

刘晓艳, 王永飞, 邓博文, 等. 绵羊肺炎支原体核糖体蛋白 30S *rpsE* 基因的原核表达及多克隆抗体的制备 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 78-84.

LIU X Y, WANG Y F, DENG B W, et al. Prokaryotic expression of *Mycoplasma ovipneumoniae* ribosomal protein 30S *rpsE* gene and preparation of its polyclonal antibody [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 78-84.

## 绵羊肺炎支原体核糖体蛋白 30S *rpsE* 基因的原核表达及多克隆抗体的制备

刘晓艳<sup>1,2</sup>, 王永飞<sup>1,2</sup>, 邓博文<sup>1,2</sup>, 哈尔勒哈·阿曼太<sup>1,2</sup>, 蔡江<sup>1,2</sup>, 李有文<sup>1,2\*</sup>

(1. 塔里木大学动物科学与技术学院, 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300;

2. 新疆生产建设兵团南疆动物疫病诊断与防控工程实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

**摘要:** 旨在了解绵羊肺炎支原体 (*Mycoplasma ovipneumoniae*) 30S *rpsE* 蛋白的生物学特性及其蛋白免疫原性。用在线分析软件预测 30S *rpsE* 蛋白的理化性质、B 细胞抗原表位、糖基化位点、二级结构及三级结构等; 采用 PCR 方法从病羊鼻拭子样品中扩增得到 30S *rpsE* 基因片段, 经 *Nde* I、*Xho* I 酶切纯化后, 将其连接到 pET-42b 载体上, 构建原核表达载体 pET-42b-30S *rpsE*, 使用不同浓度 IPTG 诱导蛋白在大肠杆菌 BL21 中表达; 重组蛋白通过 SDS-PAGE 和 Western blot 进行鉴定, 用镍层析法纯化蛋白后, 与弗氏佐剂 1:1 混合注射免疫家兔, 然后采取全血, 检测血清抗体效价及特异性。结果: 经预测 30S *rpsE* 蛋白是亲水无信号肽的膜外蛋白, 无跨膜结构域, 有一个糖基化位点; 成功构建了原核表达载体 pET-42b-30S *rpsE*, 表达的重组蛋白分子量约为 25.9 ku, 以包涵体和可溶性的形式存在; 免疫家兔后血清抗体效价为 1:25 600, 证实 30S *rpsE* 蛋白具有较好的免疫原性。

**关键词:** 肺炎支原体; 30S *rpsE* 基因; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S852.62 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)07-0078-07

## Prokaryotic expression of *Mycoplasma ovipneumoniae* ribosomal protein 30S *rpsE* gene and preparation of its polyclonal antibody

LIU Xiaoyan<sup>1,2</sup>, WANG Yongfei<sup>1,2</sup>, DENG Bowen<sup>1,2</sup>, HAERLEHA · Amantai<sup>1,2</sup>, CAI Jiang<sup>1,2</sup>, LI Youwen<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology Corps of Xinjiang Production and Construction Corps, College of Animal Science and Technology, Tarim University, Alaer 843300, China;

2. Engineering Laboratory for Diagnosis and Prevention and Control of Animal Diseases in South Xinjiang, Xinjiang Production and Construction Corps, Alaer 843300, China)

**Abstract:** The study aimed to understand the biological characteristics of *Mycoplasma ovipneumoniae* ribosomal protein 30S *rpsE* and its protein immunogenicity. The physicochemical properties of the recombinant protein, its B-cell antigenic epitopes, glycosylation sites, secondary and tertiary structures were predicted based on an online analysis software. The gene fragment of 30S *rpsE* was obtained by PCR amplification, and after *Nde* I and *Xho* I digestion, it was ligated to pET-42b, and the prokaryotic expression vector pET-42b-30S *rpsE* was prepared, and the protein was induced to be expressed in BL21 bacterium using different concentrations of gradient IPTG. Recombinant proteins were identified by SDS-PAGE and Western blot, and the adjuvants were mixed with the recombinant proteins and were immunized, while their sera were collected later and the antiserum potency and specificity were measured. The results showed that the 30S *rpsE* protein was predicted to be a hydrophilic, signal peptide-free, extramembrane protein with no transmembrane structural domains but one glycosylation site. The prokaryotic expression vector pET-42b-30S *rpsE* was successfully prepared, and the recombinant protein expressed had a relative molecular weight of about 25.9 ku, which could exist in BL21 bacteria as inclusion bodies and soluble forms. The antiserum titer was 1:25 600 after immunization of rabbits, confirming the good immunogenicity of 30S *rpsE*.

**Keywords:** *Mycoplasma ovipneumoniae*; 30S *rpsE* gene; prokaryotic expression; polyclonal antibody

收稿日期: 2023-12-07; 修回日期: 2024-04-25

基金项目: 新疆生产建设兵团区域创新基金项目 (2021BB014); 塔里木大学校长基金项目 (TDZKCX202305)

第一作者: 刘晓艳, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 李有文, 博士, 教授, 研究方向为预防兽医学, E-mail: lyw\_lk@163.com。

绵羊肺炎支原体 (*Mycoplasma ovipneumoniae*) 可引起绵羊、山羊呼吸道传染病, 临床表现以咳嗽、消瘦及肺间质性、增生性胸膜肺炎为特征, 同时动物中的多种疾病综合征也与支原体相关, 如乳腺炎、多关节炎及生殖障碍等<sup>[1]</sup>。早在 1963 年 Mackey 从绵羊体内分离得到绵羊肺炎支原体, 我国胡景韶等于 1982 年首次报道从四川某羊场分离出绵羊肺炎支原体, 而后中国云南、新疆、宁夏等地陆续有关于绵羊肺炎支原体感染的病例报道, 目前该病在全国广泛流行, 成为规模化羊场最重要的传染病之一, 其死亡率可高达 70%, 给养殖场 (户) 造成较大经济损失<sup>[2]</sup>。此外, 健康绵羊带菌也存在较大隐患<sup>[3]</sup>。有研究表明, 支原体对宿主呈慢性和渐进性感染, 当肺炎支原体入侵机体后, 可逃避机体免疫系统的防御和清除作用, 从而黏附在肺脏组织内难以彻底清除, 导致机体更容易遭受其他病原体的攻击, 如被巴氏杆菌、曼氏杆菌、肺炎链球菌等一种或多种病原混合感染<sup>[2,4]</sup>。由于支原体体外培养要求高, 且菌体产量低, 给支原体病的预防带来较大困难。许多学者开始致力于新型疫苗的研发, 例如筛选较好的保护性抗原, 研发基因工程疫苗等<sup>[4-7]</sup>。

核糖体是细胞生长和增殖的基石, 其中核糖体蛋白 (ribosomal protein, RP) 在蛋白质翻译和生物合成中起着关键作用, 此外 RP 也参与 DNA 的损伤修复以及细胞的生长调控等生理过程, 核糖体的基本结构和功能从细菌到人类的整个进化过程中高度保守<sup>[8-10]</sup>。例如 RPS29 是核糖体小亚基上的蛋白, 其氨基酸序列在白纹伊蚊和致倦库蚊等蚊种中完全一致, 在进化上保守。根据来源, RP 分为 RPL (来自大亚基) 和 RPS (来自小亚基)。根据亚细胞定位的结果显示, 绵羊 RPS20 蛋白可能在细胞质中发挥重要生物学作用<sup>[11-12]</sup>。前期学者研究发现核糖体蛋白 S5 (RPS5 或 rpsE) 的表达水平与杯状病毒 (calicivirus) 的翻译和复制呈明显的正相关性, 绵羊肺炎支原体的核糖体蛋白 30S rpsE 属于核糖体小亚基蛋白<sup>[13]</sup>, 其免疫原性的研究未见报道。

本试验通过 Expasy 等在线软件预测 30S rpsE 的亲水性, 并通过在线网站对其表达蛋白进行生物学分析, 包括二级结构预测分析、三级结构预测分析、磷酸化位点、糖基化作用位点分析以及 B 细胞抗原表位预测等, 并对表达的重组蛋白 30S rpsE 进行反应原性和免疫原性分析, 证实 RP 30S rpsE 是绵羊肺炎支原体的重要抗原, 为绵羊肺炎支原体基因工程疫苗的研发和有效诊断方法的建立提供了一个有潜在价值

的候选抗原。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、载体和试验动物

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3), 绵羊肺炎支原体菌株以及 pET-42b 载体为塔里木大学畜牧科技重点实验室保存; 家兔购自塔里木大学动物科学与技术学院合作实验动物中心。

### 1.2 主要试剂

T4 连接酶, 限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I, Ni-NTA 亲和层析介质, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的 His 单克隆抗体, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 均购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒小提试剂盒、通用型 DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; 弗氏不完全佐剂和弗氏完全佐剂购自 Sigma-Aldrich 公司; SDS-PAGE 胶、IPTG 由本实验室自制。

### 1.3 生物信息学分析

参照 NCBI 中编码核糖体蛋白 30S rpsE 基因的碱基序列 (登录号: NZ\_AGRE 01000075.1)。通过 ExPasy 软件在线预测 (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 30S rpsE 的物理性质、亲水性指数 (Hydrophilicity plot); 利用 Novopro (signalP - 5.0) 在线软件 (<https://www.novopro.cn/tools/signalp.html>) 和 TMHMM 2.0 在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测 30S rpsE 蛋白的信号肽位点及蛋白的跨膜结构; 通过 NetPhos - 3.1 在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 预测 30S rpsE 蛋白磷酸化位点; 通过 NetNGlyc-1.0 在线分析软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>) 预测 30S rpsE 蛋白糖基化位点; 通过在线网址 (<http://tools.iedb.org/bcell/>) 预测 30S rpsE 蛋白 B 细胞抗原表位; 利用 SOPMA 在线软件 ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)) 对 30S rpsE 蛋白的二级结构进行预测; 通过 SWISS-MODEL 在线软件 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测 30S rpsE 蛋白三级结构<sup>[14-15]</sup>。

### 1.4 30S rpsE 基因引物设计及合成

参照 GenBank 中公布的绵羊肺炎支原体核糖体蛋白 30S rpsE 基因全长序列, 使用 SnapGene 软件设计 rpsE 上、下游引物, 分别加入 *Nde* I、*Xho* I 酶切位点, 所设计引物序列送往生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 扩增 *rpsE* 基因所需引物设计

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp	位切酶
rpsE-P1	GGAATTC <u>CATATG</u> ATGGATACAAATCTTCAAATAAAC	630	<i>Nde</i> I
rpsE-P2	CCGCTC <u>GAGT</u> TTTTTTTTGGGCTAAACTTGTGAA		<i>Xho</i> I

注：下划线为酶切位点。

### 1.5 30S *rpsE* 基因的克隆及原核表达载体的构建

用实验室提供的阳性样品模板，PCR 扩增 *rpsE* 基因。PCR 体系 (20  $\mu$ L)：上下游引物各 0.5  $\mu$ L，去离子水 8  $\mu$ L，肺炎支原体基因组 1  $\mu$ L，2 $\times$ Easy Taq Mix 酶 10  $\mu$ L。PCR 程序设置为：94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min；94  $^{\circ}$ C 变性 30 s，57  $^{\circ}$ C 退火 30 s，72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s，35 个循环；72  $^{\circ}$ C 再延伸 8 min。将 30S *rpsE* 的胶回收产物和 pET-42b 载体分别经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切。将酶切后空载体 pET-42b 和纯化的 30 *rpsE* 基因酶切片段连接，转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞，阳性重组质粒送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

### 1.6 30S *rpsE* 重组蛋白的表达

鉴定比对正确的 pET-42b-30S *rpsE* 质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞，获得重组菌 pET-42b-30S *rpsE*-BL21 (DE3)。挑取单菌落接种于 5 mL 的含有硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中，在 37  $^{\circ}$ C 恒温摇床 (180 r/min) 中振荡培养至菌液  $OD_{600}$  值达到 0.4~0.6 时，加入不同终浓度的 IPTG (0.2、0.5、1、1.5 和 2 mmol/L) 诱导表达。验证 30S *rpsE* 蛋白的表达形式，将 2 mL 重组菌液 12 000 r/min 离心 1 min，离心收集菌体，PBS 重悬，冰浴下超声破碎，破碎结束后 5 000 r/min 离心 5 min，分别收集上清液和沉淀，加入 6 $\times$ Protein Buffer，煮沸，进行 SDS-PAGE，拍照记录结果。

### 1.7 30S *rpsE* 蛋白的 Western blot 鉴定

重组蛋白 SDS-PAGE 结束后，通过转膜仪将胶上的蛋白转印至 NC 膜，转膜结束后用 5% 脱脂奶粉 4  $^{\circ}$ C 过夜封闭，结束后用 TBST 漂洗 3 次；以小鼠抗 His 标签的一抗 (1 : 1 500) 孵育 2 h，洗涤方法同上；羊抗鼠 IgG 抗体 (1 : 5 000) 为二抗，在室温振荡孵育 1 h，洗涤方法同上；ECL 显色记录结果。

### 1.8 重组 30S *rpsE* 蛋白纯化

按优化好的条件诱导表达，将 pET-42b-30S *rpsE* 重组质粒经大量诱导表达后，使用镍柱亲和介质进行 30S *rpsE* 重组蛋白纯化，分别取用含 25、100、250 和 500 mmol/L 的咪唑洗涤梯度洗脱；洗脱完成后，超滤浓缩去除咪唑，核酸蛋白检测仪测定浓度，SDS-PAGE 分析目的蛋白纯化效果，而后将其分装，-80  $^{\circ}$ C 冻存备用。

### 1.9 抗 *rpsE* 蛋白多克隆抗体的制备

选取 1 月龄的健康家兔，免疫以背部多点皮下注射的方式进行。将弗氏完全佐剂与纯化后的 30S *rpsE* 蛋白按照 1 : 1 的比例混合乳化 (呈油包水状，且在水中不扩散)，然后每只家兔免疫 2 mL (含 *rpsE* 蛋白 300  $\mu$ g)。分别在首免后 7、14 和 28 d，以相同蛋白量与弗氏不完全佐剂 1 : 1 比例混合乳化进行二免、三免和四免。免疫前耳缘静脉采血，分离血清；免疫结束后第 7 天进行心脏采血，分离血清。

### 1.10 多克隆抗体效价测定

采用间接 ELISA 方法测定家兔抗 30S *rpsE* 多克隆抗体效价。将纯化的 30S *rpsE* 重组蛋白作为抗原，用包被液稀释至 0.3  $\mu$ g/mL，每孔 100  $\mu$ L，4  $^{\circ}$ C 过夜包被 ELISA 板，PBST 洗板 3 次；将制备的家兔抗 30S *rpsE* 多克隆抗体进行 2 倍梯度稀释 (1 : 200 ~ 1 : 12 800) 作为一抗，37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h，PBST 洗 3 次；洗涤后每孔加入 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗家兔 IgG，100  $\mu$ L/孔，37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h；洗涤结束后，显色液室温避光显色 10 min，加入终止液 50  $\mu$ L/孔终止反应，酶标仪检测  $OD_{450}$  值。当阳性血清  $OD_{450}$  值 ( $P$ ) / 阴性血清  $OD_{450}$  值 ( $N$ ) > 2.0、 $N < 1$  时判为阳性，以阳性血清最大稀释倍数为多克隆抗体的效价。

### 1.11 多克隆抗体的 Western blot 分析

将目的蛋白用转膜仪转印至 NC 膜，方法同 1.7；以制备的多克隆抗体为一抗 (1 : 100) 孵育 2 h，用 TBST 洗膜 3 次；加入 HRP 标记的山羊抗家兔 IgG (1 : 10 000) 孵育 2 h，重复上述洗涤步骤。结束后进行 ECL 显色，采用成像仪器成像后拍照。

## 2 结果

### 2.1 生物信息学分析

#### 2.1.1 30S *rpsE* 蛋白理化性质的预测及蛋白抗原表位预测

根据 ExPASy 分析结果可知：30S *rpsE* 基因 CDS 全长 630 bp，G+C 含量为 38%，无 TGA 密码子，分子式为  $C_{1027}H_{1724}N_{322}O_{297}S_1$ 。30S *rpsE* 蛋白氨基酸数量为 209 个，理论等电点为 10.94，序列的 N 端是甲硫氨酸 (Methionine)，平均不稳定指数为 24.99，总平均亲疏水性是 -0.711，变化趋势如图 1。根据在线软

件 Novopro (signalP-5.0) 和 TMHMM 2.0 预测结果显示: 30S rpsE 蛋白预测有信号肽的概率为 0.967%, 其为膜外蛋白无跨膜结构域。经 NetPhos-3.1 软件和 NetNGlyc-1.0 软件预测, 30S rpsE 蛋白共有 29 个潜在的磷酸位点, 其中有 12 个丝氨酸位点, 12 个苏氨酸位点, 5 个酪氨酸位点, 有 1 个 N-糖基化位点 (预测值>0.5), 于第 200 位。根据预测结果显示 30S rpsE 蛋白有 6 个抗原表位 (图 2), 依次为 LQNK-PVQQKTNQNSQNQKQLTPKEANRQRPRARQKPKKEK-NFRPEFEE (5~52 aa, 长度为 48 aa), KVVKGGR (62~69 aa, 长度为 8 aa), VSVPIYRRS (111~119 aa, 长度为 9 aa), RGKG (141~144 aa, 长度为 4 aa), YGSR (168~171 aa, 长度为 4 aa) 和 TINQI-AELRDLNPSQVLA (189~206 aa, 长度为 18 aa)。

### 2.1.2 30S rpsE 蛋白结构预测

应用 SOPMA 软件预测结果显示 30S rpsE 蛋白的 4 种结构及其占比为:  $\alpha$ -螺旋 33.97%、延伸链 16.75%、 $\beta$ -转角 5.74%、无规卷曲 43.54%, 以无规卷曲和  $\alpha$ -螺旋为主, 延伸链次之,  $\beta$ -转角相对较少, 各结构在氨基酸序列中的分布如图 3。根据 SWISS-MODEL 在线软件预测结果显示, 30S rpsE 蛋白与来源于猪支原体菌株 strain J/ATCC 25934/NCTC 10110 的小核糖体亚基蛋白 uS5\_MESHJ (基因: *rpsE*) 模型序列相似度达 75.96%, 结构如图 4 所示。

### 2.2 30S rpsE 基因的克隆

以实验室采集的绵羊肺炎支原体阳性样本为模板, *rpsE*-P1/*rpsE*-P2 为引物进行 PCR 扩增, 结果得到一条与预期结果大小 (630 bp) 相符的特异性条带, 如图 5 所示。

### 2.3 重组质粒 pET-42b-30S rpsE 的鉴定

PCR 鉴定阳性的菌液提取质粒后, PCR 扩增得到一条 630 bp 左右的条带, 重组质粒经双酶切后,

结果如图 (图 6)。根据测序结果进行 NCBI 原序列比对, 核糖体 30S rpsE 蛋白的基因序列与绵羊肺炎支原体菌株 MoS932N22A (登录号: CP134943.1), ATCC29419 菌株 (Y98, 登录号: CP118522.1) 和 NCTC10151 (登录号: LR215028.1) 等参考株之间同源性达 95% 及以上, 发现有 27 个碱基突变, 未突变为 TGA 密码子可以正常表达。

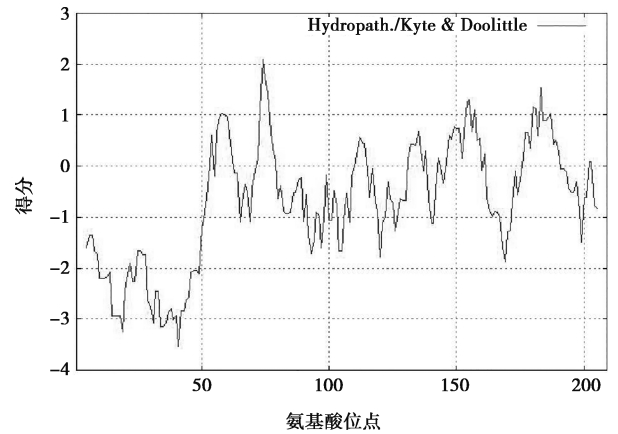


图 1 30S rpsE 蛋白亲疏水性预测

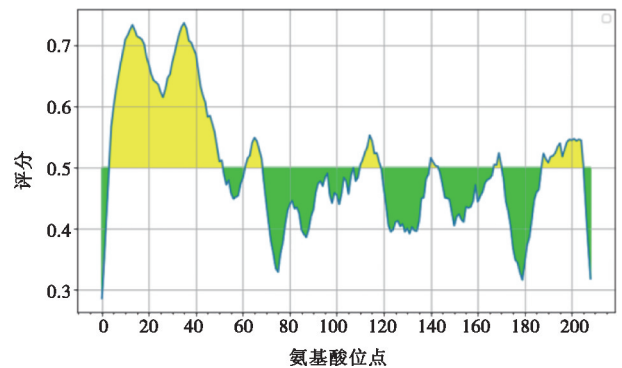


图 2 30S rpsE 蛋白 B 细胞抗原表位预测

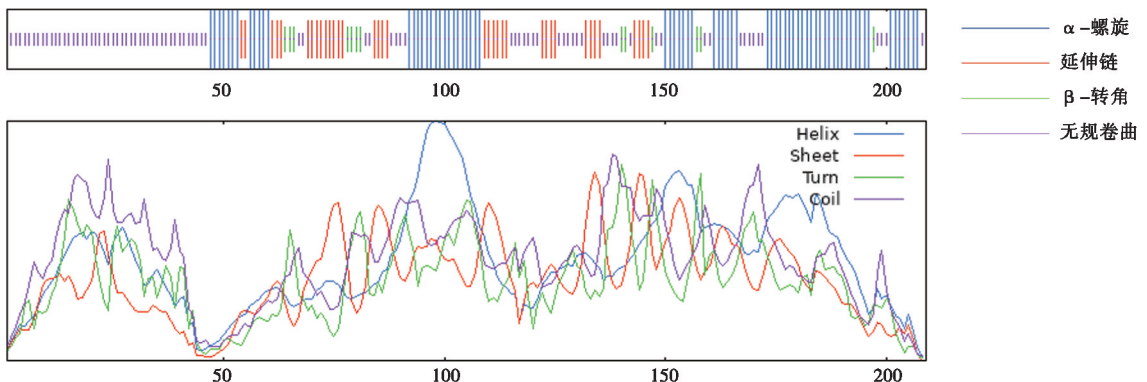
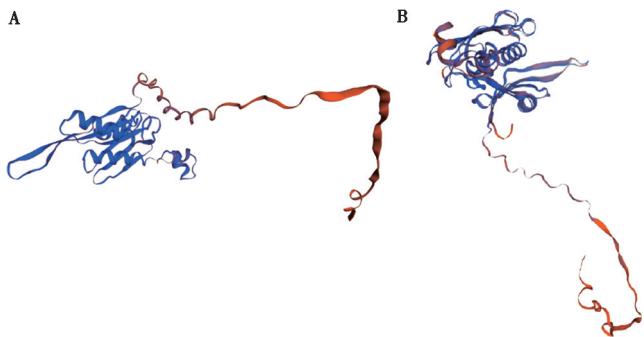
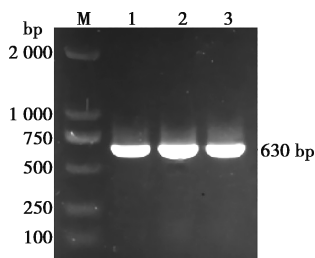


图 3 30S rpsE 蛋白二级结构预测



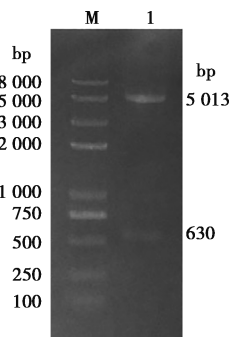
注：A、B 为不同角度三维结构图像。

图 4 30S rpsE 蛋白三级结构预测



M. DL2000 DNA Marker; 1~3. 30S rpsE 扩增产物。

图 5 肺炎支原体核糖体 30S rpsE 基因 PCR 扩增

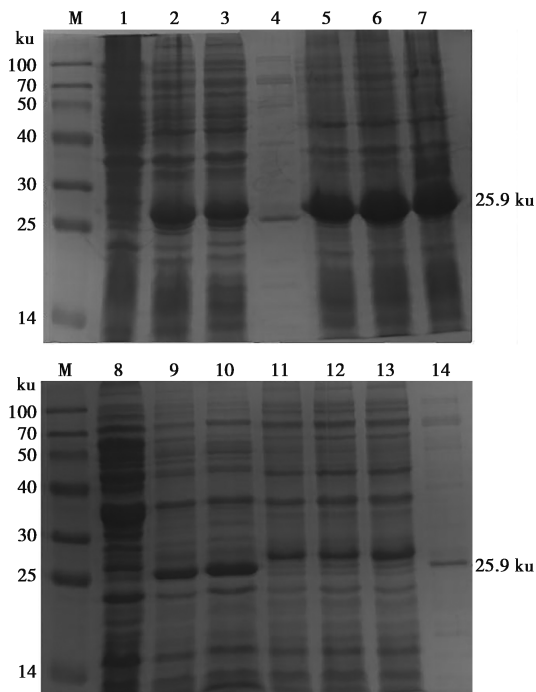


M. DL8000 DNA Marker; 1. pET-42b-30S rpsE 双酶切产物。

图 6 重组质粒 pET-42b-30S rpsE 的 PCR 双酶切鉴定

### 2.4 重组蛋白的诱导表达

对构建的重组表达质粒 pET-42b-30S rpsE 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 感受态细胞后的菌液进行 IPTG 浓度梯度诱导表达, 在 SDS-PAGE 凝胶上出现大小约为 25.9 ku 的条带 (见图 7), 与预测的目的产物大小一致。在重组菌体超声破碎上清液中观察到目的条带 (25.9 ku 处), 低浓度 IPTG 诱导在上清液和沉淀中均有表达, 选用 IPTG 终浓度为 1 mmol/L 大量诱导表达, 破碎后, 经 His-镍柱亲和和层析树脂纯化后, 目的蛋白成功表达并以可溶性形式和包涵体存在。

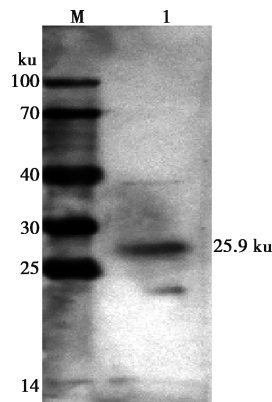


M. 蛋白 Marker; 1. 诱导表达前离心后沉淀总蛋白; 2~3、5~7. 分别为 IPTG 终浓度 0.2、0.5、1、1.5 和 2 mmol/L 诱导离心后沉淀; 4. His-镍柱亲和和层析树脂纯化后的重组蛋白 (包涵体); 8. 诱导表达前离心后上清液总蛋白; 9~13. 分别为 IPTG 终浓度 0.2、0.5、1、1.5 和 2 mmol/L 诱导离心后上清液; 14. His-镍柱亲和和层析树脂纯化后的重组蛋白 (可溶性蛋白)。

图 7 重组 30S rpsE 蛋白最佳 IPTG 诱导浓度的筛选 (沉淀、上清液、纯化蛋白)

### 2.5 重组蛋白的 Western blot 鉴定

采用镍亲和层析柱纯化得到大量纯化的蛋白, 对重组蛋白 30S rpsE 进行 Western blot 鉴定, 显色条带大小约为 25.9 ku, 证明重组蛋白得到正确表达 (见图 8)。



M. 蛋白 Marker; 1. 纯化蛋白。

图 8 重组蛋白 30S rpsE 的 Western blot 鉴定

## 2.6 30S rpsE 蛋白多克隆抗体的制备及效价测定

包被抗原为纯化后的 30S rpsE 重组蛋白，采用间接 ELISA 法测定四免后的兔抗多克隆抗体的效价。根据判定标准，表明制备的兔抗 30S rpsE 蛋白多克隆抗体效价可达 1 : 25 600，如图 9。

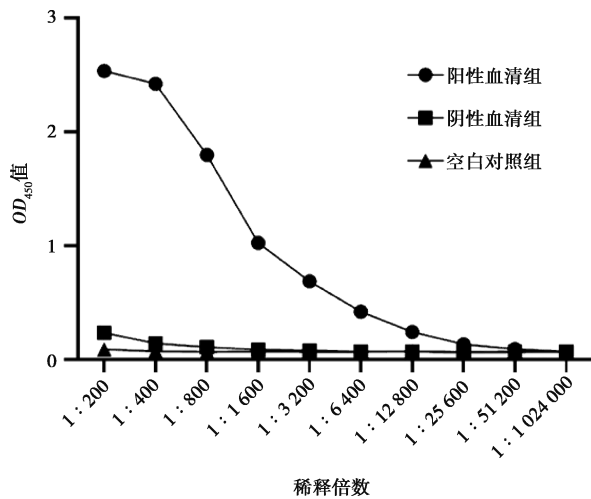
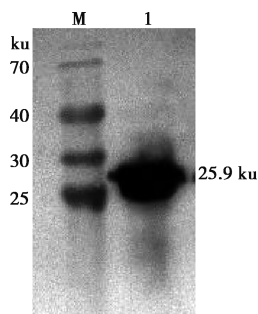


图9 兔抗 30S rpsE 多克隆抗体效价的测定

## 2.7 Western blot 检测抗 30S rpsE 多克隆抗体特异性

Western blot 检测结果如图 10 所示，在分子 25 ku 左右显现特异条带，表明兔抗重组蛋白 30S rpsE 多克隆抗体可识别重组蛋白，且特异性较好。



M. 蛋白 Marker; 1. 30S rpsE 纯化蛋白。

图10 Western blot 检测抗 30S rpsE 多克隆抗体特异性

## 3 讨论

绵羊肺炎支原体可引起绵羊呼吸系统疾病，可从患有肺炎的绵羊肺、气管和鼻中分离，偶尔从眼睛中分离，也可在健康绵羊的呼吸道中发现，它是以支气管上皮细胞定殖增生为主的病原体，感染引起的肺炎会导致动物出现严重的健康问题，从而造成经济损失<sup>[16-17]</sup>。根据现有研究结果推测，绵羊肺炎支原体

的致病性和荚膜多糖、体内毒素、膜蛋白、代谢产物等有很大的关系，其中支原体黏附素通常为单纯蛋白质或糖蛋白，是一种特殊的毒力因子<sup>[18-19]</sup>。田彤彤等<sup>[20]</sup>通过提取、纯化绵羊肺炎支原体荚膜多糖，同时利用荚膜多糖拮抗特异性血清的特性，证实了绵羊肺炎支原体 GH3-3 的荚膜多糖具有良好的反应原性。由 *tuf* 基因编码的菌体膜蛋白在绵羊肺炎支原体中大量存在<sup>[21]</sup>，陈思宇等<sup>[22]</sup>纯化出重组 EF-Tu 蛋白，并以其作为检测抗原，建立绵羊肺炎支原体抗体间接 ELISA 检测方法，敏感性和灵敏度都较好。研究发现，多种肿瘤与核糖体表达异常相关，*rps5* (*rpsE*) 在肝癌中高表达，而在结肠癌中低表达 *rps5*<sup>[23]</sup>；*rps5* 还有核糖体外功能，如连接病毒、调控细胞分化凋亡等<sup>[24]</sup>。关于核糖体蛋白基因 30S rpsE 在绵羊肺炎支原体如何发挥作用，以及是否可以作为优势抗原还有待研究。

抗原的变异性也是损害疫苗保护效力的一个因素，故而筛选候选抗原也应考虑抗原的保守性，根据测序结果进行基因序列比对，核糖体 30S rpsE 蛋白基因序列与绵羊肺炎支原体菌株等参考株之间同源性达 95% 及以上，说明 30S rpsE 在进化过程中相对保守，具有成为绵羊肺炎支原体抗原的潜质。通过在线网址进行预测糖基化、磷酸化位点等无较大差异。信号肽主要作用是促进蛋白分泌到胞外，通常较为疏水，需要在蛋白表达前对序列进行预测，根据结果对信号肽进行删除或替换，根据预测结果 30S rpsE 蛋白有信号肽的概率为 0.967%，亲水性较好，有一个糖基化位点。在生产能量和蛋白质的可变表面膜脂蛋白的恒定供应中，碳水化合物的吸收和代谢起着重要作用，当吸收代谢出现障碍时会促进支原体从宿主体液防御系统中逃逸，并在宿主体内的各种位置增殖。

30S rpsE 蛋白是存在于绵羊肺炎支原体菌株中的核糖体小亚基蛋白，目前有关绵羊肺炎支原体 30S rpsE 蛋白的功能以及免疫原性的研究罕见报道。为了研究其抗原性，本试验先对绵羊肺炎支原体核糖体 30S rpsE 基因进行生物信息学分析，而后构建其表达载体，成功表达了核糖体 30S rpsE 重组蛋白。根据对 30S rpsE 蛋白理化性质的分析，30S rpsE 蛋白是一种稳定的亲水性外膜蛋白，通过软件对其二级结构分析发现，包含无规卷曲、 $\alpha$ -螺旋及  $\beta$ -转角 3 种区域占比较大，而这些区域易于形成抗原表位，根据其 B 细胞抗原表位预测结果，30S rpsE 蛋白有 6 个优势抗原表位，B 细胞抗原表位的存在对血清学诊断方法的建立、中和抗体的产生及疫苗的研制起关键作用。试验构建了 pET-42b-30S rpsE 载体，同时将测序正确重组质粒转化到 BL21 菌中，诱导表达和大量纯化

30S rpsE 重组蛋白, 并将纯化后蛋白与佐剂混合免疫制备多克隆抗体。由 Western blot 和间接 ELISA 结果可知, 30S rpsE 重组蛋白可以与抗 30S rpsE 多克隆抗体结合, 同时免疫后效价可到 1:25 600。本研究说明所表达的重组蛋白可以作为抗原, 在绵羊肺炎支原体血清抗体检测方法的建立和基因工程疫苗的制备方面具有潜在的应用价值, 但是该蛋白在绵羊肺炎支原体中是否参与黏附过程还有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 吴皓, 赵战勤, 薛云, 等. 绵羊肺炎支原体主要免疫原蛋白及疫苗的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018 (5): 76-79.
- [2] 王紫阳. 某规模化羊场羊支原体肺炎的流行病学调查及免疫方案的初步制订 [D]. 石河子: 石河子大学, 2022.
- [3] ZHAO J Y, DU Y Z, SONG Y P, et al. Investigation of the prevalence of *Mycoplasma ovipneumoniae* in Southern Xinjiang, China [J]. J Vet Res, 2021, 65 (2): 155-160.
- [4] 张静, 李敏, 高强, 等. 绵羊肺炎支原体鹦鹉热衣原体二联灭活疫苗的免疫效力研究 [J]. 中国兽医科学, 2021, 51 (9): 1155-1162.
- [5] VILELA R T, JAISWAL A K, LEMES M R, et al. An immunoinformatics-based designed multi-epitope candidate vaccine (mpme-VAC/STV-1) against *Mycoplasma pneumoniae* [J]. Comput Biol Med, 2022, 142: 105194.
- [6] BASTOLA R, SEO J E, KEUM T, et al. Preparation of squalene oil-based emulsion adjuvants employing a self-emulsifying drug delivery system and assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-specific antibody titers in BALB/c mice [J]. Pharmaceutics, 2019, 11 (12): 667.
- [7] KHALID K, HUSSAIN T, JAMIL Z, et al. Vaccinomics-aided development of a next-generation chimeric vaccine against an emerging threat: *Mycoplasma genitalium* [J]. Vaccines (Basel), 2022, 10 (10): 1720.
- [8] KISLY I, TAMM T. Archaea/eukaryote-specific ribosomal proteins-guardians of a complex structure [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2023, 21: 1249-1261.
- [9] HURTADO-RIOS J J, CARRASCO-NAVARRO U, ALMANZA-PEREZ J C, et al. Ribosomes: the new role of ribosomal proteins as natural antimicrobials [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (16): 9123.
- [10] DERYUSHEVA E, MACHULIN A, MATYUNIN M, et al. Sequence and evolutionary analysis of bacterial ribosomal S1 proteins [J]. Proteins, 2021, 89 (9): 1111-1124.
- [11] 董力玮. 核糖体蛋白 RPS3 在 DNA 损伤修复过程中的功能及机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2022.
- [12] 陈倩玲, 何亚鹏, 张引弟, 等. 绵羊 RPS20 基因的生物信息学分析 [J]. 甘肃农业科技, 2022, 53 (8): 39-43.
- [13] LANDRY-VOYER A M, MIR HASSANI Z, AVINO M, et al. Ribosomal protein uS5 and friends: protein-protein interactions involved in ribosome assembly and beyond [J]. Biomolecules, 2023, 13 (5): 853.
- [14] ZHANG W, WANG T. Bioinformatics-aided protein sequence analysis and engineering [J]. Curr Protein Pept Sci, 2023, 24 (6): 477-487.
- [15] 潘妍妍, 王嘉琦, 杨孙玉悦, 等. 紫色红曲霉 Mp-21 MpMcrA 基因的克隆与生物信息学分析 [J]. 微生物学杂志, 2023, 43 (3): 11-18.
- [16] DAEE A A, KHODAKARAM-TAFTI A, DERAKHSHANDEH A, et al. Identification of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in sheep with pneumonia in North East of Iran [J]. Iran J Vet Res, 2020, 21 (1): 15-19.
- [17] 张金花, 郭亚男, 王建东, 等. 宁夏某羊场绵羊肺炎支原体的分离鉴定及病理组织学观察 [J]. 动物医学进展, 2023, 44 (5): 38-43.
- [18] ZHAO F, LI J, LIU J, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* isolates across different regions of China [J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2019, 8: 143.
- [19] 魏立翔, 袁婷, 高之煜, 等. 绵羊肺炎支原体不同分离株的致病性比较 [J]. 动物医学进展, 2023, 44 (10): 7-11.
- [20] 田彤彤, 葛家振, 李倩倩, 等. 绵羊肺炎支原体荚膜多糖的提取、纯化及反应原性分析 [J]. 中国兽医科学, 2024, 54 (1): 41-47.
- [21] TORIU M, HORIE M, KUMAKI Y, et al. Chloroplast translation factor EF-Tu of *Arabidopsis thaliana* can be inactivated via oxidation of a specific cysteine residue [J]. Biochem J, 2023, 480 (5): 307-318.
- [22] 陈思宇, 张梦洁, 田睿, 等. 绵羊肺炎支原体 EF-Tu 蛋白原核表达及 ELISA 方法建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2023: 1-10. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20230321.001.
- [23] 汤玉珍, 张俊平. 肝星状细胞核糖体蛋白 S5 (RPS5) 特异性敲减对肝纤维化的影响 [J]. 药学实践与服务, 2023, 41 (4): 227-233.
- [24] WEI Z, JIA J, HENG G, et al. Sirtuin-1/mitochondrial ribosomal protein S5 axis enhances the metabolic flexibility of liver cancer stem cells [J]. Hepatology, 2019, 70 (4): 1197-1213.