

DOI:10.13350/j.cjpb.230104

• 论著 •

淋球菌 MlaA 重组蛋白表达及多克隆抗体的制备与应用*

李晓晓^{1,2}, 刘明靓^{1,2}, 江银波¹, 唐三梅¹, 吴兴中¹, 廖仪文¹, 余煜奇¹, 谢庆辉¹, 刘朝奇², 覃晓琳^{1**}, 郑和平^{1**}

(1. 南方医科大学皮肤病医院, 广东广州 510000; 2. 三峡大学医学院)

【摘要】 目的 原核表达、纯化淋球菌 MlaA 蛋白, 制备并鉴定其多克隆抗体。方法 构建原核表达载体 pET-28a-MlaA, 转化 BL21(DE3) 大肠埃希菌, 经 IPTG 诱导重组蛋白的表达。通过亲和层析法纯化目的蛋白, 并进行 Western blot 鉴定。以纯化的重组蛋白作为抗原, 与佐剂乳化后免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 3 次免疫后取小鼠静脉血并分离血清, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定抗体效价, 用 Western blot、间接免疫荧光试验 (IFA) 和流式细胞术 (FCM) 检测 MlaA 多克隆抗体的反应性和特异性。结果 Western blot 显示, pET-28a-MlaA 转化 BL21 后表达相对分子质量为 35×10^3 的淋球菌 MlaA 重组蛋白。ELISA 检测 MlaA 免疫小鼠血清抗体效价为 $1:8\,000 \sim 1:32\,000$ 。Western blot、IFA 和流式细胞术检测制备的抗体能识别淋球菌变性和非变性 MlaA 蛋白。结论 成功表达并纯化淋球菌 MlaA 重组蛋白, 免疫小鼠制备多克隆抗体, 将制备的抗体血清作为一抗对淋球菌及其他不同类菌株进行 Western Blot 检测后发现, 制备的多克隆抗体可以特异性识别淋球菌中的 MlaA 蛋白。经 IFA 及 FCM 检测, 结果均表明制备的多克隆抗体与淋球菌 MlaA 有良好的反应性。

【关键词】 淋球菌; MlaA 蛋白; 重组表达; 蛋白纯化; 多克隆抗体

【中图分类号】 R387.16

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)01-0019-04

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jan;18(1):19-22,29.]

Prokaryotic expression of *Neisseria gonorrhoeae* MlaA recombinant protein and its polyclonal antibody preparation and application

LI Xiao-xiao^{1,2}, LIU Ming-jing^{1,2}, JIANG Yin-bo¹, TANG San-mei¹, WU Xing-zhong¹, LIAO Yi-wen¹, YU Yu-qi¹, XIE Qing-hui¹, LIU Chao-qi², QIN Xiao-lin¹, ZHENG He-ping¹ (1. Dermatology Hospital of Southern Medical University, Southern Medical University, Guangzhou, 510000, China; 2. Medical College, China Three Gorges University)***

【Abstract】 **Objective** To express and purify MlaA protein of *Neisseria gonorrhoeae* in prokaryotic cells, and to prepare and identify its polyclonal antibody. **Methods** The prokaryotic expression vector pET-28a-MlaA was constructed and induced by IPTG in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The target protein was purified by affinity chromatography, and was analyzed by Western Blot. The purified recombinant protein was used as antigen, emulsified with adjuvant and immunized 6-week-old female BALB/c mice. After three times of immunization, the venous blood of the mice was taken and the serum was separated to determine the titer by enzyme-linked immunosorbent assay. The reactivity and specificity of MlaA polyclonal antibody were determined by Western blot, indirect immunofluorescence assay (IFA) and flow cytometry (FCM). **Results** Western Blot results showed that the recombinant MlaA protein was successfully expressed in *Escherichia coli*, and the relative molecular weight of recombinant MlaA protein was 35×10^3 . ELISA results showed that the antibody titer of immunized mice ranged from $1:8\,000$ to $1:32\,000$. The results of Western Blot, IFA and flow cytometry showed that the prepared antibody could specifically recognize the denatured and non-denatured MlaA proteins of *N. gonorrhoeae*. **Conclusion** According to the expression and purification of MlaA protein of *N. gonorrhoeae*, immunize mice to prepare polyclonal antibodies. After Western Blot detection of *N. gonorrhoeae* and other different strains using the prepared antibody serum as a primary antibody, it was found that the prepared polyclonal antibodies can specifically recognize MlaA protein in *N. gonorrhoeae*. The results of IFA and FCM showed that the polyclonal antibody had good reactivity with *N. gonorrhoeae* MlaA.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; MlaA protein; prokaryotic expression; protein purification; polyclonal antibodies

* **【基金项目】** 国家自然科学基金青年基金项目 (No. 82104626); 广东省中医药局课题 (No. 20211277, 20191230); 广东省医学科研基金项目 (No. A2021139)。

** **【通讯作者】** 郑和平, E-mail: zhphf@hotmail.com; 覃晓琳, E-mail: qinxiaolin200810@163.com

【作者简介】 李晓晓 (1993-), 女, 湖北随州人, 硕士研究生。主要研究方向: 病原微生物学, 分子生物学。E-mail: 282375569@qq.com

淋病是由革兰阴性双球菌淋病奈瑟氏菌(淋球菌)引起的一种常见泌尿生殖系统性传播疾病。抗菌药治疗淋病通常有效,然而淋球菌已经形成了对磺胺类、青霉素类、四环素、环丙沙星以及阿奇霉素和头孢曲松的耐药机制^[1]。世界卫生组织(WHO)对淋球菌临床菌株的监测结果显示淋球菌对大多数可用抗生素均产生了耐药^[2]。抗生素耐药严重影响了淋病治疗的有效性,淋病至今仍是全球性重大公共卫生问题。

革兰阴性菌包膜由内膜(IM)和外膜(OM)组成,其不对称外膜是具有选择性的渗透屏障^[3]。维持脂质不对称(Mla)途径因其在细菌细胞包膜生理学中的作用而越来越受到重视。Mla系统由MlaA-F 6种蛋白组成^[4]。MlaA(VacJ)位于外膜内,充当从小叶穿梭磷脂的通道,MlaA缺失会破坏外膜的完整性^[5-6]。而跨越革兰阴性菌膜正是抗生素发挥作用的主要障碍^[7-8]。因此,了解外膜的合成和调节机制对研究抗生素耐药至关重要。本实验通过将淋球菌MlaA基因构建至pET-28a载体中进行原核表达,用纯化的重组蛋白免疫小鼠制备MlaA蛋白多克隆抗体,为淋球菌的基础研究和应用提供基础。

材料与方 法

1 材料

1.1 菌株、载体及实验动物 6周龄雌性BALB/c小鼠购自广州南方医大实验动物科技发展有限公司;淋球菌菌株由南方医科大学皮肤病医院保存;pET-28a载体和BL21(DE3)大肠埃希菌感受态购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 主要试剂 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG),HRP标记山羊抗鼠IgG二抗及ELISA套装试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;His标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型),BCA蛋白浓度测定试剂盒,脱脂奶粉及抗荧光淬灭封片液(含DAPI)购自上海碧云天生物技术有限公司;PVDF膜购自广州洛孚生物科技有限责任公司;蛋白Marker购自广州市迅益生物科技有限责任公司;重组克隆试剂盒购自广州真知生物科技有限责任公司;增强型ECL化学发光检测试剂盒购自广州卓升生物科技有限责任公司;弗氏完全/不完全佐剂购自广州鼎国生物技术有限公司。

2 方法

2.1 原核表达载体pET-28a-MlaA的构建及鉴定 以NCBI中淋球菌MlaA(NCBI Reference Sequence: NC_002946. 2; GenBank: CP041585. 1)作为参考序列,去掉20个氨基酸信号肽序列,序列两端酶切位点分别为Nco I和Xho I,C-端连接6 \times His用于蛋白纯化。将序列送生工合成部,通过密码子优化后合成相

应核苷酸序列,连接于pET-28a(+),构建淋球菌pET-28a-MlaA重组质粒,测序分析正确后将质粒转化至大肠埃希菌BL21(DE3)感受态中,均匀地涂布于含卡那霉素的LB平板,置37 $^{\circ}$ C恒温培养箱过夜培养,挑取单个菌落进行重组蛋白MlaA的表达与纯化。

2.2 重组蛋白的原核表达及鉴定 取上述转化了pET-28a-MlaA的BL21(DE3)菌液20 μ L接种于2mL含有卡那霉素(50 μ g/mL)抗性的LB培养基,在37 $^{\circ}$ C摇床220 r/min条件下过夜培养;次日,取过夜菌液以1:20加至2mL含有卡那霉素的LB培养基,继续培养2.5h后加入终浓度1.0 mmol/L IPTG诱导剂,诱导表达4h,收集菌液,10 000 r/min离心10 min。弃上清,用裂解液重悬沉淀,冰浴下超声破碎后离心,分别收集上清和沉淀,经SDS-PAGE电泳后进行Western blot,鉴定重组蛋白的表达。

2.3 重组MlaA蛋白的纯化与鉴定 获得的重组蛋白经镍柱亲和层析纯化目的蛋白。在变性条件下按照His标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型)说明书对目的蛋白进行纯化,并用pH值为7.4的PBS透析复性,按BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书测定其浓度,-80 $^{\circ}$ C保存。

2.4 多克隆抗体制备 免疫前取小鼠尾静脉血作为阴性血清。以纯化的重组蛋白为免疫原,采用腹腔注射方式免疫BALB/c小鼠,每只小鼠0.5 μ g/ μ L。初次免疫时,重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化,加强免疫时与弗氏不完全佐剂等体积混匀。总共免疫3次,每次间隔3周。第3次免疫后3周小鼠尾部采血,测定其抗体效价。

2.5 多克隆抗体效价的测定 采用ELISA法。重组MlaA蛋白包被浓度为1 μ g/mL,100 μ L/孔。小鼠抗MlaA多克隆抗体血清经1:2 000稀释后再作倍比稀释。HRP标记山羊抗鼠IgG抗体作1:8 000稀释,显色液为TMB。反应结束后用酶标仪测各孔A₄₅₀值。实验设免疫前小鼠血清作阴性对照,封闭液做空白对照。样品孔A₄₅₀值除以阴性对照孔A₄₅₀值 \geq 2.1即为阳性。

2.6 Western blot 鉴定多克隆抗体活性 重组蛋白经SDS-PAGE电泳后湿法转印至PVDF膜上,用5%脱脂牛奶室温封闭1h后以6 \times His或免疫小鼠血清为一抗,HRP标记的山羊抗鼠IgG为二抗进行Western blot,ECL显影。

2.7 间接免疫荧光试验(IFA) 将淋球菌接种于淋球菌选择培养皿,于35 $^{\circ}$ C、5% CO₂温箱培养18h,取菌落至生理盐水中制成3 \times 10⁸ CFU/mL菌悬液。取菌悬液滴至玻片涂布均匀,用预冷丙酮室温固定10 min,0.1% Triton X-100室温通透10 min,PBS洗涤

样品 3 次,每次 3 min;用含 2% BSA 的封闭液室温封闭 30 min, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;加入用含 1% BSA 的一抗稀释液 1 : 500 稀释小鼠抗 MlaA 多克隆抗体,正常小鼠血清作为阴性对照,室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;加入用 PBS 1 : 200 稀释的 FITC 标记山羊抗鼠 IgG 二抗,室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤玻片 3 次,每次 3 min;加入抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)封片,于激光共聚焦显微镜下观察菌体荧光图像。

2.8 流式细胞术检测(FCM) 用液体培养基培养淋球菌菌株,于 35 °C、5% CO₂ 摇床 150 r/min 培养 18 h,收取菌液,8 000 r/min 离心 3 min,弃上清;加入 1 ml PBS 重悬菌株沉淀,清洗 1 次;用 0.1% Triton X-100 冰上通透 30 min, PBS 清洗 1 次;加入 1 : 200 比例稀释的小鼠抗 MlaA 多克隆抗体,每个样品 100 μL,正常小鼠血清作为阴性对照,冰上孵育 30 min, PBS 清洗 1 次;加入 1 : 1 000 稀释的 FITC 标记山羊抗鼠 IgG,每个样品 100 μL,冰上避光孵育 30 min, PBS 清洗 1 次,沉淀用 500 μL PBS 重悬,用 200 目滤膜过滤后用流式细胞分析仪进行检测。

结果

1 MlaA 质粒的构建和鉴定

设计合成的淋球菌 MlaA 基因片段插入 pET-28a (+) 载体的 Nco I 和 Xho I 酶切位点(图 1A),经 Nco I 和 Xho I 双酶切鉴定,获得的插入片段大小与预期一致(图 1B)。对重组表达质粒测序,插入序列与理论一致且读码框正确,重组质粒 pET-28a-MlaA 构建成功。

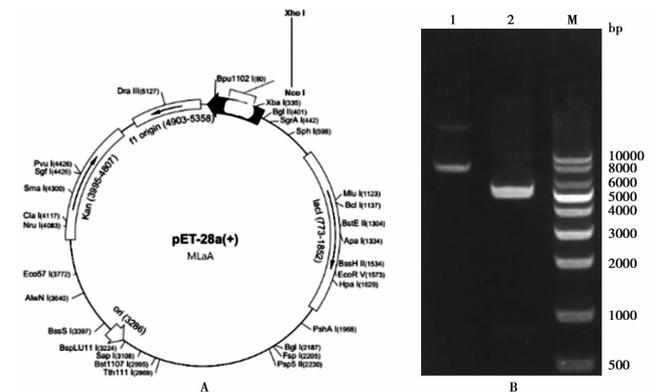


图 1 pET-28a-MlaA 图谱及克隆位点 B 电泳鉴定结果 (M DNA marker 1 pET-28a-MlaA 质粒 2 pET-28a-MlaA 质粒双酶切产物)

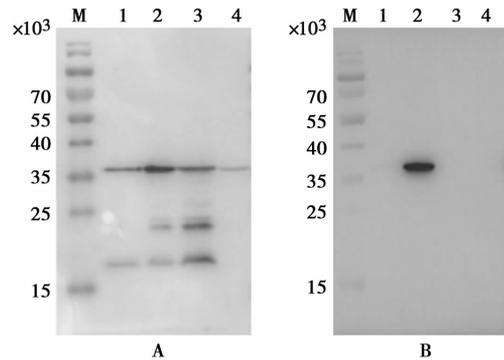
图 1 pET-28a-MlaA 质粒构建示意图及酶切鉴定

A PET-28a-MlaA map and cloning site B Electrophoretic identification results (M DNA marker 1 pET-28a-MlaA plasmid 2 pET-28a-MlaA plasmid double enzyme digestion product)

Fig. 1 Sketch map of pET-28a-MlaA plasmid construction and digestion identification

2 MlaA 蛋白的诱导表达和鉴定

应用原核表达菌 BL21(DE3)表达 pET-28a-MlaA 质粒,用 1.0 mmol/L IPTG 诱导,收集菌体细胞进行 Western blot,结果如图 2A。诱导后的菌液沉淀与免疫鼠血清反应条带位于 35 × 10³ 处,与预期一致。应用 6 × His 抗体对表达和纯化蛋白进行 Western blot,结果如图 2B,反应条带位于 35 × 10³ 处。上述结果表明 MlaA 蛋白诱导表达和纯化成功。



A Western Blot 鉴定纯化后蛋白 (M 蛋白 Marker 1 MlaA 诱导后超声上清 2 MlaA 诱导超声后沉淀 3 MlaA 诱导后沉淀 4 MlaA 诱导前沉淀) B Western Blot 分析目的蛋白 (M 蛋白 Marker 1 MlaA 诱导前沉淀 2 MlaA 诱导后沉淀 3 空载诱导前沉淀 4 空载诱导后沉淀)

图 2 Western Blot 鉴定 MlaA 蛋白的诱导表达和纯化

A The purified protein was identified by Western Blot (M protein Marker 1 Supernatant ultrasound after MlaA induction 2 Sediment ultrasound after MlaA induction 3 Sediment after MlaA induction 4 sediment before MlaA induction) B Western Blot analysis of target protein (M protein Marker 1 MlaA pre induction precipitation 2 MlaA post induction precipitation 3 No-load pre induction precipitation 4 no-load post induction precipitation)

Fig. 2 Induced expression and purification of MlaA protein identified by Western Blot

3 MlaA 蛋白多克隆抗体效价

采用间接 ELISA 法检测 MlaA 免疫小鼠血清抗体效价,结果如图 3。其中,样品 A 为 1 : 16 000,样品 B 为 1 : 32 000,样品本 C 为 1 : 8 000。

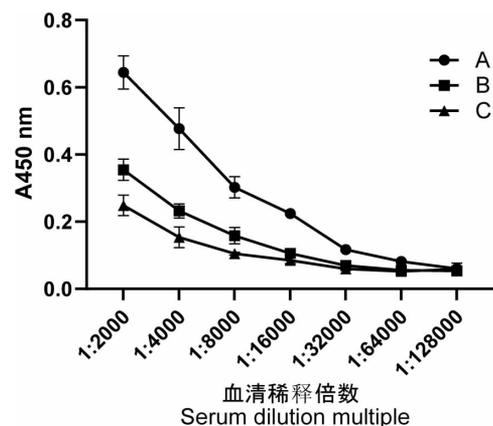
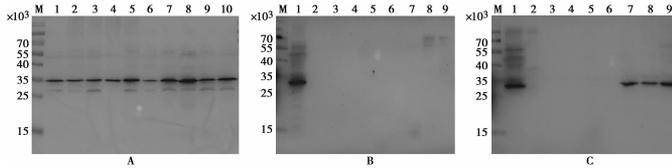


图 3 ELISA 法检测免疫小鼠的血清抗体效价 (A~C 分别为不同个体小鼠)

Fig. 3 Serum antibody titer of immunized mice detected by ELISA (A-C refer to different individual mouse respectively)

4 MlaA 蛋白多克隆抗体反应性鉴定

分别以淋球菌标准株或临床分离株的 MlaA 蛋白以及其它多种病原体蛋白为抗原,以制备的小鼠血清多克隆抗体为一抗进行 Western blot,结果如图 4。制备的小鼠抗 MlaA 蛋白多克隆抗体能识别淋球菌标准株或临床分离株的 MlaA 蛋白,链球菌、粪肠球菌、葡萄球菌、梅毒螺旋体、沙眼衣原体等多种临床病原菌均为阴性。



A M 蛋白 Marker 1~5 淋球菌质控株(WHO L/G/A/P/J) 6~10 淋球菌临床分离株(SGRM/QYRM/HZRM/ZJMB/JYPNMB)
B M 蛋白 Marker 1 淋球菌质控株(WHO L) 2~9 G 群链球菌;粪肠球菌;葡萄球菌;无乳链球菌;尿肠球菌;肺炎链球菌;梅毒螺旋体;沙眼衣原体 C M 蛋白 Marker 1 淋球菌质控株(WHO L) 2~6 嗜麦芽芽孢单胞菌;化脓性链球菌;表皮葡萄球菌;洛非不动杆菌;粪肠球菌 7~9 淋球菌质控株(WHO L/G/A)

图 4 MlaA 蛋白的抗体特异性鉴定

A M Protein Marker 1-5 *N. gonorrhoeae* quality control strain; (WHO L/G/A/P/J) 6-10 *N. gonorrhoeae* clinical isolates;SGRM/QYRM/HZRM/ZJMB/JYPNMB B M Protein Marker 1 *N. gonorrhoeae* quality control strain; (WHO L) 2-9 *Streptococcus group G*; *E. s faecalis*; *Staphylococcus*; *S. agalactiae*; *E. s faecium*; *S. pneumoniae*; *T. pallidum*; *C. a trachomatis* C M Protein Marker 1 *N. gonorrhoeae* quality control strain; (WHO L) 2-6 *S. maltophilia*; *S. pyogenes*; *S. epidermidis*; *A. Loffei* 7-9 *N. gonorrhoeae* quality control strain; (WHO L/G/A)

Fig. 4 Antibody specificity identification of MlaA protein

5 MlaA 蛋白抗体的应用

5.1 间接免疫荧光(IFA)试验 将抗 MlaA 蛋白抗体用于 IFA 试验检测淋球菌,结果显示小鼠抗 MlaA 多克隆抗体可识别淋球菌中的 MlaA 蛋白,在淋球菌中观察到绿色荧光(图 5),表明抗 MlaA 蛋白抗体可结合非变性状态的淋球菌蛋白。

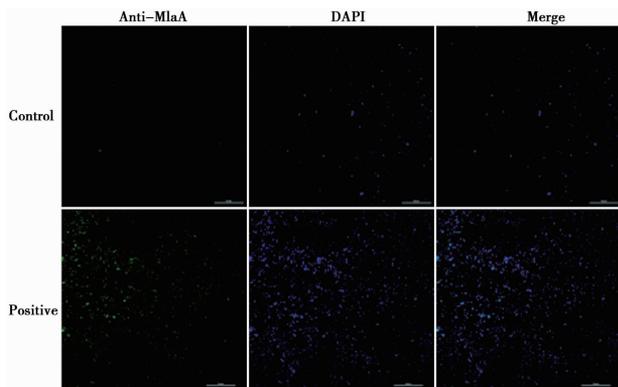
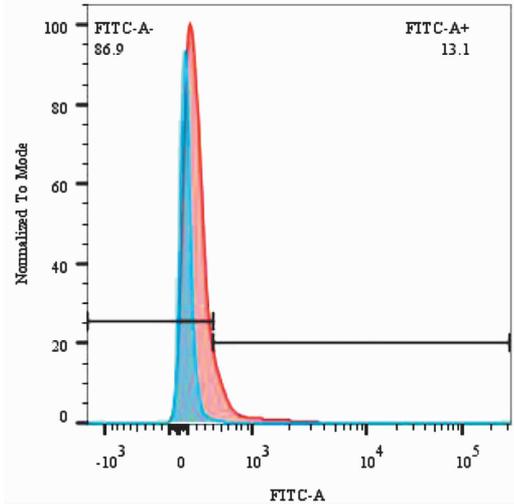


图 5 MlaA 蛋白抗体用于间接免疫荧光试验 (IFA 试验)

Fig. 5 MlaA antibody used to detect *N. gonorrhoeae* in indirect immunofluorescence test (IFA test)

5.2 流式细胞术(FCM)检测 将抗 MlaA 蛋白抗体用于 FCM 对淋球菌进行定量分析。结果显示,以正

常小鼠血清为对照,淋球菌阳性率为 1.74%,而抗 MlaA 蛋白抗体的阳性率为 13.1%(图 6),表明小鼠抗 MlaA 多克隆抗体可识别淋球菌中的 MlaA 蛋白。



注:蓝色:正常小鼠血清;红色:MlaA 多克隆抗体

图 6 MlaA 蛋白抗体用于流式细胞术(FCM)检测淋球菌

Note: Blue; normal mouse serum; Red; MlaA polyclonal antibody

Fig. 6 MlaA antibody was used to detect *N. gonorrhoeae* for flow cytometry(FCM)

讨论

淋球菌是适应宿主的人类病原体,可引起以泌尿生殖系统化脓性感染为主要表现的性传播疾病。因此,对于淋球菌的生物学活性及其相应治疗靶点的研究具有重要意义。但对于淋球菌相关的研究工具,但鲜有商品化的淋球菌相关的特异性蛋白及抗体产品,给淋球菌基础研究带来不便。因此,通过分子生物学方法进行淋球菌 MlaA 基因的蛋白表达及其抗体制备,可为淋球菌实验研究提供基础。

Mla 通路被认为是通过参与磷脂逆行转运来维持不对称的革兰阴性菌外膜^[9]。但 Mla 复合物在不同的细菌物种之间其表达也不相同。有研究表明,大肠埃希菌中 MlaA 与渗透素 OmpC 形成复合物,在维持外膜脂质不对称方面发挥着功能性作用^[10-11]。Kamisckke 等^[12]则证明 Mla 系统是维持鲍曼不动杆菌外膜完整性所必需的,且对抗生素敏感性有重要作用。另有研究表明 Mla 系统的突变会造成鲍曼不动杆菌外膜脂质不对称性缺陷^[13-14]。Baarda 等^[15]研究了 MlaA 在淋球菌中的作用,同样发现当淋球菌 MlaA 不存在时,细菌更容易受到多种抗生素的影响,证明淋球菌 MlaA 蛋白是维持淋球菌细胞外膜不对称性的关键因子。本研究前期预实验也发现淋球菌 MlaA 蛋白与其耐药性可能具有密切关系,但由于缺少商品化淋球菌 MlaA 抗体,因此无法进行蛋白水平的相关研究和验证。

(下转 29 页)

- (3):228-230.
- [4] 吕娜,高原. 粪肠球菌致病因子的研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版)2015,30(4):323-326.
- [5] Raza T, Vllah SR, Mehmood K, et al. Vancomycin resistant *Enterococci*: A brief review[J]. J Pak Med Assoc, 2018, 68(5): 768-772.
- [6] Harada T, Tsuji N, Otsuki K, et al. Detection of the esp gene in high-level gentamicin resistant *Enterococcus faecalis* strains from pet animals in Japan[J]. Vet Microbiol, 2005, 10(6): 139-143.
- [7] Larsen J, Schonheyder HC, Lester CH, et al. Hammerum AM; Porcine-origin gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* in humans, Denmark[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(4): 682-684.
- [8] Kateete DP, Kabugo U, Baluku H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63413.
- [9] Wang J, Da R, Tuo X, et al. Probiotic safety properties screening of *Enterococcus faecalis* from healthy Chinese infants [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2020, 12(3): 1115-1125.

- [10] Saffari F, Sobhanipoor MH, Shahravan A, et al. Virulence Genes, antibiotic resistance and capsule locus polymorphisms in *Enterococcus faecalis* isolated from canals root-filled teeth with periapical lesions[J]. Infect Chemother, 2018, 50(4): 340-345.
- [11] 周霞. 肠球菌性羔羊脑炎的发现及其病原特性和诊断方法研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [12] 王晓禹, 马维武, 周学章. 两株牛源致病性肠球菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(8): 809-813.
- [13] Ira P, Sujatha S, Chandra PS. Virulence factors in clinical and commensal isolates of *Enterococcus* species[J]. Indian J Pathol Microbiol. 2013, 56(1): 24-30.
- [14] Ahmadrabji R, Dalfardi MS, Farsinejad A, et al. Distribution of Ebp pili among clinical and fecal isolates of *Enterococcus faecalis* and evaluation for human platelet activation [J]. APMIS, 2018, 126(4): 314-319.
- [15] 布日额, 吴金花, 锡林高娃, 等. 牛乳腺炎粪肠球菌溶血素 CylA 基因编码多肽的理化特性及抗原性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(9): 1020-1024.

【收稿日期】 2022-08-24 【修回日期】 2022-11-09

(上接 22 页)

本实验表达了淋球菌 MlaA 蛋白, 纯化后免疫小鼠, 制备了多克隆抗体。将制备的抗体血清作为一抗进行 Western blot, 结果显示该抗体可识别淋球菌中的 MlaA 蛋白而不与其他不同类菌株反应。IFA 及 FCM 检测均表明该抗体与淋球菌 MlaA 有良好的反应性, 为淋球菌的基础及应用研究提供了实验基础。

【参考文献】

- [1] Costa-Loureno APRD, Barros Dos Santos KT, Moreira BM, et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat[J]. Braz J Microbiol, 2017, 48(4): 617-628.
- [2] Quillin SJ, Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(4): 226-240.
- [3] Sun J, Rutherford ST, Silhavy TJ, et al. Physical properties of the bacterial outer membrane[J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(4): 236-248.
- [4] Powers MJ, Trent MS. Intermembrane transport: Glycerophospholipid homeostasis of the Gram-negative cell envelope[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(35): 17147-17155.
- [5] Abell n-Ruiz J, Kaptan SS, Basl A, et al. Structural basis for maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry[J]. Nat Microbiol, 2017, 2(12): 1616-1623.
- [6] Zhao L, Gao X, Liu C, et al. Deletion of the vacJ gene affects the biology and virulence in *Haemophilus parasuis* serovar 5 [J]. Gene, 2017(603): 42-53.
- [7] Ferreira RJ, Kasson PM. Antibiotic uptake across Gram-negative outer membranes: better predictions towards better antibiotics

[J]. ACS Infect Dis, 2019, 5(12): 2096-2104.

- [8] Cama J, Henney AM, Winterhalter M. Breaching the barrier: quantifying antibiotic permeability across Gram-negative bacterial membranes[J]. J Mol Biol, 2019, 431(18): 3531-3546.
- [9] Hughes GW, Hall SCL, Laxton CS, et al. Evidence for phospholipid export from the bacterial inner membrane by the Mla ABC transport system[J]. Nat Microbiol, 2019, 4(10): 1692-1705.
- [10] Chong ZS, Woo WF, Chng SS. Osmoporin OmpC forms a complex with MlaA to maintain outer membrane lipid asymmetry in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 2015, 98(6): 1133-1146.
- [11] Yeow J, Tan KW, Holdbrook DA, et al. The architecture of the OmpC-MlaA complex sheds light on the maintenance of outer membrane lipid asymmetry in *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 2018, 293(29): 11325-11340.
- [12] Kamischke C, Fan J, Bergeron J, et al. The *Acinetobacter baumannii* Mla system and glycerophospholipid transport to the outer membrane[J]. Elife, 2019(8): e40171.
- [13] Powers MJ, Trent MS. Phospholipid retention in the absence of asymmetry strengthens the outer membrane permeability barrier to last-resort antibiotics[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(36): E8518-E8527.
- [14] Powers MJ, Simpson BW, Trent MS. The Mla pathway in *Acinetobacter baumannii* has no demonstrable role in anterograde lipid transport[J]. Elife, 2020(9): e56571.
- [15] Baarda BI, Zielke RA, Le Van A, et al. *Neisseria gonorrhoeae* MlaA influences gonococcal virulence and membrane vesicle production[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(3): e1007385.

【收稿日期】 2022-09-30 【修回日期】 2022-12-05