

# 单克隆抗体及其应用

汪美先等 编译

中国人民解放军第四军医大学《单克隆抗体通讯》编辑部

## 前 言

近几十年来,医学和生物学的发展迅速,这主要是由于引进化学分析手段的结果。在解开生命现象之谜的工作中,取得辉煌成绩的只是那些可以得到大量的均一性实验材料的学科。

作为阐明不均一生命现象的手段,研究者们都把希望寄托在免疫学方法上。因为免疫学方法对于分析不均一的、量很少的物质的结构与功能是不可缺少的;但在一般的抗血清中不仅含有所研究的那种未知物质的抗体,而且含有被注入动物体内的所有物质的抗体。通过吸收法可以排除一些不需要的抗体分子,但其作用是很有限的,往往同时丢失所需要的抗体分子。单克隆抗体技术问世以来,所生产的抗体质地均一,易于标准化,它与基因克隆一起,已成为阐明生命现象不可缺少的主要手段。

淋巴细胞是由多能造血干细胞分化而来。产生抗体的B细胞也是从这种干细胞经过许多阶段分化而成。在其分化形成中间阶段的抗体产生前驱细胞时,细胞表面具有各自不同的、作为抗原受体的抗体。在淋巴组织内存在着具有不同抗原受体的、处于分化阶段的异种B细胞前驱细胞群。当抗原进入后,只有具有这个抗原受体的B细胞前驱细胞才被活化,进而分裂、成熟。生长大量的、只能迅速合成与分泌具有与受体相同特异性的抗体的细胞。

通常作为抗原进入体内的物质是多种多样的,因而许多具有不同特异性的B细胞被活化和增殖。即使作为抗原只用纯一的一种分子,但因为一个分子上存在着许多抗原决定簇,所以不可能只产生一种特异性B细胞,因而所得到的抗血清是多种抗体的混合液。从这些异种B细胞群中各取出单个细胞单克隆化,用组织培养的方法大量增殖,这就是所谓单克隆抗体技术,能够无止境地获得纯一的抗体分子,而且还可以获得关于某种动物体内所有B细胞的资料。

由于研究出单克隆抗体技术,C.Milstein与G.Köhler获得了1984年诺贝尔医学生理学奖。他们最初的实验目的,是应用细胞融合的方法,研究抗体多样性的遗传基础。单克隆抗体技术的创建则可谓是该研究的副产物,却因此带来了医学和生物学如此重大的革命,这是发明者本人在开始研究时没有预料到的。

自单克隆抗体技术问世十多年来,由于过去未能应用化学方法所造成落后状态的领域,这些只是独立研究的领域之间的相互关系随着也变得明确起来。免疫、分化、脑神经、致癌等基本的生命现象互相携起手来,作为一些重大的新兴的边缘学科逐渐地显示出它们的主要作用,其中之一就是单克隆抗体技术。

K.Sikora和H.M.Smedley 所著“单克隆抗体”一书,阐述了单克隆抗体技术的基本理论及其应用的最新进展。该书共10章,内容新颖、简明扼要,很有参考价值。因此会同蔡昌锡、潘伯荣及朱恒同志按照1984年英文原版和1985年日译本,全部翻译出来,曾在《单克隆抗体通讯》刊登。兹应读者要求,编印成册,以供参考。



200648282

汪美先

1988, 8, 1

# 目 录

第一章	什么是单克隆抗体	( 1 )
第二章	单克隆抗体的制备	( 7 )
第三章	单克隆抗体在生物化学中的应用	( 16 )
第四章	单克隆抗体在组织学中的应用	( 25 )
第五章	单克隆抗体在微生物学中的应用	( 29 )
第六章	单克隆抗体在血液学中的应用	( 35 )
第七章	单克隆抗体在细胞生物学中的应用	( 41 )
第八章	单克隆抗体在恶性肿瘤定位中的应用	( 46 )
第九章	单克隆抗体在恶性肿瘤治疗中的应用	( 50 )
第十章	人单克隆抗体	( 59 )

# 第一章 什么是单克隆抗体

剑桥大学分子生物学研究所的George Köhler和Ce'sar Milstein在1975年发表了能无限生产具有特定特异性抗体的方法.这一方法不仅使免疫学及临床医学发生革命性变化,而且在生物学与医学的许多领域内也提供了可以广泛应用的手段。本书将讨论关于这种抗体生产的理论与临床两个方面,但首先应记住单克隆抗体(monoclonal antibodies, McAbs)具有与自然存在的抗体相同的结构。McAbs与自然存在的抗体的不同点,是不论任何McAbs产品,其中只含有一种类型的分子。McAbs与特定抗原(在免疫学基本反应中作为抗体相对应的分子)的反应总是一定的。这种结构与反应的稳定性使McAbs具有非常有用的价值。

应用单克隆抗体,即使象细胞表面这样在免疫学上相当复杂的结构,也能对其一一加以分析,在分子水平上进行研究,研究所得的知识,对于阐明许多疾病及其治疗方面无疑具有很大效益。

## 一、免疫系

高等动物具有识别进入机体内一切可能引起危害的异种分子,并将其排出体外的能力。免疫系统是对侵入体内物质的主要防卫机构之一。凡能使免疫系统产生反应的物质叫做“抗原(antigens, Ags)”。机体识别抗原后所产生的蛋白质叫做“抗体(antibodies, Abs)”。抗体识别抗原后,通过一系列的化学结合与抗原结合。每一个结合力虽微弱(非共价结合),但由于结合的数量多,作为总体来说却具有很强的结合力。抗体与抗原结合状态类似两个大的益智分合图(Jigsaw puzzle)“互相联着。通过抗体与抗原在机体内结合引起一系列反应,反应的结果排除了抗原(表1·1)。

表 1 - 1 抗体抗原互补作用效果

互 补 作 用	效 果
形成免疫结合物	消除抗原、血清病及发生病状
补 体 活 化	溶解细菌或细胞
巨噬细胞活化	溶 解 细 胞
杀伤细胞活化	溶 解 细 胞
免 疫 调 节	控制免疫系统

循环于血液中的抗体球蛋白组分,叫作“免疫球蛋白(Immunoglobulins, Igs)”。免疫球蛋白根据其分子量等物理性状的不同,分为五种主要类型。每一类型的免疫球蛋白分别命名为IgG、IgA、IgM、IgD、IgE(表1·2),并已知有好几种具有特异生物功能的亚型。IgE与变态反应的免疫应答有关,IgA是泪液等体外分泌物中的主要免疫球蛋白成分,IgG则为循环血浆中最普遍存在的免疫球蛋白,占球蛋白组分的75%。

表 1-2 各类免疫球蛋白

类别	H 链	分子量	血清中相对浓度%
IgG	$\gamma$	150,000	75
IgM	$\mu$	900,000	8
IgA	$\alpha$	160,000	16
IgD	$\delta$	180,000	<1
IgE	$e$	180,000	<1

免疫系统产生作为血清成份的抗体外，还可以通过它的细胞成份应答。这种细胞免疫主要与移植排斥反应、迟发型变态反应及移植物抗宿主反应等有关。细胞免疫古典的例子是结核菌素反应，即在皮下注射微量结核菌蛋白质时所见的反应。注射局部在注射后48小时出现特征性红肿。这是由于活化淋巴细胞在注入的蛋白质周围发生局部浸润。小鼠实验证明，细胞免疫的产生有赖于幼年时期胸腺的存在。胸腺为位于胸部上方的腺体，到成年时期就逐渐萎缩。由胸腺制造的淋巴细胞叫做“T淋巴细胞”。

体液免疫是由组织液中的循环免疫球蛋白发挥作用。鸟类产生循环性抗体的淋巴细胞要依赖其泄殖腔背侧的法氏囊 (Bursa of Fabricius)。在人类还不知道其类似的器官，但有与胸腺无关的产生抗体的淋巴细胞。这种淋巴细胞叫做“B淋巴细胞 (B细胞)”。McAbs 是人为地赋予抗体产生 B 淋巴细胞以无限增殖功能，使其能够继续不断地产生抗体。

## 二、抗原抗体的相互作用

许多能够诱发免疫应答的分子称为“抗原分子”。每一种抗原分子都具有独特的结构。抗原抗体反应的特异性是由于各种抗原分子的不同结构所决定。已知抗原分子越大越复杂，可与抗体反应的部位就越多。这种部位叫做“决定簇”或称“表位 (Epitope)”。一个抗原分子上可能存在多个表位；而小的抗原分子却只有一个表位。

抗原抗体反应基础是由互补结构的两个分子互相嵌合。抗原结构由分子的三维结构所决定。一切免疫球蛋白分子都具有二硫键联结的两个重链 (H链) 和两个轻链 (L链) 所组成的基本构造 (图 1-1)。

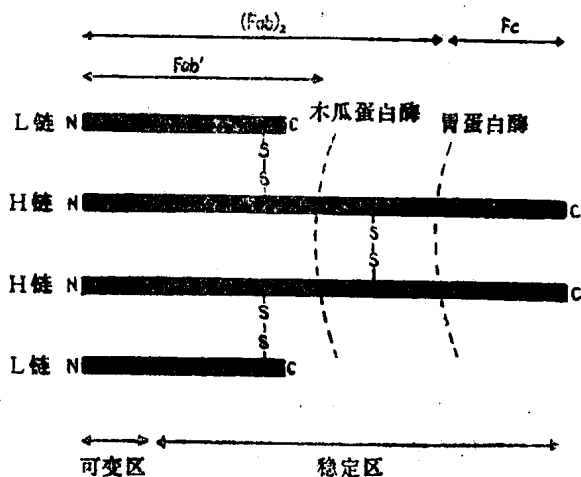


图 1-1 IgG 的结构

可变区与抗原结合部位是在肽链的N端

抗体的H链与L链具有叫做“可变区”的部位。每个抗体分子蛋白质的可变区氨基酸排列顺序不同。这种不同出现在肽链的N末端。每个抗体具有各自不同的氨基酸排列及三维结构。因此，一般认为对任何种结构的抗原，而免疫系统都能产生与之相应的抗体(图1, 2)。依靠个体内DNA中储存的有限的信息编码形成如此之多的蛋白质的机理, 近几年, 受到许多研究者的注意。免疫球蛋白不同链的编码基因存在于基因组上的不同位点, 而且控制每个链的基因都具有好几个稳定区和可变区基因。当淋巴细胞分化时, 它们在基因水平上相互连接着。所有机体对每个抗原都具有产生相应抗体的能力。但不是随时都在制造这些抗体, 只有在某种抗原进入并刺激机体, 机体才开始对抗原产生特异性抗体。在自然状态下, 这种刺激是由于将抗原摄入消化道内, 或受细菌或病毒感染, 或通过人为地免疫过程等所获得的。机体一旦产生了少量抗体, 就能容易地持续制造大量抗体。这叫作免疫系统的“记忆”。免疫有记忆, 这在通过观察曾感染风疹的患者, 以后就不再感染风疹这一事实, 已得了证实。



图1—2 抗原决定簇结合在抗体分子N末端结合部位(模式图)

当发生抗原-抗体反应时, 就引起多种其它反应。首先抗体与抗原的复合物形成分子晶格。分子晶格逐渐增大, 最终由吞噬细胞将其从血液中清除。其次, 这种结合分子能引起补体的活化。补体为一组非活化形态存在于血液中的复杂的蛋白质。当补体被活化时, 则具有溶解异种细胞的作用。接着单核-吞噬系统的巨噬细胞聚集在体内特异的部位, 能促进吞噬细胞吞噬异种细胞的作用。

免疫学的基本原理是每个B淋巴细胞只能产生具有一种特异性的免疫球蛋白。能够说明这一原理的是克隆选择学说。根据选择学说可以充分地说明免疫学的记忆, 对自己及非己的识别、免疫耐受以及由于识别自己及非己机构被破坏, 而发生自身免疫病等现象。克隆选择学说认为通过接触抗原引起对该抗原产生抗体的B淋巴细胞的克隆增殖。当产生抗体的B淋巴细胞的克隆一旦增殖后, 通过继续接触抗原, 而迅速地大量性地产生抗体。这就是免疫系统的记忆。产生对正常人体成分有害的克隆则不增殖。儿童时期通过受到经常的免疫刺激可引起一系列抗体产生B淋巴细胞克隆的增殖, 从而形成该机体的抗体库。因为每一个儿童接触的抗原在时间及量的方面都明显不同, 因此每一个儿童的抗体库也不同。

### 三、单克隆抗体的产生

为了在实验室获得对一种抗原的无限量的特定抗体, 可以使产生该抗体的B淋巴细胞的克隆长期持续生存。如果能够取出克隆通过细胞培养增殖, 则B淋巴细胞可持续产生抗体。这样就可以从细胞培养液中收集抗体。过去, 在实验中使B淋巴细胞增殖的试验均告失败。因此, 首先必须研究出一种经细胞培养可使产生抗体的B淋巴细胞充分增殖的方法。

1970年初已能够用简单方法培养多种类型的细胞，其中的一类细胞是恶性肿瘤化的B淋巴细胞，如已知的骨髓瘤细胞或浆细胞瘤细胞。这些细胞与正常B淋巴细胞不同，具有无限增殖能力，而且这些恶性肿瘤细胞为克隆原性。即：不论是在体外或移植到动物体内，每个细胞都能增殖形成克隆。如果能把体外增殖性和骨髓瘤细胞株的克隆原性与淋巴细胞产生抗体的功能结合起来，则使这种杂交的B淋巴细胞系有可能持续无限地产生抗体(图1-3)。

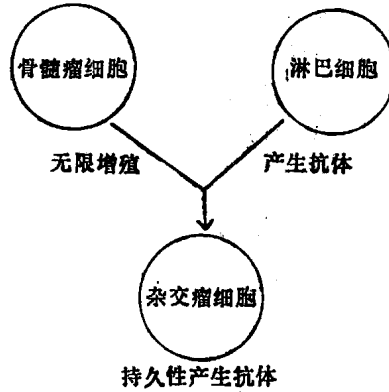


图1-3 骨髓瘤细胞与抗体形成细胞的融合，建立持续产生抗体的杂交瘤细胞系

1975年Köhler和Milstein已阐明了通过将骨髓瘤细胞株与淋巴细胞融合，获得的杂种细胞系可以产生抗体。关于这一技术和所发生的问题，以后将予说明。细胞融合后产生的子代细胞叫做“杂交瘤细胞”。杂交瘤细胞继承了其两个亲代细胞的特性，即恶性肿瘤的骨髓瘤细胞无限增殖和B淋巴细胞产生抗体的能力，要求筛选出具备这两种特性的细胞。杂种细胞形成技术可赋予产生免疫球蛋白的细胞以无限增殖能力，但本法不能选择性地只对特定淋巴细胞予以无限增殖能力。为了给予所需要的细胞以无限增殖能力，Köhler和Milstein研究出用目的抗原免疫实验动物的方法。最初实验中用的抗原是绵羊红细胞，实验动物常选用小鼠。小鼠免疫系统在注射抗原几周后，就开始产生能识别该抗原的抗体的B淋巴细胞克隆。若杀死小鼠，从其脾脏收集淋巴细胞，将淋巴细胞与骨髓细胞株融合。这样，大多数融合的淋巴细胞很可能分泌针对目的抗原的抗体。但即使采用这种诱发动物产生特异抗体的方法，也有不少产生非目的抗体的淋巴细胞被融合。当骨髓瘤细胞株与B淋巴细胞顺利地融合并产生仅分泌一种抗体的杂交瘤细胞集落(一个克隆)时，这个抗体叫做“单克隆抗体”。

通过上述融合技术可无限地产生特定抗体，但需要事先说明的是，为了获得一个所需要的McAbs，必须进行多次融合，而且常得到大量的是产生非目的抗体的杂交瘤细胞。为了获得一个有效的McAbs必须花费很多时间。其理由很清楚：首先是良好的McAbs的定义很含糊。良好McAbs的标准常被研究者需要的McAbs的功能所决定。例如某种抗体在病理切片上能很好地识别某种淋巴细胞，可能在疑难疾病的组织病理学诊断中发挥作用。如果其反应条件很严格，比如这种切片染色必须在新鲜组织的条件下进行，那么该抗体只限于应用在新鲜状态下采集的组织。因此研究者在判断抗体好坏时，了解该抗体所需的反应条件是很重要的。

的。而且研究者要制备抗体的抗原中有不少是免疫原性很弱的，结果动物免疫系统对该抗原发生的反应很弱，产生适当的McAbs的机率也低，因此获得该单克隆抗体的工作量就增大。

#### 四、复杂的抗原

在生物界仅具有一个抗原决定簇的分子是很少见的，如同遇到异种生物细胞那样，遇到复杂结构的频率很高。这种细胞具有数百个、有时数千个抗原决定簇，而且这些抗原并不是随时都在细胞表面上出现。众所周知，大多数抗原仅在细胞正在迅速分裂时期或在特定的物理条件下才出现。恶性肿瘤细胞常出现仅在正常胎儿发育期出现的抗原（癌胚抗原）。因此，如果注射这种复杂的分子混和物，则产生与各个抗原决定簇相应的抗体。经过一段时间后观察该动物血清，其中含有大量不同类型的抗体即“多克隆性抗体”。过去为了获得对恶性肿瘤或感染的免疫应答证据，曾采用这种复杂血清。但在区别恶性肿瘤与正常细胞时，由于抗原非常复杂，要发现两者的不同却很困难。许多实验表明，恶性肿瘤细胞的抗原虽然微弱，但可引起宿主明显的免疫应答，表明恶性肿瘤与正常细胞间至少有几种不同的抗原决定簇。对同样复杂的细胞表面如能采用单克隆抗体技术，也可逐次进行每个抗原的检查。采用本法已发现肿瘤细胞与正常细胞具有很多共同抗原。另一方面也有可能发现能够识别肿瘤细胞所特有，而正常细胞没有的抗原的相应抗体。如能发现能识别恶性肿瘤细胞与正常细胞间微小差异的单克隆抗体，则可用于诊断及治疗。实际检查中似乎存在着这种差异，而且事实上也能找到这种抗原。但这样抗原在体内其它组织也有存在的可能性。例如识别人类大肠癌的抗体在识别恶性肿瘤的同时也能识别骨髓白细胞。用同样方法可辨别感染性疾病的微生物类型。通过这种方法能够对细菌性或病毒性疾病进行快速而正确的诊断。

#### 五、特异性

如上所述，抗体能识别抗原分子的立体构造及其空间排列结构。如果识别的结构非常小，即识别的不是分子整体结构而只是一部分，则在其它分子上可能找到同样结构就增大。很明显，在抗体识别的结构非常小时，则其发生上述混淆的可能性非常大。根据这一理由，识别特异性范围过分狭窄的抗体，即意味着它认识的结构在其他分子上也有广泛存在的可能，因而它的用处不大。显然，在抗体结合部位的大小和立体结构所决定的机体特异性之间存在着有效抗体的最佳值。

#### 六、抗体特性

抗体结合抗原的强度叫做“亲和力”。根据应用抗体的目的不同，抗体与抗原的强结合有时是有利的，有时是不利的。正常情况下，为了排除对身体可能有有害的物质而发生抗原抗体反应。然后将形成复合物的抗原排除，可发生继发性反应。如后所述，当临床应用时为了识别特定类型的细胞或组织，最好给患者以抗体。此时决不允许McAbs含有对组织的特性，而引起补体反应，召致正常组织的破坏。此外，有时可能应用McAbs来排除患者体内的药剂或毒物。显然，此时McAbs必须具备帮助排除不要的抗原至体外的能力。

#### 七、产生抗体动物的选择

为了获得抗体必须选用动物，使其对特定抗原产生抗体。为此，在实验室专用小鼠和大



鼠。将目的抗原每隔一周给动物注射一次，共免疫3~4周，杀死动物取出淋巴细胞。但实际上是取出动物脾脏（淋巴细胞库），制成新鲜均匀的细胞悬液，从悬液中分离淋巴细胞。骨髓瘤细胞也来自小鼠和大鼠的株化细胞。初期研究中得知“种间杂交”的子代细胞的基因组成是不稳定的。因此将小鼠淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞，大鼠淋巴细胞则与大鼠骨髓瘤细胞融合。

本书主要叙述McAbs技术在临床医学中的应用。这种应用最好是得到人McAbs，即将人淋巴细胞与人骨髓瘤细胞株融合所制得的McAbs。但迄今为止，尚未能获得人McAbs。首先在道德上是决不允许的，用毒素、细菌或恶性肿瘤细胞等抗原给人类免疫，而且要获得稳定并非感染性人类骨髓瘤细胞也是很困难的。最近由于技术进步，分离人类骨髓瘤细胞株成为可能。此外，通过手术得到特定疾病患者的淋巴结，从中得到用于融合的淋巴细胞：从而对人无法进行免疫的问题已得到解决。用上述淋巴细胞与人骨髓瘤株细胞融合，已获得稳定的杂交细胞。天然存在的人类蛋白质注入患者体内不引起免疫反应，所以在需要二次以上给予单克隆抗体进行诊断或治疗时，人McAbs具有绝对的优点。如同小鼠或大鼠的蛋白质，则有患者对异种蛋白质产生抗体的顾虑。

单克隆抗体是作为针对目的抗原的一种抗体，在量的方面可以无限地产生，仅就这一点可以说是一种有无限价值的有意义的免疫球蛋白。McAbs不仅打开了进一步理解免疫系统功能基本原理的大门，也提供了在今后几年内开发新的诊断及治疗方法的可能性。

#### 进 一 步 读 物

1. Hobart M.J. & McConnell I. The Immune System, Blackwell Scientific publications, Oxford(1982)
2. Köhler G. & Milstein C, Continuous cultures of fused cells producing antibodies of predefined specificity, Nature, 256, 495-497(1975)
3. Lachmann P.J. & Peters D.K, Clinical Aspects of Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford(1982)
4. McMichael A.J. & Fabre J.W, Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, London(1982)
5. Mitchell M.S & Oettgen H.F, Hybridomas in Cancer Diagnosis and Therapy, Raven Press, New York(1982)

(汪美先 朱 恒译)

## 第二章 单克隆抗体的制备

凡动物免疫系统的细胞能识别的物质都可以制备单克隆抗体。如前所述,将一种物质或多种物质的混合物注入动物体内,则可产生识别抗原上某一部位的一组抗体。这种抗原部位叫做“抗原决定簇或表位”。多克隆抗体是识别很多抗原决定簇的免疫球蛋白的复杂体。

### 一、抗原

制备特定抗原单克隆抗体的第一步,是制备用于免疫的特定抗原。用完全纯化的抗原制品,有时也可用化学方法制成的抗原。例如为了分析狄高辛(digoxin)等药品而制备McAbs时,就是如此。这是在心脏病治疗中常用的药物。将精制的狄高辛免疫动物,可以得到抗狄高辛抗体。但在多数场合,抗原物质的纯化是不完全的,结果只能得到部分纯化的物质或极不纯的混合物。用部分纯化的干扰素制备McAbs就是一例。用含有干扰素混合物免疫动物,通过克隆化后的筛选出最适当的McAbs。

某些情况下,事情更为复杂。仅对恶性肿瘤细胞表面的分子制造McAbs时,须用整个肿瘤细胞或细胞表面标志物质作为免疫原,但这种免疫原含有正常细胞上也存在的一系列分子。制造McAbs的目的在于识别仅存在恶性肿瘤细胞而不存在于正常细胞上的分子,并将这种抗体应用于癌症患者的诊断和治疗中。

### 二、免疫

将抗原注入动物皮下或腹腔内进行免疫,同时注入加强免疫刺激剂的混合物,从而刺激动物的免疫系统。最常用的免疫刺激剂为福氏佐剂,这是将卡介苗与油脂性基质混合,将这种混合物与抗原同时注射,有加强免疫系统识别抗原的启动作用。为了使免疫刺激可靠有效,应每隔一周反复注射数次。随着反复免疫可使对抗原反应的B淋巴细胞克隆的刺激逐渐加强。一般在采集脾细胞3天前由静脉注射最后一次抗原。其目的是使所需B淋巴细胞的克隆受到可靠的最大限度的刺激。细胞融合后增殖最好的细胞是迅速分裂的细胞。已知受到免疫刺激的细胞在免疫后第三天显示最高的增殖率。由静脉注射是为了提高抗原最高浓度,这样可以同时刺激很多细胞。

### 三、融合

处死动物,剖腹取脾放入组织培养液中,为了防止细菌或真菌污染,一切操作必须无菌。为防止细菌增殖,可预先在细胞培养液中加入青霉素或链霉素等抗生素。研磨脾脏游离淋巴细胞,将脾细胞和脾脏表面的碎片静置,去除外膜团块,将分散的脾细胞留在组织培养液中。

脾脏不仅含有淋巴细胞还含有不少红细胞。红细胞可经高密度聚蔗糖(Ficoll)液体离

心而分离去除。在离心管中放入聚蔗糖，用巴斯德吸管将脾细胞轻轻层叠于其上方。用400g左右低速离心沉淀20分钟，则红细胞与死细胞一起沉淀在管底成块。淋巴细胞则留在聚蔗糖液上方呈白色带状（图2-1）。原来含有淋巴细胞的液体位于其上方。用巴斯德试管收集淋巴细胞后，再离心、洗涤，然后将淋巴细胞与制备的骨髓瘤细胞株混合。骨髓瘤细胞株与其他恶性肿瘤细胞一样具有无限分裂的能力。常用来融合的是选自小鼠、大鼠或人类等的几种骨髓瘤细胞株。这种骨髓瘤细胞系的重要特征是具有经融合过程后，使没有融合的细胞被破坏的潜在机制。将大约相同数目的骨髓瘤细胞与免疫动物脾脏淋巴细胞在聚乙二醇（PEG）存在下混合。当初曾采用仙台病毒，但在实验室保存该病毒株非常困难，因此现已用化学促融剂聚乙二醇来代替，PEG类似于用来防止汽车散热器冻结的防冻液。当将细胞在试管内混合时，因细胞表面张力而被分开，但PEG具有使表面张力丧失的作用，因而细胞能够充分混合。当细胞膜融合后，一个细胞的核就进入相邻细胞质内。

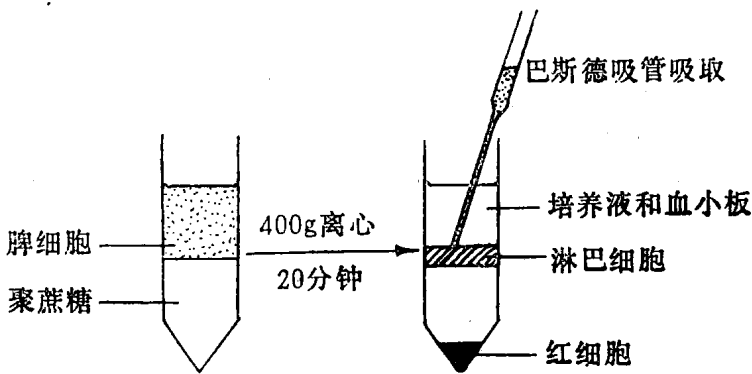


图2-1 从含红细胞与血小板的脾细胞悬液中，用聚蔗糖分离出活淋巴细胞

为了提高融合率，曾设计了种种方法。其中之一是在融合液中与PEG同时加入二甲亚砜（DMSO）的方法。这种药物也能增加细胞接触的紧密性，提高融合的机率。DMSO和PEG都对细胞具有强毒性，必须严格限制这些药物与细胞接触的时间。一般将细胞在这些药物中仅放置几分钟。在这段时间内通过离心5分钟，使细胞接触更为紧密。用新配制的培养液用于稀释药物并洗涤细胞。融合后将细胞放入培养板孔内，其中含有未融合的骨髓瘤细胞、淋巴细胞以及杂交瘤细胞（淋巴细胞与骨髓瘤细胞的杂交细胞）。

#### 四、筛 选

当然，不是一切骨髓瘤细胞都能被融合。实际上大部分骨髓瘤细胞在未融合的情况下旺盛地增殖。由于这些细胞比杂交瘤细胞增殖迅速，可使杂交瘤细胞很快地被淘汰。因此要采用使骨髓瘤细胞自行消灭的方法。根据图2-2的原理改变培养液成分。用于融合的骨髓瘤细胞系是在8-氮杂鸟嘌呤（8-Azaguanine）存在下，经培养增殖特定地筛选出来。本法有几种改良法，但其原理相同。一般情况下，如果给与8-氮杂鸟嘌呤，则骨髓瘤细胞就死亡，但可以产生合成次黄嘌呤磷酸核糖转移酶（HPRT）的细胞，而对氮杂鸟嘌呤有抵抗的细胞。这种细胞叫作HPRT阴性细胞。将HPRT阴性细胞放入次黄嘌呤（hypoxanthine）、氨基嘌呤（ami-

nopterin) 和胸腺嘧啶核苷 (thymidine) 的混合液 (HAT培养基) 中培养, 则不能合成 DNA 的细胞全部死亡。氨基嘌呤为阻止作为 DNA 合成原材料的嘌呤 (Purine) 和嘧啶 (Pyrimidine) 的主要合成径路。合成 HPRT 正常的细胞能用次黄嘌呤合成嘌呤, 在用胸腺嘧啶核苷合成嘧啶。在这一过程中必须有 HPRT 酶, 所以 HPRT 阴性细胞因不能制成嘌呤和嘧啶而死亡。

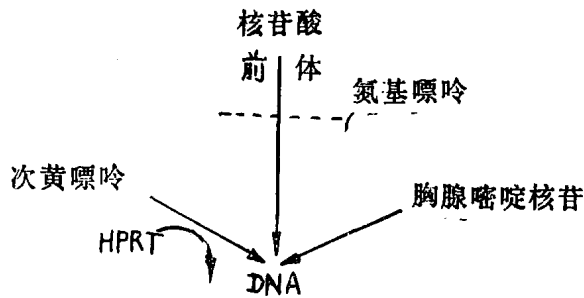


图 2—2 HAT 选择性培养基破坏未融合骨髓细胞系的原理

从免疫动物的脾脏中采集的正常淋巴细胞, 在上述培养条件下生存不到几天即死亡。没有 HPRT 的亲代骨髓瘤细胞在 HAT 选择性培养基中不能增殖, 而杂交瘤细胞则可以从骨髓瘤细胞获得无限增殖能力, 从淋巴细胞得到 HPRT 基因。结果杂交瘤细胞系在 HAT 培养基中能够增殖。

## 五、克隆化

若将一次融合获得的所有杂交瘤细胞一起增殖, 则可释放出与整个动物血清中同样多的抗体混合物。取得 McAbs 的方法是分离一个细胞作为克隆进行增殖。一个克隆是由基因完全相同的细胞所组成。每个克隆只分泌一种免疫球蛋白分子。但也存在一个问题, 即细胞分离为单个时不易增殖。这是制备 McAbs 过程中最大难关, 它必须使单个细胞成为克隆。即要使其分裂许多次, 只要细胞分裂几次后, 使其继续分裂就比较容易。问题是要诱发最初几次的分裂。为了克服这一问题, 现在正用各种方法。第一个方法是加入饲养细胞。本方法为将单个细胞与已经增殖的细胞放在一起, 从而使需要分裂的细胞顺利地分裂。另一个方法是从开始即将细胞放入富于营养成分的培养液中, 使其增殖的方法。

一般认为上述两种方法都具有提供分裂需要的所谓增殖因子 (一组低分子化学物) 的作用。关于增殖因子的成分还不大了解, 但已知它是细胞产生克隆必需的物质。实际上使细胞克隆化的方法有两种 (图 2-3)。其一为有限稀释法。

将杂交瘤悬液细胞稀释, 分别注入很多灭菌小孔中 (一般采用塑料制的器皿), 稀释到大约在一个小孔的液体量中只有一个细胞。当然由于小孔不同, 有的小孔也许一个细胞也没有, 有的也许有两个以上细胞。注入两个细胞以上的不是产生克隆而是产生原始克隆 (少数克隆) 抗体。在细胞增殖后要经过多次克隆化过程, 从而确定其为单克隆性质。第二个克隆化方法是在琼脂糖凝胶 (agarose gel) 固体培养基中使细胞增殖的方法。在各种凝胶中加入血清、氨基酸、抗生素等可使细胞增殖, 细胞分裂后形成小球样团块。由于培养基是半固体状态, 因

此可用管径小的巴斯德吸管将小球吸出。再用吸管轻轻吸上和吹下而打碎团块。将吸出的细胞移入小孔中继续培养。用这种方法可以吸出大量克隆进行增殖和分析。

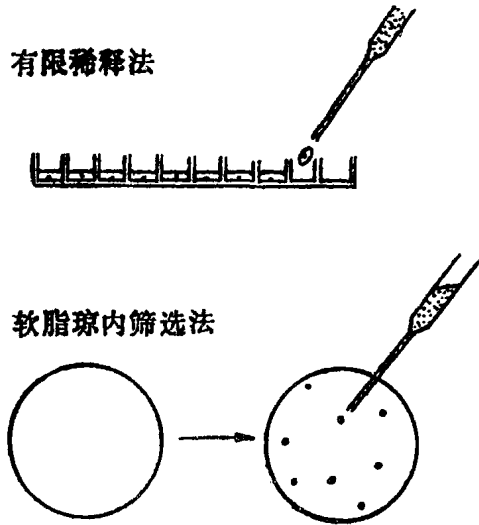


图 2—3 为获得杂交瘤细胞克隆的克隆化法

### 六、抗体的筛选

融合过程中用动物整个脾脏作为淋巴细胞供源。即使用目的抗原刺激免疫系统，但大多数融合的淋巴细胞却产生非目的抗原的抗体。尽管采用加强抗原，按照最好的免疫日程表进行免疫，但能产生该抗原的抗体脾细胞还是在 5% 以下。为了选出目的杂交瘤细胞，必须经过对每一份上清液进行筛选抗体活性的繁琐过程。为了确定需要克隆化的杂交瘤是否分泌抗体，要在克隆化之前进行筛选。检测抗体的方法有多种，但因为单克隆抗体的分离中需要反复多次地检测抗体，因此必须采用简便而经济的方法。目前已有多种分析方法。

### 七、结合分析

最简单的分析方法是检测 McAbs 与抗原结合能力的方法。将单克隆抗体与抗原的复合物洗涤，去除非特异地附着的抗体。然后用对最初结合的抗体发生反应的第二抗体测定结合反应。在用小鼠骨髓瘤细胞与免疫小鼠脾细胞融合的小鼠杂交瘤系统中，指示抗体为兔抗小鼠免疫球蛋白。这一第 2 抗体要用可被放射性测定装置测出的放射性同位素进行标记，或用加适当底物后可显示颜色的酶进行标记。下面以抗破伤风毒素抗体的制备为例进行说明(图 2-4)。

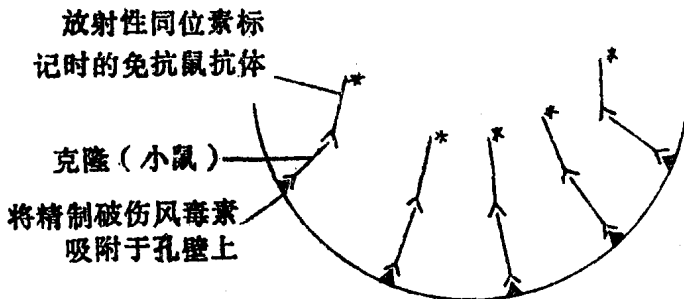


图 2—4 放射免疫分析法用于抗破伤风毒素单克隆抗体的筛选

在融合前，用纯化破伤风毒素免疫小鼠。使杂交瘤细胞增殖，分析小鼠抗破伤风毒素抗体。将纯化毒素吸附于许多小孔的塑料板内（固相法）。由于吸着为非特异性的，因此对分析可溶性抗原非常有效。将稀释的抗原溶液（约 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）加入每一小孔中，静置3小时。这一过程一般是在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下进行。因低温下可使吸附速度增加，易于维持抗原的完整结构。经3小时后，将塑料板倒置，甩掉未吸附的抗原，然后在小孔中注满缓冲液。反复同样操作数次后，加入含有牛血清白蛋白的盐溶液，静置1小时，使蛋白质覆盖塑料板孔中可吸附部位，防止其后的操作中发生非特异性吸附。因为，以后的操作中采用含有蛋白质的培养液。预先一次制成大量的结合了抗原的塑料板，冷冻保存，以便形成杂交瘤细胞后立即取出使用。

然后，在准备好的小孔内注入少量杂交瘤细胞培养上清液。由于塑料板中有96个小孔，因此可以一次检测96份培养上清液。若其中含有抗破伤风抗毒素，它就结合在小孔内的抗原上。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下静置1小时后，将塑料板翻过来甩掉上清液，继而用盐溶液洗涤，再加入放射性标记的兔抗小鼠免疫球蛋白。放射性免疫测定法中常用的同位素为 $^{125}\text{I}$ 。继续将其在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下静置1小时，再一次洗去未吸着的抗体后，加热烘干小孔，用溶解塑料的电热丝把每一个小孔切下来，然后将每个小孔分别放入小管中，用 $\gamma$ 计数器测定每一小孔的放射性。当抗体结合在破伤风毒素时放射性活性增大。当然，为了显示检测的可靠性必须设有对照。即设置未加抗体的阴性对照孔和加入稀释的免疫小鼠全血清的阳性对照孔。为了筛选多数上清液也可采用将干燥塑料板的背面直接接触感光胶片进行摄影的方法。将胶片进行显影时，在高浓度的 $^{125}\text{I}$ 结合部位出现黑色斑点。由此得知含有抗体的小孔位置后，就可将该杂交瘤细胞进行克隆化和增殖。

最近已有不少研究室在第一、二次筛选中采用酶联免疫定量法（ELISA）。这种方法的优点是无需有危害人体的放射性物质。它是用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶等来代替 $^{125}\text{I}$ 以标记指示抗体（兔抗小鼠免疫球蛋白）。这种方法在加入适当的底物时，可呈现肉眼也能看清楚的颜色变化。为了精确地测定可用分光光度计（ELISA测定仪）。用这种方法可测知杂交瘤细胞上清液中可与目的抗原结合的免疫球蛋白量。

## 八、免疫组织学

放射免疫测定法和ELISA法为多数研究室筛选的基本方法，也还有其他方法。这些方法是根据使用抗体的目的所决定。例如以检测患者活检组织标本为目的的抗体时，则用免疫组织反应作为第一次筛选可能是有利的（参照第4章）。根据这一方法，在筛选过程中不仅是能识别目的抗原的抗体，而且也可判断在所期望的条件下能否进行检测。实际上在使用抗体中存在的问题，来自抗体的单克隆性。如果是多克隆性的抗血清，则具有与抗原结合能力的每个免疫球蛋白分子，至少其中一些可能具有可在免疫组织学检测中应用的特性，然后在使用一群均一的免疫球蛋白分子时，均一性却成为缺点。

## 九、细胞毒性

如果制备McAbs的目的是杀伤细胞，则筛选出具有细胞毒性的抗体是不可缺少的。抗体杀伤细胞的方法有两种，其一为抗体引起血清中补体成分经链锁反应（即一个因子活化后引起其后的因子依次活化的现象）的活化。另一方法是抗体将一个杀伤（K）细胞群体吸附到其结合部位。在两种方法中，抗体提供识别的特异性，补体或K细胞提供杀伤手段（只在

靶细胞表面穿孔)。抗体的细胞毒害活性,通常用放射性铬 $^{51}\text{Cr}$ 释放法(图2-5)测定。将靶细胞放入含有( $^{51}\text{Cr}$ )的铬酸钠中培养,细胞摄取 $^{51}\text{Cr}$ 而成为充填有放射性的“口袋”,在“口袋”上开一个洞,则释放可测定的 $^{51}\text{Cr}$ 量。将抗体加入吸有 $^{51}\text{Cr}$ 的细胞悬液中静置1小时,用离心分离法洗涤细胞,在悬液中加入含有补体的血清或含有K细胞的淋巴细胞。当与抗体结合时, $^{51}\text{Cr}$ 被释放到细胞悬液中。继续静置1小时后,将破坏的细胞离心沉淀,然后用 $\gamma$ 计数器测定释放到上清液中的放射性。通过加入表面活性剂,从释放出全部放射性时的测定值中减掉底数值。计算其与加入抗体后释放出的放射性比值,从而得出特异性细胞损伤指数。

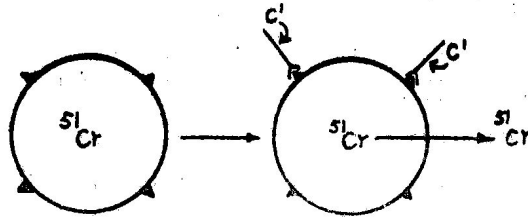


图2-5 抗体与补体存在下细胞放出放射性 $^{51}\text{Cr}$ 可用于细胞损伤分析法

将抗体加入吸有 $^{51}\text{Cr}$ 的细胞悬液中静置1小时,用离心分离法洗涤细胞,在悬液中加入含有补体的血清或含有K细胞的淋巴细胞。当与抗体结合时, $^{51}\text{Cr}$ 被释放到细胞悬液中。继续静置1小时后,将破坏的细胞离心沉淀,然后用 $\gamma$ 计数器测定释放到上清液中的放射性。通过加入表面活性剂,从释放出全部放射性时的测定值中减掉底数值。计算其与加入抗体后释放出的放射性比值,从而得出特异性细胞损伤指数。

## 十、免疫化学

另一种筛选方法是用可溶性抗原结合待测培养上清中的抗体,继而使复合物沉淀的方法。这一方法现经常使用。如预先用放射性标记抗原,则同时可以获得可被特定抗体识别的抗原的大小及分布的信息。作为更精密的方法现已有印迹法(blotting)。同以了解DNA互补碱基序列间的杂交(hybridization)情况。E.Southern博士开发了使DNA互补碱基序列在固相状态进行杂交,叫做Southern印迹法。与此相反,还有Alwine研究出的使DNA与RNA杂交,叫做Northern印迹法,从而使抗原与抗体的特点互补作用有了进一步地发展。通过非共有结合的两种蛋白质在固相状态的杂交方法,在国际上叫做Western印迹法(图2-6)。这些筛选方法特别在探索细胞表面分子复杂的混合物时有用。

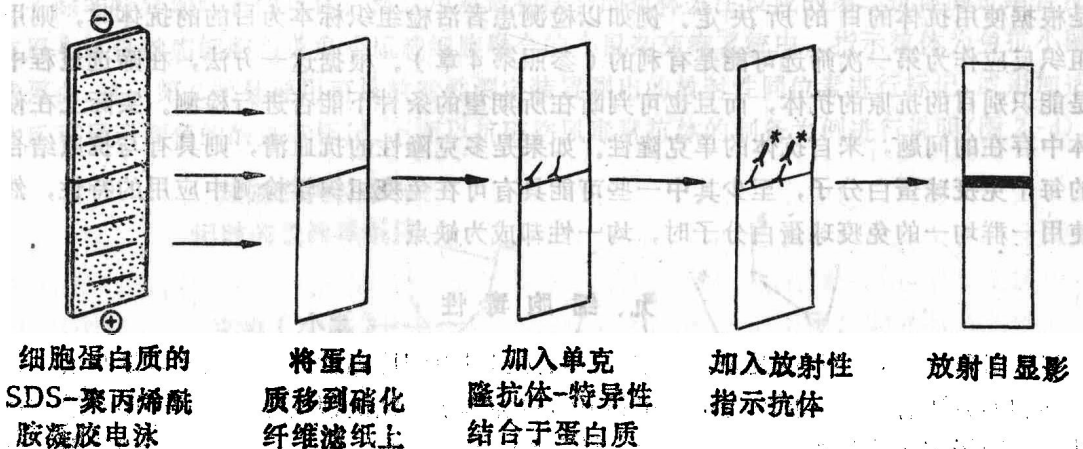


图2-6 筛选单克隆抗体活性用Western印迹法

试以癌胚抗原 (CEA) 为例说明。CEA为部分大肠癌细胞表面的180,000道尔顿的大分子糖蛋白质。通过直接注入肿瘤细胞的方法免疫动物,然后制出杂交瘤细胞,就可以获得McAbs。提纯用于免疫的株细胞的细胞膜,用表面活性剂将其溶解,在琼脂糖凝胶上电泳。这时大分子在凝胶上移动速度缓慢,所以停止于接近出发点处,但小分子则较迅速地通过凝胶。细胞表面的蛋白质在凝胶上特定位置形成带状分布,其位置由分子的大小和形状所决定。在凝胶上每条蛋白质的一部分可移到硝化纤维素滤纸上,也就是说能够印迹。由于印迹可以进行多次,因此可以制成多张同一蛋白印迹的硝化纤维素滤纸。在此滤纸上滴上含有抗体的培养上清液,放置1小时后冲洗。抗体与抗原结合的情况与放射免疫测定法中所述完全相同,即可以用放射性标记的第二抗体进行检测。第二抗体的结合情况可通过将照相胶片与干燥的硝化纤维滤纸接触后显影,就可以测出放射自显影。用这种方法不仅可以了解抗体结合情况,还能判断所识别的抗原的大小。如需要对CEA的McAbs在硝化纤维滤纸上的分子量180,000附近处寻找到所结合的抗体。

## 十一、克隆抗体的制备

通过繁琐的反复筛选、克隆化、再筛选过程,才能获得产生目的抗体的杂交瘤。在这一过程中由于疏忽大意可以发生不少问题。众所周知,组织培养容易发生细菌、真菌、酵母菌及支原体的污染。用于细胞培养的小牛血清的质量,即使来自同一厂家,但每批质量也往往不一。旺盛增殖的骨髓瘤细胞有时突然停止分裂,这对研制杂交瘤的研究室是最难办而焦急的事情。某些批号的聚乙二醇也可以原因不明地不能引起杂交细胞的形成。即使顺利地进行了融合,也还存在其它问题。大多数研究者一旦得到产生有意义的抗体的杂交细胞时,就趁着尚未丢失急于放到液氮中冻存。如果在液氮罐内 $-196^{\circ}\text{C}$ 温度下可使细胞冻结,永久保存。在冻结前要将生长良好的细胞洗涤后,放入含有甘油或二甲亚砜(DMSO)的培养液中。这些化合物可以防止破坏细胞器的冰结晶在细胞内形成。一般情况是以 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 的速度逐渐将细胞降温到 $-20^{\circ}\text{C}$ ,使其缓慢地冻结。

一旦获得良好的杂交瘤细胞系,则可以无限地获得含有抗体的上清液。为了获得高滴度的抗体,可将杂交瘤细胞注入BLA<sub>b</sub>/c小鼠或大鼠的腹腔内,作为悬浮于腹水中的肿瘤细胞而增殖。这样可以产生价效很高的抗体。当然,为了防止发生由于小鼠 $\text{H}_2$ 组织相容性不同而引起的排斥反应,则必须采用与亲代骨髓瘤细胞和免疫的淋巴细胞相同品系的动物。为了使杂交瘤细胞在腹腔内增殖良好,可于注入细胞的几周前预先将具有刺激性的有机溶剂降植烷(Pristane)(或不完全佐剂)注入腹腔内。这样可以破坏腹膜内膜,以建立杂交瘤细胞易于增殖的环境。收集腹水后离心分离,去除细胞取上清液冷藏备用。

需要高度纯化的抗体时,例如供患者注射用,则可用大量培养液将细胞进行旋转培养。如果用不含血清的培养液则纯化过程更简单。纯化时可用50%W/N浓度的硫酸铵使免疫球蛋白从培养细胞的上清液中沉淀,然后将沉淀放入缓冲液中再溶解,也可用A蛋白(Protein A)或用抗小鼠抗体制成的亲和层析柱,或用离子交换层析法纯化。离子交换层析法无须另用特殊试剂,它具有对任何抗体都能适用的优点。将溶解在硫酸铵中的免疫球蛋白在不含有盐类状态下,放在二乙氨基纤维素(diethyl-amino-ethyl cellulose DEAE)柱上。用盐浓度逐渐增加洗脱用缓冲液的离子强度。当盐浓度增高时,带有不同离子电荷的蛋白质依次流出。纯化的抗体及比较不纯的上清液可用冻结法长期保存。许多单克隆抗体在室温下



也能长期保持其活性、因此，在各研究室之间，容易做到互相交换单克隆抗体。

## 十二、小结

制备单克隆抗体的每一过程是比较简单的，但综合起来，一步一步地进行整个过程则是要花费很多时间（图 2-7）。最花费工夫的是筛选。能够自动筛选的装置现已问世，可以认

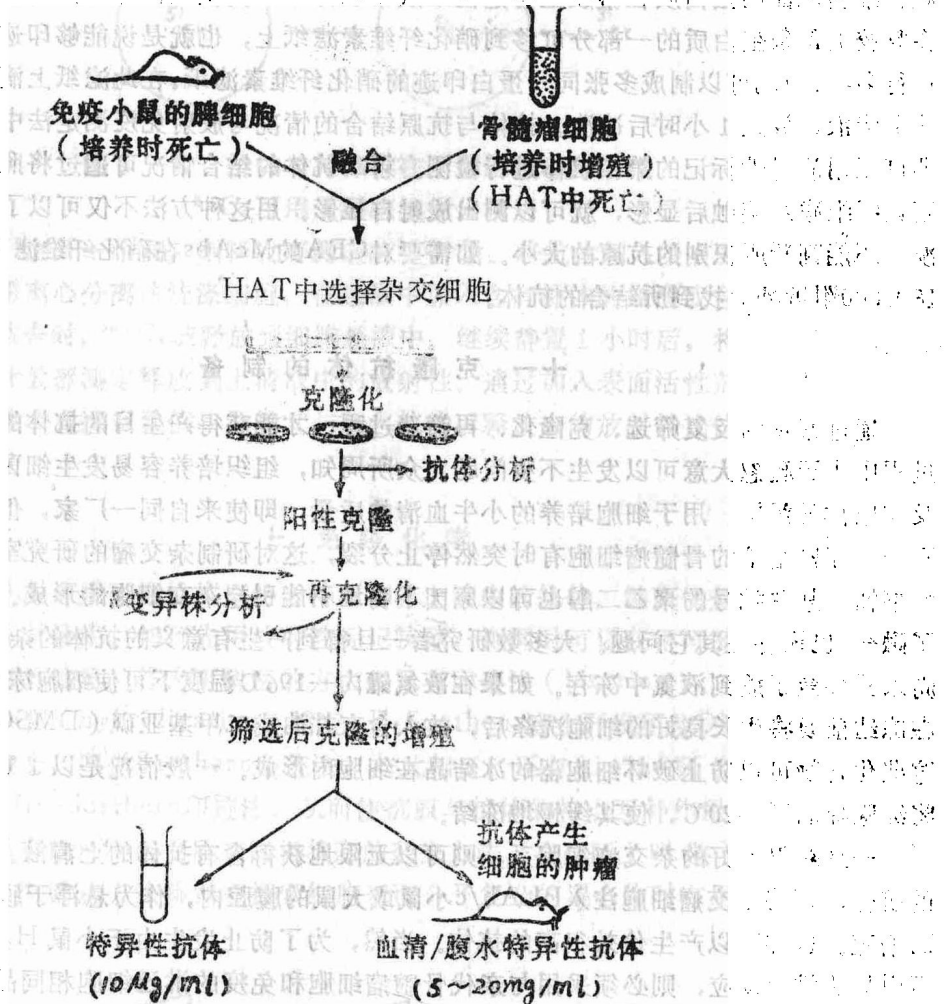


图 2-7 单克隆抗体的制备过程

为，如果收集冻存在全世界各实验室冷藏器中的杂交瘤细胞，则对所有抗原决定簇的McAbs都已准备好。对某一种抗原制备McAbs的研究者往往得到对其他蛋白质有效的抗体。最好的例子，是在制备抗人类大肠癌细胞的单克隆抗体的过程中，却得到了鉴别血型用的系列试剂。为了克服这一问题，现正在研制在融合前预先选出产生目的抗体的B淋巴细胞的复杂技术。

## 进一步读物

1. Bastin J., Kirkley J. & McMichael A.J., Production of Monoclonal Antibodies, A practical guide. In, Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine (Eds. A.J. McMichael & J. W. Fabre), p.503, Academic Press, London (1982)