

• 生物技术与方法 •

基于 Mhp336 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法的建立

淦雨洁^{1#}, 董青霜^{1#}, 张阳¹, 何佳蔚¹, 王冬经², 冯志新³, 王佳³, 周可心¹, 丁红雷^{1*}

1 西南大学 动物医学院 动物支原体学实验室, 重庆 400715

2 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 西藏 拉萨 850009

3 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014

淦雨洁, 董青霜, 张阳, 何佳蔚, 王冬经, 冯志新, 王佳, 周可心, 丁红雷. 基于 Mhp336 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2322-2332.

GAN Yujie, DONG Qingshuang, ZHANG Yang, HE Jiawei, WANG Dongjing, FENG Zhixin, WANG Jia, ZHOU Kexin, DING Honglei. Development of an ELISA method for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* based on Mhp336 protein[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2322-2332.

摘要: 本研究拟建立一种高特异性的猪肺炎支原体酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)抗体检测方法。首先, 构建重组菌大肠杆菌 BL21(DE3)-pET-32a(+)-mhp336, 诱导重组蛋白 Mhp336 表达并纯化, 获得的纯化蛋白作为包被抗原; 然后, 确定 ELISA 方法的抗原包被浓度、封闭液和封闭时间、血清和二抗稀释比例和孵育时间、显色时间和判定标准; 之后进行重复性试验、与猪的其他主要病原抗血清的交叉反应性和确定血清最大稀释倍数; 最后, 用建立的方法检测 226 份猪血清样品, 并与商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒和猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法进行比较, 确定检测方法的灵敏性和特异性。最终确定 Mhp336 纯化蛋白的最佳包被浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 封闭液为含 2.5% 脱脂奶粉的 PBS, 封闭时间为 1 h, 血清稀释比例为 1:500, 孵育时间为 0.5 h, 二抗稀释比例为 1:10 000, 孵育时间为 1 h, 显色时间为 5 min。检测方法的 cut off 值为 0.332。试剂盒的批内和批间变异系数均低于 7%。猪血清样品的检测结果表明, 本研究建立的检测方法的灵敏性和特异性均优于商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒和猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法。本研究成功建立了基于 Mhp336 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法, 灵敏性和特异性均较好, 为猪场猪支原体肺炎的净化提供了检测方法。

关键词: 猪肺炎支原体; 原核表达; 灵敏性; 特异性; 临床样品

资助项目: 国家自然科学基金(32172870)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172870).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: hongleiding@swu.edu.cn

Received: 2023-10-13; Accepted: 2024-01-31; Published online: 2024-02-04

Development of an ELISA method for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* based on Mhp336 protein

GAN Yujie^{1#}, DONG Qingshuang^{1#}, ZHANG Yang¹, HE Jiawei¹, WANG Dongjing², FENG Zhixin³, WANG Jia³, ZHOU Kexin¹, DING Honglei^{1*}

1 Laboratory of Veterinary Mycoplasmaology, College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Xizang Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850009, Xizang, China

3 Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

Abstract: This study aims to establish an ELISA method with high specificity for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. Firstly, we constructed a recombinant strain *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET-32a(+)-mhp336 to express the recombinant protein Mhp336 and used the purified Mhp336 as the coating antigen. Then, we optimized the ELISA parameters, including antigen concentration, blocking buffer, blocking time, dilution of serum, incubation time with serum, secondary antibody dilution, secondary antibody incubation time, colorimetric reaction time, and cut-off value. Afterwards, reproducibility experiments were conducted, and the cross reactivity of Mhp336 with other antisera of porcine major pathogens and the maximum dilution ratios of the sera were determined. Finally, 226 porcine serum samples were detected using the method established in this study, a commercial ELISA kit for *M. hyopneumoniae* antibody detection, and a convalescent serum ELISA kit for *M. hyopneumoniae* antibody detection. The detection results of the three methods were compared to evaluate the sensitivity and specificity of the ELISA method established in this study. For this method, the optimal antigen concentration, blocking buffer, blocking time, dilution of serum, incubation time with serum, secondary antibody dilution, secondary antibody incubation time, and colorimetric reaction time were 0.05 µg/mL, PBS containing 2.5% skim milk, 1 h, 1:500, 0.5 h, 1:10 000, 1 h, and 5 min, respectively. Validation of the ELISA method based on Mhp336 showed a cut-off value of 0.332. The coefficients of variation of both intra-batch and inter-batch kits were below 7%. The detection results of porcine serum samples indicated that the method established in this study outperformed the commercial ELISA kit and the convalescent serum ELISA kit for *M. hyopneumoniae* antibody detection in terms of sensitivity and specificity. We successfully established an ELISA method for detecting the antibodies against *M. hyopneumoniae* based on Mhp336 protein. This method demonstrated high sensitivity and specificity, serving as a tool for the prevention of mycoplasmal pneumonia of swine in pig farms.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*; prokaryotic expression; sensitivity; specificity; clinical samples

猪支原体肺炎(mycoplasmal pneumonia of swine, MPS)是由猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp)感染引起的一种慢性呼吸道传染病, 又称地方流行性肺炎(enzootic

pneumonia, EP)。该病分布广泛,是生猪养殖行业中最重要 的传染病之一。建立准确和敏感的猪肺炎支原体抗体检测方法有助于了解猪肺炎支原体在猪群的流行情况,以便采取相应的防控措施。

目前应用较为广泛的猪肺炎支原体抗体检测方法是酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。我国批准上市的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒是 IDEXX 公司开发的间接 ELISA 抗体检测试剂盒。该试剂盒用猪肺炎支原体全菌作为包被抗原,这造成该试剂盒在检测猪肺炎支原体抗体时会交叉识别环境中其他支原体刺激猪只产生的抗体,导致其特异性不高。Feng 等建立了基于 P97R1 蛋白的间接 ELISA 抗体检测方法,用于检测猪鼻腔中的猪肺炎支原体 IgA 抗体^[1-2],但该检测方法存在取样困难、采样过程不易标准化的问题。本实验室前期建立了一种基于 Mhp366-N 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法,用于检测猪只自然感染猪肺炎支原体后血清中的抗体^[3]。该方法的灵敏性和特异性优于商品化试剂盒,但特异性仍需进一步提升。实验室前期研究发现猪肺炎支原体膜蛋白 Mhp336 与猪肺炎支原体阳性血清具有良好的反应性^[4],具有作为 ELISA 检测方法包被抗原的潜力。本研究用 Mhp336 蛋白作为包被抗原,建立了一种灵敏性和特异性均较好的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法,为猪肺炎支原体的血清流行病学调查和猪场猪支原体肺炎的净化提供了帮助。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BL21(DE3)-pGEX-6P-1-mhp336^[4]和质粒 pET-32a(+)由本实验室保存,大肠杆菌 BL21(DE3)和大肠杆菌 DH5 α 感受态由本实验室制备并保存。

1.2 主要试剂

质粒提取试剂盒购自广州美基生物科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒购自 IDEXX 公司;PrimeSTAR[®] Max DNA polymerase、T4 DNA ligase、BamH I 和 Xho I 购自宝生物工程(大连)有限公司;蛋白预染 Marker 和 Omni-Easy[™] 即用型 BCA 蛋白定量试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Thermo Scientific 公司;HRP 标记兔抗猪 IgG 和鼠抗 His-Tag 单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;HRP 标记兔抗鼠 IgG 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。基于 Mhp366-N 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测试剂盒由本实验室制备^[5]。

1.3 血清

在某猪肺炎支原体阳性且未免疫过猪支原体肺炎疫苗的猪场采集血液样品 20 份。在某猪肺炎支原体阴性且未免疫过猪支原体肺炎疫苗的猪场采集血液样品 60 份;该猪场在过去 2 年的猪肺炎支原体抗体监测的结果均为阴性。在某屠宰场采集血液样品 63 份,某种猪场采集血液样品 20 份,两个育肥猪场分别采集血液样品 70、73 份,合计 226 份;这些猪均没有免疫过猪支原体肺炎疫苗,且猪场猪肺炎支原体感染状态未知。收集的血液 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,取上清分离血清。分离的血清经商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒和猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测试剂盒检测后,按 1:1 的比例加入终浓度为 50%的甘油,振荡混匀后-20 °C 保存。

猪链球菌 2 型阳性血清由华中农业大学谭臣教授惠赠;猪鼻支原体、猪滑液支原体和絮状支原体阳性血清、猪肺炎支原体灭活疫苗免疫

血清由江苏省农科院兽医研究所保存；猪瘟病毒、非洲猪瘟疫病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒 2 型和伪狂犬病病毒 gB 蛋白阳性血清由西南大学动物支原体学实验室保存。

文中的动物实验经西南大学实验动物伦理审查委员会批准(批准号: IACUC-20231228-04)。

1.4 *mhp336* 基因和 Mhp336 蛋白的保守性分析

在 NCBI 查找 *mhp336* 基因的核苷酸序列和 Mhp336 蛋白的氨基酸序列(GenBank 登录号为: AE017332.1), 将 *mhp336* 基因核苷酸序列和 Mhp336 蛋白氨基酸序列在 GenBank 进行 BLAST 序列比对(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 分析核苷酸序列和氨基酸序列与其他物种的同源性, 确定 *mhp336* 基因和 Mhp336 蛋白的保守性。

1.5 Mhp336 蛋白的原核表达与纯化

取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的大肠杆菌 BL21(DE3)-pGEX-6P-1-*mhp336*, 划线接种氨苄西林(ampicillin, Amp) LB 平板后 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h。挑取长出的单菌落, 接种于 10 mL Amp⁺ LB 液体培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养 8 h, 使用质粒提取试剂盒提取重组质粒 pGEX-6P-1-*mhp336*。根据猪肺炎支原体 232 菌株 *mhp336* 基因核苷酸序列, 用 Primer Premier 6.0 软件设计引物, 并在上游和下游引物分别引入 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点和相应保护性碱基。引物序列: *mhp336*-F: 5'-CGCGGATCCATGAAAAATAAACTAATTCTT AGTAAATTT-3'; *mhp336*-R: 5'-CCGCTCGAGTAT GTAGTTTTTTTCTTTTGGATC-3'。单下划线表示 *Bam*H I 和 *Xho* I 的酶切位点, 双下划线表示保护性碱基。以提取的重组质粒为模板, PCR 扩增 *mhp336* 基因。扩增的基因经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 与同样经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的 pET-32a(+)载体连接。连接的重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α 感受态并提取重组质粒, 提取的重组质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切和测

序鉴定。构建正确的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 重组菌命名为大肠杆菌 BL21(DE3)-pET32a(+)-*mhp336*。参考本实验室前期的方法^[6]表达目的蛋白并鉴定蛋白表达形式。

剩余菌体加入适量 Binding buffer (NaCl 0.5 mol/L, NaH₂PO₄·2H₂O 0.02 mol/L, Na₂HPO₄·12H₂O 0.02 mol/L)重悬菌体, 超声破菌后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min, 取破菌上清。破菌上清缓慢过镍柱, 使 Mhp336 重组蛋白与 Ni²⁺充分结合, Washing buffer (NaCl 0.25 mol/L、NaH₂PO₄·2H₂O 0.01 mol/L、Na₂HPO₄·12H₂O 0.01 mol/L、咪唑 0.1 mol/L)洗脱杂蛋白, Elution buffer (NaCl 0.25 mol/L、NaH₂PO₄·2H₂O 0.01 mol/L、Na₂HPO₄·12H₂O 0.01 mol/L、咪唑 0.15 mol/L)洗脱目的蛋白。SDS-PAGE 检测目的蛋白的纯化情况。

1.6 最佳反应条件的确定

参考本实验室建立的基于 Mhp366-N 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法^[6]并做少许调整确定最佳反应条件: 纯化的 Mhp336 蛋白包被浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 封闭时间为 0.5、1.0、1.5 和 2.0 h; 猪肺炎支原体阴性和阳性血清按 1:50、1:200、1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000 和 1:8 000 的比例稀释, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5、1.0、1.5 和 2.0 h; HRP 标记兔抗猪 IgG 按 1:5 000、1:10 000、1:20 000、1:40 000 和 1:80 000 比例稀释, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5、1.0、1.5 和 2.0 h; 室温避光显色时间为 5、10、15 和 20 min。

1.7 间接 ELISA 检测结果的判定标准

选取 60 份商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒和猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测试剂盒均检测为猪肺炎支原体抗体阴性的血清, 按照确定的最佳反应条件进行 ELISA 试验, 每个血清设 3 个重复, 计算平均值(\bar{x})和标准差(s), 以 $\bar{x}+2s$ 作为血清阴阳性的

临界值(cut off 值)。

1.8 重复性试验

参考本实验室建立的基于 Mhp366-N 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法^[6]并做少许调整开展重复性试验,猪肺炎支原体阴性和阳性血清各随机选择 3 份。

1.9 与其他病原阳性血清的交叉反应检测

将猪肺炎支原体阴性和阳性血清作为对照,用确定的最佳反应条件检测猪鼻支原体、猪滑液支原体、絮状支原体、猪链球菌 2 型、猪圆环病毒 2 型、猪瘟病毒、非洲猪瘟病毒、猪蓝耳病病毒和猪伪狂犬病病毒 gB 蛋白阳性血清。每个血清设 3 次重复。

1.10 血清最大稀释倍数确定

取 5 份猪肺炎支原体阳性血清,用确定的最佳封闭液按 1:100、1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000 和 1:32 000 的比例稀释,其余步骤按最佳反应条件进行,测量相应孔的 OD_{450} 值,用确定的 cut off 值判断建立的 ELISA 方法血清的最大稀释倍数。

1.11 临床样品的检测

用本研究建立的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法检测采集的 226 份临床猪血清样品、猪肺炎支原体灭活疫苗免疫前(第 0 天)和免疫后不同时间点(免疫后第 7、10、15、18、20 和 28 天)采集的血清,同时用猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测试剂盒和商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒进行检测。比较不同试剂盒的检测结果。

2 结果与分析

2.1 *mhp336* 基因和 Mhp336 蛋白的保守性

mhp336 基因和 Mhp336 蛋白与猪的其他病原不存在同源基因和同源蛋白,与感染羊的绵羊支原体(*Mycoplasma ovipneumoniae*)的相关基因和蛋

白分别有 90.3%–91.8% (*mhp336*)和 79.5%–87.4% (Mhp336)的同源性,与感染牛的殊异支原体(*Mycoplasma dispar*)相关基因和蛋白分别有 92.4%–92.5% (*mhp336*)和 83.7%–88.7% (Mhp336)的同源性;不同猪肺炎支原体菌株中 *mhp336* 基因同源性超过 95.5%,Mhp336 蛋白同源性超过 90.2%。

2.2 Mhp336 蛋白的原核表达与纯化

以提取的重组质粒 pGEX-6P-1-*mhp336* 为模板 PCR 扩增 *mhp336* 基因片段(图 1A)。*mhp336* 基因全长 1 473 bp,扩增的片段去掉了终止密码子 TAA,但在两端分别添加了 *Bam*H I 和 *Xho* I 的酶切位点及保护性碱基,因此扩增的全长为 1 488 bp。

构建的重组质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后,被酶切为两个条带(图 1B),一条为 5 900 bp 左右的 pET-32a(+)载体片段,一条为 1 476 bp 的 *mhp336* 基因片段(PCR 产物基础上去掉了保护性碱基、*Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的部分碱基)。测序发现重组质粒中的 *mhp336* 基因序列除 5 个在支原体编码色氨酸的 TGA 密码子突变为 TGG 外,其余核苷酸序列与猪肺炎支原体 232 菌株 *mhp336* 基因的核苷酸序列完全一致。构建的重组质粒命名为 pET-32a(+)-*mhp336*。

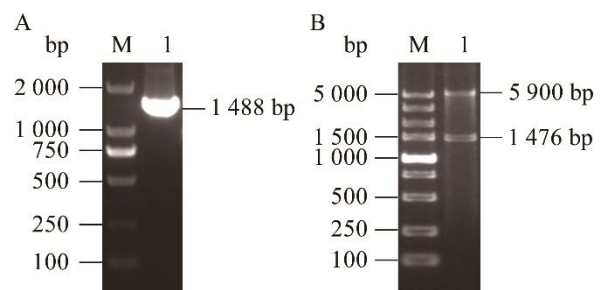


图 1 重组质粒 pET-32a(+)-*mhp336* 的构建 A: PCR 扩增 *mhp336* 基因. B: 重组质粒 pET-32a(+)-*mhp336* 的酶切鉴定

Figure 1 Construction of recombinant plasmid pET-32a(+)-*mhp336*. A: Amplification of *mhp336* gene by PCR. B: Identification of recombinant plasmid pET-32a(+)-*mhp336* by digestion.

构建的重组大肠杆菌 BL21(DE3)-pET32a(+)-mhp336 使用 IPTG 在 16 °C 诱导表达目的蛋白 20 h, 超声破菌后经多次离心, 分离得到上清和沉淀。根据 SDS-PAGE 电泳结果(图 2A) 和 Western blotting 结果(图 2B)可知, Mhp336 重组蛋白的分子量为 60 kDa, 以可溶和包涵体两种形式表达, 经纯化后纯度达到 95% 以上(图 2C)。

2.3 间接 ELISA 反应条件的确定

本研究确定 ELISA 操作步骤为: 纯化的 Mhp336 蛋白用碳酸盐缓冲液调整浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 3A), 每孔加入 100 μL , 37 °C 孵育 1 h 后 4 °C 过夜。PBST 洗涤 5 次, 每次 3 min。每孔加入 200 μL 含 2.5% 脱脂奶粉的 PBS 作为封闭液(图 3B), 37 °C 封闭 1 h (图 3C), PBST 洗涤 5 次。每孔加入 100 μL 待检猪血清(封闭液

1:500 稀释) (图 3D), 37 °C 孵育 0.5 h (图 3E), PBST 洗涤 5 次。每孔加入 100 μL 用封闭液 1:10 000 稀释(图 3F)的兔抗猪 IgG 酶标二抗, 37 °C 孵育 1 h (图 3G)后 PBST 洗涤 5 次。每孔加入底物显色液 A、B 各 50 μL 。室温避光显色 5 min (图 3H), 加入 50 μL 终止液, 10 min 内使用酶标仪测定 OD_{450} 值。

2.4 间接 ELISA 检测结果的判定标准

60 份猪肺炎支原体阴性血清 OD_{450} 的平均值(\bar{x})为 0.216, 标准差(s)为 0.058。以 $\bar{x}+2s$ 作为临界值(cut off 值), 最终确定待检血清 OD_{450} 值 ≥ 0.332 时为猪肺炎支原体抗体阳性, OD_{450} 值 < 0.332 时为猪肺炎支原体抗体阴性。

2.5 间接 ELISA 方法的重复性、交叉反应性和血清最大稀释倍数

制备的试剂盒批内和批间重复的变异系数

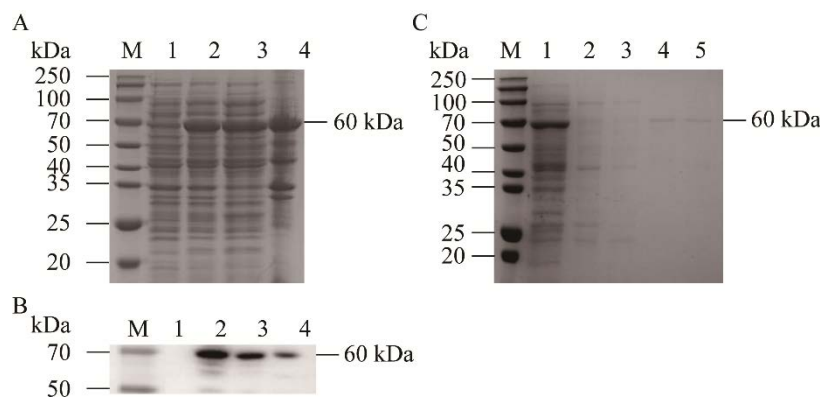


图 2 重组蛋白 Mhp336 的表达与纯化 SDS-PAGE (A)和 Western blotting (B)鉴定 Mhp336 蛋白的表达及表达形式. M: 蛋白 marker; 1: 未经 IPTG 诱导目的蛋白表达的重组菌; 2: 经 IPTG 诱导目的蛋白表达的重组菌; 3: 经 IPTG 诱导目的蛋白表达的重组菌破菌上清; 4: 经 IPTG 诱导目的蛋白表达的重组菌破菌沉淀. C: Mhp336 重组蛋白的纯化. M: 蛋白 Marker; 1: 重组菌破菌上清; 2: 流穿; 3: Washing buffer; 4-5: Elution buffer

Figure 2 Expression and purification of recombinant protein Mhp336. Identification of the expression and expression form of Mhp336 by SDS-PAGE (A) and Western blotting (B). M: Protein marker; 1: Recombinant bacteria without induction of recombinant protein expression by IPTG; 2: Recombinant bacteria with induction of recombinant protein expression by IPTG; 3: Supernatant of recombinant bacteria with induction of recombinant protein expression by IPTG; 4: The pellet of recombinant bacteria with induction of recombinant protein expression by IPTG. C: Purification of recombinant protein Mhp336. M: Protein marker; 1: Loading material; 2: Flow through; 3: Washing buffer; 4-5: Elution buffer.

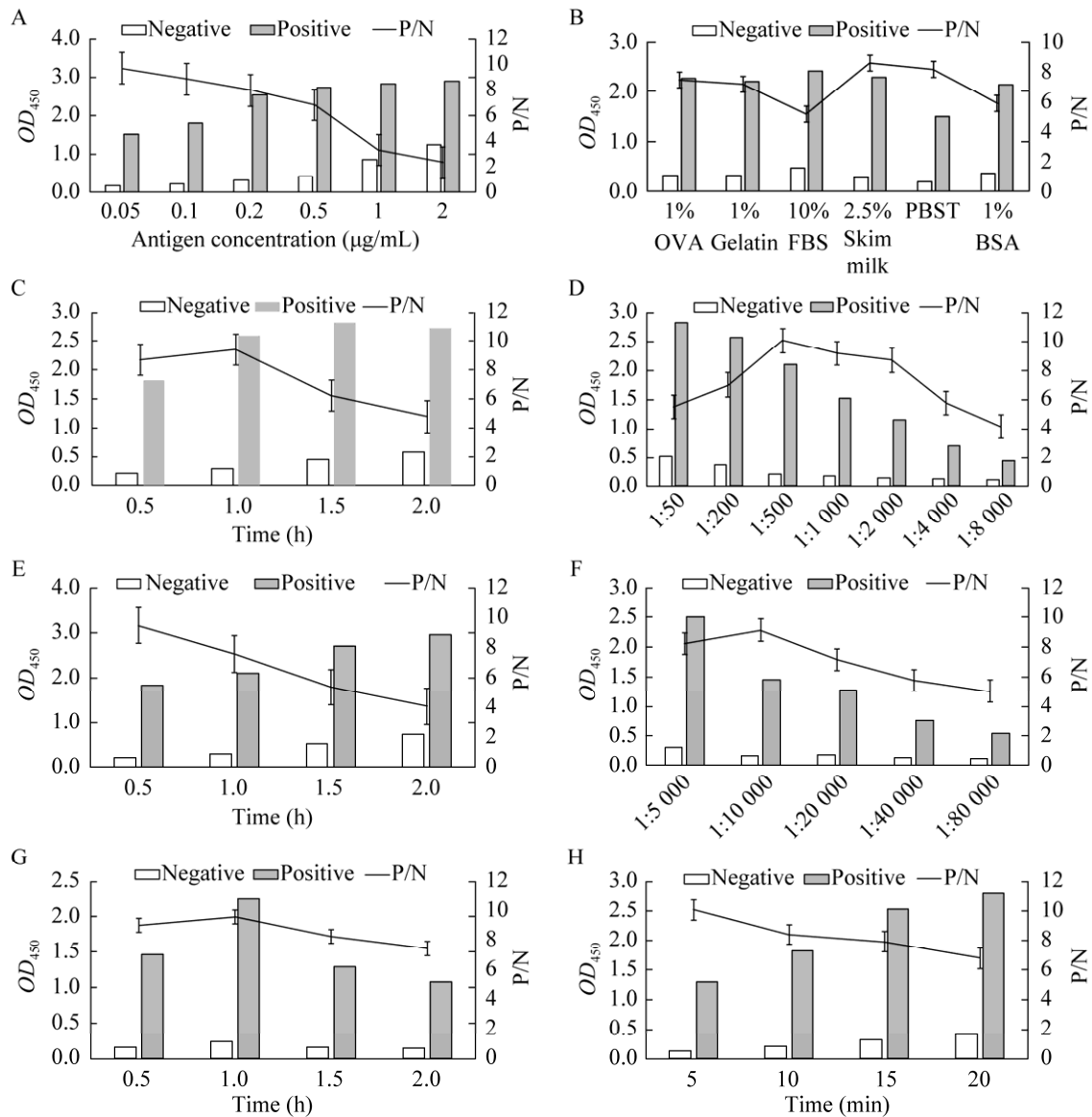


图3 基于 Mhp336 的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法的最佳反应条件 最佳抗原包被浓度为 0.05 μg/mL (A), 最佳封闭液为含 2.5% 脱脂奶粉的 PBS (B), 最佳封闭时间为 1 h (C), 最佳血清和二抗稀释倍数分别为 1:500 (D) 和 1:10 000 (F), 最佳血清和二抗孵育时间为 0.5 h (E) 和 1 h (G), 最佳显色时间为 5 min (H)

Figure 3 Optimal working conditions of the ELISA method for detection of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibody based on Mhp336 protein. The optimal antigen concentration was 0.05 μg/mL in coating buffer (A), The optimal blocking buffer was 2.5% skim milk dissolved in PBS (B), and the highest P/N value was got if the antigen was blocked for 1 h (C). The optimal dilutions of serum and secondary antibody were 1:500 (D) and 1:10 000 (F) diluted in blocking buffer. The optimal incubation times of serum and secondary antibody were 0.5 h (E) and 1 h (G), respectively. The optimal colorimetric reaction time was observed after exposing to substrate solution for 5 min (H).

分别为 2.46%–5.52% 和 3.63%–6.20%，小于 7%。表明同一批次和不同批次制备的试剂盒批

内和批间变异系数小，具有良好的批内和批间重复性。

按照本研究建立的 ELISA 方法检测 3 种支原体、1 种猪的致病菌、4 种猪的病毒和猪伪狂犬病病毒 gB 蛋白阳性血清。结果发现上述血清均为猪肺炎支原体抗体阴性(图 4), 说明建立的 ELISA 方法所用蛋白抗原和猪的其他主要病原和猪伪狂犬病病毒 gB 蛋白抗血清没有交叉反应。

由图 5 可见, 5 个猪肺炎支原体阳性血清在 1:4 000 稀释时, 所有血清均可判为阳性; 1:8 000 稀释时, 仅有 1 个血清可判为阳性; 1:16 000 和 1:32 000 稀释时, 所有的数值均低于 cut off 值。说明用该方法检测猪血清中猪肺炎支原体抗体最高可稀释 4 000 倍。

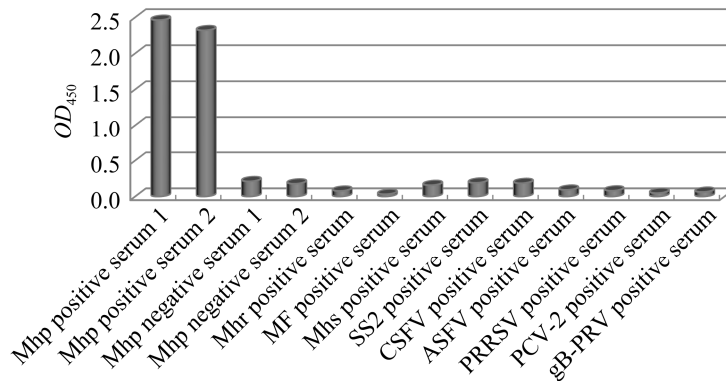


图 4 基于 Mhp336 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法检测猪的其他病原阳性血清结果

Figure 4 The detection result of positive sera of porcine pathogens using the ELISA method for detection of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibody based on Mhp336 protein. Mhp: *Mycoplasma hyopneumoniae*; Mhr: *Mycoplasma hyorhinis*; MF: *Mycoplasma flocculare*; Mhs: *Mycoplasma hyosynoviae*; SS2: *Streptococcus suis* serotype 2; CSFV: Classical swine fever virus; ASFV: African swine fever virus; PRRSV: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PCV-2: Porcine circovirus 2; gB-PRV: gB protein of pseudorabies virus.

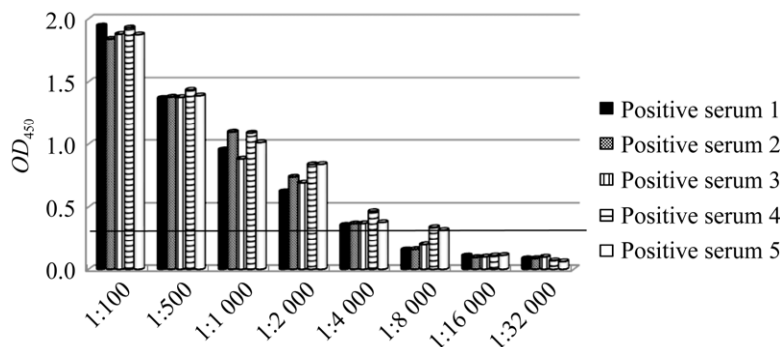


图 5 基于 Mhp336 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法的可用血清最高稀释倍数

Figure 5 The available maximum dilution ratio of porcine serum for the ELISA method for detection of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibody based on Mhp336 protein.

2.6 临床样品检测结果

采用本研究建立的基于 Mhp336 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法、猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法和商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒检测 226 份猪血清样品,结果如表 1 所示。本研究建立的方法和商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒的符合率为 81.0%,和猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法的符合率为 82.7%,猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法和商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒的符合率为 67.7%。

以商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒为基准,去掉不能判定的可疑血清,分别计算基于 Mhp336 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法和猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法的特异性和灵敏性。本方法的灵敏性和特异性分别为 87.9%和 85.2%,猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法的灵敏性和特异性分别为 86.2%和 66.5%。证明本方法的特异性和灵敏性均优于猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法。

用 3 种试剂盒检测猪肺炎支原体灭活疫苗免疫前和免疫后不同时间点采集的血清。商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒检测的

结果全部为阴性;用猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法检测,只有第 28 天采集的血清检测结果为阳性;用基于 Mhp336 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法检测,第 20 天和第 28 天采集的血清检测结果均为阳性。

3 讨论与结论

猪支原体肺炎通常不导致猪的死亡,但会严重降低猪的生产性能。在禁抗限抗以及疫苗的免疫效果有待进一步提升的背景下,猪支原体肺炎的净化越来越受到养殖企业的重视。疫病净化的关键条件之一是拥有灵敏性高、特异性好的检测试剂。

支原体是环境中的常在微生物,猪只不可避免会接触环境中的支原体并产生针对支原体的抗体。特别是絮状支原体,是猪场最常见的支原体,也是猪呼吸道的常在菌^[7-8];此外猪场还可能存在通常不引起猪发病或引起与猪链球菌病和格拉瑟病相似临床症状的猪鼻支原体^[9-10]。絮状支原体、猪鼻支原体与猪肺炎支原体存在共同抗原^[11-13]。商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒使用的包被抗原为猪肺炎支原体全菌蛋白。这就不可避免地导致试剂盒特异性较差,造成猪鼻支原体、絮状支原体或猪滑液囊支原体血清抗体的检出^[13]。有研究表明,商

表 1 使用不同的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法检测 226 份临床猪血清样品结果

Table 1 Detection results of 226 porcine serum samples using different ELISA antibody detection methods for *Mycoplasma hyopneumoniae*

Commercial <i>M. hyopneumoniae</i> antibody test kit	<i>M. hyopneumoniae</i> ELISA antibody test method based on Mhp336 protein		<i>M. hyopneumoniae</i> ELISA convalescent serum antibody test method		Total
	Positive	Negative	Positive	Negative	
Positive	51	7	50	8	58
Negative	23	132	52	103	155
Suspected	8	5	9	4	13
Total	82	144	111	115	226

品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒灵敏性较差^[14]。

基于上述情况,本实验室以猪肺炎支原体 Mhp366-N 蛋白^[14-15]为包被抗原,建立了基于 Mhp366-N 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法^[3-5]。该方法提高了检测的灵敏性,也克服了商品化试剂盒特异性不高的问题。但在临床检测过程中,我们发现在无猪支原体肺炎临床症状的猪只中使用荧光定量 PCR 方法检测不到猪肺炎支原体核酸,但用猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法检测猪血清为阳性。因此猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法可能存在较多的假阳性结果。这种方法用于猪场猪支原体肺炎净化会造成假阳性猪只的误淘汰,给猪场造成损失。因此,还需建立特异性更高的猪肺炎支原体抗体检测方法。

Mhp336 蛋白是本实验室发现的一个猪肺炎支原体体液免疫显性蛋白^[4],该蛋白与猪肺炎支原体阳性血清存在良好的反应性,经 BLAST 序列比对,与感染猪的其他微生物不存在同源蛋白,具有作为检测抗原的潜力。基于此,我们拟以 Mhp336 蛋白作为包被抗原,建立一种新的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法。

为确保得到在宿主菌以可溶形式表达的 Mhp336 蛋白,我们将 PCR 扩增得到的 *mhp336* 基因分别连接至 pET-22b(+)、pET-28a(+)、pET-30a(+)和 pET-32a(+)这 4 个载体,构建了 4 个重组菌。结果发现,只有连接 pET-32a(+)载体构建的重组菌中 Mhp336 重组蛋白大部分以可溶形式表达。因此,最终选择重组菌大肠杆菌 BL21(DE3)-pET-32a(+)-*mhp336* 用于表达 Mhp336 重组蛋白。

采用本研究建立的 ELISA 检测方法检测其他猪的病原阳性血清,结果表明,所用的包被抗

原 Mhp336 蛋白与检测的其他猪病原蛋白没有交叉反应性。

以商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒为基准,比较本研究建立的方法和猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法的灵敏性和特异性。理论上说,高灵敏性和高特异性不可兼得^[16],但我们将使用商品化猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒检测到的 13 个不能判定阴阳性的可疑样品去除后再比较两种方法的灵敏性和特异性,结果发现本研究建立的方法比猪肺炎支原体 ELISA 恢复期血清抗体检测方法的灵敏性和特异性均更高,这也说明本研究建立的方法优于其他两种方法。

总之,本研究基于猪肺炎支原体 Mhp336 蛋白建立了一种新的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法。该方法具有良好的灵敏性和特异性,适合用于猪场猪支原体肺炎的净化。

REFERENCES

- [1] FENG ZX, SHAO GQ, LIU MJ, WANG HY, GAN Y, WU XS. Development and validation of a sIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 143(2/3/4): 410-416.
- [2] BAI Y, GAN Y, HUA LZ, NATHUES H, YANG H, WEI YN, WU M, SHAO GQ, FENG ZX. Application of a sIgA-ELISA method for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* infected from vaccinated pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 223: 86-92.
- [3] DING HL, WEN YK, XU ZB, ZHOU BQ, TLILI C, TIAN YQ, WANG ZD, NING YR, XIN JQ. Development of an ELISA for distinguishing convalescent sera with *Mycoplasma hyopneumoniae* infection from hyperimmune sera responses to bacterin vaccination in pigs[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2021, 7(5): 1831-1840.
- [4] NING YR, ZHOU YQ, WANG ZD, WEN YK, XU ZB, TIAN YQ, YANG M, WANG XD, YANG YJ, DING HL. Elevated Mhp462 antibody induced by natural infection but not *in vitro* culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *Heliyon*, 2020, 6(8): e04832.

- [5] TIAN YQ, XU ZB, WEN YK, YANG M, NING YR, WANG ZD, DING HL. 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.
- [6] 徐作波. 猪肺炎支原体恢复期血清抗体 ELISA 检测方法的建立[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2019.
- XU ZB. Establishment of ELISA method for detection of convalescent serum antibody of *Mycoplasma hyopneumoniae*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2019 (in Chinese).
- [7] STRASSER M, ABIVEN P, KOBISCH M, NICOLET J. Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1992, 31(1/2): 141-153.
- [8] FERRARINI MG, SIQUEIRA FM, MUCHA SG, PALAMA TL, JOBARD É, ELENA-HERRMANN B, VASCONCELOS ATR, TARDY F, SCHRANK IS, ZAHA A, SAGOT MF. Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling[J]. BMC Genomics, 2016, 17: 353.
- [9] KO CC, MERODIO MM, SPRONK E, LEHMAN JR, SHEN HG, LI GW, DERSCHEID RJ, PIÑEYRO PE. Diagnostic investigation of *Mycoplasma hyorhinis* as a potential pathogen associated with neurological clinical signs and central nervous system lesions in pigs[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 180: 106172.
- [10] KANG I, KIM D, HAN K, SEO HW, OH Y, PARK C, LEE J, GOTTSCHALK M, CHAE C. Optimized protocol for multiplex nested polymerase chain reaction to detect and differentiate *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from pigs with polyserositis[J]. Canadian Journal of Veterinary Research =Revue Canadienne de Recherche Veterinaire, 2012, 76(3): 195-200.
- [11] PAES JA, LORENZATTO KR, de MORAES SN, MOURA H, BARR JR, FERREIRA HB. Secretomes of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* reveal differences associated to pathogenesis[J]. Journal of Proteomics, 2017, 154: 69-77.
- [12] PAES JA, del PRÁ NETTO MACHADO L, dos ANJOS LEAL FM, de MORAES SN, MOURA H, BARR JR, FERREIRA HB. Comparative proteomics of two *Mycoplasma hyopneumoniae* strains and *Mycoplasma flocculare* identified potential porcine enzootic pneumonia determinants[J]. Virulence, 2018, 9(1): 1230-1246.
- [13] NETO JCG, STRAIT EL, RAYMOND M, RAMIREZ A, MINION FC. Antibody responses of swine following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* and *M. flocculare*[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 174(1/2): 163-171.
- [14] SIMIONATTO S, MARCHIORO SB, dos SANTOS BARBOSA M, GALLI V, BRUM CB, JORGE S, DELLAGOSTIN OA. Development of ELISA using recombinant proteins for the diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection[J]. Indian Journal of Microbiology, 2022, 62(1): 88-95.
- [15] MEENS J, BOLOTIN V, FRANK R, BÖHMER J, GERLACH GF. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 142(3/4): 293-302.
- [16] PARIKH R, MATHAI A, PARIKH S, SEKHAR GC, THOMAS R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values[J]. Indian Journal of Ophthalmology, 2008, 56(1): 45-50.

(本文责编 陈宏宇)