

抗牛 H—Y 抗原单克隆抗体的研制试验

高淑静¹ 温山鸿¹ 罗承浩¹ 肖锡斌² 张昌卿²

(1 华南农业大学动物科学系, 广州 510642; 2 中山医科大学附属肿瘤医院)

摘要 H—Y 抗原是位于 Y 染色体上的基因位点所编码的细胞膜抗原, 能直接或间接地诱导原始性腺分化为睾丸。以牛睾丸组织匀浆作为抗原, 免疫 BALB/C 小鼠, 用杂交瘤细胞技术制备的单克隆抗体 6F、7H 与部分牛精子呈阳性反应。

关键词 免疫; 细胞融合杂交; 单克隆抗体; H—Y 抗原

中图分类号 S 823.820

B 淋巴细胞杂交瘤技术是近代生物医学工程领域的重大进展和突破, 已广泛应用于生命科学和临床医学研究的各个领域。在哺乳纲动物中, 染色体决定雌雄性别, 抗牛 H—Y 抗原单克隆抗体, 是以雄性器官组织匀浆作为抗原, 免疫后的 B 细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合成的细胞系所产生的抗体具有单一、特异、纯化的特性, 制备抗牛 H—Y 抗原单抗来抑制牛 Y 染色体精子, 正是应用生殖免疫生物技术来控制奶牛性别, 是生物医学工程领域内一次探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

成年公牛睾丸, BALB/C 二级小白鼠, 由中山医科大学实验动物中心提供; 牛精液, 由广州奶牛研究所提供; SP2/0 骨髓瘤细胞和羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶标抗体, 均由中山医科大学附属肿瘤医院实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 免疫用抗原的制备 牛睾丸消毒后, 去掉外膜, 剪碎加入 5 倍体积的 PBS, 放入匀浆器中研磨, 采集上清, 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 经测定其蛋白质含量为 30 g/L, 分装在 0.5 mL 塑料管中, -20℃保存, 作为牛睾丸组织匀浆 H—Y 抗原。

1.2.2 小鼠的免疫 参照刘玉斌等(1989)、钱玉昆等(1994)的方法, 将牛睾丸组织匀浆抗原, 加等量体积的完全福氏佐剂, 皮下免疫小鼠, 0.2 mL/只, 7 d 后加强免疫, 腹腔注射匀浆抗原 0.2 mL/只, 不加佐剂, 每隔 3 d 加强免疫 1 次, 连续 3 次。

1.2.3 细胞融合步骤 B 淋巴细胞悬液的制备: 取最后一次加强免疫 3 d 后的小鼠, 无菌取脾, 加无血清 RPMI—1640 培养液进行匀浆, 200 目筛网过滤, 用淋巴细胞分离液分离 B 细胞, 从一个鼠脾得到的活细胞数为 5×10^7 个。骨髓瘤细胞悬液的制备: 选好的 SP2/0 骨髓瘤细胞于融合前一周用完全培养液作好传代培养(传代 48 h 左右增殖好的细胞)计数活细胞数为 1×10^{10} 个/L。细胞融合: 淋巴细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 5:1 比例进行混合, 离心去上清液, 置于 37℃水浴中加入 50%PEG 0.2 mL, 混匀 1 min, 离心 5 min, 加无血清培养液与完全培养液各 5 mL, 混匀中止反应, 离心去上清, 加入选择性 HAT 培养液, 混匀接种于

96 孔培养板, 置于 37℃含 5% CO₂ 培养箱中进行培养。

1.2.4 筛选克隆化 融合后第 10 d 开始用 ELISA 法检测, 筛选出分泌较强阳性抗体的细胞克隆, 杂交瘤细胞克隆化采用有限稀释法, 经过 3 次克隆后保留阳性细胞株, 部分冻存, 部分制备腹水, 部分传代培养观察其稳定性。

1.2.5 腹水的制备 取雌性小白鼠, 腹腔注射液体石蜡 0.5 mL, 7 d 后注射杂交瘤细胞悬液 0.2 mL, 细胞密度为 10¹⁰个/L, 再过 7~10 d 开始采集腹水, 检测效价。

1.2.6 多抗血清及单克隆抗体的检测 用圆盘电泳及扫描(陈曾燮等, 1994)和 ELISA 法(郑怀竞等, 1994)。

2 结果

2.1 细胞融合率及杂交瘤分泌抗体的稳定性

由表 1 看出: 细胞融合率为 53/94= 56.38%, 从中选出 2 孔特异性好、效价高的阳性孔杂交瘤细胞克隆化, 经过 3 次克隆后得到 2 株能持续分泌单抗的细胞株, 分别为 6F、7H, 2 株杂交瘤细胞在体外经过连续传代 3 个月及冷冻复苏, 仍能稳定地分泌抗体。

表 1 各培养孔细胞杂交瘤融合情况¹⁾

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B	+	+	—	+	—	—	+	—	—	+	+	—
C	+	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+	+
D	+	+	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—
E	+	—	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	++	+	+	+	—	+	+
G	+	+	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+
H	—	+	+	+	+	—	++	+	+	—	+	+

1) —: 阴性孔; +: 阳性孔

2.2 单克隆抗体特性的鉴定

2.2.1 ELISA 试验结果 从表 2 可知: 用 6F 细胞株制备的 3~5 号腹水, 经过 ELISA 检测,

表 2 牛精子抗原 ELISA 检测 O.D 值¹⁾(× 10⁻³)

组别 精子类型 孔号	阴性对照		阳性对照		3 号腹水		4 号腹水		5 号腹水	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A (1:100)	空白	188	679	695	1 015	1 032	553	601	517	427
B (1:200)	127	107	491	514	901	936	420	437	444	295
C (1:400)	105	80	287	338	744	746	241	257	316	176
D (1:800)	85	57	162	251	520	471	182	124	233	63
E (1:1 600)	81	49	105	114	297	290	81	70	154	46
F (1:3 200)	70	41	71	67	200	188	57	58	88	39
G (1:6 400)	62	37	53	52	132	129	58	49	71	36
H (1:12 800)	69	45	64	63	127	121	53	79	56	39

1) 超过阴性对照 O.D 值的 2 倍者, 判断为阳性

对 X 精子的平均效价为 1 ∶ 2 667, 对 Y 精子的平均效价为 1 ∶ 3 667, 二者合并后的平均效价为 1 ∶ 3 667。

从表 3 可知: 用 6F 细胞株制备的腹水, 经过 ELISA 检测, 平均效价为 1 ∶ 12 800, 比牛精子抗原效价高, 腹水也比抗血清效价高, 证明已获得了有高效价的单克隆抗体。

表 3 牛睾丸组织匀浆抗原 ELISA 检测 O. D 值¹⁾(× 10⁻³)

组别	腹水	抗血清	阴性对照	腹水	抗血清	阴性对照	腹水	抗血清	阴性对照	腹水	抗血清	阴性对照
孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A (1 ∶ 100)	空白	592	87	843	588	84	1 050	643	106	849	729	123
B (1 ∶ 200)	1074	477	53	573	438	59	759	600	125	552	654	97
C (1 ∶ 400)	825	428	61	417	408	54	660	525	74	429	618	91
D (1 ∶ 800)	636	313	54	276	313	38	516	393	53	357	476	81
E (1 ∶ 1 600)	468	231	46	198	233	35	417	348	59	219	370	71
F (1 ∶ 3 200)	357	195	47	156	180	34	321	254	40	228	243	82
G (1 ∶ 6 400)	297	144	60	168	105	36	321	214	52	249	172	82
H (1 ∶ 12 800)	279	151	60	195	101	43	315	186	73	235	171	74

1) 超过阴性对照 O. D 值的 2 倍者, 判断为阳性

2.2.2 圆盘聚丙烯酰胺凝胶电泳照片 见图 1、2。



图 1 “匀浆—Ag”组与对照组血清电泳凝胶 图 2 “Y—Ag”组与对照组血清电泳凝胶

2.2.3 圆盘聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描、分离抗血清蛋白质与正常血清的比较 见图 3、4、5。
从血清电泳凝胶照片及 BALB/C 二级小鼠血清电泳扫描图谱来看,牛精子免疫的抗血

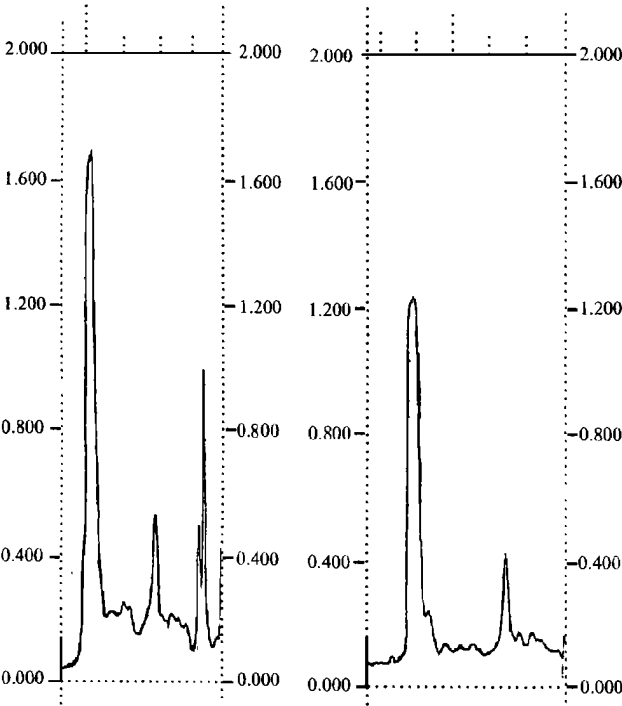


图 3 Y 染色体精子作为抗原, 免疫 BALB/ C 二级小鼠血清凝胶电泳扫描图谱

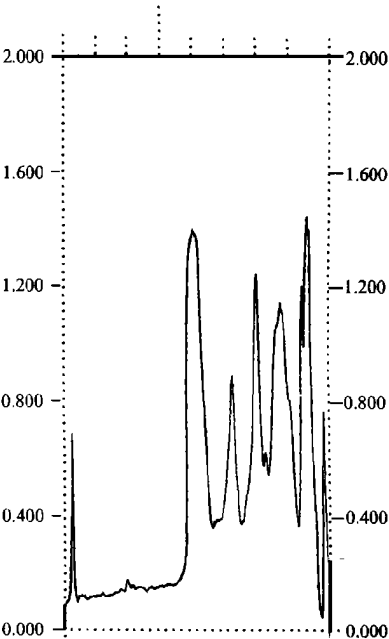


图 5 牛睾丸组织匀浆作为抗原, 免疫 BALB/ C 二级小鼠血清凝胶电泳扫描图谱

清抗体带明显高出正常血清, 峰值最高的蛋白带是由牛精子抗原刺激免疫细胞所产生的免疫抗血清蛋白(IgG)。

牛睾丸组织匀浆免疫的抗血清, 图谱宽, 波峰多, 说明抗原蛋白成分复杂, 除了含有抗 H-Y 抗原外尚含有一些不相关的蛋白质或非特异免疫球蛋白分子。

3 讨论

牛睾丸组织匀浆是成分复杂的粗抗原, 它既包含 H-Y 抗原, 也包含其它蛋白质成分。如果能把 H-Y 抗原提纯, 制备的抗体在特异性和效价上将会更加理想。

运用先进的仪器及方法提高 X 染色体与 Y 染色体精子的分离率是免疫及检测特异性抗体关键的一步, 从精子免疫抗血清电泳扫描图谱来看, 主要抗体的峰值非常明显, 如果能分离出纯度高的 Y 染色体精子, 用 ELISA 法来检测, 可以直接证明此种抗体有抑制 Y 染色体精子的作用。

6F、7H 这 2 细胞株的腹水可用于奶牛的早期胚胎性别检测试验。

单克隆抗体的制备与筛选, 尤其是特异性单克隆抗体的制备与筛选工作量大, 时间长, 单克隆抗体是由一个 B 淋巴细胞所分泌的抗体, 是仅仅针对一种抗原决定簇的成分单一的抗体, 与多抗的抗体具有不同的特点, 单克隆抗体是一个由免疫 B 淋巴细胞与肿瘤细胞融合成的细胞无限增殖形成的细胞系所产生的单一、特异、纯化的抗体(杨景山等, 1989)。该融

合的细胞是经过反复选择而克隆出来的。与多抗的抗体相比则兴利除弊, 具有很多优点。

如何改进实验方法以筛选出特异性更强, 效价更高的抗 H—Y 抗原单克隆抗体, 是我们将来进一步研究的课题。

参 考 文 献

- 陈曾燮, 刘 兢, 罗 丹等. 1994 生物化学实验. 合肥: 中国科学技术出版社, 19~25
刘玉斌, 尚仕金, 王兴龙, 等. 1989 动物免疫学技术. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1~8
杨景山, 万景华, 刘鼎新, 等. 1989 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 425~260
钱玉昆, 殷金珠. 1994 实用免疫学新技术. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 29~33
郑怀竞, 韩 松. 1994 临床检验 ELISA 指南. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1~47

PREPARATION AND ASSAY FOR THE MONOCLONAL ANTIBODY 6F & 7H TO H—Y ANTIGEN FROM BOVINE

Gao Shujing¹ Wen Shanhong¹ Luo Chenghao¹ Xiao Xibin² Zhang Changqing²

(1 Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Cancer Institute, Sun Yat-sen Univ. of Medical Sciences)

Abstract

H—Y antigen is a cell membrane antigen encoded by a gene locus located on the Y chromosome, and directly or indirectly induce the primary sex—gland to develop into testes. By immunizing BALB/C mice with H—Y antigen from bovine testis suspension and using cell hybridization technique, two cell lines, 6F & 7H which secreted H—Y monoclonal antibody, prepared. The antibody reacted positively with some bovine spermatozoa.

Key words immunization; cell fusion and hybridization; monoclonal antibody; H—Y antigen