

白喉毒素单克隆抗体的研究

李守悌 董联珠 李修兰 路歧祥

米学平 徐锡荣 阎太东

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

自从 1975 年 Kohler 和 Milsbein 证明骨髓瘤细胞与免疫动物脾细胞融合成杂交细胞系,并能分泌与免疫抗原相应抗体之后,它已成为许多领域中比较理想的工具。

白喉毒素是一个最早被发现的细菌性毒素之一,直到七十年代初期毒素分子结构与生物学活性之间的关系尚未十分清楚,而这些问题的进一步弄清将对今后开展人工合成免疫制剂起推动作用。为此,我们于 1984 年开始开展了白喉毒素单克隆抗体的研制工作。

材料和方法

1. 免疫脾细胞的制备: 用卫生部北京生物制品研究所制备的白喉毒素加等量厌氧棒状菌苗免疫 8—12 周龄的 BALB/C 鼠,腹腔接种 2 针,间隔 2 周。2 周后静脉注射不加佐剂的毒素,剂量减半,第三次免疫后 3 天将小鼠处死取脾,用 80 目的铜网制备细胞悬液,再用无血清的 MEM 培养基洗 2 次备用。

2. 细胞培养和细胞融合: 完全不分泌自身 Ig 的小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0-Ag14 (SP2/0) 系引自英国,用完全 MEM 培养基传代培养。选择生长良好的 SP2/0 细胞制成悬液,再将小鼠脾细胞悬液与其以 5—8:1 混合于沉淀管中,以 1000r/min 离心 10 分钟,弃上清并轻击管底,使细胞沉淀混均,置 37—38℃ 水浴中,慢慢滴加 50% 的聚乙二醇 (PEG MW2000) 0.5ml,边滴边摇,1 分钟内加完,静止 2 分钟后加 15ml 无血清的 MEM 终止融合。放置 3—5 分钟后离心,经 MEM 培养基洗 2 次,将细胞悬浮于 48ml HAT 培养基中,分种于细胞培养盘

中,每孔 1ml,同时加入小鼠腹腔细胞悬液 1ml (含细胞 $5-9 \times 10^5$)。

把培养盘置 CO₂ 孵箱于 37℃ 培养,5 天后开始镜下观察杂交细胞生长情况,并换入新的 HAT 培养基,以后隔日换液并观察。当孔内的细胞生长面积达孔底 1/2—2/3 以上时开始检测抗体。融合两周后改用 HT 培养基。

3. 抗体测定: 采用 PHA 法测定抗体。

4. 杂交瘤细胞克隆化: 用有限稀释法将抗体阳性杂交瘤细胞进行 3 次克隆化培养,取抗体阳性细胞扩大繁殖后冻存于液氮中,取其中 2、23 和 24 号三株继续传代并检定。

5. 动物接种: 取 10—12 周龄的 BALB/C 鼠腹腔注射 0.5ml 液体石蜡,1 周后每只小鼠腹腔接种 $1-2 \times 10^6$ 杂交瘤细胞,1 周后收集腹水。

6. 杂交瘤的染色体分析: 传代 24 小时的 2、23 和 24 号杂交瘤细胞和 SP2/0 用空气干燥法制备染色体片,以 1:50 Giemsa 染色。

7. 免疫双扩散: 为检定 IgG 亚类使用了上海生物制品研究所的羊抗鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、及 IgG₃ 的免疫血清作免疫双扩散试验。

结 果

(一) 细胞融合和抗体检测结果

3 次融合试验结果,杂交瘤的形成率均为 100%。用 PHA 测抗体,杂交瘤阳性率均在 43—50% 之间。

(二) 杂交瘤细胞的克隆培养

3 次融合共获得 71 个分泌抗体的杂交瘤,用 PHA 检测,将其中产生高滴度抗体的 12 个

杂交瘤细胞经扩大繁殖后冻存于液氮中备克隆培养。取其中之 A₃ 阳性孔细胞立即进行三次克隆化后而获得 2、23 和 24 号三株, 用 PHA 检测, 抗体阳性率均为 100%, 滴度在 1:32 左右。将亚克隆细胞注射 BALB/C 鼠能产生腹水, 用 PHA 法检测抗体阳性, 最高滴度达 1:4096。PHA 测得的腹水抗体比培养液中的抗体滴度高 128 倍。

(三) 中和试验结果

按规程操作, 结果 3 个单克隆抗体均无中和毒素作用。

(四) 染色体分析及抗体的 IgG 亚类的检定

用空气干燥法制备 SP2/0、2、23 和 24 的染色体片, 通过计数证明 SP2/0 每个细胞平均为 71 个染色体, 2 号株平均含 105 个染色体,

13 号株平均含 103 个染色体, 24 号株平均含 107 个染色体, 小鼠脾细胞含 40 个染色体, 由此可见 2、23 和 24 号三个杂交瘤细胞所含的染色体数基本是 SP2/0 和小鼠脾细胞染色体数之和。

用抗小鼠 IgG 作双扩散试验检定结果表明三株提纯腹水均与 IgG₁ 形成一条明显的沉淀线(见图 1)。

讨 论

随着单克隆抗体技术的不断发展与完善, 利用单克隆抗体技术来分析各种蛋白毒素的工作越来越多。本文利用白喉毒素制备了抗白喉毒素的单克隆抗体。从单克隆抗体的历史来看, 尽管人们最初认为用可溶性抗原制备单克隆抗体较用颗粒性抗原制备单克隆抗体更难些, 但从结果看, 还是比较满意的。只要把抗原作成均匀的乳化物进行免疫, 就能得到足够的产生抗体的脾细胞, 使融合得到成功。另外, 采用间接血凝法虽然比较 Elisa 和 RIA 敏感度低, 但方法简单, 不需要特殊设备是其优点, 只要掌握在融合初期的检测中, 虽然滴度很低, 但只要有抗体就不放过, 就可以得到较好的结果。有关抗体的其他性质以及其与毒素结构片段的关系等问题尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 罗海波等: 细菌毒素研究进展, 人民卫生出版社, 北京, 164—178 页, 1983 年。
- [2] Susumu Hayahawat et al.: *J. Biol. Chem.* 258(7): 4311, 1983.

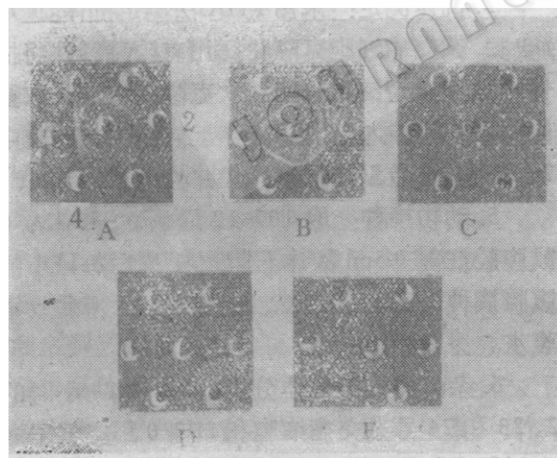


图 1 提纯腹水与抗小鼠 IgG 亚类双扩散试验

A. IgG, B. IgG₁, C. IgG_{2a}, D. IgG_{2b}, E. IgG₃, F. IgG₁

各图中第 2 孔均为 2 号株, 第 4 孔均为 24 号株,

第 6 孔均为 23 号株。