

肌细胞形态的影响。结果表明,当用10%幅度拉长、松弛硅胶片,10周期/分,进行72小时机械性运动后,心肌细胞发生形态改变,其细胞内肌动蛋白垂直于运动方向,说明机械性刺激能影响体外培养心肌细胞形态。

图版说明

1. 硅胶片上生长的正常对照心肌细胞。细胞具有典型的星形,细胞内肌动蛋白丝呈放射状分布,横纹明显。间接免疫荧光染色肌动蛋白 $\times 400$

2. 硅胶片上经伸展与缓解的机械性刺激的生长心肌细胞。拉长幅度为10%,10周期/分。刺激24小时后的心肌细胞形态发生改变,细胞内肌动蛋白丝垂直于运动的方向,细胞突起减少(箭头所指为运动方向)。间接免疫荧光染色肌动蛋白 $\times 400$

3. 作摆动运动的对照心肌细胞。细胞内肌动蛋白丝排列松散,横纹不明显,心肌细胞稍粗大,但细胞未发生方向性改变。间接免疫荧光染色肌动蛋白, $\times 400$

参考文献

- [1] Ives CL et al., *In vitro*, 1986; 22: 500-507.
- [2] Borg TK et al., *Dev. Biol.*, 1984; 104: 86-96.
- [3] Dartsch PC et al., *Eur J Cell Biol.*, 1986; 41: 339-346.
- [4] Lewis JC et al., *Lab Invest.*, 1982; 46: 123-138.
- [5] Spotnitz HM et al., *Am J Carliol.*, 1973; 32: 398-406.

脑型肌酸激酶抗原的处理方法对小鼠免疫应答的影响

童春香 朱勇刚 孙斐均

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

肌酸激酶(creatine kinase, CK)同工酶是由M和B两种亚基组成的二聚体。CK-MM(肌型肌酸激酶)存在于骨骼肌等处,CK-BB(脑型肌酸激酶)则存在于脑组织。CK-BB和CK-MB在人血清中游离浓度的测定可分别作为脑损伤、心肌梗塞等疾病临床诊断的指标^[1,2]。

Thi man等人发现^[3],有的小鼠品系(如BALB/C)对天然状态的CK-MM的免疫应答反应很弱,而使用高聚状态的CK-MM免疫该品系小鼠,则最终可以获得对天然CK-MM高亲和力的单克隆抗体(McAb)。最近,我们在研制CK-BB的McAb过程中也观察到同样的现象。本文报道这方面的结果。

材料和方法

一、抗原处理 纯化的CK-BB由上海医科大学心血管研究所制备提供,浓度为3.3 mg/ml。第一种处理方法是样品置56℃水浴中变性2小时;第二种处理方法是参考Thi man等的报道^[3],但样品中加入

戊二醛的浓度为0.6%(W/V),室温下处理5小时后再加50 mmol/L赖氨酸,反应1小时,以封闭游离的戊二醛。

二、小鼠免疫 8周龄、体重18克左右的BALB/C小鼠和F₁(BALB/C \times ICR)小鼠均由本所动物饲养室提供,各分为CK-BB热变性组、戊二醛处理组和天然CK-BB对照组,每组均为3只小鼠。免疫剂量为每只100 μ g/只。第一次免疫抗原与等体积福氏完全佐剂混合乳化,以后各次免疫抗原与福氏不完全佐剂混合。皮下和腹腔注射。各次免疫间隔为4周,免疫次数见表1,2所列。

三、抗体检测方法 采用ELISA夹心法。96孔酶标板直接包被纯化抗原(CK-BB, CK-MM, CK-MB),抗原浓度为10 μ g/ml。第二抗体为抗鼠IgG-过氧化物酶结合物,底物是四甲基联苯胺。检测采用美国Bio-Rad公司生产的酶标仪,波长为450 nm。

四、杂交瘤细胞建株 取戊二醛处理组F₁小鼠脾细胞,与653小鼠骨髓瘤细胞按5:1融合(50%PEG, MW 4000),常规操作。检测到的阳性细胞孔,再经有限稀释法克隆5次,最后得到两株抗CK-BB的杂交瘤株。

结 果

从小鼠第二次免疫开始, 各次免疫后的第7天尾静脉采血, 血清用PBS缓冲液(pH 7.2)倍比稀释, 随后用ELISA法测定其中抗CK-BB抗体的浓度。

以样品OD值/空白OD值大于3作为阳性, 以阳性样品的最高稀释数作为血清中抗体浓度的指标。所得结果见表1, 2。

表1 BALB/C小鼠血清中CK-BB抗体效价

免疫次数	2	3	4	5	6	7
抗原处理方法						
56℃热变性	2	2	4	2	4	4
戊二醛交联	128	128	512	128	512	512
对照组	0	0	0	0	0	0

表2 F₁小鼠血清中CK-BB抗体效价

免疫次数	2	3	4	5	6	7
抗原处理方法						
56℃热变性	32	128	128	64	128	128
戊二醛交联	512	512	512	512	1024	8000
对照组	4	8	4	4	8	4

在上述结果的基础上, 选取血清呈高效价的CK-BB抗体的F₁小鼠, 通过常规的细胞融合方法, 建立了G₉和B₅两株杂交瘤。两株细

表3 两株杂交瘤单克隆抗体的特异性

杂交瘤株	抗原	CK-BB	CK-MB	CK-MM
G ₉		++	+	-
B ₅		++	+	-

++: O.D值1.5以上

+: O.D值0.9—1.2

-: O.D值与阴性对照相同

胞所产生的McAb对CK-BB呈阳性反应, 抗体效价1:64。由于CK-MB含B多肽亚基, 所以呈弱阳性反应, 但对CK-MM无交叉反应, 这一结果与Jackson等人的报道相同^[4], 见表3。

讨 论

天然状态的CK-BB是一种弱抗原性抗原, 而且稳定性差^[5,6]。热处理虽可使弱抗原的抗体反应增强, 但在本实验中这一方法未能取得满意的结果。CK-BB经较高浓度的戊二醛处理后, 再免疫BALB/C小鼠, 却可以获得高效价的血清。BALB/C小鼠和F₁(BALB/C×ICR)小鼠比较, 后者的抗体反应更强, 从而建立了能产生天然CK-BB起反应的杂交瘤株。

CK-BB经戊二醛交联后, 成为团聚形式, 一般认为是提高其免疫原性的原因之一, 但不能排除通过交联保护抗原在油质佐剂中不致变性的可能性。

摘 要

CK-BB免疫抗原性弱, 经戊二醛处理后可使BALB/C及F₁(BALB/C×ICR)小鼠产生较强的抗体反应, 并建立了产生抗CK-BB单克隆抗体的杂交瘤株。

参 考 文 献

- [1] Philips, JP., et al., 1980, *Brit Med. J.*, 281: 777.
- [2] Roberts, R., et al., 1975, *Am. J. Cardiol.*, 36: 433.
- [3] Thiman, N., et al., 1989, *J. Immunol. Meth.*, 125: 251.
- [4] Jackson, AP., et al., 1984, *Clin. Chem.*, 30: 1157.
- [5] Szasz, C, et al., 1978, *Clin. Chem.*, 24: 1557.
- [6] Jackson, AP., et al., 1985, *Ann. Clin. Biochem.*, 22: 310.