

抗炭疽毒素保护性抗原单克隆抗体的制备及功能分析

吕洪臻¹,唐小军¹,熊四平¹,徐鑫¹,郑峰²,冯振卿^{1*},朱进^{1,2*}

(¹南京医科大学病理学系,江苏南京 210029;²南京军区军事医学研究所,江苏南京 210002)

[摘要] 目的:原核表达炭疽杆菌保护性抗原 PA10 蛋白,制备单克隆抗体,并进行功能分析。方法:人工合成炭疽杆菌保护性抗原 PA10 编码基因并克隆入 pUC57 载体,酶切鉴定后,将 PA10 编码基因插入原核表达载体 pCold II 中,测序验证正确后转化至大肠杆菌 BL21(DE3),在 IPTG 和低温条件下诱导蛋白表达,SDS-PAGE 验证产物;用 HiTrap IMAC HP 柱纯化重组蛋白,Western blot 进一步验证。以纯化获得 PA10 重组蛋白为抗原,常规程序免疫 BALB/c 小鼠,制备单克隆抗体,并检测所制备抗体的中和活性。结果:获得的 PA10 重组蛋白免疫小鼠制备单克隆抗体,最终获得了 4 株特异性的单克隆抗体(分别命名为 2G8、5A8、7B3、9C9)。经体外炭疽毒素保护试验证实,其中 1 株单抗(7B3)具有较强的中和活性,其保护率可高达 96%。结论:本文成功构建并表达炭疽杆菌保护性抗原 PA10,制备了具有中和活性的抗 PA 单克隆抗体,为构建人源化的抗 PA 中和抗体奠定基础,从而有望用于炭疽病的治疗。

[关键词] 炭疽杆菌;保护性抗原;单克隆抗体;中和抗体

[中图分类号] R378.72

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)11-1497-05

doi:10.7655/NYDXBNS20131103

Preparation and function identification of monoclonal antibodies against anthrax protective antigen

Lv Hongzhen¹, Tang Xiaojun¹, Xiong Siping¹, Xu Xin¹, Zheng Feng², Feng Zhenqing^{1*}, Zhu Jin^{1,2*}

(¹Department of Pathology, NJMU, Nanjing 210029; ²Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain the anthrax protective antigen in *E. coli*, prepare its monoclonal antibodies, and analyze the function. **Methods:** The gene coding for anthrax protective antigen PA10 was synthesized and cloned into pUC57 plasmids. After being identified by enzyme analysis, the target gene was inserted into pCold II plasmid. By sequencing confirmation, the plasmid pCold II-PA10 was transformed into *E. coli* BL 21 (DE3) and induced by IPTG and low temperature for expression, and identified by SDS-PAGE. The recombinant protein was purified by affinity chromatography and identified by Western blotting. After the mice BALB/c were immunized by the recombinant protein of PA10 as antigen, the monoclonal antibodies were prepared. **Results:** The recombinant protein of PA10 was used to immunize mouse, and obtain 4 strains of specific monoclonal antibodies (respectively named as 2G8, 5A8, 7B3, 9C9). The protection of anthrax toxin test *in vitro*, proved that one of four monoclonal antibody strains (7B3) has a comparatively large activity to neutralize anthrax toxin with protection rate up to 96%. **Conclusion:** This research successfully constructed the anthrax Protective antigen PA10 in *E. coli* and prepared its monoclonal antibodies, which laid the foundation for further development of chimeric neutralizing antibodies used to treat anthrax.

[Key words] bacillus anthracis; protective antigen; monoclonal antibody; neutralizing antibody

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(11): 1497-1501]

[基金项目] 国家自然科学基金(31170884);江苏省自然科学基金(BK2012527)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn; zhujin1968@njmu.edu.cn

炭疽病 (anthrax) 是由炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*) 引起的急性人兽共患传染病。炭疽病流行时间久远而且地域较广阔^[1], 主要通过皮肤、呼吸道和消化道等途径感染动物和人^[2-3], 分别引起皮肤炭疽、肺炭疽和胃肠炭疽。其中吸入性和胃肠道炭疽最

为凶险,病死率较高^[4]。炭疽杆菌致使感染者死亡的原因并非其本身,而是由其释放的炭疽毒素导致细胞损伤所致^[5]。由于其高度致病性、其芽胞在恶劣环境中有较强的生存能力以及可通过气溶胶途径感染等特点,长期以来是首选的生物武器,并用于生物恐怖袭击^[6]。

炭疽毒素是炭疽杆菌的关键致病因子,由保护性抗原(protective antigen, PA)、致死因子(lethal factor, LF)和水肿因子(edema factor, EF)组成;LF和EF在细胞外均无毒性,并无法自行进入细胞内。当PA与细胞表面受体结合后形成七聚体孔道,将LF或EF带入细胞内形成致死毒素(lethal toxin, LeTx)或水肿毒素(edema toxin, EdTx)发挥毒性作用,所以保护性抗原在介导LF和EF的细胞毒作用过程中起重要的作用^[7],目前大多数炭疽毒素中和抗体的靶点均为PA^[8-9]。本研究通过制备抗PA的单克隆抗体,为炭疽的治疗及炭疽疫苗的制备奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

4~6周龄雌性BLAB/c小鼠购于扬州大学比较医学实验动物中心。质粒pCold II、限制性内切酶Nde I和BamH I、T4 DNA连接酶(TaKaRa公司,日本);大肠杆菌DH5 α 、BL21(DE3)由本实验室保存;小量质粒提取试剂盒和DNA回收试剂盒(AxyGen公司,美国);核酸及蛋白分子量标准物(Fermentas公司,加拿大);用于PA10纯化的HiTrap IMAC HP柱、Desalting柱和protein L柱(GE公司,美国);完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂及抗体亚型鉴定试剂盒(Sigma公司,美国);商品化兔抗PA多克隆抗体(Thermo公司,英国);HRP标记的羊抗兔IgG和羊抗小鼠IgG抗体(Jackson公司,美国);PA基因和引物合成由南京金斯瑞生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 PA10原核表达载体的构建

根据GenBank公布的炭疽毒素保护基因PA(GenBank:AM404332.1)的序列,经DNASTAR软件分析抗原表位结合PA与LF/EF结合的结构域,选择PA第168~258位的氨基酸区域共91个氨基酸作为PA10。引入Nde I和BamH I限制性酶切位点及PA10核苷酸序列由南京金斯瑞生物技术有限公司合成,合成后的基因经测序正确后克隆在pUC57克隆载体中,重组质粒命名为pUC57-PA10。

将pUC57-PA10用Nde I和BamH I进行双酶

切,经T4连接酶连接到同样经Nde I和BamH I酶切过的原核表达载体pCold II中,采用热激法将连接产物转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,涂布于含有100 μ g/ml氨苄青霉素(Amp)的LB平板,37 $^{\circ}$ C培养过夜后,挑取克隆进行PCR及初步酶切鉴定,后送南京金斯瑞生物技术有限公司进一步测序鉴定。测序正确得到的重组表达载体命名为pCold II-PA10。

1.2.2 重组蛋白PA10的诱导表达

提取pCold II-PA10质粒,转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,挑取单菌落至含100 μ g/ml氨苄青霉素(Amp)的5 ml LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,220 r/min振荡培养过夜。以1:100转接到5 ml新鲜的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C,220 r/min培养至D(600 nm)约为0.6时加入IPTG至终浓度为0.5 mmol/L,16 $^{\circ}$ C诱导培养16 h。

表达产物的SDS-PAGE鉴定:取1 ml诱导后的菌液,12 000 g离心1 min,弃上清,细菌沉淀用100 μ l 1 \times PBS重悬,按比例加入5 \times SDS蛋白上样缓冲液,煮沸变性5 min,离心后用12%的SDS-PAGE进行电泳,同时以空载体pCold II的细菌蛋白作为对照,鉴定重组蛋白的表达情况。

重组蛋白的可溶性分析:按上述方法大量诱导表达目的蛋白,于4 $^{\circ}$ C,8 000 r/min离心10 min,收集菌体,用PBS重悬,采用超声破碎至清亮,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心15 min,分别收集上清和沉淀,沉淀用同体积的PBS重悬,取超声上清和沉淀重悬液,进行SDS-PAGE电泳,分析重组蛋白是否是可溶性表达。

1.2.3 重组蛋白纯化

收集1 L诱导表达的培养菌液的菌体,用100 ml PBS重悬,超声破碎后离心收集上清,经0.45 μ m滤器过滤后,利用AKTA纯化系统通过HiTrap IMAC HP柱对表达的目的蛋白PA10进行镍离子亲和层析纯化。纯化过程:应用AKTA纯化系统,用5倍柱体积的平衡液(0.02 mol/L PB、0.5 mol/L NaCl, pH7.4)平衡用水冲洗过的HiTrap IMAC HP柱,平衡后进行上样。上样后,层析柱用含有20 mmol/L及50 mmol/L咪唑的洗涤液(0.02 mol/L PB、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L或50 mmol/L咪唑)洗涤5~10个柱体积,洗涤后用含100、150、250 mmol/L咪唑的洗脱液进行洗脱,根据洗脱时的紫外吸收值,收集洗脱下来的目的蛋白。收集的目的蛋白通过5 ml的Desalting柱进行脱盐,脱盐后再用Minipore 10 kd

超滤离心管进行浓缩,紫外分光光度计测定蛋白质的浓度,获得目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,凝胶成像系统拍照后用 Image J 软件分析蛋白纯度。

1.2.4 PA10 单克隆抗体的制备与检测

动物免疫:选取 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 3 只,腹腔注射进行抗原免疫,初次免疫将 PA10 蛋白和弗氏完全佐剂 1:1 混合并搅拌乳化后,注射到小鼠腹腔内,50 μg /只,初次免疫后第 2 周和第 6 周进行第 2 次和第 3 次免疫,用 PA10 蛋白和弗氏不完全佐剂 1:1 混合并搅拌乳化后,注射到小鼠腹腔内,50 μg /只,在取小鼠脾脏融合前 2 d,用 ELISA 检测小鼠血清的抗体效价,将效价最高的小鼠用 50 μg /只的 PA10 重组蛋白经尾静脉注射至小鼠体内进行冲击免疫。

杂交瘤细胞融合、筛选和克隆:按参考文献[10]取小鼠脾脏,在 PEG 作用下与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合,融合的细胞用含有 HAT 的选择性培养基进行筛选,12~14 d 吸取培养上清用 ELISA 检测,筛选阳性克隆。将获得的阳性克隆经过 2~3 次亚克隆后,获得稳定表达抗 PA10 蛋白的杂交瘤细胞株。

抗体亚型鉴定:按照抗体亚型鉴定试剂盒的操作说明进行操作,将不同杂交瘤细胞株的培养上清,加入到包被 PA10 的 ELISA 酶标板中,室温孵育 1 h 后,分别加入针对不同抗体亚型的抗体,孵育 1 h 后,加入 HRP 标记的抗羊二抗,室温孵育 30 min 后,TMB 显色,终止后,用酶标仪进行读数(波长 450 nm),根据读数结果判断杂交瘤分泌的抗体亚型。

抗体特异性鉴定:提取灭活炭疽芽孢杆菌 A16R 总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜上,5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗为 1:1 000 稀释的通过杂交瘤制备抗 PA10 抗体,以商品化的抗 PA 抗体作为对照,二抗为 1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG,商品化抗体用 HRP 标记的羊抗兔 IgG,最后用 ECL 发光显色。

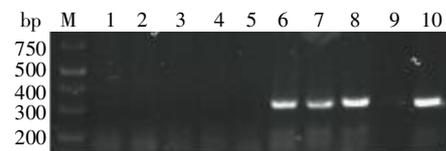
抗体中和活性分析:将被试细胞(J774A.1)培养在含有 10%小牛血清(FBS)和 1%抗生素(P/S)的 DMEM 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 5%二氧化碳条件下培养。待细胞培养良好后转种在 96 孔细胞培养板上,过夜培养当细胞生长达 70%时,无菌条件下加按比例稀释的炭疽致死毒素 (PA:0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$,LF:10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 PA 抗体(0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$),继续培养 3 h,显微镜下观察细胞死亡情况并照相,然后加 Cell Titer 96 aqueous nonradioactive cell proliferation assay (Promega

MI 公司,美国)检查乳酸脱氢酶(LDH),计算分析细胞死亡率,实验重复 3 次。

2 结果

2.1 PA10 基因原核表达载体的构建与鉴定

将合成的 PA10 基因用 *Nde* I 和 *Bam*H I 克隆到 pCold II 载体上,从转化的平板上挑取 10 个克隆经菌液 PCR 以及 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定重组质粒,菌液 PCR 鉴定结果显示在 300 bp 左右有特异性条带,与预期的条带大小一致,表明有 4 个克隆阳性(图 1),双酶切及测序结果也证明所获得的 4 个克隆是阳性克隆,表明成功构建 PA10 原核表达质粒,选取其中 1 个克隆命名为 pCold II-PA10。



1~10:挑取扩增后用于 PCR 鉴定的 10 个重组克隆。

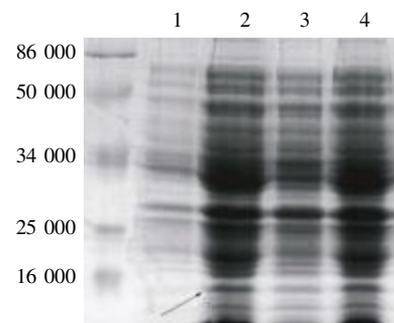
图 1 菌液 PCR 鉴定 PA10 重组克隆

Figure 1 PCR identification of prokaryotic expression vector PA10

2.2 PA10 重组蛋白的表达、纯化

pCold II-PA10 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中,经 IPTG 和低温诱导表达,超声破碎后,进行 12% SDS-PAGE 电泳,比较蛋白在全菌、上清及沉淀部分的表达量。实验结果显示在相对分子量为 10 000 处有明显的特异蛋白条带,与预期的 PA10 融合蛋白大小一致,并且 PA10 主要以可溶形式存在(图 2)。

将经 Ni 离子亲和层析柱用含 20 和 50 mmol/L 咪唑洗涤的样品及用含咪唑浓度依次是 100、150、



1:pCold II/BL21 空载全菌;2:诱导后的 pCold II-PA10/BL21 全菌;3:超声破碎的 pCold II-PA10/BL21 沉淀;4:超声破碎的 pCold II-PA10/BL21 上清。

图 2 PA10 重组蛋白的表达效果

Figure 2 Expression of recombinant proteins PA10

250 mmol/L 的洗脱液洗脱的样品进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色拍照(图 3),结果显示用 100 mmol/L 咪唑即能够洗脱出纯度大于 90% 的 PA10 重组蛋白。纯化的 PA10 蛋白经 Western blot 验证。

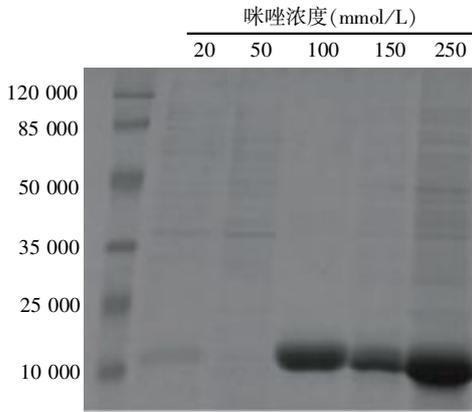


图 3 PA10 重组蛋白纯化

Figure 3 The purification of recombinant proteins PA10

2.3 抗 PA10 单克隆抗体的制备

选择效价最高的小鼠,取脾脏进行细胞融合后,通过有限稀释进行 2 次亚克隆,最终获得 4 株分泌抗 PA10 的单克隆抗体杂交瘤细胞株,分别命名为 2G8、5A8、7B3、9C9。

2.4 单克隆抗体亚型鉴定

通过抗体亚型鉴定试剂盒,采用间接 ELISA 试验,证明 2G8 和 5A8 抗体亚型为 IgM,9C9 抗体亚型为 IgG₁,7B3 抗体亚型为 IgG₃。

2.5 单克隆抗体的特异性

将炭疽杆菌 A16R 全菌蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜上后,分别用 2G8、5A8、7B3、9C9 以及商品化的抗 PA 抗体进行 Western blot,检测结果显示 5A8 和 7B3 较 2G8 和 9C9 信号强,与商品化抗体相似(图 4)。

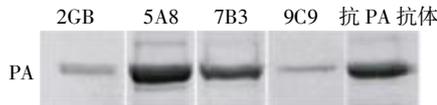


图 4 Western blotting 检测所制备的抗 PA10 的抗体与炭疽杆菌 PA 蛋白特异性结合

Figure 4 Western blotting detection PA10 prepared antibodies against *Bacillus anthracis* PA protein with specific binding

2.6 中和活性分析

抗体中和实验结果显示,与对照组相比所获得的 4 株抗体都有一定的中和活性,其中 7B3 抗体的中和活性在 LF 浓度为 10 μg/ml 时保护率为 96%,

对照组仅为 36.5%。通过方差分析显示在 LF 浓度为 10 μg/ml 时,7B3 抗体的保护作用显著高于 2G8 和 9C9 ($P < 0.05$),与 5A8 抗体没有显著差异(图 5)。

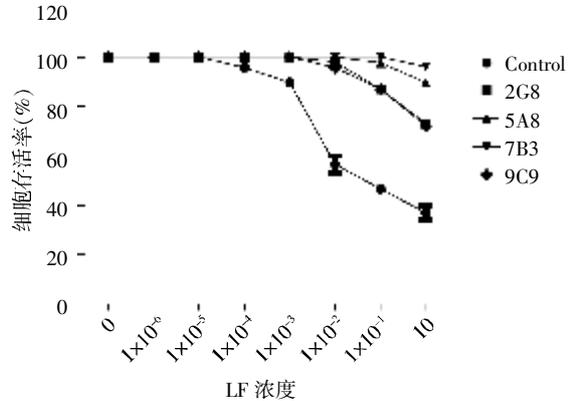


图 5 PA10 抗体中和致死毒素后细胞存活率

Figure 5 Cell viability after neutralization with lethal toxin by PA10 antibody

3 讨论

PA 蛋白不仅在炭疽的致病中发挥重要作用,而且在炭疽的免疫中起决定性作用。抗 LF/EF 抗体虽然能够阻断 LeTx 或 EdTx 发挥活性,保护动物抵抗炭疽毒素或炭疽芽孢的攻击,但是无论被动免疫还是免疫治疗,效果均不及抗 PA 的中和抗体^[11]。因为在炭疽芽孢杆菌感染的初期,炭疽菌荚膜表面有 PA 的存在,抗 PA 抗体能够与芽孢结合,增强巨噬细胞的吞噬作用,抑制出芽或通过氧化杀死正在出芽的芽孢。PA 是人用疫苗中一个关键的保护性免疫原,疫苗有效性几乎完全依赖于 PA 抗体的诱导。FDA 批准的用于人的炭疽疫苗中主要的免疫活性成分也是 PA,所以 PA 中和抗体的研制一直是被关注的重点^[12]。

PA 共包含 4 个结构域,结构域 I 包含 furin 蛋白酶的作用位点和 EF/LF 的结合位点;结构域 II 与 PA 跨膜时的孔道形成有关,其作用是使 PA 实现寡聚化和插入内体小泡膜;结构域 III 的作用是介导 PA63 的寡聚化;结构域 IV 是受体结合区^[13]。因 PA 在炭疽杆菌的免疫保护中发挥关键作用,可以刺激机体产生中和抗体,是炭疽疫苗的主要免疫活性成分。然而在以往研究中,原核表达 PA 重组蛋白,大多数是包涵体的形式,不利于重组蛋白的纯化^[14-15]。考虑到 PA 结构域 I 是 EF/LF 的结合位点,如果有针对该结构域的抗体竞争性与 EF/LF 结合 PA,从而阻断 PA 与 EF/LF 的结合,即可阻断 LF 及 EF 形成 LeTx 或 EdTx,中和炭疽毒素的毒性,达到保护作

用。综上所述,本研究通过原核表达 PA 的结构域 I (PA10),并以 PA10 制备抗 PA 的抗体。

利用 pCold II 表达系统表达的 PA10 蛋白含有 6 × His 标签,采用低温诱导表达,所获得的可溶性蛋白表达量高,且蛋白稳定性较高,通过 Ni 离子亲和柱纯化获得纯度较高的 PA10 蛋白。

纯化后的 PA10 蛋白免疫 BALB/c 小鼠,通过杂交瘤技术获得 4 株能够与 PA 结合的单克隆抗体,Western blot 结果显示在 83 000 处有特异的反应条带,由此证明制备的抗体可以识别内源性的 PA 蛋白,通过中和实验证明,所获得抗体有一定的中和活性。但是本研究的中和实验是在细胞水平进行的,仍需要在动物模型如豚鼠模型和家兔模型中通过抵抗炭疽芽孢攻击的实验验证中和抗体的滴度。

国内外研究表明,机体在暴露于炭疽芽孢之前使用抗 PA 的抗体,能够预防炭疽感染。即使在炭疽感染后出现症状(如休克)时使用抗 PA 的抗体也可以起到一定的治疗效果。虽然目前 PA 的多克隆抗体炭疽有预防保护和治疗的作用,但是由于多克隆抗体不良反应大,批次之间不稳定,不适合用于被动免疫和治疗。而单克隆抗体稳定性较好,质量易于控制,不良反应相对较小。但是单克隆抗体存在诱导人抗鼠免疫反应,随着基因工程技术的不断成熟,可以将鼠源单抗的轻链和重链的可变区与人抗体的恒定区融合,构建人源化抗体,降低免疫原性,有望用于炭疽病的治疗。

[参考文献]

- [1] 刘家阔,顾为,聂爱华. 抗炭疽毒素的小分子药物研究进展[J]. 军事医学,2011,35(1):67-72
- [2] Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, et al. Anthrax [J]. N Engl J Med, 1999, 341(11):815-826
- [3] Tourmier JN, Ulrich RG, Quesnel-Hellmann A, et al. Anthrax, toxins and vaccines; a 125-year journey targeting *Bacillus anthracis* [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009, 7(2):219-236

- [4] 范鸣. 用于治疗炭疽感染的完全重组人单克隆抗体 Raxibacumab[J]. 药学进展,2011,35(3):136-137
- [5] 郝永义,胥照平,高丽华,等. 炭疽受体 cMG2-Fc 融合蛋白在 CHO 细胞中的表达、纯化与鉴定[J]. 现代生物医学进展,2011,11:2022-2025
- [6] Anderson PD, Bokor G. Bioterrorism; pathogens as weapons[J]. J Pharm Pract, 2012, 25(5):521-529
- [7] Bann JG. Anthrax toxin protective antigen--insights into molecular switching from prepore to pore [J]. Protein Sci, 2012, 21(1):1-12
- [8] Froude JN, Thullier P, Pelat T. Antibodies against anthrax; mechanisms of action and clinical applications [J]. Toxins (Basel), 2011, 3(11):1433-452
- [9] Kaur M, Bhatnagar R. Recent progress in the development of anthrax vaccines [J]. Recent Pat Biotechnol, 2011, 5(3):148-159
- [10] Linsenmayer TF, Hendrix MJ, Little CD. Production and characterization of a monoclonal antibody to chicken type I collagen [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979, 76(8):3703-3707
- [11] Albrecht MT, Han Li, Williamson ED, et al. Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax [J]. Infect Immun, 2007, 75(11):5425-5433
- [12] 郑艳军,隋慧,郑艳霞,等. 炭疽芽孢杆菌疫苗研究进展[J]. 中国兽药杂志,2005,39(7):46-50
- [13] Khanna H, Chopra AP, Arora N, et al. Role of residues constituting the 2beta1 strand of domain II in the biological activity of anthrax protective antigen [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 199(1):27-31
- [14] Gupta P, Waheed SM, Bhatnagar R. Expression and purification of the recombinant protective antigen of *Bacillus anthracis* [J]. Protein Expr Purif, 1999, 16(3):369-376
- [15] Lu J, Wei D, Wang Y, et al. High-level expression and single-step purification of recombinant *Bacillus anthracis* protective antigen from *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2009, 52(2):107-112

[收稿日期] 2013-06-03