

- 7 Feral T. J Food Sci, 1992; **57** (2): 440
- 8 曾治义, 易建华. 武汉大学学报, 1984; **1**: 123
- 9 Lea C H, Rhodes D N, Stoll R D. Biochem J, 1955; **60**: 353
- 10 周文鸿, 徐宁宁, 陈庆才等. 药学通报, 1987; **22** (2): 77
- 11 Guebel W. Biotechnol Tech, 1991; **5** (6): 427
- 12 Singleton W S, Gray M S, Brown M L *et al.* JAOCs, 1965; **42**: 53
- 13 Lily O X, Karin E M, Milton L L. Anal Biochem, 1992; **200**: 7
- 14 郑荣波. 中药材, 1992; **15** (9): 23

The Extraction of Yolk Phospholipid by the Technique of Supercritical Fluid CO₂ Extraction. Lai Bingsen, Mao Zhongxing, Shen Xiaojing, Sun Shuqin (*Department of Biochemistry, Beijing Medical College of PLA, Beijing 100071, China*).

Abstract Phospholipid (PL) has higher med-

ical and nutritional values and widely applied in medical, food, chemical industry field etc. The natural PL of yolk powder was extracted by supercritical fluid CO₂ extraction (SFE-CO₂) technique. The phosphorus, nitrogen and PL contents, the N/P molar ratio, the triglyceride and cholesterol of the extraction were measured by means of biochemical method, thin layer chromatography, and spectral analysis. The results showed that extracted yolk PL is 95% in purity and its N/P molar ratio is 1.003. So the SFE-CO₂ technique can be used to obtain yolk PL with higher purity and quality.

Key words supercritical fluid CO₂ extraction (SFE-CO₂), phospholipid (PL), yolk

促甲状腺激素单克隆抗体的制备

刘一兵* 卓进 张杰 王衍真 贺佑丰

(中国原子能科学研究院, 北京 102413)

摘要 获得了抗促甲状腺激素 (TSH) 单克隆抗体杂交瘤细胞 20 株, 其中 T₇₄A₁₀ 小鼠腹水滴度为 1: 50 000, 亲和常数为 7.15×10^9 L/mol, T₇₁B₁₁ 小鼠腹水滴度为 1: 150 000, 亲和常数为 8.75×10^9 L/mol. 两个抗体与人绒毛膜促性腺激素 (HCG)、促卵泡激素 (FSH) 和促黄体生成激素 (LH) 的交叉反应分别小于 $1.1 \times 10^{-6}\%$ 、0.01% 和 0.016%. 将 T₇₄A₁₀ 和 T₇₁B₁₁ 应用于 TSH 免疫放射分析中, 得到了满意的结果.

关键词 促甲状腺激素 (TSH), 单克隆抗体, 免疫放射分析

自从 1975 年 Kohler 和 Milstein^[1] 经杂交瘤技术建立了第一株单克隆抗体以来, 单克隆抗体技术已被迅速地应用于生物化学、免疫学、医学等多个领域, 尤其是免疫化学中. 单克隆抗体的出现, 推动了一种新型的免疫分析方法——免疫放射分析 (IRMA) 的发展. 该方法较之放射免疫分析法 (RIA) 具有更高的灵敏度和特异性^[2~7].

发展高灵敏度检测 TSH 的分析方法对甲状腺功能的诊断, 尤其是预防由于先天性甲低而造成的先天性小儿痴呆症具有非常重要的意义. 高灵敏度的 TSH IRMA 法已成为新生儿先天性甲低筛选的首要指标. TSH IRMA 的建立必须以 TSH 单克隆抗体为基础.

* 联系人地址: 北京 275 信箱 39 分箱.

收稿日期: 1994-09-23, 修回日期: 1995-01-24

1 材料和方法

1.1 试剂

促甲状腺激素由澳大利亚Westmead医院提供. DMEM培养基(Sigma公司, 美国). 普通培养基的配制: 100 ml DMEM 培养基, 11 ml 胎牛血清, 链霉素1万单位, 青霉素4000单位. HAT培养基的配制: 100 ml普通培养基含次黄嘌呤0.1 mmol/L, 氨基嘌呤 4×10^{-2} mmol/L, 胸腺嘧啶 1.6×10^{-2} mmol/L.

1.2 动物免疫

选用 Balb/c 小鼠(雌性, 8~10 周龄, 中国药品生物检定所动物养殖场)作为免疫动物进行 TSH 免疫. 基础免疫剂量为 10 μ g/只. 加强剂量为 5 μ g/只. 每月加强一次. 融合前 3 d 进行最后一次加强免疫.

1.3 杂交瘤细胞的建立^[8]

取经 TSH 免疫的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP₂/O, 在 50% PEG 作用下进行融合, 铺于 96 孔板中, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养. 待细胞群落长至 1/3 孔大小时进行筛选. 筛选方法采用 ELISA 法或 RIA 法. 将呈抗体阳性的细胞按有限稀释法进行克隆化直至所有细胞孔均呈抗体阳性为止.

1.4 ELISA 法

用 TSH (1 mg/L, 0.1 mol/L, pH9.5 碳酸缓冲液) 包被酶标板, 4℃过夜. 次日, 用 1% 牛血清白蛋白封闭. 加入细胞上清液 100 μ l/孔, 37℃, 2 h. 用蒸馏水洗三次, 加入生物素-抗小鼠 IgG (Amersham 公司, 英国) 100 μ l/孔, 37℃, 2 h. 用蒸馏水洗 3 次. 加入亲和素-过氧化物酶 (Amersham 公司, 英国) 100 μ l/孔, 37℃, 45 min. 洗涤 3 次后, 加入底物 ABTS (2, 2'-连氨基-2-[3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸] 二胺盐) 显色, 读取 A₆₅₅ 值.

1.5 RIA 法

取细胞上清液或小鼠腹水 100 μ l, 加入 100 μ l I¹²⁵-TSH, 37℃, 3 h. 取出后, 放入 4℃, 2 h. 加入正常兔血清 100 μ l, 18% PEG 500 μ l, 离心, 3500 r/min, 20 min, 弃上清,

测其沉淀计数.

1.6 小鼠腹水的诱生

将克隆化成功的杂交瘤细胞进行扩大培养. 注入已用降植烷处理的小鼠腹腔中, 每只小鼠注入量为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个细胞. 5~7 d 后即可收取腹水.

1.7 TSH 单克隆抗体的鉴定

采用 ELISA 法对 TSH 单克隆抗体进行免疫球蛋白类型的鉴定. 采用 RIA 法对 T₇₁B₁₁ 和 T₇₄A₁₀ 小鼠腹水进行滴度, 亲和常数和交叉反应的鉴定.

1.8 TSH 单克隆抗体碘标记

采用氨胺-T 法对已纯化的 T₇₁B₁₁ 和 T₇₄A₁₀ 进行碘标记并用 Sephadex G-50 进行分离. 标记物比度为 519~594 GBq/g.

1.9 TSH 免疫放射分析 (IRMA)

1.9.1 二步法: 以 I¹²⁵-T₇₁B₁₁ 为示踪物, 按照中国原子能科学研究院血清 TSH IRMA Kit 说明书进行操作.

1.9.2 一步法: 取用 TSH 单克隆抗体或多克隆抗体包被的六星底试管, 加入 200 μ l 标准品或血清样品和 50 μ l I¹²⁵-TSH McAb (由我院试剂盒提供), 放入 37℃, 3 h 后, 转入 4℃, 过夜. 取出后, 倾去液体. 用 0.025 mol/L, pH7.4, 磷酸缓冲液洗涤 3 次. 测其放射性计数.

2 结 果

2.1 抗 TSH 单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立

先后共进行了 13 次融合, 融合率为 70%~90%. 共获得抗 TSH 单克隆抗体杂交瘤细胞株 20 株, 其中 T₇₁B₁₁、T₇₄A₁₀、T₅₅G₅ 和 T₅₁G₁₀ 所分泌的抗体呈强阳性并已稳定传代.

2.2 TSH 单克隆抗体的鉴定

采用 ELISA 法对 TSH 单克隆抗体进行免疫球蛋白类型鉴定, 结果表明 10 株为 IgM 型, 10 株为 IgG 型. T₇₁B₁₁、T₇₄A₁₀、T₅₅G₅ 和 T₅₁G₁₀ 均为 IgG 型. 用 RIA 法对 T₇₁B₁₁ 和 T₇₄A₁₀ 两株细胞的小鼠腹水进行抗体滴度、亲和常数和交叉反应鉴定. 结果列于表 1.

表 1 $T_{71}B_{11}$ 、 $T_{74}A_{10}$ 单抗的特征

	滴度/ 10^3	亲和常数/ 10^9 L/mol	交叉反应/%			
			TSH	HCG	FSH	LH
$T_{71}B_{11}$	1:150	8.57	100	3.8×10^{-6}	0.01	0.015
$T_{74}A_{10}$	1:50	7.15	100	$<1.1 \times 10^{-6}$	<0.01	0.016

2.3 TSH 单克隆抗体在 TSH IRMA 中的应用

2.3.1 TSH 单克隆抗体作为示踪物: 用 I^{125} - $T_{71}B_{11}$ 作为示踪物用于 TSH IRMA (二步法) 中, 所得标准曲线如图 1 所示. 测得正常值 ($n=27$) 为 $\bar{x} \pm s = (1.58 \pm 1.60) \mu\text{IU/ml}$, 实测范围为 $0.46 \sim 6.52 \mu\text{IU/ml}$. 血样 TSH 分析结果与我院的 TSH IRMA Kit 的分析结果相关值 $r=0.884$.

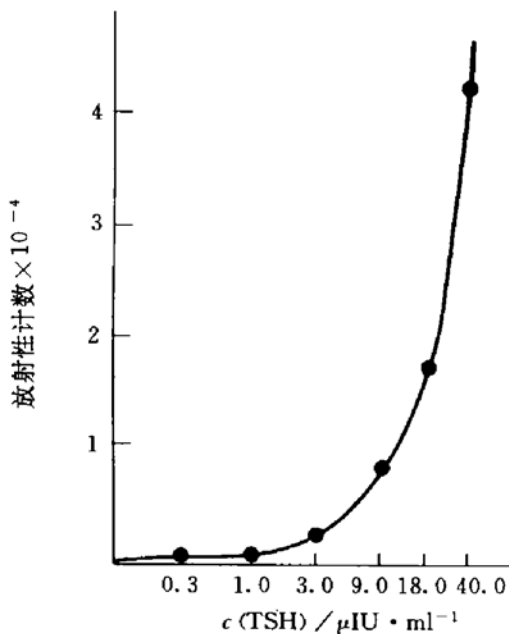


图1 TSH IRMA (二步法) 标准曲线

$28.5 \mu\text{IU/ml}$).

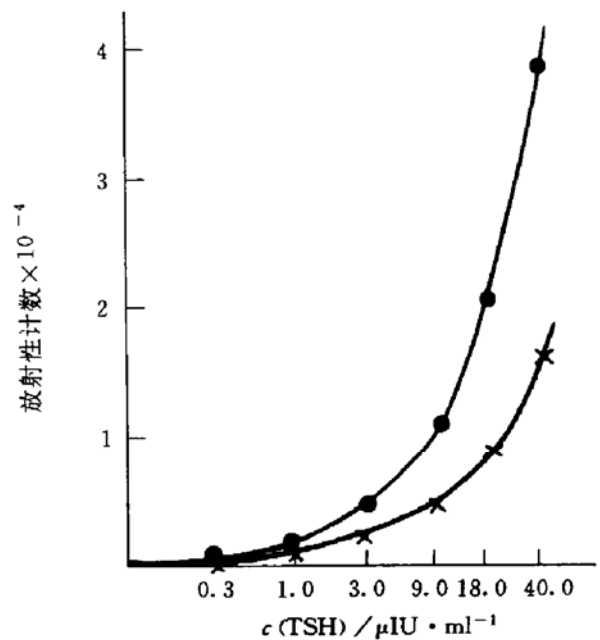


图2 TSH IRMA (一步法) 标准曲线

●—●: McAb 包被试管; ×—×: PcAb 包被试管.

3 讨 论

我们已获得 20 株 TSH 单克隆抗体的杂交瘤细胞. 其中 $T_{71}B_{11}$ 、 $T_{74}A_{10}$ 具有高滴度、高亲和性、高特异性的特性. 将其应用于 TSH IRMA 中, 结果表明不论将它们作为示踪物, 还是作为包被固相载体都得到了满意的结果. 所得标准曲线符合免疫放射分析的要求. 尤其是低剂量端比较陡峭, 提高了分析灵敏度. 正常值与报道的正常值比较接近 (DPC 和 Serono TSH IRMA Kit 的正常参考值分别为 $0.3 \sim 5 \mu\text{IU/ml}$ 和 $0.44 \sim 3.8 \mu\text{IU/ml}$)^[9]. 质控样品也在靶值范围内. 而且从图 2 我们可以看到用单抗作为固相载体比之多抗在分析灵敏度和捕捉抗原能力方面具有更大的优越性.

在单抗的制备中, 应尽量采用灵敏、简便、快速的方法作为筛选方法. 尽管 ELISA 法的灵敏度比 RIA 法高, 但是操作不如 RIA 法简便、快速, 且精确度较 RIA 法差, 抗原用量大. 在我们的实验中只需获得分泌强阳性单抗的杂交

2.3.2 TSH 单克隆抗体作为包被固相载体: 用 $T_{74}A_{10}$ 包被试管作为固相载体用于 TSH IRMA (一步法) 中, 所得标准曲线如图 2 所示. 测得质控血清为 $QC_1 = 1.9 \mu\text{IU/ml}$, $QC_2 = 13.5 \mu\text{IU/ml}$, $QC_3 = 24.4 \mu\text{IU/ml}$. (质控血清靶值给定范围: QC_1 为 $1.7 \sim 2.5 \mu\text{IU/ml}$, QC_2 为 $11.3 \sim 16.5 \mu\text{IU/ml}$, QC_3 为 $20.1 \sim$

瘤细胞. 因此, 我们认为 RIA 法比 ELISA 法更适合用于筛选.

致谢 王玉肖、燕强奋、于洁、梁瑞朋等同志对本项工作给予了指导和帮助, 特此致谢.

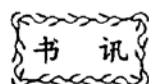
参 考 文 献

- 1 Köhler G, Milstein C. *Nature*, 1975; **256**: 495
- 2 Yelto D E, Scharff M D. *Ann Rev Biochem*, 1981; **50**: 652
- 3 Paul A W E. *Biochem J*, 1981; **200**: 1
- 4 Serier D E. *J Medical Tech*, 1985; **2** (5): 287
- 5 Cone R. *J Medical Tech*, 1985; **2** (5): 279
- 6 Douglas S R. *Ann Inter Medicine*, 1986; **104** (5): 718
- 7 Dobson S H, Smith H, Baker T *et al.* *J Immuno Method*, 1986; **88**: 83
- 8 徐志凯主编. 实用单克隆抗体技术. 西安: 陕西科学技术出版社, 1991: 27~41
- 9 王玉肖, 燕强奋, 于洁. 同位素, 1993; **6** (2): 65

Preparation of Monoclonal Antibodies Against Thyroid Stimulating Hormone (TSH). Liu Yibing, Zhuo Jin, Zhang Jie, Wang Yanzhen, He Youfeng (*China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China*).

Abstract Twenty murine hybridomas were established producing monoclonal antibodies against TSH. Their immunoglobulin subclasses were IgG or IgM. The titers of $T_{74}A_{10}$ and $T_{71}B_{11}$ were $1:50\,000 \sim 1:150\,000$ and affinity constants were 7.15×10^9 L/mol and 8.75×10^9 L/mol respectively. The cross reactivity with HCG, FSH and LH were less than $1.1 \times 10^{-6}\%$, 0.01% and 0.016% respectively. TSH IRMA was established using $T_{71}B_{11}$ and $T_{74}A_{10}$ as tracers or solid phases.

Key words thyroid stimulating hormone (TSH), monoclonal antibody, IRMA



《基因治疗-基础与临床》简介

由第一军医大学彭朝晖教授、徐铃教授, 复旦大学薛京伦教授, 第二军医大学、Case Western Reserve 大学(美国)郭亚军教授等共同主编的《基因治疗-基础与临床》一书, 已由中国科学技术出版社出版(1994, 12), 现已公开发行. 中国科学院院士谈家桢先生为该书作序.

本书系统而详尽地论述了基因治疗的基础理论知识及其在遗传病、肿瘤、心血管疾病、艾滋病等疾病中的应用. 全书48.63万字, 54幅图, 共300页(16开本). 本书内容共含五部分. 一、绪论: 介绍了基因治疗和基因转移的早期历史、现状和策略; 二、遗传型基因治疗(第一篇): 包括1. 体细胞遗传学基础; 2. 目的基因的转移; 3. 目的基因的表达与调控; 4. 基因治疗的靶细胞; 5. 基因治疗的选择系统; 6. 性系基因操作和转基因动物; 7. 遗传病的基因治疗; 三、表遗传型基因治疗(第二篇): 包括: 1. 反义核酸与基因治疗; 2. Ribozyme 及其在基因治疗中的应用; 3. 恶性肿瘤的基因治疗; 4. 艾滋病的基因治疗; 5. 心血管疾病的基因治疗; 6. 同源重组与基因治疗; 四、基因治疗的问题与展望(第三篇): 包括1. 基因治疗的安全措施; 2. 基因治疗; 社会、伦理问题; 3. 基因治疗的展望; 五、附录: 1. 人的体细胞治疗及基因治疗临床研究质控要点; 2. 世界上基因治疗公司简介. 该书适用于高等院校生物科学研究和教学及医务工作者学习和开展基因治疗的参考.

该书将有关内容已追踪至1994.10, 但由于基因治疗进展很快, 为保证该书的持续使用价值, 作者实行“售后服务”, 即在该书基础上每年编辑一册“基因治疗-基础与临床年度进展”, 每年提供给读者.

每册定价25.00元(简装本), 35元(精装本), 每册邮资2元.

读者可与第一军医大学分子生物学研究所(广州, 510515)韩虹或与复旦大学遗传所(上海邯郸路220号, 200433)邱信芳联系.