

6 株抗人 IgE 重链 McAbs 杂交瘤细胞株的建立和鉴定

邹明发 林嘉友 肖俊* 周彤 刘尔翔 吴安然

(中国医学科学院基础医学研究所免疫室,北京)

IgE 对过敏性疾病的重要性已被公认。临床上应用抗人 IgE 多克隆抗体对 I 型过敏性疾病总 IgE 进行检测,以助诊断和研究过敏性疾病的机制。本文应用杂交瘤技术建立 6 株抗人 IgE 重链单克隆抗体 (McAb) 杂交瘤细胞株,并应用 McAb 对 IgE 抗原决定簇进行初步分析。

一、材料及方法

细胞融合的基本材料及方法同常规方法^[1,2]。

1. 抗原、动物和免疫方法 抗原—IgE (骨髓瘤蛋白,由 Ishizaka 赠送)^[3]。经过纯化后应用。基础免疫用 0.55 mg IgE 加福氏完全佐剂,腹腔注入 BALB/c 小鼠 (6—8 周龄)。16 天后腹腔注入 0.5 mg IgE (生理盐水配制),41 天后连续加强 4 次,每日一次,抗原量为 0.1, 0.2, 0.3 和 0.4mg。于末次免疫后的次日取脾细胞作融合。

2. 小鼠骨髓瘤细胞株 应用非分泌型小鼠骨髓瘤细胞株: SP2/0. Ag14^[4] (简称 SP2/0),由巴塞尔研究所引进。经 8-氮杂鸟嘌呤传代筛选。融合时选用对数生长期细胞。

3. McAb 的检测方法 用 ELISA 间接法^[1],被动血凝试验 (PHA) 和被动血凝抑制试验^[1] (PHAI) (偶联抗原改用 0.1 M pH 5.6 醋酸缓冲液),琼脂糖免疫双扩散试验^[5] 以及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[1] (SDS-PAGE) 等方法。

4. ELISA 竞争试验^[5]:

(1) McAb 酶结合物的制备 (简称 McAb-HRP) 将 E1A6, E1C4, E3A4, E3B2, E3B3

和 E3B5 6 株杂交瘤细胞所产生的腹水液,经 50% 饱和硫酸铵沉淀透析后,分别应用 Protein A Sepharose-CL 4B 亲和层析柱方法^[6]提纯。将纯化后的 McAb,各取 8.0 mg 分别加入辣根过氧化物酶 (中国科学院上海生化所制, RZ > 3) 4.0mg,按经典过碘酸钠方法^[7]制备 McAb-HRP。

(2) McAb-HRP 的最适稀释浓度的选择按常规结合物滴定的基础上,再进一步选择包被 IgE 抗原 1 μ g/ml,每孔 200 μ l 的情况下,其 O.D. 值达到 1—2 之间为竞争试验的结合物稀释浓度。

(3) 步骤:试剂和基本方法同文献[5]。固相载体为上海塑料三厂生产的 40 孔聚苯乙烯酶标板 (简称酶标板)。

a) 包被 将人 IgE 用 pH9.6 碳酸盐缓冲液 (简称包被液) 稀释为 1 μ g/ml。包被酶标板,每孔 0.2ml,置 4 $^{\circ}$ C, 18 小时。

b) 加竞争性 McAb 取抗原包被板 6 块,每板 1—6 列 (每列均有 A. B. C. D. 4 孔),分别加入用 pH7.4 PBS-Tween20 (简称 PBS-T) 稀释的 E1A6, E1C4, E3A4, E3B2 E3B3 和 E3B5 McAbs 腹水液 (1:250); 第 7 列加入 1:250 稀释的无相关 McAb (简称 7C2); 第 8—10 列加入 PBS-T, 8, 9 两列为 PBS-T 对照。第 10 列为本底对照,以后不加封闭 McAb 和 McAb-HRP。以上各试验每孔均为 0.2ml,置 37 $^{\circ}$ C, 2 小时。

c) 加 McAb-HRP 根据滴定将 E1A6, E1C4 和 E3B5 McAb-HRP 用 PBS-T 稀释为

* 山东省医学科学院进修生

1:20000; E3 A4, E3 B2 和 E3 B3 McAb-HRP 稀释为 1:200000 后,每块酶标板加一种 McAb-HRP,每孔 0.2ml,置 37°C,2 小时。

每步间均用 PBS-T 洗三次,每次 3 分钟。以后步骤同 ELISA 间接法^[5]。

二、结 果

1. 杂交瘤细胞的融合率和抗体的阳性率

应用 pH7.0 50% PEG 1000(W/V)进行融合,融合后 4 天开始出现杂交瘤细胞集落群。10 天后应用 ELISA 间接方法检测抗体的阳性情况(连续检测两次)。取 O.D. 值大于 0.3 以上作为阳性标准(应用 RPMI 1640 培养基和 pH7.4 PBS-Tween 20 作阴性对照,其 O. D. 值均为“0”)。结果见表 1。

表 1 杂交瘤细胞融合率和抗体阳性率

融合率			阳性率		
试验孔数	融合孔数	%	检测孔数	阳性孔数	%
72	55	76.4	48	23	47.9

2. 6 株分泌抗人 IgE McAbs 杂交瘤细胞株的建立和鉴定

经过三次克隆化后获得的 6 株抗人 IgE 杂交瘤细胞株,在含有 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 48 小时,ELISA 的 O.D. 值经 1:2 稀释后仍达 1.0,有些达 1.8

以上;PHA 滴度介于 1:320—1:1280 之间。将杂交瘤细胞注入同系小鼠腹腔后,产生腹水液,其 PHA 滴度高达 1:256000—1:2048000,说明腹水液中 McAb 含量很高。

McAb 腹水液,用 PHA 和琼脂糖免疫双扩散试验鉴定证明 6 株抗人 IgE McAbs 腹水液仅与人 IgE 发生反应,而与 IgG, IgA, IgM, IgD 以及 Kappa 和 Lambda 均不发生反应,是对人 IgE 重链(ϵ)特异的 McAb。见表 2。

3. PHAI 试验 6 株抗人 IgE McAbs 杂交瘤细胞所产生的腹水液,PHAI 试验均为阳

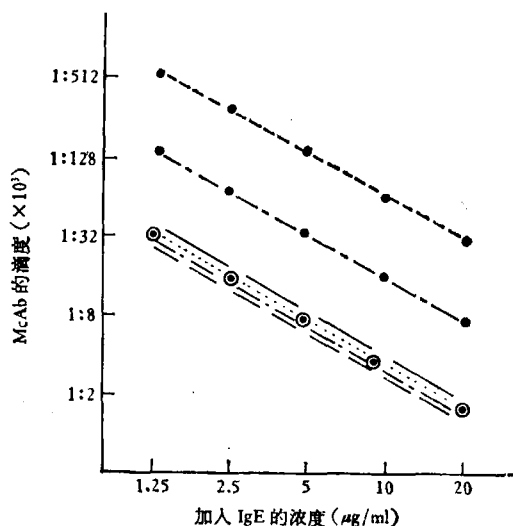


图 1 被动血凝抑制试验

E3B2(-----), E3B5(.....), E1A6(○-○),
E1C4(○.....), E3A4(○-○-○), E3B3(○-○-○)

表 2 分泌抗人 IgE McAb 杂交瘤细胞株的建立和鉴定

细胞株	培养上清		腹 水 液														
	ELISA* (O.D.)	PHA*	PHA								PHAI IgE	免疫双扩散					
			IgF ($\times 10^3$)	IgG	IgA	IgM	IgD	K	λ	IgE***		IgG	IgA	IgM	IgD	K	λ
E1A6	1.34 $\times 2$	1:320	1:512	---	---	---	---	---	---	+	+	-	-	-	-	-	-
E1C4	1.04 $\times 2$	1:320	1:256	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
E3A4	1.80 $\times 2$	1:320	1:512	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
E3B2	1.28 $\times 2$	1:320	1:2048	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
E3B3	1.42 $\times 2$	1:320	1:512	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
E3B5	1.30 $\times 2$	1:1280	1:1024	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
阳性对照* ($\times 10^3$)			1:256	1:128	1:256	1:256	1:128	1:8	1:4								

注: * 对相应的免疫原 *** - 表示效价低于 1:10

*** 透明沉淀线 - * 相应的阳性抗体

性(见图1),与所加抗原量(1.25,2.5,5.0,10和20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)呈线性关系。进一步证明 McAbs 的特异性。(其中6种抗人 IgE McAbs 曾送往瑞士伯尔尼大学临床和实验肿瘤研究所 Skvaril 教授鉴定,亦证明是对人 IgE 重链特异的 McAbs_c)

4. McAb 的小鼠 IgG 亚类的鉴定 将6株杂交瘤细胞的无血清培养液(即RPMI 1640培养液加倍量谷氨酰胺。以下简称无血清培养液)浓缩15倍后与兔抗小鼠 IgG 亚类标准血清(Miles 公司产品)作琼脂糖免疫双扩散试验,结果均属小鼠 IgG1。

5. McAbs SDS-PAGE 试验 6株杂

交瘤细胞的无血清培养液,离心 10000rpm 10分钟后取上清液作 SDS-PAGE 试验,结果见图2(封3)。未经2-巯基乙醇还原的 McAb 经 SDS-PAGE 检查只呈现一条区带,经2-巯基乙醇还原后也只显示二条区带,轻链部份未见两型轻链混杂,说明所获得的6株抗人 IgE McAbs 均来自免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞分泌的重链和轻链,是均一性。

6. 应用 McAb 对人 IgE 抗原决定簇的分析:

1) 琼脂糖免疫双扩散方法^[5],用6种抗人 IgE McAbs 对人 IgE 抗原决定簇的分析,发现抗人 IgE McAbs 均属针对人 IgE 6个不同抗

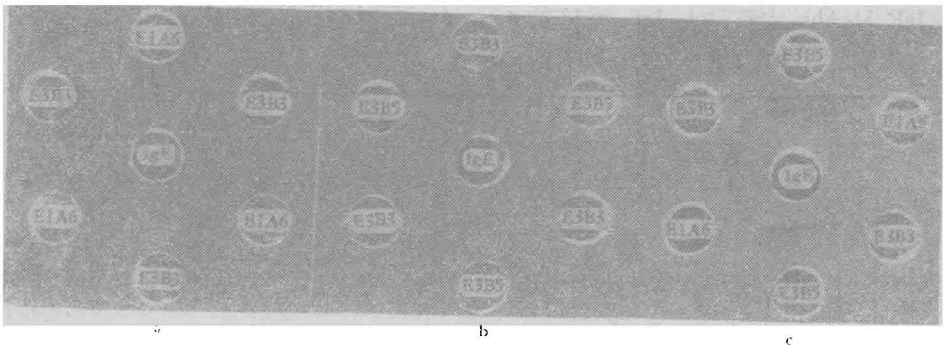


图3 应用免疫双扩散试验对抗人 IgE McAbs 的分析

中心孔: 加入人 IgE (4mg/ml), 每孔 10 μl

周围孔: 加入 McAb 腹水液, 每孔 10 μl

a. McAbs E1A6 和 E3B3 形成融合的透明沉淀线。

b. McAbs E3B3 和 E3B5 形成融合的透明沉淀线。

c. McAbs E3B5 和 E1A6 形成“V”形乳白色沉淀线。

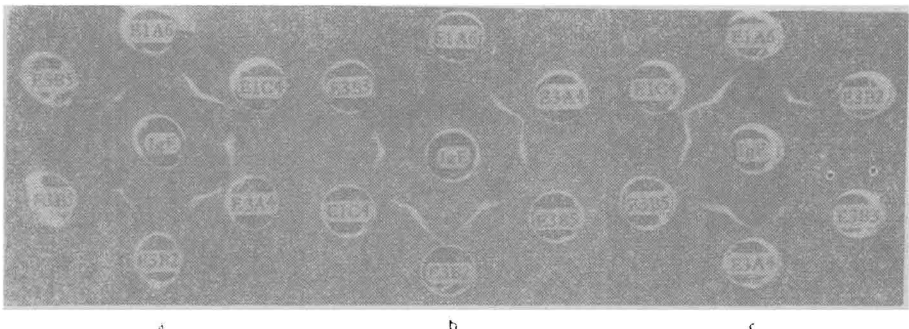


图4 应用免疫双扩散试验对抗人 IgE McAb 的分析

中心孔: 加入人 IgE (4mg/ml), 每孔 10 μl 。

周围孔: 加入 McAb 腹水液, 每孔 10 μl 。

McAbs E3B5, E1A6, E1C4, E3A4 和 E3B2 之间形成“V”形沉淀线。而 McAb E3B3 和 E1C4, E3A4 或 E3B2 之间形成“V”沉淀线。

原决定簇。在双扩散的中心孔加入人 IgE (4 mg/ml) 10 μ l, 周围孔加入 McAbs 腹水液各 10 μ l, 除在抗原孔和抗体孔之间形成透明沉淀线外, 还在外周相邻抗体孔与中心抗原孔形成的沉淀线汇合处出现“V”形(或飞燕形)乳白色沉淀线。为了阐明此现象, 我们设计了图 3 和图 4 中所列各种试验图像, 由图 3 可见: (1)两种相同的抗原决定簇的 McAbs 形成融合的透明沉淀线(E3B3 和 E3B5 或 E1A6); (2)不同的 McAbs 形成“V”形沉淀线(E3B5 和 E1A6), 说明此三种 McAbs 针对人 IgE 上三个不同抗原决定簇。而其他三种 McAbs E1C4, E3A4 和 E3B2 之间以及它们与 E1A6, E3B3 或 E3B5 均形成“V”形沉淀线(见图 4)。由此说明 6 种抗人 IgE McAbs 均属对人 IgE 重链的 6

个不同抗原决定簇。

上述结果在含有 2% PEG 6000 的 1.5% 琼脂糖免疫双扩散试验亦得到相同的结果。即相同的抗原决定簇的 McAbs 形成融合的乳白色沉淀线; 不同的抗原决定簇 McAbs 则形成乳白色交叉形的沉淀线。

2) ELISA 竞争试验, 结果如表 3 所示(共做三次试验结果均同, 表 3 所列为其中一次试验的结果) McAb 对相应的 McAb-HRP 有明显的抑制作用。各 McAb 之间的相互抑制试验的结果基本上与琼脂糖免疫双扩散试验的结果相同, 即 E3B3 和 E3B5 之间相互完全抑制, 而 E1A6 和 E3B3 或 E3B5 之间不能相互完全抑制, 甚至 E1A6 根本不能抑制 E3B5。说明三个 McAbs 所针对的抗原决定簇有不同之处。

表 3 ELISA 竞争试验

McAb-HRP	竞争性 McAb·O.D. \pm S.D. (4 孔的均值)								
	E1A6	E1C4	E3A4	E3B2	E3B3	E3B5	7C2	PBS-T	本底对照
E1A6 (1:20000)	0.560* \pm 0.018	2.433 \pm 0.059	2.413 \pm 0.010	2.303 \pm 0.095	0.160* \pm 0.100	0.590* \pm 0.036	1.975 \pm 0.160	2.168 \pm 0.067	0.010 \pm 0.019
E1C4 (1:20000)	2.343 \pm 0.028	0.245* \pm 0.123	2.393 \pm 0.005	2.055 \pm 0.060	2.340 \pm 0.026	2.383 \pm 0.017	1.283 \pm 0.104	1.353 \pm 0.108	0.050 \pm 0.008
E3A4 (1:200000)	0.665 \pm 0.073	0.485 \pm 0.066	0.105* \pm 0.006	0.660 \pm 0.008	0.738 \pm 0.025	0.798 \pm 0.057	0.473 \pm 0.021	0.485 \pm 0.021	0.053 \pm 0.010
E3B2 (1:200000)	0.675 \pm 0.021	0.553 \pm 0.069	0.678 \pm 0.074	0.140* \pm 0.008	0.680 \pm 0.039	0.700 \pm 0.0180	0.450 \pm 0.045	0.450 \pm 0.024	0.055 \pm 0.013
E3B3 (1:200000)	0.265* \pm 0.013	0.515 \pm 0.031	0.698 \pm 0.030	0.460 \pm 0.091	0.088* \pm 0.005	0.090* \pm 0.027	0.473 \pm 0.010	0.473 \pm 0.031	0.068 \pm 0.015
E3B5 (1:20000)	2.365 \pm 0.013	1.760 \pm 0.272	2.383 \pm 0.060	2.232 \pm 0.078	0.368* \pm 0.043	0.420* \pm 0.024	1.503 \pm 0.167	1.433 \pm 0.084	0.115 \pm 0.057

注 1. * 被封固

2. 7C2: 非相关 McAb

3. 包被入 IgE 的浓度: 200 μ g/well

4. 竞争性 McAb 的稀释浓度: 1:250

三、讨 论

1. 我们应用人 IgE 多次免疫 BALB/c 小鼠, 取脾细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞融合, 获得 6 株抗人 IgE McAbs 杂交瘤细胞株。经过 ELISA 间接法、被动血凝试验和被动血凝抑制试验, 以及琼脂糖免疫双扩散试验, 证明对人 IgE 是特异的, 属于抗人 IgE 重链(ϵ)特异的 McAbs。

2. 应用 McAb 对人 IgE 结构分析: 本文

报道的 6 个 McAbs 中 E3A4, E3B2 和 E1C4 之间, 以及它们与其他 3 个 McAbs (E1A6, E3B3 和 E3B5) 所针对的抗原决定簇是完全不同的。后 3 个 McAbs 之间的关系经对琼脂糖免疫双扩散试验和 ELISA 竞争试验结果的分析, 说明这 3 个 McAbs 所针对的抗原决定簇有相同之处, 也有不同之处而且以同为主, 但还存在差异。因之, 初步认为它们是针对 3 个不同的抗原决定簇的。实验系统中所表现的这种差异是决定簇本身的微小差异, 还是由于这 3 个

决定簇在人 IgE 抗体分子中的相关位置所引起,有待进一步研究。目前本实验室仅有一个骨髓瘤病人的纯 IgE 抗原,如能得到更多的骨髓瘤病人 IgE 纯抗原进行抗原决定簇的分析,当能对是否存在后一种可能性得到较明确的结果。

3. 在 ELISA 竞争试验中,我们发现加入针对不同抗原决定簇的竞争性 McAb 孔后, O. D. 值比未加入竞争 McAb 孔或加入不相关 McAb 的 O. D. 值增高,这一现象在 3 次试验中均重复出现。其原因尚不清楚。Ehrlich 等^[8]和 Moyle 等^[9]研究证实,针对 2 个不同抗原决定簇的 McAbs 混合后其对抗原的亲合力高于单一 McAb 的亲合力。Moyle 等并进一步证明这一亲合力增高现象是由于 2 个 McAb 分子与两个抗原分子在免疫反应中形成一个四聚体环状复合物所致。我们竞争试验中的 O. D. 值增高可能与此原因有关。

4. 影响透明沉淀线出现的因素。我们已经报道过 IgG 抗原与相应的 McAb 反应时出现透明沉淀线,并对其机理作了初步分析^[5]。本文用抗人 IgE McAb 对透明沉淀线的形成条件作了初步探讨。(1) 不同厂出品的琼脂糖对透明沉淀线的形成没有影响。我们使用三个厂的产品(青岛水产品加工厂,海燕牌 4#;上海东海制药厂和 Serva 厂),在相同条件下进行免疫双扩散试验,均可形成清晰的透明沉淀线。但使用 1% 琼脂 (Difco agar) 进行免疫双扩散试验则形成乳白色沉淀线,这与含有 2% PEG 6000 的 1.5% 琼脂糖的结果完全一致。(2) 抗原和抗体的浓度对透明沉淀线形成有直接关系。我们试验人 IgE 抗原浓度低于 1mg/ml 时与不同浓度 McAb (从原液稀释到 1:32) 均不形成透明沉淀线。但抗原浓度大于 2mg/ml 时, McAb 浓度稀释 1:4 时仍可出现透明沉淀线,说明抗原浓

度和 McAb 的浓度对透明沉淀线的形成有直接关系。

5. 抗人 IgE McAb 的应用: Chandler^[10] 建立两株抗人 IgE McAbs 杂交瘤细胞株,并应用检测人血液中总 IgE。Conrad^[11] 获得两株抗大鼠 IgE McAbs, 用于对肥大细胞和嗜硷性细胞组织胺释放等研究。我们建立 6 株抗人 IgE 重链特异 McAbs, 经过筛选后除可应用于过敏性疾病的临床诊断,还可以应用于 I 型过敏性疾病机理的探讨。

人 IgE 在血清中含量甚微 (μg 水平) 因而纯化非常困难。用抗人 IgE McAb 制成亲和层析柱对人 IgE 进行纯化,得到的纯 IgE,可用于 IgE 的结构和功能方面研究。

其它鉴定用的 IgA, IgM 和 IgD 抗原由本所生化室免疫化学组赠与; Kappa 和 Lambda 抗原由卫生部上海生物制品研究所赠与,一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 邹明发等:《中华微生物学和免疫学杂志》,3(5),278, 1983。
- [2] 刘尔翔:《北京医学》2(4), 244, 1980。
- [3] Ishizaka, K. et al.: *Immunochemistry*, 7, 687 1978。
- [4] Shulman, M. et al.: *Nature*, 276, 269, 1978。
- [5] Zou Mingfa, et al.: *Scientia Sinica (Series B)* 27 (8), 818, 1984。
- [6] Baeber et al.: *Selected Methods in Cellular Immunology*, P351, 1980。
- [7] 汪美先等:《医学情报资料》(ELISA 专辑)4-5, 81, 1979。
- [8] Ehrlich, P. H. et al.: *J. Immunology*, 128(6), 2709, 1982。
- [9] Moyle, W. R. et al.: *J. Immunology*, 131 (4), 1900, 1983。
- [10] Chandler, H. M. et al.: *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.*, 72, 267, 1983。
- [11] Conrad, D. H. et al.: *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.*, 70, 352, 1983。

[本文于 1984 年 2 月 13 日收到]

抗原基因工程研究取得进展——简介中国农业科学院幼畜腹泻致病菌 抗原基因工程研究成果

1985 年 3 月 24—28 日国家科委“中国生物工程开发中心”在武汉召开了基因工程疫苗研究工作交流讨论会。中国农业科学院分子生物学研究室和中国农业

科学院哈尔滨兽医研究所交流了联合攻克猪、牛、羊幼畜腹泻病致病菌抗原基因工程研究取得进展:(1) 成
(下转第 65 页)

