DOI:10.16016/j.2097-0927.202312007

# 基于单个记忆B细胞测序技术构建毒素蛋白Hcp免疫组库及抗体表达

周金锐,王文皓,顾亚茹,欧阳雪,刘碧霞,左厚义,杜烨湘,张 睿,左钱飞 西南交通大学医学院,四川成都

[摘要] **目的** 基于单个记忆B细胞测序技术制备针对鲍曼不动杆菌的人源化单克隆抗体,构建出Hcp蛋白的免疫组库,表达具有结合活性的单克隆抗体。**方法** 构建带有pGEX-6p-1-Hcp重组质粒的BL21-Hcp菌液,采用蛋白质表达和蛋白质亲和层析技术获得目的蛋白Hcp;6~8周龄雌性SPF级的BALB/c小鼠(体质量18~20 g),Hcp抗原肌肉注射免疫小鼠产生特异性记忆B细胞;采用流式细胞术分选单个特异性记忆B细胞;采用单细胞测序技术构建Hcp的免疫组库,并对测序结果进行生物信息学分析;采用抗体人源化改造技术获得单克隆抗体;采用ELISA实验检测抗体体外结合活性。**结果** 表达并纯化出纯度大于95%的目的蛋白Hcp;成功构建了Hcp的免疫组库,分析得到了该免疫组库的BCR克隆型鉴定和分析结果、CDR3区域特征分析结果、V-J基因配对特征分析结果;人源化改造了7种单克隆抗体(IgG1-1、IgG1-2、IgG2-1、IgG2-2、IgG3-1、IgG4-1、IgG4-2);ELISA结果显示,IgG1-1、IgG3-1、IgG4-1、IgG4-2抗体结合效价均为1∶1 280,IgG2-2的抗体效价为1∶10 240,IgG2-1的抗体效价为1∶5 120,IgG1-2的抗体效价为1∶160。**结论** 利用单细胞测序技术可以快速、准确、高效率地构建含有大量抗体信息的Hcp蛋白免疫组库,利用免疫组库可以表达具有结合活性的单克隆抗体。

[关键词] 鲍曼不动杆菌;溶血素共调节蛋白;免疫组库;单细胞测序;单克隆抗体
[中图法分类号] R378.7;R392-33;R392.7 [文献标志码] A

# Construction of Hcp immunohistochemical library and antibody expression based on single memory B cell sequencing technology

ZHOU Jinrui, WANG Wenhao, GU Yaru, OU Yangxue, LIU Bixia, ZUO Houyi, DU Yexiang, ZHANG Rui, ZUO Qianfei College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, China

[**Abstract**] Objective To prepare humanized monoclonal antibodies (Mabs) targeting *Acinetobacter baumannii* (Ab) based on single memory B cell sequencing technology, construct the immune repertoire of the core protein of Ab, hemolysin-coregulated protein (Hcp), and express its Mabs with binding activity. Methods *E. coli* BL21 harboring the recombinant plasmid pGEX-6p-1-Hcp was constructed. Hcp protein was obtained using protein expression and affinity chromatography. Female SPF BALB/c mice (6~8 weeks old, weighing 18~20 g) were immunized intramuscularly with antigen Hcp to generate specific memory B cells. Single antigen-specific memory B cells were sorted using flow cytometry. The immune repertoire of Hcp was constructed using single-cell sequencing technology, and bioinformatics analysis was performed on the sequencing results. Mabs were obtained using antibody humanization techniques. The *in vitro* binding activity of the antibodies was detected by ELISA. Results The target protein Hcp with a purity >95% was obtained after expression and purification. The immune repertoire of Hcp was successfully constructed, and the results of BCR clonotype identification and analysis, CDR3 region characteristic analysis, and V-J gene pairing characteristic analysis were achieved. Antibody humanization got 7 Mabs, that is, IgG1-1, IgG1-2, IgG2-1,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31970877);四川省科技计划项目(2021YJ0191)
[通信作者] 张 睿,E-mail:echorayray@qq.com

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
**引用格式**:周金锐,王文皓,顾亚茹,等. 基于单个记忆B细胞测序技术构建毒素蛋白Hcp免疫组库及抗体表达[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(15):1782-1791. DOI:10.16016/j.2097-0927.202312007.
**Citation**:ZHOU J R, WANG W H, GU Y R, *et al*. Construction of Hcp immunohistochemical library and antibody expression based on single memory B cell sequencing technology[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(15):1782-1791. DOI:10.16016/j.2097-0927.202312007.

IgG2-2, IgG3-1, IgG4-1 and IgG4-2. ELISA results showed IgG1-1, IgG3-1, IgG4-1, and IgG4-2 had an antibody binding titer of 1∶1 280, IgG2-2 of 1∶10 240, IgG2-1 of 1∶5 120, and IgG1-2 of 1∶160. **Conclusion** Single-cell sequencing technology enables rapid, accurate, and efficient construction of an Hcp protein immune repertoire containing extensive antibody information. Utilizing this immune repertoire allows for the expression of Mabs with binding activity.

[**Key words**] *Acinetobacter baumannii*; hemolysin-coregulated protein; immune repertoire; single-cell sequencing; monoclonal antibody

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31970877) and the Project of Science and Technology Plan of Sichuan Province (2021YJ0191). Corresponding author: ZHANG Rui, E-mail: echorayray@qq.com

鲍曼不动杆菌是一种在自然环境中广泛分布的革兰氏阴性细菌。其耐药变种菌株已在医院环境中广泛流行,该菌对免疫系统较弱的人群具有极强的感染和致病能力,随着鲍曼不动杆菌的临床分离率不断上升和多重耐药和泛耐药菌株的出现,鲍曼不动杆菌的预防和治疗成为全球公共卫生面临的重大挑战[1-2]。为应对这一挑战,近年来国内外研究者开发了多种治疗方案以降低鲍曼不动杆菌的感染率、耐药性和致死率。然而,新抗菌药物的开发周期长,难以及时应对其耐药性的变化。因此,免疫治疗成为一种有潜力的治疗方案,可用于替代抗菌药物的使用,以缩短研发周期及减缓细菌耐药。

随着人源化单抗技术突破性发展,针对耐药菌重要靶点的单抗研究很有可能成为遏制耐药菌感染及耐药的重要手段。Ⅵ型分泌系统(type Ⅵ secretion system,T6SS)在革兰阴性菌的生存和致病中发挥重要作用,在鲍曼不动杆菌中,溶血素共调节蛋白(hemolysin-coregulated protein,Hcp)不仅是T6SS的核心蛋白,其本身也是一种效应因子,参与了鲍曼不动杆菌对宿主细胞的侵入和致病过程[3-4]。因此,Hcp常被作为鲍曼不动杆菌研究的重要靶点。

高通量单细胞RNA测序和10x Genomics单细胞免疫组库技术在抗体库构建中具有明显的优势。高通量单细胞RNA测序能够在单细胞水平上对表达的基因进行精确的定量,揭示细胞间的异质性,这对于理解不同免疫细胞的功能和抗体多样性至关重要。10x Genomics技术通过提供高通量的单细胞分离,能够同时对成千上万个单细胞进行分析,较大地提高了抗体库构建的效率和覆盖度[5-6]。通过高通量单个记忆B细胞RNA和V(D)J测序可以实现的快速高效鉴定出具有很强治疗和预防功效的高效中和抗体。

本研究拟体外重组表达和纯化Hcp蛋白,并通过动物免疫实验获得针对Hcp的特异性记忆B细胞。利用单细胞测序技术构建抗体库,通过对抗体库的大量抗体序列进行分析和筛选得到具有研究意义的抗体序列,再对筛选得到的抗体序列进行人源化改造,随后体外重组表达,进一步对这些单克隆抗体的功能和空间结构进行评价,旨在为针对鲍曼不动杆菌Hcp毒素蛋白的抗体开发提供实验和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

质粒pGEX-6p-1、pcDNA3.1、大肠杆菌菌株BL21-Hcp购自武汉金凯瑞生物工程有限公司;APC/Cyanine7 anti-mouse CD3、APC/Cyanine7 anti-mouse CD14、APC/Cyanine7 anti-mouse CD56、FITC anti-mouse CD19、PE anti-mouse CD20、APC anti-mouse IgG Fc、Zombie NIR™ Fixable Viability Kit、STREPTAVIDIN PE-CY7购自美国Biolegend公司,DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒、辣根过氧化物酶标记-链霉亲和素、蛋白上样缓冲液购自中国碧云天生物技术有限公司;无内毒素质粒大提试剂盒购自中国天根生化科技有限公司;琼脂粉、IPTG、L-组氨酸购自生工生物工程(上海)股份有限公司;蛋白Marker购自美国Thermo公司;$Amp^+$购自美国Sigma公司;山羊抗小鼠IgG抗体购自美国Thermo公司。293F细胞由暨南大学生命科学院馈赠。

### 1.2 实验动物

10只雌性SPF级BALB/c小鼠,6~8周龄,体质量18~20 g,由湖南斯莱克生物有限公司提供。饲养环境恒温恒湿[温度(22±1)℃,相对湿度50%±10%],采用独立通风笼具系统,垫料为高压灭菌玉米芯,每日维持12/12 h明暗循环。

### 1.3 方法

**1.3.1 鲍曼不动杆菌Hcp蛋白表达、纯化** 取过夜培养的BL21-Hcp菌液加入$Amp^+$抗性的LB培养基中,150 r/min、37 ℃过夜培养,取过夜培养的菌液二次活化至吸光度[*OD*(600)]值为0.8~1.0时,加入IPTG,使其终浓度为200 μmol/L,再置于摇床诱导表达16 h。将诱导表达后的菌液取出,以6 000 r/min离心15 min,弃去上清,加入PBS混匀,超声破碎仪裂解后以6 000 r/min离心15 min,分离上清和沉淀。GST亲和纯化:选择GST亲和层析填料进行纯化,将破菌后的上清与谷胱甘肽S-转移酶磁珠(glutathione s-transferase beads,GST beads)结合,再经洗涤液洗去杂蛋白,pp酶过夜酶切GST标签

后,从层析柱上洗脱下目的蛋白Hcp。利用SDS-PAGE蛋白凝胶电泳技术验证蛋白的表达和纯化情况。

1.3.2 流式分选特异性记忆B细胞

1.3.2.1 Hcp蛋白免疫动物 首次免疫用PBS稀释Hcp蛋白抗原,加入弗氏不完全佐剂,肌肉注射,每只BALB/c小鼠注射量为20 μg,并设置阴性对照组(PBS组);第7天进行第2次免疫,免疫组分、蛋白抗原注射量和免疫途径不变;第21天进行第3次免疫,加入弗氏完全佐剂,蛋白抗原注射量和免疫途径不变;第3次免疫后第7天,采集BALB/c小鼠的血,ELISA检测小鼠免疫后IgG体液应答水平。

1.3.2.2 流式细胞术分选特异性记忆B细胞 用40%CO麻醉后,从小鼠脾脏和淋巴结获取淋巴细胞,制备成单细胞悬液后进行磁珠孵育,磁珠标记后的细胞通过MACS分选柱得到目的细胞,经过富集的细胞按1∶100的体积比例加入生物素标记的抗原蛋白,按1∶200的体积比例将APC/Cyanine7 anti-mouse CD3、APC/Cyanine7 anti-mouse CD14、APC/Cyanine7 anti-mouse CD56、FITC anti-mouse CD19、PE anti-mouse CD20、APC anti-mouse IgG Fc、Zombie NIR™ Fixable Viability Kit、STREPTAVIDIN PE-CY7加入样本中,使用流式细胞仪对表面染色后的淋巴细胞进行特异性记忆B细胞的分选,采用$CD19^{+}IgG^{+}Hcp^{PE\text{-}CY7+}CD3^{-}CD14^{-}CD56^{-}$设门方式,分选单个Hcp抗原特异性的记忆型B淋巴细胞。

1.3.3 单细胞测序构建抗体组库 实验材料为上一步分选出的含有特异性记忆B细胞的单细胞悬液,确保细胞大小均匀,细胞团及碎片的比例不超过5%。使用细胞计数仪进行细胞计数和活率测定,要求活细胞数>85%,细胞总量至少$2\times10^{5}$个。使用10× Genomics Chromium系统,将含有条形码信息的凝胶磁珠、单细胞、酶和分离的油珠混合,形成含有单细胞的油包水结构。利用poly(T)引物将mRNA反转录为cDNA,在反转录到5′末端时加上序列CCC,与TSO的GGG序列互补,继续反转录,从而在5′端的cDNA上加上条形码序列。使用5′接头的通用引物和BCR恒定区的连续巢式引物进行巢式PCR,实现BCR V(D)J区域的富集。将V(D)J cDNA用酶随机打断,通过控制打断长度以覆盖整个V(D)J片段的cDNA序列。末端修复加A尾,加上测序接头P7,进行PCR扩增,构建BCR V(D)J测序文库。文库质检合格后,采用Illumina平台进行PE150双端测序,并进行相应的生物信息学分析。

1.3.4 人源化单克隆抗体的构建与表达

1.3.4.1 质粒的构建和提取 通过对上一部分获得的BCR细胞测序结果进行筛选和分析,从表达频率前10的基因型中选择8组轻重链基因组成抗体,分别命名为IgG1-1、IgG1-2、IgG2-1、IgG2-2、IgG3-1、IgG3-2、IgG4-1、IgG4-2,将上述抗体的轻重链基因的可变区序列进行提取,同人源抗体的恒定区进行连接从而完成抗体的人源化改造,将改造后的抗体序列构建在质粒表达载体pcDNA3.1上。将pcNDA3.1-Top10-Hcp甘油菌从-80 ℃取出,室温融化,涂布于$Amp^{+}$抗性的LB固体培养基,37 ℃过夜培养后挑取单菌落扩大培养,再使用无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒。

1.3.4.2 抗体的表达和纯化 将293F细胞浓度调节至$1\times10^{6}$个/mL,37 ℃恒温培养箱的摇床培养4 h。加入150 μg的H链质粒和200 μg的L链质粒到离心管中,轻轻转动离心管使其充分混匀。并向离心管加入PEI震荡充分混匀,37 ℃孵育15 min。将转染混合液加入到含有293F细胞的培养瓶中,置于37 ℃、5%培养箱的摇床中培养5 d。将转染5 d的293F细胞收集到塑料瓶中,室温以6 000 r/min离心15 min,收集上清,用Protein A beads对抗体进行纯化。PAGE凝胶蛋白电泳测定抗体纯度。

1.3.5 ELISA测定单克隆抗体结合活性 将抗原Hcp用包被液稀释成2 μg/mL,以100 μL/孔的量加入到ELISA板中,4 ℃过夜。将纯化好的单克隆抗体分别用PBST稀释为2 μg/mL;以免疫小鼠的阳性血清作为阳性对照,并用PBST稀释100倍使用,以PBST作为阴性对照。在除第1、12排之外的全部孔中加入100 μL PBST,将稀释好的单克隆抗体以200 μL/孔加入到包被好抗原的ELISA板的第1排,从第1排取出100 μL转移到第2排,并使用排枪混匀10次。如此重复,进行2倍逐级稀释,直至第11排。将第11排中的100 μL溶液丢弃。将稀释好的山羊抗小鼠IgG抗体按100 μL/孔加入各孔,37 ℃孵育45 min。每孔加TMB显色液,37 ℃避光放置5 min,用终止液终止。酶标仪检测450 nm波长下的*OD*(450)值。

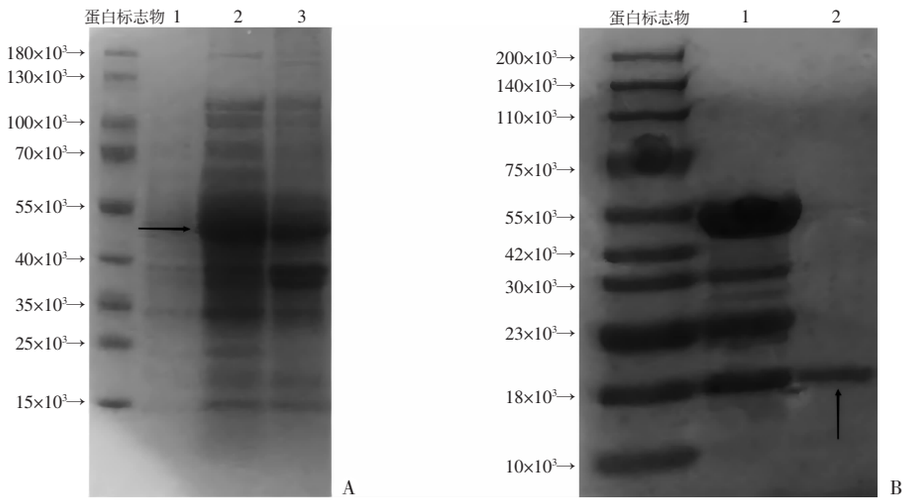
## 2 结果

### 2.1 鲍曼不动杆菌Hcp的重组表达和纯化

构建GST-Hcp表达质粒,进一步转化至BL21-Hcp菌株中,利用IPTG低温诱导过夜,表达候选抗原蛋白(图1A)。Hcp蛋白分子大小预测为$18.75\times10^{3}$,GST分子大小为$26.00\times10^{3}$,融合蛋白大小为$44.75\times10^{3}$,与蛋白标志物大小位置一致,符合实验结果,抗原蛋白为可溶性表达。Hcp蛋白分子经GST beads亲和层析纯化后,SDS-PAGE结果显示条带蛋白大小符合目的蛋白分子大小,并且纯化后,条带清晰无杂带,蛋白纯度在95%以上(图1B),可用于后续研究。

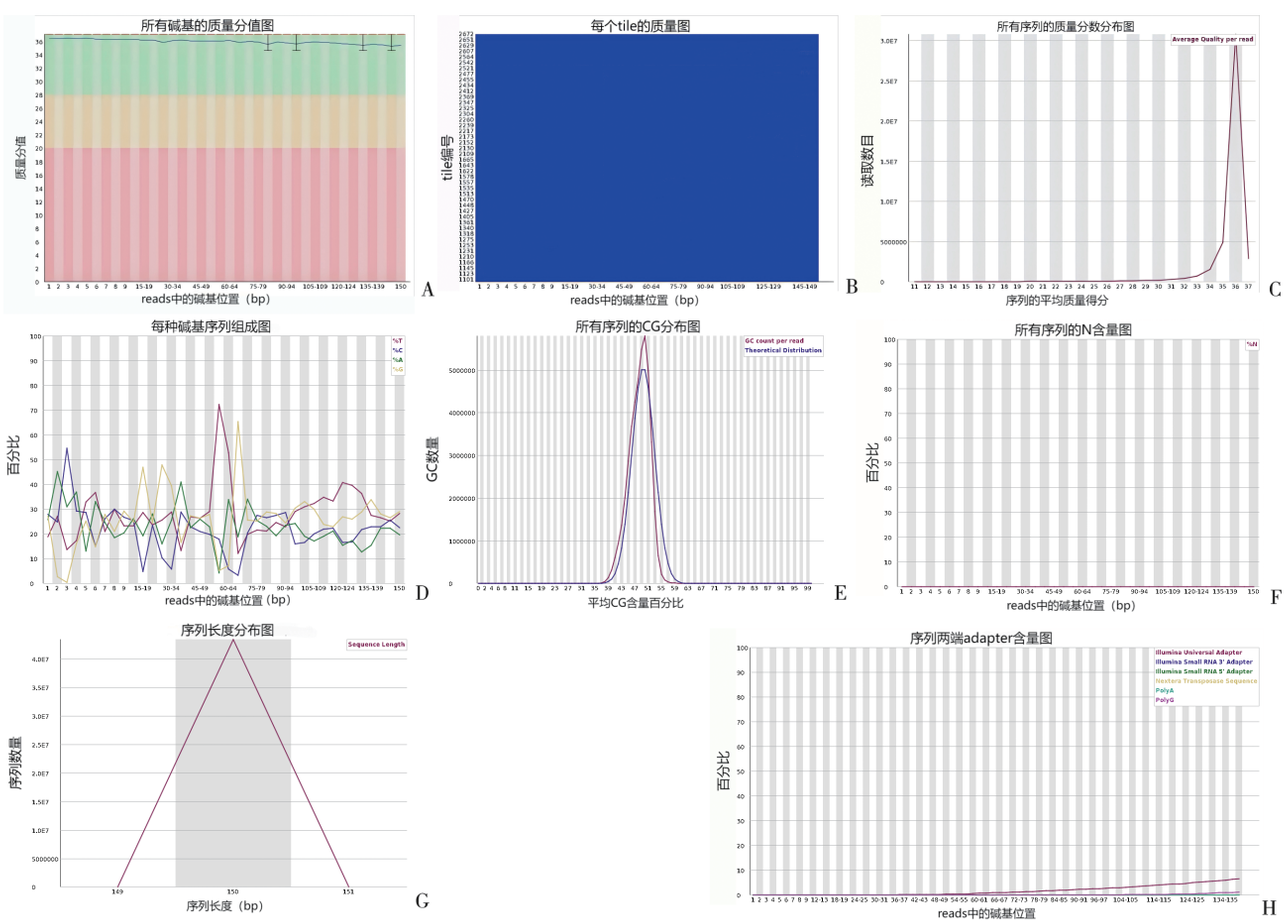
### 2.2 10× Genomics单细胞BCR测序结果

2.2.1 质量控制结果 高通量测序数据的质量直接影响单细胞分析的准确性和可靠性,因此对单细胞测序数据的质控进行分析和展示。所有碱基的质量分布图显示箱线图均位于绿色区间(图2A),测序质量合格。每个测序单元格的质量图显示整张图为蓝色,




A:鲍曼不动杆菌Hcp蛋白表达SDS-PAGE电泳凝胶图　1:示菌液诱导过夜经离心机离心后上清中蛋白的表达情况;2:示超声破碎仪破碎菌体后,离心后上清中蛋白的表达情况;3:示超声破碎仪破碎菌体后,离心后沉淀中蛋白的表达情况;黑色箭头:示目的蛋白;B:鲍曼不动杆菌Hcp蛋白纯化后SDS-PAGE电泳凝胶图　1:示酶切后的beads,以及beads上残留的非特异性蛋白和PP酶;2:示洗脱下来的目的蛋白;黑色箭头:示纯化后的目的蛋白

**图1　Hcp的重组表达和纯化**




A:所有碱基的质量分值图　绿色部分:合格;黄色部分:警告;红色部分:不合格;质量分值=$-10\times\log_{10}(P)$,P为测错的概率;B:每个测序单元格的质量图　tile代表每一次测序荧光扫描的最小单位;C:所有序列的质量分数分布图;D:每种碱基序列组成图;E:所有序列的GC分布图;F:所有序列的N含量图;G:序列长度分布图;H:序列两端接头序列含量图

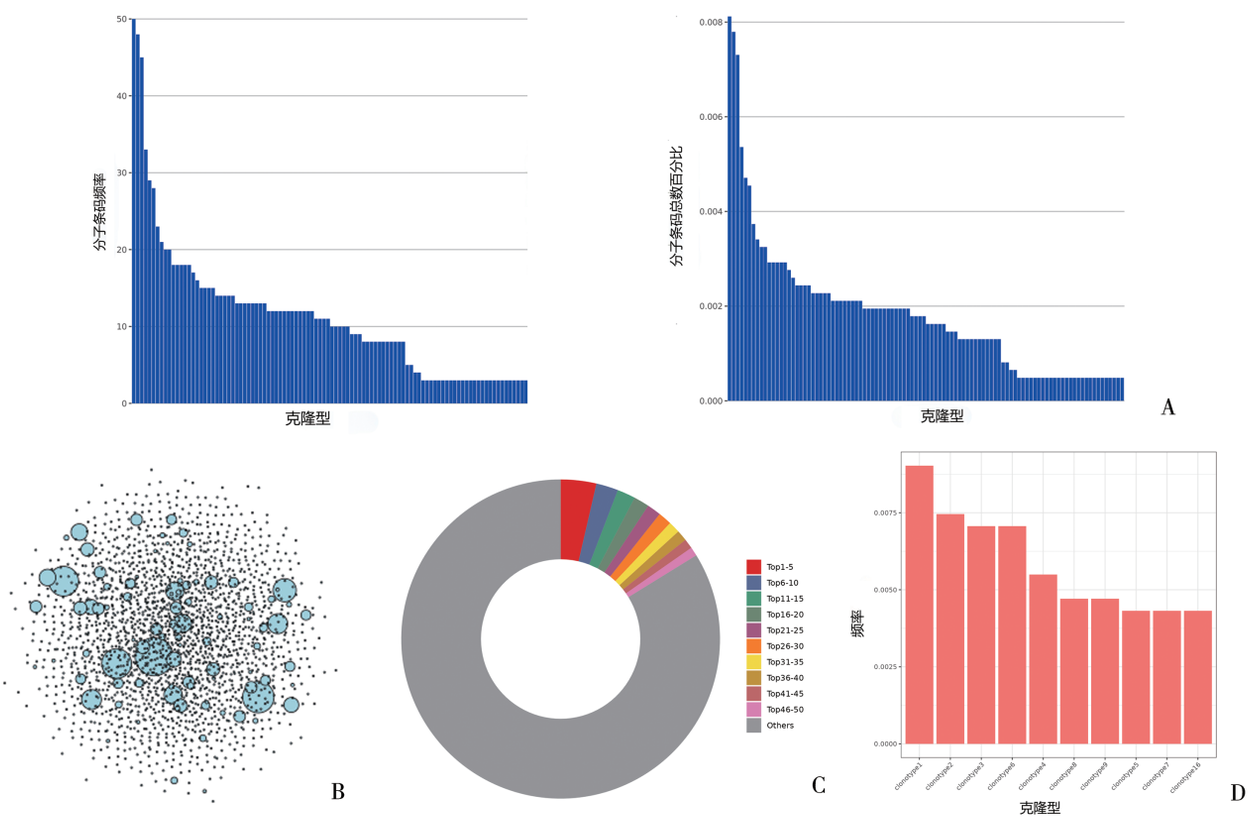
**图2　单细胞测序质量控制FastQC分析图**

表示测序单元格的偏离度小，测序质量较好(图2B)。所有序列的质量分数分布图显示最高峰的质量值>27，表示测序质量良好(图2C)。每种碱基序列组成图的结果显示，4条线在某些位置存在纷乱交织，说明结果可能存在过表达序列的污染(图2D)。所有序列的GC分布图结果显示，形状接近正态但偏离理论分布的情况提示可能有系统偏差(图2E)。所有序列的N含量图结果显示该N的含量为0，文库的碱基组成没有偏离，测序仪能给出正确的信号(图2F)。序列长度分布图结果显示整个数据序列的长度分布于149~151(图2G)。序列两端接头序列含量图结果显示实验中接头序列没有去除，在60~135部分含有曲线翘起，在后续分析的时候需要先使用去接头软件进行去接头(图2H)。以上结果提示，本次实验质量控制合格，测序结果较为可靠。

2.2.2　BCR克隆型鉴定和分析

2.2.2.1　克隆型多样性分析　　对测序结果进行分析和整理，展示了clonotype频数分布图以及clonotype频率分布图(图3A)。此外还对各个样本克隆型整体分析进行网络图分析(图3B)，每个节点表示一种克隆型，节点大小表示克隆型丰度。还对不同克隆型的占比采用环形图表示(图3C)。高丰度的克隆型往往揭示了机体对抗原刺激的重要特征，如克隆扩增等，因此，对样本表达频率前10的克隆型的细胞占比进行频率分布图可视化分析(图3D)。总共分析得到5 030种不同的克隆型，其中最高频率表达的克隆型数目为50，占所有克隆型的0.008%。

2.2.2.2　CDR3区域特征分析　　CDR3区域的长度和序列多样性是抗体识别广泛抗原类型能力的基础，不同的抗体通过其独特的CDR3结构识别和结合不同的抗原表位，这种多样性使得免疫系统能够响应无限种类的外来物质，通过分析免疫组库中CDR3区域的多样性，研究人员可以评估免疫组库的覆盖范围和潜在的抗原识别能力。针对不同克隆类型、V基因、J基因的CDR3长度分布进行分析和展示(图4A~C)。其次CDR3的V/J区基因可反映出BCR克隆分型的特征，可分别通过TRA/TRB，TRA+TRB(或IGH+IGK+IGL)进行数据统计进行丰度分析。对V/J区基因丰度分布情况进行统计，整理并展示了V区基因频率分布图(图4D)、J区基因频率分布图(图4E)，同时对更




A：clonotype频数(左)和频率(右)分布图；B：克隆型多样性网络图；C：克隆型多样性环形图；D：表达频率前10的克隆型的频率分布图

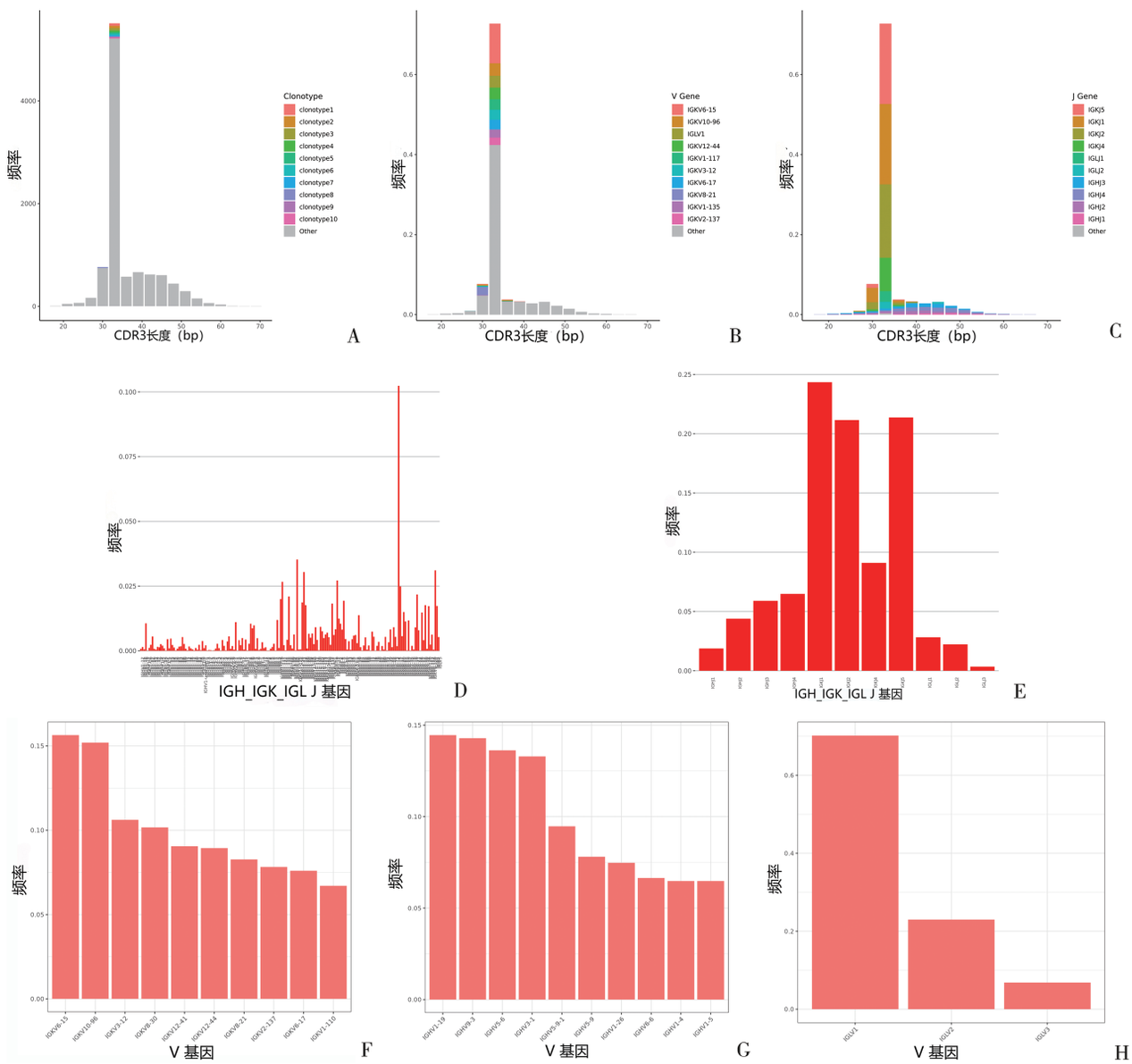
**图3　克隆型多样性分析图**

重要的V区基因的表达频率前10的基因进行条形图可视化展示(图4F~H)。

2.2.2.3　V-J基因配对特征分析　　在不同免疫组库中V-J基因配对能够反应出CDR3或免疫组库的变化,通过对V-J基因配对的统计可进行免疫学研究,比较2个不同免疫时期高丰度V-J基因配对,得到特异性表达的免疫基因。热图结果显示了V-J基因的配对丰度(图5A),同时Circos图结果显示了不同表达频率基因的配对情况(图5B),内部色块间连接弧线表示V-J基因配对。对表达频率前10的V-J基因配对使用频率进行条形图可视化图(图5C~E)。统计轻重链配对的V-J基因配对的使用情况,IgHV-J-IgλV-J的条形图和冲击图显示了表达频率前10的IgHV-J-IgλV-J基因配对情况(图5F),IgHV-J-IgκV-J的条形图和冲击图显示了表达频率前10的IgHV-J-IgκV-J基因配对情况(图5G)。

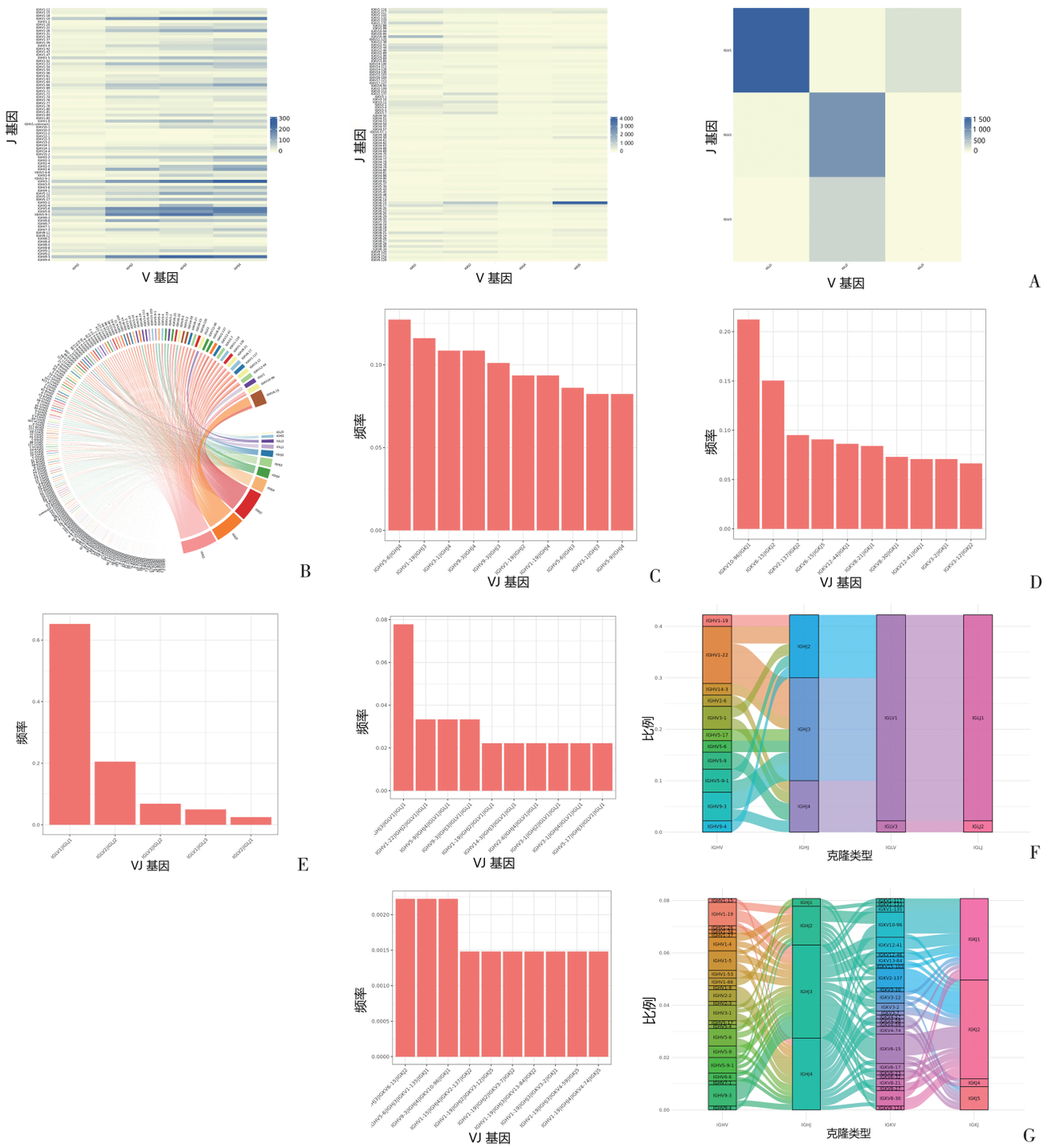
2.3　重组抗体的表达和纯化

将纯化后的抗体用还原和非还原的蛋白上样液进行制样后,进行蛋白电泳,8组重组抗体的SDS-PAGE结果显示,IgG抗体大小约为140 ×$10^3$,其中重链约50×$10^3$,轻链约2×$10^3$,经凝胶成像软件分析,成功表达IgG1-1、IgG1-2、IgG2-1、IgG2-2、IgG3-1、IgG4-1、IgG4-2抗体,并且纯度>95%(图6)。



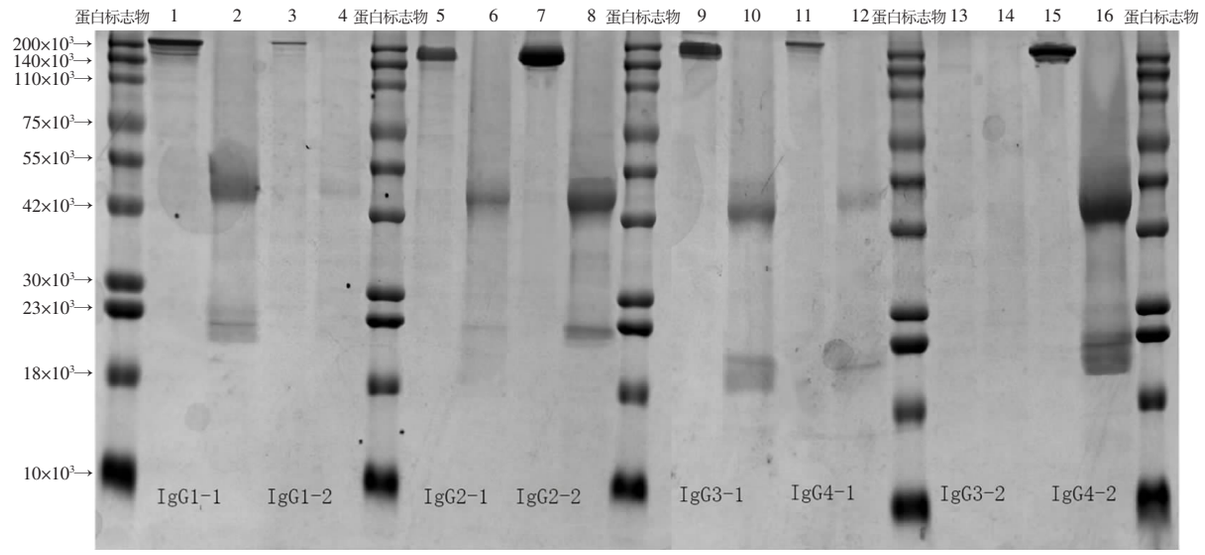

A:CDR3长度分布图;B:CDR3(V基因)碱基序列长度分布图;C:CDR3(J基因)碱基序列长度分布图　不同颜色表示不同基因,表达频率前10的基因用彩色表示,灰色部分表示其他基因;D:V区基因频率分布图;E:J区基因频率分布图;F:Igκ链V区基因表达频率前10结果;G:IgH链V区基因表达频率前10的结果;H:Igλ链V区基因表达频率前10的结果

**图4　CDR3区域特征分析图**




A:IgH 链、Igκ 链、Igλ 链的 V-J 基因配对丰度分布热图;B:TRA/TRB V-J 基因配对频率 Circos 图　每个颜色块代表一种基因,基因频率越高,色块越宽;C~E:分别为 IgH 链、Igκ 链、Igλ 链的前 10 的 V-J 基因配对使用频率图;F:表达频率前 10 的 IgHVJ-IgλVJ 基因配对使用频率条形图冲击图;G:表达频率前 10 的 IgHVJ-IgκVJ 基因配对使用频率条形图冲击图

**图 5　V-J 基因配对特征分析图**




1~16:分别为IgG1-1、IgG1-2、IgG2-1、IgG2-2、IgG3-1、IgG4-1、IgG3-2、IgG4-2非还原和还原结果

**图6 抗体纯化的SDS-PAGE鉴定**

### 2.4 单克隆抗体结合活性的评价

根据阳性判定标准,即待测孔OD值>0.1,并且大于阴性对照孔OD值的2.1倍,ELISA结果显示,成功表达的7组抗体与重组抗原都具有一定的体外结合活性,其中IgG2-2和IgG2-1的亲和力最强,IgG2-2结合效价为1∶10 240,IgG2-1的抗体效价为1∶5 120,IgG1-2与抗重组原体外结合活性最不明显,效价为1∶160(图7)。实验结果证明了从构建的抗体库中能够得到具有良好结合活性的单克隆抗体,后续可以选择抗体效价较高的IgG2-1、IgG2-2继续进行后续的抗体评价。

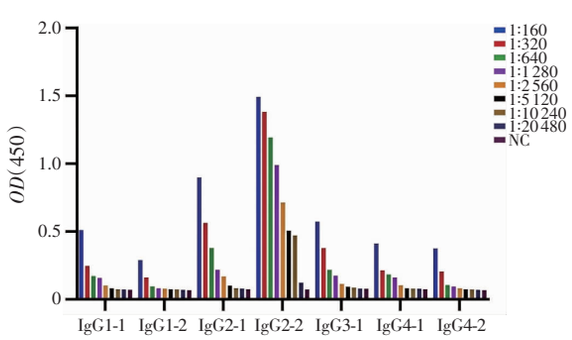



**图7 不同抗体组的抗体结合活性评价**

## 3 讨论

### 3.1 鲍曼不动杆菌毒素蛋白Hcp

Hcp蛋白是T6SS的核心组分,可以作为检测鲍曼不动杆菌活性的一个指标,开发能够特异性识别Hcp蛋白的抗体,可以快速准确地诊断鲍曼不动杆菌感染,及时启动治疗,减少不必要的抗生素使用[7]。此外,研究Hcp蛋白还为开发新型抗菌策略提供了机会,通过阻断Hcp蛋白的功能或干扰其与T6SS的相互作用,可以抑制鲍曼不动杆菌的致病能力[8],为治疗提供新的途径,这种策略可能对于解决现有抗生素难以克服的多重耐药问题提供了一线希望。本研究获得了纯度高达95%的可溶性候选蛋白。为下一步构建鲍曼不动杆菌毒素蛋白的抗体组库,制备和研究针对Hcp的人源化单克隆抗体究奠定了基础。

### 3.2 单细胞测序技术构建Hcp蛋白的免疫组库

高通量测序数据的质控与分析是进行单细胞测序研究的基石,只有通过严格的数据质控和精细的分析,才能确保得到准确、可靠的单细胞层面的生物学见解,因此本研究首先对单细胞测序的数据进行严格的数据质控和分析。

在对单细胞测序结果的分析和展示中,本研究主要针对了3个方面,克隆型多样性分析、CDR3区域特征分析和V-J基因配对特征分析。克隆型多样性反映了免疫系统中不同克隆抗体的多样性和丰度,是评估免疫应答宽度和深度的关键指标,一个多样化的免疫组库能够提供更广泛的抗原识别范围,这对于抗体筛选和疾病治疗尤为重要[9]。CDR3区域是抗体多样性的关键决定因素,其在抗体的可变区中最为多样化,直接决定了抗体与抗原的结合特异性和亲和力,通过分析免疫库中CDR3区域的多样性,研究人员可以评估免疫组库的覆盖范围和潜在的抗原识别能力[10]。V(变异)区和J(连接)区基因是编码抗体轻链可变区的关键基因段,它们通过不同的组合方式产生抗体多

样性,这是B细胞免疫应答的基础之一。这种多样性确保了免疫系统能够对广泛的抗体进行识别和反应[11]。

### 3.3 人源化单克隆抗体的制备和结合活性评价

抗体人源化改造是将非人源抗体的蛋白序列修改为更接近人类抗体序列的过程。这一步骤对于减少临床使用中可能出现的免疫原性(即引起免疫反应)至关重要。通过人源化,可以降低患者体内产生抗药物抗体的风险,这些抗体可能会中和药物的效果或引起不良反应[12]。因此在本研究中,对免疫组库中筛选出的8组抗体的轻重链基因进行了人源化改造。

结合活性评价为抗体的初步筛选提供了快速而经济的方法,通过ELISA可以量化抗体和抗原之间的结合力,这是确定抗体候选物是否有临床开发潜力的关键步骤。本研究成功表达了7组单克隆抗体,证明了其中2组抗体具有良好的体外结合活性;此外抗体组库中还有大量没有被发掘的抗体序列,这些抗体序列都有可能表达出高质量的单克隆抗体,因此该研究构建了一个具有巨大研究潜力的免疫宝库,为后续鉴定出具有治疗、预防、检测功效的单克隆抗体打下基础。

本实验所使用的浅层scRNA测序是无法区分耗尽的记忆B细胞与未耗尽的记忆B细胞所带来的影响,因此本研究构建和分析的免疫组库是随机来自这两种B细胞,为了进一步提高免疫组库的准确性,应该对该文库进行更加深入的测序,以减少耗尽的记忆B细胞所带来的干扰[13]。而且本研究主要分析了克隆富集的B细胞,因此可能会忽略绝大多数测序的B细胞,而这些B细胞也可能是mAb潜在的宝库,可以进一步使用基于生物信息学的选择方法来对剩余B细胞序列进行富集、筛选[14]。

通过293F细胞瞬时表达系统成功表达了单克隆抗体,虽然达到了mg级表达,但抗体的表达量不高,不利于后期大规模产业化。因此,可能还需要筛选能大量稳定表达此类抗体的细胞系。IgG2-1、IgG2-2在单克隆抗体结合活性的评价中反应出了良好效果并且具有较高的抗体效价,而其余几株抗体在ELISA实验中未表现出明显优势,可能是因为:①某些抗体可能在体外结合活性不佳,但在体内环境能具有中和活性,还需开展后续体内活性研究来继续评估[15]。②本研究所构建的单克隆抗体主要是基于抗体组库中前10克隆型的基因,这些基因在抗体组库中有较高的表达频率,但并不意味着这部分基因序列所构建的抗体一定具有良好的抗原结合活性。

综上所述,本研究基于单个特异性记忆B细胞测序技术,成功构建了针对鲍曼不动杆菌Hcp蛋白的抗体组库,通过对抗体组库的分析,筛选到了针对鲍曼不动杆菌Hcp蛋白的8种重组蛋白抗原的全人源化单克隆抗体并成功表达和纯化了其中7株,再通过抗体的体外活性评价对免疫组库进行验证,为未来开发更有效的治疗策略和预防手段提供重要的理论和实践基础。

**利益冲突** 本文所有作者声明不存在利益冲突

**参考文献:**

[1] 程浩, 杨赟, 孙红武, 等. TLR2/TLR9激动剂对鲍曼不动杆菌肺部感染的保护作用[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(8): 829-836. DOI:10.16016/j.2097-0927. 202401052.
CHENG H, YANG Y, SUN H W, *et al*. Protective effect of TLR2/TLR9 agonists on pulmonary Acinetobacter baumannii infection in mice[J]. J Army Med Univer, 2024, 46(8): 829-836. DOI:10.16016/j.2097-0927. 202401052.

[2] 胡音音, 杜伟鹏, 张亚东, 等. 鲍曼不动杆菌Hcp基因原核表达载体的构建及蛋白纯化[J]. 实验与检验医学, 2022, 40(2): 192-195.DOI:10.3969/j.issn.1674-1129.2022.02.015.
HU Y Y, DU W P, ZHANG Y D, *et al*. Construction of prokaryotic expression vector of Hcp gene of *Acinetobacter baumannii* and its protein purification[J]. Exp Lab Med, 2022, 40(2): 192-195. DOI: 10.3969/j. issn. 1674-1129. 2022.02.015.

[3] 殷冠坤, 靳龙阳, 王辉. 肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌Ⅵ型分泌系统研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2021, 41(8): 640-644. DOI: 10.3760/cma. j. cn112309-20201119-00527.
YIN G K, JIN L Y, WANG H. Advances in \n *Klebsiella pneumoniae* and \n *Acinetobacter baumannii* type Ⅵ secretion systems\n[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2021, 41(8): 640-644. DOI: 10.3760/cma.j.cn112309-20201119-00527.

[4] 程彤彤, 万海同, 余道军. 鲍曼不动杆菌Ⅵ型分泌系统溶血素-联合调节蛋白研究进展[J] 微生物学通报, 2021, 48(3): 873-881. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.200384.
CHENG T T, WAN H T, YU D J. Role of haemolysin-coregulated protein in *Acinetobacter baumannii* type Ⅵ secretion system: a review[J]. Microbiol China, 2021, 48(3): 873-881. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.200384.

[5] 宋金益, 胡海洋. 单细胞转录组测序技术进展及其在生物医药领域的应用革新[J]. 科技与创新, 2022(16): 173-177. DOI: 10.15913/j.cnki.kjycx.2022.16.054.
SONG J Y, HU H Y. Progress of single cell transcriptome sequencing technology and its application innovation in

biomedical field[J]. Sci Technol Innov, 2022(16): 173-177. DOI: 10.15913/j.cnki.kjycx.2022.16.054.

[6] VISTAIN L, VAN PHAN H, KEISHAM B, *et al*. Quantification of extracellular proteins, protein complexes and mRNAs in single cells by proximity sequencing[J]. Nat Methods, 2022, 19(12): 1578-1589. DOI: 10.1038/s41592-022-01684-z.

[7] GEISBRECHT B V, BOUYAIN S, POP M. An optimized system for expression and purification of secreted bacterial proteins[J]. Protein expression and purification, 2006, 46(1): 23-32. DOI:10.1016/j.pep.2005.09.003.

[8] FITZSIMONS T C. Identification of Acinetobacter baumannii type Ⅵ secretion system targets and toxins[D]. Melbourne, Monash University, 2017. https://doi. org/10.4225/03/5959b0429e1a8.

[9] CHAN E Y. Advances in sequencing technology[J]. Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen, 2005, 573(1/2): 13-40. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.01.004.

[10] MORA T, WALCZAK A M. How many different clonotypes do immune repertoires contain?[J]. Curr Opin Syst Biol, 2019, 18: 104-110. DOI: 10.1016/j.coisb.2019.10.001.

[11] BONVIN P, VENET S, KOSCO-VILBOIS M, *et al*. Purpose-oriented antibody libraries incorporating tailored CDR3 sequences[J]. Antibodies, 2015, 4(2): 103-122. DOI: 10.3390/antib4020103.

[12] SINGH S, KUMAR N K, DWIWEDI P, *et al*. Monoclonal antibodies: a review[J]. Curr Clin Pharmacol, 2018, 13(2): 85-99. DOI: 10.2174/1574884712666170809124728.

[13] LI F, LUO M, ZHOU W Y, *et al*. Single cell RNA and immune repertoire profiling of COVID-19 patients reveal novel neutralizing antibody[J]. Protein Cell, 2021, 12(10): 751-755. DOI: 10.1007/s13238-020-00807-6.

[14] SHIAKOLAS A R, KRAMER K J, JOHNSON N V, *et al*. Efficient discovery of SARS-CoV-2-neutralizing antibodies *via* B cell receptor sequencing and ligand blocking[J]. Nat Biotechnol, 2022, 40(8): 1270-1275. DOI: 10.1038/s41587-022-01232-2.

[15] GÉRARD A, WOOLFE A, MOTTET G, *et al*. Author Correction: High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics[J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(6): 756. DOI: 10.1038/s41587-020-0563-7.

(收稿:2023-12-02;修回:2024-06-20)

(编辑 刘秋池)