

研究报告



猪肺炎支原体 Mhp366-N 蛋白多克隆抗体的制备及应用

文玉康^{1,2} 周冰倩^{1,2} 陈政锐^{1,2} 杨梅^{1,2} 田亚琴^{1,2} 丁红雷^{*1,2}

1 西南大学动物医学院动物支原体学实验室 重庆 400715

2 西南大学医学研究院免疫学研究中心 重庆 400715

摘要:【背景】猪肺炎支原体是猪的一种重要的病原。该菌的研究工具较少,特别是缺少开展其致病机制研究需要的抗体。【目的】制备猪肺炎支原体 Mhp366-N 蛋白抗体并确定其应用范围和使用时的最佳稀释倍数。【方法】*Escherichia coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-mhp366-N 重组菌诱导表达 Mhp366-N 蛋白并纯化。纯化的蛋白免疫小鼠制备多克隆抗体。用免疫印迹和免疫荧光方法检测猪肺炎支原体 AH 株感染 3D4/21 细胞后的 Mhp366 蛋白,确定 2 种方法中 Mhp366-N 多克隆抗体的最佳稀释倍数;之后检测临床采集的猪肺泡巨噬细胞中的猪肺炎支原体;最后以免疫组化试验检测猪肺炎支原体感染的肺细胞。【结果】纯化的 Mhp366-N 蛋白纯度超过 85%,免疫小鼠制备的抗血清效价在 1:128 000–1:512 000 之间。在免疫印迹试验中 Mhp366-N 多克隆抗体的最佳工作浓度为 1:100 000 稀释,免疫荧光试验中 Mhp366-N 多克隆抗体在工作浓度范围在 1:1 000–1:10 000 000,其可用于临床采集的猪肺泡巨噬细胞和细胞系中猪肺炎支原体的检测。免疫组化试验结果显示猪肺炎支原体能够进入猪肺泡巨噬细胞、I 型和 II 型肺泡上皮细胞。【结论】制备的 Mhp366-N 多克隆抗体为猪肺炎支原体致病机制研究提供了良好的研究工具。

关键词: 猪肺炎支原体, 多克隆抗体, 免疫荧光, 免疫印迹, 猪肺泡巨噬细胞

Preparation and application of polyclonal antibody against Mhp366-N protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*WEN Yukang^{1,2} ZHOU Bingqian^{1,2} CHEN Zhengkun^{1,2} YANG Mei^{1,2} TIAN Yaqin^{1,2} DING Honglei^{*1,2}

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

2 Immunology Research Center of Medical Research Institute, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Background] *Mycoplasma hyopneumoniae* is an important pathogen in pigs. The research tools of this bacterium are few, especially the antibody that is used to carry out the research on its pathogenicity. [Objective] To prepare the polyclonal antibody against Mhp366-N protein of

Foundation items: Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2020B012); Chongqing Technology Innovation and Application Development Project (cstc2019jscx-msxmX0402)

***Corresponding author:** Tel: 86-23-68366382; E-mail: hongleiding@swu.edu.cn

Received: 08-04-2021; **Accepted:** 20-05-2021; **Published online:** 18-06-2021

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2020B012); 重庆市技术创新与应用发展专项 (cstc2019jscx-msxmX0402)

***通信作者:** Tel: 023-68366382; E-mail: hongleiding@swu.edu.cn

收稿日期: 2021-04-08; **接受日期:** 2021-05-20; **网络首发日期:** 2021-06-18

M. hyopneumoniae and determine its application and the optimal dilution. **[Methods]** Expression of Mhp366-N protein was induced by recombinant bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-mhp366-N, and the protein was purified. The purified protein was used to immunize mice to prepare polyclonal antibody. Using Mhp366-N polyclonal antibody as the primary antibody, the Mhp366 protein in 3D4/21 cells infected with *M. hyopneumoniae* AH strain was detected by Western blot and immunofluorescence, and the optimal dilution of antibody in each assay was determined. Then, *M. hyopneumoniae* was detected in alveolar macrophages collected clinically. Finally, the presence of *M. hyopneumoniae* in lung cells was detected by immunohistochemistry. **[Results]** The purity of purified Mhp366-N protein was more than 85%, and the titer of Mhp366-N antiserum was between 1:128 000 and 1:512 000. The optimal dilution of Mhp366-N polyclonal antibody in Western blot was 1:100 000, and in immunofluorescence assay was 1:1 000–1:10 000 000. In addition, the polyclonal antibody could be used to detect *M. hyopneumoniae* in porcine alveolar macrophages and cell lines. The results of immunohistochemistry showed that *M. hyopneumoniae* could enter porcine alveolar macrophages, type I and II alveolar epithelial cells. **[Conclusion]** Preparation of Mhp366-N polyclonal antibody could provide a good research tool for the research on the pathogenesis of *M. hyopneumoniae*.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, polyclonal antibody, immunofluorescence, Western blot, porcine alveolar cell

猪肺炎支原体是引起猪支原体肺炎的病原, 该菌广泛流行于世界各地的猪场^[1]。在集约化的现代养猪生产中, 猪支原体肺炎主要以隐性感染形式存在, 通常不引起猪的死亡, 但造成饲料转化率降低和生产性能下降。该病每年造成我国养猪业的经济损失至少 100 亿元, 间接经济损失以数倍计。因此, 应加强该病的基础理论和防控手段研究。Mhp366 蛋白是猪肺炎支原体感染细胞后大量表达的一种蛋白, 该蛋白编码的基因广泛存在于不同的猪肺炎支原体菌株^[2], 我们前期的研究也证明该蛋白是猪肺炎支原体的一种特异蛋白, 与其他病原的血清没有交叉免疫反应^[3], 因此其抗体非常适合用于猪肺炎支原体的检测。基于此, 本研究拟制备 Mhp366 蛋白的多克隆抗体, 并确定抗体的应用范围和最佳稀释倍数, 以期作为猪肺炎支原体的相关研究提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

重组菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-mhp366-N 由本实验室构建与保存^[3]。猪肺炎支原体 AH 株由江苏省农业科学院兽医研究所邵国青研究员惠赠。

1.1.2 细胞株

猪肺泡巨噬细胞系 3D4/21 购自美国模式菌种保藏中心。

1.1.3 实验动物

SPF 级 6 周龄昆明小鼠购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司, 共购买 5 只。

1.1.4 培养基、主要试剂和仪器

KM2 猪肺炎支原体肉汤培养基, 山东拓普生物工程有限公司。猪血清, 上海江莱生物科技有限公司; RPMI 1640 培养液, Thermo Fisher 公司; DMEM 高糖培养液, HyClone 公司; 镍柱, GE Healthcare 公司; HRP 标记羊抗小鼠 IgG (用于免疫组化试验), 北京索莱宝科技有限公司; HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (用于免疫印迹试验), 北京博奥森生物技术有限公司; β -Actin 小鼠单克隆抗体、Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L), Proteintech 公司; VECTASTAIN[®] ABC 免疫组化试剂盒, Vector Laboratories 公司。化学发光成像系统, 伯乐生命医学产品有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Mhp366-N 蛋白的原核表达与纯化

取本实验室 -80 °C 保存的重组菌 *E. coli*

BL21(DE3)-pET28a(+)-mhp366-N 划线于 Kan⁺ LB 平板, 37 °C 培养 15 h。挑取单菌落接种 Kan⁺ LB 液体培养基, 37 °C、120 r/min 培养过夜后, 按 1:100 比例转接 1 L Kan⁺ LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6–0.8, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 16 °C、180 r/min 诱导表达 20 h。室温 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。

收集的菌体加入 Binding Buffer, 以 12% 的功率超声破菌 30 次(超声 9 s, 间歇 9 s)后 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清进行亲和层析纯化。纯化时依次用含 0.05、0.1 和 0.25 mol/L 咪唑的 Washing Buffer 洗去杂蛋白, 最后用含 0.5 mol/L 咪唑的 Elution Buffer 洗脱纯化蛋白。纯化的蛋白加入透析袋与 PBS 透析置换, 经离心浓缩, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。纯化后的蛋白 –20 °C 保存备用。

1.2.2 Mhp366-N 蛋白多克隆抗体的制备

将纯化的 Mhp366-N 蛋白调整至浓度为 2 mg/mL, 取 1 mL 蛋白溶液与 1 mL 弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂混合, 在研钵研磨至油包水样乳剂。

购回的小鼠饲养 1 周适应环境。免疫前尾静脉采血(定为第 0 天)。分别在采血后第 1、15、22、29 天在小鼠腹股沟、背部皮下进行免疫, 每只小鼠免疫 0.2 mL。第 1 次免疫用 Mhp366-N 纯化蛋白与弗氏完全佐剂混合蛋白, 第 2、3 次免疫用 Mhp366-N 纯化蛋白与弗氏不完全佐剂混合蛋白, 第 4 次免疫浓度为 1 mg/mL 的纯化蛋白。第 35 天小鼠眼球取血。第 0 天和第 35 天采集的血液均 5 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 按 1:1 的比例加入甘油, –20 °C 保存。

1.2.3 Mhp366-N 蛋白多克隆抗体效价测定

用碳酸盐缓冲液调整纯化的 Mhp366-N 蛋白浓度至 0.25 µg/mL, 加入酶标板, 每孔 100 µL, 37 °C 孵育 1 h 后 4 °C 过夜; 用含 0.05% 吐温-20 的 PBS (PBST) 洗板 5 次, 每次 3 min; 加入 200 µL 含 2.5% 脱脂奶粉的 PBS 37 °C 封闭 1 h 后 PBST 洗涤 5 次, 每次 3 min; 将 5 份血清均用封闭液分

别按 1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000、1:256 000、1:512 000、1:1 024 000 的比例稀释, 加入酶标板, 每孔 100 µL, 免疫前小鼠血清作为阴性对照(封闭液 1:500 稀释), 37 °C 孵育 0.5 h 后洗板; 加入用封闭液按 1:10 000 比例稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 酶标二抗, 每孔 100 µL, 37 °C 孵育 1 h; 再次洗板后每孔加入底物液 A、B 各 50 µL^[3], 混匀, 室温避光显色 15 min; 加入 50 µL 终止液^[3], 10 min 内酶标仪测定 OD₄₅₀。待测血清 OD₄₅₀ 测定数值记为 S, 阴性对照血清测定 OD₄₅₀ 数值记为 N, 以 S/N ≥ 2.1 作为 Cut-Off 值。

1.2.4 猪肺炎支原体 AH 株生长曲线的测定

将 –80 °C 保存的猪肺炎支原体 AH 株按 1:9 的比例接种 KM2 液体培养基, 37 °C 静置培养至培养基颜色刚刚由红色变为浅黄色。将培养的菌液再以 1:9 的比例接种 1.8 mL KM2 液体培养基, 接种 3 管。置于 37 °C 培养箱中培养。分别在培养的 0、12、24、36、48、60、72、84 h 取 200 µL 备用。同时, 每管菌液再各取 50 µL 用分光光度计测定 OD₆₀₀ 吸光度。

取 810 支小试管, 分为 81 组, 每组 10 支试管。向每个试管加入 KM2 液体培养基 450 µL。取备用菌液 50 µL 加入第一个试管, 缓慢吸吹数次, 使备用菌液与 KM2 液体培养基混合均匀, 再吸取 50 µL 液体小心地移至第 2 支试管, 如此连续稀释至第 9 支试管, 备用菌液稀释倍数依次为 1:10 至 1:10⁹。第 10 支试管为阴性对照。每管备用菌液每个时间点做 3 个重复。稀释的菌液 37 °C 培养 7 d, 以 3 个重复的平均颜色变化单位(Color Changing Unit, CCU)作为每管备用菌液每个时间点的 CCU。

以样品不同时间点的平均 OD₆₀₀ 值为横坐标, 以样品每个时间点的 CCU 对数(lgCCU)为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.2.5 猪肺炎支原体 AH 株感染 3D4/21 细胞最佳感染复数的确定

取 96 孔细胞培养板, 每孔加入 10³ 个 3D4/21

细胞, 5% CO₂ 细胞培养箱 37 °C 培养过夜。

测定培养至颜色刚变黄的 AH 株菌液 OD₆₀₀ 值, 计算 CCU。13 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, PBS 洗涤 3 次。用含 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬 AH 株。

培养的 3D4/21 细胞 PBS 洗涤 3 次。按感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)分别为 5、10、100、200、500、1 000 加入 AH 株。1 000 r/min 离心 40 min, 在 5% CO₂ 细胞培养箱 37 °C 培养 24 h。取出细胞培养板, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 再于 5% CO₂ 细胞培养箱 37 °C 培养 2 h。酶标仪测定在 OD₄₅₀ 处的吸光度。根据测定的数值绘制细胞活力曲线。根据曲线确定 AH 株感染 3D4/21 细胞的最佳 MOI。

1.2.6 Mhp366-N 多克隆抗体用于免疫印迹试验最佳稀释倍数的确定

3D4/21 细胞接种 24 孔细胞培养板培养至 70%–80% 时, 每孔加入最佳 MOI 的 AH 株, 1 000 r/min 离心 40 min, 5% CO₂ 细胞培养箱 37 °C 分别培养 1、2 和 3 h 后弃去培养液, PBS 洗涤 2 次。加入 160 μL 细胞裂解液冰水浴 30 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清。BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度后调整蛋白浓度, 加入 SDS-PAGE 上样缓冲液, 105 °C 煮沸 8 min。SDS-PAGE 后转 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 Tris/吐温-20 缓冲液(Tris-Buffered Saline Solution/Tween-20, TBST)室温封闭 2 h。TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min。加入不同稀释比例的 Mhp366-N 多抗(1:1 000、1:10 000、1:100 000、1:1 000 000、1:10 000 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤。加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L), 室温孵育 1 h, TBST 洗涤。eECL 显色。β-Actin 作为内参。

1.2.7 Mhp366-N 多克隆抗体用于免疫荧光试验最佳稀释倍数的确定

3D4/21 细胞接种 24 孔细胞培养板培养至 70%–80% 时, 每孔加入最佳 MOI 的 AH 株, 1 000 r/min 离心 40 min, 在 5% CO₂ 细胞培养箱 37 °C 培养 1 h。培养后的细胞弃去培养液, 每孔

加入 200 μL 4% 多聚甲醛, 室温固定 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入 200 μL 0.2% Triton X-100, 透化 15 min, PBS 洗涤。加入 200 μL 5% BSA, 室温封闭 1 h, PBS 洗涤。加入不同稀释比例的 Mhp366-N 多抗(1:1 000、1:10 000、1:100 000、1:1 000 000、1:10 000 000), 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤。加入 Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (1:300 稀释), 室温孵育 1 h, PBS 洗涤。加入 200 μL DAPI, 室温避光孵育 5 min, PBS 洗涤。取出细胞爬片, 吸干水分, 滴加抗荧光衰减封片剂封片。荧光倒置显微镜观察结果。

1.2.8 Mhp366-N 多克隆抗体用于猪肺泡巨噬细胞中猪肺炎支原体的检测

在屠宰场采集猪肺, 分别取有典型猪支原体肺炎病变的猪肺和无任何病变的猪肺, 用 50 mL PBS 灌洗猪肺后取肺泡灌洗液, 1 500 r/min 离心 10 min 分离猪肺泡巨噬细胞。分离的细胞分为 3 份, 一份用巢式 PCR 检测猪肺炎支原体 *P36* 基因^[4]; 一份经细胞裂解液裂解后加入 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸, 按 1.2.6 确定的 Mhp366-N 多抗最佳稀释倍数进行免疫印迹试验; 一份接种 24 孔细胞培养板, 加入终浓度为 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素和 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 在 5% CO₂ 细胞培养箱 37 °C 培养 10 h, 按 1.2.7 确定的 Mhp366-N 多抗最佳稀释倍数进行免疫荧光试验。

1.2.9 用 Mhp366-N 多克隆抗体免疫组化检测临床肺组织样品中猪肺炎支原体

在屠宰场采集猪肺, 分别取有典型猪支原体肺炎病变和无任何病变的猪肺。每个猪肺均进行 *P36* 基因检测^[4]。取 *P36* 基因检测阴性外表无猪支原体肺炎病变和 *P36* 基因检测阳性有猪支原体肺炎典型病变的核桃大小猪肺完全浸于 10% 福尔马林中固定, 期间换液 2 次; 一个月后将固定好的肺组织切成花生米大小并置于组织包埋盒中继续固定; 切片后依次加入 1:200 稀释的 Mhp366-N 多抗和 1:200 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 并进行 DAB 显色。显微镜下观察肺组织细胞染色结果。

2 结果与分析

2.1 Mhp366-N 蛋白的原核表达与纯化

重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-mhp366-N 破菌后离心, 取上清进行纯化。SDS-PAGE 电泳显示在 40 kD 处有一条清晰的目的条带。虽然在 60 kD 处有一条杂蛋白条带, 但取 8-14 的蛋白进行浓缩, 蛋白纯度仍在 85% 以上(图 1)。

2.2 Mhp366-N 多克隆抗体的效价

5 只小鼠抗血清的抗体效价分别为 1:128 000、1:128 000、1:512 000、1:256 000、1:128 000, 表明免疫小鼠制备的 Mhp366-N 血清抗体效价均较高。选择抗体效价为 1:512 000 的抗血清用于后续试验。其余血清按 1:1 比例加入甘油-80 °C 保存备用。

2.3 猪肺炎支原体 AH 株的生长曲线

由图 2 可知, 猪肺炎支原体 AH 株的菌液浓度

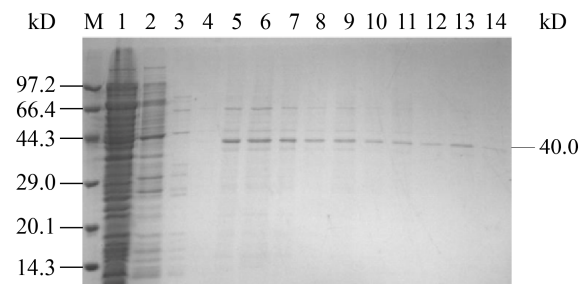


图 1 Mhp366-N 蛋白的纯化

Figure 1 Purification of Mhp366-N

注: M: Marker; 1: 超声破菌上清上样; 2: 含 0.05 mol/L 咪唑的洗脱缓冲液进行洗脱; 3: 含 0.1 mol/L 咪唑的洗脱缓冲液进行洗脱; 4: 含 0.25 mol/L 咪唑的洗脱缓冲液进行洗脱; 5-14: 纯化蛋白

Note: M: Marker; 1: Supernatant of ultrasonic bacterium; 2: Affinity purification with 0.05 mol/L imidazole; 3: Affinity purification with 0.1 mol/L imidazole; 4: Affinity purification with 0.25 mol/L imidazole; 5-14: Purified protein

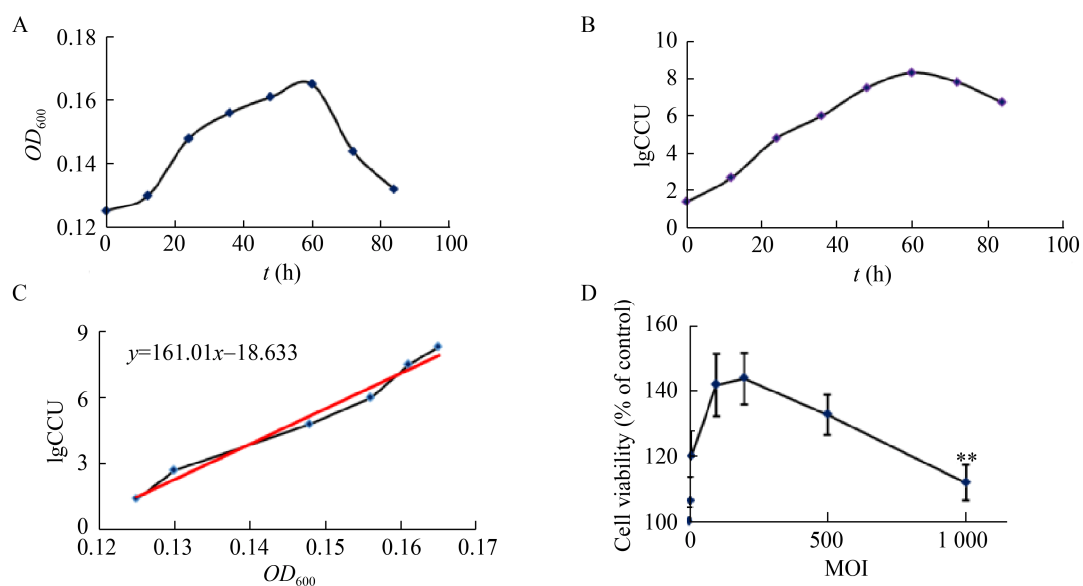


图 2 猪肺炎支原体 AH 株生长曲线及感染 3D4/21 细胞的最佳感染复数

Figure 2 Growth curve of *M. hyopneumoniae* AH strain and the optimal multiplicity of infection of 3D4/21 cells after AH strain infection

注: A: 在不同培养时间 OD_{600} 的曲线; B: 在不同培养时间 AH 株的生长曲线; C: AH 株随 OD_{600} 变化的生长曲线; D: CCK-8 试验测定 AH 株感染 3D4/21 细胞的细胞活力。细胞活力随着 MOI 的升高逐渐增加, 在 MOI=200 时达到最高, 之后随着 MOI 的升高逐渐下降。MOI=1 000 时的细胞活力显著低于 200 时的细胞活力。每个试验 3 个重复。每个点代表平均值 \pm 3 \times 标准差。统计学方法: 单因素方差分析, **: $P \leq 0.01$

Note: A: The curve of OD_{600} in different culture time. B: Growth curve of AH strain in different culture time. C: Growth curve of AH strain with the change of OD_{600} . D: Cell viability of 3D4/21 cells after AH strain infection was measured by CCK-8 assay. The cell viability increased with the increase of MOI. The cell viability was the highest when MOI was 200, and then decreased with the increase of MOI. The cell viability at MOI was 1 000 was significantly lower than that at MOI was 200. The data represent the mean \pm 3SD. One-way ANOVA, **: $P \leq 0.01$

随培养时间延长逐渐增加,在培养的第 58 h 达到最大,之后随时间延长逐渐下降(图 2A);菌液的 CCU 开始也逐渐上升,并在培养的第 60 h 达到顶峰(图 2B)。以菌液浓度为横坐标,lgCCU 为纵坐标绘制 AH 株生长曲线,lgCCU 随菌液浓度生长曲线的趋势为 $y=161.01x-18.633$,其中 y 为 lgCCU, x 为 OD_{600} (图 2C)。

2.4 猪肺炎支原体 AH 株感染 3D4/21 细胞的最佳感染复数

以不同的 MOI 感染 3D4/21 细胞,随着 MOI 的增加,在 MOI=200 时细胞活力最高,之后随着 MOI 增加细胞活力逐渐下降(图 2D)。

2.5 Mhp366-N 多克隆抗体用于免疫印迹试验的最佳稀释倍数

由图 3 可见,将 Mhp366-N 多克隆抗体以 1:1 000 稀释,免疫印迹的条带最明显;以 1:10 000、1:100 000 稀释,也能看到清晰的条带;1:100 000 稀释时,可看到 2 条条带。以 1:1 000 000、1:10 000 000 稀释,由于稀释倍数过大,目的条带模糊不清(图 3)。由于 Mhp366 可进行自身切割,Western Blot 试验可见 2 条条带^[2],因此以 1:100 000 稀释作为最佳稀释倍数。此外,在感染 0 h 时,未检测到 Mhp366 蛋白,而感染后 1 h, Mhp366 蛋白即可表达。

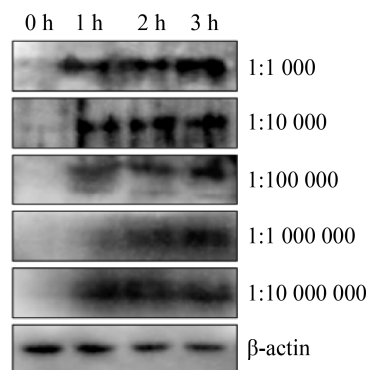


图 3 Mhp366-N 多克隆抗体用于免疫印迹试验的最佳稀释倍数

Figure 3 The optimal dilution of Mhp366-N polyclonal antibody for Western blot assay

注: Mhp366-N 多抗从 1:1 000 开始进行 10 倍系列稀释后与膜进行反应。当 1:100 000 稀释时,能看到 2 条清晰的条带

Note: Mhp366-N polyclonal antibody used in the experiments was 10-fold serially diluted starting at 1:1 000 and then reacted with the membrane. Please note that at 1:100 000 dilution, two clear bands were picked up by the antibody

2.6 Mhp366-N 多克隆抗体用于免疫荧光试验的最佳稀释倍数

以 1:1 000–1:10 000 000 稀释 Mhp366-N 多克隆抗体进行免疫荧光试验,均能检测到细胞内的 AH 株 (图 4)。说明在免疫荧光试验中 Mhp366-N 多克隆抗体工作浓度范围较为宽泛。此外,还说明猪肺炎支原体感染细胞后 1 h 即能进入细胞内。

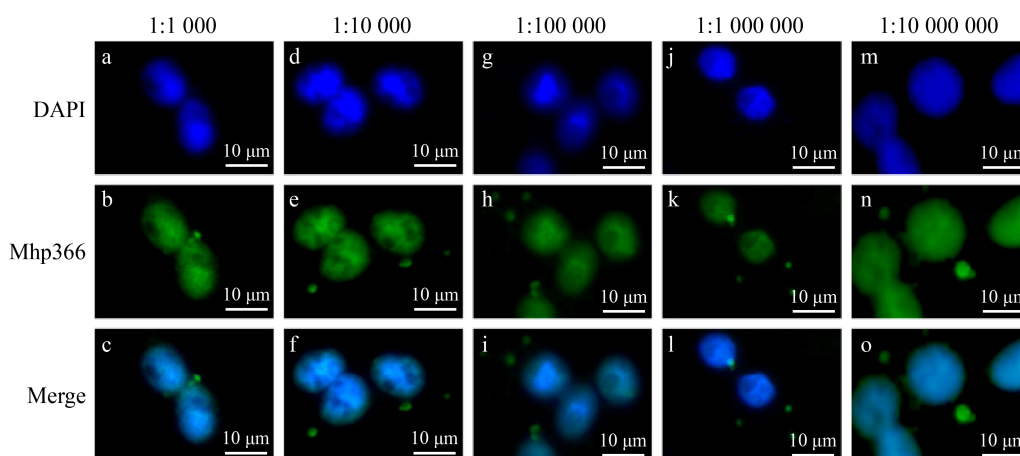


图 4 Mhp366-N 多克隆抗体用于免疫荧光试验的最佳稀释倍数

Figure 4 The optimal dilution of Mhp366-N polyclonal antibody for immunofluorescence assay

注: 在本实验中, Mhp366-N 多克隆抗体进行 10 倍系列稀释, 稀释比例从 1:1 000 到 1:10 000 000

Note: Mhp366-N polyclonal antibody used in the experiments was 10-fold serially diluted starting at 1:1 000 to 1:10 000 000

2.7 Mhp366-N 多克隆抗体用于检测临床采集的猪肺泡巨噬细胞中的猪肺炎支原体

分别采用免疫荧光和免疫印迹方法, 以 1:100 000 的比例稀释 Mhp366-N 多克隆抗体, 检测猪肺泡巨噬细胞中的 Mhp366-N 蛋白。在猪肺炎支原体阳性细胞中能观察到代表猪肺炎支原体的绿色荧光(图 5A), 也能检测到清晰的 Mhp366 蛋白片段(图 5B); 而在猪肺炎支原体阴性细胞中不能观察到绿色荧光(图 5A), 也没有检测到 Mhp366-N 特异性的条带(图 5B), 说明 Mhp366-N 多克隆抗体也能用免疫荧光和免疫印迹的方法检测临床样品中的猪肺炎支原体, 而且用免疫印迹方法在临床样品中检测 Mhp366-N 蛋白比在 3D4/21 细胞中检测 Mhp366-N 蛋白的效果更好。

2.8 猪肺炎支原体感染的肺泡细胞

尝试以 Mhp366-N 多克隆抗体为一抗, 利用免疫组化的方法检测猪肺组织细胞中的猪肺炎支原体,

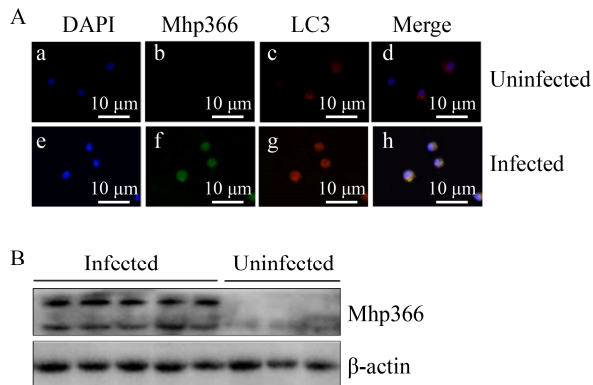


图 5 Mhp366-N 多克隆抗体用于猪肺泡巨噬细胞中猪肺炎支原体的检测

Figure 5 Mhp366-N polyclonal antibody was used to detect *M. hyopneumoniae* in porcine alveolar macrophages collected clinically

注: A: 以 Mhp366-N 多克隆抗体为一抗, 免疫荧光检测猪肺泡巨噬细胞中的猪肺炎支原体; B: 以 Mhp366-N 多克隆抗体为一抗, 免疫印迹检测猪肺泡巨噬细胞中的猪肺炎支原体

Note: A: *M. hyopneumoniae* was detected by immunofluorescence assay with Mhp366-N polyclonal antibody as the first antibody in porcine alveolar macrophages; B: *M. hyopneumoniae* was detected by Western blot with Mhp366-N polyclonal antibody as the first antibody in porcine alveolar macrophages

并确定猪肺炎支原体能存在的细胞。由图 6 可知, 制备的 Mhp366-N 多克隆抗体以 1:200 比例稀释可以用于免疫组化试验, 而且发现猪肺炎支原体可以感染猪肺泡巨噬细胞、I 型和 II 型肺泡细胞。

3 讨论与结论

猪支原体肺炎是严重影响生猪生产性能的一种疾病, 目前还没有很好的防控措施。商品灭活疫苗免疫后对于提高猪的生产性能仍存在较大疑问^[1]。疫苗免疫后猪只仍然能够被感染^[5-6], 不能阻断猪肺炎支原体在免疫猪群的传播^[5-7]。深入了解猪肺炎支原体致病机制可以为更好地研发猪肺炎支原体疫苗提供理论支撑。目前对猪肺炎支原体致病机制和免疫反应研究还较少, 因此应加强猪肺炎支原体的基础研究。

我们通过临床观察发现在有猪支原体肺炎典型临床症状的猪群使用杀灭支原体的药物, 停药一段时间后症状又会再次出现。Raymond 等发现猪肺炎支原体与宿主细胞表面的整合素 $\beta 1$ 和纤连蛋白结合后能够通过细胞内吞进入猪肾细胞系 PK-15 细胞^[8]。因此, 我们推测猪肺炎支原体进入细胞后可能通过与细胞内蛋白分子的互作发挥致病作用, 但相关研究还未见报道。为了开展猪肺炎支原体在胞内与宿主互作研究, 我们首先需要制备

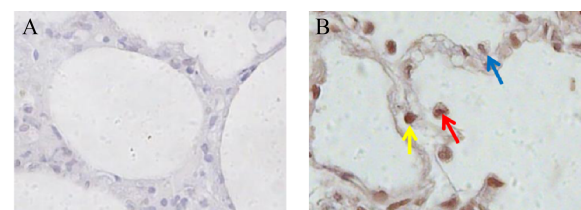


图 6 免疫组化试验检测猪肺炎支原体感染的肺细胞
Figure 6 Detection of *M. hyopneumoniae* in lung cells by immunohistochemistry

注: A: 无猪肺炎支原体感染的肺组织; B: 猪肺炎支原体感染的肺组织。红色箭头: 猪肺泡巨噬细胞; 蓝色箭头: I 型肺泡细胞; 黄色箭头: II 型肺泡细胞

Note: A: Lung tissue without *M. hyopneumoniae* infection; B: Lung tissue infected with *M. hyopneumoniae*. Red arrow: Porcine alveolar macrophage; Blue arrow: Type I alveolar cell; Yellow arrow: Type II alveolar cell

猪肺炎支原体特异性抗体。Mhp366 蛋白在体外培养的猪肺炎支原体中几乎不表达,本研究中的免疫印迹试验也印证了这一结果,却能在感染细胞后刺激机体产生强烈的体液免疫应答^[2-3,9]。免疫印迹和免疫荧光试验表明,在猪肺炎支原体感染细胞后 1 h Mhp366 蛋白即能够被检测到。此外,猪肺炎支原体在感染后 1 h 即能进入到细胞内。

我们选择 Mhp366 蛋白 N 端 279 个氨基酸的片段进行表达,该片段为 Mhp366 蛋白全长的一半。我们前期的试验结果表明该片段能够识别 Mhp366 抗体^[3,9]。因此,我们制备的 Mhp366-N 多克隆抗体也可以反过来用于检测 Mhp366 蛋白。纯化的 Mhp366-N 蛋白免疫昆明小鼠制备的多克隆抗体具有较高的效价,为了确定后续试验中抗体的稀释倍数,我们用不同比例稀释的 Mhp366-N 多克隆抗体与猪肺炎支原体 AH 株感染细胞反应,最终确定在免疫印迹试验中,最佳稀释比例为 1:100 000;免疫荧光试验中稀释比例范围为 1:1 000–1:10 000 000。此外,通过检测猪肺炎支原体感染的猪肺泡巨噬细胞,确定 Mhp366-N 多克隆抗体也可以用于临床样品中猪肺炎支原体的检测。这为后续的研究工作提供了 Mhp366-N 多克隆抗体的工作条件。

在进行免疫印迹和免疫荧光试验之前,为了确定 AH 株感染 3D4/21 细胞的最佳感染复数,为后续的猪肺炎支原体致病机制研究奠定基础,我们首先测定了 AH 株的生长曲线,接着利用生长曲线测定了 AH 株感染 3D4/21 细胞的最佳 MOI。在后续的大多数试验中我们会以最佳 MOI 感染 3D4/21 细胞。

在免疫印迹试验中检测到 2 条明显的条带,其中较大的条带为 64 kD,为 Mhp366 的原始分子量大小;另一条条带大约为 45 kD,这可能是 Mhp366 蛋白翻译后被切割的片段。在 Meens 等的试验中也有相似的结果^[2]。Mhp366 蛋白在 Western Blot 中出现 2 条条带,这对试验结果的解释可能会带来争议。我们选用该蛋白主要有 2 点考虑:一

是 Mhp366 在猪肺炎支原体高度保守,存在于所有猪肺炎支原体菌株,而在其他细菌没有同源蛋白;二是该蛋白只在猪肺炎支原体感染宿主细胞后才会表达,Meens 等^[2]的结果和本试验(图 3)也证明了这一点。上述这 2 点在检测临床样品中猪肺炎支原体感染时,有利于排除其他微生物混合感染造成的交叉反应。因为临床样品很难排除,有时也不需要排除其他病原的混合感染。由图 3 和图 5B 可知,用临床样品检测 Mhp366 蛋白的 Western Blot 图片比细胞样品的 Western Blot 图片更加清晰。课题组不同的成员多次重复均得到相同的结果。通过免疫荧光试验,我们采用 3D4/21 细胞验证了 Meyns 等^[7]的研究结果,证明猪肺炎支原体能进入细胞,还发现猪肺炎支原体能感染猪肺泡巨噬细胞。我们还确定 Mhp366-N 多克隆抗体可用于免疫组化试验。通过免疫组化试验发现猪肺炎支原体除能够感染猪肺泡巨噬细胞之外,还能够感染猪 I 型和 II 型肺泡上皮细胞。这可能就是由于猪肺炎支原体能感染所有的肺泡细胞,导致在肺的前缘出现明显的“肉变”和“胰变”。在进行免疫组化试验时,我们同时用相同组织做了 HE 染色,以确定猪肺炎支原体感染的肺泡上皮细胞类型。

本试验中采集的猪肺,除了观察肺部大体病变,还用巢式 PCR 检测猪肺炎支原体特异性的 P36 基因,确认猪肺是否被猪肺炎支原体感染。在本试验中,临床肺组织是否有其他病原感染不影响试验结果,因此未进行其他病原检测。

综上,本研究制备了用于检测猪肺炎支原体的 Mhp366-N 多克隆抗体;确定了多克隆抗体用于免疫印迹和免疫荧光试验的最佳稀释倍数;以 Mhp366-N 多克隆抗体为工具,用免疫组化试验发现猪肺炎支原体除了能够感染猪肺泡巨噬细胞,还能感染猪 I 型和 II 型肺泡上皮细胞。

REFERENCES

- [1] Leal Zimmer FMA, Paes JA, Zaha A, Ferreira HB. Pathogenicity & virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Virulence, 2020, 11(1): 1600-1622

- [2] 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
- [3] 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): 1-10
- [4] Lu XM, Feng ZX, Liu MJ, Wu XS, Gan Y, Zhang Y, Shao GQ. Establishment of a nested PCR assay for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2010, 26(1): 91-95 (in Chinese)
逯晓敏, 冯志新, 刘茂军, 吴叙苏, 甘源, 张映, 邵国青. 猪肺炎支原体套式 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 91-95
- [5] 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
- [6] Villarreal I, Maes D, Vranckx K, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains[J]. Vaccine, 2011, 29(9): 1731-1735
- [7] Meyns T, Dewulf J, De Kruif 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
- [8] Raymond BBA, Turnbull L, Jenkins C, Madhkoor R, Schleicher I, Uphoff CC, Whitchurch CB, Rohde M, Djordjevic SP. *Mycoplasma hyopneumoniae* resides intracellularly within porcine epithelial cells[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 17697
- [9] Ding HL, Zhou YQ, Wang HJ. 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