

Cross-Immunoprotectivity of Leptospiral Outer Membrane Protein Loa22

Lianying Zhang, Yanfang He, Guolan Xian, Fenfang Qi, Pengxiao Ding, Sen Luo

Basic Department, Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi Guizhou
Email: 646753084@qq.com

Received: Nov. 22nd, 2018; accepted: Dec. 6th, 2018; published: Dec. 13th, 2018

Abstract

The article is to investigate the cross-immunoprotectivity of antisera of Leptospiral outer membrane protein Loa22 against various serotypic *Leptospira*. Leptospiral outer membrane protein Loa22 was expressed and purified. Guinea pigs were immunized with Loa22 protein, recombinant LipL32 and/or PBS buffer intramuscularly at 2-week interval for three times, respectively, and then challenged with various serotypic *Leptospira*, with recombinant LipL32 as positive control and PBS as negative control. The incidence of immunized-guinea pigs were observed for 15 days. The liver, lung and kidney of immunized-guinea pigs were made into pathological slice, with cross-immunoprotectivity of antisera against Leptospiral outer membrane protein Loa22 to guinea pigs analyzed. The guinea pigs immunized with Loa22 protein were challenged with various serotypic *Leptospira*, and they showed resistance to infection but the PBS-immunized guinea pigs not. The liver, lung and kidney of immunized-guinea pigs have changed. The antisera of Leptospiral outer membrane protein Loa22 show good cross-immunoprotectivity to guinea pigs, and can resist infection of various serotypic *Leptospira*.

Keywords

Leptospira, Outer Membrane Protein Loa22, Cross-Immunoprotectivity

钩端螺旋体外膜蛋白Loa22交叉免疫保护作用研究

张连英, 何彦芳, 先国兰, 齐芬芳, 丁朋晓, 罗 森

遵义医药高等专科学校基础部, 贵州 遵义
Email: 646753084@qq.com

收稿日期: 2018年11月22日; 录用日期: 2018年12月6日; 发布日期: 2018年12月13日

摘要

研究钩端螺旋体外膜蛋白Loa22免疫血清对不同血清型钩端螺旋体的交叉免疫保护作用。表达纯化钩端螺旋体外膜蛋白Loa22。分别在0、2、4周用纯化蛋白Loa22、LipL32蛋白和PBS经豚鼠皮下多点进行免疫。以LipL32蛋白免疫组为阳性对照，PBS免疫组为阴性对照。末次免疫后2周，用培养7天的不同血清型钩体从腹腔注射攻击豚鼠。连续观察15天，观察各组豚鼠发病情况，并取各组豚鼠的肺、肝、肾作病理切片。分析钩端螺旋体外膜蛋白Loa22对豚鼠的交叉免疫保护作用。蛋白Loa22免疫组的豚鼠用不同血清型钩端螺旋体攻击，无发病现象。豚鼠健康情况良好。而PBS对照组豚鼠出现了厌食、懒动等现象，病理切片有明显的变化。钩端螺旋体外膜蛋白Loa22免疫血清对豚鼠具有交叉免疫保护作用，可以抵抗不同血清型钩体的攻击。

关键词

钩端螺旋体，外膜蛋白Loa22，交叉保护免疫作用

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

钩端螺旋体(简称钩体)是钩端螺旋体病(简称钩体病)的病原体。钩体病是一种自然疫源性传染性疾病，属和猪类是两大主要传染源。主要通过接触疫水、疫土而发生感染。其流行几乎遍及全世界，在东南沿地区尤为严重。我国大多数省、市、自治区都有本病存在和流行。临床特点为起病急，早期有高热，全身酸痛，软弱无力，结膜充血，腓肠肌压痛，表浅淋巴结肿大等钩体毒血症。后可伴肺出血、肝出血等全身出血倾向。肺弥漫性出血、心肌炎、溶血性贫血等与肝、肾衰竭为常见致死原因。目前预防和控制钩体病的主要方法是疫苗的接种。钩体疫苗主要有死疫苗，基因工程疫苗等，但现有的钩体疫苗只对同血清型钩体的感染有保护作用，对不同血清型的钩体缺乏交叉保护作用。研制有交叉保护作用的钩体疫苗具有重要的意义。研究表明钩体外膜蛋白Loa22是一种比较理想的疫苗候选分子，具有高度保守性[1][2]。前期研究已发现钩体外膜蛋白Loa22有良好的免疫原性，对同血清型钩体的感染具有保护作用[3]。体外实验也证实钩体外膜蛋白Loa22免疫血清可以阻断钩体黏附Raw264.7细胞，对细胞起到保护作用[4]。而且钩体外膜蛋白Loa22免疫血清与不同血清型钩体具有良好的交叉免疫反应性[5]。本实验在豚鼠体内对钩体外膜蛋白Loa22免疫血清与我国主要流行的不同血清型钩体的交叉免疫保护作用进行进一步探讨和研究，为钩体疫苗分子的筛选提供理论依据。

2. 实验材料与方法

2.1. 实验材料

菌株和重组质粒，问号犬群犬 56,603 株、致热群致热型 56,605 株、澳洲群澳洲型 56,607 株、波摩那群波摩那型 56,608 株、流感伤寒群临海型 56,609 株、七日群七日热型 56,610 株和明尼群明尼型 56,655 株。PQE31-Loa22 本实验室保存。

2.2. 实验动物

健康豚鼠，体重 50 g，50 只。

2.3. 实验主要试剂

蛋白分子预染 marker、Ni-NTA、IPTG、抗体和 EMJH 培养基等主要试剂。

2.4. 实验方法

1) 重组蛋白 Loa22 的表达，将重组质粒 PQE31-Loa22 转化于大肠杆菌 M15，取菌落于培养液中 37℃ 诱导过夜培养。37℃、IPTG 9 h 后，13,000 rpm、10 分钟离心收集菌体。重组蛋白经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化，取纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

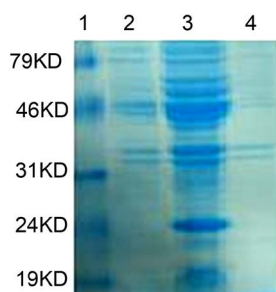
2) 重组蛋白 Loa22 的 Western-blot 鉴定，对纯化蛋白 Loa22 用鼠抗 His 为一抗，羊抗鼠为二抗，进行 Western-blot 鉴定。

3) 豚鼠交叉免疫保护试验，健康豚鼠 30 只，分成 3 组：第一组为 Loa22 蛋白免疫组，第二组为 LipL32 阳性对照组。第三组为 PBS 阴性对照组。第一次免疫：蛋白 Loa22、LipL32 阳性对照和 PBS 阴性对照各 50 μg 加等量的佐剂从豚鼠的腋下、腹股沟及背部进行免疫。相同的方法进行第二次和第三次免疫，每次间隔 2 周。最后一次免疫后 2 周进行不同血清型钩体攻击豚鼠，采用活的问号犬群犬 56,603 株、致热群致热型 56,605 株、澳洲群澳洲型 56,607 株、波摩那群波摩那型 56,608 株、流感伤寒群临海型 56,609 株、七日群七日热型 56,610 株和明尼群明尼型 56,655 株进行攻击豚鼠。不同血清型的钩体株分别经传代，EMJH 培养基 28℃ 培养，培养 3 天后，用培养基调整钩体株浓度达 2×10^9 /ml，1 ml 的不同血清型钩体株经腹腔注射攻击豚鼠。连续攻击 15 天，观察各组豚鼠的发病情况，并对各组豚鼠的肝、肺、肾进行病理切片观察病理变化。对外膜蛋白 Loa22 的交叉免疫保护作用进行评价。

3. 实验结果

3.1. 重组蛋白 Loa22 的表达的 SDS-PAGE、Western-Blot 鉴定

PQE31-Loa22 重组质粒在大肠杆菌 M15 表达 9 小时，37℃ 诱导在上清表达，不带质粒的空菌和带载体质粒的大肠杆菌不表达，无条带(图 1)，经 SDS-PAGE 鉴定分子量为 Loa22 蛋白的大小。



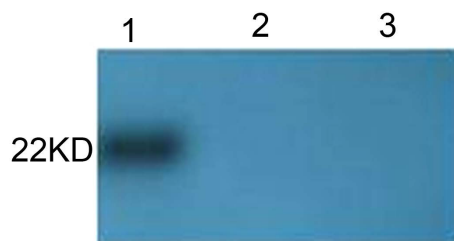
1: Protein Marker, 2: induced E.coli M15, 3: induced bacterial with PQE31/Loa22, 4: induced bacterial with PQE31

Figure 1. SDS-PAGE analysis of recombinant protein Loa22

图 1. 重组蛋白 Loa22 的 SDS-PAGE 分析

3.2. Western-Blot 鉴定

Loa22 蛋白诱导产物进行 Western-blot 鉴定，结果显示在目的位置出现单一特异性条带，而对照组未出现条带(图 2)。



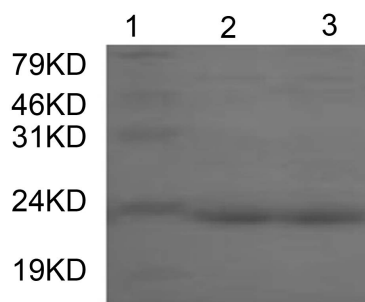
1: induced bacterial with PQE31/Loa22, 2: induced E.coilM15, 3: induced bacterial with PQE31

Figure 2. Western-blot identification of recombinant protein Loa22

图 2. 重组蛋白 Loa22 的 Western-blot 鉴定

3.3. Loa22 蛋白的纯化

蛋白 Loa22 过 Ni-NTA 柱亲和层析纯化，SDS-PAGE 分析分子量为 22kDa 的单一一条带，见图 3。



1: Protein Marker, 2-3: purified Loa22 protein

Figure 3. Loa22 protein purification SDS-PAGE results

图 3. Loa22 蛋白纯化 SDS-PAGE 结果

3.4. 豚鼠交叉免疫保护性结果

3.4.1. 不同血清型钩体感染各免疫组豚鼠的发病情况及保护情况观察

蛋白 Loa22 免疫组的豚鼠在受不同血清型钩体的攻击过程中，未出现厌食，活动等反应正常，于第 9 天死亡 1 只豚鼠。PBS 免疫组的豚鼠在攻击中，均出现厌食，懒动等表现。于第 3 天死亡豚鼠 2 只，第 6 天死亡 4 只，第 7 天死亡 4 只。Lip32 蛋白免疫组豚鼠受钩体攻击也未出现厌食，懒动等表现，于第 10 天死亡 2 只。各组的交叉保护率见表 1。

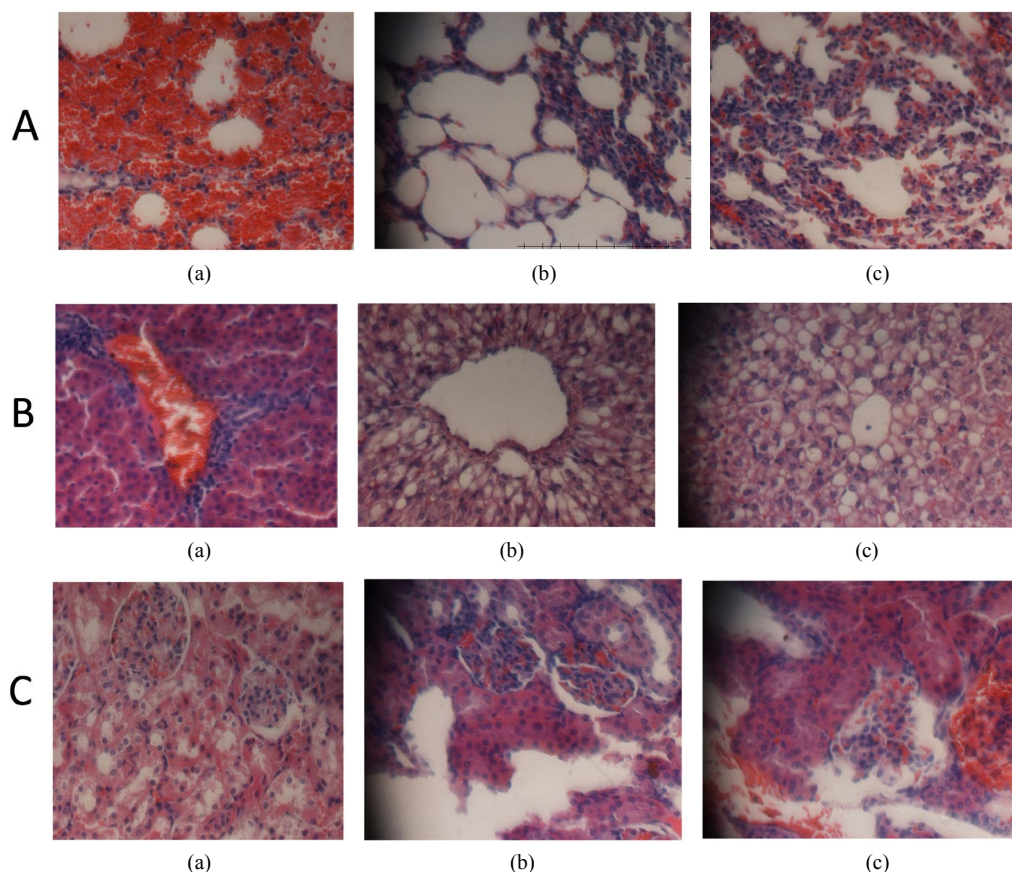
Table 1. Protection of guinea pigs in different immunized groups after infection with different serotypes

表 1. 不同血清型钩体感染后各免疫组豚鼠的保护情况

免疫组	数量	死亡数	保护率(%)
Loa22 蛋白免疫组	12	1	92
PBS 免疫组	12	10	0
LipL32 蛋白免疫组	12	2	83

3.4.2. 免疫组豚鼠的肺、肝、肾的病理切片结果(见图 4)

肺：PBS 免疫组的豚鼠肺病理切片显示肺泡腔内有出血；Loa22 蛋白及 LipL32 蛋白免疫组肺脏未见明显改变。肝：PBS 免疫组的豚鼠肝病理切片显示肝细胞肿胀，排列无序。肝中央静脉充血；Loa22 蛋白及 LipL32 蛋白免疫组肝脏未见明显改变。肾：PBS 免疫组的豚鼠肾病理切片显示肾小球囊腔内有出血；Loa22 蛋白及 LipL32 蛋白免疫组肾小球未见明显改变。



A 肺脏, B 肝脏, C 肾脏, a PBS 免疫组的病理切片结果, b LipL32 蛋白免疫组病理切片结果, c Loa22 蛋白免疫组病理切片结果

Figure 4. Pathological sections of various organs of guinea pigs in each immunized group (HE stain $\times 200$)

图 4. 各免疫组豚鼠各脏器的病理切片(HE 染色 $\times 200$)

4. 结论

钩端螺旋体病分布很广, 几乎全世界各地都有此病的存在或流行。在我国已发现 25 个省、区有钩端螺旋体病人或带菌动物。目前全世界已发现钩体有 20 个血清群, 200 多个血清型, 我国至少发现了 18 个血清群, 70 多个血清型。迄今我国大陆地区流行的问号钩体血清群和血清型中, 以黄疸出血群赖型流行最广, 其次是流感伤寒、秋季群秋季型、波摩那群波摩那型、七日热群七日热型和澳洲群澳洲型等[6]。疫苗是目前控制钩体病最有效的措施, 作为钩体疫苗抗原分子, 必须分布广且序列保守, 如此才能对不同血清型钩体产生广泛的免疫保护作用[7]。研究证实, 非致病的腐生性钩体三宝垄群 Patoc 型 Patoc1 株未检出 Loa22 基因, 我国大陆地区流行的 6 个血清群型问号钩体株中均扩增出 Loa22 基因, *L. borgpetersenii* 基因种爪哇群爪哇型 M10 株和 *L. weilii* 基因种曼耗群清水型 L105 株中也能扩增出 Loa22 基因, 提示该基因广泛存在于我国致病性钩体中。测序及序列分析结果显示, 上述 loa22 基因片段核苷酸和氨基酸序列相似性高达 85.5%~99.8%和 93.9%~99.5%。因此, Loa22 基因表达产物可作为我国钩体疫苗分子。

研究已证实问号状钩端螺旋体外膜蛋白 Loa22 的免疫血清对同血清型钩体具有免疫保护作用。与问号犬群犬 56,603 株、致热群致热型 56,605 株、澳洲群澳洲型 56,607 株、波摩那群波摩那型 56,608 株、流感伤寒群临海型 56,609 株、七日群七日热型 56,610 株和明尼群明尼型 56,655 株在体外也具有良好的免疫反应性。本实验用纯化的钩体外膜蛋白 Loa22 免疫豚鼠, 使豚鼠产生 Loa22 蛋白的特异性抗体, 并测定抗体效价。同时用上述的不同血清型的 6 株钩体对豚鼠进行攻击。观察攻击后的豚鼠的表现, 对 Loa22

蛋白的免疫保护作用进行研究。研究发现 Loa22 免疫蛋白能抵抗不同血清型钩体对豚鼠的攻击,对豚鼠能起到一定的保护作用。钩体外膜蛋白 Loa22 对不同血清型钩体能起到交叉免疫保护作用。钩体外膜蛋白 Loa22 是一良好的疫苗候选分子。但钩体血清型众多,本实验只研究了外膜蛋白 Loa22 对以上 6 株钩体的免疫保护作用,其他血清型钩体的免疫保护作用有待进一步研究。

基金项目

本研究由遵义市科技局资助项目(遵市科合社字(2014)05 号)支持。

参考文献

- [1] Koizumi, N. and Watanabe, H. (2003) Molecular Cloning and Characterization of a Novel Leptospiral Lipoprotein with OmpA Domain. *FEMS Microbiology Letters*, **226**, 215-219. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00619-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00619-0)
- [2] 朱海龙, 鲍郎, 张会东, 等. 赖型钩端螺旋体 OmpA 膜蛋白 Loa22 基因的克隆分析及蛋白表达[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(4): 294-296.
- [3] 张连英, 何汉江, 尹卫国, 等. 问号状钩端螺旋体体外膜蛋白 Loa22 的克隆表达及对豚鼠的免疫保护[J]. 实用预防医学, 2007, 14(6): 1678-1681.
- [4] 张连英, 杨正久, 丁朋晓, 等. 钩端螺旋体外膜蛋白 Loa22 对钩体黏附 Raw264.7 细胞的阻断作用研究[J]. 实用预防医学, 2013, 20(8): 1002.
- [5] 张连英, 杨正久, 丁朋晓, 等. 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[J]. 中南医学科学杂志, 2013, 41(4): 350-351.
- [6] Zhang, C., Wang, H. and Yan, J. (2012) Leptospirosis Prevalence in Chinese Populations in the Last Two Decades. *Microbes Infect*, **14**, 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.11.007>
- [7] 孙爱华, 方佳琪, 严杰. 病原菌耐药信号传导机制及多抗原肽疫苗研究进展与发展趋势[J]. 浙江大学学报, 2013, 42(2): 125-130.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: amb@hanspub.org