

# 第四章 单克隆抗体

单克隆抗体技术自 1975 年问世以来，在生命科学研究及临床医学诊断中发挥着越来越重要的作用，每年与单克隆抗体相关的研究论文数以万计，生物产品数以千计，用于临床诊断的单抗试剂日益增多。随着人类基因组计划的完成及蛋白质组计划的开始，单克隆抗体在蛋白质功能研究、基因表达谱分析、临床疾病检测及治疗等方面的应用将更为广泛。本章主要讨论鼠源性单克隆抗体制备的有关理论及在实际中经常碰到及需要注意的问题，并简述了单克隆抗体技术的发展背景、原理和应用。单克隆抗体技术的问世，使免疫学研究迈向更高和更精细的水平，单克隆抗体现已成为生物科学中最精细的探针之一。

## 第一节 单克隆抗体的产生历史与原理

1975 年 Kohler 和 Milstein 以“分泌预定特异性抗体融合细胞的持续培养”（Continuous Culture of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity）为题，在《自然》杂志首次报道用仙台病毒使小鼠骨髓瘤细胞和经羊红细胞免疫的小鼠脾细胞融合产生的杂交瘤细胞，既具有脾细胞分泌抗羊红细胞抗体的能力，又具有小鼠骨髓瘤细胞永生的特性，这一划时代开创性工作翻开了人类利用杂交瘤抗体技术制备各类不同抗体广泛用于生命科学研究及临床疾病诊断治疗的历史篇章，是生物技术发展史上的重要里程碑，Kohler 和 Milstein 亦因此获得 1984 年诺贝尔医学奖。

事实上在此之前，1970 年 Sinkovics 等人已经报导过产生特异性病毒抗体的淋巴细胞和由病毒引起的肿瘤细胞可以自然地在体内形成杂交瘤分泌特异性抗体。1973 年 Schwaber 与 Coken 首次报导了鼠—人杂交瘤的成功。1974 年 Bloom 与 Nakamura 首次应用人的 B 细胞与人的骨髓瘤细胞融合产生淋巴因子。以后于 1980 年 Luben 与 Molle 证明，在体外培养 10 天的小鼠胸腺细胞能够产生淋巴因子，并能代替在体外培养中产生初次免疫（primary immunization，也称原发性免疫）反应所需要的免疫 T 细胞。他们应用这种胸腺细胞培养液（称为条件培养液）加到小鼠脾细胞培养物中，并加入抗原（淋巴因子—破骨细胞激活因子）刺激脾细胞产生免疫反应，随后用这种细胞与鼠骨髓瘤细胞杂交而产生破骨细胞激活因子的单克隆抗体，建立了体外初次免疫反应，缩短了在体内免疫的时间。1978 年 Miller 与 Lipman 应用 EB 病毒转染人的 B 淋巴细胞产生单克隆抗体，使杂交瘤单克隆抗体技术向前迈进了一步。

生物体产生抗体的最基本特点是抗体的多样性和不均质性，它们是针对众多不同抗原决定簇（epitope）的混合性抗体。20 世纪 50 年代以前对此现象一直没有满意的解释，1957 年 Burnet 创造性地提出了抗体产生的细胞系选择学说（即克隆选择学说），认为每个 B 细胞只产生一种抗体，它以独特受体的形式存在于细胞表面，只能与一种抗原决定簇特异性地反应，由此反应激活的这一淋巴细胞系，只能产生针对这一抗原决定簇的结构与功能完全相同的免

疫球蛋白（单克隆抗体）。随后，Nossal 和 edbers 采用两种不同的抗原免疫大白鼠，结果发现，抗体生成细胞自始至终只能产生针对一个抗原的抗体，证明并支持了 Burnet 的细胞系选择学说。一个淋巴细胞只接受一个抗原决定簇刺激及经刺激后扩增的淋巴细胞产生均一的同质抗体，此即单克隆抗体技术的理论基础。

制备单克隆抗体的基本过程是 B 细胞与骨髓瘤细胞的融合，在此基础上利用骨髓瘤细胞的生化代谢缺陷在选择培养基中筛选培养，获得融合的杂交瘤细胞，因此，细胞融合和融合细胞的筛选是杂交瘤抗体技术的基础，而理想的生化缺陷型骨髓瘤细胞系的建立是筛选融合细胞的必需前提。一个浆细胞无限制增殖，导致产生一种均一的免疫球蛋白，称骨髓瘤或浆细胞瘤（plasmacytoma）。小鼠自发骨髓瘤极为罕见，需经人工诱导建立，1965 年 Sachs 等用矿物油刺激 BALB/c 小鼠诱生出骨髓瘤，并在体外培养成功，称为 P3。1972 年 Milstein 等用 8-杂氮鸟嘌呤（8-azaguanine）对其进行诱导培养，从中筛选出缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase, 简称 HGPRT）的新细胞系，称为 P3-X63-Ags。P3-X63-Ags 因缺乏 HGPRT 而不能在 HAT 培养基中生长，但仍具分泌小鼠 IgG $\kappa$ 轻链的能力，这显然不利于同 B 细胞融合后均一性抗体的产生。以后陆续诱导出的一些新的突变株，如 NS1，虽能合成 $\kappa$ 轻链，但无分泌能力，又如 P3-X63-Ag8-653 和 SP2/0，既不合免疫球蛋白，也不分泌免疫球蛋白，从而保证了 B 细胞与骨髓瘤细胞融合后抗体产生的均一性。

细胞融合是杂交瘤抗体技术的基础。人们早就观察到在某些情况下或在体外培养中偶有少数细胞可发生自发融合。早在 1958 年冈田等用高浓度的仙台病毒使小鼠艾氏腹水癌细胞发生融合，其机制是病毒神经氨酸酶可降解细胞膜上的糖蛋白，使细胞膜局部凝集在病毒颗粒的周围，在高 pH 及钙离子条件下，局部细胞质膜发生融合。1975 年，Kao 和 Chayluk 提出用聚乙二醇作为细胞融合剂，其融合率较使用仙台病毒高出数百倍。目前已知的细胞融合剂有数十种，而作为杂交瘤的融合剂主要是 PEG 的衍生物。PEG 是目前实验室制备杂交瘤最常用的融合剂，其确切机制不清，可能因 PEG 的亲水性使细胞表面极性降低，导致脂双层不稳定而引起细胞膜的融合。80 年代末，Zimmermana 报道了电融合技术，其原理是在电场中沿电力线排列的细胞在高脉冲电场的作用下，细胞膜局部区域的双层脂分子结构遭到破坏，出现微孔，细胞膜的通透性增加，继而产生相邻细胞的融合。电融合的融合率与 PEG 相比有几何级数的增加，可减少 B 细胞的用量，如能利用一些亲和物质使 B 细胞与骨髓瘤细胞在融合前配对接触，则可大大提高杂交细胞的产出率。

从上述不同技术及理论的发展历史可以看出，在 20 世纪 70 年代，免疫细胞的克隆选择学说已被普遍接受，仙台病毒作为细胞融合剂已被成功使用，缺陷型小鼠骨髓瘤细胞系及融合细胞的筛选方法均已建立，为单抗杂交瘤技术的出现奠定了理论及技术基础。1973 年，Milstein 等在研究抗体合成的遗传控制时，试图观察抗体合成的等位基因排斥规律能否在杂交细胞上被打破。他们将大鼠的骨髓瘤细胞和小鼠的骨髓瘤细胞相融合，融合产生的杂交细胞能分泌大鼠免疫球蛋白、小鼠免疫球蛋白和轻、重链分别来自大、小鼠两个亲代的杂交免疫球蛋白，表明杂交细胞合成抗体不存在“等位基因排斥”现象，它们能共显地表达两个亲代抗体信息。随后 Kohler 和 Milstein 用绵羊红细胞免疫小鼠，取脾淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞 P3-X63-Ags 通过仙台病毒进行融合，然后于 HAT 培养基中选择培养，获得了能产生与绵

羊红细胞特异结合的抗体的杂交细胞克隆。将这种杂交细胞注入同种小鼠腹腔内可形成肿瘤，故称为杂交瘤。

单克隆抗体技术的主要优点：正如 Milstein 所说，首先，它是由一个独立的细胞克隆产生的抗体，是一种十分明确的化学制品，而不是一种可随每个免疫动物，甚至同一动物不同次免疫而变化的、不明确的非同质混合物，杂交细胞的永久培养可无限制地提供结构与性质完全相同的单克隆抗体；其次，该技术提供了用不纯抗原制备纯抗体的理想方法。因此单克隆抗体技术一问世，就立即引起了生命科学研究领域的极大重视及广泛兴趣，相应技术迅速在全球范围内得到了广泛的开展与应用，数以万计分泌单抗的杂交瘤细胞在实验室产生。

与此同时，杂交瘤技术也有了充分的发展，为适应临床应用的需要，杂交瘤细胞与 B 淋巴细胞的融合或杂交瘤细胞与杂交瘤细胞的融合以产生双功能抗体，鼠骨髓瘤细胞与人 B 淋巴细胞的融合或人骨髓瘤细胞与人 B 淋巴细胞的融合以产生人单克隆抗体的技术相继出现。

1984 年开始利用 DNA 重组技术改造鼠单克隆抗体使之来源化，以便降低在人体内应用的免疫原性。

1989 年出现的噬菌体展示抗体库（phage display antibody library）技术，使获得完全人源的单克隆抗体成为可能。

而转基因小鼠（transgenic mice）的出现把分子生物学技术与鼠单克隆抗体技术的结合推向了顶峰，该技术将人抗体基因导入小鼠胚胎干细胞，使小鼠 B 淋巴细胞能产生人源抗体，然后再经常规小鼠杂交瘤单克隆抗体技术制备人单克隆抗体，解决了用人 B 淋巴细胞融合难以获得人单克隆抗体杂交瘤的难题。

毫无疑问，鼠单克隆抗体杂交瘤技术及在此基础上衍生出来的不同种类抗体制备技术，在今后的生命科学研究中将发挥越来越多的作用。

图 4-1 是单克隆抗体的制备流程。

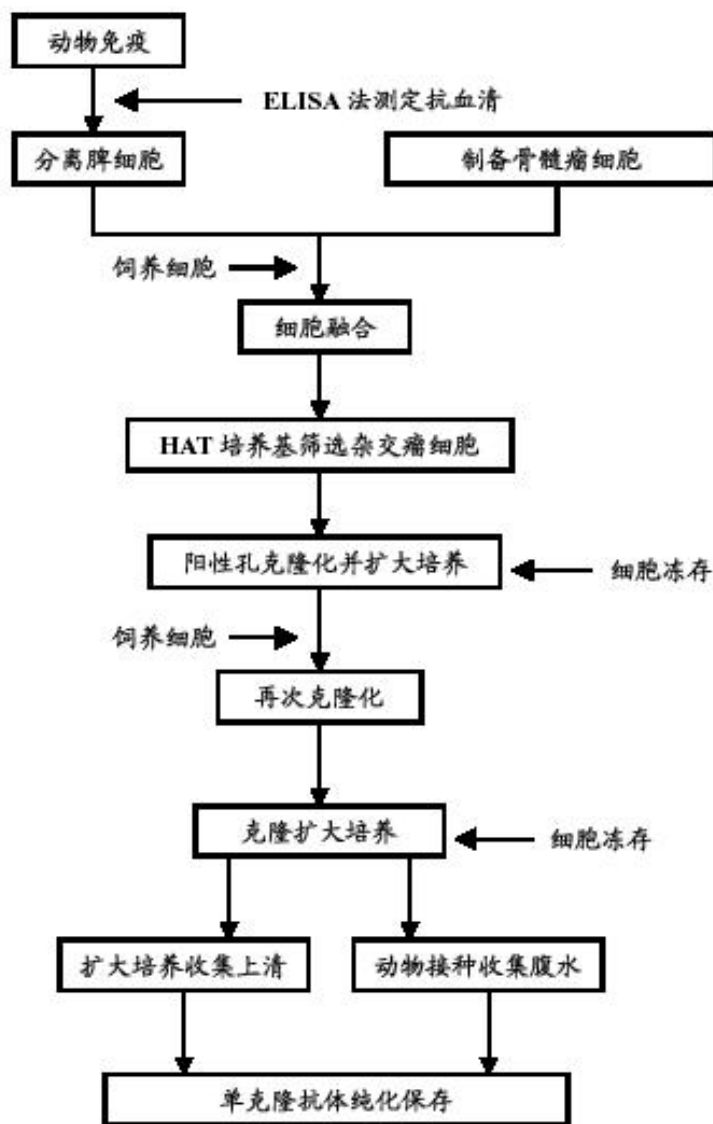


图 4-1 单克隆抗体的制备流程

## 第二节 小鼠单克隆抗体的制备

单克隆抗体的基本研制过程是将生化缺陷型骨髓瘤细胞与经抗原免疫的同种系 B 细胞进行融合，并从中筛选出既保持骨髓瘤细胞能无限增殖特性、又保持 B 细胞分泌抗体特性的杂交融合细胞。一般可把杂交瘤制备分为融合前准备、融合及融合后对杂交瘤的管理三个阶段。准备阶段主要解决实验的设备和材料，以及融合前建立各种有关的方法，如免疫、筛选方法。融合后的管理主要是杂交瘤的筛选、克隆、冻存和制备抗体。细胞融合是一个很简单过程，但就制备能分泌具有一定特异性抗体的杂交瘤而言，是一个相对复杂的操作过程，要考虑到各种因素。

### 一、融合前的准备工作

### (一) 组织培养材料的准备

#### 1. 主要设备

一般有组织培养能力的实验室均具有研制杂交瘤的基本条件。主要的仪器设备包括：超净工作台、CO<sub>2</sub> 恒温培养箱、倒置光学显微镜、普通显微镜、离心机、液氮储存器、水浴恒温装置、冰箱、培养液过滤装置、多孔培养板、塑料器皿及其它实验室常用的材料。

#### 2. 组织培养用水

一般都采用去离子水，将蒸馏水经超滤装置过滤后，即可除去其中的绝大部分离子。在整个实验过程中都应该使用符合规格的用水。

#### 3. 培养基

制备单克隆抗体最常用的培养基有两种，一种是改良的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)。DMEM 又有高糖 (4500mg/L) 和低糖 (1000mg/L) 两种。用于小鼠融合的常为高糖 DMEM。另一种为 RPMI-1640。配制时干粉制剂搅拌全溶后，加水到需要的体积，这样可以保证培养液的渗透压。经除菌过滤分装之后，即可保存于冰箱中，同时取少量培养液进行培养证明其无菌，使用前根据需要再加入适量的牛血清、抗生素、碳酸氢钠、丙酮酸盐和谷氨酰胺等成分，制备完全培养基所添加的各种成分都需要事先检菌。

#### 4. 血清

常用胎牛血清，但国内多数实验室常使用新生小牛血清，原因是新生小牛血清比胎牛血清更便宜。不同来源及批号的血清对杂交瘤细胞的生长有明显差异。因此在实验前必须对不同来源及批号的血清进行仔细的筛选检查，筛选出能支持单细胞生长或使细胞迅速增殖的血清。在外观上稍有溶血而使血清中含有少量的血红蛋白并不影响其质量。常用的方法是用一株骨髓瘤细胞及两株杂交瘤细胞按有限稀释法 (limited dilution) 将细胞接种于若干个平行孔，细胞培养液为含 20% 胎牛血清的 DMEM 或 RPMI-1640 完全培养液，并于培养后 3d、7d、10d 观察细胞增殖的情况，择优选用。

胎牛血清中球蛋白含量很低，一般不会影响杂交瘤细胞抗体分泌或抗体特异性的筛选。此外胎牛血清还含有一些生长刺激因子能促进杂交瘤细胞的生长。如补充一些马血清，融合细胞可迅速生长，同时又可节省一些胎牛血清。对于融合亲代细胞的培养一般采用含 10% 胎牛血清培养基。但在融合、筛选及随后的克隆中一般用含 20% 的胎牛血清培养基。一旦筛选出所需要的杂交瘤细胞后，可以将胎牛血清浓度逐步降低到 10% 或低至 5%，使细胞缓慢生长，以作为常规维持培养。

根据需要在用前可以将胎牛血清灭活，即放在 56°C 水浴中温育 30 min，以破坏血清中补体的活性。也有报道在 56 °C 加温 45 min 可以杀伤支原体。灭活前将在 -20°C 冻存的胎牛血清取出，放在室温或 4°C 冰箱中待其自然解冻，将解冻的胎牛血清充分混匀后再放到 56 °C 的恒温水浴中，温热 30 min，其间将血清瓶摇动混匀数次。将筛选灭活的牛血清或其它血清分装成每次需要的数量，-20 °C 保存。反复冻融会影响血清的质量。

#### 5. 抗生素

由于杂交瘤制备步骤多，持续培养的时间长，加之操作的误差和环境条件的不良常常会

使整个工作由于污染而功亏一篑。因此，避免污染是组织培养实验工作中不可轻视的一环，常见的微生物污染主要来自病毒、细菌、真菌及支原体。污染源主要来自于原代培养、血清、实验室工作人员、污染的培养物及实验环境。避免污染的最好方法莫过于建立一个严格的实验室管理制度和良好的无菌操作技术，这包括对任何引入新细胞系进行仔细的检测，对所有的组织培养试剂在使用前都应作细菌及真菌检查。

细菌的污染可以用抗生素来控制，然而常规在培养体系中加入抗生素会导致耐药株的选择性繁殖，从而有可能使实验环境处于耐药株的污染中。尽管如此，培养体系中仍然常规地加入青霉素 100U/ml 和链霉素 100 $\mu$ g/ml。当有青、链霉素耐药株出现时，则可加入庆大霉素（gentamycin）0.2mg/ml 或卡那霉素（kanamycin）500 $\mu$ g/ml，但这种处理的效果并不好。

真菌的污染是难以防范的。这主要是由于温热湿润的条件是霉菌生长的良好环境。定期清洁有助于控制真菌的污染。虽然在培养中加入两性霉素 B（fungizone, amphotericin B, 5~10 $\mu$ g/ml）或制霉菌素（mycostatin, 100 $\mu$ g/ml）可以控制某些真菌的生长，然而一旦发生真菌污染，往往也无能为力。这是因为真菌生长迅速，这两种抗生素的用量稍大也会影响杂交瘤细胞的生长，所以当发现有真菌污染时最好的方法是将其销毁，也可以在有真菌的孔中加入 1mol/L 氢氧化钠或 2mol/L 硫酸铜溶液，或者隔离重要的培养皿，并制备出复制品，尤其对具有重要意义杂交瘤细胞更应采取备份培养的方法。

细菌或真菌的污染可用肉眼或显微镜看到，而另一种更隐蔽的污染是支原体污染。支原体是一种比病毒颗粒大、比细菌小的微生物，大小为 0.22 $\mu$ m 左右，约有 1% 可以通过 0.22 $\mu$ m 滤菌器。常见的支原体主要来自人体及血清。支原体污染细胞后，培养基中除酚红指示剂显示偏酸外，并不发生浑浊，细胞病理变化轻微，所以很难发现。用作融合亲代细胞的骨髓瘤细胞在体外长期培养传代时，很容易受到这种难以察觉的污染，导致细胞增殖减缓。融合时，杂交瘤的产生会受到明显影响，在融合后 1 周左右即可发现许多融合细胞突然崩解。由于支原体污染是在不易观察的情况下发生的，其预防较为困难。良好的实验环境、良好的无菌操作技术及优质的胎牛血清和试剂等仍然是很重要的环节。另外在引入新的细胞系时，应检测细胞是否污染支原体，若无支原体污染，细胞生长良好，应先培养冻存一批，以供备用。用作融合的骨髓瘤细胞不宜长期在体外培养，一旦发现细胞生长变慢，支原体检查阳性，应立即废弃。支原体不耐热，也可以在 41 $^{\circ}$ C 恒温培养过夜，但这种方法需要了解细胞对热处理的耐受程度。如果具有重要价值的杂交瘤细胞被支原体污染，不仅影响抗体的分泌特性，而且也影响其应用。这时可采取的补救办法是将杂交瘤细胞或骨髓瘤细胞接种于小鼠腹腔内，利用机体的免疫系统来清除细胞的支原体。近年来采用 BM-cycline 等试剂处理被污染的细胞获得相当良好的结果，而且操作方法也简便。

### (二) 小鼠免疫

#### 1. 抗原

任何能引起免疫反应的物质都可以作为抗原。抗原在体内引起的免疫反应与机体对抗原的识别有关。抗原的初次免疫能使机体产生多价的低亲和力的 IgM。随着相同抗原的反复免疫，机体产生抗体的反应加速，主要产生二价的 IgG。抗体的亲和力和血清中的滴度也随着免疫次数的增多而增强。在杂交瘤的制备过程中，免疫的目的是使 B 细胞在抗原的刺激下

分化、增殖,有利于细胞融合形成杂交瘤,尤其是增加获得分泌特异性抗体的杂交瘤的几率。因此,免疫的效果是关系到能否获得特异性单抗的重要一环。

当需要免疫的抗原和动物确定之后,就应认真设计免疫方案,对抗原的质量、免疫途径、次数、间隔及是否应用佐剂都应有一个总体考虑,甚至包括动物对抗原的免疫应答的检测都应事先有所安排。

抗原的免疫包括体内免疫和体外免疫,本文主要叙述体内免疫的一些方法。为便于实验操作,在动物的免疫过程中,我们常将抗原分为可溶性抗原和颗粒性抗原。前者如蛋白质、碳水化合物或核酸等,后者如病毒、细菌和细胞等。一般颗粒性抗原都具有较强的免疫原性,可以不加佐剂,而可溶性蛋白抗原在免疫时应添加佐剂。

用 $1\mu\text{g}$ 的可溶性蛋白抗原免疫小鼠,即可产生强烈的免疫反应。但一般在初次免疫中都用 $10\sim 20\mu\text{g}$ 的抗原量。当有足够的抗原时,可以一次注射 $50\mu\text{g}$ 。很少有一次超过 $200\mu\text{g}$ ,即使抗原不够纯时,总的注射量一般也不超过 $500\mu\text{g}$ 。没有免疫原性的半抗原分子可与钥孔戚蓝蛋白或白蛋白等大分子蛋白偶合在一起,赋予其免疫原性。

颗粒性抗原由于能很快地被吞噬,所以是非常好的免疫原。利用可溶性抗原自身的多聚效应可将其固相化在琼脂上而成为颗粒性抗原。由于重组DNA技术的进展,易于制备出重组蛋白抗原。这些重组蛋白有极好的抗原性,在单抗的制备中十分有用。而且这些蛋白可以纯化,以可溶性或固相化的形式进行免疫。

另一种免疫原是根据编码序列在体外合成多肽。当合成肽与牛血清蛋白或钥孔戚蓝蛋白等载体蛋白交联后,即可成为强免疫原。用多肽抗原免疫制备抗体的主要问题是所获抗体能否与天然蛋白相结合。

活细胞也可以作为免疫原以制备针对细胞表面或内部抗原的单抗。在制备抗肿瘤细胞的单克隆抗体时应尽可能保证肿瘤组织细胞的纯度。

核酸的抗原性很弱,通常是将其作为半抗原交联到载体蛋白上。分子量超过 $50000$ 、大而复杂的碳水化合物会引起中等程度的免疫反应,但重复免疫并不总能产生继发反应,大剂量又会引起耐受,所以注射剂量应加以严格的控制。

### 2. 动物选择

在开始设计免疫方案之前要选择合适的动物品系。应考虑动物的耐受性、可利用的抗原数量及所制备抗体的特性(包括是否容易纯化)。一般选择6周龄的雌性BALB/c小鼠免疫,因融合所用骨髓瘤细胞多来自该品系的小鼠,所获杂交瘤细胞可接种于BALB/c小鼠,制备含抗体的腹水。当受检的免疫动物的血清中出现所需要的抗体时才开始做融合,如果抗血清的效价较低,会增加获得理想单克隆抗体杂交瘤细胞的难度。

### 3. 免疫途径

免疫的效果除决定于抗原的性质和宿主反应外,亦与免疫途径有关。不同的抗原可经不同的途径免疫。常用的免疫途径为皮下、腹腔、淋巴结及静脉,亦可经皮内或肌肉内注射。

为了增加抗原的免疫原性,可以将抗原交联到琼脂珠或聚丙烯酰胺等一些载体上,以利吞噬细胞的吞噬。将蛋白抗原固相化到硝酸纤维膜上也可增加其免疫原性。也可将含有抗原的硝酸纤维膜直接移植到小鼠皮下,或将含有抗原的硝酸纤维膜研碎之后悬浮于PBS中,或用二甲基亚砜或丙酮溶解硝酸纤维膜之后,再悬浮于PBS或加入完全福氏佐剂乳化后进

行免疫。

皮下局部注射可以将可溶性或不溶性抗原注射到淋巴结引流区。一般皮下注射的总量不超过 100 $\mu$ l，而且皮下多点注射有利于增加免疫效果。皮下注射可以应用完全福氏佐剂，但由于其可能的毒性，在制备及注射中要十分谨慎。

融合前一般都需要进行抗原冲击，静脉注射是最常用的途径。抗原经静脉进入血液循环之后，迅速被脾脏、肝脏或肺中的巨噬细胞所吞噬、加工，从而产生强烈的反应。但反应的时间较短促。静脉注射一般不作为初次免疫的途径，尤其是不应作为大颗粒性抗原的免疫途径，因为很可能引起血栓，损伤主要脏器，引起过敏反应，也容易诱发免疫耐受。在注射的溶液中不应含有高浓度的变性剂或叠氮钠一类有毒的防腐剂。

在进行次级免疫或抗原冲击时，理论上最好的方法是这类抗原直接注射到淋巴样器官中，如脾脏或足垫中。当抗原量少至纳克（ng）时，用脾内免疫仍能获得良好的免疫效果。微量抗原的脾内免疫较其他注入途径有更多的技术要求。打开麻醉的小鼠腹腔，用最小号的注射针头经脾脏尾端刺入脾脏，将抗原悬液慢慢的注入脾内（约 20 $\mu$ l），轻轻压迫针孔待不再渗出血液或液体时，即可缝合关闭腹腔。如果埋入吸附有抗原的硝酸纤维膜，则将约 2mm $\times$ 3mm 的三角形膜片经小切口插入到脾脏远端，将它埋植到脾脏组织中。脾脏可被重复进行免疫。但使用微量抗原脾内免疫通常不会产生明显的血清抗体，所以即使没有明显的阳性血清反应时，也可进行细胞融合。

### 4. 载体

除了白蛋白、钥孔戚蓝蛋白等大分子外，任何一种小的、惰性的、无毒性、能固定抗原并可使抗原缓慢释放的物质都可作为载体。抗原与载体的结合可以是特异性的或非特异性的。载体的选择取决于抗原的种类，在交联或其它操作过程中应避免抗原构型改变而失活。

常用的载体可分为珠体和膜两类，珠体能与配基如蛋白 A 或 G 共价交联，而配基与免疫原可有特异的亲和力。连接暴露的氨基、羟基、羧基、或巯基的衍生物珠体可制成珠体-配基-抗原复合物。

脂质体是由磷脂化合物构成的多层囊泡，各种免疫原可包裹嵌在脂质体的多层膜间。由于它在体内能被巨噬细胞迅速吞噬，在细胞内被缓慢地逐步释放，因而具有较强的增强免疫原性的作用。硝酸纤维膜、尼龙膜和阳离子尼龙膜也可以分别与亲水性蛋白质、疏水物质、以及寡核苷酸、DNA 和 RNA 结合，可以直接将抗原滴于膜上，亦可在电泳后印迹转移到膜上，取抗原区带用于免疫。

## 二、细胞融合

细胞融合是杂交瘤产生的中心环节，这一步关系到全部工作的成败。操作的全部过程必须在严格无菌的条件下进行。细胞融合要准备两种细胞，骨髓瘤细胞和脾细胞。

### (一) 主要试剂

#### 1. 培养基

完全 RPMI-1640（含 20%FCS）或完全 DMEM 培养基（含 20%FCS，20mmol/L HEPES



及 1mmol/L 丙酮酸钠), 不完全 RPMI-1640 或 DMEM 培养基 (不含血清)。

## 2. HAT 培养液

(1) HAT 100 倍贮存液 称取 136.1mg 的次黄嘌呤(H), 1.9mg 的氨基嘌呤(A)和 38.8mg 的胸腺嘧啶核苷 (T), 略偏碱, 以促进溶解。贮存液过滤除菌, -20°C冻存备用。现在实验室一般都用商品化的现成贮存液。

(2) HAT 应用液 每 100ml 完全培养基加入 1 ml 上述 HAT 贮存液。

## 3. HT 培养液

(1) HT 100 倍贮存液 称取 136.mg 次黄嘌呤 (H) 和 38.8mg 胸腺嘧啶核苷 (T) 溶于 100ml 双蒸水, 过滤除菌, -20°C冻存备用。现在实验室一般都用商品化的现成贮存液。

(2) HT 应用液 每 100ml 完全培养基中加入 1 ml 上述 HT 贮存液。

## 4. 50%PEG 溶液

在玻璃瓶中高压 10g 分子量为 4000 的 PEG (15psi/15 分钟), 使之溶化为液体, 冷却, 在其凝固之前 (约 55°C) 加入 10ml 不完全 DMEM 培养液(可以供 20 次融合使用, 可以在室温存几个月之久)。

注: 不能用含有蛋白的培养基配制 PEG 溶液。浓度低于 30%的 PEG 融合成功率低; 高于 50%的 PEG 对细胞毒性大。

## (二) 骨髓瘤细胞的准备

### 1. 骨髓瘤细胞的选择

目前可供应用的骨髓瘤系来自小鼠、大鼠和人等。由于对骨髓瘤的诱发过程高度敏感的只有 BALB/c 和 N2B 品系小鼠, 所以来自两种品系的骨髓瘤细胞较多, 人类尚无广泛成熟应用的细胞系。下表为几种可选用的鼠骨髓瘤细胞系 (表 4-1)。

表 4-1 几种常用的鼠骨髓瘤细胞系

细胞系	物种 (品系)	特性
P3-X63-Ag8	小鼠 BALB/c	分泌 IgG, 现在很少应用
P3-NS1/1-Ag4-1	小鼠 BALB/c	合成κ轻链, HAT 选择
P3-X63-Ag8.653	小鼠 BALB/c	不合成 Ig, 较广泛应用, HAT 选择
SP2/0-Ag14	小鼠 BALB/c	不合成 Ig, 广泛应用, HAT 选择
FO	小鼠 BALB/c	不合成 Ig, HAT 选择
S194/5 XXO.BU.1	小鼠 BALB/c	不合成 Ig, HAT 选择
210-CRY3-Ag1	大鼠 Lou/c	分泌κ轻链, HAT 选择
YB2/3Ag20	大鼠 Lou/c	不合成 Ig, HAT 选择
IK983F	大鼠 Lou/c	不合成 Ig, HAT 选择

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相互结合。为了避

免骨髓瘤细胞本身 Ig 轻重链的干扰，以便获得更纯一的抗体，最好选用自身不合成免疫球蛋白轻重链的骨髓瘤细胞。目前常用 SP2/0-Ag14 作为亲本细胞与脾细胞融合。

### 2. 融合前骨髓瘤细胞的准备

融合前一周用完全培养液扩增 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞，到融合的当天，必须得到以下数目的骨髓瘤细胞：与小鼠脾细胞融合约需  $1 \times 10^8$  个骨髓瘤细胞；与仓鼠脾细胞融合约需  $2 \times 10^8$  个骨髓瘤细胞；与大鼠脾融合约需  $5 \sim 10 \times 10^8$  个骨髓瘤细胞。融合前一天，用新鲜培养基将细胞传代。

注意：用于细胞融合的骨髓瘤细胞，必须处在对数生长期，细胞形态要规则，机能要活跃，活细胞数在 90%~95% 以上。细胞不能生长过度，培养基不应变浊（黄色）。骨髓瘤细胞偶尔会“回复”成能在 HAT 培养液中生长的细胞，这种情况下，可用含有诱导剂 8-氮杂鸟嘌呤（ $20 \mu\text{g/ml}$ ）或 6-巯基鸟嘌呤（ $40 \mu\text{g/ml}$ ）的完全 DMEM 培养基进行培养。

### (三) 脾细胞悬液的制备

1. 动物加强免疫 融合前 3 天进行加强免疫，方法见前。
2. 无菌取出动物脾脏。注意：不要用麻醉剂处死动物。小鼠可拉颈处死， $\text{CO}_2$  窒息可用于小鼠、仓鼠和大鼠，这样可以防止麻醉剂通过血液而进入培养系统。
3. 将脾脏放入直径 10cm、盛有 10ml 无血清培养基的平皿中。
4. 用小弯镊子剥去脾脏外的脂肪及结缔组织，将脾置于圆形不锈钢丝网上，用剪刀剪碎，再用注射器针芯挤压，使脾细胞通过网眼成为单细胞悬液。
5. 脾细胞悬液移入 50ml 离心管，加满无血清培养基， $500 \times g$  室温离心 5min，弃去上清。

注：不要使用含有 PEG、蛋白和 HEPES 的培养基，PEG 会沉淀蛋白，而 HEPES 在融合时对细胞有毒性。

6. 用 5ml  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液重悬细胞，室温放置 5min 以溶解红细胞。
7. 加入 45ml 无血清 DMEM 培养液， $500g$  室温离心 5min，弃上清。
8. 每次用 50ml 无血清 DMEM 培养液离心洗涤两次。
9. 洗涤脾细胞同时，将骨髓瘤细胞移入 50ml 离心管，离心洗涤 3 次。
10. 分别用 10ml 无血清 DMEM 培养液重悬脾细胞和骨髓瘤细胞，计算细胞数量并用台盼蓝或伊红染色计数活细胞比例。两种细胞的活细胞比例均应接近 100%。
11. 根据两种细胞的总数，计算按  $2.5 \times 10^6/\text{ml}$  重悬细胞所用完全 DMEM/ HEPES 培养基的量，将这一体积的培养基预温于  $37^\circ\text{C}$ 。

### (四) 融合细胞

1. 按细胞数 1: 1 的比例将 SP2/0-Ag14 细胞和脾细胞混合于 50ml 离心管中，加满无血清 DMEM 培养液。

注：细胞比例要求不是很严，骨髓瘤细胞和脾细胞的比例降至 1: 20 也有成功融合的报道。

2.  $500 \times g$  室温离心 5min，弃去上清，尽可能除干净液体。

3. 用手指叩击离心管底部, 使沉淀混匀如糊状, 离心管置 37°C 水浴。

4. 将在 37°C 水浴中保温的 50% 的 PEG 1ml 用滴管一滴滴加入离心管中, 在 37°C 水浴中边滴边摇动离心管, 使细胞保持在混匀状态, 1 分钟滴完。

5. 加完 PEG 后, 继续在 37°C 水浴中摇动离心管 1min。

注: 随着 PEG 处理时间的增加, 融合率和细胞毒性都增加, 低浓度 (30~35%) PEG 可以使用较长时间 (如 7min), 50% PEG 处理不超过 1~2min。

6. 用新的滴管, 将 1ml 37°C 水浴预温的无血清培养基一滴滴加入离心管, 同时轻轻晃动离心管, 一分钟加完。相同方法再加入 1ml 无血清 DMEM。

注: 稀释 PEG 很关键, 动作要轻柔, 否则会减少杂交瘤细胞的收率。

7. 用 10ml 滴管将 7ml 预温的无血清培养基一滴滴加入离心管, 2~3 分钟加完, 这时镜下观察细胞应有明显聚团现象。

8. 室温 500×g 离心 5min。弃去上清, 离心管置于水浴中。

注: 细胞融合后脆性大, 应将离心洗涤和重悬的步骤减到最少。

9. 加入预温的完全培养液 (含 20% FCS)。

10. 用 10ml 滴管轻轻吸出细胞悬液, 按每孔 2 滴 (约 100~125μl/孔) 加入到 96 孔平底培养板。37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。注意: 新形成的杂交瘤细胞还不稳定, 这一步应避免用滴管吸打细胞, 将细胞悬液加入 96 孔板时也应动作轻柔。操作时, 手不要置于培养板上方, 以防污染。重新吸取细胞悬液时, 应换用新的滴管。为防止成纤维细胞过度生长, 可以将融合后的细胞悬液放入培养瓶中贴壁过夜, 然后再种入 96 孔板。

很多研究者将杂交瘤接种入大的容器, 如 24 孔培养板, 每孔含有更多的细胞。这样以后的换液就变得容易, 但也会使每孔中含有多个杂交细胞, 一些生长快的杂交细胞可能会掩盖一些生长慢的杂交细胞。

11. 培养一天后, 用相差显微镜检查细胞。如果接种的细胞数目合适, 板底应该有接近连成单层的细胞和一些明显的细胞团。

12. 用 10ml 滴管每孔加入 2 滴 HAT 培养基, 放入培养箱继续培养。

注: 每块 96 孔板要用不同的滴管, 使每块板都相对独立, 以防可能出现的污染扩散。如果出现了污染, 最好将污染的 96 孔板弃掉。

13. 在第 2、3、4、5、7、9 和 11 天, 用吸管斜靠在培养孔口, 小心地每孔吸去 1/2 体积的培养液, 再换入 1/2 体积的 HAT 培养液 (半量换液), 96 孔板放入培养箱培养。注意: 注意每板换用新的吸管。

因为杂交瘤的成功率 $\leq 10^{-5}$ , 当加入 HAT 培养基 2~3 天后, 就会出现细胞大量死亡, 直至杂交瘤细胞扩增后才会再见到活细胞。在小鼠-小鼠融合的第 7~9 天、大鼠-小鼠融合的第 11 天、仓鼠-小鼠融合的第 14 天, 相差显微镜下就可以见到成簇的杂交瘤细胞。

除了前 4 天外, 细胞的换液可根据实际情况而定, 如每孔实际细胞密度、融合的效率、杂交瘤的出现时间和生长状况等。应每天查看培养板, 不要使培养基变黄的时间超过一天。

14. 在第 14 天, 按上一步的方法用 HT 培养基给细胞换液。

注: 不必用 HT 培养液多次换液, 经过这一次换液后氨基嘌呤已被稀释, 细胞不需再添加 HT 就可存活。

15. 在第 15 天之后, 用不含 HAT 或 HT 的完全 DMEM/HEPES 培养基给细胞换液。当大多数有细胞生长的孔达到 10%~25% 满时, 就可以准备筛选了。

注: 如果筛选中要用 3H-TdR 掺入实验时, 注意 HAT 或 HT 培养基中大量的胸腺嘧啶核苷会抑制 3H-TdR 的掺入, 应预先用不含 HAT 或 HT 的培养基换液 3~4 次。

### 三、杂交瘤细胞的筛选

两种细胞的随机融合可产生 3 种融合细胞, 加上非融合的 2 种亲本细胞, 在融合后的培养体系中有 5 种细胞, 融合细胞所占比例极小。B 淋巴细胞因不能在体外长期培养, 故易于消除, 但骨髓瘤细胞及骨髓瘤与骨髓瘤融合的细胞, 其增殖能力较杂交融合细胞强得多, 因此, 如何在融合后快速筛选杂交细胞是单克隆抗体技术的关键, 筛选方法必须在进行细胞融合之前确定下来。

HAT 筛选培养液是根据次黄嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸生物合成途径设计的。细胞 DNA 生物合成有两条途径, 一条是主要途径, 即由氨基酸及其他小分子化合物合成核苷酸, 进而合成 DNA。在这条合成途径中叶酸衍生物是必不可少的中间体, 它参与嘌呤环和胸腺嘧啶甲基的生物合成。甲氨喋呤是一种叶酸拮抗剂, 可以阻断 DNA 生物合成的主要途径, 在 HAT 选择培养基中含有甲氨喋呤, 因此在 HAT 培养液中细胞的 DNA 合成主要途径被阻断, 需要利用另一条途径, 即补救途径来合成 DNA。利用补救途径合成 DNA 需依赖次黄嘌呤、胸腺嘧啶脱氧核苷等 DNA 前体的存在, 而且细胞内要有次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶和胸腺嘧啶核苷激酶 (thymidine kinases, TK), 若缺乏其中一种酶, 该补救途径便不能发挥作用。

Littlefield 用两种突变细胞株, 一种缺失 TK 酶, 但保留 HGPRT 酶, 另一种则正相反, 缺失 HGPRT 酶, 而保留 TK 酶, 在通常培养条件下, 因为细胞可利用叶酸 (folic acid) 经主要合成途径合成 DNA, 所以这些酶的缺失对细胞生存并无影响。只有当主要合成途径被甲氨喋呤封闭时, 具有酶缺失的这些细胞便不能存活。若将这两种细胞融合, 只有杂交瘤细胞能在 HAT 培养液中生存。因为一种亲代细胞补充了另一种亲代细胞的酶缺失, 因此杂交瘤细胞能在筛选培养液中存活。没有融合的亲代细胞, 或相同亲代细胞融合产生的同核体则不能存活, 因为他们仍然缺失 TK 酶或 HGPRT 酶。

一般而言, 使骨髓瘤细胞突变, 并筛选出 HGPRT 酶缺失的细胞较 TK 酶缺失的细胞更容易一些。在正常情况下, 每个细胞的 X 染色体只有一个活性拷贝, 所以在理论上单个突变即可产生 HGPRT 酶缺失的突变体。为了获得这种突变体, 常用的方法是用浓度为 20 $\mu$ g/ml 的 8-杂氮鸟嘌呤或 6-硫代鸟嘌呤诱导骨髓瘤细胞使其成为 HGPRT 酶缺失的突变体。这是由于 HGPRT 酶的特异性差, 在嘌呤核苷酸的补救途径中也可以将嘌呤类似物 8-杂氮鸟嘌呤或 6-硫代鸟嘌呤掺入到 DNA 中, 引起细胞死亡。逐步提高这些药物的浓度可使所有具有 HGPRT 酶的细胞都死亡, 只有缺失该酶的突变细胞能存活。缺乏 HGPRT 酶或 TK 酶的细胞同时失去了 DNA 合成的补救途径, 也就获得了对 HAT 的敏感性。

突变株骨髓瘤细胞与脾细胞融合后, 脾脏 B 细胞的 HGPRT 酶提供了 DNA 合成的补救途径, 所以杂交产生的异核体可在 HAT 中存活增殖, 并产生均一的、具有特异性的抗体,

即单克隆抗体。而未融合的骨髓瘤细胞及骨髓瘤细胞的自身融合细胞因 HGPRT 的缺陷，在 HAT 培养基中不能生长，B 细胞作为终末分化细胞，自身亦不能在体外传代培养。因此，通过 HAT 选择培养，最终筛选获得的只能是骨髓瘤细胞与 B 细胞的融合细胞。

细胞融合之后，只有不到 50% 的孔中有杂交瘤细胞生长，而这其中又只有少数杂交瘤细胞分泌的抗体具有针对免疫原的专一性，必须及时、准确地将这些细胞筛选出来。筛选方法应快速、可靠，并能同时进行大量的样本筛选。因为每次细胞融合后，往往有上百个培养孔的上清液需要尽快作出阴性和阳性的判断，这里并不需要精确的定量数据。此外，融合的杂交瘤细胞不稳定，容易失去分泌抗体的染色体，并容易被不产生抗体的细胞生长过盛所排挤，为此及早进行克隆化也要求筛选这一步迅速完成。用相差显微镜观察，当大部分长有杂交瘤细胞的培养孔达到 10%~25% 满时，可以开始进行筛选，对小鼠杂交瘤细胞，筛选的时间大约在融合后的 10~14 天。理论上讲，任何检测体液抗体的方法都可以用于筛选杂交瘤细胞，实际工作中可根据抗原的性质、抗体的类型及所需敏感度等具体情况来选择。根据选择的筛选方法，准备例如 ELISA、间接免疫荧光、放射免疫测定等方法所需的材料，具体步骤如下：

1. 用相差显微镜观察杂交瘤细胞，估计生长有杂交瘤细胞的培养孔的数目，以便确定是筛选所有培养孔的上清还是筛选有细胞生长孔的上清。

2. 换液后，细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 ≥2 天。

注：这期间不能换液以防上清被稀释。

3. 从要检测的孔中取 100 μl 上清用于检测，如 ELISA，间接免疫荧光等。

注：用微量加样器取上清液时，每孔应换用新吸头。如果检测全部培养孔的上清液，可以使用多道微量加样器收集上清，同时记录样品在培养板上的位置。

## 四、杂交瘤细胞的扩增、冻存和克隆化

一旦确认了分泌抗体的杂交瘤细胞，就应尽快进行扩增和冻存，同时进行克隆化，这些工作不必等到抗体的特性被充分确定就应进行。扩增并冻存杂交瘤细胞，使筛选出的分泌抗体的杂交瘤有了可靠的来源。早期克隆化的目的是防止非分泌细胞过度生长，但非生产型突变的可能始终存在，所以有必要进行几次的克隆化。早期克隆阶段中阳性克隆很易丢失，加入一定的饲养细胞或饲养细胞上清有助于提高克隆效率。克隆化培养的方法，包括有限稀释法、软琼脂平板法、显微操作法以及 FACS 分离技术等。其中有限稀释法最常应用，可以直接检测它的上清液。

### (一) 饲养细胞上清的准备

最初的杂交瘤细胞在密度低时生长状况不良甚至死亡，许多研究者用饲养细胞提供合适的环境以促进杂交瘤细胞生长和克隆形成。常用的饲养细胞包括胸腺细胞、脾细胞、腹腔细胞等。但直接往培养孔中加入新鲜分离的或经射线照射的饲养细胞，有时会引起污染，因而可以使用不含细胞的、经过滤除菌的饲养细胞上清来提高杂交瘤细胞的克隆效率，注意不要使用麻醉剂。饲养细胞对杂交瘤细胞没有种属特异性，不必一定是来自相同种属的动物，大

鼠来源的饲养细胞也可用于小鼠-小鼠杂交瘤细胞。下面介绍胸腺细胞上清的制备。

1. 无菌取出胸腺，放入盛有完全培养基的平皿中，小心剥除外面的结缔组织，将胸腺置于不锈钢网上，用小剪刀剪碎，注射器针芯挤压，制成胸腺细胞悬液。
2. 细胞悬液移入 50ml 离心管，用培养基离心洗涤（500×g、室温离心 5min）。
3. 弃去上清，按每只胸腺 20ml 加入完全培养基重悬细胞，细胞悬液移入培养瓶，37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4~5 天。
4. 细胞悬液移入 50ml 离心管，1000×g 室温离心 5min，收集上清。
5. 上清过滤除菌，分装 10ml/瓶，-20℃冻存备用。使用前溶化，按终浓度 10%~20% 加入培养基。

### (二) 骨髓瘤细胞的扩增和冻存

1. 96 孔板中的细胞长到 25%~50% 满时，将筛选出来的阳性孔用吸管将细胞悬起，细胞悬液移入 24 孔板。注意：96 孔板中应留下足够的细胞继续培养。移入 24 孔板的细胞数过少时，细胞可能生长不良。但如果原 96 孔板中有成纤维细胞生长，则应尽早转移细胞以防成纤维细胞过度生长（如果必要可以转入另一 96 孔板）。

2. 96 孔板的原孔中加入三滴完全培养基，24 孔板中加入 1~1.5ml 含饲养细胞上清的培养基，放入培养箱培养。

注：24 孔板和 96 孔板的两个培养孔应作为独立单位操作，应使用不同的滴管和不同瓶的培养基，以防两孔同时污染。

3. 约 2~3 天后，24 孔板中的细胞长满 25%~50% 孔底，可以收集细胞按后述方法克隆化。

4. 取出足够进行克隆化的细胞后，将部分剩余细胞移入 5ml 离心管。24 孔板加入新鲜培养基继续培养。

5. 离心管中的细胞计数后室温离心 500×g、5 分钟。上清可以用于进一步检测，细胞则准备液氮冻存。

注：杂交瘤细胞系只有在得到了稳定的克隆并成功地冻存和复苏之后才算建立。如果经有限稀释法克隆后没有得到分泌特异抗体的细胞系，这里冻存的细胞复苏后种入 24 孔板，扩增后再次进行有限稀释克隆化，同时液氮冻存。

6. 细胞用含有 50%FCS 的 HT 培养基按  $6 \times 10^6$ /ml 重悬，细胞悬液中加入等体积含 30% DMSO 的 DMEM 培养基（不含血清），充分混合。

注：因为在液态时 DMSO 对细胞有毒性，所以 DMSO 加入后，冻存的步骤应尽快完成。

7. 混合后的细胞悬液按每管 2ml 加入冻存管，密封，贴上标签。

8. 冻存管放入液氮罐顶部的液氮蒸汽中，使管中的悬液以每分钟 1℃ 的速度逐渐冷却，3h 后可将冻存管送入液氮保存。

9. 复苏时，冻存管从液氮取出，立即投入 37℃ 水浴，震荡，使之在 1~2min 内迅速融化，然后用 50ml 培养液稀释，离心收集细胞，50ml 培养液再次洗涤一次后，用完全 DMEM/HEPES 培养液重悬，进行培养。

### (三) 有限稀释法克隆化

Poisson 统计分析，如果理论上按每孔 0.3 个细胞接种 96 孔板，只有 <22% 的孔有细胞生长，这其中 88% 的孔是单克隆孔。但新融合细胞的克隆效率低，为得到一定数量有细胞生长的孔，就要增加每孔接种的细胞数。在未知刚分离的杂交瘤细胞的克隆效率的大致范围时，可选用几种不同的浓度进行接种，以提高获得单细胞克隆的可能性。

1. 从上述 24 孔板中取出杂交瘤细胞，计数并用台盼蓝或伊红计算活细胞比例。

2. 根据细胞数目，用含饲养细胞上清的培养基配制 50 个细胞/ml，15 个细胞/ml 和 5 个细胞/ml 三种浓度的细胞悬液各 20ml。

注：最好用系列稀释来得到所需细胞浓度，而不要把小体积高浓度的细胞直接稀释成大体积。

3. 96 孔板中每孔加入 200 $\mu$ l 细胞悬液，每个浓度各加满一板，理论上每孔分别是 10 个细胞、3 个细胞和 1 个细胞。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 7~10 天。

4. 用相差显微镜观察细胞，查看板底有无一簇紧密生长的细胞，可认为是单一克隆。如果板底有几簇细胞生长，可认为是多克隆来源的，最好不用。

5. 在克隆的第 7~14 天，用筛选杂交瘤细胞的方法检测单克隆孔的抗体活性。用已知阳性的杂交瘤上清作为阳性对照。

注：小鼠-小鼠杂交瘤细胞可以在第 7 天就检测抗体活性，而仓鼠-小鼠杂交瘤则需生长到第 14 天。培养孔中上清变黄就可以检测这一孔。如果中间换液，要在 2 天后取上清进行检测。

6. 当确定阳性克隆后，将这一孔的细胞扩增并冻存。

7. 将上述阳性克隆按 0.3 细胞/孔（60 个细胞/40ml 培养基）接种 96 孔板，再次克隆化，重复第（4）~（6）步。

8. 用完全培养基每天按 1:2 将重新克隆的细胞传代。如果细胞能稳定生长，可以认为已经建成了杂交瘤细胞系。

注：在不同时间用不同瓶的冻存液冻存多支细胞，复苏一些细胞，检查细胞的生长状况和上清中抗体的活性，合格后，杂交瘤细胞就可以用于制备腹水或大量培养制备上清。这时可以测定单克隆抗体的类型。

即使再次克隆的杂交瘤细胞也有不稳定的表型，尤其是仓鼠-小鼠杂交瘤细胞，需要定期进行再克隆。体外长期培养可能导致丢失产生单抗的能力，解决的办法是将确定分泌抗体的细胞进行较大量的冻存，以此作为细胞的来源。

## 五、单克隆抗体的大量制备

单克隆抗体相对于多克隆抗血清的一个主要优点就是单抗能够大量生产，一般单抗产品包括杂交瘤细胞培养上清和纯化的单克隆抗体。制备杂交瘤细胞培养上清操作简单，尤其要同时制备多种不同种类单抗时适用，但杂交瘤细胞培养上清中抗体浓度较低。腹水中含有高浓度的单克隆抗体，但也含有一些非单抗成分。纯化单抗可采用亲和层析等方法。这里介绍一般制备杂交瘤细胞培养上清的方法、大规模制备上清的方法和制备腹水的方法。

### （一）制备杂交瘤培养上清

可以采用不同方式扩增杂交瘤细胞，收获上清后测定抗体滴度。如果抗体滴度高，杂交瘤细胞可以用于大规模培养或用于制备腹水。所需材料有杂交瘤细胞、完全 DMEM 培养基、175cm<sup>2</sup> 培养瓶、50ml 离心管等。

1. 杂交瘤细胞扩增入 175cm<sup>2</sup> 培养瓶，放入 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

注：大多数细胞系在细胞密度达 1~2×10<sup>6</sup>/ml 时进行转代，可以在相差显微镜下观察细胞状态和密度。除非准备收获上清，细胞绝不能过度生长出现死亡，应一直保持在对数生长状态，以减少不利环境对它的逆向选择，控制非生产型变种的生长。

2. 按 1:10 将细胞传入新的培养瓶，加入新鲜的培养基培养，直到细胞过度生长，培养基变黄，细胞出现死亡（约 5 天后）。

注：也可以采用其它方式，在新鲜培养基中加入高密度细胞（1~2×10<sup>6</sup> 细胞/ml）移入培养瓶培养，2~3 天后细胞出现死亡，收集上清。

3. 将培养物移入 50ml 离心管，1500×g 室温离心 10min，收集上清液。

4. 用适当的方法检测抗体滴度。

5. 分装上清无菌保存。一般 4°C 可以保存几个星期到几个月，-20°C 或 -70°C 可以保存数月到数年。应尽量减少冻融次数。

### (二) 大规模制备杂交瘤细胞培养上清

亲和层析纯化单克隆抗体的第一步就是要制备大量的培养上清，下面介绍用滚动式培养瓶大规模制备单克隆抗体上清的方法。细胞先在小培养瓶中培养，逐渐传入大体积的滚动式培养瓶，然后收集上清冻存备用。所需材料有完全培养基、70%乙醇、175cm<sup>2</sup> 培养瓶、850cm<sup>2</sup> 滚动式培养瓶及相应设备、250ml 离心管。

1. 按前面介绍的方法用 175cm<sup>2</sup> 培养瓶将杂交瘤细胞 1:10 传代，总体积达到 100ml。

注：应根据最终需要单克隆抗体的量决定培养规模。如果用亲和层析纯化上清，一般每升上清可得到 1~10mg 纯化产品。一般不用无血清培养基培养细胞，它会降低单抗产率。如果准备用蛋白 A 亲和层析纯化上清中的单抗，应事先检测含 FCS 的培养基中是否含有能与单抗一起被纯化的蛋白成分。新生牛血清常含有较多的免疫球蛋白能结合蛋白 A，此种情况下一般不用于杂交瘤细胞的培养。

2. 当细胞长到适当密度，将培养物从 175cm<sup>2</sup> 培养瓶（100ml）转入 850cm<sup>2</sup> 滚动式培养瓶，再加入 150ml 新鲜培养基，培养 1~2 天。

3. 用 70%酒精浸泡的棉球消毒瓶口，打开瓶盖，培养物中再加入 250ml 新鲜培养基（总体积 500ml），盖紧瓶盖，继续培养 1~2 天。

4. 消毒瓶口后打开瓶盖，加入约 2L 新鲜的完全 DMEM 培养液（总体积约 2.5L），继续培养至培养液颜色变黄（约 5 天）。

注：滚动时间不能过长，否则出现的细胞碎片残渣在离心时很难去除。

5. 将培养物转入 250ml 离心管，250g 离心 20min。收集上清，分装保存。

注：如果上清不用于生物活性试验，加入 10%的叠氮钠至终浓度 0.02%。如果上清用于亲和层析纯化或盐析纯化，最好用 0.45μm 的滤膜过滤去除残渣。

### (三) 制备单克隆抗体腹水



接种到适当的动物体内，杂交瘤细胞能在动物体内生长并产生大量免疫球蛋白。从皮下接种杂交瘤，可以从血清中收获抗体，从腹腔中接种杂交瘤，它可以在腹腔中产生类似血清的液体—腹水。腹腔接种后在腹水和血清中都可收获抗体。这些抗体大部分是由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体，但也含有宿主产生的免疫球蛋白。考虑到抗体产量，动物接种最常采用腹腔注射，从小鼠很容易得到 5~15ml 腹水。接种的动物一般应选择与杂交瘤细胞同系的动物，因为骨髓瘤细胞和脾细胞最多来源于 BALB/c 小鼠，所以制备腹水也最多用这一品系的小鼠。如果骨髓瘤细胞是其它种属来源的，可以在无胸腺的裸鼠或射线照射的小鼠体内接种。注射细胞前一般先用降植烷处理腹腔，以便产生大量腹水。所需材料有 6~8 周的 BALB/c 小鼠（或裸鼠），降植烷（Pristane）、杂交瘤细胞、无菌 PBS 或 HBSS、56°C 水浴、注射器、离心管、培养瓶等。

1. 注射细胞的前一周，小鼠腹腔内注射 0.5~1 ml 降植烷。

2. 培养细胞，使细胞处于对数生长期。

3. 细胞培养物移入 50ml 离心管，500g 离心 5min，弃上清，细胞重悬于 50ml 不含 FCS 的 PBS 或 HBSS 中，离心洗涤，弃去上清，再清洗两次，弃上清后用 5ml PBS 或 HBSS 将细胞重悬。

注：动物会对培养基中含有的血清产生抗体，所以要用无血清的缓冲液清洗细胞。

4. 计数细胞，活细胞应接近 100%。

5. 用 PBS 或 HBSS 将细胞配成  $2.5 \times 10^6$ /ml。

6. 每只小鼠腹腔内注入上述细胞悬液 2ml，约 1~2 周后形成腹水。

7. 采集腹水时一只手从背部抓牢小鼠，使小鼠腹部皮肤紧张，另一只手把 1 个 18G 的针头插入腹腔内 1~2cm，注意针头应插入腹腔的左侧或右侧下方，以避免腹腔上部的重要器官及腹中部的大血管，用 15ml 的离心管收集腹水。

注：如果腹水中间停止流出，可将针头退出一部分换方向再重新插入。

8. 将腹水 1500g 离心 5min，收集上清，先放于 4°C 保存。

9. 约 2~3 天后，小鼠又重新出现腹水，按上述方法再次收集腹水。腹水可以收集若干次，一直到动物不再长出腹水（一般不超过一周）。

10. 将前面几次收集的腹水混和，56°C 水浴灭活 45min。如果出现了结块，可以离心去除。

注：灭活可以去除补体成分和一些蛋白酶的影响。应在玻璃容器中进行，以防塑料制品化学成分可能的影响。

11. 用适当的方法测定腹水中单克隆抗体的滴度。

注：一般腹水中单抗的活性最高在 0.5% 或更高的稀释度。抗体滴度偏低可能由于杂交瘤细胞不稳定发生了非生产型突变或由于体外连续传代太多。

12. 将腹水稀释 (>1:10)，用 0.4 $\mu$ m 的滤膜过滤除菌。分装后保存于 -70°C，避免反复冻融。可保存数年之久。

### (四) 单克隆抗体的鉴定

对制备的 McAb 进行系统的鉴定是十分必要的，应做下述几个方面的鉴定：

### 1. 抗体特异性的鉴定

除用免疫原（抗原）进行抗体的检测外，还应该用与其抗原成分相关的其它抗原进行交叉试验，方法可用 ELISA、IFA 法。例如：①制备抗黑色素瘤细胞的 McAb，除用黑色素瘤细胞反应外，还应该用其它脏器的肿瘤细胞和正常细胞进行交叉反应，以便挑选肿瘤特异性或肿瘤相关抗原的单克隆抗体。②制备抗重组的细胞因子的单克隆抗体，应首先考虑是否与表达菌株的蛋白有交叉反应，其次是与其它细胞因子间有无交叉。

### 2. McAb 的 Ig 类与亚类的鉴定

一般在用酶标或荧光素标记的第二抗体进行筛选时已经基本上确定了抗体的 Ig 类型。如果用的是酶标或荧光素标记的兔抗鼠 IgG 或 IgM，则检测出来的抗体一般是 IgG 类或 IgM 类。至于亚类则需要用标准抗亚类血清系统作双扩或夹心 ELISA 来确定。在作双扩试验时，如加入适量的 PEG（3%），更有利于沉淀线的形成。

### 3. McAb 中和活性的鉴定

用动物或细胞的保护实验来确定 McAb 的生物学活性。例如，如果确定抗病毒 McAb 的中和活性，则可用抗体和病毒同时接种于易感的动物或敏感的细胞，来观察动物或细胞是否得到抗体的保护。

### 4. McAb 识别抗原表位的鉴定

用竞争结合试验，测相加指数的方法，测定 McAb 所识别抗原位点，来确定 McAb 的识别的表位是否相同。

### 5. McAb 亲合力的鉴定

用 ELISA 或 RIA 竞争结合试验来确定 McAb 与相应抗原结合的亲合力。

## 第三节 大鼠单克隆抗体的制备

作为小鼠杂交瘤单克隆抗体的重要补充，20 世纪 80 年代由比利时 Louvain 大学成功培育了可用于制备杂交瘤的大鼠体系，简称 Lou 大鼠。在此基础上，Bazin 和 Beckers 教授通过基因导入及品系的筛选，成功培育了产生 kappa-1a 和 kappa-1b 不同轻链的两种同种异型大鼠，其区别仅在轻链上的一个等位基因，而组织相容性完全相同，这一特性提供了纯化大鼠单克隆抗体的独特体系。如在免疫时使用产生 kappa-1a 的大鼠，在制备腹水时使用产生 kappa-1b 的大鼠，由于单抗的轻链为 kappa-1a，因此用针对 kappa-1a 的单抗亲和层析柱进行抗体纯化，可将特异单抗同宿主体内的抗体区别开来，使从腹水内获得单抗的纯度大大提高，而且大鼠产生单抗腹水量是小鼠的十几倍甚至更多。Lou 大鼠极易自发产生骨髓瘤，故用于融合的大鼠骨髓瘤细胞系较易建立，其诱变原理及杂交瘤的筛选均同小鼠体系。

北京肿瘤防治研究所在 1986 年将大鼠杂交瘤体系从比利时 Louvain 大学引入国内，并将其用于抗肿瘤抗体的研制。大鼠对抗原的免疫反应性与小鼠不尽相同，有些抗原难以致敏小鼠，在此种情况下选用大鼠体系较易获得理想的单克隆抗体。因用小鼠系统制备单抗已能满足绝大部分研究及临床检测对抗体的要求，故大鼠单抗杂交瘤体系的使用远不如小鼠广

泛。

### 一、大鼠杂交瘤技术特点

1. 大鼠易于饲养，制备杂交瘤的原理及技术方法与小鼠体系相同。但大鼠体内诱生的单克隆抗体腹水产量可大于小鼠的 10 余倍。一只大鼠可获取 50~150mg 单抗。作者曾用分次抽取的方法，一只大鼠最多取得 98ml 腹水。

2. 大鼠单抗的纯化可采用免疫亲和层析技术（原理详述见后），特异高效，简便快速且经济。这对贵重和（或）难以纯化的抗原尤其重要。提取免疫球蛋白所用的常规技术方法如 DEAE 层析法、凝胶过滤、制备性电泳等虽可用，但所获取的单抗纯度及其收获率均有限。

3. 大鼠抗体的多样性与小鼠不同。某些外源性抗原用大鼠研制单抗可行，而小鼠则否；另外，非源于小鼠和大鼠的某些抗原诱生的免疫反应，大鼠明显比小鼠强。

4. 大鼠免疫球蛋白的物理化学及生物学性质与小鼠不同，大鼠 IgG1、IgG2a 与 IgG2b 亚类的单抗很容易固定人或兔补体，其 IgG2b 类单抗可介导 ADCC。基于上述特点，大鼠杂交瘤体系确为小鼠的良好补充体系。此外，还可为研制独特型抗体提供一有效的手段。

5. 大鼠及骨髓瘤细胞 ①LOU 大鼠：目前采用的大鼠骨髓瘤细胞主要是 LOU 大鼠及其同种异型（allotype）大鼠，这两种同种异型的大鼠仅仅在轻链上一个等位基因（allele-a、allele-b）不同，除此以外具有完全相同的组织相容性。这一性状对建立特异的单克隆抗体纯化体系提供了特别重要的基础条件。LOU 大鼠性情温顺且容易饲养和繁殖，是一理想的实验动物。②骨髓瘤细胞：LOU/C 大鼠常在结肠淋巴结部位自发地产生免疫细胞瘤，简称 IR（immunocytoma of rat），一般于第 12~15 个月时产生自发瘤，雄性 LOU/C 肿瘤自发率平均为 28%~34% 左右，最高可达 57%。雌性大鼠为 14%~17% 左右，最高可达 29%。而 LOU/M 的 IR 自发率则很低。雄性大鼠在 1%~5% 左右，而雌性更低。IR 好发部位在结肠淋巴结，肿瘤细胞为未分化的淋巴样细胞。Bazin 和 Beckers 发现其中多数具有分泌免疫球蛋白的功能，且分泌的免疫球蛋白亚类有 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgM、IgD、IgE 及 IgA 等。其中分泌 IgG 与 IgM 的特性可保持数年之久。然而，其分泌 IgE、IgD 的特性不稳定，即使经过反复克隆，其分泌特性也很容易丢失。

### 二、大鼠杂交瘤的技术方法

制备大鼠杂交瘤细胞的原理、操作程序与小鼠杂交瘤技术相同，不再赘述。在此仅就大鼠技术体系的特点叙述如下。

#### （一）融合用骨髓瘤细胞

制备大鼠杂交瘤细胞用的骨髓瘤细胞系有 210-RCY3-Agl.2.3（简称为 Y3）、YB2 及 IR983F（简称 IR983 或 983）。Y3 自身仍分泌 $\kappa$ 链免疫球蛋白。因此制备大鼠杂交瘤细胞均采用 983 或 YB2。1986 年作者从比利时 Bazin 教授实验室引进了 IR983F 细胞系及 LOU/C、LOU/CIg $\kappa$ -Ib 及 LOU/M 大鼠，IR983F 细胞系由 Bazin 教授建立。983 来源于 LOU/C 大鼠的 immunocytoma，所以称 IR983，自身不分泌 Ig，为对 8-zaguanine 有抗性的变异细胞株，不

仅在 LOU/C 大鼠体内可以传代，而且可以在体外培养。为了便于杂交瘤细胞在动物体内诱生腹水，融合用的免疫脾细胞最好来自 LOU 大鼠。

983 细胞培养于含 10% 牛血清的 DMEM 完全培养液中。其形态椭圆或多边形，不像 SP2/0 那样呈规则的圆形。半贴壁生长，其生长增殖具有明显的浓度依赖性，每次传代时细胞浓度不能低于  $10^5/\text{ml}$ 。融合前 1 周（至少 3 天）要调整细胞浓度，以保证其最佳的生长状态。培养应隔天换液，保持细胞数为  $10^5/\text{ml}$ ，若细胞浓度为  $2 \times 10^5/\text{ml}$  即需要每天换液。要其倍增时间不超过 16h，细胞活力达 90%。

影响融合成功的因素很多，关键是 983 细胞的生长状态，其次为小牛血清的质量及是否有支原体污染等。细胞清除支原体污染的方法：收集所有污染的细胞，离心弃上清，再悬浮于 0.5ml 生理盐水中，注入 LOU 大鼠前肢的腋下皮下。

### (二) 免疫

一般采用的免疫程序如下：第一次免疫以细胞为抗原（ $10^7$  细胞/只大鼠）不用佐剂，腹腔注射。若用可溶性抗原， $100\mu\text{g}/0.3\sim 0.5\text{ml}/\text{只}$ ，加等体积的完全福氏佐剂，充分乳化，经足垫、皮下多点免疫或经腹腔注射。间隔 2~3 周后以同样的方法进行第二次免疫。因不同动物个体反应性有很大差异，尽可能多免疫几只大鼠，另外，最好取血测效价，根据效价选取动物备融合用。使动物间歇至少 1 个月或 2~3 个月后加强免疫，细胞量为  $2\sim 5 \times 10^7/\text{只}$ ，腹腔注射；可溶性抗原  $100\sim 500\mu\text{g}/\text{只}$ ，尾静脉注射。加强免疫后第 4 天融合。可溶性抗原也可连续加强免疫 3 次，每次  $100\mu\text{g}$ ，最后 1 次加强免疫的次日取脾融合。为争取时间或特殊需要也可采用短期快速的免疫程序，每隔 3 天免疫 1 次，连续免疫 3 次或 4 次，末次免疫 3~4d 后融合；或 1 次脾内免疫后融合也有获得成功的例子。融合的技术方法及试剂同小鼠体系。

### (三) 筛选及克隆

对大鼠骨髓瘤细胞的选择培养液同小鼠的 SP2/0，HAT 及 HT 为选择性培养基。大鼠杂交瘤细胞所形成的集落有的比较分散，不像小鼠杂交瘤细胞形成的集落那样密集。对有杂交瘤生长孔的培养上清进行筛选，可采用 ELISA 或微孔免疫细胞化学染色法。大鼠检测体系使用酶标记小鼠抗大鼠  $\kappa$  链（MARK-1），最后以 OPD- $\text{H}_2\text{O}_2$  或 DAB- $\text{H}_2\text{O}_2$  底物显色，也可用 Biotin 标记 MARK-1、Strapavidin 标记 HRP，再以底物显色。因大鼠的单抗 95% 为  $\kappa$  链，因此，不论哪种 Ig 亚类均可用 MARK-筛选，不致漏筛。

当筛选到阳性反应孔时应尽早进行克隆化，以免不分泌的无效细胞与分泌抗体的杂交瘤细胞竞争生长。克隆的方法有多种，比较简便易行常用的方法是有限稀释法。

### (四) 单克隆抗体的制备

#### 1. 体外培养

将分泌特异性单抗的杂交瘤细胞置于培养瓶中， $2 \times 10^5$  细胞/ $\text{ml} \times 50\text{ml}$  或根据培养瓶大小增加或减少培养液体积，但要保持同样的细胞浓度。培养 2 周，转瓶效果比静止培养好。有实验证明培养 2 周时，单抗含量达到峰坪区，约  $20\sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$  左右。

### 2. 体内培养

将  $1-2 \times 10^7$  杂交瘤细胞悬浮于 2mlPBS 或生理盐水，腹腔注射预先以 2ml 降植烷或不完全佐剂或两者等体积混合物处理的大鼠。10 天左右即产生腹水，平均每只大鼠可收获 50ml 腹水。若在大鼠状态良好时，小心分次抽取还可能获得更多的腹水。作为诱生腹水的动物选用 8~10 周龄的健康大鼠为宜，老龄鼠不易成功且产生的腹水量也低于适龄大鼠。

## 第四节 兔单克隆抗体的制备

自上世纪七十年代末鼠单克隆抗体技术发明以来，人们就梦想通过兔制备单克隆抗体，因为兔的脾脏比小鼠的脾脏大，同时从进化角度讲兔-人类的进化距离要比小鼠-人类的远，因此使用人类蛋白作为免疫原时，兔比小鼠可能获得更强的免疫反应。由于建立兔杂交瘤细胞存在许多技术难关，直到在 1995 年 Katherine Knight 博士获得永久的兔杂交瘤细胞系之前没有人能获得成功。1995 年，Dr. Katherine Knight 在 Loyola University of Chicago 成功地转基因兔中获得骨髓瘤样肿瘤(plasmacytoma)。其后几年里，Dr. Robert Pytela 和 Mr. Weimin Zhu 在 UCSF 将此技术进行了改进，使之能高产量的生产兔单克隆抗体。从目前获得的兔单克隆抗体的结果来看，兔单克隆抗体比鼠单克隆抗体具有更高的亲合力（大约 10 倍左右）。研究表明，兔的免疫系统能够对小鼠不能识别的小的抗原决定簇产生亲合力，兔单克隆抗体能够识别许多在鼠中不能产生免疫反应的抗原。美国 Epitomics 公司已获得了生产兔单克隆杂交瘤的独家专利使用权。

兔单克隆抗体的大体生产过程与常见的鼠单克隆抗体类似。包括免疫、融合、筛选、建株及扩大培养。一般制备兔单克隆抗体的周期需要 5-8 个月，包括免疫 2-3 个月，抗血清的分析检测大概要 1-2 周。融合后需要 4-6 周的时间进行杂交瘤细胞的生长、初筛，然后把状态好的细胞转移至 24 孔板中。选择预期想要获得的克隆后，需要 3-4 周的时间进行亚克隆和进一步的筛选。亚克隆扩展培养和小规模 IgG 生产（5-20mg）需要 6-8 周。

免疫和筛选所需蛋白的量相对较多（初次免疫为每只兔子 300 $\mu$ g, 强化免疫为每只 100-200 $\mu$ g），总计至少需要 3mg 蛋白来免疫 2 只兔子和完成 ELISA 检测。但是，某些情况下很难获得这个量。免疫效果取决于蛋白免疫原性，有时很少的蛋白量也能诱导很好的免疫反应（有些每次只需要 10 $\mu$ g）。在小腿注射，从腿弯部淋巴结收集细胞都是减少免疫原用量的方法。

兔单克隆抗体与其他抗体有相同的应用领域。兔单克隆抗体已经成功地应用于免疫印迹、免疫细胞化学、免疫组织化学、免疫沉淀和流式细胞术。最近兔单克隆抗体已经获准诊断应用。

## 第五节 单克隆抗体的应用

Kohler 和 Milstein 于 1975 年发明了被称之为“魔弹”的单克隆抗体技术以来，单克隆抗体由于其无可比拟的优越性，被广泛应用于生物医学的各个领域。单克隆抗体是由 B 淋巴

细胞和骨髓瘤细胞杂交形成的杂交瘤细胞产生，其重链和轻链所形成的结构域可以识别和结合特异性抗原。1987年单克隆抗体技术被成功应用到诊断试剂中，90年代随着基因工程技术的迅速发展，治疗性单抗从早期100%的鼠源性单抗到嵌合抗体、人源化抗体（Humanized Mab）到近年的全人源性抗体（图4-2），逐步消除了抗体的免疫原性问题，在保持对抗原高亲和力的同时，改善了抗体的药动力学。1997年FDA批准第一个治疗淋巴瘤的嵌合单抗药物Rituxan，CD-20上市，并进入56个国家，由IDEC/Genentech/Roche三大药厂联合生产，至今仍然供不应求。2001年5月，<时代周刊>封面文章指出，治疗性单抗是人类与癌症战斗中的一次重大胜利。至2004年，FDA已批准了20多种治疗性单抗药物，约一半用于治疗癌症。2021年，FDA批准第100个抗体药物，抗体药物达到了一个新的里程碑。

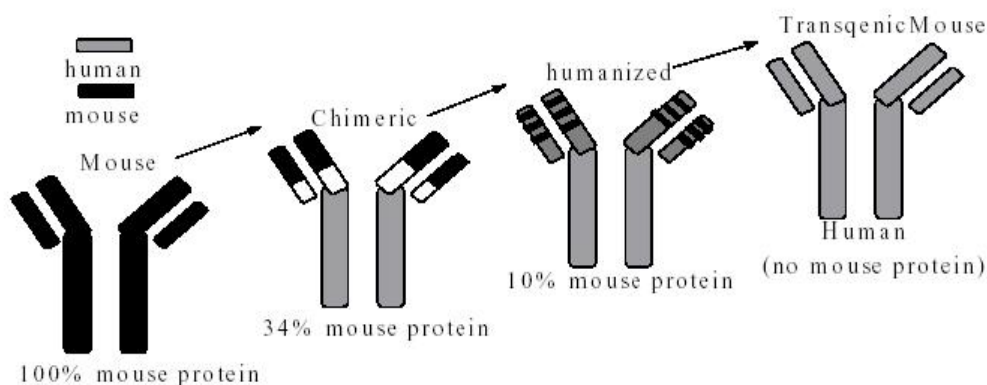


图 4-2 单抗的人源化

随着全球生命科学研究的重点由基因组计划转向蛋白质组计划，随着对自身健康、日益严重的环境、公共卫生、生物恐怖等问题的高度关注，人类对具有高亲合性、高灵敏性及高稳定性的抗体及其相关技术的需求也越来越迫切。目前抗体的应用主要集中在以下三个方面。

## 一、抗体是生命科学研究领域的主要试剂

由于单克隆抗体能识别各种生物活性物质如蛋白、多糖、核酸、脂蛋白、神经肽等的单一抗原决定簇并与其特异结合，同时由于单克隆抗体的均质性及易于大量生产，使得单克隆抗体在生命科学研究领域中得到了极为广泛的应用。

### (一) 在蛋白质组学研究领域的应用

随着人类基因组计划的初步完成，生命科学的重点转向以研究生命体整套蛋白质功能为核心的蛋白质组计划。人类蛋白质组计划（Human Proteome Project, HPP）是继人类基因组计划之后最大规模的国际性科技工程，也是21世纪第一个重大国际合作计划。首批启动的计划有“人类血浆蛋白质组计划，”（美国）、“人类肝脏蛋白质组计划”（中国）、“人类脑蛋白质组计划”（德国）和“人类抗体库计划”（瑞典）。“人类肝脏蛋白质组计划”（HLPP）是第一个人类组织、器官的蛋白质组计划，也是我国第一次领导的重大国际协作计划。

虽然蛋白质组学研究的主要支撑技术是双向凝胶电泳、质谱和计算机图像数据处理系统，但是与抗体有关的免疫学技术在蛋白质组学研究中发挥着不可替代的重要作用。抗体具有高度的特异性，抗体与亲和层析、蛋白免疫转印、流式细胞术、免疫组织细胞化学和微阵列技术（芯片）的结合，可以实现对相应蛋白质的定性、定量和细胞（内）定位分析以及成百上千种蛋白质的相对丰度比较，并可满足蛋白质组学对复杂组分高通量、高效率的检测；某些抗体可以特异性识别蛋白质翻译后修饰的糖基化或磷酸化位点、降解产物、功能状态和构象变化等，成为基因芯片检测不可替代的补充；抗体捕获组分的分析有助于蛋白质复合物及其相互作用的研究，在新的蛋白质发现和确认方面可提供重要信息和证据。总之，抗体是蛋白质组学研究领域中的重要工具之一，在蛋白质的定性、定位、定量、蛋白相互作用，以及疾病标志、药靶和诊断靶发现和评价等重要目标的完成中发挥着重要且不可替代的作用。由于抗体在蛋白质组学研究中的重要地位，在 HUPO 优先启动人类蛋白质组计划中，人类抗体计划（Human Antibody Project, 简称 HAP）就包含其中，HUPO 在抗体计划的最终目标是建立人类全套蛋白质的抗体库，约 30000 种蛋白质共 100 百万种单克隆抗体库的计划。同时，在其它蛋白质组计划中抗体库的建立也被摆在十分重要的地位，例如，已启动的“人类肝脏蛋白质组计划”和“人类血浆蛋白质组计划”中相应抗体库的建立也被置于优先发展的地位。“人类肝脏蛋白质组计划”中抗体的目标是在 5 年内建立人类肝脏蛋白全套约 5000 种蛋白的抗体库。由此可见，抗体的规模化制备及应用对蛋白质组学研究有极其重要的意义，其需求是巨大的。

虽然近年来，噬菌体抗体库技术、肽库技术、SELEX 技术、核糖体展示技术等大容量分子文库技术的高速发展，为高通量筛选鉴定亲和和配体提供了新的思路和方法。特别是大容量噬菌体抗体库技术的成熟，在治疗性抗体的筛选和制备方面已经成为重要的基本技术之一。然而，由于小分子或单链抗体亲和力弱、特异性较差、难以标记、抗原结合部位易受理化因素影响等原因，造成了筛选单链抗体容易，而后续的亲和力成熟等改构技术、特异性鉴定、标记、包被等应用难度加大，实际上难以应用于蛋白质组研究。通过动物免疫制备的单克隆抗体分子是具有 Fc 段的完整天然二聚体分子，同噬菌体展示技术获得的重组抗体相比，具有更高的亲和力和稳定性，而与多克隆免疫血清相比具有更强的特异性，因此更适合通过免疫印迹、免疫沉淀、免疫组化以及抗体芯片等技术来研究蛋白质的组织分布、细胞定位、翻译后修饰以及蛋白质的相互作用，仍然是蛋白质组学研究领域最成熟、稳定、有效的主力抗体制剂。国际抗体产业巨头如 BD-Farmingen、Santa Crus、Fizergrad、R&D 等销售的主打抗体产品均为单克隆抗体。

### （二）在细胞抗原研究及鉴定分类中的应用

不同细胞表达不同的分子，即便是同一类细胞在不同功能阶段亦表达着大量的不同分子，不同的分子表达赋予细胞特定的生物学特性，预示着其功能上的差异。因此，在同类细胞中常根据其不同的分子表达进行进一步的分类。单克隆抗体用于细胞抗原研究及功能分类的最具代表性范例是在人类的细胞分化抗原研究及淋巴细胞亚群分类中的应用。

处于静止期的淋巴细胞均呈小圆状，胞浆少，核致密，在普通显微镜下难以进一步区分彼此间的异同。现在我们知道，这些外貌相似的淋巴细胞可分为许多功能各异的亚群，它们

各自表达其特有的细胞表面标志物,利用单克隆抗体的特异识别功能,可对它们进行识别和分类。通过单克隆抗体鉴别并编号的人类白细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD)目前已近二百种。不同细胞亚群行使着不同的生理功能,为了对其功能机制进行研究,首先需要进行对不同亚群细胞分离纯化。常用方法是先将特异抗体标以荧光素(亦可将荧光素标记在第二抗体上),由于特异抗体同抗原的结合,使得表达该抗原的细胞在一定激发光下能发出荧光,因而可用荧光流式细胞仪(fluorescence-activated cell sorter, FACS)将其与其它细胞分离。

### (三) 在细胞受体研究中的应用

受体在介导细胞信号传导、调节细胞生物学行为中起着极为重要的作用,但由于受体在细胞总蛋白中所占比例极少,用一般理化方法难以纯化获得足量受体分子。由于单克隆抗体有同抗原特异结合的特性,它在受体的分离纯化、细胞定位、结构研究及功能分析中得到了广泛的应用。如在对受体进行分离纯化时,可首先将相应的单克隆抗体作为配体直接连接于固相载体上,以亲和层析方法对受体进行有效的分离与纯化。用亲和层析方法获得的受体在一般情况下能保持良好的生物活性,用该法已纯化了乙酰胆碱、胰岛素、低密度脂蛋白等受体。

将受体单克隆抗体与酶或放射性核素、荧光素连接,通过底物显色,放射显影或荧光测定可确定受体的细胞定位。如 Mccellam 等用过氧化物酶偶联的雌激素受体单抗与猴子宫内膜作用,经染色可见着色颗粒分布于细胞核及胞浆内,提示该受体定位于胞核及胞浆。King 用样方法发现乳腺癌细胞核内有雌激素受体。

由于进化的原因,不同种属的同一受体在结构上可能不尽相同。利用单抗可以了解不同种属同一受体的结构特异性。如识别牛雌激素受体的单抗不与人及其它哺乳动物雌激素受体结合,说明牛雌激素受体与其它哺乳动物的雌激素受体有结构上的差异。利用单克隆抗体也可了解受体上抗原决定簇的数目和组成,有助于对受体亚单位结构的分析。如 Chartmon 等用单克隆抗体分析了牛子宫雌激素受体的分子组成,发现每个天然的“8S”受体分子有 2 个抗原决定簇,当用高浓度盐处理后得到的“4S”后只有一个决定簇,提示受体是由“4S”组成的二聚体。

将单克隆抗体标记荧光素可用于对生物活性分子的胞内示踪,以了解该分子的活性状态。如核转录因子 NF<sub>κ</sub>B 在非转录状态下位于胞浆,当受到多种因素刺激时可形成二聚体并进入核内,调节相关基因的转录。因此,可以用抗 NF<sub>κ</sub>B 的抗体通过对其在细胞内的定位了解功能状态。又如调节细胞周期及凋亡相关的抑癌基因 p53 蛋白,正常状态下在细胞内的半衰期极短,用常规方法难以检测,但当其发生突变后,正常功能消失并半衰期明显延长,引起在细胞内的聚集,因此,用抗 p53 抗体检测细胞内 p53 聚集状况,可了解 p53 的功能状态。上述仅反映了单克隆抗体在研究领域中的应用的一个侧面,可以毫不夸张地说,单克隆抗体在生命科学中的应用是其它任何制剂所不能取代的,其应用广泛性也是前所未有的,没有单克隆抗体技术,不可能有今天生命科学研究的长足发展。

## 二、单克隆抗体在医学研究及疾病诊断、治疗中的应用



抗体在医学中的应用极为广泛，涉及疾病的研究、诊断及治疗等各个方面，抗体的应用形式也由很早以前的多抗血清逐步发展到今天的单克隆抗体。由于单克隆抗体的均一性、可大量生产及易于质量控制，因此，多克隆抗体在疾病检测中的应用已逐渐被单克隆抗体所取代。

### (一) 单克隆抗体在感染性疾病诊断中的应用

所有致病微生物及其它病原体都有其特异的抗原，在侵入人体后可刺激机体产生免疫反应，但这些抗原分子又可作为病原体的标志物。用抗体检测病原体微生物的抗原，可帮助对疾病的诊断及病期的判断，如临床对血液中乙肝病毒、艾滋病病毒等的检测，是诊断乙型肝炎和艾滋病的重要指标，对乙型肝炎病毒核心抗原和表面抗原的检测，有助于判断肝炎的临床分期。

单克隆抗体除广泛用于对感染性疾病的诊断外，在对各类病原体的分型及鉴定中也可发挥重要作用，弥补了过去多抗血清的不足。由于单抗的均一性及良好的亲和力，它被广泛用于对病原体的分离与鉴定。沙门氏菌是重要的食物致病菌，其检测常需采用分离培养的方法，费时费力，如采用快速的多克隆血清学鉴定，由于沙门氏菌有 2300 多个血清型，即便对多克隆血清进行各种纯化也难以消除其交叉反应。但使用抗沙门氏菌的单克隆抗体，则可使这种交叉反应降低到最低程度，在较短时间内即可获得对血清型的分析。又如单核细胞增多性李氏杆菌污染食品后，可导致一种类似流行性感冒的疾病，常规分离培养至少要 4 天才能确定，而采用李氏杆菌鞭毛共同抗原的单克隆抗体进行免疫学检测，可快速诊断食品中的李氏杆菌。流感病毒经常发生变异，变异后的病毒引起抗原改变而逃脱机体的免疫反应，用单克隆抗可分离出仅有一个氨基酸改变的流感病毒变异株，同时对流感变异株的鉴定有利于疫苗的研制及流感发生的预测。

### (二) 单克隆抗体在肿瘤诊断及预后判断中的应用

肿瘤是一种多因素参与、多阶段发展、多基因改变的全身性疾病。在二三十年前，对肿瘤的诊断主要局限于显微镜下的形态观察，难以了解其发生的分子改变。随着分子生物学的发展，许多与肿瘤发生发展相关的分子被不断克隆与鉴定，这些分子的异常表达经常同某些肿瘤的生物特性相关联。因此，用抗体测肿瘤相关分子的表达水平，是临床用以判断肿瘤的来源、预后及某些生物学特性等的最常用方法。

肿瘤标记物 (tumor marker) 是与肿瘤发生关系最为密切的一组生物活性物质，它可以是酶、激素、代谢产物或肿瘤细胞的一些独特表达产物。它们既可以存在于血液中，亦可存在于肿瘤细胞。如葡萄胎、绒癌患者血液中绒毛膜促性腺激素 (HCG) 的升高、肺癌病人血清唾液酸及癌胚抗原的升高、肝癌病人中甲胎蛋白的升高以及前列腺癌患者血中前列腺特异抗原 (PSA) 的升高等。用抗体对这些血液中的肿瘤标记物进行检测，是早期诊断肿瘤及判断预后的重要手段。如在实体瘤的生长与转移过程中伴随有肿瘤细胞分泌大量的促血管生成因子，如血管内皮细胞生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 等，用单克隆抗体通过放免方法进行血液中 VEGF 和 bFGF 的水平检测，有助于肿瘤的诊断及预后判断。

### (三) 单克隆抗体在其它诊断及研究中的应用

通过对杂交瘤细胞的筛选能获得高亲和力的克隆,而高亲和力抗体将大大提高对微量物质的检测敏感性,如用抗绒毛膜促性腺激素的单抗在妇女妊娠的早期,即受孕后一周内,即可检出尿中的微量绒毛膜促性腺激素。

由于单克隆抗体的结合特异性,许多既往用多抗血清难以检测或区分的抗原用单抗大多能得到鉴别。如食物肉毒杆菌毒素中毒以 A 型和 B 型内毒素最为常见,但这两种毒素间常出现交叉反应,常规方法难以区分,而用相应的肉毒毒素制备获得的单抗,则极易将二者区分开来;又如对真菌毒素的检测,既往常用理化或生物学方法进行检测,所需设备昂贵,操作复杂,而用真菌毒素单抗,其敏感性高、特异性强,非常适用于对食物样品的检测。

单克隆抗体在对兴奋剂和毒品的检测中亦得到了充分的应用。如对外源性促红细胞生成素(EPO)和内源性促红细胞生成素的鉴别,用常规方法难以鉴别,但用高度特异性单抗则易于对二者进行区别。

单克隆抗体还被广泛地用于神经生物学、发育生物学、内分泌学等各个医学研究领域。如对神经系统不同类型细胞表达的抗原鉴定、不同发育时期某一抗原的表达差异检测、激素的纯化和不同分化阶段内分泌细胞的分离等。

### (四) 单克隆抗体在疾病治疗中的应用

单克隆抗体自问世以来,由于其作为鼠源性蛋白能诱发人体产生免疫反应,因此在体内的应用发展得十分缓慢。近年来随着基因工程抗体技术的不断发展及不同技术间的巧妙结合,单克隆抗体鼠源性的问题已过通抗体人源化、噬菌体抗体库及转基因动物等技术而逐步得到解决。因此,抗体在人体内的应用已展示出良好的前景。1997年FDA批准第一个治疗淋巴瘤的嵌合单抗药物 Rituxan, CD-20 上市,并进入 56 个国家。至 2004 年 FDA 已批准了 20 多种治疗性单抗药物,约一半用于治疗癌症,在治疗慢性疾病如关节炎方面也取得了显著的临床效果。已上市抗体有不少已成为年销售额数亿美元的“重磅炸弹药物”(Blockbuster Drug)。全球抗体药物的市场增长十分迅猛,有约 200 多种单抗在进行临床实验,约占整个临床生物技术药品总数的三分之一,其中四分之一在临床三期或等候批准。2021 年,抗体药物的时常规模已经超过 2000 亿美元。

(郝文波 宁云山)