

# 猪肺炎支原体 P46 基因的原核表达与间接 ELISA 方法的建立

沈青春<sup>1,2</sup>, 王芳<sup>2</sup>, 韩明远<sup>2</sup>, 覃青松<sup>2</sup>, 范学政<sup>2</sup>, 杨汉春<sup>1\*</sup>, 宁宜宝<sup>2\*</sup>,

(1. 中国农业大学 农业部人畜共患病重点开放实验室, 北京 100193; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

**摘要:** 猪肺炎支原体是猪喘气病的病原体, 本研究选择猪肺炎支原体 P46 膜蛋白基因亲水区序列进行克隆, 并将其内 3 个编码 Trp 的 TGA 突变成 TGG, 然后再克隆到 pET28a(+) 载体中, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞内实现了高效表达, 表达产物相对分子质量约为 31 ku, 约占菌体总蛋白 35%, 表达形式为包涵体, 通过 Western blotting 证明表达产物与猪肺炎支原体高免血清具有很好的反应原性和特异性。将大肠杆菌表达的猪肺炎支原体 P46 重组蛋白经过洗涤、过柱纯化后, 作为间接 ELISA 包被抗原用于检测猪血清中猪肺炎支原体抗体, 通过对各参数和试剂的优化建立了 rP46-ELISA 方法, 获得了较好的效果, 通过与现有 ELISA 检测方法的比较, 结果表明二者间具有较高的符合率。

**关键词:** 猪肺炎支原体; P46 蛋白; 原核表达; ELISA

中图分类号: S852.62

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)03-0431-07

## Expression of P46 Protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli* and Used for Indirect ELISA

SHEN Qing-chun<sup>1,2</sup>, WANG Fang<sup>2</sup>, HAN Ming-yuan<sup>2</sup>, QIN Qing-song<sup>2</sup>,

FAN Xue-zheng<sup>2</sup>, YANG Han-chun<sup>1\*</sup>, NING Yi-bao<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Zoonosis of Ministry of Agriculture, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Institute of Veterinary Drug Control of China, Beijing 100081, China)

**Abstract:** *Mycoplasma hyopneumoniae* is the agent of enzootic pneumonia of swine. Part of the hydrophilic region of the surface protein P46 of *M. hyopneumoniae* was cloned, and three TGA coding Trp in the ORF of P46 gene were point mutated to TGG. The modified DNA fragment was cloned to vector pET28a(+), and high-efficiency expressed in *E. coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE showed that the target DNA was expressed in inclusion body, the molecular weight of the recombinant protein was 31 kDa, owed 35% of the total proteins. The recombinant protein was proved to be well reacted with the high immune serum against *M. hyopneumoniae* from rabbit specially by western blotting. After wash and purification with Ni<sup>2+</sup> column, the recombinant protein was used as coating antigen of indirect ELISA for detection the antibody against *M. hyopneumoniae* in swine serum. The ELISA detection kit was developed by optimizing the relational parameters and reagents. The further compare detection test indicated the recombinant P46 protein based ELISA was satisfactory and high complicated with the marketable products.

**Key words:** *Mycoplasma hyopneumoniae*; P46 protein; prokaryotic expression; ELISA

收稿日期: 2011-07-26

作者简介: 沈青春(1976-), 男, 湖北麻城人, 副研究员, 博士, 主要从事兽用生物制品的科研和监察工作; E-mail: shenqingchun@ivdc.gov.cn, Tel: 010-62103678

\* 通讯作者: 杨汉春, 教授, E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn; 宁宜宝, 研究员, E-mail: ningyibao@ivdc.gov.cn

猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 是一种引起猪地方性流行肺炎 (Enzootic pneumonia of swine, EPS) 的病原微生物。EPS 在我国常称为猪喘气病, 是猪最主要的支原体疾病, 广泛流行于世界各地, 也是当前难以控制的动物疫病之一。其主要危害是引起猪的生长受阻、饲料转化率大幅下降, 继发引起其他疾病, 特别是继发其他呼吸系统疾病并加重发病症状, 严重影响养猪业的经济效益<sup>[1-2]</sup>。对于该病的血清学检测主要依赖进口的 ELISA 检测试剂盒, 价格十分昂贵, 很难满足国内常规检测的需要。当前国内检测试剂仅有 Mhp 间接血凝检测试剂一种产品, 但由于制造成本较高, 产量低, 检测结果容易受到人员、环境及材料等因素的影响, 很难大面积推广使用。

P46 蛋白是一种 Mhp 具有较强种特异性的膜蛋白, 也是 Mhp 感染早期诱导产生抗体的蛋白之一, 具有很强的免疫原性。P46 基因的 ORF 全长 1 257 bp, 编码 419 个氨基酸, 并含有 3 个由 TGA 编码的色氨酸密码子, 而且均位于亲水区。将 P46 基因中编码色氨酸的 TGA 突变成 TGG 后, 使用其在大肠杆菌中的表达产物作为 ELISA 抗原可以很好地消除其它支原体抗体的干扰, 而且在人工感染后 2 周即可检测到 P46 蛋白抗体, 因此, 使用 P46 基因的表达产物作为抗原很适合用于 Mhp 抗体的早期检测, 是已知抗原蛋白中最为理想的检测抗原<sup>[3-4]</sup>。当前国内外已有很多使用 P46 基因或其表达产物建立 Mhp 检测方法的报道, 包括 PCR<sup>[5]</sup>、nest-PCR<sup>[6]</sup>、RT-PCR<sup>[7]</sup>、间接 ELISA<sup>[3]</sup>、阻断 ELISA 和双夹心 ELISA<sup>[8-9]</sup> 等。

本研究首先通过对 Mhp 232 株的 P46 基因亲水区进行克隆, 并对其内 3 个编码 Trp 的 TGA 密

码子点突变成 TGG 后克隆到表达载体上进行原核表达, 采用 SDS-PAGE 对表达形式和表达量进行检测, 使用 Western Blotting 对表达产物与 Mhp 高免血清的反应原性和特异性进行评价, 为 P46 蛋白的功能和应用研究提供了必要的技术基础。通过对重组蛋白 rP46 进行纯化后, 作为包被抗原建立间接 ELISA 方法, 为研制猪喘气病抗体检测试剂盒做准备。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

猪肺炎支原体 232 株, 由美国 IOWA 州立大学张启敬教授惠赠; *E. coli* BL21 (DE3) 菌株和 pET28a(+) 质粒购于全式金生物技术有限公司; 兔抗 Mhp 高免血清 (琼扩效价 1 : 16) 和猪肺炎支原体间接血凝 (HI) 检测试剂盒, 由本实验室制备保存。IDEXX 猪肺炎支原体抗体 ELISA 检测试剂盒, 购自世纪元亨; 质粒提取试剂盒和核酸回收试剂盒购自 Promega 公司; 限制性内切酶、pSIMPLE-18 EcoR V/BAP Vector 克隆试剂盒、多位点突变试剂盒 (Multipoints mutagenesis kit)、DNA 连接试剂盒购自大连 TaKaRa 生物技术有限公司; 酶标二抗 (羊抗兔和兔抗猪) 均购自 Sigma 公司; Ni-NTA His · Bind Resin 试剂盒购自德国 Merck 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 引物的设计 参照 GenBank 的 Mhp 232 株 P46 基因序列设计引物 P46-BU 和 P46-BD, 引物 5' 端分别引入了 *Hind* III 和 *Bam*HI 酶切位点。突变引物 TBP1、TBP2 和 TBP3 按照突变试剂盒说明书的要求设计。5 条引物的序列见表 1。

表 1 P46 蛋白表达区克隆用引物和突变引物序列

Table 1 The sequence of primers for clone and mutation of the P46 gene

序号 No.	引物名称 Primers	引物序列 Primer Sequence
1	P46-BU	5'-CATGGATCCTCAGATTCTAAACCACAAGCCGAGAC-3'
2	P46-BD	5'-CACAAAGCTTATTACCACCTGCTGGATCTTTGTT-3'
3	TBP1	5'-GATAATCCTCGATGGATTAGTGCCC-3'
4	TBP2	5'-TGCACAAAATAACTGGCTCACTCAGCAAGC-3'
5	TBP3	5'-GTTTATGTCCCAGGATGGAATTATGGAACTGC-3'

1.2.2 猪肺炎支原体 DNA 的提取和 P46 蛋白基因亲水区的克隆 将猪肺炎支原体 232 株接种于 A26 培养基,37 ℃ 静置培养至 pH 6.8 左右,菌体浓度为  $10^8$  CCU · mL<sup>-1</sup>,收获菌液,按照 Futo 等的方法提取 DNA,并将其作为模板,使用 P46-BU/D 引物和高保真酶对 P46 基因的部分亲水区序列进行 PCR 扩增。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 50 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,34 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的说明纯化回收 PCR 产物,测定核酸浓度。使用 pSIMPLE-18 EcoR V/BAP Vector 克隆试剂盒,将 P46 亲水区的 PCR 回收产物连接到 pSIMPLE-18 克隆载体上,并命名为 pS18-P46,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,送 In-vitrogen 北京分公司测序。

1.2.3 对 P46 膜蛋白基因的多点突变及其测序验证 按照突变试剂盒说明书,在 2 个 PCR 反应管中分别对锚定引物和突变引物进行磷酸化,再将其与突变质粒 pS18-P46 一起退火、延伸、连接,再使用 ETail F/R 引物对突变链进行 PCR 扩增、鉴定和回收。对突变 DNA 片段使用 *Hind* III 和 *Bam*H I 进行双酶切后,克隆 pET28a(+) 载体中,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,37 ℃ 过夜培养。挑选单菌落,提取质粒 DNA,酶切鉴定正确后,命名为 pET-P46,送 In-vitrogen 北京分公司测序。

1.2.4 P46 蛋白在大肠杆菌中的表达 将重组质粒 pET-P46 转化受体菌 BL21(DE3),所得基因重组菌命名为 DE-pET-P46。挑取单菌落,接种于含 50  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 卡那霉素的 LB 培养基中,37 ℃ 250 r · min<sup>-1</sup> 培养至 OD<sub>600 nm</sub> 为 1.0 左右,加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol · L<sup>-1</sup>,继续培养 4 h,收集菌体进行 SDS-PAGE 检测。

将 200 mL 经 IPTG 诱导 4 h 的培养物,离心后加入裂解液(50 mmol · L<sup>-1</sup> Tris · Cl,1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA,100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl)20 mL,冻融 2 次后,进行超声波裂解(200 W,超声 10 s,间歇 10 s,共 20 次)。4 ℃ 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 20 min,收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.5 Western blotting 检测 裁剪与凝胶面积一致的 Whatman 滤纸和 NC 膜,恒压 70 V 转印 2 h 转印过夜。用 5% BSA 的 TBS 缓冲液(10 mmol · L<sup>-1</sup> Tris · Cl,150 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl,pH = 7.6)4 ℃ 封闭过夜,洗涤液 PBS-T(TBS 含 0.05%

Tween20)洗膜 3 次。取 8 mL 稀释液,1:500 稀释的兔抗 Mhp 阳性血清,室温轻摇 1 h。再用 PBS-T 洗膜 3 次。8 mL 稀释液 1:5 000 稀释二抗(HR-PO 标记羊抗兔 IgG),室温轻摇 1 h,TBS-Tween20 洗涤 3 次后,在 4-氯-1-萘酚溶液中显色。

1.2.6 重组菌的 IPTG 诱导浓度的优化 挑取重组菌单菌落,接种于 3 mL LB/Kan 液体培养基中,37 ℃ 活化过夜后,0.5% 的接种量接入 7 管 10 mL LB/Kan 液体培养基中,37 ℃、230 r · min<sup>-1</sup> 振荡培养至对数生长期(OD<sub>600 nm</sub> 达到 1.0 左右),分别加入终浓度为 0、0.02、0.05、0.10、0.2、0.5 和 1.0 mmol · L<sup>-1</sup> 的 IPTG,于 37 ℃、230 r · min<sup>-1</sup> 振荡培养 5~6 h,离心收集菌体,进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.7 重组蛋白的纯化 诱导表达 DE-pET-P46 工程菌 200 mL,收集菌体,用裂解缓冲液(50 mmol · L<sup>-1</sup> Tris · Cl,1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA,100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl)洗涤 1 次后重悬。冻融 2 次后,加入终浓度为 100  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 的溶菌酶,冰浴 2 h 后超声波裂解、离心,取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。

用 8 mol · L<sup>-1</sup> 尿素溶解包涵体,离心收集上清,置 4 ℃ 下进行梯度透析和复性后,4 ℃ 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 20 min,取上清。将 1 mL 50% Ni-NTA His · Bind 树脂悬液加入到 4 mL 1 × Ni-NTA 结合缓冲液中,待树脂自然沉降后,用枪头吸去上清。加入 4 mL 复性后的包涵体蛋白溶液混匀,4 ℃ 结合 60 min。将蛋白树脂混合物加入下端封闭的空色谱柱中。除去封闭盖,收集流出液(穿过峰)。以 1 × Ni-NTA 漂洗缓冲液漂洗后,以 1 × Ni-NTA 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。经 SDS-PAGE 电泳分析后,测定蛋白浓度,加入 50% 甘油,-20 ℃ 保存备用。

1.2.8 间接 ELISA 方法的建立 Mhp 阴/阳性参考血清,经 IDEXX Mhp 抗体检测试剂盒和 Mhp HI 抗体检测试剂检测均为阴/阳性,肺支气管拭子的 PCR 结果阴性的猪的血清作为 Mhp 阴/阳性参考血清。

1.2.8.1 ELISA 程序:将重组蛋白 rP46 用包被液稀释,100  $\mu$ L · 孔<sup>-1</sup>,37 ℃ 包被 2 h 后 4 ℃ 过夜。洗涤液洗涤 3 次,3 min · 次<sup>-1</sup>。加入封闭液,150  $\mu$ L · 孔<sup>-1</sup>,37 ℃ 2 h,甩干。参考血清用稀释液适当稀释,100  $\mu$ L · 孔<sup>-1</sup>,37 ℃ 30 min,洗涤同上。用稀释液将 HRP-兔抗猪 IgG 稀释成工作浓度后,100

$\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  30 min, 洗涤同上。每孔加入新配制的底物溶液,  $100\ \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  10 min。每孔加入  $50\ \mu\text{L}$   $2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。使用酶联检测仪测定各孔  $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 。

1.2.8.2 抗原包被浓度和待检血清稀释度的确定: 用包被液将纯化后的 rP46 梯度稀释成 5.0、2.0、1.0、0.5、0.2 和  $0.1\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 96 孔板上每个梯度包被 2 列孔。横向使用 1% BSA 的 PBST 将 Mhp 阳性阴性血清作 1:25、1:50、1:100、1:200 稀释, 作为被检样品, 进行 ELISA 检测, 选择阳性血清  $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$  值在 1 左右, 且阳性  $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$  值/阴性  $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$  值(P/N) 比值最大时的抗原包被浓度和抗体稀释度为最佳工作浓度。

1.2.8.3 封闭液及血清稀释液的选择: 以最适抗原浓度包被酶标板  $37\text{ }^\circ\text{C}$  1 h 后  $4\text{ }^\circ\text{C}$  过夜, 洗涤后, 选择在 PBST 中分别加入 10% 马血清、10% 小牛血清、1% BSA、1% 明胶、5% 脱脂奶粉作为稀释液。 $150\ \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  反应 2 h。进行 ELISA, 在酶联检测仪上读出  $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$  值, 比较各组阴阳性血清的  $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$  值和 P/N 值, 以确定合适的稀释液。

1.2.8.4 阴阳性临界值的确定: 取 88 份间接血凝(HI)试剂盒和 IDEXX 的 ELISA 试剂盒检测为阴性的临床血清, 在最佳抗原包被浓度和血清稀释度的条件下进行检测, 根据公式: 阴阳性临界值 = 阴性样本  $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$  平均值 +  $3 \times$  标准差(s) 计算阴阳性临界值。

1.2.9 对比试验和评价 将 143 份冻存的新鲜猪血清样品分别使用 ELISA(IDEXX) 和本试验制备的 rP46-ELISA 试剂进行检测, 比较 2 种检测试剂的检测结果的符合程度。

## 2 结果

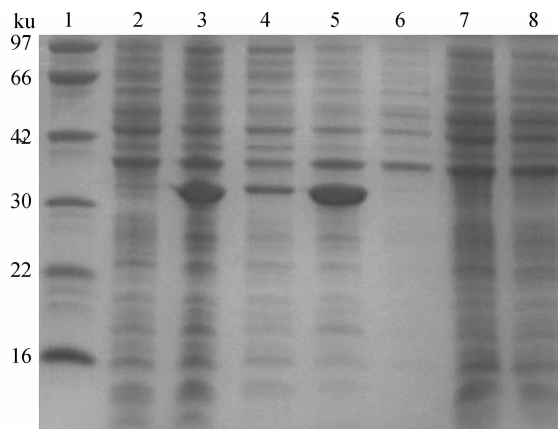
### 2.1 重组质粒 pET-P46 的酶切鉴定和序列分析结果

以 P46 蛋白亲水区序列经过多点突变、扩增、酶切后连接到 pET28a(+) 表达载体的多克隆位点上。用 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切该重组质粒, 电泳检测结果显示, pET-P46 的酶切结果和酶切片段的大小, 均与预期相符。测序结果表明, 3 个 TGA → TGG 突变位点均成功完成突变, ORF 序列翻译的氨基酸序列与预期一致, 推导的表达产物为由 285 个氨基酸组成的融合蛋白, 其中 238 个氨基酸来自 P46 蛋白亲水区。融合蛋白相对分子质量(MW) 估计值为

31.1 ku, 等电点(pI) 估计值为 6.37。

### 2.2 rP46 融合蛋白的表达与纯化

经 SDS-PAGE 电泳结果显示, 重组质粒 pET-P46 在 BL21(DE3) 受体菌中实现了 P46 蛋白的高效表达, 相对分子质量大小与预期相符合, 如图 1。



1. 蛋白质相对分子质量标准; 2. DE-pET-P46 诱导前菌体; 3. DE-pET-P46 诱导后菌体; 4. DE-pET-P46 诱导后裂解上清; 5. DE-pET-P46 诱导后裂解沉淀; 6. DE-pET 裂解沉淀; 7. DE-pET 诱导前菌体; 8. DE-pET 诱导后菌体

1. Protein marker; 2. Cell proteins of DE-pET-P46 before inducement; 3. Cell proteins of DE-pET-P46 after inducement; 4. Supernatant of lysed DE-pET-P46 cell after inducement; 5. Pellet of lysed DE-pET-P46 cell after inducement; 6. Pellet of lysed DE-pET cell; 7. Cell proteins of DE-pET before inducement; 8. Cell proteins of DE-pET after inducement

图 1 rP46 蛋白表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 1 The SDS-PAGE result of P46 expressed in *E. coli*

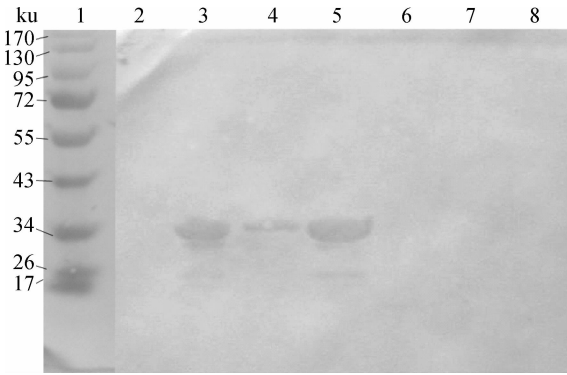
从 SDS-PAGE 电泳图的 2、3 泳道结果看, 基因工程菌 DE-pET-P46 在诱导前后差异明显, 诱导后出现了相对分子质量约为 31 ku 表达产物, 与预计大小相符合, 表达量约占菌体总蛋白 35%, 符合高效表达的要求。电泳图的 4、5 泳道的结果显示表达产物主要集中在裂解沉淀中, 上清中的含量很少, 表明 rP46 的表达形式为包涵体, 而且在沉淀中所占比例约为 80%。6、7、8 泳道的结果显示 DE-pET 空载体对照菌有无 IPTG 诱导, 细胞蛋白水平上没有差异。

### 2.3 Western blotting 结果

将按照图 1 的 SDS-PAGE 电泳图谱相同加样顺序对相同样品进行 SDS-PAGE, 经过转膜后, 进行 Western blotting, 结果图 2。

Western blotting 结果显示, 兔抗猪肺炎支原体高免血清能特异地与重组菌的表达产物带结合, 阳

性反应主要集中在沉淀中,上清中在相同位置也有阳性信号,反应信号强,表明表达产物含有猪肺炎支原体的抗原 P46 部分亲水区序列,而且具有很好的反应原性。



1. 蛋白质相对分子质量标准;2. DE-pET-P46 诱导前菌体;3. DE-pET-P46 诱导后菌体;4. DE-pET-P46 诱导后裂解上清;5. DE-pET-P46 诱导后裂解沉淀;6. DE-pET 裂解沉淀;7. DE-pET 诱导前菌体;8. DE-pET 诱导后菌体

1. Protein marker; 2. Cell proteins of DE-pET-P46 before inducement; 3. Cell proteins of DE-pET-P46 after inducement; 4. Supernatant of lysed DE-pET-P46 cell after inducement; 5. Pellet of lysed DE-pET-P46 cell after inducement; 6. Pellet of lysed DE-pET cell; 7. Cell proteins of DE-pET before inducement; 8. Cell proteins of DE-pET after inducement

图 2 rP46 蛋白表达的 Western blotting 结果

Fig. 2 The Western blotting result of P46 expressed in *E. coli*

## 2.4 IPTG 诱导浓度的优化与重组蛋白的纯化结果

电泳结果显示,当 IPTG 浓度达到  $0.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  及以上即可诱导 DE-pET-P46 重组菌的 rP46 重组蛋白的大量表达,而且表达量没有明显差别,为确保稳定表达,将 DE-pET-P46 重组菌的诱导计量确定为  $0.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

将表达的 rP46 重组蛋白包涵体经洗涤后的产物以及洗涤、溶解后再经 Ni-NTA His · Bind 树脂柱纯化浓缩后的产物分别进行 SDS-PAGE,结果表明包涵体经溶解复性后,再经 Ni-NTA His · Bind 树脂柱过柱纯化,得到较为纯净的 rP46 蛋白,电泳检测几乎不可见杂蛋白带,可用于间接 ELISA 等对蛋白纯度要求较高的检测用抗原。

## 2.5 间接 ELISA 方法条件优化和临界值的确定结果

重组蛋白 rP46 的最佳包被浓度为  $0.5$

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,5%脱脂奶粉作为稀释剂和封闭剂效果最佳。检测结果阳性与阴性参考血清的吸光值  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  比值 P/N 值最高,可达到 5.0。

通过对经 HI 和 ELISA (IDEXX) 检测均为阴性的 88 份猪血清进行检测,确定本试验 ELISA 检测结果的阴阳性判定临界值。当对照组  $\text{P/N} \geq 3.0$  时试验成立,待检血清与对照阳性血清分别减去对照阴性血清  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  值后的比值,表示为 S/P,根据统计学原则,当样品的 S/P 值  $\geq$  阴性样品 S/P 平均值  $+3 \times$  标准偏差时,可以在 99.9% 的水平上判定为阳性。88 份猪阴性血清的 S/P 平均值 = 0.04,标准偏差 = 0.138,因此临界值 =  $0.04 + 3 \times 0.138 = 0.454$ ,临界值取 0.45。即当对照组  $\text{P/N} \geq 3.0$  时试验成立,  $\text{S/P} \geq 0.45$ ,待检血清为阳性,  $\text{S/P} < 0.45$  判为阴性。

## 2.6 对比检测试验结果

使用 IDEXX 的 ELISA 检测试剂盒和 rP46-ELISA 试剂对 143 份猪血清的进行比较检测,检测结果显示, P46-ELISA 的阳性检出率为 28.7% (41/143), IDEXX 的 Mhp ELISA 试剂盒的阳性检出率为 26.5% (38/143),有 15 份血清使用两种试剂检测的结果完全相反。二者的阳性符合率为 84.2% (32/38),阴性符合率为 91.4% (96/105)。可见, rP46-ELISA 方法与 IDEXX 的 Mhp ELISA 试剂盒具有较高的符合率。

## 3 讨论

猪肺炎支原体的检测方法研究主要包括分子生物学方法和血清学方法,在田间应用中仍以血清学检测方法为主。猪支原体肺炎作为一种典型的呼吸道疾病,引起猪咳嗽、喷嚏,并能通过空气传播,猪群中 1 头猪发病就会很快污染整个猪群,在以 PCR、nest-PCR 和 Lamp-PCR 等检测方法进行活体检验时容易出现 100% 阳性的结果,这对疾病诊断没有太大的实际意义。血清学检测方法则直接反应机体的特异性血清抗体水平,对疫病诊断和免疫检测具有很好的参考价值。国内外学者曾使用细胞抗原建立了间接血凝试验 (HI) [10-11] 和 ELISA [12-13] 诊断方法,并在猪肺炎支原体检测和防治中发挥了一定的作用,但由于猪肺炎支原体与猪鼻支原体、絮状支原体等之间共有一些交叉抗原,检测结果存在假阳性问题 [12, 14-15]。随着体外表达技术的发展, Mhp 抗原蛋白的原核表达产物开始作为检测抗原应用于

ELISA 检测方法的建立,当前用于检测的表达抗原包括 P46、P65<sup>[16]</sup>、LDH<sup>[17]</sup>等。

P46 是一种具有较强种特异性的 Mhp 蛋白,而且还是激发机体最早产生特异性抗体的膜蛋白。Assuncao 等将 18 个从西班牙分离的 Mhp 菌株进行 SDS-PAGE 后转膜,分别与抗 P46、P36 和 P97 的单克隆抗体反应,结果发现抗 P46 的单抗可与全部 18 株的 P46 蛋白特异性反应,而仅有 10/18 的菌株与 P36 蛋白单抗反应,而抗 P97 的单抗可与多种不同大小的蛋白反应<sup>[18]</sup>。Futo 等克隆表达了 P46 蛋白,并用表达抗原制备单克隆抗体,建立了双夹心法 ELISA 检测方法,不仅具有特异性,而且能检测出感染后 2 周内的血清阳性样品<sup>[3-4]</sup>。Cheikh 等用 P46 和 P65 蛋白表达抗原制备的单克隆抗体,建立了猪肺炎支原体荧光抗体检测方法<sup>[8, 19]</sup>。因此, P46 蛋白是一种较为理想的 Mhp 的早期血清学诊断抗原标记。

支原体的密码子系统与通用密码子的差别,导致其基因不能在大肠杆菌等宿主中完整表达,当前对 Mhp 蛋白基因进行表达的策略主要包括两种,一种是对目的基因进行点突变,将支原体编码色氨酸的 TGA 突变成通用色氨酸密码子 TGG;第二种是对宿主菌进行改造,使其能对 UGA 通读。前者是目前对单个 Mhp 蛋白基因进行表达的主要方式,国内外许多学者成功实现了 P97、P46、P42、P65、P36 等蛋白的原核表达。第二种策略主要用于 Mhp 的表达文库构建以及载体疫苗的研究。P46 蛋白编码的 419 个氨基酸中含有 3 个 TGA<sup>[18]</sup>,国内覃青松曾用 pMAL-P2X 和 pMAL-C2X 载体实现了 MBP-P46 融合蛋白的可溶性表达,Western blotting 分析表明该融合蛋白具有较好的反应原性,并初步应用于 ELISA 检测<sup>[20-21]</sup>。迟灵芝使用表达载体 pET-32a(+)成功表达了 Mhp 的 P46 基因,融合蛋白相对分子质量约为 63.5 ku,并具有较好的免疫原性<sup>[22]</sup>。

本研究选取 P46 蛋白抗原决定簇比较集中的亲水区序列进行克隆,采用一步法对 3 个 TGA 密码子实施点突变后,克隆到 pET28a(+)表达载体,在 BL21(DE3)受体菌中实现了原核表达。本研究创新之处主要表现在策略上,首先在表达序列上选取了 714 bp 包含 P46 蛋白的抗原决定簇较为集中的区域,并避开了一些稀有密码子,使表达序列长度仅为 855 bp,比较适合于大肠杆菌的高效表达。其

次,采用组氨酸标签(His-tag)作为选择标记,其长度短,在融合蛋白中所占比重小,有利于目的蛋白的大量表达和纯化。由于不存在天然的 His-tag,纯化后的融合蛋白无需切割即可直接用作检测抗原。试验结果表明该融合蛋白以包涵体的形式高效表达,经过裂解、洗涤、纯化后,纯度达 98% 以上,符合间接 ELISA 抗原的纯度要求,Western Blotting 结果表明该蛋白具有很好的反应原性。本研究进一步建立了 Mhp 间接 ELISA 抗体检测方法,并确定了结果判定标准,但还有待对其敏感性、特异性、保存期等进行进一步试验和研究,以期尽快推出稳定、适用的 Mhp 抗体 ELISA 检测试剂盒商品,这将对猪肺炎支原体的防治工作具有十分重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] 沈青春,覃青松. 猪肺炎支原体的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2003, (6): 26-30.
- [2] 刘青海,孙洪升. 猪肺炎支原体的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2005, (6): 12-14.
- [3] FUTO S, SETO Y, OKADA M, et al. Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(3): 680-683.
- [4] FUTO S, SETO Y, MITSUSE S, et al. Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine[J]. *J Bacteriol*, 1995, 177(7): 1915-1917.
- [5] 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]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(4): 1390-1396.
- [6] STARK K D, NICOLET J, FREY J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2): 543-548.
- [7] MAROIS C, DORY D, FABLET C, et al. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs[J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 108(5): 1523-1533.
- [8] CHEIKH S B K, SHARECK F, DEA S. Monoclonal

- antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10 (3): 459-468.
- [9] 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.
- [10] YOUNG T F, ERICKSON B Z, ROSS R F, et al. Hemagglutination and hemagglutination inhibition of turkey red blood cells with *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. *Am J Vet Res*, 1989, 50(7):1052-1055.
- [11] PIJOAN C, BOUGHTON E. Tube agglutination tests with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* [J]. *Br Vet J*, 1974, 130(6):593-598.
- [12] 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.
- [13] KOBISCH M, NICOLET J. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect hemagglutination (IHA) in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection of pigs [J]. *Isr J Med Sci*, 1987, 23(6):644-646.
- [14] DJORDJEVIC S P, EAMENS G J, ROMALIS L F, et al. An improved enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of porcine serum antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. *Vet Microbiol*, 1994, 39(3-4):261-273.
- [15] SCARMAN A L, CHIN J C, EAMENS G J, et al. Identification of novel species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* by preparative SDS-PAGE ELISA profiling [J]. *Microbiology*, 1997, 143 (Pt 2):663-673.
- [16] 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]. *Infect Immun*, 1990, 58 (8): 2637-2643.
- [17] 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]. *J Gen Microbiol*, 1993, 139(2):317-323.
- [18] ASSUNCAO P, DE LA FE C, RAMIREZ A S, et al. Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and immunoblot [J]. *Vet Res Commun*, 2005, 29(7):563-574.
- [19] CARON J, SAWYER N, BEN A M 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.
- [20] 覃青松, 沈青春. 猪肺炎支原体膜蛋白 P46 基因在大肠杆菌中的表达 [J]. *中国预防兽医学报*, 2005, (02):16-19.
- [21] 覃青松, 沈青春. 猪肺炎支原体表面蛋白 P46 基因的克隆与序列比较 [J]. *中国预防兽医学报*, 2004, (04):27-30.
- [22] 迟灵芝, 刘茂军, 冯志新, 等. 猪肺炎支原体 P46 基因的克隆及表达 [J]. *江苏农业学报*, 2008, (03): 288-292.

(编辑 白永平)