

电融合技术与半固体培养技术结合 制备抗人肠道腺病毒单克隆抗体

张 云 陈力真 王树蕙 郭彩云 貌盼勇

摘要 将 1×10^7 个经肠道腺病毒(Ad40/41)免疫的小鼠脾细胞与 3×10^6 个骨髓瘤细胞进行电融合,再置 IMDM 甲基纤维素半固体选择培养基中进行选择培养,一次性得到 18 个杂交瘤细胞克隆,并从中筛选出 7 株高阳性抗体分泌克隆。从而成功地运用电融合与半固体培养相结合的方法以少量的材料制得了抗肠道腺病毒单克隆抗体。

主题词 电融合 半固体培养 肠道腺病毒 抗体,单克隆

Production of anti- enteric adenovirus monoclonal antibody by electrofusion and semi- solid medium culture

Zhang Yun, Chen Lizhen, Wang Shuhui, et al. Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005

Abstract Ten million splenocytes from the enteric adenovirus (Ad40/41) immunized mice were fused with 3×10^6 myeloma cells by electrofusion. Then, the cells were selectively cultured in methyl cellulose semi- solid medium. Eighteen clones of hybridoma were directly picked out from the culture plates and 7 of them could secrete high level specific antibodies to enteric adenovirus. So far, the anti- Ad40/41 virus monoclonal antibodies were successfully generated by the protocol of electrofusion accompanied with selective culture in methyl cellulose semi- solid medium.

Key words Electrofusion Methyl cellulose semi- solid medium Enteric adenovirus Monoclonal antibodies

Milsten 和 Kohler 于 1975 年建立了单克隆抗体(简称单抗)制备技术,普遍使用聚乙二醇(PEG)作促融剂,将骨髓瘤细胞同淋巴细胞融合成杂交瘤细胞,以产生单克隆抗体,80 年代发展起来的细胞电融合技术融合率为 $1/10^3$ ¹,但细胞数量少,在选择培养时不易达到有效生长密度。甲基纤维素 IMDM 半固体选择培养法较适宜密度小的细胞克隆生长,可一次挑出单克隆的杂交瘤细胞进行筛选,省去了有限稀释法克隆化这一步,提高了单抗制备的效率²。

肠道腺病毒(EAd40/41)是引起小儿腹泻的重要病原体之一,由其引起的发病率仅次于轮状病毒³。但在我国尚未受到足够重视,缺乏有效的诊断措施。我们将电融合法与半固体培养法相结合,试图建立一条只需少量材料的高效单抗制备途径,为诊断试剂盒的研制作准备。

1 材料和方法

1.1 材料及来源 Balb/C 雄性小鼠 6~8 周龄, (18~20g), 3~4 周龄, (10~12g); 购自医科院实验动物中心。肠道腺病毒(Ad40/41 T CLD50=3.5)由基础医学研究所微生物免疫室保存。腺病毒(Ad1, Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad7, Ad8, Ad31, Ad42)由解放军 302 医院病毒室提供。Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞系由基础医学研究所细胞生物室陈实平老师惠赠。电融合液为 280mmol/L 山梨醇(浙江永嘉精细化工厂), 0.1 mmol/L 醋酸钙(泗联化工厂)和 0.3mmol/L 醋酸镁(泗联化工厂)。RPMI 1640(GIBCO 公司)选择培养基加有 5.96g/L HEPES, 15% 小牛血清, 2g/L NaHCO₃, 0.6 g/L 谷氨酰胺, 1×10^5 U/L 青链霉素, 1% HT。IMDM

作者单位:100005 北京 中国医学科学院基础医学研究所(张云 陈力真 王树蕙 郭彩云);解放军 302 医院(貌盼勇)

1996 年 1 月 4 日收稿 4 月 18 日修回

(GIBCO 公司)半固体选择培养基加有 15% 小牛血清, 1% HAT, 3×10^9 /L 小鼠胸腺细胞, 50mg/L 脂多糖和 0.5% 甲基纤维素(Sigma)。DR-2 型多功能细胞电融合仪由清华大学生物科学与技术系北京海淀京航科技与工程部提供。电融合小室照文献 4 制作, 将 9 条直径为 0.5mm 的镍铬丝固定在 60mm 透明塑料培养皿内组成 8 个融合槽, 电极丝之间的垂直距离 0.5mm, 用乙醇浸泡融合室, 紫外线照射后进行无菌操作。酶标抗鼠 IgG 抗体(Sigma)使用时 1:1 000 稀释。

1.2 动物免疫 6~8 周龄小鼠经腹股沟皮下注射 0.2ml 病毒抗原(含 50% 福氏完全佐剂的 Ad40/41 病毒抗原), 30 天后同样剂量(改用福氏不完全佐剂)免疫 1 次, 15 天后腹腔注射 0.2ml 病毒悬液, 实验前 4 天再加强免疫 1 次。

1.3 电融合⁴ 无菌取已免疫的小鼠脾脏, 剪碎成单细胞悬液调整活细胞浓度为 1×10^{10} /L 取 1ml 与 3×10^9 /L sp2/0 细胞等体积混合, 电融合液洗 2 次后再悬起, 将 200 μ l 混合悬液移入 1 个电融合室中, 均匀加至电极之间, 接通电融合仪, 使细胞悬液首先经正弦交变电场作用 30s, 电场幅度为 250V_{p-p}/cm, 频率为 1MHz, 此时在倒置显微镜上可观察到细胞形成串珠排列, 接着再施加 4 个场强为 2~4kV/cm 的脉冲, 相邻脉冲之间的间隔为 1s, 极性倒换 1 次, 撤掉电场静置片刻, 用电融合液轻轻洗出电极丝之间的细胞。

1.4 半固体培养及克隆化² 将经电融合后的细胞悬于含 1% HAT 的 IMDM 半固体选择培养基中, 轻轻混匀, 接种在 35mm 的塑料皿中, 每皿 2.5ml, 37℃ 5% CO₂ 条件下培养。解剖显微镜下见有克隆生长时将克隆分别移至 24 孔板中(含 5% 小牛血清, 1% HT 的 1640 完全培养基)培养, 直至克隆株长至 1/2 孔大小。吸取上清, 作 ELISA 筛查。

1.5 ELISA 检测 将固定于 96 孔板被 Ad40/41 病毒感染的 293 细胞作为抗原与杂交瘤细胞上清(称第一抗体)温育后, 洗去上清加入酶标抗鼠 IgG 作第二抗体, 以邻苯二胺(OPD)为底物显色, 测吸光度 A 值(曾称光密度 OD 值)。另设抗原对照, 第一抗体对照及阴性标本对照。

2 结果

2.1 阳性抗体分泌杂交瘤克隆株的获得 将 1×10^7 个淋巴细胞与 3×10^6 个骨髓瘤细胞分别于 8 个电融合室中作电融合, 然后用电融合液洗出, 合并细胞悬入总体积为 6ml 的 IMDM

半固体培养基中轻轻混匀, 平均倒入 3 个 35mm 塑料平皿中, 20 天(在此期无需换液, 只需在解剖显微镜下观察克隆大小)后挑到 40 个克隆, 其中 18 株克隆经 24 孔扩大培养能继续繁殖生长, ELISA 检测得到 7 株 P/N 值(实验组 A 值/阴性标本 A 值)高于 2 的抗人肠道腺病毒(Ad40/41)阳性克隆株(表 1)。

2.2 所得抗人肠道腺病毒(Ad40/41)抗体的特异性 同样方法检测上述 7 株阳性克隆上清与其它组别腺病毒(Ad1, Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad7, Ad8, A31, Ad42)的反应情况, 显示有一定交叉反应, 但均较与 Ad40/41 型的反应低。C6 克隆除与 I 型有较低的阳性反应外与其它型均为阴性, 而与 Ad40/41 型的 P/N 值均 > 5, 显示了其对肠道腺病毒的特异性。

3 讨论

电融合技术因其融合率高和操作的易控性被认为有希望发展成只需从活检组织块中分得微量 B 淋巴细胞就可制备杂交瘤的技术途

表 1 ELISA 法检测抗腺病毒单抗培养上清的反应性(P/N 值)

Tab.1 Reaction of the hybridoma culture supernatant to enteric adenovirus (P/N value)

亚组 Subgroup	血清型 Serum type	阳性克隆株 Positive clone of hybridoma						
		D10	F8	C6	B9	G2	D2	F10
A	31	3.56	0.63	0.64	3.12	3.24	2.50	3.42
	B	3	3.12	2.40	1.07	3.80	1.51	3.80
C	7	3.52	3.2	1.04	3.352	1.87	3.30	3.34
	1	0.42	1.63	2.45	3.37	3.45	3.72	3.39
D	2	3.12	1.78	0.67	3.44	3.47	3.35	3.55
	5	2.88	1.63	1.11	3.35	0.28	3.40	3.29
E	8	3.26	1.35	0.52	3.29	3.11	3.38	3.15
	4	2.88	2.36	1.15	3.52	0.45	3.58	3.61
F	42	2.41	1.17	1.54	3.65	3.57	3.17	3.23
	40	4.49	4.54	5.08	4.22	3.96	5.45	4.66
	41	6.00	5.65	5.89	4.30	2.28	5.54	4.21

注: P/N 值 > 2 为阳性 Note: P/N value > 2 is positive

径⁵。这样,制备人单抗时人淋巴细胞获取困难的局限便得到很大的改善,甚至更高效的杂交瘤单抗制备手段,也很可能在电融合的基础上建立起来⁶。我们曾希望用人化 SCID 鼠提供经免疫的人淋巴细胞制备人单抗⁷,但都由于细胞量少未能成功。本研究将电融合技术与半固体选择培养技术结合起来,以 1×10^7 个脾细胞制得了 7 株高阳性单抗分泌率的杂交瘤,比 PEG 融合时所需的 $1 \sim 2 \times 10^8$ 个脾细胞少了 10~20 倍,为以少量材料制备单抗杂交瘤准备了技术手段。

有报道认为,酚红在细胞受电场作用发生细胞膜通透性改变时会对细胞的活性产生不良影响⁶,我们采用的 IMDM 选择培养基中含有酚红,可进一步试验用无酚红的培养基来增进克隆产率。电击次数过多会加大细胞的损伤⁴,我们使用了 4 次电击,是否减少电击次数亦能提高克隆产率,有待进一步研究。在实验中还观察到 1×10^7 个脾细胞和 3×10^6 个骨髓瘤细胞置入 3 个 35mm 直径的平皿中,密度仍显大,有些克隆由于拥挤和营养不足未能继续生长,这提示若以半固体培养法进行选择培养,用于融合的细胞还可进一步减少,而克隆形成率反而有望提高。

我们观察了所得 7 株杂交瘤上清对所有腺病毒亚组(A~G)的反应性,看到 C6 和 F8 克

隆株对 F 亚组(肠道腺病毒)的反应性明显高于其它组,B9、D2 和 F10 克隆株对各亚组反应性均较高。这样,我们初步设想以 B9、D2 和 F10 作为腺病毒捕捉抗体,以 C6、F8 酶标后作为肠道腺病毒检测抗体,进行建立肠道腺病毒 ELISA 双抗体夹心法诊断试剂盒的尝试。

(感谢清华大学蔡国平教授,陈刚博士对我们实验的支持和帮助。)

参 考 文 献

- 1 Susan P, Ulrich Z, Steven K H F, et al. Parameters to enhance hybridoma formation with hypoosmolar electrofusion. *Hum Antibod Hybridoma*, 1991, 2(3): 155.
- 2 王保君,陈实平,陈克铨,等 在甲基纤维素半固体培养基上制备抗人黄体生成素 McAb 中国医学科学院学报, 1992, 14(5): 380.
- 3 程绪杰,王树蕙,张云,等 我国肠道腺病毒的分离与鉴定. 中国医学科学院学报, 1995, 17(1): 16.
- 4 邹翔 一种改进的细胞电融合方法及其在人单抗研究中的应用 中国预防医学科学院硕士论文, 北京: 病毒学研究所, 1993
- 5 Jaap K, Cornelia de G, Joseph M T, et al. Efficient electric field-induced generation of hybridomas from human B lymphocytes without prior activation *in vitro*. *Hum Antibod Hybridomas*, 1992, 3(6): 48.
- 6 郑强 电场诱导细胞融合的机制及应用研究 清华大学博士论文, 北京: 清华大学, 1990
- 7 陈力真,王树蕙,张云,等 人化 SCID 鼠的建立及其对脊髓灰质炎病毒的免疫应答 中华微生物学和免疫学杂志, 1995, 15(2): 82.

用原位聚合酶链反应检测尖锐湿疣中人乳头瘤病毒 DNA

郭华阳 周来新 汪江华 刘 斌 刘盛华 黄松生 吴沾芬

尖锐湿疣(CA)是由人乳头瘤病毒(HPV)感染引起的最常见的性传播疾病之一,治疗后容易复发。由于 HPV 的抗原性差或拷贝数低,免疫细胞化学和核酸分子杂交对 CA 中的 HPV DNA 检测的应用受到了限制。普通的聚合酶链反应(PCR)技术操作简便,灵敏度高,在检测 CA 中 HPV 已得到广泛应用,但却无法给病毒定位,又可能出现假阳性,近来出现的原位 PCR 技术就克服了上述不足。我们对 15 例 CA 石蜡切片进行脱蜡、水化、蛋白酶 K 消化、4% 多聚甲醛固定和脱水等预处理后,在切片上直接进行 PCR 扩增。与普通 PCR 不同的是,将底物中标记地高辛配基的寡核苷酸(Dig- dUTP)代替部分未标记的寡核苷酸(dTTP),需用原位 PCR 仪在载玻片上直接进行,PCR 扩增后无需再进行核酸分子杂交,直接借助抗地高辛的酶标抗体在玻片上用免疫细胞化学方法显(下转第 83 页)

本课题受国家自然科学基金资助

作者单位: 630038 重庆 第三军医大学医学检验系临床生化教研室

1996 年 9 月 23 日收稿 11 月 2 日修回