

肺炎支原体 P1 蛋白的制备及其应用的初步研究

汪小五,曾宪聪,陈伟,王林定

摘要 目的 研究肺炎支原体(MP)特异性抗原免疫反应性及检测合肥地区138份儿童血清样本感染MP的情况,并初步分析其危险因素。方法 构建含rP1-513基因的克隆和表达质粒分别命名为T-rP1-513和PQE-80L-rP1-513。诱导PQE-80L-rP1-513重组菌蛋白表达。Western blot法检测其免疫反应性和ELISA法筛选血清样本感染MP的阳性标本。结果 Western blot法检测约30 ku的rP1-513蛋白有免疫反应性。ELISA法筛选出34份阳性血清,同时用商业MP ELISA试剂盒检测出24份阳性血清,两种P1蛋白作为抗原ELISA检测法检出率分别为24.6%和17.4%,且两个检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。MP感染与C-反应蛋白有显著相关性,但与性别、年龄、白细胞无相关性。结论 初步证明rP1-513蛋白具有免疫反应性,且以此蛋白构建的ELISA法有较高的灵敏度和特异性,为临床诊断MP提供一定的帮助。

关键词 肺炎支原体; rP1-513蛋白; 儿童; 危险因素

中图分类号 R 375

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1709-05

2014-08-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81271837);安徽省教育厅自然科学基金(编号:KJ2012A161);安徽医科大学博士科研经费资助项目(编号:XJ200914)

作者单位: 安徽医科大学微生物学教研室,合肥 230032

作者简介: 汪小五,女,硕士研究生;

王林定,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wan-glinding@ahmu.edu.cn

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*,MP)是一种常见的感染儿童呼吸道引起疾病的病原体,其感染有3~4年的不规则的流行周期^[1]。MP不仅仅局限于感染呼吸道引起急性呼吸道感染性疾病,还可能会导致多器官的肺外并发症如神经系统、皮肤、胃肠道等,严重者可呈多器官衰竭而出现死亡^[2]。目前对MP的致病机制尚不明确,其临床诊断方法存在不一致性,很多学者^[3~6]为找到快速、特异、灵敏的方法而做了很多努力。该研究通过构建rP1-513蛋白,研究该蛋白为包被抗原ELISA法与灵敏度及特异性,并分析感染MP的危险因素,为临床诊断提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 收集2013年8月~2014年4月源于安徽医科大学第一附属医院儿科儿童血清样本138份(其中确诊感染MP28例),并由其提供MP患者阳性血清和阴性对照血清。-80℃保存样本。

1.1.2 材料来源 PQE-80L表达载体、大肠杆菌DH5a、BL21(DE3)由本实验室保存;PMD-18-T克隆载体(日本TaKaRa公司);Ni-NTA(美国GE公司);MP(FH,ATCC15531)标准菌株(美国ATCC公司)。

4 weeks. Those rats were killed at corresponding time point. Before killing the blood and urine was stored to examine biochemical of renal function and urine osmolality. The kidney tissues were stripped to cortex and medulla. Renal tubular ultrastructure and the expression of AQP2 were respectively examined with electron microscope and Western blot. The levels of ADH in the serum were detected by ELISA. **Results** ① Electron microscope results indicated the mainly change of the rat kidney was the renal tubular injury, especially the 5 days in the tail-suspension groups. ② Western blot showed that contrasted with the control group, AQP2 changed significantly during simulated weightlessness ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while in 5 days tai-suspended rats changed the most obviously ($P < 0.01$). ③ The urine osmolality of the simulated weightlessness 5 days group was significantly higher than the others ($P < 0.01$), while for ADH and renal function there was no statistical difference. ④ The expression of AQP2 was positively correlated with urine osmolality ($r = 0.468$, $P = 0.003$). **Conclusion** The expression of AQP2 on rats renal tubular is increased when induced by simulated weightlessness, and reach peak at 5 days.

Key words simulated weightlessness; renal tubular; aquaporin 2

1.1.3 主要试剂 BamH I、Sal I (日本 TaKaRa 公司); 质粒小抽提取试剂盒(美国 Axygen 公司); PVDF 膜(美国 Bio-Rad 公司); 辣根(HRP) 标记山羊抗人 IgG 抗体(武汉博士德生物有限公司); MP 快速培养试剂盒(珠海迪尔生物工程有限公司)。细胞基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化有限公司)。

1.1.4 引物 rP1-513 基因引物由上海生物工程有限公司合成(参照文献^[3]设计)。上游引物: P1-5'-TTGGATCCAAGGGGTGTGGCGGA-3'(下划线部分为限制性内切酶 BamHI 酶切位点); 下游引物: P2-5'-TCGTCGACGGTGGAGGAGGTGTTTC-3'(下划线部分为限制性内切酶 SalI 酶切位点)。

1.2 rP1-513 蛋白制备

1.2.1 MP 标准菌株的培养 按照 MP 快速培养试剂盒说明书操作, 每日观察颜色的变化, 待培养液由红色变成黄色时终止培养。

1.2.2 rP1-513 基因的制备 MP FH 型标准菌培养后按照细胞基因组 DNA 提取试剂盒的说明提取 DNA, 以此 DNA 为总模板进行 PCR 扩增。扩增程序: 95 °C 变性 5 min, 然后 94 °C 1 min, 71 °C 30 s, 72 °C 1 min, 热循环 35 次, 最后 72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物, 以 DL 2000 DNA Marker 为参照, 切胶回收目的条带。

1.2.3 含目的基因重组质粒 T-rP1-513 和 PQE-80L-rP1-513 的构建 切胶回收的目的条带与 PMD-18-T 克隆载体连接。反应体系 10 μl 为: PMD-18-T 载体 1 μl, DNA 模板 7 μl, T₄ 连接酶 1 μl, 10 × Buffer 1 μl。置 14 °C 过夜后终止反应。重组 T 质粒 DNA 转入宿主大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 转种于铺有氨苄(Amp) 抗性和 8 μl 500 mmol/L IPTG 40 μl 20 mg/ml 半乳糖苷酶混合液的 LB 固体培养基平板上, 倒置于 37 °C 恒温培养过夜(蓝白斑筛选)。次日选取白斑单个菌落在含 Amp 的 LB 培养液 37 °C 培养过夜后用 30% 甘油 -80 °C 保存菌种 1 ml。BamH I、Sal I 双酶切质粒并基因测序鉴定构建的重组质粒 T-rP1-513。确认其正确后将质粒 BamH I、Sal I 双酶切回收目的基因条带, 同构建 T-rP1-513 质粒的过程构建 PQE-80L-rP1-513, 其利用的载体是 PQE-80L 表达载体, 连接产物转入的是宿主大肠杆菌 BL21 感受态细胞。同样 BamH I、Sal I 双酶切质粒并基因测序鉴定构建的重组质粒 PQE-80L-rP1-513(测序结果由上海生物工程有限公司提供)。

1.2.4 目的蛋白表达及纯化 -80 °C 取出重组质粒 PQE-80L-rP1-513 转化菌 3 μl 接种于 3 ml 的含 Amp 3 μl 的 LB 培养液 37 °C 培养过夜复苏。次日将培养过夜的 PQE-80L-rP1-513 转化菌按 1:50 的比例转种到 3 ml 的含 Amp 3 μl 的 LB 培养液 37 °C 培养 4 h 后, 取 1 ml 菌液 2 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 留菌体沉淀用 SDS-PAGE 的上样缓冲液工作液 100 μl 悬浮 -4 °C 保存作为诱导前对照。剩余 2 ml 菌液加入 IPTG 诱导剂(终浓度为 1 mmol/L) 37 °C 继续培养 6 h。培养 6 h 后再取 1 ml 菌液 2 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 留菌体沉淀 SDS-PAGE 的上样缓冲液工作液 100 μl 悬浮 -4 °C 保存作为诱导后对照。-4 °C 取诱导前后样品 SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白表达情况。

确定正确的重组 rP1-513 蛋白的大量诱导表达: -80 °C 取出重组质粒 PQE-80L-rP1-513 转化菌进行复苏, 次日 5 ml 转种于 500 ml 的 LB 培养液中 37 °C 培养 4 h 后加入诱导剂 IPTG(终浓度为 1 mmol/L) 继续培养。培养 6 h 后收集 500 ml 诱导表达的菌液于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min。

重组 rP1-513 蛋白表达形式的分析: 收集的表达的菌体沉淀用 100 ml 裂解缓冲液(非变性)重悬, 加入蛋白酶抑制剂 PMSF 和溶菌酶(终浓度分别为 1 mg/ml 和 1 mmol/ml), 冰上放置 30 min 预冷后, 在冰浴中用超声波细胞破碎仪进行碎菌(相关参数: 功率 300 W, 超声 3 s 间隔 10 s, 破碎 3 次, 总时间为 18~20 min)。通过镜检法确定菌体的破碎程度。破碎后的菌液于 4 °C 以 8 000 r/min 离心 10 min 之后, 用 0.45 μm 的滤膜过滤的上清液即为上清粗蛋白 50 ml 变性的裂解缓冲液室温溶解沉淀。8 000 r/min 离心 10 min 后用 0.45 μm 的滤膜过滤的上清液为包涵体粗蛋白。所得蛋白经过 SDS-PAGE 电泳分析其表达形式。

重组 rP1-513 蛋白的纯化: 吸取 50% 的 Ni²⁺-NTA 混悬液 2 ml 与亲和层析柱内, 以 20 ml 变性的裂解缓冲液。将平衡后的 Ni²⁺-NTA 混悬液吸出与包涵体粗蛋白滤液充分混匀后, 将其转入亲和层析柱内使液体自然地流出, 从而平衡柱床。杂蛋白先用 10 ml 的裂解缓冲液, 后用洗脱缓冲液洗脱。最后用 10 ml 的洗脱液缓冲液洗脱附在 Ni 柱中的目的蛋白, 分管收集样品。SDS-PAGE 电泳分析纯化的目的蛋白存在于收集管中的情况。

1.3 Western blot 法分析目的蛋白与血清的免疫反应性 SDS-PAGE 分离纯化蛋白(设置阴阳对照

即两张 PVDF 膜) 后电转到 0.45 μm PVDF 膜上, 用含 0.05% Tween-20 磷酸盐吐温缓冲液(PBST) 漂洗 PVDF 膜 3 次(每次 5 min)。用 1 \times 丽春红染液染色 PVDF 膜 15 s, 标出参照蛋白的位置。PBST 漂洗 PVDF 膜 5 次将 1 \times 丽春红染液洗去, 直到看不见丽春红染液红色为准。PVDF 膜置于封闭液中室温封闭 2 h(摆床上轻轻振摇)。PBST 漂洗封闭后 PVDF 膜 3 次(每次 10 min)。两张 PVDF 膜分别置于按 1 : 100 比例用封闭液稀释的感染 MP 的患者血清和未感染 MP 的患者血清一抗中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻轻振摇孵育过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 取出 PVDF 膜 PBST 漂洗 3 次(每次 10 min), 两张 PVDF 膜分别置于按 1 : 20 000 比例用封闭液稀释的山羊抗人 IgG 抗体(HRP 标记) 二抗中, 在室温下轻轻振摇孵育 1 h, PBST 漂洗 PVDF 膜 3 次(每次 10 min), 化学发光底物试剂混合后加至 PVDF 膜 暗室曝光, 保存图片。

1.4 ELISA 法筛查疑似感染 MP 的儿童血清标本

收集儿童血清样本 138 份经本室购于上海源叶科技有限公司的 MP ELISA 试剂盒(按试剂盒说明书操作) 和 rP1-513 蛋白为包被抗原 ELISA 法(操作过程按本实验室常规进行) 检测 MP 的 IgG 特异性抗体。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 进行分析, 采用配对设计的 χ^2 检测法分析商业 ELISA 试剂盒和本实验室制备的 rP1-513 蛋白为包被抗原 ELISA 法阳性率差异是否有统计学意义。Logistic 回归分析法对 MP 的抗体存在的不同独立的危险因素进行单因素和多因素分析, 各因素与 MP 感染率之间的相关性用优势比(95% CI) 表示。

2 结果

2.1 rP1-513 基因的制备 从 MP FH 标准菌株培养液中提取的 MP 全基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 DNA 大小为 513 bp 目的片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。见图 1。

2.2 重组质粒 T-rP1-513 和 PQE-80L-rP1-513 的构建 构建的质粒 T-rP1-513 和 PQE-80L-rP1-513 双酶切(BamHI、Sall) 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示构建的质粒中都含有 513 bp 大小的目的基因, 构建的质粒送至上海生物工程有限公司测序, 结果显示构建质粒含目的基因且大小为 513 bp。见图 1。

2.3 目的蛋白的表达纯化 IPTG 诱导剂使重组质粒 PQE-80L-rP1-513 转化菌表达出了约 30 ku 目的蛋白(如箭头所指)而且位于包涵体中。见图 2。

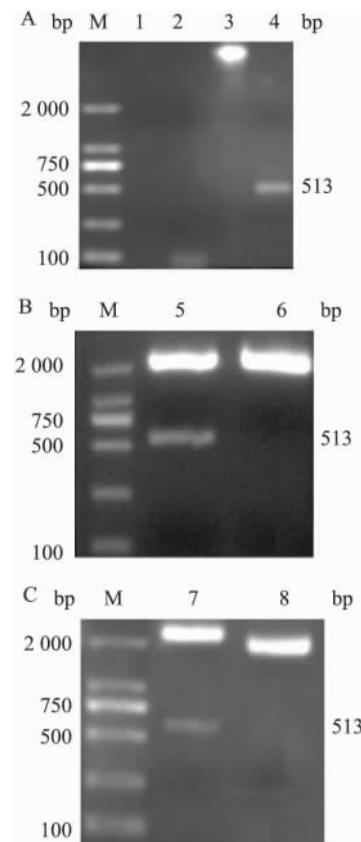


图 1 rP1-513 目的基因 PCR 扩增和重组质粒双酶切鉴定

A: rP1-513 基因 PCR 扩增图; B: 重组 T 质粒双酶切鉴定图; C: 重组 PQE-rP1-513 质粒双酶切鉴定图; M: Marker; 1: 空白对照; 2: 空白对照 PCR 扩增; 3: MP 全基因组 DNA; 4: PCR 产物 513 bp; 5: 重组 T 质粒双酶切; 6: 重组 T 质粒; 7: 重组 PQE-rP1-513 质粒; 8: 重组 PQE-rP1-513 质粒重组 PQE-rP1-513 质粒双酶切

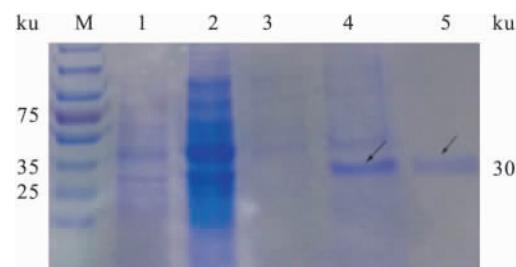


图 2 MP rP1-513 蛋白的表达与纯化

M: Marker; 1: 诱导前重组菌; 2: 诱导 6 h 后重组菌; 3: 超声破碎后上清液; 4: 超声破碎后包涵体; 5: 亲和层析法纯化后包涵体蛋白

2.4 Western blot 法分析目的蛋白与血清的免疫反应性 采用医院提供的 MP 阳性和阴性血清作为一抗对制备的 rP1-513 蛋白的免疫反应性进行检测, 发现 rP1-513 蛋白与 MP 阳性血清有免疫印迹, 而与 MP 阴性血清无免疫印迹。初步判定 rP1-513 蛋白为抗原有免疫反应性。见图 3。



图3 Western blot 检测 rP1-513 蛋白与 MP⁺ 和 MP⁻ 血清免疫反应性

1: rP1-513 蛋白与临床提供的 MP 阳性标本; 2: rP1-513 蛋白与临床提供的 MP 阴性标本

2.5 ELISA 法筛查疑似感染 MP 的儿童血清标本

以制备的 rP1-513 蛋白为包被抗原, ELISA 法检测 138 份儿童血清发现有 34 份阳性血清, 其中收集来的 28 例阳性标本经检测有 28 例仍为阳性, 而且从 106 例阴性标本中检测出了 6 例阳性标本。而 MP ELISA 商业试剂盒从 28 例阳性标本中检测出了 20 例阳性标本, 从阴性标本中筛查出 4 例阳性标本。结果判定: 如待测血清样品吸光度 (optical density, OD) 值高于临界值 Cut-Off 值则为阳性 (Cut-Off 值: 阴性样品 OD 值平均值加上 5 倍标准差)。

2.6 数据分析

2.6.1 两种 P1 蛋白作为抗原的 ELISA 检测方法阳性率比较 商业试剂盒 ELISA 法和 rP1-513 抗原 ELISA 法检测阳性率分别为 17.4% 和 24.6%, 经 McNemar 检测显示两种阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 即制备的 rP1-513 蛋白为包被抗原 ELISA 法检测 MP 阳性率比商业试剂盒 ELISA 法检测 MP 阳性率高。见表 1。

表1 两种 P1 蛋白作为抗原 ELISA 方法检查结果比较 (n)

rP1-513 抗原 ELISA	商业 ELISA 试剂盒		合计
	阳性	阴性	
阳性	22	12	34
阴性	2	102	104
合计	24	114	138

2.6.2 安徽合肥儿童 MP 感染的单因素和多因素 Logistic 回归分析 单因素分析: 男童比女童感染 MP 的阳性率高, 但差异无统计学意义。不同年龄段的儿童感染 MP 有差别 4~7 岁感染率要比其他的年龄段感染率高, 但差异无统计学意义, 同样 MP 感染与白细胞 (white blood cell, WBC) 也无相关性。对 C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 分析发现, CRP > 10 g/ml 的儿童有 27 例 (19.6%) 故认为 C-

反应蛋白与 MP 感染具有相关性 ($P < 0.05$)。多因素分析: 将性别、年龄、WBC 和 CRP 4 个变量作多因素分析, 结果显示与单因素分析相似, 即 MP 的感染率与性别、年感染与性别、年龄、WBC 无明显相关性, 与 CRP 有显著相关性 ($P = 0.010$, 95% CI: 0.908~0.987)。见表 2。

表2 安徽合肥儿童 MP 感染的单因素和多因素 Logistic 回归分析 [n(%)]

项目	MP 阳性例数	P 值	OR 值	95% CI
单因素分析				
性别				
女	12(8.7)	—	1.000	—
男	22(15.9)	0.891	1.059	0.468~2.395
年龄(岁)				
0~1	6(4.3)	—	1.000	—
2~3	8(5.7)	0.768	0.837	0.256~2.732
4~7	15(10.8)	0.179	0.477	0.162~1.405
8~12	5(3.6)	0.059	0.231	0.050~1.060
WBC($\times 10^9/L$)				
<4	3(2.1)	—	1.000	—
4~10	21(15.2)	0.248	0.286	0.034~2.396
>10	10(7.2)	0.252	0.278	0.310~2.488
CRP(g/ml)				
0~10	7(5.1)	—	1.000	—
>10	27(19.6)	0.004	0.214	0.075~0.670
多因素分析				
性别	0.480	0.640	0.185~2.208	
年龄	0.607	0.941	0.746~1.187	
WBC	0.268	1.081	0.942~1.240	
CRP	0.010	0.947	0.908~0.987	

3 讨论

MP 引起的 MP 肺炎被称为非典型肺炎, 占社区获得性肺炎 7%~20%^[7]。是支原体属中对人致病的重要支原体, 是一类没有细胞壁最小的原核细胞型微生物。由于其缺乏细胞壁结构, 故对 β 内酰胺类抗生素如青霉素存在耐药性^[6]。在临床用药前须明确引起呼吸道感染的病原体, 才能缓解症状消除病因。MP 一般通过呼吸道传播, 感染人体后会定居在呼吸道, 借助其黏附素蛋白黏附在呼吸道细胞表面。这些黏附蛋白主要包括 P1、P30、P116、P40、P90 和 HMW1-HMW5, 其 P1 黏附蛋白感染人体占主要作用^[3~8]。

本研究通过构建含目的基因 rP1-513 的表达载体, 最终纯化出了约 30 ku 的蛋白, 且通过 Western blot 法鉴定该蛋白具有免疫反应性。以 rP1-513 蛋白为包被抗原建立 ELISA 方法筛查收集来的血清样中 MP IgG 发现特异性与灵敏度都比与商业 ELISA 检测 MP 抗体 IgG 试剂盒要高, 即说明 rP1-513 蛋白是特异性很强的抗原^[3]。

目前对于 MP 抗体阳性的检测标准尚无统一的标准,该研究通过统计学分析发现 rP1-513 蛋白为抗原的 ELISA 法检出率比商业试剂盒要高。在此基础上,采用 rP1-513 蛋白为抗原的 ELISA 法,对 MP 的抗体存在的不同独立的危险因素进行单因素和多因素分析。调查显示安徽合肥地区血清 MP 抗体阳性率为 24.6%,MP 的感染率在性别、年龄、WBC 差异无统计学意义,提示性别、年龄、WBC 均不是 MP 感染率的影响因素。很多研究者^[7-9]也对血清 MP 抗体阳性率的危险因素进行了分析,发现 MP 感染的发生与年龄和季节有关。本研究没有显示与年龄有关,可能是血清样本较少,在一定程度上可能影响了统计学分析的准确性。CRP 感染因素分析显示,CRP 与 MP 的抗体阳性率之间存在相关性,提示 MP 感染机体后会导致血清 CRP 值升高。杨荣敢等^[10]研究发现 MP IgM 抗体和 CRP 可为诊治 MP 提供更为可靠的依据。这与该研究得出的 CRP 与 MP 的抗体阳性率之间存在一定的联系。CRP 是机体在受到急性创伤或者感染时在肝脏迅速合成的一种急性时相反应蛋白,但当病情好转时 CRP 会迅速下降至正常值,故 CRP 与 MP 感染机体后机体血清中出现的早期抗体 IgM 检测患者是否患有 MP 有很大的临床帮助。

参考文献

- [1] Choi I S, Byeon J H, Yoo Y, et al. Increased serum interleukin-5 and vascular endothelial growth factor in children with acute my-

- coplasma pneumonia and wheeze [J]. *Pediatr Pulm*, 2009, 44(5): 423-8.
- [2] Othman N, Isaacs D, Daley A J, et al. *Mycoplasma pneumoniae* infection in a clinical setting [J]. *Pediatr Int*, 2008, 50(5): 662-6.
- [3] Xue G, Cao L, Wang L, et al. Evaluation of P1 adhesin epitopes for the serodiagnosis of mycoplasma pneumoniae infections [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 340(2): 86-92.
- [4] Chaudhry R, Nisar N, Hora B, et al. Expression and immunological characterization of the carboxy-terminal region of the P1 adhesin protein of mycoplasma pneumoniae [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1): 321-5.
- [5] Drasbek M, Nielsen P K, Persson K, et al. Immune response to mycoplasma pneumoniae P1 and P116 in patients with atypical pneumonia analyzed by ELISA [J]. *BMC Microbiol*, 2004, 4(1): 7.
- [6] Montagnani F, De Paolis F, Beghetto E, et al. Use of recombinant chimeric antigens for the serodiagnosis of mycoplasma pneumoniae infection [J]. *Eur J Clin Microbiol*, 2010, 29(11): 1377-86.
- [7] Izumikawa K, Izumikawa K, Takazono T, et al. Clinical features, risk factors and treatment of fulminant mycoplasma pneumoniae pneumonia: a review of the Japanese literature [J]. *J Infect Chemother*, 2014, 20(3): 181-5.
- [8] 徐巧,林书祥,郭伟,等. 220 例住院肺炎患儿肺炎支原体的分子检测及其基因分型研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(1): 37-41.
- [9] 易昌清. 308 例小儿肺炎支原体感染血清检测分析 [J]. 中国实用医药, 2013, 8(12): 71-2.
- [10] 杨荣敢,周祖发. 肺炎支原体 IgM, CRP 联合检测在支原体肺炎中的应用研究 [J]. 中国当代医药, 2013, 20(15): 84-5.

Preliminary study on preparation and application of P1 protein of *Mycoplasma pneumoniae*

Wang Xiaowu, Zeng Xiancong, Chen Wei, et al

(Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the specific antigen immune reactivity, detect its infection situation in 138 children serum samples in Anhui of *Mycoplasma pneumoniae* (MP), and analyze preliminarily its risk factors. **Methods** The recombinant cloning and expression plasmids with the target gene were named as T-rP1-513 and PQE-80L-rP1-513. The protein of PQE-80L-rP1-513 recombinant bacteria was induced to express. In this study, the protein immune reactivity was detected by Western blot and antibodies to the P1 protein of MP were tested by ELISA in serum. **Results** The rP1-513 protein with approximately 30 ku had immune reactivity by Western blot. 34 positive specimens were screened by ELISA. At the same time, 24 positive specimens were found by the commercial MP ELISA kit. Their detection rates were 24.6% and 17.4% respectively, and there was a statistically significant difference ($P < 0.05$). MP infection and C-reactive protein had a significant correlation except gender, age and white blood cells. **Conclusion** It is preliminarily confirmed that ELISA method with rP1-513 protein has higher sensitivity and specificity, and can provide certain help for clinical diagnosis of MP.

Key words *Mycoplasma pneumoniae*; rP1-513 protein; children; risk factor