

人-小鼠淋巴细胞杂交瘤中抗体分泌 和人染色体丢失的关系**

吕淑霞 徐绍嫣 叶敏 桥爪秀一* 龟井优德*

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

我们曾进行人淋巴细胞杂交瘤百余次融合试验,从采用的12个亲本瘤系看,与小鼠的骨髓瘤系和人-小鼠异源骨髓瘤系(heteromyeloma)融合的人-小鼠杂交瘤都比人-人杂交瘤易获得较稳定的细胞克隆,然而抗体丢失的情况仍十分突出。究其原因之一可能和染色体丢失有关^[1]。现就我们可获得的阳性细胞克隆和原先阳性以后丢失抗体分泌能力的细胞克隆作染色体分析,以了解人染色体在人-小鼠淋巴细胞杂交瘤抗体丢失中的影响。

一、材料和方法

一、染色体制片和染色

1. 染色体制片

按照Chen方法^[2],传代杂交瘤细胞培养36—48小时后,于收集细胞前2小时加秋水仙素,终浓度为0.075—0.1微克/毫升,去培养液,加Hypo-Trypsin Versene将细胞从瓶壁冲下,1000 rpm离心5分钟,倾去上清液,加37℃预温的0.075 mol/L KCl,混匀,37℃水浴10—15分钟,去上清液;以新鲜配制的冰醋酸和甲醇(1:3)液固定,室温静置10—20分钟,1000 rpm离心5分钟,去上清液;重复以上固定过程至少三次;加上相当于细胞体积约十倍的固定液,混匀,备用。

取干净、冷藏于蒸馏水中的载玻片,甩去水,45℃倾斜,滴细胞悬液数滴于载玻片上,吹散,烘干,60℃,24小时。

2. G 11

取片龄为一周的制片,参照Friend等^[3]方法,在60℃蒸馏水中浸1—2小时后,以37℃预温的0.05 mol/L Na₂HPO₄(pH 11.3)配制的5%Giemsa染色15分钟,蒸馏水漂洗,空气干燥,镜检,结果人染色体呈浅蓝色,小鼠染色体呈深品红色。

3. C带

按照常规方法用片龄为一周左右的染色体制片,以新鲜配制的5%Ba(OH)₂ 50℃处理5分钟,蒸馏水冲洗干净,然后浸入2×ssc溶液中,60℃,1小时,蒸馏水漂洗,2.7%Giemsa染色20—30分钟。

4. G带

目的在于获得良好的分带类型。按常规方法,取用片龄在一周以内的制片,以1%Trypsin(Difco)37℃处理15—20秒,蒸馏水冲洗,2.7%Giemsa(pH 6.8)染色10—20分钟。

二、人-小鼠淋巴细胞杂交瘤株和亲本瘤系

分析的人-小鼠淋巴细胞杂交瘤共有16株,杂交瘤制备的方法参考^[4,5],其中抗体阳性9株,阴性的7株。融合的亲本瘤系共3株:小鼠骨髓瘤系P₃X 63-Ag 8.653简称653^[6](英国AFRC, Dr. Taussig, M. J. 惠赠);人-小鼠异源骨髓瘤系SHM-D 33^[7](ATCC);人-小鼠异源骨髓瘤系RF(日本森永生物科学研究所)。

二、结果和讨论

在染色体分析中,我们除了注意人+小鼠杂交瘤株中人染色体丢失情况以外,还分析了和Ig基因有关的三对人染色体,即重链基因所在的第14对染色体,K链基因所在的第2对染色体和入链基因所在的第22对染色体,请参阅图片。染色体分析的结果详见下表。

一、人-小鼠杂交瘤中人染色体丢失的情况

在人-小鼠杂交瘤中人染色体丢失很多,16

* 日本森永生物科学研究所。

** 高效群同志参加染色体制片和照相,孙佩芳、江子卿、董杰等同志提供杂交瘤细胞,特此致谢。

株细胞中,保留最多的是23条,丢失近一半,最少的只有3条。从保持抗体分泌功能的9株来看,人染色体数目保留范围为9—23条,但其中7株在13条以上。丧失抗体分泌功能的7株中,人染色体保留的数目是3—12条,除3株以外,染色体数目均在5条(含5条)以下。因此保留一定数量的人染色体,例如15条以上,可能有助于杂交瘤分泌抗体的稳定性。挑选一个拥有多条人染色体的异源骨髓瘤系作融合亲本是否可能有助于稳定杂交瘤,这种设想是可以考虑的。此外丧失分泌能力的杂交瘤株

中,多数是包含了丢失与抗体有关的染色体,但也有少数细胞株轻、重链相关的染色体都具备,如表中编号第12,13的杂交瘤株,这可能有多种原因^[1]。

二、编码Ig的三对染色体的丢失情况

在编码轻链和重链的染色体中,重链基因所在的第14号染色体是三对染色体中最稳定的,16株细胞中有14株保留这条(对)染色体。入链基因所在的染色体(22号)对K链的来说也比较稳定,有12株保留这条(对)染色体。K

人鼠杂交瘤染色体分析

编号	来源	抗原	亲本瘤系	克隆情况	分泌Ig 类型	抗体分泌	人染色 体数	人染色体编号		
								(14)	(22)	(2)
1	扁桃体	TT	653	4次以上克隆(复苏)	IgM	+	23	1	1	2
2	扁桃体	HBSAg	653	5次以上克隆化	IgM	+	13	1	1	
3	扁桃体	TT	RF	5次克隆化(复苏)	IgG	+	19	1	1	1
4	扁桃体	TT	RF	4次克隆化(复苏)	IgM	+	15	1	1	1
5	扁桃体	TT	SHM-D 33	9次克隆化	IgM	+	14	1	1	
6	扁桃体	TT	SHM-D 33	2次克隆化	IgG	+	14	2	2	
7	扁桃体	TT	SHM-D 33	2次克隆化	IgG	+	13	1	1	
8	扁桃体	TT	SHM-D 33	2次克隆化	IgG	+	10	2	2	
9	扁桃体	TT	SHM-D 33	2次克隆化	IgG	+	9	2	1	
10	扁桃体	TT	SHM-D 33	2次克隆化	IgG	+/-*	9		1	
11	扁桃体	HBSAg	RF	5次克隆化	IgG	-	12	1		
12	外周血	HBSAg	RF	1次克隆化	IgM	-	5	1	1	1
13	扁桃体	TT	SHM-D 33	2次克隆化	IgG	-	10	2	1	
14	扁桃体	TT	SHM-D 33	1次克隆化	IgG	-	5	1		
15	扁桃体	TT	SHM-D 33	1次克隆化	IgG	-	5	1		
16	扁桃体	TT	653	8次克隆化(复苏)	IgM	-	3			
SHM-D 33(U 266 × 653, 人鼠异源骨髓瘤系)							5	1	2	2
RF(SHM-D 33 × SP 2/0, 人鼠异源骨髓瘤系)							4	1	1	

* 培养孔内阳性,扩增后全阴性。

链基因所在第2号染色体,最容易丢失,一共只有5株细胞保留这条(对)染色体,它们也都同时保留了第22号染色体,在16个杂交瘤株中尚未发现保留第2号而丢失第22号染色体的。因此比较稳定的杂交瘤大多是带入链的。值得注意的是这种轻、重链的组合恰巧和人体内Ig的组合相反。因为人体中K链和入链的比例是2:1,即2/3的Ig分子是拥有K链的,因而第2号染色体的丢失的机率实际上比表上反映出来的还要大。此外今后是否应以抗入链来筛选杂交瘤以利于获得稳定细胞株也是可以考虑的。

三、融合亲本瘤系与K链基因相关染色体的丢失是否有关?

K链基因相关染色体的保留或丢失有可能和亲本瘤系有关。在16个杂交瘤株中,9个以SHM-D 33为融合亲本瘤系的瘤株中,未发现一株保留第2号染色体,而用RF系建立的4个杂交瘤株中却有3个是拥有第2号染色体的。

四、异源骨髓瘤系保留的Ig基因相关的染色体是否起作用?

在研制人杂交瘤中,我们曾应用了小鼠、人-小鼠和人的瘤系,发现653、SHM-D 33及RF系都较好,后面两株都是异源骨髓瘤系。近年来发表的有关研制人杂交瘤的论文中,也常偏用异源骨髓瘤系。从表上可见SHM-D 33和RF系都拥有人的轻、重链基因相关的染色体。可获得的杂交瘤中分泌抗体的轻链是否有可能来自瘤系而不是来自致敏淋巴细胞?也就是由异源骨髓瘤系细胞中保留的人轻链基因所编码。因为Lenner^[8]等认为抗体结合抗原的能力主要取决于重链,不同特异性的抗体可以是同一种轻链。分离的轻链结合抗原的能力很弱,然而分离的重链却保留了原有结合能力的相当部分。从这样来看,是否由于异源骨髓瘤系中保留了人的轻链基因,因而较易产生比较稳定

的杂交瘤克隆,这种可能尚需进一步研究。

摘 要

本文应用G带,G 11和C带染色体制片的方法分析16个人-小鼠杂交瘤抗体分泌和人染色体丢失的关系。结果表明抗体阳性的9株杂交瘤保留人的染色体较多,7/9在13条以上,阴性的7株中4/7在5条以下。Ig基因相关的三对人染色体中,14号(重链基因相关)最稳定,22号(入链基因相关)其次,2号(K链基因相关)最易丢失。9株以SHM-D 33为融合亲本瘤系的杂交瘤,没有1株保留第2号染色体,而用RF瘤系建立的4株杂交瘤中有3株拥有2号染色体,提示2号的丢失可能与瘤系相关。

图 版 说 明

1. SHM-D 33(人-小鼠异源骨髓瘤系,人U 266 × 小鼠P₃X 63-Ag 8.653)的染色体G带。5条人染色体中2号2条,14号1条,22号2条(箭头)。

2. 人淋巴细胞与SHM-D 33瘤系的杂交瘤细胞(表中编号第9)染色体的分化染色(G-11)。小鼠染色体深染,人染色体浅染(9条,箭头)。

3. 人淋巴细胞与SHM-D 33瘤系的杂交瘤细胞(表中编号第9)染色体的G带。9条人染色体中14号2条,22号1条(箭头)。

4. 人淋巴细胞与小鼠P₃X 63-Ag 8.653杂交瘤细胞(表中编号第2)染色体的G带。13条人染色体中14号1条,22号1条(箭头)。

参 考 文 献

- [1] James, K. and G. T. Bell, 1987, *J. Immunol. Methods*, 100:5.
- [2] Chen, T. R., 1970, *J. Fish Res. Board Can.*, 27:158.
- [3] Friend, K. K. et al., 1976, *Exp. Cell Res.*, 99:31.
- [4] Carson, D. A. and B. D. Freemark, 1985, *Advances in Immunol.*, 38:275.
- [5] Teng, N. N. H., 1983, *P. N. A. S.*, 80: 7308.
- [6] Sastry, L. et al., 1989, *P. N. A. S.*, 86: 5728.