

DOI:10.13350/j.cjpb.220702

• 论著 •

微小脲原体 UP3-00750 基因编码蛋白的表达 及生物信息学分析*

刘燕¹, 贾泽玮^{1,2}, 白一童¹, 贾晓晖¹, 周艳¹, 李萍^{1*}

(1. 河北北方学院临床检验诊断学重点实验室, 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 UP3-00750 基因的原核表达载体, 对其编码的蛋白进行表达并进行生物信息学分析。

方法 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 利用 PCR 方法扩增 UP3-00750 基因, 经限制性内切酶双酶切后与同酶消化的 pGEX-6p2 于 16 °C 在 T4 连接酶作用下连接 16 h, 连接产物转入大肠埃希菌 XL1-Blue 中, IPTG 诱导 GST-UP3-00750 融合蛋白的表达, 并采用相关生物信息学软件对其进行分析。 **结果** 对构建的 pGEX-6p2-UP3-00750 重组质粒测序, 所得序列与 NCBI 中序列比对, 与 *U. parvum* strain hebnu uu3 序列的同源性为 100%。诱导的融合蛋白经 SDS-PAGE 分析显示其分子质量与 GST-UP3-00750 融合蛋白的预期大小一致。生物信息学分析该假设蛋白由 159 个氨基酸组成, 分子式为 C₈₆₀H₁₃₆₉N₂₂₃O₂₅₄S₂, 理论等电点(pI)为 6.43, 不稳定指数为 36.70, 脂肪族指数为 112.14; 其二级结构中 α-螺旋(Hh)占 39.62%, β-折叠(Ee)占 19.50%, 无规则卷曲(Cc)占 40.88%, 无 β-转角; 属于无信号肽的跨膜蛋白; 蛋白质互作提示该基因编码的蛋白与 atpA-1、atpD-1、UU044、UU045、UU046、UU047、UU048、UU049、UU050、UU052 相关联。 **结论** 成功构建了 GST-UP3-00750 原核表达载体, 在大肠埃希菌中表达 GST 融合蛋白。该蛋白为无信号肽的跨膜蛋白, 可能参与 ATP 合成代谢途径。

【关键词】 微小脲原体; UP3-00750; 原核表达; 生物信息学

【中图分类号】 R37

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0751-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jul.;17(7):751-756.]

Expression and bioinformatics analysis of UP3-00750 gene encoding of *Ureaplasma parvum*

LIU Yan¹, JIA Ze-wei^{1,2}, BAI Yi-tong¹, JIA Xiao-hui¹, ZHOU Yan¹, LI Ping¹ (1. Key Laboratory of Clinical Laboratory and Diagnostics, Hebei North University, Zhangjiakou, 075000, Hebei, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Hebei North University) *

【Abstract】 **Objective** To construct a prokaryotic expression vector of the UP3-00750 gene in *Ureaplasma parvum* and to bioinformatically analyze the protein it encodes. **Methods** In accordance with the UP3-00750 gene sequence of *Ureaplasma parvum* published in NCBI, primers were designed using Primer Premier 5.0 software and the UP3-00750 gene(480bp) was amplified using PCR. The PCR products were purified by gel recovery kit. The purified PCR products of UP3-00750 and prokaryotic expression vector pGEX-6p2 were respectively digested by restriction endonucleases BamH I and Not I. The vector was ligated with T4 ligase at 16 °C for 16 h, and the ligate products were transformed into *Escherichia coli* XL1-Blue via the heat shock method. The transformed competent bacteria were coated on LB solid plates containing ampicillin and cultured overnight at 37 °C, and the recombinant plasmid was screened by colony PCR. After confirmed by sequencing, the positive colony was induced to produce fusion protein GST-UP3-00750 with IPTG. The protein was analyzed by bioinformatics software. **Results** The UP3-00750 gene was amplified by PCR, and the amplification fragment was 500 bp detected by gel electrophoresis. The recombinant plasmid pGEX-6p2-UP3-00750 was identified by universal primers, and the product of amplification was 600 bp in length. After sequencing, the recombinant plasmid pGEX-6p2-UP3-00750 was compared with NCBI sequence and its homology was 100% similar to the *Ureaplasma parvum* strain hebnu uu3. Expression of the recombinant plasmid transfected into *E. coli* was induced with IPTG for 3 h to express the fusion protein GST-UP3-00750. SDS-PAGE analysis showed that the molecular weight of the induced fusion protein was 44 ku. Bioinformatics analysis showed that the protein coded for by the UP3-00750 was composed of 159 amino acids, its molecular formula was C₈₆₀H₁₃₆₉N₂₂₃O₂₅₄S₂, its relative molecular weight was 18.96 ku, its theoretical isoelectric point (PI) was 6.43, its instability index was 36.70, and its aliphatic amino acid index was 112.14. Its average hydrophilicity was -0.539, so the protein was predicted to be hydrophobic. Secondary structures of fusion protein include α-he-

* **【通讯作者】** 李萍, E-mail: zjkliping@163.com

【作者简介】 刘燕(1993-), 女, 河北张家口人, 硕士研究生, 初级检验师, 主要从事解脲脲原体相关研究。E-mail: 448816470@qq.com

lix(39.62%), β -folds(19.50%),and random coil(40.88%) but no β -turns. The protein had a transmembrane region but didn't contain signal regions. Protein-protein interaction suggested that the protein encoded by UP3-00750 was associated with atpA-1,atpD-1,UU044,UU045,UU046,UU047,UU048,UU049,UU050 and UU052. **Conclusion** The GST-UP3-00750 prokaryotic expression vector was successfully constructed,and the GST fusion protein was obtained and expressed in *E. coli*. Bioinformatics predicted the protein is a transmembrane protein without signal peptide and may be involved in the ATP anabolic pathway.

【Key words】 *Ureaplasma parvum*;UP3-00750;prokaryotic expression;bioinformatics analysis

人类解脲支原体属是一种介于病毒与细菌之间、能够独立存在的微生物,分为解脲支原体(*Ureaplasma urealyticum*,UU)和微小支原体(*Ureaplasma parvum*,UP)两个生物群,共14种血清型,其中血清型1、3、6、14归为UP,血清型2、4、5、7、13归为UU。亚群的分类取决于特定遗传序列的差异,如16S rRNA基因序列、脲酶基因和多带抗原(Multiple banded antigen,MBA)基因^[1]。UU和UP是常见的引起泌尿生殖道反复或持续感染的病原体,近年来感染的发生持续增多。研究发现UP不仅引起泌尿生殖道感染和不孕症,还可以导致胎儿宫内感染、胎膜早破、新生儿脑膜炎、新生儿肺炎、高氨性脑病、坏死性小肠结肠炎和干眼症等,且临床上抗生素治疗出现不同程度的耐药^[2-3]。本实验拟克隆UP3-00750基因,构建pGEX-6p2-UP3-00750原核重组质粒,诱导表达GST-UP3-00750融合蛋白,并利用生物信息学软件对UP3-00750基因编码蛋白进行分析,为UP感染的诊断及其生物学功能研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 主要试剂 dNTP,DNA polymerase和T4连接酶等均购自大连宝生物工程有限公司;限制性内切酶BamH I和Not I购自纽英伦生物技术(北京)有限公司;Glutathione Sepharose TM 4B为美国GE公司产品;DNA Marker DL2000为日本TaKaRa公司产品;彩虹标准Marker购于Solarbio公司。

1.2 主要仪器 PCR扩增仪和MAXQ 4000恒温摇床为美国Thermo公司生产;恒温金属浴为中国Her-osbio公司生产;XD-400s超声波信号发生器为中国南京先欧公司生产;WD-9403F紫外凝胶成像仪为美国Aplegen公司生产。

1.3 菌株和细胞 原核表达载体pGEX-6p2,UP3菌株及大肠埃希菌XL1-Blue感受态均为本实验室保存。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据UP3-00750基因序列设计引物。UP3-00750-F:5'-CGCGGATCCATGAATCATAATTATAATATT-3';UP3-00750-R:5'-TTTC-

CTTTTGCGGCCGCTTATTTCTCATCTTTTATAAC-3'(下划线部分分别为BamH I和Not I的酶切位点)。引物由Invitrogen公司合成。

2.2 原核表达载体的构建 以UP3 DNA为模板,PCR扩增UP3-00750基因。100 μ l PCR反应体系:5 \times PS Buffer(Mg²⁺ plus)20 μ l,dNTP(2.5 mmol/L)8 μ l,上、下游引物各3 μ l,DNA高保真酶(2.5 U/L)1 μ l,三蒸水62 μ l。扩增反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性45 s,52 $^{\circ}$ C退火90 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min,扩增产物4 $^{\circ}$ C保存。取5 μ l PCR扩增产物进行0.8%琼脂糖凝胶电泳并拍照记录,其余95 μ l利用酚氯仿纯化。纯化产物及原核表达质粒pGEX-6p2经BamH I和Not I双酶切后同上纯化,纯化后取UP3-00750质粒2 μ l,pGEX-6p2质粒0.5 μ l,在T4连接酶作用下16 $^{\circ}$ C连接过夜(16 h),分别取3 μ l连接产物加入20 μ l XL1-Blue感受态中,放置冰上冰浴10 min,42 $^{\circ}$ C金属浴热休克42 s,迅速放到冰上计时冰浴15 min;加入0.17 ml无抗生素(Amp⁺)的LB液体培养基,混匀后置37 $^{\circ}$ C恒温摇床以200 r/min振荡培养45 min;将已转化的感受态均匀涂布于含Amp⁺(100 μ g/ml)的LB琼脂平板,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱培养12~16 h,观察菌落生长状况。期间标记疑似菌落,待菌落生长至大小合适时,选择生长良好的5个菌落,各挑取半个加入40 μ l三蒸水中,吹吸混匀,100 $^{\circ}$ C煮沸5 min,瞬时离心后置于冰上,吸取上清作为模板进行菌落PCR鉴定。20 μ l PCR反应体系:10 \times PCR Buffer 2 μ l,dNTP(2.5 mmol/L)1 μ l,载体上、下游通用引物各0.3 μ l,Taq DNA聚合酶0.3 μ l,模板16.1 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性45 s,55 $^{\circ}$ C退火90 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min后4 $^{\circ}$ C保存。取PCR产物进行0.8%琼脂糖凝胶电泳,观察结果并拍照。挑取剩余半个菌落接种于含Amp⁺(100 μ g/ml)的LB液体培养基,置37 $^{\circ}$ C恒温摇床以200 r/min振荡培养过夜,制备成甘油菌后送北京六合华大基因有限公司测序。

2.3 GST-UP3-00750融合蛋白的诱导表达及纯化 将过夜培养的GST-UP3-00750菌液接种于含Amp⁺(100 μ g/ml)的15 ml LB培养液中,置37 $^{\circ}$ C恒温摇床

以 200 r/min 振荡培养至 A₆₀₀ 值为 0.9 时加入 IPTG (100 mg/ml) 15 μl, 30 °C 诱导 3 h, 4 °C、6 000 g 离心 15 min, 收集菌体沉淀, 加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液冰浴超声破碎(超声 3 s, 间隔 4 s, 共 5 min), 4 °C、14 000 r/min 离心 30 min。收集上清转移至 1.5 ml Ep 管中, 并加入 25 μl 预处理的 50% Glutathione Sepharose™ 4B, 室温转动吸附 1.5 h, 之后分别用 0.25% PBS-T 和 1×PBS 洗 3 次, 13 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 按 1:1 的比例加入 2×SDS 上样缓冲液, 金属浴 100 °C 5 min, 煮后离心, 13 000 r/min 离心后吸取少量上清进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色 5 h, 脱色液脱色, 直至背景清晰为止, 拍照记录电泳结果。

2.4 UP3-00750 基因编码蛋白的生物信息学分析
运用 ExPASy Bioinformatics Resource Portal 软件中的 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/prot-param/protparam>) 对假设蛋白的氨基酸序列进行分析, 如分子式、消光系数、理论等电点、半衰期等理化性质; 使用 PRABI-GERLAND (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred-sopma.pl>) 分析 UP3-00750 基因编码蛋白的二级结构; 利用蛋白质分析系统 ExPASy Proteomics (<https://www.expasy.org/proteomics>) 中的 TMHMM Serve v. 2.0 (Prediction of transmembrane helices in proteins) 分析 UP3-00750 蛋白的跨膜区域; 使用 Signal P 在线分析软件 (<https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析 UP3-00750 蛋白的信号肽; 采用 STRING 在线软件 (<https://www.string-db.org/>) 分析蛋白质的基因组学, 预测与 UP3-00750 基因相互关联的基因。

结果

1 UP3-00750 基因 PCR 扩增

以 UP3 菌株 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段约为 500 bp (其中目的片段为 480 bp, 保护性碱基和酶切位点为 27 bp), 与预期结果相符(图 1)。

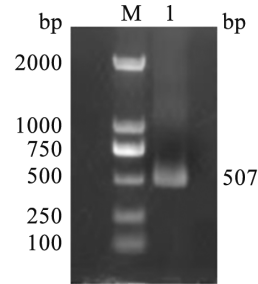
2 重组质粒菌落 PCR 扩增验证

UP3-00750 基因 PCR 产物及原核载体质粒 pGEX-6p2 经双酶切后连接, 连接产物转化至大肠埃希菌 XL1-Blue, 在含 Amp⁺ 的 LB 固体培养基上筛选。生长的菌落应用菌落 PCR 筛选, 所用的引物为针对 pGEX-6p2 的通用引物, 扩增后经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段约为 600 bp (目的片段 480 bp, 通用引物为 143 bp), 与预期大小一致(图 2)。

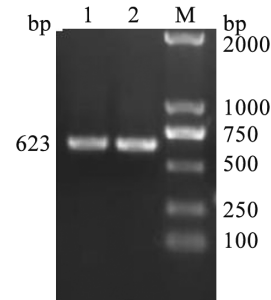
3 GST-UP3-00750 重组质粒测序分析

选择阳性克隆的菌落摇菌过夜, 送华大基因公司

测序。GST-UP3-00750 重组质粒测序结果见图 3, 经 Blast 分析后未见移码和突变现象。利用 DNAMAN 软件对测序结果与 NCBI 中 *U. parvum* strain hebnu uu3 进行序列比对, 同源率为 100%, 碱基序列完全正确(图 3)。



M DNA 标志物(DL2000) 1 UP3-00750 基因 PCR 产物
图 1 UP3-00750 基因 PCR 产物 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析
M DNA marker (DL2000) 1 PCR product of UP3-00750 gene
Fig. 1 0.8% agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of UP3-00750 gene



M DNA 标志物(DL2000) 1,2 重组质粒菌落 PCR 产物
图 2 重组质粒菌落 PCR 产物 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析
M DNA marker (DL2000) 1,2 Colony PCR product
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis results of PCR products of recombinant plasmid colony

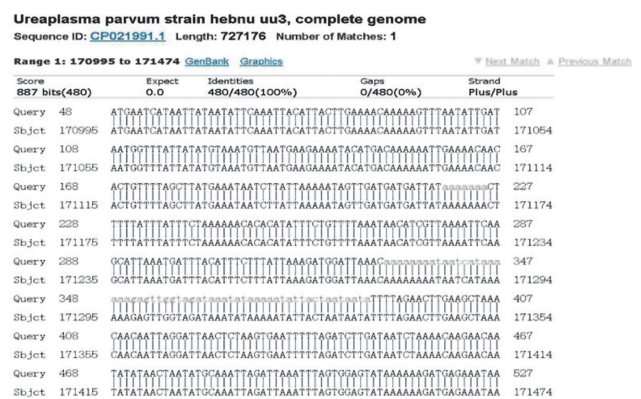
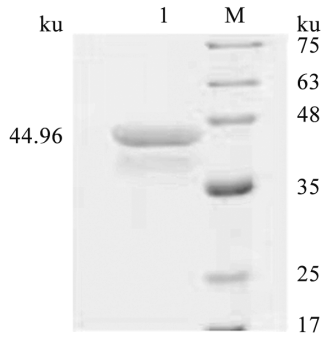


图 3 GST-UP3-00750 序列同源性比对分析
Fig. 3 Homology alignment results of GST-UP3-00750 sequence

4 GST-UP3-00750 融合蛋白的表达、纯化及 SDS-PAGE 电泳分析

选取表达的融合蛋白经 Glutathione Sepharose™ 4B 纯化后进行 SDS-PAGE 电泳, 出现为 44 ku 的

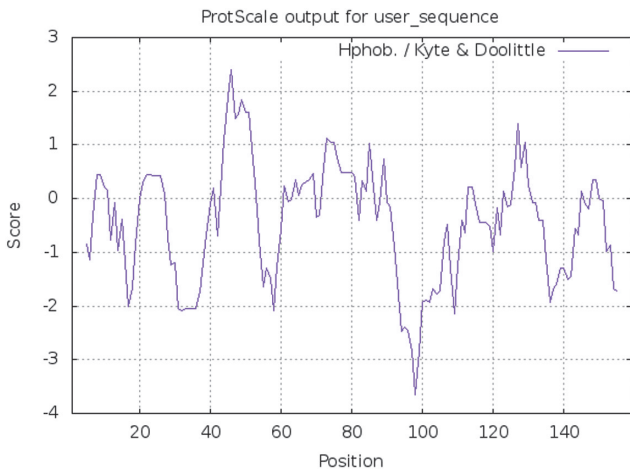
单一蛋白条带,与预期大小一致(目的蛋白约为 18 ku,GST 为 26 ku)(图 4)。



M 蛋白标志物 1 GST-UP3-00750 融合蛋白
图 4 GST-UP3-00750 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析
 M Protein marker 1 GST-UP3-00750 fusion protein
Fig.4 SDS-PAGE analysis of GST-UP3-00750 fusion protein

5 UP3-00750 基因生物信息学分析

5.1 蛋白质理化性质 采用生物信息学软件对 UP3-00750 基因进行分析,其编码蛋白氨基酸数为 159 个,分子式为 $C_{860}H_{1369}N_{223}O_{254}S_2$,相对分子质量为 18.96 ku,理论等电点(pI)为 6.43,原子总数为 2 708,在水中测量 280 nm 处摩尔消光系数为 $17420 M^{-1}cm^{-1}$ 。该蛋白在哺乳动物网织红细胞体外的半衰期为 30 h,在酵母细胞体内为 >20 h,在大肠埃希菌体内为 >10 h;不稳定指数为 36.70(该蛋白质稳定);脂肪族指数为 112.14,亲疏水性的总平均值为 -0.539,预测其为疏水性蛋白(图 5)。



注:横轴代表氨基酸残基数,纵轴代表疏水性得分。正值代表亲水性,负值代表疏水性。

图 5 UP3-00750 蛋白的亲疏水性分析

Notes:The horizontal axis represents amino acid residue base and the vertical axis represents hydrophobicity score. A negative value represents hydrophilicity and a positive value represents hydrophobicity.

Fig.5 Hydrophilic and hydrophobic analysis of UP3-00750 encoded protein

5.2 蛋白质的二级结构 运用蛋白质分析软件 PRABI-GERLAND 分析 UP3-00750 蛋白的二级结

构,共含有 63 个 α -螺旋(Hh),占 39.62%;31 个 β -折叠(Ee),占 19.50%;65 个无规则卷曲(Cc),占 40.88%。无 β -转角(图 6)。

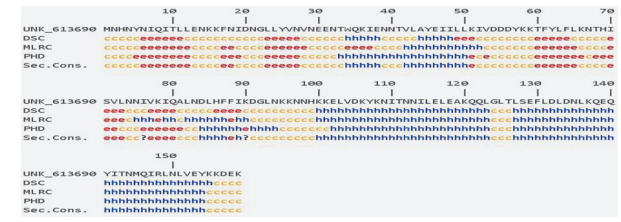


图 6 UP3-00750 蛋白的二级结构

Fig.6 Secondary structure of the protein encoded by UP3-00750 gene

5.3 蛋白质的跨膜区域 利用 TMHMM Serve v. 2.0 软件分析 UP3-00750 蛋白属于跨膜蛋白(图 7)。

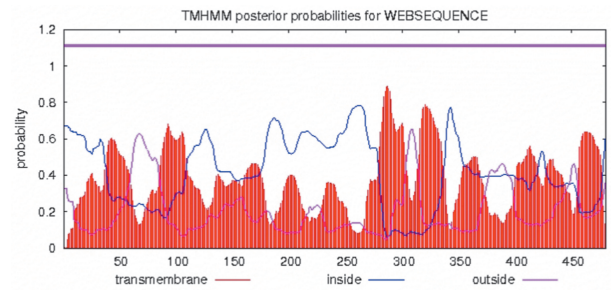


图 7 UP3-00750 蛋白的跨膜区域预测

Fig.7 Transmembrane region results of UP3-00750 encoded protein

5.4 蛋白质信号肽预测 运用 Signal P 在线分析软件分析 UP3-00750 蛋白无信号肽序列(D 值 0.437,小于阈值 0.450)(图 8)。

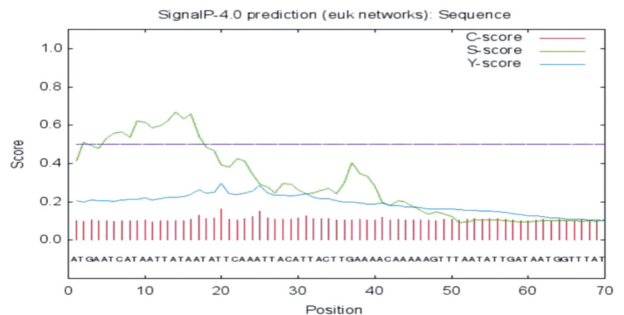


图 8 UP3-00750 蛋白信号肽预测

Fig.8 Prediction results of signal peptide encoding protein UP3-00750

5.5 互作蛋白预测 STRING 软件分析显示 UP3-00750 基因编码的氨基酸序列与解脲脲原体血清型 3 (株系 ATCC 700970)中基因编码的 UU051 蛋白同源率为 100%,预测与 UU051 相邻的蛋白分别为 atpA-1, atpD-1, UU044, UU045, UU046, UU047, UU048, UU049, UU050, UU052(图中绿色线所标),综合分值分别为 0.900,0.900,0.590,0.641,0.745,0.763,0.917,0.862,0.917,0.917。其中 UU051 与 atpA-1 相邻基因功能联系的证据为基因间距离 2 171 bp(得

分为 0.806),且同源基因在其他基因组中相邻(0.508),预测 UU051 可能参与 ATP 合成代谢途径。UP3-00750 互作蛋白预测见图 9。

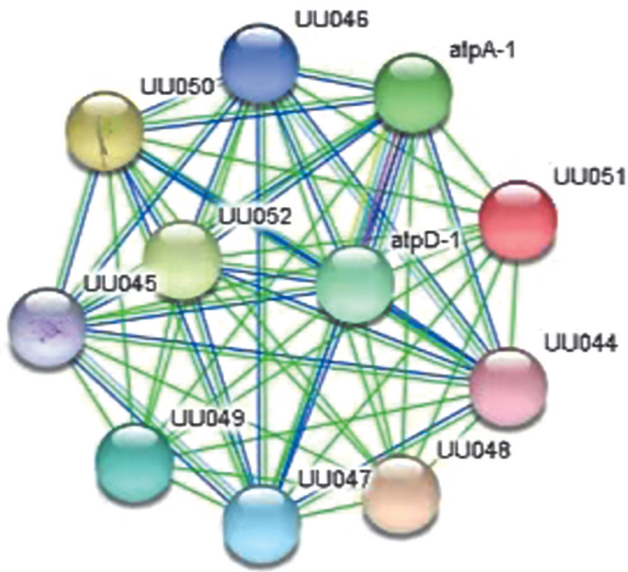


图 9 UP3-00750 互作蛋白预测
Fig. 9 Prediction of UP3-00750 encoded protein

讨论

UP 是一种无细胞壁、无肽聚糖的能够在无细胞中存活的最小的自我复制生物体,属于支原体科脲原体属,也称溶脲脲原体,是一个独特的细菌属,在人类主要分布在口腔、上呼吸道和泌尿生殖系统远端^[4]。UP 的特点是具有低 G+C 基因组含量,并且缺乏生长所需的胆固醇,能利用自身的尿素酶分解尿素以提供代谢的能量 ATP,主要代谢产物为 NH₃^[5]。UP 可引起泌尿生殖道反复或持续感染,宿主通过动员固有免疫和适应性免疫防御脲原体入侵、清除脲原体感染。但在某些条件下,宿主免疫保护作用并不能完全清除体内的脲原体,脲原体在长期抵御宿主免疫系统胁迫中已演化出复杂又精密的逃逸机制,包括逃避宿主的自噬机制、拮抗宿主营养的免疫作用、调控宿主细胞基因的表达等^[6-8]。

研究发现 UP 入侵小鼠精子,损害其功能和胚胎发育的能力,影响受精率和胚胎发育^[9-10]。UP 感染也可以引起女性盆腔炎、不孕症及绒毛膜羊膜炎,也可通过子宫垂直传播给后代,目前对解脲支原体的分子机制尚不十分清楚^[11]。

本研究就 UP3 基因组进行初步探究,首先通过对 UP3-00750 基因序列的酶切位点进行分析,发现没有被 BamH I/Not I 两种酶切割的位点,因此选用该组限制性内切酶作为克隆该基因的工具酶,采用多克隆双酶切的方法,保证插入序列的正确性^[12]。利用 DNAMAN 软件对测序结果进行比对分析,其与 NC-

BI 中 *U. parvum* strain hebnu uu3^[13-14] 序列同源性为 100%,显示碱基序列完全正确,表明克隆成功。通过对 UP3-00750 基因进行生物信息学分析,分子式为 C₈₆₀H₁₃₆₉N₂₂₃O₂₅₄S₂,理论等电点(pI)为 6.43,摩尔消光系数为 17420,不稳定指数为 36.70,脂肪族指数为 112.14,亲疏水性的总平均值为-0.539,预测其为疏水性蛋白。蛋白质的二级结构中含有 α-螺旋、β-折叠、无规则卷曲,但无 β-转角。利用 TMHMM Serve v. 2.0 软件分析 UP3-00750 蛋白属于跨膜蛋白,运用 Signal P 证实该蛋白不存在信号肽序列。预测与其相邻的蛋白中 atpA-1 参与 ATP 的合成及质子耦连转运途径,atpD-1 参与 ATP 的代谢及质子跨膜转运过程^[15-16],UP3-00750 基因编码的蛋白为 UU051,其余与其相邻的蛋白为免疫球蛋白阻断毒力蛋白(标识符 UU044),保守假设膜脂蛋白(标识符 UU045),假定的免疫球蛋白阻断毒力蛋白(标识符 UU046),保守假设的三磷酸腺苷/GTP 结合蛋白(DUF31 家族蛋白,标识符 UU047),含 DUF2714 结构域的蛋白质(标识符 UU049)。其中 atpA 和 atpD 属于支原体进化过程中的 7 个基因簇之一^[17-19]。

本实验克隆了 UP3-00750 基因,成功构建了 pGEX-6p2-UP3-00750 原核表达载体,并表达了 GST 融合蛋白,该蛋白为无信号肽的跨膜蛋白,可能参与 ATP 合成代谢途径。

【参考文献】

- [1] Sprong KE, Mabenge M, Wright CA, et al. *Ureaplasma* species and preterm birth: current perspectives[J]. Crit Rev Microbiol, 2020, 46(2): 169-181.
- [2] Abdelfattah MM, Khattab RA, Mahran MH, et al. Evaluation of patients with dry eye disease for conjunctival *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*[J]. Int J Ophthalmol, 2016, 9(10): 1457-1465.
- [3] 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(08): 755-759.
- [4] Ball ND, Snape SE. Periprosthetic joint infection with *Ureaplasma parvum* detected by 16S rRNA PCR[J]. BMJ Case Rep, 2021, 14(3): e239858.
- [5] Gerber L, Gaspert A, Bragheti A, et al. *Ureaplasma* and *Mycoplasma* in kidney allograft recipients-A case series and review of the literature[J]. Transpl Infect Dis, 2018, 20(5): e12937.
- [6] 马良,宋佳欣,贾泽玮,等. 解脲脲原体 UP3-c0006 基因原核表达载体的构建及表达[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(09): 848-850, 854.
- [7] Beeton ML, Payne MS, Jones L. The role of *Ureaplasma spp.* in the development of *Nongonococcal urethritis* and Infertility among Men[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(4): e00137-18.
- [8] Schenk M, Grumet L, Sternat J, et al. Effect of probiotics on vaginal *Ureaplasma parvum* in women suffering from unexplained infertility[J]. Reprod Biomed Online, 2021, 43(3): 503-514.

- [9] K Ito, K Akai, Nishiumi F, et al. Ability of *Ureaplasma parvum* to invade mouse sperm, fertilize eggs through infected sperm, and impair mouse sperm function and embryo development[J]. F&S Science, 2020, 10(3):815-819.
- [10] 宾东华, 李玲, 王磊, 等. 基于 AMPK/PPAR α 信号通路研究知柏地黄汤对解脲脲原体感染大鼠生精细胞能量代谢的影响[J]. 中华男科学杂志, 2021, 27(5):437-444.
- [11] Sweeney EL, Kallapur SG, Meawad S, et al. *Ureaplasma* species multiple banded antigen(MBA) variation is associated with the severity of inflammation In vivo and In vitro in human placenta[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 13(7):123-127.
- [12] 张荣荣, 贾泽玮, 李雪燕, 等. 微小脲原体 UP3-00235 基因原核载体的构建表达和生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(2):183-188.
- [13] Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Bilska-Wilkosz A. In vitro activity of lipoic acid against *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* isolated from women with infections of the urogenital tract. A pilot study[J]. Acta Biochim Pol, 2020, 67(4):623-628.
- [14] Siles-Guerrero V, Cardona-Benavides I, Liebana-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.
- [15] Butland G, Peregrin-Alvarez JM, Li J, et al. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli* [J]. Nature, 2005, 433(7025):531-537.
- [16] Gruet A, Longhi S, Bignon C. One-step generation of error-prone PCR libraries using Gateway technology[J]. Microb Cell Fact, 2012, 11(7):14-18.
- [17] Zhan C, Chen L, Hu L. Neonatal *Ureaplasma parvum* meningitis complicated with subdural hematoma; a case report and literature review[J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1):268.
- [18] Kim MS, Lee DH, Kim TJ, et al. The role of *Ureaplasma parvum* serovar-3 or serovar-14 infection in female patients with chronic micturition urethral pain and recurrent microscopic hematuria[J]. Transl Androl Urol, 2021, 10(1):96-108.
- [19] Shatsky M, Dong M, Liu H, et al. Quantitative tagless copurification: A method to validate and identify protein-protein interactions[J]. Mol Cell Proteomics, 2016, 15(6):2186-2202.

【收稿日期】 2022-02-18 【修回日期】 2022-05-10

(上接 750 页)

- [3] Iqbal Yattoo M, Hamid Z, Paray OR, et al. COVID-19 - recent advancements in identifying novel vaccine candidates and current status of upcoming SARS-CoV-2 vaccines[J]. Hum Vaccin Immunother, 2020, 16(12):2891-2904.
- [4] Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis[J]. Trends Immunol, 2020, 41(12):1100-1115.
- [5] Awadasseid A, Wu Y, Tanaka Y, et al. Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(1):8-19.
- [6] Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape[J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(7):409-424.
- [7] Dong Y, Dai T, Wei Y, et al. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1):237.
- [8] Watanabe Y, Berndsen ZT, Raghwan J, et al. Vulnerabilities in coronavirus glycan shields despite extensive glycosylation[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):2688.
- [9] Paul S, Lindestam Arlehamn CS, Scriba TJ, et al. Development and validation of a broad scheme for prediction of HLA class II restricted T cell epitopes[J]. J Immunol Methods, 2015(422):28-34.
- [10] Ye Q, West AMV, Silletti S, et al. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein[J]. Protein Sci, 2020, 29(9):1890-1901.
- [11] Kim SS, Sze L, Liu C, et al. The stress granule protein G3BP1 binds viral dsRNA and RIG-I to enhance interferon- β response[J]. J Biol Chem, 2019, 294(16):6430-6438.
- [12] Chen K, Liu J, Liu S, et al. Methyltransferase SETD2-Mediated methylation of STAT1 Is critical for interferon antiviral activity[J]. Cell, 2017, 170(3):492-506.
- [13] Muzio G, O'Bray L, Borgwardt K. Biological network analysis with deep learning[J]. Brief Bioinform, 2021, 22(2):1515-1530.
- [14] Arunkumar M, Zielinski CE. T-Cell receptor repertoire analysis with computational tools-an immunologist's perspective [J]. Cells, 2021, 10(12):3582.
- [15] Has ks z M, Kili S, Sara F. Coronaviruses and SARS-COV-2[J]. Turk J Med Sci, 2020, 50(SI-1):549-556.
- [16] Peng Y, Du N, Lei Y, et al. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design[J]. Embo J, 2020, 39(20):e105938.
- [17] Kadam SB, Sukhrmani GS, Bishnoi P, et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights[J]. J Basic Microbiol, 2021, 61(3):180-202.
- [18] Oh SJ, Shin OS. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein targets RIG-I-Like receptor pathways to inhibit the induction of interferon response[J]. Cells, 2021, 10(3):530.
- [19] Lu S, Ye Q, Singh D, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):502.
- [20] Zhao Y, Sui L, Wu P, et al. A dual-role of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in regulating innate immune response[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1):331.
- [21] Lam JH, Smith FL, Baumgarth N. B cell activation and response regulation during viral infections viral immunol[J]. Front Immunol, 2020, 33(4):294-306.
- [22] Lee E, Sandgren K, Duette G, et al. Identification of SARS-CoV-2 nucleocapsid and spike T-Cell epitopes for assessing T-cell immunity[J]. J Virol, 2021, 95(6):e02002-20.
- [23] Ura T, Yamashita A, Mizuki N, et al. New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates[J]. Vaccine, 2021, 39(2):197-201.
- [24] Poland GA, Ovsyannikova IG, Crooke SN, et al. SARS-CoV-2 vaccine development: current status[J]. Mayo Clin Proc, 2020, 95(10):2172-2188.

【收稿日期】 2022-03-08 【修回日期】 2022-05-31