

人鼠嵌合抗体重链基因转染小鼠骨髓瘤细胞的初步研究* 1)

杨志兴 杨学成 王革伏 陈虹 刘伟民 张云湖

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨)

本文介绍了通过人鼠嵌合抗体重链基因转染小鼠骨髓瘤 J558L 的研究, 较详尽地阐述了用原生质体融合法将重组的人鼠嵌合抗体重链基因转染到 J558L 骨髓瘤细胞中, 并用 ELISA 法检测转染子的过程和方法。同时简要地说明了影响转染率的一些因素。

关键词: 人鼠嵌合抗体, 转染, 骨髓瘤 J558L

向哺乳动物细胞转移外源的 DNA, 已经成为研究真核细胞基因表达的一种有效途径。转移基因的方法国外已有许多报道, 如磷酸钙沉淀转移技术^[3]、DEAE-葡聚糖技术^[8]、显微注射技术^[2]等。其中应用最为广泛的是磷酸钙沉淀法, 它具有简单、快速的优点。但若以骨髓瘤细胞作为受体时, 其转染率则较低 (Morrison 私人通信)。而原生质体融合技术最先由 Schaffner 提出^[7], 后来经过不断地改进与完善, 对骨髓瘤细胞其转染率较磷酸钙技术要高 10—20 倍^[5]。原生质体融合转染法可以克服哺乳动物细胞用其它方法吸收和表达外源 DNA 中所遇到的一些问题, 可直接筛选在真核细胞中进行基因表达的重组质粒, 因此, 这种方法是一种很有效地转移 DNA 的技术^[5, 9]。

本文的目的在于采用原生质体融合技术, 研究人鼠嵌合抗体重链基因在骨髓瘤细胞中的转染和初步表达, 试图建立人鼠嵌合抗体基因转染骨髓瘤的方法。

材料与方 法

(一) 实验材料

1. 细胞株 骨髓瘤细胞株 J558L (本身能合成免疫球蛋白 λ 轻链多肽, 但不分泌到细胞外) 由美国哥伦比亚大学 Morrison 教授提

供。

2. 供体菌株 *E. coli* HB101, 带有含人鼠嵌合抗体重链基因的 pSV₂ Δ H_{gp1} S₁₀₇V_HH_uG₄ 质粒, Morrison 教授提供。

3. 细胞长生培养基 IMDM (Iscove's Modification of Dulbecco's Medium) + 1% 庆大霉素 + 1% 制霉菌素 + 10% 马血清 (也可用小牛血清)。其中 IMDM 也可以用 DME 代替 (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)。

4. H × M 选择培养基 十次黄嘌呤 (0.45 μ g/ml) + 黄嘌呤 0.03mg/ml + 霉酚酸 (0.6mg/ml), 通常用 H × M 表示。

5. 羊抗人 IgG 辣根过氧化物酶标的绵羊抗人 IgG, 由北京生物制品所购入。

6. 溶菌酶溶液 5mg/ml 溶在 250mmol/L Tris 溶液 (pH8.0)。Sigma 公司进口。

7. PEG-DMSO, 41.7% PEG1500-12.5% DMSO-100mmol/L Tris, pH8.0、用 DME

Yang Zhixing et al.: Study on Mouse Myeloma Transfected by Human-Mouse Chimeric Antibody Heavy Chain Gene

* 本项研究为国家自然科学基金资助项目。

1) 美国哥伦比亚大学 S. L. Morrison 教授给予热情指导并提供主要实验材料; 本所李文贤向立时参加部分工作, 在此一并致谢。

本文于 1989 年 3 月 20 日收到。

配制。由 Morrison 教授提供。

(二) 方法

1. 细菌的培养^[5] 接种 *E. coli* HB101 (带 pSV₂ΔH_{gp1}V_HH₀G₄ 质粒)于 LB 液体培养基中,含 50μg/ml 的氨基苄青霉素, 37°C 振荡培养过夜。第二天以 10¹⁰ 接种量接于 100ml LB 培养液中, 37°C 振荡培养至 OD 600 达到 0.5, 加入氯霉素至终浓度 125μg/ml, 培养 12 小时, 扩增。

2. 原生质体的制备^[5] 取上述培养的细菌, 加到灭菌的离心管中, 4000 × g 离心 15 分钟, 取沉淀, 按每个 OD600 加 10ml 蔗糖-溶菌酶溶液使其终浓度分别为 2% 和 0.5mg/ml, 轻轻摇动, 置冰上 5 分钟, 加入 2ml 冷的 250 mmol/L EDTA (pH8.0) 轻轻旋动, 37°C, 保持 8 分钟 30 秒。然后分四次加入 40ml 的 10% 超纯蔗糖-10mmol/L MgCl₂-DME (5ml、5ml、10ml 和 20ml) 室温放置 30 分钟, 备用。

3. 原生质体与骨髓瘤细胞的融合^[5,9] 取生长状态良好的骨髓瘤 J558L 细胞悬液 5ml (10 细胞/ml), 2000 × g 水平离心 7 分钟, 吸掉培养基, 用 DME 洗一次。加入 5ml 上述的细菌原生质体悬液, 悬浮细胞沉淀物, 混匀, 2000 × g 室温下离心, 7 分钟, 弃去上清。弹松沉淀, 加入 0.5ml PEG-DMSO 液, 室温振荡 1 分钟, 加入 0.5ml 25% PEG-100mmol/L Tris (pH8.0), 摇动 2 分钟。然后加入预先保温的 DME 10ml, 稀释细胞悬液, 2000 × g, 室温离心 6 分钟, 弃去上清液, 向沉淀中滴加 12ml 细胞的生长培养液。混匀后在 96 孔培养板的每孔中加 2 滴, 于 CO₂ 培养箱中 37°C 培养。在融合中, 所使用的 J558L 骨髓瘤细胞为 2 × 10⁵, 而原生质体约在 2 × 10⁹。

4. 转染子的筛选 经上述转染的细胞在 37°C 培养 2 天后, 在每孔加 2 滴选择培养基, 又经过 4 天后, 吸出一半培养基, 补加新鲜的选择培养基。其后, 不定期地用选择培养基换液。

5. 抗体的检测 经上述转染的细胞在 37°C 培养后, 检测抗体。采用 ELISA 法^[3] 检测转染子所表达的嵌合抗体。具体方法与步骤如

下:

(1) 培养上清液中抗体的检测

J558L 和转染子 E₁ 上清液各 20ml
↓
加入 20ml 饱和硫酸铵 (pH7.0)
在 4°C, 放置 30 分钟, 5000rpm 离心 20 分钟
↓
沉淀物
↓
加 10ml 生理盐水、5ml 饱和硫酸铵
重复离心一次
↓
沉淀物
↓
溶解后
加 0.01mol/L PBS (pH7.4) 透析过夜
↓
透析液
↓
加入 400μl 10% 的金黄色葡萄球菌蛋白 A (菌体形式)
放冰上 15 分钟, 离心 2 分钟, 5000 rpm
↓
沉淀物
↓
用 PBS 液洗一次。离心
↓
沉淀物
↓
加入 400μl 酶标羊抗人 IgG, 在 37°C 保温 2 小时, 用 PBS-吐温 20 液 5 次, 加底物邻苯二胺 200μl, 室温保持 30 分钟, 加 H₂SO₄ 至 1mol/L 终止反应
↓
反应物在 OD_{492nm} 测定

(2) 细胞表面抗体的检测

J558L 和转染子 E₁ 的培养细胞
↓
用 PBS 液洗涤 2 次, 离心, 再用冰冷的 0.1% 戊二醛溶液处理 30 分钟, PBS 液洗 2 次。离心
↓
沉淀的细胞
↓
悬浮在 1% 的 BSA-0.1mol/L 甘氨酸-PBS 液中, 20°C 保温 1 小时, 离心, 再用 PBS 液洗 2 次, 计数细胞, 调浓度至 1 × 10⁵ 个/ml。
↓
1 × 10⁵ 个细胞
↓
加入到 55 个孔的细胞培养板中, 50 μl/孔, 37°C 保温 16—20 小时, 使溶液蒸发, 细胞固定在孔底部, 再用 PBS 液洗 2 次
↓
孔中的细胞
↓
每孔加入 200μl, 0.5—1% 的 BSA, 在 20°C 保温 20—60 分钟后, 用 PBS 洗 2 次, 每孔中加入 50μl 酶标的羊抗人 IgG, 37°C 保温 2 小时再用 PBS-吐温 20 洗 5 次

孔中细胞

加入底物邻苯二胺 $50\mu\text{l}$, 室温保持 30 分钟, 可见棕色出现, 加入 H_2SO_4 至 1mol/L , 终止反应
在 492nm 中测定 OD 值

结果与讨论

本文中, 在转染时所使用的表达载体为 $\text{pSV}_{2\text{gpt}}$ 的衍生载体, $\text{pSV}_2\Delta\text{H}_{\text{gpt}}\text{S}_{107}\text{V}_\text{H}\text{H}_\text{u}\text{G}_4$, 是由 *E. coli* 的黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核苷转移酶基因 (*gpt*), 质粒 pBR322 的氨基苄青霉素抗性基因和复制起始位点以及 SV_{40} 病毒的转录调控基因构成的质粒^[9], 如图 1 所示。利用 *Bam* HI 切点插入小鼠单抗 V_{107} 可变区基因与人的 γ_4 恒定区基因。其中的 *gpt* 基因作为真核受体细胞中的选择系统, 由于外源加入霉酚酸阻断了骨髓瘤细胞的由次黄嘌呤向黄嘌呤核苷酸的转化, 而供体 *E. coli* 的 *gpt* 选择系统可以利用外源加入的黄嘌呤和次黄嘌呤作易合成嘌呤核苷酸的底物, 所以只有与 *E. coli* 原生质体融合的骨髓瘤细胞在选择培养基上生长, 而其它未被转染的细胞则不能存活而死亡^[5,9]。

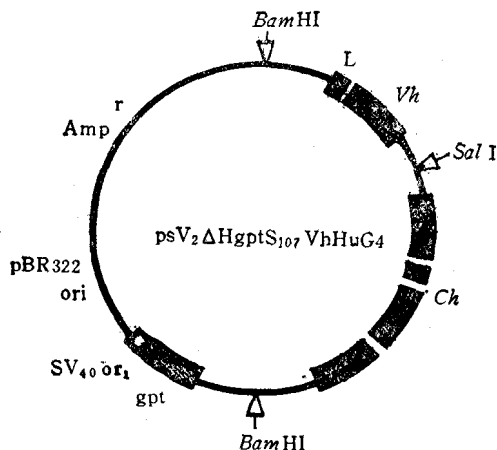


图 1 转染质粒 $\text{pSV}_2\Delta\text{H}_{\text{gpt}}\text{S}_{107}\text{V}_\text{H}\text{H}_\text{u}\text{G}_4$ 的结构图
L, 引导肽基因, V_H 重链可变区基因, C_H , 重链恒定区基因, 细线部分为 $\text{pSV}_{2\text{gpt}}$ 质粒。

在载体中的 SV_{40} 早期启动子可使外源插入的免疫球蛋白基因在真核细胞中表达^[4]。同时我们选择骨髓瘤 J558L 作为受体细胞是因为转染的免疫球蛋白重链基因在骨髓瘤中表达后能与其内源的免疫球蛋白 λ 轻链装配成完

整的抗体分子, 经糖基化后, 可以分泌到细胞外^[5,9]

通过上述实验, 转染子经过选择培养基上培养 1 周后, 发现有些孔内有单个的活细胞, 并开始增殖、形成克隆, 在两周后, 可分出细胞。我们在 96 孔培养板中得到 41 株转染成功的转染子, 并对其中 6 株作了分析。在检测抗体中, 发现 2 株 (B_{11} 和 E_1) 具有抗体分泌, 如表 1 所示。转染子 E_1 细胞株能够合成人鼠嵌合抗体。同时我们也可从照片上看出转染子细胞在形态上, 大小上有些差别, 即较对照的 J558L 骨髓瘤细胞明显大些, 而表面不如对照的整齐光滑 (见图 2)。

表 1 用 ELISA 法检测抗体的结果

项目	OD 值	J558L 细胞株(对照) $\text{OD}_{492\text{nm}}$	E_1 转染细胞株 $\text{OD}_{492\text{nm}}$
培养上清液		0.060	0.120
细胞表面		0.110	0.401

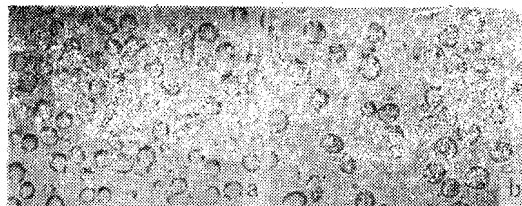


图 2 转染与对照的骨髓瘤细胞 a. 为骨髓瘤 J558L 细胞; b. 转染子 E_1 。

参 考 文 献

- [1] 洪锦心等: 1986. 中华医学检验杂志, 9(3): 162。
- [2] Diacumakus, E. G.: 1973. *Methods in Cell Biology*, 7: 287.
- [3] Graham, F. L., et al.: 1973. *J. Virology*, 52: 455.
- [4] Hames, B. D. & S. J. Higgins: 1984. in: *Transcription and Translation. A practical approach*. IRL Press. Oxford. England pp. 54—124.
- [5] Morrison S. L.: 1985. *Science*, 229: 1202—1207.
- [6] Rassoulzadegan M. B. and F. Gugjin: 1982. *Nuure*, 295: 257.
- [7] Schaffner, W.: 1980. *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 2163.
- [8] Vaheri, G. K. and E. G. Pagano: 1973. *Virology*, 27: 435.
- [9] Vernon, T. Oi & S. L. Morrison: 1986. *Chimeric Antibodies Biotechniques*, 4: 3.