维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)02-0145-03

抗单链DNA单克隆抗体的制备及应用

赵明才[1]，朱道银[1]，唐恩洁[2]

（1.重庆医科大学基础医学院微生物学教研室 重庆 400016；2.川北医学院微生物学教研室 南充 637000）

【摘 要】目的：制备特异性的抗单链DNA单克隆抗体，为建立一种特异、敏感、简便的细胞凋亡检测方法奠定基础。方法：根据烷化剂盐酸氮芥能特异性地修饰小牛胸腺DNA链上的鸟嘌呤(G)而暴露互补链上的胞嘧啶(C)这一特性，将修饰后的小牛胸腺DNA连于甲基化的牛血清白蛋白上制备成完全抗原，免疫BALB/c小鼠获得特异性的抗单链DNA单克隆抗体，并对单抗的类别和特异性进行鉴定；用叠氮钠和抗肿瘤药物VP-16诱导了HL60细胞的坏死和凋亡，利用所制备的抗单链DNA单克隆抗体对其进行检测，并与形态学方法、凝胶电泳法和TUNEL法进行了比较。结果：所制备的抗单链DNA单克隆抗体能与羊抗小鼠IgM发生特异性反应，且能与凋亡细胞特异性结合，而不结合坏死细胞。结论：所制备的单抗为IgM型，利用其能特异地结合单链DNA的特性，可用于检测细胞凋亡，简便、有效地区别细胞凋亡和坏死。

【关键词】单克隆抗体；凋亡；单链DNA；氮芥

【中国图书分类法分类号】R393.12 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-10-09

Preparation of monoclonal antibody against single-stranded DNA

ZHAO Mingcai, et al

(Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To prepare the monoclonal antibody (McAb) against single-stranded DNA(ssDNA) and examine apoptotic cells. *Methods*: Based on the exposure of the deoxycytidines(C) on the opposite DNA strand by guanines (G) selective alkylation treated with nitrogen mustard(HN_2), the calf thymus DNA treated with HN_2 and conjugated with methylated bovine serum albumin(MBSA) was used to immunize BALB/c mice and the monoclonal antibody (McAb) against single-stranded DNA(ssDNA) was prepared.HL60 cell apoptosis was induced by treatment with etoposide(VP-16) and cell necrosis was induced by exposure to sodium azide(NaN_3). Apoptotic and necrotic cells were examined by anti-ssDNA McAb stain ,TUNEL assay and agarose gels electrophoresis. *Results*: Anti-ssDNA McAb can react with goat-anti-mouse IgM and conjugate apoptotic cells. *Conclusion*: The anti-ssDNA McAb is IgM antibody and can distinguish the apoptotic cells and the necrotic cells.

【Key words】McAb; Apoptosis; ssDNA; HN_2

细胞凋亡是生物进化、发育过程中一种高度保守又必不可少的生理现象，从蠕虫、植物、动物到人类，细胞凋亡均广泛存在、并有着十分重要的生理和病理意义。因此，特异、敏感、简便、准确、直观地检出凋亡细胞，不仅有助于更深入地探索细胞凋亡的生理意义，而且有助于揭示其在肿瘤、AIDS、肝炎、自身免疫性疾病等人类重大疾病中的病理作用[1]。然而已建立的诸多细胞凋亡检测方法经实践证实均存在不尽人意之处，有必要探索并建立一种更佳的检测方法[2]。本实验利用烷化剂盐酸氮芥能特异性地修饰DNA链上的鸟嘌呤(G)而暴露互补链上的胞嘧啶(C)这一特性，将修饰后的小牛胸腺DNA连接于甲基化的牛血清白蛋白上制备成完全抗原，免疫BALB/c小鼠获得特异性抗单链DNA单克隆抗体，并对单克隆抗体的类别、特异性进行了鉴定，并初步用于细胞凋亡的检测。

作者介绍：赵明才（1970- ），男，讲师，硕士生。

主要研究方向：病毒感染与免疫。

1 材料与方法

1.1 细胞系

SP2/0细胞、HL60细胞、均由川北医学院分子生物学研究所提供。

1.2 动物

BALB/c小鼠购自重庆医科大学实验动物中心。

1.3 主要试剂

盐酸氮芥(HN_2)：上海旭东海普药业有限公司产品；小牛胸腺DNA、鼠IgM、鼠IgG：SABC公司产品；牛血清白

维普资讯 http://www.cqvip.com

蛋白(BSA)：B.M公司产品；PEG4000：MERCK. Schuchardt公司产品；小牛血清：购自成都利康实业有限公司；HAT、HT：GIBCO BRL公司产品；HRP标记的羊抗鼠κ链单克隆抗体：Outhern Biotechnology Associates、Inc.公司产品；鼠Ig亚类抗体：购自邦定泰克生物技术有限公司；秋水仙素：Sigma公司产品；叠氮钠：E. Merk公司产品；TUNEL Kit：Boerhringer Mannheim公司产品。

1.4 完全抗原制备

称取2.0克牛血清白蛋白，加入200ml甲醇，再加1.68ml 12N HCl，混匀，牛血清白蛋白经甲基化后慢慢结晶析出，溶液变混浊，室温避光放置3天，其间混匀几次，第4天分装于50ml离心管中，3000r/min离心20min、弃上清，沉淀用甲醇洗涤1次，再用乙醚洗涤1次、沉淀敞放于空气中让乙醚挥发，再用KOH干燥。将MBSA与等量的小牛胸腺DNA连接，即为完全抗原。

1.5 免疫

取6－8周龄的雌性BALB/c小鼠，体重20－25g，第1周，取200μg MBSA-DNA与等量完全弗氏佐剂混匀后皮下注射，第3、5、7周，每只小鼠用200μg MBSA-DNA作腹腔注射。于末次免疫注射两周后的第0、1、2和3天腹腔注射100μg MBSA-DNA，第4天取脾脏制备脾细胞悬液。

1.6 杂交瘤细胞系的建立

取免疫小鼠脾细胞与SP2/0细胞按常规方法在PEG4000作用下融合。对长出克隆的上清采用ELISA法筛选、使用经HN_2处理的小牛胸腺DNA包被酶标板，最后得到分泌抗单链DNA单抗的杂交瘤细胞，以有限稀释法反复克隆化。

1.7 抗体特异性检测

用小牛胸腺DNA、变性的小牛胸腺DNA、经HN_2处理的小牛胸腺DNA包被硝酸纤维膜，作斑点免疫实验。

1.8 抗体类别鉴定

利用羊抗小鼠免疫球蛋白类及亚类的单克隆抗体作双向琼脂扩散实验。

1.9 抗单链DNA单克隆抗体的应用[2,3]

分别用VP-16和叠氮钠诱导HL60细胞凋亡和坏死，用单抗对其进行检测、并与形态学方法、普通凝胶电泳法、TUNEL法对比研究。

2 结 果

2.1 单克隆抗体能特异性地与ssDNA、经HN_2处理的小牛胸腺DNA结合，而不与dsDNA结合，此结果证明，所获单抗仅为针对单链DNA的特异性单抗。

2.2 利用双向琼脂扩散实验检测、发现待测腹水与羊抗小鼠IgM发生反应，二者之间出现白色沉淀线，且与鼠IgM对照的沉淀线相吻合，而与羊抗小鼠IgG之间无沉淀线出现。

2.3 用台盼蓝染色，在经20μg/mlVP-16处理1、2、4、6、24 h的HL60细胞中死细胞百分率分别为16.55%、16.22%、22.32%、43.09%、73.33%，经50mmol/L NaN_3处理8h的HL60细胞中死细胞百分率为29.83%、正常HL60细胞中死细胞百分率为10.17%。

2.4 用Hoechst33258染色、在荧光显微镜下观察，正常HL60细胞形态完整、细胞核呈弥散均匀荧光；经NaN_3处理的HL60细胞，大多数细胞形态不规则，部分细胞核不完整，荧光染色较强；经VP-16处理的HL60细胞，随着处理时间的延长、不规则细胞所占百分率增多，细胞核染色增强，在细胞质或细胞核内也可见到浓染致密的块状荧光。

2.5 琼脂糖凝胶电泳检测，正常HL60细胞仅见少量DNA无规则断裂现象，电泳后于加样孔附近呈现较大分子量的DNA条带；经NaN_3处理的HL60细胞DNA断裂无规则，电泳后出现连续膜状条带，无DNA Ladder现象；经VP-16处理的HL60细胞，1、2h无明显DNA Ladder现象，4、6h出现DNA Ladder现象，24hDNA Ladder现象则更加明显，且随着药物处理时间的延长、大分子量DNA片段减少，小分子量的片段增多，DNA Ladder现象越明显。

2.6 TUNEL检测，阴性对照无阳性染色细胞，正常HL60细胞、经VP-16处理1、2、4、6、24h的HL60细胞和经NaN_3处理的HL60细胞阳性细胞的百分数分别为：8%、12%、21%、43%、92%、35%。

2.7 抗单链DNA单克隆抗体检测：阴性对照及空白对照无阳性染色细胞，正常HL60细胞、经VP-16处理1、2、4、6、24h的HL60细胞和经NaN_3处理的HL60细胞阳性细胞的百分数分别为：7%、28%、46%、63%、95%、5%。

3 讨 论

1987年，美国学者Frankfurt首次利用烷化剂修饰的小牛胸腺DNA免疫BALB/c小鼠制备了抗单链DNA的单克隆抗体，利用该单抗结合流式细胞仪，可定量检测单个细胞DNA损伤、借以估计烷化剂的细胞毒性、药物疗效及影响疗效的因素、进一步可分析肿瘤细胞对烷化剂的敏感性及耐药性[4~6]。1994年，Frankfurt[7]在研究Mg^{2+}对单抗结合DNA损伤细胞的影响时发现，将药物诱导的凋亡细胞置含2.5～

维普资讯 http://www.cqvip.com

4.5mmol/L $MgCl_2$的中性平衡盐溶液中加热(100℃，5min)，能特异地与抗单链DNA的单克隆抗体结合，而正常对照细胞和经NaN_3诱导的坏死细胞，不能与其结合。由于TUNEL法是较常用的细胞凋亡检测方法、因而与TUNEL对比研究发现，如用0.5mmol/L NaN_3处理MOLT-4细胞，可使其很快发生坏死，这时用TUNEL法检测呈阳性，而用单抗法检测时全部为阴性,说明单抗法有较强的特异性；用阿霉素处理急性髓细胞样白血病(AML)细胞，有一小部分细胞(0.2%～5%)无典型形态改变，TUNEL法检测为阴性，而单抗法检测为阳性，进而观察这一部分细胞可发生典型的凋亡形态改变，并由贴壁转为悬浮状态，可见单抗法可以检测早期凋亡细胞。最近、Frankfurt等又研究了单链DNA单克隆抗体检测人乳腺癌的情况，发现癌细胞凋亡率与bcl-2蛋白缺乏、雌激素受体缺失和S期细胞比例增高呈正相关，与淋巴结转移呈负相关。进而利用甲酰胺能使凋亡细胞浓缩的染色质中DNA变性而对正常细胞无影响这一特性，结合抗单链DNA单克隆抗体，能特异检测细胞凋亡、而且能检测冰冻切片和甲醛固定的石蜡包埋的组织切片中的凋亡细胞，提示抗单链DNA单克隆抗体能广泛用于细胞凋亡的检测，可用于研究肿瘤细胞凋亡相关基因的表达及判断肿瘤的预后和复发[8~10]。

本研究制备的单抗为IgM型，能特异性地与单链DNA结合，而不与双链DNA结合，利用这一特性，可用于检测细胞凋亡。对比分析抗单链DNA单抗与台盼蓝染色，Hoechst33258染色、琼脂糖凝胶电泳及TUNEL等几种现用的较简便、快速的细胞凋亡检测方法对正常的、VP16和NaN_3处理的HL60细胞的检测结果揭示抗单链DNA单抗不仅能特异、敏感地检出凋亡细胞，而且能检出早期凋亡细胞和无DNA Ladder形成的凋亡细胞，有良好的应用前景。

参 考 文 献

[1] Florencia GQ, Gregory JG. Cell death by apoptosis: basic concepts disease relevance for the gastroenterologist[J]. Gastroenterology, 1996;110:1238-1243.

[2] Desjardins LM, Macmanus JP. An adherent cell model to study different stages of apoptosis[J]. Experimental Cell Research, 1995;216:380-387.

[3] [美] J.萨姆布鲁克、E.F.弗里奇，T.曼尼阿蒂斯著·金等. 分子克隆实验指南[M]. 第2版，北京：科学出版社，1998:464-467.

[4] Frankfurt OS, Seckinger D, Sugarbaker EV. Detection of cells resistant to alkylating agents by flow cytometric analysis of DNA damage[J]. Cytometry, 1990;11(8):894-900.

[5] Fankfurt OS, Seckinger D, Sugarbaker EV. Flow cytometric analysis of DNA damage and repair in the cells resistant to alkylating agents[J]. Cancer Res, 1990; 50(15):4453-4457.

[6] Fankfurt OS. Inhibition of DNA repair and the enhancement of cytotoxicity of alkylating agents[J]. Int J Cancer, 1991;48(6): 916-923.

[7] Frankfurt OS. Detection of apoptosis in leukemic and breast cancer cells with monoclonal antibody to single-stranded DNA [J]. Anticancer Res, 1994;14(5A):1861-1869.

[8] Frankfurt OS, Robb JA, Sugarbaker EV, etc. Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis[J]. Experimental Cell Research, 1996:226:387-397

[9] Fankfurt OS, Robb JA, Sugarbaker EV, et al. Apoptosis in breast carcinomas detected with monoclonal antibody to single-stranded DNA: relation to bcl-2 express, hormone receptors, and lymph node metastase[J]. Clin Cancer Res, 1997;3(3): 465-471.

[10] Frankfurt OS, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin[J]. J Histochem Cytochem, 2001;49(3):369-378.