

产单核细胞李斯特菌溶血素 O 单克隆抗体的制备与鉴定

孔德壮¹, 张衍海², 龚振华², 李 葳², 郑增忍², 李玉清², 张彦明¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032)

【摘要】 **【目的】**制备抗产单核细胞李斯特菌溶血素 O(LLO)的特异性单克隆抗体。**【方法】**用 LLO 重折叠的原核表达产物 LLO-his 免疫 Balb/c 小鼠, 取其脾细胞, 与骨髓瘤细胞在 PEG4000 作用下融合, 经间接 ELISA 法筛选、多克隆及单克隆分离出阳性细胞株后, 再用体内诱生腹水法大量制备单克隆抗体。用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化单克隆抗体, 间接 ELISA 法测定其效价及相对亲和常数; 用 HBT 单克隆抗体亚类鉴定试剂盒鉴定抗体亚型; 常规方法制备染色体, 观察细胞株染色体数目及标志染色体; Western blot 检测抗体的特异性。**【结果】**获得了 2 株稳定分泌抗 LLO 单克隆抗体的杂交瘤细胞系, 分别命名为 3F5-G3 和 2B4-C8, 其腹水效价分别为 $1 : (1 \times 10^5)$ 和 $1 : (1 \times 10^7)$; 染色体分别为 97 ± 5 和 93 ± 8 条, 且观察到标志染色体; 相对亲和常数分别为 0.49 和 0.26 $\mu\text{g/mL}$; 抗体亚类均为 IgG1, 轻链均为 κ 链。特异性鉴定结果表明, 2 种单克隆抗体均可与 LLO 蛋白发生特异性反应, 而与载体蛋白不发生反应。**【结论】**获得了抗 LLO 的特异性单克隆抗体。

【关键词】 产单核细胞李斯特菌; 李斯特菌溶血素 O; 单克隆抗体

【中图分类号】 S855.12

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)07-0039-05

Preparation and identification of monoclonal antibodies against Listeriolysin O

KONG De-zhuang¹, ZHANG Yan-hai², GONG Zhen-hua², LI Wei²,
ZHENG Zeng-ren², LI Yu-qing², ZHANG Yan-ming¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to obtain specific monoclonal antibodies(McAbs) against Listeriolysin O(LLO). **【Method】** Balb/c mice were immunized with refolding LLO-his expressed in *E. coli* BL21, and splenocytes of immunized mice were fused with SP2/0 cell; Anti-LLO hybridoma cells were screened by indirect ELISA; McAbs were largely prepared and purified from ascites deposited by octylic acid and ammonia sulfate; The titre and relative affinity of McAbs were identified by indirect ELISA, identifying isotype of McAbs by mouse Mab isotyping test kit from HBT; The chromosome was processed for counting the number of chromosome and observing marker chromosome; The specificity of McAbs was characterized by Western blot assay. **【Result】** 2 McAbs against LLO were obtained and named 3F5-G3 and 2B4-C8 respectively; The titre of ascites was up to $1 : (1 \times 10^5)$ (3F5-G3) and $1 : (1 \times 10^7)$ (2B4-C8); The number of chromosome was 97 ± 5 (3F5-G3) and 93 ± 8 (2B4-C8); The affinity constant of McAbs was 0.49 $\mu\text{g/mL}$ (3F5-G3) and 0.26 $\mu\text{g/mL}$ (2B4-C8); The specificity identification showed that the two kinds of mono-

* [收稿日期] 2009-12-29

[基金项目] 公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903055)

[作者简介] 孔德壮(1984—), 男, 河南滑县人, 在读硕士, 主要从事兽医公共卫生学研究。E-mail: kdzpb@163.com

[通信作者] 张彦明(1956—), 男, 陕西南郑人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

E-mail: ylzhangym@sohu.com

clonal antibodies could react specifically with LLO protein, but no reaction with vector protein. 【Conclusion】 The specific McAbs against LLO were prepared in the study.

Key words: *Listeria monocytogenes*; Listeriolysin O; monoclonal antibody

产单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)是李斯特菌属的代表种,能引起人和多种动物的李斯特菌病。LM为细胞内寄生菌,其致病性依赖于细菌产生的毒力因子,其中最主要的毒力因子为产单核细胞李斯特菌溶血素 O(Listeriolysin O, LLO)^[1]。LLO由 *hly* 基因编码,分子质量为 58.6~60 ku,是 LM 的标志性蛋白,可用于 LM 的研究以及食品中 LM 的检测。LLO 是一种孔形成毒素,可破坏吞噬体,促进菌体进入胞液,是细菌在胞液内增殖的先决条件,也是主要的毒力因子,其缺失将会导致细菌毒力全部丧失^[2-4]。要对 LM 进行深入研究,其单克隆抗体是必不可少的工具,但 LLO 在培养上清液中产量很低,不能满足单克隆抗体制备的要求。原核表达可很好地解决 LLO 产量不足的问题,但 LLO 的原核表达产物主要以包涵体形式存在^[2,5-7],不能直接用于制备单克隆抗体。本研究以重折叠的原核表达 LLO 为抗原,制备抗 LLO 的特异性单克隆抗体,以期为进一步研究 LLO 的致病机理、生物学特性,以及建立 LM 的快速、特异性和高灵敏度的检测方法提供条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

骨髓瘤细胞系 SP2/0 与重组菌 BL21(pET32a-hly)由中国动物卫生与流行病学中心提供;8 周龄雌性 Balb/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;DMEM 培养基购自 GIBCOBRL 公司;弗氏佐剂、牛血清白蛋白(BSA)、PEG20000、PEG4000、L-谷氨酰胺(L-G)、TMB、HT 培养基、HAT 培养基、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠酶标二抗及秋水仙素,均购自 SIGMA 公司;单克隆抗体亚类鉴定试剂盒购自 HBT 公司。

1.2 方法

1.2.1 LLO 抗原的制备 取重组菌 BL21(pET32a-hly)以体积比 1:100 接种于 LB 培养基中,37℃振荡培养过夜,次日按同样比例接种于 2×YT 培养基中,37℃振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.2 时,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, IPTG)至终浓度为 0.1 mmol/L,30℃诱导表达 3 h,4℃、6 000 g 离心 15

min 收集菌体沉淀;300 W 工作强度超声破碎菌体 8 s,间隔 10 s 后再次超声破碎,共超声破碎 99 次;4℃、6 000 g 离心 15 min 提取包涵体;以 8 mol/L 尿素溶解,His 纯化试剂盒纯化,采用梯度尿素透析进行重折叠,以 PEG20000 浓缩,制备抗原。

1.2.2 动物的免疫 首免,取适量重折叠 LLO 蛋白与等量弗氏完全佐剂乳化,颈背部皮下多点注射小鼠,剂量为 20 μg/只;2 周后,同样剂量加强免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,共加强免疫 3 次,其间间隔 2 周。每次加强免疫 1 周后尾静脉采血,间接 ELISA 方法检测血清抗体效价,直至抗血清最大稀释倍数为 1×10⁵,其 OD₄₅₀ 与对照血清 OD₄₅₀ 之比≥2.1、且其 OD₄₅₀≥1.0 时,选择效价最高的小鼠用于单克隆抗体的制备。

1.2.3 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选 选取抗血清效价最高的小鼠,于细胞融合前 3 d 尾静脉加强免疫一次(不含佐剂)。融合前 24 h 制备饲养细胞,同时将 SP2/0 细胞培养液血清体积分数提升至 20%。取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞,以 5:1 的比例在融合剂 PEG4000 的作用下进行融合,采用间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞,并用有限稀释法对阳性细胞进行亚克隆,当细胞培养板阳性率为 100%时即可建株,再分别培养,并冻存于液氮中。

1.2.4 LLO 单克隆抗体的大量制备 取建株杂交瘤细胞进行扩大培养,4℃、800 g 离心 10 min,弃上清,用无血清培养基悬浮,将细胞密度调整至 1×10⁶ mL⁻¹,备用。每只小鼠腹腔注射石蜡油 0.5 mL,7 d 后腹腔注射上述杂交瘤细胞悬液 0.5 mL/只,10 d 后收集腹水,采用辛酸-硫酸铵法^[8]进行纯化,用 SDS-PAGE 鉴定纯化效果。

1.2.5 杂交瘤细胞的染色体分析 取已建株杂交瘤细胞扩大培养,用秋水仙素制备有丝分裂中期细胞,用低浓度 KCl 溶液进行低渗处理,使细胞膨胀、染色体松散;用甲醇-冰乙酸溶液固定,Giemsa 染色后观察,镜检杂交瘤细胞滴片,每个杂交瘤细胞株观察 100 个完整的有丝分裂中期细胞。计数结果经生物学统计软件(SPSS 13.0)处理,每个完整杂交瘤细胞的染色体数目应在 80~110 条。试验具体操作参照文献^[9]的方法。

1.2.6 LLO 单克隆抗体亚类的鉴定 取杂交瘤细

胞培养上清液,适当稀释后,参照 HBT 单克隆抗体亚类鉴定试剂盒操作规程进行亚类鉴定。

1.2.7 LLO 单克隆抗体相对亲和常数的测定 采用间接 ELISA 方法进行试验。测定不同浓度 LLO 单克隆抗体与包被抗原反应的 OD₄₅₀ 值,以单克隆抗体稀释倍数的常用对数值 (lg x) 为横坐标,以 OD₄₅₀ 为纵坐标绘制反应曲线;以曲线上趋于平坦段的 OD₄₅₀ 值为 100%,查出 50% 点对应的单克隆抗体质量浓度,作为其相对亲和常数^[10]。

1.2.8 LLO 单克隆抗体特异性的鉴定 取纯化的 PET-32a 空载体表达产物 (his-tag) 和 LLO 重折叠的原核表达产物 (LLO-his),分别进行 SDS-PAGE、Western blot 试验,鉴定其特异性。

2 结果与分析

2.1 抗 LLO 蛋白杂交瘤细胞系的获得

经免疫小鼠、细胞融合和间接 ELISA 法筛选,最终获得 2 株能稳定分泌 LLO 抗体的杂交瘤细胞系,分别命名为 3F5-G3 和 2B4-C8。

2.2 腹水的制备与纯化

小鼠腹腔注射杂交瘤细胞后 10 d 左右,见腹部明显膨大时采集腹水,间接 ELISA 法测其效价,结果显示,3F5-G3 株效价为 1 : (1×10⁵),2B4-C8 株效价为 1 : (1×10⁷)。采集的腹水经辛酸-硫酸铵法纯化后,进行 SDS-PAGE 鉴定,结果见图 1。

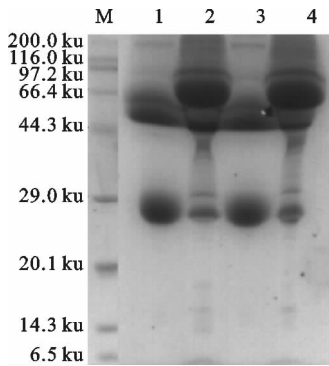


图 1 腹腔注射杂交瘤细胞后小鼠腹水的 SDS-PAGE 电泳

M. 蛋白质标样;1,3. 分别为纯化的 3F5-G3 和 2B4-C8 腹水;2,4. 分别为未纯化的 3F5-G3 和 2B4-C8 腹水

Fig. 1 SDS-PAGE of mice ascites produced by hybridoma cells
M. Protein Marker;1,3. Purified ascites from 3F5-G3 and 2B4-C8;
2,4. Non-purified ascites from 3F5-G3 and 2B4-C8

由图 1 可知,纯化腹水电泳出现 2 条带,分子质量分别为 55 和 26 ku,分别与抗体的重链和轻链分子质量一致,且杂蛋白明显减少,说明纯化效果较好。

2.3 杂交瘤细胞的染色体分析

结果显示,3F5-G3 株有 97±5 条染色体,2B4-C8 株有 93±8 条染色体,且观察到了标志性染色体 (中着丝点染色体,图 2)。

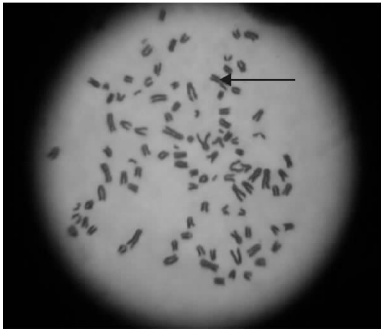


图 2 杂交瘤细胞的染色体分析(1 000×)

→. 示中着丝点染色体

Fig. 2 Chromosome identification of hybridoma cells(1 000×)

→. Marking metacentric chromosome

2.4 LLO 单克隆抗体亚类的鉴定

经鉴定,2 株杂交瘤细胞系所分泌的单克隆抗体亚类均为 IgG1,轻链均为 κ 链。

2.5 LLO 单克隆抗体相对亲和常数的测定

纯化的杂交瘤细胞培养上清液的起始蛋白质量浓度分别为 1.97 mg/mL(3F5-G3)和 2.06 mg/mL(2B4-C8);对细胞上清液进行系列稀释,测定其 OD₄₅₀,绘制 ELISA 反应曲线(图 3),获得的单克隆抗体的相对亲和常数分别为 0.49 μg/mL(3F5-G3)和 0.26 μg/mL(2B4-C8)。

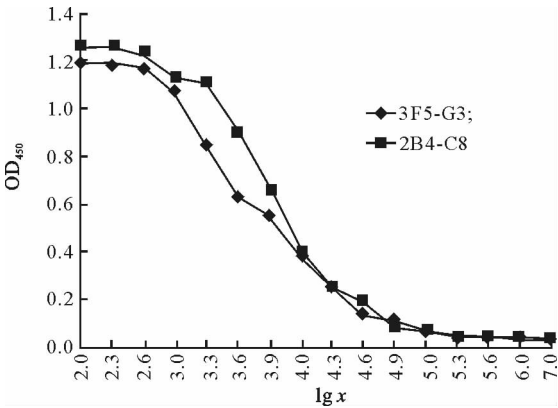


图 3 LLO 单克隆抗体的亲和力

Fig. 3 Affinity curve of McAbs against LLO

2.6 LLO 单克隆抗体特异性的鉴定

Western blot 检测结果(图 4)表明,2 株杂交瘤细胞产生的单克隆抗体均可与 LLO 原核表达产物发生特异性结合而出现目的条带,且与载体蛋白不发生反应。说明所获得的 2 种单克隆抗体均为针对

LLO 的特异性抗体。

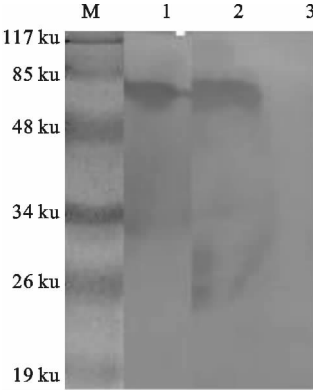


图 4 LLO 单克隆抗体的特异性鉴定

M. 蛋白质分子质量标准;1. 3F5-G3 株杂交瘤

细胞分泌的单克隆抗体的目的条带;2. 2B4-C8 株

杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体的目的条带;3. 对照(his-tag)

Fig. 4 Identification of the specification of anti-LLO McAbs

M. Protein marker;1. Specific band of 3F5-G3;

2. Specific Band of 2B4-C8;3. Control(his-tag)

3 讨 论

LM 对人和家畜均具有感染力,有 13 个血清型,其中只有 3 个血清型(1/2a,1/2b 和 4b)与人类的李斯特菌病有关^[3]。由于 LM 与葡萄球菌、大肠埃希菌和链球菌之间存在某些共同抗原,所以常规的血清学诊断方法不能严格鉴别,而通过制备抗 LM 的特异性单克隆抗体可以解决这个问题。Nato 等^[11]及 Erdenlig 等^[3]均用从 LM 培养上清液中纯化的 LLO 作为免疫原,制备了抗 LLO 的特异性单克隆抗体,并进行了初步鉴定。虽然用细菌培养上清液可以纯化出 LLO,但迄今为止所报道的方法,每升 LM 培养基中最多只能纯化出 52.0 μg LLO^[12],这远远不能满足科研和生产的需要。在国内,董慧等^[13]应用原核表达的 LLO-GST,以切胶免疫的方式制备了抗 LLO 的单克隆抗体,并进行了初步鉴定。本研究以原核表达的 LLO-his 作为免疫原,制备抗 LLO 的单克隆抗体,并对单克隆抗体进行了初步鉴定。与已报道的抗 LLO 单克隆抗体不同的是,本研究以重折叠的原核表达的 LLO 进行动物免疫,最终获得了 2 种特异的抗 LLO 的单克隆抗体。

本研究前期试验分别以重折叠和变性 LLO 2 种不同物理状态的抗原免疫小鼠,结果表明,以 20 μg/只重折叠 LLO 免疫小鼠,可获得良好的免疫效果,且在杂交瘤细胞的筛选过程中,抗体分泌稳定;而用变性 LLO 以 100 μg/只 的剂量免疫小鼠,虽然

也可以获得较高的抗体效价,但在杂交瘤细胞筛选时,抗体效价逐次降低,细胞在第 1 次单克隆时失去抗体分泌能力。对于上述现象,笔者推测其原因如下:(1)蛋白在变性剂作用下,失去了天然构象,而 B 细胞所识别的主要是抗原的构象表位。虽然加大免疫剂量,可以增强免疫效果,这可能是通过抗原递呈细胞(Antigen presenting cell,APC)将抗原递呈到 T 细胞表面,由辅助性 T 细胞将信号转导给 B 细胞,从而导致抗体基因重排,产生抗体,但这种信号微弱,故最终的抗体分泌能力丧失。而重折叠的蛋白质具有抗原的天然构象,可以直接被 B 细胞识别,同时也有部分被辅助性 T 细胞识别,而辅助性 T 细胞可再次增强抗原信号,故抗体分泌能力稳定。(2)LLO 可能是一种超抗原,复性的 LLO 具有天然抗原的生理功能,其可以直接与 APC 的 MHC II 类分子肽结合区以外的部位结合,并以完整的蛋白分子形式递呈给 T 细胞,超抗原仅与 TCR 的 β 链结合,因此可激活多个 T 细胞克隆^[14],故抗体分泌能力稳定。(3)变性溶解的 LLO 主要是线性表位,且重复表位较多,其可能主要活化 B1 细胞亚群,最终产生 IgM,而复性 LLO 是 TD 抗原,且与弗氏佐剂乳化后,共刺激 B2 细胞亚群的活化,主要产生 IgG,故抗体分泌能力稳定。

[参考文献]

[1] 陈 希,徐 亮,胡 格,等.产单核细胞李斯特菌溶血素的纯化[J].中国预防兽医学报,2008,30(8):605-607.
Chen X,Xu L,Hu G,et al.Purification of Listeriolysin O from *L. monocytogenes* [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2008,30(8):605-607. (in Chinese)
[2] Churchill R L T, Lee H, Hall J C. Rapid purification of recombinant listeriolysin O(LLO) from *Escherichia coli* [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32: 355-363.
[3] Erdenlig S, Ainswortha J A, Austin F W. Production of monoclonal antibodies to *Listeria monocytogenes* and their application to determine the virulence of isolates from channel catfish [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (7): 2827-2832.
[4] Edelson B T, Unanue E R. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth [J]. Immunity, 2001, 14: 503-512.
[5] 殷月兰,焦新安,潘志明,等.李斯特菌溶血素基因的原核表达及其生物学特性[J].微生物学报,2004,44(6):752-754.
Yin Y L, Jiao X A, Pan Z M, et al. Prokaryotic expression and bioactivity of the *Listeria monocytogenes* listeriolysin O [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(6): 752-754. (in Chinese)
[6] 任艳红,李一经,王新生.单核细胞增生性李斯特菌溶血素基因的原核表达[J].中国人兽共患病杂志,2005,21(12):1078-

1080.

Ren Y H,Li Y J,Wang X S. Prokryotic expression of the he-
molsin gene from *Listeria monocytogenes* [J]. Chinese Journal
of Zoonoses,2005,21(12):1078-1080. (in Chinese)

[7] Moors M A,Levitt B,Youngman P,et al. Expression of listeri-
olysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria*
monocytogenes [J]. American Society for Microbiology,1999,
67:131-139.

[8] 陈 丹,孙广瑞,柳增善. 辛酸-硫酸铵联合沉淀法在单克隆抗
体纯化中的应用 [J]. 安徽农业科学,2007,35(26):8105,
8108.
Chen D,Sun G R,Liu Z S. Application of caprylic and ammoni-
um sulfate precipitation in purification of monoclonal antibody
[J]. Journal of Anhui Agri Sci,2007,35(26):8105,8108. (in
Chinese)

[9] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术 [M]. 陕西西安:科学技术出版
社,1991.
Xu Z K. Practical technology of monoclonal antibody [M]. Xi’
an,Shaanxi:Science and Technology Press,1991. (in Chinese)

[10] 肖 毅,梅其炳,侯 颖,等. 抗 PH-SA 单克隆抗体相对亲和
力的测定 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,2005,21(5):657,
660.
Xiao Y,Mei Q B,Hou Y,et al. Identification of relative affini-
ty of anti-PH-SA monoclonal antibody [J]. Chin J Cell Mol

Immunol,2005,21(5):657,660. (in Chinese)

[11] Nato F,Reich K,Lhopital S,et al. Production and character-
ization of neutralizing and non-neutralizing monoclonal anti-
bodies against Listeriolysin O [J]. Infection and Immunity,
1991,59(12):4641-4646.

[12] 张衍海,白艳艳,张彦明,等. 产单核细胞李斯特菌溶血素基因
的克隆及原核表达 [J]. 中国预防兽医学报,2008,30(11):
870-874.
Zhang Y H,Bai Y Y,Zhang Y M,et al. Cloning and expres-
sion of listeriolysin O gene of *Listeria monocytogenes* [J].
Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2008,30
(11):870-874. (in Chinese)

[13] 董 慧,焦新安,殷月兰,等. 抗李斯特溶血素单克隆抗体的制
备及初步鉴定 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,2008,24(3):240-
242.
Dong H,Jiao X A,Yin Y L,et al. Preparation and character-
ization of the monoclonal antibodies against listeriolysin O
[J]. Chin J Cell Mol Immunol,2008,24(3):240-242. (in Chi-
nese)

[14] 杨汉春. 动物免疫学 [M]. 2 版. 北京:中国农业大学出版社,
2003:120-121.
Yang H C. Animal immunology [M]. 2nd Edition. Beijing:
China Agricultural University Press,2003:120-121. (in Chi-
nese)

(上接第 38 页)

[2] Longbottom D,Coulter L J. Animal chlamydioses and zoonotic
implications [J]. J Comp Path,2003,128:217-244.

[3] Hartley J C,Kaye S,Stevenson S,et al. PCR detection and mo-
lecular identification of Chlamydiaceaespecies [J]. J Clin Micro-
biol,2001,39:3072-3079.

[4] Corsaro D,Venditti D. Emerging chlamydial infections [J]. Crit
Rev Microbiol,2004,30:75-106.

[5] Kaltenboeck B,Kousoulas K G,Storz J. Structures of and allelic
diversity and relationship among the major outer membrane
protein(OmpA) genes of the four Chlamydia species [J]. J
Bacteriol,1993,175(2):487-502.

[6] Igietseme J U,Eko F O,Black C M. Contemporary approaches
to designing and evaluating vaccines against Chlamydia [J].
Vaccines,2003,1:129-146.

[7] 姜 泊,张亚历,周殿元. 分子生物学常用实验方法 [M]. 北
京:人民军医出版社,1996:66-67.
Jiang B,Zhang Y L,Zhou D Y. Molecular biology general em-
pirical method [M]. Beijing,People’s Military Medical Press,
1996:66-67. (in Chinese).

[8] 邱昌庆,周继章,曹小安,等. 畜禽衣原体病及其防治 [M]. 北
京:金盾出版社,2008:8-11.
Qiu C Q,Zhou J Z,Cao X A,et al. Prevention and treatment of
the avian and animal chlamydiae [M]. Beijing: The Jin Dun
Publishing House,2008:8-11. (in Chinese)

[9] Hewinson R,Everett K,Andersen A,et al. Detection of Chlamydia
psittacei DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction
[J]. Vet. Microbiol,1997,54:155-166.

[10] Su H,Caldwell H D. *In vitro* neutralization of Chlamydia tra-
chomatis by monovalent Fab antibody specific to the major
outer membrane protein [J]. Infect Immun. 1991,59:2843-
2845.

[11] 刘向伟,端 青,罗朝霞,等. 10 株鹦鹉热衣原体菌株主要外
膜蛋白基因的比较性研究 [J]. 中国人兽共患病杂志,2002,
18(1):16-18.
Liu X W,Duan Q,Luo Z X,et al. Comparative study on the
major outer-membrane protein gene of ten isolates of
Chlamydia psittaci [J]. Chinese Journal of Zoonoses,2002,18
(1):16-18. (in Chinese)

[12] Everett K D,Andersen A A,Plaunt M,et al. Cloning and se-
quence analysis of the major outer membrane protein gene of
Chlamydia psittaci 6BC [J]. Infect Immun,1991,59(8):2853-
2855.

[13] Wyllie S,Longbottom D,Herring A J,et al. Single channel a-
nalysis of recombinant major outer membrane protein porins
from chlamydia psittaci and chlamydia pneumoniae [J]. FEBS
Letters,1999,445:192-196.

[14] Vretou E,Psarrou E,Kaisar M,et al. Identification of prorec-
tive epitopes by sequencing of the major outer membrane pro-
tein gene of a variant strain of Chlamydia psittaci serotype 1
(*Chlamydophila abortus*) [J]. Infect Immun,1969,1:607-
612.