



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103018442 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201110286912. 6

(22) 申请日 2011. 09. 23

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M2011295 2010. 08. 22

CCTCC NO:M2011294 2011. 08. 22

(73) 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街  
1 号

专利权人 武汉科前动物生物制品有限责任  
公司

(72) 发明人 何启盖 马丰英 李燕 库旭钢

邹浩勇 陈焕春 郭爱珍 徐高原

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 张红兵

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101545904 A, 2009. 09. 30, 全文.

CN 101236206 A, 2008. 08. 06, 全文.

CN 101565707 A, 2009. 10. 28, 全文.

US 2010247571 A1, 2010. 09. 30, 全文.

EP 1991262 A2, 2008. 11. 19, 全文.

WO 2009126356 A2, 2009. 10. 15, 全文.

审查员 杨冀川

权利要求书1页 说明书13页

序列表9页 附图7页

(54) 发明名称

猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒及  
应用

(57) 摘要

本发明属于动物病毒学与动物传染病学检测技术领域,具体涉及一种猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒及应用。本发明通过基因工程重组技术得到两株表达猪肺炎支原体 p46 蛋白和 p65 蛋白的重组的大肠杆菌 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65。本发明的试剂盒包括以突变后猪肺炎支原体膜蛋白 P46 和 P65 基因表达蛋白共同作为抗原包被的酶标板和其他核心试剂。本发明公开了猪肺炎支原体膜蛋白 P46 和 P65 基因的克隆,定点突变以及 P46 和 P65 蛋白的表达及纯化方法。还公开了猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测方法。本发明制备的间接 ELISA 抗体检测试剂盒可用于猪肺炎支原体抗体的临床大规模检测和流行病学调查,具有广阔的市场前景。

1. 一种重组的大肠杆菌 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65, 其特征在于, 所述的大肠杆菌 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65 保藏在中国典型培养物保藏中心, 其保藏号分别为 CCTCC NO : M2011294 和 CCTCC NO : M2011295, 所述的大肠杆菌分别表达猪肺炎支原体主要免疫原性膜蛋白 p46 和 p65, 其编码的蛋白质的序列分别如序列表 SEQ ID NO : 2 和 SEQ ID NO : 4 所示。

2. 一种适用于猪肺炎支原体抗体检测的间接 ELISA 试剂盒, 其特征在于, 该试剂盒包括包被板、样品稀释液、阳性对照血清、阴性对照血清、洗涤液、羊抗猪酶标二抗、底物显色液 A、底物显色液 B、终止液, 其中所述的包被板包被有由保藏号为 CCTCC NO : M2011294 和 CCTCC NO : M2011295 的重组的大肠杆菌 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65 表达的 p46 和 p65 蛋白共同包被的抗原, 所述的样品稀释液、洗涤液、羊抗猪酶标二抗、底物显色液 A、底物显色液 B、终止液、阳性对照血清和阴性对照血清的成分和制备步骤如下所示 :

样品稀释液 : 牛血清白蛋白 5g、Tween-200.5ml、氯化钠 8.0g, 磷酸二氢钾 0.2g, 十二水磷酸氢二钠 2.9g, 氯化钾 0.2g 和硫柳汞钠 0.2g ; 先用注射用水溶解并定容至 1000ml, 再用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用 ;

浓缩洗涤液 : NaCl 170g, Tween-20 10ml ; 加注射用水溶解并定容至 1000ml, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 得到 20 倍浓缩洗涤液, 无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用 ;

羊抗猪酶标二抗 : 将羊抗猪 IgG-HRP 酶标抗体, 用保护剂按体积比 1 : 15000 稀释成工作浓度, 再用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用 ;

底物显色液 A :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  14.6g、柠檬酸 9.33g、过氧化氢脲 0.52g, 加注射用水溶解并定容至 1000ml, 调 pH 值至 5.0 ~ 5.4, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用 ;

底物显色液 B : 四甲基联苯胺 20mg, 加入无水乙醇 10ml 溶解, 再用注射用水定容至 1000ml, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用 ;

终止液 : 将 2.5ml 氢氟酸加到 900ml 注射用水中, 定容至 1000ml, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用 ;

保护剂 : BSA 0.5g、蔗糖 2g, 加注射用水溶解并定容至 100ml, 置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用。

所述的阳性对照血清是感染猪支原体肺炎的猪血清 ;

所述的阴性对照血清是未感染猪支原体肺炎的猪血清。

3. 权利要求 1 所述的大肠杆菌 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65 表达的抗原蛋白在制备猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒中的应用。

## 猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及动物病毒学与动物传染病学检测技术领域。具体地说,本发明涉及一种猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒及其在猪群中猪肺炎支原体抗体检测的应用。

### 背景技术

[0002] 猪支原体肺炎俗称猪喘气病或猪地方流行性肺炎,广泛分布于世界各地,以慢性、接触性、高度传染性、高发病率以及低死亡率等为特点,主要表现为咳嗽和呼吸困难,解剖可见肺组织呈肉变或者大理石样病变。

[0003] 猪肺炎支原体是猪呼吸道疾病综合征的重要病原之一,可继发感染 PRRSV、PCV<sub>2</sub> 等,从而导致了多种疫苗的接种失败。猪肺炎支原体可经空气传播,此外还易与其他细菌性疾病如猪肺疫、传染性胸膜肺炎等并发,对养猪业造成重大经济损失,是当前最常发生、最广流行、最难净化的重要疫病之一。这主要是因为猪肺炎支原体能够穿透黏膜层与纤毛粘在一起,破坏纤毛的完整性,并分泌一些有害因子,而改变纤毛的游走性,致使纤毛大量脱落,这为其它细菌和病毒的入侵创造了条件,也就致使损失加剧。

[0004] 猪肺炎支原体能在猪肺中长期滞留,治疗效果不佳,虽然该病引起的死亡率不高,但是流行的广泛性所造成的经济损失仍然是巨大的。据报道,猪肺炎支原体表面具有纤毛黏附因子,其感染猪的呼吸道后,能与黏膜上皮细胞纤维发生特异性结合,使猪肺炎支原体能够附殖并造成致病性。Raznis(1983) 研究发现,猪肺炎支原体的致病力及免疫原性都与其细胞膜上的膜蛋白有关,Gear S J 等(1985) 从猪肺炎支原体菌株 VPP11 的细胞膜中分离得到了一种致病蛋白因子,发现其具有明显的免疫原性,并证实细胞膜蛋白是导致猪患猪支原体肺炎的主要因素。根据衣阿华大学的 Ross 研究发现,猪肺炎支原体感染后淋巴细胞产生抗体的能力下降,细胞免疫力下降,肺泡巨噬细胞对病原的吞噬和清除能力亦下降,抑制性 T 细胞的活动增强,导致呼吸道免疫力减弱,抗病力下降,从而使其它病原体更容易侵入。

[0005] 对标准菌株和野外分离菌株的抗原分析表明,支原体肺炎含有几种主要免疫原,即:胞内具 LDH 活性的蛋白(P36)(Haldimann A, et al. 1993; Stipkovits L, et al. 1991), 3 种膜蛋白(P46、P65 和 P70)(Kim M F, et al. 1990; Mori Y T, et al. 1988) 和粘附素(P97)(Zhang Q T, et al. 1995)。这些蛋白在急性或初次感染肺炎支原体后,可刺激产生早期和特异抗体。

[0006] 目前关于猪支原体肺炎的诊断方法,国外研究较多,而国内研究较少,而且主要是间接血凝实验(IHA)和单抗原包被的 ELISA 方法。但是,IHA 的检测中存在着检测滴度低、结果和感染的相关性低、凝集终点判定的主观性较强以及本身固有的技术缺陷等问题,因此 IHA 在商品猪群的 Mhp 检测中实际应用前景有限。ELISA 是目前应用最广泛的检测技术,它具有敏感度高、特异性强和操作简单等特点。通过研究其特异性蛋白而建立的诊断方法是目前研究的热点。但是只选用一种蛋白作为唯一的包被蛋白,对于 Mhp 感染初期的猪很可能存在假阴性,若将 Mhp 的功能蛋白组合后再检测该病,可能检测结果更加准确可靠,易

于大规模推广应用,具有更加广阔的应用前景。

[0007] 研究发现, p46 蛋白是猪肺炎支原体的一种种属特异的膜抗原,高度保守,可以诱导早期免疫应答,并且引起的抗体反应的持续时间最长。其序列中 3 个 TGA 密码子编码 Trp,而 TGA 在通用密码子中为终止密码子,需要将 TGA 突变为 TGG 才能获得其原核表达的蛋白。S Futo 等将 P46 基因克隆到载体,然后转入大肠杆菌中进行原核表达,收获并纯化该重组蛋白,并且将其成功地应用于检测猪肺炎支原体抗体的 ELISA 实验,在该实验中可以避免与絮状支原体、猪鼻支原体,猪滑液支原体的交叉反应 (Futo S, et al. 1995)。M F Kim 等研究发现,P65 蛋白是猪肺炎支原体的一个重要的免疫原,它的碳端是其主要的抗原区 (Kim M F, et al. 1990)。P65 蛋白是一种解脂酶 (lipolytic enzyme),是猪肺炎支原体主要的具免疫原性的表面蛋白即膜蛋白之一 (Jono A, et al. 2004),其功能可能是损害肺组织中表面活性剂,即一种由脂蛋白组成的物质,是由肺部的肺泡细胞分泌的,可以通过减小肺部表面的液体表面张力来维持肺组织的稳定性 (Wise K. S. et al. 1987),还可以触发急性或首次感染猪肺炎支原体的断奶仔猪及生长猪的早期免疫应答。P65 蛋白序列中也有 1 个 TGA 密码子需要进行定点突变才能在大肠杆菌中表达。K. Cheikh Saad Bouh 等将 P46 基因和 P65 基因克隆到载体上,在大肠杆菌中对其进行原核表达,收获表达产物并对其进行复性后免疫 BALB/c 小鼠,从而获得相应的单克隆抗体,并对该单克隆抗体进行了交叉反应的研究,结果显示该蛋白具有很高的种间保守性和特异性 (Cheikh Saad Bouh K, et al. 2003)。因此, P46 蛋白和 P65 蛋白均可以作为建立 Mhp 诊断方法的优选抗原。在血清学检测方法中,ELISA 方法具有方便、快速、敏感性和特异性高等特点,在动物疾病的检测中得到了广泛的应用。本研究克隆了 Mhp P46 和 P65 基因,并以其表达的蛋白共同作为抗原建立了检测 Mhp 的间接 ELISA 方法,为临床检测猪肺炎支原体感染和流行病学调查奠定了初步基础。

## 发明内容

[0008] 本发的的主要目的在于克服现有技术存在的缺陷,提供一种猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒,以解决猪群中猪肺炎支原体抗体的检测。

[0009] 本发明的第一个目的是获得分别表达猪支原体肺炎主要免疫原性膜蛋白 p46 蛋白和 p65 蛋白的重组大肠杆菌菌株,重组菌株 pGEX-KG-46 中的 p46 蛋白基因中三个编码色氨酸的 TGA 密码子均已经定点突变为 TGG,重组菌株 pGEX-KG-65 中的 p65 蛋白基因中一个编码色氨酸的 TGA 密码子已经定点突变为 TGG,以便于这两种蛋白的原核表达;

[0010] 本发明的第二个目的是利用上述重组菌株建立一种猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测方法。

[0011] 本发明的第三个目的是组装一种猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒。

[0012] 本发明的第四个目的是利用该试剂盒在猪群中猪肺炎支原体抗体检测中的应用。

[0013] 本发明通过以下技术方案实现:

[0014] 申请人通过基因工程的方法,获得两株分别表达猪支原体肺炎主要免疫原性膜蛋白 p46 蛋白和 p65 蛋白的重组的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65,将这两株菌株于 2011 年 08 月 22 日送交湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 保藏,其保藏编号分别为 CCTCC NO :M2011294 ;CCTCC NO :M2011295。

[0015] 申请人提供了一种重组的大肠杆菌 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65 的制备方法,它包

括下列步骤：

[0016] 1) 构建重组质粒 pGEX-46 和 pGEX-65：

[0017] 分别扩增猪肺炎支原体膜蛋白 p46 和 p65 的基因片断，并将其亚克隆至原核表达载体 pGEX-KG 上，构建得到重组质粒 pGEX-46 和 pGEX-65。

[0018] 所用引物对的 DNA 序列如下所示（引物的下划线部分为酶切位点）：

[0019] p46 正向引物：CCCGGATCCATGAAAAAAAAATGCTTA (5' → 3' )，

[0020] p46 反向引物：CCCAAGCTTTTAGGCATCAGGATTA (5' → 3' )；

[0021] p65 正向引物：AAAGGATCCATGGCAAAAGAA (5' → 3' )，

[0022] p65 反向引物：CCCAAGCTTAATCCTGCTTGA (5' → 3' )；

[0023] 2) 利用三个引物对将猪肺炎支原体的 p46 蛋白基因片断中 210bp、303bp 和 662bp 处的碱基 A 人工定点突变为碱基 G，所用引物对的 DNA 序列如下所示：

[0024] 正向引物：AATCCTCGATGGATTAGTGCC (5' → 3' )，

[0025] 反向引物：CCATCGAGGATTATCCGGAT (5' → 3' )；

[0026] 正向引物：CAAAATAACTGGCTCACTCAG (5' → 3' )，

[0027] 反向引物：CCAGTTATTTTGTGCATCCTG (5' → 3' )；

[0028] 正向引物：TCCCAGGATGGAATTATGGAA (5' → 3' )，

[0029] 反向引物：CCATCCTGGGACATAAACAGC (5' → 3' )；

[0030] 利用一个引物对将猪肺炎支原体的 p65 蛋白基因片断 633bp 处的碱基 A 人工定点突变为碱基 G，所用引物对的 DNA 序列如下所示：

[0031] 正向引物：CCCTTGTA AATTGGCTTGTTAAA (5' → 3' )，

[0032] 反向引物：CCCCCAATTTACAATTTTCATTAT (5' → 3' )；

[0033] 3) 用上述突变之后的重组质粒 pGEX-46 和 pGEX-65 转化大肠杆菌 JM105，进行 PCR 和酶切鉴定并测序。将突变正确的菌株命名为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65，于 2011 年 08 月 22 日送交湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 保藏，其保藏编号分别为 CCTCC NO:M2011294；CCTCC NO:M2011295（其详细构建过程参见图 2）。

[0034] 将上述重组的大肠杆菌经 IPTG 诱导后收集菌体进行超声波破碎提取猪肺炎支原体 p46 蛋白和 p65 蛋白，所提取的 p46 蛋白和 p65 蛋白经过亲和层析纯化后可用于制备检测猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒。

[0035] 申请人获得两种能分别原核表达猪肺炎支原体主要免疫原性膜蛋白 p46 和 p65 的基因片段，将编码色氨酸的密码子 TGA 定点突变为 TGG，p46 蛋白和 p65 蛋白的基因片段的核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO:1，表 SEQ ID NO:3 所示。

[0036] 申请人利用所述的两株重组菌株 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65 所表达纯化的 p46 蛋白和 p65 蛋白为包被抗原制备成间接 ELISA 核心试剂，组装了一种用于快速检测适用于猪群的猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒。本发明的试剂盒是由包被板、样品稀释液、阳性对照血清、阴性对照血清、洗涤液、羊抗猪酶标二抗、底物显色液 A、底物显色液 B、终止液，其中所述的包被板包被有由保藏号为 CCTCC NO:M2011294 和 CCTCC NO:M2011295 的重组的大肠杆菌 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65 表达的 p46 和 p65 蛋白共同包被的抗原，所述的样品稀释液、洗涤液、羊抗猪酶标二抗、底物显色液 A、底物显色液 B、终止液、阳性对照血清

和阴性对照血清的成分和制备步骤如下所示：

[0037] 样品稀释液：牛血清白蛋白 5g、Tween-20 0.5ml、氯化钠 8.0g，磷酸二氢钾 0.2g，十二水磷酸氢二钠 2.9g，氯化钾 0.2g 和硫柳汞钠 0.2g；先用注射用水溶解并定容至 1000ml，再用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，无菌分装后置 2 ~ 8℃ 保存备用；

[0038] 浓缩洗涤液：NaCl 170g，Tween-20 10ml；加注射用水溶解并定容至 1000ml，用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，得到 20 倍浓缩洗涤液，无菌分装后置 2 ~ 8℃ 保存备用；

[0039] 羊抗猪酶标二抗：将羊抗猪 IgG-HRP 酶标抗体，用保护剂按体积比 1 : 15000 稀释成工作浓度，再用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，无菌分装后置 2 ~ 8℃ 保存备用；

[0040] 底物显色液 A：Na2HP04. 12H2O 14.6g、柠檬酸 9.33g、过氧化氢脲 0.52g，加注射用水溶解并定容至 1000ml，调 pH 值至 5.0 ~ 5.4，用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，无菌分装后置 2 ~ 8℃ 保存备用；

[0041] 底物显色液 B：四甲基联苯胺 20mg，加入无水乙醇 10ml 溶解，再用注射用水定容至 1000mL，0.22 μm 滤膜过滤除菌，无菌分装后置 2 ~ 8℃ 保存备用；

[0042] 终止液：将 2.5ml 氢氟酸加到 900ml 注射用水中，定容至 1000mL，用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，无菌分装后置 2 ~ 8℃ 保存备用；

[0043] 保护剂：BSA0.5g、蔗糖 2g，加注射用水溶解并定容至 100ml，置 2 ~ 8℃ 保存备用。

[0044] 所述的阳性对照血清是感染猪支原体肺炎的猪血清；

[0045] 所述的阴性对照血清是未感染猪支原体肺炎的猪血清。

[0046] 本发明的主要优点是：

[0047] 1、本发明的试剂盒能直接对猪肺炎支原体进行检测，具有特异性强，灵敏度高，检测时间短的特点，可用于猪肺炎支原体抗体的临床大规模检测和流行病学调查，具有广阔的市场前景。

[0048] 2、本发明将所需的各种试剂组装成试剂盒，操作简单易行，不需由专业人员操作。本发明的试剂盒稳定性好、保存期长，在 2 ~ 8℃ 条件下放置半年不会影响其敏感性。

[0049] 3、目前国内市场上还没有同时应用 Mhp 的两种功能蛋白作为包被抗原检测猪肺炎支原体抗体的间接 ELISA 试剂盒。

[0050] 更详细的技术方案见实施例所述。

## 附图说明

[0051] 序列表 SEQ ID NO :1 是本发明克隆的猪肺炎支原体免疫原性膜蛋白 p46 的基因片段，序列全长为 1260bp，在 210bp、303bp 和 662bp 处存在碱基的人工定点突变。

[0052] 序列表 SEQ ID NO :2 是克隆的猪肺炎支原体免疫原性膜蛋白 p46 的基因片段编码的蛋白质的序列，它编码 419 个氨基酸。

[0053] 序列表 SEQ ID NO :3 是本发明克隆的猪肺炎支原体免疫原性膜蛋白 p65 的基因片段，序列全长为 1803bp，存在一个 A633-G633 的人工定点突变。

[0054] 序列表 SEQ ID NO :4 是克隆的猪肺炎支原体免疫原性膜蛋白 p65 的基因片段编码的蛋白质的序列，它编码 600 个氨基酸。

[0055] 图 1：本发明总体技术路线图。

[0056] 图 2：本发明制备的能够原核表达的 p46 和 p65 基因片段的流程图。

[0057] 图 3:本发明扩增的 p46 和 p65 基因片段的 PCR 鉴定图;其中,图 3A:p46 片段的 PCR 扩增的胶图;

[0058] 图 3B:p65 片段的 PCR 扩增的胶图。

[0059] 图 4:本发明制备的 p46 基因 210bp、303bp 和 662bp 处 A-G 突变后的 PCR 鉴定图和 p65 基因 A633 突变为 G633 的 PCR 鉴定图。其中,图 4A:突变后 p46 片段的 PCR 扩增的胶图;图 4B:突变后 p65 片段的 PCR 扩增的胶图。

[0060] 图 5:本发明制备的 p46 基因 210bp、303bp 和 662bp 处 A-G 突变后的重组质粒的酶切鉴定图和 p65 基因 A633 突变为 G633 的重组质粒的酶切鉴定图。其中,图 5A:p46 经定点突变后的酶切鉴定的胶图;图 5B:p65 经定点突变后的酶切鉴定的胶图。

[0061] 图 6:本发明制备猪肺炎支原体 p46 基因和 p65 基因突变前后的 BLAST 图。其中,图 6A:p46 经定点突变后的测序结果;图 6B:p65 经定点突变后的测序结果。

[0062] 图 7:本发明制备的 p46 和 p65 重组蛋白的表达。其中,图 7A:p46 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析;图 7B:p65 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析。

[0063] 图 8:本发明制备的 p46 和 p65 重组蛋白的亲和层析纯化。其中,图 8A:重组 p46 蛋白的 SDS-PAGE 分析;图 8B:重组 p65 蛋白的 SDS-PAGE 分析。

[0064] 图 9:本发明制备的 p46 和 p65 重组蛋白的 Western-blot 分析。其中,图 9A:Western-blot 鉴定 p46 蛋白的表达;图 9B:Western-blot 鉴定 p65 蛋白的表达。

[0065] 图 10:本发明克隆的猪肺炎支原体免疫原膜蛋白 p46 和 p65 基因片段。括号内显示的是突变的碱基的位置。其中,图 10A:p46 基因片段;图 10B:p65 基因片段。

## 具体实施方式

[0066] 以下结合说明书附图对本发明作进一步的说明,本发明的技术流程如图 1 所示:

[0067] 实施例 1 猪肺炎支原体 p46 蛋白和 p65 蛋白的基因片段的克隆

[0068] 1、猪肺炎支原体 p46 和 p65 蛋白基因片段的克隆方法见图 2 所示。

[0069] 制备能够原核表达的 p46 基因片段所需的引物如表 1 所述。

[0070] 表 1 制备能够原核表达的 p46 基因片段所需的引物

引物命名	引物序列(5' → 3')	目的
p46 ( <i>Bam</i> H I)	<u>CCCGGATCC</u> ATGAAAAAATGCTTA	连接载体
p46 ( <i>Hind</i> III)	CCCAAGCTT <u>TTTAGGCATCAGGATTA</u>	pGEX-KG
p46 (a1)	AATCCTCGATGGATTAGTGCC	突变第一个
[0071] p46 (a2)	CCATCGAGGATTATCCGGAT	TGA→TGG
p46 (b1)	CAAAATAACTGGCTCACTCAG	突变第二个
p46 (b2)	CCAGTTATTTGTGCATCCTG	TGA→TGG
p46 (c1)	TCCCAGGATGGAATTATGGAA	突变第三个
p46 (c2)	CCATCCTGGGACATAAACAGC	TGA→TGG

[0072] 说明:表 1 所示引物下划线部分为酶切位点。

[0073] 表 2 制备能够原核表达的 p65 基因片段所需的引物

	引物命名	引物序列(5' →3' )	目的
[0074]	p65 ( <i>Bam</i> H I)	AAAGGATCCATGGCAAAGAA	连接载体
	p65 ( <i>Hind</i> III)	CCCAAGCTTAATCCTGCTTGA	pGEX-KG
	p65 (a1)	CCCTTGTAATTGGCTTGTTAAA	突变
	p65 (a2)	CCCCAATTTACAATTCATTAT	TGA→TGG

[0075] 说明：表 2 所示引物下划线部分为酶切位点。

[0076] 2、制备能够原核表达的 p46 和 p65 基因片段

[0077] 以猪支原体肺炎活疫苗（购自南京天邦生物科技有限公司，该活疫苗包含有猪肺炎支原体 Mhp168 株和佐剂）提取基因组 DNA（采用天根生化科技（北京）有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒，按照该公司提供的试剂盒说明书操作）为模版，分别利用如表 1 和表 2 所示的引物 p46 (*Bam*H I)/p46 (*Hind*III) ;p65 (*Bam*H I)/p65 (*Hind*III) PCR 扩增 p46 和 p65 基因片断，扩增体系如下所述：

[0078]

PCR 反应体系总体积	25 $\mu$ L
Mhp168 株基因组	1 $\mu$ L
10 $\times$ PCR buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	2.5 $\mu$ L
2.5mmol/L dNTP Mixture	2 $\mu$ L
引物 (10pmol/ $\mu$ L)	2 $\times$ 0.5 $\mu$ L
Taq 酶	0.25 $\mu$ L
灭菌无离子水	18.25 $\mu$ L

[0079] p46 基因片断的 PCR 扩增条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后，进行如下循环：94 $^{\circ}$ C 变性 45s，55 $^{\circ}$ C 退火 45s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1min30s，30 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 10min。

[0080] p65 基因片断的 PCR 扩增条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后，进行如下循环：94 $^{\circ}$ C 变性 45s，53 $^{\circ}$ C 退火 45s，72 $^{\circ}$ C 延伸 2min，30 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 10min。

[0081] 扩增完成后，取 PCR 产物 8 $\mu$ L，加入 1 $\mu$ L 10 $\times$  Loading Buffer，用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳，EB 染色，观察结果（如图 3 所示）。电泳后用 BioFlux 公司胶回收试剂盒进行目的基因的纯化（按照该试剂盒的说明书操作）。将纯化后的 p46 基因片段与载体 pGEX-KG 分别进行 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切后跑胶回收，利用 T4DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态，经 PCR 和酶切鉴定筛选出阳性克隆（同样方法进行 p65 基因的克隆）。

[0082] 从上述阳性克隆菌提取重组质粒 pGEX-46 为模板，用表 1 所示的引物 p46(a1)/p46(a2) 同上体系和条件进行 PCR 扩增，PCR 产物跑胶回收后利用限制性内切酶 *Dpn* I 切除模板，再次回收后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ，挑取单菌落，经 PCR 和酶切鉴定筛选出阳性克隆，此时第一个 TGA 已突变为 TGG，同样方法对第二个和第三个 TGA 进行 A-G 的定点突变（同理用表 2 所示的引物 p65(a1)/p65(a2) 同上体系和条件分别进行 PCR 扩增将 p65 基因的 TGA 定点突变为 TGG）。用上述突变之后的重组质粒 pGEX-46 和 pGEX-65 转化大肠杆菌 JM105，进行 PCR 和酶切鉴定并测序。原核表达的 p46 基因片段和 p65 基因片段的制备流程如图 2 所示。其 PCR 和酶切鉴定结果如图 4 和图 5 所示。测序结果与 p46 和 p65 原序列进行 BLAST 的结果如图 6 所示。由此可见，在所述的 p46 基因片段的 210bp、303bp 和 662bp 处和 p65 基因片段的 633bp 处的碱基 A 均已定点突变为 G，得到能够原核表达的猪肺炎支原体 p46 基

因片段和 p65 基因片段（其核苷酸序列见 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3 和图 10, 图 10 所示序列的括号内为碱基突变位点）。

[0083] 结果表明：所获得的分别含有 pGEX-46、pGEX-65 质粒的重组的大肠杆菌是正确的，申请人分别将其命名为大肠杆菌 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65，将两菌株于 2011 年 08 月 22 日送交湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心（CCTCC）保藏，保藏编号分别为 CCTCC NO :M2011294 和 CCTCC NO :M2011295。

[0084] 实施例 2 表达 p46、p65 融合蛋白的重组菌株 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65 的鉴定

[0085] 将突变正确的菌株按 1 : 100 的比例（体积比）接种到含 100mg/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，于 200r/min, 37℃ 振荡培养 3 小时后，再次以 1 : 1000 体积比加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷（IPTG）至终浓度为 0.8mmol/L, 诱导表达 4 小时。收集菌体并用 10mL Buffer A（配方：称取 6.057g Tris 碱、0.1861g 乙二胺四乙酸二钠、2.922g 氯化钠，甘油 50mL，溶解于去离子水后定容至 1000mL，用 0.22 μm 滤膜过滤后于 2~8℃ 保存，使用时加 0.5mM DTT）重悬。反复冻融三次后进行超声波破碎（UP 200S 超声波处理器 - 德国 Dr. Hielscher 公司制造，功率：200W、振幅：60%、操作频率：24KHz，超声波破碎时间：30s/次，间隔时间：1min/次），12000r/min 离心 15min，上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析，观察蛋白是在上清还是在包涵体内表达（图 7）。由图 7 可知，上清和沉淀（包涵体）内目的蛋白均获得表达，但通常从包涵体中纯化的蛋白往往含有杂蛋白，为了保证包被抗原的成分更纯，本发明采用亲和层吸法（纯化步骤见下面的实施例 3）纯化上清中的蛋白作为包被抗原。

[0086] 实施例 3 抗原的制备及检验

[0087] 1、p46 和 p65 融合蛋白的纯化和检验

[0088] 以可溶形式表达的 GST-46 和 GST-65 采用琼脂糖 -4B 亲和层吸柱纯化：将上清加入盛有约 1mL GST-4B 原液的离心管中，放在水平摇床于室温或更低条件下缓慢摇动 1h 后，于 2100r/min 离心 5min，上清转入另一离心管，沉淀加至少 10 倍体积的 pH7.4 的 PBS（配方：称取 8.18g 氯化钠、0.20g 氯化钾、1.42g 磷酸氢二钠、0.245g 磷酸二氢钾，溶于去离子水，浓盐酸调节 pH 至 7.4 后，用去离子水定容至 1000mL，再用 0.22 μm 滤膜过滤后于室温保存。）于摇床摇约 10min，2100r/min 离心 5min，洗涤 2 次后，加入 1ml 10mM pH8.0 的还原型谷胱甘肽溶液（配方：称取 0.307g 还原型谷胱甘肽溶于 100mL 50mM Tris-Hcl (pH8.0) 中，用 0.22 μm 滤膜过滤后于 2~8℃ 保存。）于摇床上洗脱 10min，2100r/min 离心 5min，收集上清保留，反复用还原型谷胱甘肽溶液洗脱蛋白 4-5 次。洗脱后用至少 10 倍体积的 PBS 于摇床清洗 GST-4B 原液 10min 后，2100r/min 离心 5min，弃上清，反复洗 2-3 次，加入 1~2ml 的 20% 的乙醇覆盖 GST-4B 原液后于 4℃ 保存备用。用 SDS-PAGE 电泳测定纯化抗原的纯度，应分别在 72kDa 和 91kDa 处有一条明显条带，而没有其他杂带，经凝胶成像系统扫描分析（genetools）软件（为该仪器自带的软件）纯度达 90% 以上（见图 8）。以猪肺炎支原体阳性参考血清作为一抗进行 Western blot 测定抗原活性，应分别在约 72kDa 和 91kDa 处出现一条特异性杂交带（图 9A 和图 9B）。用紫外分光光度计测定蛋白在 280nm-260nm 波长时的光吸收值（OD），按公式  $1.45 \times OD_{280nm} - 0.74 \times OD_{260nm}$  测定纯化蛋白的浓度。根据测定结果用缓冲液 PBS 稀释蛋白至终浓度为 100 μg/ml，作为 ELISA 包被抗原。

[0089] 将上述得到的两个（p46 蛋白和 p65 蛋白）抗原按 1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320 倍比稀释包被酶标板，并加封闭液（见试剂盒的封闭液配方）进行封闭，

阳性对照血清按 1 : 40 稀释,其余步骤按实施例 4 中第 5 步进行操作。由此确定抗原效价均不应低于 1 : 160 (检测阳性对照血清的  $OD_{630nm}$  值高于判定标准时的抗原最高稀释倍数作为抗原效价)。

#### [0090] 2、抗原包被板的制备

[0091] 将所制备的 p46 和 p65 抗原用包被液 (见试剂盒的包被液配方) 分别进行体积比 1 : 160 稀释 (终浓度均为  $0.625 \mu g/ml$ ), p46 和 p65 抗原以 1 : 1 的体积比按每孔  $100 \mu l$  的量加到酶标板中,置  $2 \sim 8^{\circ}C$  下作用 12 ~ 15 小时;弃去包被液,用洗涤液 (见试剂盒的洗涤液配方) 洗涤 2 ~ 3 次,每次 3min,甩干洗涤液,每孔加封闭液  $120 \mu l$ ,置  $37^{\circ}C$  下温育 2 小时;拍干,再置  $37^{\circ}C$  下干燥 30 分钟,用锡箔封口膜将抗原包被板封闭,置  $2 \sim 8^{\circ}C$  下保存。

#### [0092] 实施例 4 猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测方法

##### [0093] 1、核心试剂配制:

[0094] 样品稀释液:牛血清白蛋白 5g、吐温 20 0.5ml、氯化钠 8.0g,磷酸二氢钾 0.2g,十二水磷酸氢二钠 2.9g,氯化钾 0.2g 和硫柳汞钠 0.2g,先用注射用水溶解并定容至 1000ml,再用  $0.22 \mu m$  滤膜过滤除菌,无菌分装后置  $2 \sim 8^{\circ}C$  保存备用;

[0095] 浓缩洗涤液:NaCl 170g, Tween-20 10ml,加注射用水溶解并定容至 1000ml,  $0.22 \mu m$  滤膜过滤除菌,得到 20 倍浓缩洗涤液,无菌分装后置  $2 \sim 8^{\circ}C$  保存备用;

[0096] 羊抗猪酶标二抗:将羊抗猪 IgG-HRP 酶标抗体,用保护剂按体积比 1 : 15000 稀释成工作浓度,再用  $0.22 \mu m$  滤膜过滤除菌,无菌分装后置  $2 \sim 8^{\circ}C$  保存备用;

[0097] 底物显色液 A : $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  14.6g、柠檬酸 9.33g、过氧化氢脲 0.52g,加注射用水溶解并定容至 1000ml,调 pH 值至 5.0 ~ 5.4,用  $0.22 \mu m$  滤膜过滤除菌,无菌分装后置  $2 \sim 8^{\circ}C$  保存备用;

[0098] 底物显色液 B :四甲基联苯胺 20mg,加入无水乙醇 10ml 溶解,再用注射用水定容至 1000ml,  $0.22 \mu m$  滤膜过滤除菌,无菌分装后置  $2 \sim 8^{\circ}C$  保存备用;

[0099] 终止液:将 2.5ml 氢氟酸加到 900ml 注射用水中,定容至 1000ml,用  $0.22 \mu m$  滤膜过滤除菌,无菌分装后置  $2 \sim 8^{\circ}C$  保存备用;

[0100] 保护剂:牛血清白蛋白 (BSA) 0.5g、蔗糖 2g;加注射用水溶解并定容至 100ml;置  $2 \sim 8^{\circ}C$  保存备用。

##### [0101] 2、阴阳性对照血清的制备:

##### [0102] 阳性对照血清的制备:

[0103] a) 制造用动物选用 5 ~ 6 周龄健康仔猪 (品种为长白猪,来自华中农业大学试验猪场,为一种公开使用的品种);

[0104] b) 免疫原:西班牙海博莱生物大药厂生产的猪支原体肺炎灭活疫苗 (生产批号: 00YW-1);

[0105] c) 免疫方法:将西班牙海博莱生物大药厂生产的猪支原体肺炎灭活疫苗 (使用方法见该疫苗的使用说明书) 在猪的颈部肌肉注射免疫 2 次,每次 1 头份 / 头,两次免疫间隔时间为 2 周,末次接种后 7 日,采血检测,得到免疫后的猪血清;

[0106] d) 阳性对照血清制备:将上步骤得到的猪血清用本试剂盒检测血清效价,当其达到 1 : 160 以上时,在猪颈部动脉采血,离心分离血清;向所述的血清中加入 0.04% 硫柳贡

钠防腐,56℃水浴条件下灭活 30 分钟,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,置 -70℃下保存,有效期为 24 个月。将制备的阳性血清用保护剂稀释 10 倍(体积),再无菌分装后置 4℃下保存,即为本试剂盒的阳性对照血清。

[0107] 阴性对照血清的制备:

[0108] a) 生产血清用动物:选用 5~6 周龄健康仔猪(品种为长白猪,来自华中农业大学试验猪场,为一种公开使用的品种),用美国爱德士生物科技有限公司猪肺炎支原体抗体检测试剂盒检测抗体为阴性的猪为生产血清用动物;

[0109] b) 阴性对照血清制备:在猪颈部动脉采血,离心分离血清,加入 0.04% 硫柳贡钠防腐,56℃灭活 30 分钟,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,置 -70℃下保存,有效期为 24 个月。将制备的猪阴性血清用保护剂(见实施例 4 所示)稀释 10 倍,无菌分装后置 4℃下保存,即为试剂盒的阴性对照血清。

[0110] 3、ELISA 检测方法步骤:

[0111] (1) 包被抗原(由大肠杆菌(CCTCCNO:M2011294, CCTCCNO:M2011295 表达的抗原蛋白)最佳包被浓度、血清最佳稀释度的选择:采用方阵滴定法来确定,试验结果显示包被抗原最佳包被浓度分别为 0.625 μg/ml,血清最佳稀释度为 1:40(体积)。辣根过氧化物酶标记羊抗猪酶标二抗的最佳稀释浓度为 1:15000。

[0112] (2) 酶标板的制备:将所制备的 p46 蛋白和 p65 蛋白为包被抗原,用包被液分别进行 1:160 稀释(终浓度分别为 0.625 μg/ml),两者以 1:1 体积比按每孔 100 μl 的量加到酶标板中,置 2~8℃下作用 12~15 小时;弃去包被液,用洗涤液洗涤 2~3 次,每次 3min,甩干洗涤液,每孔加封闭液 120 μl,置 37℃下温育 2 小时;拍干,再置 37℃下干燥 30 分钟,用锡箔封口膜将抗原包被板封闭,置 2~8℃下保存。

[0113] 4、结果判定值的确定:

[0114] 通过对 32 份已知背景的猪肺炎原体阴性样品进行检测,得到结果,求其平均值  $\bar{X}=0.179$ ;标准偏差  $SD=0.068$ ,确定阴阳性临界点为  $\bar{X}+3SD=0.179+3\times 0.068=0.38$ 。检测样品的  $OD_{630}$  值  $\geq 0.38$  则判定为阳性, $OD_{630}$  值  $< 0.38$  则判定为阴性。

[0115] 5、猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测方法的使用步骤:

[0116] (1) 包被:以纯化抗原最佳包被浓度包被酶标板为 100 μl/孔,置 2~8℃下作用 12~15 小时。

[0117] (2) 洗板:弃包被液,PBST 洗涤液(配方:含 0.05% Tween-20 的 PBS(配方见上,pH7.4)),200 μl/孔,洗涤 2~3 次,每次 3min。

[0118] (3) 封闭:拍干酶标板,加入封闭液,120 μl/孔,37℃孵育 2h,封闭非特异性结合位点。

[0119] (4) 洗板:弃封闭液,同步骤 5(2)。

[0120] (5) 加待检样品:拍干酶标板,加入待检样品,100 μl/孔,设阴、阳性对照,37℃孵育 30min。

[0121] (6) 洗板:弃待检样品液,同步骤 5(2)。

[0122] (7) 加酶标抗体:拍干酶标板后加入 HRP 标记的羊抗猪酶标二抗(1:15000 倍稀释),100 μl/孔,37℃放置 30min。

[0123] (8) 洗板:弃酶标抗体,同步骤 5(2)。

[0124] (9) 显色 :每孔加入底物显色液 A、底物显色液 B 各 1 滴 (约 50  $\mu$  l), 室温避光显色 15min。

[0125] (10) 终止反应 :每孔加入 1 滴 (约 50  $\mu$  l) 终止液终止反应 ;

[0126] (11) 测定 OD<sub>630</sub> 值 :酶标仪测定波长为 630nm 时的 OD 值。

[0127] 实施例 5 猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测方法的特异性试验和重复性试验

[0128] 1、猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测方法的特异性试验

[0129] 分别将猪繁殖与呼吸综合症病毒 (PRRSV, 又称蓝耳病)、猪瘟病毒 (CSFV)、伪狂犬病病毒 (PRV)、胸膜肺炎放线杆菌 (APP)、副猪嗜血杆菌 (HSP) 等阳性血清做 1 : 40 倍稀释, 同时设阴、阳性对照, 分别用本发明的方法进行检测, OD<sub>630nm</sub> 结果值均 < 0.38, 判定为阴性, 说明本发明的方法对以上各种血清具有很好的特异性。结果见表 3 所述。

[0130] 表 3 :本发明对各种血清的检测结果

[0131]

血清类型	PRRSV	CSFV	PRV	APP	HSP	Mhp <sup>+</sup>	Mhp <sup>-</sup>
OD <sub>630</sub> 值	0.253	0.198	0.243	0.281	0.234	1.378	0.166

[0132] 2、猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测方法的重复性试验

[0133] 用 5 块不同批次的包被抗原的酶标板同时检测 3 份阳性血清和 2 份阴性血清, 结果显示 :3 份阳性血清的变异系数分别为 5.4%, 4.9%, 2.49%, 变异系数均小于 10%。通过本发明重复性试验, 表明本发明的 ELISA 方法重复性好。结果见表 4。

[0134] 表 4 : (p46+p65)-ELISA 的重复性试验

[0135]

		血清号			Serum NO	
		A(+)	B(+)	C(+)	D(-)	E(-)
抗原批次	1	0.905	1.112	1.119	0.256	0.197
Antigen	2	0.92	0.983	1.065	0.213	0.175
patches	3	0.918	1.086	1.098	0.23	0.186
	4	0.955	1.069	1.055	0.229	0.19
	5	1.031	1.022	1.104	0.243	0.179
变异系数	CV(%)	5.4%	4.9%	2.49%	/	/

[0136] 实施例 6 猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测方法 with PCR 方法的比较

[0137] 用本发明方法和美国爱德士生物科技有限公司研制的 ELISA 试剂盒同时对临床送检的 92 份血清进行平行检测, 比较两者检测结果, 结果见表 5 所述。

[0138] 表 5 显示 :本发明方法共检出 44 份阳性样本, 48 份阴性样本, 阳性检出率为 47.8% (44/92)。美国爱德士生物科技有限公司研制的 ELISA 试剂盒共检测出 42 份阳性样品, 50 份为阴性样品, 阳性检出率 45.7% (42/92); 两种方法的总符合率 91.3% (84/92)。

[0139] 表 5 :本发明 ELISA 检测方法 with 美国爱德士生物科技有限公司

[0140] 研制的 ELISA 试剂盒的方法的结果比较

		(p46+p65)-ELISA		
		阳性	阴性	总计
[0141]	ELISA-	阳性 39	3	42
	IDEXX	阴性 5	45	50
		总计 1 44	48	92

[0142] 实施例 7 猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒的组装

[0143] 1、猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒包括：

[0144] (1) 抗原包被板 2 块 (96 孔 / 块)

[0145] (2) 阴性对照血清 1 管 (1ml / 管)

[0146] (3) 阳性对照血清 1 管 (1ml / 管)

[0147] (4) 羊抗猪酶标二抗 1 瓶 (20ml / 瓶)

[0148] (5) 样品稀释液 1 瓶 (50ml / 瓶)

[0149] (6) 底物显色液 A 1 瓶 (10ml / 瓶)

[0150] (7) 底物显色液 B 1 瓶 (10ml / 瓶)

[0151] (8) 终止液 1 瓶 (10ml / 瓶)

[0152] (9) 20 倍浓缩洗涤液 1 瓶 (30ml / 瓶)

[0153] (10) 血清稀释板 2 块 (96 孔 / 块)

[0154] (11) 说明书 1 份

[0155] 2、相关试剂的配制：

[0156] 样品稀释液：牛血清白蛋白 5g、吐温 20 0.5ml、氯化钠 8.0g，磷酸二氢钾 0.2g，十二水磷酸氢二钠 2.9g，氯化钾 0.2g 和硫柳汞钠 0.2g，先用注射用水溶解并定容至 1000ml，再用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌，无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0157] 浓缩洗涤液：NaCl 170g，Tween-20 10ml，加注射用水溶解并定容至 1000ml，0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌，得到 20 倍浓缩洗涤液，无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0158] 羊抗猪酶标二抗：将羊抗猪 IgG-HRP 酶标抗体，用保护剂按体积比 1 : 15000 稀释成工作浓度，再用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌，无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0159] 底物显色液 A：Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 14.6g、柠檬酸 9.33g、过氧化氢脲 0.52g，加注射用水溶解并定容至 1000ml，调 pH 值至 5.0 ~ 5.4，用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌，无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0160] 底物显色液 B：四甲基联苯胺 20mg，加入无水乙醇 10ml 溶解，再用注射用水定容至 1000ml，0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌，无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0161] 终止液：将 2.5ml 氢氟酸加到 900ml 注射用水中，定容至 1000ml，用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌，无菌分装后置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用；

[0162] 保护剂：BSA0.5g、蔗糖 2g，加注射用水溶解并定容至 100ml，置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0163] 3、猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒的操作步骤：

[0164] (1) 取抗原包被板（根据样品多少，可拆开分次使用），用稀释好的洗涤液洗板 2 次，再将稀释好的待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清各取 100  $\mu$ l 加至抗原包被板

中,待检血清设 1 孔,阴、阳性对照各设 2 孔。轻轻振匀孔中样品,置 37℃下温育 30 分钟。

[0165] (2) 弃去板孔中的溶液,每孔加入稀释好的洗涤液 200  $\mu$  l,洗涤 2 ~ 3 次,每次 3min。

[0166] (3) 每孔加羊抗猪酶标二抗 100  $\mu$  l,置 37℃下温育 30 分钟。

[0167] (4) 弃去板孔中的溶液,洗涤 3 ~ 5 次,方法同 (2)。

[0168] (5) 每个反应孔加入底物显色液 A 一滴 (约 50  $\mu$  l)、底物显色液 B 一滴 (约 50  $\mu$  l),混匀,置室温 (20 ~ 25℃) 下避光显色 15 分钟。

[0169] (6) 每个反应空中加入终止液一滴 (约 50  $\mu$  l),10 分钟内于酶标仪上测定波长为 630nm 时 OD 值。

[0170] (7) 结果判定:阴、阳性对照的 OD 值是反应试剂盒质量和试验操作规范的重要标志,申请人选择临床通过 IDEXX 的 ELISA 检测试剂盒检测抗体效价达到 1 : 160 以上的阳性血清,解剖后肺脏有明显的猪肺炎支原体病变的猪血清,用保护剂进行 10 倍稀释即为标准阳性血清。取临床通过 IDEXX 的 ELISA 检测试剂盒检测为阴性、解剖后肺脏无任何猪肺炎支原体病变的猪血清,用样品稀释液进行 10 倍稀释即为标准阴性血清。ELISA 试验成立的条件是阳性对照 OD<sub>630nm</sub> 值  $\geq$  0.6,阴性对照 OD<sub>630nm</sub> 值  $<$  0.2。阳性对照、阴性对照必须控制在这个范围内,否则检测结果无效。

[0171] 尽管本发明的内容是结合本实施例进行说明,但是不能认为是对本发明范围的限制,本发明的保护范围由所附权利要求书限定。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰形式同样落在本发明的保护范围内。

[0172] 参考文献

[0173] 1. Cheikh Saad Bouh K, Shareck F, Dea S. Monoclonal antibodies to Escherichia coli-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of Mycoplasma hyopneumoniae in lungs of infected pigs. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10 (3) :459-468.

[0174] 2. 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 Clin Microbiol, 1995, 33 (3) :680-683.

[0175] 3. Haldimann A, Nicolet J, Frey J. DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein P36, the lactate dehydrogenase (LDH) of Mycoplasma hyopneumoniae. J Gen Microbiol, 1993, 139 (2) :317-323.

[0176] 4. Joho A, Schmidt, Glenn F, et al. Mycoplasma hyopneumoniae p65 Surface Lipoprotein Is a Lipolytic Enzyme with a Preference for Shorter-Chain Fatty Acids[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 9 (17) :5790-5798.

[0177] 5. Kim M F, Heidari M B, Stull S J, et al. Identification and mapping of an immunogenic region of Mycoplasma hyopneumoniae p65 surface lipoprotein expressed in Escherichia coli from a cloned genomic fragment. Infect Immun, 1990, 58 (8) :2637-2643.

- [0178] 6. Mori Y, Hamaoka T, Sato S, et al. Immune blotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Immunol Immunopathol*, 1988, 19(3-4) :239-250.
- [0179] 7. Stipkovits L, Nicolet J, Haldimann A, et al. Use of antibodies against the P36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *M. hyopneumoniae* strains. *Mol Cell Probes*, 1991, 5(6) :451-457.
- [0180] 8. Wise K S, Kim M F. Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. *J Bacteriol*, 1987, 169(12) :546-555.
- [0181] 9. Zhang Q, Young T F, Ross R F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesion. *Infect Immun*, 1995, 63(3) :1013-1019.

[0001]

## 序列表

---

<110> 华中农业大学  
 <120> 猪肺炎支原体间接 ELISA 抗体检测试剂盒及应用  
 <130>  
 <141> 2011-09-01  
 <160> 4  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 1260  
 <212> DNA  
 <213> 猪肺炎支原体  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (1260)  
 <223>  
 <220>  
 <221> mutation  
 <222> (662).. (662)  
 <223>  
 <220>  
 <221> mutation  
 <222> (303).. (303)  
 <223>  
 <220>  
 <221> mutation  
 <222> (210).. (210)  
 <223>  
 <220>  
 <221> gene  
 <222> (1).. (1260)  
 <223>  
 <400> 1  
 atg aaa aaa atg ctt aga aaa aaa ttc ttg tat tca tca gct att tat 48  
 Met Lys Lys Met Leu Arg Lys Lys Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 gca act tcg ctt gca tca att att gca ttt gtt gca gca ggt tgt gga 96  
 Ala Thr Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ala Phe Val Ala Ala Gly Cys Gly  
 20 25 30  
 cag aca gaa tca ggt tcg act tca gat tct aaa cca caa gcc gag act 144  
 Gln Thr Glu Ser Gly Ser Thr Ser Asp Ser Lys Pro Gln Ala Glu Thr  
 35 40 45  
 cta aaa cat aaa gta agt aat gat tct att cga ata gca cta acc gat 192  
 Leu Lys His Lys Val Ser Asn Asp Ser Ile Arg Ile Ala Leu Thr Asp

[0002]

50	55	60	
ccg gat aat cct cga tgg att agt gcc caa aaa gat att att tct tac			240
Pro Asp Asn Pro Arg Trp Ile Ser Ala Gln Lys Asp Ile Ile Ser Tyr			
65	70	75	80
gtc gat gaa aca gag gca gca act tca aca att aca aaa aac cag gat			288
Val Asp Glu Thr Glu Ala Ala Thr Ser Thr Ile Thr Lys Asn Gln Asp			
	85	90	95
gca caa aat aac tgg ctc act cag caa gct aat tta agt cca gcg cca			336
Ala Gln Asn Asn Trp Leu Thr Gln Gln Ala Asn Leu Ser Pro Ala Pro			
	100	105	110
aaa gga ttt att att gcc cct gaa aat gga agt gga gtt gga act gct			384
Lys Gly Phe Ile Ile Ala Pro Glu Asn Gly Ser Gly Val Gly Thr Ala			
	115	120	125
gtt aat aca att gct gat aaa gga att ccg att gtt gcc tat gat cga			432
Val Asn Thr Ile Ala Asp Lys Gly Ile Pro Ile Val Ala Tyr Asp Arg			
	130	135	140
cta att act gga tct gat aaa tat gat tgg tat gtt tct ttt gat aat			480
Leu Ile Thr Gly Ser Asp Lys Tyr Asp Trp Tyr Val Ser Phe Asp Asn			
	145	150	155
gaa aaa gtt ggc gaa tta caa ggt ctt tca ctt gcg gcg ggt cta tta			528
Glu Lys Val Gly Glu Leu Gln Gly Leu Ser Leu Ala Ala Gly Leu Leu			
	165	170	175
gga aaa gaa gat ggt gct ttt gat tca att gat caa atg aat gaa tat			576
Gly Lys Glu Asp Gly Ala Phe Asp Ser Ile Asp Gln Met Asn Glu Tyr			
	180	185	190
cta aaa tca cat atg ccc caa gag aca att tct ttt tat aca atc gcg			624
Leu Lys Ser His Met Pro Gln Glu Thr Ile Ser Phe Tyr Thr Ile Ala			
	195	200	205
ggt tcc caa gat gat aat aat tcc caa tat ttt tat agt ggt gca atg			672
Gly Ser Gln Asp Asp Asn Asn Ser Gln Tyr Phe Tyr Ser Gly Ala Met			
	210	215	220
aaa gta ctt aaa gaa tta atg aaa aat tcg caa aat aaa ata att gat			720
Lys Val Leu Lys Glu Leu Met Lys Asn Ser Gln Asn Lys Ile Ile Asp			
	225	230	235
tta tct cct gaa ggc gaa aat gct gtt tat gtc cca gga tgg aat tat			768
Leu Ser Pro Glu Gly Glu Asn Ala Val Tyr Val Pro Gly Trp Asn Tyr			
	245	250	255
gga act gcc ggt caa aga atc caa tct ttt cta aca att aac aaa gat			816
Gly Thr Ala Gly Gln Arg Ile Gln Ser Phe Leu Thr Ile Asn Lys Asp			
	260	265	270
cca gca ggt ggt aat aaa atc aaa gct gtt ggt tca aaa cca gct tct			864
Pro Ala Gly Gly Asn Lys Ile Lys Ala Val Gly Ser Lys Pro Ala Ser			
	275	280	285
att ttc aaa gga ttt ctt gcc cca aat gat gga atg gcc gaa caa gca			912

[0003]

Ile Phe Lys Gly Phe Leu Ala Pro Asn Asp Gly Met Ala Glu Gln Ala	
290	295 300
atc atc aaa tta aaa ctt gaa gga ttt gat acc caa aaa atc ttt gta	960
Ile Ile Lys Leu Lys Leu Glu Gly Phe Asp Thr Gln Lys Ile Phe Val	
305	310 315 320
act ggt caa gat tat aat gat aaa gcc aaa act ttt atc aaa gac ggc	1008
Thr Gly Gln Asp Tyr Asn Asp Lys Ala Lys Thr Phe Ile Lys Asp Gly	
	325 330 335
gat caa aat atg aca att tat aaa cct gat aaa gtt tta gga aaa gtt	1056
Asp Gln Asn Met Thr Ile Tyr Lys Pro Asp Lys Val Leu Gly Lys Val	
	340 345 350
gca gtt gaa gtt ctt cgg gtt tta att gca aag aaa aat aaa gca tct	1104
Ala Val Glu Val Leu Arg Val Leu Ile Ala Lys Lys Asn Lys Ala Ser	
	355 360 365
aga tca gaa gtc gaa aac gaa cta aaa gca aaa cta cca aat att tca	1152
Arg Ser Glu Val Glu Asn Glu Leu Lys Ala Lys Leu Pro Asn Ile Ser	
	370 375 380
ttt aaa tat gat aat caa aca tat aaa gtg caa ggt aaa aat att aat	1200
Phe Lys Tyr Asp Asn Gln Thr Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Ile Asn	
	385 390 395 400
aca att tta gta agt cca gta att gtt aca aaa gct aat gtt gat aat	1248
Thr Ile Leu Val Ser Pro Val Ile Val Thr Lys Ala Asn Val Asp Asn	
	405 410 415
cct gat gcc taa	1260
Pro Asp Ala	
<210> 2	
<211> 419	
<212> PRT	
<213> 猪肺炎支原体	
<400> 2	
Met Lys Lys Met Leu Arg Lys Lys Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Ile Tyr	
1	5 10 15
Ala Thr Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ala Phe Val Ala Ala Gly Cys Gly	
	20 25 30
Gln Thr Glu Ser Gly Ser Thr Ser Asp Ser Lys Pro Gln Ala Glu Thr	
	35 40 45
Leu Lys His Lys Val Ser Asn Asp Ser Ile Arg Ile Ala Leu Thr Asp	
	50 55 60
Pro Asp Asn Pro Arg Trp Ile Ser Ala Gln Lys Asp Ile Ile Ser Tyr	
	65 70 75 80
Val Asp Glu Thr Glu Ala Ala Thr Ser Thr Ile Thr Lys Asn Gln Asp	
	85 90 95
Ala Gln Asn Asn Trp Leu Thr Gln Gln Ala Asn Leu Ser Pro Ala Pro	
	100 105 110

[0004]

Lys Gly Phe Ile Ile Ala Pro Glu Asn Gly Ser Gly Val Gly Thr Ala  
 115 120 125  
 Val Asn Thr Ile Ala Asp Lys Gly Ile Pro Ile Val Ala Tyr Asp Arg  
 130 135 140  
 Leu Ile Thr Gly Ser Asp Lys Tyr Asp Trp Tyr Val Ser Phe Asp Asn  
 145 150 155 160  
 Glu Lys Val Gly Glu Leu Gln Gly Leu Ser Leu Ala Ala Gly Leu Leu  
 165 170 175  
 Gly Lys Glu Asp Gly Ala Phe Asp Ser Ile Asp Gln Met Asn Glu Tyr  
 180 185 190  
 Leu Lys Ser His Met Pro Gln Glu Thr Ile Ser Phe Tyr Thr Ile Ala  
 195 200 205  
 Gly Ser Gln Asp Asp Asn Asn Ser Gln Tyr Phe Tyr Ser Gly Ala Met  
 210 215 220  
 Lys Val Leu Lys Glu Leu Met Lys Asn Ser Gln Asn Lys Ile Ile Asp  
 225 230 235 240  
 Leu Ser Pro Glu Gly Glu Asn Ala Val Tyr Val Pro Gly Trp Asn Tyr  
 245 250 255  
 Gly Thr Ala Gly Gln Arg Ile Gln Ser Phe Leu Thr Ile Asn Lys Asp  
 260 265 270  
 Pro Ala Gly Gly Asn Lys Ile Lys Ala Val Gly Ser Lys Pro Ala Ser  
 275 280 285  
 Ile Phe Lys Gly Phe Leu Ala Pro Asn Asp Gly Met Ala Glu Gln Ala  
 290 295 300  
 Ile Ile Lys Leu Lys Leu Glu Gly Phe Asp Thr Gln Lys Ile Phe Val  
 305 310 315 320  
 Thr Gly Gln Asp Tyr Asn Asp Lys Ala Lys Thr Phe Ile Lys Asp Gly  
 325 330 335  
 Asp Gln Asn Met Thr Ile Tyr Lys Pro Asp Lys Val Leu Gly Lys Val  
 340 345 350  
 Ala Val Glu Val Leu Arg Val Leu Ile Ala Lys Lys Asn Lys Ala Ser  
 355 360 365  
 Arg Ser Glu Val Glu Asn Glu Leu Lys Ala Lys Leu Pro Asn Ile Ser  
 370 375 380  
 Phe Lys Tyr Asp Asn Gln Thr Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Ile Asn  
 385 390 395 400  
 Thr Ile Leu Val Ser Pro Val Ile Val Thr Lys Ala Asn Val Asp Asn  
 405 410 415  
 Pro Asp Ala  
 <210> 3  
 <211> 1803  
 <212> DNA  
 <213> 猪肺炎支原体  
 <220>

[0005]

```

<221> gene
<222> (1)..(1803)
<223>
<220>
<221> mutation
<222> (633)..(633)
<223>
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1803)
<223>
<400> 3
atg gca aaa gaa atc att tta gga atc gac ctt gga aca aca aac tca      48
Met Ala Lys Glu Ile Ile Leu Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser
1           5           10           15
gtt gtt gca att att gaa aat caa aaa cct gtc gtt ctc gaa aat ccc      96
Val Val Ala Ile Ile Glu Asn Gln Lys Pro Val Val Leu Glu Asn Pro
20           25           30
aac gga aaa aga aca act cca tcc gtt gtc gct ttt aaa aac aat gaa      144
Asn Gly Lys Arg Thr Thr Pro Ser Val Val Ala Phe Lys Asn Asn Glu
35           40           45
gaa att gtc ggg gat gca gct aaa aga caa ctt gaa act aac cca gaa      192
Glu Ile Val Gly Asp Ala Ala Lys Arg Gln Leu Glu Thr Asn Pro Glu
50           55           60
gca atc gct tca att aaa aga tta atg gga act gat aaa aca gtt cgt      240
Ala Ile Ala Ser Ile Lys Arg Leu Met Gly Thr Asp Lys Thr Val Arg
65           70           75           80
gca aat gaa aga gat tat aaa cct gaa gaa atc tcg gca aaa att ctt      288
Ala Asn Glu Arg Asp Tyr Lys Pro Glu Glu Ile Ser Ala Lys Ile Leu
85           90           95
gct tat tta aaa gaa tat gct gag aaa aag att ggt cat aaa gta aca      336
Ala Tyr Leu Lys Glu Tyr Ala Glu Lys Lys Ile Gly His Lys Val Thr
100          105          110
aaa gca gta att aca gta cct gct tat ttt gac aat gcc caa cgt gag      384
Lys Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asp Asn Ala Gln Arg Glu
115          120          125
gca aca aaa aat gcc gga aaa atc gct gga tta caa gta gaa aga att      432
Ala Thr Lys Asn Ala Gly Lys Ile Ala Gly Leu Gln Val Glu Arg Ile
130          135          140
ata aat gaa cca aca gcg gcc gca ctt get ttt ggc ctt gat aaa act      480
Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Leu Ala Phe Gly Leu Asp Lys Thr
145          150          155          160
gaa aaa gaa atg aaa gtt ctt gtc tat gac tta ggt ggg gga act ttt      528
Glu Lys Glu Met Lys Val Leu Val Tyr Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe

```

[0006]

gat gtc tca gtt tta gaa tta tcc ggt gga acc ttc gaa gtt tta tca	165	170	175	576
Asp Val Ser Val Leu Glu Leu Ser Gly Gly Thr Phe Glu Val Leu Ser				
act agt ggt gat aat cat tta ggt ggg gat gac tgg gat aat gaa att	180	185	190	624
Thr Ser Gly Asp Asn His Leu Gly Gly Asp Asp Trp Asp Asn Glu Ile				
gta aat tgg ctt gtt aaa aaa atc aaa gaa gaa tat gat ttt gat cca	195	200	205	672
Val Asn Trp Leu Val Lys Lys Ile Lys Glu Glu Tyr Asp Phe Asp Pro				
aaa agt gat aaa atg gcg ctt aca aga ctt aaa gaa gag gct gaa aaa	210	215	220	720
Lys Ser Asp Lys Met Ala Leu Thr Arg Leu Lys Glu Glu Ala Glu Lys				
acc aaa att aat ctt tca aat caa agt gtt tct aca gtt tct cta cca	225	230	235	768
Thr Lys Ile Asn Leu Ser Asn Gln Ser Val Ser Thr Val Ser Leu Pro				
ttt tta gga atg ggc aaa aac ggg ccg att aac gtt gaa ctt gaa ctt	245	250	255	816
Phe Leu Gly Met Gly Lys Asn Gly Pro Ile Asn Val Glu Leu Glu Leu				
aaa aga tca gaa ttt gaa aaa atg act gcc cat tta atc gat aga act	260	265	270	864
Lys Arg Ser Glu Phe Glu Lys Met Thr Ala His Leu Ile Asp Arg Thr				
cgc aaa cca att gtt gat gct cta aaa caa gca aaa att gag gct tca	275	280	285	912
Arg Lys Pro Ile Val Asp Ala Leu Lys Gln Ala Lys Ile Glu Ala Ser				
gat ctt gat gaa gtt ctc ctt gta ggt gga tca aca aga atg cca gct	290	295	300	960
Asp Leu Asp Glu Val Leu Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Met Pro Ala				
gtt cag tca atg att gag cat act tta aat aaa aag cca aat cgt tca	305	310	315	1008
Val Gln Ser Met Ile Glu His Thr Leu Asn Lys Lys Pro Asn Arg Ser				
att aat cct gat gag gta gtc gca att ggt gct gca att caa ggg ggg	325	330	335	1056
Ile Asn Pro Asp Glu Val Val Ala Ile Gly Ala Ala Ile Gln Gly Gly				
gtt cta gct gga gag atc agt gat gtt cta ctt tta gat gtt act cct	340	345	350	1104
Val Leu Ala Gly Glu Ile Ser Asp Val Leu Leu Leu Asp Val Thr Pro				
tta act tta gga att gaa act tta ggt gga att gca aca cct ttg att	355	360	365	1152
Leu Thr Leu Gly Ile Glu Thr Leu Gly Gly Ile Ala Thr Pro Leu Ile				
cca aga aat aca aca att ccg gta aca aaa tca caa att ttc tca aca	370	375	380	1200
Pro Arg Asn Thr Thr Ile Pro Val Thr Lys Ser Gln Ile Phe Ser Thr				
	385	390	395	400

[0007]

gct gag gat aat caa acc gaa gta aca att tct gtt gtc caa ggt gaa	1248
Ala Glu Asp Asn Gln Thr Glu Val Thr Ile Ser Val Val Gln Gly Glu	
405 410 415	
cgt caa ctt gca gcg gat aat aaa atg tta ggt cgc ttt aat tta tca	1296
Arg Gln Leu Ala Ala Asp Asn Lys Met Leu Gly Arg Phe Asn Leu Ser	
420 425 430	
gga att gaa gct gct cca cga ggt ctt ccc cag att gaa gtt agc ttt	1344
Gly Ile Glu Ala Ala Pro Arg Gly Leu Pro Gln Ile Glu Val Ser Phe	
435 440 445	
tca att gat gtc aac ggg att aca acg gtt tca gca aaa gat aaa aaa	1392
Ser Ile Asp Val Asn Gly Ile Thr Thr Val Ser Ala Lys Asp Lys Lys	
450 455 460	
acc ggc aaa gaa caa aca att aca att aaa aat act tca act tta tca	1440
Thr Gly Lys Glu Gln Thr Ile Thr Ile Lys Asn Thr Ser Thr Leu Ser	
465 470 475 480	
gaa gaa gaa att aat aag atg att cag gaa gcc gaa gaa aat cgt gaa	1488
Glu Glu Glu Ile Asn Lys Met Ile Gln Glu Ala Glu Glu Asn Arg Glu	
485 490 495	
gct gat gct ctt aaa aaa gac aaa atc gag aca aca gtt cgt gcc gaa	1536
Ala Asp Ala Leu Lys Lys Asp Lys Ile Glu Thr Thr Val Arg Ala Glu	
500 505 510	
ggg ctt att aat caa ctt gag aaa tca ata act gat caa ggt gaa aaa	1584
Gly Leu Ile Asn Gln Leu Glu Lys Ser Ile Thr Asp Gln Gly Glu Lys	
515 520 525	
att gat cca aaa caa aaa gaa tta ctt gaa aaa caa att caa gaa tta	1632
Ile Asp Pro Lys Gln Lys Glu Leu Leu Glu Lys Gln Ile Gln Glu Leu	
530 535 540	
aaa gat ctt cta aaa gaa gaa aaa act gac gaa tta aaa tta aaa tta	1680
Lys Asp Leu Leu Lys Glu Glu Lys Thr Asp Glu Leu Lys Leu Lys Leu	
545 550 555 560	
gac caa att gaa gca gct gcc caa tct ttt gcg cag gca acc gcg cag	1728
Asp Gln Ile Glu Ala Ala Ala Gln Ser Phe Ala Gln Ala Thr Ala Gln	
565 570 575	
caa gca aat aca tct gaa tct gat cca aaa gct gat gat tca aac aca	1776
Gln Ala Asn Thr Ser Glu Ser Asp Pro Lys Ala Asp Asp Ser Asn Thr	
580 585 590	
atg gat gct gaa atc aag cag gat taa	1803
Met Asp Ala Glu Ile Lys Gln Asp	
595 600	
<210> 4	
<211> 600	
<212> PRT	
<213> 猪肺炎支原体	
<400> 4	

[0008]

```

Met Ala Lys Glu Ile Ile Leu Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser
1           5           10           15
Val Val Ala Ile Ile Glu Asn Gln Lys Pro Val Val Leu Glu Asn Pro
          20           25           30
Asn Gly Lys Arg Thr Thr Pro Ser Val Val Ala Phe Lys Asn Asn Glu
          35           40           45
Glu Ile Val Gly Asp Ala Ala Lys Arg Gln Leu Glu Thr Asn Pro Glu
          50           55           60
Ala Ile Ala Ser Ile Lys Arg Leu Met Gly Thr Asp Lys Thr Val Arg
65           70           75           80
Ala Asn Glu Arg Asp Tyr Lys Pro Glu Glu Ile Ser Ala Lys Ile Leu
          85           90           95
Ala Tyr Leu Lys Glu Tyr Ala Glu Lys Lys Ile Gly His Lys Val Thr
          100          105          110
Lys Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asp Asn Ala Gln Arg Glu
          115          120          125
Ala Thr Lys Asn Ala Gly Lys Ile Ala Gly Leu Gln Val Glu Arg Ile
          130          135          140
Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Leu Ala Phe Gly Leu Asp Lys Thr
145          150          155          160
Glu Lys Glu Met Lys Val Leu Val Tyr Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe
          165          170          175
Asp Val Ser Val Leu Glu Leu Ser Gly Gly Thr Phe Glu Val Leu Ser
          180          185          190
Thr Ser Gly Asp Asn His Leu Gly Gly Asp Asp Trp Asp Asn Glu Ile
          195          200          205
Val Asn Trp Leu Val Lys Lys Ile Lys Glu Glu Tyr Asp Phe Asp Pro
          210          215          220
Lys Ser Asp Lys Met Ala Leu Thr Arg Leu Lys Glu Glu Ala Glu Lys
225          230          235          240
Thr Lys Ile Asn Leu Ser Asn Gln Ser Val Ser Thr Val Ser Leu Pro
          245          250          255
Phe Leu Gly Met Gly Lys Asn Gly Pro Ile Asn Val Glu Leu Glu Leu
          260          265          270
Lys Arg Ser Glu Phe Glu Lys Met Thr Ala His Leu Ile Asp Arg Thr
          275          280          285
Arg Lys Pro Ile Val Asp Ala Leu Lys Gln Ala Lys Ile Glu Ala Ser
          290          295          300
Asp Leu Asp Glu Val Leu Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Met Pro Ala
305          310          315          320
Val Gln Ser Met Ile Glu His Thr Leu Asn Lys Lys Pro Asn Arg Ser
          325          330          335
Ile Asn Pro Asp Glu Val Val Ala Ile Gly Ala Ala Ile Gln Gly Gly
          340          345          350

```

[0009]

Val Leu Ala Gly Glu Ile Ser Asp Val Leu Leu Leu Asp Val Thr Pro				
355	360	365		
Leu Thr Leu Gly Ile Glu Thr Leu Gly Gly Ile Ala Thr Pro Leu Ile				
370	375	380		
Pro Arg Asn Thr Thr Ile Pro Val Thr Lys Ser Gln Ile Phe Ser Thr				
385	390	395	400	
Ala Glu Asp Asn Gln Thr Glu Val Thr Ile Ser Val Val Gln Gly Glu				
	405	410	415	
Arg Gln Leu Ala Ala Asp Asn Lys Met Leu Gly Arg Phe Asn Leu Ser				
	420	425	430	
Gly Ile Glu Ala Ala Pro Arg Gly Leu Pro Gln Ile Glu Val Ser Phe				
	435	440	445	
Ser Ile Asp Val Asn Gly Ile Thr Thr Val Ser Ala Lys Asp Lys Lys				
	450	455	460	
Thr Gly Lys Glu Gln Thr Ile Thr Ile Lys Asn Thr Ser Thr Leu Ser				
	465	470	475	480
Glu Glu Glu Ile Asn Lys Met Ile Gln Glu Ala Glu Glu Asn Arg Glu				
	485	490	495	
Ala Asp Ala Leu Lys Lys Asp Lys Ile Glu Thr Thr Val Arg Ala Glu				
	500	505	510	
Gly Leu Ile Asn Gln Leu Glu Lys Ser Ile Thr Asp Gln Gly Glu Lys				
	515	520	525	
Ile Asp Pro Lys Gln Lys Glu Leu Leu Glu Lys Gln Ile Gln Glu Leu				
	530	535	540	
Lys Asp Leu Leu Lys Glu Glu Lys Thr Asp Glu Leu Lys Leu Lys Leu				
	545	550	555	560
Asp Gln Ile Glu Ala Ala Ala Gln Ser Phe Ala Gln Ala Thr Ala Gln				
	565	570	575	
Gln Ala Asn Thr Ser Glu Ser Asp Pro Lys Ala Asp Asp Ser Asn Thr				
	580	585	590	
Met Asp Ala Glu Ile Lys Gln Asp				
	595	600		

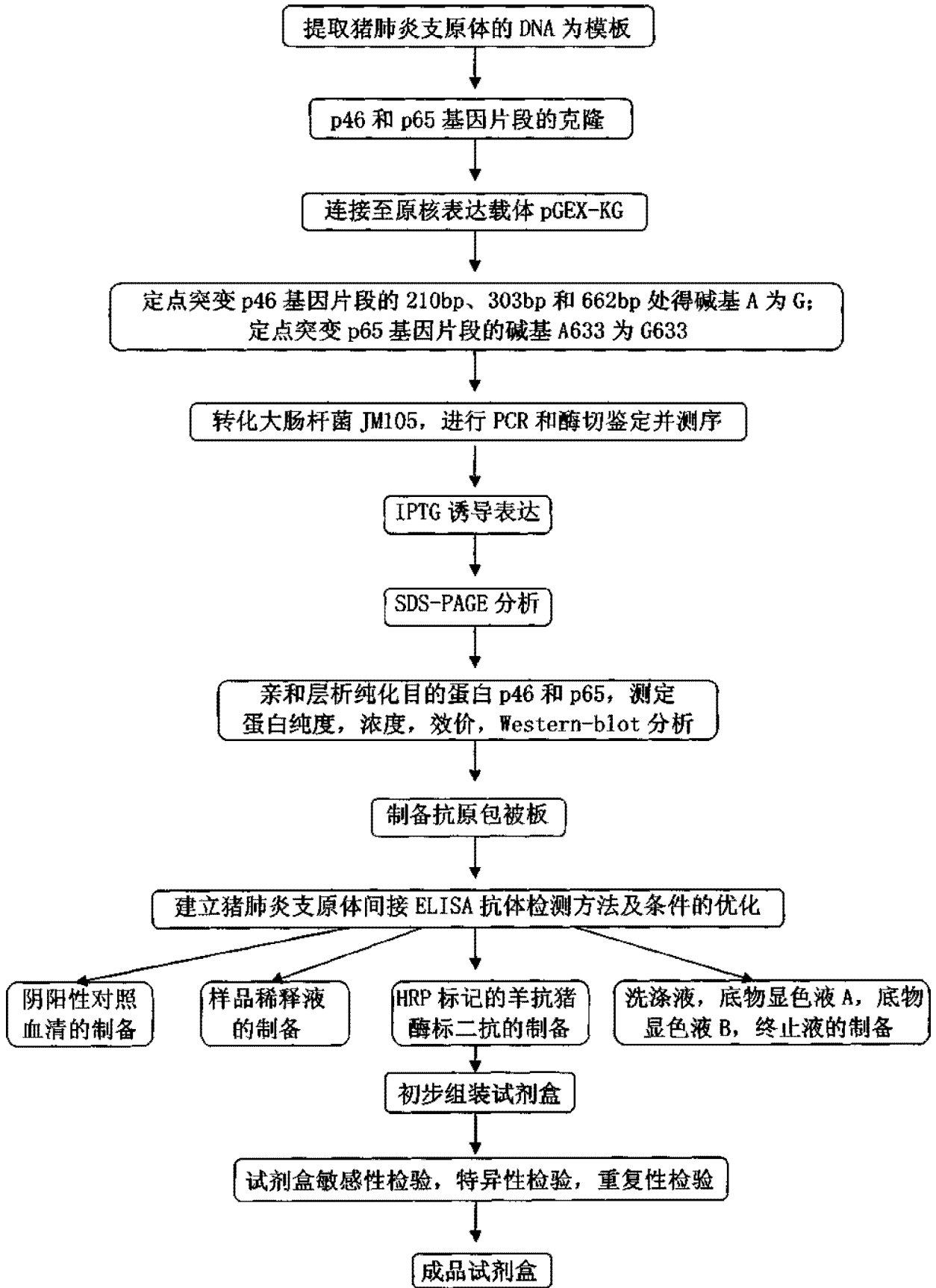


图 1

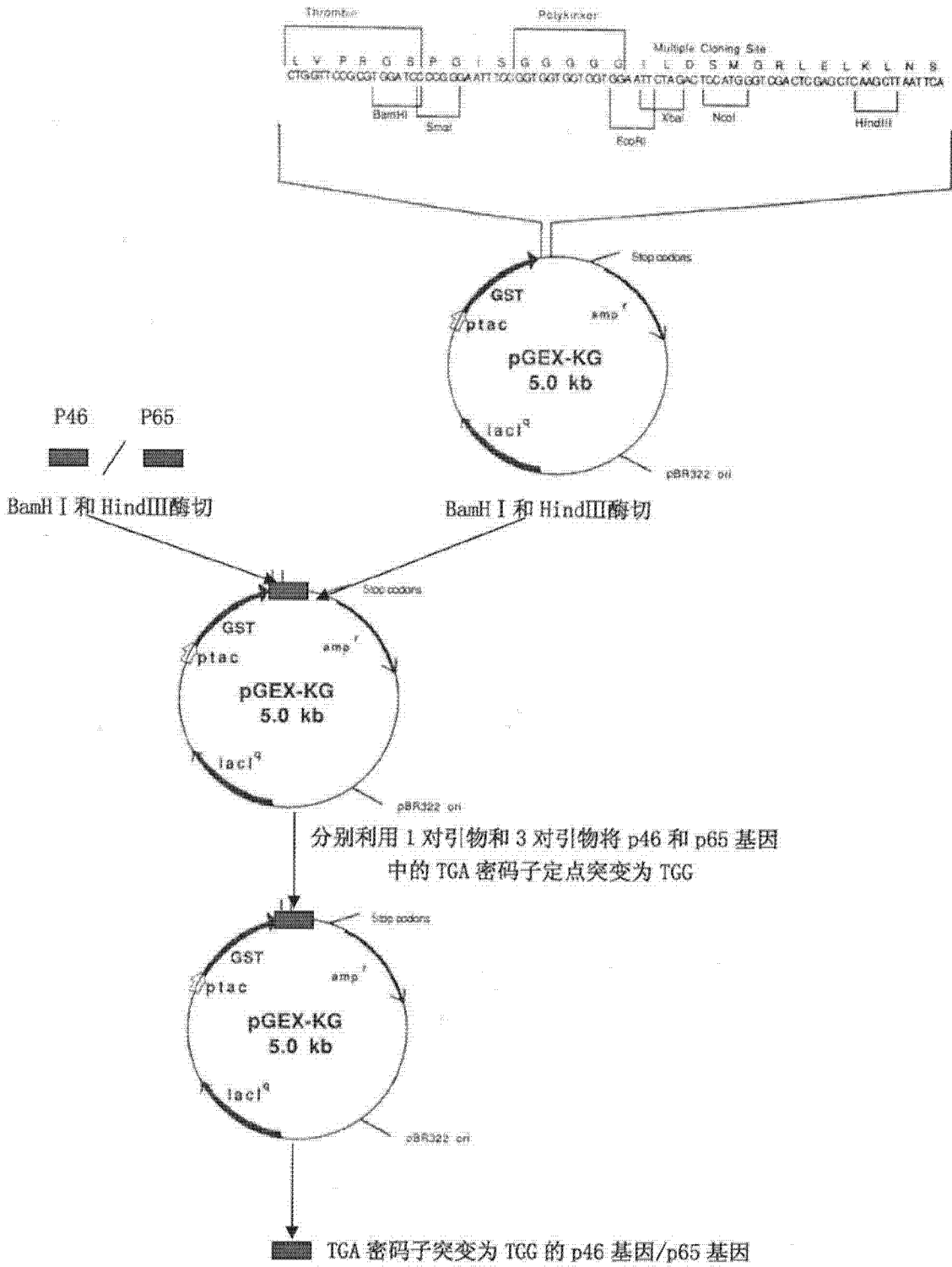


图 2

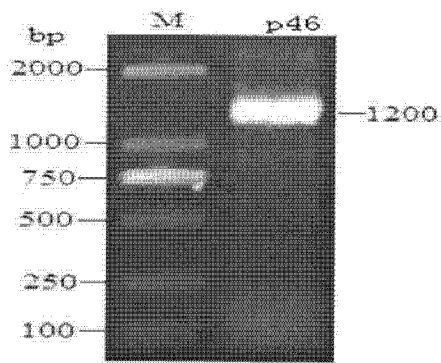


图 3A

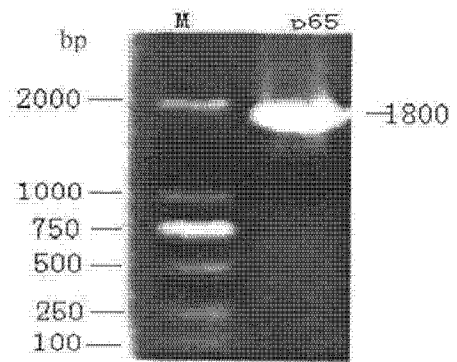


图 3B

图 3

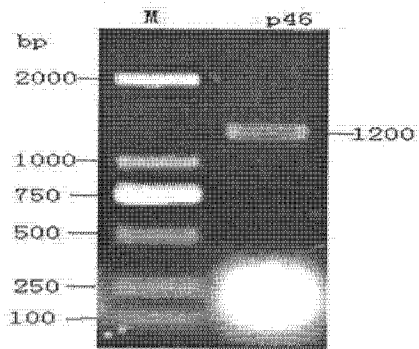


图 4A

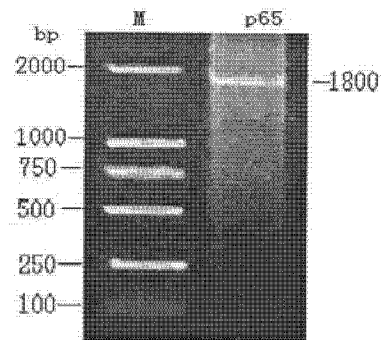


图 4B

图 4

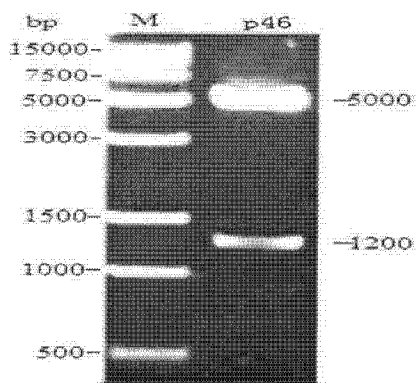


图 5A

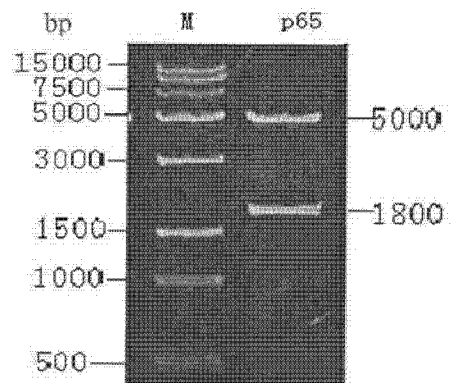


图 5B

图 5

```

Query 181 GCCTAACCGATCCGGATATCCCTCGATGGATTAGTGCCCAAAAAGATATTATTTCTTAC 240
Sbjct 181 GCCTAACCGATCCGGATATCCCTCGATGAATTAGTGCCCAAAAAGATATTATTTCTTAT 240

Query 241 GTCGATGAAACAGAGGCAGCAACTTCACRATTACAAAAACCAGGATGCACAAAATAAC 300
Sbjct 241 GTTGATGAAACAGAGGCAGCAACTTCAACAATTACAAAAACCAGGATGCACAAAATAAC 300

Query 301 TGGCTCACTCAGCAAGCTAATTTAAGTCCAGCGCCAAAAGGATTTATTATTGCCCCCGAA 360
Sbjct 301 TGACTCACTCAGCAAGCTAATTTAAGTCCAGCGCCAAAAGGATTTATTATTGCCCCCGAA 360

Query 361 AATGGAAGTGGAGTTGGAAGTCTGTTAATAACAATTGCTGATAAAGGAATTCGGATTGTT 420
Sbjct 361 AATGGAAGTGGAGTTGGAAGTCTGTTAATAACAATTGCTGATAAAGGAATTCGGATTGTT 420

Query 421 GCCTATGATCGACTAATTAAGTCTGATAAATATGATTGGTATGTTTCTTTTGATAAT 480
Sbjct 421 GCCTATGATCGACTAATTAAGTCTGATAAATATGATTGGTATGTTTCTTTTGATAAT 480

Query 481 GAAAAAGTTGGCGAATTACAAAGTCTTTTCACTTCCGGCGGGTCTATTAGGAAAAAGAT 540
Sbjct 481 GAAAAAGTTGGTGAATTAACAAGTCTTTTCACTTCCGGCGGGTCTATTAGGAAAAAGAT 540

Query 541 GGTGCTTTTATTCAATTGATCAAATGAATGAATATCTAAATCACATATGCCCAAGAG 600
Sbjct 541 GGTGCTTTTATTCAATTGATCAAATGAATGAATATCTAAATCACATATGCCCAAGAG 600

Query 601 ACAATTCCTTTTTATACAACTCCGGGGTCCCAAGATGATAAATAATCCCAATATTTTTAT 660
Sbjct 601 ACAATTCCTTTTTATACAACTCCGGGGTCCCAAGATGATAAATAATCCCAATATTTTTAT 660

Query 661 AATGGTGCAATGAAAGTACTTAAAGNATTAATGAAAAATTCGCAAAATAAAATAATTGAT 720
Sbjct 661 AATGGTGCAATGAAAGTACTTAAAGNATTAATGAAAAATTCGCAAAATAAAATAATTGAT 720

Query 721 TTATCTCCTGAAGGCGAAAAATGCTGTTTATGTCCAGGATGGAATATGGAAGTCCCGGT 780
Sbjct 721 TTATCTCCTGAAGGCGAAAAATGCTGTTTATGTCCAGGATGGAATATGGAAGTCCCGGT 780

```

图 6A

```

Query 181 ACTAACCCAGAAGCAATCGCTTCAATTAAAAGATTAATGGGAACGATAAAAACAGTTCGT 240
Sbjct 181 ACTAACCCAGAAGCAATCGCTTCAATTAAAAGATTAATGGGAACGATAAAAACAGTTCGT 240

Query 241 GCAAATGAAAGAGATTATAAACCTGAAGAAATCTCGGCAAAAATTCCTGCTTATTTAAAA 300
Sbjct 241 GCAAATGAAAGAGATTATAAACCTGAAGAAATCTCGGCAAAAATTCCTGCTTATTTAAAA 300

Query 301 GAATATGCTGAGAAAAAGATTGGTCATAAAGTAACAAAAGCAGTAATTACAGTACCTGCT 360
Sbjct 301 GAATATGCTGAGAAAAAGATTGGTCATAAAGTAACAAAAGCAGTAATTACAGTACCTGCT 360

Query 361 TATTTTGACAATGCCCAACGTGAGGCAACAAAAAATGCCGGA AAAATCGCTGGATTACAA 420
Sbjct 361 TATTTTGACAATGCCCAACGTGAGGCAACAAAAAATGCCGGA AAAATCGCTGGATTACAA 420

Query 421 GTAGAAAAGATTATAAATGAACCAACAGCGGCGCACTTGCTTTTGGCCTTGATAAAACT 480
Sbjct 421 GTAGAAAAGATTATAAATGAACCAACAGCGGCGCACTTGCTTTTGGCCTTGATAAAACT 480

Query 481 GAAAAAGAAATGAAAGTCTTGTCTATGACTTAGGTGGGGAACTTTTGATGTCTCAGTT 540
Sbjct 481 GAAAAAGAAATGAAAGTCTTGTCTATGACTTAGGTGGGGAACTTTTGATGTCTCAGTT 540

Query 541 TTAGAATTATCCGGTGGAACTTCGAAGTTTTATCACTAGTGGTGATAATCATTTAGGT 600
Sbjct 541 TTAGAATTATCCGGTGGAACTTCGAAGTTTTATCACTAGTGGTGATAATCATTTAGGT 600

Query 601 GGGGATGACTGGGATAATGAAATTTGAAATTTGGCTTGTTTCAAAAGAAAGATAT 660
Sbjct 601 GGGGATGACTGGGATAATGAAATTTGAAATTTGGCTTGTTTCAAAAGAAAGATAT 660

Query 661 GATTTTGATCCAAAAGTGATAAATGGCGCTTACAAGACTTAAAGAGAGAGGCTGAAAAA 720
Sbjct 661 GATTTTGATCCAAAAGTGATAAATGGCGCTTACAAGACTTAAAGAGAGAGGCTGAAAAA 720

Query 721 ACCAAAATTAATCTTTCAAATCAAAGTGTTCCTACAGTTTCTCTACCATTTTTAGGAATG 780
Sbjct 721 ACCAAAATTAATCTTTCAAATCAAAGTGTTCCTACAGTTTCTCTACCATTTTTAGGAATG 780

```

图 6B

图 6

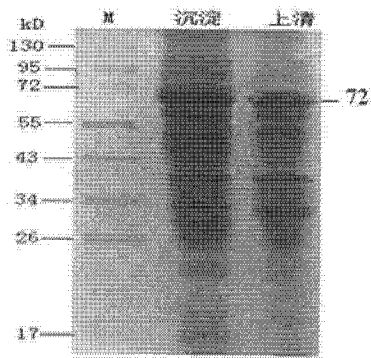


图 7A

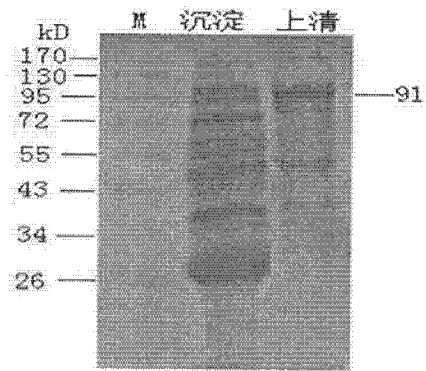


图 7B

图 7

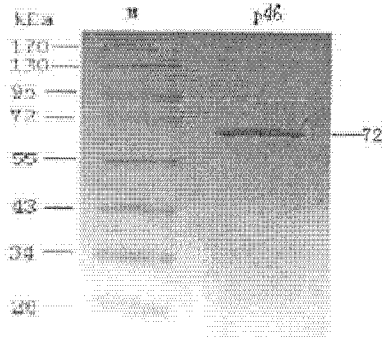


图 8A

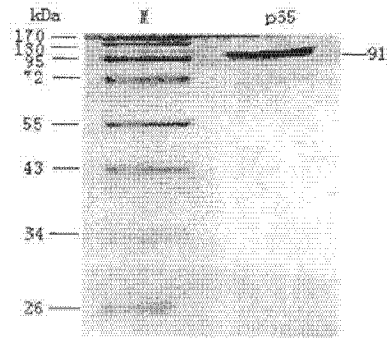


图 8B

图 8

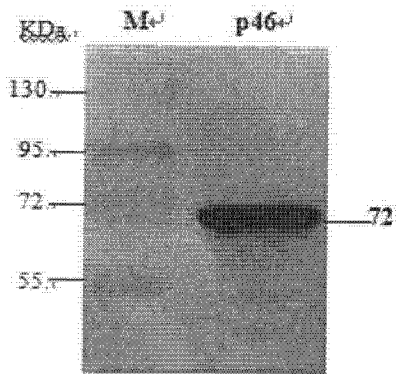


图 9A

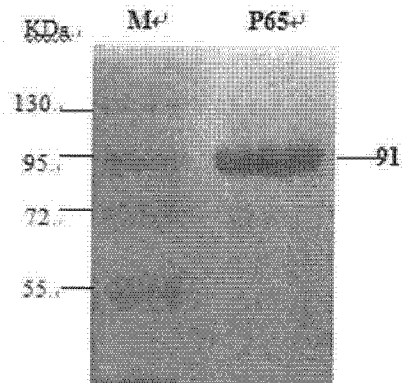


图 9B

图 9

1 ATGAAAAAAA TGCTTAGAAA AAAATTCTTG TATTCATCAG CTATTTATGC AACTTCGCTT 60  
61 GCATCAATTA TTGCATTTGT TGCAGCAGGT TGTGGACAGA CAGAATCAGG TTCGACTTCA 120  
121 GATTCTAAAC CACAAGCCGA GACTCTAAAA CATAAAGTAA GTAATGATTC TATTCGAATA 180  
181 GCACTAACCG ATCCGGATAA TCCTCGATG(A/G) ATTAGTGCCC AAAAAGATAT TATTTCTTAC 240  
241 GTCGATGAAA CAGAGCCAGC AACTTCAACA ATTACAAAA ACCAGGATGC ACAAATAAC 300  
301 TG(A/G)CTCACTC AGCAAGCTAA TTTAAGTCCA GCGCCAAAAG GATTTATTAT TGCCCCTGAA 360  
361 AATGGAAGTG GAGTTGGAAC TGCTGTTAAT ACAATTGCTG ATAAAGGAAT TCCGATTGTT 420  
421 GCCTATGATC GACTAATTAC TGGATCTGAT AAATATGATT GGTATGTTTC TTTTGATAAT 480  
481 GAAAAAGTTG GCGAATTACA AGGTCTTCA CTGCGGCGG GTCTATTAGG AAAAGAAGAT 540  
541 GGTGCTTTTG ATTCAATTGA TCAAATGAAT GAATATCTAA AATCACATAT GCCCAAGAG 600  
601 ACAATTTCTT TTTATACAAT CGCGGGTTC CAAGATGATA ATAATTCCA ATATTTTTIAT 660  
661 A(A/G)TGGTGCAA TGAAAGTACT TAAAGAATTA ATGAAAAATT CGCAAATAA AATAATTGAT 720  
721 TTATCTCCTG AAGGCGAAAA TGCTGTTTAT GTCCAGGAT GGAATTATGG AACTGCCGGT 780  
781 CAAAGAATCC AATCTTTTCT AACAAATTAAC AAAGATCCAG CAGGTGGTAA TAAAATCAAA 840  
841 GCTGTGGTT CAAAACCAGC TTCTATTTTC AAAGGATTTT TGCCCCAAA TGATGGAATG 900  
901 GCCGAACAAG CAATCATCAA ATTAAAACCT GAAGGATTTG ATACCCAAA AATCTTTGTA 960  
961 ACTGGTCAAG ATTATAATGA TAAAGCCAAA ACITTTATCA AAGACGGCGA TCAAAATATG 1020  
1021 ACAATTTATA AACCTGATAA AGTTTTAGGA AAAGTTGCAG TTGAAGTTCT TCGGGTTTTA 1080  
1081 ATTGCAAAGA AAAATAAAGC ATCTAGATCA GAAGTCGAAA ACGAACTAAA AGCAAACTA 1140  
1141 CCAAATATTT CATTTAAATA TGATAATCAA ACATATAAAG TGCAAGGTAA AAATATTAAT 1200  
1201 ACAATTTTAG TAAGTCCAGT AATTGTTACA AAAGCTAATG TTGATAATCC TGATGCCTAA 1260

图 10A

1 ATGGCAAAAG AAATCATT TT AGGAATCGAC CTTGGAACAA CAAACTCAGT TGTGCAATT 60  
 61 ATTGAAAATC AAAACCTGT CGTTCTCGAA AATCCCAACG GAAAAAGAAC AACTCCATCC 120  
 121 GTTGTCGCTT TAAAAACAA TGAAGAAATT GTCGGGGATG CAGCTAAAAG ACAACTTGAA 180  
 181 ACTAACCCAG AAGCAATCGC TTCAATTAAG AGATTAATGG GAACTGATAA AACAGTTCGT 240  
 241 GCAAAATGAAA GAGATTATAA ACCTGAAGAA ATCTCGGCAA AAATTCCTGC TTATTTAAAA 300  
 301 GAATATGCTG AGAAAAAGAT TGGTCATAAA GTAACAAAAG CAGTAATTAC AGTACCTGCT 360  
 361 TATTTTGACA ATGCCCAACG TGAGGCAACA AAAAATGCCG GAAAAATCGC TGGATTACAA 420  
 361 GTAGAAAGAA TTATAAATGA ACCAACAGCG GCCGCACTTG CTTTGGCCT TGATAAAACT 480  
 481 GAAAAAGAAA TGAAAGTTCT TGTCTATGAC TTAGGTGGGG GAACTTTTGA TGTCTCAGTT 540  
 541 TTAGAATTAT CCGGTGGAAC CTTCGAAGTT TTATCAACTA GTGGTGATAA TCATTTAGGT 600  
 601 GGGGATGACT GGGATAATGA AATTGTAAAT TG(A/G)CTTGTTA AAAAATCAA AGAAGAATAT 660  
 661 GATTTTGATC CAAAAAGTGA TAAAATGGCG CTTACAAGAC TTAAAGAAGA GGCTGAAAAA 720  
 721 ACCAAAATTA ATCTTTCAA TCAAAGTGT TCTACAGTT CTCTACCATT TTTAGGAATG 780  
 781 GGC AAAAACG GCGCGATTAA CGTTGAACTT GAACTTAAAA GATCAGAATT TGAAAAATG 840  
 841 ACTGCCCAT TAATCGATAG AACTCGCAA CCAATTGTTG ATGCTCTAAA ACAAGCAAAA 900  
 901 AFTGAGGCTT CAGATCTTGA TGAAGTTCTC CTTGTAGGTG GATCAACAAG AATGCCAGCT 960  
 961 GTTCAGTCAA TGATTGAGCA TACTTTAAAT AAAAAGCCAA ATCGTTCAAT TAATCCTGAT 1020  
 1021 GAGGTAGTCG CAATTGGTGC TGCAATTCAA GGGGGGGTTC TAGCTGGAGA GATCAGTGAT 1080  
 1081 GTTCTACTTT TAGATGTTAC TCCTTTAACT TTAGGAATTG AACTTTTAGG TGGAATTGCA 1140  
 1141 ACACCTTTGA TTCCAAGAAA TACAACAATT CCGGTAACAA AATCACAAT TTTCTCAACA 1200  
 1201 GCTGAGGATA ATCAAACCGA AGTAACAATT TCTGTTGTCC AAGGTGAACG TCAACTTGCA 1260  
 1261 GCGGATAATA AAATGTTAGG TCGCTTTAAT TTATCAGGAA TTGAAGCTGC TCCACGAGGT 1320  
 1320 CTTC CCCAGA TTGAAGTTAG CTTTTC AATT GATGTCAACG GGATTACAAC GGTTTCAGCA 1380  
 1381 AAAGATAAAA AAACCGGCAA AGAACAACA AATTACAATTA AAAATACTTC AACTTTATCA 1440  
 1441 GAAGAAGAAA TTAATAAGAT GATTCAGGAA GCCGAAGAAA ATCGTGAAGC TGATGCTCTT 1500  
 1501 AAAAAAGACA AAATCGAGAC AACAGTTCGT GCCGAAGGGC TTATTAATCA ACTTGAGAAA 1560  
 1561 TCAATAACTG ATCAAGGTGA AAAAATGAT CAAAAACAAA AAGAATTACT TGAAAAACAA 1620  
 1621 ATTCAAGAAT TAAAAGATCT TCTAAAAGAA GAAAAACTG ACGAATTAAT ATTAATAATTA 1680  
 1681 GACCAAATTG AAGCAGCTGC CCAATCTTTT GCGCAGGCAA CCGCGCAGCA AGCAAATACA 1740  
 1741 TCTGAATCTG ATCCAAAAGC TGATGATTCA AACACAATGG ATGCTGAAAT CAAGCAGGAT 1800  
 1801 TAA

图 10B

图 10

专利名称(译)	猪肺炎支原体间接ELISA抗体检测试剂盒及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103018442B</a>	公开(公告)日	2014-11-19
申请号	CN201110286912.6	申请日	2011-09-23
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学 武汉科前动物生物制品有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学 武汉科前动物生物制品有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学 武汉科前动物生物制品有限责任公司		
[标]发明人	何启盖 马丰英 李燕 库旭钢 邹浩勇 陈焕春 郭爱珍 徐高原		
发明人	何启盖 马丰英 李燕 库旭钢 邹浩勇 陈焕春 郭爱珍 徐高原		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	张红兵		
其他公开文献	CN103018442A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于动物病毒学与动物传染病学检测技术领域，具体涉及一种猪肺炎支原体间接ELISA抗体检测试剂盒及应用。本发明通过基因工程重组技术得到两株表达猪肺炎支原体p46蛋白和p65蛋白的重组的大肠杆菌pGEX-KG-46和pGEX-KG-65。本发明的试剂盒包括以突变后猪肺炎支原体膜蛋白P46和P65基因表达蛋白共同作为抗原包被的酶标板和其他核心试剂。本发明公开了猪肺炎支原体膜蛋白P46和P65基因的克隆，定点突变以及P46和P65蛋白的表达及纯化方法。还公开了猪肺炎支原体间接ELISA抗体检测方法。本发明制备的间接ELISA抗体检测试剂盒可用于猪肺炎支原体抗体的临床大规模检测和流行病学调查，具有广阔的市场前景。

引物命名	引物序列(5' → 3')	目的
p46 ( <i>Bam</i> H I)	CCCGGATCCATGAAAAAATGCTTA	连接载体
p46 ( <i>Hind</i> III)	CCCAAGCTTTTAGGCATCAGGATTA	pGEX-KG
p46 (a1)	AATCCTCGATGGATTAGTGCC	突变第一个
p46 (a2)	CCATCGAGGATTATCCGGAT	TGA→TGG
p46 (b1)	CAAAATAACTGGCTCACTCAG	突变第二个
p46 (b2)	CCAGTTATTTGTGCATCCTG	TGA→TGG
p46 (c1)	TCCCAGGATGGAATTATGGAA	突变第三个
p46 (c2)	CCATCCTGGGACATAAACAGC	TGA→TGG