

抗人 apo E 单克隆抗体细胞株的建立及其性质分析*

郭 刚 解用虹 王维兆

(天津医学院生化教研室, 天津 300070)

黄健英 刘贤明 牛瑞芳

(天津肿瘤研究所生化室)

关键词 载脂蛋白 E, 单克隆抗体

载脂蛋白 E (apo E) 是人血液中重要的载脂蛋白成分之一, 其遗传表型和血液浓度与高脂蛋白血症及动脉粥样硬化关系密切^[1-2]。制备单克隆抗体和建立相应的免疫化学技术是测定人 apo E 表型和浓度的重要途径。

利用本室建立的不连续密度梯度超速离心方法, 从高甘油三酯血浆中分离极低密度脂蛋白 (VLDL)^[3]。VLDL 用有机溶剂在低温下脱脂, 其可溶性成分经 Heparin-Sepharose CL-6B 亲和柱层析, 可分为低盐洗脱峰 I 和高盐洗脱峰 II。峰 II 经 SDS-PAGE 鉴定为单一染色带, 根据相对迁移率测定其分子量为 33900, 与 apo E 文献报告值一致。此即为纯化的人 apo E。

用 apo E 常规免疫 Balb/c 小鼠。在尾静脉加强免疫后第 4 天, 取免疫鼠脾细胞 (2.5×10^6) 与 NS-1 骨髓瘤细胞 (2.5×10^7) 在 PEG₆₀₀ 作用下融合。融合细胞接种于含 1% HAT 的选择培养基中生长。融合率为 93.3% (224/240)。融合细胞上清液首先用羊抗鼠 IgG 做免疫单扩散, 出现免疫沉淀环者为分泌抗体的杂交瘤细胞; 继用间接 ELISA, 筛选强阳性反应的细胞; 最后用 Western blotting 筛选抗人 apo E 的杂交瘤细胞: 将抗原 apo E 进行垂直板 SDS-PAGE 后, 采用液相夹心式电转移到硝酸纤维素薄膜上。先后分别与待筛选杂交瘤上清液与辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 共同孵育后, 用二氨基联苯胺 (DAB) 显色。选择仅在 apo E 分子量 34kd 区带显色的杂交瘤 5 株, 并对其中一株利用有限稀释法进行了克隆。

将待克隆细胞扩增后, 以 0.5 细胞/孔的密度接种于 96 孔培养板。连续克隆 3 次, 细胞增殖阳性孔分别为 30.2%, 11.5% 和 33.3%。第 3 次克隆后, 所有细胞增殖阳性孔上清液经间接 ELISA 测定阳性率为 100%。我们获得了一株抗体分泌性能稳定的抗人 apo E 杂交瘤细胞, 命名为 4C₄。该单克隆抗体经间接 ELISA 测定, 仅与 apo E 反应, 与人 apo A₁, A₂, B, C₁, C₂ 和 C₃ 无交叉免疫反应。其与 apo E 的反应并经上述 Western blotting 证实。

将 Balb/c 小鼠脾细胞, NS-1 骨髓瘤细胞及 4C₄ 杂交瘤细胞分别经 95% 冷乙醇固定, 用流式细胞仪测定 NS-1 的 DNA 指数为 1.75, 4C₄ 杂交瘤细胞的 DNA 指数为 2.70, 后者为前者的 1.54 倍。杂交瘤细胞的 DNA 含量明显高于 NS-1, 表明杂交瘤细胞是脾细胞和 NS-1 的融合体。

4C₄ 杂交瘤细胞培养上清液经 Protein A-Sepharose CL-4B 亲和柱层析分离, 可获得高浓度纯化的单克隆抗体。经免疫双扩散鉴定单克隆抗体的亚型为 IgG₁。纯化的单克隆抗体经 7.5% PAGE, 仅呈现单一的染色带。经含巯基乙醇的 SDS-PAGE, 呈现二条染色带, 根据相对迁移率计算分子量为 53kd 和 27kd, 各相当于重链和轻链。

杂交瘤细胞扩大培养后注入预先给予降植烷的 Balb/c 小鼠, 约两周左右可产生富含单克隆抗体的腹水, 其滴度最低为 10^5 。

* 国家自然科学基金资助课题。

技术与方法

从癌性腹水中分离 III 型前胶原氨基末端肽

李新民 殷蔚蕙 李忆梅 薛竹马 兰

(北京友谊医院消化研究室, 北京 100050)

提 要

采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 二次不同 pH 的 DEAE-Sephacel 离子交换柱层析及 Sephacryl S-200 分子筛柱层析从人癌性腹水中分离并纯化了 PIIP, 并制备了抗血清。经 SDS-PAGE 鉴定为均一蛋白带, 分子量约为 47kD。经西德药盒测定, 与西德、芬兰 PIIP 抑制曲线平行关系良好。氨基酸组成测定亦与文献报道基本一致。抗血清效价较高, 特异性强。本研究在方法学上有一定创新, 提纯方法简便易行。

关键词 人, 腹水, III 型前胶原肽, 纯化

大量胶原沉积于肝组织中造成的肝纤维化是慢性肝病及肝硬化肝功能障碍及多种并发症的原因。以前采用肝组织活检方法确定肝纤维增生程度, 由于其创伤性及难以反复进行而无法广泛应用。七十年代后期国外开展了血清学诊断方法的研究。1979 年 Rohde^[1] 第一个从胎牛皮中分离提纯了 III 型前胶原氨基末端肽 (PIIP, 45kD), 并建立了 RIA 检测方法, 证明血 PIIP 含量在肝病中的诊断意义。1983 年, 西德贝林格厂制成 PIIP 药盒出售。大量文献证明为一较好的肝纤维化血清检测指标^[2-4], 在国外已被广泛应用。由于其价格昂贵, 在我国难以广泛使用。为给肝纤维化的诊断及研究提供手段, 我们从人腹水中提取 PIIP 并制备抗血清, 建立了血清 PIIP 检测方法。

材料及方法

1. 材料

(1) 人癌性腹水 畸胎瘤腹腔转移患者的腹水

(2) 主要试剂 N-乙基顺丁烯二酰亚胺 (NEM), 苯甲磺酰氟化物 (PMSF), 对氯汞苯甲酸 (PMB), RIA-Gnost Procollagen-III-Peptide, Procollagen PIIP [¹²⁵I] Radioimmunoassay Kit、DEAE-Sephacel、Sephacryl S-200。

(3) 实验动物 新西兰白兔 (北京实验动物中心提供), 雄性, 体重 2.5kg。

2. 方法

(1) PIIP 的提取与纯化 取癌性腹水 3L, 加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 到 40% 饱和度, 搅拌

参 考 文 献

- 1 Gabelli C *et al.* J Lipid Res, 1986; 27: 326
- 2 Utermann G. Am Heart J, 1987; 113: 433

3 解用虹等. 生物化学与生物物理学报, 1987; 19: 277

[本文于 1991 年 6 月 17 日收到, 7 月 24 日修回]