

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(8):950-955; 4 August 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.014

空肠弯曲菌细胞致死性肿胀毒素单克隆抗体的制备与鉴定

陆磊[#], 商宇伟[#], 任方哲, 王楠, 焦新安, 黄金林^{*}

扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

摘要: 【目的】原核表达空肠弯曲菌细胞致死性肿胀毒素 B 蛋白 (CdtB), 制备其单克隆抗体 (mAb), 并研究 mAb 抗毒性作用。【方法】扩增空肠弯曲菌 *cdtB* 基因并将其构建到 pET-30a(+) 和 pGEX-6p-1 表达载体, 以原核表达的 GST-CdtB 蛋白为免疫原, 应用杂交瘤技术进行细胞融合; 采用间接 ELISA 方法测定细胞上清和 mAb 腹水效价, Dot-ELISA、Western blot 分析 mAb 特异性, 并以 CaCo-2 和 HD-11 细胞为模型, 鉴定 mAb 抗毒性能力。【结果】成功构建重组原核表达质粒 pET-30a(+)-*cdtB* 和 pGEX-6p-1-*cdtB*, 并融合表达 rHis-CdtB 和 rGST-CdtB 蛋白。获得 5 株稳定分泌 CdtB 抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 1F3, 1F5, 2E4, 2E11, 2F2。抗体 Ig 类和亚类检测显示 2E11 Ig 亚类为 IgG2b, 其他 4 株均为 IgG1。抗体效价高达 1:(1 × 10⁸)。Dot-ELISA 试验表明 5 株 mAb 均能与空肠弯曲菌标准株发生特异性反应, 与非空肠弯曲菌呈阴性反应; Western blot 法分析表明 5 株 mAb 均能与纯化蛋白 rGST-CdtB 有良好的反应性。基于 CaCo-2 细胞的黏附和侵袭实验表明 mAb 能显著降低细菌的黏附和侵袭能力 ($P < 0.01$)。【结论】成功制备了针对空肠弯曲菌 CdtB 蛋白的 mAb。为进一步研究空肠弯曲菌致病机制, 以及为研制治疗性类药物奠定了基础。

关键词: CdtB 蛋白, 空肠弯曲菌, 单克隆抗体

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209(2014)08-0950-06

空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*, Cj) 是一类革兰氏阴性、微需氧、可移动的弯曲短杆菌, 是引起人胃肠道感染最常见的人兽共患病原菌。某种血清型的空肠弯曲菌可引起周围神经自身免疫性格林-巴利综合征 (Guillain-Barre syndrome, GBS)^[1]。空肠弯曲菌由于培养条件苛刻、抗原结构复杂以及缺乏良好的感染动物模型, 其致病机理迄今尚不很明确^[2]。细胞致死性肿胀毒素 (cytolethal distending

toxin, CDT) 是由革兰阴性细菌产生具有细胞毒性的一种蛋白, 能通过损伤 DNA 和激活细胞周期检查点阻断细胞周期 G₂/M 期, 导致细胞肿胀和死亡^[3]。空肠弯曲菌的细胞致死性肿胀毒素由多肽 CdtA、CdtB 和 CdtC 构成, 来自于 3 个相邻基因 *cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 编码, 分子量分别为 25-35、28-30 和 20-21 kDa。CDT 被认为是空肠弯曲菌感染的重要发病因素之一, 其中 CdtB 是该毒素的活性

基金项目: 国家自然科学基金 (31372449); 国家“863 计划” (2012AA101601); 国家科技支撑计划 (2014BAD13B02)

^{*} 通信作者。Tel: +86-514-87991136; E-mail: jinlin@yzu.edu.cn

作者简介: [#] 对本文有同等贡献。陆磊 (1988-), 女, 江苏镇江人, 硕士研究生, 研究方向为兽医微生物; 商宇伟 (1988-), 男, 江苏常州人, 硕士研究生, 研究方向为人兽共患病, E-mail: shangyuwei_2007@163.com

收稿日期: 2013-11-03; **修回日期:** 2014-01-19

亚单位,也是细胞致死性肿胀毒素的关键成分^[3]。近期研究表明 CdtB 具有良好的免疫原性和保守性,是一种理想的疫苗候选抗原。CDT 的作用于细胞是一个精细而有序的进行过程,其在空肠弯曲菌发病机制中担任的角色仍不很清晰^[4]。本研究通过原核表达 CdtB 蛋白,制备其单克隆抗体,为建立空肠弯曲菌快速检测方法、进一步研究空肠弯曲菌的致病机制以及开发新型疫苗类药物提供实验材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:质粒 pET-30a(+) 购自 Novagen 公司, pGEX-6p-1 购自 Amersham Biosciences 公司;限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶、IPTG、蛋白质相对分子质量(M_r) marker、DNA ladder 购自大连宝生物有限公司。胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS) 购自 Gibco 公司。HAT、DMEM 培养基、PEG ($M_r = 1\ 450$)、完全和不完全弗氏佐剂及 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记的兔抗鸡 IgG、DMSO、鼠源 mAb 亚类检测试剂盒等均购自 Sigma 公司;其余常规试剂为国产分析纯。

1.1.2 实验动物和细胞系:6 周龄雌性 BALB/c 小鼠(体质量为 18–22 g/只) 购自扬州大学比较医学中心。小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0-Ag-14、CaCo-2 和 HD-11 细胞由本实验室保存培养。

1.1.3 菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21(DE3), 肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, SE), 李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm), 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp), 由本实验室保存培养; ATCC33560, 由江苏出入境检验检疫局惠赠; NCTC11168, 由遵义医学院惠赠。

1.2 cdtB 原核表达质粒的构建及鉴定

根据 GenBank 上公布的 *cdtB* 基因序列设计引物: Primer-F(含 *Bam*H I 酶切位点): 5'-TAGGAT CCGCCACAGAAAGCAAATGGAGT-3'; Primer-R(含 *Xho* I 酶切位点): 5'-ATCTCGAGCTAAATTTTCTAAATTTACTG-3'。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。分别构建重组质粒 pET-30a(+)-*cdtB*、pGEX-6p-1-*cdtB*。转化 BL21(DE3) 感受态细

菌, 重组菌命名为 BL21(DE3) [pET-30a(+)-*cdtB*] 和 BL21(DE3) (pGEX-6p-1-*cdtB*), 表达蛋白命名为 rHis-CdtB 和 rGST-CdtB。连接、转化、质粒提取、电泳的方法均参照文献 [5]。

1.3 cdtB 蛋白表达

重组菌 BL21(DE3) [pET-30a(+)-*cdtB*] 和 BL21(DE3) (pGEX-6p-1-*cdtB*)、新鲜培养物以 1:100 分别接种于含相应抗生素的 LB 液体培养基, 以 0.5 mmol/L 的 IPTG 在 30 $^{\circ}$ C 条件下诱导表达 5 h 后, 诱导产物 SDS-PAGE 鉴定, 操作步骤依据文献 [5] 的方法进行。

1.4 Western blot 分析

以纯化后的 rHis-CdtB 免疫 BALB/c 小鼠获得多抗血清。取 rGST-CdtB 进行 SDS-PAGE 后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 以获得的鼠源多抗血清为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 Ig(G+M) 抗体为二抗, DAB 为底物显色, 进行蛋白印迹, 分析重组蛋白 rGST-CdtB 的生物学活性。

1.5 免疫原的制备

以 GST-CdtB 作为免疫原, 将诱导表达后的重组菌 BL21(pGEX-6p-1-*cdtB*) 以 1:4 加入 5 \times SDS 样品处理液, 100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 经 SDS-PAGE。电泳结束后, 将胶块玻璃至干净平皿中, 用 1 mol/L KCl 轻轻漂洗, 目的蛋白的位置会呈现出白色, 将白色区域割下置于指形管中, -20 $^{\circ}$ C 过夜, 次日放于液氮罐中, 几小时后取出, 将胶块研磨致粉碎, 再溶于 PBS 中, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 免疫方案

将制备的免疫原 rGST-CdtB 蛋白与弗氏完全佐剂 1:1 混合乳化后, 经皮下免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 剂量和方法依据文献 [1] 所述。

1.7 杂交瘤细胞筛选与克隆

以 rHis-CdtB 蛋白作为检测抗原, 间接 ELISA 法进行杂交瘤细胞筛选, 方阵实验确定检测抗原的最佳包被浓度为 0.1 μ g/孔, 反应条件如下: 细胞上清 50 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 2 h; PBST 洗涤后加入工作浓度的酶标二抗 50 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h 后洗涤, OPD 显色 10 min。A₄₉₂ 数值大于 1.0 判定为阳性孔, 阳性孔细胞以有限稀释法进行克隆化^[6]。

1.8 mAb 生物学特性鉴定

1.8.1 mAb 亚类鉴定:按 mAb 亚类试剂盒说明书进行。

1.8.2 mAb 腹水制备及效价测定:采用体内诱生法制备腹水^[6],间接 ELISA 法测定抗体效价。

1.8.3 mAb 特异性分析:纯化蛋白 rHis-CdtB 进行 SDS-PAGE 后,电转移至硝酸纤维素膜上,以获得的 mAb 为一抗,进行 Western blot 分析,空载体 BL21 (DE3) [pET-30a(+)] 作对照。分别吸取空载体、BL21 (DE3) [pET-30a(+)-cdtB] IPTG 诱导后的裂解液以及空肠弯曲菌标准株 NCTC11168、ATCC33560 裂解液上清、副溶血性弧菌肠、李斯特菌、肠炎沙门菌各 5 μ L 点于 NC 膜上,进行 Dot-blot 分析,操作步骤如文献 [1] 所述。

1.9 基于毒素抗体的黏附和侵袭实验

将 CaCo-2 和 HD-11 细胞分别接种于 24 孔细胞板中,每孔铺 5×10^4 /mL。用灭菌的 PBS 漂洗 2 次。用 DMEM 悬起细菌 NCTC11168,稀释到所需的工作浓度。将 2 种抗体与细菌混合放入细胞培养箱中 1h。同时以 sp2/0 腹水和细菌混合的为对照,加入细胞。黏附侵袭实验步骤如前研究所述^[7],细胞用 PBS 洗 3 次,黏附实验:0.01% Triton X-100 裂解细胞,加入 150 μ L 蒸馏水,反复吹打后吸出样品,做梯度稀释后涂 CCDA 平板计数菌落数,实验重复 3 次。侵袭实验:用含有 250 μ g/mL 庆大霉素的培养基孵 1 h 以杀死细胞外的细菌,之后与黏附实验步骤相同。

1.10 统计学分析

应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。计量资料 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组间差异采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 cdtB 重组质粒的构建和鉴定

琼脂糖凝胶 (10 g/L) 电泳显示 1 条长约 699 bp 的目的条带,测序结果正确。重组质粒 pMD18T-cdtB,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后分别出现载体条带和 699 bp 的目的条带,酶切鉴定和测序结果正确。重组质粒 pET-30a(+)-cdtB 和 pGEX-6p-1-cdtB 分别经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后出现载体条带和 699bp 的目的条带,与预期相符。

2.2 cdtB 重组蛋白的表达

SDS-PAGE 分析结果显示 (图 1),在裂解后的沉淀中有诱导表达的目的蛋白条带,说明表达产物

是以包涵体形式存在,相对分子质量 (M_r) 分别为 29 kDa (rHis-CdtB) 和 53 kDa (rGST-CdtB) 与预期相符。

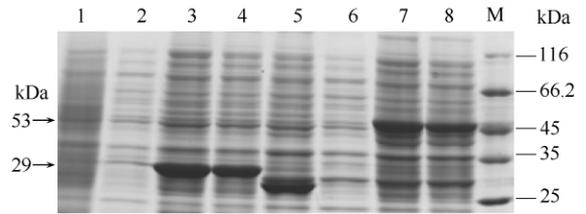


图 1. 重组大肠杆菌 BL21 (DE3) [pET-30a(+)-cdtB] 和 BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-cdtB) 的 SDS-PAGE

Figure 1. SDS-PAGE analysis of expressed product. M, protein marker; lane 1, BL21 (DE3) (pET-30a(+)) induced by IPTG; lane 2, Cracked supernatant of BL21 (DE3) [pET-30a(+)-cdtB] induced by IPTG; lane 3, Cracked deposit of BL21 (DE3) [pET-30a(+)-cdtB] induced by IPTG; lane 4, BL21 (DE3) [pET-30a(+)-cdtB] induced by IPTG; lane 5, BL21 (DE3) (pGEX-6p-1) induced by IPTG; lane 6, Cracked supernatant of BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-cdtB) induced by IPTG; lane 7, Cracked deposit of BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-cdtB) induced by IPTG; lane 8, BL21 (DE3) (pGEX-6p-1-cdtB) induced by IPTG.

2.3 重组蛋白 GST-CdtB 的生物学活性鉴定

Western blot 结果显示 His-CdtB 多抗血清能与 rGST-CdtB 发生免疫结合 (图 2),而与空载体 BL21 (DE3) (pGEX-6p-1) 全菌蛋白无交叉反应。说明免疫原 rGST-CdtB 具有良好的免疫生物学活性。

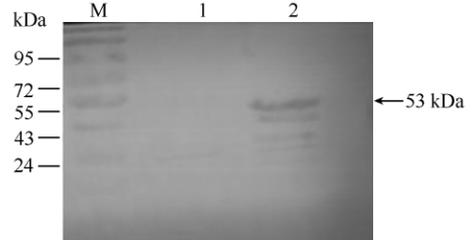


图 2. rGST-CdtB 蛋白的 Western blot 鉴定

Figure 2. Western blot analysis of rGST-CdtB. M, protein marker; lane 1, BL21 (DE3) [pET-30a(+)] whole protein; lane 2, BL21 (pGEX-6p-1-cdtB) whole protein.

2.4 mAb 的生物学特性测定

经 2 次融合,共得到 5 株 mAb 杂交瘤细胞株,分别命名为 1F3,1F5,2E4,2E11,2F2,其 Ig 类及亚类检测、效价如表 1 所示,Western blot 法显示 5 株 mAb 与 cdtB 蛋白、空肠弯曲菌具有特异性反应,与空载体无反应;Dot blot 结果显示抗体特异性强,与其他弧菌无交叉反应。

表 1. 5 株杂交瘤细胞株的检测

Table 1. Analysis of 5 hybridoma cell lines

| hybridoma cell lines | immunoglobulin subclasses | titers of the ascites fluid | Western blot | | | | Dot-blot ELISA | | | | | |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------|------------------|-----------------------|------------------|---------|---------|----|----|----|
| | | | BL21 (DE3) (pET-CdtB) | Cj11168 | BL21 (DE3) (pET) | BL21 (DE3) (pET-CdtB) | BL21 (DE3) (pET) | Cj11168 | Cj33560 | Lm | Vp | SE |
| 1F3 | IgG1 | 1:3276800 | +++ | ++ | - | +++ | - | + | + | - | - | - |
| 1F5 | IgG1 | 1:6553600 | +++ | ++ | - | +++ | - | + | + | - | - | - |
| 2E4 | IgG1 | 1:819200 | +++ | + | - | +++ | - | + | + | - | - | - |
| 2E11 | IgG2b | 1:6553600 | +++ | +++ | - | +++ | - | + | + | - | - | - |
| 2F2 | IgG1 | 1:13107200 | +++ | +++ | - | +++ | - | + | + | - | - | - |

Negative (-); Positive (+).

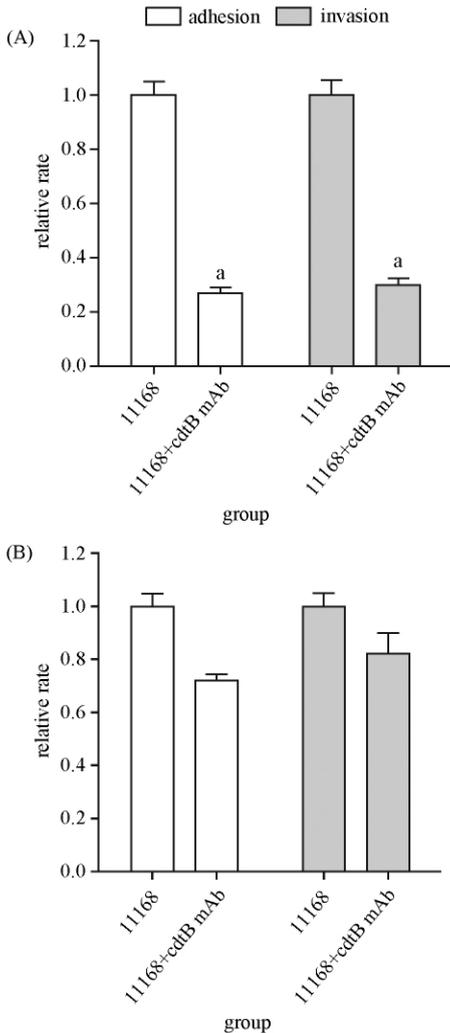


图 3. 基于 CaCo-2 (A) 和 HD-41 (B) 细胞的黏附和侵袭实验

Figure 3. Adhesion and invasion assay. A: CaCo-2; B: HD-41. * $P < 0.01$ vs 11168.

2.5 基于 CaCo-2 和 HD-41 细胞的黏附和侵袭实验

以 11168 + sp2/0 腹水 (腹水和抗体浓度均为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的黏附和侵袭值为对照。结果显示对

于 CaCo-2 细胞, 加入 CdtB 抗体, 细菌的黏附和侵袭分别下降了 73% 和 70% ($P < 0.01$) (图 3-A); 对于 HD-41 细胞, 加入 CdtB 抗体黏附率和侵袭率分别下降了 28%, 11% (图 3-B)。表明 CdtB 对细菌的黏附和侵袭有一定影响, 加入 CdtB 抗体后能显著减弱细菌对 CaCo-2 细胞的黏附和侵袭能力。

3 讨论

空肠弯曲菌已经成为世界范围内引起细菌性腹泻的最主要病原菌, 其对人的感染率不亚于沙门氏菌和志贺氏菌。在美国, 由 CJ 引起的腹泻高居榜首, 疾病控制中心 2009 年的监测数据美国人群的感染率为 13.02/100000, 每年发病超过 200 万例^[8]。特定类型的 CJ 感染后发生的 GBS 是一组免疫介导的炎性脱髓鞘性疾病, 主要累及周围神经系统。Noel 等^[9]发现 CJ 阳性的患者 GBS 发病率为 30.4/100000, 一般人群的发病率为 0.3/100000, 认为 CJ 感染阳性的患者发生 GBS 的危险性是一般人群的 100 倍。目前由于缺乏合适的动物模型以及其高变的基因组序列等原因, 限制了致病因子的挖掘和疫苗防控的研究工作。高风险的感染以及滥用抗生素的不良后果, 使得近年来新的保护性抗原、核酸疫苗及新型抗菌材料已成为研究热点^[10]。

CDT 作为一个重要的致病因素, 在几乎所有空肠弯曲菌菌株中都存在。Bang 等^[11]在丹麦火鸡中分离的 117 株空肠弯曲菌中 PCR 检测出有 114 株含有 *cdt* 基因, 在不同细胞系的感染实验中 CDT 阳性率高达 89.7% - 97.4%。CdtB 是细胞致死性肿胀毒素的关键成分, 是该毒素的活性亚单位。它具有脱氧核糖核酸酶活性, 能阻断细胞周期依赖性脱磷酸作用, 导致有丝分裂不能正常进行, 造成细胞周期阻滞^[12]。Biswas 等^[13]将空肠弯曲菌 NCTC11168

编码毒素亚基 (CdtA, CdtB 和 CdtC) 的基因进行插入突变,从而获得了 CDT 毒素的突变株,选择 HeLa 细胞和 HD-11 细胞评价突变株的黏附和侵袭能力,结果发现突变株对 HeLa 细胞的侵袭能力显著下降,对 HD-11 细胞的黏附和侵袭无显著差异。Jain 等^[7]将 CDT⁺和 CDT⁻菌株对 HeLa 进行黏附和侵袭实验。结果发现,CDT⁺菌株的黏附和侵袭能力明显高于 CDT⁻菌株。这些预示着 CDT 对空肠弯曲菌的黏附和侵袭作用有一定的影响。至今国内外只有少量关于 CJ 单克隆抗体制备的报道,主要有马尿酸水解酶、主要外膜蛋白 (MOMP)、鞭毛蛋白 FlaA、膜氨基酸转运蛋白 cjaA 等^[4,14-16],这些 mAb 为空肠弯曲菌的快速检测方法的建立奠定了基础,但没有一种用于商业化生产,而关于毒素蛋白 CDT 的 mAb 制备未见报道。

本研究通过大肠杆菌原核表达系统表达空肠弯曲菌 cdtB 基因,以纯化蛋白 rGST-CdtB 为免疫原制备了针对 CdtB 的 mAb。Western-blot 和 Dot-ELISA 分析结果表明得到的 5 株 mAb 均为抗 CdtB 蛋白的特异性抗体。基于 CaCo-2 细胞的黏附和侵袭实验表明 mAb 能显著降低细菌的黏附和侵袭能力,本实验为商品化新型抗菌药物的研发提供了思路,具有良好的应用前景。本研究制备的抗体为建立酶联免疫吸附试验、免疫磁珠吸附富集等蛋白检测方法以及开展 CDT 蛋白致病性等后续研究提供了良好的抗体资源。

参考文献

- [1] Huang J, Yin Y, Hu Y, Zhang G, Liu X, Jiao X. Preparation and characterization of monoclonal antibodies specific for CjaA protein of *Campylobacter jejuni*. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2011, 27 (11): 1204-1207. (in Chinese)
黄金林, 尹衍新, 胡元庆, 张弓, 刘秀梵, 焦新安. 空肠弯曲菌 cjaA 基因表达蛋白单克隆抗体的制备及其生物学特性鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27 (11): 1204-1207.
- [2] Shang Y, Wang N, Huang J, Jiao X. Progress in animal models of *Campylobacter jejuni* infection. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2013, 21 (4): 86-90. (in Chinese)
商宇伟, 王楠, 黄金林, 焦新安. 空肠弯曲菌感染动物模型的研究进展. *中国实验动物学报*, 2013, 21 (4): 86-90.
- [3] Lu L, Jiao X, Huang J. Research progress of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2012, 28 (10): 1048-1050. (in Chinese)
陆磊, 焦新安, 黄金林. 空肠弯曲菌细胞致死性肿胀毒素研究进展. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28 (10): 1048-1050.
- [4] Young KT, Davis LM, Dirita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5 (9): 665-79.
- [5] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [6] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994.
- [7] Jain D, Prasad KN, Sinha S, Husain N. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, 57 (Pt 3): 267-272.
- [8] Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol*, 2011, 2:200.
- [9] McCarthy N, Giesecke J. Incidence of Guillain-Barré syndrome following infection with *Campylobacter jejuni*. *American Journal of Epidemiology*, 2001, 153 (6): 610-614.
- [10] Hu Y, Shang Y, Huang J, Wang Y, Ren F, Jiao Y, Pan Z, Jiao XA. A novel immunoproteomics method for identifying in vivo-induced *Campylobacter jejuni* antigens using pre-adsorbed sera from infected patients. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1830 (11): 5229-5235.
- [11] Bang DD, Borck B, Nielsen EM, Scheutz F, Pedersen K, Madsen M. Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish turkeys by PCR and cytolethal distending toxin production of the isolates. *Journal of Food Protection*, 2004, 67 (10): 2171-2177.
- [12] Smits VA, Medema RH. Checking out the G (2) /M transition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1519 (1-2): 1-12.
- [13] Biswas D, Fernando U, Reiman C, Willson P, Potter A, Allan B. Effect of cytolethal distending toxin of *Campylobacter jejuni* on adhesion and internalization in cultured cells and in colonization of the chicken gut. *Avian Diseases*, 2006, 50 (4): 586-593.

- [14] Steele M, Gyles C, Chan VL, Odumeru J. Monoclonal antibodies specific for hippurate hydrolase of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, 2002, 40 (3) : 1080-1082.
- [15] Qian H, Pang E, Du Q, Chang J, Dong J, Toh SL, Ng FK, Tan AL, Kwang J. Production of a monoclonal antibody specific for the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* and characterization of the epitope. *Applied & Environmental Microbiology*, 2008, 74 (3) : 833-839.
- [16] Huang J, Yin Y, Mei D, Zhang G, Pan Z, Liu X, Jiao X. Preparation and characterization of monoclonal antibodies specific for FlaA protein of *Campylobacter jejuni*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (8) : 1109-1114. (in Chinese)
- 黄金林, 尹衍新, 梅德霞, 张弓, 潘志明, 刘秀梵, 焦新安. 空肠弯曲菌 FlaA 单克隆抗体的制备与鉴定. *微生物学报*, 2010, 50 (8) : 1109-1114.

Preparation and characterization of monoclonal antibodies against cytolethal distending toxin protein of *Campylobacter jejuni*

Lei Lu[#], Yuwei Shang[#], Fangzhe Ren, Nan Wang, Xin'an Jiao, Jinlin Huang^{*}

Jiangsu Key Laboratory of Zoonoses/Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To express *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin B protein (CdtB) in a prokaryote to prepare monoclonal antibodies (mAbs) against the protein, and to study their antitoxic effects. [Methods] The *C. jejuni* *cdtB* gene was amplified and inserted into the expression plasmids pET-30a(+) and pGEX-6p-1. The purified rGST-CdtB protein was used as the immunogen to screen hybridoma cells for mAbs against the protein. The mAb titers were determined with an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and their specificity with a Dot-ELISA and western blotting analysis. We determined the antitoxic properties of the mAbs in CaCo-2 and HD-11 cells. [Results] Recombinant expression plasmids pET-30a(+)-*cdtB* and pGEX-6p-1-*cdtB* were successfully constructed, and fusion proteins rHis-CdtB and rGST-CdtB expressed, respectively. Five hybridoma cell lines, designated 1F3, 1F5, 2E4, 2E11, and 2F2, were screened for the stable secretion of mAbs against CdtB. The immunoglobulin subclass of 2E11 was IgG2b and that of the other mAbs was IgG1. The mAb titers in the ascites fluids were 1:10⁸ on indirect ELISA. Dot-ELISA demonstrated that the five mAbs reacted specifically with *C. jejuni*. Western blotting analysis confirmed that the five mAbs reacted well with the rGST-CdtB fusion protein. The mAbs significantly reduced the adhesion and invasion capacities of the bacterium in CaCo-2 cells ($P < 0.01$). [Conclusion] The successful preparation of five mAbs specific for the CdtB protein will allow further study of the biological characteristics of CdtB and the pathogenesis of *C. jejuni*.

Keywords: CdtB protein, *Campylobacter jejuni*, monoclonal antibody

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31372449), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA101601) and by the National Key Technology RD Program (2014BAD13B02)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87991136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: jinlin@yzu.edu.cn

[#]These authors contributed equally to this work.

Received: 3 November 2013 / Revised: 19 January 2014