



分类号 S852

学 号 2020807156

南京农业大学

# 专业学位硕士学位论文

马链球菌兽疫亚种 SzM 蛋白可变区单克隆抗体制备及保  
护效果评价

宋浩帅

校内导师 马喆 教授

校外导师 李文良 研究员

学位类别 兽医硕士

专业领域

研究方向 动物疫病防控与检疫

答辩日期 二〇二二年五月

**Preparation and Protective Effect Evaluation of Monoclonal  
Antibody Against Variable Region of SzM Protein of  
*Streptococcus Equi* Ssp. *Zooepidemicus***

**By**

**SONG HAOSHUAI**

**A Thesis (Special Report)**

**Presented to Nanjing Agricultural University**

**in Partial Fulfillment of the Requirements**

**for the Master of Professional Degree**

**in Veterinary Medicine**

**Supervised by**

**Professor MA ZHE**

**Nanjing Agricultural University**

**Nanjing, China**

**May, 2022**

# 目 录

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 第一篇 文献综述 .....                          | 1  |
| 第一章 链球菌 M 蛋白家族的分子结构及功能研究进展 .....        | 1  |
| 1 M 蛋白的分子结构及功能 .....                    | 1  |
| 2 C 群链球菌类 M 蛋白的分子结构及功能 .....            | 3  |
| 参考文献 .....                              | 7  |
| 第二章 治疗性单克隆抗体技术的发展 .....                 | 13 |
| 1 杂交瘤细胞技术 .....                         | 13 |
| 2 重组抗体技术 .....                          | 14 |
| 3 单细胞抗体技术 .....                         | 15 |
| 参考文献 .....                              | 17 |
| 第二篇 研究内容 .....                          | 21 |
| 第三章 马链球菌兽疫亚种 SzM 可变区蛋白单克隆抗体的制备及鉴定 ..... | 21 |
| 1 材料与方法 .....                           | 22 |
| 2 结果 .....                              | 31 |
| 3 讨论 .....                              | 38 |
| 4 本章小结 .....                            | 40 |
| 参考文献 .....                              | 41 |
| 第四章 SzM 蛋白单克隆抗体的体外抗菌效果评价 .....          | 43 |
| 1 材料与方法 .....                           | 44 |
| 2 结果 .....                              | 47 |
| 3 讨论 .....                              | 49 |
| 4 本章小结 .....                            | 50 |
| 参考文献 .....                              | 51 |
| 第五章 SzM 蛋白单克隆抗体对小鼠感染 SEZ 的保护效果评价 .....  | 53 |
| 1 材料与方法 .....                           | 54 |
| 2 结果 .....                              | 56 |
| 3 讨论 .....                              | 60 |
| 4 本章小结 .....                            | 61 |
| 参考文献 .....                              | 63 |
| 全文总结 .....                              | 65 |

# 马链球菌兽疫亚种 SzM 蛋白可变区单克隆抗体制备及保护效果评价

## 摘要

马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus*, SEZ) 属兰氏分群 C 群链球菌, 是我国猪链球菌病的主要病原之一。SzM 蛋白是 SEZ 菌体表面的重要毒力因子, 其 C 端序列高度保守而 N 端序列高度变异, 导致不同 SEZ 菌株之间 SzM 蛋白同源性较低。但发生于 1976 年中国四川猪群 (分离株被 ATCC 收录编号为 ATCC35246) 和 2019-2020 年北美猪群 (分离株主要为 OH-71905、TN-74097) 的两次造成严重经济损失的 SEZ 暴发株之间 SzM 蛋白同源性达 100%, 表明即便是具有高变异特点 SzM 蛋白 N 端区域, 在猪群流行株中也具有一定保守性。研究表明虽然 SzM 蛋白可作为候选疫苗诱导机体产生调理性抗体, 但因疫苗免疫周期较长而增加猪场免疫负担。为了应对猪群未免疫或免疫不完全时暴发的 SEZ 感染, 需要一种可快速提供有效保护的生物制品。单克隆抗体特异性强、起效快, 一旦注入动物体内即可立即提供被动免疫保护, 尤其适用于感染后的紧急保护。实验室前期已获得针对 ATCC35246 菌株 SzM 蛋白 C 端恒定区的单克隆抗体, 为充分评价针对 SzM 蛋白不同区域的单克隆抗体的保护作用, 本研究对猪群流行株 ATCC35246 SzM 蛋白 N 端可变区的单克隆抗体进行制备, 并对 SzM 蛋白可变区和恒定区单克隆抗体进行特性鉴定, 体外抗菌效果和小鼠保护性效果评价, 旨在为防治猪群发生 SEZ 感染提供必要的生物材料和技术积累。

### 1. 马链球菌兽疫亚种 SzM 可变区蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

SzM 蛋白是马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus*, SEZ) 表面的重要毒力因子, 具有 N 端高度变异和 C 端高度保守的特点。本章以引起中国和北美猪链球菌病暴发的 SEZ 菌株特有的 SzM 蛋白 N 端可变区型为目标, 进行重组表达并制备单克隆抗体。经皮下多点免疫 BALB/c 小鼠后, 将血清效价最高小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合。经数次亚克隆后, 最终通过间接 ELISA 法筛选到 6 株分泌目标抗体的杂交瘤细胞株, 其分泌的抗体均属于 IgG1 亚类, 轻链为  $\kappa$  型。依据生长速率的差异选取其中增殖较快, 状态良好的 4 株杂交瘤细胞进行腹水制备并做进一步鉴定。Western Blot 显示 4 株腹水单克隆抗体与 SzM 蛋白可变区结合良好, 也可与截去信号肽的 SzM 蛋白反应; 间接免疫荧光观察发现其中 3 株腹水单克隆抗体可结合野生型 SEZ 菌体, 但与  $\Delta$ SzM 缺失株不反应。利用 SPR 技术对 3 株实验室前

期制备的抗 SzM 蛋白恒定区的单克隆抗体及本研究制备的 4 株单克隆抗体共同与 SzM 蛋白进行亲和力检测, 结果显示 7 株单克隆抗体的平衡解离常数在  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  M 之间, 亲和性良好。此外, 在抗体结合表位一致性的鉴定中, 发现抗 SzM 蛋白恒定区的 3 株单克隆抗体具有相同或相似的抗原结合表位, 而 4 株抗可变区的单克隆抗体识别表位具有多样性。依据上述结果, 后续实验将随机选取 1 株抗 SzM 蛋白恒定区单克隆抗体与本次纯化的 4 株抗 SzM 蛋白可变区单克隆抗体共同进行后续保护效果评价。

## 2. SzM 蛋白单克隆抗体的体外抗菌效果评价

靶向细菌表面蛋白的单克隆抗体抗菌作用主要通过凝集活性、补体激活和调理吞噬实现。本章对制备的 4 株 SzM 蛋白可变区单克隆抗体 (anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4) 和实验室前期保存的 1 株 SzM 蛋白恒定区单克隆抗体 (anti-cSzM-1) 的体外抗菌效果进行评价。通过抗体凝集细菌试验、介导补体杀菌试验及调理吞噬试验对这 5 株单克隆抗体的体外抗菌效果进行检测, 旨在明确其抗菌机制。抗体凝集细菌试验中, 当抗体作用浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时, 5 株单克隆抗体均不能使 ATCC35246 菌株凝集沉淀。抗体介导补体杀菌试验中, SEZ 与抗体先孵育 30 min 后再与补体共同作用 1 h, 5 株单克隆抗体及对照组 SzM 蛋白的多克隆抗体均未能激活补体裂解 SEZ, 细菌 CFU 无明显减少 ( $P > 0.05$ ); 在调理吞噬试验中, 5 株单克隆抗体均显著促进小鼠原代腹腔巨噬细胞对 ATCC35246 菌株的吞噬 ( $P < 0.05$ ), 其中 3 株 SzM 蛋白可变区单克隆抗体 (anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4) 的调理吞噬效果明显优于另外 2 株单克隆抗体 (anti-vSzM-1、anti-cSzM-1)。以上结果表明, 5 株单克隆抗体在体外均具有明显的调理吞噬活性, 但不具有凝集活性和介导补体杀菌功能。

## 3. SzM 蛋白单克隆抗体对小鼠感染 SEZ 的保护效果评价

在病原菌对传统抗生素耐药性逐渐增强的趋势下, 作为抗生素的潜在替代制品, 单克隆抗体在治疗细菌感染性疾病领域得到迅速发展。本章评价了 4 株 SzM 蛋白可变区单克隆抗体 (anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4) 和 1 株 SzM 蛋白恒定区单克隆抗体 (anti-cSzM-1) 对小鼠受到致死剂量 ( $2.4 \times 10^4$  CFU/只) SEZ 攻击的保护效果。根据单克隆抗体免疫时间点的不同, 共设计了三种抗体免疫模式: (1) 预防+治疗模式: 攻毒前 12 h、攻毒后 24 h、72 h 分别给予单克隆抗体 200  $\mu\text{g/只}$ , 三次免疫总量共 600  $\mu\text{g/只}$ ; (2) 预防模式: 攻毒前 12 h 一次性给予单克隆抗体 600  $\mu\text{g/只}$ ; (3) 治疗模式: 攻毒后 4 h 一次性给予单克隆抗体 600  $\mu\text{g/只}$ 。在预防+

治疗模式中 5 株单克隆抗体均表现出一定的保护效果，其中 4 株单克隆抗体（anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4、anti-cSzM-1）免疫小鼠的存活率达 100%，且有效清除了小鼠脏器中的 SEZ；另外 1 株单克隆抗体（anti-vSzM-1）免疫小鼠的存活率为 60%，且 2/3 存活小鼠各脏器中均可检出 SEZ。对于单克隆抗体预防模式和治疗模式的保护效果评价，本章选取调理吞噬作用相对较强的 SzM 可变区单克隆抗体（anti-vSzM-3）为代表和恒定区单克隆抗体（anti-cSzM-1）分别进行。在治疗模式中 anti-vSzM-3 表现出显著的保护效果，攻毒 7 天后小鼠存活率为 80%，且存活小鼠各脏器均未检出 SEZ；而 anti-cSzM-1 免疫组小鼠全部死亡，与 PBS 组相比虽在一定程度上延长了小鼠存活时间，但未表现出显著性差异（ $P>0.05$ ）。在预防模式中 anti-vSzM-3 免疫组攻毒 7 天后小鼠存活率达 100%且存活小鼠各脏器 SEZ 被完全清除；而 anti-cSzM-1 免疫组小鼠存活率为 60%，且 2/3 存活小鼠各脏器中仍可检出 SEZ。综合上述结果可知，在对抗 ATCC35246 菌株感染方面，针对 SzM 蛋白可变区的单克隆抗体（anti-vSzM-3）在三种免疫模式下均表现出良好保护效果，而针对 SzM 蛋白恒定区的单克隆抗体（anti-cSzM-1）在治疗模式下保护效果不佳，只有在预防+治疗模式和预防模式中表现出一定的保护作用，但依据小鼠存活率及各脏器细菌载量，其保护效果要弱于可变区单克隆抗体（anti-vSzM-3）。以上结果表明，本研究成功获得了可保护小鼠抵抗致死剂量 SEZ 攻击的单克隆抗体，在抗体免疫方式上，明确了 SzM 蛋白恒定区单克隆抗体（anti-cSzM-1）以预防+治疗的模式免疫可取得最佳保护效果，但保护作用较强的 SzM 蛋白可变区单克隆抗体（anti-vSzM-3）则可直接用于单一预防或治疗模式而获得优秀的保护效果。

**关键词：**马链球菌兽疫亚种；SzM；单克隆抗体；免疫保护

# **PREPARATION AND PROTECTIVE EFFECT EVALUATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST VARIABLE REGION OF SZM PROTEIN OF *STREPTOCOCCUS EQUI* SSP. *ZOOEPIDEMICUS***

## **ABSTRACT**

*Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus* (SEZ) belongs to Lancefield Group C streptococcus, which is one of the main pathogens of swine Streptococcus disease in China. SzM protein is an important virulence factor on the surface of SEZ, and its C-terminal sequence is highly conserved while N-terminal sequence is highly variable, resulting in low homology of SzM protein between different SEZ strains. However, the SzM protein homology of SEZ from Sichuan, China in 1976 and North American in 2019-2020 reached 100%, indicating that even though the N-terminal region of SzM protein is highly variable, it is conserved to a certain extent in the SEZ species prevalent in pigs. Many studies have shown that SzM protein can be used as a candidate vaccine to induce the production of opsonizing antibody, but the long process of immunization will increase the immune burden on pig farms. In order to deal with outbreak of SEZ when swine herds are not immunized or inadequately immunized, a biological product that can provide rapid and effective protection is needed. Monoclonal antibody has the characteristics of strong specificity and quick action. Once injected into animals, it can immediately provide passive immune protection, especially suitable for emergency protection after infection. Our laboratory has previously obtained monoclonal antibody against the conserved C-terminal region of SzM of ATCC35246. In order to fully evaluate the protective effect of monoclonal antibodies against different regions of SzM protein, this study prepared monoclonal antibody against the variable N-terminal region of ATCC35246 SzM protein of swine epidemic strain. In addition, the characteristics of monoclonal antibodies against the variable and conserved regions of SzM protein were identified, and the antibacterial effect in vitro and protective effect in mice were evaluated, aiming to provide necessary biological materials and technology for the prevention and treatment of SEZ infection in swine.

## 1. Preparation and identification of monoclonal antibody against the variable region of SzM protein from *Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus*

SzM protein is an important virulence factor on the surface of *Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus* (SEZ), which is characterized by highly variable N-terminal and highly conserved C-terminal. In this chapter, the variable region of SzM protein from SEZ strain causing streptococcus suis outbreaks in China and North America was targeted for recombinant expression and preparation of monoclonal antibodies against it. The spleen cells of BALB/c mice with the highest serum titer were fused with myeloma cells. After several subclones, 6 hybridoma cell lines secreting target antibodies were screened by indirect ELISA. The antibodies secreted by hybridoma cell lines all belonged to IgG1 subclass, and the light chain was  $\kappa$  type. According to the difference of growth rate, 4 hybridoma cells with rapid proliferation and good condition were selected for ascites preparation and further identification. Western Blot showed that 4 monoclonal antibodies in ascites could bind well to the variable region of SzM protein and also react with SzM protein with truncated signal peptide. Indirect immunofluorescence showed that 3 monoclonal antibodies ascites could bind wild-type SEZ strain, but did not react with SzM deletion strain. SPR technology was used to detect the affinity of SzM protein and 3 monoclonal antibodies against the conserved region of SzM protein prepared earlier in the laboratory and 4 monoclonal antibodies prepared in this study respectively. The results showed that the equilibrium dissociation constant of the 7 monoclonal antibodies was between  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  M, showing a good affinity. In addition, in the identification test of the consistency of antibody binding epitopes, it was found that 3 monoclonal antibodies against the conserved region of SzM protein had the same or similar binding epitope, while 4 monoclonal antibodies against the variable region had diversity in recognition epitopes. Based on the above results, 1 monoclonal antibody against the conserved region of SzM protein and 4 monoclonal antibodies against the variable region of SzM protein were selected in the subsequent experiments to evaluate the protective effect.

## 2. Evaluation of antibacterial effect of monoclonal antibody against SzM protein in vitro

The antimicrobial action of monoclonal antibodies targeting bacterial surface protein is mainly achieved through agglutination activity, complement activation and opsonophagocytosis. In this chapter, 4 monoclonal antibodies to variable region of SzM protein (anti-vSzM-1, anti-vSzM-2, anti-vSzM-3, anti-vSzM-4) and 1 monoclonal antibody to conserved region of SzM protein (anti-cSzM-1) preserved in the laboratory were evaluated

for their antibacterial effect in vitro. In order to clarify their antibacterial mechanism, the antibacterial effect of these 5 monoclonal antibodies were detected in vitro by antibody agglutination bacteria test, complement-mediated bactericidal test and opsonophagocytic test. In the agglutination test, the 5 monoclonal antibodies could not agglutinate ATCC35246 at the concentration of 200 µg/mL. In the antibody mediated complement sterilization test, SEZ and antibody were incubated for 30 min and then acted together with complement for 1 h. The 5 monoclonal antibodies and the polyclonal antibodies of SzM protein as the control could not activate complement lysis SEZ, and the bacterial CFU did not decrease significantly ( $P > 0.05$ ). In opsonophagocytosis test, all the 5 monoclonal antibodies significantly promoted the phagocytosis of mouse primary peritoneal macrophages against ATCC35246 strain ( $P < 0.05$ ). The opsonophagocytosis effect of 3 monoclonal antibodies against variable region of SzM protein (anti-vSzM-2, anti-vSzM-3, anti-vSzM-4) were significantly better than the other two monoclonal antibodies (anti-vSzM-1, anti-cSzM-1). These results indicated that all the monoclonal antibodies had obvious opsonophagocytosis activity in vitro, but did not have agglutination activity and complement bactericidal mediating function.

### **3. Evaluation of the protective effect of anti-SzM protein monoclonal antibody against SEZ infection in mice**

As a potential substitute for antibiotics, monoclonal antibody has developed rapidly in the field of treating bacterial infectious diseases due to the increasing resistance of pathogens to traditional antibiotics. In this chapter, 4 anti-SzM protein variable region monoclonal antibodies (anti-vSzM-1, anti-vSzM-2, anti-vSzM-3, anti-vSzM-4) and 1 anti-cSzM protein conserved region monoclonal antibody (anti-cSzM-1) were evaluated the protective effect on mice challenged with a lethal dose ( $2.4 \times 10^4$  CFU/mouse) of SEZ. According to the different time of monoclonal antibody immunization, there were three immune programs were designed: (1) prevention+treatment program: 12 h before challenge, 24 h and 72 h after challenge, each mouse was given monoclonal antibody 200 µg, with a total of 600 µg for three times; (2) Prevention program: 12 h before challenge, each mouse was given monoclonal antibody 600 µg at one time; (3) Treatment program: 4 h after challenge, each mouse was given monoclonal antibody 600 µg at one time. In the prevention and treatment program, all the 5 monoclonal antibodies showed certain protective effect, among which 4 monoclonal antibodies (anti-vSzM-2, anti-vSzM-3, anti-vSzM-4 and anti-cSzM-1) had 100%

survival rate and effectively cleared SEZ in various organs of mice. In addition, the survival rate of 1 monoclonal antibody (anti-vSzM-1) group was 60%, and SEZ could be detected in all organs in 2/3 of the surviving mice. For the evaluation of the protective effect of monoclonal antibodies in prevention program or treatment program, this chapter selects the anti-SzM variable region monoclonal antibody (anti-vSzM-3) with relatively strong opsonophagocytosis as the representative and the anti-SzM conserved region monoclonal antibody (anti-cSzM-1) were performed separately. In the treatment program, anti-vSzM-3 showed significant protective effect, the survival rate of mice was 80% after 7 days of challenge, and SEZ was not detected in all organs of the surviving mice. However, all mice in the anti-cSzM-1 group died after 7 days of challenge, although the survival time of mice in the anti-cSzM-1 group was prolonged to some extent compared with that in the PBS group, there was no significant difference ( $P > 0.05$ ). In the prevention program, the survival rate of mice in the anti-vSzM-3 group was 100% after 7 days of challenge, and SEZ was completely eliminated in all organs of the surviving mice, while the survival rate of mice in the anti-cSzM-1 group was 60%, and SEZ could still be detected in 2/3 surviving mice. In conclusion, monoclonal antibody(anti-vSzM-3) against variable region of SzM protein showed good protective effect against ATCC35246 strain infection in all three immune programs; Monoclonal antibody(anti-cSzM-1) against conserved region of SzM protein showed poor protective effect in the treatment program, and only showed certain protective effect in the prevention + treatment program or prevention program, however, according to the survival rate and bacterial load of each organ, its protective effect was weaker than that of monoclonal antibody (anti-vSzM-3) against the variable region. These results indicated that the monoclonal antibodies that could help mice resist lethal dose of SEZ attack were successfully obtained in this study. In terms of antibody immunization, it was clear that the anti-SzM protein conserved region monoclonal antibody could achieve the best protection effect in the prevention+treatment program. However, the anti-SzM protein variable region monoclonal antibody with stronger protection could be directly used in prevention or treatment program, and excellent protective effect could be obtained.

**KEY WORDS:** SEZ; SzM; monoclonal antibody; immune protection

## 缩略语中英文对照

| 符号   | 外文名称                                                | 中文名称            |
|------|-----------------------------------------------------|-----------------|
| CFU  | Colony forming units                                | 菌落形成单位          |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole                       | 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 |
| GAS  | Group A Streptococcus                               | A 群链球菌          |
| IPTG | Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside              | 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷  |
| MAC  | Membrane attack complex                             | 攻膜复合物           |
| PBS  | Phosphate buffer saline                             | 磷酸盐缓冲溶液         |
| SPF  | Specific pathogen free                              | 无特定病原体          |
| SEZ  | <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> | 马链球菌兽疫亚种        |
| THB  | Todd-Hewitt base                                    | 链球菌培养基          |
| Δ    | deletion                                            | 缺失              |

## 本研究目的意义

猪链球菌病长期威胁着我国养猪业发展，随着集约化养殖程度逐步提高，猪群饲养密度集中，一旦暴发传染性疾病，将会对养殖业造成严重危害。马链球菌兽疫亚种（*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*, SEZ）是引起猪链球菌病的主要病原之一，可导致猪败血症，脑膜炎，心内膜炎等疾病，严重时可致宿主死亡。1976 年我国四川暴发了由 SEZ 感染引发的猪链球菌病，造成上百万头猪发病，30 多万头猪死亡。近几年北美报道多起由 SEZ 引起的以急性死亡为特征的高死亡率猪链球菌病，提示对于 SEZ 的防治仍不可掉以轻心。

抗生素作为预防和治疗细菌性疾病的首选，多年来已在动物养殖中广泛使用，对于猪链球菌病的预防和治疗起到重要作用，但同时抗生素的过度使用会导致细菌耐药性增强。随着我国逐渐收紧的抗生素使用政策，亟需开发能有效替代抗生素的抗菌制品。疫苗已成为热门研究内容，接种疫苗可一定程度上预防 SEZ 引起的猪链球菌病，然而目前商品化的疫苗以灭活苗和弱毒活菌苗为主，灭活苗免疫原性较差，需大量接种才能有效的刺激机体免疫系统，并且会导致不良反应；而弱毒活菌苗存在毒力返强的安全隐患。除此之外，以 SEZ 表面抗原 SzP、SzM 蛋白等制备的亚单位疫苗虽在小鼠层面具有保护效果，但尚未有商品化产品推出。此外，以疫苗为代表的主动免疫具有免疫周期长的特点，猪群在未免疫或免疫不完全的情况下一旦暴发 SEZ 感染，则无法立即产生有效的保护。因此，针对猪群暴发 SEZ 感染开发出一种起效快，副反应小且无细菌耐药性的治疗措施就显得尤为重要。

单克隆抗体特异性强，起效快，注入机体内可立即提供被动免疫保护效果，特别适用于感染发生后的紧急保护，具有极高的预防和治疗价值。此外，由于 SEZ 还可感染马、牛、羊等经济价值较高的动物，值得使用单克隆抗体对动物个体进行治疗，具有良好的开发价值和市场前景。

本研究成功制备了针对 SEZ 表面重要毒力因子 SzM 蛋白可变区的单克隆抗体，并将它与实验室前期保存的针对 SzM 蛋白恒定区单克隆抗体进行了体外抗菌活性评价以及小鼠保护性试验。最终明确了无论是针对 SzM 蛋白可变区还是恒定区的单克隆抗体，在体外均具有良好的调理吞噬活性，同时均能在一定程度上预防小鼠感染 SEZ，且针对 SzM 蛋白可变区的单克隆抗体对小鼠感染 SEZ 后发挥了良好的治疗效果。以上结果表明本研究获得了具有良好保护效果的抗 SEZ 感染的单克隆抗体，不仅为替代抗生素的抗猪链球菌病生物制品开发提供了借鉴，还为后续通过基因工程手段进一步优化针对 SEZ 的单克隆抗体提供了必要的生物材料和重要的技术积累。

## 第一篇 文献综述

### 第一章 链球菌 M 蛋白家族的分子结构及功能研究进展

A 群链球菌 (Group A Streptococcus, GAS) (主要指化脓链球菌) 是一种全球广泛传播的革兰氏阳性病原菌, 可引起多种疾病, 如咽炎、皮肤感染、链球菌中毒性休克综合征以及一些自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。M 蛋白是 A 群链球菌表面的重要毒力因子, 呈  $\alpha$  螺旋卷曲结构锚定于细菌表面<sup>[2]</sup>, 可与多种宿主蛋白相互作用而帮助细菌抵抗宿主先天性免疫与获得性免疫的清除作用, 是 A 群链球菌疫苗开发的重要靶点<sup>[3]</sup>。

马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*, SEZ) 和马链球菌马亚种 (*Streptococcus equi* ssp. *equi*, SEE) 属 C 群链球菌。马链球菌马亚种具有宿主专一性, 只引起马属动物发病, 感染后症状主要为发热、咽炎、淋巴结肿大、化脓, 严重时可能造成死亡<sup>[4]</sup>。一般认为马亚种是由兽疫亚种菌株进化而来<sup>[5, 6]</sup>。马链球菌兽疫亚种具有多宿主性, 可造成多种动物感染<sup>[7-11]</sup>, 也是一种人畜共患病原菌<sup>[12]</sup>。在我国, SEZ 是猪链球菌病的主要病原之一, 可引起败血症、脑膜炎、心内膜炎以及关节炎等<sup>[13]</sup>。1976 年秋季, 我国四川省有近百万头猪发病, 死亡 30 余万头, 分离菌株命名为 ATCC35246。2019 年-2020 年, 北美多地暴发由 ATCC35246 的高度同源株 (同源性 99.7%) 引起的以高死亡率 (30%-50%) 为特征的猪链球菌病<sup>[14]</sup>。

在 SEZ 与 SEE 菌体表面存在一类结构、功能和 A 群链球菌 M 蛋白相似的纤维状蛋白, 称为类 M 蛋白, 它是一类蛋白的统称, 主要包括有 SzP 蛋白、SeM 蛋白、SzM 蛋白, 它们均具有抗吞噬作用, 且与 SEZ、SEE 致病性密切相关。其中 SzM 蛋白发现较晚, 与 SeM 蛋白具有一定同源性<sup>[15]</sup>。在 SEZ、SEE 菌体表面均有 SzP 蛋白存在, 但 SeM 蛋白只存在于 SEE 菌体表面, SzM 蛋白只存在于 SEZ 菌体表面。

#### 1 M 蛋白的分子结构及功能

1928 年, Lancefield 发现 GAS 中有一种可通过热酸法提取, 并能和抗 GAS 细菌血清发生反应的物质<sup>[16]</sup>, 早期实验认为该物质与细菌菌落形态相关, 因此以英文单词 Morphology 的首字母命名为 M 蛋白<sup>[17]</sup>, M 蛋白具有典型的结构特点, 主要包括信号肽、可变的 N 端区域、保守的 C 端区域以及细胞壁锚定 (LPXTG) 序列。

M 蛋白由两条多肽链聚合而成, 呈  $\alpha$  螺旋卷曲结构, 从细胞壁向外延伸约 500Å, 其羧基端 (C 端) 锚定于细菌表面, 氨基端 (N 端) 游离<sup>[18]</sup>。M 蛋白从 N 端到 C 端在结构上可分为 A、B、C、D 4 个重复区。A 重复区指成熟 M 蛋白 N 端前 50 个氨基

酸所在区域, B 重复区指从第 51 个氨基酸残基到 C 重复区开始的序列区域, C 重复序列由高度保守的 35 个氨基酸基序的同源性来定义。

根据特异性抗体能否与 C 重复区发生反应, M 蛋白可分为结合类(classI)与不结合类(classII)<sup>[19]</sup>。这一分类法与依靠链球菌的血清不透明因子(sof)的分类方法具有很强的相关性<sup>[20]</sup>。可将属于 classI/sof 的 M 蛋白划分为 A、B、C、D 四种类型<sup>[21]</sup>。值得注意的是, 具有 A、B、C 这三种类型 M 蛋白的菌株主要与咽部感染有关, D 型菌株主要与皮肤感染有关<sup>[22]</sup>。属于 classII/sof<sup>+</sup> 的 M 蛋白被分为 E 型, 与皮肤和咽喉感染均有关。目前被广泛研究的是 A-C 型菌株的 M 蛋白(如 M1、M3、M5、M6、M12 型), 这些菌株多与危及生命的感染有关, 即使它们只占分型菌株的 20%<sup>[23]</sup>。

在不同类型 M 蛋白之间, A 重复区与 B 重复区的大小和数量都有所差异。A-C 型菌株中, A 重复区出现频率为 50%, 而在 D 和 E 型中 A 重复区的出现频率分别为 33%和 30%。对于 B 重复区来说, 在 A-C 型、D 型和 E 型的 M 蛋白中出现的频率分别为 57%、51%和 15%。而 C 重复区在所有类型 M 蛋白上均存在, 但重复序列的数量从 1 个到 5 个不等, 其中 90%的 M 蛋白类型包含 3 个重复序列, 且这三个重复序列同源性从 C1 到 C3 不断增加。C3 序列同源性在不同类型 M 之间可达 85%以上, 但 A、B 重复序列却很少具有广泛的同源性<sup>[24]</sup>。

从整体结构来看, M 蛋白 C 端区域高度保守, N 端部分具有高度变异性, 尤其是靠近 N 端的 50 个氨基酸序列在不同 M 蛋白之间是高度可变的, 称作超变区(Hypervariable region, HVR), 可据此对 M 蛋白进行分型<sup>[25, 26]</sup>, 目前已有超过 200 种类型的 M 蛋白被定义<sup>[24]</sup>。

M 蛋白的表达对 GAS 的毒力作用至关重要, 缺失 M 蛋白后, GAS 毒力可显著下降<sup>[27]</sup>。M 蛋白具有多种生物学功能, 可介导 GAS 黏附和内化到宿主细胞中<sup>[28-30]</sup>。此外也可与多种宿主因子结合而抵抗宿主免疫系统的清除, 如与 H 因子、C4b 结合蛋白(C4BP)结合而主动抑制补体激活<sup>[31, 32]</sup>, 此外也可分别通过 B 重复区、C 重复区与纤维蛋白原和白蛋白作用而减少补体沉积并阻碍调理性抗体与菌体的结合<sup>[32-36]</sup>。

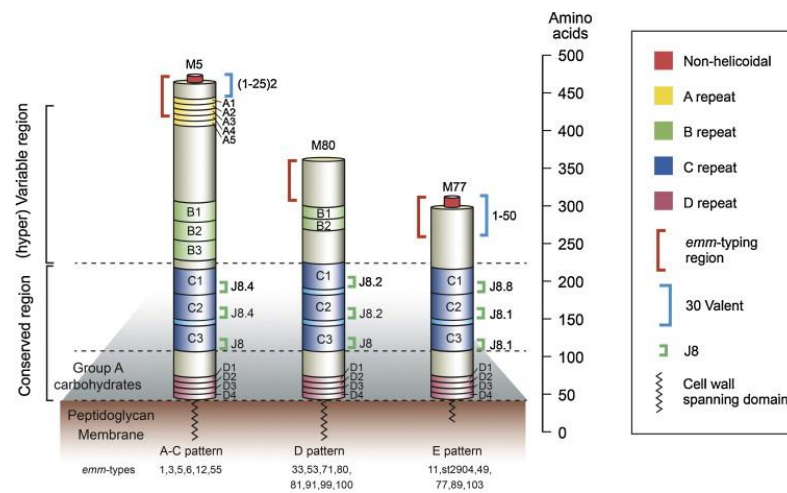
图 1-1 A 群链球菌 M 蛋白结构示意图<sup>[37]</sup>

Fig 1-1 Structure of Group A Streptococcus M protein

## 2 C 群链球菌类 M 蛋白的分子结构及功能

### 2.1 SzP 蛋白

SzP 蛋白在马链球菌兽疫亚种与马亚种菌体表面均有所表达，是一种重要的表面毒力蛋白，对马源 SEZ 分离株 W60 的 SzP 基因分析可知，该基因编码 376 个氨基酸残基，含有一个 1128bp 的开放阅读框，蛋白分子量约 40 kD<sup>[38]</sup>。SzP 蛋白 C 端富含脯氨酸，包含有跨膜区、锚定区以及细胞壁锚定（LPXTG）基序，N 端具有信号肽。SzP 蛋白与 A 群链球菌的 M 蛋白结构类似，但它由两个可变的 N 端、至少 5 个可变的中心区域和不同数量的 PEPK（脯氨酸-谷氨酸-脯氨酸-赖氨酸）的 C 末端重复序列构成<sup>[39]</sup>，并不具有 M 蛋白的 A、B、C 重复区结构<sup>[40]</sup>。不同 SzP 蛋白 N 端序列差异较大，其超变区位于 N 端信号肽后的 70 位氨基酸，比 M 蛋白的超变区（N 端后 50 位氨基酸）距离信号肽序列要远<sup>[39]</sup>。

不同 SEZ 菌株之间 SzP 蛋白表现出很大的抗原变异性，猪源分离株 ATCC35246 的 SzP 基因与马源分离株 W60 的 SzP 基因同源性的为 86.9%，而与 A 群链球菌 M 蛋白同源性的为 29.4%<sup>[40]</sup>。与 M 蛋白类似，可根据 SzP 可变区蛋白序列的差异对 SEZ 进行分型<sup>[41]</sup>。对 2019 年-2020 年暴发于北美的猪源 SEZ 进行鉴定，根据 SzP 基因可知其属于 VI 型<sup>[42]</sup>。

SzP 蛋白有助于 SEZ 黏附宿主细胞，并具有抗吞噬作用<sup>[40, 43]</sup>。当 SEZ 敲除 SzP 蛋白后，毒力可下降 1000 倍<sup>[44]</sup>。同时 SzP 蛋白可刺激机体产生保护性抗体，小鼠免疫 SzP 蛋白后，可免受 SEZ 致死剂量的攻击<sup>[38]</sup>。

## 2.2 SeM 蛋白

SeM 蛋白是一种 58 kD 的细胞壁锚定蛋白，N 末端具有信号肽，紧随信号肽的是一段纤维蛋白原结合区域，在 C 端具有跨膜区、锚定区以及胞壁锚定（LPXTG）基序。与 SzP 蛋白不同，SeM 蛋白在中心重复区具有 A、B 重复区结构。由于 SeM 的 N 端高度可变，能够区分不同的 SEE 菌株，可用作 SEE 菌株的分型，并可很好的反映菌株流行动态<sup>[45, 46]</sup>。而利用 MLST 等传统的基因分型技术对 SEE 进行比对时发现临床分离株具有高度同源性，无法达到基因分型的目的<sup>[5]</sup>。

SeM 蛋白是 SEE 的重要毒力因子和保护性抗原，可结合纤维蛋白原并抑制补体 C3b 在细菌表面的沉积，从而产生类似于 A 群链球菌 M 蛋白的抗吞噬作用<sup>[47, 48]</sup>。小鼠免疫 SeM 蛋白后，可抵抗致死剂量 SEE 的攻击<sup>[49]</sup>。针对 SeM 蛋白的抗血清在体外具有良好的调理作用<sup>[43]</sup>。

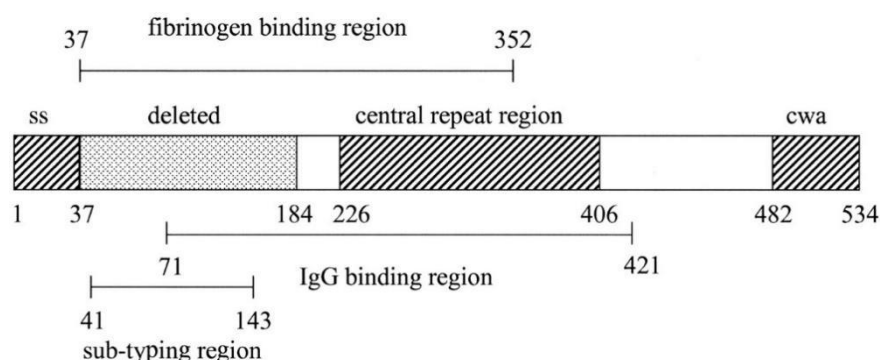


图 1-2 马链球菌马亚种 SeM 蛋白结构示意图<sup>[50]</sup>

Fig 1-2 Structure of the SeM protein of *Streptococcus equi* ssp. *equi*

## 2.3 SzM 蛋白

早期发现属于 C 群链球菌的马链球菌马亚种与马链球菌兽疫亚种都具有耐热耐酸的类 M 蛋白，但针对 SEE 的 SeM 蛋白抗血清并不与 SEZ 的热酸提取物发生反应，表明 SEZ 不表达 SeM 蛋白，而表达另一种类 M 蛋白<sup>[43]</sup>。2009 年通过比较马亚种 4047 菌株与兽疫亚种 H70 菌株的全基因组发现了 SeM 的同源基因 SzM<sup>[15]</sup>。但 SEE 的 SeM 蛋白与马源、人源 SEZ 的 SzM 序列同源性并不高，处于 26%-50% 之间<sup>[51]</sup>。

SzM 蛋白 N 端游离，C 端锚定于细胞壁上，具有 LPXTG 基序。C 端区域氨基酸序列高度保守，而 N 端区域具有高度变异性，与 SeM 蛋白类似，SzM 蛋白具有 A、B 重复区<sup>[52]</sup>。来自于马源、猪源 SEZ 分离菌株的 SzM 蛋白同源性在 19.66%-54.66%<sup>[52]</sup>，相似的，暴发于犬猫之间 SEZ 菌株的 SzM 蛋白同源性在 23.92%-57.37%<sup>[53]</sup>。由于 SzM 具有多种类型，因此只接种一类 SzM 蛋白疫苗可能无法保护不同菌株的攻击<sup>[54]</sup>。

SzM 蛋白是 SEZ 的重要毒力因子，可结合纤维蛋白原从而抑制吞噬细胞的吞噬作用，对 SEZ 在人和动物血液中存活至关重要，在 SzM 蛋白表达降低后，SEZ 毒力高度减弱<sup>[51, 55, 56]</sup>。

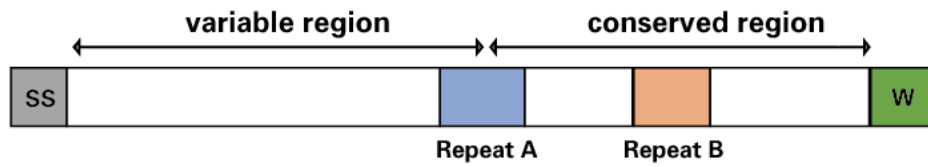


图 1-3 马链球菌兽疫亚种 ATCC35246 SzM 蛋白结构示意图

Fig 1-3 Structure of the SzM protein of SEZ ATCC35246



## 参考文献

- [1] Arvind B, Ramakrishnan S. Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease in Children [J]. Indian J Pediatr, 2020,87(4):305-311.
- [2] McNamara C, Zinkernagel AS, Macheboeuf P, Cunningham MW, Nizet V, Ghosh P. Coiled-coil irregularities and instabilities in group A *Streptococcus* M1 are required for virulence [J]. Science, 2008,319(5868):1405-1408.
- [3] Zaman M, Abdel-Aal AB, Fujita Y, Phillipps KS, Batzloff MR, Good MF, Toth I. Immunological evaluation of lipopeptide group A *Streptococcus* (GAS) vaccine: structure-activity relationship [J]. PLoS One, 2012,7(1):e30146.
- [4] Tscheschlok L, Venner M, Steward K, Böse R, Riihimäki M, Pringle J. Decreased Clinical Severity of Strangles in Weanlings Associated with Restricted Seroconversion to Optimized *Streptococcus equi* ssp *equi* Assays [J]. J Vet Intern Med, 2018,32(1):459-464.
- [5] Webb K, Jolley KA, Mitchell Z, Robinson C, Newton JR, Maiden MCJ, Waller A. Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group [J]. Microbiology (Reading), 2008,154(Pt 10):3016-3024.
- [6] Jorm LR, Love DN, Bailey GD, McKay GM, Briscoe DA. Genetic structure of populations of beta-haemolytic Lancefield group C streptococci from horses and their association with disease [J]. Res Vet Sci, 1994,57(3):292-299.
- [7] Beres SB, Sesso R, Pinto SW, Hoe NP, Porcella SF, Deleo FR, Musser JM. Genome sequence of a Lancefield group C *Streptococcus zooepidemicus* strain causing epidemic nephritis: new information about an old disease [J]. PLoS One, 2008,3(8):e3026.
- [8] Las Heras A, Vela AI, Fernández E, Legaz E, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [J]. J Clin Microbiol, 2002,40(3):1106-1108.
- [9] Pesavento PA, Hurley KF, Bannasch MJ, Artiushin S, Timoney JF. A clonal outbreak of acute fatal hemorrhagic pneumonia in intensively housed (shelter) dogs caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [J]. Vet Pathol, 2008,45(1):51-53.
- [10] Blum S, Elad D, Zukin N, Lysnyansky I, Weisblith L, Perl S, Netanel O, David D. Outbreak of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections in cats [J]. Vet Microbiol, 2010,144(1-2):236-239.
- [11] Gruszynski K, Young A, Levine SJ, Garvin JP, Brown S, Turner L, Fritzinger A, Gertz RE, Jr., Murphy JM, Vogt M, Beall B. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections associated with

- guinea pigs [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015,21(1):156-158.
- [12] Pelkonen S, Lindahl SB, Suomala P, Karhukorpi J, Vuorinen S, Koivula I, Väisänen T, Pentikäinen J, Autio T, Tuuminen T. Transmission of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection from horses to humans [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013,19(7):1041-1048.
- [13] Soedarmanto I, Pasaribu FH, Wibawan IW, Lämmle C. Identification and molecular characterization of serological group C streptococci isolated from diseased pigs and monkeys in Indonesia [J]. *J Clin Microbiol*, 1996,34(9):2201-2204.
- [14] Jensen A, Kilian M. Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies, and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes* [J]. *J. Clin. Microbiol*, 2012,50(1):113-126.
- [15] Holden MT, Heather Z, Paillot R, Steward KF, Webb K, Ainslie F, Jourdan T, Bason NC, Holroyd NE, Mungall K, Quail MA, Sanders M, Simmonds M, Willey D, Brooks K, Aanensen DM, Spratt BG, Jolley KA, Maiden MC, Kehoe M, Chanter N, Bentley SD, Robinson C, Maskell DJ, Parkhill J, Waller AS. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens [J]. *PLoS Pathog*, 2009,5(3):e1000346.
- [16] Lancefield RC. The antigenic complex of streptococcus haemolyticus : Demonstration of a type-specific substance in extracts of streptococcus haemolyticus [J]. *J Exp Med*, 1928,47(1):91-103.
- [17] Wessels MR. Capsular Polysaccharide of Group A *Streptococcus* [J]. *Microbiol Spectr*, 2019,7(1).
- [18] Swanson J, McCarty M. Electron microscopic studies on opaque colony variants of group A Streptococci [J]. *J. Bacteriol*, 1969,100(1):505-511.
- [19] Bessen D, Jones KF, Fischetti VA. Evidence for two distinct classes of streptococcal M protein and their relationship to rheumatic fever [J]. *J Exp Med*, 1989,169(1):269-283.
- [20] Henningham A, Barnett TC, Maamary PG, Walker MJ. Pathogenesis of group A streptococcal infections [J]. *Discov Med*, 2012,13(72):329-342.
- [21] Bessen DE, Fiorentino TR, Hollingshead SK. Molecular markers for throat and skin isolates of group A streptococci [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1997,418:537-543.
- [22] Smeesters PR, Vergison A, Campos D, de Aguiar E, Miendje Deyi VY, Van Melderren L. Differences between Belgian and Brazilian group A *Streptococcus* epidemiologic landscape [J]. *PLoS One*, 2006,1(1):e10.
- [23] Smeesters PR, Mardulyn P, Vergison A, Leplae R, Van Melderren L. Genetic diversity of Group A *Streptococcus* M protein: implications for typing and vaccine development [J]. *Vaccine*, 2008,26(46):5835-5842.
- [24] McMillan DJ, Drèze PA, Vu T, Bessen DE, Guglielmini J, Steer AC, Carapetis JR, Van Melderren

- L, Sriprakash KS, Smeesters PR. Updated model of group A *Streptococcus* M proteins based on a comprehensive worldwide study [J]. Clin Microbiol Infect, 2013,19(5):E222-229.
- [25] Mills JO, Ghosh P. Nonimmune antibody interactions of Group A *Streptococcus* M and M-like proteins [J]. PLoS Pathog, 2021,17(2):e1009248.
- [26] Jones KF, Manjula BN, Johnston KH, Hollingshead SK, Scott JR, Fischetti VA. Location of variable and conserved epitopes among the multiple serotypes of streptococcal M protein [J]. J Exp Med, 1985,161(3):623-628.
- [27] Lancefield RC. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci [J]. J Immunol, 1962,89:307-313.
- [28] Okada N, Pentland AP, Falk P, Caparon MG. M protein and protein F act as important determinants of cell-specific tropism of *Streptococcus pyogenes* in skin tissue [J]. J Clin Invest, 1994,94(3):965-977.
- [29] Wang JR, Stinson MW. M protein mediates streptococcal adhesion to HEp-2 cells [J]. Infect Immun, 1994,62(2):442-448.
- [30] Ochel A, Rohde M, Chhatwal GS, Talay SR. The M1 protein of *Streptococcus pyogenes* triggers an innate uptake mechanism into polarized human endothelial cells [J]. J Innate Immun, 2014,6(5):585-596.
- [31] Berggård K, Johnsson E, Morfeldt E, Persson J, Stalhammar-Carlemalm M, Lindahl G. Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in *Streptococcus pyogenes* [J]. Mol Microbiol, 2001,42(2):539-551.
- [32] Sandin C, Carlsson F, Lindahl G. Binding of human plasma proteins to *Streptococcus pyogenes* M protein determines the location of opsonic and non-opsonic epitopes [J]. Mol Microbiol, 2006, 59(1):20-30.
- [33] Whitnack E, Beachey EH. Inhibition of complement-mediated opsonization and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* by D fragments of fibrinogen and fibrin bound to cell surface M protein [J]. J Exp Med, 1985,162(6):1983-1997.
- [34] Ringdahl U, Svensson HG, Kotarsky H, Gustafsson M, Weineisen M, Sjöbring U. A role for the fibrinogen-binding regions of streptococcal M proteins in phagocytosis resistance [J]. Mol Microbiol, 2000,37(6):1318-1326.
- [35] Carlsson F, Sandin C, Lindahl G. Human fibrinogen bound to *Streptococcus pyogenes* M protein inhibits complement deposition via the classical pathway [J]. Mol Microbiol, 2005,56(1):28-39.
- [36] Macheboeuf P, Buffalo C, Fu CY, Zinkernagel AS, Cole JN, Johnson JE, Nizet V, Ghosh P. Streptococcal M1 protein constructs a pathological host fibrinogen network [J]. Nature,

- 2011,472(7341):64-68.
- [37] Moreland NJ, Waddington CS, Williamson DA, Sriskandan S, Smeesters PR, Proft T, Steer AC, Walker MJ, Baker EN, Baker MG, Lennon D, Dunbar R, Carapetis J, Fraser JD. Working towards a group A streptococcal vaccine: report of a collaborative Trans-Tasman workshop [J]. Vaccine, 2014,32(30):3713-3720.
- [38] Timoney JF, Walker J, Zhou M, Ding J. Cloning and sequence analysis of a protective M-like protein gene from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [J]. Infect Immun, 1995,63(4):1440-1445.
- [39] Walker JA, Timoney JF. Molecular basis of variation in protective SzP proteins of *Streptococcus zooepidemicus* [J]. Am J Vet Res, 1998,59(9):1129-1133.
- [40] Fan H, Wang Y, Tang F, Lu C. Determination of the mimic epitope of the M-like protein adhesin in swine *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [J]. BMC Microbiol, 2008,8:170-170.
- [41] Nicholson ML, Ferdinand L, Sampson JS, Benin A, Balter S, Pinto SW, Dowell SF, Facklam RR, Carlone GM, Beall B. Analysis of immunoreactivity to a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* M-like protein To confirm an outbreak of poststreptococcal glomerulonephritis, and sequences of M-like proteins from isolates obtained from different host species [J]. J Clin Microbiol, 2000,38(11):4126-4130.
- [42] Sitthicharoenchai P, Derscheid R, Schwartz K, Macedo N, Sahin O, Chen X, Li G, Main R, Burrough E. Cases of high mortality in cull sows and feeder pigs associated with *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* septicemia [J]. J Vet Diagn Invest, 2020,32(4):565-571.
- [43] Timoney JF, Artiushin SC, Boschwitz JS. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe [J]. Infect Immun, 1997,65(9):3600-3605.
- [44] Hong-Jie F, Fu-yu T, Ying M, Cheng-ping L. Virulence and antigenicity of the szp-gene deleted *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* mutant in mice [J]. Vaccine, 2009,27(1):56-61.
- [45] Lindahl S, Söderlund R, Frosth S, Pringle J, Båverud V, Aspán A. Tracing outbreaks of *Streptococcus equi* infection (strangles) in horses using sequence variation in the seM gene and pulsed-field gel electrophoresis [J]. Vet Microbiol, 2011,153(1-2):144-149.
- [46] Ivens PA, Matthews D, Webb K, Newton JR, Steward K, Waller AS, Robinson C, Slater JD. Molecular characterisation of 'strangles' outbreaks in the UK: the use of M-protein typing of *Streptococcus equi* ssp. *equi* [J]. Equine Vet J, 2011,43(3):359-364.
- [47] Boschwitz JS, Timoney JF. Inhibition of C3 deposition on *Streptococcus equi* subsp. *equi* by M protein: a mechanism for survival in equine blood [J]. Infect Immun, 1994,62(8):3515-3520.
- [48] Boschwitz JS, Timoney JF. Characterization of the antiphagocytic activity of equine fibrinogen

- for *Streptococcus equi* subsp. *equi* [J]. Microb Pathog, 1994,17(2):121-129.
- [49] Meehan M, Nowlan P, Owen P. Affinity purification and characterization of a fibrinogen-binding protein complex which protects mice against lethal challenge with *Streptococcus equi* subsp. *equi* [J]. Microbiology (Reading), 1998,144 ( Pt 4):993-1003.
- [50] Kelly C, Bugg M, Robinson C, Mitchell Z, Davis-Poynter N, Newton JR, Jolley KA, Maiden M CJ, Waller AS. Sequence variation of the SeM gene of *Streptococcus equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks [J]. J. Clin. Microbiol, 2006,44(2):480-486.
- [51] Bergmann R, Jentsch MC, Uhlig A, Müller U, van der Linden M, Rasmussen M, Waller A, von Köckritz-Blickwede M, Baums CG. Prominent Binding of Human and Equine Fibrinogen to *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Is Mediated by Specific SzM Types and Is a Distinct Phenotype of Zoonotic Isolates [J]. Infect Immun, 2019,88(1).
- [52] Velineni S, Timoney JF. Characterization and protective immunogenicity of the SzM protein of *Streptococcus zooepidemicus* NC78 from a clonal outbreak of equine respiratory disease [J]. Clin. Vaccine Immunol, 2013,20(8):1181-1188.
- [53] Velineni S, Timoney JF, Russell K, Hamlen HJ, Pesavento P, Fortney WD, Crawford PC. Clones of *Streptococcus zooepidemicus* from outbreaks of hemorrhagic canine pneumonia and associated immune responses [J]. Clin Vaccine Immunol, 2014,21(9):1246-1252.
- [54] Timoney JF, Qin A, Muthupalani S, Artiushin S. Vaccine potential of novel surface exposed and secreted proteins of *Streptococcus equi* [J]. Vaccine, 2007,25(30):5583-5590.
- [55] Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS. The streptococcal M protein: a highly versatile molecule [J]. Trends Microbiol, 2010,18(6):275-282.
- [56] D'Gama JD, Ma Z, Zhang H, Liu X, Fan H, Morris ERA, Cohen ND, Cywes-Bentley C, Pier GB, Waldor MK. A Conserved Streptococcal Virulence Regulator Controls the Expression of a Distinct Class of M-Like Proteins [J]. mBio, 2019,10(5).



## 第二章 治疗性单克隆抗体技术的发展

抗体按发展历程可以分为多克隆抗体，杂交瘤单克隆抗体以及基因工程抗体三个阶段。自 1975 年 Milstein 通过将 B 淋巴细胞与肿瘤细胞融合成杂交瘤细胞，获得了大量纯度高且特异性强的单克隆抗体，极大地提高了抗体的基础研究和临床应用的潜力<sup>[1]</sup>。截至 2020 年，全世界至少有 570 种治疗性单克隆抗体在进行临床试验<sup>[2]</sup>。目前，治疗性的单克隆抗体主要应用于人类疾病治疗领域<sup>[3]</sup>，而应用于动物疾病治疗的单克隆抗体报道较少，且主要集中于猪、牛、禽类、犬等动物<sup>[4]</sup>。

第一个治疗性单克隆抗体 muromonab-CD3（Orthoclone OKT3）于 1986 年被美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）批准，它是利用传统的杂交瘤技术制备的一种针对 T 细胞 CD3 的鼠源抗体，作为免疫抑制剂用于治疗急性移植排斥反应<sup>[5]</sup>。但鼠源抗体在人体内具有半衰期短、补体生物学效应激活不充分等缺点<sup>[6, 7]</sup>。为克服异源动物抗体所来带的不利影响，研究人员利用基因工程技术不断对抗体进行改造从而获得了更加适应于临床治疗的单克隆抗体，如通过将小鼠抗体可变区与人类抗体恒定区结合，开发出的嵌合抗体；如通过互补决定区（Complementarity-determining regions, CDR）移植技术将非人源性 CDR 序列移植到人类框架序列中，从而开发出的人源化抗体<sup>[8]</sup>；如通过噬菌体展示技术在体外开发出的全人源化抗体或完全动物源化的抗体，至 2020 年，已有 9 种被美国 FDA 通过的人类抗体药物是由噬菌体展示技术开发获得的<sup>[9]</sup>。此外，转基因动物技术，单个 B 细胞技术也都在治疗性抗体制备领域有所应用。

综上所述，治疗性单克隆抗体的制备从最初的杂交瘤技术到基于基因工程技术发展出的多种新型抗体制备技术，从而不断对抗体改进以满足临床治疗的需求。

### 1 杂交瘤细胞技术

杂交瘤细胞技术是用于生产单克隆抗体最常用的方法之一，通过将产生抗体的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合从而产生可无限增殖且分泌抗体的杂交瘤细胞<sup>[10]</sup>。目前美国 FDA 批准的 90%以上的抗体是由传统杂交瘤技术获得的，并直接或以嵌合抗体、人源化抗体形式使用<sup>[11]</sup>。

杂交瘤技术原理主要为<sup>[12]</sup>：细胞合成 DNA 可分为主要合成途径和旁路合成途径两种，当主要合成途径被氨基蝶呤阻断后，细胞仍可通过旁路途径继续合成 DNA 而增殖。利用次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT）缺陷性骨髓瘤细胞与脾细胞融合，在含有次黄嘌呤（H）、氨

基蝶呤（A）、胸腺嘧啶核苷（T）的选择性培养基（HAT）中培养，未融合的骨髓瘤细胞由于主要途径被氨基蝶呤阻断同时又缺乏旁路合成途径而不能增殖，而脾细胞由于不能增殖在 7-10 天后死亡，只有二者成功融合的细胞可在 HAT 培养基中增殖并无限分泌抗体。

杂交瘤细胞的制备可分为以下步骤<sup>[13]</sup>：使用目标抗原免疫实验动物后获取脾脏制备脾细胞悬液，将脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合后置于 HAT 选择培养基中筛选出融合成功的细胞，之后通过 ELISA 法筛选出分泌目标抗体的杂交瘤细胞。对于单克隆抗体的获得可分为体外法和体内法。体外法是从培养杂交瘤细胞的培养液中分离出高纯度的单克隆抗体，而体内法是通过将杂交瘤细胞注入小鼠腹腔，通过纯化产生的腹水而获得大量单克隆抗体。

用于融合的 B 细胞由于经历了体内自然亲和成熟过程，利用杂交瘤技术获得的单克隆抗体往往具有较高的亲和力<sup>[14]</sup>。虽然杂交瘤技术制备的单克隆抗体通常属于鼠源或兔源抗体，会引起人类或异源动物（如猪、牛、犬等）机体产生免疫反应，在治疗领域受到了很大限制，但基于杂交瘤技术筛选出的单克隆抗体为进一步嵌合抗体或人源化抗体改造提供了必要的材料支持。

## 2 重组抗体技术

### 2.1 嵌合抗体技术及人源化抗体技术

为避免鼠源抗体应用于人类及异源动物体内的不良影响，研究人员利用基因工程技术将鼠源抗体的可变区与人类抗体或异源动物抗体恒定区结合，从而产生了嵌合抗体，其中鼠源成分约占 35%<sup>[15]</sup>。由于鼠源成分占比较低，嵌合抗体与鼠源抗体相比，在临床应用上可表现出更长的半衰期和更低的免疫原性，且由于抗体的 Fc 段来自于同源动物，对于抗体介导的各种生物学效应影响也较小<sup>[16]</sup>。目前已有针对多种动物疾病的嵌合抗体的报道，如针对猪呼吸与繁殖综合征病毒、副猪嗜血杆菌的鼠-猪嵌合抗体<sup>[17, 18]</sup>，如针对鸡传染性法氏囊病病毒的鼠-鸡嵌合抗体<sup>[19]</sup>等。

除嵌合抗体外，对人类疾病的治疗还进一步研发出了人源化抗体。通过 CDR 移植技术将非人源抗体的 CDR 序列移植到人序列框架中并保持原有的抗原抗体特异性结合活性，从而大大提高了抗体人源化水平，其人源序列占比可达 85%-90%，第一个人源化单克隆抗体于 1988 年进入临床开发<sup>[20]</sup>。与嵌合抗体相比，在临床应用中人源化抗体具有更高的耐受性以及更低的免疫原性，Perpetua 等人将人源化 CD52 抗体与同类型的鼠源抗体进行比较，证明抗体人源化可以显著降低免疫原性<sup>[21]</sup>。

## 2.2 噬菌体展示库技术

噬菌体展示技术是第一个体外抗体筛选技术，可用于筛选具有高亲和力的抗体<sup>[22]</sup>。1985年，Smith创造性提出可以利用重组DNA技术将外源性多肽与噬菌体M13的外壳蛋白（PⅢ）融合，从而将多肽展示在噬菌体表面<sup>[23]</sup>。1990年McCafferty等通过在丝状噬菌体表面创建抗体库筛选出了具有特异性的单克隆抗体<sup>[24]</sup>。从此噬菌体展示技术成为了除杂交瘤细胞技术的另一种重要的抗体制备技术。

噬菌体展示技术中重要的一环是文库构建，根据获得的抗体基因来源，可将噬菌体展示库分为三类：（1）免疫文库（2）天然文库（3）半合成及合成文库。免疫文库由表达IgG基因的mRNA构建，抗体基因可来源于免疫动物或人类感染、恢复患者、接种疫苗的个体的外周血单核细胞、淋巴结、脾脏或扁桃体等<sup>[25]</sup>。由于抗原会刺激机体引起强烈免疫反应，所以可以从这些文库中分离出具有高亲和力的抗体并直接应用于临床疾病的治疗<sup>[26]</sup>。天然文库由表达IgM的mRNA构建，主要来源于未经免疫的健康动物淋巴细胞<sup>[27]</sup>。由于无需免疫，一方面可通过天然文库获得针对无免疫原性或有毒抗原物质的抗体，另一方面当出现新病原体时可在短时间内筛选出特异性抗体<sup>[28]</sup>。但由于天然文库中的抗体是由未经过亲和成熟过程的B细胞产生的，因此筛选出来的抗体亲和力普遍弱于免疫文库筛选到的抗体<sup>[29]</sup>。半合成和合成文库具有库容量大的特点，抗体识别抗原的特异性主要基于重链和轻链的CDR区域，半合成文库中CDR序列是随机合成的，而合成文库则是整个抗体可变区随机合成。由于动物机体内无靶向自身抗原的幼稚B细胞，因此合成和半合成文库主要用于选择针对自身抗原的抗体。

抗体库建立后通过多轮选择性筛选，可以在几周内获得目标单克隆抗体，远快于传统的杂交瘤方法<sup>[30]</sup>。此外，由于噬菌体颗粒小且溶解度高（ $10^{13}$  PFU/mL），可将 $10^{11}$ 个独立的噬菌体克隆展示在一个文库中，筛选效率更高<sup>[31]</sup>。尽管噬菌体展示技术具有多种优点，但Jain等人发现与从免疫小鼠中获得的抗体相比，直接通过噬菌体展示技术获得的抗体具有低热力学稳定性，低特异性以及短半衰期的特点<sup>[32-34]</sup>。此外，由于这些抗体是在大肠杆菌中表达而未经过糖基化修饰，可能会对其药代动力学带来负面影响<sup>[35]</sup>。

## 3 单细胞抗体技术

单细胞抗体技术可以从外周血中直接对单个B细胞分选并对抗体基因克隆，在突发传染病的紧急情况下，单细胞抗体技术可以高效快速地分离潜在的单克隆抗体。单细胞抗体技术主要包括阳性单B细胞分选、抗体基因扩增及抗体特异性表达、筛

选鉴定等过程。对于单细胞的分选，可使用显微操作法<sup>[36]</sup>、磁珠分选法<sup>[37]</sup>、流式分选法<sup>[38]</sup>等技术进行。当将单个 B 细胞分选后，利用反转录 PCR 及巢式 PCR 扩增每个 B 细胞的抗体重链及轻链基因，并将基因克隆到哺乳动物细胞表达系统内进行表达，对生成的单克隆抗体进行特异性鉴定从而获得目标抗体。

目前基于单细胞抗体技术获得的多种人类单克隆抗体已进入到临床试验阶段，如埃博拉病毒、呼吸道合胞病毒等<sup>[3]</sup>。在动物上，实验室阶段已获得针对猪流感病毒 H1N1 的中和性单克隆抗体<sup>[39]</sup>。虽尚未有基于单细胞抗体技术的单克隆抗体被美国 FDA 批准，但结合下一代测序技术，单细胞技术具有成为强有力的抗体研发工具潜力。

## 参考文献

- [1] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975 [J]. *J Immunol*, 2005,174(5):2453-2455.
- [2] Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019 [J]. *MAbs*, 2019,11(2):219-238.
- [3] Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, Wu HC. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases [J]. *J Biomed Sci*, 2020,27(1):1.
- [4] Bustamante-Córdova L, Melgoza-González EA, Hernández J. Recombinant Antibodies in Veterinary Medicine: An Update [J]. *Front Vet Sci*, 2018,5:175.
- [5] Wilde MI, Goa KL. Muromonab CD3: a reappraisal of its pharmacology and use as prophylaxis of solid organ transplant rejection [J]. *Drugs*, 1996,51(5):865-894.
- [6] Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies [J]. *Pharmacol. Res. Perspect*, 2019,7(6):e00535.
- [7] Legouffe E, Liautard J, Gaillard JP, Rossi JF, Wijdenes J, Bataille R, Klein B, Brochier J. Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6 [J]. *Clin Exp Immunol*, 1994,98(2):323-329.
- [8] Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse [J]. *Nature*, 1986,321(6069):522-525.
- [9] Lai JY, Lim TS. Infectious disease antibodies for biomedical applications: A mini review of immune antibody phage library repertoire [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020,163:640-648.
- [10] Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines [J]. *J Immunol*, 1979,123(4):1548-1550.
- [11] Parray HA, Shukla S, Samal S, Shrivastava T, Ahmed S, Sharma C, Kumar R. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020,85:106639.
- [12] Smith SA, Crowe JE, Jr. Use of Human Hybridoma Technology To Isolate Human Monoclonal Antibodies [J]. *Microbiol Spectr*, 2015,3(1):Aid-0027-2014.
- [13] Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects [J]. *J Genet Eng Biotechnol*, 2021,19(1):159-159.
- [14] Tomita M, Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production [J]. *Immunotherapy*, 2011,3(3):371-380.

- [15] García Merino A. Monoclonal antibodies. Basic features [J]. *Neurologia*, 2011,26(5):301-306.
- [16] Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006,58(5-6):640-656.
- [17] Jar AM, Osorio FA, López OJ. Mouse x pig chimeric antibodies expressed in Baculovirus retain the same properties of their parent antibodies [J]. *Biotechnol Prog*, 2009,25(2):516-523.
- [18] Chai Z, Fu F, Jiang F, Tian H, Wang Z, Zheng N, Zhang X, Wang X, Li X. Development of a neutralizing mouse-pig chimeric antibody with therapeutic potential against *Haemophilus parasuis* in *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014,354(2):85-91.
- [19] Zhang Y, Yin J, Li T, Zhou B, Xu P, Che R, Liu Y, Cao H, Ye X, Yang Y, Qi X, Zheng S, Ding G, Ren G, Yang H, Wang X, Li D. A recombinant avian antibody against VP2 of infectious bursal disease virus protects chicken from viral infection [J]. *Res Vet Sci*, 2017,114:194-201.
- [20] Gorman SD, Clark MR. Humanisation of monoclonal antibodies for therapy [J]. *Semin Immunol*, 1990,2(6):457-466.
- [21] Rebello PR, Hale G, Friend PJ, Cobbold SP, Waldmann H. Anti-globulin responses to rat and humanized CAMPATH-1 monoclonal antibody used to treat transplant rejection [J]. *Transplantation*, 1999,68(9):1417-1420.
- [22] Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ, et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires [J]. *Embo j*, 1994,13(14):3245-3260.
- [23] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985,228(4705):1315-1317.
- [24] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains [J]. *Nature*, 1990,348(6301):552-554.
- [25] Lim BN, Tye GJ, Choong YS, Ong EB, Ismail A, Lim TS. Principles and application of antibody libraries for infectious diseases [J]. *Biotechnol Lett*, 2014,36(12):2381-2392.
- [26] Bradbury AR, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries [J]. *J Immunol Methods*, 2004,290(1-2):29-49.
- [27] Hoogenboom HR, de Bruïne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications [J]. *Immunotechnology*, 1998,4(1):1-20.
- [28] Chan CE, Chan AH, Lim AP, Hanson BJ. Comparison of the efficiency of antibody selection from semi-synthetic scFv and non-immune Fab phage display libraries against protein targets for rapid development of diagnostic immunoassays [J]. *J Immunol Methods*, 2011,373(1-2):79-88.
- [29] Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R, Sargent P, Lindquist E, Schier R, Hemingsen G, Wong C,

- Gerhart JC, Marks JD. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998,95(11):6157-6162.
- [30] Lu RM, Chang YL, Chen MS, Wu HC. Single chain anti-c-Met antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor-targeted imaging and drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2011,32(12):3265-3274.
- [31] Weber M, Bujak E, Putelli A, Villa A, Matasci M, Gualandi L, Hemmerle T, Wulhfard S, Neri D. A highly functional synthetic phage display library containing over 40 billion human antibody clones [J]. *PLoS One*, 2014,9(6):e100000.
- [32] Seeliger D, Schulz P, Litzenburger T, Spitz J, Hoerer S, Blech M, Enenkel B, Studts JM, Garidel P, Karow AR. Boosting antibody developability through rational sequence optimization [J]. *MAbs*, 2015,7(3):505-515.
- [33] Jain T, Sun T, Durand S, Hall A, Houston NR, Nett JH, Sharkey B, Bobrowicz B, Caffry I, Yu Y, Cao Y, Lynaugh H, Brown M, Baruah H, Gray LT, Krauland EM, Xu Y, Vásquez M, Wittrup KD. Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017,114(5):944-949.
- [34] Wang F, Sen S, Zhang Y, Ahmad I, Zhu X, Wilson IA, Smider VV, Magliery TJ, Schultz PG. Somatic hypermutation maintains antibody thermodynamic stability during affinity maturation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013,110(11):4261-4266.
- [35] Huang L, Biolsi S, Bales KR, Kuchibhotla U. Impact of variable domain glycosylation on antibody clearance: an LC/MS characterization [J]. *Anal Biochem*, 2006,349(2):197-207.
- [36] Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections [J]. *Embo j*, 1993,12(13):4955-4967.
- [37] Lundkvist A, Hörling J, Athlin L, Rosén A, Niklasson B. Neutralizing human monoclonal antibodies against Puumala virus, causative agent of nephropathia epidemica: a novel method using an antigen-coated magnetic beads for specific B cell isolation [J]. *J Gen Virol*, 1993,74 ( Pt 7):1303-1310.
- [38] Smith K, Garman L, Wrammert J, Zheng NY, Capra JD, Ahmed R, Wilson PC. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen [J]. *Nat Protoc*, 2009,4(3):372-384.
- [39] Corti D, Voss J, Gamblin SJ, Codoni G, Macagno A, Jarrossay D, Vachieri SG, Pinna D, Minola A, Vanzetta F, Silacci C, Fernandez-Rodriguez BM, Agatic G, Bianchi S, Giacchetto-Sasselli I, Calder L, Sallusto F, Collins P, Haire LF, Temperton N, Langedijk JP, Skehel JJ, Lanzavecchia A.

A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins [J]. Science, 2011,333(6044):850-856.

## 第二篇 研究内容

### 第三章 马链球菌兽疫亚种 SzM 可变区蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

**摘要：**SzM 蛋白是马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus*, SEZ) 表面的重要毒力因子，具有 N 端高度变异和 C 端高度保守的特点。本章以引起中国和北美猪链球菌病暴发的 SEZ 菌株特有的 SzM 蛋白 N 端可变区型为目标，进行重组表达并制备单克隆抗体。经皮下多点免疫 BALB/c 小鼠后，将血清效价最高小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合。经数次亚克隆后，最终通过间接 ELISA 法筛选到 6 株分泌目标抗体的杂交瘤细胞株，其分泌的抗体均属于 IgG1 亚类，轻链为  $\kappa$  型。依据生长速率的差异选取其中增殖较快，状态良好的 4 株杂交瘤细胞进行腹水制备并做进一步鉴定。Western Blot 显示 4 株腹水单克隆抗体与 SzM 蛋白可变区结合良好，也可与截去信号肽的 SzM 蛋白反应；间接免疫荧光观察发现其中 3 株腹水单克隆抗体可结合野生型 SEZ 菌体，但与  $\Delta$ SzM 缺失株不反应。利用 SPR 技术对 3 株实验室前期制备的抗 SzM 蛋白恒定区的单克隆抗体及本研究制备的 4 株单克隆抗体共同与 SzM 蛋白进行亲和力检测，结果显示 7 株单克隆抗体的平衡解离常数在  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  M 之间，亲和性良好。此外，在抗体结合表位一致性的鉴定中，发现抗 SzM 蛋白恒定区的 3 株单克隆抗体具有相同或相似的抗原结合表位，而 4 株抗可变区的单克隆抗体识别表位具有多样性。依据上述结果，后续实验将随机选取 1 株抗 SzM 蛋白恒定区单克隆抗体与本次纯化的 4 株抗 SzM 蛋白可变区单克隆抗体共同进行后续保护效果评价。

**关键词：**单抗；SzM 蛋白；可变区；亲和力

马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*, SEZ) 可导致多种动物感染，是引起猪链球菌病的主要病原之一，也是一种重要的人畜共患病病原体<sup>[1-3]</sup>。SEZ 感染引起的猪链球菌病曾重创我国养猪业，1976 年中国四川猪群暴发 SEZ 感染，造成上百万头猪发病，死亡 30 余万头，分离菌株被 ATCC 收录，编号为 ATCC35246。近年来，随着抗生素使用受限，SEZ 在我国甚至世界范围都出现了流行风险。2019 年-2020 年，北美猪群首次暴发了由 SEZ 感染引起的猪链球菌病，导致数千头猪一周内急性死亡，分离株主要为 OH-71905 和 TN-74097<sup>[4]</sup>。值得注意的是，本次北美疫情分离株与中国分离株 ATCC35246 高度同源，基因组同源性高达 99.7%。SzM 蛋白作为 SEZ 表面重要的毒力因子，其 N 端可变区的高度变异性可用于不同 SEZ 菌株的分

型。虽然 SEZ 菌株上的 SzM 蛋白因可变区的差异而导致同源性普遍较低（处于 19.66%-54.66% 之间），但 OH-71905、TN-74097 和 ATCC35246 的 SzM 蛋白不论可变区还是恒定区序列都 100% 一致<sup>[5]</sup>，一定程度上说明这一 SzM 型的 SEZ 菌株是引起猪链球菌病的主要类型，其 SzM 序列特征可用于区分这类高毒力猪群流行株和流行于其他动物的 SEZ 菌株。针对 ATCC35246 菌株的 SzM 蛋白可变区制备的单抗对于防控和治疗高毒力猪群流行 SEZ 菌株感染具有重要意义，同时也是建立针对这一类型 SEZ 菌株血清学诊断方法的必要工具。

有研究发现马源 SEZ 分离菌株的 SzM 蛋白是潜在的候选疫苗，免疫小鼠后可刺激机体产生保护性抗体，从而抵抗致死剂量 SEZ 的攻击<sup>[6]</sup>。但由于可变区的高度变异性，马源分离株的 SzM 蛋白未必适用于对猪源分离株感染的保护。化脓链球菌（A 群链球菌）的 M 蛋白与 SEZ 的 SzM 蛋白特性非常相似，都具有 N 端高度变异和 C 端高度保守的特点，在对 M1 和 M5 型蛋白保护效果评价中发现只有针对 N 端超变区的抗体具有调理活性，其他区域激发的抗体保护效果不佳<sup>[7]</sup>，可推测针对 SzM 蛋白可变区的抗体也有可能表现出良好的抗菌活性。因此本研究将制备 ATCC35246 菌株 SzM 蛋白可变区的单克隆抗体，与实验室前期已获得的针对 SzM 蛋白恒定区单克隆抗体共同进行保护效果评价，为开发抗高毒力猪群流行 SEZ 菌株感染提供新的工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和实验动物

SP2/0 骨髓瘤细胞（由本实验室冻存）；SPF 级 7 周龄雌性 BALB/c 小鼠（购自江苏集萃药康生物公司）。

### 1.2 菌株

SEZ ATCC35246 菌株（购自美国国家标准品保藏中心）；ATCC35246 SzM 蛋白缺失株  $\Delta$ SzM（由本实验室构建）；SzM 可变区蛋白表达菌株（由本实验室构建）。

### 1.3 主要试剂与耗材

DMEM 细胞培养液、胎牛血清（购自 Gibco 公司）；PEG、HT Media Supplement、HAT Media Supplement（购自 SIGMA 公司）；青链霉素混合液（购自 Solarbio 公司）；小鼠单克隆抗体亚型试剂盒（购自北京博奥龙公司）；Goat Anti-Mouse IgG H&L（DyLight® 488）（购自 Abcam 公司）；96 孔细胞培养板、细胞瓶、15 mL 和 50 mL 离心管（购自 Corning 公司）；Countess 细胞计数腔室载玻片（购自江苏优赛斯公司）；

Series S Sensor Chip CM5 芯片（购自国药集团）；Amine Coupling Kit（购自 Cytiva 公司）。

## 1.4 SzM 可变区蛋白表达与纯化

实验室保存有分别携带 His 和 GST 标签的 SzM 可变区蛋白（variant SzM, vSzM）表达菌株，且蛋白分别表达在包涵体和上清中。

### 1.4.1 带有 His 标签的 SzM 可变区蛋白表达

将表达菌株 BL21（携带有 pET-28a-vSZM 质粒）复苏于卡那霉素抗性的 LB 平板上，挑取单菌落培养在卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中，待长至对数期（ $OD_{600}=0.6-0.8$ ）时，按 1: 1000 的比例加入 1M IPTG，37 °C 诱导 4 h。随后将菌液以 8000 r/min 转速离心 10 min，弃去上清。菌体沉淀用 PBS 重悬洗涤 3 遍后，进行超声破碎，随后以 8000 r/min 转速离心 20 min，离心结束后弃上清。此时管底沉淀即为包涵体。加入 10 mL 8 M 尿素 4 °C 过夜溶解包涵体，当包涵体完全溶解后，将溶液置于透析袋内，分别以 6 M、4 M、2 M 尿素进行透析，每种浓度尿素 4 °C 透析 12 h。透析结束后，将蛋白溶液用 His Trap  $Ni^{2+}$  柱进行纯化。

### 1.4.2 带有 GST 标签的 SzM 可变区蛋白表达

将表达菌株 BL21（携带有 pGEX6p-1-vSZM 质粒）复苏于氨苄抗性的 LB 平板上，挑取单菌落培养在氨苄抗性的 LB 液体培养基中，待长至对数期（ $OD_{600}=0.6-0.8$ ）时，按 1: 1000 的比例加入 1 M IPTG，37 °C 诱导 4 h，随后将菌液以 8000 r/min 转速离心 10 min，弃去上清。菌体沉淀用 PBS 重悬洗涤 3 遍后进行超声破碎。随后以 8000 r/min 转速离心 20 min，将上清收集起来后用 0.22  $\mu m$  滤器过滤，随后使用 GST 标签亲和层析树脂对滤液进行纯化。

## 1.5 动物免疫

为避免 GST 标签蛋白对小鼠免疫产生干扰，故使用携带 His 标签的 SzM 可变区蛋白对小鼠进行免疫，但因该蛋白表达于包涵体，为避免免疫上的不利影响，后续细胞亚克隆检测以及 Western Blot 均以携带 GST 标签的 SzM 可变区蛋白进行。将蛋白与佐剂按体积 1: 1 充分混合乳化后，背部皮下多点免疫小鼠，共进行三次免疫及一次冲击免疫，免疫流程见表 3-1。

表 3-1 免疫程序

Table 3-1 Immunization procedure

|                        | 一免 (1-14 天)<br>First immunization<br>(1-14 days)                          | 二免 (14-21 天)<br>Second immunization<br>(14-21 days)                       | 三免 (21 天-28 天)<br>Third immunization<br>(21-28 days) | 冲击免疫<br>(融合前 3 天)<br>Shock immunization<br>(3 days before fusion) |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 抗原量<br>Antigen<br>dose | 200 µg/mouse<br><br>与弗氏完全佐剂充分乳化<br>Mix with Freund's<br>complete adjuvant | 100 µg/mouse<br><br>与弗氏不完全佐剂充分乳化<br>Mix with Freund's incomplete adjuvant | 100 µg/mouse                                         | 50 µg/mouse<br><br>无佐剂<br>No adjuvant                             |
| 免疫方式<br>Immune<br>mode | 皮下多点<br>Subcutaneous injection                                            | 皮下多点<br>Subcutaneous injection                                            | 皮下多点<br>Subcutaneous injection                       | 腹腔注射<br>Intraperitoneal<br>injection                              |

## 1.6 小鼠免疫血清效价检测

于每次免疫后第 7 天对小鼠进行眼眶采血, 随后血液静置于 4 °C 冰箱 12 h, 将析出的血清和阴性血清从 1: 100 按 2 倍比连续稀释到 1: 409600。用间接 ELISA 法进行血清效价检测, 步骤如下:

(1) 包被: 按照实验室前期确定的最佳 vSzM 蛋白包被浓度 4 µg/mL 对 96 孔酶标板进行 4 °C 过夜包被, 每孔 100 µL。包被结束后, 用 PBST 对 96 孔板洗涤三遍, 每遍 5 min。

(2) 封闭: 每孔加入 200 µL 5% 脱脂乳 (使用 PBST 稀释), 置于 37 °C 温箱 2 h。结束后用 PBST 洗涤三遍, 每遍 5 min。

(3) 孵育一抗: 将获得的血清用 PBS 进行不同浓度的 2 倍比稀释, 以阴性小鼠血清作为阴性对照, 每孔 100 µL, 37 °C 孵育 1 h。结束后用 PBST 对 96 孔板洗涤三遍, 每遍 5 min。

(4) 孵育二抗: 二抗依据说明书, 以 1: 5000 的稀释度用 PBST 进行稀释, 每孔 100 µL, 37 °C 作用 45 min。结束后用 PBST 对 96 孔板洗涤三遍, 每遍 5 min。

(5) 显色: 加入 TMB 显色液, 每孔 100 µL, 室温避光反应 15 min。

(6) 终止反应: 每孔加入 100 µL 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 随后用酶标仪检测每孔 OD<sub>450</sub> 吸光度。

## 1.7 杂交瘤细胞制备

### 1.7.1 饲养层细胞的准备

在细胞融合的前一天，进行饲养层细胞的准备，方法如下：

(1) 取 BALB/c 小鼠两只，脱颈处死后浸泡于 75%酒精。在超净台中小心剪开腹部皮肤，充分暴露腹膜后，拿镊子夹起酒精棉球擦拭腹膜进行消毒。

(2) 用 5 mL 注射器吸取 4 °C 预冷的无菌 PBS，针头小心刺透腹膜，将 PBS 注入小鼠腹腔，拿镊子夹起酒精棉球轻轻按摩腹部 5 min，随后用注射器将腹腔内液体吸出，转移到 15 mL 离心管中。

(3) 重复进行 (2) 的操作两次，以便充分洗涤出腹腔巨噬细胞。

(4) 将吸出液体以 1000 r/min 转速离心 10 min，离心结束后弃去上清，此时细胞沉积于管底，再用 DMEM 培养液洗涤细胞两次后离心弃上清。

(5) 离心管中加入含 1% HAT、双抗的 DMEM 完全培养液，用巴氏吸管轻轻吹打重悬细胞，充分混匀腹腔巨噬细胞后，将细胞悬液以每孔 100  $\mu$ L 的体积滴加于 96 孔细胞板内，随后将细胞板置于 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。

### 1.7.2 骨髓瘤细胞 SP2/0 的准备

将实验室保存于液氮的 SP2/0 细胞复苏，从液氮拿出细胞冻存管后，快速置于 37 °C 温水中搅动，待彻底融化后，以 1000 r/min 速度离心 10 min，离心结束后弃去上清，用 1 mL DMEM 完全培养液（DMEM 培养液+20%胎牛血清）重悬细胞，随后转移至 T25 细胞瓶中培养，再加入 4 mL DMEM 完全培养液混匀后置于 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。

融合当天，应确保 SP2/0 细胞处于良好状态，此时细胞边缘圆润光滑，瓶中漂浮的死细胞较少。将状态优良的 SP2/0 细胞用巴氏吸管轻轻吹打下来后转移至 15 mL 离心管内，以 1000 r/min 速度离心 10 min，弃去上清后用 DMEM 完全培养液重悬洗涤 SP2/0 细胞。随后对细胞悬液进行计数，放置于细胞培养箱中待用。

### 1.7.3 脾细胞的准备

免疫结束后，取血清效价最高小鼠的脾脏进行脾细胞悬液制备，步骤如下：

(1) 脱颈处死小鼠后浸泡于 75%酒精，于超净台中固定好小鼠，小心剪开小鼠腹部皮肤，充分暴露出腹膜，随后用剪刀小心剪开腹膜暴露腹腔器官，用镊子钝性分离脾脏。

(2) 将脾脏置于无菌培养皿中，并倒入少许 DMEM 培养液保持脾脏湿润，用镊子夹起脾脏置于灭菌的滤网上。将 10 mL 注射器内芯取出，用平端磨碎脾脏，同时用 DMEM 培养液冲洗研磨部位，用 50 mL 离心管收集滤过液体。

(3) 研磨结束后，于 50 mL 离心管中加入少许 DMEM 培养液重悬脾细胞，随后以 1000 r/min 速度离心 10 min，再用 DMEM 培养液洗涤 2 遍后重悬，并对脾细胞悬液进行计数。

#### 1.7.4 细胞融合

将准备好的 SP2/0 细胞及脾细胞按照 1: 10 的比例混合，此时 SP2/0 约为  $1 \times 10^6$  个，脾细胞约为  $1 \times 10^7$  个。将细胞混合液以 1000 r/min 转速离心 10 min，离心结束后弃掉上清，随后将离心管底部于手心中缓慢旋转，使沉积于底部的细胞松动并充分混匀。之后在 37 °C 水浴环境下，沿管壁在 1 min 内匀速倒入融合剂 Polyethylene glycol solution 1 mL，边加边轻轻摇晃，之后将离心管在 37 °C 水浴环境下静置 45 s。分别在接下来 5 min 内缓慢加入 37 °C 预热的 DMEM 培养液 10 mL，结束后再一次性缓慢加入 DMEM 培养液 30 mL 结束融合过程。将细胞缓慢上下颠倒后以 1000 r/min 转速离心 10 min，结束后弃去上清，将管底的细胞置于 37 °C 水浴环境中 5-10 min，随后沿管壁缓慢加入 30 mL 含 1% HAT 的 DMEM 完全培养液，充分混匀后用巴氏吸管吸取细胞悬液滴加到铺有饲养层细胞的 96 孔板内，每孔约 2-3 滴，随后将细胞板放置在 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养。

#### 1.7.5 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

经过 7 天培养后，融合成功的细胞因不断增殖会呈现出葡萄串状细胞团，未融合成功的细胞则无法在含 HAT 培养液中生长而观察不到活细胞。当细胞团长满至 1/3 孔时即可进行阳性杂交瘤细胞的检测，取出成功融合细胞的细胞上清进行间接 ELISA 检测。用于包被 96 孔酶标板的抗原为携带 GST 标签的 SzM 可变区蛋白，步骤同本章 1.6 操作。

当筛选到阳性孔后，使用有限稀释法对阳性孔进行亚克隆培养，步骤如下：将阳性孔内原有培养液弃去，添加 200  $\mu$ L DMEM 培养液并用移液枪吹打使细胞重悬，将重悬的细胞加入到 4 mL 含 1% HAT 的 DMEM 完全培养液中，吹打混匀后，用巴氏吸管吸取 2 mL 滴加到新的 96 孔细胞培养板内，每孔 1-2 滴，剩余的 2 mL 细胞悬液加入到另外含有 2 mL HAT 完全培养液的 EP 管内进行 2 倍比稀释，混匀后再用巴氏吸管吸取 2 mL 细胞悬液滴加到新的 96 孔内。以此类推对细胞悬液不断进行 2 倍比稀释，最终对获得 8 个稀释度的细胞悬液进行滴板。最后将细胞板置于 37 °C，5% CO<sub>2</sub>

细胞培养箱内。7-10 天后，对每个 96 孔细胞板的上清进行间接 ELISA 检测，最终选取 OD<sub>450</sub> 值高，孔内细胞团小，且只有一个细胞团的阳性孔进行第二次亚克隆，方式同第一次亚克隆一样。1 周后，可进行第三次亚克隆，此时可将培养液可换成含 1% HT 的 DMEM 完全培养液。待 3 次亚克隆后，且细胞孔的阳性率为 100% 后，可对目标细胞株进行扩大培养。先将生长在 96 孔板内的细胞吹打起来，转移到 48 孔板内，当细胞密度长至约 60% 时，再将细胞转移到 24 孔板内，随后依次为 12 孔板，6 孔板内，最后转移至 T25 细胞瓶中培养。

## 1.8 杂交瘤细胞候选株的细胞上清 Western Blot 鉴定

以纯化的 vSzM 为抗原进行 SDS-PAGE，以生长在 T25 细胞瓶内的待测细胞上清作为一抗，进行 Western Blot 鉴定。步骤如下：

(1) 裁剪蛋白胶，NC 膜：SDS-PAGE 电泳结束后，将蛋白胶进行裁剪，并用尺子量取长宽，置于转膜 Buffer 中备用。根据蛋白胶的尺寸，裁剪 NC 膜，尺寸略大于胶即可。

(2) 将 NC 膜浸泡于无水甲醇 20 s 后转移至转膜 buffer 中。同时将滤纸用转膜 buffer 浸透。

(3) 转膜：以滤纸-NC 膜-蛋白胶-滤纸的顺序叠放于半干转膜仪上，每层之间不要有气泡，以 15 V，20 min 的条件进行转膜。

(4) 封闭：配置 5% 脱脂乳（PBST 稀释）为封闭液，转膜结束后，将膜放置于封闭液中，4 °C 过夜。

(5) 孵育一抗：将封闭液倒出，添加待测细胞上清，使膜完全被浸没，37 °C 孵育 2 h。

(6) 孵育二抗：将细胞上清倒出，用 PBST 洗涤膜 3 遍，每遍 15 min。洗涤结束后，添加羊抗鼠二抗（用 PBST 以 1: 5000 稀释度稀释），37 °C 作用 45 min。

(7) 曝光：二抗孵育结束后，用 PBST 洗涤三遍，每遍 15 min。随后将商品化的曝光液覆盖在膜上，用曝光仪进行曝光。

## 1.9 单抗的类、亚类和型的鉴定

依据小鼠单抗 Ig 类、亚类鉴定试剂盒说明书进行如下操作：

(1) 包被抗原：将 vSzM 蛋白用包被液稀释至 1 µg/mL，以每孔 100 µL 的体积进行 4 °C 过夜包被。包被结束后用 PBST 洗涤 96 孔板一遍。

(2) 孵育一抗：添加杂交瘤细胞上清进行孵育，每株细胞上清添加 16 个孔（进行两个重复）。37 °C 作用 30 min，之后用 PBST 洗涤 96 孔板 5 遍。

(3) 孵育二抗：加入酶标二抗 100  $\mu\text{L}$ ，37  $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min，之后用 PBST 洗涤 5 遍，每遍 3 min。

(4) 显色：加入 TMB 显色液 100  $\mu\text{L}$ /孔，37  $^{\circ}\text{C}$ 避光作用 20 min。参考显现蓝色孔对应所加的酶标二抗即可知道此单抗株的 Ig 类别。

## 1.10 腹水单抗制备及效价检测

准备 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠，每只小鼠提前一周腹腔注射 1 mL 液体石蜡。将生长状态良好的杂交瘤细胞用巴氏吸管吹打下来，以 1000 r/min 转速离心 10 min，离心结束后弃上清，用 PBS 重悬洗涤杂交瘤细胞 2 遍，之后进行细胞计数。

用注射器吸取细胞悬液，将杂交瘤细胞注入小鼠腹腔，每只小鼠给予  $1 \times 10^6$  个细胞。等待 7-10 天后，小鼠出现腹部膨大、毛发粗糙、运动困难时，可将 20 mL 注射器针头刺入腹腔，腹水即可顺着针头流出，收集腹水后，以 1000 r/min 转速离心 10 min，收集上清透亮的腹水后置于 -40  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。并通过间接 ELISA 对腹水效价进行检测，步骤同本章 1.6 操作。

## 1.11 腹水中单抗的鉴定

### 1.11.1 腹水中针对 SzM 蛋白单抗的 Western Blot 鉴定

Western Blot 步骤同本章 1.8 操作。抗原为截去信号肽的 tSzM 蛋白 (truncated SzM, tSzM)、恒定区突变体 (conserved SzM, cSzM) 和可变区突变体 (variant SzM, vSzM)，其中腹水 (一抗) 以 1: 500 进行稀释。

### 1.11.2 腹水中针对 SEZ 全菌的单抗的间接免疫荧光鉴定

为验证小鼠腹水中单抗与 ATCC35246 全菌的结合效果，我们使用间接免疫荧光进行评价，步骤如下：

(1) 刮取生长在 THB 平板上的 ATCC35246 菌落，均匀涂抹在载玻片上，使其自然风干。

(2) 用巴氏吸管吸取 4 % 多聚甲醛覆盖细菌 10 min 进行固定，之后用 PBS 洗涤三遍，每遍 5 min。

(3) 用 0.1% Triton-X100 作用 10 min，之后 PBS 洗涤三遍，每遍 5 min。

(4) 用 5% BSA 在 37  $^{\circ}\text{C}$  环境下封闭 1 h，用 PBST 洗涤三遍，每遍 5 min。

(5) 添加 1: 500 稀释后的待测腹水，37  $^{\circ}\text{C}$  作用 1 h 后，PBST 洗涤三遍，每遍 5 min，之后步骤在避光环境下进行。

(6) 添加 1: 500 稀释的二抗 Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor® 488), 室温孵育 45 min。之后用 PBST 洗涤三遍, 每遍 5 min。

(7) 添加 1: 10 稀释的 DAPI 溶液, 室温作用 10 min, 之后用 PBST 洗涤三遍, 每遍 15 min。

(8) 避光环境下, 将载玻片吹干, 之后滴加 5  $\mu$ L 封片剂, 盖上盖玻片, 置于激光共聚焦显微镜下观察。

## 1.12 单抗的纯化

(1) 配置所需试剂: 结合/洗杂溶液: 0.15 M NaCl、20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH=7.0; 洗脱 Buffer: 0.1 M 甘氨酸, pH=3.0; 中和 Buffer: 1M Tris-HCL, pH=8.5。

(2) 将腹水以 1000 r/min 转速离心 10 min, 尽可能的弃去漂浮于腹水上层的油脂。用结合/洗杂 Buffer 对腹水进行 10 倍稀释, 之后用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤腹水, 置于冰上待用。

(3) 将 Protein-G 亲和层析树脂加入到层析柱中, 待树脂沉淀后, 用 20 mL 结合/洗杂 Buffer 洗涤平衡树脂。

(4) 将稀释后的腹水用蠕动泵缓慢上样, 滴加于层析柱中, 同时收集流出液体, 之后将流出液再次上样。

(5) 上样结束后, 用 50 mL 的结合/洗杂 buffer 清洗树脂, 去除杂质。

(6) 洗涤结束后, 加入 10 mL 洗脱液, 待抗体洗脱后, 加入 1 mL 中和 Buffer 调整抗体溶液 pH 为中性。

(7) 将抗体溶液置于 10 kD 超滤管中, 以 3500 g/min 转速离心, 之后加入 PBS 置换抗体缓冲液。

(8) 超滤浓缩结束后, 收集抗体溶液并测量浓度后保存于 -40 °C 冰箱。

## 1.13 单抗的亲合力检测

实验室前期已制备出 3 株针对 SzM 恒定区蛋白的单抗 (命名为 anti-cSzM-1、anti-cSzM-2、anti-cSzM-3), 在这里与 4 株针对 SzM 可变区蛋白的单抗 (命名为 anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4) 共同进行亲和力检测。通过表面等离子共振技术 (Surface plasmon resonance technology, SPR) 测量抗原抗体之间的亲和力, 使用 CM5 型芯片进行操作。步骤如下:

(1) 试剂准备: 50 mM NaOH; 10 mM 醋酸钠 (pH=5.0); 10 mM 甘氨酸 (pH=3.0); EDC、NHS、乙醇胺溶液 (来自氨基偶联试剂盒)。

(2) 将 SzM 蛋白调整浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$ , 准备进行偶联时, 再用醋酸钠稀释为 2  $\mu\text{g/mL}$  的浓度。

(3) SzM 蛋白偶联 CM5 芯片时选用 target 自动模式, 芯片偶联量预设 70 RU。

(4) 按照仪器操作提示将 NaOH、EDC、NHS、乙醇胺溶液、经醋酸钠稀释的 SzM 蛋白溶液放置于仪器样品仓内。

(5) 运行仪器, 进行 CM5 芯片与蛋白的偶联。

(6) 芯片偶联结束后, 即可上样单抗进行亲和力检测。检测方法选用多循环动力学检测。

(7) 将纯化的单抗用 PBS 以 2 倍比稀释的方式进行 5-7 个浓度梯度稀释, 随后按照机器提示进行样品放置, 上样流速设置为 30  $\mu\text{L/min}$ , 时间为 300 s, 解离时间为 600 s, 每次循环的再生溶液选用甘氨酸, 洗脱时间设置为 30 s。由于针对不同区域的单抗亲和力检测是分批做的, 所以某些参数会有所改变, 但均符合操作流程。

### 1.14 单抗的抗原表位一致性鉴定

利用共价偶联在 CM5 芯片上的 SzM 蛋白, 可以对三株针对恒定区单抗及 4 株针对可变区单抗的抗原表位是否相同进行鉴定。

(1) 饱和结合 SzM 抗原表位: 将 CM5 芯片放置入 T200 仪器后, 调整进样流速为 10  $\mu\text{L/min}$ , 首先进样 anti-cSzM-1 抗体, 浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$ ; 由于抗体会不断与芯片上的 SzM 蛋白结合, 检测到的结合信号值会不断升高, 随着抗体进样量的增加, anti-cSzM-1 抗体所针对的抗原表位被不断饱和结合, 导致每分钟内信号值变化越来越小, 逐渐趋于稳定。

(2) 表位验证: 在芯片被饱和结合的情况下, 通过添加其他单抗 (抗 His 标签单抗、anti-cSzM-2、anti-cSzM-3、无关对照抗体), 当结合表位与 anti-cSzM-1 不一致时, 便可检测到新的结合信号, 若是一致, 则信号值变化不大。由此可以初步对抗体结合表位是否一致进行评价。由于每次更换抗体上样时机器会自动进行冲洗程序, 导致少量用于饱和结合的抗体被冲洗下来, 从而暴露出一些结合表位, 如果新上样的抗体恰好是针对该表位的抗体, 则依旧会检测到部分结合信号, 为避免误差, 在对结合信号进行比对时, 选用上样结束前 60s 内的平均信号值变化作为评判依据, 因为若是结合表位与用于饱和结合的抗体不一致, 则整个上样过程中结合信号会不断增加, 短时间内不会被饱和结合, 而若一致时, 则只能在上样初期看到少许结合信号, 但在后期结合信号变化不大。针对 SzM 蛋白可变区的单抗使用相同方法进行验证。

## 2 结果

### 2.1 表达并纯化获得重组 SzM 可变区蛋白

成功表达出两种不同标签融合的重组 vSzM 蛋白并进行亲和纯化，获得了纯度较高的目的蛋白。对表达与纯化过程中收集的样品进行 SDS-PAGE 检测，结果如图 3-1 所示。A 图为以包涵体形式表达的携带有 His 标签的 vSzM 蛋白样品，纯化后蛋白条带分子量大小约为 35-40 kD；B 图为以可溶形式表达在上清的携带有 GST 标签的 vSzM 蛋白样品，纯化后蛋白条带分子量在 55 kD 左右，两个纯化的融合重组 SzM 蛋白分子量均与预期大小一致。

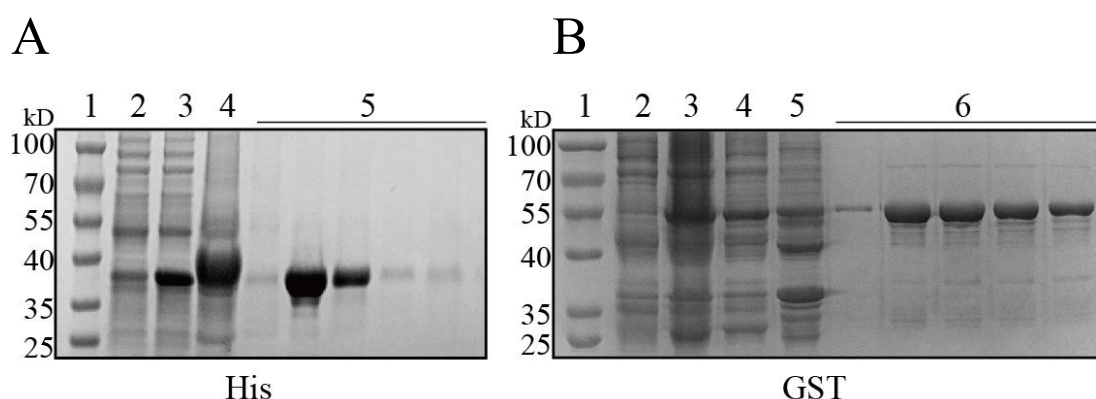


图 3-1 不同标签 SzM 可变区蛋白的表达纯化

Fig 3-1 Expression and purification of vSzM proteins with different tags

A 图：1. marker；2. IPTG 诱导前；3. IPTG 诱导后；4. 未纯化的包涵体；5. 纯化后蛋白

B 图：1. marker；2. IPTG 诱导前；3. IPTG 诱导后；4. 超声破碎后上清；5. 超声破碎后沉淀；6. 纯化后蛋白

A: 1. marker; 2. before IPTG induction; 3. after IPTG induction; 4. unpurified inclusion body; 5. purified protein;

B: 1. marker; 2. before IPTG induction; 3. after IPTG induction; 4. supernatant after ultrasonic crushing; 5. precipitation after ultrasonic crushing; 6. purified protein

### 2.2 小鼠免疫 vSzM 蛋白后具有较高的血清抗体效价

共免疫 3 只小鼠，每次免疫后 7 天采血清样本，以 P/N 值大于 2.1 的最高稀释倍数作为每次免疫后的血清效价，三次免疫血清效价如图 3-2 所示，可知 3 号小鼠的血清效价最高，达 1: 409600，因此取 3 号小鼠的脾脏进行后续的细胞融合操作。

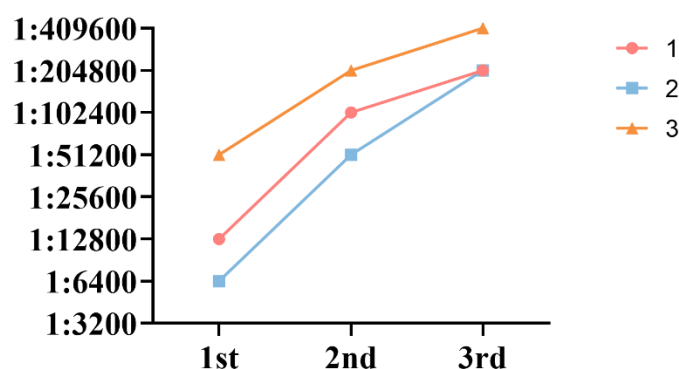


图 3-2 每次免疫后小鼠血清抗体效价

Fig 3-2 Serum antibody titer of mice after each immunization

### 2.3 Western Blot 显示细胞上清中单抗与 vSzM 蛋白结合良好

经三次亚克隆后，通过间接 ELISA 法共筛选到 6 株杂交瘤细胞，分别命名为 anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4、anti-vSzM-5、anti-vSzM-6。使用 Western Blot 对这 6 株杂交瘤细胞上清进行进一步鉴定，抗原为 vSzM 蛋白，结果如图 3-3 所示，6 株杂交瘤细胞的细胞上清均与 vSzM 蛋白具有良好结合。

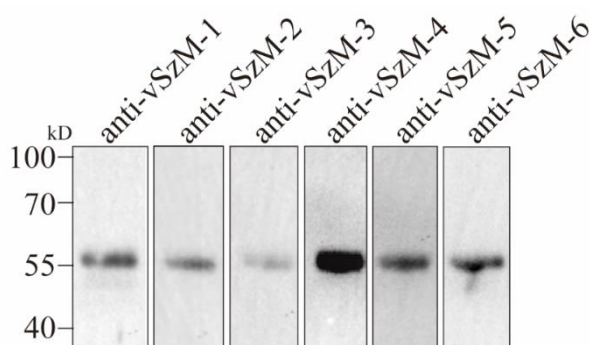


图 3-3 细胞上清的 Western Blot 鉴定

Fig 3-3 Identification the antibodies of cells culture medium by Western Blot

### 2.4 获得的 6 株杂交瘤细胞分泌的抗体类型均为 IgG1 类、κ 型

如图 3-4 所示，6 株杂交瘤细胞的上清与抗 IgG1 和 κ 轻链的二抗具有结合，经 TMB 显色后呈现肉眼可见的蓝色，而与其他 Ig 类型的二抗不反应，表明这 6 株单抗均属于 IgG1 类、轻链为 κ 型。

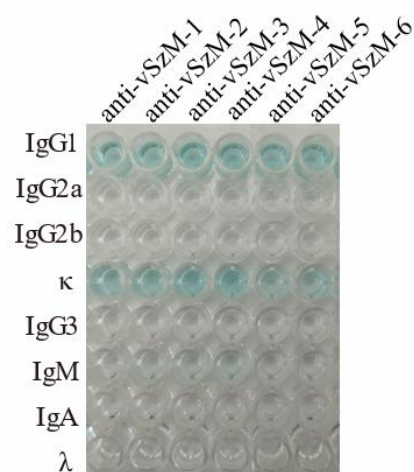


图 3-4 单克隆抗体类、亚类及型的鉴定

Fig 3-4 Identification the class, subclass and type of the monoclonal antibody

## 2.5 获得了高效价的腹水单抗

选取生长速率较快且细胞状态较好的 4 株杂交瘤细胞（anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4）进行腹水抗体的制备。用间接 ELISA 法对腹水效价进行检测，以小鼠阴性血清作为阴性对照，将 P/N 值（腹水 OD<sub>450</sub>/阴性血清 OD<sub>450</sub>）大于 2.1 的最高稀释度作为腹水效价。结果如图 3-5 所示，anti-vSzM-1、anti-vSzM-3 腹水效价为 1: 102400；anti-vSzM-2、anti-vSzM-4 腹水效价为 1: 51200。

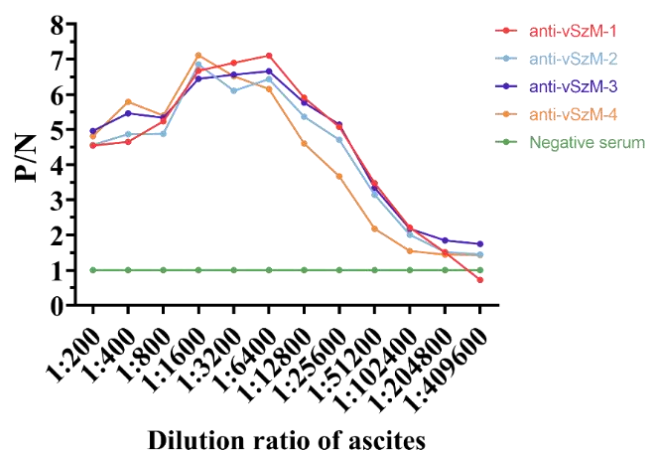


图 3-5 腹水中单抗水平

Fig 3-5 The level of antibodies in the ascites

## 2.6 腹水中单抗的鉴定

### 2.6.1 Western Blot 显示腹水中单抗与 tSzM 及 vSzM 反应良好

如图 3-6 所示，4 株单抗均可与 tSzM 蛋白、vSzM 蛋白反应，分别在 70 kD 和 55 kD 左右出现条带。由于 vSzM 蛋白是 tSzM 蛋白的一部分，所以理论上针对 vSzM 蛋白的单抗也能与 tSzM 蛋白反应，而与恒定区 cSzM 蛋白不反应，结果符合预期。

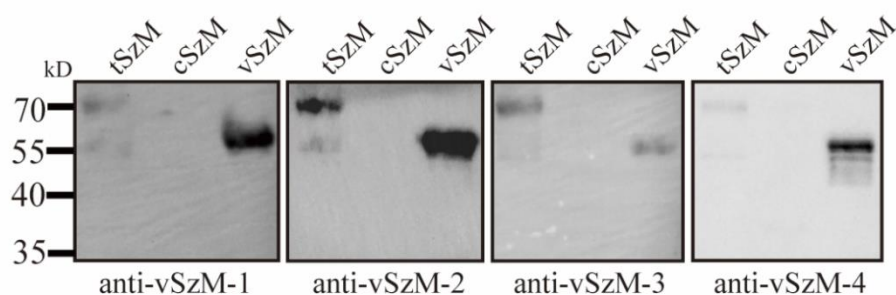


图 3-6 腹水中单克隆抗体的 Western Blot 鉴定

Fig 3-6 Identification the antibodies of ascites by Western Blot

tSzM: truncated SzM (截去信号肽的 SzM 蛋白); cSzM: conserved SzM (SzM 恒定区蛋白); vSzM: variant SzM (SzM 可变区蛋白)

tSzM: truncated SzM (signal peptide truncated SzM protein); cSzM: conserved SzM (SzM conserved region protein); vSzM: variant SzM (SzM variable region protein)

### 2.6.2 腹水中单抗可用于 SEZ ATCC35246 间接免疫荧光标记

将 4 株针对 SzM 可变区蛋白的腹水单抗 (anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4) 稀释 500 倍后分别与 ATCC35246 株和  $\Delta$ SzM 株进行间接免疫荧光标记。如图 3-7 所示，除 anti-vSzM-1 外，其他三株单抗与野生株反应良好，与  $\Delta$ SzM 菌株不反应。将 B、C、D 图中红色方框区域放大后可见明显的空心圆结构，这符合 SzM 蛋白表达在菌体表面的结构特征。对于 anti-vSzM-1 来说，由于与野生株 ATCC35246 整体结合的荧光信号微弱，即便放大后依旧无法显示出清晰的空心圆结构，但依旧能看出具有一定的结合。综上所述可知，这 4 株单抗均可与 ATCC35246 全菌产生特异性结合。

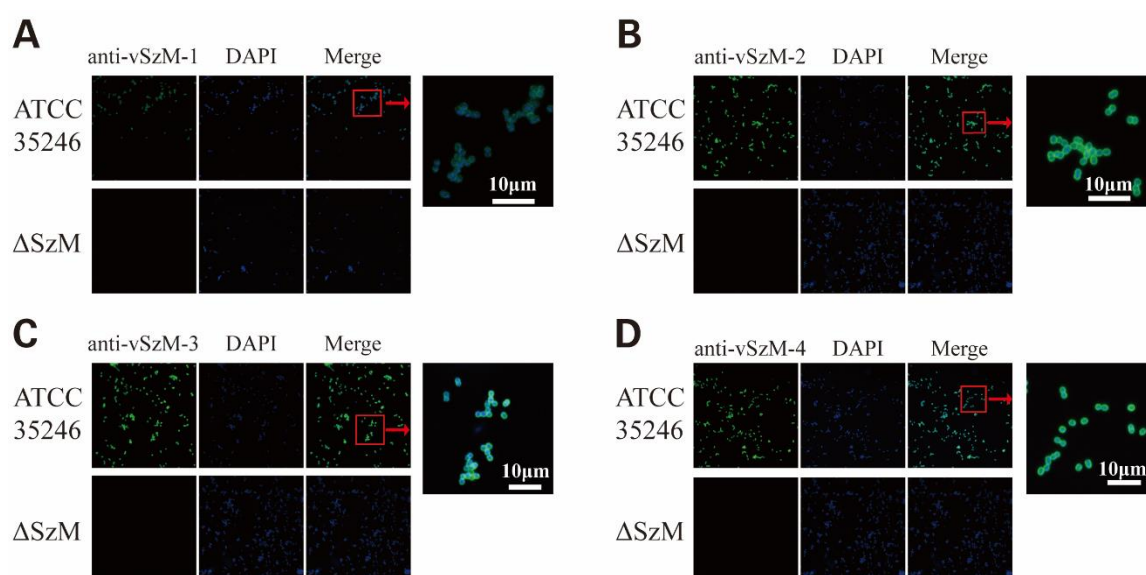


图 3-7 腹水中单克隆抗体与 ATCC35246 全菌的 IFA 鉴定

Fig 3-7 Identification of monoclonal antibodies in ascites by IFA

A. anti-vSzM-1 的 IFA 鉴定；B. anti-vSzM-2 的 IFA 鉴定；C. anti-vSzM-3 的 IFA 鉴定；D. anti-vSzM-4 的 IFA 鉴定

A. Identification of anti-vSzM-1 by IFA; B. Identification of anti-vSzM-2 by IFA; C. Identification of anti-vSzM-3 by IFA;

D. Identification of anti-vSzM-4 by IFA

## 2.7 腹水纯化后获得高纯度的单抗

对 4 株腹水单抗经 Protein-G 亲和层析树脂纯化后进行 SDS-PAGE 检测，由图 3-8（A, B）可知，纯化后的抗体条带主要处于 55 kD 和 25 kD 左右，这符合小鼠 IgG 重链和轻链的大小，并且杂带较弱，说明获得的单抗纯度较高，成功纯化出了单抗。

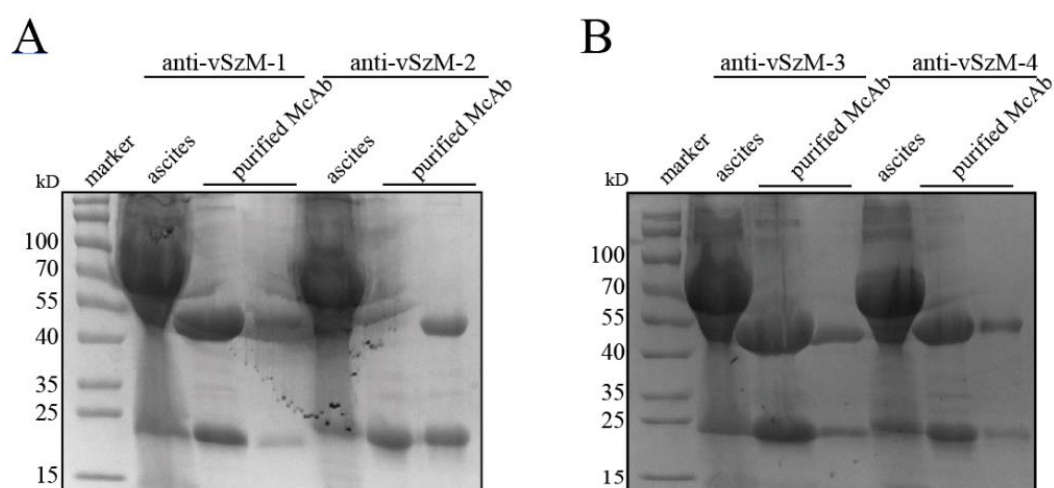


图 3-8 单克隆抗体的纯化

Fig 3-8 Purification of monoclonal antibodies

## 2.8 SzM 可变区与恒定区单抗动力学亲和力表征

利用 SPR 技术对 3 株抗 SzM 恒定区蛋白的单抗 (anti-cSzM-1、anti-cSzM-2、anti-cSzM-3) 以及 4 株抗 SzM 可变区蛋白的单抗 (anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4) 的动力学亲和力参数进行了检测, 包括结合速率常数 (Association rate constant,  $K_a$ )、解离速率常数 (Dissociation rate constant,  $K_d$ )、平衡解离常数 (Dissociation equilibrium constant,  $K_D$ )。 $K_a$  越大, 代表二者亲和力越高, 而  $K_d$  越小代表亲和力越高,  $K_D$  越小也代表亲和力越高。由表 3-2 可知, 从结合速率  $K_a$  来看, 3 株针对恒定区单抗 (anti-cSzM-1、anti-cSzM-2、anti-cSzM-3) 结合速率最快, 且均比较相近, 表明这 3 株抗体与其他抗体相比, 在相同条件下能够更快的与抗原进行结合。针对可变区的 4 株抗体与抗原结合由快到慢依次是 anti-vSzM-3、anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-4; 从解离速率  $K_d$  来看, anti-vSzM-2 最容易在结合后与抗原分离, 而 anti-vSzM-3 最不容易解离。从具有综合性评价的平衡解离常数  $K_D$  来看, 3 株针对恒定区蛋白的单抗以及 1 株针对可变区的单抗 (anti-vSzM-1) 处于  $10^{-9}$  M, 这一数量级在抗原抗体作用中属于较高亲和力范围; 而其余 3 株针对可变区蛋白的单抗 (anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4) 的  $K_D$  值处于  $10^{-8}$  M, 比针对恒定区蛋白的单抗要低 10-20 倍。

表 3-2 单克隆抗体的动力学和亲和力表征

| Antibody    | Antigen | $K_a(1/Ms)$         | $K_d(1/s)$             | $K_D(M)$               |
|-------------|---------|---------------------|------------------------|------------------------|
| Anti-cSzM-1 | tSzM    | $1.002 \times 10^5$ | $4.753 \times 10^{-4}$ | $4.745 \times 10^{-9}$ |
| Anti-cSzM-2 |         | $9.789 \times 10^4$ | $4.684 \times 10^{-4}$ | $4.785 \times 10^{-9}$ |
| Anti-cSzM-3 |         | $1.042 \times 10^5$ | $4.342 \times 10^{-4}$ | $4.166 \times 10^{-9}$ |
| Anti-vSzM-1 |         | $4.215 \times 10^4$ | $3.458 \times 10^{-4}$ | $8.203 \times 10^{-9}$ |
| Anti-vSzM-2 |         | $3.830 \times 10^4$ | $9.092 \times 10^{-4}$ | $2.374 \times 10^{-8}$ |
| Anti-vSzM-3 |         | $7.652 \times 10^4$ | $1.394 \times 10^{-3}$ | $1.822 \times 10^{-8}$ |
| Anti-vSzM-4 |         | $1.638 \times 10^4$ | $7.053 \times 10^{-4}$ | $4.305 \times 10^{-8}$ |

## 2.9 抗 SzM 蛋白恒定区单抗具有相同或相似的结合表位而可变区单抗结合表位具有多样性

利用 SPR 技术, 首先上样某种单抗以达到饱和抗原结合表位的目的, 之后上样其他单抗, 依据有无新的结合信号产生可以判断后上样的单抗表位与进行饱和抗体是否一致。为避免仪器因每次更换样品导致的结合信号产生的误差, 在这里选用抗体上样结束前 60 s 内结合信号值改变情况。

由图 3-9 (A 图) 可知, 阶段 1 (蓝色) 为饱和结合抗原表位的阶段, 使用单抗 anti-cSzM-1 进行饱和结合。此时曲线较平稳, 结合信号变化速率为 2.6 RU/min, 说明已接近饱和结合状态; 阶段 2 (红色) 为 His 标签抗体, 它作为阳性对照使用, 可见结合信号剧烈上升, 变化速率为 87.2 RU/min; 阶段 3 (棕色) 为第 2 株恒定区单抗 (anti-cSzM-2) 进样过程, 可知其结合信号改变速率仅为 0.5 RU/min, 几乎检测不到结合信号变化, 阶段 4 (绿色) 为第 3 株恒定区单抗 (anti-cSzM-3) 上样过程, 结合信号改变速率为 -0.3 RU/min, 也是几乎检测不到结合信号; 阶段 5 (灰色) 上样过程为抗胞内劳森菌 (*Lawsonia intracellularis*, LI) 热休克蛋白 (heat shock protein, Hsp) 的单抗, 以此为无关抗体对照, 由于无关抗体不会发生与 SzM 蛋白的结合, 故结合信号改变为 -8.9 RU/min, 出现较大的负结合信号主要是由于仪器在上样过程中, 液体在接触芯片表面蛋白的时候会不断少量地将结合在芯片上的饱和抗体冲洗下来, 从而使得上样通道信号值减去空白通道信号值为负值。综上所述, 在使用 anti-cSzM-1 饱和结合芯片表面 SzM 蛋白相应的抗原表位后, 上样 anti-cSzM-2、anti-cSzM-3 这两株抗体并未产生明显的结合信号, 表明这 3 株针对恒定区蛋白的单抗具有相同或重叠的表位, 这在本章结论 2.8 中的抗原抗体动力学中也有体现, 3 株抗体无论是结合速率常数还是解离速率常数, 都十分相似。

由图 3-9 (B 图) 可知, 使用单抗 anti-vSzM-3 饱和结合 SzM 蛋白后进样 anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-4, 在结束上样前 60 s 内依旧可以观察到明显的结合信号改变 (2.2 RU/min、4 RU/min、3.6 RU/min) 且在整个上样过程中结合信号不断增加, 而再次上样 anti-vSzM-3 时信号改变仅为 -0.2 RU/min (蓝色), 几乎检测不到结合信号改变, 而在阶段 5 进样 PBS (灰色) 信号值改变为 -2.6 RU/min, 阳性对照抗体 anti-cSzM-1 信号值改变为 3.8 RU/min。说明 anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-4 三株单抗与 anti-vSzM-3 的结合表位不一致, 这四株抗体中至少存在两种不同的结合表位。

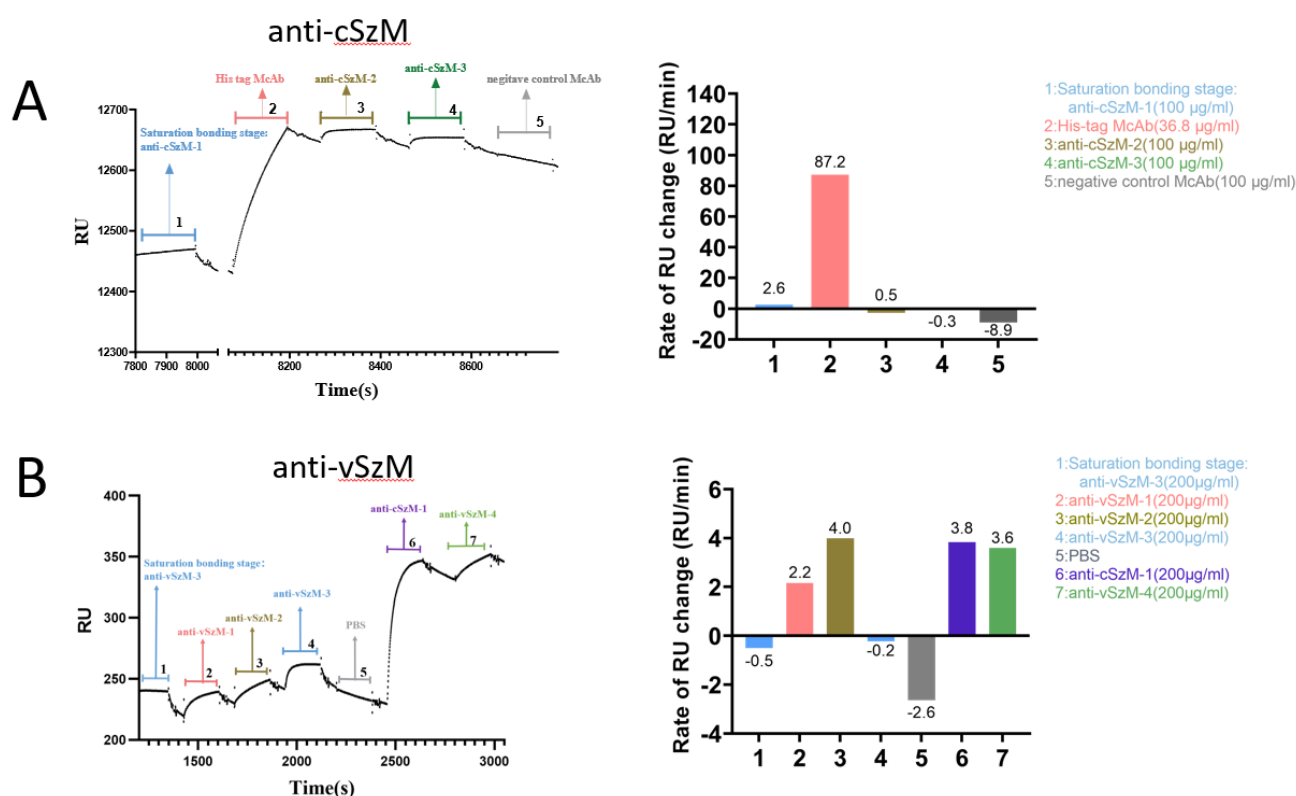


图 3-9 单克隆抗体结合表位的初步鉴定

Fig 3-9 Preliminary identification of binding epitope of monoclonal antibody

A. 左图：3 株抗 SzM 恒定区单抗的表位一致性鉴定（实时结合信号）；右图：每种抗体上样结束前 60 s 内结合信号改变速率

B. 左图：4 株抗 SzM 可变区单抗的表位一致性鉴定（实时结合信号）；右图：每种抗体上样结束前 60 s 内结合信号改变速率

A. Left picture: Epitope identity identification (real-time binding signal) of 3 anti-SzM conserved region monoclonal antibodies; right panel: Change rate of binding signal within 60 s before the end of injection of each antibody

B. Left panel: Epitope identity identification (real-time binding signal) of 4 anti-SzM variable region monoclonal antibodies; right panel: Change rate of binding signal within 60 s before the end of injection of each antibody

### 3 讨论

杂交瘤技术是单抗制备领域最基础且成功的技术，目前已有数千种单抗基于此技术被制备出来<sup>[8]</sup>。但该技术需要抗原具有良好的免疫原性，实验室前期将完整 SzM 蛋白免疫小鼠后进行杂交瘤细胞的制备，但最终只获得了 3 株与 SzM 恒定区结合的单抗。排除杂交瘤细胞筛选过程的操作误差，不难引起这样的疑惑，是否处于 N 端的可变区蛋白免疫原性较差，从而导致筛选到针对可变区的单抗概率较小。为避免

以上问题,本研究直接使用 SzM 可变区蛋白免疫小鼠制备单抗。从小鼠免疫血清具有较高抗体效价来看,单独 SzM 可变区蛋白实际上具有良好的免疫原性,但与恒定区蛋白共同存在时是否处于诱导机体免疫的劣势还需进一步研究。

本研究筛选到 6 株单抗均属于 IgG1,轻链为  $\kappa$  型。研究发现,蛋白质类抗原大多以诱导 IgG1 和 IgG3 亚类的抗体产生,而多糖类抗原则主要以诱导 IgG2 亚类抗体产生<sup>[9]</sup>。本研究免疫原为蛋白类抗原,诱导的抗体类型均为 IgG1 也在预期之内。IgG 抗体是机体含量最丰富的抗体类型,占抗体总量的 70%-80%,因较长的半衰期且可渗透到血管外从而最具有治疗潜力。此外,IgG1 抗体能够高效的诱导由 Fc 介导的各种免疫功能,这有利于后续体内外抗菌试验的开展<sup>[10]</sup>。

在间接免疫荧光试验中,anti-vSzM-1 抗体与 ATCC35246 全菌结合信号微弱,同等条件下,其他 3 株单抗能够看到明显的荧光信号。与此相反,以 SzM 蛋白为抗原进行的 SPR 亲和力检测,发现 anti-vSzM-1 是 4 株针对 vSzM 蛋白单抗中亲和力最高的一株,比其他 3 株亲和力要高 20-40 倍。Western Blot 同样显示这株单抗与 SzM 蛋白和 vSzM 蛋白均具有良好的结合活性,说明 SzM 蛋白可变区中有与 anti-vSzM-1 结合良好的表位存在。此株单抗与野生株菌体表面的 SzM 蛋白反应较差,而与重组表达的 vSzM 亲和性良好的背后的原因尚需进一步实验证实,可能的推测是 anti-vSzM-1 单抗针对的抗原表位存在空间位阻效应,该表位在 ATCC35246 菌体表面天然状态的 SzM 蛋白上属于隐蔽表位,抗体不易接触到该表位,而重组 vSzM 蛋白变性后,破坏了蛋白的空间构象,隐蔽表位暴露出来,使得抗体更容易与表位结合。

明确抗原抗体之间的亲和力对于单抗的应用至关重要,我们检测了针对 SzM 蛋白恒定区与可变区单抗的亲和力常数。高亲和力往往意味着抗体能更快,更紧密的与抗原表位结合,这对抗体发挥抗菌功能十分重要,同时也可以减少治疗性抗体的使用剂量,从而降低抗体药物的副作用<sup>[11, 12]</sup>。此外,高亲和力抗体还可应用于诊断学方面,比如阻断 ELISA、胶体金技术等。

本次我们使用 SPR 技术对抗原表位是否相同进行了鉴定,因为从动力学数据上,这 3 株抗体都极为相似,表位一致性鉴定结果也表明 3 株针对 SzM 蛋白恒定区的单抗具有相同或相似的表位,而 4 株针对 SzM 蛋白可变区单抗至少具有两个不同的结合表位。对于鉴别多株单抗针对的抗原表位是否相同,常用叠加 ELISA 方法进行判定<sup>[13]</sup>,即同一个 ELISA 孔内添加两株单抗,若结合表位不一致,则每孔抗体结合量要比单个抗体结合量多,加入酶标二抗孵育后显色,则可使吸光值增大,从而判定表位是否一致。而 SPR 技术对抗体表位的鉴定则更加直观方便,通过进样第一个抗体并达到饱和结合后,再进样第二个抗体,抗原表位是否一致可以直接从实时结合信号中得知。

## 4 本章小结

成功制备 6 株分泌抗 SzM 蛋白可变区抗体的杂交瘤细胞，抗体类型均属于 IgG1 亚类，轻链为  $\kappa$  型。选取其中 4 株进行腹水单抗制备并纯化，这 4 株腹水单抗与 SzM 蛋白反应性良好。SPR 技术检测 4 株抗 SzM 蛋白可变区单抗与实验室前期保存的 3 株抗 SzM 蛋白恒定区单抗的亲和力，表明这 7 株抗体与 SzM 蛋白的平衡解离常数在  $10^{-8}$ - $10^{-9}$ M 之间，亲和力较高，并发现 3 株抗 SzM 蛋白恒定区的单抗具有相同或重叠的结合表位，而 4 株抗 SzM 蛋白可变区的单抗识别表位具有多样性。

## 参考文献

- [1] Las Heras A, Vela AI, Fernández E, Legaz E, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [J]. J Clin Microbiol, 2002,40(3):1106-1108.
- [2] Pelkonen S, Lindahl SB, Suomala P, Karhukorpi J, Vuorinen S, Koivula I, Väisänen T, Pentikäinen J, Autio T, Tuuminen T. Transmission of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection from horses to humans [J]. Emerg Infect Dis, 2013,19(7):1041-1048.
- [3] Pesavento PA, Hurley KF, Bannasch MJ, Artiushin S, Timoney JF. A clonal outbreak of acute fatal hemorrhagic pneumonia in intensively housed (shelter) dogs caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [J]. Vet Pathol, 2008,45(1):51-53.
- [4] Chen X, Resende-De-Macedo N, Sitthicharoenchai P, Sahin O, Burrough E, Clavijo M, Derscheid R, Schwartz K, Lantz K, Robbe-Austerman S, Main R, Li G. Genetic characterization of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* associated with high swine mortality in the United States [J]. Transbound Emerg Dis, 2020,67(6):2797-2808.
- [5] Velineni S, Timoney JF. Characterization and protective immunogenicity of the SzM protein of *Streptococcus zooepidemicus* NC78 from a clonal outbreak of equine respiratory disease [J]. Clin Vaccine Immunol, 2013,20(8):1181-1188.
- [6] Timoney JF, Qin A, Muthupalani S, Artiushin S. Vaccine potential of novel surface exposed and secreted proteins of *Streptococcus equi* [J]. Vaccine, 2007,25(30):5583-5590.
- [7] Lannergård J, Gustafsson MC, Waldemarsson J, Norrby-Teglund A, Stålhammar-Carlemalm M, Lindahl G. The Hypervariable region of *Streptococcus pyogenes* M protein escapes antibody attack by antigenic variation and weak immunogenicity [J]. Cell Host Microbe, 2011,10(2):147-157.
- [8] Zaroff S, Tan G. Hybridoma technology: the preferred method for monoclonal antibody generation for in vivo applications [J]. Biotechniques, 2019,67(3):90-92.
- [9] Hjelholt A, Christiansen G, Sørensen US, Birkelund S. IgG subclass profiles in normal human sera of antibodies specific to five kinds of microbial antigens [J]. Pathog Dis, 2013,67(3):206-213.
- [10] Taeye SW, Rispens T, Vidarsson G. The ligands for human IgG and their effector functions [J]. Antibodies (Basel), 2019,8(2).
- [11] Kostolanský F, Varecková E, Betáková T, Mucha V, Russ G, Wharton SA. The strong positive correlation between effective affinity and infectivity neutralization of highly cross-reactive

- monoclonal antibody IIB4, which recognizes antigenic site B on influenza A virus haemagglutinin [J]. *J Gen Virol*, 2000,81(Pt 7):1727-1735.
- [12] Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2019,7(6):e00535.
- [13] Friguet B, Djavadi-Ohanian L, Pages J, Bussard A, Goldberg M. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the beta 2-subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase [J]. *J Immunol Methods*, 1983,60(3):351-358.

## 第四章 SzM 蛋白单克隆抗体的体外抗菌效果评价

**摘要：**靶向细菌表面蛋白的单克隆抗体抗菌作用主要通过凝集活性，补体激活和调理吞噬实现。本章对制备的 4 株 SzM 蛋白可变区单克隆抗体（anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4）和实验室前期保存的 1 株 SzM 蛋白恒定区单克隆抗体（anti-cSzM-1）的体外抗菌效果进行评价。通过抗体凝集细菌试验、介导补体杀菌试验及调理吞噬试验对这 5 株单克隆抗体的体外抗菌效果进行检测，旨在明确其抗菌机制。抗体凝集细菌试验中，抗体作用浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时，5 株单克隆抗体均不能使 ATCC35246 菌株凝集沉淀。抗体介导补体杀菌试验中，SEZ 与抗体先孵育 30 min 后再与补体共同作用 1 h，5 株单克隆抗体及对照组 SzM 蛋白的多克隆抗体均未能激活补体裂解 SEZ，细菌 CFU 无明显减少（ $P > 0.05$ ）；在调理吞噬试验中，5 株单克隆抗体均显著促进小鼠原代腹腔巨噬细胞对 ATCC35246 菌株的吞噬（ $P < 0.05$ ），其中 3 株 SzM 蛋白可变区单克隆抗体（anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4）的调理吞噬效果明显优于另外 2 株单克隆抗体（anti-vSzM-1、anti-cSzM-1）。以上结果表明，5 株单克隆抗体在体外均具有明显的调理吞噬活性，但不具有凝集活性和介导补体杀菌功能。

**关键词：**单抗；抗菌机制；调理吞噬；SzM

体液免疫是获得性免疫帮助宿主抵抗感染的重要组成，抗体是体液免疫发挥功能的核心活性分子。据报道，在绝大多数情况下抗体不能直接裂解细菌，需要补体和/或吞噬细胞的共同参与才能起到杀菌作用<sup>[1]</sup>。根据细菌的不同致病机制，抗菌性抗体的作用机制可分为两种：（i）中和外毒素及其他分泌性的毒力因子；（ii）诱导补体介导的杀菌作用以及调理吞噬细胞的吞噬和杀伤作用。对于侵袭性细菌来说，抗体则主要依赖于后一种作用途径对其进行杀伤<sup>[2]</sup>，如针对铜绿假单胞菌表面多糖的单抗可介导补体杀伤活性，并与补体共同存在时促进 HL60 细胞对铜绿假单胞菌的吞噬<sup>[3]</sup>；如针对脑膜炎球菌 H 因子结合蛋白（fHbP）的单抗和针对肺炎克雷伯菌菌毛蛋白的单抗均可在体外介导补体的杀菌活性<sup>[4, 5]</sup>。此外，抗体凝集细菌作用也被认为有助于宿主抵抗细菌感染，抗肺炎球菌表面荚膜多糖的单抗可促进细菌凝集从而限制肺炎球菌对宿主的定植<sup>[6]</sup>。

SzM 蛋白是 SEZ 菌体表面的重要毒力因子之一，可结合纤维蛋白原进而具有抗吞噬作用，对 SEZ 在人和动物血液中存活至关重要<sup>[7]</sup>。同时 SzM 蛋白具有良好的免疫原性，具有作为疫苗开发的潜力。使用 SEZ 马源分离株的 SzM 蛋白免疫小鼠后，获得的多抗血清具有调理作用<sup>[8, 9]</sup>。但对于引起中国四川和北美暴发的 SEZ 猪源分离

株来说, 其与马源分离株的 SzM 蛋白同源性较低, 针对猪源 SEZ ATCC35246 SzM 蛋白的抗体是否具有类似于马源分离株 SzM 蛋白多抗血清的体外抗菌活性我们还不得而知, 且由于 SzM 蛋白可分为恒定区与可变区, 针对不同区域抗体的体外保护效果差异也未见报道。因此, 本研究将对猪源分离株 ATCC35246 SzM 蛋白恒定区与可变区的单抗进行以下三方面的活性检测: 抗体凝集细菌试验、介导补体杀菌试验和调理吞噬试验, 从而对单抗的体外抗菌效果进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及实验动物

SEZ ATCC35246 株 (购自美国国家标准品保藏中心); ATCC35246 SzM 蛋白缺失株  $\Delta$ SzM (由本实验室构建); 10 周龄雌性豚鼠、6-7 周龄雌性 ICR 小鼠 (购自南京青龙山动物养殖场)。

### 1.2 主要试剂与耗材

1640 细胞培养液 (购自 Gibco 公司); 无菌脱纤维绵羊血、青链霉素混合液 (购自 Solarbio 公司); 兔抗绵羊红细胞溶血素 (购自上海信帆生物公司); 24 孔细胞培养板 (购自 Corning)。

### 1.3 抗体凝集细菌试验

(1) 分别挑取 THB 平板上的 SEZ ATCC35246、 $\Delta$ SzM 单菌落于 THB 液体培养基中培养, 待其生长到对数期 ( $OD_{600}=0.6-0.8$ ) 时以 7000 r/min 转速离心 10 min, 弃去上清后用 PBS 重悬洗涤 3 次, 以 PBS 的  $OD_{600}$  为基准, 调整菌液  $OD_{600}=1.0$ , 此时菌液浓度约为  $5 \times 10^8$  CFU/mL。

(2) 添加单抗到 SEZ ATCC35246、 $\Delta$ SzM 菌液中, 抗体作用浓度为 200  $\mu$ g/mL, 充分涡旋混匀后将两种菌液浓度调整一致, 大约为  $OD_{600}=0.93$ 。

(3) 将菌液分装到 2 mL 灭菌 EP 管中, 每管 1 mL, 每种混合液分装 6 管后于 4  $^{\circ}$ C 静置, 尽量避免震动。每隔 0.5 h 取出一管, 吸取最上层液体 100  $\mu$ L 进行  $OD_{600}$  吸光度检测, 共检测 3 h。

### 1.4 抗体介导补体杀菌试验

#### 1.4.1 补体活性验证

(1) 新鲜豚鼠血清的获得: 保定豚鼠, 常规消毒后用 5 mL 注射器进行心脏采血。采集的血液于 4  $^{\circ}$ C 静置 12 h, 将析出后的血清保存于 -40  $^{\circ}$ C 冰箱待用。

(2) 2%绵羊红细胞悬液的制备：商品化脱纤维绵羊血以 1000 r/min 转速离心 10 min 后，此时绵羊红细胞沉降在下层，弃去上清，吸取 100  $\mu$ L 红细胞于 4.9 mL PBS 中，缓慢上下颠倒使红细胞充分混匀，即可得到 2%绵羊红细胞悬液。

(3) 补体溶血试验：将兔抗绵羊红细胞抗体（溶血素）以 1: 800 的稀释度加入到 1 mL 2%绵羊红细胞悬液中，轻轻混匀后 37  $^{\circ}$ C 水浴 30 min，随后以 1: 50 稀释度加入豚鼠血清，混匀后继续水浴 30 min，最后观察溶血情况。同时设置对照组：2%绵羊红细胞+PBS 组；2%绵羊红细胞+溶血素组；2%绵羊红细胞+豚鼠血清组；2%绵羊红细胞+溶血素+热灭活豚鼠血清组。豚鼠血清热灭活方法：将豚鼠血清置于 56  $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后即可实现补体灭活。

#### 1.4.2 抗体介导补体杀菌试验

(1) 挑取生长在 THB 平板上的 SEZ ATCC35246 于 THB 液体培养基中培养至对数期，7000 r/min 离心 10 min 后弃去培养液，将菌体用灭菌 PBS 重悬洗涤三遍，以 PBS 的 OD<sub>600</sub> 为基准，调整菌液 OD<sub>600</sub>=1.0。

(2) 用 PBS 对调整后菌液进行 10 倍比稀释至 10<sup>3</sup> CFU/mL，取 500  $\mu$ L 菌液于 1 mL EP 管中，加入单抗或多克隆抗体，使抗体作用浓度为 200  $\mu$ g/mL，涡旋混匀后于 37  $^{\circ}$ C 摇床孵育 30 min，使抗体与 SEZ 充分结合。

(3) 孵育结束后，每管菌液加入 125  $\mu$ L 豚鼠血清，随后 37  $^{\circ}$ C 水浴 1 h，期间每 15 min 进行上下颠倒混匀。

(4) 待补体作用结束后，涡旋混匀，每管样品取 100  $\mu$ L 滴加到 THB 固体平板上，加入 5-6 颗玻璃珠摇晃数次将菌液涂布均匀，随后将平板置于 37  $^{\circ}$ C 温箱过夜培养，次日进行菌落计数。

### 1.5 调理吞噬试验

#### 1.5.1 小鼠原代腹腔巨噬细胞的获取

(1) 配置肉汤培养液（配方：1%胰蛋白胨、0.3%牛肉浸膏、0.5%氯化钠）200 mL，并高压灭菌。

(2) 连续三天对 ICR 小鼠腹腔注射 1 mL 肉汤培养液，以诱导巨噬细胞在腹腔的聚集。

(3) 3 d 后诱导结束，断颈处死小鼠并浸泡于 75%酒精 3-5 min，在超净台中固定小鼠，剪开腹部皮肤以暴露腹膜，用镊子小心夹起腹膜并用注射器往腹腔注入 5 mL 4  $^{\circ}$ C 预冷的 PBS，随后用酒精棉球轻轻按摩小鼠腹部 5 min。按摩结束后，用注射器将腹腔内液体吸出来，注意不要吸到肠壁或其他内脏，并重复进行 2-3 次 PBS 冲

洗，将获得的冲洗液收集于 15 mL 离心管中，以 1000 r/min 转速离心 10 min。

(4) 离心结束后，弃去上清，加入 1640 细胞培养液，并用巴氏吸管轻柔的反复吹打以重悬混匀细胞，将细胞悬液以每孔 500  $\mu$ L 的体积加入 24 孔板内，随后将细胞板置于细胞培养箱中培养 2 h，等待巨噬细胞贴壁。

(5) 培养 2 h 后，用 1640 细胞培养液洗涤 24 孔细胞板三次，去除未贴壁的杂细胞。

(6) 洗涤结束后，于每孔加入 500  $\mu$ L 含 10%胎牛血清的 1640 细胞培养液，随后转移至细胞培养箱中培养 48 h。

### 1.5.2 调理吞噬试验

共分为 6 组，分别为 PBS 组、anti-cSzM-1 组、anti-vSzM-1 组、anti-vSzM-2 组、anti-vSzM-3 组、anti-vSzM-4 组，每组 4 个重复孔。

(1) 细胞准备：将本章 1.5.1 铺好的含有巨噬细胞的 24 孔板用 1640 细胞培养液洗涤一遍，同时加入 400  $\mu$ L 新鲜的 1640 细胞培养液和已过滤除菌的单抗 12.5  $\mu$ L (50  $\mu$ g)，将细胞板置于 37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱孵育 1 h。

(2) 细菌准备：将生长处于对数期的 ATCC35246 的菌液离心，PBS 洗涤三遍后，调整菌液 OD<sub>600</sub>=1.0。用 PBS 对调整后菌液稀释 10 倍，之后将菌液与单抗以 100  $\mu$ L 菌液对应 12.5  $\mu$ L (50  $\mu$ g) 单抗的比例混合，涡旋混匀后于 37  $^{\circ}$ C 摇床孵育 30 min。

(3) 取 (2) 中的菌液 112.5  $\mu$ L 加入 (1) 处理后的细胞孔内，MOI=500，此时每孔中抗体浓度约为 200  $\mu$ g/mL。

(4) 菌液加入完毕后，将 24 孔板以 1000 r/min 的速度离心 10 min，从而使细菌能够充分接触细胞，随后将 24 孔板置于细胞培养箱中作用 1.5 h 进行吞噬。

(5) 吞噬结束后，用灭菌 PBS 对 24 孔板洗涤 3 遍，每遍 5 min，洗涤结束后每孔加入含青霉素 (5  $\mu$ g/mL) 和庆大霉素 (100  $\mu$ g/mL) 的 1640 培养液 2 mL，将 24 孔细胞板置于细胞培养箱中作用 1 h，杀灭未被吞噬的 SEZ。

(6) 双抗作用完毕后，用灭菌 PBS 洗涤 3 遍，每遍 5 min，随后每孔加入 500  $\mu$ L 灭菌的超纯水作用 10 min，使细胞破碎从而释放出被吞噬的细菌，再加入 500  $\mu$ L 灭菌的 2 $\times$ PBS 以调整细胞孔内液体渗透压。

(7) 用 1 mL 移液枪反复吹打每孔，随后转移至 2 mL EP 管中进行 10 倍、100 倍、1000 倍稀释，取每个稀释梯度液体 10  $\mu$ L 滴加于 THB 平板上，37  $^{\circ}$ C 过夜培养，次日进行菌落计数。

## 2 结果

### 2.1 检测的 5 株抗 SzM 蛋白的单抗均无体外凝集 SEZ 活性

如图 4-1 所示，单抗以 200  $\mu\text{g/mL}$  的浓度作用于 ATCC35246 及阴性对照  $\Delta\text{SzM}$  菌株，混匀后菌液于 4  $^{\circ}\text{C}$  环境静置，每隔 0.5 h 对菌液上清进行  $\text{OD}_{600}$  吸光度检测。结果显示，当菌液处于较高起始浓度时 ( $\text{OD}_{600}=0.93$ )，与 PBS 组相比 (蓝色线)，ATCC35246 株及  $\Delta\text{SzM}$  株添加单抗后，在三小时内细菌的凝集沉降速度并未加快，以上结果表明，1 株抗 SzM 恒定区单抗及 4 株抗 SzM 蛋白可变区单抗均不能诱导 SEZ 凝集。

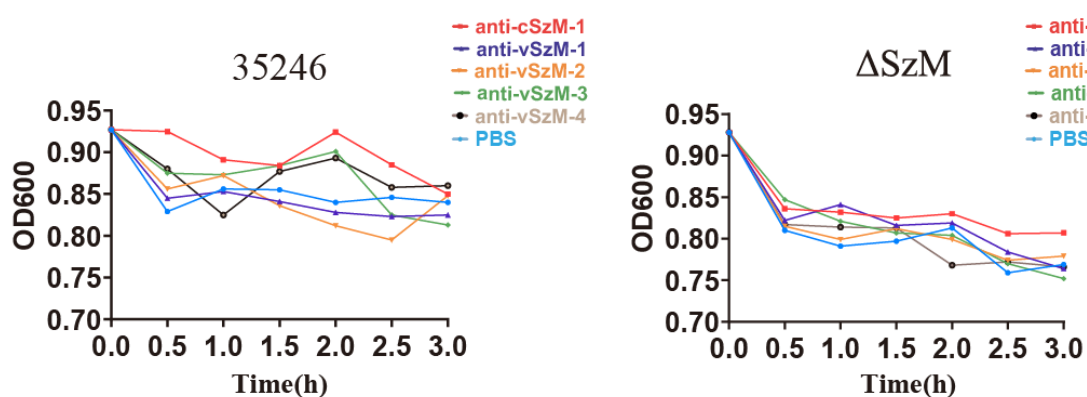


图 4-1 抗体凝集细菌试验

Fig 4-1 Antibody agglutination bacteria test

### 2.2 抗体介导补体杀菌活性

#### 2.2.1 豚鼠血清（补体）具有生物学活性

绵羊红细胞与抗绵羊红细胞的抗体结合后，加入豚鼠血清，若豚鼠血清中的补体有活性，则可被结合在红细胞表面抗体的 Fc 段激活生成攻膜复合体裂解红细胞而出现溶血现象。由图 4-2 及对应的表 4-1 可知，1 号管中的绵羊红细胞完全破裂，溶液呈现均匀透亮的特点，而未发生溶血的样品（2-5 管），经离心后红细胞沉降于管底。以上结果表明，获得的豚鼠血清中补体具有生物学活性。

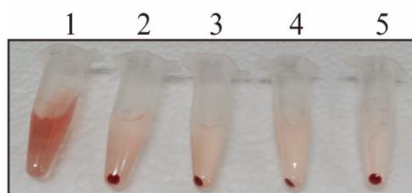


图 4-2 补体溶血试验

Fig 4-2 Complement hemolysis test

表 4-1 补体溶血试验分组

Table 4-1 Grouping for complement hemolysis test

| 分组    | 补体              | 2%绵羊红细胞                 | 兔抗绵羊红细胞抗体                              |
|-------|-----------------|-------------------------|----------------------------------------|
| Group | Complement      | 2% Sheep red blood cell | Rabbit anti-sheep erythrocyte antibody |
| 1     | √               | √                       | √                                      |
| 2     |                 | √                       | √                                      |
| 3     | √ (inactivated) | √                       | √                                      |
| 4     | √               | √                       |                                        |
| 5     |                 | √                       |                                        |

### 2.2.2 抗 SzM 蛋白的单抗均无介导补体裂解 SEZ 活性

先将 SEZ 菌液与抗体 (200  $\mu\text{g/mL}$ ) 孵育 30 min 后添加补体, 结果如图 4-3 (A 图) 所示, 与未加抗体组相比 (F、G 组), 单抗组 (A-E 组) 在添加补体后 SEZ 数量无显著变化 ( $P > 0.05$ )。同时, 使用多克隆抗体作为对照 (右图), 当将 SzM 蛋白的鼠源及兔源多抗与补体共同作用 SEZ 后, 细菌数量与未加抗体组相比, 并未有明显差异 ( $P > 0.05$ )。结果表明, 针对 SzM 蛋白的抗体不能介导补体产生杀菌活性。

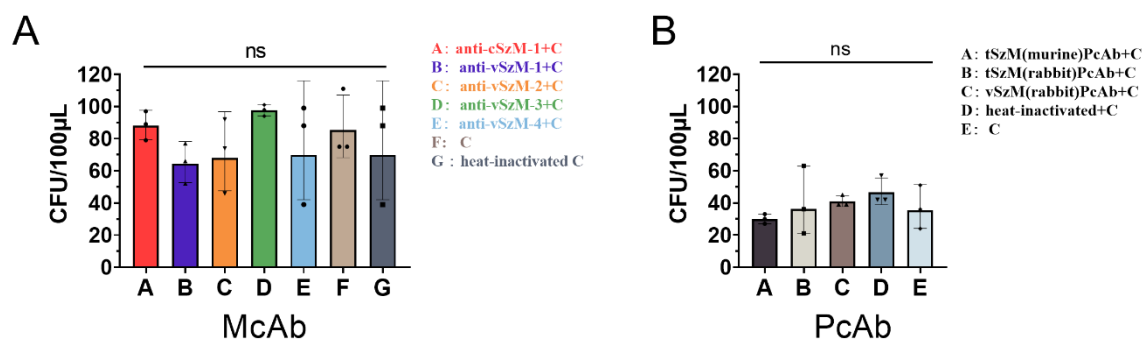


图 4-3 抗体介导补体杀菌试验

Fig 4-3 Antibody-mediated complement bactericidal test

A. 抗 SzM 蛋白的单抗介导的补体杀菌试验; B. 抗 SzM 蛋白的多抗介导的补体杀菌试验

A. Monoclonal antibody-mediated complement bactericidal test; B. Polyclonal antibody-mediated complement bactericidal test

### 2.3 针对 SzM 蛋白的单抗具有调理吞噬活性

如图 4-4 所示, 在  $\text{MOI}=500$  的情况下使用单抗进行调理吞噬 1.5 h, 与 PBS 组相比, 5 株单抗组均表现出显著的调理吞噬活性 ( $P < 0.05$ ), 且三株可变区单抗 (anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4) 的调理吞噬活性优于其他两株单抗 (anti-cSzM-

## 1、anti-vSzM-1)。

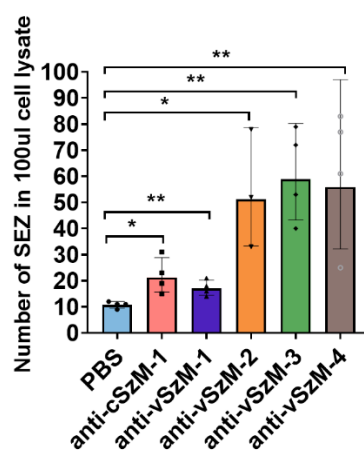


图 4-4 调理吞噬试验

Fig 4-4 Opsonophagocytosis test

## 3 讨论

抗体凝集细菌被认为是抗体发挥抗菌机制的重要途径之一，凝集性抗体一方面可独立于 Fc 段介导的生物学效应而直接阻断病原菌的黏附侵袭，另一方面可促进机体内病原菌凝集成团而加速补体及吞噬细胞对细菌的清除<sup>[10-12]</sup>。本研究中筛选到的单抗均属于 IgG1 型抗体，有报道表明该类型抗体具有良好的凝集活性，可帮助宿主抵抗病原菌的感染<sup>[6]</sup>。但在本章体外凝集试验中，抗体（200  $\mu\text{g/mL}$ ）作用于 SEZ 后并未表现出凝集活性。抗体能否引起细菌凝集，与其针对的细菌表面抗原类型相关。研究发现，与细菌表面多糖结合的抗体比与细菌表面蛋白结合的抗体更加倾向具有凝集活性<sup>[13]</sup>。在对肺炎球菌表面的凝集性抗原进行筛选时，同样发现只有针对荚膜多糖的抗体可以诱导细菌凝集<sup>[6]</sup>。此外，SEZ 菌体表面存在透明质酸荚膜，这也可能是单抗未能凝集 SEZ 的原因，因为带负电荷的荚膜会导致细菌之间具有相互排斥的倾向<sup>[14]</sup>。

为引发杀菌活性，抗体与细菌表面抗原结合后需通过补体或吞噬细胞来清除细菌。因此，细菌表面抗原的暴露程度及丰度对于抗体结合后发挥生物学功能至关重要。SzM 蛋白大量表达于菌体表面，且呈纤维状向外延申，便于单抗的结合。在这里我们评价了 SzM 蛋白单抗介导补体杀菌活性以及调理吞噬活性，这两种杀菌机制都和抗体 Fc 段密切相关。当抗体与抗原表位结合后补体 C1q 便可与抗体 Fc 段结合，从而通过经典途径激活补体系统，最终形成攻膜复合物（membrane attack complex, MAC）裂解细菌。普遍认为，MAC 对革兰氏阴性菌的杀伤效果明显<sup>[15-17]</sup>。而对于革兰氏阳性菌则效果不佳，即便许多革兰氏阳性菌菌体表面检测到 MAC 的沉积<sup>[18, 19]</sup>。

本次试验结果表明,无论是针对 SzM 蛋白的单抗或多克隆抗体,即便以较高浓度的抗体(200  $\mu\text{g/mL}$ )和补体作用于低浓度(小于  $10^3$  CFU/mL)的 SEZ 菌液,抗体介导补体对 SEZ 的杀伤作用仍不明显。一方面这可能与 SEZ 属革兰氏阳性菌,具有一层厚厚的肽聚糖细胞壁,对补体的直接裂解活性具有天然抗性有关。另一方面可能因为 SEZ 具有荚膜结构,而带有荚膜的链球菌可抑制补体激活<sup>[20]</sup>。

当使用原代小鼠腹腔巨噬细胞对抗体的调理作用进行评价时,我们发现测试的 5 株单抗均体现出显著的调理吞噬作用,且其中 3 株针对可变区的单抗(anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4)的促吞噬效果要明显优于恒定区单抗(anti-cSzM-1),有趣的是,这三株可变区单抗的亲和力远低于 anti-cSzM-1,相差大约 10-20 倍,可见高亲和力虽是评价单抗的重要表征,但与其发挥生物学效应并不成正相关。在不同 SEZ 菌株中, SzM 蛋白 C 端恒定区序列变化不大,因此,针对 ATCC35246 株 SzM 蛋白的恒定区单抗很可能同时具有对其他 SEZ 菌株的调理作用,从而发挥广谱性的保护效果。目前,这种广泛性的保护效果已在 A 群链球菌 M 蛋白的 C 端疫苗研发中体现<sup>[21]</sup>。N 端区域对于不同 SEZ 菌株的 SzM 蛋白来说高度可变,很难发挥广谱性的保护性效果,本试验筛选到 3 株具有良好调理吞噬能力的 SzM 蛋白可变区单抗,因流行于猪群 SEZ 的 SzM 蛋白类型具有一定保守性,因此针对这一 SzM 型的可变区单抗依旧具有良好的潜在应用价值。

## 4 本章小结

本章节对 4 株抗 SzM 蛋白可变区单抗与 1 株抗 SzM 恒定区单抗进行体外抗菌效果评价。最终明确了 5 株针对 SzM 蛋白的单抗均具有显著的调理吞噬活性,但不具有凝集细菌或介导补体杀菌的功能。

## 参考文献

- [1] Packer D. The history of the antibody as a tool [J]. *Acta Histochem*, 2021,123(4):151710.
- [2] Nagy E, Nagy G, Power CA, Badarau A, Szijártó V. Anti-bacterial Monoclonal Antibodies [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017,1053:119-153.
- [3] Horn MP, Zuercher AW, Imboden MA, Rudolf MP, Lazar H, Wu H, Hoiby N, Fas SC, Lang AB. Preclinical in vitro and in vivo characterization of the fully human monoclonal IgM antibody KBPA101 specific for *Pseudomonas aeruginosa* serotype IATS-O11 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010,54(6):2338-2344.
- [4] Vu DM, Pajon R, Reason DC, Granoff DM. A broadly cross-reactive monoclonal antibody against an epitope on the n-terminus of meningococcal fHbp [J]. *Sci Rep*, 2012,2:341.
- [5] Wang Q, Chang CS, Pennini M, Pelletier M, Rajan S, Zha J, Chen Y, Cvitkovic R, Sadowska A, Heidbrink Thompson J, Yu Lin H, Barnes A, Rickert K, Wilson S, Stover CK, Dall'Acqua WF, Chowdhury PS, Xiao X. Target-Agnostic Identification of Functional Monoclonal Antibodies Against *Klebsiella pneumoniae* Multimeric MrkA Fimbrial Subunit [J]. *J Infect Dis*, 2016,213(11):1800-1808.
- [6] Mitsi E, Roche AM, Reiné J, Zangari T, Owugha JT, Pennington SH, Gritzfeld JF, Wright AD, Collins AM, van Selm S, de Jonge MI, Gordon SB, Weiser JN, Ferreira DM. Agglutination by anti-capsular polysaccharide antibody is associated with protection against experimental human pneumococcal carriage [J]. *Mucosal Immunol*, 2017,10(2):385-394.
- [7] Bergmann R, Jentsch MC, Uhlig A, Müller U, van der Linden M, Rasmussen M, Waller A, von Köckritz-Blickwede M, Baums CG. Prominent Binding of Human and Equine Fibrinogen to *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Is Mediated by Specific SzM Types and Is a Distinct Phenotype of Zoonotic Isolates [J]. *Infect Immun*, 2019,88(1).
- [8] Velineni S, Timoney JF. Characterization and protective immunogenicity of the SzM protein of *Streptococcus zooepidemicus* NC78 from a clonal outbreak of equine respiratory disease [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013,20(8):1181-1188.
- [9] Velineni S, Timoney JF. Identification of novel immunoreactive proteins of *Streptococcus zooepidemicus* with potential as vaccine components [J]. *Vaccine*, 2013,31(38):4129-4135.
- [10] Roche AM, Richard AL, Rahkola JT, Janoff EN, Weiser JN. Antibody blocks acquisition of bacterial colonization through agglutination [J]. *Mucosal Immunol*, 2015,8(1):176-185.
- [11] Margni RA, Parma EA, Cerone S, Erpelding A, Perdigón G. Agglutinating and non-agglutinating antibodies in rabbits inoculated with a particulate antigen (*Salmonella typhimurium*) [J].

- Immunology, 1983,48(2):351-359.
- [12] Dalia AB, Weiser JN. Minimization of bacterial size allows for complement evasion and is overcome by the agglutinating effect of antibody [J]. Cell Host Microbe, 2011,10(5):486-496.
- [13] Kauffman RC, Adekunle O, Yu H, Cho A, Nyhoff LE, Kelly M, Harris JB, Bhuiyan TR, Qadri F, Calderwood SB, Charles RC, Ryan ET, Kong J, Wrammert J. Impact of Immunoglobulin Isotype and Epitope on the Functional Properties of *Vibrio cholerae* O-Specific Polysaccharide-Specific Monoclonal Antibodies [J]. mBio, 2021,12(2).
- [14] Courtney HS, Hasty DL. Aggregation of group A streptococci by human saliva and effect of Saliva on streptococcal adherence to host cells [J]. Infect. Immun, 1991,59(5):1661-1666.
- [15] Horn MP, Zuercher AW, Imboden MA, Rudolf MP, Lazar H, Wu H, Hoiby N, Fas SC, Lang AB. Preclinical in vitro and in vivo characterization of the fully human monoclonal IgM antibody KBPA101 specific for *Pseudomonas aeruginosa* serotype IATS-O11 [J]. Antimicrob. Agents Chemother, 2010,54(6):2338-2344.
- [16] Szijártó V, Guachalla LM, Visram ZC, Hartl K, Varga C, Mirkina I, Zmajkovic J, Badarau A, Zauer G, Pleban C, Magyarics Z, Nagy E, Nagy G. Bactericidal monoclonal antibodies specific to the lipopolysaccharide O antigen from multidrug-resistant *Escherichia coli* clone ST131-O25b: H4 elicit protection in mice [J]. Antimicrob. Agents Chemother, 2015,59(6):3109-3116.
- [17] Natali EN, Principato S, Ferlicca F, Bianchi F, Fontana LE, Faleri A, Pansegrau W, Surdo PL, Bartolini E, Santini L, Brunelli B, Giusti F, Veggi D, Ferlenghi I, Norais N, Scarselli M. Synergic complement-mediated bactericidal activity of monoclonal antibodies with distinct specificity [J]. Faseb j, 2020,34(8):10329-10341.
- [18] Berends ET, Dekkers JF, Nijland R, Kuipers A, Soppe JA, van Strijp JA, Rooijackers SH. Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria [J]. Cell Microbiol, 2013,15(12):1955-1968.
- [19] Bjanes E, Nizet V. More than a Pore: Nonlytic Antimicrobial Functions of Complement and Bacterial Strategies for Evasion [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2021,85(1).
- [20] Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms [J]. Infect Immun, 2010,78(2):704-715.
- [21] Brandt ER, Hayman WA, Currie B, Pruksakorn S, Good MF. Human antibodies to the conserved region of the M protein: opsonization of heterologous strains of group A streptococci [J]. Vaccine, 1997,15(16):1805-1812.

## 第五章 SzM 蛋白单克隆抗体对小鼠感染 SEZ 的保护效果评价

**摘要：**在病原菌对传统抗生素耐药性逐渐增强的趋势下，作为抗生素的潜在替代制品，单抗在治疗细菌感染性疾病领域得到迅速发展。本章评价了 4 株 SzM 蛋白可变区单抗（anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4）和 1 株 SzM 蛋白恒定区单抗（anti-cSzM-1）对小鼠受到致死剂量（ $2.4 \times 10^4$  CFU/只）SEZ 攻击的保护效果。根据单抗免疫时间点的不同，共设计了三种抗体免疫模式：（1）预防+治疗模式：攻毒前 12 h、攻毒后 24 h、72 h 分别给予单抗 200  $\mu$ g/只，三次总量共 600  $\mu$ g/只；（2）预防模式：攻毒前 12 h 一次性给予单抗 600  $\mu$ g/只；（3）治疗模式：攻毒后 4 h 一次性给予单抗 600  $\mu$ g/只。在预防+治疗模式中 5 株单抗均表现出一定的保护效果，其中 4 株单抗（anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4、anti-cSzM-1）免疫小鼠的存活率达 100%且有效清除了小鼠脏器中的 SEZ。另外 1 株单抗（anti-vSzM-1）组小鼠存活率为 60%，且 2/3 存活小鼠各脏器中均可检出 SEZ。对于单抗预防模式和治疗模式的保护效果评价，本章选取调理吞噬作用相对较强的 SzM 可变区单抗（anti-vSzM-3）为代表和恒定区单抗（anti-cSzM-1）分别进行。在治疗模式中 anti-vSzM-3 表现出显著的保护效果，攻毒 7 天后小鼠存活率为 80%，且存活小鼠各脏器均未检出 SEZ；而 anti-cSzM-1 免疫组小鼠全部死亡，与 PBS 组相比虽在一定程度上延长了小鼠存活时间，但未表现出显著性差异（ $P > 0.05$ ）。在预防模式中 anti-vSzM-3 免疫组攻毒 7 天后小鼠存活率达 100%且存活小鼠各脏器 SEZ 被完全清除；而 anti-cSzM-1 免疫组小鼠存活率为 60%，且 2/3 存活小鼠各脏器中仍可检出 SEZ。综合上述结果可知，在对抗 ATCC35246 菌株感染方面，SzM 蛋白可变区单抗（anti-vSzM-3）在三种免疫模式下均表现出良好保护效果，而 SzM 蛋白恒定区单抗（anti-cSzM-1）在治疗模式下保护效果不佳，只有在预防+治疗模式和预防模式中表现出一定的保护作用，但依据小鼠存活率及各脏器细菌载量，其保护效果要弱于可变区单抗（anti-vSzM-3）。以上结果表明，本研究成功获得了可保护小鼠抵抗致死剂量 SEZ 攻击的单抗，在抗体免疫方式上，明确了 SzM 蛋白恒定区单抗（anti-cSzM-1）以预防+治疗的模式免疫可取得最佳保护效果，但保护作用较强的 SzM 蛋白可变区单抗（anti-vSzM-3）则可直接用于单一预防或治疗模式而获得优秀的保护效果。

**关键词：**SEZ；单抗；保护效果；治疗

猪链球菌病严重威胁着我国养猪业，对猪链球菌病的预防和治疗依赖抗生素的

使用,但过量抗生素会增加细菌耐药性及猪肉中的药物残留<sup>[1]</sup>。SEZ 感染引起的猪链球菌病传播快,发病急,可在两周内引起 10%-50%的猪发病死亡<sup>[2]</sup>。因此亟需开发能有效替代抗生素且可快速产生保护效果的临床抗 SEZ 生物制品。随着抗体技术的发展,用于疾病治疗领域的单抗发展潜力迅速增长,截至 2019 年,已有超过 70 种单抗被批准用于人类疾病的治疗<sup>[3]</sup>。目前单抗疗法主要应用于肿瘤、自身免疫性疾病等领域,但随细菌耐药性增加,传统抗生素对细菌感染的治疗和预防逐渐受到限制,因此具有抗菌功能的单抗受到越来越多的关注<sup>[4]</sup>。

目前研发的抗菌性单抗主要集中于对细菌外毒素的中和方面,如针对金黄色葡萄球菌<sup>[5, 6]</sup>、肺炎链球菌<sup>[7]</sup>、大肠杆菌<sup>[8]</sup>、艰难梭菌<sup>[9]</sup>相关毒素的单抗获得了不同程度的成功。此外,也有多种靶向细菌表面蛋白及多糖的单抗被研发出来<sup>[10, 11]</sup>,其中最成功的是 MEDI3902,一种针对铜绿假单胞菌纤维蛋白 PcrV 和多糖 PsI 的双特异性抗体,可通过调理作用促进机体对铜绿假单胞菌的清除<sup>[12]</sup>。多项研究表明,C 群链球菌的类 M 蛋白可诱导机体产生保护性抗体,如针对 SEE 类 M 蛋白的单抗可通过被动免疫保护小鼠免受致死菌量的攻击<sup>[13, 14]</sup>;针对 SEZ 马源分离株 SzM 蛋白产生的抗体可以帮助小鼠抵抗 SEZ 感染<sup>[15]</sup>。由于不同 SEZ 菌株的 SzM 蛋白同源性较低,马源分离株 SzM 蛋白抗体表现出的保护作用并不能完全代表猪源分离株 SzM 蛋白抗体的体内保护效果,且猪源分离株比马源分离株具有更高的毒力<sup>[16]</sup>,菌株毒力间的差异性是否会影响针对 SzM 蛋白抗体的保护作用不得而知。因此需要对抗猪源分离株 ATCC35246 SzM 蛋白的抗体进行单独的体内保护性评价。此外,SzM 蛋白结构可分为恒定区与可变区,针对恒定区的单抗具有广谱抗 SEZ 菌株的潜力,而针对可变区的单抗对猪群流行 SEZ 菌株更加具有针对性,验证针对 SzM 蛋白不同区域的单抗对小鼠的保护作用可以为后续临床实际应用提供技术支持。本章以小鼠为模型,探究了针对 ATCC35246 菌株 SzM 蛋白的单抗在三种免疫模式下的保护效果,以此评价所获得单抗的体内保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和动物

SEZ ATCC35246 菌株(购自美国国家标准品保藏中心);SPF 级 6-7 周龄 C57BL/6J(购自江苏省集萃药康生物公司)。

### 1.2 耗材和仪器

毛细玻璃管、2 mL 匀浆管、胰岛素注射器(购自南京沃华生物公司);台式离心

机（购自 Eppendorf）

### 1.3 动物保护试验

#### 1.3.1 攻毒菌液的准备

挑取 THB 平板上的 ATCC35246 单菌落于 THB 液体培养基中，待长至对数期后，以 7000 r/min 转速离心 10 min，随后弃去上清，将菌体沉淀用无菌 PBS 洗涤三遍后重悬，调整菌液浓度，使  $OD_{600}=1.0$  左右，此时菌液约为  $5 \times 10^8$  CFU/mL，10 倍比稀释至  $10^5$  CFU/mL，以此为攻毒菌液。同时对攻菌原液进行 10 倍、100 倍、1000 倍稀释，每个稀释度取 10  $\mu$ L 滴加于 THB 平板中计数。

#### 1.3.2 单抗免疫小鼠程序

根据抗体免疫时间点的不同，可分为预防模式（攻毒前 12 h 每只小鼠一次性给予 600  $\mu$ g 单抗）、治疗模式（攻毒后 4 h 每只小鼠一次性给予 600  $\mu$ g 单抗）、预防+治疗模式（在攻毒前 12 h、攻毒后 24 h、72 h 分别给予每只小鼠 200  $\mu$ g 单抗，三次抗体免疫总量为 600  $\mu$ g），三种免疫模式如图 5-1 所示。单抗及 SEZ 菌液均通过尾静脉方式给予，SEZ 攻毒剂量为  $2.4 \times 10^4$  CFU/只。在预防+治疗模式中，共评价了 5 株单抗（anti-cSzM-1、anti-vSzM-1、anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4）的保护效果；对于单独的预防、治疗模式，依据调理吞噬活性，选择 anti-cSzM-1、anti-vSzM-3 分别为 SzM 蛋白恒定区、可变区单抗代表株进行保护效果的评价。

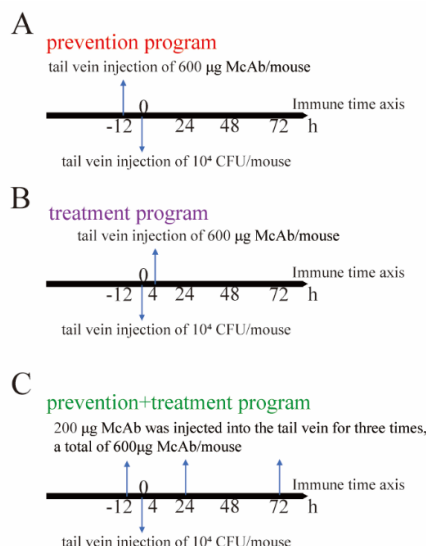


图 5-1 三种单克隆抗体免疫模式图

Fig 5-1 Three programs of monoclonal antibody immunization

A. 预防模式； B. 治疗模式； C. 预防+治疗模式

A. Prevention program; B. Treatment program; C. Prevention + treatment program

### 1.3.3 攻毒后存活小鼠各脏器细菌载量及分布

由于 PBS 组小鼠在 7 天观察期内 100% 死亡，所以只能对给予抗体且产生保护作用的存活小鼠进行各脏器细菌载量的统计。准备好灭菌的匀浆管，每管放入 4-5 颗小钢珠及 1 mL PBS，随后进行称重记录。在处死小鼠前使用毛细玻璃管进行眼眶采血收集血液，采血结束后脱颈处死小鼠并将其浸泡于 75% 酒精 3-5 min，随后在超净台中解剖小鼠，分别取心、肝、脾、肺、肾、脑，并将这些脏器置于盛有无菌 PBS 的培养皿中洗涤，然后分别放置于事先称好重量的匀浆管中，用分析天平进行再次称重，两次重量之差即为管中脏器的重量。之后将匀浆管置于匀浆仪中将各脏器研磨成液体状态，将匀浆好的各脏器液体及血液进行 10 倍比稀释，每个样本进行 6 个梯度的稀释，每个稀释度（含原液）取 10  $\mu$ L 滴于 THB 平板上进行细菌计数。

## 2 结果

### 2.1 在预防+治疗免疫模式中所有单抗均表现出保护效果

经细菌计数可知，小鼠实际攻毒剂量为  $2.4 \times 10^4$  CFU/只。在攻毒前 12 h，攻毒后 24 h、72 h 各给予单抗 200  $\mu$ g/只，单抗免疫总量为 600  $\mu$ g/只。攻毒完成后，统计 7 天内小鼠存活情况（图 5-2 左侧列）并在 7 天后对存活小鼠进行各脏器细菌载量计数（图 5-2 右侧列），由于 PBS 组小鼠在 7 天观察期内全部死亡，图中没有显示 PBS 组小鼠脏器细菌载量的计数结果。由小鼠存活曲线结果可知，5 株单抗均可提供显著的保护效果，其中针对 SzM 蛋白恒定区的单抗（anti-cSzM-1）以及 3 株针对 SzM 蛋白可变区的单抗（anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4）在致死剂量 SEZ 攻击中提供的保护率可达 100%（ $p < 0.05$ ），而 1 株可变区单抗（anti-vSzM-1）的保护效果较弱，小鼠存活率为 60%（ $p < 0.05$ ）；观察期结束后由各组存活小鼠脏器细菌载量分布可知，对于抗 SzM 蛋白恒定区的单抗（anti-cSzM-1）来说，4/5 的小鼠体内已完全清除 SEZ，仅有一只小鼠的心脏、肝脏、肺脏可检出 SEZ；4 株针对可变区蛋白的单抗中的 3 株（anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4）可帮助小鼠完全清除各脏器感染的 SEZ，而单抗 anti-vSzM-1 组 3 只存活小鼠中只有 1 只完全清除了 SEZ，其余 2 只小鼠各脏器均可检出 SEZ。

以上结果说明在预防+治疗免疫模式下，5 株抗 SzM 蛋白不同区域的单抗均可表现出保护作用，且其中 4 株单抗（anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4、anti-cSzM-1）保护效果优良，可达 100%。

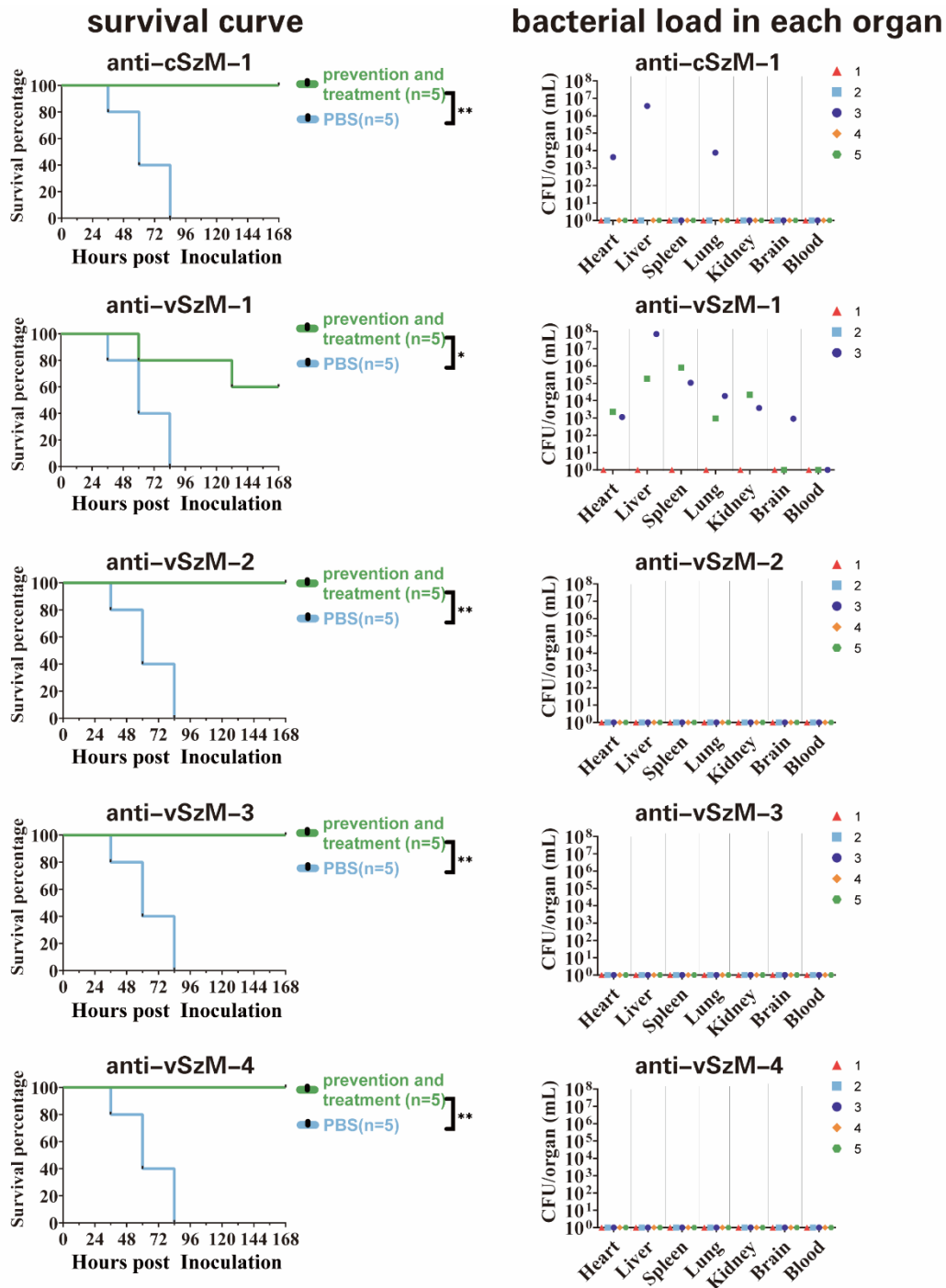


图 5-2 预防+治疗模式：小鼠生存曲线及各脏器细菌载量

Fig 5-2 Prevention + Treatment program: survival curve and bacterial load in each organ

注：脏器细菌载量分布图中每种形状代表一只小鼠

Note: The graph of each shape in the organ bacterial load graph represents a mouse

## 2.2 在治疗免疫模式中仅抗 SzM 蛋白可变区的单抗可提供保护

鉴于针对 SzM 蛋白可变区的 3 株单抗 (anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4) 在预防+治疗免疫方式中保护效果均为 100%，故从中选择调理吞噬活性相对最高的 anti-vSzM-3 单抗作为可变区单抗的代表与 anti-cSzM-1 共同进行治疗免疫模式下保护效果评价。由图 5-3 可知，单抗 anti-cSzM-1 的治疗效果并不理想，在 7 天内小鼠 100% 死亡，虽然与 PBS 组相比小鼠存活时间具有一定延长，但二者并未表现出差异 ( $P > 0.05$ )，由于 7 天后没有小鼠存活，无法进行脏器细菌载量计数；而单抗 anti-vSzM-3 免疫小鼠存活率可达 80% ( $P < 0.05$ )，且存活小鼠各脏器均未检测到 SEZ，说明细菌已完全被清除。

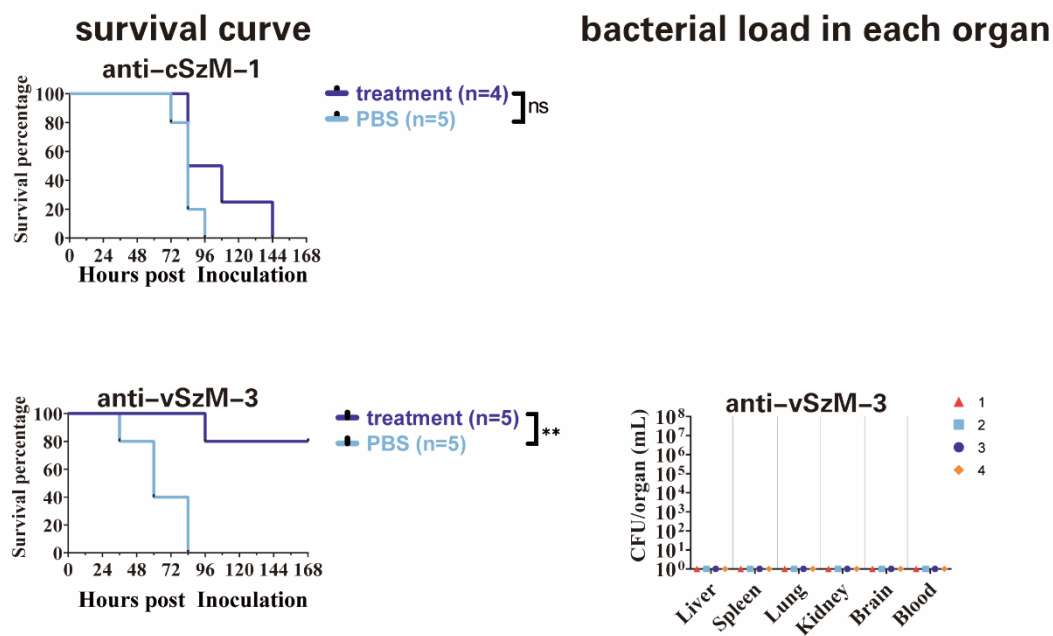


图 5-3 治疗模式：小鼠生存曲线及各脏器细菌载量

Fig 5-3 Treatment program: survival curve and bacterial load in each organ

注：脏器细菌载量分布图中每种形状代表一只小鼠

Note: The graph of each shape in the organ bacterial load graph represents a mouse

## 2.3 在预防免疫模式中所有单抗均可表现出保护效果

在攻毒前 12 h 一次性给予每只小鼠 600  $\mu$ g 单抗，结果如图 5-4 所示，anti-cSzM-1 组小鼠在攻毒 7 天后存活率为仅为 60%，但与 PBS 组相比依旧具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，脏器细菌载量计数结果表明 2/3 存活小鼠各脏器依旧可检出 SEZ；anti-vSzM-3 组小鼠 7 天内存活率为 100%，且各存活小鼠体内完全清除 SEZ。以上结果表明，anti-cSzM-1 与 anti-vSzM-3 均具可为小鼠提供预防性的保护作用，但依据小鼠

存活率及脏器细菌载量可知，抗 SzM 可变区的单抗 anti-vSzM-3 保护效果优于抗 SzM 恒定区的单抗 anti-cSzM-1。

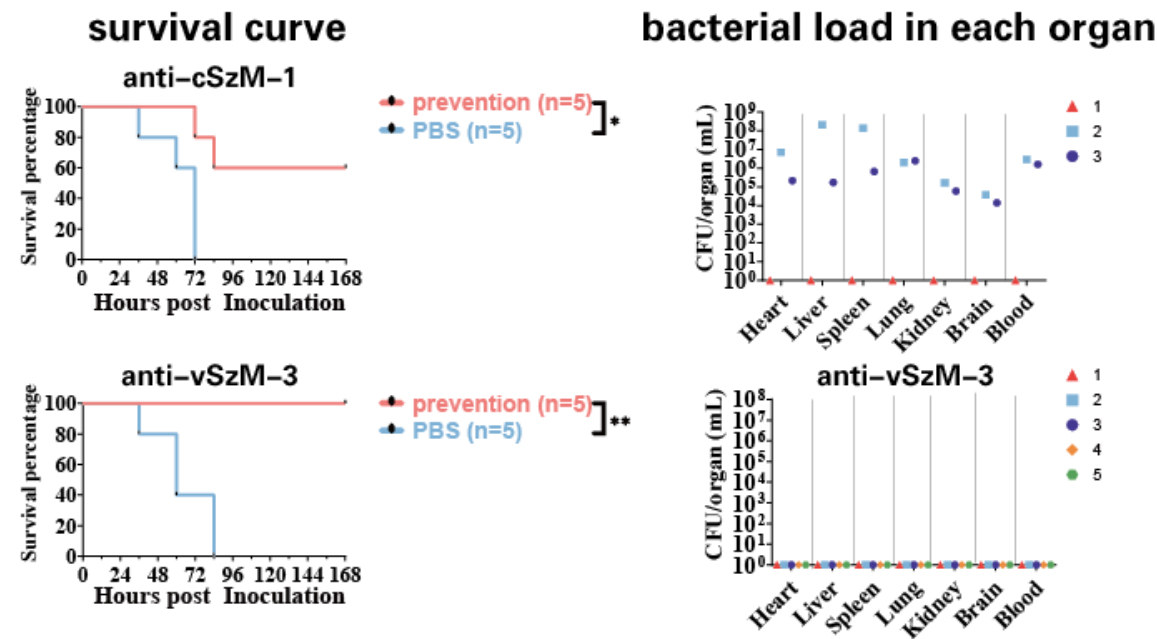


图 5-4 预防模式：小鼠生存曲线及各脏器细菌载量

Fig 5-4 Prevention program: survival curve and bacterial load in each organ

注：脏器细菌载量图中每种形状代表一只小鼠

Note: The graph of each shape in the organ bacterial load graph represents a mouse

## 2.4 三种免疫模式下不同单抗的小鼠保护效果汇总

综合上述动物实验结果，抗 SzM 蛋白可变区单抗（anti-vSzM-3）与恒定区单抗（anti-cSzM-1）在三种免疫模式下对小鼠的保护效果如表 5-1 所示。单抗 anti-vSzM-3 具有灵活的使用方式，在治疗或预防免疫模式中均可表现出理想的保护效果，且存活小鼠完全清除了体内的 SEZ；而单抗 anti-cSzM-1 则只有在预防+治疗免疫模式中才能表现出良好的保护效果。

表 5-1 不同抗体免疫模式中小鼠存活率及 SEZ 清除情况

| 免疫模式                              | 小鼠存活率         |             |             | 携带 SEZ 小鼠/存活小鼠                           |             |
|-----------------------------------|---------------|-------------|-------------|------------------------------------------|-------------|
| Immunization program              | Survival rate |             |             | Mice with SEZ infection / Surviving mice |             |
|                                   | PBS           | anti-cSzM-1 | anti-vSzM-3 | anti-cSzM-1                              | anti-vSzM-3 |
| 预防+治疗模式<br>Prevention + treatment | 0%            | 100%        | 100%        | 1/5                                      | 0/5         |
| 治疗模式<br>Treatment program         | 0%            | 0%          | 80%         | /                                        | 0/4         |
| 预防模式<br>Prevention program        | 0%            | 60%         | 100%        | 2/3                                      | 0/5         |

Table 5-1 Survival rate and SEZ clearance of mice in different immunization programs

### 3 讨论

本章通过 3 种抗体免疫模式探讨了抗 SzM 蛋白的单抗对小鼠感染致死剂量 SEZ 的保护作用。结合上一章的调理吞噬试验结果，抗体的调理吞噬活性应该是 SzM 蛋白单抗帮助小鼠抵抗 SEZ 攻击的关键。综合三种抗体免疫模式下的小鼠存活率以及脏器细菌载量结果发现，存活率较低或未能完全帮助小鼠清除体内 SEZ 的单抗有两株，分别为 anti-cSzM-1、anti-vSzM-1，而这两株抗体调理巨噬细胞对 SEZ 的平均吞噬数量要比在三种抗体免疫模式下均具有良好保护作用的 anti-vSzM-3 少 2-3 倍。

在预防+治疗模式下 3/4 针对 SzM 可变区单抗（anti-vSzM-2、anti-vSzM-3、anti-vSzM-4）的保护效果要优于保守区单抗（anti-cSzM-1），且单独的预防模式和治疗模式依旧是针对可变区单抗（anti-vSzM-3）的保护效果要优于恒定区单抗（anti-cSzM-1），在一定程度上说明大多数由 SzM 蛋白可变区诱导机体产生的抗体的保护作用强于恒定区，这一现象从 SzM 蛋白在菌体表面的结构特点可做出可能的解释：SzM 大量存在菌体表面并形成一圈致密的纤维状蛋白层，其 C 端锚定于细胞壁上，N 端游离<sup>[15]</sup>，C 端的恒定区更加靠近菌体且位于纤维状蛋白层内部，N 端的可变区远离菌体且位于纤维状蛋白层外部，空间位置的差异性导致位于外部的 SzM 蛋白可变区更易与特异性抗体结合，而内部的 SzM 蛋白保守区则相对隐蔽，一定程度上可以减少与特异性抗体的结合从而逃避机体免疫系统的清除，造成针对 SzM 蛋白恒定区的单抗（anti-cSzM-1）对小鼠的保护效果不佳。

总体来说，获得的针对 SzM 蛋白可变区单抗 anti-vSzM-3 具有优良的保护效果，三种抗体免疫模式下，小鼠存活率可达到 80%-100%，且存活小鼠体内均完全清除了 SEZ。表明该株抗体在对抗高毒力猪源分离株 ATCC35246 感染的预防或治疗上具有极高的应用潜力。

#### 4 本章小结

本章节以 C57BL/6J 小鼠为动物模型，探讨了针对 SzM 蛋白可变区或恒定区单抗对小鼠受到 ATCC35246 致死剂量攻击的保护效果，最终明确了 SzM 蛋白恒定区单抗在预防+治疗模式和预防模式下具有一定的保护效果，小鼠存活率分别为 100%和 60%；而 SzM 蛋白可变区单抗在预防+治疗模式、治疗模式和预防模式下均具有高效的保护作用，小鼠存活率在 80%-100%，且存活小鼠各脏器均完全清除了 SEZ。



## 参考文献

- [1] Palmieri C, Varaldo PE, Facinelli B. *Streptococcus suis*, an Emerging Drug-Resistant Animal and Human Pathogen [J]. *Front Microbiol*, 2011,2:235.
- [2] Costa MO, Lage B. *Streptococcus equi* Subspecies *zooepidemicus* and Sudden Deaths in Swine, Canada [J]. *Emerg Infect Dis*, 2020,26(10):2522-2524.
- [3] Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019 [J]. *mAbs*, 2019,11(2):219-238.
- [4] Motley MP, Banerjee K, Fries BC. Monoclonal antibody-based therapies for bacterial infections [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2019,32(3):210-216.
- [5] Speziale P, Rindi S, Pietrocola G. Antibody-Based Agents in the Management of Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* Diseases [J]. *Microorganisms*, 2018,6(1).
- [6] Aguilar JL, Varshney AK, Pechuan X, Dutta K, Nosanchuk JD, Fries BC. Monoclonal antibodies protect from *Staphylococcal* Enterotoxin K (SEK) induced toxic shock and sepsis by USA300 *Staphylococcus aureus* [J]. *Virulence*, 2017,8(6):741-750.
- [7] Kim D, Jang S, Oh J, Han S, Park S, Ghosh P, Rhee DK, Lee S. Molecular characterization of single-chain antibody variable fragments (scFv) specific to Pep27 from *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018,501(3):718-723.
- [8] Tremblay JM, Mukherjee J, Leysath CE, Debatis M, Ofori K, Baldwin K, Boucher C, Peters R, Beamer G, Sheoran A, Bedenice D, Tzipori S, Shoemaker CB. A single VHH-based toxin-neutralizing agent and an effector antibody protect mice against challenge with Shiga toxins 1 and 2 [J]. *Infect Immun*, 2013,81(12):4592-4603.
- [9] Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, Kelly C, Nathan R, Birch T, Cornely OA, Rahav G, Bouza E, Lee C, Jenkin G, Jensen W, Kim YS, Yoshida J, Gabryelski L, Pedley A, Eves K, Tipping R, Guris D, Kartsonis N, Dorr MB. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection [J]. *N Engl J Med*, 2017,376(4):305-317.
- [10] Tabor DE, Oganessian V, Keller AE, Yu L, McLaughlin RE, Song E, Warrenner P, Rosenthal K, Esser M, Qi Y, Ruzin A, Stover CK, DiGiandomenico A. *Pseudomonas aeruginosa* PcrV and Psl, the Molecular Targets of Bispecific Antibody MEDI3902, Are Conserved Among Diverse Global Clinical Isolates [J]. *J Infect Dis*, 2018,218(12):1983-1994.
- [11] Pennini ME, De Marco A, Pelletier M, Bonnell J, Cvitkovic R, Beltramello M, Cameroni E, Bianchi S, Zatta F, Zhao W, Xiao X, Camara MM, DiGiandomenico A, Semenova E, Lanzavecchia A, Warrenner P, Suzich J, Wang Q, Corti D, Stover CK. Immune stealth-driven O2 serotype prevalence and potential for therapeutic antibodies against multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*

- [J]. Nat Commun, 2017,8(1):1991.
- [12] Ali SO, Yu XQ, Robbie GJ, Wu Y, Shoemaker K, Yu L, DiGiandomenico A, Keller AE, Anude C, Hernandez-Illas M, Bellamy T, Falloon J, Dubovsky F, Jafri HS. Phase 1 study of MEDI3902, an investigational anti-*Pseudomonas aeruginosa* PcrV and Psl bispecific human monoclonal antibody, in healthy adults [J]. Clin Microbiol Infect, 2019,25(5):629.e621-629.e626.
- [13] Timoney JF, Guan M. Characterisation of murine monoclonal antibodies recognising opsonic, mouse-protective, chaining and mucosally relevant epitopes on the M protein of *Streptococcus equi* subspecies *equi* [J]. Res Vet Sci, 1996,60(1):76-81.
- [14] Jean-François MJ, Poskitt DC, Turnbull SJ, Macdonald LM, Yasmeen D. Protection against *Streptococcus equi* infection by monoclonal antibodies against an M-like protein [J]. J Gen Microbiol, 1991,137(9):2125-2133.
- [15] Velineni S, Timoney JF. Characterization and protective immunogenicity of the SzM protein of *Streptococcus zooepidemicus* NC78 from a clonal outbreak of equine respiratory disease [J]. Clin. Vaccine Immunol, 2013,20(8):1181-1188.
- [16] Hau SJ, Lantz K, Stuart KL, Sitthicharoenchai P, Macedo N, Derscheid RJ, Burrough ER, Robbe-Austerman S, Brockmeier SL. Replication of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* infection in swine [J]. Vet Microbiol, 2022,264:109271.

## 全文总结

1. 成功制备并纯化了 4 株针对马链球菌兽疫亚种猪源高毒力流行株 SzM 蛋白可变区的单抗，所有单抗均属 IgG1 亚类（轻链为  $\kappa$  型）且与 SzM 蛋白反应性良好。这 4 株单抗与实验室前期获得的 3 株抗 SzM 蛋白恒定区单抗的亲合常数在  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  M 之间，均与靶抗原亲和力良好且抗可变区单抗识别表位多样性优于抗恒定区单抗。
2. 对 4 株 SzM 蛋白可变区单抗及 1 株 SzM 蛋白恒定区单抗进行体外抗菌效果评价，5 株抗体均有很好的调理吞噬活性，但不具备细菌凝集或活化补体杀菌功能。
3. 对 SzM 蛋白可变区及恒定区单抗进行小鼠保护性评价，结果显示 SzM 蛋白可变区单抗具有良好的预防或治疗 SEZ 感染效果，但 SzM 蛋白恒定区单抗则必须以预防+治疗模式免疫才能提供保护，单独以预防或治疗模式免疫小鼠，保护效果均不理想。