

分类号：S855.1

学校代码：10758

密 级：公开

学 号：320212962



兽医硕士专业学位论文

猪肺炎支原体的分离鉴定及其间接 ELISA 检测方法
的建立

Isolation and Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* and
the Establishment of an Indirect ELISA Detection assay

研 究 生 姓 名	周龙玉
校内导师姓名及职称	佟盼盼 副教授
校外导师姓名及职称	张万江 研究员
专 业 学 位 类 别	兽医硕士
领 域 名 称	不分领域
研 究 方 向	动物疫病防控
所 在 学 院	动物医学学院

新疆·乌鲁木齐
二〇二四年六月

本文由

国家自然科学基金项目“猪链球菌 2 型半胱氨酸蛋白酶
ApdS 切割宿主防御肽 cathelicidin LL-37 介导其免疫逃逸
的分子机制”支持

(项目编号: 31873016)

课题主持人: 谢芳 副研究员

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所)

猪肺炎支原体的分离鉴定及其间接 ELISA 检测方法的建立

摘 要

猪支原体肺炎又称为猪气喘病或猪地方流行性肺炎，是由猪肺炎支原体（*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp）引起的猪慢性呼吸道疾病。该病流行范围广，死亡率不高，但难以治愈，其主要影响猪的正常生长，导致饲料转化率降低，给养殖户造成经济损失。该病目前主要通过疫苗免疫进行预防，但仅能提供部分保护。因此，为了更有效的控制该病的发生和流行，通过分子诊断早发现早净化是可行有效的方法。

为了建立 Mhp 的快速检测方法，本研究前期从疑似患病猪只的肺脏中分离鉴定 Mhp，通过原核表达系统表达纯化 Mhp 的免疫相关蛋白，用于建立 Mhp 间接 ELISA 检测方法；使用 Mhp-1 全菌蛋白和 Mhp 重组蛋白免疫小鼠，制备针对 Mhp 的单克隆抗体，为后续建立 Mhp 阻断 ELISA 检测方法提供前期基础。

1. 本研究从多份患病猪的肺脏组织中成功分离到一株 Mhp，后开展了细菌生物学特性鉴定、构建了系统发育树、全基因组测序等，为后续 Mhp 诊断方法的建立奠定基础。结果显示，本研究从猪的肺脏组织中成功分离出一株可以稳定传代 Mhp，命名为 Mhp-1。16S rRNA 基因系统发育树分析结果表明分离株 Mhp-1 与国外猪源 Mhp 分离株 F7.2 (KY264124) 处于同一分支；MLST 分型结果显示该分离株属于 ST184 型，ST 型聚类分析结果呈现多样性；全基因组测序结果显示，Mhp-1 的基因组大小为 0.91 Mb，毒力基因预测结果显示，存在 EF-Tu、Ltp、P216、P102、P46、P97、PDH-B、荚膜、溶血素等毒力因子的编码基因。

2. 根据 Mhp-1 的全基因组序列，选取了 7 个 Mhp 免疫相关蛋白，包括 Mhp366、Mhp378、P65、P36、P97CR1、NrdF、DnaK 等蛋白，分别构建了相应的重组原核表达质粒，将重组质粒通过化学转化转入大肠杆菌 BL21 中并诱导表达，利用 Ni-NTA 亲和层析法纯化目的蛋白，经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定后，通过初步评价最终选取了 Mhp378 和 P36 蛋白建立 Mhp 间接 ELISA 检测方法。结果显示，本研究成功表达纯化出了 Mhp 的 7 个重组蛋白，并建立了 Mhp378 蛋白和 P36 蛋白间接 ELISA 检测方法。基于 Mhp378 蛋白和 P36 蛋白建立的间接 ELISA 检测方法商品化 IDvet 试剂盒的总符合率分别为 89.09% 和 82.11%。

3. 本研究使用 Mhp-1 全菌蛋白和纯化后的 Mhp378、P36、P97CR1、P65 重组蛋白分别免疫小鼠，三次免疫后利用 ELISA 检测抗体效价，之后取小鼠脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 进行融合，利用细胞有限稀释法并结合 ELISA 方法筛选能产生特异性抗体的杂交瘤细胞株。将筛选出的杂交瘤细胞株注入小鼠腹腔制备腹水，并利用抗体纯化试剂盒进行纯化，利用抗体亚类鉴定试剂盒鉴定抗体亚型。结果显示，经过 3 次亚克隆获得了 4 株能稳定分泌抗 P65 蛋白抗体的杂交瘤细胞株，而全菌蛋白和其余三个重组蛋白未获得杂交瘤细胞株。Western blot 分析显示，四株单抗均能与 P65 重组蛋白产生反应。腹水经 Protein G 蛋白柱纯化得到高纯度的单抗。亚型鉴定结果显示四株单抗存在 IgG1、IgG2a、IgG3 三种亚型，轻链均为 κ 链。

综上所述，本研究成功分离鉴定出一株猪肺炎支原体 Mhp-1；表达纯化了 7 个 Mhp 免疫相关重组蛋白；分别建立了 Mhp378 蛋白、P36 蛋白间接 ELISA 检测方法；获得了 4 株稳定分泌针对猪肺炎支原体 P65 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

关键词：猪肺炎支原体；重组蛋白；间接 ELISA；单克隆抗体

Isolation and Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* and the Establishment of an Indirect ELISA Detection assay

Abstract

Mycoplasma pneumoniae of Swine (MPS), also known as porcine asthma or porcine endemic pneumonia, is a chronic respiratory disease in pigs caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp). The disease has a wide epidemic range and a low mortality rate, but it is difficult to cure. It mainly affects the normal growth of pigs and leads to a decrease in feed conversion rate, causing significant economic losses to China's breeding industry. The disease is currently mainly prevented through vaccination, but it can only provide partial protection. Therefore, in order to control the occurrence and epidemic of this disease more effectively, early detection through molecular diagnosis is a feasible and effective method.

In order to establish a rapid detection method for Mhp, Mhp was isolated and identified from the lungs of suspected diseased pigs in the early stage of this study. The immune related proteins of Mhp were expressed and purified through a prokaryotic expression system, which were used to establish an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection method for Mhp. Whole bacterial protein of Mhp-1 and Mhp recombinant protein were used to immunize mice to prepare monoclonal antibodies against Mhp, which provided a preliminary basis for the subsequent establishment of blocking ELISA detection method of Mhp.

1. In this study, a Mhp strain was successfully isolated from lung tissues of multiple diseased pigs. Subsequently, bacterial biological characteristics were identified, and phylogenetic trees were constructed. Whole genome sequencing (WGS) was performed, which will lay the foundation for the establishment of subsequent diagnostic methods for Mhp. The results showed that a stable Mhp strain was successfully isolated from pig lung tissue and named as Mhp-1. Phylogenetic tree analysis based on 16S rRNA gene showed that the Mhp-1 isolate and the foreign Mhp isolate F7.2 (KY264124) were in the same branch. The MLST typing results showed that the Mhp-1 isolate belonged to ST184 type, and the ST type clustering analysis showed diversity. WGS results showed that the genome size of the Mhp-1 isolate was 0.91 Mb. The prediction of virulence genes showed the presence of coding genes for virulence factors, such as EF-Tu, Ltp, P216, P102, P46, P97, PDH-B, capsule, and hemolysin.

2. Based on the complete genome sequence of Mhp-1, 7 Mhp-related proteins were selected, including Mhp366, Mhp378, P65, P36, P97CR1, NrdF, and DnaK, and then corresponding recombinant prokaryotic expression plasmids were constructed. The target proteins were purified using Ni-NTA affinity chromatography and identified by SDS-PAGE and Western blot. After preliminary evaluation, Mhp378 and P36 proteins were selected to establish an indirect ELISA detection method for Mhp. The results showed that in this study, seven recombinant proteins of Mhp were successfully expressed and purified and indirect ELISA detection methods using Mhp378 protein and P36 protein were established. The coincidence rate of the indirect ELISA methods based on Mhp378 protein and P36 protein comparing with commercial IDvet kit were 89.09% and 82.11%, respectively.

3. This study immunized mice with Mhp-1 whole cell protein and purified Mhp378, P36, P97CR1, and P65 recombinant proteins, respectively. After three immunizations, the antibody titers were detected using ELISA. Then, mouse spleen cells were fused with mouse myeloma cells (SP2/0), and hybridoma cell lines capable of producing specific antibodies were screened using the cell limited dilution method combined with ELISA. The selected hybridoma cell lines were injected into the abdominal cavity of mice

to prepare ascites, and purified using an antibody purification kit, and then antibody subtypes were identified using an antibody subclass identification kit. The results showed that four hybridoma cell lines capable of stably secreting anti P65 protein antibodies were obtained through three rounds of subcloning, while hybridoma cell lines were not obtained for whole cell protein and the other three recombinant proteins. Western blot analysis showed that all four monoclonal antibodies could react with the P65 recombinant protein. High purity monoclonal antibodies were obtained by purifying ascites using Protein G protein columns. The subtype identification results showed that the four monoclonal antibodies had three subtypes: IgG1, IgG2a, and IgG3, all of which had light chains κ Chain.

In summary, this study successfully isolated and identified a strain of Mhp strain Mhp-1 from pig and seven Mhp related recombinant proteins were expressed and purified. We have established indirect ELISA detection methods for Mhp378 protein and P36 protein, respectively. Four hybridoma cell lines were obtained that stably secrete monoclonal antibodies against Mhp P65 protein.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*; Recombinant proteins; Indirect ELISA; Monoclonal antibody

目 录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 猪肺炎支原体概述.....	1
1.2 猪肺炎支原体流行病学.....	2
1.3 致病机理.....	2
1.4 猪肺炎支原体抗原蛋白研究进展	3
1.4.1 P65 蛋白.....	3
1.4.2 P36 蛋白.....	3
1.4.3 Mhp378 蛋白	4
1.4.4 P97 蛋白.....	4
1.4.5 Mhp366 蛋白	4
1.4.6 NrdF 蛋白	5
1.4.7 DnaK 蛋白	5
1.5 猪支原体肺炎检测方法研究进展	6
1.5.1 病原分离检测.....	6
1.5.2 分子生物学检测.....	6
1.5.3 血清学检测.....	8
1.6 研究的目的意义.....	10
第 2 章 猪肺炎支原体的分离鉴定	12
2.1 试验材料.....	12
2.2 试验方法.....	12
2.2.1 病料样品的 PCR 鉴定	12
2.2.2 支原体的分离培养及形态学观察.....	13
2.2.3 分离支原体的传代及其 16S rRNA 基因的 PCR 鉴定	13
2.2.4 分离支原体的 16S rRNA 基因的系统进化树构建	13
2.2.5 分离菌 CCU 的测定	14
2.2.6 猪肺炎支原体全基因组测序及毒力基因检测	14
2.3 试验结果.....	14
2.3.1 病料的 PCR 鉴定结果	14
2.3.2 支原体的分离培养及形态学观察结果	15
2.3.3 分离支原体的传代及 16S rRNA 基因的 PCR 鉴定结果	15
2.3.4 分离支原体 CCU 的测定结果	16
2.3.5 支原体全基因组测序及其毒力基因检测结果	16
2.4 讨论.....	18
2.5 小结.....	19

第 3 章 猪肺炎支原体相关蛋白原核表达	20
3.1 试验材料.....	20
3.1.1 质粒和血清	20
3.1.2 试验试剂.....	20
3.1.3 试验仪器.....	21
3.1.4 主要溶液配制.....	22
3.2 试验方法.....	22
3.2.1 质粒合成及构建.....	22
3.2.2 连接产物的转化.....	23
3.2.3 重组质粒鉴定.....	23
3.2.4 重组蛋白诱导表达.....	24
3.2.5 重组蛋白纯化.....	24
3.2.6 重组蛋白免疫反应性分析.....	25
3.3 试验结果.....	25
3.3.1 质粒鉴定结果.....	25
3.3.2 重组蛋白的表达及存在形式.....	26
3.3.3 重组蛋白纯化.....	27
3.3.4 重组蛋白免疫反应性鉴定.....	28
3.4 讨论.....	29
3.5 小结.....	30
第 4 章 基于猪肺炎支原体蛋白间接 ELISA 检测方法的建立.....	31
4.1 试验材料.....	31
4.1.1 血清	31
4.1.2 主要试剂与耗材.....	32
4.1.3 主要仪器.....	32
4.1.4 主要溶液的配制.....	32
4.2 基于 Mhp378 蛋白的间接 ELISA 检测方法的建立.....	33
4.2.1 试验方法.....	33
4.2.2 试验结果.....	35
4.3 基于 P36 蛋白的间接 ELISA 检测方法的建立.....	41
4.3.1 试验方法.....	41
4.3.2 试验结果.....	42
4.4 讨论.....	49
4.5 小结.....	50
第 5 章 抗猪肺炎支原体 Mhp378、P36、P65、P97CR1 蛋白单抗的 制备及鉴定	51
5.1 试验材料.....	51
5.1.1 试验动物、菌株和细胞系.....	51

5.1.2 主要试剂.....	51
5.1.3 主要仪器设备.....	52
5.1.4 主要溶液及配制.....	52
5.2 试验方法.....	52
5.2.1 抗原 Mhp-1 株全菌蛋白的制备.....	52
5.2.2 小鼠的免疫.....	53
5.2.3 小鼠免疫效价检测.....	53
5.2.4 SP2/0 骨髓瘤细胞的准备.....	53
5.2.5 准备饲养细胞.....	53
5.2.6 制备脾细胞.....	54
5.2.7 细胞融合.....	54
5.2.8 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆.....	55
5.2.9 单抗亚类的鉴定.....	55
5.2.10 腹水的制备.....	55
5.2.11 腹水的纯化.....	55
5.2.12 效价检测.....	56
5.2.13 单抗免疫反应性鉴定.....	56
5.3 试验结果.....	56
5.3.1 小鼠效价检测.....	56
5.3.2 杂交瘤细胞株的建立.....	57
5.3.3 单抗亚型鉴定.....	57
5.3.4 腹水纯化结果.....	58
5.3.5 效价检测.....	58
5.3.6 单抗免疫反应性鉴定.....	58
5.4 讨论.....	59
5.5 小结.....	60
第 6 章 全文结论	61
参考文献.....	62

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
DAB	Diaminobenzidine tetrahydrochloride	二氨基联苯胺四盐酸盐
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fatal bovine serun	胎牛血清
HAT	Hypoxathine-aminopterin-thymidine	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HT	Hypoxathine-thymidine	次黄嘌呤-胸苷
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷
KAN	Kanamycin	卡那霉素
kDa	Kilodalton	千道尔顿
MAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
Mhp	<i>Mycoplasmal pneumonia</i>	猪肺炎支原体
Mhr	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	猪鼻支原体
PCR	Polymease Chain Reaction	聚合酶链反应
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基硫酸钠
TMB	Tetramethyl benzidine	3,3,5,5' -四甲基联苯胺

第 1 章 绪论

猪支原体肺炎 (*Mycoplasmal pneumonia of swine*, MPS), 又称猪气喘病、猪地方流行性肺炎, 是由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 引起的一种猪慢性呼吸道传染病。患病猪表现出生长发育不良、咳嗽、气喘等临床症状, 剖检可见肺部呈现肉样或虾肉样病变, 尽管 MPS 整体死亡率并不高, 但其病原菌 Mhp 可与多种细菌、病毒及环境因子协同作用引起猪呼吸道疾病综合征 (Porcine Respiratory Disease Complex, PRDC), 造成大量死亡, 从而给养殖户带来极大的经济负担, 对养殖产业的健康有序发展造成隐患。

1.1 猪肺炎支原体概述

支原体是最小的原核生物, 具有自主分裂繁殖能力, 即使处于无细胞的培养条件下也能生存。Mhp 是支原体科 (*Mcoplasmataceae*) 支原体属 (*Mycoplasma*) 成员。Mhp 结构简单, 仅由细胞膜、原核细胞核和核糖体组成, 无细胞壁, 呈多形态。Mhp 革兰氏染色为阴性, 但着色不佳, 姬姆萨或瑞氏染色良好^[1]。表面是由两层蛋白质中间夹着一层类脂质构成的膜状结构, 菌体内部含有数量不等、形状各异的核糖体, 丝状的脱氧核糖核酸链和小颗粒状的蛋白质^[2]。典型 Mhp 菌落直径大小约为 100~300 μm , 呈半透明灰白质地, 中央有乳突状突起, 表层有小颗粒^[2]。

支原体在生长进化的过程中逐渐丢失了生物合成的相关基因, 导致其生长过程中所需要的氨基酸、嘧啶、嘌呤以及细胞成分必须从外界环境中获取, 因此大部分支原体难以在体外进行培养^[3]。尽管早在 1965 年 Mhp 就已被发现, 但是直到 1975 年, Friis 培养基得以问世才使 Mhp 的分离与培养成为可能^[4]。分离培养 Mhp 对培养基要求极高, 耗时费力, 且易受其他细菌或支原体影响, 特别是猪鼻支原体 (*Mycoplasma hyorhinis*, Mhr) 污染会严重干扰 Mhp 的分离与培养的成功率。

Mhp 能够实现自我复制, 其基因组较小, 信息量携带较少, 但 A+T 含量较高 (>70%)。已有的研究显示 Mhp 基因组被组装和注释基因组大小在 0.86 Mb-0.96 Mb

不等^[5], G+C 含量 30%左右^[2]。Mhp 自身能够合成大分子物质但其生物合成能力有限, 必须从外界摄取一些比较复杂的基质或前体等营养物质才能维持生长^[3], 因此其在遗传进化上与革兰氏阳性菌更接近。Mhp 和大多数支原体一样采用 TGA 编码色氨酸, 而普通细菌则以 TGA 编码终止子以 TGG 编码色氨酸。这些证据进一步表明, A+T 取代 G+C 在支原体演化进程中的重要性, 同时提示在利用原核表达系统生产蛋白时, 应将其中的 TGA 替换为 TGG。

1.2 猪肺炎支原体流行病学

Mhp 具有严格的宿主特异性, 自然感染病例仅见于猪, 无年龄易感性差异。病猪和隐性感染猪是主要传染源, 与感染猪密切接触是其主要传播途径^[5]。Mhp 可长期潜伏在猪体内而不引起发病, 潜伏期可高达 240 天, 位于旧疫情区的病猪, 一般处于无症状, 属于潜伏或慢性感染。新疫区刚出现时, 该病往往以急性暴发或地区性流行的形式出现, 但是经过治疗和改进管理方式, 可降为慢性感染。有研究发现, 感染猪呼吸道分泌物中含有大量的病原体, 可通过咳嗽时呼出的气溶胶或鼻对鼻接触进行传播, 健康猪皮下、静脉、肌肉注射或胃管投入病原体都不能致病^[6], Mhp 除了直接接触和空气传播, 也可通过污染物进行间接传播。本病各时节均可发生, 尤其天气寒冷潮湿或气候突变时, 更易导致发病几率上升。养殖场环境与管理不善, 将显著降低猪群抵抗力, 增加对 Mhp 的易感性, 进一步引发多种细菌混合感染, 以至于加剧临床症状导致死亡率升高^[7]。该病一旦感染难以根除, 因此对于感染 Mhp 的猪场必须实施严格的管控措施, 减少复发病猪的出现。

1.3 致病机理

Mhp 与猪呼吸道纤毛上皮细胞的特异性黏附是引起 MPS 的先决条件^[8]。Mhp 表面具有黏附因子, 纤毛表面具有特异性受体, 使得 Mhp 进入猪体后, 能迅速识别呼吸道黏膜纤毛细胞的特异性受体, 并在其上生长繁殖^[9]。在感染的早期, Mhp 定植于细支气管和支气管的黏膜表面。在感染后期, 气管黏膜产生的分泌物和进入呼吸道的支原

体逐步破坏呼吸道粘膜层，使纤毛发生萎缩或脱落，影响其正常功能^[10]，当纤毛变短、变少或脱落时，不能有效阻止气源性病菌进入呼吸道和肺部，导致呼吸道继发感染。此外，肺炎支原体的感染可导致免疫抑制，也是 MPS 的发病机理之一^[11]。病原体数量激增，会削弱猪只呼吸道粘膜的免疫防御，进而渗透至组织深层，影响淋巴细胞活性，削弱肺泡巨噬细胞功能，使猪产生免疫抑制现象，从而导致患病猪继发其它病原体的感染^[12]。

1.4 猪肺炎支原体抗原蛋白研究进展

1.4.1 P65 蛋白

Mhp 表面的 P65 蛋白质作为一种免疫显性组分，在疾病发作期间，能够被机体特异性地识别，且免疫原性结构域在 C 端^[13,14]。其氨基酸序列分析揭示，该蛋白与脂解酶的 GDSL 家族存在相似性^[13]。研究者 Schmidt 等探讨了 P65 具备的脂解活性，尽管支原体脂解酶在生理和致病机制上尚不明确，它们或许对于支原体对长链脂肪酸的需求以及在呼吸系统疾病中对肺表面活性剂功能的降低扮演关键角色^[15]。P65 蛋白能够激发初次感染 Mhp 或经过急性感染的断奶仔猪与生长猪的早期免疫反应^[15]，其抗血清也能体外抑制 Mhp 的生长^[16]。

1.4.2 P36 蛋白

P36 是 Mhp 的特异性蛋白，研究报道表明 Mhp 的 P36 具有种属特异性的抗原决定簇^[17]，P36 的多克隆抗体对猪鼻支原体、絮凝支原体、猪滑膜支原体等相关菌属的 P36 蛋白并没有交叉反应，显示了较高的种属特异性^[18]。FREY 等报道 P36 是一种免疫优势蛋白^[19]，P36 可用于感染 Mhp 后的诊断，因此，P36 蛋白也是建立 MPS 诊断方法的优选蛋白。采用 P36 蛋白作为抗原构建 Mhp 抗体间接 ELISA 检测法，观察到虽然其引发抗体出现的时间略晚，但抗体保持期较长。感染初期 5 至 10 天，肺部轻微病变伴随低水平血清抗体；12 天起抗体水平骤增，维持至少 21 周^[19]，因此该方法可以有效检测 Mhp 的感染。由于前期产生的针对 P36 的抗体较少，只选用 P36 蛋白作为唯一包被抗原，对感染初期猪的检测很可能存在假阴性^[20]，但是基于 P36 蛋白的检测方法对于

Mhp 的后期检测和阴性状态的监控是具有重要意义。

1.4.3 Mhp378 蛋白

Jochen Meens 等通过 Triton X-114 分离富集了猪肺炎支原体细胞的膜和膜相关蛋白，分析鉴定了两个以前未知的免疫原性蛋白，斑点 43 被鉴定为推定的脂蛋白 Mhp378（登录号：AAV27543），由 ORF mhp378 编码^[21]。该 ORF 起始于猪肺炎支原体 232 株（登录号：AE017332）基因组中的 449787 位^[22]，长度为 2,124 bp（708 个氨基酸残基）。作为保守的推定脂蛋白 Mhp378 以重组 GST 融合蛋白表达，并与恢复期猪血清反应，结果显示 Mhp378 仅与猪肺炎支原体阳性血清有明显的反应^[21]，表明其具有种属特异性。

1.4.4 P97 蛋白

P97 是一个大小为 124.9 ku 的蛋白，SDS-PAGE 显示大小为 97 kDa^[23]。Zhang 等最早通过单克隆抗体确定 P97 在 Mhp 表面作为黏附素发挥作用^[24]。P97 被认为可能是猪肺炎支原体的毒力相关抗原之一，含有两个重复序列，分别是 9 个以上的 AAKPE/V 基序串联构成的 R1 区和 4 个左右的 GTPNQGKKAE 基序串联构成的 R2 区^[23]。猪群感染 Mhp 时 P97 蛋白引发的免疫反应远远早于其他抗原^[25]。Feng 等以 P97R1 表达产物作为包被抗原建立了检测 Mhp SIgA-ELISA 检测方法^[26]，以鼻拭子为检测样本检测 Mhp IgA，其敏感性、特异性和准确性均达到 94% 以上。综合 P97 的免疫特征和多位学者的试验结果，可知 P97 蛋白是一个特异性抗原^[27]，为 Mhp 诊断试剂盒的研制及 MPS 的早期诊断方法的建立奠定了基础。

1.4.5 Mhp366 蛋白

表达 Mhp366 蛋白的基因全长 1,665 bp，可编码 555 个氨基酸残基，始于猪肺炎支原体菌株 232 基因组的 432,758 位，预测大小 64 kDa 左右。Meens 等构建了一种肽点阵列，通过计算机分析 Mhp232 株编码 35 种假定脂蛋白确定了 105 种潜在线性 B 细胞表位^[28]，利用猪恢复期血清对此阵列进行免疫印迹分析发现，该蛋白上有一个强烈的免疫反应性抗原决定簇，该决定簇与疫苗免疫的猪血清不发生反应而和野毒株感染的

猪血清发生反应^[28]，由此可以区分疫苗免疫和野毒株感染。Mhp366 间接 ELISA 检测 Mhp 体液免疫优势蛋白的建立可区分灭活菌诱导的高免疫血清和恢复期血清。利用 Mhp366 蛋白建立起一种方法来区别疫苗免疫后血清和恢复期血清，从而来筛选体液中的优势蛋白^[29,30]。

1.4.6 NrdF 蛋白

NrdF 蛋白是原核生物必需的 I 类核糖核苷酸还原酶的 R2 亚基。Peter 等人利用大肠杆菌构建 Mhp 基因库中的蛋白，采用 Mhp 高免猪血清进行筛选，得到大小为 128 kDa 的融合蛋白^[31]，其与实验中的高免血清反应十分强烈，将其制备成亚单位疫苗给猪进行免疫后用 Mhp 强毒株进行攻毒，发现这种重组疫苗可保护猪免受强毒性肺炎支原体感染后产生的肺损伤。研究者利用重组鼠伤寒沙门氏菌构建表达了 NrdF 蛋白和 R2 亚单位的一部分，用于免疫猪群^[32]，发现猪体内能够产生显著且有效的针对该蛋白的抗体，临床上也能减轻 Mhp 感染引起的肺脏病变^[32]，为后期疫苗的研发奠定了基础。

1.4.7 DnaK 蛋白

DnaK 蛋白具有保护细胞存活和进行正常生命活动的生物学功能^[33]，其 N 端结构有分子伴侣的功能，C 端主要表现为免疫原和免疫佐剂的作用，可以增强机体的体液免疫和细胞免疫^[34,35]。利用原核表达获得的 DnaK 重组蛋白能与 Mhp 阳性血清发生特异性反应，具有良好的免疫原性^[36]。有研究者利用该蛋白建立了基于 Mhp-DnaK 蛋白抗体的间接 ELISA 检测方法，与商品化试剂盒相比，二者在免疫机体一段时间后刺激机体产生的体液免疫应答相似^[37]。王亮等人构建表达了 DnaK-P97 融合蛋白，证明 P97 蛋白不能单独刺激机体产生特异性抗体，但 DnaK-P97 融合蛋白却可以刺激机体产生针对 P97 蛋白的特异性抗体^[35]。刘思远等人构建表达了融合蛋白 P65-DnaKc，表明融合蛋白 P65-DnaKc 免疫原性明显优于单个 P65 和 DnaKc 蛋白，且攻毒试验发现融合蛋白 P65-DnaKc 在小鼠体内可以引发较强的免疫应答反应，保护率较高^[38]。由此可见，DnaK 还具有佐剂的作用，作为 Mhp 亚单位疫苗的免疫佐剂将有较大的应用前景。

1.5 猪支原体肺炎检测方法研究进展

Mhp 导致猪只出现持续性干咳和生长缓慢等问题，同时降低了饲料利用率，严重损害养猪养殖业的经济效益。且 MPS 发病率高而死亡率低，易于与其他病原体并发，防控难度较大。为此，定期实施全面检测和诊疗是有必要的。当前的 MPS 诊断主要依托于病原分离培养、病理学及组织化学分析，并结合血清学及分子生物学检测手段，以提高诊断精确度。

1.5.1 病原分离检测

Mhp 的菌落很小，无法直观的通过肉眼观察其生长状态，目前主要通过液体培养观察颜色变化单位确定数量（Colour change unit, CCU）。目前最常用的 Mhp 培养基主要是 Friis 培养基^[4,39]和江苏 II 号（KM₂）培养基^[40]。对于需要大量病原菌进行研究的需求，研究员对培养基不断进行优化，发现在 Friis 培养基中添加丙酮酸盐，能够加快 Mhp 的生长速度^[41]。有实验室开发了改良 Friis 培养基^[42]，在其中添加 2 µg/mL 卡那霉素能够抑制 Mhr 的生长，但对 Mhp 的生长无显著影响。改良 KM₂ 培养基与 KM₂ 培养基相比，能够增加 Mhp 的 CCU^[43]。考虑到 Mhp 的分离难度大，对培养基的要求严格，且容易受到其他菌种或支原体的污染，因此，尽管病原学分离是 Mhp 检测的金标准，但它并不是临床检验的常用方法。

1.5.2 分子生物学检测

1.5.2.1 普通 PCR

PCR 技术因其具有高灵敏性、特异性、操作简单等特点，在病原微生物的检测中被广泛应用。自 PCR 第一次用于 Mhp 的诊断以来^[44]，针对不同 Mhp 基因和不同检测目的 PCR 诊断方法层出不穷。最初由于缺少 Mhp 菌株的基因组信息，PCR 检测方法主要是基于 Mhp 的 16S rRNA 序列^[45-47]。PCR 方法能检测纯培养物中的 Mhp，以及检测出表现出 MPS 症状的猪的鼻腔分泌物、支气管肺泡灌洗液和肺脏中的 Mhp^[46]。有实验室开发了基于 Mhp P36 和 P46 保守基因检测鼻腔、肺组织中 Mhp 的 PCR 诊断方法^[48]。另外刘茂军等人开发了基于 16S rRNA 序列区分 Mhp、Mhr 和絮状支原体的多重 PCR

方法^[49]，这对于分离鉴定猪肺组织中的不同支原体提供了简便的鉴别方法。

1.5.2.2 巢式 PCR

巢式 PCR 亦称套式 PCR，通过使用双重引物扩增完整基因组片段，如果第一次引物扩增出现错误片段，则无法进行第二次扩增，这使巢式 PCR 的结果具有很高的特异性。巢式 PCR 技术于 20 世纪末开始用于鼻腔分泌物、支气管肺泡组织灌洗液和肺组织中 Mhp 的检测，其检测下限低于普通 PCR，适合于临床样本中 Mhp 的检测^[50,51]。Otagiri 等人建立了利用鼻拭子作为样本，用巢式 PCR 检测方法监测猪群中 Mhp 的感染情况^[52]。Stark 开发的巢式 PCR 方法能检测有急性 MPS 发生的猪场空气样本中的 Mhp^[53]。Kurth 等建立的巢式 PCR 方法，其检测下限可达到 1 个病原体^[54]。2012 年张旭等人根据已建立的 Mhp P36 巢式 PCR 检测法进一步优化，组装巢式 PCR 检测试剂盒^[55]，优化了 PCR 检测的最低检测限。该方法灵敏性极高，但是对无菌操作的要求也高，因此在检测 Mhp 时极易出现假阳性的结果。

1.5.2.3 实时荧光定量 PCR

与传统的 PCR 方法相比，实时荧光定量 PCR 具有更高的灵敏度和特异性，能够将模板定量，实现多重反应，并且自动化水平高，实时性强，在多种研究领域均有应用^[56]。Strait 等^[57]选择 Mhp 的看家基因 Mhp165 和 Mhp183，建立了 Mhp 的荧光定量 PCR 检测方法，并在临床样本的检测中该方法显示出接近 100% 的敏感性；武昱孜等^[58]根据 *p97* 基因的保守序列设计合成了引物和 TaqMan-BHQ 探针，建立了快速检测 Mhp 的 TaqMan-BHQ 荧光定量 PCR 方法，结果表明扩增效率为 95.85%，阳性检出率为 89.58%，比巢式 PCR 的敏感性高。Fourour 等^[59]基于 *p102*，*p37* 和 *fruA* 基因建立了检测 Mhp、Mhr 和猪絮状支原体的多重 PCR 检测方法，使用现场样品对该方法进行验证，表明其具有其较高的特异性、敏感性和可重复性。荧光定量 PCR 技术优势显著，人们持续开发各类基因检测新方法^[60-63]。但是，此检测方法的高端化限制了在基层的普及，严格的试剂标准也增加了实施难度。

1.5.2.4 环介导等温扩增

Notomi 等报道了一种新的核酸扩增方法，环介导等温扩增（Loop-mediated isothermal amplification, LAMP）^[64]，它能够在等温条件下扩增 DNA，具有快速、高

效、特异性高的特点。与常规 PCR 相比, LAMP 最显著的优势是能够在 60 °C 至 65 °C 的等温条件下扩增特定的 DNA 序列, 不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程^[64]。LAMP 试验会生成一种白色不溶的副产物焦磷酸镁, 使实验员可以直接通过肉眼观察试验结果^[64]。在 LAMP 反应体系中加入按比例混合的 SYBR Green I 和羟基萘酚蓝染料, 可以更加直观的确定试验结果^[65]。Liu 等人将 Mhp 中 *p36* 基因作为靶基因, 设计多对引物, 建立了可以快速检测 Mhp 的 LAMP 方法^[66], 该方法显示高度特异性和敏感性, 在病原体检测方面具有很好的应用前景。但是以 LAMP 技术为基础开发的商品化 Mhp 检测试剂盒价格昂贵, 限制了其在基层中的推广。Strato LAMP 是 Meichi Jin 等人提出的基于沉淀副产物的视觉分层的无标签、多路数字环路介导的等温扩增^[67]。Strato LAMP 使用两组不同浓度的引物, 在扩增不同的核酸目标时实现不同的沉淀产率, 是一种独特的、无标签的、多重核酸测定和具有极高成本效益的分析工具。

1.5.3 血清学检测

血清学检测是检测猪肺炎支原体主要有间接血凝试验 (Indirect hemagglutination test, IHA)、补体结合试验 (Complement fixation test, CFT) 和酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 等方法。鉴于 IHA 技术使用全菌作为致敏抗原, 培育步骤复杂低效, 灵敏性不及 ELISA 与 CFT, 且存在明显的假阴性的可能, 现在已经很少应用于临床^[68-70]。因此目前较为常用的 Mhp 检测方法主要是 CFT 和 ELISA 检测方法。这些方法可以有效检测出猪肺炎支原体的抗体水平, 为科学防控提出依据。

1.5.3.1 间接血凝试验

IHA 是将抗原或抗体包被于红细胞表面, 成为致敏的载体, 然后与相应的抗体或抗原结合, 从而使红细胞聚集在一起, 出现肉眼可见的凝集反应。曾有一些研究者尝试试管凝集、间接血球凝集和胶粒凝集等试验^[71]。何以正等人也曾做过试管凝集试验, 仅能见到高免兔血清能出现低度的凝集反应, 而对病猪血清未能见到与健康猪血清有所区别^[72], 原因可能在于在 IHA 检测猪肺炎支原体血清抗体时, Mhp 全菌作为致敏抗原容易造成污染^[73]。在感染后期, IHA 的检测滴度低于 ELISA 和 CFT^[69]。当 IHA 用于

检测商业猪群的血清时，检测 1,000 份血清中，ELISA 和 CFT 检测呈阳性的 135 份血清中，只有 30 份（22%）的 IHA 呈阳性。尸检时获得的群体血清的阳性 IHA 结果与 MPS 典型的大体和微观病变结果之间的一致性较差，仅为 41%和 50%^[74,75]。且 IHA 容易与絮状支原体发生交叉反应，使得检测灵敏性降低从而影响结果判定，因此一般不选择这种方法进行检测^[70]，并且由于猪肺炎支原体生长要求苛刻，制备抗原麻烦且肉眼不易看出凝集颗粒，难以分辨得出病猪和健康猪，不适用于临床^[72]。

1.5.3.2 补体结合试验

CFT 是利用抗原抗体复合物同补体结合，把含有已知浓度的补体反应液中的补体消耗掉使浓度降低，以检出抗原或抗体的检测方法^[76]。CFT 在早期 Mhp 抗体的检测中是应用最广泛的血清学方法，利用此方法在 Mhp 感染 2 周后即能够检测到抗体^[77]。但该方法的灵敏性和特异性差，与 Mhr 和其他猪源支原体抗体存在交叉反应^[78,79]，检测的灵敏度较低，在 Mhp 感染 5 个月后就无法检测到抗体^[77]。另外，该方法对热极其敏感，血清在 60 °C 处理 30 min，抗体滴度显著下降^[78]。因此该方法很少用于 Mhp 的临床诊断。

1.5.3.3 酶联免疫吸附试验

ELISA 因其在血清学抗体检测中有着敏感性高、特异性强，简单方便易操作等特点，是进行 Mhp 抗体检测的优选方法。市场上应用最广且较权威的 ELISA 检测试剂盒主要是 IDEXX 的 Mhp 全菌体的间接 ELISA 抗体检测试剂盒和 Oxoid Limited 的基于固有抗原蛋白的阻断 ELISA 抗体检测试剂盒^[80]。在 Mhp 感染猪只 28 天后，用两种试剂盒检测血清中的抗体，二者对于 Mhp 慢性感染后血清抗体的检测效果相同，对于 Mhp 急性感染，阻断 ELISA 试剂盒的敏感性优于间接 ELISA 试剂盒^[81]。ELISA 检测具有实用性的独特优势，这也激发了研究者对各类 ELISA 检测方法的深入探索。Feng 等^[27]利用原核表达 Mhp 的粘附素 P97R1 作为抗原蛋白建立了一种间接酶联免疫吸附试验，该方法能够将 Mhp 感染的猪同接种 Mhp 疫苗的猪区别开来，但是取样困难，采样过程不易标准化，容易影响结果判定。该团队还分别建立了分别基于 P97R1、P46 和 P36 蛋白的三种间接 ELISA 抗体检测方法。三种方法在感染后 7 天均能检测到血清中的 Mhp IgG 抗体，但基于 P97R1 蛋白的 ELISA 方法敏感性更高^[82]。Potier 利用制备的单克隆

抗体开发了一种阻断 ELISA 检测方法^[83]，该方法可检测到 Mhp 一个 40 kDa 大小的膜蛋白上的一个特异性表位。Okada 等^[79]建立了双抗夹心 ELISA，该方法具有极高的特异性，但在人工感染 Mhp 需 3 周后才能检测出。Liu^[84]等人基于 P65 蛋白的单克隆抗体开发了检测血清 IgG 抗体的阻断 ELISA 方法，其特异性和敏感性与 IDEXX 公司的间接 ELISA 试剂盒相似，特异性达到 95.7%，敏感性达到 94.8%。王宁等^[85]构建 pET-32a-P97CR1 蛋白，表达纯化后筛选出单克隆抗体，建立了敏感性高，特异性强，准确率高的竞争 ELISA 检测方法，该方法与商品化 IDEXX 试剂盒的符合率达到 91.2%。Tian 等^[86]表达并纯化了重组 Mhp366-N 蛋白，建立了一种重复性好、灵敏度高、特异性好的间接 ELISA 检测方法，该 ELISA 可排除疫苗接种干扰，用于对养猪场的猪肺炎支原体感染进行大规模监测。ELISA 检测方法因为血清抗体检测的高效性、准确性，目前已经成为检测 Mhp 抗体的优先选择。

1.6 研究的目的意义

Mhp 引起的 MPS 是不要求主动通报的疾病，因此关于各国猪肺炎支原体的流行数据较少，难以全面把握其状况。Mhp 容易诱发其他病原体混合感染引发慢性肺炎^[87]，除了增加死亡率外，还会通过降低饲料转化效率而导致生产损失^[88]。封闭畜群、药物治疗和疫苗接种相结合是目前北美地区根除猪肺炎支原体的常用方法^[89]。但是药物使用的增加和猪生产性能的下降，也会造成畜主重大的疾病负担和经济损失^[90]。目前为止仍然没有方法可以彻底清除猪肺炎支原体，接种疫苗被认为是用于预防猪肺炎支原体的最有效手段，本研究从发病猪的肺脏组织中分离到一株 Mhp，对该菌株进行了一系列生物学特性鉴定，对该菌株进行全基因组测序后分析毒力基因，为研究制备 Mhp 疫苗提供潜在菌株，为猪肺炎支原体病 MPS 的防控及致病机制研究提供参考。

早发现并采取针对性的预防措施也是防控猪支原体病的重要策略，采用 ELISA 检测技术针对肺炎支原体进行抗体检测为普遍的现场监测手段。本研究通过构建并表达 Mhp 的相关蛋白 Mhp366、Mhp378、P65、P36、P97CR1、NrdF 和 DnaK，通过对各个反应条件的优化初步建立 Mhp378 和 P36 蛋白间接 ELISA 方法，以期为猪肺炎支原体的 ELISA 检测方法提供参考价值或增加检测手段。另外，采用猪肺炎支原体 Mhp-1 分

离株和重组蛋白作为免疫原制备单克隆抗体，为开发猪肺炎支原体阻断 ELISA 检测方法奠定良好基础。

第 2 章 猪肺炎支原体的分离鉴定

由于 Mhp 无细胞壁，对抗生素敏感性低，临床上抗生素治疗难以根除 Mhp。长期感染 Mhp 的猪群，食欲下降，生长缓慢，免疫力下降，更加容易感染其他病原而导致死亡，给养猪业造成严重的经济损失，接种疫苗只能预防不能治疗，分离 Mhp 菌株以及深入了解 Mhp 的致病性因素，对于研发全菌疫苗、新型靶向药物、诊断方法具有重大意义。本研究从发病猪的肺脏组织中分离到一株 Mhp，对该菌株进行了一系列生物学特性鉴定，并且构建了 Mhp 16S rRNA 基因的系统进化树，分析各菌株之间的系统进化关系，通过使用二代 Illumina 测序技术和三代 Oxford Nanopore 测序平台对该菌株进行全基因组测序后分析其毒力基因，可以为猪气喘病的防控及致病机制研究提供参考。

2.1 试验材料

20 份肺脏出现“虾肉样”病变的病死猪组织样品来自黑龙江省一些规模化养猪场；细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司；瑞氏-姬姆萨染液购自珠海贝索生物技术有限公司；江苏二号（KM₂）培养基购自江苏省农科院；猪鼻阳性血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所猪消化道团队危艳武老师惠赠；Premix Taq™（ExTaq™ Version 2.0 plus dye）购自宝生物工程（大连）有限公司；KOD One™ PCR Master Mix 购自东洋纺（上海）生物科技有限公司；滤器购自德国默克生物科技有限公司；纳米孔测序芯片 Flowcell（R9.4.1）、SQK-RBK004 快速条码试剂盒、EXP-WSH004 芯片清洗试剂盒购自 Oxford Nanopore Technologies 公司。

2.2 试验方法

2.2.1 病料样品的 PCR 鉴定

取肺脏样品放入有铜网的无菌平皿中，同时加入 PBS 研磨，吸取组织匀浆液经 0.45 μm 的滤器过滤后，12,000 r/min 离心 30 min，弃上清，将沉淀用 PBS 重悬后采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组作为模板，采用朱红振的 Mhp 的 P46 特异性引

物^[91] (Mhp-P46-F: 5'-ATGAAAAAATGCTTAGAAA-3', Mhp-P46-R: 5'-TTAGGCAT CAGGATTATCA-3'); Mhr P37 蛋白特异性引物 (Mhr-P37-F: 5'-ATGCTGAAGAAGC TGAAG-3', Mhr-P37-R: 5'-GTTACTTGATGGCCTTCTC-3') 经 PCR 检测两种支原体。P46、P37 基因的目的片段大小分别为 1,220 bp, 619 bp。

2.2.2 支原体的分离培养及形态学观察

经 PCR 鉴定为 Mhp 阳性, 同时 Mhr 鉴定结果为阴性的样品, 组织研磨后使用 0.45 μm 的滤器过滤, 将滤液按照体积比 2:8 比例接种于江苏 2 号 (KM₂) 液体培养基中, 同时加入 Mhr 阳性血清抑制 Mhr 生长, 设 KM₂ 液体培养基作阴性对照, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱每天观察培养基颜色及浑浊度变化, 连续观察 7~14 d。将颜色规律性变黄的液体培养物接种到 KM₂ 固体培养基上, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 5-7 d。取 20 μL 上述颜色稳定变黄、并且澄清透明的培养物, 经瑞氏姬姆萨染色后镜检, 观察菌体形态与染色特性。

2.2.3 分离支原体的传代及其 16S rRNA 基因的 PCR 鉴定

将颜色规律性变黄的液体培养物, 每次颜色变黄后, 将其以体积比 2:8 的比例接种 KM₂ 液体培养基传代, 每隔 3 代利用 P46、P37 特异性引物分别经 PCR 鉴定 Mhp 和 Mhr, 以确定该分离菌是否能够稳定传代, 且每次鉴定均为 Mhp, 无 Mhr 污染。利用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取的 DNA 作为模板, 采用北京睿博兴科生物技术有限公司合成的 16S rRNA 基因序列引物 (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/1492R/5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 对其进行 PCR 扩增, PCR 产物由北京睿博兴科生物技术有限公司利用 Sanger 技术测序鉴定。

2.2.4 分离支原体的 16S rRNA 基因的系统进化树构建

将测序获得的 16S rRNA 基因序列通过 BLAST 比对, 选取比对相似性较高的 24 株 Mhp 16S rRNA 基因序列与本试验分离菌株的 16S rRNA 基因序列, 利用软件 MEGA11, 采用邻接法 (Neighbor-JoiningMethod) 构建 Mhp 16S rRNA 基因的系统进化树, 分析分离菌株 Mhp-1 与其它 Mhp 分离株间的亲缘性。

2.2.5 分离菌 CCU 的测定

取颜色变黄的液体培养物接种于含有 KM₂ 液体培养基的青霉素瓶中，按照 10 倍倍比稀释至 1×10⁸，设 KM₂ 液体培养基作空白对照，置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 14 d，每天观察并记录培养物颜色和浑浊度的变化，以最后培养物颜色不再发生变化的最高稀释度即为该培养物的 CCU。

2.2.6 猪肺炎支原体全基因组测序及毒力基因检测

利用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取细菌总 DNA，由北京诺禾致源生物科技有限公司，利用二代 Illumina 测序技术对其高通量测序，测序完成后通过 FastQC 对测序数据进行质控，利用 Trimmomatic 对原始数据过滤和优化，去掉数据中的 Adapter 序列，获得 Mhp 的短读数据。同时，利用本实验室的三代 Oxford Nanopore 测序平台进行全基因组测序，获得长读测序数据，利用混合组装软件 Unicycler 对获得的二代短读数据和三代长读数据进行全基因组序列组装，获得 Mhp 完整的全基因组序列。利用软件 CGView (<https://stothardresearch.ca/cgview/>) 绘制全基因组圈图。利用 pubMLST 在线服务器 (<https://pubmlst.org/>) 获得分离株 Mhp-1 以及 GenBank 可查询 Mhp 菌株 168、J、232、7448、7422、ES-2、ES-2L、LH、F7.2C 的 3 个 MLST 管家基因 *adk*、*rpoB* 和 *tpiA*，并利用其进行 ST 分型，采用 PHYLOViZ 软件 (<https://online.phyloviz.net/index>) 对 MLST 分型结果进行聚类分析。利用 RAST 软件 (<https://rast.nmpdr.org/>) 对 Mhp-1 基因组序列进行注释。利用在线服务器 VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>) 的 Vfanalyzer 软件对获得的细菌基因组进行毒力基因的检测分析。

2.3 试验结果

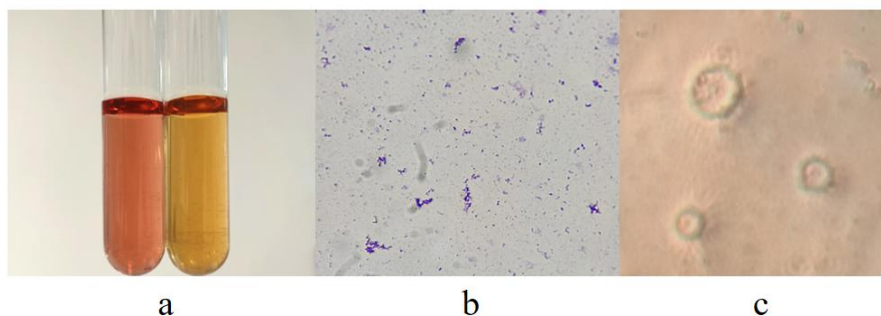
2.3.1 病料的 PCR 鉴定结果

以黑龙江省分离的 20 份猪肺脏样品的 DNA 为模板，经 PCR 去扩增其中的 Mhp 及 Mhr，结果显示，有 9 份样品出现 1,220 bp 的目的条带 (Mhp)，9 份样品出现 619 bp 的目的条带 (Mhr)，3 份样品为 Mhp 阳性且 Mhr 阴性。Mhr 与 Mhp 同时检出的概率

极高, 在 Mhp 感染猪时, 常伴有 Mhr 的感染。因 Mhp 的培养条件比 Mhr 严苛, 用于培养 Mhp 的培养基 Mhr 也能快速生长, 所以在分离试验中, 尽量选择未检出 Mhr 的病料进行后续试验。因此本试验将 3 份未检出 Mhr, 但是 Mhp 检测阳性的样品用于后续支原体的分离培养。

2.3.2 支原体的分离培养及形态学观察结果

将 3 份无 Mhr 仅检出 Mhp 的样品经处理接种于 KM₂ 液体培养基, 空白培养基颜色为红色, 每天观察培养基颜色变化, 培养 5-7 d。结果显示, 只有 1 份接种 KM₂ 的培养基的样品在 5 d 后由红色变为黄色, 且培养液澄清透亮不浑浊 (图 2-1a)。结果表明, 分离到一株猪肺炎支原体且无杂菌污染, 命名为 Mhp-1。取 20 μ L 规律变黄且澄清透明的培养物经瑞氏-吉姆萨染色后镜检, 结果可见环状、点状、丝状、两级状等形状且大小不等的菌体形态 (图 2-1b)。涂布于 KM₂ 固体培养基培养 7 d 后出现表面光滑、透明、形似煎蛋样的菌落 (图 2-1c)。



注: a: 分离菌培养基颜色变化; b: 分离菌瑞氏染色结果(1000 $\times$); c: 分离菌固体培养基镜检结果。

Note: a: Color change of isolate on the culture medium; b: Rui's Giemsa stain result of the isolate (1000 $\times$); c: Microscopic examination results of the isolate on the solid culture medium.

图 2-1 分离培养及染色结果

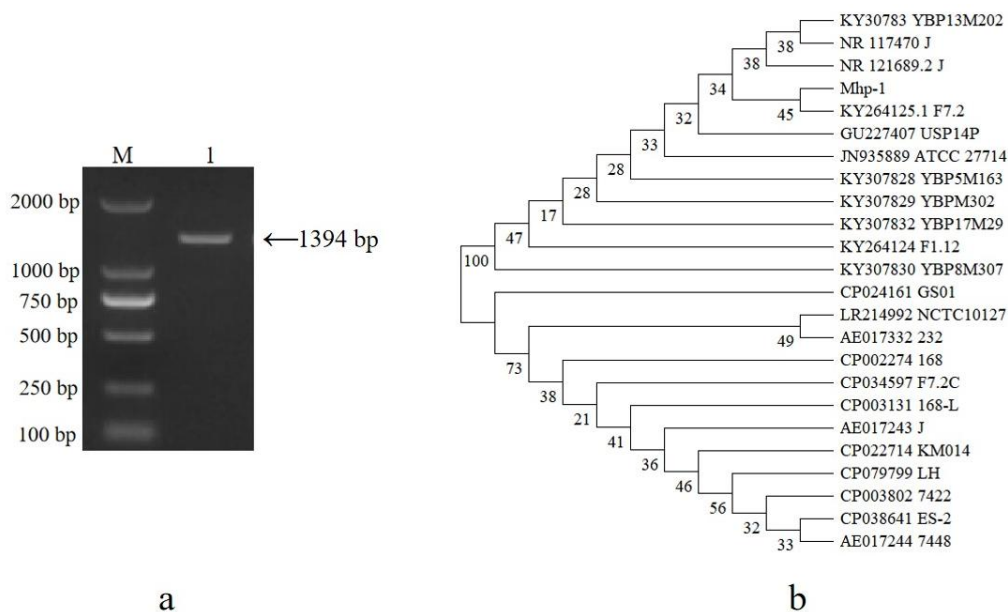
Fig. 2-1 Culture and stain of the isolate

2.3.3 分离支原体的传代及 16S rRNA 基因的 PCR 鉴定结果

将颜色规律性变黄的液体培养物以体积比 2 : 8 的比例接种 KM₂ 液体培养基传代, 结果显示, 传代 12 次 KM₂ 液体培养基仍然呈现规律性变黄, 且经特异性引物 PCR 鉴定, 每隔 3 代均扩增出大小为 1,220 bp 的目的条带, 无 619 bp 的条带污染, 表明该分离菌可以稳定传代, 无 Mhr 污染。以提取的分离菌 DNA 作为模板, 采用 16S rRNA PCR 扩增, 结果显示, 扩增到 1,397 bp 大小的目的条带 (图 2-2a)。将该序列进行

BLAST 分析, 结果显示测序结果与 GenBank 数据库中已报道的 Mhp 菌株 ES-2 (登录号: CP038641.1) 同源性达 100%, 进一步表明, 分离到一株 Mhp, 且能够稳定遗传。

选择 BLAST 比对相似性较高的 24 株猪肺炎支原体 16S rRNA 基因序列与该分离株的 16SrRNA 基因序列进行对比, 构建系统进化树。结果显示, 分离株 Mhp-1 与国外猪源 Mhp 分离株 F7.2 (KY264124) 处于同一分支 (图 2-2b), 亲缘关系最近。



注: M: DL2000 DNA Marker; 1: Mhp-1 的扩增产物。

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Amplification product of Mhp-1.

图 2-2 16S rRNA 的 PCR 鉴定 (a) 及基于 16S rRNA 基因构建的系统进化树 (b)

Fig. 2-2 PCR identification of 16S rRNA (A) and Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence (B)

2.3.4 分离支原体 CCU 的测定结果

将鉴定纯化后的分离株 10 倍倍比稀释至 10^8 接种于 KM_2 液体培养基培养 14 d, 每天观察变色管数。结果显示, 培养 14 d 后分离株在 10^7 稀释度之后培养物颜色不再发生变化, 测定分离株在 KM_2 培养基上的 CCU 测定结果为 1×10^7 CCU/mL, 表明该菌在 KM_2 液体培养基中生长较好, KM_2 培养基适合分离支原体的生长。

2.3.5 支原体全基因组测序及其毒力基因检测结果

通过全基因组测序获得大小为 0.91 Mb 的 Mhp 完整全基因组序列。通过对基因组进行注释并利用软件 CGView 绘制全基因组圈图, 预测结果显示, Mhp-1 基因组包含 773 个编码区序列 (CDS), GC 含量为 28.5% (图 3)。

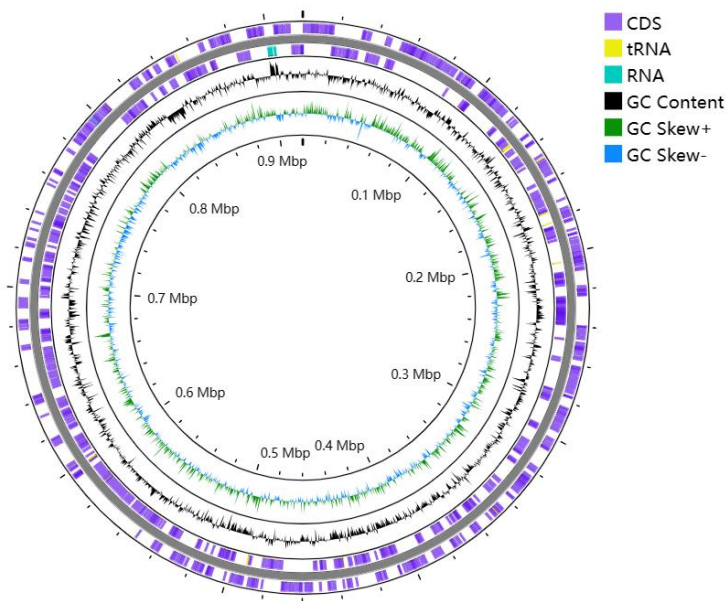


图 2-3 猪肺炎支原体 Mhp-1 株全基因组圈图

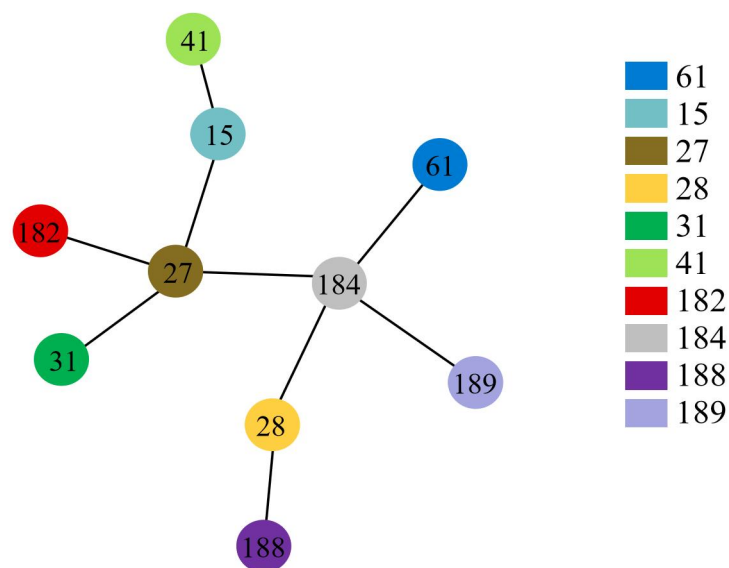
Fig. 2-3 Circle map of Mhp-1 whole genome

根据 PubMLST 数据库确定分离株 Mhp-1 与已报道的 Mhp 菌株 168、J、232、7448、7422、ES-2、ES-2L、LH、F7.2C 的 3 个 MLST 管家基因 *adk*、*rpoB* 和 *tpiA*，确定 ST 型，结果显示，10 株支原体分别为 10 种不同的 ST 型（表 2-1），表明猪肺炎支原体流行株呈现多型性。采用 PHYLOViZ 软件进行 MLST 的聚类分析，结果显示，分离株 Mhp-1 与 168、J 和 ES-2L 具有相同的一个节点（图 2-4），表明 Mhp-1 与 168、J 和 ES-2L 的同源性最高。

表 2-1 Mhp 的 ST 分型结果

Table 2-1 ST results of Mhp

菌株名	登录号	ST 型	MLST 管家基因		
			<i>adk</i>	<i>rpoB</i>	<i>tpiA</i>
Mhp-1		184	51	15	57
168	CP002274.1	61	16	15	34
J	AE017243.1	28	5	16	16
232	AE017332.1	27	11	15	15
F7.2C	CP034597.1	31	14	18	20
7448	AE017244.1	15	13	17	19
7422	CP003802.1	41	13	22	26
ES-2	CP038641.1	188	5	59	58
ES-2L	CP058578.1	189	23	69	57
LH	CP079799.1	182	50	58	15



注：图中不同的节点颜色表不同的 ST 型。

Note: Different node colors in the figure represent different ST.

图 2-4 ST 分型的聚类分析

Fig. 2-4 Cluster analysis of ST

分离支原体毒力基因的检测结果显示，存在 EF-Tu、Ltp、P216、P102、P46、P97、PDH-B、Capsule、HlyA 等毒力因子的编码基因。

2.4 讨论

Mhp 感染虽然对于猪群健康和饲料转化率有影响但致死率并不高。Mhp 流行病学的另一个复杂因素是在现场传播的具有不同毒力的不同菌株的出现^[92]。因此，检测和鉴定在一个群体或地理区域内传播的 Mhp 菌株至关重要。本研究成功分离到 1 株 Mhp，全基因组测序为 0.91 Mb，已有的研究显示 Mhp 基因组被组装和注释基因组大小从 0.86 Mb 到 0.96 Mb 不等^[5]，该分离支原体基因组大小符合 Mhp 的全基因组大小。通过对基因组进行注释并利用软件 CGView 绘制全基因组圈图，预测 Mhp-1 菌株基因组包含 773 个编码区序列（CDS），GC 含量为 28.5%，该支原体 CDS 数量、GC 含量与已报道的 Mhp 基因组统计数据相似^[93]。本研究在一定程度上为我国 Mhp 的病原学研究丰富了菌株信息。

在规模化猪场，Mhp 仅是 PRDC 的常见病原体之一，对于 Mhp 感染，弱毒苗和灭

活苗的免疫保护力均有限^[94]。因此，预防或消灭猪肺炎支原体还需全面考虑疫苗预防、生物安全、药物控制和净化等综合措施。目前为止，治疗 Mhp 感染常用抗生素疗效研究表明，抗菌药物治疗通常可以改善临床参数，减少因肺炎支原体感染而造成的性能损失^[95]。但是抗生素药物的使用存在增加 Mhp 耐药性的风险，因此，使用抗菌药物治疗时也应慎重用药。

不同 Mhp 菌株的致病性或毒力可能不同，尽管 Mhp 的体积很小，但高达 30% 的基因仍然具有未知的功能。鉴于目前已报道的 Mhp 分离株较少，加之可利用的全基因组序列屈指可数，严重制约了 Mhp 的相关研究。已知的毒力因子是粘附素、蛋白酶、膜转运蛋白和氧化应激相关蛋白，它们作用或调节多种生物过程。Mhp 的可溶性分泌组被认为是毒力因子的储存库，其可能与猪肺炎支原体感染后的发病机制存在相关性^[96]。该菌株检测到 P97、P46、P102 等毒力因子的编码基因，编码 P97，P46，P102 等膜蛋白，这些黏附蛋白样可能作为细胞外抗原触发宿主免疫防御^[97]。Mhp 可以诱导宿主产生抗体，但它们不具有保护性^[98]。在这种情况下，Mhp 调节宿主免疫反应的能力是影响毒力和疾病进展的重要特征。Mhp 通过定植纤毛诱发猪呼吸道疾病，宿主可通过肝素阻断 Mhp 黏附于纤毛上保护宿主，而 P216 毒力因子编码的 P216 蛋白可通过水解处理纤毛与肝素结合^[99]，对 Mhp 的黏附起到辅助作用。EF-Tu 与因子 H 的结合也能增加 Mhp 对上皮细胞的粘附能力^[100]。有研究表明 EF-Tu、P46、PDH-B 与 Mhp 细胞表面因子 H 结合可以使细菌产生灭活沉积在肺炎支原体表面的 C3b 的能力，从而避免补体活化，抑制补体途径^[101]，逃避宿主免疫。本研究检测出该菌株含有的多种毒力相关基因，均与猪肺炎支原体感染后的发病机制存在相关性，合理推测其可能具有较强的致病性。为深入研究猪肺炎支原体的致病机制及其黏附能力和致病性减弱或增强原因奠定了基础，为规模化猪场猪肺炎支原体的预防和深入研究提供了研究资料。

2.5 小结

- (1) 成功分离出一株猪肺炎支原体 Mhp-1 并获得其全基因组序列。
- (2) 基于分离株 Mhp-1 的全基因组序列，对其基因型、毒力基因进行了预测分析。

第 3 章 猪肺炎支原体相关蛋白原核表达

Mhp 的可溶性分泌组被认为是毒力因子的储存库，其可能与猪肺炎支原体感染后的发病机制存在相关性^[96]。在宿主-病原体相互作用中，分泌的蛋白质扮演着重要角色，直接参与了两者的最初接触。对于病原菌，分泌蛋白可能是重要的毒力因子或致病性决定因素。在本实验室前期研究中，参考 GenBank 中 Mhp232 株的基因序列，根据注释的 Mhp-1 的全基因组序列，选取了 7 个 Mhp 免疫相关蛋白的基因序列送至睿博兴科生物技术有限公司进行合成，由于支原体表达色氨酸的密码子 TGA 在大肠杆菌中是终止密码子，为了使其能在大肠杆菌中正常表达，引物合成前先对基因序列进行优化，将 TGA 变为 TGG，合成重组原核表达质粒 pET28a-Mhp378、pET28a-P36、pET28a-P65、pET28a-P97、pET28a-Mhp366、pET28a-Dnak、pET28a-NrdF，并转入大肠杆菌 BL21 中进行了高效表达。经 IPTG 诱导表达，SDS-PAGE 电泳分析蛋白大小，将纯化浓缩后的蛋白使用 Western blot 检测其反应原性。本研究为后续建立间接 ELISA 检测方法和制备单克隆抗体提供免疫蛋白。

3.1 试验材料

3.1.1 质粒和血清

E. coli DH5 α 和 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司。Mhp-1 株、猪 Mhp 高免阳性血清和阴性血清由哈尔滨兽医研究所猪消化道团队危艳武老师惠赠。

3.1.2 试验试剂

主要试验试剂见表 3-1。

表 3-1 主要试验试剂与耗材

Table 3-1 Main experimental reagents and consumables

试剂名称	规格型号	公司
LB 培养基	212485	美国 BD 公司
PBS (干粉)	PM5090-50x2L	北京 Coolaber 公司
TBS (干粉)	PM5080-50	北京 Coolaber 公司

续表 3-1 试验试剂与耗材

试剂名称	规格型号	公司
Tris-MOPS-SDS Running Buffer Power	M00138	中国 GenScript 公司
WB 转膜缓冲液（干粉）	PM5070-10	北京 Coolaber 公司
卡那霉素	70560-51-9	上海源叶生物科技有限公司
甲醇	AR-500 mL	天津市富宇精细化工有限公司
无水乙醇	AR-500 mL	天津市富宇精细化工有限公司
丙三醇	AR-500 mL	天津市富宇精细化工有限公司
Skim Milk	232100	美国 BD 公司
吐温 20	9005-64-5	德国 Sigma 公司
DNA 2,000 Marker	3427A	日本 Takara 公司
蛋白 Marker	26616	美国 Thermo 公司
十二水合磷酸氢二钠	AR-500 g	国药集团化学试剂有限公司
无水碳酸钠	AR-500 g	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠	AR-500 g	国药集团化学试剂有限公司
HRP 标签兔抗猪二抗	A5670-1 mL	德国 Sigma 公司
NI Sepharose™ excel	17371201	上海 Cytiva 公司
细菌基因组 DNA 提取试剂盒	DP303-02	天根生化科技有限公司
质粒小提试剂盒	D6943-01	美国 Omage 公司
胶回收试剂盒	D2500-01	美国 Omage 公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	BL521A 500T	中国 Biosharp 公司
HRP-DAB 显色底物试剂盒	PA110	天根生化科技有限公司
PVDF 膜	ISEQ00010	德国 Merck 公司
蛋白超滤管	UFC901096	德国 Merck 公司

3.1.3 试验仪器

主要试验仪器见表 3-2。

表 3-2 仪器
Table 3-2 Instruments

仪器名称	规格型号	公司
生物安全柜	1389	美国 Thermo 公司
恒温振荡器	IS-RDS3C	美国 Crystal 公司
酶标仪	ELx808	美国 BioTek 公司
洗板机	ELx50	美国 BioTek 公司
超声细胞破碎仪	ULTRASONIC	美国 Cole Parmer 公司
高速离心机	Centrifuge 5804 R	德国 Eppendorf 公司
PCR 仪	C1000 Touch	美国 Bio-rid 公司
电热恒温培养箱	GNP-9050	精宏实验设备有限公司
全自动凝胶成像系统	CLiNX	上海勤翔科学技术有限公司
半干转膜仪	TRANS-BLOT SD	美国 Bio-rid 公司
超纯水仪	GenPure Pro UV/UF	美国 Thermo 公司

续表 3-2 仪器

仪器名称	规格型号	公司
水平电泳仪	BG-power300	北京百晶生物技术有限公司
生物光度计	6133IR102223	德国 Eppendorf 公司
蛋白电泳槽	Mini-PROTEAN Tetra	美国 Bio-rid 公司

3.1.4 主要溶液配制

(1) 蛋白纯化平衡液 (1 L): 称取 7.16 g 十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 合 29.22 g 氯化钠 (NaCl) 置于烧杯中, 加入 980 mL 纯净水充分溶解, 将溶液的 pH 值调节至 7.4, 定容至 1 L, 最终使用 0.45 μm 滤膜过滤, 保存在室温备用。

(2) 1 M 咪唑 (100 mL): 称取 6.8 g 咪唑置于烧杯中, 加入 100 mL 纯净水充分溶解, 使用 0.45 μm 滤膜过滤后, 室温保存备用。

(3) 10% 甘油保存液: 10 mL 甘油加入 90 mL 水, 混匀后使用 0.45 μm 滤膜过滤, 室温保存备用。

(4) Western blot 转膜缓冲液 (1 L): 转膜缓冲液粉末加入 800 mL 水和 200 mL 甲醇混匀。

(5) 50 g/mL 卡那霉素的 LB 培养液 (1 L): 1L LB 液体培养基内加入 1 mL 浓度为 50 g/mL 的卡那霉素。

(6) PBST 溶液 (1 L): 1 L PBS 缓冲液中加入 0.5 mL 吐温 20。

3.2 试验方法

3.2.1 质粒合成及构建

参考 GenBank 数据库中的 Mhp232 株 (登录号: NC_006360.1) 全基因组序列, 根据本试验前期获得的 Mhp-1 全基因组, 挑选出 *mhp366*、*mhp378*、*p65*、*p36*、*p97*、*nrdF*、*dnaK* 等基因, 由睿博兴科生物技术有限公司进行基因优化并连接至 pET-28a 载体上, 获得重组质粒 pET28a-P65、pET28a-P36、pET28a-Mhp366、pET28a-P97CR1、pET28a-Mhp378、pET28a-NrdF、pET28a-DnaK。

3.2.2 连接产物的转化

冰上融化感受态细胞后，各取 1 μL pET28a-Mhp378、pET28a-P65、pET28a-P36、pET28a-Mhp366、pET28a-P97CR1、pET28a-NrdF、pET28a-DnaK 重组质粒分别加入 7 管含有 100 μL 大肠杆菌 BL21 感受态细胞的 1.5 mL 离心管中，轻轻混匀，置于冰上冰浴 30 min，转入 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅热激 60 s，然后快速将试管插入冰上，冰浴 2 min。每管加入 900 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 提前预热的 LB 液体培养基，混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温摇床，180 r/min 振荡培养 60 min 后取出，5,000 r/min 离心 5 min，吸出上清液，每管剩余 100 μL 左右培养基将沉淀重悬混匀后，铺于含 50 g/mL 卡那霉素的 LB 平板，于放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养 12-16 h。

3.2.3 重组质粒鉴定

从平板中挑取单个菌落，接种于 5 mL 含 50 g/mL 卡那霉素的 LB 培养液中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min 培养 12 h，使用 Omega 质粒提取试剂盒提取重组质粒，以重组质粒为模板，用引物 T7 和 T7ter（T7：5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'，T7ter：5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'）进行 PCR 扩增，用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测扩增情况。扩增出目的大小条带的产物由睿博兴科生物技术有限公司进行测序确定结果是否正常。质粒提取具体步骤参照 Omega 质粒提取试剂盒进行操作：

（1）使用离心管收集 5-10 mL 过夜培养的菌液，水平离心机室温 3,000 r/min 离心 10 min，弃上清，用 2 mL 超纯水重悬后洗涤 2 次，每次 10,000 r/min 离心 1 min。

（2）离心后弃上清，加入 250 μL Solution I 重悬沉淀。加入 250 μL Solution II，温和缓慢的颠倒混匀 3 min，加入 350 μL Solution III 颠倒混匀 2 min，此时可以看到白色的絮状沉淀，然后使用离心机 12,000 r/min 离心 10 min。

（3）将上清液转移至柱子，12,000 r/min 离心 1 min，弃废液。

（4）加入 500 μL HBC Buffer 后，12,000 r/min 离心 1 min，弃废液。

（5）加入 700 μL Wash Buffer，12,000 r/min 离心 1 min，弃废液，重复该步骤一次。

（6）12,000 r/min 空离 2 min，将柱子换至 1.5 mL 离心管上，晾干 2 min。

(7) 加入 30 μ L 提前 60 $^{\circ}$ C 提前预热的超纯水，静置 2 min，12,000 r/min 离心 2 min，收集离心管液体，-20 $^{\circ}$ C 保存。

3.2.4 重组蛋白诱导表达

将鉴定为阳性的菌落扩大培养后，以 1% 比例转入含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中，放置于 37 $^{\circ}$ C 180 r/min 恒温摇床培养，当培养液浑浊后，取部分菌液利用分光光度计检测 OD₆₃₀ 值，当 OD₆₃₀ 值在 0.6-0.8 时，将浓度为 1 M 的 IPTG 按照 1:1,000 的比例加入培养液中，于 37 $^{\circ}$ C 180 r/min 恒温摇床中进行诱导表达 4 h。同时设 pET28a 空载体菌做阴性对照。8,000 r/min 离心 10 min 离心收集菌体，沉淀按照原菌液与 PBS 缓冲液比例为 10: 1 重悬后进行超声破碎。取出部分超声破碎后含全菌蛋白液体，剩余的液体 12,000 r/min 离心 15 min，上清液转移到新的离心管中，沉淀用等体积 PBS 重悬，将样品分别进行 SDS-PAGE 电泳，检测目的蛋白的存在形式。

3.2.5 重组蛋白纯化

(1) 收集 1 L 经 IPTG 诱导表达后的重组蛋白菌体，使用 PBS 缓冲液，按照原菌液与 PBS 缓冲液 10: 1 的比例将沉淀重悬起来，8,000 r/min 离心 10 min，洗涤 3 次。

(2) 弃上清，加入 100 mL 平衡液重悬，利用超声细胞破碎仪进行超声破碎。设置超声破碎参数：功率为 38%，时间为 30 min，超声 3 s，暂停 3 s，超声破碎完成后 8,000 r/min 转速离心 40 min 分离上清和沉淀后插入冰上备用。

(3) 往含有 Ni-NTA 介质的蛋白纯化柱中加入 2 个柱体积的平衡液。

(4) 将超声后的上清加入蛋白纯化柱中，让其依靠重力自然流出，收集流出的穿过液，再次加入蛋白纯化柱中，反复操作 3-5 次使上清中的蛋白和含 Ni 介质充分结合。

(5) 往结合有目的蛋白的柱子中加入 20 mL 10 mM 咪唑，20 mL 20 mM 咪唑进行洗涤，除去杂蛋白，加入 15 mL 30 mM 咪唑，10 mL 80 mM 咪唑，10 mL 100 mM 咪唑，5 mL 500 mM 咪唑进行洗涤，不同浓度洗脱液留样进行 SDS-PAGE 检测。

(6) 根据 SDS-PAGE 检测结果，将无杂蛋白且含有目的蛋白的洗脱液加入 10 K 规格的超滤管，在 4 $^{\circ}$ C 条件下，以 3,500 r/min 离心，超滤浓缩至剩余 2 mL，再加入 10 mL 保存液至超滤管中，再次以相同条件离心，重复此操作 3 次，完成溶液置换。

(7) 浓缩后的目的蛋白溶液采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定其浓度，分装后置于-80 °C保存备用。

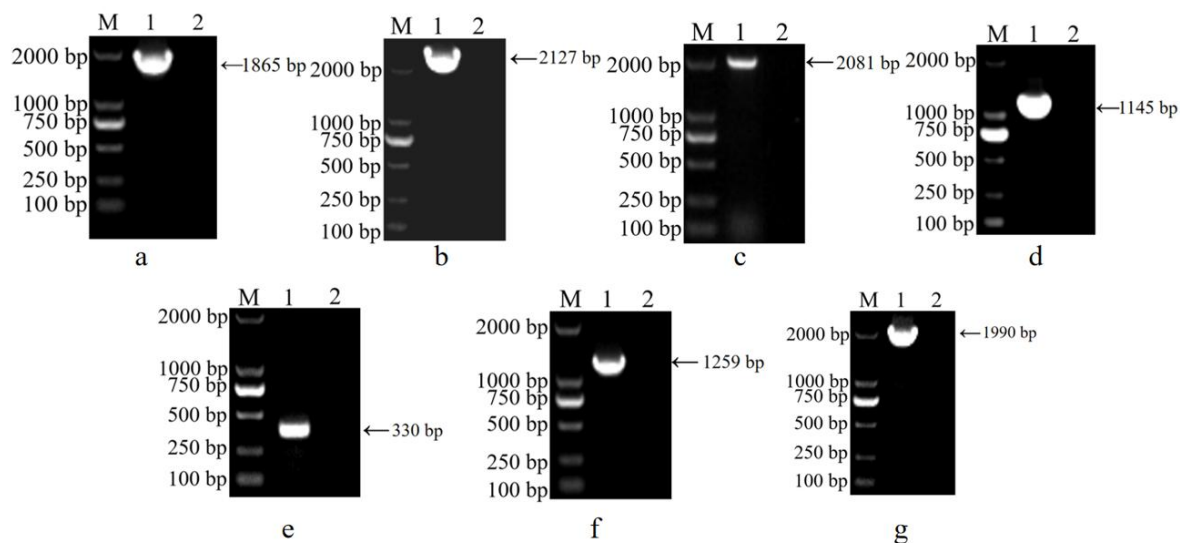
3.2.6 重组蛋白免疫反应性分析

将诱导表达纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 后，取出跑好的蛋白胶。在半干转膜仪中，按照顺序上中下分别为蛋白胶，PVDF 膜，吸水纸进行放置。将蛋白转移到 PVDF 膜上。加入 5% 脱脂乳室温封闭 1 h 后使用 PBST 洗涤 3 次，每次 5min。Mhp 的高免阳性血清和 SPF 猪血清按照 1:100 的比例使用 PBST 稀释后分别作为一抗进行孵育，4 °C 孵育 16 h 后使用 PBST 洗涤 3 次，每次 5min。使用 HRP 标记的山羊抗猪抗体，按照 P 1:20,000 比例使用 PBST 进行稀释后作为二抗，室温震荡孵育 1 h 后 PBST 洗涤 3 次，每次洗涤 5min。最后使用 DAB 显色液，避光显色 5 min，加入纯水终止反应，晾干后，观察试验结果。

3.3 试验结果

3.3.1 质粒鉴定结果

以重组质粒 pET28a-Mhp366、pET28a-Mhp378、pET28a-P65、pET28a-P36、pET28a-P97CR1、pET28a-NrdF、pET28a-DnaK 为模板，使用引物 T7、T7ter 扩增获得目的片段大小（图 3-1），实际大小需要加上 T7、T7ter 片段 197 bp，结果显示，重组质粒分别扩增出 1,865 bp、2,127 bp、2,081 bp、1,145 bp、330 bp、1,259 bp、1,990 bp 大小片段。含目的片段产物由睿博兴科生物有限技术公司进行测序，结果显示构建的重组质粒阅读框架和序列均正确且无突变和移码现象，表明原核表达重组质粒成功构建。



注：a-g 分别为重组质粒 pET28a-Mhp366、pET28a-Mhp378、pET28a-P65、pET28a-P36、pET28a-P97CR1、pET28a-NrdF、pET28a-DnaK 的扩增结果；M：DL2,000 Marker；1：重组质粒扩增结果；2：阴性对照。

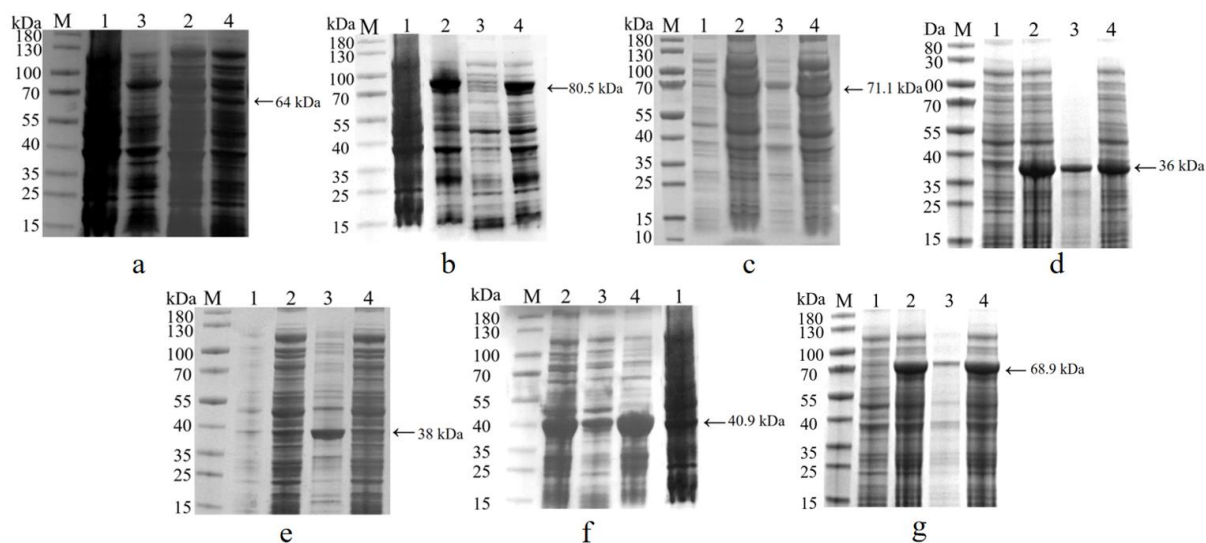
Note: a-g represents the amplification results of recombinant plasmids pET28a-Mhp366, pET28a-Mhp378, pET28a-P65, pET28a-P36, pET28a-P97CR1, pET28a-NrdF, pET28a-DnaK respectively; M: DL2,000 Marker; 1: Result of recombinant plasmid amplification; 2: Negative control.

图 3-1 重组质粒 PCR 扩增结果

Fig. 3-1 Result of recombinant plasmid PCR amplification

3.3.2 重组蛋白的表达及存在形式

重组质粒 pET28a-Mhp366、pET28a-Mhp378、pET28a-P65、pET28a-P36、pET28a-P97CR1、pET28a-NrdF、pET28a-DnaK 转入在大肠杆菌 BL21 感受态细胞表达，经 IPTG 诱导后，分别表达出大小为 64 kDa、80.5 kDa、71.1 kDa、36 kDa、38 kDa、40.9 kDa、68.9 kDa 的蛋白，将超声后的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 检测，结果显示 Mhp366 蛋白在上清和沉淀在均有表达；Mhp378 蛋白于上清中表达量大；P65、P36、NrdF 和 DnaK 蛋白于上清和沉淀在均有表达，上清中表达量大；P97CR1 蛋白上清和沉淀在均有表达，沉淀中表达量大（图 3-2）。



注：a-g 分别为 Mhp366、Mhp378、P65、P36、P97CR1、NrdF、DnaK 蛋白表达及存在形式；M:蛋白 Marker；1: pET28a 空菌；2: 重组蛋白表达菌；3: 沉淀；4: 上清。

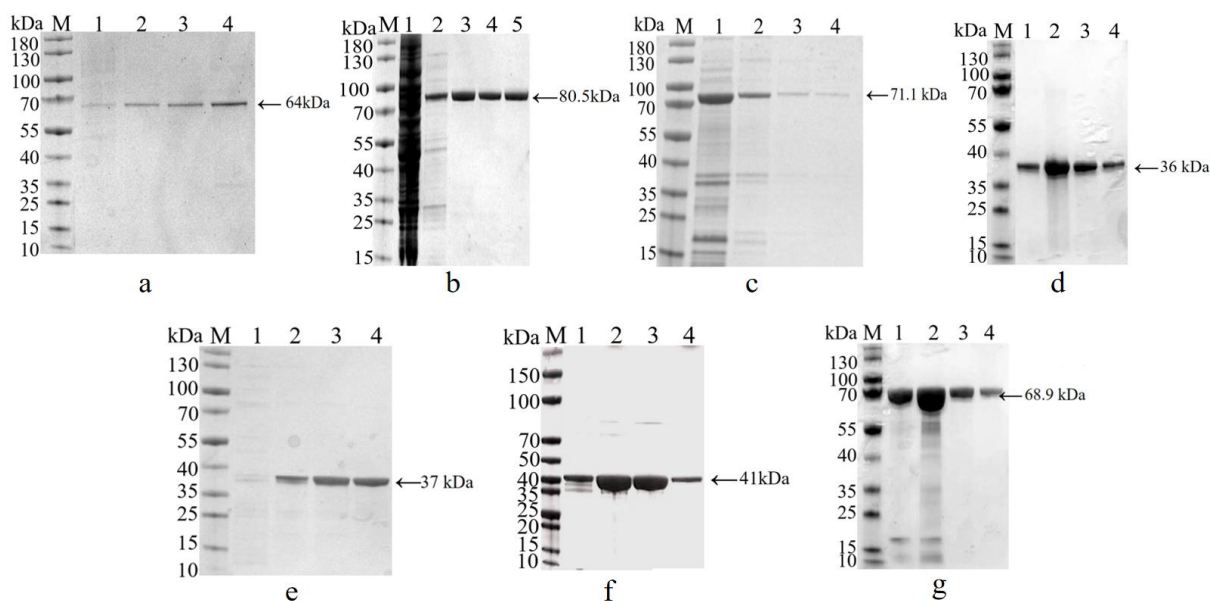
Note: a-g represents respectively Mhp366, Mhp378, P65, P36, P97CR1, NrdF, DnaK expression and existing forms; M: Protein Marker; 1: PET28a empty bacteria; 2: Recombinant protein expression bacteria; 3: Sedimentation; 4: Supernatant.

图 3-2 重组蛋白的表达及存在形式

Fig. 3-2 Expression and existing forms of recombinant proteins

3.3.3 重组蛋白纯化

37 °C条件下对转化有重组质粒 pET28a-Mhp366、pET28a-Mhp378、pET28a-P65、pET28a-P36、pET28a-P97CR1、pET28a-NrdF、pET28a-DnaK 的 BL21 菌体进行诱导表达收集菌体后进行洗涤、超声破碎、离心后，取上清用镍柱亲和层析法进行蛋白纯化。经过优化，各蛋白的纯化条件如图 3-3 所示：Mhp366 蛋白 10 mM 即可洗脱大量杂蛋白，20 mM 咪唑浓度开始洗脱目的蛋白；Mhp378 蛋白 10 mM、20 mM 咪唑即可洗脱目的蛋白，但是含有少量杂蛋白，80 mM 咪唑用于洗脱目的蛋白；P65 蛋白 80 mM 咪唑浓度洗脱目的蛋白；P36 蛋白 30 mM 咪唑浓度洗脱目的蛋白；P97CR1 蛋白 80 mM 咪唑浓度洗脱目的蛋白；NrdF 蛋白 100mM 咪唑浓度洗脱目的蛋白；DnaK 蛋白 100mM 咪唑浓度洗脱目的蛋白。



注：a-g 分别为 Mhp366、Mhp378、P65、P36、P97CR1、NrdF、DnaK 等蛋白的不同咪唑洗脱的 SDS-PAGE 图；a：M：蛋白 Marker；1：10 mM；2：20 mM；3：30 mM；4：80 mM；b：M：蛋白 Marker；1：穿过液；2：10 mM；3：20 mM；4：30 mM；5：80 mM；c：M：蛋白 Marker；1：10 mM；2：20 mM；3：30 mM；4：80 mM；d：M：蛋白 Marker；1：30 mM；2：80 mM；3：100 mM；4：500 mM；e：M：蛋白 Marker；1：20 mM；2：30 mM；3：80 mM；4：100 mM；f：M：蛋白 Marker；1：20 mM；2：30 mM；3：80 mM；4：100 mM；g：M：蛋白 Marker；1：30 mM；2：80 mM；3：100 mM；4：500 mM。

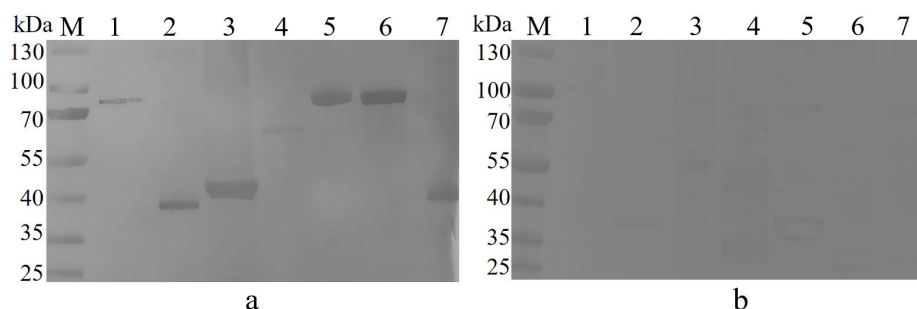
Note: SDS-PAGE results of proteins eluted at different imidazole concentrations: including these proteins: Mhp366, Mhp378, P65, P36, P97CR1, NrdF, DnaK; a: M: Protein Marker; 1: 10 mM; 2: 20 mM; 3: 30 mM; 4: 80 mM; b: M: Protein Marker; 1: Through liquid; 2: 10 mM; 3: 20 mM; 4: 30 mM; 5: 80 mM; c: M: Protein Marker; 1: 10 mM; 2: 20 mM; 3: 30 mM; 4: 80 mM; d: M: Protein Marker; 1: 30 mM; 2: 80 mM; 3: 100 mM; 4: 500 mM; e: M: Protein Marker; 1: 20 mM; 2: 30 mM; 3: 80 mM; 4: 100 mM; f: M: Protein Marker; 1: 20 mM; 2: 30 mM; 3: 80 mM; 4: 100 mM; g: M: Protein Marker; 1: 30 mM; 2: 80 mM; 3: 100 mM; 4: 500 mM.

图 3-3 重组蛋白纯化

Fig. 3-3 Purification for recombinant proteins

3.3.4 重组蛋白免疫反应性鉴定

将纯化后的重组蛋白进行 Western blot 分析，用猪的 Mhp 高免阳性血清和猪的标准阴性血清作一抗孵育，结果显示，以 Mhp 阳性血清为一抗时，在各目的蛋白均出现明显的反应条带（图 3-4a），但与阴性血清反应无条带（图 3-4b），表明目的蛋白 Mhp366、Mhp378、P65、P36、P97CR1、NrdF、DnaK 与 Mhp 阳性血清有较强的免疫反应原性。



注：a: Mhp 阳性血清: M: 蛋白 Marker; 1: Mhp378 蛋白; 2: P36 蛋白; 3: NrdF 蛋白; 4: Mhp366 蛋白; 5: P65 蛋白; 6: P36 蛋白; 7: P97CR1 蛋白; b: Mhp 阴性血清: 1: NrdF 蛋白; 2: P36 蛋白; 3: P65 蛋白; 4: Mhp366 蛋白; 5: P97CR1 蛋白; 6: Mhp378 蛋白; 7: DnaK 蛋白。

Note: a: Mhp-positive serum; M: Protein Marker; 1: Mhp378 protein; 2: P36 protein; 3: NrdF protein; 4: Mhp366 protein; 5: P65 protein; 6: P36 protein; 7: P97CR1 protein; b: Mhp-negative serum; 1: NrdF protein; 2: P36 protein; 3: Mhp366 protein; 4: P97CR1 protein; 5: Mhp366 protein; 6: Mhp378 protein; 7: DnaK protein.

图 3-4 重组蛋白免疫反应性鉴定

Fig. 3-4 Immunoreactivity identification of recombinant proteins

3.4 讨论

Mhp 感染会改变宿主免疫反应，导致组织损伤和疾病，由于没有细胞壁，支原体表面的脂质相关膜蛋白在支原体与其宿主之间的相互作用中起着至关重要的作用^[3]，其中 Mhp 的分泌蛋白可能是重要的毒力因子或与某些致病性因素有关，其分泌的蛋白可能介导免疫逃避，促进细菌存活，或触发促炎机制，从而导致 PEP 的严重程度^[97,102]。从宿主的角度来看，猪感染 Mhp，宿主分泌的蛋白质可能介导保护性免疫反应，导致病原体消除，也可能加剧炎症反应，导致肺部病变^[103]。因此，猪肺炎支原体感染的结果取决于来自细菌和宿主起源的发病决定因素之间的微妙平衡，其中分泌蛋白是重要的参与者^[103]。

不同的技术用于重组蛋白的产生，利用不同的宿主细胞制造大量的蛋白质。其中宿主包括各种原核系统、昆虫细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞和植物细胞^[104]。利用细菌制造重组蛋白是一种被广泛采用的方法，而大肠杆菌因其经济的特性和快速的发展而成为首选的生物，因此本试验采用大肠杆菌作为纯化目的蛋白的表达系统，主要从诱导蛋白表达形式、纯化条件等方面优化 Mhp 蛋白表达的最佳条件。试验结果表明，经大肠杆菌表达系统纯化的 7 个目的蛋白均为可溶性表达，部分蛋白中存在少量包涵体形式，可能原因在于蛋白质在大肠杆菌中的表达水平高，速度过快或生长过度导致

细菌合成系统产生负担，形成的包涵体^[105]。试验中选择使用原核表达载体 pET-28a，利用其存在 His-Tag 的特性，使用 Ni-NTA 柱亲和层析的方法纯化目的蛋白，可以使用咪唑直接将目的蛋白洗脱下来，很大程度上保证目的蛋白的纯度。此外，pET-28a 的 6 个组氨酸标签表达的蛋白大小仅有 0.84 kDa，可忽略其对原蛋白的影响。在大肠杆菌表达系统中存在一些组氨酸蛋白可以与镍柱结合，但是结合不牢固，低浓度咪唑即能洗下杂蛋白，试验中逐步增加洗脱液的咪唑浓度，摸索最佳咪唑洗脱浓度。试验结果表明，当杂蛋白被大量洗去，少量目的蛋白开始洗下时，缓慢增加咪唑浓度，最佳咪唑浓度可直接洗下大量目的蛋白，而无杂蛋白。蛋白洗脱纯化结果表明，7 个目的蛋白在 10mM 浓度的咪唑洗脱时，均能洗脱下大量杂蛋白，大部分在 80 mM、100 mM 浓度咪唑洗脱目的蛋白。

本研究根据本试验前期获得的 Mhp-1 的全基因组，挑选出 *mhp366*、*mhp378*、*p65*、*p36*、*p97*、*nrdF*、*dnaK* 等基因，由睿博兴科生物技术有限公司进行基因优化并连接至 pET-28a 载体上，利用大肠杆菌构建原核表达载体获取蛋白。密码子 TGA 在支原体中可以正常表达色氨酸，但在大肠杆菌中是终止密码子，如果利用大肠杆菌表达蛋白，还需要对编码区序列进行优化才能正常表达。因此，需要将基因序列中的 TGA 突变为 TGG 合成基因序列，才能连接至 pET-28a 表达载体。本研究构建并诱导表达纯化了 Mhp 相关蛋白，为后续 ELISA 方法的建立奠定了基础。

3.5 小结

(1) 本研究成功构建重组质粒 pET28a-Mhp366、pET28a-Mhp378、pET28a-P65、pET28a-P36、pET28a-P97CR1、pET28a-NrdF、pET28a-DnaK。

(2) 本研究成功诱导表达纯化出 7 个 Mhp 特异蛋白 Mhp366、Mhp378、P65、P36、P97CR1、NrdF、DnaK。

第 4 章 基于猪肺炎支原体蛋白间接 ELISA 检测方法的建立

Mhp 是一种具有重要经济意义的猪病原体，为了控制 Mhp 的流行传播，快速准确的检测是净化该病的必要手段。基于 ELISA 的 Mhp 血清学抗体检测被广泛用于规模化猪场的常规监测。Mhp 的膜蛋白是研究者开发血清学抗体检测试剂盒的常用目标蛋白。20 世纪 80 年代后，针对 Mhp 的血清学与分子生物学诊断方面的研究取得了较大进展。然而，在我国针对 Mhp 的检测还存在许多难题，检测速度与准确性均有待提高。血清学检测中 ELISA 检测周期短、操作简单、准确率较高被认为是目前最理想的检测方法。Mhp378 蛋白被研究证明具有良好的特异性，且目前国内还未有人利用该蛋白建立 ELISA 检测方法，本研究利用 Mhp378 蛋白建立的间接 ELISA 检测方法，为建立良好的 Mhp ELISA 检测方法提供了参考数据。P36 蛋白作为建立猪支原体肺炎诊断方法的优选抗原，在猪感染 Mhp 后能产生较强的针对 P36 蛋白的抗体^[48]。祝永琴利用毕赤酵母表达的 P36 蛋白作为包被抗原建立了间接 ELISA 诊断方法^[20]，该方法特异性良好但是与商品化的试剂盒相比符合率不高。本研究通过大肠杆菌表达 P36 蛋白作为抗原建立检测 Mhp 抗体的间接 ELISA 检测方法，目的在于提高以 P36 蛋白为基础的间接 ELISA 检测方法的商品化试剂盒的符合率，为建立 Mhp 的检测方法提供参考数据。

4.1 试验材料

4.1.1 血清

标准阳性血清购自江苏省农业科学院；标准阴性血清、Mhp 高免阳性血清、Mhr 阳性血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所猪消化道团队危艳武老师惠赠；猪流行性腹泻病毒（*Porcine epidemic diarrhea virus*, PEDV）阳性血清、猪传染性胃肠炎病毒（*Transmissible gastroenteritis virus*, TGEV）阳性血清由哈尔滨兽医研究所季朝阳老师惠赠；猪伪狂犬病毒（*Pseudorabies virus*, PRV）、繁殖与呼吸综合征病毒（*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV）阳性猪血清由哈尔滨兽医研究所张洪亮老师惠赠；传染性胸膜肺炎（*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP）阳性血清、多杀性巴氏杆菌（*Pasteurella multocida*, PM）阳性血清、猪链球菌（*Streptococcus suis*,

SS) 阳性血清、副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 阳性血清、猪临床血清由本实验室保存。

4.1.2 主要试剂与耗材

主要试验试剂见表 4-1。

表 4-1 主要试验试剂与耗材

Table 4-1 Main experimental reagents and consumables

试剂名称	规格型号	公司
酶标板	42592	美国 Costar 公司
PBS (干粉)	PM5090-50x2L	北京 Coolaber 公司
BSA	9048-46-8	上海源叶生物科技有限公司
明胶	G7041-500 g	德国 Sigma 公司
PEG 8,000	25322-68-3	上海源叶生物科技有限公司
Skim Milk	232100	美国 BD 公司
酪蛋白	C5890-100 g	德国 Sigma 公司
吐温 20	9005-64-5	德国 Sigma 公司
浓硫酸	AR-500 mL	国药集团化学试剂有限公司
无水碳酸钠	AR-500 g	国药集团化学试剂有限公司
碳酸氢钠	AR-500 g	国药集团化学试剂有限公司
HRP 标签兔抗猪二抗	A5670-1 mL	德国 Sigma 公司
TMB 底物溶液	G448	加拿大 ABM 公司
猪肺炎支原体竞争 ELISA 抗体检测试剂盒	MHYOPC-5P	法国 IDvet 公司

4.1.3 主要仪器

主要仪器见表 4-2。

表 4-2 主要仪器

Table 4-2 Main instruments

仪器名称	规格型号	公司
酶标仪	ELx808	美国 BioTek 公司
洗板机	ELx50	美国 BioTek 公司
电热恒温培养箱	GNP-9050	精宏实验设备有限公司
PH 计	Laquatwin-pH-22	日本 Horiba 公司
超纯水仪	GenPure Pro UV/UF	美国 Thermo 公司

4.1.4 主要溶液的配制

(1) 碳酸盐缓冲液 (CBS): 分别称取 29.3g NaHCO_3 , 1.59g Na_2CO_3 加入 1 L 烧

杯中，加入 900 mL 去离子水搅拌均匀，并调节 pH 为 9.6，再定容至 1 L，4 °C 保存。

(2) 硫酸终止液：往 1 L 体积的烧杯中加入 889 mL 去离子水，随后缓慢操作，边搅拌边加入 111 mL 浓硫酸，混匀后之后分置玻璃瓶，阴凉干燥处密封保存。

4.2 基于 Mhp378 蛋白的间接 ELISA 检测方法的建立

4.2.1 试验方法

4.2.1.1 间接 ELISA 检测方法的基本操作程序

参考王宁用于筛选 P97CR1 单抗所建立的间接 ELISA 检测方法步骤^[85]。

(1) 使用 CBS 稀释液纯化的重组蛋白包被抗原，按照每孔 100 μ L 加入酶标板中，置于 4 °C 条件下 16 h，弃去包被液体，用 PBST 洗 3 次，吸水纸拍干酶标板。

(2) 每孔加入 200 μ L 5% 脱脂乳进行封闭，37 °C 放置 2 h，弃去封闭液，用 PBST 洗涤 3 次，吸水纸拍干酶标板；

(3) 每孔加入 100 μ L 稀释好的待检血清进行孵育，37 °C 放置 1 h，弃去待检血清，用 PBST 洗涤 3 次，除去未结合的抗原或抗体，吸水纸拍干酶标板；

(4) 每孔加入 100 μ L 稀释好的酶标抗体，37 °C 放置 1 h，弃去酶标抗体，用 PBST 洗涤 3 次，除去未结合的酶标抗体，吸水纸拍干酶标板；

(5) 每孔加入 100 μ L TMB 显色液，室温避光 15 min，使结合的酶标记抗体和底物产生显色反应。

(6) 每孔加入 100 μ L 2M H₂SO₄ 终止反应，根据酶标仪读数，确定待测样品 OD_{450nm} 值；

4.2.1.2 Mhp378 蛋白间接 ELISA 最佳工作条件的确定

以 Mhp378 蛋白作为包被抗原，设置一个抗原、标准阴阳性血清以及酶标二抗的三水平三因素正交试验，选择抗原包被量为 25 ng、50 ng、100 ng、200 ng、400 ng、800 ng；标准阳性血清和标准阴性血清作为待检抗体；血清稀释度从 1:10 倍比稀释至 1:640；HRP 标记的酶标二抗稀释度为 1:20,000、1:40,000 和 1:80,000。按照 4.2.1.1 中间接的 ELISA 基本操作步骤进行试验，测定 OD_{450nm} 值，进行数据分析。以阳性血清

OD_{450nm} 值 (P 值) / 阴性血清 OD_{450nm} 值 (N 值), 即 P/N 值最大时, 确定抗原、血清和酶标二抗最佳的工作浓度。在此基础上, 分别设置以下优化条件, 封闭液为 1 mg/mL BSA、1 mg/mL 酪蛋白、1 mg/mL 脱脂乳、5 mg/mL 脱脂乳, 封闭时间 45 min、60 min、90 min; 血清稀释液 PBST、0.5% 脱脂乳 PBST、0.5% FBS PBST、1% PEG8,000 PBST; 一抗作用时间 45 min、60 min、90 min; 酶标二抗孵育时间 30 min、45 min、60 min、90 min、120 min、显色时间 5 min、10 min、15 min、20 min、30 min 等, 每个条件设置 3 个重复, 测定 OD_{450nm} 值, 以 P/N 值最大确定最佳反应条件。

4.2.1.3 Mhp378 蛋白间接 ELISA 临界值的确定

用 IDvet 试剂盒检测猪血清样品, 阴性血清 76 份, 阳性血清 44 份, 根据建立的间接 ELISA 检测方法结果计算 S/P 值, $S/P \text{ 值} = (\text{样本 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值} - \text{阴性对照 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值}) / (\text{阳性对照 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值} - \text{阴性对照 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值})$ 。采用 ROC 标准曲线进行分析, 取敏感度与特异度最高点作为界定阳阴性的 cut-off 值。高于该值则为阳性, 低于该值则为阴性。

4.2.1.4 Mhp378 蛋白间接 ELISA 灵敏性试验

分别将 Mhp 标准阳性血清和标准阴性血清使用血清和 PBST 比例为 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1,600、1:3,200、1:6,400、1:12,800 进行稀释检测评价该检测方法的灵敏性。

4.2.1.5 Mhp378 蛋白间接 ELISA 重复性试验

取同一批次纯化复性的 Mhp378 蛋白作为包被抗原, 进行批内重复性试验检测; 3 批不同批次纯化的 Mhp378 蛋白作为包被抗原, 进行批间重复性试验检测; 使用已建立的最佳检测方法检测标准阳性血清和标准阴性血清以及 4 个临床样本, 每个样本设置 3 个重复, 测定每孔的 OD_{450nm} 值, 计算变异系数。

4.2.1.6 Mhp378 蛋白间接 ELISA 特异性试验

用已经建立的 Mhp378 蛋白间接 ELISA 检测方法对已知 Mhr、HPS、SS、PEDV、APP 和 PM、PRRSV、TGEV 的阳性血清进行检测, 同时设立标准阴、阳性对照, 根据确定的 cut-off 值判断该检测方法的特异性。

4.2.1.7 Mhp378 蛋白间接 ELISA 临床样本检测

用本文中建立的 Mhp378 蛋白间接 ELISA 检测方法和 IDvet 诊断试剂盒对临床血清进行检测，根据结果，计算该间接 ELISA 检测方法与 IDvet 检测试剂盒检测方法的符合率。

4.2.2 试验结果

4.2.2.1 Mhp378 最佳工作条件确定

Mhp378 蛋白最佳抗原包被量为每孔 800 ng，血清稀释度为 1:80，酶标二抗稀释度为 1:20,000（表 4-3）。

表 4-3 最佳工作条件的确定

Table 4-3 Determination of optimal working conditions

二抗稀释度	血清稀释度		Ag (ng)					
			800	400	200	100	50	25
1: 20,000	1: 10	P	3.55	3.406	3.286	2.89	2.6	2.549
		N	0.917	0.867	0.937	0.987	0.967	0.937
		P/N	3.871	3.928	3.507	2.928	2.689	2.720
1: 20,000	1: 20	P	3.136	2.946	2.793	2.214	2.206	2.129
		N	0.737	0.711	0.809	0.787	0.701	0.809
		P/N	4.255	4.143	3.452	2.813	3.147	2.632
1: 20,000	1: 40	P	1.968	2.445	2.252	1.777	1.705	1.673
		N	0.626	0.547	0.633	0.689	0.73	0.718
		P/N	3.144	4.470	3.558	2.579	2.336	2.330
1: 20,000	1: 80	P	2.299	2.117	1.847	1.568	1.487	1.489
		N	0.472	0.485	0.562	0.482	0.465	0.362
		P/N	4.871	4.365	3.286	3.253	3.198	4.113
1: 20,000	1: 160	P	1.747	1.589	1.406	1.293	1.239	1.189
		N	0.411	0.397	0.433	0.411	0.397	0.433
		P/N	4.251	4.003	3.247	3.146	3.121	2.746
1: 20,000	1: 320	P	0.979	1.055	0.941	0.98	0.931	0.961
		N	0.373	0.361	0.402	0.343	0.321	0.302
		P/N	2.625	2.922	2.341	2.857	2.900	3.182
1: 20,000	1: 640	P	0.779	0.65	0.698	0.7	0.726	0.729
		N	0.34	0.319	0.374	0.37	0.316	0.37
		P/N	2.291	2.038	1.866	1.892	2.297	1.970
1: 40,000	1: 10	P	2.192	2.044	1.986	1.559	1.422	1.348
		N	0.541	0.484	0.552	0.505	0.49	0.369
		P/N	4.052	4.223	3.598	3.087	2.902	3.653

续表 4-3 最佳工作条件的确定

二抗稀释度	血清稀释度		Ag (ng)					
			800	400	200	100	50	25
1: 40,000	1: 20	P	1.811	1.676	1.552	1.251	1.154	1.098
		N	0.456	0.421	0.461	0.409	0.396	0.297
		P/N	3.971	3.981	3.367	3.059	2.914	3.697
1: 40,000	1: 40	P	1.443	1.416	1.252	0.978	0.907	0.868
		N	0.368	0.328	0.365	0.301	0.301	0.298
		P/N	3.921	4.317	3.430	3.249	3.013	2.913
1: 40,000	1: 80	P	1.253	1.153	1.043	0.879	0.827	0.784
		N	0.303	0.287	0.332	0.297	0.213	0.294
		P/N	4.135	4.017	3.142	2.960	3.883	2.667
1: 40,000	1: 160	P	0.963	0.948	0.793	0.72	0.698	0.705
		N	0.24	0.236	0.259	0.323	0.333	0.35
		P/N	4.013	4.017	3.062	2.229	2.096	2.014
1: 40,000	1: 320	P	0.571	0.603	0.56	0.507	0.505	0.545
		N	0.205	0.197	0.224	0.284	0.305	0.312
		P/N	2.785	3.061	2.500	1.785	1.656	1.747
1: 40,000	1: 640	P	0.433	0.419	0.389	0.397	0.393	0.407
		N	0.195	0.186	0.199	0.251	0.292	0.305
		P/N	2.221	2.253	1.955	1.582	1.346	1.334
1: 80,000	1: 10	P	1.377	1.232	1.107	0.882	0.828	0.815
		N	0.357	0.313	0.325	0.277	0.275	0.287
		P/N	3.857	3.936	3.406	3.184	3.011	2.840
1: 80,000	1: 20	P	1.13	0.984	0.834	0.714	0.664	0.649
		N	0.293	0.261	0.275	0.204	0.213	0.201
		P/N	3.857	3.770	3.033	3.500	3.117	3.229
1: 80,000	1: 40	P	0.948	0.773	0.673	0.535	0.547	0.516
		N	0.236	0.202	0.212	0.243	0.218	0.236
		P/N	4.017	3.827	3.175	2.202	2.509	2.186
1: 80,000	1: 80	P	0.766	0.657	0.546	0.472	0.429	0.444
		N	0.203	0.183	0.203	0.206	0.204	0.202
		P/N	3.773	3.590	2.690	2.291	2.103	2.198
1: 80,000	1: 160	P	0.578	0.49	0.442	0.391	0.356	0.379
		N	0.155	0.147	0.157	0.135	0.147	0.137
		P/N	3.729	3.333	2.815	2.896	2.422	2.766
1: 80,000	1: 320	P	0.329	0.362	0.294	0.282	0.276	0.284
		N	0.152	0.136	0.141	0.181	0.191	0.201
		P/N	2.164	2.662	2.085	1.558	1.445	1.413
1: 80,000	1: 640	P	0.256	0.246	0.222	0.223	0.231	0.233
		N	0.129	0.125	0.135	0.129	0.125	0.125
		P/N	1.984	1.968	1.644	1.729	1.848	1.864

注: Ag: 抗原; P: 阳性血清 OD_{450nm} 值; N: 阴性血清 OD_{450nm} 值。P/N: 阳性血清 OD_{450nm}/阴性血清 OD_{450nm}。

Note: Ag: Antigen; P: Positive serum OD_{450 nm}; N: Negative serum OD_{450 nm}. P/N: Positive OD_{450nm}/ Negative OD_{450nm}.

在抗原、血清和酶标二抗最佳工作条件的基础上，优化间接 ELISA 检测方法其他条件，以 1% 酪蛋白作为封闭液、封闭时间 45 min（表 4-4）；血清孵育时间 45 min、最佳血清稀释液 PBST（表 4-5）；酶标二抗孵育时间 120 min（表 4-6）；TMB 显色 15 min（表 4-7），为 Mhp378 蛋白间接 ELISA 检测方法的最佳条件。

表 4-4 最佳封闭液和封闭时间的确定

Table 4-4 Determination of optimal sealing solution and sealing time

封闭液	血清	封闭时间 (min)								
		45			60			120		
5% 脱脂乳	P	2.224	2.132	2.058	2.121	2.137	2.174	2.171	2.27	2.371
	N	0.5	0.499	0.483	0.462	0.48	0.47	0.519	0.536	0.554
	P/N	4.448	4.273	4.261	4.591	4.452	4.626	4.183	4.235	4.280
1% 脱脂乳	P	2.301	2.285	2.276	2.024	2.099	2.092	2.046	2.25	2.251
	N	0.454	0.452	0.461	0.467	0.458	0.435	0.436	0.443	0.468
	P/N	5.068	5.055	4.937	4.334	4.583	4.809	4.693	5.079	4.810
1% BSA	P	2.646	2.517	2.509	2.294	2.396	2.353	2.306	2.38	2.453
	N	0.589	0.529	0.555	0.56	0.562	0.536	0.559	0.58	0.6
	P/N	4.492	4.758	4.521	4.096	4.263	4.390	4.125	4.103	4.088
1% 酪蛋白	P	2.328	2.043	2.211	1.955	1.899	1.84	1.811	1.933	1.954
	N	0.42	0.368	0.41	0.366	0.382	0.37	0.351	0.359	0.366
	P/N	5.543	5.552	5.393	5.342	4.97	4.973	5.160	5.384	5.339

表 4-5 最佳血清孵育时间的确定

Table 4-5 Determination of optimal serum incubation time

血清稀释液	血清	血清孵育时间 (min)								
		45			60			90		
0.5% 脱脂乳 PBST	P	2.426	2.437	2.511	2.626	2.647	2.557	2.669	2.771	2.809
	N	0.409	0.427	0.427	0.519	0.507	0.526	0.557	0.565	0.565
	P/N	5.932	5.707	5.881	5.060	5.221	4.861	4.792	4.904	4.972
PBST	P	2.685	2.578	2.452	2.648	2.712	2.660	2.816	2.864	2.957
	N	0.417	0.402	0.373	0.441	0.450	0.423	0.478	0.521	0.506
	P/N	6.439	6.413	6.574	6.005	6.027	6.288	5.891	5.497	5.844
0.5% FBS PBST	P	2.763	2.572	2.554	2.647	2.708	2.631	2.855	2.848	2.911
	N	0.472	0.437	0.428	0.511	0.507	0.471	0.574	0.495	0.581
	P/N	5.854	5.886	5.967	5.180	5.341	5.586	4.974	5.754	5.010
1% PEG8,000 PBST	P	2.693	2.572	2.684	2.733	2.844	2.876	2.897	3.006	3.106
	N	0.446	0.429	0.468	0.529	0.568	0.594	0.635	0.654	0.657
	P/N	6.038	5.995	5.735	5.166	5.007	4.842	4.562	4.596	4.728

表 4-6 酶标二抗最佳孵育时间的确定

Table 4-6 Determination of optimal HRP-Pig-Anti-Goat IgG incubation time

血清	二抗孵育时间 (min)				
	30	45	60	90	120
P	1.558	2.143	2.365	2.612	3.099
N	0.243	0.311	0.35	0.351	0.424
P/N	6.412	6.891	6.757	7.442	7.309
P	1.511	2.033	2.265	2.461	3.144
N	0.264	0.303	0.342	0.364	0.425
P/N	5.723	6.710	6.623	6.761	7.398
P	1.564	2.014	2.339	2.439	3.09
N	0.244	0.297	0.356	0.339	0.428
P/N	6.410	6.781	6.570	7.195	7.220
$\Delta P/N$	6.169	6.795	6.650	7.127	7.309

注: $\Delta P/N = P/N$ 之和/重复次数, 下标同。

Note: $\Delta P/N = \text{sum of } P/N / \text{number of repetitions}$, The following table is the same.

表 4-7 底物作用最佳时间的确定

Table 4-7 Selection of optimal time for substrate action

血清	底物作用时间 (min)				
	5	10	15	20	30
P	1.186	2.203	2.782	3.295	3.807
N	0.188	0.308	0.366	0.431	0.543
P/N	6.309	7.153	7.601	7.645	7.011
P	1.310	2.109	2.642	3.176	3.720
N	0.194	0.316	0.382	0.505	0.529
P/N	6.753	6.674	6.916	6.289	7.032
P	1.2	2.117	2.605	3.194	3.703
N	0.177	0.297	0.376	0.465	0.526
P/N	6.780	7.128	6.928	6.869	7.040
$\Delta P/N$	6.612	6.980	7.143	6.899	7.028

4.2.2.2 Mhp378 蛋白间接 ELISA 临界值结果

用建立的 Mhp378 蛋白间接 ELISA 方法检测 76 份已经确定为 Mhp 阴性的血清, 44 份已经确定为 Mhp 阳性的血清, 测定其 OD_{450nm} 值, 计算 S/P 值并使用 ROC 标准曲线进行分析。结果显示, 当 S/P 值为 0.355 时, 敏感性和特异性的和最大, 即为 cut-off 值。S/P 值低于 0.355 时判定为阴性, 高于 0.355 则判定为阳性。

表 4-8 临界值的确定

Table 4-8 Determination of Critical Values

已知阴性血清 OD _{450nm} 值							
0.791	0.284	0.599	0.334	0.638	0.429	0.573	0.296
0.434	0.507	0.357	0.587	0.297	0.552	0.39	0.296
0.217	0.484	0.412	0.487	0.502	0.376	0.565	0.227
0.708	0.438	0.798	0.605	0.488	0.477	0.383	0.308
0.395	0.387	0.678	0.521	0.35	0.466	0.254	0.518
0.384	0.439	0.255	0.800	0.852	0.818	0.31	0.42
0.453	0.613	0.32	0.352	0.306	0.748	0.391	0.211
0.381	0.567	0.589	0.828	0.828	0.286	0.654	0.786
0.661	0.295	0.305	0.264	0.817	0.806	0.737	0.527
0.697	0.555	0.69	0.539				

表 4-9 临界值的确定

Table 4-9 Determination of Critical Values

已知阳性血清 OD _{450nm} 值							
1.019	2.74	1.327	1.527	1.22	1.329	1.687	1.155
2.167	1.223	1.2	1.317	1.111	1.018	1.162	1.873
1.693	1.147	1.036	1.04	1.439	1.603	1.659	1.033
0.91	1.425	1.088	0.975	1.241	1.141	1.222	1.205
1.036	1.144	1.128	1.082	1.393	1.56	1.264	1.08
1.292	1.545	0.942	1.107				

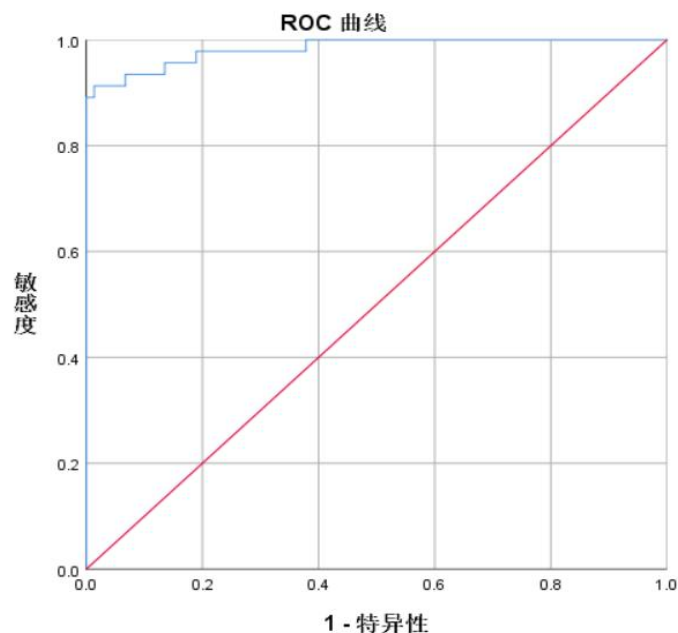


图 4-1 ROC 标准曲线

Fig. 4-1 The ROC the standard curve

4.2.2.3 Mhp 间接 ELISA 灵敏性试验结果

试验结果表明，标准阳性血清稀释度为 1:3200 时阳性血清与阴性血清的 OD_{450nm} 的比值仍可以达到 2，灵敏性良好。

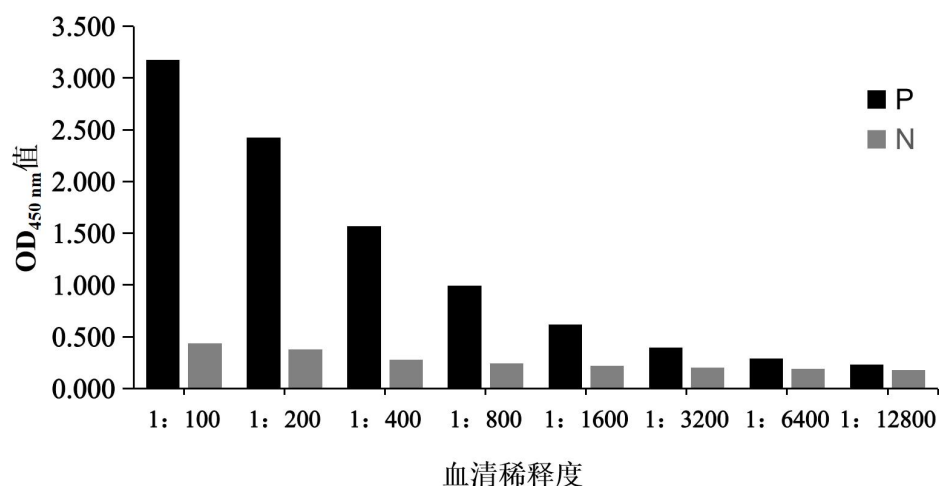


图 4-2 Mhp378 蛋白间接 ELISA 灵敏性试验结果

Fig. 4-2 Results of indirect ELISA sensitivity test for P65 protein

4.2.2.4 Mhp378 间接 ELISA 重复性试验结果

Mhp378 蛋白批内重复性试验结果显示，6 份血清变异系数均在 5% 以内（表 4-10），表明该检测方法批内重复性结果良好。

表 4-10 批内重复试验结果

Table 4-10 Repeated test result sin batch

检测样本	孔 1	孔 2	孔 3	OD 均值	标准差	CV%
阳性血清	2.977	3.048	3.091	3.039	0.058	1.895
阴性血清	0.38	0.38	0.389	0.383	0.005	1.357
样本 1	0.502	0.519	0.543	0.521	0.021	3.951
样本 2	1.96	1.923	1.947	1.943	0.019	0.966
样本 3	0.776	0.746	0.764	0.762	0.015	1.982
样本 4	1.954	1.945	1.906	1.935	0.026	1.319

Mhp378 蛋白批间重复性试验结果显示，结果显示 6 份血清变异系数均在 10% 以内（表 4-11），表明该检测方法批间重复性良好。

表 4-11 批间重复试验结果

Table 4-11 Repeated test results between batches

检测样本	板 1 均值	板 2 均值	板 3 均值	OD 均值	标准差	CV%
阳性血清	3.039	2.846	3.243	3.043	0.186	6.111
阴性血清	0.434	0.408	0.458	0.433	0.030	6.956

续表 4-11 批间重复试验结果

检测样本	板 1 均值	板 2 均值	板 3 均值	OD 均值	标准差	CV%
样本 1	0.521	0.530	0.600	0.550	0.040	7.218
样本 2	1.943	2.079	2.101	2.041	0.083	4.048
样本 3	0.762	0.759	0.868	0.796	0.060	7.552
样本 4	1.935	2.023	2.054	2.004	0.071	3.565

4.2.2.5 Mhp378 间接 ELISA 特异性试验结果

按照本研究建立的 Mhp378 蛋白间接 ELISA 检测方法检测 Mhr、HPS、SS、PEDV、APP、PM、PRRSV、TGEV 阳性血清，根据建立的 cut-off 值判断结果，以上血清均为阴性，该检测方法具有良好的特异性。

4.2.2.6 Mhp378 间接 ELISA 临床样本检测结果

用本文中建立的 Mhp378 蛋白间接 ELISA 检测方法和 IDvet 猪肺炎支原体竞争 ELISA 抗体检测试剂盒，同时对 440 份临床血清进行检测，商品化试剂盒检测结果显示阳性样品 178 份，阴性样品 262 份；本研究初步建立的 Mhp378 间接 ELISA 检测方法的检测结果为阳性样品 188 份，阴性样品 252 份，计算后该方法与 IDvet Mhp 抗体检测试剂盒的阳性符合率为 89.32%，阴性符合率为 88.93%，总符合率为 89.09%。

表 4-12 符合率试验结果
Table 4-12 Conformity test results

		IDvet Mhp 抗体检测试剂盒		
		178 份阳性	262 份阴性	总数
间接 ELISA	阳性	159	19	178
	阴性	29	233	262
总数		188	252	440
符合率 (%)		89.32	88.93	89.09

4.3 基于 P36 蛋白的间接 ELISA 检测方法的建立

4.3.1 试验方法

4.3.1.1 间接 ELISA 检测方法的基本操作程序

方法同 4.2.1.1。

4.3.1.2 P36 蛋白间接 ELISA 最佳工作条件的确定

以纯化的 P36 蛋白作为包被抗原，选择抗原包被量为 12.5 ng、25 ng、50 ng、100

ng、200 ng、400 ng；封闭液为 1 mg/mL BSA、1 mg/mL 酪蛋白、1 mg/mL 明胶、5 mg/mL 脱脂乳，封闭时间 45 min、60 min、90 min、120 min，设置 2 个重复；血清稀释液 PBST、0.5% 脱脂乳 PBST、0.5% FBS PBST、1% PEG 8,000 PBST，设置 2 个重复；抗原抗体作用时间 45 min、60 min、90 min；酶标二抗孵育时间 30 min、45 min、60 min、90 min、120 min，显色时间 5 min、10 min、15 min、20 min、30 min；其余条件同 4.2.1.2，设置 3 个重复，测定 OD_{450nm} 值，以 P/N 值最大确定最佳反应条件。

4.3.1.3 P36 蛋白间接 ELISA 临界值的确定

方法同 4.2.1.3。

4.3.1.4 P36 蛋白间接 ELISA 灵敏性试验

方法同 4.2.1.4。

4.3.1.5 P36 蛋白间接 ELISA 重复性试验

方法同 4.2.1.5。

4.3.1.6 P36 蛋白间接 ELISA 特异性试验

方法同 4.2.1.6。

4.3.1.7 P36 蛋白间接 ELISA 临床样本检测

方法同 4.2.1.7。

4.3.2 试验结果

4.3.2.1 P36 蛋白间接 ELISA 最佳工作条件结果

P36 蛋白最佳抗原包被量为每孔 400 ng，血清稀释度为 1:640，酶标二抗稀释度为 1:40,000（表 4-13）。

表 4-13 最佳工作条件的确定

Table 4-13 Determination of optimal working conditions

二抗稀释度	血清稀释度	Ag	400ng	200ng	100ng	50ng	25ng	12.5ng
1: 20,000	1: 10	P	3.072	2.771	2.694	2.268	1.872	1.614
		N	1.464	1.421	1.312	1.299	1.238	1.308
		P/N	2.098	1.950	2.053	1.746	1.512	1.234
1: 20,000	1: 20	P	3.145	2.925	2.612	2.100	1.613	1.363
		N	1.134	1.119	1.177	1.087	1.034	1.090
		P/N	2.773	2.614	2.219	1.932	1.560	1.250

续表 4-13 最佳工作条件的确定

二抗稀释度	血清稀释度	Ag	400ng	200ng	100ng	50ng	25ng	12.5ng
1: 20,000	1: 40	P	3.005	2.526	2.236	1.680	1.316	1.091
		N	0.947	0.854	0.884	0.830	0.823	0.859
		P/N	3.173	2.958	2.529	2.024	1.599	1.270
1: 20,000	1: 80	P	2.905	2.533	1.990	1.868	0.993	0.825
		N	0.775	0.714	0.715	0.668	0.628	0.649
		P/N	3.748	3.548	2.783	2.796	1.581	1.271
1: 20,000	1: 160	P	2.491	2.200	1.846	1.249	0.790	0.657
		N	0.525	0.506	0.523	0.449	0.439	0.447
		P/N	4.745	4.348	3.530	2.782	1.800	1.470
1: 20,000	1: 320	P	2.199	1.797	1.430	0.936	0.550	0.453
		N	0.480	0.473	0.392	0.358	0.305	0.323
		P/N	4.581	3.799	3.648	2.615	1.803	1.402
1: 20,000	1: 640	P	1.761	1.415	1.009	0.674	0.360	0.299
		N	0.480	0.400	0.349	0.339	0.231	0.230
		P/N	3.669	3.538	2.891	1.988	1.558	1.300
1: 40,000	1: 10	P	2.094	1.875	1.737	1.452	1.151	0.976
		N	0.839	0.912	0.873	0.845	0.851	0.862
		P/N	2.496	2.056	1.990	1.718	1.353	1.132
1: 40,000	1: 20	P	2.188	1.923	1.709	1.268	1.020	0.857
		N	0.695	0.752	0.683	0.675	0.667	0.647
		P/N	3.148	2.557	2.502	1.879	1.529	1.325
1: 40,000	1: 40	P	1.921	1.794	1.513	1.146	0.802	0.644
		N	0.598	0.608	0.547	0.533	0.532	0.515
		P/N	3.212	2.951	2.766	2.150	1.508	1.250
1: 40,000	1: 80	P	1.992	1.675	1.373	1.006	0.682	0.532
		N	0.457	0.481	0.446	0.414	0.414	0.401
		P/N	4.359	3.482	3.078	2.430	1.647	1.327
1: 40,000	1: 160	P	1.732	1.374	1.134	0.797	0.532	0.440
		N	0.351	0.366	0.333	0.320	0.307	0.319
		P/N	4.934	3.754	3.405	2.491	1.733	1.379
1: 40,000	1: 320	P	1.439	1.190	0.892	0.554	0.385	0.315
		N	0.257	0.256	0.238	0.223	0.225	0.237
		P/N	5.599	4.648	3.748	2.484	1.711	1.329
1: 40,000	1: 640	P	1.157	0.845	0.624	0.382	0.264	0.231
		N	0.190	0.197	0.179	0.173	0.162	0.169
		P/N	6.089	4.289	3.486	2.208	1.630	1.367
1: 80,000	1: 10	P	1.184	1.014	0.922	0.746	0.619	0.522
		N	0.468	0.458	0.448	0.443	0.423	0.452
		P/N	2.530	2.214	2.058	1.684	1.463	1.155
		P	1.161	0.902	0.787	0.643	0.506	0.430

续表 4-13 最佳工作条件的确定

二抗稀释度	血清稀释度	Ag	400ng	200ng	100ng	50ng	25ng	12.5ng
1: 80,000	1: 20	N	0.372	0.370	0.357	0.344	0.339	0.342
		P/N	3.121	2.438	2.204	1.869	1.493	1.257
		P	1.055	0.861	0.717	0.557	0.418	0.332
1: 80,000	1: 40	N	0.314	0.306	0.397	0.289	0.277	0.274
		P/N	3.360	2.814	1.806	1.927	1.509	1.212
		P	1.054	0.778	0.684	0.486	0.355	0.277
1: 80,000	1: 80	N	0.264	0.255	0.242	0.229	0.221	0.223
		P/N	3.992	3.051	2.826	2.122	1.606	1.242
		P	0.907	0.722	0.635	0.430	0.293	0.240
1: 80,000	1: 160	N	0.189	0.189	0.189	0.177	0.175	0.178
		P/N	4.799	3.820	3.360	2.429	1.674	1.348
		P	0.683	0.519	0.431	0.299	0.209	0.176
1: 80,000	1: 320	N	0.140	0.156	0.142	0.133	0.128	0.132
		P/N	4.879	3.327	3.035	2.248	1.633	1.333
		P	0.552	0.386	0.329	0.209	0.154	0.131
1: 80,000	1: 640	N	0.108	0.111	0.109	0.104	0.104	0.107
		P/N	5.111	3.477	3.018	2.010	1.481	1.224

在抗原、血清和酶标二抗最佳工作条件的基础上，优化间接 ELISA 检测方法其他条件，以 5% 脱脂乳为 P36 蛋白间接 ELISA 检测方法的最佳封闭液、最佳封闭时间为 45 min（表 4-14）、最佳血清孵育时间为 45 min、最佳血清稀释液为 PBST（表 4-15），最佳酶标二抗孵育时间 90 min（表 4-16）、最佳底物作用时间为 10 min（表 4-17）。

表 4-14 最佳封闭液和封闭时间的确定

Table 4-14 Determination of optimal sealing solution and sealing time

封闭液	血清	封闭时间 (min)							
		45	60	90	120				
5% 脱脂乳	P	1.123	1.158	1.118	1.129	1.063	1.108	1.094	1.084
	N	0.191	0.186	0.204	0.188	0.201	0.202	0.205	0.208
	P/N	5.880	6.226	5.480	6.005	5.289	5.485	5.337	5.212
1% BSA	P	1.237	1.163	1.147	1.131	1.152	1.159	1.153	1.151
	N	0.215	0.213	0.230	0.221	0.231	0.232	0.211	0.227
	P/N	5.753	5.460	4.987	5.118	4.987	4.996	5.464	5.070
1% 酪蛋白	P	0.938	0.924	0.883	0.867	0.841	0.827	0.771	0.826
	N	0.158	0.153	0.156	0.151	0.158	0.158	0.154	0.150
	P/N	5.937	6.039	5.660	5.742	5.323	5.234	5.006	5.507
1% 明胶	P	1.155	1.141	1.092	1.104	1.090	1.109	1.035	1.069
	N	0.214	0.207	0.208	0.198	0.204	0.199	0.195	0.194
	P/N	5.397	5.512	5.250	5.576	5.343	5.573	5.308	5.510

表 4-15 最佳血清孵育时间的确定

Table 4-15 Determination of optimal incubation time of serum

血清稀释液	血清	封闭时间 (min)							
		45		60		90		120	
PBST	P	1.179	1.200	1.253	1.295	1.359	1.365	1.496	1.465
	N	0.175	0.180	0.196	0.193	0.223	0.207	0.243	0.233
	P/N	6.737	6.667	6.393	6.710	6.094	6.594	6.156	6.288
0.5% FBS PBST	P	1.063	1.146	1.177	1.171	1.321	1.285	1.449	1.369
	N	0.175	0.181	0.191	0.188	0.218	0.215	0.239	0.234
	P/N	6.074	6.331	6.162	6.229	6.060	5.977	6.063	5.850
0.5% 脱脂乳 PBST	P	0.928	0.945	1.022	1.036	1.183	1.153	1.269	1.262
	N	0.146	0.140	0.160	0.159	0.195	0.182	0.193	0.190
	P/N	6.356	6.750	6.388	6.516	6.067	6.335	6.575	6.642
1% PEG8,000 PBST	P	1.095	1.184	1.195	1.185	1.383	1.332	1.462	1.454
	N	0.197	0.207	0.224	0.217	0.270	0.275	0.291	0.291
	P/N	5.558	5.720	5.335	5.461	5.122	4.844	5.024	4.997

表 4-16 酶标二抗最佳孵育时间的选择

Table 4-16 Determination of optimal HRP-Pig-Anti-Goat IgG incubation time

血清	二抗孵育时间 (min)				
	30	45	60	90	120
P	0.725	0.846	0.981	1.245	1.367
N	0.144	0.164	0.187	0.218	0.256
P/N	5.035	5.159	5.246	5.711	5.340
P	0.709	0.824	0.991	1.205	1.349
N	0.138	0.159	0.177	0.213	0.269
P/N	5.138	5.182	5.599	5.657	5.015
P	0.732	0.847	1.002	1.240	1.413
N	0.131	0.158	0.175	0.216	0.250
P/N	5.588	5.361	5.726	5.741	5.652
$\Delta P/N$	5.253	5.234	5.524	5.703	5.336

表 4-17 底物作用最佳时间的选择

Table 4-17 Selection of optimal time for substrate action

血清	底物作用时间 (min)				
	5	10	15	20	30
P	0.521	0.950	1.250	1.557	2.013
N	0.102	0.153	0.214	0.297	0.402
P/N	5.108	6.209	5.841	5.242	5.007
P	0.536	0.850	1.140	1.490	2.120
N	0.099	0.149	0.192	0.272	0.410
P/N	5.414	5.705	5.938	5.478	5.171

续表 4-17 底物作用最佳时间的选择

血清	底物作用时间 (min)				
	5	10	15	20	30
P	0.527	0.886	1.168	1.589	2.123
N	0.101	0.152	0.215	0.280	0.425
P/N	5.218	5.829	5.433	5.675	4.995
$\Delta P/N$	5.247	5.914	5.737	5.465	5.058

4.3.2.2 P36 间接 ELISA 临界值

用建立的 P36 蛋白间接 ELISA 方法检测已经确定为 Mhp 阴性血清 84 份, Mhp 阳性血清 43 份, 测定其 OD_{450nm} 值, 计算 S/P 值并使用 ROC 标准曲线进行分析。结果显示, 当 S/P 值为 0.157 时, 敏感性和特异性的和最大, 即为 cut-off 值。S/P 值低于 0.157 时判定为阴性, 高于 0.157 判定为阳性。结果见表 4-18、4-19。

表 4-18 临界值的确定

Table 4-18 Determination of critical values

已知阴性血清 S/P 值							
0.276	0.169	0.187	0.147	0.171	0.283	0.164	0.209
0.179	0.225	0.260	0.161	0.325	0.129	0.140	0.161
0.140	0.149	0.256	0.347	0.178	0.354	0.142	0.143
0.131	0.333	0.181	0.116	0.286	0.153	0.131	0.155
0.187	0.136	0.235	0.220	0.248	0.206	0.178	0.293
0.273	0.152	0.164	0.127	0.344	0.120	0.153	0.160
0.157	0.161	0.149	0.115	0.184	0.144	0.124	0.233
0.350	0.127	0.316	0.184	0.330	0.106	0.134	0.145
0.179	0.195	0.197	0.145	0.180	0.198	0.127	0.150
0.259	0.167	0.151	0.249	0.104	0.304	0.347	0.168
0.165	0.166	0.150	1.533				

表 4-19 临界值的确定

Table 4-19 Determination of critical values

已知阳性血清 S/P 值								
0.671	0.555	0.555	0.473	0.544	0.651	0.790	0.548	0.790
0.436	0.510	0.418	0.461	0.539	0.596	0.632	0.735	0.998
0.407	0.503	0.563	0.569	0.616	0.512	0.591	0.506	0.581
0.538	0.517	0.525	0.538	0.487	0.473	0.460	0.547	
0.410	0.658	0.761	0.513	0.462	0.546	0.403	1.138	

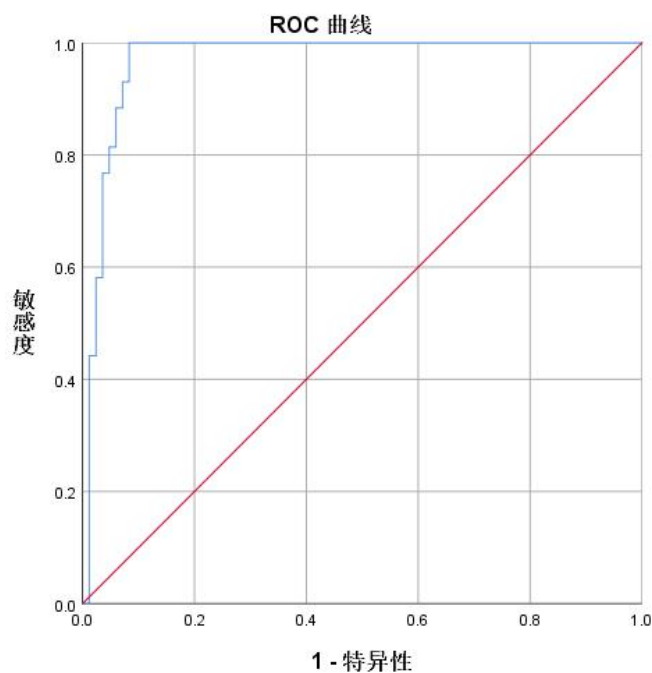


图 4-3 ROC 标准曲线

Fig. 4-3 The ROC the standard curve

4.3.2.3 P36 间接 ELISA 灵敏性试验结果

灵敏性试验结果表明，标准阳性血清稀释度为 1:3200 时 OD_{450nm} 值仍在 0.3 之上，灵敏性可达到 1:3200（图 4-4），灵敏性良好。

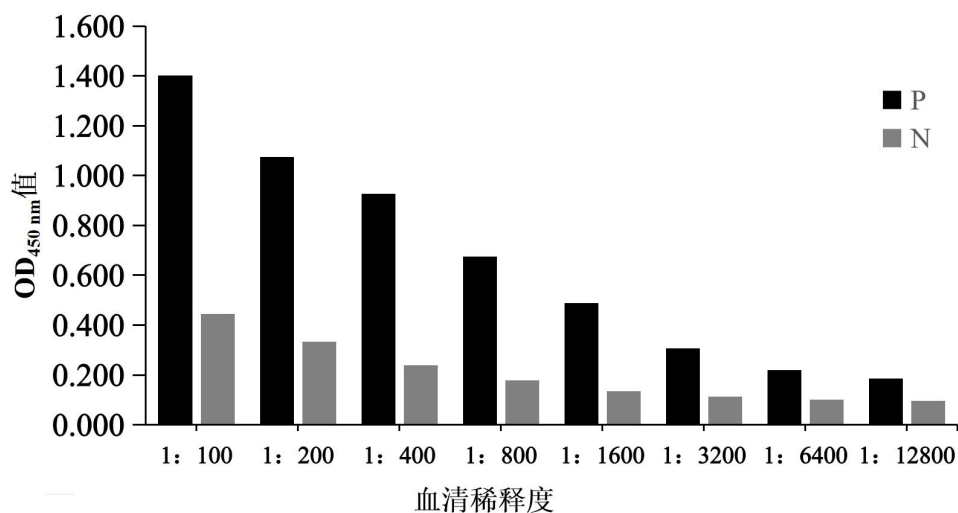


图 4-4 P36 蛋白间接 ELISA 灵敏性试验结果

Fig. 4-4 Results of in-direct ELISA sensitivity test for P36 protein

4.3.2.4 P36 间接 ELISA 重复性试验结果

P36 蛋白批间重复性试验结果显示, 6 份血清变异系数均在 10%以内 (表 4-11), 表明该检测方法批间重复性良好。

表 4-20 批内重复试验结果

Table 4-20 Repeated test result sin batch

检测样本	孔 1	孔 2	孔 3	OD 均值	标准差	CV%
阳性血清	0.934	0.930	0.922	0.929	0.006	0.658
阴性血清	0.122	0.126	0.112	0.120	0.007	6.009
样本 1	0.098	0.093	0.099	0.097	0.003	3.325
样本 2	0.195	0.184	0.181	0.187	0.007	3.949
样本 3	0.589	0.597	0.535	0.574	0.034	5.879
样本 4	0.303	0.307	0.300	0.303	0.004	1.158

P36 蛋白批内重复性试验结果显示, 6 份血清变异系数均在 10%以内 (表 4-11), 表明该检测方法批内重复性良好。

表 4-21 批间重复试验结果

Table 4-21 Repeated test results between batches

检测样本	板 1 均值	板 2 均值	板 3 均值	OD 均值	标准差	CV%
阳性血清	0.929	1.049	0.947	0.975	0.064	6.581
阴性血清	0.120	0.119	0.115	0.118	0.005	4.484
样本 1	0.097	0.095	0.102	0.098	0.005	4.793
样本 2	0.183	0.171	0.163	0.173	0.010	5.567
样本 3	0.574	0.571	0.559	0.568	0.021	3.663
样本 4	0.303	0.333	0.356	0.331	0.023	6.975

4.3.2.5 P36 间接 ELISA 特异性试验结果

按照本研究建立的 P36 蛋白间接 ELISA 检测方法检测 Mhr、HPS、SS、PEDV、APP、PM 和 PRRSV 的阳性血清, 根据建立的 cut-off 值判断结果, 以上血清均为阴性, 该检测方法具有良好的特异性。

4.3.2.6 P36 间接 ELISA 临床样本检测结果

用本文中建立的 P36 蛋白间接 ELISA 检测方法和 IDvet 猪肺炎支原体竞争 ELISA 抗体检测试剂盒, 同时对 369 份临床血清进行检测, 商品化试剂盒检测结果显示阳性样品 110 份, 阴性样品 261 份; 本研究初步建立的 P36 蛋白间接 ELISA 检测方法的检测结果为阳性样品 142 份, 阴性样品 227 份, 计算后该方法与 IDvet Mhp 抗体检测试剂

盒的阳性符合率为 84.54%，阴性符合率为 81.08%，总符合率为 82.11%（表 4-22）。

表 4-22 符合率试验结果
Table 4-22 Conformity test results

		IDvet Mhp 抗体检测试剂盒		
		110 份阳性	259 份阴性	总数
间接 ELISA	阳性	93	49	142
	阴性	17	210	227
总数		110	259	369
符合率（%）		84.54	81.08	82.11

4.4 讨论

MPS 目前已经是全球公认的主要猪病之一，对于其感染源 Mhp 秉持早发现，早净化的策略。血清学抗体检测中的 ELISA 检测方法因其操作简单、灵敏度高、特异性强，是国际上广泛应用的猪 Mhp 血清学抗体检测手段，并且针对 Mhp 抗体研发了多种检测试剂盒。但是进口试剂盒价格昂贵，对于养殖户来说会产生较重的经济负担，难以应用到实际中，相较于进口试剂盒而言国产检测试剂盒的种类较少且缺乏较高可靠性。

目前，通过研究特异性蛋白而建立检测 Mhp 的方法是目前抗体诊断研究的热点，本研究通过利用前期构建表达纯化的 Mhp 免疫原蛋白 Mhp378 蛋白和 P36 蛋白，建立了 Mhp 间接 ELISA 抗体检测方法。其中，基于 Mhp378 蛋白建立的间接 ELISA 抗体检测方法检测结果与 IDvet 试剂盒检测结果相比较，阳性符合率为 89.32%，阴性符合率为 88.93%，总符合率为 89.09%。样本存在不符合的情况，推测原因可能在于猪群感染 Mhp 后产生针对不同蛋白的抗体的时间不一致，单一的蛋白可能无法完全检测不同时期感染 Mhp 感染的猪只。此外，由于 Mhp378 和 P36 蛋白都是经由大肠杆菌原核表达后纯化的，其中一些大肠杆菌的蛋白无法完全去除，利用这样纯化出来的蛋白会与感染大肠杆菌的猪只血清发生反应导致出现假阳性。目前国内暂时没有利用 Mhp378 蛋白建立间接 ELISA 抗体检测方法的相关数据，本研究为研发基于 Mhp378 蛋白的间接 ELISA 试剂盒奠定了理论基础。基于 P36 蛋白建立的 Mhp 间接 ELISA 检测方法的临床检测结果与 IDvet 试剂盒检测结果比较，阳性符合率为 84.54%，阴性符合率为 81.08%，总符合率为 82.11%，相较于祝永琴^[20]等利用毕赤酵母表达 P36 蛋白建立方法的 ELISA

检测方法，本实验采用大肠杆菌表达的 P36 蛋白建立的检测方法优化了时间和血清的使用，检测所用时间更短，灵敏性更高，但是因为比较所用的试剂盒不同，符合率无法确定是否有所提高。

与商品化的试剂盒相比，本实验建立的间接 ELISA 检测方法还有很多不足，在检测时间和实验条件上还有很大的优化空间。本实验中对基于 Mhp378 蛋白和 P36 蛋白的 Mhp 间接 ELISA 抗体检测的初步探索，为之后研发新型、可靠的 Mhp 快速诊断技术奠定了基础。

4.5 小结

建立了基于 Mhp378 蛋白和 P36 蛋白的猪肺炎支原体抗体间接 ELISA 检测方法，该方法重复性、灵敏性良好，与商品化试剂盒的符合率均在 80%以上。

第 5 章 抗猪肺炎支原体 Mhp378、P36、P65、P97CR1 蛋白单抗的制备及鉴定

血清学检测方法因操作简便、灵敏度高、可高效处理大量样本以及便于标准化等优点，常是诊断 Mhp 的首选工具。然而，以全菌蛋白为包被抗原的血清学检测方法易与相关支原体属发生交叉反应，影响其特异性。因此，深入研究 Mhp 特异性蛋白质的生物特性和作用机制，进而构建高特异性的检测方法，是攻克此难题的可行途径。单一蛋白的检测方法中，存在部分表达重组蛋白宿主自身的蛋白，对于 Mhp 的特异性检测可能存在干扰。检测病原抗体的方法中，标准的单克隆抗体能有效防止包被抗原被非特异性杂质干扰，保证其检测的特异性。本研究用获得的 Mhp-1 全菌和以纯化的 Mhp378、P36、P65、P97CR1 蛋白制备单克隆抗体，期望能用于建立一种检测猪肺炎支原体特异性抗体的方法。

5.1 试验材料

5.1.1 试验动物、菌株和细胞系

4-6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华生物技术有限公司；猪肺炎支原体 Mhp-1 株、Mhp378 蛋白、P36 蛋白、P65 蛋白、P97CR1 蛋白、SP2/0 骨髓瘤细胞均由本实验室保存。

5.1.2 主要试剂

主要试验试剂见表 5-1。

表 5-1 主要试验试剂与耗材

Table 5-1 Main experimental reagents and consumables

试剂名称	规格型号	公司
HRP 标记山羊抗小鼠 IgG	ZB-2305	北京中杉金桥生物公司
ProteinA+G Agarose	HZ1012-1	汇研生物技术公司
SBA Clonotyping System-HRP 抗体亚类鉴定试剂盒	5300-05	美国 Southern Biotech 公司
胎牛血清	F8687-500 mL	德国 Sigma 公司
Hybridoma Feeder 添加因子	CM2001	北京博奥龙公司

续表 5-1 主要试验试剂与耗材

试剂名称	规格型号	公司
Polyethylene glycol solution	P7181-5X5ML	德国 Sigma 公司
Pen Strep	15140-122	美国 Gibco 公司
HAT 培养基添加剂	H0262-10VL	德国 Sigma 公司
HT 培养基添加剂	H0137-10VL	德国 Sigma 公司
弗氏不完全佐剂	F5881-10ML	德国 Sigma 公司
弗氏完全佐剂	F5506-10ML	德国 Sigma 公司

其余试剂参照 3.2.1。

5.1.3 主要仪器设备

主要仪器见表 5-2。

表 5-2 仪器

Table 5-2 Instrument

仪器名称	规格型号	公司
生物安全柜	1389	美国 Thermo 公司
二氧化碳培养箱	3111	美国 Thermo 公司
水平离心机	Allegra X-22R Centrifuge	美国贝克曼库尔特有限公司
三孔电热恒温水槽	DK-8D	上海一恒科学仪器有限公司
光学倒置显微镜	AE2000	麦克奥迪实业集团有限公司

5.1.4 主要溶液及配制

小鼠腹水纯化试剂平衡液（0.02 M PB、0.15M NaCl，pH7.0-7.4）；洗脱液（0.1 M Glycine-HCl，pH2.7）；中和液（1.0 M Tris-HCl，pH9.0）；碳酸盐缓冲液和 2M 硫酸终止液配制方法同 4.1.2。

5.2 试验方法

5.2.1 抗原 Mhp-1 株全菌蛋白的制备

将 500 mL 猪肺炎支原体 Mhp-1 株培养物于 3,000 r/min 离心 10 min 去除杂质，再使用 12,000 r/min 的条件下，离心 30 min，弃去上清，收集菌体。将菌体沉淀使用无菌的 PBS 缓冲溶液重悬起来，12,000 r/min，离心 30 min，重复此步骤 3 次。使用 2mL PBS 缓冲液将菌体重悬起来，超声破碎后作为免疫原。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒

测定蛋白浓度，-20℃保存备用。

5.2.2 小鼠的免疫

将制备好的 Mhp378、P36、P65、P97CR1 蛋白和猪肺炎支原体 Mhp-1 全菌蛋白分别使用 PBS 稀释至 1 mg/mL，按照体积比 1:1 比例与弗氏完全佐剂混合后充分乳化后，取上述抗原对 4-6 周龄雌性 BALB/c 小鼠分别进行免疫，分别记录小鼠编号为鼠 A、鼠 B、鼠 C、鼠 D，鼠 E，免疫方式为小鼠背部皮下多点注射，每只小鼠 100 μ g，同时设置空白组鼠 N。免疫 14 d 后将制备好的 Mhp378、P36、P65、P97CR1 蛋白和猪肺炎支原体 Mhp-1 全菌蛋白分别使用 PBS 稀释至 1 mg/mL，按照体积比 1:1 比例与弗氏不完全佐剂混合后充分乳化后重复免疫一次，免疫剂量与第一次免疫相同，在完成两次免疫一周后，通过尾静脉采血对小鼠产生的抗体效价进行评估，若血清中的抗体效价高于 1:10,000，则可以进行细胞融合，若效价没有达到需再次加强免疫直到达到效价。在进行细胞融合前 5 d，对小鼠进行一次加强免疫。

5.2.3 小鼠免疫效价检测

检测方法参考 4.2.1.1。

5.2.4 SP2/0 骨髓瘤细胞的准备

状态良好 SP2/0 细胞是细胞融合成功率的关键。在进行细胞融合前，提前复苏冻存的 SP2/0 细胞。融合当天选择生长状态最好的 SP2/0 细胞，用无血清 1640 培养基进行洗涤计数后，置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱备用。

5.2.5 准备饲养细胞

融合前选用未经免疫 BALB/c 品系雌性小鼠，实施眼内采血获取阴性对照血清。采用颈椎断离法处死小鼠后，浸泡于酒精中进行灭菌处理 5-10 min。取出小鼠，以腹部朝上的姿势固定于解剖板上，利用灭菌剪刀沿腹中线剪开皮肤，充分暴露腹部。用 5 mL 注射器向腹腔中注入 1640 基础培养基，反复吹打几次，将腹腔内的培养液吸出，加入含有 1% 双抗、1% HAT、20% FBS 的完全培养基（HAT 培养基）40 mL 中，重新

吸取 1640 基础培养基后，重复此步骤 2 次。将获得的饲养细胞混匀按照每孔 100 μL ，铺于 5 个 96 孔细胞培养板，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度细胞培养箱中过夜。

5.2.6 制备脾细胞

将达到效价的小鼠实施眼内采血获取阳性对照血清后，采用颈椎断离法处死小鼠，浸泡于酒精中进行灭菌处理 5-10 min。取出小鼠，固定于解剖板上，在无菌的条件下，使用高压灭菌的剪刀镊子依次剪开腹部皮肤、腹膜（每剪开一层需更换一副剪刀镊子），使腹腔充分暴露，取出小鼠腹腔左侧脾脏。

将脾脏置于含有 5 mL 用 1640 基础培养基的无菌培养皿中，剪去脾脏上的筋膜，脾脏转移至含有滤网和 10 mL 1640 基础培养基的无菌培养皿中，并将脾脏剪成多块，使用无菌注射器研磨。将过滤网后的脾细胞悬液用 1640 基础培养基洗涤后 1,000 r/min 离心 5 min，洗涤 2 次。用 1640 基础培养基再次悬浮细胞后计数，获得 10 mL 细胞浓度为 1×10^7 个/mL 的细胞悬液。

5.2.7 细胞融合

（1）于 50 mL 离心管内，按照 1:5 配比混合 SP2/0 细胞和免疫脾细胞，随后用 1640 基础培养基进行洗涤，1,000 r/min，离心 5 min，弃去上清，重复 2 次。

（2）指尖轻轻敲击离心管底部，使细胞松散，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下加入 1 mL PEG，同时缓慢旋转离心管并搅拌，注意 PEG 要在 1 min 加完，速度不能太快，随后 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 90 s。

（3）将提前预热好的 37 $^{\circ}\text{C}$ 1640 基础培养基沿着管壁缓慢加入离心管中，边加边转动离心管，第一分钟和第二分钟逐滴滴入 1 mL；第三分钟 2-3 mL；第四分钟加入 5 mL，边加边缓慢摇晃，10 min 时加入 1640 基础培养基至 20 mL，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5-8 min。

（4）离心管 800 r/min，离心 5 min，弃去上清，轻轻敲击管壁，使细胞松散，缓慢加入 HAT 培养基至 50 mL，混匀后按照每孔 100 μL 铺于饲养细胞上，最后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度细胞培养箱中过夜。

（5）细胞融合次日，检查是否污染，培养至第五天，观察细胞团形成情况，第七天进行半量换液，移除 80 μL HAT 培养基，补充 100 μL HT 培养基。

(6) 约 50%-60%细胞培养孔颜色变黄可进行检测。

5.2.8 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

在细胞融合成功后，以间接 ELISA 检测方法检测细胞上清，检测为阳性的杂交瘤细胞采用细胞有限稀释法进行亚克隆，三次亚克隆后检测仍为阳性杂交瘤细胞株进行扩大培养后液氮保存。

5.2.9 单抗亚类的鉴定

在进行单抗亚类鉴定前，提前将 SBA Clonotyping System-HRP 抗体亚类鉴定试剂盒从冰箱拿出恢复至室温。具体操作步骤参照 4.2.1.1 进行，试验使用 CBS 缓冲液稀释捕获抗体至 10 $\mu\text{g/mL}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育，封闭液使用 5% 脱脂乳，一抗为含有单克隆抗体的杂交瘤细胞培养上清。二抗为 HRP 标记的单抗鼠抗体（IgG、IgG1、IgG2b、IgG2a、IgG3、IgM、IgA、 κ 链、 λ 链）。

5.2.10 腹水的制备

在接种杂交瘤细胞前，预先给 8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠腹腔注射弗氏不完全佐剂致敏。7 d 后调整细胞浓度至 $2 \times 10^5/\text{mL}$ ，对小鼠进行腹腔内注射，每只注射 0.5 mL 细胞悬液。每天观察到小鼠腹部情况，若腹部明显膨大，即可采用注射器收集腹水。

5.2.11 腹水的纯化

选用 Protein G Focurose 4FF，1 mL 亲和层析柱进行纯化。具体方法如下：

(1) 先将腹水过一遍 0.45 μm 滤膜，然后用超滤管对其进行缓冲液置换，将腹水的缓冲液置换为平衡液。

(2) 为避免引入气泡，采用液滴对液滴的方式将柱子连接到注射器上。

(3) 用去离子水以 1 mL/min 的流速冲洗 5 mL。

(4) 用平衡液以 1 mL/min 的流速冲洗 10 mL。

(5) 将样品以 0.2 mL/min 流速上样，将洗脱下的液体反复上样 3-5 次；

(6) 用平衡液以 1 mL/min 的流速冲洗 10-15 mL，流速不宜太快，避免过度洗脱

产量太低。

(7) 用洗脱液洗脱 10 mL，将洗脱下来的样品用中和液将值调到中性。

(8) 洗脱结束后，用去离子水以 1 mL/min 的流速冲洗 5 mL，再用 20% 乙醇以 1 mL/min 流速冲洗 5 mL 后，置于 4 °C 条件下保存柱子。

(9) 提取的单抗经 SDS-PAGE 鉴定纯度后，分装保存于 -20 °C 供日后使用。

5.2.12 效价检测

参照建立的间接 ELISA 检测方法，利用纯化的蛋白作为包被抗原，使用 SP2/0 细胞培养上清和 SP2/0 细胞制备的腹水阴性对照，将杂交瘤细胞培养上清和制备好的腹水倍比稀释后作为一抗进行检测，测定抗体效价。

5.2.13 单抗免疫反应性鉴定

(1) 将纯化重组蛋白、大肠杆菌 pET28a 空载体、猪肺炎支原体 Mhp-1 株全菌蛋白进行 SDS-PAGE 电泳然后使用半干转膜仪转移到 PVDF 膜。

(2) 加入 5% 的脱脂乳室温封闭 1 h，PBST 洗涤 3 次，每次 5 min。

(3) 加入 PBST 稀释的腹水 4 °C 孵育 16 h，PBST 洗涤 3 次，每次 5 min。

(4) 加入 HRP 标记的山羊抗鼠抗体，室温孵育 1 h 后，PBST 洗涤 3 次，每次 5 min。

(5) 使用增强型 HRP-DAB 显色液，避光显色 5 min，加入纯水终止反应，晾干后，观察试验结果。

5.3 试验结果

5.3.1 小鼠效价检测

免疫小鼠在三免后进行抗体效价检测，结果显示重组蛋白免疫小鼠血清稀释比例为 1: 20,000 时 OD_{450nm} 值大于 1.0，且远高于未进行免疫的阴性小鼠血清（鼠 N）OD_{450nm} 值，Mhp-1 全菌蛋白免疫小鼠血清稀释比例为 1: 20,000 时 OD_{450nm} 值远小于 1.0，与重组蛋白免疫小鼠血清测定相比较，全菌体蛋白免疫小鼠血清效价上升较慢。

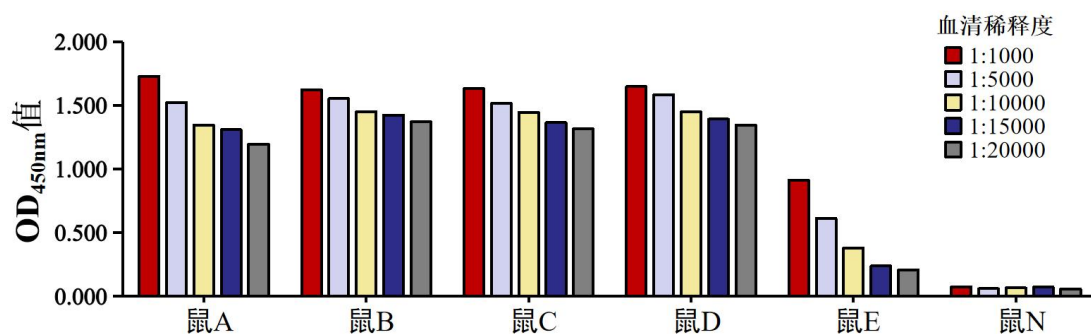


图 5-1 小鼠免疫效价结果

Fig. 5-1 Mouse immune titer results

5.3.2 杂交瘤细胞株的建立

取达到效价的免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞按照常规方法进行细胞融合，将经 ELISA 抗体检测为阳性的 96 孔板中的杂交瘤细胞进行亚克隆，3 次亚克隆后没有筛选出能分泌针对 Mhp378、P36 和 P97CR1 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞，仅筛选出四株能与 P65 蛋白和 Mhp-1 全菌蛋白反应的阳性杂交瘤细胞株，分别命名为 A15、A22、A23、A24。

5.3.3 单抗亚型鉴定

经抗体亚型鉴定试剂盒鉴定，结果显示筛选出的单克隆抗体重链有 3 种亚类，分别为 IgG1、IgG2a、IgG3，轻链均为κ链（表 5-3）。

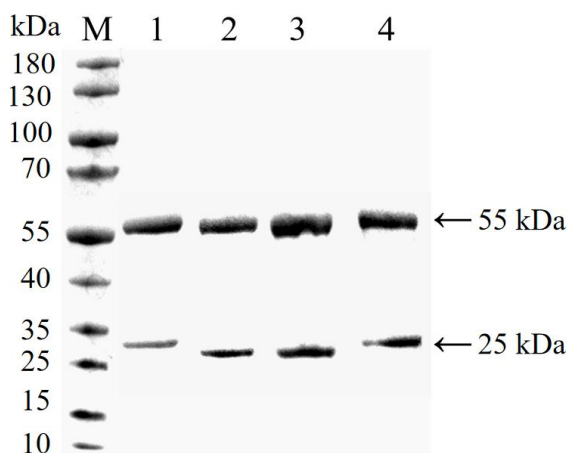
表 5-3 抗体亚型鉴定结果

Table 5-3 Result of subtype identification

单抗亚型	单抗亚型鉴定							
	A15		A22		A23		A24	
IgM	0.089	0.074	0.13	0.094	0.099	0.097	0.09	0.105
λ链	0.072	0.066	0.101	0.07	0.066	0.08	0.071	0.071
IgA	0.071	0.066	0.093	0.082	0.075	0.109	0.076	0.077
κ链	1.411	1.309	1.652	1.777	1.359	1.652	4.063	4.094
Ig	0.66	0.613	1.16	1.226	0.845	0.92	2.216	2.246
IgG1	0.077	0.066	0.122	0.151	3.867	3.681	0.147	0.136
IgG3	2.113	1.929	0.116	0.116	0.083	0.075	3.869	3.808
IgG2a	0.1	0.081	3.522	3.535	0.086	0.082	0.093	0.099
IgG2b	0.077	0.077	0.16	0.16	0.082	0.095	0.104	0.107

5.3.4 腹水纯化结果

单抗腹水经亲和层析法纯化后经过 SDS-PAGE 检测，A15、A22、A23、A24 在 55 kD 和 25 kD 大小左右出现两条条带（图 5-2）。



注：M：蛋白 Marker；1：A15MAbs；2：A22MAbs；3：A23MAbs；4：A24MAbs。

Note: M: Protein Marker; 1:A15MAbs; 2:A22MAbs; 3:A23MAbs; 4:A24MAbs.

图 5-2 纯化 MAbs 的 SDS-PAGE 分析

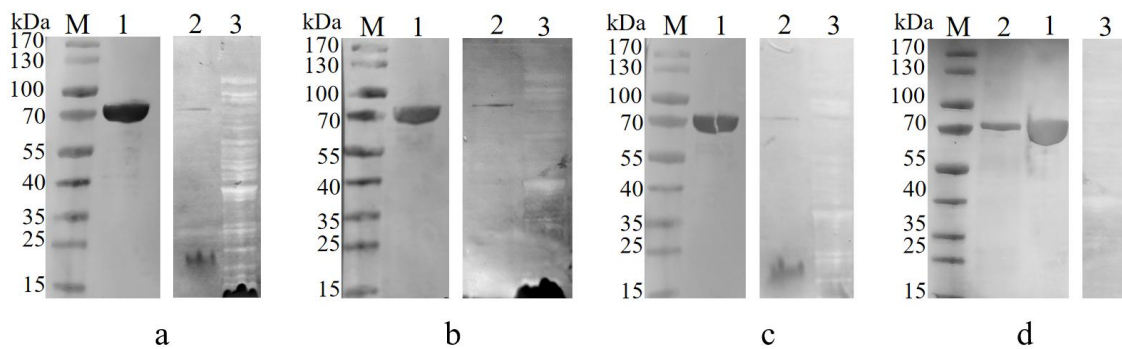
Fig. 5-2 SDS-PAGE analysis of purified MAbs

5.3.5 效价检测

采用间接 ELISA 法测得 A15、A22、A23、A24 杂交瘤细胞培养上清与 P65 蛋白反应抗体的效价分别为 $1:1.6 \times 10^3$ 、 $1:1.6 \times 10^3$ 、 $1:2 \times 10^3$ 、 $1:3.2 \times 10^3$ ；腹水效价分别为 $1:6.4 \times 10^3$ 、 $1:6.4 \times 10^3$ 、 $1:1.28 \times 10^5$ 、 $1:1.28 \times 10^5$ 。

5.3.6 单抗免疫反应性鉴定

将四株单克隆抗体进行 Western blot，结果显示均能与 P65 蛋白反应，与 Mhp-1 全菌蛋白在相同位置出现反应条带，且与大肠杆菌 pET28a 空载体的全菌蛋白无反应。



注：a：A15 MAbs 反应；b：A22 MAbs 反应；c：A23 MAbs 反应；d：A24 MAbs 反应；M：蛋白 Marker；1：P65 蛋白；2：Mhp-1 全菌蛋白；3：pET28a 诱导菌。

Note: a:A15MAbs reaction; b:A22MAbs reaction; c:A23MAbs reaction; d:A24MAbs reaction; M:Protein Marker; 1:P65 Protein; 2: Mhp-1 whole bacterial protein; 3: pET28a induced bacteria.

图 5-3 单抗免疫反应性鉴定

Fig. 5-3 Identification of monoclonal antibody immunoreactivity

5.4 讨论

单克隆抗体技术研发至今，在很多领域是非常关键的试验材料，因为其较高的特异性和敏感性，应用广泛，但是其制备过程复杂、周期冗长且预见性差。因此单抗免疫原选择和制备极为重要，纯化后的重组蛋白免疫小鼠可在短期内获得较高的小鼠抗体效价，具有良好免疫原性的抗原，筛选出优质单抗的概率更高。本试验采用分离出的猪肺炎支原体 Mhp-1 株全菌体蛋白和 Mhp378、P36、P65 蛋白作为免疫原，分别进行免疫，但是最后仅筛选出针对 P65 蛋白单克隆抗体，原因可能与细胞融合时 SP2/0 细胞的状态、重组蛋白免疫小鼠融合时的效价以及蛋白的结构有关。此外，原核表达可能会使蛋白表位构象发生改变，重组蛋白可能会与天然蛋白结构不一致，导致获得的单抗可能不与天然的 Mhp 蛋白发生反应，使用猪肺炎支原体 Mhp-1 株全菌蛋白免疫小鼠筛选单抗目的在于希望能筛选出针对 Mhp 天然构象蛋白的抗体。试验中考虑到使用全菌蛋白免疫的小鼠，效价上升缓慢，3 次免疫并没有达到能进行细胞融合的效价，免疫周期可能会拉长，选择 BALB/c 小鼠进行免疫时，优先考虑 4-6 周龄的小鼠。

单抗筛选过程受多种因素制约，免疫蛋白序列、各级结构、免疫蛋白的纯度等都可能影响单克隆抗体的制造和提纯过程等以及筛选出的单抗的性能。因此，在整个制备过程中必须严密关注并妥善处理各个环节，以取得最佳效果。在本实验中因为小鼠

免疫周期较长，为了防止小鼠在免疫过程中死亡，影响实验进程，实验采取分批次免疫，每次免疫多只小鼠。有研究表明皮下注射免疫更容易产生 IgG 类型抗体^[106]，本实验筛选出的四株杂交瘤细胞株，分泌抗体均为 IgG 型， κ 链。

Mhp 血清学抗体检测方法中，阻断 ELISA 检测方法能有效避免杂蛋白干扰，是具有优良特异性的检测方法之一。张悦制备了 P65 的单抗，建立了重组蛋白 P65 作为包被抗原的 Mhp 阻断 ELISA 抗体检测方法^[25]，王宁制备了 P97CR1 单抗，建立了重组蛋白 P97CR1 作为包被抗原的 Mhp 阻断 ELISA 抗体检测方法^[85]，均具有良好的敏感性和特异性，与商品化的试剂盒相比，符合率较高，且特异性更强，能检测到较早的抗体。本实验成功筛选出四株分泌针对 P65 蛋白抗体的阳性杂交瘤细胞 A15、A22、A23、A24，为后续建立 Mhp 阻断 ELISA 检测方法奠定了坚实的基础。

5.5 小结

(1) 成功筛选出 4 株分泌抗猪肺炎支原体 P65 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株，分别命名为 A15、A22、A23、A24。

(2) 经鉴定 A15 和 A24 分泌的单克隆抗体为 IgG3 亚类，A22 为 IgG2a 亚类，A23 为 IgG1，轻链均为 κ 链。

第 6 章 全文结论

(1) 成功分离出一株猪肺炎支原体 Mhp-1 并获得其全基因组序列。基于分离株 Mhp-1 的全基因组序列，对其基因型、毒力基因进行了预测分析。

(2) 成功构建 7 个 Mhp 蛋白重组表达质粒，利用大肠杆菌表达系统诱导表达纯化出相应的特异重组蛋白 Mhp366、Mhp378、P65、P36、P97CR1、NrdF、DnaK。

(3) 建立了基于 Mhp378 蛋白和 P36 蛋白的猪肺炎支原体抗体间接 ELISA 检测方法，该方法重复性好、灵敏性高，与商品化试剂盒符合率均在 80%以上。

(4) 成功筛选出 4 株分泌抗 Mhp P65 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株 A15、A22、A23、A24。经鉴定 A15 和 A24 抗体亚型为 IgG3，A22 为 IgG2a，A23 为 IgG1，轻链均为 κ 链。

参考文献

- [1] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006:254-258.
- [2] 吴移谋. 支原体学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008:203-210.
- [3] RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas[J]. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 1998, 62(4): 1094-1156.
- [4] FRIIS N F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* a survey[J]. Nordisk Veterinaermedicin, 1975, 27(6): 337-339.
- [5] TAVARES B A da R, PAES J A, ZAHA A, et al. Reannotation of *Mycoplasma hyopneumoniae* hypothetical proteins revealed novel potential virulence factors[J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 162: 105344.
- [6] NATHUES H, WOESTE H, DOEHRING S, et al. Herd specific risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning[J]. Acta Vet Scand, 2013, 55(1): 30.
- [7] HERMANN J R, BROCKMEIER S L, YOON K J, et al. Detection of respiratory pathogens in air samples from acutely infected pigs[J]. Can J Vet Res, 2008, 72(4): 367-370.
- [8] 李彦伟, 刘茂军, 武昱孜, 等. 猪肺炎支原体致病机理研究进展[J]. 动物医学进展, 2013, 34(8): 84-88.
- [9] PAN Q, XU Q, LIU T, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* membrane protein Mhp271 interacts with host UPR protein GRP78 to facilitate infection[J]. Mol Microbiol, 2022, 118(3): 208-222.
- [10] 董晓伟, 张建明, 冯晓东. 猪肺炎支原体致病机理及其影响因素[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2014, 34(9): 66.
- [11] SIMIONATTO S, MARCHIORO S B, MAES D, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development[J]. Vet Microbiol, 2013, 165(3-4): 234-242.
- [12] JEONG J, KANG I, KIM S, et al. Comparison of 3 vaccination strategies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Mycoplasma hyopneumoniae*, and porcine circovirus type 2 on a 3 pathogen challenge model[J]. Can J Vet Res, 2018, 82(1): 39-47.
- [13] KIM M F, HEIDARI M B, STULL S J, et al. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment[J]. Infection and Immunity, 1990, 58(8): 2637-2643.
- [14] WISE K S, KIM M F. Identification of intrinsic and extrinsic membrane proteins bearing surface epitopes of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Israel Journal of Medical Sciences, 1987, 23(5): 469-473.
- [15] SCHMIDT J A, BROWNING G F, MARKHAM P F. *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(17): 5790-5798.
- [16] UPTON C, BUCKLEY J T. A new family of lipolytic enzymes?[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1995, 20(5): 178-179.
- [17] CARON J, SAWYER N, BEN ABDEL MOUMEN B, et al. Species-specific monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed p36 cytosolic protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(4): 528-535.
- [18] HALDIMANN A, NICOLET J, FREY J. DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein P36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(2): 317-323.
- [19] FREY J, HALDIMANN A, KOBISCH M, et al. Immune response against the L-lactate

- dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine[J]. Microbial Pathogenesis, 1994, 17(5): 313-322.
- [20] 祝永琴, 冯志新, 刘茂军, 等. 猪肺炎支原体 P36 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(5): 987-992.
- [21] MEENS J, SELKE M, GERLACH G F. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651[J]. Vet Microbiol, 2006, 116(1-3): 85-95.
- [22] MINION F C, LEFKOWITZ E J, MADSEN M L, et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(21): 7123-7133.
- [23] HSU T, ARTIUSHIN S, MINION F C. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(4): 1317-1323.
- [24] ZHANG Q, YOUNG T F, ROSS R F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(3): 1013-1019.
- [25] 张悦. 猪肺炎支原体 P65 蛋白的克隆表达、单克隆抗体制备及阻断 ELISA 抗体检测方法建立[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [26] THACKER E L, THACKER B J, KUHN M, et al. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs[J]. American Journal of Veterinary Research, 2000, 61(11): 1384-1389.
- [27] FENG Z X, SHAO G Q, LIU M J, et al. Development and validation of a SIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection[J]. Vet Microbiol, 2010, 143(2-4): 410-416.
- [28] MEENS J, BOLOTIN V, FRANK R, et al. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array[J]. Vet Microbiol, 2010, 142(3-4): 293-302.
- [29] DING H, ZHOU Y, WANG H. Development of an indirect ELISA for detecting humoral immunodominant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* which can discriminate between inactivated bacterin-induced hyperimmune sera and convalescent sera[J]. BMC veterinary research, 2019, 15(1): 327.
- [30] 周瑶琴, 游凤, 钟杰, 等. 一种快速鉴定猪肺炎支原体免疫显性蛋白抗原的 ELISA 方法的建立[J]. 生物工程学报, 2018, 34(1): 44-53.
- [31] FAGAN P K, DJORDJEVIC S P, EAMENS G J, et al. Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (nrdF) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia[J]. Infection and Immunity, 1996, 64(3): 1060-1064.
- [32] FAGAN P K, DJORDJEVIC S P, CHIN J, et al. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF)[J]. Infection and Immunity, 1997, 65(6): 2502-2507.
- [33] FALAH M, GUPTA R S. Phylogenetic analysis of mycoplasmas based on Hsp70 sequences: cloning of the dnaK (hsp70) gene region of *Mycoplasma capricolum*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(1): 38-45.
- [34] CHOU S Y, CHUNG T L, CHEN R J, et al. Molecular cloning and analysis of a HSP (heat shock protein)-like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Biochemistry and Molecular Biology International, 1997, 41(4): 821-831.
- [35] 王亮, 乔祖健, 李媛, 等. 猪肺炎霉形体 Dnak-P97 融合基因的表达及其产物的生物学活性[J]. 中国

- 兽医科学, 2008(2): 123-127.
- [36] 李媛, 张建华, 王亮, 等. 猪肺炎支原体中国分离株热休克蛋白 Hsp70(Dnak)的全基因克隆及 C 末端基因的表达与免疫活性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2008(3): 169-173.
- [37] 刘茂军, 丁志勇, 刘冬霞, 等. 猪肺炎支原体 DnaK 基因的表达及 ELISA 方法建立[J]. 金陵科技学院学报, 2011, 27(4): 79-84.
- [38] 刘思远, 刘东, 关婉怡, 等. 猪肺炎支原体 168 弱毒菌株 P65-DnaKc 融合蛋白的表达及免疫原性[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(9): 1463-1467.
- [39] FRIIS N. A selective medium for *Mycoplasma suis*[J]. Acta Vet Scand, 1971, 12(3): 454-456.
- [40] 江苏省农业科学研究所畜牧兽医研究室. 猪气喘病病原体——猪肺炎支原体的分离和培养研究[J]. 兽医科技资料, 1978(1): 21-24.
- [41] KAMMINGA T, SLAGMAN SJ, BIJLSMA JJE, et al. Metabolic modeling of energy balances in *Mycoplasma hyopneumoniae* shows that pyruvate addition increases growth rate[J]. Biotechnol Bioeng, 2017, 114(10):2339-2347.
- [42] COOK B S, BEDDOW J G, MANSO-SILVÁN L, et al. Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Vet Microbiol, 2016, 195: 158-164.
- [43] 李石, 李劫, 周霞. 猪肺炎支原体生长培养基的筛选[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(18): 61-63.
- [44] HARASAWA R, KOSHIMIZU K, TAKEDA O, et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction[J]. Molecular and Cellular Probes, 1991, 5(2): 103-109.
- [45] STEMKE G W, PHAN R, YOUNG T F, et al. Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, and *M. hyorhinis* on the basis of amplification of a 16S rRNA gene sequence[J]. American Journal of Veterinary Research, 1994, 55(1): 81-84.
- [46] MATTSSON J G, BERGSTRÖM K, WALLGREN P, et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(4): 893-897.
- [47] STEMKE G W. Gene amplification (PCR) to detect and differentiate *Mycoplasmas* in porcine *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 25(5): 327-330.
- [48] CARON J, OUARDANI M, DEA S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(4): 1390-1396.
- [49] 刘茂军, 李冬梅, 邵国青, 等. 猪肺炎支原体 PCR 鉴定方法的建立[J]. 金陵科技学院学报, 2008(3): 99-101.
- [50] CALSAMIGLIA M, PIJOAN C, TRIGO A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 1999, 11(3): 246-251.
- [51] VERDIN E, SAILLARD C, LABBÉ A, et al. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs[J]. Vet Microbiol, 2000, 76(1): 31-40.
- [52] OTAGIRI Y, ASAI T, OKADA M, et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods[J]. J Vet Med Sci, 2005, 67(8): 801-805.
- [53] STÄRK K D, NICOLET J, FREY J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 543-548.
- [54] KURTH K T, HSU T, SNOOK E R, et al. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine[J]. J Vet Diagn Invest, 2002, 14(6):

- 463-469.
- [55] 张旭, 刘茂军, 邵国青, 等. 猪肺炎支原体巢式 PCR 检测试剂盒的组装及初步应用[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(S1): 328.
- [56] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2020(6): 1-3+8.
- [57] STRAIT E L, MADSEN M L, MINION F C, et al. Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(8): 2491-2498.
- [58] 武昱孜, 靳蒙蒙, 白方方, 等. 猪肺炎支原体 P97 TaqMan-BHQ 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(12): 1268-1272.
- [59] FOUROUR S, FABLET C, TOCQUEVILLE V, et al. A new multiplex real-time TaqMan® PCR for quantification of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare*: exploratory epidemiological investigations to research mycoplasmal association in enzootic pneumonia-like lesions in slaughtered pigs[J]. J Appl Microbiol, 2018, 125(2): 345-355.
- [60] VANGROENWEGHE F, KARRIKER L, MAIN R, et al. Assessment of litter prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in preweaned piglets utilizing an antemortem tracheobronchial mucus collection technique and a real-time polymerase chain reaction assay[J]. J Vet Diagn Invest, 2015, 27(5): 606-610.
- [61] LIU L, LI R, ZHANG R, et al. Rapid and sensitive detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by recombinase polymerase amplification assay[J]. J Microbiol Methods, 2019, 159: 56-61.
- [62] TAKEUTI K L, DE BARCELLOS D E S N, PIETERS M. *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in nylon-flocked and rayon-bud swabs[J]. J Microbiol Methods, 2017, 141: 118-120.
- [63] GOTO Y, FUKUNARI K, TADA S, et al. A multiplex real-time RT-PCR system to simultaneously diagnose 16 pathogens associated with swine respiratory disease[J]. J Appl Microbiol, 2023, 134(11): 263.
- [64] FU S, QU G, GUO S, et al. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 163(7): 845-850.
- [65] LI J, MINION F C, PETERSEN A C, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and convenient detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 29(4): 607-616.
- [66] LIU M J, DU G M, BAI F F, et al. A rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification procedure (LAMP) for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection based on the p36 gene[J]. Genetics and molecular research: GMR, 2015, 14(2): 4677-4686.
- [67] JIN M, DING J, ZHOU Y, et al. StratoLAMP: Label-free, multiplex digital loop-mediated isothermal amplification based on visual stratification of precipitate[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2024, 121(2): e2314030121.
- [68] FELD N C, QVIST P, AHRENS P, et al. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Vet Microbiol, 1992, 30(1): 35-46.
- [69] FREEMAN M J, LOPEZ-OSUNA M, ARMSTRONG C H, et al. Evaluation of the indirect hemagglutination assay as a practical serodiagnostic test for mycoplasmal pneumonia of swine[J]. Vet Microbiol, 1984, 9(3): 259-270.
- [70] KOBISCH M, NICOLET J. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect hemagglutination (IHA) in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection of pigs[J]. Israel Journal of Medical Sciences, 1987, 23(6): 644-646.
- [71] BALKE E, SCHLIESSER T, HEUN E. [Differentiation of swine-*Mycoplasma* by latex-agglutination

- (author's transl)][J]. Zentralbl Bakteriolog Orig A: Medizinische Mikrobiologie Und Parasitologie, 1976, 234(2): 260-264.
- [72] 何正礼, 储静华, 金洪效, 等. 在显微镜下观察微粒凝集反应对猪地方性肺炎的诊断和鉴定猪肺炎支原体的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1980(3): 175-186.
- [73] SORENSEN V, BARFOD K, FELD N C. Evaluation of a monoclonal blocking ELISA and IHA for antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF-pig herds[J]. Vet Rec, 1992, 130(22): 488-490.
- [74] ARMSTRONG C H, FREEMAN M J, SANDS-FREEMAN L, et al. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Can J Comp Med, 1983, 47(4): 464-470.
- [75] FREEMAN M J, ARMSTRONG C H, SANDS-FREEMAN L L, et al. Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination tests[J]. Can J Comp Med, 1984, 48(2): 202-207.
- [76] 胡圣尧, 孟凡云. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2012:48-50.
- [77] BEREITER M, YOUNG T F, JOO H S, et al. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum[J]. Vet Microbiol, 1990, 25(2-3): 177-192.
- [78] ROBERTS D H, LITTLE T W. Serological studies in pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. J Comp Pathol, 1970, 80(2): 211-220.
- [79] OKADA M, ASAI T, FUTO S, et al. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Vet Microbiol, 2005, 105(3-4): 251-259.
- [80] 徐作波, 李九彬, 丁红雷. 猪肺炎支原体检测技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(4): 78-83.
- [81] FANO E, PIJOAN C, DEE S, et al. Longitudinal assessment of two *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays in challenged and contact-exposed pigs[J]. J Vet Diagn Invest, 2012, 24(2): 383-387.
- [82] FENG Z X, BAI Y, YAO J T, et al. Use of serological and mucosal immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P97R1, P46 and P36 in the diagnosis of infection[J]. Vet, 2014, 202(1): 128-133.
- [83] LE POTIER M F, ABIVEN P, KOBISCH M, et al. A blocking ELISA using a monoclonal antibody for the serological detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Res Vet Sci, 1994, 56(3): 338-345.
- [84] LIU M, DU G, ZHANG Y, et al. Development of a blocking ELISA for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection based on a monoclonal antibody against protein P65[J]. J Vet Med Sci, 2016, 78(8): 1319-1322.
- [85] 王宁. 猪肺炎支原体 P97 蛋白的单抗制备及阻断 ELISA 抗体检测方法的初步建立[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [86] TIAN Y, XU Z, WEN Y, et al. Development of an indirect ELISA for detection of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* IgG in naturally infected pathogen-induced convalescent sera[J]. BMC veterinary research, 2021, 17(1): 123.
- [87] SIBILA M, PIETERS M, MOLITOR T, et al. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection[J]. Vet J, 2009, 181(3): 221-231.
- [88] COHEN L M, GRØNTVEDT C A, KLEM T B, et al. A descriptive study of acute outbreaks of respiratory disease in Norwegian fattening pig herds[J]. Acta Vet Scand, 2020, 62(1): 35.

- [89] GARZA-MORENO L, VILALTA C, PIETERS M. Environmental detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in breed-to-wean farms[J]. Res Vet Sci., 2022, 145: 188-192.
- [90] PIETERS, M.G. AND MAES, D. Mycoplasmosis[M/OL]. Diseases of Swine Bacterial Diseases, 2019.863-883.<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/chapter-epub/10.1002/9781119350927.ch56>
- [91] 朱红振. 猪鼻支原体与猪肺炎支原体的鉴别诊断及致病性比较的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020[2023-11-14].
- [92] MAES D, SIBILA M, KUHNERT P, et al. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control[J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65 Suppl 1: 110-124.
- [93] ZONG B, ZHU Y, LIU M, et al. Characteristics of *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain ES-2 Isolated From Chinese Native Black Pig Lungs[J]. Front Vet Sci, 2022, 9: 883416.
- [94] 彭涛, 马梓承, 王宏宇, 等. 猪支原体肺炎弱毒活疫苗与灭活疫苗联合免疫的免疫效果评估[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(3): 284-289.
- [95] MAES D, BOYEN F, HAESBROUCK F, et al. Antimicrobial treatment of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections[J]. Vet J, 2020, 259-260: 105474.
- [96] TACCHI J L, RAYMOND B B A, JAROCKI V M, et al. Cilium adhesin P216 (MHJ_0493) is a target of ectodomain shedding and aminopeptidase activity on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. J Proteome Res, 2014, 13(6): 2920-2930.
- [97] PAES J A, LORENZATTO K R, DE MORAES S N, et al. Secretomes of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* reveal differences associated to pathogenesis[J]. J Proteomics, 2017, 154: 69-77.
- [98] LEAL ZIMMER FMA, PAES JA, ZAHA A, et al. Pathogenicity & virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Virulence, 2020, 11(1):1600-1622.
- [99] WILTON J, JENKINS C, CORDWELL S J, et al. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Mol Microbiol, 2009, 71(3): 566-582.
- [100] PROD'HOMME T, WEBER M S, STEINMAN L, et al. A neuropeptide in immune-mediated inflammation, Y?[J]. Trends in Immunology, 2006, 27(4): 164-167.
- [101] GOMES NETO J C, STRAIT E L, RAYMOND M, et al. Antibody responses of swine following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* and *M. flocculare*[J]. Vet Microbiol, 2014, 174(1-2): 163-171.
- [102] GALLI V, SIMIONATTO S, MARCHIORO S B, et al. Recombinant secreted antigens from *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as a cocktail vaccine enhance the immune response of mice[J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(9): 1370-1376.
- [103] RODRÍGUEZ F, BATISTA M, HERNÁNDEZ J N, et al. Relationship Between Expression of Interleukin-5 and Interleukin-13 by Epithelial Cells and Bronchiolar Changes in Pigs Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. J Comp Pathol, 2016, 154(2-3): 165-168.
- [104] V P, FH F. Polyionic Tags as Enhancers of Protein Solubility in Recombinant Protein Expression[J]. Microorganisms, 2018, 6(2):47.
- [105] KIEFHABER T, RUDOLPH R, KOHLER H H, et al. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation[J]. Biotechnology (N Y), 1991, 9(9): 825-829.
- [106] 张韬. 猪树突状细胞表面分子 CD103 单克隆抗体的制备及其功能验证[D]. 新疆: 新疆农业大学, 2022.