

问号钩端螺旋体属特异性 OmpL1s 抗原膜定位及其自然抗体应答

孙百莉^{1,4} 郭宗琪² 罗冬娇³ 孙军德¹ 严 杰^{4*}

(1 沈阳农业大学土地与环境学院 沈阳 110161) (2 四川省疾病预防控制中心 成都 610041)

(3 杭州师范学院基础医学部 杭州 310018) (4 浙江大学医学院 杭州 310058)

摘 要: 为了确定问号钩端螺旋体(简称钩体)属特异性 OmpL1s 抗原膜定位及其自然抗体应答情况和抗体类型,为 OmpL1s 用于研制通用性钩体基因工程疫苗及检测试剂盒抗原提供依据。采用显微镜凝集试验(MAT)检测四川地区 156 份钩体病人血清标本。用 PCR 和核苷酸序列分析,了解中国流行的钩体主要血清群 ompL1 基因型。采用常规基因工程技术构建 ompL1/1 和 ompL1/2 主要基因型原核表达系统, Ni-NTA 亲和层析法提纯目的重组表达产物 rOmpL1/1 和 rOmpL1/2。采用胶体金免疫电镜技术,对 OmpL1s 进行膜定位。建立了基于 rOmpL1s 的 ELISAs 检测钩体病人血清中特异性抗体水平及其类型。试验结果表明,黄疸出血群钩体仍然是四川地区最主要的优势钩体血清群。中国流行的钩体主要血清群 ompL1 基因可有 ompL1/1 和 ompL1/2 两个基因型,两者核苷酸和氨基酸序列相似性之间有较明显的差异。OmpL1s 是位于钩体外膜表面的蛋白分子。不同稀释度的 156 例钩体病人血清标本中, rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 特异性 IgM 阳性率分别为 67.9% ~ 79.5% 和 75.0% ~ 75.6%, 特异性 IgG 阳性率分别为 71.8% ~ 79.5% 和 75.0% ~ 76.9%。上述试验结果提示, OmpL1s 是位于钩体表面属特异性蛋白抗原。自然感染钩体时, rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 均可诱导机体体液免疫应答并产生 IgM 和 IgG 两类血清抗体,且两者之间有广泛的抗原交叉反应。rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 可作为研制通用性钩体基因工程疫苗和检测试剂盒的候选抗原。

关键词: 问号钩端螺旋体; ompL1 基因; 重组表达; 分子定位; 免疫应答

中图分类号: Q939.91 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)02-0329-06

钩端螺旋体(简称钩体)病是全世界范围内流行的人兽共患病^[1~3],也是洪涝时重点监控的传染病之一^[4~6]。钩体血清群、型众多,各群、型间交叉保护作用微弱^[7~9]。因此,目前采用的钩体疫苗均为根据当地流行问号钩体血清群、型制备的多价全菌死疫苗,但该疫苗对其未包含的钩体血清群、型感染保护作用有限,易引起钩体病的爆发流行^[7]。寻找钩体属特异性保护抗原,对于筛选通用型钩体疫苗及实验室诊断试剂盒候选抗原均有重要价值。

钩体分为对人和动物致病的问号钩体(*Leptospira interrogans*)和腐生性的双曲钩体(*Leptospira biflexa*)。Haake 等^[10]首先从流感伤寒群 RM52 株钩体中克隆了 OmpL1 基因,并发现该基因及其产物仅存在于致病性问号钩体中。国内学者报道黄疸出血群 56601 株和爪哇群 56602 株具有 ompL1 基因^[11,12]; ompL1 基因有不同基因型,其重组表达产物有良好的抗原性^[13]。由于基因携带载体和宿主菌不同,极有可能存在重组或自然表达抗原免疫原性的差异,了解抗原存在部位及其在自然感

染人群中的抗体反应和类型,对于研制疫苗及诊断试剂盒均具有重要参考价值,目前未见文献报道。本研究克隆并构建了 ompL1/1 和 ompL1/2 主要基因型原核表达系统,建立了基于 rOmpL1s 的 ELISAs 检测了钩体病人血清中特异性 IgG 和 IgM,同时采用免疫电镜技术对 OmpL1s 进行了膜定位。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源及其培养: 我国 15 群 15 型问号钩体参考标准株黄疸出血群赖型 56601 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鉴定所。采用 EMJH 培养基培养钩体,培养物用 400× 暗视野显微镜检查,若菌体形态典型、运动活泼、菌数 ≥ 200 条/每个视野者可供使用^[14]。

1.1.2 主要试剂和仪器: 高保真 PCR 试剂盒、各种

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(39970678) 浙江省教育厅科研基金(20050716)

* 通讯作者。Tel 86-571-88208297 E-mail: Med_bp@zju.edu.cn

作者简介: 孙百莉(1979-)女,辽宁人,硕士研究生,从事人兽共患病病原菌研究。E-mail: sunbaili791012@163.com

收稿日期: 2006-08-07 接受日期: 2006-09-28 修回日期: 2006-11-30

限制性内切酶购于大连宝生物(TaKaRa)公司;T-A克隆试剂盒购于BioColor公司;胶体金(12nm)标记羊抗兔IgG购自美国Jackson ImmunoResearch公司。主要仪器为PCR仪(HyBaid Spt001型)、凝胶图象分析系统(BioRad Universal Hood II型)、透射电镜(Siemens 300型)、自动酶联免疫分析系统(BioRad Model 680型)。

1.2 病人血清标本来源及其MAT检测

钩体病人血清标本由四川省疾病预防控制中心提供,参照文献[7,14]进行MAT检测,以MAT效价 $\geq 1:80$ 为阳性结果判断终点。MAT结果表明,156份病人血清标本MAT效价 $\geq 1:80$,其中2004年凉山州血清标本71份、2005年峨眉山市血清标本51份、2005年名山市血清标本34份,感染的钩体血清群为黄疸出血、秋季、澳洲、波摩那、流感伤寒和七日热群。

1.3 ompL1基因扩增及产物检测

根据上述钩体病人感染的钩体血清群,采用常规苯酚-氯仿法提取问号钩体56601、56606、56607、56608、56609、56610株和双曲钩体Patoc I株的DNA,经无DNA酶的RNA酶消化后,再次用苯酚-氯仿法提取DNA,用分光光度法测定DNA的浓度和纯度^[15]。根据GenBank公布的ompL1基因序列(No: I61405, AF250318, AY622658 ~ AY622667)^[13],以及内切酶图谱分析结果,采用Primer Designer软件设计引物。引物由上海博亚生物技术有限公司(BioAsia)合成,序列如下:上游5'-CCGGAATTCATGATCCGTAACATAAGTAAG-3'(EcoRI),下游5'-CCGCTCGAGTTAGAGTTTCGTGTTTATAACC-3'(XhoI)。采用高保真PCR试剂盒扩增ompL1基因,反应总体积为100 μ L,内含2.5mol/L MgCl₂、0.25mmol/L dNTP、250nmol/L各引物、2.5U EX-Taq聚合酶、100ng DNA模板和1 \times PCR缓冲液(pH8.3)。PCR反应参数:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,52 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 90s,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,目的扩增片段预期长度为963bp。

1.4 T-A克隆和序列测定

用T-A克隆试剂盒将目的扩增片段克隆至pUCm-T载体中,转化至*E. coli* DH 5 α 株中并扩增,碱变性法提取质粒^[15],双酶切初步被鉴定后委托BioColor公司测定重组质粒中插入片段的核苷酸序列。

1.5 原核表达系统构建及重组蛋白表达和提纯

根据测序结果,所克隆的目的基因有ompL1/1

和ompL1/2两个基因型。采用表达载体pET32a(Novagen)和表达宿主菌*E. coli* BL21DE3,按常规方法构建ompL1/1和ompL1/2重组表达系统pET32a-ompL1/1-*E. coli* BL21DE3和pET32a-ompL1/2-*E. coli* BL21DE3,0.5mmol/L IPTG 37 $^{\circ}$ C诱导目的重组蛋白rOmpL1/1和rOmpL1/2表达。采用Ni-NTA亲和层析法提纯目的重组蛋白,15%SDS-PAGE和凝胶图象分析系统检查目的重组蛋白表达和提纯效果。

1.6 目的重组蛋白抗血清的制备及其效价测定

1mg的rOmpL1/1或rOmpL1/2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2只SPF级新西兰家兔,间隔一周免疫1次,共4次。末次免疫10d后采集心血,分离血清,采用免疫双扩散法测定抗血清效价。

1.7 OmpL1的定位

采用免疫电镜法。钩体56601株和56609株新鲜培养物10000r/min离心15min,取沉淀用PBS重悬并离心洗涤2次。取沉淀加入20倍体积的2%多聚甲醛液,4 $^{\circ}$ C固定24h,再用PBS洗涤2次,明胶包埋后冰冻超薄切片。用0.5mmol/L NH₄Cl-0.1mol/L PBS(pH7.4)作用15min,以封闭切片中游离醛基,PBS漂洗3次后用1%BSA-0.1mol/L PBS(pH7.4)室温封闭30min。以1:1000稀释的rOmpL1/1或rOmpL1/2兔抗血清为一抗,4 $^{\circ}$ C作用过夜。PBS反复漂洗后,加入1:20稀释的胶体金(12nm)标记羊抗兔IgG为二抗,4 $^{\circ}$ C作用2h。PBS反复漂洗后分别用中性醋酸双氧铀和酸性醋酸双氧铀溶液各染色10min,漂洗、干燥后用透射电镜观察。阴性对照除用PBS代替兔抗血清一抗外,其余实验步骤、所用试剂及其浓度均相同。

1.8 rOmpL1s-IgG/IgM-ELISAs

酶标板每孔加入浓度为50 μ g/mL的rOmpL1/1或rOmpL1/2溶液0.1mL,4 $^{\circ}$ C包被过夜。次日按常规封闭、PBS-Tween 20洗涤,分别以1:50和1:100或1:100和1:200稀释的病人血清为一抗用于IgM或IgG检测,以1:3000稀释的HRP标记羊抗人IgM(Jackson ImmunoResearch)或1:4000稀释的HRP标记羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch)为二抗,OPD为底物,显色后检测OD₄₉₀值。采用相同稀释度的16份正常人血清作为阴性对照,稀释度及所用其它试剂和实验步骤均与病人血清样本相同。以被检标本OD₄₉₀值 \geq 阴性对照OD₄₉₀均值+3SD者为阳性^[16]。

2 结果

2.1 钩体病人血清 MAT 检测结果

共有 156 份血清 MAT 效价 ≥ 1:80(表 1),75%

(117/156)患者感染黄疸出血群钩体 ,其余 25%(39/156)患者分别感染秋季群、澳州群、波摩那群、流感伤寒群和七日热群钩体。

表 1 钩体病人血清标本 MAT 检测结果

Table 1 MAT examination results of leptospirosis patients ' serum samples										
Regions	Cases	Serogroups	MAT Titers (cases)							Total
			1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
Liangshan	71	Icterohaemorrhagiae	13	4	8	3	6	4	1	39
		Autumnalis	0	3	0	1	1	0	0	5
		Grippityphosa	1	4	0	2	1	0	0	8
		Australis	2	3	1	1	0	0	0	7
		Hebdomadis	4	0	2	1	0	0	0	7
		Pomona	1	0	2	2	0	0	0	5
Emeishan	51	Icterohaemorrhagiae	3	4	11	7	9	13	4	51
Mingshan	34	Icterohaemorrhagiae	3	7	2	8	5	2	0	27
		Australis	1	1	1	2	1	0	0	6
		Pomona	0	0	0	0	1	0	0	1
Total	156		28	26	27	27	24	19	5	156

2.2 PCR 和序列分析结果

从 6 株问号钩体 DNA 中均扩增获得预期大小的 ompL1 基因目的片段 ,但双曲钩体 Patoc I 株扩增结果阴性。序列分析结果表明 6 株问号钩体 ompL1 基因可分为 ompL1/1 和 ompL1/2 两个基因型 ,其中 56606 和 56609 株为 ompL1/1 基因型 ,56601、56607、56608 和 56610 株为 ompL1/2 基因型。与 GenBank 中相应 ompL1 基因型序列(No. :I61405 , AF250318 , AY622658 ~ AY622667)比较 ,所获得的 ompL1/1 和 ompL1/2 基因型核苷酸序列相似性分别为 96.87% ~ 99.48%和 95.07% ~ 99.36% ,氨基酸序列相似性分别为 98.44% ~ 100% 和 95.69% ~ 100%。但 ompL1/1 和 ompL1/2 基因型之间的核苷酸和氨基酸序列相似性仅分别为 92.11% ~ 93.06% 和 92.51% ~ 93.45%。

2.3 目的重组蛋白的表达及提纯结果

SDS-PAGE 和凝胶图象分析系统分析显示 ,所构建的 ompL1/1 和 ompL1/2 原核表达系统在 IPTG 诱导下能表达目的重组蛋白 rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 ,其表达量分别约占细菌总蛋白的 30%和 15% ,Ni-NTA 亲和层析法提纯后见单一的蛋白条带(图 1)。

2.4 兔抗血清免疫效价及 OmpL1 的定位

rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 兔抗血清免疫双扩散试验效价均为 1:4。免疫电镜观察结果显示 ,免疫胶体金颗粒均定位于钩体 56609 株和 56601 株菌体表面(图 2) ,提示 OmpL1/1 和 OmpL1/2 均是钩体外膜蛋白。

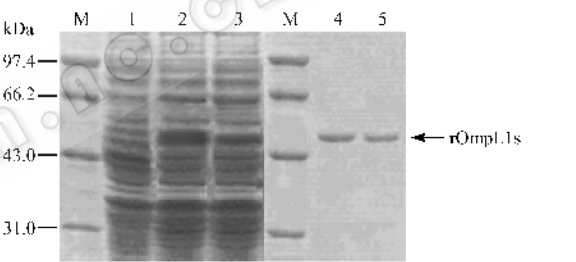


图 1 rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 表达及其提纯效果

Fig.1 Expression and purification effects of rOmpL1/1 and rOmpL1/2. M. Markers ; 1.The pET32a with no inserted fragments ; 2 and 3.The expressed rOmpL1/1 and rOmpL1/2 ; 4 and 5.The purified rOmpL1/1 and rOmpL1/2.

2.5 rOmpL1s-IgG/IgM-ELISAs 检测结果

rOmpL1/1-IgG-ELISA 中 ,1:100 或 1:200 稀释的阴性对照血清标本 OD₄₉₀ 均值 ± SD 分别为 0.19 ± 0.07 或 0.14 ± 0.04 ,故其阳性判断标准值分别为 0.40 和 0.26 ;rOmpL1/2-IgG-ELISA 中 ,1:100 或 1:200 稀释的阴性对照血清标本 OD₄₉₀ 均值 ± SD 分别为 0.19 ± 0.05 或 0.13 ± 0.04 ,故阳性判断标准值分别为 0.33 和 0.24。根据上述判断标准值 ,1:100 或 1:200 稀释的血清标本 rOmpL1/1-IgG-ELISA 阳性率分别为 79.5%(124/156)和 71.8%(112/156) ,1:100 或 1:200 稀释的血清标本 rOmpL1/2-IgG-ELISA 阳性率分别为 76.9%(120/156)和 75.0%(117/156)。rOmpL1/1-IgM-ELISA 中 ,1:50 或 1:100 稀释的阴性对照血清标本 OD₄₉₀ 均值 ± SD 分别为 0.23 ± 0.06 或 0.17 ± 0.05 ,故阳性判断标准值分别为 0.41 和 0.32 ;rOmpL1/2-IgM-ELISA 中 ,1:50 或 1:100 稀释的

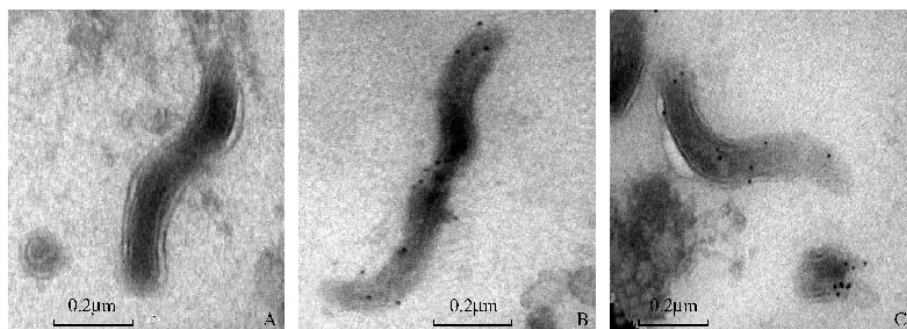


图2 OmpL1s 定位的免疫电镜观察结果

Fig.2 The results of OmpL1s location by immunoelectron microscopy. A: the negative control; B: the immuno-aurosol particles binding OmpL1/1 on the surface of *L. interrogans* strain 56609; C: the immuno-aurosol particles binding OmpL1/2 on the surface of *L. interrogans* strain 56601.

阴性对照血清标本 OD_{490} 均值 \pm SD 分别为 0.27 ± 0.06 或 0.17 ± 0.04 , 故阳性判断标准值分别为 0.45 和 0.29。根据上述判断标准值, 1:50 或 1:100 稀释的血清标本 rOmpL1/1-IgM-ELISA 阳性率分别为 79.5%(124/156) 和 67.9%(106/156), 1:50 或 1:100 稀释的血清标本 rOmpL1/2-IgM-ELISA 阳性率分别为 75.0%(117/156) 和 75.6%(118/156)。

3 讨论

致病性问号钩体因其血清群、型众多且有地区分布差异, 故不同地区必须采用不同组合的多价疫苗进行免疫接种, 血清学检测方法及其过程也相当烦琐和复杂。钩体属特异性抗原(GP-Ag)是指不同钩体血清群、型均具有的抗原^[7,14], 因而在研制通用型钩体疫苗及检测试剂盒中有重要应用价值和现实意义。采用目前成熟的基因工程技术, 可较为便利地获得大量目的蛋白, 故钩体属特异性外膜蛋白抗原更受到人们重视。

迄今全球问号钩体已有 25 个血清群、168 个血清型, 我国则有 18 群 75 型, 且新的血清群、型仍在不断发现之中^[7]。尽管我国问号钩体血清群众多, 但黄疸出血群、流感伤寒群、秋季群和波摩那群是我国最为流行的钩体血清群, 其次是七日热群和澳洲群, 近年引起我国南方地区钩体病暴发流行的棉兰型钩体, 早年也归属于七日热群^[14]。本研究 MAT 检测结果也证实, 四川地区 156 例钩体病人感染的钩体血清群也分别是黄疸出血群、流感伤寒群、秋季群、波摩那群、七日热群和澳洲群。尽管我们曾发现 ompL1 基因有 3 个基因型^[13], 但含有 ompL1/3 基因型的钩体血清群引起人类钩体病极为罕见^[7,14]。本研究中 MAT 结果也证实, 156 份阳性钩体病人血清

均为 OmpL1/1 和 OmpL1/2 型钩体感染所致。因此, 选择上述 6 群我国参考标准株进行 ompL1 基因型分析并构建其原核表达系统, 有其充分依据。上述 MAT 结果还表明, 黄疸出血群是四川省峨眉山市和名山市主要流行的钩体血清群(100%和 79.4%), 该省凉山州流行的钩体血清群较为复杂, 虽以黄疸出血群多见(54.9%), 但感染问号钩体澳洲群、流感伤寒群、秋季群、七日热群和波摩那群也占 45.1%。由于合计有 75%(117/156) 上述患者感染黄疸出血群钩体, 因此黄疸出血群钩体仍然是四川地区最主要的优势钩体血清群^[17]。

我们的实验结果表明, 从上述 6 群我国参考标准株钩体基因组 DNA 中均可扩增出 ompL1 基因目的片段, 序列分析结果证实秋季群 56606 株、流感伤寒群 56609 株和黄疸出血群 56601 株、澳洲群 56607 株、波摩那群 56608 株、七日热群 56610 株的 ompL1 基因分别为 ompL1/1 和 ompL1/2 型, 两种基因型之间氨基酸序列也显示了较为明显的差异。由于双曲钩体 Patoc 1 株 ompL1 基因扩增结果为阴性, 表明该基因仅存在于致病性问号钩体中。所构建的 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 rOmpL1/1 和 rOmpL1/2, Ni-NTA 亲和层析法对 rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 有良好的提纯效果。

MAT 是暗视野显微镜下观察的活钩体与其抗体的免疫凝集试验^[7,14]。我们以往证实的 rOmpL1s 抗血清与我国 15 群 15 型钩体参考标准株均可呈阳性的 MAT 结果, 不仅提示 OmpL1 是属特异性抗原, 也提示该抗原可能位于钩体表面^[13]。从 ompL1 基因序列和结构特点分析, 其产物也应是膜蛋白^[10], 但无法确定是内膜或外膜及外膜内、外表面或穿膜

蛋白。众所周知,必须是位于病原微生物表面的抗原,才能用于研制疫苗或检测试剂盒,故确认 OmpL1s 是否位于钩体外膜表面仍有其必要性。免疫胶体金技术用于靶分子定位,较之酶免疫技术因无显色底物弥散现象而更为精确。本研究中我们采用了免疫胶体金电镜技术,发现 OmpL1 可定位于钩体菌体表面,提示该 OmpL1 是钩体外膜外表面或穿膜蛋白。

问号钩体非常奇特地具有大、小两个染色体,ompL1 基因位于大染色体中^[18]。采用基因工程技术进行目的基因原核表达,基因携带载体和宿主菌分别改为质粒和大肠杆菌,有可能因外部条件改变而引起蛋白分子空间构像变化。尽管原核细胞微生物蛋白的免疫原性主要取决于分子的一级结构,但存在空间构像变化导致免疫原性改变的可能性。已知钩体抗感染免疫主要依赖抗体为主的体液免疫^[7,14]。为此,我们建立了基于 rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 的 ELISAs,以期了解在钩体自然感染人群后,机体有无对 OmpL1 产生抗体应答及特异性抗体类型。实验结果表明,不同稀释度的 156 例钩体病人血清标本中, rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 特异性 IgM 阳性率分别为 67.9%~79.5% 和 75.0%~75.6%,特异性 IgG 阳性率分别为 71.8%~79.5% 和 75.0%~76.9%,提示自然感染钩体病患者可出现对 OmpL1s 有效的体液免疫应答并产生 IgM 和 IgG 两类血清抗体, rOmpL1/1 和 rOmpL1/2 可作为通用性钩体基因工程疫苗的候选抗原。

试验中发现,上述 ELISAs 阴性标本的 MAT 效价为 1:80~1:5120,ELISAs 阳性与否与 MAT 效价之间也无明显相关性。MAT 抗原主要为细胞壁糖脂^[7]。本研究中 ELISAs 以重组外膜蛋白为抗原,已知糖脂类抗原与蛋白类抗原诱导机体抗体应答的途径及产生规律有明显差异^[19,20],这可能是 ELISAs 检测结果与 MAT 效价不能完全吻合的主要原因。此外,除细胞壁糖脂外,MAT 抗原成分可包括所有不同性质、有抗原性的钩体表面大分子物质^[7],ELISAs 中仅使用单一的重组外膜蛋白为抗原,因而本研究中 ELISAs 阳性率不如 MAT。尽管 MAT 特异性和敏感性均较高,但操作程序十分繁复,若能进一步改进和完善基于重组钩体外膜蛋白的 ELISAs,如同时采用多种不同的重组外膜蛋白抗原等,有可能成为简便、快速、通用的钩体病血清学检测方法,用于临床钩体病实验室诊断。

参 考 文 献

- [1] Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 2001, **14**(2):296-326.
- [2] Meslin FX. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. *Emerg Infect Dis*, 1997, **3**(2):223-228.
- [3] Lomar AV, Diamant D, Torres JR. Leptospirosis in Latin America. *Infect Dis Clin North Am*, 2000, **14**(1):23-39.
- [4] Sehgal SC, Sugunan AP, Vijayachari P. Outbreak of leptospirosis after the cyclone in Orissa. *Natl Med J India*, 2002, **15**(1):22-23.
- [5] 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**(Suppl):59-67.
- [6] Fuortes L, Nettleman M. Leptospirosis: a consequence of the Iowa flood. *Iowa Med*, 1994, **84**(10):449-450.
- [7] Faine S, Adler B, Bolin C. *Leptospira and Leptospirosis*. Second edition. Australia, Melbourne: MedSci, 1999.
- [8] Sonrier C, Branger C, Michel V, et al. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine*, 2000, **19**(1):86-94.
- [9] Guerreiro H, Croda J, Flannery B, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun*, 2001, **69**(8):4958-4968.
- [10] 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**(13):4225-4234.
- [11] 胡昌华, 鲍 郎, 晏菊芳, 等. 赖型钩端螺旋体外膜蛋白基因结构比较性研究. *生命科学研究*, 2000, **4**(3):211-221.
- [12] 邱 薇, 孟佩云, 尹惠琼, 等. 3 株钩端螺旋体外膜蛋白基因的序列分析. *中国人兽共患病杂志*, 2001, **17**(4):17-18.
- [13] 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 基因型、原核表达系统构建及免疫学鉴定. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, **24**(6):439-444.
- [14] 严 杰, 戴保民, 于恩庶主编. 钩端螺旋体病学. 第三版, 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp1.21-1.52, 2.60-2.80, 7.30-7.35, 9.14-9.22.
- [16] Lewis SM, Osei-Bimpong A. Haemoglobinometry in general practice. *Clin Lab Haematol*, 2003, **25**(6):343-346.
- [17] Dai B. Advances in research on leptospira and human leptospirosis in China. *Chin Med Sci J*, 1992, **7**(4):239-243.
- [18] Ren SX, Fu G, Jiang XG, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 2003, **422**(6934):888-893.
- [19] 余传霖, 叶天星, 陆德源主编. 现代医学免疫学. 第一版, 上海: 上海医科大学出版社, 1998.
- [20] Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*, Sixth edition. New York: 2001.

Membrane location and naturally antibody responses of genus-specific antigen OmpL1s of *Leptospira interrogans*

SUN Bai-li^{1,4}, GUO Zong-qi², LUO Dong-jiao³, YAN Jie^{4*}

(¹ College of Land and Environment, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

(² Sichuan Diseases Control and Prevention, Chengdu 610041, China)

(³ Faculty of Basic Medicine, Hangzhou Teachers' College, Hangzhou 310018, China)

(⁴ College of Medicinal, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract The major aim of this study is to determine the location on outer envelope of the genus-specific antigen OmpL1s of *Leptospira interrogans*, and the inducement of naturally antibody response and types of the antigen, which will offer the evidences to use OmpL1s as the antigen candidate for developing universal genetic engineering vaccine and detection kit. The serum samples from 156 leptospirosis patients in Sichuan area were detected using microscope agglutination test (MAT). By using PCR plus nucleotide sequence analysis, the genotypes of the dominant *L. interrogans* serogroups in China were demonstrated. Routine genetic engineering technique was applied to construct the prokaryotic expression systems of genotypes ompL1/1 and ompL1/2, and Ni-NTA affinity chromatography was performed to extract the target recombinant products rOmpL1/1 and rOmpL1/2. Immune aerosol electron microscopy was selected to locate the position of OmpL1s on leptospiral envelope. ELISAs based on rOmpL1s were established to confirm the level and types of specific antibody. The results indicated that *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae remains to be the most important dominant leptospiral serogroup in Sichuan area. There are two ompL1 genotypes of ompL1/1 and ompL1/2 in the dominant leptospiral serogroup in China. And remarkable differences of the nucleotide and putative amino acid sequence similarities between the two genotypes are present. OmpL1s are the protein molecular that located on the external surface of leptospiral envelope. In the 156 cases of leptospirosis patients' serum samples using different dilutions, the positive rates for rOmpL1/1 or rOmpL1/2 specific IgM are 67.9% ~ 79.5% and 75.0% ~ 75.6%, while for rOmpL1/1 or rOmpL1/2 specific IgG are 71.8% ~ 79.5% and 75.0% ~ 76.9%, respectively. All the results mentioned above lead to the conclusions that OmpL1s is the leptospiral genus-specific superficial protein antigen of *L. interrogans* and both rOmpL1/1 and rOmpL1/2 can induce humoral response in individuals naturally infected with *L. interrogans* as well as produce two serum antibodies IgM and IgG with extensive antigenic-cross reaction. Therefore, rOmpL1/1 and rOmpL1/2 can be used as the antigen candidate for developing universal genetic engineering vaccine and detection kit.

Keywords : *Leptospira interrogans*; ompL1 gene; recombinant expression; molecular location; immune response