

分类号:

学 号: 20222113048

密 级: 公开

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 牛支原体 LAMP-LFD 及间接 ELISA 方法的建立

学 位 申 请 人

王雅茜

指 导 教 师

陈创夫 教授

朱良全 研究员

申 请 学 位 级 别

专业硕士

专 业 名 称

兽医

研 究 方 向

动物疫病防控与检疫

所 在 学 院

石河子大学动物科技学院

中国·新疆·石河子

2025 年 6 月

分类号：  
学 号：20222113048

密 级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 牛支原体 LAMP-LFD 及间接 ELISA 方法的建立

学 位 申 请 人	王雅茜
指 导 教 师	陈创夫 教授 朱良全 研究员
申 请 学 位 级 别	专业硕士
专 业 名 称	兽医
研 究 方 向	动物疫病防控与检疫
所 在 学 院	石河子大学动物科技学院

中国·新疆·石河子

2025 年 6 月

**Development of LAMP-LFD and Indirect ELISA Methods for  
Mycoplasma bovis Detection**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Veterinary**

**By**

**Wang Yaqian**

**(Animal disease prevention and control and quarantine)**

Dissertation Supervisor: Prof. Chen chuangfu; PI. Zhu liangquan

June, 2025

Shihezi, Xinjiang, China

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：王雅迪

时间：2025年5月25日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：王雅迪

时间：2025年5月25日

导师签名：王雅迪

时间：2025年5月25日

# 课题来源

课题来源：国家重点研发计划“草食家畜重要疫病鉴别诊断技术与产品的研发” 2022YFD1800703；

国家重点研发计划“疫苗质量控制体系及疫苗评价技术研究” 2022YFD1800903。

河北省重点研发计划项目（21322912D）。

石河子大学高层次人才科研启动项目（RCZK202456）。

新疆维吾尔自治区“天池英才(青年博士)”计划。

## 摘要

牛支原体 (*Mycoplasma bovis*, *M. bovis*) 是牛呼吸道疾病综合征重要病原, 主要引起牛肺炎、乳腺炎和关节炎等疾病, 在临床中与易其他病原发生混合感染或继发感染, 给我国养牛业造成巨大经济损失。

目的: 本研究针对抗原抗体两方面分别建立牛支原体检测方法, 实现牛支原体病的快速有效诊断, 为其防控和流行病学调查提供技术支撑。

方法: (1) 以牛支原体膜蛋白 *P48* 特异性基因保守区域为靶标基因片段, 设计环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 引物。通过荧光染料法与 *oppD/F*、*oppD*、*urvC* 为靶基因的 LAMP 引物进行比较。对 *P48* 引物组的内引物 (FIP/BIP) 分别用生物素和 6-羧基荧光素标记, 使 LAMP 与横向流动试纸条 (Lateral flow dipstick, LFD) 进行结合; 利用单一控制变量法对反应温度、时间和引物浓度比优化。评价该方法敏感性、特异性、重复性及临床应用效果。(2) 利用重叠 PCR 法将牛支原体 *P81* 基因片段中 165bp, 690bp, 1455bp, 1674bp 位置的 A 碱基突变为 G 碱基, 再进行各片段连接, 组装成 *P81* 全长基因。通过 MEGA11 和 NCBI 数据库分析 *P81* 基因保守性。借助生物信息学软件预测 *P81* 蛋白的二级结构和 3D 结构, 同时对该蛋白亲水性、柔韧性、表面可极性和潜在抗原表位预测和分析。原核表达纯化重组 *P81* 蛋白, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。(3) 用重组 *P81* 蛋白建立间接 ELISA 方法, 采用棋盘法筛选优化确定蛋白包被浓度、封闭液选择、血清稀释比例、酶标二抗稀释比例、封闭时间、血清孵育时间、酶标二抗孵育时间、显色时间。利用 ROC 曲线确定间接 ELISA 方法临界 (Cut-off) 值, 评价该方法敏感性、特异性以及重复性, 对临床样品检测效果进行评估。

结果: (1) 本研究成功建立牛支原体 *P48* 基因 LAMP-LFD 检测方法。该方法的 *P48* LAMP 引物组优于已报道的 LAMP 引物组; 当反应温度为 60°C、引物 (F3/B3:FIP/BIP) 浓度比为 1:4、反应时间为 40 min 时为最佳反应条件; 最低检测核酸浓度为 17.28 fg/μL, 比行业标准 PCR 检测方法灵敏 1000 倍; 与引起牛呼吸道疾病相关病原体核酸样品均无交叉反应; 批间与批内试验均一致; 运用该方法检测 39 份临床鼻拭子样品, 检出率为 28.21%, 高于行业标准的 PCR 法 (检出率 23.07%)。

(2) *P81* 基因序列比对结果发现该基因在牛支原体中高度保守。通过二级结构预测发现 *P81* 蛋白包括 40 个 α 螺旋, 42 个 β 折叠, 14 个转角结构、22 个无规则卷曲。其次, *P81* 蛋白的亲水指数较高, 存在较多高抗原指数区域。SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果表明, *P81* 蛋白为可溶性表达蛋白, 蛋白大小约 100 kDa, 且该蛋白能与牛支原体阳性血清发生特异性反应, 具有良好的反应原性。(3) 以重组 *P81* 蛋白为靶抗原, 成功建立了间接 ELISA 方法。最佳抗原包被浓度为 2 μg/mL; 最佳血清稀释倍数为 1:100, 作用时间为 45 min; 最佳封闭剂为 5% BSA, 封闭时间为 150 min; 最佳酶标二抗稀释倍数为 1:500, 作用时间为 75 min; 最佳显色时间为 10 min; 临界值为 0.1281; ELISA 检测

最大稀释倍数为 3200 倍；与牛多杀性巴氏杆菌等 8 种病原阳性血清均无交叉反应；批间与批内试验变异系数均小于 10%；275 份牛血清样品检测显示阳性率为 65.09%（179/275），其检出率与商品化进口牛支原体检测试剂盒结果符合率为 97.20%。

结论：（1）本研究基于牛支原体 *P48* 基因保守片段，成功建立了敏感性高，特异性强的牛支原体抗原检测 LAMP-LFD 检测方法。（2）成功表达并纯化鉴定具有较好反应原性的牛支原体 P81 蛋白。（3）基于 P81 蛋白成功建立牛支原体抗体间接 ELISA 检测方法，具有较好敏感性和特异性。综上所述，本研究分别从抗原抗体两方面建立牛支原体检测方法，能够为筛选抗原抗体双阴性动物、疫病诊断和监测、疫苗评价提供技术支撑。

**关键词：**牛支原体；*P48* 基因；P81 蛋白；LAMP-LFD；间接 ELISA

## Abstract

*Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) is an important pathogen of bovine respiratory disease syndrome, primarily causing bovine pneumonia, mastitis, arthritis, and other diseases. In clinical practice, it often co-infects or causes secondary infections with other pathogens, resulting in significant economic losses to China's cattle industry.

**Objective:** This study aimed to establish detection methods for *M. bovis* antigens and antibodies, enabling rapid and effective diagnosis of *M. bovis* and providing technical support for its prevention, control, and epidemiological investigation.

**Methods:**(1) LAMP primers were designed based on the conserved region of the *M. bovis* membrane protein *P48* specific gene as the target gene fragment. The LAMP primers, including *oppD/F*, *oppD*, and *urvC*, were compared using a fluorescent dye method. The inner primers (FIP/BIP) of the *P48* primer group were labeled with biotin and 6-carboxyfluorescein, respectively, to bind LAMP to LFD. The reaction temperature, time, and primer concentration ratio were optimized using the single-variable control method. The sensitivity, specificity, repeatability, and clinical applicability of the method were evaluated.(2) The A base at 165bp, 690bp, 1455bp, and 1674bp in the *P81* gene fragment of *M. bovis* was mutated to G base using overlapping PCR, and each fragment was ligated to assemble the full-length P81 gene. The conservation of the *P81* gene was analyzed using MEGA11 and the NCBI database. Secondary structure and 3D structure predictions of the P81 protein were made using bioinformatics software, and hydrophilicity, flexibility, surface polarity, and potential epitopes of the protein were predicted. The recombinant P81 protein was purified through prokaryotic expression and identified by SDS-PAGE and Western blot.(3) An indirect ELISA method was developed using the recombinant P81 protein. The optimal antigen coating concentration, blocking solution selection, serum dilution ratio, enzyme-labeled secondary antibody dilution ratio, blocking time, serum incubation time, enzyme-labeled secondary antibody incubation time, and color development time were optimized using the checkerboard method. The ROC curve was used to determine the cut-off value for the indirect ELISA method. The sensitivity, specificity, and repeatability of the method were evaluated, and the clinical sample detection performance was assessed.

**Results:**(1) The LAMP-LFD detection method for the P48 gene of *M. bovis* was successfully established. The P48 LAMP primer set developed in this study was superior to previously reported sets. The best reaction conditions were achieved at a reaction temperature of 60°C, with a primer (F3/B3:FIP/BIP) concentration ratio of 1:4 and a reaction time of 40 minutes. The minimum detection concentration of nucleic acid was 17.28 fg/μL, which was 1000 times more sensitive than the

industry-standard PCR detection method. There was no cross-reaction with nucleic acid samples from pathogens associated with bovine respiratory diseases. Both inter-batch and intra-batch tests were consistent. This method was used to detect 39 clinical nasal swab samples, with a detection rate of 28.21%, which was higher than the detection rate of the industry-standard PCR method (23.07%).(2) Sequence alignment of the P81 gene showed that it was highly conserved in *M. bovis*. Secondary structure prediction revealed that the P81 protein contained 40  $\alpha$ -helices, 42  $\beta$ -sheets, 14 turns, and 22 random coils. The hydrophilic index of P81 was high, with several regions showing strong antigenic potential. SDS-PAGE and Western blot results indicated that the P81 protein was a soluble expression product with a size of approximately 100 kDa and specifically reacted with *M. bovis* positive serum, demonstrating good immunoreactivity.(3) An indirect ELISA method using recombinant P81 protein as the target antigen was successfully developed. The optimal antigen coating concentration was 2  $\mu\text{g/mL}$ , and the optimal serum dilution ratio was 1:100, with an incubation time of 45 minutes. The best blocking agent was 5% BSA, with a blocking time of 150 minutes. The optimal dilution ratio for the enzyme-labeled secondary antibody was 1:500, with a reaction time of 75 minutes. The best chromogenic time was 10 minutes, with a cutoff value of 0.1281. The maximum dilution of the ELISA was 3200-fold. No cross-reaction was observed with eight types of pathogenic positive serum, including *Pasteurella multocida* in cattle. The coefficient of variation for both inter-batch and intra-batch tests was less than 10%. Testing of 275 bovine serum samples showed a positive rate of 65.09% (179/275), and the detection results were 97.20% consistent with those of a commercial imported *M. bovis* detection kit.

**Conclusion:**(1) A high-sensitivity and high-specificity LAMP-LFD detection method for *M. bovis* antigen was successfully developed based on the conserved fragment of the *P48* gene.(2) The P81 protein of *M. bovis* with good immunoreactivity was successfully expressed and purified.(3) An indirect ELISA method for detecting *M. bovis* antibodies was successfully established based on P81 protein, with excellent sensitivity and specificity.

In conclusion, this study established two detection methods for *M. bovis*—for antigen and antibody—which can provide technical support for screening antigen-antibody double-negative animals, disease diagnosis and monitoring, and vaccine evaluation.

**Key words:** *Mycoplasma bovis*; *P48* gene; P81 protein; LAMP-LFD; indirect ELISA

# 目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
英文缩略表.....	VIII
第1章 绪论.....	1
1.1 牛支原体的研究进展.....	1
1.1.1 生物学特征和培养特性.....	1
1.1.2 流行病学.....	2
1.1.3 临床症状和病理变化.....	2
1.1.4 致病机理.....	3
1.2 诊断方法.....	3
1.2.1 病原诊断.....	3
1.2.2 分子生物学诊断.....	3
1.2.3 血清学诊断.....	5
1.3 研究目的及意义.....	6
1.4 技术路线.....	7
第2章 牛支原体抗原核酸 LAMP-LFD 方法的建立.....	8
2.1 材料.....	9
2.1.1 菌株来源.....	9
2.1.2 主要试剂.....	9
2.1.3 主要仪器.....	10
2.2 方法.....	10
2.2.1 菌株的复苏与培养.....	10
2.2.2 病原核酸提取.....	10
2.2.3 LAMP 引物设计.....	11
2.2.4 引物筛选.....	11
2.2.5 LAMP 反应体系和条件优化.....	12
2.2.6 牛支原体 LAMP-LFD 方法的建立.....	12
2.2.7 特异性试验.....	12
2.2.8 敏感性试验.....	12
2.2.9 重复性试验.....	13
2.2.10 临床样本检测.....	13
2.3 结果.....	13

2.3.1 LAMP 引物筛选结果 .....	13
2.3.2 条件优化结果 .....	14
2.3.3 LAMP-LFD 结果判读 .....	15
2.3.4 特异性结果 .....	15
2.3.5 敏感性结果 .....	16
2.3.6 重复性结果 .....	18
2.3.7 临床样本检测结果 .....	18
2.4 讨论 .....	19
2.5 小结 .....	20
第 3 章 牛支原体 P81 蛋白结构预测、表达、纯化及鉴定 .....	21
3.1 材料 .....	22
3.1.1 菌株来源 .....	22
3.1.2 主要试剂 .....	22
3.1.3 主要仪器 .....	23
3.2 方法 .....	23
3.2.1 病原核酸提取 .....	23
3.2.2 引物设计 .....	23
3.2.3 目的基因扩增 .....	24
3.2.5 P81 蛋白预测 .....	25
3.2.6 pET-32a-P81 重组表达载体的构建与鉴定 .....	25
3.2.7 重组 P81 蛋白的表达、纯化与鉴定 .....	27
3.3 结果 .....	29
3.3.1 牛支原体 <i>P81</i> 基因扩增 .....	29
3.3.2 <i>P81</i> 基因序列分析 .....	30
3.3.3 <i>P81</i> 蛋白预测 .....	31
3.3.4 重组表达载体 pET-32a-P81 的构建及鉴定 .....	34
3.3.5 重组 P81 蛋白表达、纯化与鉴定 .....	34
3.4 讨论 .....	36
3.5 小结 .....	37
第 4 章 牛支原体重组 P81 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立 .....	38
4.1 材料 .....	39
4.1.1 血清、抗原 .....	39
4.1.2 主要试剂 .....	39
4.1.3 主要仪器 .....	39

4.2 方法 .....	40
4.2.1 ELISA 基本步骤 .....	40
4.2.2 反应条件优化 .....	40
4.2.3 临界值确定 .....	41
4.2.4 特异性验证 .....	42
4.2.5 敏感性验证 .....	42
4.2.6 重复性验证 .....	42
4.2.7 临床应用 .....	42
4.2.8 数据处理与分析 .....	43
4.3 结果 .....	43
4.3.1 反应条件优化 .....	43
4.3.2 检测临界值 .....	47
4.3.3 特异性 .....	48
4.3.4 敏感性 .....	49
4.3.5 重复性 .....	50
4.3.6 临床应用 .....	50
4.4 讨论 .....	51
4.5 小结 .....	52
第 5 章 全文总结 .....	53
参考文献 .....	54
附录 A 牛支原体培养示意图 .....	67
附录 B 天根细菌 DNA 基因组试剂盒说明书 .....	68
附录 C P81 序列比对及序列 .....	69
致谢 .....	72
作者简介 .....	73
导师评阅表 .....	74

## 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文全称
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
ddH <sub>2</sub> O	double distilled H <sub>2</sub> O	双蒸水
Amp	Ampicillin	氨苄西林
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸缓冲液
PBST	Phosphate Buffered Solution	含吐温-20 的磷酸盐缓冲液
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定
<i>M. bovis</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>	牛支原体
BRDC	Bovine Respiratory Disease	牛呼吸疾病综合征
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导等温扩增技术
LFD	Lateral flow dipstick	横向流动试纸条
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
RPA	Recombinase Polymerase Amplification	重组酶聚合酶扩增
GICA	Colloidal Gold Immunochromatographic Assay	胶体金免疫层析技术

## 第 1 章 绪论

### 1.1 牛支原体的研究进展

牛支原体 (*M. bovis*) 能导致各年龄段的牛出现乳腺炎、关节炎和肺炎等临床症状<sup>[1]</sup>。其中有研究学者普遍认为,牛支原体是犊牛和青年牛发生牛呼吸道疾病 (BRD) 的重要促成因素和病原学因子<sup>[2,3,4]</sup>。与许多参与 BRD 发展的牛细菌病原体一样,牛支原体被认为是寄生在健康动物上呼吸道的常在菌,当入侵下呼吸道粘膜表面时才会导致疾病发生<sup>[7]</sup>。

牛支原体在世界范围内广泛流行,最早被美国发现和报道 (1961 年)<sup>[5]</sup>。随后我国也在 1983 年相继分离到牛支原体<sup>[6,8]</sup>。至此,在我国畜牧养殖规模较大的地区均有牛支原体相关报道<sup>[9,10,11]</sup>。

#### 1.1.1 生物学特征和培养特性

牛支原体 (*M. bovis*) 一类以没有细胞壁为特征的细菌,小而多形性。电镜下仅可见外层为细胞膜,中间层由脂质构成,细胞质内有核糖体<sup>[12]</sup>。2010 年公布了牛支原体标准株 PG45 的全基因组序列,它的大小约为 1080 kb,只有典型细菌基因组大小的 20%~40%。

牛支原体基因组 G+C 比值较低,大约为 27.8~32.9%<sup>[13]</sup>。该细菌具有复杂的营养需求,缺乏三羧酸循环 (TCA),依赖宿主获得脂质、氨基酸、核酸前体等<sup>[14,15,17]</sup>,并且不能发酵葡萄糖<sup>[16]</sup>。

牛支原体在 pH 为中性条件下生长最佳,当 pH 小于 7.0 时,极易发生死亡<sup>[17]</sup>。在液体培养基中培养时,生长期与细菌一致也分为四个时期,但比细菌生长时间长,生长周期有 24 h-48 h<sup>[15]</sup>。在固体培养基生长所需时间更长,通常需要 3~4 天才能出现典型的“煎蛋状”菌落形态<sup>[6,19]</sup>。

牛支原体对温度非常敏感,在较高温度下,存活率较低 (60°C 5 min 灭活),但在海绵和牛奶中,4°C 可存活 2 个月,在水中能存活 2 周以上<sup>[20]</sup>。由于牛支原体没有细胞壁,其细胞膜直接暴露于宿主环境中,易遭受渗透性休克<sup>[18]</sup>。因此对抑制肽聚糖合成的  $\beta$ -内酰胺家族抗菌剂具有耐药性,但对影响蛋白以及核酸合成的抗生素药物敏感<sup>[21,22,23,24,25,26]</sup>。

### 1.1.2 流行病学

牛支原体的传播途径广泛，可通过直接或间接接触进行传播。其中临床中健康犊牛可以在没有出现呼吸道症状的情况下，将呼吸道携带的牛支原体，通过鼻分泌物排出体外数月或数年<sup>[18]</sup>。而雄性动物和雌性动物可通过生殖道进行传播，同时牛支原体也可以通过人工授精的方式引起传播<sup>[27,29,30]</sup>。在临床上健康奶牛可以通过牛奶来传播牛支原体，这也是哺乳犊牛感染牛支原体的主要来源之一<sup>[28]</sup>。

临床中牛支原体常与其他病原微生物如牛腺病毒、BVDV、多杀性巴氏杆菌、溶血性曼氏杆菌、化脓性隐杆菌等发生混合感染<sup>[31]</sup>。当发生混合感染时，通常会引发更严重的临床症状<sup>[32]</sup>。

我国自1983年首次发现牛支原体感染后，牛支原体在我国的流行率居高不下，并且存在逐年递升的趋势<sup>[33,34]</sup>。韩林梅对广西地区牛呼吸道综合征的病原进行流行病学调查发现，牛支原体阳性率为30.86%<sup>[35]</sup>。张晓宇对我国30个养殖场的乳用犊牛呼吸道综合征相关病原学进行调查，其中牛支原体整体阳性率为47.0%。而国外牛支原体感染也引起了严重的影响<sup>[2]</sup>。例如在丹麦地区，牛支原体的感染率在牛呼吸道疾病综合征病原中占据首位，阳性率达67.4%<sup>[37]</sup>。

### 1.1.3 临床症状和病理变化

牛支原体感染主要引起的临床症状包括肺炎、关节炎、乳腺炎、中耳炎等，其中较为常见的是肺炎和乳腺炎<sup>[38]</sup>。牛支原体肺炎能够引起各年龄段的牛出现临床症状，其临床症状无特异性，包括发热、呼吸急促、呼吸困难、食欲下降、体重增加速度减慢、或不伴有流鼻涕和咳嗽等<sup>[3,40,41,42]</sup>。其中自然感染的牛会产生以急性坏死性支气管肺炎为特征的肺部病变，通常呈颅腹侧分布，这与其他形式的支气管肺炎不同，因为在合并区域内会存在独特的多个圆形易碎的干酪样坏死灶<sup>[43,44,45,46]</sup>。

发生乳腺炎症状的牛，在第14天就会出现肺泡间结缔组织增生，浆细胞、淋巴样细胞弥漫性浸润。腺泡停止分泌乳汁<sup>[48]</sup>。而第28天，感染和未感染的乳房都变硬、结实，乳池粘膜增厚且不均匀<sup>[47,49]</sup>。

关节炎型的病牛常患有多发性关节炎<sup>[47]</sup>，患病牛通常不能负重，关节肿胀和疼痛，在患部可见关节间隙纤维蛋白脓性渗出物，软骨糜烂，并被息肉样肉芽组织取代，在显微镜下可见滑膜下炎性细胞浸润及血管血栓的形成<sup>[47,45]</sup>。

### 1.1.4 致病机理

牛支原体在宿主呼吸道黏膜上进行粘附来入侵上呼吸道，而具有黏附功能的膜蛋白是牛支原体在宿主体内定植和存活的关键<sup>[50]</sup>。粘附特性的改变可能会使支原体从“局部”感染阶段转变为“全身”阶段，从而产生不同的临床疾病表现<sup>[50]</sup>。牛支原体可以侵入非吞噬性宿主细胞，从而抵抗宿主防御，并建立慢性感染<sup>[53]</sup>。

牛支原体具有入侵并在宿主细胞内存活的能力，使其能抵御宿主自身的免疫反应。有研究证明，牛支原体可以侵入牛外周血单个核细胞（PBMC），来帮助其在宿主体内存活<sup>[52]</sup>。另一方面，牛支原体的表面膜蛋白，包括 Vsp 等，能够与宿主的免疫系统相互作用，通过诱导炎性细胞因子，从而抑制免疫应答<sup>[51,52]</sup>。

## 1.2 诊断方法

### 1.2.1 病原诊断

病原诊断常是通过从具有病变器官或常见携带病原部位采集的样本进行支原体培养。但是由于牛支原体结构简单，不能自我合成必需氨基酸，需要 pH 为 7.3-7.8 的高富集生长培养基中才能成功分离培养<sup>[54,55,56]</sup>。而牛支原体的培养最好在特定 PPLO 培养基中或在添加青霉素的支原体液体培养基中进行，温度需要在 37°C，5-10%的 CO<sub>2</sub> 条件下进行<sup>[58]</sup>。由于牛支原体生长相对缓慢<sup>[54]</sup>，只有在 4-6 天后所有培养基中均未观察到牛支原体才能明确地确诊为阴性<sup>[59]</sup>。

### 1.2.2 分子生物学诊断

#### 1.2.2.1 聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction, PCR）

常用的牛支原体实验室诊断技术为 PCR 检测技术，它比病原学检测大大节省鉴定牛支原体的时间，检测结果也更加准确、特异<sup>[55]</sup>。目前通过技术的不断发展，将普通 PCR 技术进行优化改进，出现了许多由 PCR 技术衍生出更加灵敏和特异的检测方法，并将这些方法应用于牛支原体的诊断中<sup>[60,62,61,63]</sup>。

1997 年首次使用 16S rRNA 序列对牛支原体进行 PCR 检测，但无法将牛支原体与无乳支原体区分开来<sup>[64]</sup>。后续通过选择牛支原体特异性基因 *urvC*<sup>[65]</sup>、*oppD/F*<sup>[66]</sup> 基因等来鉴别牛支原体。在 2001 年 Pinnow 等人通过建立的巢式 PCR 可鉴定出使用防腐剂处