

研究报告



滑液支原体 NADH 氧化酶的酶学活性及亚细胞定位研究

李浩然^{1,2} 祁晶晶² 王宇² 尚原冰³ 王桂军*¹ 于圣青*²

1 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

2 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241

3 锦州医科大学畜牧兽医学院 辽宁 锦州 121000

摘要:【背景】许多研究表明,支原体的 NADH 氧化酶(NADH oxidase, NOX)不仅在胞浆中发挥生物酶学功能,也存在于细胞膜上发挥黏附宿主细胞功能。【目的】对滑液支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)的 NOX 进行酶学活性及亚细胞定位研究,分析其在 MS 致病过程中的潜在作用。【方法】对 MS 的 NOX 蛋白进行原核表达、纯化,然后对重组 MSNOX (rMSNOX)的酶学活性及影响酶活的条件进行研究,测定其酶比活力、米氏常数及最大反应速率,接着用 MS 阳性血清及制备的 rMSNOX 兔多克隆抗体,分别与 rMSNOX 蛋白及 MS 全菌、膜蛋白和胞浆蛋白进行 Western blotting 反应,鉴定 rMSNOX 的免疫原性及其在 MS 中的分布情况。【结果】在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达 rMSNOX 蛋白,相对分子质量约为 53 kD,并获得纯化的 rMSNOX 蛋白;酶活测定显示 rMSNOX 蛋白的酶比活力为 14.17 IU/mg,最适酶促温度为 37 °C,最适 pH 为 7.5,双倒数法求得 rMSNOX 的最大反应速率 V_{max} 为 21.8 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$,米氏常数 $K_m(\text{NADH})$ 为 244.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$; rMSNOX 蛋白与 MS 阳性血清特异性结合,证明具有良好的免疫原性;亚细胞定位研究表明 NOX 蛋白主要存在于 MS 的胞浆中,细胞膜上有少量的分布。【结论】首次证实 MS 的 NOX 不仅具有 NADH 氧化酶活性,也是 MS 具有免疫原性的膜蛋白,为进一步探索 NOX 在 MS 致病过程中的作用提供了分子基础。

关键词: 滑液支原体, NADH 氧化酶, 酶学活性, 免疫原性, 亚细胞定位

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0500705); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2019JB11)

*Corresponding authors: WANG Gui-Jun: Tel: 86-551-65786328; E-mail: wgj@ahau.edu.cn
YU Sheng-Qing: Tel: 86-21-34293461; E-mail: yus@shvri.ac.cn

Received: 06-08-2019; **Accepted:** 28-11-2019; **Published online:** 13-12-2019

基金项目: 国家重点研发项目(2017YFD0500705); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2019JB11)

*通信作者: 王桂军: Tel: 0551-65786328; E-mail: wgj@ahau.edu.cn

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

收稿日期: 2019-08-06; 接受日期: 2019-11-28; 网络首发日期: 2019-12-13

Enzymatic activity and subcellular localization analyses of the NADH oxidase in *Mycoplasma synoviae*

LI Hao-Ran^{1,2} QI Jing-Jing² WANG Yu² SHANG Yuan-Bing³ WANG Gui-Jun^{*1}
YU Sheng-Qing^{*2}

1 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

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

3 College of Veterinary, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China

Abstract: [Background] Studies have shown that the NADH oxidase (NOX) of *Mycoplasma* not only functions as an enzyme in cytoplasm, but also exists on the cell membrane as an adhesin. [Objective] To study the enzymatic activity and subcellular localization of the NOX of *Mycoplasma synoviae* (MS), analyze its potential role in the MS pathogenesis. [Methods] The recombinant MS NOX (rMSNOX) protein was prokaryotic expressed and purified. Then the enzymatic activity of purified rMSNOX and the factors affecting enzymatic activity were studied. In addition, the enzymatic specific activity, the maximum reaction rate (V_{max}) and the Michaelis constant (K_m) of the rMSNOX were determined. The MS positive chicken serum was used for Western blotting analysis of the immunogenicity of the rMSNOX. The *Mycoplasma* whole-cell, membrane and cytoplasmic fractions were prepared for Western blotting analysis to determine the subcellular localization of MSNOX using the rabbit anti-rMSNOX serum. [Results] The rMSNOX protein was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified. The relative molecular mass was about 53 kD. The enzymatic specific activity of the rMSNOX protein was determined as 14.17 IU/mg, the optimum enzymatic temperature was 37 °C, and the optimum pH was 7.5 by an enzyme activity analysis. The K_m (NADH) of rMSNOX was determined as 244.0 $\mu\text{mol/L}$, and the V_{max} as 21.8 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ using the double-reciprocal method. The rMSNOX presented a specific binding to MS positive chicken serum, which proved that it had good immunogenicity. Subcellular localization analysis indicates that NOX protein distributed in MS cytoplasm and cell membrane. [Conclusion] This study demonstrates for the first time that MSNOX not only possesses NADH oxidase activity, but also is an immunogenic membrane protein, which provides a molecular basis for further exploring the role of NOX in the MS pathogenesis.

Keywords: *Mycoplasma synoviae*, NADH oxidase, Enzymatic activity, Immunogenicity, Subcellular localization

滑液支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)是感染禽类的一种重要的致病性支原体, 目前已知对禽类致病的支原体约有 28 种, 其中危害较为严重的主要有鸡毒支原体、滑液支原体、火鸡支原体等^[1-2]。MS 感染主要引起家禽关节炎、滑膜炎、气囊炎、生殖道炎^[3-4], 可导致病鸡明显的跛行, 生长发育迟缓、产蛋量下降等^[5], 是造成全球肉鸡行业经济损失的主要原因之一。此外, MS 感染可引起免疫抑制, 并因此导致其他呼吸道病原(如新城疫病毒、传染性支气管炎病毒、传染性法氏囊病毒、大肠杆菌及葡萄球菌等)的混合或继发感染^[6]。近年来, 国内

禽支原体流行态势加剧, 尤其是 MS 感染对养殖业的威胁越来越大^[7], 而我国关于滑液囊支原体的防控基础相对薄弱, MS 的致病机制也有待于进一步研究。

MS 主要是通过黏附宿主细胞表面因子, 再入侵到宿主细胞内部, 从而导致宿主发病^[8]。MS 的一些糖酵解代谢酶类被证实不仅分布在胞浆中发挥生物酶学功能, 也在 MS 膜表面有少量分布, 发挥黏附宿主细胞的功能, 如烯醇化酶(enolase, Eno)^[9]、丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, PDC)的 α 亚基(PDCA)和 β 亚基(PDCB)^[10]、乳酸脱氢酶

(lactate dehydrogenase, LDH)^[11]等。NADH 氧化酶(NADH oxidase, NOX)是一种氧化还原酶,在 O₂ 存在下能催化 NADH 氧化为 NAD⁺,同时 O₂ 还原为 H₂O 或 H₂O₂^[12]。NOX 来源菌可分为需氧菌和厌氧或兼性厌氧菌两类,前者的产物主要是 H₂O₂, NOX 在膜上或胞内均有分布;另一类中大部分是乳酸菌,产物主要为 H₂O, NOX 在胞内分布^[13]。有研究表明,牛支原体和无乳支原体均能在催化 NADH 生成 NAD⁺ 的过程中产生 H₂O₂^[14]。Zhao 等^[15] 研究发现牛支原体的 NOX 在膜和胞浆中均有分布,能产生 H₂O₂,且能黏附宿主细胞,牛支原体 NOX 突变株对胚胎牛肺细胞的黏附能力显著下降。Berčić 等^[16] 通过 SDS-PAGE 电泳结合 N 末端测序法鉴定出了包括 NOX 在内的一系列 MS 主要免疫原性蛋白。此后,包世俊等^[17] 通过将提取的 MS 膜蛋白进行二维电泳及免疫印迹分析,结合质谱鉴定,筛选到 NOX 是 MS 具有免疫原性的膜蛋白,但他们均未对筛选结果进一步验证。本研究将对 MS WVU₁₈₅₃ 株 NOX 蛋白进行原核表达纯化,并分析其酶学活性、亚细胞定位及免疫反应性,为进一步研究 MSNOX 的生物学功能奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 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: CVCC385);大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 和 BL21(DE3)感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司。

支原体基础培养基,青岛海博生物技术有限公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD),Roche 公司;猪血清,HyClone 公司;胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂,OXOID 公司;MS 液体培养基:称取 33.0 g 支原体基础培养基溶解于 1 000 mL 去离子水中,1 \times 10⁵ Pa 灭菌 15 min,冷却至室温,无菌操作添加 0.1% NAD 和 10% 猪血清;LB 液体培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,NaCl 5.0;LB 固体培养基:LB 液体培养基在高压灭菌前再添加琼

脂 15.0 g/L,1 \times 10⁵ Pa 灭菌 15 min。

还原型辅酶 I 二钠盐(NADH)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒,上海碧云天生物技术公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,北京天根生化科技有限公司;Prime STAR DNA 聚合酶, TaKaRa 公司;2 \times Taq Master Mix,北京康为世纪生物科技有限公司;表达载体 pET-28a(+),Novagen 公司;BeaverBeadsTM His-Tag 蛋白纯化试剂盒, Selleck 公司;膜蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒,上海贝博生物公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂, Sigma-Aldrich 公司;ECL 化学发光试剂盒,上海圣尔生物科技有限公司;MS 阳性鸡血清、SPF 鸡阴性血清,中国兽医药品监察所;HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗, Thermo Fisher Scientific 公司;HRP 标记的羊抗鸡 IgY 二抗, Abcam 公司;新西兰兔,上海松联实验动物场。

PCR 仪, ABI 公司;DNA 电泳仪、凝胶成像系统、全自动化学发光测定仪,上海天能科技有限公司;微量电子天平,奥豪斯仪器有限公司;BioSpectrometer 分光光度计、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;蛋白电泳仪、转印槽, Bio-Rad 公司。

1.2 生物信息学分析

登录 GenBank 数据库,从该数据库中查找 MS WVU₁₈₅₃ 株 NOX 蛋白的氨基酸序列,将获取的 NOX 蛋白的氨基酸序列上传至在线分析软件 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>),分别预测 NOX 蛋白的信号肽以及该蛋白的跨膜区;用 BLASTp 检索 non-redundant protein sequences (nr)数据库,分析 MSNOX 氨基酸序列与其他病原菌来源 NOX 的同源性,并用 DNASTar 中的 MegAlign 软件进行序列比对分析。将 MSNOX 蛋白与已解析晶体结构的肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, *S. pneumoniae*) NOX 蛋白

(Protein Data Bank accession code: 2BC0)^[18], 已进行功能鉴定的牛支原体(*Mycoplasma bovis*, *M. bovis*) NOX 蛋白^[15], 以及已解析序列特征的山羊支原体(*Mycoplasma capricolum*, *M. capricolum*) NOX 蛋白^[19]进行序列比对分析, 预测 MSNOX 蛋白的活性位点。

1.3 MS 全基因组提取

从-80 °C 冰箱取出冻存的 MS WVU₁₈₅₃ 菌株, 按 5%比例转接至 MS 液体培养基, 于培养箱(37 °C、5% CO₂)中静置培养, 待支原体培养基变黄后 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, PBS 清洗 2 遍后, 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒抽提 MS WVU₁₈₅₃ 的基因组, 然后用微量分光光度计测定基因组 DNA 浓度, 并于-20 °C 保存备用。

1.4 Overlap PCR 扩增 MSnox 基因

根据 MS WVU₁₈₅₃ (CP011096.1)的 *nox* 基因 (VY93_02845)序列设计 4 对引物(表 1), 以提取的 MS WVU₁₈₅₃ 基因组 DNA 为模板, 分别进行第一轮 PCR 扩增获得 MSnox 各个片段。将获得的各个片段回收后, 混合作为模板, 用两端引物(MSnox 1F 和 MSnox 4R)进行第二轮 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×Prime STAR MAX Premix 20 μL, 上、下游引物各 1 μL (0.4 μmol/L), MS WVU₁₈₅₃ 基因组 DNA 模板 1 μL (100 ng), ddH₂O 补足至 40 μL。PCR 反应

条件: 98 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 16 °C 10 min。将扩增得到的产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 确认大小与预期相符后切胶回收, 即为 MSnox 基因全长序列。

1.5 表达载体的构建

将扩增获得的 MSnox 基因全长与表达载体 pET-28a(+)经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后用 T4 DNA 连接酶连接, 并将连接产物转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞中, 将转化后的 *E. coli* DH5α 感受态细胞涂布于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 37 °C 静置培养 12 h 后, 挑取平板上单菌落至含 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中进行扩大培养并进行菌液 PCR 鉴定。PCR 体系: 2×Taq Master Mix 10 μL, 上、下游引物 MSnox 1F、MSnox 4R 各 1 μL (0.4 μmol/L), 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。鉴定正确的单菌落扩大培养后, 使用高纯度质粒小提中量试剂盒提取质粒, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定后, 送上海睿勉生物科技有限公司进行测序, 测序结果无误后, 将 pET-28a-MSnox 转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中, PCR 鉴定结果正确后, 保存于-80 °C 冰箱中。

表 1 MSnox 基因 Overlap PCR 扩增引物序列

Table 1 Primer sequences for overlap PCR amplification of MSnox gene

| 引物名称 | 引物序列 | 产物长度 |
|--------------|------------------------------------|----------------------|
| Primer names | Primer sequences (5'→3') | Product lengths (bp) |
| MSnox 1F | <u>GGATCC</u> ATGGAACAATAAAATTATAG | 154 |
| MSnox 1R | AACATTCCTCCAACCCAAACAG | |
| MSnox 2F | GCTGTTTGGGTTGGAGGAATG | 226 |
| MSnox 2R | ATGGAGGAACATATAGCCATGTTC | |
| MSnox 3F | GCTGGAGGAACATGGCCTATAG | 869 |
| MSnox 3R | AATCTTGTCCCAAGAACCAAC | |
| MSnox 4F | CAAGTTGGTCTTGGGGACAAG | 182 |
| MSnox 4R | <u>CTCGAG</u> TTAAGCTTTATATTTAAACC | |

注: 下划线为 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点序列; 加粗代表突变位点。

Note: The restriction enzyme sites of *Bam*H I and *Xho* I were underlined; the mutated nucleotides were in bold.

1.6 重组蛋白的表达与纯化

将鉴定正确的重组菌株 *E. coli* BL21(pET-28a-MSnox)按照 1%比例转接于 LB 培养基中(含卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养至菌液浓度 OD_{600} 值为 0.6–0.8, 将 IPTG (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)按 0.1% 接入菌液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 诱导 8 h。经 IPTG 诱导后的菌液用 PBS 洗涤 2 次后, 用 Binding buffer (20 mmol/L K_3PO_4 , 500 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑)重悬。重悬的菌液经超声(功率 60 W, 工作 3 s, 间歇 2 s) 30 min 破碎后, 即为全菌总蛋白。将全菌总蛋白 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min 后收集上清, 即为上清蛋白。上清蛋白经 BeaverBeads™ His-Tag 蛋白纯化试剂盒纯化后, 获得纯化的重组 MSNOX (rMSNOX)蛋白, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。

1.7 rMSNOX 蛋白酶活性与影响因素的测定

1.7.1 NADH 紫外吸光值标准曲线的测定

用微量电子天平称量 0.764 g NADH 粉末溶于 10 mL 去离子水, 即成 0.1 mol/L NADH 标准液。用 0.1 mol/L K_3PO_4 缓冲液(pH 7.5)将 NADH 标准液稀释至 100、200、300、400、500、600、700 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 工作浓度, 用 BioSpectrometer 分光光度计测量其在 OD_{340} 的吸光值, 以 NADH 溶液浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)为横坐标、 OD_{340} 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.7.2 rMSNOX 的酶活性测定

酶活测定体系(200 μL): 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 在 0.1 mol/L K_3PO_4 缓冲液(pH 7.5)中加入底物 NADH 至终浓度为 1 mmol/L, 再加入新鲜制备的纯化 rMSNOX 蛋白(终浓度分别为 0.3、0.6、1.2、1.8、2.4 和 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每隔 5 min 测量 OD_{340} 值。同时设置不加 rMSNOX 蛋白、不加 NADH 的对照组, 其他反应条件不变。国际单位(IU)的酶活定义为最适条件下(温度 25 $^{\circ}\text{C}$) 每 1 min 转换 1 μmol 底物所需的酶活力^[20], 根据该定义, 推导 rMSNOX 的酶比活力(IU/mg)计算公式:

$$\text{酶比活力(IU/mg)} = \frac{\Delta OD_{340} \times \text{测试体积(mL)}}{\text{NADH标准曲线系数(L}/\mu\text{mol)} \times \text{反应时间(min)} \times \text{酶蛋白量(mg)}}$$

1.7.3 温度对 rMSNOX 酶学活性的影响

在 pH 7.5 条件下, 分别测定 4、25、37、42、56 $^{\circ}\text{C}$ 时 rMSNOX 的酶学活性, 每个温度重复 3 次。

1.7.4 pH 对 rMSNOX 酶学活性的影响

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 分别测定 pH 为 4.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 及 10.0 时 rMSNOX 的酶学活性, 每个 pH 重复 3 次。

1.7.5 底物浓度对 rMSNOX 酶学活性的影响

在上述试验确定的最适温度和 pH 条件下, 分别测定 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 rMSNOX 在不同 NADH 底物浓度(100、200、300、400、500、600、700 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 下的反应速率。记录酶催化反应体系在不同 NADH 底物浓度(S)下, 1 min 内 OD_{340} 值的变化数据, 依据 NADH 紫外吸光值标准曲线中 OD_{340} 值与 NADH 浓度($\mu\text{mol}/\text{mL}$)之间线性关系, 得到在相应时间内 NADH 浓度的变化值, 进而计算出不同 S 时的反应速率 v 。根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 米氏方程式 $v = V_{\text{max}} \cdot S / (K_m + S)$ 双倒数法转化为 $1/v = K_m / V_{\text{max}} \cdot 1/S + 1/V_{\text{max}}$, $1/v$ 和 $1/S$ 呈线性关系^[16]。以 $1/S$ 为横坐标, $1/v$ 为纵坐标作图, 获得双倒数曲线, 进而计算最大反应速度 V_{max} 和米氏常数 K_m 值。

1.8 NOX 蛋白的免疫原性鉴定

将纯化的 rMSNOX 蛋白按 0.5 μg 每孔上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转印后的 NC 膜用 5% 脱脂乳 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, 经 PBST (PBS 溶液中添加 0.05% Tween-20)洗涤 3 次后, 分别与 MS 阳性鸡血清(1:1 000)或 SPF 鸡阴性血清(1:1 000)常温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次后, 用 HRP 标记的羊抗鸡 IgY 抗体(1:5 000)常温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次后, 加入 ECL 底物显色液进行显色反应。

1.9 抗 rMSNOX 兔多克隆抗体制备

准备 2 月龄新西兰兔 1 只, 在免疫前对其进行耳缘静脉采血, 分离免疫前兔血清; 然后取 600 μg 的 rMSNOX 纯化蛋白与等体积的弗氏完全佐剂乳化, 对该兔进行背部皮下多点免疫; 此后每隔 2 周加强免疫一次, 加强免疫用的 rMSNOX 蛋白剂量为 300 $\mu\text{g}/\text{只}$, 与等体积弗氏不完全佐剂乳化。在第

二次加强免疫后 2 周对兔子进行耳缘静脉采血, 分离血清, 即为抗 rMSNOX 兔血清, 用基于 rMSNOX 包被的间接 ELISA 法^[9]测定其抗体效价, 达到 1:20 480 分装后保存于-20 °C。

1.10 MS 全菌蛋白、膜蛋白、胞浆蛋白的制备

将 MS WVU₁₈₅₃ 菌液培养至对数生长期, 8 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 弃去上清后 PBS 洗 2 遍, 接着用膜蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒分别提取 MS 的膜蛋白和胞浆蛋白。将洗涤后的 MS 菌体沉淀用 PBS 重悬, 超声破碎(功率 60 W, 每次 2 s, 间隔 1 s), 制备 MS 全菌蛋白。用 BCA 试剂盒测出制备蛋白的浓度, -80 °C 分装保存。

1.11 NOX 蛋白在 MS 中的亚细胞定位分析

将制备的 MS 全菌蛋白、膜蛋白和胞浆蛋白按照 10 μg 每孔进行 SDS-PAGE 电泳, 转印 NC 膜后, 分别与抗 rMSNOX 兔血清(1:5 000)、抗 rMSFBA 兔血清(由本实验室制备的胞浆蛋白对照血清, 1:5 000)^[21]进行 Western blotting 反应, 方法同 1.8, 用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:20 000)作为二抗,

最后用 ECL 显色液显色。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

经 TMHMM Server V2.0 和 SignalP 4.1 Server 预测, MSNOX 蛋白无跨膜区, 无信号肽, 包含了 458 个氨基酸。通过 BLASTp 将 MSNOX 蛋白序列比对 nr 数据库, 结果显示 NOX 蛋白序列在 MS 种属内高度保守, 在不同 MS 分离株之间相似性高达 99%, 而与其他支原体 NOX 蛋白序列相似性差异较大(48%–72%), 与禽支原体(*Mycoplasma gallinaceum*, *M. gallinaceum*)的相似性最高达 72%, 与鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, *M. gallisepticum*)的 NOX 蛋白相似性仅为 49%。用 MegAlign 将 MS 的 NOX 序列与 *S. pneumonia*^[18]、*M. bovis*^[15]及 *M. capricolum*^[19]的 NOX 序列进行比对, 同时与 *M. gallisepticum* 的 NOX 蛋白序列比较, 发现它们均具有相同的催化位点(Cys46), 两个 FAD 结合位点(Gly11–Gly16; Ile292–Asp302)和一个 NADH 结合位点(Gly174–Gly179) (图 1)。

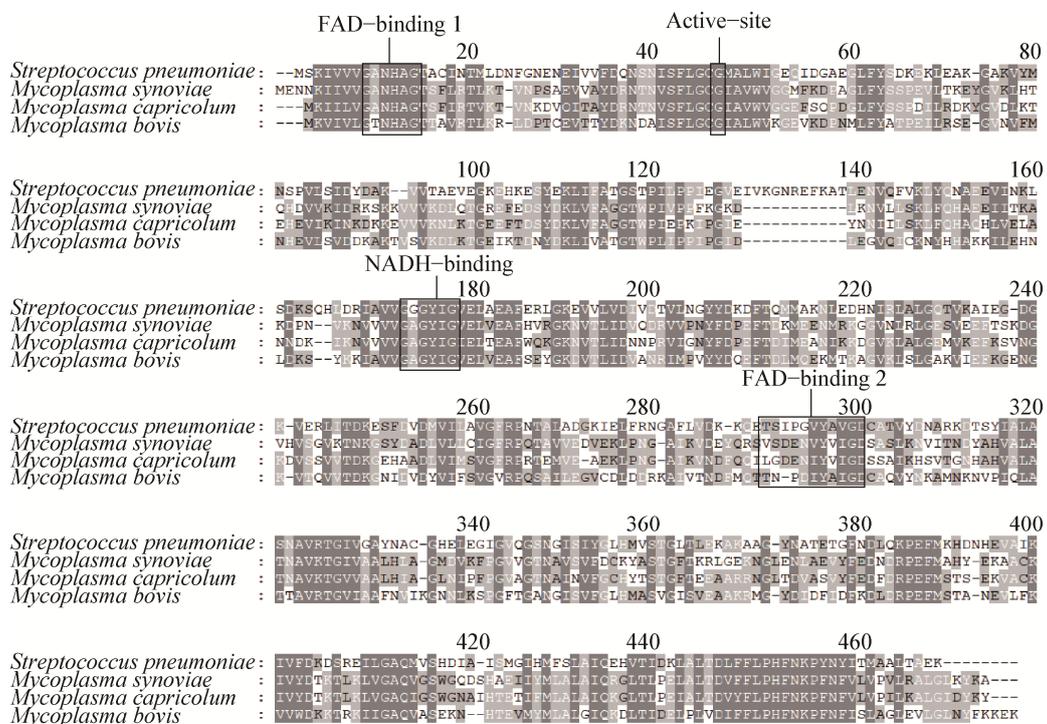


图 1 不同 NOX 蛋白的序列比对

Figure 1 Sequence alignment of different NOX proteins

2.2 Overlap PCR 扩增 MSnox

以 MS WVU₁₈₅₃ 株的基因组 DNA 为模板, 根据设计的 4 对引物进行第一轮 PCR 扩增, 获得大小正确的 4 个片段(图 2A), 将获得的 4 个片段混合作为模板, 经第二轮 Overlap PCR 得到完整的 MSnox 基因片段, 其大小为 1 377 bp (图 2B)。

2.3 表达载体的构建

将获得的 MSnox 基因全长序列经双酶切后, 连接至表达载体 pET-28a(+), 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。在抗性平板上挑取重组菌, 将 PCR 鉴定为阳性的菌抽提重组质粒, 双酶切鉴定结果见图

3A。测序结果显示重组质粒序列完全正确, 表明成功获得重组表达载体 pET-28a-MSnox。将重组载体转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 菌液 PCR 鉴定正确(图 3B), 所挑取的 5 株单克隆均鉴定为阳性。

2.4 重组蛋白的表达与纯化

将重组表达菌株 *E. coli* BL21(pET-28a-MSnox) 经 IPTG 诱导前的全菌蛋白、诱导后的全菌蛋白、诱导后的上清蛋白以及经 His-tag 标记磁珠纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果显示重组

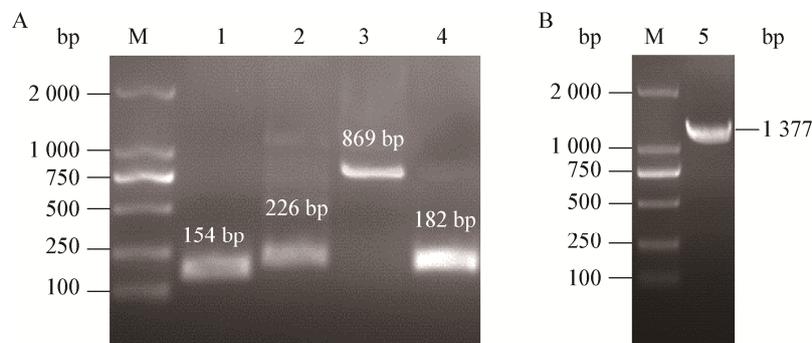


图 2 重叠延伸 PCR 扩增 MSnox 基因

Figure 2 Overlap PCR amplification of MSnox gene

注: M: DNA 分子标准 DL2000; 1: MSnox 1F/1R 扩增产物; 2: MSnox 2F/2R 扩增产物; 3: MSnox 3F/3R 扩增产物; 4: MSnox 4F/4R 扩增产物; 5: MSnox 基因全长。

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR product with primers MSnox 1F/1R; 2: PCR product with primers MSnox 2F/2R; 3: PCR product with primers MSnox 3F/3R; 4: PCR product with primers MSnox 4F/4R; 5: Full-length of MSnox gene.

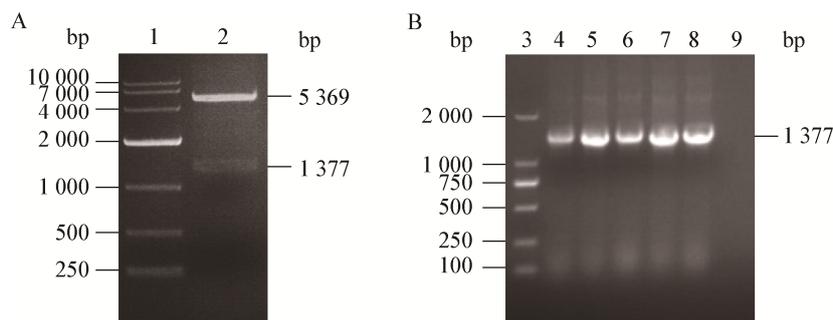


图 3 重组菌的双酶切鉴定及 PCR 鉴定

Figure 3 Identification of recombinant bacteria by double enzyme digestion and PCR amplification

注: 1: DNA 分子标准 DL10000; 2: pET-28a-MSnox 双酶切产物; 3: DNA 分子标准 DL2000; 4-8: *E. coli* BL21(pET-28a-MSnox) 待检菌液样品的 PCR 鉴定; 9: 阴性对照 ddH₂O。

Note: 1: DL10000 DNA Marker; 2: Double enzyme digestion product of pET-28a-MSnox; 3: DL2000 DNA Marker; 4-8: PCR amplification of *E. coli* BL21(pET-28a-MSnox) samples; 9: Negative control (ddH₂O).

表达菌株经 IPTG 诱导后, 在 53 kD 左右有明显的蛋白表达条带, 经纯化后的 rMSNOX 蛋白条带较纯(图 4)。

2.5 NADH 紫外吸收标准曲线的测定

用底物反应液将 NADH 标准液稀释至不同工作浓度, 并在 OD_{340} 处测吸光值, 以 NADH 浓度($\mu\text{mol/L}$)为 X 轴, OD_{340} 值为 Y 轴, 绘制标准曲线(图 5), 二者之间的换算公式为: $y=0.002x+0.1723$ ($R^2=0.9997$)。

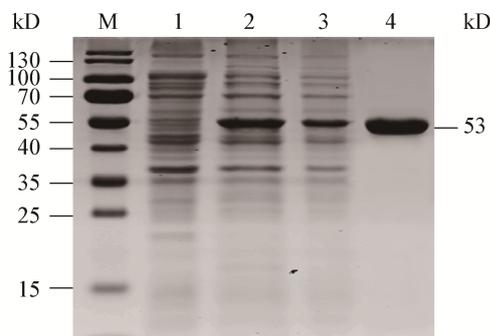


图 4 rMSNOX 蛋白表达和纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of expression and purification of rMSNOX protein

注: M: 蛋白质分子质量标准; 1: 重组表达菌株经 IPTG 诱导前全菌蛋白; 2: 经 IPTG 诱导后全菌蛋白; 3: 诱导后上清蛋白; 4: 纯化的 rMSNOX 蛋白。

Note: M: Protein marker; 1: Whole cell lysates of *E. coli* BL21(pET-28a-MSnox) before IPTG induced; 2: Whole cell lysates of *E. coli* BL21(pET-28a-MSnox) after IPTG induced; 3: Supernatants from IPTG induced *E. coli* BL21(pET-28a-MSnox); 4: Purified rMSNOX protein.

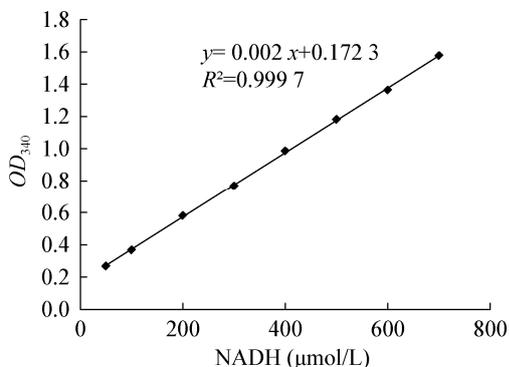


图 5 NADH 标准曲线图

Figure 5 The standard curve of NADH

2.6 rMSNOX 蛋白酶学活性的测定

在 K_3PO_4 缓冲液 pH 7.5、25 °C 条件下, 加入 rMSNOX 后, OD_{340} 值随时间变化逐渐降低, 随着 rMSNOX 浓度增大, OD_{340} 值降低越快, 无 rMSNOX 对照组 OD_{340} 值较稳定(图 6)。由此可见, rMSNOX 蛋白能催化 NADH 生成 NAD^+ , 且在底物浓度不变的情况下, 催化速度随着 rMSNOX 蛋白量的增加而加快。当 rMSNOX 蛋白在 200 μL 酶反应体系中的终浓度为 1.8 $\mu\text{g/mL}$ 时, 5 min 内 OD_{340} 变化值为 0.255, 根据图 5 绘制的 NADH 标准曲线推得系数为 0.002 L/ μmol , 将这些数据代入 1.7.2 中的酶比活计算公式, 通过计算得知 rMSNOX 蛋白的酶比活力为 14.17 IU/mg。

2.7 温度对 rMSNOX 酶学活性的影响

在磷酸钾缓冲液 pH 7.5 条件下, 分别测定 rMSNOX 在 4、25、37、42、56 °C 时, 反应 5 min 内反应体系的 OD_{340} 值变化。以最高酶活为 100%, 绘制温度对 rMSNOX 酶活的影响曲线(图 7), 结果

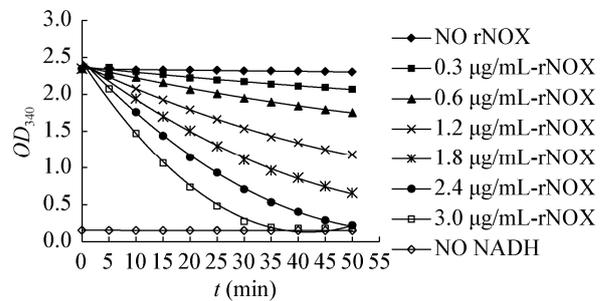


图 6 rMSNOX 蛋白酶学活性检测

Figure 6 Analysis of enzyme activity of rMSNOX protein

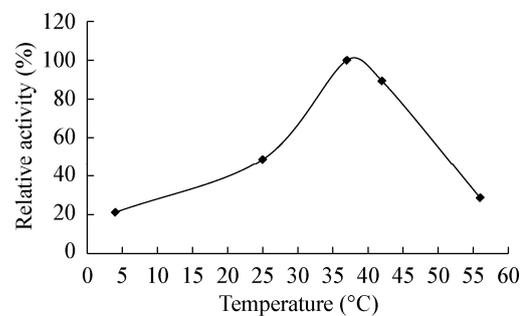


图 7 温度对 rMSNOX 酶比活力的影响

Figure 7 Effect of temperature on rMSNOX specific activity

表明 rMSNOX 酶促反应最适温度为 37 °C, 温度过高或过低都会降低 rMSNOX 酶活性。

2.8 pH 对 rMSNOX 酶学活性的影响

在 25 °C 条件下, 分别测定 pH 为 4.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 及 10.0 时 rMSNOX 的酶学活性, 以最高酶活为 100%, 绘制 pH 对 rMSNOX 酶活的影响曲线(图 8), 结果表明: 当磷酸钾缓冲液 pH 为 7.5 时, rMSNOX 酶比活力最高, pH<6.0 或>9.0 时酶比活力显著降低。

2.9 底物浓度对 rNOX 酶学活性的影响

计算出 rNOX 酶在不同底物浓度(S)条件下的反应速率(v), 以 1/S 为横坐标, 1/v 为纵坐标, 通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 得出双倒数曲线(图 9), 公式为: $y=11.222x+0.0459$ ($R^2=0.9968$), 因而求得 rNOX 的最大反应速率 V_{max} 为 21.8 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 米氏常数 $K_m(\text{NADH})$ 为 244.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

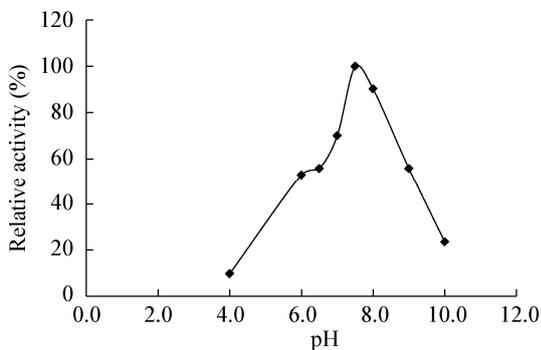


图 8 pH 对 rMSNOX 酶比活力的影响

Figure 8 Effect of pH on rMSNOX specific activity

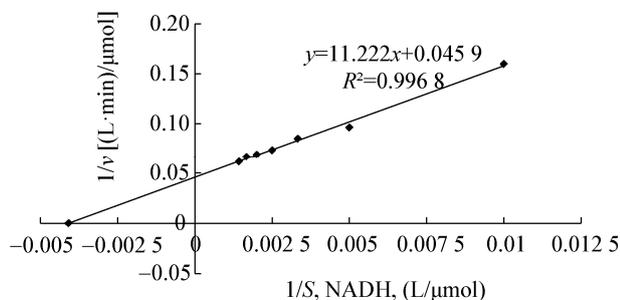


图 9 双倒数曲线

Figure 9 The double reciprocal curve graph

2.10 rMSNOX 免疫原性鉴定

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 blotting 分析, 结果表明 MS 阳性鸡血清可与 rMSNOX 蛋白结合(图 10A), 而 SPF 鸡阴性血清(阴性对照, 图 10B)与 rMSNOX 蛋白未见反应条带, 表明 MSNOX 蛋白具有良好的免疫原性。

2.11 鉴定 NOX 蛋白在 MS 中的分布情况

利用制备的抗 rMSNOX 兔血清与抗 rMSFBA 兔血清(胞浆蛋白抗血清对照)对 MS WVU₁₈₅₃ 全菌蛋白、膜蛋白和胞浆蛋白进行 Western blotting 分析, 结果显示: NOX 蛋白在 MS 的细胞膜和胞浆中均有分布, 而 FBA 蛋白作为胞浆蛋白主要分布于 MS 胞浆中, 细胞膜中未见分布, 证明所制备的膜蛋白未被胞浆蛋白污染(图 11)。

3 讨论与结论

NOX 位于多个调节途径交叉点上, 本身也被多个途径调节, 例如在细菌糖酵解过程中, NAD^+ 转化为 NADH, NOX 将 NADH 转化为 NAD^+ 以维持 NAD^+/NADH 的动态平衡, 在糖酵解过程中起重要

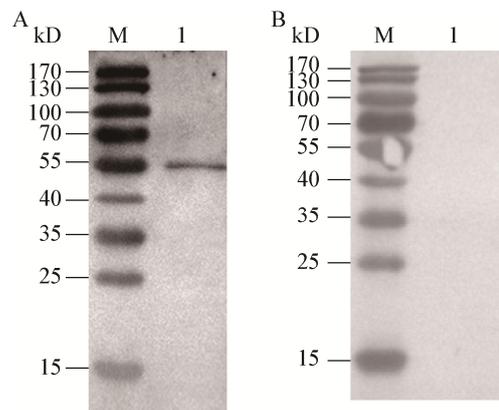


图 10 rMSNOX 蛋白免疫原性鉴定

Figure 10 Immunogenicity analysis of the rMSNOX protein

注: M: 蛋白质分子质量标准; 1: 纯化的 rMSNOX 蛋白与 MS 阳性鸡血清反应; 2: 纯化的 rMSNOX 蛋白与 SPF 鸡阴性血清反应。

Note: M: Protein marker; 1: Purified rMSNOX protein reacted with MS-positive chicken serum; 2: Purified rMSNOX protein reacted with negative serum of SPF chicken.

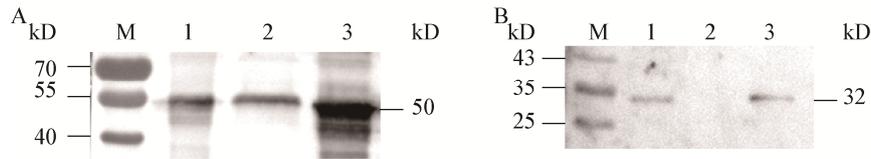


图 11 Western blotting 分析蛋白的亚细胞定位情况

Figure 11 Subcellular localization analysis by western blotting

注: A: MSNOX 蛋白在 MS 中的亚细胞定位分析; B: MSFBA 蛋白的亚细胞定位分析; M: 蛋白分子质量标准; 1: MS WVU₁₈₅₃ 全菌蛋白; 2: MS WVU₁₈₅₃ 膜蛋白; 3: MS WVU₁₈₅₃ 胞浆蛋白.

Note: A: Subcellular localization analysis of the MSNOX; B: Subcellular localization analysis of the MSFBA; M: Protein marker; 1: Whole cell lysates of MS WVU₁₈₅₃; 2: Membrane proteins of MS WVU₁₈₅₃; 3: Cytoplasmic proteins of MS WVU₁₈₅₃.

作用^[22], 因此通过对 NOX 酶学活性研究, 有助于了解 MS 代谢机理。本研究对 MS 的 NOX 蛋白进行了原核表达纯化, 并鉴定其酶学活性。结果表明, 在初始底物(NADH)浓度一定时, rMSNOX 的酶促反应速率随着酶浓度的增大而加快, 随着催化反应的进行而逐渐减慢, 这与一般酶的酶促反应动力学特征相一致。研究温度对 rMSNOX 酶活力的影响发现, 随着温度升高, 酶促反应逐渐加快, 在 37 °C 时, 该酶的酶活力最高, 随后随着温度继续升高, 酶活力逐渐下降, 造成这一结果的主要原因可能是温度影响了底物与辅基的结构或者是温度影响了酶的活性。在反应温度和反应体系不变的情况下, 磷酸钾缓冲液 pH 对酶活性影响较大, 试验发现磷酸钾缓冲液最适 pH 为 7.5。在最适温度 37 °C 和 pH 为 7.5 的条件下, 通过双倒数作图法, 求得 rMSNOX 酶促反应的最大反应速率 V_{max} 为 21.8 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 即为当 rMSNOX 酶全部被底物饱和时的最大反应速率; 求得米氏常数 $K_m(\text{NADH})$ 为 244.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 即为酶反应速率达到 1/2 V_{max} 时的底物浓度。通过生物信息学分析发现, NOX 在同种支原体内的保守性很高, 氨基酸序列相似性高达 99%, 与其他支原体 NOX 蛋白相似性差异较大, 在 48%–72% 之间, 但它们均具有相对保守的活性位点、FAD 结合位点以及 NADH 结合位点。由此可见, 尽管 NOX 酶在不同种属的菌内序列差异较大, 但其酶活相关的功能位点相对保守, 是决定其催化 NADH 底物的关键位点。

有研究报道, 牛支原体和无乳支原体不同分离

株产 H_2O_2 的能力不同, 体外连续传代的牛支原体其 H_2O_2 产量逐渐减少^[15]。祁晶晶对牛支原体 HB0801 原代株和 3 株传代株(115、150 和 180 代次)进行比较蛋白质组研究发现, 至少从 150 代开始, *M. bovis* 的 NOX 蛋白表达量显著降低^[23]。另有研究报道, 无胆淄原体培养物的细胞质膜催化 NADH 氧化的活性随培养时间而降低, 进一步研究发现这是由于老化的支原体细胞质膜中酶的活性分子数量减少所致, 并不是酶的性质发生了改变^[24]。可见, 支原体不同分离株的 NOX 活性不完全一致, 同一支原体的 NOX 酶促活性会随着菌体的老化、传代次数的增大而逐渐降低, 这些可能与支原体中 NOX 蛋白表达量的变化有关。

Muchnik 等^[18]研究发 *S. pneumoniae* 的 NOX 缺失菌株对肺上皮细胞的黏附能力显著下降, 证明 NOX 可能作为黏附素介导 *S. pneumoniae* 对宿主细胞的黏附作用。Ge 等^[25-26]研究发现, NOX 缺失影响血链球菌(*Streptococcus sanguinis*, *S. sanguinis*)的生物被膜形成能力, 进一步研究发现 NOX 缺失引起 *S. sanguinis* 的口腔竞争能力以及致病力减弱。由此可见, NOX 对细菌的氧化应激、菌膜形成、毒力调控及代谢产物生成等生理生化过程产生一系列影响^[22]。Western blotting 对 MSNOX 蛋白亚细胞定位分析表明 MSNOX 蛋白在细胞膜和细胞浆中均有分布, 但大部分存在于 MS 胞浆中, 可见其主要在胞浆中发挥代谢酶功能, 在细胞膜上少量的存在预示其可能参与 MS 于宿主细胞的相互作用。

此外, Muchnik 等^[18]用 *S. pneumoniae* 的 rNOX

免疫小鼠发现其可诱发小鼠对肺炎链球菌产生免疫保护抗体, 由于在无氧或有氧的环境下均可激发免疫保护反应, 推测 rNOX 蛋白可作为肺炎链球菌亚单位疫苗的候选抗原。本研究初步证实 rMSNOX 可激发免疫体对 rMSNOX 蛋白产生较好的免疫应答反应, 且能与 MS 阳性血清反应, 其是否能作为免疫保护性抗原或 MS 病诊断的靶标还有待进一步研究。

由于支原体无细胞壁, 支原体的膜蛋白在支原体的粘附入侵宿主细胞以及逃避宿主免疫系统的识别方面扮演着重要角色。本研究对 MS 的 NOX 蛋白的酶学活性进行了研究, 证实重组表达的 MSNOX 蛋白具有 NADH 氧化酶的活性, 且免疫原性和亚细胞定位分析证实其不仅在 MS 胞浆中分布, 也是 MS 膜表面分布的免疫原性蛋白。该研究为进一步探索 NOX 在 MS 致病过程中的作用提供了分子基础, 为解析 MS 的致病分子机制提供了新的研究思路。

REFERENCES

- [1] Liu T. Isolation, identification of *Mycoplasma synoviae* and development of multiplex PCR assay for detection of avian mycoplasma, *Escherichia coli* and *Salmonella*[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2016 (in Chinese)
刘婷. 鸡滑液囊支原体 JS1 株的分离鉴定及禽支原体、大肠杆菌、沙门菌多重 PCR 检测方法的建立[D]. 泰安: 山东农业大学硕士论文, 2016
- [2] Marois C, Savoye C, Kobisch M, et al. A reverse transcription-PCR assay to detect viable *Mycoplasma synoviae* in poultry environmental samples[J]. *Veterinary Microbiology*, 2002, 89(1): 17-28
- [3] Shi XL. Isolation and identification of *Mycoplasma synoviae* and evaluation of the effect of live-vaccine[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2018 (in Chinese)
石晓磊. 鸡滑液囊支原体的分离鉴定及其活疫苗免疫效果的评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士论文, 2018
- [4] Ding MJ. Isolation and identification of *Mycoplasma synoviae* and its partial biological characteristics[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese)
丁美娟. 鸡滑液囊支原体的分离鉴定及部分生物学特性研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士论文, 2013
- [5] Ding MJ, Yin XF, Huang XM, et al. Advances in research of *Mycoplasma synoviae*[J]. *China Poultry*, 2013, 35(13): 39-41 (in Chinese)
丁美娟, 尹秀凤, 黄显明, 等. 鸡滑液囊支原体病研究进展[J]. *中国家禽*, 2013, 35(13): 39-41
- [6] Bolha L, Benčina D, Cizelj I, et al. Effect of *Mycoplasma synoviae* and lentogenic Newcastle disease virus coinfection on cytokine and chemokine gene expression in chicken embryos[J]. *Poultry Science*, 2013, 92(12): 3134-3143
- [7] Sun SK, Lin X, Chen F, et al. Epidemiological investigation of *Mycoplasma synoviae* in native chicken breeds in China[J]. *BMC Veterinary Research*, 2017, 13: 115
- [8] He SB, Tan L, Bao SJ, et al. Prokaryotic expression and membrane localization of aldolase of *Mycoplasma gallisepticum*[J]. *Veterinary Science in China*, 2013, 43(1): 42-46 (in Chinese)
何随彬, 谭磊, 包世俊, 等. 鸡毒支原体醛缩酶的原核表达及膜定位鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(1): 42-46
- [9] Bao SJ, Guo XQ, Yu SQ, et al. *Mycoplasma synoviae* enolase is a plasminogen/fibronectin binding protein[J]. *BMC Veterinary Research*, 2014, 10: 223
- [10] Bao SJ. Study on biological characteristics of pyruvic decarboxylase on the surface of *Mycoplasma synoviae*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014 (in Chinese)
包世俊. 滑液支原体膜表面丙酮酸脱羧酶的生物学特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士论文, 2014
- [11] Ren F. Study on the biological functions of LDH from *Mycoplasma synoviae*[D]. Jinzhong: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2014 (in Chinese)
任峰. 滑液支原体乳酸脱氢酶生物学功能的研究[D]. 晋中: 山西农业大学硕士论文, 2014
- [12] Qing SH, Fang BS. Recent progress in research of NADH oxidase[J]. *Journal of Huaqiao University (Natural Science)*, 2011, 32(5): 554-559 (in Chinese)
卿三红, 方柏山. NADH 氧化酶的研究进展[J]. *华侨大学学报: 自然科学版*, 2011, 32(5): 554-559
- [13] Li LB, Luo Y, Qu LB, et al. Research progress of NADH oxidase[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2010, 31(4): 80-88 (in Chinese)
李林波, 罗宇, 屈凌波, 等. NADH 氧化酶研究进展[J]. *河南工业大学学报: 自然科学版*, 2010, 31(4): 80-88
- [14] Khan LA, Miles RJ, Nicholas RAJ. Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of *in vitro* passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H₂O₂[J]. *Veterinary Research Communications*, 2005, 29(3): 181-188
- [15] Zhao G, Zhang H, Chen X, et al. *Mycoplasma bovis* NADH

- oxidase functions as both a NADH oxidizing and O₂ reducing enzyme and an adhesin[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 44
- [16] Berčić RL, Slavec B, Lavrič M, et al. Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 127(1/2): 147-154
- [17] Bao SJ, Ding XQ, Xing XY, et al. Preliminary analysis of immune-related membrane proteins from *Mycoplasma synoviae* WVU1853 strain[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(2): 316-323 (in Chinese)
包世俊, 丁小琴, 邢小勇, 等. 滑液支原体 WVU1853 株免疫相关膜蛋白的初步分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(2): 316-323
- [18] Muchnik L, Adawi A, Ohayon A, et al. NADH oxidase functions as an adhesin in *Streptococcus pneumoniae* and elicits a protective immune response in mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61128
- [19] Zhu PP, Peterkofsky A. Sequence and organization of genes encoding enzymes involved in pyruvate metabolism in *Mycoplasma capricolum*[J]. *Protein Science*, 1996, 5(8): 1719-1736
- [20] Bisswanger H. *Practical Enzymology*[M]. Liu XQ, trans. Beijing: Chemical Industry Press, 2018: 50-52 (in Chinese)
比斯瓦根 H. *酶学实验手册*[M]. 刘晓晴, 译. 北京: 化学工业出版社, 2018: 50-52
- [21] Wang Y, Qi JJ, Liu T, et al. Subcellular localization and immunogenicity of Fructose-Bisphosphate Aldolase (FBAs) in *Mycoplasma synoviae*[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(4): 780-789 (in Chinese)
王宇, 祁晶晶, 刘婷, 等. 滑液支原体醛缩酶的亚细胞定位及免疫原性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(4): 780-789
- [22] Wang Y, Ding CC, Qiu JX, et al. Advances in bacterial *nox* gene[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(5): 112-120 (in Chinese)
王艳, 丁承超, 邱景旋, 等. 细菌 *nox* 基因研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2018, 38(5): 112-120
- [23] Qi JJ. Comparative genomics and proteomics of *Mycoplasma bovis* HB0801 and three attenuated strains[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese)
祁晶晶. 牛支原体 HB0801 株及其三株传代致弱株的比较基因组学及比较蛋白质组学研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士论文, 2013
- [24] Aksenov M, Kapitanov AB, Archakov AI. Self-inactivation of NADH-oxidase from *Mycoplasma* cells during reaction[J]. *Biokhimiia*, 1988, 53(1): 113-117
- [25] Ge XC, Shi XL, Shi LM, et al. Involvement of NADH oxidase in biofilm formation in *Streptococcus sanguinis*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151142
- [26] Ge XC, Yu Y, Zhang M, et al. Involvement of NADH oxidase in competition and endocarditis virulence in *Streptococcus sanguinis*[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(5): 1470-1477