

## 白喉毒素 A 片段的表达纯化与单克隆抗体制备

欧阳晶 王健伟\* 王春晓 郭 丽 脱厚珍 崔 婷 洪 涛

(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052)

**摘 要** 白喉毒素(Diphtheria toxin, DT)A 片段(DTA)是白喉毒素的酶活性区,也是 DT 类免疫毒素的关键结构域。DTA 蛋白及其单克隆抗体在免疫毒素的毒性机理、检测与纯化研究等方面具有重要价值。通过在 *E. coli* 中表达了 DTA,经 Q-Sepharose FF 和  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose 两步层析纯化,得到纯度约为 90% 的融合蛋白。以 DTA 为抗原免疫 BalB/c 小鼠,获得了分泌抗 DTA 特异单抗的杂交瘤细胞株 3B6 和 3B9。单抗为 IgG1 亚型,滴度达  $1:10^6$  以上,与 DTA 的结合可被抗 DT 马血清竞争抑制。抗 DTA 单抗用于免疫印迹试验,或制备成免疫亲和柱纯化基于 DT 的重组免疫毒素,均获得较好效果,为免疫毒素的研究奠定了良好基础。

**关键词** 白喉毒素 A 片段,单克隆抗体,免疫毒素,免疫亲和层析

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0689-05

导向性治疗是肿瘤治疗研究的热点之一<sup>[1,2]</sup>。随着一种基于白喉毒素(Diphtheria toxin, DT)的免疫毒素 ONTAK 的上市(1999 年美国 FDA 批准将其用于治疗成人皮肤 T 细胞淋巴瘤)<sup>[3-6]</sup>,DT 类免疫毒素的开发应用前景日益广阔,大量相关研究正在进行,涉及毒性机理、表达纯化及临床应用等多个方面<sup>[6-9]</sup>。ONTAK(DAB<sub>389</sub>-IL2)是白喉毒素 N 端 389 个氨基酸与人白细胞介素 2 的融合蛋白。其前 193 个氨基酸为白喉毒素 A 片段(DTA),是 DT 的酶活性区和所有 DT 类免疫毒素的关键结构域,它可催化真核细胞延伸因子 EF2 特有的白喉酰胺 His<sub>699</sub> 发生 ADP-核糖基化,从而阻止蛋白质合成并导致细胞死亡<sup>[3,9]</sup>。人们发现蓖麻毒素的一种基序可结合并杀伤人脐静脉内皮细胞,而 DTA 具有类似基序<sup>[10]</sup>。因此,DTA 是免疫毒素细胞毒性研究的重要蛋白和人工改造的主要对象。

由于 DT 类免疫毒素在纯化过程中易降解,国外采用抗 DT 马血清-免疫亲和层析以提高纯化效率<sup>[11,12]</sup>。但我们发现,用马血清制备的层析柱受血清批次影响,重复性较差<sup>[13]</sup>,并且因白喉流行减少,马血清的生产已经很少,在来源上也有困难,因此急需替代马血清的抗 DT 抗体。单克隆抗体(Monoclonal antibody, McAb, 简称单抗)由于具有质

量均一、亲和力稳定、可实现工业化生产等优点<sup>[14,15]</sup>,在检测和免疫亲和层析中具有潜在优势。鉴于 DTA 的重要性,可将其作为免疫毒素的分子标记,但目前尚无抗 DTA 单抗出售。本研究表达纯化了 DTA 片段,制备了抗 DTA 单克隆抗体,并将其应用于免疫毒素的检测与纯化,以期深入开展 DT 类免疫毒素的研究工作而服务。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与质粒:** *E. coli* DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3, plysS)及质粒 pcDNAII、pET11a 为本室保存。携带全长 DT 基因的质粒 pUC18/DT<sup>[16]</sup>及 DT<sub>389</sub>-IL2、GMCSF-DT<sub>386</sub>、DT<sub>386</sub>-GMCSF<sub>87</sub>、DT<sub>386</sub>表达菌株<sup>[12,17,18]</sup>为本室克隆、构建并保存。

**1.1.2 主要试剂与仪器:** Vent 酶购自 Biolab,限制酶和 DNA 分子量标准购自 TaKaRa。层析填料、FPLC 及凝胶成像扫描系统为 Amersham-Pharmacia 产品。胎牛血清及细胞培养基等为 GIBCO 产品。抗 DT 马血清购自兰州生物制品所,辣根过氧化物酶(HRP)标记抗马 IgG 购自北京吉泰科联,HRP 或碱性磷酸酶(AP)标记抗兔、抗鼠 IgG 为 Pierce 产品。

**1.1.3 细胞与动物:** SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞为本室

收稿日期:2004-02-25,修回日期:2004-05-20。

基金项目:国家自然科学基金资助(No. 30300412)。

\* 通讯作者。 Tel:86-10-63578244; Fax:86-10-63529809; E-mail:wangjw28@vip.sina.com

传代细胞, BalB/c 雌性小鼠(6~8周)、昆明小鼠购自军事医学科学院动物中心。

## 1.2 方法

**1.2.1 DTA 表达质粒的构建:**以质粒 pUC18/DT 为模板,用分别带有 *Nde* I 和 *Bam* H I 酶切位点(下画线)的引物 **DTA1**: 5' > TTGGCATATGGGCTCTCATC-ACCATCACCACCATGGCCTGAGACT < 3' (引入 6 个 His, 斜体)与引物 **DTA2**: 5' > TTGGGGATCCTCAA-CCTACAGAGCGACG < 3', PCR 扩增 DTA(193aa) 编码基因。PCR 产物插入 pcDNAII, 测序正确的质粒经 *Nde* I、*Bam* H I 酶切切下 DTA 片段,定向插入 pET11a。酶切鉴定正确的质粒命名为 pET11a/DTA。

**1.2.2 重组蛋白的表达与纯化:**挑取转化表达质粒 pET11a/DTA 的 *E. coli* BL21 单个菌落,常规 IPTG 诱导,离心收集菌体。SDS-PAGE 观察蛋白表达情况。*E. coli* 菌体经超声破碎,包涵体变性于 20mL 8mol/L 尿素中,4℃复性于 2L 含 2mol/L 尿素的缓冲液 48~72h。复性液上样至 Q-Sepharose FF 柱,用 A 液(20mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH7.4)与 B 液(A 液 + 1mol/L NaCl)梯度洗脱,收集 25% B 液洗脱峰。以 C 液(0.5mol/L NaCl, 20mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH7.4)透析,上样于 Ni<sup>2+</sup>-Sepharose 柱,用 D 液(C 液 + 0.5mol/L 咪唑)洗脱,收集洗脱峰,4℃以 PBS 透析或用 HiTrap Desalting 柱脱盐后冻干备用。

**1.2.3 动物免疫:**以 DTA 纯化样品为抗原免疫 BalB/c 小鼠(6~8 周龄,雌性)。首次按 50μg/只剂量与等量福氏完全佐剂混匀,腹腔注射。2 周后追加免疫(30μg/只,不完全佐剂),此后 3 周每周重复免疫(30μg/只)1 次。1 周后脾内注射 10μg 加强免疫,3d 后取脾脏融合。

**1.2.4 杂交瘤细胞株的制备与竞争抑制 ELISA:**免疫小鼠单个脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 融合,用含 2% HAT、20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液选择性培养。取细胞培养上清,以三孔包被法筛选。酶标板分别以 DTA 纯化样品(0.5μg/孔)、表达 DT<sub>389</sub>-IL2<sup>[12]</sup> 的 BL21 细胞裂解液(阳性对照,0.5μg/孔)及空白 BL21 细胞裂解液(阴性对照,4μg/孔)为抗原包被。间接 ELISA 法筛选强阳性单克隆细胞孔:(实验孔-空白孔)/(阴性对照-空白孔)≥2.1。阳性孔经多轮克隆化及扩大传代,以昆明小鼠大量制备单抗(腹水法)。竞争抑制 ELISA 采用前述 DTA 包被酶标板,每孔加入 50μL 单抗稀释液(1:10<sup>4</sup> 稀释,吸光度约 1.0)与 50μL 马抗血清(不同稀释度),37℃孵育 2h,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 100μL,常规法测定 A<sub>450</sub>。

**1.2.5 单抗的纯化,抗 DTA 单抗(aDTA)-亲和柱的制备和亲和层析:**单抗经辛酸-硫酸铵沉淀及 Protein G 亲和层析纯化,按照说明制备 aDTA-Sepharose4B 亲和柱。表达 DT<sub>389</sub>-IL2 的 *E. coli* 菌体超声破碎,上清用 E 液(0.1mol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH 7.4)稀释,上样于亲和柱。用 F 液(E 液 + 4mol/L 盐酸胍)洗脱,收集目的蛋白峰。

**1.2.6 蛋白质浓度与纯度测定:**紫外分光光度法及 BCA 试剂盒法(按照 Pierce 公司说明操作)测定浓度。将样品的 SDS-PAGE 进行凝胶成像扫描,应用配套软件计算纯度。

## 2 结果

### 2.1 白喉毒素 A 片段表达载体的构建

白喉毒素 A 片段为 DT 的 N 端 193aa,其基因的 5'端由引物引入 *Nde* I 酶切位点,翻译起始密码子 ATG 后加入 6 个 His 编码序列,3'端引入 *Bam* H I 酶切位点。PCR 产物长度约为 600bp,将其回收后插入质粒 pcDNAII,得到质粒 pcDNAII/DTA,序列分析表明 PCR 扩增所得基因片段完全正确(结果未显示)。将 DTA 基因用 *Nde* I 和 *Bam* H I 切下,插入 pET11a 表达载体,得到质粒 pET11a/DTA。PCR 及表达质粒酶切鉴定结果见图 1。

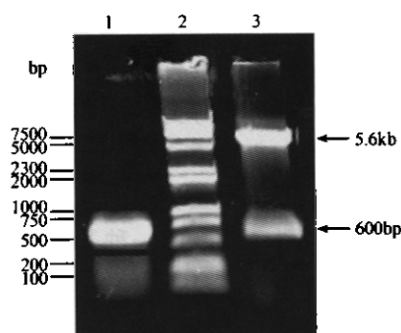


图 1 DTA 基因的克隆及表达质粒的鉴定

Fig.1 Cloning of DTA gene and identification of expression plasmid pET11a/DTA

1: PCR product of DTA; 2: DNA Markers:

DL2000 + DL15000; 3: pET11a/DTA/*Nde* I + *Bam* H I

### 2.2 白喉毒素 A 片段的表达与纯化

转化有 pET11a/DTA 的 *E. coli* BL21(DE3, plyS) 菌株用 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 分析显示 DTA 获得高效表达,约占菌体总蛋白的 25%(图 2a)。包涵体变性液澄清,复性液亦透明,无蛋白聚集现象。复性液经 Q-Sepharose FF 离子交换层析和 Ni<sup>2+</sup>-Sepharose 金属螯合层析纯化后,得到带 6 × His 融合

蛋白 His-DTA,主要条带分子量约为 25kD。样品经凝胶扫描分析,纯度约为 90%(图 2b,c)。Western blot 结果显示,蛋白纯化样品的主、次条带均与抗

DT 马血清有很强的免疫反应(图 2d)。随后发现纯化样品对细胞具有杀伤毒性(另文发表<sup>[18]</sup>)。以上结果提示,DTA 得到了正确表达和折叠。

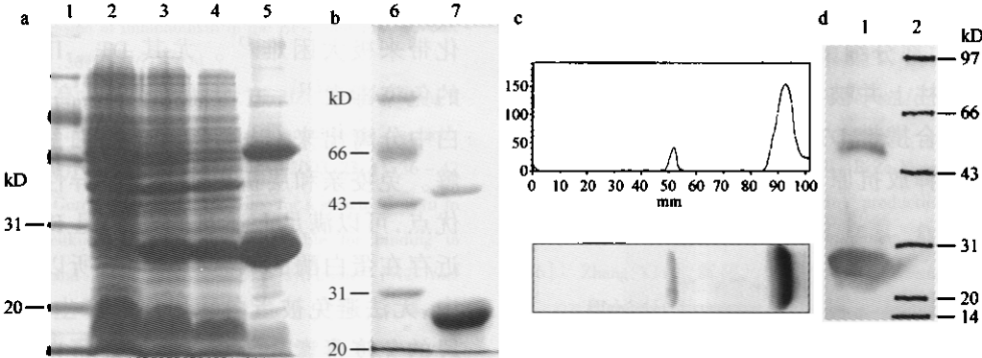


图 2 白喉毒素 A 片段的表达纯化与鉴定

Fig.2 Expression, purification and identification of DTA from *E. coli*

a:induced expression of DTA in BL21. 1:protein markers; 2~4:DTA expressed in *E. coli* before(2) or after(3,4) induction with IPTG; 5:DTA inclusion body (IB); b:purification of DTA(SDS-PAGE): 6:protein markers; 7:purified His-DTA after Ni<sup>2+</sup>-Sephacryl chromatography; c:purity analysis of His-DTA; d:western blot analysis of recombinant DTA with horse sera against diphtheria toxin:1: purified His-DTA; 2:protein markers

2.3 分泌特异性抗 DTA 单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立

DTA 免疫小鼠的血清抗体滴度达到了 1:10<sup>6</sup>,表明免疫应答良好。免疫小鼠脾细胞与 Sp2/0 细胞的融合率为 69%(198/288)。取细胞培养上清以三孔平行法检测抗体;以 BL21 菌体蛋白为阴性孔,DT<sub>389</sub>-IL2 和 DTA 为阳性孔,阳性率达 99%(197/198),经 3 轮亚克隆获得 2 株能稳定分泌表达特异性抗体的杂交瘤细胞克隆(3B6、3B9)。

2.4 DTA 单克隆抗体(aDTA)的鉴定

应用获得的单抗细胞株制备了腹水,并分析了抗体特性:抗体均为 IgG1 亚类,细胞培养上清及腹水的稀释度分别达 1:10<sup>3</sup> 及 1:10<sup>6</sup> 以上。为证实单抗对 DTA 的特异性,首先用标准马抗 DT 血清进行了竞争抑制试验。发现单抗与 DTA 的结合可被马血清竞争性抑制,且存在剂量反应关系:随着马血清浓度的降低,抑制作用减弱(图 3)。随后以不含 6×His 的 DT 片段和免疫毒素为样品,用单抗进行 Western blot 检测。发现 2 株单抗均可与携带 DTA 片段的多种不同长度的白喉毒素蛋白的诱导表达菌体样品发生反应,如 DT<sub>389</sub>-IL2<sup>[14]</sup>、GMCSF-DT<sub>386</sub><sup>[17]</sup>、DT<sub>386</sub><sup>[17]</sup>、DT<sub>386</sub>-GM-CSF<sub>87</sub><sup>[17]</sup> 等(图 4),而与携带空载体的 BL21 菌体样品无免疫反应,排除了抗原中 6×His 成分对单抗特异性的干扰,同时进一步表明所获单抗确系特异性抗 DTA 的抗体。

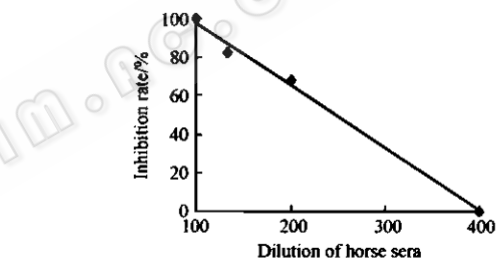


图 3 抗 DTA 单克隆抗体与马血清的竞争抑制试验

Fig.3 Competitive inhibition of binding of anti-DTA McAb with DTA by horse sera against diphtheria toxin

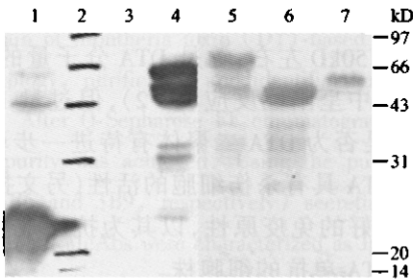


图 4 抗 DTA 单克隆抗体与不同白喉毒素免疫毒素的免疫印迹反应

Fig.4 Western blot analysis of different immunotoxins comprising of diphtheria toxin with McAb against DTA

1,3~6: *E. coli* BL21 samples expressing DTA(1); None(3,pET11a); GMCSF-DT<sub>386</sub>(4); DT<sub>389</sub>-IL2(5); DT<sub>386</sub>(6); DT<sub>386</sub>-GMCSF<sub>87</sub>(7); 2: markers

## 2.5 单克隆抗体在免疫亲和层析中的初步应用

单抗 aDTA 经辛酸-硫酸铵沉淀和 Protein G 亲和层析纯化后,纯度约 90% (未显示)。以其制备成 aDTA 免疫亲和柱,应用于重组毒素 DT<sub>389</sub>-IL2 样品的纯化,可去除大部分细菌杂蛋白,仅目的蛋白及少数杂蛋白吸附于柱上并被洗脱(图 5)。表明抗 DTA 单抗能够有效结合携带 DTA 抗原成分的融合蛋白,并在适当条件下释放抗原。

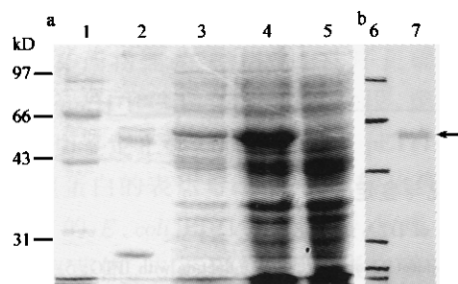


图 5 重组免疫毒素 DT<sub>389</sub>-IL2 的 aDTA 免疫亲和层析

Fig.5 aDTA Affinity chromatography of recombinant immunotoxin DT389-IL2

a: 12% SDS-PAGE (1 - 5); b: western blot analysis (6 - 7): 1, 6: markers; 2, 7: affinity eluate of DT389-IL2; 3: supernatant of expression cell lysate; 4: cell lysate (induced expression); 5: cell lysate without DT<sub>389</sub>-IL2 expression (Negative control).

## 3 讨论

DTA 的酶活性决定着 DT 及 DT 融合蛋白的细胞毒性,因而它具有重要的基础研究和应用价值。为便于 DTA 蛋白的纯化,本文对 DTA 进行了加入 6 × His 标签的融合表达。DTA 纯化样品的 SDS-PAGE 显示,主要条带的分子量与预期大小相符;次要条带的分子量为 50kD 左右,约是 DTA 分子量的 2 倍,在 Western blot 中呈阳性反应(图 2),但过量 DTT 处理无法去除,是否为 DTA 二聚体有待进一步验证。本文制备的 DTA 具有杀伤细胞的活性(另文报道<sup>[18]</sup>),并且具有很好的免疫原性,以其为抗原成功地建立了分泌抗 DTA 单抗的细胞株。

在杂交瘤细胞株的筛选方面,本文设计并采用了三孔平行法。以表达菌 *E. coli* BL21 的细菌蛋白包被孔作为阴性孔,剔除了因 DTA 抗原中混有来自 *E. coli* 的杂蛋白而造成的假阳性细胞克隆;选择与 DT<sub>389</sub>-IL2、DTA 抗原反应的阳性孔,从而保证筛选出的杂交瘤细胞株分泌的抗体是针对白喉毒素 DTA 抗原成分的。Western blot 结果(图 4)显示 BL21 (pET11a)样品无阳性条带,而其他 DT 蛋白表达样

品有阳性条带,验证了此筛选方法的有效性。

DT 类免疫毒素的 Western blot 结果中,常见多条比目的蛋白小的阳性条带(如图 4 所示),推测是不完全表达、蛋白酶酶切或其他降解因素导致,给纯化带来极大困难<sup>[13]</sup>。尤其 DT<sub>389</sub>-IL2 等可溶性表达的免疫毒素<sup>[12]</sup>,迫切需要快速、高纯度地从菌体蛋白中分离出来,以脱离富含蛋白酶的环境,减少降解。免疫亲和层析由于具有特异性强、高效、快速的优点,可以满足上述目的<sup>[11]</sup>。但 DT 的 aa193-194 附近存在蛋白酶的敏感位点<sup>[3,9]</sup>,所以在表达纯化过程中,无法避免被蛋白酶切割并产生一些失去 DTA 片段的免疫毒素分子。这类杂质蛋白的分子量稍小于全长分子,丧失了杀细胞活性。抗 DT 多抗的抗原表位广泛,能够与上述分子结合,会影响免疫毒素的纯化效率。如果使用抗 DTA 的抗体进行纯化,只有含 DTA 成分的蛋白(如 DTA 或完整的免疫毒素)才能结合到亲和层析介质上,不含 DTA 的蛋白因不能结合被除去;而 DTA 分子量小,经凝胶层析可将其与目的蛋白(60kD 左右)分开,达到分离纯化的目的。本文结果证实,经抗 DTA 单抗-免疫亲和层析纯化后,DT<sub>389</sub>-IL2 样品中大量杂蛋白可被有效去除,但尚需进一步纯化。

本文建立了 DTA 的表达纯化方法,制备的 DTA 单抗可检测出不同长度的 DT 类免疫毒素中 DTA 的存在,亦可制备成亲和柱纯化 DT 融合蛋白,为各种 DT 类免疫毒素进一步的毒性研究、纯化研究及应用打下了良好基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA. Targeted toxins. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 326 - 334
- [2] Kreitman RJ. Recombinant toxins for the treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther*, 2003, 5(1): 44 - 51
- [3] Frankel AE, Powell BL, Lilly MB. Diphtheria toxin conjugate therapy of cancer. *Cancer Chemother Biol Response Modi*, 2002, 20: 301 - 313
- [4] Olsen E, Duvic M, Frankel A *et al.* Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin difitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2001, 19(2): 376 - 388
- [5] Duvic M, Kuzel TM, Olsen EA *et al.* Quality-of-life improvements in cutaneous T-cell lymphoma patients treated with denileukin difitox (ONTAK(R)). *Clin Lymphoma*, 2002, 2(4): 222 - 228
- [6] DR Powell BL, Gartenhaus R. DAB(389)IL2 (ONTAK(R)) fusion protein therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3(1): 179 - 186
- [7] Urieto JO, Liu T, Black JH *et al.* Expression and purification of the

- recombinant diphtheria fusion toxin DT<sub>388</sub> IL3 for phase I clinical trials. *Protein Expr Purif*, 2004, **33**(1):123-133
- [8] Liu YY, Woo JH, Neville DM. Targeted introduction of a diphtheria toxin resistant mutation into the chromosomal EF-2 locus of *Pichia pastoris* and expression of immunotoxin in the EF-2 mutants. *Protein Expr Purif*, 2003, **30**(2):262-274
- [9] Ouyang J(欧阳晶), Wang JW(王健伟), Tuo HZ(脱厚珍), Hong T(洪涛). Progress in diphtheria Toxin-based immunotoxin research. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2003, **23**(4):36-42
- [10] Balma R, Rizo J, Gordon BE *et al*. Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1999, **96**:3957-3962
- [11] Diane P Williams, Catherine E Snider +, Terry B Strom *et al*. Structure/function analysis of interleukin-2-toxin (DAB486-IL-2). Fragment b sequences required for the delivery of fragment a to the cytosol of target cells. *J Biol Chem*, 1990, **265**(20):11685-11669
- [12] Liu Y(刘扬). Genetic construction, expression, characterization and cytotoxicity of diphtheria toxin-related interleukin 2 (DAB<sub>389</sub>-IL-2). Beijing: PhD dissertation of Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine(中国预防医学科学院博士学位论文), 2001
- [13] Liu Y(刘扬), Wang JW(王健伟), Qu JG(屈建国) *et al*. Cloning and expression of recombinant chimeric toxin DT<sub>389</sub>-IL-2 and testing of its specific cytotoxicity toward cells which bearing high affinity IL-2 receptor. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 2001, **17**(2):117-121
- [14] da Silva e Mouta S Jr, Otavio Alves Vianna C, Ennes I, de Andrade Gomes S *et al*. Simple immunoaffinity method to purify recombinant hepatitis B surface antigen secreted by transfected mammalian cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, **787**(2):303-311
- [15] Acosta Bas C, Baluja Conde IB, Brito Moreno AI *et al*. Monoclonal antibody against human trypsin: production, characterization, and use for diagnosis. *Hybrid Hybridomics*, 2002, **21**(6):487-490
- [16] Zhang XJ(张新建), Li J(李晶), Zhang BY(张宝云) *et al*. High-level Expression and Characterization of the Fusion Protein Consisting of Diphtheria Toxin and Human Interleukin 6. *Acta Biochim Biophys Sin*(生物化学与生物物理学报), 1998, **30**(2):169-173
- [17] Ouyang J(欧阳晶). Studies on diphtheria toxin-based immunotoxins targeted to GM-CSF receptor. Beijing: PhD dissertation of Institute for viral disease control and prevention, China CDC(中国疾病预防控制中心博士学位论文), 2003
- [18] Ouyang J(欧阳晶), Wang JW(王健伟), Qu JG(屈建国) *et al*. Expression, purification and cytotoxicity of diphtheria toxin fragment DT<sub>386</sub>. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2004, **24**(6):74-80

## Expression, Purification and Specific Monoclonal Antibodies Preparation of Diphtheria Toxin A Fragment

OUYANG Jing WANG Jian-Wei\* WANG Chun-Xiao GUO Li TUO Hou-Zhen CUI Ting HONG Tao  
(Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center of Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)

**Abstract** Diphtheria toxin A fragment (DTA) is an essential catalytic domain of diphtheria toxin (DT)-based immunotoxin. DTA protein and its antibodies play an important role in the studies on toxicology, purification and identification of DT-based immunotoxins. In this paper, DTA was expressed and purified from *E. coli*. After Q-Sepharose FF chromatography and Ni<sup>2+</sup>-Sepharose affinity chromatography, 6 × His-DTA fusion protein with 90% purity was achieved. Using the purified DTA as antigen to immunize BalB/c mice, 2 hybridoma cell lines (designated as 3B6 and 3B9, respectively) secreting monoclonal antibodies (McAbs) against DTA were established. Investigations showed that both McAbs were characterized as IgG1 with titers of 1:10<sup>6</sup>. The binding of the McAbs to DTA was competitively inhibited by horse sera against DT. The fact that anti-DTA McAbs could be used in western blot analysis and affinity chromatography purification of DT-based immunotoxins implied that they will be useful agents in the studies on DT-based immunotoxins.

**Key words** Diphtheria toxin A fragment, monoclonal antibodies, immunotoxin, immuno-affinity chromatography

Received: 02-25-2004

This work was supported by Grant from NSFC program(No.30300412).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-63578244; Fax: 86-10-63529809; E-mail: wangjw28@vip.sina.com