

小鼠杂交瘤细胞系的建立及抗兔 IgG 单克隆抗体的应用

王远程 郭 军 蔡少华

(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京)

经三次免疫一次细胞融合, 得到分泌抗兔 IgG 的杂交瘤细胞克隆 27 个。细胞融合率 100%, 阳性孔率 4%。经筛选和克隆化培养建立了杂交瘤细胞系 3C8E4 和 6A3H6, 其免疫球蛋白分别为 IgG2a 和 IgG3。3C8E4 腹水抗体滴度超过 1:1024000。3C8E4 除和兔 IgG 有反应外, 还和人与马 IgG 有反应; 6A3H6 只和兔 IgG 有反应, 与其它七种动物和人 IgG 无交叉反应。经用过碘酸盐法将 3C8E4 MAb 和辣根过氧化物酶标记, 制得酶标抗体, 当使用浓度为 1:10000 时, 其 OD>2.0。用该酶标记抗体 ELISA 法检测植物病毒 PVX、PVY、TEV 和 TuMV 效果良好。

关键词 杂交瘤; 单克隆抗体 (MAb); 兔 IgG

在动植物病原研究领域广泛应用兔抗血清和抗兔 IgG 的酶标抗体, 但目前多为羊抗兔 IgG 的抗血清, 这种抗血清的制备要求以高纯度的兔 IgG 为抗原, 而所得抗血清滴度又取决于免疫效果、所用动物免疫反应、免疫方法等许多因素。而应用单克隆抗体可以弥补这些不足。因此抗兔 IgG 的单克隆抗体的研制有重要的应用价值。到目前为止国内外未检索到类似报道。

材 料 和 方 法

(一) 材料

实验用兔和 BALB/c 小鼠购自于中国医学科学院实验动物研究所。SP2/O-Ag-14 骨髓瘤细胞系和用于交叉反应的各种动物血清由中国兽医药品监察所惠赠。辣根过氧化物酶由中国科学院上海生化研究所东风试剂厂出品 (批号为 8804092)。人血清由北京市海淀区医院化验室提供 (一级化验室)。羊抗人 IgG、IgM 血清和羊抗兔 IgG 抗血清由卫生部北京生物

制品研究所生产。植物病毒和兔抗血清由本院蔬菜研究所惠赠。

(二) 实验方法

1. 兔 IgG 的纯化: 取健康兔血清参照文献[1]纯化。
2. 免疫参照文献[2]进行。
3. 骨髓瘤细胞的培养、细胞融合、阳性克隆的筛选、细胞克隆化、冻存和复苏、腹水抗体的制备参照文献[3]进行。
4. 单克隆抗体亚类的测定: 用美国 Litton Bionetics Inc. 的兔抗鼠 Ig 亚类和培养上清浓缩(20:1)液做琼脂双扩散。琼脂糖浓度为 0.6%。
5. 交叉反应: 琼脂双扩散中琼脂糖浓度为 0.6%, 加 3% PEG6000。
6. 封闭试验: 包被人和兔 IgG, 加羊抗人 IgG、羊抗人 IgM、羊抗兔 IgG 抗血清, 加 3C8E4 酶标鼠抗兔单克隆抗体 (本

本文于 1990 年 6 月 8 日收到。

本文实验得到本院蔬菜研究所冯兰香、田如燕、刘佳等同志和中国兽医药品监察所王在石同志大力协助, 在此一并致谢。

实验制备),加底物。

7. 单克隆抗体的纯化: 用硫酸铵沉淀及葡聚糖凝胶 G-200 柱进行纯化^[4]。单抗与辣根过氧化物酶交联参照文献^[5]的方法进行。

8. 酶标抗体的冻融、冻干实验: 取酶标抗体四份, 每份 0.5ml, 于 -60℃ 冰箱和室温分别反复冰融 3、6、9 和 12 次, 用 ELISA 法测定滴度。冻干实验在四种情况下进行: 即酶标抗体分别溶于 PBS、PBS + 牛血清、蒸馏水、蒸馏水 + 牛血清中进行冻干, 以比较在什么条件下冻干对酶标抗体活性影响最小。

9. 酶标抗体的应用实验: 用间接 ELISA 法检测植物病毒: 马铃薯 X 病毒 (PVX)、马铃薯 Y 病毒 (PVY)、芜菁花叶病毒 (TuMV) 和烟草蚀纹病毒 (TEV), 方法参照文献^[6]的方法。

10. 文中所有 ELISA 法均用 OD₄₉₂ 表示。

结 果

(一) 细胞融合率和阳性孔率

细胞融合后分配于七块 96 孔板中。融合率为 100%。共得阳性克隆 27 个, 阳性率为 4%。

(二) 交叉反应和 MAb 的免疫球蛋白类型测定

经克隆化所得细胞系四个。选择其中两个 (3C8E4 和 6A3H6) 用于与人、马、牛、羊、猪、狗、鸡、鸭、兔等做免疫双扩散和 ELISA, 结果见图 1 和表 1。3C8E4 除和兔 IgG 有反应外, 还与人和马 IgG 有交叉反应, 6A3H6 只与兔 IgG 产生特异性反应。经测定杂交瘤细胞系 3C8E4 的免疫球蛋白为 IgG2a, 6A3H6 为 IgG3。

表 1 MAb 的交叉反应和 Ig 亚类

Table 1 Cross reaction and Ig subclass of MAb

方法 Method	单抗 MAb	IgG	人 Human	牛 Cattle	马 Horse	猪 Pig	羊 Sheep	狗 Dog	鸡 Chicken	鸭 Duck	兔 Rabbit	Ig 亚类 Ig subclass
琼脂扩散 Gel diffuse	3C8E4	+++	—	+++	—	—	—	—	—	—	+++	IgG1a
	6A3H6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	IgG3
ELISA	3C8E4	+++	0.00	+++	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	+++	
	6A3H6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	+++	

+++; OD 值超过 2.0.

OD is over 2.0.

(三) MAb 滴度及硫酸铵沉淀对 MAb 的影响

结果见表 2。3C8E4 上清液滴度为

1:10240, 腹水抗体滴度高达 1:1024000。两次硫酸铵沉淀使 3C8E4 腹水抗体滴度下降 8—10 倍。

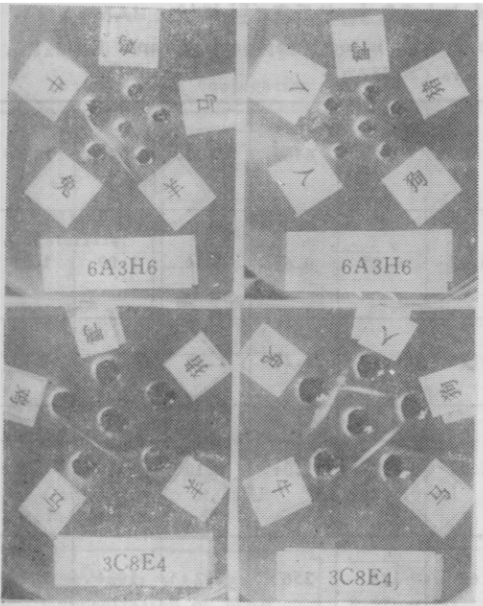


图1 琼脂糖双扩散法测定 MAb 3C8E4 和 6A3H6 与八种动物血清及人血清的交叉反应

Fig. 1 The cross reactions of MAb 3C8E4 and 6A3H6 to eight animals and human IgG by using jel diffuse

(四) 封闭试验

表 2 MAb 3C3E4、6A3H6 的滴度测定和硫酸铵沉淀对 3C8E4 的影响 (ELISA)

Table 2 Titers of MAb 3C8E4 6A3H6 and effect of precipitation in ammonium sulfate on MAb-3C8E4 (ELISA)

腹水 Ascites	滴度 ×1000 Titer	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
	3C8E4	***	***	***	***	***	***	1.56	1.06	0.63	0.36	0.20
	*	***	***	***	***	1.52	0.86	0.48	0.23	0.11	0.06	0.03
	6A3H6	***	***	***	1.48	1.21	0.99	0.46	0.27	0.10	0.04	0.00
上清 Supernatant	滴度 ×10 Titer	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
	3C8E4	0.70	0.68	0.65	0.67	0.67	0.67	0.41	0.41	0.41	0.28	0.12
	6A3H6	0.66	0.60	0.52	0.41	0.38	0.32	0.31	0.25	0.06	0.06	0.02

*: 3C8E4 腹水经两次硫酸沉淀。

Two times precipitating 3C8E4 ascites in ammonium sulfate.

从表 3 可以看出人 IgG 和兔 IgG 与 3C8E4 的结合可以被羊抗人IgG 和羊抗兔 IgG 抗血清阻断。而羊抗人 IgM 血清则不能阻断 3C8E4 和人 IgG 的结合。

(五) 3C8E4 腹水抗体的纯化及酶 标 记 结 果

从表 4 可见,5ml 腹水经两次 40% 硫酸铵沉淀和葡聚糖凝胶 G-200 柱纯化后共得 IgG 29.5ml。其平均产量为 5.9mg IgG/ml 腹水。标记后总产量为 25ml。直接 ELISA 法检测其滴度为 1:409600,使用浓度为 1:1000 时,其 OD 值大于 2.0,酶标交联反应产物用葡聚糖G-200 柱分离纯化,其洗脱图和纯化后收集产物的扫描图见图 2。从图 2-A 可见 OD₂₈₀ 和 OD₄₀₃ 曲线的主峰完全重合,说明标记成功。在洗到 50—60ml 时 (OD₄₀₃) 又出现一个小峰这是游离酶分子的峰,表明尚有小部分酶没参与交联反应。从图 2-B 可见标记产物的两个峰正好和 IgG 的 280nm 处的吸

表 3 用羊抗人和兔 Ig 血清封闭 3C8E4 与人或兔 Ig 的反应 (ELISA)
Table 3 Blocking human IgG and rabbit IgG by using sheep anti-human IgG and rabbit IgG sera (ELISA)

包被人血清1:1000 Coating human IgG	封闭稀释 Blocking dilution	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
	羊抗人 IgG 血清 Sheep α human IgG serum	0.12	0.05	0.00	0.02	0.25	0.68	0.94	1.09	1.08
	羊血清 Sheep serum	1.24	1.25	1.25	1.16	1.16	1.27	1.25	1.15	1.13
	羊抗人 IgM 血清 Sheep α human IgM serum	1.02	1.07	1.06	1.14	1.07	1.04	1.10	1.16	1.18
包被兔 IgG 2.5 μ g/ml Coating rabbit IgG	封闭稀释 Blocking dilution	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
	羊抗兔 IgG 血清 Sheep α rabbit IgG serum	0.00	0.00	0.00	0.06	0.16	0.41	0.64	0.97	1.03
	羊血清 Sheep serum	1.02	1.07	1.06	1.14	1.07	1.04	1.10	1.16	1.18

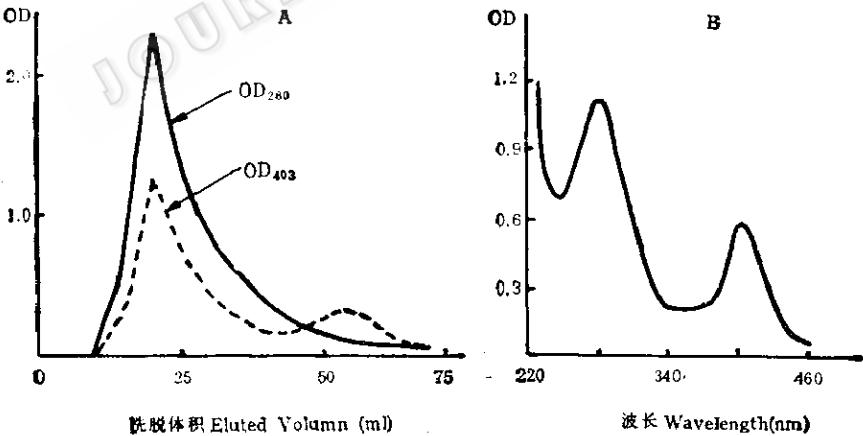


图 2-A. 酶标抗体 3C8E4 的葡聚糖凝胶 G-200 柱 (5cm² × 25cm) 层析
2-B. 合并 10-35ml 之后的波长扫描图

Fig. 2 A. The chromatography of 3C8E4 conjugate on Sephadex G-200 column (5cm² × 25cm)
B. A scanning drawing of the 10ml-35ml mixture of conjugate under wavelength of 220nm-460nm (Backman DU-70)

收峰和辣根过氧化物酶在 403nm 吸收峰完全吻合, 而未发现其它吸收峰。从酶结合物标记率为 55.4% 和酶/抗体克分子比为 1.98 两项指标看, 标记结果令人满意。

表 4 MAb 3C8E4 抗体纯化及酶标记结果

Table 4 The result of purification and enzyme-MAb conjugation of 3C8E4

原料 Materials	腹水 Ascites	5ml
	IgG	29.5mg
	酶 Enzyme HRP	16.0mg
产量 Yield		25.0ml
结合物中酶浓度 Concentration of HRP in conjugate		0.23mg/ml
结合物中 MAb 浓度 Concentration of MAb in conjugate		0.47mg/ml
酶/抗体克分子比 Enzyme/MAb in molarity		1.98
酶结合物标记率 Conjugation rate		55.4%
ELISA 稀释终点 Ending dilution of ELISA		1:409600

(六) 冻融冻干对酶标抗体活性的影响

从表 5 可以看出,标记抗体不加保护蛋白和不透析脱盐而直接在 PBS 中冻干会使酶标记抗体滴度有较大下降,经透析后不加保护剂滴度也略有下降,未透析加保护剂滴度也受影响,在四种处理中以透析后加保护剂的效果最好。冻融 12 次以内对酶标记抗体活性影响很小。

(七) MAb-3C8E4 酶标记抗体在植物病毒检测中的应用

ELISA 法测定结果见表 6。所测定各种植物病毒,经多次重复其 OD 值均在 1.0 以上,而健康叶片对照的 OD 值则小

于 0.5。可见其应用效果良好。经中国农业科学院蔬菜花卉研究所、中国科学院微生物研究所和上海农业科学院园艺研究所等单位试用后反应良好。

讨 论

免疫和检测所用的兔 IgG 是用 DEAE 纤维素 G-52 柱层析分离纯化的,难免在 IgG 中存在少量杂蛋白,为确保杂交瘤所分泌的抗体是针对 IgG 的,所以我们采用了以下方法排除杂蛋白的干扰。(一)包括两种方法:(1)在以 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞克隆时,先包被兔抗血清,再加 MAb,再加酶标二抗,最后加底物;(2)先包被植物病毒,依次是兔抗病毒血清、MAb、羊抗鼠酶标二抗、最后加底物。如果 MAb 是针对杂蛋白的,则会在第二种方法测定时滴度下降,从而被淘汰。(二)加设阴性对照:用抗两种以上不同抗原的兔免疫血清做交叉测定。方法如下:包被抗原 A、B 和 C 于一块 ELISA 反应板上,分别加相应的和不同的兔抗 A、B 和 C 的兔抗血清,用这种板来测定 MAb 的反应,如果该 MAb 对抗原和兔抗血清不同组为阴性反应,而对抗原抗体相应组滴度很高,则说明该 MAb 是对兔 IgG 的,并予以保留。如对抗原抗体不同组和相同组的结果一样,则将其淘汰。此外用羊抗兔 IgG 血清能否阻断 MAb 与兔 IgG 的结合也说明该 MAb 是否为针对兔 IgG 的。

在封闭试验中有一现象:即用羊抗人 IgG 封闭 3C8E4 对人 IgG 的反应时,所用羊抗人 IgG 浓度高于 1:200 时,则反而不能完全被封闭,会产生弱的阳性反应,而用浓度在 1:400—1:1600 时,则可完全封闭,超过 1:1600 时又出现阳性反应。这可能是由于羊 IgG 与人 IgG 结合之后发

表 5 冻融和冻干对酶标 MAb-3C8E4 的影响

Table 5 Effect of freezing and thawing and freeze-drying on MAb-3C8E4 conjugate

Item 项目		滴度 Titer	OD ₄₉₂						
冻融次数 Times of freezing and thawing	稀释×100 Dilution		128	256	512	1024	2048	4096	8192
	未冻融 No freezing and thawing		***	1.59	0.84	0.47	0.22	0.12	0.05
	三次 Three times		***	1.58	0.90	0.50	0.25	0.13	0.05
	六次 Six times		***	1.60	0.87	0.46	0.23	0.10	0.04
	九次 Nine times		***	1.59	0.86	0.44	0.21	0.10	0.04
	十二次 Twelve times		***	1.58	0.84	0.43	0.20	0.10	0.03
冻干 Freeze-drying	稀释×100 Dilution		128	256	512	1024	2048	4096	8192
	1	未冻干 No freeze-drying	***	1.59	0.89	0.40	0.21	0.09	0.05
		冻干 Freeze-drying	0.87	0.46	0.24	0.14	0.06	0.02	0.00
		*	***	1.36	0.68	0.40	0.19	0.09	0.04
	2	未冻干 No freeze drying	***	1.58	0.69	0.35	0.19	0.11	0.07
		冻干 Freeze-drying	***	1.26	0.66	0.36	0.17	0.10	0.04
		*	***	1.44	0.71	0.46	0.21	0.15	0.06

1.酶标抗体在 PBS 缓冲液中 Conjugate in PBS buffer

2.酶标抗体对蒸馏水透析 24 小时 Conjugate was dialysed in dd water for 24 h

* 100μl 样品+100μl 牛血清冻干 Freeze-drying of 100μl sample + 100μl cattle serum

表 6 用酶标抗体 3C8E4 检测植物病毒*

Table 6 Detection of the viruses by using 3C8E4-Conjugate

病毒和健叶 Viruses and healthy leave	PVX		PVY		TEV		TuMV	
	V	H	V	H	V	H	V	H
OD ₄₉₂	1.28	0.27	1.44	0.09	1.40	0.03	1.45	0.18

* PVX:马铃薯X病毒 Potato virus X

PVY:马铃薯Y病毒 Potato virus Y

TEV:烟草蚀纹病毒 Tobacco etch virus

TuMV:芜菁花叶病毒 Turnip mosaic virus

V:病毒 Virus; H:健康叶片 Healthy Leave

生某种变化,或是大量的羊 IgG 结合上去之后产生的对兔 IgG 的非特异性吸附所致。

从交叉反应可以推断,在人、马和兔的 IgG 之间存在着共同的抗原决定簇。在做 MAb 与其它动物 IgG 和人 IgG 的交叉反应时,琼脂糖凝胶中所用 PEG 浓度和分子量很重要。当不加 PEG 和加 PEG 4000(1.5%) 均不产生沉淀线,只有在琼脂糖中加 PEG 6000 3% 时才会出现沉淀线。

在冻干 MAb 酶标抗体时如果不用蒸馏水透析或不加保护蛋白都会使其滴度下降,特别是在 PBS 中,由于冻干过程中盐

浓度越来越高,最后冻干物已是抗体和盐的混合物,所以滴度会有较大下降。

参 考 文 献

- [1] 朱培坤: 免疫酶技术,第 43 页;第 232 页,科学出版社,北京,1983 年。
- [2] 肖小文等: 生物工程学报, 5(2): 108—112, 1989。
- [3] Zola, H.: Monoclonal antibodies a manual of techniques, p. 23—59, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 1987.
- [4] 林卓坤: 色谱法(一), 第 67—75 页,科学出版社,北京,1982 年。
- [5] 蒋成淦: 酶免疫测定法,第 40—46 页,人民卫生出版社,北京,1984 年。
- [6] 梁训生等: 植物病毒血清学技术, 第 209—222 页,农业出版社,北京,1985 年。

ESTABLISHMENT OF HYBRIDOMA CELL LINES SECRETING MONOCLONAL ANTIBODIES (MAb) AGAINST RABBIT IgG AND ITS APPLICATION

Wang Yuancheng Guo Jun Cai Saohua

(Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

BALB/c mouse was immunized three times and cell fusion was performed between splenocytes of the mice and Sp2/O-Ag-14 myeloma cells after 72 hours of last immunization. Fusion rate was 100% and specific positive rate of rabbit IgG was 4%, twenty-seven specific positive clones of rabbit IgG were obtained. Cell lines 3C8E4 and 6A3H6 were established in four cloning hybridomas. The immunoglobulins of MAb-3C8E4 and MAb-6A3H6 are IgG2a and IgG3 respectively. Ascites titer of 3C8E4 was over 1:1024000. Besides rabbit IgG, 3C8E4 has cross reactions with human IgG and horse IgG in eight animals and human, 6A3H6

can only react with rabbit IgG. MAb-3C8E4 was conjugated with horseradish peroxidase (HRP) by using improved sodium periodate method. The conjugate titer was over 1:40000, the O.D. value was over 2.0 when the dilution was 1:10000. It gives a good result when using ELISA method to detect plant viruses PVX, PVY, TEV, TuMV by using the conjugate.

Key words

Hybridoma; Monoclonal antibodies; Rabbit IgG