

提高细胞融合率和 杂交瘤细胞过量生长的方法¹⁾

李 健 强

(西北农业大学兽医系)

David T. Shen William C. Davis

(美国农业部动物疾病研究单位)

(美国华盛顿州立大学)

摘 要

B淋巴细胞促分裂素—鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, STM) 细胞壁水溶性蛋白提取物的应用, 以及延迟使用HAT的选择性培养基等条件的改进, 使细胞融合率提高到90%以上。分泌特异性抗体的杂交瘤细胞系阳性率提高到50%以上。并得到了不同类和亚类的单克隆抗体。本文也对某些影响杂交瘤细胞生长的因素和条件作了讨论。

关键词: 单克隆抗体; B淋巴细胞促分裂素; 杂交瘤; 融合

单克隆抗体是生物学、医学和兽医学基础和临床应用研究的重要工具。用于单克隆抗体生产的方法仍在不断的发展, 为改进单克隆抗体的制备, 许多人从不同的方面做了试验^[1-6], 结果表明多种因素影响到细胞融合后杂交瘤细胞的生长量, 包括免疫脾细胞中B淋巴细胞的状态; 用作融合的骨髓瘤细胞的生长周期阶段; 用来诱使细胞融合的融合剂成分; 成纤维细胞和巨噬细胞作为污染物在最初培养液中的存在; 杂交瘤细胞在最初培养液中生长的浓度; 胎犊牛血清中是否有生长因子; 胸腺细胞、脾细胞、腹腔巨噬细胞的协同培养以及有无2-巯基乙醇和其它生长补充物等。本研究的目的在于改进单克隆抗体制备中的培养条件和操作程序, 以便获得较高的细胞融合率和促进杂交瘤细胞的过量生长。

1 材料与方 法

1.1 培养基

基础培养基: 瘤细胞和脾细胞融合用, 主要成分是Dulbecco's改进的必需培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), 唯一添加成分为青、链霉素混合液 1ml/100ml培养基。青霉素 (10 000u/ml) 和链霉素 (10 000mg/ml) 储存液 -20℃冻存储用。10mM HEPES加到培养基使其pH的变动降低到最低限度。

本文于1987年10月9日收到。

1) 本研究是在美国华盛顿州立大学美国农业部动物疾病研究单位完成的。

完全培养基: 细胞融合后用, 其构成为每100ml基础培养基中加入200mM谷氨酰胺1ml, 胎牛血清13~15ml, 2-巯基乙醇0.1ml储存液(原液0.035ml 2-巯基乙醇加到10ml DMEM)。

选择性培养基: 即完全培养基加HAT, 用于融合后杂交瘤细胞的筛选, 并分为每100ml完全培养基中加2ml 50×HAT。50×HAT的制备法: ①100×HT储存液: 0.1361g次黄嘌呤和0.03875g胸腺嘧啶溶于100ml双蒸水中, 按此量称两次, 制备出200ml 100×HT液, 加热(60~70℃)溶解。取出100ml稀释成50×HT液, 滤过除菌, 冻存-20℃备用。②1000×氨基嘌呤液: 0.0176g氨基嘌呤溶于100ml双蒸水中即成。可先溶解于80ml水中, 若不溶解可加几滴1N NaOH促溶, 最后加水到100ml, 以10ml量分装保存-20℃备用。③50×HAT溶液: 取100×HT液100ml, 1000×氨基嘌呤10ml, 加90ml双蒸水, 滤过除菌, 以2ml量分装冻存-20℃备用。

1.2 细胞

饲养细胞: 为4~6周龄BALB/C小鼠胸腺细胞。一个胸腺可得到 2×10^8 细胞。以无菌手术取出胸腺放在100目筛上, 用橡皮刷抖动使细胞通过筛孔, 再滤过, 最后用完全培养基稀释其最终浓度为 $8 \sim 10 \times 10^6$ 细胞/ml。

免疫脾细胞: BALB/C小鼠用密度梯度离心(30~60%蔗糖溶液, 25000转/分)90分钟提纯的病毒粒子(纯化抗原)和仅经过40%蔗糖垫离心(25000转/分)60分钟提纯的病毒粒子(半纯化抗原), 经三次免疫(第一次, 0.02mg病毒蛋白加弗氏完全佐剂皮下注射; 第二次为二周过后, 0.05mg病毒蛋白加弗氏不完全佐剂腹内注射; 第三次, 融合前三天, 用0.015mg病毒蛋白尾静脉注射)的脾脏, 以无菌手术取出, 放在不含血清的DMEM培养基的平皿内, 其内放一100目筛, 用橡皮刷抖动脾, 即可使脾细胞逸出, 滤过。以1200转/分离心10分钟, 细胞沉淀再悬浮于1ml不含血清的培养基中, 加1.5ml无菌馏水与细胞悬液混合, 以便溶解红血细胞, 很快用不含血清的DMEM稀释至30ml, 这一过程必须在4秒钟内完成。再按上述速度离心, 细胞重悬浮于不含血清的DMEM, 并作细胞计数和活力检验。

骨髓瘤细胞: 用x63·Ag8·653骨髓瘤细胞系在融合前24小时, 将细胞培养液离心、洗一次, 计数并将其分为两个培养瓶加完全培养基。融合当天, 将细胞移至50ml离心管, 以1200转/分离心10分钟, 再悬浮于基础培养基并作细胞计数和活力检验。若有大量细胞碎片或细胞活力低于95%, 停止融合过程, 生长新鲜瘤细胞。

1.3 细胞融合剂

聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG, 分子量1540)加热融化, 以0.5ml量分装经高压灭菌后储存于冰箱或室温下备用。常用50%浓度作融合试验。

1.4 B淋巴细胞促分裂素(Mitogen)

用鼠伤寒沙门氏菌细胞壁水溶性蛋白提取物加到细胞融合后的培养液, 其浓度为每孔0.2ml培养液含1μg。

1.5 细胞融合

(1) 在一个50ml离心管内将瘤细胞和免疫脾细胞按1:2.5比例混合, 然后离心

1200转/分10分钟,同时配置30mlDMEM和50%PEG备用。(2)移去离心管内上清液即刻加1ml50%PEG于细胞沉积之上,计时3分钟,将细胞与融合剂搅匀,在2分钟内细胞应均匀地分散于其中,再观察细胞的分散状况。(3)在第3分钟时,用吸管吸取10mlDMEM,将其插入离心管底部,以0.5ml量加入,于10分钟内加完,混匀,然后再加20mlDMEM,于5分钟内加完。(4)以1000转/分离心8分钟,倒去上清液,将融合的细胞再悬浮于100ml完全培养基内并与100ml饲喂细胞混合,此后即可给对照96孔板(不含B淋巴细胞促分裂素)滴加,然后加入B淋巴细胞促分裂素,其最终浓度为 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用10ml吸管将融合细胞悬液以0.2ml量移加至96孔板。(5)融合后24小时,每孔加1滴选择性培养基,间隔两天换液,3~4天可见到杂交瘤细胞生长,其它细胞逐渐死亡。第3次(融合后第9天)换液前作杂交瘤的筛选。若有阳性孔出现可从96孔板移至24孔板,一般此时可知结果,也可后推2~3天。(6)杂交瘤细胞应在选择性培养基中维持2周,然后再用完全培养基加HT(每100ml培养基内加入 $50\times\text{HT}2\text{ml}$)维持一周,此后细胞就可在完全培养基中正常生长。

2 结 果

2.1 B淋巴细胞促分裂素(STM)对杂交瘤细胞生长的影响

由表1,2可以看出,含有STM的培养液对杂交瘤细胞的生长有促进作用,这种作用进一步提高了细胞的融合率和阳性杂交瘤获得率。

表1 STM对杂交瘤细胞生长的影响

孔数/每板

融 合 次 数	试 验 组		对 照 组	
	平均有克隆	阳 性	平均有克隆	阳 性
1	53 (10)	14	15 (2) ¹⁾	3
2	90 (10)	30	10 (2)	2
3	81 (3)	20	34 (1)	3
4	83 (3)	44	31 (1)	9

注: 1) 使用的96孔板数

表2 STM对提高细胞融合率和阳性率的效果

%

融 合 次 数	试 验 组		对 照 组	
	融 合 率	阳 性 率	融 合 率	阳 性 率
1	55.2 (530/960) ¹⁾	26 (140/530) ²⁾	15 (30/192)	20 (6/30)
2	94 (900/960)	33 (300/900)	10 (20/192)	20 (4/20)
3	84 (243/288)	24 (60/243)	35 (34/96)	8.8 (3/34)
4	86 (249/288)	53 (132/249)	32 (31/96)	29 (9/31)

注: 1) 分子为有克隆的孔数, 分母为培养板的孔数。

2) 分子为阳性孔数, 分母为有克隆的孔数。

2.2 加入HAT的不同时间对获得杂交瘤生长的影响

从表3可知, 融合后24小时加入含HAT的选择性培养基, 能提高获得杂交瘤细胞的比率。

表3 加入HAT和STM的不同时间对杂交瘤细胞的影响¹⁾

融合次数	融合后即刻加	融合后24小时加
1	40 (6) ²⁾	63 (6)
2	30 (6)	46 (6)
3	30 (6)	56 (4)
4	35 (2)	44 (9)

注: 1) 为平均有克隆的孔数/每板。

2) 96孔培养板数。

3 讨论

3.1 B淋巴细胞促分裂素的使用

B淋巴细胞促分裂素应用于单克隆抗体的制备尚未见报道, 本试验结果表明它对促进杂交瘤细胞过量生长有显著作用。这是一种以非选择性途径增加杂交瘤细胞的增殖。

3.2 HAT加入时间

融合后24小时加入HAT, 使杂交瘤的生长量显著增加, 进一步表明, 融合后24小时内细胞的生长条件在杂交瘤的存活与增殖方面起重要作用。

3.3 免疫抗原

一般说来, 用作免疫动物的抗原要求是纯化的, 但在很多情况下, 有用的抗原不一定是纯化的^[4]。杂交瘤技术的主要优点之一是可能得到高度特异的抗体, 但所用的抗原不是纯的, 随后用这些抗体来纯化抗原^[3]。本试验也证明, 免疫用抗原不一定要很纯, 但在筛选杂交瘤时, 最好用纯化的和半纯化抗原混合物, 以保证不漏掉任何阳性细胞系。

3.4 单克隆抗体的大量生产

一旦鉴定为单克隆阳性细胞系, 即刻进行扩大培养和注射于预先注射过降植烷的小鼠腹腔内, 这样安全有效, 不会因冻存条件而失去理想的阳性细胞系。

3.5 细胞融合时间

在融合剂PEG存在的情况下, 确保瘤细胞与脾细胞有一定的接触时间, 太短了达不到融合目的, 太长了会使细胞失去活力, 根据我们的经验以3分钟较为理想。

致谢: 本研究得到美国爱达荷大学和华盛顿州立大学美国农业部动物疾病研究单位的资助, 并得到Soonhee Kwin帮助, 谨致感谢。

参 考 文 献

- 1 Davis w c et al. Biochemical and biological applications of monoclonal antibody technology in developing countries. *Periodicum biologorum* 1984; 85: 259—281
- 2 Stahli C et al. High frequencies of antigen-specific hybridomas; dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. *J Immun methods* 1980; 32: 297
- 3 John G R Hurrell; Monoclonal antibodies: Techniques and applications, CRC Pr INC, 1985; 1—57
- 4 Letchworth G S et al. The methods for production of monoclonal antibodies, *USDA Agr Handbook* No. 630, 1984; 1—50
- 5 Katz David H Monoclonal antibodies and T cell products, CRC Pr INC, 1982; 24—50

AN APPROACH TO IMPROVE FUSION RATE AND OUTGROWTH OF HYBRID CELLS

Li Jianqiang

(*Department of Veterinary Science, Northwestern Agricultural University*)

David T. Shen

W. C. Davis

(*Animal Disease Research Unit,
USDA, USA*)

(*Washington State University, USA*)

Abstract

The application of the water-soluble proteinase extracted from cell walls of *Salmonella typhimurium* served as B-cell mitogen and the improved conditions of selective and culture medium of delayed use of HAT can raise the fusion rate of over 90%. The positive rate of hybridomas secreted specific antibody has been improved to more than 50%, based on which various kinds of classes and subclasses of monoclonal antibodies have been obtained. Also, this paper deals with some factors and conditions affecting the growth of hybrid cells.

key words: monoclonal antibody; B-cell mitogen; hybridoma; fusion