

H-Y 单克隆抗体的制备方法

张永振^{*1} 张守全¹ 彭良平²

(1 华南农业大学动物科学系, 广州, 510642; 2 第一军医大学免疫学教研室)

摘要 用 Balb/c 雄小鼠的脾细胞和皮肤组织对同系雌小鼠脾脏作一次直接免疫和 5 次腹腔加强免疫, 雌小鼠产生良好的免疫应答。其抗血清用未经免疫的雌小鼠脾细胞吸收后, 经细胞毒性法检测, H-Y 抗血清的效价可达 1:1024; 选择免疫应答最好的 2 只雌小鼠, 取其脾细胞与 NS-1 骨髓瘤细胞进行融合, 融合率 100%, 经 3 次有限稀释克隆后, 取 4 只阳性最强的杂交瘤细胞制备腹水。取其中一株的腹水采用胚胎细胞毒法进行特异性鉴定, 结果其对 20 个正常胚胎中的 7 个有杀伤溶解现象。4 株细胞系分泌的抗体(腹水)以精子细胞毒法测定其效价分别为 1:512, 1:512, 1:256 和 1:128。

关键词 H-Y 抗原; 单克隆抗体; 间接免疫荧光; 胚胎细胞毒

中图分类号 S852.43

H-Y 抗原早在 1955 年由 Eichwald 和 Silmser 发现并描述 (Billingham et al, 1958), Billingham 等 (1968) 进一步证实了这种抗原的存在, 并称其为 H-Y 抗原 (histocompatibility antigen y)。H-Y 抗原在哺乳动物仅存在于雄性细胞表面, 为哺乳动物雄性特异性抗原 (李宝森等, 1991)。Goldberg 等 (1971) 发现了 H-Y 抗血清对精子具有细胞毒作用, 且这一活性可被雄性细胞吸收。这一发现促进了 H-Y 抗原的广泛研究, 并由此建立以精子细胞毒法进行检测 H-Y 抗体效价的方法。Kraco 等 (1976) 首次证实了 H-Y 抗原在 8- 细胞期雄性胚胎细胞开始表达, 而雌性胚胎则否。这两项发现奠定了 H-Y 抗原在哺乳动物性别控制上的研究基础。但由于 H-Y 抗原是一种弱的次要组织相容性抗原, 其抗原决定簇是由一种带有一个半乳糖末端残基的糖基所决定的 (Shapiro et al, 1981) 和哺乳动物雄性特异性抗原的异质性 (McEvoy, 1992), 这就决定了用一般免疫方法所制备的 H-Y 多克隆抗体的效价低和特异性差, 从而影响了 H-Y 抗体在哺乳动物性别控制研究上的准确性。国外 80 年代起有 H-Y 单克隆抗体的报道, 但均未见其制备的具体方法。国内黄华墚等 (1986)、曹文广等 (1993) 分别报道了用免疫后的 C57BL/6 雌小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 克隆出能分泌 H-Y 抗体的细胞株。但由于 C57BL/6 雌鼠的脾细胞与 SP2/0 瘤细胞不是来自于同系小鼠, 由此建立起来的细胞系稳定性差 (Harrell, 1982)。本试验目的就是对 H-Y 单克隆抗体的制备方法进行探索, 试图建立起能分泌亲和力高, 稳定性强, 特异性强的 H-Y 抗体杂交瘤细胞株。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Balb/c 小鼠和昆明小鼠 (以下简称小鼠) 来自第一军医大学实验动物中心。

1995-01-05 收稿, 1995-10-23 收修改稿

* 现通讯地址: 中国科学院昆明动物研究所免疫室, 昆明, 650223

1.2 实验方法

1.2.1 免疫 雄小鼠脾细胞的制备方法(刘玉斌等, 1989): 无菌取出雄小鼠脾脏, 碾碎后过 100 目钢网, 用无菌 PBS 冲下细胞, 离心洗涤两次, 调制成细胞悬液(1×10^9 个/L)。雄小鼠皮肤组织悬液的制备: 无菌割取去毛后雄性小鼠背部皮肤, 剪碎, 用含有抗菌素的 PBS 制成皮肤组织悬液。选 10 只 6~8 周龄的雌小鼠, 乙醚麻醉, 左侧近脊柱手术拉出脾脏, 沿脾脏长轴, 注入雄小鼠脾细胞悬液 0.1 mL 后, 将脾脏送入腹腔, 用 502 胶水封伤口, 一周后用雄小鼠皮肤组织悬液进行腹腔免疫, 每次剂量为 0.2 mL, 每周一次, 连续 5 次, 以精子细胞毒试验检测血清抗体效价(施舍尔, 1989)。在检测前抗血清用未免疫的同系雌小鼠脾细胞吸收, 选抗血清效价最高的两只小鼠在融合前再加强免疫一次。

1.2.2 细胞融合 脾细胞的制备: 加强免疫 3 d 后的 2 只雌小鼠, 眼眶放血致死, 无菌取出脾脏, 碾碎后过 100 目不锈钢网, 用无血清 RPMI-1640 培养基冲下细胞, 离心洗涤 2 次, 制成 RPMI-1640-脾细胞悬液, 取样计数活细胞, 备融合用。

NS-1 骨髓瘤制备: 快速解冻后的 NS-1 细胞, 用无血清 RPMI-1640 培养基洗涤 2 次除去冷冻保护剂, 在 RPMI-1640 完全培养基中传代培养, 取生长对数期的瘤细胞计数, 备融合用。

细胞融合: 将洗涤好的脾细胞与 NS-1 细胞以 5:1 的比例混合, 离心去上清, 加总量 0.5 mL 的 50%PEG(MW1400, Sigma) 溶液, 于 1 min 内边加边摇动逐滴加入混合细胞中, 静置 90 s 后于 5 min 内缓缓加入 10 mL RPMI-1640 培养基, 静置 10 min, 离心去上清, 用含 HAT(50 倍, Sigma) 的完全培养基调整细胞密度至 1×10^9 个/L, 接种于已种有饲养细胞的(前 1 d 接种)5 块 96 孔培养板中, 每孔加 0.1 mL(以上均在室温下进行)。将细胞置于 37 °C, 5% CO₂, 100% 湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.3 阳性孔筛选 快速解冻奶牛冻精颗粒(广州市奶牛所提供), 用 PBS 洗涤 2 次后, 调整精子密度至 1×10^8 个/L, 涂片、甲醇固定, 干燥后滴加杂交瘤细胞培养上清, 每片设对照, 对照滴加 RPMI-1640 完全培养基, 置于湿盒中 37 °C 作用 1 h 时, 用 PBS 冲洗, 干燥后滴加第二抗体—兔抗鼠 Ig 荧光抗体(1:20, 军事医学科学院), 置湿盒中再作用 1 h, 用 PBS 漂洗, 冲去多余的荧光单抗, 置荧光显微镜下镜检。

1.2.4 克隆及抗体的制备 把阳性孔的细胞克隆从培养板中取出, 采用液相有限稀释法克隆 3 次(杨景山, 1989)。选择阳性最强的单克隆细胞, 扩大培养。6~8 周龄雌小鼠腹腔注射 0.5 mL Pristane (Sigma), 一周后腹腔注射 4×10^9 个/L 阳性杂交瘤细胞, 2 周后采集腹水。

1.2.5 单克隆抗体的特异性检测 小鼠胚胎的收集: 挑选 8~10 周龄的昆明雌小鼠, 每只腹腔注射 PMSG 10IU, 48 h 后再腹腔注射 HCG 10 IU, 随后与雄小鼠合笼交配, 第 2 d 早晨 8 点检查阴道栓, 以出现阴道栓的当天为零天, 3 d 后从输卵管伞部冲取胚胎, 冲胚液为 RPMI-1640 完全培养基。

胚胎细胞毒试验: 在倒置显微镜下对冲出的 8 细胞期至桑椹期胚胎进行观察分级。选取发育良好, 轮廓清晰, 细胞形态完整的胚胎用于实验, 供试胚胎在 50 μL 抗体和 0.1 mL 冲胚液中于 37 °C 温育 45 min, 然后加入 1:10 稀释的补体 50 μL(补体效价为 1:32)再继续作用 45 min, 对照组加未经免疫的雌小鼠血清, 其余同, 于倒置显微镜下观察胚胎被杀伤溶解的结果。

1.2.6 单克隆抗体的效价检测 以精子细胞毒法检测, 同上。

2 试验结果

2.1 H-Y 抗原的免疫应答

取经 1 次脾内免疫和 5 次腹腔免疫的雌小鼠血清, 用未经免疫的雌小鼠脾细胞吸收, 除去非相关抗体, 以牛精子为靶细胞, 抗血清、牛精子在 37 ℃ 温育 45 min, 加入补体继续温育 45 min, 采用细胞毒法测其效价。抗血清的检测结果见表 1。

表 1 抗血清对牛精子存活情况的影响⁽¹⁾

| 组 别 | 稀 释 度 | | | | | | | | | |
|-----|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 | 1:2048 |
| 实验组 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | — | — |
| 对照组 | ++++ | ++ | ++ | — | — | — | — | — | — | — |

(1) 活精子全部死亡判为“++++”, 80% 死亡判为“++”, 50% 死亡判为“++”, 20% 死亡判为“+”。

2.2 阳性杂交瘤细胞系的建立和腹水的制备

2.2.1 细胞融合 免疫后的雌小鼠脾细胞与 NS-1 骨髓瘤细胞融合后, 接种于 96 孔培养板培养, 3 d 后所有的培养孔均有克隆生长, 融合率(有克隆生长孔数/接种有细胞孔数)为 100%。

2.2.2 阳性孔的克隆 对 16 孔阳性细胞以有限稀释法进行克隆, 选择阳性最强的 4 株再克隆 2 次, 4 株细胞阳性克隆率(阳性孔数/有克隆生长孔数)分别为 100%、100%、97%、95%。

2.2.3 腹水的制备 把阳性细胞接种于 6~8 周龄的雌小鼠腹腔中, 得到了 4 株细胞系的腹水。

2.3 单克隆抗体的特异性检测

发育正常的小鼠胚胎, 在先后与加入的抗体和补体温育后, 在倒置相差显微镜下观察, 凡胚胎轮廓清晰, 形态正常, 细胞圆满, 细胞质均匀。分裂球体积一致。定为正常胚胎; 相反, 轮廓不清, 细胞形态不正常, 细胞质不均匀, 定为胚胎被抗体所杀伤。结果见表 2。实验组和对照组差异显著($P < 0.05$)。

2.4 单克隆抗体效价的检测

以精子细胞毒法检测单克隆抗体的效价, 抽出的腹水在检测前离心(1 000 r/min), 细胞冻存和扩增培养。上清为抗体, 4 株细胞所分泌的单克隆抗体的效价分别为 1:512、1:512、1:256 和 1:128。

3 讨论

H-Y 抗原与 HLA 和 H-2 抗原相比是一种弱的次要组织相容性抗原。次要组织相容性抗原的免疫原性较弱, 引起的免疫反应慢而弱(郑武飞, 1989)。Heslop(1989)认为 H-Y

表 2 单克隆抗体对小鼠胚胎的影响

| 组别 | 胚胎总数 | 异常胚胎数 | 正常胚胎数 |
|-----|------|-------|-------|
| 实验组 | 20 | 7 | 13 |
| 对照组 | 20 | 0 | 20 |

抗原较易引起T淋巴细胞应答但不能有效地刺激B细胞应答。Shapiro等(1981)提出由血清学确定的H-Y抗原决定簇是由一种带一个半乳糖末端残基的糖基决定,通常难以获得高滴度的H-Y抗体。有关的试验也表明,H-Y的抗血清的效价一般为1:8~1:16(曹文广,1993),这也证明了H-Y抗原的弱免疫原性。不同品系的小鼠H-Y抗原的免疫应答性不同,其中以C57BL/6的免疫应答性最强,其他品系小鼠的免疫应答性较弱(林剑,1982)。因而,制备H-Y抗血清(田国才,1981)和自Koo等(1981)建立能分泌H-Y抗体的杂交瘤细胞系大都采用C57BL/6雄小鼠脾脏细胞免疫同系雌小鼠制备抗血清和用免疫后获得的雌小鼠脾细胞与NS-1或SP2/0骨髓瘤细胞融合建立杂交瘤细胞系。所以提高雌小鼠对H-Y抗原的免疫应答性是建立杂交瘤细胞系的关键。如前所述,要想使建立起来的杂交瘤细胞系稳定性强,则最好采用Balb/c小鼠的脾细胞与NS-1或SP2/0骨髓瘤细胞融合建系。本试验用Balb/c雄小鼠的脾细胞作脾内直接免疫,随后用皮肤组织悬液腹腔加强免疫同系雌小鼠。抗血清用精子细胞毒法测定为1:1024,获得了较好的免疫效果,这为建立分泌H-Y抗体的杂交瘤细胞系奠定了良好的基础。

由于H-Y抗原的性质,在建立杂交瘤细胞系的阳性孔检测过程中,没有灵敏准确的检测方法,则不易检测到阳性克隆孔。黄华墚等(1986)在建立能分泌H-Y单克隆抗体的杂交瘤细胞系时,以C57小鼠的脾细胞作靶细胞,用ELISA进行阳性孔检测,然而其免疫时所使用的抗原也是雄小鼠的脾细胞,这就很难避免因组织相容性抗原个体间的差异和哺乳动物雄性特异性抗原的异质性所产生的假阳性。曹文广等(1993)同样用ELISA和细胞毒法进行阳性孔检测,但未说明所使用的是何种靶细胞。鉴于H-Y抗原为组织相容性抗原和在进化上的高度保守性与稳定性(Watchel et al,1975),本试验在检测阳性孔时采用间接免疫荧光法,靶细胞用奶牛精子,这是因为小鼠与奶牛进化上的亲缘关系较远,非相关抗原的同源性较低,上清中非相关抗原的抗体不易与牛精子发生反应;而小鼠和牛H-Y抗原进化上的保守性,则小鼠与牛的H-Y抗原结构上相同(或相似)。这样在阳性孔检测时,杂交瘤细胞分泌的抗体能同牛精子结合,再结合荧光二抗后,在荧光显微镜下镜检,发出荧光,则说明上清中结合到牛精子的抗体为H-Y抗体的可能性最大,而为其他杂抗的可能性最小,同时,在检测时为了避免因非特异性吸附所产生的假阳性。本试验采用每玻片均设置对照,判断阳性时以比对照高两个“+”号为准。而且,对于比对照高两个“+”的阳性孔,以3个人的观察判断为准。

细胞融合后的第3d,接种的5块培养板皆肉眼可见到细胞克隆。每孔所长的克隆数多为2~3个,而且融合率100%,这是其他实验所不多见的。这可能是因为所使用的骨髓瘤细胞生长繁殖能力强所致。为避免因非骨髓瘤细胞与脾细胞的融合形成假阳性,在第2次克隆过程中所用的培养基仍为HAT培养基。

由于哺乳动物雄性特异性抗原的异质性,尽管在阳性孔检测时采用上述方法检测,克隆到的阳性杂交瘤细胞为能分泌H-Y抗体的细胞可能性最大,但仍需进一步确定其特异性。Krci等(1976)用细胞毒法发现8细胞期胚胎半数H-Y阳性以来,随后小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、猪和牛等动物上证明雄性胚胎发育到8细胞期至囊胚期有H-Y抗原的表达,把采用细胞毒法或间接免疫荧光法鉴定为H-Y阴性的胚胎移植,生雌性后代的准确率在80%以上(陈云鹤等,1993)。因此,本试验以小鼠胚胎细胞作为靶细胞,用细胞毒法检测所制备的

单克隆抗体是否是 H-Y 抗体。制备的单克隆抗体能杀伤溶解其中随机分组的 8 细胞期至桑椹胚期的胚胎, 而对照无, 故认为所制的单克隆抗体为 H-Y 抗体。如能用小鼠特异的 SRY 作探针, 进一步检测被杀伤的胚胎和形态完整的胚胎, 则更能确认单克隆抗体的特异性。

检测 H-Y 抗原抗体的方法可用补体依赖细胞毒法、ELISA 和放射免疫法等测定。但补体依赖的精子细胞毒法最为常用(曹鹤年, 1987)。故本试验采用精子细胞毒检测抗血清和腹水 H-Y 抗体的效价。另外, 采用此法检测腹水的效价有助于说明已制备的单克隆抗体的特异性, 这是因为其和 H-Y 抗血清一样水精子具有细胞毒作用。

本试验是对 H-Y 单克隆抗体制备方法的初步研究。H-Y 抗原是一种次要的组织相容性抗原, 免疫原性弱, 能否提高 H-Y 抗原的免疫应答性, 采用适当的方法检测阳性细胞株及用特异性强的方法鉴定所制备的单克隆抗体的特异性是建立能分泌 H-Y 抗体的杂交瘤细胞系的关键。本试验所获得的 4 株阳性细胞系, 还需进一步纯化和检测其分泌的单克隆抗体, 以便能更有效的应用于哺乳动物性别控制的研究和 H-Y 抗原的检测。

参 考 文 献

- 田国才. 1981. H-Y 抗原的研究现状. 国外医学: 免疫学分册, 4(5): 225 ~ 235
- 李宝森, 胡庆宝. 1991. 遗传学. 天津: 南开大学出版社, 544 ~ 548
- 刘玉斌, 苛仕金. 1989. 动物免疫学实验技术. 长春: 吉林科技出版社, 288 ~ 294
- 陈云鹤, 门红升, 周星良. 1993. 间接免疫荧光法鉴别奶牛胚胎性别的研究. 动物学研究, 14(3): 246 ~ 250
- 杨景山. 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学大学出版社, 463
- 林 剑. 1982. 免疫遗传学基础. 北京: 北京大学出版社, 130 ~ 134
- 郑武飞. 1989. 医学免疫学. 北京: 人民卫生出版社, 252
- 施舍尔. 1989. 细胞免疫学方法选编. 张叔人等译. 北京: 北京卫生出版社, 276 ~ 278
- 黄华樑, 宁益华, 陈 艾. 1986. 抗 H-Y 抗原单克隆抗体的研究. 遗传, 8(2): 43
- 曹文广, 董 伟, 毛 烨. 1993. 应用 H-Y 单克隆抗体鉴别小鼠和家兔胚胎性别. 畜牧兽医学报, 24(3), 505 ~ 511
- 曹鹤年. 1987. H-Y 抗原的血清学检测及意义. 上海免疫学杂志, 7(3): 155 ~ 158
- Billingham R E, Silvers W K. 1958. Induction of tolerance of skin isografts from male donors in female mice. Science, 128: 780 ~ 781
- Billingham R E, Silvers W K. 1968. Studies on tolerance of the Y chromosome antigen in mice. J Immun, 85:14 ~ 26
- Goldberg E H, Boyse E A, Bennett D, et al. 1971. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. Nature, 232: 478 ~ 480
- Harrell G R John. 1982. Monoclonal hybridoma antibodies. New York: CRC Press Inc, 5 ~ 38
- Heslop B F, Bradley M P, Baird M, et al. 1989. A proposed growth regulatory function for the serologically detectable sex-specific antigen H-Y. Hum Genet, 81:99 ~ 104

- Koo G C, Tada N, Chaganti R, et al. 1981. Application of monoclonal anti H-Y antibody for human typing. *Hum Genet*, 57:64 ~ 67
- Krco C J, Goldberg E H. 1976. H-Y(male) antigen: detection on eight-cell mouse embryos. *Science*, 193:1134 ~ 1135
- McEvoy J D. 1992. Alteration of the sex ratio. *Animal Breeding Abstracts*, 60(2):98 ~ 111
- Shapiro M, Erickson R P. 1981. Evidence that the serological determinant of H-Y antigen is carbohydrate. *Nature*, 290:503 ~ 505
- Wachtel S S, Koo G C, Boyse E A, et al. 1975. Evolutionary conservation of H-Y(male) antigen. *Nature*, 254:270 ~ 272

PREPARTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST H-Y ANTIGEN

Zhang Yongzhen¹ Zhang Shouquan¹ Peng Liangping²

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

2 Dept. of Immunology, The First Militatry Medical Univ.)

Abstract

After Balb/c female mice were primarily immunized by intra-splenic injection of Balb/c male splenocytes, and then by intraperitoneal injection of male minced skin tissue for five times, they mounted a high immune response. The sera collected from immunized female mice were absorbed by splenocytes from non-immunized female mice, and were subjected to sperm cytotoxicity test giving a titer of 1024. NS-1 cells and splenocytes from immunized mice were fused in 50% PEG. The fusion rate was 100%. After being cloned three times by limiting dilution, four clones of hybridomas that could secret monoclonal antibodies were obtained. The specificity of monoclonal antibodies were determined by embryo cytotoxicity test. The titers of monoclonal antibodies detected with the method described above were 1:512, 1:512, 1:256 and 1:128 respectively.

Key words H-Y antigen; monoclonal antibodies; indirect immunofluorescence; embryo cytotoxicity test

*Present address: Dept. of immunology, The Kunming institute of Zoology, Academia Sinica, Kunming, 650223