

抗 HBs 单克隆抗体的制备及初步应用

传染病研究所 吕新法 吴健敏 赵忠良 胡中荣

内容提要 利用冻融裂解 Dane 颗粒的方法提取 HBsAg, 免疫小鼠后, 取其脾细胞与 FO 骨髓瘤细胞融合, 获得 4 株分泌抗 HBs McAb 的杂交瘤细胞株。接种同系小鼠腹腔诱生的腹水用 ELISA 测定抗 HBs 效价达 $3.2 \sim 6.4 \times 10^6$ 。所制成的抗 HBs McAb 与纯化 HBsAg、高滴度 HBsAg 阳性血清能产生沉淀反应。用 HRP 标记的抗 HBs McAb 作 ELISA 测定血清 HBsAg, 与用放射免疫检测的 30 份血清及用北京 302 医院 EIA 试剂测试的 40 份血清的结果符合。

关键词 单克隆抗体/生物合成; 乙型肝炎表面抗原/血液; 乙型肝炎/诊断; 酶连接免疫吸附测定; 杂交瘤

HBsAg 检测是临床上诊断乙型肝炎的最常用的指标之一, 有助于乙型肝炎临床诊断和流行病学调查的深入研究。本文报告了我们研究建立的 4 株分泌抗 HBs McAb 杂交瘤细胞株的生物学特性及初步应用结果。

1 材料与与方法

1.1 杂交瘤细胞株的建立

1.1.1 HBsAg 的制备: 取对流免疫电泳滴度为 1:64 的 HBsAg 阳性血清 200ml, 于 4℃ 10500 r/min 离心 30min, 取上清, 加生理盐水倍量稀释后, 置 4℃ 40000 r/min 离心 3h, 收集沉淀, 冻融裂解处理^[1]后作为免疫用抗原, 蛋白含量为 2.43mg/ml。

1.1.2 免疫 BALB/c 小鼠: 取 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 将弗氏完全佐剂乳化抗原注射于四肢皮下, 2.673mg/鼠, 间隔 28d 同法重复注射一次。初免 80d 后, 经尾静脉注射 2.43mg 抗原加强免疫。

1.1.3 细胞融合及培养: 加强免疫后 96h, 无菌取脾, 制成细胞悬液与小鼠 FO 骨髓瘤细胞融合, 融合剂为 PEG 4000, 将细胞分配

于用 HAT 选择性培养基的 96 孔培养板, 置含 5~7% CO₂ 细胞培养箱中, 37℃ 培养。

1.1.4 克隆的选择: 采用 ELISA 法检测培养物上清液的抗 HBs。用有限稀释法将初筛抗 HBs 阳性的杂交瘤细胞亚克隆 3 次以上, 直至连续二次全部细胞生长孔均呈抗体阳性反应。严格挑选单克隆细胞, 再进行检测、扩增和冻存。

1.1.5 抗 HBs McAb 的鉴定: 按常规法进行 McAb 特异性、IgG 亚类及杂交瘤细胞染色体的测定。

1.2 检测 HBsAg ELISA 诊断试剂的制备及应用

1.2.1 小鼠腹水 McAb 的纯化与酶标记: 小鼠腹水用 50% 饱和硫酸铵沉淀或亲和层析纯化, 已纯化的各株杂交瘤腹水 McAb 作等量混合, 采用过碘酸钠法^[2], 以辣根过氧化物酶 (Serva 公司产品) 标记。加保护剂后分装, 置 -26℃ 备用。

1.2.2 包被抗体的纯化与选择: 选用对流免疫电泳效价在 1:256 以上的马抗 HBs、羊抗 HBs 和豚鼠抗 HBs 血清依次经硫酸铵沉淀分

级,正常人血清固相柱吸收以及 HBsAg 固相柱层析纯化。比较了纯化的豚鼠抗 HBs、马抗 HBs、羊抗 HBs 和混合 McAb,发现羊抗 HBs 包被最好,OD 值为 1.5,混合 McAb 次之,OD 值为 1.0。

1.2.3 临床血清标本 HBsAg 检测:采用棋盘滴定法,确定包被抗体和酶标抗体的最佳工作浓度,分别为 20 μ g/ml 和 1:2000。用 ELISA 双抗体夹心法检测 70 份血清标本。

2 结果

2.1 分泌抗 HBs McAb 杂交瘤细胞株的检出及其生物学特性 应用以上方法,先后进行了二次细胞融合,三次有限稀释,检出 4 株分泌抗 HBs McAb 的杂交瘤细胞株:Sc III 1、Sc III 3、Sc III 6 和 Sc III 7,经过反复冻存和复苏,连续传代近 6 个月仍然稳定地分泌抗 HBs McAb,并能诱致 BALB/c 小鼠产生腹水,部分生物学特性见表 1。

表 1 4 株杂交瘤细胞株的部分生物学特性

细胞株	染色体数 [*]	Ig 亚型	Mc 抗 HBs 的滴度 ^{**}	
			培养上清	腹水
Sc III 1	104	I _g G ₁	3.2 \times 10 ³	3.2 \times 10 ⁵
Sc III 3	108	I _g G ₁	6.4 \times 10 ³	6.4 \times 10 ⁵
Sc III 6	96	I _g G ₁	3.2 \times 10 ³	3.2 \times 10 ⁵
Sc III 7	87	I _g G ₁	6.4 \times 10 ³	6.4 \times 10 ⁵

* FO 细胞的染色体数为 72 条 ** ELISA 测定

2.2 抗 HBs McAb 的特异性 将腹水纯化的抗 HBs McAb 与经亲和层析纯化的 HBsAg 及高滴度 HBsAg 阳性血清作免疫电泳,均出现肉眼可见的沉淀线,与正常人血清则无反应,表明这 4 个 McAb 具有良好的特异性。

2.3 血清 HBsAg 检测结果 用 ELISA 双抗体夹心法检测血清 70 份,并分别与放射免疫检测试剂(山东 3V 公司)及北京 302 医院

EIA 试剂(亦由单抗组成)对照,结果见表 2、表 3。

表 2 与放射免疫试剂对比检测 HBsAg 的结果

放射免疫试剂 (3V 公司)	羊抗 HBs 包被+Mc 抗 HBs-HRP		
	阳性	阴性	合计
阳性	22	2	24
阴性	0	6	6
合计	22	8	30

表 3 与 302 医院 EIA 试剂对比检测 HBsAg 的结果

EIA 试剂 (302 医院)	羊抗 HBs 包被+Mc 抗 HBs-HRP		
	阳性	阴性	合计
阳性	26	3	29
阴性	4	7	11
合计	30	10	40

3 讨论

检测 HBsAg 的方法有多种,其中 ELISA 较为常用。提高该法质量的关键在于选用高效价和特异性强的抗体。

我们建立的 4 株分泌抗 HBs McAb 的杂交瘤细胞株的染色体数在 87~104 条之间,免疫球蛋白亚类属 IgG₁,对正常人血清成分无反应性,与纯化的 HBsAg 及高滴度 HBsAg 阳性血清作免疫双扩散和免疫电泳时均出现肉眼可见的沉淀线。以羊抗 HBs 作包被抗体、辣根过氧化物酶标记单克隆指示抗体检测 HBsAg,其检测结果与以放射免疫检测 30 份血清及以北京 302 医院 EIA 单抗试剂盒测试 40 份血清的结果均基本一致。

与豚鼠抗 HBs、马抗 HBs、羊抗 HBs 和混合 McAb 所作的包被抗体的配对试验表明,用羊抗 HBs 作包被抗体最佳,混合 McAb 次之,用豚鼠抗 HBs 不够理想,这与刘庆良等^[3]

报道的用豚鼠抗 HBs 作包被最好的结果不一致。分析其原因,可能由于高度纯化的豚鼠抗 HBs 降解所致。采用 ELISA 双抗体夹心法检测抗原时,选择合适的包被抗体与指示抗体十分重要,应用不同的抗体匹配,S/N 值相差可高达百倍^[4-6]。由于 HBsAg 具有 148 个抗原决定簇,不同株 McAb 可能针对不同的抗原决定簇,要想充分发挥 McAb 高度专一的特性,必须进行 McAb-抗原决定簇配对实验。我们所用为各株单抗的等量混合物,如能进行配对实验,然后组装成药盒,其检测灵敏

度可能会更高。

参 考 文 献

1. 吕新法,等. 浙江医科大学学报 1990;19(2): 49
2. Smith AM and Tedder RS. J Virol Methods 1981;3(1): 1
3. 刘庆良,等. 中华微生物学和免疫学杂志 1988;8(2): 89
4. 张华远,等. 中国人兽共患病杂志 1987;3(5): 12
5. Goodall AH, et al. J Immun Methods 1982;52(2): 167
6. 吴绍沉,等. 中华微生物学和免疫学杂志 1987;7(3): 165

(1992年2月20日收稿,同年8月26日修回)

乙型肝炎病毒引起多发性浆膜炎一例

附属儿童医院 汪洁 陈思俊

1 病例摘要

患儿女性,12岁,因咳嗽月余,气促10余天,颜面浮肿3天入院。体检:营养发育中等,呼吸稍促,眼睑浮肿,气管居中,两下肺叩浊,语音减低,呼吸音低,无干湿罗音;心界左乳线外0.5cm,心音稍偏低,心律齐,无杂音;腹软,肝肋下6cm,剑下8cm,质中,脾肋下2cm,腹部移动性浊音阳性。辅助检查:血红蛋白119g/L,白细胞 $13.8 \times 10^9/L$,中性0.29,血小板数 $192 \times 10^9/L$ 。胸片、超声心动图、胸腹B超提示双侧胸腔积液,少量心包积液及腹水。胸水常规:黄色,李凡他试验弱阳性,细胞数 $0.58 \times 10^9/L$,单核0.82,细菌未找到。心电图示广泛T波改变。肝功能正常,血清HBV检查示HBsAg阴性,pre-s₂阴性,抗HBs阳性,抗HBc IgM阴性,抗HBe阳性;胸水HBV检查示抗HBs阳性,抗HBe阳性,PPD试验++~+++ ,血沉三次检查正常,抗核抗体,抗“O”,GOT,CPK,LDH,C-反应蛋白,类风湿因子,免疫球蛋白,补体C₃,T细胞亚群测定均正常。患儿父母亲血清HBV检查:父结果正常,母抗HBs阳性。

入院后以一般抗生素治疗,一周左右,心包积液、腹水消失,胸腔积液明显吸收,后因PPD皮试++~+++ ,考虑结核感染可能,改用雷米封治疗,但胸腔积液在吸收好转的情况下又反复出现,同时又出现少量腹水。胸水HBV检查示抗HBs阳性,抗HBe阳性,考

虑患儿系由HBV感染引起的多发性浆膜炎,停止抗结核治疗,给予维生素,辅酶Q₁₀及护肝治疗一月余,心肌损害渐好转,多发性浆膜炎痊愈出院。随访三个月病情无反复。

2 讨 论

HBV感染时,肝外表现较为复杂。呼吸系统的合并症可有间质性肺炎、胸膜炎、胸腔积液等,但较少见。由HBV引起多发性浆膜炎更是罕见。本例患者胸腔、心包腔、腹腔同时出现积液,胸水检查提示为渗出液,诊断多发性浆膜炎是无疑的。由于患儿起病较缓,无发热,无中毒症状,血沉反复检查均正常,胸腹X线摄片无结核病灶,未给正规抗结核治疗,浆膜腔积液自行消退,故结核性可以排除。根据患儿血、胸水HBV检查结果均为抗HBs阳性,抗HBe阳性,提示与HBV感染有关。HBV感染引起多发性浆膜炎发病机理可能为:①由于HBV直接侵犯多浆膜所致;②可能与循环免疫复合物有关。本例患儿HBV血清学测定提示处于肝炎恢复后期,而多浆膜腔渗出反复出现,难以前者的发病机理解释。根据Bacon等在75%的未经治疗的病例中检测到抗HBs,但未发现有HBsAg,他们推测抗HBs,可能是某种免疫复合物的重要成分。本例检测结果与此相类似,因此考虑其发病机理可能与循环免疫复合物有关。

(1992年5月6日收稿,同年6月1日修回)