

DOI:10.3969/j.issn.1004-3845.2013.05.012

• 技术与方法 •

一种快速制备甲胎蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系的方法

丁宁, 石心泉, 郭永, 张瑶楠, 邹检平*

(国家人口计生委科学技术研究所内分泌室, 北京 100081)

【摘要】 目的 建立一种快速制备甲胎蛋白单克隆抗体(AFP-McAb)杂交瘤细胞系的方法。方法 以常规和改良两种方式同时免疫 8~12 周 Balb/c 小鼠,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合并行次黄嘌呤、氨基蝶呤与胸苷选择性培养。用间接酶链免疫吸附试验法(ELISA)筛选阳性克隆株,并建立细胞系。结果 在较短时间内,改良法能获得高效价的免疫抗体,与常规免疫法相比有极显著差异($P < 0.001$),同时改良法的细胞融合率和抗体阳性率也显著高于常规免疫法($P < 0.001$)。筛选获得的高效分泌抗人 AFP-McAb 的阳性杂交瘤细胞株进行了初步鉴定。结论 新的改良方法优化了常规的 McAb 制备中动物免疫程序,并能成功筛选出 AFP-McAb 杂交瘤细胞系。

【关键词】 甲胎蛋白; 杂交瘤; 单克隆抗体

Establishment of a rapid method for preparing alpha-fetoprotein monoclonal antibody hybridoma cell line

DING Ning, SHI Xin-quan, GUO Yong, ZHANG Yao-nan, ZOU Jian-ping*

Department of Endocrinology, National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081

【Abstract】

Objective: To establish a rapid method for preparing alpha-fetoprotein monoclonal antibody (AFP - McAb) hybridoma cell line.

Methods: Balb/c mice with 8-12 weeks were immunized by routine and modified methods respectively. The spleen cells from the immunized mice were fused with SP2/0 cell line of marrow tumor by technology of traditional hybridoma. The fused cells were selectively cultured with HAT medium. The positive cloning lines were screened by indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)for establishing AFP-McAb cell lines.

Results: The cell fusion rate and the McAb positive cell line rate in the modified method group were significantly higher than those in routine immune method group($P < 0.001$). The positive hybridoma cells secreting higher efficient McAb against human AFP were established. The preliminary identification for AFP- McAb has been performed.

Conclusions: The modified method is an optimized process of animal immunization method for preparing the AFP-McAb. The hybridoma cell line producing AFP-McAb has been established successfully.

Key words: Alpha-fetoprotein; Hybridoma; Monoclonal antibody

(*J Reprod Med* 2013,22(5):360-363)

【收稿日期】 2013-01-09; **【回复日期】** 2013-01-21

【基金项目】 国家人口计生委科学技术研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2010GJSSJKB01)

【作者简介】 丁宁,女,内蒙古人,硕士,助理研究员,从事生物化学、分子生物学方面的研究。Email:dingning7952@yahoo.com.cn (* 通讯作者)

甲胎蛋白(AFP)是一种胎儿特异性糖蛋白,分子量约 70,000~72,000 道尔顿^[1],在胚胎肝脏和卵黄囊中合成,正常人血中含量甚微。1972 年有人首次报道开放性神经管畸形胎儿、羊水中含有高水平的 AFP。若胎儿羊水中 AFP 值高于均值常见于患无脑儿或脊柱裂的胎儿,亦见于其他多种畸形,如先天性肾病、食道或肠闭锁、囊性水瘤、骶尾部畸胎瘤、Rh 血型不和、先天愚型、先天性性腺发育不全等^[2]。1983 年发现母体血清 AFP 水平的降低与唐氏综合征有密切关系^[3]。因此制备高效特异的 AFP 单克隆抗体(McAb)具有重要的意义。

在 McAb 的研制过程中,动物免疫是 McAb 制备过程中的关键步骤。但是传统动物免疫方式通常需要二个月左右,不但耗时长,而且抗原消耗量大、对抗原纯度要求高。本实验试图通过优化传统免疫小鼠的方法,大大缩短动物免疫时间并减少了抗原的消耗量,为进一步组装患者肿瘤组织及血清中 AFP 水平检测的试剂盒打下良好的基础,为临床研究、肿瘤的诊治提供更为有效的工具。

材料与方法

一、材料

AFP 购自上海领潮公司。SP2/0 骨髓瘤细胞(中科院上海细胞库)。

8~12 周龄 Balb/c 小鼠(第四军医大学实验动物中心),SPF 级。

二、方法

1. 动物免疫:将 4 只 8~12 周龄 Balb/c 小鼠随机分为两组,每组 2 只,分别命名为 1 号和 2 号(第一组)、3 号和 4 号(第二组)。第一组按常规免疫方法进行免疫^[4],第二组采用改良的免疫方法进行免疫。免疫前静脉采集少量血液,析出血清作为后续检测的阴性对照血清。

第一组:AFP 50 μ g(50 μ l)与等量福氏完全佐剂(Sigma,美国)混合,充分乳化后注入 8~12 周龄 Balb/c 小鼠腹腔,2 周后用同量抗原加不完全福氏佐剂(Sigma,美国)腹腔注射,4 周后用同量抗原加不完全福氏佐剂腹腔注射,融合前 3 d 作腹腔注射加强免疫。

第二组:取 50 μ g AFP 以 PBS 稀释至 50 μ l,取 50 μ l 免疫佐剂(北京康碧生物科技有限公司)快速混匀后,注射于 8~12 周龄的 Balb/c 小鼠腹腔,完成初次免疫;2 周后以 30 μ g AFP/只的剂量与 50 μ l

免疫佐剂快速混匀后注射小鼠腹腔加强免疫,融合前 3 d 作腹腔注射加强免疫。

2. 间接酶链免疫吸附试验法(ELISA)测定血清的抗体效价:将抗血清 100、1,000、10,000 倍系列稀释后,用间接 ELISA 法进行抗体的检测,采用 MK3 酶标仪(Thermo,美国)测定,判定标准为:样品孔 OD₄₅₀/(阴性对照孔 OD₄₅₀ - 空白孔 OD₄₅₀) \geq 2 时的抗体的最大稀释度作为抗血清的抗体效价^[5]。

3. 细胞融合:按常规杂交瘤技术,用免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 瘤细胞行融合^[6]。

4. 杂交瘤细胞的筛选和克隆化:用间接 ELISA 法检测杂交瘤细胞培养上清中的 McAb,从检测阳性的瘤细胞中挑选生长快,分泌抗体效价高,形态良好细胞株,用有限稀释法^[7]连续克隆 3~4 次,直至细胞建株。

5. AFP-McAb 的效价评估:用间接 ELISA 法测定杂交瘤细胞培养上清和小鼠腹水中的 McAb 效价。

6. McAb 的稳定性:以 ELISA 试验观察 McAb 腹水和纯化 McAb 在不同保存条件下的活性。

7. 杂交瘤细胞染色体观察:按常规方法制备细胞涂片,Giemsa 染色后镜检^[8],计数分裂相细胞的染色体数。

三、统计学方法

采用生物学 SPSS(Windows 13.0 版)统计软件,进行两样本 *t* 测定和 χ^2 检验,当 $P < 0.05$ 时,差异具有显著统计学意义,当 $P < 0.001$ 时,差异具有极显著统计学意义。

结 果

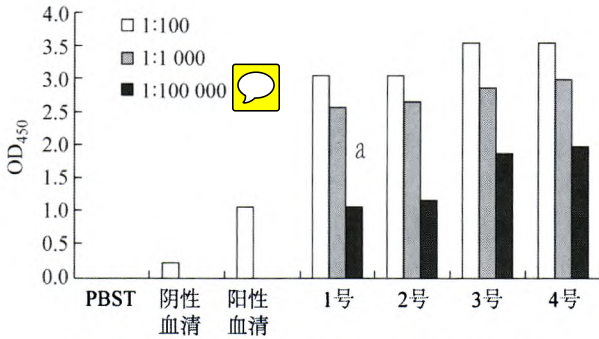
一、两种免疫方式小鼠血清效价比较

对两组试验动物在完成了基础免疫后,尾静脉采集少量血液,分离血清,进行间接 ELISA 测定抗体效价,检测结果见图 1。

由图中数据可知,新的改良免疫方法,在第二次免疫后,抗体效价即达到 1:10⁴。两组数据经生物学统计软件 SPSS(Windows 13.0 版)进行 *t* 检验,统计结果差异极显著($P < 0.001$)。

二、两种免疫方式小鼠融合率比较

在细胞融合后约 7~10 d 可见孔内杂交瘤细胞生长,当细胞融合成片达孔底面积的 35%~50% 时,用 ELISA 检测特异性抗体。两组免疫小鼠细胞



1, 2 号小鼠为常规免疫, 3, 4 号小鼠为改良免疫

图 1 间接 ELISA 测定血清抗体效价 (OD₄₅₀)

融合结果见表 1。

两组小鼠的细胞融合率和抗体阳性率经统计学检验, 差异极显著 ($P < 0.001$)。

表 1 两组细胞融合率及抗体阳性率

组别	杂交瘤生长百分率 (%)	细胞融合率 (%)	ELISA 检测孔数	抗体产生孔数	抗体阳性率 (%)
第一组	85.2	83	67	45	67.2
第二组	87.9	98*	72	63	87.5*

注: 与第一组比较, * $P < 0.001$

三、杂交瘤分泌 McAb 的稳定性

杂交瘤细胞体外连续传代培养了 3 个月, 培养上清经 ELISA 检测能持续分泌抗 AFP-McAb, 杂交细胞经液氮冻存一年后细胞复苏培养生长良好, 仍能保持分泌抗 AFP-McAb 的能力。

四、杂交瘤细胞染色体计数

杂交瘤细胞染色体总数为 96 ~ 104 条, SP2/0 骨髓瘤细胞染色体总数为 65 条, Balb/c 小鼠脾细胞染色体总数为 40 条, 符合杂交瘤特征。

讨 论

动物免疫方法对于 McAb 的制备具有重要的意义。本试验在免疫动物时, 采用了两种不同的免疫方法, 第一种为常规免疫方法, 第二种为参考相关文献^[6]后对常规免疫方法加以改进并重新设计的一种改良免疫方法。

通过动物试验的初步验证, 改良免疫方法在免疫动物后一个月左右即可获得理想的抗体效价, 而常规免疫法则最短需要二个月左右时间才能获得理想的抗体效价。经生物学统计软件统计后表明, 改良免疫法与常规免疫方法获得的抗体效价差异极显

著。改良法耗费时间短, 但获得的抗体效价更高。

由于改良免疫法只需二次基础免疫而常规免疫法则需要 2 倍于改良法的免疫次数, 所以改良法抗原用量明显少于常规法, 从而大大减少了实验成本的消耗。

此外, 本实验通过对比两种免疫方法的细胞融合率及抗体阳性率, 发现改良免疫法均显著高于常规免疫法。

经过后续实验, 证明改良法免疫小鼠的杂交瘤细胞经二次克隆化后, 抗体阳性率可达检测孔的 90% 以上。杂交瘤细胞体外连续传代培养, 并冻存复苏后仍具有分泌 AFP-McAb 的能力, 并经染色体计数结果表明已成功获得一株 AFP-McAb 细胞株。这表明改良法与常规方法具有同样的有效性和稳定性。

综上所述, 新的改良的小鼠免疫方法具有很好实验效果。孕妇血清 AFP 水平的变化与唐氏综合征有密切关系。目前孕中期人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 联合 AFP 筛查唐氏综合征胎儿已成为欧美亚许多国家常规服务项目之一, 在假阳性率为 5% 左右情况下, 这种筛查方案对唐氏综合征的检出率可以达 65% ~ 75%^[9-11]。因而免疫方法测定血清中 AFP 浓度已在临床得到广泛应用。羊水和母体血清中 AFP 浓度的升高, 对胎儿神经管缺陷和其他遗传缺陷的产前诊断, 也具有应用价值。在大多数原发性肝细胞癌和内胚窦癌患者血清中 AFP 浓度升高, 检测 AFP 有助于肿瘤的早期诊断, 也是在治疗过程中观察疗效的一项指标。采用本实验新改进的方法制备 AFP-McAb, 对胚胎发育、癌变过程中基因表达、AFP 的纯化、肝癌的导向治疗以及提供诊断试剂等都有重要的实际应用意义^[12]。

【参 考 文 献】

- [1] 刘继洪, 朱海红, 陈智, 等. 人甲胎蛋白基因的克隆和表达 [J]. 科技通报, 2004, 20: 241-246.
- [2] 张国英, 梁建芳, 赵龙凤. AFP 检测的临床意义及生物学作用研究新发现 [J]. 中国科技论文, 2004, 19: 1-8.
- [3] 邱晋芳, 张豫燕, 蔡晓宁, 等. 孕妇血清绒毛膜促性腺激素联合甲胎蛋白产前筛查唐氏综合征的研究 [J]. 中国儿童保健杂志, 2007, 15: 22-24.
- [4] 吴萌. 抗甲胎蛋白单克隆抗体的研制及其在免疫组化中的应用 [J]. 河北省科学院学报, 2004, 21: 54-56.
- [5] 邓光荣, 蔡中祥. TRFIA、RIA 及 ELISA 法测定 AFP 的比较 [J]. 长江大学学报, 2006, 3: 276-277.

- [6] Tsung Y K, Dudich EI, Dudich IV, et al. Secretion by hybridoma of antibodies against human alpha-fetoprotein[J]. *New Engl J Med*, 1980, 302:180-183.
- [7] 赵付荣, 华荣虹, 王斌, 等. 流行性乙型脑炎病毒 E 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 2010, 46:3-5.
- [8] 刘辉. 免疫学与免疫学检验[M]. 第 1 版, 北京:人民军医出版社, 2006:78.
- [9] Abdul HS, Fox R, Martin I. Maternal serum screening for trisomy 21 in women with a false positive result in last pregnancy[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2004, 24:374-376.
- [10] Wasant P, Liammongkolkul S. Prenatal genetic screening for Down syndrome and open neural tube defects using maternal serum markers in Thai pregnant women. [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2003, 34 [Suppl 3]: 244-248.
- [11] Beaman JM, Goldie DJ. Second trimester screening for Down's syndrome: 7 years experience [J]. *J Med Screen*, 2001, 8:128-131.
- [12] 许凯黎. 甲种胎儿蛋白分子变异体研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1984, 56:9-14.

DOI: 搭建信息资源的桥梁

数字对象唯一标识(digital object identifier, DOI)被形象地称为“英特网上的条形码”,如同贴了标签的商品,数字对象一旦被分配一个 DOI 号,无论它处于英特网上的任何位置,通过 DOI 都能够找到它,因此解决了传统网络标识系统的不稳定性,实现了更有效的网络链接。DOI 技术即将成为国际上数字出版界构建数字信息交换平台的首要选择。

美国出版协会(AAP)于 1998 年创建了 DOI 以来,制定了标准,并建立了相应的解析系统,目前在出版界得到了广泛和成功的应用。DOI 已用于期刊、电子书、技术报告、标准等各种文献类型的标识,并向与文献相关的科学数据、版权、甚至作者标识等多元化方向发展。截止 2008 年 4 月底,DOI 的注册量已超过了 3,000 多万个,应用 DOI 的出版社和学会有 2,500 多家,图书馆 1,300 多个。万方数据公司已获得了在中国注册 DOI 代理机构权。

中国科学技术信息研究所精品科技期刊项目组已经向 DOI 中文注册机构申请精品科技期刊前缀,并对 300 种精品科技期刊每一篇论文注册 DOI 号,并可通过 DOI 中文注册机构的 DOI 解析服务器(<http://www.chinadoi.cn/>)提供精品科技期刊数字资源的查询和解析。另外,还可通过(<http://dx.doi.org/DOI>)查询资料。

本刊已在万方数据公司注册了 DOI 号,自 2009 年起本刊采用 DOI:10.3969/j.issn.1004-3845.2009.---.---。之后,凡在本刊刊登的论文将获得更宽广的数字信息交流平台。

(宋济范)

本刊论著英文摘要书写方法

本刊自 2001 年第 1 期开始论著中英文摘要的书写方法,采用结构式,明确标出摘要内容,必需有标题。参照几本国际著名杂志如 *Fertil Steril* 等摘要包括下列标题:

目的(Objectives): 论文研究的主要目的,用一句话概括。

方法(Methods): 临床研究中受试对象的基本情况和条件;所采用的技术方法(实验室技术扼要描述,若是常规方法只需提方法名称,无需描述);结果的主要指标。

结果(Results): 研究结果的总结,将论文结果的主要数据列出,此段是最主要的部分。

结论(Conclusion): 每项研究必须有结论,反映作者从研究中得出的结论性意见及作者的观点。

关键词(Key words): 主题词不多于 5 个。


作者可根据论著内容酌情选择标题,但至少必须有 5 项:目的、方法、结果、结论及关键词。具体请参考本刊论著中英文摘要。自即日起投稿者必须附结构式中英文摘要,以免影响稿件受理。

本刊编辑部

一种快速制备甲胎蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系的方法

作者: [丁宁](#), [石心泉](#), [郭永](#), [张瑶楠](#), [邹检平](#), [DING Ning](#), [SHI Xin-quan](#), [GUO Yong](#), [ZHANG Yao-nan](#), [ZOU Jian-ping](#)

作者单位: [国家人口计生委科学技术研究所内分泌室, 北京, 100081](#)

刊名: [生殖医学杂志](#) 

英文刊名: [Journal of Reproductive Medicine](#)

年, 卷(期): 2013, 22(5)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_szyzzz201305012.aspx