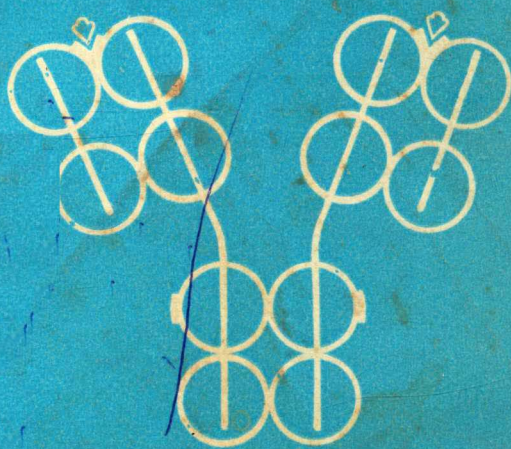
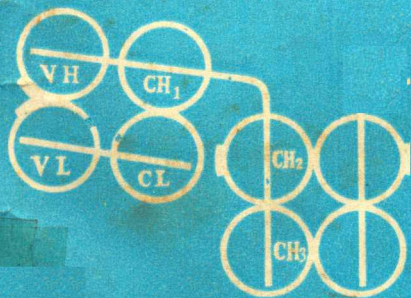


# 单克隆抗体

杂交瘤与ELISA

岩崎辰夫·安東民衛·市川かおる·保井太郎著  
林碧瑚 译 严詠楷 郭辉玉 审校



## 译者的话

“单克隆抗体”一书是日本东京都神经科综合研究所岩崎辰夫教授根据他们研究室的日常工作写成的。它十分详细而具体地介绍了用B细胞杂交瘤制备单克隆抗体的实验技术。书中附有大量插图，形象地描绘各项实验操作，使读者易于理解和应用。

单克隆制备技术的问世，是生物学技术上的一次革命。单克隆抗体如今作为一种梦寐以求的药物广泛应用于医学和生物学的各个领域。该书对从事单克隆抗体制备的同志无疑是一本极好的参考书，对当代医学生及广大医务工作者也是一本难得的学习资料。因此译者特将它译成中文介绍给国内读者。如能对大家有所帮助，译者将感到十分荣幸。由于水平所限，译本中错漏在所难免。欢迎广大读者批评指正。

本译著承蒙中山医学院微生物教研组严咏楷教授和郭辉玉教授审校。在印刷出版过程中得到广东省卫生厅科教处的大力支持。仅此表示衷心感谢。

译者

1983.8.20.

## 新序 前言

1975年,英国的Milstein等将不能长期持续培养的抗体产生细胞,与能够长期持续培养的骨髓瘤细胞,融合成为既能产生抗体、又能长期持续培养的B细胞杂交瘤,使大量制备均一性抗体成为可能。这是一划时代的工作,也可以说是生物学上的一次革命。目前,单克隆抗体作为“梦寐以求”的试剂正广泛应用于医学生物学的各个领域。本书仅介绍我们实验室日常进行的利用B细胞杂交瘤制备单克隆抗体的技术。能对有志于制备单克隆抗体的学者们提供参考,将是十分荣幸的。

本书的编写和出版得到讲谈社科学部以富雅映氏为代表的各位先生的协作和鼓励,仅此向诸位致以衷心的感谢。

1982年12月

岩崎、辰夫

# 目次

## 第一章 单克隆抗体

(岩崎 辰夫)

- 一、抗体的基本结构
- 二、抗体的多样性
- 三、单克隆抗体

## 第二章 杂交瘤制备的原理

(岩崎 辰夫)

- 一、抗体产生细胞与杂交瘤细胞株
- 二、细胞融合与杂交瘤的选择
- 三、抗体的筛选、杂交瘤的克隆化, 单克隆抗体的大量生产。

## 第三章 单克隆抗体的应用

(市川かわる)

- 一、细胞分化的研究与单克隆抗体
  - (一)人类 T 细胞分化与机能亚群研究的应用。
  - (二)鼠 T 细胞分化与机能亚群及单克隆抗体
- 二、病毒糖蛋白抗原分析
  - (一)容易发生糖蛋白抗原变异的病毒
  - (二)不易发生糖蛋白抗原变异的病毒

(岩崎一辰夫)

- 三、病毒颗粒糖蛋白的功能分析

## 第四章 单克隆抗体制备法

(安东 民卫)

- 一、前言
- 二、细胞融合前的准备
  - (一)动物的免疫
  - (二)脾细胞的制备
  - (三)骨髓瘤的培养
- 三、细胞融合
- 四、从杂交瘤形成到单克隆抗体的制备
  - (一)细胞的HAT选择与筛选
  - (二)用有限稀释法克隆化
  - (三)细胞的冰冻保存
  - (四)单克隆抗体溶液的制备与保存
- 五、杂交瘤的定量分析
  - (一)细胞的接种
  - (二)细胞的增殖

(三) 杂交瘤形成的障碍

第四章附录

- I 抗原明矾沉淀法
- II 胎牛血清质量检查法
- III 脾细胞中红血球的破坏
- IV RPMI 1640培养基(NS-1用)的制备
- V 50倍浓度HAT保存液(HAT培养基用)的制备
- VI 50倍浓度HT保存液(HT培养基用)的制备
- VII NS-1培养基, HAT培养基、HT培养基的制备
- VIII 200倍浓度青、链霉素混合液的制备(RPMI培养基用保存液)
- IX 含NaCl的pH7.4 0.05M磷酸缓冲液的制备(透析用1)
- X Dulbeccos' 磷酸缓冲盐水的制备(透析用2)
- XI 单克隆抗体制备实例

第五章 单克隆抗体检出法

(保井孝太郎)

- 一、ELISA法与RIA法
  - (一)ELISA法
  - (二)RIA法
- 二、细胞性抗原的抗体检测
- 三、使用细胞损伤、<sup>51</sup>Cr释放法检测细胞表面抗原的单克隆抗体
- 四、各类免疫球蛋白及其亚群的鉴定
- 五、用蛋白A提纯单克隆抗体
- 六、用单克隆抗体鉴定和提纯抗原
  - (一)用单克隆抗体配位的亲和层析
  - (二)用免疫沉淀反应鉴定抗原

索引(略一译者)

# 第一章

## 单克隆抗体

### 一、抗体的基本结构

抗体的基本结构由二条轻链和二条重链构成。轻链是由大约215个氨基酸组成的短肽链，重链是由大约430个氨基酸组成的长肽链。轻链和重链都是由约110个氨基酸组成的排列相似的同簇体单位 (homology unit) 重复构筑而成。同簇体单位通过S—S结合形成球状的domain结构(1~3)。轻链由2个domain，重链由4~5个domain构成。

轻链和重链的氨基末端第一个domain是结合抗原的部位，该domain的氨基酸排列可因该抗体结合抗原的特异性而改变，称为可变区。轻链用V<sub>L</sub>重链用V<sub>H</sub>符号表示。可变区由氨基酸排列固定的4个骨架区 (framework residues: FR) FR<sub>1</sub>, FR<sub>2</sub>, FR<sub>3</sub>, FR<sub>4</sub>与氨基酸排列多变的三个超可变区 (hypervariable region: HV) HV<sub>1</sub>, HV<sub>2</sub>, HV<sub>3</sub>组成(4)。轻链羧基末端的氨基酸排列与该抗体结合抗原的特异性无关而且排列恒定，称为恒常区。以C<sub>L</sub>符号表示。C<sub>L</sub>的氨基酸排列有两个型，κ型与λ型。重链除可变区外，也有与该抗体结合抗原的特异

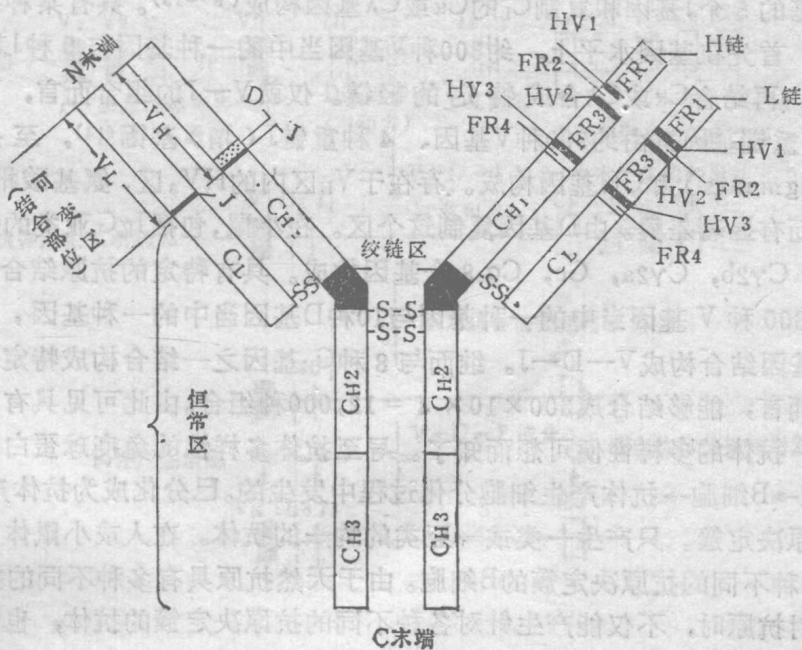


图1.1抗体的Y字型构造。构造和机能上都是左右对称的，为了图示详细构造而将其分为左右两部分。

性无关的、氨基酸排列比较恒定的三个domain  $CH_1$ ,  $CH_2$ ,  $CH_3$ 构成的恒常区 $CH$ 。抗体以 $CH$ 的氨基酸排列为基准区分为IgM、IgD、IgG、IgA、IgE五类。分别具有重链 $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ 链。 $\mu$ 链与其他重链不同,具有 $CH_4$ domain而稍长些; $\gamma$ 链,在人类有 $\gamma_1$ 、 $\gamma_2$ 、 $\gamma_3$ 、 $\gamma_4$ 、链。在小鼠有 $\gamma_1$ ,  $\gamma_{2a}$ ,  $\gamma_{2b}$ ,  $\gamma_3$ 链。分别构成人类的IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>与小鼠的IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>。 $CH$ 具有结合补体、结合Fc受体,通过胎盘等抗体的生物学功能。 $CH_1$  domain和 $CH_2$  domain之间有绞链区(hinge region)。它具有调节两个抗原结合部位间距离的绞链功能,在形成抗体分子Y字型构造的方面,是一个重要的部位。

免疫球蛋白的基本结构由2条相同的轻链和2条相同的重链构成,各条链以S—S结合而相互连结。IgD, IgG, 血清型IgA由一个基本结构单位组成, IgM是5个,分泌型IgA是2个基本结构单位的聚合物。在基本结构单位的聚合上,需要一种叫做J链(joining chain)的、分子量为15,000的、胱氨酸含量高的多肽<sup>(5)</sup>。而分泌型IgA再与被 称为SC成分(Secretory component)的分子量为65,000的多肽结合,分泌于粘膜表面<sup>(6~8)</sup>。因此, IgM的分子结构是 $(\mu_2\kappa_2)_5J$ 或 $(\mu_2\lambda_2)_5J$ ; IgG是 $\gamma_2\kappa_2$ 或 $\gamma_2\lambda_2$ ; IgD是 $\delta_2\kappa_2$ 或 $\delta_2\lambda_2$ ; IgE是 $\epsilon_2\kappa_2$ 或 $\epsilon_2\lambda_2$ ; 血清型IgA是 $\alpha_2\kappa_2$ 或 $\alpha_2\lambda_2$ , 分泌型IgA是 $(\alpha_2\kappa_2)_2J$ , SC或 $(\alpha_2\lambda_2)_2JSC$ 。

## 二、抗体的多样性

抗体具有结合抗原的特异性,具有类、亚类、亲和力等等的多样性。如何发现这种多样性是多年来免疫学的重要课题。最近,由于遗传工程学的急速进步,这个课题也不断地得以阐明。

复制轻链的轻链基因群,推测有能够复制抗原结合特异性的约300种V基因,复制VL的最后13个氨基酸残基的5个J基因和复制 $C_L$ 的 $C_{\kappa}$ 或 $C_{\lambda}$ 基因构成<sup>(9~13)</sup>。具有某种抗原结合特异性的轻链的产生,首先在基因水平上,约300种V基因当中的一种基因与5种J基因中的一种基因结合成V—J,再结合 $C_{\kappa}$ 或 $C_{\lambda}$ 合成特定的轻链。仅就V—J的组合而言,可有 $300 \times 5 = 1,500$ 种组合。重链基因群由约300种V基因、4种重链J( $J_H$ )基因<sup>(14)</sup>,至少有10种D基因(diversity segments)和 $CH$ 基因构成。存在于 $V_H$ 区内的 $HV_3$ 区,氨基酸排列和残基数,因抗体分子不同而有显著差异。由D基因复制这个区。在小鼠,包括IgG亚类的 $C_H$ 基因由 $C_{\mu}$ ,  $C_{\delta}$ ,  $C_{\gamma_3}$ ,  $C_{\gamma_1}$ ,  $C_{\gamma_{2b}}$ ,  $C_{\gamma_{2a}}$ ,  $C_{\epsilon}$ ,  $C_{\alpha}$  8个基因构成。具有特定的抗原结合特异性的重链的产生,由约300种V基因当中的一种基因与10种D基因当中的一种基因,再与4种 $J_H$ 基因当中的一种基因结合构成V—D—J。继而与8种 $C_H$ 基因之一结合构成特定的重链。仅就V—D—J的组合而言,能够结合成 $300 \times 10 \times 4 = 12,000$ 种组合。由此可见具有抗体多样性的分子遗传学基础,抗体的多样性便可想而知了。导致抗体多样性的免疫球蛋白基因的种种结合,是在生殖细胞→B细胞→抗体产生细胞分化过程中发生的。已分化成为抗体产生细胞者,只能识别一种抗原决定簇。只产生一类或一亚类的均一的抗体。在人或小鼠体内,估计有 $10^6$ 以上的识别各种不同的抗原决定簇的B细胞。由于天然抗原具有多种不同的抗原决定簇,因此在给动物注射抗原时,不仅能产生针对各种不同的抗原决定簇的抗体,也能产生针对一种抗原决定簇的不同类别、亚类和亲和力的复数抗体。即使是等量注射同一抗原,由于动物种类和个体差异、采血时间的不同,存在于血清中的抗体的组成也不同。因此,免疫血清中有多种多样的抗体混合存在。

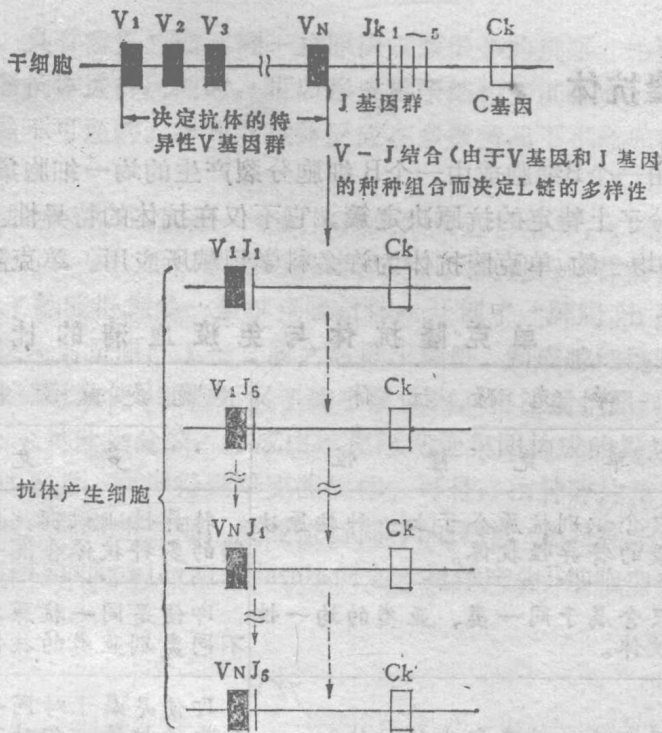


图1.2 L链的多样性的分子遗传学基础

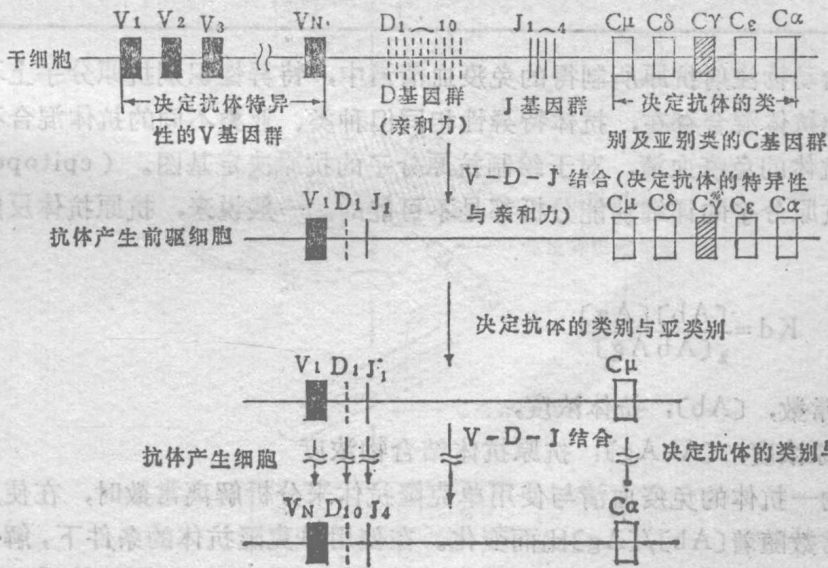


图1.3 H链的多样性的分子遗传学基础\*小鼠有Cγ3 Cγ1 Cγ2b Cγ2a基因群



### 三、单克隆抗体

单克隆抗体是由一个B细胞或由一个B细胞分裂产生的均一细胞集团所产生的抗体。因此，它只识别抗原分子上特定的抗原决定簇。它不仅在抗体的特异性上是均一的，而且类、亚类、亲和力等都是均一的。单克隆抗体为许多科学领域所应用。单克隆抗体有效性的基点在

表1.1 单克隆抗体与免疫血清的比较

	单克隆抗体	免疫血清中所含的抗体
抗体产生细胞	单克隆性	多克隆性
抗体的特异性	只含识别抗原分子上一种抗原决定簇的特异性抗体。	特异性地识别抗原分子上各种抗原决定簇的多种抗体混合一起。
抗体的类、亚类	只含属于同一类、亚类的均一性的抗体。	即使是同一抗原决定簇的相应抗体，但不同类别亚类的抗体混合存在。
抗体的亲和力	只含均一性亲和力的抗体。	即使是属于对同一抗原决定簇的同一类亚类的抗体，但对不同抗原具有不同亲和力的抗体混合存在。
抗原—抗体反应	反应机理可用分子反应进行解释。可逆的。	由于不均一抗体的混合存在，单纯用分子反应难以解释。不可逆的
抗原—抗体形成的格子结构	一般难以形成。	容易形成。

于它的均一性。给动物注射抗原所制得的免疫血清当中，特异性识别抗原分子上不同抗原决定簇的各种类型的抗体混合存在，抗体特异性相同但种类、亚类不同的抗体混合存在，使用这种含有不均一抗体的免疫血清，对于绘制抗原分子的抗原决定基图。(epitope map)或者利用抗体进行抗原分子的详细功能分析都是不可能的。一般说来，抗原抗体反应以下述分子反应式表示：

$$K_d = \frac{[Ab][Ag]}{[AbAg]}$$

K<sub>d</sub>: 解离常数, [Ab]: 抗体浓度,

[Ag]: 抗原浓度, [AbAg]: 抗原抗体结合物浓度

使用含有不均一抗体的免疫血清与使用单克隆抗体来分析解离常数时，在使用免疫血清的情况下，解离常数随着[Ab]/[Ag]比而变化。在使用单克隆抗体的条件下，解离常数不受[Ab]/[Ag]支配，通常是固定的。这意味着在单克隆抗体方面，抗原抗体反应单纯地作为二分子反应进行。使用含有能够与抗原分子上的多种抗原决定簇特异性结合的混杂抗体的免疫血清，与抗原进行反应时，在抗原分子之间，由于抗体的多样性架桥而产生具有三次格子结构的沉淀物。利用这种现象可以对各种抗体或抗原进行定量分析。单克隆抗体由于只含有识别抗原分子上一种抗原决定簇的抗体，与抗原进行反应时，由抗原分子间的抗原决定簇架桥而

形成格子结构的很少。具有重复构造、同一抗原决定簇很多的抗原，由同一亚单位重合而形成的多量体等与单克隆抗体进行反应时，可以形成格子结构的沉淀物。这样形成的三次元格子结构，其反应最终是不可逆的。单克隆抗体反应在多数情况下不形成格子结构，所以是可逆的。

从注射了抗原的动物的脾脏，取出一个抗体产生细胞进行培养，可以产生单克隆抗体。由于脾细胞在一周内将全部死尽，所以获得的抗体极少。反复进行同样的操作也得不到相同的抗体。Keimman等为了能够得到多一些单克隆抗体，开创了“脾局灶系”（Spleen focus system）方法。给小鼠注射抗原，1~2周之后取出脾脏，制成脾细胞悬液。将 $10^6 \sim 10^7$ 免疫脾细胞移入经过X线照射致使B细胞死灭了的小鼠体内，再注射抗原时，已分别在脾脏的各个部位定居了的B细胞便开始分裂，形成由单克隆细胞集团构成的局灶。将含有一个局灶的脾组织切成碎片进行培养，可以得到单克隆抗体。可是，由脾碎片培养所产生的抗体，只能持续2周，所产生的抗体量也有限，反复进行同样的操作，还是得不到两次相同的抗体。为了克服这一缺点，1975年Kohlev与milstein创立了抗体产生B细胞杂交瘤。

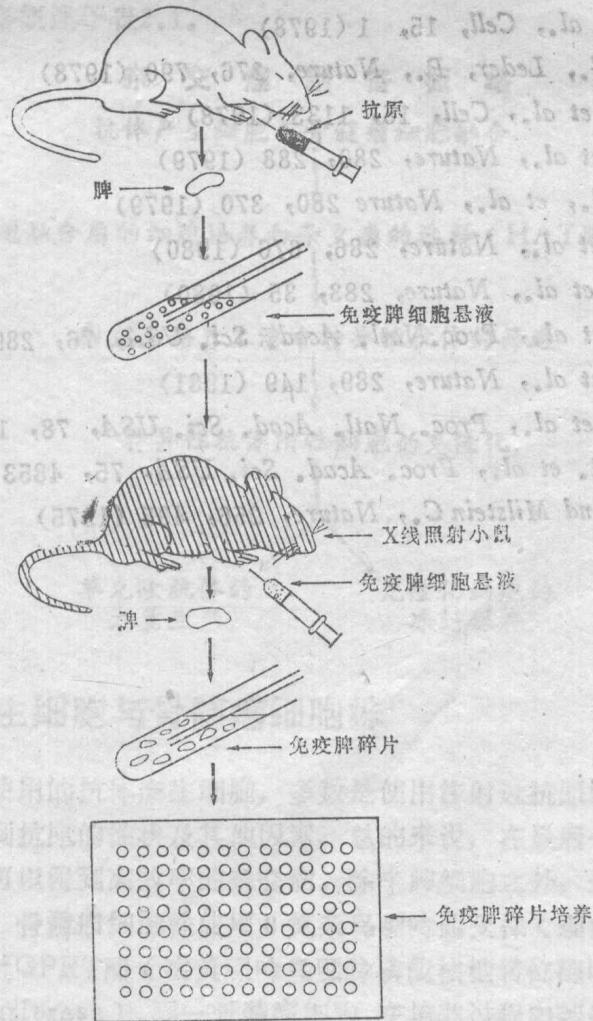


图1.4 脾局灶系

## 文 献

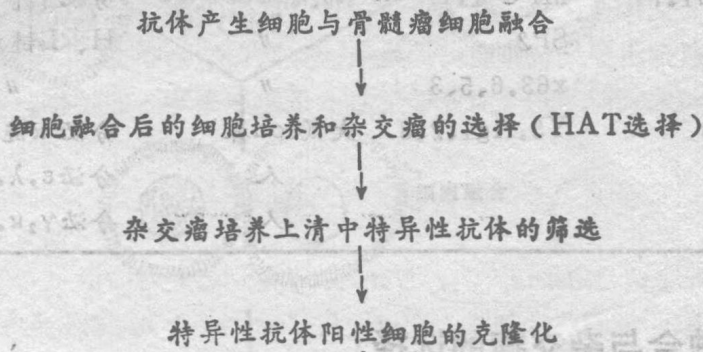
1. Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63, 78 (1969)
2. Amzel, L.M., Poljak, R.J., *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 961 (1979)
3. Silverton, E.W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS*, 74, 5140 (1977)
4. Kafat, E.A., Wu, T.T. Bilofsky, H., in *Sequences of Immunoglobulin Chains*, NIH (1979)
5. Mestecky, J. et al., *Science*, 171, 1163 (1971)
6. O'Dalk, J. and Cebra, J.J., *Protides of Biological Fluids*, p. 205, pergamon (1969)
7. Newcomb, R.W. et al., *J. Immunol*, 101, 905 (1968)
8. Tomasi, T.B. and Czerninski, D.S., *The Nat'l Fdn. March of Dimes*, Vol. IV, No. 1, p. 270 (1968)
9. Brack, C. et al., *Cell*, 15, 1 (1978)
10. Seidman, J.G., Leder, P., *Nature*, 276, 790 (1978)
11. Bernard, O. et al., *Cell*, 15, 1133 (1978)
12. Sakano, H. et al., *Nature*, 280, 288 (1979)
13. Seidman, J.G., et al., *Nature* 280, 370 (1979)
14. Sakano, H. et al., *Nature*, 286, 676 (1980)
15. Schilling, J. et al., *Nature*, 283, 35 (1980)
16. Rao, D.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 2890 (1979)
17. Shimizu, A. et al., *Nature*, 289, 149 (1981)
18. Nishida, Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1581 (1981)
19. Breathnach, R. et al., *Proc. Acad. Sci. USA*, 75, 4853 (1978)
20. Köhler, G. and Milstein C., *Nature*, 256, 495 (1975)

# 第二章

## 杂交瘤制备原理

从免疫动物取出的抗体产生细胞，其寿命不同于肿瘤细胞，不能够长期持续培养。若能建立既产生抗体又能长期持续培养的细胞株，则任何时候都能够大量地制备单克隆抗体。为此，制备一种具有产生抗体的细胞质和能够持续培养的细胞质的杂种细胞无疑是最理想的。出于这种考虑Köhler和milstein的抗体产生B细胞杂交瘤问世了。用羊红细胞免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合，建立了既产生抗羊红细胞膜的特定抗原决定簇的单克隆抗体又能够持续培养的杂交瘤。这一划时代的技术的建立，和遗传工程一样，带来了生物学实验方法的革命。杂交瘤制备概述于表2.1。

表2.1 杂交瘤制备概略



### 一、抗体产生细胞与骨髓瘤细胞株

制备杂交瘤时所使用的抗体产生细胞，多数是使用注射过抗原的动物的脾细胞。制订免疫方案时，必须考虑到抗原的性状及其他因素，总的来说，在最后一次追加免疫之后的第3~4天采取脾细胞，可以得到高效率的杂交瘤。除了脾细胞之外，还可以用淋巴结细胞、末梢血中的淋巴细胞等。骨髓瘤细胞株使用8氮杂鸟嘌呤耐受株（理由参考下一节）。8氮杂鸟嘌呤耐受株，缺乏HGPRT酶（次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转位酶hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase），同一骨髓瘤细胞，在培养过程中若出现突变株混杂，那么8氮杂鸟嘌呤耐受性、细胞融合能力、杂交瘤的抗体产生能力都会改变。常常需要再进行克隆化才能维持其产生高度均一性抗体的能力。

制备杂交瘤时，必须考虑到抗体产生细胞与肿瘤细胞的组合问题。小鼠的骨髓瘤细胞株与同系或异系小鼠的脾细胞或大白鼠细胞融合，可以获得高效率的产生单克隆抗体的杂交瘤。与兔的脾细胞融合时，杂交瘤的形成率在同系小鼠的1/10以下。而且只分泌兔的轻链而不分泌完全的兔抗体。小鼠来源的骨髓瘤株与人或蛙的抗体产生细胞制备杂交瘤时也难以产生人或蛙的抗体。非鼠染色体优先脱落。用小鼠的脾细胞与小鼠的T细胞肿瘤(thymoma)细胞株制备杂交瘤时，不产生抗体。因此必须采用适合于抗体产生细胞的肿瘤细胞株。骨髓瘤细胞当中，有合成轻链或重链的，采用这种细胞株时，可能发现抗体产生细胞合成的重链或轻链中有杂瘤抗体分子(hybrid antibody molecules)混杂。最近有人采用了不合成重链或轻链的骨髓瘤细胞株。

表2.2 制备杂交瘤所使用的骨髓瘤细胞株

全 称	简 称	来 源	特 征
P3-NS-1-1-Ag4-1	NS-1	小鼠BALB/C	细胞内合成κ链，但不分泌
P3-x63-Ag8	P <sub>3</sub>	BALB/C	分泌γ <sub>1</sub> κ链
P3-x63-Ag8-U <sub>1</sub>	P3U <sub>1</sub>	"	合成γ链，但不分泌。
MPC11-45, 6.TG1.7	MPC-11	"	分泌γ <sub>2b</sub> κ。
SP2/0-Ag14	SP2	"	H、L链都不合成
X63-Ag8-6.5.3	x63.6.5.3	"	"
210RCY Ag 1,2,3	Y3.Ag1,2,3	大鼠lou株	分泌κ链
SKO-OO 7		人	分泌ε.λ。
GM15006TG-A <sub>12</sub>		人	分泌γ <sub>2</sub> κ。

## 二、细胞融合与杂交瘤的选择

细胞与细胞互相融合的方法，有岡田发现的使用HVJ病毒的方法和利用电流的方法等等。最近采用了细胞毒性比较小，融合操作又比较简单的聚乙二醇(Polyethyleneglycol)法，聚乙二醇搅乱细胞膜的双层脂质结构，增加细胞膜的流动性，使相互接近的细胞膜之间容易发生膜融合。抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合，形成一个含有双方细胞核的异型核细胞。异型核通过细胞分裂而成为具有双方染色体的同型核的杂交瘤。细胞融合在任何种类的细胞之间均可发生。骨髓瘤与脾细胞、骨髓瘤细胞与骨髓瘤细胞，脾细胞与脾细胞之间均可发生。因此必须仅仅选择那些产生抗体的杂交瘤。为此骨髓瘤细胞株用HGPRT酶缺损的8氮杂鸟嘌呤耐受株。核苷酸的合成途径有两条。一条是第一途径，另一条是旁小路。氨基嘌呤是叶酸的衍生物，它阻断第一途径中的叶酸还原酶，从而阻碍嘌呤和嘧啶的合成。因此，在氨基嘌呤存在时，细胞为了继续生存，必须利用次黄嘌呤和胸腺嘧啶来合成核苷酸。第二条途径就是旁路。细胞融合时所用的骨髓瘤细胞，是8氮杂鸟嘌呤耐受株，缺乏核苷酸合成旁路中所必需的HGPRT酶。在HAT培养基中(含次黄嘌呤氨基嘌呤胸腺嘧啶 hypoxanthin-Aminopterin-thymidin的培基)由于不能合成核苷酸因而不能存活。骨髓瘤细胞与骨髓瘤细胞形成的融合细胞同样也不能存活，骨髓瘤细胞与脾细胞形成的融合细胞，利用脾细胞的

表2.3

HAT 选择培养基中各种细胞的增殖能力

细胞	Hypoxanthin-Aminopterin-thymidine (HAT) 培养基中的增殖
骨髓瘤细胞: 骨髓瘤细胞	不能增殖
骨髓瘤细胞: 脾细胞	能增殖
脾细胞: 脾细胞	约2周内死尽

HGPRT酶合成核苷酸,因此在HAT培养基中可以存活。但脾细胞与脾细胞形成的融合细胞,因为是正常细胞,寿命短,两周内将全部死亡,以上是用HAT培养选择杂交瘤的原理。

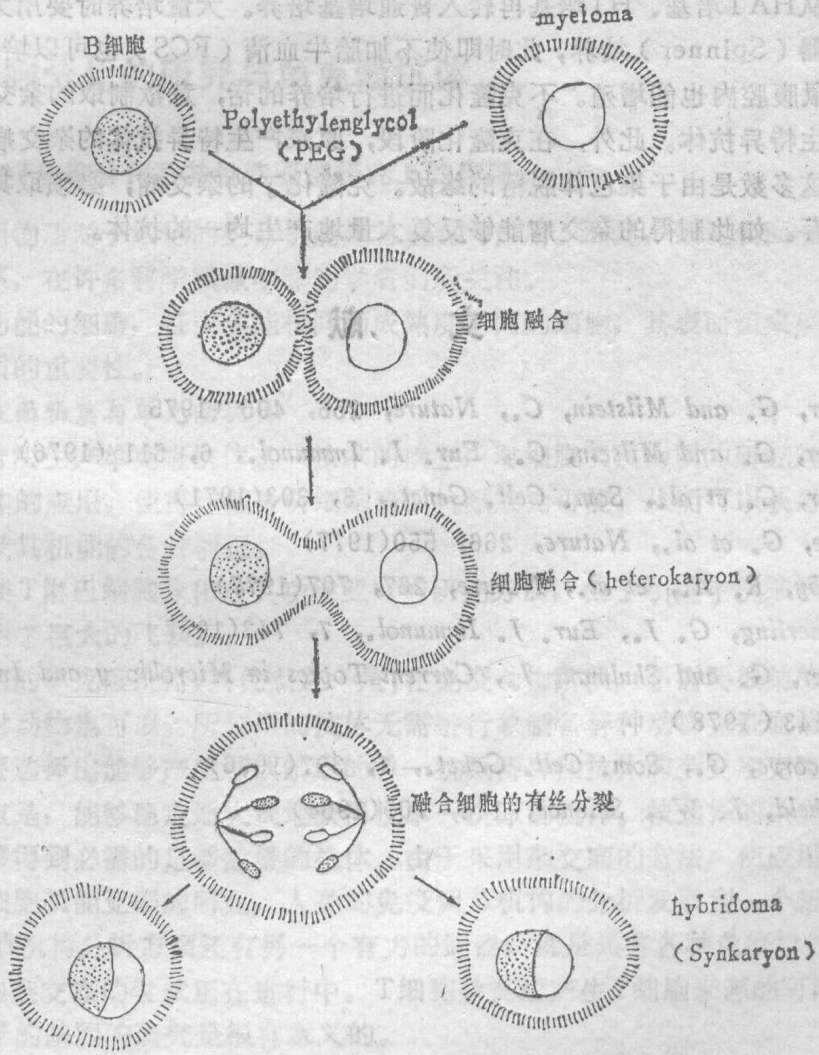


图2.1 B细胞融合

### 三、抗体筛选, 杂交瘤克隆化, 单克隆抗体的大量生产。

取细胞融合之后的细胞悬液, 加入96孔微量滴定盘内, 培养约两周, 此间不断添加HAT培养基。在这一过程中, 只有骨髓瘤细胞与抗体产生细胞形成的杂交瘤, 才能选择性地存活下来。形成杂交瘤的孔内, 培养上清中是否产生特异性抗体, 按第四章所记载的方法进行筛选。将抗体阳性孔内的杂交瘤移到24孔盘内, 加大培养规模。再从各孔的培养上清中筛选特异性抗体, 然后将阳性孔内的杂交瘤进行克隆化, 克隆化的方法如第四章所记载的那样, 有(1)用有限稀释法稀释至每孔含有一个杂交瘤。(2)用软琼脂法挑取软琼脂中形成的克隆。(3)用显微操纵器(micromanipulator)挑取单个细胞的方法。(4)“Sorter Clone”分类器法: 用FACS(荧光激活细胞分类器Fluorescent Activated Cell Sorter参考第三章)分离单个细胞等等。有限稀释法因其简便而被广泛应用。因为意欲制取的杂交瘤有被其他杂交瘤稀释殆尽的可能, 所以尽快克隆化是很重要的。克隆化通常要重复2次。克隆化了的杂交瘤, 从HAT培养基、HT培养基再转入普通培养基培养。大量培养时要用大型培养瓶。回转培养或旋转器(Spinner)培养, 此时即使不加胎牛血清(FCS)也可以培养。同系小鼠腹腔内或nu/nu鼠腹腔内也能增殖。不克隆化而进行培养的话, 意欲制取的杂交瘤有可能会被稀释而不能产生特异抗体。此外, 在克隆化阶段, 原来产生特异抗体的杂交瘤, 也可能突然不产生抗体。这多数是由于染色体脱落的缘故。克隆化了的杂交瘤, 必须取其中的一部分置液氮中冻结保存。如此制得的杂交瘤能够反复大量地产生均一的抗体。

### 文 献

1. Kohler, G. and Milstein, C., *Nature*, 256, 495 (1975)
2. Kohler, G. and Milstein, C., *Eur. J. Immunol.*, 6, 511 (1976)
3. Kohler, G. et al., *Som. Cell. Genet.*, 3, 303 (1971)
4. Galfre, G. et al., *Nature*, 266, 550 (1977)
5. Goldsby, R. A., et al., *Nature*, 267, 707 (1977)
6. Hammerling, G. J., *Eur. J. Immunol.*, 7, 743 (1977)
7. Kohler, G. and Shulman, J., *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 81, 143 (1978)
8. Pontecorve, G., *Som. Cell. Genet.*, 1, 397 (1976)
9. Littleheld, J. W., *Science*, 145, 709 (1964)

# 第三章

## 单克隆抗体的应用

由杂交瘤产生的单克隆抗体,广泛应用于各个科学领域。利用杂交瘤产生单克隆抗体,其优点是,能够大量地反复地制备识别一个抗原决定簇的均一的抗体。因此,单克隆抗体的有效性完全是从这一优点上发挥起来的。本书不旨在介绍单克隆抗体在所有科学领域中的应用,而仅仅介绍二、三个应用实例。

### 一、细胞分化的研究与单克隆抗体

#### (一) 人类T细胞分化及其机能亚群研究上的应用。

细胞膜表面物质对于细胞的生命机能起着重要的作用。因此,细胞表面物质的分子结构与其功能的关系,在许多科学领域中深为学者们所关注。

具有不同功能的细胞,甚或功能相同而成熟度不同的细胞,其表面组成确实不一样,可见细胞表面物质的重要性。

#### A. 细胞表面物质与单克隆抗体

用细胞融合法生产单克隆抗体这一技术的确立,对细胞表面物质的研究起着重要的作用。单克隆抗体的应用,使得详细分析细胞表面抗原成为可能。从而可以获得丰富的有关细胞发生、分化及其机能的各情情报。

尤其在人类T淋巴细胞分化及其功能亚群的研究方面,由于引进了抗细胞表面抗原的单克隆抗体而产生了巨大的飞跃。

杂交瘤产生的单克隆抗体,其优点之一是,在免疫动物阶段,不需要很纯的抗原。即使把完整的细胞注射动物也可以。所制得的抗体无需进行象制备异种动物免疫血清时那样复杂的吸收过程。只要选择出能够产生意欲制取的单一抗原特异性抗体的杂交瘤克隆就行。

第二个优点是:能够稳定地大量地获得抗单一抗原的抗体。被选择的杂交瘤在试管内或体内增殖,能够得到必需的足够数量的抗体。由于采用杂交瘤的方法,使应用异种血清难以取得进展的T细胞机能亚群的研究,人类的免疫调节机构的分析发展到一个新的阶段。

在免疫调节机构分析方面还有另一个有力的武器,就是具有各种免疫机能的T细胞杂交瘤。建立T细胞杂交瘤的尝试正在进行中。T细胞杂交瘤产生T细胞来源的可溶性因子,这对于产生该因子的基因的研究是很有意义的。

#### B. 人类T细胞亚群研究的进展

在小鼠方面,由于以前就建立了同系小鼠(基因类似),制备了抗Thy-1, Lyt-1,



- 2; - 3 抗原的抗血清, 在单克隆抗体法确立之前, T细胞亚群的研究已有相当进展。目前, 正在进一步应用各种单克隆抗体来详细调查T细胞从胸腺到末梢的发生、分化过程。

在人类方面, 单克隆抗体制备技术成功之前, 利用自然产生的自身抗体(传染性单核细胞增多症、系统性红斑性狼疮(SLE)患者血清, 冷凝集阳性患者血清中的冷IgM自身抗体等)、异种动物免疫血清(用T细胞白血病的细胞、提纯的末梢T细胞等作为抗原, 免疫家兔所制得的血清)。来分析T细胞的工作已经进行。但是用这些方法进行的研究进展缓慢。已知人类和鼠类一样, 在T淋巴细胞中具有机能上完全不同的细胞, 但是由于存在着抗体的不均一性, 低效价抗体及吸收实验繁杂等困难, 这方面的工作总也打不开局面。

Kohler, milstein等用细胞融合确立了单克隆抗体法之后, 上述困难一应得以解决。对于复合抗原的多特异性反应也可以分解为单特异性反应了。

在人类细胞表面抗原研究的进展中, 抗T细胞表面抗原的单克隆抗体相继制得并已有市售商品。这些制品已应用于基础研究和临床各科。主要有Leu系统和OKT系统。就Leu系统而言, 将其与作为小鼠T细胞抗原的Lyt抗原进行比较的工作在进展中, OKT系统由于它系统地整理了人类T细胞在分化与机能上不同的亚群的抗原性, 因而容易理解。在此, 仅就E.L. Renherz, S.F. Schlossman等的文献对OKT系统作具体介绍。

### 1. OKT系统单克隆抗体的制备

在OKT<sub>1</sub>、OKT<sub>3</sub>、OKT<sub>4</sub>单克隆抗体制备方面有如下报告。8周龄鼠(♀, BALB/CJ或CAF<sub>1</sub>)腹腔注射经羊红细胞玫瑰花结法\*提纯的人类末梢T细胞 $2 \times 10^7$ 个, 间隔14天, 三次注射后的第四天取其脾脏制成细胞悬液, 以此作为B细胞。将此细胞与骨髓瘤细胞进行融合形成杂交瘤(参考第四章)。

取细胞增殖后的上清液检测抗体, 在386个增殖细胞中, 分泌只与E<sup>+</sup>(有形成羊红细胞玫瑰花结能力的)细胞结合而不与E<sup>-</sup>(不形成羊红细胞玫瑰花结的)细胞结合的抗体的杂交瘤只有4个。将这4个杂交瘤用有限稀释法克隆化, 证实它是产生单克隆抗体的单一克隆, 并将该克隆所产生的抗体作为抗T细胞表面抗原的抗体, 分别命名为OKT<sub>1</sub>、OKT<sub>2</sub>、OKT<sub>3</sub>、OKT<sub>4</sub>。将这种杂交瘤在小鼠腹腔内增殖, 然后取肿瘤性腹水作为单克隆抗体, 检测它与人类各种淋巴细胞, 白血病患者淋巴细胞株等的反应, 以及IgG亚类, 补体结合能力等。结果, OKT<sub>1</sub>与OKT<sub>2</sub>都是IgG<sub>1</sub>抗体, 与各种细胞的反应模式也完全相同, 因而认为它们来自同一个克隆。而OKT<sub>1</sub>、OKT<sub>3</sub>、OKT<sub>4</sub>根据与各种细胞的反应模式, IgG亚类等表明它们相互之间确有差异。B细胞、单核细胞、颗粒性白细胞、null细胞与这三种抗体均不发生反应。然而T细胞、胸腺细胞、株化T细胞与三者均有程度不同的反应。这三种单克隆抗体被确认为是特异性识别T细胞表面抗原的抗体。

### 2. OKT抗体的总体像与T细胞分化

Reinherz, Schlossman用以上方法相继制备了有关T细胞表面抗原的单克隆抗体, 并

\* 人类的T细胞, 不加任何处理与绵羊红细胞形成自然玫瑰花结。这是偶然发现的反应, 因为不需要抗体和补体等, 是鉴定末梢T细胞和胸腺细胞的简便而有用的反应。利用这个性质, 可以纯化T细胞。但是形成绵羊红细胞玫瑰花结的细胞似乎并非都具有T细胞的功能。Beverly和Callardg报告, 使用单克隆抗体检查E<sup>+</sup>细胞, 发现不具有其他T细胞的标记。部分有NK (natural Killer) 活性。