

# 针对炭疽保护性抗原不同结构域的中和性单克隆抗体的筛选和鉴定

徐俊杰 张 军 刘树玲 吕天敬 陈 薇\*

(军事医学科学院微生物流行病研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

**摘 要** 炭疽保护性抗原(PA)是炭疽毒素的重要组分,同时也是现有炭疽疫苗的主要有效成分,在炭疽杆菌的致病与免疫中发挥关键作用。以重组 PA 为免疫原,采用 B 淋巴细胞杂交瘤技术,结合炭疽毒素敏感细胞的毒性中和试验,大量筛选抗 PA 单克隆抗体,获得了 9 株炭疽毒素中和性单抗。进一步分析表明这些单抗以 IgG1 亚类为主,分别识别 PA 3 个结构域的 4 个不同中和表位区。针对结构域 2 的 4 株单抗识别同一表位区,其中 3 株单抗的中和活性强于抗 PA 多抗,针对结构域 4 的 4 株单抗识别两个不同表位区,另有 1 株单抗识别位于结构域 3 的表位。实验结果提示 PA 具有多个中和表位,分别位于其不同结构域,其中结构域 2、4 包含主要中和表位。实验中获得的不同表位的中和性单抗为深入研究 PA 的免疫保护机理提供了工具,也为研制针对炭疽毒素的被动免疫制剂和治疗药物打下基础。

**关键词** 炭疽杆菌 炭疽毒素 保护性抗原 单克隆抗体 中和表位

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)06-0947-05

炭疽杆菌的主要致病因子包括炭疽毒素和细菌荚膜,它们的编码基因分别位于细菌的两个质粒 pXO1 和 pXO2 上。荚膜能阻止细菌被宿主免疫细胞吞噬,而毒素是造成宿主损伤和死亡的主要原因<sup>[1,2]</sup>。炭疽毒素包括 3 种蛋白质成分:保护性抗原(Protective antigen,PA)、致死因子(Lethal factor,LF)和水肿因子(Edema factor,EF)。PA 通过与靶细胞膜上的受体结合将 LF 和 EF 导入细胞内发挥活性作用。PA 能诱导机体的保护性免疫,是目前唯一获美国食品和药品管理局(FDA)批准的人用炭疽疫苗(Anthrax vaccine adsorbed,AVA)的主要免疫活性成分;EF 具有依耐钙调蛋白的腺苷酸环化酶活性,可使靶细胞内 cAMP 浓度升高,导致宿主防御能力下降;LF 具有金属蛋白酶活性,已发现的底物为丝裂原激活的蛋白激酶的激酶家族(MAPKKs)经过一系列未知的级联反应可导致细胞裂解与死亡。

炭疽的治疗主要依靠抗生素,多种抗生素对炭疽有效,但必须在感染初期立即使用,而在感染晚期由于毒素的大量产生,仍会导致患者死亡。2001 年在美国发生的炭疽芽孢恐怖事件中,虽然用了最好的抗生素,仍有接近 50%(5/11)的吸入性炭疽患者死亡,可见针对炭疽毒素的治疗极为重要<sup>[3,4]</sup>。目前国际上已经广泛开展了有关炭疽毒素抑制剂的研

究,主要包括:各种毒素突变体、受体类似物、小分子毒素抑制剂、毒素中和性抗体等<sup>[6-10]</sup>。相对于其他毒素抑制剂,用中和性单克隆抗体进行被动免疫治疗作用机制明确,研制相对容易,是目前较为切实可行的办法<sup>[8-10]</sup>。

本研究用重组 PA 免疫 BALB/c 小鼠,进行杂交瘤细胞融合和筛选,用细胞毒性中和试验检测抗 PA 单抗对炭疽毒素的中和作用,获得了 9 株针对 PA 不同结构域的中和性单抗。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

重组 PA 与重组 LF 由本室用基因工程的方法在大肠杆菌中表达制备,纯度在 95%以上<sup>[11,12]</sup>;HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体,ImmunoType™ Kit 购自 Sigma 公司;SP2/0 骨髓瘤细胞为本室传代保存;小鼠巨噬细胞 J774A.1 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所;雌性 BALB/c 小鼠(6 周龄)由军事医学科学院动物中心提供;Protein G 预装柱购自 Pharmacia 公司;EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase Kit 购自 Pierce 公司。

### 1.2 PA 不同结构域的表达

在重组 PA 表达质粒 PAS-PA<sup>[11]</sup>基础上,采用

基金项目:国家自然科学基金(30300016);军队医学杰出中青年基金(04J014)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-66948565; Fax: 86-10-63815273; E-mail: xw789661@yahoo.com

作者简介:徐俊杰(1972-),男,江苏南京人,副研究员,博士,研究方向为病原微生物学和免疫学。E-mail: xujj02@yahoo.com.cn

其他作者:李冠霖,葛 猛,郭 强

收稿日期:2005-04-11,修回日期:2005-09-02

PCR 的方法,分别扩增包含一个或多个 PA 结构域的基因片段,替换原质粒中的 PA 基因,在大肠杆菌中表达。纯化方法参考完整 PA 的纯化方法<sup>[11]</sup>。这些片段包括 PA<sub>D4</sub>(PA 结构域 4,氨基酸 596~735), PA<sub>D3-4</sub>(PA 结构域 3~4,氨基酸 489~735), PA<sub>D1-3</sub>(PA 结构域 1~3,氨基酸 1~607), PA<sub>D1</sub>(PA 结构域 1,氨基酸 1~258)。

### 1.3 小鼠杂交瘤融合与筛选

将 PA(100 µg/只鼠)与佐剂混合后免疫 BALB/c 小鼠。首次免疫使用福氏完全佐剂,皮下注射。2 周后用福氏不完全佐剂第二次免疫,剂量、途径相同。2 周后尾静脉取血,用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清抗 PA 滴度,抗体滴度大于  $1 \times 10^5$  的小鼠供融合用。融合前 3 天再加强免疫一次。无菌操作取小鼠脾脏,制备成脾细胞悬液,与 SP2/0 骨髓瘤细胞用常规方法融合。在融合细胞克隆生长至 1/4 细胞孔大小时用 ELISA 法进行筛选,取抗 PA 抗体阳性孔培养上清用细胞毒性中和试验检测中和活性,有中和活性的孔进行亚克隆,反复克隆 3 次阳性率达 100%。最后克隆株编号液氮中保存。

### 1.4 抗 PA 抗体 ELISA 检测

用 PA(2 µg/mL)包被 96 孔酶标板条,每孔 0.1 mL,包被液为 pH 9.6 碳酸盐缓冲液,置 4℃ 过夜。次日用封闭液(2% BSA, 0.05% Tween-20, PBS)封闭,洗板后加入梯度稀释的待测样品 0.1 mL/孔, 37℃ 孵育 1 h,洗板后加入 1:20000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 37℃ 孵育 1 h,洗板后用 TMB 显色液显色,酶标仪测  $OD_{450}$ 。以未加待测样品的孔为阴性对照,  $OD_{450}$  大于阴性对照 2.1 倍以上的孔为阳性,此时样品最大稀释度定义为抗 PA 抗体的滴度。

### 1.5 细胞毒性中和试验(TNA)

J774A.1 细胞以  $10^5$ /mL 接种于 96 孔细胞培养板,长至 90% 满,将用培养液梯度稀释的待检抗体与 100 ng/mL PA 37℃ 孵育 1 h,再与 100 ng/mL LF 一起加入细胞培养孔中,37℃ 孵育 3 h,加入 20 µL MTT (5 mg/mL),37℃ 孵育 30 min,吸取上清,每孔加入 100 µL 盐酸异丙醇,振荡溶解沉淀后测  $OD_{570}$ 。结果取 2 个复孔的平均值。以纯化的兔抗 PA 多克隆抗体<sup>[11]</sup>(纯化方法如单抗)为阳性对照,以未加待检抗体的培养液为阴性对照,比阴性对照孔  $OD_{570}$  高 0.1 以上的细胞孔判为阳性,此时的最大稀释度定义为 TNA 效价。根据加入抗体的量效关系计算可保护 50% 细胞免受炭疽致死毒素作用的抗体浓度  $IC_{50}$ 。

### 1.6 单抗的纯化和亚类鉴定

常规方法制备杂交瘤腹水。纯化时将腹水离心,去脂肪层,腹水上清用 0.2 µm 滤膜过滤后用 1 mL Protein G 预装柱进行纯化,纯化的单抗定量后分装, -70℃ 保存待用。单抗亚类鉴定使用 ImmunoType™ Kit,按说明书操作。

### 1.7 单抗识别的 PA 结构域分析

将 PA 不同结构域蛋白分别包被酶联板,用 ELISA 方法检测各株单抗与 PA 不同结构域的结合情况。将完整 PA 与不同结构域蛋白 SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜,分别用各株单抗进行 Western blot 分析,进一步确定其识别的 PA 结构域。

### 1.8 单抗的标记和竞争抑制试验

纯化的单抗用 EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase Kit 标记上过氧化物酶(HRP),用于竞争抑制试验。标记单抗工作浓度的确定:PA(2 µg/mL)包被酶标板,封闭后加入梯度稀释的标记单抗 37℃ 孵育 1 h, TMB 显色后测  $OD_{450}$ ,选择  $OD_{450}$  约 1.0 时的稀释度为抗体工作浓度。抑制试验:同上包被和封闭酶标板条,加入饱和浓度未标记的单抗,37℃ 孵育 0.5 h,再加入工作浓度的 HRP 标记单抗 37℃ 孵育 1 h, TMB 显色后测  $OD_{450}$ 。以未加未标记单抗的孔为对照,抑制率  $(1 - \text{各孔测定值}/\text{对照值}) \times 100\%$ 。结果分析标准:抑制率  $\geq 50\%$  为存在抑制;抑制率  $\geq 20\%$ ,  $< 50\%$  为存在部分抑制;抑制率  $< 20\%$  为无抑制。

## 2 结果

### 2.1 抗 PA 中和性单抗的筛选

PA 与 LF 结合称为致死毒素(LT),在体外可导致敏感细胞(如小鼠 J774A.1 细胞)的死亡<sup>[13]</sup>,而中和性抗体可以保护细胞免受毒素的作用。本实验以重组 PA 为免疫原,常规免疫 BALB/c 小鼠,采用 B 淋巴细胞杂交瘤技术进行细胞融合,用 ELISA 筛选能特异分泌抗 PA 单抗的杂交瘤细胞克隆,在亚克隆前即用细胞毒性中和试验(TNA)检测培养上清对炭疽致死毒素的中和作用,有中和活性的克隆再进行亚克隆,共获得 9 株分泌中和性单抗的杂交瘤细胞株。

### 2.2 单抗的纯化和亚类鉴定

杂交瘤细胞株经扩大培养后,分别制备腹水,并进行纯化,纯化抗体的还原型 SDS-PAGE 如图 1 所示,抗体轻重链位置的不同进一步表明了单抗之间的差异。经鉴定 9 株中和性单抗中 5 株 IgG 亚类为 IgG1,2 株为 IgG2a,2 株为 IgG2b。Western blot 分析

显示 9 株单抗均能与 PA 特异性结合 ,形成阳性条带 ,而与对照的大肠杆菌菌体蛋白不结合 ,表明这些单抗具有良好的识别 PA 的特异性( 结果未显示 )。

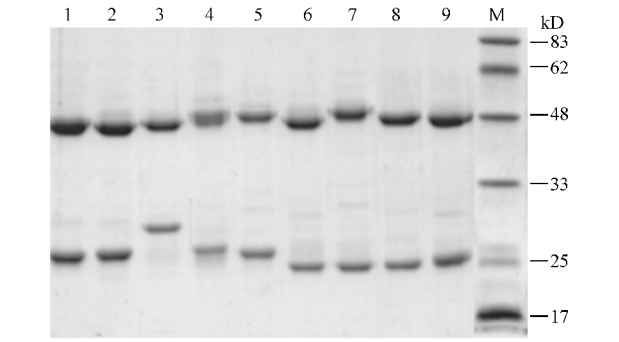


图 1 中性单抗的还原型 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Toxin-neutralizing monoclonal antibodies analyzed by reduced SDS-PAGE

1. 4B6 ; 2.4B2 ; 3.3E3 ; 4.4F12 ; 5.1B3 ; 6.5E1 ; 7.2A8 ; 8.5E12 ; 9.4D10.

### 2.3 单抗的中和活性比较

为比较单抗中和活性大小 ,将纯化后的单抗均配成 1mg/mL 的溶液 ,同时用 1mg/mL 纯化的兔多抗作为对照 ,用细胞毒性中和试验( TNA )检测这些抗体的中和效价 ,同时计算 IC<sub>50</sub>( 表 1 )。结果表明 ,9 株单抗中和活性大小相差较大 ,其中 3 株单抗( 5E12、2A8、5E1 )中和活性最高 ,其 IC<sub>50</sub> 高于兔多抗。

表 1 中性单克隆抗体的性质鉴定				
Table 1 Characterization of toxin-neutralizing monoclonal antibodies				
McAb/ ( 1mg/mL )	Subclass	ELISA	TNA * titer	IC <sub>50</sub> ( μg/mL )
5E12	IgG1	1.6 × 10 <sup>5</sup>	1.28 × 10 <sup>4</sup>	0.15
2A8	IgG2b	8 × 10 <sup>4</sup>	1.28 × 10 <sup>4</sup>	0.16
5E1	IgG1	8 × 10 <sup>4</sup>	6.4 × 10 <sup>3</sup>	0.31
1B3	IgG2b	1 × 10 <sup>4</sup>	4 × 10 <sup>2</sup>	4.9
4D10	IgG1	2.56 × 10 <sup>6</sup>	100	16.5
4B2	IgG2a	1.28 × 10 <sup>6</sup>	800	1.95
4B6	IgG2a	1.28 × 10 <sup>6</sup>	800	1.95
4F12	IgG1	2.56 × 10 <sup>6</sup>	200	9.15
3E3	IgG1	6.4 × 10 <sup>5</sup>	50	39.0
RAb **	— **	1.6 × 10 <sup>5</sup>	3.2 × 10 <sup>3</sup>	0.68

\* Toxin neutralization assay ; \*\* :Rabbit anti-PA antibodies ; \*\*\* :Not assayed.

### 2.4 中性单抗识别的 PA 结构域分析

以重组表达的 PA 不同结构域包被酶联板 ,用 ELISA 法检测中性单抗与它们的结合情况。PA 蛋白片段所包含的结构域见图 2 ,ELISA 结果见表 2。以 5E12 为例 ,它可以与 PAD<sub>1-3</sub>( PA 结构域 1 ~

3 )结合 ,但不和 PAD<sub>3-4</sub>( PA 结构域 3 ~ 4 )和 PAD1 ( PA 结构域 1 )结合 ,可以推测出它识别的表位位于 PA 结构域 2。分析显示这 9 株单抗分别针对 PA 3 个不同结构域 ,结构域 2、4 各有 4 株 ,结构域 3 有 1 株 ,表明 PA 存在多个中性表位 ,并且位于多个结构域。Western blot 鉴定进一步证实了此结果。图 3 显示了其中 3 株单抗的 Western blot 结果 ,与 ELISA 结果一致。

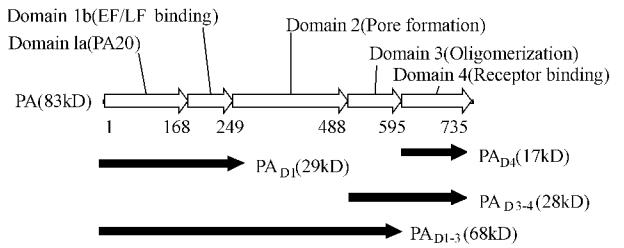


图 2 重组表达的 PA 不同结构域示意图

Fig.2 Recombinant PA fragments including different domains

表 2 ELISA 方法分析中性单抗识别的 PA 结构域						
Table 2 Domains of PA recognized by toxin-neutralizing monoclonal antibodies						
McAb	ELISA results( Antigen )					Domains of PA recognized by McAbs
	PA	PAD <sub>1</sub>	PAD <sub>1-3</sub>	PAD <sub>3-4</sub>	PAD <sub>4</sub>	
5E12	+	-	+	-	-	Domain 2
2A8	+	-	+	-	-	Domain 2
5E1	+	-	+	-	-	Domain 2
1B3	+	-	+	-	-	Domain 2
4D10	+	-	+	+	-	Domain 3
4B2	+	-	-	+	+	Domain 4
4B6	+	-	-	+	+	Domain 4
4F12	+	-	-	+	+	Domain 4
3E3	+	-	-	+	+	Domain 4

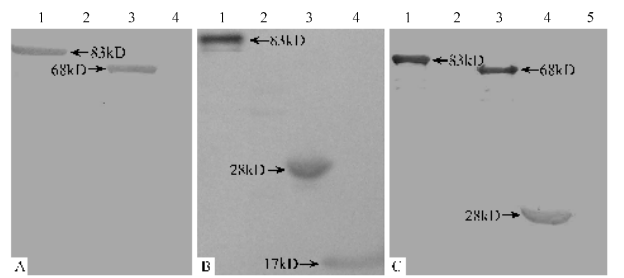


图 3 Western blot 分析中性单抗识别的 PA 结构域

Fig.3 Domains of PA recognized by toxin-neutralizing monoclonal antibodies

A : 5E12 ; B : 4B2 ; C. 4D10. 1. PA ; 2. PAD1 ; 3. PAD1-3 ; 4. PAD3-4 ; 5. PAD4.

### 2.5 竞争抑制试验分析中性单抗识别的 PA 表位

将 9 株单抗分别用 HRP 标记 ,通过竞争抑制试验分析它们识别的 PA 表位。结果显示( 表 3 )针对 PA 结构域 2 的 4 株单抗( 5E12、2A8、5E1、1B3 )相互间的抑制率在 24% ~ 66% 之间 ,表明它们识别相同

的表位或者识别的表位间有交叉 ,也可以说它们识别一个共同的中和表位区 ,1B3 抑制率较低的原因可能与其亲和力较低有关( 其 ELISA 效价仅为  $1 \times 10^4$  表 1 );针对 PA 结构域 4 的 4 株单抗中 4B2、

4B6、4F12 的抑制率在 78% ~ 92% 之间 ,表明它们识别一个中和表位区 ,而 3E3 识别另一个中和表位区 ;针对 PA 结构域 3 的 4D10 识别一个独立的中和表位。

表 3 中和性单抗间的竞争抑制 ELISA 结果

Table 3 Competitive binding ELISA between toxin-neutralizing monoclonal antibodies

Unlabelled McAb	HRP conjugated McAb								
	5E12	2A8	5E1	1B3	4D10	4B2	4B6	4F12	3E3
5E12	65 *	44	46	59	0	0	- **	-	-
2A8	40	63	52	47	0	1	-	-	-
5E1	49	53	65	53	0	4	-	-	-
1B3	32	24	28	42	3	0	-	-	-
4D10	2	0	-	-	82	4	0	-	-
4B2	0	-	-	-	0	90	78	89	5
4B6	0	-	-	-	1	88	90	82	0
4F12	4	-	-	-	0	91	85	92	7
3E3	0	-	-	-	0	5	2	0	87

\* : % blocking ; \*\* :Not determined.

3 讨论

接种炭疽疫苗是预防炭疽的有效手段 ,但是疫苗产生保护性免疫需要一定时间 ,在疾病流行和某些突发事件发生时无法提供有效的紧急免疫防护。而中和性抗体作为有效的被动免疫制剂可以弥补炭疽疫苗的不足 ,能够提供紧急免疫<sup>[10]</sup>。对炭疽的治疗来说 ,单纯使用抗生素无法中和患者体内的毒素 ,因此有必要研制针对毒素的治疗药物 ,其中中和性单抗最有发展前景<sup>[8~10]</sup>。但在对炭疽芽孢攻击的保护试验中 ,单抗的保护结果与多抗相比还有差距<sup>[14,15]</sup>。单抗保护效果欠佳的原因可能是因为炭疽毒素具有多个中和性表位 ,针对某一个表位的单抗不足以完全中和毒素的活性<sup>[10]</sup> ,因此有必要获得针对不同表位的毒素中和性单抗。

本研究获得了 9 株炭疽毒素中和性单抗 ,分别识别 PA 3 个结构域的 4 个不同中和表位区。PA 包含 4 个结构域 结构域 1 包括 furin 蛋白酶的作用位点和 EF/LF 的结合位点 结构域 2 与 PA 跨膜孔道的形成有关 结构域 3 与 PA 在细胞膜上形成七聚体有关 结构域 4 则被认为是 PA 与其受体的结合部位。国外早期研究认为 PA 结构域 4 含有蛋白的主要中和表位<sup>[16]</sup> ,但近年来发现其他结构域也存在中和表位<sup>[17]</sup>。本研究结果进一步证实 PA 结构域 2、3、4 均存在中和表位。

Little 等<sup>[18,19]</sup>最早开展了炭疽毒素中和性单抗的筛选工作 ,先后获得了 8 株抗 PA 中和性单抗 ,分别识别 3 个不同的抗原区 ,包括结构域 4 的 671 ~

721 位氨基酸( 3 株 ) 结构域 3、4 之间的 581 ~ 601 位氨基酸( 4 株 ) ,以及结构域 1、2 之间的 168 ~ 314 位氨基酸( 1 株 ) ,其中识别位点在结构域 1、2 之间的那株单抗中和活性最强。最近 Brossier 等<sup>[17]</sup>也获得了两株中和性单抗 ,识别位点分别位于 PA 结构域 2 ( 412 ~ 419 位氨基酸 ) 和结构域 4 ,两株单抗中和活性相近。在一项用半胱氨酸逐一替换 PA 氨基酸的突变扫描研究中 ,使 PA 失去活性的大多数突变均位于结构域 2<sup>[20]</sup>。本研究获得的 9 株中和性单抗有 8 株针对 PA 结构域 2、4。以上结果都表明结构域 2 和 4 包含 PA 的主要中和表位。

虽然无法与国外获得的单抗的中和活性进行直接比较 ,但与抗 PA 多抗的比较结果表明本研究获得的针对结构域 2 的单抗 5E12、2A8、5E1 具有较强的中和活性 ,不仅强于抗 PA 多抗 ,也强于其他中和性单抗 ,这一方面再次提示结构域 2 包含 PA 的重要中和性表位 ,另一方面也提示这些单抗( 也包括实验中获得的其他中和性单抗 ) 或者以这些单抗为基础的人源化抗体潜在的应用前景。

另外值得注意的是单抗的中和活性与其 ELISA 测定的效价并不完全对应( 表 1 ) ,如 4D10 和 4F12 的 ELISA 效价很高 ,但中和活性较低 ,而中和活性最强的 3 株单抗 ELISA 效价并不高。这是因为这些单抗识别不同的表位 ,这些表位对 PA 发挥功能的重要性是不同的 ,只有针对主要中和表位的抗体才能产生较强的中和活性。因此有必要进一步分析和确定 PA 的主要中和表位 ,从而深入研究 PA 的免疫保护机理。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Mourez M. Anthrax toxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2004, **152**( 1 ): 135 – 164.
- [ 2 ] Ascenzi P, Visca P, Ippolito G, *et al.* Anthrax toxin: a tripartite lethal combination. *FEBS Lett*, 2002, **531**: 384 – 388.
- [ 3 ] Friedlander A M. Tackling anthrax. *Nature*, 2001, **414**: 160 – 161.
- [ 4 ] Enserink M. ‘ Borrowed immunity ’ may save future victims. *Science*, 2002, **295**: 777.
- [ 5 ] Rainey G J, Young J A. Antitoxins: novel strategies to target agents of bioterrorism. *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**( 9 ): 721 – 726.
- [ 6 ] Panchal R G, Hermone A R, Nguyen T L, *et al.* Identification of small molecule inhibitors of anthrax lethal factor. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, **11**( 1 ): 67 – 72.
- [ 7 ] Mourez M, Kane R S, Mogridge J, *et al.* Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 958 – 961.
- [ 8 ] Maynard J A, Maassen C B, Leppla S H, *et al.* Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 597 – 601.
- [ 9 ] Cirino N M, Sblattero D, Allen D, *et al.* Disruption of anthrax toxin binding with the use of human antibodies and competitive inhibitors. *Infect Immun*, 1999, **67**( 6 ): 2957 – 2963.
- [ 10 ] Casadevall A. Passive antibody administration ( immediate immunity ) as a specific defense against biological weapons. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, **8**: 833 – 841.
- [ 11 ] 徐俊杰, 董大勇, 宋小红, 等. 重组炭疽保护性抗原的表达、纯化与生物活性分析. *生物工程学报*, 2004, **20**( 5 ): 652 – 655.
- [ 12 ] 郭 强, 徐俊杰, 董大勇, 等. 重组炭疽致死因子的表达及生物活性分析. *微生物学报*, 2004, **44**( 6 ): 749 – 751.
- [ 13 ] Singh Y, Leppla S H, Bhatnagar R, *et al.* Internalization and processing of lethal toxin by toxin-sensitive and -resistant cells. *J Biol Chem*, 1989, **264**( 19 ): 11099 – 11102.
- [ 14 ] Little S F, Ivins B E, Fellows P F, *et al.* Passive protection by polyclonal antibodies against *Bacillus anthracis* infection in guinea pigs. *Infect Immun*, 1997, **65**: 5171 – 5175.
- [ 15 ] Kobiler D, Gozes Y, Rosenberg H, *et al.* Efficiency of protection of guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive immunization. *Infect Immun*, 2002, **70**: 544 – 550.
- [ 16 ] Flick-Smith H C, Walker N J, Gibson P, *et al.* A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against anthrax infection. *Infect Immun*, 2002, **70**( 3 ): 1653 – 1656.
- [ 17 ] Brossier F, Levy M, Landier A, *et al.* Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 2004, **72**( 11 ): 6313 – 6317.
- [ 18 ] Little S F, Leppla S H, Cora E, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of *Bacillus anthracis* toxin. *Infect Immun*, 1988, **56**( 7 ): 1807 – 1813.
- [ 19 ] Little S F, Novak J M, Lowe J R, *et al.* Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies. *Microbiology*, 1996, **142**: 707 – 715.
- [ 20 ] Mourez M, Yan M, Lacy D B, *et al.* Mapping dominant-negative mutations of anthrax protective antigen by scanning mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, **100**: 13803 – 13808.

## Toxin-neutralizing monoclonal antibodies to the different domains of anthrax protective antigen

XU Jun-jie ZHANG Jun LIU Shu-ling LV Tian-jing CHEN Wei\*

( State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China )

**Abstract** : Anthrax toxin from *Bacillus anthracis* is a three-component toxin consisting of lethal factor ( LF ), edema factor ( EF ), and protective antigen ( PA ). PA binds to target cells and transports LF or EF into the cell cytosol where they carry out their enzymatic functions. PA can induce protective immunity to the infection of the bacterium and is the major component in the only anthrax vaccine approved by FDA of USA. Mouse hybridoma clones specifically secreting anti-PA monoclonal antibodies ( MAbs ) were generated by cell fusion technique and their ability to neutralize anthrax lethal toxin activities was screened *in vitro* on a toxin-sensitive cell line. Nine toxin-neutralizing MAbs obtained were then characterized for the domains of PA they recognize, and the epitope regions they bind were analyzed by competitive binding ELISA. It was found that these MAbs bind four potential neutralizing epitope regions in three different domains of PA. Four MAbs bind to two non-overlapping epitope regions in domain 4 of PA and may prevent the binding of PA to its cell receptor. Four MAbs bind to domain 2, a domain involved in membrane insertion. One MAb binds to domain 3, a region involved in the oligomerization of PA. The results provided supporting evidence that PA has several neutralizing epitopes, and offered potential immunotherapeutic agents for the treatment of anthrax.

**Key words** : *Bacillus anthracis*, Anthrax toxin, Protective antigen, Monoclonal antibody, Neutralizing epitope

Foundation item: National Natural Science Foundation of China ( 30300016 ); Military Medical Science Foundation for Distinguished Young Scholars ( 04J014 )

\* Corresponding author. Tel : 86-10-66948565 ; Fax : 86-10-63815273 ; E-mail : cw789661@ yahoo. com

Other authors : LI Guan-lin, GE Meng, GUO Qiang

Received date 04-11-2005