

# 牛支原体热休克蛋白 GrpE 的表达及黏附功能分析

张梦婷<sup>1</sup>, 尚小粉<sup>1</sup>, 马海云<sup>1</sup>, 张立<sup>1</sup>, 杨永宁<sup>2</sup>, 何肖肖<sup>1</sup>, 邢小勇<sup>1</sup>,  
权国梅<sup>1</sup>, 武小椿<sup>1</sup>, 包世俊<sup>1\*</sup>, 张志雄<sup>1\*</sup>

1 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州

2 青海农牧科技职业学院, 青海 西宁

张梦婷, 尚小粉, 马海云, 张立, 杨永宁, 何肖肖, 邢小勇, 权国梅, 武小椿, 包世俊, 张志雄. 牛支原体热休克蛋白 GrpE 的表达及黏附功能分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(1): 267-283.

ZHANG Mengting, SHANG Xiaofen, MA Haiyun, ZHANG Li, YANG Yongning, HE Xiaoxiao, XING Xiaoyong, QUAN Guomei, WU Xiaochun, BAO Shijun, ZHANG Zhixiong. Investigating the expression and adhesive role of the heat shock protein GrpE in *Mycoplasma bovis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(1): 267-283.

**摘要:** 【目的】分析牛支原体(*Mycoplasma bovis*, Mb)热休克蛋白 GrpE 的进化保守性与结构特征, 解析其亚细胞定位及在介导黏附过程中的生物学特性。【方法】参照 Mb PG45 株 GrpE 基因序列(GenBank 登录号为 CP002188.1)设计引物, 构建原核表达载体 pET-GrpE。基于基因测序结果, 利用生物信息学方法分析 GrpE 的同源性、遗传进化、理化性质及结构特征。将重组质粒转化后诱导表达, 经镍亲和层析纯化获得重组 GrpE 蛋白, 采用 SDS-PAGE 分析结果。以重组蛋白免疫新西兰白兔制备多克隆抗体, 采用 ELISA 测定抗体效价, 通过 Western blotting 检测其免疫原性。利用间接免疫荧光(indirect fluorescent antibody assay, IFA)、ELISA 及 Western blotting 分析 GrpE 的亚细胞定位; 采用 IFA 和 ELISA 结合试验验证 GrpE 的黏附功能。【结果】成功构建原核表达载体 pET-GrpE, 生物信息学分析发现 GrpE 序列在 Mb 内高度保守(相似性达 95% 以上), 该序列编码的蛋白由 341 个氨基酸组成, 无信号肽和跨膜结构, 含有潜在 N-糖基化位点及磷酸化位点。SDS-PAGE 分析显示 GrpE 成功表达且以可溶性形式存在。利用重组蛋白制备多克隆抗体测得其效价为 1:16 000, Western blotting 结果表明 GrpE 蛋白具有良好的免疫原性。IFA、ELISA 及 Western blotting 结果显示 GrpE 定位于菌体胞膜与胞质, 但主要分布于膜表面。IFA 显示 GrpE 蛋白多抗血清可抑制 Mb 对胎牛肺(embryonic bovine lung, EBL)细胞的黏附。结合试验结果表明 GrpE 蛋白以剂量依赖性方式结合宿主细胞膜蛋白, 且该结合可被 GrpE 蛋白多抗抑制( $P < 0.001$ )。

资助项目: 甘肃省农业农村厅科技支撑项目(KJZC-2024-15); 甘肃省现代寒旱特色农业牛产业技术体系建设专项资金(GSARS-01); 甘肃省联合科研基金(24JRRA804); 甘肃省研产融合科技攻关赋能计划(25FNNA002)

This work was supported by the Science and Technology Support Project of the Gansu Provincial Department of Agriculture and Rural Affairs (KJZC-2024-15), the Earmarked Fund for Gansu Agriculture Research System (GSARS-01), the Joint Research Foundation of Gansu Province (24JRRA804), and the Gansu Province R&D-Industry Integration and Technology Empowerment Program (25FNNA002).

\*Corresponding authors. E-mail: BAO Shijun, bsjdy@126.com; ZHANG Zhixiong, zhangzhix@gsau.edu.cn

Received: 2025-06-27; Accepted: 2025-09-09; Published online: 2025-09-29

**【结论】** GrpE 蛋白是 Mb 的一种高度保守的新型黏附素，直接参与 Mb 对宿主细胞的黏附过程，为阐明牛支原体致病机制提供了关键分子靶标。

**关键词：** 牛支原体；GrpE 蛋白；原核表达；亚细胞定位；黏附特性

## Investigating the expression and adhesive role of the heat shock protein GrpE in *Mycoplasma bovis*

ZHANG Mengting<sup>1</sup>, SHANG Xiaofen<sup>1</sup>, MA Haiyun<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, YANG Yongning<sup>2</sup>, HE Xiaoxiao<sup>1</sup>, XING Xiaoyong<sup>1</sup>, QUAN Guomei<sup>1</sup>, WU Xiaochun<sup>1</sup>, BAO Shijun<sup>1\*</sup>, ZHANG Zhixiong<sup>1\*</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China

2 Qinghai Agri-animal Husbandry Vocational College, Xining, Qinghai, China

**Abstract: [Objective]** To analyze the evolutionary conservation and structural characteristics of the heat shock protein GrpE from *Mycoplasma bovis*, elucidate its subcellular localization, and investigate its biological properties in mediating the adhesion process. **[Methods]** Primers were designed based on the GrpE gene sequence (GenBank accession number: CP002188.1) of *Mycoplasma bovis* PG45, and the prokaryotic expression vector pET-GrpE was constructed. Following gene sequencing, bioinformatics methods were employed to analyze the homology, phylogenetic relationships, physicochemical properties, and structural characteristics of GrpE. Following transformation of the recombinant plasmid and induced expression, the yielded recombinant GrpE protein was purified *via* nickel affinity chromatography, and then SDS-PAGE was conducted. The purified recombinant protein was used to immunize New Zealand White rabbits to generate polyclonal antibodies, with the antibody titer determined by ELISA and immunogenicity assessed *via* Western blotting. The subcellular localization of GrpE was examined *via* indirect indirect fluorescent antibody assay (IFA), ELISA, and Western blotting. The adhesion function of GrpE was validated through integrated IFA and ELISA. **[Results]** The prokaryotic expression vector pET-GrpE was successfully constructed in this study. Bioinformatics analysis revealed that the GrpE sequence was highly conserved in *Mycoplasma bovis* (with identity exceeding 95%). The encoded protein consisted of 341 amino acid residues, with no signal peptide and transmembrane domain but potential N-glycosylation and phosphorylation sites. SDS-PAGE results confirmed the successful expression of GrpE in a soluble form. Polyclonal antibodies generated *via* the purified recombinant protein exhibited a titer of 1:16 000. Western blotting analysis further verified the strong immunogenicity of the GrpE protein. Localization studies using IFA, ELISA, and Western blotting indicated that GrpE is distributed in both the cell membrane and the cytoplasm, with predominant distribution observed on the membrane surface. Importantly, the anti-GrpE polyclonal antiserum significantly inhibited the adhesion of *Mycoplasma bovis* to embryonic bovine lung (EBL) cells. Furthermore, binding assays demonstrated that the interaction between GrpE and host cell membrane proteins is dose-dependent, and this binding was inhibited

by the polyclonal antibody ( $P < 0.001$ ). **[Conclusion]** GrpE is identified as a highly conserved novel adhesion of *Mycoplasma bovis* that directly participates in the adhesion to host cells, providing a key molecular target for elucidating the pathogenic mechanism of *Mycoplasma bovis*.

**Keywords:** *Mycoplasma bovis*; GrpE protein; prokaryotic expression; subcellular localization; adhesion properties

牛支原体(*Mycoplasma bovis*, Mb)是一种严重危害牛群健康的重要病原体。1961年,美国学者 Hale 从患乳腺炎的病牛体内分离得到该病原体<sup>[1]</sup>; 1976年,依据 16S rRNA 基因将其命名为牛支原体<sup>[2]</sup>。牛支原体感染可引发牛的多种疾病,如呼吸道综合征、中耳炎、关节炎、肺炎、乳腺炎等<sup>[3-4]</sup>,这些疾病给养牛业带来了巨大的经济损失。由于该病原菌无细胞壁结构,抗原组成复杂,致病机制尚不完全明确<sup>[5]</sup>,且缺乏有效的疫苗和治疗手段,导致该病的防控面临巨大挑战。随着对牛支原体致病机制研究的深入,其蛋白的致病及免疫相关特性逐渐受到关注。因此,深入探究牛支原体的关键致病因子对于研究其致病机制和免疫机理,以及研发新型诊断技术和防控策略具有重要意义。

Mb 感染宿主的过程主要与其膜蛋白相关,这些膜蛋白在 Mb 黏附过程中能够与宿主细胞表面的多种靶蛋白直接或间接结合,从而促进病原体的定殖和感染<sup>[6]</sup>。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)作为分子伴侣,在正常细胞过程和应激条件下负责蛋白质的折叠、组装、转运和降解起着关键作用<sup>[7-8]</sup>。其中, Hsp70 家族核酸交换因子(GrpE)与 DnaK 和 DnaJ 共同参与蛋白质的折叠和修复,维持细胞内蛋白质的稳态<sup>[9]</sup>。GrpE 是一种高度保守的抗原和新型免疫激活剂,在多种病原体与宿主细胞的相互作用中作为重要的毒力因子发挥关键作用,如结核分枝杆菌 GrpE 参与调节宿主免疫反应,特别是在促进 Th1 型免疫应答方面<sup>[10]</sup>; 猪链球菌 GrpE 蛋白与 ComD 蛋白协同作用,促进细菌黏附到宿主细胞表面,并参与其生物膜的形成,从而增强了猪链球菌的毒力<sup>[11]</sup>。

目前,尚无关于 Mb GrpE 的相关研究报道。本研究首先对牛支原体 GrpE 基因进行 PCR 扩增,构建其原核表达载体;随后利用生物信息学方法分析 GrpE 蛋白的进化保守性和结构特征。将重组质粒转化至大肠杆菌 Rosetta(DE3)后,经 IPTG 诱导表达并纯化重组蛋白;其次利用重组蛋白免疫新西兰白兔以制备多克隆抗体。同时,通过免疫原性分析、亚细胞定位和黏附特性试验阐明 GrpE 在 Mb 感染过程中的作用,以期揭示病原菌与宿主细胞的相互作用关系提供理论依据,并为后续新型疫苗研发及靶向治疗策略的开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种、载体、细胞与实验动物

牛支原体武威分离株由甘肃农业大学传染病实验室从病死牛肺组织中分离并鉴定保存<sup>[12]</sup>;原核表达载体 pET-28a(+),大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ 、胎牛肺细胞均由甘肃农业大学动物医学院传染病实验室保存。大肠杆菌感受态细胞 Rosetta(DE3)购自北京擎科生物科技股份有限公司,新西兰白兔购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

支原体培养基基础,青岛海博生物技术有限公司; T4 DNA Ligase、*Bam*H I、*Xho* I 限制酶,宝日医生物技术(北京)有限公司;  $2\times$ Taq Master Mix,北京擎科生物技术有限公司;核酸提取与胶回收相关试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;支原体膜蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、细胞膜提取试剂盒,

Solarbio 公司; ECL 显色试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司; DM2000 DNA marker, 康为世纪生物科技有限公司; 山羊抗兔 FITC/HRP IgG H&L, 北京博奥森生物技术有限公司; DM8000 DNA marker 与蛋白分子质量标准, 赛默飞世尔科技公司; 弗氏佐剂, BioFroxx 公司; High Affinity Ni-NTA Resin, GenScript 公司; 兔抗 Mb 菌体多抗血清为本实验室制备。

## 1.2 Mb 培养及基因组的提取

将冻存的 Mb 涂布于牛支原体固体培养基上, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。挑取单菌落后于试管中以 10% 的比例传代培养, 培养至对数中后期(*OD*<sub>600</sub> 为 0.3)。取 1 mL 菌液 12 000 r/min 离心 10 min, 无菌 PBS 洗涤后, 用 50 μL PBS 重悬, 沸水浴 10 min, 冰浴 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清即为粗提的牛支原体基因组 DNA, -80 °C 保存备用。

## 1.3 GrpE 基因的扩增

参照 GenBank 中 Mb PG45 株 GrpE 蛋白基因序列(序列号为 CP002188.1)设计特异性引物 GrpE-F (5'-CGGGATCCATGAGTTCGATGATGATAAAAG-3')和 GrpE-R (5'-CCCTCGAGTTACTTATTGCTTTTGCA-3'), 上下游引物中已分别添加酶切位点, 其中下划线标记部分即为引入的 *Bam*H I (上游)和 *Xho* I (下游)酶切位点, 引物由北京擎科生物科技股份有限公司西安分公司合成。PCR 反应体系(20 μL): 2×*Taq* Master Mix (2 U/50 μL) 10 μL, 基因组 DNA 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 双蒸水 7 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析并应用通用型 DNA 纯化回收试剂盒回收目的基因。

## 1.4 原核表达载体 pET-GrpE 的构建

用 *Bam*H I 和 *Xho* I 对 GrpE 基因与 pET-28a(+) 进行双酶切, 37 °C 酶切 6–7 h 后应用通用型

DNA 纯化回收试剂盒回收酶切产物。将酶切后的目的基因与酶切后的 pET-28a(+)用 T4 DNA Ligase 于 16 °C 过夜连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5α。将菌液涂布于含卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养过夜。挑取单个菌落于含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 7–8 h, 通过菌液 PCR 筛选阳性菌落。双酶切验证结果正确后送北京擎科生物科技股份有限公司西安分公司测序, 测序正确的质粒命名为 pET-GrpE, 测序完成后将序列数据提交至国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC)保存, 编号为 NMDCN00092V5。提交的数据可通过以下链接访问: <https://nmdc.cn/resource/genomics/sequence/detail/NMDCN00092V5>。

## 1.5 Mb GrpE 基因及其编码蛋白的生物信息学分析

本实验室前期研究表明, Mb 武威株相关基因(如 *p48*<sup>[13]</sup>、*pdhc*<sup>[14]</sup>、*fba*<sup>[15]</sup>、*eno*<sup>[16]</sup>等)与 PG45 株一致性均大于 99%。基于此, 将测序后获得的 GrpE 序列与 Mb PG45 株进行比对, 并在 NCBI 进行检索, 通过在线 BLAST 进行同源性分析, 利用 TBtools 软件绘制同源性热图。相关同源性参考株见表 1, 通过 MEGA-11.0 采用邻接法构建系统发育树。

利用在线软件 ProtParam 分析理化性质, 在线软件 SOPMA 和 SWISS-MODEL 预测二级、三级结构, 使用 ProtScale、SignalP、TMHMM 2.0、NetPhos 3.1 和 NetNGlyc 1.0 在线软件分析预测疏水性、信号肽、跨膜结构、磷酸化和糖基化位点。

## 1.6 Mb GrpE 原核表达及纯化

将重组质粒 pET-GrpE 转化至大肠杆菌 Rosetta(DE3)感受态细胞, 挑取阳性菌落于含卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 培养 7–8 h, 1:100 转接于含卡那霉素的 2YT 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 *OD*<sub>600</sub> 约 0.6 时加入 10<sup>-3</sup> mol/L 的 IPTG 16 °C 诱导表达 16–18 h,

表1 GrpE参考毒株信息

Table 1 Information of GrpE reference strains

毒株名称 Strain name	GenBank 登录号 GenBank accession number	来源 Origins	分离年 Separatist year
<i>Mycoplasmopsis bovis</i> PG45	CP002188.1	USA	1962
<i>Mycoplasmopsis bovis</i> HB0801	CP002058.1	China	2012
<i>Mycoplasmopsis bovis</i> Hubei-1	CP002513.1	China	2008
<i>Mycoplasmopsis bovis</i> CQ-W70	AIA34177.1	China	2009
<i>Mycoplasmopsis bovis</i> KG4397	BBJ33502	Japan	2012
<i>Mycoplasmopsis bovis</i>	WP141790845	USA	1962
<i>Mycoplasmopsis agalactiae</i>	WP433962572.1	Poland	1931
<i>Mycoplasmopsis agalactiae</i> 14628	EIN15301.1	France	2006
<i>Mycoplasmopsis primat</i>	WP051622776	USA	1971
<i>Mycoplasmopsis tauri</i>	WP223656126	Austria	1964
<i>Mycoplasmopsis felifaucium</i>	WP338822355.1	Britain	2000
<i>Mycoplasmopsis phocirhinis</i>	WP130429694.1	USA	1991
<i>Mycoplasmopsis gallinarum</i>	WP063626320.1	Canada	1955
<i>Mycoplasmopsis californica</i>	WP051604552.1	USA	1981
<i>Mycoplasmopsis hominis</i>	WP114091269.1	Germany	1953

将菌液 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 采用 Binding buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.8 g、NaCl 14.61 g、咪唑 0.170 2 g, 溶于适量超纯水后调 pH 至 8.0, 定容至 500 mL) 悬浮菌体并在冰浴条件下进行超声 (功率 220 W、工作 3 s、停歇 3 s, 时间 15 min) 破碎, 破碎液清亮后在 4 °C、10 000 r/min 离心 8 min, 上清液采用 0.45 μm 滤器过滤, 应用 High Affinity Ni-TNA Resin 纯化重组蛋白, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 然后进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.7 抗血清的制备及效价检测

取含 800 μg 纯化 GrpE 蛋白与等量的弗氏完全佐剂完全乳化, 皮下多点注射免疫新西兰白兔, 首免 2 周后进行二免, 蛋白剂量减半并与等量的弗氏不完全佐剂混匀乳化, 之后的免疫操作与二免相同。经 4 次免疫后分离血清测定抗体效价, 达到预期结果后, 心脏采血分离血清于 -20 °C 保存。将牛支原体全菌按每孔 5 μg 包被 96 孔酶标板, 37 °C 孵育 2 h, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。将阳性血清和阴性血清按倍比稀

释后加入各孔, 37 °C 孵育 2 h, 1:5 000 稀释山羊抗兔 HRP-IgG, 37 °C 孵育 1 h, 加入显色底物 TMB 室温避光孵育 15 min, 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 在 OD<sub>450</sub> 处测量吸光值并分析。

### 1.8 重组蛋白 GrpE 免疫原性分析

取等体积的 pET-28a(+) 及纯化蛋白制样, 取 10 μL 上清进行 SDS-PAGE, 电泳后应用湿转法 (100 V, 45 min) 将蛋白转印至 NC 膜, 用 5% 封闭液室温封闭 2 h, 用 Mb 全菌多抗血清 1:1 000 室温孵育 2 h, 用 1:5 000 稀释的山羊抗兔 HRP-IgG 室温孵育 1.5 h, 应用 ECL 显色试剂盒显色。

### 1.9 重组蛋白 GrpE 亚细胞定位

取 100 mL 培养至对数生长期的 Mb 菌液, 10 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体, PBS 洗涤 3 次, 用 1 mL PBS 重悬菌体。取适量作为 Mb 菌体蛋白, 剩余菌液使用支原体膜蛋白提取试剂盒提取胞膜和胞质蛋白。

将 Mb 菌体蛋白、胞膜蛋白和胞质蛋白分别包被酶标板, 以 1:400 稀释的 rMb GrpE 抗血清

为一抗, 采用 ELISA 分析其在 Mb 中的分布。

取等体积的牛支原体菌体蛋白、胞膜蛋白和胞质蛋白沸水浴制样, 各吸 10  $\mu$ L 上清进行 SDS-PAGE, 电泳后应用湿转法(电压 100 V)将蛋白转印至 NC 膜, 5% 封闭液室温封闭 2 h, 用 1:1 000 稀释的 GrpE 兔抗血清室温孵育 2 h, 用 1:5 000 稀释的山羊抗兔 HRP-IgG 室温孵育 1.5 h, 应用 ECL 显色试剂盒显色。

取 2 mL 培养至对数生长期的 Mb, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用 100  $\mu$ L 的无菌 PBS 重悬菌液。取适量菌液均匀涂布于载玻片, 待自然风干后用 4% 多聚甲醛固定, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 用 1:1 000 稀释的 rGrpE 抗血清、Mb 抗血清和免疫前血清 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 用 1:500 稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG H&L 避光 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 清洗后封片在荧光显微镜下观察。

## 1.10 rGrpE 蛋白黏附特性研究

### 1.10.1 Mb 对 EBL 细胞的黏附及多抗血清对该黏附的抑制

将 EBL 细胞接种于含细胞爬片的 12 孔板, 培养至细胞融合度达 60%–70% 时, 将其中一孔细胞用胰酶消化后计数。收集生长到对数生长期的 Mb, 用无菌 PBS 洗 3 次后采用 100  $\mu$ L PBS 重悬。将 Mb 以 1:50 的比例分别与 PBS、免疫前阴性血清、Mb 和 rMb GrpE 多抗血清(血清需提前灭活)混合, 在 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中共同孵育 2 h, PBS 洗去未结合的抗体。将上述混合物分别加入 12 孔板, 在培养箱中培养 2 h, 用预冷的 PBS 清洗。用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 5% BSA 室温封闭 2 h, PBS 洗去多余的封闭液; 一抗为用 1:1 000 稀释的 Mb 多抗血清, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 1:500 稀释 FITC 标记的羊抗兔 IgG H&L 为二抗, DiI 染料标记细胞膜, DAPI 标记细胞核。PBS 洗涤后, 将细胞爬片置于含抗荧光淬灭封片液的载玻片上, 于显微镜下观察。试验

设置空白组(正常细胞组)、Mb 感染组、Mb 多抗血清试验组、rMb GrpE 多抗血清试验组、免疫前血清阴性组。结果采用 ImageJ 图像分析软件测定相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI), 取平均值。

### 1.10.2 ELISA 检测 rGrpE 与 EBL 细胞之间的结合能力

提取 EBL 细胞膜总蛋白(500 ng/孔)包被于 96 孔板, 并在 4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 将 rGrpE 蛋白的倍比稀释液(0.977–500 ng)加入含有 EBL 细胞膜总蛋白的 ELISA 孔中; 在抑制试验中, 首先将不同稀释度的抗 GrpE 血清(1:10–1:2 560 稀释)预孵育重组蛋白, 随后加入含有 EBL 细胞膜总蛋白的各孔中, 在 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育, 抗 GrpE 血清(1:1 000)和山羊抗兔 HRP-IgG (1:5 000)分别作为一抗和二抗。37  $^{\circ}$ C 孵育后使用的显色底物是 TMB, 测  $OD_{450}$  值。阴性对照为 BSA 处理。

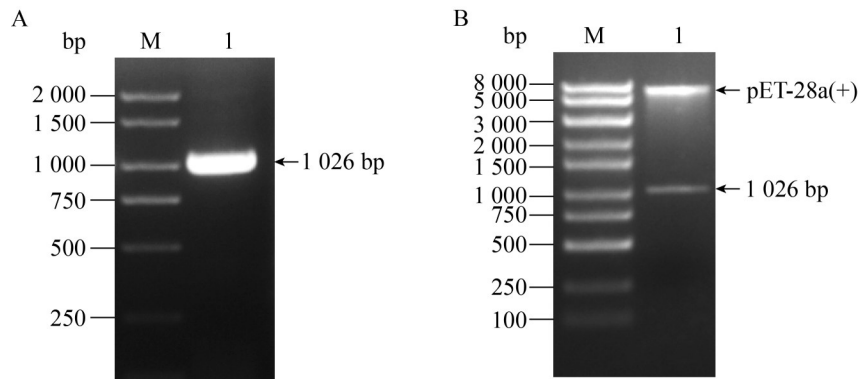
## 1.11 数据处理与统计分析

数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差。所有统计分析均使用 GraphPad Prism 8 软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA)进行差异显著性检验分析并制图。显著性水平设定如下: ns 表示无显著差异, \* 表示差异或效应有统计学意义 ( $0.01 < P < 0.05$ ), \*\* 表示差异显著 ( $P < 0.01$ ), \*\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.001$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 Mb GrpE 基因克隆与重组质粒的鉴定结果

以牛支原体武威分离株 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得牛支原体武威分离株 GrpE 基因序列, 其大小为 1 026 bp (图 1A), 与预期大小一致。将 GrpE 基因片段与 pET-28a(+) 分别进行双酶切后连接, 获得重组质粒 pET-GrpE, 经双酶切鉴定并测序, 测序结果符合预期(图 1B)。



**图1 Mb GrpE分子克隆及重组质粒验证。** A: 基因扩增(泳道M: DNA分子质量标准; 泳道1: GrpE基因PCR产物); B: pET-GrpE双酶切鉴定(泳道M: DNA分子质量标准; 泳道1: pET-GrpE双酶切产物)。

Figure 1 Molecular cloning of *Mycoplasma bovis* GrpE and validation of recombinant plasmid. A: Gene amplification (Lane M: DNA molecular weight markers; Lane 1: GrpE gene PCR product); B: pET-GrpE double enzyme digestion identification (Lane M: DNA molecular weight markers; Lane 1: pET-GrpE double enzyme digestion product).

## 2.2 生物信息学分析结果

### 2.2.1 构建系统发育树

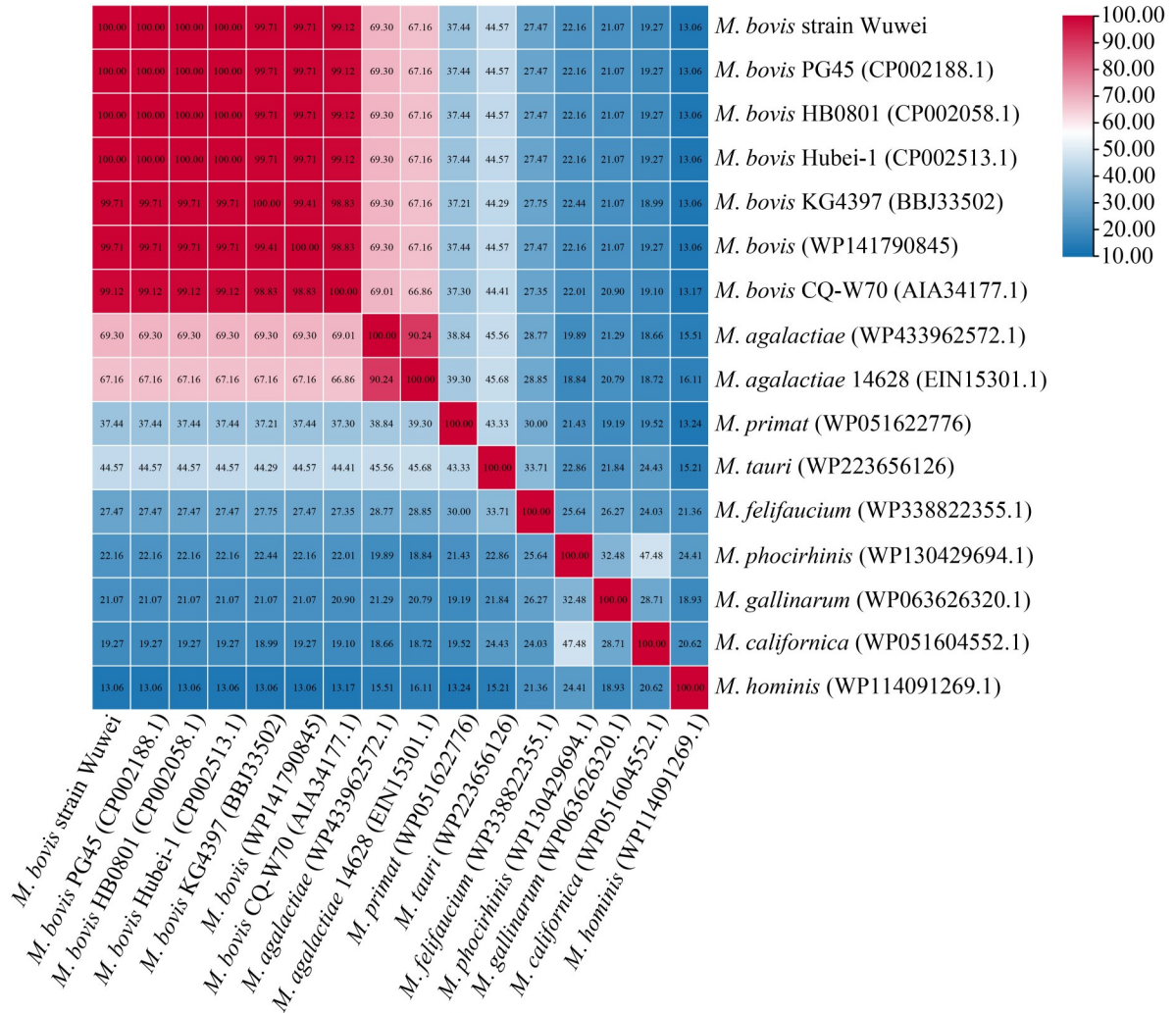
测序结果显示 Mb 武威分离株 GrpE 与国际标准株 PG45 的 GrpE 序列完全一致, 表明两者在基因序列上具有高度相似性。通过同源性热图(图 2A)和系统发育树(图 2B)分析 Mb 武威分离株与其他菌株的遗传关系。同源性分析发现, Mb 武威分离株与 Mb PG45、HB0801、Hubei-1、CQ-W70、KG4397 和 WP141790845 菌株显示出较高的同源性(95% 以上), 与 *M. agalactiae*、*M. agalactiae* 14628 和 *M. primat* 等菌株的同源性较低。从发育树中可以看出, Mb 武威分离株与 PG45、HB0801 和 Hubei-1 形成了一个紧密的分支, 显示出高度的遗传相似性; Mb CQ-W70 株和 Mb WP141790845 与 Mb 武威分离株聚集在同一分支, 显示较高的亲缘关系, 但位于不同的分支点, 表明它们在进化过程中可能经历了一定程度的遗传分化。Mb 武威分离株与其他支原体物种, 如 *M. agalactiae*、*M. primat*、*M. tauri*、*M. felifaucium*、*M. hominis*、*M. gallinarum*、*M. phocirhinis* 和 *M. californica* 的 GrpE 蛋白之间的亲缘关系较远, 这些物种在发

育树上形成了不同的分支, 显示了 GrpE 蛋白在不同支原体物种间的多样性。

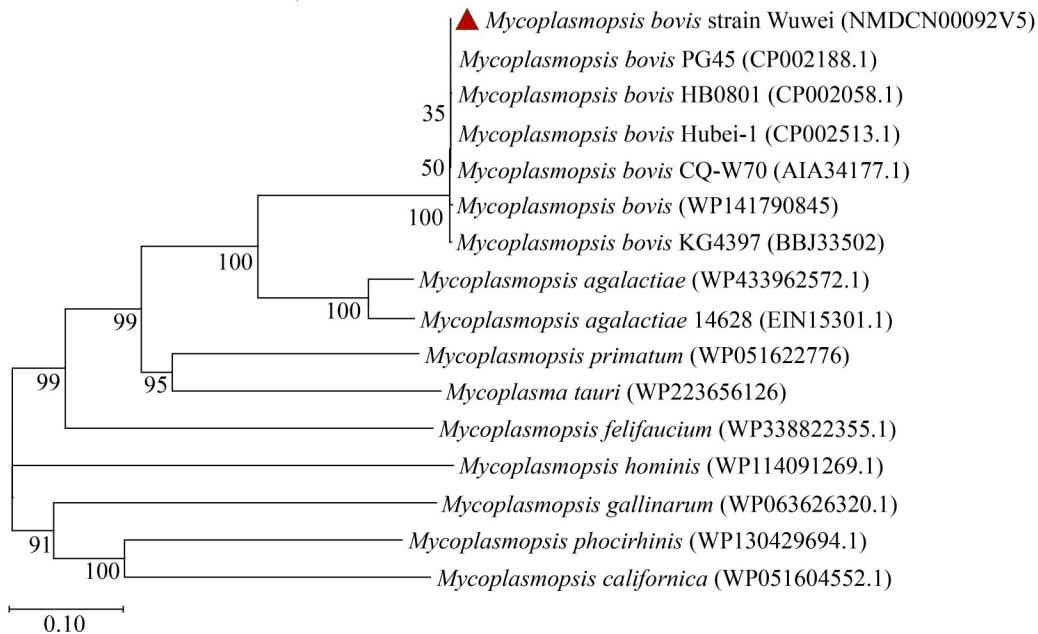
### 2.2.2 GrpE 蛋白结构预测分析结果

通过 ProtParam 预测得知 GrpE 蛋白由 341 个氨基酸组成, 理论等电点为 6.35, 分子量为 39.72 kDa。该蛋白富含赖氨酸(12.9%), 而半胱氨酸含量较低(0.3%), 整体上呈现轻微的负电荷。其分子式为  $C_{1793}H_{2797}N_{463}O_{539}S_8$ , 280 nm 处的吸光度为 0.765, 显示出良好的稳定性(不稳定性指数 27.87), 且具有较高的亲水性(疏水性指数 78.06, GRAVY 值为-0.682)。SignalP 和 TMHMM 2.0 分析表明, GrpE 蛋白缺乏经典的信号肽和跨膜结构域, 提示其可能通过非传统途径定位或分泌。SOPMA 预测显示, 该蛋白主要由  $\alpha$ -螺旋(55.72%)和无规卷曲(34.60%)构成, 含有少量  $\beta$ -折叠(9.68%), 表明其具有较多灵活区域。SWISS-MODEL 预测的三维结构模型(图 3A-3B)具有较高的可靠性(GMQE 为 0.79), 且 92.04% 的残基位于 Ramachandran 最有利区域(图 3C), Clash score 为 0.36, 进一步证实了模型的准确性。NetNGlyc 1.0 预测在第 11 位天冬酰胺残基处存在一个可能的 N-糖基化位点,

A

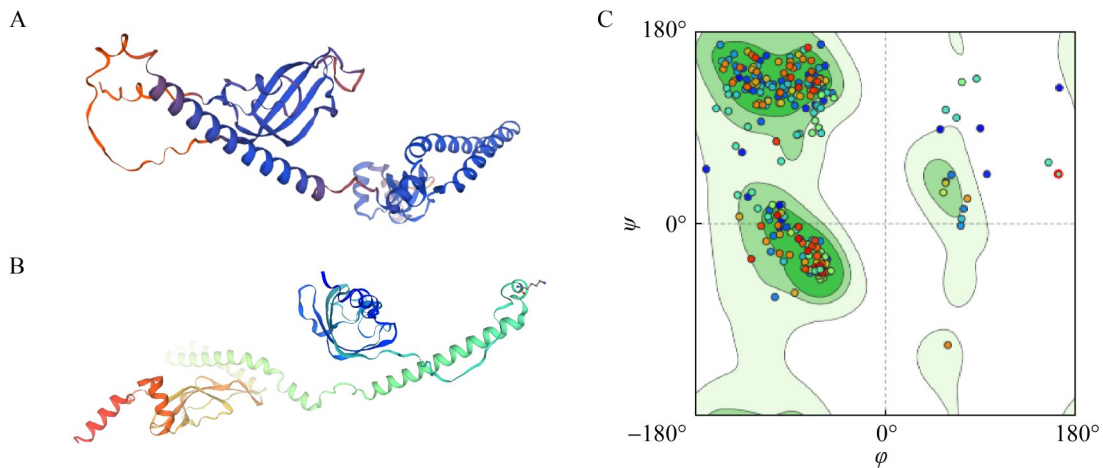


B



**图2 GrpE同源性分析及系统发育树。**A: 同源性热图[颜色梯度从蓝色(低同源性)到红色(高同源性)表示不同菌株间的遗传相似度]; B: 系统发育树基于多序列比对分析构建, 采用邻接法进行推断[图中每个节点上的数字表示该分支的同源性(百分比), 反映了相应分支的置信度; 括号内的序列号为GenBank数据库中的登录号, 用于标识各个菌株; 红色三角形标记的节点代表本研究中分析的牛支原体武威分离株; 标尺表示遗传距离(单位为0.10)用于衡量不同菌株之间的遗传差异, 数值越小表示遗传关系越近]。

Figure 2 Homology analysis and phylogenetic tree of GrpE. A: Homology heat map [The colour gradient from blue (low homology) to red (high homology) indicates the genetic similarity between different strains]; B: The phylogenetic tree was constructed based on multiple sequence alignment analysis and inferred using the neighbor-joining method [The numbers on each node in the figure indicate the homology (percentage) of that branch, reflecting the confidence level of the corresponding branch; The sequence numbers in parentheses are the accession numbers in the GenBank database, used to identify each strain; Nodes marked with red triangle represent the *Mycoplasma bovis* Wuwei isolate analyzed in this study; The scale represents genetic distance (units of 0.10) used to measure genetic differences between strains, with smaller values indicating closer genetic relationships].



**图3 Mb GrpE蛋白三级结构预测及其拉曼光谱分析图。**A-B: Mb GrpE蛋白的三级结构预测(不同颜色代表不同的二级结构: 蓝色为 $\alpha$ -螺旋, 橙色为 $\beta$ -折叠, 绿色为无规卷曲); C: 拉曼光谱分析图(点的分布表示蛋白质中各个残基的二面角值; 颜色编码表示不同的拉曼位移: 其中红色点表示位于最有利区域的残基, 黄色点表示位于允许区域的残基, 蓝色点表示位于宽松区域的残基)。

Figure 3 Prediction of the tertiary structure of *Mycoplasma bovis* GrpE protein and its Raman spectroscopy analysis diagram. A-B: Predicted tertiary structure of *Mycoplasma bovis* GrpE protein (Different colours represent different secondary structures: blue represents  $\alpha$ -helices, orange represents  $\beta$ -sheets, and green represents random coils); C: Raman spectroscopy analysis diagram (The distribution of points indicates the dihedral angle values of each residue in the protein; The colour coding indicates different Raman shifts: red dots represent residues located in the most favourable region, yellow dots represent residues located in the allowed region, blue dots represent residues located in the loose region).

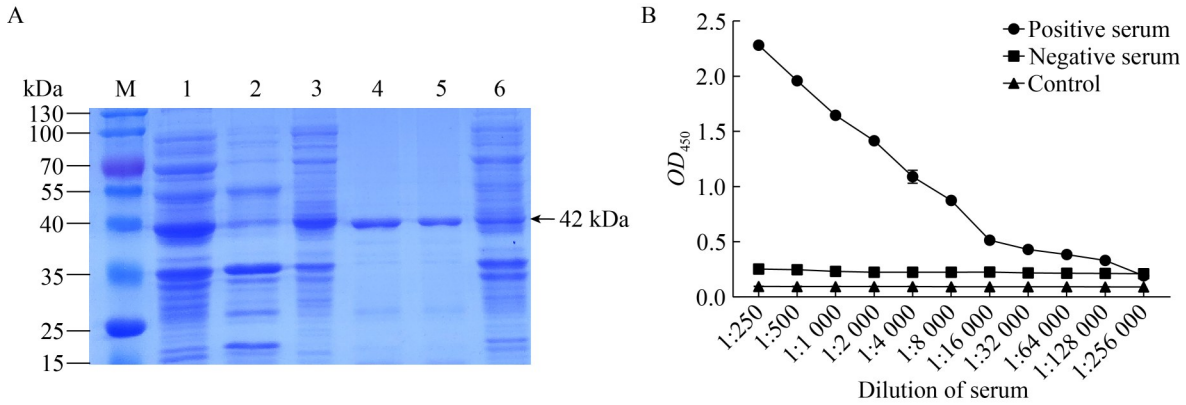
得分为 0.685 0。NetPhos 3.1 预测了多个丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的磷酸化位点, 这些位点的磷酸化潜力得分均超过阈值。

### 2.3 rMb GrpE 蛋白纯化及多抗血清效价检测

重组质粒转化后诱导表达, 经 High Affinity

Ni-NTA Resin 纯化得到的重组蛋白 GrpE, SDS-PAGE 分析表明该蛋白为可溶性表达, 大小约 42 kDa (图 4A), 与预期结果一致。以 Mb 全菌包

被酶标板, 采用间接 ELISA 方法检测分析牛支原体 GrpE 抗血清效价, 结果显示所得抗血清效价为 1:16 000 (图 4B), 表明其具有良好的特异性。



**图4 rMb GrpE蛋白纯化及多克隆抗体效价测定。** A: SDS-PAGE分析蛋白纯化情况[泳道M: 蛋白质分子质量标准; 泳道1: 全菌; 泳道2: pET-GrpE诱导后沉淀; 泳道3: pET-GrpE诱导后上清; 泳道4、5: 纯化后重组蛋白; 泳道6: 诱导后pET-28a(+)]; B: ELISA测定rMb GrpE蛋白的抗体效价。

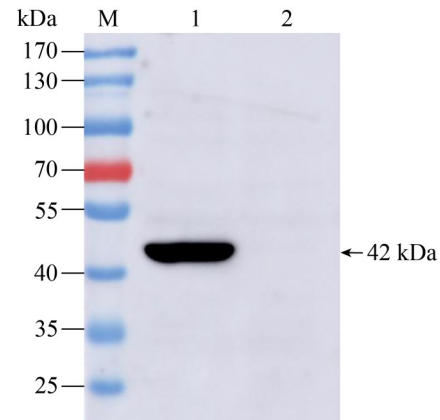
Figure 4 Purification of rMb GrpE protein and titration of polyclonal antibody. A: SDS-PAGE analysis of protein purification [Lane M: Protein molecular weight standards; Lane 1: Whole bacteria; Lane 2: pET-GrpE induced precipitation; Lane 3: pET-GrpE induced supernatant; Lane 4, 5: Purified recombinant protein; Lane 6: Induced pET-28a(+)]; B: ELISA assay for determining antibody titers against recombinant human *Mycoplasma bovis* GrpE protein.

## 2.4 重组蛋白 GrpE 免疫原性试验结果分析

应用 Western blotting 方法分析重组蛋白的免疫原性, 结果显示 Mb 全菌阳性血清可与 GrpE 蛋白有效结合(图 5), 表明该蛋白具有良好的免疫反应原性。

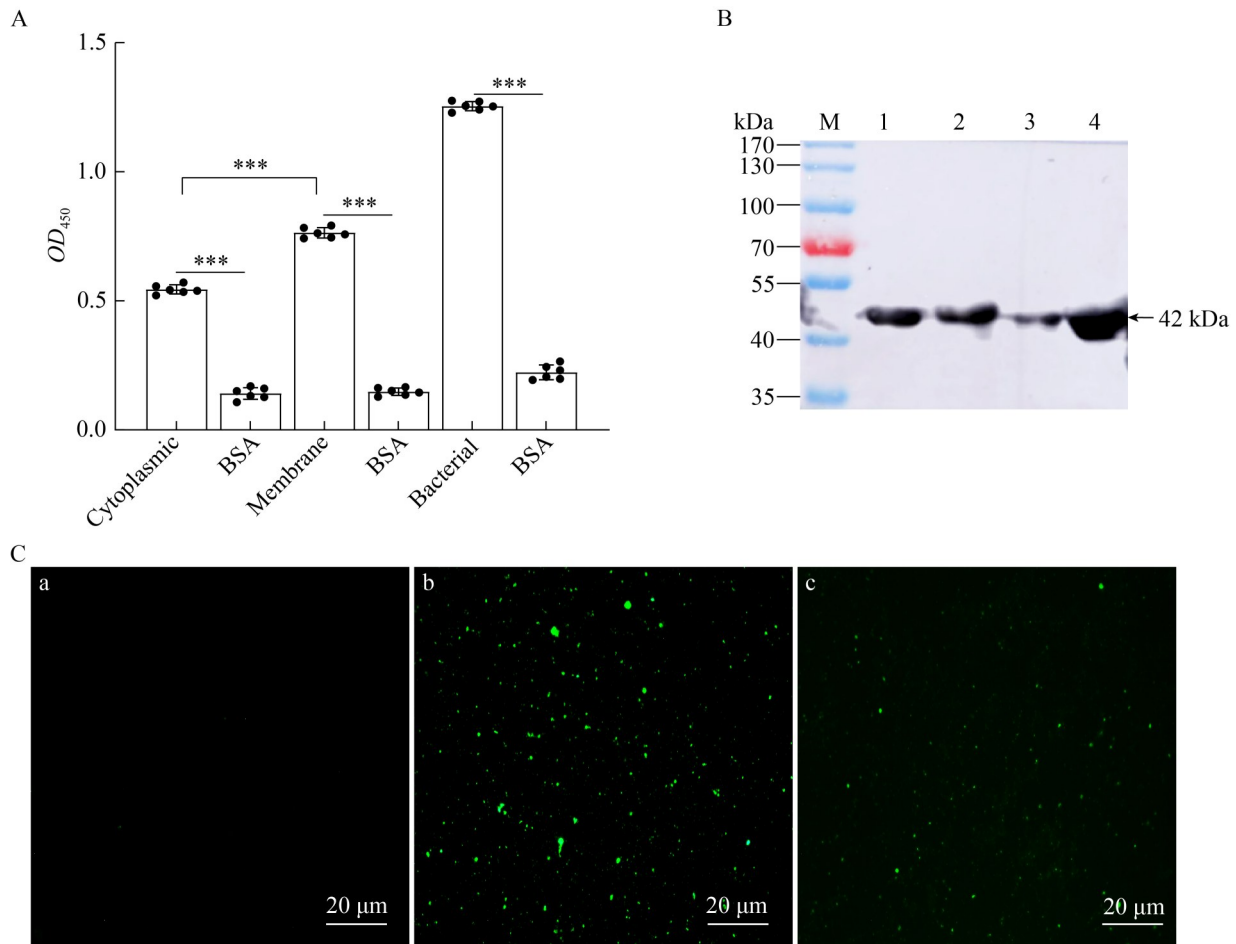
## 2.5 rMb GrpE 的亚细胞定位结果

ELISA 分析结果显示, 与胞质和阴性对照组相比, GrpE 蛋白在牛支原体胞膜中分布较多 (图 6A,  $P < 0.001$ ); Western blotting 结果表明, GrpE 蛋白主要定位于牛支原体的胞膜中, 而在胞质中的表达量较低(图 6B), 与 ELISA 分析结果一致; 间接免疫荧光显示 rGrpE 抗血清组与阳性对照组均于 Mb 菌体周边呈现点状绿色荧光, 免疫前血清阴性对照未检测到特异性荧光, 视野中均未观察到弥散荧光, 表明抗体仅与暴



**图5 重组蛋白GrpE免疫原性分析。** 泳道M: 蛋白质分子质量标准; 泳道1: 纯化后重组蛋白GrpE; 泳道2: IPTG诱导pET-28a(+)表达菌。

Figure 5 Immunogenicity analysis of recombinant protein. Lane M: Protein molecular weight standards; Lane 1: Purified recombinant protein GrpE; Lane 2: IPTG-induced pET-28a(+) expressing bacteria.



**图6 重组蛋白GrpE在Mb中的分布。** A: ELISA检测GrpE在Mb中的分布[图中设置阴性对照组(BSA)和试验组(胞质蛋白、胞膜蛋白和菌体蛋白), 其中, 与阴性对照组相比, \*\*\*表示 $P<0.001$ , 差异极显著; 胞质与胞膜相比, \*\*\*表示 $P<0.001$ , 差异极显著。误差线表示每组数据的标准误差(SEM)]; B: Western blotting分析GrpE蛋白的亚细胞定位[泳道M: 蛋白质分子质量标准; 泳道1: 牛支原体菌体蛋白; 泳道2: 牛支原体胞膜蛋白; 泳道3: 牛支原体胞质蛋白; 泳道4: 纯化重组蛋白]; C: 免疫荧光试验验证GrpE在Mb细胞膜表面的分布(20×)[a: 阴性对照(免疫前血清); b: 阳性对照(Mb菌体抗血清); c: 试验组(rMb GrpE抗血清)]。

**Figure 6** Distribution of the recombinant protein GrpE in *Mycoplasma bovis*. A: ELISA detection of GrpE distribution in *Mycoplasma bovis* [The figure includes a negative control group (BSA) and experimental groups (cytoplasmic protein, membrane protein, and bacterial protein). Compared with the negative control group, \*\*\* indicates  $P<0.001$ , indicating a highly significant difference; Compared with the membrane protein, \*\*\* indicates  $P<0.001$ , indicating a highly significant difference. Error bars represent the standard error of the mean (SEM) for each group]; B: Western blotting analysis of the subcellular localization of the GrpE protein (Lane M: Molecular weight standards for proteins; Lane 1: *Mycoplasma bovis* whole bacterial proteins; Lane 2: *Mycoplasma bovis* membrane proteins; Lane 3: *Mycoplasma bovis* cytoplasmic proteins; Lane 4: Purified recombinant protein); C: Immunofluorescence assay to verify the distribution of GrpE on the *Mycoplasma bovis* cell membrane surface (20×) [a: Negative control (pre-immunization serum); b: Positive control (*Mycoplasma bovis* bacterial antiserum); c: Test group (rMb GrpE antiserum)].

露于膜表面的 GrpE 结合, 进一步证实 GrpE 蛋白主要分布在牛支原体胞膜中(图 6C)。

## 2.6 rGrpE 抗体抑制 Mb 对 EBL 细胞的黏附

利用间接免疫荧光染色法评估牛支原体与 EBL 细胞黏附的影响。IFA 结果显示, 在未免疫血清存在的情况下牛支原体黏附于 EBL 细胞并呈现绿色荧光, 而抗 rGrpE 血清和抗 Mb 血清组中, 绿色荧光显著减少, 表明这 2 种血清均抑制牛支原体的黏附能力(图 7A)。定量分析进一步证实, 阴性血清对牛支原体黏附 EBL 细胞无抑制作用, 抗 rGrpE 血清和抗 Mb 血清则显著降低了牛支原体的黏附能力(图 7B)。

## 2.7 rGrpE 对 EBL 细胞膜蛋白的黏附和黏附抑制

ELISA 定量分析 rGrpE 和细胞之间的相互作用, 在 0.977–500 ng 的范围内, rGrpE 以剂量依赖的方式与细胞膜蛋白结合(图 8A), 与阴性血清相比, 这种结合被抗 GrpE 血清以剂量依赖性抑制, 而阴性血清无明显抑制作用(图 8B), 这些数据表明 Mb GrpE 发挥黏附素的功能。

## 3 讨论

牛支原体病是引发牛呼吸道疾病等多种疾病的重要病原体, 多发于冬春两季<sup>[17]</sup>。自 2008 年我国首次分离出牛支原体以来<sup>[18]</sup>, 该病原已在全国范围内扩散, 给我国养牛业带来了巨大的经济损失, 牛支原体感染可引发多种疾病<sup>[19]</sup>, 其致病机制与多种表面蛋白的黏附功能密切相关, 而膜相关蛋白也会引发免疫反应<sup>[20]</sup>。因此, 深入研究牛支原体膜蛋白的黏附特性及其免疫原性有助于揭示牛支原体的致病机制, 并制定相应的防控策略。

GrpE 作为一种热休克蛋白, 在支原体属(如肺炎支原体、生殖支原体)及亲缘属(如脲原体属)的多种细菌中, 其基因序列与蛋白结构均高度保守<sup>[21]</sup>。在鸡毒支原体中热休克蛋白 GrpE 的

功能结构域具有高度保守性, 且具有强免疫原性, 已被用于设计亚单位疫苗<sup>[22-23]</sup>。此外, 分枝杆菌属结核分枝杆菌 GrpE 的 TLR4 结合域高度保守, 感染宿主后其表达显著上调, 可增强机体抗结核分枝杆菌感染的能力, 具有作为候选疫苗的潜力<sup>[10]</sup>。GrpE 具有良好的免疫原性, 能够诱导宿主产生特异性的体液和细胞免疫反应<sup>[24]</sup>。本研究以 PG45 作为标准株进行牛支原体 GrpE 基因引物设计, 以牛支原体武威分离株为模板扩增目的基因, 成功构建了原核表达载体。通过同源性热图和系统发育树分析发现, Mb 武威分离株 GrpE 序列在牛支原体内高度保守, 该序列编码的蛋白具有典型的热休克蛋白结构特征( $\alpha$ -螺旋主导的三维构象、潜在修饰位点)。序列保守这一发现与肺炎支原体、生殖支原体等研究中 GrpE 的高度保守性一致<sup>[25]</sup>, 为其作为免疫靶标提供了进化依据。应用 Ni-NTA 纯化重组 His 标签蛋白后经 SDS-PAGE 分析, GrpE 成功表达且以可溶性形式存在。纯化后的重组 GrpE 蛋白制备多抗分析其效价为 1:16 000, 并且通过免疫原性分析发现其具有良好的免疫原性, 有望成为开发针对牛支原体感染的亚单位疫苗的候选抗原。

膜相关蛋白在 Mb 的致病过程中不仅参与黏附和入侵宿主细胞, 还会引发强烈的免疫反应<sup>[20]</sup>。研究表明 NADH 氧化酶(NOX)是一种膜蛋白, 不仅具有氧化酶的催化活性, 还作为黏附素发挥作用<sup>[26]</sup>; 膜蛋白  $\alpha$ -烯醇酶具有高度的免疫原性, 能够诱导宿主产生强烈的免疫反应<sup>[27]</sup>, 还能与宿主细胞的血浆纤溶酶原(Plg)结合, 从而促进牛支原体的入侵<sup>[28]</sup>; MilA 是一种具有脂酶活性的膜蛋白, 参与免疫逃逸机制, 抑制牛支原体的体外增殖<sup>[29-30]</sup>。通过 ELISA、Western blotting 和间接免疫荧光证实 GrpE 是牛支原体的膜蛋白。

近年来, 研究发现牛支原体的多种表面蛋白具有黏附功能, 可对宿主细胞造成损伤, 主要依赖于该功能这些蛋白在病原体与宿主细胞的相

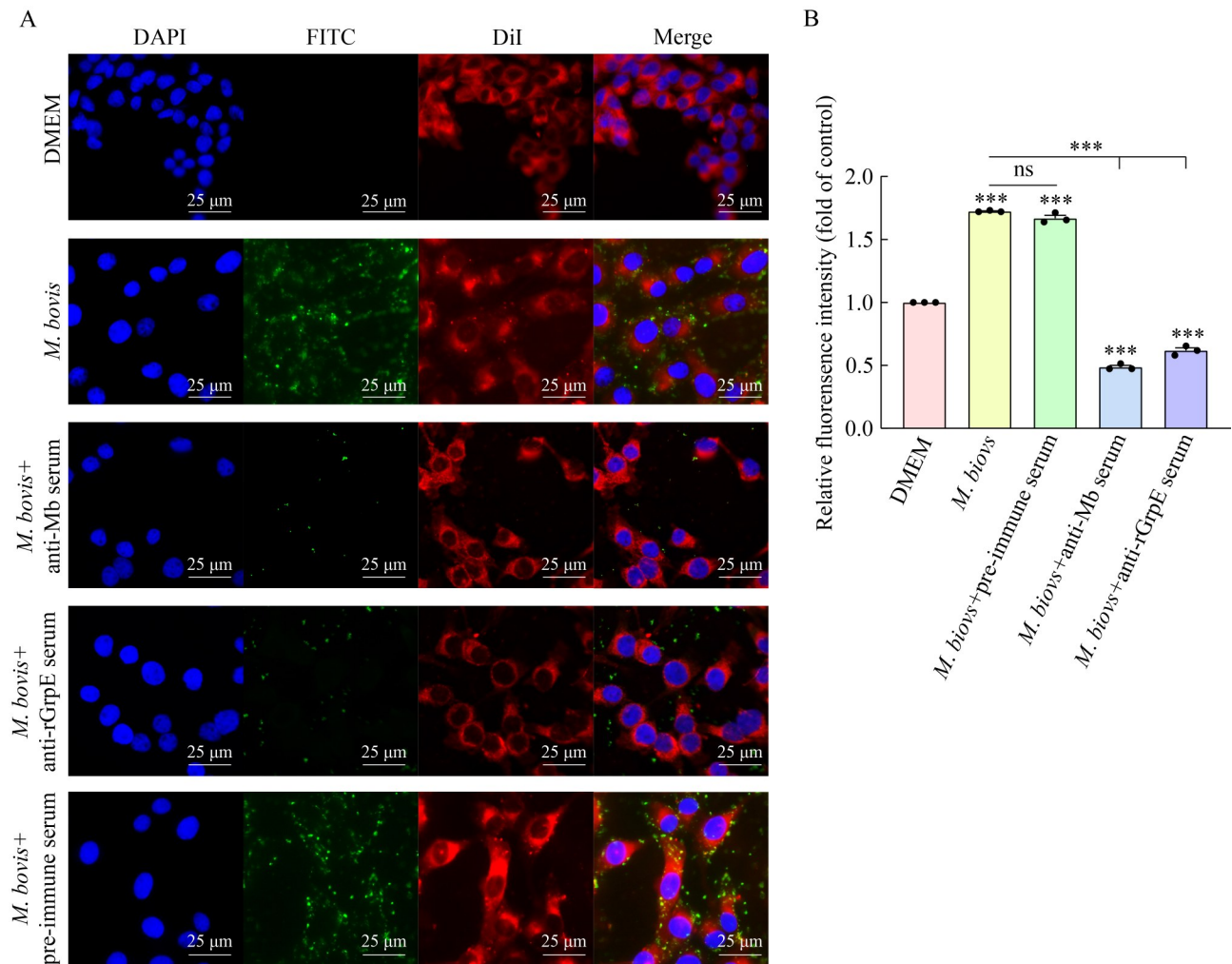
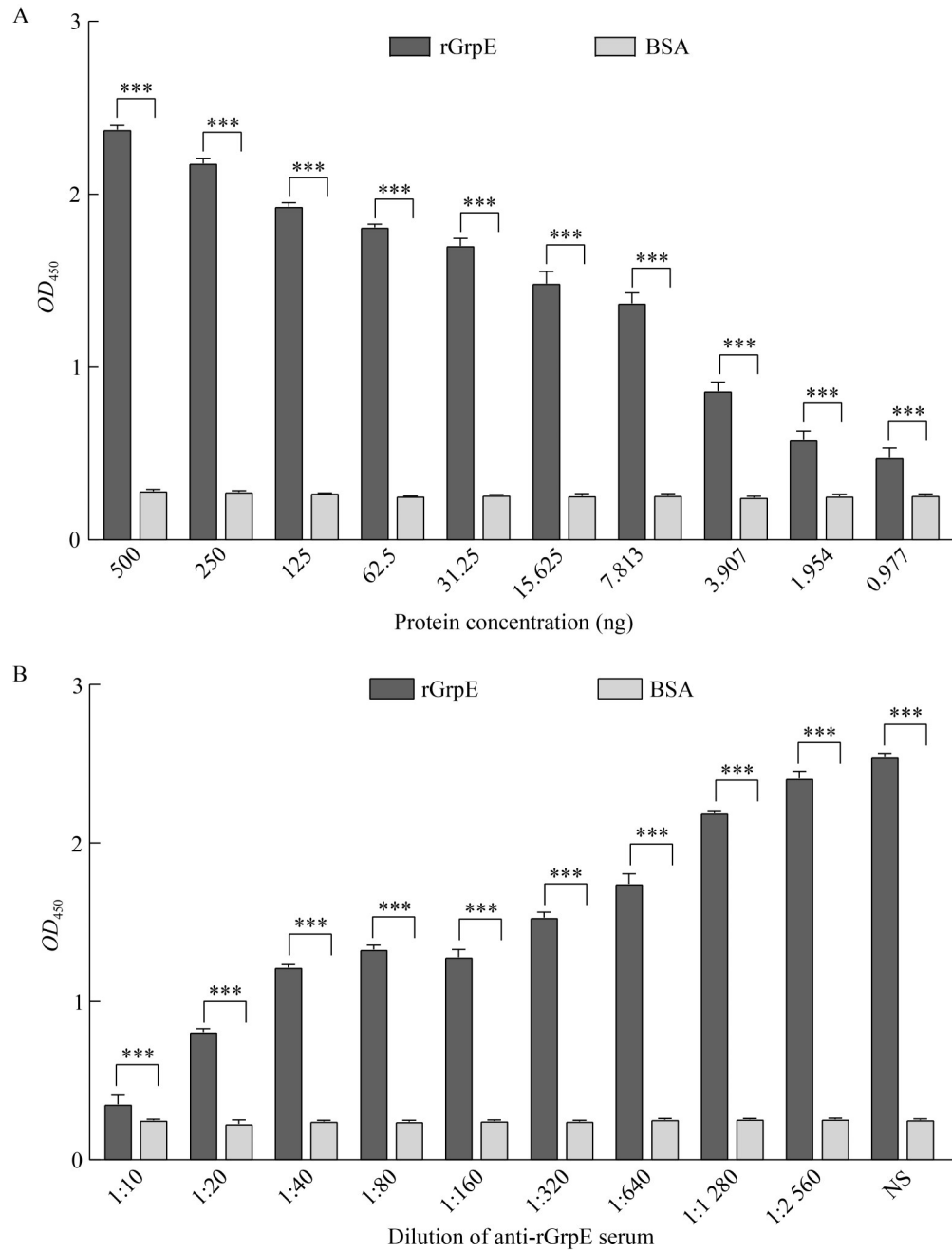


图7 rGrpE抗血清对牛支原体黏附EBL细胞的影响。A: 免疫荧光染色分析Mb与EBL细胞的黏附情况(将GrpE蛋白用兔抗rGrpE、抗Mb或免疫前血清进行预处理, 之后观察黏附能力, 以DMEM作为空白对照); B: 免疫荧光定量分析黏附水平[ns表示无显著差异, \*\*\*表示差异极显著( $P < 0.001$ )]。

Figure 7 Effect of rGrpE antiserum on *Mycoplasma bovis*-adhered EBL cells. A: Immunofluorescence staining analysis of the adhesion of *Mycoplasma bovis* and EBL cells (The GrpE protein was pretreated with rabbit anti-rGrpE, anti-Mb, or pre-immunisation serum, and then the adhesion ability was observed, with DMEM as the blank control); B: Immunofluorescence quantitative analysis of adhesion levels [ns indicates no significant difference, \*\*\* indicates extremely significant difference ( $P < 0.001$ )].

相互作用中发挥重要作用<sup>[31]</sup>。牛支原体可变表面脂蛋白家族中的蛋白(surface protein antigens, VSPs)<sup>[19,32]</sup>、TrmFO<sup>[33-34]</sup>、NOX<sup>[26]</sup>、LRR<sup>[6]</sup>、LPPB<sup>[35]</sup>、LPPA<sup>[36-37]</sup>和分子伴侣蛋白Dnak<sup>[38]</sup>等被证实是Mb膜表面的免疫相关蛋白, 具有黏附功能, 其抗血清能够抑制Mb对EBL细胞的黏

附作用。NOX能够与EBL细胞的膜蛋白和胞浆蛋白结合, 并且这种结合可以被抗NOX血清特异性阻断, 从而促进牛支原体对宿主细胞的黏附<sup>[25]</sup>。周长平等<sup>[22]</sup>通过试验发现GrpE分布于鸡毒支原体膜表面, 证明其是一种新的具有黏附作用的蛋白。作为典型的分子伴侣辅助蛋白,



**图8 rGrpE黏附EBL细胞及rGrpE阳性血清抑制rGrpE对EBL细胞的黏附。** A: rGrpE以剂量依赖性方式与EBL细胞膜提取物结合(BSA作为阴性对照); B: 抗rGrpE血清抑制rGrpE与EBL细胞膜的结合[使用免疫前血清作为阴性对照。与阴性组相比, \*\*\*表示差异极显著( $P<0.001$ )]。

Figure 8 The adhesion of rGrpE to EBL cells and the inhibition of the adhesion of rGrpE to EBL cells by rGrpE positive serum. A: rGrpE binds to EBL cell membrane extracts in a dose-dependent manner [Bovine serum albumin (BSA) was used as a negative control]; B: Anti-rGrpE serum inhibits the binding of rGrpE to EBL cell membranes [Pre-immune serum was used as a negative control. Compared with the negative group, \*\*\* indicates extremely significant difference ( $P<0.001$ )].

GrpE 本身缺乏跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD)<sup>[25]</sup>, 而 GrpE 在分子伴侣系统中通常与 DnaK (Hsp70) 紧密协作<sup>[39]</sup>。GrpE 的膜定位机制可能依赖于其与 DnaK 的相互作用。DnaK 本身具有膜定位的能力, 可能通过其 C 端的疏水区域或与膜整合蛋白的相互作用实现膜定位<sup>[40]</sup>。GrpE 通过与 DnaK 形成复合物, 被“招募”或“锚定”到膜上<sup>[41]</sup>。这种间接的膜定位机制为 GrpE 提供了定位基础, 并可能参与了对宿主细胞受体的识别或黏附结构的稳定。经黏附特异性试验发现, 牛支原体 GrpE 蛋白参与了牛支原体对宿主细胞的黏附, 证明 GrpE 是牛支原体新的黏附相关膜蛋白, 但 GrpE 是间接还是直接参与黏附过程需通过构建牛支原体 GrpE 缺失株进行验证才更具说服力。因此, 牛支原体 GrpE 是否发生直接作用以及其在体内感染中的具体机制仍需进一步研究。

## 4 结论

本研究成功构建并纯化了牛支原体 GrpE 原核表达载体, 制备了高效价多克隆抗体(效价达 1:16 000)。GrpE 具有良好的免疫原性, 其作为牛支原体膜蛋白参与牛支原体对宿主细胞的黏附过程, 为牛支原体致病机制研究及相关检测技术开发提供了重要依据。

### 作者贡献声明

张梦婷: 数据收集与监管, 数据分析验证, 完成呈现, 撰写文章; 尚小粉: 数据采集, 数据分析; 马海云: 方法论; 张立: 监督管理, 验证; 杨永宁: 数据收集; 何肖肖: 数据分析; 邢小勇: 监督管理; 权国梅: 审阅论文学术规范; 武小椿: 审阅研究内容严谨性; 包世俊: 提出概念, 审阅修改文章, 提供资源, 监督管理; 张志雄: 项目管理, 审阅修改文章。

### 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作

的已知经济利益或个人关系。

### 参考文献

- [1] HALE HH, HELMBOLDT CF, PLASTRIDGE WN, STULA EF. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species[J]. *Cornell Veterinarian*, 1962, 52: 582-591.
- [2] ASKAA G, ERNØ H. NOTE: elevation of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to species rank: *Mycoplasma bovis* (Hale et al.) comb. nov[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1976, 26(3): 323-325.
- [3] 包世俊, 朱彩宏, 邢小勇, 丁小琴, 温峰琴, 武小椿, 薛惠文. 牛支原体 NOX2 的原核表达及黏附特性[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(11): 2895-2902.  
BAO SJ, ZHU CH, XING XY, DING XQ, WEN FQ, WU XC, XUE HW. Prokaryotic expression of NOX2 of *Mycoplasma bovis* and its adherence characterization[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(11): 2895-2902 (in Chinese).
- [4] 周华倩. 牛支原体抗体检测胶体金免疫层析试纸条的研制及初步应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.  
ZHOU HQ. The detection of antibody against of *Mycoplasma bovis* colloidal gold immunochromatographic strip development and preliminary application[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [5] KHAN FA, FAISAL M, CHAO J, LIU K, CHEN X, ZHAO G, MENGHWAR H, ZHANG H, ZHU XF, RASHEED MA, HE CF, HU CM, CHEN YY, BARANOWSKI E, CHEN HC, GUO AZ. Immunoproteomic identification of MbovP579, a promising diagnostic biomarker for serological detection of *Mycoplasma bovis* infection[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 39376-39395.
- [6] 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.
- [7] PARK CJ, SEO YS. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2015, 31(4): 323-333.
- [8] 彭乔烽, 陈朗, 马小梅, 彭帅, 舒星富, 刘丽霞. 热休克蛋白 HSP70 家族功能研究进展[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2019, 49(5): 18-20.
- [9] ROSSI MA, POZHIDAEVA AK, CLERICO EM, PETRIDIS C, GIERASCH LM. New insights into the structure and function of the complex between the *Escherichia coli* Hsp70, DnaK, and its nucleotide-exchange factor, GrpE[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2024, 300(1): 105574.
- [10] KIM WS, JUNG ID, KIM JS, KIM HM, KWON KW, PARK YM, SHIN SJ. *Mycobacterium tuberculosis* GrpE, a heat-shock stress responsive chaperone, promotes Th1-biased T cell immune response via TLR4-mediated activation of dendritic cells[J]. *Frontiers in Cellular and*

- Infection Microbiology, 2018, 8: 95.
- [11] YU F, DONG CL, ZHANG YF, CHE RX, XIE CM, LIU YY, ZHANG ZY, LI L, CHEN XY, CAI XH, WANG G, LI YH. GrpE and ComD contribute to the adherence, biofilm formation, and pathogenicity of *Streptococcus suis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2023, 205(4): 159.
- [12] 丁小琴, 包世俊, 邢小勇, 薛慧文, 李国治, 温峰琴, 项海涛, 胡永浩. 牛支原体武威株的分离鉴定及药敏试验[J]. *中国兽医杂志*, 2014, 50(5): 55-57, 51.
- [13] 胡国明, 邢小勇, 李娜, 苏炜德, 温峰琴, 项海涛, 胡永浩, 包世俊. 牛支原体武威株脂蛋白P48基因的克隆、原核表达及亚细胞定位[J]. *甘肃农业大学学报*, 2016, 51(2): 1-7.
- HU GM, XING XY, LI N, SU WD, WEN FQ, XIANG HT, HU YH, BAO SJ. Gene cloning, prokaryotic expression and subcellular localization of lipoprotein P48 of mycoplasma bovis Wuwei strain[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2016, 51(2): 1-7 (in Chinese).
- [14] 张懿. 牛支原体PDHc-E2的原核表达及融合蛋白细胞黏附特性研究和单克隆抗体的制备[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2018.
- ZHANG Y. Prokaryotic expression of the PDHc-E2 of *Mycoplasma bovis* and study on its adhesion property and preparation of monoclonal antibody[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [15] 高翔, 邢小勇, 冯娜, 薛慧文, 温峰琴, 包世俊. 牛支原体武威株 *fb*a 基因的克隆、表达及亚细胞定位[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(2): 274-281.
- GAO X, XING XY, FENG N, XUE HW, WEN FQ, BAO SJ. Cloning, expression and subcellular localization of *fb*a gene in *Mycoplasma bovis* Wuwei strain[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(2): 274-281 (in Chinese).
- [16] 高翔, 王昱茜, 邢小勇, 魏彦明, 包世俊. 牛支原体武威分离株 *eno* 基因的克隆、表达及酶活测定[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(5): 936-942.
- GAO X, WANG YX, XING XY, WEI YM, BAO SJ. Cloning, expression and determination of enzymatic activity of *eno* gene from *Mycoplasma bovis* Wuwei strain[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(5): 936-942 (in Chinese).
- [17] DUDEK K, NICHOLAS RAJ, SZACAWA E, BEDNAREK D. *Mycoplasma bovis* infections: occurrence, diagnosis and control[J]. *Pathogens*, 2020, 9(8): 640.
- [18] 辛九庆, 李媛, 郭丹, 宋念华, 胡守萍, 陈超, 裴洁, 曹培丽. 国内首次从患肺炎的犊牛肺脏中分离到牛支原体[J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(9): 661-664.
- XIN JQ, LI Y, GUO D, SONG NH, HU SP, CHEN C, PEI J, CAO PL. First isolation of *Mycoplasma bovis* from calf lung with pneumoniae in China[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 30(9): 661-664 (in Chinese).
- [19] SACHSE K, HELBIG JH, LYSNYANSKY I, GRAJETZKI C, MÜLLER W, JACOBS E, YOGEV D. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(2): 680-687.
- [20] XU QY, PAN Q, WU Q, XIN JQ. *Mycoplasma bovis* adhesins and their target proteins[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1016641.
- [21] VISHNYAKOV IE, BORCHSENIUS SN. *Mycoplasma* heat shock proteins and their genes[J]. *Microbiology*, 2013, 82(6): 653-667.
- [22] 周长平, 陈莹, 李媛, 高利萍, 王显兵, 王莉莉, 于艳超, 辛九庆. 鸡毒支原体热休克蛋白 GrpE 黏附特性的鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(1): 28-33.
- ZHOU CP, CHEN Y, LI Y, GAO LP, WANG XB, WANG LL, YU YC, XIN JQ. Identification of the adhesive characterization of the heat shock protein GrpE of the *Mycoplasma gallisepticum*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39(1): 28-33 (in Chinese).
- [23] 陈曦, 刘东明, 张慧, 朱习芳, 陈颖钰, 胡长敏, 郭爱珍. 牛支原体 VspX 蛋白黏附特性解析[J]. *华中农业大学学报*, 2020, 39(4): 77-84.
- CHEN X, LIU DM, ZHANG H, ZHU XF, CHEN YY, HU CM, GUO AZ. Adhesion characteristics of *Mycoplasma bovis* VspX protein[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2020, 39(4): 77-84 (in Chinese).
- [24] ZHANG GH, HAN L, LI ZW, CHEN YF, LI Q, WANG SF, SHI HY. Screening of immunogenic proteins and evaluation of vaccine candidates against *Mycoplasma synoviae*[J]. *npj Vaccines*, 2023, 8: 121.
- [25] 唐愈菲, 黄泽智, 赵爽, 李冉辉. 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[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(10): 1140-1144, 1149.
- TANG YF, HUANG ZZ, ZHAO S, LI RH. Bioinformatics analysis and purification of *Mycoplasma pneumoniae* GrpE protein and preparation of polyclonal antibody[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2022, 17(10): 1140-1144, 1149 (in Chinese).
- [26] ZHAO G, ZHANG H, CHEN X, ZHU XF, GUO YS, HE CF, KHAN FA, CHEN YY, HU CM, CHEN HC, GUO AZ. *Mycoplasma bovis* NADH oxidase functions as both a NADH oxidizing and O<sub>2</sub> reducing enzyme and an adhesin[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44.
- [27] PANCHOLI V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58(7): 902-920.
- [28] SONG ZQ, LI Y, LIU Y, XIN JQ, ZOU XH, SUN WJ.  $\alpha$ -enolase, an adhesion-related factor of *Mycoplasma bovis*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38836.
- [29] WAWEGAMA NK, BROWNING GF, KANCI AN, MARENDA MS, MARKHAM PF. Development of a recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2014, 21(2): 196-202.
- [30] ADAMU JY, WAWEGAMA NK, KANCI CONDELLO A, MARENDA MS, MARKHAM PF, BROWNING GF, TIVENDALE KA. *Mycoplasma bovis* membrane protein *MilA* is a multifunctional lipase with novel lipid and glycosaminoglycan binding activity[J]. *Infection and Immunity*, 2020, 88(6): e00945-19.
- [31] ZOU XH, LI Y, WANG Y, ZHOU YM, LIU Y, XIN JQ. Molecular cloning and characterization of a surface-

- localized adhesion protein in *Mycoplasma bovis* Hubei-1 strain[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69644.
- [32] BEIER T, HOTZEL H, LYSNYANSKY I, GRAJETZKI C, HELLER M, RABELING B, YOGEV D, SACHSE K. Intraspecies polymorphism of *vsp* genes and expression profiles of variable surface protein antigens (VSPs) in field isolates of *Mycoplasma bovis*[J]. Veterinary Microbiology, 1998, 63(2/3/4): 189-203.
- [33] GUO YP, ZHU HM, WANG JY, HUANG J, KHAN FA, ZHANG JJ, GUO AZ, CHEN X. TrmFO, a fibronectin-binding adhesin of *Mycoplasma bovis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(8): 1732.
- [34] ZHANG R, HAN XX, CHEN YY, MUSTAFA R, QI JJ, CHEN X, HU CM, CHEN HC, GUO AZ. Attenuated *Mycoplasma bovis* strains provide protection against virulent infection in calves[J]. Vaccine, 2014, 32(25): 3107-3114.
- [35] 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]. The FASEB Journal, 2023, 37(10): e23176.
- [36] 刘爽. 牛支原体新黏附分子 LppA 的功能鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2024.
- LIU S. Characterization of new adhesion protein LppA in *Mycoplasma bovis*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2024 (in Chinese).
- [37] LIU S, LI ZC, LAN SM, HAO HF, JIN XR, LIANG JJ, BAZ AA, YAN XM, GAO PC, CHEN SL, CHU YF. LppA is a novel plasminogen receptor of *Mycoplasma bovis* that contributes to adhesion by binding the host extracellular matrix and Annexin A2[J]. Veterinary Research, 2023, 54(1): 107.
- [38] 赵云海, 张阳阳, 马海云, 王青, 何肖肖, 刘凯, 张钰婷, 刘玉东, 杨永宁, 武小椿, 邢小勇, 权国梅, 张志雄, 包世俊. 牛支原体分子伴侣 Dnak 的原核表达及黏附特性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(6): 2868-2878.
- ZHAO YH, ZHANG YY, MA HY, WANG Q, HE XX, LIU K, ZHANG YT, LIU YD, YANG YN, WU XC, XING XY, QUAN GM, ZHANG ZX, BAO SJ. Prokaryotic expression and adhesion characteristics of molecular chaperone Dnak of *Mycoplasma bovis*[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2025, 56(6): 2868-2878 (in Chinese).
- [39] HARRISON C. GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK[J]. Cell Stress & Chaperones, 2003, 8(3): 218-224.
- [40] EL YAAGOUBI A, KOHIYAMA M, RICHARME G. Localization of DnaK (chaperone 70) from *Escherichia coli* in an osmotic-shock-sensitive compartment of the cytoplasm[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(22): 7074-7078.
- [41] XIAO XS, FAY A, MOLINA PS, KOVACH A, GLICKMAN MS, LI HL. Structure of the *M. tuberculosis* DnaK-GrpE complex reveals how key DnaK roles are controlled[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 660.