

• 动物及兽医生物技术 •

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

周瑶琴, 游凤, 钟杰, 王豪举, 丁红雷

西南大学 兽医传染病学实验室, 重庆 400715

周瑶琴, 游凤, 钟杰, 等. 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. 生物工程学报, 2018, 34(1): 44–53.

Zhou YQ, You F, Zhong J, et al. Development of an ELISA for identification of immunodominant protein antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Chin J Biotech, 2018, 34(1): 44–53.

摘要: 旨在建立一种快速鉴定猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 血清体液免疫显性蛋白抗原的方法。通过构建 pGEX-6P-1-mhp366 重组表达质粒并转入大肠杆菌 BL21(DE3), 将 GST-Mhp366 重组蛋白进行原核表达。将 GST-Mhp366 重组菌和 GST 工程菌裂解液加入谷胱甘肽包被板进行抗原包被, 分别与 17 份 Mhp 阳性血清和 13 份 Mhp 阴性血清反应, 通过对抗原包被量、封闭液、血清和二抗稀释度的优化, 确定间接 ELISA 的反应条件。最终确定 GST-Mhp366 重组菌和 GST 工程菌裂解液原液为抗原的最佳包被量, PBS+10% FBS+2.5% 脱脂奶粉为最佳封闭液, 分别将血清按照 1:500 稀释、酶标二抗按照 1:40 000 稀释作为最佳工作浓度, 从而建立了一种基于间接 ELISA 的快速鉴定 Mhp 血清体液免疫显性蛋白抗原的方法, 同时通过已知的血清体液免疫显性蛋白 Mhp156 和 Mhp364 对所建立的方法进行了验证。该方法的建立能够用于在基因组水平高通量筛选 Mhp 血清体液免疫显性蛋白抗原, 并为 Mhp 初乳体液免疫和黏膜免疫显性蛋白抗原鉴定方法的建立奠定基础。

关键词: 猪支原体肺炎, Mhp366, 免疫显性蛋白抗原, 酶联免疫吸附试验

Received: May 31, 2017; **Accepted:** November 16, 2017

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. XDJK2017D034), Chongqing Special Project of Social Livelihood Science and Technology Innovation (No. cstc2015shmszx 80033).

Corresponding author: Honglei Ding. Tel: +86-23-68251196; E-mail: hongleiding@swu.edu.cn

中央高校基本科研业务费专项资金(No. XDJK2017D034), 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项 (No. cstc2015shmszx80033) 资助。

网络出版时间: 2017-11-28

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20171128.1049.002.html>

Development of an ELISA for identification of immunodominant protein antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae*

Yaoqin Zhou, Feng You, Jie Zhong, Haoju Wang, and Honglei Ding

Laboratory of Veterinary Lemology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: We developed a method to identify serological humoral immunodominant protein antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp). After constructing the recombinant plasmid pGEX-6P-1-mhp366 and transforming it into *Escherichia coli* BL21(DE3), the recombinant GST-Mhp366 protein was expressed successfully. The lysates of the recombinant GST-Mhp366 and genetic engineering GST were added into glutathione coated plates and reacted with 17 positive sera or 13 negative sera. Meanwhile, the optimization of experimental conditions, including coated antigen, blocking buffer, dilutions of sera and second antibody were determined. The optimal concentration of the coated antigen was the original bacteria lysates without dilution, and the optimal blocking buffer contained 10% FBS and 2.5% skim milk in PBS. Besides, the working concentration of serum samples and the HRP-tagged rabbit anti-pig IgG secondary antibody were 1:500 and 1:40 000, respectively. Thus, an indirect ELISA was established for identification of immunodominant protein antigens of Mhp. Meanwhile, this method was confirmed by the identified serological humoral immunodominant protein antigen Mhp156 and Mhp364. This method can be used for identification of the candidate vaccine antigens on a genome-wide scale. Furthermore, it can lay the foundation for identifying the candidate vaccine antigens through colostrum and the nasal mucosal secretions.

Keywords: mycoplasmal pneumonia of swine, Mhp366, immunodominant antigen, enzyme-linked immunosorbent assay

猪支原体肺炎 (Mycoplasma pneumoniae of swine, MPS) 是由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 引起的一种慢性、接触性呼吸道传染病, 广泛分布于世界各地^[1]。我国每年由此病造成的直接经济损失超过 100 亿元^[2]。现阶段我国大部分猪场使用 MPS 灭活疫苗, 还有部分猪场使用弱毒疫苗控制 MPS。这些疫苗能够在一定程度减轻临床症状和肺部病理损伤^[3-4], 提高日增重^[4], 但其免疫保护效果和人们的期望仍有差距^[5-6]。基因工程疫苗是未来 MPS 疫苗的一个发展方向。基因工程疫苗保护性抗原的筛选通常采用体外表达纯化病原蛋白后再免疫实验动物或宿主, 测定实验动物或宿主的免疫学指标和评价蛋白抗原对实验动物或宿主的免疫保护来实现。这种方法工作量大, 花费不菲, 且对抗原的选择盲目性很大, 抗原筛选的成功率不高^[7]。

若能在病原菌基因组编码的所有蛋白信息基础上, 高通量大规模鉴定疫苗蛋白抗原, 则能够

降低因只关注某几个潜在抗原蛋白而造成抗原筛选的遗漏和偏差, 增加基因工程疫苗研发成功的概率和提高疫苗免疫保护效果。建立快速鉴定 Mhp 免疫显性抗原的方法在高通量大规模鉴定 MPS 疫苗候选蛋白抗原工作中十分必要, 这在很大程度上能够减少抗原筛选的工作量, 加快工作进度。

Mhp366 是一种能够在 Mhp 自然感染条件下, 刺激宿主产生强烈体液免疫的蛋白^[8]。本研究以 Mhp366 蛋白为例, 建立了一种基于间接酶联免疫吸附试验 (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay, Indirect ELISA) 原理的快速鉴定 Mhp 血清体液免疫显性蛋白抗原的方法, 并用 Mhp156 和 Mhp364 蛋白验证了该方法的有效性^[9]。该方法的建立能够在基因组水平高通量筛选 Mhp 血清体液免疫显性蛋白抗原, 并为 Mhp 初乳体液免疫和粘膜免疫显性蛋白抗原鉴定方法的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BL21(DE3)、大肠杆菌 XL-1 Blue 感受态和 pGEX-6P-1 载体由本实验室保存。

mhp366、*mhp364* 和 *mhp156* 基因由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。在合成时将 *mhp366* 中第 835–837、967–969、1224–1226 和 1312–1314 位, *mhp364* 中第 676–678、979–981、1456–1458 位, *mhp156* 中第 133–135、169–171、193–195、235–237、256–258 位 TGA 密码子修改为 TGG。合成的基因连接 pGEX-6P-1 载体, 构建 pGEX-6P-1-*mhp366*、pGEX-6P-1-*mhp364*、pGEX-6P-1-*mhp156* 重组质粒, 转化入大肠杆菌 DH5 α 。

1.2 血清

Mhp 阳性猪场血清采集自重庆市和四川省两个猪场具有咳嗽、气喘等典型猪支原体肺炎临床症状的猪, 共 35 份。这两个猪场的猪群在寒冷季节和气候骤变时表现出明显的 MPS 临床症状; Mhp 阴性血清采集自贵州省某猪场, 共 30 份。该猪场具有良好的管理模式, 猪群没有 MPS 临床症状, 在过去两年的血清学监测中, Mhp 抗体均为阴性。同时采集对应的猪的支气管肺泡灌洗液。

1.3 主要试剂和菌株

核酸 marker 购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒小量提取试剂盒购自 Omega 公司。*Bam*H I、*Xho* I、*Sal* I、蛋白 marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。谷胱甘肽琼脂糖珠购自 GE Healthcare 公司。谷胱甘肽包被板、HRP 标记兔抗猪 IgG、胎牛血清(FBS) 购自 Thermo Scientific 公司。猪肺炎支原体抗体 ELISA 检测试剂盒购自美国 IDEXX 公司。ELISA 底物液 A、B 和终止液购自武汉科前生物股份有限公司。鼠抗 GST-Tag 单抗购自 Bioworld 公司。HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 Proteintech 公司。PVDF 膜购自 Roche Diagnostics

公司。eECL 购自康为世纪生物科技有限公司。PreScission Protease 由第三军医大学微生物与生化药学实验室惠赠。

1.4 重组蛋白的原核表达与纯化

提取大肠杆菌 DH5 α 中的 pGEX-6P-1-*mhp366*、pGEX-6P-1-*mhp364* 和 pGEX-6P-1-*mhp156* 质粒, pGEX-6P-1-*mhp366* 和 pGEX-6P-1-*mhp364* 经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定, pGEX-6P-1-*mhp156* 经 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切鉴定。鉴定正确后, pGEX-6P-1-*mhp366*、pGEX-6P-1-*mhp364* 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, pGEX-6P-1-*mhp156* 转化大肠杆菌 XL-1 Blue 感受态细胞, 筛选阳性重组子, 分别再次经 *Bam*H I + *Xho* I、*Bam*H I + *Xho* I 以及 *Bam*H I + *Sal* I 双酶切鉴定。鉴定正确的重组菌分别命名为 GST-Mhp366 重组菌、GST-Mhp364 重组菌和 GST-Mhp156 重组菌。

GST-Mhp366 重组菌、GST-Mhp364 重组菌和 GST-Mhp156 重组菌分别接种于含 100 μ g/mL 氨苄西林的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD_{600} 为 0.7–0.9 时, 加入 IPTG 使终浓度为 1 mmol/L, GST-Mhp366 和 GST-Mhp364 30 $^{\circ}$ C 诱导表达目的蛋白 4 h, GST-Mhp156 16 $^{\circ}$ C 诱导表达目的蛋白 20 h。收集菌液, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 15 min。弃上清后加入细菌裂解液(PBS 中加入 1% Triton X-100、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟、75 IU/mL 抑肽酶、20 μ mol/L 亮肽素、1.6 μ mol/L 抑肽素, pH 7.2), 超声(220 V、110 W) 破碎细菌 30 次(工作 3 s, 间歇 4 s)。4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 与谷胱甘肽琼脂糖珠室温旋转(25 r/min) 孵育 1 h, 经 PBST 洗涤 2 次和 PBS 洗涤 1 次后离心。沉淀经 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。

与谷胱甘肽琼脂糖珠孵育结合的蛋白加入适量 PBS 和 PreScission Protease, 室温酶切 5 h 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 1 min, 取上清; 在沉淀中再次加入适量 PBS, 振荡后再次离心取上清, 如此重

复 2 次。将上清液和剩余的沉淀经 SDS-PAGE 检测蛋白纯化情况。

pGEX-6P-1 载体转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,提取质粒鉴定,该基因工程菌命名为 GST 工程菌,作为阴性对照。其诱导表达温度和 IPTG 浓度同 GST-Mhp366 重组菌。

1.5 重组蛋白的鉴定

将纯化的 GST-Mhp366、GST-Mhp364、GST-Mhp156 蛋白进行 Western blotting 鉴定。SDS-PAGE 后转 PVDF 膜,5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min;鼠抗 GST-Tag 单抗 (1:8 000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min;HRP 标记羊抗鼠 IgG (1:20 000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min, eECL 显色。

1.6 Mhp 阳性血清和阴性血清的准备

Mhp 阳性猪场血清和阴性猪场血清经 Mhp 抗体检测试剂盒检测,支气管肺泡灌洗液经套式 PCR 检测^[10]。在 Mhp 阳性猪场中随机选取 17 份 Mhp 抗体阳性和核酸阳性猪血清,在 Mhp 阴性猪场中随机选取 13 份 Mhp 抗体阴性和核酸阴性猪血清。

GST 工程菌经 IPTG 诱导表达后制备细菌裂解液,按 GST 细菌裂解液:血清=1:50 的比例加入 Mhp 阳性血清/阴性血清,4℃过夜旋转 (25 r/min) 孵育,对血清进行预吸附。

1.7 最佳抗原包被浓度的选择

GST-Mhp366 重组菌经诱导表达后离心,加入细菌裂解液超声破碎,25 mL 菌液对应 1 mL 细菌裂解液,4℃、13 000 r/min 离心 15 min 去除细胞碎片。细菌裂解液按原液、1:5、1:10 比例稀释后,谷胱甘肽包被板每孔加入 200 μ L,4℃包被过夜,PBST 洗涤 5 次,每次 3 min。加入 200 μ L 含 0.25%脱脂奶粉和 10% FBS 的 PBS 作为封闭液室温封闭 1 h, PBST 洗涤 5 次,每次 3 min。将

猪血清用封闭液按 1:500 比例稀释后,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℃孵育 1 h, PBST 洗涤 5 次,每次 3 min。每孔加入底物液 A 和底物液 B 各 50 μ L,混匀,室温避光显色 10 min 后加入 50 μ L 终止液,10 min 内酶标仪测定 OD_{630} 值。

GST 工程菌诱导表达后按 GST-Mhp366 重组菌条件进行 ELISA 试验,测定相应孔的 OD_{630} 值。

1.8 最佳封闭液的确定

按已确定的 GST-Mhp366 重组菌和 GST 工程菌的最佳细菌裂解液浓度加入谷胱甘肽包被板,分别以 PBS+10% FBS、PBS+2.5%脱脂奶粉、PBS+10% FBS+2.5%脱脂奶粉封闭,每孔加入 200 μ L,室温封闭 1 h,进行 ELISA 试验,测量相应孔的 OD_{630} 值。

1.9 最佳血清稀释度和最佳酶标二抗工作浓度的确定

按已确定的 GST-Mhp366 重组菌和 GST 工程菌的最佳细菌裂解液浓度加入谷胱甘肽包被板,使用最佳封闭液进行封闭。血清按 1:100、1:200、1:500、1:1000 稀释,HRP 标记兔抗猪 IgG 酶标二抗按照 1:20 000、1:40 000、1:80 000 稀释。测量相应孔的 OD_{630} 值。

1.10 间接 ELISA 反应条件的判定标准

根据不同的反应条件进行间接 ELISA。GST-Mhp366 细菌裂解液和 GST 细菌裂解液分别与 13 份 Mhp 阴性血清反应,计算 GST-Mhp366 细菌裂解液和 GST 细菌裂解液与每份阴性血清反应的 OD_{630} 值之差,该差值的平均值为 \bar{x} ,标准差为 s ,将 $\bar{x}+2s$ 所得的值定为用 Mhp366 蛋白判定阴阳血清的界限。

GST-Mhp366 细菌裂解液和 GST 细菌裂解液分别与 17 份 Mhp 阳性血清反应。同理,计算 GST-Mhp366 细菌裂解液和 GST 细菌裂解液与每份阳性血清反应的 OD_{630} 值之差,该差值命名为

A。若 $A \geq \bar{x} + 2s$ ，则判定为 Mhp366 抗体阳性。选择 A 值 $\geq \bar{x} + 2s$ 对应的血清数量最多的反应条件，确定为 Mhp 血清体液免疫显性蛋白抗原 ELISA 的最佳反应条件。

1.11 间接 ELISA 方法的验证

GST-Mhp364 重组菌和 GST-Mhp156 重组菌经诱导表达后离心收集菌体，加入细菌裂解液超声破碎，25 mL 菌液对应 1 mL 细菌裂解液，离心去除细胞碎片。用 GST-Mhp366 蛋白建立的间接 ELISA 反应条件^[9]检测 Mhp364 抗体阳性血清数量和 Mhp156 抗体阳性血清数量。若某蛋白抗体阳性血清数量超过 Mhp 阳性血清数量的一半，则将该蛋白判定为血清体液免疫显性蛋白抗原。

2 结果与分析

2.1 GST-Mhp366、GST-Mhp364、GST-Mhp156 和 GST 蛋白的原核表达、纯化与鉴定

提取 GST-Mhp366、GST-Mhp364 和 GST-Mhp156 重组菌中的重组质粒，分别经双酶切后，得到 4 984 bp 的载体片段和 3 个载体中的 1 668 bp、1 599 bp、1 062 bp 的 *mhp366*、*mhp364*、*mhp156* 基因片段（图 1）。所有片段和预期条带大小相符，说明 pGEX-6P-1-*mhp366*、pGEX-6P-1-*mhp364*、pGEX-6P-1-*mhp156* 重组质粒构建正确，并在大肠杆菌 BL21(DE3)/XL-1 Blue 中成功转化。GST 重组菌中也能提取出大小约 5 000 bp 的质粒，说明 pGEX-6P-1 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)成功。

GST-Mhp366、GST-Mhp364、GST-Mhp156 重组菌经 1 mmol/L IPTG 诱导后超声破菌，以 13 000 r/min 离心取上清检测蛋白表达情况并进行后续试验。由于包涵体蛋白 12 000 $\times g$ 离心后沉淀^[11]，因此，3 个重组蛋白均能够以可溶形式表达。

经谷胱甘肽琼脂糖珠吸附的 GST-Mhp366 破菌上清 SDS-PAGE 后可见在 90 kDa 和 26 kDa 处各有一条明显的条带（图 2，第 1 泳道）。90 kDa

处为与预期蛋白大小相同的 GST-Mhp366 融合表达蛋白，26 kDa 处为 GST 蛋白。融合蛋白经 PreScission Protease 酶切后，得到约 70 kDa 的 Mhp366（图 2，第 2、3、4、5 泳道），比预期蛋白大小（64 kDa）偏大。经酶切之后的谷胱甘肽琼脂糖珠-融合蛋白复合物中仍有未被酶切的融合蛋白、被酶切的 Mhp366 蛋白、GST 蛋白和 46 kDa 的 PreScission Protease（图 2，第 6 泳道）。

经吸附的 GST-Mhp364 破菌上清电泳后可见与预期蛋白大小相同的 87 kDa GST-Mhp364 融合蛋白和 26 kDa GST 蛋白（图 2，第 7 泳道），经 PreScission Protease 酶切后，得到 61 kDa 与预期蛋白大小相同的 Mhp364（图 2，第 8、9、10、11 泳道）。经酶切之后的谷胱甘肽琼脂糖珠-融合蛋白复合物中仍有未被酶切的融合蛋白、被酶切的 Mhp364 蛋白、GST 蛋白和 46 kDa 的 PreScission Protease（图 2，第 12 泳道）。

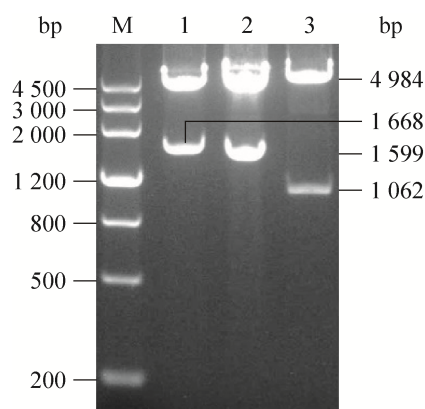


图 1 pGEX-6P-1-*mhp366*、pGEX-6P-1-*mhp364*、pGEX-6P-1-*mhp156* 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmids pGEX-6P-1-*mhp366*, pGEX-6P-1-*mhp364* and pGEX-6P-1-*mhp156* by double enzyme digestion. M: DNA marker III; Lane 1: pGEX-6P-1-*mhp366* was digested with *Bam*H I and *Xho* I. Lane 2: pGEX-6P-1-*mhp364* was digested with *Bam*H I and *Xho* I. Lane 3: pGEX-6P-1-*mhp156* was digested with *Bam*H I and *Sal* I.

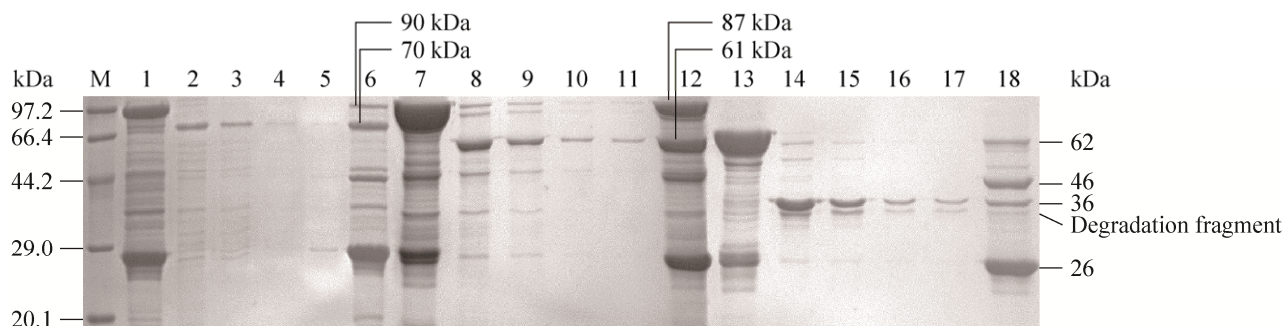


图 2 GST-Mhp366、GST-Mhp364、GST-Mhp156 重组蛋白表达纯化及蛋白酶切分析的电泳图

Fig. 2 Recombinant proteins GST-Mhp366, GST-Mhp364 and GST-Mhp156 were purified by Glutathione SepharoseTM 4B and digested by PreScission Protease. M: protein molecular weight marker; 1: GST-Mhp366 fusion protein; 2: the Mhp366 supernatant was harvested after the cleavage; 3–5: the Mhp366 beads were sequentially washed three times with PBS; 6: the remaining Mhp366 bead sample after digestion and washing; 7: GST-Mhp364 fusion protein; 8: the Mhp364 supernatant was harvested after the cleavage; 9–11: the Mhp364 beads were sequentially washed three times with PBS; 12: the remaining Mhp364 bead sample after digestion and washing; 13: GST-Mhp156 fusion protein; 14: the Mhp156 supernatant was harvested after the cleavage; 15–17: the Mhp156 beads were sequentially washed three times with PBS; 18: the remaining Mhp156 bead sample after digestion and washing.

经吸附的 GST-Mhp156 破菌上清电泳后可见与预期蛋白大小相同的 62 kDa GST-Mhp156 融合蛋白和 26 kDa GST 蛋白 (图 2, 第 13 泳道), 经 PreScission Protease 酶切后, 得到 36 kDa 的 Mhp156 (图 2, 第 14、15、16、17 泳道), 与预期蛋白大小相同。该蛋白极易降解。经酶切之后的谷胱甘肽琼脂糖珠-融合蛋白复合物中仍有未被酶切的融合蛋白、被酶切的 Mhp156 蛋白、GST 蛋白和 46 kDa 的 PreScission Protease (图 2, 第 18 泳道)。

图 2 泳道 1–18 中的杂带为非特异结合在谷胱甘肽琼脂糖珠的杂蛋白。

用抗 GST 标签单抗进行 Western blotting, 结果表明 GST-Mhp366、GST-Mhp364、GST-Mhp156 融合蛋白大小分别为 90、87、62 kDa (图 3), 均与预期大小相符, 进一步表明这 3 个重组蛋白均成功表达。

2.2 间接 ELISA 反应条件的确定

2.2.1 最佳抗原包被浓度的选择

GST-Mhp366 和 GST 细菌裂解液原液按 1 : 5、

1 : 10 比例稀释后进行抗原包被, 原液和按 1 : 5 稀释时 $A \geq \bar{x} + 2s$ 对应的 Mhp366 抗体阳性血清数最多 (图 4)。考虑到在今后 Mhp 血清免疫显性蛋白抗原的筛选试验中, 部分重组蛋白抗原的表

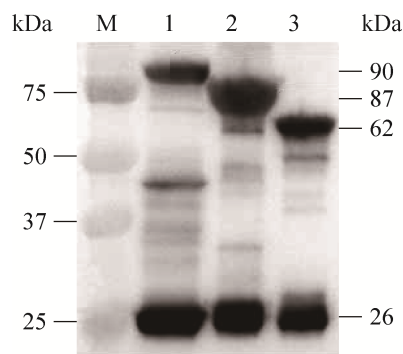


图 3 GST-Mhp366、GST-Mhp364、GST-Mhp156 重组蛋白进行 Western blotting 分析

Fig. 3 Western blotting analysis of recombinant proteins GST-Mhp366, GST-Mhp364 and GST-Mhp156. M: precision Plus ProteinTM Dual Color Standards; 1: GST-Mhp366 fusion protein; 2: GST-Mhp364 fusion protein; 3: GST-Mhp156 fusion protein.

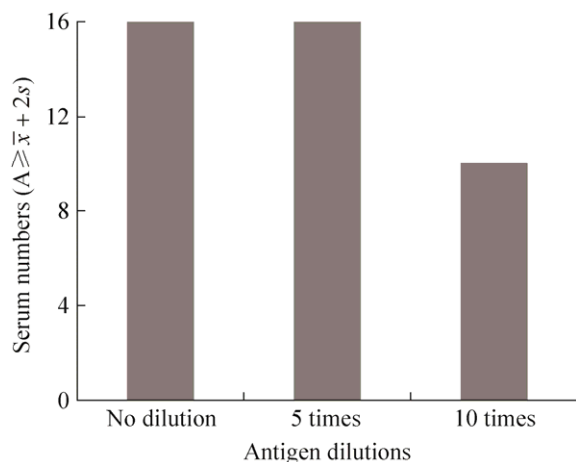


图4 抗原最佳包被浓度的选择

Fig. 4 Optimization for the concentration of coating antigen with indirect ELISA.

达量可能低于 GST-Mhp366 重组菌中重组蛋白的表达量, 因此将细菌裂解液原液作为最佳抗原包被浓度。

2.2.2 最佳封闭液的选择

以最佳抗原包被浓度包被酶标板, 选用 PBS+10% FBS、PBS+2.5%脱脂奶粉、PBS+10% FBS+2.5%脱脂奶粉 3 种封闭液比较封闭效果, 结果显示 PBS+10% FBS+2.5%脱脂奶粉作为封闭液进行 ELISA, A 值 $\geq \bar{x} + 2s$ 对应的 Mhp366 抗体阳性血清数最多 (图 5)。因此选择 PBS+10% FBS+2.5% 脱脂奶粉作为封闭液。

2.2.3 最佳血清稀释度和最佳酶标二抗工作浓度的确定

血清 1:500 稀释, 酶标二抗 1:40 000、1:80 000 稀释时均有 16 个 Mhp366 抗体阳性血清, 因此选择血清 1:500 稀释为最佳血清稀释度; 考虑到酶标二抗稀释度越高试验误差越大, 因此将酶标二抗按照 1:40 000 稀释作为最佳工作浓度 (图 6)。

2.2.4 间接 ELISA 方法的验证

采用本试验建立的方法, GST-Mhp364 和 GST-Mhp156 重组菌裂解液分别与 17 份 Mhp 抗体阳性

血清和 13 份抗体阴性血清反应后, Mhp364 抗体阳性血清有 9 份, Mhp156 抗体阳性血清有 12 份, 二者的抗体阳性血清数量均超过所用 Mhp 抗体阳性血清数量的一半。因此, Mhp364 和 Mhp156 蛋白均为血清体液免疫显性蛋白抗原, 这与 Simionatto 等报道的结果一致 (Mhp364 和 Mhp156 在 7 448 株中编号分别为 MHP0353 和 MHP0223)^[9]。

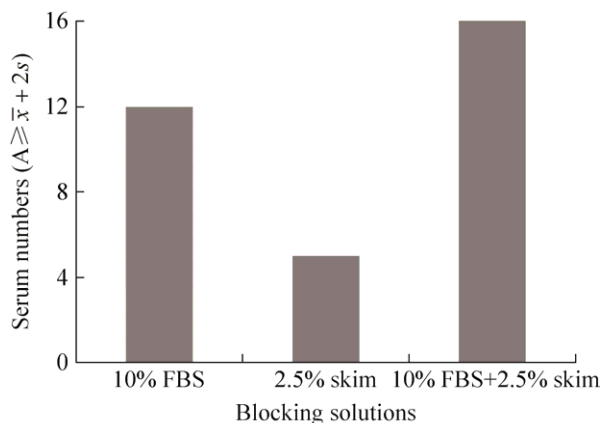


图5 最佳封闭液的选择

Fig. 5 Optimization of blocking buffer.

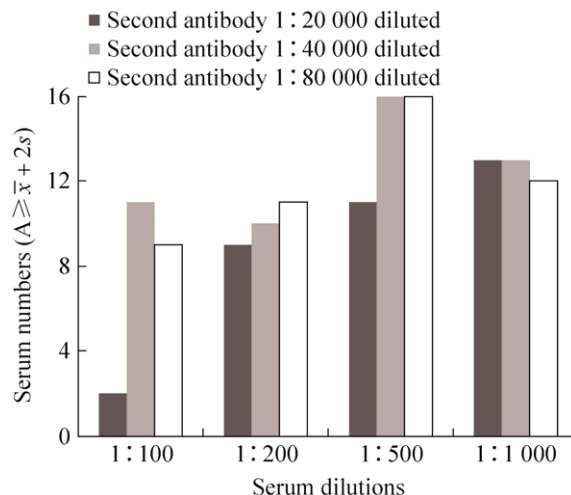


图6 最佳血清稀释度和最佳酶标二抗工作浓度的确定

Fig. 6 Determination of optimal dilution of serum and HRP-conjugated IgG.

3 讨论

本研究中的 Mhp366 蛋白在自然感染菌株中能够刺激机体产生强烈的体液免疫反应；体外无细胞培养时，表达量很低，几乎不能刺激机体产生体液免疫反应，也几乎不与 Mhp 高免血清发生反应^[8]。因此，本研究以 Mhp366 蛋白为基础，建立筛选猪肺炎支原体血清体液免疫显性蛋白抗原方法。

在真核生物和大部分原核生物中色氨酸由 TGG 编码，在支原体中色氨酸由 TGA 编码^[12]。TGA 在真核生物和大部分原核生物中编码终止密码子。在 *mhp366*、*mhp364*、*mhp156* 中，分别有 4 个、3 个、5 个编码色氨酸的 TGA 密码子。因此，若在大肠杆菌中表达 Mhp366、Mhp364、Mhp156 蛋白，需要将 TGA 突变为 TGG。考虑到 PCR 扩增 *mhp366*、*mhp364* 和 *mhp156* 后再将 TGA 密码子突变为 TGG，工作量很大，因此，本研究直接合成了 3 个基因，并将 TGA 密码子直接修改为 TGG。

本试验采用 pGEX-6P-1 载体连接 *mhp366*、*mhp364*、*mhp156* 基因分别构建重组质粒。因为 pGEX-6P-1 载体含有 GST 基因，重组菌表达的 GST 蛋白具有极强的亲水性，和 Mhp366、Mhp364、Mhp156 分别形成融合蛋白后能最大限度地保证融合蛋白以具有天然构象的可溶形式表达^[12]。另外 GST 蛋白能和商品化谷胱甘肽包被板上的谷胱甘肽形成特异性硫键共价结合，间接地包被了目的蛋白，实现了目的蛋白的快速包被。不同重组菌目的蛋白的表达量存在差别，为了能够饱和包被板上的谷胱甘肽^[13]，采用重组菌裂解液原液来包被谷胱甘肽板。

我们采用重组菌裂解液包被 ELISA 的结果减去 GST 工程菌裂解液包被 ELISA 的结果，减少重组菌中由于非特异结合形成的背景值。另外在

ELISA 之前，我们还用 GST 工程菌裂解液吸附了血清中可能存在的 GST 抗体和一些其他病原感染猪形成的抗体，特别是环境中大量存在的大肠杆菌蛋白抗体，最大限度降低了血清的背景值，其结果优于不使用 GST 工程菌裂解液吸附。

传统的蛋白抗原筛选通常是通过纯化蛋白后免疫实验动物评价抗原的免疫应答和对实验动物的免疫保护作用^[14]。许多 Mhp 外膜蛋白也作为疫苗候选抗原用于免疫小鼠，并对相应的免疫学指标进行了检测^[15-17]。但抗原对小鼠的免疫应答不能代表抗原对猪的免疫应答，更重要的是这种免疫应答不能代表对猪的免疫保护。反向疫苗学技术为疫苗抗原的筛选提供了全新的思路，可以基于微生物学基因组编码的所有蛋白，通过与感染病原的本动物血清反应，筛选具有高免疫反应性的普遍存在于病原的保守蛋白抗原^[9,18]，但这些方法比较费时费力。已有实验室采用反向疫苗学方法，利用谷胱甘肽包被板与携带 GST 标签的沙眼衣原体重组蛋白结合，筛选免疫显性蛋白抗原，建立了沙眼衣原体免疫显性抗原组^[19-21]，该实验室还利用此方法筛选了肺炎衣原体^[22]和鼠衣原体^[23-24]免疫显性蛋白抗原。那么，这种方法能否用于 Mhp 免疫显性蛋白抗原的检测？本试验在可溶表达 GST-Mhp366 重组蛋白基础上，将重组菌细胞裂解液与谷胱甘肽包被板结合，直接与本动物血清反应，发现 Mhp366 蛋白几乎能与所有 Mhp 阳性血清反应（16/17），证明了 Meens 等的结果^[8]，并以此建立了一种快速鉴定 Mhp 血清体液免疫显性蛋白抗原的方法。

Mhp364 和 Mhp156 是两个能够在体外和体内表达、高度保守^[25]且在自然感染条件下刺激猪产生体液免疫反应的 Mhp 蛋白^[9]。本研究进一步用 Mhp364 和 Mhp156 验证了所建立筛选方法的有效性，这为 Mhp 基因工程疫苗蛋白抗原的筛选提供了有效的研究方法。今后将对 Mhp 蛋白进行大量

表达,并用此方法大规模筛选 Mhp 血清体液免疫显性蛋白抗原。

REFERENCES

- [1] Maes D, Segales J, Meyns T, et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol*, 2008, 126(4): 297–309.
- [2] Chen C, Hua LZ, Gan Y, et al. Research progress of MPS eradication programme. *China Animal Health*, 2014, 16(11): 16–19 (in Chinese).
陈财, 华利忠, 甘源, 等. 猪支原体肺炎净化研究进展. *中国动物保健*, 2014, 16(11): 16–19.
- [3] Sibila M, Bernal R, Torrents D, et al. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Vet Microbiol*, 2008, 127(1/2): 165–170.
- [4] Meyns T, Dewulf J, de Kruif A, et al. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine*, 2006, 24(49/50): 7081–7086.
- [5] Villarreal I, Meyns T, Dewulf J, et al. The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *Vet J*, 2011, 188(1): 48–52.
- [6] Villarreal I, Maes D, Vranckx K, et al. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vaccine*, 2011, 29(9): 1731–1735.
- [7] Singh K, Mehta S. The clinical development process for a novel preventive vaccine: an overview. *J Postgrad Med*, 2016, 62(1): 4–11.
- [8] Meens J, Bolotin V, Frank R, et al. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. *Vet Microbiol*, 2010, 142(3/4): 293–302.
- [9] Simionatto S, Marchioro SB, Galli V, et al. Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2012, 35(2): 209–216.
- [10] Lu XM, Feng ZX, Liu MJ, et al. Establishment of a nested PCR assay for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Jiangsu J Agric Sci*, 2010, 26(1): 91–95 (in Chinese).
逯晓敏, 冯志新, 刘茂军, 等. 猪肺炎支原体套式 PCR 检测方法的建立及应用. *江苏农业学报*, 2010, 26(1): 91–95.
- [11] Ding HL, Pan J, Zhang WJ, et al. *Helicobacter pylori* cagT protein: expression, purification and immunogenicity. *J Southwest Univ: Nat Sci Ed*, 2010, 32(4): 46–50 (in Chinese).
丁红雷, 潘竞, 张卫军, 等. 幽门螺杆菌 cagT 蛋白的表达、纯化及免疫原性研究. *西南大学学报: 自然科学版*, 2010, 32(4): 46–50.
- [12] Yamao F, Muto A, Kawauchi Y, et al. UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(8): 2306–2309.
- [13] Sharma J, Zhong Y, Dong F, et al. Profiling of human antibody responses to *Chlamydia trachomatis* urogenital tract infection using microplates arrayed with 156 chlamydial fusion proteins. *Infect Immun*, 2006, 74(3): 1490–1499.
- [14] Sharon J, Rynkiewicz MJ, Lu Z, et al. Discovery of protective B-cell epitopes for development of antimicrobial vaccines and antibody therapeutics. *Immunology*, 2014, 142(1): 1–23.
- [15] Conceição FR, Moreira AN, Dellagostin OA. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine*, 2006, 24(29/30): 5734–5743.
- [16] Chen YL, Wang SN, Yang WJ, et al. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun*, 2003, 71(3): 1155–1160.
- [17] Galli V, Simionatto S, Marchioro SB, et al. Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. *Vaccine*, 2012, 31(1): 135–140.
- [18] Marchioro SB, Simionatto S, Galli V, et al. Production and characterization of recombinant transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol*, 2012, 155(1): 44–52.

- [19] Li Z, Chen C, Chen D, et al. Characterization of fifty putative inclusion membrane proteins encoded in the *Chlamydia trachomatis* genome. *Infect Immun*, 2008, 76(6): 2746–2757.
- [20] Wang J, Zhang Y, Lu C, et al. A genome-wide profiling of the humoral immune response to *Chlamydia trachomatis* infection reveals vaccine candidate antigens expressed in humans. *J Immunol*, 2010, 185(3):1670–1680.
- [21] Wang J, Chen L, Chen F, et al. A chlamydial type III-secreted effector protein (Tarp) is predominantly recognized by antibodies from humans infected with *Chlamydia trachomatis* and induces protective immunity against upper genital tract pathologies in mice. *Vaccine*, 2009, 27(22): 2967–2980.
- [22] Luo J, Liu G, Zhong Y, et al. Characterization of hypothetical proteins Cpn0146, 0147, 0284 & 0285 that are predicted to be in the *Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane. *BMC Microbiol*, 2007, 7: 38.
- [23] Zeng H, Gong S, Hou S, et al. Identification of antigen-specific antibody responses associated with upper genital tract pathology in mice infected with *Chlamydia muridarum*. *Infect Immun*, 2012, 80(3): 1098–1106.
- [24] Zeng H, Hou S, Gong S, et al. Mapping immunodominant antigens and H-2-linked antibody responses in mice urogenitally infected with *Chlamydia muridarum*. *Microbes Infect*, 2012, 14(7-8): 659–665.
- [25] Pendarvis K, Padula MP, Tacchi JL, et al. Proteogenomic mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* virulent strain 232. *BMC Genomics*, 2014, 15: 576.

(本文责编 郝丽芳)