

研究报告

猪肺炎支原体 Mhp367 蛋白不同区段与恢复期血清反应能力的比较

杨梅¹, 董青霜¹, 冯林¹, 黄佐兴², 吴彦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 新疆生产建设兵团第十师畜牧兽医工作站, 新疆 北屯 836099

杨梅, 董青霜, 冯林, 黄佐兴, 吴彦, 丁红雷. 猪肺炎支原体 Mhp367 蛋白不同区段与恢复期血清反应能力的比较[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2152-2159

Yang Mei, Dong Qingshuang, Feng Lin, Huang Zuoxing, Wu Yan, Ding Honglei. Comparison of the reactivity of convalescent sera to different regions of *Mycoplasma hyopneumoniae* Mhp367 protein[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2152-2159

摘要:【背景】课题组前期研究发现猪肺炎支原体 Mhp367 蛋白是体液免疫显性蛋白, 但该蛋白不同区段与猪肺炎支原体恢复期血清的反应能力尚不明确。【目的】鉴定 Mhp367 蛋白不同区段与猪肺炎支原体恢复期血清的反应能力。【方法】利用不同的引物组合扩增 *mhp367* 基因片段, 扩增的片段连接 pGEX-6P-1、pGEX-4T-3 或 pGEX-5X-3 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。提取的质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切及测序确定重组质粒是否构建成功。正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞构建重组菌。重组菌经 IPTG 诱导和超声破菌后, 经与谷胱甘肽 beads 结合和 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白表达情况。表达目的蛋白的重组菌破菌后上清包被谷胱甘肽板, ELISA 方法鉴定 Mhp367 蛋白不同区段与猪肺炎支原体恢复期血清的反应能力。【结果】构建了 9 个能以可溶形式表达目的蛋白的重组菌; 9 个 Mhp367 蛋白片段均为体液免疫显性, 第 394–524 位氨基酸区段与猪肺炎支原体恢复期血清反应最强, 是一个良好的疫苗候选抗原区段。【结论】本研究为猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗的研发提供了候选抗原靶标。

关键词: 猪肺炎支原体; Mhp367; 恢复期血清; ELISA

基金项目: 国家自然科学基金(32172870); 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2020B012); 家畜疫病病原生物学国家重点实验室(中国农业科学院兰州兽医研究所)开放课题(SKLV2021KFKT003); 西南大学大学生创新创业训练计划项目(S202110635138)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32172870); Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2020B012); Project of State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology (Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences) (SKLV2021KFKT003); College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of Southwest University (S202110635138)

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

Received: 2021-09-24; Accepted: 2022-01-05; Published online: 2022-02-14

Comparison of the reactivity of convalescent sera to different regions of *Mycoplasma hyopneumoniae* Mhp367 protein

YANG Mei¹, DONG Qingshuang¹, FENG Lin¹, HUANG Zuoxing², WU Yan¹,
DING Honglei^{*1}

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

2 Animal Husbandry and Veterinary Station of the Tenth Division, Xinjiang Production and Construction Corps, Beitun 836099, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Previous studies in our laboratory have demonstrated that *Mycoplasma hyopneumoniae* Mhp367 protein is a humoral immunodominant proteinic antigen. However, the reactivity of different regions of Mhp367 to the convalescent sera remains unclear. [Objective] The purpose of this study is to identify the reactivity of different regions of Mhp367 to the convalescent sera. [Methods] Nine DNA fragments of *mhp367* were amplified with different primer combinations. The amplified products were respectively ligated into pGEX-6P-1, pGEX-4T-3, or pGEX-5X-3, and the ligation products were transformed into *Escherichia coli* DH5 α competent cells. The constructed plasmids were extracted from the cells and confirmed by digestion with *Bam*H I and *Xho* I and nucleotide sequencing. The identified plasmids were then transformed into *E. coli* BL21(DE3) to express target proteins (different fragments of Mhp367) under the induction of IPTG. After ultrasonic disruption of the recombinant bacteria, the protein was purified with glutathione-conjugated agarose beads. The expression of proteins was visualized by SDS-PAGE. ELISA was employed to identify the reactivity between different fragments of Mhp367 protein and convalescent sera. [Results] Nine recombinant strains that could express different fragments of Mhp367 in soluble form were successfully constructed. All of the nine fragments were humoral immunodominant. The region aa 394–524 in Mhp367 had the strongest reactivity with convalescent sera and was a good antigen fragment for vaccine candidates. [Conclusion] This study provides a candidate of genetic engineering subunit vaccines against *M. hyopneumoniae*.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*; Mhp367; convalescent serum; ELISA

猪肺炎支原体是引起猪支原体肺炎(或者叫作猪喘气病、猪气喘病)的病原,该菌广泛存在于世界各地猪场^[1]。目前对猪支原体肺炎最主要的防控方式是免疫疫苗,而疫苗特别是灭活疫苗的免疫效果存在争议,甚至认为猪免疫猪肺炎支原体灭活疫苗后不能有效提升生产性能^[2-3]。因此亟须开发具有良好免疫保护效果的新型猪肺炎支原体疫苗。在新型猪肺炎支原体疫苗蛋白抗原筛选中,如果能尽量减少蛋白的氨基酸长度,则可以在疫苗特别是基因工程疫

苗的制备中增加更多的保护性蛋白抗原,提高疫苗的免疫保护效果。Mhp367蛋白是一种在猪肺炎支原体菌株中高度保守的蛋白,相对分子质量为 61 kDa,其基因全长为 1 575 bp。本实验室前期研究证明,猪肺炎支原体感染猪只后能刺激机体产生高水平的 Mhp367 蛋白抗体^[4],但该蛋白在刺激机体产生体液免疫反应时哪个区段最重要还不明确。因此,本研究筛选 Mhp367 蛋白中与猪肺炎支原体恢复期血清(猪肺炎支原体感染猪只而非疫苗免疫产生的抗体阳性血清)

反应最强烈的氨基酸区段, 以期为新型猪肺炎支原体疫苗的开发提供候选蛋白抗原。

1 材料与方法

1.1 菌株和血清

重组菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)-pGEX-6P-1-mhp367、GST 工程菌^[5]、大肠杆菌 DH5 α 感受态、大肠杆菌 BL21(DE3)感受态、pGEX-6P-1 载体、pGEX-5X-3 载体、pGEX-4T-3 载体、猪肺炎支原体恢复期血清和阴性血清^[6]均由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒, 广州美基生物科技有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒, 湖南艾科瑞生物工程有限公司; *Bam*H I、*Xho* I、蛋白 Marker、DNA Marker、PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase、T4 连接酶, 宝日医生物技术(北京)有限公司; 谷胱甘肽琼脂糖珠, GE Healthcare 公司; HRP 标记兔抗猪 IgG, 北京博奥森生物技术有限公司; 新生牛血清(newborn bovine serum, NBS), 浙江天杭生物科技股份有限公司; 谷胱甘肽包

被板, Thermo Scientific 公司; ELISA 底物液 A、B 和终止液参照文献[7]配制。PCR 仪, 杭州晶格科学仪器有限公司; 凝胶成像系统, 杭州奥盛仪器有限公司; 蛋白凝胶电泳仪、酶标仪, Bio-Rad 公司。

1.3 引物设计与合成

共设计 8 条引物, 引物名称及序列分别为 367-1 (5'-CGCGGATCCATGAAAAAATCACTAAATATTTGTTAAT-3'), 367-2 (5'-CCGCTCGAGCTAATTTTCCCAATTTTAAAGCTGA-3'), 367-3 (5'-CGCGGATCCATGGTTATAAGAAAAGAAAATCAAACACTACT-3'), 367-4 (5'-CCGCTCGAGCTAATAACGAGGATTGATTTGGT-3'), 367-5 (5'-CGCGGATCCATGCTAAAATTTATGCGATATTATGATGA-3'), 367-6 (5'-CCGCTCGAGCTAAAATTTTGAAATTTTTTCCCAATATT-3'), 367-7 (5'-CGCGGATCCATGGAGCCTCTAAAATTTCTGATAA-3')和 367-8 (5'-CCGCTCGAGTTATTTTAGATATGCCTTATAAATCTCA-3'), 下划波浪线为保护性碱基, 下划横线为酶切位点。各引物预计扩增片段见图 1。引物由重庆擎科兴业生物技术有限公司合成。

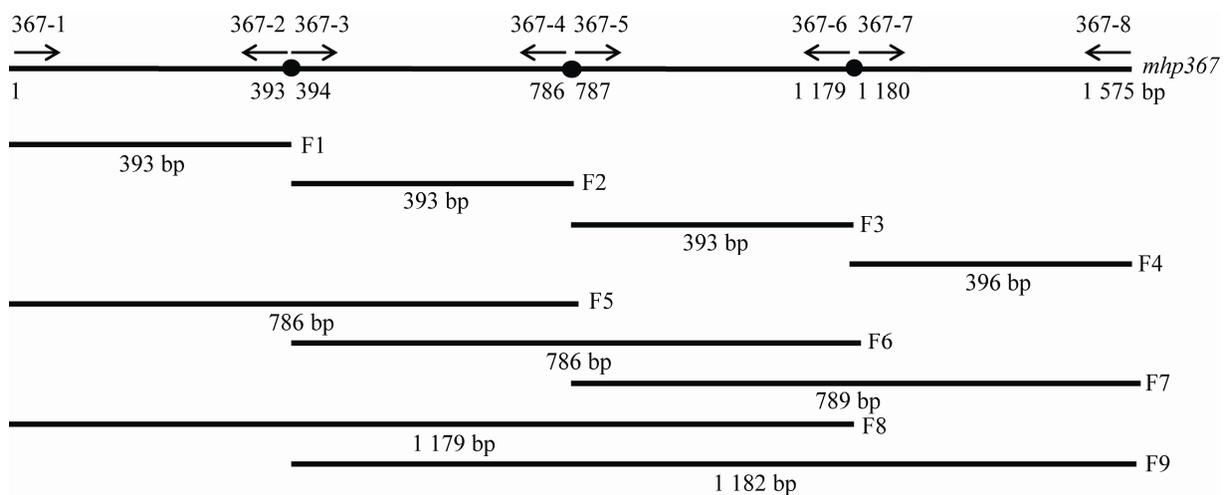


图 1 扩增 *mhp367* 基因片段示意图

Figure 1 Schematic diagram of *mhp367* fragments to be amplified.

1.4 Mhp367 蛋白的分段表达与纯化

根据不同的引物组合 PCR 扩增 *mhp367* 基因片段, 引物组合为: 367-1/367-2、367-3/367-4、367-5/367-6、367-7/367-8、367-1/367-4、367-3/367-6、367-5/367-8、367-1/367-6 和 367-3/367-8, 扩增的片段依次命名为 F1、F2、F3、F4、F5、F6、F7、F8 和 F9。PCR 反应体系: PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 25 μ L, 模板 DNA 0.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/mL) 各 1 μ L, ddH₂O 22.5 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 20 s, 50 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 6 min。

对 PCR 扩增片段进行胶回收, 回收产物用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h 后再次进行胶回收。胶回收产物与同样经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的 pGEX-6P-1、pGEX-5X-3 或 pGEX-4T-3 载体连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后, 涂布于含 100 mg/L 氨苄西林(Amp⁺)的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。挑取单菌落接种于 Amp⁺ LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 8 h 后提取质粒, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定和序列测定。构建正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞后涂布 Amp⁺ LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。挑取单菌落接种于 Amp⁺ LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 8 h 后提取质粒, 再次经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。

重组菌于 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.7–0.9 时, 加入 IPTG (1 mmol/L), 继续在 16 $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下培养 20 h。之后将培养的菌液于 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入原菌液体积 1/25 的 PBS 重悬, 超声破菌(120 W 功率, 工作 9 s, 间歇 9 s)至菌液清亮。破菌产物于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min 取上清, 与谷胱甘肽琼脂糖珠室温旋转孵育 1–2 h 或

4 $^{\circ}$ C 旋转孵育过夜。经 PBST (PBS+0.05% Tween) 洗涤 2 次和 PBS 洗涤 1 次后于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 2 min, 弃上清。沉淀经 12% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达和纯化情况。

1.5 重组菌的大规模诱导表达

将构建的 9 个重组菌和 *E. coli* BL21(DE3)-pGEX-6P-1-*mhp367*、GST 工程菌分别接种于 10 mL Amp⁺ LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养过夜。取 5 mL 培养液接种至 500 mL Amp⁺ LB 液体培养基, 诱导表达目的蛋白 20 h。表达目的蛋白的菌液于 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。加入 PBS 重悬后同 1.4 超声破菌至菌液清亮, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清。各重组菌及 GST 工程菌分别取破菌上清 1 mL, 与谷胱甘肽 beads 结合后用 12%凝胶进行 SDS-PAGE 电泳, 检测重组蛋白和 GST 蛋白的表达情况。

1.6 Mhp367 蛋白体液免疫显性区段的筛选鉴定

参照 Ning 等^[4]的方法, 将 10 个重组菌和 GST 工程菌的裂解液分别加入谷胱甘肽包被板孔, 每孔 200 μ L。4 $^{\circ}$ C 包被过夜, PBST 洗涤 5 次, 每次 3 min。每孔加入 200 μ L 含 10% (体积分数) NBS 和 2.5% (质量体积分数)脱脂奶粉的 PBS 作为封闭液室温封闭 1 h, PBST 洗涤 5 次, 每次 3 min。将 15 份猪肺炎支原体恢复期血清和 9 份阴性血清(所有血清均经 IPTG 诱导的 GST 工程菌破菌产物预吸附, 以降低血清中非特异抗体的干扰)用封闭液按 1:500 比例稀释后, 加入谷胱甘肽包被板中相应孔, 每孔加入 100 μ L, 室温孵育 2 h, PBST 洗涤 5 次, 每次 3 min。HRP 标记兔抗猪 IgG 用封闭液 1:40 000 比例稀释后, 每孔加入 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 洗涤 5 次, 每次 3 min。每孔加入底物液 A 和 B 各 50 μ L, 混匀, 室温避光显色 10 min

后加入 50 μL 终止液, 10 min 内酶标仪测定 OD_{450} 。同时将 GST 工程菌诱导表达后按此条件进行 ELISA 试验, 测定相应孔的 OD_{450} 值。

计算每个重组菌裂解液和 GST 工程菌裂解液与每份阴性血清反应的 OD_{450} 值之差, 该差值的平均值为 \bar{x} , 标准差为 SD; 同时, 计算每个重组菌裂解液和 GST 细菌裂解液与每份恢复期血清反应的 OD_{450} 值之差, 该差值命名为 A 。若 $A \geq \bar{x} + 2SD$, 则该血清判定为阳性。若某蛋白的阳性血清数量超过恢复期血清数量的一半, 则将该蛋白判定为体液免疫显性蛋白抗原。

2 结果与分析

2.1 重组菌的构建

使用高保真酶扩增 *mhp367* 基因各片段。由于设计 PCR 扩增引物时引入了保护性碱基和酶切位点, 有些还添加了起始密码子 ATG 和/或终止密码子 TAA, 所以实际扩增的片段比截取的片段大。扩增的片段大小依次为: 414 bp (F1)、417 bp (F2)、417 bp (F3)、417 bp (F4)、807 bp (F5)、810 bp (F6)、810 bp (F7)、1 200 bp (F8)和 1 203 bp (F9) (图 2)。

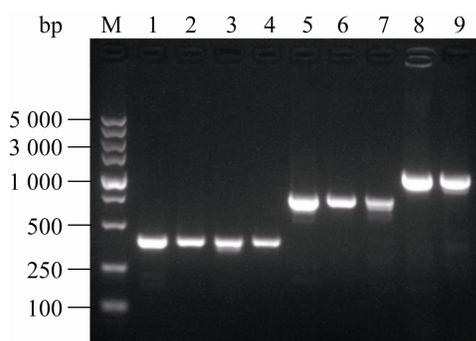


图 2 *mhp367* 基因片段的 PCR 扩增产物电泳图
Figure 2 Amplification of *mhp367* fragments. M: DL5000 DNA Marker; 1: F1 fragment; 2: F2 fragment; 3: F3 fragment; 4: F4 fragment; 5: F5 fragment; 6: F6 fragment; 7: F7 fragment; 8: F8 fragment; 9: F9 fragment.

片段 F1、F2、F3、F4、F5、F7、F9 分别连接 pGEX-6P-1 载体, F6 连接 pGEX-5X-3 载体, F8 连接 pGEX-4T-3 载体, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞构建大肠杆菌 DH5 α 重组菌。提取重组菌的质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 所有质粒均能酶切出一条 5 000 bp 左右的载体片段及与预期大小相符的基因片段 (图 3)。构建的重组质粒插入片段经酶切后去掉了保护碱基及 *Bam*H I 酶切位点的 GATCC 碱基和 *Xho* I 酶切位点的 C 碱基, 所以每个插入片段比 PCR 片段少 12 bp, 酶切后的插入片段大小分别为 402 bp (F1)、405 bp (F2)、405 bp (F3)、405 bp (F4)、795 bp (F5)、798 bp (F6)、798 bp (F7)、1 188 bp (F8)和 1 191 bp (F9) (图 3)。重组质粒经测序鉴定, 与 *mhp367* 基因相应片段的核苷酸序列完全一致, 说明成功构建了重组质粒。将这 9 个重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态, 构建大肠杆菌 BL21(DE3) 重组菌。

2.2 重组蛋白的诱导表达

10 个重组菌及 GST 工程菌均能够表达目的蛋白。由图 4 可见, 重组蛋白 GST-Mhp367 大小为 87 kDa (泳道 1), F1、F3、F4 为 42 kDa (泳道 2、4、5), F2 为 41 kDa (泳道 3), F5 为

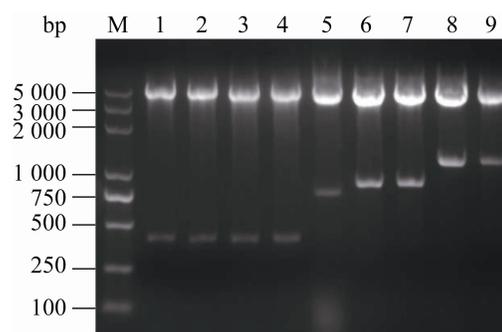


图 3 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定重组质粒电泳图
Figure 3 Recombinant plasmids were identified by digestion with *Bam*H I and *Xho* I. M: DL5000 DNA Marker; 1: F1; 2: F2; 3: F3; 4: F4; 5: F5; 6: F6; 7: F7; 8: F8; 9: F9.

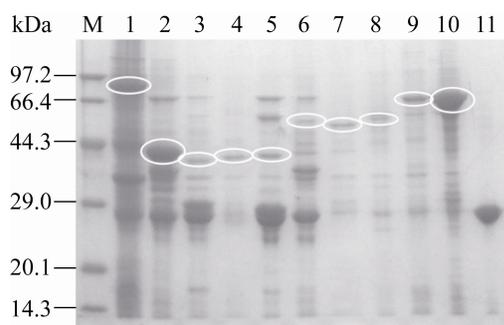


图 4 重组蛋白的诱导表达

Figure 4 Expression of recombinant proteins induced with IPTG. M: Protein Marker; 1: GST-Mhp367; 2: F1; 3: F2; 4: F3; 5: F4; 6: F5; 7: F6; 8: F7; 9: F8; 10: F9; 11: GST.

56 kDa (泳道 6), F6 为 55 kDa (泳道 7), F7 为 57 kDa (泳道 8), F8 和 F9 为 72 kDa (泳道 9、10)。此外, GST 工程菌能大量表达 GST 蛋白(泳道 11)。从蛋白表达量来看, F1 和 F9 的表达量较高, 其余几个片段的表达量一般。

2.3 Mhp367 体液免疫显性蛋白区段的筛选

除 F6 蛋白与 9 份恢复期血清反应外, 其余 9 个重组蛋白均能与 15 份恢复期血清反应(图 5A、5B)。计算与每个蛋白反应的所有血清的 \bar{x} 值之和(图 5C, 表 1)及平均 \bar{x} 值(图 5D, 表 1), \bar{x} 值之和及平均 \bar{x} 值从大到小对应的蛋白依次为 F9、F4、F8、GST-Mhp367、F2、F5、F1、F6、F3 和 F7。从 Mhp367 分的 4 个片段 F1、F2、F3 和 F4 来看, \bar{x} 值之和及平均 \bar{x} 值从大到小对应的蛋白依次为 F4、F2、F1 和 F3, F4 与血清的反应最强烈, 与 F1、F2 和 F3 具有显著性差异($P \leq 0.001$)。

3 讨论与结论

猪肺炎支原体在世界各地的猪场广泛存在, 而且净化较为困难。除了良好的生物安全措施, 免疫疫苗被认为是目前防控该病最方便

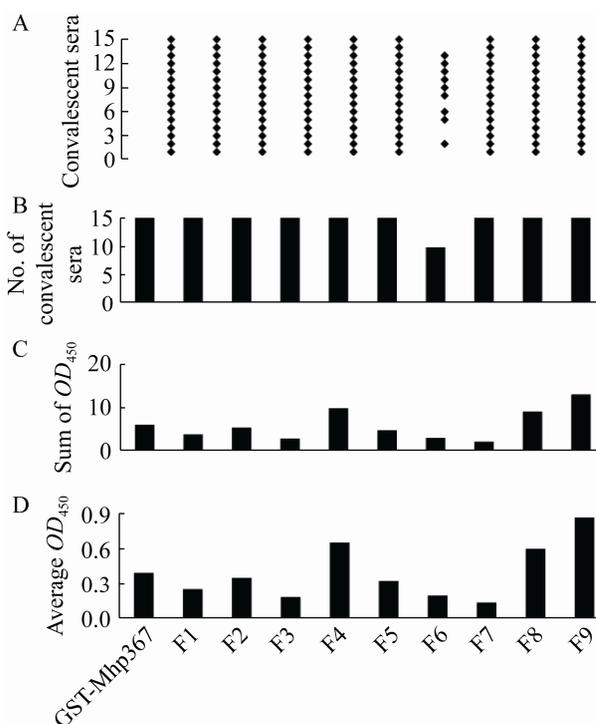


图 5 Mhp367 及其不同区段与 15 份恢复期血清的反应结果 A: 能与重组蛋白反应的血清; B: 能与重组蛋白反应的血清数量; C: 与重组蛋白反应的血清的 \bar{x} 值之和; D: 与重组蛋白反应的血清的平均 \bar{x} 值

Figure 5 Reactivity of 15 porcine convalescent sera to Mhp367 and its fragments. A: Serum that reacts with Mhp367 and its fragments. B: Number of sera that reacted with each fusion protein. C: Differences in total titers between convalescent and negative sera. D: Differences in average titers between convalescent and negative sera.

的手段^[1,8]。然而现有疫苗的实际免疫效果和人们的期望存在很大差距, 这使得开发更有效的疫苗成为猪支原体肺炎研究中亟须解决的问题^[9]。抗原筛选是疫苗研发的重要环节。本实验室通过 ELISA 方法比较了一些猪肺炎支原体膜蛋白与高免血清(猪肺炎支原体灭活疫苗免疫猪只产生的抗体阳性血清)和恢复期血清的反应发现, 高免血清与蛋白反应的 OD_{450} 值远

表1 与蛋白反应的血清总 OD_{450} 值及平均 OD_{450} 值
Table 1 Total and average OD_{450} value of sera reacting with proteins

OD_{450} 值 OD_{450} value	与蛋白反应的血清 OD_{450} 值之和 Total OD_{450} value of sera reacting with proteins	与蛋白反应的血清平 均 OD_{450} 值 Average OD_{450} value of sera reacting with proteins
GST-Mhp367	5.93	0.40
F1	3.71	0.25
F2	5.27	0.35
F3	2.70	0.18
F4	9.81 ^a	0.65 ^a
F5	4.66	0.31
F6	2.88	0.19
F7	1.99	0.13
F8	9.02	0.60
F9	13.02	0.87

Note: ^a: $P \leq 0.001$.

远低于恢复期血清与蛋白反应的 OD_{450} 值。疫苗免疫刺激机体产生的体液免疫水平低下,这可能是体液免疫保护效果不佳的重要原因。因此,本实验室筛选了一些体液免疫显性蛋白,为后续猪肺炎支原体疫苗开发提供了候选抗原。

在疫苗中加入尽可能多的保护性抗原有利于提高疫苗的免疫保护效果。将保护性抗原串联表达是制备基因工程亚单位疫苗的一个重要手段,但每个表达载体能够容纳的核苷酸长度是有限的^[10]。筛选体液免疫显性蛋白区段,将蛋白抗原的长度尽可能缩短能够增加表达载体中抗原的数量。我们课题组前期研究发现,猪肺炎支原体 Mhp367 蛋白能与恢复期血清发生强烈的体液免疫反应^[4],其有可能是一个良好的疫苗抗原。基于前述分析,我们希望找到该蛋白的体液免疫显性区段,为后续的疫苗研发奠定基础。

我们将 *mhp367* 基因分为 4 段,并通过不同的组合连接 pGEX 系列载体后转化大肠杆菌,以可溶形式表达了 Mhp367 蛋白的 9 个区段。从与抗原反应的血清数量来看, Mhp367 蛋白的 4 个小区段(F1-F4)均能与机体产生体

液免疫反应,但强度有差异,其中 F4 区段(394-524 位氨基酸)的免疫反应最强烈,其次为 F2 (132-262 位氨基酸)和 F1 (1-131 位氨基酸),F3 区段(263-393 位氨基酸)的免疫反应最弱,说明这 4 个区段中均存在刺激机体产生体液免疫的抗原表位。预测 Mhp367 蛋白的亚细胞定位发现,该蛋白锚定在细胞膜上,是一个膜表面蛋白,F1-F4 区段均位于细胞膜外^[11-12],因此这 4 个区段均可能刺激机体发生免疫反应。三维结构预测软件 SWISS-MODEL^[13-14]和 Phyre2^[15]不能预测 Mhp367 蛋白全长的三维结构,但能预测 F4 区段部分氨基酸序列的结构,该部分结构和胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶的部分结构相同。有研究表明,丝氨酸蛋白酶在病原菌的黏附、定殖、促进疾病发生中具有重要作用,而其作为抗原免疫机体则可发挥免疫清除病原的功能^[16]。因此,F4 区段也可能在 Mhp367 蛋白的免疫保护中发挥重要作用。

F6 区段(132-393 位氨基酸)只能与部分血清发生免疫反应;F7 区段(263-524 位氨基酸)与恢复期血清反应的 OD_{450} 值较小,与血清反应的能力较弱。主要原因可能有 3 个:(1) F6 和 F7 区段均包括与血清反应能力较弱的 F3 区段;(2) 虽然 F6 和 F7 区段分别包括与恢复期血清反应能力较强的 F2 和 F4 区段,但 F6 和 F7 区段形成的蛋白的三维结构与完整的 Mhp367 蛋白的三维结构不同,优势抗原表位较多的 F2 和 F4 区段大部分包裹进了蛋白的内部,暴露出来的大部分为 F3 区段氨基酸;(3) B 细胞表面受体或抗体识别的抗原表位多为构象表位,仅有少数为线性表位^[17],F6 和 F7 区段在蛋白形成过程中未形成与完整 Mhp367 蛋白相同的三维结构,从而导致形成的构象表位数量较少。

F8 (1-393 位氨基酸)和 F9 (132-524 位氨基酸)区段与血清反应的 OD_{450} 值之和比 Mhp367 蛋白与血清反应的 OD_{450} 值之和还要高,可能原因

是这 2 个区段氨基酸数量比其他区段多, 更容易形成与原蛋白相同的三维结构, 而且形成的抗原表位与原蛋白相比更多地暴露在蛋白表面, 与血清抗体更容易结合, 因此得到的 OD_{450} 值更高。

上述分析提示我们, 在今后的抗原筛选过程中不能只关注蛋白本身, 更应该考虑到抗原表位, 因为实际上刺激机体产生免疫反应的是抗原表位。因此, 可以通过蛋白三维结构修饰充分暴露其抗原表位, 激发机体更强的免疫反应, 以此来筛选疫苗候选抗原。

REFERENCES

- [1] Maes D, Sibila M, Kuhnert P, Segalés J, Haesebrouck F, Pieters M. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: knowledge gaps for improved disease control[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(Suppl 1): 110-124
- [2] Meyns T, Dewulf J, De Kruijff A, Calus D, Haesebrouck F, Maes D. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations[J]. *Vaccine*, 2006, 24(49/50): 7081-7086
- [3] Villarreal I, Meyns T, Dewulf J, Vranckx K, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F, Maes D. The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions[J]. *The Veterinary Journal*, 2011, 188(1): 48-52
- [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] 周瑶琴, 游凤, 钟杰, 王豪举, 丁红雷. 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
Zhou YQ, You F, Zhong J, Wang HJ, Ding HL. Development of an ELISA for identification of immunodominant protein antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(1): 44-53 (in Chinese)
- [6] 钟杰, 蔡宜冰, 周瑶琴, 徐作波, 吴建云, 丁红雷. 猪肺炎支原体部分血清体液免疫显性蛋白抗原的筛选鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(5): 894-900
Zhong J, Cai YB, Zhou YQ, Xu ZB, Wu JY, Ding HL. Screening and identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* serological humoral immunodominant proteinic antigen[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2019, 39(5): 894-900 (in Chinese)
- [7] 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
- [8] Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 126(4): 297-309
- [9] Simionatto S, Marchioro SB, Maes D, Dellagostin OA. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 165(3/4): 234-242
- [10] Hunt I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression[J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 40(1): 1-22
- [11] Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 338(5): 1027-1036
- [12] Yu CS, Cheng CW, Su WC, Chang KC, Huang SW, Hwang JK, Lu CH. CELLO2GO: a web server for protein subcellular localization prediction with functional gene ontology annotation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99368
- [13] Bienert S, Waterhouse A, de Beer TAP, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL repository — new features and functionality[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 45(D1): D313-D319
- [14] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, De Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296-W303
- [15] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845-858
- [16] Ali MQ, Kohler TP, Schulig L, Burchhardt G, Hammerschmidt S. Pneumococcal extracellular serine proteases: molecular analysis and impact on colonization and disease[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 763152
- [17] 曹雪涛. 医学免疫学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018
Cao XT. *Medical Immunology*[M]. 7th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018 (in Chinese)