

红萍鱼腥藻单克隆抗体的研究

刘中柱¹ 程由铨² 唐龙飞¹ 郑琦¹
宋铁英¹ 陈明昂¹ 李怡英² 林天龙²

提 要

用提纯的红萍鱼腥藻免疫BALB/C小白鼠的脾细胞与鼠骨髓瘤SP₂/O细胞杂交融合,成功地建立了13个分泌对红萍鱼腥藻特异性单克隆抗体(McAb)的杂交瘤细胞株,杂交瘤细胞株的平均染色体数从86到105。培养液中的免疫荧光抗体(IFA)滴度为5—80,腹水中的IFA滴度为10²~10⁵。

13个McAb中,11个McAb对7种红萍鱼腥藻均发生反应,1个McAb(C₁₆)只与三胞亚属红萍鱼腥藻发生反应,而不与九胞亚属红萍鱼腥藻发生反应,具有亚属特异性,McAb-P₂只识别九胞亚属中莆田羽叶萍鱼腥藻,具有种的特异性。

这些McAb中,R₁₅属于IgG₁,P₂属于IgG_{2a},C₁₆、Me₃、P₁、P₃、P₆、R₂、R₆属于IgG₃,P₅、R₁、R₈、R₉属于I_gM,这些单克隆抗体与其他固氮蓝藻不发生反应。

实验用McAb-C₁₆和异硫氰酸荧光素(FITC)的结合物进行直接FA试验获得成功,其结合物的抗体滴度可达1280,这种反应可被特异性抗血清所阻断。

自1873年Strasburger发现红萍叶腔中存在固氮鱼腥藻(红萍鱼腥藻 *Anabaena azollae*)以来,随着对红萍固氮生理及其体内鱼腥藻研究的深入,人们对不同品种红萍叶腔中的鱼腥藻是否属于同一种有争议。近十几年来,许多研究者在常规血清学(用多克隆抗体)方面作了大量的研究工作,然而,结果不一致,Elisha(1)等采用放射免疫方法(Radioimmunoassay RIA)比较了卡州萍(*A. caroliniana*)和羽叶萍(*A. pinnata*)的鱼腥藻培养物,结果不能区分这两种红萍鱼腥藻;Gates等(2,3)用红萍鱼腥藻的抗血清经相应抗原吸收后,以荧光抗体试验(FA)可以区别卡州萍与羽叶萍体内的鱼腥藻。但是,Ladha等(4)试图采用同样的方法区分三胞和九胞红萍体内鱼腥藻,结果没有成功,1984年唐龙飞等(5)用经蔗糖密度梯度离心提纯的红萍鱼腥藻,制备BALB/C小鼠抗鱼腥藻血清,经IFA试验结果表明,三胞亚属和九胞亚属红萍体内鱼腥藻细胞表面抗原有一定的差异。但是,它们之间会出现交叉反应。

1.福建省农科院红萍研究中心

2.福建省农科院畜牧兽医研究所

1986年8月14日收到

为了深入进行萍藻之间关系的研究,我们利用淋巴细胞杂交瘤单克隆抗体技术,探索红萍体内鱼腥藻细胞表面抗原结构,建立敏感性高、特异性强的监测手段,对红萍体内鱼腥藻进行系统的分类研究。本文报道红萍鱼腥藻特异性单克隆抗体细胞株的建立和单克隆抗体的特性。

材 料 和 方 法

一、萍 种

三胞亚属红萍:卡州萍(*A. caroliniana*)、细绿萍(*A. filiculoides*)、小叶萍(*A. microphylla*)、墨西哥萍(*A. mexicana*)和洋州萍(*A. rubra*)。九胞亚属红萍:莆田羽叶萍(*A. pinnata* var *putian*)和尼罗萍(*A. nilotica*)。以上萍种除了莆田羽叶萍采自福建莆田外,其他萍种均引自国际水稻研究所。

二、BALB/C小白鼠的免疫程序

红萍鱼腥藻经蔗糖密度梯度离心提纯,主要参照Peter(6)的方法。选择6~7周龄的BALB/c小白鼠免疫注射提纯的红萍鱼腥藻,每只小白鼠腹腔注射(i.p)0.3毫升鱼腥藻细胞悬液(1×10^7 细胞/只)和等量完全福氏佐剂的混合液。第一次免疫注射后3周,第二次注射,注射剂量和方法同第一次,只是以不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂。第二次免疫注射后14天,腹腔注射同样剂量的细胞,但不含佐剂。3~5天后眼角取血分离血清,IFA试验检测抗体滴度,抗体滴度 $>1:100$ 即可放血取脾细胞进行杂交融合。

三、淋巴细胞杂交融合和杂交瘤细胞的筛选

取三次免疫的BALB/C小白鼠脾脏,分离脾细胞于DMEM培养液中,以1000rpm离心10分钟后,把细胞重悬于5毫升0.17M氯化铵水溶液中,冰浴10分钟,使红细胞溶解,再离心沉淀,弃上清液,细胞重悬于10毫升不含血清的DMEM中,计数脾细胞,按2:1(脾细胞:小白鼠SP₂/O骨髓瘤细胞)的比例混合,细胞混合物于800rpm离心5分钟,混合细胞重悬于1毫升含有35%聚乙二醇(PEG M.W.1000)和5%二甲亚砜(DMSO)的DMEM中,然后逐渐倍量加入DMEM,使总量为16毫升,总的融合时间为10分钟,于800rpm离心8分钟,细胞重悬于选择培养基(HAT)中,使每毫升含骨髓瘤细胞 1×10^5 ,分装96孔微量细胞培养板,每孔0.1毫升。于37℃、6%二氧化碳培养箱中培养4~5天后,用新鲜的HAT培养液替换一半旧的HAT培养液。当杂交瘤细胞生长一定数量时,取上清液用IFA试验检测特异性抗体。

选择培养基(HAT)为含15%灭活小牛血清、2mM谷氨酰胺、100μM次黄嘌呤、16μM胸腺嘧啶核苷、1μM氨基喋呤的DMEM培养液。HT培养液除了不含氨基喋呤外,其他成份与HAT培养液相同。

四、杂交瘤细胞培养和单克隆抗体的制备

抗体检测阳性的杂交瘤细胞,从96孔培养板逐步扩大培养,以有限稀释法(Limiting dilution)进行克隆化,获得分泌单一特异性抗体的杂交瘤细胞株,其上清液即培养液单克隆抗体。预先注射0.3毫升2,6,10,14—四甲基五癸烷(2,6,10,14—tetramethyl pentadecane)或液体石蜡的BALB/C小白鼠腹腔注射杂交瘤细胞(5×10^6 细胞/只)。

当小白鼠形成腹水瘤后,收获腹水,离心取上清液即腹水单克隆抗体。这两种方法制备的单克隆抗体均用于以下各项试验。

五、间接荧光抗体试验 (IFA)

剥离红萍叶腔鱼腥藻于玻片上,室温干燥保存于4℃或-20℃备用。取杂交瘤细胞培养液或抗血清(不同稀释度)10微升(μl),滴盖于鱼腥藻标本上,置37℃水浴箱内作用30分钟,用0.01M pH7.4的PBS洗涤3次,再滴盖10微升羊抗鼠Fab、IgG血清异硫氰酸荧光素(FITC)标记物(silenus Laboratories PTY.Ltd.工作浓度为1:100)于37℃水浴箱内作用30分钟后,洗涤3次。50%甘油PBS封片,西德Leitz荧光显微镜观察,试验设各种对照。

六、免疫球蛋白的分类

含有0.02%叠氮钠(NaN₃)的1.5%琼脂糖,作琼脂双扩散试验,检测单克隆抗体的免疫球蛋白亚类。各种不同兔抗鼠免疫球蛋白亚类的血清分别放在中央孔,被检测的标本放在周围孔,每孔10μl,置室温1~2天后观察结果。

七、单克隆抗体的荧光素标记方法

按Hurrel^[7]介绍的方法,从小白鼠腹水中提纯McAb,以每毫克免疫球蛋白和0.3毫克异硫氰酸荧光素(FITC)的比例混合,于室温搅拌30分钟,15,000rpm离心15分钟,取上清液通过葡聚糖凝胶(Sephadex—50)柱层析,取第一峰,装透析袋于pH7.2 PBS中,4℃透析24小时,其中至少换3次PBS,分离和除去游离荧光素,收获标记抗体。

结 果

一、杂交瘤细胞的选育

用五个不同品种的红萍鱼腥藻分别免疫注射BALB/C小白鼠,进行五次杂交融合,共接种2573个培养孔,每孔均生长杂交瘤细胞,融合率均为100%。IFA试验结果,其阳性率亦不同。从分泌特异性抗体的杂交瘤细胞中,建立了13个分泌对不同萍种鱼腥藻特异性抗体的杂交瘤细胞株。部分杂交瘤细胞在克隆化之前就丢失了分泌抗体的能力。详见表1。

表1 杂交瘤细胞选育结果

融合序数	免疫抗原	融合孔数 总培养孔数	融合率(%)	IFA 阳性孔数 检测孔数	阳性率 (%)	特异性杂交瘤细胞株 (建株)
1	卡州萍鱼腥藻	144/144	100	1/144	0.7	C ₁₀
2	墨西哥萍鱼腥藻	524/524	100	9/520	1.7	Me ₃
3	小叶萍鱼腥藻	456/456	100	15/456	3.3	
4	羽叶萍鱼腥藻	528/528	100	7/528	1.3	P ₁ , P ₂ , P ₃ , P ₅ , P ₆
5	洋州萍鱼腥藻	921/921	100	15/921	1.6	R ₁ , R ₂ , R ₆ , R ₈ , R ₉ , R ₁₅
合 计		2573/2573	100	47/2339	1.8	

二、杂交瘤细胞的染色体检查

按Tjio等^[8]方法,检查了4个不同特性的杂交瘤细胞株,鼠骨髓瘤SP₂/O细胞和

BALB/C小白鼠脾细胞的染色体数。结果见表2。

表2 杂交瘤细胞染色体数

杂交瘤细胞	亲本细胞染色体数(平均)		染色体数(平均)
	脾脏细胞	骨髓瘤细胞	
C ₁₀	40	60	86
Me ₃	40	73	100
P ₃	40	73	105
R ₆	40	73	100

三、红萍鱼腥藻单克隆抗体的特性

我们建立了13个分泌对红萍鱼腥藻特异性抗体的杂交瘤细胞株,其中的7株其细胞培养液对免疫用红萍鱼腥藻的IFA抗体滴度分别为1/5~1/80,这7个McAb腹水的IFA抗体滴度分别为1/100~1/100000。从表3看出,腹水中的抗体滴度比培养液中抗体滴度高20~5000倍。

10倍浓缩的McAb细胞培养液,与兔抗鼠免疫球蛋白(IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃和IgM)抗血清(购自美国Miles Scientific Inc),进行琼脂双扩散试验。结果13株McAb中,1个McAb属IgG₁,1个McAb属IgG_{2a},7个McAb属于IgG₃,4个McAb属于IgM。详见表3。

表3 红萍鱼腥藻单克隆抗体特性

单克隆抗体	IFA 滴 度		免疫球蛋白亚类
	培 养 液	腹 水	
C ₁₀	80	10000	IgG ₃
Me ₃	5	100	IgG ₃
P ₁	20	10000	IgG ₃
P ₂	5	10000	IgG _{2a}
P ₃	40	100000	IgG ₃
P ₅	20	100000	IgM
P ₆	40		IgG ₃
R ₁	40		IgM
R ₂	40		IgG ₃
R ₆	80	10000	IgG ₃
R ₈	20	1000	IgM
R ₉	40		IgM
R ₁₅	10		IgG ₁

四、单克隆抗体对不同品种红萍鱼腥藻及其它固氮蓝藻的交叉反应

比较了C₁₀, Me₃, P₁, P₃, P₅和R₃等7个McAb对不同品种红萍鱼腥藻和其他固氮蓝藻的IFA试验。结果是: C₁₀对三胞亚属的卡州萍、细绿萍和洋州萍鱼腥藻的IFA滴度为

10^4 ，而与小叶萍和墨西哥萍鱼腥藻的IFA滴度为 10^2 ； Me_3 、 P_1 、 P_3 和 P_5 对九鳔亚属和三鳔亚属红萍鱼腥藻均有不同程度的反应。但是，其IFA滴度不同， P_1 、 P_3 和 P_5 对九鳔亚属红萍鱼腥藻的IFA滴度比三鳔亚属红萍鱼腥藻的IFA滴度高10~100倍，而 Me_3 对三鳔亚属红萍鱼腥藻的抗体滴度比九鳔亚属红萍鱼腥藻的抗体滴度高10倍； R_8 对试验用7种红萍鱼腥藻均发生反应； P_2 只对莆田羽叶萍鱼腥藻发生特异性反应，其IFA滴度达 10^4 ，它不与其他品种红萍鱼腥藻发生任何反应。

表4 单克隆抗体对不同品种红萍鱼腥藻的交叉反应

	尼罗萍	羽叶萍	卡州萍	细绿萍	洋州萍	小叶萍	墨西哥萍	自生固氮蓝藻	
								Anabaena azotica	Tolypothrix tenuis
C_{18}	—	—	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-2}	—	—
Me_3	10^{-1}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	—	—
P_1	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}	—	—
P_2	—	10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—
P_3	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}	—	—
P_5	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}	—	—
R_8	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	—	—

五、标记红萍鱼腥藻单克隆抗体对不同品种红萍鱼腥藻和其它固氮蓝藻的反应特性

标记异硫氰酸荧光素 (FITC) 的 C_{18} ，用直接FA试验对不同品种红萍鱼腥藻和其它固氮蓝藻进行交叉反应。结果是： C_{18} -FITC对三鳔亚属红萍鱼腥藻出现特异性反应，对卡州萍、细绿萍和洋州萍鱼腥藻的FA滴度为1280，而对小叶萍和墨西哥萍鱼腥藻的FA滴度为40。对九鳔亚属红萍鱼腥藻及其它固氮蓝藻均不发生任何反应，说明可以用标记的红萍鱼腥藻单克隆抗体进行直接FA试验，其敏感性高、特异性强。

讨 论

我们分别用卡州萍、墨西哥萍、羽叶萍和洋州萍的鱼腥藻免疫BALB/C小白鼠的脾细胞与鼠骨髓瘤SP₂/O细胞融合，成功地建立了13个分泌对红萍鱼腥藻特异性抗体的杂交瘤细胞株。红萍鱼腥藻单克隆抗体的建立，解决了长期以来为国内外专家争论的不同种红萍，其鱼腥藻是否相同的问题。实验结果表明，在红萍鱼腥藻中至少有4个亚群(subgroup)。 Me_3 、 P_1 、 P_3 和 P_5 单克隆抗体可以区分红萍鱼腥藻和其它固氮蓝藻； C_{18} 除了可明确区分九鳔亚属红萍鱼腥藻和三鳔亚属红萍鱼腥藻外，还可把三鳔亚属红萍鱼腥藻分为2个亚群； P_2 可把九鳔亚属的两种红萍鱼腥藻区分开。

红萍鱼腥藻单克隆抗体的建立，不仅使人们对红萍鱼腥藻表面抗原有了新的认识，而且将成为红萍鱼腥藻分类的重要手段，它可作为一种准确、迅速的监测手段，为萍藻重组、红萍孢子果杂交等红萍基础生物学研究提供可靠的科学依据。当然，要应用单克隆抗体对红萍鱼腥藻进行系统的分类研究，有待建立更多的、特异于各红萍品种的单克隆抗体。

参 考 文 献

- [1] Elisha Telor et al., The Unique Symbiotic Properties of *Anabaena* in the Water Fern *Azolla*.
- [2] Gates, J.E, Fisher, R.W. et al. 1980. Antigenic differences between *Anabaena azollae* fresh from the *Azolla* fern leaf cavity and free-living cyanobacteria. *Arch. Microbiol* 128 (1) : 126~129.
- [3] Gates, J., Brown, D., et al. 1981. A comparison of the surface antigenicity of the N-fixing cyanobacterial symbionts of *A.pinnata*, *A.caroliniana*, and *A.microphylla*, (Abstract). *Plant Physiol.* 67 (4 suppl.) : 134.
- [4] Ladha, J.K. and Watanabe, I. 1982. Antigenic similarity among *Anabaena azollae* separated from different species of *Azolla*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109 (31) : 675~682.
- [5] 唐龙飞等, 1986, 间接荧光抗体试验区别红萍鱼腥藻细胞表面抗原。福建农业科技 1 : 32~33。
- [6] Peters, G.A. and Mayne, B.C 1974. The *Azolla Anabaena Azollae* Relationship. *Plant Physiol.* 53 : 813~819.
- [7] Hurrell John G.R. 1982. *Monoclonal Hybridoma Antibodies : Techniques and Applications*. CRC Press Inc, Boca Ruton, Floria 51.
- [8] Tjio and Whang, C.D. 达林顿, L.F. 拉柯著, 1962, 染色体处理 姚壁君译, 第188页。

STUDIES ON MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ANABAENA AZOLLAE

Liu Chungchu¹, Cheng Youquan², Tang Longfei¹, Zhen Qi¹,
Shong Tieying¹, Chen Mingang¹, Li Yiyi², and Lin Tianlong²

ABSTRACT

13 hybridoma cell lines secreting monoclonal antibody against *Anabaena azollae* have been established by fusion of SP2/0 myeloma cells with spleen cells from BALB/C mice immunized with *Anabaena azollae*. The chromosome numbers of the hybridoma cell lines range from 86 to 105, respectively. The antibodies from the culture medium have fluorescence antibody (FA) titers of up to 5-80, and those from mouse ascitic fluid have titers ranging from 10^2 to 10^5 .

Among the 13 monoclonal antibodies (McAbs), 11 McAbs react with all *Anabaena azollae* from seven species of *Azolla*. One (McAb-C16) reacts only with the symbionts from *Euazolla*, it did not react with that from *Rhizosperma* i. e., it is a subgroup-specific McAb. Another one (McAb-P2), which reacts only with the symbiont from *A. pinnata*, is a species-specific McAb.

Two McAbs (R15 and P2) belong to IgG1 and IgG2a subclasses, respectively. The McAbs (C16, Me3, P1, P3, P6, R2 and R6) belong to IgG3 subclass, and the remaining four McAbs (P5, R1, R8 and R9) belong to IgM subclass. All 13 McAbs did not react with free-living nitrogen fixing algae, *Anabaena azotica* and *Tolypothrix tenuis*.

The direct FA for *Anabaena azollae* was established with fluorescein isothiocyanate (FITC) labelled McAb-C16. The titer of McAb-C16 conjugated reached 1280, and the specific reaction was blocked by rabbit anti-*Anabaena azollae* serum.

1. Azolla Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences