

· 实验研究 ·

钩端螺旋体主要属特异性蛋白抗原分布及其免疫性研究

孙百莉 罗冬娇 孙军德 严杰

【摘要】 目的 确定致病性问号钩端螺旋体(钩体)属特异性外膜蛋白的抗原性和交叉免疫反应性,为研制通用性钩体基因工程疫苗及检测试剂盒提供依据。方法 采用 Ni-NTA 亲和层析法,提取了 4 种钩体外膜蛋白主要基因型重组表达产物 rLipL21、rLipL32/1 和 rLipL32/2、rLipL41/1 和 rLipL41/2、rOmpL1/1 和 rOmpL1/2,并用 SDS-PAGE 检测表达及提纯效果。上述重组蛋白常规皮下免疫家兔获得抗血清,显微镜凝集试验(MAT)检测各抗血清交叉凝集效价。采用盐变法提取了我国 15 群问号钩体参考标准株及非致病的双曲钩体 Patoc I 株的外膜蛋白。以兔抗血清为一抗,采用 Western blot 检测上述 4 种外膜蛋白自然表达情况及其免疫反应性。结果 rLipL21、rLipL32/1 和 rLipL32/2、rLipL41/1 和 rLipL41/2、rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 表达量分别约占细菌总蛋白的 10%、40% 和 35%、15% 和 10%、30% 和 15%,各重组蛋白 SDS-PAGE 提纯后均仅见单一的蛋白条带。重组蛋白兔抗血清在同一基因不同基因型表达产物之间有广泛的交叉免疫反应性,与不同钩体血清群的 MAT 效价为 1:2~1:128。各血清群钩体外膜中均可检出上述 4 种外膜蛋白,但 LipL21 仅存在于问号钩体中。结论 LipL21、LipL32、LipL41、OmpL1 均为钩体属特异性表面抗原,可作为通用性钩体疫苗及检测试剂盒的候选抗原。

【关键词】 问号钩端螺旋体;外膜蛋白;属特异性抗原;交叉凝集;免疫性鉴定

Study on the immunogenicity of major leptospiral genus-specific protein antigens and the distribution of antigens in different serogroups of *Leptospira interrogans* SUN Bai-li*, LUO Dong-jiao, SUN Jun-de, YAN Jie. *College of Land and Environment Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China Corresponding author: YAN Jie, Email: Med_bp@zju.edu.cn

【Abstract】 Objective The determination of antigenicity and immunogenicity of *Leptospira interrogans* genus-specific outer envelope proteins (OEPs) will offer evidence for developing universal leptospiral genetic engineering vaccine and detection kit. **Methods** In this study, Ni-NTA affinity chromatography is used to purify the recombinant products rLipL21, rOmpL1/1, rOmpL1/2, rLipL32/1, rLipL32/2, rLipL41/1 and rLipL41/2 expressed by the major genotypes of four leptospiral OEPs of 15 serogroups. SDS-PAGE is applied to examine the expression and purity of the recombinant proteins. Rabbits are intracutaneously immunized with the recombinant proteins to obtain antisera. Microscope agglutination test (MAT) is used to measure the cross immunoagglutination titers of antisera. The OMPs of the reference standard strains belonging to 15 serogroups of *L. interrogans* in China and *L. biflexa* strain Patoc I are prepared using salt-denature method. By each of the antisera as the first antibody, Western blot assay is established to detect the natural expressions and immunoreactivity of the four OEPs. **Results** The outputs of rLipL21, rLipL32/1, rLipL32/2, rLipL41/1, rLipL41/2, rOmpL1/1 and rOmpL1/2 are 10%, 40%, 35%, 15%, 10%, 30% and 15%, respectively. Each the purified recombinant proteins shows a single fragment after SDS-PAGE. Each the rabbit antisera displays extensive cross immunoreactivity between the products expressed by different genotypes of the same gene and the MAT titers ranging from 1:2-1:128. All the four OEPs can be detectable in the OEPs preparations. However, LipL21 is found to exist only in *L. interrogans*. **Conclusion** The results of this study indicate that all the four OEPs are superficial genus-specific antigens of *Leptospira* which can be used as the candidate antigens of leptospiral universal vaccine and detection kit.

【Key words】 *Leptospira interrogans*; Outer envelope proteins; Genus-specific antigen; Cross agglutination; Immune identification

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970678);浙江省教育厅科研基金资助项目(20050716)

作者单位:110161 沈阳农业大学土地与环境学院(孙百莉、孙军德);杭州师范学院基础医学部(罗冬娇);浙江大学医学院(严杰)

通讯作者:严杰, E-mail: Med_bp@zju.edu.cn

钩端螺旋体(钩体)病是世界范围流行的自然疫源性疾病^[1-3],也是洪涝灾害时重点监控的传染病之一^[4-6]。钩体血清群、型众多,分布有地区性差异,且各群、型间交叉保护作用较弱或无^[7-9],故目前国内外均采用当地流行的钩体血清群、型来制备多价钩体全菌死疫苗。由于多价钩体全菌死疫苗对其中未包含的其他钩体血清群、型感染保护作用极其有限,易造成钩体病的暴发流行^[10]。因此,寻找可用于研制通用性钩体疫苗及实验室诊断方法的钩体属特异性蛋白抗原,对于钩体病预防、控制和诊断均有重要意义。

近年我国科学家报道了钩体黄疸出血群赖型赖株的全基因序列^[11],国外学者也报告了跨膜蛋白 OmpL1、脂蛋白 LipL32 和 LipL41 可能是所有钩体主要外膜蛋白^[12-15]。我们曾证实我国流行的钩体参考标准株均含有 lipL21、lipL32、lipL41 和 ompL1 基因,但后 3 个基因存在不同的基因型^[16-18]。然而,上述钩体基因自然表达及其抗原性和交叉免疫反应性尚未有深入研究的报道。本研究中,我们采用 Ni-NTA 亲和层析、SDS-PAGE、Western blot 和显微镜凝集试验(MAT)等方法,探讨了钩体上述基因主要基因型自然表达情况及其重组抗原的抗原性和交叉免疫反应,以期为此等抗原作为通用性钩体基因工程疫苗及检测试剂盒候选抗原提供依据。

材料与方 法

1. 钩体菌株及其培养:钩体参考标准株黄疸出血群赖型 56601 株、爪哇群爪哇型 56602 株、犬群大型 56603 株、拜伦群拜伦型 56604 株、致热群致热型 56605 株、秋季群秋季型 56606 株、澳洲群澳洲型 56607 株、波摩那群波摩那型 56608 株、流感伤寒群临型 56609 株、七日热群七日热型 56610 株、巴达维亚群巴叶赞型 56612 株、塔拉索夫群塔拉索夫型 56613 株、曼耗群曼耗 II 型 56615 株、赛罗群乌尔夫型 56635 株、明尼群明尼型 56655 株,以及双曲钩体国际参考标准株三宝垄群 patoc 型 Patoc I 株均购自北京中国药品生物制品检定所,培养基为 8% 兔血清的 Korthof 培养基。

2. 目的重组抗原表达和提纯:lipL32/1、lipL32/2、lipL41/1、lipL41/2、ompL1/1、ompL1/2 基因型包含了我国主要流行的钩体黄疸出血群、秋季群、波摩那群、流感伤寒群等,本实验室已构建了上述基因型及 lipL21 基因的 pET-32/*E. coli* BL21DE3 原核表

达系统^[16-19]。上述 7 个原核表达系统在 0.5 mmol/L IPTG 诱导下,30℃ 振荡培养 4 h,以表达目的重组蛋白。采用 Ni-NTA 亲和层析法提纯目的重组蛋白,15% SDS-PAGE 及 Bio-Rad 凝胶图像分析系统检测其表达量和纯化情况。

3. 抗血清制备及其效价测定:各重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂混合,充分乳化后背部皮下多点注射免疫家兔,每只家兔每次间隔一周免疫 1 mg 蛋白抗原,共 4 次。末次免疫 10 d 后采集心血,分离血清,采用免疫双扩散法测定抗血清效价。

4. MAT:将各抗血清用生理盐水对倍稀释,各取 0.1 ml 分别与 0.1 ml 上述我国 15 群 15 型 15 株致病性问号钩体及 Patoc I 株双曲钩体新鲜培养物混合,37℃ 孵育 2 h,用暗视野显微镜观察交叉凝集情况,以生理盐水为空白对照,以 50% 钩体被凝集的血清最高稀释度为抗血清 MAT 效价判断的终点^[20]。

5. 外膜制备及 SDS-PAGE 分析:按文献[20]制备上述 15 株问号钩体和双曲钩体 Patoc I 的外膜(OE)。紫外分光光度法测定不同 OE 提取物的蛋白含量,采用 15% 分离胶及不同上样量,对相近蛋白含量的不同 OE 提取物进行 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝 R250 染色分析。

6. Western blot:钩体 OEP 提取物 SDS-PAGE 后电转移至 PVDF 膜(Life Sciences)上。分别以 1:2500 稀释的 rLipL21 兔抗血清以及 1:10 000 稀释的 rLipL32/1、rLipL32/2、rLipL41/1、rLipL41/2、rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 兔抗血清为一抗,1:3000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG(Immuno Research)为二抗,ECL(BioColor)法曝光显影。用本实验室构建的幽门螺杆菌鞘膜蛋白 pET-32/*E. coli* BL21DE3 原核表达系统作为对照,其目的重组表达产物相对分子量(M_r)约为 37×10^3 ^[21]。

结 果

1. 目的重组蛋白的表达及纯化结果:凝胶图像分析结果显示,rLipL21、rLipL32/1、rLipL32/2、rLipL41/1、rLipL41/2、rOmpL1/1、rOmpL1/2 表达量分别约占细菌总蛋白的 10%、40% 和 35%、15% 和 10%、30% 和 15%,经 Ni-NTA 亲和层析法提纯后在 SDS-PAGE 上各目的重组蛋白均仅见单一的条带(图 1)。

2. 各兔抗血清免疫双扩散试验和 MAT 凝集效

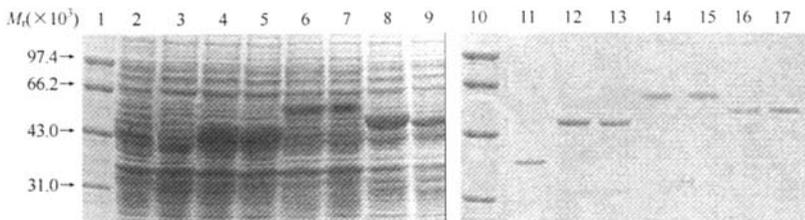
价:rLipL21 兔抗血清免疫双扩散试验效价为1:2,其余均为1:4。各目的重组蛋白兔抗血清均可与我国 15 群 15 型问号钩体参考标准株发生不同程度的交叉凝集反应,其效价范围1:2~1:128,但仅有 rLipL21 兔抗血清不能凝集双曲钩体 Patoc I 株(表 1)。

3. OEP 提取物 SDS-PAGE 图谱:不同钩体 OE 提取物的 SDS-PAGE 图谱见图 2,其主要 OE 条带处于 M_r $20 \times 10^3 \sim 85 \times 10^3$ 之间。

4. Western blot 结果:兔抗钩体 TR/Patoc I 血清,兔抗 LipL32/1、LipL32/2、LipL41/1、LipL41/2、OmpL1/1、OmpL1/2 均能与提取的 16 株钩体外膜蛋白结合,兔抗 LipL21 血清能与 PatocI 外的 15 株钩体外膜蛋白结合。LipL21 与所提外膜蛋白反应条带较弱, LipL32/1、LipL32/2、LipL41/1、LipL41/2、OmpL1/1、OmpL1/2 之间,以及各血清内部 16 菌株间反应条带差异不大(图 3)。

讨 论

钩体血清群除有地理分布差异外,也会发生同一地区钩体优势血清群更迭^[20,22]。流行病学调查结果显示,赛罗群棉兰型钩体逐渐成为两湖及安徽地区新的主要流行钩体血清群型,七日热群在江西省流行的钩体血清群中约占 1/3,但该两群均未包含在疫苗之中。因此,钩体属特异性蛋白抗原对于研制通用性疫苗及诊断方法均有重要意义。尽管已发现一些表面蛋白存在于各钩体血清群中,但了解其抗原性及免疫反应性将为上述疫苗和诊断方法研究提供实验依据。

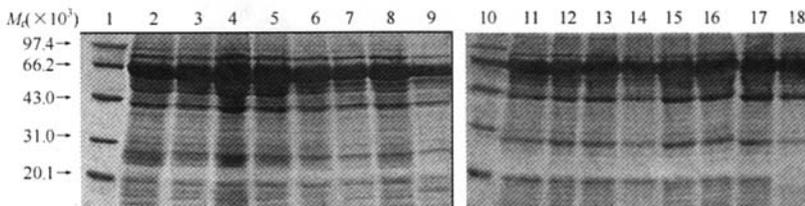


1 和 10:Marker; 2;空质粒; 3~9:IPTG 诱导表达的 rLipL21、rLipL32/1、rLipL32/2、rLipL41/1、rLipL41/2、rOmpL1/1 和 rOmpL1/2; 11~17: Ni-NTA 亲和层析法提纯的 rLipL21、rLipL32/1、rLipL32/2、rLipL41/1、rLipL41/2、rOmpL1/1 和 rOmpL1/2, $M_r (\times 10^3)$ 分别为 36.8、48.4、48.4、58.0、58.0、52.0 和 52.0

图1 SDS-PAGE 分析钩体目的重组蛋白表达量及其提取物纯度

表1 目的重组蛋白兔抗血清与不同钩体株的 MAT 结果

菌株	MAT 效价 (1:)						
	Anti-rLipL21	Anti-rLipL32/1	Anti-rLipL32/2	Anti-rLipL41/1	Anti-rLipL41/2	Anti-rOmpL1/1	Anti-rOmpL1/2
56601	64	8	16	128	32	8	8
856602	32	4	8	16	64	8	8
456603	32	4	8	32	16	8	8
456604	32	8	8	16	128	8	8
456605	128	16	16	64	32	8	4
56606	128	64	32	128	64	32	16
56607	64	32	16	64	16	8	16
56608	128	16	8	64	32	4	4
56609	64	8	16	128	16	32	16
56610	64	8	8	32	16	2	2
56612	32	4	8	64	32	2	4
56613	64	8	8	16	64	4	4
56615	16	2	2	32	8	2	2
56635	64	8	8	32	8	4	4
56655	16	16	8	8	32	4	8
Patoc I	0	16	8	4	2	4	8



1 和 10:Marker; 2~9:问号钩体 56601、56602、56603、56604、56605、56606、56607、56608 株 OE; 11~18:问号钩体 56609、56610、56612、56613、56615、56635、56655 株和双曲钩 Patoc I 株 OE

图2 钩体外膜提取物 SDS-PAGE 后考马斯亮蓝染色图谱

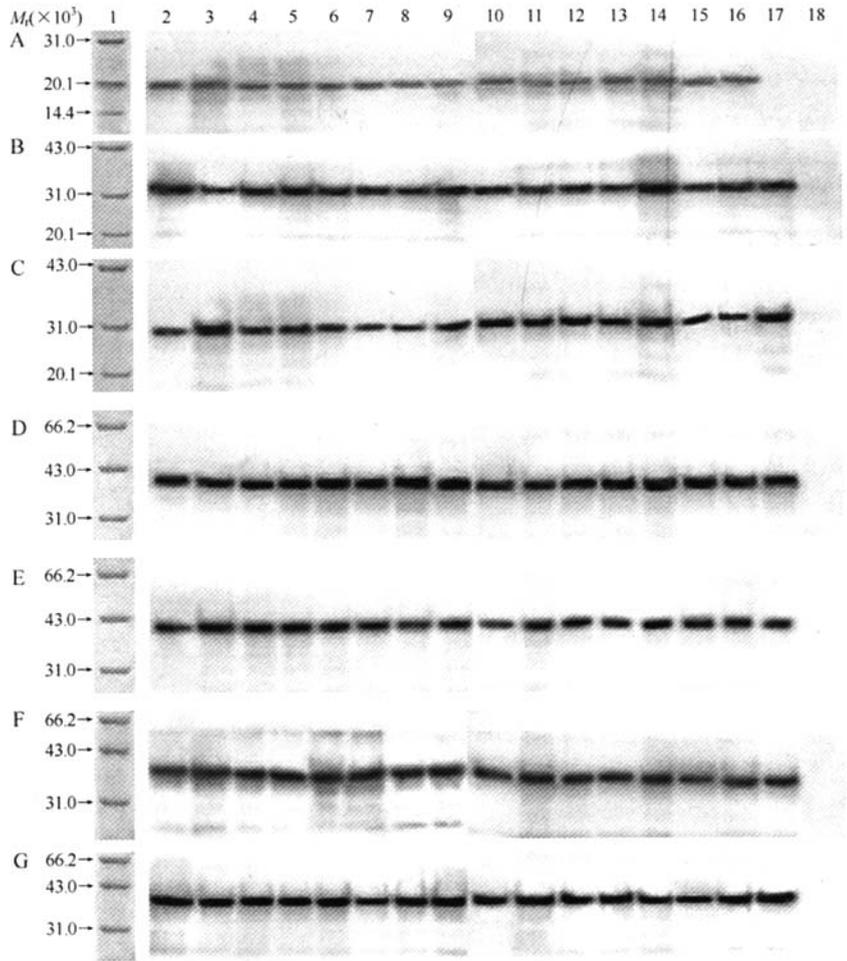
我们在以往的研究中发现,LipL21 无基因型差别,LipL32、LipL41 和 OmpL1 分别有 2、2 和 3 个基因型,但含有 ompL 1/3 基因型的爪哇群、拜伦群、致热群、塔拉索夫群和明尼群均为非流行的钩体血清群,因而本实验未涉及该基因型产物免疫性的研究。

我们的实验结果显示,所构建的 lipL21、lipL32/1 和 lipL32/2、lipL41/1 和 lipL41/2、ompL1/1 和 ompL1/2 基因型原核表达系统能有效地表达目的重组蛋白,其产量分别约占细菌总蛋白的 10%、40%、35%、15%、10%、30% 和 15%,所建立的 Ni-NTA 亲和层析法可获得高纯度的上述目的重组蛋白。

MAT 是在暗视野显微镜下,用新鲜培养的活钩体与相应抗体进行的免疫凝集试验。MAT 抗体具有免疫保护性,可在补体存在下溶解钩体细胞,且在较低效价时即有保护作用^[22]。我们的 MAT 结果证实, rLipL21、rLipL32/1、rLipL32/2、rLipL41/1、rLipL41/2、rOmpL1/1、rOmpL1/2 兔抗血清均能与上述 16 株钩体发生不同程度的凝集反应,效价范围为 1:2~1:128,表明上述蛋白抗原是自然状态表达的位于钩体细胞表面的属特异性抗原。

不同钩体培养物浓度常有差异,因而其 OE 制品浓度常有一定差别。我们在实验中采用分光光度法测定不同 OE 制品中的蛋白浓度后,采用调节不同 OE 制品上样量,获得了令人满意的 SDS-PAGE 及其染色图谱。从 SDS-PAGE 图谱可见,不同钩体株 OEP 种类及含量极为相似,仅双曲钩体 Patoc I 株低分子量蛋白条带略有差异。

免疫双扩散试验结果表明,目的重组蛋白有较好的抗原性。Western blot 结果显示,所有目的重组蛋白兔抗血清均能与 16 株钩体 OE 制品中某一蛋



1: Marker; 217: 问号钩体 56601、56602、56603、56604、56605、56606、56607、56608、56609、56610、56612、56613、56615、56635、56655 株和双曲钩体 Patoc I 株 OE 与兔抗 LipL21(A)、LipL32/1(B)、LipL32/2(C)、LipL41/1(D)、LipL41/2(E)、OmpL1/1(F)、OmpL1/2(G) 血清的 Western blot 结果; 18: 幽门螺杆菌鞘膜蛋白原核表达产物的阴性对照

图3 目的重组蛋白兔抗血清与钩体外膜蛋白提取物的 Western blot 结果

白条带发生较强的免疫反应,其位置与 lipL32/1、lipL32/2、lipL41/1、lipL41/2、ompL1/1 和 ompL1/2 基因表达产物分子量相符。此与 MAT 结果相似,即上述基因表达产物是存在于钩体表面、具有良好免疫反应性的属特异性蛋白抗原。其中 LipL21 条带着色最弱,提示其表达量可能较其他蛋白为低。LipL32/1 条带略浓于 LipL32/2、LipL41/1、LipL41/2、OmpL1/1、OmpL1/2,且该基因型几乎包括了我国流行最广的钩体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,以及巴达维亚群、赛罗群、明尼群^[16],且我们的

实验也证实 rLipL32/1 表达产量最高,提示 rLipL32/1 应是研制钩体通用性疫苗及检测试剂盒的首选抗原。LipL41/1、LipL41/2、OmpL1/1 和 OmpL1/2 条带无明显差异,但 lipL41/1 基因型所包含的钩体血清群与 lipL32/1 基因型几乎完全相同^[17];流行最广的流感伤寒群、秋季群及黄疸出血群、波摩那群和七日热群分别含 ompL1/1 和 ompL1/2 基因型^[18],但 rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 表达量高于 rLipL41/1 和 rLipL41/2。因此,rLipL41/1、rLipL41/2、rOmpL1/1、rOmpL1/2 作为疫苗及检测试剂盒候选抗原各有优劣,故若研制多价抗原基因工程疫苗或检测试剂盒时,应综合考虑进行选择。

(该论文在浙江大学医学院病原生物学系完成)

参 考 文 献

- Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev, 2001, 14: 296-326.
- Meslin FX. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. Emerg Infect Dis, 1997, 3: 223-228.
- Lomar AV, Diament D, Torres JR. Leptospirosis in Latin America. Infect Dis Clin North Am, 2000, 14: 23-39.
- Sehgal SC, Sugunan AP, Vijayachari P. Outbreak of leptospirosis after the cyclone in Orissa. Natl Med J India, 2002, 15: 22-23.
- Barcellos C, Sabroza PC. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. Cad Saude Publica, 2001, 17: 59-67.
- Fuertes L, Nettleman M. Leptospirosis: a consequence of the Iowa flood. Iowa Med, 1994, 84: 449-450.
- Sonrier C, Branger C, Michel V, et al. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. Vaccine, 2000, 19: 86-94.
- Guerreiro H, Croda J, Flannery B, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in human. Infect Immun, 2001, 69: 4958-4968.
- Kobayashi Y. Clinical observation and treatment of leptospirosis. J Infect Chemother, 2001, 7: 59-68.
- Barcellos C, Sabroza PC. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. Cad Saude Publica, 2001, 17: 59-67.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature, 2003, 422: 888-893.
- Haake DA, Champion CI, Marfinich C, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. J Bacteriol, 1993, 175: 4225-4234.
- 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: 2322-2330.
- Haake DA, Chao G, Zuemer RL, et al. The leptospiral major membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect Immun, 2000, 68: 2276-2285.
- Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, et al. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. J Bacteriology, 2004, 186: 2818-2128.
- 范兴丽, 严杰, 毛亚飞, 等. 问号钩端螺旋体血清群 LipL32 基因型分析及其重组蛋白的免疫学鉴定. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24: 92-97.
- 丁威, 严杰, 毛亚飞, 等. 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.
- 徐飏, 严杰, 毛亚飞, 等. 中国主要问号钩端螺旋体血清群外膜蛋白 OmpL1 的基因型, 原核表达系统构建表达及免疫学鉴定. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24: 439-444.
- 刘云英, 罗冬娇, 严杰. 我国 4 个钩端螺旋体血清群 lipL21 基因序列分析及其表达产物的鉴定. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21: 744-747.
- 严杰, 戴保民, 于恩庶, 主编. 钩端螺旋体病学. 北京: 人民卫生出版社, 2006. 59-60, 493-495.
- Mao YF, Yan J, Li LW, et al. Construction of hpaA gene from a clinical isolate of *Helicobacter pylori* and identification of fusion protein. World J Gastroenterol, 2003, 9: 1529-1536.
- Faine S, Adler B. *Leptospira* and Leptospirosis. 2ed edition. Melbourne: MediSci, Australia, 2000.

(收稿日期: 2006-04-27)

(本文编辑: 王多春)

· 有错即改 ·

《中华流行病学杂志》2006 年第 10 期目录中作者名字的更正

《中华流行病学杂志》2006 年第 10 期目录中“疾病控制”栏目第 4 篇文章作者“郭炳红”应为“郭炳虹”, 特此更正。同时对由于我们的工作不周所造成的影响, 表示歉意。

本刊编辑部