

# 抗人肝癌 AFP-McAb 的制备及其筛检方法的改进

葛曰萍 陈尊器 陈维洁 邹东霆 丘翠芳

(广州医学院肿瘤研究所 510182)

杂交瘤技术为研制单克隆抗体(McAb)开辟了广阔途径。McAb具有独特之处,它既是定向产生的、而只与特异抗原决定簇结合的专一性抗体,又可作为生物探针分析抗原特性,以及定位诊断和导向治疗等,其应用前景广阔。制备甲胎蛋白单克隆抗体(AFP-McAb)已有过报道<sup>[1]</sup>,但所采用的抗原多从正常胚胎或胎血提取。已知AFP分子的不均一性和肿瘤的异质性,病人与正常人的AFP可有差异<sup>[2]</sup>,因此选择适当的抗原制备McAb,可能更针对肿瘤病人的特异性。在制备杂交瘤细胞过程中也常有漏筛等问题,这些都值得不断探索改进。

本文抗原取材自本实验室新建立的人肝癌细胞系GHC-1<sup>[3]</sup>及另一系低血清培养的人肝癌细胞系GHC-3<sup>[4]</sup>所分泌的AFP,获得两株具有较高专一性的分泌抗人肝癌AFP-McAb杂交瘤细胞,定名为GAH<sub>1</sub>及GAH<sub>2</sub>;同时,改进了对杂交瘤细胞及McAb的筛选、检测,效果较为满意,现报道。

## 材料与方 法

**一、AFP来源** 从人肝癌细胞系GHC-3短期无血清培养以及另一系人肝癌细胞GHC-1分别收集的条件培养液中提取、经免疫电泳鉴定的AFP作抗原,供免疫动物和检测用。

**二、抗AFP-McAb制备** 按常规可溶性抗原体内免疫法,以100μg/只加福氏佐剂,另一组以5μg/kg滴于硝酸纤维膜,加二甲基亚砜,分别对BALB/C小鼠行皮下多点注射,2周后重复一次,间隔两月,再腹腔注射加强免疫。三天后,按常规制备脾细胞,与SP2/0小鼠骨髓瘤细胞(5:1)在有PEG中进行融合,接种于有饲养细胞的96孔板,置37℃恒温、饱和湿度、5%CO<sub>2</sub>培养箱内,经HAT选择,换HT后转为正常完全培养液培养。

经适时检测培养液上清液确定其呈抗体阳性的单

个集落行再克隆,连续再克隆共4次,选择专一性较强、均一的克隆,获得单克隆杂交瘤细胞株。扩增,从细胞培养液上清液及腹腔接种BALB/C小鼠获得的腹水提取制备McAb。

**三、McAb筛检** 例行均作平板双向扩散、对流免疫电泳和免疫电泳,同时加以下几项检测作筛选、鉴定。

1. 酶联免疫吸附抑制试验(ELISA-I):按Segal法<sup>[5]</sup>加以改进。100μl(10μg/mL)鼠IgG包板,卵蛋白封闭,杂交瘤细胞培养液上清液先与HRP-抗鼠IgG和常规ELISA各项对照,置37℃湿盒2小时,OPD显色,测OD<sub>492</sub>,双份、双盲进行。

2. 点免疫结合试验(DIBA):以硝酸纤维膜为载体,吸附羊抗鼠IgG,加杂交瘤细胞培养液上清液,加AFP或各种肿瘤病人标本,加酶标羊抗AFP,DAB显色。

3. 反向间接血凝抑制试验(RPHA-I):定量/稀释的AFP或各种肿瘤病人标本,加杂交瘤细胞培养液上清液,加抗AFP致敏血细胞,分别置37℃湿盒半小时。另设单纯培养液、正常血清和生理盐水等对照。

4. IgG亚型鉴定:用抗小鼠IgG亚型标准样(Sigma)与杂交瘤细胞培养液上清液多次加样双扩法,24—48小时后观察结果。

## 结 果

**一、抗AFP-McAb杂交瘤细胞株** 融合后按常规细胞培养,倒置显微镜下观察生长情况。5天后试验孔出现小集落,逐渐增大至约1/4孔底面积时,取上清液检测。选择仅有单个集落的阳性孔作有限稀释再克隆,经连续再克隆4次至抗体阳性孔达100%,从中再行特异性鉴定,筛选获得两株抗AFP较高专一性的GAH<sub>1</sub>和GAH<sub>2</sub>杂交瘤细胞株。该两株细胞经体外连续培养3个月和/或液氮冻存半年以上复苏,仍能分泌特异性的McAb。

## 二、McAb类别的判定 1. ELISA-I

本项检测的杂交瘤细胞培养液上清液呈抑制反应,表明所分泌的抗体为 IgG。经再克隆后选出的两株杂交瘤细胞 GAH<sub>1</sub> 和 GAH<sub>2</sub>, 体外连续培养 3 个月,对其培养液上清液抽样检测 3 次(每次间隔 6 周),结果见表 1。从表 1 可见所得结果基本一致,表明该两株细胞分泌的 McAb 较稳定。2. 双向扩散及对流免疫电泳:杂交瘤细胞培养液上清液与抗鼠 IgG 反应呈单一沉淀线,所得结果与 ELISA-I 相一致。

表 1 杂交瘤细胞培养液上清液  
ELISA-I 3 次检测结果

样 品	OD		
	一	二	三
GAH <sub>1</sub> 上清液 + *HRP-Ab	0.31	0.40	0.30
GAH <sub>2</sub> 上清液 + *HRP-Ab	0.34	0.36	0.30
正常培养液 + *HRP-Ab	1.07	1.11	0.94
*HRP-Ab	1.02	1.29	0.98
鼠 IgG + *HRP-Ab	0.28	0.38	0.25
PBS 对照	0.02	0.06	0.03
空白对照	0.00	0.00	0.00

注:三次检测每次间隔 6 周。

再经抗鼠 IgG 亚型标准血清检测,结果 GAH<sub>1</sub> 为 IgG<sub>3</sub> 型, GAH<sub>2</sub> 为 IgG<sub>2b</sub> 型。

三、特异性鉴定 1. RPHA-I 原免疫用的 AFP、胚胎浸出液以及 10 例肝癌病人 AFP(+) 的血清/腹水,分别与抗 AFP 致敏血细胞反应均呈凝集;加入 GAH<sub>1</sub> 或 GAH<sub>2</sub> 细胞培养液上清液,则呈血凝抑制。

GAH<sub>1</sub> 和 GAH<sub>2</sub> 培养液上清液与肝癌病人 AFP(+) 的血清或腹水的血凝抑制反应结果,均较与胎血的抑制反应更明显;而对 30 例 AFP(-) 的其他肿瘤病人血清,则均无血凝现象和抑制(表 2)。2. DIBA GAH<sub>1</sub> 和 GAH<sub>2</sub> 培养液上清液与 AFP 反应的显色斑为淡棕色。3. GAH<sub>1</sub> 和 GAH<sub>2</sub> 培养液上清液与 AFP 行琼脂双向扩散,未出现清晰可辨的沉淀线。

## 讨 论

AFP 是原发性肝癌诊断的一项指标,其

表 2 RPHA-I 反应结果

标 本	例次	AFP	RPHA	RPHA-I
免疫抗原	5	+	凝集	抑制
胚胎浸出液	5	+	凝集	抑制
肝癌病人	10	+	凝集	抑制
胃 癌	6	-	不凝	-
肺 癌	7	-	不凝	-
乳 腺 癌	4	-	不凝	-
鼻 咽 癌	5	-	不凝	-
淋巴肉瘤	2	-	不凝	-
骨肉瘤	1	-	不凝	-
胆囊肿瘤	1	-	不凝	-
肝 癌	4	-	不凝	-
胎 血	4	+	凝集	部分抑制

检出率的高低各地不完全一致。从不同来源的 AFP 分析,其分子结构也有一定差异<sup>[2]</sup>。鉴于 McAb 对抗原有特异选择的特性,我们针对抗原的选择和 McAb 的筛选两个方面作了一些改进探索,期望从不同角度取得实际成效。本文取材本实验室新建的人肝癌细胞系 GHC-1 及 GHC-3 所得的 AFP 作抗原,经微量法免疫后,一次融合即获得多株杂交瘤细胞。就其显示对肝癌 AFP 具特异性提示,免疫措施的改进,不仅抗原用量少,而且保留了抗原性,这是较大的优点。

ELISA-I 是初次用于筛选 McAb 的一种方法,利用竞争抑制,检测较为灵敏和特异,可以争取尽早进行再克隆的时机。为了验证检测结果,对经 ELISA-I 测得的阳性上清液,同时又再做免疫电泳或双扩,互相佐证,显示其结果的稳定可靠性,重复性好。

对于 AFP-McAb 专一性的鉴定,我们在 RPHA 特异性反应的基础上,再加上 RPHA-I 的特异性抑制,两种检测同时显示其特异性的结果,应该比单一方法更加可靠。

本文通过对抗原来源的选择和改进筛检方法所得的 AFP-McAb,效果比较满意。这也表明,本实验室建立的低血清培养的人肝癌细胞系 GHC-3 具有较好的应用价值。有关基础和应用工作,我们正在进一步研究中。

(下转 102 页)