DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.005

抗丙型肝炎病毒核心抗原单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及初步鉴定*

王 闻 李梦东 郝 飞 胡大荣 (第三军医大学附属西南医院传染病中心)重庆,630038
姚仲寅 (河南医科大学医学科学研究所)郑州,450052
崔大敏 (中国科学研究院上海生化研究所)上海,200000

提 要 用丙型肝炎病毒(HCV)核心区合成肽作抗原免疫BALB/c小鼠,取其脾细胞与骨髓瘤细胞$SP^2/0$进行融合。经有限稀释法克隆3代后获得一株抗HCV核心抗原CP_{10}的单克隆抗体(McAb)杂交瘤细胞株3E,,并对其分泌抗体进行初步鉴定。杂交瘤细胞培养上清的抗体滴度为1∶320,诱生同系小鼠腹水的滴度为1∶12800,该McAb能与CP_{10}特异性结合。杂交瘤细胞染色体数目为106条。分泌的抗体为IgG型。

关键词 丙型肝炎病毒;肽/化学合成;单克隆抗体;杂交瘤细胞株
中图法分类号 R373.21

丙型肝炎病毒(HCV)系RNA病毒,基因由大约9400个核苷酸组成,能编码产生一个长约3010～3011个氨基酸的病毒前体多肽,其中核心区(C区)基因具有较高的保守性,其编码产生的多肽已广泛应用于HCV感染的血清学诊断,并显示有较高的应用价值[1]。本研究旨在建立C区抗原的单克隆抗体(McAb)的杂交瘤细胞株,为检测HCV感染患者血清和组织中的HCV抗原提供新的途径和手段。

1 材料与方法

1.1 试剂及其它

1.1.1 HCV C区合成肽 CP_9序列:^{39}R R G P R L G V R A T R K T S E R S Q P R G R R Q P I P K V R R P E G R C V^{74}。CP_{10}序列:^{5}P K P Q R K T K R N T N R R Q D V K^{23}[2],分别偶联牛血清蛋白(BSA),以上均由中科院上海生化所提供。

1.1.2 $SP^2/0$骨髓瘤细胞株 引自中国预防医学科学院病毒研究所。

1.1.3 BALB/c小鼠 购自中科院实验动物中心。

1.1.4 HCV C区重组抗原C_{22-3} 由美国Chiron公司馈赠。

1.2 动物免疫

取合成肽CP_9和CP_{10}各200 μg,偶联BSA各400 μg,加等体积的福氏完全佐剂充分乳化后注入6～8周龄的BALB/c小鼠腹腔。一月后以等量合成肽和BSA加入等体积福氏不完全佐剂乳化后腹腔加强免疫一次,4周后取鼠尾静脉血与免疫抗原作ELISA。选抗合成肽阳性而抗BSA阴性者用于融合,融合前3 d用合成肽50 μg和BSA 100 μg经小鼠尾静脉进行免疫攻击。

1.3 融合

按照常规杂交瘤技术进行细胞融合[3]。

1.4 杂交瘤细胞筛选

用纯CP_9、CP_{10}及BSA分别包被酶标板。包被量CP_9和CP_{10}各为4 μg/孔。BSA为20 μg/孔。CP_9和CP_{10}包被孔用10%马血清溶液封闭,加入杂交瘤细胞培养上清,以间接ELISA法测定$A(OD)_{492\,nm}$值,标本A(OD)值大于阴性对照值2.1倍判为阳性。

1.5 杂交瘤细胞克隆化

用有限稀释法,将抗HCV阳性而抗BSA阴性杂交瘤细胞稀释成25个/ml、5个/ml和2.5个/ml,分别接种于96孔培养板,每孔0.2 ml,于37℃、5%CO_2培养箱中静止培养10 d,凡抗HCV阳性的单克隆细胞再进行亚克隆,同时扩大培养,收集细胞株置液氮冻存。

1.6 诱生BALB/c小鼠腹水

取10～12周龄健康小鼠,腹腔注射抗HCV C区抗原阳性杂交瘤单克隆细胞悬液(2×10^6～10^7/ml)0.2～0.3 ml,10 d左右收集腹水,检测其抗体滴度。

1.7 杂交瘤细胞株的鉴定

1.7.1 抗体滴度的测定

1.7.1.1 杂交瘤细胞培养上清单克隆抗体滴度 取培养上清50 μl,倍比稀释后作间接ELISA测抗体滴度。阴性对照为正常$SP^2/0$细胞培养上清。

1.7.1.2 腹水中McAb滴度 取诱生腹水离心后上清50 μl,倍比稀释后作间接ELISA测抗体滴度。阴性对照为正常$SP^2/0$小鼠腹水。

* 全军"八五"攻关项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.7.2 Ig 型的鉴定 收集杂交瘤细胞无血清培养上清，采用饱和硫酸铵沉淀法提纯 Ig。提纯的 Ig 与标准鼠 IgG 和 IgM 抗血清作琼脂扩散试验和 ELISA。

1.7.3 抗体特异性鉴定

1.7.3.1 特异性中和抑制试验 取不同稀释度杂交瘤细胞株诱生腹水 200 μl，加入 200 μl 合成肽抗原(1 mg/ml)混匀后，45℃水浴 60 min，3000 r/min 离心 20 min 后，取上清以间接 ELISA 法测定上清抗体水平值(N)。同时以不加抗原的不同稀释度腹水抗体水平值(S)作对照。

1.7.3.2 $3E_7$McAb 和合成肽及重组抗原的结合试验 用不同稀释度的 $3E_7$McAb 腹水，与合成肽 CP_{10}和重组抗原 C_{22-3}反应，检测其结合能力。

1.7.4 杂交瘤细胞染色体制备和计数 按照常规染色体制备方法制备杂交瘤细胞染色体[3]，并与 BALB/c 小鼠脾细胞及 $SP^2/0$ 骨髓瘤细胞染色体对照。

2 结果

2.1 经筛选杂交瘤细胞和有稀释法克隆 3 代获得一株稳定分泌 CP_{10}McAb 的杂交瘤细胞株 $3E_7$。

2.2 杂交瘤细胞培养上清液和小鼠腹水 $3E_7$McAb 滴度测定试验结果：培养上清液抗体 ELISA 滴度为 1∶320，腹水抗体 ELISA 滴度为 1∶12800。

2.3 Ig 型鉴定

经琼脂扩散试验证实 $3E_7$McAb 与鼠标准 IgG 抗血清出现沉淀线，ELISA 也证实其不与 HRP－抗鼠 IgM 发生反应，而与 HRP－抗鼠 IgG 反应，表明该 McAb 为 IgG 型。

2.4 $3E_7$McAb 特异性鉴定

2.4.1 特异性中和抑制试验 $3E_7$McAb 不同稀释度的腹水经 CP_{10}处理后，用间接 ELISA 法测定中和后抗体水平，结果显示 $3E_7$McAb 能被 CP_{10}抑制，见图 1。

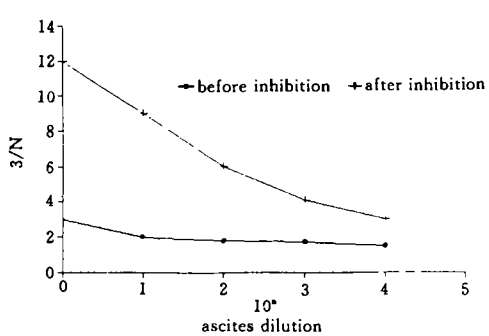


图 1 特异性中和抑制曲线

Fig 1 The curve of neutralization inhibiting test

2.4.2 $3E_7$McAb 与 CP_{10}与 C_{22-3}结合试验 $3E_7$McAb 均能与 CP_{10}和 C_{22-3}反应，如图 2 和图 3。

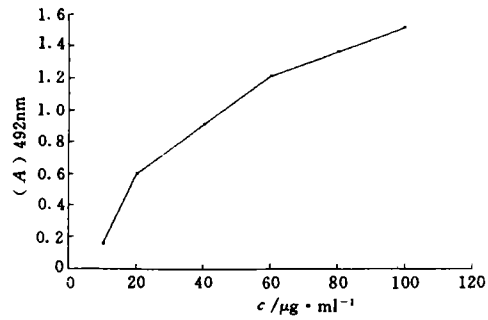


图 2 $3E_7$McAb 与 CP_{10}反应

Fig 2 Affinity of $3E_7$McAb against CP_{10}

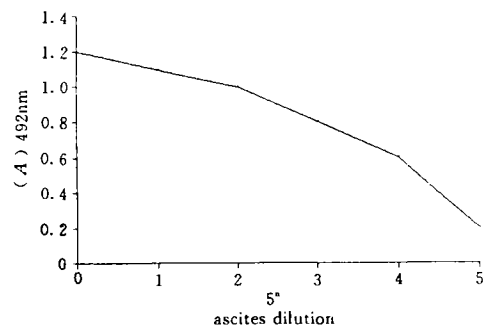


图 3 $3E_7$McAb 与 C_{22-3}反应

Fig 3 Affinity of the $3E_7$McAb against C_{22-3}

2.5 杂交瘤细胞的染色体分析

同法制备 $SP^2/0$ 骨髓瘤和 $3E_7$ 杂交瘤细胞的染色体片，计数结果 $SP^2/0$ 骨髓瘤细胞染色体数目平均为 68 条，$3E_7$ 杂交瘤细胞的平均为 106 条，而 BALB/C 小鼠脾细胞为 40 条染色体，可见 $3E_7$ 杂交瘤细胞的染色体数目接近于 $SP^2/0$ 和小鼠脾细胞染色体数目之和。

3 讨论

随着 HCV 基因克隆和表达技术的逐步完善，国外学者利用合成肽或重组抗原制备 McAb 已获得成功[4~6]。我们也成功地建立了抗 HCV C 区合成肽 CP_{10}McAb 的杂交瘤细胞株，并进行了初步鉴定。

目前国内尚未见 CP_{10}这一段序列合成肽制备 McAb 成功的报道。CP_{10}位于 CP_9 上游，虽仅含有 19 个氨基酸残基，但亲水性强，临床应用价值更大。用化学合成的多肽制备的 McAb 不仅与合成肽有良好的结合能力，而且与重组抗原也有同样的结合力，提示合成肽与 BSA 偶联后并没有显著改变其所含 HCV 抗原表位，进一步说明合成肽制备天然多肽抗原的 McAb 是可行的。高滴度的抗 HCV C 区抗原 McAb

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的制备成功，可用于HCV感染者血清和组织中HCV抗原或抗原抗体复合物的检测，有助于深入研究HCV感染的发病机理，具有良好的应用前景。

参考文献

1 Plageman PGW. Hepatitis C virus. Arch Virol, 1991; 120: 165

2 Takahashi K, Okamoto H, Kishimoto S, et al. Demonstration of a hepatitis C virus－specific antigen predicted from the putative core gene in cirulation of infected hosts. J Gen Virol, 1992; 73: 667

3 王文章，苏钟浦. 细胞杂交瘤技术与McAb的应用. 见：高寿征主编. 病毒性肝炎防治研究. 北京：北京出版社，1993: 511～597

4 Hiramatsu N, Hayashi N, Haruna Y et al. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus－infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS_3 regions of the hepatitis C virus genome. Hepatology, 1992; 16: 306

5 Tsutsumi K, Urashina S, Takada et al. Detection of antigens related to hepatitis C virus RNA encoding the NS_5 region in the livers of patients with chronic type C hepatitis. Hepatology, 1994; 19: 265

6 Yap SH. Detection of hepatitis C virus antigen by immuno－histochemical staining: a histological of hepatitis C virus infection. J Hepatol, 1994; 20: 281

（收稿：1995-03-02；修回：1995-07-23）

Establishment and preliminary identification of a hybridoma cell line producing monoclonal antibodies against core antigen of hepatitis C virus

Wang Ge, Li Mengdong, Hao Fei, Hu Darong (Clinical Center of Infectious Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract A hybridoma cell line to produce monoclonal antibodies against the core antigen of hepatitis C virus was established by the fusion of $SP^2/0$ mouse myeloma cells with the splenocytes of BALB/c mouse immunized with the synthetic peptide of the core region of hepatitis C virus (HCV). The titer of the culture supernatant was 1∶320 and that of the ascites from the mouse with transplanted hybridoma was 1∶12800. The specificity and affinity of the monoclonal antibodies were preliminarily identified with neutralization inhibition test and ELISA. It was shown that the monoclonal antibodies was IgG in nature and the hybridoma was consisted of 106 chromosomes.

Keywords hepatitis C virus; peptide/CI; monoclonal antibody; hybridoma cell line

****

一氧化氮对内毒素血症大鼠肠道损伤影响的实验研究

The experimental studies of the effect of nitric oxide on intestinal damage in rats with endotoxemia

肖 南 陈惠孙 （第三军医大学野战外科研究所第二研究室）重庆，630042

本研究用一氧化氮(NO)合成酶底物左旋精氨酸(L-arg)和其特异性抑制剂硝基左旋精氨酸(LNNA)从正反两方面探讨了NO对内毒素(10 mg/kg)血症大鼠肠道损伤、细菌移位的影响及其机理；并进一步评估了NO对内毒素血症大鼠转归的作用。结果表明，用L-arg(40 mg/kg)促进NO合成可明显降低肠组织伊文氏兰(EB)含量，稳定二胺氧化酶(DAO)活性，降低肠系膜淋巴结细菌检出率和菌落计数，降低肠组织髓过氧化酶(MPO)活性及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量，改善肠系膜血管舒张反应性和肠组织血流；而用LNNA(4 mg/kg)抑制NO产生则加重上述改变。提示在本实验条件下NO对内毒素血症时肠道损伤及细菌移位有保护作用，其机理可能是通过改善肠血流、降低白细胞积聚和脂质过氧化损伤而发挥作用。此外，内毒素血症时血浆NO的稳定代谢产物NO_2^-/NO_3^-明显升高，且与血压下降有一定关系，抑制NO产生虽可明显升高血压，但可加重酸血症，明显降低24 h动物存活率，并有剂量依赖性。而促进NO合成则能较好地维持血压、减轻酸血症，提高动物存活率。提示本实验条件下NO对内毒素血症大鼠的转归有改善作用，这与其细胞保护和减轻组织损伤作用有关。

关键词 内毒素血症；肠道；细菌移位；一氧化氮

中图法分类号 R574

（收稿：1995-06-23；修回：1995-07-17）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net