

草鱼生长激素单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立及鉴定*

杨 峰¹ 陈松林² 樊 震¹ 贺 路² 王远程¹

(¹ 中国农业科学院生物技术研究中心 北京 100081)

(² 中国水产科学研究院长江水产研究所 沙市 434000)

摘 要 用经草鱼生长激素(gcGH)免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞(Sp2/0-Ag14)融合,经 3 次克隆化培养和 ELISA 筛选,得到 7 株阳性杂交瘤细胞株,其中 2 株为强阳性。交叉试验表明,这些杂交瘤细胞株所分泌的单克隆抗体(McAb)同大鳞大马哈鱼生长激素(sGH)、大鳞大马哈鱼促性腺激素(sGTH)及牛生长激素(bGH)均不起反应。小鼠腹水 McAbs 滴度高达 1:1280000。受体-gcGH-McAb 夹心试验表明,McAb 确与有活性的 gcGH 有特异反应。用间接 ELISA 方法可检测到浓度为 0.125 μ g/ml 的 gcGH。

关键词 草鱼生长激素,杂交瘤,单克隆抗体

鱼类生长激素作为促进鱼类生长的最重要的因子,近年来越来越受到国内外科学家的普遍重视^[1]。科学家们正在进行鱼类生长激素基因工程方面的研究,希望能通过基因工程的方法大幅度提高鱼的产量,这就迫切需要建立鱼类生长激素快速、灵敏的检测方法。传统方法过于繁杂;同位素放射免疫方法又太昂贵、危险。现代免疫学技术的发展为建立快速、灵敏、准确的检测方法提供了可能,但鱼生长激素体内含量微少、提纯困难、纯化成本高昂,多抗血清显然不太适用。为此,我们选用我国四大淡水鱼类之一的草鱼作为研究对象,着手建立了草鱼生长激素的单克隆抗体。

1 材料和方法

1.1 抗原来源

用于免疫及杂交瘤细胞筛选的草鱼生长激素的纯化参见文献[2]。激素及其受体经 HPLC 测定均为单一、左右对称的峰。

1.2 免疫

取 6 周龄 BALB/c 小鼠,第一次用福氏完全佐剂乳化后皮下多点注射,第二次和第三次免疫采用福氏不完全佐剂乳化后的腹腔注射,间隔均为 15d。第四次免疫为尾静脉注射,3d 后融合。每只免疫剂量均为 100 μ g。

1.3 细胞融合及抗体检测

参照文献[3]。免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 按 5:1 混合,融合剂为 45%PEG(MW1450, Sigma)。抗体检测和阳性杂交瘤细胞克隆化的筛选

* 本研究为国家自然科学基金资助项目。

本文于 1995 年 1 月 15 日收到。

用间接 ELISA 方法。辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG 结合物为军事医学科学院微生物流行病学研究所研制,使用浓度为 1:1000。

1.4 细胞克隆化培养

参照文献[4]。采用有限稀释法克隆化三次以上。

1.5 McAb 的特异性鉴定

以间接 ELISA 方法分别检测 McAb 与大鳞大马哈鱼生长激素(sGH)^[5]、大鳞大马哈鱼促性腺激素(sGTH)^[6]及牛生长激素(bGH, NIH 提供)之间的反应情况。

1.6 腹水 McAb 制备

参照文献[7]。BALB/c 小鼠在注射杂交瘤细胞前一周,每只注射 0.5ml Pristane,杂交瘤细胞注射量为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 细胞/只。

1.7 Ig 类型和亚类的测定

以琼脂双扩散法,用兔抗鼠 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 标准血清(Sigma)测定经 20 倍浓缩的杂交瘤细胞培养上清液中 McAb 的 Ig 类型和亚类。

1.8 互补试验

用间接 ELISA 方法测定两种 McAb 单独存在和等体积混合后呈相同显色强度时的稀释度。详见文献[8]。

1.9 McAb 的纯化

腹水 McAb 经 50%、40%和 33%三次硫酸铵沉淀后,用 Sephadex G-200 柱层析纯化。纯化 McAb 用 SDS-PAGE 检验纯度。

1.10 McAb 初步应用

1.10.1 间接 ELISA 方法:以倍比稀释包被 gcGH,与不同浓度的 McAb 反应,观察反应情况。

1.10.2 受体-gcGH-McAb 夹心 ELISA 法:包被受体分别为 1:20、1:100 稀释并加热处理,以不同浓度的 gcGH 与之反应,最后用 McAb 和酶标抗体检测反应情况。

2 结果

2.1 细胞融合

167 个被测克隆中有 19 个为阳性,阳性率 11.4%。其中强阳性克隆 2 个,1D2B9 和 3E8A5;中等强度阳性克隆 5 个,1C1A4、1A2E6、2E5H8、2G10F3 和 3B11D7。

2.2 杂交瘤细胞系特异性鉴定

上述 7 种杂交瘤细胞系所分泌的 McAbs 均不与牛生长激素、大马哈鱼生长激素、大马哈鱼促性腺激素起交叉反应(表 1)。

2.3 杂交瘤细胞系的传代培养及冻存稳定性

上述杂交瘤细胞系在 3 次克隆化后,经细胞传代培养 20 代以上,液氮冻存半年后仍能稳定分泌 McAbs,抗体滴度无明显下降。

2.4 腹水 McAbs 滴度

结果见表 2。

2.5 杂交瘤细胞系 1D2B9 和 3E8A5 所分泌抗体的 Ig 类型和亚类的测定

经测定杂交瘤细胞系 1D2B9 和 3E8A5 的抗体类型均为 IgG2b。

表 1 单克隆抗体特性鉴定

Table 1 The determination of MaAbs' specificity

激素 Hormone	杂交瘤细胞株 Hybridoma cell lines						
	1C1A4	1A2E6	1D2B9	2G10F3	2E5H8	3B11D7	3E8A5
草鱼生长激素 gcGH	+	+	++	+	+	+	++
大马哈鱼生长激素 sGH	-	-	-	-	-	-	-
大马哈鱼促性腺激素 sGTH	-	-	-	-	-	-	-
牛生长激素 bGH	-	-	-	-	-	-	-

注: ++为强阳性反应; +为中等强度阳性反应; -为阴性反应。

Note: ++ represents strong positive reaction; + represents medium positive reaction; - represents negative reaction.

表 2 杂交瘤细胞株所分泌单抗的滴度

Table 2 Titers of McAbs secreted by hybridomas

杂交瘤细胞株 Hybridomas	单抗的滴度 Titers of McAbs	
	腹 水 Ascitic fluids	杂交瘤培养上清 Supernatant of cultured hybridomas
1C1A4	1 : 320000	1 : 640
1A2E6	1 : 320000	1 : 640
1D2B9	1 : 1280000	1 : 2560
2G10F3	1 : 640000	1 : 1280
2E5H8	1 : 320000	1 : 640
3B11D7	1 : 640000	1 : 1280
3E8A5	1 : 1280000	1 : 2560

2.6 杂交瘤细胞系 1D2B9 和 3E8A5 抗体互补试验

两种 McAb 混合液的稀释度与单独的 McAb 液稀释度相近,说明互补效果不显著,抗原识别位点差异不大。

2.7 纯化抗体的电泳分析

按材料方法纯化 McAb,纯化后的 McAb 在 SDS-PAGE 中呈现两条带,经分子量测定证明分别是抗体分子解离后的重链和轻链(图 1)。

2.8 McAb 的初步应用

2.8.1 间接 ELISA 方法:从图 2 中三条曲线的比较可以看出,腹水 McAb 按 1 : 10000 ~ 20000 的使用浓度稀释可以获得良好的检测结果。而且,gcGH 抗原浓度在 0.0625 ~ 0.25μg / ml 之间时抗原浓度与 492nm 处吸光值基本呈线性关系,这就为用 ELISA 方法

定量分析 gcGH 提供了可能。

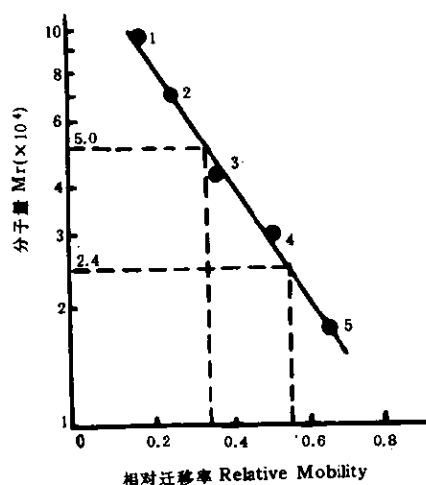


图 1 纯化 McAb 的分子量

Fig.1 Molecular weight of purified McAb

1. Phosphorylase b (94 000);
2. Albumin (67 000);
3. Actin (43 000);
4. Carbonic Anhydrase (30 000);
5. TMV coat protein (17 500).

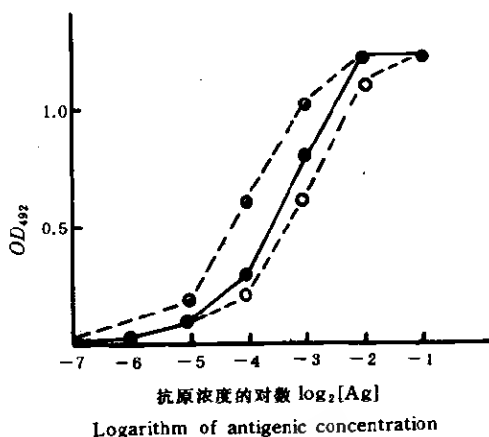


图 2 1D2B9 间接 ELISA 方法检测 gcGH

1D2B9 的稀释度分别为 1 : 1000(●);

1 : 10000(·); 1 : 20000(○).

Fig.2 Detection of gcGH with 1D2B9

by indirect-ELISA

The dilutions of 1D2B9 are 1 : 1000(●);

1 : 10000(·); 1 : 20000(○).

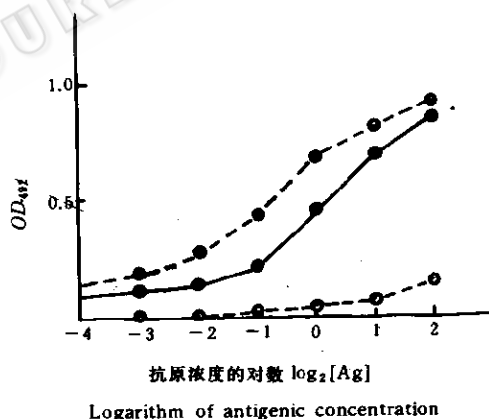


图 3 受体-gcGH-McAb 夹心 ELISA

包被受体 1 : 20(●); 1 : 100(·); 加热失活处理(○).

Fig.3 Test of receptor-gcGH-McAb sandwich-ELISA

Coating receptor 1 : 20(●); 1 : 100(·); Heat treatment(○).

2.8.2 受体-gcGH-McAb 夹心 ELISA 方法: 从图 3 中可见, 当受体以 1 : 20 或 1 : 100 稀释后包被, 光吸收值随 gcGH 浓度增加而均有明显增长, 而加热失活的受体则无此现

象。这说明与 McAb 有反应的 gcGH 是能与受体结合的,是有活性的 gcGH。另外,从受体不同包被浓度的比较中可以看出,受体包被浓度越高,曲线越向左位移,说明检测灵敏度提高(图 3)。

3 讨论

长期以来,人们对激素的定量研究一直采用放射免疫和生物活性测定的方法。前者最大的优点在于灵敏度高,可以达到一般化学分析测不到的 $10^{-14} \sim 10^{-15}$ g,但由于强的放射性同位素射线对人体有伤害,因此,在进行实验时要求一定的设备条件,实验操作也较一般生化实验复杂。后者的测定结果直观、准确,但灵敏度不及前者。同时,两种方法都对设备有较高的要求,操作繁杂,不利于大量样品的测定。

草鱼生长激素单克隆抗体的制备为人们使用血清学技术定量研究草鱼生长激素提供了可能。酶联免疫方法不仅具有较高的灵敏度,能够检测到 $10^{-9} \sim 10^{-8}$ g,符合体液循环水平激素测定的要求,而且,该方法最大的优点是简便、快速,可以测定大量的样品,弥补了放射免疫和生物活性测定方法的不足。当然,酶联免疫方法与放射免疫和生物活性方法测定结果的一致性,还有待于进一步的证实。

应用酶联免疫方法最关键的步骤是确证选用的 McAb 是特异性针对草鱼生长激素。为此,我们不仅选用了几种 HPLC 纯化的激素作特异性鉴定,而且利用高度纯化的激素受体,通过激素-受体之间的特异性结合关系,进一步证实所制备的单抗确实是对有活性的草鱼生长激素有特异反应的。

由于生长激素在鱼体内含量极低,所以提取非常困难,不仅步骤繁、成本高、产量低,而且纯度不高。现在可以用鱼生长激素的单克隆抗体制备成亲和层析柱,再用它来纯化生长激素,将更加经济、简便,而且产品纯度高。另外,单克隆抗体还可用在免疫组织化学方面,使垂体细胞的定位及生理生化研究更加方便有效。

参 考 文 献

- [1] 陈松林.水产学报,1992,16(1):91~100.
- [2] 陈松林.动物学报,1995,41(3):40~50.
- [3] Galfre G,Howe S C, Milstein C. *Nature*, 1977, 266:550~552.
- [4] Schreier M.Hybridoma Techniques.Basel: EMSO SKMB Course, 1980.7~36.
- [5] 陈松林.生物化学杂志,1992,8(6):656~660.
- [6] 陈松林.动物学报,1991,37(3):263~270.
- [7] Zola H.Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques.Florida: CRC Press, 1987.67~70.
- [8] 刘庆良.上海免疫学杂志,1988,8(3)231~234.

THE DEVELOPMENT AND IDENTIFICATION OF HYBRIDOMA CELL LINES SECRETING MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST GRASS-CARP GROWTH HORMONE

Yang Feng¹ Chen Songlin² Fan Zhen¹ He Lu² Wang Yuancheng¹

(¹*Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*)

(²*Changjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shashi 434000*)

Abstract Monoclonal antibodies of hybridomas derived from fusing the mouse spleenocytes immunized by gcGH with BALB / c mouse myeloma cells (Sp2 / 0-Ag14). Seven hybridomas cell lines were produced by indirect-ELISA screening and cloning for three times with limited dilution. In crossreaction test, these monoclonal antibodies didn't react with sGH, sGTH and bGH. Antibody titer of ascitic fluids was about 1 : 1280000 in indirect-ELISA. In receptor-gcGH-McAb sandwich-ELISA test, monoclonal antibodies reacted with biological-active gcGH. GcGH can be detected at the concentration of 0.125 $\mu\text{g} / \text{ml}$ in indirect-ELISA.

Key words Grass-carp growth hormone, Hybridoma, Monoclonal antibodies