

# 猪鼻支原体 vlp 重复区融合蛋白的构建表达及反应原性分析

熊祺琰, 纪 燕, 刘占军, 马庆红, 冯志新, 刘茂军, 白方方, 邵国青

**摘要:**目的 猪鼻支原体(Mhr)是临床猪场常见病原菌之一,同时研究证实其与多种人类肿瘤有关。目前对Mhr的血清学检测尚无有效的方法。本研究以Mhr可变脂蛋白(vlp)家族为对象,设计vlp家族蛋白重复区片段融合蛋白,以作为检测用包被抗原使用。**方法** 根据大肠杆菌的密码子偏嗜性,设计并构建串联表达7种Mhr可变脂蛋白vlpA、B、C、D、E、F、G重复区片段的重组蛋白vlpA-G基因。将该基因片段装入pET-32a(+)载体中转化大肠杆菌,筛选鉴定获得阳性工程菌。IPTG诱导表达,镍柱亲和层析获得纯化的重组蛋白vlpA-G。Western Blot鉴定该重组蛋白与Mhr阳性血清的反应能力,并利用该重组蛋白为包被抗原初步建立间接ELISA方法用于检测猪血清中的Mhr抗体。**结果** 构建表达vlpA-G重组蛋白的基因工程菌,经PCR及DNA测序正确。IPTG诱导后出现明显蛋白条带,经镍柱亲和层析纯化获得vlpA-G重组蛋白。Western Blot试验证明重组蛋白vlpA-G能够和Mhr阳性兔血清产生明显的阳性杂交带;利用重组vlpA-G为包被抗原初步建立间接ELISA检测方法可成功检测Mhr阳性猪血清,证明该重组vlpA-G蛋白具有良好的反应原性。**结论** 本研究构建了重组蛋白vlpA-G并证实该蛋白具有良好的反应原性,可作为Mhr血清学诊断方法研究的候选抗原,同时也为Mhr重组蛋白疫苗提供可选抗原。

**关键词:**猪鼻支原体;可变脂蛋白;原核表达;反应原性

中图分类号:R375

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)09-0877-06

## Cloning, prokaryotic expression and reactogenicity analysis of a recombinant protein for detecting *Mycoplasma hyorhinis*

XIONG Qi-yan, JI Yan, LIU Zhan-jun, MA Qing-hong,  
FENG Zhi-xin, LIU Mao-jun, BAI Fang-fang, SHAO Guo-qing

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture / National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

**ABSTRACT:** In the present study, a recombinant protein containing segments of different variable lipoprotein(vlp) of *Mycoplasma hyorhinis* (Mhr) was constructed to be used as antigen for detecting serum antibody. A gene coding for the recombinant protein containing repeating region sequences of all the 7 vlp members was designed and optimized for expressing in *Escherichia coli*. The gene was inserted into the prokaryotic expression vector pET-32a(+) and transformed into *Escherichia coli*. PCR and DNA sequencing was used to identify the positive clone. The recombinant vlpA-G was induced to express by IPTG and purified by the Ni-column. The interaction between vlpA-G and positive rabbit serum against Mhr was tested by the Western blot assay. After that, vlpA-G was used as coating antigen to primarily establish an indirect ELISA method to detect the antibody in the serum of swine. The result indicated that the genetic engineering bacteria expressing recombinant vlpA-G was successfully constructed confirming by PCR and DNA sequencing. An obvious protein band existed after induction by IPTG. Then vlpA-G protein was purified by using the Ni-column. In the assay of Western blot, the purified vlpA-G showed a strong reaction with the standard positive rabbit serum for Mhr. The vlpA-G was then used to establish an indirect ELISA method,

江苏省农业科技自主创新资金(No. cx(12)1001-05)

通讯作者:邵国青, Email:gqshaonj@163.com

作者单位:江苏省农业科学院兽医研究所,农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,国家兽用生物制品工程技术研究中心,南京 210014;

Email:qianxiongnj@163.com

and showed positive result when detecting the Mhr positive pig serum. In conclusion, a recombinant vlpA-G protein is constructed and proved to be reactogenic to the antibody for Mhr. The result of this research provided a potential antigen for developing the diagnostic methods for Mhr, as well as

the recombinant vaccine against Mhr infection.

**KEY WORDS:** *Mycoplasma hyorhinis*; variable lipoprotein; prokaryotic expression; reactogenicity

Supported by the Special Fund for Independent Innovation of Agricultural Science and Technology in Jiangsu Province of China (No. cx(12)1001-05)

Corresponding author: Shao Guo-qing, Email:gqshaonj@163.com

猪鼻支原体(*Mycoplasma hyorhinis*) (以下简写为 Mhr)是一种能够引起猪多发性浆膜炎、关节炎、中耳炎、肺炎等病症的致病性支原体<sup>[1-4]</sup>。Mhr 在临床猪场的感染率较高,通常由母猪或大猪传染给小猪,主要通过上呼吸道感染传播,该病原从呼吸系统向全身发生侵染将导致多浆膜炎、关节炎等疾病的发生。Mhr 也是细胞培养中引起培养污染的最常见支原体<sup>[5]</sup>。近年来的研究发现 Mhr 感染与人的多种癌症,包括胃癌、大肠癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌等有明显的相关性<sup>[6-9]</sup>。目前临幊上 Mhr 的感染检测主要依赖于 PCR 方法,尚未有商品化试剂盒用于血清学检测。

支原体的基因组相对较小,缺乏细胞壁结构,在多种支原体的基因组中都含有多个编码表面可变脂蛋白的基因,其功能主要通过改变脂蛋白种类及大小来改变支原体表面的抗原性,帮助支原体逃避宿主的免疫系统识别,从而在不同宿主中实现持续感染。Mhr 中发现的表面可变脂蛋白为 vlp(variable lipoprotein, vlp)<sup>[10-11]</sup>,目前发现的 Mhr vlp 家族成员共有 7 个,分别为 vlpA-vlpG。本研究拟构建表达一种重组蛋白,包含 vlpA-vlpG 的主要表位,该重组蛋白可用于建立 Mhr 的血清学诊断方法,及用于开发 Mhr 重组蛋白疫苗。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌种与质粒 大肠杆菌 BL-21(DE3) 及表达质粒载体 pET-32a(+) 均由江苏省农业科学院兽医研究所保存。

1.1.2 材料与试剂 硝酸纤维素膜,美国 Millipore 公司;镍柱,金斯瑞生物科技公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG,美国 Bethyl 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,武汉博士德生物工程有限公司;DAB 显色液,武汉博士德公司;基因合成,金斯瑞生物科技公司。Mhr 阳性兔血清,实验室自制,用 Mhr 全菌灭活抗原免疫 5 只健康新西兰大白兔,免疫 3 次每次间隔 2 周,第 3 次免疫后 2 周采血;Mhr 阳性猪血清,实验室自制,用 Mhr 全菌灭

活抗原免疫 3 头健康猪,免疫 3 次每次间隔 2 周,第 3 次免疫后 2 周采血。

### 1.2 试验方法

1.2.1 vlpA-G 蛋白设计 在 GenBank 上检索 vlp 家族成员序列,用 blast 分析蛋白片段的 Mhr 特异性,并分析各自的重复区序列。为维持表位的完整性,vlpB-vlpG 蛋白的重复区都采用 2 段重复片段。各个序列之间添加柔性片段 GGGGS 作为连接肽。由于 vlpA 可能仅含有两段重复区片段并间隔较远,故仅取一段 vlpA 的重复片段,以 GGGGS 为连接肽串联在 vlpB-G 的 C 端,设计得到重组蛋白 vlpA-G。

1.2.2 重组蛋白 vlpA-G 表达质粒的构建 采用基因合成的方式获得表达 vlpB-G 的基因序列,同时利用大肠杆菌偏爱的密码子进行序列优化以帮助表达。两端分别添加 EcoR I 和 Hind III 酶切位点。合成的基因片段经 EcoR I 和 Hind III 双酶切后插入 pET-32a(+) 空质粒载体中,构建得到 pET32a-vlpB-G 重组表达质粒。

在 vlpB-G 序列的基础上,根据 GenBank 中登录的 vlpA 序列(登录号为 AF193874.1)设计引物扩增 vlpA 基因重复片段放入 vlpB-G 的 C 端,其间加入 GGGGS 作为连接肽。具体方法为:以 vlpB-G 基因为模板用下游两次加端 PCR 的方法扩增得到 vlpA-G 基因,C 端加入 Hind III 酶切位点。PCR 引物分别为:上游引物,5'-AAAGAACCGCGGGT-GGCAGCTGGCACGGGCTGGATTCTCAG 3';下游引物-1,5'-TGCCTATTTCTGGTTTCG AGCCGCCACCGCCGCTGTCTGCCTGACCGCT GCTTT 3';下游引物-2,5'-CCGAAGCTTAGGT-GCCCGGCGCCTCGCTTGCTGCGTATTTCG GTTTTCGAGCC 3'。扩增的 PCR 产物经 EcoR I 和 Hind III 双酶切后插入 pET-32a(+) 空质粒载体中,构建得到表达 vlpA-G 的重组质粒 pET32a-vlpA-G。转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,用上游引物和下游引物-2 PCR 筛选阳性克隆,得到的阳性克隆进行一次单克隆,再重复筛选一次,获得阳性菌株,测序鉴定序列的正确性。制备甘油管保存菌种。

1.2.3 重组 vlpA-G 蛋白的表达 接种 20 μL 甘

油管菌液至 5 mL 氨苄抗性的 LB 培养基中,过夜培养得到种子液,次日将种子液以 2% 的量转接至氨苄抗性的 LB 培养基中,振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.4 ~ 0.6,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37℃ 诱导,于不同时间点收集菌体,进行 SDS-PAGE(15% 分离胶、5% 浓缩胶),测定最佳诱导时间。

**1.2.4 重组 vlpA-G 蛋白的制备及纯化** 同上接种,并于上述摸索的最佳诱导时间点收集菌体,超声裂解菌体,离心收集上清,镍柱亲和层析纯化。

**1.2.5 Western Blot 检测 Mhr 抗体** 蛋白经 SDS-PAGE 分离,用半干转印法(Tris-Gly 缓冲系统,0.65 mA/cm<sup>2</sup>,转印 1.5 h)转移至硝酸纤维素膜(NC)上。5% 脱脂奶室温或 37℃ 摆动封闭 2 h,加入用 1% 脱脂奶粉,10 mmol/L PBS 稀释 40 倍的 Mhr 阳性兔血清,37℃ 摆动杂交 1 h。0.05% Tween-20,10 mmol/L PBS 洗膜 5 次,每次 5 min。洗涤后加入用 1% 脱脂奶粉,10 mmol/L PBS 稀释 5 000 倍的羊抗兔酶标二抗,37℃ 作用 1 h。同上洗涤后加入显色液,出现明显条带后用蒸馏水冲洗膜以终止反应。

**1.2.6 间接 ELISA 方法建立** 取纯化的重组 vlpA-G 蛋白,考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白浓度。用包被稀释液 0.05 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>缓冲液(pH 9.6)将蛋白稀释至为 5 μg/mL,每孔加 100 μL,4℃ 包被过夜,次日用含 0.05% Tween-20 的 PBST 溶液洗涤 3 次,每次 5 min;每孔加 200 μL 3%BSA 于 37℃ 封闭 2 h,同上洗涤 3 次;加入 1:100 倍稀释的 Mhr 抗体阳性猪血清或阴性血清样本,每孔 100 μL,置 37℃ 孵育 1 h,洗涤;加入 1:8 000

稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG 二抗,每孔 100 μL,置 37℃ 孵育 1 h,洗涤;加新鲜配制的 TMB 底物 100 μL,37℃ 避光显色 10 min;加入 50 μL 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,于 450 nm 波长测定。

## 2 结 果

**2.1 vlpA-G 蛋白设计** 在 GenBank 上检索 vlp 家族成员序列,7 种 vlp 蛋白 vlpA、vlpB、vlpC、vlpD、vlpE、vlpF、vlpG 结构及重复片段区代表性示意图如图 1。

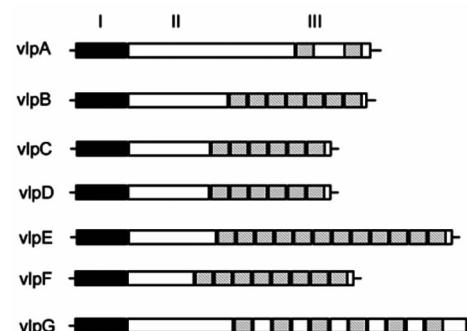


图 1 vlp 家族蛋白  
Fig. 1 The vlp family protein

经 Blast 分析发现 vlp 蛋白都具有较强的 Mhr 特异性,适合作为检测抗原使用。将 vlpB、vlpC、vlpD、vlpE、vlpF、vlpG 各自的 2 段重复片段串联,之间添加柔性片段 GGGGS 作为连接肽,设计重组蛋白 vlpB-G(图 2A)。取 vlpA 的一段重复片段串联至 vlpB-G 的 C 端,中间添加柔性片段 GGGGS 作为连接肽,设计得到重组蛋白 vlpA-G。具体蛋白序列如图 2B 所示。

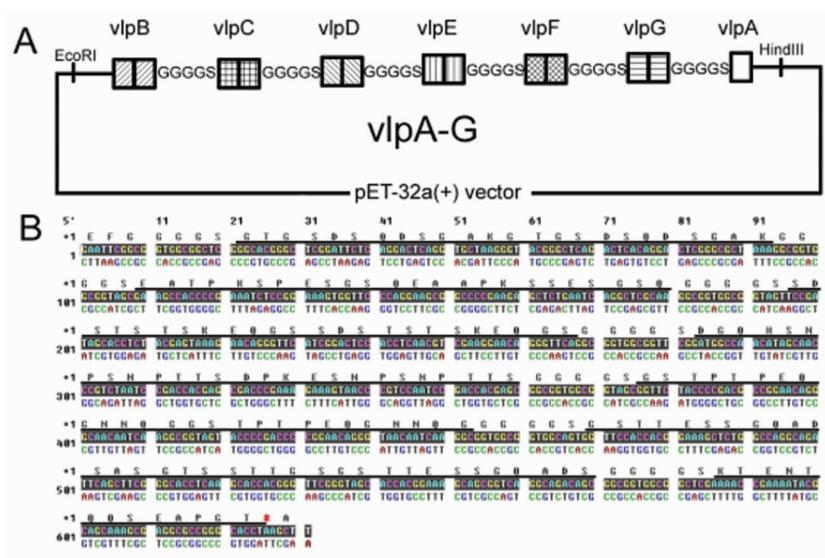
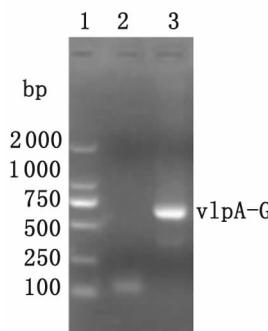


图 2 重组 vlpA-G 蛋白设计及其序列  
Fig. 2 Design and sequence of the recombinant vlpA-G protein

**2.2 重组表达质粒 pET32a-vlpA-G 的构建** 采用基因合成的方式获得串联表达 vlpB-vlpG 重复区多肽的基因序列,用加端 PCR 方法将 vlpA 重复片段基因串联至 vlpB-G 基因 C 端,插入 pET32a-vlpB-G 重组质粒中,构建得到表达 vlpA-G 的重组质粒 pET32a-vlpA-G。用 vlpA-G 上下游引物进行 PCR 筛选(图 3),挑选阳性克隆,经单克隆后 DNA 测序,测序结果正确。制备甘油管保存菌种。



**图 3 重组表达质粒 pET32a-vlpA-G 的鉴定**

1. DNA 分子量标准;2. 阴性对照;3. vlpA-G 基因扩增产物

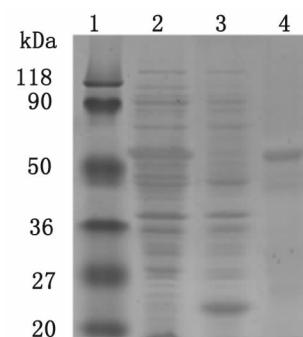
**Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid expressing vlpA-G**

1: DNA molecular weight markers; 2: Negative control; 3: PCR product of vlpA-G gene

**2.3 重组蛋白 vlpA-G 的表达及分离纯化** IPTG 诱导后重组 vlpA-G 蛋白可以在大肠杆菌中有效地表达,在分子量为 50 kDa 与 90 kDa 的标准条带位置中间偏 50 kDa 处有显著加深的蛋白带。IPTG 诱导后不同时间取样,发现加入 IPTG 诱导 6 h 后蛋白的表达达到高峰并处于稳定水平,故选择诱导 6 h 后收集菌体。采用镍柱亲和纯化重组 vlpA-G 蛋白,结果见图 4。对蒸馏水透析后冻干保存于 -20 ℃。

**2.4 Western Blot 检测 Mhr 抗体** 将纯化的 vlpA-G 重组蛋白以及 pET-32a(+)空载体表达纯化蛋白电泳分离后用 Mhr 抗血清进行 Western Blot 检测,结果可见 vlpA-G 重组蛋白可与 Mhr 阳性兔血清产生明显杂交条带,而 pET-32a(+)空载体表达纯化蛋白与 Mhr 阳性兔血清无杂交反应,说明重组 vlpA-G 蛋白具有明显的 Mhr 抗体反应原性。以未免疫健康兔血清为阴性对照,未发现杂交条带。

**2.6 间接 ELISA 检测 Mhr 抗体** 以重组蛋白 vlpA-G 为包被抗原检测 Mhr 免疫猪血清,以未免疫健康猪血清为阴性对照。结果表明 Mhr 免疫猪血清中可检测到明显的 Mhr 抗体,与阴性血清相比差



**图 4 重组 vlpA-G 蛋白的表达纯化**

1. 蛋白分子量标准;2. pET32a-vlpA-G 重组菌诱导后;3. pET-32a(+)空载体对照菌诱导后;4. 纯化的 vlpA-G

**Fig. 4 Expression and purification of the recombinant vlpA-G protein**

1: Protein molecular weight markers; 2: Total protein of *E. coli* BL-21 containing pET32a-vlpA-G after induction; 3: Total protein of *E. coli* BL-21 containing pET-32a(+) after induction; 4: Purified vlpA-G protein

异极显著,说明该重组 vlpA-G 蛋白具有良好的反应原性,可作为候选抗原蛋白用于血清学诊断方法的后续研究。

### 3 讨 论

Mhr 是第一种从猪体内分离到的支原体,主要通过呼吸道感染传播,但目前 Mhr 的研究较少,其具体的致病机制尚不清楚,可能通过黏附到纤毛细胞上进而侵入机体<sup>[12-13]</sup>,同时 Mhr 对纤毛的损伤也为其他病原菌的感染提供便利从而导致共感染的发生。除了引起天然宿主猪的疾病外,Mhr 也被发现与多种人类肿瘤相关。早在上世纪 90 年代人们就注意到某些支原体的感染与人类肿瘤之间存在着一定的相关性,其中包括 Mhr。Mhr 的一种膜蛋白 P37 被证明与细胞肿瘤化有直接关系<sup>[8,14]</sup>,是目前唯一鉴定出的 Mhr 肿瘤相关抗原。

目前,猪群 Mhr 感染的诊断手段主要包括分离培养、PCR<sup>[15]</sup>、免疫组化<sup>[16]</sup>及原位杂交<sup>[3]</sup>。利用 PCR 检测 16sRNA、P37 基因建立 PCR 方法能够较为灵敏地检测 Mhr,并能与猪滑液支原体、猪肺炎支原体区别开来。但活体动物的 PCR 通常使用鼻拭子及支气管肺泡灌洗液作为待检样本。其中鼻拭子样本检出率较低,通常只能用于群体感染性的判断,而对于个体发病而言容易出现假阴性。支气管肺泡灌洗液虽然可以通过麻醉动物后利用纤维支气管镜等仪器实现活体采集,但是难以应用于临床进行大规模采样。免疫组化及原位杂交方法虽然也可

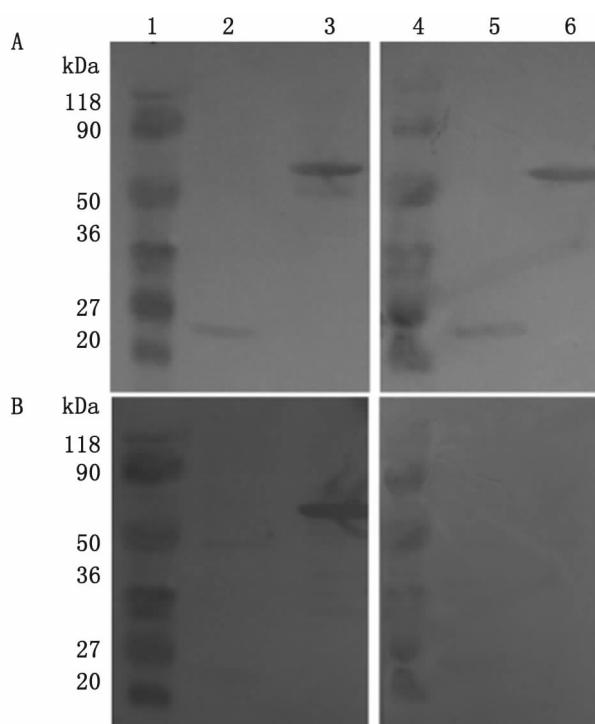


图 5 重组蛋白 vlpA-G Western Blot 检测 Mhr 血清抗体

A:丽春红染色结果;

B:Western blot 杂交结果

1-3. Mhr 阳性血清杂交;4-6. Mhr 阴性血清杂交

1、4 池道, 蛋白分子量标准;2、5 池道, 转化 pET-32a (+) 空载体的工程菌纯化表达蛋白;3、6 池道, 纯化重组蛋白 vlpA-G.

Fig. 5 Detection of serum antibody against Mhr by recombinant vlpA-G protein in Western blot assay

A: Stained by poncean before hybridization;

B: Result of Western blot

1-3: Hybridized with Mhr positive serum; 4-6: Hybridized with Mhr negative serum;

1 and 4: Protein molecular weight markers;

2 and 5: Purified protein of *E. coli* BL-21 containing pET-32a(+) after induction;

3 and 6: Purified recombinant vlpA-G protein.

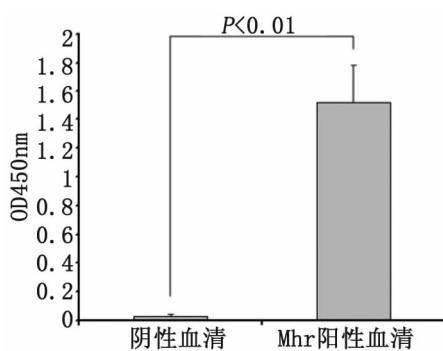


图 6 重组蛋白 vlpA-G ELISA 检测 Mhr 血清抗体

Fig. 6 Detection of serum antibody against Mhr by the ELISA assay using recombinant vlpA-G protein as coating antigen

以特异性地检测猪体内的 Mhr,但是同样都需要剖杀动物检查。血清学检测是临床主要依赖的检测手段。刘星等报道利用 Mhr 特异性的单抗建立阻断 ELISA 方法可用于检测血清中 Mhr<sup>[17]</sup>。

本研究利用 Mhr vlp 可变脂蛋白家族为靶蛋白,构建重组蛋白拟作为 ELISA 包被抗原使用。Mhr vlp 家族蛋白结构类似都由 3 部分构成<sup>[10-11]</sup>:I 区为信号肽区域,7 种 vlp 蛋白的信号肽区序列完全相同;II 区为相对保守的过渡区,III 区为重复片段区,由 12~13 个氨基酸的短肽片段串联重复而成,重复次数 2~11 个不等,7 种 vlp 蛋白重复序列各不相同,少数 vlp 蛋白在重复片段之间存在连接序列。在不同菌株及同一菌株传代过程中 vlp 蛋白家族表达的数量、种类和分子量大小各不相同,这种表达差异使得 Mhr 具有多变的表面抗原性,在免疫逃避中起到关键作用。vlp 家族蛋白作为 Mhr 的表面脂蛋白,是建立血清学诊断方法的理想抗原,同时表面蛋白通常也具有较好的免疫原性,因此也适合作为重组疫苗的候选蛋白。介于 vlp 家族蛋白本身的表达变异性,在本研究中设计的 vlpA-G 串联表达了 vlp 家族 7 种蛋白的重复片段,囊括了目前已知的 vlp 家族的所有成员的主要免疫区段,可以对广泛的 Mhr 菌株产生反应。在试验过程中我们发现表达出来的 vlpA-G 蛋白的分子量大于 50 kDa,而设计的重组蛋白理论分子量应为 36.8 kDa,另一方面,DNA 测序结果却显示所设计的 vlpA-G 基因序列正确地插入到 pET-32a(+)载体中。其分子量与预期不符的原因可能与 vlp 蛋白本身的功能和性质有关,在其他支原体的一些黏附蛋白上也报道过这种现象<sup>[18]</sup>。

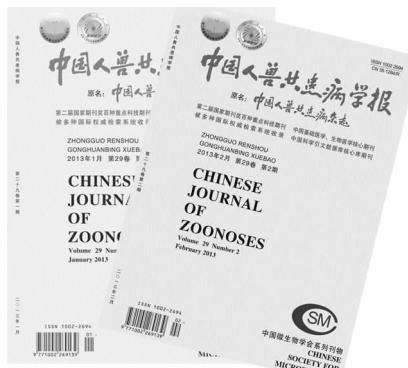
本研究结果证明,重组 vlpA-G 可以在大肠杆菌中很好地表达,以其为包被抗原初步建立 ELISA 方法能够明显地检测到 Mhr 的阳性血清。本结果将为 Mhr 血清或黏膜抗体间接 ELISA 检测方法的建立奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Lin JH, Chen SP, Yeh KS, et al. *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen[J]. Vet Microbiol, 2006, 115(1-3): 111-116. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.02.004
- [2] Morita T, Fukuda H, Awakura T, et al. Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media[J]. Vet Pathol, 1995, 32(2): 107-111. DOI: 10.1177/030098589503200202
- [3] Kim B, Lee K, Han K, et al. Development of *in situ* hybridiza-

- tion for the detection of *Mycoplasma hyorhinis* formalin-fixed paraffin-embedded tissues from naturally infected pigs with polyserositis[J]. J Vet Med Sci, 2010, 72(9): 1225-1227. DOI: 10.1292/jvms.10-0062
- [4] Jayagopala RN, Wilkie BN, Borgs P, et al. Cytokines in *Mycoplasma hyorhinis*-induced arthritis in pigs bred selectively for high and low immune responses[J]. Infect Immun, 2000, 68(3): 1150-1155. DOI: 10.1128/IAI.68.3.1150-1155.2000
- [5] Zinocker S, Wang MY, Gaustad P, et al. *Mycoplasma* contamination revisited: mesenchymal stromal cells harboring *Mycoplasma hyorhinis* potently inhibit lymphocyte proliferation *in vitro* [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16005. DOI: 10.1371/journal.pone.0016005
- [6] Yang H, Qu L, Ma H, et al. *Mycoplasma hyorhinis* infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells[J]. BMC Gastroenterol, 2010, 10: 132. DOI: 10.1186/1471-230X-10-132
- [7] Namiki K, Goodison S, Porvasnik S, et al. Persistent exposure to *Mycoplasma* induces malignant transformation of human prostate cells[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e6872. DOI: 10.1371/journal.pone.0006872
- [8] Urbanek C, Goodison S, Chang M, et al. Detection of antibodies directed at *M. hyorhinis* p37 in the serum of men with newly diagnosed prostate cancer[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 233. DOI: 10.1186/1471-2407-11-233
- [9] Mariotti E, Gemei M, Mirabelli P, et al. The percentage of CD133+ cells in human colorectal cancer cell lines is influenced by *Mycoplasma hyorhinis* infection[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 120. DOI: 10.1186/1471-2407-10-120
- [10] Citti C, Watson-McKown R, Drosse M, et al. Gene families encoding phase- and size-variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinis*[J]. J Bacteriol, 2000, 182(5): 1356-1363. DOI: 10.1128/JB.182.5.1356-1363.2000
- [11] Citti C, Kim MF, Wise KS. Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies[J]. Infect Immun, 1997, 65(5): 1773-1785.
- [12] Johannsen U, Menger S, Kinne J, et al. The pathology and pathogenesis of experimental *Mycoplasma hyorhinis* infection of piglets with and without thermomotor stress. 2. Electron microscopic study results[J]. Zentralbl Veterinarmed A, 1991, 38(5): 321-336.
- [13] Morita T, Fukuda H, Awakura T, et al. Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media[J]. Vet Pathol, 1995, 32(2): 107-111. DOI: 10.1177/030098589503200202
- [14] Gong M, Meng L, Jiang B, et al. p37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(3): 530-537. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2191
- [15] Caron J, Ouardani M, Dea S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(4): 1390-1396.
- [16] Morita T, Muraki Y, Awakura T, et al. Detection of *Mycoplasma hyorhinis* in porcine eustachitis[J]. J Vet Med Sci, 1993, 55(3): 475-477. DOI: 10.1292/jvms.55.475
- [17] Liu X, Zhang LF, Yang YP, et al. Preparation of monoclonal antibodies of *Mycoplasma hyorhinis* and establishment of antibody-sandwich ELISA method[J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(3): 55-58. (in Chinese)
- 刘星, 张丽芳, 杨玉萍, 等. 抗猪鼻支原体单克隆抗体的研制及双抗体夹心ELISA检测法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 18(3): 55-58. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2008.03.013
- [18] Jenkins C, Wilton JL, Minion FC, et al. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin [J]. Infect Immun, 2006, 74(1): 481-487. DOI: 10.1128/IAI.74.1.481-487.2006

收稿日期:2012-12-11;修回日期:2013-03-21



# 欢 迎 订 阅

## 《中国人兽共患病学报》

邮发代号:34-46

全年订价:96元