

胞,具有恶性细胞的生物学特性。本文所介绍的方法为环境致癌研究提供了经验。

参 考 文 献

- [1] Berwald, Y. et al., 1965, *J. Nat. Cancer Inst.*, 35: 641—661.
- [2] Dipaolo, J. A. et al., 1967, *Exptl. Cell Res.*, 48: 361—377.
- [3] 李申德等, 1979, *实验生物学报*, 12(3).
- [4] 李申德等, 1981, *国外医学遗传分册*, 4: 177—180.
- [5] A. Sivak et al., 1968, *Exp. Cell Res.*, 49: 572—583.
- [6] 苏兆众等, 1987, *中国科学 B 辑*第 7 期.
- [7] Lu Shou-Zhen, et al., 1988, In "Pollution in the Urban Environment POLMET 88" Vol 2, p 520—525, Edited, by P. Hills, et al.
- [8] Maria Palajda, et al., 1985, *Mutation Res.*, 153: 79—134.
- [9] Philippe Quillardet, et al, 1985, *Mutation Res.*, 147: 65—78.
- [10] 陈中孚等, 1988, *微生物学报*, 28 (4): 313—318.
- [11] 陆寿珍等, 1988, *细胞生物学杂志*, 10(1): 33—38.
- [12] Reznikoff CA, et al., 1973, *Cancer Res.*, 33: 3239—4249.

抗 K 物质单克隆抗体的制备

王荣芳 王 珏 葛锡锐 姚 鑫

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

长期以来, P 物质一直被认为是唯一的存在于哺乳动物中的速激肽(tachykinin)^[1], 直至最近, 由于几种新的属于速激肽族的肽——K 物质(substance K)和神经素B(neurokinin B)在猪的脊髓中被分离得到^[2,3]以及 Neuropeptide K 的发现^[4], 这种观点才被打破。Nawa 等进而搞清了 K 物质的一级结构, 即: His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂^[5]。对速激肽族中肽的一级结构的比较分析发现, 不论是存在于无脊椎动物中的速激肽, 还是存在于脊椎动物中的速激肽, 它们的一级结构都具有高度的同源性, 在 C-末端都含有: —Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ 这样的氨基酸序列^[6]。进化过程中的高度保守性说明这一类肽在生命活动中具有不可替代的重要作用。一些研究表明, 这一类肽都能引起肠平滑肌收缩, 使血压下降^[7]。已有证据表明 K 物质的分布可能与 P 物质的分布一样十分广泛^[8-10], 提示它可能具有另外的一些非常重要的生理功能, 至少可能起一个神经递质的作用^[9]。最近的研究还表明

这类肽在免疫系统中充当着重要的角色^[11,12]。许多关于神经肽的分布与功能研究都依赖于免疫学手段, 而应用单克隆抗体将为这一领域的研究带来广阔的前景。

由于 K 物质是一个仅由 10 个氨基酸组成的小肽, 免疫原性非常弱, 且速激肽族肽类具有高度的同源性, 给抗 K 物质的抗体制备带来了困难。本文报道建立产生抗 K 物质单克隆抗体的杂交瘤细胞系的建系情况。

材 料 和 方 法

一、抗原及免疫

K 物质(Peninsula Laboratory, INC); 甲状腺球蛋白, 牛血清白蛋白均为 Sigma 公司产品; 碳二亚胺(水溶性)为 E. Merck 产品。

按碳二亚胺法^[13,14]将每毫克 K 物质与 5 毫克甲状腺球蛋白偶联在一起作为免疫原。免疫原与福氏佐剂充分乳化后以 10—20 μg 的剂量反复分别免疫 Wistar 大鼠和 Balb/c 小鼠。每隔一月免疫 1 次, 计 5 次。最后一次免疫后 3 天放血处死, 取脾脏细胞用于融合。

二、细胞融合和克隆法

参照 Köhler 和 Milstein 的报告^[15]。

三、酶联免疫吸附试验

以 ELISA 方法作为筛选单克隆抗体的方法之一。血蓝蛋白 Type VII (本所洪龙生同志提供) 与 K 物质按戊二醛法^[16]偶联起来作为包被抗原。

酶联免疫吸附试验参照叶敏等的方法^[17]。

四、杂交瘤细胞系分泌抗体稳定性测定

Tyr-°K 物质 (Tyr-°SK) 为 Peninsula Lab. INC 产品。Iodogen 试剂由本所谢弘同志提供。碘标采用 Iodogen 法^[18]。简述如下:

用 200 μ l 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 溶解 10 μ g Tyr-°SK, 吸至预先经 40 μ g Iodogen 包被的圆底塑料管中, 冰浴条件下加 600 μ ci Na¹²⁵I 振荡 20 分钟后吸出反应液, 加 200 μ l 0.05 mol/L 磷酸缓冲液洗涤振荡 5 分钟后吸出液体。用 DEAE-Sephadex A25 柱 (1.5 $\times$ 19 cm) 进行层析分离。洗脱液为 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2), 分管收集。选择在 γ -井型计数器上读数高于 1×10^6 /10 秒者, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{{}^{125}\text{I 结合率}(\text{未加抑制物组}) - {}^{125}\text{I 结合率}(\text{加抑制物组})}{{}^{125}\text{I 结合率}(\text{未加抑制物组})} \times 100\%$$

结 果

一、不同品系动物对 K 物质免疫应答能力比较

以 K 物质-牛血清白蛋白偶联物免疫了 6 个 Balb/c 小鼠, 采血样测定小鼠抗 K 物质的免疫应答能力, 结果很弱, 抗血清滴度仅 10 左右。又以 K 物质-甲状腺球蛋白作为免疫原, 免疫了 10 只 Balb/c 小鼠和 5 只 Wistar 大鼠, 经过 5 次反复免疫后, 随机采取 2 只 Wistar 大鼠和 3 只 Balb/c 小鼠的血样, 用 ELISA 测定抗血清滴度, 结果见表 1。

表 1 不同动物对 K 物质免疫应答反应的比较

动物品种	Balb/c 小鼠			Wistar 大鼠	
编 号	1	2	3	1	2
抗血清滴度	1:100	1:500	1:100	1:16000	1:8000

由表 1 可以看出, 以上述偶联物免疫 Balb/c

将经过 5 次克隆化的杂交瘤系 (SE-1 系) 在体外连续传 10 代, 分别收集上清液, 然后分别和碘标 K 物质 (约 10000 cpm) 混合在一起。反应体系为含 20% 正常大鼠血清的 PELH 缓冲液^[19]。4 $^{\circ}$ C 温育 48 小时, 然后加入等体积饱和硫酸铵溶液, 充分混匀后于 4 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟。4000 rpm 离心 20 分钟。弃去上清液, 沉淀于 FJ-2003/50 型 γ 免疫计数器上计数。

五、应用放射免疫法对抗体特异性的分析

放射免疫检测^[20,21]过程简述如下:

SE-1 单克隆抗体先与未经碘标记的 K 物质或其他脑肽或 P 物质类似物 (0.001 μ g—5 μ g) 在 4 $^{\circ}$ C 中温育 2 小时, 然后加入碘标的 K 物质, 总体积 200 μ l。SE-1 单克隆抗体的最终稀释度为 1:4。缓冲液仍为含 20% 正常大鼠血清的 PELH 液。4 $^{\circ}$ C 继续温育 46 小时后, 加入 200 μ l 饱和硫酸铵溶液, 4 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟。通过 4000 rpm 离心 20 分钟将游离抗原和结合抗原分开, 于 FJ-2003/50 型 γ 免疫计数器上测定沉淀物抗指数。竞争抑制反应的抑制率计算参照 Fons 等的实验^[22]。

小鼠所引起的抗体滴度较低, 而 2 只 Wistar 大鼠却抗体滴度较高, 分别为 16000 和 8000。用免疫的 Balb/c 小鼠和 Wistar 大鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞分别进行融合, 表 2 示其中 2 次融合的结果。

表 2 二次融合实验结果

抗血清滴度	动物品种	集落孔数	抗体分泌阳性孔数	阳性率 %	稳定的细胞系
1:16000	Wistar 大鼠	29	5	17.2	1
1:100	Balb/c 小鼠	141	1	0.7	0

用免疫的 Balb/c 小鼠的脾细胞与 SP 2/0 骨髓瘤细胞融合后有 141 孔长出集落, 但仅有 1 孔测到阳性, 经过一次克隆化后, 阳性反应消失。而用免疫过的 Wistar 大鼠脾细胞与 NS-1 骨髓瘤细胞的融合, 尽管其可能由于是种间的融合抑或是所用的 NS-1 骨髓瘤细胞本身不稳定, 其融合率及融合细胞存活率很低, 但仍有 29 个集落长到可测水平, 其中 5 个集落

呈阳性反应。其抗K物质抗体分泌阳性率显著高于 Balb/c 小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞的融合。

此后对所有 5 个集落用有限稀释法克隆化, 大多数集落在此过程中逐渐丧失抗体分泌能力或死亡, 仅一个集落的抗体分泌能力仍保持稳定(图 1)。

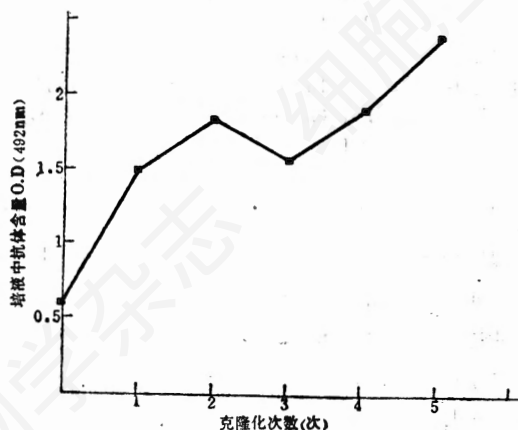


图 1 克隆化过程中细胞分泌抗体强度的比较(ELISA 法)

表 3 SE-1 杂交瘤细胞系的克隆化

克隆化次数	集落孔数	克隆率 %	阳性率 %
1	66/192	37	55
2	57/192	30	100
3	60/192	31	100
4	50/192	26	100
5	16/96	16	100

经 5 次克隆化(表 3), 最终得到一株稳定地分泌抗 K 物质单克隆抗体的细胞系 (SE-1)。细胞在体外传 10 代, 抗体分泌能力未见减弱(图 2), 显示其良好的稳定性。

二、SE-1 细胞系分泌的单克隆抗体的特异性及所对应抗原决定簇的分析

根据放射免疫检测方法中抗原抗体竞争抑制反应原理, 用未标记的 K 物质或其他脑肽(表 4)竞争抗体与碘标 K 物质的反应, 根据抑制率来分析抗体的特异性, 结果如图 3。

整个抑制曲线显示了 K 物质的抑制强度高于 P 物质。P 物质 C-末端羧基未酰胺化的几

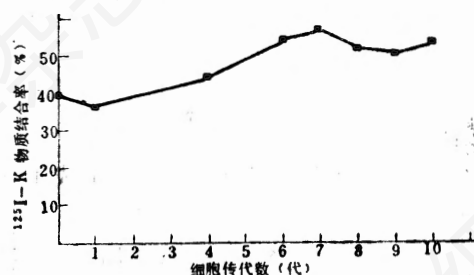


图 2 SE-1 杂交瘤细胞克隆分泌抗体的稳定性(RIA 法)

■ 培养上清液

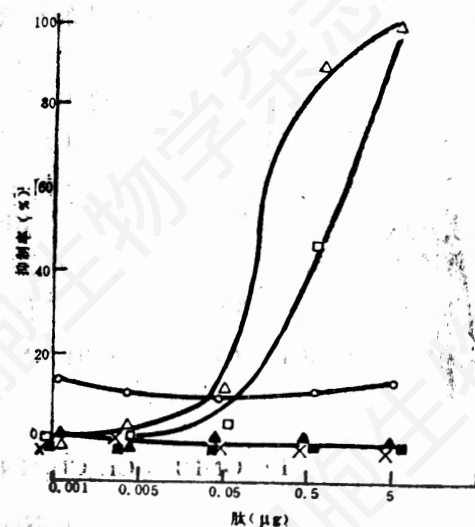


图 3 SE-1 单克隆抗体与 K 物质及其他脑肽的放射免疫竞争抑制试验

△——, K 物质; □——, P 物质; ○——, P 物质 COOH; ■——, 脑啡肽; ▲——, 脑啡肽; ×——皮啡肽

乎不能抑制碘标 K 物质与抗体的结合。脑啡肽、皮啡肽也无抑制作用。比较 P 物质与 P 物质 C-末端未酰胺化的区别, 仅 C-末端甲硫氨酸 α -羧基酰胺化否之差异, 然而它们却表现出与 SE-1 单克隆抗体反应能力的极大不同。据此, 我们推测 C-末端甲硫氨酸的 α -羧基酰胺化是组成该抗体识别位点所必需。

比较 K 物质与 P 物质的氨基酸组成, 不难发现二者近 C-末端均为: —Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ 的结构, 差别主要表现在 N-末端。而 SE-1 单抗与 P 物质有较强的反应。因此,

我们作出推论,即:SE-1单克隆抗体所对应的抗原决定簇位于近C-末端部分。

讨 论

(1) 肽抗原决定簇包含3—5个或4—8个氨基酸,并且有一定的复杂性及空间构型^[23]。通过小肽的聚合虽也可增加免疫原性,但由于可能会遮盖其抗原决定簇而不常采用。常用的增加小肽抗原性的方法是将小肽偶联于大分子载体上。

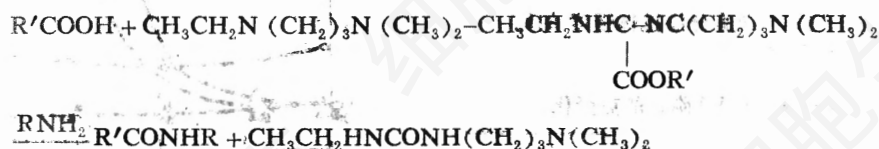
K物质是一个由10个氨基酸组成的小肽,我们采用碳二亚胺法将其偶联于大分子载体上(甲状腺球蛋白或牛血清白蛋白),免疫动物后,其中抗血清效价最高的可达到16000。运用杂交瘤技术得到了一株能连续地、稳定地分泌抗K物质单克隆抗体的杂交瘤细胞系(SE-1)。利用RIA对SE-1单克隆抗体特异性的分析,发现SE-1单抗除与K物质结合外,亦能与

P物质发生反应。从两者的氨基酸组成看,具有高度的同源性,C-末端的氨基酸组成完全一致(表4)。

表4 肽的结构

K物质	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
P物质	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
脑啡肽(亮)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH ₂
脑啡肽(甲硫)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-NH ₂
皮啡肽	Tyr-O-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂

因此,要获得特异性强的不与P物质交叉的抗K物质的抗体,其抗原决定簇部位须位于N-末端才有可能。碳二亚胺法偶联蛋白的机制是通过缩水反应将-NH₂与-COOH基脱水缩合,形成酰胺键,从而将两个蛋白质偶联在一起^[13,14]:



K物质共有3个-NH₂(N-末端游离的α-NH₂, 赖氨酸的ε-NH₂及C-末端酰胺化的-NH₂)和1个天冬氨酸的β-COOH,共有4个基团可参与偶联反应。然而C-末端的酰胺化-NH₂活泼程度大大低于另3个基团。因此,反应产物大部分是以K物质N-末端的两个-NH₂和一个-COOH基团与甲状腺球蛋白或牛血清白蛋白上的-NH₂或-COOH基团以酰胺键偶联在一起的。这样,用此产物免疫动物后得到的抗K物质的抗血清和单克隆抗体就可能与P物质有交叉反应。Lee等^[24]用羧端未酰胺化的P物质(P物质-COOH)在用保护剂将第1位Arg及第3位Lys的-NH₂基团保护起来后,按碳二亚胺法将其与牛血清白蛋白偶联,免疫动物后获得的抗血清与P物质(2-11)和P物质(3-11)仅有0.1%和0.01%的交叉反应,与其他P物质C-末端片段几乎不反应。说明N-末端

参与大分子载体连接与否直接影响到所获得的抗血清的特异性。原因很可能是载体大分子蛋白分子较大,覆盖了连接端的抗原决定簇或是影响了免疫活性细胞对于连接端的抗原决定簇的识别。

摘 要

速激肽族肽,包括K物质、P物质、神经素B等都具有神经递质的功能,它们越来越引起人们的关注。免疫学方法诸如:放射免疫测定法、免疫组织化学法等对神经肽的分布、定位和生物学功能等方面的研究提供了极大的方便。我们以K物质-甲状腺球蛋白偶联物免疫动物——Wistar大鼠和Balb/c小鼠。Wistar大鼠对K物质-甲状腺球蛋白的免疫应答能力显著高于Balb/c小鼠。通过Wistar大鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行异种细胞融合,获

得了一株稳定地分泌抗K物质的单克隆抗体的细胞系(SE-1)。用RIA检测该单克隆抗体的特异性,除与P物质有一些交叉外,与其余我们所用的脑肽均不反应。

参考文献

- [1] Pernow, B., 1983, *Pharmacological Rev.*, 35: 85
- [2] Kanagawa, K., et al., 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114: 533
- [3] Minamino, N. et al., 1984, *Neuropeptides.*, 4: 157
- [4] Elvar, T. N. et al., 1985, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 131: 77
- [5] Nawa, H. et al., 1983, *Nature.*, 306: 32
- [6] Erspamer, V., 1981, *Trends in Neuroscience.*, 4: 267
- [7] Iversen, L. L., 1982, Substance P receptors in the nervous system and possible receptor subtypes. In: R. Porter and M. O'Connor ed. *Substance P in the nervous system.*, Ciba Foundation Symposium 91, 186.
- [8] Minamino, N. et al., 1984, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124: 731
- [9] Schultz, C. W. et al., 1985, *Peptides.*, 6: 343
- [10] Ichiro, K. et al., 1984, *Neuroscience Research.*, 2: 111.
- [11] Stanis, A. M. et al., 1986, *J. Immunol.* 136: 152.
- [12] Scicchitano, R. et al., 1988, *Immunology.*, 63: 733.
- [13] Coodfriend, T. L. et al., 1964, *Science.*, 144: 1344.
- [14] Sarà, B. and M. Wilchek, 1980, *Methods in Enzymology.*, 70: 151.
- [15] Kohler, G., and C. Milstein, 1975, *Nature.*, 256: 495.
- [16] Huang, J. S. et al., 1983, *J. Cell Biol.*, 97: 383.
- [17] 叶敏, 季永儒, 1981, 上海免疫学杂志, 1(3): 1.
- [18] Fraker, P. J. and J. C. Speck, 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80: 849.
- [19] 邹冈等, 1980, 中国科学, 5: 492.
- [20] Powell, D. et al., 1973, *Nature. (London) New Biology.* 241: 252.
- [21] 汪淑华等, 1985, 生物化学与生物物理学报, 17: 594.
- [22] Fons, G. C. M. U. and D. M. E. O. Albert, 1985, *J. Immunol.* 134: 1225.
- [23] 陆以信, 1982, 小肽放射免疫分析近况, 葛锡锐编, 中国生物化学会专题讨论会文集。“免疫活性细胞与免疫方法进展” p. 161.
- [24] Lee, C. M., et al., 1980, *Life Science.* 27: 535.

电泳照片计算机处理——处理方法之一

张耀远 吴立丹

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

电泳技术是生物学研究中广泛使用的一种分析技术,在电泳照片上包含着丰富的生物研究信息。今天,随着生物技术的深入发展,微量分析以及超微量分析日趋盛行。因此生物学家对电泳照片上出现的依稀可辨的微弱信息,也就日趋重视起来。由于他们所关心的这部分信息十分浅淡,在发表文章的制版过程中,制版技术上的不可避免的信息损失,往往

将这类可贵的信息丢失,从而制版后的照片在目视上与原照片存在较大的差异,因此作为数据的说服力就不强,以致于造成作者、读者和编者们的极大遗憾。多少年来人们希望通过某种科学技术能将电泳照片上这部分微弱的信息增强,使之明显起来,而同时不破坏原照片上的其他图像信息。随着计算机图像处理技术的发展,为解决这类问题指明了方向。使我们能