

世界卫生组织 技术资料译丛

杂交瘤技术 在寄生虫病方面的应用

人民卫生出版社

R53
WSZ

012670

93658

世界卫生组织技术资料译丛

杂交瘤技术在 寄生虫病方面的应用

联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织

译者

王世中	刘火媛	刘尔翔	刘景生
石 镜	张永祥	朱孝堃	李宝莲
陈毓仙	何惠珍	沈国良	邵 群
郑珊珊	林嘉友	赵玉兰	祝金泉
谢会蓉	邹明发	管远志	

人 民 卫 生 出 版 社

HYBRIDOMA TECHNOLOGY WITH SPECIAL REFERENCE TO PARASITIC DISEASES

Two Courses Held in October and November 1979

UNDP/WORLD BANK/WHO

Special Programme for Research and
Training in Tropical Diseases

杂交瘤技术在寄生虫病方面的应用

刘 尔 翔 等译

人 民 卫 生 出 版 社 出 版
(北京市崇文区天坛西里10号)

北京通县印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 4 $\frac{1}{4}$ 印张 95千字

1981年10月第1版第1次印刷

印数：1—3,900

统一书号：14048·4039 定价：0.46元

20.10/01

译者前言

淋巴细胞杂交瘤技术，是一项带有突破性的新技术。1975年成功后发展迅速，在产生各种特异性单克隆抗体方面进展更快，国外市场上已有多种单克隆抗体出售。应用这些抗体，可以更精确、更特异地分析、鉴定细胞的表面结构、受体、标志等，推动了细胞生物学、分子生物学、遗传学及免疫学等学科的深入发展。最近T细胞杂交瘤的工作也有进展，将会为T细胞的研究开辟新的领域。我国在这方面的工作刚刚开始，有关淋巴细胞杂交瘤的文献很少，为了更快地开展这一新技术，我们翻译此书作为参考。

本书虽名为《杂交瘤技术在寄生虫病方面的应用》，但大部分内容是基本理论及一般操作方法，完全可以应用于其它领域。

本书是世界卫生组织1979年10月在瑞士洛桑，和同年11月在巴西贝洛奥里藏特举办的二次淋巴细胞杂交瘤训练班的讲义，由当时担任教学的人员编写，汇集而成。由于编写人员来自世界各地，所用名词及文字表达方式都不一致，有些内容有些重复，方法也不完全相同。翻译时，尽量按原作者的用词，适当地加以统一，在内容上也作了个别删节。原文在印刷时有些错误，根据我们的水平，予以改正。为了加快本书的出版，约请一些作过这方面工作的同志参加翻译，由于水平不一，会出现一些错误，望读者指正。

刘尔翔

1981年1月

目 录

译者前言	
前言	1
第一部分 基础知识	5
第一章 浆细胞杂交瘤的产生：与成年脾细胞， 单克隆脾碎片，新生脾细胞及人脾细胞 融合	5
第二章 淋巴细胞融合的细胞学和分子生物学上 的限制	24
第二部分 杂交瘤技术	33
第三章 分泌抗体的骨髓瘤杂交细胞的产生和保 持	33
第四章 产生与获得分泌单价特异性抗体的杂交 瘤的操作程序	46
第五章 高融合率的抗原特异性杂交瘤：依赖于 免疫方法和应用脾细胞分析进行预测	67
第三部分 杂交瘤产物的分离、提纯与鉴定	79
第六章 免疫琼脂扩散法鉴定各类免疫球蛋白	79
第七章 斑点试验——测定杂交瘤上清中的小鼠 免疫球蛋白	80
第八章 杂交瘤产生的免疫球蛋白的纯化	81
第九章 用 ¹²⁵ I 标记单克隆抗体	84
第十章 由杂交细胞产生的生物合成性 ³ H 标记 免疫球蛋白	86

〔1〕

第十一章	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	88
第十二章	等电点聚焦 (IEF)	91
第十三章	细胞表面上的竞争测定法	96
第十四章	细胞表面抗原的间接放射结合测定 法	97
第十五章	用同位素双扩散法鉴定抗各种抗原决 定基团的单克隆抗体	102
第十六章	放射免疫分析法 (RIA) 和酶免疫分 析法 (EIA) 用于直接检测生长在琼 脂中的分泌抗体的杂交瘤克隆	105
第十七章	应用放射性标记的抗免疫球蛋白制剂 测定单克隆抗体	109
第四部分 杂交瘤技术应用于热带寄生虫病及麻 风		114
第十八章	产生分泌抗恶性疟原虫单克隆特异性 抗体的杂交瘤技术	114
第十九章	抗曼氏血吸虫单克隆抗体的产生及其 生物学活性的初步研究	119
第二十章	麻风分枝杆菌种特异性抗原分析	125

前 言

M. Nabholz, P. H. Lambert

1975年 Köhler 和 Milstein (Nature 256, 495) 证明骨髓瘤细胞与免疫动物的脾细胞融合形成的杂交细胞系，能分泌针对免疫抗原的抗体。这一技术上的突破，在制造和使用抗体（作为科研和诊断工具）开创了新纪元。自 Köhler 和 Milstein 的报告后，此法已被用来产生对许多抗原的单克隆抗体。一旦杂交细胞系建立之后，它将永远存活而且获得的产物是无限的。因此，有关试剂标准化的所有难题都解决了，这些试剂将具前所未有的特异性。

到现在为止，大部分报告的杂交瘤是由小鼠骨髓瘤细胞与同种动物的脾细胞融合而成。其他种的脾细胞可以成功地与小鼠骨髓瘤细胞系杂交，用大鼠脾细胞已融合了许多分泌抗体的杂交瘤。用兔或人淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞的杂交到现在为止并不十分成功，可能是由于这些种间的组合，在杂交瘤的生长过程中许多或大部分非小鼠的染色体被自然排除。解决这一问题的方法是在体外培育并建立人和兔的骨髓瘤细胞系。有些实验室在作，可以估计这样的细胞系在不太久的将来就会成为现实。

如果骨髓瘤本身分泌免疫球蛋白，则合成的杂交瘤分泌的球蛋白是由骨髓瘤和融合的脾细胞二者的重和/或轻链所组成。这样的分子对特异性抗原的亲合力要远比完全由脾细胞组成的链低，因此可能降低了所分泌抗体的滴度。为了解决这个问题，有些实验室培育了一些瘤细胞系，不再合成或

不分泌自己的免疫球蛋白分子，即使与脾细胞杂交后仍然如此，同时并不阻止脾细胞抗体分子的分泌。

任何具备最简单组织培养设备的实验室就能生产杂交瘤。一个重要条件是能长时期保存（即在液氮中）冷冻的保种细胞。

筛选产生所需特异性和性质的抗体的杂交细胞有许多困难，影响这些困难的因素中有许多尚未充分研究，因此还没有一些公认的方法。在融合时所使用的淋巴细胞群中只有一小部分细胞是对免疫的抗原是特异的。因此产生的杂交瘤中只有部分能分泌所需特异性抗体。使针对抗原的特异性细胞增多的方法只有使用抗原，这样在融合时特异性细胞的组成相当大，因此选择阳性杂交瘤就没有问题。但阳性杂交瘤的出现率不只依赖脾细胞中特异性 B 细胞的数量，还与这些细胞的成熟时期有关。后者决定了 B 淋巴细胞融合的成功率和杂交瘤的形成。似乎活化的 B 细胞比静止的 B 细胞更易融合，但有关活化时期与融合率间的关系的更确切的描述，尚未见到。

如上所述，决定融合结果的重要因素之一是免疫方法。为了使脾中对抗原特异的活化淋巴细胞达到高峰，现在多使用在融合以前 2~4 天静脉注射大剂量抗原。由 Miggiano 等的工作看来，至少对一些可溶性抗原，在融合以前几天，每天注射抗原可对抗原特异性杂交瘤的出现率产生明显的影响。另外一些作者发现，初次免疫过的脾细胞在体外刺激后再融合，可增加获得特异性杂交瘤克隆的机会。有些结果认为对细胞表面抗原来说，高度免疫的效果不如免疫一次或两次。

此技术的一个重要方面，是将杂交瘤克隆化来纯化抗

体。即使免疫原是非常复杂的各种分子或决定簇的混合物，使用杂交瘤技术也可以获得针对单一抗原决定簇或分子的抗体。需要注意，在上述情况下，对不同决定簇起反应的淋巴细胞数量，和产生的杂交瘤数差异很大，因此在所有针对免疫原的杂交瘤中，产生所需特异性抗体的杂交瘤可能很少。

在任何情况下，筛选的单个杂交瘤的数目愈多，测得抗原特异性杂交瘤的机会也愈大。因此，筛选杂交瘤方法的重要条件之一是这种方法能否适用于测定大量——高达几百份的培养上清。

在寄生虫病中杂交瘤技术的应用

在寄生虫病中，有三个主要领域可以使用杂交瘤技术：

第一，在免疫诊断方面，针对不同的寄生虫抗原的一些单克隆抗体是一个很好的工具，可以用来检查感染宿主中的抗原。使用这样的试剂就可以避免寄生虫抗原间的交叉反应，同时也可避免抗宿主抗原的抗体污染抗寄生虫的抗体。单克隆抗体在鉴别寄生虫株或变异株（如非洲锥虫）时是理想的试剂。

产生单克隆抗体并不需要大量抗原，因此当由感染的宿主中或小量培养中获得的少量特异性寄生虫发育时期的抗原，也可以产生相应的抗体。使用单克隆抗体的一个重要特点是可能得到满意的标准试剂，它们能长期保持稳定并重复。这样的试剂可能代表未来的寄生虫抗原的国际标准。

第二，单克隆抗体提供了由寄生虫提取物中纯化抗原的良好工具，可以使用一般的免疫化学方法如固相免疫吸附柱。同样地，单克隆抗体在鉴别寄生虫提取物中某些抗原方面有特殊的用途。例如，曾联合使用同位素标记寄生虫抗原，和用单克隆抗体免疫沉淀两种方法，产生的沉淀再用凝胶电泳

和自显影进行分析。

第三，使用单克隆抗体会对辨认寄生虫膜上的产生保护性免疫的抗原决定簇有用处。同样地，可以估价针对同一表面抗原的不同类型的单克隆抗体，对杀伤寄生虫的能力有无不同，例如可以估价单克隆 IgE 抗体对防御蠕虫方面的作用。

因此，虽然单克隆抗体在寄生虫病的即刻应用可能是在免疫诊断方面，但这种抗体在防治寄生虫病的免疫预防中可能成为最重要的工具。

(刘尔翔 译)

第一部分 基础知识

第一章 浆细胞杂交瘤的产生:

与成年脾细胞, 单克隆脾碎片,

新生脾细胞及人脾细胞融合

R. H. Kennett, K. A. Denis, A. S. Tung,

N. R. Klinman

选自 Current Topics in Microbiology and

Immunology 81:77~91, 1978.

A. 前言

Milstein 等^[1,2,3]发展的产生杂交瘤系的方法, 可以对选择的抗原合成抗体, 将推动生物学和免疫化学中许多领域的进展。一般来说, 此方法至少在两个领域内将有所前进: ①分析小鼠 B 细胞组成。②制造作为试剂用的单克隆抗体。这里描述在这两个领域内我们所用过的方法。

I. 分析小鼠 B 细胞组成

产生抗半抗原 2,4-二硝基酚 (DNP) 和 2,4,6-三硝基酚 (TNP) 抗体的杂交瘤, 可将瘤细胞系与用半抗原-载体复合物免疫后的成年小鼠脾细胞相融合而获得^[1,2]。这样的细胞系可成为单克隆抗体的来源, 作为氨基酸序列分析之用, 也可能成为合成抗体的核酸来源, 用以分离和分析 DNA 序列^[4]。这样就可能与早期占优势的 B 细胞克隆类型形成

杂交瘤，这些类型曾在纯种小鼠中得到证明。例如在新生 Balb/C 小鼠发育的头几天内，可能三个优势克隆对 DNP 产生抗体^[5]。借助于把这些早期克隆类型和晚期克隆类型的 B 细胞与瘤细胞形成杂交瘤，再研究它们抗体蛋白和核酸的序列，就可以肯定这些早期和晚期克隆类型间的遗传上的联系。可使我们进一步了解抗体多样性的产生机理。

解决这样的问题，依赖于能否产生这样的杂交瘤，它们与表现早期克隆类型的 B 细胞，同时也与表现新生鼠晚期和成年小鼠的 B 细胞融合。为了分离代表早期克隆类型的杂交瘤，最适合的细胞来源是新生脾细胞，和由新生 B 细胞来的单克隆脾碎片，它们的抗体类别、特性和克隆类型或等电点 (pI) 都已被确定。我们将描述与这些来源的 B 细胞形成杂交瘤的方法。

II. 制造作为试剂用的单克隆抗体

无疑的，杂交瘤产生的抗体可用于过去一直使用抗体的许多技术中。此外，这些抗体可用于许多新技术，因为它们分辨力高，非特异性低，并可源源不断供应。

这方面特别有用的是产生对人抗原的抗体。抗人抗原抗体可由其他种动物产生，但这些抗体常伴有高滴度的异种抗体。研究者们常用的另一种办法是依赖多产妇女体内产生的抗体，其抗体滴度低，通常是针对多种抗原的。

我们对产生针对人的分化抗原和肿瘤的特异性抗原的抗体有兴趣，这些抗体可用于检测表现在小鼠 × 人杂交瘤表面上的抗原，并可分离并纯化这些抗原。我们将讨论产生抗人细胞表面抗原的抗体的杂交瘤工作的进展。

扩大杂交方法到种间杂交，可以得到产生其它种动物抗体的杂交瘤。我们在此介绍一些小鼠浆细胞瘤和人淋巴细胞

(包括取自一名何杰金氏病人的脾淋巴细胞——系由含何杰金氏瘤结节的脾活检取得)的杂交方法。

B. 材料与方法

I. 浆细胞瘤细胞系

P3/X63-Ag8 是一种 BALB/c 小鼠浆细胞瘤, Milstein^[6] 由 MOPC-21 分离而得。45.6 TG 1.7 是一种 BALB/c 细胞系, Schorff 由 MPC-11 分离出来^[7]。两系都缺乏次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT), 因此在 HAT 选择培养基中被杀死^[8]。

II. 培养基

母细胞系在静止的 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM) 中培养, 加高浓度的葡萄糖 (4.5g/L) 及 10~20% 胎牛血清, 在 8~10% CO₂ 中孵育, 细胞浓度在 10⁵~10⁶/ml 之间。

融合后杂交瘤在 HY 培养基中生长并克隆化。HY 培养基: DMEM, 10% NCTC 109 培养基, 20% 胎牛血清, 0.2 单位牛胰岛素/ml, 0.45mM 丙酮酸盐, 1mM 草酰乙酸盐 (oxaloacetate), 有效的抗菌素。除 NCTC 109 已有的之外, 还按 Littlefield 氏再加胸腺嘧啶核苷 1.6×10^{-8} M 和次黄嘌呤 1×10^{-4} M。如配制 HY-HAT 培养基, 按下面所述加氨基蝶呤。

III. 免疫和脾细胞的制备

获得对某一抗原决定簇产生抗体的杂交瘤的合适时间与下列因素有关: 抗原的种类; 免疫的途径与时间; 及最后一次加强与取脾细胞间隔的时间。我们发现, 初次腹腔注射后, 再作一次静脉注射, 可以产生足够的杂交瘤, 可以被筛选出而且传代, 以作为分析之用。我们也由高度免疫的动物

中获得杂交瘤，该动物在几月内多次注射半抗原-载体结合物或瘤细胞，发现多次免疫对获得杂交瘤的数量无明显差异。

用细胞培养的上清免疫动物时，初次免疫要用浓缩的上清加完全佐剂（1/1），以后再静脉注射 0.1ml 浓缩的上清。此上清来自人的 B-类淋巴母细胞系，在含 0.5% 人 AB 血清的 RPMI1640 培养基中培养 4 天。收集的上清在 Amicon 压力小室中浓缩，使用的滤膜可以保留分子量大于 10,100 的分子。

为产生对人细胞的抗体，小鼠初次腹腔内注射在 0.2ml 盐水内的 10^7 细胞。在取脾细胞作融合的前三天，静脉内第 2 次注射 $2\sim5\times10^6$ 细胞。

用抗人抗血清包被的细胞的制备：细胞在 4°C 与 1ml 稀释的抗血清（在 RPMI1640 中稀释 100 倍）孵育 1 小时，离心，将沉淀再悬浮于 0.2ml 培养基中注射。抗人血清来自高度免疫的小鼠，曾多次腹腔注射人的 B-类淋巴母细胞系。

最后一次静脉注射后第三天，取脾，在室温放入 60mm 平皿中，内有含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基（DMEM-S20）。我们用有 26 号针头的 2 支注射器把细胞由脾冲洗出来。在脾上刺几个孔，用一个注射器将培养基轻轻注入脾脏，用另一注射器固定脾。要小心，不要把冲散的细胞吸入针头，然后用力冲过针头的小开口。取出脾细胞，放入锥形离心管中，在 IEC-MS2 离心机（直径 = 35 公分）1000 转/分沉淀。去掉上清，将沉淀打散，悬浮于 5ml 冷的 $0.17\text{ M NH}_4\text{Cl}$ 10 分钟。加冷的 DMEM-S20，再离心。沉淀悬于 10ml DMEM-S20 中，在相差显微镜下或台盼蓝中测细胞数及死活。用此法每脾可得 $5\sim10\times10^7$ 脾淋巴细胞。通常活细胞数高于

95%。

IV. 与成年脾细胞融合

按照 Geffer 等^[9]融合小鼠浆细胞瘤的方法，加以改进。

30%PEG溶液的制备方法：将无菌的 PEG1000 (Baker, 分子量为 950~1050) 和无血清的 DMEM (DMEM-SO) 加热到 41℃, 将 3ml PEG 与 7ml DMEM-SO 混合，用热的滴管反复吸吹保证完全混匀。混合液的 pH 应为 7.4~7.6。混合后放在 37℃待用。注意作为洗液的 DMEM-SO 的 pH 也要保持在 7.4~7.6。

浆细胞瘤细胞系应活力很强并且分裂指数要高，这一点是重要的。生长好的，在中对数期的培养比细胞数相同但生长率下降的培养会产生更多的杂交瘤。

由一个脾得到的细胞与 10^7 个浆细胞瘤细胞混合，在圆底试管离心沉淀。在 10ml DMEM-SO 中洗一次，离心去上清。加 0.2ml 的 30%PEG1000，振动试管，打散沉淀。细胞与 PEG 接触 8 分钟。在此期间，细胞在 1000rpm 离心 3~6 分钟。离心时间长一般产生的杂交瘤要多一些。8 分钟后，轻轻加 5ml DMEM-SO，使 PEG 稀释，沉淀被悬浮。再加 5ml 培养基，在 1000rpm 沉淀。再用 30ml HY 培养基悬浮，并分到 6 个微量板上 (Linbro FB 96 TC)，每孔一滴 (约 50 μ l)。第二天每孔再加一滴含有 2 倍氨基蝶呤 (8×10^{-7} M) 的 HY 培养基。6~7 天后加 2 滴 HY 培养基，一般在 10~20 天可见群落生长。HAT 可在融合后立即加入，对杂交瘤的数量无影响，HAT 也可以在第一周内连续使用。

V. 与新生脾细胞融合

小于 3 天的新生 BALB/c 小鼠的单个脾细胞悬液，在冰

浴中加 $0.17\text{M NH}_4\text{Cl}$ 作用 10 分钟以去除红细胞。这些细胞再悬浮于 DMEM-S20 中, 密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。加等量的含有 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 脂多醣的 DMEM-S20, 使最终浓度为 1×10^6 细胞/ ml 及 $20\mu\text{g}$ 脂多醣/ ml 。在脂多醣刺激后的不同时间, 按上法将 1×10^7 脾细胞与 1×10^6 瘤细胞融合。14~21 天后培养孔有生长时, 上清用下文描述的方法测有无 IgM 产生。

VI. 与单克隆脾碎片融合

许多报导描述了在碎片培养基中产生合成抗体克隆的方法^[10, 11, 12]。简单说来, 由小于 3 天的老鼠, 取定量的脾细胞 ($2 \sim 4 \times 10^8$), 静脉注入致命照射过 (1300r) 并用血蓝蛋白 (hemocyanin) 致敏的成年小鼠。16~18 小时后, 取出含有新生细胞的受鼠脾, 并切为约 50 块, 这些小块放入微型培养孔中, 用二硝基酚-血蓝蛋白刺激 3 天。培养液每 3 天换一次, 第 9 天收集的培养基用下述放射免疫法测抗二硝基酚抗体。

产生抗二硝基酚抗体的脾块用 26 号针头撕碎并冲成单个细胞悬液。每块脾的细胞加上 $1 \sim 2 \times 10^5$ 瘤细胞, 在 $12 \times 75\text{mm}$ 无菌试管中离心沉淀。用无血清培养基洗后, 加 0.1ml 30% PEG, 按上法进行融合。细胞经最后一次洗涤后, 悬浮于 $0.3 \sim 0.5\text{ml}$ 的 HY 培养基中, 分装到 5~6 个微型培养孔。第二天加氨基蝶呤。

14~21 天后出现生长孔的上清, 用下法测抗二硝基酚的活性。

VII. 与人淋巴细胞融合

人的淋巴细胞可与上述两种小鼠浆细胞瘤融合。我们曾用 10^7 小鼠瘤细胞与 $10^7 \sim 10^8$ 人淋巴细胞融合。融合方法如上述。我们发现如不加饲养细胞, 则小鼠 $\times$ 人杂交瘤的数量

相当低，如每孔加入 1000~2000 照射过的 (4500r) 人胚成纤维细胞，则数量增多。这些细胞可以在融合的前一天加入，或加在融合细胞内一起分装于培养孔内。

VII. 收集上清进行测定

当肉眼见到克隆时，可吸取大部分培养基，加入新培养基。至少换 2 次以除去未融合脾细胞所产生的剩余抗体。第二次培养基换过后，保持原培养基至少 4 天，再取上清测活性及特异性。

如抗原是半抗原，则由于未融合脾细胞所产生剩余抗体而产生的假阳性问题不大；如抗原是复杂的多种决定簇，例如人细胞培养，则问题较大。

VIII. 测定方法

1. 放射免疫测定抗半抗原抗体及免疫球蛋白链的产物
此法详见文献[10]。简言之，培养液加于预先用二硝基酚-牛清蛋白及封闭蛋白包被的聚氯乙烯微型板中。清洗后，用 ^{125}I 标记的抗小鼠 Fab 或特异制剂来测结合的特异性抗体。此法可测出 0.5ng 的抗 DNP 抗体。

在测用脂多醣刺激的新生脾杂交瘤产生的 IgM 时，上法作了些更改。聚氯乙烯板先用兔抗小鼠 Fab (40ng/孔) 再用封闭蛋白包被。最后测定培养基中来的结合免疫球蛋白时，用 ^{125}I 抗小鼠 IgM。

2. 将细胞膜或蛋白结合到滤纸片的放射免疫测定法
抗膜成分或可溶酶的抗体，可将抗原与溴化氰活化的滤纸片结合来测定。我们用 Crumpton ⁽²⁹⁾ 氏法制备膜，用纯化的膜或粗的膜组分与滤纸相结合。滤纸的制备及测定方法见 Manson 等。

3. 细胞沉淀的放射免疫测定 这是 Bechtol 介绍给我们