

研究报告



滑液支原体醛缩酶的亚细胞定位及免疫原性

王宇^{1,2} 祁晶晶² 刘婷² 温政³ 闫遵祥² 高崧^{*1} 于圣青^{*2}

1 扬州大学兽医学院 江苏 扬州 225009

2 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241

3 山东农业大学动物科技学院 山东 泰安 271099

摘要:【背景】滑液支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)感染能够引起鸡和火鸡的气囊炎、关节渗出性的滑液囊膜及腱鞘滑膜炎等。有研究表明,许多支原体中与代谢相关的酶类不仅分布在细胞质,也分布于细胞膜表面,通过结合宿主细胞的胞外基质蛋白,协助病原菌黏附入侵宿主细胞。已有报道牛支原体(*Mycoplasma bovis*)和鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*)的醛缩酶(Fructose-bisphosphate aldolase, FBA)分布在膜蛋白和胞浆蛋白中,而MS的FBA蛋白还未见相关研究。【目的】对MSFBA蛋白进行生物信息学分析、原核表达、免疫原性分析及亚细胞定位检测,为进一步探索MS代谢相关酶类的生物学功能奠定基础。【方法】通过分析软件PSORTb、SignalP 4.1 Server和TMHMM Server在线预测MSFBA的亚细胞定位、信号肽及跨膜区,并用BLASTn和MEGA 5.0进行同源比对及进化树分析;通过Overlap PCR点突变扩增MS的fba全基因序列,连接表达载体pET-28a(+)并进行原核表达及纯化,获得纯化后的重组MSFBA(rMSFBA)蛋白;用MS阳性血清进行Western blot鉴定rMSFBA的免疫原性;用纯化的rMSFBA蛋白制备兔多克隆抗体,与MS全菌蛋白、膜蛋白及胞浆蛋白进行Western blot分析,同时对MS全菌进行悬浮免疫荧光分析,检测MSFBA的膜定位情况。

【结果】生物信息分析预测MSFBA分布在细胞质中,无信号肽,无跨膜区,在MS种内相似性高达99%,与其他种属FBA相似性在61%–78%之间,进化树显示其与牛鼻支原体(*Mycoplasma bovirhinis*)、仓鼠支原体(*Mycoplasma cricetuli*)等的FBA蛋白进化关系较近,与精氨酸支原体(*Mycoplasma arginini*)、人型支原体(*Mycoplasma hominis*)等的FBA蛋白进化关系较远;表达rMSFBA蛋白并纯化,经测定其相对分子质量大小约为33 kD; rMSFBA能与MS阳性鸡血清特异性结合,证实其具有较好的免疫原性;Western blot显示抗rMSFBA的兔血清能与MS全菌蛋白和胞浆蛋白反应,而与膜蛋白不反应,说明MSFBA蛋白分布于胞浆中;悬浮免疫荧光实验证实MS的细胞膜上未见FBA蛋白分布。【结论】首次报道了滑液支原体的FBA蛋白是一个高度保守的免疫原性蛋白,主要分布在细胞质中,该结果为进一步研究MSFBA蛋白的生物学功能提供了分子基础。

关键词:滑液支原体,醛缩酶,原核表达,亚细胞定位,免疫原性

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0500705)

***Corresponding authors:** GAO Song: Tel: 86-514-8797217; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

YU Sheng-Qing: Tel: 86-21-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

Received: 28-05-2018; **Accepted:** 05-07-2018; **Published online:** 06-08-2018

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0500705)

***通信作者:** 高崧: Tel: 0514-87972117; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

于圣青: Tel: 021-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

收稿日期: 2018-05-28; **接受日期:** 2018-07-05; **网络首发日期:** 2018-08-06

Subcellular localization and immunogenicity of fructose-bisphosphate aldolase (FBAs) in *Mycoplasma synoviae*

WANG Yu^{1,2} QI Jing-Jing² LIU Ting² WEN Zheng³ YAN Zun-Xiang² GAO Song^{*1}
YU Sheng-Qing^{*2}

1 College of Veterinary, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Shanghai 200241, China

3 College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271099, China

Abstract: [Background] *Mycoplasma synoviae* (MS) can infect chickens and turkeys to cause airsacculitis, joint exudative, synovial bursitis and tendon sheath synovitis. Previous studies have shown that many metabolism-related enzymes in mycoplasma are present not only in the cytoplasm but also on the cell membrane surface, which act as adhesion associated proteins and play roles on the pathogenicity. The fructose-bisphosphate aldolases (FBAs) have been identified on the membrane and cytoplasmic fractions of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma gallisepticum*, however, the MS FBA has not been studied before. [Objective] To explore the biological functions of metabolism related enzymes in MS, the FBA protein was subjected to bioinformatics analysis, prokaryotic expression, as well as immunogenicity and subcellular localization determinations in this study. [Methods] Using softwares of PSORTb, SignalP 4.1 Server and TMHMM Server to predict the subcellular localization, signal peptides and transmembrane regions of MSFBA. Blastn and MEGA 5.0 were used to analyze the homology and construct the phylogenetic tree of MSFBA. The full length of MS *fba* gene was amplified by overlap PCR and inserted into the expression vector of pET-28a(+). The recombinant MSFBA (rMSFBA) protein was then expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and purified. The immunogenicity of rMSFBA was determined by Western blot analysis using MS-positive chicken serum. The rabbit anti-rMSFBA sera were prepared, and used to perform Western blot against the whole-cell, membrane and cytoplasmic fractions of MS to determine the subcellular localization. Suspension immunofluorescence assay further confirmed the non-membrane surface localization of the MSFBA. [Results] The MSFBA is predicted to be a cytoplasmic protein with no signal peptide and no transmembrane region. It is highly conserved protein which shows up to 99% homology among different MS strains, and 61% to 78% homology with different species of mycoplasma. The phylogenetic tree shows that the MSFBA is evolutionally closed to the FBA from *Mycoplasma bovirhinis* and *Mycoplasma cricetuli*, but remote to that of *Mycoplasma arginini* and *Mycoplasma hominis*. The rMSFBA protein was successfully expressed and purified, and the relative molecular mass was approximately 33 kD. The rMSFBA presented a specific binding to MS-positive chicken serum, which proved that it had good immunogenicity. Western blot analysis showed the rabbit anti-rMSFBA sera can react with the whole-cell and cytoplasmic fractions of MS bacteria, but not the membrane fraction, indicating the MSFBA protein is distributed in the cytoplasm. Suspension immunofluorescence assay further confirmed the FBA was not displayed on the membrane surface of MS cells. [Conclusion] The MSFBA protein is a highly conserved, immunogenic and cytoplasmic localized protein. The results provide a molecular basis for further study of the biological function of MSFBA protein.

Keywords: *Mycoplasma synoviae*, Fructose-bisphosphate aldolase, Prokaryotic expression, Subcellular localization, Immunogenicity

引起鸡致病的支原体主要包括鸡毒支原体和滑液支原体^[1]。鸡滑液支原体能够引起鸡和火鸡的上呼吸道感染、传染性滑膜炎和黏液炎^[2], 主要表现为气囊炎、关节渗出性的滑液囊膜及腱鞘滑膜

炎。在生产上, 滑液支原体感染常常引起产蛋量和产蛋品质下降, 影响鸡群的生长状况, 给世界范围的养鸡业造成经济损失^[3]。

支原体致病主要通过表面的黏附因子黏附到

宿主细胞表面,再入侵到宿主细胞内部,对宿主产生毒性作用^[4]。支原体细胞表面与黏附及致病相关的黏附因子包括表面分布的酶类(如神经氨酸酶等)以及脂蛋白成分^[5]。越来越多的研究表明,许多支原体中与代谢相关的酶类,如烯醇化酶(Eno)^[6-7]、磷酸丙糖异构酶(TPI)^[8]、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)^[9]、丙酮酸激酶(PK)^[10]等,不仅在细胞质中发挥生物催化功能,还分布于细胞膜表面,通过结合宿主细胞的胞外基质蛋白(Extracellular matrix, ECM)如纤溶酶原(Plasminogen, Plg)^[6-7]等,协助病原菌在宿主体内定殖、入侵和传播^[6,11-12]。

与其他支原体一样,滑液支原体不具备完整的三羧酸循环,主要的能量来自于糖酵解途径。在糖酵解过程中,醛缩酶(Fructose-bisphosphate aldolase, FBA)能够可逆地将果糖-1,6-二磷酸裂解为1分子的二羟丙酮磷酸和1分子的甘油醛-3-磷酸^[13],它是机体产生能量的重要酶之一。在猪链球菌^[14]、单核细胞增生李斯特氏菌^[15]等革兰氏阳性菌中,FBA蛋白被证实是一个免疫原性膜蛋白,可作为表面诊断抗原;在脑膜炎奈瑟菌中FBA蛋白位于细胞质和细胞膜中,并且在此蛋白缺失的情况下,菌体黏附靶细胞能力下降^[16]。

在支原体中,已有报道牛支原体^[17]和鸡毒支原体^[4]中的FBA蛋白分布在膜蛋白和胞浆蛋白上,而滑液支原体的FBA蛋白还未见相关研究。本研究针对滑液支原体WVU1853株的*fba*基因,构建原核表达质粒pET28a-MS*fba*,表达并纯化重组蛋白MSFBA(rMSFBA),利用制备的抗rMSFBA的兔血清对其进行定位分析,同时鉴定MSFBA的免疫原性,为进一步探索滑液支原体糖酵解酶的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

MS WVU1853菌株购自中国兽医微生物菌种保藏中心(保藏编号为CVCC385);滑液支原体鸡阳性血清购自中国兽药药品监察所;带His标签的

重组MSEno(rMSEno)纯化蛋白由本实验室前期制备^[7];新西兰兔购自上海市松江区松联实验动物场;大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α 和BL21(DE3)感受态细胞、细菌基因组DNA提取试剂盒、pLB零背景快速连接试剂盒、质粒快速小提试剂盒和胶回收试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司;Prime STAR DNA聚合酶及各限制性内切酶购自TaKaRa公司;2 \times Taq Master Mix购自北京康为世纪生物科技有限公司;表达载体pET-28a(+)购自Novagen公司;BeaverBeadsTM His-Tag蛋白纯化试剂盒为Selleck公司产品;膜蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒购自上海贝博生物公司;二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。HRP标记羊抗兔IgG二抗和FITC标记鼠抗兔IgG二抗购自Thermo Fisher Scientific公司,HRP标记的羊抗鸡IgY二抗购自Abcam公司。支原体基础培养基购自青岛海博生物技术有限公司;NAD购自Roche公司;马血清购自Gibco公司;胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂均购自OXOID公司;NaCl购自生工生物工程(上海)股份有限公司。滑液支原体液体培养基:支原体基础培养基33.0 g/L,1 \times 10⁵ Pa灭菌15 min后添加0.01% NAD和10%马血清;LB液体培养基(g/L):胰蛋白胨10.0,酵母提取物5.0,NaCl 5.0,琼脂15.0(固体培养基),1 \times 10⁵ Pa灭菌15 min。

PCR仪,ABI公司;DNA电泳仪、凝胶成像系统,上海天能科技有限公司;高速台式离心机,Eppendorf公司;恒温培养摇床,北京创新思成公司;NanoDrop微量分光光度计,Thermo Fisher Scientific公司;紫外倒置显微镜,Leica公司;蛋白电泳仪、转印槽,Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

从GenBank数据库中获取滑液支原体WVU1853株FBA蛋白的氨基酸序列(WP_011283497.1)。使用PSORTb version 3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/>)

对 MSFBA 蛋白的亚细胞定位进行在线预测;使用 TMHMM Server version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测 MSFBA 蛋白的跨膜区;使用在线软件 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测蛋白信号肽;利用在线 BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)检索 nr/nt 数据库,分析 MSfba 基因与其他 fba 的同源性;用 MEGA 5.0 软件进行序列比对,同时进行进化树分析(基于 Neighbor-Joining 法)。

1.2.2 MS 的培养和全基因组的提取

取冻存的滑液支原体 WVU1853 株,按 5%接种比例转接至 50 mL 滑液支原体液体培养基中,37 °C 静置培养 40 h,12 000×g 离心 20 min 收集菌体。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明书提取 MSWVU1853 的基因组 DNA,NanoDrop 微量分光光度计测定基因组 DNA 浓度,于-20 °C 冻存备用。

1.2.3 MSfba 基因的点突变及全长获取

从 GenBank 数据库中获取鸡滑液支原体 WVU1853 株(CP011096.1)的 fba 基因序列(VY93_01925)。由于支原体中编码色氨酸的 TGA 在大肠杆菌中为终止密码子,为了使目的基因能够在大肠杆菌中顺利表达,通常需要将 TGA 突变为 TGG。对 MSfba 基因序列进行分析,发现有两处位点需要进行突变(第 90 位和第 558 位)。用 Primer 5.0 软件在目的片段两端及突变位点处设计特异性

引物共 3 对,引物序列见表 1。

先用 MSfba 1F/1R、MSfba 2F/2R 及 MSfba 3F/3R 分别扩增获得 MSfba 各片段,PCR 体系(40 μL): Prime STAR MAX Premix (2×) 20 μL,上、下游引物各 0.25 μmol/L,MS WVU1853 基因组 DNA 模板 100 ng,ddH₂O 补足至 40 μL。PCR 条件: 98 °C 5 min; 98 °C 30s, 58 °C 5 s, 72 °C 15 s, 35 个循环; 72 °C 10 min; 16 °C 10 min。将各片段产物回收后混合作为模板,进行第二轮 PCR,反应体系和反应条件同上。将获得产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳后切取与预期大小相符片段回收,即为 MSfba 基因全长。

1.2.4 MSfba 基因表达载体的构建

将 Overlap PCR 获得的 MSfba 基因全长用 BamH I 和 EcoR I 双酶切后连接表达载体 pET-28a(+),连接产物转化 E. coli DH5α 感受态细胞,涂布含 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板,37 °C 培养 12 h。挑取长出的单菌落,接种至含 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基,在 37 °C、220 r/min 振荡培养 6 h,取菌液进行 PCR 鉴定,PCR 反应体系(20 μL): 2×Taq Master Mix 10 μL,引物 MSfba 1F、MSfba 3R 各 0.5 μmol/L,待鉴定菌液 2 μL,ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 反应条件: 98 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 16 °C 10 min。将鉴定为阳性的菌株扩大培养,按照质粒快速小提试剂盒的说明书抽提质粒,然后对

表 1 用于 MSfba 基因重叠延伸 PCR 的扩增引物

Table 1 Primers used for overlap PCR amplification of MSfba gene

| 引物名称 Primers name | 引物序列 Primers sequence (5'→3') | 序列长度 Sequences length (bp) |
|----------------------|---|-------------------------------|
| MSfba 1F | <u>CGGATCC</u> ATGCCATTAACAAACG | 106 |
| MSfba 1R | GAAGCACAGCTTTAGCCCATTCTA | |
| MSfba 2F | TAGAAATGGGCTAAAGCTGTGCTTC | 487 |
| MSfba 2R | TCAAGAGATTTC CAATTTT CTGGATATGGC | |
| MSfba 3F | GCCATATCCAGAAAATTG GAAATCTCT TGA | 328 |
| MSfba 3R | CG GAAATCT TTAAGCTTTATTTTGTGATCC | |

注: 下划线为添加的酶切位点 BamH I (GGATCC)和 EcoR I (GAATTC); 加粗的是突变密码子位点。

Note: The restriction enzyme sites of BamH I (GGATCC) and EcoR I (GAATTC) were underlined; The mutated nucleotides were in bold.

质粒进行双酶切鉴定。将经 PCR 及酶切鉴定均正确的质粒送上海睿勉生物科技有限公司测序,将序列完全正确的质粒保存,标记为 pET28a-MSfba。将 pET28a-MSfba 转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,PCR 鉴定为阳性的菌株即为重组表达菌株 *E. coli* BL21(pET28a-MSfba),添加 20% 甘油保存于 -80 °C。

1.2.5 重组 MSFBA (rMSFBA)蛋白的原核表达及纯化

将重组表达菌株转接到 10 mL 含 50 µg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 时,加入 50 µg/mL IPTG 诱导表达 6 h,12 000×g 离心 10 min 收集菌体,PBS 洗涤菌体 2 遍,1 mL PBS 重悬菌体,超声破碎 20 min (功率 40 W,工作 5 s,间歇 5 s),4 °C、12 000×g 离心 10 min 得到上清和沉淀,SDS-PAGE 检测 rMSFBA 蛋白是否为可溶性表达。按上述方法将 200 mL 重组菌液进行大量诱导表达,再利用 BeaverBeads™ His-Tag 蛋白纯化试剂盒对上清中的 rMSFBA 蛋白进行纯化,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化蛋白浓度,-80 °C 保存备用。

1.2.6 多克隆抗体的制备

取纯化好的 rMSFBA 及 rMSEno 蛋白各 1 mg,分别与等体积的弗式完全佐剂混合后乳化,通过背部皮下多点注射,分别免疫两月龄的新西兰兔,首次免疫后每 2 周加强免疫一次,对三免后 2 周的兔子进行耳静脉采血,同时对未免疫的兔子采血,分离的血清分别为抗 rMSFBA 兔血清、抗 rMSEno 兔血清和兔阴性血清,将血清分别分装小管冻于 -40 °C 备用。

1.2.7 MS 全菌、膜及胞浆蛋白的提取

收集对数生长期的 MS WVU1853 菌体,4 °C、12 000×g 离心 10 min,PBS 洗 2 次,用 1% 菌液体积的 PBS 重悬菌体沉淀。将 PBS 洗涤后的菌体超声破碎(条件同 1.2.5),即为 MS 全菌蛋白。参照膜蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒(上海贝博)分离 MS 的膜蛋白和胞浆蛋白,将提取的蛋白分别用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度后分装保存。

1.2.8 Western blot 检测 MS 的 FBA 蛋白在膜和胞浆中的分布

将制备好的 MS 全菌蛋白、膜蛋白以及胞浆蛋白按等量(4 µg/孔)进行 SDS-PAGE 电泳,制备 3 块电泳胶。其中一块胶进行考马斯亮蓝染色,其余两块 PAGE 胶转印硝酸纤维素(NC)膜,然后用制备的抗 rMSFBA 兔血清和抗 rMSEno 兔血清分别作为一抗进行 Western blot 分析。具体方法为:将转印后的 NC 膜用 5% 的脱脂乳 37 °C 封闭 2 h;PBST (PBS 溶液中添加 0.05% 吐温-20)洗涤 3 次;用抗 rMSFBA 或抗 rMSEno 的兔血清(1:1 000)在 37 °C 孵育 1.5 h;PBST 洗 3 次,每次 10 min;用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗在 37 °C 孵育 1 h;PBST 洗 3 次,每次 10 min;加入 ECL 底物显色液进行显色反应。

1.2.9 悬浮免疫荧光实验

将 PBS 重悬的 MS 菌体用 4% 中性甲醛室温固定 30 min,中间数次轻轻混匀,12 000 ×g 离心 10 min (以下离心均采用相同转速和时间)后再用 PBS 悬浮洗 3 次,取抗 rMSFBA 兔血清(1:200)于 37 °C 振荡孵育 1.5 h,再用 PBS 悬浮洗 3 次,加入 FITC 标记的鼠抗兔 IgG 抗体(1:1 000),避光 37 °C 孵育 1 h,PBS 再次悬浮洗 4–5 次,最后离心后的菌体用 100 µL PBS 混匀后,涂在载玻片上,自然晾干后封片,在荧光显微镜下观察。以抗 rMSEno 兔血清(1:200)和兔阴性血清(1:200)分别作为阳性和阴性对照。

1.2.10 免疫原性鉴定

将 rMSFBA 纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,按 1.2.8 中的方法进行 Western blot,以鸡滑液支原体阳性血清(1:200)为一抗在 37 °C 孵育 1.5 h,PBST 洗 3 次;用 HRP 标记的羊抗鸡 IgY 二抗(1:5 000)在 37 °C 孵育 1 h,PBST 洗 3 次,用 ECL 底物显色液进行显色反应。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

利用 PSORTb version 3.0.2 进行亚细胞定位预

测,结果显示其分布在细胞质中。TMHMM Server Version 2.0 和 SignalP 4.1 Server 预测该蛋白无跨膜区,无信号肽。通过 BLASTn 将 MS*fba* 基因序列比对 nr/nt 数据库,结果显示 *fba* 基因在滑液支原体种内高度保守,MS 不同分离株之间的 *fba* 基因序列相似性高达 99%;在种间保守性也较高,与其他支原体的 *fba* 基因相似性达 61%–78%,同时与其他种属的细菌如无胆甾原体属(*Acholeplasma*)、虫原体属(*Entomoplasma*)、螺原体属(*Spiroplasma*)、

厌氧球菌属(*Anaerococcus*)以及梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*) *fba* 基因的相似性也较高(66%–69%)。

利用 MEGA 5.0 对不同来源的 FBA 蛋白氨基酸序列构建进化树(图 1)。结果显示 MSFBA 的氨基酸序列与牛鼻支原体(*M. bovirhinis*) CIP 71.24 和仓鼠支原体(*M. cricetuli*) ATCC 35279 菌株等的 FBA 进化关系较近,与精氨酸支原体(*M. arginini*) 7264 和人型支原体(*M. hominis*) ATCC 27545 菌株等的 FBA 进化关系较远。

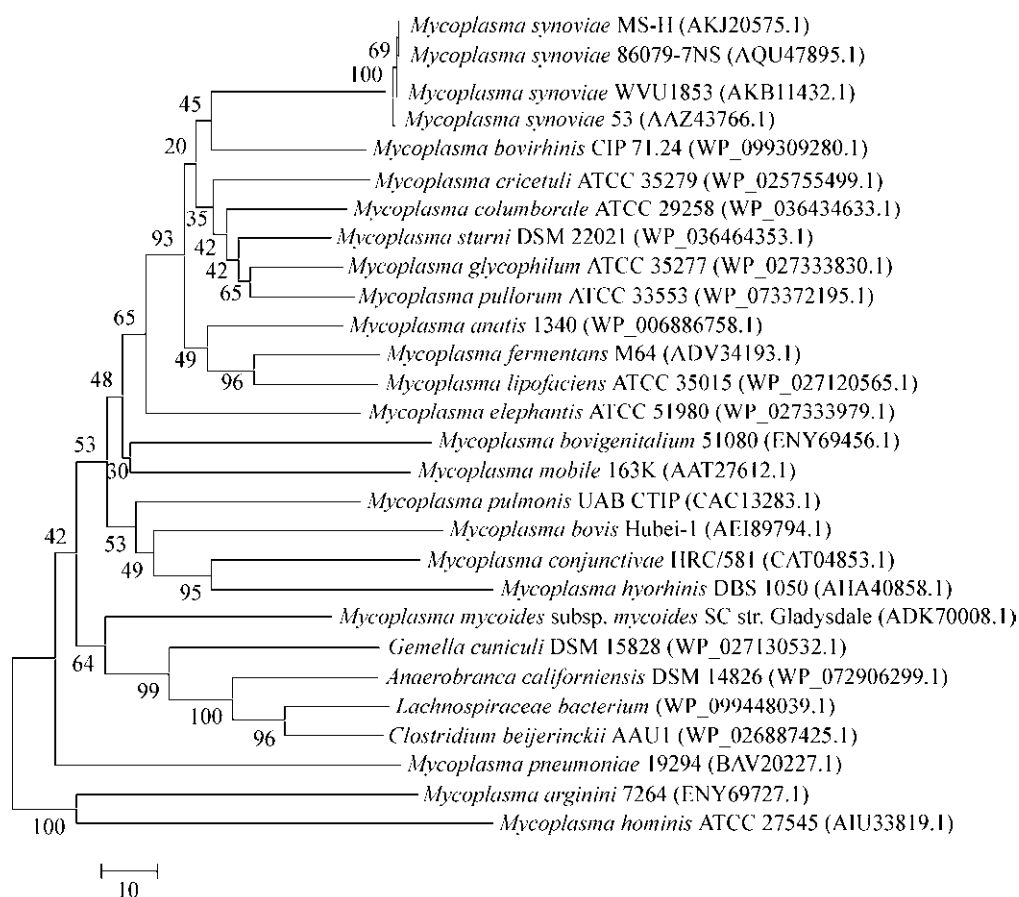


图 1 不同种属 FBA 蛋白的系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of FBA proteins from different species

注: 系统进化树中各菌株名代表各 FBA 蛋白的菌株来源, 括号内的序列号代表 FBA 蛋白序列的 GenBank 登录号; 节点旁数字代表 Bootstrap 值为 1 000 的自展支持率; 树下标尺为进化距离标尺(以每条序列的氨基酸变异数为单位); 进化树按标尺绘制, 其分支长度与进化距离的单位相同。

Note: The strain names and the followed sequence numbers listed in the phylogenetic tree represent the origins of different FBA proteins and their GenBank accession numbers; The number on each node indicates the percentage with which each branch topology was supported in the bootstrap test (1 000 replicates); The scale under the tree represents the evolutionary distance scale (the unit of which is in the units of the number of amino acid differences per sequence); The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances.

2.2 MSfba 基因的 Overlap PCR 扩增

以 MS WVU1853 株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增突变 2 个位点, 获得正确大小的 3 个片段, 经 Overlap PCR 得到完整的 MSfba 基因片段 (867 bp), 结果见图 2。

2.3 重组表达载体的构建和鉴定

将 Overlap PCR 扩增获得的 MSfba 全长序列经双酶切后与表达载体 pET-28a(+)连接, 再转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 菌液 PCR 鉴定见图 3A, 所挑取的 5 株克隆(孔 2-6)均鉴定为阳性。双酶切鉴定结果见图 3B, 获得与预期大小相符的片段。重组载体经测序验证后序列全部正确, 表明成功获得重组表达载体 pET28a-MSfba, 且 MSfba 片段中的两处 TGA 已成功突变为 TGG。

2.4 重组蛋白 MSFBA (rMSFBA)的诱导表达及纯化

将重组表达载体转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 经 PCR 鉴定为阳性的菌株即为重组表达菌株 *E. coli* BL21(pET28a-MSfba)。重组表达菌株经 IPTG 诱导表达, 超声裂解后, 收集上清, 用 His-tag 标记的磁珠进行纯化, 纯化产物

进行 SDS-PAGE 电泳分析, 图 4 结果显示重组蛋白的条带大小约为 33 kD, 与目的蛋白的预期分子量基本一致, 纯化后的 rMSFBA 蛋白条带较纯, 无杂带。

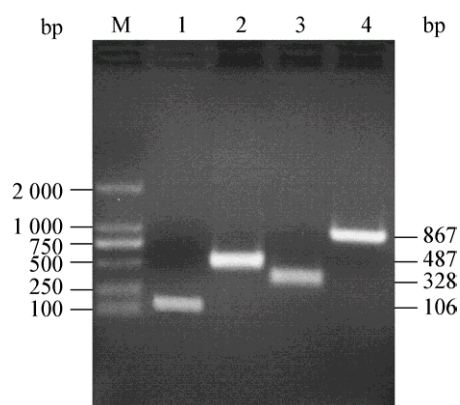


图 2 MSfba 基因的重叠延伸 PCR 扩增

Figure 2 Overlap PCR amplification of MSfba gene

注: M: DL2000 DNA marker; 1: MSfba 1F/1R 扩增产物; 2: MSfba 2F/2R 扩增产物; 3: MSfba 3F/3R 扩增产物; 4: 重叠延伸 PCR 获得的 MSfba 基因全长。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product with primers MSfba 1F/1R; 2: PCR product with primers MSfba 2F/2R; 3: PCR product with primers MSfba 3F/3R; 4: Full gene length of MSfba produced by overlap PCR amplification.

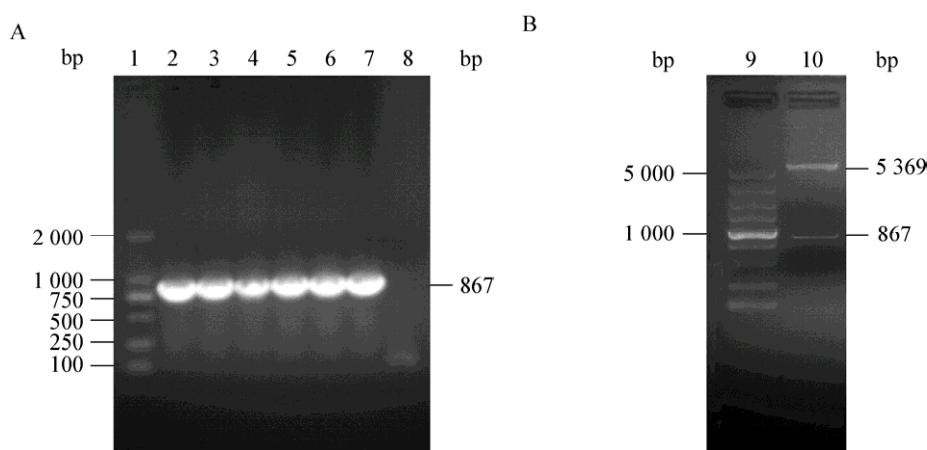


图 3 *E. coli* DH5 α (pET28a-MSfba)的菌落 PCR 鉴定及双酶切鉴定

Figure 3 Identification of *E. coli* DH5 α (pET28a-MSfba) by colony PCR amplification and double enzyme

注: 1: DL2000 DNA marker; 2: PCR 鉴定阳性对照(MSWVU1853 菌液); 3-7: *E. coli* DH5 α (pET28a-MSfba)待验证菌液样品 1-5; 8: 阴性对照(ddH₂O); 9: DL5000 DNA marker; 10: 重组质粒 pET28a-MSfba 双酶切产物。

Note: 1: DL2000 DNA marker; 2: Positive control (MSWVU1853 bacteria) for PCR identification; 3-7: PCR amplification of *E. coli* DH5 α (pET28a-MSfba) samples 1-5; 8: Negative control (ddH₂O) for PCR amplification; 9: DL5000 DNA marker; 10: Double enzyme digestion product of vector pET28a-MSfba.

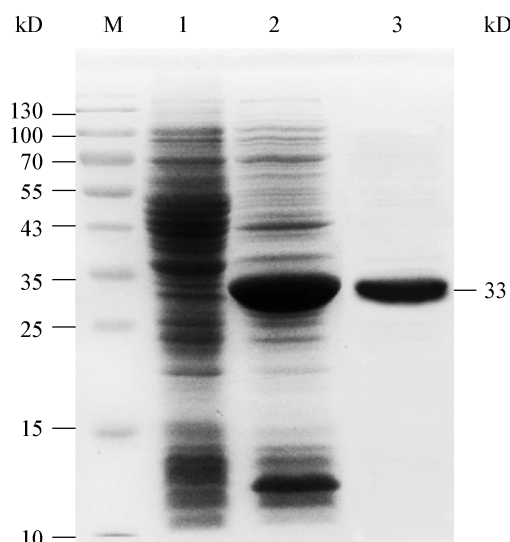


图4 rMSFBA 蛋白的表达和纯化

Figure 4 Expression and purification of recombinant MSFBA protein

注: M: Protein marker; 1: IPTG 诱导的空载体菌; 2: IPTG 诱导的重组表达菌株裂解后上清; 3: 纯化的重组蛋白 MSFBA.

Note: M: Protein marker; 1: IPTG induced *E. coli* BL21(pET28a) cells; 2: Supernatants from IPTG induced *E. coli* BL21(pET28a-MSFBA) cells; 3: Purified rMSFBA protein.

2.5 Western blot 检测 MSFBA 在 MS 中的分布

制备 MS WVU1853 的全菌蛋白、膜蛋白和胞浆蛋白, 定量制备蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色结果见图 5A。利用制备的抗 rMSFBA 兔血清进行 Western blot 分析(图 5B), 结果显示 MSFBA 蛋白仅在 MS 胞浆中有分布。同时, 用制备的抗 rMSEno 兔血清对提取的全菌蛋白、膜蛋白及胞浆蛋白进行 Western blot 检测(图 5C), 发现 Eno 蛋白在 MS 的细胞膜、胞浆中均有分布(蛋白大小约 49 kD), 与前期 MSEno 膜定位研究结果一致^[7], 证明所提取的膜蛋白和胞浆蛋白质量较好。

2.6 悬浮免疫荧光分析

悬浮免疫荧光实验显示, 抗 rMSFBA 兔血清处理 MS 菌体, 其表面不能结合荧光标记二抗, 未见到绿色荧光(图 6A), 兔阴性血清(阴性对照)处理的 MS 表面在荧光显微镜下未见到绿色荧光(图 6B), 而抗 rMSEno 兔血清处理组(阳性对照)的 MS 表面检测到绿色荧光(图 6C)。结果表明 MSFBA 不在 MS 膜表面分布。

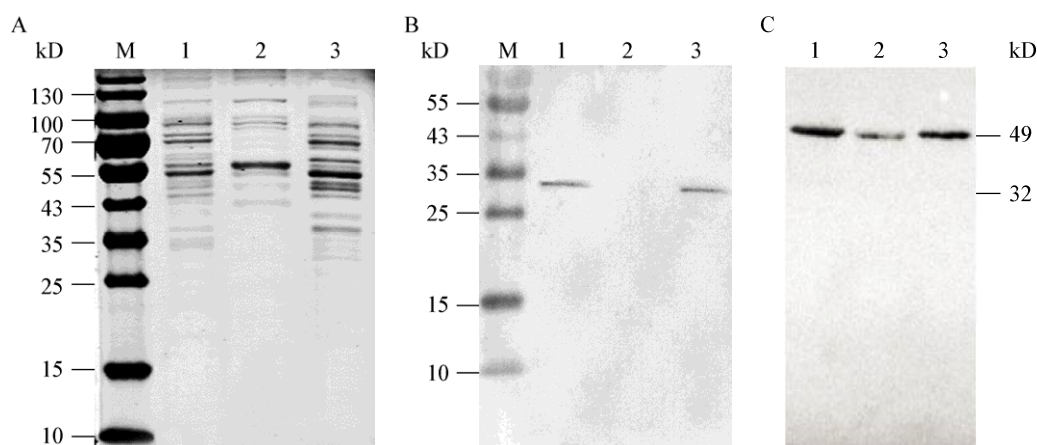


图5 MS 膜蛋白和胞浆蛋白的 SDS-PAGE (A)和 Western blot (B、C)分析

Figure 5 SDS-PAGE (A) and Western blot (B, C) analysis of MS membrane fraction and cytoplasmic fraction

注: M: Protein marker. A: MS 膜蛋白和胞浆蛋白的 SDS-PAGE 分析; B: Western blot 检测 MSFBA 在 MS 膜和胞浆中的分布; C: Western blot 检测 MSEno 在 MS 膜和胞浆中的分布. 1: MSWVU1853 全菌蛋白; 2: MSWVU1853 膜蛋白; 3: MSWVU1853 胞浆蛋白.

Note: M: Protein marker. A: SDS-PAGE analysis of MS membrane fraction and cytoplasmic fraction; B: Western blot analysis of the localization of MSFBA in MS; C: Western blot analysis of the localization of MSEno in MS. 1: Total proteins of MS WVU1853; 2: Membrane proteins from MS WVU1853; 3: Cytoplasmic proteins from MS WVU1853.

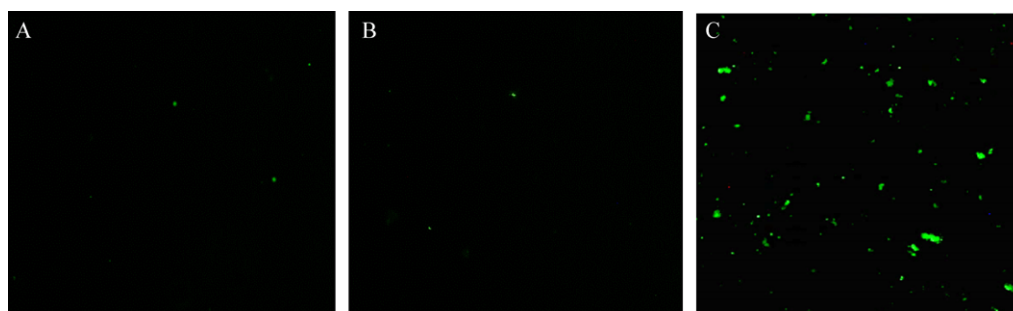


图6 悬浮免疫荧光检测结果

Figure 6 Suspension immunofluorescence detection results

注: A: 抗 rMSFBA 兔血清处理; B: 兔阴性血清对照; C: 抗 rMSEno 兔血清处理。

Note: A: MS cells treated with rabbit anti-rMSFBA serum; B: MS cells treated with non-immunized rabbit serum; C: MS cells treated with rabbit anti-rMSEno serum.

2.7 MSFBA 的免疫原性研究

以 MS 阳性鸡血清作为一抗, 以 HRP 标记的羊抗鸡 IgY 抗体作为二抗进行 Western blot 分析, 结果表明, MS 阳性鸡血清可与经纯化后的 rMSFBA 蛋白(大小约为 33 kD)结合, 而与阴性对照蛋白 BSA 无结合反应(图 7)。这表明 MSFBA 蛋白具有良好的免疫原性。

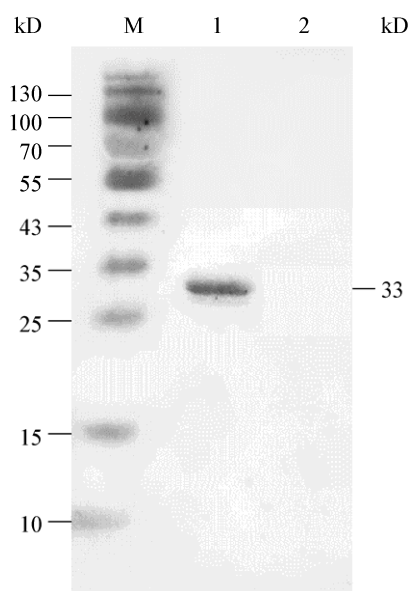


图7 MSFBA 蛋白免疫原性分析

Figure 7 Immunogenicity analysis of MSFBA protein

注: M: Protein marker; 1: 纯化的重组蛋白 rMSFBA; 2: 牛血清白蛋白。

Note: M: Protein marker; 1: Purified rMSFBA protein; 2: BSA.

3 讨论与结论

支原体属于柔膜体纲, 是一类能在无生命培养基中生长繁殖的最小原核细胞型生物。由于大部分支原体缺乏三羧酸循环相关基因, 糖酵解途径成为其重要的能量来源, 因此研究其糖酵解相关酶类对于支原体的研究具有重要意义。FBA 在糖酵解过程中是裂解酶, 是支原体生长的关键酶。Sun 等^[18]对 5 种水产养殖病原菌 FBA 蛋白的抗原识别和相关免疫应答研究表明, 这些 FBA 蛋白均能够激发有效免疫反应, 可作为一种针对各种水产养殖病原菌的广谱亚单位疫苗的候选抗原。副球孢子菌属的 FBA 蛋白是一种胞浆蛋白结合蛋白, 蛋白存在于真菌的分泌蛋白中, 呈现出与纤溶酶原结合的能力, 是真菌与宿主相互作用的靶点, 它们可能有助于真菌的黏附与侵袭^[19]。王玠等^[20]用日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 的重组 FBA (rSjFBA) 蛋白作为包被抗原, 建立了检测抗 rSjFBA 抗体 IgG 的酶联免疫吸附试验(ELISA)方法, 可用于监测感染日本血吸虫的家兔体内抗 SjFBA 的抗体 IgG 的动态变化。在鸡毒支原体^[4]和牛支原体^[17]的胞膜中均有检测到 FBA 蛋白的分布, 因此本文采用 Western blot 对 MSFBA 蛋白的亚细胞定位进行了初步探索, 用抗 rMSFBA 兔血清作用显示 MS 膜中未见 FBA 蛋白分布, 而全菌和胞浆蛋白中有 FBA 蛋白分布, 可见提取的 MS 膜蛋白中未掺杂胞浆蛋白组分。同

时, 采用抗 rMSEno 兔血清作为阳性对照, 对所提取的 MS 膜蛋白和胞浆蛋白进行检测, 发现膜蛋白和胞浆蛋白中均有 MSEno 分布, 证实所提取的膜蛋白质量较好, 亚细胞定位结果较可靠。为进一步验证该结果, 我们又采用悬浮免疫荧光技术检测 FBA 蛋白是否分布在 MS 细胞膜表面, 结果显示为阴性, 说明 MSFBA 蛋白主要分布在细胞质中。经过 Western blot 检测出 FBA 蛋白是一个较好的免疫原性蛋白, 可诱导宿主产生较好的免疫应答反应。

据报道, 脑膜炎奈瑟菌的 FBA 蛋白能够影响病原菌对宿主细胞的黏附^[16], 推测其在病原菌定殖、入侵宿主细胞过程中有重要作用。由于支原体无细胞壁, 探究支原体细胞膜上蛋白与机体之间的作用有助于进一步研究支原体的致病机制^[17], 而在鸡滑液支原体中, FBA 蛋白的研究还未见报道。因此, 对 MSFBA 的亚细胞定位和免疫原性研究有助于探索其生物学功能, 进一步研究其致病机理对于目前鸡滑液支原体的诊断和防控研究有重要意义。

REFERENCES

- [1] Lu F. Study on inactivated of *Mycoplasma gallisepticum* disease and *Mycoplasma synoviae* disease combined vaccine[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [2] Liu JS, Yin XT. Diagnosis and treatment of *Mycoplasma synoviae* disease[J]. Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2009, 30(12): 91 (in Chinese)
- [3] Bradbury JM, Howell LJ. The response of chickens to experimental infection 'in ovo' with *Mycoplasma synoviae*[J]. Avian Pathology, 1975, 4(4): 277-286
- [4] He SB, Tan L, Bao SJ, et al. Prokaryotic expression and membrane localization of aldolase of *Mycoplasma gallisepticum*[J]. Chinese Veterinary Science, 2013, 43(1): 42-46 (in Chinese)
- [5] Wu YM, Ye YK. Mycoplasmaology[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 69 (in Chinese)
- [6] Chen HJ, Yu SQ, Shen XY, et al. The *Mycoplasma gallisepticum* α -enolase is cell surface-exposed and mediates adherence by binding to chicken plasminogen[J]. Microbial Pathogenesis, 2011, 51(4): 285-290
- [7] Bao SJ, Guo XQ, Yu SQ, et al. *Mycoplasma synoviae* enolase is a plasminogen/fibronectin binding protein[J]. BMC Veterinary Research, 2014, 10: 223
- [8] Bao SJ, Chen DQ, Yu SQ, et al. Characterization of triosephosphate isomerase from *Mycoplasma gallisepticum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(17): fnv140
- [9] Dumke R, Hausner M, Jacobs E. Role of *Mycoplasma pneumoniae* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in mediating interactions with the human extracellular matrix[J]. Microbiology, 2011, 157(8): 2328-2338
- [10] He SB, Qi JJ, Yu SQ, et al. Expression and immunological characteristics of the surface-localized pyruvate kinase in *Mycoplasma gallisepticum*[J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 89: 161-168
- [11] Hegde S, Rosengarten R, Chopra-Dewasthaly R. Disruption of the *pdhB* pyruvate dehydrogenase gene affects colony morphology, *in vitro* growth and cell invasiveness of *Mycoplasma agalactiae*[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119706
- [12] Bhattacharya S, Ploplis VA, Castellino FJ. Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 2012: 482096
- [13] Wang SJ. Cloning and expression of FBA gene from *Mycoplasma Hyopneumoniae*, analysis of immunogenicity and activity[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [14] Wu ZF, Zhang W, Lu CP. Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2008, 53(1): 52-59
- [15] Mendonça M, Moreira GMSG, Conceição FR, et al. Fructose 1,6-bisphosphate aldolase, a novel immunogenic surface protein on *Listeria species*[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160544
- [16] Tunio SA, Oldfield NJ, Berry A, et al. The moonlighting protein fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis*: surface localization and role in host cell adhesion[J]. Molecular Microbiology, 2010, 76(3): 605-615
- [17] Gao X, Xing XY, Feng N, et al. Cloning, expression and subcellular localization of *fba* gene in *Mycoplasma bovis* Wuwei strain[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(2): 274-281 (in Chinese)
- [18] Sun ZY, Shen BB, Wu HZ, et al. The secreted fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a broad spectrum vaccine candidate against pathogenic bacteria in aquaculture[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 638-647
- [19] Chaves EGA, Weber SS, Bão SN, et al. Analysis of *Paracoccidioides* secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein[J]. BMC Microbiology, 2015, 15: 53
- [20] Wang J, Yu CX, Xiao D, et al. Patterns and diagnostic value of the antibody response to fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Schistosoma japonicum*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2015, 10(3): 232-238 (in Chinese)

王玠, 余传信, 肖迪, 等. 日本血吸虫果糖二磷酸醛缩酶抗体反应模式及诊断价值的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(3): 232-238