

計畫編號：DOH91-DC-2018

行政院衛生署疾病管制局九十一年度委託研究計畫

腦膜炎雙球菌之分子免疫學研究

Molecular Immunologically Studies of *Neisseria meningitidis*

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

研究主持人：李永盛

研究人員：楊秋英、盧政雄、許至安

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

計畫編號：DOH91-DC-2018

行政院衛生署疾病管制局九十一年度委託研究計畫

腦膜炎雙球菌之分子免疫學研究

Molecular Immunologically Studies of *Neisseria meningitidis*

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

研究主持人：李永盛

研究人員：楊秋英、盧政雄、許至安

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	(2)
內文	
一、摘要	(3)
二、前言	(5)
三、材料與方法	(7)
四、結果	(9)
五、討論	(11)
六、結論與建議	(15)
七、參考文獻	(15)
八、圖	(16)
九、表	(18)

共 (18) 頁

摘要

本計畫之目的在於找尋一些能模擬奈瑟氏腦膜炎球菌 (*Neisseria meningitidis*, NM) 免疫優勢抗原決定位 (immunodominant epitopes) 之胜肽，作為進一步疫苗研發的基礎。為了達到此目的，本研究以 NM 之 B-及 Y-群菌注射小鼠製備單株抗體。經以西方轉漬分析，發現我們製的的單株抗體所能辨認的抗原幾乎包括所有的表面抗原在內，含莢膜多醣、外膜蛋白、含脂多醣及線毛。此一結果顯示此等抗體之抗原表位頗有發展成疫苗之價值。其次，利用純化之抗體在噬菌體展示庫中進行親和性選拔及免疫篩選的結果，以獲得能與抗體結合的重組噬菌體。此等重組噬菌體之活性亦已經由抑制型免疫酵素分析加以確認。至今，我們已為三株單株抗體找到能專一結合的重組噬菌體。而利用此等重組噬菌體當作疫苗的可行性將於第三年計畫中加以評估。

關鍵詞：奈瑟氏腦膜炎雙球菌、單源抗體、噬菌體展示技術、抗原表位、胜肽疫苗

Abstract

The ultimate goal of this project is to identify peptides that mimic the immunodominant epitopes of the *Neisseria meningitidis* (NM) to be used as the basis for development of the peptide vaccine for NM. To achieve this goal, monoclonal antibodies (mAbs) specific for NM were generated from serogroup B- and Y- immunized mice. Western blot analyses revealed that the specificities of the mAbs generated in this study almost cover all surface antigens including capsular polysaccharide, outer membrane proteins, lipopolysaccharide, and pilus indicating that the epitopes of these antibodies are of valuable in vaccine development. Affinity selection of phage display random peptide libraries with the purified antibodies followed by plaque immunoscreening, recombinant phages (phagotopes) bound to antibody have been obtained. The specificity of individual phagotopes was confirmed by inhibition ELISA. Up to date, specific phagotopes have been obtained for three monoclonal antibodies. The possibility of using these phagotopes as a vaccine will be investigated in the project of the third year.

Keyword: *Neisseria meningitides*, monoclonal antibodies, phage display, epitope, and peptide vaccine.

一、前言

奈瑟氏腦膜炎球菌(*Neisseria meningitidis*, NM)為具有莢膜的格蘭氏陰性菌。根據莢膜多醣的化學組成與抗原性可分為 13 血清型(serotype)，其中血清群 A、B、C、Y 及 W-135 五群為人類病原菌，可引起致命的腦脊髓膜炎及敗血症，是造成第三世界國家高死亡率的主要因子(1)。雖然在工業化的國家，腦膜炎球菌引起的病例不多；其中有 50% 以上是 B 群菌感染所致，但在今日交通發達且旅遊興盛天涯若比鄰的時代，腦膜炎球菌感染可能造成的流行性或區域性腦脊髓膜炎，仍是目前亟待解決的一個全球性的健康問題(2, 3)。例如：2000 年因前往沙烏地阿拉伯朝聖而受腦膜炎球菌感染的病例，到當年 5 月 12 日為止就有 390 件，其中有 71 人死亡(國際疫情報導)。根據 WHO 報告，1990-1997 年亞洲地區每年均有上萬個病例；其中中國大陸在 1993-1997 年間的病例數，分別為 5000、5863、5771、5730 及 4751。台灣的流行性腦脊髓膜炎歷年來均只有 B 型及 W135 型，2001 年卻發現有 A、C 及 Y 型病例。

奈瑟氏腦膜炎球菌的的表面抗原有莢膜多醣(CPS, capsule polysaccharide)、外膜蛋白、脂肪多醣(LPS, lipopolysaccharide, 即內毒素)與線毛(pilus)四種(4)。這些抗原均具備成為疫苗的可能性。唯因 CPS 是在菌的最外圍，且與菌的致病力有關，因此成為首要的疫苗候選者。腦膜炎球菌的疫苗研發史超過 80 年，已經有抗血清群 A、C、Y 與 W135 的 CPS 多醣疫苗可供使用(3)。由於 B 群奈瑟氏腦膜炎球菌(GBM)的 CPS 在人類引發免疫反應的能力很弱(5)，只能得到結合力非常弱的抗體反應，嚴重的阻礙其疫苗的研發進度，目前尚未有優良疫苗上市。

疫苗的設計除了考慮其效力外，同時要考慮其安全性。基於這兩點的

考量，在疫苗的設計上，近年來以抗原模擬分子為疫苗是一個相當引人注目的策略，尤其是對有毒或不易純化或抗原力弱的抗原，例如：LPS 與多醣類 (6)。雖然 anti-idiotypic 能模擬抗原引發抗體反應(7)，但其製備非常不易。另一方面因為噬菌體展示技術的發展，大大的提高抗原決定位圖譜定位(epitope mapping) 的效率。目前以胜肽模擬醣抗原的相關研究很多(6)，其中包括腦膜炎球菌多醣(8)、III 型 B 群鏈球菌多醣(Type III group B streptococcal polysaccharide) (9) 以及痢疾桿菌 (*Shigella. flexneri*) 的 lipopolysaccharide (10)。

噬菌體展示技術是一種基因表現產物與親和選擇(affinity selection)結合的技術。它是將外源 DNA 與噬菌體外套蛋白基因透過接頭(linker)相連，進而使外源 DNA 主導之產物與外套蛋白融合，並展示在噬菌體表面(11)；當把一組隨機編碼序列插入噬菌體載體進行表現及展示時，其總體即稱為噬菌體展示胜肽庫(peptide library)(12)。在噬菌體胜肽庫中每一個噬菌體粒子只展示一種序列的外源胜肽，不同噬菌體粒子展示不同的外源胜肽，這些胜肽依其氨基酸序列之差異而產生不同結構，可以模擬與抗體結合之抗原決定位或接受體(receptor) 之結合體(ligand)，因此稱為 mimitopes (13)。噬菌體胜肽庫可作為研究分子與分子作用時的“多功能”胜肽提供者。利用已知的選擇體進行親和選擇，不但能定出線性(14)或構形抗原決定位(15)，甚且能模擬非蛋白質性質之結合體，包括 streptavidin (11)、醣類(16)、DNA(17)及抗生素結合體(18)。

本計畫的最終目標是找出具有模擬 NM 表面抗原之免疫優勢抗原決定位(immunodominant epitopes)之胜肽，作為疫苗研發的基礎。本年度計畫主要是製備更多辨識 NM 表面抗原之抗體，以及利用這些抗體由噬菌體展示

胜肽庫中找出模擬抗原表位之胜肽。

二、 材料與方法

實驗菌株：本計畫使用的奈瑟氏腦膜炎雙球菌包括 GBM 39 株、W135 型兩株、C 型(GCM)一株及 Y 型(GYM) 六株。

製備單源抗體：將 10^8 CFU 菌經加熱或福馬林處理後的 NM 注射入 4-5 週齡小鼠之腹腔，在第七天與第十三天分別以同劑量追加。不同時間由尾巴採血，收集血清，以 GYM 全菌進行 ELISA，檢測各免疫小鼠對 GYM 的反應情形。取血清中抗 GYM 抗體力價高的小鼠脾臟細胞與 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤細胞融合。以 GYM-ELISA 篩選分泌 GYM 抗體的融合細胞。融合瘤細胞的單源化是將細胞培養在含有 0.3% 的 soft agarose 的細胞培養基，詳細步驟可參閱(19)。

NM-ELISA：以全菌為抗原進行 ELISA 主要是根據 Abdillahi 與 Poolman (20)的方法進行。進行步驟如下：將 NM 懸浮於磷酸緩衝生理液(PBS, phosphate buffer saline) (pH 7.2) ($OD_{620} = 0.1 - 0.15$)以 56°C 加熱 30 分鐘後保存於 4°C ，備用；將 $100\ \mu\text{l}$ 熱處理後的菌液放入 96-孔盤置於 37°C ，直到蒸乾；於每孔中加入 $150\ \mu\text{l}$ 的 blocking solution (5% nonfat milk in PBS)，放置 2 小時；以磷酸緩衝生理液 沖洗三次後，於每孔中加入 $100\ \mu\text{l}$ 不同稀釋倍數的血清，放置 2 小時；以磷酸緩衝生理液沖洗三次後，於每孔中加入 $100\ \mu\text{l}$ 的 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse antibodies，放置 2 小時；以磷酸緩衝生理液 沖洗三次後，於每孔中加入 $100\ \mu\text{l}$ 呈色試劑(p-nitrophenyl phosphate substrate)，避光反應一小時後加入 $20\ \mu\text{l}$ 之 5N NaOH 終止反應，立即測定其在 405 nm 的吸光值。

Western blot 分析：將 10^8 CFU 菌直接以 SDS-PAGE 的 sample buffer 裂解，以 12.5% SDS-gel 分析後轉漬到硝化纖維濾膜(nitrocellulose membrane)；以融合瘤細胞培養液為初級抗體，續與 AP-anti-mouse 作用後，以 BCIP/NBT 呈色(21)。

抗體活化補體媒介殺菌力分析：主要參考 Quakyi 等人(22)之方法在 96-孔盤進行。依序於每孔中加入(a) 50 μ l 抗體溶液、(b) 20 μ l 人類補體、(c) 30 μ l 活的 GBM ($2 - 4 \times 10^4$ cfu/ml)，置於 37°C 緩慢搖幌 30 分鐘後，從每孔中取出 50 μ l 塗在巧克力平板盤，將平板盤置於 37°C/5% CO₂ 培養箱 18 小時後，計算平板上的菌落數。

親和選擇：取適量重組噬菌體庫與抗體混合於室溫中作用兩小時後，加入 1/5 體積的 10% 死的金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 全菌，離心後去除上清液，沉澱物以磷酸緩衝生理液沖洗三次，最後以 0.1 M glycine (pH 2) 將噬菌體由沉澱物分離，並以 Tris buffer 中和。

濾膜免疫篩選法：以重組噬菌體感染大腸桿菌(*E. coli*)後，加入 soft agar 後令其平鋪在 LB 平板，於 37°C 培養一個晚上(約 13 小時)；將硝化纖維濾膜小心的覆蓋在含有噬菌斑的平板上，靜置 15 - 20 分鐘；將硝化纖維濾膜小心的由平板移至含有阻斷緩衝液(Blocking buffer, 5% nonfat milk/PBS)的容器，室溫作用 60 分鐘後加入親和選擇時使用的抗體，室溫作用 2 小時；將硝化纖維濾膜以磷酸緩衝生理液 泡洗後與 Alkaline phosphatase (AP)-anti-mouse 於室溫作用一小時；將硝化纖維濾膜以 Tris buffer (pH 8) 泡洗後，以 BCIP/NBT 進行呈色。

抑制型 NM-ELISA：將根據 Abdillahi 與 Poolman (20)的方法以全菌為抗原進行。基本步驟如下：將 NM 懸浮於磷酸緩衝生理液 (pH 7.2) ($OD_{620} = 0.1 - 0.15$)以 56°C 加熱 30 分鐘後保存於 4°C，備用；將 100 μ l 熱處理

後的菌液放入 96-孔盤置於 37°C，直到蒸乾；於每孔中加入 150 μ l 的 blocking solution (5% nonfat milk in PBS)，放置室溫 2 小時；以磷酸緩衝生理液 沖洗三次後，於每孔中加入 100 μ l 與不同濃度噬菌體混合的定量抗體溶液，放置室溫 2 小時；以磷酸緩衝生理液 沖洗三次後，於每孔中加入 100 μ l 的 AP- anti-mouse antibodies，放置室溫 2 小時；以磷酸緩衝生理液 沖洗三次後，於每孔中加入 100 μ l 呈色試劑(*p*-nitrophenyl phosphate substrate)，避光反應一小時後加入 20 μ l 之 5N NaOH 終止反應，立即測定其在 405 nm 的吸光值。

個別重組噬菌體展示胜肽序列分析：抽取個別噬菌體的單股去氧核糖核酸(ssDNA, single strand DNA)，以 Sanger 法進行核酸序列分析(21)，由核酸序列轉譯出展示胜肽的胺基酸序列，進行排列比對分析。

三、 結果

一、NM 單源抗體的製備：分別以加熱處理後之 GBM 及 GYM 菌免疫小鼠，取其脾臟細胞與 Sp2/0 細胞進行融合。在 GBM 抗體的製備，前後共進行了五次，酶免疫分析法(ELISA)分析各小孔的細胞培養液與 GBM 的結合情形，初步篩選有近百個 wells 成陽性反應；將各細胞保存於液態氮。由於抗 GBM 抗體可能與人類神經母細胞有交叉反應，首先以酶免疫分析法測試細胞培養液與人類神經母細胞 IMR-32 之結合情形，再進行單株化。目前已經得到 7 株單源抗體，三株為 IMR-32 negative。在 GYM 抗體的製備方面，進行了一次融合反應，目前保存了 15 個小孔的細胞，其中 9 株完成單株化。表一為單株化之融合瘤細胞及抗體。

二、抗體的抗原分析：初步以西方墨點 (Western blot) 分析各抗體與免疫菌株縱蛋白之反應情形，結果 4-13-227 或 18-205 並未有明顯的蛋白條帶出現，顯示這兩株抗體之抗原可能為多醣類。210-06 抗體主要辨識的蛋白位於分子量 40-kDa 左右；12-01 辨識 32-kDa 蛋白，54-07 辨識 17-kDa 蛋白；107-01 在 83-kDa 附近有多條的反應帶；172-33 辨識的蛋白則位於 28-kDa 左右(圖 1)。進一步以純化的外膜蛋白進行西方墨點分析，並以 MALDI-TOF 分析確定 210-06 的抗原為 PorA 蛋白；12-01 之抗原為 PorB 蛋白；172-33 抗原則是 Opa1 蛋白(感謝台大醫學院周綠蘋教授幫忙進行 MALDI-TOF 分析)。4-7-3 抗體在 10-15kDa 之間則有一類似醣蛋白的反應條帶(圖 1)，IEF 顯示此蛋白 pI 介於 9-10 之間，根據此結果推測 4-7-3 之抗原可能為 pilin。

三、抗體純化：目前已經完成純化的抗體有 GBM 的 4-13-227、4-7-3 和 172-33，以及 GYM 抗體 210-06 及 24-03。

四、抗體與其他 NM 之交叉反應：以酶免疫分析法分析抗體與全菌結合之最佳條件，再以此條件檢測各抗體與不同 NM 之結合情形，結果 GBM 抗體 4-13-227 及 4-7-3 對所有測試的 NM 都有結合情形；210-01 無法與 GCM 菌結合，在 38 株 GBM 中有 11 株可被 210-06 辨識；18-205 和大部分的 NM 有交叉反應(表一)。

五、抗體活化補體媒介殺菌力測試：初步以未純化濃縮之培養液測試各抗體活化補體媒介殺菌力分析，結果 210-06 的培養液在稀釋 27 倍仍具能將 90% 的 GYM 殺死；而 4-13-227 與 4-7-3 的細胞培養可能

因抗體濃度太低，並未有顯著的殺菌力。為了確定各抗體活化補體達到殺菌效果，以純化的抗體進行補體殺菌測試，結果顯示 210-06 殺菌力最強，而 4-13-227 與 4-7-3 媒介補體殺菌力相當(表一)。

六、抗體之抗原表位分析：首先以純化抗體對噬菌體展示胜肽庫進行親和選擇，再將被抗體分子吸附下來之重組噬菌體重新感染大腸桿菌後，以平板培養形成溶菌斑，讓溶菌斑黏附於硝化纖維濾膜，以抗體進行免疫篩選。初步得到 5 個 210-06 辨識的重組噬菌斑、兩個 172-33 辨識的重組噬菌斑以及八個 4-7-3 辨識的重組噬菌斑；其中 5 個與 210-06 抗體結合之胜肽均為環狀構造，而 4-7-3 結合的 8 個噬菌斑經序列分析結果只含有三種序列。以抑制型酶免疫分析法分析各重組噬菌體對 210-01 與純化之外膜蛋白的結合情形，結果均有明顯的抑制效果(圖 2)。以 4-13-227 對 Ph. D-C7C、Ph. D-12 以及由 Dr. Smith (University of Missouri-Columbia)實驗室取得的胜肽庫進行親和選擇，進一步已噬菌斑濾膜進行免疫篩選，並未得到任何呈陽性反應的重組噬菌體，顯示這些胜肽庫中並未有模擬抗體 4-13-227 之胜肽分子。由於以 4-13-227 對 NM 總蛋白進行西方墨點分析並未有任何的免疫條帶產生，顯示 4-13-227 的抗原可能糖分子。另外以硫酸胺沉澱的 18-105 (IgA) 對噬菌體展示胜肽庫進行 Biopanning 後以噬菌斑免疫篩選，結果並未篩選到呈正反應的噬菌斑。

四、 討論

本計畫以全菌為抗原進行免疫注射製備單源抗體，以酶免疫分析法篩

選能與全菌結合的單源抗體。以西方墨點分析單源抗體的抗原種類顯示除了抗體 4-13-223 與 18-105 沒有反應帶之外，其他抗體主要的抗原本質是蛋白；其中 172-33、210-06 及 12-01 之抗原確定分別為 Opa1、PorA 及 PorB。全菌酶免疫分析法結果顯示 12-01 僅對免疫菌株有微弱的結合力，對其他 NM 沒有任何的反應。此結果顯示作為免疫原的 GYM 可能為 serotype 4 或 5，因為此二血清型的 PorB 屬於 PorB3 為 poorly accessible (22)。既然如此，為什麼以全菌為免疫原可以得到辨識 PorB 之抗體，推測可能因為加熱使得原先不裸露的抗原外露而引發抗體反應。這類抗體雖然無法應用在疫苗研發上，但可提供結構分析或分型之研究。

本計畫以噬菌體展示胜肽庫為抗原表位來源進行抗原決定位圖譜定位，目前採用的噬菌體展示胜肽庫主要是 NEB (New England Biolabs, US) 出品的 PhD-12 及 PhD-C7C。本計劃共進行了五株單源抗體之圖譜定位，目前尚未找到模擬糖抗原之胜肽分子，可能是所使用的胜肽庫中沒有這類分子存在。雖然由 Dr. Smith (University of Missouri, Columbia) 實驗室取得了九種不同形式的胜肽庫，但仍未搜尋到能與抗體 4-13-227 或 18-205 結合的重組噬菌體。此可能是因為 Dr. Smith 所提供之展示庫是再增殖過以及運送過程造成多樣性不如預期。

NM 的血清群主要是以莢膜多醣分類。全菌酶免疫分析法分析顯示抗體 4-13-227 對所有測驗的 NM 有不同程度的結合能力，而 18-205 則對 90% 的測試菌株有反應；Western blot 結果推測 4-13-227 及 18-205 之抗原應該為莢膜多醣，綜合上述結果推測此二抗體所辨識莢膜多醣的位置應該是各血清群相似的構造，若能找出其模擬胜肽，以此胜肽為基礎之疫苗可提供對不同血清群之免疫力。

五、 結論與建議

本年度計劃共對五株抗體以噬菌體展示技術進行抗原表位分析，由噬菌體展示勝肽庫中找到與三株辨識蛋白抗原的抗體結合的重組噬菌體。為了找到抗體 4-13-227 與 18-205 之抗原表位模擬勝肽，擬再採用展示長鏈勝肽之展示庫進行後續研究。

六、 參考文獻

1. Griffiss JM, Apicella MA, Greenwood B, and Baker CJ. Vaccines against encapsulated bacteria: a global agenda. *Rev Infect Dis* 1984; 1:176-188.
2. Frasch CE. Prospects for the prevention of meningococcal disease: special reference to group B. *Vaccine* 1987; 5:3-4.
3. Peltola H. Meningococcal vaccines. Current status and future possibilities. *Drugs* 1998; 55:347-366.
4. Verheul AF, Snippe H, and Poolman JT. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol Rev* 1993; 57:34-49.
5. Granoff DM, Bartoloni A, Ricci S, Gallo E, Rosa D, Ravenscroft N, Guarnieri V, Seid RC, Shan A, Usinger WR, Tan S, McHugh YE, and Moe GR. Bactericidal monoclonal antibodies that define unique meningococcal B polysaccharide epitopes that do not cross-react with human polysialic acid. *J Immunol* 1998; 160:5028-5036.
6. Moe GR, Tan S, and Granoff DM. Molecular mimetics of polysaccharide epitopes as vaccine candidates for prevention of *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 26:209-226.

7. Westerink MA, Campagnari AA, Wirth MA, and Apicella MA. Development and characterization of an anti-idiotypic antibody to the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C. *Infect Immun* 1988; 56:1120-1127.
8. Westerink MA, Giardina PC, Apicella MA, and Kieber-Emmons T. Peptide mimicry of the meningococcal group C capsular polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:4021-4025.
9. Pincus, S. H., M. J. Smith, H. J. Jennings, J. B. Burritt, and P. M. Glee. 1998. Peptides that mimic the group B streptococcal type III capsular polysaccharide antigen. *J Immunol* 160:293.
10. Phalipon A, Folgori A, Arondel J, Sgaramella G, Fortugno P, Cortese R, Sansonetti PJ, and Felici F. Induction of anti-carbohydrate antibodies by phage library-selected peptide mimics. *Eur J Immunol* 1997; 27:2620-2625.
11. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315-1317.
12. Devlin JJ, Panganiban LC, Devlin PE. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* 1990; 249:404-406
13. Geysen HM, Rodda SJ, and Mason TJ. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol* 1986; 23:709-715.
14. Scott JK, and Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1999; 249:386-390.
15. Luzzago A, Felici F, Tramontano A, Pessi A, and Cortese R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* 1993; 128:51-57.
16. Scott JK. Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem Sci* 1992; 17:241-245.

17. Cheng X, Kay BK, and Juliano RL. Identification of a biologically significant DNA-binding peptide motif by use of a random phage display library. *Gene* 1998; 171:1-8.
18. Popkov M, Lussier I, Medvedkine V, Esteve PO, Alakhov V, and Mandeville R. Multidrug-resistance drug-binding peptides generated by using a phage display library. *Eur J Biochem* 1998; 251:155-163.
19. Yang CY. Using a heavy chain-loss hybridoma 26.4.1LL for studying the structural basis of immunoglobulin chain association. *Proc. Nat. Sci. Coun. ROC* 2000; 24:101-107.
20. Abdillahi H, and Poolman J. T. *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. *Microb Pathog* 1988; 4:27-32.
21. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
22. Michaelsen TE, Aase A, Kolberg J, Wedge E, and Rosenqvist E. 2001. PorB3 outer membrane protein on *Neisseria meningitidis* is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. *Vaccine* 19:1526-1533.

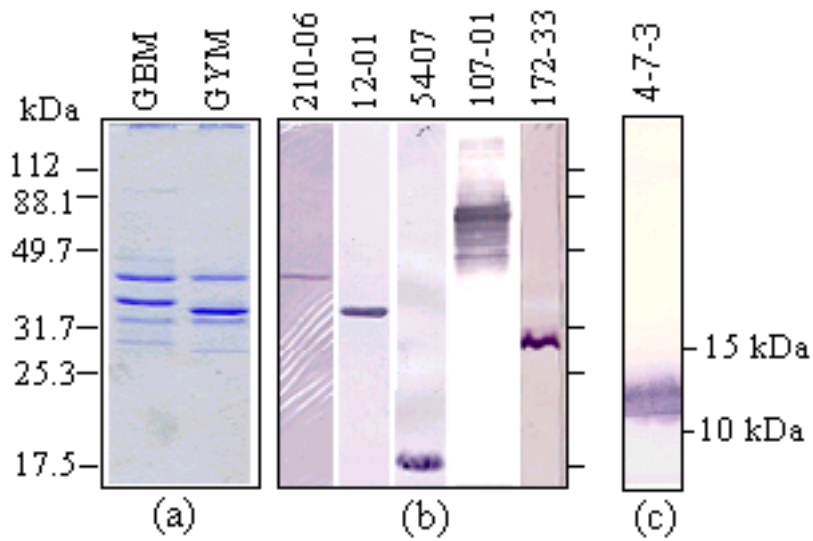


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of outer membrane proteins isolated from GBM and GYM (a) and Western blots in which total protein of the immunogen (GYM or GBM) was probed with monoclonal antibodies (mAb) 210-01, 12-01, 54-07, 107-01, 172-33 (b) and 4-7-3 (c), respectively. Samples were analysis in 12.5% (a and b) or 15% SDS-polyacrylamide gels.

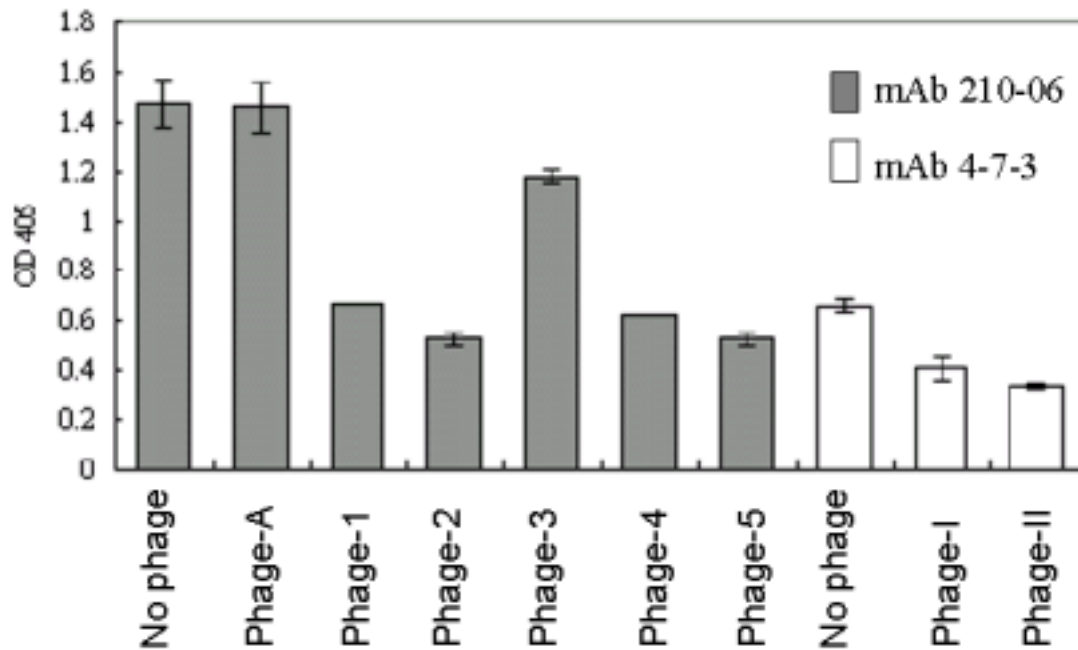


Fig. 2. The bindings of mAb 210-06 to the GYM outer membrane proteins and mAb 4-7-3 to heat-killed GBM were inhibited by 210-06-selected phages (phage-1 to phage-5) and 4-7-3-selected phages (phage-I and Phage-II), respectively. A mAb 172-33-selected phage (phage-A) was used as a negative control. The phages used in this assay was 10^{13} pfu.

Table 1. General properties of monoclonal antibodies generated in this study

Hybridoma	Isotype	ELISA					BC50 ($\mu\text{g/ml}$) ^a
		GBM	GW135M	GCM	GYM	IMR-32	
Anti-GBM							
4-13-227	IgG3	38/38	4/4	1/1	6/6	-	~6
4-7-3	IgG3	38/38	4/4	1/1	6/6	-	~6
5-1-7	IgM	+	ND ^b	ND	ND	+	ND
5-4-48	IgM	+	ND	ND	ND	+	ND
5-4-46	IgM	+	ND	ND	ND	+	ND
5-4-48	IgM	+	ND	ND	ND	+	ND
172-33	IgG2b	3/38	-	-	-	-	ND
Anti-GYM							
210-06	IgG2a	11/38	4/4	-	6/6	-	0.03-0.04
18-205	IgA	37/38	1/4	\pm	6/6	ND	ND
54-07	IgM	37/38	4/4	1/1	6/6	ND	ND
66-01	IgM	ND	ND	ND	+	ND	ND
23-08	IgM	ND	ND	ND	+	ND	ND
24-03	IgG3	ND	ND	ND	+	ND	ND
12-01	IgG1	0	0	0	1/6	ND	ND
107-01	IgG2b	ND	ND	ND	+	ND	ND
79-07	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND

^a BC50, concentration of monoclonal antibody that when incubated for 30 min with bacterial cells and 20% human complement yielded a 50% decrease in CFU compared to that without complement.

^b ND, not determined