

封面式樣

計畫編號：DOH90-DC-1030

行政院衛生署疾病管制局九十年度委託研究計畫

B 型腦膜炎雙球菌之分子免疫學研究

委託研究成果報告

執行機構：國立中興大學

研究主持人：楊秋英

研究人員：楊秋英、盧政雄、李永盛、許至安

執行期間：90年2月9日至90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	(6)
四、結果	(7)
五、討論	(8)
六、結論與建議	(9)
七、參考文獻	(9)
八、圖	(12)
九、表	(13)
	共 ( 15 ) 頁

## 摘要

本計畫的最終目標是找出具有模擬 B 群腦膜炎球菌 (*Group B Neisseria meningitides*, GBM) 免疫優勢抗原決定位 (immunodominant epitopes) 之銓鈦，作為疫苗研發的基礎。全程計畫可分為三個階段，預計分三年完成。第一年的計畫目標是製備抗 GBM 之小鼠單株抗體，作為鑑定 GBM 表面抗原之免疫優勢抗原決定位之分子工具。為達此目標，首先以 GBM 全菌為抗原對小鼠進行免疫注射；以酵素連結免疫吸附分析 (ELISA) 各免疫小鼠血清中 GBM 的抗體力價，選取抗體力價高的小鼠，取其脾臟進行細胞融合製備單株抗體。前後進行 3 次細胞融合；以 ELISA 分析各細胞培養液與免疫注射抗原 GBM 的結合情形。為找出與人類細胞沒有交叉反應的 GBM 抗體，續以 ELISA 分析這些抗體與人類神經原母細胞瘤 IMR-32 細胞的結合情形，在已經完成的 40 個樣品中，有 11 個與 IMR-32 沒有結合反應。挑取其中六株與 IMR-32 沒有反應的細胞進行補體殺菌力測試，結果顯示其殺菌力隨稀釋度增加而減弱。由於此六株細胞所分泌的抗體無法與莢膜脫落的 GBM 結合，顯示其抗原應為莢膜多糖。下年度計畫將以噬菌體隨機銓鈦庫為抗原表位庫 (epitope library)，找出與這些抗體有結合之銓鈦 (醣抗原模擬物)。

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、銓鈦疫苗

### **Abstract**

The ultimate goal of this three-year project is to identify peptides that mimicking the immunodominant epitopes of the group B *Neisseria meningitides* (GBM) to be used as the basis for development of the peptide vaccine for GBM. The specific aim of this first year project is to prepare antibodies specific for GBM but do not cross-react with human cells to be used as the molecular tools for epitope mapping. To achieve this aim, spleen cells of GBM-immunized mice with high serum anti-GBM titer were fused with Sp2/0 cells. The immunogen-reactive clones were identified by whole- cell ELISA. To select antibodies against GBM but do not cross-react to human cells, culture supernatants were evaluated for reactivity to human neuroblastoma cell line IMR-32 by ELISA. Among the 40 test culture supernatants, 11 gave a negative reaction. The ability of six GBM-positive-IMR-32-negative supernatants to activate bacteriolysis in the presence of human complement was tested. All tested supernatants elicited complement-mediated bacteriolysis in a dose-dependent manner. The antigenic specificity of these antibodies was defined to be the capsular polysaccharides because no binding activity was observed when ELISA was performed with uncapsulated GBM. Peptides that mimic the carbohydrate-epitopes of these antibodies will be obtained by affinity selection of phage display random peptide libraries in the following 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*)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 12 血清群(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主要是 B 型與 W135 型，病例雖然不多(自 1992 年到 1999 年確定的病例有 83 件，死亡人數 11 人)，但因國人出國旅遊風氣極盛，未來與大陸的三通以及愈來愈多外籍新娘與外勞，大大的提高國人受境外移入腦膜炎球菌感染的機會，這可能是造成 1999 年國內腦脊髓膜炎死亡數劇增(13 確定病例中有 5 人不治)的原因。

腦膜炎球菌的表面抗原有莢膜多醣(CPS)、外膜蛋白、脂肪多醣(LPS 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，目前尚未有疫苗。在 GBM 疫苗設計上，可分為兩大方向，一是以引發抗莢膜的抗體為基礎(6)；另一個則是以其他表面抗原為目標，包括外膜蛋白包囊 (OMV) (7)、純化外膜蛋白(OMP) (8)、以及去毒的 LPS (9)。

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 (10)。雖然 anti-idiotypic 能模擬抗原引發抗體反應(11)，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 epitope mapping 的效率。目前以 peptide 模擬醣抗原的相關研究很多(10)，其中包括腦膜炎球菌多醣(12)、Type III group B streptococcal 多醣 (13)以及 *S. flexneri* 的 lipopolysaccharide (14)。

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(15)；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銜鈎

庫(peptide library)(16)。在噬菌體銓鈦庫中每一個噬菌體粒子只展示一種序列的外源銓鈦，不同噬菌體粒子展示不同的外源銓鈦，這些銓鈦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簇(epitope)或 receptor 之結合體(ligand)，因此稱為 mimitopes (17)。噬菌體銓鈦庫可作為研究分子與分子作用時的“多功能”銓鈦提供者。利用已知的選擇體進行親和選擇，不但能定出線性(18)或構形抗原決定位(19)，甚且能模擬非蛋白性質之結合體，包括 streptavidin (16)、醣類(20)、DNA(21)及抗生素結合體(22)。

本計畫的最終目標是找出具有模擬 B 群腦膜炎球菌 (Group B *Neisseria meningitides*, GBM) 免疫優勢抗原決定位(immunodominant epitopes)之銓鈦，作為疫苗研發的基礎。本年度計畫主要是製備對 GBM-CPS 專一抗體，作為搜尋模擬醣抗原的銓鈦分子的工具。

## 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均由疾病管制局提供。包括 GBM 不同分離株九株(Nm21992, Nm22208, Nm21700, Nm21261, 及 Nm21435 由台中疾管局提供)、W135 型兩株、C 型及 Y 型各一株。實驗菌的培養主要在台中疾管局進行。

**單源抗體的製備：**將  $10^8$  經加熱或福馬林處理後的 GBM 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 GBM 全菌進行 ELISA，檢測各免疫小鼠對 GBM 的反應情形。取血清中抗 GBM 抗體力價高的小鼠脾臟細胞與 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤細胞融合。以 GBM-ELISA 篩選分泌 GBM 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 (23)。

**GBM-ELISA：**以全菌為抗原進行 ELISA 主要是根據 Abdillahi 與 Poolman (24)的方法進行。進行步驟如下：將 GBM 懸浮於 PBS (pH 7.2) ( $OD_{620} = 0.1 - 0.15$ ) 以  $56^{\circ}\text{C}$  加熱 30 分鐘後保存於  $4^{\circ}\text{C}$ ，備用；將 100  $\mu\text{l}$  熱處理後的菌液放入 96-孔盤置於  $37^{\circ}\text{C}$ ，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 PBS 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 PBS 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 PBS 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。

**以 ELISA 分析抗體對人類細胞的交叉反應：**將人類神經原母細胞 IMR-32 (CCRC 60014; ATCC #CCL-127) 置於 96-孔盤培養到近 confluent，PBS 沖洗後，以 0.1% glutaraldehyde 固定；以 PBS 沖洗三次後，於每孔中加入 100  $\mu\text{l}$

細胞培養液，放置 2 小時；以 PBS 沖洗三次後，於每孔中加入 100  $\mu$ l 的 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse antibodies (AP-anti-mouse)，放置 2 小時；以 PBS 沖洗三次後，於每孔中加入 100  $\mu$ l 呈色試劑(p-nitrophenyl phosphate substrate)，避光反應一小時後加入 20  $\mu$ 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 108 菌直接以 SDS-PAGE 的 sample buffer 裂解，以 12.5% SDS-gel 分析後轉漬到 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(25)。

**抗體活化補體媒介殺菌力分析**：主要參考 Quakyi 等人(26)之方法在 96-孔盤進行。依序於每孔中加入(a) 50  $\mu$ l 抗體溶液、(b) 20  $\mu$ l 幼兔血清當作 complement 來源、(c) 30  $\mu$ l 活的 GBM ( $2-4 \times 10^4$  cfu/ml)，置於 37°C 緩慢搖晃 30 分鐘後，從每孔中取出 50  $\mu$ l 塗在巧克力平板盤，將平板盤置於 37°C/5% CO<sub>2</sub> 培養箱 18 小時後，計算平板上的菌落數。

### 三、結果

本計畫共進行了三次細胞融合。第一次是以福馬林固定的 GBM 進行小鼠的免疫注射。融合的細胞培養在八個 96-孔盤，在含有 HAT 的培養液中，有 425 個 wells 有存活的細胞。ELISA 初步篩選結果 OD 值大於 0.8 的共有 299 個，分別將這些細胞繼代培養後再分析，並冷凍保存了其中 36 株細胞。解凍後有 25 株存活；分析各細胞培養液對抗原的結合能力，結果只剩 6 株其 OD 值仍 >0.5(表一)。這六株細胞為 2-6-C、2-8-C、4-8-F、5-2-G、5-10-A 及 8-2-H。ELISA 分析這些細胞培養液與其他的奈瑟氏腦膜炎雙球菌之結合情形，結果顯示 2-6-C、2-8-C、與 4-8-F 與五株 GBM 分離株皆有顯著的結合；2-6-C 與 W 型亦有顯著的結合情形。5-2-G、5-10-A 及 8-2-H 雖與抗原有很好的結合能力，但皆無法與第五株 GBM 結合；5-2-G、5-10-A 與 GBM-(林)亦未有明顯的結合(表一)。

造成此結果主要有兩個可能性：(a)不同 isolate 之間的差異，以及(b)菌的處理方式不同；GBM-陳，GBM-林，GWM-胡，GWM-陳，GYM 及 GCM 是以福馬林固定後再以 glycine 處理，而其他的菌則是將菌由平板刮下後懸浮於 PBS 加熱後直接使用。前人研究(27)顯示帶有夾膜的 GBM 在 Balb/c 小鼠引起的抗體反應不會因為重複注射抗原而增加。圖 1 顯示以 GBM-陳或 GBM-林免疫之小鼠其抗體力價隨追加抗原而增加，由此結果推測用來進行免疫注射的 GBM 可能 CPS 已經不完整或脫落。經染色並於顯微鏡下觀察菌之 CPS 是否存在，結果顯示以化學方法固定的菌均無法明顯辨別出其 CPS，因此推測這批融合瘤細胞生產的抗體主要應該是針對外膜蛋白或 LPS。而以 2-6-C、4-8-F 及 2-8-C 進行 Western blot 分析，結果在福馬林處理的 GBM 除有一條明顯的免疫反應帶外，在其上方則是一片 smear，對熱處理的 GBM 則無法辨識(data not shown)，顯示其辨識的位置

是因化學固定而產生的，而非菌原有的抗原構造。

由於我們的主要目標是製備 CPS 抗體，因此，我們改以加熱法將 GBM 殺死、染色並於顯微鏡下觀察，確定大部份的菌體外圍仍有 CPS，再用這些菌為抗原進行免疫注射。第二次融合共得到 74 株對抗原有顯著結合的細胞。在進行單源化前，初步分析各細胞培養液中抗體與不同分離株的結合情形，以及抗體的 isotype，結果列於表二。其中有 25 株與測試的 9 株 GBM 分離株皆有反應；13 株與 W135 型、C 型與 Y 型有反應；在 isotyping 的 29 個樣品中，一半以上含有兩種以上的 isotypes；70% 的細胞培養液中含有 IgM。

為了初步了解這些抗體的抗原特性，將 GBM 抗原總蛋白以 SDS-PAGE 分離後，以細胞培養液為初級抗體進行 Western blot 分析，36 樣品中所得到的結果可分為：(a) 有明顯的蛋白帶；(b) 在 25-75 kDa 之間有 ladder-like pattern；(c) 在 37-75 kDa 之間有模糊的呈色反應；(d) 在分子量 >150 kDa 有 ladder like 條帶；及 (e) 沒有明顯的呈色區。這些結果顯示這一批融合瘤中抗體的專一性主要以醣類為主。

為了解抗體對人類細胞 polysialic acid 的反應情形，以 ELISA 分析各細胞培養液與人類神經母細胞瘤 IMR-32 細胞(25)的結合：在 38 個分析樣品中有 11 株與 IMR-32 的 OD 值與 Sp2/0 相近(OD < 0.1)。這些抗體即為本計畫的目標。為了進一步確定這些抗體辨識 GBM 的能力，取其中六個樣品分別測試其活化人類補體的能力：將 GBM、人類補體及測試培養液一起培養三十分鐘後，將菌塗在培養基上培養隔夜後計算菌落數，結果含測試培養液(GBM<sup>+</sup>IMR<sup>-</sup>)的菌落數隨稀釋度增加而增加(圖 2)，證明這六個 wells 的細胞所分泌的抗體不但能與 GBM 結合且能活化補體達到殺菌效果。

第三次融合共篩選了 351 個 wells 的細胞，繼代培養近三個月後，目前共有 15 株仍繼續分泌抗體。

#### 四、討論

本計畫以全菌為抗原進行免疫注射。最初考慮以噬菌抗體技術為主，細胞融合為輔製備 GBM 抗體，結果細胞融合的效率遠較預期的高，因此本計畫主要以融合瘤技術製備抗 GBM 抗體。三次融合共得到近百個 wells 的細胞分泌與抗原 GBM 具結合能力的抗體。然而藉由分析各細胞培養液與其他分離株的結合情形，結果發現第一批製備的抗體主要的抗原並不是莢膜多醣。第一批菌是由疾管局徐先生幫忙製備，在處理的過程中除了以福馬林固定外，另以 glycine 溶液沖洗，推測莢膜可能在處理過程中脫落，此推測經染色後於顯微鏡下觀察而得到證實。有鑑於此，在抗原的製備上我們改採熱處理將菌去活化，並於染色後顯微鏡下觀察確定免疫注射的菌仍具有莢膜的構造。



為求保持全菌的完整性，在後續的免疫注射我們並未使用 Adjuvant。在後續兩次的融合我們共得到近百個 wells 分泌 GBM 抗體。由於本計劃製備 GBM 抗體的目的主要是作為找出模擬莢膜多醣的胜鈦，在研究策略上首先以 ELISA 分析各細胞培養液與不同分離株之結合情形，以及與人類細胞的交叉反應現象。目前共獲得 11 個 wells 的細胞培養液與人類神經母細胞 IMR-32 沒有明顯結合力，其中六個(其中 2-2-13 及 2-1-35 已經完成單株化)已經證實能活化人類補體而達到殺菌的效果。

Isotype typing 各細胞培養液的結果顯示大部分的 wells 含有一個以上的細胞殖系，為了避免漏失有用的單株抗體(GBM<sup>+</sup>IMR<sup>-</sup>)，我們將繼續進行細胞單株化，保留更多的 GBM<sup>+</sup>IMR<sup>-</sup>融合細胞，作為下年度鑑定抗原表位的工具。

## 五、結論與建議

本計畫是以全菌為抗原製備抗體，這些抗體主要對莢膜多醣具專一性，其中也包括外膜蛋白及 LPS 的抗體，不但可作為研發胜鈦疫苗(本計畫目標)的工具，亦可應用在 GBM 的分子免疫分型(molecular-immuno-typing)，可提升對病原菌之鑑定速度與準確度。

建議：期末報告是否能改在計畫執行結束後一個月後繳交。

## 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. Pon RA, Lussier M, Yang QL, and Jennings HJ. N-Propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique bactericidal capsular epitope in group B *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 1998; 185:1929-1938.
7. Fischer M, Carlone GM, Holst J, Williams D, Stephens DS, and Perkins BA. *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane vesicle vaccine in adults with occupational risk for meningococcal disease. *Vaccine* 1999; 17:2377-2383.
8. Christodoulides M, Brooks JL, Rattue E, and Heckels JE. Immunization with

- recombinant class I outer-membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of liposomes and adjuvants on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci. *Microbiology* 1998; 144:3027-3037.
9. Moxon ER, Hood D, and Richards J. Bacterial lipopolysaccharides: candidate vaccines to prevent *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* infections. *Adv Exp Med Biol* 1998; 435:237-243.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. Phalipon A, Folgari 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.
  15. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315-1317.
  16. Devlin JJ, Panganiban LC, Devlin PE. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* 1990; 249:404-406
  17. 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.
  18. Scott JK, and Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1999; 249:386-390.
  19. 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.
  20. Scott JK. Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem Sci* 1992; 17:241-245.
  21. 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.
  22. 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.

23. 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.
24. Abdillahi H, and Poolman J. T. Neisseria meningitidis group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. Microb Pathog 1988; 4:27-32.
25. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
26. Quakyi EK, Frascch CE, Buller N, and Tsai CM. Immunization with meningococcal outer-membrane protein vesicles containing lipooligosaccharide protects mice against lethal experimental group B Neisseria meningitidis infection and septic shock. J Infect Dis 1999; 180:747-754.
27. Frosch M, Gorgen I, Boulnois GJ, Timmis KN, and Bitter-Suermann D. NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of Escherichia coli K1 and group B meningococci. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82:1194-1198.

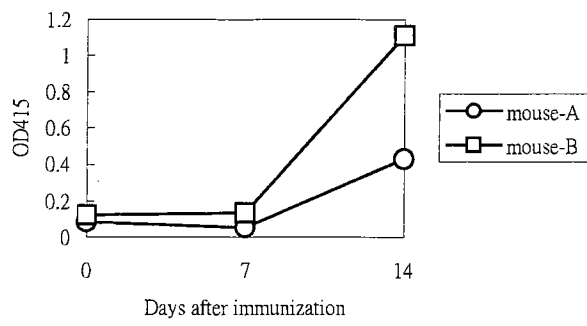


Fig. 1. Immune responses of Balb/c mice immunized with GBM-林(mouse-A) or GBM-陳 (mouse-B).

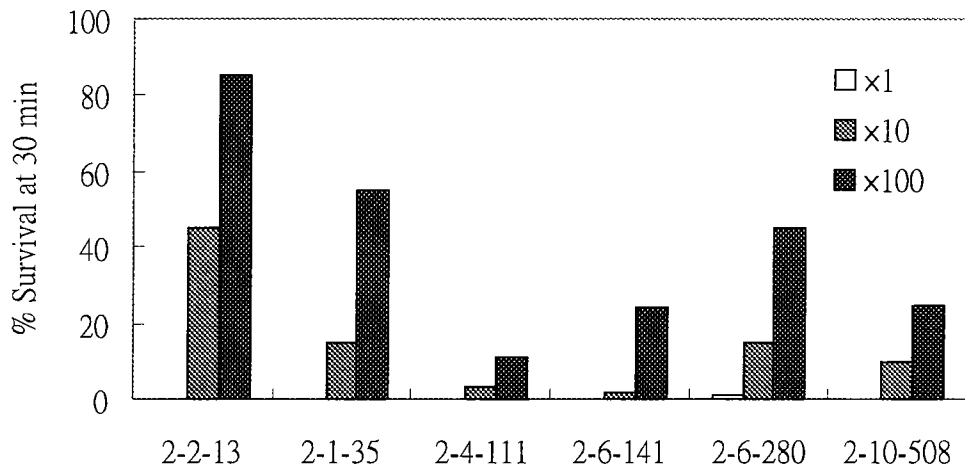


Fig. 2. Complement-mediated bacterial activity of six supernatants at different dilution factors when tested against the GBM isolate used as the immunogen.

**Table 1.** Cross-reactivity analysis of hybridoma antibodies prepared from mouse immunized with formalin-fixed GBM-陳.

Hybridoma	GBM <sup>a</sup> -陳 <sup>b</sup>	GBM-林	GBM-黃	GBM-吳	GBM	GWM	GWM-胡	GWM-陳	GYM	GCM
2-2-D	+ <sup>c</sup>	-	+	-	+	-	-	-	+	+
2-6-A	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
2-6-C	+++++	++++	+	+	+	+	++++	+++	+	+
2-6-G	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
2-7-G	+	-	+	-	+	++	+	+	+	+
2-8-C	++	++	++	+++	++	+	+	+	+	++
2-8-F	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3-5-B	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
3-10-E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-2-C	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
4-8-F	+++++	+	++++	+	+	+	+	-	+	+
4-10-E	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
5-2-B	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
5-2-D	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
5-2-G	+++++	-	++++	+	-	-	-	-	-	+
5-7-G	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
5-9-F	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
5-10-A	++++	-	++++	+	+	-	-	+	-	+
6-3-C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
6-3-F	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
6-6-B	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
7-9-G	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
7-11-D	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
8-2-H	+++	++	+	+	-	+	++	++	+	+
8-5-E	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+

<sup>a</sup> GBM, group B *N. meningitidis*; GWM, group W *N. meningitidis*; GYM, group Y *N. meningitidis*; and GCM, group C *N. meningitidis*.

<sup>b</sup> Source of this isolate.

<sup>c</sup> OD values of ELISA. "+", 0.1 - 0.5; "++", 0.5 - 1.0; "+++", 1.0 - 1.5; "++++", 1.5 - 2.0; "+++++", > 2.0; "-", < 0.1.

**Table 2.** Characterization of hybridoma antibodies prepared from heat-killed GBM immunized mouse by ELISA.

Hybridoma	Isotype	ELISA					Western band pattern
		GBM	W135	C	Y	IMR-32	
2-2-3	IgM, IgG1, IgG2b	9/9	3/3	+	+	+	*
2-2-5		9/9					
<b>2-2-13<sup>#</sup></b>	<b>IgM</b>	<b>9/9</b>	-	-	-	-	<b>e</b>
2-3-16		9/9					
2-3-17		9/9					
2-3-77	IgM	9/9	-	-	-	+	c
2-6-22	IgM, IgG2b	9/9	3/3	+	+	+	
2-8-27		9/9	3/3	+	+	+	c, d
2-4-97		9/9					
2-5-134	IgG3	9/9	-	+	+	+	a, c
<b>2-6-141<sup>#</sup></b>		<b>9/9</b>	-	-	+	-	
2-6-146	IgG2b	9/9	-	-	-	+	
2-8-160	IgM, IgG2b	9/9	-	-	-	+	
2-8-166	IgM, IgG1	9/9	3/3	+	+	+	c
2-8-171	IgM	9/9	3/3	+	+	+	
2-8-172	IgM, IgG2b, IgA	9/9	-	-	-	+	a
2-1-202	IgM	9/9	-	-	+	+	
2-6-279	IgM	9/9	3/3	+	+	+	c
<b>2-6-280<sup>#</sup></b>		<b>9/9</b>	<b>3/3</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	
2-9-487		9/9	-	-	-	-	
2-9-495		9/9	+	+	+	+	
2-2-536	IgG1, IgG2b, IgM	9/9	1/3	-	+		
2-2-542	IgG1, IgG2b, IgM	9/9	-	-	-		
2-2-545	IgG2b	9/9	3/3	+	+		
2-5-574	IgG1	9/9	-	-	-	+	
<b>2-1-35<sup>#</sup></b>	<b>IgG2b</b>	<b>8/9</b>	-	-	+	-	<b>d</b>
2-1-43		8/9	3/3	+	+		
<b>2-4-111</b>		<b>8/9</b>	-	-	-	-	<b>c</b>
2-4-112		8/9	-	-	-	+	
2-9-482		8/9					
<b>2-10-508<sup>#</sup></b>		<b>8/9</b>	-	+	-	-	
2-8-420		8/9	1/3	-	-	+	
2-2-57		7/9					
2-3-222	IgM	7/9	-	-	-	+	
2-8-449		7/9	2/3	-	-		
2-9-474		7/9	3/3	+	+	+	
2-1-514		7/9	-	-	-		
2-1-531	IgG1, IgG2b, IgM	7/9	-	-	-		
2-2-48		6/9					
2-3-68		6/9	-	-	-	+	
2-4-99	IgG2b, IgM	6/9	-	-	-	+	
2-10-192		6/9	-	-	+	±	
2-6-285	IgG1	6/9	2/3	-	-	+	a
2-8-451		6/9	-	-	-	+	
2-1-519		6/9					
2-2-549	IgG1, IgG2b, IgM	6/9	1/3				
2-2-551	IgG1, IgG2b, IgM	6/9	-	-	-		
2-4-562		6/9					
2-6-592		6/9	-	-	-	+	
2-7-609		6/9					
2-3-14		5/9	-	-	-	-	
2-7-152		5/9	-	-	-	-	
2-5-271	IgG1, IgG2a, IgG3	5/9	-	-	-	+	
2-5-273		5/9	-	-	-		
2-1-295		5/9	1/3	-	-	-	
2-8-459		5/9	-	-	-	-	
2-2-557	IgG1, IgG2b, IgM	5/9	-	-	-		
2-2-4		4/9	3/3	+	+	+	
2-5-128		4/9					
2-8-163		4/9	-	-	-	-	
2-9-469		4/9	1/3	-	-	+	
2-4-570		4/9					
2-6-143		3/9	1/3	-	-	-	

2-3-221	IgG1, IgG2b, IgG3, IgM, IgA	3/9	-	-	-	+	
2-5-277		3/9	3/3	+	+	+	
2-8-454		3/9	-	-	-	-	
2-7-389		2/9	2/3	-	-	+	
2-4-353	IgG1, IgG2b	2/9	-	-	-	±	a
2-1-299		2/9	3/3	+	+	-	
2-2-218	IgM	2/9	-	-	+		
2-3-91	IgG3, IgA	2/9	-	-	+		c

\*空格表示尚未進行分析

#已進行補體殺菌測試