维普资讯 http://www.cqvip.com

1998\91955X\023b03 217-328

第23卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.23 No.3

1998 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1998

98,23(3) 217-219

重组人GM－CSF－IL_3融合蛋合(G_3)单克隆抗体的研制和鉴定

医学检验系分析化学教研室 黄 昕*

基础医学院病理生理教研室 蓝 轲 范维珂

中心实验室 邱宗荫

R392-33

提 要 用重组人粒细胞－巨噬细胞集落刺激因子－白细胞介素3(rhGM－CSF－IL_3)融合蛋白(G3)作为免疫原，通过B淋巴细胞杂交瘤技术建立了两株稳定分泌抗rhGM－CSF－IL_3(G_3)单克隆抗体的杂交瘤细胞株。分别命名为MG_{31}和MG_{32}。经鉴定，两种单抗均为小鼠IgG_1亚类。其染色体众数分别为91和86。并能特异地识别分子量约30KD的G_3。MG_{31}和MG_{32}经3个月传代培养及冻存复苏。在培养液及Balb/c小鼠腹水中均能产生高滴度抗体。抗G_3单克隆抗体的获得为深入研究G_3的亲和层析纯化、G_3的免疫学测定及其生物学特性提供了必要的条件。

关键词 rhGM－CSF－IL_3(G_3);单克隆抗体

中图分类号 R392.11

造血刺激因子，融合蛋白，G3 命名、

rhGM－CSF和IL－3均为造血刺激因子，它们能够促进不同阶段的造血干细胞及祖细胞增殖和分化。北京医科大学免疫室在1994年将GM－CSF的C端直接与IL－3的N端连接，构建并高效表达了人GM－CSF－IL_3融合蛋白，命名为G_3，活性鉴定表明G_3对AML－193细胞株的促增殖作用及刺激红系、单核/巨噬系、多潜能始祖造血细胞的集落形成的作用明显高于单独使用IL－3、GM－CSF、或IL－3与GM－CSF同时使用[1]。目前，在美国rhGM－CSF－IL_3融合蛋白(PIXY321)已进入临床Ⅲ期试验。为了进步研究G_3的生物学特性、建立G_3活性测定的免疫学方法及亲和层纯化方法，我们应用B淋巴细胞杂交瘤技术建立了能稳定分泌抗G_3单克隆抗体的两株杂交瘤细胞：MG_{31}和MG_{32}，并对它们分泌的单抗进行了初步鉴定。

1 材料和方法

1.1 试剂

1.1.1 重组人GM－CSF－IL_3(G_3)和IL－3，由北京医科大学免疫室马大龙教授惠赠。

1.1.2 重组人血小板生成素(Pepro Tech. A269)，GM－CSF(Amgen，7911)和重组红细生成素(Amgen，546D9)，由美国莫菲特癌症研究中心刘运康副研究员惠赠。

1.1.3 标准羊抗鼠IgG_1、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG_3购自军事医学科学院

1.2 **实验动物和细胞株** Balb/c小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供雌性，20克左右；小鼠髓瘤细胞株SP2/0由三军医大学免疫室提供。

1.3 杂交瘤细胞株的建立

8周龄雌性Balb/c小鼠经皮下、腹腔多途径反复免疫，每次注射$G_3$20μg/只，共5次。末次免疫第3天，取小鼠脾细胞与SP2/0细胞融合[2]，采用ELISA间接法[3]筛选，有限稀释法连续克隆3次，杂交瘤细胞体外连续传代3个月。

1.4 单克隆抗体的鉴定

1.4.1 小鼠免疫球蛋白亚类的的测定

采用琼脂扩散法[4]，分别取浓缩20倍的两株杂交瘤细胞培养上清与标准羊抗鼠IgG_1、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG_3抗体作双向免疫扩散。

1.4.2 单抗效价检测

采用ELISA间接法，对杂交瘤细胞培养上清及小鼠腹水单抗进行系列稀释作效价测定。

1.4.3 特异性鉴定

1.4.3.1 免疫印迹试验 采用Tsang的方法[5]将G_3在还原条件下经SDS－PAGE分离后，经电转移将蛋白带转印于硝酸纤维膜上，用抗G_3单抗和酶标抗体与之反应，显色，观察结果。

1.4.3.2 ELISA试验 用G_3、GM－CSF、IL－3、血小板生成素(TPO)和红细胞生成素(EPO)包被96孔板，用ELISA间接法测定单克隆抗体的特异性。

1.4.4 杂交瘤细胞株核型分析 采用汤为学的方法[6]在已克隆化的培养细胞中加入秋水仙素，终浓度为0.05μg/ml，37℃，2小时；用0.075MKCL处理细胞，再用甲

* 男；1967－11出生，讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

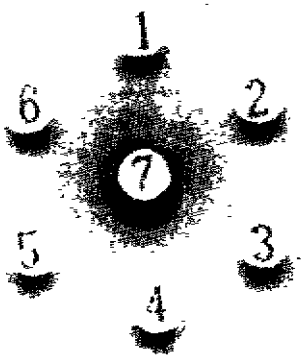


图1 MG_{31}McAb的琼脂双扩图。第1－5孔依次为抗IgG_1、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG_3，第6孔为空白，第7次为MG_{31}McAb

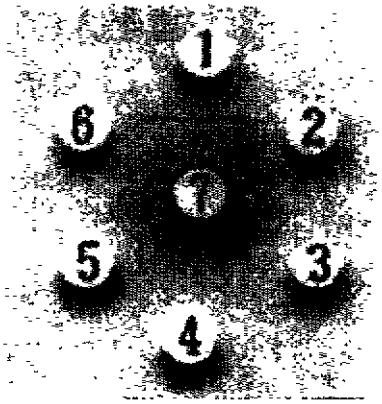


图2 MG_{32}McAb的琼脂双扩图。第1－4孔依次为抗IgG_1、IgG_2、IgG_{2b}、IgG_3第5，6孔为空白，第7孔为MG_{32}McAb

醇:冰醋酸(3:1)混合液固定两次，20分钟/次;冰水制片，空气干燥，Giemsa染色，油镜下计数染色体并求众数。

2 结果

2.1 抗rhGM－CSF－IL_3融合蛋白(G_3)单克隆体杂交瘤细胞株的建立

共进行细胞融合6次，其中一次，接种384孔，融合后第6天可见细胞呈克隆性生长，用ELISA间接法筛选阳性孔，结果见表1。其中两株(MG_{31}、MG_{32})经连续克隆三次，结果传代3个月以上仍能保持分泌抗体的能力。扩大培养后液氮冻存，复苏后仍保持分泌抗体的能力。

表1 细胞融合ELISA检测结果

接种孔数	克隆生长孔数	融合率(%)	ELISA阳性孔数	阳性率(%)
384	289	70.1	21	7.2

2.2 小鼠免疫球蛋白亚类测定

经免疫双向扩散法显示，两种单克隆抗体均属IgG_1，见图1、图2。

2.3 单克隆抗体效价测定

用ELISA间接法测定效价，见表2。两种单抗在免疫腹水中的效价均明显高于培养上清。

表2 MG_{31}、MG_{32}单抗效价

细胞株	培养上清	小鼠腹水
MG_{31}	10^{-5}	10^{-7}
MG_{32}	10^{-5}	10^{-7}

2.4 单克隆抗体特异性鉴定

用ELISA间接法检测，MG_{31}单抗与G_3呈现阳性反应，与其它细胞因子无交叉反应;MG_{32}单抗能识别G_3和GM－CSF，与其它细胞因子无交叉反应，见表3。表明两种单抗均具有较好的特异性。

表3 MG_{31}、MG_{32}McAb特异性(ELISA法)

抗体	抗原				
	G_3	GM－CSF	IL－3	TPO	EPO
MG_{31}	++++	—	—	—	—
MG_{32}	++++	+++	—	—	—
PBS(对照)	—	—	—	—	—

2.5 免疫印迹试验

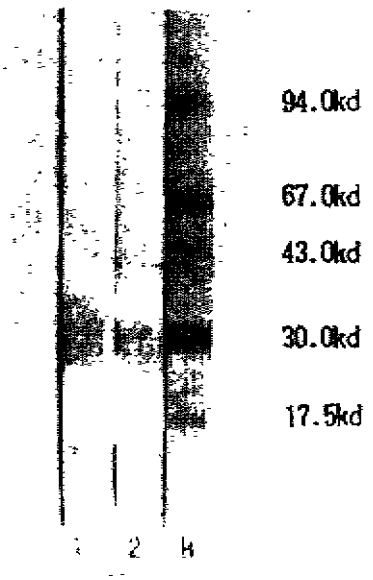


图3 MG_{31}、MG_{32}、McAb的免疫印迹结果。
1－G_3+MG_{31} 2—G_3+MG_{32} M—低分子量蛋白标准

维普资讯 http://www.cqvip.com

G_3先进行SDS－PAGE，再将电泳后的G_3电转移至硝酸纤维薄膜后进行免疫酶染色，见图3。结果显示两种单抗均能特异地识别分子量约为30KD的G_3。

2.6 杂交瘤细胞核型分析

MG_{31}和MG_{32}细胞株的染色体众数为91和86，均超过其亲本的染色体众数，说明它们是融合产生的杂交瘤细胞，见图4图5。



图4 MG_{31}杂交瘤细胞染色体图像



图5 MG_{32}杂交瘤细胞染色体图像

3 讨论

本研究成功建立了两株分泌抗GM－CSF－IL_3融合蛋白(G_3)单克隆抗体的杂交瘤细胞，这对G_3的分离纯化、鉴定、分子特征分析和生物学活性等研究均有重要意义。

对MG_{31}和MG_{32}单克隆抗体特异性进行ELISA间接法分析，结果表明两种单抗均具有G_3特异性，而MG_{32}还能识别GM－CSF，这提示G_3上至少具有两个不完全相关的抗体结合位区，由此为抗原的免疫学测定提供了理论依据。以MG_{31}和MG_{32}单抗建立双抗体夹心法，能为临床检测G_3提供方便、准确的检测方法。

免疫印迹试验表明，MG_{31}和MG_{32}细胞株分泌的单克隆抗体与分子量约为30KD的G_3呈一条反应带，说明所制备的两种单抗均为特异地针对G_3的单克隆抗体。以此为基础，能够建立一条全新的分离纯化G_3的途径——高特异性的免疫亲和层析法。

参考文献

1.刘 劼，等. 生物化学与生物物理学进展，1994;21:194
2.胡 军，等. 中国免疫学杂志，1987;3:258
3.谢少文，等. 临床免疫学技术 上海科学技术出版社，1982;32
4.谢少文，等. 临床免疫学技术 上海科学技术出版社，1982;211
5.Tsang VCW.et al. Meth in Enzymol.1983;92:377
6.汤为学，等. 重庆医科大学学报 1986;11:233

(收稿日期 1997－11－23)

Preparation and characterization of McAb to rhGM－CSF－IL_3(G_3)

Huang Xin, et al

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Medical Laboratory Science

The rhGM－CSF－IL_3 fusion protein (G_3) was used us antigen and two hybridoma cell strains secreting McAbs to rhGM－CSF－IL_3 were obtained by B lymphocyte hybridoma technique. They were named as MG_{31} and MG_{32} respectively.The resuets proved that two McAbs were murine IgG_1 subleass. Their chromosome modes are 91 and 86 respectively and they could recognize G_3 (MW＝30KD)specifically. After they had been cultured for three months in freezing and thawing.the andibody titers in culture supernatant and Balb/c murine ascites were high. McAbs to G_3 are useful for studying biologic properties and functions of G_3. the immunoaffinity purification of G_3 and the establishment of an immunodetermination method for G_3.

KEY WORDS rh GM－CSF－IL_3(G_3);McAb