

管礼麟, 马 媛, 杨丹茹, 等. 绵羊肺炎支原体 P208 蛋白质的分子特征分析及免疫原性[J]. 江苏农业学报, 2018, 34( 1 ): 81-86.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.012

## 绵羊肺炎支原体 P208 蛋白质的分子特征分析及免疫原性

管礼麟, 马 媛, 杨丹茹, 杨发龙  
(西南民族大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610041)

**摘要:** 为了研究绵羊肺炎支原体 P208 蛋白质的结构及功能, 本试验在对 *p208* 基因进行生物信息学分析的基础上, 对其部分基因片段进行了克隆及原核表达, 并采用 Western-blot 对其免疫原性进行分析。结果显示, *p208* 基因与猪肺炎支原体黏附素 *p216* 基因、殊异支原体细胞表面蛋白基因以及絮状支原体 P97/LPPS 家族蛋白基因具有较高的同源性。重组 P208 蛋白以可溶性形式在大肠杆菌 BL21( DE3 ) 工程菌中成功得到表达; 纯化的重组蛋白与山羊抗绵羊肺炎支原体全菌血清发生结合反应, 表明 P208 蛋白质是绵羊肺炎支原体的免疫原之一。研究结果为进一步分析其功能及其应用提供了重要的依据。

**关键词:** 绵羊肺炎支原体; P208 蛋白; 分子特征; 免疫原性

**中图分类号:** 858.26      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440( 2018 ) 01-0081-06

## Study on molecular characterization and immunogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* P208 protein

GUAN Li-lin, MA Yuan, YANG Dan-ru, YANG Fa-long  
( College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China )

**Abstract:** To investigate the structure and function of P208 protein of *Mycoplasma ovipneumoniae*, based on bioinformatics analysis, a fragment of *p208* gene was amplified and expressed in *Escherichia coli*. The immunogenicity of P208 was analyzed by Western-blot. The results showed that *p208* gene was homologous to the *p216* in *Mycoplasma hyopneumoniae*, a gene encoding cell surface protein of *Mycoplasma dispar* and a gene encoding P97/LPPS family protein of *Mycoplasma flocculare*. The P208 was successfully expressed in *E. coli* BL21( DE3 ) with soluble form. The purified recombinant protein could react with goat serum against *M. ovipneumoniae*, this suggesting that P208 was one of the immunogens of *M. ovipneumoniae*. The results provide an important basis for further analysis of the function and application of P208.

**Key words:** *Mycoplasma ovipneumoniae*; P208 protein; molecular characterization; immunogenicity

绵羊肺炎支原体( *Mycoplasma ovipneumoniae* )是引起绵羊、山羊以及小反刍野生动物非典型肺炎的

重要病原<sup>[1-4]</sup>。此外, 羊感染绵羊肺炎支原体后, 对其他病原的易感性增加<sup>[5]</sup>。该病原在世界多个国家及地区均有分布, 在中国多个地区流行也十分广泛, 给养羊业带来较大的经济损失<sup>[6-8]</sup>。

研究结果表明, 绵羊肺炎支原体与引起猪地方流行性肺炎的病原猪肺炎支原体( *Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp ) 具有最为相近的亲缘关系<sup>[9-10]</sup>。目前对猪肺炎支原体的毒力因子及重要功能蛋白进行了较为深入的研究, 特别是黏附相关分子和免疫

收稿日期: 2017-06-23

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目( 2016YFD0500907 ); 西南民族大学研究生创新型科研项目( CX2016SZ090 )

作者简介: 管礼麟( 1994- ), 男, 江西赣州人, 硕士研究生, 主要从事动物病原生物学的研究。( Tel ) 13072853553; ( E-mail ) 1129979411@qq.com

通讯作者: 杨发龙, ( E-mail ) yfalong@hotmail.com

原蛋白<sup>[11-12]</sup>。其中由 *mhp493* 基因(*p216* 基因)编码的 P216 蛋白,不仅参与猪肺炎支原体对细胞的黏附,也证明是重要的免疫原之一,可诱导机体产生抗体<sup>[13-14]</sup>。在对绵羊肺炎支原体 SC01 全基因组<sup>[14]</sup>进行分析的过程中,发现 1 个与猪肺炎支原体 *p216* 高度同源的基因,其编码蛋白的分子量预测为 208 400,故暂命名为 *p208* 基因,编码蛋白命名为 P208 蛋白。但目前对该蛋白分子特征以及免疫原特性尚不清楚。因此本研究对 *p208* 基因序列进行生物信息学分析,对其进行原核表达,并分析其免疫原性,旨在为下一步深入研究其结构及功能以及其在亚单位疫苗和血清学诊断中作为抗原的可能性提供依据。

## 1 材料及方法

### 1.1 菌株、载体及血清

绵羊肺炎支原体 SC01 株由西南民族大学动物医学实验室分离鉴定和保存。pET-32a(+)载体为 Novagen 公司产品。大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)感受态细胞均购自北京天恩泽基因科技有限公司。山羊抗绵羊肺炎支原体 SC01 株阳性血清由本实验室制备。HRP 标记的兔抗山羊 IgG 购自 Abbkine 公司。

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Bam* H I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品。金牌 Mix (green) Golden Star T6 Super PCR Mix (1.1x) 为北京擎科新业生物技术有限公司产品。Gel Extraction Kit、Plasmid Miniprep Kit 均为 Omega 公司产品。Histrap<sup>TM</sup> 蛋白纯化柱为 GE Healthcare 公司产品。SuperLumina ECL HRP Substrate Kit 为 Abbkine 公司产品。

### 1.3 *p208* 基因序列分析

采用 NCBI 的 BLAST 工具及 DNASTar 软件进行核苷酸及氨基酸序列的同源性比较和分析,同时进行核苷酸和氨基酸的比对及分析。采用 TMHMM、SignalP4.1、LipoP1.0 等在线软件对 P208 蛋白的跨膜区、信号肽、脂蛋白及抗原性及理化性质进行分析。

### 1.4 引物设计

根据绵羊肺炎支原体 SC01 株 *p208* 基因序列 (Accession: AFH001000009.1),采用 Primer Premier 6.0 软件设计了 1 对引物 P208F 和 P208R,其序列

为: P208F: 5'-CGCGGATCCGAAGATGCCCTTGC-CAGTCT-3'(下划线部分为 *Bam* H I 酶切位点); P208R: 5'-CCGCTCGAGCAGATGCTGAACACCTTGGT-3'(下划线部分为 *Xho* I 酶切位点)。这对引物扩增的片段大小为 676 bp (从第 1 498 bp 至 2 173 bp),该片段编码的 P208 蛋白从第 500 位至第 725 位氨基酸,该区域不含有在支原体中编码色氨酸的 TGA 密码子,且含有丰富的抗原表位。引物由上海生工生物工程公司合成。

### 1.5 目的片段的 PCR 扩增

采用酚/氯仿法提取绵羊肺炎支原体 SC01 株基因组 DNA 作为 PCR 扩增反应中需添加的模板,利用上述引物 P208F/P208R 进行 PCR 扩增,反应总体系为 20  $\mu$ l,包括金牌 Mix (green) Golden Star T6 Super PCR Mix (1.1x) (5 U/ $\mu$ l) 10  $\mu$ l、上下游引物 (10 U/L) 各 1  $\mu$ l、DNA 模板 2  $\mu$ l 以及双蒸水 6  $\mu$ l。反应条件为:首先 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min;然后 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,62  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 35 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存并结束反应。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 原核表达载体的构建

采用 Gel Extraction Kit 进行 PCR 产物纯化回收。分别用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I 对纯化的目的片段和 pET-32a(+)空质粒进行双酶切,对酶切产物进行纯化回收后,采用 T4 DNA 连接酶进行连接反应。将连接产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,随后均匀涂布至含有 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板培养基上,37  $^{\circ}$ C 恒温培养 18 h。挑取阳性菌落,接种至含有 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 肉汤中,37  $^{\circ}$ C 160 r/min 水平摇床培养过夜后离心收集菌体,采用 Plasmid Miniprep Kit 按试剂盒操作说明提取质粒。通过 PCR 扩增对质粒进行鉴定,并将阳性克隆交由上海生工生物工程有限公司进行测序确认。将重组表达载体命名为 pET-32a(+)-P208。由其编码表达的重组蛋白命名为 rP208。

### 1.7 重组蛋白的诱导表达、可溶性分析及纯化

将鉴定正确的阳性重组质粒 pET-32a(+)-P208 转化至表达工程菌 *E. coli* BL21(DE3)中,均匀涂布于含有 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板培养基上,37  $^{\circ}$ C 恒温培养过夜。挑取单个阳性菌落接种至含有 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 肉汤中,37  $^{\circ}$ C 160 r/min 水平振荡培养过夜。取 500  $\mu$ l 培养菌液

接种至 50 ml 含有 100  $\mu\text{g/ml}$  氨苄青霉素的 LB 肉汤中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养至  $OD_{600}$  达到 0.6 后, 加入 0.4 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达 12 h 后, 随后 8 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 加入适量 PBS 重悬菌体沉淀后, 同条件再次离心, 收集菌体沉淀, 加入 10 ml PBS 重悬后, 采用超声破碎仪在冰浴条件下进行超声裂解。破碎完成后 8 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 30 min, 分别收取上清液和沉淀, 沉淀加入 5 ml PBS (0.01 mol/L, pH7.4) 重悬。利用 SDS-PAGE 电泳对沉淀和上清液中的重组蛋白质进行检测, 鉴定其可溶性。根据可溶性结果, 使用 GE 公司 HisTrap<sup>TM</sup> HP 纯化柱按照说明书对重组蛋白质 rP208 进行纯化。

### 1.8 Western blot 分析

用纯化的 rP208 蛋白质制样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 利用半干转印仪转移至 PVDF 膜上。50 g/L 脱脂奶粉溶液封闭过夜, TBST 洗涤 3 次 (每次 10 min) 后以 1:100 稀释的山羊抗绵羊肺炎支原体 SC01 株阳性血清为一抗孵育 2 h, 同法洗涤后孵育二抗 2 h, 二抗为 1:10 000 稀释的 HRP 标记的兔抗山羊 IgG, 最后洗涤完毕后, 加入 SuperLumia ECL HRP Substrate Kit 发光剂, 于 Versa Doc 成像系统成像。以绵羊肺炎支原体抗体阴性的山羊血清作为对照。

## 2 结果

### 2.1 p208 基因及其编码蛋白质的分子特征分析

**2.1.1 同源性分析** 经 BLAST 比较分析, 绵羊肺炎支原体 p208 基因仅与猪肺炎支原体 p216 (GenBank: AF541877.1)、编码殊异支原体细胞表面蛋白基因 (MDIS-02775) (GenBank: CP007229.1) 以及编码猪絮状支原体 P97/LPPS 家族蛋白基因 (MYF-00960) (GenBank: CP007585.1) 之间具有较高的相似性。经 DNASTar 软件进行比对分析 (表 1) 发现, 绵羊肺炎支原体 p208 基因与编码殊异支原体细胞表面蛋白基因相似性最高, 两者核苷酸序列相似性为 58.6%, 与猪肺炎支原体 p216 基因及编码猪絮状支原体 P97/LPPS 家族蛋白基因核苷酸序列相似性均为 56.2%。因此可推测上述 4 个基因为直系同源基因。

**2.1.2 蛋白质理化性质分析** P208 蛋白的相对分子质量为 208 401, 理论等电点为 5.5。原子总数为

29 158, 原子组成为 C: 9 249; H: 14 513; N: 2 457; O: 2 911; S: 11; Se: 17, 分子式为  $\text{C}_{9249}\text{H}_{14513}\text{N}_{2457}\text{O}_{2911}\text{S}_{11}\text{Se}_{17}$ 。其中, Ser (9.7%)、Leu (9.3%)、Lys (8.1%)、Asp (7.3%)、Gln (7.0%)、Asn (7.0%) 等含量较高, 而 Seu (0.9%)、Met (0.6%)、Trp (0.3%) 等含量相对较低。不稳定系数为 39.61, 是一个稳定蛋白质。

表 1 p208 核苷酸同源性分析

Table 1 The homology analysis of p208 nucleotide

基因	1	2	3	4
1		65.2	58.6	64.9
2			56.2	65.7
3				56.2
4				

1: 编码殊异支原体细胞表面蛋白基因 MDIS-02775; 2: 猪肺炎支原体 p216; 3: 绵羊肺炎支原体 p208; 4: 编码猪絮状支原体 P97/LPPS 家族蛋白基因 MYF-00960。

**2.1.3 跨膜区及信号肽分析** 根据 P208 蛋白的蛋白质信号肽的分析以及蛋白质跨膜结构的预测结果 (图 1) 分析可知, P208 蛋白不含脂蛋白信号肽成分, 其氨基酸序列中第 1~18 个氨基酸位于细胞膜内部, 第 19~41 个氨基酸间形成 1 个明显的跨膜螺旋结构区域, 第 42~1 853 氨基酸则位于细胞膜外侧, 即 P208 蛋白主要位于细胞膜外侧。

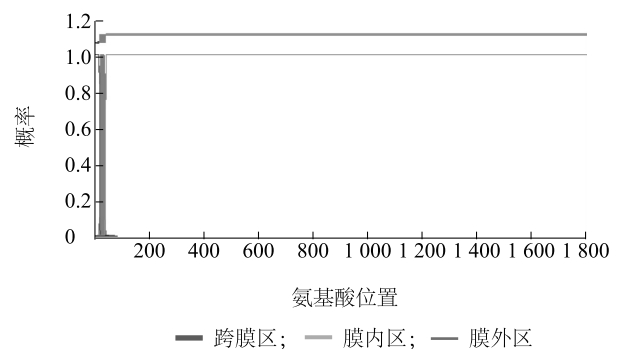


图 1 P208 蛋白跨膜区分布

Fig.1 Transmembrane region distribution of P208 protein

**2.1.4 抗原表位分析** 在线分析抗原表位, 结果 (图 2) 表明, P208 蛋白可能含有 69 个抗原表位, 平均抗原趋向性为 1.020 8, 其中第 157~180 位氨基酸形成的表位抗原指数最高, 其氨基酸序列为 TK-SIYLSVVDAPKAALAQFS DIVD。

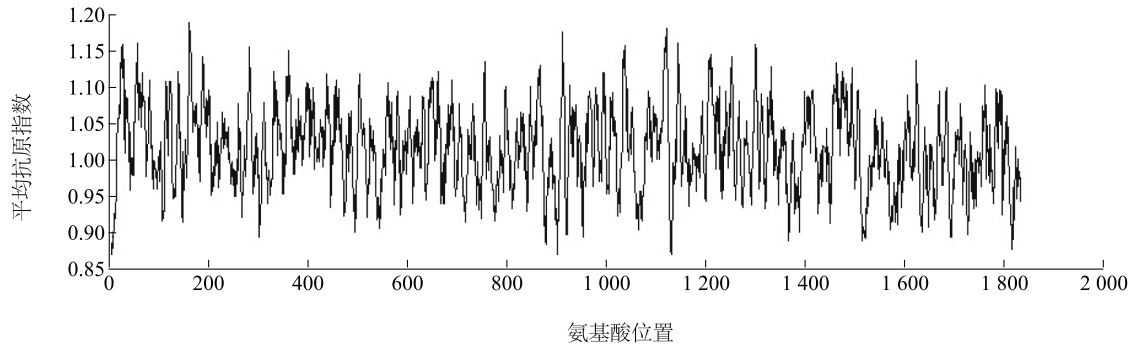
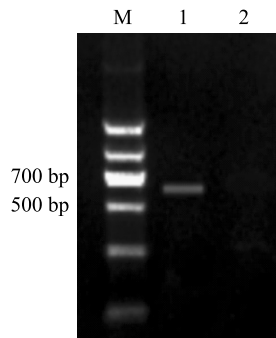


图 2 P208 蛋白抗原表位分布

Fig.2 Antigenic epitopes distribution of P208 protein

## 2.2 *p208* 基因片段的 PCR 扩增

使用特异性引物 P208F/P208R, 以绵羊肺炎支原体 SC01 株 DNA 作为模板进行 PCR 扩增后, 经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, 在 700 bp 左右出现了特异性条带, 该片段与预期中目的条带的大小(676 bp)相符, 阴性对照没有出现扩增(图 3)。

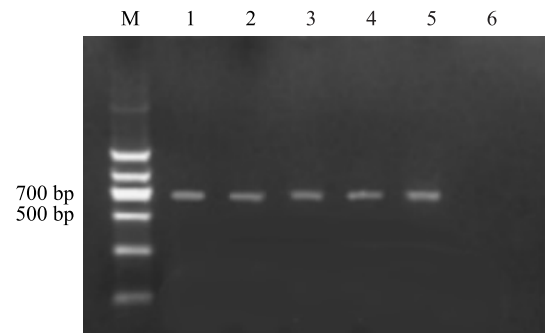


M: DNA marker II; 1: 绵羊肺炎支原体 SC01 株基因组 DNA; 2: 阴性对照。

图 3 *p208* 基因片段的 PCR 扩增结果Fig.3 PCR amplification of *p208* fragment

## 2.3 原核表达载体的构建及鉴定

PCR 产物连接至 pET-32a(+) 载体, 转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选得到阳性克隆后, 以提取的重组质粒为模板, 采用 P208F/P208R 进行 PCR 扩增, 所得条带与预期相符(图 4)。对 PCR 鉴定为阳性的质粒进行测序, 结果表明, 目的片段的序列及大小与绵羊肺炎支原体 SC01 株 *p208* 基因相应区域完全相同。



M: DNA marker II; 1: 绵羊肺炎支原体 SC01 株基因组 DNA; 2~5: 重组质粒; 6: 阴性对照。

图 4 重组质粒的 PCR 鉴定

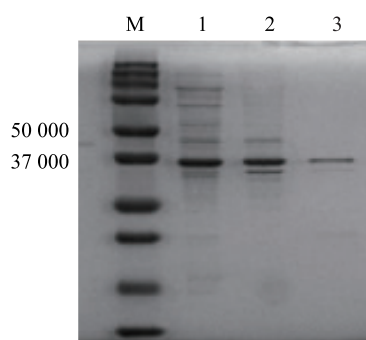
Fig.4 Identification of recombinant plasmid by PCR

## 2.4 重组蛋白的表达、可溶性分析及纯化

将重组质粒 pET-32a(+)-*p208* 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞后进行 IPTG 诱导表达, 在不同时间点收集菌体进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示, 重组表达工程菌经 IPTG 诱导后, 表达蛋白的条带大小与预期(36 500)相符, 表明目的片段以融合蛋白质的形式得到了表达。

为分析重组蛋白质的可溶性, 分别对全菌裂解物上清液及沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示, 表达的重组蛋白质主要存在于上清液中, 表明该蛋白质以可溶性形式进行表达。利用 HisTrap<sup>TM</sup> HP 纯化柱对重组 P208 蛋白进行纯化, 经 SDS-PAGE 电泳, 结果可知, 在 36 500 左右处出现明显条带(图 5), 说明纯化效果良好。





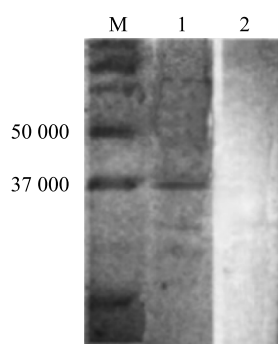
M: 蛋白分子量标准;1:上清液;2:沉淀;3:纯化产物。

图5 表达产物的可溶性分析及纯化

Fig.5 Solubility analysis and purification of rP208

## 2.5 重组蛋白 Western-blot 分析

以纯化 P208 蛋白制样,进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后,利用山羊抗绵羊肺炎支原体高免血清为一抗,以辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 为二抗进行 Western-blot 分析。结果(图 6)表明,经纯化后的重组蛋白与山羊抗绵羊肺炎支原体全菌抗体结合。表明 P208 蛋白具有良好的免疫原性。



M: 蛋白分子量标准;1:纯化的重组蛋白 rP208+阳性血清;2:纯化的重组蛋白 rP208+阴性血清。

图6 P208 纯化重组蛋白的 Western-blot 分析

Fig.6 Western-blot analysis of P208 purified recombinant protein

## 3 讨论

绵羊肺炎支原体作为感染小反刍动物的呼吸道病原,随着养羊业从传统的放养向集约化、规模化的圈养等饲养方式的转变,其危害越来越严重。但是,对于该病原的致病机制、毒力因子的研究相对较少,

而且也没有在临床上普遍使用的血清学诊断试剂和疫苗。因此,深入研究该病原的分子生物学特征,对于揭示其致病机制以及开发诊断试剂和疫苗均非常重要。

黏附素是支原体重要的毒力因子,同时也往往是良好的免疫原分子。在绵羊肺炎支原体中,目前尚无确定的黏附素蛋白。在我们前期的研究中,在对绵羊肺炎支原体全基因组进行测序的基础上,对可能的黏附素分子进行了预测<sup>[15]</sup>,并对 P113<sup>[16-17]</sup>, P109<sup>[18]</sup>, P128<sup>[19]</sup>, P108<sup>[20]</sup> 等的分子特征和免疫原性进行了研究。为进一步丰富对绵羊肺炎支原体黏附分子及免疫原蛋白的认识,本研究对绵羊肺炎支原体 P208 蛋白的生物信息学进行了分析。同源性比较分析发现, *p208* 基因与猪肺炎支原体黏附素 *p216* 基因、编码殊异支原体细胞表面蛋白基因以及编码猪絮状支原体 P97/LPPS 家族蛋白基因具有较高的同源性。其中针对殊异支原体细胞表面蛋白及猪絮状支原体 P97/LPPS 家族蛋白的免疫原功能无相关研究报道,而针对猪肺炎支原体 P216 蛋白,研究结果表明其不仅参与猪肺炎支原体的黏附过程,同时也可以体内得到表达<sup>[21]</sup>,诱导机体产生抗体,是一个良好的免疫原。

因此这提示绵羊肺炎支原体 *p208* 编码蛋白也可能是一个良好的免疫原且可能参与黏附过程。为了研究该蛋白的功能,本研究通过对编码绵羊肺炎支原体 P208 蛋白的部分基因片段进行了克隆,并成功在大肠杆菌中以可溶性蛋白的形式得到大量表达。利用山羊抗绵羊肺炎支原体全菌抗体进行 Western-blot 分析,结果表明纯化后的重组蛋白能与山羊抗绵羊肺炎支原体全菌抗体特异性结合,说明 P208 蛋白具有免疫原性,是绵羊肺炎支原体良好的免疫原之一。这同时也说明本研究所表达的重组蛋白可以作为抗原,在亚单位疫苗开发以及 ELISA 等绵羊肺炎支原体血清抗体检测试剂盒的研制方面具有潜在的应用价值。但是 P208 蛋白是否参与绵羊肺炎支原体的黏附过程尚不清楚,有待进一步的研究。

## 参考文献:

- [1] BESSER T E, HIGHLAND M A, KATHERINE B, et al. Causes of pneumonia epizootics among bighorn sheep, western United States [J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(3):406-414.

- [2] RIFATBEGOVIC M, MAKSIMOVIC Z, HULAJ B. *Mycoplasma ovipneumoniae* associated with severe respiratory disease in goats [J]. *Veterinary Record Journal of the British Veterinary Association*, 2011, 168(21):565.
- [3] 胡新岗, 黄银云, 郭广富, 等. 利用 PCR 技术检测波杂肉山羊中的绵羊肺炎支原体 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(7):271-273.
- [4] GONÇALVES R, MARIANO I, NÚÑEZ A, et al. Atypical non-progressive pneumonia in goats [J]. *Veterinary Journal*, 2010, 183(2):219-221.
- [5] DASSANAYAKE R P, SHANTHALINGAM S, HERNDON C N, et al. *Mycoplasma ovipneumoniae* can predispose bighorn sheep to fatal *Mannheimia haemolytica pneumonia* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 145(3/4):354-359.
- [6] GIANCASPERO M, NICHOLAS R A, HLUSEK M, et al. Seroepidemiological survey of sheep flocks from Northern Japan for *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma agalactiae* [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2012, 44(3):395-398.
- [7] ETTORRE C, SACCHINI F, SCACCHIA M, et al. Pneumonia of lambs in the Abruzzo region of Italy: anatomopathological and histopathological studies and localisation of *Mycoplasma ovipneumoniae* [J]. *Veterinaria Italiana*, 2007, 43(1):149-155.
- [8] 张萍慧, 郝永清, 张爱荣, 等. 绵羊肺炎支原体的分离与鉴定 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2010, 31(1):142-143.
- [9] PETTERSSON B, UHLÉN M, JOHANSSON K E. Phylogeny of some mycoplasmas from ruminants based on 16S rRNA sequences and definition of a new cluster within the hominis group [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(4):1093-1098.
- [10] LI M, MA C J, LIU X M, et al. Molecular cloning of HSP70 in *Mycoplasma ovipneumoniae* and comparison with that of other mycoplasmas [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2011, 10(2):834-848.
- [11] HSU T, MINION F C. Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. *Gene*, 1998, 214(2):13-23.
- [12] WOOLLEY L K, FELL S A, GONSALVES J R, et al. Evaluation of recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* P97/P102 paralogs formulated with selected adjuvants as vaccines against mycoplasmal pneumonia in pigs [J]. *Vaccine*, 2014, 32(34):4333-4341.
- [13] WILTON J, JENKINS C, CORDWELL S J, et al. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 71(3):566-582.
- [14] 杜海霞, 刘茂军, 冯志新, 等. 猪肺炎支原体 P216 基因片段的表达及黏附活性研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(8):1324-1329.
- [15] FALONG Y, CHENG T, YONG W, et al. Genome sequence of *Mycoplasma ovipneumoniae* strain SC01 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(18):5018.
- [16] 杨发龙, 张贤宇, 汤承, 等. 绵羊肺炎支原体 P113 蛋白 C 端重复区的表达及其免疫原性 [J]. *中国兽医科学*, 2013(7):733-737.
- [17] 张贤宇, 杨发龙, 冯旭飞, 等. 绵羊肺炎支原体 P113 蛋白 N 端原核表达及其抗原性分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2013(7):7-10.
- [18] 谢珊珊, 黄金, 杨发龙. 绵羊肺炎支原体 P109 蛋白质分子特征、原核表达及其免疫反应性 [J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(4):824-828.
- [19] 冯旭飞, 刀筱芳, 张贤宇, 等. 绵羊肺炎支原体 p128 基因序列分析及原核表达 [J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(2):20-26.
- [20] 王娟, 刀筱芳, 杨发龙. 绵羊肺炎支原体 P108 蛋白的分子特征分析及免疫原性研究 [J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(7):894-899.
- [21] ADAMS C, PITZER J, MINION F C. *In vivo* expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(11):7784-7787.

(责任编辑:陈海霞)