

硕士学位论文

F 型肉毒毒素单克隆抗体的筛选及
生物学活性评价

马骏池

哈尔滨商业大学

2022 年 6 月

学校代码：10240

学号：Y1913070617

学位论文

F型肉毒毒素单克隆抗体的筛选及生物学活性评价

马骏池

指导教师姓名：高世勇 哈尔滨商业大学

申请学位级别：硕士 学科专业：药理学

论文提交日期：2022.6.8 论文答辩日期：2022.5.27

授予学位单位：哈尔滨商业大学 授予学位日期：

哈尔滨商业大学

University Code: 10240

Register Code : Y1913070617

Dissertation for the Degree of Master

Preparation and identification of monoclonal antibodies against Botulinum toxin F

Candidate:	Ma Jun chi
Supervisor:	Gao Shi yong
Associate Supervisor:	
Academic Degree Applied for:	Degree of Master
Speciality:	Pharmacology
Date of Oral Examination:	2022.5.27
University:	Harbin University of Commerce

哈尔滨商业大学硕士学位论文原创性声明

本人郑重声明：本论文的所有工作，是在导师的指导下，由作者本人独立完成的。有关观点、方法、数据和文献等的引用已在文中指出，并与参考文献相对应。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经公开发表的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本论文文责自负。

学位论文作者签名： 签字日期：2022年6月6日

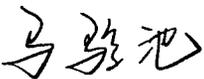
哈尔滨商业大学硕士学位论文版权使用授权书

本论文系作者本人在哈尔滨商业大学攻读硕士学位期间，在导师指导下完成的硕士学位论文。本论文的研究成果归哈尔滨商业大学所有，本论文的研究内容不得以其他单位的名义发表。本人完全了解哈尔滨商业大学关于保留、使用学位论文的规定，同意学校保留、送交本论文的复印件，允许本论文被查阅和借阅；学校可以公布本论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存、汇编本学位论文。

保密口， 在 年解密后适用本授权书。

本学位论文属于

不保密。

学位论文作者签名： 签字日期：2022年6月6日

导师签名： 签字日期：2022年6月6日

摘 要

肉毒毒素 (botulinum toxins, BoNT) 是由肉毒梭状芽孢杆菌产生的一种毒性极强的蛋白类神经毒素, 是目前自然界已知生物和化学毒素中毒性最强的毒素之一。当人 BoNT 感染时, BoNT 可通过阻断神经递质释放而引起松弛性肌肉麻痹, 严重时可导致人窒息死亡。迄今为止, 无论是 BoNT 在临床中的预防、诊断和治疗都受到研究人员的广泛关注。尤其是针对于 BoNT 中毒后的治疗, 在尚无有效化学药物的情况下, 临床上常使用马源抗毒素, 但其仍存在治疗周期长及成本高昂等问题, 使得其临床应用受限, 故亟需要找到更好的治疗药物来替代马源抗毒素。在抗体药物飞速发展的今天, 单克隆抗体已然成为诊断、乃至治疗 BoNT 中毒的热门研发起点。在 BoNT 的有 7 种血清型之中, A、B、E、F 型可导致人中毒。在以往研究多集中在 A、B 型、关于 F 型肉毒毒素的研究极少, 研究筛选 F 型肉毒毒素的单克隆抗体也就具有了特殊意义。本研究旨在通过杂交瘤技术和噬菌体展示技术筛选针对 F 型肉毒毒素特异性强、亲和力高的中和单克隆抗体并对其进行评价鉴定, 为后续其作为诊疗药物的开发提供参考。

为了制备肉毒毒素单克隆抗体, 首先构建针对 F 型肉毒毒素的毒性结构域的重组抗原, 在对抗原进行表达和鉴定后, 纯化获得高纯度重组抗原。两种方式免疫动物后, 通过杂交瘤及噬菌体展示库技术, 分别筛选鼠源单克隆抗体及人源单链抗体, 以进一步进行抗体的评价。

利用实验室前期已构建质粒 pTIG-BoNT/F 扩增片段 FLHn, 构建重组质粒 pTIG-BoNT/FLHn, 并通过大肠杆菌表达系统表达重组蛋白。使用 His Trap HP 亲和层析柱以及 PD10 脱盐柱对重组蛋白分别进行纯化及脱盐操作, GF1-pro32 分析蛋白纯度均 >95%。纯化后重组蛋白经 Western Blot 鉴定其抗原性, 表明重组蛋白可以作为后续抗体制备所需的免疫抗原及筛选抗原。

其次, 以重组蛋白 BoNT/FLHn 为免疫原分别使用快速免疫和常规免疫两种免疫方案免疫雌性 BALB/c 小鼠, 使用间接 ELISA 法测定小鼠的尾血上清效价并筛选阳性细胞, 发现两种免疫方案的小鼠尾血效价均能达到后续细胞融合的需要。快速免疫和常规免疫细胞融合率分别为 18.9%、95.42%, 阳性率分别为 79.35%、21.72%。筛选得到共 10 株阳性杂交瘤细胞株 (1F8、1G11、2D3、5B7、10F6、1D2、1D6、1F9、2C11、3E3), 其中快速免疫及常规免疫各 5 株。有限稀释法获得单克隆杂交瘤细胞株后通过体内诱生法制备腹水, 同时腹水制备完成后对其效价进行检测。后根据抗体亚型的不同分别采用 Protein G 柱、Protein L 柱 IgM Purification 柱纯化, 使用 PD10 脱盐柱进行单抗脱盐操作。经 GF1-pro32 分析抗体纯度后对其进行多方面的评价。抗体重链亚型共获得三种, 轻链均为 κ 型。快速免疫中除 2D3 为 IgG1 型外, 其余均为 IgM 型。常规免疫中 1D2 及 1F9 为 IgG2b 型, 1D6 及 3E3 为 IgG1 型, 2C11 为 IgM 型。对全部所得抗体通过 Western Blot 检测其是否为线性构象。结果所得常规免疫中 1D6 及 3E3 为线性构象。

继而对筛选到的 BoNT/F 单克隆抗体进行应用评价, 特异性检测结果表明, 1G11、2D3、1F9 单抗特异性相对较强, 1D6 抗体具有极强与免疫重组抗原特异性结合的趋势, 其中 3E3 虽然亲和力指标相对较高, 但其存在针对免疫抗原的特异性指标较低。另对生物活性指标即中和活性进行评价, 经由 BoNT/F 攻毒实验发现, 所得鼠源单克隆抗体并无中和作用。

与此同时, 噬菌体展示库技术通过 ELISA 固相筛选的方式, 利用现有的人源噬菌体展示库, 以所纯化重组抗原为底物包被, 三轮富集-洗涤-扩增后, 得到亲和力指标较强的 4 株人源单链抗体。所得 CDR 区序列分别为: F2-1-C5: LCDR3:QVWAG NRSKC, HCDR3:YWRFNGSFD P; F1-2-C6: LCDR3:AADNGLGL, HCDR3:YGVY RDFDD; F2-1-B5: LCDR3:QVWDDNSLDQ, HCDR3:HSVFRVPFAV; F2-1-G2: LCDR3:SAHELRI, HCDR3:HFGHRRPFAY。经质粒构建及表达纯化后其亲和力及特异性仍待验证。

通过以上研究表明, BoNT/FLHn 重组蛋白可以使用大肠杆菌表达系统表达, 利用表达产物作为免疫原, 使用杂交瘤技术可以筛选具有高亲和力、高特异性的 BoNT/F 单克隆抗体。两种免疫方案得到的单克隆抗体评价过程中除亲和力指标外并无明显差异, 但其中快速免疫可能提升单克隆抗体出现重链亚型 IgM 的概率, 从而加大纯化抗体难度。然而, 对于中和抗体的筛选, 实验室前期通过 BoNT/F 的跨膜结构域作为杂交瘤技术抗体制备的筛选抗原已经得到具有较好中和活性的抗体, 猜测中和抗体的得率可能与抗原结构域的选择有关。

噬菌体展示库也同样可得到高亲和力的单链抗体, 区别于杂交瘤技术, 利用人源噬菌体库可直接得到人源的抗体序列, 无需后期进行鼠源抗体人源化的操作来降低单克隆抗体除治疗作用外自身潜在的免疫原性。

最后, 利用杂交瘤技术筛选得到的亲和力指标达 nmol/L 的 1D6 抗体联合结合 Hc 端结构域的 1E2B 抗体建立了双抗夹心 ELISA 检测方法, 线性检测范围区间为 2.048-32.000 ng/mL, 重复性良好, 具有统计学意义。

综上, 鼠源抗体的获得可为临床中建立与应用诊断 BoNT/F 中毒的试剂盒提供参考数据, 人源单链抗体的序列则可为实现诊断或治疗肉毒毒素中毒提供具有研发可行性的参考, 本研究获得的抗体可以为后续 BoNT/F 中毒诊疗药物的开发奠定前期实验基础, 具有现实应用意义。

关键词 BoNT/F; 单克隆抗体; 杂交瘤技术; 噬菌体展示库技术; 双抗夹心 ELISA

Abstract

Botulinum toxins are an extremely poisonous protein neurotoxin generated by *Clostridium botulinum*. It is presently one of the most dangerous toxins known in nature, both biologically and chemically. When BoNT infecting human, BoNT can cause flaccid muscle paralysis by blocking the release of neurotransmitters, which can lead to death by asphyxiation in severe cases. What's more, the prevention, diagnosis and treatment of BoNT in the clinic have received so much attention from researchers. Until now, there is no effective chemical drug to treat BoNT poisoning when Horse-derived antitoxins are often used clinically. To replace it with antitoxins, monoclonal antibodies have emerged as a novel therapy option in the treatment of BoNT poisoning. Today, with the increasing development of antibody drugs, monoclonal antibodies have become a popular research field and development starting point for the diagnosis and even treatment of BoNT poisoning. Among the seven distinct serotypes of BoNT, 4 of them: A, B, F, and F have been shown to cause human poisoning, however, past research has mostly concentrated on types A and B. According to this, BoNT/F seems to be receiving less attention, especially in the aspect of monoclonal antibodies. Furthermore, no antibodies against BoNT/F poisoning have been approved for commercial use. In light of this situation, preparing the neutralizing antibody of BoNT/F is of great significance. In conclusion, this study aims to prepare and evaluate murine neutralizing monoclonal antibodies with strong specificity and high affinity for BoNT/F, which will be accomplished by the use of hybridoma technology and phage display technology, respectively.

In order to prepare botulinum toxin monoclonal antibodies, a recombinant antigen against the toxic domain of BoNT/F is first constructed. After the antigen is expressed and identified, the recombinant antigen is obtained by affinity chromatography. Then use different immunization methods to immunize the animals. Further use two technical means, hybridoma and phage display library technology, to screen murine monoclonal antibodies and human single-chain antibodies, respectively, for further antibody evaluation.

Utilizing the plasmid pTIG-BoNT/F that has been constructed in the early stage of the laboratory to amplify the fragment FLHn, construct the recombinant plasmid pTIG-BoNT/FLHn, and express the recombinant protein through the *E. coli* expression system. The recombinant protein was purified and desalted using His Trap HP affinity chromatography column and PD10 desalting column, respectively. The purity of the protein analyzed by GF1-pro32 was >95%. After purification, the recombinant protein was identified by Western Blot for its antigenicity, indicating that the recombinant protein can be used as an immune antigen and screening antigen for subsequent antibody preparation.

Furthermore, the recombinant protein BoNT/FLHn was used as the immunogen to immunize female BALB/c mice with two immunization schemes: rapid immunization and conventional immunization, respectively, and the indirect ELISA method was used to determine the titer of the tail blood supernatant of the mice and screen positive cells. It was found that the mouse tail blood titers of the two immunization regimens can meet the needs of subsequent cell fusion. The fusion rates of rapid immunization and conventional immune cells were 18.9% and 95.42%, respectively, and the positive rates were 79.35% and 21.72%, respectively. A total of 10 positive hybridoma cell lines were screened (1F8, 1G11, 2D3, 5B7, 10F6, 1D2, 1D6, 1F9, 2C11, 3E3), including 5 rapid immunization and conventional immunization. The monoclonal hybridoma cell line was obtained by the limiting dilution method and the ascites was prepared by the in vivo induction method. At the same time, the titer of the ascites was tested after the preparation of the ascites was completed. Then, according to the different antibody subtypes, Protein G column and Protein L column IgM Purification column were used for purification, and PD10 desalting column was used for monoclonal antibody desalting operation. After analyzing the purity of the antibody by GF1-pro32, it was evaluated in many aspects. There are three antibody heavy chain subtypes, and the light chains are all kappa type. Except 2D3 which is of IgG1 type, the rest are of IgM type in rapid immunization. In routine immunization, 1D2 and 1F9 are IgG2b type, 1D6 and 3E3 are IgG1 type, and 2C11 is IgM type. All the obtained antibodies were tested by Western Blot for linear conformation. Results 1D6 and 3E3 were linear conformations in routine immunization.

Then, the application evaluation of the selected BoNT/F monoclonal antibodies was carried out. The specificity test results showed that the specificity of 1G11, 2D3, and 1F9 monoclonal antibodies was relatively strong, and the 1D6 antibody had a strong tendency to specifically bind to immune recombinant antigens. Although 3E3 has a relatively high affinity index, it has a low specificity index for immune antigens. In addition, the biological activity index, namely the neutralization activity, was evaluated. Through the BoNT/F challenge experiment, it was found that the obtained murine monoclonal antibody had no neutralization effect.

At the same time, the phage display library technology uses the existing human phage display library through ELISA solid-phase screening, and coats the purified recombinant antigen as a substrate. After three rounds of enrichment-washing-amplification, the affinity is obtained. Four human single-chain antibodies with strong indicators. The sequences of the CDR regions obtained are: F2-1-C5: LCDR3: QVWAG NRSKC, HCDR3: YWRFNGSFDP; F1-2-C6: LCDR3: AADNGLGL, HCDR3: YGVY RDFDD; F2-1-B5: LCDR3: QVWDDNSLDQ, HCDR3: HSVFRVPFAV ; F2-1-G2: LCDR3: SAHELRI, HCDR3:

HFGHRRPFAY. After plasmid construction, expression and purification, its affinity and specificity still need to be verified.

The above research shows that the BoNT/FLHn recombinant protein can be expressed using the *E. coli* expression system, the expression product is used as an immunogen, and hybridoma technology can be used to screen BoNT/F monoclonal antibodies with high affinity and high specificity. There is no significant difference in the evaluation process of the monoclonal antibodies obtained by the two immunization schemes except for the affinity index, but the rapid immunization may increase the probability of the heavy chain subtype IgM of the monoclonal antibody, thereby increasing the difficulty of purifying the antibody. However, for the screening of neutralizing antibodies, the screening antigen prepared by the transmembrane domain of BoNT/F as a hybridoma technology antibody in the early stage of the laboratory has obtained antibodies with good neutralizing activity. It is speculated that the yield of neutralizing antibodies may be The choice of antigen domain is related.

Phage display library can also obtain high-affinity single-chain antibodies. Different from hybridoma technology, human phage library can be used to directly obtain human antibody sequences, without the need for later humanization of murine antibodies to reduce monoclonal antibodies. In addition to the therapeutic effect, its own potential immunogenicity.

Finally, a double-antibody sandwich ELISA method was established by combining 1D6 antibody with an affinity index of nmol/L screened by hybridoma technology and 1E2B antibody with Hc terminal domain. The linear detection range was 2.048-32.000 ng/mL, repeatability was good and had statistical significance.

In conclusion, the rat access to the source antibody can be BoNT/F for the establishment and application in the clinical diagnosis of poisoning kit provides reference data, the sequence of single-chain antibodies are to achieve targeted treatment or botulinum toxin poisoning to provide reference in research and feasibility, this study obtained antibodies for subsequent BoNT/F poisoning diagnosis and treatment of drug development preliminary experimental basis, It has practical application significance.

Keywords BoNT/F; Monoclonal antibody; Hybridoma technology; Phage display technology; Double antibody sandwich ELISA

目录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
1 绪论.....	1
1.1 课题背景.....	1
1.1.1 肉毒毒素.....	1
1.1.2 单克隆抗体.....	3
1.2 课题研究内容及目的.....	4
1.2.1 重组抗原的制备及鉴定.....	4
1.2.2 杂交瘤技术鼠源单克隆抗体的筛选及生物学活性评价.....	5
1.2.3 噬菌体展示技术人源单链抗体的筛选.....	5
1.2.4 F 型肉毒毒素双抗夹心 ELISA 检测方法的建立.....	5
2 BoNT/FLHn 重组蛋白构建表达及鉴定.....	7
2.1 引言.....	7
2.2 实验材料.....	7
2.2.1 载体及菌株.....	7
2.2.2 实验仪器及材料.....	7
2.2.3 实验试剂.....	8
2.2.4 溶液配制.....	9
2.3 实验方法.....	10
2.3.1 质粒构建.....	10
2.3.2 蛋白表达及表达形式鉴定.....	14
2.3.3 蛋白纯化.....	15
2.3.4 蛋白定量与鉴定.....	16
2.4 实验结果与分析.....	17
2.4.1 质粒构建.....	17
2.4.2 蛋白表达及表达形式.....	18

2.4.3 蛋白纯化.....	19
2.4.4 蛋白定量与鉴定.....	20
2.5 本章小结.....	21
3 BoNT/FLHn 单克隆抗体的制备及生物学活性评价.....	22
3.1 引言.....	22
3.2 实验材料.....	22
3.2.1 杂交瘤技术.....	22
3.2.2 噬菌体展示技术.....	25
3.3 实验方法.....	26
3.3.1 杂交瘤技术.....	26
3.3.2 噬菌体展示技术.....	35
3.4 实验结果与分析.....	37
3.4.1 杂交瘤技术.....	37
3.4.2 噬菌体展示技术.....	47
3.5 本章小结.....	48
4 BoNT/F 肉毒毒素双抗夹心 ELISA 检测方法的建立.....	50
4.1 引言.....	50
4.2 实验材料.....	50
4.2.1 实验仪器及材料.....	50
4.2.2 实验试剂.....	50
4.2.3 溶液配制.....	50
4.3 实验方法.....	50
4.3.1 叠加 ELISA 检测双抗体叠加系数.....	50
4.3.2 双抗夹心 ELISA 法建立.....	51
4.3.3 夹心 ELISA 法评价.....	52
4.3.4 统计学分析.....	52
4.4 实验结果与分析.....	52
4.4.1 叠加 ELISA 叠加系数计算.....	52

4.4.2 双抗夹心 ELISA 标准曲线的绘制及线性区间的确定.....	53
4.4.3 灵敏度及重复性检测.....	53
4.4.4 特异性考察.....	54
4.5 本章小结.....	54
讨论	56
结论	58
参考文献	59
附录	64
攻读学位期间发表的学术论文	65
致谢	66

1 绪论

1.1 课题背景

1.1.1 肉毒毒素

肉毒毒素是厌氧性的革兰氏阳性菌——肉毒梭菌在生长和繁殖的过程中产生的一种细菌外毒素^[1]。根据性质及作用机制的不同,细菌外毒素可分为神经毒素、细胞毒素及肠毒素三种。其中,肉毒毒素是神经毒素中最具代表性的一类天然细菌外毒素^[2,3]。区别于其他细菌外毒素,肉毒毒素毒性极强,并具有极高的亲嗜性。从分子结构上看,平面构象中轻链及重链两条链构成其结构,分子量为 150KDa,其间由二硫键相连。就空间结构而言,可分为三种功能结构域,重链 C 端及 N 端结构域分别发挥感染时毒素与靶细胞的受体结合及介导跨膜的作用。轻链为毒性结构域,在毒素实现跨膜后对细胞内原有蛋白的结构及生物学功能造成影响,继而发挥其毒性作用^[4,5]。

1.1.1.1 肉毒毒素感染及机制

当前,肉毒毒素通常被分为 A-G 7 种血清型,人类肉毒毒素中毒可由 A、B、E 和 F 型引起,C 和 D 型以动物感染居多。当人或动物发生肉毒毒素感染时,毒素可以特异性靶向胆碱能神经末梢突触前膜的表面受体,通过胞饮作用实现毒素内转,继而阻止胆碱能神经介质——乙酰胆碱的正常释放^[6,7]。此外,毒素受体结合结构域阻滞了神经细胞膜的钙离子通道,钙离子进入胞内刺激胞吐及释放神经递质的功能也被限制^[8],使得乙酰胆碱无法发挥其正常生理功能,进而阻断神经肌肉传导,导致肌肉松弛性麻痹^[9,10]。感染前期还会伴随头痛、头昏、眩晕、软弱无力及视力紊乱的临床表现,严重者可能会出现呼吸麻痹等症状,若抢救不及时甚至可能出现致死的情况^[11]。

1.1.1.2 肉毒毒素的防治措施

肉毒毒素最早被作为一种生化武器应用于战场,其中各血清型中属 A 型军用意义最大,常被作为生化武器和用于生物恐怖袭击。1986 年,加拿大一名眼科教授发现肉毒毒素另有让患者眼部的皱纹消失的功效,于是,肉毒毒素应用范围逐步拓宽,开始应用于美容界。除 A 型外的其它可感染人类的亚型中毒途径多见于食物污染。

针对于肉毒毒素中毒的的预防,疫苗免疫是目前最有效的方法之一^[12,13]。目前市场上以类毒素疫苗为主,也有部分的重组亚单位疫苗仍处于临床阶段。但当机体前期因并

未接种肉毒毒素疫苗而发生感染时，就需要快速采取相应的诊疗措施防止临床中各种继发症状的发生发展^[14-17]。

当毒素入侵机体时，肉毒毒素作为一类外源蛋白，首先会激活宿主免疫系统以产生相应免疫应答，会产生具有特异中和作用的免疫球蛋白，这种免疫球蛋白被称为抗毒素^[18]。目前，临床中现有且仅有的肉毒毒素治疗制剂也只有马源抗毒素血清，利用减毒毒素毒力降低但仍具备其原有免疫原性的特点，将灭活毒素接种至马身上，利用马血清中产生的抗毒素经纯化精制后制备成针剂用于临床^[19]。另基于毒素靶细胞为神经细胞这一特点，化药由于其无法通过血脑屏障的局限从而面临研发瓶颈。

现有的生物药——马源抗毒素血清虽然在临床肉毒毒素中毒后的治疗中作为首选药物，但其仍具有相当的使用局限性，除去特异性差、成本高昂、生产周期长的问题，马源抗毒素血清最大的应用局限则在于其可导致人畜共患病，通过动物获得人治疗用的抗毒素血清，在一定程度上保留了动物自身对人体的免疫原性，所以在临床应用抗毒素血清时首先要进行试敏操作，以避免抗毒素自身的潜在免疫原性对人体造成不必要的影响^[20, 21]。

1.1.1.3 肉毒毒素的临床诊断

检验医学中，诊断临床肉毒毒素的中毒类型分四种，食物中毒、婴儿型中毒、创伤性中毒，成人的婴儿型中毒。且该毒素中毒主要发生在新疆，青海等高海拔地区。从流行病学角度来看，肉毒毒素的传播途径主要为食物传播，中毒食品多为家庭发酵豆制品，其次为肉制品及罐头制品，另有伤口传染的可能^[22]。

临床诊断毒素中毒除观察患者临床表现是否符合肉毒中毒典型症状外，还需佐以诊断医学中的检测方法进行定性验证^[23]。实验样品一般选择中毒食品或是患者的粪便及血液，检出毒素的同时，判定其血清型^[24-26]。

1.1.1.4 F型肉毒毒素国内外研究进展

最早的人类F型肉毒毒素中毒案例在1960年及1972年先后被Moller和Midura报道，其两例属于成人F型肉毒毒素中毒。后续又在1979年报导该毒素同样可以引起婴儿中毒^[27, 28]。虽然F型毒素的感染风险低于其他血清型，但时至今日，F型肉毒毒素中毒的可能性仍然存在，感染并引起神经系统失调的后果仍被视为一个亟待解决的问题。

F型肉毒毒素目前存在8种不同的亚型，各亚型在入侵神经系统后均可以特异性切

割囊泡相关膜蛋白 2 致使相关的神经递质——乙酰胆碱释放失调^[29-31]。且针对于该血清型的毒素研究报道并不多见，Ritika Chauhan^[32]等人从 8-羟基喹啉中获得 2 种小分子化合物以作为 BoNT/F 中和药物的开发前体。Yongfeng Fan^[33]等人利用酵母展示系统来筛选针对于 BoNT/F 的 scFv 单链抗体，通过三个非重叠表位的抗体联用来中和 BoNT/F。

1.1.2 单克隆抗体

自 1890 年 Behring 和北里柴三郎打开了抗体世界的大门以来，抗体领域可谓是在百年以来得到了飞速的发展^[34]。到目前为止，抗体工程技术已经广泛用于人类疾病的诊断、预防、治疗以及免疫机制的研究^[35]。随着现代生物技术的迅猛发展，单克隆抗体作为生物医药产业中的中流砥柱，其发展对优化产业结构及人民群众健康水平的提高都产生了不可忽视的推动作用^[36-39]。尤其受到全球疫情的影响，全球的生物制药产业都处在飞速上升期，单克隆抗体等一系列的抗体药物也随即成为生物医药领域中的“潜力股”^[40-42]。

1.1.2.1 单克隆抗体的制备

单克隆抗体的起源可追溯至 1975 年，研究员 Köhler 和 Milstein^[43]基于自然杂交技术首次创立了 B 淋巴细胞杂交瘤技术。以纯系小鼠为宿主，利用抗原入侵机体而产生的固有及适应性免疫应答免疫小鼠，免疫周期结束后在无菌环境中分离得到小鼠脾细胞即 B 淋巴细胞，将恶性骨髓瘤细胞与其共同培养，在特定条件刺激下让其发生细胞融合，再通过干扰核苷酸合成途径的选择性培养基实现细胞筛选，将保留的既可以分泌抗体，又能同时实现无限增殖的融合细胞细胞扩大培养，形成独立细胞系，即可实现对单一抗原分泌抗体的杂交瘤细胞的筛选，后期抗体的大量制备则通过体内诱生和体外培养方式实现^[44-46]。

但单克隆抗体的制备方式不仅仅局限于此，通过杂交瘤技术所制备的细胞克隆因带有 B 细胞特性可达到继续合成并分泌针对单表位的遗传学同源性抗体的功能虽在一定程度上实现了临床中的药物靶向及治疗作用，但在研发角度看同时也具备了难以跨越的局限性^[47]。通过免疫动物制备的单克隆抗体与动物自身的天然免疫球蛋白同源，在临床中不可避免的会发生排异反应，这种非人源抗体所带来的潜在免疫原性同时也为其临床应用带来了不可预估的风险。

出于降低抗体的免疫原性并同时提高其功能性指标的出发点，单克隆抗体的不同制备方式相继而出，众多技术中噬菌体展示技术颇具代表性^[48-50]。该技术借由噬菌体展示

系统可以展示外源蛋白并同时保证其生物活性的功能基础实现抗体筛选^[51]。利用杂交瘤技术中使用的免疫抗原作为底物抗原，以亲和力及特异性的双指标筛选展示在噬菌体外壳上的蛋白肽，通过生物淘选的方式最终实现目标抗体的富集，其中值得一提的是，在淘选过程中的不断“加压”过程会更有助于获得高亲和水平的噬菌体克隆^[52]。另，展示库的筛选质量也在很大程度上取决于所建库的容量及其多样性指标^[53-55]。

噬菌体展示技术筛选抗体就是将靶标分子抗原固定至固相载体上，通过数轮的富集，洗涤及扩增可实现高通量筛选。也是目前高滴度单克隆抗体制备方法中较为常用的一种^[50, 56-58]。

1.1.2.2 单克隆抗体的应用

单克隆抗体作为一种生物药物，其应用贯穿了疾病的预防、诊断、治疗的各个环节。在疾病的预防方面，一些经过工程化处理的抗体可以作为制备疫苗样药物的前体，通过非竞争抑制的方式阻断靶点与致病分子的结合，继而实现疾病的预防。

事实上，截至目前，单克隆抗体最大的应用市场在于商品诊断试剂，抗体特异性强、纯度高、均一性好，这些优势就体现了其作为检验试剂的极强的应用价值^[59-61]。尤其在医学领域，其不仅可以作为检验医学实验室的诊断试剂，用于诊断乙肝病毒、疱疹病毒等，另对肿瘤的诊断、分型及定位、各细胞亚群和细胞分化阶段的区分等也发挥了不可小觑的作用。从实验操作技术手段来看，单克隆抗体也时常应用于酶联免疫吸附试验、放射免疫分析、免疫组化和流式细胞仪等各方法的操作中^[62, 63]。

临床中，单克隆抗体可被视作生物治疗的导向武器^[64, 65]。其中，有些抗体在实现靶向作用的同时也具有疾病治疗的功效，中和抗体就是具有代表性的一种治疗性抗体^[66-69]。另，其他药物的设计与开发也可以借鉴单克隆抗体的靶向作用^[70]。时至今日，各抗体联合其他生物药以及化学药的诊疗思路层出不穷^[71-73]。以“导弹”疗法为例，将抗体通过化学交联或生物合成的方式连接具有抗癌功效的药物，将抗体作为核弹头，在患者体内实现药物的定向输送^[74]。不仅可以在一定程度上缩短发挥药效的时间，提高药物的作用效率，也可以同时实现对药物靶点的双重刺激^[75, 76]。

1.2 课题研究内容及目的

1.2.1 重组抗原的制备及鉴定

抗原制备的第一步就是选择目的抗原，组成 BoNT/F 的三个结构域中，Hc 端受体结

合结构域已被报道可作为免疫抗原及筛选抗原制备出具有良好中和活性和亲和力指标，又同时具有极高人源化潜力的鼠源单克隆抗体。于是本课题选用 BoNT/FLHn 结构域，即跨膜及毒性结构域作为筛选抗原，通过重组表达的形式实现抗原的制备，继而完成抗体的筛选。

本部分实验主要是通过酶切连接法构建重组表达质粒，将 BoNT/FLHn 结构域所对应基因序列通过聚合酶链式反应扩增，载体及片段双酶切后借由 T4 连接酶连接。完成分子克隆后通过原核表达系统表达重组抗原，纯化后以 SDS-PAGE、Western Blot 等方法对纯化后的蛋白进行分析及鉴定，为后续鼠源及人源抗体的筛选奠定实验基础。

1.2.2 杂交瘤技术鼠源单克隆抗体的筛选及生物学活性评价

以制备的重组抗原作为免疫抗原免疫动物，待免疫周期结束后取其脾细胞在化学刺激下进行细胞融合。所产生的杂交瘤细胞具有持续分泌单克隆抗体的能力。经过间接 ELISA，重组抗原作为筛选抗原，终选出能够稳定分泌抗体的高指标杂交瘤细胞株。体内诱生法制备抗体，纯化后分别对鼠抗的亚型、效价、构象、亲和力、特异性及各生物学活性指标进行评价。

后将靶向 BoNT/FLHn 结构域亲和力指标最高的抗体与靶向 BoNT/FHc 结构域的高水平抗体联合应用，通过叠加 ELISA 的方式计算叠加系数，建立双抗夹心 ELISA 的方法，并对其检测限、稳定性、精密度、加样回收率等作出评价。为实现临床检测中的实际应用价值提供借鉴。

1.2.3 噬菌体展示技术人源单链抗体的筛选

鼠源中和单抗若想实现临床应用，仍需后续的人源化工作以弱化其所携带的潜在免疫原性致人体产生人抗鼠抗体反应的风险。而通过人源噬菌体单链抗体库直接进行抗体的筛选不仅可以减免后续抗体人源化结构的设计操作，也极大程度缩减了时间成本。

本实验利用现有人源噬菌体库，将前期纯化所得重组抗原作为筛选底物包板，通过间接 ELISA 的固相筛选，经 3 轮吸附-洗涤-扩增后获得单克隆，终获得 4 株具有高亲和力及特异性的人源单链抗体。

1.2.4 F 型肉毒毒素双抗夹心 ELISA 检测方法的建立

将 BoNT/FLHn 结构域作为筛选抗原通过杂交瘤技术得到的亲和力最高的抗体与 BoNT/FHc 作为筛选抗原同方法获得的高指标抗体联合应用，建立 F 型肉毒毒素双抗夹

心 ELISA 检测方法。

综上，本课题可为针对 F 型肉毒毒素临床检测制剂及治疗性生物药的开发提供参考，并同时所得高水平人源单链抗体后续的研发奠定实验基础。

2 BoNT/FLHn 重组蛋白构建表达及鉴定

2.1 引言

截至目前，肉毒毒素中毒的案例也时有发生，本文选用肉毒毒素 F 血清型结构中的毒性及跨膜结构域作为抗原，进行后续抗体的筛选。参考 NCBI 数据库中 BoNT/F 的序列及结构域划分，比对实验室中现存 pTIG-BoNT/F 的质粒，通过 PCR 及酶切连接的技术手段实现目的序列的质粒构建，后利用大肠杆菌原核表达系统及 Ni 柱亲和层析完成目的蛋白的诱导表达及纯化，经鉴定后获得理想的筛选抗原 BoNT/FLHn。

2.2 实验材料

2.2.1 载体及菌株

载体及菌株	厂家
pET22b 质粒表达载体	实验室保存
pTIG-BoNT/F 质粒表达载体	实验室保存
大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞	北京擎科新业科技有限公司
大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞	北京擎科新业科技有限公司

2.2.2 实验仪器及材料

仪器/材料名称	型号/批号	厂家
PCR 仪	T100	Bio-Rad 公司
稳压稳流型电泳仪	041BR	Bio-Rad 公司
恒温金属浴	H ₂ O ³ PRO	金银杏生物科技有限公司
凝胶成像仪	Gel-pro 2020D	Biotech 公司
蛋白染色仪	eStain™ L1	金斯瑞生物科技有限公司
AKTA purifier 纯化仪	B-900	Cytiva 公司
半干法转膜仪	221B1/PAC200	Bio-Rad 公司
电转化仪	1652100	Bio-Rad 公司
高压蒸汽灭菌锅	MLS-3780	日本三洋公司

控温摇床	HZQ-M	吉特实验仪器厂
低温高速离心机	3K-18	Sigma 公司
常温高速离心机	5424	Eppendorf 公司
凝胶成像仪	Gel-Pro2020D	Bio-Rad 公司
紫外分光光度计	UV-2100	美国尤尼柯仪器有限公司
化学发光成像仪	733BR-2751	Bio-Rad 公司
电子天平	BS2202S	Sartorius 公司
分析天平	BP211D	Sartorius 公司
纯水仪	milli-q	Millipore 公司
酶标仪	550	Bio-Rad 公司
-80℃冰箱	86L388	海尔集团公司
洗板机	1575	Bio-Rad 公司
EPSON SCAN 凝胶扫描仪	11000XL	EPSON 公司
超声破碎仪	VC605/VC750	SONICS 公司
涡旋振荡器	MS2	IKA 公司
磁力搅拌器	96-1A	常州荣华仪器制造有限公司
pH 计	FE28	梅特勒-托利多有限公司
His Trap HP 亲和层析柱	17524801	Cytiva 公司
PD10 脱盐柱	17085101	Cytiva 公司
96 孔酶标板	42592/9018	Corning 公司

2.2.3 实验试剂

试剂名称	货号/批号	厂家
FastPfu DNA Polymerase	AP221-13	AP221-13
GeneJET Gel Extraction Kit	K0692	Thermo 公司
1×TAE 速溶颗粒	CR00101M	莫纳生物科技有限公司
进口琼脂糖	162135	Biowest 公司
Trans2K Plus II DNA Marker	BM121-01	北京全式金生物技术有限公司
6×DNA Loading Buffer	GH101-01	北京全式金生物技术有限公司

内切酶 (XhoI)	FD0574	Thermo 公司
内切酶 (XbaI)	FD0684	Thermo 公司
T4 DNA Ligase	M0202L	BioLabs 公司
2×Rapid Taq Master Mix	P222	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
质粒小提试剂盒	8084011	北京达科为生物科技有限公司
Protein Marker	26630	Thermo 公司
6×Protein Loading Buffer	DL101-02	北京全式金生物技术有限公司
EasySee Western Blot Kit	DW101-02	北京全式金生物技术有限公司
脱脂奶粉	A600669	生工生物工程(上海)股份有限公司
PVDF 膜	MM0100-1	Millipore 公司
1×PBST 速溶颗粒	CR10101M	莫纳生物科技有限公司
HRP-Anti-His-Tag Mouse mAb	294367	Abmart 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	ZJ102	上海雅酶生物医药科技有限公司
EasySee Western Blot Kit	DW101-02	北京全式金生物技术有限公司

2.2.4 溶液配制

溶液名称	配制方法
LB 液体培养基	胰蛋白胨 1 g、酵母提取物 0.5 g、氯化钠 1 g，蒸馏水定容至 100 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min。
LB 固体培养基	胰蛋白胨 1 g、酵母提取物 0.5 g、氯化钠 1 g、琼脂粉 1.5 g，加蒸馏水定容至 100 mL，121 °C 高压灭菌 20 min。
TE 裂解液	10 mM Tris-HCl 和 1 mM EDTA 以超纯水配制，再加入 5%蛋白酶抑制剂
氨苄青霉素	氨苄青霉素粉末 0.5 g 加蒸馏水溶解并定容至 5 mL，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌，分装后贮存于-20 °C。
10×转膜缓冲液	甘氨酸 29 g、SDS 粉末 3.7 g、Tris 58 g，加蒸馏水溶解并定容至 1000 mL。
1×转膜缓冲液	每 100 mL 10×转膜缓冲液中加入 200 mL 甲醇再用蒸馏水定容至

1000 mL, 室温保存。

10×SDS-PAGE 缓冲液	Glycine 188 g, Tris 30.2 g, SDS 10.0 g, 加蒸馏水溶解并定容至 1000 mL。
Binding Buffer	12.9 mM NaH ₂ PO ₄ 、7.2 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O、500 mM NaCl 和 20 mM 咪唑, 用蒸馏水配制, 调 pH 7.4
Elution Buffer	12.9 mM NaH ₂ PO ₄ 、7.2 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O、500 mM NaCl 和 500 mM 咪唑, 以蒸馏水配制, 调 pH 7.4

2.3 实验方法

2.3.1 质粒构建

2.3.1.1 序列分析及引物合成

参照 NCBI 数据库中的 BoNT/F 结构域的划分, 利用实验室现存 BoNT/F 全长质粒, 经 EditSeq 及 DNAMAN 软件的序列分析以及酶切分析可得, BoNT/F 全长中, BoNT/FLHn 基因编码序列长度为 2571bp, GC 占比 45.7%。结合质粒连接载体 pTIG 酶切分析结果综合考量后, 选择酶切位点 XhoI 及 EcoRI 进行片段载体连接。EditSeq 设计片段 PCR 扩增引物后, 交由北京擎科新业科技有限公司合成。

表 2-1 PCR 扩增引物

Table 2-1 primers for PCR amplification

Primer	Sequence (5'→3')
FLHn-EcoRI-F	GGGAATTCTAATGCCGGTAGTTATCAACAGC
FLHn-XhoI-R	GGCTCGAGCAGGATCAGGATTTTGTCGTTG

2.3.1.2 基因扩增及片段回收

以现有的 pTIG-BoNT/F 质粒为模板, 使用 FastPfu DNA Polymerase 进行 PCR 扩增 BoNT/FLHn 基因序列, PCR 反应体系如表 2-2。

表 2-2 PCR 反应体系

Table 2-2 PCR reaction system

Component	Volume (μL)
Nuclease-free Water	32

TransStart FastPfu DNA Polymerase	1
2.5 mM dNTPs	4
Primer F	1
Primer R	1
5×TransStart FastPfu Buffer	10
Templete	1
Total volume	50

PCR 扩增反应条件如下表 2-3:

表 2-3 PCR 扩增条件

Table 2-3 PCR amplification conditions

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^a	95℃	60 sec	1
变性 ^a	95℃	20 sec	
退火 ^b	Tm-5℃	20 sec	40
延伸 ^c	72℃	60 sec/kb	
彻底延伸	72℃	5 min	1

待 PCR 扩增结束, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定所得产物片段大小, 若符合预期, 则通过 GeneJET Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒对所得片段进行回收, 具体操作步骤如表 2-4。

表 2-4 胶回收操作

Table 2-4 rubber recovery operations

步骤	操作
切胶	320 nm 紫外光的照射可观察到目的条带, 用手术刀切下, 放入无菌离心管中
溶胶	离心管中加入试剂盒的溶胶 Binding Buffer, 放至 50℃恒温金属浴
除杂	胶完全溶解后, 将溶液转移至配套吸附柱中, 12400 rcf 离心 30 s, 再加入配套 Wash Buffer 700 μ L 12400 rcf 离心 30s,
挥醇	将吸附柱置于新离心管上 30 min
洗脱	吸附柱内加入配套 Elution Buffer 25 μ L, 12400 rcf 离心 2 min

2.3.1.3 载体、片段双酶切及连接

将所回收目的片段与载体共同进行双酶切操作，酶切反应体系如表 2-5，体系配制完成后置于 37 °C 恒温培养箱中 1.5 h。酶切完成后，同样通过琼脂糖凝胶电泳进行鉴定及回收。

表 2-5 (a) 基因片段双酶切体系

Table 2-5 (a) gene fragment double digestion system

目的片段双酶切组分	体积 (μL)
目的片段	16
10×Fast Digest Buffer	2
EcoRI	1
XhoI	1
Nuclease-free Water	0
Total volume	20

表 2-5 (b) 载体双酶切体系

Table 2-5 (b) Vector double digestion system

载体双酶切组分	体积 (μL)
pTIG	4
10×Fast Digest Buffer	2
EcoRI	1
XhoI	1
Nuclease-free Water	12
Total volume	20

回收后的酶切载体及片段利用 T4 DNA Ligase 在 16°C 金属浴的条件下连接过夜，反应体系如下表 2-6。

表 2-6 片段与载体连接体系

Table 2-6 connection system between fragments and carriers

连接组分	体积 (μL)
酶切后回收目的片段	7

酶切后回收载体	1
T4 DNA Ligase	1
T4 DNA Ligase Buffer	1
Total volume	10

2.3.1.4 质粒转化

将过夜连接后的产物转化至大肠杆菌感受态细胞,借助 pTIG 载体自身携带的氨苄青霉素抗性进行加压筛选,具体操作如下表 2-7。

表 2-7 连接产物转化操作

Table 2-7 connection product conversion operations

步骤	操作
冰浴	将感受态细胞 DH5 α 于 4 °C 冰浴中融化,加入 10 μ L 连接产物,静置 30 min
热击	将混合物放入 42 °C 恒温金属内 60 s, 4 °C 冰浴 3 min
无抗性适应培养	于无菌超净台中向混合物中加入 200 μ L 无抗性 LB 液体培养基,置于 37 °C 振荡培养箱, 200 rpm/min 培养 45 min
涂布	经过适应性培养的菌液均匀涂布至含氨苄青霉素抗性的 LB 固体平板上, 37 °C 恒温培养箱中倒置培养 12-16 h

2.3.1.5 菌液 PCR 阳性鉴定及测序

在 LB 固体平板上随机挑取单克隆,置于携带抗性的液体培养基中,37°C, 200rpm/min 培养至对数生长期。利用 2 \times Rapid Taq Master Mix 进行菌液 PCR 鉴定阳性克隆,在设置实验组的同时设置阳性对照组及空白对照组。菌液 PCR 反应体系如表 2-8。

表 2-8 菌液 PCR 反应体系

Table 2-8 PCR reaction system of bacterial solution

菌液 PCR 体系组分	体积 (μ L)
ddH ₂ O	20
2 \times Rapid Taq Master Mix	25
Primer F	2
Primer R	2

Templete	1
Total volume	50

菌液 PCR 扩增程序:

表 2-9 菌液 PCR 扩增程序

Table 2-9 PCR amplification procedure of bacterial solution

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^a	95℃	3 min	1
变性 ^a	95℃	15 sec	
退火 ^b	55℃-65℃	15 sec	
延伸 ^c	72℃	15 sec/kb	30
彻底延伸	72℃	5 min	1

在电泳后将所得阳性克隆菌液送至公司测序，经由 DNAMAN 序列比对正确后，将公司返还质粒-20℃保存。

2.3.2 蛋白表达及表达形式鉴定

2.3.2.1 重组质粒转化及诱导表达

利用大肠杆菌原核表达系统常用感受态 BL21 进行重组质粒的转化，转化后进行单菌落培养，利用 IPTG 诱导其蛋白表达，同理转化并诱导表达与 pTIG 相似的 pET22b 空质粒作为阴性对照。操作步骤如下表 2-10。

表 2-10 质粒化转操作

Table 2-10 plasmid transformation operations

步骤	操作
冰浴	将感受态细胞 BL21 于 4℃冰浴中融化，加入 1 μL 重组质粒，静置 30 min
热击	将混合物放入 42℃恒温金属内 60 s，4℃冰浴 3 min
无抗性适应培养	于无菌超净台中向混合物中加入 200 μL 无抗性 LB 液体培养基，置于 37℃振荡培养箱，200 rpm/min 培养 45 min
涂布	经过适应性培养的菌液均匀涂布至含氨苄青霉素抗性的 LB 固体平板上，37℃恒温培养箱中倒置培养 12-16 h

挑取单菌落	随机挑取单菌落，每个单独加入 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37 °C 振荡培养至对数期
诱导	每支试管加入 1M IPTG 2.5 μL 进行诱导，16 °C 振荡培养过夜
表达裂解	取 1 mL 诱导过夜的菌液于离心管中，12400 rcf 离心 2 min，弃去上清，加入 TE 裂解液 500 μL/管
超声破碎	4 °C 冰浴超声破碎菌体 3 min，留样备用

超声破碎后，样品通过 SDS-PAGE 对重组蛋白的诱导表达进行鉴定，所选择的胶浓度为 12.5%。

2.3.2.2 蛋白表达形式鉴定

同理使用胶浓度为 12.5% 的 SDS-PAGE 进行电泳鉴定重组蛋白表达形式，具体操作如下表 2-11。

表 2-11 表达形式样品制备

Table 2-11 sample preparation of expression forms

步骤	操作
全菌样品制备	收集直接破碎的样品液体为全菌样品
上清样品制备	全菌样品 12400 rcf 离心 2 min，取上清液为上清样品
包涵体样品制备	全菌样品 12400 rcf 离心 2 min，弃上清液，加入 TE 裂解液重悬为包涵体样品

阴性对照制备步骤同上。

2.3.3 蛋白纯化

2.3.3.1 蛋白批量制备

将已验证蛋白表达形式的菌液扩大培养，培养条件同上，对数生长期后离心收菌，1:1 混入纯化所需 Binding Buffer (A 液) 重悬菌体。在 4 °C 冰浴中使用超声破碎仪对菌体进行破碎，条件如下：超声功率 37%、超声 30 min 其中每间隔 10 s 超声 5 s，切记超声过程中产热温度较高，速度较快，需勤更换冰水。超声后使用落地离心机 8000rpm/min，20min 收取裂解液上清。

2.3.3.2 蛋白分步纯化

裂解液上清作为纯化原液利用 AKTA Pure 纯化仪进行重组蛋白纯化，选用 His Trap HP 亲和层析柱串接纯化仪，配制全部纯化所需缓冲液，梯度洗脱后将所收集目的蛋白洗脱液混合，超滤管 3500rpm/min 浓缩至合适体积后利用 PD10 脱盐柱进行缓冲液置换以达到脱盐目的。具体操作见表 2-12。

表 2-12 重组蛋白纯化操作

Table 2-12 purification procedures of recombinant proteins

步骤	操作
样品处理	保存上清经 0.22 μm 滤膜过滤
纯化仪开启	仪器自检后蒸馏水冲洗至基线稳定, 将 His Trap HP 柱连接
His Trap HP 柱平衡	蒸馏水冲洗以替换柱中乙醇, 再用 Binding Buffer 冲洗至基线平稳
进样	缓慢进样后用 Binding Buffer 冲洗至基线平稳
洗脱	Elution Buffer 进行洗脱收集
纯化仪关闭	蒸馏水冲洗至基线平稳
PD10 脱盐柱平衡	蒸馏水冲洗 30 mL, PBS 冲洗 20 mL
进样	进样初步纯化的重组蛋白溶液 2.5 mL
洗脱	PBS 3.5 mL 洗脱, 洗脱后重复平衡、进样、洗脱至结束
PD10 脱盐柱保存	蒸馏水冲洗 50 mL, 无水乙醇 40mL 冲洗, 封存

收集得到脱盐柱洗脱液即为所制备重组抗原成品, SDS-PAGE 电泳鉴定, 并通过 Gel-pro32 软件纯度分析。该蛋白可直接定量后作为后期免疫动物的原始抗原, 亦可冻干保存至-80℃。

2.3.4 蛋白定量与鉴定

2.3.4.1 BCA 法蛋白定量

利用 BCA 法进行蛋白的浓度测定, 使用 Omin-Easy 即用型 BCA 蛋白定量试剂盒进行实验, 以 50:1 的比例配置试剂显色工作液, 将标准品与样品工作体积各 20 μL 加入至酶标板中 (做复孔), 加入相应体积工作液, 后根据茚三酮反应在 37℃ 恒温箱中静置显色, 酶标仪 570nm 处读数。扣除空白后绘制标准曲线, 根据公式计算蛋白浓度, 并计算所得蛋白总量。

2.3.4.2 重组蛋白质量鉴定

在利用软件评价重组蛋白纯度的同时, 辅助 Western Blot 法对抗原的质量进行二次验证, 转膜重组蛋白后使用抗 His 标签并携带 HRP 的抗体孵育, 洗膜后直接显影。操作过程如下表 2-13。

表 2-13 Western Blot 操作

Table 2-13 Western Blot operations

步骤	样品	次数	条件	时间
电泳	BoNT/FLHn	1	室温	30min

转膜	BoNT/FLHn	1	室温	15min
封闭	脱脂奶粉	1	4℃过夜	2h
洗涤	PBST	5	室温	5min
一抗	抗 His-HRP 抗体	1	室温	1h
洗涤	PBST	5	室温	5min
显色	ECL	1	室温	1min

2.4 实验结果与分析

2.4.1 质粒构建

2.4.1.1 目的基因扩增

以 BoNT/F 毒素全长为模板，通过 PCR 所得目的片段 FLHn 基因片段，1%琼脂糖凝胶电泳后参考 Marker 的位置，显示在 2000-3000bp 存在一特异性条带，与片段预期大小 2791bp 相符，表明目的基因片段扩增成功。

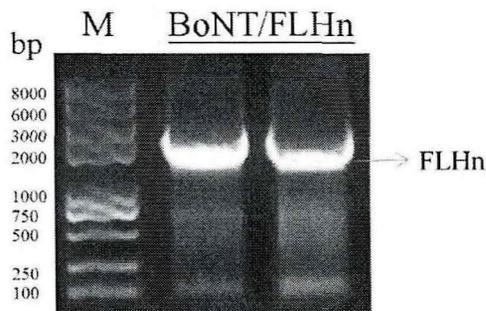


图 2-1 目的基因扩增

Figure 2-1 amplification of target gene fragment

2.4.1.2 载体、片段双酶切

对载体与回收的目的片段共同进行酶切处理，由于载体 XhoI 与 EcoRI 酶切位点间连接有其它小于其本身片段大小的基因片段，故回收载体 pTIG 酶切后的上方条带。另，BoNT/FLHn 片段酶切后同符合预期片段大小，与载体一同回收。

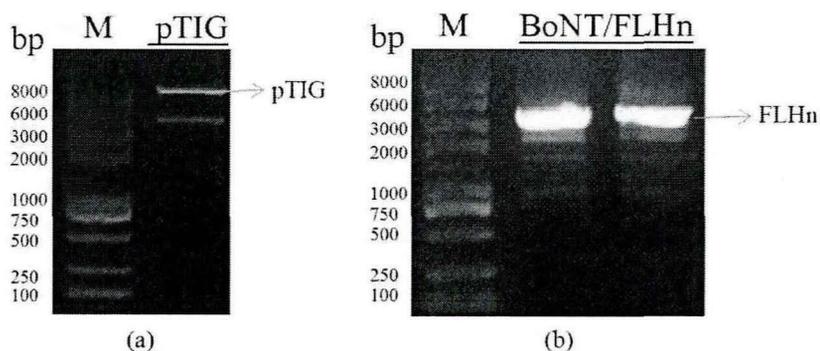


图 2-2 目的基因片段及载体双酶切

Figure 2-2 double enzyme digestion of target gene fragment and vector

(a) PCR 扩增 BoNT/FLHn 基因片段； (b) pTIG 质粒载体

2.4.1.3 菌液 PCR 鉴定及测序

在菌液阳性鉴定时引入阳性对照及阴性对照以保证实验结果的有效性，PCR 后选择任意除阳性对照外的阳性实验组菌液送至公司测序，菌液 PCR 结果及经 DNAMAN 软件比对的测序结果如图 2-3。

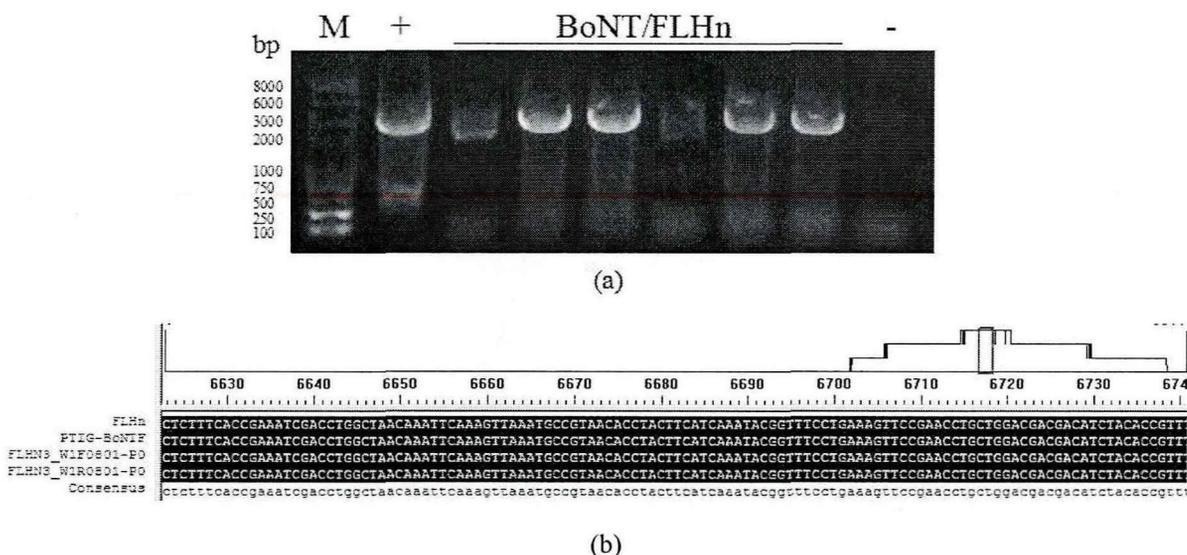


图 2-3 阳性克隆筛选

Figure 2-3 screening of positive clones

(a) 菌液 PCR 结果图； (b) 重组质粒序列比对图

阳性菌液经结果比对后发现，两端单项测序结果末端均有个别位点的突变，是正常现象，序列拼接结果显示并无某些位点的突变，以上结果表明重组质粒构建成功。

2.4.2 蛋白表达及表达形式

2.4.2.1 蛋白诱导表达鉴定

采用重组蛋白常见的大肠杆菌原核表达系统，通过 IPTG 诱导表达目的蛋白，全菌制

样，经 SDS-PAGE 验证如图 2-4，与阴性对照相比，98kDa 处有一明显条带，符合预期，可判断 BoNT/FLHn 在大肠杆菌中存在特异性表达。同理进行该系统中蛋白表达形式的判定。

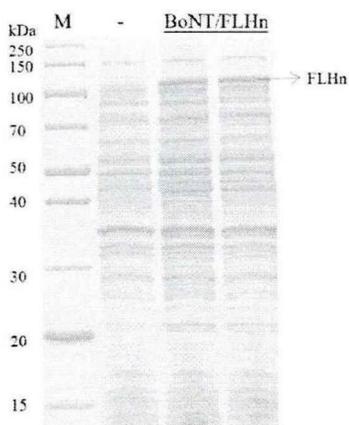


图 2-4 BoNT/FLHn 表达鉴定

Figure 2-4 expression and identification of BoNT/FLHn recombinant protein

2.4.2.2 蛋白表达形式鉴定

将全菌以离心的方式将上清及菌体分离，分别制样以判定 BoNT/FLHn 表达形式。结果如图 2-5。图中显示，特异性条带在菌体沉淀样品中存在，但比例远小于其上清，因此可判断 BoNT/FLHn 表达形式以可溶性表达为主，包涵体表达为辅，为半可溶半包涵体表达。

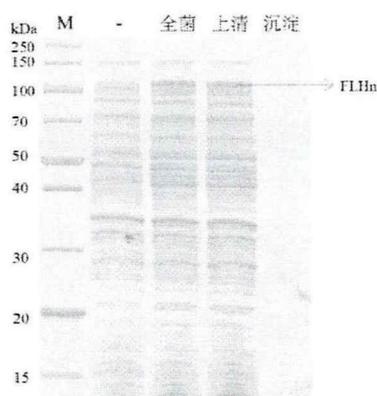


图 2-5 BoNT/FLHn 表达形式鉴定

Figure 2-5 identification of expression form of BoNT/FLHn recombinant protein

2.4.3 蛋白纯化

2.4.3.1 蛋白 Ni 柱纯化

利用目的蛋白与 pTIG 上所携带的组氨酸标签融合表达所具备的对 Ni 柱的亲和力采用 Ni 柱亲和层析的方式作为该蛋白纯化方式的首选。按照说明书配制全部 Buffer，梯度洗脱时，重组蛋白洗脱情况如图 2-6，将该梯度范围洗脱液混合，利用超滤管浓缩到理想

体积，以便后期进行缓冲液置换。

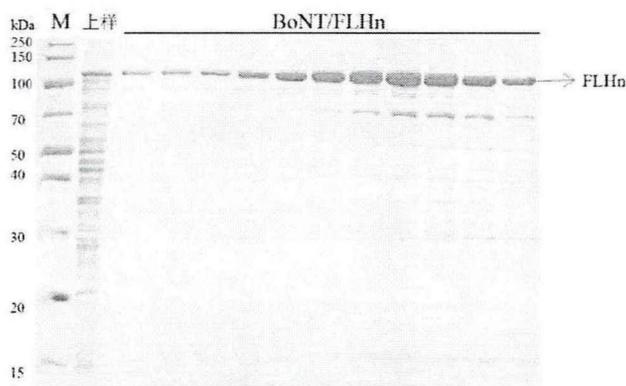


图 2-6 BoNT/FLHn Ni 柱纯化电泳图

Figure 2-6 SDS-PAGE of purification of BoNT/FLHn recombinant protein

2.4.3.2 蛋白脱盐处理

蛋白洗脱液浓缩后以前述方式进行 PD-10 脱盐柱的预处理，2.5 ml 每次进行上样，缓冲液 PBS 洗脱，所回收的全部洗脱液混合进行 SDS-PAGE 电泳，电泳图如图 2-7 所示。通过 Gel-pro32 软件纯度分析可得，所得重组蛋白经两步纯化后纯度可达 95.0%以上，符合后期免疫动物的抗原标准。

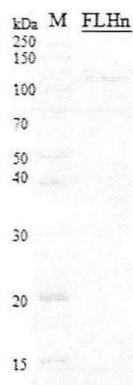


图 2-7 BoNT/FLHn 纯度验证

Figure 2-7 BoNT/FLHn purity verification

2.4.4 蛋白定量与鉴定

2.4.4.1 BCA 法蛋白定量

按照 BCA 定量法试剂盒操作，酶标仪读数后绘制标准曲线，如图 2-7。代入公式可得纯化蛋白浓度为 0.772 mg/mL，共得约 14.6 mg 蛋白。

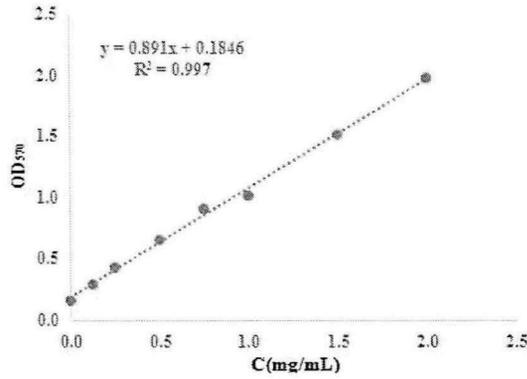


图 2-8 蛋白定量标准曲线

Figure 2-8 protein quantitative standard curve

随即将后续需要使用的蛋白分装至西林瓶中，冻干后置-80℃保存。

2.4.4.2 Western Blot 验证重组抗原

在纯度鉴定该重组蛋白后，同利用 Western Blot 对该蛋白进行双重验证，图 2-8 显示，图中唯一一条特异性条带处于 70kDa-100kDa 之间，符合目的蛋白分子量大小，可判定该条带为目的重组抗原。另，该抗原携带 His 标签，对于抗 His 多抗具有极强的特异性，进一步验证了该抗原可作为后期实验免疫抗原及筛选抗原的结论。

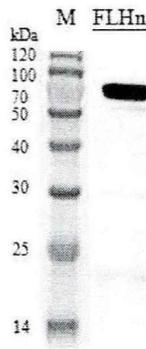


图 2-9 Western Blot 图

Figure 2-9 Western Blot figure

2.5 本章小结

本部分利用 PCR、酶切连接的方式完成目的片段的分子克隆，又经菌液 PCR 阳性及测序验证后获得重组质粒。借由原核表达系统对 BoNT/F 的毒性及跨膜结构域进行诱导表达，利用其表达产物与 Ni 柱的亲和力辅助分子筛对重组蛋白进行纯化。后期实验结果：SDS-PAGE 电泳鉴定重组蛋白纯度电泳，Gel-pro32 软件分析数据及 Western Blot 图均可以表明，所得纯化产物纯度已达到 95.0%以上，且单一抗原质量可以达到后期作为动物免疫抗原及筛选抗原的要求。

综上，本章完成了重组质粒的构建过程，并对目的蛋白 BoNT/FLHn 的表达及纯化所得产物进行了质控，可为后续实验的顺利进行奠定基础。

3 BoNT/FLHn 单克隆抗体的制备及生物学活性评价

3.1 引言

BoNT 作为一种细菌外毒素，其在我国导致人及动物神经中毒的事件时有发生，马源抗毒素血清作为目前临床中常见的治疗药物也存在着可能导致机体出现严重过敏现象的风险。导致人体中毒的 4 种血清型中 BoNT/F 中毒目前暂无对其具有针对性治疗作用的有效药物及诊断试剂。综上，本实验以获得具有作为中和抗体药物开发潜力或检测试剂的单克隆抗体为出发点，借由杂交瘤技术及噬菌体展示技术两种方式，以抗体的亲和力和特异性为指标，分别进行鼠源及人源单克隆抗体的筛选。

3.2 实验材料

3.2.1 杂交瘤技术

3.2.1.1 实验动物与细胞

7 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证号：SCXK(京)2016-0006；北京斯贝福生物技术有限公司，合格证号：SCXK(京)2019-0010）；19-21g 的 SPF 级雄性 KM 小鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证号：SCXK(京)2016-0011；北京斯贝福生物技术有限公司，合格证号：SCXK(京)2019-0010）；Sp2-O 小鼠骨髓瘤细胞（本实验室保存）。

3.2.1.2 实验仪器及材料

仪器/材料名称	型号/批号	厂家
常温高速离心机	5424	Eppendorf 公司
倒置显微镜	CDIC1819	OPTEC
液氮罐(存储罐)	YDS-35-125	海尔集团公司
水套式 CO ₂ 细胞培养箱	3111	Thermo 公司
电热恒温水浴锅	XMTB	北京长风仪器仪表公司
PCR 仪	T100	Bio-Rad 公司
稳压稳流型电泳仪	041BR	Bio-Rad 公司
恒温金属浴	H2O3 PRO	金银杏生物科技公司
凝胶成像仪	Gel-pro 2020D	Biotech 公司
蛋白染色仪	eStain TM L1	金斯瑞生物科技有限公司

AKTA purifier 纯化仪	B-900	Cytiva 公司
半干法转膜仪	221B1/PAC200	Bio-Rad 公司
电转化仪	1652100	Bio-Rad 公司
高压蒸汽灭菌锅	MLS-3780	日本三洋公司
紫外分光光度计	UV-2100	美国尤尼柯仪器有限公司
化学发光成像仪	733BR-2751	Bio-Rad 公司
电子天平	BS2202S	Sartorius 公司
分析天平	BP211D	Sartorius 公司
纯水仪	mini-Q	Millipore 公司
酶标仪	550	Bio-Rad 公司
-80℃冰箱	86L388	海尔集团公司
洗板机	1575	Bio-Rad 公司
EPSON 凝胶扫描仪	11000XL	EPSON 公司
涡旋振荡器	MS2	IKA 公司
磁力搅拌器	96-1A	常州荣华仪器制造有限公司
pH 计	FE28	梅特勒-托利多有限公司
PVDF 膜	MM0100-1	Millipore 公司
25T 细胞培养瓶	3055	Corning 公司
细胞冻存管	430659	Corning 公司
96 孔细胞培养板	11092018	Corning 公司
Hitrap Protein L HP	17547851	Cytiva 公司
Hitrap IgM Purification HP	17511001	Cytiva 公司
Hitrap Protein G HP	17040501	Cytiva 公司
PD10 脱盐柱	17085101	Cytiva 公司

3.2.1.3 实验试剂

试剂名称	货号/批号	厂家
QuickAnyibody 免疫佐剂	KX0210041	苏州博奥龙免疫技术有限公司
1×PBST 速溶颗粒	CR10101M	莫纳生物科技有限公司

1×PBS 速溶颗粒	CR10201M	莫纳生物科技有限公司
DMEM 培养基	D6429	Sigma 公司
50×HAT Supplement	21060017	Gibco 公司
100×HT Supplement	11067030	Gibco 公司
DMSO	INAG0430	北京伊诺凯科技有限公司
100×青链霉素混合液	15140122	Gibco 公司
胎牛血清	10099-141	Gibco 公司
PEG	36632100	Sigma 公司
逆转录试剂盒	MR05101	莫纳生物科技有限公司
TA/Blunt-Zero Cloning Kit	C601	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
单组份高敏 TMB 显色液	CZ-TB01	北京成志科为生物科技有限公司
GeneJET Gel Extraction Kit	K0692	Thermo 公司
弗氏不完全佐剂	F5506	Sigma 公司
弗氏完全佐剂	F5881	Sigma 公司
1×TAE 速溶颗粒	CR00101M	莫纳生物科技有限公司
进口琼脂糖	162135	Biowest 公司
Protein Marker	26630	Thermo 公司
Protein Marker	26610	Thermo 公司
6×Protein Loading Buffer	DL101-02	北京全式金生物技术有限公司
M5 超宽范围预染蛋白 marker	MF-290	北京聚合美生物技术有限公司
HRP 标记山羊抗小鼠 IgG	BF03001	苏州博奥龙免疫技术有限公司
HRP 标记山羊抗小鼠 IgM	BF03006	苏州博奥龙免疫技术有限公司
抗体亚型鉴定试剂盒	BF16002X	苏州博奥龙免疫技术有限公司
BCA 蛋白定量试剂盒	ZJ102	上海雅酶生物医药科技有限公司

3.2.1.4 溶液配制

溶液名称	配制方法
DMEM 完全培养基	含有 1%的双抗，10%的血清的 DMEM 细胞培养基。
HAT 选择培养基	50×HAT 用 10%血清的 DMEM 培养基稀释为 1×HAT。

HT 选择培养基	100×HT 用 10%血清的 DMEM 培养基稀释为 1×HT。
细胞冻存液	含 90%血清, 10% DMSO。
底物包被缓冲液	NaHCO ₃ 2.93 g, Na ₂ CO ₃ 1.59 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 溶解调 pH 9.6。
5%脱脂奶粉	每 100 mL PBST 缓冲液中含有 5 g 脱脂奶粉。
2 M H ₂ SO ₄	量取 21.7 mL 浓硫酸加入蒸馏水定容至 200 mL, 搅拌均匀。
卡那霉素	卡那霉素 0.25 g 加蒸馏水定容至 5 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装后贮存于-20℃。
氨苄青霉素	氨苄青霉素 0.5 g 加蒸馏水定容至 5 mL, 使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装后贮存于-20℃。
10×SDS-PAGE 缓冲液	Glycine 188g, Tris 30.2g, SDS 10.0g, 加蒸馏水定容至 1 L。
10×转膜缓冲液	甘氨酸 29 g、Tris 58 g、SDS 3.7 g, 加蒸馏水定容至 1 L。
1×转膜缓冲液	每 100 mL 10×转膜缓冲液中加入 200 mL 甲醇再用蒸馏水定容至 1000 mL, 室温保存。
Binding Buffer(G)	NaH ₂ PO ₄ 1.47 g, Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 1.1 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 7.0。
Elution Buffer(G)	Glycine 7.507 g 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 2.7。
1 M Tris-HCl	Tris—Base 12.11 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 用 HCl 调 pH 至 9.0。
Binding Buffer(L)	Na ₃ PO ₄ 3.28 g, NaCl 8.77 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 7.0。
Elution Buffer(L)	柠檬酸三钠 29.41 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 2.7。
Binding Buffer(M)	Na ₃ PO ₄ 3.28 g, (NH ₄) ₂ SO ₄ 105.71 g 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 7.5。
Elution Buffer(M)	Na ₃ PO ₄ 3.28 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 7.5。
Regeneration Buffer(M)	Na ₃ PO ₄ 3.28 g, 加 30%异丙酮定容至 1 L, 调 pH 7.5。

3.2.2 噬菌体展示技术

3.2.2.1 实验仪器与材料

仪器/材料名称	型号/批号	厂家
通用型台式高速冷冻离心机	3K15	Sigma 公司
Nunc MaxiSorp	470319	Nunc 公司
96 孔深孔板	FPT021	碧云天生物技术有限公司

其余仪器与材料同 3.2.1.2。

3.2.2.2 实验试剂

试剂名称	货号/批号	厂家
酸水解酪蛋白	C8221	北京索莱宝科技有限公司
Anti-M13 Antibody(HRP),Mouse Monoclonal	11973-MM05T-H	北京义翘神州科技有限公司
PEG 8000	25322-68-3	sigma 公司

其余试剂同 3.2.1.3。

3.2.2.3 溶液配制

溶液名称	配制方法
2-YT 液体培养基	胰蛋白胨 1.6 g、酵母提取物 1.0 g、氯化钠 0.5 g, 加蒸馏水定容至 100 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min。
2-YT 固体培养基	胰蛋白胨 1.6 g、酵母提取物 1.0 g、氯化钠 0.5 g, 加蒸馏水定容至 100 mL, 琼脂粉 1.5 g, 121 °C 高压灭菌 20 min。
20%葡萄糖	20.0 g 葡萄糖粉末加少量蒸馏水加热搅拌至完全溶解, 定容至 100 mL, 经滤膜除菌后分装, 贮存于 4°C
卡那霉素	卡那霉素蒸馏水溶解至终浓度 50 µg/mL, 使用 0.22 µm 滤膜过滤除菌, 分装后贮存于-20°C。
氯霉素	氯霉素乙醇溶解至终浓度 50 µg/mL, 使用 0.22 µm 滤膜过滤除菌, 分装后贮存于-20°C。
四环素	四环素蒸馏水溶解至终浓度 10 µg/mL, 使用 0.22 µm 滤膜过滤除菌, 分装后贮存于-20°C。
20% PEG 8000	称取 200g PEG 8000, 加入 146.1g NaCl, 加蒸馏水定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 20 min。

其余试剂同 3.2.1.4。

3.3 实验方法

3.3.1 杂交瘤技术

3.3.1.1 常规免疫及快速免疫

订购 10 只 SPF 级 6-8 周龄 BALB/c 小鼠 (雌性) 作为两种不同免疫方式的免疫动物。免疫方案中单次抗原的免疫量可根据小鼠对其耐受性的表现作以调整。整体免疫方案如下表 3-1 及 3-2 所示。其中常规免疫是采用最为传统的免疫手段。使用弗式佐剂强化免疫

效果, 而快速免疫则是疫情席卷全球后应运而生的一种较常规免疫周期稍短的免疫方式。

表 3-1 小鼠常规免疫方案

Table 3-1 quick immune protocol for mice

抗原	免疫时间	免疫方式	免疫剂量/只	注射剂量
BoNT/FLHn	初次免疫-第 1 天	皮下多点注射	50 μg 抗原+等量弗氏完全佐剂	500 μL/只
	二次免疫-第 21 天	皮下多点注射	50 μg 抗原+等量弗氏不完全佐剂	500 μL/只
	三次免疫-第 42 天	腹腔注射	50 μg 抗原+等量弗氏不完全佐剂	500 μL/只
	尾血效价-第 56 天	-	-	-
	抗原冲击-第 63 天	腹腔注射	100 ug 抗原	100 μL/只

表 3-2 小鼠快速免疫方案

Table 3-2 normal immune protocol for mice

抗原	免疫时间	免疫方式	免疫剂量/只	注射剂量
BoNT/FLHn	初次免疫-第 1 天	皮下多点注射	20 μg 抗原+等量快速佐剂	100 μL/只
	二次免疫-第 25 天	皮下多点注射	20 μg 抗原+快速佐剂	100 μL/只
	尾血效价-第 30 天	-	-	-
	加强免疫-第 42 天	腹腔注射	100 ug 抗原	100 μL/只

免疫过程中涉及间接 ELISA 测定所免疫小鼠尾血效价, 使用前期纯化所得重组抗原以 10 μg/mL 的包被浓度作为底物, 采集免疫小鼠及阴性对照小鼠尾血后, 离心做尾血样品的初处理, 取离心后样品上清即血清, 作为一抗以 1:1000 的原始稀释比例 2 倍稀释稀释 7 个梯度, 具体操作见表 3-3。

表 3-3 尾血效价测定操作

Table 3-3 assay of tail blood titer

步骤	样品	体积	次数	时间
抗原	BoNT/FLHn	100μl/孔	1	3h
封闭	脱脂奶粉	300μl/孔	1	3h
洗涤	PBST	300μl/孔	1	-
一抗	小鼠血清	100μl/孔	1	1h
洗涤	PBST	300μl/孔	5	-
二抗	HRP 羊抗鼠 IgG	100μl/孔	1	1h

洗涤	PBST	300 μ l/孔	5	-
显色	TMB	100 μ l/孔	1	5min
终止	H ₂ SO ₄	50 μ l/孔	1	-

根据小鼠尾血效价的测定结果选择各方案中最优免疫小鼠作为后续细胞融合的脾细胞来源。另，两种免疫方式所进行的杂交瘤细胞的筛选只有免疫方案的差别，后续的细胞融合及筛选过程以及相应评价操作完全一致。

3.3.1.2 细胞融合

细胞融合前要做好 SP2-O 细胞的培养及饲养层细胞的制备操作。关于 SP2-O 细胞的培养，需将实验室前期冻存的细胞复苏，培养至最佳状态及合适数量，以备融合。另取 1-2 只 SPF 级 6-8 周龄 BALB/c 小鼠（雌性）制备饲养层细胞，小鼠断颈处死，在无菌条件下用手术剪剪开小鼠腹部并固定，保证其腹膜完好。随即将准备好的注射器中的 DMEM 培养基在合适的角度刺入小鼠腹腔，轻晃腹部 5min 后吸出，期间尽可能保证在不刺破小鼠其他脏器的情况下吸出完全。将所获得的小鼠饲养层细胞定容至理想体积，混匀后两种免疫方案各铺 10 块 96 孔细胞培养板，100 μ L/孔，过夜放置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养箱中。

次日，同样在无菌条件下，处死抗原免疫滴度最高的小鼠，剪开腹腔，取出脾脏后用 DMEM 培养基清洗以去除上面结缔组织及脂肪。清洗完成后置于细胞筛网中研磨，网中残留细胞可用 DMEM 进行清洗，并混入细胞悬液中。完成脾细胞的制备后需同 SP2-O 细胞一同进行细胞计数。计数后，参考脾细胞的总量，以 1:10 的比例吸取 SP2-O 细胞，均匀混合于同一离心管中。室温 1000 rpm 离心 5 min，与此同时进行 PEG 的 37 $^{\circ}$ C 预热。离心完成后弃培养基，轻弹管底使底部细胞松散，取出预热完成的 PEG，沿离心管壁缓慢旋转加入（PEG 使用量根据细胞总量而定），待 PEG 全部加入完成后，每 2 min 逐滴缓慢加入已预热的 DMEM 不完全培养基 1、2、4、8、16、31 mL（共 50 mL）以终止融合反应，期间注意沿管壁缓慢加入，以免破坏刚融合的细胞。反应结束后室温将细胞以 800 rpm 的转速离心 8 min，弃上清，将沉淀细胞重悬至合适体积的 HAT 培养基中，以 100 μ L/孔加入至前期已铺饲养层细胞的细胞培养板中。

3.3.1.3 阳性细胞株筛选及克隆化培养

在细胞融合铺板 5 d 左右时，可能就会出现部分细胞明显增殖的现象，为避免前期换液造成细胞不必要的损失，待增殖约 14 d 后进行细胞换液（具体换液时间视细胞生长情况而定）。在整个细胞培养过程中，需将原培养基 100% HAT 的成分逐步替换为 100% HT，进而完全替换为含 10% 血清的普通培养基，以实现培养对杂交瘤细胞的初步加压筛选。

在杂交瘤细胞培养基过渡过程中，取孔板中的细胞培养基上清进行间接 ELISA，以重组抗原为底物 10 μ g/mL 包板，细胞上清为一抗，HRP 羊抗鼠 IgG 为二抗，以此完成阳性杂交瘤细胞的进一步筛选。参考实验结果一并计算细胞融合率及阳性率。具体操作方

法见表 3-4。

表 3-4 杂交瘤细胞筛选操作

Table 3-4 hybridoma cell screening operation

步骤	样品	体积	次数	时间
抗原	BoNT/FLHn	100μl/孔	1	1h
封闭	脱脂奶粉	300μl/孔	1	2h
洗涤	PBST	300μl/孔	1	-
一抗	杂交瘤细胞上清	100μl/孔	1	1h
洗涤	PBST	300μl/孔	5	-
二抗	HRP 羊抗鼠 IgG	100μl/孔	1	1h
洗涤	PBST	300μl/孔	5	-
显色	TMB	100μl/孔	1	5min
终止	H ₂ SO ₄	50μl/孔	1	-

直至杂交瘤细胞在普通培养基中稳定增殖至一定程度时，同样以细胞培养上清作为一抗进行杂交瘤细胞分泌抗体能力的稳定性 ELISA 检测。后选出可以稳定分泌抗体且效价指标较高的细胞进行有限稀释法分离单克隆，扩大至 6 孔细胞板培养。

3.3.1.4 细胞亚型鉴定及上清效价评价

以单克隆杂交瘤细胞增殖情况达培养孔面积 80 %以上为标准，采用抗体亚型鉴定试剂盒鉴定所分泌抗体亚型，并同时评价其细胞上清效价。其中，亚型鉴定流程如表 3-5 所示。细胞上清效价以细胞上清原液作为一抗，十倍梯度稀释至合适梯度，操作基本同上 3-4。

表 3-5 单抗亚型鉴定操作

Table 3-5 identification of monoclonal antibody subtypes

步骤	样品	体积	次数	时间
抗原	BoNT/FLHn	100μl/孔	1	1h
封闭	脱脂奶粉	300μl/孔	1	2h
洗涤	PBST	300μl/孔	1	-
一抗	杂交瘤细胞上清	100μl/孔	1	1h
洗涤	PBST	300μl/孔	5	-
二抗	亚型抗体	100μl/孔	1	1h

洗涤	PBST	300μl/孔	5	-
显色	TMB	100μl/孔	1	5min
终止	H ₂ SO ₄	50μl/孔	1	-

3.3.1.5 抗体可变区基因调取

将单克隆杂交瘤细胞培养至一定数量时，离心收集细胞。使用超纯 RNA 提取试剂盒进行 RNA 提取，具体步骤见表 3-6。

表 3-6 细胞总 RNA 提取操作

Table 3-6 cell total RNA extraction operation

样品	体积	次数	操作时间
TRIzon Reagent	1mL	1	静置 5min
氯仿	200 μL	1	振荡 15s、静置 2min、离心 20s
70%乙醇	600 μL	1	离心 20s、弃废液
Buffer RW1	700 μL	1	离心 20s、弃废液
Buffer RW2	500 μL	2	离心 20s、弃废液、离心 5min
Elution Buffer	30 μL	1	离心 2min

得到细胞 RNA 后为防止其迅速降解，应将其定量后取部分进行下一步的逆转录操作，剩余放进-80℃条件下保存。逆转录采用 MonScript RTIII All-in-One Mix with dsDNase 试剂盒，步骤如下表 3-7。

表 3-7(a) 逆转录温度控制

Table 3-7(a) reverse transcription temperature control

温度	次数	时间
37℃	1	2min
55℃	1	15min
85℃	1	5min

表 3-7(b) 逆转录体系

Table 3-7(b) reverse transcription system

Component	Volume
模板 RNA	50 ng-1 μg

MonScript RTIII All-in-One	4 μ L
MonScript dsDNase	1 μ L
Nuclease-free Water	To 20 μ L

逆转录后以所得到的 cDNA 为模板，以鼠源抗体基因序列扩增的简并引物为 PCR 扩增引物（表 3-8），按 TransStart FastPfu DNA Polymerase 说明书扩增抗体重链、轻链的可变区基因，PCR 扩增体系见表 3-9(a)，PCR 扩增条件见表 3-9(b)。剩余 cDNA 可放入-20℃冰箱保存。

表 3-8 抗体可变区扩增引物

Table 3-8 primer for variable region amplification of antibody

Heavy chain primer	Sequence (5'→3')
VH1	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG
VH2	SAGGTYCARCTKCAGCAGYCTGG
VH	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC
Light chain primer	Sequence (5'→3')
VL1	ATGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA
VL2	ATGKCCCCWRCTCAGYTYCTKGT
VL	GGATACAGTTGGTGCAGCATCAGCCCGTTT

表 3-9(a) PCR 反应体系

Table 3-9(a) PCR reaction system

Component	Volume (μ L)
Nuclease-free Water	32
TransStart FastPfu DNA Polymerase	1
2.5 mM dNTPs	4
Primer F	1
Primer R	1
5×TransStart FastPfu Buffer	10
Templete	1
Total volume	50

表 3-9(b) PCR 扩增条件

Table 3-9(b) PCR amplified condition

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^a	95℃	60 sec	1
变性 ^a	95℃	20 sec	
退火 ^b	Tm-5℃	20 sec	40
延伸 ^c	72℃	60 sec/kb	
彻底延伸	72℃	5 min	1

PCR 产物回收后,将其分别与 TA/Blunt-Zero Cloning Kit 试剂盒中所包含的 T 载体连接,连接反应体系如表 3-10。

表 3-10 载体连接反应体系

Table 3-10 carrier connection reaction system

Component	Volume (μL)
5×TA/Blunt-Zero Cloning Kit	1
PCR 产物	1-4
Nuclease-free Water	to 5
Total volume	5

体系配制完成后置于 25℃ 反应 10 min,反应结束将所连接质粒直接转化至 DH5α 中,以氨苄青霉素和卡那霉素双重抗性的 LB 固体平板进行加压筛选,所得单克隆阳性菌株扩增后测序处理, DNAMAN 软件比对后获得抗体轻重链序列,并利用 Igbblast Tool 对测序结果进行同源基因比对及氨基酸序列分析。

3.3.1.6 腹水诱生制备单抗及纯化

鼠源单克隆抗体采用体内诱生法制备。订购足够数量只 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠(根据不同抗体腹水产出量灵活调整),0.5 mL/只腹腔注射弗式不完全佐剂使小鼠致敏 7 d,后同腹腔注射杂交瘤细胞约 $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个,待 7~10 d 后抽取腹水,4℃ 12000 rpm 离心至血细胞、腹水及油脂完全分离,取中间层腹水,置 -20℃ 保存备用。

单抗纯化同利用重组抗原纯化时使用的 AKTA Pure 纯化仪,串联不同抗体亚型亲和层析柱,本实验采用 Protein L HP 柱、Protein G HP 柱及 IgM Purification HP 柱进行抗体的纯化,其中 Protein L HP 柱、Protein G HP 柱除使用缓冲液不同外,操作方法完全相同,现将纯化步骤分别阐述见下表 3-11(a)、3-11(b)。

表 3-11(a) Protein L HP、Protein G HP 柱纯化操作

Table 3-11(a) Protein L HP and Protein G HP column purification

步骤	操作
样品处理	保存上清经 0.45 μm 滤膜过滤，与 Binding Buffer 1:1 混合
纯化仪开启	仪器自检后蒸馏水冲洗 50 mL，将层析柱柱连接至纯化仪
柱平衡	蒸馏水冲洗 50 mL，再用 Binding Buffer 冲洗至基线平稳
进样	缓慢进样后用 Binding Buffer 冲洗至基线平稳
洗脱	Elution Buffer 进行洗脱，收集管中加入适量 1 mol/L Tris-HCl 调节 pH 至 7.0
纯化仪关闭	Binding Buffer 冲洗至基线平稳，再蒸馏水冲洗至基线平稳
PD10 脱盐柱平衡	蒸馏水冲洗 30 mL，PBS 冲洗 20 mL
进样	进样初步纯化的单克隆抗体 2.5 mL
洗脱	PBS 3.5 mL 洗脱，洗脱后重复平衡、进样、洗脱至结束
PD10 脱盐柱保存	蒸馏水冲洗 50 mL，无水乙醇 40mL 冲洗，封存

表 3-11(b) IgM Purification HP 柱纯化操作

Table 3-11(b) Purification of IgM HP column

步骤	操作
样品处理	保存上清经 0.45 μm 滤膜过滤，与 2×Binding Buffer 1:1 混合（保证样品中含有 0.6 M 硫酸铵）
纯化仪开启	仪器自检后蒸馏水冲洗 50 mL，将 IgM Purification HP 柱连接
IgM Purification HP 柱平衡	蒸馏水冲洗 50 mL，再用 Binding Buffer 冲洗至基线平稳
进样	缓慢进样后用 Binding Buffer 冲洗至基线平稳
洗脱	Elution Buffer 进行洗脱
重生	Regeneration Buffer 进行二次洗脱
纯化仪关闭	Binding Buffer 冲洗至基线平稳，再蒸馏水冲洗至基线平稳
PD10 脱盐柱平衡	蒸馏水冲洗 30 mL，PBS 冲洗 20 mL
进样	进样初步纯化的单克隆抗体 2.5 mL
洗脱	PBS 3.5 mL 洗脱，洗脱后重复平衡、进样、洗脱至结束
PD10 脱盐柱保存	蒸馏水冲洗 50 mL，无水乙醇 40mL 冲洗，封存

3.3.1.7 抗体纯度鉴定

抗体纯度鉴定方法同上 2.3.3.2。

3.3.1.8 抗体定量及冻干保存

抗体定量及冻干操作同 2.3.4。

3.3.1.9 抗体 Western Blot 构象鉴定

通过 Western Blot 鉴定抗体构象，使用纯化所得抗体作为一抗，HRP 羊抗鼠 IgG/IgM 为二抗孵育，洗膜后显影。观察抗体可否结合特异性抗原条带，若结合，则可判断该抗体为线性构象。具体步骤见表 3-12。

表 3-12 单抗结合表位鉴定

Table 3-12 monoclonal antibody binding epitopes identification

步骤	样品	次数	时间
电泳	BoNT/FLHn	1	15min
封闭	脱脂奶粉	1	2h
洗涤	PBST	5	5min
一抗	单克隆抗体	1	1h
洗涤	PBST	5	5min
二抗	HRP 羊抗鼠 IgG/IgM	1	1h
洗涤	PBST	5	5min
显色	ECL	1	1min

3.3.1.10 亲和力常数检测

通过非竞争 ELISA 法测定抗体的亲和力常数。BoNT/FLHn 为底物抗原，通过 4 倍梯度稀释粗略判断抗原抗体的最适结合浓度，后对所选择合适稀释范围，抗原以 2 倍浓度稀释，100 μ l/孔加入至 96 孔酶标板，4 $^{\circ}$ C 包被过夜，抗体按照 16 个梯度稀释，后经酶标仪在 450nm 及 630nm 双波长读数绘制结合曲线，GraphPad Prism 9 拟合曲线，另参考文献中的公式计算抗体亲和力。

3.3.1.11 特异性鉴定

使用间接 ELISA 对所得抗体的特异性进行鉴定，包被抗原分别为不同血清型 A、B、E 及 F 中的 LHn 段结构域，操作步骤同下表 3-13。

表 3-13 单抗特异性鉴定

Table 3-13 specific identification of monoclonal antibodies

步骤	样品	体积	次数	时间
抗原	BoNT/A/B/E/FLHn	100 μ l/孔	1	1h
封闭	脱脂奶粉	300 μ l/孔	1	2h
洗涤	PBST	300 μ l/孔	1	-
一抗	单克隆抗体	100 μ l/孔	1	1h
洗涤	PBST	300 μ l/孔	5	-
二抗	HRP 羊抗鼠 IgG/IgM	100 μ l/孔	1	1h
洗涤	PBST	300 μ l/孔	5	-
显色	TMB	100 μ l/孔	1	5min
终止	H ₂ SO ₄	50 μ l/孔	1	-

3.3.1.12 抗体中和活性评价

参考 2015 年药典“肉毒毒素抗毒素效价测定法-小鼠试验法”，通过小鼠中和实验对纯化的抗体进行中和活性初测，以判断各抗体是否具有鉴定中和效价的必要。每组 2 只小鼠，小鼠毒素量为 10 LD₅₀/只，抗体设置不同浓度梯度进行攻毒实验，将配置适宜浓度抗体与毒素体外混合 45 min 后，以 0.5 mL/只的体积腹腔注射，96 h 观察小鼠生存情况，GraphPad Prism 9 软件绘制生存曲线。

3.3.2 噬菌体展示技术

3.3.2.1 抗体库一轮固相筛选

噬菌体抗体库由军事医学研究院生物工程研究所杜鹏老师惠赠（共 2 种）。抗体库的固相筛选通过 ELISA 的实验方法完成。筛选过程经历 3 轮，选用亲水性免疫管包被适量底物抗原 BoNT/FLHn（包被的抗原量随筛选次数的增加而适当下调），首次包被浓度为 20 μ g/mL 缓冲液使用 PBS，4 $^{\circ}$ C 包被过夜。

第二日封闭液选用 2% BSA 的 PBS（也可另选用 0.2% 酸水解酪蛋白或含 2.5% 脱脂奶粉的 PBS 交替封闭），37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。同时配制总体积为 1 mL 含抗体库、封闭剂及 0.1% (v/v) Tween 20 的 PBS 溶液于同样条件下封闭（抗体库投入量要求达到有效库容量的 50 倍以上，投入体积不小于 50*库容量*10/库滴度。当天在 LB 培养基琼脂平板划线培养大肠杆菌 XL1-Blue，37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

封闭完成后弃免疫管中封闭液，将同时封闭的噬菌体抗体库全部加至免疫管中，4 $^{\circ}$ C 结合过夜（>18 h 或 37 $^{\circ}$ C 预封闭 1 h 或室温 2 h），具体条件根据实验情况酌情选择。前日的划线平板 4 $^{\circ}$ C 放置，当晚挑划线平板中单克隆菌 XL1-Blue 于 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养

过夜。

次日，用 PBST (0.1 % Tween 20 的 PBS 溶液) 洗涤 10-15 次，PBS 洗涤 5-10 次，5 min/次，分别记录洗涤总体积和洗涤总时间（第一轮洗涤强度可不必太大，根据后续产出适当对洗涤强度进行调整）。洗涤时可准备 2×YT-CTG 的固体培养板。

洗脱使用 1 mL pH 为 2.2 的 0.1 M HCl-Glycine (盐酸甘氨酸缓冲液)，室温摇动 400 rpm*10 min 洗脱，洗脱完毕后洗脱液移入 50 mL 离心管，100 μ L 1M Tris 溶液中和，至 pH7.4。前日试管培养的 XL1-Blue 以 1: 10 的比例转接过夜菌，以 37 $^{\circ}$ C、200 rpm 的条件培养至 OD₆₀₀=0.5-1.0 备用。洗脱后直接利用准备好的 XL1-Blue 室温静置 30 min 以感染噬菌体。同时，向前述离心管中加入 18 mL 的菌液，混匀后室温静置感染 30 min。感染后将免疫管及离心管转入 37 $^{\circ}$ C、150 rpm 培养 1 h。

计时结束，将免疫管中菌液混至离心管中，混匀后取 1 % 及 0.1 % 体积涂布于准备好的培养板中，37 $^{\circ}$ C 过夜培养计算产率。剩余菌液浓缩后同涂布至平板中扩大培养。

次日，将扩大培养的菌落用涂布棒刮下，取一定体积至 150 mL 的 2×YT-CTG 培养基中培养至 OD₆₀₀ 约 0.7 (菌密度按照 2×10^8 /mL)，剩余菌液甘油保存至 -20 $^{\circ}$ C。将培养好的菌液按感染复数 MOI=50 加入辅助噬菌体 M13KO7，混匀后室温超感染 30 min，结束后于 37 $^{\circ}$ C、150 rpm 培养 1 h；3600 rpm*10 min 离心收集细菌，重悬于 150 mL 2×YT-CTK 培养基，混匀后分成 3 等份，分别加入 7.5 μ L 1 M IPTG 至终浓度为 0.15 mM，625 μ L 20 % 葡萄糖至终浓度 0.25 %，最后一组不加葡萄糖和 IPTG。三份均于 30 $^{\circ}$ C，200 rpm 培养过夜 (10-12 h)。

第二天使用落地离心机 8000 rpm*5-10 min 离心回收噬菌体上清，加入 1/4 体积的高压后的 PEG 8000，混匀后置于冰上至少 2 h；8000 rpm*30-45 min 离心，弃上清，回收沉淀。将其重悬于 2-3 mL PBS，0.45 μ m 滤膜过滤除菌，并加入终浓度 0.5 % 酸水解酪蛋白 (与下一轮筛选的封闭剂一致)。取少量测滴度，剩余 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

滴度测定需取 5 μ L 待测噬菌体上清，稀释至 495 μ L 培养基中，混匀后取 5 μ L 照此步骤共稀释三次；完成后取 50 μ L 稀释至 450 μ L 培养基中，同样流程稀释三次。将 5、6 两个稀释梯度所对应的 EP 管中加入等体积处于对数生长期的 XL1-Blue (提前准备)，混匀后室温感染 30 min，37 $^{\circ}$ C 150 rpm 培养 1 h，各取 200 μ L 涂布于 2×YT-CTG 及 2×YT-TKG 固体培养板中，37 $^{\circ}$ C 培养过夜，菌落计数并估算滴度。

3.3.2.2 抗体库二轮固相筛选

噬菌体抗体库二轮固相筛选流程与第一轮操作近乎相同，但抗原量减半，且包被后封闭液的选择要区别于第一轮筛选。待封闭后需加入噬菌体库时，要根据第一轮筛选的结果计算二轮噬菌体投入量 (投入量需保证达到产出估算值的 50 倍以上)。后续操作同 3.3.2.1。

3.3.2.3 抗体库三轮固相筛选

噬菌体抗体库三轮固相筛选原则同前两轮。待洗脱感染计数后，剩余菌液 4 $^{\circ}$ C 放置。

第二日复苏后, 根据产出结果, 取适量涂板, 用于单克隆鉴定, 剩余部分全部涂板, 扩大培养后 4℃ 保存备用 (视单克隆鉴定结果决定是否进行第四轮筛选)。

3.3.2.4 噬菌体单克隆呈现

取足够数量的无菌 96 孔深孔板, 200 μL /孔加入 2×YT-CTG 培养基, 从用于单克隆鉴定的平板中挑取单克隆菌落, 37℃、220 rpm 培养过夜至饱和。另取同等数量的 96 孔深孔板, 按 360 μL /孔加入 2×YT-CT 培养基, 将前期培养至饱和的菌液按 40 μL /孔转接至新板中, 37℃、220 rpm 培养至 OD₆₀₀ 约 0.7。无菌环境内按感染复数 MOI=50 加入辅助噬菌体 M13KO7, 室温静置 45 min, 然后转入 37℃、150 rpm 培养 1 h。

随后诱导表达, 200 μL /孔加入含卡那抗生素及 IPTG 的 2×YT-CT 培养基 (卡那终浓度 50 mg/mL, IPTG 终浓度 0.15 mM)。30℃, 200 rpm 培养 12 h。另配制含 20% 脱脂奶粉和 0.8% Tween 20 的 PBST 牛奶母液, 按 100 μL /孔加入新的深孔板中, 前述过夜培养的深孔板 4000 rpm*10 min 离心, 700 μL /孔吸取上清加入新的深孔板中, 480 rpm 水平摇床室温混合封闭 1-2 h。

3.3.2.5 间接 ELISA 鉴定阳性克隆

与前述诱导当日准备 96 孔酶标板, 按照 100 μL /孔包被重组抗原, rhCD47-GFP-His 及酪蛋白, 三列一组, 一抗加入封闭后 3.3.2.4 中的菌液, 二抗选用 Anti-M13 Antibody(HRP), Mouse Monoclonal, 根据说明书合适比例稀释, 操作步骤与 3.3.1.3 完全一致。结果以酶标仪读数 OD₄₅₀-OD₆₃₀>0.2 吸光度值为阳性, 计算阳性率。

3.3.2.6 人源噬菌体库 scfv 序列调取

选择亲和力及特异性指标符合要求的阳性菌液送至公司测序, 获得人源噬菌体抗体库中与 BoNT/FLHn 特异性结合的单链抗体序列。

3.4 实验结果与分析

3.4.1 杂交瘤技术

3.4.1.1 动物免疫尾血效价检测

同以常规免疫及快速免疫两种方式使用纯化所得重组抗原免疫小鼠, 免疫效果由间接 ELISA 法评价。该方法测定小鼠尾血血清效价后, 计算 cut off 值, 选择符合该指标所对应的血清稀释倍数作为选定免疫动物的依据。不同免疫方法所测定的小鼠尾血效价如图 3-1(a), 3-1(b)。

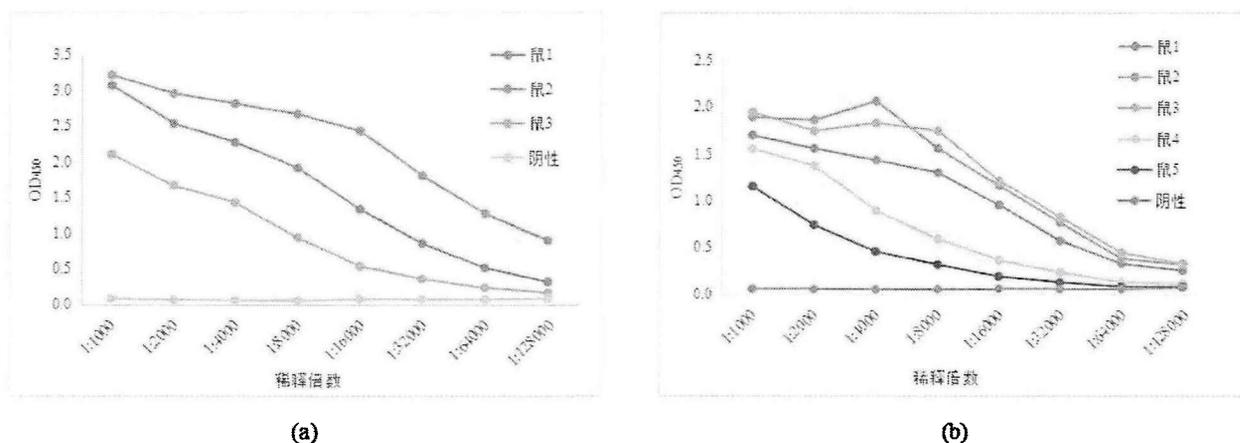


图 3-1 常规免疫及快速免疫小鼠尾血效价检测

Figure 3-1 tail blood titer of routine and rapid immunization mice

(a) 常规免疫小鼠尾血效价检测； (b) 快速免疫小鼠尾血效价检测

结果表明，无论是常规免疫还是快速免疫中的任意免疫方案，ELISA 实验中，当小鼠血清稀释倍数为 1:64000 时，cut-off 值>2.1。分别选用该稀释倍数效价最高的鼠 2 和鼠 3 进行后续的细胞融合试验。

3.4.1.2 杂交瘤细胞融合及筛选

铺板培养近 7 d 后，融合的细胞增殖状态如图 3-2。

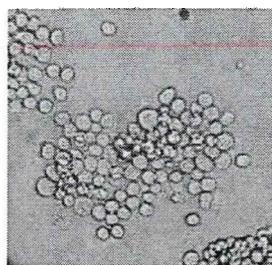


图 3-2 显微镜 (100×10) 观察细胞融合

Figure 3-2 cell fusion observed under a microscope (100×10)

细胞融合后，同样利用间接 ELISA 法进行阳性细胞率的判定，根据每个板的不同情况界定合适吸光度作为阳性临界值。最终以 cut off >2.1，临界值为指标，汇总前期所得细胞融合率，计算结果分别见下表 3-1、3-2。

表 3-1 常规免疫杂交瘤细胞融合率及阳性率

Table 3-1 fusion rate and positive rate of routine immune hybridoma cells

编号	融合率	阳性率
1	92.7% (89/96)	37.1% (33/89)
2	92.7% (89/96)	37.1% (33/89)

3	92.7% (89/96)	27.0% (24/89)
4	94.8% (91/96)	15.4% (14/91)
5	93.8% (90/96)	21.1% (19/90)
6	98.0% (94/96)	18.1% (17/94)
7	96.9% (93/96)	15.1% (14/93)
8	96.9% (93/96)	18.3% (17/93)
9	98.0% (94/96)	13.8% (13/94)
10	98.0% (94/96)	16.0% (15/94)
合计	95.42% (916/960)	21.72% (199/916)

表 3-2 快速免疫杂交瘤细胞融合率及阳性率

Table 3-2 fusion rate and positive rate of rapid immune hybridoma cells

编号	融合率	阳性率
1	15.6% (15/96)	80.0% (12/15)
2	19.8% (19/96)	36.8% (7/19)
3	26.0% (25/96)	80.0% (20/25)
4	15.6% (15/96)	100.0% (15/15)
5	21.9% (21/96)	100.0% (21/21)
6	16.7% (16/96)	87.5% (14/16)
7	19.8% (19/96)	78.9% (15/19)
8	21.9% (21/96)	57.1% (12/21)
9	16.7% (16/96)	81.3% (13/16)
10	14.6% (14/96)	100.0% (17/17)

合计 18.9% (181/960) 79.35%(146/184)

杂交瘤细胞的融合率的指标很大程度上是由原始细胞量决定的，在取出小鼠脾脏时发现，常规免疫及快速免疫过后小鼠的脾脏大小存在较大差异。由此，原始细胞量的差异也就导致了常规免疫的细胞融合率远大于快速免疫融合率的结果。阳性率同理，参看细胞总融合的基数，乃至细胞融合率的差异，快速免疫阳性率指标优于常规免疫。

该结果也进一步反应了不同免疫方式的免疫效果差异。其中，常规免疫免疫周期长，抗原使用量大，细胞融合率高，阳性细胞多。而快速免疫免疫周期短，抗原使用量小，细胞基数小从而导致细胞融合率低，但并不排除存在高指标抗体的可能。综上，免疫方式可以根据需求的不同合理选择。

3.4.1.3 细胞亚型鉴定及上清效价检测

阳性细胞扩大培养后留取细胞上清用于亚型鉴定及上清效价检测。亚型鉴定借由苏州博奥龙免疫技术公司抗体亚型鉴定试剂盒完成，上清效价检测方法同上 3.3.1.1，所得结果汇总如表 3-3、表 3-4。

表 3-3 常规免疫细胞上清效价及亚型测定

Table 3-3 determination of titer and subtype of routine immune cell supernatant

抗体编号	1D2	1D6	1F9	2C11	3E3
效价	10 ²	10 ⁶	10 ³	10 ⁵	10 ⁶
亚型	IgG2b/κ	IgG1/κ	Ig2b/κ	IgM/κ	IgG1/κ

表 3-4 快速免疫细胞上清效价及亚型测定

Table 3-4 determination of supernatant titers and subtypes of rapid immune cells

抗体编号	1F8	1G11	2D3	5B7	10F6
效价	10 ²	10 ¹	10 ⁴	10 ¹	10 ¹
亚型	IgM/κ	IgM/κ	IgG1/κ	IgM/κ	IgM/κ

通过结果分析可得，两种不同免疫方式筛得抗体的亚型可能存在一定的差异性。常规免疫中，筛得的抗体亚型更多为 IgG 型，另，快速免疫中获得的抗体亚型以 IgM 居多。分析可能与免疫周期有关，IgM 为抗原免疫首先产生的抗体类型，所以快速免疫获得 IgM 抗体的概率相对较大，常规免疫产生 IgG 抗体同理。

3.4.1.4 可变区序列调取

提取所培养杂交瘤细胞 RNA，反转录成 cDNA 后，利用通用引物进行聚合酶链式反应，产物回收连接至 T 载体测序，经由 Igblast Tool 分析后可得单克隆抗体的可变区轻重链序列，汇总见下表 3-5、3-6。

表 3-5 常规免疫抗体可变区序列分析

Table 3-5 sequence analysis of variable region of routine immune antibody

抗体编号	抗体调取	V-L/H 基因同源性		CDR 区氨基酸数		CDR3 氨基酸序	
				-L		CDR3 区序列-L	列-L
1D2	√/-	IGKV3-5*01 98.6% (292/296)	-	10,3,6		CAGCAAAGTG	
						ATGACGATCC	QQSDDDPYT
1D6	√/√	IGKV1-110*01 99.7% (298/299)	IGHV1-76*01 90.8% (266/293)	11,3,7		TCTCAAAGTA	
						CACATGTTCC	SQSTHVPT
						GACG	
1F9	√/√	IGKV3-12*01 9 8.0% (288/294)	IGHV1S132*01 91.1% (267/293)	10,3,6		CAGCACATTA	
						GGGAGCTTAC	QHIRELTR
2C11	√/√	IGκV3-12*01 97.6% (287/294)	IGHV3-8*02 99.3% (289/291)	10,3,6		CAGCACATTA	
						GGGAGCTTAC	QHIRELTR
						ACG	
3E3	√/√	IGκV3-12*01 98.3% (289/294)	IGHV14-3*02 97.2% (282/290)	10,3,8		CAGCACATTA	
						GGGAGCTTAC	QHIRELTR
						ACG	

表 3-6 常规免疫抗体可变区序列分析

Table 3-6 sequence analysis of variable region of routine immune antibody

抗体编号	抗体调取	V-L/H 基因同源性		CDR 区氨基酸数		CDR3 氨基酸序	
				-L		CDR3 区序列-L	列-L
1F8	√/√	IGκV3-12*01 98.3% (289/294)	IGHV14-1*02 100% (289/289)	10,3,8		CAGCACATTA	
						GGGAGCTTAC	QHIRELTR
						ACGT	

		IGκV3-12*01			CAGCACATTA	
1G11	√/-	98.3%	-	10,3,8	GGGAGCTTAC	QHIRELTR
		(289/294)			ACG	
		IGκV3-12*01	IGHV2-4-1*01		CAGCACATTA	
2D3	√/√	98.3%	95.9%	10,3,8	GGGAGCTTAC	QHIRELTR
		(289/294)	(281/293)		ACG	
		IGKV4-57*01	IGHV14-1*02		CAGCAAAGGA	
5B7	√/√	100.0%	100.0%	5,3,9	GTAGTTACCC	QQRSSYPYT
		(281/281)	(289/289)		GTACACG	
		IGκV3-12*01			CAGCACATTA	
10F6	√/-	98.3%	-	10,3,8	GGGAGCTTAC	QHIRELTR
		(289/294)			ACGT	

比对结果可得，10株细胞中有7株细胞能够完整调取轻重链可变区序列。其中常规免疫及快速免疫所得抗体轻链具有极高同源性，另，仅有1株与IGKV4-57*01序列100%一致。重链可变区序列存在较大差异。

3.4.1.5 抗体纯度鉴定

利用SDS-PAGE电泳结合Gel-pro32软件进行分析，现将纯化所得全部10株抗体纯度分析如图3-3、3-4所示。

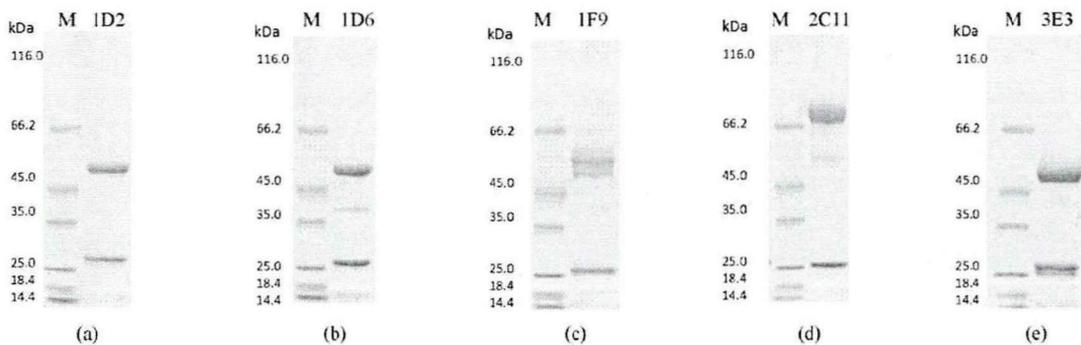


图 3-3 常规免疫单克隆抗体纯度鉴定

Figure 3-3 purity identification of routine immunized monoclonal antibody

(a) 1D2 纯度鉴定； (b) 1D6 纯度鉴定； (c) 1F9 纯度鉴定； (d) 2C11 纯度鉴定； (e) 3E3 纯度鉴定

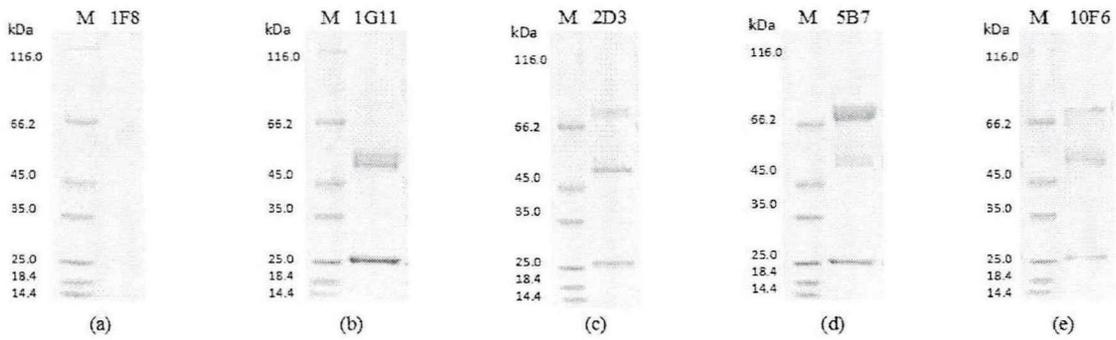


图 3-4 快速免疫单克隆抗体纯度鉴定

Figure 3-4 purity identification of rapid immunization monoclonal antibody

(a) 1F8 纯度鉴定； (b) 1G11 纯度鉴定； (c) 2D3 纯度鉴定； (d) 5B7 纯度鉴定； (e) 10F6 纯度鉴定

纯化的全部抗体中，两种不同免疫方式中的 IgM 分别是由 IgM Purification HP 柱及 Protein L HP 柱纯化所得。实验发现，IgM Purification HP 柱对 IgM 的纯化作用优于 Protein L HP 柱，尤其在二次洗脱过程中可获得相较于一次洗脱的目的抗体纯度更高的洗脱液。另，Protein L HP 柱纯化过程中，原抗体损耗大，获得抗体总量较少，对后续其生物活性评价的实验设计产生了一定影响。

其中，Protein L HP 柱的结合原理即结合抗体的κ亚型的轻链，IgM Purification HP 柱的纯化原理则是其预装柱包装有亲硫吸附介质，可高水平回收活性的 IgM 以完成抗体的纯化。整体而言，Protein G HP 柱对抗体的纯化作用是远胜于另两种层析柱的，IgG 获得总量客观，且抗体纯度也已经达到后续评价抗体的指标要求。

3.4.1.6 抗体定量及保存

10 株纯化所得单克隆抗体定量操作方法同 3.3.1.8，后分装冻干保存。抗体定量后得抗体总量数据汇总至下表 3-7。

表 3-7 常规免疫及快速免疫抗体总量

Table 3-7 total amount of routine and rapid immunization antibodies

抗体编号	1D2	1D6	1F9	2C11	3E3
总量(mg)	30.95	47.68	9.27	37.95	29.53
抗体编号	1F8	1G11	2D3	5B7	10F6
总量(mg)	2.13	1.84	38.92	1.52	2.98

综上，IgM 亚型抗体得率相较 IgG 低，且纯化流程相对繁琐。但所获得抗体量足以完成单株抗体的生物学活性评价工作。另体内诱生法抗体获得总量与杂交瘤细胞分泌及增殖性质有关，该性质会影响小鼠最终的腹水产出，从而导致抗体制备总量在注射细胞量近似相同时存在较大差异。

3.4.1.7 抗体 Western Blot 构象鉴定

通过 Western Blot 法对 10 种抗体的构象类型进行鉴定, BoNT/FLHn 作为样品, 电泳后转膜, 经一抗二抗先后孵育后显影。结果图 3-5 提示 10 株抗体中存在 2 株抗体构象为线性构象。



图 3-5 快速免疫单克隆抗体纯度鉴定

Figure 3-5 purity identification of rapid immunization monoclonal antibody

(a) 1D6 构象鉴定; (b) 3E3 构象鉴定

3.4.1.8 亲和力常数检测

非竞争 ELISA 法测定抗体亲和力常数, SPSS 26 软件计算常数值, GraphPad Prism 9 软件进行曲线拟合后发现, 常规免疫所得抗体的亲和力常数按照顺序依次为 1.07×10^{-6} mol/L, 7.3×10^{-9} mol/L, 3.1×10^{-7} mol/L, 8.7×10^{-8} mol/L, 1.3×10^{-7} mol/L。其中, 以 1D6 抗体亲和力指标最高, 与抗原的亲和力常数达到了 nmol/L 水平。

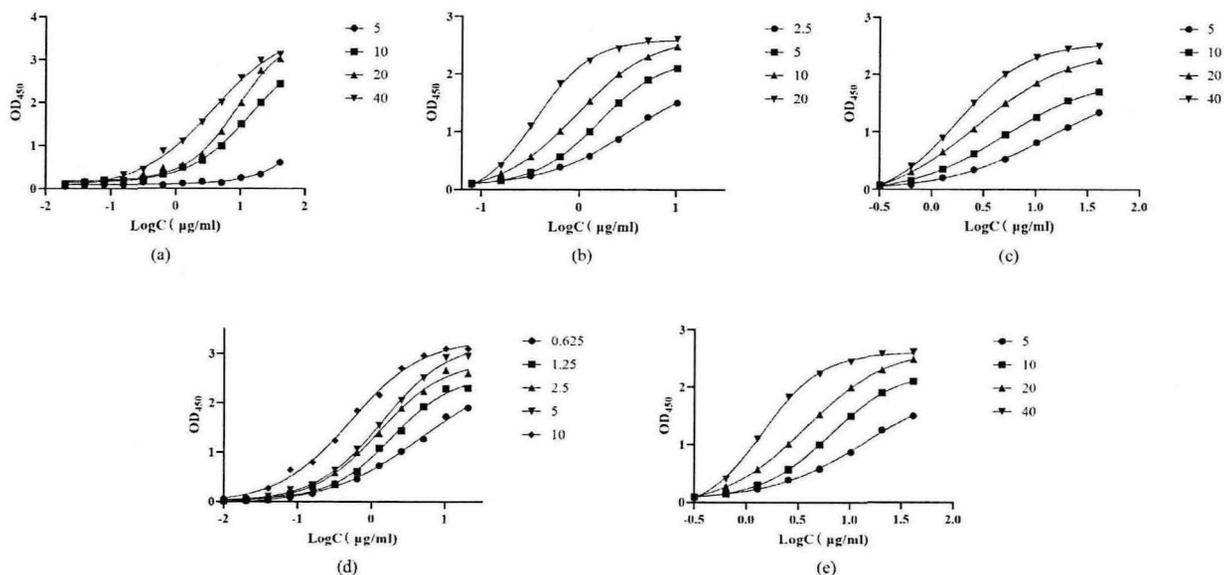


图 3-6 常规免疫单克隆抗体亲和力常数检测

Figure 3-6 affinity constant detection of routine immune monoclonal antibodies

(a) 1D2 亲和力常数检测; (b) 1D6 亲和力常数检测; (c) 1F9 亲和力常数检测; (d) 2C11 亲和

力常数检测；(e) 3E3 亲和力常数检测

快速免疫所得抗体的亲和力常数按照顺序依次为 1.96×10^{-6} mol/L, 5.81×10^{-4} mol/L, 1.66×10^{-8} mol/L, 4.79×10^{-7} mol/L, 4.79×10^{-7} mol/L。

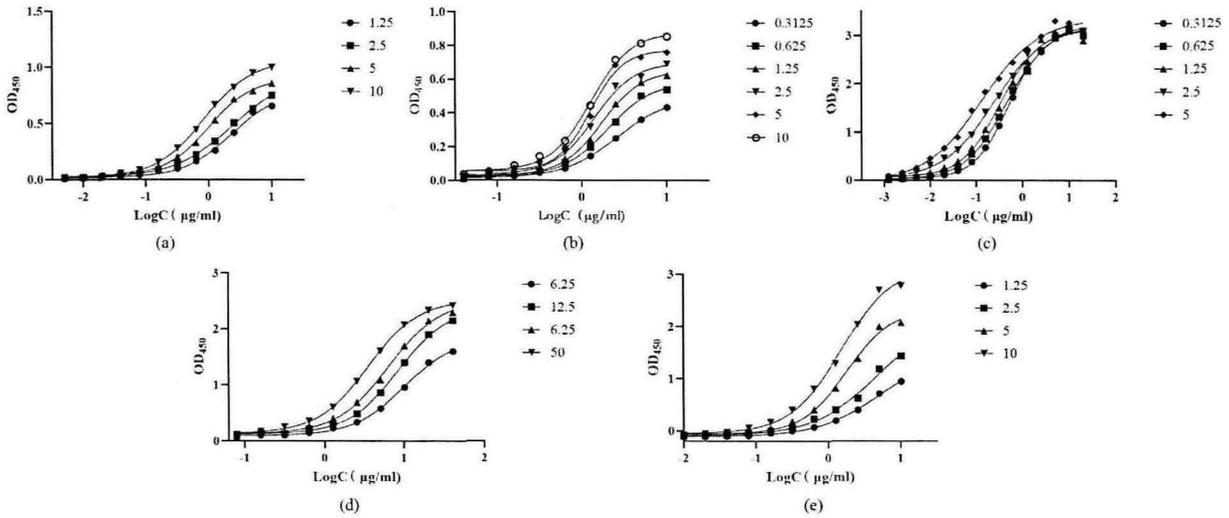


图 3-7 快速免疫单克隆抗体亲和力常数检测

Figure 3-7 affinity constant detection of rapid immunization monoclonal antibody

(a) 1F8 亲和力常数检测；(b) 1G11 亲和力常数检测；(c) 2D3 亲和力常数检测；(d) 5B7 亲和力常数检测；(e) 10F6 亲和力常数检测

综上，相较于常规免疫，快速免疫得到的抗体亲和力指标普遍偏低。亲和力指标与抗体质量、免疫抗原量及周期有关，常规免疫抗原量远高于快速免疫，因此不难理解两种免疫方式通过同种方法筛选得到的抗体亲和力存在数量级的差异。

3.4.1.9 特异性鉴定

间接 ELISA 法测定两种免疫方法所获得的各单抗对于除毒素 F 外的 A、B 毒素的毒性及跨膜结构域的特异性结果如下图 3-8。

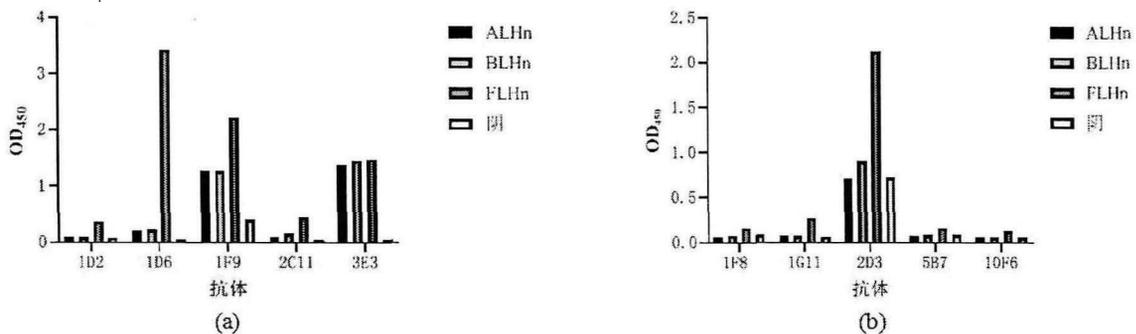


图 3-8 单克隆抗体特异性

Figure 3-8 monoclonal antibody specificity

(a) 常规免疫单克隆抗体特异性；(b) 快速免疫单克隆抗体特异性

由图可得，常规免疫抗体中 1D6 为特异性指标最高抗体，相较于另一抗体 3E3，3E3 的亲合力指标虽然可达 10^{-8} mol/L，但其特异性不强，若作为临床检测抗体开发，其应用性会受到限制。另快速免疫中属 2D3 特异性指标高，其余抗体的检测应用意义不大。

3.4.1.10 中和活性评价

为判断所筛鼠源单克隆抗体有无作为临床治疗性抗体的开发潜力，分别将 10 株单克隆抗体作以中和活性评价，小鼠生存曲线如下图 3-9、3-10。

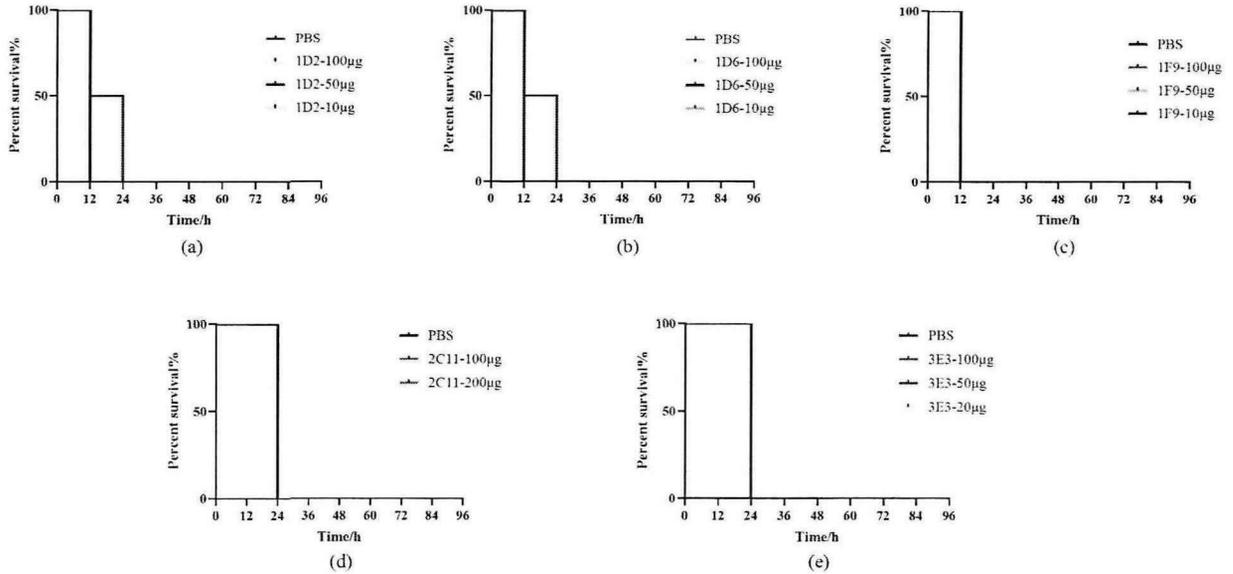


图 3-9 常规免疫单克隆抗体中和活性粗测

Figure 3-9 crude neutralization activity of routine immunized monoclonal antibody

(a) 1D2 中和活性粗测； (b) 1D6 中和活性粗测； (c) 1F9 中和活性粗测； (d) 2C11 中和活性粗测； (e) 3E3 中和活性粗测

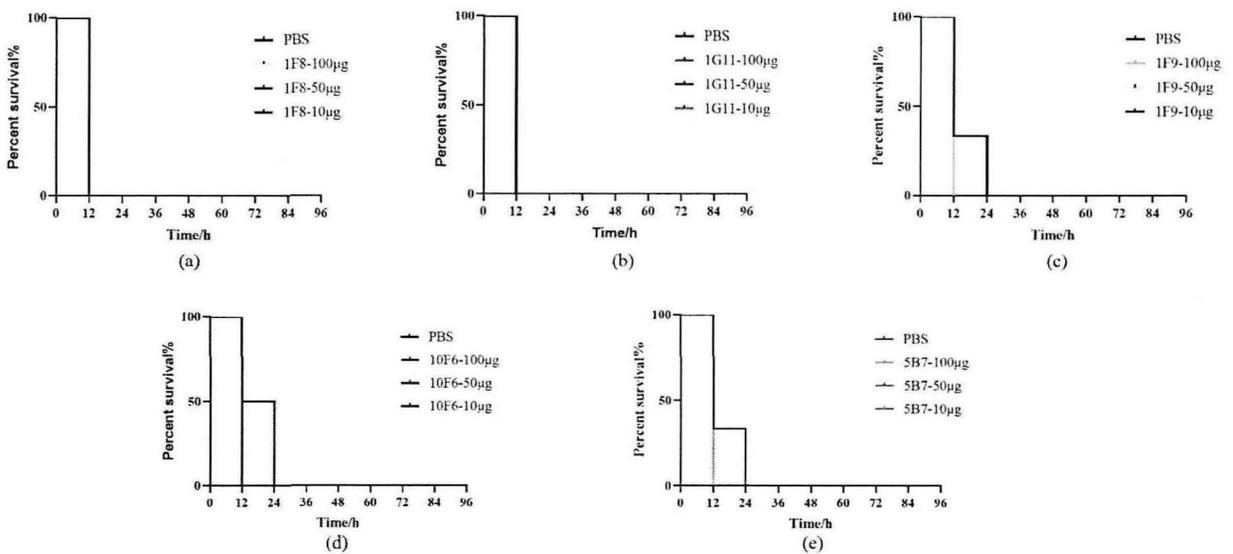


图 3-10 快速免疫单克隆抗体中和活性粗测

Figure 3-10 crude neutralization activity of rapid immunization monoclonal antibody

(a) 1F8 中和活性粗测； (b) 1G11 中和活性粗测； (c) 2D3 中和活性粗测； (d) 5B7 中和活性粗测； (e) 10F6 中和活性粗测

由图 3-9、3-10 可知，全部 10 株抗体中，暂无可开发作为中和抗体的潜在治疗型抗体。但部分抗体如 1D6，其亲和力及特异性指标仍有作为临床检测试剂的开发价值。

3.4.2 噬菌体展示技术

3.4.2.1 噬菌体抗体库的富集分析

由共三轮的计数板计算每一轮的产出量，汇总抗体库的富集分析如下表 3-8。

表 3-8 噬菌体抗体库的富集分析

Table 3-8 enrichment analysis of phage antibody library

筛选次数	BoNT/FLHn 抗原包被量 (μg/mL)	噬菌体投入量 (pfu)		噬菌体输出量 (pfu)		相对产量		滴度 (pfu/mL)	
		1 库	2 库	1 库	2 库	1 库	2 库	1 库	2 库
		1	20	5×10 ¹²	2×10 ¹²	1.21×10 ⁴	1.79×10 ⁴	2.42×10 ⁻⁸	8.95×10 ⁻⁸
2	10	5×10 ¹²	2×10 ¹²	1.52×10 ⁵	1.85×10 ⁵	3.04×10 ⁻⁸	9.25×10 ⁻⁸	3.25×10 ¹²	2.51×10 ¹²
3	1	5×10 ¹²	2×10 ¹²	1.47×10 ⁵	1.55×10 ⁵	2.94×10 ⁻⁸	7.75×10 ⁻⁸	5.22×10 ¹³	7.98×10 ¹²

每一轮的筛选大约可以使特异性噬菌体得到 100-1000 倍的富集。富集分析后直接进行单克隆的呈现与鉴定。

3.4.2.2 人源噬菌体库 scfv 序列调取

挑取 300 个单克隆，呈现后通过间接 ELISA 法进行阳性克隆的筛选，同时计算阳性率汇总于表 3-9。

表 3-9 噬菌体单克隆阳性率

Table 3-9 positive rates of phage monoclones

噬菌抗体题库	阳性率
1 库	1.04%
2 库	0.52%

筛选完成后将所获得的 9 株阳性克隆直接进行序列测定，测序结果经 Igbblast Tool 比对后得到 4 株单链抗体轻重链序列可变区 CDR3 区汇总如下表 3-10。

表 3-10 常规免疫抗体可变区序列分析

Table 3-10 sequence analysis of variable region of routine immune antibody

序号	LCDR3	HCDR3
F2-1-C5	CAGGTGTGGGCTGGCAACC	ATTGGCGTTTTAATGGGTCG
	GTAGTAAGTGT	TTCGATCCC
	QVWAGNRSKC	YWRFNGSFDP
F1-2-C6	GCCGCGGATAACGGCCTGGG	TATGGGGTGTATCGGGATTTC
	GCTG	GATGAC
	AADNGLGL	YGVYRDFDD
F2-1-B5	CAGGTGTGGGATGACAACA	CATTCTGTTTTTCGGGTTTCCT
	GTTTGGATCAG	TTCGCTGTC
	QVWDDNSLDQ	HSVFRVPFAV
F2-1-G2	CTCGGCGCATGAGTAGCTTA	CATTTTGGTCATCGTCGTCCT
	GGAT	TTCGCTTAC
	SAHE.LRI	HFGHRRPFAY

通过人源噬菌体库的筛选及呈现获得共计 4 株人源单链抗体，其轻重链可变区的序列，可直接用于开发治疗或诊断 F 型肉毒毒素的小分子靶向制剂的“弹头”，也可以利用其序列联合人源恒定区优化设计以制备全抗，直接作为中和抗体的开发药物应用于临床。

3.5 本章小结

本部分利用两种方式完成了 BoNT/FLHn 鼠源及人源单链抗体的筛选。首先通过两种免疫方式免疫动物，通过尾血效价检测选择免疫效果最好的小鼠用于进一步的细胞融合。继而经过 PEG 的化学刺激及培养基成分的加压筛选培养出可以稳定增殖的杂交瘤细胞，同时利用间接 ELISA 法以杂交瘤细胞的培养上清与免疫抗原 BoNT/FLHn 的亲和力作为筛选指标，得到效价相对较高的稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株。两种免疫方式各获得 5 株。体内诱生制备腹水后，根据抗体亚型选择不同的纯化柱完成抗体的纯化。其中以 IgG 亚型的抗体纯化优势较为明显，另 IgM 型除纯化流程相对复杂外，抗体得率较少。将获

得的全部抗体定量并进行生物学指标的评价。其中各指标优异的抗体以常规免疫所得的 1D6 较为突出,其抗体亚型为 IgG 型,易于纯化,高特异性,亲和力指标达 nmol/L 水平,为可开发应用于临床检测的潜在抗体。

获得鼠源高指标单克隆抗体后,同时利用噬菌体展示手段进行人源 scfv 抗体的直接筛选。间接 ELISA 筛选 3 轮后,通过不断地富集-扩增-洗脱,最终获得高亲和力及特异性的人源单链抗体共 4 株。该人源抗体可通过后续的全抗构建用于临床治疗型抗体及检测型抗体的开发。

4 BoNT/F 肉毒毒素双抗夹心 ELISA 检测方法的建立

4.1 引言

本章旨在完成杂交瘤技术所筛得的鼠源单克隆抗体临床检测试剂开发的初步探究。常规免疫获得的单克隆抗体中 1D6 的亲和力可达到 nmol/L 水平,且高特异性。其免疫抗原是 F 型毒素的 LHn 结构域,结合实验室前期针对毒素中 Hc 端结构域的抗体筛选所获得的高指标 1E2B 单抗^[77],借由两抗体各靶向结合 F 型毒素中的不同区段的特点,本章节试建立双抗夹心 ELISA 检测方法以为开发在临床中检测并定性患者 F 型毒素中毒的试剂盒奠定研究基础。

4.2 实验材料

4.2.1 实验仪器及材料

仪器及材料同 3.2.1.2。

4.2.2 实验试剂

试剂同 3.2.1.3。

4.2.3 溶液配制

溶液配制同 3.2.1.4。

4.3 实验方法

4.3.1 叠加 ELISA 检测双抗体叠加系数

参考实验结果 3.4.1.8,1D6 对筛选抗原 BoNT/FLHn 的亲和力常数指标可达到 7.3×10^{-9} mol/L,另 1E2B 对抗原 BoNT/FHc 的亲和力可达 5.2×10^{-8} mol/L。以 BoNT/F 底物抗原,确定相应饱和抗体浓度,设计叠加 ELISA 实验以摸索并确定两抗体组合的叠加系数,即 A.I 值。

实验设计如下:通过预实验确定两抗体分别对应 BoNT/F 的饱和浓度,以节约用量为标准,设计配对实验。固定量底物抗原 BoNT/F 包板后,分别以 1D6、1E2B 为一抗,1E2B、1D6 为叠加一抗,1E2B、1D6 为一抗,1D6、1E2B 为叠加一抗进行实验。同时设立非叠加组、阴性组(无一抗,以排除二抗与底物抗原的结合影响),空白组作对照,设置三组平行实验。按照次序依次叠加抗体,经酶标仪读数后,根据结果计算 A.I 值,其中 A1、A2、A(1+2)分别指代两抗体非叠加组的吸光度及叠加后的吸光度。具体操作步骤如下表 4-1。

$$A.I = \frac{A(1+2) - \frac{A1+A2}{2}}{A1+A2 - \frac{A1+A2}{2}} \times 100\% = \left(\frac{2A(1+2)}{A1+A2} - 1 \right) \times 100\%$$

表 4-1 叠加 ELISA 操作

Table 4-1 superimposed ELISA operations

步骤	样品	体积	次数	时间
抗原	BoNT/F	100μl/孔	1	1h
封闭	脱脂奶粉	300μl/孔	1	2h
洗涤	PBST	300μl/孔	4	-
一抗	1D6/1E2B	100μl/孔	1	1h
洗涤	PBST	300μl/孔	4	-
叠加一抗	1E2B/1D6	100μl/孔	1	1h
二抗	HRP 羊抗鼠 IgG	100μl/孔	1	1h
洗涤	PBST	300μl/孔	4	-
显色	TMB	100μl/孔	1	5min
终止	H ₂ SO ₄	50μl/孔	1	-

4.3.2 双抗夹心 ELISA 法建立

通过 A.I 值验证两抗体的结合特异性后，建立双抗夹心 ELISA 法，选定 1D6 为捕获抗体，1E2B 为一抗进行实验操作。确定捕获抗体及一抗浓度分别为 1 μg/mL 及 2.5 μg/mL，二抗稀释倍数确定为 1:10000，BoNT/F 以 100 μg/mL 初始浓度 6 倍稀释 11 个梯度，同理设置阴性对照组（不加入 BoNT/F 样品）及空白对照组，平行三组实验。操作步骤如下表 4-2。

表 4-2 双抗夹心 ELISA 法操作

Table 4-2 double antibody sandwich ELISA method

步骤	样品	体积	次数	时间
抗原	1D6	100μl/孔	1	1h
封闭	脱脂奶粉	300μl/孔	1	2h
洗涤	PBST	300μl/孔	4	-
样品	BoNT/F	100μl/孔	1	1h

洗涤	PBST	300μl/孔	4	-
一抗	1E2B	100μl/孔	1	1h
洗涤	PBST	300μl/孔	4	-
二抗	HRP 羊抗鼠 IgG	100μl/孔	1	1h
洗涤	PBST	300μl/孔	4	-
显色	TMB	100μl/孔	1	5min
终止	H2SO4	50μl/孔	1	-

4.3.2.1 夹心 ELISA 法绘制线性标准曲线

酶标仪读数后绘制其标准曲线，继而确定其线性范围，同理绘制线性检测范围的标准曲线。

4.3.3 夹心 ELISA 法评价

4.3.3.1 夹心 ELISA 法灵敏度及重复性检测

利用所建立双抗夹心 ELISA 方法在线性范围内选定同一样品进行多组检测，计算变异系数，操作方法同上 4.3.2。

4.3.3.2 夹心 ELISA 法特异性考察

选用 A、B、E、F 不同血清型的毒素利用该方法进行特异性考察，操作方法同上 4.3.2。

4.3.4 统计学分析

采用 SPSS19 软件包进行统计学分析和曲线拟合，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

4.4 实验结果与分析

4.4.1 叠加 ELISA 叠加系数计算

叠加 ELISA 以验证两抗体是否结合相似抗原决定簇，用 A.I 值判断两种抗体叠加是否有意义。预实验确定饱和抗体浓度后，通过叠加 ELISA 以确定 A.I 值。分别求得两抗体叠加的 A.I 值、A.I 平均值、A.I 变异系数，见表 4-1。

表 4-1 ELISA 叠加系数计算

Table 4-1 calculation of ELISA superposition coefficient

编号	1 次结果	2 次结果	3 次结果	平均值	变异系数
A.I 值 (1D6, 1E2B)	46.6 %	45.9 %	46.2 %	46.2 %	0.6 %
A.I 值 (1E2B, 1D6)	45.0 %	45.6 %	46.0 %	45.5 %	0.9 %

结果可得，变异系数值小于 15%，两抗体结合目的抗原不同决定簇，叠加有意义，

同时选用 1D6 作为捕获抗体以建立双抗夹心 ELISA 法。

4.4.2 双抗夹心 ELISA 标准曲线的绘制及线性区间的确定

按照 4.3.2 方法绘制标准曲线，确定双抗夹心 ELISA 的线性范围见图 4-1 和 4-2。所得该方法线性检测范围是 2.048-32.000 ng/mL，线性方程为 $y=0.043x + 0.348$ ， $R^2=0.991$ 。

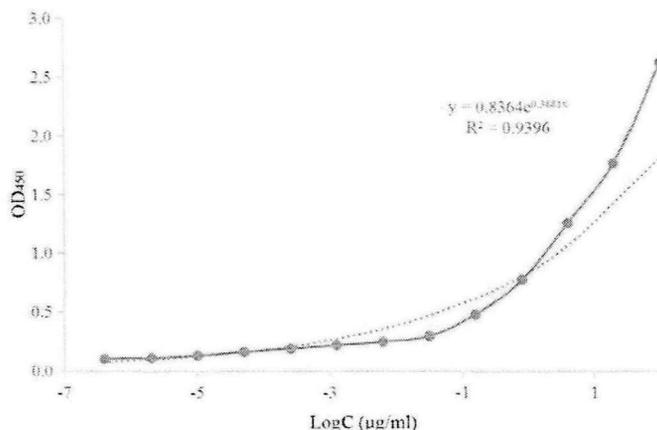


图 4-1 双抗夹心 ELISA 标准曲线

Figure 4-1 double antibody sandwich ELISA standard curve

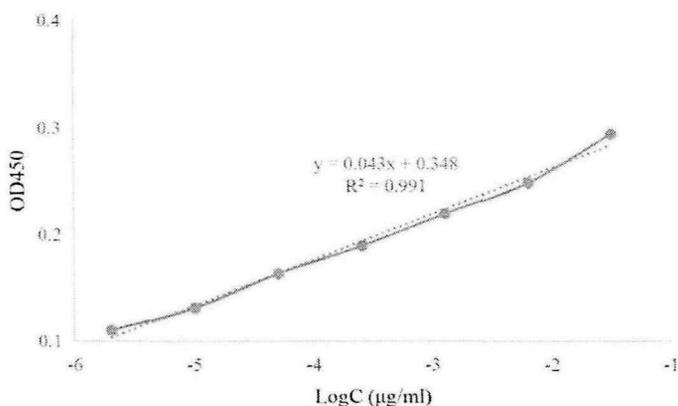


图 4-2 双抗夹心 ELISA 线性检测范围

Figure 4-2 linear detection range of double antibody sandwich ELISA

4.4.3 灵敏度及重复性检测

验证方法灵敏度及重复性可得下表 4-2。

表 4-1 双抗夹心 ELISA 灵敏度及重复性检测

Table 4-1 sensitivity and repeatability of double antibody sandwich ELISA

抗体浓度 (µg/mL)	OD ₄₅₀			平均值	变异系数 (%)
	1 次结果	2 次结果	3 次结果		
1.000	0.833	0.727	0.930	0.830	9.988

2.50×10^{-1}	0.537	0.498	0.662	0.566	12.37
6.25×10^{-2}	0.401	0.307	0.392	0.367	11.55
1.56×10^{-2}	0.263	0.290	0.338	0.297	10.44
3.90×10^{-3}	0.211	0.197	0.243	0.217	8.872
9.77×10^{-4}	0.183	0.157	0.201	0.180	10.02
2.44×10^{-4}	0.152	0.132	0.166	0.150	9.302
6.10×10^{-5}	0.131	0.131	0.148	0.137	5.864
1.53×10^{-5}	0.121	0.130	0.129	0.126	3.586

由表可得，所建立方法灵敏度可达 ng/mL 以上，CV % 介于 3.586%~12.37% 之间，说明实验重复性良好。

4.4.4 特异性考察

采用所建立 BoNT/F 双抗夹心 ELISA 检测方法对不同血清型毒素进行特异性检测，Graphpad Prism 8 软件计算可得 BoNT/A、BoNT/B、BoNT/E 三组均与 BoNT/F 具有显著性差异，遂得出结论：该方法具有良好特异性。

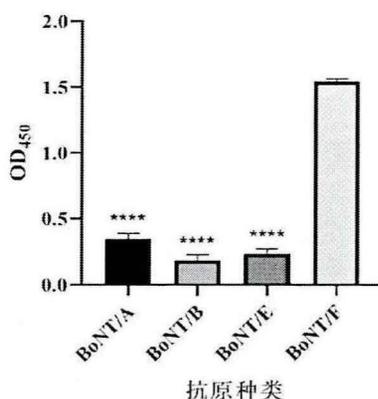


图 4-3 双抗夹心 ELISA 方法特异性考察

Figure 4-3 specificity of double antibody sandwich ELISA method

4.5 本章小结

本部分利用了两株抗体结合 BoNT/F 不同结构域的特点，建立了双抗夹心 ELISA 检测方法。首先通过对目标抗原抗体饱和浓度的摸索确定叠加 ELISA 的最佳抗体浓度，后经 A.I 值验证两抗体结合不同抗原决定簇，得出叠加有意义的结论。遂建立双抗夹心 ELISA 法，通过 A.I 值选定捕获抗体及一抗，将检测样品即 BoNT/F 按照一定浓度梯度稀

释，绘制标准曲线后确定其线性检测区间，经重复性、灵敏度及特异性的考察，完成对所建立方法的统计学验证。

该方法的建立为临床中肉毒毒素中毒血清型的定性检测提供了实验基础，在一定程度上也体现了高亲和力及特异性指标的抗体在临床诊断试剂研究中的开发价值。

讨论

时至今日, 临床中肉毒毒素中毒感染事件仍时有发生, 作为一类危害生物安全的病原微生物, 对其预防、诊断及治疗的研究是尤为重要且必要的。针对于肉毒毒素感染的预防工作, 目前主要依赖疫苗来完成; 诊断一般依据其检验目的分别选用不同方法对其毒力及含量来判定, 其中对肉毒毒素的定性及定量检测以 ELISA 法最为常见; 感染后一般依靠马源抗毒素血清来实现对其毒力的中和作用。但针对于 F 血清型的肉毒毒素感染, 其感染后的诊断及治疗工作并无已报道的特异检验方法及特效中和药物, 且马源血清也由于其自身具有的强大免疫原性限制了包括 F 血清型等其他血清型在临床中的治疗范围, 另也为了避免在临床诊断患者肉毒毒素中毒后, 需对病人进行局部血清试敏的繁冗工作。所以, 本课题通过两种方法进行 F 型肉毒毒素抗体的筛选, 以获取具有高中和、高亲和力、高特异性的抗体为研究目的, 并对其进行生物学活性等其他指标进行评价, 进而判断所得抗体有无作为临床中诊疗试剂的开发潜力。

进行抗体的筛选的前提是获得质量合格的免疫及筛选抗原, 本课题通过基因工程技术成功构建目的片段表达载体, 并利用原核表达系统进行重组蛋白的表达, 借由组氨酸标签与 Ni 柱的亲和力完成对蛋白的纯化。后通过 SDS-PAGE、Western Blot 等技术方法实现对获得重组蛋白的质量评价, 以符合后续对动物免疫及阳性筛选的免疫抗原及筛选抗原的指标要求。

继而, 通过所纯化重组蛋白获得抗体的技术手段分为以下两种:

杂交瘤技术中的关键环节为细胞融合, 需将已免疫抗原的小鼠的脾细胞与对数生长期的 SP2-O 融合。免疫方法文中采用了两种, 各有其优劣势。常规免疫的免疫周期长, 抗原量大, 免疫周期结束后获得的脾细胞多, 筛选抗体的亲和力指标相对较高。而快速免疫也有其特点, 免疫周期短, 免疫抗原使用量小, 更加适合短期内阳性杂交瘤细胞的筛选。两种免疫方式各获得 5 株高指标单克隆抗体, 完成各抗体生物学指标评价后发现, 10 株抗体中以常规免疫所获得的亲和力指标达 nmol/L 的 1D6 最具应用价值。

除杂交瘤技术外, 另采用噬菌体展示技术直接利用两种不同的人源单链噬菌体抗体库进行底物蛋白的固相筛选, 经三轮的筛选流程共获得 4 株高亲和力及特异性指标的人源单链抗体。其优势在于: 人源抗体的免疫原性相较于传统的杂交瘤技术筛得的鼠源抗体具有明显的治疗抗体的开发价值, 若在添加人源恒定区构建全抗后验证存在中和活性, 则可在靶向抗原决定簇治疗疾病的同时, 避免异源性如鼠源单抗所带来的不必要的副作用, 此举极大拓宽了人源抗体的应用前景。同时 scFv 的获得也为后续其朝着诊疗药物的开发提供了前期实验基础, scFv 的应用不仅仅局限于中和抗体即治疗药物的开发, 在如今抗体药物的发展趋势下, scFv 更可以作为靶向目标靶点的“弹头”, 以化学连接或是生物连接的方式与真正的治疗药物结合, 借由其分子量小、且亲和力及药代动力学指标高的优势, 更加易于靶向目的抗原, 且在加速药物发挥药效的同时作为生物成分在体内也更易于代谢和排出, 为当下的热门研究方向。

在两种方法分别获得鼠源单克隆抗体及人源单链抗体后, 为探寻所获全抗有无作为诊疗试剂的开发潜力, 对其中和效价测定后发现并无中和抗体的开发价值, 遂参考所获得抗体的各指标, 选用杂交瘤技术筛选得到的 1D6 联合结合 BoNT/F 中其它结构域的高亲和力抗体, 建立了

双抗夹心 ELISA 法, 在绘制标准曲线后确定了该方法的线性检测范围, 且同时具有统计学意义。

截至目前, 国际上针对肉毒毒素的检测方法可根据检测目的的不同分为活性检测及受体检测两种。其中, ELISA 是目前应用范围最广泛的检测方式, 毒素的检测主要采用夹心 ELISA, 区别于国际上最早确立的 BoNT 的检测方法——小鼠生物学试验法, 该方法的敏感度极高, 并可用于毒素的定量, 且在 2001 年由华盛顿大学食品研究所及美国 CDC、FDA 共同建立的可检测 BoNT/A, B, E 的双抗夹心 ELISA 方法已经获得国际分析科学家联合会批准, 成为第二个检测 BoNT 的国际认可的标准方法。

但肉毒毒素临床检测方法的开发也逐渐多元化, 除 ELISA 外, 核酸检测技术也日益受到人们的关注, 更有方法联结 PCR 技术及 ELISA 方法, 推出 PCR-ELISA, 利用微孔板, 即 ELISA 的反应载体, 进行大批量的样品检测, 其优势在于: 载样量大的同时对实验仪器的需求也较为简单, 仅需要 PCR 仪及酶标仪。该方法虽适用范围广, 但仍存局限。针对其操作相对繁琐的短板, 未来如何将该技术自动化也就成为了一个亟待解决的问题。

综上, 本课题通过传统杂交瘤技术筛得 1 株检测性鼠抗 1D6, 并对比了细胞融合前期动物免疫方式的优劣, 又在后续的抗体纯化过程中对于不同亚型抗体的纯化工作进行了类比分析。与此同时, 也利用现有人源抗体噬菌体展示库, 通过纯化所得的重组抗原直接进行人源抗体的筛选, 此举可谓是减免了许多中和鼠源抗体面向临床需要解决的繁冗操作——人源化, 也极大增强了后续单链抗体具有诊疗试剂潜力的开发价值。

最终, 利用采用最具开发价值的特异性靶向 BoNT/FLHn 结构域的高指标抗体, 联合实验室前期筛得靶向 BoNT/FHc 结构域的另一 1E2B 抗体, 建立针对 BoNT/F 的双抗夹心 ELISA 法, 并对其进行初步的方法学验证。该检测方法的建立为针对 F 血清型 BoNT 中毒的临床检测奠定了前期实验基础, 也为后续临床中不同检测方法的开发提供了实验参考。

结论

F 型单克隆抗体的筛选及生物学活性评价的结论可分为以下几个方面：

(1) 采用杂交瘤技术直接制备两种免疫方式小鼠的鼠源抗体，共得 10 株能稳定分泌抗体的细胞株，获得了一株亲和力常数为 7.3×10^{-9} mol/L 的检测性抗体。

(2) 利用噬菌体展示库的方法直接获得高特异性高亲和力的 4 株人源单链抗体序列，可用于人源全抗的制备。

(3) 借由筛得检测性抗体联合靶向 BoNT/F 不同结构域的 1E2B 建立高灵敏度双抗夹心 ELISA 法。

综上，本课题通过对鼠源及人源抗体的筛选和生物学指标的评价，获得了 10 株可与 BoNT/FLHn 结构域靶向结合的高指标抗体和 4 株高特异性的 scfv。为获得所筛得抗体的更大开发价值，选用亲和力指标达 nmol/L 的 1D6 联合实验室前期获得的针对 F 型毒素的另一单抗 1E2B，完成了双抗夹心 ELISA 检测方法的建立。

参考文献

- [1] Lam S M. The Basic Science of Botulinum Toxin[J]. Facial plastic surgery clinics of North America, 2003, 11(4): 431-438.
- [2] Hill K K, Smith T J. Genetic Diversity within Clostridium Botulinum Serotypes, Botulinum Neurotoxin Gene Clusters and Toxin Subtypes[J]. Current topics in microbiology and immunology, 2013, 364: 1-20.
- [3] Kreyden O P, Geiges M L, Böni R, et al. Botulinum Toxin: From Poison to Drug. A Historical Review[J]. Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete, 2000, 51(10): 733-737.
- [4] Dong M, Masuyer G, Stenmark P. Botulinum and Tetanus Neurotoxins[J]. Annual review of biochemistry, 2019, 88: 811-837.
- [5] Kammerer R A, Benoit R M. Botulinum Neurotoxins: New Questions Arising from Structural Biology[J]. Trends in biochemical sciences, 2014, 39(11): 517-526.
- [6] Simpson L. The Life History of a Botulinum Toxin Molecule[J]. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, 2013, 68: 40-59.
- [7] Simpson L L. Identification of the Major Steps in Botulinum Toxin Action[J]. Annual review of pharmacology and toxicology, 2004, 44: 167-193.
- [8] Lalli G, Bohnert S, Deinhardt K, et al. The Journey of Tetanus and Botulinum Neurotoxins in Neurons[J]. Trends in microbiology, 2003, 11(9): 431-437.
- [9] Matak I, Lacković Z. Botulinum Neurotoxin Type A: Actions Beyond Snap-25[J]. Toxicology, 2015, 335: 79-84.
- [10] Matsumura T, Sugawara Y, Yutani M, et al. Botulinum Toxin a Complex Exploits Intestinal M Cells to Enter the Host and Exert Neurotoxicity[J]. Nature communications, 2015, 6: 6255.
- [11] Argoff C E. A Focused Review on the Use of Botulinum Toxins for Neuropathic Pain[J]. The Clinical journal of pain, 2002, 18(6 Suppl): 177-181.
- [12] Yu Y Z, Zhang S M, Ma Y, et al. Development and Evaluation of Candidate Vaccine and Antitoxin against Botulinum Neurotoxin Serotype F[J]. Clinical immunology (Orlando, Fla), 2010, 137(2): 271-280.
- [13] Scott V L, Villarreal D O, Hutnick N A, et al. DNA Vaccines Targeting Heavy Chain C-Terminal Fragments of Clostridium Botulinum Neurotoxin Serotypes a, B, and E Induce Potent Humoral and Cellular Immunity and Provide Protection from Lethal Toxin Challenge[J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2015, 11(8): 1961-1971.
- [14] Chalk C H, Benstead T J, Pound J D, et al. Medical Treatment for Botulism[J]. The Cochrane database of systematic reviews, 2019, 4(4): Cd008123.
- [15] Hakami R M, Ruthel G, Stahl A M, et al. Gaining Ground: Assays for Therapeutics against

- Botulinum Neurotoxin[J]. Trends in microbiology, 2010, 18(4): 164-172.
- [16]游哲荣, 王景林. 肉毒毒素疫苗及治疗性抗体的研究进展[J]. 军事医学, 2013, 37(07): 550-554.
- [17]Pirazzini M, Rossetto O. Challenges in Searching for Therapeutics against Botulinum Neurotoxins[J]. Expert opinion on drug discovery, 2017, 12(5): 497-510.
- [18]Hifumi T, Yamamoto A, Ato M, et al. Clinical Serum Therapy: Benefits, Cautions, and Potential Applications[J]. The Keio journal of medicine, 2017, 66(4): 57-64.
- [19]Kim N Y, Ahn H B, Yu C H, et al. Intradermal Immunization with Botulinum Neurotoxin Serotype E DNA Vaccine Induces Humoral and Cellular Immunity and Protects against Lethal Toxin Challenge[J]. Human vaccines & immunotherapeutics, 2019, 15(2): 412-419.
- [20]Griese S E, Kisselburgh H M, Bartenfeld M T, et al. Pediatric Botulism and Use of Equine Botulinum Antitoxin in Children: A Systematic Review[J]. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2017, 66(suppl-1): 17-29.
- [21]Parrera G S, Astacio H, Tunga P, et al. Use of Botulism Antitoxin Heptavalent (a, B, C, D, E, F, G)-(Equine) (Bat(®)) in Clinical Study Subjects and Patients: A 15-Year Systematic Safety Review[J]. Toxins, 2021, 14(1): 19.
- [22]Arnon S S, Schechter R, Inglesby T V, et al. Botulinum Toxin as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management[J]. Jama, 2001, 285(8): 1059-1070.
- [23]左庭婷. 肉毒毒素的中毒和检测方法[J]. 微生物学免疫学进展, 2003, (02): 87-90.
- [24]Evans E R, Skipper P J, Shone C C. An Assay for Botulinum Toxin Types a, B and F That Requires Both Functional Binding and Catalytic Activities within the Neurotoxin[J]. Journal of applied microbiology, 2009, 107(4): 1384-1391.
- [25]Lindström M, Korkeala H. Laboratory Diagnostics of Botulism[J]. Clinical microbiology reviews, 2006, 19(2): 298-314.
- [26]康琳, 王景林. 肉毒梭菌神经毒素检测技术的研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2008, (04): 386-389.
- [27]郭素珍. 首例 f 型肉毒毒素引起的婴儿肉毒中毒[J]. 国外医学(微生物学分册), 1981, (06): 284.
- [28]黄才胜. 人类肉毒中毒(F 型)——一种罕见的类型[J]. 海南卫生, 1984, (02): 66-67.
- [29]Kalb S R, Baudys J, Webb R P, et al. Discovery of a Novel Enzymatic Cleavage Site for Botulinum Neurotoxin F5[J]. FEBS letters, 2012, 586(2): 109-115.
- [30]Guo J, Chen S. Expression and Biochemical Characterization of Light Chains of Botulinum Neurotoxin Subtypes F5 and F7[J]. Protein expression and purification, 2015, 111: 87-90.
- [31]Guo J, Chan E W, Chen S. Comparative Characterization of Botulinum Neurotoxin Subtypes F1 and F7 Featuring Differential Substrate Recognition and Cleavage Mechanisms[J]. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, 2016, 111: 77-85.
- [32]Chauhan R, Chauhan V, Sonkar P, et al. Targeted 8-Hydroxyquinoline Fragment Based Small

- Molecule Drug Discovery against Neglected Botulinum Neurotoxin Type F[J]. *Bioorganic chemistry*, 2019, 92: 103297.
- [33]Fan Y, Garcia-Rodriguez C, Lou J, et al. A Three Monoclonal Antibody Combination Potently Neutralizes Multiple Botulinum Neurotoxin Serotype F Subtypes[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174187.
- [34]付志浩, 徐刚领, 黄璟, 等. 单克隆抗体药物研发进展[J]. *中国药事*, 2021, 35(11): 1253-1268.
- [35]Buss N A, Henderson S J, McFarlane M, et al. Monoclonal Antibody Therapeutics: History and Future[J]. *Current opinion in pharmacology*, 2012, 12(5): 615-622.
- [36]Ecker D M, Jones S D, Levine H L. The Therapeutic Monoclonal Antibody Market[J]. *mAbs*, 2015, 7(1): 9-14.
- [37]Maggon K. Monoclonal Antibody "Gold Rush"[J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(18): 1978-1987.
- [38]Safdar A, Butt M H, Ahmad A, et al. Progress in Oncology Biosimilars Till 2020: Scrutinizing Comparative Studies of Biosimilar Monoclonal Antibodies[J]. *Journal of oncology pharmacy practice : official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*, 2021, 27(5): 1195-1204.
- [39]Xia Z N, Cai X T, Cao P. Monoclonal Antibody: The Corner Stone of Modern Biotherapeutics[J]. *Acta pharmaceutica Sinica*, 2012, 47(10): 1275-1280.
- [40]El Abd Y, Tabll A, Smolic R, et al. Mini-Review: The Market Growth of Diagnostic and Therapeutic Monoclonal Antibodies; Sars Cov-2 an Example[J]. *Human antibodies*, 2021, 30(1): 15-24.
- [41]Grilo A L, Mantalaris A. The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market[J]. *Trends in biotechnology*, 2019, 37(1): 9-16.
- [42]陈玉琴, 沈琦. FDA 在审批上市新抗体药物及生物类似药方面的进展[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(14): 1604-1609+1647.
- [43]Köhler G, Howe S C, Milstein C. Fusion between Immunoglobulin-Secreting and Nonsecreting Myeloma Cell Lines[J]. *European journal of immunology*, 1976, 6(4): 292-295.
- [44]Daugherty A L, Mrsny R J. Formulation and Delivery Issues for Monoclonal Antibody Therapeutics[J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2006, 58(5-6): 686-706.
- [45]Gupta K, Parasnis M, Jain R, et al. Vector-Related Stratagems for Enhanced Monoclonal Antibody Production in Mammalian Cells[J]. *Biotechnology advances*, 2019, 37(8): 107415.
- [46]Pedrioli A, Oxenius A. Single B Cell Technologies for Monoclonal Antibody Discovery[J]. *Trends in immunology*, 2021, 42(12): 1143-1158.
- [47]刘曦. 单克隆抗体的制备现状及应用前景[J]. *化工设计通讯*, 2016, 42(04): 200.
- [48]Wittrup K D. Phage on Display[J]. *Trends in biotechnology*, 1999, 17(11): 423-424.
- [49]Staquicini F I, Sidman R L, Arap W, et al. Phage Display Technology for Stem Cell Delivery and Systemic Therapy[J]. *Advanced drug delivery reviews*, 2010, 62(12): 1213-1216.

- [50]史云龙, 刘永明. 噬菌体展示随机肽库技术的医学研究应用[J]. 华夏医学, 2016, 29(03): 171-175.
- [51]Shim H. Therapeutic Antibodies by Phage Display[J]. Current pharmaceutical design, 2016, 22(43): 6538-6559.
- [52]Cortese R, Felici F, Galfre G, et al. Epitope Discovery Using Peptide Libraries Displayed on Phage[J]. Trends in biotechnology, 1994, 12(7): 262-267.
- [53]李书成, 韩宁, 李翀. 抗体库技术研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(02): 278-284.
- [54]Nagano K, Tsutsumi Y. Phage Display Technology as a Powerful Platform for Antibody Drug Discovery[J]. Viruses, 2021, 13(2): 178.
- [55]Pande J, Szewczyk M M, Grover A K. Phage Display: Concept, Innovations, Applications and Future[J]. Biotechnology advances, 2010, 28(6): 849-858.
- [56]Conrad U, Scheller J. Considerations on Antibody-Phage Display Methodology[J]. Combinatorial chemistry & high throughput screening, 2005, 8(2): 117-126.
- [57]Petropoulos K. Phage Display[J]. Methods Mol Biol, 2012, 901: 33-51.
- [58]Shim H. Antibody Phage Display[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1053: 21-34.
- [59]王春雨, 孙宗志. 人血红蛋白单克隆抗体 elisa 在种属检验中应用. 首届中国法医物证学术交流会, 中国江苏无锡, 1993.
- [60]Hu Y, Hou J, Feng Y Q, et al. [Establishment and Evaluation of the Diagnostic Kit for Anti-Hiv1/2 Antibody and P24 Antigen][J]. Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology, 2007, 21(4): 391-393.
- [61]Mizutani N, Abe M, Matsuoka S, et al. Establishment of Anti-Mesothelioma Monoclonal Antibodies[J]. BMC research notes, 2016, 9: 324.
- [62]金涌. 单克隆抗体技术及其在食品卫生检验中的应用[J]. 农牧产品开发, 2001, 05: 9-12.
- [63]梁景青, 郭晋荣, 王大力, 杜文平. 单克隆抗体在微量人体组织血型检验中的应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1994, 02: 64-66.
- [64]Matsumura T, Amatsu S, Misaki R, et al. Fully Human Monoclonal Antibodies Effectively Neutralizing Botulinum Neurotoxin Serotype B[J]. Toxins, 2020, 12(5): 302.
- [65]Mirjalili S Z, Sabourian R, Sadeghalvad M, et al. Therapeutic Applications of Biosimilar Monoclonal Antibodies: Systematic Review of the Efficacy, Safety, and Immunogenicity in Autoimmune Disorders[J]. International immunopharmacology, 2021, 101(Pt B): 108305.
- [66]Corti D, Purcell L A, Snell G, et al. Tackling Covid-19 with Neutralizing Monoclonal Antibodies[J]. Cell, 2021, 184(12): 3086-3108.
- [67]Hansel T T, Kropshofer H, Singer T, et al. The Safety and Side Effects of Monoclonal Antibodies[J]. Nature reviews Drug discovery, 2010, 9(4): 325-338.
- [68]Jaworski J P, Cahn P. Preventive and Therapeutic Features of Broadly Neutralising Monoclonal Antibodies against Hiv-1[J]. The lancet HIV, 2018, 5(12): 723-731.

- [69]Li M, Lee D, Obi C R, et al. An Ambient Temperature-Stable Antitoxin of Nine Co-Formulated Antibodies for Botulism Caused by Serotypes a, B and E[J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0197011.
- [70]姚雪静. 抗体药物偶联物的研究进展[J]. 中外医学研究, 2020, 18(12): 185-188.
- [71]Nelson A L, Dhimolea E, Reichert J M. Development Trends for Human Monoclonal Antibody Therapeutics[J]. Nature reviews Drug discovery, 2010, 9(10): 767-774.
- [72]Rodgers K R, Chou R C. Therapeutic Monoclonal Antibodies and Derivatives: Historical Perspectives and Future Directions[J]. Biotechnology advances, 2016, 34(6): 1149-1158.
- [73]Yau K Y, Lee H, Hall J C. Emerging Trends in the Synthesis and Improvement of Hapten-Specific Recombinant Antibodies[J]. Biotechnology advances, 2003, 21(7): 599-637.
- [74]Beck A, Goetsch L, Dumontet C, et al. Strategies and Challenges for the Next Generation of Antibody-Drug Conjugates[J]. Nature reviews Drug discovery, 2017, 16(5): 315-337.
- [75]Weiner G J. Building Better Monoclonal Antibody-Based Therapeutics[J]. Nature reviews Cancer, 2015, 15(6): 361-370.
- [76]Zhou H, Mascelli M A. Mechanisms of Monoclonal Antibody-Drug Interactions[J]. Annual review of pharmacology and toxicology, 2011, 51: 359-372.
- [77]许永亮. F 型肉毒毒素单克隆抗体的制备及鉴定[D]. 辽宁大学, 2020.

附录

英文缩略词表

缩略词	中文全称	英文全称
Amp	氨苄青霉素	ampicillin
BoNT	肉毒毒素	botulinum neurotoxins
BoNT /F	F 型肉毒毒素	botulinum neurotoxins type F
bp	碱基对	base pair
CDR	互补性决定区	complementary determining region
ELISA	酶联免疫吸附实验	Enzyme-linked immunosorbent assay
FR	骨架区	framework region
HRP	辣根过氧化物酶	Horseradish peroxidase
IPTG	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷	isopropyl thio- β -D-galactoride
Kan	卡那霉素	kanamycin
kDa	千道尔顿	kilodalton
LD50	半数致死剂量	50% Lethal Dose
OD	吸光度	optical density
SDS	十二烷基硫酸钠	sodium dodecyl sulfate
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	聚合酶链式反应	polymerase chain reaction
TMB	3,3',5,5'-四甲基联苯胺	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

攻读学位期间发表的学术论文

- [1] 马骏池,赵晋彤,高世勇,贾绍华,张秀娟.五味子乙素提纯工艺及药理作用研究进展[J/OL].中国现代中药:1-18[2022-03-10].
- [2] 张秀娟,马骏池,赵晋彤,高世勇.小檗碱对肠道菌群作用的研究进展[J].食品工业科技,2020,41(23):359-363.

致谢

时光荏苒，回看三年学习生涯，幸得良师，亦获益友。一直以来，承蒙各位老师的关心及帮助，无论是生活上的关切，还是实验方面的点拨。感谢高世勇导师的帮助，也同样感谢张秀娟教授的悉心教导，更有进修单位军事医学研究院生物工程研究所的全部导师：张惟材老师、熊向华老师、薛冲老师的无私帮助，在提供更为优渥的科研资源的同时更让我感受到了人情温暖。多年积累，倾囊相授，既是良师，又是益友，短短两年时光，所获良多，这一切都让我心怀感恩。

道阻且长，行则将至。我必定谨遵各位老师的教诲，砥砺前行，不辱使命。

最后，衷心祝愿所有帮助过我的人们，希望你们幸福、平安。