

朱艳丽, 刘甜甜, 何瑜, 等. 猪肺炎支原体截短融合蛋白 P46-P97-P65 的表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (10): 43-49.

Zhu Y L, Liu T T, He Y, et al. Expression of truncated fusion protein P46-P97-P65 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and development of an indirect ELISA antibody detection method [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (10): 43-49.

猪肺炎支原体截短融合蛋白 P46-P97-P65 的表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立

朱艳丽¹, 刘甜甜¹, 何瑜², 陈智², 陈志雄¹, 李欣¹,
戴伶³, 张震萍³, 刘增再^{2*}, 葛猛^{1*}

(1. 湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128;

2. 长沙市动物疫病预防控制中心, 湖南 长沙 410100;

3. 长沙市农业综合执法支队, 湖南 长沙 410000)

摘要: 旨在建立一种检测猪肺炎支原体 (Mhp) 抗体的方法。选取 Mhp P46、P97 和 P65 的截短蛋白作为抗原, 不同抗原之间用柔性连接肽 Linker (GGGGS) 将 3 个片段进行连接, 构建重组质粒 pET28-Mhp-P46-P97-P65, 对该质粒进行双酶切鉴定, 确认结果无误后, 将其转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 诱导表达后获得可溶性表达的 Mhp-P46-P97-P65 截短融合蛋白。以纯化的 Mhp-P46-P97-P65 截短融合蛋白为包被抗原, 优化各项反应条件, 初步建立了间接 ELISA 抗体检测方法。优化结果显示: ELISA 方法的抗原包被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 待检血清 1:50 稀释; 羊抗猪 IgG-HRP 抗体使用浓度为 1:1 000, 临界值为 0.250。该方法具有较高的特异性, 与猪丹毒杆菌 (Er)、伪狂犬病病毒 (PRV)、猪瘟病毒 (CSFV) 等病原抗体无交叉反应; 批内和批间变异系数均低于 10%, 表现出良好的重复性。采用本研究建立方法和 IDEXX 公司 Mhp 抗体 ELISA 试剂盒对比检测 217 份临床血清, 结果显示, Mhp ELISA 阳性率为 47% (102/217), 阴性率 53% (115/217); IDEXX ELISA 阳性率为 54.84% (119/217), 阴性率 45.16% (98/217), 两者的阳性符合率为 80.67%, 阴性符合率为 93.88%, 总符合率为 86.64%。上述结果表明, 本研究所建立的 Mhp ELISA 方法检测结果准确可靠, 具有很好的应用前景。

关键词: 猪肺炎支原体; 融合蛋白; P46; P97; P65; 间接 ELISA

中图分类号: S852.62 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)10-0043-07

Expression of truncated fusion protein P46-P97-P65 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and development of an indirect ELISA antibody detection method

ZHU Yanli¹, LIU Tiantian¹, HE Yu², CHEN Zhi², CHEN Zhixiong¹, LI Xin¹,
DAI Ling³, ZHANG Zhenping³, LIU Zengzai^{2*}, GE Meng^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Changsha Animal Disease Prevention and Control Center, Changsha 410100, China;

3. Changsha Municipal Agricultural Comprehensive Law Enforcement Detachment, Changsha 410000, China)

Abstract: To establish a method for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* (Mhp) antibody, the P46, P97 and P65 proteins of Mhp were selected as antigens, and the three fragments were ligated with flexible ligation peptide Linker (GGGGS) between different antigens, and the recombinant plasmid pET28-Mhp-P46-P97-P65 was constructed, which was correctly identified by double digestion and transformed into BL21 (DE3) competent cells. Solubly expressed Mhp-P46-P97-P65 truncated fusion protein was obtained after induction of expression. The purified Mhp-P46-P97-P65 truncated fusion protein was used as the encapsulated antigen, and the reaction conditions were

收稿日期: 2025-09-28; 修回日期: 2026-07-27

基金项目: 湖南省重点研发计划项目 (2023NK2017)

第一作者: 朱艳丽, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 葛猛, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要从事动物传染病诊断及防控研究, E-mail: gmg02@126.com; 刘增再, 硕士, 正高级兽医师, 主要从事重大动物疫病和人畜共患病防控工作, E-mail: 15378351@qq.com。

optimized to establish a preliminary indirect ELISA antibody detection method. The optimization results showed that: the antigen encapsulation concentration of the ELISA method was 1.0 $\mu\text{g/mL}$, and the serum to be examined was diluted 1 : 50; and the concentration of the sheep anti-swine IgG-HRP antibody used was 1 : 1 000, with a critical value of 0.250. This method exhibited high specificity, with no cross-reactivity observed against antibodies to pathogens such as *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Er), pseudorabies virus (PRV), and classical swine fever virus (CSFV). The intra- and inter-batch coefficients of variation were lower than 10%, showing good reproducibility. Comparison of 217 serum samples using the method established in this study and IDEXX ELISA kit for Mhp antibody showed that the positive rate of Mhp ELISA was 47% (102/217) and the negative rate was 53% (115/217); and the positive rate of IDEXX ELISA was 54.84% (119/217) and the negative rate was 45.16% (98/217). The positive compliance rate of the two was 80.67%, the negative compliance rate was 93.88%, and the total compliance rate was 86.64%. The above results indicated that the Mhp ELISA test established here was accurate and reliable, with a promising application prospect.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*; fusion protein; P46; P97; P65; indirect ELISA

猪支原体肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae* of swine, MPS) 是由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp) 感染引起的慢性呼吸道疾病, 以咳嗽、气喘、生长发育不良、高发病率和低死亡率为主要特征^[1], 是猪场常见的一种传染病, 也被称为猪气喘病、猪地方流行性肺炎等^[2]。Mhp 本身致死率不高, 但很容易继发感染猪繁殖与呼吸系统综合征病毒 (PRRSV) 和猪圆环病毒 2 (PCV2) 等, 严重的导致猪死亡, 造成的经济损失巨大^[3-4]。

Mhp 缺乏细胞壁, 其细胞膜在该菌致病过程中发挥着极其重要的作用。P46 和 P65 蛋白属于 Mhp 表面抗原, 是免疫优势蛋白^[5]; p97 蛋白作为主要抗原决定簇使机体产生强烈免疫反应, 也可以发挥纤毛的黏附功能^[6], 常应用于 Mhp 血清学检测和亚单位疫苗的开发。目前, 血清学检测方法是 Mhp 流行病学调查较为常用的方法^[7]。Sorensen 等^[8]对 Mhp 的早期诊断技术进行研究, 指出用优势抗原建立 ELISA 方法具有高特异性的特点, 且该方法操作简单、检测速度快, 是目前临床应用最广泛的 Mhp 抗体检测方法^[9]。当前我国主要使用进口 Mhp 抗体 ELISA 检测试剂盒, 价格相对较贵, 限制了其在临床中的大规模应用。本研究通过对主要保护性蛋白 P46、P97 和 P65 在大肠杆菌中进行截短融合表达、纯化, 并建立了基于截短融合蛋白 Mhp-P46-P97-P65 的间接 ELISA 检测方法, 且进行了初步应用, 为 Mhp 感染的血清学诊断提供一定的帮助。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

pET-28a (+) 质粒由本实验室保存; Ni-IDA 纯化介质购自武汉汇研生物科技有限公司; 封闭液、血清稀释液、二抗稀释液均购自长沙恩樾生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗猪 IgG、TMB 显色液均购自 KPL 公司; Mhp 抗体检测试剂盒为美国 IDEXX 公司产品; Bradford 试剂盒购自北京索

莱宝科技有限公司。

1.2 血清样品

猪丹毒杆菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*, Er), 伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV), 猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV), 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV), 猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV), 猪圆环病毒 2 (porcine circovirus 2, PCV2) 和胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 阳性血清由本实验室保存。3 份 Mhp 阳性参考血清、3 份阴性参考血清和 46 份确定临界值的阴性血清样本均经过 IDEXX Mhp 抗体 ELISA 试剂盒检测确认。217 份临床血清来自湖南省某规模化猪场。

1.3 重组质粒的构建与鉴定

以 Mhp232 株 (NC_006360.1) 基因组为参考序列, 选取 Mhp P46、P97 和 P65 蛋白作为抗原, 使用 TMHMM2.0、DNASTar Protean、Expasy 软件分别预测 P46、P97 和 P65 蛋白的跨膜区及抗原表位分析, 不同抗原之间用柔性连接肽 Linker (GGGGS) 将 3 个片段进行连接, 在目的基因编码序列的 5' 和 3' 末端分别加上 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶识别位点及保护碱基, 该基因经南京金斯瑞生物科技有限公司密码子优化后合成构建重组质粒 pET28-Mhp-P46-P97-P65。对重组质粒进行双酶切鉴定, 将鉴定正确的重组质粒送至上海生工生物工程有限公司进行测序, 测序正确的质粒命名为 pET28-Mhp-P46-P97-P65。

1.4 重组 P46-P97-P65 蛋白的表达与纯化

将经测序确认正确的 pET28-Mhp-P46-P97-P65 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 值达到 0.6, 加入最终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 诱导 5 h, 离心收集细菌。将所得菌泥用超纯水进行 25 倍浓缩重悬, 在冰水浴条件下进行超声波破碎, 超声破碎仪参数设置为 35% 功率输出, 采用工作 3 s、间歇 5 s 的模式。

破碎后的样品在 4 ℃ 条件下以 8 000 r/min 离心 15 min, 分别收集菌体的上清液与沉淀。沉淀用等体积裂解缓冲液重悬, 将沉淀超声破碎 5 min, 10 000 g 离心 15 min。将处理好的样品进行 SDS-PAGE 检测以确定蛋白表达方式。确定表达方式后, 采用孔径为 0.45 μm 的滤膜, 对蛋白上清液进行过滤处理, 处理后与汇研 Ni-IDA 纯化介质结合 2 h 后进行纯化。纯化后的样品通过 SDS-PAGE 分析, Bradford 法测定纯化蛋白的浓度。

1.5 间接 ELISA 检测方法最佳反应条件的确定

采用方阵滴定法确定 Mhp-P46-P97-P65 间接 ELISA 的最佳蛋白包被浓度和血清稀释倍数, 将纯化后的 Mhp-P46-P97-P65 重组蛋白分别使用碳酸盐缓冲液 (pH=9.6) 按 2.0、1.0、0.5 μg/mL 的浓度稀释, 4 ℃ 包被 24 h, 37 ℃ 封闭 1 h。5 份 Mhp 阳性参考血清和 3 份阴性参考血清按 1:25、1:50、1:100、1:200 稀释, 进行方阵滴定。计算阳性和阴性参考血清的 $OD_{450\text{ nm}}$ 比值 (P/N 值), 以 P/N 值最大的抗原包被浓度和血清稀释度为判定条件。在此条件下, 进一步优化待检血清 37 ℃ 条件下反应时间 (15、30、45、60 min), 羊抗猪 IgG-HRP 抗体使用浓度 (1:500、1:1000、1:2 000) 及其在 37 ℃ 条件下反应时间 (15、30、45、60 min)、TMB 37 ℃ 条件下显色时间 (5、10、15、20 min)。选取 P/N 值最大的反应条件为最佳反应条件。

1.6 临界值的确定

选取 46 份经 IDEXX 公司试剂盒检测为阴性的血清, 与阳性对照血清共同进行 ELISA 检测, 计算阴性血清 S/P 值的平均数 (阴性血清样品 $OD_{450\text{ nm}}$ 值 / 阳性对照 $OD_{450\text{ nm}}$ 值) 和标准偏差 (SD)。临界值 = 阴性血清 S/P 值的平均数 + 3SD。当待检血清的 S/P 值 ≥ 临界值, 判定为阳性; 待检血清的 S/P 值 < 临界值, 判定为阴性。

1.7 特异性试验

为评估所建立的 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 方法的特异性, 采用该方法对 Er、PRV、CSFV、PRRSV、PEDV、PCV2、APP 阳性血清进行检测, 并分析其与常见病原阳性血清间的交叉反应性。

1.8 灵敏度试验

选取 1 份 Mhp 临床阳性血清, 进行倍比稀释 (1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、

1:1 280、1:2 560), 采用 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 方法和 IDEXX 试剂盒同时检测, 比较二者的检测灵敏度。

1.9 重复性试验

为了评估 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 方法的批内重复性, 取 3 份不同抗体水平的阳性参考血清和 3 份阴性参考血清, 用同一批次制备的蛋白包被板在 3 个不同的时间点分别进行检测。为了评估 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 的批间重复性, 取 3 份不同抗体水平的阳性参考血清和 3 份阴性参考血清用 3 个不同批次的抗原包被板分别进行检测。计算每份血清样品平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值 ($\bar{x}$) 和 SD, 变异系数 (CV) = $(SD/\bar{x}) \times 100\%$, 以评估该方法的重复性。

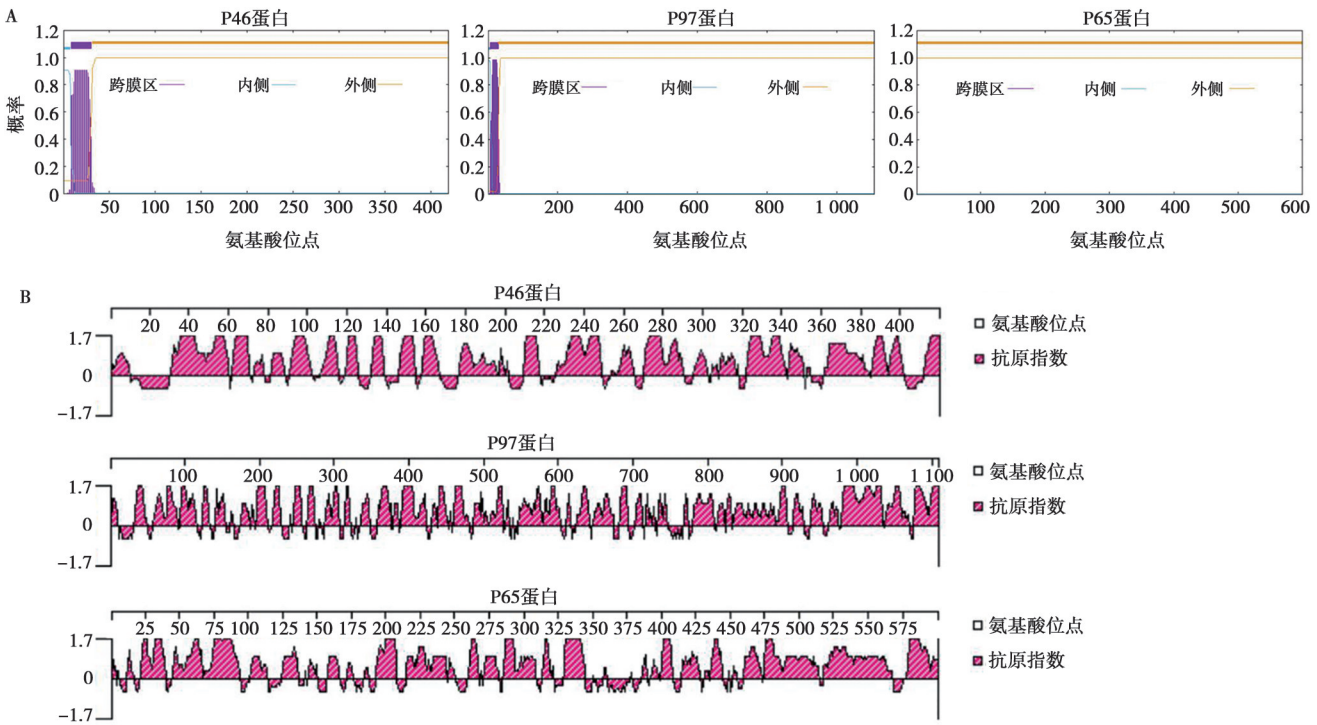
1.10 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 与 IDEXX 试剂盒对比检测临床血清

本研究采用建立的 ELISA 方法与 IDEXX 公司 Mhp ELISA 试剂盒对 217 份临床猪血清进行对比检测, 分析检测结果一致性, 并计算两种方法的符合率。

2 结果

2.1 抗原表位分析及截短融合蛋白的基因序列

使用 TMHMM2.0 分析可知, P46 和 P97 蛋白的跨膜区分别位于各自第 9~31 位和第 7~29 位氨基酸, P65 蛋白氨基酸无跨膜区, 全部序列均位于膜外区 (图 1A)。根据 DNASTAR Protean 软件对 P46、P97 和 P65 蛋白的抗原指数预测结果 (图 1B), 选取 P46 蛋白的 33~103 位氨基酸、P97 蛋白 R1 区 819~883 位氨基酸和 P65 蛋白的 473~562 位氨基酸等抗原指数较高的抗原区域作为备选抗原片段。使用 Expasy 软件分析以上 3 个片段, 显示其不稳定指数 (II) 分别为 31.37、31.26 和 31.17, 全部归类为稳定蛋白。将以上所选取的 P46 蛋白第 33~103 位氨基酸重复 3 遍序列, 通过 GGGGS 柔性连接肽依次与 P97 蛋白的 819~883 位氨基酸以及 P65 蛋白的第 473~562 位氨基酸进行串联, 作为最终重组融合蛋白用于后续试验。使用 Expasy 软件分析截短融合后的蛋白序列, 显示其不稳定指数为 33.94, 归类为稳定蛋白。根据该重组抗原的氨基酸序列进行密码子优化, 并由生物公司合成基因且构建重组表达质粒 pET28-Mhp-P46-P97-P65。

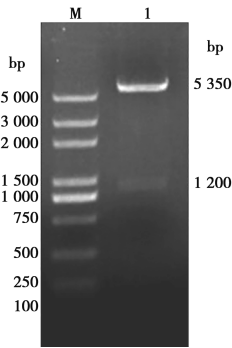


A. TMHMM2.0 软件分析结果；B. DNASTAR Protean 软件分析结果。

图 1 Mhp 蛋白 P46、P97 和 P65 的抗原表位分析

2.2 重组质粒的鉴定

对重组质粒使用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定，结果如图 2 所示，可见重组质粒被双酶切为 5 350 bp 和 1 200 bp 左右的 2 个条带，鉴定结果与测序结果均正确，结果表明重组质粒 pET28-Mhp-P46-P97-P65 成功构建。



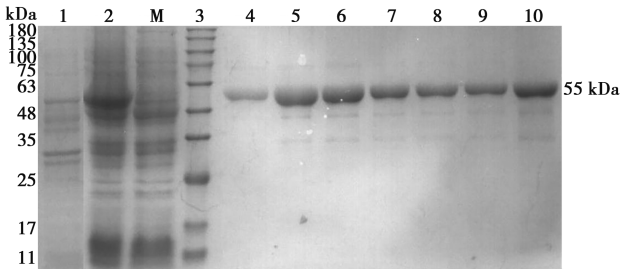
M. DNA 相对分子质量标准；1. pET28-Mhp-P46-P97-P65 的双酶切鉴定。

图 2 pET28-Mhp-P46-P97-P65 重组质粒的双酶切鉴定

2.3 重组蛋白表达与纯化的 SDS-PAGE 检测

SDS-PAGE 结果显示，Mhp-P46-P97-P65 蛋白在大肠杆菌表达系统中为可溶性表达，在约 55 kDa 处出现目的条带（图 3），进一步采用 Ni-IDA 亲和层析法纯化目的蛋白，纯化产物的结果显示在 55 kDa 处出现单一目的条带（图 3）。表明 Mhp-P46-P97-P65 蛋白在大肠杆菌中成功表达且纯化效果较好。

析法纯化目的蛋白，纯化产物的结果显示在 55 kDa 处出现单一目的条带（图 3）。表明 Mhp-P46-P97-P65 蛋白在大肠杆菌中成功表达且纯化效果较好。



M. 蛋白质相对分子质量标准；1. 裂解离心后沉淀；2. 裂解离心后上清液；3. 流穿液；4~10. 咪唑洗脱液。

图 3 Mhp-P46-P97-P65 蛋白纯化结果

2.4 Mhp-P46-P97-P65 蛋白抗体间接 ELISA 方法的优化

2.4.1 最优抗原包被浓度和血清稀释比例的确定
使用方阵滴定法确定最优抗原包被浓度和血清稀释比例。结果如图 4 所示，包被浓度为 1.0 μ g/mL 和 2.0 μ g/mL，血清稀释比例为 1 : 50 的条件下，P/N 值较高且相差不大，考虑到低浓度抗原的特异性更好，确定了 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 的最佳包

被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，最佳血清稀释比例为 1 : 50。

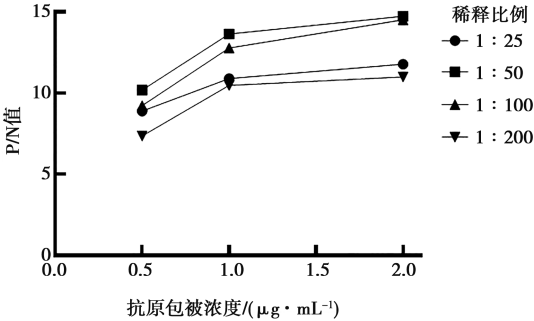


图 4 最优抗原包被浓度和血清稀释比例的确定

2. 4. 2 最佳二抗工作浓度的确定

确定上述条件后，分别使用不同工作浓度的二抗，检测结果如图 5 所示，当二抗工作浓度为 1 : 1 000 时 P/N 值最大，因此确定最佳工作浓度为 1 : 1 000。

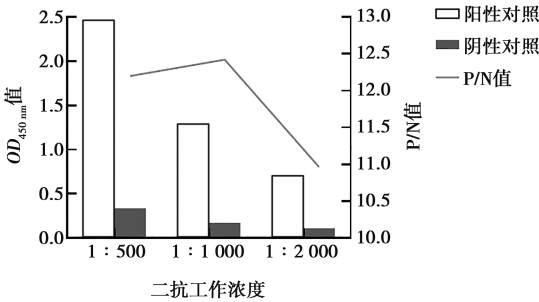
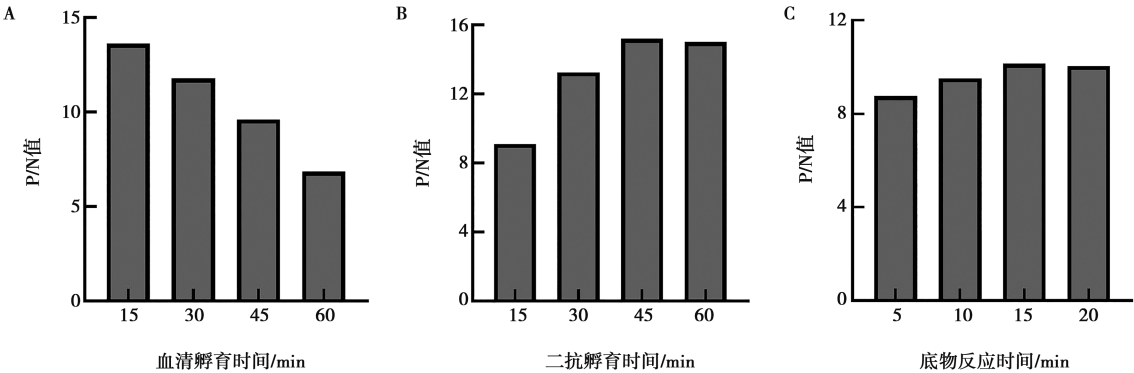


图 5 最佳二抗工作浓度的确定

2. 4. 3 最佳孵育时间的确定

检测结果如图 6 所示，随着血清孵育时间增加，P/N 值呈降低趋势，与商品化试剂盒结果对比分析，选择 30 min 为最佳血清孵育时间；酶标二抗孵育时间为 45 min、底物反应时间为 15 min 时 P/N 值最大，因此确定以此为最佳反应条件。



A. 最佳血清孵育时间的确定；B. 最佳二抗孵育时间的确定；C. 最佳底物反应时间的确定。

图 6 最佳孵育时间的确定

2. 5 临界值的确定

采用本研究建立的 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 方法对 46 份阴性血清样品进行检测，得出其 S/P 值的平均数 ($\bar{x}$) 为 0.101，S/P 值的 SD 为 0.049 7， $\bar{x} + 3SD = 0.250$ ，因此将 Mhp-ELISA 临界值设为 0.250。即当 S/P < 0.250 为阴性；S/P $\geq$ 0.250 为阳性。

2. 6 特异性试验

采用建立的 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 方法对 Er、PRV、CSFV、PRRSV、PEDV、PCV2、APP 和 Mhp 的阳性血清进行检测，结果显示，除 Mhp 阳性血清外，其他血清 S/P 值均低于临界值 0.250 (图 7)，说明本方法与其他常见病原抗体无交叉反应，具有较强的特异性。

2. 7 灵敏度试验

倍比稀释结果显示，本方法可检测出的阳性血清

最大稀释倍数为 1 : 1 280 (图 8A)，IDEXX 试剂盒可检测出的阳性血清最大稀释倍数为 1 : 320 (图 8B)，表明本研究建立的 Mhp-P46-P97-P65 方法具有较高灵敏度。

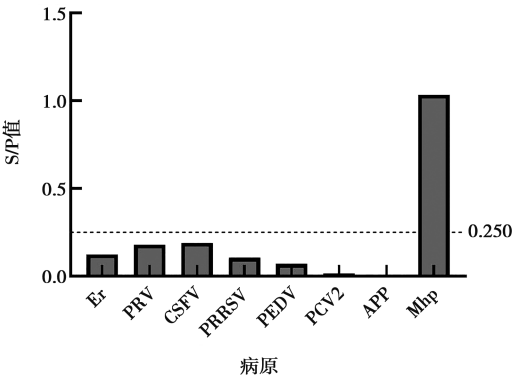


图 7 血清特异性试验结果

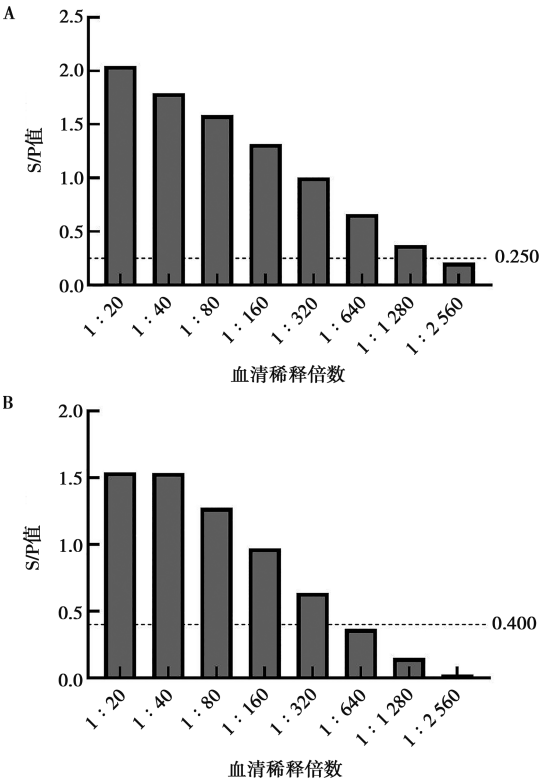


图8 Mhp-P46-P97-P65 ELISA (A) 和 IDExx ELISA (B) 灵敏度试验结果

2.8 重复性试验

用建立的 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 方法对 3 份不同抗体水平的阳性参考血清和 3 份阴性参考血清分别进行批内和批间重复性试验。结果表明，批内变异系数为 1.94%~8.96%，批间变异系数为 1.98%~9.65%，均小于 10%（表 1），表明本研究建立的 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 方法具有良好的重复性。

表1 Mhp-ELISA 重复性试验结果

血清 编号	批内重复试验		批间重复试验	
	$\bar{x}\pm SD$	CV/%	$\bar{x}\pm SD$	CV/%
1	1.776±0.038	2.13	1.741±0.034	1.98
2	1.119±0.041	3.71	1.159±0.074	6.43
3	0.948±0.085	8.96	0.972±0.081	8.35
4	0.079±0.002	1.94	0.100±0.007	7.05
5	0.190±0.012	6.07	0.198±0.016	7.83
6	0.227±0.019	8.37	0.248±0.024	9.65

2.9 Mhp-P46-P97-P65 ELISA 与 IDExx 试剂盒对比检测临床血清

用本方法和 IDExx 公司 Mhp 抗体 ELISA 试剂盒同时检测 217 份临床血清样品，本研究建立的间接 ELISA 试剂盒检测出阳性 102 份，阴性 115 份；用

IDExx Mhp 抗体检测试剂盒检测出阳性 119 份，阴性 98 份。两种检测方法的阳性符合率为 80.67% (96/119)，阴性符合率为 93.88% (92/98)，总符合率为 86.64% (188/217)，kappa 系数为 0.733 4，详见表 2。结果表明，本研究建立的 ELISA 方法与 IDExx ELISA 方法具有良好的一致性，可以用于临床样品的检测。

表2 临床猪血清样品的检测结果对比

本方法	IDExx		共计
	阳性血清数	阴性血清数	
阳性血清数	96	6	102
阴性血清数	23	92	115
共计	119	98	217

3 讨论

Mhp 自 20 世纪 60 年代首次被鉴定以来，目前已经在世界范围内广泛流行和传播，严重危害着集约化养猪业的健康发展^[10]。Mhp 的检测方法研究主要包括分子生物学方法和血清学方法，在实际生产中仍以血清学检测方法为主^[11]。血清学诊断技术中 ELISA 方法因方便快捷、时间短、特异性高、试验结果直观等优势而被广泛应用。目前针对 Mhp 的 ELISA 检测方法已有一些研究，张飞雁等^[12]以抗 p46 多抗为包被抗体、HRP-p46 单抗为检测抗体建立了双抗夹心 ELISA 方法，该方法可用于 Mhp 灭活疫苗（JM 株、RM48 株）的定量检测与质控。祝永琴等^[13]建立了 Mhp P36 蛋白的间接 ELISA 方法，与 IDExx 检测试剂盒的符合率在 73% 左右，能够有效检测疫苗免疫后的抗体变化，同时指出单一的 P36 蛋白作为包被抗原可能存在假阴性。

由多蛋白组成的重组融合蛋白相较于单一蛋白有着更高敏感性和特异性，该优点已在多项研究中得到证实。杨振宇等^[14]以 P46、P65 蛋白为抗原建立了检测 Mhp 抗体的 ELISA 方法，与广泛使用的 IDExx 公司的 ELISA 方法和 Mhp 的颜色变化抑制试验比较，其敏感性更高、特异性更强，解决了目前 Mhp ELISA 抗体检测方法敏感性偏低的问题；李叔光等^[15]建立了 Mhp P46-P36 融合蛋白的间接 ELISA 方法，具有很好的特异性，且能够监测 Mhp 早期感染和中晚期感染的抗体水平。P46 和 P65 蛋白是 2 个重要的膜蛋白，其中 P46 蛋白属于 Mhp 表面抗原，是引起早期免疫反应的表面脂蛋白，与猪絮状支原体、猪鼻支原体和猪滑液支原体等病原体之间无交叉反应，是 Mhp 主要免疫优势蛋白^[16]；P65 蛋白可引起机体的早期

免疫反应,也常作为 Mhp 血清学诊断的候选蛋白^[17]。国内外研究表明,纤毛黏附因子 P97 是 Mhp 的特异性免疫原,其基因 C 端的 R1 区被证实为 P97 的抗原决定簇,直接参与黏附^[18],因此本研究选取 Mhp P97 蛋白 R1 区作为抗原片段。基于 Mhp 的 P46、P97、P65 蛋白相对保守,且是主要保护性蛋白的特性,本研究将 3 个蛋白进行生物信息学分析,选取目的序列进行串联表达,可同时捕获针对不同表位的抗体,引入 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点合成目的基因,并利用大肠杆菌系统对蛋白进行原核表达纯化,获得可溶性表达的重组蛋白 Mhp-P46-P97-P65;以该重组 Mhp-P46-P97-P65 融合蛋白作为抗原,在对反应条件进行优化后,建立针对 Mhp 的间接 ELISA 方法。

为验证该方法的特异性与准确性,本试验利用该方法对 Er、PRRSV、PEDV 等 7 种病原阳性血清进行抗体检测,并与 IDEXX 公司商品化试剂盒进行了对比。结果显示本研究建立的方法与其他病原阳性血清均无交叉反应;Mhp 阳性血清稀释至 1:1 280 时仍为阳性,说明本方法具有良好的分析敏感性;批内和批间变异系数均低于 10%,表现出良好的重复性;与进口试剂盒对比检测临床血清结果总符合率为 86.64%,2 种方法的 kappa 系数为 0.733 4, kappa 值介于 0.6~0.8 之间,表明具有较高的一致性^[19]。检测临床样品的阳性率低于进口试剂盒,提示其诊断敏感性可能低于进口试剂盒。这可能与以下两方面因素有关:一是包被抗原不同,本研究建立的方法以 Mhp-P46-P97-P65 截短融合蛋白作为包被抗原,而 IDEXX 公司试剂盒包被抗原为 P46 蛋白^[20],2 种方法能检测到的抗体有所差异;二是临床血清样品来源较为复杂,不同样品中 Mhp 抗体存在一定差异,尤其是对处于抗体产生初期或消退阶段的血清抗体,采用不同方法检测结果可能存在明显差异。这也说明未来可通过优化抗原组合进一步提升检测敏感性。

综上,本研究成功建立检测了 Mhp 抗体的间接 ELISA 方法,该方法操作简便,为预防和控制 Mhp 感染提供了一种可行的诊断技术,同时为实现同类进口试剂盒的国产替代奠定了基础。

参考文献:

[1] 李娇,王文秀,李峰,等.我国猪肺炎支原体感染现状及实验室检测技术研究进展[J].养猪,2019(6):105-108.

[2] 张海梅.浅析猪支原体肺炎流行病学及其防治[J].中国畜禽种业,2020,16(6):146.

[3] Li B, Du L, Xu X, et al. Transcription analysis on response of

porcine alveolar macrophages to co-infection of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. Virus Res, 2015, 196: 60-69.

[4] Seo H W, Park S J, Park C, et al. Interaction of porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines on dually infected pigs [J]. Vaccine, 2014, 32 (21): 2480-2486.

[5] 郭绍华.猪肺炎支原体表面膜蛋白的原核表达及免疫原性分析[D].武汉:华中农业大学,2013.

[6] 王文秀,王宝琴,徐晴晴,等.猪肺炎支原体主要保护性抗原的研究进展[J].家畜生态学报,2018,39(6):79-85.

[7] 涂雨洁,董青霜,张阳,等.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.

[8] Sørensen V, Ahrens P, Barford K, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays [J]. Vet Microbiol, 1997, 54 (1): 23-34.

[9] 徐作波,李九彬,丁红雷.猪肺炎支原体检测技术研究进展[J].中国生物工程杂志,2019,39(4):78-83.

[10] 谢青云,邢蕙萱,于岩飞,等.猪肺炎支原体解螺旋酶 RuvA 的原核表达、多克隆抗体制备及活性鉴定[J].畜牧兽医学报,2024,55(1):271-281.

[11] 沈青春,王芳,韩明远,等.猪肺炎支原体 P46 基因的原核表达与间接 ELISA 方法的建立[J].畜牧兽医学报,2012,43(3):431-437.

[12] 张飞雁,秦涛,谢红玲,等.猪肺炎支原体 p46 蛋白定量检测双抗夹心 ELISA 方法的建立[J].动物医学进展,2024,45(11):64-69.

[13] 祝永琴,冯志新,刘茂军,等.猪肺炎支原体 P36 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立[J].江苏农业学报,2010,26(5):987-992.

[14] 杨振宇,李璇,刘一宁,等.猪肺炎支原体 P46-P65 重组蛋白的表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2024,46(7):709-715.

[15] 李书光,张娣,赵家磊,等.猪肺炎支原体融合蛋白 MHP-P46-P36 的表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J].中国兽医学报,2022,42(7):1376-1381.

[16] Futo S, Seto Y, Okada M, et al. Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33 (3): 680-683.

[17] 刘茂军,张悦,杜改梅,等.猪肺炎支原体 P65 基因原核表达及免疫原性分析[J].畜牧兽医学报,2014,45(2):262-267.

[18] Minion F C, Adams C, Hsu T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine Cilia [J]. Infect Immunity, 2000, 68 (5): 3056-3060.

[19] 颜虹.医学统计学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2010:21.

[20] Poeta Silva A P S, Magtoto R L, Souza Almeida H M, et al. Performance of commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* serum enzyme-linked immunosorbent assays under experimental and field conditions [J]. J Clin Microbiol, 2020, 58 (12): e00485-20.