST T R, TUIITE M F. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding[J]. Trends Biochem Sci, 1994, 19: 331-336.
- [13] KODALI V K, THORPE C. Oxidative protein folding and the quiescin-sulfhydryl oxidase family of flavoproteins[J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 13: 1217-1230.
- [14] ALON A, HECKLER E J, THORPE C, FASS D. QSOX contains a pseudo-dimer of functional and degenerate sulfhydryl oxidase domains[J]. FEBS Lett, 2010, 584: 1521-1525.
- [15] HAQUE S J, MAJUMDAR T, BARIK S. Redox-assisted protein folding systems in eukaryotic parasites[J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 17: 674-683.
- [16] LIMOR-WAISBERG K, BEN-DOR S, FASS D. Diversification of quiescin sulfhydryl oxidase in a preserved framework for redox relay[J/OL]. BMC Evol Biol, 2013, 13: 70. DOI: 10.1186/1471-2148-13-70.
- [17] KATCHMAN B A, ANTWI K, HOSTETTER G, DEMEURE M J, WATANABE A, DECKER G A, et al. Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases[J]. Mol Cancer Res, 2011, 9: 1621-1631.
- [18] MEBAZAA A, VANPOUCKE G, THOMAS G, VERLEYSEN K, COHEN-SOLAL A, VANDERHEYDEN M, et al. Unbiased plasma proteomics for novel diagnostic biomarkers in cardiovascular disease: identification of quiescin Q6 as a candidate biomarker of acutely decompensated heart failure[J]. Eur Heart J, 2012, 33: 2317-2324.
- [19] POILLET L, PERNODET N, BOYER-GUITTAUT M, ADAMI P, BORG C, JOUVENOT M, et al. QSOX1 inhibits autophagic flux in breast cancer cells[J/OL]. PLoS One, 2014, 9: e86641. DOI: 10.1371/journal.pone.0086641.
- [20] SONG H, ZHANG B, WATSON M A, HUMPHREY P A, LIM H, MILBRANDT J. Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis[J]. Oncogene, 2009, 28: 3307-3319.
- [21] BASU S, LEONARD J C, DESAI N, MAVRIDOU D A, TANG K H, GODDARD A D, et al. Divergence of Erv1-associated mitochondrial import and export pathways in trypanosomes and anaerobic protists[J]. Eukaryot Cell, 2013, 12: 343-355.
- [22] TURTURICE B A, LAMM M A, TASCH J J, ZALEWSKI A, KOOISTRA R, SCHROETER E H, et al. Expression of cytosolic peroxiredoxins in *Plasmodium berghei* ookinetes is regulated by environmental factors in the mosquito bloodmeal[J/OL]. PLoS Pathog, 2013, 9:

- e1003136. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003136.
- [23] HANAVAN P D, BORGES C R, KATCHMAN B A, FAIGEL D O, HO T H, MA C T, et al. Ebselen inhibits QSOX1 enzymatic activity and suppresses invasion of pancreatic and renal cancer cell lines[J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 18418-18428.
- [24] BORGES B E, APPEL M H, COFRÉ A R, PRADO M L, STECLAN C A, ESNARD F, et al. The flavo-oxidase QSOX1 supports vascular smooth muscle cell migration and proliferation: evidence for a role in neointima growth[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852: 1334-1346.
- [25] SUN X, ZHENG M, ZHANG M, QIAN M, ZHENG Y, LI M, et al. Differences in the expression of chromosome 1 genes between lung telocytes and other cells: mesenchymal stem cells, fibroblasts, alveolar type II cells, airway epithelial cells and lymphocytes[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18: 801-810.
- [26] WANG T E, LI S H, MINABE S, ANDERSON A L, DUN M D, MAEDA K I, et al. Mouse quiescin sulfhydryl oxidases exhibit distinct epididymal luminal distribution with segment-specific sperm surface associations[J]. *Biol Reprod*, 2018, 99: 1022-1033.
- [27] ABSKHARON R, DANG J, ELFARASH A, WANG Z, SHEN P, ZOU L S, et al. Soluble polymorphic bank vole prion proteins induced by co-expression of quiescin sulfhydryl oxidase in *E. coli* and their aggregation behaviors[J/OL]. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 170. DOI: 10.1186/s12934-017-0782-x.
- [28] TURY A, MAIRET-COELLO G, PONCET F, JACQUEMARD C, RISOLD P Y, FELLMANN D, et al. QSOX sulfhydryl oxidase in rat adenohypophysis: localization and regulation by estrogens[J]. *J Endocrinol*, 2004, 183: 353-363.
- [29] ILANI T, ALON A, GROSSMAN I, HOROWITZ B, KARTVELISHVILY E, COHEN S R, et al. A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function[J]. *Science*, 2013, 341: 74-76.
- [30] COPPOCK D, KOPMAN C, GUDAS J, CINA-POPPE D A. Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269: 604-610.
- [31] ISRAEL B A, JIANG L, GANNON S A, THORPE C. Disulfide bond generation in mammalian blood serum: detection and purification of quiescin-sulfhydryl oxidase[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 69: 129-135.
- [32] TONKIN C J, VAN DOOREN G G, SPURCK T P, STRUCK N S, GOOD R T, HANDMAN E, et al. Localization of organellar proteins in *Plasmodium falciparum* using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2004, 137: 13-21.
- [33] LEHMANN C, HEITMANN A, MISHRA S, BURDA P C, SINGER M, PRADO M, et al. A cysteine protease inhibitor of *Plasmodium berghei* is essential for exoerythrocytic development[J/OL]. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004336. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004336.
- [34] JANSE C J, RAMESAR J, WATERS A P. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1: 346-356.
- [35] MIURA K, TAKASHIMA E, DENG B, TULLO G, DIOUF A, MORETZ S E, et al. Functional comparison of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay[J]. *Infect Immun*, 2013, 81: 4377-4382.

[本文编辑] 孙岩