

分类号 Q71

学号 200611B052

U D C

密级 公开

军事科学院

博士学位论文

蓖麻毒素全人源 DMAb 抗体中和活性研究
Study of anti-ricin toxin fully human DMAb neutralizing activity

作者姓名	<u>于昊天</u>
学科专业	<u>基础兽医学</u>
学位类型	<u>学术学位</u>
指导教师	<u>刘文森 许娜</u>
答辩主席	<u>任林柱</u>
学位授予单位	<u>军事科学院</u>
论文提交日期	<u>2023 年 5 月 31 日</u>

目 录

前言.....	1
1 蓖麻毒素研究进展.....	1
1.1 蓖麻毒素的理化性质和分子结构.....	1
1.2 蓖麻毒素的毒性机制.....	2
2 蓖麻毒素中和抗体概述.....	4
2.1 结合不同亚基的蓖麻毒素中和抗体.....	5
2.2 不同改造策略的蓖麻毒素中和抗体.....	7
3 DMAb 研究进展.....	10
3.1 DMAb 体内递送.....	10
3.2 DMAb 体内表达人源 IgG.....	12
3.3 DMAb 生物安全性.....	13
4 单细胞测序技术概述.....	14
第一章 蓖麻毒素免疫 B 细胞转录组和受体库研究.....	15
1.1 实验材料及仪器.....	15
1.1.1 实验主要试剂.....	15
1.1.2 主要仪器及设备.....	16
1.1.3 主要溶液配制.....	16
1.1.4 数据库及软件.....	17
1.1.5 实验动物.....	17
1.2 实验方法.....	17
1.2.1 动物免疫.....	17
1.2.2 总 B 细胞制备.....	19
1.2.3 样本测序和初步分析.....	20
1.2.4 转录组数据分析.....	20
1.2.5 BCR 数据分析.....	21
1.3 实验结果.....	22
1.3.1 总 B 细胞制备.....	22
1.3.2 测序数据初步分析.....	23
1.3.3 细胞类型及表达分析.....	25
1.3.4 MBC 测序数据分析.....	27
1.3.5 BCR 特征分析.....	33
1.4 讨论.....	39
1.5 小结.....	40
第二章 全人源抗蓖麻毒素中和抗体制备和鉴定.....	41

2.1 实验材料及仪器.....	41
2.1.1 实验主要试剂.....	41
2.1.2 主要仪器及设备.....	42
2.1.3 主要溶液配制.....	42
2.1.4 数据库及软件.....	43
2.1.5 实验动物及细胞株.....	44
2.2 实验方法.....	44
2.2.1 动物免疫.....	44
2.2.2 抗体制备.....	44
2.2.3 抗体基本信息鉴定.....	46
2.2.4 抗体对蓖麻毒素结合活性鉴定.....	50
2.2.5 抗体对蓖麻毒素中和活性鉴定.....	52
2.3 实验结果.....	54
2.3.1 抗体制备和基本信息鉴定.....	54
2.3.2 抗体对蓖麻毒素结合活性鉴定.....	57
2.3.3 抗体对蓖麻毒素中和活性鉴定.....	60
2.4 讨论.....	62
2.5 小结.....	64
第三章 DMAb 预防蓖麻毒素中毒研究.....	65
3.1 实验材料及仪器.....	65
3.1.1 实验主要试剂.....	65
3.1.2 主要仪器及设备.....	66
3.1.3 主要溶液配制.....	66
3.1.4 实验动物及细胞株.....	67
3.1.5 抗体序列.....	67
3.2 实验方法.....	68
3.2.1 DMAb 制备和鉴定.....	68
3.2.2 DMAb 电转染.....	69
3.2.3 DMAb 抗体分泌能力鉴定.....	70
3.2.4 DMAb 体内攻毒保护实验.....	71
3.2.5 DMAb 电转染安全性评价.....	72
3.3 实验结果.....	73
3.3.1 DMAb 抗体分泌能力鉴定.....	73
3.3.2 DMAb 体内攻毒保护实验.....	75
3.3.3 DMAb 电转染安全性评价.....	77
3.4 讨论.....	81
3.5 小结.....	82
第四章 全人源抗蓖麻毒素抗体保护机制探究.....	83

4.1 实验材料及仪器.....	83
4.1.1 实验主要试剂.....	83
4.1.2 主要仪器及设备.....	84
4.1.3 主要溶液配制.....	84
4.1.4 数据库及软件.....	85
4.1.5 细胞株.....	85
4.2 实验方法.....	85
4.2.1 蓖麻毒素的亚细胞定位.....	85
4.2.2 抗体阻碍 PDI 水解蓖麻毒素二硫键	87
4.2.3 抗原抗体复合物结构预测.....	88
4.3 实验结果.....	89
4.3.1 抗体阻碍蓖麻毒素逆向转运.....	89
4.3.2 抗体阻碍 PDI 水解蓖麻毒素二硫键	90
4.3.3 抗原抗体复合物结构预测.....	91
4.4 讨论.....	95
4.5 小结.....	96
第五章 结论与展望	97
结论.....	97
展望.....	97
参考文献.....	99

表 目 录

表 1.1 分子对接 BCR 克隆型信息汇总	38
表 2.1 SDS-PAGE 凝胶配制体系	47
表 2.2 逆转录反应体系	48
表 2.3 PCR 反应体系	49
表 2.4 引物列表	49
表 2.5 琼脂糖凝胶配制体系	50
表 2.6 抗体基本信息汇总	58
表 3.1 双酶切反应体系	69
表 4.1 抗体阻断 PDI 水解蓖麻毒素二硫键反应体系	87

图 目 录

图 1 蓖麻毒素在胞内逆向转运示意图	3
图 2 蓖麻毒素中和性抗原表位示意图	4
图 1.1 单细胞测序实验流程示意图	23
图 1.2 免疫后血清效价和 B 细胞分选	23
图 1.3 线粒体占比相关性分析	24
图 1.4 UMAP 降维及初步聚类分析	24
图 1.5 细胞类型初步分析	25
图 1.6 不同类型细胞转录组分析	26
图 1.7 根据表面标志物分类 B 细胞	27
图 1.8 根据拟时序分析分类 B 细胞	28
图 1.9 B 细胞分类和数量	29
图 1.10 细胞轨迹验证 B 细胞分型	29
图 1.11 B 细胞转录因子分析	30
图 1.12 MBC 标志物表达情况	31
图 1.13 基因功能富集分析	32
图 1.14 基因信号通路富集分析	32
图 1.15 轻重链 V 基因和 J 基因使用频率	33
图 1.16 BCR Cluster 和 Cluster Overlap 分析	34
图 1.17 CDR3 长度和 V 基因使用分布	35
图 1.18 CDR3 长度和组成分析	35
图 1.19 抗体重链可变区和蓖麻毒素分子建模	36
图 1.20 蓖麻毒素免疫优势表位与中和性表位	37
图 2.1 杂交瘤细胞的筛选和鉴定	54
图 2.2 Protein G 亲和层析纯化曲线	55
图 2.3 SDS-PAGE 鉴定抗体纯度	55
图 2.4 抗体 IgG 亚型鉴定	56
图 2.5 琼脂糖凝胶电泳鉴定抗体轻重链可变区	56
图 2.6 抗体轻重链可变区比对	57
图 2.7 ELISA 鉴定抗体对蓖麻毒素特异性结合	57
图 2.8 竞争性 ELISA 鉴定抗体对蓖麻毒素亚基的结合	59
图 2.9 竞争性 ELISA 分析抗体表位	59

图 2.10 MTT 评价抗体对蓖麻毒素的中和活性	60
图 2.11 注射蓖麻毒素后小鼠生存率	61
图 2.12 注射蓖麻毒素后小鼠体重和血糖变化	61
图 2.13 注射蓖麻毒素后小鼠脏器病理变化	62
图 3.1 DMAb 构建和鉴定	73
图 3.2 DMAb 转染 HEK 293T 细胞	74
图 3.3 转染 DMAb 后小鼠腓肠肌间绿色荧光	74
图 3.4 转染 DMAb 后小鼠体内抗体水平与分布	75
图 3.5 注射蓖麻毒素后小鼠生存率	76
图 3.6 注射蓖麻毒素后小鼠体重和血糖变化	76
图 3.7 注射蓖麻毒素后小鼠脏器病理变化	77
图 3.8 转染 DMAb-IgG 后小鼠血常规指标	78
图 3.9 转染 DMAb-IgG 后小鼠腓肠肌间中性粒细胞	78
图 3.10 电转染后小鼠腓肠肌病理变化	79
图 3.11 电转染后小鼠肝脏病理变化	79
图 3.12 电转染后小鼠脾脏病理变化	80
图 3.13 电转染后小鼠肾脏病理变化	80
图 4.1 抗体阻碍蓖麻毒素在高尔基体驻留	89
图 4.2 抗体增加蓖麻毒素在早期内体中累积	90
图 4.3 抗体阻碍 PDI 水解蓖麻毒素二硫键	91
图 4.4 抗体 4-4E 的同源建模信息	92
图 4.5 抗体 4-4E 模型的拉式图	92
图 4.6 可视化 ZDOCK 结果	93
图 4.7 抗体 4-4E 和蓖麻毒素对接模型	94
图 4.8 抗体 4-4E 和蓖麻毒素结合关键氨基酸	94

缩略语表

英文缩写	英文全称	中文名称
ADA	Anti-drug antibody	抗药抗体
AP	Ammonium Persulphate	过硫酸铵
ATCC	American Type Culture Collection	美国模式培养物集存库
BCR	B cell receptor	B 细胞受体
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BsAb	Bispecific Antibody	双特异性抗体
BP	Biological Process	生物过程
CC	Cell Components	细胞组分
CD	Clusters of Differentiation	分化簇
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
CDR	Complementarity-Determining Regions	互补决定簇
CSR	Class switch recombination	类开关重组
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DMAb	DNA encoded monoclonal antibody	DNA 编码单克隆抗体
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbecco 改良 Eagle 培养基
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
EE	Early Endosome	早期内体
EC ₅₀	Half maximal effective concentration	半数最大效应浓度
ERAD	ER-associated protein degradation	内质网参与的蛋白降解
ERK	Extracellular regulated protein kinases	细胞外调节蛋白激酶
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	增强的绿色荧光蛋白
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
Fab	Antigen-binding fragment	抗原结合片段
Fc	Fragment crystallizable	可结晶片段
GO	Gene ontology	基因本体
HAMA	Human Anti-Mouse Antibody	人抗鼠抗体
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
HE	Hematoxylin-Eosin	苏木精-伊红
HEK	Human Embryonic Kidney	人胚肾细胞

IBC	Immature B Cell	不成熟 B 细胞
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	半抑制浓度
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IL	Interleukin	白细胞介素
IRES	Internal ribosome entry site	内部核糖体进入位点
JNK	c-Jun N-terminal kinase	氨基末端激酶
Kan	Kanamycin	卡那霉素
LD ₅₀	Median lethal dose	半数致死量
mAb	Monoclonal Antibody	单克隆抗体
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
MBC	Memory B Cell	记忆 B 细胞
MF	Molecular Function	分子功能
MHC	Major Histocompatibility Complex	主要组织相容性复合体
MNN	Mutual Nearest Neighbor	互近邻
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	还原型辅酶II
NBC	Naïve B Cell	初始 B 细胞
NF-κB	Nuclear factor κB	核因子κB
MTT	Methyl Thiazolyl Tetrazolium	噻唑蓝
PBS	Phosphate Buffer Solution	磷酸盐缓冲液
PCA	Principal Component Analysis	主成分分析
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluorid	苯甲基磺酰氟
RIP	Ribosome inactivating protein	核糖体失活蛋白
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay	放射免疫沉淀法
RT	Ricin Toxin	蓖麻毒素
RTA	Ricin Toxin A chain	蓖麻毒素 A 亚基
RTB	Ricin Toxin B chain	蓖麻毒素 B 亚基
RMSD	Root Mean Square Deviation	均方根偏差
SCENIC	Single-cell regulatory network inference and clustering	单细胞转录因子分析

ScFv	Single chain fragment variable	单链可变区片段
SdAb	Single-domain antibody	单域抗体
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
SHM	Somatic hypermutation	体细胞高频突变
SPF	Specific Pathogen Free	无特定病原体
TGN	Trans Golgi Network	反面高尔基体管网状结构
TLR4	Toll-like receptor 4	Toll 样受体 4
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
TrxR	Thioredoxin Reductase	硫氧还蛋白还原酶
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection	统一流形逼近与投影

摘要

蓖麻毒素 (ricin toxin, RT) 提取自蓖麻 (*Ricinus communis*) 植物种子, 属于 II 型核糖体失活蛋白 (ribosome inactivating protein, RIP), 可以通过吞食、注射以及吸入等多种摄入途径导致急性中毒。蓖麻在全球各地被大量种植, 其工业产物蓖麻油的生产废料中含有 5% 的剧毒 RT。RT 由于毒性剧烈, 且来源广泛, 对社会公共安全有着潜在威胁, 所以已被国际社会列为 B 类生物管控物质。RT 含有 541 个氨基酸, 分子量约为 60~64 kDa, 全毒素由蓖麻毒素 A 亚基 (ricin toxin A chain, RTA) 和蓖麻毒素 B 亚基 (ricin toxin B chain, RTB) 组成。RTA 亚基具有 N-糖苷酶活性, RTB 亚基具有半乳糖残基结合活性, 入胞后两个亚基协同作用, 沿高尔基体-内质网腔逆向转运, 最终使核糖体失活。RT 中和抗体研究是针对 RT 中毒防治的主要研究热点, 但是还一直处于实验室和临床研究阶段, 对于 RT 免疫优势表位和中和性表位缺乏初步认识; 鼠源抗 RT 抗体会引起人抗鼠抗体 (human anti-mouse antibody, HAMA) 过敏性反应; 抗体药物在靶组织难摄取, 体内清除率高, 需要多次给药, 因此, RT 抗体药物的新形式和递送抗体药物的新方法亟需开展进一步研究。

本研究通过单细胞测序技术对 RT 免疫的全人源抗体转基因小鼠脾脏 B 细胞转录组和 B 细胞受体 (B cell receptor, BCR) 库测序并分析数据, 利用杂交瘤技术筛选和鉴定全人源 RT 中和抗体, 通过 DNA 编码单克隆抗体 (DNA encoded monoclonal antibody, DMAb) 技术研究在体内分泌中和抗体和 RT 中毒小鼠的保护作用。

1. RT 免疫 B 细胞转录组和受体库研究

利用 RT 类毒素免疫全人源抗体转基因小鼠, 通过单细胞测序对其脾脏 B 细胞进行转录组和 BCR 受体库测序并进行数据分析。单细胞转录组数据分析结果发现 17 种脾脏记忆 B 细胞 (memory B cell, MBC) 新标志物, 脾脏 MBC 在 RT 类毒素免疫后翻译相关功能和免疫相关信号通路显著上调。BCR 受体库数据分析结果显示, 脾脏 B 细胞 V 基因中 IGHV1-2 和 IGKV3-20 使用频率最高, J 基因中 IGHJ4、IGKJ1 和 IGKJ4 使用频率最高, VDJ 基因搭配形式中 IGKJ4-none-IGHV1-2 和 IGKJ4-none-IGHV6-1 使用频率最高。免疫组 MBC 中 BCR CDR3 氨基酸组成分析结果显示, 重链和轻链可变区的 CDR3 基本组成形式分别为 CARFDYW 和 CQQY-S-P-TF。通过对免疫组 MBC 的 20 个主要克隆型 IGH 进行同源建模和抗原抗体模拟对接, 结果显示, RT 的免疫优势表位与中和性抗原表位存在

明显差别,提示弱结合力抗体的中和功能潜力。

2. 全人源抗 RT 中和抗体制备和鉴定

通过全人源抗体转基因小鼠,利用杂交瘤技术筛选和制备特异性针对 RT 的全人源中和抗体。鉴定结果显示,10 株抗 RT 单克隆抗体全部为全人源序列,其中包含 3 株特异性结合 RTA 抗体,2 株特异性结合 RTB 抗体,5 株对 RTA 和 RTB 均有结合的抗体,其中 EC_{50} 最小为 $0.12 \mu\text{g/mL}$,最大为 $46.16 \mu\text{g/mL}$ 。通过体内外实验,筛选得到 1 株全人源抗 RT 中和抗体 4-4E。体内攻毒实验结果显示,攻毒前 24 h 注射 2.5 mg/kg 抗体,腹腔注射 $2 \times LD_{50}$ RT 72 h 内小鼠存活率 83%,小鼠肠道损伤相较对照组显著降低。

3. DMAb 表达抗体预防 RT 中毒研究

利用 DMAb 技术构建带有抗 RT 抗体序列的 DMAb,在体内外分别检测 DMAb 分泌抗体和中和 RT 的能力。结果显示,DMAb-4D12、DMAb-4-4E 和 DMAb-c43RCA 在体内外均具有良好的抗体分泌能力,小鼠血清中人源抗体水平在转染后第 7 天达到 $10 \mu\text{g/mL}$ 以上,小鼠体内鼠源抗体 4D12 持续表达超过 120 天,集中分布于小肠和腓肠肌组织。对小鼠体内转染 DMAb-4-4E 或 DMAb-c43RCA $25 \mu\text{g}$,5 天后腹腔注射 $2 \times LD_{50}$ RT,72 h 内小鼠存活率分别为 83% 和 100%,各组小鼠体重均迅速降低,DMAb-IgG 组小鼠血糖在攻毒后 72 h 内恢复至正常组水平,肠道和肾脏损伤相较对照组显著降低。同时,实验结果显示,电转染 DMAb 导致腓肠肌组织存在粒细胞浸润,肾脏、脾脏和肝脏出现炎症反应和可恢复性损伤。

4. 全人源抗 RT 抗体保护机制探究

利用生物信息学和相关实验预测 4-4E 抗体和抗原结合细节,发现 4-4E 抗体重链可变区 CDR3 中的 99D/101Q/102Q 在抗原抗体结合中发挥关键作用。结果显示,4-4E 抗体可以阻碍 RT 的胞内逆向转运,抑制蓖麻毒素在高尔基体驻留,增加蓖麻毒素在早期内体累积。同时,4-4E 抗体可以阻碍 PDI 水解 RT 二硫键。

上述结果显示,RT 的免疫优势表位与中和性抗原表位存在明显差别,RT 弱结合力抗体可能具有强中和功能活性,全人源抗 RT 中和抗体 4-4E 特异性结合 RTA, EC_{50} 为 $22.58 \mu\text{g/mL}$,通过阻碍 RT 胞内逆向转运和二硫键水解,抗体和其 DMAb 对于 RT 中毒小鼠均具有较好的保护效果。本研究对解析 RT 抗原表位进行了有益探索,对开发全新全人源 RT 中和抗体药物和预防 RT 中毒具有理论和实践意义。

关键词:蓖麻毒素;单细胞测序;全人源抗体;中和抗体;DMAb

Abstract

Ricin toxin (RT) is extracted from the seeds of *Ricinus communis* and belongs to ribosome inactivating protein (RIP), which can cause poisoning in various ingestion routes such as ingestion, injection and inhalation. As a cash crop, castor is not only grown in large quantities around the world, but its industrial product, castor oil, contains 5% of the highly toxic ricin in the production waste. Ricin is highly toxic and widely sourced, posing a potential threat to social and public safety, and has been listed as a Class B biological control substance by the international community. Ricin contains 541 amino acids, molecular weight is about 60~64 kDa, and the whole toxin is composed of ricin toxin A chain (RTA) and ricin toxin B chain (RTB). The ricin B subunit has galactose residue binding activity, and the ricin A subunit has N-glycosidase activity, and the two subunits work synergistically to reverse transport along the Golgi apparatus-endoplasmic reticulum lumen, eventually inactivating the ribosome. For a long time, ricin neutralizing antibodies have been the main research direction for the prevention and treatment of ricin poisoning. However, the research on ricin-neutralizing antibodies has been in the laboratory and clinical research stage, and the relevant research has the following problems: first, there is a lack of preliminary understanding of the immunodominant epitope and neutralizing epitope of ricin; second, allergic reactions of human anti-mouse antibody (HAMA) caused by murine anti-ricin antibody; Third, antibody drugs are difficult to ingest in target tissues, have high clearance in vivo, and require multiple administrations. Therefore, new methods and new forms of ricin antibody drug development and delivery continue to be further studied.

In this study, ricin toxoid immunized human antibody transgenic mice were used to obtain and analyze spleen B cell transcriptome and B cell receptor (BCR) library data through single-cell sequencing, fully human ricin neutralizing antibodies were screened and identified by hybridoma technology, and DNA encoded monoclonal antibody (DMAb) technology was used to identify neutralizing antibodies in vivo. Validation of protective effect in ricin-poisoned mice.

1. RT immunized B cell transcriptome and receptor library study

Ricin toxoid immunized human antibody transgenic mice were sequenced and analyzed by transcriptome and BCR receptor library of B cells in their spleen by single-cell sequencing. In the analysis of single-cell transcriptome data, 17 memory B cell (MBC) markers were found, and spleen MBCs were significantly upregulated in translation-related functions and immune-related signaling pathways after RT immunization, suggesting that MBCs were activated after RT immunization. The analysis results of B cell receptor library data showed that IGHV1-2 and IGKV3-20

were used most frequently in V gene and IGHJ4, IGKJ1 and IGKJ4 were used most frequently in J gene. IGKJ4-none-IGHV1-2 and IGKJ4-none-IGHV6-1 were used most frequently in VDJ gene matching types. The analysis of CDR3 amino acid composition of MBCs in the immune group showed that the basic composition forms of CDR3 in the variable region of heavy chain and light chain were CAR-FDYW and CQQY-S-P-TF, respectively. Through homologous modeling and antigen simulation docking of 20 major clonal forms of immune group MBCs, the results showed that the immunodominant epitope of RT was different from the neutralizing epitope, suggesting the neutralizing activity potential of weak-binding antibodies, and determining the supplementary strategy to explore weak-binding antibodies.

2. Preparation and identification of fully human anti-ricin neutralizing antibodies

Fully human neutralizing antibodies specific to ricin were screened and prepared by hybridoma antibody technology by using ricin toxoid-immunized human antibody transgenic mice. The experimental results showed that all 10 anti-ricin monoclonal antibodies were human sequences, including 3 RTA-specific antibodies, 2 RTB-specific antibodies, and 5 antibodies binding to RTA and RTB, of which EC_{50} was $0.12 \mu\text{g/mL} \sim 46.16 \mu\text{g/mL}$. The fully human anti-ricin neutralizing antibody 4-4E was screened and identified in vitro and in vivo. The experiments results in vivo showed that the survival rate of mice within 24 h of 2.5 mg/kg antibody injection and intraperitoneal injection of $2 \times LD_{50}$ ricin within 72 h before challenge was 83%, and the intestinal damage of mice was significantly reduced compared with the control group.

3. Prevention of ricin poisoning by DMAb-expressed antibodies

DMAb technology was used to construct DMAb with anti-ricin antibody sequence, and the ability of DMAb to secrete antibodies and prevent ricin poisoning was detected in vitro and in vivo. The experimental results showed that DMAb-4D12, DMAb-4-4E and DMAb-c43RCA had good antibody secretion ability in vitro and in vivo, and the level of human antibodies in mouse serum reached more than $10 \mu\text{g/mL}$ on the 7th day after transfection, concentrated in the intestinal and gastrocnemius muscle tissues. The murine antibody 4D12 was continuously expressed in mice for more than 120 days. After $25 \mu\text{g}$ transfection of DMAb-4-4E or DMAb-c43RCA, the survival rates of mice injected of $2 \times LD_{50}$ ricin in 72 h were 83% and 100%, respectively. The blood glucose of mice returned to normal within 72 h after challenge, and the intestinal damage were reduced compared with the control group. At the same time, the experimental results showed that DMAb electrotransfection led to granulocyte infiltration of gastrocnemius muscle tissue, inflammatory response and restorative damage to the kidney, spleen and liver.

4. Exploration of the antibody RT-protecting mechanism

Bioinformatics and related experiments are used to predict and explore the binding details of antibody antigens to understand the internal mechanism of 4-4E neutralizing function. The experimental results showed that 4-4E antibodies could hinder the intracellular reverse transport of ricin, decrease ricin residence in the Golgi apparatus and increase ricin residence in early endosomes. At the same time, 4-4E antibodies could hinder PDI hydrolysis of ricin disulfide bonds. Further prediction of results showed that 99D/101Q/102Q in the 4-4E heavy chain variable region CDR3 played a key role in antigen-antibody binding.

The above results showed that there was a significant difference between the immunodominant epitope and the neutralizing epitope of ricin, and the weakly binding antibody of ricin may have strong neutralizing activity, and the fully human anti-ricin neutralizing antibody 4-4E specifically targeted RTA, EC_{50} was 22.58 $\mu\text{g/mL}$, and the antibody protein and its DMAb had a good protective effect on ricin-poisoned mice by hindering the intracellular reverse transport and disulfide bond hydrolysis of ricin. This study strives to comprehensively analyze ricin epitopes and develop a new fully human ricin-neutralizing antibody drug to provide important experimental data reference for the prevention of ricin poisoning. This study has made a useful exploration for the analysis of ricin epitopes, which has theoretical and practical significance for the development of fully human ricin-neutralizing antibody drugs.

Keywords: Ricin toxin, Single-cell sequencing, Fully human antibodies, Neutralizing antibodies, DMAb

前言

1 蓖麻毒素研究进展

蓖麻毒素 (Ricin toxin, RT) 是蓖麻籽中含有的一种植物毒素, 属于II型核糖体失活蛋白。蓖麻毒素毒性剧烈, 可以通过多种途径导致哺乳动物中毒并致死, 成人肌肉注射蓖麻毒素的 LD_{50} 大约为 $22 \mu\text{g/kg}$ 。轻度染毒者出现腹泻、恶心和头痛症状, 腹泻严重者伴随有脱水症状; 严重中毒患者, 血压迅速下降并四肢抽搐。

蓖麻毒素理化性质稳定、制备成本低廉、中毒途径多, 历史上曾多次被用作暗杀武器, 至今仍然未有特效解毒剂^[1]。1978年, 保加利亚作家马尔科夫在伦敦被特制雨伞注入蓖麻毒素, 四天后中毒逝世。2003年, 美国截获两封寄往白宫的含有蓖麻毒素的信件。2013年, 密西西比一名男子在寄给奥巴马和共和党议员的信件中加入蓖麻毒素, 信件后来被截获。作为毒素战剂武器, 蓖麻毒素获取来源广泛且毒性极强, 严重威胁社会公共安全^[2]。

1.1 蓖麻毒素的理化性质和分子结构

蓖麻毒素为白色粉末或固体结晶, 无味, 不溶于氯仿、乙醇等有机溶剂, 易溶于稀酸或盐类水溶液, 在饱和硫酸铵溶液中能够沉淀析出。高温高压可使蓖麻毒素蛋白发生变性, 从而失去毒性, 但干热状态下不易变性。和一般蛋白质相比, 蓖麻毒素理化性质较为稳定, 对温度和 pH 不敏感, 在半乳糖溶液中可以保存数月而不失活, 冻干后在 -80°C 冰箱可以保存十年以上。

蓖麻毒素含有 541 个氨基酸, 分子量约为 60~64 kDa。蓖麻毒素全毒素包含蓖麻毒素 A 亚基 (ricin toxin A chain, RTA) 和蓖麻毒素 B 亚基 (ricin toxin B chain, RTB) 两个亚基, 两个亚基通过二硫键相连。蓖麻毒素 A 亚基是一种 N-糖苷酶, 能够对核糖体发挥活性抑制作用, 使 28S rRNA 第 4324 位脱去腺嘌呤, 阻碍细胞的蛋白质合成功能。蓖麻毒素 A 亚基含有 267 个氨基酸, 分子量约为 32 kDa。蓖麻毒素 A 亚基呈高度 α 螺旋化, 包含由三个主要结构域形成的 N-糖苷酶活性口袋, 其活性位点主要为 177 位 Glu 和 180 位 Arg。蓖麻毒素 B 亚基通过与细胞表面糖蛋白受体特异性结合, 使蓖麻毒素驻留在细胞表面, 通过胞吞进入胞

内。蓖麻毒素 B 亚基含有 262 个氨基酸，分子量约为 34 kDa^[3-5]。蓖麻毒素 B 亚基呈双叶形结构，两个半球各成一个结构域，每个结构域包含三个亚区（ α ， β ， γ ），研究表明，1 α 、1 β 、2 γ 三个亚区具有半乳糖残基结合活性^[6]。

1.2 蓖麻毒素的毒性机制

1.2.1 蓖麻毒素的高剂量毒性机制

蓖麻毒素发挥毒性的一个特点是存在剂量依赖性，在高剂量下蓖麻毒素发挥毒性的方式主要表现为蛋白质合成功能障碍。根据机体暴露于蓖麻毒素的途径不同，其毒性强弱也存在差异。蓖麻毒素通过吸入途径进入机体的毒性最强，能够导致严重的肺损伤。蓖麻毒素借助 B 亚基结合细胞膜表面半乳糖残基，利用细胞吞进入胞内（如图 1 所示）。蓖麻毒素分子沿高尔基体-内质网腔的方向逆向转运，在内质网时蛋白质二硫键异构酶（protein disulfide isomerase, PDI）会催化蓖麻毒素两个亚基间的二硫键水解，导致 A、B 亚基分离^[3,6,7]。蓖麻毒素 A 亚基通过分子内的赖氨酸的含量影响聚泛素与自身的结合，进而逃逸内质网参与的蛋白降解过程（ER-associated protein degradation, ERAD）。逃逸该过程的蓖麻毒素 A 亚基分子将转运至胞浆，最终发挥毒性。目前，人们对于蓖麻毒素在逆向转运借助的中间媒介还没有得出答案，但研究表明，逆向转运抑制剂能明显降低蓖麻毒素的毒性^[7,8]。

1.2.2 蓖麻毒素的低剂量毒性机制

当蓖麻毒素处于低剂量时，蓖麻毒素发挥毒性的方式主要表现为诱导细胞凋亡、细胞膜结构和功能损伤以及细胞炎性损伤。一方面，研究表明蓖麻毒素可导致细胞内线粒体膜电位丧失、细胞色素 c 释放、Caspase-3 和 Caspase-9 活化、核仁断裂和 DNA 降解。Caspase-3、Caspase-7、Caspase-8 and Caspase-9 参与该途径，并诱导细胞凋亡，同样的机制也存在于蓖麻毒素 A 亚基中^[9-13]。另一方面，越来越多的研究表明，蓖麻毒素会引发先天免疫反应，增加促炎细胞因子的释放和全身炎症，导致随后的多器官衰竭^[14]。这种炎症反应说明，先天免疫系统导致且加剧了这种炎性损伤^[15]。在 RAW264.7 巨噬细胞中，蓖麻毒素诱导的 28S rRNA 脱嘌呤导致了细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinases, ERK）、氨基末端激酶（c-Jun N-terminal kinase, JNK）和丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路的激活，MAPK 信号通路的激活最终将导致一系列促炎细胞因子激活^[16]。另外，相关研究结果表明，蓖麻毒

素还可以结合细胞膜表面 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 激活下游核因子 NF- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路, 最终导致促炎反应^[17,18]。

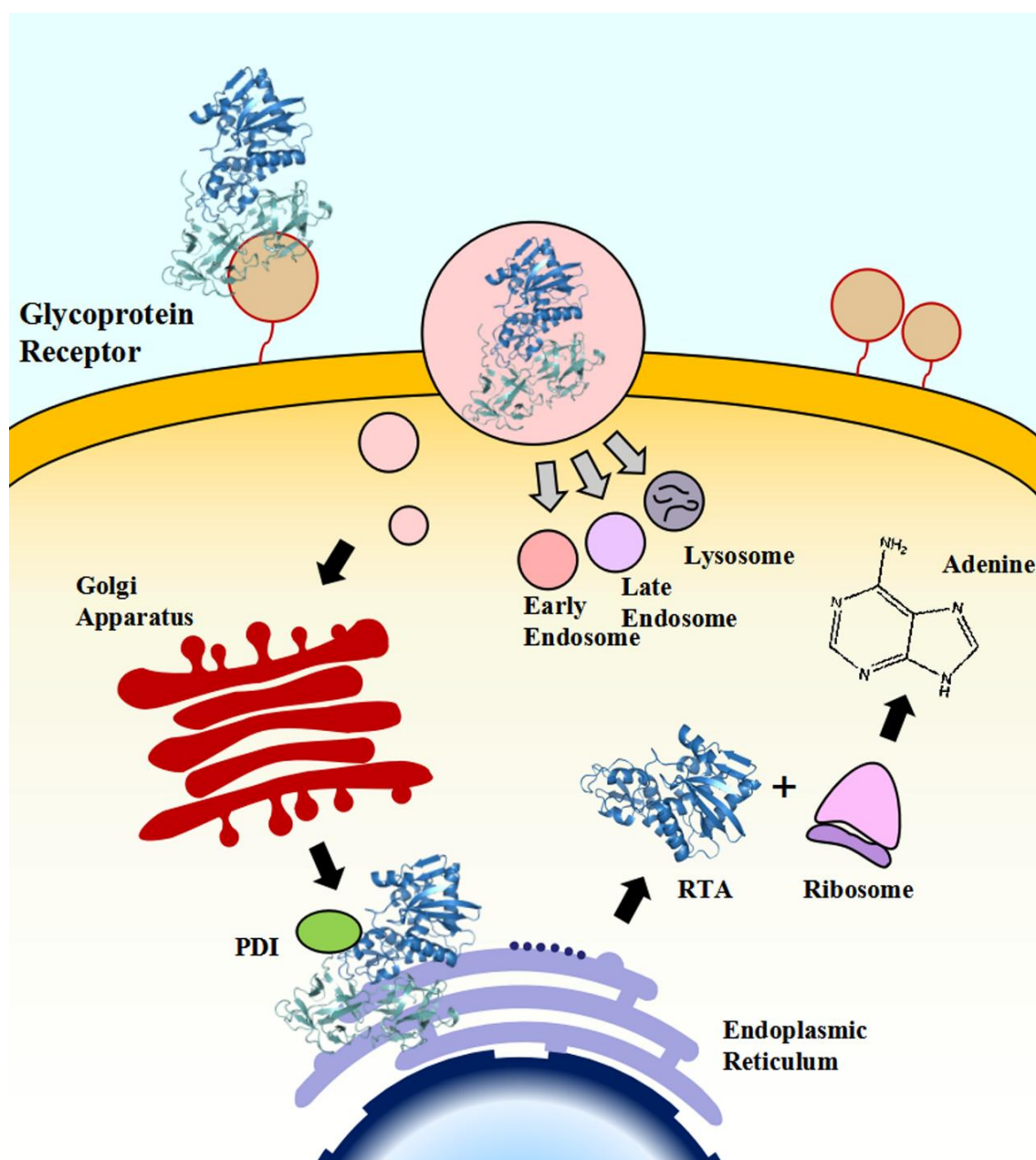


图 1 蓖麻毒素在胞内逆向转运示意图^[150]

Figure 1 Schematic diagram of ricin reverse transport within the cell

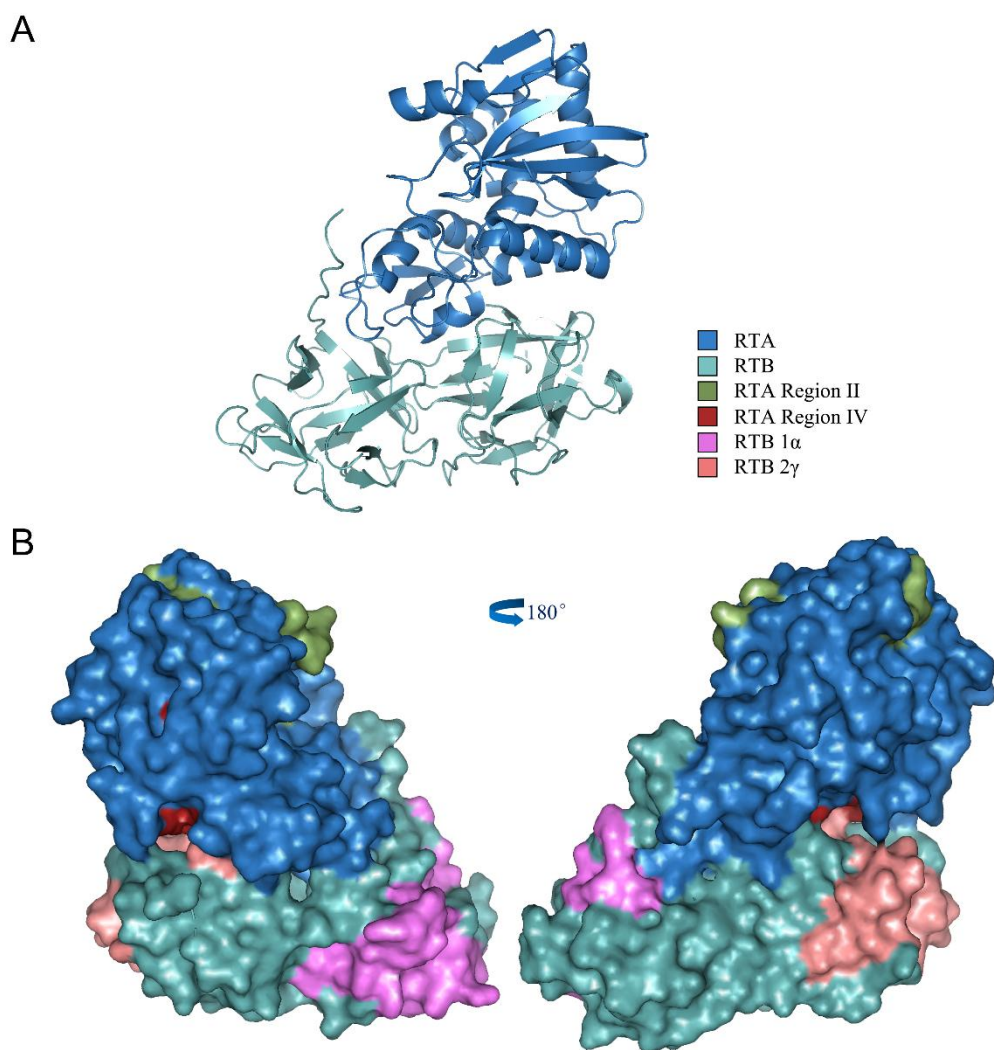


图 2 蓖麻毒素中和性抗原表位示意图^[150]

Figure 2 Schematic diagram of ricin-neutralizing epitopes

(A) 蓖麻毒素结构示意图；(B) 蓖麻毒素中和性抗原表位示意图

2 蓖麻毒素中和抗体概述

到目前为止，临床上还没有已批准的针对蓖麻毒素中毒的针对性治疗方案。为了显著提升蓖麻毒素中毒后相关时间点的存活率，唯一有效的治疗方法是蓖麻毒素中和抗体。本节从以下两个角度总结了涉及蓖麻毒素中和抗体的主要研究：①不同结合表位的蓖麻毒素中和抗体；②不同改造策略下的蓖麻毒素中和抗体。这些抗体在预防和治疗蓖麻毒素中毒方面展示了有效的中和活性和抗体药物潜力。

2.1 结合不同亚基的蓖麻毒素中和抗体

2.1.1 抗 RTA 中和抗体

2009 年, Thibaut Pelat 利用 RTA 免疫食蟹猴构建了一个库容 2×10^8 的噬菌体单链抗体展示文库, 并从中筛选得到了高度人源化的抗蓖麻毒素中和性单链抗体 43RCA^[19]。2016 年, Renaud Respaud 继续对 43RCA 进行人源化改造获得 43RCA-G1, 通过雾化吸入式给药能够保护食蟹猴免受蓖麻毒素中毒^[20]。2010 年, O'Hara JM 等开发了抗 RTA 中和抗体 SyH7 和 PB10^[21], PB10 可以对注射蓖麻毒素 3 小时内的动物提供 100% 保护, 并且可以在提前 24 小时注射 10 mg/kg 剂量中预防致死量的蓖麻毒素^[22,23]。2010 年, Neal LM 等开发了结合 RTA 的鼠源抗体 GD12 和 R70, 其中 GD12 特异性结合 RTA 线性表位 L161 到 I175, 提前 24 小时注射 5 μ g 剂量的 GD12 或 R79 均可以保护小鼠免受 $5 \times LD_{50}$ 剂量的蓖麻毒素中毒^[23,24]。2013 年, O'Hara JM 等又开发了抗 RTA 鼠源抗体 IB2, 并利用 PDI 重组蛋白在体外研究发现抗体能够完全阻断 PDI 对蓖麻毒素二硫键的还原^[25]。2013 年, David J Vance 利用蓖麻毒素免疫羊驼, 构建了噬菌体展示文库, 筛选得到 E5、F5 和 D10 三个抗 RTA 的单域抗体, D10 的体外中和 IC_{50} 达到了 0.15 nM^[26,27]。2016 年, Tal Noy-Porat 则通过同样的方法免疫猕猴并构建噬菌体展示文库, 筛选得到抗 RTA 抗体 MH1, 体外中和蓖麻毒素的 IC_{50} 低于 0.001 nM^[28]。2017 年, Michael J Rudolph 筛选噬菌体展示库制备驼源中和性单域抗体 V5E1, 体外中和蓖麻毒素的 IC_{50} 低于 1 nM^[29]。

动物实验结果表明, 机体产生的抗体 84% 针对 RTA, 13% 针对 RTB。在 RTA 特异性抗体中, 只有 6% 能够中和蓖麻毒素, 其他 94% 不能够保护细胞免受蓖麻毒素损伤^[30]。对于 RTA 上的中和表位, 研究表明, 有六个免疫优势区域, 其指定如下: 区域 I (30~60), 区域 II (78~108), 区域 III (120~150), 区域 IV (170~190), 区域 V (204~240) 和区域 VI (258~264) (如图 2 所示)。其中五个表位簇可以由以下六个中和抗体识别: FGA12 (I 区), PB10 (II 区), GD12 (IV 区), SyH7 (IV 区), SB1 (V 区), BD7 (VI 区)。进一步研究发现, FGA12 和 BD7 不具有体外中和活性, SB1 具有体外中和活性但不具有体内中和活性^[30]。除此之外, RTA 上还存在一个容易被研究者忽视的特殊表位。他们发现存在一系列抗体特异性结合 RTA 的疏水口袋, 在 RTA 与 RTB 分离之前, RTA 分子不会暴露该表位。作为“胞内抗体”, 这些抗体可以阻断 RTA 与 P 茎蛋白的相互作用, 并阻断 RTA 对核糖体的脱嘌呤作用^[31]。这些研究结果充分说明了

抗体结合表位对抗体中和蓖麻毒素的能力至关重要^[21]。

R Baluna 发现 RTA 抗体通过结合 RTA 能够降低炎症反应和线粒体自噬^[32]，因此 RTA 介导的蛋白质合成抑制和细胞凋亡与分子表面的不同表位高度相关。Anastasiya Yermakova 在研究中发现 R70 和 SyH7 这两种特异性针对 RTA 不同表位的抗体会干扰蓖麻毒素从质膜到高尔基体的转运。在细胞表面形成的抗原抗体复合物增加了蓖麻毒素在囊泡中的累积，最终累积的蓖麻毒素将在溶酶体中降解，证实 R70 和 SyH7 等 RTA 抗体中和蓖麻毒素的机制是阻碍逆向转运^[23,33]。

2.1.2 抗 RTB 中和抗体

2006 年，Carolyn R McGuinness 等开发了抗 RTB 鼠源抗体 24B11，24B11 阻碍蓖麻蛋白与原代小鼠脾细胞和人粘膜上皮细胞表面的半乳糖苷受体结合，对蓖麻毒素的中和效率是抗 RTA 抗体 R70 的两倍^[34-37]。2013 年，Wei-Gang Hu 等通过杂交瘤技术制备了抗 RTB 鼠源抗体 D9 及其人源化抗体 hD9^[38]。以每只小鼠 5 μg 的剂量腹腔注射 D9，可以在 $5\times\text{LD}_{50}$ 蓖麻毒素攻毒 6 小时后完全保护小鼠^[39]。2013 年，David J Vance 通过噬菌体单域抗体展示库筛选到九种抗 RTB 单域抗体，其中唯一的中和性单域抗体是 B7，体外中和蓖麻毒素的 IC_{50} 可达 4 nM^[26]。2014 年，Erin K Sully 等开发了 JB4 和 SylH3 两株抗 RTB 鼠源抗体及其嵌合抗体，JB4 能够可以完全保护小鼠免受 $5\times\text{LD}_{50}$ 剂量的蓖麻毒素中毒，而 SylH3 只可以提供部分保护。2016 年，Tal Noy-Porat 通过免疫猕猴构建了噬菌体展示文库，筛选得到抗 RTB 抗体 MH75，体外中和蓖麻毒素的 IC_{50} 低于 0.001 nM^[28]。

抗 RTB 中和抗体可根据其靶向的表位分为两类：I 型抗体，以 SylH3 为例，抑制蓖麻毒素与细胞表面受体的结合；而 II 型抗体，以 24B11 为例，阻碍质膜和反面高尔基体管网状结构（Trans Golgi Network, TGN）之间的细胞内毒素转运。SylH3 以剂量依赖性方式结合 RTB-1 α ，而 24B11 以剂量依赖性方式结合 RTB-2 γ （如图 2 所示）。还有研究发现 JB4 的结合表位位于子结构域的 2 γ 内，因此，在 RTB 的 6 个子结构域中，1 α 和 2 γ 是两个极为关键的中和性表位，对蓖麻毒素的保护性免疫起决定性作用^[34,40]。

2.1.3 抗体鸡尾酒疗法

抗体鸡尾酒（antibody cocktail）疗法是指将不同比例的不同抗体组合混合使用的治疗方法，能够提升单一抗体治疗效果，实现“1+1>2”的治疗作用。单个中和抗体的中和能力可能会由于单一的结合表位而表现不佳，通过使用对蓖麻毒

素具有不同结合表位的几种中和抗体的组合,可以显著提高单个中和抗体的中和能力^[41]。2011年,Julie Prigent 鉴定抗 RTB 中和抗体 RB34 的体外 IC_{50} 为 59 ng/mL,通过与 IC_{50} 为 1276 ng/mL 的 RB37 联用将 IC_{50} 降低至 41 ng/mL,再将该两株抗体与 IC_{50} 为 1988 ng/mL 的 RA36 联用进一步将 IC_{50} 降低至 31 ng/mL,充分说明了抗体鸡尾酒疗法对蓖麻毒素中毒治疗效果的改善^[42,43]。2013年,Wei-Gang Hu 制备了蓖麻毒素中和抗体 B10 和 D9,虽然 B10 的亲数和常数是 D9 的 8 倍左右,但通过将 B10 与 D9 联用显著提高了体外中和蓖麻毒素的能力^[38]。2013年,类似的结果在其他研究中发现,David J Vance 通过联用抗 RTA 抗体 D10 和抗 RTB 抗体 B7 将 IC_{50} 提高了近一个数量级^[26]。2017年,Tal Noy-Porat 在比较 MH1、MH73 和 MH77 的体外中和活性时发现,虽然 MH73 的半数保护剂量是其他几株抗体的几十倍,但 MH73 与 MH77 或 MH1 联用都能够显著降低半数保护剂量。在随后的研究中,基于三抗体的抗体鸡尾酒 (MH1+MH75+MH77) 对暴露于蓖麻毒素 24 小时后的鼠能够产生 80% 的保护率^[44]。PB10 或抗体混合物 (PB10+SylH3) 可以对接受致死剂量的蓖麻毒素的鼠进行治疗并使其存活。PB10 治疗的鼠表现出体重减轻、中度肺部炎症和肺巨噬细胞凋亡,进一步使用抗体鸡尾酒处理的小鼠在以上所有方面均显示正常^[45,46]。这些研究结果提示,两种或两种以上不同抗原表位的蓖麻毒素抗体的联合使用可能提升抗体疗效^[47]。

2.2 不同改造策略的蓖麻毒素中和抗体

越来越多的蓖麻毒素中和抗体进化策略有望帮助开发针对蓖麻毒素中毒的新型抗体治疗药物。基于重组蛋白,不同类型的中和抗体具有独特的治疗优势,本文总结了目前对蓖麻毒素中和抗体进化策略的知识。

2.2.1 嵌合抗体

嵌合抗体 (chimeric antibody) 是指通过基因克隆技术对鼠源单克隆抗体进行改造,将其恒定区序列全部替换为人源抗体恒定区序列,这种改造方法由于保留了亲本抗体的可变区,因此可以较好地保留功能活性,同时引入人源抗体恒定区降低免疫原性。Erin K Sully 等通过改造鼠源抗蓖麻毒素抗体的恒定区制备了 GD12、SyH7、PB10、SylH3 和 JB4 一系列嵌合抗体。其中所有抗体都显示出与亲本抗体无显著差异的体外中和活性,但在体内保护实验中,c-JB4 与 JB4 的保护能力相差较大,c-PB10 的保护能力与亲本抗体无差异。在注射蓖麻毒素后的 4~5 小时注射 c-GD12 或 c-PB10 均能够保护 90% 以上的试验小鼠,研究结果说明

嵌合抗体与其亲本抗体的中和能力基本相一致^[22]。

2.2.2 人源化抗体

由于鼠源抗蓖麻毒素抗体容易引起人抗鼠抗体（human anti-mouse antibody, HAMA）反应，因此人源化抗体应运而生。人源化抗体是指运用基因克隆技术在嵌合抗体的思路进一步改造亲本抗体的可变区。这种方法最终可以得到人源化程度 90%以上的抗体，相比嵌合抗体人源化程度更高，但其技术难度大，对可变区的改造容易导致抗体活性丢失。

一种人源化改造的方法是互补决定区（complementarity determining region, CDR）嫁接，通过将亲本抗体的 CDR 区和人源骨架区或恒定区相嫁接，得到人源化程度较高的人源化抗体。D9 抗体可在攻毒 6 小时后保护小鼠，因此是作为人源化改造的合适对象。2012 年，研究者通过 CDR 嫁接的方法，将人源化 D9（hD9）抗体 CDR 进一步移植到人重链和轻链恒定区，组成完整的 hD9 抗体。相比之下，人源化抗体 hD9 也具备类似的中和蓖麻毒素毒性的能力，但仅能在 4 小时后完全保护小鼠，攻毒后 6 小时给药的保护率仅有 50%^[39]。2016 年，其他研究者对 43RCA 抗体进行人源化改造，通过对轻重链可变区比对，并移植到 κ 恒定区的人免疫球蛋白 G（Immunoglobulin G, IgG）的骨架上得到 43RCA-G1 抗体。结果表明，它还保留了与亲本抗体相同的亲和力和中和活性，表明突变并未削弱其结合和中和蓖麻毒素的能力。另一种人源化改造的方法是构建噬菌体抗体展示文库，调取非人灵长类动物体内的抗体基因进行筛选^[20]。2016 年，Tal Noy-Porat 通过免疫猕猴，构建了噬菌体单链抗体展示文库，从中筛选得到 10 种蓖麻毒素中和抗体（5 种抗 RTA 抗体和 5 种抗 RTB 抗体）。携带有这些可变区的抗体能够完全保护蓖麻毒素中毒六小时后的鼠^[28]。

2.2.3 双特异性抗体

双特异性抗体（bispecific monoclonal antibody, BsAb）是指同时对不同抗原表位均具有特异性结合能力的抗体。双特异性抗体的构建方式有很多，比较常见的是改变 IgG 中的一条轻链和一条重链的可变区部分，使同一个 IgG 能够携带两对不同的轻重链可变区。2012 年，张天成将抗 RTA 抗体 6C2 和抗 RTB 抗体 3E1 联合给药后，发现抗体在体内外的保护水平都得到了较大提高^[48-50]。因此，研究人员设计了一种双特异性抗体 DVD，分别含有 6C2 抗体和 3E1 抗体可变区。体内外攻毒保护实验的结果显示其保护效果，相比单个中和抗体提升了 10 多倍，相

比 6C2 抗体和 3E1 抗体联用提升 3 倍。DVD 抗体阻碍了 PDI 与 RT 的空间结合位点, 导致二硫键无法水解, 使 RTA 在内质网中滞留, 从而无法进入胞质发挥毒性。2013 年, David J Vance 根据之前抗 RTA 抗体 D10 和抗 RTB 抗体 B7 联用能够提高体外中和能力的研究结果, 设计了二聚单域抗体 D10/B7, 进一步降低 IC_{50} 。除此之外, 研究还表明二聚单域抗体 E5/B7 可以 100% 保护小鼠受到的 $10 \times LD_{50}$ RT 攻毒^[26]。Na Dong 等制备的鼠源抗体 4C13 可以识别并结合 RTA、RTB, 并对蓖麻毒素全毒素以高亲和力结合。经静脉注射, 抗体 4C13 即使在中毒后 6 小时也可以在 $20 \mu\text{g/kg}$ 剂量下保护小鼠。研究结果说明分别结合 RTA 和 RTB 的抗体有可能存在某种机制阻碍 RT 发挥毒性^[51]。

2.2.4 单链抗体

单链可变区片段 (single chain fragment variable, scFv), 又称单链抗体, 是通过柔性 linker 将轻链可变区和重链可变区相连得到的重组抗体。这种抗体形式在完整保留抗原特异性的同时, 大大降低了抗体的分子量大小, 有利于加快体内清除代谢并提升组织穿透性^[52-54]。2009 年, Thibaut Pelat 等人通过筛选噬菌体展示文库得到单链抗体 43RCA, 该单链抗体展示了优异的蓖麻毒素特异性结合和中和活性, 并可以在 41 pM 剂量下有效中和蓖麻毒素^[19]。2016 年, Tal Noy-Porat 等人通过筛选免疫后的噬菌体展示文库得到 10 种单链抗体, 实验结果显示, 10 种单链抗体均能够在体外中和蓖麻毒素, 其中 MH76 抗体可在小鼠蓖麻毒素中毒 6 h 后 100% 保护小鼠^[44]。2019 年, 笔者也曾通过噬菌体展示文库筛选并制备抗蓖麻毒素单链抗体 JE11, 并验证了抗体在体内外对蓖麻毒素的中和作用^[55,56]。

2.2.5 单域抗体

单域抗体 (Single-domain antibody, sdAb) 是仅包含单个可变区的抗体片段, 相比其他抗体形式, 单域抗体是天然抗体中保留抗原特异性的最小片段^[57-59]。2014 年, Cristina Herrera 等研究人员发现了一株 RTB 特异性单域抗体 24B11, 该抗体在体外实验中具有良好的中和能力, 随后制备了基于 24B11 抗体序列的单克隆抗体, 可在体内发挥良好中和活性^[60]。2015 年, 研究人员继续制备了基于单域抗体的双特异性抗体, 同样可以保护蓖麻毒素中毒小鼠, 并且发现异源二聚体保护效果优于同源二聚体^[61]。2022 年, Timothy F Czajka 等人开发了一种抗蓖麻毒素抗体 V9F6, 可以通过阻断 RTA 与核糖体 P-茎蛋白的结合来中和蓖麻毒素^[31]。这些结果提示了单域抗体在中和蓖麻毒素方面的优势。

3 DMAb 研究进展

单克隆抗体（monoclonal antibody, mAb）疗法彻底改变了现代医学的格局。迄今为止，为了治疗传染病、癌症、哮喘和自身免疫症等疾病，美国食品和药物管理局和欧洲药品管理局共批准了 80 多种抗体药物。但抗体药物开发仍然存在大量局限性，严重阻碍了药物走向临床应用^[62,63]。其一，抗体氨基酸序列所决定的蛋白理化特性常常导致抗体蛋白聚沉和体内外不稳定等问题。其二，抗体药物进行体内给药需要较高剂量才能达到治疗效果，因此成本通常较高。抗体药物的规模化生产所包含的无内毒素的生产环境和耗材、后续纯化所需耗材都让成本更加昂贵^[64,65]。其三，抗体药物由于分子量大，难以被一些特定的靶组织摄取，从而导致体内清除率高，半衰期短。为了维持药物与血液之间的动态平衡，绝大多数已上市抗体药物需要多次给药，给临床患者治疗带来不便。

基于以上这些原因，抗体药物开发与递送的新方法、新形式成为了领域研究热点。David B. Weiner 创新性地发明了 DNA 编码单克隆抗体（DNA-encoded monoclonal antibody, DMAb）技术，并将其广泛应用于癌症治疗和抗病毒领域。DMAb 是携带重组抗体基因的 DNA 质粒，可以在体内迅速表达抗体，2 周内达到血清浓度峰值，并持续 2~3 个月^[66,67,77,78,128,129]。此后随着质粒不断从细胞中丢失，mAb 将从血清中自然清除^[68,69]。全球新冠疫情爆发后，其团队利用该技术比较了 DMAb 形式的抗体鸡尾酒与对应的临床上的重组抗体鸡尾酒替沙吉韦单抗和西尔加维单抗，功能表征结果显示，与直接注射重组蛋白相比，DMAbs 编码的抗体在预防 SARS-CoV-2 的多种动物攻击模型中表现出相似的特异性、广泛的抗病毒效力和同等的保护效果。在药代动力学研究中，与重组蛋白直接给药相比，DMAb 递送维持了更持久的血清抗体滴度。数据表明，DMAb 抗体鸡尾酒对 SARS-CoV-2 Omicron 变异株具有很好的识别和抗病毒活性。该研究表明了 DMAb 技术在新一代生物制剂研发方面有巨大的研究潜力。该技术首次在小鼠中使用抗登革热病毒单克隆抗体进行测试，结果表明，在肌内给药 2 种针对不同病毒表位的 DMAb 后，小鼠血清对所有四种登革热血清型均存在中和能力^[70]。

3.1 DMAb 体内递送

在体内大量表达抗体必须依赖高效率的递送方法。由于体内环境的多样性和复杂性，裸 DNA 进入体内即迅速降解，对大型哺乳动物如猴子和人类进行高效

率的胞内递送十分困难。将外源性 DNA 递送至真核细胞是一个十分复杂的过程，在 DNA 最终到达细胞核之前，DNA 必须克服三个主要障碍：细胞膜、细胞质和核膜。当 DNA 进入到肌肉组织后，首先将面对细胞外基质层（表观肌、肌周和肌内膜）的阻拦。在穿过细胞膜后，细胞质中的溶酶体可能拦截和降解 DNA。然后，DNA 分别通过微管快速运输和肌动蛋白丝缓慢运输，最终抵达核膜。

因此，研究人员发明了一种暂时增加细胞通透性的物理方法，即电穿孔（Electro-Poration, EP）。电穿孔通过短暂的电脉冲使哺乳动物细胞的脂质双分子层膜内产生短暂的亲水途径，使 DNA 分子可以高效地穿过细胞膜结构进入核内。自适应电穿孔利用了方向变换场，具有深度传感新技术和集成电阻传感。这大大提高了 DNA 递送耐受性，并将体内转染效率提高了约 500~1000 倍，从而直接增加了蛋白质表达^[48]。目前电穿孔技术已广泛用于基因治疗领域，相关转染装置也已经在实验动物和临床中进行了应用。其中 Celectra-3P 电穿孔装置应用较为广泛，这是一种针对皮肤的真皮和皮下层的微创电穿孔设备^[71-73]。新冠疫情爆发不久，印度紧急授权批准了一款 DNA 新冠疫苗 ZyCoV-D，这是全球第一款 DNA 新冠疫苗，使用 Celectra-3P 作为专用注射器。2022 年 9 月，Inovio Pharmaceuticals 公司和 GeneOne 生命科学公司联合开发了全球首款预防丙肝疫苗 GLS-615，也使用 Celectra-3P 装置进行电穿孔。

在各种复杂参数中最重要的变量因素是电脉冲的大小。连续的电脉冲可以透化细胞膜，但电压不能太高以防对细胞造成不可逆损伤。研究人员在实验初期探索了低压和高压的电脉冲，结果显示，使用持续时间较长的低压电脉冲的转染效率低于使用短时间的高压电脉冲。另外，转染的靶组织也直接影响了转染效率。骨骼肌由于其解剖学特性，适合用于全身性基因治疗。DNA 介导的蛋白表达水平主要取决于电转染选择的肌肉类型：I 型肌肉（缓慢表达，如比目鱼肌）或 II 型肌肉（快速表达，如腓肠肌）。肌肉纤维的局部损伤可以逐渐恢复，这确保了蛋白持续表达。在这种恢复过程中，卫星细胞是骨骼肌生长和再生所必需的成肌细胞的来源，其所介导的肌纤维再生可能是延长基因表达的主要机制^[143]。

除此之外，还有其他一些方法，能够提高转染效率。通过透明质酸酶对肌肉进行预处理，可以暂时促进细胞外基质分散，提高转染效率^[74,75]。在早期的相关研究中，Yamazaki 等人在透明质酸酶预处理前观察到小鼠的表达量为 4 ng/mL，而经过透明质酸酶预处理后表达量高达 15 μ g/mL^[76]。其他几项研究结果也表明，透明质酸酶预处理后体内表达将增加^[77-79]。Schommer 等人最近的一项研究利用

软骨素酶降解软骨素，作为透明质酸酶的替代品，也达到了类似的效果^[80]。通过提前注射高渗蔗糖溶液也可以提高肌细胞摄入 DNA 效率，但由于蔗糖溶液对于肌内膜和肌细胞膜并无破坏，这些物理屏障对 DNA 的摄入仍有一定的阻碍作用。另外，通过提前向肌肉中注射心肌毒素，可以对肌纤维造成损伤，并诱发处于肌纤维基底层和细胞膜之间的肌肉干细胞迅速向成熟肌细胞分化。在肌肉再生过程中，注入质粒 DNA，可使转染效率提高约 10 倍，这可能是肌肉的再生打乱了正常的组织结构，使注入的 DNA 溶液较易扩散。此外，尚未完全成熟的肌纤维摄取 DNA 的能力较成熟肌细胞强。同时，施用局部麻醉可以导致肌肉松弛，同样对加速 DNA 扩散起到了重要作用^[80]。

3.2 DMAb 体内表达人源 IgG

受机体免疫和代谢系统影响，全人源抗体的体内表达在动物模型中仍面临一些问题。在使用与动物种属匹配的 Fc 进行的 DMAb 研究中，例如全鼠源抗原结合片段（Antigen-binding fragment, Fab）^[66,81]或全鼠源 IgG，小鼠血清中的抗体持续时间较长；而全人源抗体在小鼠体内表达持续时间较短。有研究表明，人源抗体作为外源物质在免疫功能正常动物体内递送的过程中会出现快速免疫反应或抗药抗体（Anti-drug antibody, ADA）反应，进而影响人源抗体在模型动物体内的表达量和表达持续时间^[82]。

为了解决蛋白与实验动物种属之间的差异问题，研究人员通常会构建携带实验动物恒定区序列的嵌合抗体，用来更准确地观察抗体可变区在体内发挥的功能活性。为了更精准地表征人源抗体在动物体内的表达情况，研究人员通常采用“免疫屏蔽”的策略。一种常见的方法是使用免疫缺陷动物进行评价，如免疫缺陷 RAG1 敲除鼠或裸鼠。Patel 等人发现，抗 DMAb 抗体反应是主要组织相容性复合体（Major Histocompatibility Complex, MHC）II 类依赖性的，使用 T 细胞耗竭的小鼠模型可以消除该反应^[78]。T 细胞耗竭动物模型是一种免疫缺陷动物，可以作为评估人 IgG 抗体表达和功能的替代模型。然而，免疫缺陷小鼠无法模拟功能性免疫系统的复杂性，所以是否能够作为临床前动物模型还有待商榷。最近研究发现，NSG 小鼠清除重组抗体药物的速度比其他小鼠模型快，这对评价该动物模型中的抗体药物带来了更多待解决的问题^[83]。David B. Weiner 等人使用 B6.Cg-Foxn1nu/J 无胸腺小鼠评价了抗铜绿假单胞菌双特异性抗体基因 DMAb-BiSPA 的体内表达情况。对胫骨前肌或股四头肌单次注射 100 μ g 剂量的 DNA 质粒，在注

射部位进行电转染后,该小鼠体内可以检测到长达 100~120 天的长期抗体表达^[78]。另一种方法是 T 细胞耗竭,该技术在免疫学上已经有了很广泛的应用,通过抗 CD4 和抗 CD8 抗体实现小鼠体内免疫细胞的瞬时耗竭。Ami Patel 等人利用小鼠感染模型进行抗埃博拉病毒的 DNA 编码抗体的体内转移试验中,利用 T 细胞耗竭的方法屏蔽了 DMAb 注射早期的小鼠免疫功能,从而避免了鼠抗人抗体反应,在 14~21 天后,小鼠免疫细胞功能恢复正常,抗体基因长期表达^[68]。而与未进行 T 细胞耗竭的对照组相比,在 DMAb 注射的 14 天内观察到了强烈的抗抗体反应,伴随着抗体表达水平的急剧下降。T 细胞耗竭的优势在于免疫细胞的消耗只是暂时的,小鼠的免疫功能几天内即可恢复正常,从而能够在免疫功能正常鼠体内表达人源抗体并进行后续体内实验。

3.3 DMAb 生物安全性

迄今为止,质粒 DNA 已经历了超过 30 年的广泛研究,但还未发现任何与质粒 DNA 相关的严重不良事件的报告^[84,85]。DNA 质粒注射耐受性良好,即使高剂量给药,也未发现存在与 mRNA 注射类似的不良反应。曾有学者提出质粒 DNA 与基因组整合的可能是质粒 DNA 平台的风险因素之一。不过相关研究表明,在电穿孔给药后约 49 天内,200 μg /只 DNA 质粒在小鼠的大多数组织中被迅速清除(不包括肌肉),未发现质粒整合到宿主基因组中。无论质粒中存在的编码序列和非编码序列如何,至今还没有观察到 DNA 质粒在基因组中的插入,这证明了 DMAb 进行各种传染病预防的抗体表达所具有的安全性和适用性。这些结果有力地支持了 DMAb 作为核酸抗体药物的进一步临床开发。

除此之外,来自质粒 DNA 的过度表达的影响也须加以重视,某种蛋白质的超常规表达可能导致免疫系统受到不适宜的刺激,导致急性期反应和慢性炎症反应的发生、自身免疫集结和正常组织的损伤。无论对临床还是临床前试验而言,自身免疫反应都是一种潜在的危险,那么临床前研究必须保持足够长的时期,以使这些不正常的情况显示出来。研究结果显示,最常见的不良反应是注射部位疼痛、发红、肿胀和瘙痒,发生在大约一半的受试者中。与头痛、肌痛、上呼吸道感染、疲劳和恶心相关的全身性不良事件在受试者中不常见^[85,86]。

此外,传统 DNA 质粒中通常含有细菌相关序列,尤其是抗生素或抗性标志物容易产生生物安全性问题,监管部门建议避免使用它们进行治疗。因此,研究人员开发了一些无抗生素抗性标记的质粒骨干,并用于大规模无抗生素生产,如

pCOR、pORT 和 npDNA (NTC8385-VA1 和 NTC9385R) [87]。pCOR 载体是专为基因治疗而设计和开发的 DNA 质粒,符合多项质量安全标准。该质粒携带最少量的细菌序列并且不含抗生素抗性基因,并在改造后精氨酸依赖的大肠杆菌中复制拷贝,可以最大限度地防止在生产或治疗过程中发生感染[87,88]。npDNA 同样去除了抗生素抗性基因并拥有更小的质粒骨架,这可以改善基因表达,也利于大规模工业化生产,并符合相关监管条例[86]。研究人员发现,等摩尔剂量的携带抗生素抗性基因的传统 pSSI 表达载体和该新型载体均可以诱导同水平的蛋白表达。

4 单细胞测序技术概述

自 2009 年首次问世,十几年以来单细胞测序技术一直在持续不断地发展。近几年,单细胞测序技术出现了爆发式的发展和普及。随着对细胞功能和表达的深入研究,研究者们逐渐清楚地认识到,同群细胞间看似相同,但其中单个细胞与细胞之间的表达存在着差异[101]。因此,单细胞测序技术应运而生,该技术可以帮助将细胞进行单个分离、测序和分析[102,103]。

以 10X Genomics Chromium 转录组测序为例,细胞与逆转录试剂预混在一起,通过微流控芯片的一条通道,与另一通道中携带有不同 barcode 的 gel beads 被包裹在一个油滴中,组成含有单个细胞和单个凝胶珠的油包水滴 GEMs。每一个凝胶珠携带足量的核酸链,而每条核酸链由 read primer、barcode、UMI、poly 尾组成。一个凝胶珠上所有的核酸链的 barcode 是相同的序列,用于标记细胞。一个凝胶珠上所有的核酸链的 UMI 是各不相同的,用于标记不同的 RNA 序列。之后,对测序样本进行 cDNA 回收、建库和测序,通过识别 barcode 得到单个细胞的表达矩阵等数据。这种单细胞检测平台的商业化,使得单细胞测序技术的使用门槛和检测成本大大降低,而且提高了细胞通量[104,105]。

目前免疫组学测序面临的最大问题是序列太过多样化,但单细胞测序技术很好地解决了这个问题。单细胞测序技术可以同时获取 1000~10000 个单细胞的基因表达数据和 VDJ 全长序列,在肿瘤治疗、免疫疾病治疗、器官移植后排斥等领域中有着广泛的应用。在新冠疫情中,单细胞测序技术发挥了重要作用,北京大学谢晓亮团队利用单细胞转录组和单细胞 BCR 测序技术对 B 细胞进行检测,筛选得到 8558 种抗体序列,并获得 14 株中和抗体[106]。

第一章 蓖麻毒素免疫 B 细胞转录组和受体库研究

蓖麻毒素属于Ⅱ型核糖体失活蛋白，具有制备成本低廉、性质稳定、中毒途径多等特点，严重威胁社会公共安全。蓖麻毒素至今无特效药，目前针对蓖麻毒素中毒防护和治疗的研究方向主要集中在重组疫苗和中和抗体。因此，解析蓖麻毒素抗原表位，正确理解机体内 B 细胞受体（B cell receptor, BCR）对蓖麻毒素的特异性识别，对于蓖麻毒素疫苗和中和抗体的开发均具有重要的意义。

单细胞测序（Single-cell sequencing）技术可以帮助研究人员分离单个细胞，进行测序和分析^[89]。为了探究机体内 BCR 对于蓖麻毒素的特异性识别，使用蓖麻毒素类毒素免疫人源抗体转基因小鼠，通过单细胞测序对脾脏 B 细胞进行转录组和 BCR 受体库测序。本研究为开发蓖麻毒素疫苗或中和抗体奠定了研究基础，具有重要的理论意义。

1.1 实验材料及仪器

1.1.1 实验主要试剂

用于制备类毒素和检测血清的蓖麻毒素为实验室保存；弗式完全佐剂、弗式不完全佐剂、RPMI-1640 培养基、TMB 底物溶液、红细胞裂解液、Tween-20 和 BSA 均购自美国 Sigma 公司；0.4%台盼蓝染液购自北京索莱宝科技有限公司；10X Chromium Next GEM Single Cell 5' HT Gel Bead Kit v2、Next GEM Single Cell 5' HT GEM Kit v2、Chromium Single Cell V(D)J Reagent Kits、Chromium i7 Multiplex Kit、Nova 6000 S4 测序试剂 PE150 和 Recovery Agent 均购自美国 10X Genomics 公司；NaCl、NaH₂PO₄·2H₂O、Na₂HPO₄、Tween-20、BSA、H₂SO₄、无水乙醇和 TMB 底物溶液均购自生工生物工程股份有限公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（增强型）购自上海碧云天生物技术有限公司；HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Human IgG 购自美国 Proteintech 公司；PE anti-mouse/human CD45R/B220 Antibody 购自美国 Biolegend 公司。

1.1.2 主要仪器及设备

高速低温冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司，5810R 型）；层析实验冷柜（北京博医康实验仪器有限公司，YC-2 型）；超低温冰箱（中科美菱低温科技股份有限公司，YCD-EL259A 型）；Milli-Q 超纯水制备仪（美国 Milipore 公司，IQ 7000 型）；酶联免疫检测仪（瑞士 Tecan 公司，F500 型）；电热恒温培养箱（上海新诺仪器集团有限公司，HPS-250 型）；酸度计（瑞士 Mettler 公司，PHS-4CT 型）；分析天平（赛多利斯科学仪器有限公司，BCE224I-1CCN 型）；流式细胞仪（美国 Beckman 公司，CytoFlexLX 型）；三温三控水槽（上海博迅医疗生物仪器股份有限公司，DK-8D 型）；超净工作台（深圳市博立斯智能装备有限公司，DL-CJ-IN 型）；恒温磁力搅拌器（上海司乐仪器有限公司，85-1 型）；全自动细胞计数仪（美国 Thermo Scientific 公司，Countess II 型）；PCR 扩增仪（美国 Bio-Rad 公司，T100 型）；Chromium Controller（美国 10X Genomics 公司，Chromium Controller）；测序平台（美国 Illumina 公司，NovaSeq6000）；移液器（美国 Thermo 公司，4510030 型）；佐剂乳化器（苏州博奥龙科技有限公司，BDYQ1001 型）。

1.1.3 主要溶液配制

PBS 溶液：称取 11.68 g NaCl、9.44 g Na_2HPO_4 、5.28 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，加蒸馏水定容至 2 L，调节 pH=7.4，室温保存备用。

PBST 溶液：0.05% Tween-20-PBS 溶液。向 1 L PBS 溶液中加入 500 μL 的 Tween-20，充分搅拌溶解，室温保存备用。

固定液：4%多聚甲醛-PBS 溶液。向 800 mL PBS 溶液中加入 100 mL 甲醛溶液，充分混合后，用 PBS 溶液定容至 1 L，室温保存备用。

封闭液：3%BSA-PBS 溶液。称取 0.45 g BSA，用 PBS 溶液定容至 15 mL，现用现配。

终止液：2 mol/L 硫酸溶液。向 100 mL 水中边搅拌边缓慢滴加 21.74 mL 硫酸，充分混匀后定容至 200 mL，室温保存。

1.1.4 数据库及软件

CellMarker (<http://biocc.hrbmu.edu.cn>) ;

PanglaoDB (<https://panglaodb.se>) ;

MGT database (<https://support.10xgenomics.com>) ;

VDJ database (<https://vdjdb.cdr3.net>) ;

IMGT (<http://www.imgt.org>) ;

Cell Ranger (<https://support.10xgenomics.com>) ;

Loupe Browser (<https://support.10xgenomics.com>) ;

Seurat (<http://satijalab.org/seurat/install.html>) ;

SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) ;

Discovery Studio (<https://discover.3ds.com>) ;

PyMOL (<https://pymol.org/2/>) 。

1.1.5 实验动物

实验动物采用人源抗体转基因小鼠 CAMouse，购自重庆金迈博生物科技有限公司，使用清洁鼠饲料和垫料进行分笼饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 动物免疫

1.2.1.1 蓖麻毒素类毒素制备

将蓖麻毒素用 PBS 溶液稀释至约 0.5 mg/mL，装入透析袋。将透析袋置于含有 4%多聚甲醛的 PBS 溶液中，透析液内外体积比 1:100，37℃透析 14 天。取出

蓖麻毒素类毒素，测定浓度后-20℃保存。

1.2.1.2 类毒素免疫

挑选 6~8 周龄健康雌性小鼠 5 只，腹腔注射乳化后的抗原进行免疫，类毒素抗原剂量为前两次每次 5 $\mu\text{g}/0.2\text{ mL}$ ·只，第三次 50 $\mu\text{g}/0.2\text{ mL}$ ·只，免疫间隔为 2 周。完成 3 次免疫后，在制备脾细胞悬液前 3 天，腹腔注射蓖麻毒素类毒素水剂 50 $\mu\text{g}/200\text{ }\mu\text{L}$ ·只。

初次免疫将蓖麻毒素类毒素溶液与弗氏完全佐剂以 1:1 体积比混合并通过乳化装置乳化完全后腹腔注射，第二次、第三次免疫将蓖麻毒素类毒素溶液与弗氏不完全佐剂以 1:1 体积比混合并通过乳化装置乳化完全后腹腔注射。乳化完全的标志是液滴中油相和水相看不到明显的分界面。整个体系较为均匀，液滴为白色、稳定、均一的小油滴。

1.2.1.3 ELISA 操作流程

酶联免疫吸附测定（Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）的一般操作流程如下：

- （1）包被：用 PBS 溶液稀释抗原，混匀后加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，4℃静置过夜。
- （2）洗涤：用 PBST 溶液洗涤酶标板，加入 280 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，静置 1 min，弃掉拍干为洗一次，共洗三次。
- （3）封闭：用 PBS 溶液配制 3% BSA 溶液，混匀后加入 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37℃孵育 2 h。
- （4）洗涤：用 PBST 溶液洗涤酶标板，共洗三次。
- （5）一抗：用 PBS 溶液稀释一抗，混匀后加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37℃孵育 2 h。
- （6）洗涤：用 PBST 溶液洗涤酶标板，共洗三次。
- （7）二抗：用 PBS 溶液稀释二抗，混匀后加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37℃孵育 1 h。
- （8）洗涤：用 PBST 溶液洗涤酶标板，共洗五次。
- （9）显色：加入 TMB 底物溶液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37℃避光孵育 10~15 min。
- （10）终止：加入终止液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。

(11) 测值：通过酶标仪在 450 nm 处检测各孔 OD 值。

1.2.1.4 ELISA 法测定血清效价

在免疫前和第三次免疫 7 天后对小鼠进行断尾取血，5000 r/min 离心 10 min 分离血清，通过 ELISA 检测血清效价。对 1.2.1.3 ELISA 步骤作如下修改：

(1) 包被步骤更改：用 PBS 溶液稀释蓖麻毒素至 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 一抗步骤更改：用 PBS 溶液 1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600 稀释血清。

(3) 二抗步骤更改：用 PBS 溶液 1:10000 稀释羊抗人酶标抗体。

(4) 测值步骤更改：观察在 1:12800 稀释倍数下，若有孔 OD 值大于 1.0，则视为免疫达标。

1.2.2 总 B 细胞制备

1.2.2.1 脾细胞提取

(1) 断颈处死小鼠，浸泡于 75%乙醇溶液中。

(2) 在超净台中取出小鼠脾脏，研磨后用 1640 培养基重悬。

(3) 室温，水平转子 800 $\times g$ 离心 5 min，弃上清。

(4) 用红细胞裂解液裂解红细胞，冰上放置 10 min。

(5) 室温，水平转子 800 $\times g$ 离心 5 min，弃上清。

(6) 用 1 mL 1640 培养基重悬细胞，过细胞筛网后得脾细胞悬液。

1.2.2.2 总 B 细胞分选

(1) 分别取每只小鼠 1×10^6 个细胞，加入抗 B220 荧光抗体，避光室温孵育 15 min。

(2) 室温，水平转子 800 $\times g$ 离心 5 min，弃上清。

(3) 用 PBS 溶液重悬细胞，通过流式分选仪对脾细胞根据荧光进行分选。

(4) 离心管收集阳性细胞作为样本，冰上保存，交由上海烈冰生物医药科

技有限公司建库测序。

1.2.3 样本测序和初步分析

1.2.3.1 数据过滤和校正

使用 fastp 软件对原始数据中的过短或低质量的序列过滤。利用 Seurat Package 对于上述偏差因素进行校正，获得准确无偏差的预处理后的单细胞基因表达数据。采用主成分分析（Principal components analysis, PCA）算法和统一流形逼近与投影（Uniform Manifold Approximation and Projection, UMAP）算法对结果进行降维和可视化。

1.2.3.2 细胞聚类分群

根据基因表达情况，通过互近邻（Mutual Nearest Neighbor, MNN）矫正和 BCR 矫正，对分群后的细胞建立跨样本间细胞聚类，对聚类间表达量矫正，利用矫正后的表达量进一步划分单细胞群体。通过差异筛选算法，计算单细胞聚类划分和标志物基因表达情况，并根据标志物基因表达情况，对每个细胞聚类进行推测。

1.2.3.3 拟时序和细胞轨迹分析

根据每个细胞中的基因表达情况，构建细胞轨迹，通过模拟细胞时序，细致分析细胞聚类之间的演替顺序。根据细胞轨迹计算免疫前后两组的表达多样性。根据结果分析细胞分群是否正确，继续按照分群后聚类重新分析细胞轨迹。

1.2.4 转录组数据分析

1.2.4.1 标志基因分析

根据数据库和文献中提到的 B 细胞标志基因，分析现有分群下各聚类的标志基因的表达情况。

1.2.4.2 基因功能富集分析

作为当今使用最广泛的基因注释数据库之一，基因本体（Gene Ontology, GO）数据库主要涵盖了细胞组分、分子功能、生物学进程三个层次的基因注释。根据数据库记载的各类基因注释信息，将各个细胞聚类的基因分别从生物学进程

(Biological Process, BP)、分子功能 (Molecular Function, MF)、细胞组分 (Cellular Component, CC) 这三个类别进行 GO 注释, 采用 Fisher 检验计算每个 GO 的显著性水平, 最终筛选出显著性 GO ($P\text{-Value} < 0.05$) [90]。

1.2.4.3 基因信号通路富集分析

KEGG 数据库记载了目前已知的各种信号通路和基因之间的关系, 基于该数据库, 细胞聚类中差异表达的基因集将富集得到相关信号通路。通过对差异基因注释相关信号通路, 得到 Pathway Term, 采用 Fisher 检验计算信号通路在富集中的显著性水平, 最终筛选出显著性 Pathway Term ($P\text{-Value} < 0.05$) [91]。

1.2.4.4 SCENIC 转录因子分析

单细胞转录因子分析 (Single-cell regulatory network inference and clustering, SCENIC) 是一个基于共表达和 motif 分析, 计算单细胞转录组数据基因调控网络以及细胞状态的方法。AUCell 可以识别单细胞 RNA 序列数据中具有活跃基因集的细胞。

首先通过 GENIE3 从基因表达量数据推断基因调控网络, 预测数据集中每个基因表达的随机森林模型, 测量它们各自的相关性以预测每个靶基因的表达。然后通过 RcisTarget 从基因列表识别富集的 motifs 和候选转录因子。最后通过比较所有细胞间的 AUCell (area under the recovery curve) 打分值, 识别哪些细胞具有更显著的调节子活性。

1.2.5 BCR 数据分析

1.2.5.1 BCR 数据标准化

对于受体库测序数据进行质量控制, 主要包括单细胞测序 BCR 数据的 VDJ 过滤、比对、组装及注释。首先去除测序错误的序列, 去除接头, 过滤掉低质量的 Reads, 去除低质量的 Contig 序列, 再进行 VDJ 过滤、组装和注释。对 Contig 序列、Consensus 序列, Clonetype 克隆分型分析结果进行可视化。由于来自同一细胞的 BCR 序列和转录组序列有着相同的 Barcode, 因此可以对单个细胞的 V(D)J 信息和转录组数据进行整合分析[92]。

1.2.5.2 BCR 受体库分析

根据每个样本 BCR 分析的结果, 参照 IMGT 数据库分析 VDJ 序列数据。对

BCR 的组成信息进行统计描述，包括 VDJ 使用偏好性（主要包括 IGHV、IGHJ、IGHC、IGLV、IGHLJ 的使用偏好，以及 VDJ 和 VJ 使用组合情况）、CDR3 序列长度分布、聚类、氨基酸组成，以及细胞的 clonotype 数量、size 大小等。

1.2.5.3 BCR Cluster Overlap 分析

根据每个样本 BCR 分析的结果，可以结合对应的单细胞转录组数据，通过计算不同 Cluster 或 Cell type 之间的 Clonotype 是否存在 overlap，来判断这两个 Cluster 或 Cell type 之间是否会存在状态的演变。

1.2.5.4 同源建模和蛋白对接

（1）利用 SWISS-MODEL 数据库，根据免疫后样本中记忆 B 细胞（Memory B Cell, MBC）中 BCR 重链可变区的氨基酸序列来进行同源建模。通过 Discovery Studio 中的 ZDOCK 工具来进行蓖麻毒素（PDB ID: 3rti）和抗体的蛋白对接。

（2）使用 ZDOCK 工具并修改参数。其中，Angular Step Size 参数选择 15；Interface Cutoff 选择 9；RMSD Cutoff 参数选择 6；Maximum Number of Clusters 参数选择 60。其余参数均为默认值^[4]。

（3）待计算运行结束后，通过 3D Point Plot 工具分析所有构型。根据 ZDOCK 分数和 RDOCK 分数排序对构型进行筛选，得到最优构型后，计算接触界面氨基酸。对蓖麻毒素上氨基酸进行打分，每个最优构型中的抗原上存在的接触残基各计 1 分，通过 PyMOL 对蓖麻毒素上接触残基的总评分进行可视化统计。

1.3 实验结果

1.3.1 总 B 细胞制备

如图 1.1 所示，通过该流程对人源抗体转基因小鼠的 B 细胞进行单细胞测序。通过 ELISA 对免疫后的小鼠血清效价进行鉴定，通过流式分选仪对脾细胞悬液中的 B 细胞进行分选。如图 1.2A 所示，G945 和 G946 两只小鼠血清效价超过 12800，说明免疫成功。如图 1.2B 所示，对该小鼠的脾细胞分选 B 细胞，免疫组和对照组的 B 细胞占比均在 20%左右，属于正常范围内。

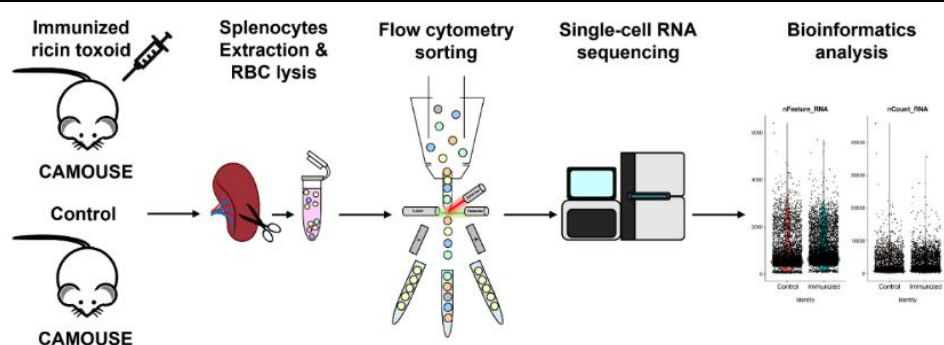


图 1.1 单细胞测序实验流程示意图

Figure 1.1 Schematic diagram of the single-cell sequencing workflow

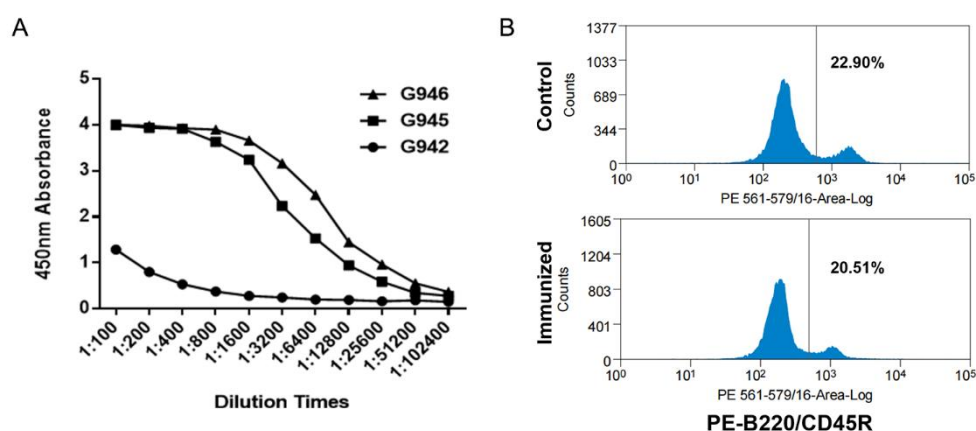


图 1.2 免疫后血清效价和 B 细胞分选

Figure 1.2 Post-immunization serum titer and B-cell sorting

(A) 免疫后小鼠血清效价；(B) 流式细胞仪分选 B 细胞

1.3.2 测序数据初步分析

1.3.2.1 线粒体占比相关性分析

如图 1.3A 所示，对单细胞测序中每个细胞进行线粒体占比相关性分析，Y 轴为细胞线粒体占比，X 轴为细胞 UMI 数量。如图 1.3B 所示，通过小提琴图描述了样本中的基因数量情况和 UMI 数量情况。两组间样本中基因数量和 UMI 数量接近，可以进行后续分析。

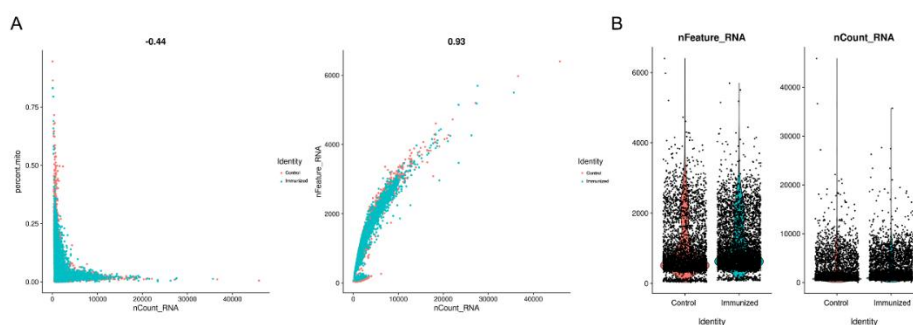


图 1.3 线粒体占比相关性分析

Figure 1.3 Mitochondrial proportion correlation analysis

(A) 线粒体占比相关性分析; (B) 基因和 UMI 数量情况

1.3.2.2 细胞初步聚类分析

UMAP 是一种降维技术, 假设可用数据样本均匀分布在拓扑空间中, 可以从这些有限数据样本中近似并映射到低维空间。如图 1.4A 所示, 通过 UMAP 定位细胞分群情况, 利用 Graphcluster 算法计算无监督聚类后的分群情况, 免疫组和对照组各占一半。如图 1.4B、1.4C 和 1.4D 所示, 样本共分成 16 个聚类, 为了关注其中的 B 细胞 (聚类 0~10), 通过 B 细胞标志物 (*Cd79a* 和 *Ms4a1*) 定位总 B 细胞。

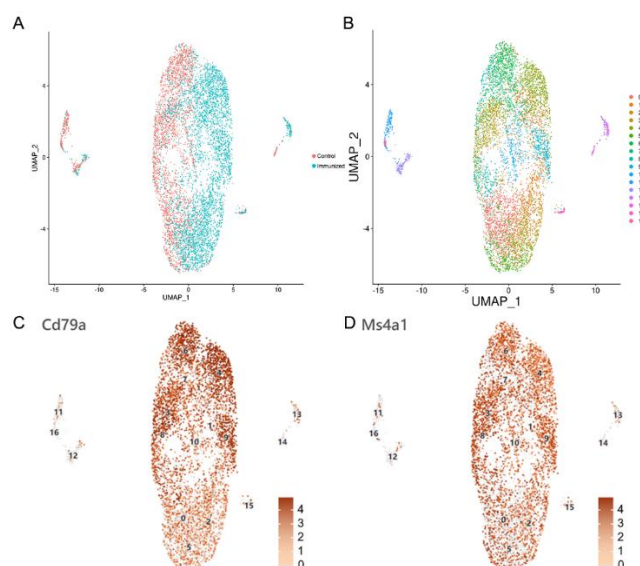


图 1.4 UMAP 降维及初步聚类分析

Figure 1.4 UMAP dimensionality reduction and preliminary cluster analysis

(A) 对照组和免疫组细胞降维示意图; (B) 聚类降维示意图;

(C) *Cd79a* 表达分布示意图; (D) *Ms4a1* 表达分布示意图

1.3.3 细胞类型及表达分析

根据各类细胞主要表面标志物表达量，对样本进行初步细胞分群。如图 1.5A 所示，主要分为以下几种细胞：B 细胞、血细胞、巨噬细胞、NK 细胞、浆细胞样树突状细胞和 T 细胞。如图 1.5B 和 1.5C 所示，分析各类细胞占总细胞数的百分比和在两组中的占比，B 细胞在两组中占比接近。如图 1.6 所示，对不同类型细胞进行转录组分析，对比不同类型细胞和同类型细胞中不同聚类的表达差异。

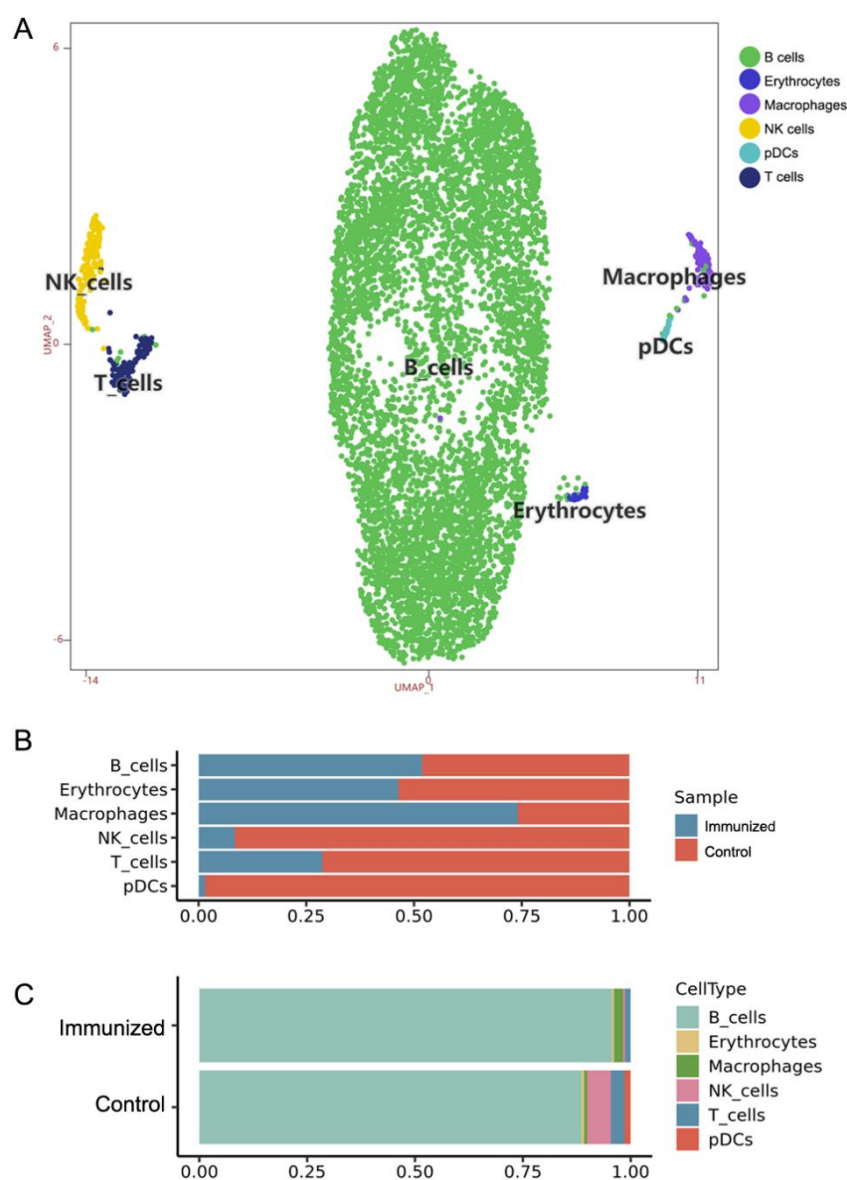


图 1.5 细胞类型初步分析

Figure 1.5 Preliminary analysis of cell types

(A) 细胞初步分型示意图；(B) 组间细胞占比示意图；(C) 组内细胞占比示意图

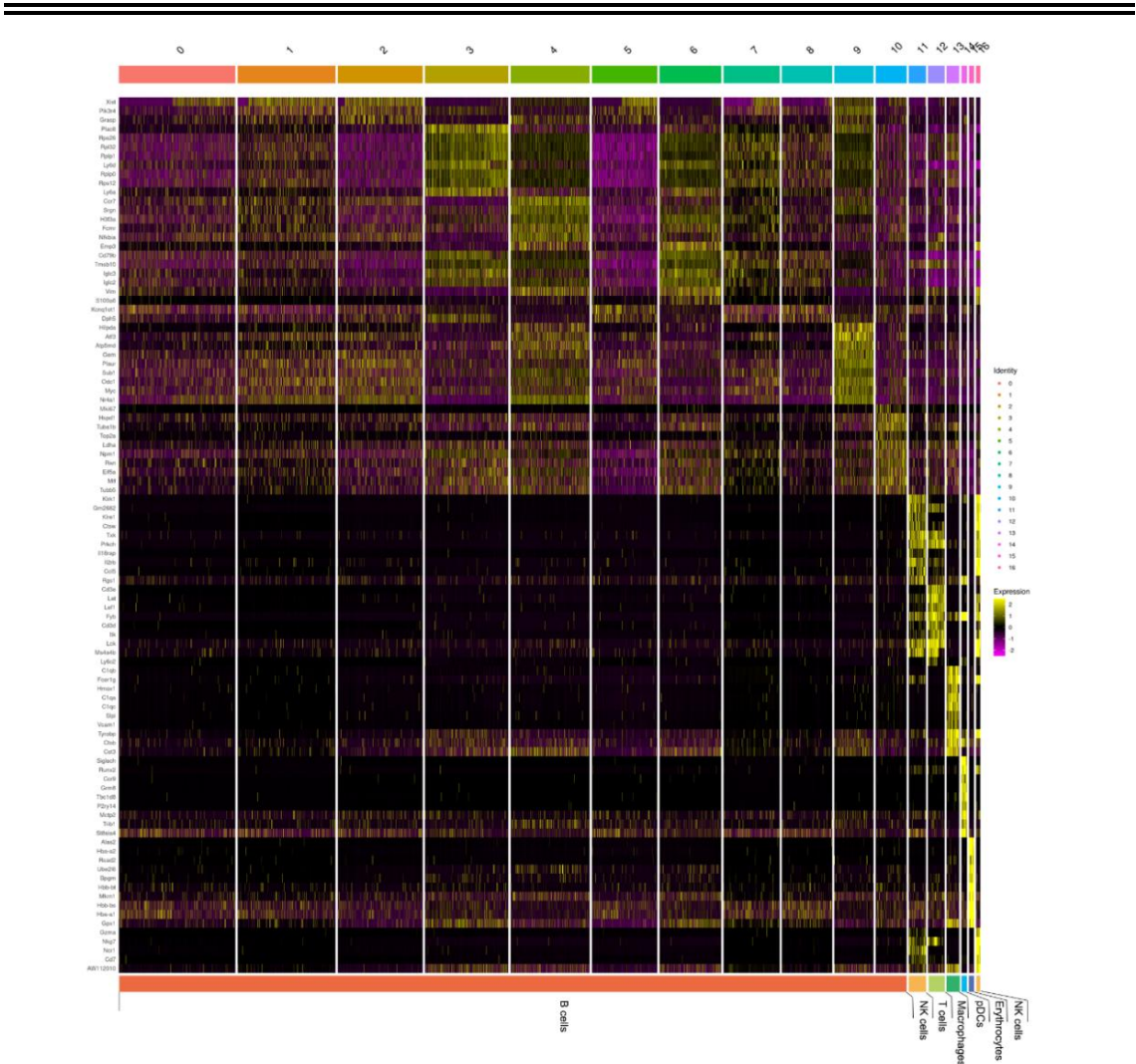


图 1.6 不同类型细胞转录组分析

Figure 1.6 Transcriptome analysis of different types of cells

对细胞类型初步分析后，继续对 B 细胞进行更细致的类型分析。所有 B 细胞（如图 1.7A）被分为 9 个聚类，其中 MBC 的主要表面标志物 *Cd9*、*Cd274* 在聚类 1、4 中表达较高，MBC 代表性转录因子 *Ebi3* 和 *Ybx3* 在聚类 8 中表达较高，因此，初步分析 1、4、8 三个聚类为 MBC（如图 1.7B）。另外，如图 1.7 所示，根据 IGHD（图中未显示）、*Il4r* 高表达可以判断 0、2、5 三个聚类为初始 B 细胞（Naïve B Cell, NBC）；3、6、7 群细胞可能由于细胞质量问题，没有符合其特征的亚群，根据 *Cd19*、*Ms4a1* 高表达的特征，可以将其判断为不成熟 B 细胞（Immature B Cell, IBC）^[93,94]。

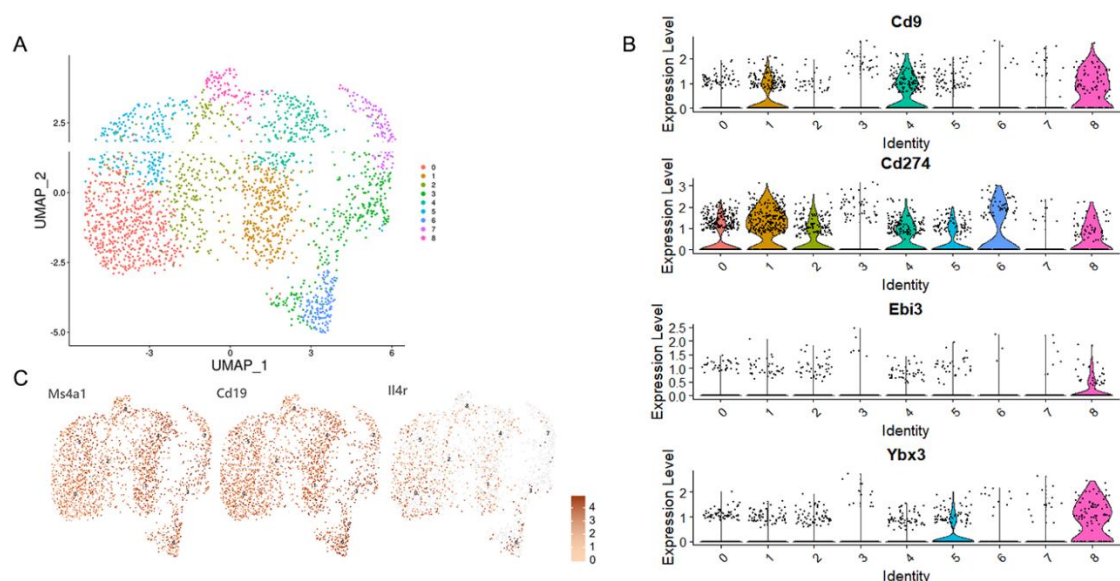


图 1.7 根据表面标志物分类 B 细胞

Figure 1.7 Classify B cells according to surface markers

(A) 细胞 MNN 分型示意图；(B) MBC 主要标志物表达情况；
(C) NBC/IBC 主要标志物表达情况

1.3.4 MBC 测序数据分析

1.3.4.1 B 细胞拟时序分析

如图 1.8A 所示，根据不同细胞聚类基因表达情况，模拟时序并构建细胞轨迹。如图 1.8B 所示，不同细胞聚类沿细胞轨迹不同程度分布，其中 4、8 两个聚类落在细胞轨迹末端，符合 MBC 特征。如图 1.8C 所示，根据免疫组和对照组中基因表达多样性，观察其随时间变化的情况。免疫组的多样性相比对照组随时间推移逐渐降低，推测可能是免疫后特定表达特征的 B 细胞得到了富集。因此，综合拟时序分析和表面标志物分析确定 MBC、NBC 和 IBC 细胞分型，三种 B 细胞在拟时序轨迹上如图 1.8D 所示分布。

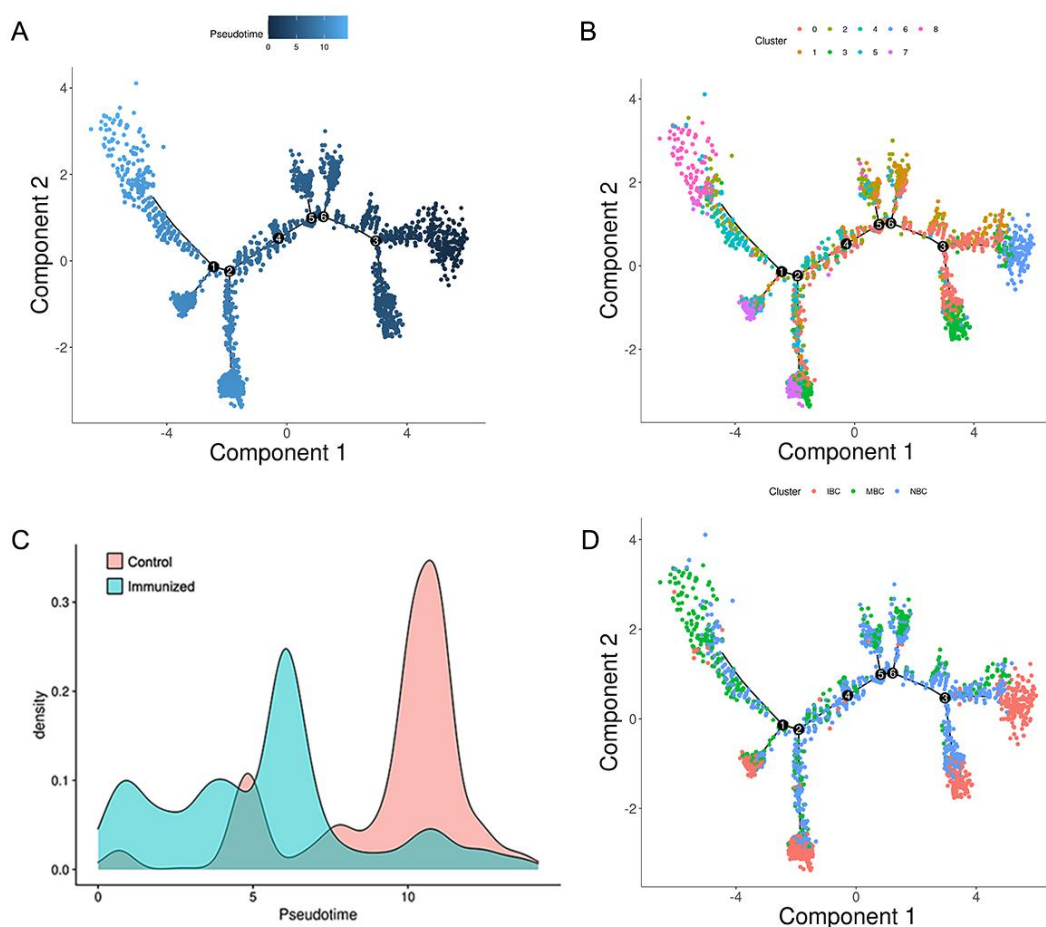


图 1.8 根据拟时序分析分类 B 细胞

Figure 1.8 Classify B cells according to pseudotime analysis

(A) 拟时序细胞轨迹图; (B) 聚类沿细胞轨迹分布示意图;

(C) 组间细胞表达多样性分析; (D) 细胞类型沿细胞轨迹分布示意图

1.3.4.2 B 细胞 CytoTRACE 分析

如图 1.9A 所示, 细胞标志物和拟时序分析得到 MBC、NBC 和 IBC 三种 B 细胞分型, 并由 UMAP 二维化。如图 1.9B 和 1.9C 所示, 三种 B 细胞中, NBC 数量最多, MBC 在免疫组和对照组中数量接近。

通过细胞轨迹分析验证三种 B 细胞分型, 如图 1.10A 和图 1.10B 所示, CytoTRACE score $MBC > NBC > IBC$, 说明 MBC 处于分化末端, 符合 MBC 特征。其中, 如图 1.10C 所示, 与 CytoTRACE 相关的基因表达中 *Rpl41* 等 10 个基因均明显上调。

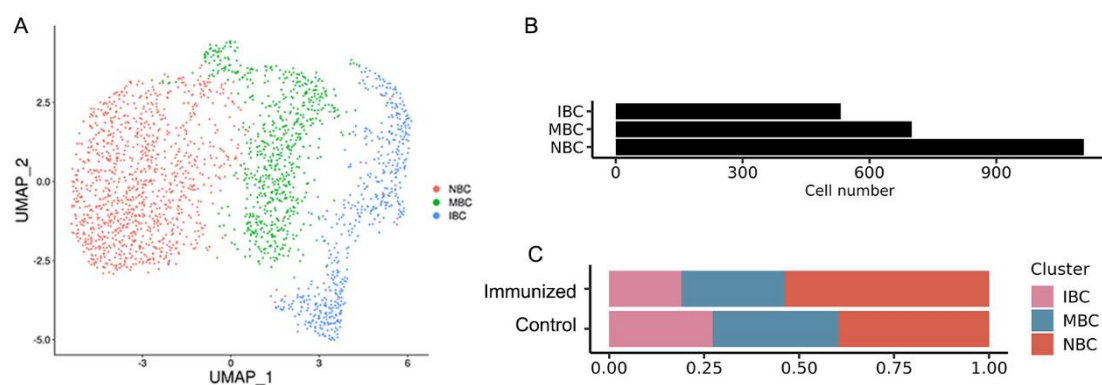


图 1.9 B 细胞分类和数量

Figure 1.9 B cell classification and quantity

(A) 细胞类型细致分型示意图；(B) 三类细胞数量情况；(C) 组内细胞占比情况

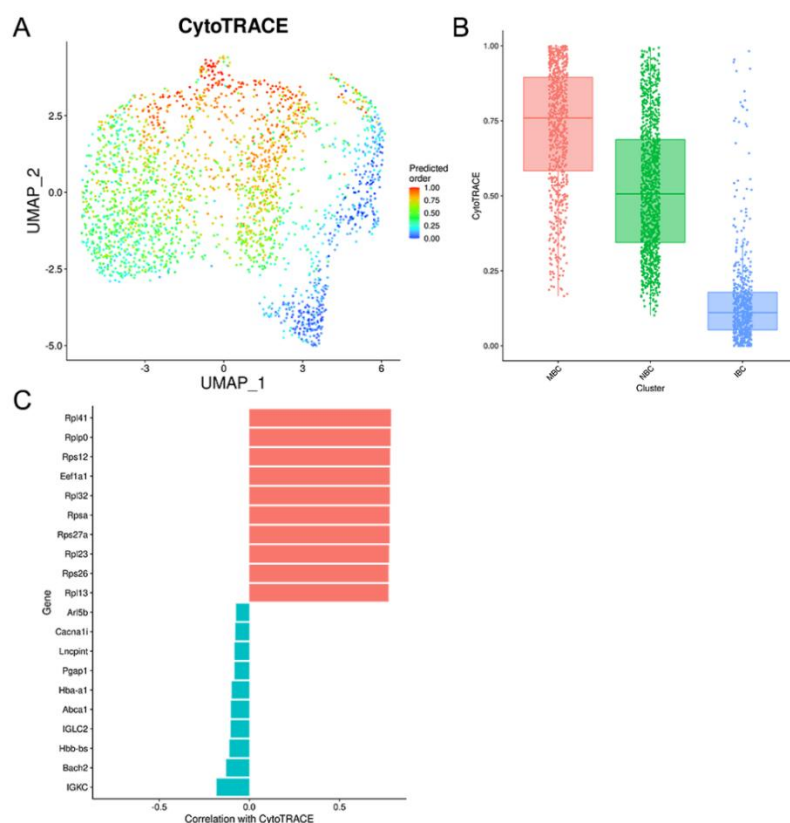


图 1.10 细胞轨迹验证 B 细胞分型

Figure 1.10 Cytotrace analysis verifies B cell types

(A) Cytotrace 评分分布示意图；(B) 三类细胞 Cytotrace 评分；

(C) Cytotrace 相关基因表达情况

1.3.4.3 B 细胞 SCENIC 转录因子分析

根据测序数据，通过 AUC_{cell} 分析免疫组中 MBC、NBC 和 IBC 的转录因子调控，以更好地区分和鉴定 B 细胞。如图 1.11A 所示，比较三种细胞的转录因子调控情况，相比 NBC 和 IBC，MBC 中存在 *Hes5* 和 *Irf9* 两种转录因子的上调，其中 *Hes5* 与 B 细胞发育抑制相关，*Irf9* 则是 B 细胞表达抗体的必要基因。如图 1.11B 所示，MBC 转录因子 *Tbx21* 和 *Klf10* 也存在上调，提示 MBC 被激活，与文献报道相一致，进一步佐证该群细胞的 MBC 特征^[93,95-100]。

在转录组数据中继续关注 MBC，可以发现如图 1.12A 所示，三群细胞均具有明显的 B 细胞特征（*Ms4a1* 和 *Cd19* 上调）。如图 1.12B 所示，其中，与 MBC 识别相关的一系列标志物存在上调：其中，*Cd9*、*Cd81* 和 *Cd274* 是鼠源 MBC 与 NBC 区分的重要标志物；*Ybx3* 是 MBC 重要的调控因子；*Ell3* 在成熟和活化的人 B 细胞中动态上调等^[94]。除文献报道的几种标志物外，还有 *Ackr3*、*Rsu1*、*Dph5* 等共 17 种新 MBC 标志物被发现（黑色虚线框内）。这些标志物的表达情况均可以进一步证明该群细胞的 MBC 特征。

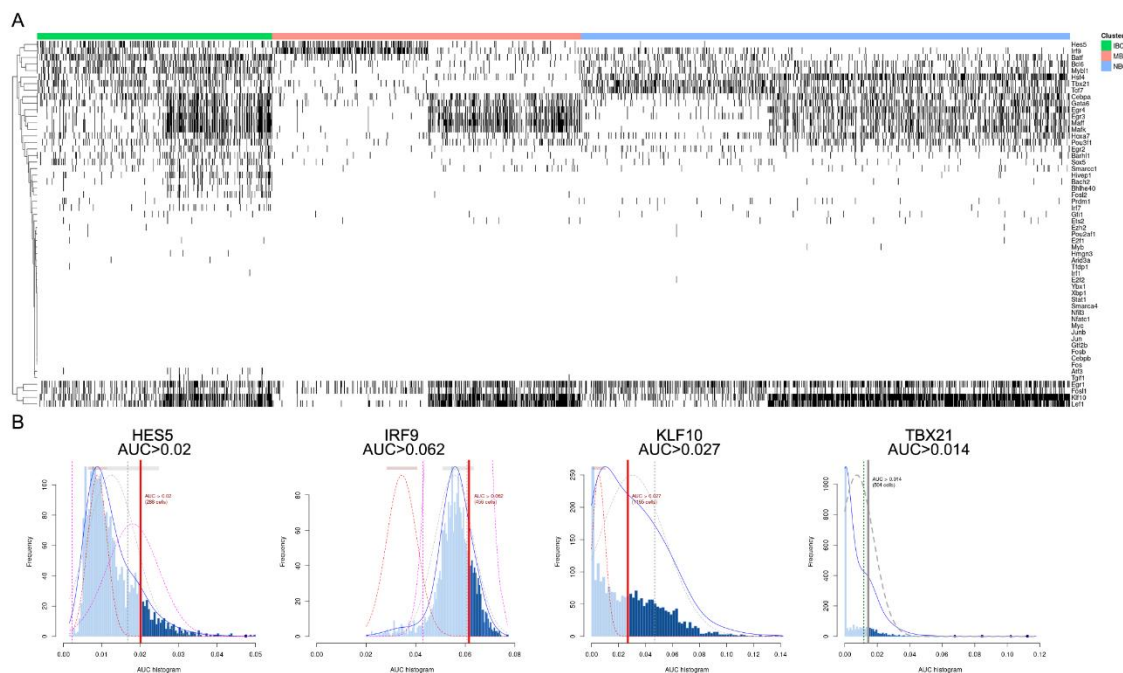


图 1.11 B 细胞转录因子分析

Figure 1.11 B cell Transcription factor analysis

（A）三类细胞转录因子调控情况；（B）MBC 关键转录因子调控情况

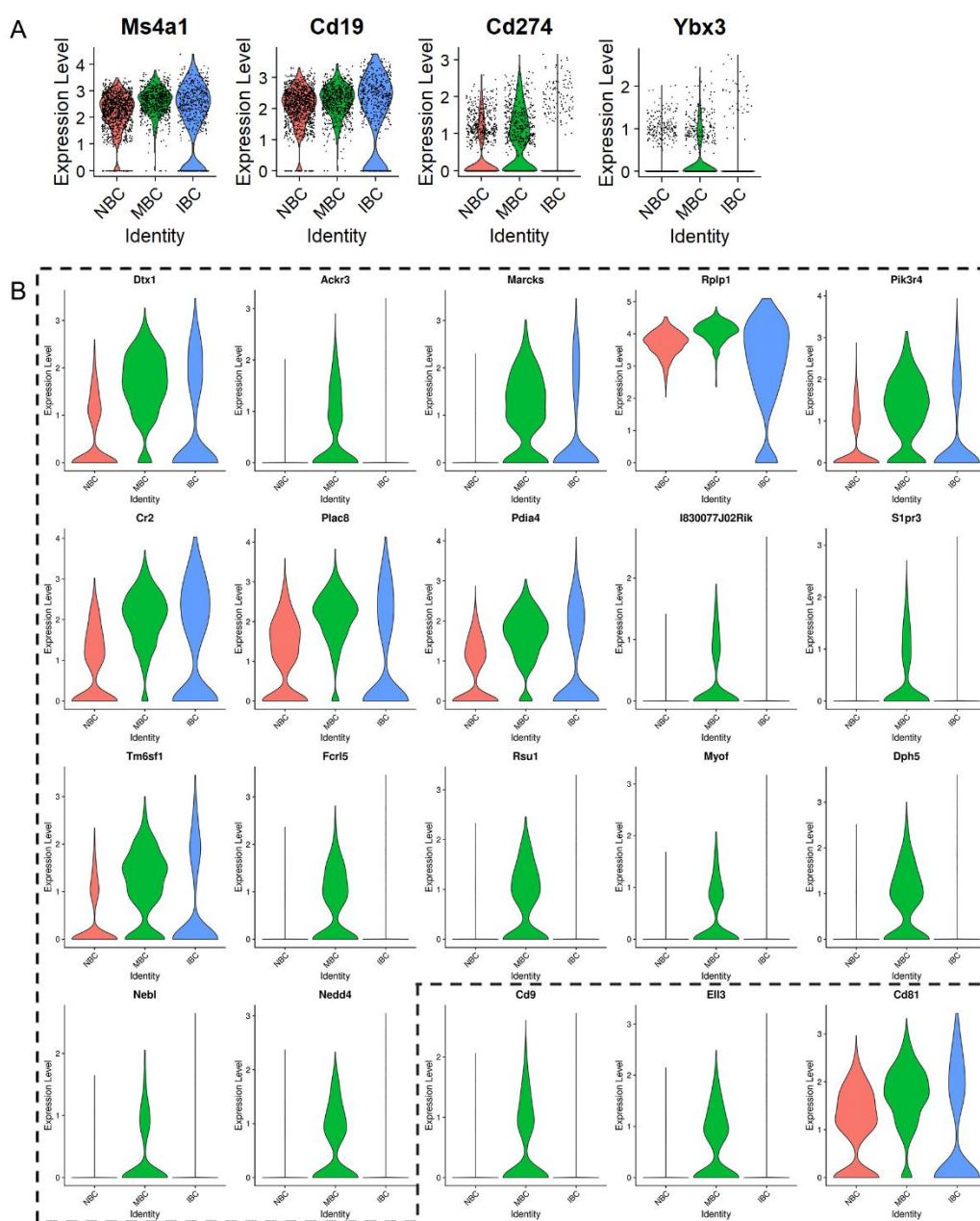


图 1.12 MBC 标志物表达情况

Figure 1.12 MBC marker expression

(A) 三类细胞中 B 细胞标志物表达情况；(B) 三类细胞中 MBC 标志物表达情况

1.3.4.4 MBC 基因功能富集分析

如图 1.13 所示，功能富集分析的结果显示，富集最显著的功能在分子功能、生物学进程和细胞组分中分别是核糖体结构组分、翻译和核糖体。较为显著的功能是细胞质翻译和细胞质核糖体大亚基。这些结果说明 MBC 被抗原激活，核糖体大量合成相关蛋白和信号分子，正在向能够分泌抗体的浆细胞分化。

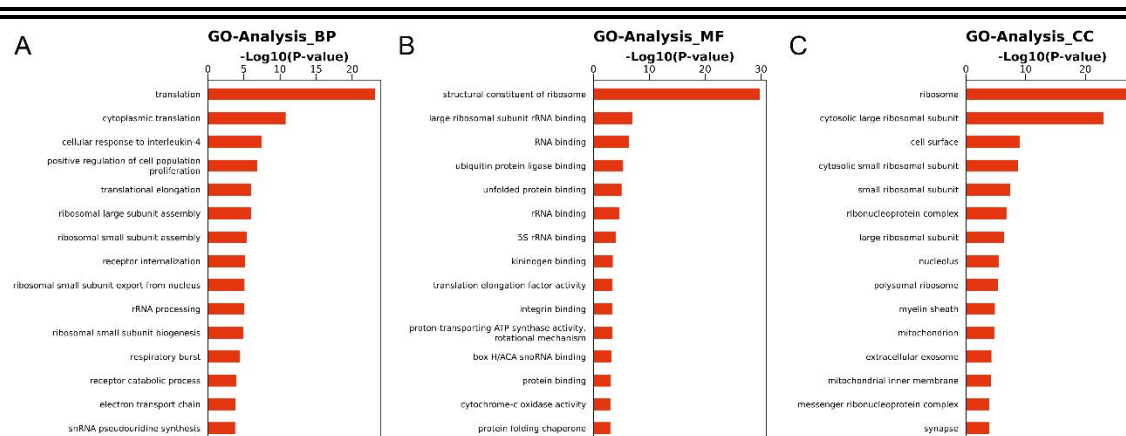


图 1.13 基因功能富集分析

Figure 1.13 Gene ontology function enrichment analysis

(A) 生物学过程富集分析; (B) 分子功能富集分析; (C) 细胞组分富集分析

1.3.4.5 MBC 信号通路富集分析

根据差异基因表达情况, 对 MBC 进行信号通路富集分析, 结果如图 1.14 所示, 核糖体和病毒感染引起的免疫相关通路显著富集。这些分析结果说明, 免疫后 B 细胞正经历与免疫相关的生物学过程, 相关通路被激活并上调。

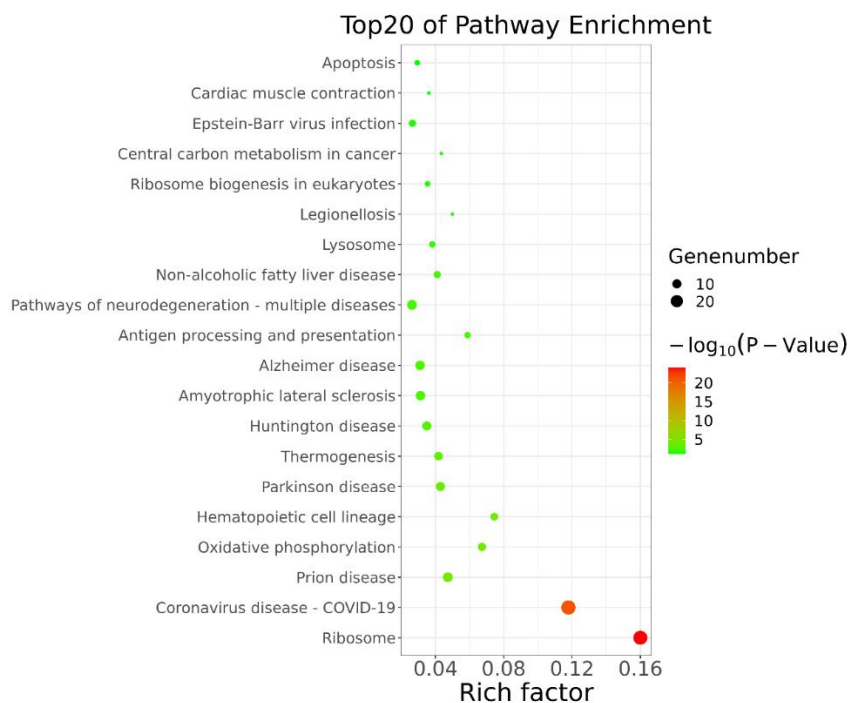


图 1.14 基因信号通路富集分析

Figure 1.14 Enrichment analysis of gene signaling pathways

1.3.5 BCR 特征分析

1.3.5.1 V 基因和 J 基因使用频率分析

通过人源抗体数据库识别和分析 BCR 测序数据。如图 1.15A 所示，在轻重链 V 基因中 IGHV1-2 和 IGKV3-20 使用频率最高；如图 1.15B 所示，在轻重链 J 基因中 IGHJ4、IGKJ1 和 IGKJ4 使用频率最高；如图 1.15C 所示，在重链 V、D、J 基因搭配中，IGKJ4-none-IGHV1-2、IGKJ4-none-IGHV6-1 使用频率最高；如图 1.15D 所示，在轻链 V、J 基因搭配中，IGKJ1-IGKV3-20、IGKJ2-IGKV3-20 和 IGKJ4-IGKV3-20 使用频率最高。这些高频使用的 V、D、J 基因代表了人源抗体转基因小鼠体内的 VDJ 基因使用偏好性。

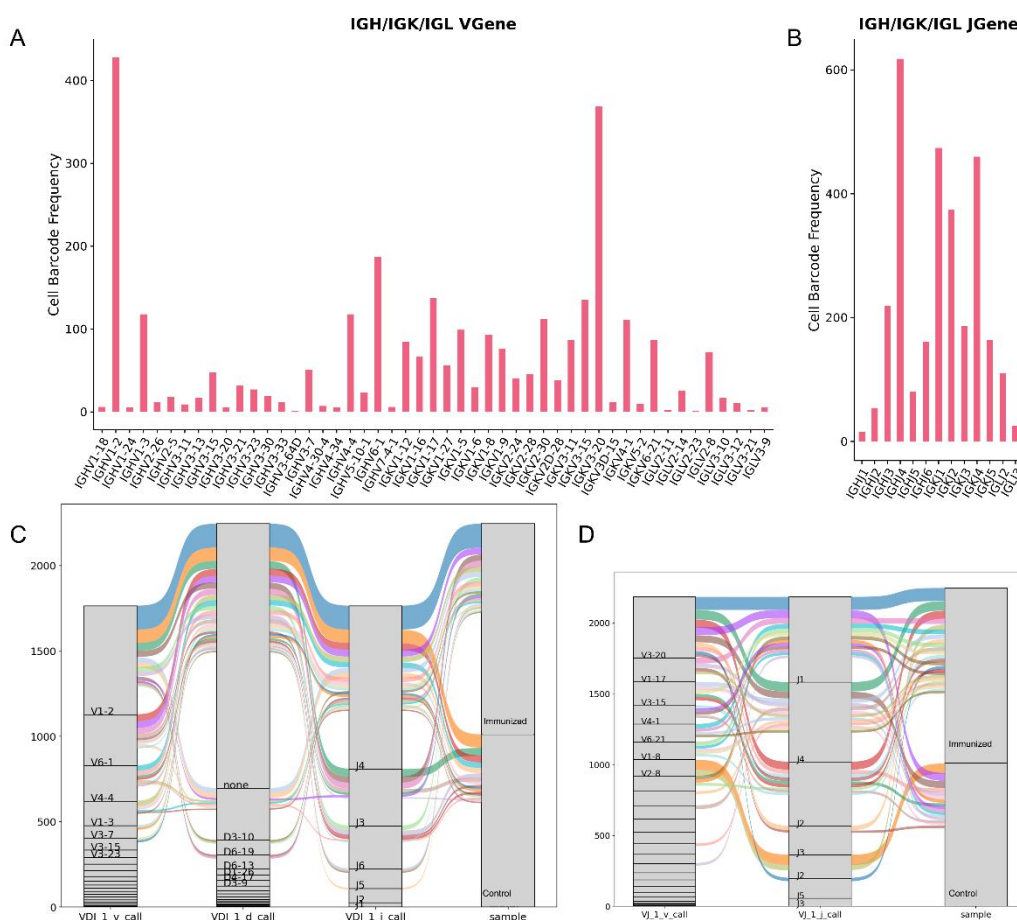


图 1.15 轻重链 V 基因和 J 基因使用频率

Figure 1.15 Frequency of use of light and heavy chain variable and joining genes

(A) V 基因使用频率分析； (B) J 基因使用频率分析；
(C) VDJ 使用频率分析； (D) VJ 使用频率分析

1.3.5.2 BCR Cluster 和 Cluster Overlap 分析

根据 BCR 的相关性分析 BCR 聚类，并分析 MBC 与 IBC 或 NBC 中的 CDR 是否存在 overlap，判断不同类型细胞间是否存在演变。如图 1.16A 所示，聚类 size 最大的是 Clonotype20，所包含的 BCR 序列均为 IGK。如图 1.16B 所示，在 MBC 中，可以在免疫组中发现数量和多样性更多的 BCR 序列，其中包含 IGK 和 IGH。如图 1.16C 所示，免疫组相比对照组，与 NBC 中存在 overlap 的 CDR 在 MBC 中大幅增多。这些实验结果说明，蓖麻毒素类毒素免疫后，机体内针对蓖麻毒素的 MBC 产生了特异性富集。

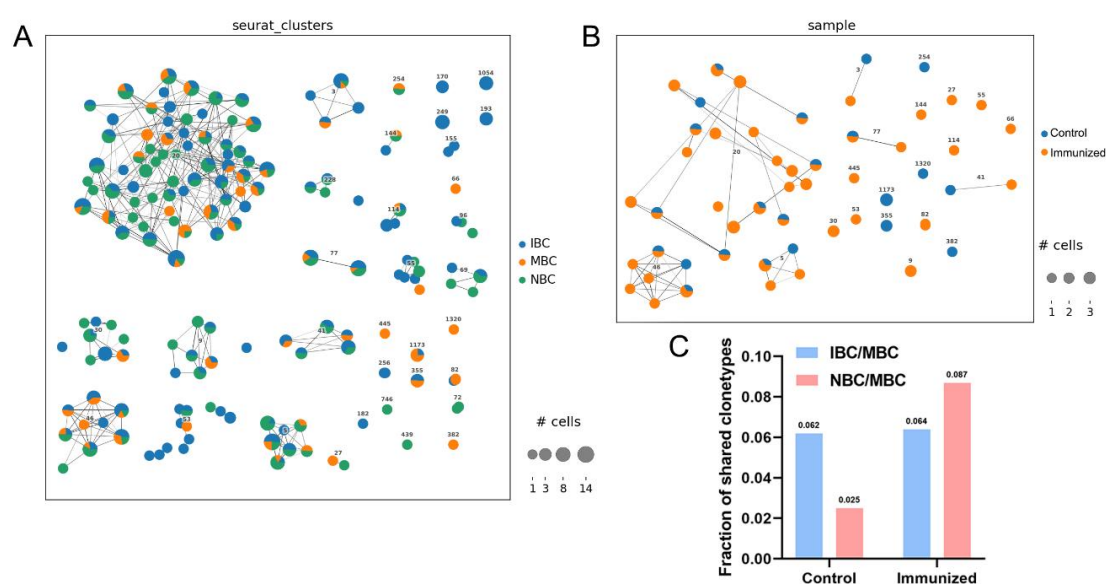


图 1.16 BCR Cluster 和 Cluster Overlap 分析

Figure 1.16 BCR Cluster and Cluster Overlap analysis

(A) 细胞 BCR 聚类分析；(B) 组间 BCR 聚类分析；(C) 细胞 BCR Overlap 分析

1.3.5.3 CDR3 长度和组成分析

为了更好地理解 CDR3 与 VDJ 基因的关系，对 CDR3 长度和 VDJ 基因组成进行分析。如图 1.17 所示，对不同长度的 CDR 分别计算 V 基因使用频率，从结果中可以发现，重链 CDR3 长度富集在 40~50 bp 左右，IGHV1-2 使用频率最高；轻链 CDR3 富集在 30~35 bp 左右，IGLV2-8 和 IGKV3-20 使用频率最高。

为了更加细致地分析 CDR3 中的氨基酸组成，对 CDR3 长度和组成进行分析。如图 1.18A 所示，重链可变区和轻链可变区中的 CDR3 长度分别集中在 13~16 个氨基酸和 10~12 个氨基酸，各个长度下细胞种类比例基本一致。如图 1.18B 所示，

在 4 个长度中的重链可变区 CDR3 氨基酸组成中, CAR-FDYW 成为占比最多的突变形式, 中间所包含的不同长度的变体中以 D、G、Y 这 3 种氨基酸为主。值得注意的是, Y 在多个位置的占比均较大。如图 1.18C 所示, 11 个氨基酸的轻链可变区 CDR3 占比最大。在 3 个长度中的轻链可变区 CDR3 氨基酸组成中, CQQY-S-P-TF 为占比最多的突变形式。

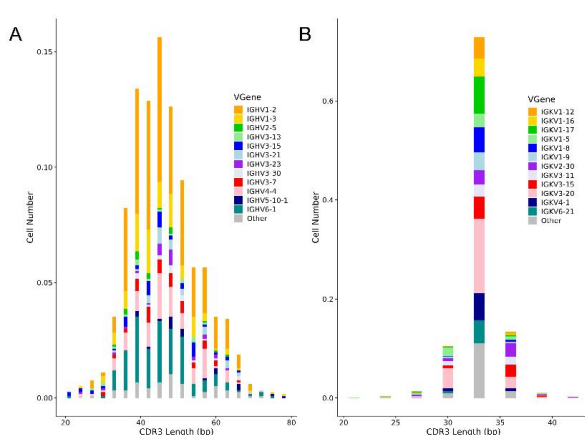


图 1.17 CDR3 长度和 V 基因使用分布

Figure 1.17 Distribution of CDR3 length and V gene use

(A) 重链 V 基因占比与 CDR3 长度分析; (B) 轻链 V 基因占比与 CDR3 长度分析

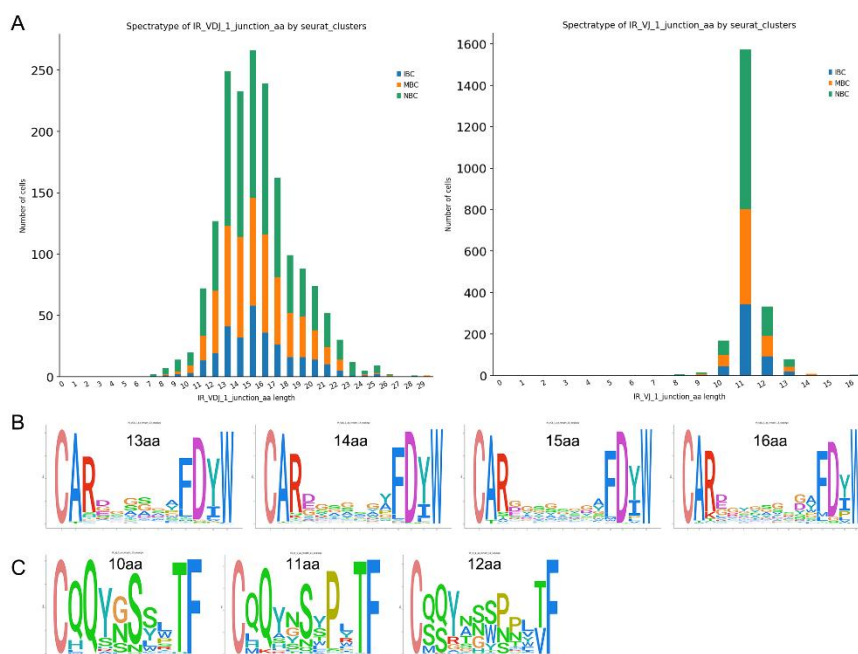


图 1.18 CDR3 长度和组成分析

Figure 1.18 CDR3 length and composition analysis

(A) CDR3 长度分析; (B) 重链 CDR3 氨基酸分析; (C) 轻链 CDR3 氨基酸分析

1.3.5.4 蓖麻毒素抗原表位分析

为了比较蓖麻毒素中和性抗原表位与免疫优势抗原表位的关系，对免疫组中 MBC 所包含的 IGH 的可变区序列（见表 1.1）进行同源建模。如图 1.19A 和图 1.19B 所示，对 20 个主要的 Clonotype 的重链可变区序列进行同源建模，并与数据库中的蓖麻毒素分子模型进行蛋白分子对接，最终得到抗原抗体复合物模型。如图 1.20A 所示，通过软件模拟对接，免疫类毒素后 MBC 中重链可变区与蓖麻毒素结合表位集中在蓖麻毒素分子的 1~40、200~230、250~270、340~370、470~510 位氨基酸处，说明这些位置代表了蓖麻毒素分子的免疫优势表位。如图 1.20B 和图 1.20C 所示，与之前文献总结的一些蓖麻毒素中和性抗原表位相比，蓖麻毒素的免疫优势表位存在差别，这说明机体识别蓖麻毒素后产生的高结合力抗体的结合表位并未集中在中和性表位处，因此对于蓖麻毒素中和抗体的发现应该补充探索结合力稍弱的抗体。

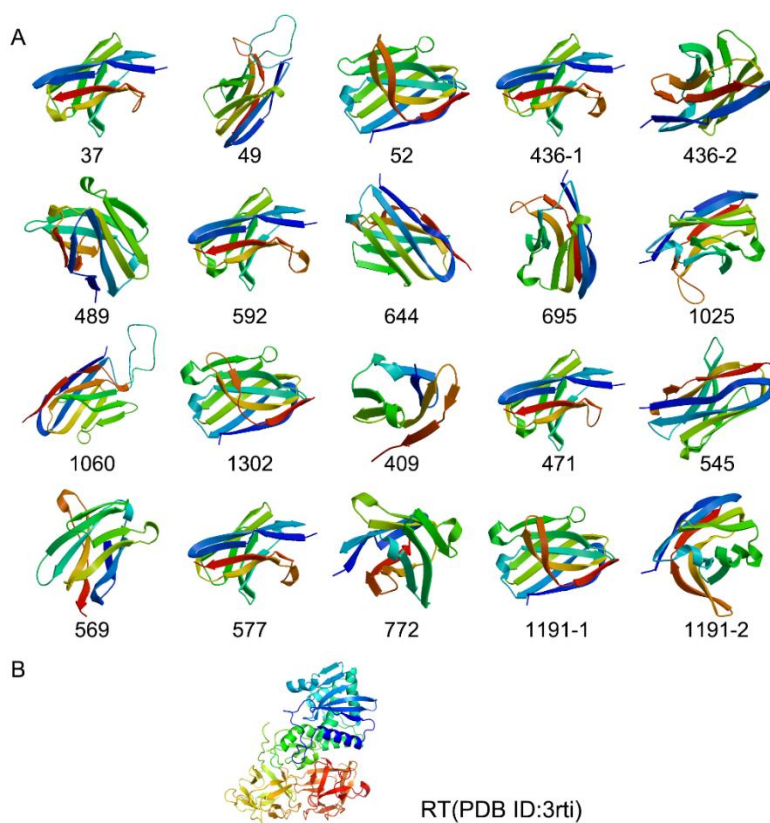


图 1.19 抗体重链可变区和蓖麻毒素分子建模

Figure 1.19 Molecular modeling of antibody heavy chain variable regions and ricin toxin

(A) 20 个主要克隆型 IGH 同源建模结构示意图； (B) 蓖麻毒素结构示意图

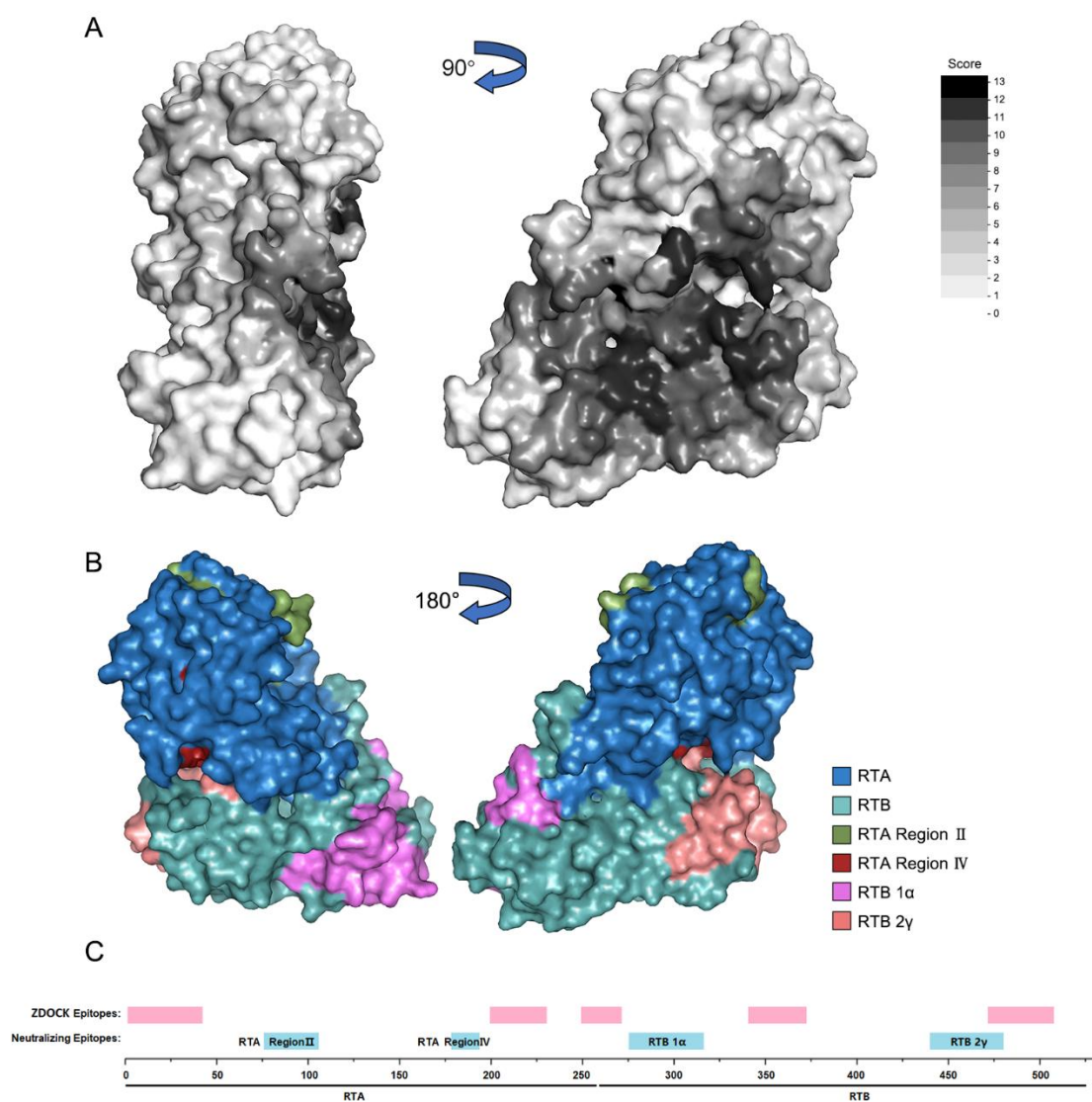


图 1.20 蓖麻毒素免疫优势表位与中和性表位

Figure 1.20 Ricin toxin immunodominance epitopes and neutralizing epitopes

(A) 蓖麻毒素免疫优势表位示意图；(B) 蓖麻毒素中和性表位示意图；

(C) 蓖麻毒素免疫优势表位与中和性表位对比示意图

表 1.1 分子对接 BCR 克隆型信息汇总

Table 1.1 Summary of molecular docking BCR clonotypes information clonotypes

Clonotype	V gene	D gene	J gene	C gene	CDR3 aa
clonotype49	IGHV1-3	IGHD6-13	IGHJ3	IGHG1	CARARIAAAGTDAF DIW
clonotype577	IGHV1-2		IGHJ4	IGHG1	CARGTVAYYFDYW
clonotype436	IGHV1-2		IGHJ4	IGHG1	CARDRGGSYFDYW
clonotype436	IGHV7-4-1		IGHJ4	IGHG1	CARDCFDYW
clonotype1191	IGHV3-15	IGHD6-13	IGHJ3	IGHG1	CTTAYSSSWYGAFD IW
clonotype1191	IGHV3-15	IGHD4-17	IGHJ4	IGHG1	CTTVMTTVTTSYFD YW
clonotype1025	IGHV1-2	IGHD4-17	IGHJ3	IGHG1	CARGGDYGDPAF DIW
clonotype695	IGHV3-7		IGHJ4	IGHG1	CAREYSSGCLFDYW
clonotype409	IGHV1-3		IGHJ4	IGHG1	CARDLDYW
clonotype37	IGHV1-2	IGHD3-10	IGHJ4	IGHG1	CARGITMVRGVIDY W
clonotype772	IGHV6-1		IGHJ4	IGHG1	CASGLFFDYW
clonotype52	IGHV3-15	IGHD3-10	IGHJ4	IGHG1	CTTEGITMVRGVTP YFDYW
clonotype644	IGHV3-30		IGHJ4	IGHG1	CAKEKLAAALDYW
clonotype545	IGHV3-13		IGHJ3	IGHG1	CARELGRGAFDIW
clonotype569	IGHV1-3		IGHJ4		CARGSSGWYFDYW
clonotype1302	IGHV3-15		IGHJ5	IGHG1	CTTDQGIVGANNWF DPW
clonotype1060	IGHV6-1		IGHJ3	IGHG1	CARAGDDAFDIW
clonotype592	IGHV1-2		IGHJ4	IGHG1	CAREVAAAGFDYW
clonotype489	IGHV1-24		IGHJ4	IGHG1	CATGNWGSIDYW
clonotype471	IGHV1-2		IGHJ4	IGHG1	CARGGAALDYW

1.4 讨论

随着对细胞功能和表达的深入研究，研究者们逐渐清楚地认识到，同群细胞间看似相同，但其中单个细胞与细胞之间的表达存在着差异^[101]。因此，单细胞测序技术应运而生，该技术可以帮助将细胞进行单个分离、测序和分析^[102,103]。

以 10X Genomics Chromium 转录组测序为例，细胞与凝胶珠组成含有单个细胞和单个凝胶珠的油包水滴 GEMs。每一个凝胶珠携带有足量的核酸链，而每条核酸链由 read primer、barcode、UMI、poly 尾组成。一个凝胶珠上所有的核酸链的 barcode 是相同的序列，用于标记细胞。一个凝胶珠上所有的核酸链的 UMI 是不同的，用于标记不同的 RNA 序列。之后，对测序样本进行 cDNA 回收、建库和测序，通过识别 barcode 得到单个细胞的表达矩阵等数据。这种单细胞检测平台的商业化，使得单细胞测序技术的使用门槛和检测成本大大降低，而且提高了细胞通量^[104,105]。

研究人员认为，确定与蓖麻毒素的中和性表位库和免疫优势表位对于蓖麻毒素疫苗开发非常重要^[107]。先前的研究表明，适应性免疫产生的大多数 mAb 均以非中和抗体和一些毒素增强抗体为主^[108,109]。而中和抗体仅占蓖麻毒素特异性抗体库的 10% 左右^[110]。因此，假设存在一个或多个免疫优势表位，这些表位提高了蓖麻毒素分子表面在体内的表位免疫原性，并且趋避了中和性相关表位。因此正确认识免疫系统对蓖麻毒素分子的适应性免疫并表征由适应性免疫产生的 BCR 受体库具有重要意义。为了探究机体内 BCR 对于蓖麻毒素的特异性识别，使用蓖麻毒素类毒素免疫人源抗体转基因小鼠，通过单细胞测序对其脾脏 B 细胞进行转录组和 BCR 测序。MBC 是 B 细胞的一种亚型，初次免疫后在生发中心内形成，若再次免疫，MBC 将产生更强的体液免疫反应^[111]。因此，在多次使用蓖麻毒素类毒素免疫动物后，对脾脏 MBC 进行 BCR 受体库的测序，更加有利于分析对蓖麻毒素类毒素具有特异性的 BCR 序列。

单细胞转录组分析、GO 基因功能富集分析和信号通路富集分析的研究结果显示，MBC 被抗原激活，核糖体大量合成相关蛋白和信号分子，正在向能够分泌抗体的浆细胞分化；并且 B 细胞正经历与免疫相关的生物学过程，相关通路被激活并上调。BCR 受体库分析的研究结果显示，在重链可变区的 V、D、J 基因搭配中，IGKJ4-none-IGHV1-2、IGKJ4-none-IGHV6-1 使用频率最高；在轻链可变区的 V、J 基因搭配中，IGKJ1-IGKV3-20、IGKJ2-IGKV3-20 和 IGKJ4-IGKV3-20 使

用频率最高。在免疫组 MBC 的重链可变区和轻链可变区中的 CDR3 长度分别集中在 13~16 个氨基酸和 10~12 个氨基酸，各个长度下细胞种类比例基本一致。在重链可变区 CDR3 氨基酸组成中，CAR-FDYW 成为占比最多的突变形式，中间所包含的不同长度的变体中以 D、G、Y 这 3 种氨基酸为主，Y 在多个位置的占比均较大。轻链可变区 CDR3 氨基酸组成中，CQQY-S-P-TF 为占比最多的突变形式。与之前文献总结的一些蓖麻毒素中和性抗原表位相比，蓖麻毒素的免疫优势表位存在差别，这与之前文献中报道基本一致，验证了之前的假设。这说明蓖麻毒素类毒素进入到机体内以后，部分非中和性表位优先被识别并生成高结合力抗体，而这些抗体对于最终中和毒素可能收效甚微。因此，对于开发蓖麻毒素中和抗体，应该适当地调整策略，探索结合力稍弱的抗体可以更好地兼顾结合力和抗原表位这两个影响抗体功能活性的重要因素。同样的，这对蓖麻毒素疫苗的开发也具有提示作用，应当尽量提高分子表面中和性表位的免疫原性，中和性表位如果能在机体内被优先识别并产生高结合力抗体，疫苗的有效性可能会显著提高。

这些研究结果既提示了抗体中和功能与表位的相关性，也说明对于蓖麻毒素中和抗体的发现应该补充探索结合力稍弱的抗体，这对接下来开发中和抗体具有启示意义，并提供了一个重要策略。本研究为开发蓖麻毒素疫苗和蓖麻毒素中和抗体奠定了研究基础，具有重要的理论意义。

1.5 小结

(1) 单细胞转录组数据分析，发现 17 种新脾脏记忆 B 细胞标志物，脾脏记忆 B 细胞在蓖麻毒素类毒素免疫后翻译相关功能和免疫相关信号通路上调。

(2) 通过对 B 细胞受体库分析，表征脾脏 B 细胞中 V、D、J 基因搭配使用频率，CDR3 长度和氨基酸组成。发现最高使用频率的 VDJ 基因搭配形式，IGKJ4-none-IGHV1-2 和 IGKJ4-none-IGHV6-1，并发现免疫组中记忆 B 细胞中重链和轻链可变区的 CDR3 基本组成形式分别为 CAR-FDYW 和 CQQY-S-P-TF。

(3) 通过对免疫组记忆 B 细胞的 20 个主要克隆型 IGH 进行同源建模和抗原模拟对接，发现蓖麻毒素的免疫优势表位和中和性表位存在差别，提示弱结合力抗体的中和功能潜力。

第二章 全人源抗蓖麻毒素中和抗体制备和鉴定

单克隆抗体是结合特定抗原表位的抗体，可以利用杂交瘤技术平台进行抗体筛选和制备。由于人体免疫系统能够识别鼠源抗体，发生人抗鼠抗体反应，导致严重的不良反应，几十年来，单克隆抗体历经鼠源、嵌合、人源化和全人源单抗四个技术阶段，人源化和全人源单抗逐渐成为抗体药物的大势所趋。所以从鼠源抗体到全人源抗体，是减轻、避免排异反应的一种发展之路。

因此，本研究通过全人源抗体转基因小鼠，利用杂交瘤技术筛选和制备特异性针对 RT 的全人源中和抗体。本研究对于开发蓖麻毒素中和抗体具有重要意义，为相关研究提供了新思路和技术方向。

2.1 实验材料及仪器

2.1.1 实验主要试剂

本章节中所有引物的合成和 DNA 测序均由吉林省库美生物科技有限公司完成；用于检测的 RTA 和 RTB 重组蛋白为实验室保存；蓖麻毒素为实验室保存；RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基（Dulbecco 改良 Eagle 培养基）、无水乙醇和 EDTA 均购自美国 Sigma 公司；胎牛血清、HAT 添加剂和 HT 添加剂购自美国 Gibco 公司；二甲苯、苏木精、醇溶伊红、中性树胶、石蜡、DMSO、Tris、HCl、Glycine、NaCl、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2HPO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、Tween-20、BSA、 H_2SO_4 、 NaHCO_3 、TMB 底物溶液、SDS protein loading buffer、石蜡油、30%丙烯酰胺、SDS、TEMED、琼脂糖和管式透析器均购自生工生物工程股份有限公司；电融合缓冲液购自美国 BTX 公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（增强型）购自上海碧云天生物技术有限公司；考马斯亮蓝免脱色染液购自上海雅酶公司；抗体 Ig 类/亚类鉴定 ELISA 试剂盒购自武汉英科生物技术有限公司；HiTrap Protein G HP 1 mL 预装柱购自美国 GE 公司；DNA 标准分子量 Marker、蛋白质标准分子量 Marker 和 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 购自北京 Takara 公司；MTT、DSB-X Biotin Protein Labeling Kit 和 RNA 逆转录试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司；DNA Stain Red 购自荷兰 Enzo Life Sciences 公司；葡萄糖测定试剂盒（葡萄糖氧

化酶法) 购自南京建成生物工程研究所; HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Human IgG 购自美国 Proteintech 公司; HRP Avidin 购自美国 Biolegend 公司。

2.1.2 主要仪器及设备

高速低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司, 5810R 型); 层析实验冷柜(北京博医康实验仪器有限公司, YC-2 型); Milli-Q 超纯水制备仪(美国 Milipore 公司, IQ 7000 型); 电热恒温培养箱(上海新诺仪器集团有限公司, HPS-250 型); 酶联免疫检测仪(瑞士 Tecan 公司, F500 型); 酸度计(瑞士 Mettler 公司, PHS-4CT 型); 超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司, YCD-EL259A 型); 超净工作台(深圳市博立斯智能装备有限公司, DL-CJ-IN 型); 分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司, BCE224I-1CCN 型); 恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司, 85-1 型); PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司, T100 型); 小型垂直电泳转印系统(美国 Bio-Rad 公司, 1658033 型); AKTA 蛋白纯化系统(美国 Cytiva 公司, Purifier 100 型); 高精度小动物体重秤(北京佳宸弘生物技术有限公司, jc-1200g-01 型); 数显冷冻包埋机(桂宁实验器材有限公司, TS210569); 三温三控水槽(上海博迅实业有限公司, DK-8D 型); 病理组织摊片机(山东博科生物产业有限公司, BT-I); 石蜡切片机(深圳市达科为生物技术股份有限公司, KD-202A); 移液器(美国 Thermo Scientific 公司, 4510030 型)。

2.1.3 主要溶液配制

PBS 溶液: 称取 11.68 g NaCl、9.44 g Na_2HPO_4 、5.28 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 加蒸馏水定容至 2 L, 调节 pH=7.4, 室温保存备用。

PBST 溶液: 0.05% Tween-20-PBS 溶液。向 1 L PBS 溶液中加入 500 μL 的 Tween-20, 充分搅拌溶解, 室温保存备用。

固定液: 4%多聚甲醛-PBS 溶液。向 800 mL PBS 溶液中加入 100 mL 甲醛溶液, 充分混合后, 用 PBS 溶液定容至 1 L, 室温保存备用。

封闭液: 3%BSA-PBS 溶液。称取 0.45 g BSA, 用 PBS 溶液定容至 15 mL, 现用现配。

终止液: 2 mol/L 硫酸溶液。向 100 mL 水中边搅拌边缓慢滴加 21.74 mL 硫酸,

充分混匀后定容至 200 mL，室温保存。

洗脱液：0.1 mol/L 甘氨酸溶液。称取 7.5 g 甘氨酸粉末，加蒸馏水 800 mL 充分搅拌溶解后，调节 pH 值 $\leq$ 2.7，定容至 1 L 后 4℃保存。

中和缓冲液：1 mol/L Tris-HCl 溶液。称取 19.36 g Tris 固体，加蒸馏水 160 mL 充分搅拌溶解后，调节 pH 值=9.0，定容至 200 mL 后 4℃保存。

饱和硫酸铵溶液：称取硫酸铵粉末 780 g 以上，加入约 1 L 蒸馏水，充分搅拌均匀，调节 pH=7.0。室温静置过夜，仍能观察到溶液底部有部分硫酸铵不溶，则上清液为饱和硫酸铵溶液。

50×TAE 溶液：称量 $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 18.6 g，Tris 121 g，缓慢加入约 300 mL 蒸馏水，充分搅拌并溶解后加入 28.55 mL 的冰乙酸，定容至 500 mL，室温保存。

5×电泳缓冲液：称取 15.1 g Tris 固体和 94 g Glycine 固体，量取 10%SDS 溶液 50 mL，加水 800 mL 充分溶解后，用 HCl 将 pH 值调至 8.3，定容至 1 L 后常温保存。

10%过硫酸铵溶液：称取 5 g 过硫酸铵，加蒸馏水定容至 50 mL 充分搅拌溶解，分装 4℃保存。

10%SDS 溶液：称取 10 g SDS 粉末，加蒸馏水至 100 mL 充分搅拌溶解后分装，4℃保存。

1 mol/L 碳酸氢钠溶液：称取 8.4 g 碳酸氢钠固体，加水至 100 mL 充分溶解，调节 pH=9.0，分装后 4℃保存。

2.1.4 数据库及软件

IMGIT (<http://www.imgt.org>) ;

DNAMAN 9 (<https://www.lynnnon.com/dnaman.html>) ;

ImageJ (<https://imagej.net/software/imagej/>) ;

Primer Premier 5 (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>) 。

2.1.5 实验动物及细胞株

用于制备全人源抗体的实验动物采用人源抗体转基因小鼠 CAMouse，购自重庆金迈博生物科技有限公司，使用清洁鼠饲料和垫料进行分笼饲养。其他实验动物均采用 SPF 级 4~6 周龄的 BALB/c 雌性小鼠，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，许可证号：SCXK（L）2020-0001，使用清洁鼠饲料和垫料进行分笼饲养。

SP2/0 骨髓瘤细胞购自中国医学科学院基础医学研究所国家生物医学实验细胞资源库；A549 细胞购自 American Type Culture Collection（ATCC）。

2.2 实验方法

2.2.1 动物免疫

该部分方法参见 1.2.1.2。

2.2.2 抗体制备

2.2.2.1 SP2/0 骨髓瘤细胞的培养

在超净工作台中进行无菌操作，耗材应提前进行高压灭菌，超净工作台应提前进行紫外灭菌。

- （1）取出需要复苏的 SP2/0 细胞，置于 37℃ 水浴，轻轻摇晃快速融化；
- （2）融化后将细胞转移至 2 mL 10% DMEM 培养液中，室温 1000 r/min 离心 3 min；
- （3）在细胞培养皿中加入 10% DMEM 的完全培养液；
- （4）离心结束后，弃掉上清。加入 1 mL 完全培养液重悬细胞，转移至细胞培养皿中；
- （5）“8”字晃匀后，培养于 37℃ 5% CO₂ 培养箱；
- （6）24 h 后，视细胞生长状态，进行传代、换液等其他操作处理。

2.2.2.2 脾细胞提取和细胞融合

脾细胞的提取方法参见 1.2.2.1。

(1) 将脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞一起加入至 10 mL PBS 溶液，充分混合，1200 r/min 离心 3 min，弃去上清。

(2) 加入融合液洗涤细胞，1200 r/min 离心 3 min，吸去上清。

(3) 重复步骤 (2)，将细胞用融合液重悬备用。

(4) 将细胞悬液加入至融合槽内，设定融合参数，进行细胞融合流程。向电融合结束后的细胞悬液中加入 10 mL 完全培养基充分洗涤，1200 r/min 离心 3 min，弃去上清。再加入 15 mL 完全培养基重悬细胞，于 37°C 5% CO₂ 培养过夜。

(5) 将融合细胞以 1000 r/min 离心 5 min，弃去上清。向融合细胞内加入 1640 培养基充分重悬，和半固体培养基充分混匀后继续培养。

2.2.2.3 杂交瘤细胞饲养和筛选

(1) 在 5% CO₂ 37°C 条件下培养杂交瘤细胞 7 天，用 HAT 完全培养基换液一半。

(2) 待克隆生长至白点时，挑单个细胞克隆至 200 μ L/孔 HT 培养基培养；培养 3~5 天后，观察细胞生长密度达到 50~70% 时，吸出 50 μ L 通过 ELISA 方法检测对抗原的结合力。

2.2.2.4 ELISA 检测抗蓖麻毒素抗体

ELISA 一般操作流程参见 1.2.1.3，在此方法上稍作修改。

(1) 包被步骤更改：用 PBS 溶液稀释蓖麻毒素至 5 μ g/mL。

(2) 一抗步骤更改：加入吸取的杂交瘤细胞培养液上清。

(3) 二抗步骤更改：用 PBS 溶液 1:10000 稀释羊抗人酶标二抗。

2.2.2.5 腹水制备

(1) 每组准备 3 只 BALB/c 小鼠，8~10 周龄，腹腔注射石蜡油 500 μ L/只。

(2) 7 天后对小鼠进行腹腔注射杂交瘤细胞 1×10^7 个/只。

(3) 待第 5~7 天左右开始密切观察小鼠腹部, 若腹部明显变大, 行动不便, 则使用针头放腹水, 鼠未死亡, 便可继续观察和取腹水。

(4) 腹水统一保存在 -80°C 。

2.2.2.6 腹水粗纯化

(1) 腹水蛋白浓度太高而且含有血液、油脂和组织碎片, 因此需要粗纯化。12000 r/min 离心 5 min 后取上清部分, 用 PBS 溶液 10 倍稀释该溶液。

(2) 加入 2 倍体积的饱和硫酸铵溶液, 充分搅拌后 4°C 静置 6 h 以上。

(3) 8000 r/min 离心 30 min, 弃掉上清, 用 PBS 溶液溶解沉淀, 4°C 保存。

2.2.2.7 Protein G 亲和层析纯化

(1) 平衡: 用 PBS 溶液平衡 10 个柱体积以上, 直到基线无峰。

(2) 上样: 用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤器过滤样品后上样, 然后继续通平衡液至无峰。

(3) 洗脱: 用 $0.1\ \text{mol/L}$ 甘氨酸溶液洗脱至峰平, 将洗脱液滴在盛有中和缓冲液的 EP 管中, 使体积比例最终约 $60\ \mu\text{L/mL}$ 。

(4) 将洗脱液缓慢上下颠倒混匀, 倒入透析袋内, 用 100 倍体积的 PBS 溶液在 4°C 条件下透析 12 h 以上。

(5) 透析结束后加入 50% 甘油, 在 -20°C 保存, 切勿冻融。

2.2.3 抗体基本信息鉴定

2.2.3.1 SDS-PAGE 凝胶电泳

(1) 配胶: 配制 SDS-PAGE, 配制体系见表 2.1。

(2) 制样: 向样品中加入 SDS protein loading buffer, 沸水煮样 5 分钟。

(3) 上样: 设置电泳电压为 80 V, 每孔上样 $10\ \mu\text{g}$ 蛋白样品和 marker, 待跑至胶底部可以结束电泳。

(4) 染色: 免脱色染色液应在室温摇晃染色 15 分钟, 染色结束后通过凝胶成像系统观察条带。

2.2.3.2 ELISA 鉴定抗体 IgG 亚型

ELISA 一般操作流程参见 1.2.1.3，在此方法上稍作修改。

- (1) 包被步骤更改：用试剂盒中抗原稀释液按说明书稀释试剂盒中抗原。
- (2) 一抗步骤更改：用 PBS 溶液稀释抗体样品至 200 ng/mL。
- (3) 二抗步骤更改：用 PBS 溶液按说明书稀释试剂盒中二抗。
- (4) 测值步骤更改：根据 OD 值按说明书计算抗体浓度，IgG 亚型鉴定为 IgG1 和 IgG2 中值较高者。

表 2.1 SDS-PAGE 凝胶配制体系

Table 2.1 SDS-PAGE gel preparation system

分离胶（12%）成分	体积（μL）	浓缩胶（5%）成分	体积（μL）
蒸馏水	3300	蒸馏水	1700
30%丙烯酰胺溶液	4000	30%丙烯酰胺溶液	415
Tris-HCl（pH8.8）	2500	Tris-HCl（pH6.8）	315
10%SDS	100	10%SDS	25
10%过硫酸铵	100	10%过硫酸铵	25
TEMED	4	TEMED	2.5
Total	约 10 mL	Total	约 2.5 mL

2.2.3.3 杂交瘤细胞总 RNA 提取和逆转录

- (1) 取对数期生长的单克隆杂交瘤细胞，加入 500 μL Lysis Buffer 进行裂解处理，充分裂解后将悬液转移至 1.5 mL EP 管，涡旋 10 s；
- (2) 向裂解后的细胞悬液中加入等体积无水乙醇，混匀后将液体加入至 RNA 吸附柱，4000 ×g 离心 1 min；
- (3) 加入 500 μL Wash Buffer 至 RNA 吸附柱内，12000 ×g 离心 1 min；
- (4) 弃掉废液，将 RNA 吸附柱装回收集管，空管离心一次；

- (5) 将 RNA 吸附柱放到无 RNA 酶的 1.5 mL EP 管上，开盖晾干 2 min；
- (6) 在 RNA 吸附柱的膜中心加入 30 μ L Elution Buffer，室温孵育 2 min；
- (7) 12000 $\times g$ 离心 1 min 洗脱，紫外分光光度计测定浓度，保存于 -80 $^{\circ}$ C；
- (8) 对总 RNA 进行逆转录反应，反应体系见表 2.2。设置 PCR 仪参数为：37 $^{\circ}$ C 60 min、95 $^{\circ}$ C 5 min。反应结束后得到的 cDNA 可保存于 -20 $^{\circ}$ C。

表 2.2 逆转录反应体系

Table 2.2 Reverse transcription reaction system	
成分	体积 (μ L)
5 $\times$ RT Buffer	4.0
MgCl ₂	4.0
dNTP	2.0
RNase RRI	0.5
M-MLV	2.5
Oligo (dT)	0.5
总 RNA	1.0 μ g
ddH ₂ O	6.5 -总 RNA 体积
共计	20.0

2.2.3.4 抗体可变区 PCR 扩增和分析比对

- (1) 通过聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 实验鉴定和扩增可变区序列，PCR 体系见表 2.3。通过 Primer Premier 5 软件设计引物，PCR 实验所使用引物见表 2.4。
- (2) 设置 PCR 仪扩增参数为：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min、94 $^{\circ}$ C 50 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 120 s，共扩增 35 个循环，最后在 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min。反应结束后，通过琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果，操作方法参见 2.2.3.5。
- (3) 将 PCR 扩增产物转交至公司测序，通过 IMGT 数据库比对测序结果，分析可变区序列。

(4) 从 NCBI 数据库中获取 43RCA (VH GenBank: FJ178346.1, VL GenBank ID: FJ178347.1) 和 3E1 (VH GenBank: DQ389247.1, VL GenBank ID: DQ389246.1.) 的可变区序列, 通过 DNAMAN 软件与其他已有抗体序列一起进行多序列比对。

表 2.3 PCR 反应体系

Table 2.3 PCR reaction system

成分	体积 (μL)
上游引物	1.0
下游引物	1.0
样品 cDNA	2.0
PrimeSTAR Max DNA Polymerase	12.5
ddH ₂ O	8.5
共计	25.0

表 2.4 引物列表

Table 2.4 List of primers

基因名称	引物名称	引物类型	碱基序列* (5'-3')
huVH	PVH1	上游引物	TATCCTCGAGCGGTACCSAGGTSC AGCTGGTRCAGTCTGG
	PVH2		TATCCTCGAGCGGTACCSAGGTGC AGCTGKTGGAG
	PVH3		TATCCTCGAGCGGTACCCAGRTCA CCTTGAAGGAGTCT
	PVH4		TATCCTCGAGCGGTACCCAGSTGC AGCTRCAGSAGT
huVL	PVHback	下游引物	GCGGATGCGCTAGCTGARGAGA CRGTGACC
	PVK1	上游引物	TAATGCGCGCATGCCGMCATCCRG WTGACCCAGTCTCC

PVK2		TAATGCGCGCATGCCGATATTGTG ATGACYCAGWCTCC
PVK3		TAATGCGCGCATGCCGAAATTGTG WTGACRCAGTCTCC
PVK4		TAATGCGCGCATGCCGAAACGAC ACTCACGCAGTCT
PVKback	下游引物	GGTCGACCCTCCGGAACGTTTGAT HTCCASCTTGGT

*注：本列使用了简并碱基：R=A/G；M=A/C；S=G/C；Y=C/T；K=G/T；W=A/T。

2.2.3.5 琼脂糖凝胶电泳

- （1）配胶：配制琼脂糖凝胶，配制体系见表 2.5。
- （2）上样：待凝胶冷却凝固后，将样品和 Marker 加入至孔内。
- （3）电泳：设定电泳参数为：电压 110 V，电泳时间 30 min，开始电泳。
- （4）通过凝胶成像系统观察电泳结束后凝胶中的条带。

表 2.5 琼脂糖凝胶配制体系

Table 2.5 Agarose gel preparation system	
成分	含量
1×TAE 溶液	20 mL
琼脂糖	0.2 g
DNA Stain Red	2 μL

2.2.4 抗体对蓖麻毒素结合活性鉴定

2.2.4.1 ELISA 测定抗体结合力

ELISA 一般操作流程参见 1.2.1.3，在此方法上稍作修改。

- （1）包被步骤更改：用 PBS 溶液稀释蓖麻毒素至 5 μg/mL。
- （2）一抗步骤更改：用 PBS 溶液稀释抗体样品至不同浓度梯度（200 μg/mL、

100 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 、3.125 $\mu\text{g/mL}$ 、0.781 $\mu\text{g/mL}$ 、0.195 $\mu\text{g/mL}$ 、0.049 $\mu\text{g/mL}$ 、0.012 $\mu\text{g/mL}$ 和 0 $\mu\text{g/mL}$ ）。

(3) 二抗步骤更改：用 PBS 溶液 1:10000 稀释羊抗人酶标二抗。

2.2.4.2 ELISA 鉴定结合亚基

ELISA 一般操作流程参见 1.2.1.3，在此方法上稍作修改。

(1) 包被步骤更改：用 PBS 溶液稀释蓖麻毒素至 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 一抗步骤更改：用 PBS 溶液稀释抗体样品至 EC_{90} 浓度，在抗体溶液中分别混入不同浓度（1 mg/mL 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$ ）的 RTA 或 RTB 重组蛋白。

(3) 二抗步骤更改：用 PBS 溶液 1:10000 稀释羊抗人酶标二抗。

2.2.4.3 ELISA 鉴定抗体表位分析

ELISA 一般操作流程参见 1.2.1.3，在此方法上稍作修改。

(1) 包被步骤更改：用 PBS 溶液稀释抗体样品至 EC_{90} 浓度。

(2) 一抗步骤更改：用 PBS 溶液稀释蓖麻毒素至 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

(3) 二抗步骤更改：用 PBS 溶液分别稀释不同抗体样品至 EC_{90} 浓度，并混入 5 $\mu\text{g/mL}$ 的生物素修饰的蓖麻毒素，混匀后加入 100 $\mu\text{L/孔}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

(4) 增加三抗步骤：用 PBS 溶液 1:10000 稀释酶标亲和素后充分混匀，加入 100 $\mu\text{L/孔}$ 后，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h。

(5) 竞争耐受性的计算：阳性孔为包被 A 抗体，一抗 bio-RT，二抗 PBS；阴性孔为包被 A 抗体，一抗 RT，二抗 A 抗体和 bio-RT；实验孔为包被 A 抗体，一抗 RT，二抗 B 抗体和 bio-RT。因此，A、B 抗体表位竞争耐受性 = (实验孔 OD 值 - 阴性孔 OD 值) / (阳性孔 OD 值 - 阴性孔 OD 值)。

2.2.4.4 蓖麻毒素的生物素修饰

(1) 取 200 μL 0.5 mg/mL 蓖麻毒素溶液，加入 1 mol/L 碳酸氢钠溶液 20 μL 。

(2) 用 40 μL DMSO 溶液溶解 DSB-X 生物素琥珀酰亚胺酯，充分混匀后，加入 2 μL 至蓖麻毒素溶液。

(3) 室温缓慢搅拌 1~1.5 h, 转移至微量管式透析器, 用 PBS 溶液 4℃透析 24 h 以上, 4℃保存。

2.2.5 抗体对蓖麻毒素中和活性鉴定

2.2.5.1 A549 细胞的培养

A549 细胞的培养方法参见 2.2.2.1。

2.2.5.2 MTT 鉴定蓖麻毒素对 A549 细胞毒性损伤

(1) 培养 A549 细胞密度为 8×10^4 个/mL, 继续培养 24 h 后加入不同浓度 (0 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、160 ng/mL、320 ng/mL、640 ng/mL、1000 ng/mL、2000 ng/mL) 的蓖麻毒素, 37℃孵育 2 h 后洗去。

(2) 继续培养 20 h 后, 加入 10 μ L/孔 MTT, 继续孵育 4 h。

(3) 用 1 mL 注射器慢慢将上清液体吸出, 加入 DMSO 100 μ L/孔, 充分震荡 5 min。通过酶标仪检测 490 nm 处吸光度值, 样本细胞活率 = $100\% \times \text{样本吸光度值} / \text{正常对照吸光度值}$ 。

2.2.5.3 MTT 评价抗体对蓖麻毒素中和活性

(1) 培养 A549 细胞密度为 8×10^4 个/mL, 继续培养 24 h 后, 加入不同浓度 (0 μ g/mL、12.5 μ g/mL、25 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL) 的抗体 100 μ L/孔, 37℃条件下孵育 1 h。

(2) 继续加入 0 ng/mL 或 320 ng/mL 的蓖麻毒素 100 μ L/孔, 37℃孵育 2 h。

(3) 吸去所有液体, PBS 洗 1 次, 换 10% DMEM 培养液。

(4) 继续培养 20 h 后, 加入 10 μ L/孔 MTT, 继续孵育 4 h。

(5) 取出后用 1 mL 注射器小心将液体吸出 (切勿触碰细胞), 每孔加入 100 μ L DMSO, 震荡 5 min 摇匀, 酶标仪检测 490 nm 处吸光度值。

2.2.5.4 体内攻毒保护实验

(1) 如图 2.11A, 每组准备 6 只小鼠, 8~10 周龄, 腹腔注射抗体 2.5 mg/kg。

(2) 12 h 或 24 h 后, 腹腔注射蓖麻毒素 16 μ g/kg ($2 \times \text{LD}_{50}$)。

(3) 测量并记录 0 h~72 h 内小鼠的血糖和体重值, 每 24 h 测量 1 次。

(4) 使用 SPSS 26 软件分析统计学差异性, 通过双边 t-检验测定两组独立样本数据之间的显著性差异。*表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$, ****表示 $p < 0.0001$ 。

2.2.5.5 血糖测定

(1) 通过葡萄糖(葡萄糖氧化酶法)测定试剂盒检测小鼠血糖。

(2) 对小鼠进行尾静脉取血, 5000 r/min 离心 10 min, 吸取血清部分保存于 -80°C, 注意不要吸到血浆等沉淀物。

(3) 加入 1 μ L/孔血清或校准液 (5.55 mmol/L), 然后加入葡萄糖测定试剂 100 μ L/孔, 37°C 孵育 10 分钟。

(4) 酶标仪检测 505 nm 处吸光度值, 根据吸光度值代入公式计算血糖浓度, 血糖浓度 (mmol/L) = $5.55 \times \text{样本孔吸光度值} / \text{校准孔吸光度值}$ 。

2.2.5.6 石蜡切片制备和苏木精-伊红染色

(1) 采样: 注射蓖麻毒素后, 取不同组小鼠肠道、肝脏、脾脏、肾脏组织, 并置于固定液中 24 h 以上, 待后续进行石蜡切片制备和苏木精-伊红 (Hematoxylin-eosin, HE) 染色。

(2) 样本处理: 切割样本至合适大小, 放入包埋盒。

(3) 脱水、浸蜡处理: 75%乙醇 (30 min) $\rightarrow$ 80%乙醇 (30 min) $\rightarrow$ 90%乙醇 (30 min) $\rightarrow$ 95%乙醇 (30 min) $\rightarrow$ 100%乙醇 (30 min) $\rightarrow$ 100%乙醇 (30 min) $\rightarrow$ 二甲苯 (2 min) $\rightarrow$ 二甲苯 (2 min) $\rightarrow$ 65°C 石蜡 (50 min) $\rightarrow$ 63°C 石蜡 (50 min)。

(4) 包埋处理: 放入预热的包埋机, 进行包埋。

(5) 切片制备: 切片厚度 7 μ m, 切片在 43°C 水中摊片, 待充分展开后捞片。

(6) 烤片: 65°C 烤片 4~6 h。

(7) 脱蜡、水化: 二甲苯 (5 min) $\rightarrow$ 二甲苯 (5 min) $\rightarrow$ 100%乙醇 (5 min) $\rightarrow$ 100%乙醇 (5 min) $\rightarrow$ 95%乙醇 (3 min) $\rightarrow$ 90%乙醇 (3 min) $\rightarrow$ 80%乙醇 (3 min) $\rightarrow$ 蒸馏水 (3 min) $\rightarrow$ 蒸馏水 (3 min)。

- (8) 苏木精染色 10 min，自来水洗涤 1 次，自来水蓝化 3~5 min。
- (9) 醇溶伊红溶液染色 10 s 左右。
- (10) 脱水、透明：95%乙醇（30 s）→100%乙醇（3 min）→100%乙醇（3 min）→二甲苯（3 min）→二甲苯（3 min）。
- (11) 通过中性树胶进行封片，室温晾干后，显微镜下观察病理变化。

2.3 实验结果

2.3.1 抗体制备和基本信息鉴定

2.3.1.1 杂交瘤细胞的筛选

通过对 SP2/0 骨髓瘤细胞与脾细胞进行电脉冲细胞融合，获得杂交瘤细胞。在半固体培养基中生长 7~10 天后，挑取杂交瘤的单个克隆，共计挑选 2208 个单克隆进行培养（如图 2.1A）。通过 ELISA 鉴定各杂交瘤单克隆细胞株培养液上清对蓖麻毒素的特异性结合能力，最终得到 49 株 $OD_{450nm} > 1.0$ 的杂交瘤克隆（如图 2.1B）。对上述 49 株杂交瘤细胞及时冻存，于 -80°C 条件下保存，防止丢失。

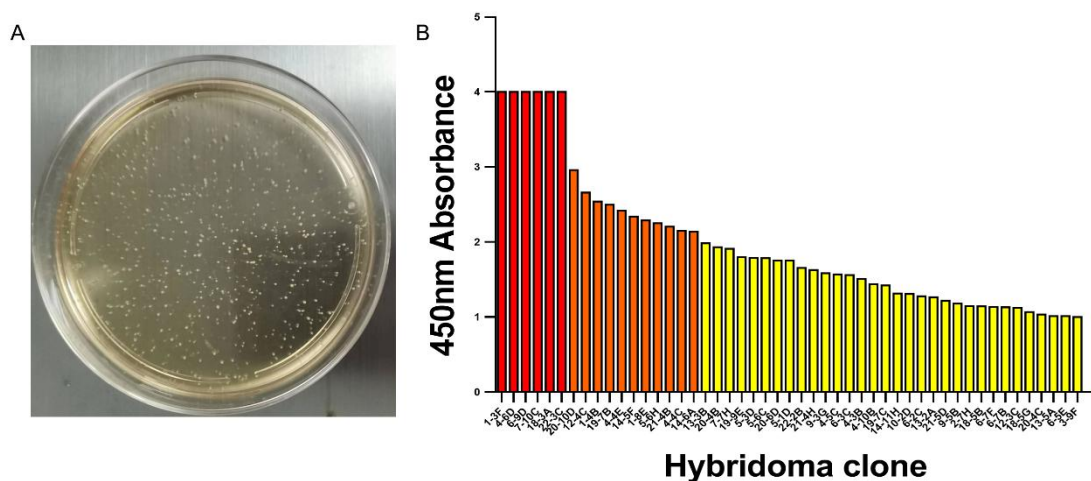


图 2.1 杂交瘤细胞的筛选和鉴定

Figure 2.1 Screening and identification of hybridoma cells

(A) 融合后杂交瘤细胞外观； (B) ELISA 鉴定杂交瘤上清结合力

2.3.1.2 腹水纯化和抗体纯度鉴定

依据第一章中总结的筛选策略，选取上清结合力最高的几株杂交瘤和结合力稍弱的几株杂交瘤，对小鼠注射杂交瘤细胞株后制备得到腹水。通过硫酸铵沉淀法去除腹水中的部分杂蛋白和油脂，如图 2.2 所示，然后对抗体溶液进行 Protein G 亲和层析，获得 10 种抗体蛋白。利用 BCA 法鉴定抗体的准确浓度，通过 SDS-PAGE 鉴定抗体纯度。如图 2.3 所示，能够分别在 25 kDa 和 55 kDa 处观察到抗体的轻链和重链条带。

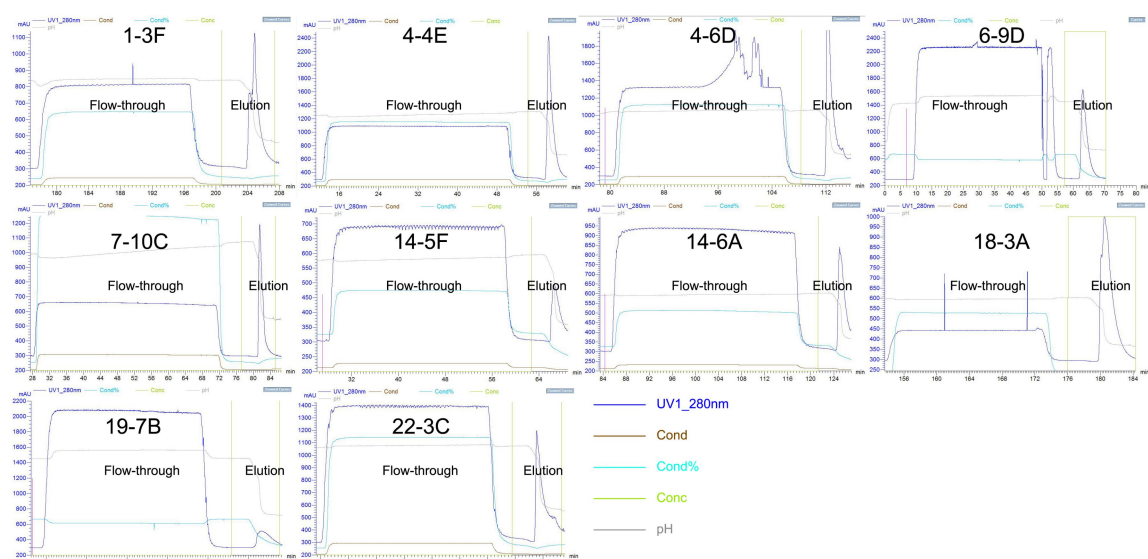


图 2.2 Protein G 亲和层析纯化曲线

Figure 2.2 Protein G affinity chromatography purification curve

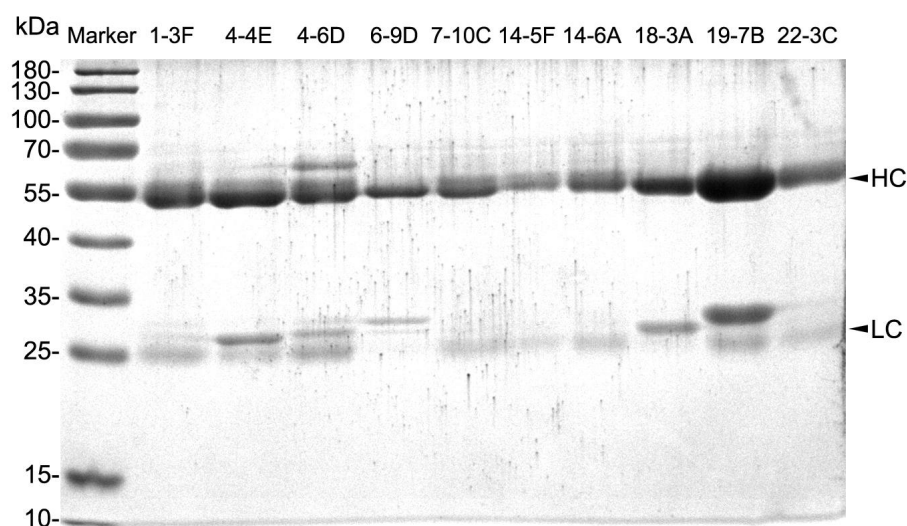


图 2.3 SDS-PAGE 鉴定抗体纯度

Figure 2.3 SDS-PAGE identifies antibody purity

2.3.1.3 抗体 IgG 亚型鉴定

通过抗体 IgG 亚型试剂盒对 10 种抗体进行鉴定，ELISA 结果显示存在 9 个 IgG1 抗体和 1 个 IgG2 抗体 18-3A（如图 2.4 和表 2.6）。

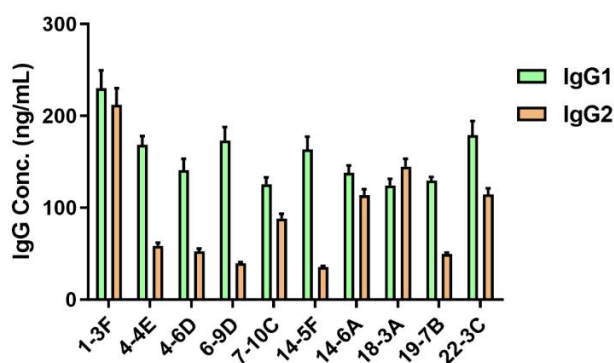


图 2.4 抗体 IgG 亚型鉴定

Figure 2.4 Identification of antibody IgG subtypes

2.3.1.4 抗体轻链和重链可变区的测序和比对

通过 PCR 反应对抗体轻链可变区和重链可变区进行扩增，如图 2.5 所示，经琼脂糖凝胶电泳鉴定轻链和重链可变区分子量大小均为 350 bp 左右，送至公司测序。测序结果先通过 IMGT 数据库进行比对，确定可变区的序列。然后在 NCBI 数据库调取 43RCA 和 3E1 两株已知可变区序列的鼠源抗蓖麻毒素中和抗体的序列。通过 IMGT 数据库比对，所有可变区均为人源。通过 DNAMAN 进行多序列比对，如图 2.6 所示，发现其中 4-4E 与 43RCA 的重链可变区有着较高的相似性。

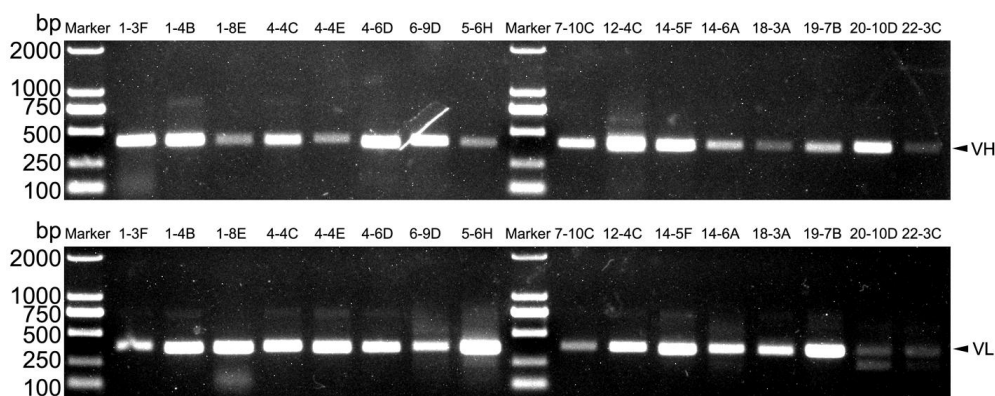


图 2.5 琼脂糖凝胶电泳鉴定抗体轻重链可变区

Figure 2.5 Agarose gel electrophoresis to identify variable regions of antibody light and heavy chains

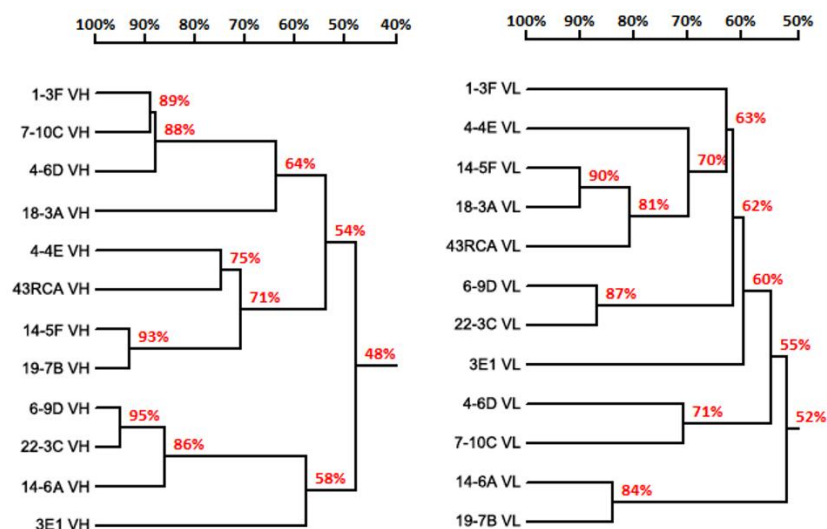


图 2.6 抗体轻重链可变区比对

Figure 2.6 Variable region alignment of antibody light and heavy chains

2.3.2 抗体对蓖麻毒素结合活性鉴定

2.3.2.1 抗体对蓖麻毒素结合力测定

通过 ELISA 鉴定 10 种抗体对蓖麻毒素的特异性结合，如图 2.7 所示，OD 值随抗体浓度升高而增大，说明 10 种抗体均能够与蓖麻毒素特异性结合，且这种特异性结合具有浓度依赖性。

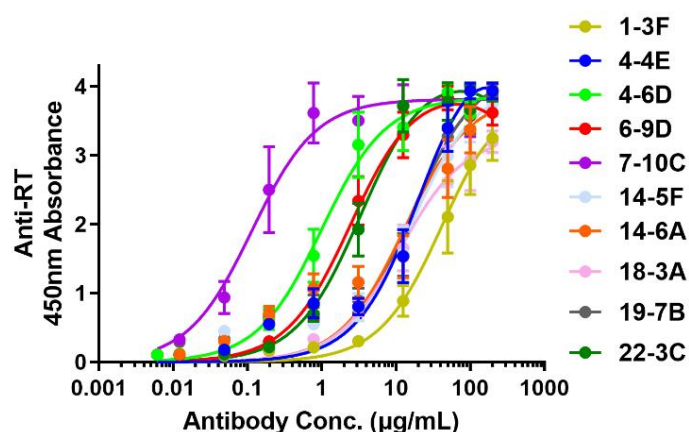


图 2.7 ELISA 鉴定抗体对蓖麻毒素特异性结合

Figure 2.7 ELISA identifies antibodies that bind specifically to RT

表 2.6 抗体基本信息汇总

Table 2.6 Summary of antibody information

抗体名称	V 基因	IgG 亚型	抗原表位	EC ₅₀ (μg/mL)
1-3F	IGHV4-4 IGKV4-1	IgG1	RTA+RTB	46.16
4-4E	IGHV3-20 IGKV3-11	IgG1	RTA	22.58
4-6D	IGHV4-4 IGKV2-30	IgG1	RTB	1.00
6-9D	IGHV1-2 IGKV6-21	IgG1	RTA+RTB	2.49
7-10C	IGHV4-4 IGKV2-28	IgG1	RTA	0.12
14-5F	IGHV3-15 IGKV1-5	IgG1	RTB	16.53
14-6A	IGHV1-2 IGKV3-12	IgG1	RTA+RTB	13.07
18-3A	IGHV6-1 IGKV1-5	IgG2	RTA	11.46
19-7B	IGHV3-15 IGKV3-12	IgG1	RTA+RTB	15.89
22-3C	IGHV1-2 IGKV6-21	IgG1	RTA+RTB	3.38

2.3.2.2 抗体对蓖麻毒素亚基结合测定

通过竞争性 ELISA 鉴定 10 种抗体分别对 RTA 或 RTB 的特异性结合，利用重组 RTA 或 RTB 蛋白竞争蓖麻毒素抗原表位。如图 2.8 所示，在 10 种抗体中，7-10C、18-3A、4-4E 特异性结合 RTA；4-6D、14-5F 特异性结合 RTB；1-3F、6-9D、22-3C、14-6A、19-7B 对 RTA 和 RTB 均有结合。

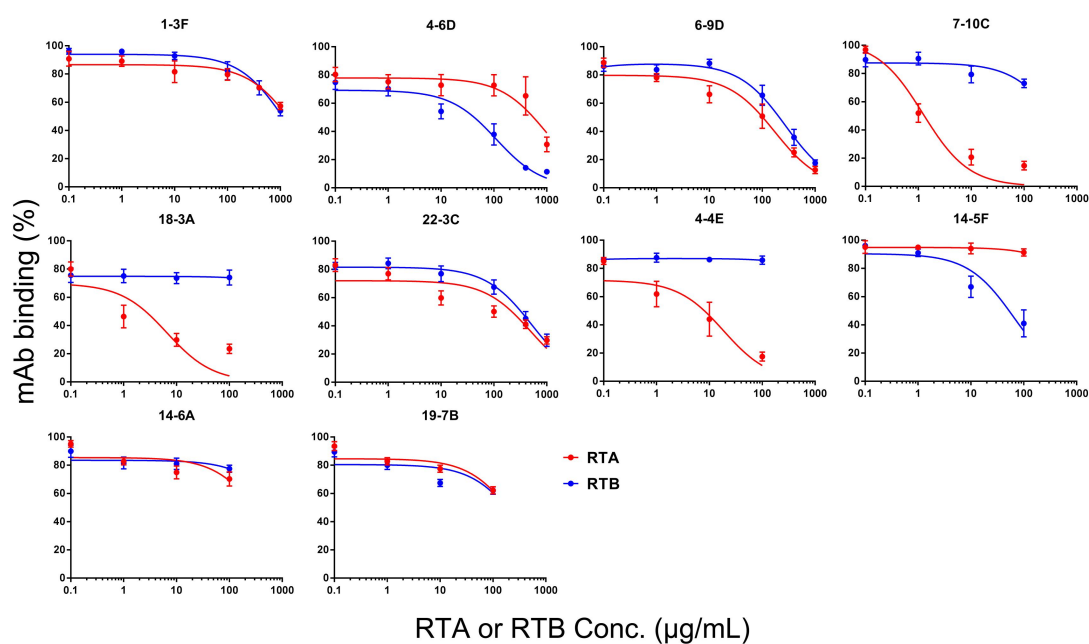


图 2.8 竞争性 ELISA 鉴定抗体对蓖麻毒素亚基的结合

Figure 2.8 Competitive ELISA identifies antibody binding to RT subunits

2.3.2.3 ELISA 鉴定抗体表位分析

通过 ELISA 鉴定 10 种抗体表位之间的重合程度，如图 2.9 所示，其中 7-10C/14-6A、7-10C/18-3A、18-3A/14-6A、18-3A/22-3C 的竞争耐受性超过了 50%，说明没有重叠表位的可能性很高。

包被抗体 夹心抗体	1-3F	4-4E	4-6D	6-9D	7-10C	14-5F	14-6A	18-3A	19-7B	22-3C
1-3F		13.69%	6.12%	29.79%	7.14%	6.79%	26.23%	11.09%	25.72%	27.23%
4-4E	-4.65%		13.36%	32.19%	25.28%	14.07%	38.95%	21.63%	30.06%	41.70%
4-6D	-9.81%	23.59%		46.93%	5.83%	11.06%	45.64%	38.25%	14.41%	27.82%
6-9D	-16.97%	-5.05%	13.00%		30.76%	14.98%	43.81%	13.15%	18.80%	21.52%
7-10C	-8.22%	10.95%	31.39%	48.63%		15.96%	31.92%	23.01%	17.31%	39.81%
14-5F	-14.78%	1.42%	9.62%	26.59%	22.75%		9.99%	5.42%	26.60%	32.67%
14-6A	-8.87%	5.66%	30.00%	19.77%	61.01%	34.13%		55.33%	30.12%	20.58%
18-3A	6.65%	13.36%	19.33%	47.11%	54.71%	23.27%	32.99%		46.27%	54.48%
19-7B	4.88%	18.29%	30.49%	33.85%	35.75%	43.69%	38.28%	22.15%		47.61%
22-3C	-8.94%	1.49%	11.61%	7.13%	14.20%	9.97%	24.11%	10.92%	28.50%	

图 2.9 竞争性 ELISA 分析抗体表位

Figure 2.9 Competitive ELISA analysis of antibody epitopes

2.3.3 抗体对蓖麻毒素中和活性鉴定

2.3.3.1 抗体对蓖麻毒素的中和活性测定

利用 A549 细胞评价蓖麻毒素的毒性与抗体对蓖麻毒素的中和活性。如图 2.10A 所示，40 ng/mL 的蓖麻毒素可将 A549 细胞活力降低至 50%，超过 160 ng/mL 的蓖麻毒素作用于 A549 细胞后，细胞活力保持在 40%。因此，选取 160 ng/mL 作为攻毒剂量。

分别加入 6.25~50 $\mu\text{g/mL}$ 不同浓度的 10 种抗体保护 A549 细胞，其中 4-4E、22-3C 和 14-6A 可以较好的中和蓖麻毒素（其他抗体数据未显示）。如图 2.10B 所示，A549 细胞活力随抗体浓度上升而升高，因此这种保护作用具有浓度依赖性。

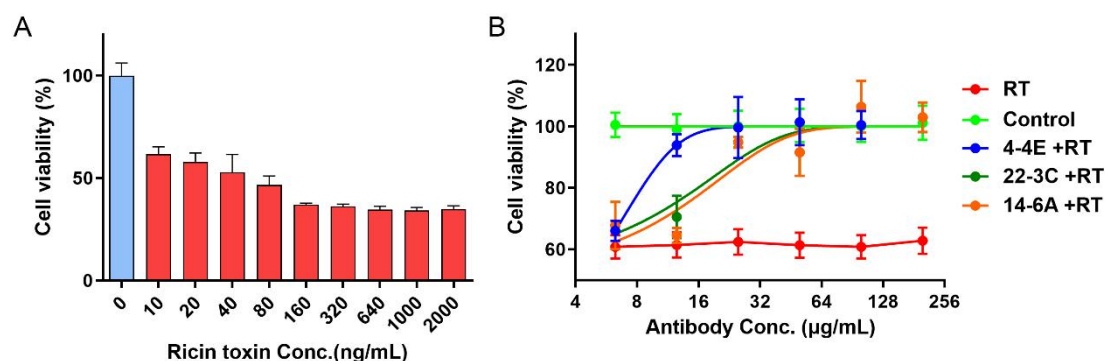


图 2.10 MTT 评价抗体对蓖麻毒素的中和活性

Figure 2.10 MTT evaluates the neutralizing activity of antibodies against RT

(A) MTT 鉴定蓖麻毒素对 A549 细胞毒性；(B) MTT 筛选蓖麻毒素中和抗体

2.3.3.2 体内攻毒保护实验

如图 2.11A，以小鼠为蓖麻毒素中毒的模型动物评价抗体对蓖麻毒素的中和能力。分别以提前 24 h 或 12 h 两种条件注射抗体来预防蓖麻毒素中毒，观察记录小鼠在注射蓖麻毒素后 72 h 内的生存率。如图 2.11B 和图 2.11C 所示，提前 24 h 注射抗体总体上可以起到更好的预防效果。14-6A 相比蓖麻毒素对照组更早出现死亡，且 72 h 内生存率较低，推测该抗体自身对机体存在一定毒性。22-3C 和 4-4E 均显示了对蓖麻毒素的中和活性，其中 4-4E 中和活性最强，提前 24 h 注射条件下达到了 83% 存活率。

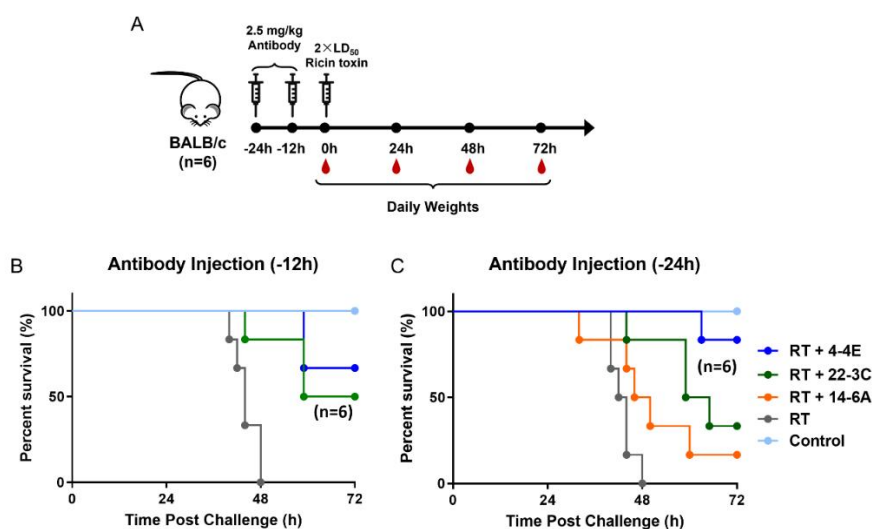


图 2.11 注射蓖麻毒素后小鼠生存率

Figure 2.11 Survival of mice after RT injection

(A) 体内攻毒保护实验示意图；(B) 提前 12 小时注射抗体小鼠存活率；
(C) 提前 24 小时注射抗体小鼠存活率

2.3.3.3 血糖和体重测定

血糖和体重是蓖麻毒素中毒的重要指标，因此在评价抗体对体内蓖麻毒素中和能力的实验中对这两个指标进行了测定。如图 2.12A 所示，小鼠体重在注射蓖麻毒素后发生了具有统计学差异的下降，在注射抗体组中这种现象发生的相对更不显著，但这种状态在 72 h 内持续存在，并且未被抗体保护所逆转。如图 2.12B 所示，小鼠血糖在注射蓖麻毒素后同样发生了下降，具有统计学差异，但这种差异的显著性在 72 h 左右逐渐变小，说明小鼠体内的蓖麻毒素被抗体中和。

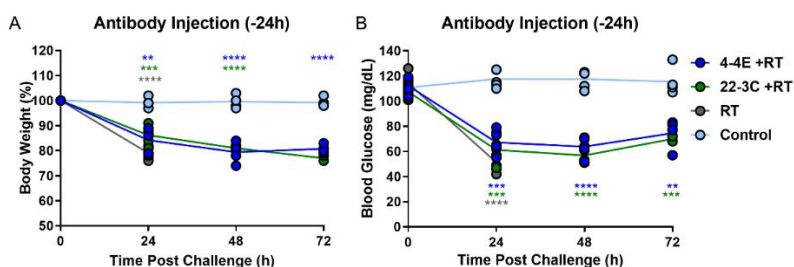


图 2.12 注射蓖麻毒素后小鼠体重和血糖变化

Figure 2.12 Changes in mice weight and blood glucose after RT injection

(A) 提前 24 小时注射抗体小鼠体重变化；(B) 提前 24 小时注射抗体小鼠血糖变化

2.3.3.4 脏器病理损伤

在注射蓖麻毒素 72 h 后，取各组存活小鼠的肠道、肝脏、脾脏和肾脏制作病理切片，观察病理变化。如图 2.13 所示，在蓖麻毒素对照组中小鼠的小肠肠壁存在出血点（箭头处），抗体组和正常对照组中未出现；蓖麻毒素对照组和抗体组肝脏均存在一定程度的肝细胞变性，胞浆疏松化；脾脏中蓖麻毒素对照组和抗体组均发生了淋巴细胞的增多和红髓白髓的结构紊乱；肾脏中蓖麻毒素对照组中肾小球基底膜增厚，抗体组和正常对照组中未出现。这些病理现象说明蓖麻毒素不仅毒性剧烈，而且在小鼠体内带来了剧烈的免疫反应和炎症反应。而抗体的介入虽不能消除这种免疫反应和炎症反应，但可以有效降低小鼠小肠肠壁所受到的损伤。

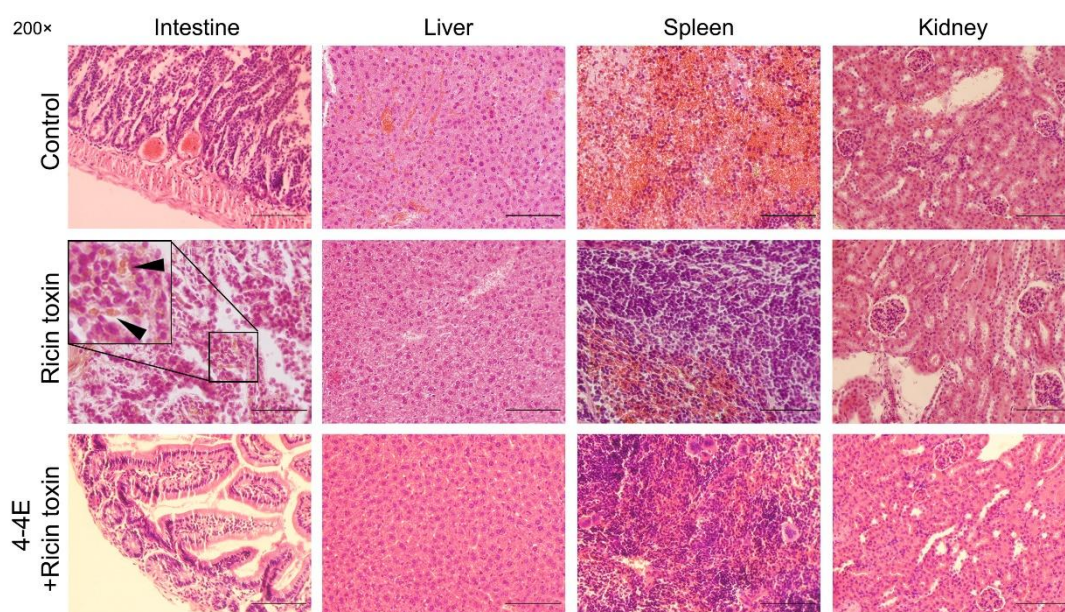


图 2.13 注射蓖麻毒素后小鼠脏器病理变化

Figure 2.13 Pathological changes in mice organs after RT injection

2.4 讨论

几十年来，单克隆抗体药物因其特异性强、副作用小的优势，以革命性的速度改进了癌症、自身免疫系统疾病等重点疾病领域的临床治疗方法，是目前技术发展成熟、商业化成功的一类抗体药物^[112]。因此，特异性针对蓖麻毒素的单克隆抗体一直被认为是最有希望预防和治疗蓖麻毒素中毒的药物^[8,95,96]。杂交瘤技术作

为开发单克隆抗体的主流技术，其优势有三：①细胞融合操作简单而且稳定，技术门槛相对较低，更易于推广和普及；②腹水法制备单克隆抗体，操作简单而且产量大；③相比单细胞测序技术平台，杂交瘤技术可以得到原始 B 细胞中所包含的天然配对的重链和轻链序列，抗体活性和稳定性可以得到保证^[113-115]。

由于鼠源抗体可以被人体免疫系统识别并引起人抗鼠抗体反应，引起严重的不良反应^[116]，所以人源化和全人源单抗逐渐成为抗体药物的大势所趋，这是减轻、避免排异反应的一种发展之路^[117]。人源抗体转基因小鼠是开发全人源单抗的重要工具。人源抗体转基因小鼠是特异性敲除小鼠内源抗体基因，然后将人源抗体基因插入小鼠体内得到的转基因动物^[118,119]。该技术通过诱发小鼠机体适应性免疫反应，利用了体内抗体亲和力成熟的各种自然机理，如：体细胞高频突变（Somatic hypermutation, SHM）、类开关重组（Class switch recombination, CSR）等，从而使得到的抗体具有良好的亲和性、稳定性和可溶性^[120-126]。在本研究中，使用人源抗体转基因小鼠搭配杂交瘤技术，形成了兼顾天然全人源抗体活力与稳定性的研发平台，为制备和筛选全人源单克隆抗体奠定了基础。

杂交瘤腹水法由于操作便利且产量大的技术优势，是最广泛运用的单克隆抗体制备方法。获得的腹水通过硫酸铵沉淀法进行粗纯，初步去除油脂、细胞碎片和大量杂蛋白。利用 Protein G 填料对于 IgG 的可结晶片段（Fragment crystallizable, Fc）的特异性亲和作用，通过 Protein G 亲和层析进行精纯，得到高纯度抗体，以进行抗体的活性鉴定实验^[127]。抗体的抗原表位和结合力强弱对抗体发挥功能起到了至关重要的作用。通过 ELISA 直接法或间接法，使用蓖麻毒素、蓖麻毒素的重组亚基 RTA 和 RTB 来鉴定抗体对相应抗原的特异性结合能力。

在鉴定抗体对蓖麻毒素的中和活性过程中，参考了大量文献并对鉴定方法进行了大量的探索和改进，最终得到本章所述方法^[26,36]。A549 细胞是人非小细胞肺癌细胞系，对于蓖麻毒素损伤较为敏感，可通过 MTT 实验检测到蓖麻毒素对 A549 细胞系造成的损伤。最终实验结果表明，在体外水平具有中和蓖麻毒素能力的抗体有 4-4E、22-3C 和 14-6A。在通过体内攻毒保护实验之前，查阅文献并验证了抗体的半衰期大约为 22~24 h 左右，根据这些数据设计了攻毒保护实验。同时，发现在攻毒时或攻毒后注射抗体不能够提高小鼠的存活率，因此将研究目的集中在抗体的预防保护效果上。另外还发现，4-4E 与 43RCA 的重链可变区具有一定的相似度，这可能说明了多序列比对的分析结果一定程度上也具有筛选抗体的参考价值。然而，在体内的抗体保护实验中，14-6A 和 22-3C 均未展现较强的

中和能力，对蓖麻毒素中毒动物的保护能力较差。相较其他抗体，4-4E 对动物的保护效果较好，并且在脏器病理切片中能够明显观察到 4-4E 对动物脏器的保护作用。考虑到 14-6A 和 22-3C 的重链 V 基因均为使用频率最高的 IGHV1-2，因此推断 14-6A 和 22-3C 均可能是抗原表位与免疫优势表位重合的抗体，其抗原表位与中和性表位的重合程度较低。抗体 4-4E 使用的 V 基因为 IGHV3-20，根据第一章中的研究结果可得知这是一种使用频率较低的 V 基因，而且 4-4E 的 EC_{50} 是 7-10C 的 EC_{50} 的 188 倍。这些结果说明 4-4E 抗体虽然具有良好的中和功能，但与高结合力、高富集 BCR 等特点并不相关，这侧面说明了第一章中所总结的中和抗体筛选策略的重要性。

在本研究中，通过使用蓖麻毒素类毒素免疫后的人源抗体转基因小鼠，利用杂交瘤抗体技术筛选和制备特异性针对蓖麻毒素的全人源中和抗体，并鉴定了抗体的基本性质、结合活性和体内对蓖麻毒素的中和活性。本研究对于全人源蓖麻毒素中和抗体的开发具有重要意义，为接下来的研究奠定了坚实基础。

2.5 小结

(1) 筛选得到 10 株全人源抗蓖麻毒素单克隆杂交瘤细胞株，制备获得 10 株全人源抗蓖麻毒素单克隆抗体并鉴定其基本信息。

(2) 鉴定得到 3 株抗体特异性结合 RTA，2 株抗体特异性结合 RTB，5 株抗体与 RTA 和 RTB 均有结合；其中 EC_{50} 最小为 $0.12 \mu\text{g/mL}$ ，最大为 $46.16 \mu\text{g/mL}$ 。

(3) 鉴定得到 1 株全人源抗蓖麻毒素中和抗体 4-4E，攻毒前 24 h 注射 2.5 mg/kg 抗体， $2 \times LD_{50}$ 腹腔注射蓖麻毒素 72 h 内小鼠存活率 83%，小鼠小肠肠壁损伤相较对照组显著降低。

第三章 DMAb 预防蓖麻毒素中毒研究

近年来,全球抗体药物产业发展迅速,但抗体药物开发仍然存在大量局限性,严重阻碍了药物走向临床应用^[52,53]。其一,抗体药物存在蛋白聚沉和体内外不稳定等问题;其二,抗体药物的高剂量给药带来了高昂的用药成本^[54,55];其三,抗体药物在靶组织难摄取,体内清除率高,需要多次给药。基于以上这些原因,开发抗体药物的新方法和递送药物的新形式成为了领域研究的热点。

David B. Weiner 创新性地发明了 DMAb 技术,并将其广泛应用于抗体治疗领域。DMAb 携带抗体基因,可以在哺乳动物体内迅速表达大量抗体。在抗体含量水平达到血清浓度峰值后,抗体水平随时间推移不断降低,最终从血清中自然清除^[56,57,67,68]。本章利用 DMAb 技术,构建了搭载抗蓖麻毒素中和抗体的人源抗体,并在体内外水平检测了该 DMAb 分泌中和抗体和预防蓖麻毒素中毒的能力。此方法制备成本低廉、特异性强、靶组织易摄取,本研究为预防蓖麻毒素的相关抗体药物的快速研发和制备提供了理论基础。

3.1 实验材料及仪器

3.1.1 实验主要试剂

本章节中 DNA 基因均由吉林省库美生物科技有限公司合成并插入至质粒;pIRES2-EGFP 真核表达载体由实验室保存;4D12 鼠源抗蓖麻毒素抗体和序列由实验室保存;用于检测的蓖麻毒素由实验室保存;RPMI-1640 培养基、无水乙醇和 EDTA 均购自美国 Sigma 公司;MgCl₂、醋酸、丙三醇、NaAc、β-巯基乙醇、生理盐水、二甲苯、苏木精、醇溶伊红、中性树胶、石蜡、Tris、HCl、NaCl、NaH₂PO₄·2H₂O、Na₂HPO₄、(NH₄)₂SO₄、Tween-20、BSA、H₂SO₄、TMB 底物溶液、石蜡油、Loading Buffer 和琼脂糖均购自生工生物工程股份有限公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;透明质酸酶购于北京索莱宝科技有限公司;RIPA 裂解提取缓冲液和 PMSF 蛋白酶抑制剂购自美国 Thermo Scientific 公司;AxyPrep 质粒中量制备试剂盒购自美国 Axygen 公司;DNA Stain Red 购自荷兰 Enzo Life Sciences 公司;NheI、BamHI 限制性内切酶和 DNA 标准分子量 Marker 购自北京 Takara 公司;葡萄糖测定试剂盒(葡萄糖氧化酶法)购自南京建成生物工程研究

所; SF Cell Line 4D-Nucleofector X Kit L 购于瑞士 Lonza 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购自上海碧云天生物技术有限公司; 水合氯醛溶液(10%w/v)购于上海泽叶生物科技有限公司; OCT 冰冻切片包埋剂购于上海睿铂赛生物科技有限公司; Goat anti-Human IgG-Fc Fragment Antibody Affinity Purified 购于美国 Bethyl 公司; PE Anti-Mouse CD11b Antibody、FITC Anti-Mouse Ly-6G Antibody、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG 和 HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Human IgG 购自美国 Proteintech 公司。

3.1.2 主要仪器及设备

高速低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司, 5810R 型); 超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司, YCD-EL259A 型); 层析实验冷柜(北京博医康实验仪器有限公司, YC-2 型); 酶联免疫检测仪(瑞士 Tecan 公司, F500 型); Milli-Q 超纯水制备仪(美国 Milipore 公司, IQ 7000 型); 电热恒温培养箱(上海新诺仪器集团有限公司, HPS-250 型); 酸度计(瑞士 Mettler 公司, PHS-4CT 型); 分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司, BCE224I-1CCN 型); 三温三控水槽(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司, DK-8D 型); 恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司, 85-1 型); 超净工作台(深圳市博立斯智能装备有限公司, DL-CJ-IN 型); 小型垂直电泳转印系统(美国 Bio-Rad, 1658033 型); 高精度小动物体重秤(北京佳宸弘生物技术有限公司, jc-1200g-01 型); 电转染仪(瑞士 Lonza 公司, 4D-Nucleofector 型); 卡钳电极(英国 BTX 公司, 450101-384 型); 匀浆机(德国 IKA 公司, T18 型); 数显冷冻包埋机(桂宁实验器材有限公司, TS210569); 冷冻切片机(德国 Leica 公司, CM1950 型); 病理组织摊片机(山东博科生物产业有限公司, BT-I); 石蜡切片机(深圳市达科为生物技术股份有限公司, KD-202A); 全自动血常规分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司, BC-2900 型); 倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司, IX53 型); 电穿孔仪(英国 BTX 公司, ECM2001 型); 移液器(美国 Thermo Scientific 公司, 4510030 型)。

3.1.3 主要溶液配制

PBS 溶液: 称取 11.68 g NaCl、9.44 g Na₂HPO₄、5.28 g NaH₂PO₄·2H₂O, 加蒸馏水定容至 2 L, 调节 pH=7.4, 室温保存备用。

PBST 溶液：0.05% Tween-20-PBS 溶液。向 1 L PBS 溶液中加入 500 μ L 的 Tween-20，充分搅拌溶解，室温保存备用。

封闭液：3%BSA-PBS 溶液。称取 0.45 g BSA，用 PBS 溶液定容至 15 mL，现用现配。

终止液：2 mol/L 硫酸溶液。向 100 mL 水中边搅拌边缓慢滴加 21.74 mL 硫酸，充分混匀后定容至 200 mL，室温保存。

固定液：向 400 mL 蒸馏水中加入 50 mL 甲醛溶液，充分混合后用蒸馏水将该溶液定容至 500 mL，室温保存。

50 $\times$ TAE 溶液：称量 $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 18.6 g，Tris 121 g，缓慢加入约 300 mL 蒸馏水，充分搅拌并溶解后加入 28.55 mL 的冰乙酸，定容至 500 mL，室温保存。

10 $\times$ N Buffer：称量 Tris 121 mg， MgCl_2 67 mg，NaCl 292 mg，BSA 10 mg，加入 8 mL 去离子水充分搅拌溶解，加入 49 μ L β -巯基乙醇，调节 pH=7.5，定容至 10 mL，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3 mol/L 醋酸钠溶液：称量 NaAc 49.2 g，加入 180 mL 去离子水，充分搅拌溶解，醋酸调节 pH=5.2，去离子水定容至 200 mL，室温保存备用。

3.1.4 实验动物及细胞株

实验动物均采用 SPF 级 4~6 周龄的 BALB/c 雌性小鼠，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，许可证号：SCXK（L）2020-0001，使用清洁鼠饲料和垫料进行分笼饲养。

HEK 293T 细胞购自 American Type Culture Collection（ATCC）。

3.1.5 抗体序列

鼠源抗蓖麻毒素抗体 4D12 的可变区序列由实验室保存^[130]；

鼠源抗体恒定区获取自 NCBI 数据库，mCH GenBank ID：BAQ25543.1，mCL GenBank ID：BAQ25544.1；

鼠源抗蓖麻毒素抗体 43RCA 的可变区序列获取自 NCBI 数据库，43RCA VH GenBank：FJ178346.1，43RCA VL GenBank ID：FJ178347.1；

人源抗蓖麻毒素抗体 4-4E 的可变区序列来自 2.2.3.4 测序结果;

人源抗体恒定区获取自 NCBI 数据库, huCH GenBank ID: QRG33947.1, huCL GenBank ID: QRG34017.1。

3.2 实验方法

3.2.1 DMAb 制备和鉴定

3.2.1.1 质粒中提

(1) 向无菌的带抗性的 LB 培养基中接菌, 置于摇床 37°C 180 r/min 震荡培养 15 个小时后, 使用质粒中提试剂盒开始提取质粒。

(2) 取 70 mL 菌液, 8000 r/min 离心 10 min, 弃尽上清。

(3) 用 4.5 mL S1 溶液充分重悬菌体。

(4) 加入 4.5 mL S2 溶液, 轻轻摇晃混匀 10 次。

(5) 加入 4.5 mL S3 溶液, 立即轻轻摇晃混匀 10 次。

(6) 8000 r/min 离心 10 min, 用滤器过滤上清至吸附柱内。

(7) 加入 7 mL W1 溶液, 全部滤干; 再加入 8 mL W2 溶液, 全部滤干。

(8) 取下抽提柱底部, 加入 300 μ L W2 溶液, 9000 r/min 离心 1 min。

(9) 将抽提柱转移至新 EP 管, 加入 300 μ L 65°C 预热的去离子水。

(10) 测 DNA 浓度后, 若低于 400 ng/ μ L, 等待继续浓缩; 若高于 400 ng/ μ L, 保存于 -20°C。

3.2.1.2 质粒浓缩

(1) 向质粒溶液中加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠溶液, 反复颠倒混匀。

(2) 向混合溶液加入 2 倍体积的无水乙醇, 充分混匀。

(3) -20°C 静置 6 h 以上, 8000 r/min 离心 10 min。

(4) 小心吸去所有上清液, 通过滤纸擦干部分无水乙醇残留, 通过等待蒸

发进一步减少剩余无水乙醇。

(5) 加入适量去离子水，充分溶解沉淀后测 DNA 浓度。

3.2.1.3 质粒双酶切

(1) 双酶切体系见表 3.1，30℃孵育 3 h。

(2) 反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳，方法参见 2.2.3.5。

表 3.1 双酶切反应体系

Table 3.1 Double digestion reaction system	
成分	体积 (μL)
NheI	0.5
BamHI	0.5
10×N Buffer	1.0
DNA 质粒	1.0 μg
ddH ₂ O	8.0-DNA 质粒体积
共计	10.0

3.2.2 DMAb 电转染

3.2.2.1 HEK 293T 细胞的培养

HEK 293T 细胞的培养方法参见 2.2.2.1，培养液改用 8% RPMI-1640。

3.2.2.2 细胞电转染

(1) 培养 HEK 293T 细胞至一定数量后，消化细胞后离心计数。

(2) 取 2×10⁶ 个细胞，1000 r/min 离心 5 min，弃掉上清。

(3) 加入 Supplement I 18 μL、SF Cell Line Solution 82 μL 和 2 μg DNA 质粒，充分重悬细胞，转移至无菌电转杯。

(4) 将电转杯放入电转仪，开始电转染。

(5) 转染结束后将细胞转移至 6 孔板中培养, 分别在 0 h、24 h、48 h、72 h 观察增强的绿色荧光蛋白 (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) 共表达, 并分别保留少量培养液上清液检测人源抗体。

3.2.2.3 小鼠腓肠机电转染

(1) 如图 3.5A 所示, 每组准备 6 只小鼠, 8~10 周龄, 将后腿腓肠肌两侧毛剃净。

(2) 向腓肠肌部位注射 30 μL 透明质酸酶溶液 (0.4 U/ μL)。

(3) 2 小时后, 对小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 (20 μL /10 g 小鼠体重)。

(4) 5 分钟后, 待小鼠完全麻醉, 向小鼠腓肠肌部位注射 50 μL DNA 质粒 (浓度约为 500 ng/ μL , 共 25 μg)。

(5) 在肌肉两侧涂抹均匀生理盐水, 立即开始电转染。

(6) 根据小鼠肌肉厚度, 设置电压类型和大小为直流电 175 V/cm, 脉冲宽度 100 ms, 脉冲数量 8 个, 使用面积为 1 cm $\times$ 1 cm 的紫铜镀镍电极进行电转染。

(7) 转染结束后, 将小鼠放回笼内侧卧, 以防窒息死亡。

3.2.3 DMAb 抗体分泌能力鉴定

3.2.3.1 ELISA 检测人源抗体

ELISA 一般操作流程参见 1.2.1.3, 在此方法上稍作修改。

(1) 包被步骤更改: 用 PBS 溶液 1:5000 稀释羊抗人 IgG-Fc 抗体。

(2) 一抗步骤更改: 样品孔用 PBS 溶液以 1:100 和 1:1000 两种稀释比例稀释样品。标准曲线孔用 PBS 溶液稀释人源抗体至不同浓度 (0 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、1000 ng/mL) 作为标准孔。

(3) 二抗步骤更改: 用 PBS 溶液 1:5000 稀释羊抗人 IgG-Fc 酶标二抗。

3.2.3.2 ELISA 检测抗蓖麻毒素鼠源抗体

ELISA 一般操作流程参见 1.2.1.3, 在此方法上稍作修改。

(1) 包被步骤更改: 用 PBS 溶液稀释蓖麻毒素至 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 一抗步骤更改: 用 PBS 溶液 1:10 或 1:20 稀释血清; 同时用 PBS 溶液稀释 4D12 抗体标准品至 5 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.625 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3125 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1563 $\mu\text{g/mL}$ 、0.0781 $\mu\text{g/mL}$ 、0.0391 $\mu\text{g/mL}$, 作为标准孔。

(3) 二抗步骤更改: 用 PBS 溶液 1:10000 稀释羊抗鼠酶标抗体。

3.2.3.3 腓肠肌冰冻切片制备

(1) 取材: 待小鼠腓肠机电转染后第 7 天, 取转染的腓肠肌部位, 平放于软塑小盒内。

(2) 包埋: 加入 OCT 包埋剂浸没组织, 置于 -80°C 冰箱冰冻。

(3) 切片: 预冷恒温冰冻切片机, 通过 OCT 包埋剂使冰冻的组织块贴合于样品托上, 置于速冻架快速冷冻。固定好后开始切片, 适当调整载玻片角度附贴组织切片。

(4) 封片: 室温下稍稍晾干, 滴加丙三醇, 缓缓贴附盖玻片, 置于荧光显微镜下观察 EGFP 绿色荧光蛋白。

3.2.3.4 提取组织总蛋白

(1) 取材: 待小鼠腓肠机电转染后第 7 天, 取小鼠的全身各组织 (大脑、小脑、肺脏、脾脏、肝脏、肾脏、腓肠肌、肠道), 称重后取 100 mg, 剩余组织保存至 -80°C 冰箱。

(2) 取 990 μL 放射免疫沉淀 (Radio Immunoprecipitation Assay, RIPA) 裂解液, 并加入苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluorid, PMSF) 10 μL , 充分混匀后加入至组织。

(3) 使用超声匀浆探头对组织充分研磨后, 4°C 静置 30 min。

(4) 4°C 条件下 12000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液保存于 4°C , 用于检测人源抗体水平, 方法参见 3.2.3.1。

3.2.4 DMAb 体内攻毒保护实验

(1) 参见 3.2.2.3 方法, 待小鼠腓肠机电转染 DMAb (25 μg /只) 后第 5 天, 腹腔注射蓖麻毒素 16 $\mu\text{g/kg}$ ($2\times\text{LD}_{50}$)。

(2) 测量并记录 0 h~72 h 内小鼠的血糖和体重值, 每 24 h 测量 1 次。血糖的测定方法参见 2.2.5.5。

(3) 使用 SPSS 26 软件分析统计学差异性, 通过双边 t-检验测定两组独立样本数据之间的显著性差异。*表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$, ****表示 $p < 0.0001$ 。

3.2.5 DMAb 电转染安全性评价

3.2.5.1 血常规指标测定

(1) 参见 3.2.2.3 方法, 待小鼠腓肠机电转染 DMAb-4D12 (25 μg /只) 后第 14 天, 摘小鼠眼球取血。

(2) 将全血滴至含有抗凝剂的采血管, 室温缓缓摇晃均匀。

(3) 通过血常规仪对血常规指标进行测定并记录。

3.2.5.2 组织免疫荧光

(1) 待小鼠腓肠机电转染 DMAb-4D12 (25 μg /只) 后第 7 天, 取小鼠腓肠肌制作冰冻切片, 冰冻切片的制备参见 3.2.3.3 方法。

(2) 固定: 浸入固定液固定 10 min。

(3) 洗涤: 浸入 PBS 溶液浸洗 3 次, 每次 3 min。

(4) 封闭: 用免疫组化笔圈出组织, 滴加封闭液室温封闭 60 min。

(5) 荧光抗体: 用 PBS 溶液 1:1000 稀释相应荧光抗体后从组织边缘缓慢滴加, 平放于 4°C 湿盒静置过夜。

(6) 洗涤: 浸入 PBS 溶液浸洗 3 次, 每次 3 min。

(7) 染核: 滴加 DAPI 染色液, 室温避光孵育 3 min。

(8) 洗涤: 浸入 PBS 溶液浸洗 3 次, 每次 3 min。

(9) 封片: 滴加抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 将盖玻片小心贴附在组织上封片, 通过荧光显微镜观察并记录荧光。

3.2.5.3 石蜡切片制备和苏木精-伊红染色

参见 2.2.5.6 中方法。

3.3 实验结果

3.3.1 DMAb 抗体分泌能力鉴定

3.3.1.1 双酶切鉴定

DMAb 的抗体序列设计如图 3.1A 和图 3.1B 所示，轻重链基因由 2A 肽隔开，将抗体片段插入至 pIRES2-EGFP 载体中。通过 *NheI* 和 *BamHI* 限制性内切酶剪切处于多克隆位点的目的片段，通过琼脂糖凝胶电泳检测载体片段和目的片段大小。如图 3.1C 所示，抗体片段大约为 2300 bp，载体片段大约为 5300 bp。

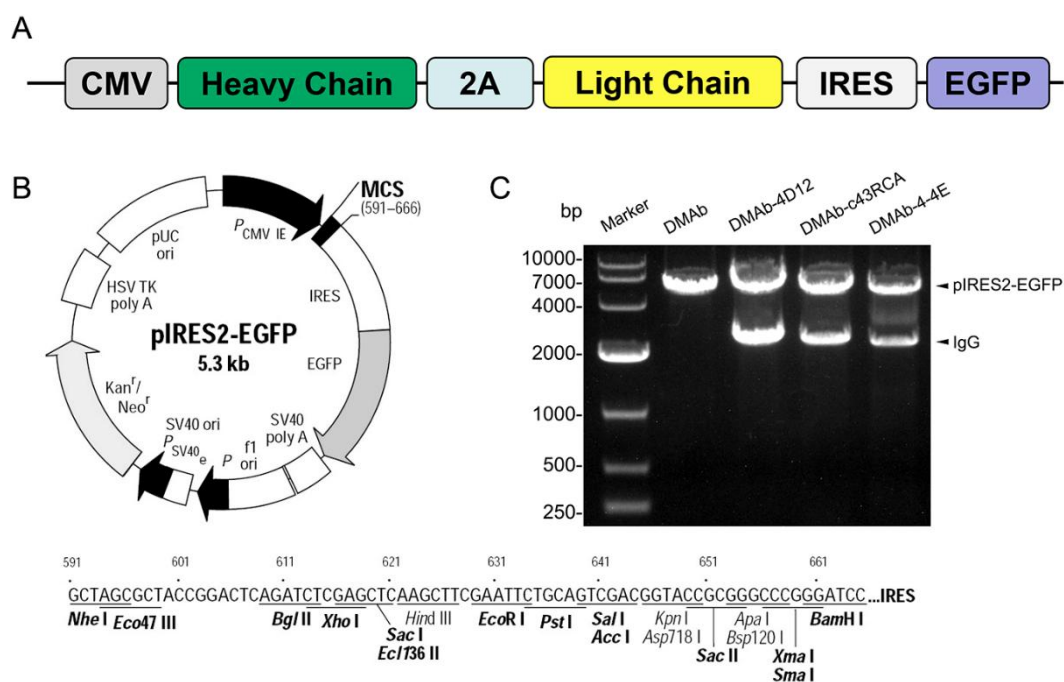


图 3.1 DMAb 构建和鉴定

Figure 3.1 DMAb construction and qualification

(A) DMAb 构建示意图； (B) pIRES2-EGFP 载体图谱； (C) DMAb 双酶切鉴定结果

3.3.1.2 DMAb 转染 HEK 293T 细胞

将 DMAb 通过电转染方法递送至 HEK 293T 细胞，在电转染后 48 h 观察 EGFP 的表达，分别在 0 h、24 h、48 h 和 72 h 取培养液上清液检测抗体分泌表达。如图 3.2A 所示，所有组中细胞均可见绿色荧光，说明 EGFP 成功随载体共表达；如图 3.2B 所示，载有抗体片段的 DMAb 转染细胞后，可以在细胞培养液中检测到大量分泌表达的抗体，表达量在 48 h 左右到达峰值。

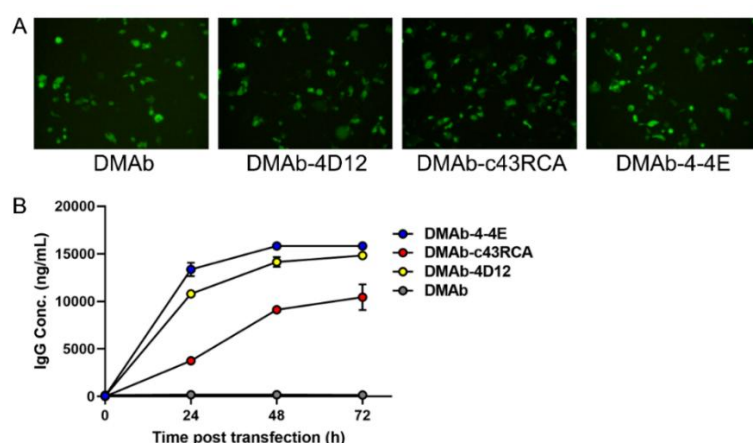


图 3.2 DMAb 转染 HEK 293T 细胞

Figure 3.2 DMAb transfection in HEK 293T cells

(A) 细胞转染荧光图；(B) ELISA 鉴定细胞培养液上清中人源抗体

3.3.1.3 DMAb 转染小鼠腓肠肌

每只小鼠腓肠肌部位被电转染 25 μ g DMAb，在转染后第 7 天，切除小鼠腓肠肌部位制备冰冻切片，观察 EGFP 的共表达。如图 3.3 所示，小鼠腓肠肌组织间可以观察到绿色荧光。

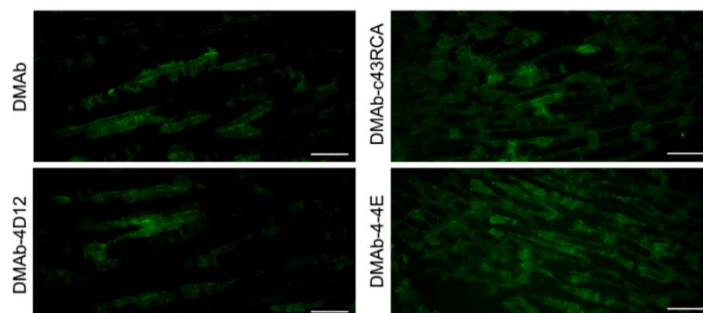


图 3.3 转染 DMAb 后小鼠腓肠肌间绿色荧光

Figure 3.3 Green fluorescence between the gastrocnemius muscles of mice after DMAb transfection

通过 ELISA 对小鼠体内人源抗体水平的变化和分布进行了测定。如图 3.4A 所示, 在转染后 0~14 天内, 人源抗体在第 7 天左右达到峰值, 然后在体内逐渐清除。另外, 如图 3.4B 所示, 人源抗体在小鼠体内主要集中在小肠和腓肠肌组织中。为了比较不同种属抗体在小鼠体内的表达情况, 探究种属对抗体药物体内代谢问题的影响, 通过搭载鼠源抗体 4D12 的 DMAb-4D12 对小鼠腓肠肌组织进行电转染。如图 3.4C 所示, 在单次电转染后, 小鼠血清内抗体水平在第 14 天达到峰值, 平均值为 20 $\mu\text{g/mL}$, 小鼠体内 DMAb 可以持续表达抗体超过 120 天, 说明小鼠体内 DMAb 抗体表达存在种属特异性。

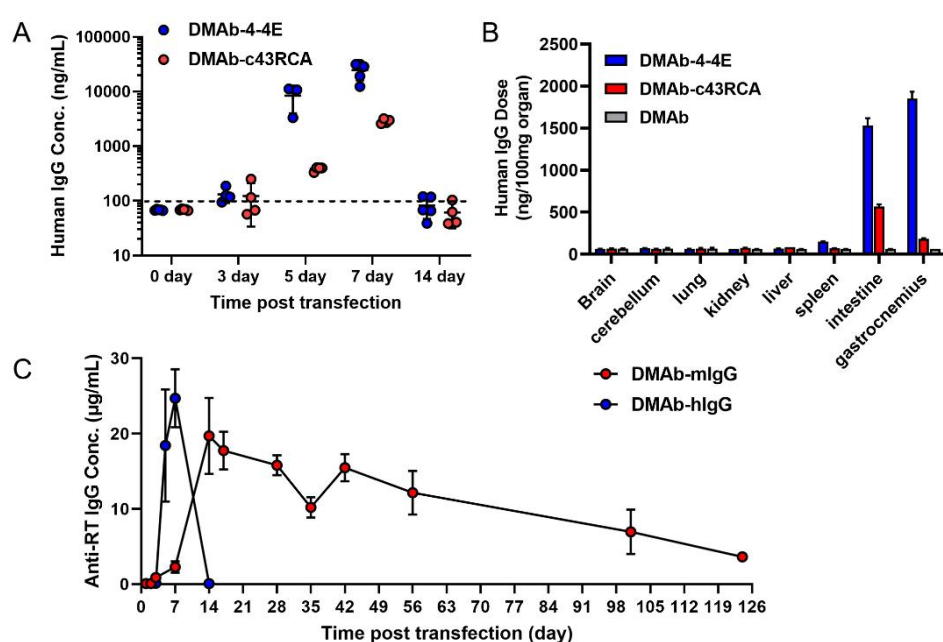


图 3.4 转染 DMAb 后小鼠体内抗体水平与分布

Figure 3.4 Antibody levels and distribution in mice after DMAb transfection

(A) ELISA 鉴定 DMAb 体内抗体表达水平; (B) ELISA 鉴定 DMAb 体内抗体表达分布;
(C) ELISA 比较 DMAb 体内表达鼠源和人源抗体表达情况

3.3.2 DMAb 体内攻毒保护实验

3.3.2.1 小鼠生存率测定

对电转染 DMAb 的小鼠腹腔注射 $2 \times \text{LD}_{50}$ 蓖麻毒素, 观察并记录 72 h 内的小鼠生存率 (如图 3.5A)。结果如图 3.5B 所示, DMAb-c43RCA (6/6) 和 DMAb-4-4E (5/6) 均可以保护小鼠免受蓖麻毒素致死。

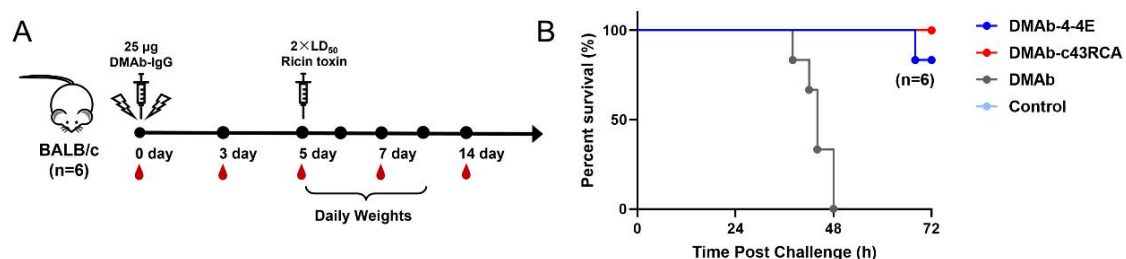


图 3.5 注射蓖麻毒素后小鼠生存率

Figure 3.5 Survival of mice after RT injection

(A) 小鼠体内转染攻毒保护实验示意图；(B) 小鼠攻毒后存活率

3.3.2.2 血糖和体重测定

对电转染 DMAb 的小鼠腹腔注射蓖麻毒素，测定并记录 72 h 内的小鼠的体重和血糖水平。如图 3.6A 所示，注射蓖麻毒素后，DMAb-c43RCA 组小鼠体重下降幅度小于 DMAb-4-4E 组小鼠，说明 DMAb-c43RCA 保护效果更好；如图 3.6B 所示，注射蓖麻毒素后，DMAb 组与蓖麻毒素组在 24 h 内血糖水平迅速下降，但在 48~72 h 内回升至正常组水平，在 72 h 血糖水平与正常对照组无统计学差异。

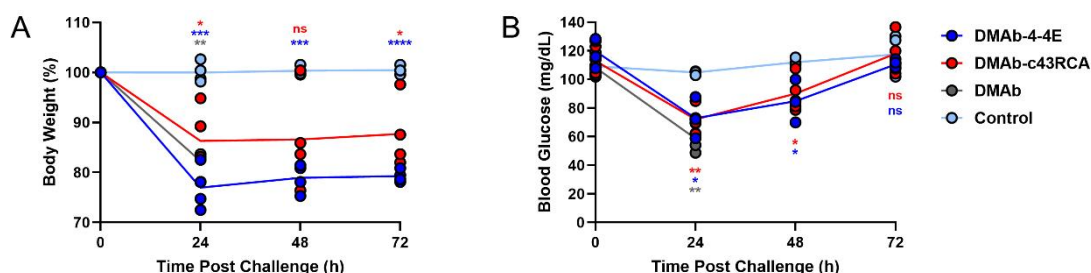


图 3.6 注射蓖麻毒素后小鼠体重和血糖变化

Figure 3.6 Changes in blood glucose and body weight in mice after RT injection

(A) 攻毒后小鼠体重变化；(B) 攻毒后小鼠血糖变化

3.3.2.3 脏器病理损伤

在注射蓖麻毒素 72 h 后，取 DMAb 各组存活小鼠的肠道、肝脏、脾脏和肾脏制作病理切片，观察病理变化。如图 3.7 所示，在蓖麻毒素对照组中小鼠的小肠肠壁存在出血点（箭头处），DMAb 各组 and 正常对照组中未出现；转染 DMAb-4-4E 小鼠的肝脏中出现肝细胞变性，胞浆疏松化，而其他各组中未出现；脾脏中蓖麻毒素对照组和 DMAb 各组肝脏均发生了淋巴细胞的增多和红髓骨髓的结构紊乱；肾脏中蓖麻毒素对照组和 DMAb-4-4E 组中肾小球基底膜增厚，抗体

组和正常对照组中未出现该现象。以上结果说明 DMAb-c43RCA 具有优异的预防蓖麻毒素中毒的能力，DMAb-4-4E 也可以一定程度中和蓖麻毒素的毒性，但肝脏和脾脏均不可避免地出现病理损伤。

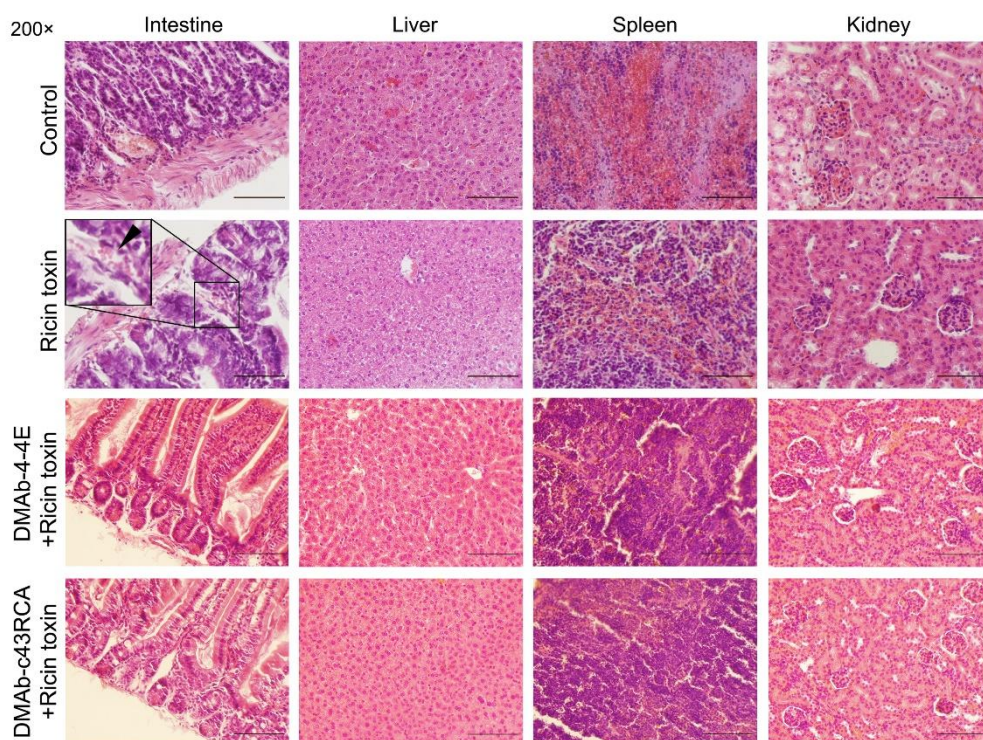


图 3.7 注射蓖麻毒素后小鼠脏器病理变化

Figure 3.7 Pathological changes in mice organs after RT injection

3.3.3 DMAb 电转染安全性评价

3.3.3.1 血常规指标测定

待小鼠腓肠肌电转染 DMAb-4D12 (25 $\mu\text{g}/\text{只}$) 后第 14 天，取全血检测血常规指标。如图 3.8 所示，小鼠在转染 DMAb 后第 14 天时，白细胞中的淋巴细胞显著增多，说明体内正在发生免疫反应和炎症反应。

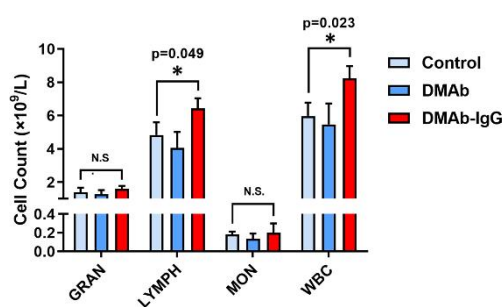


图 3.8 转染 DMAb-IgG 后小鼠血常规指标

Figure 3.8 Routine blood markers in mice after transfection of DMAb-IgG

3.3.3.2 腓肠肌粒细胞浸润

待小鼠腓肠肌电转染 DMAb-4D12 (25 μ g/只) 后第 7 天, 取小鼠腓肠肌制备冰冻切片。如图 3.9 所示, CD11b 和 Ly6G 分别被红色和绿色荧光染色, 腓肠肌组织间可见明显红色和绿色荧光, 说明组织间存在中性粒细胞的浸润, 即电转染对腓肠肌组织造成了一定的炎症反应。

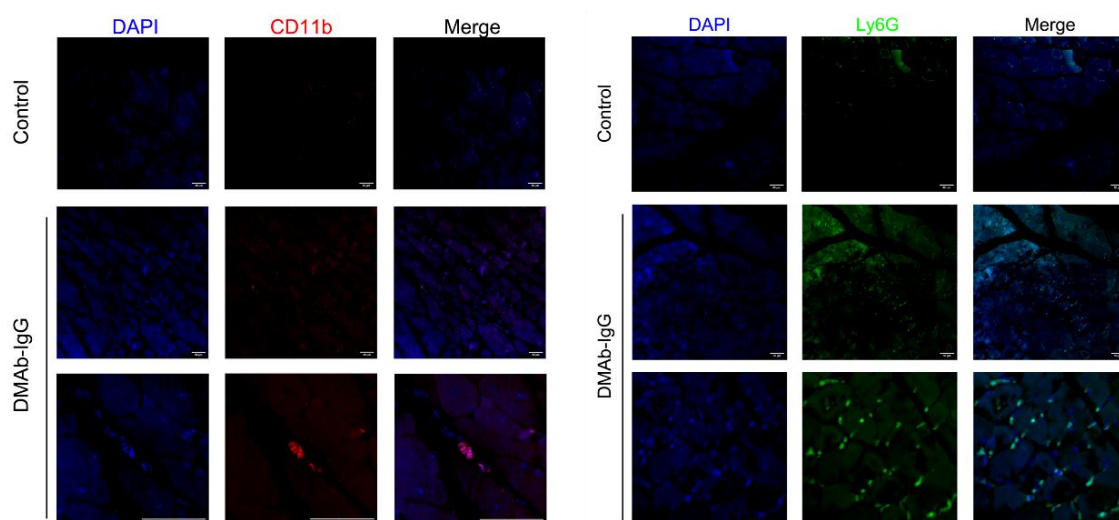


图 3.9 转染 DMAb-IgG 后小鼠腓肠肌间中性粒细胞

Figure 3.9 Mice gastrocnemius muscle neutrophils after DMAb-IgG transfection

3.3.3.3 脏器病理变化

待小鼠腓肠肌电转染 DMAb-4D12 (25 μ g/只) 后第 7~28 天, 取腓肠肌、脾脏、肾脏和肝脏制备病理切片观察病理变化。如图 3.10 所示, 空载体对照组、IgG 载体组在第 7 天核内移, 腓肠肌肌纤维坏死, 炎细胞浸润。这些病理变化在第 14~28 天恢复正常; 如图 3.11 所示, 空载体对照组、IgG 载体组在肝细胞浆内

出现空泡，肝细胞变性，至第 28 天逐渐好转；如图 3.12 所示，IgG 载体组在脾脏红髓和白髓结构紊乱，红髓中淋巴细胞大量增生，至第 28 天逐渐好转；如图 3.13 所示，IgG 载体组（第 14 天）肾脏中出现缺血性改变，肾小球固缩、基底膜增厚，至第 28 天逐渐好转。

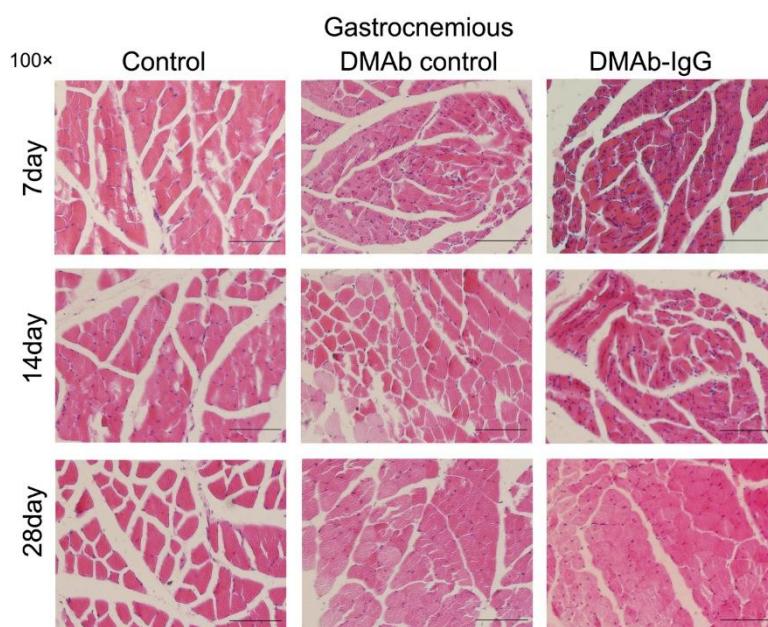


图 3.10 电转染后小鼠腓肠肌病理变化

Figure 3.10 Pathological changes in gastrocnemius muscle in mice after electrotransfection

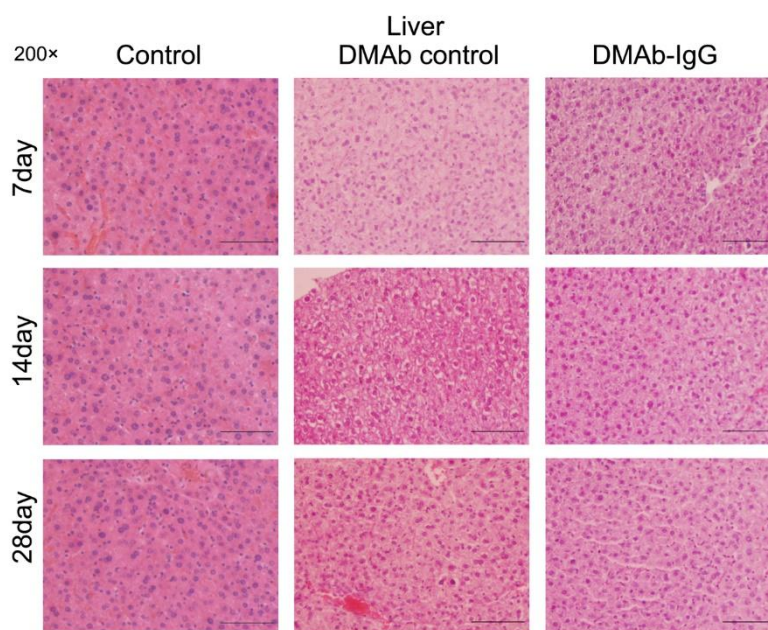


图 3.11 电转染后小鼠肝脏病理变化

Figure 3.11 Pathological changes in liver in mice after electrotransfection

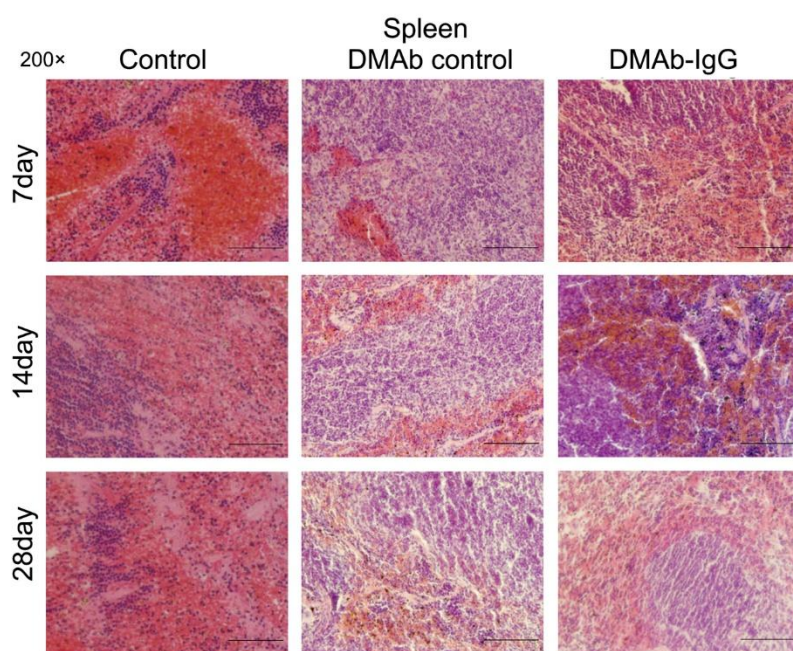


图 3.12 电转染后小鼠脾脏病理变化

Figure 3.11 Pathological changes in spleen in mice after electrotransfection

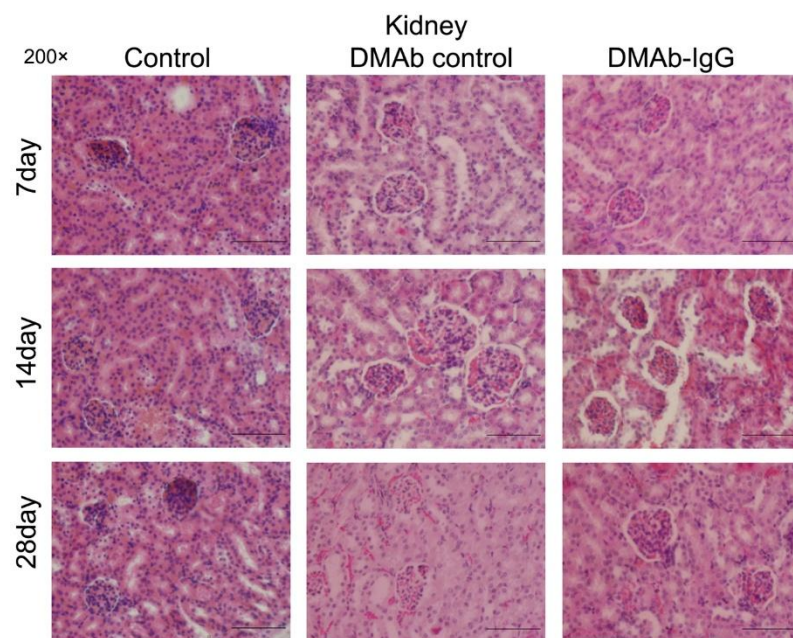


图 3.13 电转染后小鼠肾脏病理变化

Figure 3.11 Pathological changes in kidney in mice after electrotransfection

3.4 讨论

近几十年来, 抗体药物的开发设计和临床应用都日益成熟, 但抗体药物仍然有其局限性^[97-100]。其一, 抗体药物存在蛋白聚沉和体内外不稳定等问题; 其二, 抗体药物的高剂量给药带来了高昂的用药成本; 其三, 抗体药物在靶组织难摄取, 体内清除率高, 需要多次给药^[54,55]。为了解决这些抗体药物本身固有的问题, 本研究利用 DMAb 技术在小鼠体内表达中和抗体, 预防蓖麻毒素中毒带来的损伤。

David B. Weiner 创新性地发明了 DMAb 技术, 并将其广泛应用于抗体治疗领域。DMAb 携带抗体基因, 可以在哺乳动物体内迅速表达大量抗体。在抗体含量水平达到血清浓度峰值后, 抗体水平随时间推移不断降低, 最终从血清中自然清除^[128,129]。在设计和构建 DMAb 的过程中, 使抗体的轻链和重链以 1:1 摩尔比表达, 充分提高抗体表达效率^[131,132]。在信号肽选择上, 参考先前的研究, 分别选择分泌效率最高的两条序列作为重链和轻链可变区的信号肽^[133]。在载体选择上, 选择了 pIRES2-EGFP 真核表达载体。该载体携带真核生物强启动子 CMV, 这对在哺乳动物体内高效率表达和分泌抗体至关重要。该载体还携带有内部核糖体进入位点 (Internal ribosome entry site, IRES) 序列^[134]和 EGFP 蛋白基因^[135,136], 通过观察共表达的绿色荧光蛋白, 可以对体内外表达情况有更直观的了解。

DMAb 的转染效率对于抗体表达的峰值和达峰速度都至关重要, 所以选择电脉冲技术对腓肠肌进行转染^[137-139]。电脉冲转染技术作为物理转染方法之一, 可以有效对细胞膜造成穿孔, 具有简单、快速和稳定的技术特点^[140-143]。在体内转染 DMAb 实验结果中, 观察到小鼠血清人源抗体水平的峰值大约出现在第 7 天左右。在后续的攻毒保护实验中, 选取在第 5 天注射蓖麻毒素, 这样能够最大限度地观察到抗体对蓖麻毒素中毒动物的保护作用。研究结果显示, DMAb-c43RCA (6/6) 和 DMAb-4-4E (5/6) 均可以保护小鼠在 72 h 内免受 $2 \times LD_{50}$ 蓖麻毒素致死, 小鼠血糖在攻毒后 72 h 内恢复至正常组水平, 小肠肠壁和肾脏损伤相较对照组显著降低。为了比较不同种属抗体在小鼠体内的表达情况, 探究种属对抗体药物体内代谢问题的影响, 通过对小鼠腓肠肌组织进行电转染 DMAb-4D12。实验结果显示, 在单次电转染后, 小鼠血清内抗体水平在第 14 天达到峰值平均值为 $20 \mu\text{g/mL}$, 小鼠体内 DMAb 可以持续表达抗体超过 120 天, DMAb 体内表达抗体具有明显的种属特异性。另外, 普通单抗药物由于分子结构和理化性质的问题, 不易被亲脂性生物膜摄取, 难以通过胃肠道吸收, 实验中发现通过 DMAb 体内表

达人源抗体可以改善该问题。实验结果显示,小鼠体内人源抗体主要集中在小肠和腓肠肌组织中,这不仅改善了普通单抗药物在肠道组织的生物利用度,也对预防蓖麻毒素对肠道损伤产生了积极影响。

除此之外,为了评价 DMAb 技术的生物安全性,针对 DMAb 和电转染对小鼠机体的影响进行了一系列评价实验。在通过 DMAb 表达抗体的小鼠体内血液中,能明显观察到白细胞中的淋巴细胞的上升,这说明通过 DMAb 技术表达的抗体在身体中仍然会被识别成异源蛋白并引发免疫反应^[144-147]。另外,对肌肉进行电脉冲也会对局部肌肉组织造成粒细胞浸润,引发局部炎症反应^[148]。随后,对其他脏器病理切片的观察结果也为这些结论提供了支撑,所得结论与已有报道相一致^[149]。

在本研究中,利用 DMAb 技术,构建了搭载抗蓖麻毒素抗体序列的 DMAb 载体,并在体内外水平检测了该 DMAb 载体分泌抗体和预防蓖麻毒素中毒的能力。DMAb 制备成本低廉、特异性强、靶组织易摄取,为预防蓖麻毒素的相关抗体药物的快速研发和制备提供了理论基础。

3.5 小结

(1) 制备得到 DMAb-4D12、DMAb-4-4E 和 DMAb-c43RCA 三种载体,在体内外均具有良好的抗体分泌能力。小鼠体内 DMAb 抗体表达存在种属特异性,小鼠血清中人源抗体水平在转染后第 7 天达到 10 $\mu\text{g/mL}$ 以上,小鼠体内鼠源抗体 4D12 持续表达超过 120 天,集中分布于小肠和腓肠肌组织。

(2) 在攻毒前 5 天体内转染 DMAb-4-4E 或 DMAb-c43RCA 25 μg ,腹腔注射 $2\times\text{LD}_{50}$ 蓖麻毒素 72 h 内小鼠存活率分别为 83%和 100%,各组小鼠体重均迅速降低, DMAb-IgG 组小鼠血糖在攻毒后 72 h 内恢复至正常组水平,小肠肠壁损伤相较对照组显著降低。

(3) 电转染 DMAb 导致腓肠肌组织存在粒细胞浸润,肾脏、脾脏和肝脏出现炎症反应和可恢复性损伤。

第四章 全人源抗蓖麻毒素抗体保护机制探究

抗体药物作为一种靶向性强的药物，其最大的优势就是能够精准靶向特定的抗原表位，而这与其独特结构密切相关。蛋白结构决定了不同的抗原表位，也就决定了不同的蛋白功能和机制。因此，探究抗体抗原的结合细节和正确理解抗体发挥功能的内在机制，对于抗体药物开发具有重要的意义。

蓖麻毒素在胞内发挥毒性，主要是借助细胞的逆向转运途径。蓖麻毒素借助 RTB 在膜表面停留，而后通过胞吞入胞，在高尔基体、内质网驻留，在蛋白质二硫键异构酶的催化下释放 RTA。RTA 分子被运往胞浆，最终发挥毒性。目前已发现的蓖麻毒素抗体保护机制包括：①阻碍逆向转运，干扰蓖麻毒素从质膜到高尔基体的转运；②阻断 PDI 对蓖麻毒素二硫键的还原；③直接屏蔽蓖麻毒素作为 RIP 的酶活性中心；④阻碍 RTB 与膜表面受体结合^[150]。

本章将利用生物信息学和相关实验探究抗体抗原的结合细节，进而了解抗体发挥保护功能的内在机制，本研究对于今后进一步开发蓖麻毒素中和抗体提供了重要的理论基础。

4.1 实验材料及仪器

4.1.1 实验主要试剂

用于检测的蓖麻毒素由实验室保存；无水乙醇、脱脂奶粉、蛋白质二硫化异构酶、EDTA 和 DMEM 培养基均购自美国 Sigma 公司；胎牛血清购自美国 Gibco 公司；抗荧光淬灭剂购自上海信裕生物科技有限公司；Super fluor 680 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；Triton X-100、K₃PO₄、DTT、GSH、GSSG、DMSO、Tris、HCl、NaCl、NaH₂PO₄·2H₂O、SDS、Na₂HPO₄、(NH₄)₂SO₄、30% 丙烯酰胺、Tween-20、BSA、NaHCO₃、Native protein loading buffer、TEMED 均购自生工生物工程股份有限公司；NADPH 购于北京索莱宝科技有限公司；TrxR 购自武汉云克隆科技股份有限公司；预染蛋白质标准分子量 Marker 购自北京 Takara 公司；DAPI 染色液、High-sig ECL Western Blotting Substrate 购自美国 Thermo Scientific 公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（增强型）购自上海碧云天生

物技术有限公司； FITC-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG、Golgin 97 Polyclonal Antibody 和 EEA1 Polyclonal Antibody 购自美国 Proteintech 公司； HRP Avidin 购自美国 Biolegend 公司。

4.1.2 主要仪器及设备

高速低温冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司，5810R 型）；超低温冰箱（中科美菱低温科技股份有限公司，YCD-EL259A 型）；层析实验冷柜（北京博医康实验仪器有限公司，YC-2 型）；酶联免疫检测仪（瑞士 Tecan 公司，F500 型）；小型垂直电泳转印系统（美国 Bio-Rad 公司，1658033 型）；Milli-Q 超纯水制备仪（美国 Milipore 公司，IQ 7000 型）；倒置荧光显微镜（日本 OLYMPUS 公司，IX53 型）；电热恒温培养箱（上海新诺仪器集团有限公司，HPS-250 型）；酸度计（瑞士 Mettler 公司，PHS-4CT 型）；分析天平（赛多利斯科学仪器有限公司，BCE224I-1CCN 型）；三温三控水槽（上海博迅医疗生物仪器股份有限公司，DK-8D 型）；恒温磁力搅拌器（上海司乐仪器有限公司，85-1 型）；超净工作台（深圳市博立斯智能装备有限公司，DL-CJ-IN 型）；全能型蛋白转印系统（美国 Bio-Rad 公司，1704150 型）；移液器（美国 Thermo Scientific 公司，4510030 型）。

4.1.3 主要溶液配制

PBS 溶液：称取 11.68 g NaCl、9.44 g Na_2HPO_4 、5.28 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，加蒸馏水定容至 2 L，调节 pH=7.4，室温保存备用。

PBST 溶液：0.05% Tween-20-PBS 溶液。向 1 L PBS 溶液中加入 500 μL 的 Tween-20，充分搅拌溶解，室温保存备用。

封闭液：3%BSA-PBS 溶液。称取 0.45 g BSA，用 PBS 溶液定容至 15 mL，现用现配。

固定液：向 400 mL 蒸馏水中加入 50 mL 甲醛溶液，充分混合后用蒸馏水将该溶液定容至 500 mL，室温保存。

透化液：向 100 mL 去离子水中缓慢加入 200 μL Triton X-100，搅拌混匀后于 4℃保存。

0.15 mol/L NaCl 溶液：称取 8.8 g NaCl 固体，定容至 1 L，4℃保存备用。

5×电泳缓冲液：称取 15.1 g Tris 固体和 94 g Glycine 固体，量取 10%SDS 溶液 50 mL，加水 800 mL 充分溶解后，用 HCl 将 pH 值调至 8.3，定容至 1 L 后常温保存。

10%过硫酸铵溶液：称取 5 g 过硫酸铵，加蒸馏水定容至 50 mL，充分搅拌溶解，分装后 4℃保存。

10%SDS 溶液：称取 50 g SDS 固体，加蒸馏水至 500 mL 充分溶解，分装后 4℃保存。

4.1.4 数据库及软件

IMGT (<http://www.imgt.org>) ;

SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) ;

UCLA-DOE LAB-SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) ;

Discovery Studio (<https://discover.3ds.com>) ;

DNAMAN 9 (<https://www.lynnnon.com/dnaman.html>) ;

ImageJ (<https://imagej.net/software/imagej/>) ;

PyMOL (<https://pymol.org/2/>) 。

4.1.5 细胞株

Vero 细胞购自 American Type Culture Collection (ATCC) 。

4.2 实验方法

4.2.1 蓖麻毒素的亚细胞定位

4.2.1.1 蓖麻毒素的 Super fluor 680 修饰

(1) 蛋白预处理：用蒸馏水稀释蓖麻毒素至 2 mg/mL，加入 1/10 体积的 1

mol/L 碳酸氢钠溶液。

(2) 染料溶解：用 DMSO 将染料配制为 1 mg/mL。

(3) 标记：将染料溶液缓慢加入 1 mL 蛋白溶液中（蛋白：染料摩尔比=1:20），常温避光缓慢搅拌 1 h。

(4) 透析：用 100 mL 0.15 mol/L NaCl 溶液于常温避光透析 4 次，每次 4 h；用 1 L 0.15 mol/L NaCl 溶液于 4℃避光透析过夜；用 100 mL PBS 溶液于 4℃避光透析过夜，-20℃避光保存。

4.2.1.2 Vero 细胞爬片制备

(1) Vero 细胞的培养方法参见 2.2.2.1 SP2/0 骨髓瘤细胞的培养方法。

(2) 在细胞培养板中提前放置爬片，Vero 细胞密度为 8×10^4 个/mL，培养 24 h 后，加入 50 μ g/mL 的抗体 250 μ L/孔，37℃孵育 1 h。

(3) 加入 10 ng/mL 的蓖麻毒素 250 μ L/孔，37℃孵育 2 h。

(4) 吸去所有液体，加入 PBS 溶液 500 μ L/孔，然后进行免疫荧光实验。

4.2.1.3 细胞免疫荧光

(1) 洗涤：加入 PBS 溶液 500 μ L/孔浸洗 3 次，每次 3 min；

(2) 固定：加入固定液 500 μ L/孔固定 15 min；

(3) 洗涤：加入 PBS 溶液 500 μ L/孔浸洗 3 次，每次 3 min；

(4) 透化：加入透化液 500 μ L/孔透化 5 min；

(5) 洗涤：加入 PBS 溶液 500 μ L/孔浸洗 3 次，每次 3 min；

(6) 封闭：加入封闭液 500 μ L/孔，室温封闭 60 min；

(7) 一抗：用 PBS 溶液 1:3 稀释封闭液，使用该混合溶液按说明书比例稀释抗 Golgin 97 抗体和抗 EEA1 抗体 500 μ L/孔，4℃孵育过夜；

(8) 洗涤：加入 PBS 溶液 500 μ L/孔浸洗 3 次，每次 3 min；

(9) 二抗：用 PBS 溶液 1:5000 稀释 FITC 羊抗兔荧光二抗，加入 500 μ L/孔，室温避光孵育 60 min；

- (10) 洗涤：加入 PBS 溶液 500 μL /孔避光浸洗 3 次，每次 3 min；
- (11) 染核：加入 DAPI 染色液 500 μL /孔，室温避光孵育 3 min；
- (12) 洗涤：加入 PBS 溶液 500 μL /孔避光浸洗 3 次，每次 3 min；
- (13) 封片：滴加抗荧光淬灭封片液于载玻片上，将爬片小心夹出倒置，封片，通过荧光显微镜观察并记录荧光，用 ImageJ 软件量化分析结果。

4.2.2 抗体阻碍 PDI 水解蓖麻毒素二硫键

4.2.2.1 抗体阻碍 PDI 水解蓖麻毒素二硫键

(1) 首先需要激活 PDI 蛋白，见表 4.1 中反应一体系，加入各组分后轻轻混匀，室温避光孵育 20 min。

(2) 另外需提前混合蓖麻毒素和抗体，见表 4.1 中反应二体系，预混后加入至反应结束的反应一，充分混合；设置阳性对照，等量 Bio-RT 与 DDT (20 mmol/L) 充分混合；设置阴性对照，等量 Bio-RT，各组均 37°C 避光孵育 60 min。

(3) 反应结束后，对各组加入 Native protein loading buffer 至工作浓度，立即进行蓖麻毒素亚基的鉴定。

表 4.1 抗体阻断 PDI 水解蓖麻毒素二硫键反应体系

Table 4.1 Antibodies block PDI hydrolyzed ricin disulfide bond reaction system

反应一成分	含量	反应二成分	含量
PDI	1.2 $\mu\text{mol/L}$	Bio-RT*	20 nmol/L
TrxR	90 nmol/L	IgG	2 $\mu\text{mol/L}$
K ₃ PO ₄	100 mmol/L	GSH	750 $\mu\text{mol/L}$
EDTA	2 mmol/L	GSSG	250 $\mu\text{mol/L}$
NADPH	200 $\mu\text{mol/L}$		
室温避光孵育 20 min。		预混后加入反应结束的反应一， 37°C 避光孵育 60 min。	

*生物素修饰蓖麻毒素的方法参见 2.2.4.4。

4.2.2.2 Western Blot 鉴定蓖麻毒素亚基

- (1) 配胶：配制 SDS-PAGE 凝胶，配制方法见 2.2.3.1。
- (2) 上样：每孔分别加入样品或预染蛋白质标准分子量 Marker。设置电压为 80 V，待溴酚蓝抵达胶的尾部附近即关闭电源。
- (3) 转膜：通过转膜装置对 PVDF 膜进行转膜，设置转膜电流为 350 mA，转膜时间为 45 min。
- (4) 封闭：转膜结束后，将膜置于 2% MPBS 溶液中，轻轻摇晃，室温封闭 2 h，弃尽封闭液。
- (5) 洗涤：用 PBST 溶液洗涤膜，每次洗涤 10 min，共洗涤 3 次。
- (6) 一抗：用 PBST 溶液 1:10000 稀释酶标亲和素，轻轻摇晃，室温孵育 1 h。
- (7) 洗涤：用 PBST 溶液洗涤膜，每次洗涤 10 min，共洗涤 5 次。
- (8) 将试剂盒中 A 液和 B 液等体积混合，在膜上均匀滴加混合溶液，通过凝胶成像系统观察蛋白印迹。

4.2.3 抗原抗体复合物结构预测

4.2.3.1 同源建模和评价

- (1) 登陆 SWISS MODELING 建模平台，在 Modelling - User Template Mode 中，提交抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列，开始进行同源建模和分析。
- (2) 建模任务完成后，下载报告文件。文件中包含了目标蛋白序列与同源模板序列之间比对信息和对建模结果的置信度区间等信息。此外，还记载了模板比对和搜索中的相关信息。
- (3) 在 Discovery Studio 软件中打开建模文件，使用 Chart- Ramachandran Plot 功能，构建拉式图，根据拉式图评估结果对错误区氨基酸进行优化。

4.2.3.2 ZDOCK 和 RDOCK

- (1) 使用 DS 软件打开受体蛋白和配体蛋白的结构文件。

(2) 使用蛋白对接 (ZDOCK) 工具并修改其中参数。其中, Angular Step Size 参数选择 15; RMSD Cutoff 参数选择 6; Interface Cutoff 选择 9; Maximum Number of Clusters 参数选择 60。其余参数均为默认值^[4]。

(3) 待对接任务结束后, 作 3D Point Plot 图分析对接得到的所有构型, 选取聚类多、对接评分高和符合实验数据的对接结果。

(4) 利用 CHARMM Polar H 力场对构型空间赋值, 通过 RDOCK 工具优化对接构型, 通过比较各构型之间 E_RDOCK 的分数, 得到最优构型。

4.3 实验结果

4.3.1 抗体阻碍蓖麻毒素逆向转运

蓖麻毒素的胞内逆向转运是蓖麻毒素发挥毒性的重要机制, 因此, 有必要探究抗体的中和功能是否与阻碍逆向转运相关。在抗体中和蓖麻毒素的过程中, 通过免疫荧光实验分别定位蓖麻毒素与相关细胞器的位置, 对比观察抗体对逆向转运的阻碍作用。如图 4.1 所示, 加入抗体后, 蓖麻毒素与高尔基体标志物 Golgin97 共定位减少, 说明抗体抑制蓖麻毒素在高尔基体驻留。

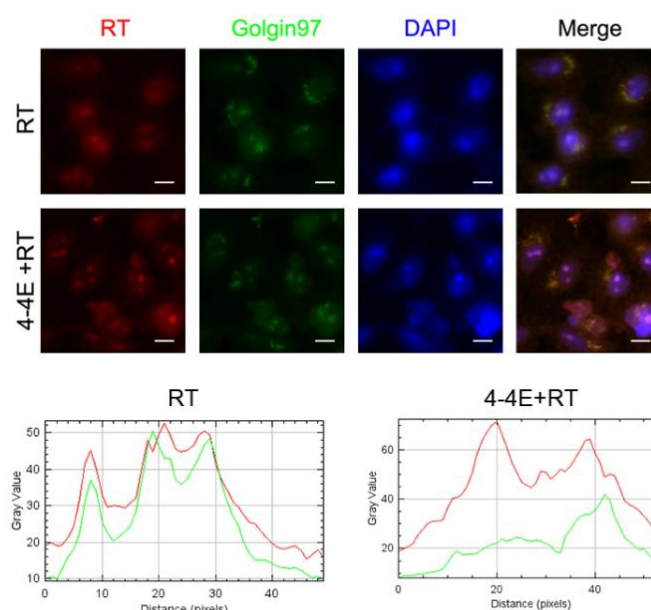


图 4.1 抗体阻碍蓖麻毒素在高尔基体驻留

Figure 4.1 Antibodies impede ricin residency in the Golgi apparatus

蓖麻毒素在逆向转运的过程中，大多数分子均会被内体识别，并最终在溶酶体中被降解。因此，为了进一步了解未能驻留在高尔基体的蓖麻毒素的去向，有必要进一步探究蓖麻毒素和内体的共定位关系。如图 4.2 所示，加入抗体后，蓖麻毒素与早期内体（Early Endosome, EE）标志物 EEA1 共定位增加，说明抗体增加蓖麻毒素在早期内体中累积，从而最终导向被溶酶体降解的命运。

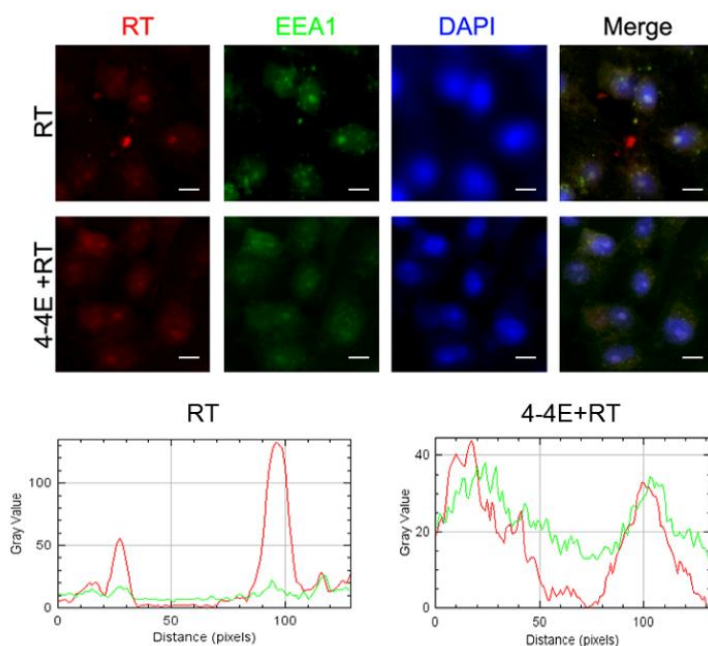


图 4.2 抗体增加蓖麻毒素在早期内体中累积

Figure 4.2 Antibodies increase ricin accumulation in early endosomes

4.3.2 抗体阻碍 PDI 水解蓖麻毒素二硫键

蓖麻毒素在转运至内质网后，将被 PDI 水解其二硫键，使 RTA 和 RTB 相互解离，从而使 RTA 继续向胞浆转运并最终发挥核糖体失活酶活性。因此，为了鉴定抗体是否能够阻碍 PDI 水解蓖麻毒素的二硫键，通过蛋白印迹实验鉴定了 PDI 重组蛋白对生物素修饰的蓖麻毒素二硫键的水解。如图 4.3A 所示，除 6-9D 和 7-10C 外，其他抗体均能够在不同程度上阻碍 PDI 对蓖麻毒素二硫键的水解。

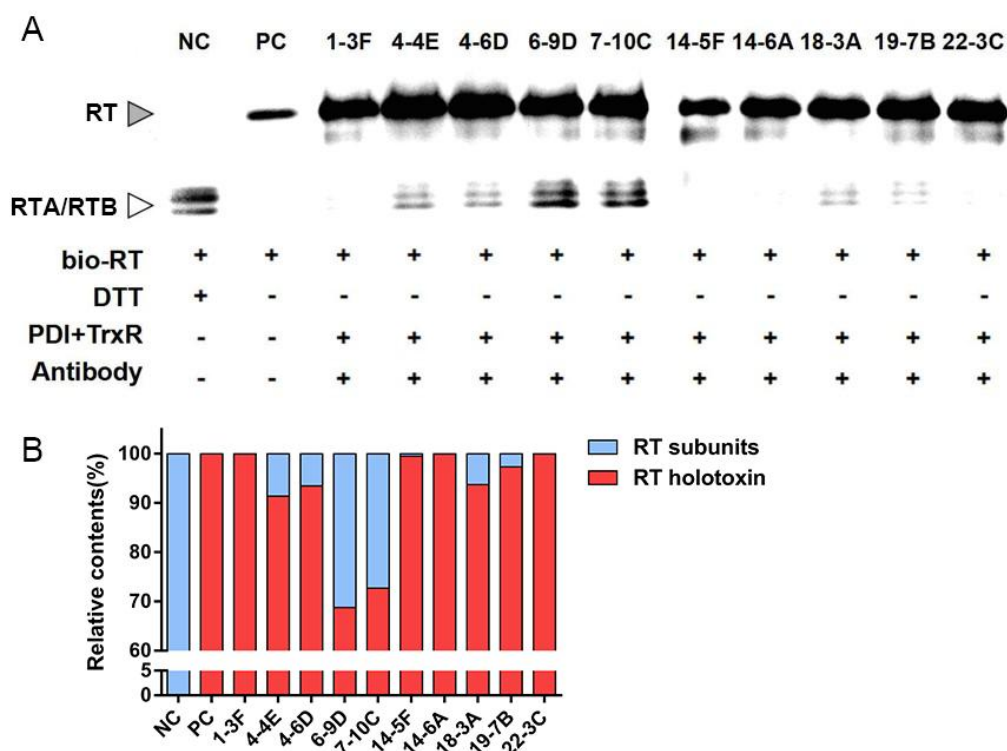


图 4.3 抗体阻碍 PDI 水解蓖麻毒素二硫键

Figure 4.3 Antibodies impede PDI hydrolysis of ricin disulfide bonds

4.3.3 抗原抗体复合物结构预测

4.3.3.1 同源建模和评价

通过 SWISS-MODEL 数据库对抗体 4-4E 的轻重链可变区进行同源建模。如图 4.4A 和图 4.4C 所示，通过模板（PDB ID: 5i1c.1）同源建模得到 4-4E 的轻重链可变区模型。另外，如图 4.4B 所示，蓖麻毒素分子的结构模型选择直接应用数据库中的已知模型（PDB ID: 3rti）。

通过 UCLA-SAVES 数据库计算蛋白质结构中所有残基中的 ϕ 和 ψ ，并绘制拉式图（Ramachandran Plot）。如图 4.5 所示，“不允许区”的氨基酸数量占比为 0%，模型可信。

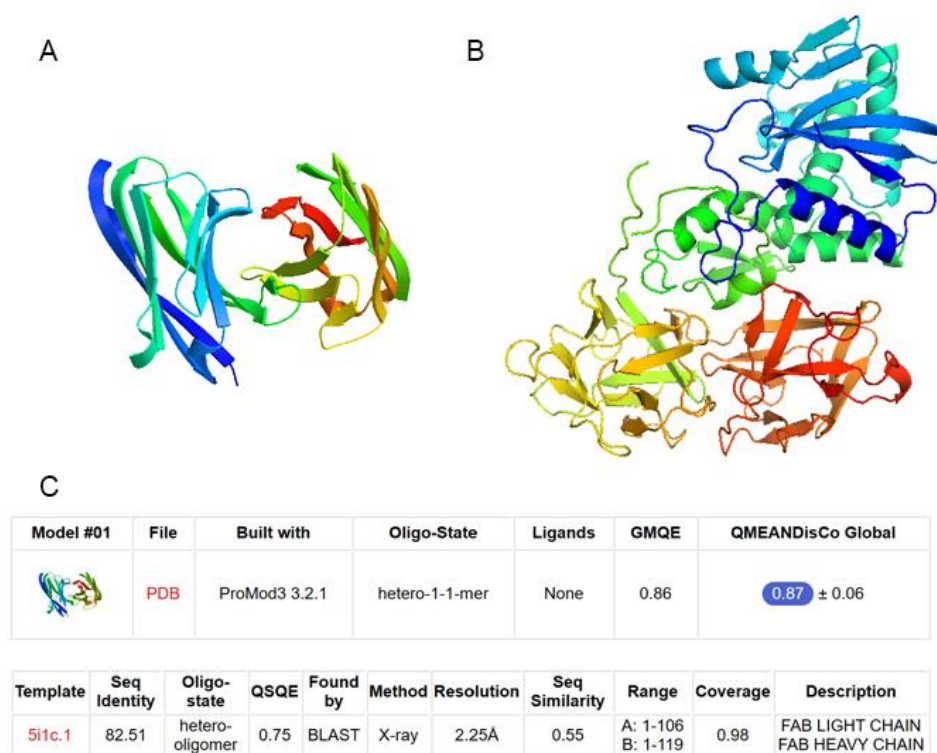


图 4.4 抗体 4-4E 的同源建模信息

Figure 4.4 Homologous modeling details for antibody 4-4E

(A) 4-4E 可变区同源建模结构示意图；(B) 蓖麻毒素结构示意图；(C) 同源建模信息

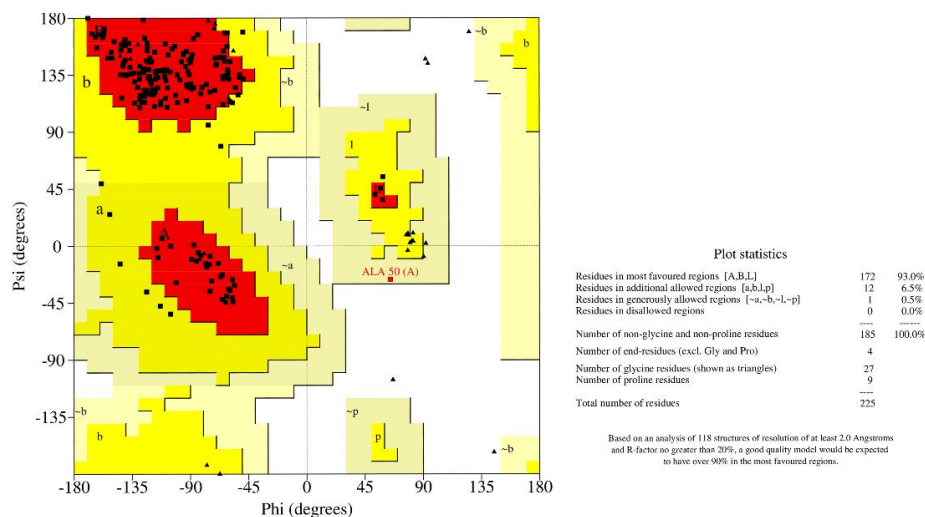


图 4.5 抗体 4-4E 模型的拉式图

Figure 4.5 Ramachandran plot of antibody 4-4E model

4.3.3.2 抗原抗体对接

通过 Discovery Studio 软件中的 ZDOCK 工具对 4-4E 和 RT 的结构模型进行蛋白对接。蛋白对接任务结果中：ZDock Score 代表每个构型的对接评分、Density 代表同聚类下对接构型数目、Cluster 代表不同对接结构型所组成的聚类。如图 4.6 所示，通过 Analyze Docked Proteins 工具和 3D Point Plot 对所有对接构型进行分析和结果可视化，选择可信对接构型继续进行 RDOCK 优化，最终通过 Pose1686 得到最优构型，见图 4.6。

如图 4.7 所示，抗体 4-4E 与蓖麻毒素分子以此构型相结合，其结合界面氨基酸在大多集中在 RTA 分子的前 60 个氨基酸范围内。如图 4.8 所示，抗体 4-4E 的重链可变区 CDR3 中的 99D/101Q/102Q 在抗原抗体结合中发挥了关键作用。

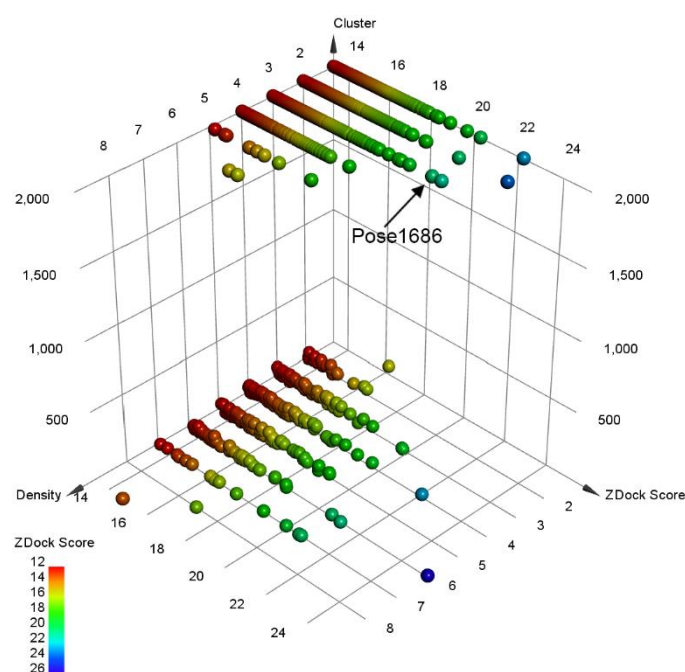


图 4.6 可视化 ZDOCK 结果

Figure 4.6 3D point plot of ZDOCK results

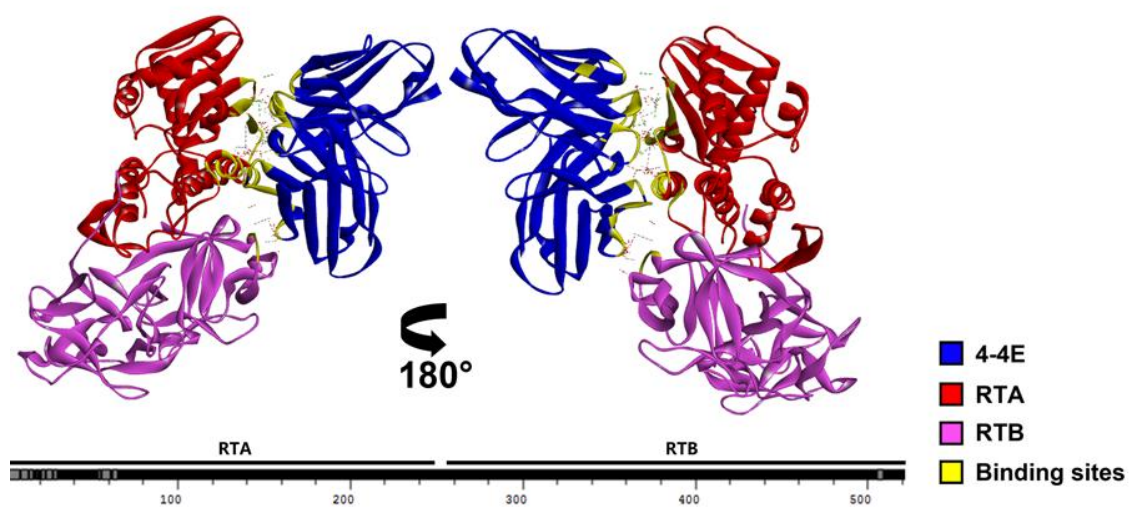


图 4.7 抗体 4-4E 和蓖麻毒素对接模型

Figure 4.7 Antibody 4-4E and RT docking model

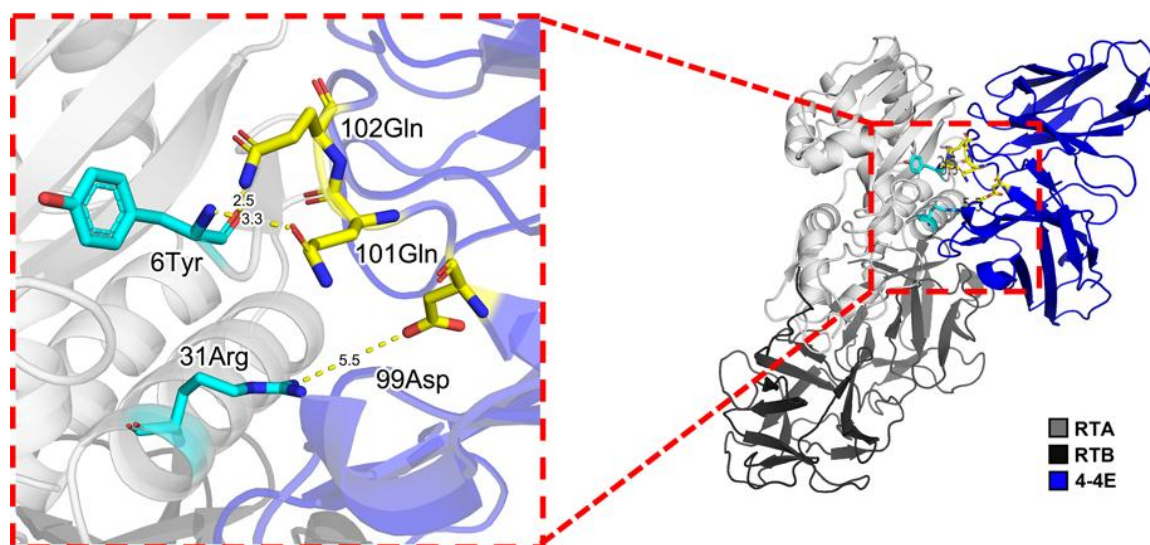


图 4.8 抗体 4-4E 和蓖麻毒素结合关键氨基酸

Figure 4.8 Antibody 4-4E and RT binding key amino acids

4.4 讨论

蓖麻毒素在胞内发挥毒性，主要是借助细胞的逆向转运途径。目前已发现的蓖麻毒素抗体保护机制包括：①阻碍逆向转运，干扰蓖麻毒素从质膜到高尔基体的转运；②阻断 PDI 对蓖麻毒素二硫键的还原；③直接屏蔽蓖麻毒素作为 RIP 的酶活性中心；④阻碍 RTB 与膜表面受体结合^[150]。

免疫荧光实验是一种可以对多个靶标同时进行标记的实验方法，其优势在于灵敏度高、检测范围广和性价比高。因此，本研究通过免疫荧光实验来观察在抗体作用下，蓖麻毒素和细胞器的共定位是否变化，进而验证抗体是否对蓖麻毒素胞内逆向转运存在阻碍作用^[23]。除此之外，为了探究抗体对 PDI 水解蓖麻毒素二硫键的阻碍作用，通过 Western Blot 实验观察蓖麻毒素两个亚基的解离情况。利用硫氧还蛋白还原酶（Thioredoxin Reductase, TrxR）和还原型辅酶 II（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH），在体外激活 PDI 重组蛋白的酶活性^[50,151]，观察在加入或不加入抗体后的实验结果变化，并通过生物素修饰蓖麻毒素来减少结果背景。结果发现 4-4E 不仅对蓖麻毒素的胞内逆向转运发挥阻碍作用，而且能够一定程度上影响 PDI 对蓖麻毒素二硫键的解离。

抗体药物能够精准靶向特定分子的抗原表位，发挥特定的功能和机制，这与其独特结构密切相关。因此，探究抗原抗体结合细节，对抗体药物开发具有重要的意义。为了更清楚地了解抗原抗体结合细节，使用 Discovery Studio 软件中 ZDOCK 工具对抗原-抗体复合物进行结构预测。基于快速傅里叶变换，ZDOCK 是一种广泛应用的刚性蛋白对接算法，通过将配体蛋白围绕受体蛋白平移和旋转，从而搜索整个空间中所有可能的蛋白结合构型，并使用评分函数对每个结合构型的总结合能进行计算和打分，经过全世界各类研究检验，具有优异的预测性能^[152-159]。抗原抗体复合物结构模型显示，4-4E 大部分抗原表位集中在 RTA 分子上，与第二章中竞争性 ELISA 的结果相一致。从第二章的研究结果中可以发现，相比其他抗体 4-4E 对蓖麻毒素的结合活力并不高，但由于其抗原表位的独特性而具有中和蓖麻毒素毒性的作用。因此，在以后的研究中可以探索更多的中和性抗原表位，进而提高中和活性。

本研究利用生物信息学和相关实验预测和探究抗体抗原的结合细节，进而推测抗体发挥保护功能的内在机制，本研究对今后进一步开发蓖麻毒素中和抗体提供了重要的理论基础。

4.5 小结

(1) 4-4E 抗体可以阻碍蓖麻毒素的胞内逆向转运, 抑制蓖麻毒素在高尔基体驻留, 增加蓖麻毒素在早期内体累积。

(2) 4-4E 抗体可以阻碍 PDI 水解蓖麻毒素二硫键。

(3) 4-4E 抗体重链可变区 CDR3 中的 99D/101Q/102Q 在抗原抗体结合中具有关键性作用。

第五章 结论与展望

结论

1. 转录组分析发现 17 种脾脏 MBC 新标志物，并发现蓖麻毒素的免疫优势表位与中和性抗原表位存在差别。
2. 利用全人抗体转基因小鼠，制备得到 10 株全人源抗蓖麻毒素单克隆抗体，筛选得到 1 株全人源抗蓖麻毒素中和抗体 4-4E。
3. 小鼠体内 DMAb 抗体表达存在种属特异性，人源抗体 14 天内从体内清除，鼠源抗体持续表达超过 120 天。DMAb-4-4E 或 DMAb-c43RCA 可保护小鼠免受蓖麻毒素致死。
4. 阻碍蓖麻毒素的胞内逆向转运和二硫键的水解为抗体 4-4E 的保护机制。

展望

蓖麻毒素属于Ⅱ型核糖体失活蛋白，对社会公共安全存在潜在威胁。蓖麻毒素至今无特效药，目前针对蓖麻毒素中毒防护的热门研究方向是蓖麻毒素中和抗体。为了更全面地理解蓖麻毒素的中和性抗原表位并开发新型蓖麻毒素抗体药物，本研究通过单细胞测序技术对 RT 免疫的全人源抗体转基因小鼠脾脏 B 细胞转录组和 B 细胞 BCR 库测序并分析数据，利用杂交瘤技术筛选和鉴定全人源 RT 中和抗体，通过 DMAb 技术研究在体内分泌中和抗体和对 RT 中毒小鼠的保护作用。本研究力求解析蓖麻毒素抗原表位，开发全新的全人源蓖麻毒素中和抗体药物，对于预防蓖麻毒素中毒具有重要的理论和实践意义。

在今后的研究中，4-4E 抗体的结合表位需要得到进一步实验验证（例如点突变实验），抗体中和功能需要对抗体重链可变区 CDR3 进行亲和力成熟。DMAb 技术将特异性抗体序列直接导入机体，在短时间内产生大量抗体，填补了疫苗免疫后短时间内机体抗体不足的窗口期，具有制备简便、成本低廉、持续性好的优势。DMAb 抗体有望与传统疫苗相结合，诱导机体在更短时间内分泌高水平抗体，并最终应用于毒素或人兽共患病的预防或治疗。但由于电脉冲和自身免疫所带来的局部副反应等潜在风险，开发 DMAb 药物仍然存在巨大的挑战。随着生物信息

学、人工智能、反向疫苗学等技术的发展，未来将探索功能活性更强的抗体序列，寻找更加安全和有效的抗体递送方法。

参考文献

- [1] Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin poisoning: a comprehensive review. *JAMA*. 2005 Nov 9;294(18):2342-51. doi: 10.1001/jama.294.18.2342. PMID: 16278363.
- [2] From S, Płusa T. Współczesne zagrożenie toksyną rycynową [Today's threat of ricin toxin]. *Pol Merkur Lekarski*. 2015 Sep;39(231):162-4. Polish. PMID: 26449579.
- [3] Grela P, Szajwaj M, Horbowicz-Drożdżal P, Tchórzewski M. How Ricin Damages the Ribosome. *Toxins (Basel)*. 2019 Apr 27;11(5):241. doi: 10.3390/toxins11050241. PMID: 31035546; PMCID: PMC6562825.
- [4] 霍玉淼,文艳鹏,包春光,袁朴芳,任文静,高昶,李玉玲,黄凤兰.蓖麻毒素应用研究进展[J].*特种经济动植物*,2023,26(01):79-81+101.
- [5] 任文静,尹明达,霍玉淼,袁朴芳,王艳,李瑞英,崔凯,黄凤兰.蓖麻毒蛋白的研究进展[J].*特种经济动植物*,2022,25(11):77-80.
- [6] Frankel AE, Burbage C, Fu T, Tagge E, Chandler J, Willingham MC. Ricin toxin contains at least three galactose-binding sites located in B chain subdomains 1 alpha, 1 beta, and 2 gamma. *Biochemistry*. 1996 Nov 26;35(47):14749-56. doi: 10.1021/bi960798s. PMID: 8942636.
- [7] Roberts LM, Smith DC. Ricin: the endoplasmic reticulum connection. *Toxicon*. 2004 Oct;44(5):469-72. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.07.002. PMID: 15450920.
- [8] 赵旭,钟武,李行舟,刘子侨.蓖麻毒素及其解毒剂研究进展[J].*国际药学研究杂志*, 2017,44(01):35-39.DOI:10.13220/j.cnki.jipr.2017.01.006.
- [9] Jetzt AE, Cheng JS, Tumer NE, Cohick WS. Ricin A-chain requires c-Jun N-terminal kinase to induce apoptosis in nontransformed epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Dec;41(12):2503-10. doi: 10.1016/j.biocel.2009.08.007. Epub 2009 Aug 18. PMID: 19695342; PMCID: PMC2783365.
- [10] Tesh VL. The induction of apoptosis by Shiga toxins and ricin. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2012;357:137-78. doi: 10.1007/82_2011_155. PMID: 22130961.
- [11] Rao PV, Jayaraj R, Bhaskar AS, Kumar O, Bhattacharya R, Saxena P, Dash PK, Vijayaraghavan R. Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2005 Mar 1;69(5):855-65. doi: 10.1016/j.bcp.2004.11.010. Epub 2005 Jan 22. PMID: 15710362.
- [12] Sha O, Yew DT, Ng TB, Yuan L, Kwong WH. Different in vitro toxicities of structurally similar type I ribosome-inactivating proteins (RIPs). *Toxicol In Vitro*. 2010 Jun;24(4):1176-82. doi: 10.1016/j.tiv.2010.02.014. Epub 2010 Feb 17. PMID: 20170725.
- [13] Hodges AL, Kempen CG, McCaig WD, Parker CA, Mantis NJ, LaRocca TJ. TNF Family Cytokines Induce Distinct Cell Death Modalities in the A549 Human Lung Epithelial Cell Line when Administered in Combination with Ricin Toxin. *Toxins (Basel)*. 2020 Jun 1;12(6):351. doi: 10.3390/toxins12060351. PMID: 32512342.

- 019 Aug 1;11(8):450. doi: 10.3390/toxins11080450. PMID: 31374990; PMCID: PMC6723388.
- [14] 王玉霞,乔虹,刘子侨.蓖麻毒素毒性作用机制及防治研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2016,30(12):1385-1396.
- [15] Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011 Mar;75(1):50-83. doi: 10.1128/MMBR.00031-10. Erratum in: *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012 Jun;76(2):496. PMID: 21372320; PMCID: PMC3063353.
- [16] Yu K, Yu H, Wang Y, Dong M, Wang Y, Zhao N, Zhang J, Sun C, Xu N, Liu W. Identification of a lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA network to explore the effects of ricin toxin-induced inflammation in RAW264.7 cells. *Toxicon.* 2021 Nov;203:129-138. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.10.007. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34673083.
- [17] Dong M, Yu H, Wang Y, Sun C, Chang Y, Yin Q, Zhao G, Xu N, Liu W. Critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) in ricin toxin-induced inflammatory responses in macrophages. *Toxicol Lett.* 2020 Mar 15;321:54-60. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.12.021. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31862508.
- [18] Dong M, Zhang X, Yu H, Wang Y, Chang Y, Sun C, Zhang J, Zhao N, Yu K, Sun G, Zhao G, Xu N, Liu W. CircEpc1 Promotes Ricin Toxin-Induced Inflammation via Activation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways by Sponging miR-5114. *Front Pharmacol.* 2021 Oct 22;12:767900. doi: 10.3389/fphar.2021.767900. PMID: 34744746; PMCID: PMC8569240.
- [19] Pelat T, Hust M, Hale M, Lefranc MP, Dübel S, Thullier P. Isolation of a human-like antibody fragment (scFv) that neutralizes ricin biological activity. *BMC Biotechnol.* 2009 Jun 30;9:60. doi: 10.1186/1472-6750-9-60. PMID: 19563687; PMCID: PMC2716335.
- [20] Respaud R, Marchand D, Pelat T, Tchou-Wong KM, Roy CJ, Parent C, Cabrera M, Guillemain J, Mac Loughlin R, Levacher E, Fontayne A, Douziech-Eyrolles L, Junqua-Moulet A, Guilleminault L, Thullier P, Guillot-Combe E, Vecellio L, Heuzé-Vourc'h N. Development of a drug delivery system for efficient alveolar delivery of a neutralizing monoclonal antibody to treat pulmonary intoxication to ricin. *J Control Release.* 2016 Jul 28;234:21-32. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.05.018. Epub 2016 May 9. PMID: 27173943.
- [21] O'Hara JM, Neal LM, McCarthy EA, Kasten-Jolly JA, Brey RN 3rd, Mantis NJ. Folding domains within the ricin toxin A subunit as targets of protective antibodies. *Vaccine.* 2010 Oct 8;28(43):7035-46. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.08.020. Epub 2010 Aug 18. PMID: 20727394; PMCID: PMC2954487.
- [22] Sully EK, Whaley KJ, Bohorova N, Bohorov O, Goodman C, Kim DH, Pauly MH, Velasco J, Hiatt E, Morton J, Swope K, Roy CJ, Zeitlin L, Mantis NJ. Chimeric plantibody passively protects mice against aerosolized ricin challenge. *Clin Vaccine Immunol.*

-
- 2014 May;21(5):777-82. doi: 10.1128/CVI.00003-14. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24574537; PMCID: PMC4018890.
- [23] Yermakova A, Klok TI, O'Hara JM, Cole R, Sandvig K, Mantis NJ. Neutralizing Monoclonal Antibodies against Disparate Epitopes on Ricin Toxin's Enzymatic Subunit Interfere with Intracellular Toxin Transport. *Sci Rep*. 2016 Mar 7;6:22721. doi: 10.1038/srep22721. PMID: 26949061; PMCID: PMC4779987.
- [24] Neal LM, O'Hara J, Brey RN 3rd, Mantis NJ. A monoclonal immunoglobulin G antibody directed against an immunodominant linear epitope on the ricin A chain confers systemic and mucosal immunity to ricin. *Infect Immun*. 2010 Jan;78(1):552-61. doi: 10.1128/IAI.00796-09. Epub 2009 Oct 26. PMID: 19858297; PMCID: PMC2798177.
- [25] O'Hara JM, Mantis NJ. Neutralizing monoclonal antibodies against ricin's enzymatic subunit interfere with protein disulfide isomerase-mediated reduction of ricin holotoxin in vitro. *J Immunol Methods*. 2013 Sep 30;395(1-2):71-8. doi: 10.1016/j.jim.2013.06.004. Epub 2013 Jun 15. PMID: 23774033; PMCID: PMC3753220.
- [26] Vance DJ, Tremblay JM, Mantis NJ, Shoemaker CB. Stepwise engineering of heterodimeric single domain camelid VHH antibodies that passively protect mice from ricin toxin. *J Biol Chem*. 2013 Dec 20;288(51):36538-47. doi: 10.1074/jbc.M113.519207. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24202178; PMCID: PMC3868766.
- [27] Rudolph MJ, Vance DJ, Cassidy MS, Rong Y, Shoemaker CB, Mantis NJ. Structural analysis of nested neutralizing and non-neutralizing B cell epitopes on ricin toxin's enzymatic subunit. *Proteins*. 2016 Aug;84(8):1162-72. doi: 10.1002/prot.25062. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27159829; PMCID: PMC4945499.
- [28] Noy-Porat T, Rosenfeld R, Ariel N, Epstein E, Alcalay R, Zvi A, Kronman C, Orntlich A, Mazor O. Isolation of Anti-Ricin Protective Antibodies Exhibiting High Affinity from Immunized Non-Human Primates. *Toxins (Basel)*. 2016 Mar 3;8(3):64. doi: 10.3390/toxins8030064. PMID: 26950154; PMCID: PMC4810209.
- [29] Rudolph MJ, Vance DJ, Cassidy MS, Rong Y, Mantis NJ. Structural Analysis of Single Domain Antibodies Bound to a Second Neutralizing Hot Spot on Ricin Toxin's Enzymatic Subunit. *J Biol Chem*. 2017 Jan 20;292(3):872-883. doi: 10.1074/jbc.M116.758102. Epub 2016 Nov 30. PMID: 27903650; PMCID: PMC5247660.
- [30] Maddaloni M, Cooke C, Wilkinson R, Stout AV, Eng L, Pincus SH. Immunological characteristics associated with the protective efficacy of antibodies to ricin. *J Immunol*. 2004 May 15;172(10):6221-8. doi: 10.4049/jimmunol.172.10.6221. PMID: 15128810.
- [31] Czajka TF, Vance DJ, Davis S, Rudolph MJ, Mantis NJ. Single-domain antibodies neutralize ricin toxin intracellularly by blocking access to ribosomal P-stalk proteins. *J Biol Chem*. 2022 Feb 17;298(4):101742. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101742. Epub ahead of print. PMID: 35182523.
- [32] Baluna R, Coleman E, Jones C, Ghetie V, Vitetta ES. The effect of a monoclonal antibody coupled to ricin A chain-derived peptides on endothelial cells in vitro: insights i
-

-
- nto toxin-mediated vascular damage. *Exp Cell Res*. 2000 Aug 1;258(2):417-24. doi: 10.1006/excr.2000.4954. PMID: 10896793.
- [33] O'Hara JM, Kasten-Jolly JC, Reynolds CE, Mantis NJ. Localization of non-linear neutralizing B cell epitopes on ricin toxin's enzymatic subunit (RTA). *Immunol Lett*. 2014 Mar-Apr;158(1-2):7-13. doi: 10.1016/j.imlet.2013.11.009. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24269767; PMCID: PMC4070743.
- [34] McGuinness CR, Mantis NJ. Characterization of a novel high-affinity monoclonal immunoglobulin G antibody against the ricin B subunit. *Infect Immun*. 2006 Jun;74(6):3463-70. doi: 10.1128/IAI.00324-06. PMID: 16714577; PMCID: PMC1479246.
- [35] Vance DJ, Poon AY, Mantis NJ. Sites of vulnerability on ricin B chain revealed through epitope mapping of toxin-neutralizing monoclonal antibodies. *PLoS One*. 2020 Nov 9;15(11):e0236538. doi: 10.1371/journal.pone.0236538. PMID: 33166282; PMCID: PMC7652295.
- [36] Yermakova A, Mantis NJ. Neutralizing activity and protective immunity to ricin toxin conferred by B subunit (RTB)-specific Fab fragments. *Toxicon*. 2013 Sep;72:29-34. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.04.005. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23603317; PMCID: PMC3774546.
- [37] Yermakova A, Mantis NJ. Protective immunity to ricin toxin conferred by antibodies against the toxin's binding subunit (RTB). *Vaccine*. 2011 Oct 19;29(45):7925-35. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.075. Epub 2011 Aug 26. PMID: 21872634; PMCID: PMC3191258.
- [38] Hu WG, Yin J, Chau D, Hu CC, Lillico D, Yu J, Negrych LM, Cherwonogrodzky JW. Conformation-dependent high-affinity potent ricin-neutralizing monoclonal antibodies. *Biomed Res Int*. 2013;2013:471346. doi: 10.1155/2013/471346. Epub 2012 Dec 26. PMID: 23484120; PMCID: PMC3591125.
- [39] Hu WG, Yin J, Chau D, Negrych LM, Cherwonogrodzky JW. Humanization and characterization of an anti-ricin neutralization monoclonal antibody. *PLoS One*. 2012;7(9):e45595. doi: 10.1371/journal.pone.0045595. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23049820; PMCID: PMC3458913.
- [40] Yermakova A, Vance DJ, Mantis NJ. Sub-domains of ricin's B subunit as targets of toxin neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies. *PLoS One*. 2012;7(9):e44317. doi: 10.1371/journal.pone.0044317. Epub 2012 Sep 11. PMID: 22984492; PMCID: PMC3439471.
- [41] Diamant E, Torgeman A, Ozeri E, Zichel R. Monoclonal Antibody Combinations that Present Synergistic Neutralizing Activity: A Platform for Next-Generation Anti-Toxin Drugs. *Toxins (Basel)*. 2015 May 29;7(6):1854-81. doi: 10.3390/toxins7061854. PMID: 26035486; PMCID: PMC4488679.
- [42] Prigent J, Panigai L, Lamourette P, Sauvaire D, Devilliers K, Plaisance M, Volland H, Créminon C, Simon S. Neutralising antibodies against ricin toxin. *PLoS One*. 2011;
-

- 6(5):e20166. doi: 10.1371/journal.pone.0020166. Epub 2011 May 25. PMID: 21633505; PMCID: PMC3102095.
- [43] Orsini Delgado ML, Avril A, Prigent J, Dano J, Rouaix A, Worbs S, Dorner BG, Rougeaux C, Becher F, Fenaille F, Livet S, Volland H, Tournier JN, Simon S. Ricin Antibodies' Neutralizing Capacity against Different Ricin Isoforms and Cultivars. *Toxins (Basel)*. 2021 Jan 29;13(2):100. doi: 10.3390/toxins13020100. PMID: 33573016; PMCID: PMC7911099.
- [44] Noy-Porat T, Alcalay R, Epstein E, Sabo T, Kronman C, Mazor O. Extended therapeutic window for post-exposure treatment of ricin intoxication conferred by the use of high-affinity antibodies. *Toxicon*. 2017 Mar 1;127:100-105. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.01.009. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28089771.
- [45] Rong Y, Pauly M, Guthals A, Pham H, Ehrbar D, Zeitlin L, Mantis NJ. A Humanized Monoclonal Antibody Cocktail to Prevent Pulmonary Ricin Intoxication. *Toxins (Basel)*. 2020 Mar 29;12(4):215. doi: 10.3390/toxins12040215. PMID: 32235318; PMCID: PMC7232472.
- [46] Rong Y, Torres-Velez FJ, Ehrbar D, Doering J, Song R, Mantis NJ. An intranasally administered monoclonal antibody cocktail abrogates ricin toxin-induced pulmonary tissue damage and inflammation. *Hum Vaccin Immunother*. 2020 Apr 2;16(4):793-807. doi: 10.1080/21645515.2019.1664243. Epub 2019 Oct 29. PMID: 31589555; PMCID: PMC7227631.
- [47] Rudolph MJ, Poon AY, Kavaliauskiene S, Myrann AG, Reynolds-Peterson C, Davis SA, Sandvig K, Vance DJ, Mantis NJ. Structural Analysis of Toxin-Neutralizing, Single-Domain Antibodies that Bridge Ricin's A-B Subunit Interface. *J Mol Biol*. 2021 Jul 23;433(15):167086. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167086. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34089718.
- [48] Zhu Y, Dai J, Zhang T, Li X, Fang P, Wang H, Jiang Y, Yu X, Xia T, Niu L, Guo Y, Teng M. Structural insights into the neutralization mechanism of monoclonal antibody 6C2 against ricin. *J Biol Chem*. 2013 Aug 30;288(35):25165-25172. doi: 10.1074/jbc.M113.480830. Epub 2013 Jul 12. Erratum in: *J Biol Chem*. 2013 Sep 27; 288(39):28311. PMID: 23853097; PMCID: PMC3757180.
- [49] Guo JW, Shen BF, Feng JN, Sun YX, Yu M, Hu MR. A novel neutralizing monoclonal antibody against cell-binding polypeptide of ricin. *Hybridoma (Larchmt)*. 2005 Oct;24(5):263-6. doi: 10.1089/hyb.2005.24.263. PMID: 16225427.
- [50] 张天成. 抗蓖麻毒素对可变区抗体的构建和机制研究[D].第二军医大学,2012.
- [51] Dong N, Luo L, Wu J, Jia P, Li Q, Wang Y, Gao Z, Peng H, Lv M, Huang C, Feng J, Li H, Shan J, Han G, Shen B. Monoclonal antibody, mAb 4C13, an effective detoxicant antibody against ricin poisoning. *Vaccine*. 2015 Jul 31;33(32):3836-42. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.06.096. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26141013.
- [52] 陈哲浩,李林鸿,曹王丽,金朱明,方玲,杨军,王如伟,尚云龙.单域抗体的特性及其临床开发进展[J].中国新药杂志,2019,28(21):2581-2587.

-
-
- [53] 柴小龙,袁毅君,马玉凤,赵娣.单链抗体的开发与应用[J].天水师范学院学报,2018,38(05):98-102.
- [54] 康晓圳,曹佳莉,张保惠,袁权.单域抗体的研究和应用进展[J].生物工程学报,2018,34(12):1974-1984.DOI:10.13345/j.cjb.180076.
- [55] 于昊天.全人源抗蓖麻毒素单链抗体制备及其生物学活性研究[D].军事科学院,2020.DOI:10.27193/d.cnki.gjsky.2020.000048.
- [56] Haotian Yu, Ying Chang, Mingxin Dong, Yan Wang, Chengbiao Sun, Zhongliang Liu, Xin Wang, Na Xu, Wensen Liu. Neutralization and binding activity of a human single-chain antibody to ricin toxin. *Food and Agricultural Immunology*. 2019, 31 (1) , 63-74.https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1698521
- [57] 苏幼红,李江伟.骆驼来源单域抗体在免疫治疗中的研究进展[J].生物技术通报,2010(06):27-32.DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2010.06.034.
- [58] 潘欣,潘伯驹,蔡家麟,李晗,王颖,蓝乐夫,廖万清.单域抗体研究进展[J].生命科学,2012,24(05):404-410.DOI:10.13376/j.cbls/2012.05.001.
- [59] 康晓圳,曹佳莉,张保惠,袁权.单域抗体的研究和应用进展[J].生物工程学报,2018,34(12):1974-1984.DOI:10.13345/j.cjb.180076.
- [60] Herrera C, Tremblay JM, Shoemaker CB, Mantis NJ. Mechanisms of Ricin Toxin Neutralization Revealed through Engineered Homodimeric and Heterodimeric Camelid Antibodies. *J Biol Chem*. 2015 Nov 13;290(46):27880-9. doi: 10.1074/jbc.M115.658070. Epub 2015 Sep 22. PMID: 26396190; PMCID: PMC4646030.
- [61] Czajka TF, Mantis NJ. Single-Domain Antibodies for Intracellular Toxin Neutralization. *Methods Mol Biol*. 2022;2446:469-487. doi: 10.1007/978-1-0716-2075-5_24. PMID: 35157289.
- [62] Lauer TM, Agrawal NJ, Chennamsetty N, Egodage K, Helk B, Trout BL. Developability index: a rapid in silico tool for the screening of antibody aggregation propensity. *J Pharm Sci*. 2012 Jan;101(1):102-15. doi: 10.1002/jps.22758. Epub 2011 Sep 20. PMID: 21935950.
- [63] Raybould MIJ, Marks C, Krawczyk K, Taddese B, Nowak J, Lewis AP, Bujotzek A, Shi J, Deane CM. Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Mar 5;116(10):4025-4030. doi: 10.1073/pnas.1810576116. Epub 2019 Feb 14. PMID: 30765520; PMCID: PMC6410772.
- [64] Shaughnessy AF. Monoclonal antibodies: magic bullets with a hefty price tag. *BM J*. 2012 Dec 12;345:e8346. doi: 10.1136/bmj.e8346. PMID: 23236036.
- [65] Hernandez I, Bott SW, Patel AS, Wolf CG, Hospodar AR, Sampathkumar S, Shank WH. Pricing of monoclonal antibody therapies: higher if used for cancer? *Am J Manag Care*. 2018 Feb;24(2):109-112. PMID: 29461857.
- [66] Andrews CD, Luo Y, Sun M, Yu J, Goff AJ, Glass PJ, Padte NN, Huang Y, Ho D D. In Vivo Production of Monoclonal Antibodies by Gene Transfer via Electroporation Protects against Lethal Influenza and Ebola Infections. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 20

17 Sep 20;7:74-82. doi: 10.1016/j.omtm.2017.09.003. PMID: 29034261; PMCID: PMC5633264.

[67] Hollevoet K, De Smidt E, Geukens N, Declerck P. Prolonged in vivo expression and anti-tumor response of DNA-based anti-HER2 antibodies. *Oncotarget*. 2018 Feb 6;9(17):13623-13636. doi: 10.18632/oncotarget.24426. PMID: 29568382; PMCID: PMC5862603.

[68] Patel A, Park DH, Davis CW, Smith TRF, Leung A, Tierney K, Bryan A, Davidson E, Yu X, Racine T, Reed C, Gorman ME, Wise MC, Elliott STC, Esquivel R, Yan J, Chen J, Muthumani K, Doranz BJ, Sapphire EO, Crowe JE, Broderick KE, Kobinger GP, He S, Qiu X, Kobasa D, Humeau L, Sardesai NY, Ahmed R, Weiner DB. In Vivo Delivery of Synthetic Human DNA-Encoded Monoclonal Antibodies Protect against Ebola virus Infection in a Mouse Model. *Cell Rep*. 2018 Nov 13;25(7):1982-1993.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.062. PMID: 30428362; PMCID: PMC6319964.

[69] Wise MC, Xu Z, Tello-Ruiz E, Beck C, Trautz A, Patel A, Elliott ST, Chokkalingam N, Kim S, Kerkau MG, Muthumani K, Jiang J, Fisher PD, Ramos SJ, Smith TR, Mendoza J, Broderick KE, Montefiori DC, Ferrari G, Kulp DW, Humeau LM, Weiner DB. In vivo delivery of synthetic DNA-encoded antibodies induces broad HIV-1-neutralizing activity. *J Clin Invest*. 2020 Feb 3;130(2):827-837. doi: 10.1172/JCI132779. PMID: 31697648; PMCID: PMC6994112.

[70] Flingai S, Plummer EM, Patel A, Shrestha S, Mendoza JM, Broderick KE, Sardesai NY, Muthumani K, Weiner DB. Protection against dengue disease by synthetic nucleic acid antibody prophylaxis/immunotherapy. *Sci Rep*. 2015 Jul 29;5:12616. doi: 10.1038/srep12616. PMID: 26220099; PMCID: PMC4518257.

[71] Lu QL, Bou-Gharios G, Partridge TA. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene Ther*. 2003 Jan;10(2):131-42. doi: 10.1038/sj.gt.3301874. PMID: 12571642.

[72] Ratanamart J, Shaw JA. Plasmid-mediated muscle-targeted gene therapy for circulating therapeutic protein replacement: a tale of the tortoise and the hare? *Curr Gene Ther*. 2006 Feb;6(1):93-110. doi: 10.2174/156652306775515583. PMID: 16475948.

[73] Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med*. 2018 May;20(5):e3015. doi: 10.1002/jgm.3015. Epub 2018 Apr 19. Erratum in: *J Gene Med*. 2019 Sep;21(9):e3124. PMID: 29575374.

[74] Akerstrom T, Vedel K, Needham J, Hojman P, Kontou E, Hellsten Y, Wojtaszewski JFP. Optimizing hyaluronidase dose and plasmid DNA delivery greatly improves gene electrotransfer efficiency in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Oct 22;474:342-350. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.10.007. PMID: 26124223; PMCID: PMC5669402.

[75] McMahon JM, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ. Optimisation of electroporation of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase -- increased

- expression with reduced muscle damage. *Gene Ther.* 2001 Aug;8(16):1264-70. doi: 10.1038/sj.gt.3301522. PMID: 11509960.
- [76] Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Aina A, Hasegawa H, Chiba J. Passive immune-prophylaxis against influenza virus infection by the expression of neutralizing anti-hemagglutinin monoclonal antibodies from plasmids. *Jpn J Infect Dis.* 2011;64(1):40-9. PMID: 21266754.
- [77] Elliott STC, Kallewaard NL, Benjamin E, Wachter-Rosati L, McAuliffe JM, Patel A, Smith TRF, Schultheis K, Park DH, Flingai S, Wise MC, Mendoza J, Ramos S, Broderick KE, Yan J, Humeau LM, Sardesai NY, Muthumani K, Zhu Q, Weiner DB. DMAb inoculation of synthetic cross reactive antibodies protects against lethal influenza A and B infections. *NPJ Vaccines.* 2017 Jul 6;2:18. doi: 10.1038/s41541-017-0020-x. PMID: 29263874; PMCID: PMC5627301.
- [78] Patel A, DiGiandomenico A, Keller AE, Smith TRF, Park DH, Ramos S, Schultheis K, Elliott STC, Mendoza J, Broderick KE, Wise MC, Yan J, Jiang J, Flingai S, Khan AS, Muthumani K, Humeau L, Cheng LI, Wachter-Rosati L, Stover CK, Sardesai NY, Weiner DB. An engineered bispecific DNA-encoded IgG antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa* in a pneumonia challenge model. *Nat Commun.* 2017 Sep 21;8(1):637. doi: 10.1038/s41467-017-00576-7. PMID: 28935938; PMCID: PMC5608701.
- [79] Andrews A. Treating with Checkpoint Inhibitors-Figure \$1 Million per Patient. *Am Health Drug Benefits.* 2015 Aug;8(Spec Issue):9. PMID: 26380599; PMCID: PMC4570079.
- [80] Schommer NN, Nguyen J, Yung BS, Schultheis K, Muthumani K, Weiner DB, Humeau L, Broderick KE, Smith TRF. Active Immunoprophylaxis and Vaccine Augmentations Mediated by a Novel Plasmid DNA Formulation. *Hum Gene Ther.* 2019 Apr;30(4):523-533. doi: 10.1089/hum.2018.241. PMID: 30860399; PMCID: PMC6479233.
- [81] Khoshnejad M, Patel A, Wojtak K, Kudchodkar SB, Humeau L, Lyssenko NN, Rader DJ, Muthumani K, Weiner DB. Development of Novel DNA-Encoded PCSK9 Monoclonal Antibodies as Lipid-Lowering Therapeutics. *Mol Ther.* 2019 Jan 2;27(1):188-199. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.10.016. Epub 2018 Nov 15. PMID: 30449662; PMCID: PMC6319316.
- [82] Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *M Abs.* 2010 May-Jun;2(3):256-65. doi: 10.4161/mabs.2.3.11641. Epub 2010 May 1. PMID: 20400861; PMCID: PMC2881252.
- [83] Li F, Ulrich ML, Shih VF, Cochran JH, Hunter JH, Westendorf L, Neale J, Benjamin DR. Mouse Strains Influence Clearance and Efficacy of Antibody and Antibody-Drug Conjugate Via Fc-FcγR Interaction. *Mol Cancer Ther.* 2019 Apr;18(4):780-787. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0977. Epub 2019 Mar 1. PMID: 30824607.
- [84] Kou J, Yang J, Lim JE, Pattanayak A, Song M, Planque S, Paul S, Fukuchi K. Catalytic immunoglobulin gene delivery in a mouse model of Alzheimer's disease: prophylaxis

- ctic and therapeutic applications. *Mol Neurobiol*. 2015 Feb;51(1):43-56. doi: 10.1007/s12035-014-8691-z. Epub 2014 Apr 15. PMID: 24733587; PMCID: PMC4198531.
- [85] Dong L, Feng M, Qiao Y, Liu C, Zhou Y, Xing S, Zhang K, Cai Z, Wu H, Wu J, Yu X, Zhang H, Kong W. Preclinical Safety and Biodistribution in Mice Following Single-Dose Intramuscular Inoculation of Tumor DNA Vaccine by Electroporation. *Hum Gene Ther*. 2022 Jul;33(13-14):757-764. doi: 10.1089/hum.2022.038. Epub 2022 Jul 5. PMID: 35369733.
- [86] Tebas P, Roberts CC, Muthumani K, Reuschel EL, Kudchodkar SB, Zaidi FI, White S, Khan AS, Racine T, Choi H, Boyer J, Park YK, Trottier S, Remigio C, Krieger D, Spruill SE, Bagarazzi M, Kobinger GP, Weiner DB, Maslow JN. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine. *N Engl J Med*. 2021 Sep 16;385(12):e35. doi: 10.1056/NEJMoa1708120. PMID: 34525286; PMCID: PMC6824915.
- [87] Maulik N. NV1FGF, a pCOR plasmid-based angiogenic gene therapy for the treatment of intermittent claudication and critical limb ischemia. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009 Mar;10(3):259-68. PMID: 19333884.
- [88] Soubrier F, Laborderie B, Cameron B. Improvement of pCOR plasmid copy number for pharmaceutical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005 Mar;66(6):683-8. doi: 10.1007/s00253-004-1729-9. Epub 2004 Sep 3. PMID: 15349701.
- [89] Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, Reinius B, Guillaumet-Adkins A, Smets M, Leonhardt H, Heyn H, Hellmann I, Enard W. Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Mol Cell*. 2017 Feb 16;65(4):631-643.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2017.01.023. PMID: 28212749.
- [90] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):25-9. doi: 10.1038/75556. PMID: 10802651; PMCID: PMC3037419.
- [91] Draghici S, Khatri P, Tarca AL, Amin K, Done A, Voichita C, Georgescu C, Romero R. A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome Res*. 2007 Oct;17(10):1537-45. doi: 10.1101/gr.6202607. Epub 2007 Sep 4. PMID: 17785539; PMCID: PMC1987343.
- [92] Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018 Sep 1;34(17):i884-i890. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560. PMID: 30423086; PMCID: PMC6129281.
- [93] Horns F, Dekker CL, Quake SR. Memory B Cell Activation, Broad Anti-influenza Antibodies, and Bystander Activation Revealed by Single-Cell Transcriptomics. *Cell Rep*. 2020 Jan 21;30(3):905-913.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.063. PMID: 31968262; PMCID: PMC7891556.
- [94] Weisel NM, Joachim SM, Smita S, Callahan D, Elsner RA, Conter LJ, Chikina M, Farber DL, Weisel FJ, Shlomchik MJ. Surface phenotypes of naive and memory B cells

- in mouse and human tissues. *Nat Immunol.* 2022 Jan;23(1):135-145. doi: 10.1038/s41590-021-01078-x. Epub 2021 Dec 22. PMID: 34937918; PMCID: PMC8712407.
- [95] Varnum-Finney B, Dallas MH, Kato K, Bernstein ID. Notch target Hes5 ensures appropriate Notch induced T- versus B-cell choices in the thymus. *Blood.* 2008 Mar 1;111(5):2615-20. doi: 10.1182/blood-2007-03-079855. Epub 2007 Nov 29. PMID: 18048645; PMCID: PMC2254545.
- [96] Thibault DL, Chu AD, Graham KL, Balboni I, Lee LY, Kohlmoos C, Landrigan A, Higgins JP, Tibshirani R, Utz PJ. IRF9 and STAT1 are required for IgG autoantibody production and B cell expression of TLR7 in mice. *J Clin Invest.* 2008 Apr;118(4):1417-26. doi: 10.1172/JCI30065. PMID: 18340381; PMCID: PMC2267033.
- [97] Muppidi JR, Lu E, Cyster JG. The G protein-coupled receptor P2RY8 and follicular dendritic cells promote germinal center confinement of B cells, whereas S1PR3 can contribute to their dissemination. *J Exp Med.* 2015 Dec 14;212(13):2213-22. doi: 10.1084/jem.20151250. Epub 2015 Nov 16. PMID: 26573295; PMCID: PMC4689170.
- [98] Alexander LMM, Watters J, Reusch JA, Maurin M, Nepon-Sixt BS, Vrzalikova K, Alexandrow MG, Murray PG, Wright KL. Selective expression of the transcription elongation factor ELL3 in B cells prior to ELL2 drives proliferation and survival. *Mol Immunol.* 2017 Nov;91:8-16. doi: 10.1016/j.molimm.2017.08.016. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28858629; PMCID: PMC5653440.
- [99] Ellebedy AH, Jackson KJ, Kissick HT, Nakaya HI, Davis CW, Roskin KM, McElroy AK, Oshansky CM, Elbein R, Thomas S, Lyon GM, Spiropoulou CF, Mehta AK, Thomas PG, Boyd SD, Ahmed R. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. *Nat Immunol.* 2016 Oct;17(10):1226-34. doi: 10.1038/ni.3533. Epub 2016 Aug 15. PMID: 27525369; PMCID: PMC5054979.
- [100] Hondares E, Brown MA, Musset B, Morgan D, Cherny VV, Taubert C, Bhamrah MK, Coe D, Marelli-Berg F, Gribben JG, Dyer MJ, DeCoursey TE, Capasso M. Enhanced activation of an amino-terminally truncated isoform of the voltage-gated proton channel HVCN1 enriched in malignant B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Dec 16;111(50):18078-83. doi: 10.1073/pnas.1411390111. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25425665; PMCID: PMC4273330.
- [101] Gao S. Data Analysis in Single-Cell Transcriptome Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2018;1754:311-326. doi: 10.1007/978-1-4939-7717-8_18. PMID: 29536451.
- [102] Sklavenitis-Pistofidis R, Getz G, Ghobrial I. Single-cell RNA sequencing: one step closer to the clinic. *Nat Med.* 2021 Mar;27(3):375-376. doi: 10.1038/s41591-021-01276-y. PMID: 33664491.
- [103] 李倩, 韦薇. 单细胞测序技术在药物开发过程中的应用[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(02):154-158.
- [104] 张永卓, 傅博强, 牛春艳, 高运华, 王晶. 单细胞测序技术的发展[J]. 计量学报, 2023, 44(01):149-156.

-
- [105] 汪颖,张立莹.单细胞 RNA 测序数据的聚类研究[J].黑龙江科学,2022,13(22):15-18+25.
- [106] Cao Y, Su B, Guo X, Sun W, Deng Y, Bao L, Zhu Q, Zhang X, Zheng Y, Geng C, Chai X, He R, Li X, Lv Q, Zhu H, Deng W, Xu Y, Wang Y, Qiao L, Tan Y, Song L, Wang G, Du X, Gao N, Liu J, Xiao J, Su XD, Du Z, Feng Y, Qin C, Qin C, Jin R, Xie XS. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells. *Cell*. 2020 Jul 9;182(1):73-84.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.025. Epub 2020 May 18. PMID: 32425270; PMCID: PMC7231725.
- [107] Vance DJ, Mantis NJ. Progress and challenges associated with the development of ricin toxin subunit vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2016 Sep;15(9):1213-22. doi: 10.1586/14760584.2016.1168701. Epub 2016 Apr 6. PMID: 26998662; PMCID: PMC5193006.
- [108] Colombatti M, Johnson VG, Skopicki HA, Fendley B, Lewis MS, Youle RJ. Identification and characterization of a monoclonal antibody recognizing a galactose-binding domain of the toxin ricin. *J Immunol*. 1987 May 15;138(10):3339-44. PMID: 2437188.
- [109] O'Hara JM, Yermakova A, Mantis NJ. Immunity to ricin: fundamental insights into toxin-antibody interactions. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2012;357:209-41. doi: 10.1007/82_2011_193. PMID: 22113742; PMCID: PMC4433546.
- [110] Toth RT 4th, Angalakurthi SK, Van Slyke G, Vance DJ, Hickey JM, Joshi SB, Middaugh CR, Volkin DB, Weis DD, Mantis NJ. High-Definition Mapping of Four Spatially Distinct Neutralizing Epitope Clusters on RiVax, a Candidate Ricin Toxin Subunit Vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2017 Dec 5;24(12):e00237-17. doi: 10.1128/CVI.00237-17. PMID: 29046307; PMCID: PMC5717194.
- [111] Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, Takahashi Y, Fukuyama H, Okada T, Kurosaki T. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat Immunol*. 2016 Jul;17(7):861-9. doi: 10.1038/ni.3460. Epub 2016 May 9. PMID: 27158841.
- [112] Shukla AA, Wolfe LS, Mostafa SS, Norman C. Evolving trends in mAb production processes. *Bioeng Transl Med*. 2017 Apr 3;2(1):58-69. doi: 10.1002/btm2.10061. PMID: 29313024; PMCID: PMC5689530.
- [113] 牟大超,周轶,白秀峰.单克隆抗体技术进展及上市药物分析[J].药物生物技术,2022,29(01):87-94.DOI:10.19526/j.cnki.1005-8915.20220117.
- [114] 武瑞君,桑晓冬,李治非,敖翼,范玲.抗体技术的研发现状与展望[J].中国药理学与毒理学杂志,2021,35(05):374-381.
- [115] 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.
- [116] Klee GG. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jun;124(6):921-3. doi: 10.5858/2000-124-0921-HAMA. PMID: 10835540.
- [117] 冯健男,乔春霞.人源治疗性抗体研发技术进展[J].南京医科大学学报(自然科学版),2020,40(11):1571-1574.
-

- [118] 吴梦,邹贤刚,刘作华,杨松全,葛良鹏.人源抗体转基因动物平台及专利保护[J].生物学杂志,2021,38(06):92-98.
- [119] Yang X, Chi H, Wu M, Wang Z, Lang Q, Han Q, Wang X, Liu X, Li Y, Wang X, Huang N, Bi J, Liang H, Gao Y, Zhao Y, Feng N, Yang S, Wang T, Xia X, Ge L. Discovery and characterization of SARS-CoV-2 reactive and neutralizing antibodies from humanized CAMouseHG mice through rapid hybridoma screening and high-throughput single-cell V(D)J sequencing. *Front Immunol.* 2022 Sep 23;13:992787. doi: 10.3389/fimmu.2022.992787. PMID: 36211410; PMCID: PMC9545174.
- [120] 俞晓峰.遗传修饰人源化模式动物在抗体药物研制及其应用的研究[C]//2016第十四届国际新药发明科技年会——2016首届国际现代中医药大会、2016第三届国际高科技针灸与中西医结合大会、2016第九届国际癌症免疫治疗研讨会、2016第十届国际再生医学与干细胞大会、2016第六届世界微生物大会会刊,2016:335.
- [121] 王潇霖,迟象阳,刘炬,刘威岑,刘树玲,邱顺芳,温中华,范鹏飞,刘坤,宋小红,付玲,张军,于长明.利用转基因小鼠筛选全人源炭疽致死因子中和抗体[J].生物工程学报,2016,32(11):1590-1599.DOI:10.13345/j.cjb.160049.
- [122] 孙志伟,王双,陈惠鹏.转基因小鼠在抗体药物研发中的应用[J].生物产业技术,2012(06):21-25.
- [123] 孙剑华,钱旻.产生人抗体的转基因和转染色体动物研究进展[J].现代免疫学,2004(02):172-174.
- [124] 王锋,倪培华,宋巍,周同.利用转基因小鼠及转染色体小鼠产生人抗体的研究进展[J].生命科学,2001(04):163-166.
- [125] 孙雷心.导入人基因的转基因小鼠产生全人抗体[J].生物技术通报,1997(03):32.
- [126] 朱遐.转基因小鼠产生全人抗体[J].生物技术通报,1994(06):24.
- [127] 徐梦蔚,宋武琦,付治美,张凤民.实验室水平单克隆抗体制备方法及相应纯化策略的研究进展[J].中国生物制品学杂志,2022,35(02):228-232+238.DOI:10.13200/j.cnki.cjb.003536.
- [128] Esquivel RN, Patel A, Kudchodkar SB, Park DH, Stettler K, Beltramello M, Allen JW, Mendoza J, Ramos S, Choi H, Borole P, Asija K, Bah M, Shaheen S, Chen J, Yan J, Durham AC, Smith TRF, Broderick K, Guibinga G, Muthumani K, Corti D, Humeau L, Weiner DB. In Vivo Delivery of a DNA-Encoded Monoclonal Antibody Protects Non-human Primates against Zika Virus. *Mol Ther.* 2019 May 8;27(5):974-985. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.03.005. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30962164; PMCID: PMC6520333.
- [129] Hollevoet K, De Vleeschauwer S, De Smidt E, Vermeire G, Geukens N, Declercq P. Bridging the Clinical Gap for DNA-Based Antibody Therapy Through Translational Studies in Sheep. *Hum Gene Ther.* 2019 Nov;30(11):1431-1443. doi: 10.1089/hum.2019.128. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31382777.
- [130] 纪秋野.抗蓖麻毒素单链抗体的构建、表达、纯化及功能测定[D].黑龙江八一农垦大学,2010.
- [131] 张欢,黄思超,蔡绍晖.基于 2A 肽策略构建多基因表达载体的研究进展[J].中国生物工程杂志,2013,33(01):104-108.DOI:10.13523/j.cb.20130117.

-
-
- [132] 刘必胜,刘新垣,钱程.构建多顺反子表达载体的有效工具——FMDV 2A[J].生物工程学报,2007(05):765-769.DOI:10.13345/j.cjb.2007.05.020.
- [133] Lin J, Neo SH, Ho SCL, Yeo JHM, Wang T, Zhang W, Bi X, Chao SH, Yang Y. Impact of Signal Peptides on Furin-2A Mediated Monoclonal Antibody Secretion in CHO Cells. *Biotechnol J*. 2017 Sep;12(9). doi: 10.1002/biot.201700268. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28727292.
- [134] 傅美贤,龙健儿.病毒 IRES 的结构及 IRES 介导的蛋白质翻译研究进展[J].生命科学,2021,33(04):407-418.DOI:10.13376/j.cbbs/2021045.
- [135] Hechler D, Nitsch R, Hendrix S. Green-fluorescent-protein-expressing mice as models for the study of axonal growth and regeneration in vitro. *Brain Res Rev*. 2006 Aug 30;52(1):160-9. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.01.005. Epub 2006 Feb 23. PMID: 16497382.
- [136] Chopra A. Recombinant adenovirus with enhanced green fluorescent protein. 2007 Dec 9 [updated 2008 Jan 2]. In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004–2013. PMID: 20641460.
- [137] 罗维,艾磊,周越.小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞电穿孔转染条件的建立和验证[J].中国实验动物学报,2020,28(02):193-200.
- [138] 闫东科,许凤霞,吕平,李冬.电穿孔法转染人乳腺癌细胞 MCF-7 的条件优化研究[J].生物化工,2020,6(01):27-31.
- [139] 张放,周载鑫,张丹丹,房贺,刘善荣.电穿孔法转染人原代成纤维细胞条件的优化[J].第二军医大学学报,2017,38(10):1311-1314.DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.10.1311.
- [140] 李小曼,万利杰,王晓娟,谢红梅,兰建,刘晓云.脉冲电场在医学中的基础研究及电穿孔的临床应用[J].现代生物医学进展,2017,17(06):1190-1193+1186.DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2017.06.050.
- [141] 张禾璇,单可人,何燕,张婷,王婵娟,官志忠.脂质体法与电穿孔法转染两种细胞效率的比较[J].重庆医学,2014,43(33):4432-4433.
- [142] 刘晓娟,赵晓飞,曾贝妮,张萌,马正海.电穿孔法转染 293T 细胞条件的优化[J].生物学通报,2014,49(11):52-54+64.
- [143] Sokołowska E, Błażnio-Zabielska AU. A Critical Review of Electroporation as A Plasmid Delivery System in Mouse Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 6;20(11):2776. doi: 10.3390/ijms20112776. PMID: 31174257; PMCID: PMC6600476.
- [144] 王慧敏,闻镍,王晓霞,刘丽,刘会芳.蛋白多肽类药物和单抗药物免疫原性评价方法及研究进展[J].中国医药生物技术,2021,16(03):251-255.
- [145] 宫新江,满素勤,邵雪,赵小平,李华,朱晰,王海学.抗体药物偶联物抗药抗体中和活性分析研究进展[J].中国新药杂志,2019,28(21):2573-2580.
- [146] 徐冉驰,苗红,郑剑恒.抗体偶联药物吸收、分布、代谢、排泄和毒性特征及分析方法研究进展[J].中国新药杂志,2019,28(09):1087-1093.

-
- [147] 朱瑞芳,丁肖梁,缪丽燕.单克隆抗体药物的治疗药物监测研究进展[J].中国药
学杂志,2018,53(20):1714-1717.
- [148] Tevz G, Pavlin D, Kamensek U, Kranjc S, Mesojednik S, Coer A, Sersa G, Cema
zar M. Gene electrotransfer into murine skeletal muscle: a systematic analysis of param
eters for long-term gene expression. *Technol Cancer Res Treat*. 2008 Apr;7(2):91-101.
doi: 10.1177/153303460800700201. PMID: 18345697.
- [149] Spugnini EP, Scimeca M, Amadio B, Cortese G, Fanciulli M, Vincenzi B, De Luc
a A, Baldi A. Definition of a Novel Plasmid-Based Gene Transfection Protocol of Mam
malian Skeletal Muscles by Means of In Vivo Electroporation. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep
5;21(18):6494. doi: 10.3390/ijms21186494. PMID: 32899477; PMCID: PMC7555604.
- [150] Yu H, Li S, Xu N, Liu W. Ricin toxin and its neutralizing antibodies: A review. *Tox
icon*. 2022 Jul 30;214:47-53. doi: 10.1016/j.toxicon.2022.05.005. Epub 2022 May 17.
PMID: 35595086.
- [151] Bellisola G, Fracasso G, Ippoliti R, Menestrina G, Rosén A, Soldà S, Udali S, To
mazzolli R, Tridente G, Colombatti M. Reductive activation of ricin and ricin A-chain i
mmunotoxins by protein disulfide isomerase and thioredoxin reductase. *Biochem Pharm
acol*. 2004 May 1;67(9):1721-31. doi: 10.1016/j.bcp.2004.01.013. PMID: 15081871.
- [152] Rajpoot S, Kumar A, Zhang KYJ, Gan SH, Baig MS. TIRAP-mediated activation
of p38 MAPK in inflammatory signaling. *Sci Rep*. 2022 Apr 4;12(1):5601. doi: 10.1038
/s41598-022-09528-8. PMID: 35379857; PMCID: PMC8979995.
- [153] Hu WP, Kumar JV, Huang CJ, Chen WY. Computational selection of RNA aptam
er against angiopoietin-2 and experimental evaluation. *Biomed Res Int*. 2015;2015:6587
12. doi: 10.1155/2015/658712. Epub 2015 Mar 19. PMID: 25866800; PMCID: PMC43
83501.
- [154] Nandy SK, Bhuyan R, Seal A. Modelling family 2 cystatins and their interaction
with papain. *J Biomol Struct Dyn*. 2013;31(6):649-64. doi: 10.1080/07391102.2012.706
403. Epub 2012 Aug 13. PMID: 22881286.
- [155] Heiat M, Najafi A, Ranjbar R, Latifi AM, Rasaei MJ. Computational approach to
analyze isolated ssDNA aptamers against angiotensin II. *J Biotechnol*. 2016 Jul 20;230:
34-9. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.021. Epub 2016 May 14. PMID: 27188956.
- [156] Kumar K, Rajasekharan S, Gulati S, Rana J, Gabrani R, Jain CK, Gupta A, Chaud
hary VK, Gupta S. Elucidating the interacting domains of chandipura virus nucleocapsi
d protein. *Adv Virol*. 2013;2013:594319. doi: 10.1155/2013/594319. Epub 2013 Oct 28.
PMID: 24288532; PMCID: PMC3830837.
- [157] Nanda Kumar Y, Jeyakodi G, Gunasekaran K, Jambulingam P. Computational scr
eening and characterization of putative vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *J Bio
mol Struct Dyn*. 2016 Aug;34(8):1736-50. doi: 10.1080/07391102.2015.1090344. Epub
2015 Oct 29. PMID: 26338678.
- [158] Jagilinki BP, Gadewal N, Mehta H, Mahadik H, Pandey V, Sawant U, A Wadega
onkar P, Goyal P, Kumar S, K Varma A. Conserved residues at the MAPKs binding inte
-

rfaces that regulate transcriptional machinery. *J Biomol Struct Dyn*. 2015;33(4):852-60. doi: 10.1080/07391102.2014.915764. Epub 2014 May 14. PMID: 24739067.

[159] Patil R, Das S, Stanley A, Yadav L, Sudhakar A, Varma AK. Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of drug-designing. *PLoS One*. 2010 Aug 16;5(8):e12029. doi: 10.1371/journal.pone.0012029. PMID: 20808434; PMCID: PMC2922327.