

王文章 苏钟浦 编著

细胞杂交瘤技术与 单克隆抗体的应用

XIBAO

ZAJIAOLIU

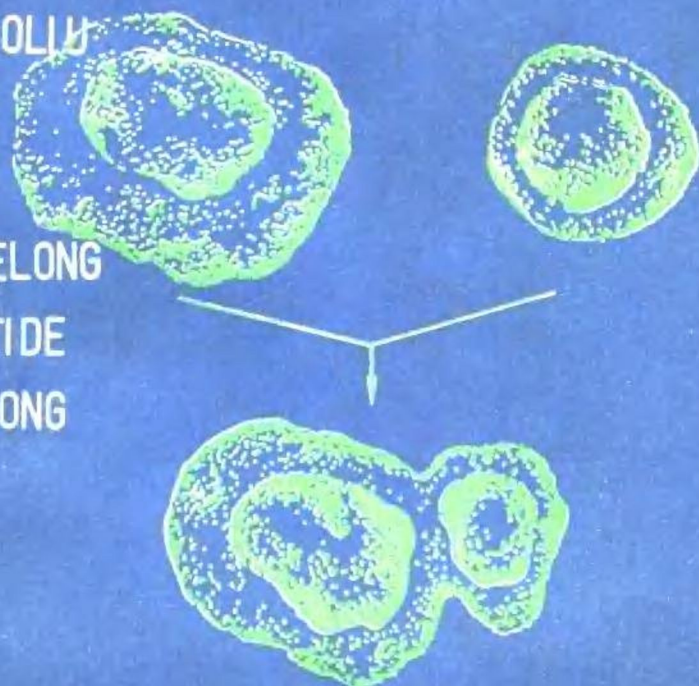
JI SHU

YU

DANKELONG

KANGTIDE

YINGYONG



0.3

辽宁科学技术出版社

内 容 提 要

本书共分二章。第一章介绍了B淋巴细胞杂交瘤的原理和细胞杂交瘤技术的操作方法。第二章介绍了国内外单克隆抗体的应用概况。书末附录,介绍了与细胞杂交瘤技术有关的试剂配制、小鼠骨髓瘤细胞培养方法以及荧光抗体的标记技术等。

本书可供从事免疫学、细胞学的科研人员以及医学院校师生学习参考。

细胞杂交瘤技术与单克隆抗体的应用

Xibao Zajiaoliu Jishu Yu

Dankelong Kangti De Yingyong

王文章 苏钟浦 编著

辽宁科学技术出版社出版 (沈阳市南京街6段1里2号)

辽宁省新华书店发行 大连印刷工业总厂印刷

开本: 787×1092 1/32 印张: 4 1/8 字数: 89,000

1986年3月第1版 1986年3月第1次印刷

责任编辑: 傅 强

封面设计: 邹君文

印数: 1—1,900

统一书号: 14288·67

定价: 0.98元

引 言

细胞杂交瘤是近年来兴起的一门实验技术。目前国外已普遍开展，并应用于科研和医疗实践中。国内，如北京、上海等地已经开展此项研究。

杂交瘤技术广泛地用于生物学、遗传学、免疫学以及医学各个领域，如病毒、细菌、寄生虫学，特别是在肿瘤学方面，它给探讨肿瘤发病机制、早期诊断与有效治疗等展现了光明的前景。因此，有人说杂交瘤技术是医学界的革命，是继DNA重组技术后的又一伟大成果。

细胞杂交通常是指以不同种属的动物（或植物）的体细胞，进行原生质融合，以获得杂种细胞的一种技术。实验证明，用不同种的动物体细胞进行融合，可以形成杂种细胞。但是动物细胞与植物细胞不同，它不具有全能性，所以杂种细胞不能培养成杂种个体，但可用来探讨细胞生物学及医学上的问题。

基于上述原理，应用细胞杂交瘤技术的目的是在于获得单克隆抗体。众所周知，抗体是一种免疫球蛋白，由体内B淋巴细胞产生。当机体受到细菌、病毒或其它抗原攻击时，B淋巴细胞就增殖、产生对这些抗原相应的抗体。但这些抗体不是均质的，即不是单一特异性的。所谓抗体多样性，是指抗体是由多种多样免疫球蛋白分子组成的，这些免疫球蛋白分子的形状、大小、结构及氨基酸的组成与排列等都有差

别。抗体多样性是机体免疫反应的特点之一。体内大约有一亿种B淋巴细胞，每一种只接受一种抗原决定簇的刺激而产生相应的抗体。⁽¹⁾给动物接种抗原后，机体便会产生出针对不同抗原分子或不同抗原决定簇的抗体分子。

那么，什么是单克隆抗体？首先必须了解什么是单克隆。单克隆的概念来源于50年代 Burnet 的无性繁殖细胞系选择假说。该假说认为，每一个抗体形成细胞（B细胞）及其分化的后代（浆细胞）被称为一个克隆（Clone）；一个克隆只能产生一种针对单一抗原决定簇的抗体而且是受遗传因素决定的。通俗地说：由一个细胞繁殖而形成的具有相同遗传特征的细胞叫做“克隆”；由一个抗体形成细胞大量增殖形成的克隆所产生的抗体就叫单克隆抗体（Monoclonal Antibody，以下简称为MoAb）。这种抗体分子组成是绝对纯一的，并且有高度特异性。而常规抗血清则是来自体内许多不同的抗体产生细胞的克隆，因而是多克隆抗体。在机体内，一般情况下不能形成MoAb，这是因为动物对于特定抗原刺激的抗体应答反应所决定的。由于种类繁多的大量免疫应答细胞共同活动的结果，每一种抗原均可为其不同抗原决定簇的各种抗体所识别，而每一抗原决定簇又可为多种抗体所识别。据估计纯系小鼠的抗体库范围位于 1×10^7 — 5×10^7 之间，每个抗原决定簇可为多达1000—8000种的不同抗体所识别。天然抗体系统所特有的这种高度复杂性和异质性，决定了很难或根本不可能由此制备可重复的针对某一特定抗原决定簇的抗体制剂。

多克隆抗体在应用上受到了严重地限制。人们长期以来梦寐以求能获得纯一的抗体——MoAb；能在体外大量地“生产”这种抗体；能对不完全纯化或抗原性很弱的抗原也

能产生MoAb。这几点应用杂交瘤技术或称细胞融合技术得到了解决。1975年8月George köhler 和Cesar Milstein 在剑桥的“医学研究委员会分子生物学实验室”发表了第一例制备大量 MoAb 的报告。从此开创了应用杂交瘤技术产生 MoAb的新纪元。(2)

目 录

引 言

第一章 细胞杂交瘤的实验技术	1
第一节 淋巴细胞杂交瘤的发展简史	1
第二节 杂交瘤技术的原理	2
第三节 杂交瘤技术的基本条件	4
(一) 选择骨髓瘤细胞	4
(二) 选择免疫动物	7
(三) HAT 培养液	8
(四) 细胞融合剂	10
(五) 胎牛血清	13
(六) 饲养细胞	14
(七) 免 疫	15
第四节 杂交瘤技术的基本操作方法	16
(一) 免疫小鼠脾细胞悬液的收集	17
(二) 小鼠腹腔巨噬细胞的收集	18
(三) 小鼠骨髓瘤细胞的准备	18
(四) 细胞融合的步骤与方法	19
第五节 杂交瘤细胞的筛选	23
(一) 选择筛选方法的原则	24
(二) 常用筛选方法简介	25
第六节 杂交瘤细胞的克隆化	31

(一) 有限稀释法.....	32
(二) 软琼脂培养法.....	34
(三) 显微操作法.....	34
(四) 应用荧光激活细胞分类器.....	35
第七节 单克隆抗体的鉴定.....	36
(一) 单克隆抗体的Ig类型鉴定.....	36
(二) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	36
(三) 凝胶等电点聚焦电泳.....	38
第八节 单克隆抗体的大量制备.....	41
(一) 体外培养法.....	41
(二) 动物体内培养法.....	42
(三) 微囊技术.....	43
第九节 杂交瘤细胞的冷冻保存.....	43
第十节 单克隆抗体的分离、纯化与保存.....	45
(一) 盐析法纯化单克隆抗体.....	46
(二) 亲和层析法纯化单克隆抗体.....	47
(三) DEAE 离子交换层析法.....	48
(四) 蛋白质 A- 琼脂糖珠亲和层析法.....	49
(五) 单克隆抗体的保存.....	50
第十一节 小鼠单克隆抗体的某些理化性质.....	51
第十二节 关于预防污染问题.....	52
第二章 单克隆抗体的应用	54
第一节 在某些基因调控方面的应用.....	54
(一) 绘制人类基因图.....	54
(二) DNA 复制检测.....	55
(三) 遗传缺陷的基因互补.....	56
(四) 控制肿瘤的恶性行为.....	57

第二节	应用单克隆抗体寻找特异性抗原·····	58
第三节	单克隆抗体在细胞免疫 方面的研究及应用·····	59
	(一) 抗人T细胞单克隆抗体的分类·····	59
	(二) 抗人T细胞单克隆抗体在人 T细胞研究中的应用·····	60
第四节	单克隆抗体在体液免疫方面的研究·····	62
	(一) 抗人IgG单克隆抗体·····	62
	(二) 抗人IgA单克隆抗体·····	63
	(三) 抗人IgE单克隆抗体·····	64
第五节	单克隆抗体在肿瘤学中的应用·····	64
	(一) 应用单克隆抗体探讨肿瘤抗原·····	64
	(二) 应用单克隆抗体探索肿瘤 抗原的初步成果·····	65
	(三) 单克隆抗体在肿瘤治疗、 诊断方面的应用·····	78
第六节	单克隆抗体在病毒方面的应用·····	81
	(一) 流感病毒·····	82
	(二) 乙型肝炎病毒·····	82
	(三) 脊髓灰质炎病毒·····	84
	(四) 其它·····	85
第七节	单克隆抗体在寄生虫方面的 研究与应用·····	86
第八节	单克隆抗体在钩端螺旋体 方面的研究·····	88
第九节	单克隆抗体在霍乱毒素 方面的研究·····	89

第十节	单克隆抗体在组织移植	
	方面的应用.....	89
第十一节	单克隆抗体在自身抗体	
	方面的研究与应用.....	91
第十二节	单克隆抗体用于肌无力的研究.....	93
第十三节	单克隆抗体用于硬皮病的研究.....	94
第十四节	单克隆抗体在干扰素方面的应用.....	95
第十五节	单克隆抗体在酶学中的应用.....	95
	(一) 抗人前列腺酸性磷酸酶的	
	单克隆抗体.....	95
	(二) 抗 β - 半乳糖苷酶的单克隆抗体.....	96
第十六节	单克隆抗体在激素、	
	受体及其它领域的应用.....	98
结 语		101
附 录		104
	(一) 细胞杂交瘤技术中主要试剂配制.....	104
	(二) 小鼠骨髓瘤细胞的培养方法.....	106
	(三) 无血清培养液的应用.....	107
	(四) 金黄色葡萄球菌蛋白 A	
	的纯化方法.....	108
	(五) 荧光抗体标记技术.....	109
	(六) 杂交瘤技术流程概要.....	111
	(七) 本书英语缩写检索.....	112
参考文献		114

第一章 细胞杂交瘤的实验技术

第一节 淋巴细胞杂交瘤的发展简史

杂交瘤技术的成功和其它事物一样是离不开前人的成果的。现在让我们对淋巴细胞杂交瘤的研究和发展，作一简单的回顾。

远在1838年Müller第一个描述了脊椎动物肿瘤细胞融合成多核细胞的现象。在这以后，人们相继在正常组织（如骨髓）以及炎症、坏死等病理组织中也发现了融合的多核细胞。1907年体外组织培养技术成功之后，人们又观察到体外培养的细胞，也能融合而形成多核巨细胞。到1958年冈田氏用高浓度的仙台病毒在体外成功地融合了小鼠艾氏腹水癌细胞后，细胞融合技术得到迅速发展。⁽³⁾1965年Harris⁽⁴⁾首次成功地用仙台病毒将体外培养的人Hela细胞与小鼠艾氏腹水癌细胞融合成一个杂交细胞。从此证明了不同种动物之间的细胞也可以融合在一起，所形成的杂交细胞具有亲代双方细胞的特性。现在不但不同种动物的细胞可以融合，而且植物细胞的原生质体与人Hela细胞的杂交也获得了成功。⁽⁵⁾1964年Littlefield⁽⁶⁾应用选择性培养基，能更方便地挑选出所需要的杂种细胞，这在融合技术上是重大进展。

本世纪50年代人们认识到骨髓瘤细胞能分泌均一的骨髓瘤蛋白。但是体外建株是在1965年成功的。Sachs等用矿物

油刺激BALB/C小鼠，诱生骨髓瘤细胞并在体外培养成功，于是给淋巴细胞杂交瘤技术的建立提供了条件。

1973年 Milstein 等⁽⁷⁾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，当杂交细胞合成抗体时，它们共显性地表达了两个亲代的信息。在这个实验的启发下，1975年⁽⁸⁾Köhler和 Milstein 用小鼠骨髓瘤细胞与用绵羊红细胞 (SRBC) 免疫的小鼠脾细胞杂交，在产生的杂种细胞中发现一个令人振奋的现象，那就是，它既能分泌特异性抗 SRBC 的 MoAb，又能在体外培养中永存传代。这项工作发表后立刻引起各国研究者的重视，相继开展了此项科研，在短短几年内无论在技术上还是在应用上都有迅速发展。由于单克隆抗体显示出对人类遗传表型突变或肿瘤发生有控制性能的意义，因而受到国内外普遍重视。

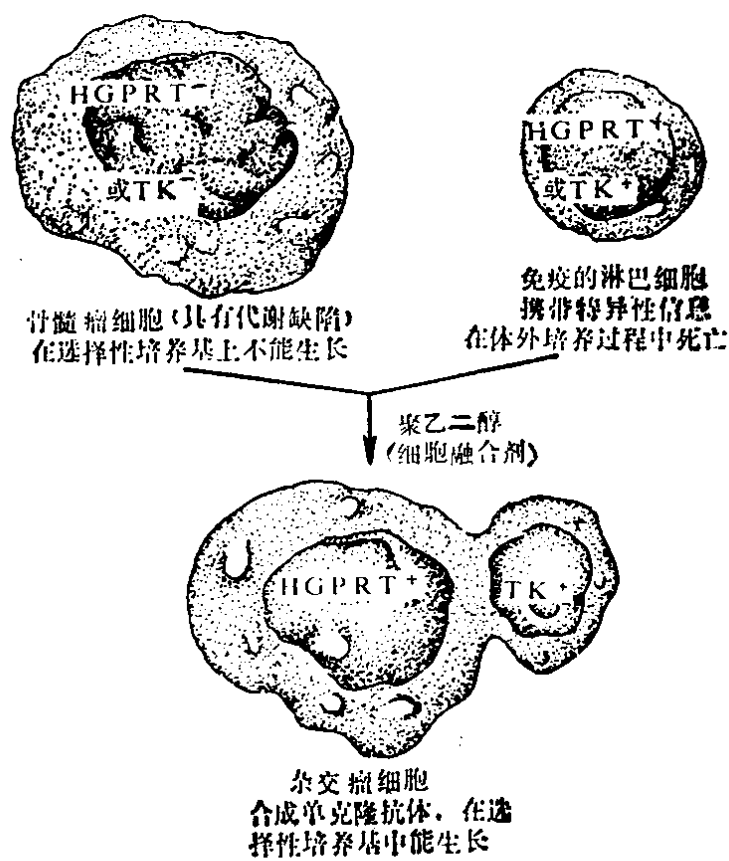
第二节 杂交瘤技术的原理

杂交瘤技术的基本原理是正常产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞，在选择性培养基中和细胞融合剂的存在情况下，经过一定条件的孵育，产生表现两亲代特征的杂交体(hybrid)：具有肿瘤一样的无限生长能力并使抗体产生细胞合成特异性抗体。

我们知道，免疫的 B 淋巴细胞能产生特异性抗体，但在体外培养却不能久存，最多只能存活10—20天。而骨髓瘤细胞在培养液中虽然能大量繁殖，但它分泌的骨髓蛋白却没有特异性。然而，这两种细胞融合起来产生的杂交瘤细胞，一方面具有骨髓瘤细胞那种在体外迅速生长的能力；另一方面又继承了免疫淋巴细胞的功能，携带特异性抗体。这样，就

可以通过培养，在体内、外大量地合成特异性抗体。由于每一个免疫淋巴细胞只能对单一的抗原决定簇产生特异性抗体，所以单克隆化的杂交瘤细胞所分泌的就必然是纯一的MoAb。

自发的细胞融合一般不易发生，如果添加一定的细胞融合剂，或称诱导细胞融合因子，几乎任何两种细胞都可以发生融合。然而融合的细胞毕竟还是少数，而未融合的肿瘤细胞会因迅速而大量地繁殖，最后以多数压倒杂交细胞。这就需要有一种方法，即保证只有杂交瘤细胞生长。现在普遍采用的是 Littlefield 设计的方法。(6) 这种方法的原理，是嘌呤和嘧啶的主要生物合成途径，可被叶酸的拮抗物氨基喋呤(A)阻断。但还存在一条所谓的“补救途径”。当存在胸腺嘧啶激酶(TK)和次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核苷转换酶(HGPRT)时，细胞可以利用外源的胸腺嘧啶(T)和次黄嘌呤(H)合成DNA，如果缺乏其中任何一种酶，补救途径的生物合成也就不能进行。但当这种缺乏某一种酶的细胞



HGPRT⁺: 次黄嘌呤—鸟嘌呤磷酸核苷转换酶
T⁺ K⁺: 胸腺嘧啶激酶

图1 杂交瘤细胞的生长原理

(如骨髓瘤细胞) 与另一个能提供所缺乏酶的细胞 (如免疫的淋巴细胞) 融合后, 就会在次黄嘌呤-氨基喋呤-胸腺嘧啶 (Hypoxanthine-aminopterin-thymidine:HAT) 选择性培养基中“挽救”下来, 并得以生长。而脾淋巴细胞尽管含 TK 和 HGPRT 却不能在体外长期存活; 骨髓瘤细胞则因缺乏 TK 或 HGPRT 而死亡⁽⁹⁾ (见图一, 杂交瘤细胞的生长原理)。

关于细胞融合的机制, 迄今还不完全被了解。在培养过程中观察, 首先看到细胞膜发生融合, 导致异核体 (Heterokaryous) 的形成, 后者具有 2 个或多个细胞核, 当在下次分裂时, 细胞核便发生融合, 于是产生杂交细胞。这种融合可能和细胞膜中的脂类物质有密切关系, 但只有在细胞互相紧密地接触后, 细胞膜中的脂类物质才会出现其分子物理结构的重新排列而实现细胞融合。“细胞融合剂”可能使细胞表面膜的脂类分子间物理结构发生变形, 容易打开细胞脂膜, 促使细胞融合 (详见细胞融合剂一节)。

第三节 杂交瘤技术的基本条件

有关杂交瘤技术应具备的基本条件, 大体涉及到供给融合的骨髓瘤细胞, 免疫动物的选择, 免疫方法, 培养条件与融合剂的使用等几个问题。

(一) 选择骨髓瘤细胞

根据上述杂交瘤形成的基本原理, 需要有 HGPRT 或 TK 缺乏的骨髓瘤细胞。选育缺乏 HGPRT 的细胞比较容易, 因为该酶由 X 染色体上的一个基因所编码, 而哺乳动物

仅有一条活性X染色体。因此，仅需一次突变就可使这种酶丧失殆尽。而选育缺乏TK的细胞系则较困难。(10)

小鼠骨髓瘤细胞的产生，可以通过在小鼠腹腔内注射一些碳氢化合物（塑料）、石蜡或油类制剂而诱发产生。比较简单的方法是反复在动物腹腔内注射姥鲛烷(Pristane)，或者在注射Pristane后再接种Abelson白血病毒，也可以诱发出骨髓瘤细胞。(9)也可以通过分别采用8-氮鸟嘌呤(8-Azaguanine:8-Aza)或5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-Bromodesoxyuridine:BuaR)培养剂进行诱导、选择而产生。不过目前所知，对上述诱发过程有高度敏感性的只有BALB/C和N2B品系小鼠。所以大量的小鼠骨髓瘤细胞是来自上述两种品系，而且适合细胞融合的也只是其中少数几种。

由于在细胞融合过程中，骨髓瘤细胞与脾细胞的轻、重链可能会随机地互相融合，因此为了避免骨髓瘤本身的免疫球蛋白的干扰，以便获得更纯一的抗体。从理论上选用不合成自身免疫球蛋白轻、重链或仅有免疫球蛋白的轻链的骨髓瘤细胞作为亲本细胞与脾细胞融合是最为理想的。

产生杂交瘤最常用的细胞是BALB/C小鼠的骨髓瘤细胞（起源于Mopc-21细胞），它分泌IgG₁分子和κ轻链。这个细胞系由Horibata等成功地适应于组织培养后被重新命名为P₃K。Milstein实验室建立了一株对8-Aza有抵抗力的P₃K亚系，命名为P₃-X63-Ag8，简称为X₆₃。这株细胞第一次用在脾细胞与骨髓瘤细胞的融合。该融合细胞除分泌由脾细胞方面来的Ig外，还分泌X₆₃的γ₁、κ链及混合分子。以后又从P₃选育出另一变种，叫做P₃-NS1-Ag4-1（简称为NS-1），它不合成γ₁重链，能合成κ轻链，但并不分泌出来，在细胞内就被降解了。采用NS-1而获得的杂交细胞，

除分泌脾细胞方面的 Ig 外，还分泌含 Mopc-21 κ 轻链的杂合子。两者的机率各占25%，其余50%可能是前者，也可能是后者。尽管这样，NS-1 细胞系仍是目前广泛用于杂交瘤生产的细胞系。

完全不分泌自身 Ig 的瘤细胞系，目前已选育出 2 株，并已普遍使用，它们是 X₆₃-Ag-8-653 和 SP2/0-Ag-4，SP2 所产生的杂交瘤对环境适应性差，不耐受高度的稀释和碱性 pH。

至今大鼠的合适的骨髓瘤细胞系只有一株 (210-RCY3-Ag-1)，它能分泌 κ 链，不分泌重链，是由骨髓瘤高发品系 Lou 株大鼠中选育出来的。

为了解决人单克隆抗体产生，人们曾试图寻找人细胞系以代替小鼠骨髓瘤系。在多发性骨髓瘤病人中已建立了各种细胞系，但是就每个细胞的 Ig 产生速度来说，还都赶不上小鼠或大鼠骨髓瘤。最近美国斯坦福大学 Olsson 和 Kaplan⁽¹¹⁾ 以及费城 Wistar 研究所的 Croce⁽¹²⁾ 先后报道成功地产生了人类的杂交瘤细胞。前者应用骨髓瘤细胞 SKO-007，这是从人类骨髓瘤细胞株 U-266 经 8-Aza 诱发而成的酶缺陷 (HGPRT⁻) 变异株。后者应用骨髓瘤细胞 A₁₂，系从人类骨髓瘤细胞株 GM1500 化学诱发而成的亚型。最近谷淑燕等报道，从人的高分化鼻咽癌细胞株 (CNF) 中建立了抵抗 8-Aza 的 CNF-A 细胞株，可用于人细胞与人细胞融合。⁽¹³⁾ 人类杂交瘤细胞产生的 MoAb，可能更有助于临床应用。现将用于融合的主要骨髓瘤细胞系列在表 1 以供参考。顺便提一下，对于这些瘤系进行比较的专门报道虽然不多，但据一些研究者的意见，它们的融合率似乎无明显差异，只是瘤细胞系本身会发生改变、或融合率下降、或抗体合成不稳定。因此，

在初次融合时，切忌单用一种瘤系，至少要用 3 种不同的瘤系分别进行融合。然后从中找出结果最佳者大量冻存，以备应用。

表 1 用于融合的骨髓瘤细胞株

细胞株 (简称)	染色体数	物 种 (品系)	分泌Ig链
P ₃ -X63-Ag8 (P ₃)	65	小鼠 BALB/C	κ, γ
P ₃ -NS1-Ag4-1 (NS1)	65	(X63)BALB/C	κ (非分泌型)
P ₃ -X63-Ag8-653 (P ₃ -653)	58	(X63-Ag8) BALB/C	不合成
SP2/0-Ag14 (SP2/0)	72	(X63-Ag8 × BALB/C 杂交瘤)	不合成
FO	72	SP2/0-Ag14 克隆	不合成
S194/5XXOBU1 (S194)		小鼠 BALB/C	不合成
MPC11-45-6TG (MPC11)	62	小鼠 BALB/C	$\gamma 26, \kappa$
210-RCY ₃ -Ag123 (R210)	39	大鼠 Lou	κ
PuBu1-Ou		小鼠 BALB/C	不合成
P ₃ -X63-Ag8-U1		小鼠 BALB/C	不合成
U266AR (SKO-007)		人类	κ, γ
GM1500-A12 (A12)		人类	λ_2

(二) 选择免疫动物

选择免疫动物，即供脾动物，通常选用小鼠。一般的经验是，正常供体和骨髓瘤细胞种系发生越近缘，产生的杂交瘤就越稳定(反之亦然)。因为作为融合用的大多数小鼠骨髓

瘤细胞是从BALB/C纯系小白鼠取得,所以用BALB/C作脾细胞供体最为合适。脾细胞供体免疫的目的主要有二:①扩大所需要的细胞系数,以增加获得该种杂交细胞产生的机会。②激活B细胞,以分化成为能融合及形成有用的杂交细胞。(14)据报道选用大鼠作脾脏供体,有时要比小鼠好。例如,用小鼠淋巴细胞为免疫原时,大鼠供体的杂交瘤抗体,可检出更多的抗原。而且,在大鼠体内生长时,能产生大量的腹水和血清。但不利因素是,只有少数大鼠的IgG分子能与葡萄球菌蛋白A结合,妨碍了简化的纯化抗体方法的使用。(后详)有人做兔—小鼠的杂交细胞没有得到满意结果。

(三) HAT培养液

当细胞融合之后要加HAT培养液,这种培养液是在普通培养基里面加上HAT(H为次黄嘌呤Hypoxanthine, A为氨基喋呤Aminopterin, T为胸腺嘧啶Thymidine。其配方见附录一),于是使脾细胞及骨髓瘤细胞不能繁殖而死亡,但融合的杂交瘤细胞可以大量地繁殖,所以也称选择性培养基。杂交细胞选择性培养基是1964年Littlefield创立,他利用生化方面具有不同缺陷的亲代细胞进行杂交,由于亲代细胞在培养基中不能生长,因而能方便地挑选出生长的杂种细胞。在选择性培养基中,HAT培养基是应用最广的一种。它的原理前面已经概括谈过,这里再详细解释一下。

1. 正常的骨髓瘤细胞可以利用谷酰胺(Gln)与尿核苷单磷酸(UMP)合成DNA,这是主要途径。但这条途径可被氨基喋呤所阻断。此外,还可以通过骨髓瘤细胞体内的HGPRT利用次黄嘌呤合成DNA;也可以通过TK利用胸腺嘧啶合成