

立氏立克次体外膜蛋白 H 基因片段的克隆表达与免疫原性分析

吴德平¹ 焦留宏¹ 王加林¹ 杨文娟¹ 陈金拳¹ 王 猛¹ 王 颖^{2△}

(1 解放军 82 医院 江苏 淮安 223001 2 解放军 457 医院 湖北 武汉 430012)

摘要 目的 克隆表达立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)外膜蛋白 H 基因(ompH)片段并对其进行免疫原性分析。方法 采用 PCR 技术从立氏立克次体基因组中扩增 ompH 基因片段,将该基因片段与原核表达载体 pET32a 连接,构建重组原核表达质粒 pET32a/ompH;将 pET32a/ompH 转入大肠杆菌细胞内,用 IPTG 诱导转化大肠杆菌表达目的基因。结果 获得长为 327bp 的 ompH 基因片段,SDS-PAGE 分析发现 pET32a/ompH 转化菌表达了大小约 27kDa 蛋白,该蛋白与立氏立克次体免疫豚鼠血清及斑点热患者血清在免疫印迹分析中呈阳性反应,经该重组蛋白免疫血清中和后的立氏立克次体感染 VERO 活力减低。结论: pET32a/ompH 转化的大肠杆菌表达了 ompH 基因片段,所产生的重组蛋白具有良好的免疫反应性及保护性。

关键词 立氏立克次体 基因重组 外膜蛋白 H

中图分类号 Q291,Q75,Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)06-1063-05

Cloning, Expression and Immunogenicity of Outer Membrane Protein H Gene Fragment of *Rickettsia Rickettsii* in *E.coli*

WU De-ping¹, JIAO Liu-hong¹, WANG Jia-ling¹, YANG Wen-juan¹, CHEN Jin-quan¹, WANG Meng¹, WANG Ying^{2△}

(1 The 82th hospital of PLA, 223001, Huai-an, China; 2 The 457th hospital of PLA, 430012, Wuhan, China)

ABSTRACT Objective: To express the gene encoding outer membrane protein H (OmpH) of *Rickettsia rickettsii*(R.r) in *E.coli* and to investigate the immunogenicity. **Methods:** The gene fragment encoding the outer membrane protein H (OmpH) was amplified from the genomic DNA of R .r by PCR, and was transferred into the prokaryotic expression vector pET32a to construct the recombinant plasmid pET32a/ompH. The recombinant plasmid were transformed into the *E. coli* cells and the recombinant gene were induced to express protein by IPTG. The recombinant protein was analyzes by immunoblotting assay. **Results:** A ompH gene fragment with length of 486 bp was cloned,The recombinant protein of approximately 27kDa could recognized by sera of the infected guinea pigs and sera from patients. Before being added to suspended VERO cells to assess their infectivity by fluorescent quantitative PCR assays, hyperimmune antirickettsial sera, prepared in mouse by injections of the recombinant protein and R.r in growth medium were incubated in serum at room temperature for 30 min (pretreatment). It was concluded that immune serum may inhibit rickettsial infection. **Conclusions:** *E. coli* cells transformed by plasmid pET32a/ompH can express a 29 kDa recombinant protein and this protein may be the major antigens of R. r capable to induce specific immune responses and may be used as the new candidate to develop diagnostic reagents or to prepare the subunit vaccine for spotted fever.

Key words: *Rickettsia rickettsii*; gene recombinant; outer membrane protein H

Chinese Library Classification: Q291, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)06-1063-05

前言

立氏立克次体 (*Rickettsia rickettsii* R.r) 是落矶山斑点热 (Rocky Mountain Spotted Fever, RMSF) 的病原体,主要分布在北美洲,其强毒株为斑点热群立克次体(spotted fever group rickettsia, SFGR)中毒力最强的一个种,也可以说是所有病原性立克次体中致病性最强的,蜱是其寄生宿主、储存宿主和传播媒介,人对其高度易感^[1]。血清学诊断仍然是目前对该病进行确诊的常规方法。由于立克次体在细胞内生长慢,细胞内立克次体的纯化复杂,因而难以获得大量纯化的立氏立克次体做血清学

诊断抗原。目前使用蜱、鸡胚或细胞培养的立氏立克次体制备的灭活疫苗不仅不能有效的预防落矶山斑点热,并且发现一些人在接种部位产生强烈的局部反应^[2]。为了克服胞内寄生菌菌体抗原难以大量制备以及全菌抗原做疫苗的副作用大等问题,目前国内外均采用分子克隆技术,克隆和表达致病菌的保护性抗原基因,制备重组保护性抗原做诊断抗原或亚单位疫苗。

本研究利用 A1G_02015 序列克隆与表达立氏立克次体的外膜蛋白 H 基因,获得了重组蛋白抗原,并将产生的重组蛋白抗原与立氏立克次体实验感染的豚鼠血清以及自然感染斑点热患者血清做免疫印迹,证明它是免疫反应性强的抗原。研究证明,体内的抗体在立氏立克次体的感染防护中发挥着重要作用,在本次试验中,我们将用获得的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠获得多克隆免疫血清,将免疫血清分别与立氏立克次体孵育后,再将中和过的 R.r 感染 VERO 细胞,荧光定量 PCR 检测不同时段 VERO 细胞中的 R.r 拷贝数,以检测其在体外对立氏立

作者简介 吴德平 (1980),男,硕士,主治医师,主要研究方向:分子微生物学与抗感染免疫 E-mail:wudeping520@yahoo.com.cn

△通讯作者 王颖 (1977),女,博士,主管技师,主要研究方向:分子微生物学与抗感染免疫 E-mail:13971088031@139.com

(收稿日期 2010-11-05 接受日期 2010-12-09)

克次体感染能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

E.coli BL21 菌株为本室保存,载体 pET32a、组织 DNA 提取试剂盒为 QIAGEN 公司产品;限制性内切酶 Bam HI、Xho I、Taq 酶为 TaKaRa 公司产品;连接酶为 Promega 公司产品;质粒提取及 DNA 快速纯化回收试剂盒购自博大公司;立氏立克次体 R 株、VERO 细胞、立氏立克次体感染豚鼠血清、斑点热患者血清(间接免疫荧光效价 $\geq 1:1024$)、立氏立克次体 Taq-Man-MGB 探针及引物由军事医学科学院立克次体专业实验室惠赠。六周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠,购自军事医学科学院实验动物中心。RPMI-1640 培养基、牛血清白蛋白、胰蛋白酶为 HyClone 产品;荧光定量 PCR 检测专用 96 孔板、盖膜及 TaqMan Universal PCR Master Mix 购自美国 ABI 公司;FITC 标记羊抗小鼠 IgG 为北京思语伟业公司产品,正常鼠血清由本室制备保存。

1.2 引物设计及合成

根据 GenBank 立氏立克次体全基因组序列 (GenBank accession no. CP000848) 中的 A1G_02015 基因序列,设计一对引物,引物由赛百盛基因技术有限公司合成。上游引物为 5'-GGAGGATCCATCGCTATAAAAGATTTGC-3', 引入了 BamH I 酶切位点,下游引物为 5'-GGACTCGAGGACTTGAGCACTTGGAATT-3', 引入了 Xho I 酶切位点。

1.3 PCR 扩增与纯化

按 QIAGEN 血液和组织 DNA 提取试剂盒操作方法提取立氏立克次体感染鸡胚卵黄囊膜全基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板。PCR 扩增采用 25 μ L 反应体系:模板 1 μ L (50ng/ μ L), 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture 2 μ L, 上下游引物各 1 μ L (12.5 μ M), Taq 酶 0.625U, 加水至 25 μ L。通用扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5min 后,再 95 $^{\circ}$ C 40S, 55 $^{\circ}$ C 40S, 72 $^{\circ}$ C 1min, 作 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。采用 PCR 产物纯化试剂盒将目的基因纯化回收。

1.4 目的基因的表达与目的蛋白鉴定

将 pET32a 质粒和目的基因以相应的内切酶分别进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C 酶切 4h 后回收酶切产物, 而后各取 2.5 μ L 混合, 并加入 5 μ L DNA 连接试剂盒的 Solution I 混匀, 16 $^{\circ}$ C 连接 2h, 将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞。依据《分子克隆》标准方法筛选转化阳性克隆和诱导转化菌表达目的蛋白, 并用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析、鉴定转化菌表达的目的蛋白及其表达形式(可溶性或包涵体形式)。

1.5 免疫印迹分析重组蛋白抗原

取纯化后的目的蛋白 100 μ L 加入 2 $\times$ SDS 上样缓冲液 100 μ L, 沸水煮 10min, 离心后按照《分子克隆》标准方法进行 SDS-PAGE 和半干电转印实验^[3], 将目的蛋白转移至硝酸纤维素 (PVDF) 膜上。血清在使用前用 pET32a 质粒转化大肠杆菌裂解物在室温下吸附 2h, 去除血清中与大肠杆菌非特异性反应的抗体。将 1:200 倍稀释血清与 5% 脱脂奶粉封闭的载有目的蛋白的 PVDF 膜室温作用 1h, 经 3 次洗涤后加入辣根过氧化物

酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 / 人 IgG (1:2 000 稀释), 室温作用 1h 后经 3 次洗涤, 以 DAB 显色试剂盒进行显色。

1.6 免疫动物

将重组目的蛋白纯化后免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠。用 40 μ g 的重组蛋白与等体积的 Al (OH)₃ 佐剂混匀, 初次免疫为皮下注射, 初次免疫后第 30d、40d 腹腔注射加强免疫, 末次免疫后 10 天小鼠眼球摘除取血分离血清, 用 0.22 μ m 的滤器过滤除菌。

1.7 立氏立克次体感染 VERO 细胞

将培养的 VERO 细胞用胰酶消化后调整为约 5×10^5 个/ml 浓度, 将纯化的 R.r 与各组血清混合, 调整抗血清量, 使其在加入 VERO 细胞悬液后的终浓度为 5%, 血清使用前用 56 $^{\circ}$ C 热灭活补体, 设立灭活 R.r 组、阴性血清对照组、PBS 空白对照组, 33 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟后, 按 R.r:VERO 细胞约为 100:1 的量加入到 VERO 细胞中, 混匀按 0.5ml/孔分装到 24 孔培养板中, 置于 33 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 孵箱中培养, 于 0h, 1h, 3h, 5h, 9h, 24h 取样一次, 除 0h 外其余吸弃上清, 只取细胞层, 24h 时吸弃所有上清, 并补加新鲜含 2% FBS 1640 培养基 500 μ L, 以后每隔 48h 小时取一孔含上清的 VERO 细胞, 参照 QIAGEN DNA 提取试剂盒说明书中的组织 DNA 提取步骤提取样本 DNA, 每份样本 DNA 用 50 μ L 去离子水溶解。

1.8 荧光定量 PCR 检测不同时间段各培养孔中的 R.r 拷贝数

根据文献^[4]的方法采用 25 μ L 反应体系, 每个反应体系中含有 12.5 μ L TaqMan Universal PCR Master Mix, 5 μ L 引物和探针混合物[100 μ L 体系中含引物各 3 μ L (50 μ M), 探针 2 μ L (50 μ M), 92 μ L 去离子水], 5.5 μ L 去离子水, 2 μ L DNA 模板。扩增条件为: 50 $^{\circ}$ C 2min, 95 $^{\circ}$ C 10min, 然后 95 $^{\circ}$ C 15S, 60 $^{\circ}$ C 1min 循环 45 次。

1.9 统计学处理

根据每次荧光定量 PCR 检测结果, 比较各组血清及不同取样时间对 R.r 活性的影响, 统计学方法采用 SAS 统计学软件中的单因素 K 水平方差分析及 SNK 法进行两两比较。

2 结果

2.1 目的基因的克隆表达及鉴定

用提取的 R.r DNA 为模板, 经 PCR 扩增出一条与预计的 327bp 目的片段大小一致的产物(图 1)。将扩增的目的基因及质粒酶切纯化后连接, 将连接产物转化 BL21 菌, 经氨苄青霉素抗性平板筛选得到数十个克隆。随机挑取若干个克隆进行 PCR 扩增, 选取一个阳性克隆提取质粒送赛百盛基因技术有限公司测序后比对发现得到的克隆片段的 DNA 序列与 GenBank 中的 R.r 的外膜蛋白 H 基因序列一致, 说明目的基因片段已克隆于表达载体中, 将构建的表达质粒命名为 pET32a/ompH。

2.2 重组蛋白的表达及鉴定

将 IPTG 诱导后的 pET32a/ompH 转化菌作 SDS-PAGE, 在相对分子量约为 27kDa 的位置出现一条特有的蛋白带(图 2)。免疫印分析显示该 27kDa 蛋白与 R.r 免疫豚血清及斑点热患者血清反应呈阳性(图 3)。

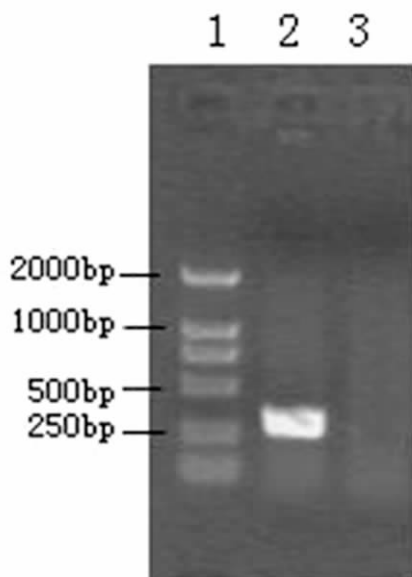


图1 PCR 扩增立氏立克次体 ompB 基因片段:1,DNA 标准;2,PCR 产物;2,阴性对照。

Fig.1 Amplification of an ompH fragment of *R. rickettsii* by PCR:

1, DNA marker 2, PCR Product; 3, negative control;

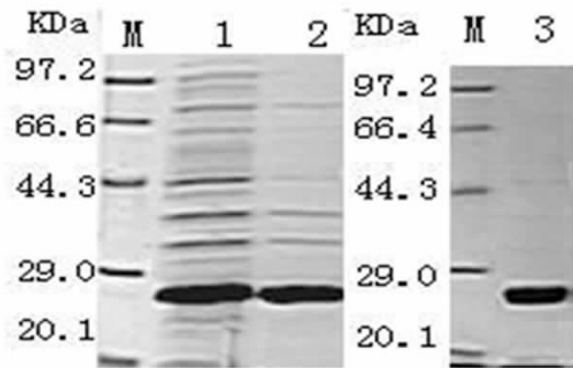


图2 pET32a/ompH 转化菌的表达产物的 SDS - PAGE 分析 M,蛋白分子量子标准;1,经 IPTG 诱导的 pET32a / ompH/ E.coli 裂解物;2,经 IPTG 诱导的 pET32a/ompH/E.coli 裂解物离心上清;3,从经 IPTG 诱导的 pET32a/ompH/ E. coli 中提取的重组蛋白

Fig.2 SDS - PAGE analysis of *E. coli* cells transformed with pET32a/ompH M, protein marker; 1, pET32a/ompH/*E. coli* induced by IPTG; 2, supernate protein of pET32a/ompH/*E. coli* induced by IPTG; 3, protein extracted from pET32a/ompH/*E. coli* induced by IPTG.

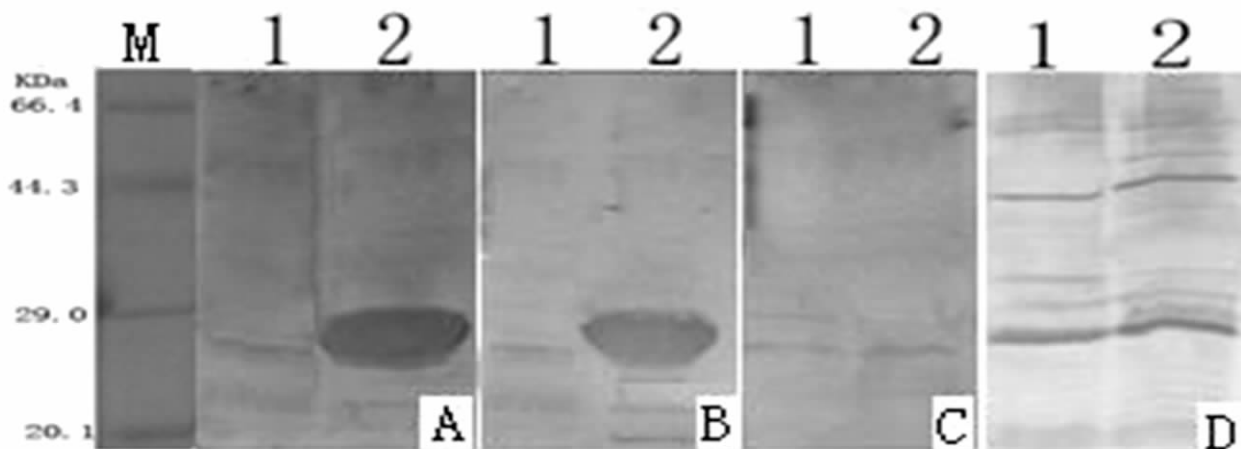


图3 重组蛋白的免疫印迹分析 M,蛋白分子量子标准;1,非诱导 pET32a/ompH/ E. coli 裂解物;2,经 IPTG 诱导的 pET32a/ompH/ E. coli 裂解物;A,立氏立克次体 R 株免疫豚鼠血清;B,斑点热患者血清;C,正常豚鼠血清 D,正常人血清

Fig.3 Immunoblot analysis of the recombinant protein M, protein marker; 1, uninduced pET32a/ompH/ *E. coli*; 2, pET32a/ompH/*E. coli* induced by IPTG; A, sera from guinea pigs infected by *R.r.*; B, sera from patients suffering from spotted fever; C, sera from health guinea pigs; D, sera from health adults

2.3 各血清对灭活 *R.r.* 进入 VERO 细胞的影响

我们用不同稀释度的血清与 56℃ 热灭活的 *R.r.* 孵育后再加入到培养的 VERO 细胞中,在不同时间点取样用 PCR 法检测不同时间点进入 VERO 细胞内的立克次体 DNA 含量,结果表明,不同的免疫血清对灭活的 *R.r.* 进入 VERO 细胞量没有影响,*R.r.* 可被 VERO 细胞主动吞噬。各组进入 VERO 细胞的 *R.r.* 量统计分析无显著差异,各组结果见表 1。

2.4 各血清对 *R.r.* 感染吸附能力的影响

在前 10 个小时内取四次样检测重组蛋白免疫血清对立氏立克次体进入 VERO 细胞的影响,检测 VERO 细胞内立氏立克次体的载量,结果显示,重组 OmpH 蛋白血清处理立氏立克

次体后,与空白对照组及阴性血清处理组相比可显著降低立氏立克次体进入 VERO 细胞的量,统计分析差别有显著性(单因素 K 水平的方差分析,两两比较用 SNK 法, $P < 0.05$),结果见表 2,图 4。

2.5 各血清对 *R.r.* 感染增殖能力的影响

从表 3 中可以看出,虽然血清可以阻止早期的立氏立克次体进入 VERO 细胞内,但是在 24h 后,进入细胞内的立克次体达到一个平衡,各组之间差异不显著,立氏立克次体进入 VERO 细胞后 72 小时后开始较显著增殖,最终使 VERO 细胞破碎坏死,立氏立克次体载量达到一顶点。

表 1 各血清对灭活 R.r 进入 VERO 细胞的影响

Table 1 The influence of sera on inactive R.r enter VERO cells.

Group	Dilution	拷贝数 lg (copies/ μ l)
		$\bar{X} \pm S$
Blank group	1:1	4.81 $\pm$ 0.026
Negative serum group	1:1	4.54 $\pm$ 0.276
Positive serum group	1:1	4.63 $\pm$ 0.155
	1:10	4.64 $\pm$ 0.163
	1:100	4.7 $\pm$ 0.173
OmpH serum group	1:1	4.59 $\pm$ 0.072
	1:10	4.72 $\pm$ 0.193
	1:100	4.7 $\pm$ 0.161

表 2 R.r 经不同血清中和后进入 VERO 细胞的量

Table 2 The copies of R.r in VERO cells after neutralized by sera.

Group	Copies lgn ($\bar{X} \pm S$)
Inactive R.r group	5.98 $\pm$ 0.19
Blank group	5.45 $\pm$ 0.24
Negative serum group	5.33 $\pm$ 0.079
Positive serum group	4.72 $\pm$ 0.24*▲
OmpH serum group	4.92 $\pm$ 0.058*▲

Note: *P<0.05, vs Negative serum group, ▲P<0.05,vs Blank group

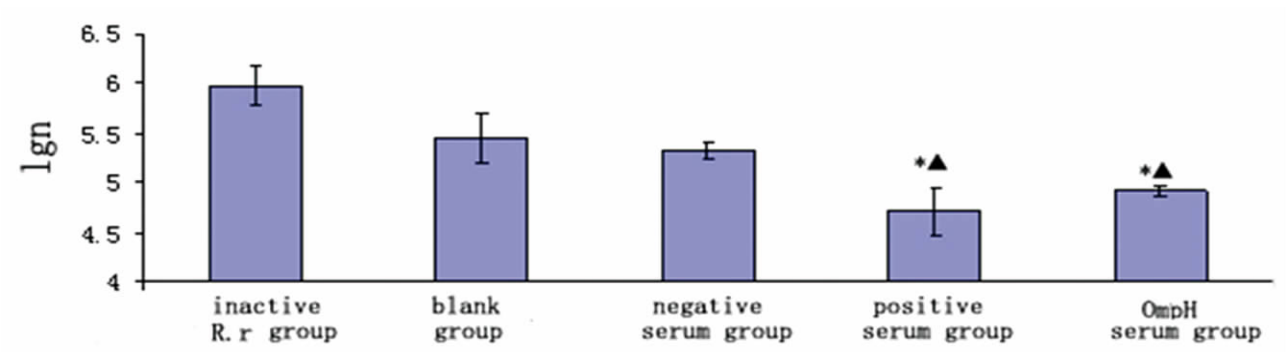


图 4 不同血清中和对立氏立克次体进入 VERO 细胞的影响

Figure 4 The copies of R.r entering VERO cells after neutralized by serum

Note: *P<0.05, vs Negative serum group, ▲P<0.05,vs Blank group.

表 3 各组血清对进入 VERO 细胞的立氏立克次体增殖的影响

Table 3 The influence of sera on R.r proliferating in VERO cells

group	R.r copies in VERO cells (lgn)					
	24h	3d	5d	7d	9d	11d
Inactive R.r group	3.50E+06	3.16E+06	2.13E+06	1.40E+06	1.19E+06	1.19E+06
Blank group	2.38E+05	3.44E+05	4.18E+05	5.16E+06	1.02E+07	7.86E+06
Negative serum group	1.29E+05	1.26E+05	5.65E+05	2.65E+06	5.51E+06	4.32E+06
Positive serum group	1.38E+05	1.79E+05	1.80E+04	1.60E+06	1.81E+06	1.19E+07
Omph serum group	1.35E+05	6.17E+04	2.96E+05	5.42E+05	7.37E+06	9.56E+06

注 各血清组之间比较无统计学差异。

Note: There is no statistics difference between varies groups.

3 讨论

OmpH 为立氏立克次体的膜表面蛋白, 基因标识为 A1G_02015, 长度为 486bp, 编码大小约 16kDa 左右的蛋白, 该蛋白在其它菌中显示了较好的免疫原性及保护性。如出血败血性巴斯德菌的(*Pasteurella multocida*)OmpH 为保护性外膜蛋白, 可保护小鸡免受感染^[5], 研究人员利用该菌的两个外膜蛋白 OmpH 和 OmpA 制备单克隆抗体, 研究中发现 OmpH 抗体可以抑制该菌的扩增, 含两者杂瘤的 B/C 小鼠用同源的无毒株攻击, 前者可保护小鼠, 而含 OmpA 的杂交瘤则没有保护性, 研究还发现 OmpH 抗体可以促进多形核白细胞在感染部位的聚集, 并抑制病原体的增殖, 黄杆菌属的 OmpH 样蛋白可以产生高滴度的保护性抗体, 是很好的亚单位疫苗的候选抗原^[6]。以上研究表明, 该蛋白可能比 OmpA 具有更好的保护性。

本研究克隆并表达了 ompH 基因, 并获得了重组 OmpH, 通过免疫印迹分析显示, 该蛋白可与立氏立克次体感染的豚鼠血清与斑点热患者血清反应, 免疫印迹分析结果说明该蛋白抗原能够诱导机体产生特异性免疫应答, 并能够与相应的特异性抗体发生明显反应, 应为立氏立克次体的重要抗原分子, 这结果与吴德平的研究相一致^[7]。立氏立克次体是严格的细胞内寄生菌, 它必须进入宿主细胞内才能繁殖, 并逃出细胞外而感染其它细胞, 它吸附在内皮细胞胞膜上, 介导细胞吞噬它, 又从吞噬小体内逸出进入胞浆并通过二分裂繁殖, 在细胞内的立克次体可通过细胞伪足持续逃出细胞^[8], 目前立克次体粘附机制及宿主细胞的受体机制均不清楚。

血清抗体在宿主体内急性期及持续感染期的抗立克次体作用机制还不是很明确, 在体外试验中, 免疫血清可减低立克次体对培养细胞的损伤, 抗血清可以减轻立克次体感染 BS-C-1 细胞导致的细胞病变^[9], 并减少感染 L 细胞形成的空斑数^[10], Hanson^[11]等的研究结果表明, 抗立克次体血清可以阻止立克次体吸附并进入鸡胚成纤维细胞, 其阻止能力取决于抗血清的浓度而与补体的存在与否无关, 血清的中和活性可以被葡萄球菌蛋白 A 及完整的立克次体中和, 但靶细胞的吸附不会减低血清的中和能力, 用血清中和后不会改变立克次体代谢谷氨酸的能力, 也不会显著破坏立克次体细胞膜的通透性, 这些都表明, 免疫血清可能通过封闭立克次体表面的某些与吸附与穿透相关的成份从而影响立克次体与靶细胞之间的相互作用。本研究用获得的 OmpH 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠获得免疫血清, 用该血清与立氏立克次体孵育后, 再感染 VERO 细胞, 研究结果表明, 与阴性血清及 PBS 对照组相比, OmpH 重组蛋白的抗血清在培养早期可以显著阻止立氏立克次体进入细胞内, 但是在培养 11 天后, 各组 VERO 细胞中的立氏立克次量达到一个顶点, 此时细胞病变严重, 这些表明 OmpH 重组蛋白的免疫血清能过某种方式阻止立克次体进入培养细胞而不是直接杀死病原体, 且对已进入细胞的立克次体不起作用, 胞内

立克次体仍能不受影响地繁殖。

本研究还观察到, 各免疫血清对 VERO 吸附热灭活的立克次体没有影响, 大部分灭活的立克次体均被 VERO 细胞吸附或吞噬, 这可能与灭活立克次体被吞噬入 VERO 细胞内后, 不能主动逃出细胞有关。

立氏立克次体 OmpH 具有很好的免疫原性及反应性, 且在体外试验中也显示出了较好的保护作用, 其在体内的保护作用以及在诊断方面的应用还有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Silber JL. Rocky Mountain spotted fever [J]. Clin Dermatol, 1996, 14 (3): 245-258
- [2] Kenyon RH, Pedersen CE. Preparation of Rocky Mountain spotted fever vaccine suitable for human immunization [J]. Clin Microbiol, 1975, 1(6): 500-503
- [3] 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 科学出版社, 1992
Jin Dong-Yan, Li Meng-feng, Hou Yun-de. Molecular cloning--Laboratory manuals[M]. The second edition, Science Press, 2001
- [4] 牛东升, 杨晓, 陈梅玲, 等. 实时荧光定量 PCR 检测斑点热立克次体的方法建立[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(11): 1297-1299
Niu Dong-sheng, Yang Xiao, Chen Mei-ling, et al. Rapid detection of spotted fever group rickettsiae with real-time quantitative PCR [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2008, 33 (11): 1297-1299
- [5] Luo Y, et al. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (ompH) of *Pasteurella multocida* X-73[J]. J Bacteriol, 1997, 179(24): 7856-7864
- [6] Dumetz F. A protective immune response is generated in rainbow trout by an OmpH-like surface antigen (P18) of *Flavobacterium psychrophilum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(7): 4845-4852
- [7] 吴德平, 王颖, 王锡乐, 等. 立氏立克次体蛋白抗原基因的表达和重组蛋白抗原的免疫印迹分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25 (10): 931-934
Wu De-ping, Wang Ying, Wang Xi-le, et al. Expression of the genes encoding protein antigens of *Rickettsia rickettsii* and the analysis of the recombinant protein antigens by immunoblotting [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009, 25(10): 931-934
- [8] Walker DH. Effect of synthetic protease inhibitors of the amidine type on cell injury by *Rickettsia rickettsii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1984, 25(5): 582-585
- [9] Barker LF, Patt JK, Hopps HE, et al. Titration and neutralization of *Rickettsia tsutsugamushi* in tissue culture [J]. J Immunol, 1968, 100 (4): 825-830
- [10] Oaks SC, Hetrick FM, Osterman JV. A plaque reduction assay for studying antigenic relationships among strains of *Rickettsia tsutsugamushi*[J]. Am J Trop Med Hyg, 1980, 29(5): 998-1006
- [11] Hanson BA. Effect of immune serum on infectivity of *Rickettsia tsutsugamushi*[J]. Infect Immun, 1983, 42(1): 341-9