

得到的量很少,只可供 GC-MS 作进一步的分离和定性鉴定之用^[9]。1976 年在美国爆发了一种新的疾病:军团肺炎 (Legionnaires Disease, 又叫蓬提克热 Pontiac Fever), 其细菌毒素纯品,就是用制备等速电泳获得的,并确定它为分子量 3,400 的蛋白质^[9]。

从等速电泳发展的历史看,它主要用途是在生化和医药方面,它的电解质体系没有多大的变化余地,有时对付组分复杂而性质相近的样品还有困难。它适合于分析检测,而不适于分离制备,这是它难以克服的缺点。使用这种技术时,我们应注意与其它技术相互配合。

参 考 文 献

- [1] Everaerts, F. M. et al.: *Isotachopheresis*, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- [2] 竺安《化学通报》, 11, 665, 1980.
- [3] Sakagishi, Y.: *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, Special Issus, 161, 1980.
- [4] Kodama, H.: *J. Chromatog.*, 163, 300, 1979.
- [5] Pradayral, L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 701, 1978.
- [6] Adam, A. et al.: *Biochemical and Biological Applications of Isotachopheresis*, Elsevier, Amsterdam, 1980.
- [7] Delmotte, P.: *Science Tools*, 24, 33, 1977.

- [8] Hedlung, K. W. et al.: *Proceedings of Electrophoresis* 79, Walter de Gruyter and Co., Berlin, p. 765, 1980.
- [9] Everaerts, F. M.: *Analytical Isotachopheresis*, Elsevier Amsterdam, 1981.
- [10] Kjellin, K. G.: *J. Neurol.*, 221, 225, 1979.
- [11] Smuts, H. E. M.: *J. Neuro. Sci.*, 56, 283, 1982.
- [12] Hedlung, K. W. et al.: *J. Immunol. Methods*, 25, 43, 1979.
- [13] Holloway, C. J. et al.: *J. Chromatog.*, 188, 235, 1980.
- [14] Katoh, K. et al.: *ibid*, 188, 383, 1980.
- [15] Shimada, K., et al.: *Physiol. Plant*, 47, 173, 1979.
- [16] Hjerten, S.: *Peptides of Biological Fluids*, 22nd (Ed. Peeters, H.) Pergamon Press, New York, p. 669, 1975.
- [17] Hess, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 41, 1, 1974.
- [18] 竺安, 杨其民:《全国生物膜学术讨论会交流资料》, 1982.
- [19] Simmonds, H. A. et al.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 17, 441, 1979.
- [20] Tatsuhara, T. et al.: *Yakugaku Zasshi*, 102, 988, 1982.
- [21] Aomine, M. et al.: *JRN. J. Physiol.*, 32, 741, 1982.
- [22] Schwendtnner, N. et al.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 20, 833, 1982.
- [23] Talbot, A.: *Acta Med. Okayama*, 36, 431, 1982.
- [24] Kojima, K. et al.: *Shoyakugaku Zasshi*, 36, 280, 1982.
- [25] Battersby, R. V.: *Electrophoresis* (Weinheim, F. R. G.), 3, 275, 1982.

[本文于1983年7月20日收到]

抗人 IgG-Fab (λ 型)单克隆抗体和抗人 IgG 单克隆抗体的鉴定

谭瀟瀾* 林嘉友 邹明发 吴安然

(中国医学科学院基础医学研究所免疫室, 北京)

淋巴细胞杂交瘤技术,已成为生物学、医学领域中十分重要的研究方法。Lowe^[1]指出抗人免疫球蛋白(Ig)单克隆抗体(McAb)的建立,不仅为鉴定 Ig 的类、亚类、型、亚型、亚群和基因型等提供有价值的试剂,而且还可以在决定簇的水平上进一步研究 Ig 的结构和功能。Lowe 等^[1]曾对抗 K 和 λ 链的 McAb 性质进行了研究。李伟雄等建立了抗游离 λ 链的 McAb (待发表)。本文对抗人 IgG 的 Fab 和抗人 IgG

的 McAb 进行了研究和探讨。

一、材料和方法^[2-4]

1. 抗原动物及免疫 用人 IgG 经木瓜酶断链后提取的 Fab 片断蛋白作为免疫抗原。动物为 BALB/C 小鼠, 6—7 周龄。Fab 蛋白 300 μ g 加福氏完全佐剂制成乳剂、腹腔注射, 做

* 哈尔滨医科大学进修生。

为基础免疫,半个月后腹腔注入 Fab 300 μ g。再隔半月后,连续四天腹腔注入 Fab,剂量分别为 50 μ g、100 μ g、200 μ g 和 200 μ g,次日取脾脏进行融合。

2. 细胞融合 取健康 BALB/C 小鼠腹腔细胞,分装 24 孔板,每孔 1×10^5 个细胞。

在融合前一周 SP2/O-Ag14 细胞,先用含 8-氮鸟嘌呤 RPMI-1640 培养液传代五次,然后用含 15% 的小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液进行融合。融合时取免疫小鼠的脾细胞 (1×10^8) 与骨髓瘤细胞 (1×10^7), PEG 的浓度是 50% (MW = 1000), pH 为 8.0, 体积 0.7ml, 按常规方法进行融合。

3. 细胞培养与筛选 细胞融合时用完全培养基,第 2 天以含 HAT 的培养基换液,连续 3 天后,每 3 天换液 1 次,到第 14 天改用 HT 培养基。再过 14 天,改用完全培养基换液。逐日观察细胞生长情况,当细胞群增长超过板孔面积的 1/3 时,用 ELISA 法^[5]检测上清液抗体连续两次以上,当 OD 值大于 0.5 时,择优用有限稀释法进行克隆。克隆后,选取只有一个细胞群的孔,用 ELISA 和间接血凝法^[6]测上清液中 McAb 效价。选择效价高的孔作第 2 次及第 3 次克隆,在筛选过程中细胞传入小瓶增殖并在液氮中保存。

4. 单克隆抗体的鉴定 小鼠 IgG 亚类的鉴定 兔抗小鼠 IgG 亚类抗血清(美国 Miles 公司产品),作常规琼脂免疫双扩散^[1],鉴定 McAb 所属小鼠 IgG 亚类。

McAb 的纯度及轻链重链组成的鉴定 将细胞无血清培养上清浓缩液用 β -巯基乙醇还原处理后,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[8]鉴定。

杂交瘤细胞腹水 McAb 的获得与鉴定 于 BALB/C 小鼠腹腔先注入 2, 6, 10, 14-甲基十五烷,每只 0.5ml, 1—2 周后,腹注杂交瘤细胞 ($0.5-1.01 \times 10^6$ / 每鼠), 10 天左右可获得腹水,进行下列测定:

琼脂免疫双扩散试验 用含 2—3% PEG (MW6000) 的琼脂糖板,抗原与相应 McAb 反应

可见乳白色沉淀线。

免疫电泳 于琼脂凝胶板中含 2% PEG。

间接血凝 (PHA) 和间接血凝抑制试验 (PHIA) 即用含不同量的已知抗原和稀释成不同浓度的 McAbs 混合,于 37 $^{\circ}$ C 条件结合后再加抗原致敏的 SRBC 与之反应,检测 McAb 的特异性。

ELISA 间接法 采用微量法。

检测杂交瘤细胞株的染色体数目 按本室方法^[2]进行。

二、结 果

1. 融合率 三块 24 孔板中,共有 70 孔出现细胞融合,融合率为 97.22%。

2. 筛选阳性细胞株 经 ELISA 和间接血凝试验筛选融合细胞,经三次克隆,从中选出 2 个克隆株(包括 7 个亚克隆株),各选一个代表株,即 C31.10 和 C31.6,进行了鉴定。

3. McAb 的鉴定 用人 IgG, K, λ , IgA, IgM 抗原致敏醛化的 SRBC, 做间接血凝试验,测定腹水中 McAb 的效价,结果两株 McAb 与 IgG 凝集效价均在 1:32,000 以上, C31.6 甚至达到 1:1,024,000。但此 McAb 与 K 抗原也产生低度凝集,经 SDS 电泳检查证明, K 抗原中含有 IgG, 不够纯。两株 McAbs 均不与 λ 、

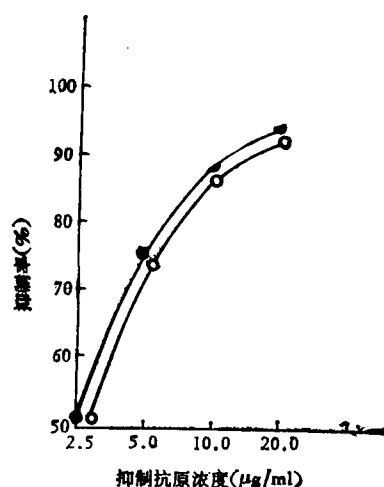


图 1 血凝抑制率和抗原浓度的关系
C31.10—○—, C31.6—●—

IgA、IgM 抗原发生凝集。

根据实验结果,按下式计算血凝抑制率(图1),血凝抑制率随所加的抗原量而增加,两者呈线性关系,证明 McAb 与 IgG 的反应是特异的

$$\text{血凝抑制率} = \frac{\text{血凝滴度} - \text{血凝抑制滴度}}{\text{血凝滴度}} \times 100\%$$

McAbs 与多种抗原的琼脂免疫双扩散试验,结果见表1。

表1 两株 McAbs 与 IgG 及 IgG 亚类等抗原双扩散反应结果

Ag McAb	Ig						轻链	λ 型				K 型	正常血清 (20份)
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE	IgG-FC	K*λ	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	IgG ₁ IgG ₂ IgG ₃ IgG ₄	
C31.10	+	-	-	-	-	-	- -	+	+	+	+	- - - -	+
C31.6**	+	-	-	-	-	-	+ -	+	+	+	+	+	+

人 IgG 亚类抗原由伯尔尼肿瘤研究所赠送。

* K 抗原中含有微量 IgG。

** C31.6 与人 IgG 及血清反应可出现 2-3 条沉淀线,与 IgG 亚类只有 1 条沉淀线。

两种 McAbs 和 IgG 沉淀反应效价,均为 1:128。免疫电泳结果与双扩散结果一致。

4. McAb 的所属小鼠 IgG 亚类鉴定 应用琼脂免疫双扩散试验证明, C31.10, C31.6 McAbs 均属小鼠 IgG₁ 亚类。

5. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 结果见图2。试验使用牛血清白蛋白和已知 K 链蛋白作对照。McAbs C31.10, C31.6 经 β-巯基乙醇还原处理后,可见一条重链 (H), 在牛血清蛋白带的下方,分子量相当 50,000。另一条轻链 (L), 与 K 对照带相当,分子量约 25000。

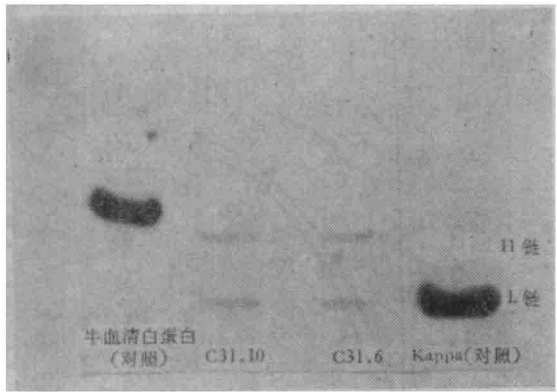


图2 C31.10 和 C31.6McAbs SDS-PAGE 图型

6. 染色体计数 20 个杂交瘤细胞染色体数目的平均值: C31.10 为 101 对, C31.6 为 100 对。

7. 杂交瘤细胞复苏后检查 在液氮中保存 4 个月以上的细胞,复苏后生长良好,染色体数未见减少, McAbs 效价保持稳定。

三、讨 论

本研究应用木瓜酶消化提取的 Fab 蛋白抗原,免疫小鼠后融合、克隆,获得两株杂交瘤细胞。它们所分泌的 McAb,经鉴定它是针对 IgG 抗原不同部位。

C31.10 McAb 与 IgG 和 λ 型 IgG₁、2、3、4 反应,不与 λ、K 轻链及 K 型 IgG₁、2、3、4 反应,也不同 IgG 的 FC 片段反应。证明它不是抗游离 λ 或 K 链的 McAb^[4],也不是单纯抗 IgG 的 γ 链,而是抗 IgG 的 Fab(λ) 片段或抗 IgG 结合型 λ 的 McAb,反应部位可能不在 IgG 的 CH₂ 和 CH₃ 区上,而在 CH₁ 与 λ 链结合的部位,其决定簇是由 CH₁ L 链共同组成的。李伟雄获得 11 株抗 λ 链 McAb,其中 10 株是抗游离的 λ 链,1 株与游离 λ 链反应,也同结合型 λ 链反应。我们获得的 C31.10McAb 和李氏 11 株均不相同。

C31.6 McAb 可与 K 及 λ 型 IgG 四个亚类反应,不同 K、λ 轻链反应,不与 FC 段反应。推测它是属于抗 IgG 重链 CH₁ 区决定簇的,如人 IgG 4 个亚类所共同的部位。本株 McAb

与人 IgG 及正常人血清行双扩散试验时,可见 2—3 条沉淀线,而与标准的 IgG 亚类反应时只见一条沉淀线。又进行一次克隆后检查,仍然得到相同的结果。这是否与提取的 IgG 及人血清中,有聚合的 Ig 或不同 IgG 的碎片有关,其原因待进一步探讨。

我们的经验是:免疫小鼠用的抗原,应力求提纯,否则将给筛选鉴定带来麻烦。尽管免疫时可用不纯的抗原,甚至是未知的,但鉴定时必须用很纯的抗原,才能准确、及时地鉴定出 McAb 的性质,确定 McAb 与抗原反应的范围和应用价值。如 McAb 作为研究 Ig 决定簇的试剂时,特异性要高,反应范围要窄,而作为检定

Ig 类别时,则只要求反应范围宽。

本试验得到王世中教授多次指导,免疫抗原由聂良才提取特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Lowe, J. et al.: *Immunology*, **42**(2), 649, 1981.
- [2] 刘尔翔等译:《杂交瘤技术在寄生虫病方面的应用》,人民卫生出版社,北京,1981。
- [3] Goding, J. W.; *J. of Immunological Methods*, **39**(4), 285, 1980.
- [4] 肖俊:《国外医学》, **6**: 290, 分册, **6**: 290, 1982。
- [5] 严自助等:《中华医学杂志》, **58**(8), 470, 1978。
- [6] Ling, N. R: *Brit. J. Haemat*, **7**, 299, 1961.
- [7] 王世中主编:《免疫学技术》,科学出版社,北京,1980。
- [8] Weber, K. et al: *J. B. C.*, **244**(4), 4406, 1969.

[本文于1983年7月7日收到]

分离纯化限制性核酸内切酶的基本方法和纯度鉴定

吴绳祖 吴 雪 陆惠芬 杨 颖

(中国科学院上海生物化学研究所)

为了适应研究工作需要,我们完成了 Bam-HI、EcoRI、PstI^[1]、AluI、BglII、SalI 等十几种限制性核酸内切酶的分离纯化工作,样品在质量上达到国外同类产品的水平。这些酶制剂用于遗传工程及核酸结构功能研究已能取代相应的进口酶,促进了科研工作的发展。

本文报道我们在制备限制性核酸内切酶中常用的几种方法,以及有实用意义的鉴定酶纯度的分析方法。

一、材料与试剂

1. 菌株: *Arthrobacter luteus* (ATCC21606), *Bacillus globigii*, *Streptomyces albus* G.

上述菌株由 CSHL 赠送

2. 试剂: 磷酸纤维素(P11)和 DEAE 纤维素(DE52)为 Whatman 产品; 聚乙烯亚胺, Serva 产品; λ DNA, 本所东风厂产品; 肝素琼脂糖、氨基戊烷琼脂糖, 5'-³²P λ DNA/HaeIII, 本室制备。

3. 磷酸钾缓冲液: 10mM K₂HPO₄-

KH₂PO₄(pH7.4) 1mM Na₂ EDTA, 7mM 巯基乙醇, 10% 甘油。

4. 酶反应液:

NaCl Tris-HCl MgCl₂ DTT
(pH7.4)

AluI 50mM 10mM 10mM 1mM

BglII 60mM 10mM 10mM 1mM

SalI 150mM 10mM 10mM 1mM

二、方 法

1. 菌体培养: *Arthrobacter luteus* 与 *Bacillus globigii* 菌株生长在 P. B 培养基(每升含牛肉膏 10 克, 蛋白胨 8 克、氯化钠 5 克), 30℃ 过夜培养, 低速离心得菌 5 克/升。 *Streptomyces albus* G 菌株生长的培养基(上述 P. B 培养基每升加入 10 克 MgCl₂, 340 克蔗糖), 37℃ 培养 24 至 32 小时, 低速离心得菌 15 克/升。

2. *AluI*, *BglII*、*SalI* 分离纯化(在 4℃ 条件下进行)。

(1) 粗酶制剂提取 菌体 25 克悬浮于 100