维普资讯 http://www.cqvip.com

90~93

抗人Hb单克隆抗体的制备与鉴定

医学检验系 王开正* 罗春丽
北民佑安医院 陈祖贵 闵福援 冷 强

R392.11

提 要 用超声波快速乳化人Hb，作为抗原免疫BALB/C小鼠，取其脾细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞经离心PEG法融合，微波ELISA筛选阳性克隆，获得三株分泌针对人Hb不同抗原位点的单克隆抗体杂交瘤细胞系。分别命名为Hb264、Hb210和Hb238。其中Hb264能特异识别人Hb的β链而不与动物Hb交叉反应；解离常数Kb为1.6×10^{-9}mol/L；IgG_{2a}。Hb210能结合人Hb的α链，可被猪Hb抑制，但亲合力低100倍；Kd(人Hb)为2.8×10^{-8}mol/L；Kd(猪Hb)为3.0×10^{-8}mol/L；IgG_{2b}。Hb238是两个脾细胞与一个Sp2/0细胞融合而成的三体瘤(trioma)；染色体132条；Hb238单克隆抗体可同人Hb的α和β链结合，Kd(人Hb)为8.9×10^{-9}mol/L；IgG_{2a}；经分析鉴定，Hb238是针对人Hb α和β链的双特异性抗体。本方法对免疫学隐血检测、法医学鉴定和双特异抗体的研制有一定意义。

关键词 血红蛋白；杂交瘤；双特异性单克隆抗体；ELISA
中图分类号 R329.11

人们对血红蛋白(Hb)的免疫学特性比其生物化学性质了解的要少得多，部分原因是Hb对实验动物只有较弱的抗原活性[1]。然而在血液材料研究、遗传学调查、临床诊断与治疗等方面需要详细了解人Hb的免疫学特性[2,3]。单克隆抗体(McAb)则是这些研究必不可少的重要工具。近年来免疫学隐血检测方法的发展要求特异性高，亲合力强和针对不同抗原决定簇的抗人HbMcAb。我们用离心细胞融合同时制备了抗人Hbα和β链的单特异和双特异McAb(BisMcAb)，方法简单易行，报告如下。

材料与方法

1. **人Hb及其肽链的制备** 见文献[4]。

2. **超声波乳化Hb的抗原** 含Hb600μg/ml抗原溶液，加等体积不完全福氏佐剂于塑料试管中，浸于冰水，插入超声波发声器探头0.5—1.0cm深，每次超声振荡5s，功率120—180W，间隙25s，5min共超声振荡10次，取出少许乳化液滴进水中不扩散即可。

3. **动物免疫** 7周龄BALB/C雌鼠，首次免疫在背部皮下3—5点注射0.5ml抗原乳液(注射前加活卡介苗3mg/ml混匀)。第14天进行第2次免疫，方法同前但不加卡介苗。第21天在腹腔注射0.5ml含Hb300μg的抗原溶液加强免疫。第24天取尾血测效价并取脾细胞备用。

4. **细胞融合** 三只免疫小鼠的脾细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞按10:1混合，30s内加入

* 本系硕士研究生现在泸州医学院附属医院。

维普资讯 http://www.cqvip.com

50%PEGMW4000并混匀，放水平式离心机以1500rpm离心3min，加入RPMI-1640稀释，1000rpm离心10min，弃上清，加入含20%胎牛血清的HAT培养液，按每孔0.1ml分配于培养48h的鼠腹腔细胞作滋养层的96孔培养板中，置5%CO_2，37℃恒温培养。

5. 杂交瘤的筛选：微波ELISA(另文报道)。

6. 杂交瘤克隆化、冻存与复苏、McAb腹水的制备和染色体分析见文献[3]。

7. McAb的特性鉴定

(1) 鼠IgG亚类分析琼脂扩散法[5]，羊抗鼠IgG亚类抗血清为军事医学科学院产品，批号92010

(2) 亲合力测定用竞争ELISA测定抗原抗体复合物的解离常数Kd[6]。主要步骤：杂交瘤培养液上清液加入不同浓度的Hb，4℃过夜让其抗原抗体反应充分平衡，再加到包被有Hb的酶标板中测定游离的McAb，按下式计算Kd，取中位数表示亲合力。

$$\frac{A_0}{A_0-A}=1+\frac{Kd}{a_0}$$

式中A_0指Hb浓度为零的吸光度值；A为加入Hb浓度为a_0时的吸光度值。Kd越小则亲合力越高。

(3) McAb特异性分析：竞争ELISA测定各种动物Hb对人Hb与McAb结合的抑制率，方法同亲合力测定。

(4) 抗原位点分析人Hbα链和β链用醋酸纤维素膜分离，将醋纤膜分成三份。一份氨基黑10B染色显示两条带；另一份对应α与β带剪下洗脱用于间接ELISA筛选McAb；第三份与硝酸纤维素膜吸印转移，免疫酶染色[7]进一步鉴定抗原位点。

7.5双特异性McAb的鉴定：染色体分析三体瘤(trioma)；免疫酶染色显示两条带；α与β链互相不抑制排除交叉反应。

结　果

1. McAb的基本特性　见表1。

2. McAb特异性分析　用竞争ELISA测定猪、牛、羊、兔、鸡、鸭Hb对McAb与人Hb结合的抑制率。结果表明：Hb264对6种动物Hb无交叉反应，抑制率均小于3%；猪Hb与Hb210和Hb238有弱的反应，但亲合力比人Hb低10—100倍，Kd(猪Hb)分别为3.0×10^{-6}mol/L和7.2×10^{-7}mol/L。三株McAb均不与牛、羊、兔、鸡、鸭Hb交叉反应。

3. 抗原位点分析　间接ELISA和免疫酶染色结果表明：Hb264和Hb210分别针对人Hb的β链和α链；Hb238可同时结合α链和β链。

4. Hb238 McAb双特异性分析　过量的β链与Hb238 McAb结合后，加在包被α链的酶标板中，仍然检测到大量的McAb与α链结合。吸光度比值大于0.85。反之用α链平衡，β链包被的竞争ELISA也得到相同结果，从而证明Hb238是针对人Hb α与β链的BisMcAb，并非是α与β链有相同或相似抗原决定簇引起的交叉反应。

5. McAb的初步应用　用抗人Hbβ链的Hb264McAb建立了竞争ELISA方法和胶体金凝集抑制试验检测粪便中的微量Hb，灵敏度高，特异性强，简单实用，对于提高粪便隐血试验的准确度以及隐血试纸质量评价与控制有意义。

讨　论

杂交瘤单克隆抗体技术的创立为所有需要使用特异性抗体的研究领域提供全新的手段和制剂，促进了众多学科的发展。由于McAb具有单一的抗原位点特异性和均质性

表1　抗人Hb McAb的基本特性

McAb	IgG亚类	抗原位点	Kd	腹水效价	染色体数
Hb264	IgG2a	β	1.6×10^{-6}mol/L	1.6×10^{6}	98
Hb210	IgG2b	α	2.8×10^{-6}mol/L	4.12×10^{6}	101
Hb238	IgG2a	α.β	8.9×10^{-6}mol/L	2.06×10^{6}	132

维普资讯 http://www.cqvip.com

等特点，大大推动了生物活性物质在分子水平上的研究。对于具有重要生理功能的Hb的研究。McAb也显示出它独特的优越性[1]。Kazim和等[8]用多种动物抗血清研究人Hb的α链，认为有5个抗原位点，β链在种族间变异较大，抗原位点尚难估计。Krlo[1]总结了人HbMcAb在抗原位点上有四种类型：(1) 对α链特异；(2) 对β链特异；(3) α和β链有交叉反应；(4) 对α和β共同组成的抗原决定簇结合，即抗空间构型的McAb。本文报道的Hb210和Hb264属于Krco第1和第2类型，而Hb238是人Hb抗体谱新成员，即BisMcAb，依据是：Hb238杂交瘤细胞染色体132条，接近两个脾细胞和一个Sp2/0细胞的总和；染色体大多数为端着丝点，(脾细胞特点)，见图。因此，Hb238是两个脾细胞与一个Sp2/0细胞融合的三体瘤(trioma)，有分泌BisMcAb的基因基础；免疫酶染色显示两条带和α与β互相不产生竞争抑制，证实Hb238可分泌抗人Hb α和β的BisMcAb。

离心融合法制备三体瘤的基本原理，可能是在离心力作用下细胞之间距离减小，细胞膜紧密粘合，在PEG作用下形成多个细胞的融合体。这样一次融合得到分泌BisMcAb的杂交瘤，其概率仍是很低的。但是，如果将两种抗原(如肿瘤抗原和毒素)分别免疫的小鼠脾细胞与$Sp^2/0$一起离心融合，得到BisMcAb是可能的。

制备BisAb可用化学交联(chemicol linkage)、二次杂交瘤(hybrid-hybridomas)和基因工程(genetic engineering)技术[9]。这些方法尚处于探索之中。其中二次杂交瘤技术制备的BisAb在许多方面类似于天然抗体，特别适用于免疫治疗剂和细胞生物学的研究。但是二次杂交瘤的制备需要赋予亲本一次杂交瘤某种抗性或敏感性，以便于融合后筛选。因此二次杂交瘤制备周期长，方法繁琐，稳定性差。本工作采用离心融合一次制备三体瘤，方法简单，抗体分泌性能稳定，为研制BisMcAb开辟一条新途径。

用抗人HbMcAb建立了新颖的胶体金凝集抑制试验和竞争ELISA检测粪便隐血，初步显示了抗人HbMcAb作为隐血诊断试剂具有特异性强，灵敏度高的特点，在消化道出血的诊断和筛选早期大肠癌有实用价值。

本工作采用超声乳化抗原佐剂和微波ELISA筛选阳性克隆，提高了McAb技术的工作效率。



图1 Hb238杂交瘤细胞染色体(1000×)

参 考 文 献

1 Krco CJ, et al. Journal of Immunogenetics 1985;12:197

2 Chang TM, et al. Biomaterials, Artificial Cells, and Immobilization, Biotechnology 1992;20:611

3 Fazekas, et al. Journal of Immunological Methods 1980;35:1

4 朱忠勇，等. 实用医学检验 第一版 人民军医出版社 1992;104

5 徐志凯，等. 实用单克隆抗体技术 第1版 陕西科学技术出版社 1992;75

6 Friquet B, et al. Journal of Immunological Methods 1985;77:305

7 李成文. 现代免疫化学技术 第1版 上海科学技术出版社 1992;83

8 Kazim AL, et al. Biochemical Journal 1982; 203:201

维普资讯 http://www.cqvip.com

9 Fanger MW, et al. Critical Reviews in Immunology 1992;12:101

(收稿日期 1994-01-20)

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN HEMOGLOBIN

Wang Kaizheng, et al

Faculty of Laboratory Medicine

Three hybridoma cell lines, desingnated Hb264, Hb210 and Hb238, were prepared by the developed hybridomas technology. Hb264 McAb specific for the beta-chain of human Hb is the murine IgG2a; the Kd of the complex of Hb264-Hb is 1.6 mol/L. Hb210 McAb reacts to the alpha-chain of human Hb; Kd of Hb210-Hb is 2.8 mol/L; murine IgG2b. Hb238, murine IgG2a, is a bispecific McAb which can combine with the alpha-chain as wdll as beta-chain of Hb; The hybridoma Hb238 is a trioma fused with two spleen cells of the mice and one Sp2/0 plasmacytoma cell; Kd of Hb 238-Hb is 8.9 mol/L. The methods and results of cell fusion, screening, characterization have been discussed.

KEY WORDS hemoglobin; hybridomas; bispecific monoclonal antibodies; ELISA

(上接96页)

STUDIES ON THE PROTECTIVES EFFECTS OF PHOSPHOLIPASE A2 INHIBITORS AND ANTIOXIDANT ON BIOMEMBRANES INJURIES INDUCED BY ENDOTOXIN ADMINISTRATION IN WISTAR RATS

Lu Liying, et al

Dept. of Chinical Biochemistry

The protective effects of phospholipase A2 inhibitors, chloropromazine and dexamethasone, and antioxidant vitamine E on biomembranes injuries induced by endotoxin administration were studied on wistar male rats. The results showed that phospholipase A2 inhibitors significantly prevented the membrane phospholipids structure from phospholipase A2 involved degradation and reduced the accumulation of lipid peroxidation induced by endotoxin administration, and antioxidant vitamine E had a powerful effect in the prevention of lipid peroxidation. It is suggested that the activation of phospholipase A2 and lipid peroxidation may play critical roles in the procese of biomembranes injuries induced by endotoxin administration.

KEY WORDS Phospholipase A2; Lipid peroxidation; Endotoxin; Biomembrane; phospholipids