

# 电融合方法建立抗结核杆菌单克隆抗体细胞株

郭明霞

(天津医科大学影像系 天津 300203)

潘最 汪和睦

(南开大学物理系 天津 300071)

**关键词** 细胞电融合, 单克隆抗体 (McAb), 分枝杆菌, ELISA

**分类号** Q93-31

目前, 结核病依然是世界性严重的传染病之一。据报道, 每年死亡人数可达 300 万<sup>[1]</sup>。尤其近年来随着 HIV 阳性人数和爱滋病患者的剧增, 以及多发耐药性结核病菌株的出现, 47%~54% 的 HIV 感染患者死于结核并发症<sup>[2]</sup>。故深入研究结核杆菌并建立快速、高效、简便的诊断方法有着重要意义。

细胞电融合技术是 80 年代中期发展起来的一种高效率融合技术。它具有过程可控、融合率高、无毒性和融合作用机制相对较清楚等优点。只要掌握细胞电融合仪的原理和技术, 摸清电融合各项参数, 即可大大提高融合效率。我们采用细胞电融合技术获得效价高、特异性强的结核分枝杆菌单克隆抗体 (McAb), 为结核病的血清学诊断提供了重要依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 分枝杆菌的培养

将分枝杆菌接种小川培养基, 37℃ 培养箱中培养。

### 1.2 抗原制备

将人型 ( $H_3Ra$ )、BCG 型、鸟型、胞内型、堪萨斯型 5 种分枝杆菌的菌液混合, 经超声粉碎仪粉碎、离心, 取上清液作为免疫抗原。

### 1.3 动物免疫

初次免疫在小鼠足掌、腋下、腹股沟三处注射。各处剂量为 100 $\mu$ l 菌液加等量不完全 Freund's 佐剂。3 周后进行第二次免疫, 每处 200 $\mu$ l 菌液。两周后再进行一次腹腔免疫, 剂量为 250 $\mu$ l。融合前 3 天, 将 200 $\mu$ l 抗原注入脾脏作为终免疫。

### 1.4 细胞融合

用本实验室自制的 BT-300 细胞电穿孔融合仪, 设置各种参数, 将一只 BALB/c 小鼠的 NS1 实体瘤细胞与一只免疫小鼠的脾细胞按 1:2 混合进行电融合。

### 1.5 抗体检测

抗体检测采用间接 ELISA 法, 前期粗筛用 5 种菌体的混合液包被检测板, 后期特异性鉴定分别采用相应的单独抗原包被。

### 1.6 分泌抗分枝杆菌 McAb 细胞株的建立

融合细胞经检测、筛选、扩大、克隆化和传代培养, 获得 22 株稳定分泌抗分枝杆菌 McAb 的阳性杂交瘤细胞株。

## 2 结果

### 2.1 最佳电融合参数的确定

参考本实验室建立的电融合标准程序<sup>[3]</sup>,初步确定细胞排队交流电场强度峰值  $E_p = 275\text{V/cm}$ , 频率  $f = 1\text{MHz}$ , 电穿孔 RC 脉冲电场幅度  $E_0 = 4.0\text{kV/cm}$ , 脉冲个数  $n = 1$ .

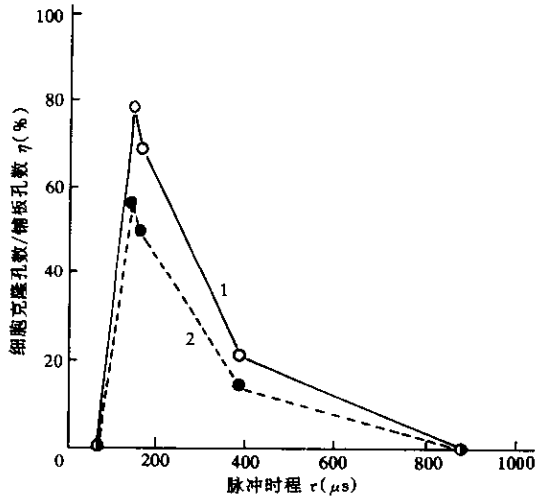


图1 RC脉冲时程及培养板对细胞融合率的影响

1. 新板; 2. 旧板.

将小鼠脾 B 淋巴细胞与 NSI 瘤细胞混合悬浮液分为 10 等份, 分别加入 10 个平行多电极小池中。每个小池设置不同的脉冲时程进行融合。融合后每个小池的细胞混合液分别铺于新旧两块培养板中培养。待杂交瘤克隆生长起来后, 统计克隆数并计算融合率。图 1 中显示出不同脉冲时程及培养板对细胞融合率的影响。

实验结果表明, 不同脉冲时程对细胞融合率影响很大。当脉冲时程  $\tau = 150\mu\text{s}$  时, 达最佳融合率  $\eta = 79\%$ 。在电融合参数完全相同情况下, 采用新的细胞培养板比旧板获得更高的融合率。在最佳电融合参数下, 一只小鼠的脾 B 淋巴细胞 ( $10^8$ ) 可产生 1750 孔杂交瘤细胞。这是一般 PEG 方法融合效率<sup>[4]</sup>的 20 倍。

### 2.2 抗分枝杆菌 McAb 特性的初步鉴定

表1 8株McAb对不同分枝杆菌特异性鉴定

McAbs	人型 分枝杆菌	BCG型 分枝杆菌	鸟型 分枝杆菌	胞内型 分枝杆菌	堪萨斯型 分枝杆菌	大肠 杆菌	混合 抗原
7G11	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
9G12	++	++	++	+	+	-	++
15E1	++	+	-	-	-	-	++
18F6	++	+	-	-	-	-	++
12F10	+	++	-	-	+++	-	+++
12B11	+	+	-	-	+++	-	++
12E6	++	+	-	-	+	-	+
14B9	+	+	-	-	-	-	+
抗人型分枝 杆菌McAb	++	+	+-	+-	+	-	++
抗BCG型分 枝杆菌McAb	++	+++	+-	+-	+-	-	++
免疫血清	++	++	++	++	++	-	+++
NS1上清液	-	-	-	-	-	-	-

注:  $OD \geq 0.80$  +++;  $0.80 > OD \geq 0.50$  ++;  $0.50 > OD \geq 0.20$  +;  $0.20 > OD \geq 0.10$  +-;  $OD < 0.10$  -。OD 为酶标仪  $OD_{450\text{nm}}$  读数。

2.2.1 McAb 与分枝杆菌的反应特异性: 取 8 株杂交瘤细胞株与不同分枝杆菌的标准株进行了 ELISA 检测。用解放军 309 医院提供的抗人型、抗 BCG 型 McAb 及小鼠免疫血清作阳性对照, NS1 细胞培养上清液作阴性对照。实验结果见表 1。

表 1 结果表明, 7G11 与几种分枝杆菌抗原都显示了强阳性反应; 12B11、12 F10 只与堪萨斯型分枝杆菌呈强阳性反应; 15E1、18F6、12E6 对人型分枝杆菌呈较强阳性反应。9G12 与不同分枝杆菌呈现

不同程度的交叉反应。

**2.2.2** 38 000 基因工程蛋白抗原反应及蛋白酶消化试验: 为鉴定 McAb 识别抗原的成份, 将上述 8 株杂交瘤细胞株分泌的抗体与 38 000 基因工程蛋白抗原进行反应, 并与经链霉蛋白酶消化的人型-PPD、BCG 型-PPD 进行反应。实验结果表明, 7G11、15E1、9G12、12E6 与 38 000 呈强阳性或较强阳性反应, 可初步判定其相应抗原是蛋白, 分子量 38 000; 18F6、14B9 的相应抗原可能是脂多糖或糖蛋白的糖基。

**2.2.3** ELISA-相加试验: 对上述 8 株细胞株进行 ELISA-相加试验, 18F6、14B9 作用于同一抗原位点, 其他各株分别作用于互不相同的抗原位点。

### 3 讨论

我们运用高效电融合技术, 摸索最佳融合条件及多种抗原混合免疫小鼠的方法, 一次获得抗不同分枝杆菌的单克隆抗体。Zimmermann<sup>[5]</sup>早期研究认为, 电穿孔脉冲宽度上限为 100 $\mu$ s, 否则将由于不可逆电击穿而发生胞溶。因而在细胞融合时, 多采用数十微秒的脉冲宽度。而我们的实验结果则表明, 在脉冲电场强度适当的情况下, 脉冲宽度小于 900 $\mu$ s 时, 都有一定的融合率, 脉冲时程  $\tau = 400\mu$ s 时, 融合率可达 21%, 故电融合最佳参数应在更大范围内选择。实验中还发现在相同电融合参数下, 不同的培养板对融合率将产生影响, 新板优于旧板。我们对其中 8 株细胞株的特异性、相应抗原成份及抗原位点作了初步研究, 为结核病的血清学诊断及分枝杆菌菌型鉴定提供了重要依据。

### 参 考 文 献

- [1] Murray C J, Styblo K, Rouillon A. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis*, 1990, 65:6~24.
- [2] Nightingale S D, Byrd L T, Southern P M *et al. Journal of Infections Diseases*, 1992, 165:1082~1085.
- [3] 谢廷栋, 汪和陆. 中国生物医学工程学报, 1989, 8(1): 25~30.
- [4] 纪其雄, 汪和陆. 生物物理学报, 1993, 9(3): 168.
- [5] Zimmermann U. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 694:227~277.

## ESTABLISHMENT OF HYBRIDOMA SECRETING ANTI-MYCOBACTERIA MONOCLONAL ANTIBODY BY USING ELECTROFUSION TECHNIQUE

Guo Mingxia

(Department of Medical Imaging, Tianjin Medical University, Tianjin 300203)

Pan Zui Wang Hemu

(Department of Physics, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract** By using the electrofusion technique, the fusion of NS1 myeloma cells with spleen cells of BALB/c mouse immunized with five species of mycobacteria was carried out. With the optimal electrofusion conditions, we obtained a high fusion efficiency of 1.75 hybrid cell clones per  $10^5$  spleen cells. ELISA was used for screening secreting antimycobacteria McAb hybrid cells. After cloning, 22 stable hybrid cells lines were selected, and 8 of them had been studied.

**Key words** Cell electrofusion, Monoclonal antibody, Mycobacteria, ELISA