

大鼠杂交瘤技术及抗HIV、HBsAg大鼠 单克隆抗体的制备

方家椿¹ M. Bodeus² G. Burtonboy²

¹(北京市肿瘤研究所细胞生物学室, 北京)

²(比利时鲁汶大学医学院病毒室, 布鲁塞尔)

在目前制备单克隆抗体的三个主要体系: 小鼠、大鼠和人杂交瘤体系中, 大鼠系统具有某些特有的优点。本文以制备抗艾滋病病毒和抗乙型肝炎表面抗原的大鼠单克隆抗体为例, 较详细的介绍了大鼠杂交瘤的特点及大鼠单克隆抗体制备技术。

关键词 大鼠杂交瘤技术; 艾滋病病毒; 乙型肝炎表面抗原; 大鼠单克隆抗体

目前, 单克隆抗体(以下简称单抗)的制备主要采用小鼠、大鼠和人杂交瘤技术。其中, 人单抗由于某些技术上的困难, 成功的例子尚不多见。小鼠杂交瘤是1975年由Köhler和 Milstein 首创用于研制单抗的系统, 目前有关单抗的资料主要来源于这一系统。而大鼠杂交瘤与小鼠体系比较具有以下优点^[2-4]: 1. 大鼠的“抗体库”(antibody repertoire)与小鼠不完全相同, 对某些抗原大鼠可能产生比小鼠更强的免疫反应。据报道, 90%生长的大鼠杂交瘤细胞可表达脾B细胞的免疫球蛋白, 而小鼠杂交瘤仅有60%表达^[5]; 2. 大鼠非分泌型亲本骨髓瘤细胞系回复突变率比小鼠的低(10^{-4} /细胞世代对 10^{-3} /细胞世代); 3. 大鼠 IgG₁、IgG₂和 IgG_{2b}型单抗易于固定人类补体。如果该单抗考虑用于治疗, 此特征将具有一定意义; 4. 大鼠腹水产量约为小鼠的10倍, 单抗产量远比小鼠的高^[6]; 5. 大鼠单抗的纯化方法更加容易、高效而便宜。

当前, 单抗的研制方兴未艾, 而大鼠杂交瘤无疑是另一个具有实用价值、值得

推广应用的系统。大鼠杂交瘤技术应用于病毒学、微生物学、血液学等已有不少报道^[7-9]。

本文以研制抗艾滋病病毒(HIV)和抗乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的大鼠单抗为例, 介绍大鼠杂交瘤的特点及大鼠单抗的制备技术。

材 料 和 方 法

(一)动物和细胞系

1. 免疫动物: 采用2—3月龄的 LOU/C 大鼠, 雌雄皆可。有关该鼠的特征可参阅文献[2, 10—12]。

2. 用于融合的骨髓瘤细胞系 IR983F: 来源于LOU/C大鼠的非分泌型浆细胞瘤^[4], 后经筛选为8-氮鸟嘌呤抗性细胞系。

3. CEM细胞系是一株人T淋巴细胞白血病细胞系^[13], 在本文中用作繁殖

本文于1989年10月3日收到。

本文系作者于1987—1988年在比利时鲁汶大学医学院病毒室完成的部分工作。

艾滋病毒的宿主细胞。

(二)培养液

1. IR983F 细胞的培养用改良的 Dulbecco's Eagle(DMEM)培养液,含 10%灭活胎牛血清, 1%非必需氨基酸, 1%丙酮酸钠(0.1mol/L), 1%谷氨酰胺, 0.1%庆大霉素(50mg/ml)。

2. 杂交瘤细胞的筛选用 HAT 培养液^[14]。

3. CEM细胞用 1640 培养液培养。

(三)饲养层细胞

于细胞融合前二天,取大鼠腹腔巨噬细胞,悬浮于HAT培养液内(2×10^5 细胞/ml),接种入96孔培养板,0.1ml/孔,置于CO₂培养箱(37℃)培养。

(四)大鼠的免疫

1. 将4000ml培养 HIV 的上清,高速离心,20000rpm,4h,去上清,含病毒颗粒的沉淀重新悬浮至1ml PBS内,加等量完全弗氏佐剂乳化,注入 LOU/C (Ilg-1a) 大鼠腹腔,15天后第二次免疫,3—6个月后于融合前三天加强免疫,三次免疫的剂量和注射途径均相同,但加强免疫不加弗氏佐剂。

2. 用HBsAg(基因工程合成)免疫大鼠,方法同前,剂量20μg/次。

(五)细胞融合

基本上按照文献[7]的方法,具体步骤如下:将IR983F细胞(5×10^7)和免疫大鼠的脾细胞($10-15 \times 10^7$),用无血清EMEM培养液(或PBS)洗二次,将二种细胞混合悬浮于EMEM液内,离心(200g,10min),去上清,轻微振摇使细胞团分散,于37℃水浴1分钟内缓慢滴加1ml 50%聚乙二醇(PEG4000, Merck),继续作用90秒后,于2分钟内缓慢滴加20ml EMEM液以稀释PEG,离心,去上清,加入100ml HAT 培养液使细胞悬浮,将

细胞悬液加入铺有饲养细胞层的96孔板,100μl/孔,放入CO₂培养箱培养。此后每隔2天用HAT培养液半量换液,10天后改用HT培养液,继续使用二周后换正常DMEM培养液。

(六)单抗的检测

1. 间接免疫荧光法^[15]:将HIV感染和未感染的CEM细胞滴在载玻片上,用冷丙酮固定10min,待干,然后滴加待测杂交瘤细胞培养上清,培育30min(37℃),PBS洗三次后,加FITC标记的羊(或兔)抗大鼠Ig抗体,培育30min(37℃),PBS洗三次后用90%甘油封片,荧光显微镜检查。

2. 荧光激活细胞分类法(FACS):将HIV感染和未感染的CEM细胞,分别加入待检测杂交瘤上清培育45min(37℃),用含2.5%小牛血清的PBS洗二次,用FITC标记的二抗培育45min(37℃),经PBS洗二次后用1%甲醛固定,用FACS仪测定。

3. 免疫印迹法(Western blotting, W.B)分析:将标准分子量蛋白样品和HIV感染及未感染的CEM细胞样品,用聚丙烯酰胺-SDS凝胶电泳,然后按照 Towbin 等^[16]的方法电泳转移到硝酸纤维素薄膜上,经乳蛋白封闭4h(室温),用PBS(含0.1%吐温)洗三次,将薄膜用杂交瘤上清培育1h(室温)后过夜(4℃),用PBS-吐温洗三次,用过氧化物酶标记的兔抗大鼠二抗培育1h(室温),经PBS-吐温洗三次后用4-氯-1-萘酚(含0.001% H₂O₂)显色。

4. 酶联免疫检测(EIA):抗HBsAg单抗的筛选用AUSAB酶免疫试剂盒检测,其方法如下:将包被有人HBsAg的聚苯乙烯珠用待检杂交瘤培养上清培育,洗涤三次后加入生物素偶联的HBsAg,

经培育后洗涤, 加过氧化物酶标记的亲生素培育, 最后用邻苯二胺 (OPD) 显色, 酶标仪测定结果。

(七) 单抗免疫球蛋白分型

采用双向免疫扩散法。

(八) 杂交瘤软琼脂克隆法

用 0.6% 含 DMEM 的琼脂培养基, 加入 4 个小平皿 ($3 \times 1 \text{cm}$), 1.5ml/平皿, 待凝, 将杂交瘤细胞浓度调至每毫升 2000, 1000, 500 和 250 个细胞, 与等量 0.6% 琼脂培养基混合, 加到底层琼脂上, 0.4ml/平皿, 置于 CO_2 培养箱培养 (37°C), 二周后即有肉眼可见细胞集落出现。用巴斯德吸管将分散好的单个集落转移至 24 孔培养板, 几天后检测培养上清单抗原分泌情况。

(九) 大鼠单抗的纯化

1. 用亲和层析柱纯化大鼠腹水中的单抗: 按照文献[17]的方法。该亲和柱用 7.5g Sepharose 4B (Pharmacia), 大约固化 200mg 小鼠抗大鼠 κ 轻链单抗 (MARK-1)。先用三倍柱床容积的 PBS 洗柱, 然后加样, PBS 洗脱 ($A_{280 \text{nm}}$), 第一个峰为杂蛋白, 接着用含 2.5mol/L NaCl 的 PBS 洗脱去除非特异结合蛋白, 换 PBS 洗脱至回复到基线, 改用 pH 2.8 的甘氨酸-HCl 缓冲液, 此时出现第二个峰即为纯化的单抗。收集这部分洗脱液并尽快用 0.1mol/L, pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中和, 经透析后浓缩保存。

2. 用离子交换柱纯化大鼠单抗: 首先将腹水稀释二倍, 然后用 50% 硫酸铵沉淀, 重新用盐溶液溶解此沉淀, 并用 Tris-HCl (0.05mol/L, pH 8.0) 平衡, DEAE 柱亦用相同缓冲液平衡, 单抗用一线性梯度缓冲盐溶液洗脱, 其缓冲盐液 Tris-HCl + NaCl 终浓度各为 0.05mol/L, pH 8.0。

结 果 和 讨 论

(一) IR983F 大鼠骨髓瘤细胞生长曲线

据报道[18,19], 用于融合的骨髓瘤细胞须保持对数生长状态。为此, 除了给细胞提供有足够的营养和生长促进因子而无毒性因子的培养液外, 细胞还需有适宜的密度。本实验比较了 IR983F 细胞密度与生长的关系, 当细胞从液氮中复苏后, 细胞浓度需大于 $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ 始可增殖, 若低于 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$, 则细胞生长曲线逐渐降低, 细胞趋于死亡(图略)。

(二) 免疫程序与阳性杂交瘤比率的关系

本实验比较了加强免疫一次和连续加强免疫三次的效果, 结果显示, 一次加强免疫(融合 G), 其阳性杂交瘤为 14%, 当改为三次加强免疫(融合 H 和 I), 阳性杂交瘤比率分别增至 46% 和 42% (表略), 提示三次加强免疫可提高阳性率。

(三) 软琼脂中的细胞克隆

CEM 细胞和杂交瘤细胞接种于软琼脂后 2—3 周即有肉眼可见细胞克隆(表 1)。从表中可以看出, 每个小平皿中接种 100—500 个细胞可获得单个分散的细胞集落, 由于有时单个细胞集落可能来自一个以上的细胞, 因此再次克隆常常是必要的。

除上述软琼脂克隆法以外, 有限稀释法是另一个可行的方法, 可参阅有关文献。

(四) 单抗的免疫球蛋白分型

在双向免疫扩散实验中, 本实验获得的单抗分别被鉴定为 IgG_1 、 IgG_{2a} 、 IgG_{2b} 和 IgM (表 2)。

(五) 大鼠单抗的纯化

由于 95% 的大鼠免疫球蛋白携带有

表 1 软琼脂中生长的细胞克隆
Table 1 Cloning of cells in soft agar (number of clone/petri dish)

细胞或杂交瘤 Cell or hybrids	接种细胞数/平皿 Number of cell/petri dish						
	100000	10000	1000	500	250	125	100
CEM	++	+	23	ND	ND	ND	2
CEM	ND	ND	20	13	5	2	ND
I1C11	ND	ND	10	8	5	1	ND
I7G9	ND	ND	9	7	0	1	ND
I8G11	ND	ND	1	0	0	0	ND
I9E8	ND	ND	5	0	4	3	ND

+, 克隆数在200以上 Number of clones superior to 200

++, 非常高的克隆数 Very high number of clones. ND, Not done

表 2 单克隆抗体的免疫球蛋白分型
Table 2 The Immunoglobulin class and subclass of McAb

免疫球蛋白类型 Type of Ig	大鼠单克隆抗体 Rat monoclonal antibodies	%
IgG ₁	B7A7 E5F4 G4D11 H8H5 I1C11 I7G9 M1A6	24
IgG _{2a}	G4E6 G4F9 G4H10 H11B2 H12F3 H14C5 I5B11 I8G11 M8B3 M14F12 M11E10	40
IgG _{2b}	RH2 RH40 RH42 RH46	13
IgG _{2c}	H8C10	3
IgM	RH8 RH50 G4D2 G8H11 G9E8 G2G1	20

Kappa型轻链且在酸性pH 中是稳定的, 因此采用抗大鼠 κ 轻链的单抗制备的免疫亲和层析柱, 能很方便而有效的将绝大多数大鼠单抗纯化^[17]。

在LOU大白鼠 κ 轻链的恒定区有一异型位点, 其中Ig κ -1a型为LOU/C大鼠携带, 而Ig κ -1b异型为另一近亲繁殖系(DA, LOU/C·Ig κ -1b)携带, 这两株大鼠是完全组织相容的。

将分泌Ig κ -1a型单抗的杂交瘤接种到Ig κ -1b大鼠体内, 取其腹水, 通过一个用抗大鼠Ig κ -1a单抗(Mouse Anti-Rat Kappa Ig κ -1a allotype, MARK-3)制备的亲和层析柱, 其腹水中的杂蛋白包括宿主的免疫球蛋白(Ig κ -1b)都在第一个峰洗脱下来, 而与亲和柱结合的大鼠单抗, 用一酸性缓冲液(pH2.8)即可洗脱下来。

本实验中, 抗HIV单抗E5F4采用MARK-1亲和层析柱纯化的洗脱峰曲线

如图1所示, 第二峰为纯化的单抗。

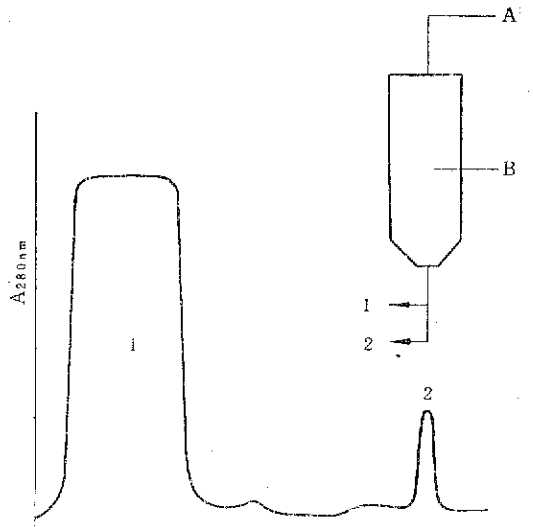


图 1 E5F4单抗通过MARK-1亲和层析柱纯化
Fig.1 Purification of McAb E5F4 by affinity chromatography on a MARK-1 column
A. E5F4杂交瘤培养上清Culture supernatant of E5F4 hybridoma B. 固相化小鼠抗大鼠 κ 轻链单抗(MARK-1)Insolubilized mouse McAb to rat kappa light chain(MARK-1)1. 培养上清Culture supernatant 2. E5F4单抗 McAb E5F4

另一个单抗 B6G1, 采用离子交换层析柱, 其洗脱峰见图 2, 第一个峰为纯化的单抗。

经纯化的大鼠单抗在琼脂糖凝胶电泳中显示出单一的带。

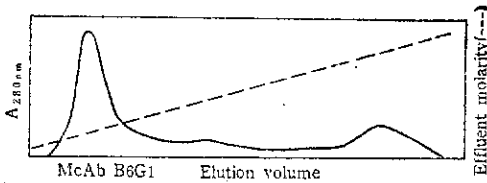


图 2 单抗 B6G1(腹水)通过DEAE琼脂糖6B离子交换层析柱纯化

Fig. 2 Purification of McAb B6G1 from ascitic fluid by DEAE sepharose CL-6B ion exchange chromatography

(六)抗HIV单抗的鉴定

本实验采用免疫荧光法、荧光激活细胞分类法、点免疫结合和免疫印迹, 筛选出 5 株抗HIV的单抗, 其特征见表 3。从表 3 可见, 这些单抗特异地针对HIV的抗原而非感染的CEM和HUT 细胞无交叉反应。蛋白印迹结果显示, 单抗 E5F4 和 I1c11 均可识别HIV的二个病毒株 ARV 和LAV 的 P25 及其前身物P55多肽, 此外尚能识别HTLV-III的P25多肽。P55 为 GAG基因所编码。而HTLV-III的 P55 及

其降解产物 P13 多肽为单抗 I5B11 所识别, 单抗I7G9和I8G11则可识别 ARV 的 P34多肽, 此多肽可能是核酸内切酶。

由于这些单抗可识别HIV的某些结构蛋白, 从而提供了纯化这些蛋白及其前身物的工具。此外, 某些单抗所针对的抗原决定簇似乎属于特异的病毒株, 如单抗 I7G9和I8G11识别 ARV 的抗原决定簇, 这些决定簇不存在于LAV和HTLV-III。相反, 单抗I5B11可识别LAV和HTLV-III 而不识别 ARV 。

上述杂交瘤细胞经过亚克隆筛选并接种入大鼠腹腔(均获得腹水), 亚克隆培养上清和腹水经免疫荧光法鉴定皆获得相同的阳性结果。

(七)抗HBsAg单抗的鉴定

本实验共获得 4 株分泌抗 HBsAg 单抗的杂交瘤, 经 AUSAB-EIA 试剂盒检测, 均为阳性, 杂交瘤培养上清中的抗体含量经AUSAB 定量试剂盒测定为 8—17 mIU/ml。

本文抗HIV和抗 HBsAg 大鼠单抗的获得是大鼠杂交瘤技术在病毒学中应用的成功例证, 该法具有稳定、有效、简便等特点。

表 3 抗HIV单抗的特征
Table 3 The characterization of McAb against HIV

McAb	ARV*		HUT		LAV*			CEM	HTLV-III*		Type of Ig
	IF	W.B	IF	FACS	IF	D.I	W.B	IF	W.B		
E5F4 and I1c11	+	P55	-	-	+	+	-	-	-	-	IgG1
		P25	-	-							
I5B11	-	-	-	-	+	+	-	-	-	P13	IgG2a
I7G9	+	P34	-	-	-	-	-	-	-	-	IgG1
		P34	-	-	-	-	-	-	-	-	
I8G11	+	P34	-	-	-	-	-	-	-	-	IgG2a
		P34	-	-	-	-	-	-	-	-	

CEM, HUT: 人T淋巴细胞系 Human T lymphocyte cell line, *: 不同来源的HIV病毒株 The HIV strains from different origin, ARV: 被ARV感染的HUT细胞 HUT cells infected by ARV, LAV: 被LAV感染的CEM细胞 CEM cells infected by LAV, IF: 免疫荧光 Immunofluorescence, W.B: 免疫印迹 Western blot, FACS: 荧光激活细胞分类 Fluorescence activated cell sorter, D.I: 点免疫结合 Dot immunobinding

参 考 文 献

- [1] Köhler, G. and Milstein, G.: *Nature*, 256:495, 1975.
- [2] Bazin, H. et al.: *Eur. Cancer J.*, 10:568, 1972.
- [3] Bazin, H. et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 51:1359, 1973.
- [4] Bazin, H.: *Protides of the Biological Fluids*, 28th Colloquium, Ed. Peeters, H. Oxford, 615, 1982.
- [5] Clark, M. et al.: *Immunol. Today*, 4:100, 1983.
- [6] Galfre, G. et al.: *Nature*, 277:131, 1979.
- [7] Burtonboy, G. et al.: *Archives of Virology*, 71:291, 1982.
- [8] Ackermans, F. et al.: *Infection and Immunity*, 49(2):344, 1985.
- [9] Lebacqz, A.M. et al.: *Int. J. Cancer*, 32: 273, 1983.
- [10] Bazin, H. et al.: *Eur. J. Immunol.*, 4:44, 1974.
- [11] Burtonboy, G. et al.: *Eur. Cancer J.*, 9:259, 1973.
- [12] Burtonboy, G. et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 61:477, 1978.
- [13] Gerge, E.F. et al.: *Cancer*, 18(4):522, 1965.
- [14] Littlefield, J.W.: *Science*, 145: 709, 1964.
- [15] Kawamura, A.: *Fluorescence Antibody Techniques and their Applications*, p.68, Tokyo-Baltimore, London, University of Tokyo Press-University of Park Press, 1977.
- [16] Towbin, H. et al.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350, 1979.
- [17] Bazin, H. et al.: *J. Immunol. Meth.*, 71:9, 1984.
- [18] Goding, J.W.: *J. Immunol. Meth.*, 39:285, 1980.
- [19] Labacqz, A.M. et al.: *Hybridoma*, 2:355, 1983.

Study on Rat-rat Hybridoma Technique and Production of Rat Monoclonal Antibodies Against HIV and HBsAg

Fang Jiachun¹ M. Bodeus² G. Burtonboy²

¹(Department of Cell Biology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing)

²(Virology Unit, Faculty of Medicine, University of Louvain, Brussels, Belgium)

The rat-rat hybridoma has some definite advantages in the three system currently utilized for monoclonal antibody production: mouse, rat and human system.

The study on rat-rat hybridoma technique and its application to the productions of monoclonal antibodies against human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) are described as examples in this paper.

Key words

Rat hybridoma technique; HIV; HBsAg; rat monoclonal antibody