

DOI:10.13350/j.cjpb.221006

• 论著 •

肺炎支原体 GrpE 蛋白的生物信息学分析、纯化
及多克隆抗体的制备*唐愈菲¹, 黄泽智¹, 赵爽¹, 李冉辉^{2,3,*}(1. 邵阳学院医学技术学院医学检验技术教研室, 湖南邵阳 422600; 2. 南华大学衡阳医学院病原生物学研究所;
3. 右江民族医学院基础医学院)**【摘要】 目的** 利用生物信息学方法分析肺炎支原体 GrpE 蛋白的生物学特性, 纯化 MpGrpE 蛋白并制备多克隆抗体。

方法 从 NCBI 网站获得肺炎支原体 GrpE 蛋白的氨基酸序列, 并将其与大肠埃希菌、结核分枝杆菌、解脲支原体、生殖支原体、鸡毒支原体和龟支原体的 GrpE 蛋白进行序列比对。利用生物信息学软件分析预测 MpGrpE 蛋白的信号肽、跨膜区、细胞定位、磷酸化和糖基化修饰、二级结构、三级结构、B 细胞表位和作蛋白等生物学特性。将重组质粒 pET28a-MpGrpE 转化大肠埃希菌, 诱导表达后通过 Ni^{2+} 亲和层析纯化重组 MpGrpE 蛋白。用重组蛋白免疫小鼠, 获得抗血清并测定抗体滴度。

结果 MpGrpE 蛋白与生殖支原体 GrpE 蛋白同源率为 73%。MpGrpE 蛋白共有 217 个氨基酸, 分子式 $\text{C}_{1108}\text{H}_{1807}\text{N}_{291}\text{O}_{336}\text{S}_3$, 理论分子质量为 24.7 ku, 理论等电点为 7.7, 为不稳定的疏水性蛋白。MpGrpE 蛋白无信号肽, 无跨膜区, 定位在胞质。该蛋白含有 8 个丝氨酸、4 个苏氨酸和 2 个酪氨酸磷酸化位点, 无糖基化位点。其二级结构中 α 螺旋占 69.12%, β 折叠占 8.29%, 无规卷曲占 18.89%, β 转角占 3.69%。MpGrpE 蛋白 83.2% 的三级结构为最佳状态。MpGrpE 蛋白含有 4 个连续的 B 表位和 4 个非线性表位。MpGrpE 蛋白的互作蛋白有 DnaK、GroS、GroL 等。通过 Ni^{2+} 亲和层析获得了较高纯度的 MpGrpE 蛋白, 用该蛋白免疫小鼠能够诱导产生 IgG 抗体。

结论 生物信息学分析 MpGrpE 蛋白是定位在肺炎支原体胞质的一种疏水性蛋白, 克隆表达的 MpGrpE 蛋白具有良好的免疫原性, 为肺炎支原体的致病机制以及疫苗研发提供了实验基础。

【关键词】 肺炎支原体; 核苷酸交换因子; 生物信息学; 多克隆抗体**【中图分类号】** R375.2**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)10-1140-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Oct.; 17(10):1140-1144, 1149.]

Bioinformatics analysis and purification of *Mycoplasma pneumoniae* GrpE protein and preparation of polyclonal antibody

TANG Yu-fei¹, HUANG Ze-zhi¹, ZHAO Shuang¹, LI Ran-hui^{2,3} (1. Department of medical laboratory technology, College of medical technology, Shaoyang University, Hunan Shaoyang 422600; 2. Institute of Pathogen Biology, Hengyang Medical School, University of South China; 3. College of Basic Medical Sciences, Youjiang Medical University for Nationalities)***

【Abstract】 Objective To analyze the biological characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* GrpE protein, purify GrpE protein and prepare polyclonal antibody. **Methods** The amino acid sequence of MpGrpE protein was obtained from NCBI website, which was used to compare with the amino acids of GrpE protein from *E. coli*, *My. tuberculosis*, *U. urealyticum*, *M. genitalium*, *M. gallisepticum* and *M. tortoise*. Bioinformatics software was used to analyze and predict the biological characteristics of MpGrpE protein, such as signal peptide, transmembrane region, cell localization, phosphorylation and glycosylation modification, secondary structure, tertiary structure, B cell epitope and acting protein. The recombinant plasmid pET28a-MpGrpE was transformed into *E. coli*, and the recombinant MpGrpE protein was induced and purified by Ni^{2+} affinity chromatography. The recombinant protein was immunized with mice to obtain antiserum and determine the antibody titer. **Results** The homology between MpGrpE protein and GrpE protein of *M. genitalium* was as high as 73%. MpGrpE protein is an unstable hydrophobic protein, which has 217 amino acids in total, with molecular formula $\text{C}_{1108}\text{H}_{1807}\text{N}_{291}\text{O}_{336}\text{S}_3$ and theoretical molecular weight is 24.7 10^3 ku, the theoretical isoelectric point is 7.7. MpGrpE protein has no signal peptide and transmembrane region, which is located in the cytoplasm. It may contain 8 serine, 4 threonine, 2 tyrosine phosphorylation sites and no glycosylation sites. The content of α -helix is 69.12%. The con-

* **【基金项目】** 湖南省自然科学基金项目(No. 2020JJ5522)。** **【通讯作者】** 李冉辉, E-mail: ranhui81@163.com**【作者简介】** 唐愈菲(1982-), 女, 湖南邵阳人, 副教授, 硕士。专业方向: 病原生物学。E-mail: 34416452@qq.com

tent of random coil was 18.89%, β -sheet was 8.29% and β -turn was 3.69%. The 83.2% of the tertiary structure of MpGrpE protein was in the best state. MpGrpE protein contains four continuous B epitopes and four nonlinear epitopes. The interacting proteins of MpGrpE protein include DnaK, GroS, groL and so on. High purity MpGrpE protein was obtained, which can induce mice to produce IgG antibody. **Conclusion** MpGrpE protein is a hydrophobic protein localized in the cytoplasm of *M. pneumoniae* and has good immunogenicity. This paper provides an experimental basis for the pathogenesis of *M. pneumoniae* and vaccine research and development.

【Key words】 *Mycoplasma pneumoniae*; GrpE protein; bioinformatics; polyclonal antibody

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, Mp)属于柔膜纲,支原体科,支原体属,无细胞壁,细胞呈多形态,且能在无生命培养基中培养原核微生物^[1-3]。Mp容易感染婴幼儿和老年人等免疫力低下患者,是导致社区获得性肺炎的重要致病菌。Mp感染后会引引起气管炎、支气管炎、肺炎和鼻咽炎等呼吸系统疾病,有时会导致贫血、多形性红斑以及心肌炎等并发症,严重时会导致患者死亡^[2,4-5]。目前临床上多采用抗生素进行治疗 Mp 感染,但该病原体对克拉霉素、红霉素和阿奇霉素等多种药物易产生耐药^[6-8],慢性 and 无症状 Mp 感染给临床用药也带来了严重挑战,故研究 Mp 的致病机制具有重要的现实意义^[9]。

热休克蛋白(Heat Shock Protein)是一组高度保守且在广泛存在的蛋白家族,热休克蛋白在细菌蛋白质的折叠组装、蛋白质复性以及跨膜转运等过程中起着极为重要的作用^[10]。核苷酸交换因子(nucleotide exchange factor, GrpE 蛋白)是细胞在热感应中起重要作用的一种热休克蛋白,GrpE 蛋白被称为细菌热感应器,通常以 DnaK-GrpE-DnaJ 的形式共表达,能加快 DnaK 与 ADP 的解离速度以及结合 ATP,起辅助 Hsp70 蛋白的功能^[11-12]。研究证实 GrpE 蛋白与细菌的黏附功能密切相关,如参与肺炎链球菌识别呼吸道上皮细胞^[13]。鸡毒支原体 GrpE 蛋白定位细胞表面并介导黏附活性^[14]。但关于 MpGrpE 蛋白的功能尚不清楚。本实验拟对 MpGrpE 蛋白与解脲脲原体、大肠埃希菌、生殖支原体等 GrpE 蛋白的氨基酸序列进行比对分析,利用生物信息学方法预测和分析 MpGrpE 蛋白的生物学特性;合成重组质粒 pET28a-GrpE,纯化得到 MpGrpE 蛋白,免疫小鼠后获得多克隆抗体,为研究 Mp 的致病机制提供实验基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌种和质粒 大肠埃希菌 BL21 由邵阳学院病原学实验中心保存;重组质粒 pET28a-MpGrpE 由金唯智生物科技有限公司构建。

1.2 主要试剂 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自美国 eBioscience 公司;LB 培养基和卡那霉素购自生工生物工

程(上海)股份有限公司。

1.3 实验动物 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自斯莱克景达实验动物有限公司。

2 方法

2.1 生物信息学分析 利用 Clustal Omega 比对肺炎支原体(*M. pneumoniae*, GenBank: WP_014325356.1)与结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*, GenBank: NC_000962.3)、解脲脲原体(*U. urealyticum*, GenBank: ACI59925.1)、大肠埃希菌(*E. coli*, GenBank: NC_000913.3)、生殖支原体(*M. genitalium*, GenBank: WP_014893991.1)、鸡毒支原体(*M. gallisepticum*, GenBank: WP_027333188.1)龟支原体(*M. testudinis*, GenBank: WP_052663394.1)GrpE 的蛋白序列;通过 www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM 网站预测 MpGrpE 蛋白是否具有跨膜结构域;利用 Gneg-mPLoc 软件分析 MpGrpE 蛋白的定位;采用 SignalP 5.0 分析 MpGrpE 蛋白是否具有信号肽;使用 ProtParam 分析 MpGrpE 蛋白的基本理化性质;采用 YinOYang1.2 预测 MpGrpE 蛋白的糖基化位点;采用 NetPhos3.1 预测 MpGrpE 蛋白的磷酸化位点;利用软件预测 MpGrpE 蛋白的二级结构;使用 Phyre2 网站预测 MpGrpE 蛋白的三级结构,使用 VMD 软件进行查看,使用拉氏图分析三级结构的可信度;通过 www.iedb.org 网站预测 MpGrpE 蛋白的 B 表位;通过 <https://string-db.org> 网站分析 MpGrpE 蛋白的互作蛋白。

2.2 MpGrpE 蛋白的表达与纯化 利用热激法将重组质粒 pET28a-MpGrpE 转化大肠埃希菌 BL21 star (DE 3)。挑取单菌落接种到含卡那霉素的液体 Luria-Bertani 培养基,置 37 °C、200 r/min 恒温培养箱中培养 16 h;取培养菌液按 1:100 的比例扩接培养,待培养液 A₆₀₀ 值为 0.6 时加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,再放入 28 °C、200 r/min 培养箱培养 4 h;取菌液,10 000 r/min 离心 5 min 收集细菌,用 PBS 溶液(pH 7.4)洗涤 2 次;超声破碎,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,利用 Ni²⁺ 亲和层析纯化 MpGrpE 蛋白,去内毒素后采用 BSA 法进行蛋白定量。

2.3 小鼠免疫 取 MpGrpE 蛋白与完全弗氏佐剂按

1:1 的比例完全混合均匀,取 50 μg 的 MpGrpE 蛋白皮下注射免疫小鼠,同时设置佐剂和 PBS 对照组。在第 3 周和第 6 周时将 MpGrpE 蛋白与弗氏不完全佐剂按 1:1 完全混合均匀,多点皮下注射免疫小鼠。末次免疫 2 周后取血,分离血清, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.4 抗体检测 采用 ELISA 方法。这 96 孔板每孔中分别加入 150 ng 重组 MpGrpE 蛋白包被量为 150 ng/孔,待测血清作倍比稀释,HRP 酶标记羊抗鼠 IgG 稀释度为 1:1 000。加入显色液反应 15 min 后用酶标仪测定各孔 A_{450} 值,计算抗体滴度。

2.5 统计学分析 采用 GraphPad(7.0)软件进行统计学分析。比较组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 GrpE 蛋白的同源性分析

从 GenBank 中获得肺炎支原体、解脲脲原体、生殖支原体、大肠埃希菌、鸡毒支原体、龟支原体和结核分枝杆菌 GrpE 蛋白的序列,然后使用 Clustal Omega 在线软件进行同源性比对,结果见图 1。其中 MpGrpE 蛋白与生殖支原体 GrpE 蛋白氨基酸同源性为 73%,与其他细菌的 GrpE 蛋白氨基酸同源性均低于 50%。



图 1 不同细菌 GrpE 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of GrpE protein from different bacteria

2 MpGrpE 蛋白的基本理化性质

MpGrpE 蛋白共有 217 个氨基酸,分子式 $\text{C}_{1108}\text{H}_{1807}\text{N}_{291}\text{O}_{336}\text{S}_3$,含有 3 545 个原子数,理论分子质量为 24.7 ku,理论等电点为 7.7。MpGrpE 蛋白在 280 nm 处的消光系数为 11 460,吸光系数为 0.464。不稳定指数为 41.97,表明该蛋白为不稳定蛋白质。MpGrpE 蛋白亲水性平均系数(GRAVY)为 -0.417 ,属于疏水性蛋白。

3 MpGrpE 蛋白的信号肽、跨膜区和细胞定位预测

利用 SignalP 5.0 预测 MpGrpE 蛋白无信号肽, TMHMM 软件预测该蛋白无跨膜区(图 2),Gneg-mPLoc 软件预测 MpGrpE 蛋白定位在细菌细胞质。

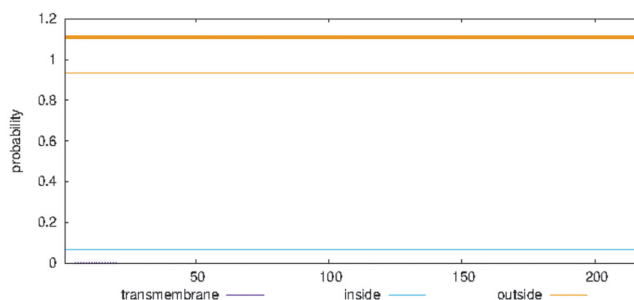


图 2 MpGrpE 蛋白跨膜区预测

Fig. 2 Transmembrane region of MpGrpE protein

4 MpGrpE 蛋白的磷酸化和糖基化修饰

使用 NetPhos3.1 预测 MpGrpE 蛋白可能有 8 个丝氨酸、4 个苏氨酸和 2 个酪氨酸磷酸化位点(图 3A)。利用 YinOYang1.2 软件预测 MpGrpE 蛋白无糖基化位点(图 3B)。

5 MpGrpE 蛋白的二、三级结构

采用软件分析 MpGrpE 蛋白的二级结构含量,其中 150 个氨基酸为 α 螺旋(h),占总体的 69.12%;18 个氨基酸为 β 折叠(e),占 8.29%;41 个氨基酸为无规卷曲(C),占 18.89%;8 个氨基酸为 β 转角(t),占 3.69%(图 4)。

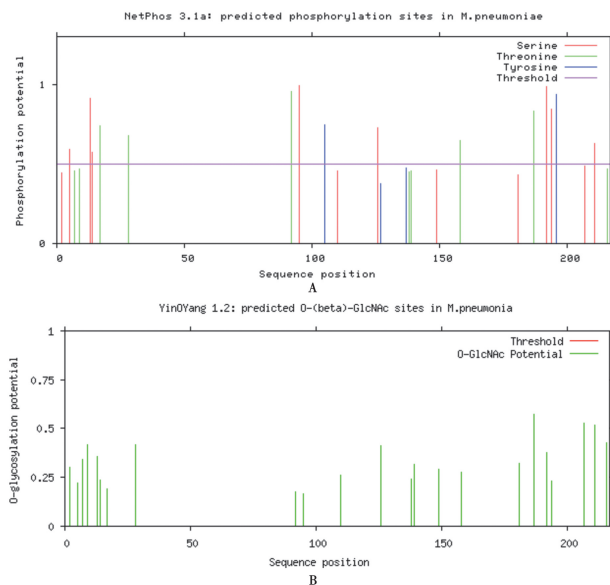


图 3 MpGrpE 蛋白的磷酸化(A)和糖基化位点(B)预测

Fig. 3 The phosphorylation(A) and glycosylation(B) sites of MpGrpE protein

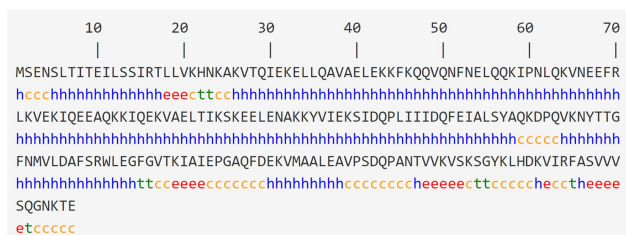


图 4 MpGrpE 蛋白的二级结构

Fig. 4 Secondary structure of MpGrpE protein

利用 Phyre2 网站预测 MpGrpE 蛋白的三级结构,然后使用 VMD 软件进行看图,获得的空间结构如图 5A。其中 N 端的氨基酸呈现一个长的 α 螺旋结构, β 折叠、无规卷曲和 β 转角位于 C 端。使用拉氏图(Ramachandran plot)检查结果,其中 83.2% 的区域为最合理结构,14.7% 为一般合理区,2.1% 为不可靠区域(图 5B)。

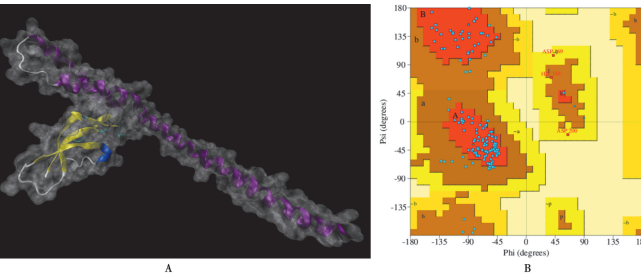


图 5 MpGrpE 蛋白的三级结构(A)和拉氏图(B)
Fig. 5 Tertiary structure(A) and ramachandran plot(B) of MpGrpE protein

6 MpGrpE 蛋白的 B 细胞表位

利用 Bepipred 网站预测 MpGrpE 共有 4 个连续的 B 表位,其氨基酸序列、位置及得分见表 1。MpGrpE 蛋白还含有 4 个非线性表位,其氨基酸组成、位置及得分见表 2 和图 6。

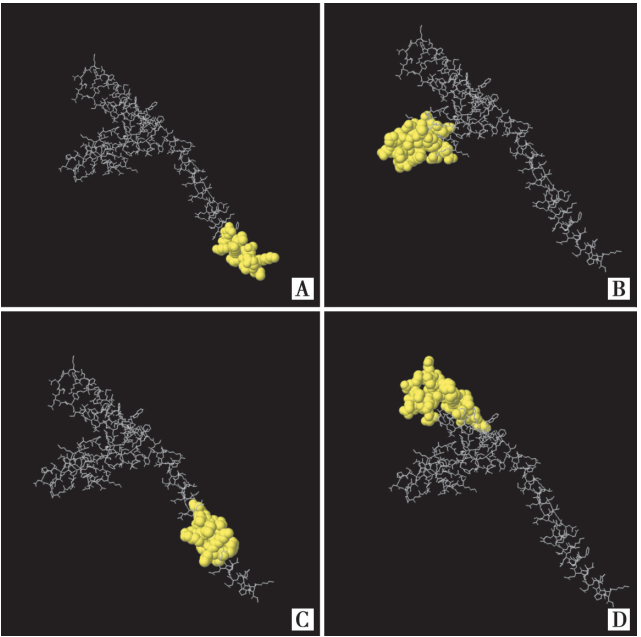


图 6 MpGrpE 蛋白非连续性表位的空间位置
Fig. 6 Spatial location of discontinuous epitopes in MpGrpE protein

7 MpGrpE 互作蛋白

利用在线软件 String 分析 MpGrpE 蛋白的互作蛋白有 DnaK、GroS、GroL、ClpB、HrcA、Tig、FtsY、MPN0138 和 MPNE0024 等(图 7)。

表 1 MpGrpE 蛋白的连续表位的序列以及位置
Table 1 Locations and sequences of continuous B epitopes in MpGrpE protein

编号 No.	起点 Start	终点 End	肽段 Peptide	氨基酸数量 Amount of amino acids	得分 Score
1	57	82	QKIPNLQKVNEEF RLKVEKIQEEAQK ALEAVPSDQPA- NTVV	26	0.807
2	175	189	SYAQKDPQVKNY- TTGFNMVLDA	15	0.795
3	126	147	EPGAQF	22	0.64
4	163	168		6	0.571

表 2 MpGrpE 蛋白的非连续表位的序列以及位置
Table 2 Locations and sequences of discontinuous B epitopes in MpGrpE protein

编号 No.	氨基酸及位置 Amino acid residues and location	氨基酸数量 Amount of amino acids	得分 Score
1	_:Q57, _:K58, _:I59, _:P60, _:N61, _:L62, _:Q63, _:K64, _:V65, _:N66, _:E67, _:E68	12	0.935
2	_:A161, _:I162, _:E163, _:P164, _:G165, _:A166, _:Q167, _:F168, _:D169, _:A175, _:L176, _:E177, _:A178, _:V179, _:P180, _:S181, _:D182, _:Q183, _:P184, _:A185, _:N186, _:T187, _:V188, _:V189, _:V209, _:V210, _:S211, _:Q212	28	0.689
3	_:F69, _:R70, _:L71, _:K72, _:V73, _:E74, _:K75, _:I76, _:Q77, _:E78, _:E79, _:A80, _:Q81, _:K82, _:Q85	15	0.684
4	_:S126, _:Y127, _:A128, _:Q129, _:K130, _:D131, _:P132, _:Q133, _:V134, _:K135, _:N136, _:Y137, _:T138, _:T139, _:G140, _:F141, _:N142, _:M143, _:V144, _:L145, _:D146, _:A147, _:R150	23	0.64

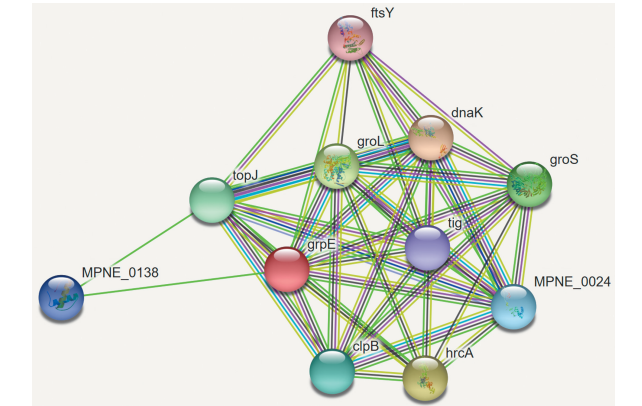
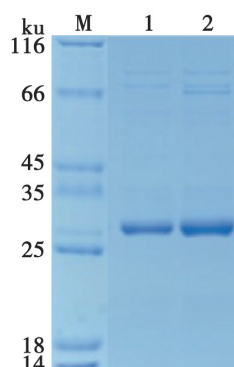


图 7 MpGrpE 的互作蛋白
Fig. 7 The interaction proteins of MpGrpE protein

8 MpGrpE 蛋白的表达与纯化

为了获得重组 MpGrpE 蛋白,利用热激法将 pET28a-MpGrpE 质粒转化表达菌 BL21star (DE3),加入 IPTG,诱导重组菌表达重组 MpGrpE 蛋白。使用 Ni²⁺ 亲和和层析纯化得到 MpGrpE 蛋白,SDS-PAGE

电泳显示为分子质量约为 28.2 ku 的单一蛋白条带(图 8)。



M 蛋白分子质量标准 1、2 纯化的 MpGrpE 蛋白

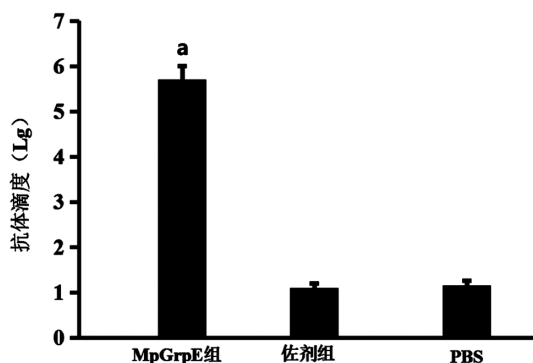
图 8 纯化 MpGrpE 蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein molecular weight standard 1,2 Purified MpGrpE protein

Fig. 8 The purified MpGrpE protein

9 MpGrpE 蛋白的多克隆抗体制备

利用 ELISA 检测 MpGrpE 蛋白免疫小鼠血清中特异 IgG 水平,结果如图 9。MpGrpE 蛋白免疫组小鼠血清抗体滴度显著高于佐剂组和 PBS 对照组(均 $P < 0.05$),表明 MpGrpE 蛋白具有免疫原性。



注(Notes):^a 与佐剂组和 PBS 组比较(Compared with adjuvant group and PBS group), $P < 0.05$ 。

图 9 小鼠血清中 MpGrpE 特异性抗体水平

Fig. 9 MpGrpE antibody

讨论

Mp 是一种引起社区性肺炎的常见致病菌,临床症状为咳嗽,反复喘气。由于儿童和老人免疫力较弱,故极易感染 Mp,近年来我国儿童感染患者明显增加,Mp 在儿童呼吸道感染中的比例高达 40%^[15]。虽然 Mp 感染后大多预后良好,但临床重症感染患者也在增多,非典型病例和并发症愈发常见,因此寻找 Mp 毒力因子及研究 Mp 的致病机制显得十分关键^[16]。

GrpE 蛋白是一种具有多种生物学功能的分子伴侣蛋白,能够通过与二磷酸腺苷的相互作用来调节分子伴侣 HSP70 的活性,与 HSP70 一起辅助蛋白质折叠成正确结构^[10-12]。近年研究发现微生物 GrpE 蛋白参与抵抗胁迫,在营养缺乏、缺氧和高温等不利条件下

起保护功能。肺炎链球菌和鸡毒支原体 GrpE 蛋白还能够介导病原菌对宿主细胞的粘附,是一种十分重要的毒力因子^[13-14]。本研究将 MpGrpE 蛋白与几种同源性较高的支原体以及大肠埃希菌和结核分枝杆菌 GrpE 蛋白进行了比对,结果显示 MpGrpE 与大肠埃希菌和结核分枝杆菌的同源性较低,但是预测得到的 MpGrpE 蛋白三级结构与其他细菌的 GrpE 蛋白三级结构相类似:N 端有一个长 α 螺旋,大部分的 β 折叠、无规卷曲和 β 转角集中在 C 端。但是 MpGrpE 蛋白是否参与肺炎支原体的致病过程有待进一步研究。

生物信息学是一门将计算机科学与生物科学相结合的学科,已广泛用于蛋白质结构和功能的预测分析^[17]。本研究采用多种生物信息学工具分析了 MpGrpE 蛋白的理化性质、信号肽、结构、B 细胞表位、二级结构、三级结构和互作蛋白网络等生物学特性。结果显示,MpGrpE 蛋白的 α 螺旋含量高达 69.12%,预测得到的三级结构中 83.2% 的区域具最佳可信度。MpGrpE 蛋白含有 4 个连续和 4 个非连续的 B 细胞表位,表明 MpGrpE 蛋白具有良好的免疫原性。利用基因工程的方法纯化获得了重组 MpGrpE 蛋白,并用其免疫小鼠,结果证实 MpGrpE 蛋白能够诱导小鼠分泌高滴度的特异性抗体,这与解脲脲原体和结核分枝杆菌 GrpE 蛋白具有良好的免疫保护效果相符合^[18-19]。

本实验采用生物信息学方法预测分析了 MpGrpE 蛋白的生物学特性,利用基因重组及亲和层析技术获得纯化的重组 MpGrpE 蛋白。该蛋白具有免疫原性,能够诱导小鼠产生特异性抗体,为研究 Mp 的致病机制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Waites KB, Xiao L, Liu Y, et al. *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(3):747-809.
- [2] Chen YC, Hsu WY, Chang TH. Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* infections in pediatric community-acquired pneumonia[J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(7):1382-1391.
- [3] Jiang Z, Li S, Zhu C, et al. *Mycoplasma pneumoniae* infections: Pathogenesis and vaccine development[J]. Pathogens, 2021, 10(2):119.
- [4] Xiao L, Ratliff AE, Crabb DM, et al. Molecular characterization of *Mycoplasma pneumoniae* isolates in the United States from 2012 to 2018[J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(10):e00710-20.
- [5] Wang J, Ma X, Wei S, et al. Clinical efficacy and safety of shashen maidong decoction in the treatment of pediatric *Mycoplasma pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis[J]. Front Pharmacol, 2021(12):765656.
- [6] 倪珊珊, 孙红妹. 肺炎支原体对大环内酯类抗生素耐药机制的研究近况[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(8):743-747.

(下转 1149 页)

- [5] Smith JR, Ashander LM, Arruda SL, et al. Pathogenesis of ocular toxoplasmosis [J]. Prog Retin Eye Res, 2021(81):100882.
- [6] Dubey JP, Cerqueira-Cezar CK, Murata FHA, et al. All about toxoplasmosis in cats: the last decade [J]. Vet Parasitol, 2020(283):109145.
- [7] Saraf P, Shwab EK, Dubey JP, et al. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice [J]. Exp Parasitol, 2017(174):25-30.
- [8] Yang Y, Ren H, Xin S, et al. Comparative immunological response and pathobiology of mice in oculated with *Toxoplasma gondii* isolated from different hosts [J]. J Parasitol, 2021, 107(2):179-181.
- [9] Matta SK, Rinkenberger N, Dunay IR, et al. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(7):467-480.
- [10] Mendez OA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*: entry, association, and physiological influence on the central nervous system [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(7):e1006351.
- [11] Li ZY, Liang X, Guo HT, et al. *Toxoplasma* invasion delayed by TgERK7 eradication [J]. Parasitol Res, 2020, 119(11):3771-3776.
- [12] Antil N, Kumar M, Behera SK, et al. Unraveling *Toxoplasma gondii* GT1 strain virulence and new protein-coding genes with proteogenomic analyses [J]. OMICS, 2021, 25(9):591-604.
- [13] Olias P, Sibley LD. Functional analysis of the role of *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolases I and II in acute mouse virulence and immune suppression [J]. Infect Immun, 2016, 84(7):1994-2001.
- [14] Mirza Alizadeh A, Jazaeri S, Shemshadi B, et al. A review on inactivation methods of *Toxoplasma gondii* in foods [J]. Pathog Glob Health, 2018, 112(6):306-319.
- [15] Khan A, Grigg ME. *Toxoplasma gondii*: laboratory maintenance and growth [J]. Curr Protoc Microbiol, 2017(44):11-17.
- [16] Wurtz N, Papa A, Hukic M, et al. Survey of laboratory-acquired infections around the world in biosafety level 3 and 4 laboratories [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(8):1247-1258.
- [17] M nard AD, Trant JF. A review and critique of academic laboratory safety research [J]. Nat Chem, 2020, 12(1):17-25.
- [18] Gassiep I, Bauer MJ, Harris PNA, et al. Laboratory safety: handling *Burkholderia pseudomallei* isolates without a biosafety cabinet [J]. J Clin Microbiol, 2021, 59(7):e0042421.
- [19] Yucesan B, Ozkan O. Laboratory safety in parasitology laboratory [J]. Turkiye Parazitolo Derg, 2018, 42(2):144-153.
- [20] Valenzuela-Moreno LF, Mendez-Cruz ST, Rico-Torres CP, et al. SAG3 *Toxoplasma gondii* cloning reveals unexpected fivefold infection in the blood of feral cats in the Mexican Caribbean [J]. BMC Vet Res, 2022, 18(1):33.
- [21] Galvan-Ramirez Mde L, Gutierrez-Maldonado AF, Verduzco-Grijalva F, et al. The role of hormones on *Toxoplasma gondii* infection: a systematic review [J]. Front Microbiol, 2014(5):503.

【收稿日期】 2020-04-20 【修回日期】 2020-07-15

(上接 1144 页)

- [7] Rivaya B, Jordana-Lluch E, Fernandez-Rivas G, et al. Macrolide resistance and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* infections during a 4 year period in Spain [J]. J Antimicrob Chemother, 2020, 75(10):2752-2759.
- [8] Zhou Y, Wang J, Chen W, et al. Impact of viral coinfection and macrolide-resistant mycoplasma infection in children with refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia [J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1):633.
- [9] Beeton ML, Zhang XS, Uldum SA, et al. *Mycoplasma pneumoniae* infections, 11 countries in Europe and Israel, 2011 to 2016 [J]. Euro Surveill, 2020, 25(2):1900112.
- [10] Nakamura A, Takumi K, Miki K. Crystal structure of a thermophilic GrpE protein: insight into thermosensing function for the DnaK chaperone system [J]. J Mol Biol, 2010, 396(4):1000-1011.
- [11] Ziemienowicz A, Skowyra D, Zeilstra-Ryalls J, et al. Both the *Escherichia coli* chaperone systems, GroEL/GroES and DnaK/DnaJ/GrpE, can reactivate heat-treated RNA polymerase. Different mechanisms for the same activity [J]. J Biol Chem, 1993, 268(34):25425-25431.
- [12] Bracher A, Verghese J. GrpE, Hsp110/Grp170, HspBP1/Sil1 and BAG domain proteins: nucleotide exchange factors for Hsp70 molecular chaperones [J]. Subcell Biochem, 2015(78):1-33.
- [13] Murakami J, Terao Y, Morisaki I, et al. Group A streptococcus adheres to pharyngeal epithelial cells with salivary proline-rich proteins via GrpE chaperone protein [J]. J Biol Chem, 2012, 287(26):22266-22275.
- [14] 周长平, 陈莹, 李媛, 等. 鸡毒支原体热休克蛋白 GrpE 粘附特性的鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(1):28-33.
- [15] Zhang WZ, Zhang SJ, Wang QY, et al. Outbreak of macrolide-resistant *mycoplasma pneumoniae* in a primary school in Beijing, China in 2018 [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1):871.
- [16] Lin M, Shi L, Huang A, et al. Efficacy of levofloxacin on macrolide-unresponsive and corticosteroid-resistant refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children [J]. Ann Palliat Med, 2019, 8(5):632-639.
- [17] 黄晓慧, 王伟, 王倩, 等. 生殖支原体 P110 蛋白的生物信息学分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(06):639-643, 650.
- [18] Tang Y, Guo F, Lei A, et al. GrpE immunization protects against *Ureaplasma urealyticum* infection in BALB/C mice [J]. Front Immunol, 2020(11):1495.
- [19] Kim WS, Kim JS, Kim HM, et al. Comparison of immunogenicity and vaccine efficacy between heat-shock proteins, HSP70 and GrpE, in the DnaK operon of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):14411.

【收稿日期】 2022-05-08 【修回日期】 2022-07-22