问号钩端螺旋体疫苗候选基因 LB061 的抗原性和保守性研究

杨宏亮[1]　林　玮[2]　秦金红[1]　胡宝瑜[1]　杨　杨[1]　谭立志[2]　郭晓奎[1]

【摘要】 **目的**　克隆表达和鉴定问号钩端螺旋体黄疸出血群赖型赖株中疫苗候选基因 LB061，研究 LB061 的免疫原性和在不同血清型钩端螺旋体菌中的保守性。**方法**　生物信息学软件分析预测 LB061 的特征。构建原核表达质粒 pQE31-LB061，经 IPTG 诱导后用 SDS-PAGE 及 Western 印迹法鉴定表达情况。用表达的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠，Western 印迹法检测其抗原性和在不同血清型钩端螺旋体中的保守性。Western 印迹法检测钩端螺旋体全菌兔抗血清中的 LB061 抗体。**结果**　生物信息学预测结果显示，LB061 含有 DUF839 家族结构域。成功克隆了重组质粒 pQE31-LB061，表达的重组蛋白能刺激 BALB/c 小鼠产生抗体(效价为 1∶32 000)，并能与相应抗体反应，具有良好的抗原性。在 16 株不同血清型的钩端螺旋体中均可检测到 LB061 蛋白的表达，并在钩端螺旋体赖株全菌兔抗血清中检测到其抗体。**结论**　LB061 蛋白可以作为外膜蛋白刺激宿主免疫系统产生抗体，具有良好的抗原性和保守性。本研究为其作为疫苗候选基因的研究奠定了基础。

【关键词】 问号钩端螺旋体；　外膜蛋白；　疫苗候选基因；　抗原性；　保守性

Research on antigenicity and conservation of Leptospira interrogans **vaccine candidate gene LB061**

YANG Hong-liang, LIN Wei, QIN Jin-hong, HU Bao-yu, YANG Yang, TAN Li-zhi, GUO Xiao-kui (Department of Microbiology and Parasitology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, *China)*

【**Abstract**】 **Objective**　To clone and express the *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*) vaccine candidate gene, LB061 and to analysis the immunogenicity and conservation of the recombinant protein in different serovars of L interrogans. **Methods**　The characters of LB061 gene were predicted by bioinformatics software. The prokaryotic expression system of the LB061 was constructed by routine molecular biological techniques. Expression of the recombinant LB061 protein was induced by IPTG, and confirmed by Western blot. Balb/C mice were immunized with ercombinant LB061 and immune serum was used to study the immunogenicity of LB061 and the conservation of expressed LB061 in sixteen different serovars. In addition, antibodies against LB061 in rabbit serum infected with *L. interrogans* strain Lai (56601) were examined by Western blot. **Results**　LB061 is a putative outer membrane protein in *L. interrogans* as predicted by bioinformatical analysiss The prokaryotic expression system of LB061 was constructed successfully. Serum titers of anti-recombinant LB061 antibodies in immunized BALB/c mice were 1∶32000. LB061 was detected in sixteen different serovars of *L. interrogans*. LB061-specific antibodies were detected in rabbit serum infected wit *L. interrogans* strain Lai by Western blot. **Conclusion**　The vaccine candidate gene, LB061, of *L. interrogans* serogroup, icterohemorrhagic serovar, Lai strain can elicit antibody responses in rabbit during infection with *Leptospira interrogans*. Our studies provide a basis for further investigation on the role of LB061 as a vaccine candidate gene.

【**Key words**】 Leptospira interrogans;　Outer membrane protein;　Vaccine candidate gene;　Antigenicity;　Conservation

钩端螺旋体病是由致病性钩端螺旋体感染引起的自然疫源性人兽共患病，我国是钩端螺旋体病发病的主要流行地区之一[1]。研制有效的种属特异性疫苗是控制此病流行的有效措施。目前已经研制出的商业化钩端螺旋体疫苗如全菌疫苗和二价外膜疫苗都存在免疫力不持久、缺乏种属间交叉保护性、副作用多等缺点。病原菌的表面暴露蛋白在宿主体内与免疫系统接触，可以诱导产生免疫应答，是病原菌疫苗的重要候选蛋白[2]。钩端螺旋体外膜蛋白是已被证明具有属特异性的抗原[3]，其中在人感染钩端螺旋体病中高表达的 LipL32、LipL41 等已被证明是具有一定的免疫保护性的外膜蛋白，但仍未得到满意的免疫效果[4,5]。Yang 等[6]通过生物信息学、比较基因组学以及转录组学技术，从钩端螺旋体赖型赖株基因组中筛选出了 226 个疫苗候选基因，为研究更为有效的钩端螺旋体疫苗候选基因奠定了基础，其中预测表达于外膜的基因 120 个。LB061 是其中的疫苗候选基因之一，推测表达钩端螺旋体外膜。本研究通过原核表达 LB061 基因，验证重组表达蛋白的免疫反应性、抗原性及其在致病性与非致病性钩端螺旋体菌株中的保守性，进一步为 LB061 作为候选基因疫苗的研究奠定了基础。

基金项目：国家自然科学基金(30670102，30370071)

作者单位：1. 上海交通大学医学院病原生物学教研室，上海 200025；2. 南华大学病原生物学研究所

通讯作者：郭晓奎，E-mail：microbiology@sjtu.edu.cn

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

材料和方法

1. 菌株、质粒和试剂　我国流行的 15 个血清群钩端螺旋体代表株及 1 株腐生型双曲钩体(57001)由中国疾病预防控制中心传染病研究所提供,EMJH 培养基 28 ℃培养。亚克隆载体 PMZ、表达载体 pQE31 及宿主菌 *E. coli* DH5α 和 *E. coli* M15 为本室保存。小量质粒抽提及胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;T_4DNA 连接酶及限制性内切酶为 Takara 公司产品;Ni-NTA resin、BCA 蛋白定量测定试剂盒、Goat-anti-Rabbit/Mouse IgG HRP 购自上海申能博彩公司;Goat-anti-Rabbit/Mouse IgG HRP(H+L)购自 KPL。钩端螺旋体赖株全菌兔抗血清由本实验室制备保存,MAT 检测其效价为 1∶16 000。

2. 实验动物　6~8 周龄的清洁级雌性 BALB/c 小鼠由上海交通大学医学院动物科学部提供。

3. 生物信息学分析　蛋白质的一级序列检索自 NCBI 提供的蛋白质数据库 http://www.ncbi.nlm.nih.gov。应用 SignalP3.0 预测信号肽(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/),应用 pfam(http://pfam.janelia.org/cgi-bin/hmmsearch)预测结构域。

4. 聚合酶链反应(PCR)扩增目的基因　钩端螺旋体赖型赖株(56601 株)在 EMJH 培养基中 28 ℃培养至菌体密度为 10^8/ml 时,10 000g 离心 10 min 收集菌体。用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取钩端螺旋体基因组 DNA(上海华舜生物公司)。根据 GenBank 提供的基因序列设计 LB061 引物。上游引物:5′-CGGGATCCAAATTGTAAATCAGAAG-3′,下游引物:5′-CCAAGCTTTTACTTTAGATAAATTGCA-3′。酶切位点为 BamH Ⅰ和 Hind Ⅲ。引物由上海生物工程有限公司合成。PCR 体系为:2 μl DNA 模板、引物 50 mmol/L 各 2 μl、50 μl Pfu Master Mix(TIANGEN 公司),加去离子水至 100 μl。反应条件:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 30 s,52 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 2 min,35 个循环,72 ℃终延伸 10 min。扩增后 PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,DNA 胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物。

5. 原核表达载体的构建与鉴定　将回收纯化的 PCR 产物连接至表达载体 pQE31 转化入宿主菌大肠埃希菌 DH5α。酶切鉴定后,挑阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序鉴定。

6. 重组蛋白的表达及纯化　将测序成功的重组质粒转化至表达菌 *E. coli* M15,经 30 ℃8 h 诱导表达重组蛋白质(IPTG 浓度为 0.5 mmol),超声裂解破碎菌体,分别收集沉淀上清液,经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western 印迹法鉴定后,大量表达并由 Ni-NTA 亲和层析纯化重组蛋白,透析浓缩后用 BCA 蛋白定量测定试剂盒测其浓度。

7. 重组蛋白多克隆抗体制备　20 μg 重组蛋白加等体积完全弗氏佐剂(Sigma 公司)免疫 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,PBS 加佐剂为阴性对照组,初次免疫后每间隔 15 d 用 20 μg 重组蛋白加等体积不完全弗氏佐剂加强 1 次,加强 2 次后第 10 天采血,酶联免疫吸附试验(ELISA)测其效价。

8. Western-印迹法检测重组蛋白的免疫反应性　5 μg 重组蛋白经 SDS-PAGE 后转膜,小鼠血清 1∶2 000 稀释作为一抗,二抗为羊抗鼠 IgG HRP(1∶2 000)。

9. 钩端螺旋体兔抗血清中 LB061 抗体的检测　Western 印迹法检测钩端螺旋体全菌兔抗血清中的 LB061 抗体。5 μg 纯化后的重组蛋白 SDS-PAGE 后转膜,以兔抗 56601 株全菌血清作为一抗(1∶100),二抗为羊抗兔 IgG HRP(1∶2 000)。

10. 重组蛋白在不同血清型钩端螺旋体中保守性检测　将我国流行的 15 个血清群钩端螺旋体代表株及腐生型双曲钩体(57001)由上样缓冲液(62.5 mmol/L Tris 盐酸(pH6.8),10%甘油,5% 2-巯基乙醇,2% SDS)处理后经 10% SDS-PAGE 分离后转膜,以重组蛋白鼠抗血清为一抗(1∶2 000),以羊抗鼠 IgG HRP(1∶2 000)作二抗,Western 印迹法检测重组蛋白在不同血清型钩端螺旋体中的保守性。

结　果

1. 生物信息学预测结果分析　生物信息学预测结果显示,问号钩体赖型赖株 LB061 基因全长 1 596 bp,编码全长为 532 个氨基酸的蛋白质,基因产物为假定的蛋白质 LB061。在 29~30 氨基酸位置有 Ⅰ型信号肽酶切位点,44 与 501 氨基酸区间为结构域 DUF839。

2. PCR 扩增结果及重组质粒酶切鉴定　以提取的 56601 株基因组 DNA 为模板,用特异性引物 PCR 扩增,回收纯化的 PCR 产物连接至表达载体 pQE31 转化入宿主菌大肠埃希菌 DH5α,成功构建原核重组质粒,酶切鉴定结果见图 1。

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

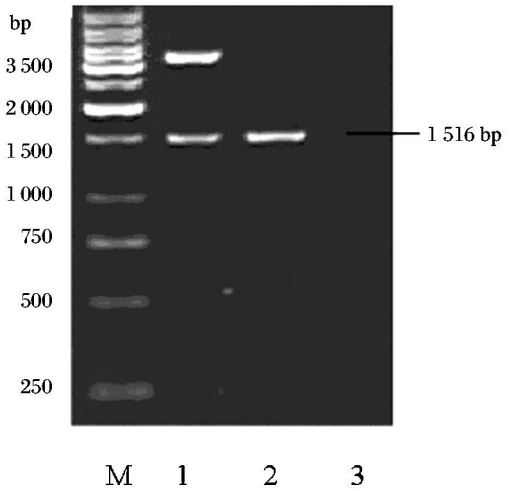


图 1　pQE31 重组表达载体的 BamH Ⅰ和 Hind Ⅲ限制性酶切分析

Fig 1.　Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid by BamH Ⅰ and Hind Ⅲ

1: recombinant plasmid digested with BamHI and Hind Ⅲ, 2: PCR production, 3: empty vector, M: DNA maker.

3. 重组蛋白表达纯化　SDS-PAGE 及 Western 印迹法鉴定相对分子质量 (*Mr*) 与理论预期值一致, 约为 47.4 ×10^3 (图 2), 表达产物主要存在于菌体超声破碎物离心后的沉淀中。

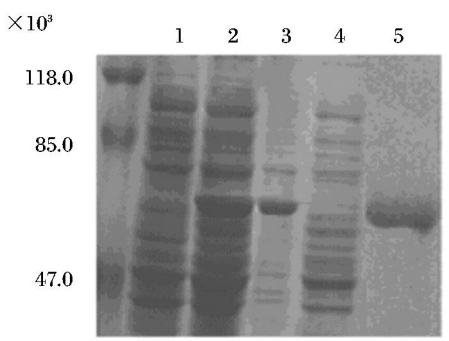


图 2　LB061 重组蛋白在 M15 中表达的 SDS-PAGE 分析及鉴定

Fig 2.　SDS-PAGE analysis and identification of recombinant protein in M15

1: Non-induced recombinant protein, 2: induced recombinant protein, 3: precipitation of recombinant protein; 4: supernatant of recombinant protein; 5: purified protein; M: Protein marker.

4. 免疫反应性检测分析　表达的重组蛋白能刺激 BALB/c 小鼠产生抗体, ELISA 检测其效价为 1∶32 000。Western 印迹法鉴定显示, 制备的多克隆抗体可以和相应的重组蛋白结合 (图 3)。试验结果表明, 目的蛋白可以刺激动物产生特异性抗体, 并能与相应抗体结合, 具有良好的抗原性。

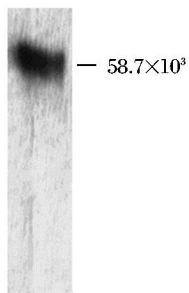


图 3　LB061 重组蛋白抗血清与相应蛋白的 Western 印迹法结果

Fig 3.　Western-blot analysis on the recognition of recombinant LB061 protein by LB061 immune serum

5. 钩端螺旋体兔抗血清中 LB061 抗体的检测　Western 印迹法检测到钩端螺旋体赖株兔抗血清中存在 LB061 的抗体 (图 4)。结果表明钩端螺旋体 LB061 基因在感染钩端螺旋体的动物体内有表达并能刺激机体产生相应抗体。

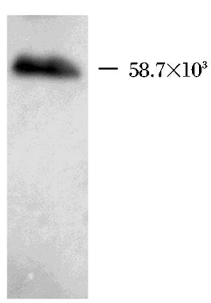


图 4　LB061 重组蛋白与钩端螺旋体赖株全菌兔抗血清的 Western 印迹法结果

Fig 4.　Western-blot analysis on the recognition of LB061 protein anti-*L. interrogans* strain 56601 serum

6. 不同致病菌株中重组蛋白保守性检测　Western 印迹法检测 LB061 在我国流行的 15 个血清群钩端螺旋体代表株及腐生型双曲钩体中的分布情况。结果显示在 16 株钩端螺旋体中均有 LB061 蛋白的表达 (图 5), 说明 LB061 是保守的钩端螺旋体蛋白。

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

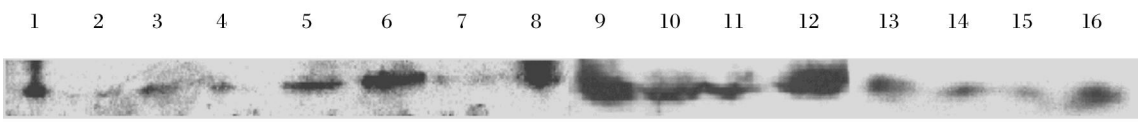


图 5 LB061 在 15 株致病菌株及 1 株非致病菌株中的表达情况

Fig 5. Western blot analysis of pathogenic and non-pathogenic leptospires using anti-LB061 immune sera

1 :56601 ,2 :56602 ,3 :56603 ,4 :56604 ,5 :56605 ,6 :56606 ,7 :56607 ,8 : :56608 ,9 :56609 ,10 :56610 ,11 :56612 ,12 :56613 ,13 :56615 ,14 :56635 ,15 :56655 ,16 :57001.

讨 论

LB061 是位于钩端螺旋体小染色体上的编码蛋白的基因 ,LB061 蛋白预测位于外膜 ,是钩端螺旋体的候选疫苗之一。生物信息学预测显示在 LB061 的 44～501 氨基酸区为结构域 DUF839 ,DUF839 家族是未知功能的细菌蛋白质 ,在多种微生物中均存在 DUF839 家族蛋白质。在天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 基因组中 ,具有 DUF839 家族的基因编码推测的膜蛋白者分泌蛋白质[7]。在空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 基因组中也存在编码 DUF839 家族蛋白质的基因 ,其编码蛋白质功能未知[8]。在钩端螺旋体哥本哈根血清型 Fiocruz L1-130 株基因组中也有编码未知功能的含 DUF839 家族的基因 LIC20047 ,与钩端螺旋体赖株的 LB061 蛋白质相比仅有 2 个氨基酸的差异[9]。本研究结果显示 ,在问号钩端螺旋体 56601 株兔抗血清中可以检测出 LB061 的抗体 ,说明在钩端螺旋体感染中 LB061 可能作为外膜蛋白在宿主体内与免疫系统接触 ,诱导产生免疫应答 ,从而刺激机体产生抗体。Western 印迹法检测结果显示 ,在我国流行的 15 个血清群的代表株及腐生型双曲钩端螺旋体中均有 LB061 的表达 ,表明 LB061 在不同血清型钩端螺旋体中具有强保守性。

本研究首次报道了在问号钩端螺旋体赖型赖株中疫苗候选基因 LB061 的表达以及抗原性和保守性 ,该蛋白可能作为外膜蛋白刺激宿主免疫系统产生抗体 ,并与特异性抗体反应 ,具有良好的抗原性 ,且 LB061 在不同血清群的钩端螺旋体中具有高度保守性。本课题为进一步研究疫苗候选基因 LB061 奠定了基础。

参 考 文 献

1. 郭晓奎 . 钩端螺旋体的研究进展 . 国外医学 :微生物学分册 ,2005 ,28(6) :1～2 ,16
2. Rodriguez-Ortega MJ ,Norais N ,Bensi G ,et al. Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A Streptococcus surface proteome. Nat biotechnol , 2006 ,24 :191～197
3. Vachaev BF ,Iagovkin EA. The immunochemical and biological properties of Leptospira membranes. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol ,1992 ,(11-12) :46～49
4. 阮萍 ,严杰 ,毛亚飞 ,等 . 问号钩端螺旋体 rLTB/ rCTB-LipL32/ 1 免疫保护作用及野生株 LipL32 基因表达和患者抗体检测 . 中华微生物学和免疫学杂志 ,2005 ,25 :369～374
5. Haake DA , Mazel MK, McCoy AM , et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. Infect Immun ,1999 ,67 :6572～6582
6. Yang HL , Zhu YZ, Qin JH , et al. In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against Leptospira interrogans. BMC Genomics , 2006 ,7 :293
7. Bentley SD , Chater KF , Cerdeno-Tarraga AM , et al. Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2) . Nature 2002 ,17 :141～147
8. Parkhill J ,Wren BW ,Mungall K ,et al. The genome sequence of the food-borne pathogen Campylobacter jejuni reveals hypervariable sequences. Nature ,2000 ,403 :665～668
9. Nascimento AL , Ko AI , Martins EA , et al. Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. J Bacteriol , 2004 , 186 :2164～2172

(收稿日期 :2007-01-15)

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net