

杂交瘤细胞磁性颗粒筛选方法的建立及探讨

陈文勇 林 信 陈 蕾 吴 悦 刘庆良

(卫生部上海生物制品研究所免疫研究室 200052)

单克隆抗体现已广泛应用于科研和临床诊断、治疗中,与杂交瘤有关的技术也不断地得到更新与发展。如何从众多的融合细胞中简便、快速地筛选出所需的分泌高亲和力和高特异性抗体的杂交瘤细胞始终是人们探索的目标。1989年Horton等^[1]报道了用包被着抗原的磁性颗粒筛选分泌高亲和力抗体的杂交瘤细胞,效果好,省时方便。我们采用小鼠抗人IgM杂交瘤细胞为分离模型,建立了杂交瘤细胞的磁性颗粒筛选方法,并对磁性颗粒对杂交瘤细胞的影响作初步研究。

材 料 和 方 法

一、磁性颗粒的制备

纤维素包被的顺磁性四氧化三铁磁性颗粒由上海医科大学邢圣民教授赠送。颗粒经过溴化氰活化后,接上ε-氨基己酸作手臂,置4℃冰箱备用^[2]。

二、抗原包被磁性颗粒的制备

经灭菌的接上手臂的磁性颗粒用碳二亚胺活化1小时,用丙酮与0.1 mol/l碳酸氢钠溶液分别洗三次后,加入除菌过滤的层析纯人IgM,在4℃—10℃旋转反应12小时,即制成抗原包被的磁性颗粒。反应上清中残余的IgM量采用Lowry法测定。

三、杂交瘤细胞

由我室建立和保存的小鼠抗人IgM杂交瘤细胞株M-12,经复苏后,培养至足够数量。另以SP2/O细胞作阴性对照。

四、细胞筛选与克隆

经血球计数器计数的 1×10^7 抗原包被的磁性颗粒与 5×10^5 的M-12细胞同置于一小试管中,混匀,室温下摇匀作用15分钟,置入冰浴放置1小时,期间不时地进行摇动,使磁性颗粒与细胞充分混匀。然后加入10 ml细胞培养液洗涤磁粉,用磁铁将磁性颗粒吸于试管侧壁,弃去溶液,重复洗涤一遍后,加入1 ml培养液,作细胞计数,并按有限稀释法将连接着

磁性颗粒的细胞分种于96孔细胞培养板中培养。

五、IgG含量与亲和常数的测定

参照Beatty^[3,4]的方法,以定量的小鼠IgG为标准,用ELISA方法测定培养上清中单抗IgG含量和亲和常数。

结 果

一、磁性颗粒上蛋白偶联量对细胞分离效果的影响

用40 mg磁性颗粒与不同量的IgM反应后,所制得的磁性颗粒-抗原连接物的蛋白偶联情况及其对细胞分离的效果见图1。从图中可知,每40 mg磁性颗粒用200 μg IgM进行包被反应所制得的连接物对细胞的分离效果较好,且偶联率较高;再提高蛋白反应量对偶联率与分离效果均不利。

二、细胞分离条件的建立

磁性颗粒与细胞数之比对分离效果的影响见图2。当比例为20:1—40:1时,分离效果较好,并在显微镜下可见到磁粉与细胞形成的“黑色花环”。

磁性颗粒与细胞作用的最佳反应体积为100—400 μl,当体积增大为800 μl时,颗粒

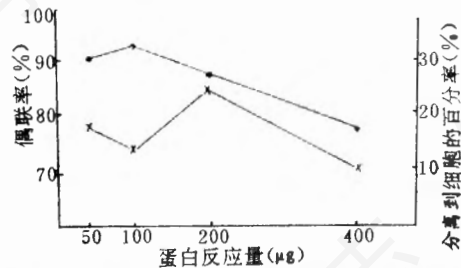


图1 磁性颗粒蛋白偶联量对细胞分离效果的影响

●—● 偶联率 ×—× 分离到细胞的百分率

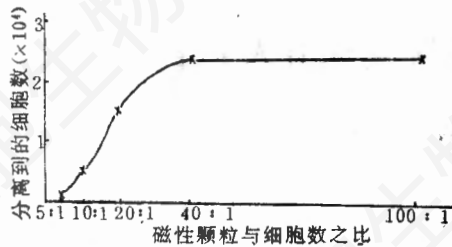


图2 磁性颗粒与细胞数之比对细胞分离效果的影响

与细胞间碰撞机率减小,当体积减小为 50 μl 时颗粒与细胞过度堆积,均对反应不利。

磁性颗粒与细胞在冰浴中最佳作用时间为 30—60 分钟,延长时间未能提高分离效果。

三、磁性颗粒对杂交瘤细胞生长的影响

将 M-12 细胞、磁粉分离的 M-12 以及抗原刺激的 M-12(指用相当于磁粉表面所接的抗原量的游离抗原,按磁性颗粒分离程序处理过的 M-12),按有限稀释法,分种于同一块培养板上,各 32 孔。培养 3 天后,记录其克隆生长孔数,见表 1。经抗原刺激与磁粉分离的

表 1 抗原包被的磁性颗粒与游离抗原对杂交瘤细胞生长的影响

杂交瘤组	阳性孔数					阳性率 (%)
	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 7 天	第 10 天	
M-12	11	17	22	22	22	69
抗原刺激的 M-12	0	0	2	5	5	16
磁粉分离的 M-12	1	4	5	8	8	25

M-12 生长速度与克隆生长孔(阳性孔)数明显低于正常的 M-12 细胞。

四、磁性颗粒对杂交瘤细胞抗体分泌的影响

在细胞培养的第 10 天,取上述三类细胞各 4 孔(各孔在显微镜下细胞均为视野的 1/3),测定其培养上清的抗体效价、IgG 浓度以及单抗的亲数和常数,其平均值列于表 2。磁粉分离到的细胞培养上清效价与 IgG 浓度显著高于 M-12 与抗原刺激的 M-12,而三者的亲数和常数相近。

表 2 抗原包被的磁性颗粒与游离抗原对杂交瘤细胞抗体分泌的影响

杂交瘤组	培养上清平均效价	上清 IgG 平均浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	单抗的平均亲数和常数 (M^{-1})
M-12	1:360 (1:50—1:800)	12.6 (3.60—20.7)	9.14×10^7 (5.59×10^7 — 1.17×10^8)
抗原刺激的 M-12	1:550 (1:100—1:1000)	14.7 (0.70—31.5)	8.86×10^7 (6.99×10^6 — 1.42×10^8)
磁粉分离的 M-12	1:2200 (1:1200—1:3500)	50.8 (22.5—80.0)	1.28×10^8 (7.75×10^7 — 1.79×10^8)

表中各括号内的数值示该组数值中的最低值与最高值。

讨 论

近年来常使用特异性蛋白包被的磁性颗粒与混合细胞中的无用细胞结合,经磁吸除去,纯化了所需的细胞且不影响其功能^[5,6]。Horton 则采用磁性颗粒与所需的杂交瘤细胞结合,分离后的细胞即用于培养,让磁粉在培养过程中自行脱落。由于携带着磁粉,细胞的生长、分泌情况可能受到影响,本文在建立了磁

性颗粒分离方法的基础上,对这种影响作了初步研究。

接上 ϵ -氨基己酸作手臂的磁性颗粒具有良好的稳定性,可经高压灭菌而不影响其反应性。磁粉表面的蛋白质包被不宜过多,否则将引起蛋白失活而导致细胞分离效果的下跌。所建立的方法具有良好的特异性,非特异吸附的 Sp 2/O 细胞经两次洗涤可完全去除。

根据表 2 结果,无论是游离抗原处理的还

是磁粉分离的杂交瘤细胞,其生长速度与成活率均受到抑制,游离抗原的抑制情况更甚。这表明影响细胞生长的主要原因可能是它的表面标记物 SIg 被特异性抗原中和之故,而磁粉对其影响不大。但我们发现,上述抑制作用主要发生于培养的初期,一旦克隆形成后,细胞的增殖速度则与未处理的杂交瘤细胞相近,可能是因为新生成的细胞不再携带抗原之故。

本文建立的磁性颗粒法分离细胞的效率不够高(图1),其主要原因是磁性颗粒的质量。所用磁粉原用于放射免疫分析^[2],在显微镜下可见磁粉呈无定形状态,表面粗糙不规则,大小亦不够均一。由于磁粉与细胞的结合是通过连接于各自表面上的抗原和 SIg 的结合进行的,这种结合强烈地受到固相表面空间位阻的影响。磁粉不规则、粗糙的表面形态大大影响了上述结合。Horton 采用的是一种通过聚合反应制备的磁性微珠,具有光滑、规则的表面形态,有利于细胞与磁粉的结合,可提高细胞分离率。

已建株的杂交瘤细胞若再经克隆,不同的阳性孔中长成的细胞其抗体分泌能力与单抗特性仍会有差异。表2中,同一杂交瘤组、不同孔的上清 IgG 浓度及单抗亲和常数的变化正说明了这点。但对比不同的杂交瘤组可发现,磁性颗粒分离的细胞其培养上清 IgG 浓度显著高于原杂交瘤细胞,而单纯的抗原刺激作用却不大,表明磁性颗粒可以筛选到具有较高抗体分泌能力的细胞。由于容易与磁粉结合的细胞,其表面要么有较高亲和力,要么有较多的 SIg,在只使用一株细胞时,亲和力相差不大,只有其表面带有较多的 SIg 的细胞才容易与磁粉结合,因此可推测这些含有较多 SIg 的杂交瘤细

胞具有较大的抗体分泌能力。

由于磁粉与细胞在最佳反应条件下可以形成“黑色花环”,而易形成此花环的细胞多为分泌高亲和力抗体或高分泌力的细胞。因此,“黑色花环”可成为显微操作下从众多的含不同亲和力、分泌力和特异性的混合的融合细胞中挑选出优质细胞的良好指示,使一次筛选获得单克隆,并分泌高亲和力抗体的细胞成为可能,并大幅度地减少工作量,提高筛选到优质细胞的几率。目前,有关磁性颗粒筛选方法的应用以及与细胞显微操作相结合的试验正在积极进行之中。

摘 要

本文报道一种新的杂交瘤细胞分离法——磁性颗粒筛选法,探讨了磁性颗粒的蛋白偶联量,磁性颗粒与细胞的作用比例、体积和时间对细胞分离效果的影响。对磁性颗粒对杂交瘤细胞的影响所作的初步研究表明,游离抗原或抗原包被的磁性颗粒对细胞的生长与成活有抑制作用,但磁性颗粒筛选到的杂交瘤细胞具有显著高于普通杂交瘤细胞的抗体分泌能力。

参 考 文 献

- [1] Horton, J. K., et al., 1989, *J. Immunol. Methods*, 124: 225—230.
- [2] 邴圣民,朱秀英,1991,上海医科大学学报, 18(1): 75—77.
- [3] Beatty, J. D., et al., 1987, *J. Immunol. Methods*, 100: 161—172.
- [4] Beatty, J. D., et al., 1987, *ibid.*, 100: 173—179.
- [5] Hebell, T. and Gotze, O., 1989, *ibid.*, 123: 283—291.
- [6] Owen, C. S., 1983, *Cell Separation: Methods and Selected Applications*, ed. by Pretlow, T. G. and Pretlow, T. N., pp. 127—144. Academic Press, New York.

TIL 细胞治疗肿瘤

简讯 研究人员发现,病人的肿瘤组织中存在着一类细胞叫肿瘤浸润淋巴细胞(TIL 细胞)。从手术切除的肿瘤组织块中分离出的这种细胞在实验室中培养增殖一段时间后,再回输给病人,能有效地识别并杀死残余的原发病灶的肿瘤细胞和转移的肿瘤细胞。这种疗法,没有任何副作用。国外临床治疗结果表明,对黑色素瘤和肾癌疗效特别显著。因此,具有手术指征的恶性肿瘤患者,尤其是肾癌,配合肿瘤浸润淋巴细胞疗法,将更有效地延长病人生存期,降低复发率,提高治愈率。上海中山医院泌尿科的张永康主任医师和中国科学院上海细胞生物学研究所的叶敏研究员已展开此项工作,疗效良好。