

- 237:660-7.
 [8] Farhood, H. et al., 1995, *Anal. Biochem.*, **225**:89-93.
 [9] Hoke, G. D. et al., 1991, *Nucleic Acids Res.*, **19**:5743-8.
 [10] Campbell, J. M. et al., 1990, *J. Biochem. Biophys. Meths.*, **20**:259-67.
 [11] Tao, M. et al., 1999, *FEBS Lett.*, **454**:312-6.

THE TRANSFECTION EFFICIENCY OF OLIGONUCLEOTIDES TRANSFECTION MEDIATED BY CATIONIC LIPOSOMES IN HELA CELLS

TAO Mao Xuan* TAKAKU Hiroshi**

(* Union School of Public Health, Chinese Academy of Preventive Medicine, Peijing (100021), China)

(** Department of Industrial Chemistry, Chiba Institute of Technology, 2-17-1 Tsudanuma, Narashino, Chiba (275-0016), Japan)

ABSTRACT

The enhance effect of oligonucleotide transfection mediated by cationic liposomes (Lipofectin, LipofectAmine, FuGENE6 and DMRIE-C) were investigated using flow cytometry in HeLa cells. Two 19-mer molecules, phosphodiester oligonucleotide (ODN19) and phosphorothioate oligonucleotides (S-ODN19), were employed, which are labeled with Fluorescein isothiocyanate (FITC) and have the same sequence. The results show that, for the unmodified ODN19 molecules, LipofectAmine and DMRIE-C can obviously improve the transfection, but no improving effect were observed in other two liposome. For the S-ODN19 transfection, all of the 4 cationic liposomes possess the observed ability to enhance the transfection, of which the LipofectAmine was more efficient than three others. The mean FITC density (5203.11) of LipofectAmine mediated transfection was several decades times comparable to the control cultures without mediated liposome. The improving effect of liposomes mediated transfection was ranked as LipofectAmine > FuGENE6 > DMRIE-C > lipofectin. Meanwhile. The experiment also suggested that, when transfection procedure was performed for about 4 hours, a high efficiency can be expected in FuGENE6 mediated oligonucleotides transfection.

Key words: Cationic liposome; Transfection; Oligonucleotide; HeLa cell

抗人 Leptin 单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用

董秀华 赵跃然* 张建华 王郡甫 张捷 刘伟** 张彩 田志刚

(山东省肿瘤生物治疗研究中心 山东省医学科学院基础医学研究所 **放射医学研究所 济南 250062)

Leptin 是近年来发现的调节机体内分泌和能量代谢的最重要的肽类激素^[1]。它由脂肪细胞分泌后进入血液循环,与特异性运输蛋白结合,通过血脑屏障,作用于下丘脑的 Leptin 受体,促进下丘脑神经肽的分泌,或直接作用于靶细胞的 Leptin 受体,产生广泛的生物学效应^[2,3]。Leptin 具有调节食欲、能量消耗及体内脂肪贮存等生物效应。研究发现,Leptin 不仅与肥胖发生直接相关,而且与糖尿病的发生、发展及其并发症的出现关系密切。转基因动物研究显示 Leptin 高水平表达能改善糖尿病鼠的糖耐量状况,提高对胰岛素的敏感性,延迟糖代谢异常所致并发症的发生,促进糖尿病的康复^[4]。提示 Leptin 有可能用于糖尿病的治疗。为进一步探讨 Leptin 的生物学功能,我们在进行了人 Leptin 原

核、真核系统的表达及其生物学活性研究的基础上^[5,6],制备了抗人 Leptin 单克隆抗体,对其免疫学特性进行了鉴定,并通过免疫印迹、免疫组化和免疫荧光技术,对获得的单抗进行了初步应用的研究。结果报道如下。

材料与amp;方法

1. 材料

重组人 Leptin(rh-Lep)及鼠伤寒沙门氏菌由本室制备;小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 由本室冻存;Leptin 标准品为美国 R&D 公司产品;BALB/c 小鼠购自山东大学动物中心;HAT、8-氮杂鸟嘌呤为 Sigma 公司产品;辣根过氧化物酶

本文 2001 年 12 月 19 日收到,2002 年 3 月 18 日接受。

* 通讯作者。

(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中山生物制品公司;抗小鼠 IgM、IgG 及其亚类抗体由上海生物制品研究所提供;其他生化及化学试剂为国产或进口分析纯。

2. 方法

(1) 杂交瘤细胞株的建立和筛选 鼠伤寒沙门氏菌的培养及裸菌制备按文献进行^[7]。选用 8 周龄 BALB/c 小鼠,首次取 rh-Lep/裸菌复合物 0.15ml(约含 20 μ g Leptin)脾内直接注射免疫,后改用腹腔注射免疫法每两周免疫一次,共四次,自第三次尾静脉取血检测抗体滴度,融合前三天尾静脉加强免疫一次。取免疫小鼠的脾细胞和 Sp2/0 细胞常规融合,HAT、HT 选择性培养基进行培养,间接 ELISA 法筛选阳性克隆,有限稀释法^[8]进行克隆化筛选。

(2) 单克隆抗体的制备及鉴定 体内诱生法制备腹水^[9],DEAE 离子交换层析纯化单抗,间接 ELISA 法测定腹水效价、免疫球蛋白的类型;秋水仙素抑制法^[10]分析杂交瘤细胞染色体;并进行单抗特异性鉴定、亲和常数测定^[11]及抗原结合位点的分析^[12]。

(3) 辣根过氧化物酶标记抗体的制备 改良过碘酸钠标记法^[13]。

(4) Western blotting 印迹 以标准 Leptin 为抗原,常规进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭并依次加入制备的抗 Leptin 单抗和酶标二抗,在底物液中显色。

(5) 免疫组化 新鲜人下肢皮下脂肪组织,冰冻切片 12 μ m,空气干燥,滴加 50%乙醇 6 分钟,分别设 HE 染色组、Leptin 单抗组(1:100 稀释单抗)及空白对照组(不加单抗),后两组常规 SABC 法进行脂肪组织染色,光镜下观察。

(6) 免疫荧光 人皮下脂肪组织冰冻切片用正常兔血清封闭,加入 1:100 稀释的抗 Leptin 单抗(空白对照组不加单抗)、兔抗鼠 IgG-FITC(1:200),荧光显微镜观察。

结 果

1. 杂交瘤细胞株的建立及鉴定

经 PEG 细胞融合后,从初始 36 个阳性孔中经 4 次克隆化获得 3 株能稳定分泌 Leptin 单抗的细胞株,分别命名为 1F11、2A7、3G5。经 3 个月液氮冻存、复苏,并在体外培养至 6 个月后仍能稳定分泌 Leptin 单抗。三株单抗所产生的腹水效价高,Ig 亚类均为 IgG3,染色体条数接近鼠脾细胞和 Sp2/0 骨髓瘤细胞染色体条数的总和(表 1)。

表 1 3 株 rh-Lep 单抗的 Ig 亚类、染色体及腹水效价

杂交瘤细胞株	Ig 亚类	染色体条数	腹水效价
1F11	IgG3	104	1×10^{-6}
2A7	IgG3	102	1×10^{-7}
3G5	IgG3	99	1×10^{-7}

2. 单抗特异性鉴定

用 rh-Lep、标准 Leptin、rhIL-2、rhIL-3、rhIL-6、

rhIL-15、rhG-CSF、rhGM-CSF 和裸菌液包被 96 孔聚苯乙烯板,间接 ELISA 法检测单抗与这些物质的反应结果显示,3 株单抗与 rh-Lep、Leptin 标准品均有明显的特异性结合,而与上述重组人的细胞因子及裸菌无交叉反应,表明各 McAb 具有较高的特异性。

3. 单抗相对亲和力测定

间接 ELISA 法测定三种单抗的相对亲和力(图 1)。Leptin 单抗 3G5、2A7 和 1F11 的 50%最大结合浓度分别为 0.6 μ g/ml、0.82 μ g/ml 及 1.0 μ g/ml。由于亲和力越大,所需的抗体浓度越低,故三株单体的亲和力依次为 3G5>2A7>1F11。

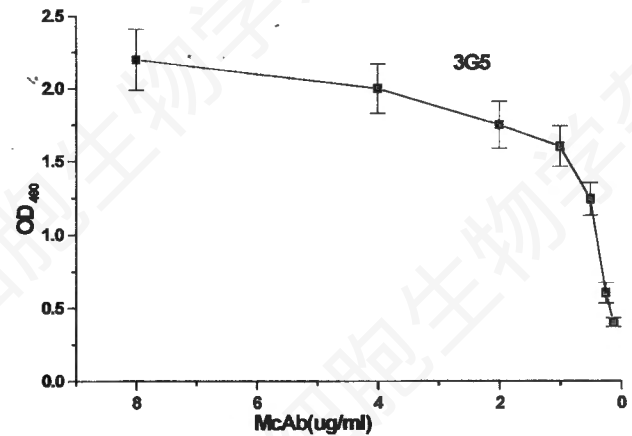


图 1 抗人 Leptin McAb 的相对亲和力曲线

4. 三株 Leptin 单抗与抗原结合位点分析

为了测定三株单抗所针对的抗原决定簇,进行了单抗相加实验(additive test)。当相加指数(additive index, AI)大于 50%时,即可认为二单抗识别不同的抗原决定簇,实验结果表明,三株单抗至少识别二个不同的抗原决定簇(表 2):2A7 与 3G5、1F11 识别不同的决定簇;3G5 与 1F11 识别的决定簇相同或空间位点相近。

表 2 三株单抗的相加实验结果(AI%)

McAb	2A7	1F11	3G5
2A7	-	72	63
1F11	69	-	41
3G5	71	43	-

5. Leptin 单抗的酶标记

以 rh-Lep 抗原 2 μ g/ml 包被 96 孔聚苯乙烯板,将辣根过氧化物酶标记的 2A7 单抗作一系列的稀释、反应。测得 OD 值显示 HRP 标记的人 Leptin 抗体和 Leptin 仍有较高的特异性结合,表明经标记

后,抗体仍保留了免疫活性。

6. Western blotting 印迹

Western blotting 结果显示,在标准 Leptin 电泳带约 16kD 处出现特异的显色带,表明所获单抗可用于 Leptin 的免疫杂交分析。

7. 免疫组化

冰冻切片用常规 HE 染色进行脂肪组织定位,用 SABC 法检测脂肪组织 Leptin,结果显示:HE 染色可清楚地标明脂肪组织,免疫组化显示脂肪组织出现棕黄色颗粒染色,而空白对照无颗粒出现(见图版),表明所获单抗可用于脂肪组织中 Leptin 抗原定位检测。

8. 免疫荧光

人皮下脂肪组织单抗组观察到许多大小不等的颗粒或线性荧光,而空白对照组未观察到荧光,表明所获单抗可用于脂肪组织中 Leptin 的免疫荧光检测。

讨 论

Leptin 是近年发现的肥胖基因(OB)表达的可溶性蛋白,分子量为 16kD。由于分子量小,免疫原性弱,采用传统的抗原加福氏佐剂乳化免疫法不仅抗原需求量大、费时、费力,且难以获得高效价的抗体。本研究突破传统的采用福氏完全、不完全佐剂的方法,在国内率先采用 Bellstedt^[7]的方法,将裸化的鼠伤寒沙门氏菌作佐剂,制备蛋白/裸菌复合物进行免疫,使免疫原量降到微克水平,通过脾内直接免疫、腹腔免疫、静脉免疫,制备了高效价的人 Leptin 多抗,为进一步融合及筛选打下良好的基础。用裸菌作为载体具有以下优点:(1)菌体容易获取;(2)整个处理过程简单,无需特殊设备和试剂。此外,免疫途径亦是影响免疫效果的重要因素。传统的免疫方法有:皮下、腹腔、静脉等途径。考虑到 Leptin 的免疫原性弱,本研究首次免疫采用脾内直接注射法,再通过腹腔免疫,最后采用静脉途径加强免疫,取得了满意的效果,为获得高效价的 Leptin 单抗奠定了重要基础。三种免疫途径的有机结合不仅增强了免疫效果,提高了细胞融合率,而且使抗原用量减少到最低限度,尤其在抗原来源困难,价格昂贵的情况下,该方法更显示出较大的优越性。

本研究制备的抗人 Leptin 抗体均一,特异性高,亲和力强。初步应用研究显示,获得的单抗不但可进行 HRP 标记及 Leptin 的 Western blotting、免疫组化及免疫荧光检测,而且为 Leptin 检测试剂盒的制备及其生物学活性研究奠定了重要基础。

摘 要

本研究用本室制备的重组人 Leptin 为抗原,以鼠伤寒沙门氏裸菌为佐剂,通过脾内、腹腔、静脉三种途径相结合免疫 BALB/c 鼠,以 PEG 为促融剂,将免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 细胞进行融合, HAT/HT 选择性培养基、间接 ELISA 筛选阳性克隆,有限稀释法进行 4 次克隆化,获得三株能稳定分泌抗人 Leptin 单抗的杂交瘤细胞株。对所获得的细胞株及其分泌的单抗特性进行较系统的鉴定显示,获得的单抗特异性高,亲和力强,免疫球蛋白亚类均为 IgG3。初步应用的研究显示,获得的单抗不仅可用于体外 Leptin 的免疫印迹检测,而且可通过免疫组化、免疫荧光等技术用于脂肪组织中 Leptin 的检测,为 Leptin 的基础和临床研究奠定了基础。

关键词: Leptin 杂交瘤 单克隆抗体

参 考 文 献

- [1] Zhang Y et al., 1994, *Nature*, **372**:425-432.
- [2] Flier JS, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 4242-4245.
- [3] Emilsson V, et al., 1997, *Diabetes*, **46**:313-316.
- [4] Masuzaki H, et al., 1999, *Diabetes*, **48**:1615-1622.
- [5] 赵跃然等, 2000, *中国生物化学与分子生物学报*, **16**(6):742-745.
- [6] 赵跃然等, 2001, *生物工程学报*, **17**(2):175-179.
- [7] Bellstedt DU, et al., 1987, *J Immunol Methods*, **98**:249.
- [8] Goding JW. 1980, *J Immunol Methods*, **39**:285.
- [9] 辛颜彬, 1900, *单克隆抗体通讯*, **6**(2):63.
- [10] 鄂征主编, 1982, *组织培养技术*, P177-180, 人民卫生出版社.
- [11] Graewe R., et al., 1984, *J. Immunol Methods*, **72**:177-182.
- [12] Frigue B, et al., 1983, *J Immunol Methods*, **60**, 351-355.
- [13] 王浩丹主编, 1995, *生物医学标记示踪技术*, P103, 人民卫生出版社.

PREPARATION AND PRELIMINARY APPLICATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HUMAN LEPTIN

DONG Xiu Hua ZHAO Yue Ran ZHANG Jian Hua WANG Jun Fu

ZHANG Jie LIU Wei ZHANG Cai TIAN Zhi Gang

(Center for Tumor Biotherapy of Shandong, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062)

ABSTRACT

Recombinant human leptin(rh-Lep) was conjugated to naked bacteria of salmonella typhimurium as immunogen to immunize BALB/c mice. Rh-Lep was administered by three routes of intrasplenic inoculation, intraperitoneal and intravenous injection. The spleen cells were fused with SP2/0 cells using polyethylene glycol and hybridoma cells were selected by HAT medium and screened with enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). After rounds of cloning with limited dilution method, three of hybridoma cell lines were obtained which stably secrete monoclonal antibodies of IgG3 against human leptin with high specificity and affinity. MCAs were tested for their potential uses and the results showed that these McAbs can be used in Western blotting, Immunohistochemical and Immunofluorescent techniques.

Key words: Leptin Hybridoma Monoclonal antibody(McAb)

单核细胞促进人外周血淋巴细胞离体增殖的自由基机理

白海涛 张永芳 潘金燕 江家贵*

(苏州大学医学院 苏州 215007)

许多研究表明多种细胞,例如人成纤维细胞、内皮细胞和胰岛细胞,在体外培养条件下可向培养基中释放低浓度的超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ ^[1], $O_2^{\cdot-}$ 充当了第二信使的作用,可激活细胞增殖信号传导链上的多种靶分子,从而导致细胞增殖^[2]。人们早就发现,在淋巴细胞培养过程中加入少量的单核细胞可促进 PHA 刺激的淋巴细胞的体外增殖。然而其确切机制尚不清楚,为此我们设想淋巴细胞和单核细胞共同培养条件下的介质中的 $O_2^{\cdot-}$ 是否参与了淋巴细胞的增殖调控作用? 因此我们设计了下列实验。

材料和方法

一、主要仪器和试剂

低本底液闪仪 LS-6800 USA; 3H -TdR 上海原子能研究所; 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase SOD)按丙酮沉淀法^[3]从猪红细胞提取(比活力 $5000\mu/mg$ 蛋白); 淋巴细胞分离液, 上海试剂二厂; 细胞色素 C, 二亚苯基碘(Diphenyleneiodonium, DPI), PHA 均购自 Sigma 公司。

二、细胞的分离

吴县市中心血站提供健康人外周血, 肝素抗凝后以淋巴

细胞分离液分离出单个核细胞, PBS 洗三次, 用含 PHA 的无酚红 RPMI-1640(PHA 浓度为 $60\mu g/ml$)液配制成 $0.5 - 1 \times 10^7/ml$ 的细胞悬液, 加入无菌培养皿中, $37^\circ C$ 静置 90 分钟。吸取非贴壁细胞, PBS 洗两次, 即为淋巴细胞。PBS 冲洗培养皿三次, 小心刮取贴壁细胞, 瑞氏染色后镜下观察, 单核细胞比例为 $84\% - 90\%$ 。

三、细胞培养

(1) 取 24 孔培养板, 每孔加入淋巴细胞 1×10^6 , 实验分单纯淋巴细胞组, 淋巴细胞 + 1×10^5 单核细胞组, 淋巴细胞 + 2×10^5 单核细胞组, 每组设九个复孔, $37^\circ C$ 无血清培养 48 小时后, 每组前三孔加入 3H -TdR $20\mu l$ ($2.22 \times 10^5 Bq/ml$), 继续培养 16 小时, 吸取非贴壁的淋巴细胞, 滤膜法制样, 液闪测定各样品的 DPM 值(每分钟衰变数)^[4]。后六孔作如下处理, 其中三孔加入细胞色素 C $160\mu mol/L$, 另三孔加入等量细胞色素 C 的同时加入 SOD 1200μ (测定非 $O_2^{\cdot-}$ 因素对结果的影响)^[5], $37^\circ C$ 培养 1 小时后, 将样品 1000 转离心 10 分钟, $550nm$ 波长处测定上层相吸光度值(OD 值), 计算出两者 OD 差值, 再换算成 $O_2^{\cdot-}$ 浓度($nmol/h/10^6$ 细胞)^[5]。

(2) 取另一块培养板, 各处理组加入 DPI $20\mu mol/L$, 分组和处理同上。

本文 2001 年 7 月 2 日收到, 11 月 5 日接受。

* 导师、通讯联系人。