



基于脂蛋白 P80 的滑液支原体抗体 ELISA 检测方法的建立及应用

王宇^{1,2}, 李浩然^{1,3}, 温政^{1,4}, 尚原冰¹, 刘婷^{1,4}, 丁铲¹, 高崧², 祁晶晶^{1*}, 于圣青^{1*}

¹ 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

² 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

³ 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036

⁴ 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271099

摘要:【目的】研究滑液支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)脂蛋白 P80 的免疫反应性及其在 MS 血清抗体 ELISA 检测中的应用。【方法】对 MS P80 的氨基酸序列进行生物信息学分析、原核表达和纯化,并用免疫印迹法分析其与 6 种不同 MS 分离株阳性血清的免疫反应性以及与其他禽病原血清的交叉反应性;运用纯化的 MS P80 表达蛋白作为包被抗原建立了 MS 血清抗体的间接 ELISA 检测方法,对其敏感性和重复性进行检测;比较检测了与美国爱德士检测试剂盒对 50 份临床血清样品的阳性符合率。【结果】生物信息学分析预测 MS P80 蛋白为脂蛋白且含有信号肽,其在 MS 种内同源性高达 98%–100%,与其他种属 P80 蛋白同源性在 25%–34%之间,成功表达和纯化了 MS P80 重组蛋白(rMS P80);Western blotting 分析表明纯化的 rMS P80 具有良好的免疫反应性和特异性;运用 rMS P80 建立的 MS 血清 ELISA 抗体检测方法可对不同株 MS 阳性血清进行抗体效价检测,而对其他禽病原阳性血清均无交叉反应性;该检测方法的批内变异系数小于 5%,批间变异系数小于 10%,重复性良好;与美国 IDEXX 检测试剂盒比较,本文建立的 ELISA 抗体检测方法敏感性更高,阳性符合率为 75%,阴性符合率为 89.47%,总样本符合率为 86%。【结论】MS P80 具有较好的免疫反应性、种内保守性和种间特异,并且可用作 MS 抗体检测的靶标抗原。

关键词: 脂蛋白, 滑液支原体, 免疫反应性, 间接 ELISA

滑液支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)是已知禽致病性支原体之一^[1],感染 MS 能导致鸡和火鸡等关节、足垫、腱鞘及气囊发炎,主要表现为关节及足垫肿大,偶尔可见气囊内存在干酪物^[2]。

基金项目: 国家重点研发项目(2017YFD0500705); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2019JB11)

*通信作者。于圣青, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn; 祁晶晶, Tel: +86-21-34293412, E-mail: qjj1011@163.com

收稿日期: 2019-05-20; 修回日期: 2019-09-30; 网络出版日期: 2019-10-21

最新研究报道, 2010–2015 年^[3], 中国 21 个省份总体血清阳性率为 41.19%, 而鸡场阳性率高达 80.99%, 可见我国鸡群感染 MS 的范围之广泛, 形势之严峻。MS 能引起鸡群持续性感染, 造成免疫抑制, 引发其他重要传染病如禽流感、新城疫、传染性支气管炎等病的混合感染, 造成严重经济损失。因此, 在防控其他疾病的同时, 建立和完善 MS 感染的监测和防控机制显得尤为重要。

支原体表面的细胞膜不含脂多糖和肽聚糖, 有大量与革兰氏阳性菌表面脂多糖结构相似的脂质相关蛋白, 而大部分支原体脂蛋白都暴露在外, 作为抗原诱导宿主的免疫反应或发挥毒力作用^[4–5]。在 MS 中, 脂蛋白 MSPB 能诱导宿主体体强烈的免疫应答^[6], 其被证实可以用来作为包被抗原, 建立 MS 血清抗体 ELISA 检测方法, 且特异性和敏感性较好^[7–8]。但 MSPB 具有高频率的抗原变异性^[9–10], 因此有必要筛选 MS 特异性高且保守性好的免疫原性蛋白。本研究前期通过 MS 膜蛋白的免疫蛋白质组学分析筛选到 MS 的免疫原性膜蛋白 MS P80, 通过生物信息学分析预测其为可能的脂蛋白, 接着对其进行了原核表达, 研究了其免疫反应性和与其他禽病原阳性血清的交叉反应性。同时对其在 MS 血清抗体 ELISA 检测中的应用进行了初步探索, 为国内滑液支原体病的诊断提供了可参考的方法。

1 材料和方法

1.1 菌株、细胞与实验动物

MS WVU₁₈₅₃ 菌株、衣阿原支原体(MI) 695 株均购自中国兽医微生物菌种保藏中心(保藏编号: CVCC385、CVCC364); MS JS1 株、SD1 株、SH1 株和 HB1 株均由本实验室保藏; 原核表达载体

pCold I 购自宝生物工程(大连)有限公司; 大肠杆菌 *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; SPF 鸡购自济南斯派福瑞禽业科技有限公司。

1.2 主要材料

MS 标准阳性鸡血清、SPF 鸡阴性血清、鸡毒支原体(MG) 阳性鸡血清、大肠杆菌(EG) O1/O2/O78 鸡阳性血清、鸡白痢鸡伤寒沙门氏菌(SPG)阳性鸡血清、鸡新城疫病毒(NDV)阳性鸡血清、鸡传染性法氏囊炎病毒(IBDV)阳性鸡血清均购自中国兽药监察所; 50 份临床鸡血清样本来自上海某养禽场; 佐剂 MONTANIDE ISA 71 VG 由法国 SEPPIC 公司提供; Prime STAR DNA 聚合酶及各限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; BeaverBeads™ His-Tag 蛋白纯化试剂盒为苏州海狸生物医学工程有限公司产品; 二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、TMB 显色液购自上海碧云天生物技术有限公司; HRP 标记羊抗鸡 IgY 抗体购自 Abcam 公司; 支原体培养基基础购自青岛海博生物技术有限公司; 商品化滑液支原体抗体检测试剂盒购自美国 IDEXX 公司。

支原体培养基的配制(1 L 体系): 支原体基础培养基 33.0 g, ddH₂O 补足至 895 mL, 121 °C 灭菌 15 min 后, 加 10 mL 1% NAD, 100 mL 马血清。LB 液体培养基(1 L 体系): 10.0 g 胰蛋白胍, 5.0 g 酵母提取物, 5.0 g NaCl。pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min (固体培养基加 15 g 琼脂)。

1.3 主要仪器

PCR 仪购自美国 ABI 公司; DNA 电泳仪、化学发光成像系统购自上海天能科技有限公司; 高

速台式离心机购自德国 Eppendorf 公司; 恒温培养摇床购自北京创新思成公司; 蛋白电泳仪、转印槽购自 Bio-Rad 公司。

1.4 生物信息学分析

从 GenBank 数据库中获取 MS WVU₁₈₅₃ 株 (CP011096.1) 的 P80 蛋白氨基酸序列 (WP_020003184.1)。利用在线蛋白质分析工具 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白的氨基酸数、分子质量; 使用在线软件 Prosite(<https://prosite.expasy.org/>) 对 MS P80 蛋白功能域进行预测; 使用 SignalP server 5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线预测 P80 蛋白的信号肽。使用在线软件 Blastp(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析 MS P80 氨基酸序列与其他菌种 P80 氨基酸序列的同源性。

1.5 MS 的培养和全基因组的提取

复苏 MS WVU₁₈₅₃ 株, 在支原体基础培养基中

将其扩大培养至 50 mL, 培养至对数生长后期, 收集细菌, 按照细菌基因组的提取试剂盒说明书的操作来提取 MS WVU₁₈₅₃ 的基因组 DNA。Nanodrop 微量分光光度计测定基因组 DNA 浓度, 于 -20 °C 冻存备用。

1.6 MS *p80* 基因的点突变及全长获取

从 GenBank 数据库中获取 MS WVU₁₈₅₃ 株 *p80* 基因 (MS *p80*) 的碱基序列 (VY93_01820)。SignalP server 5.0 软件分析后若有信号肽, 设计引物时以去除信号肽的基因序列为模板。由于支原体中编码色氨酸的 TGA 在大肠杆菌中为终止密码子, 为了使目的基因能够在大肠杆菌中顺利表达, 通常需要将 TGA 突变为 TGG。利用软件 Primer 5.0 对 MS *p80* 基因序列进行分析, 发现有 6 处碱基位点需要进行突变 (分别为第 159、258、792、1245、1830、1935 位), 因此利用该软件在目的片段两端及需突变的位点处设计特异性引物共 7 对 (表 1), 接着采用 Overlap PCR 的方法实现点突变。

表 1. MS *p80* 的 Overlap PCR 扩增引物

Table 1. The primers of MS *p80* for overlapping PCR amplification

Primers names	Primers sequences (5' → 3')	Sequence length/bp
MS <i>p80</i> 1F	<u>GGATCC</u> GGAGATAAAACTGATGGTGGATC	99
MS <i>p80</i> 1R	GTTATTAATTCTTTTCCATTCTTCAGGAG	
MS <i>p80</i> 2F	CTCCTGAAGAATGGAAAAGAATTAATAAC	126
MS <i>p80</i> 2R	TCTCCTTCGCTCCATGGAG	
MS <i>p80</i> 3F	CTCCATGGAGCGAAGGAGA	543
MS <i>p80</i> 3R	ACCCACAGTTCTTTAACTGCTTC	
MS <i>p80</i> 4F	GAAGCAGTTAAAGAACTGTGGGGT	480
MS <i>p80</i> 4R	CTTCCCAGTGTGATGTTGAAAC	
MS <i>p80</i> 5F	GTTTCAACATCACACTGGGGAAAG	609
MS <i>p80</i> 5R	CATTTTCCATTTTCCAGGAACA	
MS <i>p80</i> 6F	TGTTCTGGAAAATGGAAAAATG	136
MS <i>p80</i> 6R	GATAGAAGCCATTTTAGGAATAATCTTGTAG	
MS <i>p80</i> 7F	CTACAAGATTATTCCTAAAATGGCTTCTATC	401
MS <i>p80</i> 7R	<u>CTCGAGT</u> TAGTTGTTAGTAGCTCTAACGGTTGA	

The additive restriction endonuclease sites were underlined (GGATCC, *Bam*H I; CTCGAG, *Xho* I). The mutation sites were bold.

先用 7 对引物分别扩增获得 MS *p80* 的 7 个分段片段, PCR 体系(40 μ L): Prime STAR MAX Premix (2 \times) 20 μ L, 上、下游引物各 0.2 μ mol/L, MS WVU₁₈₅₃ 基因组 DNA 模板 100 ng, ddH₂O 补足至 40 μ L 体系。PCR 条件为 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 5 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将 7 个分段产物回收后混合作为模板, 进行第二轮 PCR, 扩增体系和反应条件同上。将获得产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳后切取与预期大小相符片段回收, 即为 MS *p80* 基因全长。

1.7 MS *p80* 基因表达载体的构建

将 Overlap PCR 获得的 MS *p80* 基因全长用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后连接表达载体 pCold I, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12–16 h。挑取长出的菌落用 MS *p80* 1F 和 MS *p80* 7R 引物进行菌落 PCR 鉴定, 扩增体系和反应条件同 1.6, 同时将鉴定为阳性的菌株扩大培养, 抽提质粒, 对质粒进行双酶切鉴定。将经 PCR 及酶切鉴定均正确的质粒送上海睿勉生物科技有限公司测序, 将序列完全正确的质粒保存, 标记为 pCold I -MS *p80*。将 pCold I -MS *p80* 转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, PCR 鉴定为阳性的菌株即为重组表达菌株 *E. coli* BL21(pCold I -MS *p80*), 添加 20%甘油保存于 -80 $^{\circ}$ C。

1.8 rMS P80 蛋白的原核表达及纯化

将重组表达菌株转接到 10 mL 含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 值达到 0.4–0.6 时, 加入 50 μ g/mL IPTG, 15 $^{\circ}$ C、110 r/min 诱导表达 24 h, 离心收集菌体, PBS 洗涤菌体 2 遍, 1 mL PBS 重悬菌体, 超声裂解(功率 30 W, 破碎与间歇时间分别为 2 s

和 3 s), 10000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 获得上清和沉淀, SDS-PAGE 检测 rMS P80 蛋白是否为可溶性表达。按上述方法将 200 mL 重组菌液进行大量诱导表达, 再利用 BeaverBeads™ His-Tag 蛋白纯化试剂盒对上清中的 rMS P80 蛋白进行纯化, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化蛋白浓度, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.9 MS 不同分离株(WVU₁₈₅₃、JS1、SD1、SH1 和 HB1)和 MI 695 株阳性鸡血清的制备

准备 24 只 10 日龄的 SPF 鸡, 分到 6 个隔离器中培养, 每个隔离器 4 只。用支原体培养基分别培养 MS 不同分离株和 MI 695 株, 在培养好的 MS WVU₁₈₅₃ 株、JS1 株、SD1 株、SH1 株、HB1 株及 MI 695 株各菌液中分别加入 0.4%的福尔马林于 37 $^{\circ}$ C 灭活 24 h, 离心收集菌体, 并用无菌 PBS 洗涤 2 遍, 将各菌体用 PBS 重悬, 并与佐剂 MONTANIDE ISA 71 VG 等体积混合, 充分乳化后按照 1×10^9 CCU/只的剂量分别对 SPF 鸡进行颈部皮下免疫, 2 周后按相同剂量进行二次免疫, 二免后 2 周对免疫鸡只进行翅静脉采血, 制备得到血清并用 ELISA 法检测抗体效价。

1.10 rMS P80 蛋白与 MS 不同分离株及其他禽病原阳性鸡血清的免疫印迹分析

将 rMS P80 纯化蛋白进行 SDS-PAGE, 每个泳道 1 μ g 上样量, 总共 12 个泳道, 转印 NC 膜后, 分别以 MS 不同分离株(MS WVU₁₈₅₃、MS JS1、MS SD1、MS SH1 和 MS HB1)阳性血清、MG 阳性血清、MI 阳性血清、EC O1/O2/O78 混合阳性血清、SPG 阳性血清、NDV 阳性血清和 IBDV 阳性鸡血清作为一抗进行孵育, 同时设置 SPF 鸡阴性血清为阴性对照, 所有血清按 1:500 倍稀释, 在 37 $^{\circ}$ C 作用 1.5 h, PBST 洗 3 次; 用

HRP 标记的羊抗鸡 IgY 二抗(1:5000)在 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 用 ECL 底物显色液进行显色反应。

1.11 基于 rMS P80 蛋白的间接 ELISA 检测方法的初步建立

用碳酸盐缓冲液稀释抗原蛋白, 于 96 孔酶标板中每孔加 100 μL , 37 °C 温育 2 h; PBST (PBS 中添加 0.5% Tween-20)洗涤 3 次, 拍干; 每孔加入 200 μL 的 5%脱脂乳, 37 °C 封闭 2 h; PBST 洗涤 3 次, 拍干; 加入经 PBST 稀释的待检血清 100 μL /孔, 并加入经 PBST 同样稀释的 MS 标准阳性、SPF 鸡阴性血清分别用作阳性、阴性对照, 37 °C 作用 1.5 h; PBST 洗涤 4 次, 拍干; 每孔加入最适浓度的山羊抗鸡 IgG-HRP 二抗, 37 °C 作用 1 h; 洗涤 4 次, 拍干; 每孔加入 100 μL TMB 底物显色液, 37 °C 避光显色 15 min, 加入 50 μL 终止液, 10 min 内在酶标仪上测 OD_{450} 值, 并计算 P/N 值。

1.11.1 最适抗原包被浓度和血清最适稀释度的确定: 将 rMS P80 用碳酸盐缓冲液稀释至 5.00、2.50、1.25、0.62、0.31、0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板, 4 °C 过夜。将 MS 标准阳性、SPF 鸡阴性血清用 PBST 分别按照 1:200、1:500 稀释。HRP 标记的羊抗鸡 IgY 二抗按照 1:20000 稀释, 每孔 100 μL 。选择当阳性血清 OD_{450} 大于 1.0、阴性血清 OD_{450} 小于 0.2 时, 且 P/N 值(标准阳性血清 OD_{450} /标准阴性血清 OD_{450})最大的组合, 即为最适抗原包被浓度和血清稀释度。

1.11.2 酶标二抗稀释度确定: 以最适稀释度的重组抗原包被 96 孔酶标板, 加入最适稀释度的 MS 标准阳性血清、SPF 鸡阴性血清。将酶标二抗稀释成 1:20000、1:40000、1:60000。每个稀释度分

别作用 1 h, 每孔 100 μL 。选择 P/N 值较大的组别作为酶标二抗稀释度。

1.11.3 阴性血清临界值的确定: 运用本方法检测 30 份来自临床的阴性血清样品(经 IDEXX 及平板凝集鉴定均为阴性), 每个血清样本设 3 个重复孔, 计算血清样品的 S/P 值的平均值 \bar{X} 和标准差 SD。 $S/P = (\text{待检血清样品 } OD_{450} \text{ 平均值} - \text{标准阴性血清 } OD_{450} \text{ 平均值}) / (\text{MS 标准阳性血清 } OD_{450} \text{ 平均值} - \text{MS 标准阴性血清 } OD_{450} \text{ 平均值})$ 。当待检样品血清 S/P 值 $\geq \bar{X} + 3 \times SD$, 判断为阳性; 当待检样品血清 S/P 值 $< \bar{X} + 3 \times SD$ 时, 判断为阴性。

1.11.4 特异性检测: 用建立的间接 ELISA 方法分别对 MS JS1 阳性血清、MS SD1 阳性血清、MG 阳性血清、MI 阳性血清、EC O1/O2/O78 混合阳性血清、SPG 阳性血清、NDV 阳性血清和 IBDV 阳性血清, 同时设定 MS 标准阳性、SPF 鸡阴性血清对照, 每种血清设 3 个重复, 测定 OD_{450} 平均值, 并计算 S/P 值。商品化滑液支原体抗体检测试剂盒(IDEXX)用作方法对照, 参照说明书进行操作, 试剂盒判断标准为 $S/P \geq 0.5$ 为阳性, 小于 0.5 为阴性。

1.11.5 敏感性试验: 取 5 份阳性血清样品, 分别用 PBST 按 1:50、1:100、1:200...1:102400 倍比稀释, 利用建立的 ELISA 检测方法和 IDEXX 试剂盒进行抗体滴度比较, 测定能够检测样品为阳性的最大血清稀释倍数。

1.11.6 重复性试验: 取 5 份阳性血清和 5 份阴性血清, 用同一批次制备的 rMS P80 蛋白包被 ELISA 板, 对这 10 份血清样本进行 ELISA 检测, 每份血清样本设 5 个重复孔, 测定 OD_{450} 值, 计算各血清批次内变异系数。同时, 将这 10 份血清样本用 3 个不同批次包被的 ELISA 板进行检测, 每份血

清设 3 个重复孔, 计算批次间变异系数。

1.11.7 临床样品检测: 分别使用本研究建立的 ELISA 方法以及 IDEXX 滑液支原体抗体检测试剂盒, 对来自上海某养禽场的 50 份临床鸡血清样品进行检测, 对结果进行统计学分析, 并计算两种检测方法的符合率。

2 结果和分析

2.1 生物信息学分析结果

通过 ProtParam 在线软件分析发现, P80 蛋白共有 770 个氨基酸, 分子质量为 83.7 kDa。Prosite 软件分析得出 P80 蛋白的 1-24 个氨基酸序列为原核细胞膜脂蛋白脂类附着位点, SignalP 软件分析出该蛋白的前 20 位氨基酸为信号肽。通过 BLASTp 将 MS WVU1853 株的 P80 蛋白序列比对非冗余蛋白序列(Non-redundant protein sequences, nr)数据库, 结果显示, MS P80 在不同 MS 分离株间 (MS WVU1853、MS NCTC10121、MS-H 及 MS 53 株)的蛋白序列同源性达到 98.31%–100%, Query

cover 值均为 100%, 而与其他种属蛋白序列的同源性低于 35%, 故推断这 2 个蛋白序列在 MS 种属内高度保守且特异性高。

2.2 MS *p80* 基因 Overlap PCR 扩增

将 MS P80 蛋白序列去掉信号肽后设计特异性引物, 以 MS WVU₁₈₅₃ 株的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 成功突变 6 个位点, 获得正确大小的 7 个片段(图 1-A), 经 Overlap PCR 得到完整的 MS *p80* 基因片段(2238 bp), 见图 1-B。

2.3 重组表达载体的构建和鉴定

将 Overlap PCR 扩增获得的 MS *p80* 全长序列经双酶切后与表达载体 pCold I 连接, 再转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 菌液 PCR 鉴定见图 2-A, 所挑取的 4 株克隆(泳道 2-5)均鉴定为阳性。双酶切鉴定结果见图 2-B, 获得与预期大小相符的片段 2238 bp 和 4407 bp 的载体片段。重组载体经测序验证后序列全部正确, 表明成功获得重组表达载体 pCold I-MS *p80*, 且 MS *p80* 片段中的 6 处 TGA 已成功突变为 TGG。

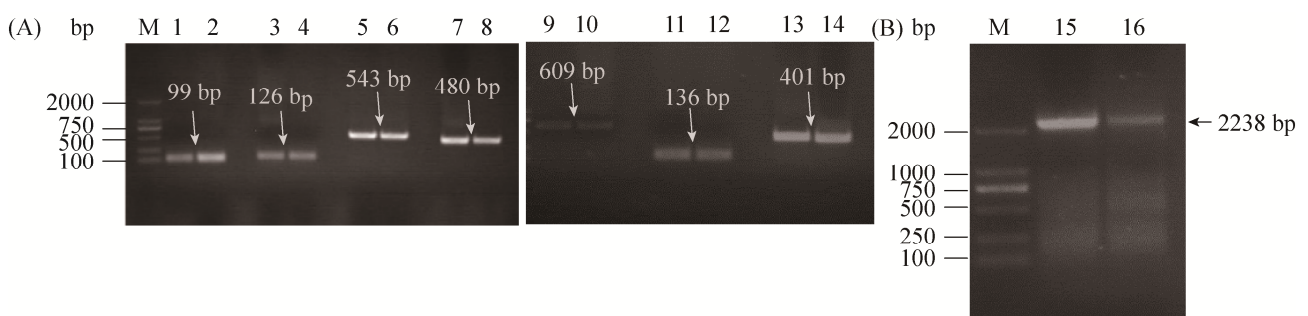


图 1. MS *p80* 重叠延伸 PCR 扩增

Figure 1. Overlap PCR amplification of MS *p80* gene. M: 2000 DNA marker; lane 1, 2: amplified with MS *p80* 1F/1R; lane 3, 4: amplified with MS *p80* 2F/2R; lane 5, 6: amplified with MS *p80* 3F/3R; lane 7, 8: amplified with MS *p80* 4F/4R; lane 9, 10: amplified with MS *p80* 5F/5R; lane 11, 12: amplified with MS *p80* 6F/6R; lane 13, 14: amplified with MS *p80* 7F/7R; lane 15, 16: amplified with MS *p80* 1F/7R by overlapping PCR.

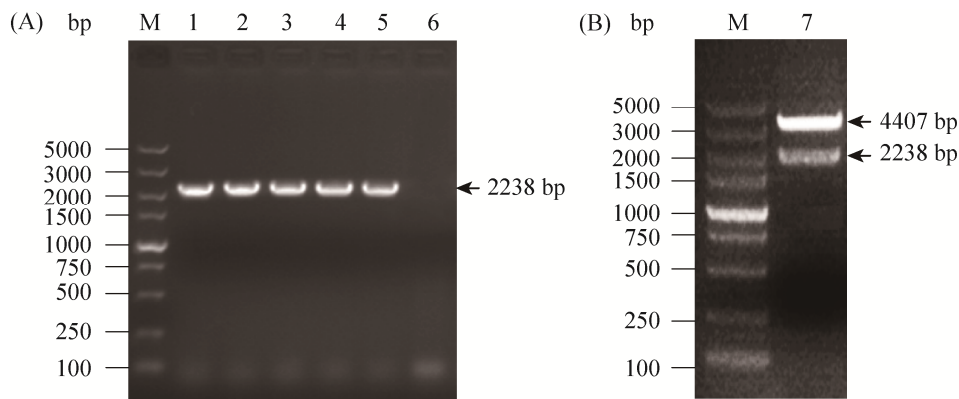


图 2. 重组表达载体的构建和鉴定

Figure 2. Construction and identification of recombinant expression vector. A: identification of *E. coli* DH5 α (pCold I-MS p80) by colony PCR amplification; B: double enzyme digestion of pCold I-MS p80 vector with *Bam*H I and *Xho* I. M: 5000 DNA marker; lane 1: positive control (MS WVU₁₈₅₃ genomic DNA); lane 2–5: *E. coli* DH5 α (pCold I-MS p80) samples 1–4; lane 6: negative control (PBS); lane 7: product from double enzyme digestion of pCold I-MS p80 vector.

2.4 重组蛋白 MS P80 的表达与纯化

将重组表达载体转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞，经 PCR 鉴定为阳性的菌株即为重组表达菌株 *E. coli* BL21(pCold I-MS p80)。重组表达菌株经 IPTG 诱导表达，超声裂解后，收集上清，用 His-Tag 标记的磁珠进行纯化，纯化产物进行 SDS-PAGE 分析，见图 3。结果显示重组蛋白

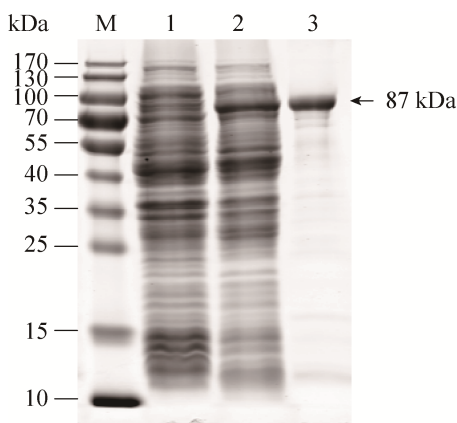


图 3. rMS P80 蛋白的表达和纯化

Figure 3. Expression and purification of rMS P80 protein. M: protein marker; lane 1: total proteins of *E. coli* BL21(pCold I) after induced by IPTG; lane 2: the supernatants of *E. coli* BL21(pCold I-MS p80) after induced by IPTG; lane 3: purified recombinant MS P80 protein.

成功表达并且纯化出约为 87 kDa 的单一一条带，与目的蛋白的预期分子量基本一致，纯化后的 rMS P80 蛋白条带较纯。

2.5 rMS P80 蛋白与 MS 不同分离株及其他禽病原阳性鸡血清的免疫印迹分析

制备的不同 MS 分离株(MS JS1、SD1、SH1、HB1)、MI 695 株免疫阳性血清经 ELISA 效价测定后效价分别为 25600、51200、25600、51200、12800。纯化的 rMS P80 蛋白与不同 MS 分离株(MS WVU₁₈₅₃、MS JS1、MS SD1、MSSH1、MS HB1)阳性鸡血清的免疫印迹结果显示(图 4, 泳道 1–5)，纯化的 rMS P80 蛋白与 MS 不同分离株阳性鸡血清均能发生特异性反应条带，而与 SPF 鸡阴性血清未见反应条带(泳道 12)，可见 rMS P80 蛋白具有良好的免疫反应性且种内保守性较好；而其与 MG、MI、EC O1/O2/O78、SPG、NDV、IBDV 阳性鸡血清的免疫印迹反应均未见反应条带(图 4, 泳道 6–11)，可见 rMS P80 蛋白具有较好的种间特异性。

2.6 基于 rMS P80 蛋白的间接 ELISA 检测方法的初步建立

2.6.1 最适包被浓度和血清最适稀释度的确定： 当抗原包被浓度为 1.25 μg/mL、血清稀释倍数为

1:500 时，阳性血清 OD_{450} 值大于 1.0，阴性血清 OD_{450} 值小于 0.2，且 P/N 值相对较大(表 2)。因此，确定最适抗原包被浓度为 1.25 μg/mL，MS 标准阳性、SPF 阴性血清最佳稀释倍数为 1:500。

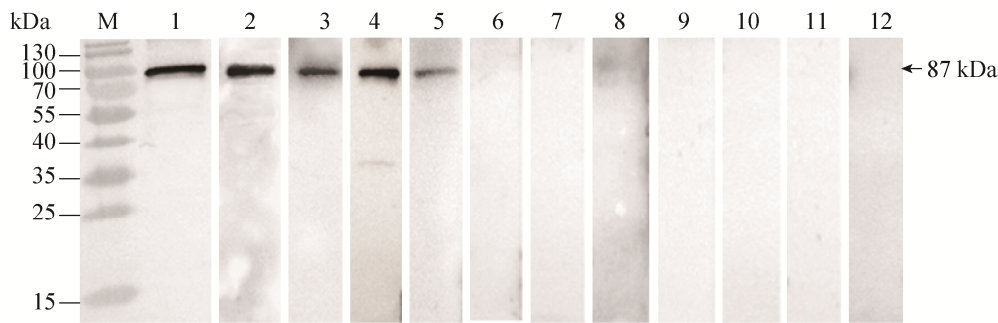


图 4. 纯化 rMS P80 蛋白与不同禽病原阳性血清的免疫印迹分析

Figure 4. Western blotting analysis of purified rMS P80 with different avian pathogens positive sera. M: protein marker; lane 1: MS WVU₁₈₅₃ positive serum; lane 2: MS JS1 positive serum; lane 3: MS SD1 positive serum; lane 4: MS SH1 positive serum; lane 5: MS HB1 positive serum; lane 6: MG positive serum; lane 7: MI positive serum; lane 8: EC O1/O2/O78 positive serum; lane 9: SPG positive serum; lane 10: NDV positive serum; lane 11: IBDV positive serum; lane 12: negative serum from SPF chicken.

表 2. 抗原最适包被量及血清稀释倍数的 ELISA 结果(OD_{450})

Table 2. ELISA results of optimal antigen dosage and serum dilution factor (OD_{450} values)

Dilutions of serum	Serum	Concentration of coated antigen/(μg/mL)					
		5.00	2.50	1.25	0.62	0.31	0.15
1:200	Positive	1.483	1.379	1.234	1.006	0.842	0.597
	Negative	0.644	0.376	0.239	0.158	0.113	0.098
	P/N	2.302	3.667	5.163	6.367	7.451	6.092
1:500	Positive	1.346	1.223	1.143	0.817	0.632	0.586
	Negative	0.397	0.270	0.175	0.144	0.121	0.111
	P/N	3.390	4.530	6.531	5.674	5.223	5.279

2.6.2 酶标二抗工作浓度确定：试验结果表明，酶标二抗在稀释度为 1:20000 时 P/N 值相对较大(表 3)，因此确定酶标二抗稀释度为 1:20000。

2.6.3 阴性血清临界值的确定：使用本试剂盒检测 30 份临床 MS 阴性鸡血清，根据 OD_{450} 值计算出 S/P 值(表 4)，求得其 S/P 值平均值=0.323；标准偏差 SD=0.257，由此确定待检血清 S/P 值 \geq 0.323 时判断为阳性，小于 0.323 时判为阴性。

表 3. 酶标二抗最适工作浓度的试验结果

Table 3. ELISA for optimum work concentration of HRP-labeled second antibody

Serum	Dilutions of antibody		
	1:20000	1:40000	1:60000
OD_{450} value of positive serum	1.143	0.611	0.463
OD_{450} value of negative serum	0.175	0.110	0.095
P/N	6.531	5.554	4.874

表 4. 测定 30 份临床 MS 阴性鸡血清的 S/P 值

Table 4. Detection of S/P values of 30 clinical MS-negative chicken sera

Serum number	S/P	Serum number	S/P	Serum number	S/P
1	0.263	11	0.225	21	0.020
2	0.204	12	0.155	22	0.191
3	-0.003	13	0.118	23	0.196
4	0.130	14	0.144	24	0.177
5	0.123	15	0.045	25	0.127
6	0.179	16	0.174	26	0.117
7	0.154	17	0.148	27	0.172
8	0.003	18	0.120	28	0.067
9	0.144	19	0.033	29	0.116
10	0.095	20	0.069	30	0.080

2.6.4 特异性检测: 本研究建立的 ELISA 检测法和 IDEXX 试剂盒对其他禽病原阳性血清的检测结果见表 5。基于 rMS P80 蛋白的 ELISA 法检测结果显示 MS JS1、MS SD1 阳性血清结果为阳性, MS 临床阴性血清结果为阴性, 而 MG、MI、EC O1/O2/O78、SPG、NDV、IBDV 阳性血清均为阴性结果, 该结果同 IDEXX 试剂盒检测(S/P 大于等于 0.5 阳性, 小于 0.5 阴性)结果一致, 故建立的 ELISA 法与 IDEXX 试剂盒检测均具有较好特异性。

表 5. 特异性检测结果(与 IDEXX 试剂盒比较)

Table 5. Results of specificity assay (compared to IDEXX kit)

Serum	ELISA assay based on rMS P80		IDEXX kit	
	S/P average	Judgement	S/P average	Judgement
MS JS1-positive serum	1.071	+	0.505	+
MS SD1-positive serum	0.608	+	0.517	+
MG-positive serum	0.028	-	-0.253	-
MI-positive serum	0.017	-	-0.257	-
EC O1/O2/O78-positive serum	-0.01497	-	-0.241	-
SPG-positive serum	-0.032	-	-0.310	-
NDV-positive serum	0.056	-	-0.200	-
IBDV-positive serum	0.141	-	-0.271	-

2.6.5 敏感性试验: 利用制备的 ELISA 检测方法和 IDEXX 试剂盒分别检测 5 份 MS 阳性血清抗体效价(表 6), 结果显示, 基于 rMS P80 蛋白的 ELISA 检测方法的敏感性显著优于 IDEXX 试剂盒, 是 IDEXX 试剂盒敏感性的 4-32 倍。

2.6.6 重复性试验: 用建立的 ELISA 检测方法对 5 份 MS 阳性血清和 5 份 MS 阴性血清的 OD_{450} 值进行重复性检测, 结果显示(表 7), 10 份血清的批次内变异系数为均小于 5% (0.999%-4.451%), 批次间变异系数均小于 10% (3.417%-9.092%), 因此建立的 ELISA 方法具有较好的重复性。

2.6.7 临床样品检测: 采用本研究建立的 ELISA 检测方法对上海某养殖场 50 份临床鸡血清样本进行检测, 并与 IDEXX 滑液支原体抗体检测试剂盒检测结果相比较。表 8 显示, 本 ELISA 方法检出

表 6. 敏感性检测结果(与 IDEXX 试剂盒比较)

Table 6. Results of sensitivity assay (compared to IDEXX kit)

Serum	The ELISA assay based on rMS P80	IDEXX
1	1:3200	1:800
2	1:102400	1:3200
3	1:1600	1:400
4	1:6400	1:1600
5	1:6400	1:1600

表 7. 重复性试验结果

Table 7. Reproducibility of intra- and inter-assays

Serum number	Intra-assay (OD_{450})			Inter-assay (OD_{450})		
	Average	SD	Coefficient of variation (CV%)	Average	SD	Coefficient of variation (CV%)
1	0.902	0.009	0.999	0.954	0.054	5.689
2	1.248	0.017	1.441	1.283	0.049	3.843
3	0.812	0.014	1.817	0.835	0.034	4.056
4	0.786	0.025	3.282	0.819	0.042	5.114
5	1.063	0.036	3.463	1.119	0.078	7.000
6	0.123	0.005	4.451	0.114	0.007	6.477
7	0.105	0.005	0.520	0.099	0.007	6.786
8	0.123	0.002	1.851	0.113	0.010	9.092
9	0.134	0.003	2.000	0.129	0.004	3.494
10	0.109	0.002	1.400	0.107	0.004	3.417

阳性血清 13 份、阴性血清 37 份, IDEXX 试剂盒
检出阳性血清 12 份、阴性血清 38 份, 共同检出
阳性血清 9 份、阴性血清 34 份。以 IDEXX 试剂

盒检测结果为参照, 两种方法的阳性样本相符率
75%, 阴性样本相符率为 89.47%, 两种方法的总
符合率为 $(9+34)/50=86\%$ 。

表 8. 临床样品检测

Table 8. Detection results of two methods on 50 clinical sera (S/P values)

Serum number	ELISA assay based on rMS P80	IDEXX kit	Serum number	ELISA assay based on rMS P80	IDEXX kit
1	0.263(-)	0.289(-)	26	0.295(-)	0.046(-)
2	0.204(-)	0.058(-)	27	0.033(-)	0.281(-)
3	0.202(-)	0.289(-)	28	0.603(+)	0.878(+)
4	1.076(+)	0.578(+)	29	0.228(-)	0.039(-)
5	-0.003(-)	0.085(-)	30	0.235(-)	0.486(-)
6	0.314(-)	0.069(-)	31	0.606(+)	0.352(-)
7	0.223(-)	0.277(-)	32	0.473(+)	0.522(+)
8	0.130(-)	0.123(-)	33	0.069(-)	-0.016(-)
9	0.603(+)	0.878(+)	34	0.020(-)	0.013(-)
10	0.228(-)	0.039(-)	35	0.334(+)	0.672(+)
11	0.235(-)	0.486(-)	36	0.055(-)	1.266(+)
12	0.606(+)	0.352(-)	37	0.254(-)	0.219(-)
13	0.473(+)	0.522(+)	38	0.268(-)	0.016(-)
14	0.295(-)	0.405(-)	39	0.191(-)	0.039(-)
15	0.144(-)	0.351(-)	40	0.288(-)	0.130(-)
16	0.045(-)	0.123(-)	41	0.289(-)	2.655(+)
17	0.282(-)	0.143(-)	42	0.598(+)	1.262(+)
18	0.080(-)	0.590(+)	43	0.276(-)	0.033(-)
19	0.174(-)	0.320(-)	44	0.369(+)	0.529(+)
20	0.102(-)	0.285(-)	45	0.739(+)	0.228(-)
21	0.232(-)	0.235(-)	46	1.039(+)	0.577(+)
22	0.148(-)	0.220(-)	47	0.262(-)	0.039(-)
23	0.246(-)	0.150(-)	48	0.204(-)	0.033(-)
24	0.330(+)	0.173(-)	49	0.181(-)	0.189(-)
25	0.120(-)	0.096(-)	50	0.151(-)	0.123(-)

3 讨论和结论

滑液支原体是一种能够引起鸡关节肿大、滑液囊及肌腱发炎和实质器官的肿大的病原体，鸡群感染 MS 后易发生混合感染，加剧病情，死亡率增高，造成严重的经济损失。目前普遍认为，支原体通过持续感染引发宿主机体免疫应答而导致病变，当支原体黏附并入侵宿主体内时，可以影响宿主的免疫系统，使病原逃避宿主免疫系统的监视，维持其在宿主细胞中长期生存，促进和辅助其他疾病的并发，造成宿主机体严重损伤^[11]。

支原体膜由大约三分之二的蛋白质和三分之一的脂质组成，在多种支原体中，膜表面脂蛋白是其重要的致病相关因子，参与介导支原体与宿主细胞的黏附作用，具有较好的免疫原性，能调节宿主的免疫反应，同时发挥细胞毒性作用，引起宿主细胞的炎症反应或凋亡^[12-13]。有研究表明，猪鼻支原体(*M. hyorhinis*)表面可变脂蛋白 VlpB^[14]能够黏附宿主细胞；鸡毒支原体(*M. gallisepticum*)的表面脂蛋白 MslA^[5]是一种具有免疫原性的脂蛋白，有一定的毒力；人型支原体(*M. hominis*)中表面脂蛋白 OppA^[15]除能黏附宿主细胞外，还可以诱导细胞凋亡；从致病性支原体中纯化出炎症诱导因子，鉴定出其为脂蛋白，该脂蛋白能通过 Toll 样受体 2(TLR2)诱导炎症反应^[16]，其 N 端结构是诱导免疫和识别 Toll 样受体的重要因子^[17]。肺炎分枝杆菌(*M. hyopneumoniae*)中表面脂蛋白 P46L 是膜表面抗原，利用该抗原建立 ELISA 试剂盒，可用于实验室小鼠和大鼠肺炎支原体感染的血清学检测^[18]，因此研究支原体膜表面免疫原性脂蛋白是检测该病原和研究其致病机制的基础之一。

本实验室前期通过 MS 膜蛋白的免疫蛋白质

组学结合质谱分析鉴定到 MS 的免疫原性蛋白 MS P80，2008 年 Berčič 在当地分离的 MS 免疫原性蛋白分析实验中同样筛选到 MS P80 是免疫原性蛋白^[19]。从生物信息学分析预测该蛋白是一种脂蛋白，而其他生物学功能研究还是一片空白。因此，本研究成功克隆表达重组蛋白 MS P80，并将该蛋白与 MS 不同分离株阳性血清以及 6 种其他禽病原阳性血清进行免疫印迹分析，结果表明该蛋白与 MS 不同分离株阳性血清均具有良好的免疫反应性，而与其他禽病原阳性血清均无交叉反应，证实该蛋白是一个 MS 特异性的诊断抗原，可作为 MS 病诊断的候选抗原。接着我们利用该蛋白作为包被抗原，初步建立了 MS 血清抗体的 ELISA 检测方法，并评估了其敏感性、重复性及与 IDEXX 试剂盒的相符率。结果显示，基于 rMS P80 蛋白的 ELISA 检测方法具有较好的重复性；与 IDEXX 试剂盒相比，该方法敏感性更高。对 50 份临床血清样本检测结果显示，两种方法的阳性样本相符率为 75%，总样本符合率为 86%，初步证实该蛋白具有一定的应用潜力。

目前国内外尚未见以 P80 蛋白作为诊断抗原的相关报道。本研究初步建立了以 rMS P80 作为包被抗原的 MS 血清抗体间接 ELISA 检测方法，为我国 MS 病的诊断、流行病学调查提供了可参考的检测方法。同时，其是否与其他脂蛋白一样，参与 MS 与宿主细胞的黏附作用、调控宿主免疫系统、诱导机体炎症反应等，还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陆凤. 鸡毒支原体、滑液支原体二联灭活苗的研究. 甘肃农业大学硕士学位论文, 2015.
- [2] Zhang JM. Epidemiology, clinical symptoms, changes of

- autopsy and preventive measures of *Mycoplasma synoviae* disease in laying hens. *Modern Animal Husbandry Science & Technology*, 2019, (1): 96–97. (in Chinese)
- 张济明. 蛋鸡滑液囊支原体病的流行病学、临床症状、剖检变化及防治措施. *现代畜牧科技*, 2019, (1): 96–97.
- [3] Xue J, Xu MY, Ma ZJ, Zhao J, Jin N, Zhang GZ. Serological investigation of *Mycoplasma synoviae* infection in China from 2010 to 2015. *Poultry Science*, 2017, 96(9): 3109–3112.
- [4] Washburn LR, Bird DW, Dybvig K. Restoration of cytoadherence to an adherence-deficient mutant of *Mycoplasma arthritis* by genetic complementation. *Infection and Immunity*, 2003, 71(2): 671–675.
- [5] Szczepanek SM, Frasca S Jr, Schumacher VL, Liao X, Padula M, Djordjevic SP, Geary SJ. Identification of lipoprotein MslA as a neoteric virulence factor of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity*, 2010, 78(8): 3475–3483.
- [6] Noormohammadi AH, Markham PF, Duffy MF, Whithear KG, Browning GF. Multigene families encoding the major hemagglutinins in phylogenetically distinct mycoplasmas. *Infection and Immunity*, 1998, 66(7): 3470–3475.
- [7] Noormohammadi AH, Markham PF, Markham JF, Whithear KG, Browning GF. *Mycoplasma synoviae* surface protein MSPB as a recombinant antigen in an indirect ELISA. *Microbiology*, 1999, 145(8): 2087–2094.
- [8] Noormohammadi AH, Browning GF, Jones J, Whithear KG. Improved detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* vaccine MS-H using an autologous recombinant MSPB enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Pathology*, 2002, 31(6): 611–617.
- [9] Noormohammadi AH, Markham PF, Whithear KG, Walker ID, Gurevich VA, Ley DH, Browning GF. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase-variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infection and Immunity*, 1997, 65(7): 2542–2547.
- [10] Noormohammadi AH, Markham PF, Kanci A, Whithear KG, Browning GF. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Molecular Microbiology*, 2000, 35(4): 911–923.
- [11] Hegde S, Rosengarten R, Chopra-Dewasthaly R. Disruption of the *pdhB* pyruvate dehydrogenase gene affects colony morphology, *in vitro* growth and cell invasiveness of *Mycoplasma agalactiae*. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119706.
- [12] Christodoulides A, Gupta N, Yacoubian V, Maithel N, Parker J, Kelesidis T. The Role of lipoproteins in mycoplasma-mediated immunomodulation. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1682.
- [13] Xu CG, Hao YQ, Zhang L, Hao RX, Liu XL, Huang ZY. Molecular cloning and immune response analysis of putative variable lipoproteins from *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(1): 1527–1539.
- [14] Hu YT, Zhang BX, Wang J, Feng ZX, Shao GQ, Xiong QY. The function of the variable lipoprotein B of *Mycoplasma hyorhinis* in adherence to host cell. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40(11): 1049–1054. (in Chinese)
- 胡永婷, 张必雄, 王佳, 冯志新, 邵国青, 熊祺琰. 猪鼻支原体表面可变脂蛋白 VlpB 黏附宿主细胞功能研究. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(11): 1049–1054.
- [15] Hopfe M, Henrich B. OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 55.
- [16] Shimizu T. Pathogenic factors of mycoplasma. *Nippon Saikingaku Zasshi*, 2015, 70(4): 369–374.
- [17] Zuo LL, Wu YM, You XX. Mycoplasma lipoproteins and Toll-like receptors. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2009, 10(1): 67–76.
- [18] Asano A, Torigoe D, Sasaki N, Agui T. Development of an ELISA using a recombinant P46-like lipoprotein for diagnosis of *Mycoplasma pulmonis* infection in rodents. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2014, 76(2): 151–157.
- [19] Berčič RL, Slavec B, Lavrič M, Narat M, Bidovec A, Dovč P, Benčina D. Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates. *Veterinary Microbiology*, 2008, 127(1/2): 147–154.

Establishment and application of ELISA method for detection of *Mycoplasma synoviae* antibody based on lipoprotein P80

Yu Wang^{1,2}, Haoran Li^{1,3}, Zheng Wen^{1,4}, Yuanbing Shang¹, Ting Liu^{1,4}, Chan Ding¹, Song Gao², Jingjing Qi^{1*}, Shengqing Yu^{1*}

¹ Shanghai Veterinary Research Institute, the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Shanghai 200241, China

² College of Veterinary, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

³ College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China

⁴ College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271099, Shandong Province, China

Abstract: **[Objective]** We studied the immunoreactivity of *Mycoplasma synoviae* lipoprotein P80 (MS P80) and applied it to detect ELISA antibody. **[Methods]** Firstly, we performed bioinformatics analysis, prokaryotic expression and purification on MS P80, and analyzed its immunoreactivity with 6 positive sera against different MS isolates and other avian pathogens by Western blotting. Then we used the purified rMS P80 as coating antigen to establish an indirect ELISA assay for detection of MS antibodies, and tested its specificity, sensitivity, reproducibility and coincidence rates compared with US IDEXX ELISA kit. **[Results]** The MS P80 protein was predicted as a lipoprotein that shared 98%–100% homology between different MS strains and 25% to 34% homology with other species. Western blotting analysis proved that rMS P80 protein had good immunoreactivity and specificity. An indirect ELISA assay based on rMS P80 was established and showed no cross-reaction with positive sera against other pathogens. The intra- and inter-assay variation coefficients were less than 5% and 10%, respectively. When compared with the commercial kit, the established ELISA assay was more sensitive, and the total coincidence rate was 86%. **[Conclusion]** MS P80 has good immunoreactivity, intraspecies conservation and interspecies specificity. Therefore, it can be used as a target antigen for MS antibody detection.

Keywords: lipoprotein, *Mycoplasma synoviae*, immunoreactivity, indirect ELISA

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0500705) and by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2019JB11)

*Corresponding authors. Shengqing Yu, Tel: +86-21-34293461, E-mail: yus@shvri.ac.cn; Jingjing Qi, Tel: +86-21-34293412, E-mail: qijj1011@163.com

Received: 20 May 2019; Revised: 30 September 2019; Published online: 21 October 2019