

钩端螺旋体外膜蛋白 Loa22 免疫血清与不同血清型钩端螺旋体的交叉免疫反应

张连英¹, 杨正久¹, 丁朋晓¹, 曾庆华¹, 谭立志², 陈琳³

(1. 遵义医药高等专科学校微生物教研室, 贵州 遵义 563002; 2. 南华大学病原生物研究所;
3. 第三军医大学免疫研究所)

摘要: **目的** 探讨钩端螺旋体(钩体)外膜蛋白 Loa22 免疫血清与不同血清型钩体间的交叉免疫反应作用, 为筛选钩体候选疫苗分子提供依据。 **方法** 制备钩体重组 Loa22 蛋白、LipL32 蛋白豚鼠免疫血清, 以 LipL32 免疫血清为阳性对照, 未免疫豚鼠为阴性对照, ELISA 测定与我国常见的各血清型钩体株的交叉反应的 Loa22 蛋白免疫血清效价。 **结果** 与钩体犬群犬型 56603 株、致热群致热型 56605 株、澳洲群澳洲型 56607 株、波摩那群波摩那型 56608 株、流感伤寒群临海型 56609 株、七日群七日热型 56610 株及明尼群明尼型 56655 株反应的钩体 Loa22 蛋白免疫血清效价分别为 1:81 920、1:20 480、1:40 960、1:40 960、1:40 960、1:10 240 和 1:10 240。 **结论** Loa22 蛋白免疫血清与不同血清型钩体有良好的交叉免疫反应性。

关键词: 钩端螺旋体; Loa22 蛋白; 血清型; 交叉免疫反应

中图分类号: R377.5 **文献标识码:** A

Cross-immunoreactivity Between Antisera Against Leptospiral Outer Membrane Protein Loa22 and Various Serotypic Leptospira

ZHANG Lianying, YANG Zhengjiu, DING Pengxiao, et al

(Department of Microbiology & Immunology, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi, Guizhou 563002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the cross-immunoreactivity between antisera against Leptospiral outer membrane protein loa22 and various serotypic leptospira, providing a basis for screening Leptospiral candidate vaccine molecules. **Methods** The antisera were obtained from guinea pigs immunized with recombinant Loa22 or LipL32. With antisera against LipL32 as positive control and normal sera as negative control, ELISA was performed to determine the titers of antisera against loa22 which reacted with various common serotypic leptospira in China. **Results** The titers of antisera against Loa22 which reacted with various pathogenic L. interrogans strains 56603, 56605, 56607, 56608, 56609, 56610 and 56655 were 1:81 920, 1:20 480, 1:40 960, 1:40 960, 1:40 960, 1:10 240 and 1:10 240, respectively. **Conclusion** The antisera against Leptospiral outer membrane protein Loa22 show good cross-immunoreactivity with various serotypic Leptospira.

Key words: Leptospira; Loa22; serotype; cross-immunoreactivity

钩端螺旋体病(简称钩体病)是由致病性的问号钩端螺旋体(简称钩体)所致的一种自然疫源性

传染病,我国是该病的主要疫区之一。钩体病最好的预防和控制措施是接种疫苗,但现有疫苗对不同血清型钩端螺旋体感染无交叉免疫保护作用,亟待研制有交叉保护作用的高效钩体疫苗。研究表明钩体 Loa22 蛋白是钩体的一种高度保守的外膜蛋白,是较理想的钩体候选疫苗分子^[1-3]。前期研究已经证实重组钩体 Loa22 蛋白具有良好的免疫原性^[4],

收稿日期:2013-02-25

基金项目:遵义医药高等专科学校资助项目(遵医专科合[2001]210号)。

作者简介:张连英,硕士,讲师,研究方向:从事钩体疫苗研究, E-mail: lianyingzhang1120@163.com.

免疫动物后对黄疸出血群赖株钩体攻击感染具有保护作用^[5]。本实验进一步探讨从问号钩端螺旋体黄疸出血群赖株 56601 克隆表达的重组 Loa22 蛋白的免疫豚鼠血清与我国主要流行的不同血清型钩体的交叉免疫反应,为筛选钩体候选疫苗分子提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

钩体株:问号犬群犬型 56603 株、致热群致热型 56605 株、澳洲群澳洲型 56607 株、波摩那群波摩那型 56608 株、流感伤寒群临海型 56609 株、七日群七日热型 56610 株及明尼群明尼型 56655 株为本室保存。豚鼠血清:钩体重组蛋白 Loa22 免疫血清、钩体重组脂蛋白 LipL32 免疫血清(阳性对照)和未免疫正常血清为本室保存。

1.2 试剂和仪器

EMJH 培养基(美国 BD 公司),HRP-羊抗豚鼠 IgG(二抗)(深圳晶美生物公司),紫外分光光度计(美国 Bio-Rad),全自动酶标检测仪(芬兰雷勃 Multiskan MK-3),-152℃ 深低温冰箱和 -80℃ 冰箱(日本 SANYO 公司),96 孔板(德国 greiner 公司)。

1.3 方法

1.3.1 钩体抗原制备与含量测定 采用 EMJH 培养基常规培养各钩体株,收集菌体,经 PBS 洗涤,超

声破碎,煮沸变性,15 000 rpm 离心 30 min,取 200 μL 于 0.5 mL Ep 管,紫外分光光度计检测各钩体抗原 OD 值,按照公式:Protein = $OD_{280} \times 1.45 - OD_{280} \times 0.74$ (mg/mL) 计算蛋白含量,其余分装 -80℃ 备用。

1.3.2 血清制备 抗 Loa22 蛋白豚鼠免疫血清、钩体脂蛋白 LipL32 免疫豚鼠血清、未免疫正常豚鼠血清制备参考文献[4-5]。

1.3.3 间接 ELISA 测定血清效价 根据预试验,以 1 μg/孔的各钩体抗原包被反应孔,以 1:10 开始不同倍比稀释的各血清为一抗,1:10 000 HRP-羊抗豚鼠 IgG 为二抗,按常规法进行间接 ELISA,酶标仪检测 A₄₅₀ 值,以(样品 A₄₅₀ - 空白 A₄₅₀)/(阴性 A₄₅₀ - 空白 A₄₅₀) > 2.1 判断为阳性,阳性时血清的最高稀释度即为抗体的效价。

2 结 果

ELISA 法检测钩体 Loa22 蛋白免疫血清与钩体犬群犬型 56603 株、致热群致热型 56605 株、澳洲群澳洲型 56607 株、波摩那群波摩那型 56608 株、流感伤寒群临海型 56609 株、七日群七日热型 56610 株及明尼群明尼型 56655 株的效价分别为 1:81 920、1:20 480、1:40 960、1:40 960、1:40 960、1:10 240 和 1:10 240,均高于或等于相应阳性对照血清效价,见表 1。

表 1 Loa22 抗血清与各致病钩体抗原的交叉反应

钩体血清群	血清型	菌株	Loa22 免疫血清效价	LipL32 免疫血清效价
犬群	犬型	56603 株	1:81 920	1:81 920
致热群	致热型	56605 株	1:20 480	1:10 240
澳洲群	澳洲型	56607 株	1:40 960	1:10 240
波摩那群	波摩那型	56608 株	1:40 960	1:20 480
流感伤寒群	临海型	56609 株	1:40 960	1:40 960
七日群	七日型	56610 株	1:10 240	1:10 240
明尼群	明尼型	56655 株	1:10 240	1:10 240

3 讨 论

问号钩体血清群和型众多,目前全球已发现钩体有 25 个血清群,273 个血清型,我国至少存在 19 个血清群 74 个血清型,是世界上血清型最多的国家之一,而且钩体由于受到我国自然环境的影响,在我

国不同的区域、不同的季节流行的优势血清群和型钩体有明显差异,且各血清群之间交叉保护作用较弱或缺乏^[6],因此目前仍采用当地流行的数种问号钩体血清型的全菌混合死疫苗接种的免疫方案,但此类疫苗副作用大,且对其它血清群钩体的感染无交叉免疫保护作用,因此研发能针对所有问号钩体血清群和血清型的通用型疫苗具有极其重要的意

义。目前尚未发现问号钩体能产生外毒素,也无明显的侵袭性毒力因子^[7],故外膜蛋白(OPMs)成为目前钩体疫苗的主要靶位^[8],而确定OMP是否为钩体属特异性抗原,其编码基因是否存在于所有致病性钩体基因组中是关键。

前期研究表明,钩体Loa22蛋白存在所有致病钩体的外膜中^[1-3],本文的前期研究表明,Loa22重组蛋白有很强的免疫原性,而且免疫力持久^[4],对澳洲群同种血清型钩体有很强的保护作用^[5],但该蛋白免疫血清是否与其它血清型钩体进行免疫交叉反应尚不明确。为此,本实验以LipL32免疫血清为阳性对照(该蛋白在各血清群和血清型致病性问号钩体间高度保守^[9]),在动物体外用ELISA检测了Loa22蛋白免疫血清与我国主要流行的问号犬群犬型56603株、致热群致热型56605株、澳洲群澳洲型56607株、波摩那群波摩那型56608株、流感伤寒群临海型56609株、七日群七日热型56610株及明尼群明尼型56655株的交叉免疫反应,结果显示Loa22蛋白免疫血清与各钩体株间均有良好的免疫反应性,各效价均高于或等于相应的阳性对照血清效价,提示以Loa22重组蛋白免疫血清可能对以上各血清群和型钩体的感染具有交叉免疫保护作用,但这需在进一步的动物实验中得到证实。

参考文献:

[1] Gamberini M, Gomez RM, Atzingen MV, et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify poten-

tial vaccine candidates against leptospirosis [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 244(2): 305-313.

- [2] Nally JE, Whitelegge JP, Aguilera R, et al. Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a clinical isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni [J]. Proteomics, 2005, 5(1): 144-152.
- [3] Yang HL, Jiang XC, Zhang XY, et al. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation [J]. BMC Infect Dis, 2006, 6(1): 6-19.
- [4] 张连英, 丁朋晓, 何汉江, 等. 研究钩端螺旋体外膜脂蛋白Loa22的免疫原性[J]. 南华大学学报: 医学版, 2010, 38(3): 335-337.
- [5] 张连英, 何汉江, 尹卫国, 等. 问号状钩端螺旋体外膜脂蛋白Loa22的克隆表达及对豚鼠的免疫保护作用研究[J]. 实用预防医学, 2007, 14(6): 1678-1681.
- [6] 严杰. 钩端螺旋体病学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1-547.
- [7] Ren SX, Fu G, Jiang XG, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing [J]. Nature, 2003, 422(6934): 888-893.
- [8] Wang Z, Jin L, Wegrzyn A. Leptospirosis vaccines [J]. Microb Cell Fact, 2007, 6: 39.
- [9] Murray GL. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology [J]. Vet Microbiol, 2013, 162(2-4): 305-314.

(此文编辑: 蒋湘莲)