

刘 威,袁芳艳,周丹娜,等. 猪肺炎支原体脂蛋白 LppT 的多克隆抗体制备及鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(19):220-223.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.19.051

# 猪肺炎支原体脂蛋白 LppT 的多克隆抗体制备及鉴定

刘 威<sup>1</sup>,袁芳艳<sup>1</sup>,周丹娜<sup>1</sup>,刘泽文<sup>1</sup>,杨克礼<sup>1</sup>,段正赢<sup>1</sup>,郭 锐<sup>1</sup>,蔡 行<sup>1</sup>,肖少波<sup>2</sup>,田永祥<sup>1</sup>

(1. 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所/动物胚胎与分子育种湖北省重点实验室,湖北武汉 430064;

2. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室,湖北武汉 430064)

**摘要:**试验构建猪肺炎支原体重组表达质粒 pET30a-LppT,通过快速定点突变试剂盒将 LppT 基因中 513、945、1 860、2 547 bp 处的 A 突变为 G,使改造后的 LppT 基因能在大肠杆菌系统中正确表达,IPTG 诱导重组蛋白的表达并进行了蛋白纯化,纯化的蛋白与佐剂混合、乳化制备免疫原,免疫新西兰大白兔制备 LppT 蛋白多克隆抗体。SDS-PAGE 分析结果显示,IPTG 诱导表达后获得 1 条特异性蛋白条带,分子质量约为 110 ku,与预期蛋白大小一致。可溶性分析结果表明目的蛋白以可溶形式表达于上清中,纯化的蛋白经 SDS-PAGE 分离后,用制备的 LppT 多克隆抗体进行 Western Blot 检测,结果表明制备的 LppT 多克隆抗体具有较强的特异性。

**关键词:**猪肺炎支原体;脂蛋白;LppT;多克隆抗体

**中图分类号:**S858.28 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)19-0220-04

猪支原体肺炎(mycoplasmal pneumonia of swine,MPS)是由猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*,Mhp)引起的,以猪咳嗽和气喘为主要症状的慢性呼吸道传染病<sup>[1]</sup>,具有慢性、接触性、高传染性、高发病率和低死亡率特征。该病广泛分布于世界各地,国外常被称为猪地方流行性肺炎,而在我国常被称为猪气喘病(又称喘气病)<sup>[2]</sup>。

猪肺炎支原体感染导致猪的生长率下降 12%~16%,饲料转化率降低 13%~22%,体质量相对减少 10~25 kg,商品猪的出栏时间延迟 10~30 d<sup>[3]</sup>;同时还破坏猪的支气管和细支气管纤毛,进而损伤阻挡病原微生物入侵的物理屏障,破坏猪的巨噬细胞,降低机体的免疫清除能力,导致免疫抑制<sup>[4]</sup>。因此,在临床上猪肺炎支原体常常与猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪Ⅱ型圆环病毒、猪流感病毒、胸膜肺炎放线杆菌、多杀性巴氏杆菌等病原混合感染,增加了当前猪病诊断和预防控制的难度<sup>[5-6]</sup>。此外,由于猪肺炎支原体是缺少细胞壁的原核微生物,对常作用于细胞壁的抗生素(如 $\beta$ -内酰胺酶类抗生素等)不敏感,猪群一旦被猪肺炎支原体感染,控制和净化将十分困难<sup>[7]</sup>。据初步统计,全球每年因猪肺炎支原体感染造成的直接经济损失高达 2 亿美元。可以说,猪肺炎支原体已成为当前严重影响养猪业经济效益的重大疫病,被喻为影响养猪业经济效益的“隐性杀手”。

在以前的研究中,笔者完成了 Mhp168 株以及体外传代致弱株 Mhp168-L 的全基因组序列的测定<sup>[8]</sup>。通过 Mhp 强弱毒力菌株的比较基因组学分析,筛选出了 330 个遗传变异位点,分布于 123 个基因中,进一步分析发现当前国际上报道的 Mhp 毒力基因(如:P97、P102、P146、P159、P216 等)几乎全包括在这 123 个基因中,其他基因多数功能未知,极可能还存在潜在的未知毒力基因<sup>[9]</sup>。其中 MHP168\_424 编码的氨基酸序列与 *M. conjunctivae* 的膜脂蛋白 LppT 相似度较高,且均含有 1 处典型的细菌脂蛋白信号肽区域。*M. conjunctivae* 的 LppT 蛋白具有体外黏附羔羊关节滑膜细胞的能力,且抗 LppT 的抗体能有效阻断 *M. conjunctivae* 与羔羊关节滑膜细胞的黏附<sup>[10]</sup>。因此,推测脂蛋白 LppT 很可能是猪肺炎支原体的一个毒力相关因子。为了进一步研究脂蛋白 LppT 的功能,本试验拟获得 LppT 的体外表达产物并制备抗 LppT 的多克隆抗体,为深入研究 LppT 的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株、载体及实验动物 MHP168 菌株,由江苏省农业科学院兽医研究所提供,笔者所在实验室保存。原核表达质粒 pET-30a(+),大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3),由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所兽医室保存。新西兰大白兔,购自湖北省疫病预防控制中心。

1.1.2 主要试剂 质粒小量提取试剂盒购自 TIANGEN 公司;琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒购自 Omega 公司。DNA 聚合酶、核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。六联组氨酸纯化镍柱、山羊抗兔 IgG、HRP-DAB 底物显色试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 分别通过 SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 TMHMM(<http://www.>

收稿日期:2016-05-27

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0500906);国家自然科学基金(编号:31502069、31170160);湖北省农业科学院青年科学基金(编号:2015NKYJJ14);湖北省农业科学院竞争性计划项目(编号:2016jzxjh030);湖北省农业科技创新中心资助项目(编号:2015-620-004-001)。

作者简介:刘 威(1985—),男,湖北武汉人,博士,助理研究员,主要从事动物传染病研究工作。E-mail:liuwei85@126.com。

通信作者:田永祥,研究员,主要从事家畜主要疫病生物制剂的研制及综合防控技术研究。E-mail:tyxanbit@163.com。

cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) 预测 *LppT* 基因的信号肽序列和跨膜区,结果显示 *LppT* 不含有信号肽序列,但是存在 1 处跨膜区域,跨膜区域位于 9~31 位氨基酸。跨膜区的存在可能导致蛋白的不表达和少量表达,因此在设计引物时去掉了前 31 个氨基酸的跨膜区域。引物根据 Mhp168 株 *LppT* 基因的核苷酸序列设计(基因登录号:ADQ90626.1):上游引物 *LppT*-F:5'-TTTGGATCCATGTCCCAAGCCGAAAAAT-3',下游引物 *LppT*-R:5'-TTTCTCGAGTTATTCATATATTCGCT-3'。在上、下游引物中分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。

**1.2.2 重组表达载体的构建** 以猪肺炎支原体基因组 DNA 为模板,用 Primer Star DNA 聚合酶扩增目的基因。PCR 反应体系 50  $\mu$ L;DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,基因组 DNA 模板 1  $\mu$ L,Buffer 10  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 32.5  $\mu$ L。PCR 反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95  $^{\circ}$ C 变性 45 s,51  $^{\circ}$ C 退火 15 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 3 min,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳,观察电泳结果。回收纯化 PCR 目的条带。

对纯化的 PCR 产物和 pET-30a(+) 载体分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切,回收纯化的 pET-30a 片段和 *LppT* 片段,用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶进行连接。对重组质粒进行 PCR、双酶切及测序鉴定,将鉴定正确的重组质粒命名为 pET30a-*LppT*。

**1.2.3 *LppT* 的密码子改造** 通过 Atermis 软件对 *LppT* 基因的核苷酸序列进行分析发现,*LppT* 基因中存在 4 处密码子为 TGA,为了使 *LppT* 基因能在大肠杆菌中正确表达,设计了 4 对引物用于 *LppT* 基因的密码子改造(表 1),引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。密码子改造采用天根生化科技有限公司的快速定点突变试剂盒,按照说明书中操作流程依次对 *LppT* 中 4 处 TGA 进行单点突变,将完成密码子改造的重组质粒命名为 pET30a- $\Delta$ *LppT*。

表 1 *LppT* 基因密码子改造的引物序列

突变位点	引物名称	引物序列(5'→3')
513 bp	<i>LppT</i> -1F	TATTTTATAATGCTTGGCTAAAACGGT
	<i>LppT</i> -1R	CCAAGCATTATAAAATAAAATTGCTATT
945 bp	<i>LppT</i> -2F	CTAAATTTGAGTCCTGCTTTATTCAAA
	<i>LppT</i> -2R	CCAGGACTCAAATTTAGTTAAATC
1 860 bp	<i>LppT</i> -3F	ATTTATTCCTTGATTGGCGATCAAATAT
	<i>LppT</i> -3R	CCAATCAAGGAATAAATCGGTATTG
2 547 bp	<i>LppT</i> -4F	GGAAATTTTACGTGGAAGCCAAAAT
	<i>LppT</i> -4R	CCAGCTAAAAATTTTCCTTTTCCCT

**1.2.4 pET30a- $\Delta$ *LppT* 的诱导表达及目的蛋白纯化** 将鉴定正确的重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 表达菌中,以 IPTG 为诱导剂进行诱导表达。以空载体和未加 IPTG 的培养物为对照,进行 SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达情况;在确定原核重组蛋白可以稳定表达后,再次诱导 100 mL 重组菌,通过高压破碎仪破碎后,12 000 r/min 离心 10 min,将上清和沉淀分别煮样,进行 12% SDS-PAGE 检测,确定重组蛋白的表达形式。

将含有重组质粒 pET30a- $\Delta$ *LppT* 的 BL21(DE3) 菌株接种于含有卡那霉素的 LB 溶液中,37  $^{\circ}$ C 振荡培养至  $D_{600\text{nm}} = 0.6$ ,经 IPTG 诱导表达 4 h 后,离心收集菌体,用 PBS 溶液洗

涤并重悬沉淀,超声破碎细胞,离心收集上清,在上清中加入 Ni-NTA Agarose,4  $^{\circ}$ C 振摇 60 min 后将混合液装入纯化柱,分别用不同浓度的咪唑洗脱,采用 SDS-PAGE 分析蛋白洗脱情况,洗脱液经 0.01 mol/L PBST 溶液(pH 值 8.0)于 4  $^{\circ}$ C 透析 24 h 后获得纯化蛋白。采遥 SDS-PAGE 电泳分析纯化蛋白的纯度。

**1.2.5 *LppT* 脂蛋白的多克隆抗体的制备** 以纯化的 *LppT* 融合蛋白免疫新西兰大白兔,共免疫 5 次,每周免疫 1 次,每次免疫蛋白量约为 1 mg。免疫前于兔耳缘静脉取 2 mL 血作为阴性对照血清。首次免疫将纯化蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,以皮下多点注射的方式免疫。第 2、3、4、5 次免疫,采用弗氏不完全佐剂制备的免疫原以同样的注射方式进行免疫,每只兔免疫蛋白含量为 1 mg。最后一次免疫 10 d 后心脏采血。血样 4  $^{\circ}$ C 放置过夜,8 000 r/min 离心 10 min 得上清即为抗血清。

**1.2.6 多克隆抗体的效价测定** 采用间接 ELISA 法测定抗血清的效价。以免疫前健康兔血清作为阴性对照,将纯化的 *LppT* 融合蛋白用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 值为 9.6)稀释 20 倍,包被酶标板,4  $^{\circ}$ C 反应过夜。用 0.01 mol/L PBST 溶液洗涤 3 次,每次 5 min,加入封闭液(含 3% 脱脂奶粉的 PBST 溶液),37  $^{\circ}$ C 封闭 1 h,同上洗涤后加入用 PBST 连续倍比稀释( $100 \times 2^1 \sim 100 \times 2^{12}$ )的 *LppT* 多克隆抗体和阴性血清,每个梯度设置 3 个重复,37  $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,同上洗涤后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,37  $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,同上洗涤后加入 100  $\mu$ L 现配制的四甲基联苯胺(TMB)显色液,37  $^{\circ}$ C 显色 20 min,加入 100  $\mu$ L 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。通过酶标仪检测  $D_{450\text{nm}}$  值,每个梯度取平均值进行比较,若阳性与阴性的比值大于 2.0,则视为阳性,否则为阴性。

**1.2.7 多克隆抗体的特异性分析** 纯化的 *LppT* 融合蛋白通过 SDS-PAGE 分离后转印至 PVDF 膜上,将膜用 PBST 溶液淋洗后用 10 mL 3% 脱脂奶粉封闭 30 min,加入 1:10 000 稀释的 *LppT* 多克隆抗体 37  $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,用 PBST 溶液洗膜 3 次,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,洗膜 3 次后进行显色,将增强化学发光免疫印迹法检测底物(enhanced chemiluminescence Western Blotting detection substrate)A 和 B 液(Thermo)按照 1:1 的比例混合后,滴加至用滤纸吸干了的 PVDF 膜上,在化学发光成像系统中显色观察并保存图片。

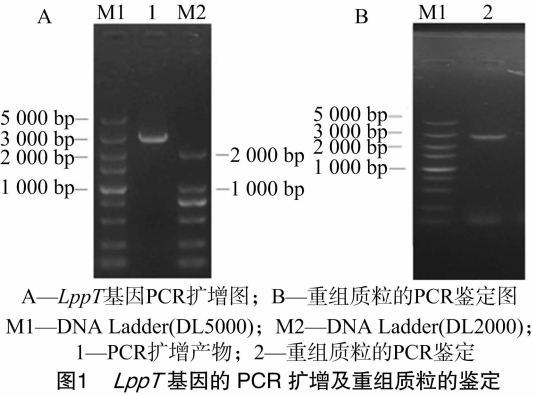
## 2 结果与分析

### 2.1 pET30a-*LppT* 重组载体的构建及鉴定

如图 1-A 所示,以猪肺炎支原体基因组 DNA 为模板,扩增出 *LppT* 目的基因,凝胶电泳检测发现在 2 800 bp 位置出现目的条带。将 *LppT* 连接至 pET-30a(+) 载体,获得重组质粒 pET30a-*LppT*,并对所构建的重组质粒进行 PCR 及测序鉴定。以重组质粒为模板,PCR 扩增后,出现大小为 2 800 bp 的目的条带(图 1-B),与预期大小相符。重组质粒进行测序,并与目的序列进行比对,比对结果提示重组质粒 pET30a-*LppT* 构建正确。

### 2.2 *LppT* 的密码子改造

采用天根生化科技有限公司的快速定点突变试剂盒依次将 *LppT* 基因中的 4 处终止密码子(TGA)突变为精氨酸



(TGG)。测序分析结果显示, *LppT* 基因中 513、945、1 860、

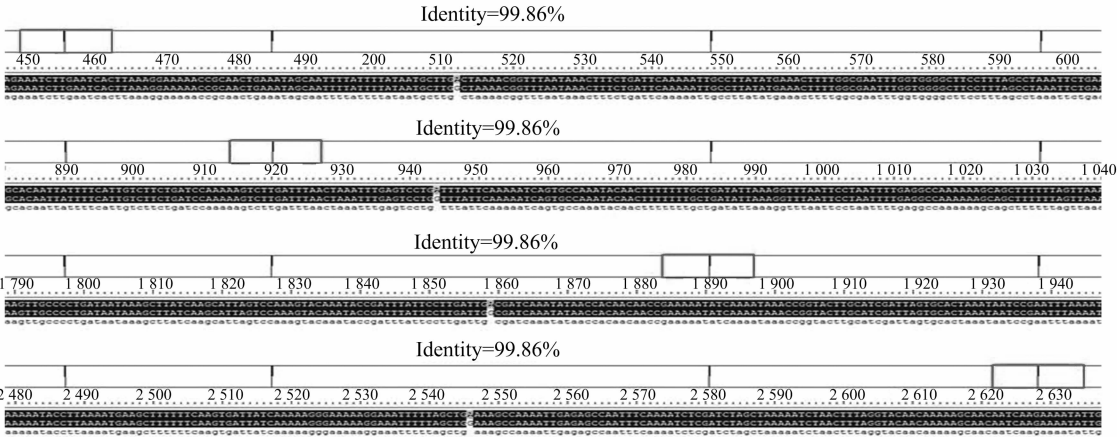


图2 密码子改造前后的序列比对

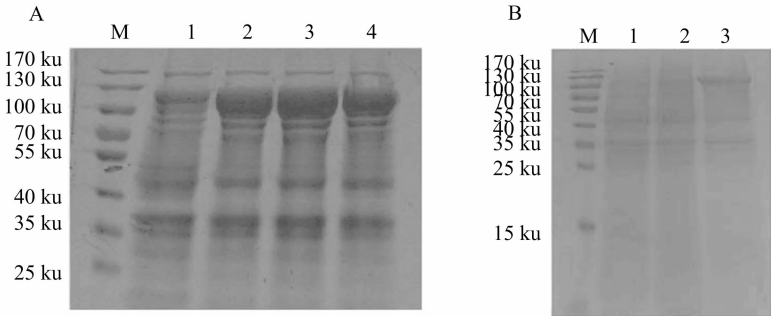


图3 *LppT* 融合蛋白的诱导表达和可溶性分析

2.4 融合蛋白的纯化

采用 Ni - NTA 亲和层析柱纯化上清中的 pET30a -  $\Delta LppT$  表达蛋白, SDS - PAGE 结果显示, 用不同浓度的咪唑洗脱可获得 1 条约为 110 ku 的特异性蛋白条带, 经透析后获得纯化的蛋白用于多克隆抗体的制备(图 4)。

2.5 抗血清效价的测定

以纯化的 *LppT* 蛋白为包被抗原, 免疫前的兔血清为阴性对照, 测定 *LppT* 抗体的效价。抗血清及免疫前血清按  $100 \times 2^1 (200) \sim 100 \times 2^{12} (409\ 600)$  连续倍比稀释, 结果显示抗体稀释  $100 \times 2^{12}$  倍时,  $D_{450\text{ nm}}$  阳性/ $D_{450\text{ nm}}$  阴性  $> 2.0$ , 说明该

2 547 bp 处的 A 成功突变为 G(图 2)。完成密码子改造的重组质粒命名为 pET30a -  $\Delta LppT$ 。

2.3 *LppT* 融合蛋白的诱导表达与可溶性分析

pET30a -  $\Delta LppT$  诱导表达产物的 SDS - PAGE 分析结果显示, 重组质粒 pET30a -  $\Delta LppT$  诱导表达后在约 110 ku 处有 1 条特异性条带, 而空载体对照质粒表达的蛋白中没有此带(图 3 - A)。诱导表达的 *LppT* 融合蛋白大小与理论值一致, 说明在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功诱导了 *LppT* 蛋白的表达。离心收集诱导表达后的含有 pET30a -  $\Delta LppT$  表达质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3), 取上清及沉淀分别进行 SDS - PAGE, 结果显示重组蛋白大小约为 110 ku, 主要存在于上清中, 在沉淀中肉眼无法观察到蛋白的表达, 提示重组蛋白主要以可溶的形式表达于上清中(图 3 - B)。

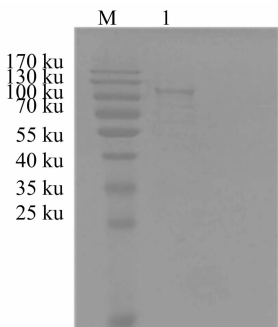
抗体效价大于 1 : 409 600。

2.6 多克隆抗体的特异性检测

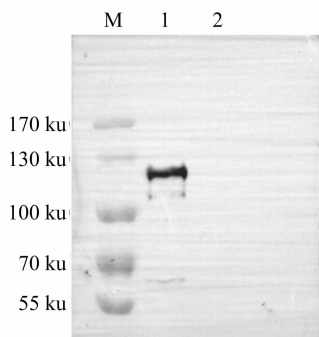
以制备的 *LppT* 多克隆抗体为一抗(1 : 10 000 倍稀释)对纯化的 *LppT* 融合蛋白进行 Western Blot 分析, 可以在 110 ku 左右检测到 1 条特异性条带, 条带大小与纯化蛋白大小一致(图 5), 表明制备的 *LppT* 多克隆抗体特异性良好。

3 讨论

支原体是一类缺少细胞壁的原核微生物, 宿主范围十分广泛, 可在多种动物以及植物体内寄生, 从而引起多种疾病。



M—maker; 1— $\text{Ni}^{2+}$ 柱亲和和层析纯化后的上清蛋白  
图4 LppT 蛋白的纯化



M—maker; 1—含抗LppT多克隆抗体的血清;  
2—阴性血清  
图5 Western blotting 检测抗 LppT 多克隆抗体的特异性

支原体感染往往并不导致致命的损伤,而是通过长期持续的感染,诱发机体产生免疫损伤和凋亡而导致病变的发生。几乎所有人和动物支原体都是通过最初的黏附从而实现在宿主体内的繁殖和感染。从现有研究报道来看,猪肺炎支原体毒力因子的研究和评价主要集中于黏附蛋白的筛选以及功能鉴定方面<sup>[11-14]</sup>。然而,猪肺炎支原体的致病机制十分复杂,仅仅筛选黏附相关的蛋白难以解释 Mhp 复杂的致病机制,是否存在其他与宿主细胞凋亡、宿主免疫损伤等相关的毒力因子尚未见报道。另一方面,猪肺炎支原体遗传操作系统极难构建<sup>[15]</sup>,给潜在毒力基因的功能验证造成了不小的阻力。

支原体的密码子使用与大肠杆菌有很大不同,UGA 在支原体中编码色氨酸,而在大肠杆菌中为终止密码子。如果要在大肠杆菌中表达支原体蛋白,就要进行相应的密码子突变。本研究通过 Atermis 软件对 *LppT* 基因的核酸序列进行分析,并采用定点突变的方法将 *LppT* 中的 TGA 突变为 TGG,使其能在大肠杆菌系统中正确表达。跨膜区域的存在往往会影响膜蛋白的表达,一方面大肠杆菌的膜区空间有限,最初表达的蛋白先挤占了膜空间,并通过某种方式反作用于蛋白的翻译过程和翻译后的加工过程,抑制膜蛋白的过多表达,从而利于大肠杆菌的生存。脂蛋白 LppT 是一种跨膜蛋白,跨膜区位于 N 端,且这个跨膜区包含 31 个氨基酸,C 端可能才是其重要的功能区域。因此本研究忽略了 N 端跨膜区对整个蛋白功能的影响,通过 PCR 扩增去掉 *LppT* 的 N 端跨膜区序列,避免了跨膜区域的存在对蛋白表达的影响。综上,本研究以前期比较基因组学研究中发现的候选毒力相关基因 *LppT* 为研究对象<sup>[8]</sup>,通过体外克隆、密码子改造、原核表达、蛋白纯化、多抗制备,最终获得了抗 LppT 的多克隆抗体,并且抗体效价

达到了 1 : 409 600,同时多抗可以特异性地识别 LppT 融合蛋白,该多克隆抗体的获得为在体外试验中深入研究 LppT 的蛋白功能提供了支撑。

#### 参考文献:

- [1] Minion F C, Lefkowitz E J, Madsen M L, et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (21): 7123 - 7133.
- [2] Maes D, Segales J, Meyns T, et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 126 (4): 297 - 309.
- [3] 邵国青, 刘茂军, 靳 岷. 检测猪肺炎支原体抗体间接 ELISA 方法的建立[J]. *江苏农业学报*, 2007, 23 (5): 437 - 441.
- [4] 叶宝宏, 杨 柳. 猪肺炎支原体的免疫学研究现状[J]. *榆林学院学报*, 2009 (2): 10 - 13.
- [5] Ciprián A, Pijoan C, Cruz T, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia[J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1988, 52 (4): 434 - 438.
- [6] Woeste K, Grosse B E. Transmission of agents of the porcine respiratory disease complex (PRDC) between swine herds: a review. Part 1—diagnosis, transmission by animal contact[J]. *Dtsch Tierärztliche Wochenschrift*, 2007, 114 (9): 324 - 326, 328 - 337.
- [7] Weisburg W G, Tully J G, Rose D L, et al. A phylogenetic analysis of the *Mycoplasmas*: basis for their classification [J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171 (12): 6455 - 6467.
- [8] Liu W, Feng Z, Fang L, et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (4): 1016 - 1017.
- [9] Liu W, Xiao S, Li M, et al. Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high - passaged attenuated strain[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 80.
- [10] Zimmermann L, Peterhans E, Frey J. RGD motif of lipoprotein T, involved in adhesion of *Mycoplasma conjunctivae* to lamb synovial tissue cells [J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (14): 3773 - 3779.
- [11] Minion F C, Adams C, Hsu T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia [J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68 (5): 3056 - 3060.
- [12] 丁丽娟, 贺莉娜, 郑 英, 等. 黏蛋白在良、恶性宫颈病变中的表达及其临床意义[J]. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2015, 36 (1): 11 - 15.
- [13] Seymour L M, Jenkins C, Deutscher A T, et al. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin (ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface[J]. *Cellular Microbiology*, 2012, 14 (1): 81 - 94.
- [14] 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.
- [15] Maglennon G A, Cook B S, Matthews D, et al. Development of a self - replicating plasmid system for *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. *Veterinary Research*, 2013, 44: 63.