

DOI:10.13350/j.cjpb.230208

• 论著 •

微小脲原体 UP3-00830 基因原核表达载体的构建表达及生物信息学分析

白一童¹, 贾泽玮^{1,2}, 贾晓晖¹, 李瑞平¹, 贾天军^{1*}

(1. 河北北方学院临床检验诊断学重点实验室, 河北北方学院病原生物学与免疫研究所, 河北张家口 075000;

2. 河北北方学院附属第二医院检验科)

【摘要】 **目的** 构建微小脲原体 UP3-00830 基因原核表达载体, 诱导表达蛋白并进行生物信息学分析。 **方法** 通过 PCR 方法扩增 UP3-00830 基因。双酶切目的基因和载体质粒 pGEX-6P-2, 经 T4 连接酶连接, 连接产物转化 XL1-Blue 感受态, 经 10 mmol/L IPTG 诱导表达 GST-UP3-00830 融合蛋白, 运用生物信息学软件预测 UP3-00830 基因编码的假设蛋白的功能。 **结果** 成功构建了 pGEX-6p-2-UP3-00830 重组质粒, 测序后与 NCBI 中录入的序列进行比对, 同源性为 99.85%。将重组质粒转染大肠埃希菌后经 10 mmol/L IPTG 诱导, 表达相对分子质量为 51×10^3 的 GST-UP3-00830 融合蛋白, 与预期相符。采用生物信息学软件分析 UP3-00830 基因编码的假设蛋白, 其分子式为 $C_{1150}H_{1846}N_{302}O_{356}S_4$, 理论相对分子质量为 25.73×10^3 , 理论等电点(pI)为 5.19, 氨基酸数目为 218, 氨基酸组成中的赖氨酸(Lys)所占比例最高。含有 α -螺旋、延伸链、无规则卷曲和 β -转角, 无跨膜区域和信号肽区域, 第 178-216 位为卷曲螺旋区域。高级结构分析显示, UP3-00830 基因编码的假设蛋白与蛋白库中 1zxi.1 相似性最高, 为 31.05%; 结构及功能预测显示该蛋白具有蛋白转运和蛋白折叠的功能, 与其相邻的蛋白分别为 UU067、fecE(UU069)、hmuU-1(UU070)和 ABCsbp-4(UU071)。 **结论** 成功构建 UP3-00830 基因原核表达载体, 并诱导表达为 51×10^3 的目的蛋白, 该蛋白可能参与物质转运和信号转导。

【关键词】 微小脲原体; UP3-00830; 原核表达; 生物信息学分析

【中图分类号】 R37

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)02-0162-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Feb;18(2):162-167.]

Construction and expression of prokaryotic expression vector of UP3-00830 gene of *Ureaplasma parvum*

BAI Yi-tong¹, JIA Ze-wei^{1,2}, JIA Xiao-hui¹, LI Rui-ping¹, JIA Tian-jun¹ (1. Institute of Pathogenic Biology and Immunology, Key Laboratory of Clinical Laboratory and Diagnostics, Hebei North University, Zhangjiakou, 075000; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Hebei North University)*

【Abstract】 **Objective** To construct the prokaryotic expression vector of *Ureaplasma minutiae* UP3-00830 gene, induce the expression of protein and conduct bioinformatics analysis. **Methods** The UP3-00830 gene was amplified by PCR. The target gene and vector plasmid pGEX-6P-2 were double-digested, ligated by T4 ligase, and the ligated product was transformed into XL1-Blue competent, induced to express GST-UP3-00830 fusion protein by 10mmol/L IPTG, the functions of hypothetical proteins encoded by the UP3-00830 gene were predicted using bioinformatics software. **Results** The pGEX-6p-2-UP3-00830 recombinant plasmid was successfully constructed, and compared with the sequence entered in NCBI after sequencing, the homology was 99.85%. After the recombinant plasmid was transfected into *Escherichia coli* and induced by 10mmol/L IPTG, the GST-UP3-00830 fusion protein with a relative molecular mass of 51×10^3 was expressed, which was in line with expectations. Using bioinformatics software to analyze the hypothetical protein encoded by the UP3-00830 gene, its molecular formula is $C_{1150}H_{1846}N_{302}O_{356}S_4$, the theoretical relative molecular mass is 25.73×10^3 , the theoretical isoelectric point (pI) is 5.19, the number of amino acids is 218, and lysine in the amino acid composition Acid (Lys) has the highest proportion. Contains α -helix, extended chain, random coil and β -turn, no transmembrane region and signal peptide region, the 178th-216th is the coiled-coil region. Advanced structural analysis shows that the hypothetical protein encoded by the UP3-00830 gene has the highest similarity with 1zxi.1 in the protein library, at 31.05%; structure and function predictions show that this protein has the functions of protein transport and protein folding, and its adjacent proteins are respectively for UU067, fecE (UU069), hmuU-1 (UU070) and ABCsbp-4

* **【通讯作者】** 贾天军, E-mail: 452871832@qq.com

【作者简介】 白一童(1996-), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 主要从事解脲脲原体相关研究。E-mail: 772041530@qq.com

(UU071). **Conclusion** The prokaryotic expression vector of UP3-00830 gene was successfully constructed, and the target protein of 51×10^3 was induced to express, which may be involved in material transport and signal transduction.

【Key words】 *Ureaplasma parvum*; UP3-00830; prokaryotic expression; bioinformatics analysis

微小脲原体(*Ureaplasma parvum*, UP)是能够自我复制、最小的原核细胞型微生物^[1]。具有较独特的能量代谢方式,能利用自身的尿素酶水解尿素产生ATP供能。UP常寄居于人类泌尿生殖道,与泌尿生殖道感染密切相关^[2]。近年研究发现,UP感染可引起其他疾病如尿道炎、不孕症、绒毛膜羊膜炎^[3],新生儿感染如脑膜炎、菌血症^[4],坏死性软组织和其他伤口感染^[5],从而越来越引起重视。UP主要定植于泌尿生殖道上皮细胞,夺取脂质与胆固醇而引起宿主细胞膜损伤^[6-7];产生氨等毒性代谢产物,pH值的变化可引起急性毒性损害^[8];具有人IgA特异蛋白酶活性从而使黏膜屏障受损^[9];还可利用宿主细胞自噬逃避宿主免疫防御机制^[10]。目前,对UP的病原生物学特性及致病机制尚不十分清楚,涉及到具体基因编码功能的研究较少。随着后基因组时代的到来,研究微生物单个基因的功能成为现实。本研究采用分子克隆技术构建pGEX-6P-2-UP3-00830基因的重组表达载体,诱导表达成为融合蛋白,并运用生物信息学技术分析预测UP3-00830基因编码的假设蛋白,以期探讨其可能的生物学作用,以期从分子水平研究UP基因的生物学功能,对UP的生长增殖特性、致病耐药性等进行更深入的了解,从而找到解决UP感染问题的办法。

材料与方 法

1 材 料

1.1 主要试剂与仪器 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;dNTP(2.5 mmol/L),TaqDNA聚合酶,10×Primer STAR Buffer及标准DNA marker 购自宝日医生物技术(北京)有限公司;PCR仪,低温高速离心机及MAXQ 4000 恒温摇床购自美国 Thermo Fisher 公司;WD-9403F 凝胶成像仪购自美国 OMEGA 公司。

1.2 载体和菌株 原核表达载体 pGEX-6p-2, UP3 菌株和大肠埃希菌 XL1-Blue 感受态均为本实验室保存。

2 方 法

2.1 pGEX-6p-2-UP3-00830 原核表达载体的构建 根据 NCBI 基因库微小脲原体 UP3-00830 基因序列设计引物 UP3-00830-F 和 UP3-00830-R(表 1)。以 UP3 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增反应,20 μL 反应体系:10×Primer STAR Buffer 2 μL,dNTP(2.5 mmol/L)1.5 μL,UP3-0830-F 和 UP3-0830-R 各 1.5

μL,UP3 基因组 DNA 1 μL,三蒸水 14.6 μL。反应条件:95 °C 5 min;95 °C 1 min,50 °C 1 min,72 °C 1 min,共 40 个循环;72 °C 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像仪中观察结果并拍照,鉴定后的产物于 4 °C 保存。利用 ClonExpres MultiS One Step Cloning Kit 进行重组,于冰上配制 20 μL 重组反应体系:载体 pGEX-6P-2 1 μL,目的片段 1 μL,5 × CE II Buffer 4 μL,Exnase II 2 μL,三蒸水 12 μL。轻轻吹打混匀,短暂离心将反应液收集至管底,37 °C 反应 30 min,于 4 °C 保存。取 2 μL 重组产物加入 20 μL XL1-Blue 感受态细胞中,边加边搅拌,立即放置冰上静置 30 min,随后立即置于金属浴 42 °C 热激活 45 s,立即冰浴 3 min,使用热休克法转化入感受态细胞 XL1-Blue。于转化的感受态中加入 200 μL LB 液体培养基,37 °C 恒温摇床摇菌 45 min,使细菌回复生长,将转化菌接种于含氨苄青霉素(AMP)的 LB 固体培养基中倒置培养过夜。挑取半个菌落加入到 40 μL 灭菌三蒸水中混匀,98 °C 煮沸 5 min,立即冰浴 5 min 后作为模板。用 pGEX-6P-2 通用引物进行菌落 PCR,20 μL 反应体系:10×Primer STAR Buffer 2 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 1 μL,上、下游通用引物各 0.3 μL,Taq DNA 酶 0.3 μL,模板 16.1 μL。反应条件:94 °C 5 min;95 °C 45 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,共 35 个循环;72 °C 10 min。菌落 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果并拍照。挑取另半个菌落在含 AMP(100 mg/L)的 LB 液体培养基中震荡过夜,取菌液进行序列验证,通过 BLAST 软件对本次基因测序结果与 NCBI 中微小脲原体 UP3-00830 基因序列进行比对。

表 1 PCR 引物
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
UP3-00830-F	5'-TTCCAGGGGCCCTGGGATCCATG-AATTTTAAAAGTACCATC-3'
UP3-00830-R	5'-TCAGACAGTCACGATGCGGGCCGC-TTATTTGTCAGCGTTTTG-3'

2.2 GST-UP3-00830 融合蛋白的诱导表达 将增菌菌液 500 μL 加入含有 20 mL 液体 LB 培养基,37 °C 200 r/min 震荡培养 3 h,至 A₆₀₀ 值为 0.85 时加入 IPTG 12 μL,30 °C 通气状态下低温诱导表达 3 h,4 °C 4 000 r/min 离心 10 min,弃培养液,收集细菌。加入裂解液置于冰上超声破菌,4 °C、12 000 r/min 离心 30

min, 取上清液至 Ep 管中; 加 20 μ L GST-Beads 混匀室温翻转吸附 1 h, 室温 14 000 r/min 离心 30 s, 弃上清; 用 0.05% PBS-T 和 1 \times PBS 各洗 3 次, 14 000 r/min 离心 10 min; 加入 20 μ L 2 \times SDS 上样缓冲液 100 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰上放置 5 min, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清进行 SDS-PAGE。考马斯亮蓝染色后用脱色液脱色至条带清晰, 在凝胶成像仪中观察结果并拍照。

2.3 UP3-00830 假设蛋白的生物信息学分析 使用 ExPasy 在线分析软件 (<http://www.expasy.org/proteomics>) 中的 ProtParam 工具 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 针对 UP3-00830 假设蛋白的一级结构(理化性质)进行分析, 包括蛋白质的分子质量、氨基酸数目、氨基酸组成和半衰期等; 使用 ExPasy 在线分析软件中的 ProtScale 工具 (<http://web.expasy.org/protscale>) 分析 UP3-00830 假设蛋白的亲疏水性; 使用 Proteomics (<http://www.expasy.org/proteomics>) 中的 TMNMM Server v. 2.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 分析 UP3-00830 假设蛋白有无跨膜结构域; 使用 Signal P 在线分析软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析 UP3-00830 假设蛋白有无信号肽。使用 PSORT II 在线分析软件 (<https://psort.hgc.jp/form.html>) 进行 UP3-00830 假设蛋白亚细胞定位预测;

使用 PRABI 工具 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html) 蛋白质分析系统分析 UP3-00830 假设蛋白的二级结构; 使用 SMART 蛋白结构域分析系统 (<http://smart.embl.de/>) 分析 UP3-00830 假设蛋白结构域; 使用蛋白质分析系统 EXPASY Proteomics 中的 SWISS-MODEL 软件 (<https://swissmodel.expasy.org>) 预测 UP3-00830 假设蛋白的三级结构(空间结构); 使用在线分析软件 STRING (<https://string.embl.de>) 预测与 UP3-00830 假设蛋白相互作用的蛋白。

结 果

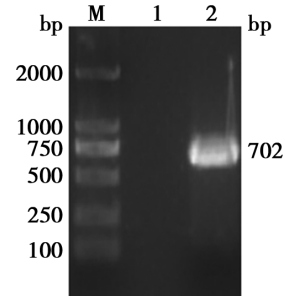
1 UP3-00830 基因的获取

PCR 扩增 UP3-00830 基因, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 大小介于 500~750 bp 间, 与预期结果(702 bp)相符(其中目的片段 657 bp, 同源序列 45 bp)(图 1)。

2 原核表达载体构建的鉴定

目的基因片段与载体片段连接后转化感受态细胞并进行培养。挑取含 AMP 抗性的固体培养基上的菌落作为模板, 使用 pGEX-6p-2 通用引物进行菌落 PCR

扩增, PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 目的基因介于 750~1 000 bp 间, 与预期结果(807 bp)相符(其中目的片段 657 bp, 通用引物 150 bp)(图 2)。

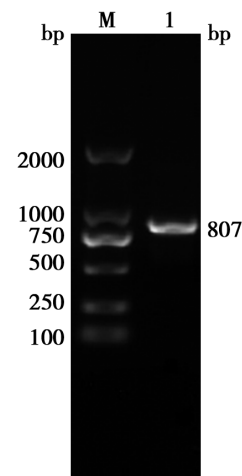


M DNA 标志物(DL2000) 1 阴性对照 2 UP3-00830 基因 PCR 产物

图 1 UP3-00830 基因 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA marker (DL2000) 1 Negative control 2 PCR product

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of UP3-00830 gene amplification product



M DNA 标志物(DL2000) 1 菌落 PCR 产物

图 2 重组质粒菌落 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA marker(DL2000) 1 Colony PCR amplification product

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid colony PCR

菌落 PCR 鉴定正确的含有重组质粒的甘油菌交由北京六合华大基因公司测序, 经 DNAMAN 软件比对分析, 测序结果与 UP3-00830 基因序列同源率为 99.85%, 无移码现象, 表明重组质粒构建成功(图 3)。

3 GST-UP3-00830 融合蛋白的表达鉴定

将吸附纯化后的 GST-UP3-00830 融合蛋白进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色后使用脱色液进行脱色, 待条带清晰时在凝胶成像仪中观察结果并拍照。结果显示 GST-UP3-00830 融合蛋白主带约为 51×10^3 , 同时在 29×10^3 处有另一条带, 可能为 GST 标签蛋白, 与预期相符(图 4)。

4 GST-UP3-00830 融合蛋白的生物信息学分析

4.1 理化性质 生物信息学软件分析 UP3-00830 基因假设蛋白的分子式为 $C_{1150}H_{1846}N_{302}O_{356}S_4$, 相对分

子质量为 25.73×10^3 , 理论等电点 (pI) 为 5.19, 原子数目为 3 658; 氨基酸数目为 218, 氨基酸组成中的赖氨酸 (Lys) 所占比例最高 (达 13.3%), 同时含有 36 个碱性氨基酸 (R、K)、44 个酸性氨基酸 (D、E) 和 17 个芳香族氨基酸 (W、F、Y); 脂肪族氨基酸指数为 91.79; 该蛋白在 280 nm 的水中的消光系数为 18450 / (Mol/cm), 吸光度值为 0.717 (1 g/L); 在序列的 N-末端是 M (Met) 的前提下, 该蛋白在哺乳动物体外、酵母体内、大肠埃希菌体内的半衰期值分别为 30、20、10 h; 不稳定性指数 (II) 为 43.75, 高于阈值 40, 表明该蛋白质不稳定; 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.708, 表明该蛋白极可能为亲水性蛋白。

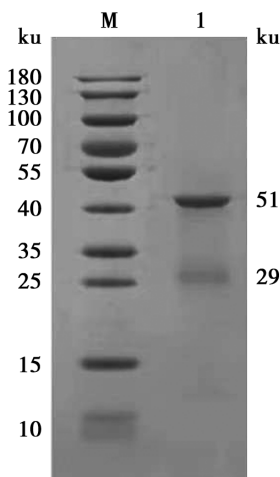
Ureaplasma parvum strain hebnu uu3, complete genome
Sequence ID: CP021991.1 Length: 727176 Number of Matches: 1

Range 1: 193809 to 194465 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1208 bits(654)	0.0	656/657(99%)	0/657(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATGAATTTTAAAGTACCATGTTTAAATAAAAAACCGATTGATGGAACACACAAATGTT	60		
Sbjct 194465	ATGAATTTTAAAGTACCATGTTTAAATAAAAAACCGATTGATGGAACACACAAATGTT	194406		
Query 61	TTAGAGAAATTAAGTGTGATCTAAGGCAATGAGAAATGCATAAAGAAAGAAATTAACACA	120		
Sbjct 194405	TTAGAGAAATTAAGTGTGATCTAAGGCAATGAGAAATGCATAAAGAAAGAAATTAACACA	194346		
Query 121	GTTTTTCAAAACAACTGAAAGAACAGCTTCTCAACAATTCATACATTAATGATGCT	180		
Sbjct 194345	GTTTTTCAAAACAACTGAAAGAACAGCTTCTCAACAATTCATACATTAATGATGCT	194286		
Query 181	GAAAAATTTTAAATAAAGCAATGACATATCTGCTGATTTTATGAAATGATGTTAAT	240		
Sbjct 194285	GAAAAATTTTAAATAAAGCAATGACATATCTGCTGATTTTATGAAATGATGTTAAT	194226		
Query 241	GAAAGAAATTAAGGATTTAGCAACCAAGTATTAAGCAAGCAATTTGGTGTGAAGATGAA	300		
Sbjct 194225	GAAAGAAATTAAGGATTTAGCAACCAAGTATTAAGCAAGCAATTTGGTGTGAAGATGAA	194166		
Query 301	AAAGTTAAGTTTAAAGTATGCAAAAAAATCAATGCTTAAAGCAATTAATTTTCAAGATTTA	360		
Sbjct 194165	AAAGTTAAGTTTAAAGTATGCAAAAAAATCAATGCTTAAAGCAATTAATTTTCAAGATTTA	194106		
Query 361	CAAAAAGAAATTTCAATTAAGAAATTAAGCAATTAAGCAATTAAGCAATTAAGCAATTAAG	420		
Sbjct 194105	CAAAAAGAAATTTCAATTAAGAAATTAAGCAATTAAGCAATTAAGCAATTAAGCAATTAAG	194046		
Query 421	TATCAAGAGACAAACTTATCAATTTGCTGACTTTAAAGAAAACAAAGCAATGAGAAAGCT	480		
Sbjct 194045	TATCAAGAGACAAACTTATCAATTTGCTGACTTTAAAGAAAACAAAGCAATGAGAAAGCT	193986		
Query 481	GCAAAATCAACATTTATGAAAGAAAACCAACAGCTTTATTTGATAAATTTGATGCT	540		
Sbjct 193985	GCAAAATCAACATTTATGAAAGAAAACCAACAGCTTTATTTGATAAATTTGATGCT	193926		
Query 541	GATTTATCAATTTGAAAGCTAATTTGCTGAAAGAAATGCTGAAACAAATGGAACCTGAT	600		
Sbjct 193925	GATTTATCAATTTGAAAGCTAATTTGCTGAAAGAAATGCTGAAACAAATGGAACCTGAT	193866		
Query 601	AAAAAGATTAAGGAAATCAAGCAATTAACAAATCAAAAACAAAAGCTGCAAAATAA	657		
Sbjct 193865	AAAAAGATTAAGGAAATCAAGCAATTAACAAATCAAAAACAAAAGCTGCAAAATAA	193809		

图 3 pGEX-6p-2-UP3-00830 序列同源性对比

Fig. 3 Homology comparison of pGEX-6p-2-UP3-00830 sequence



M 蛋白分子质量标准 1 融合蛋白

图 4 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

M Protein marker 1 Fusion protein

Fig. 4 SDS-PAGE results of fusion protein

4.2 亲疏水性 ProtScale 在线软件分析 UP3-00830 基因假设蛋白的亲疏水性 (图 5), 显示该蛋白 A114 残基疏水性最强, Score 值为 1.811; K211 残基亲水性最强, Score 值为 -3.289; 且亲水性残基明显多于疏水性残基, 预测该蛋白可能为可溶性蛋白。

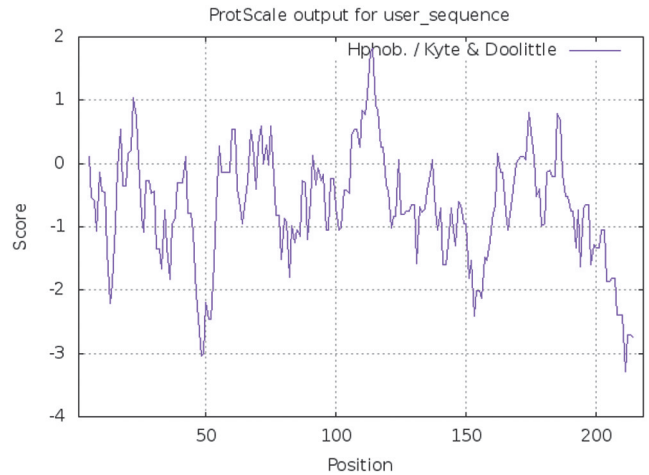
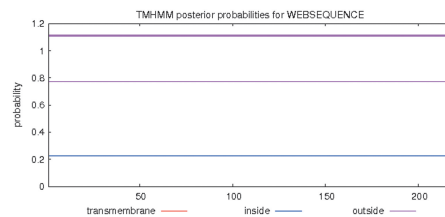


图 5 UP3-00830 基因假设蛋白亲疏水性分析

Fig. 5 Hydrophilicity and hydrophobicity analysis of UP3-00830 hypothetical protein

4.3 跨膜区域及信号肽预测 TMNMM Server v. 2.0 在线服务器分析 UP3-00830 假设蛋白的跨膜区域 (图 6), TMH 数量为 0, 说明该蛋白无跨膜区域, 不属于跨膜蛋白。预测的信号肽 C、S、Y 比分均为 NO, D 值小于 0.450 (阈值), 说明该蛋白没有信号肽序列, 不是分泌蛋白 (图 7)。



注: 横轴为氨基酸的位置, 纵轴为可能性。

图 6 UP3-00830 基因假设蛋白跨膜区域

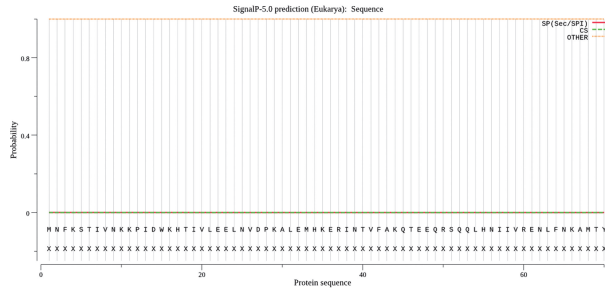
Notes: The horizontal axis is the position of amino acids and the longitudinal axis is the possibility.

Fig. 6 Transmembrane region of UP3-00830 hypothetical protein

4.4 亚细胞定位 使用 PSORT II 软件进行亚细胞定位预测, 结果显示 UP3-00830 假设蛋白主要在细胞质 (56.5%)、细胞核 (17.4%) 和线粒体 (17.4%) 发挥作用, 在液泡 (4.3%) 和细胞骨架 (4.3%) 也发挥部分功能。

4.5 二、三级结构及蛋白结构域 UP3-00830 基因假设蛋白的二级结构显示 (图 8), 该蛋白含有 158 个 α -螺旋 (Hh)、16 个延伸链 (Ee)、36 个无规则卷曲 (Cc) 和 8 个 β -转角 (Tt), 分别占 72.48%、7.34%、16.51% 和 3.67%。使用 SMART 在线工具分析 UP3-00830

假设蛋白的结构域(图9),显示第178位到第216位是卷曲螺旋区域。典型的卷曲螺旋结构以串联的7个氨基酸残基的重复单元为基础,具有跨膜信号转导、分子识别、维持细胞稳定等功能^[11]。使用 SWISS-MODEL 软件预测 UP3-00830 基因假设蛋白的三级结构(空间结构),经过分子模型构建该蛋白三维结构与 1zxj.1 相似性最高,为 31.05%(图10)。



注:横轴为氨基酸位置,纵轴为信号肽 D 值。
图 7 UP3-00830 基因假设蛋白信号肽预测

Notes: The horizontal axis is the position of amino acid and the longitudinal axis is the value of signal peptide D.

Fig. 7 Prediction results of UP3-00830 hypothetical protein signal peptides

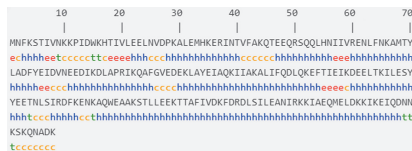


图 8 UP3-00830 基因假设蛋白的二级结构

Fig. 8 Secondary structure of UP3-00830 hypothetical protein

Confidently predicted domains, repeats, motifs and features:

Name	Start ▲	End	E-value
coiled coil	178	216	N/A

图 9 UP3-00830 基因假设蛋白的结构域

Fig. 9 Domains of UP3-00830 hypothetical protein

4.6 相关蛋白预测 UP3-00830 基因编码的蛋白为假设蛋白(UU068),与其密切相关的蛋白有 UU067、fecE (UU069)、hmuU-1 (UU070) 和 ABCsbp-4 (UU071)(图11)。

讨论

UP 作为一种寄居于人体泌尿生殖道的常见条件致病菌,除可引起泌尿生殖道感染外,还与高氨血症、产褥热、不良妊娠、脑室炎等多种疾病的发生有关,极易影响孕妇、新生儿和免疫力低下的人群^[12-14]。当前 UP 的感染已经趋于低龄化,女性感染率明显高于男性,并且其耐药率逐年升高^[15-16]。由于 UP 独特的生理功能导致内在抗药性水平升高,因此治疗选择尤其

在胎儿或新生儿发育过程中受到极大限制,通常治疗仅限于大环内酯类药物或氟喹诺酮类药物^[17]。为了预防更多耐药菌株的产生,临床治疗对于 UP 感染所引发的相关疾病,主要在观察患者临床表现的同时结合相应的支原体培养、鉴定和药敏结果来确定治疗方案^[18]。而不同地区的 UP 药敏结果存在一定差异,因此各地区的首选药物也都不同,其原因可能与不同地点的药物使用情况及 UP 的耐药基因有关^[19]。

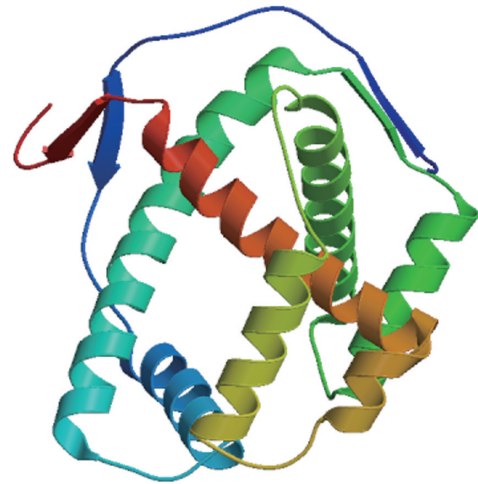


图 10 UP3-00830 基因编码蛋白的建模空间

Fig. 10 Modeling Spatial results of UP3-00830 hypothetical proteins

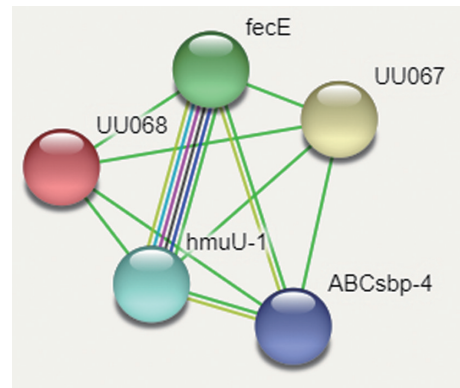


图 11 UP3-00830 假蛋白功能预测

Fig. 11 Prediction of UP3-00830 hypothetical protein function

本研究在对此株 UP 进行全基因组测序的基础上^[20],通过 PCR 方法获取目的基因 UP3-00830,通过构建原核表达载体使其在大肠埃希菌中成功表达。对该假设蛋白进行生物信息学预测,显示 UP3-00830 基因假设蛋白很可能具有蛋白转运和蛋白折叠的功能。其中蛋白转运是通过某种媒介在细胞内、细胞外或细胞间的定向运动,包含有机物转运、氮化合物转运以及蛋白定位的建立^[21]。蛋白折叠是协助单链多肽或多亚基复合物通过共价键或非共价键组装成三级结构^[22]。分析其结构域,显示该假设蛋白具有卷曲螺旋

结构域。研究表明,在分子识别作用的多种转录因子均含有卷曲螺旋结构域,它们在细胞 DNA 转录起始过程实现对特定 DNA 分子的识别^[23]。最新研究发现,基于卷曲螺旋结构的分子系统为提高现有药物的疗效提供了新的技术,有助于改善药物靶向和药物摄取,从而为药物生产和疫苗等方面提供新的治疗策略^[24]。其中与 UP3-00830 基因假设蛋白密切相关的蛋白有 UU067、fecE(UU069)、hmuU-1(UU070)和 ABCsbp-4(UU071),它们的功能分别为:UU067,具有 DNA 结合转录因子活性,通过非共价结合到顺式作用元件来调节基因组的转录;fecE(UU069),具有 ATP 酶偶联跨膜转运体活性,是溶质跨膜的转运复合体;血红素转运系统跨膜蛋白(HmuU),参与血红素载体介导的血红素摄取途径,在血红素转运系统中具有重要作用^[25-26];ABC(ATP 结合盒)转运蛋白,参与生物体中多种重要的转运过程、真核生物中的信号转导、蛋白质的分泌以及抗原递呈过程^[27]。Drazek 等^[28]的研究发现,hmuT、hmuU 和 hmuV 与革兰阴性菌中血红素转运所需的基因具有高度同源性,并且提议三者是 ABC(ATP 结合盒)转运系统的一部分。其中,HmuT 在体外能够结合血红素和血红蛋白琼脂糖,并且可作为白喉棒状杆菌中的血红素受体发挥作用,对 HmuT 基因的破坏可导致弯曲杆菌利用血红素或血红蛋白作为铁源的能力大大降低^[29]。由此推测,UP3-00830 基因编码的假设蛋白可能协同 hmuU-1(UU070)和 ABCsbp-4(UU071)参与物质转运过程,进而参与 UP 的信号转导和能量代谢。但对于此基因表达的蛋白的具体功能还不清楚,尚需进一步研究。

【参考文献】

[1] 李雪燕,郑洪柳,李瑞平,等. 微小脲原体 3-00990 的生物信息学分析与原核表达[J]. 重庆医学,2020,49(21):3647-3651.
[2] Sprong KE, Mabenge M, Wright CA, et al. *Ureaplasma* species and preterm birth: current perspectives[J]. Crit Rev Microbiol, 2020,46(2):169-181.
[3] Sweeney EL, Dando SJ, Kallapur SG, et al. The Human *Ureaplasma* species as causative agents of chorioamnionitis[J]. Clin Microbiol Rev,2017,30(1):349-379.
[4] Zllkau J, Pieper DH, Pastuschek J, et al. Lethal neonatal respiratory failure by perinatal transmission of *Ureaplasma parvum* after maternal PPROM[J]. Z Geburtshilfe Neonatol, 2021,225(4):361-365.
[5] Gassiep I, Gore L, Dale JL, et al. *Ureaplasma urealyticum* necrotizing soft tissue infection[J]. J Infect Chemother,2017,23(12):830-832.
[6] Waites KB, Katz B, Schelonka RL. *Mycoplasmas* and *ureaplasmas* as neonatal pathogens[J]. Clin Microbiol Rev,2005(18):757-789.
[7] Dando SJ, Nitsos I, Polglase GR, et al. *Ureaplasma parvum* undergoes selection in utero resulting in genetically diverse isolates colonizing the chorioamnion of fetal sheep [J]. Biol Reprod,2014,90(2):27.

[8] Kokkayil P, Dhawan B. *Ureaplasma*: Current perspectives[J]. Indian J Med Microbiol,2015,33(2):205-214.
[9] Nishiumi F, Ogawa M, Nakura Y, et al. Intracellular fate of *Ureaplasma parvum* entrapped by host cellular autophagy[J]. Microbiologyopen,2017,6(3):e00441.
[10] 郭方毅,唐艳红,向璟,等. 脲原体免疫逃逸机制的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2020,36(8):755-759.
[11] 纪兆林,石刘飞,李健,等. 卷曲螺旋结构及其研究进展[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):6-12.
[12] Donders GGG, Ruban K, Bellen G, et al. *Mycoplasma/Ureaplasma* infection in pregnancy: to screen or not to screen [J]. J Perinat Med,2017,45(5):505-515.
[13] 杨英杰,谈笑. 解脲脲原体感染研究进展[J]. 医学信息,2018,31(3):61-63.
[14] Saje A, Velnar T, Smrke B, et al. *Ureaplasma parvum* ventriculitis related to surgery and ventricular peritoneal drainage[J]. J Infect Chemother,2020,26(5):513-515.
[15] Siles-Guerrero V, Cardona-Benavides I, Li bana-Martos C, et al. Recent clinical relevance of mono-genital colonization/infection by *Ureaplasma parvum* [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2020,39(10):1899-1905.
[16] Ahmadi MH. Resistance to tetracyclines among clinical isolates of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species: a systematic review and meta-analysis[J]. J Antimicrob Chemother,2021,76(4):865-875.
[17] Beeton ML, Spiller OB. Antibiotic resistance among *Ureaplasma spp.* isolates; cause for concern? [J]. J Antimicrob Chemother,2017,72(2):330-337.
[18] Waites KB, Taylor-Robinson D. *Mycoplasma* and *Ureaplasma* [J]. Manual Clin Microbiol,2007(9):1004-1020.
[19] 程灿灿,朱剑霞,古裕莲,等. 泌尿生殖道脲原体喹诺酮类耐药机制的初步研究[J]. 医学综述,2020,26(7):1414-1418.
[20] 马良,赫聪慧,李萍,等. 1 株抗生素耐药微小脲原体 hebn3h07 的全基因组测序及序列分析[J]. 河北北方学院学报(自然科学版),2018,34(2):1-7,13.
[21] Chen Y, Shanmugam SK, Dalbey RE. The Principles of protein targeting and transport across cell membranes[J]. Protein J, 2019,38(3):236-248.
[22] 马彬广. 蛋白折叠预测[J]. 科学通报,2016,61(24):2670-2680.
[23] Liu J, Zheng Q, Deng Y, et al. A seven-helix coiled coil[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(42):15457-15462.
[24] Utterström J, Naeimipour S, Selegard R, et al. Coiled coil-based therapeutics and drug delivery systems[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2020(170):26-43.
[25] 徐巧霞. 肠外致病性大肠埃希菌基因缺失突变株 Δ hmuU, Δ hmuV, Δ hmuU/ Δ hmuV 的构建[D]. 武汉:华中农业大学,2013.
[26] Cuiv PO, Keogh D, Clarke P, et al. The hmuUV genes of *Sinorhizobium meliloti* 2011 encode the permease and ATPase components of an ABC transport system for the utilization of both haem and the hydroxamate siderophores, ferrichrome and ferrioxamine B[J]. Mol Microbiol,2008,70(5):1261-1273.
[27] 曲俊泽,陈天华,姚明东,等. ABC 转运蛋白及其在合成生物学中的应用[J]. 生物工程学报,2020,36(9):1754-1766.
[28] Drazek ES, Hammack CA, Schmitt MP. *Corynebacterium diphtheriae* genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters [J]. Mol Microbiol,2000,36(1):68-84.
[29] Schmitt MP, Drazek ES. Construction and consequences of directed mutations affecting the hemin receptor in pathogenic *Corynebacterium* species[J]. J Bacteriol,2001,183(4):1476-1481.

【收稿日期】 2022-08-23 【修回日期】 2022-11-12