

肺炎嗜衣原体蛋白酶样活性因子免疫优势区基因 重组蛋白在早期诊断中的应用

郑江花, 吴移谋*, 刘佳强, 刘广超, 陈超群

(南华大学医学院病原生物学研究所, 衡阳 421001)

摘要:【目的】克隆和表达肺炎嗜衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, Cpn)蛋白酶样活性因子(CPAF)免疫优势区基因,评价重组蛋白在早期感染诊断中的应用价值。【方法】挑选并克隆出 Cpn CPAF 免疫优势区基因,构建原核表达载体,诱导表达并纯化重组蛋白,分析其抗原特异性;间接 ELISA 法检测 Cpn 参考血清、临床血清标本中的特异性 IgM 抗体,以及呼吸道感染患者痰咽拭子中的 Cpn 抗原;检测沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)临床阳性血清和泌尿生殖道分泌物。【结果】高效表达和纯化出一相对分子量约 51.3kDa 的重组蛋白;Western blot 证明其只与人抗 Cpn 抗血清发生特异性反应;间接 ELISA 法检测 40 份 Cpn IgM 参考血清,阴性和阳性结果的一致率均为 100%(40/40);与“金标准”方法 MIF 对照,检测 300 例临床血清标本中的 IgM 抗体,符合率为 98.3%;与 PCR 试剂对照,检测 120 份呼吸道感染患者痰咽拭子中的 Cpn 抗原,符合率为 88.3%;检测 Ct 阳性血清和泌尿生殖道分泌物,与 Ct 没有交叉反应。【结论】制备的 CPAF 免疫优势区基因重组蛋白具有良好的抗原性,在 Cpn 感染早期诊断中具有较高的利用价值。

关键词:肺炎嗜衣原体;衣原体蛋白酶样活性因子;重组蛋白;抗原性;间接 ELISA;早期诊断

中图分类号:Q392 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2008)04-0520-06

肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, Cpn)是一种严格的真核细胞内寄生菌,根据 2004 年公布的伯杰氏细菌分类学手册,被更名为肺炎嗜衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, Cpn)。Cpn 的感染极为普遍,主要引起各个年龄阶段人群的呼吸道感染^[1],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、心肌梗塞、冠心病等的发生和发展密切相关,严重威胁着人类的生命健康^[2]。因此 Cpn 感染早期的准确诊断非常重要,可以有效地预防、尽早发现和治疗 Cpn 感染疾病。

目前对 Cpn 的实验室诊断方法有一定发展,主要有病原体分离培养、PCR 技术、检测 IgM 抗体或 Cpn 抗原物质的免疫学方法等,但是国际上尚无公认

的标准方法。Cpn 是被公认的一种极难培养的衣原体,而 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^[3,4],所以对 Cpn 的诊断主要依赖于免疫学方法。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 法操作简便、使用可靠的仪器客观地阅读结果,可应用于各级实验室^[5]。但是当今使用的 ELISA 试剂盒均依赖于 Cpn 全菌抗原(Cpn 的始体 EB)或其属抗原(脂多糖 LPS 和外膜蛋白 OMP)的制备,它们在各种衣原体之间存在较多的共同抗原表位,例如不同种衣原体间主要外膜蛋白基因的同源性为 69%~70%,它所编码的氨基酸同源性达到 73%~80%,主要与沙眼衣原体(*Chlamydia trachoma-*

基金项目:湖南省科技厅重点专项基金(06FJ2004)

*通讯作者。Tel: +86-734-8281555; Fax: +86-734-8282907; E-mail: yimou wu@sina.com

作者简介:郑江花(1972-),女,湖南人,主管技师,硕士,从事衣原体的诊断与防治研究。E-mail: jhzheng2005@21cn.com

收稿日期:2007-10-08;修回日期:2007-12-11

tis, Ct)的交叉反应降低了方法的特异性^[6,7],限制了它们的推广应用。所以为了提高诊断 Cpn 感染方法的准确性,寻找一种新的抗原非常必要。

衣原体蛋白酶样活性因子(CPAF)是在近几年被鉴定的一种免疫原^[8],在 Cpn 感染早期的人体内可以检测到 CPAF 及其抗体^[9,10]。在衣原体菌株中 CPAF 蛋白具有高度的特异性,并且它的免疫优势区明显能被人中和抗体所识别^[11]。据报道重组抗原具有高度特异、高纯度、成本低、易大规模生产等优点,是制备检测试剂盒的诊断抗原和研制疫苗的较好方法,它克服了天然抗原来源困难的问题,还可以提高诊断方法的特异性。

因此本研究选择 Cpn CPAF 的免疫优势区(第 181~400 位 CPAF 片段,本文简称 CPAFm)编码基因(gi:15617929 中 1167582~1168241bp),对其克隆和表达,分析重组蛋白的抗原性,建立间接 ELISA 法,检测呼吸道感染患儿血清和痰咽拭子,初步评价其作为 Cpn 感染早期诊断候选抗原在临床诊断中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: Cpn CWL029 株基因组 DNA 模板和 pGEX6p-2 表达载体由美国得州大学圣安东尼奥医学中心钟光明教授馈赠。大肠杆菌(*Escherichia coli*, E.coli)BL21、JM109 为本研究所保存。

1.1.2 临床标本: 300 份人血清样本和 120 份痰咽拭子均采集于 2005 年 1 月至 2007 年 2 月就诊于衡阳市南华大学附属一医院小儿科的呼吸道感染儿童患者;40 份 Ct 临床阳性血清和 Ct 感染的泌尿生殖道分泌物均收集于本研究所,均无任何 Cpn 感染的临床实验室检查证据;160 份健康献血者血清保存于本所。

1.1.3 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、DNA 聚合酶、DNA 标准均为美国 MBI 公司产品, P7708V 蛋白质标准为北京纽英伦公司产品, GST 琼脂糖凝胶 FF 购于北京天来公司,增强化学发光(ECL)试剂盒购于美国 CST 公司,抗原偶联的 CNBr-activated Sepharose 4B 纯化柱为美国 Sigma 公司生产,80 份 Cpn IgM 参考血清和 MIF 试剂为德国欧蒙医疗诊断公司产品,检测 Cpn 的 PCR 试剂盒购于上海复生公司。梯度 PCR 仪为 Biometra 公司生产;DU640 核酸蛋白定量分析仪由 Beckman 公司生产;Multiskan MK3 全自动酶标检测仪为芬兰雷勃公司产品。

1.2 表达质粒的构建及鉴定

在 NCBI 数据库中查询到 CpnCWL029 株 CPAF 的氨基酸序列(GI:15618924),用生物信息学软件分析后,选择 CPAFm 基因(gi:15617929;1167582~1168241bp),设计其扩增引物,由上海生工合成。正义链引物 P1 序列为 5'-CCGG[▼]GATCCGATGCGGTTCCTTCAG-3',反义链引物 P2 序列为 5'-TTGC[▼]-GGCCGCTTAGACTTCATCCTGAGTG-3',引入下划线的核苷酸与 Bam H 和 Not 限制性酶切位点分别相符合,PCR 扩增 CPAFm 编码基因,经纯化后被亚克隆至原核表达载体 pGEX6p-2 上,将 pGEX6p-2/CPAFm 重组质粒转化入 *E.coli* JM109 中,对转化子进行 PCR 筛选,双酶切和测序(上海 Sangon 公司)鉴定。

1.3 重组蛋白的表达和纯化

确证的重组质粒被转化入表达菌 *E.coli* BL21 中,按著作^[12]所述方法,阳性克隆接种于含 100 μ g/mL 的 LB 培养液中,于 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0 时,加入终浓度为 1.0mmol/L 的 IPTG 诱导。离心后收集菌体,加入细胞裂解液中于 4 $^{\circ}$ C 过夜;反复冻融后超声破菌,收集沉淀,用包涵体洗涤液冲洗三次;离心后取沉淀加入包涵体溶解液(8mol/L Urea, 20mmol/L Tris-Cl, 6mmol/L DTT pH8.0)中过夜。再次离心后,在上清中先后加入 GST 融合蛋白复性液(20mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 1mmol/L EDTA pH 8.0, 0.9mmol/L GSH, 0.1mmol/L GSSG)和“万金油”透析复性液(0.1mmol/L GSSG, 1mmol/L GSH 等, pH 8.5)中孵育,使重组蛋白充分复性。然后按说明书用 GST 琼脂糖凝胶 FF 进行纯化。10%SDS-PAGE 分析蛋白质的表达形式及纯度;在核酸蛋白分析仪上,采用 A₂₈₀ 紫外分光光度法测定蛋白质浓度。

1.4 GST-CPAFm 的抗原性分析

Western blot 实验证明重组蛋白的抗原特异性,一抗为 1:100 稀释的人抗 Cpn IgM 抗血清(本所用德国欧蒙公司的 MIF 商品试剂盒确定),二抗为 1:10000 稀释的羊抗人 IgM-HRP(北京 Solarbio 公司产品),最后用 ECL 试剂盒显影,观察特异性免疫反应条带。

200 μ g 纯化的重组蛋白与等体积弗氏佐剂混匀,分 2 组分别免疫 8 只新西兰兔(雄性,1.5~3.0kg/兔),并设立空白和阴性对照组。第 1 组兔免疫 1 次,每间隔 10 天从兔耳中静脉采血,用间接 ELISA 法检测血清中特异性 IgM 抗体的滴度,分析 GST-CPAFm 的免疫原性;另 1 组按教材^[13]所述方法,免疫 4 次后采集血清制备特异性的多克隆抗体。

1.5 Cpn 感染早期的临床诊断应用

含 3 μ g/mL 重组蛋白的缓冲液包被微量反应板, 建立检测 CpnIgM 抗体的间接 ELISA 法, 检测 160 份健康献血者血清(1:50 稀释), 以 Cpn IgM 阴、阳性参考血清为阴、阳性对照, 羊抗人 IgM-HRP(1:1000 稀释)为二抗, 四甲基联苯胺(TMB)为显色底物, 酶标仪测定 450nm 波长处的吸光度值, 阳性临界值(COV)为 160 份献血者血清的平均 A_{450} 值(\bar{X}) $\pm 2 \times$ 标准差(s)。

建立的间接 ELISA 法检测不同稀释度(最高为 1:200)的 Cpn IgM 参考血清, 计算阴性和阳性结果的一致率, 验证该方法的准确性。MIF 为参考方法, 与建立的间接 ELISA 法同时检测 300 份血清样本中的 Cpn IgM 抗体, 据结果初步评价重组蛋白在 Cpn 感染早期 IgM 抗体检测中的应用价值。被测孔的平均 A_{450} 值大于 COV 则判为阳性, 反之判为阴性。

用饱和硫酸铵粗提及抗原偶联的 CNBr-activated Sepharose 4B 纯化抗 GST-CPAFm 的多抗, 具体方法按说明书进行。建立检测 Cpn 抗原的间接 ELISA 法: 对 120 份痰咽拭子, 用 200 μ L 生理盐水洗涤, 加入细胞裂解液 200 μ L, 离心收集上清包被酶标板, 一抗为纯化的 GST-CPAFm 多抗(1:8000 稀释), 同时以献血员痰咽拭子作阴性对照, 标本 A_{450} 值/阴性对照孔值 2.1 者为阳性。与 PCR 试剂比较, 检测 Cpn 抗原物质, 评价重组蛋白在 Cpn 感染早期抗原检测中的应用价值。

1.6 与 Ct 的交叉反应

建立的间接 ELISA 法分别检测 40 份 Ct 临床阳性血清和泌尿生殖道分泌物, 分析与 Ct 的交叉反应。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

PCR 检测重组质粒, 获得产物有一条清晰的特异性条带, 长度约 714bp, 与预期值相符。Bam H 和 Not 双酶切重组质粒(图 1)和测序结果的 BLAST 分析证实其中有 CPAFm 基因插入子, 序列与 GenBank 登录的 CPAF 基因片段完全相同。

2.2 重组蛋白的表达、纯化和鉴定

经 10% SDS-PAGE 检测发现, 与阴性对照相比较, 含该重组质粒的 *E. coli* BL21 明显有一条另外的蛋白质带, 其相对分子量(Mr)约为 51.3 kDa, 与预期值相符(图 2); 表达产物以包涵体形式存在于 *E. coli* 中; 纯化的表达产物只见 51.3 kDa 左右的单一清晰条带, 纯度高达

95%以上(图 3), 测得浓度为 1.365mg/mL。

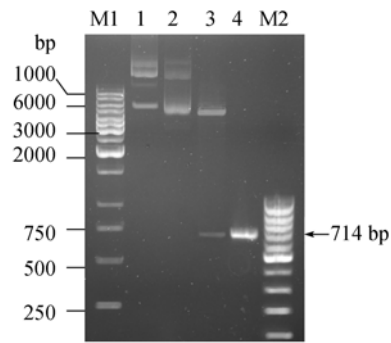


图 1 pGEX6p-2/CPAFm 重组质粒的酶切及 PCR 检测

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pGEX6p-2/CPAFm with restrictive enzyme digestion and its PCR. M1.1000bp DNA marker; 1. recombinant plasmid pGEX6p-2/CPAFm; 2. pGEX6p-2 vector; 3. pGEX6p-2/CPAFm by BamH I and Not I; 4. PCR detection of pGEX6p-2/CPAFm; M2. 100bp DNA Marker.

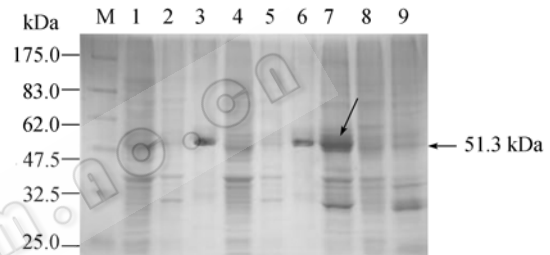


图 2 重组蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的诱导表达, 细菌全裂解物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analyses of lysate of whole *E. coli* BL21(DE3) bacterium, expression of recombinant protein in DE3 after induction. M. Protein marker; 1,4. DE3/pGEX6p-2/CPAFm non-induced by IPTG at 37 $^{\circ}$ C, 24 $^{\circ}$ C; 2,5. supernatant of broken DE3/pGEX6p-2/CPAFm induced by IPTG at 37 $^{\circ}$ C, 24 $^{\circ}$ C; 3,6. precipitation of broken DE3/pGEX6p-2/CPAFm induced by IPTG at 37 $^{\circ}$ C, 24 $^{\circ}$ C; 7. DE3/pGEX6p-2/CPAFm induced by IPTG at 24 $^{\circ}$ C; 8. empty DE3 bacteria induced by IPTG at 24 $^{\circ}$ C; 9. DE3/pGEX6p-2 induced by IPTG at 24 $^{\circ}$ C.

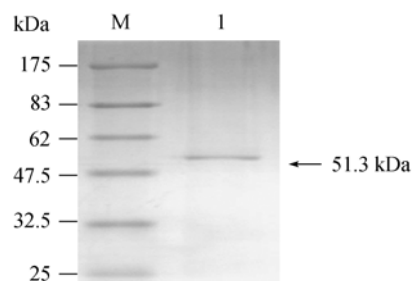


图 3 纯化的 GST-CPAFm 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein GST-CPAFm purified. M. Protein marker; 1. purified GST-CPAFm.

2.3 GST-CPAFm 的抗原性分析

建立的间接 ELISA 法检测到用 GST-CPAFm 免疫 1 次后第 40 天兔血清中的特异性 IgM 滴度高达 1:8000 以上, 而对照组无。Western blot 证明 GST-CPAFm 能与人抗 Cpn 抗血清作用, 表现出特异性免疫印迹反应(图 4)。

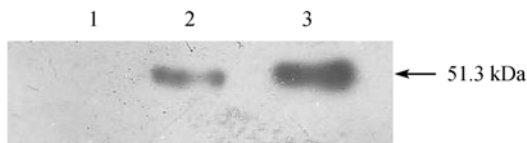


图 4 大肠杆菌 BL21 全裂解物和纯化了的重组蛋白 GST-CPAFm 的抗原性分析

Fig. 4 Western blot analyses of lysate of whole *E. coli* BL21 bacterium and purified recombinant protein GST-CPAFm. 1. DE3/pGEX6p-2/CPAFm non-induced by IPTG; 2. DE3/pGEX6p-2/CPAFm induced by IPTG; 3. recombinant protein GST-CPAFm purified.

2.4 Cpn 感染早期的临床诊断应用

建立的间接 ELISA 法检测 Cpn IgM 参考血清, 阳性和阴性结果的一致率都是 100%。与 MIF 相比较, 建立的间接 ELISA 法检测 300 份血清样本中的 IgM 抗体的灵敏度为 94.6%(87/92), 特异度为 100%(208/208); 两方法符合率为 98.3%, 卡方检验 (χ^2)分析两方法无统计学差异(表 1)。

表 1 建立的间接 ELISA 法与金标准方法 MIF 检测 300 份血清标本中 CpnIgM 结果。

Table 1 Qualitative results of the developed indirect ELISA in comparison with MIF for *C. pneumoniae* IgM detection in 300 serum samples.

gold standard method (MIF) results	The indirect ELISA results		
	Positive	Negative	Total
Positive	87	5	92
Negative	0	208	208
Total	87	213	300

$\chi^2=3.20$, $P>0.05$; Agreement:(87+208)/(87+213)=98.3%.

与 Cpn 的 PCR 试剂比较, 建立的间接 ELISA 法检测 120 份呼吸道感染患者痰咽拭子, 敏感度为 85.7%(24/28), 特异度为 89.1%(82/92); 两方法符合率为 88.3%, 经 χ^2 检验分析两方法无统计学差异(表 2)。

2.5 与 Ct 的交叉反应

建立的间接 ELISA 法检测 40 份 Ct IgM 阳性血清和泌尿生殖道分泌物,无一例阳性结果。

表 2 建立的间接 ELISA 法与法国 PCR 试剂检测 120 份痰咽拭子结果。

Table 2 Qualitative results of the developed indirect ELISA in comparison with French PCR reagent for *C. pneumoniae* antigen detection in 120 sputum throat swabs.

PCR reagent	The indirect ELISA results		
	Positive	Negative	Total
Positive	24	10	34
Negative	4	82	86
Total	28	92	120

$\chi^2=1.79$, $P>0.05$; Agreement:(24+82)/(34+86)=88.3%.

3 讨论

随着现代文明的飞速发展, Cpn 感染呈上升趋势, 人们对它的致病分子机制和诊断预防给予了高度的重视。尤其感染早期准确地诊断 Cpn, 能够有效地控制起其传播和预防并发症的发生, 但是现行的各种方法均存在不足之处^[6,7]。目前认为 ELISA 法具有广阔的应用前景, 然而采用的抗原与 Ct 同源性较高, 检测时容易出现假阳性结果, 所以急待寻找一种新的抗原来改进和提高方法的特异性。

近几年文献报道, CPAF 是由衣原体基因编码并被分泌到宿主细胞胞浆内的蛋白质, 其合成与分泌依赖于感染活动期(早期)衣原体的复制, 感染了衣原体的机体能产生特异性的 CPAF 抗体^[9-11]; 在衣原体菌株中 CPAF 基因高度保守, 与其它所有已知基因没有显著的同源性^[8], CPAF 蛋白具有高度的特异性, 其种内一致性高达 99%而种间一致性低至 46%^[14]; 研究发现 Cpn CPAF 由 619 个氨基酸组成, 其免疫优势区在第 200~338 位氨基酸残基区域, 经生物信息学分析发现该区的抗原性较好, 特异性较高。这些均提示 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度上具有巨大的潜力。

本研究应用分子生物学技术, 成功构建了 pGEX6p-2/CPAFm 原核表达质粒, 并在大肠杆菌 BL21 中高效表达了重组蛋白。以纯化蛋白免疫新西兰兔, 间接 ELISA 法检测兔免疫血清中的 IgM 抗体效价高达 1:8000 以上, 证明重组蛋白具有良好的免疫原性, 能刺激新西兰兔引发强烈的体液免疫应答。经 Western blot 分析证明重组蛋白能被 Cpn 阳性血清特异性地识别, 具有良好的免疫反应性。

建立的间接 ELISA 法检测 Cpn 参考血清, 其灵

敏度和特异度均为 100%，初步证明它是一种准确的方法；检测 300 份呼吸道感染患者血清中的 IgM 抗体，结果显示建立的间接 ELISA 法的灵敏度、特异度均较高，当检测 40 份 Ct IgM 阳性血清时，未发现交叉反应，提示方法的特异性比较好，当然能否完全避免与 Ct 的交叉反应，还须进一步检测大量的临床标本加以验证。实验中发现有 5 份病人血清标本未被重组抗原识别而能被 MIF 试剂检测出来，可能是以下原因引起：(1) 市售试剂盒本身有一定的假阳性；(2) 间接 ELISA 建立在覆盖表位有限的抗原基础上，降低了灵敏度；(3) 标本在检测时经几次冻融后抗体滴度可能下降，影响了检出率；(4) 病人经抗生素治疗，抗体效价在一段时间内明显下降，影响了抗体的检出。

检测 120 份呼吸道感染患者痰咽拭子中的 Cpn 抗原，结果显示间接 ELISA 法的灵敏度、特异度均较高，当检测 40 份 Ct 感染的泌尿生殖道分泌物时，未发现交叉反应。

因此本研究初步证实，肺炎嗜衣原体 CPAF 免疫优势区重组蛋白具有良好的抗原活性，以其为基础建立的 ELISA 法，具有良好的敏感性和特异性，在 Cpn 感染早期诊断中具有较高的利用价值。本研究丰富了 Cpn 感染的诊断候选抗原库，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。

参 考 文 献

- [1] Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(4): 568–576.
- [2] Grayston, JT. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis*, 2000, 181(Suppl. 3): S402–S410.
- [3] Verkooyen RP, Willemsse D, Casteren SCAMH, *et al.* Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(8): 2301–2307.
- [4] 陈丽丽, 吴移谋, 雷达, 等. 泌尿生殖道沙眼衣原体 omp1 基因多态性研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(2): 214–218.
- [5] 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(1): 135–140.
- [6] 周洲, 吴移谋, 刘劫, 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. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(3): 512–516.
- [7] Sueur JM, Beaumont K, Cabioch T, *et al.* Diagnostic value of an ELISA using a recombinant 54-kDa species-specific protein from *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Micro and Infect*, 2006, 12(5): 470–477.
- [8] Zhong G, Fan P, Ji H, *et al.* Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med*, 2001, 193(8): 935–942.
- [9] Sharma J, Bosnic AM, Piper JM, *et al.* Human antibody responses to a *Chlamydia*-secreted protease factor. *Infect Immun*, 2004, 72 (12): 7164–7171.
- [10] 牛玉宏, 董峰, 史剑慧, 等. 肺炎衣原体蛋白酶样活性因子在急性感染期的表达和分泌. *中华微生物学和免疫学杂志(J Microbiol Immunol)*, 2004, 24(4): 272–274.
- [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*. *Infect Immun*, 2005, 73(7): 4414–4419.
- [12] Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF, 分子克隆实验指南. 金冬雁, 等译第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] 陶义训. 免疫学和免疫学检验. 第二版, 北京: 人民卫生出版社, 1997.
- [14] 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. *Infect Immun*, 2005, 73(3): 1868–1872.

Early diagnosis using recombinant protein of immunodominant region gene of chlamydial protease-like activity factor from *Chlamydomphila pneumoniae*

Jianghua Zheng, Yimou Wu, Jiaqiang Liu, Guangchao Liu, Chaoqun Chen

(Institute of Pathogenic Biology, Medical College, University of South China, Hengyang, 421001, China)

Abstract: [Objective] To clone and express the immunodominant domain gene of the chlamydial protease-like activity factor(CPAF) from *Chlamydomphila pneumoniae*. The value of the recombinant protein was evaluated for diagnosing early infection. [Methods] According to bioinformatics analyses and references, we chose the immunodominant region epitope of chlamydial protease-like activity factor(CPAF) from *Chlamydomphila pneumoniae*, then amplified the genes of the epitope by PCR, and then ligated the genes into a pGEX6p-2 vector. We purified the expressed recombinant protein with glutathione S-transferase (GST) agarose gel FF, then identified it by SDS-PAGE. By immunizing New Zealand rabbits evaluated the immunogenicity of the recombinant protein, and analyzed its antigenicity with Western blot. The specific IgM antibodies in 300 clinical sera samples and *C. pneumoniae* reference sera, the antigen of *C. pneumoniae* in 120 sputum and throat swabs were detected with the developed indirect ELISA. At last, we investigated the cross-reactivity against *Chlamydia trachomatis* with the developed ELISA method to detect anti-*C. trachomatis* positive antisera and secretions in genitourinary tract. [Results] We attained successfully a 51.3kDa recombinant protein. Western blot assay proved the recombinant protein could only specifically react with human anti-*C. pneumoniae* antisera. The titer of the specific IgM antibodies in the immunized New Zealand rabbits was above 1:8000. The developed ELISA detected anti-*C. pneumoniae* IgM positive and negative reference sera, the sensitivity and specificity were both 100% (40/40). The concordance rate between the indirect ELISA and the MIF to 300 clinical sera samples was 98.3%. The concordance rate of antigen detection between the new ELISA and the PCR reagent to 120 sputum and throat swabs was 88.3%. When detecting anti-*C. trachomatis* positive antisera and secretions in genitourinary tract with the developed ELISA, we didn't found any cross reaction against *C. trachomatis*. [Conclusion] The prepared recombinant protein of the CPAF immunodominant region epitope gene from *C. pneumoniae* shows excellent antigenicity and can highly benefit on developing new indirect ELISA as methods to detect IgM antibodies and antigen of *C. pneumoniae* for diagnosing early infection.

Keywords: *Chlamydomphila pneumoniae*; Chlamydial protease-like activity factor; Recombinant protein; Antigenicity; Indirect ELISA; Early diagnosis

Supported by the Key Special-purpose Project of Hunan Provincial Technology Department(06FJ2004)

*Corresponding author. Tel: +86-734-8281555; Fax: +86-734-8282907; E-mail: yimouwu@sina.com

Received: 8 October 2007/ Revised: 11 December 2007

答 作 者 问

问：我的文章现已审查完毕，并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询，如果文章修改后，再次投递，是否还需要交稿件受理费？是否仍然用原论文编号提交？

答：这要分2种情况，(1)如果你的文章已经被通知“退稿”了，那么文章修改之后再投来的将按“新稿件”处理，从程序上来讲和新投稿件是一样的，仍需要缴纳稿件受理费，只是为便于稿件受理进程，请作者在投稿时注明“原稿件号+修后再投”字样。(2)如果是编辑部在审稿意见中要求您改后再投来“复审”，则不作为新稿处置，请直接注明“原稿件号+修后再审”字样，不再另交稿件受理费。