·生物医药前沿·

H 因子结合蛋白单克隆抗体的制备及 ELISA 法含量检测初探

苏桂民[1,2],冀　颖[1,2],纪国存[1,2],龙　静[1,2],郭　通[1,2],申卫家[1,2],张　宇[1,2],朱卫华[1,2],杜　琳[1,2]
(1 北京市细菌性疫苗工程技术研究中心,北京 100176;2 北京智飞绿竹生物制药有限公司,北京 100176)

[摘要] **目的**:制备 B 群脑膜炎球菌 H 因子结合蛋白 A(fHBP A)和 H 因子结合蛋白 B(fHBP B)亚家族的单克隆抗体,建立检测 fHBP 抗原含量的 ELISA 方法。**方法**:重组表达并纯化 fHBP A(His)和 fHBP B(His)标签蛋白免疫小鼠,将小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合,筛选 3 株稳定分泌抗 fHBP 单克隆抗体的细胞株 A,B 和 AB。以抗 AB 为一抗,辣根过氧化物酶标记抗 A、抗 B 为二抗,分别建立检测 fHBP A 和 fHBP B 的双抗夹心 ELISA 方法。**结果**:3 种单抗效价均在 4.4×10^5 ~ 8.8×10^5,Western Blot 及 ELISA 显示 3 种抗体均有结合特异性,且单抗 AB 和 A,B 对应不同的抗原识别位点,相互独立。双抗夹心 ELISA 方法灵敏度达到 10 ng·mL^{-1},变异系数 <10%。**结论**:采用单克隆抗体检测 fHBP 抗原的 ELISA 方法特异性和适用性良好,为进一步建立快速灵敏检测和鉴定 fHBP 抗原的方法奠定了基础。

[关键词] H 因子结合蛋白;单克隆抗体;ELISA;B 群脑膜炎球菌
[中图分类号] R943.42;R979.1　[文献标志码] A　[文章编号] 1003 - 3734(2021)10 - 0921 - 08

Preparation of monoclonal antibodies against fHBP and its application in determination of antigen content by ELISA

SU Gui-min[1,2], JI Ying[1,2], JI Guo-cun[1,2], LONG Jing[1,2], GUO Tong[1,2], SHEN Wei-jia[1,2], ZHANG Yu[1,2], ZHU Wei-hua[1,2], DU Lin[1,2]
(1 *Beijing Bacterial Vaccine Engineering Research Centre, Beijing* 100176, *China*;
2 *Beijing Zhifei Lvzhu Biopharmaceutical Co., Ltd., Beijing* 100176, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To obtain monoclonal antibodies of the factor H binding protein (fHBP) A and B subfamily proteins in meningococcal group B, and establish an ELISA detection method which can provide a new way for quantitation and identification of fHBP antigen. **Methods**: Mice were immunized with purified histidine-labeled recombinant fHBP (His), the spleen cells of mouse were fused with SP2/0 cells. 3 cell strains with stable secretion of anti-fHBP monoclonal antibodies were acquired, respectively named A, B and AB. To establish a double-antibody sandwich ELISA method for detecting recombinant fHBP antigen, AB was coated as primary antibodies, A and B were labeled by horseradish peroxidase (HRP) as the second antibody. **Results**: The GMTs valences of A, B and AB antibodies produced in mouse ascites were all between $4.4\sim8.8\times10^5$, and Western Blot showed that the 3 antibodies could specifically bind the corresponding recombinant fHBP antigens. The direct ELISA test also demonstrated that the 3 monoclonal antibodies merely reacted with proteins containing fHBP A or fHBP B through different recognition sites on antigens, independent of each other. The double-antibody sandwich ELISA method had good specificity and applicability, with sensitivity up to 10 ng·mL^{-1} and coefficient variation of less than 10%. **Conclusion**: The double antibody sandwich ELISA method based on monoclonal antibody has good specificity and applicability, which laid a foundation to further establish a sensitive and rapid method for detection and identification of fHBP antigen.

[**Key words**] fHBP; monoclonal antibody; ELISA; meningococcal group B

[作者简介] 苏桂民,男,硕士研究生,生物制药高级工程师,主要从事疫苗研发工作。联系电话:(010)67872389,E-mail:suguimin@zhifeishengwu.com。

B 群脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitides* group B),俗称 B 群脑膜炎球菌,能够引起流行性脑脊髓膜炎(以下简称流脑)和败血症,该病具有较高的发病率和病死率。2007 年流行病学调查显示,A,B,C 群脑膜炎球菌引起的病例占流脑病例 90%[1],近年来 B 群脑膜炎球菌流行呈上升趋势[2-3]。区别于其他脑膜炎球菌,B 群的荚膜多糖线性多聚唾液酸与人神经细胞黏附因子的 *N*-乙酰神经氨酸聚合物结构类似,在人体内不具备免疫原性,且有诱发自身免疫疾病的危险,所以 B 群脑膜炎球菌外膜蛋白成为疫苗的候选抗原[4-5]。其中的外膜脂蛋白 2086(LP2086)能够结合人 H 因子,下调补体激活途径的旁路途径,使细菌逃避机体的识别与攻击而生存,现称为 H 因子结合蛋白(factor H binding protein,fHBP)[6-8]。fHBP 分为 A 亚家族和 B 亚家族,即 fHBP A 与 fHBP B。基于聚类比对分析,fHBP 系统发生树表明,B 亚家族约占分离株的 70%,A 亚家族约占 30%[5-6,9-10]。fHBP 的氨基酸序列较保守,同一亚族内 91.6% ~100% 氨基酸相同,不同亚族间氨基酸最低相似率为 62.8%[11-13]。fHBP 是一种几乎表达于所有脑膜炎球菌表面的特异性脂蛋白,相对分子质量 29 kDa 左右,是脑膜炎球菌重要的毒力因子和疫苗抗原,为已上市或研发中的 B 群脑膜炎球菌疫苗中的重要的组成成份[10,14-15]。国内外研究机构和疫苗研发企业已从脑膜炎球菌中分离纯化和重组克隆表达 fHBP,抗原特异性研究和多克隆抗体血清用以鉴定诊断流行性脑膜炎致病菌类型也得到广泛应用,已报道 fHBP 单克隆抗体如 MN86-994-11[16],JAR41[17] 和 anti-GNA1780 Mab502[18] 主要应用于检定不同亚型蛋白和新疫苗位点研发[19]。本实验通过重组表达 fHBP A(His)和 fHBP B(His),旨在制备特异性单克隆抗体,并建立不同亚家族 fHBP 蛋白含量检测的 ELISA 方法。

材料与方法

1 基因序列及表达载体

合成基因序列(南京金斯瑞生物科技有限公司):*fHBP A*(GenBank:AY330361.1),*fHBP B*(GenBank:AY330406.1),*fHBP AF*(gga att cca tat gtg cag ctc tgg ctc agg tt),*fHBP AR*(ccg ctc gag ctg ttt acc cgc gat gcc a),*fHBP BF*(gga att cca tat gaa aac cac cct gaa aat gac gg),*fHBP BR*(ccg ctc gag ctg ttt tgc cgc ca);表达载体 pET28a(Merck 公司);大肠杆菌 DH5α 和 BL21(DE3)(TaKaRa 公司)。

2 实验动物及细胞

BALB/c 小鼠(SPF 级,8 周龄,雌性,12 ~ 14 g,北京维通利华公司),动物合格证号:No.11400700296586;SP2/0 细胞(北京智飞绿竹生物制药有限公司保存)。

3 试剂

fHBP A,A' 和 fHBP B,B' 重组纯化蛋白(北京智飞绿竹生物制药有限公司);B 群脑膜炎球菌 fHBP 多克隆抗体 Rabbit Anti-MenB fHBP antiserum(11707BO.3-L,Alpha Diagnostic Intl 公司);抗体纯化预装柱 Hitrap MabSelect SuRe(10265241,GE 公司);DMEM 培养基(1821224,Gibco 公司);胎牛血清(20150520,浙江天杭公司);羊抗鼠 IgG:HRP(SLBC3207,Sigma 公司);DMSO(3244C490,aMResco 公司);NaCl,Na_2CO_3 等试剂(国药集团化学试剂有限公司,分析纯)。

4 仪器

AC2-4S1 生物安全柜(ESCO 公司);SimpliAmp 生物学聚合酶链反应(PCR)仪(Life Technologies 公司);Power Pac Basic 电泳仪(Bio-Rad 公司);AKTA Avant 25 纯化层析仪(GE 公司);3111 二氧化碳培养箱(Thermo Scientific 公司);Spectra Max190 酶标仪(Molecular Devices 公司);Sorvall ST 16R 高速冷冻离心机(Thermo Fisher 公司)等。

5 扩增 *fHBP* 基因

以 BamH Ⅰ和 Xol Ⅰ为酶切位点,分别以 *fHBP AF*,*fHBP AR* 和 *fHBP BF*,*fHBP BR* 为引物,PCR 扩增 2 个已重组蛋白 *fHBP A*(GenBank:AY330361.1),*fHBP B*(GenBank:AY330406.1)的基因序列。

6 *fHBP* 基因克隆与表达

以 BamH Ⅰ和 Xho Ⅰ对表达载体质粒 pET28a 和 PCR 产物双酶切,回收目的基因片段和载体大片段,T4 连接酶 16 ℃水浴过夜连接,转化 DH5α,构建载体分别命名为 pET28-fHBP A 和 pET28-fHBP B,质粒测序鉴定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。将重组质粒分别转化 BL21(DE3),异丙基-β-*D*-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导,12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测重组蛋白表达量和纯度。采用美国通用电气公司 HisTrap HP 填料,收集 0.7 mol·L^{-1} 咪唑(pH 7.4)的洗脱峰,即为目的蛋白 fHBP A(His)和 fHBP B(His),冻干保存。

7 动物免疫

将 fHBP A(His)和 fHBP B(His)以 0.1 mg·只$^{-1}$

皮下注射免疫小鼠，每组 4 只，免疫 2 次，间隔 2 周，再分别以 0.02 mg·只$^{-1}$尾静脉注射加强免疫，d 5 取小鼠脾脏。

8　细胞融合和筛选

将小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞按 5∶1混合，37 ℃水浴中加入 50% PEG2000 融合。将融合细胞加入已添加 DMEM 完全培养基（含 0.5% HAT）的 96 孔细胞培养板中，37 ℃、5% CO_2 培养。1 周后更换 DMEM 完全培养基（含 1% HAT），2 周后检测细胞培养上清抗体效价，将吸光度值（OD 值）>1.0 培养孔扩大培养后以有限稀释法筛选单克隆抗体。

9　单克隆抗体制备和效价测定

将筛选的单克隆细胞株培养后，以 2.5×10^5 个细胞·只$^{-1}$注射小鼠腹腔，4 d 后，观察并收集小鼠腹水，用间接 ELISA 法测定效价。

10　单克隆抗体鉴定

IgG 类型试剂盒（SBA Clonotyping System-HRP 5300-05）参照说明书鉴定单克隆抗体的亚型，ELISA 和 Western Blot 法鉴定单克隆抗体的特异性。

11　双抗夹心 ELISA 法检测 fHBP 抗原含量的建立

11.1　单克隆抗体饱和曲线及叠加实验　以 0.05 mol·L^{-1}碳酸盐缓冲液稀释并包被 fHBP A（His）和 fHBP B（His）蛋白，间接 ELISA 检测效价方法测定单克隆抗体的饱和值，绘制饱和曲线。

按文献[20]方法，将一种饱和浓度的单抗 $McAb_1$ 加至已包被酶标板上，37 ℃孵育 1 h，洗涤后再加入另一种单抗 $McAb_2$，同样孵育洗涤；加入 1∶4 000 比例稀释的羊抗小鼠二抗 IgG-HRP，加入底物显色，测定 OD_{450}值，计算增值指数（appreciation-index，AI）：

$$AI=\frac{A_{1+2}-A_1}{A_2}\times100\%$$

A_1 为 $McAb_1$ 的 OD_{450}值，A_2 为 $McAb_2$ 的 OD_{450}值，A_{1+2}为 $McAb_1$ 叠加 $McAb_2$ 的 OD_{450}值。当 AI≥10%时表示针对不同抗原位点，AI 值越大，抗原位点重叠的可能性越小。

11.2　单克隆抗体标记辣根过氧化物酶（horse radish peroxidase，HRP）　简易过碘酸钠法对单克隆抗体进行标记，工作浓度为 1∶5 000，3，3’，5，5’-四甲基联苯胺（TMB）底物显色。

11.3　fHBP 双抗夹心 ELISA 法的建立　包被单克隆抗体 AB，fHBP 蛋白稀释范围 10 ~ 1 000 ng·mL^{-1}，HRP 标记的单克隆抗体 A，B 稀释 8 000 倍，分别进行 ELISA 方法检验。以标准曲线相关系数 $r>0.99$，抗原梯度 OD 值范围 0.1 ~ 1.8 作为标准确定反应体系，实验重复 3 次。

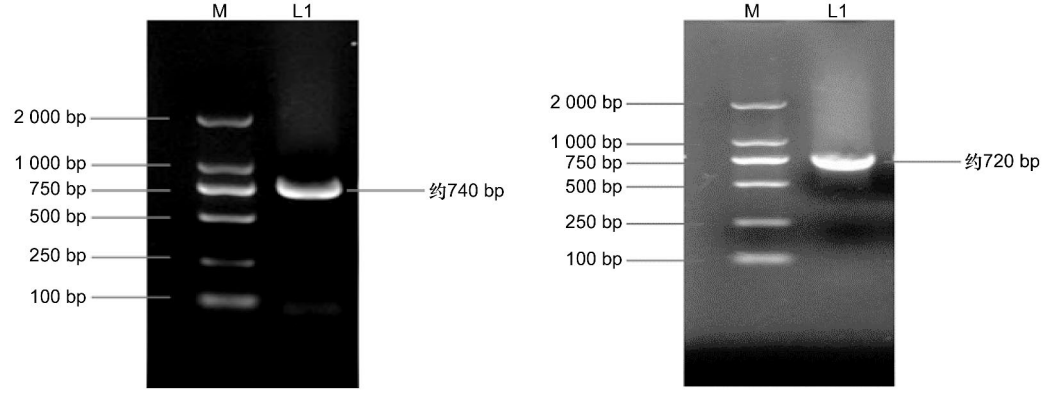
12　统计学分析

采用 Origin 2019 软件，进行单因素方差分析和 t 检验，以 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

结　果

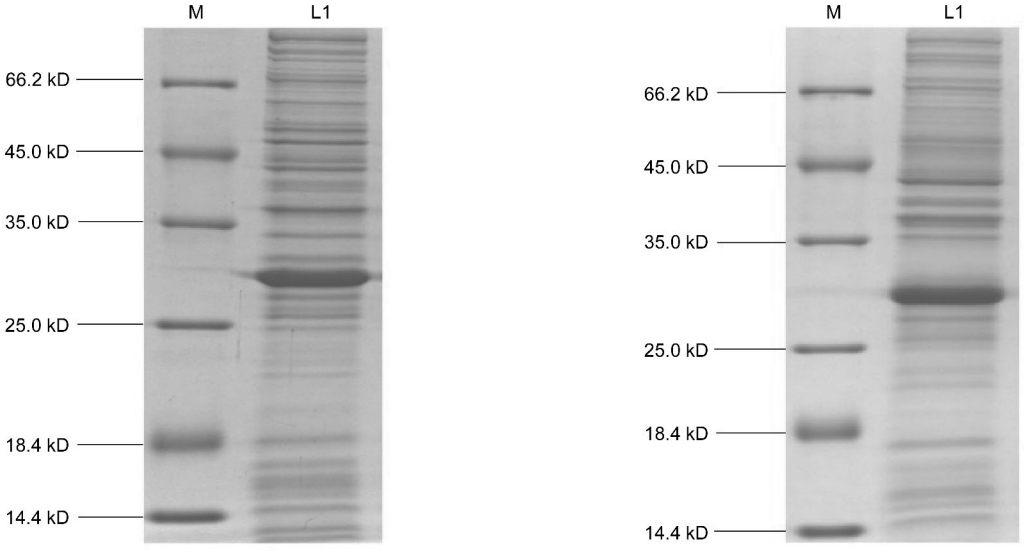
1　*fHBP* 基因克隆与表达

从 *fHBP A*，*fHBP B* 质粒 PCR 扩增 2 种目的基因片段，分别为 740 和 720 bp，经胶回收和 BamH Ⅰ，Xho Ⅰ 双酶切克隆至 pET28a 中，获得重组质粒 pET28a-fHBP A 和 pET28a-fHBP B，经酶切和测序鉴定克隆基因为 *fHBP A* 和 *fHBP B*，经美国国家生物技术信息中心（NCBI）DNA 序列数据库比对，与 *fHBP* 序列同源性分别在 78% ~95% 和 84% ~98%。菌株经 IPTG 诱导表达可溶性目的蛋白，12% SDS-PAGE 电泳显示蛋白分子量分别为 32.5 和 31.0 kDa。Western Blot 鉴定 2 种表达蛋白均为 fHBP 蛋白。见图 1 ~ 图 3。



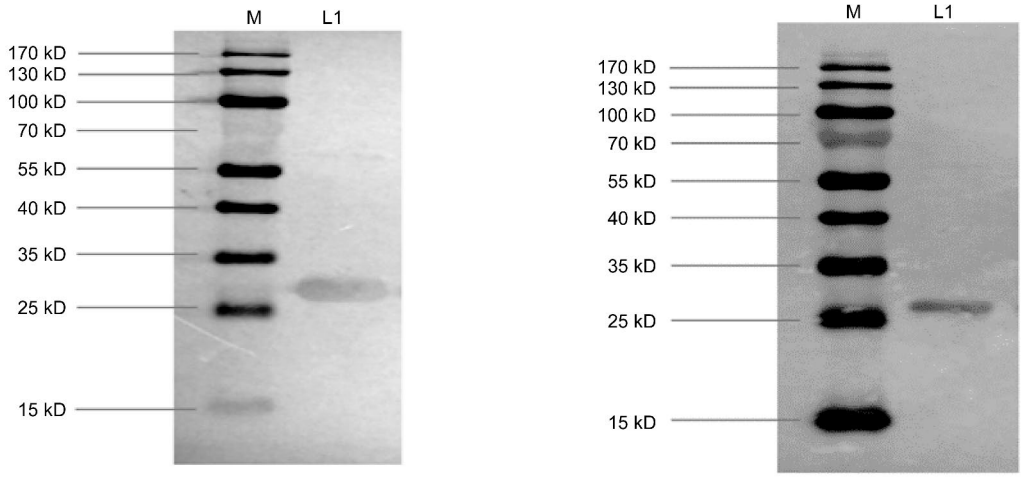
左图 L1：*fHBP A* 基因片段；右图 L1：*fHBP B* 基因片段

图 1　*fHBP A*，*fHBP B* 目的基因的 PCR 扩增



左图 L1:fHBP A(His) SDS-PAGE 电泳图;右图 L1:fHBP B(His) SDS-PAGE 电泳图

图 2 目的蛋白 fHBP A(His)和 fHBP B(His)的表达鉴定



左图 L1:fHBP A(His)蛋白印迹;右图 L1:fHBP B(His)蛋白印迹;
一抗为 Rabbit Anti-MenB fHbp antiserum ADI 1:8 000

图 3 目的蛋白 fHBP A(His)和 fHBP B(His)的 Western Blot 鉴定

2 单克隆抗体筛选和鉴定

如表 1 所示,小鼠融合前血清效价均在 1∶10^5 以上,小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合后,筛选 OD 值 >1.0 的阳性克隆孔。经 3 次有限稀释法筛选,获得 3 株稳定分泌抗 fHBP 单克隆抗体的杂交瘤细胞,分别命名为 A,B 和 AB。A 来源于 fHBP A(His)免疫小鼠,B 和 AB 来源于 fHBP B(His)免疫小鼠。制备单克隆抗体腹水,ELISA 检测 A 腹水对 fHBP A 效价为 4.4×10^5[几何平均滴度(GMT)值 5.644],B 腹水对 fHBP B 效价为 8.8×10^5(GMT 值 5.945),相互之间无交叉($P<0.01$),AB 对 fHBP A 和 fHBP B 效价分别为 5.2×10^5 和 8.8×10^5(GMT 值为 5.720 和 5.945)。以羊抗鼠 IgG,IgG1 和 IgG2-HRP 为酶标抗体鉴定单克隆抗体亚型,表明 3 株融合细胞分泌抗体均为 IgG1。

表 1 ELISA 法检测抗体效价(GMT)

样品	包被 fHBP A(His)		包被 fHBP B(His)	
	GMT	RSD/% ($n=3$)	GMT	RSD/% ($n=3$)
抗 A 单抗腹水	5.644 ± 0.151	2.67	1.957 ± 0.174	8.89
fHBP-A(His)免疫小鼠血清	5.042 ± 0.150	2.97	4.591 ± 0.450	9.80
抗 B 单抗腹水	2.709 ± 0.246	9.08	5.945 ± 0.150	2.54
fHBP-B(His)免疫小鼠血清	3.763 ± 0.389	10.34	5.419 ± 0.301	5.56
抗 AB 单抗腹水	5.720 ± 0.255	4.45	5.945 ± 0.151	2.54
空白小鼠血清	1.656 ± 0.174	10.51	1.907 ± 0.173	9.12
E. coli 蛋白免疫小鼠血清	3.211 ± 0.174	5.42	2.709 ± 0.079	2.92

GMT 值以效价数值取 lg 对数计算;对抗 A 单抗腹水、抗 B 单抗腹水效价进行差异 t 检验,$P<0.01$,有显著性差异;对抗 AB 单抗腹水,$P>0.01$,无显著性差异

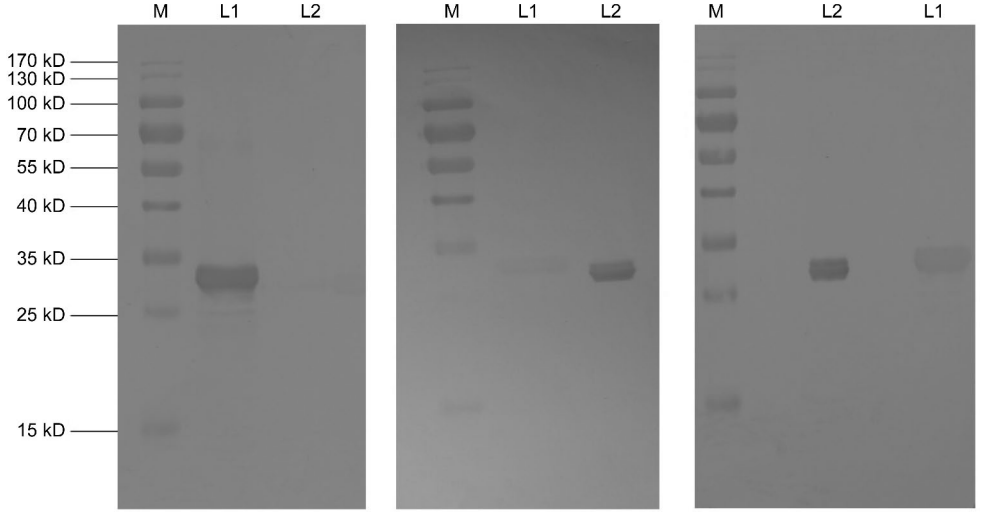
杂交瘤细胞染色体计数,3 株杂交瘤细胞染色体数目均高于两亲本细胞染色体数目,在 90 ~ 110 之间,见表 2。

表 2 杂交瘤细胞染色体计数 $\bar{x} \pm s, n=20$

单克隆抗体杂交瘤细胞株	染色体形态特点	染色体数目
A	分散好,可见中间着丝点染色体和端着丝点染色体	103 ± 3.78
B	分散好,可见中间着丝点染色体和端着丝点染色体	104 ± 4.62
AB	分散好,可见中间着丝点染色体和端着丝点染色体	99 ± 5.58

3 单克隆抗体结合特异性

将 fHBP A 和 fHBP B SDS-PAGE 后转印至 PVDF 膜上,以大肠杆菌、牛血清白蛋白为对照,分别以 3 种单抗为一抗孵育,结果如图 4 所示,单克隆抗体特异性结合,抗 A 结合 fHBP A,抗 B 结合 fHBP B,抗 AB 与 fHBP A 和 fHBP B 均能结合。免疫印迹为单一条带,分子量相符,抗体与对照蛋白均不反应。



L1:fHBP A;L2:fHBP B;从左至右一抗分别为抗 A 1∶4 000,抗 B 1∶4 000,抗 AB 1∶5 000

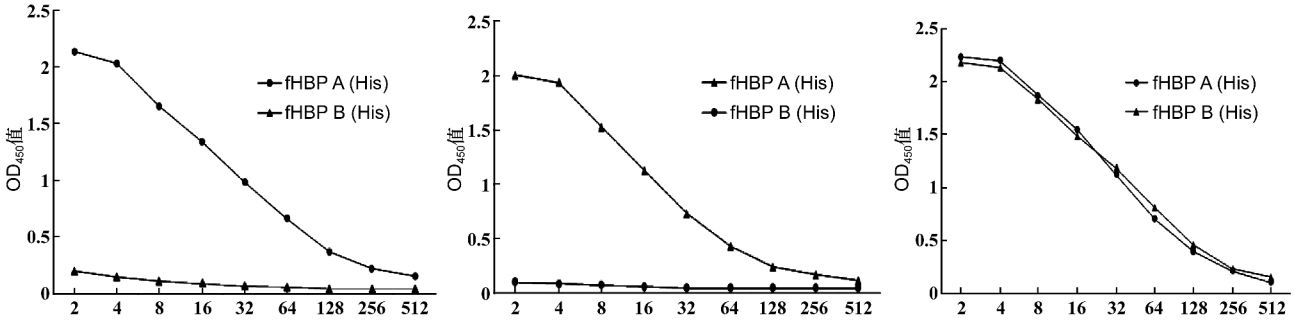
图 4 3 种单克隆抗体特异性结合免疫印迹

稀释 fHBP、对照蛋白 100 ~ 1 000 ng·mL^{-1}包被酶标板,检测 1 000 倍稀释单克隆抗体与抗原结合能力,ELISA 结果表明所有单克隆抗体在 100 ng·mL^{-1}抗原水平上 OD_{450}值均 >0.5,对照蛋白 OD_{450}值均在 0.1 以下。

4 双抗夹心 ELISA 法检测 fHBP 抗原含量

4.1 单抗饱和曲线及识别抗原位点叠加实验 参照间接 ELISA 法效价检测,3 种单抗的 OD_{450}值在一定浓度时趋于直线,随着抗体稀释梯度增加,OD_{450}值开始下降,开始下降的浓度以上为该抗体的饱和

浓度,如表 3 所示,单抗 A,B,AB 的饱和工作浓度均在 1∶400 以上(X 轴单位为 100),OD_{450} 值可达到 2.0;以 1.0 μg·mL^{-1} 包被酶标板,先后分别加入 2 种 1∶400 稀释的抗体,叠加后测定 OD_{450} 值,计算 AI 值如下:所有 AI 值均 >10%,单抗 A,B 和 AB 识别 fHBP 抗原的位点不同,3 种单抗与抗原结合的识别位点相互独立,抗 A 和抗 B 对 2 种蛋白亦无相互交叉反应。



从左至右图分别为抗 A、抗 B、抗 AB 抗体对 fHBP 抗原的饱和曲线

图 5 单克隆抗体 A,B 和 AB 对 fHBP 蛋白的饱和曲线

表 3 3 种单抗之间增值指数(AI)的测定

抗原	$McAb_1$	$McAb_2$(%)			$McAb_2$ 不叠加对照
		抗 A	抗 B	抗 AB	
fHBPA(His)	抗 A	1.730	1.787(99.29)	2.042(16.45)	1.714
	抗 B	1.760(34.88)	0.084	2.013(109.3)	0.086
	抗 AB	2.135(20.85)	1.917(95.20)	2.042	1.917
fHBPB(His)	抗 A	0.310	1.525(77.47)	1.922(38.73)	0.222
	抗 B	1.560(99.11)	1.518	2.018(13.48)	1.350
	抗 AB	1.867(89.54)	1.990(34.85)	1.922	1.835

4.2 酶标单克隆抗体的特异性检验 包被 fHBP A 和 fHBP B 检测经 HRP 标记的抗 A 和抗 B 抗体,如表 4 所示,OD_{450} 值与抗原蛋白浓度梯度对应趋势良好,曲线 OD 值范围广,特异性良好。

表 4 fHBP 蛋白检测酶标抗体特异性结合

蛋白浓度/μg·mL^{-1}		OD 值(450 nm)					
		1	2	3	平均值	标准偏差	变异系数/%
fHBP A	0	0.051	0.041	0.044	0.045	0.005	11.3
	0.25	0.644	0.615	0.610	0.623	0.018	2.9
	1.0	1.788	1.682	1.737	1.736	0.053	3.0
	4.0	3.186	2.994	3.278	3.153	0.115	4.6
fHBP B	0	0.042	0.045	0.051	0.046	0.005	9.9
	0.25	0.604	0.584	0.561	0.583	0.022	3.7
	1.0	1.850	1.771	1.798	1.806	0.040	2.2
	4.0	2.942	2.859	2.900	2.900	0.042	1.4
E. coli	10.0	0.085	0.085	0.094	0.088	0.005	5.9

4.3 双抗夹心 ELISA 法测抗原 以抗 AB 为包被抗体,HRP 标记的抗 A 和抗 B 为酶标抗体,以大肠杆菌蛋白为阴性对照测定 fHBP 蛋白的含量。以吸光值的对数值为纵坐标,以 fHBP 蛋白的浓度(ng·mL^{-1})为横坐标建立标准曲线。结果如表 5 和表 6 所示,抗 AB 稀释 2 000 倍包被,酶标单抗各稀

释 8 000 倍,在 10 ~ 1 000 ng·mL^{-1}浓度范围内,fHBP 蛋白的浓度与吸光值的对数值呈良好线性关系。同时设置 250 和 500 ng·mL^{-1}浓度水平验证标准曲线的准确性,结果为变异系数(CV)均 <10%,最小检测浓度可达 10 ng·mL^{-1}。

表 5 fHBP A/fHBP A(His)抗原含量检测

实验编号	相关系数	抗原含量/ng·mL^{-1}(CV/%)				
	(*r*)	阴性对照	fHBP A 含量	fHBP A' 含量		fHBP A(His)
1	0.995	0.983(0.370)	508.76(4.005)	495.20(7.065)	234.06(5.589)	511.28(1.853)
2	0.996	0.063(0.527)	524.72(8.062)	551.04(6.117)	253.95(5.497)	509.36(2.116)
3	0.997	1.232(0.878)	495.09(2.947)	505.47(4.501)	245.95(1.338)	512.21(4.774)

表 6 fHBP B/fHBP B(His)抗原含量检测

实验编号	相关系数(*r*)	抗原含量/ng·mL^{-1}(CV/%)			
		阴性对照	fHBP B	fHBP B'	fHBP B(His)
1	0.998	0.042(0.034)	263.95(4.813)	547.51(3.062)	511.72(4.073)
2	0.994	0.031(0.027)	250.95(2.039)	541.40(2.505)	495.09(2.162)
3	0.995	0.026(0.018)	258.86(3.710)	549.04(3.809)	504.04(3.797)

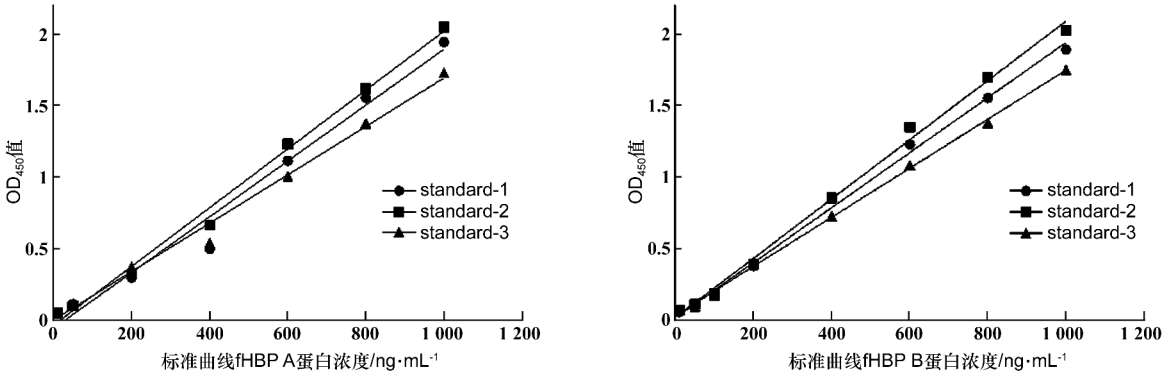


图 6 抗原检测标准曲线

讨　论

fHBP 蛋白是 B 群脑膜炎球菌的有效疫苗抗原,fHBP 抗原含量的检测对 B 群脑膜炎疫苗的质量控制至关重要。fHBP 蛋白 2 个亚家族间蛋白序列保守性较高,以多克隆抗体夹心法检测抗原,不能针对 2 个亚家族的蛋白进行特异性区分。本研究中筛选的单克隆抗体,抗 A、抗 B 分别特异性针对 2 个亚家族,同时获得了针对 2 个亚家族 fHBP 保守区序列的特异性单抗 AB,均为 IgG1 类型抗体。3 种抗体的重叠实验中,叠加顺序在 2 种抗原上表现出 AI 值的变化,如 fHBPA(His)上抗 A 叠加抗 B 计算 AI 值为 99.29%,反之则为 34.88%,而抗 B 叠加抗 AB 的 AI 值可达到 109.3%,除了抗体结合能力强弱因素以外,也与抗体并非处于最适反应浓度有关。以 AI 值均 >10% 为标准,单抗 AB,A,B 与 fHBP 结合的抗原位点均不重合,解决了双抗夹心法可能存在的位点竞争问题。

包被 AB 抗体,采用抗 A 和抗 B 酶标抗体检测 fHBP 抗原含量的 ELISA 方法,可以检测单一 fHBP 亚家族蛋白,而不受其他亚家族蛋白的干扰,由于单抗对应独立的结合位点,检测的特异性、灵敏性和准确性得以提高。检测数据显示 10 ~ 1 000 ng·mL^{-1}范围内标准曲线相关系数 >0.99,检测变异系数 <10%,初步建立了抗原含量测定方法。

本研究的单克隆抗体及以单克隆抗体为基础建立的双抗夹心检测抗原含量的方法,对有无标签的重组 fHBP 蛋白均有特异性结合。单克隆抗体一般

为线性位点或构象抗原位点,因此若检测其他亚家族 fHBP 蛋白可能由于序列差异而降低此法的适用范围,在以 fHBP 为抗原成分的 B 群脑膜炎球菌疫苗研究中,抗原含量的准确检测也会受到纯化工艺、步骤及纯度的影响,尤其无标签 fHBP 蛋白的纯度尚未达到 95%,尚存在一定局限性,因而抗原标准品的建立、各步骤抗原含量变化以及检测影响因素的确定需进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 邵祝军, 徐丽, 高源, 等. 中国流行性脑脊髓膜炎流行菌群变化趋势分析[J]. 中国计划免疫, 2007, 13(6): 541 - 544.

[2] 李军宏, 吴丹, 温宁, 等. 2015—2019 年中国流行性脑脊髓膜炎血清群分布特征[J]. 中国疫苗和免疫, 2020, 26(3): 241 - 244.

[3] VESIKARI T, ESPOSITO S, PRYMULA R, *et al*. Immunogenicity and safety of an investigational multicomponent, recombinant, meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) administered concomitantly with routine infant and child vaccinations: results of two randomised trials[J]. *Lancet*, 2013, 381(9869): 825 - 835.

[4] MARTIN NG, SNAPE MD. A multicomponent serogroup B meningococcal vaccine is licensed for use in Europe: what do we know, and what are we yet to learn? [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2013, 12(8): 837 - 858.

[5] BEERNINK PT, LEIPUS A, GRANOFF DM. Rapid genetic grouping of factor h-binding protein (genome-derived neisserial antigen 1870), a promising group B meningococcal vaccine candidate[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(7): 758 - 763.

[6] SEIB KL, SCARSELLI M, COMANDUCCI M, *et al*. *Neisseria meningitidis* factor H-binding protein fHbp: a key virulence factor and vaccine antigen[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(6): 841 - 859.

[7] GIUNTINI S, REASON DC, GRANOFF DM. Complement-mediated bactericidal activity of anti-factor H binding protein monoclonal antibodies against the meningococcus relies upon blocking factor H binding[J]. *Infect Immun*, 2011, 79(9): 3751 - 3759.

[8] 付昱, 朱喜梅. 新型隐球菌脑膜炎患者的抗真菌治疗分析与药学监护[J]. 今日药学, 2020,30(8):569 - 572.

[9] GANDHI A, BALMER P, YORK LJ. Characteristics of a new meningococcal serogroup B vaccine, bivalent rLP2086 (MenB-FHbp; Trumenba®)[J]. *Postgrad Med*, 2016, 128(6): 548 - 556.

[10] MURPHY E, ANDREW L, LEE KL, *et al*. Sequence diversity of the factor H binding protein vaccine candidate in epidemiologically relevant strains of serogroup B *Neisseria meningitidis*[J]. *J Infect Dis*, 2009, 200(3): 379 - 389.

[11] MASIGNANI V, COMANDUCCI M, GIULIANI MM, *et al*. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870[J]. *J Exp Med*, 2003, 197(6): 789 - 799.

[12] 刘建东, 张静飞, 郑海发. B 群流行性脑脊髓膜炎疫苗的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(4): 472 - 475.

[13] MADICO G, WELSCH JA, LEWIS LA, *et al*. The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance[J]. *J Immunol*, 2006, 177(1): 501 - 510.

[14] COSTA I, PAJON R, GRANOFF DM. Human factor H (FH) impairs protective meningococcal anti-FHbp antibody responses and the antibodies enhance FH binding[J]. *mBio*, 2014, 5(5): e01625 - e01614.

[15] ZLOTNICK GW, JONES TR, LIBERATOR P, *et al*. The discovery and development of a novel vaccine to protect against *Neisseria meningitidis* Serogroup B Disease[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2015, 11(1): 5 - 13.

[16] FLETCHER LD, BERNFIELD L, BARNIAK V, *et al*. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(4): 2088 - 2100.

[17] VU DM, PAJON R, REASON DC, *et al*. A broadly cross-reactive monoclonal antibody against an epitope on the n-*Terminus* of meningococcal fHbp[J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 341.

[18] GIULIANI MM, SANTINI L, BRUNELLI B, *et al*. The region comprising amino acids 100 to 255 of *Neisseria meningitidis* lipoprotein GNA 1870 elicits bactericidal antibodies[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(2): 1151 - 1160.

[19] 吴根鹏, 袁萍, 王月红, 等. 脑膜炎球菌表面蛋白 fHBP 与 PorA 的融合表达及其免疫原性[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(2): 124 - 128.

[20] 孙智锋, 杜念兴, 徐为燕. 兔出血症病毒单克隆抗体的抗原识别位点分析[J]. 南京农业大学学报,1997,20(1):71 - 75.

编辑:杨青/接受日期:2020 - 11 - 10