

# 抗肺炎衣原体蛋白酶样活性因子单克隆抗体在冠状动脉硬化患者肺炎衣原体感染诊断中的初步应用

唐熟能<sup>1</sup>, 郑江花<sup>2,3</sup>, 莫小辉<sup>4</sup>, 王继平<sup>5</sup>

(1. 厦门大学附属第一医院检验科, 福建省厦门市 361003; 2. 上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心, 上海市 201508; 3. 南华大学附属第二医院医学检验科, 湖南省衡阳市 421001; 4. 上海市皮肤性病医院中心实验室, 上海市 200050; 5. 上海市第六人民医院中心实验室, 上海市 200233)

[关键词] 肺炎衣原体; 冠状动脉硬化; 衣原体蛋白酶样活性因子重组蛋白; 单克隆抗体; 抗原诊断

[摘要] **目的** 制备抗肺炎衣原体蛋白酶样活性因子重组蛋白的单克隆抗体, 检测冠状动脉硬化患者的外周血单核细胞和冠状动脉粥样斑块中肺炎衣原体特异性抗原。**方法** 以肺炎衣原体蛋白酶样活性因子重组蛋白免疫小鼠, 与 SP2/0 细胞融合后, 采用间接 ELISA 和 Western blot 筛选阳性杂交瘤细胞, 经亚克隆建株; 小鼠体内诱生腹水法制备单克隆抗体, 用硫酸铵沉淀法对腹水中的单克隆抗体进行纯化, 测定其亚类和效价; 检测肺炎衣原体标准株以鉴定其特异性。建立间接 ELISA 方法检测冠状动脉硬化患者外周血单核细胞和冠状动脉粥样斑块标本中的肺炎衣原体抗原。**结果** 获得 4 株稳定分泌抗蛋白酶样活性因子重组蛋白的杂交瘤细胞株, 分别命名为 3F8、7B9、8C4 和 11B5, 其效价分别为 1:28000、1:16000、1:38000 和 1:12000; 经亚类鉴定, 3F8 和 7B9 杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体为 IgG2b, 其它 2 株均为 IgG1。以制备的单克隆抗体建立间接 ELISA 检测肺炎衣原体抗原, 与经典 PCR 方法的检测结果比较, 检出率具有较高的一致性。**结论** 成功获得了抗肺炎衣原体蛋白酶样活性因子重组蛋白的特异性单克隆抗体, 能特异地识别天然肺炎衣原体蛋白酶样活性因子抗原, 有望应用于冠状动脉硬化患者肺炎衣原体感染的抗原诊断。

[中图分类号] R44

[文献标识码] A

## Preliminary Application of the Monoclonal Antibodies Against Chlamydial Protease-Like Activity Factor From Chlamydia Pneumoniae to Diagnose Coronary Arteriosclerosis

TANG Shu-Neng<sup>1</sup>, ZHENG Jiang-Hua<sup>2,3</sup>, MO Xiao-Hui<sup>4</sup>, and WANG Ji-Ping<sup>5</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003; 2. Medical Clinical Laboratory of Shanghai Public Health Clinical Center Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508; 3. Medical Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001; 4. Central Lab, Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai 200050; 5. Central Lab, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

[KEY WORDS] Chlamydia Pneumoniae; Coronary Arteriosclerosis; Chlamydial Protease-Like Activity Factor Recombinant Protein; Monoclonal Antibody; Antigen Diagnosis

[ABSTRACT] **Aim** To prepare and identify the monoclonal antibodies against recombinant protein of chlamydial protease-like activity factor from chlamydia pneumoniae for clinical diagnosing C. pneumoniae infection. **Methods** The chlamydial protease-like activity factor recombinant protein was used as antigen for the immunization of female BALB/c mice, and the spleen cells of mice were fused with SP2/0 myelomas. Indirect ELISA and Western blot analysis were used to screen the hybridomas secreting antibodies and then subcloning positive clones were carried out to establish stable cell lines by limiting dilution. Ascites were induced to produce MAbs and their specificity were identified by indirected

[收稿日期] 2012-12-03

[基金项目] 湖南省自然科学基金(10JJ3014), 复旦大学医院优势学科建设项目“感染性疾病实验诊断”

[作者简介] 唐熟能, 主管技师, 在南华大学附属第二医院医学检验科进修。通讯作者郑江花, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为病原体的诊断防治与治病机制研究, E-mail 为 jhzheng2009@yahoo.cn。莫小辉, 硕士, 主管技师。

immunofluorescence (IIF) test and Western blot analysis based *C. pneumoniae* type strain. The new indirect ELISA was established to examine coronary artery plaques from patients and the results were analyzed by statistical method. **Re-**

**results** Four hybridoma cell lines secreted the monoclonal antibodies stably were finally obtained and named as 3F8、7B9、8C4 and 11B5, respectively; the subtype of the monoclonal antibodies secreted by 3F8 and 7B9 strain was IgG2b, the other two monoclonal antibodies were IgG1 and their titers in ascites were 1:28000, 1:16000, 1:38000 and 1:12000, respectively. The Western blot and IIF analysis showed that these monoclonal antibodies have excellent specificity to *C. pneumoniae*. The results of detecting clinical samples by the new indirect ELISA based on self-produced the monoclonal antibodies had better consistency with the results of PCR kits for *C. pneumoniae* infection. **Conclusion** The specific monoclonal antibodies against chlamydial protease-like activity factor recombinant protein of *C. pneumoniae* were obtained.

All the 4 monoclonal antibodies belonged to IgG, which can react with native chlamydial protease-like activity factor from *C. pneumoniae*. The self-produced monoclonal antibodies are suitable for *C. pneumoniae* antigen diagnosis to coronary arteriosclerosis patients.

肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*, Cpn) 是一种严格的真核细胞内寄生菌, 主要引起人的呼吸道感染; Cpn 感染非常普遍, 在临床上多以隐性、持续性感染形式存在, 反复迁延导致难以治疗的并发症, 与动脉粥样硬化、心肌梗死、冠心病等的发生、发展密切相关, 严重威胁着人类的生命健康<sup>[1-3]</sup>。目前 Cpn 感染诊断方法有病原体分离培养、PCR 技术、检测抗体或抗原物质的免疫学方法, 国际上尚无公认的标准方法<sup>[4,5]</sup>。临床诊断 Cpn 感染主要依靠抗体的检测<sup>[6]</sup>, 但不能准确反映人体内是否存在 Cpn 活菌, 而肺炎衣原体特异性抗原 (Cpn-Ag) 的检测能直接反映该个体内有无 Cpn 活菌<sup>[7,8]</sup>, 为临床 Cpn 感染疾病的准确诊断提供直接证据。根据文献报道, 衣原体蛋白酶样活性因子 (chlamydial protease-like activity factor, CPAF) 是一种免疫优势抗原, 在 Cpn 感染人体内可以检测到 CPAF 及其抗体<sup>[9-11]</sup>。单克隆抗体 (MAb) 的特异性强, 能够大大提高抗原抗体反应的特异性, 减少可能的交叉反应。其均一性和生物活性单一性使抗原抗体反应结果便于质量控制, 利于标准化和规范化<sup>[12,13]</sup>。所以本研究选择已被我们鉴定的 Cpn CPAF 重组蛋白来制备 MAb, 建立检测 Cpn 抗原的 ELISA, 检测冠状动脉硬化患者外周血单核细胞 (PBMC) 和冠状动脉粥样斑块中 Cpn-Ag, 初步探讨制备的单克隆抗体在 Cpn 感染抗原诊断中的应用价值, 为研制有效诊断 Cpn 感染的新方法提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂、HT、HAT、PEG3350、DMSO、HRP、小鼠 MAb 亚类鉴定试剂盒、HRP-山羊抗鼠 IgG + IgM 和 96 孔聚丙乙烯微孔板均购自 Sigma 公司, 高糖型 DMEM 无血清培养基、

胎牛血清购自 Hyclone 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司; 硝酸纤维素膜购自上海生物工程公司。GST 亲和层析纯化柱为北京天根公司产品; Cpn 的 PCR 检测试剂盒由北京市 Midica 优生遗传研究中心提供, 细胞爬片购自美国 Fisher 公司。

### 1.2 实验材料

Cpn 和沙眼衣原体 (CT) 标准株为美国得克萨斯大学圣安东尼奥医学中心钟光明教授馈赠, 大肠杆菌 (*E. coli*) JM109 由本室保存。pGEX6p-2-CPAF 由本室构建; SP2/0 购自中国科学院细胞库, 6~8 周龄 BALB/c 小鼠由上海斯莱克实验动物有限公司 (上海实验动物中心) 提供。340 例 PBMC 和 88 例冠状动脉粥样斑块采集自 2009 年 10 月至 2012 年 3 月, 来自南华大学附属第一医院和上海市第六人民医院心血管内科的冠状动脉粥样硬化确诊患者。

### 1.3 免疫动物

选取鉴定的 Cpn CPAF 免疫优势区 (第 181~400 位 CPAF 片段, 简称 CPAFm) 编码基因 (gi: 15617929 中 1167582~1168241 bp) 重组蛋白 CPAFm, 经纯化、复性后免疫 BALB/c 小鼠, 第 1 次腹腔注射与等体积福氏完全佐剂乳化, 抗原剂量为每只 50  $\mu\text{g}$ 。以后每隔 2~3 周用同等剂量抗原与福氏不完全佐剂等体积混匀行腹腔注射, 重复 2~3 次。7 天后采血测定效价, 检测免疫效果。融合前 3 天进行冲击免疫, 抗原剂量为每只 100  $\mu\text{g}$ 。

### 1.4 单克隆抗体的制备和纯化

按照常规方法进行细胞融合, 然后用 HAT 选择培养 10 天, 改用 HT 培养 2 周。用纯化的重组蛋白 CPAFm 包板, 采用间接 ELISA 检测杂交瘤细胞培养上清, 筛选分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株, 细胞融合后 10~20 天进行检测。采用有限稀释法进行亚克隆建株。取健康小鼠腹腔注射液体石蜡 0.5 mL/只, 1 周后每只小鼠经腹腔注射 (5~10)  $\times 10^6$

杂交瘤细胞, 10 ~ 15 天后收集腹水, -20℃ 保存。腹水离心去油状物及沉淀, 用饱和硫酸盐法纯化得特异性单克隆抗体。

### 1.5 单克隆抗体的生物学特性鉴定

(1) MAb 类型及亚型鉴定按照小鼠 MAb 亚类鉴定试剂盒使用说明书进行。(2) 腹水效价采用间接 ELISA 法测定<sup>[14]</sup>。(3) MAb 的 Western blot 鉴定: 将纯化的重组蛋白 CPAFm 和腹水均进行 SDS-PAGE, 再将蛋白从凝胶转移至硝酸纤维滤膜上, 一抗为制备的 MAb, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体, 底物为四甲基联苯胺。

### 1.6 制备单克隆抗体的特异性鉴定

分别培养 Cpn 标准株 (AR39 和 CWL029), 取适量细胞制成细胞爬片, 检测自制 MAb 是否与其发生特异性结合反应。在爬片上加入 MAb 于湿盒中室温孵育 1 h, 以健康小鼠血清作为阴性对照。用 PBS 溶液冲洗玻片后, 置入 PBS 溶液中漂洗 3 次。将按要求稀释的异硫氰酸荧光素标记羊抗鼠 IgG 以 50 μL 体积滴加到玻片上, 置湿盒 37℃ 孵育 30 min 后按上述方法冲洗。荧光显微镜观察, 见到发出苹果绿色荧光的衣原体菌体即为阳性, 显示 MAb 具有针对 Cpn 抗原表位族的特异性结合特征。同时根据荧光强度筛选出反应特异性最高的 MAb, 用作检测临床标本。同样培养 CT 标准株和 E. coli JM109, 检测自制 MAb 是否与其发生结合反应。

### 1.7 PCR 方法检测临床标本

将收集的冠状动脉粥样硬化患者 PBMC 和冠状动脉瘤斑块按试剂盒说明进行 PCR 检测和判读结果。

### 1.8 建立间接 ELISA 检测临床标本

有效感染了 Cpn 标准株 CWL029 的 Hella 细胞经超声破碎后, 其裂解物被用作阳性对照, 以 PBS 作阴性对照。阴性和阳性对照被包被于酶标板条孔内 (Costar, Cambridge, Mass), 置于 37℃ 孵育 2 h 或 4℃ 过夜。用 0.05% PBST 冲洗, 经封闭后加入以 1:100 稀释的经前面筛选制备的 MAb, 置于 37℃ 震荡 2 h; PBST 冲洗, 加入 1:3000 稀释的羊抗鼠 HRP-IgG, 置于 37℃ 孵育 1 h; PBST 冲洗, 加入含 0.4% 四甲基联苯胺 (TMB) 的 PBS 底物溶液 (pH5.0), 37℃ 孵育 10 min; 终止反应, 于酶标仪上测试在波长 450 nm 处的吸光度值, 每个正常痰咽拭子样品测试三个复孔, Cutoff 值被设定为所有样品的平均吸光度值加上两倍标准差。

将收集的冠状动脉粥样硬化患者 PBMC 和冠状

动脉瘤斑块按前述方法<sup>[14]</sup>破碎后包被 96 孔板, 37℃ 孵育 2 h 或 4℃ 过夜。取制备的 MAb 以 1:100 稀释, 以 PBS 为阴性对照。酶标抗体用羊抗鼠 HRP-IgG 1:10000 稀释。用底物 TMB 显色后, 酶标仪在波长 450 nm 处检测吸光度。检测结果与 PCR 方法测试结果作比较, 初步评价自制的 MAb 在临床标本 Cpn 抗原诊断中的应用价值。

## 2 结果

### 2.1 杂交瘤细胞株的建立及腹水的制备

经常规融合, 3 次亚克隆后得到 4 株分泌抗重组蛋白 CPAFm 的 MAb 杂交瘤细胞系, 分别命名为 3F8、7B9、8C4 和 11B5。扩大培养并冻存, 2 个月后复苏细胞仍能稳定分泌抗体。4 株杂交瘤细胞小鼠腹水阳性形成率为 80% 以上, 腹水收获量平均为每只 5.0 mL, 纯化后的抗体蛋白含量约为 1.20 g/L。

### 2.2 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

与阴性对照比较, 4 株杂交瘤细胞分泌的 MAb 均能识别 Mr 约为  $26 \times 10^3$  的重组蛋白 CPAFm, 出现特异性反应条带 (图 1)。

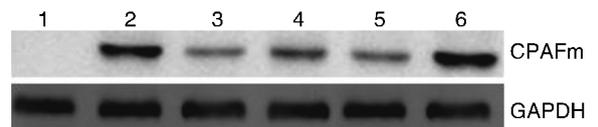


图 1. 4 株 MAb 的 Western blot 分析 1 为阴性对照, 2 为阳性对照, 3 为 3F8, 4 为 7B9, 5 为 11B5, 6 为 8C4。

Figure 1. Western blot analysis of four strain MAbs (ascites)

### 2.3 单克隆抗体的亚类、效价测定

MAb 杂交瘤细胞系 8C4 和 11B5 为 IgG1, 3F8 和 7B9 均为 IgG2b。以纯化的重组 CPAFm 包板, 采用间接 ELISA 法检测, 3F8、7B9、8C4 和 11B5 杂交瘤细胞株产生的腹水抗体平均效价分别为 1:28000、1:16000、1:38000 和 12000。

### 2.4 单克隆抗体的特异性鉴定

自制 MAb 检测 2 株 Cpn 标准株 (AR39 和 CWL029) 是否与其发生特异性结合反应。在荧光显微镜下观察到 2 株 Cpn 标准株均发出绿色荧光的衣原体菌体即为阳性 (图 2)。而自制 MAb 与 CT 标准株和 E. coli JM109 没有发生结合反应。

### 2.5 间接 ELISA 与 PCR 检测结果比较

将间接 ELISA 法与 PCR 检测 PBMC 结果进行比较, 发现两方法检测结果差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 1.22, P > 0.05$ ), 符合率为 95.29% (表 1)。

将间接 ELISA 法与 PCR 检测冠状动脉硬化斑块结果进行比较,结果发现两方法检测结果差异无

统计学意义 ( $\chi^2 = 1.31, P > 0.05$ ), 符合率为 92.05% (表 2)。

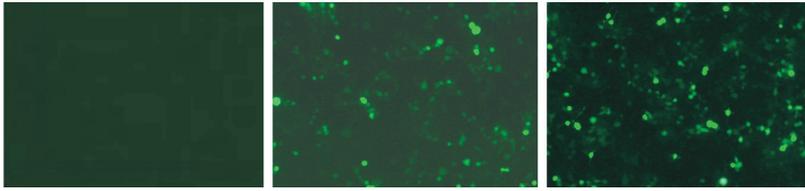


图 2. 单克隆抗体与 Cpn 标准株的反应结果 ( $\times 100$ ) 左为阴性对照, 中为 8C4 与 Cpn 标准株 AR39 反应结果, 右为 8C4 与 Cpn 标准株 CWL029 反应结果。

Figure 2. IIF staining results using CPAFm monoclonal antibody 8C4 (original magnification,  $\times 100$ )

表 1. 间接 ELISA 与 PCR 检测 340 例 PBMC 临床标本 (例)  
Table 1. The indirect ELISA and PCR for *C. pneumoniae* antigen detection in 340 PBMC samples

PCR 法	间接 ELISA		合计
	阳性	阴性	
阳性	96	4	100
阴性	12	228	240
合计	108	232	340

表 2. 间接 ELISA 与 PCR 检测 88 例冠状动脉硬化斑块结果  
Table 2. The indirect ELISA and PCR for *C. pneumoniae* antigen detection in 88 coronary atherosclerotic plaques samples

PCR 法	间接 ELISA (例)		合计
	阳性	阴性	
阳性	24	3	27
阴性	4	57	61
合计	28	60	88

### 3 讨论

动脉粥样硬化性心脏病已成为危害人类健康的第一号杀手,有关动脉粥样硬化的危险因素已成为人们研究的热点,除了主要包括高脂血症、高血压、糖尿病、吸烟、年龄和家族史,1988 年 Saikku 等第一次报道血清肺炎衣原体抗体与冠状动脉心脏病相关,随后大量的临床血清学检测、包括对兔和小鼠的动物实验、细胞分子水平研究均报道证实了 Cpn 感染与动脉粥样硬化的相关性。但是二者是否存在直接关系,尚需更多不同人群的临床实验来验证。

现行的 Cpn 感染诊断方法均存在不足之处,严重影响到 Cpn 感染的诊断和治疗,并且 Cpn 是被公

认的一种极难培养的衣原体,PCR 技术对试验的专业技术和设备要求均高,还容易出现假阳性,对 Cpn 的诊断主要依赖于免疫学方法<sup>[4,5]</sup>。其中暂被称为“金标准”方法的微量免疫荧光法 (MIF) 需要荧光显微镜检查法的专业技术,多于科研中使用;而 ELISA 方法的特异性又亟待提高<sup>[6-8]</sup>。

CPAF 是由衣原体基因合成并分泌到宿主细胞胞浆内的蛋白质,具有良好的免疫原性;Cpn 的 CPAF 由 619 个氨基酸组成,其中心区是第 200 ~ 338 位氨基酸残基区域,为免疫优势区,明显能被人中和抗体识别。在衣原体菌株中 CPAF 基因高度保守,与其他所有已知基因几乎没有同源性。我们前期研究提示 CPAF 是诊断 Cpn 感染的一种新的靶抗原,其免疫优势区在提高检测方法的特异性上具有巨大的潜力<sup>[9-11]</sup>。Mab 能够识别并与特定的某个抗原表位特异地结合,从而避免与其它抗原产生交叉反应。因此,Cpn 的 CPAF 是 Cpn 感染诊断与防治研究的方向之一<sup>[12,13]</sup>。

在前期成功制备出 Cpn 多克隆抗体的基础上,我们用纯化的重组蛋白 CPAFm 免疫 BALB/c 鼠,采用传统的杂交瘤技术,获得 4 株能分泌抗重组蛋白的杂交瘤细胞株 3F8、7B9、8C4 和 11B5。经 Western blot 和间接 ELISA 鉴定,其分泌的抗体均能与 Cpn 的 CPAFm 重组蛋白发生反应,筛选出纯度较高的 Cpn- Mab,经与 Cpn 标准株 AR39 和 CWL029 分别反应验证其具有高度的特异性。将杂交瘤细胞株 8C4 分泌的滴度较高的 Mab 建立间接 ELISA 法,检测 PBMC 和冠状动脉硬化斑块中的 Cpn 抗原,与常用的 PCR 检测结果比较,表明自制的 Mab 能识别天然的 Cpn 抗原,并且其检出率与常用的 PCR 方法检查结果具有较高的符合率。

因此本研究初步证实,用重组蛋白 CPAFm 筛选得到的 Mab,能特异地识别 Cpn 天然蛋白抗原。可以筛选出针对不同表位,特异性、敏感性均高的

MAB, 采用双抗体夹心法, 有望建立一种适应于检测 Cpn 感染抗原的快速、简便的 ELISA 诊断方法, 可望应用于 Cpn 感染的临床及流行病学调查研究。结合前期研究结果, 进一步证明了重组蛋白 CPAFm 是诊断 Cpn 感染的一种候选抗原, 为最终筛选出一种合适的诊断抗原, 开发出一种在实验室早期、快速、高效地检测 Cpn 感染的新试剂盒奠定了基础。同时, 由于 PBMC 和冠状动脉硬化患者的斑块标本中, Cpn-Ag 的检出能直接反映该个体内有无 Cpn 活菌存在, 因此 PBMC 中 Cpn-Ag 的检测可为诊治与该病原体相关的疾病提供比较可靠的实验依据。

本研究结果还表明, 冠状动脉硬化患者斑块标本中有大量 Cpn-Ag 沉积, 分别位于外膜下及粥样硬化斑块内。这种现象与以往报道相一致<sup>[15]</sup>。本研究发现粥样硬化斑块的标本中外膜均有大量 Cpn-Ag 沉积, 而在斑块周围的内膜下未发现 Cpn-Ag。Cpn-Ag 在颈动脉内膜增厚者及粥样硬化血管壁外膜较高阳性率均提示 Cpn 感染可能与动脉粥样硬化形成相关<sup>[16]</sup>, 对 Cpn-Ag 在血管外膜可能通过参与动脉粥样硬化形成的机制研究提供了有力的实验证据。

#### [参考文献]

[1] Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44: 568-576.

[2] Luque A, Turu MM, Rovira N, et al. Early atherosclerotic plaques show evidence of infection by *Chlamydia pneumoniae* [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012, 4: 2 423-432.

[3] 张腾腾, 张利军, 王蓓蓓, 等. PI3K/Akt 在肺炎衣原体感染诱导血管平滑肌细胞迁移中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(3): 207-211.

[4] Wohlschlaeger J, Wimmer ML, Nagler DK, et al. Identification of *Chlamydia pneumoniae* in intracranial and extracranial arteries in patients with stroke and in controls: combined immunohistochemical and polymerase chain reaction analyses [J]. *Hum Pathol*, 2005, 36(4): 359-402.

[5] Phoon MC, Yee GW, Koh WP, et al. Comparative seroepidemiologic analysis of *Chlamydia pneumoniae* infection using microimmunofluorescence, enzyme immunoassay and neutralization test: implications for serodiagnosis [J]. *Indian J Microbiol*, 2011, 51(2): 223-229.

[6] Ciervo A, Petrucca A, Visca P, et al. Evaluation and optimization of ELISA for detection of anti-*Chlamydia pneumoniae* IgG and IgA in patients with coronary heart diseases [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 59: 135-140.

[7] 周洲, 吴移谋, 刘劼, 等. 肺炎衣原体 ompA 基因 VD2-VD3 区重组蛋白在血清学诊断中的初步应用[J]. *微生物学报*, 2007, 47(3): 512-516.

[8] Sueur JM, Beaumont K, Cabioch T, et al. Diagnostic value of an ELISA using a recombinant 54-kDa species-specific protein from *Chlamydia pneumoniae* [J]. *Clin Micro Infect*, 2006, 12(5): 470-477.

[9] Dong F, Zhong Y, Arulanandam B, et al. Production of a proteolytically active protein, chlamydial protease/proteasome-like activity factor, by five different *Chlamydia* species [J]. *Infect Immun*, 2005, 73: 1 868-872.

[10] Sharma J, Bosnic AM, Piper JM, et al. Human antibody responses to a *Chlamydia*-secreted protease factor [J]. *Infect Immun*, 2004, 72: 7 164-171.

[11] Sharma J, Dong F, Pirbhai M, et al. Inhibition of proteolytic activity of a chlamydial proteasome/protease-like activity factor by antibodies from humans infected with *Chlamydia trachomatis* [J]. *Infect Immun*, 2005, 73: 4 414-419.

[12] Zhang RY, Shen WD. Monoclonal antibody expression in Mammalian cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 907: 341-358.

[13] Balakrishna K, Radhika M, Murali HS, et al. Specific identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by monoclonal antibodies generated against recombinant attachment invasion locus (rAil) protein [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(2): 533-539.

[14] Zheng JH, Wu YM, Ding T, et al. Preparation and analysis of immunocompetence of recombinant fusion protein of the immunodominant region in chlamydial protease-like activity factor from *Chlamydia pneumoniae* and its application in serodiagnosis [J]. *J Microbiol Immunol*, 2007, 5(2): 107-115.

[15] 史益军, 钱利生, 王卫群, 等. 自制肺炎衣原体单克隆抗体检测其特异性抗原对动脉粥样硬化诊断的临床意义[J]. *中国全科医学*, 2007, 10(1): 29-31.

[16] 杨彤, 黄红兰, 李凡. 肺炎衣原体感染加速高脂血症 C57BL/6J 小鼠动脉粥样硬化的形成[J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(11): 3 236-244.

(此文编辑 许雪梅)