

陈曦, 刘东明, 张慧, 等. 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.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.04.011

## 牛支原体 VspX 蛋白黏附特性解析

陈曦<sup>1,2</sup>, 刘东明<sup>1</sup>, 张慧<sup>1,2</sup>, 朱习芳<sup>1,2</sup>, 陈颖钰<sup>1,2</sup>, 胡长敏<sup>1,2</sup>, 郭爱珍<sup>1,2,3,4,5</sup>

1. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070; 2. 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;  
3. 农业农村部反刍动物生物制品重点实验室, 武汉 430070; 4. 湖北省动物疫苗工程技术研究中心, 武汉 430070;  
5. 动物生物药物教育部工程研究中心, 武汉 430070

**摘要** 为进一步解析牛支原体(*Mycoplasma bovis*) VspX 蛋白的黏附特性, 采用间接免疫荧光法检测 VspX 蛋白在 *M. bovis* 中的分布, 通过黏附试验和抗体黏附抑制试验检测 VspX 蛋白的黏附性, 采用 ELISA 方法进一步分析 VspX 蛋白和突变株结合纤连蛋白(Fn)的特性。结果显示, *M. bovis* VspX 蛋白位于 *M. bovis* 菌体表面; 重组 VspX 蛋白(rVspX)能黏附到 EBL 细胞表面, 且 *M. bovis* VspX 基因缺失突变株(*M. bovis*  $\Delta$ VspX)体外黏附 EBL 细胞能力与 *M. bovis* 野生株(*M. bovis* WT)相比显著下降, 两个结果说明 rVspX 蛋白具有黏附特性; 并且抗 rVspX 蛋白单抗能抑制 *M. bovis* 黏附 EBL 细胞, 进而证实 rVspX 蛋白黏附的特异性; 此外, rVspX 蛋白与 Fn 呈剂量依赖性结合, 且 *M. bovis*  $\Delta$ VspX 结合 Fn 能力与 *M. bovis* WT 相比显著下降, 证明 *M. bovis* VspX 蛋白与 Fn 为特异性结合, 且 Fn 分布在 EBL 细胞表面。以上结果表明, *M. bovis* VspX 蛋白是一种具有 Fn 结合特性的黏附相关蛋白, 能通过 EBL 细胞外基质成分 Fn 介导其黏附 EBL 细胞。

**关键词** 牛支原体; VspX 蛋白; 黏附蛋白; 纤连蛋白

**中图分类号** S 852.62 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)04-0077-08

牛支原体(*Mycoplasma bovis*)属于柔膜体纲、支原体科、支原体属, 无细胞壁, 是当前引起牛呼吸道疾病的重要病原之一。牛支原体可引发多种临床症状, 主要包括支气管肺炎、乳腺炎、关节炎、生殖道炎和腱鞘炎等<sup>[1]</sup>。牛支原体最早于 1961 年在美国由牛乳汁中分离得到, 我国于 2008 年首次从患病牛肺脏中分离到 *M. bovis*<sup>[2]</sup>。目前, 牛支原体病在世界范围内广泛流行。由于其确切的致病机制仍然不清楚, 致使本病目前仍无有效的防控手段, 给养牛业带来巨大的经济损失。

*M. bovis* 黏附呼吸道上皮细胞是其定殖和入侵细胞的关键步骤。黏附素是 *M. bovis* 的主要毒力因子之一, 它们分布在牛支原体细胞膜上。纤连蛋白(fibronectin, Fn)为一种细胞外基质成分(ECM), 它可以作为分子桥连接细菌黏附素与宿主细胞的表面受体<sup>[3]</sup>, 因此, 具有 Fn 结合特性的蛋白(FnBPs)在细菌的致病中起重要作用<sup>[4]</sup>。

有研究报道 VpmaX 是 *M. bovis* Hubei 株的一种具有纤溶酶原(PLG)结合特性的黏附蛋白<sup>[5]</sup>, 通过序列比对发现它与笔者所在实验室前期分离株 *M. bovis* HB0801 的 VspX 序列相同<sup>[6]</sup>, 表明 VspX 也是一种黏附蛋白, 但其与 Fn 的结合特性未知, 因此, 本研究进一步解析 VspX 的黏附特性, 以期对牛支原体 VspX 蛋白的系统研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

*M. bovis* HB0801 株(CCTCC, # M2010040)由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室分离并保存; EBL 细胞由哈尔滨兽医研究所薛飞研究员惠赠; pET-30a-VspX 重组质粒、抗 rVspX 蛋白的单克隆抗体<sup>[7]</sup>和 *M. bovis* HB0801 突变体库为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室前期制备。羊抗鼠 IgG-HRP 抗体购自 Biotech 公司; 牛源 Fn 和

收稿日期: 2020-04-26

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0501802); 国家现代农业(肉牛/牦牛)产业技术体系项目(CARS-37); 全国农业科研杰出人才及其“牛病防治基础与技术创新团队”专项; 河北省自然科学基金项目(C2018402137)

陈曦, 博士, 讲师. 研究方向: 牛传染病. E-mail: chenxi@mail.hzau.edu.cn

通信作者: 郭爱珍, 博士, 教授. 研究方向: 牛传染病与流行病学. E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

兔抗牛 Fn 抗体购自 Millipore 公司;Bio-rad 化学发光底物购自 Bio-rad 公司;Alexa 488 标记的驴抗鼠抗体购自武汉安特捷生物技术有限公司;DAPI 细胞核染色液购自上海碧云天生物技术有限公司。

## 1.2 菌株和细胞培养

将笔者所在实验室保存的 *M. bovis* HB0801 菌株复苏培养,接种于 PPLO 液体培养基,在 37 °C 培养箱中培养至对数期,12 000 r/min,4 °C 离心 10 min,收集菌体。

胎牛肺上皮细胞培养于含 15% 胎牛血清的 MEM 培养基中。待细胞长至单层时,用 0.25% 含 EDTA 的胰酶 37 °C 处理 2 min,按照质量比 1:3 的比例进行传代培养,每 2 d 更换 1 次培养基至长成单层细胞。

## 1.3 *M. bovis* VspX 基因突变株筛选与验证

将笔者所在实验室已构建的 *M. bovis* HB0801 突变体库送武汉锐志魔方生物科技有限公司进行测序,从中筛选出在 *VspX* 基因内发生转座子 Tn4001 插入的突变株,命名为 *M. bovis*  $\Delta VspX$ 。

将 *M. bovis* 野生型菌株(*M. bovis* WT)与 *M. bovis*  $\Delta VspX$  在 PPLO 培养基中培养 48 h 后,收集菌体,裂解后将全菌蛋白经 SDS-PAGE 分离,转印到 PVDF 膜上;洗涤封闭后,以抗 rVspX 蛋白单克隆抗体(1:2 000)为一抗,以羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体(1:4 000)为二抗进行孵育,通过化学发光底物显色后进行 Western blot 分析。

## 1.4 野生型菌株和突变株生长特性

*M. bovis* WT 和 *M. bovis*  $\Delta VspX$  复苏后,分别接种于 PPLO 固体培养基上,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h,每个菌株挑取 3 个单克隆,分别接种于 1 mL PPLO 液体培养基中,37 °C 培养 96 h,每隔 12 h 取菌液涂布于 PPLO 平板上,培养 72 h 后,在显微镜下计数菌落数并绘制生长曲线。

将培养至对数期的 *M. bovis* WT 和 *M. bovis*  $\Delta VspX$  分别接种于 PPLO 固体平板,在相同培养条件下培养 72 h 后,显微镜下观察菌落形态。

## 1.5 rVspX 蛋白的表达与纯化

将实验室前期构建的 pET-30a-VspX 重组质粒转入 *E. coli* BL21 感受态,经 IPTG 诱导后,将重组菌液破碎,12 000 r/min 离心 30 min,收集的上清液通过 Ni-NTA 树脂按常规方法进行重组蛋白纯化,纯化后的蛋白用 BCA 蛋白定量试剂盒定量,存

于 -80 °C 冰箱。

## 1.6 IFA 检测 VspX 蛋白亚细胞定位

参照 Guo 等<sup>[8]</sup>间接免疫荧光方法进行,收集培养至对数期的 *M. bovis*,离心洗涤后,以  $1 \times 10^{10}$  cfu/mL 的浓度悬浮于 PBS 中。将 *M. bovis* 分别与抗 rVspX 蛋白的单克隆抗体(1:500 稀释)、SP2/0 细胞刺激小鼠产生的腹水(1:500 稀释)和 PBS 在 37 °C 下孵育 1.5 h。洗涤后,将各不同处理的 *M. bovis* 与驴抗鼠 IgG-Alexa 488 抗体(1:300 稀释)在 37 °C 孵育 1 h,洗涤后,重悬于 300  $\mu$ L PBS 溶液中,滴于盖玻片上,用激光共聚焦显微镜检测 VspX 蛋白的表面分布。

## 1.7 蛋白和菌株黏附细胞检测

参照 Guo 等<sup>[8]</sup>重组蛋白黏附细胞检测方法,将培养在激光共聚焦小皿中的 EBL 细胞用 4% 多聚甲醛固定,洗涤后,加入 25  $\mu$ g rVspX 蛋白,4 °C 孵育 1 h,无蛋白的 PBS 溶液作为阴性对照;洗涤后,用 1% BSA-PBS 室温封闭 1 h;然后每个皿加入抗 rVspX 抗体(1:2 000 稀释),室温孵育 1 h;洗涤后,每个皿加入驴抗鼠 IgG-Alexa 488 抗体(1:300 稀释),室温孵育 1 h;洗涤后,用 DAPI 染细胞核;最后在激光共聚焦显微镜下检测 rVspX 与 EBL 细胞的黏附。

参照 Chen 等<sup>[9]</sup>牛支原体黏附细胞检测方法,将 EBL 细胞接种在 24 孔细胞培养板内,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 20 h,弃掉培养基,用 1% BSA-MEM 在 37 °C 封闭细胞 15 min。将 *M. bovis* WT 与 *M. bovis*  $\Delta VspX$  ( $1 \times 10^8$  cfu)分别加入到含有 EBL 细胞(约  $2 \times 10^5$  个/孔)的培养板中,37 °C 振荡孵育 30 min。PBS 充分洗涤 4 次后,用 0.25% 胰蛋白酶消化单层细胞,采用连续稀释法将细胞悬液涂布到 PPLO 固体平板上,培养 72 h 后显微镜下计数菌落数,计算每孔黏附的 *M. bovis* 数量(cfu)。重复 5 次实验,每次设置 6 个重复。

## 1.8 抗 rVspX 蛋白单抗黏附抑制检测

EBL 细胞接种在 24 孔细胞培养板内,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 20 h;洗涤后,用 1% BSA-MEM 在 37 °C 封闭细胞 15 min;预先将大约  $1 \times 10^8$  cfu 的牛支原体与鼠抗 rVspX 单克隆抗体和 SP2/0 腹水在 4 °C 孵育 2 h;然后将牛支原体和抗体的混合物一起加入到封闭后的细胞培养板中,在 37 °C 振荡孵育 30 min;充分洗涤 4 次后,用 0.25% 胰蛋白酶消化单层细胞,采用连续稀释法将细胞悬液涂布到 PPLO

琼脂平板上,培养 72 h 后显微镜下观察菌落并计数,计算每孔黏附的 *M. bovis* 数量(cfu/孔)。

### 1.9 rVspX 蛋白与 Fn 结合特性

参照 Chen 等<sup>[9]</sup>重组蛋白与 Fn 结合检测方法,将 rVspX 蛋白质和 BSA(阴性对照)包被在 96 孔板上,500 ng/孔,4 °C 孵育过夜;洗涤后,用 5% 脱脂奶的 PBS 溶液在 37 °C 封闭 2 h;洗涤后,将不同质量浓度的 Fn(0、3.125、6.25、12.5、25、50、75 μg/mL)以每孔 100 μL 加入 96 孔板中,室温孵育 1.5 h;洗涤后,每孔加入兔抗 Fn 抗体,室温孵育 1 h;洗涤后,再每孔加入抗兔 IgG-HRP 抗体(1 : 6 000 稀释)室温孵育 1 h;TMB 底物显色后 630 nm 波长下测各孔吸光值,从而检测 rVspX 与 Fn 结合特性。

将 100 μL 浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/mL 的 *M. bovis* WT 与 *M. bovis*  $\Delta VspX$  分别加到 96 孔板中,2 229 r/min 离心 10 min;脱脂奶封闭后,与不同质量浓度的牛源 Fn(分别为 0、5、25、50 μg/mL)在室温下孵育 1.5 h;然后依次与兔抗牛 Fn 抗体(1 : 500 稀释)和山羊抗兔 IgG-HRP 抗体(1 : 6 000 稀释)孵育;TMB 底物显色后在 630 nm 波长下测吸光值。重复 6 次实验,每次设置 3 个重复。

### 1.10 Fn 在 EBL 细胞表面分布检测

将 EBL 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 24 孔细胞培养板,在 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 20 h;洗涤后,用 4% 甲醛在室温下封闭 15 min,PBS 洗涤后,37 °C,5% 脱脂奶封闭 2 h,洗涤后用兔抗牛 Fn 抗体(1 : 1 000 稀释),不加兔抗牛 Fn 抗体孔作为阴性对照,在室温下孵育 1 h,PBST 洗涤后,加入羊抗

兔-HRP 抗体(1 : 4 000 稀释),室温孵育 1 h,洗涤后加入 TMB 显色液,用酶标仪检测 630 nm 波长下各孔吸光值。

### 1.11 抗 Fn 抗体黏附抑制试验

EBL 细胞培养、固定和封闭的方法同本文“1.10”,封闭后每孔加入 1% 脱脂奶-PBS 溶液稀释的兔抗 Fn 抗体(1 : 50 稀释),室温孵育 1 h;PBST 洗涤后,加入 rVspX 蛋白,12.5 μg/孔,室温孵育 1 h;洗涤后加入抗 rVspX 蛋白的单克隆抗体(1 : 2 000 稀释),37 °C 孵育 45 min;洗涤后加入羊抗鼠-HRP 标记抗体(1 : 6 000 稀释),37 °C 孵育 30 min;洗涤后加入 TMB 显色液,用酶标仪检测 630 nm 波长下各孔吸光值。不加兔抗 Fn 抗体孔、不加 rVspX 蛋白孔和不加抗 rVspX 蛋白单抗的孔分别作为 3 个阴性对照。

### 1.12 统计学分析

试验数据使用 Graphpad prism 5.0 软件包中的相关程序(student's *t*-test)进行分析,数值表示为平均值±SE, $P < 0.05$  为差异显著,用 \* 表示; $P < 0.01$  或  $P < 0.001$  为差异极显著,分别用 \*\* 或 \*\*\* 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 *M. bovis* $\Delta VspX$ 菌株筛选与验证

将 *M. bovis* 突变体库测序结果与 *M. bovis* HB0801 全基因序列进行比对后,发现 1 株 *VspX* 基因的插入突变株,Tn4001 转座子插入位点位于全基因组 548 342 位点后,位于 *VspX* 基因 384 位点后(图 1)。

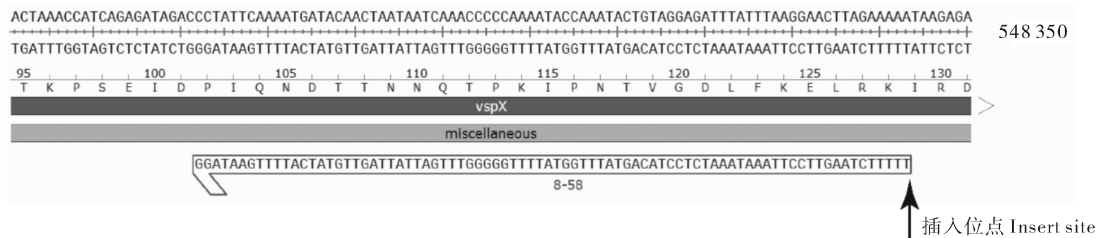


图 1 *M. bovis* 突变株测序结果

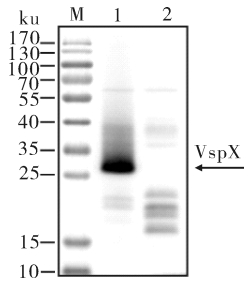
Fig.1 Sequencing results of *M. bovis* mutant strain

利用 Western blot 对 *M. bovis*  $\Delta VspX$  进行蛋白表达的鉴定。结果显示,*M. bovis*  $\Delta VspX$  在 27 ku 处检测不到 *VspX* 蛋白条带,而 *M. bovis* WT 在该位置可检测到蛋白条带(图 2),表明 *M. bovis*  $\Delta VspX$  突变株缺失表达 *VspX* 蛋白,突变成功。

### 2.2 野生型菌株与突变株的生长特性

2 株菌的生长曲线显示,*M. bovis* WT 和 *M. bovis*  $\Delta VspX$  的生长速率和生长状态相似,无明显差别,12~24 h 处于对数期,24~60 h 处于平台期,然后进入衰亡期(图 3)。





M: 显色蛋白质标准; 1: *M. bovis* WT 全菌蛋白; 2: *M. bovis*  $\Delta VspX$  全菌蛋白。M: Pre-stained protein standard; 1: Total proteins of *M. bovis* WT; 2: Total proteins of *M. bovis*  $\Delta VspX$ 。

图 2 Western blot 验证 *M. bovis* WT 和 *M. bovis*  $\Delta VspX$  菌株中 VspX 蛋白表达

Fig.2 Expression verification of VspX protein in *M. bovis* WT and  $\Delta VspX$  strains by Western blot

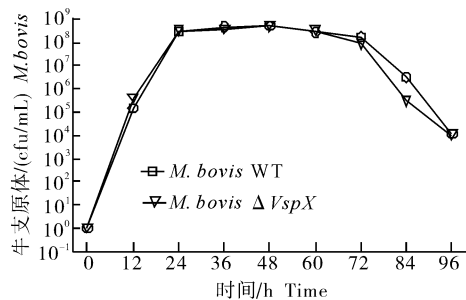
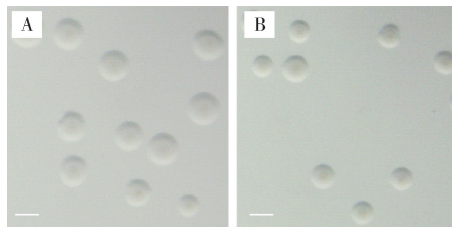


图 3 *M. bovis* WT 和 *M. bovis*  $\Delta VspX$  的生长曲线

Fig.3 The growth curves of *M. bovis* WT and *M. bovis*  $\Delta VspX$  mutant strains

*M. bovis* WT 和 *M. bovis*  $\Delta VspX$  在固体平板上培养 72 h 后, 两者均长出肉眼可见、针尖大小的菌落, 显微镜下菌落呈圆形, 边缘光滑, 为典型的“煎蛋状”, 有中心脐, 两者的菌落形态和大小无明显差异(图 4), 表明 *VspX* 基因缺失后并不影响 *M. bovis* 的生长特性。



A: *M. bovis* WT 菌株; B: *M. bovis*  $\Delta VspX$  突变株。Bars=500  $\mu\text{m}$ 。  
A: *M. bovis* WT strain; B: *M. bovis*  $\Delta VspX$  mutant strain. Bars=500  $\mu\text{m}$ 。

图 4 *M. bovis* WT 与 *M. bovis*  $\Delta VspX$  在显微镜下的菌落形态

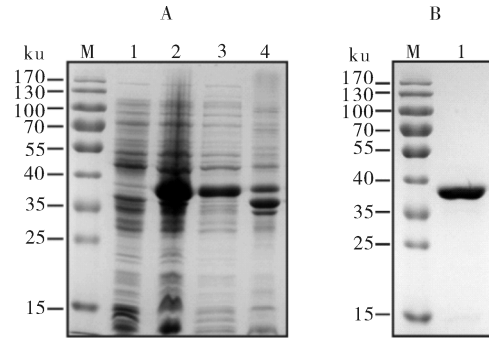
Fig.4 The colonies of *M. bovis* WT and

*M. bovis*  $\Delta VspX$  mutant strains under the microscope

### 2.3 rVspX 蛋白表达与纯化

*E. coli* BL21 重组菌经 IPTG 诱导后, 表达 37

ku 大小的外源蛋白, 蛋白在上清和沉淀中均有表达, 与 rVspX 蛋白预期大小一致(图 5A), 并经亲和层析获得纯化 rVspX 蛋白(图 5B)。



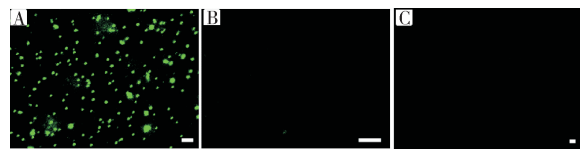
A: 重组菌诱导表达验证。M: 显色蛋白质标准; 1: 诱导前; 2: 诱导后; 3: 上清; 4: 沉淀; B: SDS-PAGE 分析纯化蛋白。M: 显色蛋白质标准; 1: 纯化的 rVspX 蛋白。A: Expression verification of recombinant *E. coli* BL21 strain. M: Pre-stained protein standard; 1: Before induction; 2: After induction; 3: Supernatant proteins; 4: Precipitation proteins; B: SDS-PAGE analysis of the purified rVspX protein; M: Pre-stained protein standard; 1: Purified rVspX protein。

图 5 rVspX 蛋白表达验证

Fig.5 Expression verification of rVspX protein

### 2.4 VspX 蛋白在 *M. bovis* 中的亚细胞定位

完整的 *M. bovis* 与抗 rVspX 蛋白的单抗孵育后, 在镜下可见绿色荧光信号(图 6A), 而与小鼠阴性腹水(图 6B)和 PBS(图 6C)作用的 *M. bovis* 并未在其表面检测到荧光信号, 表明 VspX 分布在 *M. bovis* 表面。



A: *M. bovis* 与抗 rVspX 蛋白单抗作用; B: *M. bovis* 与阴性腹水作用; C: *M. bovis* 与 PBS 作用; Bars=2  $\mu\text{m}$ 。A: *M. bovis* cells were treated with anti-rVspX monoclonal antibodies; B: *M. bovis* cells were treated with negative ascites; C: *M. bovis* cells were treated with PBS; Bars=2  $\mu\text{m}$ 。

图 6 间接免疫荧光法检测 VspX

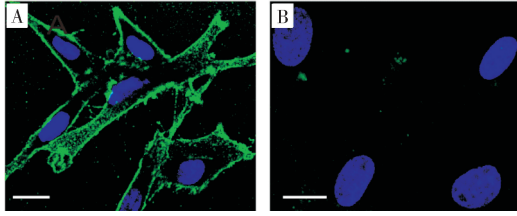
蛋白在 *M. bovis* 的表面分布

Fig.6 Identification of surface-located VspX on *M. bovis* by indirect immunofluorescence assay

### 2.5 黏附检测结果

间接免疫荧光结果显示, rVspX 蛋白与 EBL 细胞作用后, 蓝染的细胞核外周出现较强的绿色荧光,

其分布轮廓与 EBL 细胞轮廓相似(图 7A);而相同实验条件下,不加入蛋白的对照组中,EBL 细胞外周无绿色荧光(图 7B),表明 rVspX 蛋白特异性结合 EBL 细胞。



A:rVspX 蛋白与 EBL 细胞孵育; B: PBS 与 EBL 细胞孵育。Bars=20 μm; A: EBL cells were incubated with rVspX protein; B: EBL cells were incubated with PBS. Bars=20 μm.

图 7 间接免疫荧光检测 rVspX 蛋白与 EBL 细胞黏附

Fig.7 Adhesion assay of rVspX protein to EBL cells by IFA

*M. bovis* WT 和 *M. bovis* Δ*VspX* 以相同的感染比接种于 EBL 细胞,通过每孔细胞上黏附的 *M. bovis* 数量,判定两菌株对细胞黏附能力。结果显示,黏附在 EBL 细胞上的 *M. bovis* Δ*VspX* 菌株数量显著低于 *M. bovis* WT 菌株( $P < 0.05$ )(图 8),表明 *VspX* 基因缺失表达后,*M. bovis* 黏附能力下降,进一步证实 *VspX* 蛋白是一种黏附相关蛋白。

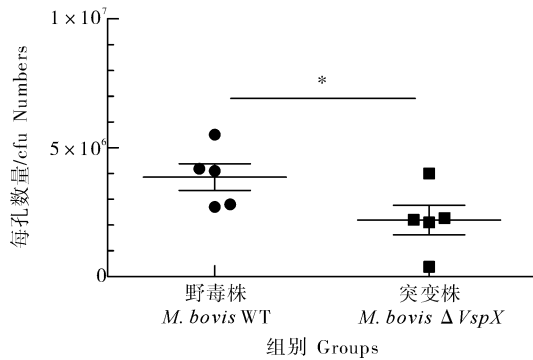


图 8 *M. bovis* WT 和 *M. bovis* Δ*VspX* 菌株黏附 EBL 细胞数量

Fig.8 The number of *M. bovis* WT strain and its Δ*VspX* mutant strain bound to EBL cells

### 2.6 抗 rVspX 蛋白单抗黏附抑制检测

抑制试验结果显示,与 SP2/0 阴性腹水相比,鼠抗 rVspX 单抗(1:10 稀释)与 *M. bovis* 作用后,黏附到 EBL 细胞上的数量显著下降( $P < 0.05$ )(图 9),抗 rVspX 单抗抑制 *M. bovis* 黏附到 EBL 细胞上,进一步证实 rVspX 对 EBL 细胞黏附的特异性。

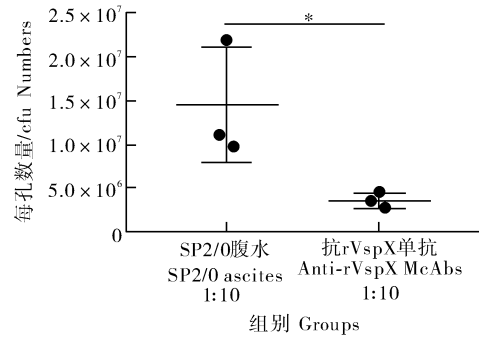


图 9 抗 rVspX 单抗抑制 *M. bovis* 黏附 EBL 细胞

Fig.9 Adhesion of *M. bovis* to EBL cells was inhibited by anti-rVspX monoclonal antibody

### 2.7 rVspX 蛋白与 Fn 结合特性

ELISA 结果显示 rVspX 以剂量依赖性方式与 Fn 结合,rVspX 结合 Fn 的量是随着 Fn 质量浓度增加而增加;而 BSA 与 Fn 是以低水平、非特异性方式结合(图 10),因此,rVspX 是一种具有 Fn 结合特性的蛋白。

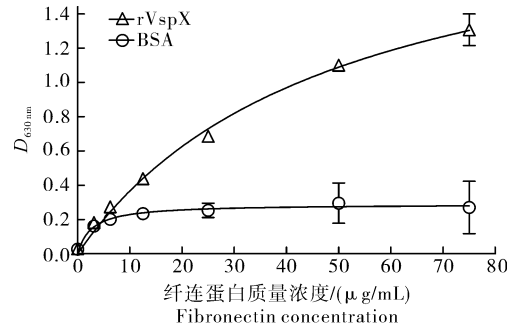


图 10 ELISA 检测 rVspX 蛋白与 Fn 黏附能力

Fig.10 Identification of the Fn-binding ability of rVspX protein by ELISA

菌株与 Fn 结合 ELISA 结果显示,随着 Fn 质量浓度的增加,2 株菌结合 Fn 的量也随之增加,菌株与 Fn 呈剂量依赖性结合;在同一 Fn 质量浓度下,*M. bovis* WT 比 *M. bovis* Δ*VspX* 结合 Fn 的量更多,当 Fn 质量浓度为 50 μg/mL 时,*M. bovis* WT 结合 Fn 的量显著高于 *M. bovis* Δ*VspX* 结合 Fn 的量( $P < 0.05$ )(图 11),进一步证实 *VspX* 蛋白具有 Fn 结合特性。

### 2.8 Fn 在 EBL 细胞表面分布检测结果

在单层 EBL 细胞板中加入抗 Fn 抗体后,该孔的吸光值( $0.8457 \pm 0.0247$ )极显著高于不加抗 Fn 抗体孔的吸光值( $0.2322 \pm 0.0048$ )( $P < 0.001$ ),表明抗 Fn 抗体与孔中的 Fn 发生结合,Fn 分布在 EBL 细胞表面。

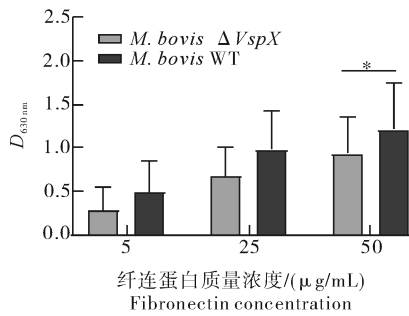


图 11 *M. bovis* WT 和 *M. bovis*  $\Delta VspX$  与 Fn 黏附能力比较

Fig.11 Comparison of the ability of *M. bovis* WT strain and its  $\Delta VspX$  mutant to adhere to Fn

## 2.9 兔抗 Fn 抗体黏附抑制试验结果

抗体抑制试验结果显示,加入兔抗 Fn 抗体孔的 OD 值极显著高于不加入 rVspX 蛋白孔的 OD 值( $P < 0.001$ ),也极显著高于不加入抗 rVspX 蛋白单抗孔的 OD 值( $P < 0.001$ );而加入兔抗 Fn 抗体孔的 OD 值与无抗 Fn 抗体孔的 OD 值之间则无明显差异( $P > 0.05$ )(图 12),表明兔抗 Fn 抗体并没有抑制 rVspX 蛋白与 EBL 细胞的黏附作用。

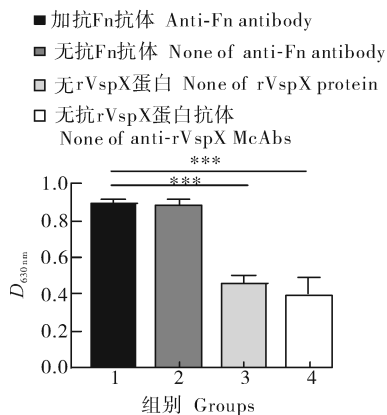


图 12 ELISA 检测兔抗 Fn 抗体抑制 rVspX 黏附

Fig.12 Detection of rabbit anti-Fn antibody inhibiting the adhesion of rVspX to EBL cells by ELISA

## 3 讨论

细菌与宿主细胞的黏附是其随后定植、侵袭和增殖的先决条件<sup>[10-11]</sup>,该过程是细菌的黏附素、黏附细胞器和黏附相关蛋白与宿主细胞相互作用的结果。*M. bovis* 没有专门的黏附细胞器,与宿主呼吸道上皮细胞的黏附是由其表面分布的多种黏附素和黏附相关蛋白完成的。早期研究表明 VspX 家族的一些成员<sup>[12-14]</sup>除了具有较强的免疫原性外,还参与

*M. bovis* 的黏附过程。近年来,一些新的 *M. bovis* 黏附相关蛋白也相继被鉴定,如具有 Plg 结合活性的  $\alpha$ -Enolase<sup>[15]</sup>、P18<sup>[16]</sup>、VpmaX<sup>[5]</sup> 和 FBA<sup>[17]</sup> 等,具有 Fn 结合能力的 TrmFO<sup>[8]</sup>、P27<sup>[9]</sup> 和 FBA<sup>[18]</sup> 等,这些黏附相关蛋白参与 *M. bovis* 在体内的致病过程。

Fn 是多种病原菌靶向的一种 ECM 成分,它是一种多结构域糖蛋白分子,大多数以可溶性二聚体形式在许多宿主的体液中存在,包括血浆、脑脊液和羊水等;Fn 也可以作为不溶性多聚体,连接胶原蛋白和其他 ECM 成分,或与真核细胞表面和基底膜结合<sup>[9]</sup>。Fn 是首先被发现的与细菌结合的真核细胞受体,FnBPs 促进细菌感染和侵袭。葡萄球菌、链球菌和 *M. bovis*、*M. pneumoniae* 等通过 FnBPs 定植于黏膜表面,在致病中发挥重要作用。研究表明,一些 FnBPs 基因的失活能显著降低支原体黏附能力,与其野生型菌株相比,毒性也显著降低<sup>[19-20]</sup>。因此,鉴定 FnBPs 对于揭示 *M. bovis* 发病机制具有重要意义。

本研究通过 rVspX 蛋白黏附 EBL 细胞的间接免疫荧光试验和 *M. bovis*  $\Delta VspX$  菌株黏附力降低试验证实 *M. bovis* 表面分布的 VspX 蛋白是一种黏附相关蛋白,且抗 rVspX 单抗抑制 *M. bovis* 黏附 EBL 细胞试验进一步证实 rVspX 蛋白黏附的特异性。为了进一步阐明 VspX 蛋白与宿主细胞黏附的分子机制,本研究采用 ELISA 方法,进行 rVspX 蛋白和 *M. bovis*  $\Delta VspX$  菌株与牛源 Fn 结合特性研究,结果显示 *M. bovis* VspX 蛋白具有 Fn 结合特性,并且本研究又证实 EBL 细胞表面分布有 Fn,因此,可以推断 *M. bovis* VspX 与宿主细胞 EBL 细胞的黏附是通过 Fn 介导的,Fn 起着分子桥的作用。本研究通过兔抗 Fn 抗体进行的黏附抑制检测结果并未表现出其对 rVspX 蛋白抑制作用,推测可能是 rVspX 蛋白与 Fn 结合的位点不同于抗 Fn 抗体与 Fn 结合的位点,因此,抗 Fn 抗体与 Fn 结合后并没有封闭位于 Fn 上能够与 rVspX 蛋白结合的位点,所以,抗 Fn 的抗体才未对 rVspX 蛋白黏附产生抑制作用。

总之,本研究证实了 *M. bovis* VspX 是一种表面分布的具有 Fn 结合特性的黏附相关蛋白,属于 FnBPs 家族成员,参与 *M. bovis* 黏附宿主细胞,推

测其在 *M. bovis* 致病中可能发挥重要作用。本研究有助于从蛋白质水平认识 *M. bovis* 与机体的相互作用关系,为深入解析该病的发病机制奠定基础。

### 参考文献 References

- [1] BURKI S, FREY J, PILO P. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis* [J]. *Veterinary microbiology*, 2015, 179(1/2): 15-22.
- [2] 辛九庆, 李媛, 郭丹, 等. 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 J Q, LI Y, GUO D, et al. 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 with English abstract).
- [3] SCHWARZ-LINEK U, HOOK M, POTTS J R. Fibronectin-binding proteins of gram-positive cocci [J]. *Microbes and infection*, 2006, 8(8): 2291-2298.
- [4] HENDERSON B, NAIR S, PALLAS J, et al. Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins [J]. *FEMS microbiology reviews*, 2011, 35(1): 147-200.
- [5] ZOU X, LI Y, WANG Y, et al. Molecular cloning and characterization of a surface-localized adhesion protein in *Mycoplasma bovis* Hubei-1 strain [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69644 [2020-04-26]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069644>.
- [6] QI J, GUO A, CUI P, et al. Comparative geno-plasticity analysis of *Mycoplasma bovis* HB0801 (Chinese isolate) [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e38239 [2020-04-26]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038239>.
- [7] 陈曦, 朱洪梅, 赵刚, 等. 牛支原体 HB0801 株 VspX 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(3): 868-878. CHEN X, ZHU H M, ZHAO G, et al. Preparation and identification of the monoclonal antibodies against VspX protein in *Mycoplasma bovis* strain HB0801 [J]. *China animal husbandry & veterinary medicine*, 2017, 44(3): 868-878 (in Chinese with English abstract).
- [8] GUO Y, ZHU H, WANG J, et al. TrmFO, a fibronectin-binding adhesin of *Mycoplasma bovis* [J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2017, 18(8): 1732 [2020-04-26]. <https://doi.org/10.3390/ijms18081732>.
- [9] CHEN X, HUANG J, ZHU H M, et al. P27 (MBOV\_RS03440) is a novel fibronectin binding adhesin of *Mycoplasma bovis* [J]. *International journal of medical microbiology*, 2018, 308(7): 848-857.
- [10] CHAGNOT C, LISTRAT A, ASTRUC T, et al. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components [J]. *Cell microbiology*, 2012, 14(11): 1687-1696.
- [11] ROTTEM S. Interaction of mycoplasmas with host cells [J]. *Physiological reviews*, 2003, 83(2): 417-432.
- [12] SACHSE K, HELBIG J H, LYSNYANSKY I, et al. 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.
- [13] THOMAS A, SACHSE K, FARNIR F, et al. Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells [J]. *Microbial pathogenesis*, 2003, 34(3): 141-148.
- [14] THOMAS A, LEPRINCE P, DIZIER I, et al. Identification by two-dimensional electrophoresis of a new adhesin expressed by a low-passaged strain of *Mycoplasma bovis* [J]. *Research in microbiology*, 2005, 156(5/6): 713-718.
- [15] SONG Z, LI Y, LIU Y, et al. alpha-Enolase, an adhesion-related factor of *Mycoplasma bovis* [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38836 [2020-04-26]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038836>.
- [16] 宋志强, 李媛, 孙文静, 等. 牛支原体新基因(P18)的克隆表达及活性鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(3): 184-187. SONG Z Q, LI Y, SUN W J, et al. Cloning, expression and characterization of a novel gene (P18) from *Mycoplasma bovis* [J]. *Chinese journal of preventive veterinary medicine*, 2012, 34(3): 184-187 (in Chinese with English abstract).
- [17] GAO X, BAO S, XING X, et al. Fructose-1, 6-bisphosphate aldolase of *Mycoplasma bovis* is a plasminogen-binding adhesin [J]. *Microbial pathogenesis*, 2018, 124(11): 230-237.
- [18] HUANG J, ZHU H, WANG J, et al. Fructose-1, 6-bisphosphate aldolase is involved in *Mycoplasma bovis* colonization as a fibronectin-binding adhesin [J]. *Research in veterinary science*, 2019, 124(3): 70-78.
- [19] DALLO S F, KANNAN T R, BLAYLOCK M W, et al. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae* [J]. *Molecular microbiology*, 2002, 46(4): 1041-1051.
- [20] MAY M, PAPA ZISI L, GORTON T S, et al. Identification of fibronectin-binding proteins in *Mycoplasma gallisepticum* strain R [J]. *Infection and immunity*, 2006, 74(3): 1777-1785.

## Adhesion characteristics of *Mycoplasma bovis* VspX protein

CHEN Xi<sup>1,2</sup>, LIU Dongming<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>1,2</sup>, ZHU Xifang<sup>1,2</sup>,  
CHEN Yingyu<sup>1,2</sup>, HU Changmin<sup>1,2</sup>, GUO Aizhen<sup>1,2,3,4,5</sup>

1. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China;

3. Key Laboratory of Ruminant Bio-Products of Ministry, Agriculture and Rural Affairs,  
Wuhan 430070, China;

4. Hubei Provincial Engineering Technology Research Center of Animal Vaccine,  
Wuhan 430070, China;

5. Animal Biopharmaceutical Engineering Research Center, Ministry of Education,  
Wuhan 430070, China

**Abstract** *Mycoplasma bovis* is one of the serious pathogens causing bovine respiratory diseases. Meanwhile, *M. bovis* can cause a variety of clinical signs, including bronchopneumonia, mastitis, arthritis, genital tract inflammation, and tenosynovitis. Adhesion to airway epithelial cells is a key step for *M. bovis* colonization and invasion of cells. Adhesin is one of the main virulence factors of *M. bovis*. Research about attachment has become an important field of pathogenic mechanisms research of *M. bovis*. To further analyze the adhesion characteristics of the *M. bovis* VspX protein, experiments, including indirect immunofluorescence assay, adhesion assay of protein and mutant strain to embryonic bovine lung (EBL) cells, antibody inhibition adhesion detection, ELISA assay of protein and strains binding fibronectin (Fn), were carried out, to clarify the molecular mechanism of VspX protein adhesion. The results showed that the *M. bovis* VspX protein was located on the surface of the strain. The recombinant VspX protein (rVspX) was able to adhere to the embryonic bovine lung (EBL) cells. Compared with the *M. bovis* wild strain (*M. bovis* WT), the *M. bovis* VspX gene-deleted mutant strain (*M. bovis*  $\Delta$ VspX) had a significantly decreased ability to adhere to EBL cells *in vitro* ( $P < 0.05$ ). The above results showed that the VspX protein was an adhesion-related protein. The anti-rVspX monoclonal antibody was able to inhibit the adhesion of *M. bovis* to EBL cells, which further confirmed the specificity of the adhesion. Also, the rVspX protein bound to Fn in a dose-dependent manner, and the *M. bovis*  $\Delta$ VspX strain had a significantly lower adherence ability to Fn ( $P < 0.05$ ) than that of the *M. bovis* WT strain. These results further demonstrated the binding specificity of *M. bovis* VspX protein to Fn. And Fn was distributed on the surface of EBL cells. In summary, the study validated that *M. bovis* VspX protein was an adhesion-related protein with Fn binding properties, and the adhesion of VspX to EBL cells was mediated by the extracellular matrix component, Fn.

**Keywords** *Mycoplasma bovis*; VspX protein; adhesion protein; fibronectin

(责任编辑:边书京)