

單克隆抗体
技术
及其应用

DANKELONG
GTIJISHUJIQIYINGYONG

0.3

河南科学技术出版社

目 录

一、单克隆抗体技术和原理	(1)
(一) 杂交瘤的产生	(1)
(二) 筛选程序	(12)
(三) 杂交瘤的维持、特征形成及单克隆抗体的分离	(23)
(四) 单克隆抗体的放射标记	(29)
二、人和人的杂交瘤产生的单克隆抗体	(36)
三、哺乳类神经系统抗原的单克隆抗体	(44)
四、抗H—Y单克隆抗体	(54)
五、利用单克隆抗体鉴定人实体瘤抗原	(63)
六、单克隆抗体治疗鼠类移植性白血病——一种被动免疫治疗的模式	(83)
七、单克隆抗体的影象	(95)
附录：一、浓缩100倍的HAT液的配制	(103)
二、GKN液的配制	(104)
三、聚乙二醇溶液的配制	(104)
四、巨噬细胞饲养层的制备	(104)
五、单克隆抗体技术常用的缩写	(104)

一、单克隆抗体技术和原理

(一) 杂交瘤的产生

A、方法技术上一般考虑的问题

形成抗体的细胞同骨髓瘤细胞融合后，结果形成了体细胞性的杂种细胞（杂交瘤），它从浆细胞瘤亲本细胞那里继承了无限分裂的能力，同时又从两个亲本细胞继承了合成免疫球蛋白的能力。在设计一种有效的融合技术时，应当考虑一些问题（图 1—1）。

首先考虑的问题是：用聚乙二醇诱导的一些细胞融合基本上是一种机遇过程。虽然缺乏精确的资料，但已表明大部分稳定的杂交细胞象两性生殖细胞融合的方式一样进行增殖。因此，当由免疫过的B细胞产生分泌抗体的杂种细胞时，可以证明一种B细胞瘤比一种T细胞瘤更为合适。为了保存合成和分泌免疫球蛋白的细胞机构，一种浆细胞瘤比B—淋巴瘤细胞更为合适。然而与预期的相反，充分分化的正常浆细胞不及正在分裂的浆母细胞（Plasmablast）。在这种情况下，一种抑制因素可能使连续分裂的母细胞成为相对无分裂能力，而最后分化成浆细胞。

一个进一步改良方法是：被用来与骨髓瘤融合的对象不把自己的免疫球蛋白的轻和重链传给杂交瘤产生的抗体上。这种杂交瘤常可以产生特异性不同的杂交抗体分子。从表 1

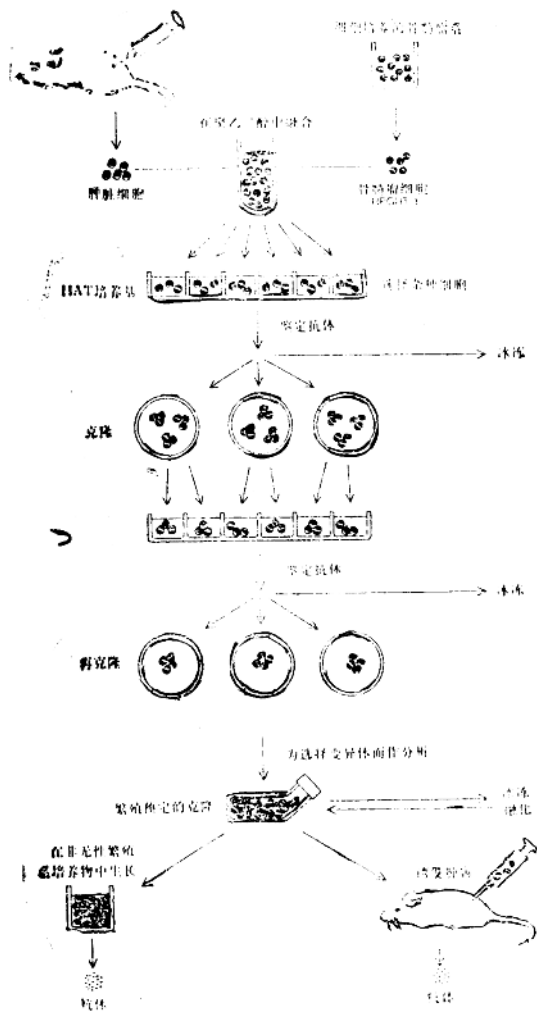


图1—1：产生单克隆抗体的第一步是以聚乙二醇促进经免疫的小鼠(或大鼠)的脾细胞和小鼠(或大鼠)的骨髓瘤细胞融合，在HAT中选出杂种细胞。检测培养基中的抗体分泌物。为了谨慎起见，把每一种阳性培养物的一部分冰冻贮藏起来。先让阳性培养物形成克隆，并检测这些克隆。然后冰冻阳性克隆，使其再克隆化，并检测是否存在免疫球蛋白变异体。最后选出的克隆可被冰冻贮藏，当样品融化后，它们可在培养基上生长，并产生抗体，或者被注入动物体内，以诱发分泌抗体的骨髓瘤。

可见，目前至少有3种不产生任何特征的融合骨髓瘤适用于杂交瘤的建立(表1转下页)。

B、杂交瘤形成的频率

在随机融合的混合物中，分泌某种特殊抗体的杂交瘤形成的频率，一般反映了免疫脾细胞群体中抗体形成细胞的频率。它们的范围是 10^{-4} — 10^{-2} 。因此，目的应是获得最大量的免疫细胞。衡量免疫细胞的标准无需是血清中最大抗体滴

*参考文献： 1) Nature 256, 495; 2) Eur. J. Immunol. 6, 511; 3) J. Immunol 123, 1548; 4) Nature 276, 269; 5) J. Immunol. Methods 35, 1; 6) J. Exp. Med. 148, 313; 7) Cell 8, 405; 8) Nature 277, 131; 9) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 5429; 10) Nature 288, 488.

表1 适合于融合的细胞系

演发来源	染色体数	Ig类别	亲本骨髓瘤的来源	参考文献*
小鼠				
X63-Ag8	65	γ_1, κ	MOPC-21	1
NS1-Ag4/1	65	κ 细胞内	X63	2
MPC11-45.6TG1.7	62	γ_{2b}, κ	BALB/C	7
X63-Ag8.653	58	无	X63-Ag8	3
SP2/0-Ag14	72	无	X63-Ag8 × BALB/C 杂交瘤	4
大鼠				
FO	72	无	Sp2/0-Ag14克隆	5
S194/5XXo, BU.1		无	BALB/C	6
人				
210·RCY3·Ag1.2.3	39	μ, κ	Iou大鼠	8
U-226AR ₁	—	e, λ	U-266骨髓瘤系	9
GM1500GTGAL ₂	—	γ_2, κ	GM1500骨髓瘤	10

* 参考文献见3页

度。但是由于增殖的需要，应有大量的浆母细胞。通常在给予每种抗原后3—6天达到这种高峰。这甚至早在 Paslay 和 Roozen 的著作中就已被指出。

用 PEG 作融合剂的现行技术所得到的异核体形成频率平均是 10^{-2} 。继之，形成核融合和合核体，其频率为 10^{-3} 。因此、在适宜的条件下，每 10^5 个融合细胞中只有一个能产生一个可存活的杂交细胞克隆。当形成珠斑的细胞在脾内以平均频率 (10^{-3}) 增殖时，这种频率出现的最好结果为 10^{-8} 。因此，一个含有 $1 \sim 2 \times 10^8$ 个细胞的免疫小鼠脾只少应产生一个特殊的杂交瘤克隆。

C、产生抗体的杂交瘤的测定

对于形成抗体的集落的筛选已成为实验的一个根本问题。因为新形成的杂交瘤克隆可能是不稳定的，一些检验程序的速度和经济比其精确度和敏感性更为重要。因为在培养的上清液中抗体的数量通常是丰富的，故通常用适宜的抗原可以测定其敏感性。究竟采用何种技术方法要看被选择的抗体类型而定。例如：若欲用作细胞毒抗体，那么应采用细胞毒技术进行筛选。如果想要中和抗体（酶、病毒），应采用相应的中和方法。若不需要免疫球蛋白重链或轻链类或一种抗体的特别机能，应考虑根据采用的多价抗小鼠免疫球蛋白或蛋白A结合的检查方法。

D、杂交瘤的稳定性和选择

应特别注意这样一个事实，原始的杂交体细胞具有双套染色体，这些细胞将必定把染色体分开，直至再形成约为正常的 $2n$ 结构为止。为了维持携带免疫球蛋白基因的染色体，这时不宜作选择（因为不知道这些染色体与细胞哪种至关重

要的功能相联系)。反之,对于营养物的竞争可能有利于不分泌Ig的细胞的选择性生长。经验说明,后者能迅速长满培养基,而代替了可能生长慢的分泌细胞。因而最重要的是尽可能早的检测分泌抗体的克隆,并且应立即开始再克隆。所以能否迅速测定抗体活性是关键。因为在大量的亚代培养和进一步传代中可能收获少,而不能选择稳定的克隆及不能保证形成特殊抗体细胞的成克隆能力,所以在分离后,应立即将原始含有杂交瘤细胞的孔槽中那些细胞冻存起来,这是一个很好的经验。

在亲本细胞的混合物中,杂交细胞最初是少数。应当做一些选择的准备,特别是从骨髓瘤的亲本细胞中选择时。古典的生物化学选择方法是依据采用HGPRT阴性或TK阴性肿瘤细胞,该方法为Littlefield所介绍^[1],并被广泛使用。激活荧光细胞分类器(fluorescence-activated cell sorter: FACS)选择杂交细胞的改良方法是很有希望的方法。因为这些方法能够同珠异性抗原的选择程序相偶联,故可以相当大地减少组织培养工作量,并节约筛选所用的人力。

新形成的杂交瘤细胞需要有饲养细胞,而有几种细胞显示出满意的结果(鼠类脾细胞、胸腺细胞、连续培养的成纤维细胞),腹腔渗出液细胞表现了特别有效,因为它们也能够从HAT(Hypoxanthine Aminopterin-Thymidine)培养液里死亡的细胞中清除大量的细胞碎片。

E、小鼠和大鼠的免疫方法

由于抗原的性质、致免疫性、相容性(小鼠和大鼠品系的选择)各不相同,以及各种不能预测的情况,可能需要对

剂量、方法，时间安排和佐剂进行明智的选择，但这里只能作一般介绍。一般讲，不能错误地选择有高浓度的循环抗体的动物。但是为了大量的繁殖浆母细胞，建议在融合前1~3天给予抗原。实际上，在免疫的动物中抗体的产生可以和形成特异性杂交细胞的数目无关系。某些情况下，在激发后每天进行免疫攻击，只要经过3天以上，这种应急过程对制备杂交瘤就已经有效。虽然根据传统的免疫学经验，这种办法最后可能导致免疫麻痹和/或抑制性T细胞的过度产生。

关于选择小鼠的品系问题，应该用纯系的或生命较强的杂合体BALB/C株，除非由于免疫遗传的考虑而不能自由选择。实际上，除用BALB/C外，采用其它品种或者甚至大鼠，并未表现出融合率减少。但是，在原始的杂交瘤培养中，应警惕诱导细胞毒性T细胞的可能性，因此，应注意将饲养层细胞的H-2抗原和杂交瘤相配合，特别是将脾细胞用于此目的时。鉴于实际理由，除了BALB/C F₁杂合体株外，只可以用纯系株。否则，由于组织相容性产生难以与宿主相配合，则可以妨碍杂交瘤在体内的顺利生长。然而，在那种情况下，例如在大鼠/小鼠杂交瘤时，可以应用裸鼠。

F、免疫草案

下边，提出免疫的一些典型方法：

(1)可溶性外来蛋白、多糖类、带有半抗原的结合物、病毒或其他微生物。(BALB/C×B₆)F₁小鼠，4~6周鼠龄，用1~10 μg抗原溶于0.1ml完全Freund氏佐剂中，皮下和腹腔内注射，接着注射加倍量的不完全的佐剂溶解的抗原3~6周。融合前3天，静脉或腹腔内给予相当大剂量的抗原(20~50 μg)，只要避免过敏性休克的危险，任何部

位都可以注射。

(2)完整的细胞(正常或肿瘤细胞,病毒感染的、培养的细胞等),不用Freund氏佐剂,静脉内注射,在第1、21和42天,给每一只小鼠(或大鼠)逐渐增加剂量,从 1×10^7 到 5×10^7 个细胞。选择产生抗体的量最大的动物,在除去脾前3天,静脉内接受大剂量(5×10^7 到 10×10^7 个细胞)。将免疫引流部位的淋巴结细胞融合,曾获得相当大的成功。用这种方法,在小鼠爪足垫、腹股沟、腋下区附近注射带有Freund佐剂的抗原,经适宜的免疫处理后,除去引流淋巴结,并进行融合,该种情况下,在融合后、平板挑选融合混合物前必须加饲养层细胞。

G、产生啮齿类杂交瘤的细胞融合草案

下边叙述的方法曾成功地应用于我们实验室,但读者可以参阅其他文献以便进一步详细了解和讨论〔278〕。

(1)骨髓瘤细胞(为了选择细胞系,可参阅表1。)可培养在加10~15%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,其中并加有2 mmol新配制的谷氨酰胺和抗生素〔青霉素100单位/ml,链霉素100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,两性霉素B(Amphotericin B) 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 〕,此后称作完全培养液。从指数生长的培养物中收获细胞,用无血清的RPMI 1640洗之。

(2)制备淋巴结和脾细胞悬浮液,用无血清RPMI 1640培养液洗。

(3)进行细胞计数,并将它同骨髓瘤细胞以2:1比率在无血清RPMI 1640中混合,离心形成小球。

(4)将上清的培养液完全吸出后,每 10^8 个细胞中缓慢地加1 ml PEG 4000,并轻轻混合,制备PEG溶液的方法

是：加20g高压灭菌的PEG 4000到28ml用无菌的Dulbecco磷酸缓冲盐液配成的15% DMSO中[△]。

(5) 37℃下将细胞混合液在PEG溶液中的孵育30~60秒钟。

(6) 用20ml无血清RPMI1640一滴一滴加入，慢慢将PEG4000稀释，轻微旋转摇动3分钟。

(7) 离心细胞，去除上清液并将细胞在HAT⁽¹⁾培养液中重新悬浮，浓度为 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞/ml，不要破坏细胞的簇丛。

(8) 加腹腔渗出细胞作饲养层细胞[☆]，每一毫升融合物中用 4×10^4 细胞。

(9) 将细胞混合液分放到24孔(1ml/每孔)或96孔(0.2ml/每孔)Costar板中。

H、原代杂交瘤培养物的维持和监视

每天应当将培养物在显微镜下观察，以监视培养的进展，决定饲养的需要以及去除那些被污染的培养物。用HAT培养基*对培养物进行培养，培养基中指示剂颜色的变化可指示pH的变化。一般讲，半饲养(即除去一半的消耗培养基并用新的培养物取代之)，96孔培养皿每隔2~3天需这样换液一次，而24孔培养皿换培养液的频率要少些(通常头7~14天不换液)。在培养2周后，用正常培养液稀释方法逐渐淘汰HAT培养液。勿使HAT培养液突然变为正常培养液，如果这，常可导致一些克隆的死亡。当集落的直径达到1~2mm

[△] 另一配方见附录 [☆] 制备方法见附录

* 配制方法见附录

时，抗体产生的筛选就应开始。

在起初维持过程中最重要的是：任何显示产生抗体征象的培养物的细胞，都应立即冻存于液氮中。一个少量的细胞标本（100~1000个细胞）可以保存起来，以便用有限的稀释技术进行克隆。一种适宜的冰冻技术是用含有20%FCS和10%DMSO(dimethyl sulfoxide)RPMI 1640培养悬浮细胞，将细胞悬液密封到塑料瓶内，并将瓶放入-70℃低温冰箱中，放置过夜，后移到液氮罐中。

I、杂交瘤生产失败的原因

由于所有的生物过程都涉及到组织培养和实验动物，有很多变化均可引起杂交瘤生产的失败或低产。预测这些技术误差的所有原因是不可能的。我们将讨论最可能的原因，并列举一些防止和减轻的方法。

J、组织培养技术

在进行此项工作时，需要小心监测的最明显参数是pH、温度以及湿度的控制和培养基的质量。这些因素的头三个显然决定于所用的高质量的控制湿度的CO₂培养箱。甚至有些较好的培养箱，有时也难维持湿度，特别是将培养箱连续开放和关闭时。一种防止的简便办法是用聚乙烯薄膜单独地或重叠在一起包绕组织培养板，这样可允许气体渗透，而防止湿度丢失；另一个好处是保护组织培养板，以防止环境污染。

完全培养基所用的附加血清是非常重要的，大多数批号的胎牛血清将能引起成功的融合，每一批号血清产生的效果各异。应用某些批号的新生小牛血清也可以获得成功，但首先应经过筛选。虽然曾采用过一些去除免疫球蛋白的马血清，但

通常证明用马血清是不成功的。据介绍新配制的培养液应加2mmol谷氨酰胺，加1mmol丙酮酸钠和另外一些缓冲剂。现已记述了向完全培养液中加入0.075%碳酸氢钠和25mmol HEPES也可能有助于杂交瘤的产生和生长。

K、防止和控制微生物的污染

显然，在生产杂交瘤全过程中应注意的是：需要用无菌的组织培养技术，特别是因为杂交瘤的产生是一个长期过程，在杂交瘤培养日常检查中，应观察判定有无明显的细菌、真菌或酵母的感染。含有这种感染的孔槽应当用非挥发性消毒剂加以处理。如用含有1%硫酸酮的洗涤剂或5N NaOH处理，以防止微生物或芽胞扩散到其他孔中。

虽然曾介绍采用抗生素，如青霉素和链霉素，但应当指出：连续用抗菌素，特别在维持骨髓瘤系时，可能产生抗生素株。因而，通常应当将骨髓瘤细胞作适当冻存，则较连续培养维持细胞为好。检测细胞系和杂交瘤支原体更隐蔽的污染是很困难的，但这是杂交瘤生产失败的主要原因。

L、除去细胞系的支原体

支原体污染对杂交瘤的生产特别是克隆程序带来了严重问题，如果融合的亲本细胞被支原体污染，多不能获得杂交瘤。在支原体感染的情况下，可以观察到小的杂交瘤集落，几天后这些集落即死亡。

过去曾详细叙述过检测支原体的方法^{47,60}。但我们愿意建议应有一个有经验的微生物学家协助。过去从组织培养体系中去支原体是非常困难的。最近，Schimmelpfeng⁶¹等曾叙述了用支原体特异性抗生素和吞噬性巨噬细胞联合作用是一个很有用的程序。

M、程 序

(详细情况, 参阅文献6)

(1) 巨噬细胞单层: 将大约 10^6 腹腔巨噬细胞或由7~10天骨髓培养物中获得的巨噬细胞悬浮于1.5ml完全培养液中, 并加支原体特异抗生素即 $100\ \mu\text{g}$ 烯霉素(linomycin)/ml和 $100\ \mu\text{g}$ 太乐菌素(tylosin)/ml。再将该细胞悬液加到Costar 3524孔中做成平板。

(2) 每一个孔中加约100个骨髓瘤细胞。

(3) 7天后, 轻轻吸取, 收获骨髓瘤细胞, 勿需进一步加Linomycin和tylosin, 可以在完全培养液中扩增。一般讲, 经处理后, 无支原体。但为了完全将支原体去除应对细胞系进行检查。

(二) 筛选程序

A、放射免疫法(RIA)

a、用于可溶性抗原:

下边的一些方法可以用于溶性抗原。包括半抗原, 糖蛋白和脂蛋白等多糖类。

(1) 用磷酸缓冲盐溶液(PBS)制备成 $1-10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗原的溶液(应测定适宜浓度, 也可以改变pH和盐浓度以促使最大限度的结合)。

(2) $50-100\ \text{ml}$ 标本被分散在聚乙烯96孔板中(例如Cooke工程), 冷孵育4~12小时。

(3) 除去抗原溶液。该溶液可废物利用, 用来覆盖其他板子。

(4) 用含有0.1%小牛血清白蛋白(BSA)的PBS浸

洗 2 次，并立即应用或贮存于 -70°C 。

(5) 将 0.1 ml 杂交瘤培养标本转移到覆盖过抗原的板上(万一有高频生长的阳性孔，应考虑复制板法)。

(6) 在室温(RT)下孵育30分钟，用含有0.1% BSA的PBS将板洗2~3次。并将 ^{125}I 标记的亲纯化山羊或兔抗小鼠的免疫球蛋白(约10,000 c. p. m. $10\sim 20 \mu\text{l}$ PBS + 0.1% BSA)加到每一个孔槽中。

(7) 在室温下孵育30分钟，并用PBS重复洗后，结合的放射性活性，用下边二种方法之一测量。

①通过板孔用 γ -闪烁光谱仪(γ -scintillation spectroscopy)进行测量。

②将整个板在x线胶片上曝光，用荧光图像增强器荧光屏(fluorography intensifier screen)可缩短曝光时间(参阅Parkhouse和Guamotta的文章²²)。

b、用于细胞相关抗原：

所用的方法与上述的程序相似，但有所改良，不管是活细胞(为保持细胞表面抗原)，或依次经戊二醛和冷乙醇(-20°C) (分别为保存表面和内部抗原)固定的细胞，均可用作抗原。在每次孵育和按上述的步骤洗后，该种程序需要细胞的混合物并将板离心(步骤4--7)。

B、细胞毒性法

(1) 制备靶细胞悬液。在含有1% FCS RPMI 1640培养液中，作成每 ml 含有 2×10^3 细胞(正常脾、胸腺、周围血淋巴细胞、肿瘤细胞等)的悬液。活性应在90%以上或更多些。

(2) 2 μl 杂交瘤培养物的上清液分散复制到Terasakiⁱ

显微细胞毒性板中。

(3) 用重复分散器 (repeat-dispenser) 每孔中加一份 $1 \mu\text{l}$ 靶细胞。

(4) 用重复分散器每孔加 $40 \mu\text{l}$ $1:8$ 稀释的新鲜的无毒性的兔补体。

(5) 在湿润的 37°C 培养箱中, 将板孵育 45 分钟,

(6) 每孔加一滴 ($10 \mu\text{l}$) 用盐溶液新配制的 0.1% 台盼蓝 (trypan blue), 将板在冰上孵育 5 分钟。

(7) 将板轻轻振动, 一旦除去大部分液体, 同时用 RPMI 1640 将各孔充满, 以便使之与表面平。将浸过甲醛 (formalin) 的纸条加到孔隙中, 将处理的细胞保存在板中, 以便进一步检查。

(8) 用倒置显微镜观察, 估计溶解细胞的比率。

C、固定细胞的免疫荧光法

因为它的可见性, 故该方法可以同时阐明抗体的特异性和特别的细胞结构, 如细胞膜、细丝和细胞器的关系。

(1) 用下列两个方法之一, 将靶细胞固定在多点显微镜载片的孔槽上 (Headley-Essex 多点载片, Shandon Southern Instruments)

① 在一个湿润的 Petri 盘中, 将各个培养物滴于灭菌的载片上, 培养过夜。

② 用多聚-L-赖氨酸 (Poly-L-Lysine) 使细胞贴附。为此, 首先用 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 多聚-L-赖氨酸水溶液处理载片。继之用水洗并使之干燥。每一滴无蛋白的培养液含 $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^2$ 细胞, 每一孔中放一滴, 在室温中孵育 30 分钟。吸除多余的部分。加含有 1% FBS (胎牛血清) 的

RPMI, 以便阻断被赖氨酸包被区的多余的结合。

(2) 将载片浸入冷的70%酒精5分钟。蒸馏水洗, 并使之干燥(之后可将其贮存于 -70°C)。

(3) 每一个孔中加一滴培养物上清液。载片在有湿度的箱中 37°C 下孵育30分钟。将滴加的上清液吸出并用PBS洗两次。

(4) 每一孔中加一滴($20\ \mu\text{l}$)稀释度为1:40到1:100的结合荧光素的亲和纯化的羊抗小鼠Ig抗体(在大鼠杂交瘤的情况下, 加抗大鼠免疫球蛋白)。载片如上述孵育和冲洗。

(5) 用Evan's 蓝溶液复染载片, 用50%甘油PBS液封固, 用装有落射光系统的荧光显微镜观察。

D、玫瑰花结法

这是抗体结合方法的一种特别变种的方法, 结合形成了玫瑰花结。因为红细胞结合到少量的抗原决定簇上, 从而有放大的效果, 这种方法可以算作是最敏感的方法。然而, 它只局限于用作测定表面抗原(详细了解, 可参阅文献8, 9)。

该方法能够用于对活细胞表面抗原的分析。但是为防止细胞在空气中暴露, 需要仔细的细胞程序。实际上, 由于它并不如细胞相关的RIA或ELISA方法, 故不推荐作为一般的筛选方法。

(1) 蛋白A包盖羊红细胞的氯化铬(Chromium Chloride)方法¹⁰: $10\ \mu\text{l}$ 洗过的并经过包盖的羊红细胞与 $100\ \mu\text{g}$ 蛋白A在 $1\ \text{ml}$ 盐液(无磷酸盐的盐溶液)和 $1\ \text{ml}$ 0.01%氯化铬溶液一滴一滴地加入, 并不断混合。混合液在室温中