

电融合产生黄瓜花叶病毒的单克隆抗体

蔡文启 王 荣 覃秉益 马顺福* 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

张成良 陈 京 季 良

(农牧渔业部植物检疫实验所, 北京)

用提纯的黄瓜花叶病毒 (CMV) 种传 SS-30 株和豇豆株 (P 株) 混合免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0, 用 BAEKON 2000 基因转移仪使其融合。通过 2—3 次简易、快速的有限稀释, 获得 6 个能持续分泌抗体的杂交瘤细胞株, 所获抗体分属 IgG₁ 和 IgG_{2a}, 并能诱导高滴度腹水抗体。间接 ELISA 试验证明这些单克隆抗体对种传 CMVSS-30 株、P 株和非种传 CMV 的黄瓜、日本、山东、香蕉、向日葵和 Q 等分离物有特异性反应, 与 C₁, 分离物的反应性较弱, 而对花生矮化病毒 (PSV) 无交叉反应。利用间接 ELISA 测定了几个单克隆抗体的亲和力常数。单克隆抗体 C₇H₁、A₁H₁ 与 G₁G₁、G₁H₁ 所抗的抗原决定簇相距较远, 而 C₇H₁ 与 A₁H₁、G₁G₁ 与 G₁H₁ 为抗同一抗原决定簇的单克隆抗体。

关键词 黄瓜花叶病毒; 电融合; 单克隆抗体

自 1975 年 Köhler 和 Milstein^[1] 首次得到杂交瘤单克隆抗体以来, 由于单克隆抗体在生物学和医学上的高度重要性, 产品已迅速商品化, 传统的细胞融合技术是以聚乙二醇 (PEG) 作为融合剂。70 年代末和 80 年代初一些科学家^[2,3,4] 先后研究了电融合技术。Zimmermann 等人将细胞经蛋白酶预处理后放在一个非均一的高压电场中, 偶极化的细胞彼此相吸似糖葫芦状排列成串, 然后加一短直流脉冲, 沿细胞排列方向在膜上打开一些小孔, 由此产生细胞融合。但成功地获得能稳定地分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞的实例还相当少。1984 年 Lo, M. M. S. 等人^[5] 用抗生物素-生物素系统进行了选择性电融合。将抗生物素化的抗原与同种抗原免疫过的 B-淋巴细胞温育, 由于抗原与 B-淋巴细胞受体特异地结合形成了 B-淋巴细胞-抗原-抗生物素的复合物。另一方面把生物素连接在骨髓瘤细胞表面。再把上述两种

复合物放在电场中, 由于抗生物素和生物素具有天然的高亲和力, 在低水平的电脉冲作用下 (4kV/cm, 5 μ s) 那些已紧密地结合在一起的细胞对发生融合。一旦得到杂交瘤细胞其分泌的抗体必定是针对用来免疫的抗原, 单克隆抗体的亲和力要比其它方法高 100 倍, 但这种电融合需借助抗生物素和生物素系统。1985 年 Karsten 等^[6] 采用类似 Zimmermann 的方法, 稍后 Abel 等^[7] 改用在均一高压电场下进行电融合均获得了能分泌抗体的杂交瘤。

本文报道了用 BAEKON 2000 基因转移仪成功地获得了 6 个能稳定地分泌抗 CMV (种传和非种传) 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 杂交瘤冻存后复苏不但生长良好, 而且持续地产生高滴度的单克隆抗体。

本文于 1988 年 10 月 4 日收到。

* 中国科学院生物物理研究所。

本课题为中国科学院择优资助课题。

感谢中国科学院生物物理研究所江不栋副研究员在调试 BAEKON 2000 时的热情帮助。

此外,还介绍了一种简易、有效的有限稀释克隆化方法。

材料和方法

(一) 病毒

免疫用病毒有黄瓜花叶病毒 (CMV) 种传 SS-30 株和豇豆株 (P 株)。用于单克隆抗体特异性测定的病毒是 CMV 非种传的黄化、日本、山东、香蕉、向日葵、Q 和 C₃, 等分离物。CMV 的各分离物在枯斑珊西烟 (*Nicotiana tobacum* var. Xanthi-nc) 上繁殖,接种后 9 天采集显症的病叶,参考 Lot 等人^[3]方法用 0.5mol/L 柠檬酸钠 (pH 7.0) 提取病毒,粗汁液用氯仿澄清后经 PEG 沉淀和差速离心获得纯品。

(二) 免疫

选用数只 6 周龄的 BALB/c 小鼠,每只腹腔注射 100 μ g CMVSS-30 (以 1:1 体积与 GIBCO 的弗氏完全佐剂混合并乳化),两周后腹腔注射 100 μ g CMVSS-30 和 100 μ g CMV-P (以 1:1 体积与 GIBCO 的弗氏不完全佐剂混合并乳化),又过两周分别以背部皮下和腹腔各注射 50 μ g 的 SS-30 和 CMV-P (与等量弗氏不完全佐剂混合并乳化)。数周后用间接 ELISA 测试抗血清的滴度。融合前三天尾静脉注射 CMVSS-30 和 CMV-P 各 75 μ g (病毒用生理盐水稀释)。

(三) 骨髓瘤细胞系和饲养细胞

SP2/0 细胞株培养在 RPMI₁₆₄₀ (GIBCO) 培养液 (含 15% 新生小牛血清、2mmol/L L-谷氨酰胺和 1% Antibiotic-Antimycotic) 中。饲养细胞取自未免疫的正常 BALB/c 小鼠的脾细胞,一个脾的细胞可用来分配 6 块 96 孔培养板 (RINBRO),其它均按我们以前的方法^[3]。

(四) 电融合和杂交瘤培养

融合前将已进入对数生长期的 SP2/0 用含胰岛素的培养液培养,融合当天用无血清培养液分别收集 SP2/0 和免疫过的脾细胞,两种细胞分别计数后按 2.5 份脾细胞和 1 份 SP2/0 的比例混合, (细胞总数为 10^8) 1300r/min 离心 7min, 弃上清液,细胞用经高压灭菌的 PBS (pH 7.2) 离心法洗涤 3 次,最后加少量 PBS 悬浮细胞混合物,实验和电融合在室温下进行,将 200 μ l (融合体积)

细胞悬液小心地转移到小容器 (如图 1 所示),小容器为锥形,底部镶嵌一个不锈钢小球,当容器安放在反应器底座时,不锈钢小球正好与底座的阴极接触,细胞悬液内以及细胞悬液与不锈钢小球之间不能有气泡。阳极被固定在反应器的上部,不插入也不接触细胞悬液,阳极与细胞悬液表面之间距离可通过反应器顶部的调节器来控制。阳、阴极与高压电脉冲控制器连接后,调整电融合所要求的各项参数,电激后取出细胞悬液加到含胰岛素的 HAT 选择性培养液中 (约 25ml),最后用滴管把电融合后的细胞分配到含饲养细胞的 96 孔培养板中,每孔 2 滴。设两个对照孔,一个对照孔仅加 SP2/0 和 HAT 选择性培养液以证明所用的 SP2/0 全部具有 HGPRT⁻ 的特性,另一个对照孔仅含饲养细胞。每周用 HT 培养液更换一次。



图 1 BAEKON 2000 反应器和容器
Fig. 1 BAEKON 2000 reactor and receptacle

(五) 分泌特异性抗体杂交瘤的筛选

融合后两周采用间接 ELISA 检测产生杂交瘤克隆各孔的上清液。将 5 μ g/ml CMVSS-30 和 CMV-P 分别包被在 40 孔聚苯乙烯板上 (上海塑料三厂出品),每孔加 100 μ l,待检上清液用 PBST 作 1:2 稀释,辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 工作稀释度为 1:200 (卫生部北京生物制品研究所产品),底物用邻苯二胺。SP2/0 和饲养细胞在 HT 培养液中培养的上清液作为检测的阴性对照。显色后 7—10min 终止反应,在 Dynatech minireader 读其 490nm 的吸光度值。单克隆抗体特异性测定也采用该法。

(六) 用简易、有效的标准稀释法克隆化杂交瘤细胞

参考 Mernaugh 等人^[10]方法, 96 孔培养板的阳性孔杂交瘤克隆生长面积一般经 ELISA 测定后已达 1/2 孔和 3/4 孔的面积 (约每毫升 $2 \times 10^3 - 10^4$ 个细胞) 时, 用一支滴管吸取孔底的杂交瘤细胞, 将一滴细胞悬液 (约 50 μ l) 滴入 5ml 无血清培养液 (约每毫升 200—1000 个细胞), 摇匀后取出 0.5ml 加入到 4.5ml 的 HT 培养液中 (约每毫升 20—100 个细胞), 摇匀后取出 4ml 加入到 4ml HT 培养液中 (每毫升约 10—50 个细胞), 摇匀后分配到含饲养细胞的 96 孔培养板中, 每孔 2 滴。

(七) 小鼠腹水的单克隆抗体制备

按 Galfre 和 Milstein 的方法^[11]制备。

(八) 小鼠杂交瘤单克隆抗体 Ig 类型鉴定

用免疫双扩散法测定。Miles 公司的兔抗小鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM 血清和 TEOH BROTHERS 的兔抗小鼠 IgK 轻链、 λ 轻链血清作标准品。

(九) 单克隆抗体亲和力常数测定

参考 Frighet 等人^[12]的方法, 用间接 ELISA 测定亲和力常数。取 50 μ l 经 PBST 1:5 稀释的杂交瘤细胞培养上清液与等体积 500 μ g/ml 或 100 μ g/ml CMV-P 在 37℃ 温育 2h, 15000 r/min 离心 10min, 将溶液移至包被有相同病毒抗原 (5 μ g/ml) 的聚苯乙烯微量板中, 用间接 ELISA 测定溶液中剩余的游离抗体量, 同时测定无抗原存在时抗体的吸光度, 用公式计算出亲和力常数 (CMV 平均分子量为 6.2×10^4 道尔顿)。

结 果

(一) 电融合产生杂交瘤最适参数的选择

BAEKON 2000 基因转移仪的融合效率与选用的电脉冲幅度、脉冲数、脉冲宽度、电激时间 (作用时间和间隙时间)、细胞悬液的体积以及待融合细胞处在生长循环的那一个相期有关。图 2 示意 BAEKON2000 参数的含义。

用 CMV 的黄化、日本、山东、C₅, 四个分离物混合免疫过的 BALB/c 小鼠做电融

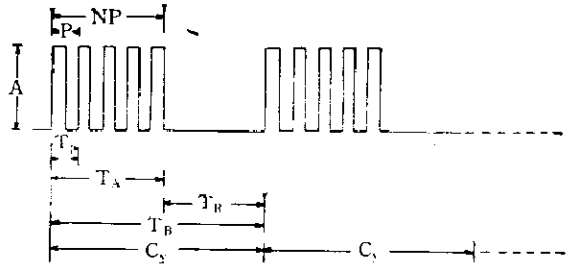


图 2 BAEKON 2000 参数的含义

P = 脉冲; A = 脉冲幅度; NP = 脉冲数; T_p = 脉冲宽度 = 1 个脉冲时间 = 62.5 微秒; T_B = 电激时间 = $T_A + T_R$; T_A = 作用时间; T_R = 间隙时间; C = 循环
Fig. 2 Graphical representation of parameters
P = Pulse; A = Amplitude; NP = Number of pulses;
 T_p = Duration time of a pulse = pulse width = 62.5 μ sec.; T_B = Burst time = $T_A + T_R$; T_A = Action time; T_R = Relaxation time; C = Cycle

合各参数最适选择的预实验。先固定脾细胞和 SP2/0 的比例 (2.5:1); 反应体积 (100 μ l); 阳极和细胞悬液表面之间距离 (4mm); 脉冲数 (64); 电激时间 (0.2s); 脉冲宽度 (62.5 μ s) 等参数, 改变脉冲幅度和循环数, 其结果如表 1 所示, 脉冲幅度选用 6KV 是有希望的。

此后, 用种传 CMV 免疫过的 BALB/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 在电脉冲幅度为 6KV; 脉冲数为 64, 电激时间 0.2s, 脉冲宽度 62.5 μ s, 细胞悬液体积 200 μ l, 阳极距细胞悬液表面 4mm 条件下进行了 3 次融合, 融合后六天在倒置显微镜下已能看到有 1/4 视野大小的杂交瘤克隆, 更换 HT 培养液后生长迅速, 在第十天杂交瘤克隆已肉眼可见 (图版 I), 最慢的也有 1/2 视野面积, 并开始检测阳性孔。从表 2 可见选用 6KV, 两次循环 50, 融合后细胞分配到 93 和 95 孔, 生长杂交瘤的孔分别有 41 和 47, 占总孔数的 44% 和 49%。阳性孔占生长杂交瘤孔数的 20% 和 17%。而采用 6KV 和循环 98 效果不理想。

(二) 电融合产生杂交瘤分泌抗体的稳定性

表1 电融合脉冲幅度和循环次数的选择
Table 1 Selection of amplitude and cycle of electrofusion

实验次数 No. of experiment	脉冲幅度 (KV) Amplitude	循 环 Cycle	出杂交瘤孔数 No. of well with hybridoma	出杂交瘤的天数 The day after electrofusion
1	8	98	1	30
2	8	98	1	20
3	8	66	1	20
3	6	98	6	5
3	4	98	0	
4	6	98	14	5
4	10	98	0	

表2 电融合产生杂交瘤
Table 2 Hybridoma production of electrofusion

实验次数 No. of experiment	脉冲幅度 (KV) Amplitude	循 环 Cycle	总孔数 No. of well	出杂交瘤孔数 No. of well with hybridoma	阳性孔数 No. of positive well
1	6	50×2	93	41	8
2	6	50×2	95	17	8
3	6	98	95	2	2

第一次电融合得到的阳性孔在有限稀释克隆化后继续分泌抗体, 但不慎因培养液污染未能继续培养。第二次电融合 8 个阳性孔中的一个阳性孔继代培养和第一次有限稀释克隆化之全部单克隆的杂交瘤孔持续分泌高滴度抗体, 第二次有限稀释含单克隆杂交瘤孔共有 82 个, 其培养上清液均显示强的免疫反应, Minireader 显示 OVER 字样, 即 $A_{490} > 2.5$, 由此可信杂交

瘤在继代培养过程中没有发生分泌抗体部分染色体丢失的遗传变异。在液氮中冷冻后又复苏, 杂交瘤生长迅速, 其培养上清液经测定 $A_{490} > 2.5$, 体外连续培养四个月后单克隆杂交瘤培养上清液在 ELISA 测定中 $A_{490} > 2.5$, 上清液 4℃ 放置数月其滴度不变。表 3 列出第二次电融合得到的单克隆抗体 C_7H_3 、 A_2E_6 、 A_6H_4 和 C_7D_1 培养上清液滴度达 1:1250 或更高。第三次

表3 单克隆抗体(杂交瘤培养上清液)的滴度
Table 3 The titer of monoclonal antibodies
(supernatant of hybridoma)

单克隆抗体 McAb	吸 光 度 A_{490}							滴 度 Titer
	1:2	1:10	1:50	1:250	1:1250	1:6250	1:31250	
C_7H_3	>2.5	1.92	1.88	1.57	0.85	0.33	0.20	>1:1250
A_2E_6	1.84	1.77	1.74	1.37	0.78	—	—	>1:1250
A_6H_4	>2.5	1.88	1.77	1.28	0.51	0.21	0.24	>1:1250
C_7D_1	>2.5	1.86	1.81	1.52	1.09	—	—	>1:1250
G_6G_1	—	0.95	0.51	0.51	0.39	0.24	0.15	1:250
G_6H_1	—	0.85	0.57	0.48	0.35	0.25	0.18	1:250

电融合所得到单克隆抗体 G₄G₃ 和 G₄H₃ 滴度稍低为 1:250。C₇H₃ 的腹水单克隆抗体其滴度高达 1:1 × 10⁶—1:1 × 10⁷ 之间。以上结果足以证明由电融合获得了能持续分泌高滴度单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

(三) 单克隆抗体的特异性

所有的单克隆抗体与烟草花叶病毒 (TMV, 棒状)、大麦条纹花叶病毒 (BSMV, 长、短两种, 棒状) 和葡萄扇叶病毒 (GFV, 球状) 无任何交叉反应。表 4 指出 A₂E₄、C₇H₃、A₄H₄ 与 CMV 种传 SS-30 株、P

株和 CMV 非种传的黄化、日本、山东、向日葵、香蕉和 Q 等分离物均有强的结合反应, 与 C₃₉ 为弱的结合反应。G₄H₃ 与 SS-30、p、黄化、山东和 Q 等分离物有较强的结合反应, 而与日本、香蕉等分离物结合反应弱。所有这些单克隆抗体与花生矮化病毒 (PSV) 无结合反应, 其中 G₄G₃ 与向日葵分离物也无结合反应。

(四) 杂交瘤抗体 Ig 类型鉴定

用免疫双扩散法得知 A₄H₄、C₇H₃、C₇D₂、A₂E₄ 培养物浓缩上清液均与标准的

表 4 用间接 ELISA 测定单克隆抗体与 CMV 组一些成员的结合反应(以 A₄₉₀ 表示)
Table 4 The binding ability of monoclonal antibodies to CMV isolates by indirect ELISA

病毒 Virus	单克隆抗体 McAb	A ₂ E ₄	C ₇ H ₃	A ₄ H ₄	G ₄ H ₃	G ₄ G ₃	SP2/0
SS-30		>2.5	>2.5	>2.5	1.12	1.22	0.20
P		>2.5	>2.5	>2.5	1.22	1.48	0.30
黄化 Yellow		1.26	>2.5	>2.5	1.64	1.23	0.14
日本 Japan		>2.5	>2.5	>2.5	1.24	0.80	0.20
山东 Shan dong		>2.5	>2.5	>2.5	0.93	1.05	0.13
向日葵 Sunflower		>2.5	>2.5	>2.5	0.53	0.09	0.15
香蕉 Banana		>2.5	>2.5	>2.5	1.15	0.92	0.16
Q		>2.5	>2.5	>2.5	0.86	1.17	0.15
C ₃₉		0.45	0.56	0.47	0.71	0.45	0.06
花生矮化 PSV		0.10	0.12	0.10	0.06	0.05	0.05

兔抗小鼠 IgG₁ 和 IgK 轻链血清产生一条细而明显的沉淀线。G₄H₃ 和 G₄G₃ 培养物浓缩上清液与标准的兔抗小鼠 IgG_{2a} 和 IgK 轻链血清产生一条细而明显的沉淀线。而 SP2/0 培养物浓缩上清液与任

何一种标准抗血清无沉淀线产生。我们得到的单克隆抗体分属 IgG₁ 和 IgG_{2a} 亚类, 并都属于 IgK 轻链。

(五) 单克隆抗体亲和力常数测定

设 A₀ 为无抗原时的抗体吸光度值; A

为加入克分子浓度为 a_0 抗原后的抗体吸光度值； K 为亲和力常数的倒数，按公式 $\frac{A_0}{A_0 - A} = 1 + \frac{K}{a_0}$ 可以计算出亲和力常数(表 5)。第 1、2 两次实验抗原是 500 $\mu\text{g/ml}$ CMV-P，第 3 次实验抗原是 100 $\mu\text{g/ml}$ CMV-P。虽所用病毒浓度不同，但都表明 A_2H_1 亲和力比 C_7H_1 和 A_2E_6 大。为避免因加入病毒抗原由非特异性吸附造成吸光度值降低，曾加入 500 $\mu\text{g/ml}$ 不相关抗原 TMV 作为对照， A_2H_1 的吸光度值变化甚微，非特异性吸附可忽略不计。

(六) 抗原决定簇的识别

沈培奋等人^[13]指出了测定两个单克隆抗体是否抗同一抗原决定簇，如果在双抗体系统中用酶标记的第二抗体来指示两个单克隆抗体对抗原决定簇有无竞争性，就可以直接利用商品化的酶标第二抗体进行测定，但必须先测定抗体的饱和曲线。我们参考该方法，以该饱和浓度(1:10 稀释度)单独或成对与包被在聚苯乙烯板上的 5 $\mu\text{g/ml}$ 抗原病毒 CMV-P 反应，与抗原结合的抗体数以酶标第二抗体来定量。如果两个抗体抗不同的抗原决定簇，则结合

表 5 单克隆抗体的亲和力常数
Table 5 Affinity constant of McAb

实验次数 No. of experiment	单克隆抗体 McAb	$A_{0.490}$	A_{490}	亲和力常数 (L/mol) Affinity constant
1	C_7H_1	1.67	1.46	2×10^6
	A_2H_1	1.61	1.21	4×10^6
	A_2E_6	1.65	1.45	2×10^6
2	C_7H_1	1.84	1.43	3×10^6
	A_2H_1	1.75	1.23	5×10^6
3	C_7H_1	1.84	1.73	4×10^6
	A_2H_1	1.75	1.54	8×10^6

表 6 四个单克隆抗体的加成指数
Table 6 Additivity index of four McAbs

单克隆抗体 McAb	C_7H_1	A_2H_1	G_4G_1	G_4H_1
C_7H_1	—	0	49	52
A_2H_1		—	47	62
G_4G_1			—	0
G_4H_1				—

酶标第二抗体的量等于两个单克隆抗体单独结合之和；当两个单克隆抗体同时结合到抗原上则得到的 490nm 吸光度值 A_{1+2} 等于 $A_1 + A_2$ ，加成指数 $A.I \sim 100\%$ ，表明两个抗体所抗的是不同的抗原决定簇。相反当两个单克隆抗体识别同一个抗原决定簇时， $A_{1+2} = A_1$ 或 A_2 ，加成指数 $A.I \sim$

0%。 $A.I = \left(\frac{2A_{1+2}}{A_1 + A_2} - 1 \right) \times 100$ ， A_1 ：

在结合试验中单独加单克隆抗体 1 得到的 490nm 吸光度值。 A_2 ：在结合试验中单独加单克隆抗体 2 得到的 490nm 吸光度值。 A_{1+2} ：在结合试验中同时加单克隆抗体 1 和 2 得到的 490nm 吸光度值。实际测定

时由于操作误差,两个单克隆抗体与抗原结合时的空间位阻等原因,A.I.值在0—100%之间。当 $A.I. < 20\%$ 时,表明两个抗体抗同一抗原决定簇或它们所抗的抗原决定簇非常接近。当 $A.I. > 50\%$ 时,则两个抗体所抗的抗原决定簇相距较远。表6展示 C_7H_3 等四个单克隆抗体的加成指数,表明 C_7H_3 与 A_6H_4 , G_4G_8 与 G_4H_3 为抗同一抗原决定簇的单克隆抗体。 C_7H_3 、 A_6H_4 与 G_4G_8 、 G_4H_3 所抗的抗原决定簇相距较远。

讨 论

电融合技术与传统融合方法比较其优点是技术简单易行、快速、无外加物质,没有化学修饰的可能,细胞融合率高,不需要细胞表面特异性受体。但一般认为电融合后的细胞不易生长,而使用BAEKON 2000选择合适的参数,获得杂交瘤也是容易的,而且融合后数天就能出现杂交瘤克隆,10天就能检测其阳性孔,其速度与用PEG作融合剂相当。这种电融合与Zimmermann方法相比不需要用蛋白酶来处理动物细胞。高压电脉冲产生空气及液体放电, T_A 使细胞膜产生小孔, T_R 则使细胞膜小孔回复以减少对细胞的损伤,在细胞膜产生小孔的瞬间,细胞间随机地进行核物质的交流以实现细胞融合。Lo等人曾描述借助抗生物素-生物素系统的电融合技术,在融合后的第六周,72孔中有31孔生长杂交瘤(43%);另一份实验中,144孔中有11孔杂交瘤生长(7.6%)。相比之下BAEKON 2000基因转移仪的电融合技术更好一些。

PSV与CMV有较远的血清学关系,CMV的cDNA探针与PSV核酸也不易杂交,PSV与CMV核酸的同源性很低,本文得到的单克隆抗体均与PSV无交叉

反应,似乎也支持这两种病毒亲缘关系较远的观点。

本文描述的单克隆抗体与谷登峰等人^[14]报道的抗CMV单克隆抗体相比,其小鼠Ig类型不同,而且与CMV不同分离物结合反应相差较大,他们得到的单克隆抗体仅与CMV-Q、CMV-p和CMV-B有结合反应,而本文报道的能与CMV的9个分离物有结合反应。从诊断学意义来看,有更大的应用价值。此外,得到了抗不同抗原决定簇的单克隆抗体,为建立双单克隆抗体夹心法检测CMV提供了先决条件。

本文尝试了用间接ELISA进行单克隆抗体亲和力常数的测定,当制备单克隆抗体用来做亲和层析,那么融合后就可以利用此法快速及时筛选出能适合做亲和层析的单克隆抗体。

采用了简易、有效的标准稀释法来克隆杂交瘤,不必计数细胞,只用一支滴管几分钟就能完成一个阳性孔杂交瘤的克隆化,大大节省了人力和物力,而且效率高。一个阳性孔经稀释后分配到一块96孔板,含单克隆孔的出现率均在25/95、31/95或26/95左右。比计数时做的有限稀释更有把握。

参 考 文 献

- [1] Köhler, G. et al.: *Nature*, **265**: 495, 1975.
- [2] Zimmermann, U. et al.: Sixth Int Biophys Cong. Kyoto Abstr, **IV**, 19(H), 140, 1978.
- [3] Berg, H.: *Stud. Biophys.*, **90**: 169, 1982.
- [4] Zimmermann, U.: *Biochem. Biophys. Acta*, **634**: 227, 1982.
- [5] Lo, M. M. S. et al.: *Nature*, **310**: 792, 1984.
- [6] Karsten, U. et al.: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **21**: 733, 1985.
- [7] Abel, H. et al.: *Acta Biotechnol.*, **6**: 287, 1986.
- [8] Lot, H. et al.: *Ann. Phytopathol.*, **4**: 25, 1972.
- [9] 蔡文启等: 生物工程学报, **1**: 34, 1985.
- [10] Mermaugh, R. L. et al.: *Biotechnology Tech-*

- niques*, 1: 31, 1987.
- [11] Galfre, G. et al.: *Methods in Enzymology*, 73: 3, 1981.
- [12] Friguet, B. et al.: *J Immunol. Meth.*, 77, 305, 1987.
- [13] 沈倍奋等: *生物化学杂志*, 3: 463, 1987.
- [14] 谷登峰等: *微生物学报*, 27: 128, 1987.

CMV SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCTION BY ELECTROFUSION

Cai Wenqi Wang Rong Qin Bingyi

Ma Shunfu Tian Bo

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Zhang Chengliang Cheng Jing Ji Liang

(*Experimental Institute of Plant Quarantine, Ministry of Agriculture, Husbandry and Fishery, Beijing*)

Six hybridomas stably producing high titer monoclonal antibodies against CMV have been derived from electrofusion the spleen cells of CMV-ss-30 and CMV-p immunized BALB/c mice with SP2/0 using BAEKON 2000 Advanced Gene Transfer System. Then they were cloned by 2—3 times of simple, efficient, standard-dilution. The monoclonal antibodies were of IgG₁ and IgG_{2a} subclass. Their specificities were determined by indirect ELISA and show quite strong binding ability against ss-30, p, yellow, Japan, Shandong, banana, sunflower and Q isolates of

CMV. The lower binding ability was observed with C₃₀ isolate of CMV. They were not reacted at all with PSV. The affinity constant and additivity index of monoclonal antibodies have been determined by indirect ELISA. The C₇H₃ and A₆H₁, G₄G₃ and G₄H₅ have same determinant. The C₇H₃, A₆H₁ and G₄G₃, G₄H₅ might recognized different determinant.

Key words

CMV; Electrofusion; Monoclonal antibodies