



牛支原体 LRR5 蛋白原核表达及其在牛支原体入侵宿主细胞过程中的作用分析

冯雅茹^{1,2}, 周梦婷^{1,2}, 张瑜瑜^{1,2}, 张格^{1,2}, 高鹏程^{3,4}, 冉多良^{1,2}, 许健^{1,3,4}, 储岳峰^{1,3,4*}, 李斌^{1,2*}

- 1 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052
- 2 新疆草食动物新药研究与创制重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052
- 3 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730000
- 4 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州 730046

冯雅茹, 周梦婷, 张瑜瑜, 张格, 高鹏程, 冉多良, 许健, 储岳峰, 李斌. 牛支原体 LRR5 蛋白原核表达及其在牛支原体入侵宿主细胞过程中的作用分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1469-1482.

FENG Yaru, ZHOU Mengting, ZHANG Yuyu, ZHANG ge, GAO Pengcheng, RAN Duoliang, XU Jian, CHU Yuefeng, LI Bin. Prokaryotic expression of *Mycoplasma bovis* LRR5 protein involved in the invasion of *Mycoplasma bovis* into host cells[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1469-1482.

摘要: 致病性支原体具有入侵宿主细胞的能力, 这是其发挥致病作用的关键。介导支原体入侵宿主细胞的自身功能蛋白可能是一种潜在的疫苗或药物靶标。【目的】克隆表达牛支原体 (*Mycoplasma bovis*) MBOVPG45_0564 基因编码蛋白(命名为 LRR5 蛋白), 并探究其在 *M. bovis* 入侵宿主细胞过程中的作用。【方法】利用 NCBI 数据库对 MBOVPG45_0564 基因进行同源性分析, 用 Discovery Studio Client 系统对 LRR5 蛋白进行蛋白结构预测; 原核表达 LRR5 蛋白并制备其小鼠多克隆抗体, 利用免疫电镜对 LRR5 蛋白进行亚细胞定位; 通过平板计数、激光共聚焦显微镜观察 LRR5 抗体封闭后 *M. bovis* 对胎牛肺(embryonic bovine lung, EBL)细胞入侵率的变化; 将 LRR5

资助项目: 国家自然科学基金(32260885); “新疆草食动物新药研究与创制”重点实验室开放课题(XJCDVM-HDRC-S202305); 中国农业科学院兰州兽医研究所创新工程重点任务项目(CAAS-ASTIP-JBGS-20210701); 甘肃省科技重大专项课题(22ZD6NA001); 大学生研究创新项目(dxscx2023196)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260885), the Open Project of Key Laboratory of “Research and Creation of New Drugs for Herbivores in Xinjiang” (XJCDVM-HDRC-S202305), the Key Task Project of Innovation Engineering of Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-JBGS-20210701), the Major Science and Technology Project of Gansu Province (22ZD6NA001), and the Research and Innovation Projects for University Students (dxscx2023196).

*Corresponding authors. E-mail: CHU Yuefeng, chuyuefeng@caas.cn; LI Bin, libin19921221@126.com

Received: 2023-11-08; Accepted: 2024-02-19; Published online: 2024-02-22

蛋白偶联至荧光微球表面后,以激光共聚焦显微镜及高内涵活细胞成像系统观察微球进入 EBL 细胞情况。【结果】*MBOVPG45_0564* 基因在牛支原体属中为保守基因,其编码蛋白 LRR5 为膜相关蛋白,空间构象呈典型的月牙状,多个重复的亮氨酸基序以超螺旋方式组装并形成螺线管蛋白质结构单元。LRR5 抗体封闭后,*M. bovis* 对 EBL 细胞的入侵率显著降低($P<0.05$),荧光微球偶联 LRR5 蛋白后,荧光微球可成功进入 EBL 细胞。【结论】*MBOVPG45_0564* 基因编码的 LRR5 蛋白定位在 *M. bovis* 膜上,在 *M. bovis* 入侵宿主细胞过程中发挥着重要作用。

关键词:牛支原体; *MBOVPG45_0564* 基因; 入侵; 蛋白表达; 生物学功能

Prokaryotic expression of *Mycoplasma bovis* LRR5 protein involved in the invasion of *Mycoplasma bovis* into host cells

FENG Yaru^{1,2}, ZHOU Mengting^{1,2}, ZHANG Yuyu^{1,2}, ZHANG Ge^{1,2}, GAO Pengcheng^{3,4}, RAN Duoliang^{1,2}, XU Jian^{1,3,4}, CHU Yuefeng^{1,3,4*}, LI Bin^{1,2*}

1 College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

2 Xinjiang Key Laboratory of Research and Creation of New Drugs for Herbivores, Urumqi 830052, Xinjiang, China

3 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

4 Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: Pathogenic mycoplasma has the ability to invade host cells, which is a key mechanism to their pathogenicity. Functional proteins that mediate the entry of mycoplasma may serve as potential drug or vaccine targets. **[Objective]** To clone and express the LRR5 protein encoded by *MBOVPG45_0564* in *Mycoplasma bovis* and to explore its role in the invasion of host cells by *M. bovis*. **[Methods]** The NCBI database was used for the homology analysis of *MBOVPG45_0564*, and the structure of LRR5 protein was predicted by the Discovery Studio Client system. After prokaryotic expression of LRR5 protein, the mouse polyclonal antibody was prepared, and the subcellular localization of LRR5 protein was observed by immunoelectron microscopy. The invasion of *M. bovis* into embryonic bovine lung (EBL) cells after LRR5 antibody blocking was observed by plate counting and laser confocal microscopy. After conjugation of LRR5 protein to the surface of fluorescent microspheres, the entry of the microspheres into EBL cells was observed by laser confocal microscopy and a high-content live-cell imaging system. **[Results]** *MBOVPG45_0564* was a conserved sequence in *M. bovis* and encoded LRR5, a membrane-associated protein with a typical crescent-like spatial conformation. Multiple repeating leucine motifs were assembled in a supercoiled manner to form a solenoid protein structural unit. After LRR5 antibody blocking, the invasion rate of *M. bovis* to EBL cells reduced ($P<0.05$), and the fluorescent microspheres conjugated with LRR5 protein could successfully enter EBL cells. **[Conclusion]** The LRR5 protein

encoded by *MBOVPG45_0564* is localized on the *M. bovis* membrane and plays a role in the invasion of *M. bovis* into host cells.

Keywords: *Mycoplasma bovis*; *MBOVPG45_0564*; invasion; protein expression; biological function

牛支原体(*Mycoplasma bovis*)是目前已知最小且能自我复制的原核微生物,是严重危害现代养牛业健康发展的病原体之一,可引起多种疾病^[1]。*M. bovis*感染可引致牛肺炎、乳腺炎和关节炎等疾病,在防治上无有效疫苗和药物,一旦发病极难净化,呈世界性流行,给全球养牛业造成了重大的经济损失。*M. bovis*具有多种免疫逃避策略,其中入侵宿主细胞是病原菌免疫逃避最重要的途径之一。近年来,多项研究表明 *M. bovis* 可入侵多种宿主细胞,包括各类非吞噬细胞^[2]。普遍认为 *M. bovis* 通过各类黏附素及其靶蛋白黏附于宿主细胞表面而实现其定植^[3],随后利用其膜表面某些毒力蛋白介导其入侵,并在胞内长期存活甚至繁殖,以实现免疫逃避和长程感染的目标。

现已证明支原体可通过非自然吞噬的方式进入宿主细胞内部^[4],如生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*, Mg)黏附蛋白 MgPa 可以通过 CypA 黏附并侵入 SV-HUC-1 细胞,并诱导细胞外 CypA 的分泌^[5];肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, Mp) CARDS 与细胞结合后通过网格蛋白介导的途径以剂量和时间依赖性的方式快速内化^[6];鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)入侵红细胞并在一定时间内保持胞内存活繁殖^[7]。虽然越来越多的 *M. bovis* 膜蛋白被证实与黏附作用相关,但 *M. bovis* 入侵细胞过程有关的毒力蛋白尚未被鉴定,入侵途径尚未解析。

本研究通过原核表达纯化 LRR5 蛋白、制备多克隆抗体,以抗体封闭、间接免疫荧光及偶联微球等方法探究 LRR5 蛋白在 *M. bovis* 入侵细胞过程中发挥的生物学功能,对于揭示 *M. bovis* 免疫逃避机制或疫苗创制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞系

牛支原体 PG45 标准株(GenBank 登录号为 NC_014760.1)及 PG45-GFP 荧光菌株由中国农业科学院兰州兽医研究所草食动物细菌病团队实验室保存;胎牛肺细胞(embryonic bovine lung cell, EBL cell),由甘肃农业大学武小椿教授惠赠;6-8 周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雌性昆明系小鼠,由中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心提供,所有动物实验均按照中华人民共和国实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892—2018, <http://openstd.samr.gov.cn>)的要求进行。动物实验获得中国农业科学院兰州兽医研究所动物伦理委员会批准(编号:LVRIAEC2021-028)。

1.1.2 主要试剂和仪器

弗氏完全佐剂(Freunds complete adjuvant, FCA)、弗氏不完全佐剂(Freunds incomplete adjuvant, FIA),默克 Sigma 公司;PPLO 肉汤培养基、PPLO 琼脂培养基,北京中源合聚生物科技有限公司;免疫染色封闭液、免疫染色通透液、细胞膜红色荧光染色试剂盒(DiI)、Hoechst 33342 活细胞染色液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒及羊抗鼠二抗,上海碧云天生物技术股份有限公司;DAPI、抗荧光淬灭封片剂、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒及 EZ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;T4 DNA Ligase,宝日医生物技术(北京)有限公司;荧光微球,上海涛宇国际贸易有限公司;荧光二抗,艾博抗(上海)贸易有限公司;凝胶成像系统、酶标仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;透射

电子显微镜, 日立里电子有限公司; 激光共聚焦显微镜, 徕卡公司; 高内涵成像系统, 珀金埃尔默股份有限公司。

1.2 支原体培养方法及 CFU 的测定

将牛支原体标准株 PG45 及 PG45-GFP (本研究团队构建的 GFP 荧光标签支原体菌株) 复苏后扩大培养, 用细胞培养液 DMEM 重悬保存, 同时梯度稀释涂布 MTA 平板, 在光学显微镜下计数单菌落。

1.3 牛支原体入侵率测定方法

将 EBL 细胞传代至 24 孔细胞板中, 待其长至 80%–90% 时, 进行细胞计数(每批做 3 个重复); 将 PG45 按 MOI=1 000 分别加入细胞孔中, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 4 h; 清洗后加入工作浓度为 400 µg/mL 的庆大霉素, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 3 h, 以杀死胞外支原体; PBS 清洗后加入 0.25% 含 EDTA 胰蛋白酶过度消化细胞, 12 000 r/min 离心 10 min, 重悬后梯度稀释、涂布于 MTA 平板上计数, 并以 *t* 检验的方法进行差异性分析。

1.4 MBOVPG45_0564 基因分析方法

NCBI 数据库查询比对 *MBOVPG45_0564* 基因(GenBank 登录号为 CP002188.1)在支原体属中的高一一致性菌株, 并用 MAGE 7 软件、邻接(Neighbor-Joining, NJ)法分析及绘制进化树, 用 iTOL 网站(<https://itol.embl.de>)美化进化树。

1.5 LRR5 蛋白结构分析方法

使用在线 ExPASy 蛋白分析软件 ProtParam 程序 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 LRR5 蛋白(GenBank 登录号为 ADR25256.1)的基本组成、等电点、疏水性、不稳定性指数等; 采用 UniProt 数据库查询 LRR5 蛋白信息 (<https://www.uniprot.org/>); 使用 Discovery Studio Client 软件, 选择 95% 一致性无冗余信息数据库中同源性较高的模板进行同源建模生成蛋白质

三级结构; 使用 TMHMM 网站(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 预测 LRR5 蛋白跨膜域。

1.6 LRR5 蛋白原核表达及纯化方法

对膜外区氨基酸基因按照大肠杆菌属进行密码子优化, 选择 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点, 由武汉金开瑞生物工程有限公司化学合成, 并连接至 pET28a 质粒上。将 LRR5 合成质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 获得重组质粒菌 LRR5-pET28a-BL21, 并由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。以 BL21 空载菌株为对照, 将重组菌株培养至 OD₆₀₀ 为 0.6–0.8 时, 按照前期最优条件(0.1 mmol/L IPTG 16 °C 诱导 30 h) 进行诱导。将菌体超声破碎至悬液清亮, 收集上清, 用 0.45 µm 孔径滤膜过滤后用 HisPur™-NTA 树脂进行目的蛋白纯化。SDS-PAGE 检验纯化蛋白的纯度, 合并仅有目的蛋白的收集管, 用分子截留量为 30 kDa 的超滤管浓缩, 以 BCA 法对收集的蛋白进行浓度测定, 加入蛋白缓冲液(兰州兽医研究所草食动物细菌病团队高鹏程自配)后于 –80 °C 保存。

1.7 LRR5 蛋白多克隆抗体制备及效价测定

1.7.1 LRR5 蛋白多克隆抗体的制备方法

取 10 只 SPF 昆明系雌性小鼠适应性饲养 7 d 后开始免疫, 以纯化的 LRR5 蛋白为抗原, 与弗氏完全佐剂/弗氏不完全佐剂 1:1 于冰上乳化, 按 100 µg/只免疫, 同时设置 PBS 阴性对照及空白对照。从首免开始记为 0 d, 此后每隔 7 d 免疫一次, 共免疫 4 次, 其中一免、二免使用弗氏完全佐剂, 三免、四免使用弗氏不完全佐剂。每次免疫后第 7 天采集小鼠血液, 收集血清, 将所有采集到的血清以 5% BSA 溶液按 1:1 000 稀释后作为一抗进行 Western blotting 检测。根据检测结果, 于 28 d 后采集全部小鼠血液, 冻存备用。

1.7.2 LRR5 蛋白多克隆抗体效价的测定

将纯化的 LRR5 蛋白以 100 ng/100 µL/孔

(CB 包被液稀释) 4 °C 过夜包被酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA) 板, 每次使用 300 μ L/孔的 PBST 溶液进行洗涤, 共进行 3 次; 用 2% 酪蛋白溶液进行封闭, 按 100 μ L/孔于 37 °C 封闭 2 h, PBST 洗涤 3 次; 向孔内分别加入不同稀释度(1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000、1:256 000 和 1:512 000)的小鼠多克隆抗体(PC serum), 以相同稀释度的非免疫小鼠血清作为阴性对照(NC serum), 100 μ L/孔, 每组设置 3 个复孔, 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗涤后每孔加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG, 100 μ L/孔, 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗涤后, 避光条件下加入 TMB 底物溶液, 100 μ L/孔, 室温避光作用 10 min 后 100 μ L/孔加入终止液终止反应; 酶标仪 OD_{450} 读数。

1.8 免疫电镜制备方法

将 PG45 解冻复苏大量培养, 12 000 r/min 离心 10 min 洗涤, 留菌体沉淀, 沿着离心管壁小心加入 500 μ L 3% 戊二醛, 过夜固定后将样品和 LRR5 蛋白多克隆抗体一并送往成都里来生物科技有限公司进行制样切片, 主要步骤如下: 缓冲液清洗、封闭、一抗、清洗、胶体金二抗、清洗、戊二醛固定、清洗、醋酸铀染色、丙酮脱水、渗透、包埋、切片、染色, 电镜观察。

1.9 透射电镜样品的制备方法

将 EBL 细胞培养至 80%, 按 MOI=1 000 加入 PG45, 37 °C、5% CO₂ 孵育 4 h, PBS 清洗后用细胞刮刀按一个方向将细胞刮下, 清洗菌体沉淀, 随后沿着离心管壁小心加入 500 μ L 3% 戊二醛, 过夜固定, 随后送往中国农业科学院兰州兽医研究所中心仪器室进行样品后续制作: 缓冲液漂洗、钨酸固定、缓冲液漂洗、酒精脱水、丙酮脱水、包埋剂渗透、包埋、聚合、修块、超薄切片, 用透射电镜观察样品。

1.10 LRR5 蛋白多克隆抗体封闭实验

将 PG45 与 LRR5 小鼠多克隆抗体(PC serum)

(1:100 DMEM 稀释) 4 °C 垂直旋转孵育 4 h, 待 EBL 细胞长至 90% 时, 将处理后的 PG45 按 MOI=1 000 加入细胞中, 参照 1.3 所述方法进行平板计数(以 PBS 孵育作为对照, 记为 NC serum), 并用 GraphPad Prism 8.0.2 绘制柱状图 two-way ANOVA 法分析差异性。

1.11 激光共聚焦显微镜样品制备方法

将 EBL 细胞接种至细胞爬片上, 参照 1.10 所述方法处理 PG45-GFP 菌株, 待细胞长至 70% 时接毒, 37 °C 孵育 4 h, 随后 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 免疫荧光通透液室温处理 10 min, 按 DiI 细胞膜染色试剂盒进行细胞膜染色, DAPI 染料进行细胞核染色, 取出细胞爬片, 加入抗荧光猝灭剂进行封片。以未处理的 PG45-GFP 作为对照, 记录实验结果, 用 ImageJ 进行荧光强度值分析, 并用 GraphPad Prism 8.0.2 绘制柱状图 two-way ANOVA 法分析差异性。

1.12 高内涵活细胞成像系统样品制备

参照 1.10 所述方法处理 PG45-GFP 菌株, 按 DiI 细胞膜染色试剂盒及 Hoechst 33342 活细胞染色液说明书进行染色, 随后接毒并上机拍摄 8 h, 以未处理的 PG45-GFP 作为对照, 记录实验结果, 通过入侵踪迹图及图层叠加 3D 模型图观察 PG45 入侵细胞的动态, 并用 Image 分析定位在胞内的绿色荧光信号强度值, GraphPad Prism 8.0.2 绘制折线图。

1.13 荧光微球透射电镜样品的制备方法

将 LRR5 小鼠多克隆抗体(1:100 PBS 稀释)与荧光微球在垂直旋转仪上室温孵育 2 h, 加入 500 μ g LRR5 蛋白于垂直旋转仪上 4 °C 过夜共孵育, 成功制备 LRR5 蛋白偶联的荧光微球(以下简称 LRR5-微球)。同时将 EBL 细胞培养至 70%, 加入与荧光微球偶联的 LRR5 蛋白, 37 °C、5% CO₂ 孵育 8 h, PBS 清洗后用细胞刮刀按一个方向将细

胞刮下，离心洗涤留菌体沉淀，随后沿着离心管壁小心加入 500 μ L 3%戊二醛，过夜固定，随后送往中国农业科学院兰州兽医研究所中心仪器室进行样品后续制作，用透射电镜观察样品。

1.14 荧光微球激光共聚焦显微镜样品制备方法

按照 1.13 所述方法将 LRR5 蛋白偶联荧光微球并感染接种至爬片上的 EBL 细胞，按 1.11 的方法进行固定、染色、封片。以未偶联 LRR5 蛋白的荧光微球为对照，记录试验结果，用 ImageJ 进行荧光强度值分析。

2 结果与分析

2.1 *MBOVPG45_0564* 基因分析结果

使用计算机工具和算法分析从克隆序列中获得的信息，以预测其身份。基于 Blast 输出分析，所有查询 *MBOVPG45_0564* 的一致性显著，查询覆盖率为 100%，*E* 值为 0.0，百分比恒等性为 98.01%–99.96%，该分析涉及 100 个菌株。来自牛支原体标准株 PG45 的基因 *MBOVPG45_0564* 在构建的树中用红色背景框标注(图 1)。本实验

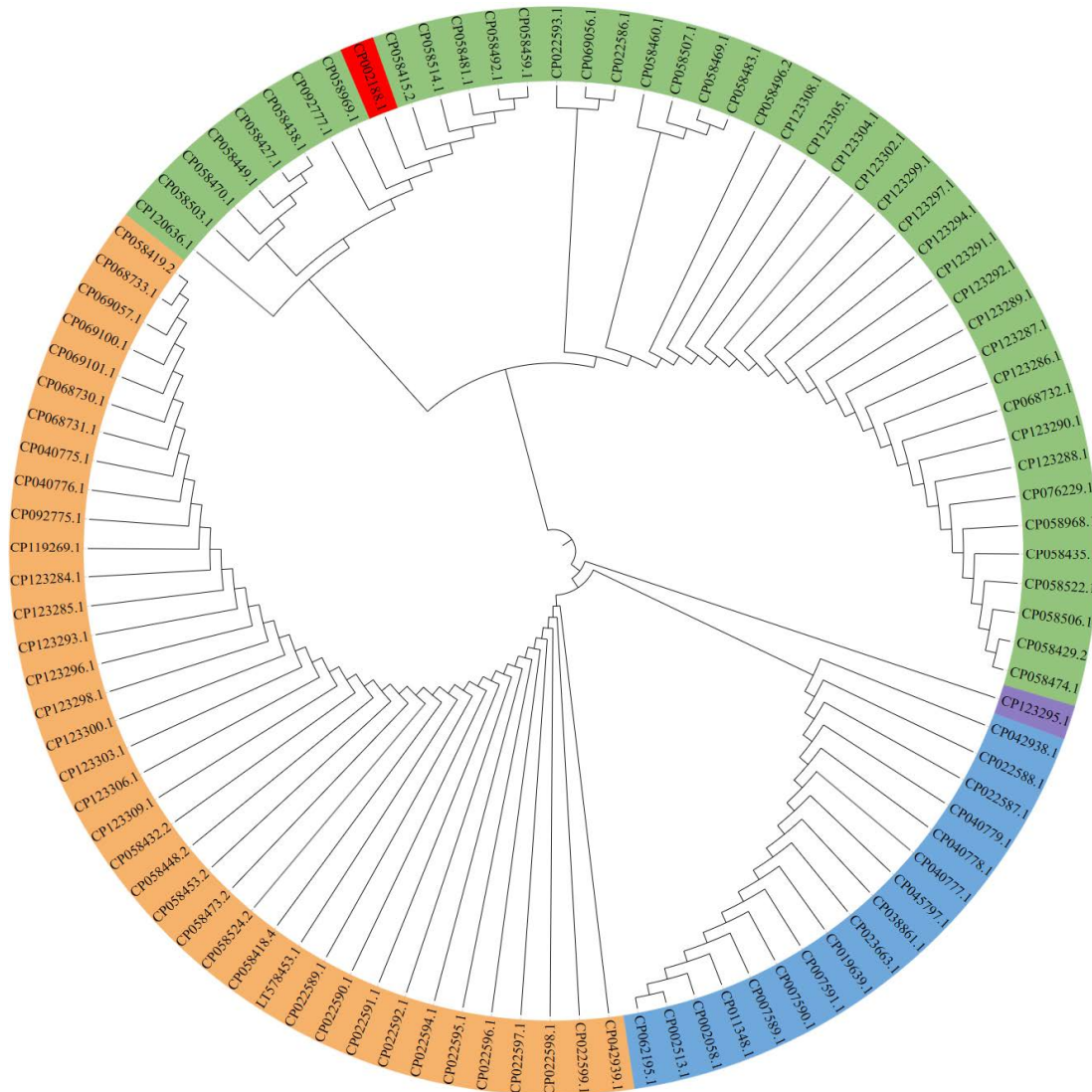


图 1 *MBOVPG45_0564* 基因的进化关系图

Figure 1 Evolutionary diagram of *MBOVPG45_0564* gene.

所用菌株与其他部分牛支原体菌株形成 2 个大支, 与牛支原体 F9160、1982-M6152、PG45.1-10、Hubei-1、Tibet-10、HB0801、NM2012、NX114、08M、Ningxia-1、16M、XBY01、VK19、Mb225 和 TO19 等菌株一致性均高于 98.01%, 表明该基因在牛支原体属中较为保守。

2.2 LRR5 蛋白结构分析结果

ProtParam 预测 LRR5 蛋白分子式为 $C_{3962}H_{6339}N_{1015}O_{173}S_3$, 包含 769 个氨基酸, 分子量为 87 kDa, 等电点为 8.45, 氨基酸组成中赖氨酸(Lys)和谷氨酸(Glu)分别占比 11.8%和 9.2%, 平均疏水性为-0.362, 不稳定性指数为 39.30, 根据 ProtParam 分析将 LRR5 蛋白归类为稳定。UniProt 数据库对 LRR5 蛋白注释为“putative lipoprotein”, 在 LRR5 蛋白序列中含有 5 个亮氨酸重复序列(leucine rich repeats, LRR), 该基序区域具有黏附素活性, 通常与蛋白间的互作有关。从 Discovery Studio Client 软件所预测的三级结构模型中可看到, 该蛋白具有在大多数含 LRR 区域的蛋白质中看到的特征 α/β 螺旋管马蹄形褶皱(图 2A)。通过 TMHMM 网站对 LRR5 蛋白的跨膜结构进行预测, 结果显示: 该蛋白 1-6 氨基酸位点为膜内区域; 7-25 氨基酸位点为跨膜区域; 26-769 氨基酸位点为膜外区域(图 2B)。

2.3 LRR5 蛋白原核表达

对 LRR5-pET28a 质粒用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切显示条带大小符合, 经测序比对与目的序列一致, 表明重组质粒合成无误。

诱导结果显示, LRR5 蛋白主要存在于上清中(图 3A), IPTG 的终浓度为 0.1 mmol/L、温度为 16 °C、时间为 30 h 时, LRR5 蛋白为可溶性形式。通过 HisPur™-NTA 树脂纯化(图 3B, 泳道 1-9)、超滤管浓缩(图 3B, 泳道 10)获得 LRR5 蛋白。

2.4 LRR5 蛋白多克隆抗体的制备及效价的检测

用纯化的 LRR5 蛋白免疫 SPF 小鼠 4 次后分离血清, 以 Western blotting 检测抗体滴度, 结果显示: 7 d 即可检测到明显的特异性条带, 随着免疫次数的增加, 小鼠血清中抗体滴度持续升高, 第 28 天时抗体滴度达到最高(图 4A), 所制备的多克隆抗体在 1:512 000 时达到临界值, 具有较高的免疫原性(图 4B)。

2.5 免疫电镜观察 LRR5 蛋白亚细胞定位

免疫电镜结果显示, LRR5 免疫阳性金标颗粒沉淀定位在牛支原体 PG45 膜上(图 5, 箭头), 证明该蛋白为支原体膜相关蛋白, 与生物信息学预测结果相符。

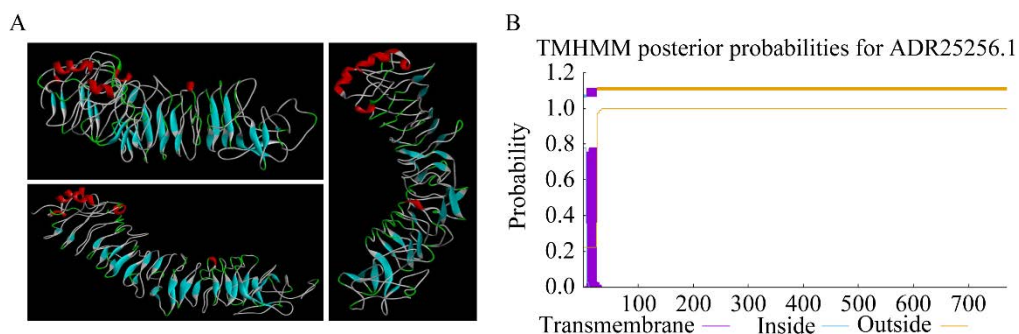


图 2 LRR5 蛋白结构分析 A: LRR5 蛋白结构模型三视图. B: LRR5 蛋白跨膜结构预测图

Figure 2 LRR5 protein structure analysis. A: The three views of LRR5 protein structure model. B: The prediction map of the transmembrane structure of LRR5 protein.

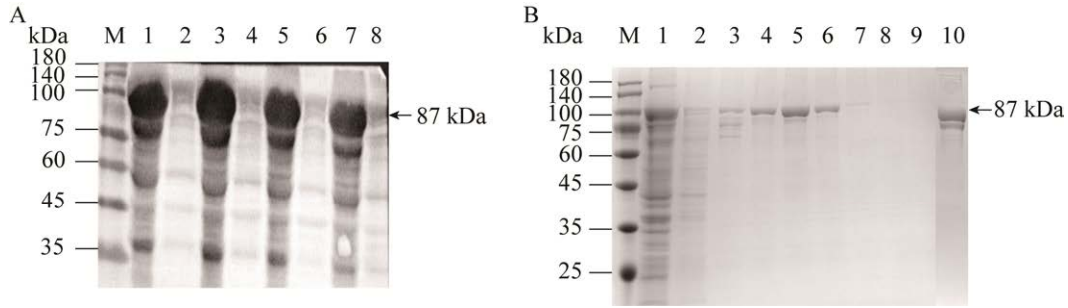


图 3 LRR5 蛋白的原核表达及纯化 A: LRR5-pET28a-BL21 16 °C 不同 IPTG 诱导浓度下的 Western blotting 图. M: 蛋白 Marker; 1-8 依次为 0.1、0.5、1、5 mmol IPTG 上清和沉淀. B: HisPur™-NTA 树脂纯化 LRR5 蛋白考马斯亮蓝染色图. M: 蛋白 Marker; 1: 纯化流穿液; 2-9 依次为 12.5、50、75、100、200、300、500、1 000 mmol/L 洗脱液; 10: LRR5 蛋白

Figure 3 Prokaryotic expression and purification of LRR5 protein. A: LRR5-pET28a-BL21 Western blotting diagram of different IPTG induction concentrations at 16 °C. M: Protein Marker; 1-8: 0.1, 0.5, 1, 5 mmol IPTG supernatant and precipitate. B: HisPur-NTA™ resin purified LRR5 protein Coomassie brilliant blue staining diagram. M: Protein Marker; 1: Purified flow through; 2-9: 12.5, 50, 75, 100, 200, 300, 500, and 1 000 mmol/L eluent, respectively; 10: LRR5 protein.

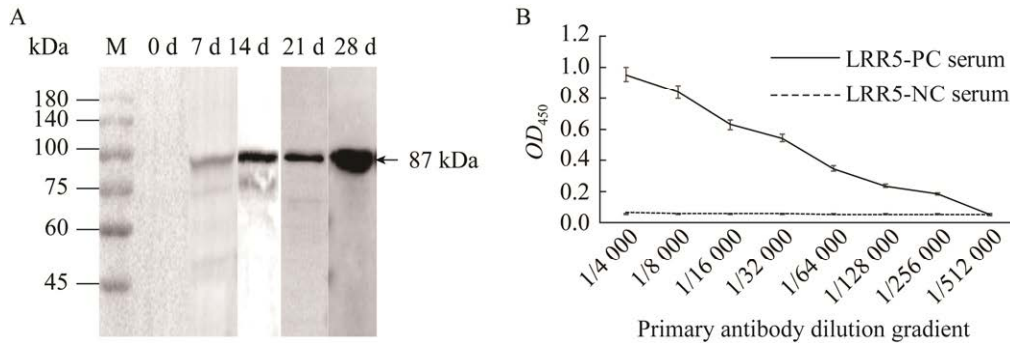


图 4 LRR5 蛋白小鼠多克隆抗体制备及效价检测 A: LRR5 蛋白多抗 Western blotting 图. M: 蛋白 Marker; 免疫 0、7、14、21、28 d 血清. B: LRR5 蛋白多抗效价统计图

Figure 4 Preparation of mouse polyclonal antibody with LRR5 protein and titer detection. A: Western blotting diagram of LRR5 protein polyclonal antibody. M: Protein Marker; Serum of 0, 7, 14, 21, and 28 d. B: Multi-titer chart of LRR5 protein.

2.6 PG45 入侵 EBL 细胞透射电镜观察结果

透射电镜结果显示,与未被 PG45 感染的细胞对比,感染 4 h 时已有部分 PG45 入侵至 EBL 细胞内部,同时可观察到 PG45 可黏附于细胞膜外表面(图 6)。

2.7 LRR5 抗体封闭实验结果

与牛支原体标准株 PG45 组和血清阴性组相比,用 LRR5 蛋白多克隆抗体封闭 PG45 后牛支原体的入侵率显著下降($P < 0.05$),可以说明

LRR5 蛋白与牛支原体入侵细胞有关,可能是牛支原体入侵的关键蛋白(图 7)。

2.8 激光共聚焦显微镜研究 LRR5 蛋白功能

共聚焦结果发现,当用 LRR5 小鼠多克隆抗体封闭 PG45 后牛支原体不能入侵 EBL 细胞,而未封闭 PG45 的组中牛支原体可以正常入侵细胞(图 8A),进一步对胞内荧光强度的数据分析可知:当抗体封闭 PG45 后牛支原体的入侵率下降($P < 0.05$) (图 8B)。

2.9 高内涵成像系统研究 LRR5 蛋白功能

高内涵成像系统结果显示：与未处理的 PG45 组相比，当 LRR5 小鼠多克隆抗体封闭 PG45 之后，牛支原体入侵 EBL 细胞的能力大大减弱，胞内可见的绿色荧光几乎没有，从运动轨迹上看也无向细胞内部迈进的趋势，通过图层叠加所形成的 3D 模型中可以看出封闭后的 PG45 存在于细胞表面(图 9)。

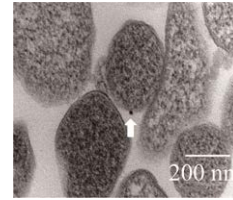


图 5 LRR5 蛋白免疫电镜图 白色箭头为标记的 LRR5 蛋白

Figure 5 LRR5 protein immunoelectron microscopy. The white arrows are labeled LRR5 proteins.

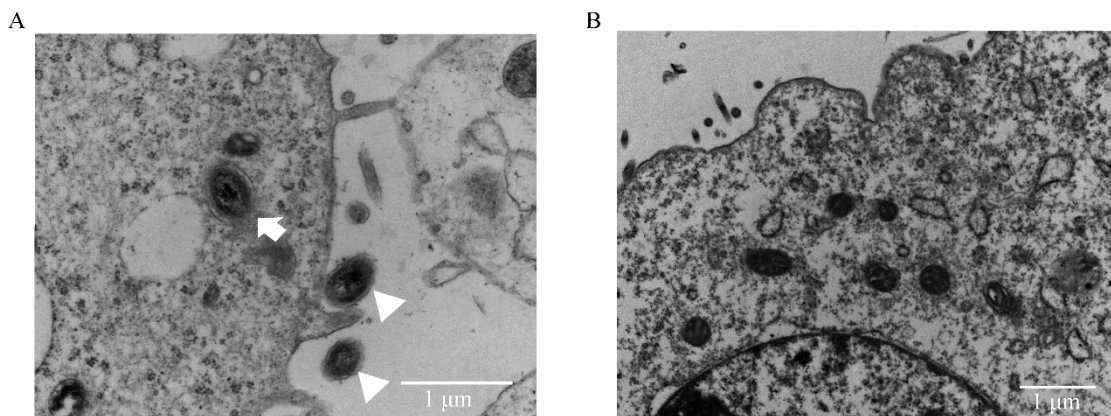


图 6 PG45 入侵 EBL 细胞透射电镜图 A: PG45 感染 EBL 细胞 4 h 透射电镜图. 白色箭头表示入侵至胞内 PG45; 白色三角形表示为胞外 PG45. B: 空白细胞透射电镜图

Figure 6 Electron microscopy of PG45 invasion of EBL cells. A: The transmission electron microscopy of EBL cells infected by PG45 for 4 h. The intracellular PG45 is shown by white arrow; The extracellular PG45 is shown by white triangle. B: The transmission electron microscopy of negative control cells.

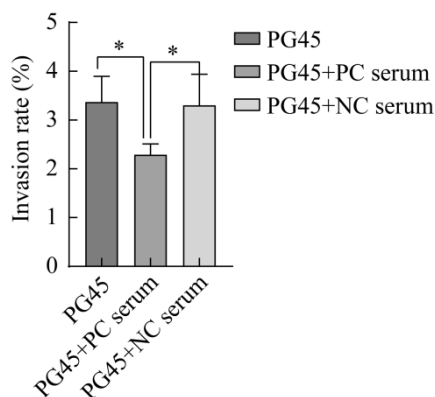


图 7 LRR5 抗体封闭实验结果 PC 为阳性; NC 为阴性. *代表显著差异($P<0.05$)

Figure 7 LRR5 protein antibody blocking test results. PC is positive; NC is negative. * represents significant difference ($P<0.05$).

2.10 透射电镜观察 LRR5-微球入侵现象

透射电镜观察结果显示：偶联 LRR5 蛋白的荧光微球可以入侵 EBL 细胞(图 10A, 白色箭头)，但荧光微球对照组未能在细胞质内观察到荧光微球，显示荧光微球不具有入侵细胞的能力(图 10B)。该实验结果表明 LRR5 蛋白具有介导大分子物质入侵细胞的功能。

2.11 激光共聚焦观察 LRR5-微球入侵现象

将 LRR5 蛋白偶联至绿色荧光微球，使用激光共聚焦显微镜观察可见：偶联 LRR5 蛋白的荧光微球可在 8 h 内入侵至 EBL 细胞内部，而 IgG-microsphere 组则大量黏附于细胞表面，未在胞质内观察到明显的荧光信号(图 11A)，分析

胞内绿色荧光强度发现, 偶联 LRR5 蛋白组荧光值显著高于 IgG 对照组($P<0.01$) (图 11B)。本试验结果证明 LRR5 蛋白与牛支原体的入侵过程有关。

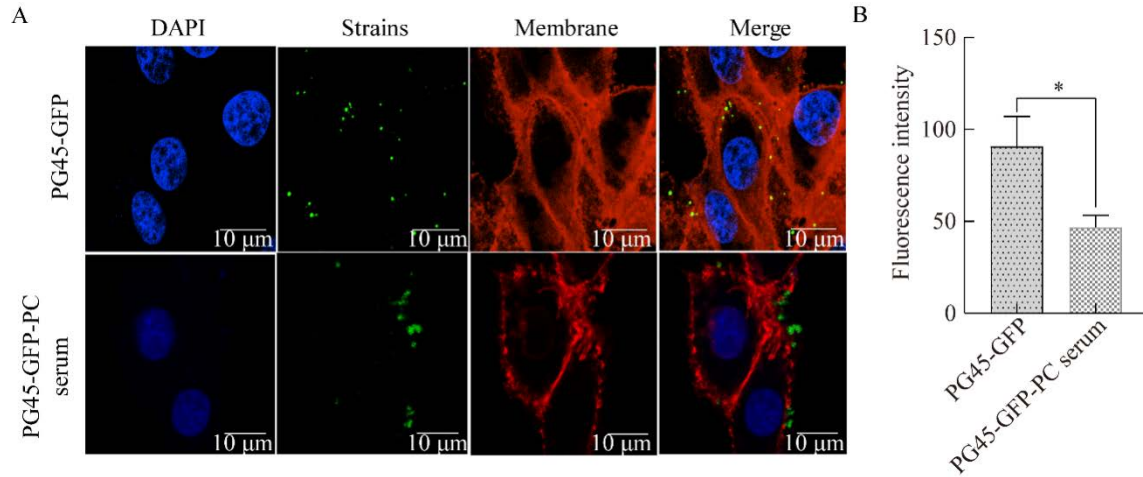


图 8 LRR5 抗体封闭后 PG45 与 EBL 细胞共孵育激光共聚焦显微镜图 A: 牛支原体入侵 EBL 激光共聚焦显微镜观察图. B: 荧光强度分析图. *代表显著差异($P<0.05$)

Figure 8 Laser confocal microscopy after co-incubation of LRR5 protein with EBL cells. A: *Mycoplasma bovis* invasion EBL laser confocal microscopy image. B: Fluorescence intensity analysis plot. * represents significant difference ($P<0.05$).

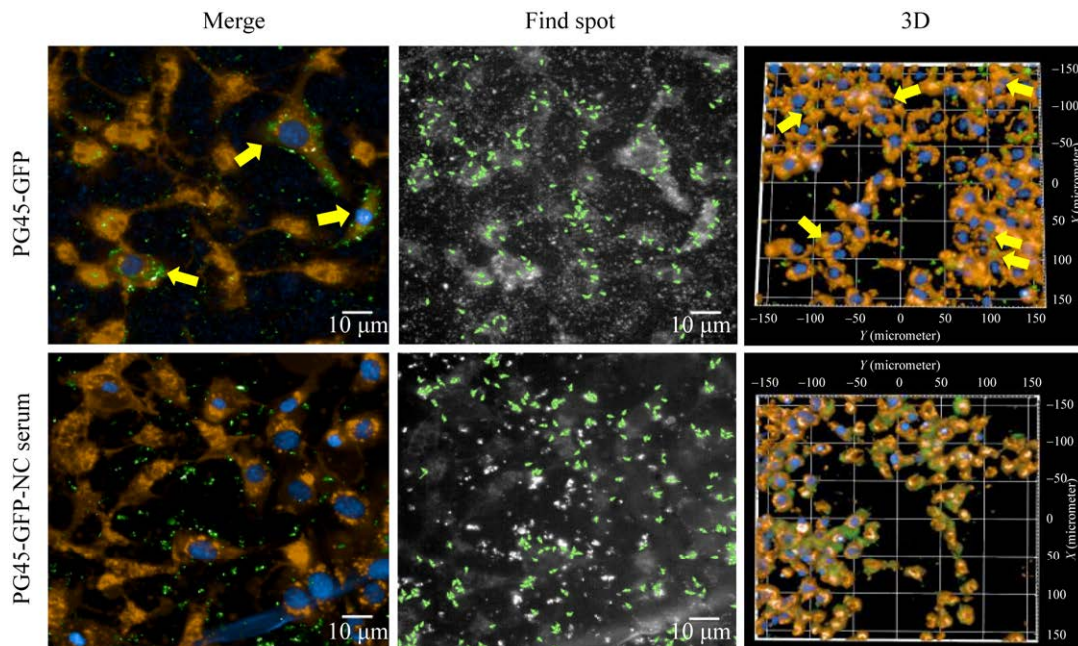


图 9 LRR5 抗体封闭后 PG45 入侵 EBL 细胞高内涵活细胞成像图 Merge 为 PG45 入侵细胞图; Find spot 为细胞表面及内部 PG45 运动轨迹示踪图; 3D 为 PG45 入侵细胞模型图

Figure 9 Imaging of high-content live-cell with LRR5 protein invasion of EBL. Merge is the PG45 invading cell map; Find spot is the PG45 motion trajectory tracer map of the cell surface and interior; 3D is the PG45 invading cell model map.

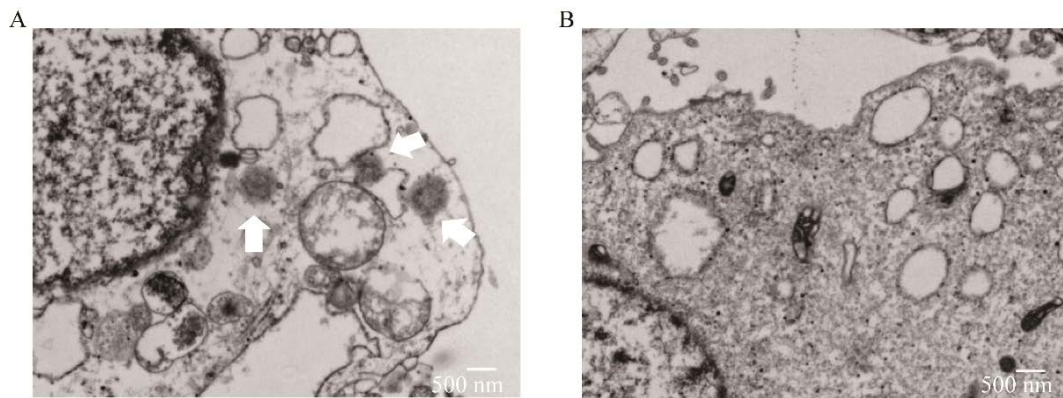


图 10 LRR5 蛋白偶联荧光微球后入侵 EBL 细胞透射电镜图 A: LRR5 蛋白偶联荧光微球实验组. B: 荧光微球对照组

Figure 10 LRR5 protein-coupled fluorescent beads invading EBL cells with transmission electron microscopy. A: LRR5 protein-conjugated fluorescence microsphere experimental group. B: Fluorescent bead control group.

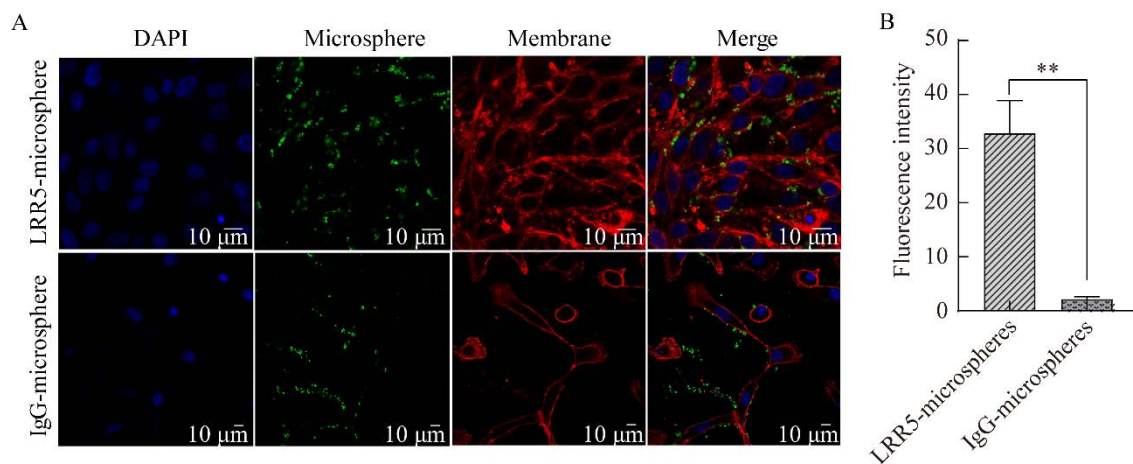


图 11 LRR5 蛋白偶联荧光微球后入侵 EBL 细胞激光共聚焦图 A: LRR5 蛋白入侵 EBL 激光共聚焦显微镜观察图. B: 荧光强度分析图. **代表极显著差异($P<0.01$)

Figure 11 Laser confocal pattern of invasion of EBL cells after LRR5 protein conjugated fluorescent beads. A: Observation of LRR5 protein invasion EBL laser confocal microscopy. B: Fluorescence intensity analysis plot. ** represents very significant difference ($P<0.01$).

3 讨论与结论

目前,关于牛支原体的致病性与相关毒力因子以及致病机制的研究并不十分深入和清晰。牛支原体入侵宿主是一个复杂的过程,且牛支原体会通过入侵的方式来逃避宿主的免疫,造成长期慢性感染,为养殖业带来巨大的损失。筛选及鉴

定牛支原体上与入侵相关的毒力基因,并探究该基因功能变得尤为重要。然而,牛支原体入侵宿主会涉及到自身的黏附和入侵蛋白、分泌系统、代谢产物等方面,或与宿主细胞膜表面受体、信号传导等密切相关,因而牛支原体入侵的毒力基因筛选及鉴定具有较大的难度。

富亮氨酸重复序列(LRR)广泛存在于病毒、细菌、古菌和真核生物蛋白中,具有各种二级结构,目前已知结构的14种LRR蛋白,每种均包含4-17个重复序列,揭示了LRR结构域折叠成马蹄形(或弧形),重复序列通过氢键网络结合在一起在凹面上具有平行的 β 片,提供多功能的蛋白质结合支架^[8],这是由名为LRR基序的保守序列模式产生的,其最小形式为“LxxLxL”类型,其中L通常是亮氨酸,较少是其他疏水氨基酸。已经确定了近400个LRR结构域的三维结构^[9],尽管序列具有显著的多样性,但它们大多形成高度相似的结构。LRR结构域主要参与蛋白质-蛋白质相互作用,并具有不同的功能和细胞位置,如信号转导、细胞黏附、DNA修复、重组、转录、RNA加工、抗病、冰核、细胞凋亡、植物免疫反应和哺乳动物先天免疫反应^[8],通常发挥受体或配体的作用^[10]。在先天免疫中,LRR模块存在于许多受体类别的各种结构域组织中,如植物受体样激酶(RLK)、受体样蛋白(RLP)、NOD样受体(NLR)和Toll样受体(TLR)。在植物基础免疫中,LRR N末端结构域面向细胞外环境,存在于受体样激酶(RLK)或受体样蛋白(RLP)中,具体取决于受体胞质侧是否存在C端激酶结构域^[11]。Lee等^[12]研究了巨噬细胞中含有NACHT、LRR和PYD结构域的蛋白3(NLRP3)炎症小体,发现NLRP3或半胱天冬酶-1敲除后,巨噬细胞促进黑色素瘤细胞迁移和侵袭的能力大大降低,用NLRP3炎症小体抑制剂 celastrol 处理降低了巨噬细胞刺激黑色素瘤细胞迁移和侵袭的效力,但是否LRR基序发挥了主要作用还有待研究。据Adamu等^[13]报道,MBOVPG45_0565基因与牛支原体黏附宿主有关,该基因编码的mbfN蛋白存在LRR基序,但是否因为含有LRR基序才得以发挥黏附功能

尚不清楚。在比对了基因、分析了结构、封闭了蛋白后,证明了LRR5蛋白可以介导牛支原体入侵宿主细胞,但LRR基序具体发挥了何种作用还需后续深入研究。

由于支原体的基因组简单、缺乏细胞壁、生物合成的能力有限、缺乏可用于基因组编辑和严格监管的工具,这使得支原体在遗传操作上无法获得有效的进展,阻碍了对牛支原体致病机制的理解。Piñero-Lambea等^[14]开发了一种基于GP35的寡核苷酸重组系统,通过点突变在*Mp*中取得良好的效果;同时报告了一种与基于CRISPR/Cas9的*Mp*反选择偶联的重组技术GP35-CRISPR/Cas9系统,该系统进行基因编辑不会留下任何痕迹,因此可以在不需要选择标记回收的情况下进行迭代轮次。这为支原体的遗传编辑提供了新的策略,将重组酶GP35应用在牛支原体定向基因操作的研究中,或许是一种极有潜力的研究方向。此外,Klose等^[15]和Mahdizadeh等^[16]利用CRISPR/Cas系统将*ksgA*靶基因以及*mnuA*靶基因替换成春日霉素抗性基因以此对*MG*进行了定向诱变,研究发现*Mp*和*M.b*中的主要核酸酶由*mnuA*基因编码,该基因的直系同源物存在于*MG*基因组中。由于支原体中许多基因的功能未知、用于靶向诱变的工具有限,所以CRISPR/Cas系统尚未成功用于支原体基因组的靶向操作等,但牛支原体似乎可以借鉴*MG*的遗传操作,能否成功有待研究。转座子作为支原体的宝贵遗传工具,Lan等^[17]构建了转座子突变体库并结合高通量筛选了34个新黏附相关基因,其中突变了牛支原体LPPB蛋白后牛支原体对EBL细胞的黏附下降,随后被证实LPPB为牛支原体黏附关键因子,可作为牛支原体潜在治疗和疫苗靶点。尽管已有一些相关报道,但目前仍无高效且稳定成熟的遗传操作系

统,对于基因敲除株的构建存有一定难度,因此,本研究目前未能成功构建 *MBOVPG45_0564* 基因的敲除菌株,实现该基因的敲除。

入侵作为重要的致病机制和免疫逃避机制,其作用机制在其他细菌上有所报道,但在牛支原体上尚不清晰。李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM) CICC 21635 黏附和侵袭吞噬细胞和非吞噬细胞的能力是其发病机制的一个重要方面,其中内化素 A (InlA)和内化素 B (InlB)在入侵过程中发挥作用。InlA 结合 E-钙黏蛋白后可将 β 连环蛋白和 α 连环蛋白招募到细菌侵入位点,又与肌动蛋白结合进而触发肌动蛋白的聚合;InlB 结合肝细胞生长因子受体 Met, 通过诱导 Gab1、Cbl 和 Shc 等一些调节蛋白的招募,活化位于质膜的磷酸肌醇-3 激酶(PI3K), 调节上游肌动蛋白的重排, 以此介导内吞作用诱导细菌摄取^[18]; 另外, LM 还可依靠网格蛋白依赖性内化机制完成侵袭。研究发现, InlA 和 InlB 都含有 LRR 基序, InlA 由一个 N 末端帽、一个富含亮氨酸的重复结构域(LRR)和一个 Ig 样重复结构域组成, 后跟 3 个间隔结构域以允许在细胞表面呈递, InlA 的受体通过其 LRR 结构域的凹面结合 E-钙黏蛋白^[19]; 哺乳动物细胞活性可通过 InlB 结构域引发, 该结构域由成熟的 595 残基蛋白(67 kDa)的 N 末端 213 残基(24 kDa)组成, 包含了 InlB 的 LRR 区域, InlB 是通过与 PI3 激酶的膜定位有关的衔接蛋白的 InlB 刺激酪氨酸磷酸化, 进而激活宿主细胞内的磷酸肌醇 PI3 激酶诱导吞噬作用, PI3 激酶参与包括影响肌动蛋白聚合在内的许多信号事件, 因此, 该结构域对于激活 PI3 激酶和影响细胞骨架变化既必要又充分, LRR 结构域也足以诱导吞噬作用^[20]。因此, LM 的入侵方式可能也适用于牛支原体, 这将会在后期进行研究。此时, 鉴定牛支原体与入侵有关的基因对机制的研究、产生新的疫苗和疗法至关重要

要,本研究以期牛支原体致病机制和免疫逃避机制的研究奠定基础提供方向,为牛支原体疫苗的研发提供靶点。

本研究成功表达了牛支原体 LRR5 蛋白,制备了多克隆抗体,通过抗体封闭实验及可视化观察初步探究了 LRR5 蛋白与牛支原体入侵过程相关的功能;通过偶联荧光微球后透射电镜、激光共聚焦显微镜及高内涵活细胞成像系统的观察,证明了 LRR5 蛋白具有入侵宿主细胞 EBL 的能力。综上所述, *MBOVPG45_0564* 基因是介导牛支原体入侵宿主的关键基因, 编码的 LRR5 蛋白是关键蛋白。

致谢

感谢中国农业科学院兰州兽医研究所中心仪器室提供的电镜技术支持。

参考文献

- [1] POHJANVIRTA T, VÄHÄNIKKILÄ N, MUTIKAINEN M, LINDBERG H, PELKONEN S, PEIPPO J, AUTIO T. Transmission of *Mycoplasma bovis* infection in bovine *in vitro* embryo production[J]. *Theriogenology*, 2023, 199: 43-49.
- [2] NISHI K, GONDAIRA S, FUJIKI J, KATAGATA M, SAWADA C, EGUCHI A, IWASAKI T, IWANO H, HIGUCHI H. Invasion of *Mycoplasma bovis* into bovine synovial cells utilizing the clathrin-dependent endocytosis pathway[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 253: 108956.
- [3] XU QY, PAN Q, WU Q, XIN JQ. *Mycoplasma bovis* adhesins and their target proteins[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1016641.
- [4] 季文恒, 陈胜利, 赵萍, 郝华芳, 王展慧, 刘永生, 储岳峰. 牛支原体致病机理的研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(4): 361-367.
JI WH, CHEN SL, ZHAO P, HAO HF, WANG ZH, LIU YS, CHU YF. Research progress on pathogenic mechanism of *Mycoplasma bovis*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40(4): 361-367 (in Chinese).

- [5] LIAO YT, PENG KL, LI X, YE YY, LIU P, ZENG YH. The adhesion protein of *Mycoplasma genitalium* inhibits urethral epithelial cell apoptosis through CypA-CD147 activating PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(19): 6657-6669.
- [6] KRISHNAN M, KANNAN TR, BASEMAN JB. *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin is internalized via clathrin-mediated endocytosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62706.
- [7] VOGL G, PLAICKNER A, SZATHMARY S, STIPKOVITS L, ROSENGARTEN R, SZOSTAK MP. *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(1): 71-77.
- [8] ENKHBAYAR P, KAMIYA M, OSAKI M, MATSUMOTO T, MATSUSHIMA N. Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins[J]. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, 2003, 54(3): 394-403.
- [9] TAKKOUCHE A, QIU XR, SEDOVA M, JAROSZEWSKI L, GODZIK A. Unusual structural and functional features of TpLRR/BspA-like LRR proteins[J]. *Journal of Structural Biology*, 2023, 215(3): 108011.
- [10] WANG YX, GUO Y, HU JJ, BAO ZM, ZHOU B, WANG MQ. An LRR domain-containing membrane protein gene in rotifer *Brachionus plicatilis*: sequence feature, expression pattern, and ligands binding activity[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2023, 141: 104634.
- [11] MARTIN EC, SUKARTA OCA, SPIRIDON L, GRIGORE LG, CONSTANTINESCU V, TACUTU R, GOVERSE A, PETRESCU AJ. LRRpredictor-a new LRR motif detection method for irregular motifs of plant NLR proteins using an ensemble of classifiers[J]. *Genes*, 2020, 11(3): 286.
- [12] LEE HE, LEE JY, YANG G, KANG HC, CHO YY, LEE HS, LEE JY. Inhibition of NLRP3 inflammasome in tumor microenvironment leads to suppression of metastatic potential of cancer cells[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 12277.
- [13] ADAMU JY, MITIKU F, HARTLEY CA, SANSOM FM, MARENDA MS, MARKHAM PF, BROWNING GF, TIVENDALE KA. *Mycoplasma bovis* mbfN encodes a novel LRR lipoprotein that undergoes proteolytic processing and binds host extracellular matrix components[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 203(2): e00154-20.
- [14] PIÑERO-LAMBEA C, GARCIA-RAMALLO E, MARTINEZ S, DELGADO J, SERRANO L, LLUCH-SENAR M. *Mycoplasma pneumoniae* genome editing based on oligo recombineering and Cas9-mediated counterselection[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(7): 1693-1704.
- [15] KLOSE SM, WAWEGAMA N, SANSOM FM, MARENDA MS, BROWNING GF. Efficient disruption of the function of the mnuA nuclease gene using the endogenous CRISPR/Cas system in *Mycoplasma gallisepticum*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2022, 269: 109436.
- [16] MAHDIZADEH S, SANSOM FM, LEE SW, BROWNING GF, MARENDA MS. Targeted mutagenesis of *Mycoplasma gallisepticum* using its endogenous CRISPR/Cas system[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 250: 108868.
- [17] LAN SM, LI ZC, HAO HF, LIU S, HUANG ZC, BAI YT, LI YZ, YAN XM, GAO PC, CHEN SL, CHU YF. A genome-wide transposon mutagenesis screening identifies LppB as a key factor associated with *Mycoplasma bovis* colonization and invasion into host cells[J]. *FASEB Journal*, 2023, 37(10): e23176.
- [18] SEVEAU S, PIZARRO-CERDA J, COSSART P. Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion[J]. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1167-1175.
- [19] YAMAZAKI T, NAGATOISHI S, YAMAWAKI T, NOZAWA T, MATSUNAGA R, NAKAKIDO M, CAAVEIRO JMM, NAKAGAWA I, TSUMOTO K. Anti-InlA single-domain antibodies that inhibit the cell invasion of *Listeria monocytogenes*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(10): 105254.
- [20] MARINO M, BRAUN L, COSSART P, GHOSH P. Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*[J]. *Molecular Cell*, 1999, 4(6): 1063-1072.