

实验技术

双盲交叉筛选分泌抗直肠腺癌神经节苷脂
单克隆抗体杂交瘤细胞株 PG 10

范广胜** 严泰英 莫汉庆 孙 册

(中国科学院上海生物化学研究所)

吴伯良

(广州暨南大学生物系)

寻找肿瘤细胞表面特异性抗原以及制备单克隆抗体, 长期以来一直是肿瘤免疫研究的重点, 尤其是高特异性单克隆抗体的获得是研制抗癌生物导弹的关键^[1]。60年代末HaKomori, s. 等人首次证实致癌转化细胞与正常细胞相比具有不同的鞘糖脂组成。此后, 发现鞘糖脂肿瘤相关抗原(TAA)。在自发肿瘤包括人癌组织广泛存在^[2]。其中更为引人注目的是肿瘤相关神经节苷脂——一类存在于细胞膜表面的含唾液酸的鞘糖脂。

随着单克隆抗体技术的引入, 不仅促进了肿瘤相关神经节苷脂的研究, 而且得到了一系列肿瘤相关的抗神经节苷脂的单克隆抗体^[3]。制备这类单克隆抗体常见的途径有两条: 1. 用肿瘤细胞免疫, 筛选出一系列抗该肿瘤细胞的单克隆抗体, 再用单克隆抗体“垂钓”出一系列对应的抗原, 逐一甄别, 证明许多单克隆抗体是抗肿瘤相关神经节苷脂^[4]。2. 用纯化的某种肿瘤相关神经节苷脂直接免疫, 制备出抗该神经节苷脂的单克隆抗体^[5]。大量事实证明, 制备此类单克隆抗体, 用于阐明神经节苷脂的结构和功能、抑制肿瘤细胞的生长、恶性肿瘤的早期诊断和导向治疗具有重要的意义^[6]。

由于上述两种方法均有一定的局限性, 前者具有不确定性, 而且工作量大; 后者常常因为组织中含量甚微难以纯化。本文报道一种新的制备抗直肠癌“特异”的神经节苷脂单克隆抗

体方法——双盲交叉筛选法。

材 料 和 方 法

一、材料

人直肠腺癌细胞株 HR-8348 来自杭州肿瘤医院病理研究室^[8]; 胰蛋白酶为 Difco 进口分装, 培养液为 DMEM(Gibco); 新生小牛血清; 辣根过氧化物酶交联的兔抗小鼠免疫球蛋白抗体(HRP-二抗), 系上海生物工程基地陈登鸿先生赠送; 聚乙二醇(PEG), 分子量 1540, (BDH); 氨基嘌呤、次黄嘌呤、胸腺嘧啶(Sigma); 邻苯二胺(国产); BALB/C 小鼠系上海实验动物中心提供; DG-3022 型酶联免疫检测仪(国产)。

神经节苷脂(ganglioside, GLS)的制备 分别取直肠腺癌组织以及来自同一个体的远端正常直肠组织各 32 克, 分离纯化出 GLS^[7]。

二、抗原及免疫

抗原 I: 人直肠腺癌 HR-8348 细胞株, 用 GKN 平衡盐溶液洗两次, 再悬浮于 GKN 中, 使成 5×10^6 个细胞/ml。抗原 II: 取 0.25% 胰蛋白酶滤菌后, 调至 pH 7.2, 加入 HR-8348 细胞株共同孵育 20 分钟, 经酶切, 去除细胞表面糖蛋白, 再加入 3 倍于酶体积的完全 DMEM 培养液, 终止酶切, 5 分钟后, 离心 $1500 \text{ r/min} \times 10$ 分钟, 用 GKN 洗两次, 使成 5×10^6

* 在进行脾内免疫的过程中, 得到了中国科学院上海细胞生物学研究所孙培楠技师的帮助, 在此谨致谢意。

** 研究生, 上海生物化学研究所和广州暨南大学联合培养

个细胞/ml。

脾内免疫 参照 Spitz, M. 的方法^[9]并加以改进。取10周龄雌性 BALB/C 小鼠8只,分为两组,每组4只,第一组用抗原 I 免疫,第二组用抗原 II 免疫。用微量注射器,分别吸取抗原 I、II 各 100 μ l (每 100 μ l 含 5×10^5 个细胞)。在轻夹脾门以短暂断血流的同时,从脾头进针,沿纵轴刺入,边退边注入,距出口 0.2 cm 时注完,检查无出血或渗出,回纳脾脏,缝合腹膜、腹膜外肌层和皮肤。

三、细胞融合和克隆

参照 Kohler, G. 和 Milstein, C. 的报告^[10]略作改进。抗原注入第四天(85小时),处死被免疫的 BALB/C 小鼠,每组选三只呈肿大、深暗红的脾脏,各取三分之一脾组织,常规制备脾细胞悬液,与 SP 2/0 骨髓瘤细胞融合(10:1)。融合剂为 50% PEG(W/V),融合后,悬浮于含 200 μ g/ml 青霉素、200 μ g/ml 链霉素,20%小牛血清和 HAT 的 DMEM 培养液。每组布 5 块 96 孔培养板(Data Packaging Corporation, Cambridge, Mass, USA),置 5% CO₂ 培养箱培养,根据细胞生长情况,每 2—3 天换培养液一次。通过有限稀释克隆。

四、双向交叉筛选

第 14 天,对甲组(抗原 I)、乙组(抗原 II),同时用分离纯化所得的正常直肠神经节苷脂和直肠腺癌神经节苷脂,进行酶联免疫吸附试验,交叉筛选流程图见图 1。对正常组织神经节苷脂和癌组织神经节苷脂同时呈阳性或只对正常组织神经节苷脂呈阳性的细胞集落规定为阴性,而仅对癌组织神经节苷脂呈阳性反应的细胞集落孔为本试验的目的孔。ELISA 参照 Shizuo Shimada 的方法^[5]并作改进。神经节苷脂溶于甲醇,包被国产 40 孔标板,0.4 μ l/孔,将甲醇蒸干后,每孔加入含 0.5% BSA 的 PBS(A 液)200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时,用含 0.05% Tween 20 的 PBS(B 液)洗 3 次,然后,每孔加入细胞培养液 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 小时后,用 B 液洗 2—3 次,加入用 A 液稀释的 HRP-兔抗小鼠免疫球蛋白抗体(1:500),100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 小时,再加入邻苯二胺底物溶液(含双氧水)100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟后,用 4 N 硫酸终止,置酶联免疫检测仪测定 O. D. 值,波长 490 nm。

五、单克隆抗体 Ig 类型鉴定

经琼脂免疫双向扩散法测定,此单克隆抗体为 IgM。



图 1 双向交叉筛选流程

结果与讨论

首次筛选 ELISA 结果见表 1, 从表中可见, 经酶切去除直肠癌 HR-8348 细胞表面糖蛋白的乙组肿瘤细胞作抗原, 检测其融合细胞上清液, 可见, 对直肠腺癌 GLS 特异的阳性细胞集落数较甲组高。已经查明细胞外被(Cell Coat)主要由复合糖类构成, 包括糖蛋白、糖脂及蛋白聚糖, 糖蛋白的肽链疏水序列固定于膜的脂双层中, 肽链的亲水序列和糖链则暴露于质膜的外环境, 由于暴露于膜外侧面的糖蛋白分子, 远远大于暴露于膜外环境的糖脂分子, 使部分糖脂呈隐蔽状态, 因此, 经胰蛋白酶对细胞表面糖蛋白酶切, 增加了隐蔽糖脂的暴露, 使得乙组抗直肠腺癌 GLS 的阳性集落数较未经酶切处理的甲组高。分别分离纯化自同一个体的正常直肠及直肠腺癌神经节苷脂, 高效薄层层析图谱分析表明: 正常直肠和直肠腺癌组织的神经节苷脂, 主要含 GM₃、GM₂、GM₁、GD₃、GD_{1a}、GD_{1b}、GT_{1b}+GQ,

表1 甲、乙两组在直肠腺癌 GLS 和正常直肠 GLS 的 ELISA 阳性集落数

	直肠腺癌 GLS	正常直肠 GLS
甲组阳性集落数	4/60*	1/60*
乙组阳性集落数	16/96*	11/96*

* 为被检测孔仅含单细胞集落的集落数。

表2 直肠腺癌 GLS 最高阳性反应的细胞集落再克隆 ELISA 检测结果

	P ₁ A ₂	P ₁ G ₅	P ₁ G ₁₀
阳性集落数	40/55	36/60	43/58
最高 O.D. 值 (490 nm)	0.51	0.54	1.18

表3 PG 10 杂交瘤细胞集落第三次克隆化 ELISA 检测的阳性率比较

克隆化次数	集落孔数	克隆率%	阳性率%
1	58/192	30	74
2	50/192	26	100
3	46/192	24	100

其最令人感兴趣的结果⁴⁷是：发现两条直肠癌“特异”的 GLS 条带，一条位于 GD_{1a} 与 GD_{1b} 之间，是含二个唾液酸的 GLS。占总 GLS 的 1.3—7.8%。另一条位于 GM₃ 通常的两条带之后，是单唾液酸的 GLS，也具有肿瘤“特异性”(9/10)，占总 GLS 的 1.5—10.4%；同时还发现在正常直肠组织神经节苷脂中，存在直肠癌组织 GLS 中所没有发现的 GLS 条带，位于 GD_{1b} 与 GT_{1b} 之间，这与表 1 的结果相吻合，互为佐证。经胰蛋白酶处理的乙组被检测的 96 个细胞集落中，有 16 个是直肠腺癌“特异”GLS 的阳性细胞集落，11 个是正常直肠 GLS 中“特异”组分的阳性细胞集落。取乙组中仅对直肠腺癌 GLS 呈最高阳性反应的三孔细胞集落进行有限稀释克隆化，它们在培养液中，抗体含量的 O. D. 值(490 nm) 分别是：P₁A₂ 0.53；P₁G₅ 0.48；P₁G₁₀ 1.23。常规培养 12 天后，分别对上述克隆板中可测水平的细胞

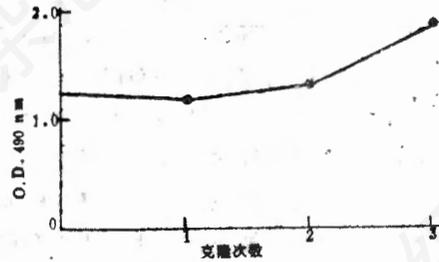


图2 克隆过程中分泌抗体的 O. D. 值比较

集落上清检测(ELISA)，结果见表 2，冻存 P₁A₂、P₁G₅ 细胞集落，对 P₁G₁₀ 杂交瘤细胞集落进行三次克隆化，结果见表 3，对 P₁G₁₀ 杂交瘤细胞经 3 次克隆化，达到 2 次阳性率 100%，表明该杂交瘤细胞分泌抗体基本稳定，三次克隆化阳性集落培养液中抗体的最高 O. D. 值(490 nm)见图 2。

双盲交叉筛选是指免疫原不确定，即用于免疫的细胞表面含有包括神经节苷脂在内的各种生物大分子，因此，经融合产生的各种杂交瘤细胞株，既有抗 GLS 的杂交瘤细胞株，也有抗其它生物分子的杂交瘤细胞株。而用于检测的包被抗原也相对是不确定的。应用此方法的优点是，用于免疫的抗原和用于 ELISA 检测的包被抗原均无需纯化至单一组分，然而能同时筛选出不同的目标杂交瘤细胞株。就本文而言，至少可以得到 3 种分泌不同单克隆抗体的杂交瘤细胞株，即抗癌组织特异的 GLS，抗正常直肠组织特异的 GLS 以及抗已知的在癌组织和正常组织共同存在的 GLS 的单克隆抗体细胞株。这些不同的单克隆抗体既可用于寻找新的神经节苷脂，也可用于对已知神经节苷脂的结构和功能进行研究，而抗肿瘤“特异”神经节苷脂的单克隆抗体，有可能成为抗癌生物导弹的有效载体，同时，它对直肠癌的早期诊断也具有不可低估的潜在价值。

正常直肠和直肠腺癌组织含有各种 GLS 组分，但二者的 GLS 组分绝大多数相同，仅存在少量各自“特异”的 GLS 组分，而这些“特异”的 GLS 组分由于含量极少，难以分离纯化出

来,作为单一的检测抗原。本文报告的交叉ELISA检测方法,克服了上述障碍,通过分别包被正常直肠和直肠腺癌组织GLS作为检测抗原,同步检测同一杂交瘤细胞集落培养中的抗体,若同时出现阳性者,说明此杂交瘤细胞是分泌抗正常直肠和直肠癌组织GLS相同组分的抗体,若仅在包被正常直肠组织GLS处出现阳性,表明是分泌抗正常直肠组织“特异”GLS组分的单克隆细胞株。相反,若仅在包被直肠腺癌GLS处出现阳性,说明是分泌抗癌组织“特异”GLS组分的杂交瘤细胞株,此细胞株为本文的目标杂交瘤细胞株。

本文采用了改良脾内免疫的方法,证明免疫效果满意,节约了免疫时间,仅需3—4天,缩短了常规制备单克隆抗体的周期。由于脾内免疫产生抗体的高峰在第6—7天,若在此时进行细胞融合效果很差^[9],最佳细胞融合时间,在脾内免疫后82—88小时,而此时血清抗体滴度较低,我们的实验结果是,在脾内免疫后85小时,经ELISA检测其血清抗体滴度为1:64,故采用脾内免疫尚有一定的盲目性。因此,我们建议在脾内免疫的同时,作常规免疫的第一次注射,待脾内免疫成功,常规免疫鼠可留作提供饲养细胞。

摘 要

采用改良脾内免疫的方法,比较分析了甲、乙两组,经不同方法处理的直肠腺癌细胞株HR-8348的免疫效果(甲组未经酶处理;乙

组用0.25%胰蛋白酶,37℃孵育20分钟)。实验结果表明:乙组对正常直肠和直肠腺癌神经节苷脂的阳性杂交瘤细胞集落数远远高于甲组。用分别分离、纯化自同一个体的正常直肠和直肠腺癌神经节苷脂作检测抗原,交叉筛选出分泌抗直肠腺癌特异神经节苷脂单克隆抗体的PG 10杂交瘤细胞株,经三次克隆,二次达百分之百阳性,培液中抗体的最高O. D.值(490 nm)为1.85。描述了用双盲交叉法筛选抗直肠腺癌特异神经节苷脂单克隆抗体的新方法。

参 考 文 献

- [1] Oldham, R. K., 1987, *Principles of cancer biotherapy*, ed, by Oldham R. K. pp 1-, Raven Press, New York.
- [2] Hakomori, S., 1975, *Biochim Biophys. Acta.*, 417:55—89.
- [3] Svennerholm, Lars., 1988, *New Trends in Ganglioside Research*, ed, Ledeen R. W. et al., pp 135—150, Liviana Press, Padova.
- [4] Magnani, J. L. et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257:14365—14369.
- [5] Shizno Shimada and Daiji Iwata, 1987, *Microbiol. Immunol.*, 31:923—933.
- [6] Cheresch, D. A. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82,5155—5159.
- [7] 范广胜等, 1991, 生物化学与生物物理学报。
- [8] 张宗显等, 1986, 中国科学B辑, 11:1197.
- [9] Spitz, M. et al., 1984, *J. Immunological Methods*, 70:39—43.
- [10] Kohler, G. and Millstein, C., 1975, *Nature*, 256:495—497:

简讯 宁波经济技术开发区电子仪器公司(宁波市小港环山路6号,邮编:315803,业务联系人曹友生)研制的DF—6P 3A型超声波粉碎机具有对生物材料进行超声处理达到破碎组织块、细胞以及乳化、加速化学反应等效能。是生物工程人员的必备工具。

该产品的特点是输出功率国内最大,配有定时装置和空震动保护装置,有5种钛合金探头可选配。

中科院上海细胞所实生细胞开发公司有售。