

草鱼生长激素单克隆抗体制备及其 免疫学性质的研究*

陈松林¹ 杨 峰² 贺 路¹ 陈细华¹ 王远程² 邓文涛¹ 樊 震²

¹ (中国水产科学研究院长江水产研究所淡水鱼类种质资源与生物技术实验室, 沙市 434000)

² (中国农业科学院生物技术中心)

摘 要 应用我们自己纯化的草鱼生长激素 (gcGH) 作为抗原免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠, 经 4 次免疫后进行细胞融合。用常规 ELISA 法筛选阳性克隆, 从 167 个被测克隆中筛选出 7 个阳性克隆, 阳性率为 4.1%。其中中等强度阳性克隆 5 个, 强阳性克隆 2 个 (1D2B9 和 3E8A5)。将强阳性克隆经过 3 次有限稀释克隆化培养后, 制备腹水抗体。ELISA 测定表明腹水单抗的滴度高达 1:1280000。单抗亚类测定表明 1D2B9 和 3E8A5 两个杂交瘤细胞株所产生的抗体均为 IgG2b 型。互补试验表明这二种单抗之间没有互补性。交叉试验表明这二种细胞株所分泌的单抗只与草鱼生长激素有强烈的免疫反应, 而与大鳞大马哈鱼 GH、牛 GH 以及黑鲑促性腺激素 (GtH) 均无免疫交叉反应。草鱼垂体免疫细胞化学研究表明 gcGH 单克隆抗体只与垂体间叶 (PPD) 生长激素分泌细胞特异结合, 而与垂体前叶 (RPD) 和后叶 (PI) 细胞均无染色反应。

关键词 草鱼, 生长激素, 单克隆抗体, 免疫细胞化学

前 言

1975 年, Kohler 和 Milstein 成功地创建了淋巴细胞杂交瘤技术, 从此人们可以获得抗某种抗原单一决定簇、特异性极高的单克隆抗体。与多克隆抗血清相比, 单克隆抗体不仅具有特异性强、滴度高、质地均一、反应灵敏等优点, 而且还可以进行工业性大规模生产。因而, 这项技术一问世就呈现出巨大的生命力和诱人的应用前景, 很快在医学及生物学的各个领域中得到应用。

生长激素 (GH) 是调节鱼类生长发育的最重要激素^[1]。单克隆抗体在建立鱼类 GH 免疫测定技术及开展鱼类生长激素基因工程研究方面具有重要的意义和应用价值, 因而近年来许多国家都开展了鱼类 GH 单克隆抗体制备的研究工作, 但目前成功的报道却很少。日本学者 Furuga 等^[8] 率先报道了制备大马哈鱼 GH 单克隆抗体的结果, 但由于技术上的原因, 他们未能获得理想的单克隆抗体。随后, 加拿大的 Farbridge 等^[7] 成功

* 国家自然科学基金资助项目。

地获得了抗基因重组大马哈鱼 GH 的单克隆抗体。而在鲤科鱼类上,目前国内外均未见有关 GH 单抗的报道。

我们在完成草鱼 GH 分离纯化的研究课题后,继续开展了 GH 单克隆抗体研制的工作,并在国内外首次获得了特异性强、滴度高的草鱼 GH 单克隆抗体。现将研究结果报道如下。

材 料 与 方 法

(一) 材料及试剂

草鱼生长激素(gcGH)为笔者从草鱼垂体中分离纯化而来^[3];大鳞大马哈鱼生长激素(sGH)及其抗血清由笔者自制^[2];黑鲑促性腺激素(bscGtH)及其抗血清由台湾余玉林博士惠赠。福氏佐剂、邻苯二胺(OPD)购自Sigma公司。酶标羊抗鼠IgG购自北京生物制品所;羊抗兔IgG及鼠PAP购自华美公司。

(二) 方法

1. 免疫程序 用gcGH抗原免疫二只6周龄BALB/c小鼠,共进行4次免疫,第一次为皮下多点注射,第二和第三次为腹腔注射,最后一次为静脉注射,各次注射之间隔时间均为二周,每次注射剂量为100 μ g/只鼠。最后一次注射后3天,取脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合。

2. 细胞融合及阳性克隆的筛选 基本按刘尔翔^[4]方法进行。简言之,将脾细胞与培养好的骨髓瘤细胞(SP2/0)按5:1比例混合,经45%PEG(M.W.1540)处理后,将细胞悬浮于选择性HAT-DMEM培养液中,使细胞密度为 5×10^5 细胞/ml,分配到96孔培养板中培养。14天后,换成HT-DMEM培养液,一周后改用DMEM培养液。用常规ELISA法筛选能分泌抗体的阳性细胞克隆,通过3次有限稀释法进行单细胞克隆。

3. 腹水单抗的制备 取健康的BALB/c鼠,预先注射0.5ml/只降植烷,7天后注射 3×10^5 个杂交瘤细胞/只,10-14天后可见小鼠腹部明显肿大,即可开始收集腹水,每隔3天抽取一次腹水,直至鼠死亡。每次得到的腹水经200g离心10分钟,合并上清即为腹水单克隆抗体。

4. 单抗亚类鉴定 采用琼脂双扩散法测定杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体的类型及其亚类。标准免疫球蛋白及亚类为兔抗鼠IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3(Sigma)。琼脂糖浓度为1%,杂交瘤细胞培养液经20倍浓缩后用作样品。

5. 单抗滴度及特异性测定 采用常规ELISA法检测腹水单抗的滴度及其特异性。方法简述如下:先用激素抗原包被96孔板,4 $^{\circ}$ C过夜后用0.5%牛血清白蛋白(BSA)于37 $^{\circ}$ C封闭1小时;换用适度稀释的腹水单抗37 $^{\circ}$ C反应2h;再换用酶标羊抗鼠IgG温育1h(37 $^{\circ}$ C);最后用邻苯二胺室温下显色30分钟。在490nm处测定各孔的光密度值(O.D.)。

6. 单抗互补性的测定 用上述ELISA方法检测1D2B9和3E8A5两种单抗单独存在时或等量混合后的滴度,观察这二种单抗是抗GH分子的同一抗原决定簇还是抗不同抗原决定簇,从而确定两种单抗之间是否具有互补效应。

7. 免疫细胞化学研究 取性腺未成熟草鱼垂体在Hollande-升汞固定液中固定6-8小

时, 然后流水冲洗过夜, 经各级酒精脱水后用石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度为 3 μ m。免疫细胞化学染色采用 PAP 法 (过氧化物酶-抗过氧化物酶法)。切片经脱蜡、腹水后先与单抗温育, 然后再依次与羊抗鼠 IgG、鼠 PAP 温育, 最后用二氨基联苯胺 (DAB) 显色。

结 果

(一) 杂交瘤细胞系的建立及亚类分析

用草鱼生长激素 (gcGH) 免疫 2 只小鼠, 进行了二次细胞融合, 其中一次获得成功。融合细胞共接种 3 块 96 孔板, 融合率达 90% 以上。从被检测的 167 个细胞克隆中筛选出 7 个阳性克隆, 阳性率为 4.1%。将这 7 个阳性克隆进行 3 次克隆化培养后, 注入小鼠腹腔, 生产腹水单抗。经 ELISA 检测, 从中筛选出两个能稳定分泌抗草鱼 GH 特异抗体的杂交瘤细胞系, 分别命名为 1D2B9 和 3E8A5。经琼脂糖双扩散法测得这两个细胞株分泌的抗体均为 IgG2b 型。

(二) 单抗滴度测定

应用常规 ELISA 方法检测 1D2B9 和 3E8A5 两种腹水单抗的滴度。结果见图 1。由图可见, 1D2B9 和 3E8A5 两种单抗的滴度均很高。当用 0.5 μ g/ml gcGH 包被时, 将这二种腹水分别稀释至 1:1280000 时, 仍有明显的颜色反应, 故将这二种单抗的滴度定为 1:1280000。同时还可可见, 3E8A5 腹水的效价稍高于 1D2B9 腹水。当然, 单抗滴度的确定与抗原的包被浓度有较密切的关系。gcGH 的包被浓度越高, 所测出的单抗的滴度也越高 (图 2)。随着抗原包被浓度的降低, 所测定的单抗滴度也随之下降。当 gcGH 的包被

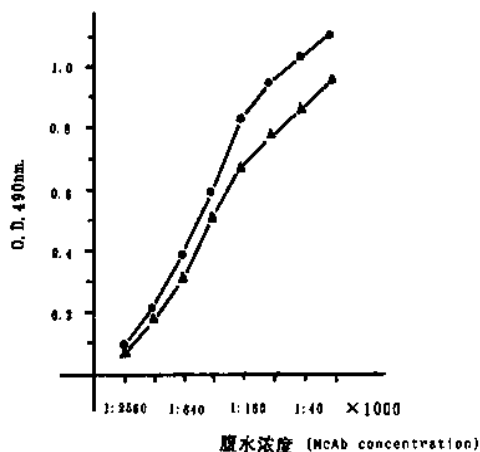


图 1 单抗滴度的比较. 用 0.5 μ g gcGH/ml 包被板孔(▲) 1D2B9; (●) 3E8A5

Fig.1 McAb titration curve. plates coated with 0.5 μ g gcGH/ml.

(▲) 1D2B9; (●) 3E8A5

浓度低至 $0.0625\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 即使 1D2B9 单抗的稀释度高达 $1:40000$ 时, 抗原-抗体之间的反应也很弱, 表明这种浓度不适宜用作包被浓度。

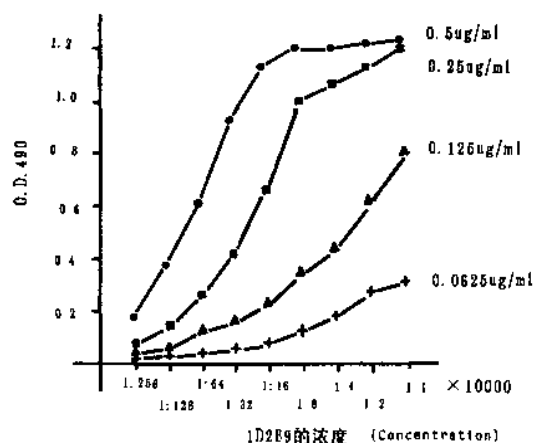


图 2 gcGH 包被浓度对单抗 1D2B9 滴度的影响

Fig.2 Effect of gcGH coating concentration on the titre of McAb 1D2B9

(三) 单抗互补性测定

互补试验表明, 将 1D2B9 和 3E8A5 两种腹水单抗等量混合后使用, 其滴度没有提高 (图 3), 其滴度测定曲线与单独使用 1D2B9 或 3E8A5 时, 基本相同。从而暗示着这两种单克隆抗体可能是抗草鱼 GH 分子同一抗原决定簇的。

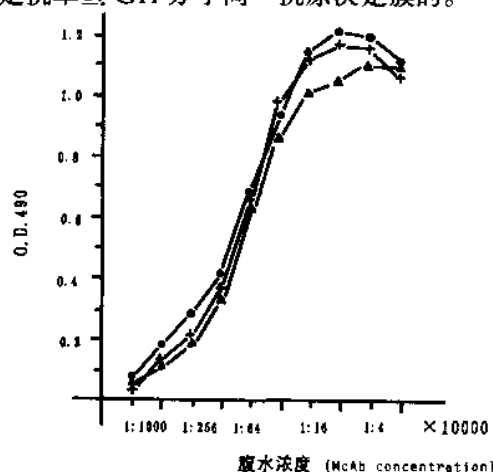


图 3 单抗 1D2B9 和 3E8A5 互补性测定. 用 $0.5\mu\text{g}$ gcGH / ml 包被板孔

Fig.3 Complementary effect of McAb 1D2B9 and 3E8A5. plates coated with $0.5\mu\text{g}$ gcGH / ml

(Δ) 1D2B9; ($\bullet$) 3E8A5; (+) 1D2B9+3E8A5

(四) 单抗特异性鉴定

用 ELISA 检测了 1D2B9 腹水单抗的特异性。结果表明, 1D2B9 只与 gcGH 抗原特异反应, 而与大马哈鱼 GH、黑鲢 GtH、牛 GH 以及草鱼催乳素 (gcPRL) 等基本上都

无明显交叉反应 (图 4), 显示出该单克隆抗体高度的特异性。

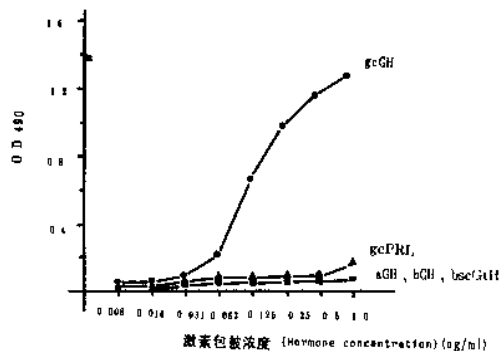


图 4 单抗 1D2B9 特异性的检测. 单抗的稀释度为 1 : 20000

Fig.4 Specificity of McAb 1D2B9 diluted in 1 : 2000

(五) 草鱼垂体免疫细胞化学染色

免疫细胞化学染色表明 gcGH 单克隆抗体只与草鱼垂体间叶 (PPD) 细胞发生特异结合反应, 而与前叶 (RPD) 和后叶 (PI) 细胞毫无免疫反应 (图 5A)。同时用兔抗大马哈鱼 GH 多价抗血清进行了对照染色 (图 5B), 结果表明, 大马哈鱼 GH 抗血清也主要与垂体 PPD 细胞反应, 其染色模式 (即着色细胞的排列方式) 与单克隆抗体的基本相同。与单抗不同的是, sGH 多价抗血清在垂体后叶 (PI) 还有少数着色颗粒, 表明多克隆抗血清的特异性差于单克隆抗体。同时还可见, 黑鲢 GtH 抗血清在 PPD 区域的染色模式与单抗的完全不同 (图 5C)。



图 5 草鱼垂体免疫细胞化学染色. A. 用 gcGH 单克隆抗体; B. 用兔抗大马哈鱼 GH 抗血清;
C. 用兔抗黑鲢 GtH 抗血清.

Fig.5 Immunocytochemistry staining of grass carp pituitary with gcGH McAb (A), sGH antiserum(B) and bseGtH antiserum(C)

讨 论

1. 单克隆抗体由于具有特异性强、对免疫原纯度要求较低、能大量生产等优点,因而一直受到人们的重视。但由于单克隆抗体制备技术难度较大,操作繁杂,工作量大,因而迄今为止,有关鱼类 GH 单克隆抗体制备的成功报道很少。Furuya 等^[8]报道了大马哈鱼 GH 单克隆抗体的研究结果,但可能由于技术上的原因,他们未获得理想的单抗,更谈不上达到应用水平。最近,加拿大、英国两国科学家合作,利用日本科学家制备的重组大马哈鱼 GH 成功地获得了较为理想的 sGH 单克隆抗体^[7]。本文利用我们自己从草鱼垂体中分离纯化的生长激素作抗原,建立了两个分泌抗 gcGH 特异抗体的杂交瘤细胞系,成功地获得了理想的单克隆抗体。这也是鲤科鱼类 GH 单克隆抗体制备的首次成功报道。ELISA 测定表明,草鱼 GH 单克隆抗体特异性强、滴度高,达到了应用的水平。

2. 在单克隆抗体研究中,最重要的步骤、也是最冗长、繁杂的步骤就是从大量的细胞克隆中筛选出能分泌特异抗体的阳性克隆。因此,筛选方法必须快速、简单而且准确。本文将常规 ELISA 方法和免疫细胞化学技术结合起来,用于单抗的筛选和特异性的鉴定,取得良好效果。在筛选阳性克隆时,由于工作量大,故采用常规 ELISA 方法,快速简单。由于 ELISA 中使用的抗原与免疫用的抗原完全一致,加之抗原并非绝对纯,其中尚残留有少量杂蛋白,为检测所获单抗的特异性,确保其百分之百是抗 GH 分子的,因而采用了免疫细胞化学技术,让单抗去与垂体细胞中的 GH 分子反应。由于鱼类垂体中几种激素细胞的分布具有明显特征,特别是易与 GH 相混淆的催乳素(PRL)细胞与 GH 细胞分布在不同的垂体区域,PRL 细胞在前叶(RPD)而 GH 细胞则在间叶(PPD),区别非常明显^[5,6]因而这种方法的特异性很强。从本文结果来看,我们获得的草鱼 GH 单克隆抗体只与垂体 PPD 区域细胞反应,而与前叶(RPD)和后叶(PI)细胞完全没有反应,充分证明本文制备的单克隆抗体确实是抗草鱼 GH 分子的。

3. 草鱼 GH 单克隆抗体的获得对于鲤科鱼类生长内分泌学及生长激素基因工程的研究具有重要的意义和应用价值。单抗可以用来建立高度灵敏、特异的草鱼 GH 酶联免疫测定技术、为鱼类生长内分泌调控的研究及鲤科鱼类 GH 基因转移后表达的检测研究提供可靠的技术手段;单克隆抗体还可以用来制备免疫亲和层析柱,用于分离纯化基因工程合成的鱼类生长激素,这样,只需一步就可从大肠杆菌表达产物中获得高纯度的 GH 产品,这对于鱼类 GH 基因工程生产的产业化具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 陈松林, 1992. 鱼类生长内分泌学及鱼类养殖. 水产学报, 16: 91-100.
- [2] 陈松林等, 1992. 大鳞大马哈鱼垂体生长激素的分离、纯化与鉴定. 生物化学杂志, 8: 656-660.
- [3] 陈松林等, 1995. 草鱼垂体生长激素的分离、纯化及其性质的研究. 动物学报, 41(3): 282-290.
- [4] 刘尔翔, 1981. 杂交瘤技术在寄生虫病方面的应用. 人民卫生出版社(北京).
- [5] Cook, H. et al. 1983 Ultrastructural immunocytochemistry of growth hormone cells in the goldfish pituitary gland, Gen. Comp. Endocrinol. 50, 348-353.
- [6] Doerr-Schott, 1976. Immunohistochemical detection, by light and electron microscopy, of pituitary hormones in

- cold-blooded vertebrates. I fish and amphibians. Gen. Comp. Endocrinol. 28: 487-512.
- [7] Farbridge, K. J. et al. 1990. The development of Monoclonal Antibodies against salmon (*Oncorhynchus kisutch* and *O. keta*) pituitary hormones. Gen. Comp. Endocrinol. 79: 361-374.
- [8] Furuya A et al. 1987. Generation and Application of Monoclonal Antibodies against salmon Somatotropin and prolactin, Agric. Biol. Chem. 51: 2331-2335.

GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST GRASS CARP GROWTH HORMONE AND THEIR IMMUNOCYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION

Chen Songlin Yang Peng* He Lu Chen Xihua Wang Yuancheng*
Deng Wentao Fan Zhen*

(Chang Jiang Fishery Institute, State Key Lab. of Fish Germplasm Resources & Biotechnology, Chines Academy of
Fishery sciences, Shashi 434000)

(* Biotechnology Research Center of CAAS)

ABSTRACT Monoclonal antibodies (McAb) directed against grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) growth hormone were generated by the fusion of myeloma cells (SP2/0) with spleen cells from mice that had been immunized with grass carp GH purified by Chen Songlin et al. (1994). Hybridoma were cloned by limiting dilution and screened for McAb production using ELISA. 7 positive clones were produced from 167 clones tested, giving a positive rate of 4.1%. Two hybridomas cell lines were developed and used to produce ascitic fluids. Two McAbs to gcGH, designated 1D2B9 and 3E8A5, had a titer of about 1 : 1280000 and reacted specifically with gcGH, and did not react with salmon GH, bovine GH and black silver carp GtH in ELISA. Immunocytochemistry study showed that McAbs specifically bound to GH cells in proximal pars distalis (PPD), and did not bind to cells in rostral pars distalis (RPD) and pars intermedia (PI).

KEY WORDS *Ctenopharyngodon idellus*, Growth hormone, Monoclonal antibody, Immunocytochemistry