

抗炭疽 PA15 单克隆抗体的制备及免疫学检测方法的建立

方国平^{1,2},唐甜^{2,3},仇镇宁¹,冯振卿^{1,2*},朱进^{1,4*},管晓虹¹

(¹南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室,²病理学系,江苏 南京 210029;³广州医科大学附属第二医院病理科,广东 广州 510260;⁴南京军区军事医学研究所,江苏 南京 210002)

[摘要] 目的:制备抗炭疽保护性抗原 15(protective antigen,PA15)单克隆抗体,初步建立双抗体夹心 ELISA 检测炭疽感染者血清中的保护性抗原。方法:以纯化的 PA63 蛋白为免疫原免疫小鼠,利用杂交瘤技术制备单克隆抗体,SDS-PAGE 电泳检测抗体纯度,间接 ELISA、Western blot、免疫沉淀(IP)和蛋白质谱分析单抗特异性,并建立双抗体夹心 ELISA 检测方法。结果:制备了 2 株抗 PA15 单克隆抗体,命名为 3D7 和 8E9。SDS-PAGE 电泳可见抗体的重链和轻链,间接 ELISA、Western blot 发现单抗 3D7 和 8E9 可与 PA15、PA63 特异性结合,IP 和蛋白质谱分析发现单抗 3D7 可与 PA83 特异性结合,双抗体夹心 ELISA 方法检测炭疽感染血清中保护性抗原的最低检出浓度为 16 ng/ml。结论:成功制备了抗 PA15 单克隆抗体,并建立了双抗体夹心 ELISA 方法检测炭疽感染血清中的保护性抗原。

[关键词] 炭疽病;炭疽芽胞杆菌;保护性抗原;单克隆抗体

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)06-734-07

doi:10.7655/NYDXBNS20140608

Generation of monoclonal antibodies against *Bacillus anthracis* PA15 and establishment of AC-ELISA detection system

Fang Guoping^{1,2}, Tang Tian^{2,3}, Qiu Zhenning¹, Feng Zhenqing^{1,2*}, Zhu Jin^{1,4*}, Guan Xiaohong¹

(¹Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health,²Department of Pathology,NJMU,Nanjing 210029;³Department of Pathology,the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University,Guangzhou 510260;⁴Huadong Medical Institute of Biotechniques,Nanjing 210002,China)

[Abstract] **Objective:** To produce monoclonal antibodies against *Bacillus anthracis* PA15, and preliminarily establish double antibody sandwich-ELISA to detect the protective antigen obtained from serum of patient infected with *Bacillus anthracis*. **Methods:** Purified PA63 proteins were performed as immunogen to immunize mice. Hybridoma technology was performed to produce monoclonal antibodies. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to detect the purity of antibodies. Indirect ELISA, Western blot, immunoprecipitation (IP) and protein profiling were performed to analyze the specificity of monoclonal antibodies. Furthermore, double antibody sandwich-ELISA method was performed. **Results:** Two monoclonal antibodies against PA15 were obtained, named 3D7 and 8E9. SDS-PAGE showed the heavy and light chains of antibodies. Indirect ELISA and Western blot detected that monoclonal antibodies 3D7 and 8E9 can specifically bind PA15 and PA63. IP and protein profiling analyses showed that monoclonal antibody 3D7 can specifically bind PA83. Double antibody sandwich-ELISA detected that the limited detectable concentration of protective antigen from serum infected with *Bacillus anthracis* was 16 ng/ml. **Conclusion:** We have successfully developed monoclonal antibody against PA15, and established double antibody sandwich-ELISA to detect anthrax infected serum protective antigen.

[Key words] anthrax; *Bacillus anthracis*; protective antigen; monoclonal antibody

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(06): 734-740]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(31170884)

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

炭疽病是由炭疽芽胞杆菌引起的急性传染病,牛、羊等食草动物的发病率最高,人可通过接触患炭疽的动物及其畜产品,或通过存在于空气、土壤中的

炭疽杆菌芽胞而被感染。炭疽杆菌具有高度致病性、其芽胞在恶劣环境中有较强的生存能力,可通过气溶胶途径感染,临床上依据感染途径不同将炭疽分为 3 型,即皮肤炭疽、吸入性炭疽和消化道炭疽。吸入性炭疽,又称肺炭疽,其致死率接近 100%。炭疽病发病早期没有特异性临床症状,诊断较为困难。目前主要治疗手段为对症处理和尽早使用大剂量青霉素用于杀灭体内的细菌,但青霉素对炭疽杆菌产生的外毒素并无作用^[1-5]。炭疽外毒素是致病的主要因素,且炭疽外毒素中的保护性抗原(protective antigen, PA)在发病中起核心作用^[6-8],从而使得 PA 成为炭疽病诊断和治疗的靶点。本研究利用杂交瘤技术制备抗 PA15 单克隆抗体,并建立双抗体夹心 ELISA 法检测炭疽感染血清中的 PA,为炭疽病的早期诊断奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

骨髓瘤细胞系 SP2/0 由本实验室保存,细胞置于完全培养液 RPMI1640, 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养,隔天换液 1 次。HRP 标记羊抗鼠 IgG(Santa Cruz 公司,美国)、重组 PA63 和重组 PA15 蛋白(本实验室制备)、抗 PA 兔多克隆抗体(本实验室制备)、RPMI1640(Gibco 公司,美国)、PEG 和 HAT(Sigma 公司,美国)、Protein L beads (GenScript 公司,美国)。6 周龄 SPF 级纯系 BALB/c 雄性小鼠,体重 18~20 g,由扬州大学比较医学中心提供。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫

初次免疫,重组 PA63 蛋白浓度为 0.5 g/L,按 1:1 加入弗氏完全佐剂混合,振荡乳化,20 μg/只腹腔注射,免疫 3 只 BALB/c 小鼠。第 2、3 次免疫分别于第 2、4 周,按 1:1 加入弗氏不完全佐剂,剂量同初次,腹腔注射。第 3 次免疫 7 d 后采血,以正常小鼠血清做为阴性对照,间接 ELISA 检测抗体效价。选择血清效价最高的小鼠于融合前进行最后 1 次加强免疫(剂量同前),3~5 d 后取脾。

1.2.2 杂交瘤细胞株的筛选和克隆

按常规方法无菌条件下取小鼠脾脏,研磨制备脾细胞悬液,将脾细胞与 SP2/0 细胞按 1:5 的比例混合在一起,离心,充分吸净上清,轻轻震荡底部,使两种细胞充分混匀。加入提前预热的 PEG,边加边轻轻搅拌进行细胞融合,加完后继续搅拌。再以先慢后快的方式加入预热的 RPMI1640 不完全培养

液,以终止 PEG 的作用。离心细胞,弃上清。补加完全培养液后,铺 10 块 96 孔板,然后将培养板置于培养箱内培养 2 周。将重组 PA15 抗原稀释到包被液中,使用间接 ELISA 筛选阳性克隆,有限稀释法处理阳性孔杂交瘤细胞,克隆化培养。数次亚克隆后,当细胞生长铺满孔底时,取培养上清作 Western blot 检测。

1.2.3 抗 PA15 单克隆抗体的制备、纯化及鉴定

选取 6 周龄雄性 BALB/c 小鼠,腹腔注射液体石蜡。密切观察小鼠的健康状况与腹水产生情况,用针头采集腹水,离心,除去细胞成分和其他沉淀物,收集上清,测抗体效价。上清中加入等量 PBS,然后加二氧化硅粉末,混悬,离心,得澄清腹水,用过滤器滤去杂质和细菌。平衡液平衡 Protein G HP 亲和层析柱。将腹水上样,再用平衡液平衡亲和层析柱。待蛋白峰下降后,用甘氨酸缓冲液洗脱层析柱,收集洗脱液。用 Tris 调节收集管中蛋白样品 pH 至 7.0。超滤管超滤,收集管内蛋白即为抗 PA15 单克隆抗体。AG22331Hamburg 分光光度计(Eppendorf 公司,美国)检测蛋白浓度,分装标记, -20℃ 保存。

SDS-PAGE 检测:样品中加等体积上样缓冲液混匀,加热,上样于 SDS-PAGE 电泳。剥胶后,将其置于考马斯亮蓝染色液中慢摇,再放入脱色液中脱色至底色透明后,观察分析纯化的单抗条带。

单克隆抗体亚类鉴定:使用单抗亚类鉴定 ELISA 试剂盒检测单抗亚类。将表位特征性抗体 IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM 分别用 PBS 稀释,包被,孵育,洗涤,加入待检测的单抗上清,孵育,洗涤,用 PBS 将 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 抗体进行稀释,孵育,洗板后加底物四甲基联苯胺溶液,显色,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,使用 Lab System 全波长酶标仪(Thermo 公司,美国),测出 450 nm 时的吸光度值。

1.2.4 抗 PA15 单克隆抗体的效价及特异性分析

间接 ELISA:用 PBS 将纯化的 PA63、PA15 蛋白稀释至 5 μg/ml 包被 96 孔酶标板,5% 小牛血清封闭过夜,洗 96 孔酶标板,纯化后的待测单抗用 PBS 做倍比稀释依次加入待检孔,阴性对照为正常小鼠血清,空白对照为 PBS,37℃,温育 2 h。PBST 洗 6 遍后,加入二抗 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,100 μl/孔,37℃,温育 60 min。洗板后,加入底物四甲基联苯胺溶液 50 μl/孔,显色 15 min,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,使用 Lab System 全波长酶标仪,空白孔调零,测 450 nm 时的吸光度值。

Western blot:配制 10% 的分离胶。凝胶置于 Tris-甘氨酸电泳缓冲液中,依次将 PA15 和 PA63 上

样,恒压 50 V 电泳至分离胶,转为 90 V 电泳至溴酚蓝消失。将 SDS-PAGE 电泳后得到的蛋白凝胶用转移槽系统转移至 PVDF 膜上,半干转设定:恒流 1.3 mA,15 min。将膜浸于 Western blot 封闭液中,室温孵育 1 h,封闭膜上的非特异性蛋白结合位点。加入 1:300 稀释的抗 PA15 单克隆抗体,4℃孵育过夜。洗涤 5 次,加入 1:5 000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG,室温孵育 1 h,洗涤 5 min,ECL 显色后,化学发光凝胶成像系统曝光,观察结果。

1.2.5 免疫沉淀与质谱分析

以 PBS 重悬炭疽减毒株,超声破碎,再以 10 000 g 离心 10 min,取裂解上清,加入 50 μg 抗 PA15 单克隆抗体以及 50 μl Protein L beads 混和,4℃翻转过夜,弃上清后,每管均加入 30 μl 2×SDS 上样缓冲液,充分重悬、混匀管底 beads,100℃煮沸 5 min;10 000 r/min 4℃离心 1 min,取上清作为 IP 样本备用。制备 8% SDS-PAGE 凝胶,将上述样本依次加入,恒压 90 V 电泳。切取 SDS-PAGE 胶上的目的条带,进行质谱分析,采用 SWISS-PROT 数据库和 MASCOT 查询软件分析结果。

1.2.6 抗原捕获 ELISA 检测炭疽杆菌感染者血清

抗原捕获 ELISA 方法的建立:用碳酸盐缓冲液稀释纯化的兔抗 PA 多克隆抗体,2 μg/孔,包被 96 孔酶标板,加入 5 %脱脂奶粉溶液,封闭过夜,次日用 PBST 洗板,拍干。用 PBS 将纯化的 PA63 进行倍比稀释,分别加入到 96 孔板中,温育,用 PBST 洗板,加入用简易过碘酸钠法制备的 HRP 标记的抗 PA15 单克隆抗体(1:1 000)温育。洗板后,加底物四甲基联苯胺显色,H₂SO₄ 终止反应,使用酶标仪测 450 nm 时的吸光度值。

抗原捕获 ELISA 检测炭疽杆菌感染者的血清:用碳酸盐缓冲液稀释纯化的兔抗 PA 多克隆抗体,2 μg/孔,包被 96 孔酶标板,加入 5 %脱脂奶粉溶液,封闭过夜,次日用 PBST 洗板,拍干。取炭疽杆菌感染者的血清、PBS 稀释 PA83 和纯化的 PA63,温育。设纯化的 PA63 为阳性对照,正常人血清为阴性对照。用 PBST 洗板,加入 HRP 标记的抗 PA15 单克隆抗体(1:1 000)温育。洗板后,加底物四甲基联苯胺显色,H₂SO₄ 终止反应,使用酶标仪测 450 nm 时的吸光度值。

2 结果

2.1 间接 ELISA 检测免疫小鼠血清

按常规方法免疫小鼠,最后 1 次免疫 3 d 后,间

接 ELISA 检测小鼠血清抗体效价,ELISA 检测结果显示 3 号小鼠血清效价最高,稀释比在 1:128 000 仍为阳性(图 1)。取 3 号小鼠在融合前做最后 1 次加强免疫,3 d 后取脾,做细胞融合。

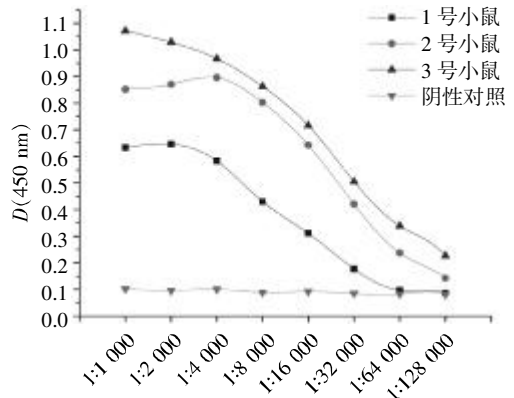


图 1 免疫小鼠血清间接 ELISA 检测结果

Figure 1 Indirect ELISA of immunized mouse serum

2.2 抗 PA15 单克隆抗体杂交瘤细胞建株

取小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞融合,铺 10 块 96 孔培养板,待克隆形成后 10~14 d 取细胞上清,用重组 PA15 蛋白包被的酶标板进行 ELISA 检测,SP2/0 细胞培养上清作为阴性对照。将阳性克隆用有限稀释法处理,连续 3 次亚克隆,获得 2 株稳定分泌抗 PA15 抗体且高效价的杂交瘤细胞株,命名为 3D7 和 8E9。

2.3 杂交瘤细胞上清 Western blot 检测

将 2 株抗 PA15 杂交瘤细胞扩大培养 5 d 后,各取 2 ml 培养上清进行 Western blot 检测,均发现在 63 000 和 15 000 处有阳性条带,说明这 2 株抗体均能与 PA63 和 PA15 特异性结合(图 2)。

2.4 抗 PA15 单克隆抗体的制备和纯化

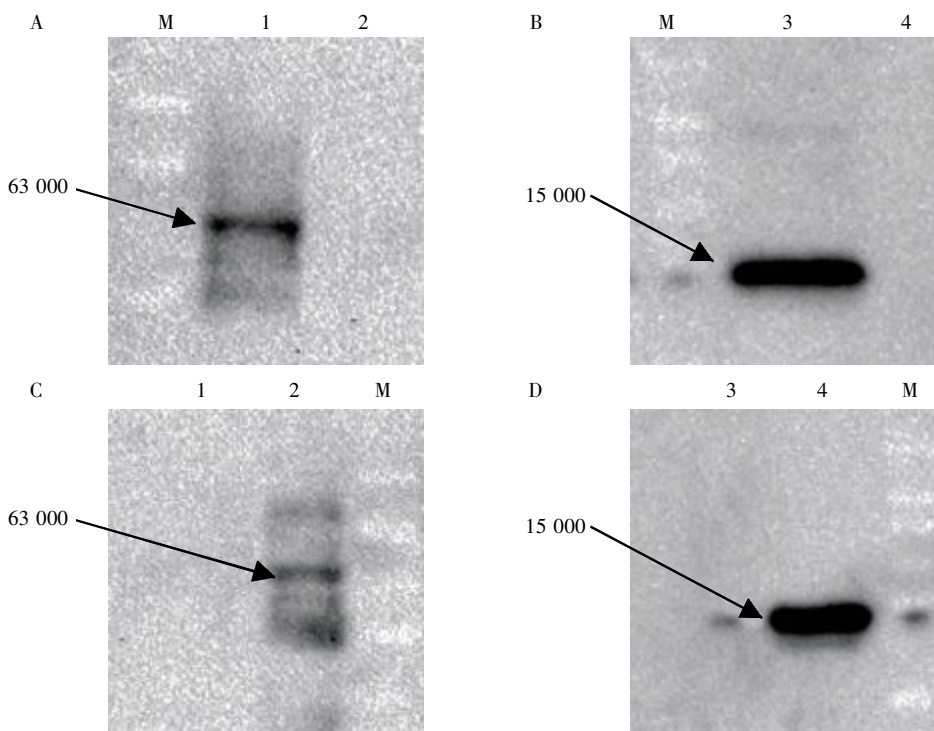
将 2 株细胞大量培养后,制备腹水。腹水用 Protein G 亲和层析柱纯化,纯化后超滤浓缩,获得抗 PA15 单克隆抗体,纯化后的 3D7 抗体和 8E9 抗体浓度分别为 21.3 g/L 和 25.0 g/L。将纯化的 2 株单抗进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,在还原剂的作用下,抗体分解为 2 个片段,分别为 50 000 的重链和 25 000 的轻链,与小鼠 IgG 重链、轻链大小相符(图 3),H 为重链,L 为轻链。

2.5 抗 PA15 单克隆抗体亚类鉴定

使用单抗亚类鉴定 ELISA 试剂盒对上述 2 株单抗进行亚类鉴定,表 1 结果表明,制备的 2 株单抗的亚类均为 IgG2a。

2.6 抗 PA15 单克隆抗体的效价检测

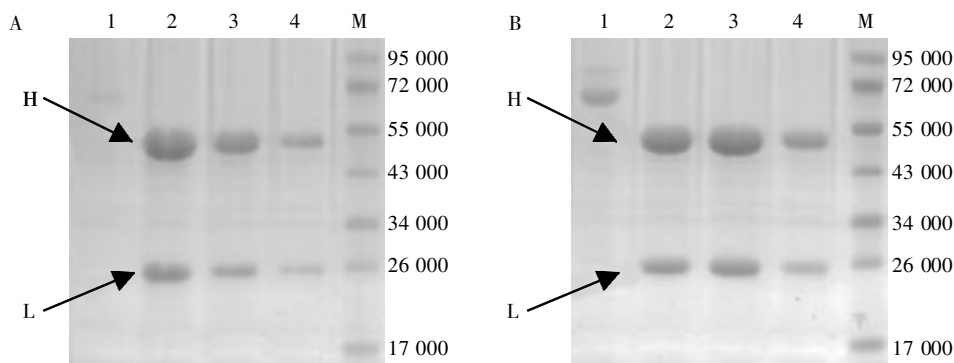
以重组 PA63 和 PA15 包板,用间接 ELISA 法



A、B:3D7 杂交瘤细胞上清。M:蛋白 Marker;1:纯化的 PA63 蛋白;2:Rosetta 空菌;3:纯化的 PA15 蛋白;4:Rosetta 空菌。C、D:8E9 杂交瘤细胞上清。M:蛋白 Marker;1:Rosetta 空菌;2:纯化的 PA63 蛋白;3:Rosetta 空菌;4:纯化的 PA15 蛋白。

图 2 3D7、8E9 杂交瘤细胞上清 Western blot 鉴定结果

Figure 2 Western blot of supernatant of 3D7 and 8E9 hybridoma cells



A:3D7 单抗;B:8E9 单抗。1:流穿液;2、3、4:洗脱收集蛋白;M:蛋白 Marker。

图 3 纯化抗 PA15 单克隆抗体 SDS-PAGE 电泳检测结果

Figure 3 SDS-PAGE analysis for purified anti-PA15 monoclonal antibody

表 1 单克隆抗体亚型鉴定

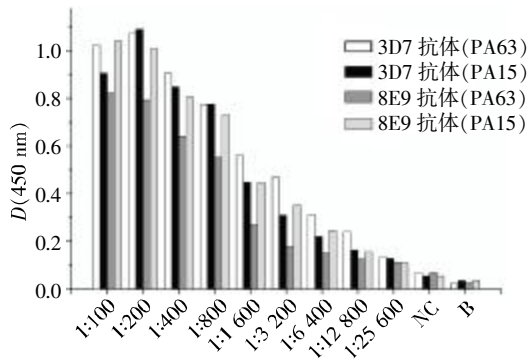
Table 1 Identification of monoclonal antibody subtypes

抗体亚型	吸光度值		
	阴性对照	3D7	8E9
IgG1	0.035	0.270	0.110
IgG2a	0.021	0.658	0.535
IgG2b	0.059	0.310	0.325
IgG3	0.032	0.325	0.274
IgA	0.038	0.109	0.117
IgM	0.044	0.102	0.169

检测纯化的抗 PA15 单克隆抗体的效价。结果显示, 3D7 抗体稀释比在 1:12 800 时, 仍能检测到抗体与 PA63 和 PA15 特异性反应, 而 8E9 抗体与 PA63 和 PA15 反应的最小稀释比分别为 1:3 200 和 1:6 400 (图4)。

2.7 抗 PA15 单克隆抗体特异性检测

将纯化的 3D7 抗体和 8E9 抗体进行 Western blot 检测, 在 63 000 和 15 000 处均有阳性条带, 表明抗体能与 PA63 和 PA15 特异性结合(图 5)。



NC: 阴性对照(正常小鼠血清); B: 空白对照(PBS)。

图 4 纯化的单克隆抗体间接 ELISA 检测结果

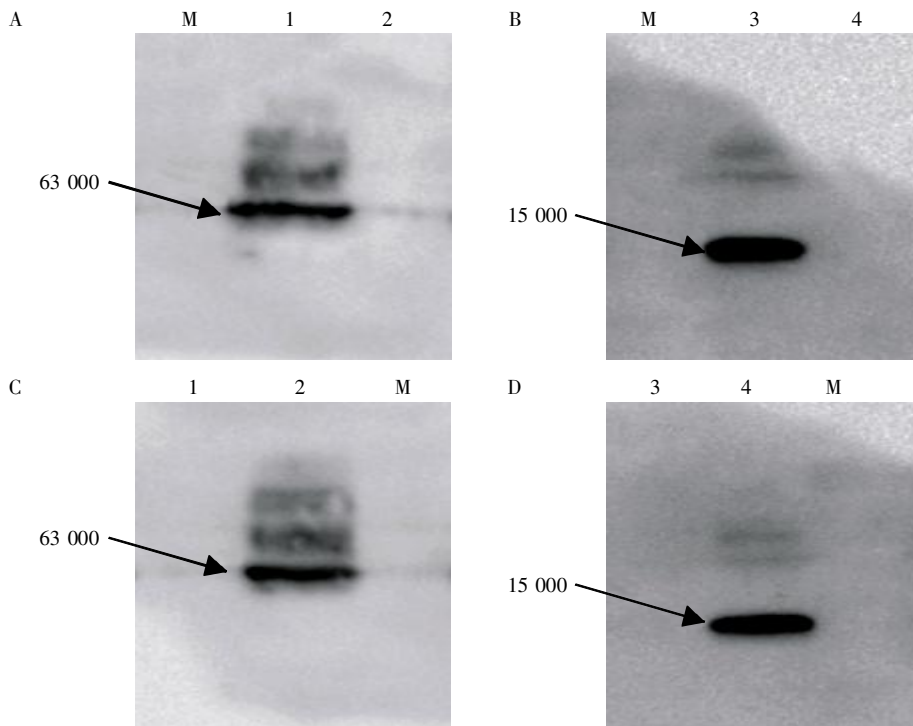
Figure 4 Indirect ELISA of purified monoclonal antibody

2.8 免疫沉淀和蛋白质谱分析

通过 3D7 抗体与炭疽减毒株的裂解蛋白免疫共沉淀后,切取 SDS-PAGE 凝胶上 85 000 左右的蛋白条带,处理后经串联质谱,采用 SWISS-PROT 数据库和 MASCOT 查询软件分析,搜索软件评分为 302 分,其中有 50%的肽段序列与 PA83 匹配,该结果证实 3D7 抗体结合的炭疽减毒株的裂解蛋白为 PA83 (图 6)。

2.9 抗原捕获 ELISA 检测结果

结果显示,以 P/N \geq 2.1 为阳性判定标准,可以检测到低至 16 ng/ml 的 PA63 蛋白,可定量分析炭疽外毒素 PA63(图 7)。表 2 为 2 例炭疽感染者血清



A, B: 3D7 单克隆抗体。M: 蛋白 Marker; 1: 纯化的 PA63 蛋白; 2: Rosetta 空菌; 3: 纯化的 PA15 蛋白; 4: Rosetta 空菌。C, D: 8E9 单克隆抗体。M: 蛋白 Marker; 1: Rosetta 空菌; 2: 纯化的 PA63 蛋白; 3: Rosetta 空菌; 4: 纯化的 PA15 蛋白。

图 5 3D7、8E9 单克隆抗体 Western blot 鉴定结果

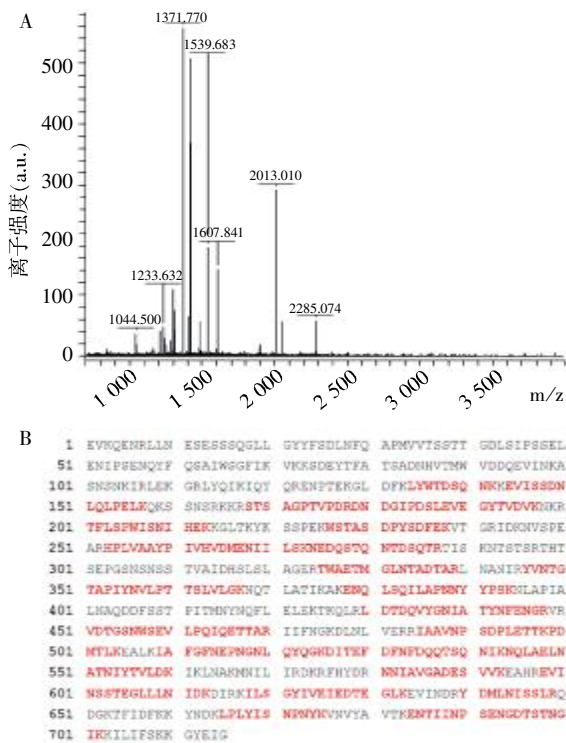
Figure 5 Western blot of 3D7 and 8E9 monoclonal antibodies

中保护性抗原的检测结果,表明单克隆抗体 3D7 能与炭疽杆菌感染者血清中的保护性抗原发生特异性结合,且检测到 2 例炭疽感染者中的保护性抗原分别约为 12.5、6.3 ng。以上结果表明单克隆抗体 3D7 可以用来检测炭疽杆菌感染者血清中的保护性抗原。

3 讨论

PA 在炭疽致病作用中起核心作用,从而使它成

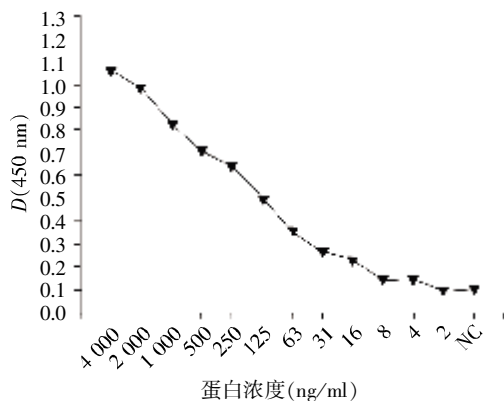
为一个很好的诊断和治疗靶点^[9]。天然状态的 PA 分子量为 83 000(PA83),PA83 单体包括 4 个结构域:结构域 I 位于 PA83 的 N 端,包括含 PA20、弗林蛋白酶的识别位点和称为 1' 区的水肿因子(edema factor, EF)、致死因子(lethal factor, LF)结合位点;结构域 II 与形成 PA63 七聚体和嵌入膜的通道有关;结构域 III 介导 PA63 单体间相互连接,利于 PA63 寡聚化;结构域 IV 为 PA15,位于 PA83 的 C 端,是与细



A: 3D7 单克隆抗体结合蛋白的肽质量指纹图谱; B: 3D7 单克隆抗体结合蛋白的序列比对分析 (红色为匹配序列)。

图 6 3D7 单克隆抗体结合蛋白的质谱分析结果

Figure 6 Mass spectrographic analysis of 3D7 monoclonal antibody binding protein



可定量分析重组 PA63, 检测阈值为 16 ng/ml, BSA 为阴性对照 (NC)。

图 7 抗原捕获 ELISA 检测 3D7 抗体的敏感性

Figure 7 AC-ELISA detection for susceptibility

表 2 3D7 检测 2 例炭疽感染者血清中的保护性抗原

Table 2 Protective antigen in serum detected by 3D7 in 2 anthrax infection cases

分组	吸光度值
感染者 1 血清	0.505
感染者 2 血清	0.427
PA63	0.278
PA83	0.292
正常人血清	0.144

胞受体的结合部位^[10-11]。

目前炭疽的发病机制已比较清楚。PA83 与细胞膜受体结合后, 细胞膜上的弗林蛋白酶将其水解为 PA63, 然后 PA63 自动形成 PA63 七聚体, EF 或 LF 与之结合, 再通过受体介导的内吞作用进入胞内, 在胞内高浓度氢离子的作用下, EF 或 LF 从 PA63 七聚体孔道中脱落下来。EF 为钙离子和钙调素依赖性腺苷酸环化酶前体, 活化后引起胞内 cAMP 浓度增高, 破坏胞内水平衡和细胞信号通路, 最终造成局部水肿; LF 为锌离子金属蛋白酶, 能特异性裂解胞内多个丝裂原活化蛋白激酶氨基端, 从而阻断多种细胞 MAPK 信号转导通路, 最终导致细胞死亡, 可引起实验动物致死性休克^[12-14]。

目前, 临床诊断炭疽病主要依据病史和临床表现, 但炭疽感染者在发病早期并没有明显症状, 需通过实验室检查才能确诊。目前, 检测炭疽杆菌感染有以下几种方法: 细菌学检测、核酸检测和免疫学检测。由于涂片检查特异性不明确, 而细菌培养、药敏试验和动物接种检测周期过长、操作较为繁琐; 实验室常用的核酸检测包括 PCR 和实时定量 PCR, 不但价格昂贵, 而且操作复杂, 均不适于在基层推广^[4,15-19]。2005 年卫生部关于《炭疽病诊断治疗与处置方案》中的免疫学检测是用 ELISA 检测患者血液内炭疽杆菌保护性抗原的抗体。其主要分为两步, 首次采集患者血液应在 5 d 内完成检测, 恢复期血清应在发病后 15 d 左右采取^[14]。免疫学检测是用间接 ELISA 检测患者血液内炭疽杆菌保护性抗原的抗体, 但由于机体体液免疫应答的规律, 诱导产生的 IgG 大约在感染后 14 d 左右达高峰, 且抗体滴度较低, 致使难以进行早期诊断, 且检测的敏感性不高。以上这些方法均不能在短时间内对炭疽病作出快速准确的诊断, 尤其对于致死率接近 100% 的肺炭疽和肠炭疽, 可能延误患者病情。

通过检测血液中的炭疽保护性抗原可以达到早期诊断的目的。本研究应用重组 PA63 作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 以重组 PA15 作为筛选抗原包板筛选阳性克隆。经 3 次亚克隆, 获得 2 株稳定分泌抗 PA15 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 3D7 和 8E9。SDS-PAGE 电泳可见抗体的重链和轻链, 抗体亚类鉴定两株单抗均为 IgG2a。间接 ELISA、Western blot 结果表明, 杂交瘤细胞株 3D7 和 8E9 分泌的抗 PA15 单克隆抗体能够与 PA15、PA63 及炭疽杆菌减毒株分泌的 PA83 特异性结合。免疫沉淀和蛋白质谱分析结果表明, 与单克隆抗体 3D7 结合的炭疽杆菌减毒

株裂解蛋白为 PA83。提示本研究成功建立了特异性抗 PA15 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

抗原捕获 ELISA 是一种敏感性高、特异性强, 适合大规模检测的方法。本研究建立的抗原捕获 ELISA 用于检测炭疽感染者血清中的保护性抗原。为了提高检测效能, 选用兔抗 PA 多克隆抗体作为捕获抗体和效价较高的单抗 3D7 作为检测抗体, 建立了双抗体夹心 ELISA 方法, 可定量检测 PA63, 其检测阈值为 16 ng/ml。应用该方法检测炭疽感染者的血清, 结果表明单抗 3D7 能与炭疽感染者血清中的保护性抗原特异性结合, 且检测到 2 例炭疽感染者血清中的保护性抗原分别约为 12.5、6.3 ng。提示本研究建立的双抗体夹心 ELISA 可用于检测炭疽感染者血清中的保护性抗原, 为炭疽病的早期诊断奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Chen Z, Moayeri M, Crown D, et al. Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(9): 3902-3908
- [2] Greenberg DS. US anthrax scares prompt action on bioterrorism [J]. *Lancet*, 2001, 358(9291): 1435
- [3] Tournier JN, Rossi PS, Quesnel-Hellmann A, et al. Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses [J]. *Mol Aspects Med*, 2009, 30(6): 456-466
- [4] Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, et al. Anthrax [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(11): 815-826
- [5] Swartz MN. Recognition and management of anthrax--an update [J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(22): 1621-1626
- [6] Wu G, Feng C, Hong Y, et al. Soluble expression and purification of the anthrax protective antigen in *E. coli* and identification of a novel dominant-negative mutant N435C [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(2): 609-616
- [7] Chang HH, Tsai MF, Chung CP, et al. Single-step purification of recombinant anthrax lethal factor from periplasm of *Escherichia coli* [J]. *J Biotechnol*, 2006, 126(3): 277-285
- [8] Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, et al. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin [J]. *Nature*, 2001, 414(6860): 225-229
- [9] 吕洪臻, 唐小军, 熊四平, 等. 抗炭疽毒素保护性抗原单克隆抗体的制备及功能分析 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(11): 1497-1501
- [10] Ascenzi P, Visca P, Ippolito G, et al. Anthrax toxin: a tripartite lethal combination [J]. *FEBS Lett*, 2002, 531(3): 384-388
- [11] Petosa C, Collier RJ, Klimpel KR, et al. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen [J]. *Nature*, 1997, 385(6619): 833-838
- [12] Moayeri M, Leppla SH. The roles of anthrax toxin in pathogenesis [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7(1): 19-24
- [13] Sanchez AM, Bradley KA. Anthrax toxin: can a little be a good thing [J]. *Trends Microbiol*, 2004, 12(4): 143-145
- [14] Scobie HM, Young JA. Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(1): 106-112
- [15] 魏来, 胡大一. 感染性疾病 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2011: 229-231
- [16] 周华, 程锦泉. 炭疽病防治手册 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2002: 74-83
- [17] Ireng LM, Gala JL. Rapid detection methods for *Bacillus anthracis* in environmental samples: a review [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(4): 1411-1422
- [18] Rao SS, Mohan KV, Atreya CD. Detection technologies for *Bacillus anthracis*: prospects and challenges [J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 82(1): 1-10
- [19] 贾文祥. 医学微生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 179-182

[收稿日期] 2014-01-27