四川大学学报（医学版）
J Sichuan Univ（Med Sci Edi） 2016；47(1)：1－6

·论著·

嗜肺军团菌 *mip*/*flaA* 二联优势抗原表位基因融合表达载体的构建及表达

何金蕾[1]，彭　冉[2]，张俊荣[1]，余泽英[1]，李娜丽莎[2]，龚艳菊[2]，陈　莹[2]，陈达丽[1]，陈建平[1△]

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 寄生虫学教研室（成都 610041）；
2. 四川大学华西基础医学与法医学院 基础医学专业（成都 610041）

【摘要】 目的 选取嗜肺军团菌 *mip* 和 *flaA* 优势抗原表位基因，构建 *mip*/*flaA* 二联优势抗原表位基因融合表达载体，并在原核系统中表达，为后续制备嗜肺军团菌蛋白疫苗提供初步的实验基础。**方法** 运用生物信息学方法对 Mip 和 FlaA 蛋白的二级结构和表面特性如理化性质、亲水性、可塑性、抗原指数以及胞外区等方面进行分析，选择其活性表位可能存在的区域为优势抗原表位区。通过 PCR 扩增和 *T*4 连接酶构建 pET-*mip*、pET-*flaA* 和 pET-*mip*/*flaA* 优势抗原表位基因融合表达载体，并诱导其在大肠杆菌中表达。**结果** Mip 和 FlaA 都存在多个潜在的抗原表位位点，选取其优势抗原表位区域进行克隆和表达获得成功，并成功表达了 *mip*/*flaA* 二联优势抗原表位融合蛋白。**结论** DNA Star 软件和 Expasy 在线蛋白分析系统能够成功预测嗜肺军团菌 Mip 和 FlaA 抗原的表位；选取其优势抗原表位成功构建了 pET-*mip*/*flaA* 二联原核表达载体，并高效表达。

【关键词】 嗜肺军团菌　优势抗原表位　*mip* 基因　*flaA* 基因　融合表达

Construction and Expression of Vector with *mip*/*flaA* Advantages Epitope Genes of *Legionella pneumophila*

HE Jin-lei[1], *PENG Ran*[2], *ZHANG Jun-rong*[1], *YU Ze-ying*[1], *LI Na-li-sha*[2], *GONG Yan-ju*[2], *CHEN Ying*[2], *CHEN Da-li*[1], *CHEN Jian-ping*[1△]. 1. *Department of Parasitology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University*, Chengdu 610041, China; 2. *Preclinical Medicine, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University*, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: jpchen007@163.com

【Abstract】 Objective To generate and express fusion vector with *mip*/*flaA* advantages epitope genes of *Legionella pneumophila* by select *mip* and *flaA* advantages epitope genes for future research on *Legionella pneumophila* protein vaccine. **Methods** Following analysis of secondary structure and surface properties such as: physical and chemical properties, hydropathy, plasticity, antigen index and extracellular domain of Mip and FlaA proteins by bioinformatics methods, the region which active epitope may exist was selected as advantages epitope region. Then, the recombinant plasmid pET-*mip*, pET-*flaA* and pET-*mip*/*flaA* with advantages epitope genes were constructed by PCR amplification and *T*4 ligase connection, and induced the expression in *E. coli*. **Results** Many potential antigenic epitopes in Mip and FlaA were identified, and the selected advantages epitope regions were cloned and expressed successfully. Moreover, the *mip*/*flaA* two advantages associated epitope fusion proteins were also successfully expressed. **Conclusion** DNA Star software and Expasy online analysis system can successfully predict antigenic epitopes for *Legionella pneumophila* Mip and FlaA. And prokaryotic expression vector pET-*mip*/*flaA* with advantages epitope genes has been successfully constructed and efficiently expressed.

【Key words】 *Legionella pneumophila*　Advantages epitope　*mip* gene　*flaA* gene　Fusion expression

军团菌（*Legionella*）广泛存在于各种自然水源和人工管道水源以及土壤中，属于兼性胞内寄生菌，革兰氏染色阴性。人体主要是由于吸入被军团菌污染的气溶胶而被感染，该病原体可侵入巨噬细胞，并且有效的逃避吞噬体和溶酶体的杀伤作用[1]。军团菌感染引起的军团病（Legionnaires' disease）可表现为严重的肺炎，肺炎型患者往往出现高热、寒颤、肌痛、咳嗽等症状，病程进展快，严重者甚至出现肾衰竭、心肌炎、心内膜炎和脑膜炎等并发症，如不能及时、正确治疗，死亡率可高达 50%[2]。其中，约有 80%～90% 的军团菌病由嗜肺军团菌血清 1 型（*Legionella pneumophila* serogroup1，Lp1）引起。在严重的社会获得性肺炎中，Lp 为第二位病因[3]。我国已将军团菌病列为需要重点防治的一种新发传

△ 通讯作者，E-mail：jpchen007@163.com

染病,但目前尚无理想的预防措施。因此,迫切需要研究高效、持久和无毒副作用的疫苗。

研究表明,由单一保护性抗原基因构建的疫苗,其免疫保护性往往不是很好,选择多价疫苗蛋白加强免疫效果已成为构建军团菌蛋白疫苗的一个重要方向[4,5]。因此,本实验选择嗜肺军团菌的巨噬细胞感染增强蛋白(Mip)和鞭毛亚单位蛋白(FlaA)两种蛋白为疫苗的候选蛋白,通过融合表达两种蛋白制备军团菌的蛋白疫苗。并且为减少免疫原性无关肽段的副作用,本实验通过生物学信息分析技术,对两种蛋白进行二级结构分析和胞外区分析,进行优势抗原表位预测,筛选其活性表位可能存在的区域进行克隆和表达,为下一步蛋白疫苗的研制提供实验依据。希望通过制备 *mip*/*flaA* 二联优势抗原表位疫苗达到较好的免疫原性及保护性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 嗜肺军团菌血清1型标准株由中国疾病预防控制中心传染病控制所惠赠。质粒pET30a(+)购自北京拜尔迪公司,感受态大肠杆菌DH5α、BL21(DE3)均购自TIANGEN公司。

1.1.2 酶及主要试剂 限制性内切酶 *Eco*RⅤ、*Bam*HⅠ、*Sal*Ⅰ、*Xho*Ⅰ和*T*4连接酶均购自Thermo公司;2×Taq master Mix购自SinoBio公司;细菌基因组DNA提取试剂盒和DNA纯化回收试剂盒购自TIANGEN公司;质粒提取试剂盒购自OMEGA公司。一抗为本实验室制备的兔抗军团菌多克隆抗体;二抗为Trans公司的山羊抗兔IgG。

1.2 方法

1.2.1 Mip和FlaA蛋白的优势抗原表位选取

1.2.1.1 两种蛋白的二级结构预测 运用DNA Star软件提供的Protean模块进行,采用Chou fasman预测方案和Garnier Robson方案,分析预测Mip和FlaA两种蛋白的二级结构。采用Kyte-Doolittle方案分析两种蛋白的亲水性,Karplus-Schulz方案分析蛋白的可塑区域,Jameson-Wolf方案分析蛋白的抗原指数,Emini方案分析蛋白表面可及性。

1.2.1.2 两种蛋白的胞外区分析 利用在线蛋白分析Expasy系统的SOSUI method和HMMTOP method进行蛋白质胞外区分析(http://www.expasy.org/tools/)。

1.2.2 细菌培养 取液体石蜡保种的嗜肺军团菌Lp1菌株,分区划线接种于BCYE-a固体培养平板,37 ℃烛缸法培养3~5 d,用PBS洗下平板上的细菌,根据试剂盒说明书提取基因组DNA。

1.2.3 重组质粒的构建和鉴定

1.2.3.1 *mip* 和 *flaA* 优势抗原表位基因的扩增 以提取的军团菌Lp1型DNA为模板,根据NCBI上报道的 *mip* 和 *flaA* 基因序列,通过软件分析选取优势抗原表位基因序列,再自行设计扩增军团菌 *mip* 和 *flaA* 优势抗原表位基因的引物(成都擎科梓熙公司合成)。分别在两个优势表位基因引物的5′端加上限制性酶切位点和保护性碱基,部分引物5′端插入起始密码子或终止密码子用于蛋白表达,以及插入连接两个蛋白的柔性肽片段以确保蛋白的结构正常。具体引物序列见附表。扩增条件:94 ℃预变性1 min 30 s,94 ℃变性30 s,57 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,30次循环,再72 ℃延伸5 min,4 ℃保温。

附表 *mip* 和 *flaA* 优势抗原表位基因引物

Table Primer sequences of *mip* and *flaA* advantages epitope genes

Name	Primer (5′-3′)	Restriction enzyme
mip	P1: CGCGATATCATGGCTACAGACAAGGAT	*Eco*RⅤ
	P2: CGCGGATCCTTACGTTGCTGGCTTACC	*Bam*HⅠ
flaA	P3: CGCGATATCATGTCTATCCAGCGTTTAT	*Eco*RⅤ
	P4: CGCGGATCCTTAATTGGCAGAAGAGT	*Bam*HⅠ
mip/*flaA*	P5: CGCGATATCATGGCTACAGACAAGGAT	*Eco*RⅤ
	P6: CGCGGATCCACCGCCACCCGTTGCTGGCTTACC	*Bam*HⅠ
	P7: CGCGGATCCGGTGGCGGTGGCTCCTCTATCCAGCGTTTAT	*Bam*HⅠ
	P8: CGCGTCGACTTAATTGGCAGAAGAGT	*Sal*Ⅰ

The underlined bases are the restriction enzyme sites. P1 and P2 are *mip* primers, P3 and P4 are *flaA* primers. P5-P8 are the primers connected *mip* and *flaA*. Among them, P5 and P6 contains a linker for *mip*, P7 and P8 contains a linker for *flaA*

1.2.3.2 二联基因 *mip*/*flaA* 基因片段的连接和扩增 用*Bam*HⅠ单酶切扩增的 *mip*(P5和P6)和 *flaA*(P7和P8)优势抗原表位基因,通过*T*4连接酶连接单酶切的 *mip* 与 *flaA*。再以连接产物为模板,进行二联基因的PCR扩增(P5和P8),即得到 *mip*/*flaA* 二联优势抗原表位基因。扩增条件为:

94 ℃预变性 1 min 30 s，94 ℃变性 30 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 55 s，30 次循环，再 72 ℃延伸 5 min，4 ℃保温。

1.2.3.3　三种重组质粒的构建　用 *Eco*R Ⅴ和 *Bam*H Ⅰ双酶切扩增的 *mip*、*flaA* 单基因，*mip*/*flaA* 二联基因及载体 pET30a(＋)。纯化双酶切的产物，并将纯化后的基因片段与载体 pET30a(＋)用 *T*4 连接酶连接，再转化感受态大肠杆菌 DH5α，涂布于含卡那霉素、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)和 X-Gal 的 LB 平板，37 ℃培养过夜。筛选阳性克隆，将构建的重组质粒分别命名为 pET-*mip*、pET-*flaA* 和 pET-*mip*/*flaA*。

1.2.3.4　阳性重组质粒的鉴定　将重组子进行蓝白斑筛选、菌落 PCR、质粒 PCR 以及酶切鉴定，鉴定正确的重组质粒 pET-*mip*、pET-*flaA* 和 pET-*mip*/*flaA* 送交成都擎科梓熙公司进行测序鉴定。

1.2.4　三种融合蛋白的诱导表达和纯化　将鉴定正确的三种重组质粒和质粒 pET30a(＋)转化到感受态大肠杆菌 BL21 中，加入 IPTG 进行诱导表达。设置 IPTG 浓度梯度、诱导的时间梯度和温度梯度，摸索最佳诱导表达的条件并制备蛋白样品。诱导出的蛋白通过镍柱纯化。

1.2.5　SDS-PAGE 和 Western blot　取各蛋白样品上清 10 μL 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白的诱导表达情况。纯化后的蛋白样品进行常规 Western blot 检测，一抗为兔抗军团菌多克隆抗体(1∶7 500)，二抗为山羊抗兔 IgG，ECL 显色，摄像并保存结果。

2　结果

2.1　两种蛋白优势抗原表位的选取

2.1.1　两种蛋白二级结构分析　用 DNA Star 软件计算结果表明：Mip 蛋白相对分子质量为 2 514.00，等电点为 9.21，编码 236 个氨基酸；FlaA 蛋白相对分子质量为 47 886.03，等电点为 4.71，编码 476 个氨基酸。二级结构预测表明：Mip 蛋白以 α 螺旋和 β 折叠为主，亲水性主要集中在中间区域，可塑性较高区域和表面可及性分布较散，存在多个潜在抗原表位位点(图 1)；FlaA 蛋白以 β 折叠为主，亲水性较高区域和可及性区域主要集中在 C 端和 N 端，可塑性较高区域较多，存在多个潜在抗原表位位点(图 2)。



图 1　DNA Star 软件分析出的 Mip 蛋白二级结构

Fig 1　Secondary structure of Mip protein analysed by the DNA Star software

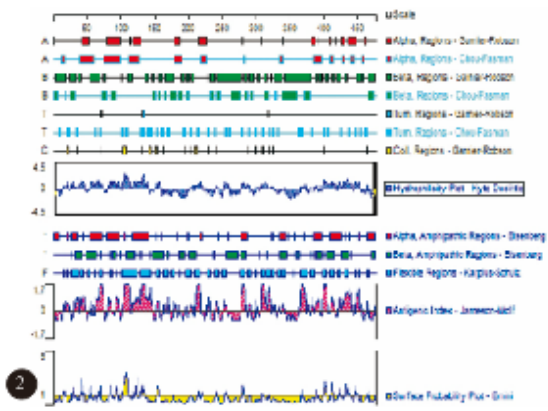


图 2　DNA Star 软件分析出的 FlaA 蛋白二级结构

Fig 2　Secondary structure of FlaA protein analysed by the DNA Star software

2.1.2　两种蛋白胞外区分析　SOSUI method 结果显示：Mip 蛋白的胞外区为 29～235 aa，跨膜区为 6～28 aa，胞内区为 1～5 aa(图 3)；FlaA 全部氨基酸序列均在胞外区。HMMTOP method 结果显示：Mip 蛋白的胞外区为 25～235 aa，跨膜区为 7～24 aa，胞内区为 1～6 aa；FlaA 全部氨基酸序列均在胞外区。

综合两种方法分析目的蛋白的抗原指数、二级结构、亲水性、可塑性以及表面可及性，并结合胞外

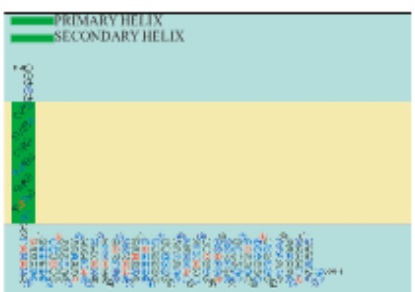


图 3　Mip 蛋白胞外区分布

Fig 3　Extracellular region of Mip

区选择其活性表位可能存在的区域为优势抗原表位区,进行后续的 PCR 扩增和克隆表达。

2.2 *mip*、*flaA* 和 *mip*/*flaA* 优势抗原表位基因 PCR 扩增结果

mip、*flaA* 和 *mip*/*flaA* 二联优势抗原表位基因 PCR 扩增结果见图 4。优势抗原表位基因 *mip* 为 459 bp,*flaA* 为 558 bp,*mip*/*flaA* 为1 023 bp,与电泳结果相符。

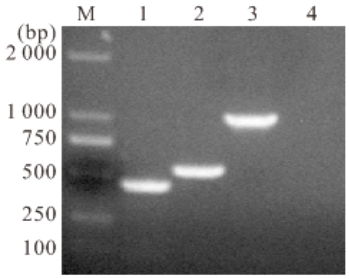


图 4 三种基因的 PCR 扩增产物 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳

Fig 4 12 g/L agarose gel electrophoresis for PCR products of three genes

M: DNA marker (DL2000); 1: PCR product of *mip* gene amplified by primer P1 and P2; 2: PCR product of *flaA* gene amplified by primer P3 and P4; 3: PCR product of *mip*/*flaA* gene amplified by primer P5 and P8; 4: Negative control

2.3 三种重组质粒测序鉴定的结果

将测序结果登陆 GenBank 进行 Blast 比对,结果表明载体 pET-*mip*、pET-*flaA* 和 pET-*mip*/*flaA* 上插入的序列与 GenBank 中发表的嗜肺军团菌国外标准株 Lp1 的 *mip* 基因和 *flaA* 基因均具有 99%的同源性,4 个碱基位点发生突变,分别有 1 个氨基酸发生改变。但所有改变对蛋白质的空间结构和功能几乎没有影响。

2.4 SDS-PAGE 和 Western blot 检测三种蛋白的诱导表达

见图 5～图 7。通过条件摸索,确定重组质粒 pET-*mip*、pET-*flaA* 以及 pET-*mip*/*flaA* 最佳诱导表达条件分别为:IPTG 浓度 0.1 mmol/L,时间 4 h;IPTG 浓度 0.1 mmol/L,时间 4 h;IPTG 浓度 1 mmol/L,时间 6 h;温度均为 37 ℃。经 IPTG 诱导,样品 2 中出现一相对分子质量约为 39×10^3 的较浓蛋白条带,为载体 T7 启动子下游的组氨酸标签基因所编码的 His 标签蛋白和插入其下游的 *mip*/*flaA* 二联优势抗原表位基因所编码的二联蛋白所形成的融合蛋白。样品 3 中相对分子质量约 28×10^3 的较浓蛋白条带为His标签蛋白和 *flaA* 优势抗原表位基因所编码的蛋白所形成的融合蛋

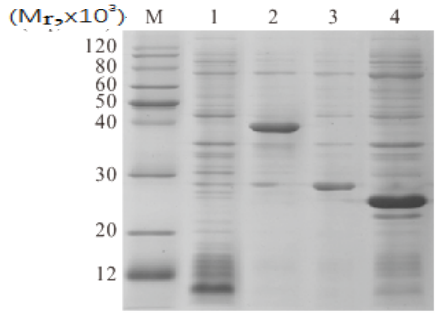


图 5 纯化前三种重组质粒表达产物的 SDS-PAGE

Fig 5 SDS-PAGE of three recombinant plasmid expression products before purified

M: Protein marker (12×10^3-120×10^3); 1: The expression product of plasmid pET30a(+) after induced with 0.1 mmol/L IPTG 4 h; 2: The expression product of plasmid pET-*mip*/*flaA* after induced with 1 mmol/L IPTG 6 h; 3: The expression product of plasmid pET-*flaA* after induced with 0.1 mmol/L IPTG 4 h; 4: The expression product of plasmid pET-*mip* after induced with 0.1 mmol/L IPTG 4 h

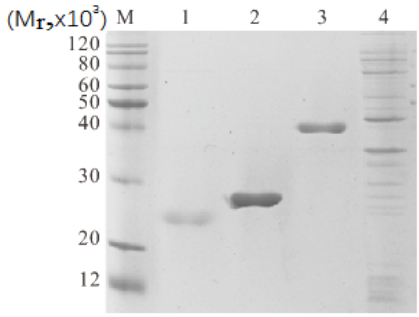


图 6 纯化后三种重组质粒表达产物的 SDS-PAGE

Fig 6 SDS-PAGE of three recombinant plasmid expression products after purified

M: Protein marker (12×10^3-120×10^3); 1: Purified His-Mip; 2: Purified His-FlaA; 3: Purified His-Mip/FlaA; 4: Total cell proteins of *E. coli* BL21 (DE3) containing plasmid pET30a (+)

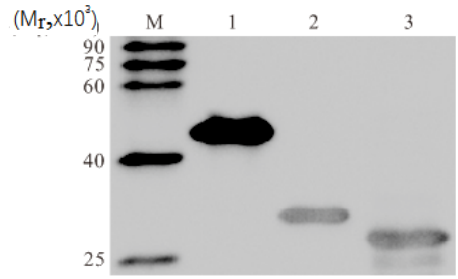


图 7 纯化后三种重组质粒表达产物的 Western blot

Fig 7 Western blot analysis of three recombinant plasmid expression products after purified

M: EasySee Western marker (25×10^3-90×10^3); 1: Purified His-Mip/FlaA; 2: Purified His-FlaA; 3: Purified His-Mip

白。样品 4 中 His 标签蛋白和 *mip* 优势抗原表位基因所编码的蛋白所形成的融合蛋白相对分子质量约26×10^3。将纯化后的融合蛋白进行 Western blot 检测也得到了相应的杂交条带。SDS-PAGE 电泳和 Western blot 结果表明三种重组融合蛋白成功表达。

3　讨论

表位疫苗(epitope vaccine)是指用抗原表位氨基酸序列制备的疫苗，其抗原分子中可同时包含 B 细胞表位和 T 细胞表位，可诱导出高度特异性的细胞或体液免疫应答，有更好的免疫效果[6]。在抗感染性疾病的疫苗研究中如对抗 HIV、流感病毒和疟原虫等已有表位疫苗的报道[7]，而在嗜肺军团菌疫苗的研究中也有表位疫苗的相关报道，并证明其有一定的免疫效果。Xu 等[8]利用生物信息学对嗜肺军团菌三种毒力蛋白进行分析，选取其优势抗原表位区进行基因克隆、表达和纯化，制备了优势抗原表位的三联蛋白疫苗，并免疫 A/J 小鼠发现其具有一定的免疫原性和免疫保护性。此外，经过分析得到的表位疫苗可以除去抗原中免疫原性不强、起负向调节作用或多变异的区域，将疾病特异的编码表位的基因片段构建到载体上表达，从而设计和筛选对预防和治疗疾病有用的表位来制备疫苗[9]。目前，表位疫苗已成为研制感染性疾病、恶性肿瘤以及自身免疫性疾病等疫苗的新方向[9]，也是军团菌疫苗研究的一个新方向。

在选择抗原表位作为表位疫苗的候选蛋白时，首先需要分析该蛋白的结构。蛋白质的二级结构中 α 螺旋和 β 折叠结构规则不易变形，较难结合抗体，一般不作为抗原表位；而 β 转角为凸出结构，多出现在蛋白质抗原表面，有利于与抗体结合，较可能成为抗原表位[10]。可塑性较高区域可能具有一定柔韧性，形成表位的可能性较大，容易与抗体结合。并且抗原表位一般分布于可及性较高区域。此外，抗原表位多分布于胞外区[10]。因此，本实验在进行优势抗原表位的选择时，以抗原指数高于 1 的区域为基础，辅以亲水性、可塑性和表面可及性，并在二级结构上含易形成抗原表位的转角和不规则卷曲结构以及结合胞外区进行综合分析[8]。本实验运用 DNA Star 软件预测出嗜肺军团菌 Mip 和 FlaA 两种蛋白的二级结构，并结合 Expasy 在线蛋白分析系统的胞外区分析选择活性表位可能存在的区域为优势抗原表位区。其中 FlaA 蛋白的分析结果与 Xu 等[8]的分析结果一致。

本实验选取嗜肺军团菌两个毒力因子 Mip 和 FlaA 蛋白进行研究。Mip 蛋白是军团菌明确的毒力因子之一，在军团菌属中保守性较高，为一种强碱性蛋白，在细菌表面表达。嗜肺军团菌感染人体后，Mip 蛋白通过影响肺巨噬细胞的有氧氧化与胞浆膜去极化，在嗜肺军团菌抵抗宿主细胞内杀灭机制中发挥重要作用，并且在嗜肺军团菌破坏肺组织和在人体内的传播中也有作用[11]。Köhler 等[12]的研究表明，在豚鼠感染模型中，缺乏 Mip 的嗜肺军团菌株或表达低肽基脯氨酰基顺反异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase，PPIase)活性的 Mip 突变株，其感染豚鼠的能力显著降低。而嗜肺军团菌 *flaA* 基因编码产生的鞭毛亚单位蛋白(FlaA)，参与各型嗜肺军团菌鞭毛的构成，与侵入宿主细胞有关，也是嗜肺军团菌的毒力因子之一。Ricci 等[13]在 A/J 小鼠的模型中，用纯化的嗜肺军团菌鞭毛蛋白诱导免疫保护反应；证明鞭毛能产生强烈的免疫原性，刺激 T 细胞介导的免疫反应，并且在 Lp 对 A/J 小鼠的致死性攻击中有免疫保护作用。Mip 和 FlaA 蛋白自被报道以来，有诸多研究将其应用于军团菌的检测和诊断[11-14]，但目前还没有报道将这两种蛋白结合起来用于嗜肺军团菌疫苗的研制。并且针对嗜肺军团菌蛋白疫苗的相关研究表明，联合运用几个毒力因子所制成的蛋白疫苗其免疫原性和免疫保护性比单个蛋白疫苗强[8,15]。

因此，本实验首次将嗜肺军团菌两个毒力因子 Mip 和 FlaA 通过基因克隆连接在一起作为候选疫苗，并通过生物信息学的方法分析两个蛋白，选择其优势抗原表位，排除抗原中免疫原性不强或起负向调节作用的区域，设计和筛选对预防疾病有用的表位来制备疫苗，希望能获得较好的安全性、免疫原性和免疫保护性。后续将利用该蛋白疫苗免疫动物，研究其免疫原性和保护性以及临床应用价值。本实验将表位疫苗和二联蛋白疫苗成功结合起来用于军团菌的研究，为军团菌蛋白疫苗的研制提供了初步的实验基础。

参　考　文　献

1　Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, *et al*. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. Clin Microbiol Rev, 2010; 23(2): 274-298.

2　Gomez-Valero L, Rusniok C, Rolando M, *et al*. Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. Genome Biol, 2014; 15

(11):505.

3 Ditommaso S, Giacomuzzi M, Rivera SR, *et al*. Virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water system and healthcare-associated Legionnaires' disease in Northern Italy between 2004 and 2009. BMC Infect Dis, 2014; 14:483. doi:10.1186/1471-2334-14-483.

4 Jiang G, Charoenvit Y, Moreno A, *et al*. Induction of multi-antigen multi-stage immune responses against *Plasmodium falciparum* in rhesus monkeys, in the absence of antigen interference, with heterologous DNA prime/poxvirus boost immunization. Malar J, 2007; 6:135.

5 Heppner DG Jr, Kester KE, Ockenhouse CF, *et al*. Towards an RTS, S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. Vaccine, 2005; 23(17-18):2243-2250.

6 兰 希, 赵 慧, 丁剑冰等. 寄生虫病疫苗研究新进展. 中国病原生物学杂志, 2014; 9(11):3-5.

7 Sharon J, Rynkiewicz MJ, Lu Z, *et al*. Discovery of protective B-cell epitopes for development of antimicrobial vaccines and antibody therapeutics. Immunology, 2014; 142(1):1-23.

8 Xu Y, Guan W, Xu JN, *et al*. Evaluation of the protective immunity of the *Legionella pneumophila* recombinant protein FlaA/MompS/PilE in an A/J mouse model. Vaccine, 2011; 29 (23):4051-4057.

9 Burton DR, Poignard P, Stanfield RL, *et al*. Broadly neutralizing antibodies suggest new prospects to counter highly antigenically diverse viruses. Science, 2012; 337 (6091): 183-186.

10 Delfani S, Imani Fooladi AA, Mobarez AM, *et al*. *In silico* analysis for identifying potential vaccine candidates against *Staphylococcus aureus*. Clin Exp Vaccine Res, 2015; 4(1):99-106.

11 Ceymann A, Horstmann M, Ehses P, *et al*. Solution structure of the *Legionella pneumophila* Mip-rapamycin complex. BMC Struct Biol, 2008; 8:17. doi: 10.1186/1472-6807-8-17.

12 Köhler R, Fanghönel J, König B, *et al*. Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. Infect Immun, 2003; 71 (8):4389-4397.

13 Ricci ML, Torosantucci A, Scaturro M, *et al*. Induction of protective immunity by *Legionella pneumophila* flagellum in an A/J mouse model. Vaccine, 2005; 23(40):4811-4820.

14 Pereira MS, Morgantetti GF, Massis LM, *et al*. Activation of NLRC4 by flagellated bacteria triggers caspase-1-dependent and -independent responses to restrict *Legionella pneumophila* replication in macrophages and *in vivo*. J Immunol, 2011; 187 (12):6447-6455.

15 Xu JN, Yang ZW, Chen JP, *et al*. Protective immunity against Legionnaires' disease in an A/J mouse model using a DNA vaccine composed of an outer membrane protein (29 kDa) and the PilE fusion protein. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012; 73 (1):9-15.

(2015-03-18收稿, 2015-07-13修回)

编辑 沈 进

本 刊 征 稿 启 事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖、首届国家期刊奖提名奖、第二、三届国家期刊奖百种重点期刊、四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖,2014中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE),《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS,BA),《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS,CA),荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM),中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc),中文生物医学期刊文献数据库(CMCC),中国学术期刊网全文数据库(CNKI),中国学术期刊(光盘版),万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。用英文撰写的稿件投稿时应附上中文稿。英文稿一经采用,刊出时间可提前。

本刊在线投稿网址:http://scdx.cnjournals.com

地址:四川省成都市人民南路三段17号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码:610041

电话/传真:(028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部