

# 问号钩端螺旋体 *lipL41* 基因 表达及重组抗原分析

阮萍 严杰 毛亚飞 彭慧琴 周晓辉

**【摘要】** 目的 构建问号钩端螺旋体(钩体) *ltB/ctB-lipL41/1* 融合基因及其原核表达系统。方法 采用连接引物聚合酶链反应(PCR)构建 *ltB-lipL41/1* 和 *ctB-lipL41/1* 融合基因,常规方法构建其原核表达系统。采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测目的重组蛋白 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 表达情况;用免疫印迹和神经节苷脂-酶联免疫吸附试验(GM<sub>1</sub>-ELISA)分别检测上述目的重组蛋白的免疫原性和佐剂活性;采用 PCR 和显微镜凝集试验(MAT)分别检测 97 株问号钩体野生株 *lipL41/1* 基因及其表达情况;用 ELISA 检测 228 例钩体患者血清 *lipL41* 基因产物的抗体。结果 与报道的相关序列比较, *ltB-lipL41/1* 和 *ctB-lipL41/1* 融合基因核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 99.6%~99.9% 和 99.8%~100%。rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 表达产量均约为细菌总蛋白的 10%, 主要以包涵体形式存在。rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 均分别能与 rLipL41/1 兔抗血清和牛 GM<sub>1</sub> 结合。87.6% (85/97) 问号钩体野生株含有 *lipL41* 基因, 84.5% (82/97) 问号钩体野生株分别与 rLipL41/1 和 rLipL41/2 兔抗血清出现效价范围为 1:4~1:128 的 MAT 阳性结果。84.6% (193/228) 和 78.5% (179/228) 的患者血清分别 rLipL41/1 和 rLipL41/2 抗体阳性。结论 成功地构建了 *ltB-lipL41/1* 和 *ctB-lipL41/1* 融合基因及其原核表达系统。所表达的 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 融合蛋白有良好的免疫原性和佐剂活性。*lipL41* 基因存在于不同问号钩体血清群中并高频率表达。rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 具有成为钩体属特异性疫苗抗原的良好前景。

**【关键词】** 问号钩端螺旋体; 融合基因; 分析

**Identification on the immunogenic activity of recombinant rLTB/CTB-LipL41/1 to *Leptospira interrogans* and detection of *lipL41* gene with its production** RUAN-Ping\*, YAN Jie, MAO Ya-fei, PENG Hui-qin, ZHOU Xiao-hui. \*Department of Medical Microbiology and Parasitology, Medical School of Shaoxing University, Shaoxing 312000, China

Corresponding author: YAN Jie, Email: yanchen@mail.hz.zj.cn

**【Abstract】** **Objective** To construct prokaryotic expression systems of *ltB/ctB-lipL41/1* fusion genes, identify immunogenic and adjuvant activities of the products as well as to understand the frequencies of *lipL41* gene that carrying and expressing in *L. interrogans* wild strains and specific antibody levels in sera from patients with leptospirosis. **Methods** Polymerase chain reaction(PCR) with linking primer was applied to construct the fusion genes *ltB-lipL41/1* and *ctB-lipL41/1*. By routine molecular biological techniques, prokaryotic expression systems of the two fusion genes were constructed. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to examine expression of the target recombinant proteins rLTB-rLipL41/1 and rCTB-rLipL41/1. Both western blot and Ganglioside-enzyme linked immunosorbent assay(GM<sub>1</sub>-ELISA) were used while immunogenic and adjuvant activities of rLTB-rLipL41/1 and rCTB-rLipL41/1 were measured. PCR and MAT were performed to detect *lipL41* gene and expression of the gene in 97 wild strains of *L. interrogans*, respectively. Antibodies against product of *lipL41* gene in serum samples from 228 leptospirosis patients were detected by ELISA. **Results** In comparison with reported corresponding sequences, the similarities of *ltB-lipL41/1* and *ctB-lipL41/1* fusion genes to nucleotide and putative amino acid sequence were 99.6%~99.9% and 99.8%~100%, respectively. Expression outputs of both rLTB-rLipL41/1 and rCTB-rLipL41/1, mainly presenting with inclusion body, consisting approximate 10% of the total bacterial proteins. Both rLTB-rLipL41/1 and

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970678)

作者单位:312000 绍兴文理学院医学院(阮萍);浙江大学医学院病原生物学教研室(严杰、毛亚飞、彭慧琴、周晓辉)

通讯作者:严杰, Email: yanchen@mail.hz.zj.cn

rCTB-rLipL41/1 could combine rabbit anti-rLipL41/1 serum as well as bovine GM<sub>1</sub>, respectively. 87.6% of the *L. interrogans* wild strains (85/97) having *lipL41* gene while 84.5% (82/97) of the wild strains with rLipL41/1 or rLipL41/2 antiserum were positive for MAT with titers of 1:4-1:128. 84.6% (193/228), 78.5% (179/228) from the patients' serum samples were positive for rLipL41/1 and rLipL41/2 antibodies, respectively. **Conclusion** *ltB-lipL41/1* and *ctB-lipL41/1* fusion genes and their prokaryotic expression systems were successfully constructed in this study. The two expressed fusion proteins showed qualified immunogenic and adjuvant activities. *lipL41* gene was extensively distributed and frequently expressed in different serogroups of *L. interrogans*. rLTB-rLipL41/1 or rCTB-rLipL41/1 seemed to have had good potential to serve as an antigen in *L. interrogans* genus-specific vaccine.

**【Key words】** *Leptospira interrogans*; Fusion gene; Analysis

问号钩端螺旋体(钩体)血清群、型众多,不同地区有明显差异<sup>[1,2]</sup>。目前使用的问号钩体多价全菌死疫苗副作用大,且对其未包含的血清群保护作用极为有限<sup>[3,4]</sup>。Shang 等<sup>[5]</sup>报道了问号钩体表面均有编码 355 个氨基酸脂蛋白 *lipL41* 基因。我国 15 群 15 株问号钩体参考标准株有 *lipL41/1* 和 *lipL41/2* 两个基因型,前者包括了我国流行最广的血清群<sup>[6]</sup>,故可作为属特异性基因工程疫苗的候选抗原。重组大肠埃希菌不耐热肠毒素 B 亚单位(LTB)和霍乱肠毒素 B 亚单位(CTB)是抗体生成的良好佐剂<sup>[7,8]</sup>。为了提高表达产物抗原性及减少发酵次数<sup>[9,10]</sup>,我们构建了 *ltB-lipL41/1* 和 *ctB-lipL41* 融合基因及其原核表达系统,检测了表达产物免疫性和佐剂活性,以及问号钩体野生株 *lipL41* 基因的携带率和钩体患者血清特异性抗体的阳性率。

## 材料与方 法

1. 菌株来源:问号钩体黄疸出血群赖型 56601 株、大肠埃希菌 44851 株均购自中国药品生物制品检定所,霍乱弧菌东 74 株培养物由浙江省医学科学院何浙生研究员惠赠。采用 EMJH 培养基培养钩体,LB 培养基培养大肠埃希菌。97 株分离自患者的钩体野生株、显微镜凝集试验(MAT)效价 $\geq$ 1:400 的 228 份钩体患者血清分别由浙江省和广东省疾病预防控制中心及本实验室提供。rLipL41/1、rLipL41/2 以及 rLTB、rCTB、rLipL41/1、rLipL41/2 兔抗血清均由本实验室提供<sup>[6,9]</sup>。

2. *ltB*、*ctB* 和 *lipL41* 基因的扩增、克隆和测序:采用苯酚-氯仿法提取钩体 56601 株、大肠埃希菌 44851 株和霍乱弧菌东 74 株 DNA,溶于 TE 缓冲液中,用分光光度法测定 DNA 浓度和纯度<sup>[11]</sup>。*ltB* 上游引物序列:5'-CCGGAATTCATGAATAAAGTAAAATA-3' (EcoR I), *ctB* 上游引物序列:5'-CCGGAATTCATGATTAATTAATAATTG-3' (EcoR I), *ltB* 和 *ctB* 下游连接引物序列:5'-

TAGAGAAGATAATTTTCTATTTGCCATACTAA TTGCGGC-3'。*lipL41* 引物序列:上游 5'-ATGAGAAAATTATCTTCTCTA-3', 下游 5'-GCACTCGAGTTACTTTGCGTTGCTTTTCG TC-3' (Xho I)。聚合酶链反应(PCR)总体积为 100  $\mu$ l,内含:2.5 mol/L 各 dNTP、250 nmol/L 各引物、20 mol/L MgCl<sub>2</sub>、3.0 U EX Taq 酶、100 ng DNA 模板、1 $\times$ PCR 缓冲液(pH 8.3)。*ltB* 和 *ctB* 基因 PCR 参数:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,48 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。*lipL41* 基因 PCR 参数:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。用 1.5% 溴化乙锭预染色的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,*ltB*、*ctB* 和 *lipL41* 基因目的扩增片段预期大小分别为 375、375 和 1068 bp。引物由上海博亚生物技术有限公司(BioAsia)合成,PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)。

3. *ltB-lipL41/1* 和 *ctB-lipL41/1* 融合基因的构建:将 *ltB*、*ctB* 和 *lipL41/1* 基因扩增产物用上海申能博彩生物科技有限公司(Biocolor)小量 DNA 3S 柱快速离心纯化试剂盒回收目的片段,用分光光度法测定其浓度<sup>[11]</sup>。将 *ltB* 或 *ctB* 与 *lipL41/1* 等摩尔混合,DNA 总量<500 ng,加入除引物外的上述 PCR 试剂,反应参数:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,45 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 150 s,10 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。由于 *ltB* 和 *ctB* 基因扩增时,下游采用连接引物,即该引物 3' 端有 18 个核苷酸序列与 *lipL41/1* 基因 5' 端互补,故经 PCR 后会形成部分 *ltB* 或 *ctB* 与 *lipL41/1* 复合模板。在上述反应产物中分别加入 *ltB* 或 *ctB* 上游引物和 *lipL41* 下游引物,扩增获得 *ltB-lipL41/1* 或 *ctB-lipL41/1* 融合基因,PCR 参数:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 150 s,10 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 160 s(以后每循环增加 10 s),15 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。目的扩增片段预期大小均为 1437 bp。

4. T-A 克隆、亚克隆和测序:采用T-A克隆试剂盒(Biocolour)将 *ltB-lipL41/1* 和 *ctB-lipL41/1* 融合基因扩增片段克隆至 pUCm-T 载体中,转化于 *E. coli* DH 5 $\alpha$  并扩增,碱变性法提取重组质粒<sup>[11]</sup>, EcoR I 和 Xho I 双酶切初步鉴定后委托 BioAsia 测定插入片段的核苷酸序列,并与报道的 *lipL41*、*ltB* 和 *ctB* 基因序列比较<sup>[6,9]</sup>。将重组质粒和表达载体 pET32a 分别用 EcoR I 和 Xho I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳和小量 DNA 3S 柱快速离心纯化试剂盒分离并回收目的片段,连接后转化于表达宿主菌 *E. coli* BL21DE3 中,经扩增、提取质粒后再次测序。

5. 目的重组蛋白表达和收集:所构建的原核重组表达系统 pET32a-*ltB-lipL41/1*-*E. coli* BL21DE3 和 pET32a-*ctB-lipL41/1*-*E. coli* BL21DE3 在含 1 mmol/L IPTG 的 LB 培养基中 37℃ 振荡培养。所收集的菌体超声破碎(300 V, 5S $\times$ 3),离心后分为沉淀和上清。采用 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检查目的重组蛋白 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 的表达情况。

6. rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 免疫原性及佐剂活性的鉴定:以 rLipL41/1 兔抗血清为一抗<sup>[6]</sup>、1:3000 稀释 HRP 标记羊抗兔 IgG(Jackson ImmunoResearch)为二抗,用免疫印迹(Western bolt)检测 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 的免疫原性。用牛神经节苷脂(GM<sub>1</sub>)包被酶标板,洗涤后分别加入 4  $\mu$ g 的 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1,重复 5 孔,以 rLTB 或 rCTB 兔抗血清为一抗、上述 HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗、OPD 为底物,显色后检吸光度(A<sub>490</sub>)值。实验中以等量 BSA 代替 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/2 为阴性对照,重复 5 孔。

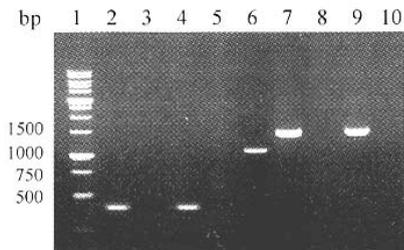
7. 钩体野生株 *lipL41* 基因及其表达的检测:按上法采用 PCR 检测 97 株问号钩体野生株 *lipL41* 基因携带情况。按 Faine 等<sup>[11]</sup>介绍的方法,检测 97 株问号钩体野生株与 rLipL41/1 和 rLipL41/2 兔抗血清的 MAT 效价,实验中采用正常兔血清作为阴性对照。

8. 钩体患者血清特异性抗体的检测:rLipL41/1 或 rLipL41/2 (50  $\mu$ g/ml) 0.1 ml 包被酶标板各孔,4℃ 过夜,封闭、洗涤后以 1:400 稀释的患者血清为一抗、1:4000 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG 为二抗、OPD 为底物,显色后检 A<sub>490</sub> 值。实验中用相同稀释度的 5 份正常人血清作为阴性对照,重复 5 孔。若

患者血清标本 A<sub>490</sub> 值  $\geq$  阴性对照均值  $\pm$  标准差者为阳性<sup>[12]</sup>。

### 结 果

1. *ltB*、*ctB* 基因和 *ltB-lipL41*、*ctB-lipL41* 融合基因扩增结果见图 1。

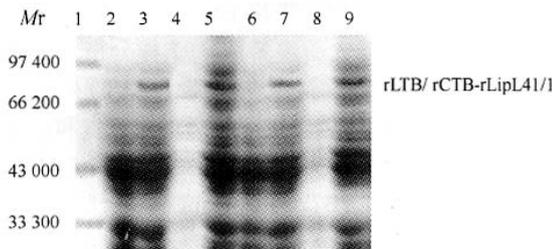


1. DNA 分子量参考标准; 2、4 和 6: 分别为 *ltB*、*ctB*、*lipL41/1* 基因扩增片段; 7 和 9: 分别为 *ltB-lipL41/1* 和 *ctB-lipL41/1* 融合基因扩增片段; 3、5、8 和 10: 相应的空白对照

图1 *ltB*、*ctB* 基因和 *ltB-lipL41/1*、*ctB-lipL41/1* 融合基因目的扩增片段

2. 核苷酸和氨基酸序列分析:与报道的相应序列比较<sup>[6,7]</sup>, *ltB-lipL41/1* 和 *ctB-lipL41/1* 融合基因核苷酸序列相似性分别为 99.9% 和 99.6%, 氨基酸序列相似性分别为 100% 和 99.8%, T-A 克隆和亚克隆测序结果完全相同,比较时不包括引物序列。

3. 目的重组融合蛋白的表达: IPTG 能有效地诱导 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 的表达,表达产物主要存在于菌体超声破碎物离心后的沉淀中,其产量均约占细菌总蛋白的 10% (图 2)。

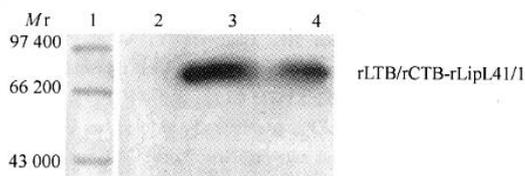


1: 蛋白质相对分子质量(M<sub>r</sub>)参考标准; 2、3: 分别为未诱导和 IPTG 诱导的 rLTB-rLipL41/1 表达情况; 4、5: 分别为诱导后表达 rLTB-rLipL41/1 细菌的上清和沉淀; 6、7: 分别为未诱导和 IPTG 诱导的 rCTB-rLipL41/1 表达情况; 8、9: 分别为诱导后表达 rCTB-rLipL41/1 细菌的上清和沉淀

图2 IPTG 诱导时 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 的表达

4. 目的重组融合蛋白的免疫原性和佐剂活性:

Western bolt 结果表明, rLipL41 兔抗血清均能与 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 结合(图 3)。5 孔阴性对照的  $A_{490}$  均值  $\pm$  标准差为  $0.21 \pm 0.05$ , 阳性标准为 0.36; 5 孔 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 的  $A_{490}$  均值  $\pm$  标准差分别为  $1.09 \pm 0.14$  和  $1.15 \pm 0.17$ , 表明 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 均能与牛 GM<sub>1</sub> 结合。



1: 蛋白质 Mr 参考标准; 2: 空白对照; 3, 4: rLipL41 抗血清识别的 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1

图3 rLipL41/1 兔抗血清和 rLTB-rLipL41/1 及 rCTB-rLipL41/1 的 Western blot 结果

5. 问号钩体野生株 *lipL41* 基因携带率和表达率: 87.6% (85/97) 问号钩体野生株 *lipL41* 基因 PCR 扩增结果阳性, 84.5% (82/97) 问号钩体野生株与 rLipL41/1 和 rLipL41/2 兔抗血清出现效价范围为 1:4 ~ 1:128 的 MAT 阳性结果(表 1)。

表1 97 株钩体野生株 *lipL41* 基因携带率和表达率

| 血清群  | 菌株数 | PCR (+) | MAT (+) | MAT 滴度(1:)  |             |
|------|-----|---------|---------|-------------|-------------|
|      |     |         |         | 抗-rLipL41/1 | 抗-rLipL41/2 |
| 黄疸出血 | 27  | 24      | 24      | 8~128       | 8~64        |
| 犬    | 8   | 7       | 7       | 4~64        | 4~16        |
| 波摩那  | 18  | 16      | 15      | 4~64        | 4~32        |
| 流感伤寒 | 11  | 10      | 10      | 4~128       | 4~64        |
| 七日热  | 12  | 10      | 10      | 4~64        | 4~16        |
| 赛罗   | 21  | 18      | 16      | 4~32        | 4~16        |

6. 钩体患者血清 LipL41 抗体阳性率: 由于 rLipL41/1 和 rLipL41/2 的阴性对照均值  $\pm$  标准差分别为  $0.122 \pm 0.039$  和  $0.115 \pm 0.46$ , 阳性标准分别为 0.239 和 0.253。根据上述判断标准, 分别有 84.6% (193/228) 和 78.5% (179/228) 的患者血清 rLipL41/1 和 rLipL41/2 抗体阳性(表 2)。

### 讨 论

以往的研究结果表明, 我国 15 群 15 株致病性问号钩体参考标准株均含有 *lipL41* 基因, 但可分为 *lipL41/1* 和 *lipL41/2* 两个基因型, 前者包括了我国人群中流行最广的血清群, 如黄疸出血群、犬群、致热群、秋季群、澳洲群、波摩那群、流感伤寒群和七日

热群等, 具有 *lipL41/2* 基因型的爪哇群、拜伦群、塔拉索夫群和明尼群国内很少引起流行<sup>[6]</sup>, 因而本文采用 *lipL41/1* 为目的克隆基因。

表2 228 例钩体患者血清 rLipL41s 抗体 ELISA 检测阳性率

| 血清群  | 例数 | ELISA 结果(+/-) |             |
|------|----|---------------|-------------|
|      |    | 抗-rLipL41/1   | 抗-rLipL41/2 |
| 黄疸出血 | 74 | 65/9          | 60/14       |
| 犬    | 11 | 9/2           | 8/3         |
| 秋季   | 8  | 7/1           | 6/2         |
| 波摩那  | 38 | 32/6          | 31/7        |
| 流感伤寒 | 22 | 17/5          | 16/6        |
| 七日热  | 30 | 25/5          | 23/7        |
| 赛罗   | 45 | 38/7          | 35/10       |

基因工程疫苗往往因抗原单一而导致保护效果不理想, 若加入佐剂则可明显提高免疫效果。LTB 和 CTB 是目前公认的诱导血清抗体和分泌性 IgA 的佐剂<sup>[7, 8]</sup>。业已证实, LTB 和 CTB 佐剂活性取决于与细胞表面 GM<sub>1</sub> 受体的结合能力<sup>[15]</sup>。本文中 ELISA 结果证实, rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 能与牛 GM<sub>1</sub> 结合, 表明上述融合蛋白中的 rLTB 和 rCTB 仍具有佐剂活性。CTB 诱导产生血清 IgG 作用较 LTB 为强<sup>[14]</sup>, 但 CTB 激活 TH2 途径而产生的 IL-4 能选择性地促进 IgE 合成, 因而有可能引起变态反应<sup>[15]</sup>。LTB 主要激活 TH1 途径, 其次是 TH2, TH1 途径不产生 IL-4, 故认为 LTB 一般不引起变态反应<sup>[16]</sup>。因此, 我们构建了 *ltB-lipL41/1* 和 *ctB-lipL41/1* 两种融合基因的原核表达系统, 为后继研制基因工程疫苗留有选择余地。

与报道的相应序列比较<sup>[6, 7]</sup>, 我们克隆的 *ltB*、*ctB*、*lipL41* 基因核苷酸和氨基酸序列相似性高达 99.6% ~ 100%, T-A 克隆和亚克隆测序结果完全相同。SDS-PAGE 后可在预期位置出现 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1 表达产物, rLipL41/1 兔抗血清能识别 rLTB-rLipL41/1 和 rCTB-rLipL41/1, 表明 rLTB-rLipL41/1/1 和 rCTB-rLipL41/1/1 均具有良好的免疫原性。

MAT 是用新鲜培养的活钩体与相应抗体进行的显微镜凝集试验。我们在实验中发现, 87.6% (85/97) 问号钩体野生株显示 *lipL41* 基因扩增片段, 84.5% (82/97) 问号钩体野生株与 rLipL41/1 和 rLipL41/2 兔抗血清的 MAT 结果阳性, 提示 *lipL41* 是广泛存在于不同血清群问号钩体表面、有较高携带率和表达率的基因。早已肯定, MAT 抗体是保护

性抗体,可在补体存在下溶解问号钩体<sup>[1]</sup>。我们的实验结果表明,rLipL41/1 和 rLipL41/2 兔抗血清对我国流行最广的 6 群问号钩体 MAT 效价为 1:4~1:128,提示 *lipL41* 基因产物为保护性抗原。根据 ELISA 结果,分别有 84.6% (193/228) 和 78.5% (179/228) 的患者血清 rLipL41/1 和 rLipL41/2 抗体阳性,提示 *lipL41* 基因产物有良好的抗原性,能有效地诱导绝大多数感染者产生抗体。

综上所述,我们成功地构建了 *ltB-lipL41/1* 和 *ctB-lipL41/1* 融合基因及其原核表达系统,所表达的产物具有良好的免疫原性,*lipL41* 是广泛存在于不同血清群问号钩体表面、有较高携带率和表达率的基因。因此,rLTB-rLipL41/1 或 rCTB-rLipL41/1 具有成为问号钩体属特异性疫苗抗原的前景。但上述表达系统目的蛋白的产量均约为细菌总蛋白 10%,有必要进一步研究以提高表达产量。

参 考 文 献

- 1 Faine S, Adler B, Bolin C, et al. *Leptospira* and Leptospirosis, Second edition, Melbourne, Australia:MedSci, 1999.
- 2 Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14:296-326.
- 3 Sonrier C, Branger C, Michel V, et al. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine*, 2000, 18:86-94.
- 4 Stevens H. Thoughts on leptospirosis vaccines. *J Am Vet Med Assoc*, 2004, 224:1245-1246.
- 5 Shang ES, Summers TA, Haake DA, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding *lipL41*, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *leptospira* species. *Infect Immun*, 1996, 64:2322-2326.
- 6 丁威,严杰,毛亚飞. 问号钩端螺旋体血清群 *lipL41* 基因型分析及其表达产物的免疫学鉴定. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24:859-865.
- 7 Erweij WR, de Haan L, Holtrop M, et al. Mucosal

- immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. *Vaccine*, 1998, 16:2069-2076.
- 8 Tochikubo K, Isaka M, Yasuda Y, et al. Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. *Vaccine*, 1998, 16:150-155.
- 9 夏肖萍,严杰,刘守凤,等. 大肠埃希菌 LTB 与霍乱弧菌 CTB 基因的克隆和表达及鉴定. *浙江大学学报(医学版)*, 2003, 32:17-20.
- 10 Yamamoto M, McGhee JR, Hagiwara Y, et al. Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. *Scand J Immunol*, 2001, 53:211-217.
- 11 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 1. 21-1. 52, 2. 60-2. 80, 7. 3-7. 35, 9. 14-9. 22.
- 12 Lewis SM, Osei-Bimpong A. Haemoglobinometry in general practice. *Clin Lab Haematol*. 2003, 25:343-346.
- 13 de Haan L, Feil IK, Verweij WR, et al. Mutational analysis of the role of ADP-ribosylation activity and GMI-binding activity in the adjuvant properties of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin towards intranasally administered keyhole limpet hemocyanin. *Eur J Immunol*, 1998, 28:1243-1250.
- 14 de Haan L, Verweij WR, Holtrop M, et al. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA- and IgG mediated protective mucosal immunity. *Vaccine*, 2001, 19:2898-2907.
- 15 Saito K, Shoj IJ, Inada N, et al. Immunosuppressive effect of cholera toxin B on allergic conjunctivitis model in guinea pig. *Jpn J Ophthalmol*, 2001, 45:332-338.
- 16 Tamura S, Hatori E, Tsuruhara T, et al. Suppression of delayed-type hypersensitivity and IgE antibody responses to ovalbumin by intranasal administration of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit-conjugated ovalbumin. *Vaccine*, 1997, 15:225-229.

(收稿日期:2004-10-21)  
(本文编辑:尹廉)

· 消息 ·

本刊 2005 年投稿须知

为提高本刊出文章的时效性,缩短文稿的刊出时滞,避免在邮寄过程中的丢失,本刊编辑部决定,请作者投稿前仔细阅读本刊的稿约并予以执行,同时作者可选择两种方式投稿:

①凡采取纸版形式邮寄方式作者务必提供有效的 Email 地址及方便联系的电话,本刊编辑部将根据情况采用 Email 或电话与作者联系。

②本刊欢迎采用 Email 方式投稿,但以电子版方式投稿后请电话通知本刊编辑部,同时最好在寄单位推荐信时邮寄一份纸版稿件。

本刊 Email: lxbonly@public3.bta.net.cn  
电话: 010-61739449