

R730.5
DBM
01
R510

80770



单克隆抗体与人兽共患病

戴保民 胡孝素 等 编著

44-14

科学出版社

1989

0-108

内 容 简 介

杂交瘤单克隆抗体技术的创立，促进了现代医学与生物学的研究和发展。现今世界许多国家的科研人员竞相开展此项研究，并在多种疾病的诊断、预防及治疗上已取得很大进展。本书作者参考大量国内外最新研究资料，并结合自己多年科研成果。介绍了单克隆抗体技术在 20 余种人兽共患病中的应用情况及研究成果。书中还介绍了以单克隆抗体作为研究受体的工具及其在 DNA 重组、基因工程疫苗和生物导弹等方面的研究新成果；有四章专述重要的单克隆抗体操作技术。

本书可供临床医生、卫生防疫人员、基础医学和生物技术研究人员及医学院校有关专业师生参考。

EW99/11

单克隆抗体与人兽共患病

戴保民 胡孝素 等 编著

责任编辑 何伟华 姜朋逊

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经营

*

1989 年 8 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

1989 年 8 月第一次印刷 印张：12 1/4 插页：2

印数：0001—2 380 字数：271 000

ISBN 7-03-001053-1/R·43

定价：10.50 元

目 录

序言

前言

第一章 概述	戴保民 (1)
第一节 单克隆抗体简介	1
一、单克隆抗体的理论基础——“细胞系选择学说”的提出和证实.....	1
二、单克隆抗体技术的必要前提——骨髓瘤细胞系的建立.....	2
三、细胞融合和杂交细胞的选择.....	3
四、关于杂交瘤.....	4
五、杂交瘤单克隆抗体的一般应用.....	5
六、单克隆抗体技术用于诊断人兽共患病的优点和缺点.....	6
七、关于人源单克隆抗体.....	8
第二节 人兽共患病简介	10
一、人兽共患病的定义.....	10
二、人兽共患病对人群健康和经济造成的危害.....	11
三、人兽共患病的分类.....	11
四、我国常见的几种重要人兽共患病.....	13
五、人兽共患病的预防措施.....	13
六、单克隆抗体应用于人兽共患病的几个方面.....	13
第二章 单克隆抗体在人兽共患病病毒的应用	戴保民 (16)
第一节 单纯性疱疹	17
一、简介.....	17
二、单纯疱疹病毒的生物学特点.....	18
三、HSV-1 和 HSV-2 型感染的临床特征.....	18
四、HSV感染早期快速定型诊断的必要性.....	19
五、HSV感染的两种早期快速定型诊断方法.....	19
六、荧光抗体法对 HSV 细胞培养物的定型法.....	20
七、单克隆抗体对小鼠单纯疱疹病毒引起神经损伤的保护作用.....	21
八、单克隆抗体用于对 HSV 糖蛋白抗原结构的分析.....	21
九、单克隆抗体在 HSV 遗传学分析中的应用.....	22
第二节 流行性感 冒.....	23
一、简介.....	23
二、流感病毒的生物学特性.....	23
三、流感病毒抗原性的变异.....	24
四 单克隆抗体在流感病毒变异中的应用.....	24

第三节 狂犬病	25
一、简介	25
二、狂犬病病毒的生物学特性	25
三、单克隆抗体用于狂犬病病毒分型	26
四、单克隆抗体在狂犬病病毒变异方面的应用	26
第四节 登革热	27
一、简介	27
二、登革病毒的生物学特性	27
三、单克隆抗体在登革病毒特异性研究中的应用	28
四、单克隆抗体用于快速鉴定登革病毒	29
第五节 日本乙型脑炎	30
一、简介	30
二、日本乙型脑炎病毒的生物学特性	30
三、单克隆抗体用于研究病毒表面抗原及其抗原决定簇	31
四、单克隆抗体用于鉴定日本乙型脑炎病毒的属、亚组和种的特异性	31
五、单克隆抗体在日本乙型脑炎快速诊断中的应用	32
第六节 黄热病	33
一、简介	33
二、黄热病病毒的生物学特性	34
三、单克隆抗体用于鉴别典型病毒株(Asibi YF)与变异株(17 DYE)	34
四、单克隆抗体用于鉴别黄热病病毒及非黄热病病毒的相关病毒	34
第七节 流行性出血热	37
一、简介	37
二、流行性出血热病毒的发现及其生物学特性	37
三、单克隆抗体用于确定两株 Hantaan 病毒间抗原的差异	38
四、单克隆抗体用于我国流行性出血热病毒的抗原分析	38
第三章 单克隆抗体在人兽共患细菌性疾病中的应用 袁保民(41)	
第一节 单克隆抗体在细菌病方面的应用与人兽共患细菌病的分类	41
一、简介	41
二、单克隆抗体在细菌病方面的应用	41
三、人兽共患细菌性疾病的分类	42
第二节 钩端螺旋体病	42
一、简介	42
二、单克隆抗体在钩体分类和血清群(型)检定中的应用	43
三、单克隆抗体用于研究分析钩体抗原及其抗原决定簇	48
四、单克隆抗体在研究钩端螺旋体变异中的应用	53
五、单克隆抗体用于研究钩端螺旋体在宿主体内的分布	54
第三节 布鲁氏菌病	54
一、简介	54

二、布鲁氏菌的生物学特性.....	55
三、单克隆抗体用于鉴定流产布鲁氏菌或牛布鲁氏菌和耶尔森氏小肠结肠炎菌 0:9 型.....	56
四、针对与光滑型脂多糖复合物相关的布鲁氏菌表面抗原的单克隆抗体.....	57
第四节 大肠杆菌病.....	59
一、简介.....	59
二、大肠杆菌的生物学特性.....	59
三、用单克隆抗体鉴定不同来源的不耐热肠毒素 (LT).....	60
四、用单克隆抗体研究大肠杆菌与其他革兰氏阴性菌的交叉反应性.....	62
五、口服大肠杆菌 K99 特异单克隆抗体预防小牛致死性大肠杆菌病.....	63
第四章 单克隆抗体在人兽共患寄生原虫病中的应用.....	65
第一节 利什曼病.....	胡孝素(65)
一、简介.....	65
二、单克隆抗体用于利什曼原虫种、株的鉴定.....	66
三、单克隆抗体在抗原定位及检测白蛉体内原虫方面的应用.....	67
四、应用单克隆抗体检测循环抗原.....	68
五、单克隆抗体的保护性免疫及识别保护性抗原.....	70
六、分离提纯利什曼原虫膜抗原.....	72
七、利什曼原虫与骨髓瘤细胞 SP2/O 的杂交瘤建立及抗原表达.....	73
第二节 弓形虫病.....	胡孝素(73)
一、简介.....	73
二、单克隆抗体用于弓形虫抗原的识别及定位.....	74
三、应用单克隆抗体检测循环抗原.....	74
四、单克隆抗体的保护性免疫.....	75
第三节 疟疾.....	77
一、简介.....	胡孝素(77)
二、单克隆抗体作为抗原识别定位、提纯分析的探针.....	王兴振(78)
三、单克隆抗体在疟原虫种、株鉴定和分型中的应用.....	王兴振(83)
四、应用单克隆抗体检测血液中疟原虫抗原.....	胡孝素(85)
五、单克隆抗体的保护性免疫.....	胡孝素(86)
六、单克隆抗体在疟疾疫苗研制中的应用.....	吕洪刚(90)
第四节 锥虫病.....	胡孝素(93)
一、简介.....	93
二、应用单克隆抗体检测循环抗原及抗原的识别.....	93
三、保护性免疫.....	93
第五节 贾第虫病.....	胡孝素(94)
一、简介.....	94
二、单克隆抗体用于种特异性鉴别.....	94
三、抗贾第虫单克隆抗体产生的细胞毒作用.....	94

第六节	阿米巴病	胡孝素(95)
一、	简介	95
二、	单克隆抗体用于检测阿米巴抗原的优越性	95
第五章	单克隆抗体在人兽共患蠕虫病中的应用	101
第一节	血吸虫病	胡孝素(101)
一、	简介	101
二、	单克隆抗体用于识别抗原及鉴定血吸虫循环抗原	102
三、	单克隆抗体用于血吸虫病诊断及环卵沉淀试验	103
四、	单克隆抗体的保护性免疫作用	104
五、	抗独特型单克隆抗体疫苗在实验性血吸虫病的应用研究	105
六、	血吸虫基因工程疫苗	106
第二节	肺吸虫病	胡孝素(107)
一、	简介	107
二、	用单克隆抗体测定并殖吸虫抗原分子量及检测循环抗原	108
第三节	棘球蚴及多房棘球蚴病	109
一、	简介	胡孝素(109)
二、	单克隆抗体用于提纯抗原及免疫诊断	110
第四节	丝虫病	111
一、	简介	胡孝素(111)
二、	单克隆抗体用于检测循环抗原以诊断丝虫病	胡孝素(111)
三、	抗马来微丝蚴单克隆抗体识别抗原与抑制传播免疫	冯瑞元(112)
第五节	旋毛虫病	冯瑞元(115)
一、	简介	115
二、	以单克隆抗体为探针识别旋毛虫特异抗原	118
三、	应用单克隆抗体纯化抗原诊断旋毛虫病	120
四、	应用单克隆抗体纯化靶抗原免疫动物宿主	120
第六章	单克隆抗体在其他方面的应用	126
第一节	单克隆抗体作为研究受体的工具	吕洪刚(126)
一、	单克隆抗体亲和层析纯化受体	126
二、	单克隆抗体定位受体	126
三、	单克隆抗体研究受体的结构	127
四、	单克隆抗体研究受体的功能	127
第二节	单克隆抗体与 DNA 重组技术及基因工程疫苗	吕洪刚(128)
一、	单克隆抗体与 DNA 重组技术	128
二、	单克隆抗体与基因工程疫苗	129
第三节	单克隆抗体及生物导弹(蓖麻毒蛋白-McAb)在骨髓移植中的应用	戴保民(130)
一、	生物导弹	130
二、	骨髓移植概述	132

三、生物导弹用于骨髓移植	134
四、单克隆抗体用于治疗 aGVHD	135
第四节 单克隆抗体及生物导弹在治疗恶性肿瘤方面的研究	戴保氏(135)
一、单独使用单克隆抗体治疗人恶性肿瘤	135
二、生物导弹用于治疗恶性肿瘤	137
三、展望	138
第七章 杂交瘤单克隆抗体的产生和检测	阎和平(140)
第一节 杂交瘤细胞融合技术	140
一、小鼠骨髓瘤细胞系	140
二、培养液	140
三、血清的选择	141
四、细胞的生长	141
五、细胞融合剂	141
六、动物免疫方法	142
七、细胞融合	142
第二节 杂交瘤细胞融合新技术	143
一、电融合技术	143
二、激光融合技术	144
三、双特异单克隆抗体的制备	144
第三节 杂交瘤细胞的筛选	145
第四节 杂交瘤细胞的克隆化	146
一、有限稀释法	146
二、半固体琼脂培养法	146
三、显微操作法	147
四、荧光激活细胞分离器操作法	147
第五节 单克隆抗体的检测和杂交瘤细胞染色体分析	147
一、单克隆抗体的检测	147
二、杂交瘤细胞的染色体分析	150
第六节 人-人杂交单克隆抗体	150
第八章 单克隆抗体的大量制备、提纯及保存	胡孝素(153)
第一节 单克隆抗体的大量制备	153
一、微囊技术	153
二、动物体内诱生单克隆抗体的方法	153
三、体外培养法	154
第二节 单克隆抗体的纯化: 免疫球蛋白及链、片段的制备、纯化	155
一、中性盐沉淀法	155
二、蛋白 A- 琼脂糖珠亲和层析法	155
三、凝胶过滤	157
四、DEAE 离子交换层析法	157

五、IgG 链、片段的制备、纯化	158
第三节 杂交瘤细胞及单克隆抗体的保存	159
一、杂交瘤细胞的冷冻保存	159
二、单克隆抗体的冷冻保存	160
第九章 单克隆抗体的鉴定、电泳转移及用以检测循环抗原	胡孝素(161)
第一节 单克隆抗体的鉴定	161
一、单克隆抗体的 Ig 类型鉴定	161
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 及 SDS-PAGE	161
三、等电点聚焦电泳 (IEF)	163
第二节 电泳转移	164
一、原理	165
二、电泳转移程序	165
三、单克隆抗体识别特异抗原分子	165
第三节 应用单克隆抗体检测血清循环抗原	166
一、单克隆抗体-抗原斑点试验	166
二、聚乙二醇-酶联免疫吸附抑制试验	167
三、放射免疫聚乙二醇沉淀试验	167
四、免疫放射计量测定	168
五、ELISA 双抗体夹心法	168
第十章 抗体标记技术及抗原定位	170
第一节 免疫酶标记	阎和平(170)
一、常用的标记酶	170
二、酶标记抗体的制备	170
三、酶-抗酶复合物的制备及其应用	171
第二节 放射免疫标记	阎和平(172)
一、基本原理	172
二、放射性碘标记法	173
三、 ³ H 标记法	174
第三节 免疫荧光标记	阎和平(174)
一、常用的标记荧光素	174
二、免疫荧光标记法	175
第四节 胶体金技术	王子龙(175)
一、简介	175
二、胶体金标记蛋白质的原理	176
三、胶体金试剂的制备	176
四、胶体金技术在光镜水平的应用	177
五、胶体金技术在电镜水平的应用	178
术语缩写	181

第一章 概 述

第一节 单克隆抗体简介

近十年来,生物技术(基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程),特别是基因工程,取得了十分可喜的进展。生物技术对医学、生物学乃至人类的未来,已经产生,并将继续产生深刻的影响。单克隆抗体技术的创建和发展,是生物技术革命性创举之一。1975年Köhler和Milstein创建了一个免疫的脾细胞与骨髓瘤细胞融合模型,可定向地产生只作用于某些抗原决定簇的单克隆抗体。他们在《自然》杂志(*Nature*, 256: 495, 1975)发表了题为:“分泌预定特异性抗体融合细胞的持续培养”(Continuous Culture of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity)的经典论文。这篇论文对生物学和医学基础理论和应用方面的研究,产生了深远影响。现在全世界的不少研究人员已制备出许多杂交瘤,并得到数以千计的单克隆抗体。Milstein和Köhler二人因此而获得了1984年诺贝尔医学奖。

单克隆抗体技术的潜在用途很多,前景十分广阔。其主要优点,正如Milstein(1979)自己所说的,在于它有两个基本特点:第一,由一个独立的克隆产生的单克隆抗体,是一种十分明确的化学制品,而不是一种可随每个免疫动物,甚至随着同一动物的不同次采用而变化的、不明确的非同质混合物。永久培养可无限制地提供化学结构完全相同的单克隆抗体;第二,杂交瘤单克隆抗体技术是用不纯抗原制备纯抗体的理想方法。

应当着重指出的是,同任何别的新兴科学技术的出现一样,单克隆抗体技术的出现也有其深刻的历史渊源。这甚至可以追溯到1847年Benca Jones在骨髓瘤病人尿中发现本周氏蛋白这样一些看来“似乎无关”的许多重要发现。例如,由Burnet于1957年提出,并经1958年Nossal和Littlefield创建的“细胞融合技术”,1962年Pottér和Boyce建立的“人工诱导浆细胞瘤”技术等,均与单克隆抗体技术有直接联系。为了使读者对此技术的形成有一简明的概念,下面扼要地介绍几个与此密切相关的理论与技术。

一、单克隆抗体的理论基础——“细胞系选择学说”的提出和证实

生物体产生抗体最基本的特点,是抗体的复杂性和多样性。它们是针对许多抗原决定簇的、混合的、非同质性抗体。这在50年代之前,并没有找到满意的解释。1957年Burnet有创建地提出了“细胞系选择学说”。认为每个B淋巴细胞有一个独特的受体(现在认为一个B淋巴细胞有结构相同的10万个受体),只能接受一种结构相同的抗原决定簇。由此激活的这一淋巴细胞系,只能产生针对这一抗原决定簇结构功能完全相同的免疫球蛋白(单克隆抗体)。这一学说从近代遗传学的角度,比较圆满地解释了抗体的产生机制。但是,Burnet的这一学说最初并未被多数同行们所接受,甚至遭到非议。

1958年, Nossal 和 Ledberg 采用大白鼠的一个抗体生成细胞, 同时用两种不同的抗原进行免疫, 结果得到的是仅能产生针对一个抗原的抗体。这个细胞从未产生过同时针对两种抗原的抗体。他们的成功, 证明并支持了 Burnet 的“细胞系选择学说”。1968年之后, 这个学说才得到广泛的支持和采用, 并成为杂交瘤单克隆抗体技术的理论基础。

二、单克隆抗体技术的必要前提——骨髓瘤细胞系的建立

细胞融合和杂交瘤是单克隆抗体技术的基础; 而选择良好骨髓瘤细胞系, 则是建立淋巴细胞杂交瘤株的重要前提。一个浆细胞系无限制增殖, 导致产生一种均一的免疫球蛋白, 称骨髓瘤或浆细胞瘤(plasmacytoma)。小鼠自发骨髓瘤是罕见的, 但在 LOu/C 大鼠却极为常见。人骨髓瘤也不少。许多学者试图在体外建立能分泌均一骨髓瘤免疫球蛋白的浆细胞株, 都没有成功。1965年 Sachs 等用矿物油刺激 BALB/c 小鼠, 诱生出骨髓瘤, 并在体外培养成功, 称为 P₃。Milstein 等于 1972 年用 20 微克 8-氮杂鸟嘌呤(8-azaguanine) 从 P₃ 中选出缺乏次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT) 的新细胞系, 称为 P₃-X₆₃-Ag₈。该株缺乏 HGPRT 酶, 因而不能在 HAT 培养基中生长。但该瘤细胞可以分泌小鼠 IgG₁, 具有 κ 轻链。目前已诱导出一些新的突变细胞株。最常用的有: P₃-NS₁-1-Ag₁₋₁, 简称 NS₁, 此株骨髓瘤细胞可以合成小鼠骨髓瘤 κ 轻链, 但无分泌能力; P₃-X₆₃-Ag₈-

表 1-1 小鼠和大鼠浆细胞瘤株特点

全名	简称	来源	特点
P ₃ -X ₆₃ -Ag ₈	X ₆₃	BALB/c	浆细胞瘤分泌 γ ₁ , κ 链
P ₃ -NS ₁ -1-Ag ₁₋₁	NS ₁	BALB/c	浆细胞瘤合成 κ (非分泌型)
MPC-11-X ₆₃ -6TG	X ₆₃	BALB/c	浆细胞瘤分泌 γ ₁ , κ 链
BW5147	BW	AKR	胸腺淋巴瘤
EL-4	EL-4	C57B ₆	胸腺淋巴瘤
P ₃ -X ₆₃ -Ag ₈ -653	P ₃ 653	BALB/c	不合成不分泌
SP2/O-Ag ₁₁	SP2/O	BALB/c	不合成不分泌
S194/5-xxo-B01	S194	BALB/c	不合成不分泌
210 RCY ₁ Ag ₁ ·2·3	R210	大鼠 LOu	分泌 κ 链

表 1-2 人浆细胞瘤细胞系特征

细胞系	来源	核型	分泌的 Ig 类型		建株时间
			体内	体外	
RPM18228	PBL	类三倍体	γ ₁ λ	λ	1967
ARH77	PBL	45-56	γ ₁ λ	γ ₁ λ	1978
L363	PBL	—	γ	未测	1978
266BL	PBL	近二倍体	δ ₂ λ	δ ₂ λ	1970
266BM	骨髓(BM)	近二倍体	δ ₂ λ	δ ₂ λ	1970
LA49	胸腔渗出液	多倍体(23-250)	δ ₂ λ	δ ₂ λ	1974
Oda	皮下浆细胞瘤	46	δ ₂ λ	δ ₂ λ	1974
KMM56	胸膜腔渗出液	71(49-144)	λ	λ	1980
Karpas 707	PBL 与 BM	45,XY ₂ Ph ⁺	γ ₁ λ	λ	1982
KMM-1	皮下浆细胞瘤	47,X ₂ -Y	λ	λ	1982

653,此株骨髓瘤细胞既不合成,也不分泌免疫球蛋白; SP2/O-Ag₁₄ (简称 SP2/O),也不合成和分泌免疫球蛋白。这是解决杂交瘤单克隆抗体技术的一个重要条件。现在,除建立了小鼠骨髓瘤细胞系外,还建立了人骨髓瘤细胞系(见表 1-1 和表 1-2)。这些骨髓瘤细胞系的建立,为单克隆抗体技术提供了必要的基础或前题条件。

三、细胞融合和杂交细胞的选择

1976年 Ringertz 和 Savage 用仙台病毒 (Sendai virus) 或高浓度聚乙二醇使两个细胞膜融合并形成多核细胞,称为异核体 (Heterokaryons)。在试管内观察到两个或几个不同来源的体细胞发生两膜融合。异核体的细胞核发生融合,以后经过细胞分裂,其子代细胞具有亲代异核体一半的遗传物质。

杂交细胞的遗传性不很稳定,原因至今不明。但杂交细胞失去其亲代所具有的一些染色体,则是常见现象。染色体的丢失并非完全随机,而是取决于动物的种属或细胞类型。染色体丢失的一般情况是,先丢失用于融合的两种细胞中的一种细胞的染色体,从而丢失杂交细胞系的功能。由此可见,杂交细胞系的功能稳定性与核型稳定性是密切相关的。

(一) 杂交细胞系的选择

当两种细胞(例如 A 和 B)在融合剂作用下,发生细胞融合时,除了 A-B 融合外,也可能出现 A-A 或 B-B 融合。为了获得一种纯 A-B 杂交细胞系,就必须经过适当的选择。目前,为人们广泛采用的杂交细胞系选择方法,是 1964 年 Littlefield 创建的“细胞融合技术”。他根据微生物选择原理,利用两种不同生化缺陷的双亲细胞进行杂交,借助于含有次黄嘌呤氨基蝶呤及胸腺嘧啶核苷的 HAT 选择性培养基,以杀死其双亲细胞,选择杂交细胞。

(二) 杂交细胞选择性培养基原理

生物细胞合成 DNA 的途径有两条。其主要合成途径,可被叶酸拮抗剂氨基蝶呤阻断;另一途径,是利用胸腺核苷激酶 (thymidine kinase, 简称 TK) 和次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转化酶 (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase, 简称 HGPRT) 合成 DNA。如果缺乏以上两种酶中的任何一种,这一途径亦将被阻断而不能合成 DNA。HGPRT 酶缺陷的细胞,在含有次黄嘌呤、氨基蝶呤及胸腺嘧啶核苷的 HAT 培养基中,其 DNA 合成的主要途径和挽救旁路(合成嘌呤核酸)均被阻断,因而不能繁殖并死亡。因此,在细胞融合时加入 HAT 于培养基中,持续培养 2 周,凡是能繁殖成群落的细胞,基本上都是杂种细胞。

HGPRT⁻变异株可通过 20 微克 8-氮杂鸟嘌呤(8-azaquanine)诱导而建立。8-氮杂鸟嘌呤通过 HGPRT 嵌入 DNA。HGPRT 通过 X 染色体传递,因而 HGPRT⁻变异株容易建立。但选择 TK⁻变异株则难以建立(TK 通过常染色体传递)。

(三) 细胞融合剂聚乙二醇(PEG)

PEG 是当今使用最广泛的细胞融合剂。它能使两个细胞膜融合,但本身也有毒性。常用的 PEG 分子量有 500、1000、1500 和 4000 等四种。PEG 的使用浓度为 35—60%。

许多研究者探索了不同分子量 PEG 的使用、融合中的 pH、两种细胞的比例、不同批号的血清和不同类型的培养基、胸腺细胞和其他饲养细胞及融合细胞培养的不同方法(Current Topics in Microbiology and Immunology 81, 1987) 等。注重这些条件的变化,虽可能产生更多可重复的结果,但没有哪一个条件能使杂交细胞系的绝对量增加。

四、关于杂交瘤

用杂交瘤 (hybridoma) 生产单克隆抗体,十多年来成为许多免疫学家的重点研究课题,但都没有取得突破。1973 年 Milstein 等在研究抗体合成的遗传控制时,试图观察抗体合成的等位排斥规律能否在杂交细胞被打破。他们融合了二株不同的骨髓瘤细胞——一株是大鼠的,另一株是小鼠的。融合产生的杂交细胞分泌三种免疫球蛋白:一株是大鼠的免疫球蛋白;另一株是小鼠的免疫球蛋白,以及轻、重链,分别来自大鼠、小鼠两个亲代的杂交免疫球蛋白分子。由此证明,杂交细胞合成抗体时,不存在“等位排斥”现象,它们共显性地表达两个亲代的信息。Kraust(1970年)和 Pott (1977年)也进行过类似实验。

1975年, Köhler 和 Milstein 将培养的小鼠骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞融合,证明得到的部分杂交系可产生抗免疫用抗原的同质性抗体,这些杂交细胞能在培养基中持续生长,可得到一种“永生的”特殊抗体。并且当给同种小鼠注射杂交细胞后,可形成肿瘤,现在称为杂交瘤。生长肿瘤的小鼠,其血清和腹水存在着高滴度的同质性抗体。这一惊人发现,目前已被应用到多种学科领域,它比过去所用的许多方法都更为精确可靠。

(一) Köhler 和 Milstein 初次创建的杂交瘤技术

他们用羊红细胞 (SRBC) 免疫小鼠,取出免疫小鼠的脾,制成能大量产生抗体的 B 淋巴细胞悬液。从中取出 2×10^5 个细胞与等量小鼠骨髓瘤细胞株 (P₃-X₆₃-Ag₈) 细胞混合,并加入仙台病毒,进行细胞融合(以后多用聚乙二醇作融合剂)。待细胞融合后,种于特定的 HAT 培养基中培养。在此培养基上,仅杂交瘤细胞存活并形成克隆。再稀释克隆细胞,分别于微量培养板上培养。数周后,新克隆产生。分析这些孔的细胞上清液,选择与羊红细胞起抗原-抗体反应的克隆,注入小鼠腹腔,让杂交瘤生长。生长杂交瘤的小鼠腹水产生的抗体,即是单克隆抗体。

他们所得到的杂交瘤,具有其亲代的特征。免疫鼠的脾细胞有产生抗羊红细胞抗体功能,但易死去;多发性骨髓瘤细胞株有肿瘤细胞不断增殖的特点,但它所分泌的免疫球蛋白不具备特异抗体活性。而杂交瘤细胞却各取二者所长,既能不断增殖,又能生产出人们需要的抗体 (Milstein, 1982)。

Köhler 等证明:两种细胞融合后,产生抗体的原因是 DNA 链的结合,而不是简单的两种 B 细胞产生的轻、重链在胞浆中的结合;染色体核型分析,证明也不是两个脾细胞的融合。

(二) 杂交瘤单克隆抗体产生方法概述

目前,大多数实验室所采用的杂交瘤技术,主要是按 Köhler 和 Milstein 的方法。其步骤包括:

1. 免疫。
2. 杂交。
3. 选择。
4. 放射免疫或酶联免疫测定。

5. 克隆化 (cloning) 和再克隆化 (recloning)。为什么要克隆化和再克隆化? 这是因为一个培养孔中,不只存在一种杂交瘤,因此需要纯化或克隆化。方法是选择出单个细胞,使之繁殖为一个细胞系,称为一个克隆。这一细胞系所产生的抗体或表面标志,都是专一、纯化的。克隆化必须进行第二次,称再克隆化,以保证每个克隆是真正的克隆,并可排除不产生抗体的变异株。

克隆化的方法很多,目前多数采用有限稀释法(limiting dilution)。即将杂交瘤细胞稀释到 7—10 个/毫升,再分种于 96 孔培养板内,每孔 0.1 毫升,经常观察孔中是否只有一个群落生长。其理论根据是,如果每孔的细胞数量很少,按柏松分布 $f(0) = e^{-\lambda}$ 。(f(0) 是没有生长的孔, λ 是每孔克隆的平均数)如果 $\lambda = 1$, $f(0) = 0.37$,即表示,要想得到理想的孔中只含一个单独的克隆,就应该有超过 37% 的孔中没有细胞生长。

6. 饲养细胞。在体外组织培养中,单个或少数分散的细胞不易生存与繁殖,必须加入其他活细胞才能使之生存并繁殖。加入的这种细胞称为饲养细胞。

常用的饲养细胞有腹腔巨噬细胞和胸腺细胞,而一般实验室所用的是小鼠腹腔渗出细胞,其中主要是巨噬细胞,并有少量的淋巴细胞。巨噬细胞的数量应在 10^4 以上。

7. 单克隆抗体的过筛试验细胞融合后,在 HAT 培养基中培养 1 周左右,杂交瘤即可在培养板中生长出群落。然后更换 HT 培养基或普通培养基,当群落生长面积超过培养孔的 1/2 以上时,即可测试杂交瘤特征。

测定杂交瘤的特征是很重要的步骤。由于细胞融合时,一个培养孔中可能有一种以上的杂交瘤,所以,产生特异性抗体的就更少。必须用敏感的方法测试抗体。常用的测试方法有同位素法、ELISA、间接血凝法、间接免疫荧光法等。

五、杂交瘤单克隆抗体的一般应用

杂交瘤单克隆抗体技术建立以来,产生了大量的、以基础理论研究和临床应用为目的的单克隆抗体。使过去以免疫学原理为依据的血清学分析,开始发生改变。并为进一步研究病毒和其他微生物提供了新的手段和方法。

(一) 在理论研究方面的应用

1. 单克隆抗体作为人类遗传学分析的工具,在基因研究方面,已得到较多的应用。现已制备和建立了抗各种人类基因产物的单克隆抗体。例如: C_{10} McAb, C_3 McAb, 碱性磷酸酶单克隆抗体,抗主要组织相容性复合物抗原的单克隆抗体及抗相关抗原的单克隆抗

体等。单克隆抗体技术,很可能取代在人类遗传学分析中广泛应用的组织配型试剂,也有可能进而用作诊断试剂和治疗制剂。

2. 杂交瘤在酶遗传学中的应用。已产生了四株能够特异性地识别人胎盘碱性磷酸酶(ALP) 抗原决定簇的杂交瘤。

3. 用单克隆抗体鉴定和分离人类T淋巴细胞群的特性。目前十分引人注目的是抗人类T淋巴细胞表面标志的单克隆抗体,即OKT系列的出现。Patrick 等用OKT系单克隆抗体分析一种叫做T细胞性皮肤淋巴瘤的细胞,结果呈现出OKT⁺, OKT₁⁺, OKT₂⁺和OKT₃⁺。表明系辅助T淋巴细胞恶变所致。

4. 在神经生物学方面的应用。可用于对神经系统不同类型细胞表面抗原的鉴定。已经发现并获得了只对大鼠中枢神经系统神经原,而不对外周神经系统神经原发生反应的单克隆抗体。

5. 在发育生物学的应用中,已建立了抗Forssman抗原(此种抗原在脾脏的一小部分淋巴细胞、成体睾丸、肾和脑中存在,在睾丸畸胎瘤上也有,但在分化了的组织上则没有)的单克隆抗体和专门针对睾丸畸胎瘤细胞株的糖脂质,而不与Forssman抗原发生交叉反应的另一株单克隆抗体。

6. 在内分泌学方面,已成功地应用于纯化激素和分离不同分化阶段的内分泌细胞。1981年Elsen barch 用大鼠的胰岛细胞株RIN 制备出几种单克隆抗体。其中有一种抗体仅特异地与胰岛细胞起反应。因而可利用它来分离胰岛细胞。

1981年Yavin 获得了5个抗TSH受体的单克隆抗体。

(二) 单克隆抗体在临床方面的应用

1. 在肿瘤的诊断方面,已制备出针对黑色素瘤,平滑肌肉瘤,骨肉瘤,肺、胃、直肠、胰腺癌,神经母细胞瘤,神经胶质瘤,白血病和淋巴瘤等的单克隆抗体。这些单克隆抗体原则上有望作为诊断制品应用于临床。

2. 在器官移植方面,已有用特异性T细胞单克隆抗体除去导致排斥反应的T细胞,以预防和治疗生物体对移植物的排斥反应。

3. 在人兽共患病方面的应用,将另列专题介绍。

六、单克隆抗体技术用于诊断人兽共患病的优点和缺点

半个世纪以来,人兽共患性疾病的特异诊断,取决于从该病人体内(包括体液或其他组织)分离、培养并鉴定病原体(包括虫卵)以及对感染者血清抗体的动态检测。这些方法在历史上的贡献是已有定论的。而且,在今后一个相当长的时期内仍将是诊断感染性疾病及寄生虫病重要手段。

但是,已往对任何病原体的分离、培养与鉴定,不仅阳性率低、费时、耗力,而且采用任何免疫学方法所获得的抗血清(甚至经过纯化的)都相对的不纯,含有多价抗体,多种结合力和多种抗体的类型、亚类。因而都有特异性低、与其他微生物出现交叉反应、纯度差、效价低、检测不够灵敏等缺点。

同时,由于动物个体对抗原反应的差异性,用动物制备血清,不同批号抗血清的抗体

效价也不尽相同,且不易标准化。一些免疫源性很弱的抗原,如B群脑膜炎球菌荚膜多糖抗原、乙型肝炎病毒抗原等,要从这些抗原制备出抗血清,是十分困难的。而且,抗血清供应量有限,价格高昂。因而,免疫诊断技术的改革势在必行。

免疫学和血清学诊断存在的上述缺点,主要原因是抗血清存在的不可避免的异质性所造成。因此,寻找高特异性的快速准确诊断的免疫检测方法,是医学科学研究者的重要课题。

(一) 单克隆抗体技术应用于诊断的优点

随着微生物学、寄生虫学、免疫学研究的发展,人类对感染性和寄生虫性疾病有了新的认识。人们在研究中发现:一个病原体上存在着许许多多性质不同的抗原;在同一个抗原上,又可能存在许许多多性质不同的属、种、群、型特异抗原。因此,医学科研工作者十分紧迫的任务之一是,通过识别不同的抗原或抗原决定簇(epitope),以寻求对感染性疾病和寄生虫病的快速而准确的诊断。

1. 单克隆抗体具有前所未有的特异性。表现在不仅可以识别不同的病原体,而且可以识别相同病原体的不同属、种、血清群、血清型的特异抗原。在实验室,用单克隆抗体能极容易地选择流感病毒及狂犬病毒的抗原变异株。这就很容易客观地纠正以往的错误结论。例如:过去把使用抗血清治疗狂犬病无效的原因归结为“未能及早使用”。现在业已证明:自然界事实上存在着许多狂犬病毒的变异株,而所使用的狂犬抗血清不可能和已经产生变异的狂犬病毒发生中和作用而使之灭活。这才是使用狂犬血清效果不好的真实原因。

2. 单克隆抗体具有纯一性和均匀性。由于单克隆抗体是从一个特异指令性B细胞中分离出来并传递下去的,它分泌的抗体具有完全相同的免疫特异性和生物特性;相同的免疫球蛋白类型和/或亚类;带有共同免疫性质如补体结合或调理作用或凝集;而且抗原决定簇位于固定的位置。所以,由单克隆产生的免疫球蛋白,其纯度超过用人工生物化学方式纯化的物质。

3. 与抗原反应的亲和力(affinity)始终不变。单克隆抗体虽被认为与抗原的亲和力不高,有时甚至比免疫抗血清的亲和力还低,但其亲和力恒定而且高度特异。例如,用荧光标记的单克隆抗体诊断临床标本中的相应抗原,其阳性率可达100%,且不出现非特异荧光。单克隆抗体的恒定亲和力,使试验结果较为准确。

4. 单克隆抗体的重复性强。由于制备单克隆抗体所使用的抗原都是预先鉴定的、特异的和稳定的,因而多次产生的单克隆抗体均具有始终如一和专一的特性。

5. 用不纯的抗原可能制备高特异性单克隆抗体,易于体外大量生产。同时还具备以下优点:

(1) 易于在实验室里开展而不需要很多生化或组织培养设备。

(2) 一旦杂交瘤株建立,就可源源不断地提供大量单克隆抗体,既可在体外连续培养,也可在液氮中冻存。

(3) 产量高。杂交瘤在培养基中生长,所产生的单克隆抗体可高达100微克/毫升;在小鼠腹水中高达10毫克/毫升。

(4) 成本低,可标准化。

(5) 用单克隆抗体测定未知标本比一般培养省时,早出报告。以往的培养需时一周,而采用单克隆抗体技术检定,仅需 30 分钟到数小时。

(6) 可制备高比活性的标记抗体。当把标记氨基酸加入培养液时,可能得到纯度高、比活性高的标记抗体。

这些优点可使研究者以单克隆抗体技术获得许多特异性抗体,以鉴定许多微生物、寄生虫。可以预言:必将有更多的由微生物和寄生虫引起的感染性疾病要采用杂交瘤单克隆抗体技术来作诊断。

(二) 当前单克隆抗体技术的缺点

同任何一项新技术、新方法一样,现时单克隆抗体技术也不是完美无缺的,还存在以下一些不足之处:

1. 单克隆抗体特异性太高,也给诊断带来一定困难。

(1) 不能与免疫原产生沉淀反应,因为单克隆抗体只针对一个特定的抗原决定簇,分布的局限性太大,影响交联及格子结构的形成,往往不能形成沉淀反应,影响结果判定。

(2) 某些单克隆抗体的免疫球蛋白类和亚类不固定补体,也不具细胞毒性。

(3) 由于单克隆抗体太特异,寻找了抗原的“错误”部位。如某一单克隆抗体效价高达 1:204800,但却没有保护作用。

(4) 要获得理想的单克隆抗体,往往需要经过复杂的筛选。

2. 与抗血清相比,单克隆抗体与抗原发生交叉反应的机会虽少,但也并非完全不发生。事实上,个别单克隆抗体能以不同的亲和力与一组有关抗原结合,而这种交叉反应是不能吸收排除掉的。

3. 低结合亲和性 (low binding affinity),单克隆抗体在某些情况下特异性可不一定很高。

4. 单克隆抗体易受 pH 和温度变化的影响而失活。个别杂交瘤株产生抗体不稳定,甚至中断。

5. 建立杂交瘤株也是一项费时、耗力的工作。

以上简要地介绍了单克隆抗体技术的现状和当前可以看出的一些优缺点。尽管单克隆抗体技术不是十全十美的,存在一些尚待克服的缺点,但应用它来诊断感染性和寄生虫性疾病,特别是针对迄今尚无良好试验手段的人兽共患病,却将是十分有用和必要的。

七、关于人源单克隆抗体

目前,绝大多数单克隆抗体都是应用小鼠杂交瘤技术制备的鼠源单克隆抗体,对人系异种蛋白,故在应用于人体时存在许多障碍。近年来人们十分关注对人源单克隆抗体的研究。

Olsson (1980) 报告从人骨髓瘤细胞株 (U266 株)建立了 8-氮鸟嘌呤 (8AG) 抵抗、HAT 培养基敏感的突变株 (U266AR₁),后来称为 SKO-007 骨髓瘤细胞株,它分泌免疫球蛋白 λ 型抗体。用于融合的脾细胞采自一例 Hodgkin 病患者,该患者取脾前,经用 DNP 半抗原免疫,将脾细胞与 SKO-007 骨髓瘤细胞株进行融合,获得人源性抗

DNP McAb,属 IgG 类,产量为 3—11 微克。杂交瘤的染色体稳定,不携带 EB 病毒。建立的人-人杂交瘤细胞株如能分泌特异性强,有针对性的单克隆抗体,必将是临床医学最感兴趣的单克隆抗体试剂。

(一) 人源单克隆抗体优点

1. 同种生物体细胞杂交,杂交瘤细胞染色体稳定。
2. 人源杂交瘤产生的单克隆抗体,属于人免疫球蛋白类型,可多次注入人体,以满足治疗的需要。当然,人源单克隆抗体还可能存在抗个体基因型抗体。
3. 人源单克隆抗体注入人体后,在体内清除速度较慢(鼠单克隆抗体清除速度快),且引起过敏反应及发生免疫复合物机会较少。
4. 人源单克隆抗体用于制备白细胞分型试剂,HLA 抗原多态性决定簇单克隆抗体的制剂较小鼠单克隆抗体优越。

(二) 人源单克隆抗体制备的困难

1. 人浆细胞瘤的体外建系(株)在培养技术上较困难。
2. 不易获得定向地产生只作用于某些抗原决定簇的人脾细胞或淋巴母细胞。
3. 不易建立稳定而高产的人源单克隆抗体杂交瘤细胞株。
4. 大量生产困难。

(三) 人源单克隆抗体研制的方法

1. 人-人杂交瘤方法。即用人骨髓瘤细胞系(株)或淋巴母细胞(LCL)与人免疫 B 细胞融合的人-人杂交瘤技术。

用于人-人杂交瘤的骨髓瘤细胞应具备的条件: (1)高融合率,(2)繁殖迅速,(3)亲本细胞无分泌免疫球蛋白能力,(4)容易建立 HGPRT⁻株,(5)形成的杂交瘤能分泌高滴度抗体; B 淋巴细胞应具备的条件: (1)能对特定抗原通过遗传机制产生特定抗体,(2)在适宜激活状态可形成高滴度特异抗体的杂交瘤,(3)融合成功率较高。最常用的 B 淋巴细胞有: 外周血淋巴细胞,脾细胞,扁桃体细胞,病变灶浸润性淋巴细胞等。

目前,已建株的人骨髓瘤细胞系见表 1-2。已建立的为数不多的细胞系中,符合上述条件,如 HGPRT⁻突变株,对 HAT 培养基敏感的细胞株不多。自身不分泌免疫球蛋白的细胞株就更少。它们来源于: (1)骨髓瘤系: 主要有 SKO-007 株, TM-H₂ 株, DHMC 株, IBTCHM8310 株(不分泌 Ig) 等; (2)淋巴母细胞系(LCL): GM1500 株, KR4 株, LICR-LON-HMy2 株, GMO467.3 株, UC729 株, GM4672 株, GM152 株等。值得指出的是, LCL 主要特征为 EB 病毒阳性,染色体为二倍体。

2. EB 病毒转化技术。B 淋巴细胞表面存在 EB 病毒受体。EB 病毒对 B 细胞亲和力较高,并能刺激 B 细胞的转化,有助于建立细胞系(株)。但 EB 病毒是一种多克隆 B 细胞激活剂,因此必须结合早期有限稀释克隆化技术,从中筛选出具抗原专一性的人源单克隆抗体。

用 EB 病毒转化技术制备的人单克隆抗体的产量甚低,一般均低于每毫升 1 微克,因此只有再进行一次人-人杂交,才能提高产量与保持稳定性。