

2.4 大鼠大脑皮层和海马中 NO 含量测定

我们利用本检测方法测定了隔-海马伞横切大鼠 (P: 1.8 LR: 1.0 H: 5.0 横切距 4.0) 皮层和海马中 NO 含量, 结果表明: 隔-海马传导通路切断的学习记忆功能障碍大鼠, 海马中 NO 水平与伪手术和正常对照大鼠相比明显降低 ($P < 0.01$), 皮层中 NO 水平未见显著改变 ($P > 0.05$) (表 1).

表 1 大鼠大脑皮层和海马中 NO 含量

	<i>n</i>	<i>c</i> (NO) / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	
		皮层	海马
隔-海马损伤组	6	12.53+ 6.00	53.01+ 11.02
伪手术组	6	16.65+ 7.63	115.96+ 28.52
正常对照组	6	17.45+ 5.40	112.81+ 22.74

注: $\bar{x} \pm s$.

2.5 LPS 活化 M ϕ 培养上清和血清中 NO 含量

我们检测了正常 Wistar 大鼠 LPS 诱导 M ϕ 培养上清和血清中 NO 水平, 结果表明培养上清中 NO 含量 ($\bar{x} \pm s$) 为 ($1.408 \times 10^{-4} \pm 0.058 \times 10^{-4}$) mol/L ($n = 6$), 血清中 NO 含量为 ($8.20 \pm 0.26 \times 10^{-6}$) mol/L ($n = 6$).

参 考 文 献

1 菊地和也. NO の測定に关する. 现代医疗, 1995, 27 (3): 147~ 151
2 Ohta T, Arai Y, Takitani S. Fluorometric determination of

nitrite. Anal Chem, 1986, 58: 3132~ 3135
3 Kder A, Frazzini V I, Solomon R A *et al.* Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rat. Stroke, 1993, 24: 1709~ 1716
4 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteir-dye binding. Anal Biochem, 1972, 72: 248~ 254
5 Termin A, Hoffman M, Bihng R J. A simplifild method for the determination of nitric oxide in biological solutions. Life Science, 1992, 51 (20): 621

Determination of Nitric Oxide Level of Tissue and Serum by Fluorospectrophotometry.

WANG Jinghua, YANG Shijie, YANG Guizhen (*Department of Immunology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China*).

Abstract According to the principle that NO $_2^-$ is able to enhance the fluorescence intensity of 4-hydroxycoumarin, a spectrofluorometric method for determination of nitric oxide in biological sample was developed. The nitrite concentration in the range of 2×10^{-5} mol/L to 2×10^{-8} mol/L in the sample can be measured. The method has been applied to determine the level of NO in cortex and hippcampus, cultural supernatant of macrophage activated by LPS and serum in rat.

Key words nitric oxide, fluoroasepectrophotometry, cortex, hippcampus, serum

抗人 IL-6 单克隆抗体的制备及鉴定

蒋盘宏 莫 畏 窦良军 赵晓萌 袁廷君 宋金华

(北京市生化试剂高技术实验室, 北京 100022)

摘要 用基因重组人 IL-6 免疫 Balb/c 小鼠, 采用小鼠杂交瘤技术, 筛选克隆到分泌抗人重组 IL-6 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 并对其中 2H $_2$ 、1D $_2$ 和 4B $_4$ 瘤细胞株进行了鉴定. 其抗体类别均为 IgG,

亚类分别为 IgG1 和 IgG2a. 用多种细胞因子和无关蛋白的鉴别试验结果证实它们均特异地识别 rhIL-6. 免疫转染结果显示, 该单抗识别分子质量为 21 ku 的 IL-6 单一条带. IL-6 单克隆抗体的亲和常数 $K_{\text{aff}} = 1.62 \times 10^9 \text{ (mol/L)}^{-1}$.

关键词 单克隆抗体, 白细胞介素 6, 亲和力系数

人白细胞介素 6 (IL-6) 是细胞因子网络中非常重要的成员之一. IL-6 在调节免疫应答、急性期反应、促进骨髓造血等方面均具有重要作用. IL-6 异常表达和失调是某些免疫性疾病的典型特征, 因而 IL-6 可能成为与发病机理直接相关的一个重要细胞因子. 因此对 IL-6 水平的检测也更具有重要的临床意义.

本研究采用杂交瘤技术, 筛选得到了 3 株抗人重组 IL-6 的单克隆抗体, 并建立了双抗体夹心 ELISA 检测方法, 现把研究结果报道如下.

1 材料与方法

1.1 细胞因子

初步纯化的重组人细胞因子: rhIL-6, rhGM-CSF, rhIL-2, rhG-CSF 由法国国立医学卫生研究院 Chany 教授提供.

1.2 单克隆抗体的制备

用初步纯化的重组人 IL-6 免疫 Balb/c 小鼠共 4 次, 每次间隔 3 周, 每次注射 50 μg/只, 融合前三天腹腔加强免疫一次. 取免疫小鼠脾细胞与 Sp2/O 骨髓瘤细胞在 50% PEG 作用下融合, 经 HAT 选择培养液培养. 采用间接 ELISA 法对杂交瘤细胞培养上清进行筛选, 并经有限稀释法亚克隆 3~4 次, 建立细胞系, 并将杂交瘤细胞接种于 Balb/c 小鼠腹腔, 制备腹水^[1,2].

1.3 ELISA 测定

按常规方法^[3]进行, rhIL-6 抗原包被量为 1 mg/L, 其他细胞因子也以相应浓度包被, 并以 JM103 全菌体蛋白作为无关对照抗原.

1.4 IgG 类别和亚类的检测

采用 Sigma 标准小鼠 IgM、IgG、IgG1、

IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3 包被酶标板, 加入待测 McAb, 最后加入酶标羊抗鼠 IgG, 采用 ELISA 法测定, 以确定 Ig 类别和亚类.

1.5 免疫印染

rhIL-6 经 SDS-PAGE 分离, 按常规方法在 Bio-Rad 电转移系统中将凝胶蛋白带转移至硝酸纤维素膜上, 用 2% 小牛血清白蛋白封闭, 在以 IL-6 单抗与纤维素膜反应后, 浸入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 (1:300) 中, 最终以四甲基联苯胺 (TMB) 系统显色.

1.6 亲和力的测定

采用 ELISA 法检测^[4]. 先以三种不同浓度的 rhIL-6 标准抗原包被酶标板, 包被浓度分别为 5 000 μg/L、2 500 μg/L、1 250 μg/L. 最后以 TMB 系统显色终止后测定 A 值. 以每个单抗不同浓度的对数值为横坐标, 以其相应的 A 值为纵坐标, 绘制出包被不同浓度的三条反应曲线, 再按 Beatty 等推导的公式计算 K_{aff} .

1.7 临床标本的收集

从北京两家医院收集 20 多份正常人和风湿病人血清标本用于检测.

2 结 果

2.1 rhIL-6 单抗细胞系的建立

细胞融合的融合率为 89%. 强阳性孔 9 个, 对其中的 2H₂、1D₂、4B₄ 细胞株进行克隆化建系, 经 4 次亚克隆后, 全部克隆为阳性, 且 A 值基本一致. 将上述各株细胞连续培养 6 个月及冻存后复苏, 其效价稳定不变.

2.2 Ig 类别及亚类

用标准的羊抗小鼠 IgG, 羊抗小鼠 IgM, 与我们所得到的抗人 IL-6 McAb 进行各单抗的类别及亚类测定. 表 1 结果表明: 所有单抗均为 IgG 型, 其中 4B₄ 为 IgG2a, 2H₂ 和 1D₂

为 IgG1.

表 1 抗 rh IL-6 单克隆抗体的类别和亚类

细胞株名称	IgM	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
2H ₂	-	+	+	-	-	-
1D ₂	-	+	+	-	-	-
4B ₄	-	+	-	+	-	-

2.3 单抗的特异性鉴定

三株抗人 IL-6 单抗与各种细胞因子的反应结果 (表 2) 表明这些单抗特异性识别 IL-6, 与其他细胞因子和无关蛋白无交叉. SDS-PAGE 免疫印迹结果显示抗体只识别 21 ku 的 rhIL-6 (图 1).

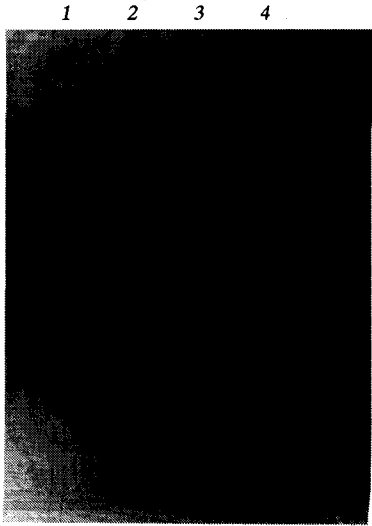


图 1 单抗识别 rh IL-6 的免疫印迹实验
1: 蛋白质分子质量标准, 2: rhIL-6 纯品,
3: rhGM-CSF, 4: rhIL-6 粗品.

表 2 抗 rh IL-6 单克隆抗体的特异性

细胞名称	rhIL-6	rhIL-2	rhGM-CSF	rhG-CSF	IFN-a
2H ₂	++	-	-	-	-
1D ₂	++	-	-	-	-
4B ₄	++	-	-	-	-

2.4 抗人 IL-6 单抗的亲合力测定

用 ELISA 检测时所加的抗 IL-6 McAb 的浓度为横坐标, 以其相应的 A 为纵坐标, 绘制出包被浓度分别为 5 000 $\mu\text{g/L}$ 、2 500 $\mu\text{g/L}$ 、和 1 250 $\mu\text{g/L}$ rhIL-6 分子的三条反应曲线, 再按推导的公式计算. 得到每个单抗的 K_1 , K_2 , K_3 , 从而得到 $K_{\text{aff}} = 1/3 (K_1 + K_2 + K_3)$.

图 2 结果表明 rhIL-6 单克隆抗体的亲和常数 $K_{\text{aff}} = 1.62 \times 10^9 (\text{mol/L})^{-1}$.

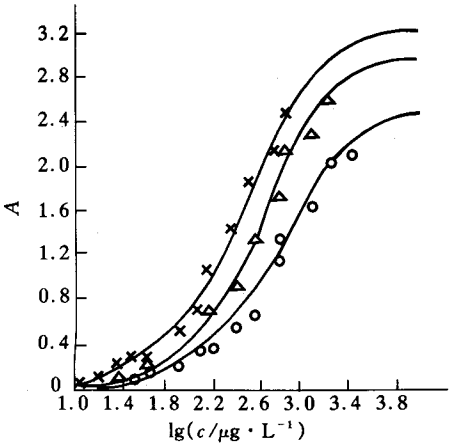


图 2 抗 IL-6 McAb 的亲合力测定
×——×: 500 $\mu\text{g/L}$; Δ —— Δ : 250 $\mu\text{g/L}$;
○——○: 125 $\mu\text{g/L}$.

2.5 临床标本的测定

用我们研制的 IL-6 试剂盒对临床标本进行检测, 结果表明: 风湿病人血清中 IL-6 含量明显高于正常人 (图 3).

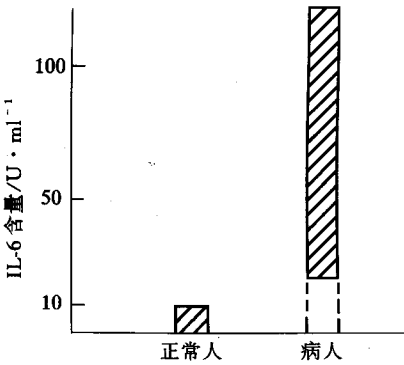


图 3 人血清中 IL-6 测定

3 讨 论

上述结果显示本实验室所得到的 3 株 IL-6 单抗均有较强的特异性, 只识别 21 ku 的 rhIL-6, 而与其他细胞因子无交叉. 它对 IL-6 的亲常数达 $1.62 \times 10^9 \text{ (mol/L)}^{-1}$. 用本实验室研制的 3 株抗 IL-6 的单抗并建立的双抗体夹心 ELISA 法检测临床收集的血清标本, 测定结果表明风湿病人血清中 IL-6 的含量大大超过正常人. 其特点是: 快速、实用、灵敏度高、重复性好. 近年来, 许多临床资料表明: 测定血清中 IL-6 水平对许多自身免疫疾病, 如类风湿关节炎、红斑狼疮等的诊断和治疗及愈后判定均有重要的指导意义. 国产化试剂盒的研制成功, 必将推动这些疾病发病机理、诊断及疗效的进一步研究.

参 考 文 献

1 Kohler G, Milstein C. Continuoccs culures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, **256**: 495~ 498

2 Goding J W. Antibody production by hybridomas. *J Immunol Method*, 1980, **39**: 285~ 308

3 孙瑛勋, 赵薇薇, 孙启鸿. 抗人 IgD 单克隆抗体的制备及其特性鉴定. *单克隆抗体通讯*, 1993, **9** (2): 40~ 44

4 Beatty J D, Barbara G B, William G V. Measurement of monoclonal antibody affinity by noncompetitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods*, 1987, **100**: 173~ 179

Preparation and Characterization of A Series of Monoclonal Antibodies Against Recombinant Human Interleukin-6. JINAG Panhong, MO Wei, DOU Liangjun, ZHAO Xiaomeng, YUAN Tingjun, SONG Jinhua (*Beijing Laboratory for Biochemicals, Beijing 100022, China*).

Abstract Using the hybridoma technique, a series of secreting monoclonal antibodies (McAbs) against recombinant human interleukin-6 (rhIL-6) have been established after immunization of Balb/c mice with rhIL-6. Three of these McAbs 2H₂, 1D₂ and 4B₄ were well characterized. Their Ig class and subclass were determined as IgG1 and IgG2a respectively. These McAbs reacted with a high degree of specificity to rhIL-6 and did not have cross reactivity with many other cytokines and irrelevant proteins. Immunoblotting results showed that these McAb only recognized a single band of rhIL-6 with molecular mass of 21 ku. These McAb reacted strongly with IL-6 molecules with an affinity constant (K_{aff}) $1.62 \times 10^9 \text{ (mol/L)}^{-1}$.

Key words monoclonal antibodies, interleukin-6, affinity constant

用 Blue Sepharose CL-6B 快速纯化天花粉蛋白

袁惠东 夏其昌 张祖传

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 差光谱显示染料 cibacron blue F3GA 与天花粉蛋白 (TCS) 有特异性结合, 复合物在可见光部分的最大吸收波长在 690 nm. 摩尔消光系数 $\epsilon = 2.6 \times 10^{-3} \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 解离常数 $K_d = 1.8 \mu\text{mol/L}$, 0.5 mol/L NaCl 可使复合物解离. 根据这一特点, 用 Blue-Sepharose CL-6B 凝胶从栝蒌块茎中亲和纯化了 TCS. 此法快速、简便、高效, 易于大量制备.

关键词 天花粉蛋白, Cibacron blue F3GA, 差光谱, 亲和层析