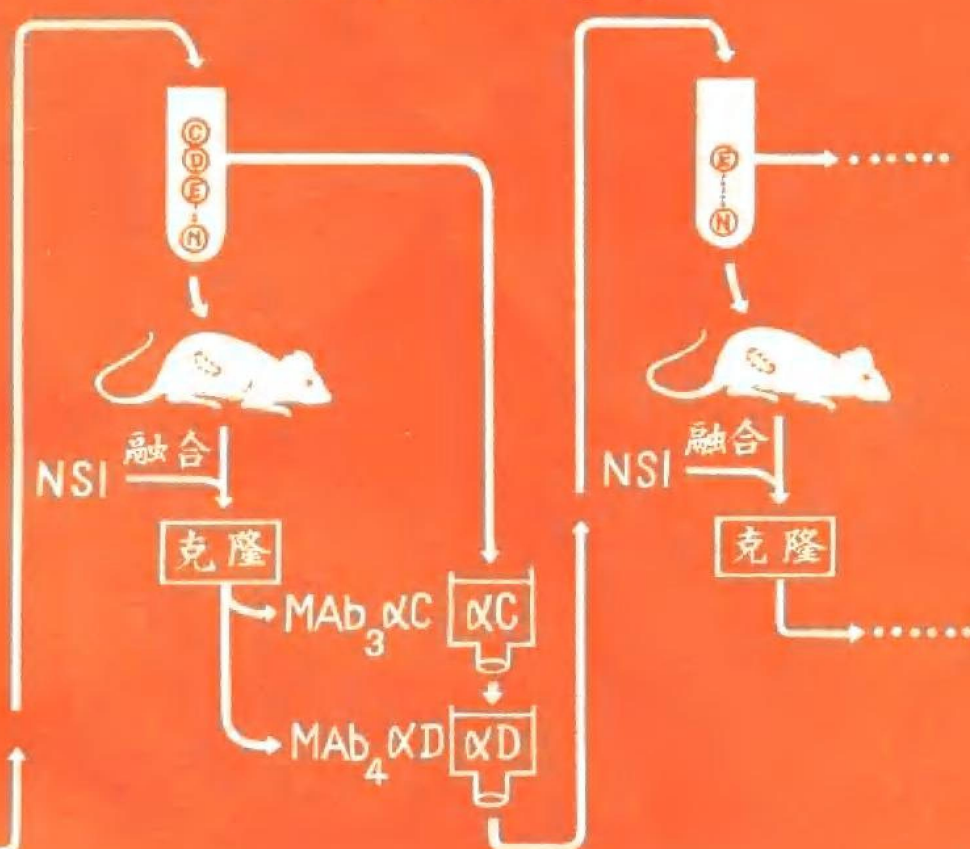


单克隆抗体

杂交瘤：生物学分析的一个新领域

(美) Roger H. Kennett, Thomas J. McKeam,

Kathleen B. Bethtol 等著



人民军医出版社

单克隆抗体

杂交瘤：生物学分析的一个新领域

(美) Roger H. Kennett., Thomas J. McKearn., Kathleen B. Bethtol 等著

张红毅 石勇兵 金建平 等 译

汪美先 徐志凯 黄其全 徐震洲 校

人民军医出版社

1983年8月

MONOCLONAL ANTIBODIES

Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses

Edited by

Roger H. Kennett., Thomas J. McKearn and Kathleen B. Bethtol

Plenum Press, New York and London, 1980

单 克 隆 抗 体

杂交瘤：生物学分析的一个新领域

张红毅等 译

汪美先等 校

责任编辑：汪美先

*

人民军医出版社出版

(北京市复兴路22号甲3号)

第四军医大学印刷、发行

*

开本：787×1092毫米 1/16 印张：21½ 字数：544,000

1983年8月第1版第1次印刷 印数：2000册

统一书号：14281·006 定价：3.2元

译者前言

淋巴细胞杂交瘤产生单克隆抗体技术,是近年来细胞生物学与免疫学中的一项重大突破。它和“遗传工程”一样,被认为是有巨大生命力和发展前途的新技术。尽管这项技术还处在实验研究阶段,但从根本上解决了免疫学中长期存在的“特异性”、“重复性”等问题,并可无限地大量生产高特异性的、标准化的单克隆抗体。应用这些抗体,可以更精确地分析、鉴定细胞表面结构、受体、标志等。采用单克隆抗体技术,可为传染病、免疫病及非免疫病的诊、防、治提供精确有效的标准制剂,并为研究免疫机制、调节免疫应答提供新的手段。此外,单克隆抗体还是一种新的大有希望的抗癌武器。总之,单克隆抗体技术的建立和发展,必将推动细胞生物学、分子生物学、遗传学、微生物学及免疫学等学科的深入发展。

我国自1980年开展单克隆抗体技术以来,进展也较快,在实验方法的建立,肿瘤抗原、淋巴细胞表面标志、病毒及寄生虫抗原分析,以及特异性诊断血清制备等方面进行了研究,有的已取得了可喜的成果。

目前,我国有关单克隆抗体技术方面的文献和参考书很少,为了积极开展这一新技术,推广这方面的知识,特翻译了此书作为参考。原书编著者都是深入研究本项技术的专家。全书共分五篇二十章及一个附录,系统阐述了“体外传代细胞系产生特异性抗体”、“免疫球蛋白结构及遗传学分析”、“人类基因产物的检测和分析”、“单克隆抗体作为细胞分化和免疫遗传学研究的探索工具”以及“抗微生物单克隆抗体”;附录中详细介绍了“制备和鉴定单克隆抗体的方法”。每一章均附有大量的参考文献。本书内容新颖,从生物学角度分析和论述较为深入,并介绍了丰富的经验和体会,是一本较好的基础理论和基本技术的参考书,可供细胞生物学、分子生物学、遗传学,微生物学及免疫学等工作参考。

本书在译、校过程中,得到第四军医大学各级领导的大力支持,以及微生物教研室、403研究室3室及单克隆抗体研究组同志们的帮助,在此一并致谢。由于我们专业与翻译水平有限,时间匆忙,错误之处尚请批评指正。

汪 美 先

1983年5月10日

前 言

Roger H. Kennett, Thomas J. McKearn, Kathleen B. Bechtol

1975年8月7日, Köhler和Milstein在自然杂志 (*Nature*, 256:495) 上发表了题为“分泌预定特异性抗体的融合细胞的持续培养 (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity)”的报道。这篇报道已成为经典文献, 对生物学和医学领域中的基础和应用研究产生了深远的影响。到1978年4月3~5日, 在美国马里兰州 Bethesda 召开第一次淋巴细胞杂交瘤专题讨论会时 (*Current Topics in Microbiology and Immunology*, 81, 1978), 许多实验室的研究人员都已制备出浆细胞瘤与免疫动物脾细胞的杂交系, 并且得到了与多种不同抗原决定簇起反应的单克隆抗体。

在 Köhler 和 Milstein 介绍这一新技术时, 本书作者们正在从事制备抗分化抗原 (K. B.B)、组织相容性抗原 (T. J. Mck) 及人类肿瘤相关抗原 (R.H.K) 的抗血清的工作。由于单克隆抗体在这些方面具有潜在的应用价值, 作者们都开始生产杂交瘤, 并分析得到的单克隆抗体反应物。在杂交瘤技术建立和应用的早期, 最引人注目的问题之一, 是该技术如何首先在免疫学和免疫遗传学工作者中逐步展开, 以后扩大到生物科学的其他领域, 如进化生物学、生物化学、人类遗传学、以及细胞和肿瘤生物学等。

Köhler 和 Milstein 的成功, 除了为获得可用于许多生物学领域中的同质性抗体提供了新的途径外, 还为应用杂交细胞获得一些与能在体外产生特异性产物、或执行特异功能的转化细胞系相类似的、具有特殊功能的细胞克隆提供了一个范例。考虑到产生特异性免疫球蛋白可能仅是细胞融合产生的若干功能之一, 因此 Köhler 和 Milstein 的报道中的全部含义, 很可能还远远没有被充分认识到。

本书旨在综合单克隆抗体产生和应用的各种观点, 并促进该技术在生物学其他领域中的应用。本书内容并非很全面, 但作者力图概括为探索本技术所建立的诸多方法及其应用的实例。作者期望本书能对生物学和医学专业的大学生、研究生及科学家们有所裨益。

目 录

前 言

第一篇 体外传代细胞系产生特异性抗体..... (1)

第一章 浆细胞瘤和杂交瘤的发展与应用..... (1)

第一节 引言..... (1)

第二节 浆细胞瘤在实验上的应用..... (1)

第三节 小鼠骨髓瘤与免疫脾细胞的融合..... (5)

第四节 单克隆抗体的应用..... (7)

第五节 利用细胞融合获得功能细胞系..... (7)

第六节 小结..... (9)

参考文献..... (9)

第二章 持续增殖的人细胞系合成具有预定特异性的抗体..... (15)

第一节 引言..... (15)

第二节 合成特异性抗体的细胞系..... (16)

第三节 抗体生成细胞的预选..... (20)

第四节 人B淋巴细胞的体外免疫..... (22)

第五节 小结..... (23)

参考文献..... (24)

第二篇 免疫球蛋白结构及遗传学分析..... (30)

第三章 小鼠抗 α (1 $\rightarrow$ 3) 葡聚糖抗体的差异性及其个体基因型决定簇结构..... (30)

第一节 引言..... (30)

第二节 小鼠抗 α (1 $\rightarrow$ 3) 葡聚糖血清抗体..... (30)

第三节 体细胞杂交系产生的单克隆抗葡聚糖抗体..... (34)

第四节 抗葡聚糖抗体 V_H 区的结构..... (34)

第五节 个体基因型决定簇的结构相关性..... (35)

第六节 上述研究有关的问题..... (36)

第七节 讨论..... (37)

第八节 小结..... (38)

参考文献..... (38)

第四章 用单克隆碎片培养的杂交瘤确定B细胞组成..... (42)

第一节 引言..... (42)

第二节 利用杂交瘤确定B细胞的组成..... (42)

第三节	新生 B 细胞的组成	(43)
第四节	用新生鼠脾碎片培养获得杂交瘤	(44)
	参考文献	(48)
第五章	用杂交瘤定位小鼠免疫球蛋白基因	(52)
第一节	引言	(52)
第二节	实验方法	(52)
第三节	讨论	(58)
	参考文献	(59)
第三篇	人类基因产物的检测和分析	(62)
第六章	单克隆抗体作为人类遗传学分析的工具	(62)
第一节	引言	(62)
第二节	抗各种人类基因产物的单克隆抗体	(64)
第三节	体细胞杂交系	(76)
第四节	红细胞特异性抗原	(78)
第五节	胸腺细胞特异性抗原	(78)
第六节	讨论	(79)
第七节	小结	(81)
	参考文献	(82)
第七章	杂交瘤在酶遗传学中的应用	(88)
第一节	引言	(88)
第二节	产生和检测抗人胎盘碱性磷酸酶抗体的方法	(92)
第三节	结果及讨论	(93)
第四节	小结	(97)
	参考文献	(97)
第八章	用单克隆抗体鉴定和分离人类 T 细胞群的特性	(102)
第一节	引言	(102)
第二节	人类 T 细胞抗体的产生与选择	(102)
第三节	用单克隆抗体鉴定人类 T 细胞抗原的特性	(106)
第四节	讨论	(109)
	参考文献	(110)
第九章	小鼠×人杂交瘤	(113)
第一节	引言	(113)
第二节	小鼠骨髓瘤细胞与人类 B 细胞瘤的杂交	(113)
第三节	分泌的人类免疫球蛋白的特性	(116)
第四节	分泌型 μ 链与膜型 μ 链的关系	(118)
第五节	μ 链产生与 μ 链 mRNA 存在的关系	(120)
第六节	制备针对人类免疫球蛋白的抗个体基因型制剂	(122)
第七节	小结	(124)

参考文献	(124)
第十章 抗人类肿瘤相关抗原的单克隆抗体	(126)
第一节 引言	(126)
第二节 肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原	(126)
第三节 用单克隆抗体检测人类肿瘤抗原	(127)
第四节 抗人神经母细胞瘤抗体	(127)
第五节 转移性神经母细胞瘤的检测	(131)
第六节 单克隆抗体与人类肿瘤抗原的遗传学	(132)
参考文献	(134)
第四篇 单克隆抗体作为细胞分化和免疫遗传学研究的工具	(137)
第十一章 生殖细胞及神经系统相关的分化过程及肿瘤抗原	(137)
第一节 引言	(137)
第二节 免疫	(138)
第三节 单克隆抗体在研究精子发生中的应用	(138)
第四节 单克隆抗体在神经系统分化及神经系统肿瘤研究方面的应用	(140)
第五节 抗睾丸和抗 C1300 杂交瘤的活性	(141)
第六节 小结	(145)
参考文献	(146)
第十二章 小鼠细胞表面分化(用异种大鼠单克隆抗体鉴定“跳跃”和“种属”抗原)	(149)
第一节 引言	(149)
第二节 制备和确定稳定性分化抗原单克隆抗体的技术	(149)
第三节 大鼠单克隆抗体的性质	(155)
第四节 用大鼠单克隆抗体确定小鼠分化抗原	(157)
第五节 分化抗原的表达形式	(166)
第六节 小结	(170)
参考文献	(170)
第十三章 大鼠×小鼠杂交瘤及其在研究主要组织相容性复合物中的应用	(175)
第一节 引言	(175)
第二节 大鼠×小鼠杂交瘤的一般特性	(175)
第三节 杂交瘤技术在研究大鼠主要组织相容性复合物中的应用	(177)
参考文献	(184)
第十四章 单克隆抗体检测小鼠 T 细胞分化抗原	(188)
第一节 引言	(188)
第二节 单克隆抗体与细胞表面抗原反应的检测与分析	(188)
第三节 单克隆抗体鉴定小鼠 Thy-1 的两种抗原特异性	(191)
第四节 单克隆抗体确定 Lyt-1 和 Lyt-2 糖蛋白的特征	(193)
第五节 两种尚未报道的 T 细胞分化抗原的鉴定	(196)

	参考文献	(198)
第十五章	用单克隆抗体确定大鼠T淋巴细胞亚群	(204)
第一节	引言	(204)
第二节	抗体的产生和检测	(205)
第三节	用单克隆抗体标记大鼠淋巴样细胞	(207)
第四节	单一细胞的抗原量及其在其他组织上的表达	(210)
第五节	功能性研究	(211)
第六节	W3/25抗体对混和淋巴细胞反应的抑制作用	(217)
第七节	讨论	(219)
第八节	小结	(219)
	参考文献	(220)
第十六章	单克隆抗体治疗小鼠白血病	(223)
第一节	引言	(223)
第二节	用于血清治疗的抗Thy-1抗体的特性	(223)
第三节	单克隆抗Thy-1.1抗体对小鼠白血病细胞的影响	(225)
第四节	单克隆抗体的药物动力学	(229)
第五节	手术与抗体/补体治疗联合应用	(230)
第六节	体内抗肿瘤作用的机制	(230)
第七节	单克隆抗体在体内对正常T细胞的影响	(232)
第八节	小结	(235)
	参考文献	(235)
第五篇	抗微生物单克隆抗体	(237)
第十七章	用单克隆抗体测绘病毒蛋白的构型——对鼠白血病 病毒囊膜蛋白的分析	(237)
第一节	引言	(237)
第二节	分离产生单克隆抗病毒抗体的杂交细胞系	(238)
第三节	抗病毒单克隆抗体的血清学特征	(239)
第四节	用单克隆抗体测绘病毒蛋白的构型	(245)
	参考文献	(252)
第十八章	抗流感病毒单克隆抗体	(255)
第一节	引言	(255)
第二节	各种抗流感病毒杂交瘤的产生	(255)
第三节	病毒抗原的研究	(259)
第四节	抗病毒免疫应答的研究	(263)
第五节	附录	(265)
	参考文献	(266)
第十九章	抗狂犬病病毒单克隆抗体	(269)
第一节	引言	(269)

第二节	抗狂犬病病毒单克隆抗体	(269)
第三节	狂犬病病毒变异株的选择	(278)
第四节	杂交瘤抗体对小鼠的保护	(281)
第五节	小结	(282)
	参考文献	(282)
第二十章	抗链球菌抗原单克隆抗体	(283)
第一节	B族链球菌作为新生儿病原菌的重要性	(283)
第二节	抗Ⅱ型和Ⅲ型B族链球菌单克隆抗体的产生	(283)
第三节	讨论	(286)
	参考文献	(287)
附录	产生和鉴定单克隆抗体的方法	(290)
	引 言	(290)
一、	浆细胞瘤细胞系	(290)
二、	融合程序	(290)
(一)	离心悬浮于聚乙二醇液中的细胞进行融合	(290)
(二)	粘附单层中的细胞融合	(292)
(三)	悬浮细胞的融合和杂交瘤细胞在适应性培养液中的选择生长	(294)
三、	杂交瘤克隆化	(295)
(一)	在半固体琼脂糖中克隆化	(295)
(二)	液相有限稀释法进行杂交瘤细胞克隆化	(296)
四、	杂交瘤细胞的冻存	(296)
五、	细胞吸附于聚氯乙烯板上进行酶联抗体分析	(297)
六、	过氧化物酶结合抗球蛋白法检测细胞表面抗原	(298)
七、	放射免疫测定法	(299)
八、	定量吸收/阻断试验	(301)
九、	用单克隆抗体筛选蛋白质基因的放射免疫测定法	(302)
十、	单克隆抗体结合于聚氯乙烯微量滴定板	(303)
十一、	微量细胞毒试验	(304)
十二、	⁵¹ Cr 释放细胞毒试验	(305)
十三、	单克隆抗体免疫沉淀法	(307)
十四、	生物合成的标记单克隆抗体的结合抑制试验	(309)
十五、	适用于标记杂交瘤抗体的蛋白质碘化法	(311)
十六、	大白鼠或小白鼠体内生长杂交瘤的方法	(311)
十七、	硫酸铵沉淀上清液分离单克隆抗体	(312)
十八、	杂交瘤免疫球蛋白在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中的特性	(313)
十九、	用放射免疫测定法计算抗原-抗体结合常数	(316)
二十、	其他方法的参考文献	(319)
索 引		(322)

第一篇 体外传代细胞系产生特异性抗体

第一章 浆细胞瘤和杂交瘤的发展与应用

Dale E. Yelton, David H. Margulies, Betty Diamond, Matthew D. Scharff

第一节 引言

Köhler 和 Milstein (1975) 证明用体细胞杂交术可制备产生单克隆抗体的传代“杂交瘤”细胞系 (“Hybridoma” cell line), 从而开创了免疫学研究的新纪元。杂交瘤技术实现了免疫学家多年来致力于达到的一项主要目标: 常规制备大量针对不同抗原的同质性抗体。这类制品的用途将在本书中的各章节中阐述。

最近有些研究者证明, 也可用细胞融合来获得能产生具有免疫学意义的效应分子, 或对免疫调节发生反应的细胞系。这类杂交细胞系可实现免疫学家的第二项主要目标: 获得可用于研究免疫反应中细胞相互作用的遗传基础、生化基础和分子基础的同质性细胞系。

杂交瘤技术的建立, 用于解决技术难题的措施取得了进展, 但仍存在问题, 这些都是细胞融合和免疫球蛋白合成的生化学和遗传学的反映。简要回顾一些有关的实验和早期在制备同质性抗体方面的尝试, 不仅有助于开阔眼界, 而且还将时时提醒我们, 对基础目标的研究, 终将导致具有重大实际意义的发现。

第二节 浆细胞瘤在实验上的应用

多发性骨髓瘤是一种抗体生成细胞的肿瘤。每个肿块代表一个抗体生成细胞克隆的增殖。对这一点的认识, 曾引导作者用患者的付蛋白来研究抗体结构。可经实验诱发和无限传代的小鼠类似肿瘤, 为化学分析提供了源源不断的同质性小鼠免疫球蛋白 (Potter, 1972)。参阅1967年Cold Spring Harbor的专著“论抗体”一文, 也许能很好地理解小鼠骨髓瘤的用途。在该专著中, 还介绍了NIH的Potter's骨髓瘤诱发程序, 以及后来由Cohn等倡导的Salk诱发程序的巨大影响。不仅肿瘤本身重要, 而且肿瘤的分布也促进了在现代免疫学进程中起决定性作用的理论和试剂的更新, 并终将得到免疫球蛋白基因结构的最新信息 (Seidman等, 1978; Bernard等, 1978; Sakano等, 1978)。

起初, 并不清楚骨髓瘤及其产物与正常免疫反应的关系。由于发现了许多骨髓瘤蛋白不仅能与各种环境抗原起反应, 而且在血清学上与针对相同抗原产生的正常抗体完全一样, 因此, 这个关系基本明确了 (Potter, 1978)。此外, 目前已能制备针对某些抗原, 特别是细菌多糖

抗原的同质性抗体(Krause, 1970; Haber, 1970)。这些抗体的氨基酸序列及其他分析已经完成,其结果与骨髓瘤蛋白的研究是一致的(Cebra等, 1974; Capra等, 1975 a、b; Haber等, 1977)。甚至连骨髓瘤细胞中免疫球蛋白分子的合成和装配过程,也与在正常淋巴样细胞中非常相象(Scharff和Laskov, 1970; Kuehl, 1977; Williamson, 1971)。实际上,正常细胞和恶变细胞中,免疫球蛋白代谢的唯一可重复差异是在分泌动力学方面,正常细胞分泌得较快且较规则(Helmreich等, 1961; Baumal和Scharff, 1973)。

小鼠骨髓瘤细胞已广泛用于免疫球蛋白产物的生化研究,因为它们可进行培养、克隆化,并可作为相对纯的、且能持续生长的培养细胞系加以保存(Pettengill和Sorenson, 1967; Horibata和Harris, 1970; Laskov和Scharff, 1970)。这些细胞系还保留了良好的体细胞遗传体系。免疫球蛋白产物和结构发生变异的株较易获得(Scharff, 1974; Margulies等, 1977),可通过融合产生不同类型的正常或变异分子的细胞来研究基因和基因产物的相互作用(Margulies等, 1977; Milstein等, 1977)。实际上,培养的骨髓瘤细胞系很独特,表现为给小鼠注射变异细胞后,可从它们及其后代的血清或腹水中提纯出数百毫克的基因突变产物(Adetugbo等, 1977; Francus和Birshtein, 1978)。

尽管骨髓瘤有上述优点,但作为抗多数抗原的抗体来源,却是令人失望的。使动物免疫,然后产生合成抗免疫原的抗体的小鼠骨髓瘤是不可能的。诱发的小鼠骨髓瘤肿块数以千计,但能产生与已知抗原反应的免疫球蛋白的却寥寥无几(Potter等, 1977)。这些与抗原结合的付蛋白可通过针对潜在抗原进行细致地筛选,来加以鉴定(Cohn, 1967)。显然,上述方法不能成为生物学家感兴趣的、针对各种半抗原和抗原的同质性抗体的来源。

过去,许多研究者曾试图通过用各种病毒转化不同种属的免疫淋巴细胞,来克服上述困难,但大多未能得到产生抗免疫原抗体的传代细胞系。例如,几年前, Baumal等(1977)为了获得传代淋巴母细胞系,曾取致敏个体的外周血细胞,在体外用抗原刺激和用EB病毒转化。在当时所用的实验条件下,细胞系的产生需要抗原,即当用供者细胞对之敏感的抗原培养细胞时,就有传代细胞系产生;而不加抗原或用供者对之不敏感的抗原培养细胞时,则无细胞系产生。这些细胞系都产生大量免疫球蛋白,但十个细胞系中都没有产生可测得的抗免疫原的抗体。另外,有人用小鼠细胞和Abelson病毒进行了类似实验。无疑,有关这个课题的各种研究已在许多实验室展开,并有若干成功的报导。例如:Stosberg等(1974)用SV40病毒转化,从产生大量肺炎球菌Ⅲ型多糖的同质性抗体的家兔得到的细胞,获得了能产生少量这种同质性抗体的细胞系。最近,Zurawski等(1978)获得了产生抗破伤风类毒素抗体的传代人淋巴母细胞系(Zurawski; Black和Haber, 见本书)。Steinitz等(1977)也获得了经EB病毒转化的,能产生抗4-羟基-3,5-二硝基非那西汀酸(NNP)半抗原抗体的细胞系。但用这种方法只能产生针对少数几种抗原的抗体,而且抗体的产量也低。

对小鼠骨髓瘤细胞系融合的研究,原是为了加深理解免疫球蛋白基因表达的调节。早先,融合骨髓瘤细胞的大部分尝试都是采用灭活的仙台病毒,以期使骨髓瘤×骨髓瘤杂交株极低的自发率提高,但未能成功。这可能是由于即使不是全部,也是大部分的小鼠骨髓瘤细胞没有仙台病毒的受体(P. Maucés和M. Cohn, 私人交流)。然而,Cotton和Milstein(1973)获得的小鼠和大鼠骨髓瘤细胞间的杂交系,则可持续产生小鼠重链、轻链和大鼠轻链。随后Köhler和Milstein(1975)以及本实验室(Margulies等, 1976)也获得了药物标记的小鼠骨髓瘤细胞系之间低频率的融合,并证明形成的确实是杂交系。根据作者的 经验,杂交

株自发率约为 $1/10^6 \sim 10^7$ 细胞, 加入已证明可增加其他种间细胞融合率的仙台病毒、脱酯酸卵磷脂 (Lysolecithin) 或其他试剂, 都不能使之明显增加。尽管如此, 获得的杂交系还是足够用于免疫球蛋白基因表达的分析。与理解杂交瘤技术成功之处有关的这些实验证明了: (1) 不同小鼠骨髓瘤细胞间可形成杂交系; (2) 免疫球蛋白链的表达为双重显性 (Codominant), 即杂交系持续合成由亲本双方细胞系产生的全部免疫球蛋白链; (3) 杂交系的染色体总数少于亲本染色体总数之和, 表明染色体有丢失。这种丢失有时与一条或多条免疫球蛋白多肽链的表达缺如有关。

表 1 45.6.TG1.7和P326BU₄ 之间杂交系的免疫球蛋白表达和染色体*

细 胞 系	染 色 体			免 疫 球 蛋 白			
	平均值 $\pm$ 标准差	范 围	臂比 平均值	重 链		轻 链	
				P3	45.6	P3	45.6
亲 本							
45.6. TG1.7	62.4 $\pm$ 2.2	58~66	0.9	+	+	-	+
P 326BU ₄	61.7 $\pm$ 2.7	55~56	3.9	-	-	+	-
杂交系							
10.3				+	+	+	+
10.3.2	112.4 $\pm$ 7.0	93~123	2.7	+	+	+	+
10.3.2.3	107.4 $\pm$ 6.9	98~124	4.1	+	+	+	+
10.3.2.4	105.7 $\pm$ 4.3	99~111	4.3	+	+	+	+
10.3.2.5	105.1 $\pm$ 2.9	101~109	2.9	+	+	+	+
10.3.2.6	104.8 $\pm$ 6.7	87~119	2.7	-	+	+	+
10.3.2.7	102.1 $\pm$ 7.9	86~129	6.0	+	-	+	+

* 杂交系经HAT选择后分离, 10.3是再克隆的一个初级杂交系, 它的一个亚克隆 10.3.2 经重复克隆化产生克隆系10.3.2.3~7。初次融合后31周通过分析 15~20 中段分布进行染色体分析。按 Margulies 等 (1976) 介绍的方法, 用血清学方法和电泳法鉴定重链, 用电泳法鉴定轻链。

表 1 用图表的方式介绍了一例 P3 细胞系 P326 BU(P3)和 45.6.TG 1.7 (45.6) 之间的融合, 前者产生 IgG1 (κ), 后者产生 IgG2b (κ), 表中前两列介绍了亲本细胞系的染色体特征。重链和轻链经电泳法鉴别, 并用亚类特异性抗血清鉴定了重链。获得杂交瘤的方法是将两种细胞系混合接种于含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶核苷 (HAT) 的选择培养基中, 该培养基可使亲本细胞死亡, 只允许杂交细胞存活 (Littlefield, 1964)。暂不考虑免疫球蛋白产物如何, 根据下列事实可推知杂交株克隆系的性质: (1) 它们可在选择培养基上生长, 因为每个亲本细胞系所存在的缺陷都可得到相互补偿。(2) 杂交系的染色体总数多于任何一个亲本, 并且有标记染色体存在。(3) 在其他融合中, 鉴别亲本的 H-2 表面标志存在于杂交系中 (Margulies 等, 1976)。大多数杂交系都能持续产生由每一亲本细胞系合成的全部免疫球蛋白多肽链, 这一发现关系重大。Milstein 的实验室和本实验室 (Milstein等, 1977; Margulies等, 1977) 的研究都证实了这一点, 且无论亲本骨髓瘤产生何类

或亚类免疫球蛋白，一概如此。此外，Milstein 和 Köhler (1977) 的研究还表明，没有新的免疫球蛋白合成。从上述种种观察中得出结论，杂交系的免疫球蛋白基因表达为双重显性，表明可溶性的抑制和/或激活因子不参予骨髓瘤细胞免疫球蛋白基因的表达调控。而且，既使用骨髓瘤细胞系中的一个不产生免疫球蛋白的变异株与一个产生免疫球蛋白的细胞系融合，也不致中止免疫球蛋白的产生。该杂交系合成的是后者的免疫球蛋白 (Köhler 等, 1976)。

详细研究由这些骨髓瘤×骨髓瘤杂交系分泌的免疫球蛋白，发现了另一个对改进杂交瘤技术有重要意义的现象。即分泌的免疫球蛋白中，有许多是含有亲本双方细胞合成的重链和/或轻链的混合分子。如图 1 所示，产生 IgG1 (κ) 的 P3 和产生 IgG2b (κ) 的 45.6 细胞系间杂交系的分泌物 (图中虚线) 经放射标记后，与每个亲本细胞系分泌的免疫球蛋白混合物 (图中实线) 一道放在 DEAE-纤维素中，进行色谱分析。大量物质的色谱是在这两种标记物之间。这些分子含有来自亲本双方的重链和轻链。另外，对各个片段进行电泳分析，发现由色谱与亲本 P3 略有不同的杂交系分泌的分子含有 P3 重链和 45.6 轻链。另一方面，几乎没有 P3 轻链和重链组合。后来在用其他杂交系进行研究时，发现混合分子的数量有所不同 (Margulies 等, 1977)。

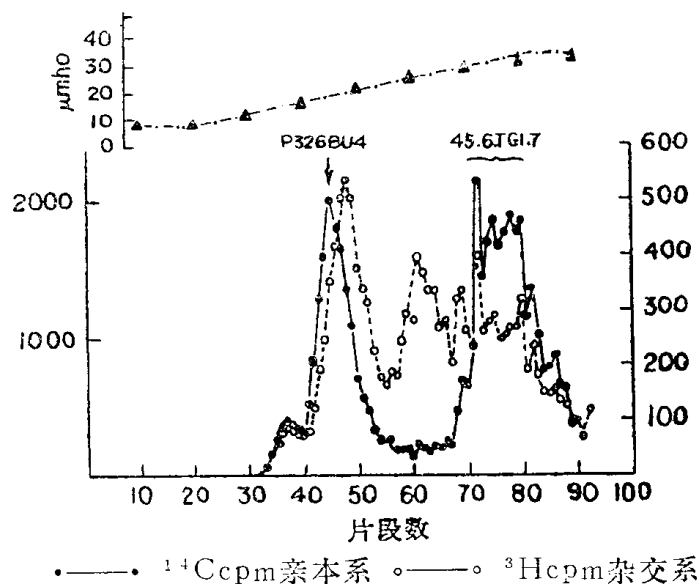


图 1：将杂交株与 [^{14}C] 缬氨酸共同孵育 3 小时，每个亲本细胞系分别与 [^3H] 缬氨酸共同孵育 3 小时，将这些孵育液混合后，装入 DEAE-纤维素柱，用间断洗脱法提纯，使其形成单一峰值，然后用线性梯度法重复层析该峰 (具体方法见 Margulies 等, 1977)。

骨髓瘤×骨髓瘤杂交系的上述种种研究，由于杂交率低而较难进行。自报告聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 可增加所用细胞系融合率后 (Davidson 和 Gerald, 1976)，这项技术得到了改进，以便应用骨髓瘤细胞 (Margulies 等, 1977) 和脾细胞 (Köhler 和 Milstein, 1976) 的悬液。Geffer 等 (1977) 证明 PEG 的作用浓度和时间很重要，条件适宜时可使融合率明显增加。

第三节 小鼠骨髓瘤与免疫脾细胞的融合

在前面介绍的所有实验结果中, 虽然只提供了有用的基础知识, 但当Köhler和Milstein (1975) 将培养的小鼠骨髓瘤细胞与免疫小鼠的正常脾细胞融合, 并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后, 这些结果就具有了更为显著的意义。这些杂交瘤能在培养基中持续生长, 从而得到一种“永生的”(“immortalizing”)特殊抗体, 并且当给同种小鼠注射杂交细胞后可形成肿瘤。长出肿瘤的小鼠, 其血清和腹水中存在着高滴度的同质性抗体。这一惊人发现, 目前已被推广到多种类型的抗原。看来这项技术势必成为制备血清学试剂的标准方法, 它将比过去所用的方法更为精确可靠。

从骨髓瘤×骨髓瘤杂交系的研究可以看出, 一些技术问题必须解决, 才能充分发挥杂交瘤技术的潜力。如图1所示, 首要问题是存在着由骨髓瘤和脾细胞所产生的多肽链共同构成的免疫球蛋白分子。如果组合是完全随机的, 那么, 所产生的 H_2L_2 分子中就只有1/10是仅含来源于脾细胞的(即能结合抗原的)多肽链, 这样, 不仅降低了抗体滴度, 甚至可能导致新的抗原特性产生(Köhler和Milstein, 1976)。实际上, 在多种组合中, 常常是同源链优先互相组合, 但即使这样也仍可产生混合分子。

通过使用一种不表达骨髓瘤轻链和重链的骨髓瘤变异细胞来作亲本, 解决了混合分子问题。这类变异株先前已由Milstein和本实验室介绍过(Cotton等, 1973; Scharff, 1974)。在软琼脂上对细胞进行克隆化, 并用对重链和轻链特异的抗血清复盖这些克隆, 变异株即可频繁产生, 并较易获得(Coffino等, 1972)。用低倍显微镜可观察到, 原始型细胞被抗原抗体沉淀物所包围, 而变异细胞则不被沉淀物包围, 且可恢复, 并长成集落。当用这类不产生免疫球蛋白的变异株与其他骨髓瘤细胞或脾细胞融合后, 并不中断产生免疫球蛋白。虽然这些变异株中有些并不产生大量杂交系, 但有些变异细胞系目前已得到有效地应用(Schulman等, 1978; Kearney等, 1979)。

第二个长期未能解决的问题是融合率低。使用PEG和未破碎的脾细胞, 通常可能使每 2×10^5 个脾细胞产生1个杂交系, 这样, 一个脾脏就可产生500个杂交系。这在用强免疫原时是没问题的, 但若用弱免疫原就有严重问题了。表2表明绵羊红细胞(SRBC)是一种优质免疫原, 很易使动物免疫, 致使分泌抗体的脾细胞可达1%。如果融合率是1个杂交系/ 2×10^5 个脾细胞, 那么, 可期望 10^8 脾细胞至少获得5个产生抗体的杂交系。实际上, 正如Köhler和Milstein(1975)最初报告的那样, 融合造成了空斑形成细胞(PFC)的明显浓缩, 而且通常作者获得的阳性杂交系也比预计的要多。这也许是由于骨髓瘤细胞与正在繁殖的脾脏B细胞选择性融合; 或是由于非空斑形成前体细胞融合造成抗体生成杂交系增殖; 或是由于某些未知因素的作用。无论怎样解释, 空斑形成细胞明显浓缩, 几乎总是得到公认和欢迎的。当使用弱免疫原时, 抗体生成细胞出现率低是个严重问题, 表2用H-2^b单型的特异性33说明了这一点。目前, 作者测定的抗体分泌细胞出现率约为1/10,000脾细胞。因此, 每个免疫的脾脏仅含有 10^4 抗体分泌细胞。即使有浓缩的希望, 作者也只能推测, 每3至5个脾脏产生1个杂交系。事实上, 作者还没能产生一种稳定的抗33杂交系。尽管有人已获得了产生其他H-2特异性的同质性抗体的杂交系(Current Topics in Microbiology and Immunology 81, 1978)。

表 2 杂交系产生率*

每个脾脏	抗SRBC	抗H-2.33
PFC	10^6	10^4
杂交系		
计算值	5	0.05
实际值	20~30	0.2~0.3

* 1个脾脏 = 10^8 细胞；融合率 = 1个杂交系 / 2×10^5 脾细胞 (500个杂交系/脾)

解决上述问题有两个可能的办法。一是增加融合率。许多研究者探索了不同分子量 PEG 的使用、融合中 pH 的重要性 (J. Sharon 和 S. L. Morrison, 私人交流)、脾细胞和骨髓瘤细胞的比例 (在 10/1 和 1/1 之间已应用成功)、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以及融合细胞培养的不同方法 (Current Topics in Microbiology and Immunology 81, 1978) 等。注重这些条件变化, 虽可能产生更多可重复的结果, 但没有哪一个条件能使每一免疫脾脏中可获得的杂交细胞系的绝对量明显增加。

第二个办法是增加抗体生成细胞的量。大多数研究者通常都是免疫一批动物, 并用抗体滴度最高的小鼠脾细胞进行融合。浓缩抗体生成细胞或抗原结合细胞也应当是可能的。但尚未查明, 究竟是哪种脾细胞真正与骨髓瘤细胞融合, 而产生抗体生成杂交细胞系的。由于融合率低, 因此任何一种浓缩程序也都应当充分提供适当的细胞绝对量。这些问题以及其他一些问题使大多数通过控制用于融合的脾细胞而改进技术的尝试受到挫折。

第三个主要的技术难题, 是一些 (不是全部) 杂交瘤具有不稳定性。其原因还不完全清楚。但由于染色体丢失而伴随出现的重链或轻链合成能力的丧失; 污染克隆生长过度; 或在杂交瘤增殖过程中发生变异等因素, 无疑在一定程度上可导致不稳定性。这些因素中哪个最重要, 或者是否还有其他因素的作用还不清楚。通过将融合细胞小量、低密度的培养于微板中, 或在融合后立即在软琼脂中克隆化, 可使同时产生的非抗体合成细胞的过度生长减少到最低限度 (Sharon 等, 1979)。尽管这样, 有些克隆化的杂交系仍然非常不稳定, 有时偶尔需要再克隆化。根据作者的经验, 如果能产生出许多生成理想的同质性抗体的杂交系, 那么设法保存不稳定的杂交系还不如丢弃它。当新增殖的杂交瘤具有专一特异性而必须加以保存时, 那么通过反复克隆化, 或用任何一种方法来浓缩抗原结合细胞, 就有可能使该杂交瘤维持下去 (Haas 和 Von Boehmer, 1978)。

除了这些显而易见的技术问题外, 对杂交瘤技术的了解, 至今在许多方面还很贫乏。一般可假定, 融合中亲本恶性细胞的表现型应与希望产生的细胞系非常相象。例如, 已证明纤维母细胞或上皮细胞与骨髓瘤细胞融合后, 重链和轻链的基因表达被压抑 (Coffino 等, 1971)。然而, 几乎没有实验资料可以说明, 参予融合的两种细胞究竟如何相象才能确保持续产生抗体。有可能的是, 非骨髓瘤 B 细胞系或一些尚未试验的淋巴瘤, 将产生比目前常用的骨髓瘤系更高的融合率或更稳定的杂交系。

杂交瘤技术只在少数几种动物中应用成功。最常见的是小鼠骨髓瘤与小鼠脾细胞间的杂交瘤, 但也有些研究者用大鼠脾细胞与小鼠 (Galfre 等, 1977) 或大鼠 (Galfre 等, 1979)

的骨髓瘤进行融合。在异种融合中,可将杂交瘤注入照射过的小鼠或裸鼠体内,以使其血清和腹水中产生高滴度的抗体。维持小鼠骨髓瘤×兔脾细胞或小鼠骨髓瘤×人血细胞杂交系的抗体生成更困难些,这很可能是由于杂交系中兔和人的染色体迅速丢失的缘故。据作者所知,对其他种间融合的可能性尚未做广泛研究。

第四节 单克隆抗体的应用

单克隆抗体的潜在用途很多,在以后的章节中将详细介绍。Milstein等(1979)恰如其分地论述了杂交瘤的进展对血清学的吸引力。

“杂交瘤技术的主要优点在于它有两个基本特点:第一,由一个独立的克隆产生出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血而变化的不明确的非同质性混合物。永久培养即可无限制地提供化学结构完全相同的单克隆抗体。第二,杂交瘤技术是用不纯抗原制备纯抗体的理想方法”。

这些优点唤起了生物学许多领域中研究者的想象力。其中有些是应用该技术产生大量对下列抗原有高度亲和力的特异性抗体:(1)免疫原性组织相容性抗原或分化抗原;(2)分化抗原、肿瘤抗原或其他细胞表面抗原,这些抗原缺乏多形性,在同种系统中无免疫原性,但在异种免疫中却可以被识别;(3)病毒和细菌抗原;(4)各种蛋白质、核酸和糖表面的单一抗原决定簇。这些抗体将使我们能够鉴定和分离细胞亚群,区分细胞发育的不同阶段,更为精确地进行组织分型,提纯较小的表面抗原,精细地鉴定微生物以供诊断和流行病学研究,以及对重要的生物大分子进行更可靠的放射免疫分析和其他免疫学分析。

杂交瘤技术还为研究正常B细胞的抗体生成克隆开辟了一条新的途径,借此可检验对抗原刺激应答时产生的抗体的全部组成。这项技术具有使每个能做化学研究的克隆产生大量抗体的优点。实际上,它既有骨髓瘤系的全部优点,又有由研究者决定的那种抗体的长处。

虽然有这些优点,但必须记住,单克隆抗体与经过很好吸收的高滴度抗血清完全不同。它将有固定的亲和力,如果低了,可能出现問題。因为它具有同质性,所以不可能通过再吸收以进一步强化其特异性。由于每个细胞系只能合成一类或一个亚类的免疫球蛋白,因而每种单克隆抗体只具有非同质性抗血清的一部分生物学活性。例如:能或不能固定补体、有或没有细胞毒作用或结合金黄色葡萄球菌A蛋白的作用。有些单克隆抗体不能使血细胞凝集,据推测可能是因为其铰链区缺乏韧性,或是红细胞表面的表位(epitop,为抗原决定簇的别称)密度太低。除了这些常见的问题外,也确有一些意外的发现。例如,Howard等(1978)报告了一种更易与细胞表面抗原结合的单克隆抗体,条件是这个抗原的另一部位已先与另一种单克隆抗体发生了反应。骨髓瘤经常产生因氨基酸序列改变而变异的免疫球蛋白(Cotton等,1973;Scharff,1974;Cook和Scharff,1977)。作者在杂交瘤中也鉴定出了类似的变异(D.E.Yelton,未发表资料)。如果这是一种普遍现象,就有必要定期复查杂交瘤的亲和力和特异性,或及时冰冻保存。

第五节 利用细胞融合获得功能细胞系

正如引言所述,细胞免疫学家的第二个长远目标是获得能完成和应答正常免疫调节功能的传代细胞系。出于希望产生可调节的细胞系,过去也采用了如同将肿瘤和病毒转化细胞用于试制同质性抗体一样的类似方法。这些肿瘤和转化细胞系有助于研究不同分化阶段的淋巴样