

DOI:10.13350/j.cjpb.230503

• 论著 •

淋病奈瑟菌外膜蛋白 H. 8 抗原表位分析 及其原核表达与纯化*

李紫玥^{1,2}, 苏晓悦^{1,2}, 谢晓婷^{1,2}, 胡欣^{1,2}, 陈佳琪^{1,2}, 董凤^{1,2}, 黄钰^{1,2}, 张莉^{1,2**}, 张雷^{1,2***}

(1. 大理大学病原与媒介生物研究所, 云南省自然疫源性疾病预防控制技术重点实验室, 云南大理 671000;

2. 大理大学基础医学院病原生物学综合实验室)

【摘要】 目的 分析淋病奈瑟菌外膜蛋白 H. 8 的抗原表位, 利用原核表达系统表达并纯化该蛋白。方法 运用生物信息学相关软件对目的蛋白进行理化性质分析及 B 细胞表位、T 细胞表位的预测。将外膜蛋白 H. 8 基因克隆至 pET32a(+) 质粒, 并在 Rosetta(DE3) 宿主菌中构建原核表达系统, 利用镍柱亲和层析纯化重组蛋白, 采用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定重组蛋白的表达及其免疫反应性。结果 生物信息学分析显示外膜蛋白 H. 8 的优势 B 细胞表位位于 20-57、66-73、76-81、93-99、111-117、120-132、141-147、157-160 肽段, 优势 T 细胞表位位于 125-139、132-146 肽段。构建的含有外膜蛋白 H. 8 基因的 pET32a(+) 重组质粒转化 DE3 后表达重组蛋白, 以 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 时重组蛋白在上清中的表达效果最佳; Western blot 检测该重组蛋白能分别被 His 标签抗体和淋病奈瑟菌多克隆抗体识别。结论 生物信息学方法预测淋病奈瑟菌外膜蛋白 H. 8 含有优势 B 细胞表位和优势 T 细胞表位, 原核表达的外膜蛋白 H. 8 具有免疫反应性, 为淋病奈瑟菌疫苗及其致病机制的研究提供了实验基础。

【关键词】 淋病奈瑟菌; 外膜蛋白 H. 8; 原核表达及纯化; 表位分析

【中图分类号】 R378.16

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)05-0508-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 May;18(5):508-512.]

Antigen epitopes analysis, prokaryotic expression and purification of out membrane protein H. 8 from *Neisseria gonorrhoeae*

LI Ziyue^{1,2}, SU Xiaoyue^{1,2}, XIE Xiaoting^{1,2}, HU Xin^{1,2}, CHEN Jiaqi^{1,2}, DONG Feng^{1,2}, HUANG Yu^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2} (1. Institute of Pathogens and Vectors, Yunnan Provincial Key Laboratory for Zoonosis Control and Prevention, Dali University, Dali, Yunnan, 671000, China; 2. Laboratory of Pathogenic Biology, Dali University School of Basic Medicine)***

【Abstract】 **Objective** Analysis of the antigenic epitope of the outer membrane protein H. 8, expression and purification of the protein using a prokaryotic expression system. **Methods** The target protein was analyzed by bioinformatics technology to obtain its corresponding physical, chemical properties and prediction of B cell and T cell epitopes. The out membrane protein H. 8 gene was cloned into pET32a(+), and its prokaryotic expression system was constructed using the *E. coli* expression hosts, Rosetta (DE3). The fusion protein was detected by SDS-PAGE, and isolated and purified by nickel column affinity chromatography to verify its immunoreactivity by Western blot assay.

Results Peptides 19-57, 63-70, 73-83, 90-100, 108-135, 140-150 and 153-163 of the out membrane protein H. 8 were the dominant B cell epitopes, while peptides 125-139 and 132-146 were the dominant T cell epitopes. The recombinant protein was significantly expressed in the supernatant at IPTG concentration of 0.5 mmol/L after transformation of DE3 with the constructed pET32a(+) recombinant plasmid containing the outer membrane protein H. 8 gene. The results of Western blot showed that the recombinant protein can recognize by His-tag antibody and polyclonal antibody of *N. gonorrhoeae* respectively. **Conclusion** Bioinformatics methods predicted that *N. gonorrhoeae* outer membrane protein H. 8 contains dominant B-cell epitopes and dominant T-cell epitopes, and that the outer membrane protein H. 8 expressed in prokaryotic cells has immunoreactive, which providing an experimental basis for the study of *N. gonorrhoeae* vaccines and its pathogenic mechanisms.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; out membrane protein H. 8; prokaryotic expression and purification; antigen epitopes analysis

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 81760303)。

** **【通讯作者】** 张雷, E-mail: leigzhang@163.com; 张莉, E-mail: nizi9358@163.com

【作者简介】 李紫玥 (1999-), 女, 云南蒙自市人, 硕士研究生。从事专业: 病原生物学。E-mail: 1022465176@qq.com

淋病是一种由淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*, NG) 感染引起的性传播疾病。据 WHO 估计,全球每年约有 7800 万的新发病例^[1],2020 年我国报告的新发病例超过 10 万例^[2]。目前淋病的治疗依赖于抗菌药物,因而抗菌药物的使用频率高,由于缺乏对其耐药性的控制和监测,淋病抗菌药物治疗指南更新又较慢,而 NG 却具有发展和维持耐药性的超常能力,可以预见未来 NG 的耐药性很有可能成为一个全球性问题^[3]。因此,开发安全高效的淋病疫苗以预防和控制淋病的发生与流行已是迫在眉睫。

通过病原微生物的基因组和蛋白质组进行候选抗原挖掘的反向疫苗学已经被证明可筛选出多种致病菌的候选疫苗^[4-5]。这种将蛋白质组平台和免疫蛋白质组学与生物信息学相结合的反向疫苗学技术在 NG 候选疫苗抗原挖掘中具有良好的应用前景^[6]。陈佳琪等^[7]利用生物信息学技术从 NG FA1090 菌株中筛选出 30 个最有可能表达在淋球菌外膜的蛋白,其中包括外膜蛋白 H.8(out membrane protein H.8, OMP H.8)。现有研究表明 OMP H.8 是表达于致病性奈瑟菌包括淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitides*, NM) 表面的一种脂蛋白,具有高度的保守性^[8]。OMP H.8 具有促炎活性,可作为 toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TCR2) 的配体刺激上皮细胞诱导释放炎症因子 IL-6、IL-8,并激活 NF- κ B 信号通路,导致大量中性粒细胞流入感染部位而引起机体的固有性免疫应答^[9]。本研究拟分析 OMP H.8 的表位,并利用原核表达系统表达纯化 OMP H.8,为 NG 疫苗的开发及其致病机制的研究提供实验基础。

材料与方法

1 材料

1.1 主要试剂 质粒小提试剂盒和 T4 DNA 购自天根生化科技有限公司;化学发光检测试剂购自上海百赛生物技术股份有限公司;限制性内切酶 EcoR I、Xho I 分别购自加拿大 Fermentas 公司和美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Ni-NTA 琼脂糖购自美国 Invitrogen 公司;二抗(羊抗小鼠 IgG)购自美国 Jackson Immuno Research 公司;His-tag 单抗购自索莱宝公司;NG 多克隆抗体(来源于 BALB/c 小鼠)由本实验室制备。

1.2 菌株 NG 菌株 FA1090 购自美国 ATCC 公司;大肠埃希菌 Rosetta(DE3)和 pET32a(+)质粒由本实验室制备。

2 方法

2.1 OMP H.8 蛋白的生物信息学分析

2.1.1 理化性质分析 登录 NCBI 网站获取 OMP

H.8 氨基酸序列,登录号:WP_003688275.1。应用在线软件 ExPASy 中的 ProtParam 分析 OMP H.8 的理化性质。

2.1.2 B 细胞表位分析 使用 DNASTar 软件中的 Protean 模块对 OMP H.8 的全长氨基酸序列进行蛋白的亲水性、柔韧性、抗原性及表面可及性分析^[10]。并结合 IEDB 在线软件预测 B 细胞的优势表位。

2.1.3 T 细胞表位分析 应用在线软件 SYFPEITHI 和 IEDB 预测细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位;应用在线软件 SYFPEITHI 和 NetMHCpan 4.0 预测辅助性 T 细胞(Helper T, Th)表位。MHC type 分别选择覆盖率高的 HLA-A * 02:01、HLA-A * 03:01 和 HLA-B * 07:02 及基因分布较广的 HLA-DRB1 * 01:01、HLA-DRB1 * 03:01、HLA-DRB1 * 04:01、HLA-DRB1 * 07:01、HLA-DRB1 * 11:01、HLA-DRB1 * 15:01。分析软件根据蛋白质序列预测肽段与 HLA 等位基因间的亲和力而进行评价,亲和力较高的以强结合肽段(Strong binder, SB)或优结合肽段(Good binder, GB)表示。

2.2 重组质粒的构建及 OMP H.8 蛋白的表达与纯化

2.2.1 重组质粒的构建 以 NG 菌株 FA1090 的 DNA 为模板 PCR 扩增 OMP H.8 基因,用 CaCl₂ 法制备感受态的宿主细胞 Rosetta(DE3),采用 EcoR I 和 Xho I 双酶切的方法将 OMP H.8 定向克隆到 pET32a(+),并转化 Rosetta(DE3)感受态宿主细胞。经 PCR 筛选出的重组质粒经碱裂解法小量提取纯化后再进行双酶切鉴定及测序鉴定(由武汉金开瑞生物公司完成)。

2.2.2 重组蛋白的诱导表达及纯化 挑选经测序无误的单个阳性克隆菌落接种至氨苄抗性的 LB 液体培养基中,37 °C 培养至 A₆₀₀ 值约 0.6,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,30 °C 继续培养 3 h,离心收集菌体。重悬菌体冰浴 30 min,超声破碎菌体,离心后收集上清及沉淀,用 Ni-NTA 柱进行纯化,洗脱液为不同浓度咪唑溶液。收集洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳,检测重组蛋白表达情况及纯度。

2.2.3 重组蛋白的 Western blot 鉴定 纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳分之后电转印到 PVDF 膜上,分别用 NG 多克隆抗体和 His 标签抗体进行 Western blot,检测重组蛋白的免疫反应性。

结果

1 OMP H.8 的生物信息学分析

1.1 氨基酸序列 预测 OMP H.8 的氨基酸数为

183, 相对分子质量为 18.5×10^3 , 不稳定系数为 32.06 (40 为界, 大于 40 则不稳定), 为亲水性蛋白。

1.2 B 细胞表位 经 DNASTar 软件中的 Protean 模块分析, 外膜蛋白 OMP H. 8 的亲水性区域主要位于 62-81、90-101、110-116、125-136、155-164 肽段; 表面可及性较高区域主要位于 64-72、92-97、126-132 肽段。由于亲水性区域与可及性较高区域暴露在蛋白表面的几率较大, 因此这些肽段成为 B 细胞抗原表位的可能性也较高。可塑性较好区域主要位于 19-23、29-40、63-68、72-76、90-98、108-112、117-119、124-133、141-162、177-179 肽段, 这些区域可能具有较好的柔韧性, 易发生扭曲、折叠, 易与抗体较好地嵌合; 抗原性较高区域主要位于 19-57、63-70、73-83、90-100、108-135、140-150、153-163 肽段, 提示这些区域可能存在优势 B 细胞抗原表位(图 1)。

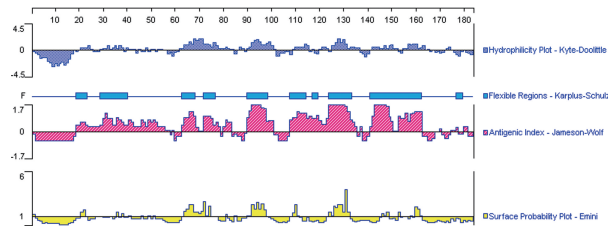


图 1 DNASTar 分析 OMP H. 8 的 B 细胞抗原表位
Fig. 1 Prediction results of the out membrane protein H. 8 by DNASTar

在线软件 IEDB 分析显示, OMP H. 8 得分较高的潜在优势 B 细胞表位包括 20-57、66-73、76-81、93-99、111-117、120-132、141-147、157-160 共 8 个肽段(图 2)。

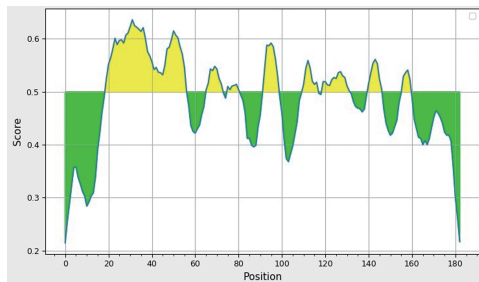


图 2 IEDB 分析 OMP H. 8 的优势 B 细胞表位
Fig. 2 The prediction results of advantage B cell epitopes of the out membrane protein H. 8 by IEDB

结合 DNASTar 分析结果, IEDB 分析预测的 8 个 B 细胞表位肽段均位于亲水性区域、具有较高的可及性、较好的可塑性和较高的抗原性, 因而成为优势 B 细胞表位的潜力较高(表 1)。

1.3 T 细胞表位 应用 SYFPEITHI 软件分析 CTL 表位, 结果显示有 13 个得分较高的 CTL 表位, 其中得分高于 25 分的有 5 个; IEDB 在线软件分析 CTL 表位

结果显示有 6 个优结合 CTL 表位(表 2)。综合二者分析结果, 4-12、129-137、173-181、174-182 共 4 个肽段为优势 CTL 表位。

表 1 OMP H. 8 的优势 B 细胞表位
Table 1 advantageous B cell epitopes of the out membrane protein H. 8

编号 No.	位点 Site	序列 Sequence	长度 Length
1	20-57	QEPAAPAAEATPAGEAPASEAPAAEAAPADAAEAPAAC	38
2	66-73	NDNMQFNT	8
3	76-81	IQVSKA	6
4	93-99	GTQPKAS	7
5	111-117	DMDGVFK	7
6	120-132	VGAADTDYVKPDD	13
7	141-147	LIGGGEE	7
8	157-160	LADG	4

表 2 SYFPEITHI 和 IEDB 分析 OMP H. 8 的优势 CTL 表位
Table 2 Advantageous cytotoxic T lymphocyte(CTL) epitopes of the out membrane protein H. 8

HLA-I 类 等位基因 HLA-I Allele	SYFPEITHI			IEDB		
	位点 Site	序列 Sequence	得分 Score	位点 Site	序列 Sequence	评价 Evaluation
HLA-A* 02:01	173-181	ALMNGKVTL	29	173-181	ALMNGKVTL	GB
	174-182	LMNGKVTLV	28	174-182	LMNGKVTLV	GB
	4-12	YLALISAAV	27	4-12	YLALISAAV	GB
	7-15	LISAAVIGL	25	156-164	KLADGDYKF	GB
	149-157	SLTLDPAKL	25			
HLA-A* 03:01	11-19	AVIGLAACS	24	72-80	NTKDIQVSK	GB
	173-181	ALMNVKTL	24			
	6-14	ALISAAVIG	23			
HLA-B* 07:02	140-148	KLIGGGEEES	23			
	21-29	EPAAPAAEA	23	35-43	APASEAPAA	GB
	24-32	APAAEATPA	22	24-32	APAAEATPA	GB
	40-48	APAAEAAPA	22	53-61	APAAGNCAA	GB
	129-137	KPDDARVVA	22	129-137	KPDDARVVA	GB

应用 SYFPEITHI 分析 Th 表位, 结果显示有 26 个得分较高的 Th 表位, 其中得分高于 25 分的有 12 个肽段; 应用 NetMHCpan 4.0 在线软件分析 Th 表位, 结果显示有 16 个强结合 Th 表位。结合二者分析结果, 82-96、101-115、125-139、132-146、147-161、159-173 六个肽段为潜在的优势 Th 细胞表位(表 3)。

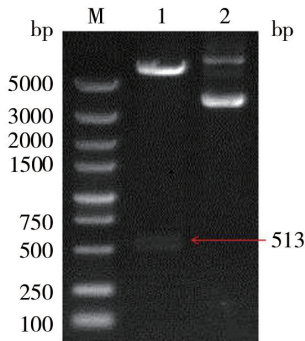
表 3 OMP H. 8 的优势 Th 表位
Table 3 Advantageous Th epitopes of the out membrane protein H. 8

位点 Site	序列 Sequence	SYFPEITHI	NetMHCpan4.0
		得分 Score	评价 Evaluation
82-96	CKEFTITLKHTGTQP	26	SB
101-115	GHNLVIAKAEDMDGV	28	SB
125-139	TDYVKPDDARVVAHT	26	SB
132-146	DARVVAHTKLIGGGEE	21	SB
147-161	ESSLTLDPAKLADGD	24	SB
159-173	DGDYKFACTFPGHGA	24	SB

综合 CTL 表位与 Th 表位的预测结果,OMP H. 8 的第 125-139、132-146 肽段均具有与 CTL 细胞和 Th 细胞的抗原受体(T cell receptor, TCR)结合的潜力,因而是潜在的优势 T 细胞表位。

2 重组质粒的构建及鉴定

构建 OMP H. 8 基因重组质粒并进行 PCR 筛选,筛选出的阳性重组质粒经双酶切后进行 1%琼脂糖凝胶电泳,目的基因片段约 513 bp(图 3),与预期相符。测序表明目的基因与 FA1090 中的 OMP H. 8 基因序列完全一致。



M DNA 标志物 1 重组质粒经 EcoR I 和 Xho I 双酶切 2 空质粒 pET32a(+)对照

图 3 重组质粒双酶切鉴定

M DNA marker 1 Recombinant plasmid is digested by EcoR I and Xho I 2 Plasmid pET32a(+)

Fig.3 Electrophoresis diagram of recombinant plasmid double digestion

3 重组蛋白的诱导表达及纯化

重组质粒用 IPTG 诱导表达后经 SDS-PAGE 检测,重组蛋白主要在菌体上清中以可溶性的形式大量表达,表达蛋白的相对分子质量约为 37×10^3 ,与预期融合蛋白分子质量相符[pET32a(+)带有 18×10^3 左右的融合蛋白标签]。采用镍柱亲和和层析法纯化蛋白,用 150mmol/L 的咪唑洗脱,得到纯度较高的重组蛋白(图 4)。

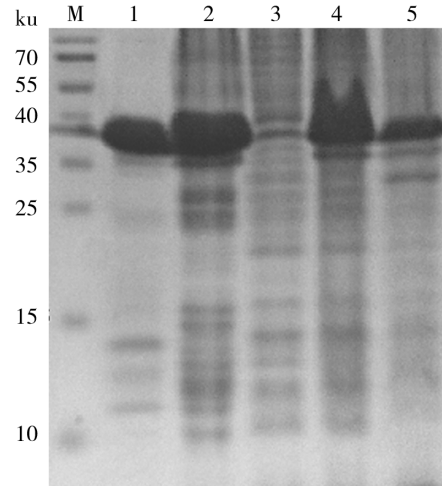
4 重组蛋白的 Western blot 鉴定

纯化的重组蛋白分别以 His 标签抗体和 NG 多克隆抗体为一抗进行 Western blot 检测,结果如图 5。该重组蛋白均能被 His 标签抗体以及鼠源性 NG 多克隆抗体识别,反应条带位于 40×10^3 处。

讨论

淋病疫苗的研制历时数个世纪,但至今仍未能获得任何成功的疫苗^[11]。而针对 B 组脑膜炎奈瑟菌的含有外膜囊泡(out membrane vesicle, OMV)MeNZB 疫苗尽管在一定程度上可减少淋病的发病率,但估计其有效性仅为 31%^[12]。目前,抗生素疗法仍是淋病的一线治疗方案,但 NG 获得耐药性迅速,其推荐治疗药物几经变更,提示即使是新开发的抗生素最终也会因

耐药而失效。因此,从淋病防治的长期策略来看,开发一种有效的 NG 疫苗是控制 NG 感染的唯一可持续的方法。现阶段 NG 疫苗的研究主要集中在蛋白质靶点,如外膜蛋白和表面的脂蛋白。理想情况下,这种疫苗抗原应高度保守,广泛存在于各 NG 菌株中,其能够诱导机体产生具有杀菌作用、调理作用或阻断 NG 感染的抗体^[13]。

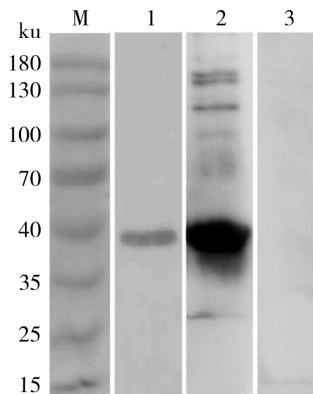


M 蛋白分子质量标准 1 150mmol/L 咪唑洗脱蛋白 2 25mmol/L 咪唑洗脱蛋白 3 上柱流出液 4 重组菌超声破碎上清 5 重组菌超声破碎沉淀

图 4 原核表达及纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker 1 Eluting protein of 150mmol/L imidazole 2 Eluting protein of 25mmol/L imidazole 3 Fluid penetrating fluid 4 Supernatant of bacterial lysates 5 Precipitation of bacterial lysates

Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis of the expression and purification of the recombinant protein



M 蛋白分子质量标准 1 纯化重组蛋白与 His 2 纯化重组蛋白与 NG 多克隆抗体反应条带 3 阴性对照

图 5 纯化重组蛋白的 Western blot 检测

M Protein marker 1 The primary antibody is His-tag antibody 2 The primary antibody is NG polyclonal antibody 3 Negative control

Fig.5 The purified recombinant protein were detected by Western blot

细菌脂蛋白的特征是存在一个保守的 N 端脂质修饰半胱氨酸残基,这可以让亲水性的脂蛋白得以固定在细菌细胞膜上^[14]。OMP H. 8 为表达于 NG 外膜

的高度保守的脂蛋白,成熟 OMP H. 8N 端前的 39 个氨基酸存在不完全重复氨基酸序列 AAEP^[15],此序列高度保守且在不同菌株中其重复序列数的差异可导致 OMP H. 8 分子大小的不同。研究表明 OMP H. 8 表达于 NG 和 NM 菌株表面,播散性奈瑟菌感染者的恢复期血清可与 NG 或 NM 的 OMP H. 8 结合而阻断 OMP H. 8 与其单克隆抗体的结合,且 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 结果显示上述恢复期血清中的 IgG 抗体可与 OMP H. 8 特异性结合^[16]。OMP H. 8 单克隆抗体可结合所有淋病奈瑟球菌和脑膜炎奈瑟菌株,以及乳酰胺奈瑟菌(*N. lactamica*)、灰色奈瑟菌(*N. cinerea*),但很少结合到其他非致病奈瑟菌^[8,16]。虽然 NG 和 NM 的感染机制不同,但其基因组一级序列有 80%~90% 的同源性,许多表面暴露的蛋白序列也具有高度同源性,而 OMP H. 8 作为致病性奈瑟菌属共同的表面抗原,对其研究可有助于了解致病性奈瑟菌的感染和抗感染免疫机制^[17]。1985 年,Black 等^[16]的研究发现 OMP H. 8 是一种具有免疫原性的 NG 表面抗原,但尚未见其相关疫苗的开发研究报道,针对 OMP H. 8 的抗体反应是否能够清除或防止 NG 或 NM 感染及其在奈瑟菌致病中的具体机制等均不清楚。因此,暴露在 NG 表面的具有高度保守性的 OMP H. 8 作为 NG 候选疫苗的免疫原性、免疫反应性、免疫保护性及其在 NG 感染致病中的具体机制值得进一步研究。

表位疫苗是指利用抗原表位制备的疫苗,相比传统减毒活疫苗其安全、无毒、稳定的优势更加突出,近年来被广泛用于表位鉴定和初步设计候选疫苗。本研究采用生物信息学方法对 OMP H. 8 抗原表位进行预测,结果表明其具有众多的 B 细胞和 T 细胞表位。在筛选优势 B 细胞表位中,综合采用亲水性、可及性、可塑性及抗原性 4 个分析方案,发现 OMP H. 8 有 8 个肽段为优势 B 细胞表位。在分析优势 T 细胞表位时充分考虑了人类 HLA 基因的多态性及多基因性,选用覆盖率高、分布广的 HLA 等位基因,将与 HLA 分子亲和力评分高的抗原肽筛选出来作为其优势 T 细胞表位,结果发现有两个肽段同时具有 CTL 表位和 Th 表位的特性且评分较高。在设计 OMP H. 8 表位疫苗中应考虑以上这些肽段序列,以全面激发机体的免疫应答。本研究结果表明 OMP H. 8 重组蛋白可被 BALB/c 小鼠来源的 NG 多克隆抗体识别,表明重组蛋白仍具有免疫反应性,OMP H. 8 的原核表达和纯化为其致病机制及疫苗的研究提供了实验基础。

【参考文献】

[1] No authors listed. Global, regional, and national disability-adjusted

- life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet*, 2017, 390(10100):1260-1344.
- [2] 马娜, 张小斌, 刘春桃, 等. 生殖道沙眼衣原体和淋球菌感染流行状况与防治[J]. *皮肤与性病*, 2021, 43(5):623-625.
- [3] Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2014, 27(3):587-613.
- [4] de Alwis R, Liang L, Taghavian O, et al. The identification of novel immunogenic antigens as potential *Shigella* vaccine components[J]. *Genome Med*, 2021, 13(1):8.
- [5] Pizza M, Scarlato V, Masignani V, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B *meningococcus* by whole-genome sequencing[J]. *Science*, 2000, 287(5459):1816-1820.
- [6] Baarda BL, Martinez FG, Sikora AE. Proteomics, bioinformatics and structure-function antigen mining for *gonorrhoea* vaccines[J]. *Front Immunol*, 2018(9):2793.
- [7] 陈佳琪, 宋佳林, 高洁, 等. 淋病奈瑟菌全基因组中外膜蛋白的筛选及其表位分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(7):787-791.
- [8] Cannon JG, Black WJ, Nachamkin I, et al. Monoclonal antibody that recognizes an outer membrane antigen common to the pathogenic *Neisseria* species but not to most nonpathogenic *Neisseria* species[J]. *Infect Immun*, 1984, 43(3):994-999.
- [9] Fiset PL, Ram S, Andersen JM, et al. The Lip lipoprotein from *Neisseria gonorrhoeae* stimulates cytokine release and NF-kappaB activation in epithelial cells in a Toll-like receptor 2-dependent manner[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(47):46252-46260.
- [10] Zheng W, Ruan J, Hu G, et al. Analysis of conformational B-cell epitopes in the antibody-antigen complex using the depth function and the convex hull [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e134835.
- [11] Jefferson A, Smith A, Fasinu PS, et al. Sexually TRANSMITTED *Neisseria gonorrhoeae* infections-update on drug treatment and vaccine development[J]. *Medicines (Basel)*, 2021, 8(2):150-153.
- [12] Petousis-Harris H, Paynter J, Morgan J, et al. Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against *gonorrhoea* in New Zealand: a retrospective case-control study [J]. *Lancet*, 2017, 390(10102):1603-1610.
- [13] El-Rami FE, Zielke RA, Wi T, et al. Quantitative proteomics of the 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains surveys vaccine candidates and antimicrobial resistance determinants[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18(1):127-150.
- [14] Nakayama H, Kurokawa K, Lee BL. Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways [J]. *FEBS J*, 2012, 279(23):4247-4268.
- [15] Kawula TH, Spinola SM, Klapper DG, et al. Localization of a conserved epitope and an azurin-like domain in the H. 8 protein of pathogenic *Neisseria* [J]. *Mol Microbiol*, 1987, 1(2):179-185.
- [16] Black JR, Black WJ, Cannon JG. Neisserial antigen H. 8 is immunogenic in patients with disseminated gonococcal and meningococcal infections[J]. *J Infect Dis*, 1985, 151(4):650-657.
- [17] Tinsley CR, Nassif X. Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(20):11109-11114.

【收稿日期】 2022-12-16 【修回日期】 2023-03-03