

杂交瘤细胞
和
单克隆抗体

实验技术

许廷贵
孔昭敏
庄汉澜

节译
校
审校

乌鲁木齐军区后勤部军事医学研究所

69287

杂交瘤细胞
和
单克隆抗体

实验技术

乌鲁木齐军区后勤部军事医学研究所

2156/11

杂交瘤细胞和单克隆抗体实验技术

(内 部 交 流)

许廷贵 节 译

孔昭敏 校

庄汉澜 审 校

乌鲁木齐军区后勤部军事医学研究所

中国人民解放军58068部队印刷所印刷

印数：2000册 工本费0.30元

译 者 的 话

1975年,英国剑桥 Kohler和Milstein 成功地将小鼠骨髓瘤细胞和产生抗体的小鼠脾淋巴细胞融合生成杂交瘤细胞。该细胞系在体外培养条件下能分泌单克隆抗体,并能离体长期传代而不失其特性。此后,各国学者纷纷开展了此项研究。近几年来,杂交瘤技术已在医学和生物学领域中广泛应用,它不仅在免疫学,而且在分子生物学中获得了显著成就。杂交瘤技术所产生的单克隆抗体,性质纯一,能在体外大量制备,从而使血清学进入了一个新时期。为了推广这一先进技术,我们以Leslie Hudson和Frank C. Hay编著的《实用免疫学》(1980年第二版)的11章为蓝本,参考其它资料节译成此小册子,以供国内同道和初学者参考。由于我们水平有限,错误肯定难免,恳望老前辈和有关同志赐教。

译 者

1982.11.1

目 录

第一篇 杂交瘤技术和单克隆 抗体的应用

前 言	1
一、用细胞融合技术建立功能细胞系	1
二、单克隆抗体的应用	3
(一) 常规血清学试剂	4
(二) 抗病毒的单克隆抗体	5
(三) 抗寄生虫的单克隆抗体	6
(四) 鉴定鼠肿瘤细胞及其分化抗原的 单克隆抗体	7
(五) 鉴定人肿瘤细胞及其分化抗原的 单克隆抗体	8
(六) 人类主要组织相容性复合物编码 抗原的单克隆抗体	11
(七) 单克隆在临床药理学中的应用	12
三、尚待解决的问题	13

第二篇 杂交瘤细胞和单克隆 抗体的实验技术

一、技术概述	19
(一) 融合和选择的原则	19

(二) 浆细胞瘤细胞的除去	19
(三) 融合用浆细胞瘤细胞株的来源	21
二、融合用浆细胞瘤细胞的维持	22
三、融合用的靶细胞	23
四、融合方案	25
(一) 脾细胞的制备	27
(二) 浆细胞瘤细胞的制备	27
(三) 融合	27
(四) HAT 培养基贮存液的制备	29
(五) HAT 培养基的制备	30
(六) 巨噬细胞饲养层的制备	31
五、有抗体活性融合孔的筛选	33
(一) 细胞表面抗原固相放射免疫分析法	34
(二) 结合测定法	35
六、杂交瘤细胞的克隆化	38
(一) 在软琼脂中克隆化	38
(二) 有限稀释法	40
七、细胞系的始动和维持	41
八、抗体的纯化	42
(一) 抗原免疫吸附剂	42
(二) 细胞表面免疫吸附剂	42
(三) 免疫球蛋白的分离	44
九、单克隆抗体的实际应用	45
十、摘要和结论	47
 附 录	 50

第一篇 杂交瘤技术和单克隆抗体的应用

前 言

1975年, Köhler和Milstein 首次以小鼠骨髓瘤细胞系与脾细胞融合产生了可培养的“杂交瘤”细胞系, 该细胞系能产生大量的单克隆抗体。此发现为免疫学研究和免疫学方法在基础理论及临床应用方面开创了新纪元。它有两点重要价值: (1) 用细胞融合技术获得了可连续培养的具有免疫学功能和生产免疫效应分子的细胞系。只有获得这样的同质性细胞系, 才有可能研究免疫应答中细胞相互作用的基因的、生化的和分子基础, 以及对由B、T淋巴细胞和巨噬细胞所产生的分子进行提纯和鉴定。(2) 更为重要的是通过杂交瘤技术可生产大量的针对各种重要抗原的同质性抗体。由于杂交瘤既可连续培养, 又保留了骨髓瘤亲代的恶性无性繁殖表型, 因此可以克隆化来保证其同质性。细胞可冷冻保存, 必要时复苏, 注入小鼠诱发腹水, 其中含大量同质性抗体。这样, 就可不定期、实际上无限量地产生有用的抗体, 以供研究或临床实验室使用, 亦可做参考试剂。由于杂交瘤技术的克隆实质上来自脾的单个抗体形成细胞, 因此可用未纯化的抗原免疫动物而获得纯抗体。

本篇介绍杂交瘤技术在基础和临床几个方面的应用。

一、用细胞融合技术建立功能细胞系

通过对B、T淋巴细胞及巨噬细胞在抗体形成中相互作

用的研究，发现这些细胞的特异性表面受体和所释放的某些因子在免疫应答中起重要作用。利用正常细胞进行研究，虽对这类分子的性质有所了解，然而，由于细胞数量有限，以及所分离的正常细胞群的异质性，一般难以阐明其化学特征。克隆技术是提供同质性细胞群的手段之一，而杂交瘤技术通过适宜的淋巴瘤、骨髓瘤或巨噬细胞样细胞系与其相对应的正常细胞融合形成克隆，则是获同质性细胞群的另一手段。已有一些研究者用杂交瘤技术成功地获得了具有免疫学功能和分泌免疫调节因子的T、B和巨噬细胞系。

克隆技术和杂交瘤克隆技术，其技术要求虽相同，但存在一些本质的不同。克隆技术来自单一细胞（通常是正常细胞），因而，需要生长因子才能增殖。杂交瘤技术包括两种细胞，其中之一为肿瘤细胞，故保留恶性增殖的潜能，只需稍加刺激就能增殖。这两种技术可互为补充：克隆技术广泛应用于细胞生理学的研究；杂交瘤技术很适用于受体和其它细胞产物的生化研究，而且对细胞分子遗传学研究有其特殊价值。

杂交瘤技术在研究抗体多样性，B细胞指令(repertoire)范围，抗原结合点，个体基因型与氨基酸排列序列之间的关系等方面非常有用。通过对小鼠骨髓瘤蛋白的详细研究，对上述问题的了解有了很大进展，但因可用的能与抗原结合的骨髓瘤数目少，使这方面的研究受到一定限制。多年来，只培育出了7~8种小鼠骨髓瘤株能产生针对磷酸胆碱或其它半抗原的抗体。

利用杂交瘤技术，针对相同的半抗原，一个实验室在几个月内经一次融合至少可获得相同数目的杂交瘤。由于这些

杂交瘤能生产大量抗体，因此，可如研究骨髓瘤蛋白一样容易地研究这些免疫球蛋白分子的结构、血清学和与抗原结合的特性，及更多地了解如与 $\alpha - (1 \rightarrow 3)$ 葡聚糖、磷酸胆碱、偶氮苯肿、聚谷酰氨-丙氨酰-酪氨酸、二硝基苯和硝基碘苯等半抗原起反应的抗原结合部分的B细胞指令。这些研究结果揭示，每类抗体的异质性要比过去推测的大得多，并证实重链V-区至少有三组基因编码随机组合，使抗体具多样性。如对19个抗葡聚糖杂交瘤蛋白的氨基酸序列分析发现无两者相似者。类似的多样性亦见于抗苯肿酸盐抗体系统。此外，杂交瘤蛋白有可能生产出更纯的抗个体基因型的抗体，可用来测定氨基酸的序列。显然，获得有免疫功能的B细胞、T细胞和巨噬细胞的同质性细胞系将有助于对基础免疫现象的更多了解。

二、单克隆抗体的应用

杂交瘤技术最重要的成果是能无限期地和无限量地生产同质性抗体。多克隆抗体多年来已应用于生物和医学的各个领域，用于对复杂的生物学系统的小组分的定性、定量、分类和纯化。医务工作者常依抗体来预防、诊断和治疗多种疾病。利用抗体作自动化测定已成为医院实验室的主要工具。免疫学测定法用处虽大，但因好的血清试剂难以得到，使应用受到限制。这些困难主要来自免疫应答的不可预见和异质性。由免疫动物制备多克隆抗体是一门技术而不是一门科学。即使遗传型相同的动物免疫后，每个动物的免疫应答亦不尽同，抗体的量和质均有区别，甚至同一动物不同采血期的血中抗体的质和量也不一样。此外，提纯的抗原中也有可能污染少量大分子，它产生大量不必要的抗体。即使高效价

的特异抗血清，在抗体的亲和力、生物学活性和交叉反应上也存在异质性。鉴于免疫应答的不可预知及异质性，优质血清一般甚难获得，尤其在用大动物如马制备免疫血清时更是如此。如获得了特异性杂交瘤，所有这些困难都将被克服。只要有一些针对某一特异抗原的杂交瘤，就可制出供每个特殊用途的血清学试剂。杂交瘤技术一旦成功地应用于各个领域，将会显示出巨大的效益。

(一) 常规血清学试剂

杂交瘤技术已被研究人员和商业单位用来生产常规血清学试剂，已有针对多种抗原的单克隆抗体，包括激素、药物、血清组分、微生物和胚胎性肿瘤的制剂用于研究和诊断。免疫学家已制备出针对不同类及亚类鼠免疫球蛋白的单克隆抗体，利用同种异体免疫法能获得鉴别小鼠免疫球蛋白同种异型标记的单克隆抗体，利用同种异型和异种免疫能制得抗个体基因型抗体。已证明，单克隆抗体在小鼠免疫球蛋白亚类的常规鉴定，免疫球蛋白分子各个区段的结构和功能的研究，由于构型的微小改变而造成的微细差别的鉴别，以及对V-区的结构和遗传的研究等方面，都很有用。此外，抗鼠免疫球蛋白单克隆抗体在免疫测定法（如免疫荧光、酶联免疫吸附或放射免疫测定）中做为第二抗体，在鼠免疫球蛋白的提纯和免疫复合物的鉴定等方面也极有用。鉴于单克隆抗体的同质性、特异性和可裁切性，从而提高了免疫测定法的可靠性。但单克隆抗体的使用还存在一些问题，如绝大多数不能在琼脂中直接形成沉淀，因此，不能用于常规平板双向扩散（Ouchterlony）分析、放射免疫扩散或免疫电泳。但用二、三种高亲和力单克隆抗体的混合物就能解决此问题。鉴

于自动免疫测定也不能采用琼脂扩散法，看来不能直接沉淀并不是主要障碍。现已有针对人免疫球蛋白和某些其它人血清成分的单克隆抗体。预测，今后几年内，在临床诊断实验室中，单克隆抗体肯定将替代多克隆抗体。

(二) 抗病毒的单克隆抗体

应用单克隆抗体对病毒抗原、病毒复制和动物病毒的流行病学及基因漂移 (drift) (连续变异) 的研究表明了单克隆抗体的潜能。现已能生产针对流感、副流感、狂犬病、疱疹、麻疹、SV-40、呼肠病毒 (reovirus)、RNA 肿瘤病毒和其它病毒的单克隆抗体。正是使用这些抗体才得以鉴定这些病毒的亚种，并鉴别了多克隆抗体不能区分的狂犬病毒街毒株间的差别。例如，用多克隆抗体揭示世界不同地区所分离的狂犬病毒株无差异，因而使人信以为狂犬病毒的抗原性相当稳定，只要有二个疫苗株即可给世界各地提供恰当的免疫力。然而，单克隆抗体却揭示世界不同地区分离的病毒的抗原性明显不同。此一发现提出了某些疫苗无效可能是因疫苗株和不同地区狂犬病“街毒”株之间的抗原性不同的推论。现在有可能用单克隆抗体来验证此假设，若需要可挑选另外的病毒株供疫苗生产。

对流感病毒抗原的漂移现已了解清楚，单克隆抗体可进一步分析不同流行地区病毒株抗原性的差异。病毒在有单克隆抗体的环境中生长，有可能在体外造成基因漂移，并可比较亲代株及变异株之间的抗原性差异。现已证明，流感病毒的变异频率为 $10^{-5.5}$ /亲代病毒感染单位。体外基因漂移实验表明，流感单步变异株 (Single-step variants) 的糖蛋白某一特定部分的单个氨基酸组分可能与基因漂移有关。用此

途径有可能对今后出现变异株的血清学和化学性质进行预测。令人感兴趣的是，单克隆抗体也可培育狂犬病毒的血清学变种，其变异频率与流感病毒一样。这些观察提出了一些很有意义的问题；病毒都在自然界中进化，为什么狂犬病毒看来却比流感病毒稳定。

针对病毒多肽链的单克隆抗体可用于研究病毒的复制及非结构与结构多肽链间的关系；尤其在确定大的多肽链与其裂解产物之间的相互关系上特别有用。

参考抗体对诊断病毒感染，寻找动物贮存宿主和研究病毒的流行病学都特别重要。由于单克隆抗体能大量生产并无限期地获得，它将极大地甚或完全取代传统的抗体，至少在全球监测病毒性疾病的主要参考实验室如此。

(三) 抗寄生虫的单克隆抗体

针对寄生虫生活周期各阶段表面抗原的单克隆抗体尚处于初期研究阶段。已有针对锥虫表面糖蛋白的单克隆抗体，并用于分析此寄生虫的复杂基因和抗原变异。除供分析外，单克隆抗体还为抗体亲和层析法纯化各抗原大分子提供了可能。

疟疾的研究已取得明显进展。从动物实验发现，用孢子免疫所制得的抗表面抗原的抗体能中和寄生虫，并表明孢子有6种主要表面成分。用蚊虫叮咬法免疫，可把相当纯的寄生虫制剂注入动物并研制出能检测表面抗原的杂交瘤。某一特定杂交瘤抗体能与6种表面抗原之一一起反应，而此抗原对疟原虫的虫种和其生活周期中某一特殊阶段是特异的。此单克隆抗体为IgG1亚型，当被动给予时，可保护动物不被感染。有意义的是此单克隆抗体的Fab段也很有效。

现已能生产针对其它虫种包括恶性疟原虫(*Falciparum*)的单克隆抗体。特别要指出的是, 针对恶性疟原虫裂殖子的单克隆抗体干扰了寄生虫侵入红细胞。这些研究提示, 单克隆抗体将对疟原虫的生活周期提供重要的资料并干扰感染的进程。有人曾设想通过蚊叮咬把抗体被动注入人体。如有直接针对生活周期的某一恰当阶段的单克隆抗体, 注入此单克隆抗体将会干扰寄生虫的发育, 从而切断生活链。此外, 单克隆抗体将有助于寄生虫流行病学和基因漂移的研究, 亦有筛选出供制备疫苗用的抗原的可能性。

(四) 鉴定鼠肿瘤细胞及其分化抗原的单克隆抗体

杂交瘤技术可用于鉴别细胞表面分子及其特性。整个细胞和细胞膜成分均可用来生产小鼠或大鼠的同种和异种抗体。为了产生对分化抗原、遗传限定的多形性抗原、肿瘤抗原及有重要功能的细胞表面分子有特异性的抗体, 在与适当的细胞系杂交后, 筛选其有特异性的单个杂交瘤克隆是关键性的一步。单克隆抗体技术在这方面的非凡潜力目前尚不能充分显示。在小鼠系统中, 已培育出数十个产生各种抗体的杂交瘤细胞系, 这在鉴别血液、淋巴样器官、神经组织等各类细胞中均有很大价值。这些抗体正在或将用于提纯和研究细胞表面分子。相信不久的将来, 将对这些具有生物学重要意义的细胞表面分子的特征会有更多的了解, 并将有助于细胞间的相互作用和多种细胞功能的了解。用杂交瘤技术也将促进免疫应答中的细胞组分, 调节性辅助细胞和抑制细胞的亚群, 对免疫功能有调节作用的分子, 以及与肿瘤转移、排斥有关的自然杀伤细胞和诱导杀伤细胞的作用机理等方面研究的进展。这些领域中的研究进展和小鼠自家免疫病实验所

获得的异常细胞基础，将有助于对人类疾病的更好了解。此外，对小鼠特异肿瘤抗原的鉴定和分离，将会促进自身肿瘤的宿主应答理论的发展。如肿瘤存在特异性抗原，杂交瘤技术则有可能鉴定肿瘤特异抗原，以与正常抗原鉴别。但肿瘤抗原亦发生于分化正常的阶段，因而不易表现。

已制出几种针对小鼠的已知T细胞抗原(包括Thy-1和Ly抗原——Lyt-1, Lyt-2和Lyt-3)的单克隆抗体。还有针对H2K-、D-、I-、T1a-和Qa-区的抗原以及抗主要组织相容性复合物和围绕主要组织相容性复合物编码各位点内其它抗原的小鼠单克隆抗体。有重要功能的细胞表面抗原，保守地说可能有几百种甚至几千种。单克隆抗体在鉴定和描述这些抗原或细胞表面标记的特征中的重要作用是显而易见的。免疫和挑选单克隆抗体的方法，尤其是对细胞上不经常出现或在极少数细胞上出现的分子的免疫和挑选方法必须改进。现有技术包括用荧光激活细胞分类器测定单个细胞上的流动荧光，可溶性抗原的放射免疫测定和细胞膜生化技术等改进，将于几年内促进杂交瘤技术更全面地发展。

(五) 鉴定人肿瘤细胞及其分化抗原的单克隆抗体

用体细胞杂交技术已生产了多种特异性单克隆抗体，包括针对肿瘤抗原，具有生物学重要性的血浆蛋白和其它分子及正常人淋巴细胞和淋巴瘤细胞的各种表面糖蛋白。还制出了针对伴随主要组织相容性复合物和外周T细胞各种多形性和非多形性抗原，胸腺细胞分化抗原，黑色素瘤和白血病的特异性或伴随抗原，以及与直肠癌、乳腺癌和肺癌有关抗原的单克隆抗体。在某些方面已进行了相当详尽的探索，如利用一系列抗T细胞杂交瘤抗体查明人T淋巴细胞群是由不

同细胞亚群组成的。单克隆抗体在鉴定胸腺内分化的人T淋巴细胞抗原和鉴别成熟分化的T淋巴细胞抗原时同样有用。例如人胸腺细胞可分成三种主要群：幼稚（早期）、共同（中期）和成熟（晚期）胸腺细胞分别占10%、80%和10%。幼稚胸腺细胞群含T9/T10抗原，进一步成熟T9消失，而T6、T4和T5/T8抗原同时出现，组成共同胸腺细胞库。有趣的是几种动物带有类似系列抗原，如人T6相当于TL（45,000和12,000道尔顿），T4为人的诱导细胞表型，T5为人的细胞毒/抑制细胞表型。这样，小鼠的 $TL^+Ly1^+2^+3^+$ 细胞恰好相当于人的T6、T4、T5细胞亚群。

共同胸腺细胞群最初发现于胸腺皮质，进一步成熟后，分化成两个细胞群。在分化过程中，T6消失，获得T1和T3，成熟胸腺细胞的两个亚群可在髓质区发现。晚期细胞群为T10、T1、T3、T4⁺群和T10、T1、T3、T5⁺群。T1、T3抗原系成熟T细胞所有，因此，获得T1、T3抗原即得到免疫活性。此类人细胞相当于小鼠的考的松耐受胸腺细胞。

当细胞从胸腺输出失去T10，分化成循环的诱导（辅助）细胞群和细胞毒细胞群，相当于T1、T3、T4⁺细胞群和T1、T3、T5⁺群。在人体中，此两群细胞已肯定为主要调节性细胞亚群，调控着细胞和体液免疫应答反应的型别和强度。以往的研究表明，60%的循环T细胞能与T4反应，具有辅助功能。只有带有T4的T细胞群在细胞介导的淋巴细胞溶解中，辅助细胞毒性杀伤细胞的成长，有利于B细胞的增殖、分化和免疫球蛋白及可溶性辅助因子的产生。相反，T5⁺群在细胞介导的淋巴细胞溶解中是细胞毒效应细胞，其作用与各种T-T和T-B相互作用中的抑制细胞一样。下

述一系列疾病中，存在调节性细胞群的失常，包括多发性硬化症，系统性红斑狼疮，少年类风湿性关节炎及感染性疾病如传染性单核细胞增多症，结节性麻风，免疫调节紊乱者也可能是各种自家免疫病、感染和获得性或先天性免疫缺陷症的主要因素。

获得性丙种球蛋白缺乏症可由产生免疫球蛋白的B细胞的缺损造成，亦可由诱导细胞如T₄亚型缺少及抑制细胞群激活所引起。因此，对某些人类疾病的了解，尚有待于对涉及正常免疫应答的细胞群特性的更明确肯定。

杂交瘤技术的另一方面应用是用于淋巴瘤和白血病的分类。以往，是以组织形态学来诊断大多数非何杰金氏淋巴瘤和白血病的。近几年来，虽已有鉴别B和T细胞肿瘤细胞表面标记的常规试剂，但用途有限。现又建立了鉴定正常B细胞，巨噬细胞，粒细胞，T淋巴细胞和特异性白血病及淋巴瘤等抗原的单克隆试剂。现已清楚T细胞白血病的异质性相当于正常T细胞的分化阶段。大多数T细胞急性白血病细胞相当于最早期的胸腺细胞，而恶性T细胞淋巴瘤相当于胸腺成熟过程的较成熟阶段，主要表现为Ⅱ和Ⅲ期抗原。相反，成熟T细胞型慢性淋巴性白血病和Sezary综合症的表型则由正常人的辅助细胞和抑制细胞群决定。与鉴定B细胞分化的特异阶段的抗体的研究结果一样，这些观察结果得出的结论是大多数淋巴瘤属于正常分化成熟过程的不同阶段。有些淋巴瘤是否表示内部免疫调控存在缺陷尚不清楚，但可用上述某些抗体进行研究。

大部分肿瘤除反映细胞分化正常阶段的一般规律外，有令人信服的证据表明，某些肿瘤抗原不代表细胞分化的某一

阶段，而是肿瘤的特异抗原或转化蛋白如CALLA，其它淋巴瘤抗原，实体瘤抗原（黑色素瘤、乳腺癌和直肠癌）等。因而，未来几年内杂交瘤技术将决定是否存在肿瘤抗原。如存在，杂交瘤技术将有可能进一步确定肿瘤抗原是否反映正常分化抗原，以及这些抗原与正常细胞组分之间是什么关系。有了这些知识，加上对肿瘤免疫应答细胞基础的了解，有可能合理地安排宿主对肿瘤的应答。

（六）人类主要组织相容性复合物编码抗原的单克隆抗体

人类主要组织相容性复合物（MHC）含有HLA—A、B、C、和DR抗原特异性（Ia糖蛋白）、某些补体成分和免疫应答中各种其它蛋白的信息。

现已肯定主要组织相容性基因复合物在对各种抗原的免疫应答、细胞毒杀伤细胞的产生和特异性、细胞间的相互制约和自家免疫性等复杂的免疫应答过程中起着主要作用。显然，对基因产物特性的更好确定，将有助于对MHC生物学功能的更好了解。杂交瘤技术为供鉴定用的人MHC试剂的制备提供了新途径。以前，用多产妇血清鉴定大部分HLA—A、B、C和DR的特异性，能鉴别约60种以上的HLA—A、B、C和DR特异抗原。因血清效价一般较低，特异性差，一些重要实验不能进行，所以用孕妇血清极难确定多形性HLA抗原。因缺乏高效价试剂，限制了对MHC抗原的生物化学和免疫化学特征的确定；又因无相应的I-A、IE/C和I-J的试剂，对人的某些I亚区的探索差。杂交瘤技术有可能制出高效价抗体，有利于对这些重要抗原的生化分析。如今，已能生产对 β 2微球蛋白、HLA—A、B、C和DR