

解脲脲原体UPA3-0382基因原核表达载体的构建与表达分析

赫聪慧^{1,3} 李春亮² 李雪燕^{1,3} 贾泽玮^{1,3} 栗晓燕^{1,3} 贾天军^{1,3*}

(¹河北北方学院医学检验学院, 张家口 075000; ²河北北方学院附属校医院, 张家口 075000;

³河北北方学院病原生物学与免疫研究所, 张家口 075000)

摘要 为了探讨解脲脲原体UPA3-0382基因的功能, 该研究构建了解脲脲原体UPA3-0382基因的原核表达载体, 并对其表达蛋白进行了初步的生物信息学分析。首先, 利用PCR方法克隆得到624 bp的UPA3-0382基因, 使用限制性内切酶BamH I和Not I酶切目的基因和质粒pGEX-6P-2, 并用T4连接酶连接后转化入大肠埃希菌感受态XL1-Blue中, 并诱导表达蛋白, 而后运用生物信息学软件分析编码蛋白的结构及功能。结果显示, 克隆出的UPA3-0382基因测序结果经Blast比对显示同源性为100%, 表达出分子量约为50 kDa的GST-UPA3-0382融合蛋白, 大小与预期一致, 经生物信息学软件分析该蛋白由207个氨基酸组成, 分子式为C₁₀₇₅H₁₇₄₉N₃₀₅O₃₄₈S₃, 分子量为24.62 kDa, 理论等电点为6.40。二级结构中含有 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角及无规则卷曲, 比例分别为48.79%、16.91%、7.25%和27.05%, 无信号肽及跨膜区域, 蛋白质空间结构及功能预测显示, 该蛋白为假设蛋白, 推测其可能参与了解脲脲原体信号转导与能量代谢等作用, 为进一步研究解脲脲原体奠定了基础。

关键词 解脲脲原体; UPA3-0382; 原核表达; 生物信息学分析

Construction and Expression Analysis of Prokaryotic Expression Vector of UPA3-0382 Gene

He Conghui^{1,3}, Li Chunliang², Li Xueyan^{1,3}, Jia Zewei^{1,3}, Li Xiaoyan^{1,3}, Jia Tianjun^{1,3*}

(¹College of Medical Laboratory, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; ²Hebei Northern University Affiliated Hospital, Zhangjiakou 075000, China; ³Institute of Pathogenic Biology and Immunology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract In order to investigate the function of *Ureaplasma urealyticum* UPA3-0382 gene, a prokaryotic expression vector of *Ureaplasma urealyticum* UPA3-0382 was constructed and bioinformatics analysis of the expressed protein was performed in this study. At first, UPA3-0382 gene with a length of 624 bp was cloned by PCR, the target gene and plasmid pGEX-6P-2 were digested by BamH I and Not I, then recombined with T4 ligase, the recombinant plasmid was transformed into XL1-Blue and then expressed fusion-protein. Finally, the structure and function of the fusion protein was predicted with bioinformatical software. The results showed that the homology between sequencing results and UPA3-0382 in NCBI was 100% and the molecular weight of fusion protein was 50 kDa. UPA3-0382 gene encoding protein consists of 207 amino acids and its molecular formula was C₁₀₇₅H₁₇₄₉N₃₀₅O₃₄₈S₃, the molecular mass was 24.62 kDa and its theoretical isoelectric point was 6.40. The ratio of α -helix, β -fold, β -turn and random curl in the secondary structure of the protein was 48.79%, 16.91%, 7.25%

收稿日期: 2018-03-05 接受日期: 2018-05-31

*通讯作者。Tel: 18931316365, E-mail: 452871832@qq.com

Received: March 5, 2018 Accepted: May 31, 2018

*Corresponding author. Tel: 18931316365, E-mail: 452871832@qq.com

网络出版时间: 2018-07-27 16:36:41

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180727.1636.008.html>

and 27.05%, respectively. There is no transmembrane domain and no signal peptide in this protein. Protein spatial structure and function predictions show that this protein is a hypothetical protein and may participate in *Ureaplasma urealyticum* signal transduction and energy metabolism. These findings may lay the foundation for further study of *Ureaplasma urealyticum*.

Keywords *Ureaplasma urealyticum*; UPA3-0382; prokaryotic expression; bioinformatics analysis

解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*, UU)属于柔膜体纲, 是一种介于病毒与细菌之间、能够独立存在的病原微生物^[1]。由于缺乏结构完整性, 形态具有多形性, 单个生物的大小范围可以从100 nm到1 μm, 因此UU被认为是最小的自我复制微生物之一。由于解脲脲原体是由革兰阳性菌退化演变而来, 失去了细胞壁中的肽聚糖而缺乏细胞壁这种基本结构^[2], 所以解脲脲原体一般定植在人类的泌尿生殖道, 致病力较低, 但在特定条件下可引起男性的非淋菌性尿道炎及女性围生期不良妊娠结局以及新生儿疾病, 包括脑膜炎、支气管肺发育不良、围生期死亡等多种疾病, 给人们的健康带来了很大的危害^[3]。临床上治疗UU感染的抗菌药物主要有四环素类、大环内酯类和喹诺酮类^[4-5]等, 但都出现了不同程度的耐药。目前, 对解脲脲原体的病原体特性及致病的分子机制尚不完全清楚, 推测可能与UU编码相关蛋白有关。UPA3-0382编码蛋白为假设蛋白, 其生物学作用及其致病机制尚不清楚。本研究拟克隆UPA3-0382基因, 采用生物信息学方法对其编码的蛋白进行结构与功能分析, 为后续探究UU及该基因可能的生物学作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及感受态 UPA3菌株和大肠埃希菌XL1-Blue感受态细胞为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂及仪器 2.5 mol/L的dNTP、5×Primer STAR Buffer、10×PCR buffer、*Bam*H I、*Not* I、T4连接酶、高保真酶、标准蛋白Marker及DNA marker

均购自TaKaRa公司; IPTG、琼脂糖凝胶电泳试剂、蛋白电泳试剂、AMP母液、LB液体培养基及固体培养基、凝胶回收及质粒提取试剂盒均购自OMEGA公司; PCR仪、恒温摇床(MAXQ 4000)及低温高速离心机均购自美国Thermo公司; 恒温金属浴购自中国Heros公司; 超声波信号发生器(XD-400s)购自南京先欧生物科技有限公司; 电泳仪(DYY-7C型电泳仪)购自北京市六一仪器厂; 凝胶成像仪(WD-9403F)购自OMEGA公司。

1.2 方法

1.2.1 UPA3-0382基因的克隆 根据NCBI基因库提供的UPA3-0382基因信息设计引物UPA3-0382-F和UPA3-0382-R(表1)。以解脲脲原体UPA3基因为模板进行PCR扩增反应, 100 μL反应体系如下: 5×Primer STAR Buffer 20 μL、dNTP(2.5 mmol/L) 8 μL、引物UPA3-0382-F、UPA3-0382-R各4 μL、UPA3基因模板4 μL、高保真DNA聚合酶1 μL、三蒸水59 μL。反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 45 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共30个循环; 72℃ 10 min。扩增产物经过1%琼脂糖凝胶电泳后, 在凝胶成像仪中观察结果并拍照, 鉴定后的产物于4℃保存。

1.2.2 原核表达载体的构建 对扩增产物进行酚氯仿纯化后, 与pGEX-6P-2原核载体分别进行 *Bam*H I和*Not* I双酶切, 再用酚-氯仿纯化酶切产物。取2 μL酶切纯化产物, 0.5 μL质粒放入连接体系中, 16℃连接过夜, 取3 μL连接产物边加边摇加入20 μL感受态菌中, 在冰上放置15 min, 金属浴42℃ 42 s后立即拿出, 冰上放置10 min, 热休克法转化入感受态细菌XL1-Blue。将转化的感受态加入到170 μL的LB液体培养基中, 在37℃培养45 min后, 将连接产物

表1 UPA3-0382基因克隆所用引物
Table 1 Primers used to clone UPA3-0382 genes

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
UPA3-0382-F	CGC GGA TCC ATG TCT GCA ACT AAT AAA AAA TAT
UPA3-0382-R	TTT TCC TTT TGC GGC CGC TTA TTG CTC GTT TTT TGC TTC

倾倒在LB选择性培养基(100 mg/L AMP)中, 无菌枪头密集划线, 37 °C培养箱中培养24 h后挑取生长的半个菌落, 加入到30 μ L三蒸水中, 煮沸5 min, 冰上冷却后当作模板。用pGEX-6P-2通用引物进行菌落PCR, 20 μ L反应体系如下: 10 $\times$ PCR buffer 2.0 μ L、dNTP(2.5 mmol/L) 1 μ L、上、下游引物各0.2 μ L、Taq DNA酶0.2 μ L、模板16.4 μ L。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共30个循环; 72 °C 10 min。菌落PCR产物经琼脂糖电泳观察结果并拍照。挑取另半个菌落在LB液体培养基中扩大培养后用质粒提取试剂盒提取质粒, 将提取质粒送华大基因公司测序进行序列鉴定。

1.2.3 融合蛋白的诱导 将增菌菌液600 μ L接种于含AMP的20 mL LB培养基, 37 °C 200 r/min震荡培养3 h至 D_{600} 值为0.85时加入IPTG 12 μ L, 30 °C通气培养3 h, 5 000 r/min离心20 min后收集细菌。加入裂解液冰浴超声破菌后, 5 000 r/min离心20 min取上清至EP管中, 加20 μ L GST-Beads混匀摇转吸附2 h, 14 000 r/min离心10 min, 弃上清; 用0.1% PBST和1 $\times$ PBS各洗3次, 14 000 r/min离心10 min后加入20 μ L 2 $\times$ SDS上样缓冲液95 °C变性5 min。变性后的样品12 000 rpm离心3 min, 取上清进行SDS-PAGE。考马斯亮兰染色后用脱色液脱色至条带清晰在凝胶成像仪中观察结果并拍照。

1.2.4 蛋白质生物信息学分析 (1)理化性质分析: 利用蛋白质分析系统EXPASY Proteomics(<http://www.expasy.org/proteomics>)中的蛋白质在线分析软件protparam(expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam)及ALPHLYSE(<http://www.alphalyse.com>)对该假设膜蛋白的氨基酸序列进行理化性质的分析(包括氨基酸组成、分子式、理论等电点、消化系数及半衰期等预测)。

(2)蛋白质二级结构预测: 采用PRABI-GERLAND在线软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)分析该蛋白质的二级结构。

(3)跨膜区域预测: 运用蛋白质分析系统EXPASY Proteomics(<http://www.expasy.org/proteomics>)中的TMNMM Server v.2.0软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)分析该蛋白的跨膜区域。

(4)信号肽预测: 运用SignalP在线分析软件

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对该蛋白进行信号肽分析。

(5)模拟蛋白质三级结构: 运用蛋白质分析系统EXPASY Proteomics(<http://www.expasy.org/proteomics>)中的SWISS-MODEL软件(<https://swissmodel.expasy.org>)模拟构建同源结构。

(6)蛋白功能预测: 运用在线分析软件STRING(<https://string.embl.de>)通过比较基因组学对蛋白质进行功能预测。

2 结果

2.1 UP43-0382基因克隆PCR结果

分别将以菌液为模板和以蒸馏水为模板的PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。结果显示, 以菌液为模板的扩增产物在约624 bp处有扩增条带, 以蒸馏水为模板的扩增产物没有条带显示(图1)。

2.2 重组质粒菌落PCR结果

使用pGEX-6P-2质粒通用引物进行菌落PCR扩增, 经琼脂糖凝胶电泳在约774 bp处有扩增条带(图2), 与预期结果相符。

2.3 重组质粒测序结果图谱

测序结果如图3所示。酶切位点如图中标注GAATCC为*Bam*H I酶切位点, GCG GCC GC为*Not* I酶切位点, 两个酶切位点中间的序列为目的基因序列。

2.4 测序结果比对

利用DANMAN软件对测序结果和NCBI中UP43-0382进行序列比对, 两者同源率为100%(图4)。

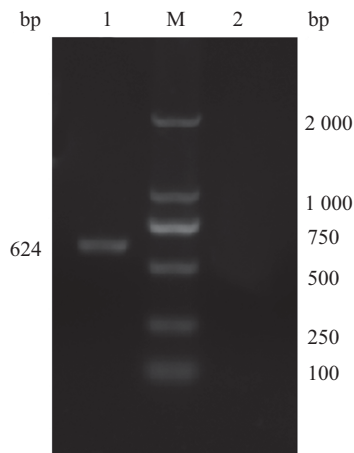
2.5 融合蛋白的表达与鉴定

表达的融合蛋白经纯化后进行SDS-PAGE电泳, 结果显示, 其分子质量单位约为50 kDa, 因有部分蛋白出现降解情况, 分子质量约29 kDa处出现一条GST条带(图5)。

2.6 UP43-0382编码蛋白的生物信息学分析

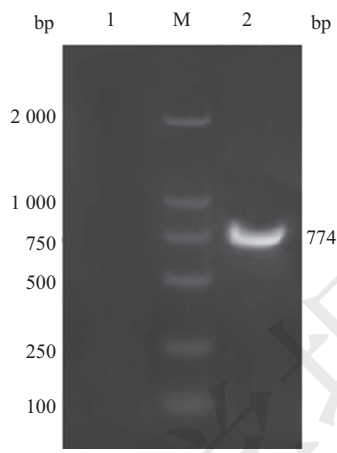
2.6.1 蛋白质的理化性质 该蛋白由207个氨基酸组成, 分子式为 $C_{1075}H_{1749}N_{305}O_{348}S_3$, 含有碱性氨基酸(R、K), 41个酸性氨基酸(D、E), 12个芳香族氨基酸(W、F、Y)。分子量为24.62 kDa, 理论等电点为6.40, 消光系数18 910, 不稳定指数48.76, 脂溶性指数77.10, 在280 nm波长处吸光度(D)值为0.768, 在哺乳动物体外半衰期为30 h, 在酵母体内半衰期大于20 h, 在大肠杆菌体内大于10 h。

2.6.2 蛋白质二级结构 经PRABI-GERLAND软



M: DNA Marker DL2000; 1: PCR产物; 2: 空白对照。
M: DNA Marker DL2000; 1: PCR product; 2: blank control.

图1 UPA3-0382基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 UPA3-0382 gene amplification product agarose gel electrophoresis



M: DNA Marker DL2000; 1: 空白对照; 2: 目的基因菌落PCR扩增条带。
M: DNA Marker DL2000; 1: blank control; 2: band of target gene.

图2 重组质粒PCR鉴定
Fig.2 Identification of recombinant plasmid colony PCR

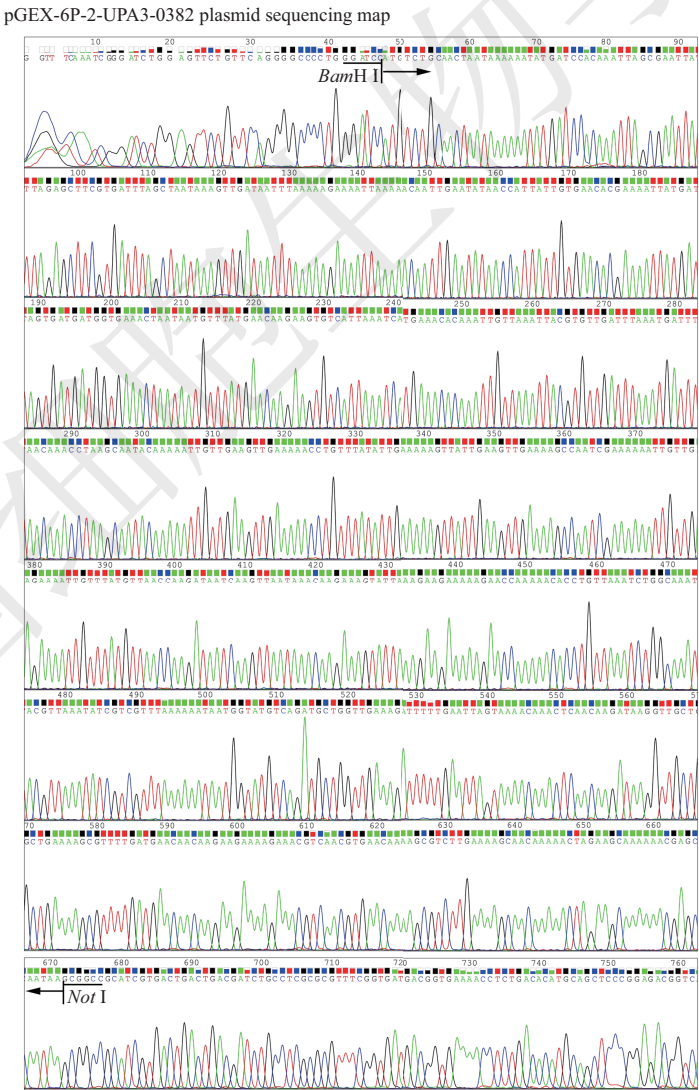


图3 重组质粒测序结果图谱
Fig.3 Recombinant plasmid sequencing map

Ureaplasma parvum strain hebnu UU3, complete genome

Sequence ID: CP021991.1 Length: 727 176 Number of Matches: 1

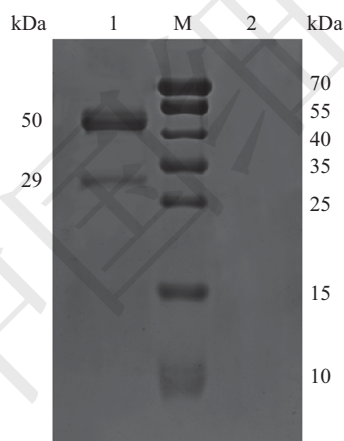
Range 1: 504 219 to 504 842 GenBank graphics

▼ Next match ▲ Previous match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1153 bits (624)	0.0	624/624 (100%)	0/624 (0%)	Plus/Minus
Query 1	ATGTCTGCAACTAATAAAAAATATGATCCACAAATTAGCGAATTATTAGAGCTTCGTGAT	60		
Sbjct 504842	ATGTCTGCAACTAATAAAAAATATGATCCACAAATTAGCGAATTATTAGAGCTTCGTGAT	504783		
Query 61	TTAGCTAATAAAGTTGATAATTTAAAAAGAAAATTAACAATTGAATATAACCATAT	120		
Sbjct 504782	TTAGCTAATAAAGTTGATAATTTAAAAAGAAAATTAACAATTGAATATAACCATAT	504723		
Query 121	TGTGAACACGAAAATTATGATAGTGATGATGGTGAAACTAATAATGTTTATGAACAAGAA	180		
Sbjct 504722	TGTGAACACGAAAATTATGATAGTGATGATGGTGAAACTAATAATGTTTATGAACAAGAA	504663		
Query 181	GTGTCATTAAATCATGAAACACAAATGTTAAATTACGTGTTGATTAAATGATTAAACA	240		
Sbjct 504662	GTGTCATTAAATCATGAAACACAAATGTTAAATTACGTGTTGATTAAATGATTAAACA	504603		
Query 241	AACCTAAGCAATACAAAAATTGTTGAAGTTGAAAAACCTGTTTATATTGAAAAAGTTATT	300		
Sbjct 504602	AACCTAAGCAATACAAAAATTGTTGAAGTTGAAAAACCTGTTTATATTGAAAAAGTTATT	504543		
Query 301	GAAGTTGAAAAAGCCAAATCGAAAAAATGTTGAGAAAATGTTTATGTTAACCAAGATAAT	360		
Sbjct 504542	GAAGTTGAAAAAGCCAAATCGAAAAAATGTTGAGAAAATGTTTATGTTAACCAAGATAAT	504483		
Query 361	CAAGTTAATAAACAAGAAAGTATTAAAGAAGAAAAAGAACCAAAACACCTGTTAAATCT	420		
Sbjct 504482	CAAGTTAATAAACAAGAAAGTATTAAAGAAGAAAAAGAACCAAAACACCTGTTAAATCT	504423		
Query 421	GGCAAATACGTTAAATATCGTCGTTTAAAAAATATGGTATGTCAGATGCTGGTTGAAAG	480		
Sbjct 504422	GGCAAATACGTTAAATATCGTCGTTTAAAAAATATGGTATGTCAGATGCTGGTTGAAAG	504363		
Query 481	ATTTTGAATTAGTAAACAAACTCAACAAGATAAGGTTGCTGCTGAAAAGCGTTTGTAT	540		
Sbjct 504362	ATTTTGAATTAGTAAACAAACTCAACAAGATAAGGTTGCTGCTGAAAAGCGTTTGTAT	504303		
Query 541	GAACAACAAGAGAAAAAGAACGTCAACGTGAACAAAAGCGCTTGAAGCAACAAAAA	600		
Sbjct 504302	GAACAACAAGAGAAAAAGAACGTCAACGTGAACAAAAGCGCTTGAAGCAACAAAAA	504243		
Query 601	CTAGAAGCAAAAAACGAGCAATAA	624		
Sbjct 504242	CTAGAAGCAAAAAACGAGCAATAA	504219		

图4 序列同源性比对结果

Fig.4 Sequence homology comparison results



M: 蛋白标志物; 1: 融合蛋白; 2: 空白对照。

M: protein marker; 1: fusion protein; 2: blank control.

图5 表达蛋白的SDS-PAGE电泳结果

Fig.5 SDS-PAGE results of expressed proteins

件分析结果显示, 该假设蛋白的二级结构中有101个 α -螺旋(Hh)(比例为48.79%), 35个 β -折叠(Ee)(比例为

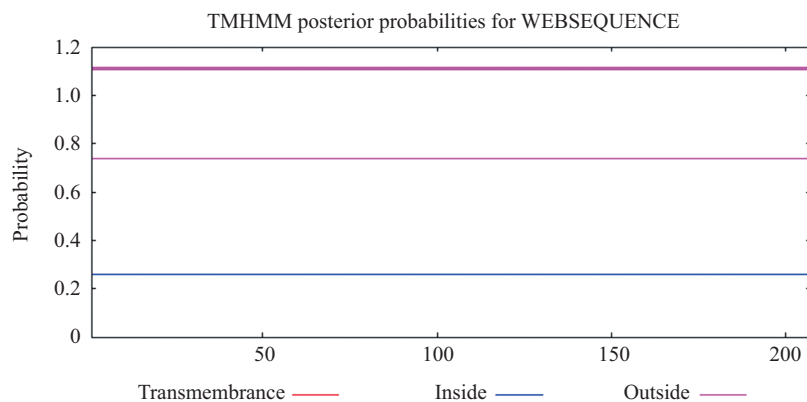
16.91%), 15个 β -转角(Tt)(比例为7.25%), 56个无规则卷曲(Cc)(比例为27.05%)。

2.6.3 蛋白质的跨膜区域 TMHMM Server v.2.0 软件分析显示该蛋白无跨膜区域不属于跨膜蛋白(图6)。

2.6.4 信号肽 SignalP结果显示, D 值为0.109, 小于阈值0.450, 所以该蛋白不存在信号肽序列(图7)。

2.6.5 蛋白质的高级结构 运用SWISS-MODEL软件(<https://swissmodel.expasy.org>)构建了编码蛋白的三维结构分子模型, 该蛋白分子三级结构模型与蛋白质结构数据库中2k6i.1.1蛋白A链相似性最高, 为16.67%(图8)。

2.6.6 蛋白质功能预测 运用软件STRING(<https://string.embl.de>)对蛋白质进行功能预测, $UPA3-0382$ 基因编码蛋白为假设蛋白(UUR10-0375), 与其相邻的蛋白有天冬酰胺酰-tRNA合成酶(asnS)、CDP-二酰甘油-甘油-3-磷酸3-磷脂酰转移酶(pgsA)、醛脱

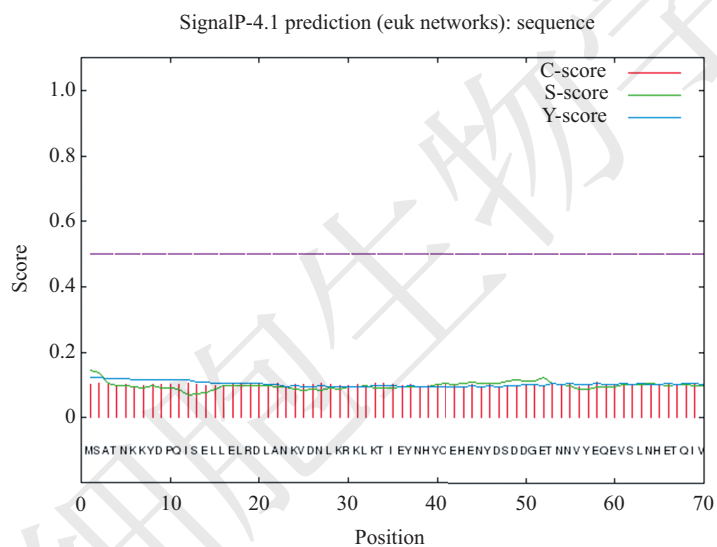


横轴为氨基酸的位置, 纵轴为有跨膜区域的可能性。

The horizontal axis is the position of amino acids and the vertical axis is the possibility of a transmembrane region.

图6 UP43-0382编码蛋白的跨膜区域结果

Fig.6 Transmembrane domain results of UP43-0382 encoded protein



横轴为氨基酸的位置, 纵轴为信号肽的D值。

The horizontal axis is the position of amino acid and the vertical axis is the D value of signal peptide.

图7 UP43-0382编码蛋白的信号肽预测结果

Fig.7 Signal peptide prediction of UP43-0382 encoded protein

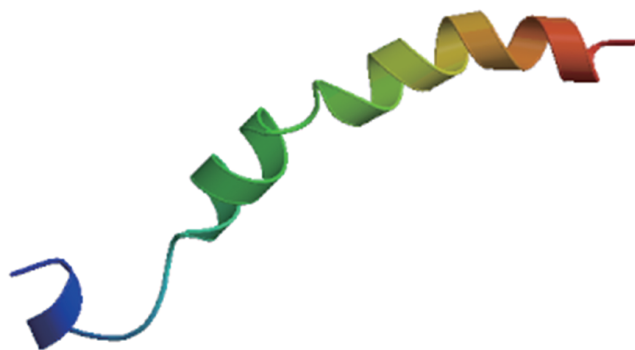


图8 UP43-0382编码蛋白的模建空间结构

Fig.8 The model of steric structure of UP43-0382 encoded protein

氢酶(NAD)家族蛋白及天冬酰胺合成酶(asnA)等蛋白。

3 讨论

解脲脲原体是与真核细胞相关的最小的自我复制生物体之一^[6], 是从男性和女性的泌尿生殖道分离出的最普遍的潜在致病菌。在自然界中分布广泛, 已经在人体、家畜及实验动物中分离得到^[7-8]。虽然它是一种机会性致病菌, 但UU可以产生一些有毒物质, 如脲酶、IgA蛋白酶和磷脂酶, 并通过吸附到呼吸道或尿道上皮细胞表面受体上来增殖, 这增加了其致病风险^[9]。UU是缺乏细胞壁的最小的原核型微生物, 无脂多糖、肽聚糖和脂磷壁酸等细胞壁成分^[10-11], 所以细胞膜是其与外界环境相互作用的唯一结构。解脲脲原体虽无细胞壁结构, 但含有大量的膜蛋白^[12], 细胞膜由脂质双分子层和膜蛋白构成, 膜蛋白是暴露在表面与周围各种成分不断相互作用, 影响机体免疫系统的一种主要蛋白, 是介导解脲脲原体黏附宿主细胞表面, 入侵宿主细胞导致细胞受损与死亡的物质基础^[13]。由于UU的基因组较小, 它们具有有限的生物合成能力, 因此, 其具有特殊的营养需求和代谢方式^[14]。

生物信息学在病原体的检测、基因信息分析、疫苗研发等领域均有应用, 已逐渐成为研究蛋白质结构与功能的重要工具。目前, 对UP43-0382基因的研究相对较少, 通过克隆基因, 对UP43-0382基因编码的蛋白进行生物信息学分析, 显示其编码蛋白为假设蛋白, 与其相邻的蛋白为天冬酰胺酰-tRNA合成酶(Asns), 是一种高度表达的分泌蛋白, 该蛋白具有阻断IL-8受体的能力^[15], Asns和天然IL-8配体都能激活MAPK, 通过IL-8受体进行信号转导, 这与其G蛋白偶联受体结合至关重要^[16]。与其相邻的另一蛋白为天冬酰胺合成酶(asnA), asnA以氨或谷氨酰胺为底物, 使用三磷酸腺苷(ATP)作为能源来催化天冬氨酸合成来参与体内氮的代谢^[17]及转录后水平的调控^[18]。由于UU在细胞和基因组方面比传统细菌小, 所以其代谢方式较特殊, 生物体含有编码表面蛋白质的几种基因, 最重要的是编码多重带抗原(MBA)的基因。MBA是一种主要的脲原体毒力因子, 是人类感染期间血清识别的主要抗原, 一种表面暴露的脂蛋白^[19], TLR1、TLR2和TLR6是MBA激活核因子 κ B的模式识别受体^[20]。转录因子NF- κ B也是

众所周知的促炎趋化因子IL-8的调节剂, 并且发现MBA抗原的变化与宿主炎症反应程度相关, 这表明, MBA的变化与UU致病性有关^[21]。由此猜测, UP43-0382编码蛋白可能参与了解脲脲原体信号转导与能量代谢。

随着UU感染趋势的逐年增长, 期待从分子水平进一步明确UU致病性、感染者机体的免疫应答调节及代谢等问题, 从而进一步加强对人群UU感染筛查及感染的早期控制及早期治疗, 本实验成功构建了pGEX-6P2-UP43-0382的原核表达载体, 并对其编码蛋白进行了初步的生物信息学分析, 为进一步研究该基因及解脲脲原体奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 张艳, 华川, 李苏利, 宋娟, 王芊, 李扬. 解脲脲原体生物群分布与耐药性差异研究. 中国人兽共患病学报(Zhang Yan, Hua Chuan, Li Suli, Song Juan, Wang Qian, Li Yang. Study on the biodiversity distribution and drug resistance of *Ureaplasma urealyticum*. Chinese Journal of Zoonosis) 2016; 32(1): 45-50.
- 2 Viscardi RM. *Ureaplasma* species: role in neonatal morbidities and outcomes. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2014; 99(1): 87-92.
- 3 Kallapur SG, Kramer BW, Jobe AH. *Ureaplasma* and BPD. Semin Perinatol 2013; 37(2): 94-101.
- 4 Sobouti B, Fallah S, Mobayen M, Noorbakhsh S, Ghavami Y. Colonization of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women and their transmission to offspring. Iran J Microbiol 2014; 6(4): 219-24.
- 5 Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Lombaard HA, Kock MM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. BMC Infect Dis 2014; 14(1): 171.
- 6 Piccinelli G, Gargiulo F, Biscaro V, Caccuri F, Caruso A, De Francesco MA. Analysis of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* serovars resistant to fluoroquinolones. Infect Genet Evol 2017; 47: 64-7.
- 7 Waites KB, Schelonka RL, Xiao L, Grigsby PL, Novy MJ. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. Semin Fetal Neonatal Med 2009; 14(4): 190-9.
- 8 Bryan L, Joseph H. *Mycoplasma*, *ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. Infect Dis Obstet Gynecol 2010; 2010(10): 504-32.
- 9 Smith DG, Russell WC, Thirkell D. Adherence of *Ureaplasma urealyticum* to human epithelial cells. Microbiology 1994; 140(Pt10): 2893-8.
- 10 Zhu C, Liu J, Yang L, Dong C, Wu T, Yu X, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Chinese women with genital infectious diseases. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2012; 78(3): 406-7.
- 11 Machado AA, Zorzi AR, Glória AE, Donadi EA. Frequency of

- Mycoplasma hominis and *Ureaplasma urealyticum* infections in women with systemic lupus erythematosus. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34(3): 243-7.
- 12 Kwak DW, Cho HY, Kwon JY, Park YW, Kim YH. Usefulness of maternal serum C-reactive protein with vaginal *Ureaplasma urealyticum* as a marker for prediction of imminent preterm delivery and chorioamnionitis in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. *J Perinat Med* 2015; 43(4): 409-15.
- 13 陈芸, 刘晓健, 赵松兰. 脂质相关膜蛋白体外诱导hBD-2基因表达的研究. 实用临床医药杂志(Chen Yun, Liu Xiao Jian, Zhao Song Lan. Induction of hBD-2 gene expression by lipid-associated membrane protein *in vitro*. *Practical Journal of Clinical Medicine*) 2011; 15(5): 42-5.
- 14 Waites KB, Li X, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI. *Mycoplasma* and *ureaplasma*. New York: Humana Press, 2013, 229-81.
- 15 Ramirez BL, Howard OM, Dong HF, Edamatsu T, Gao P, Hartlein M, *et al.* *Brugia malayi* asparaginyl-transfer RNA synthetase induces chemotaxis of human leukocytes and activates G-protein-coupled receptors CXCR1 and CXCR2. *J Infect Dis* 2006; 193(8): 1164-71.
- 16 Kron MA, Metwali A, Vodanovicjankovic S, Elliott D. Nematode asparaginyl-tRNA synthetase resolves intestinal inflammation in mice with T-cell transfer colitis. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20(2): 276-81.
- 17 Manhas R, Tripathi P, Khan S, Sethu LB, Lal SK, Gowri, VS, *et al.* Identification and functional characterization of a novel bacterial type asparagine synthetase A: a tRNA synthetase paralog from *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2014; 289(17): 12096-108.
- 18 张博. 天冬酰胺合成酶在肝细胞癌中的表达与预后分析及功能研究(博士论文). 第二军医大学(Zhang Bo. Expression, prognosis and functional analysis of asparagine synthetase in hepatocellular carcinoma, The Second Military Medical University), 2013.
- 19 Dando SJ, Nitsos I, Kallapur SG, Newnham JP, Polglase GR, Pillow JJ, *et al.* The role of the multiple banded antigen of *Ureaplasma parvum* in intra-amniotic infection: major virulence factor or decoy? *PLoS One* 2012; 7(1): e29856.
- 20 Kokkayil P, Dhawan B. *Ureaplasma*: Current perspectives. *Indian J Med Microbiol* 2015; 33(2): 205-14.
- 21 Robinson JW, Dando SJ, Nitsos I, Newnham J, Polglase GR, Kallapur SG, *et al.* *Ureaplasma parvum* serovar 3 multiple banded antigen size variation after chronic intra-amniotic infection/colonization. *PLoS One* 2013; 8(4): e62746.