

单克隆抗体技术

马德芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

二十世纪60年代以来,免疫学中出现的高灵敏度、高特异性放射免疫和酶联免疫技术,虽然在医学、病毒学、分子生物学等学科的发展中,起了巨大的推动作用,但由于动物天然抗体系统所具有的高度复杂性和异质性,不可能得到针对某一特定抗原决定簇的抗体。从分子水平上讲,抗体本身的纯度问题仍未解决,致使体液抗体的应用受到严重限制。

动物对于特定抗原刺激的抗体应答反应极为复杂,一特定抗原的不同抗原决定簇均可刺激动物的免疫细胞产生与其相应的抗体。由于动物体内种类繁多的大量免疫细胞共同活动的结果,所产生的针对不同抗原决定簇的各种抗体都能识别该抗原,如纯系小鼠的抗体库范围为 $1-5 \times 10^7$,每个抗原决定簇可为多达1,000—8,000种抗体所识别。而在实际工作中,分析小鼠对这些抗原的反应时,仅能测出其中5—10种抗体。

1975年,英国的Milstein和Köhler合作,在体细胞杂交技术基础上,建立了淋巴细胞杂交瘤技术并由此首创单克隆抗体技术,因而获得诺贝尔奖金。单克隆抗体技术的建立不仅从根本上改变了免疫学的面貌,实现了免疫学家渴望获取纯净、单一抗体的宿愿,而且对生物学领域诸学科的发展,产生了巨大影响。此项技术和DNA重组技术称为当今生物学领域两项重大突破。

一、单克隆抗体产生的原理

产生抗体的淋巴细胞是不断生成、不断消亡的,因此要培养正常的产生抗体的淋巴细胞十分困难。但是

癌变细胞却有很强的生命力,很容易培养。如果将这两种细胞融合,就能得到既能产生抗体又容易培养的细胞。Milstein使小鼠骨髓瘤细胞与经绵羊红细胞免疫的小鼠脾细胞融合^[1],发现此融合细胞既具有亲本脾细胞分泌抗绵羊红细胞抗体的能力,又具有亲本瘤细胞能在体外培养或在小鼠体内不断增殖的特性。于是,在一般培养中不易存活的分泌特异性抗体的B淋巴细胞,通过和骨髓瘤细胞融合,便成了“永生”的抗体形成细胞。这种融合细胞就称为B淋巴细胞杂交瘤细胞。经选择和克隆化培养,将此杂交瘤细胞培养成克隆系,即可由不同细胞系的培养液或接受移植B淋巴细胞杂交瘤细胞的小鼠腹水或血清中获得大量针对各抗原决定簇的单一抗体,这就是单克隆抗体。

二、单克隆抗体的制备^[2]

1. 细胞融合前的准备

a. 骨髓瘤细胞: 应用最广的是若干种小鼠和大鼠的骨髓瘤细胞,用于融合的瘤细胞必须是纯净的处于对数生长期的细胞。

b. 产生抗体的细胞: 一般采用免疫小鼠的脾细胞,最好是与骨髓瘤细胞同系之小鼠为免疫小鼠。用灭活的百日咳杆菌或全佐剂与抗原混合、乳化后进行免疫。免疫后处死小鼠,取脾做成均匀的脾细胞悬液,一个脾脏可获得 $5 \times 10^7-2 \times 10^8$ 个脾细胞。

饲养细胞: 在筛选、扩大和克隆化培养杂交瘤细胞时必须加入活的饲养细胞。小鼠腹腔巨噬细胞、脾细胞、胸腺细胞均可做为饲养细胞,一般用从12周龄与骨髓瘤细胞同系之雌鼠腹腔制取的巨噬细胞为宜。

2. 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选

这是能否获得优质的单克隆抗体的关键之一。通常于初次免疫后 3—4 天或加强注射后第 3 天取脾做成脾细胞悬液进行融合。最好将免疫的几只小鼠的脾细胞混合后与瘤细胞融合。初次融合时最好选用几种不同的瘤系分别进行,留最佳者于液氮中冻存。用于融合的主要瘤系应为仅含免疫球蛋白轻链或不合成任何免疫球蛋白重、轻链的各种变种,以避免骨髓瘤细胞自身免疫球蛋白的干扰。脾细胞和骨髓瘤细胞经促融剂(50% PEG 1000)处理后,除脾、瘤两种细胞间的融合外,还有脾细胞与脾细胞、瘤细胞与瘤细胞间的自身融合,所以融合后需迅速将其移入选择性培养液中培养,除去未融合及自身融合的细胞。和正常细胞一样,肿瘤细胞除了可利用谷氨酰胺和尿核苷磷酸从头合成 DNA 之外,在此途径被 HAT* 培养液中的氨基嘌呤所阻断时,还可以利用 HAT 培养液中的次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷借应急通路合成 DNA。但是用于融合的骨髓瘤细胞,是经嘌呤类似物 8-氮鸟嘌呤或 6-巯基鸟嘌呤筛选而得到的,均为次黄嘌呤磷酸核糖转化酶(HGPRT)的缺陷型,以致未融合的骨髓瘤细胞或其自身融合物,因不能利用 HAT 培养液中次黄嘌呤合成 DNA 而死亡。而脾细胞及其自身融合物,虽具 HGPRT 酶,却缺乏在组织培养条件下生长的能力,也在短时间内陆续死亡。只有脾细胞与骨髓瘤细胞融合而成的杂交瘤细胞,由于分别由二亲本细胞获得了应急通路所必须的 HGPRT 酶和在组织培养条件下生长的能力,而得以在 HAT 培养液中幸存并迅速增殖,最后被筛选出来。通过选择性培养而得到的杂交瘤细胞,只有很少一部份具有分泌专一性抗体的能力。因此,在克隆化培养之前,需用琼脂扩散、免疫电泳、间接血凝、酶联免疫或放射免疫等方法进行专一性检查。杂交瘤细胞很不稳定,一旦筛选出来之后,应尽快进行克隆化培养及冷冻保存,以免因染色体丢失,抗体重、轻链基因分离而丧失原有的专一性。

3. 克隆化培养

由单个阳性杂交瘤细胞开始,通过增殖繁衍而获得大量杂交瘤细胞的克隆化培养是继专一杂交瘤细胞筛选之后,获取纯净单克隆抗体的又一重要步骤。不仅刚筛选出来的阳性杂交瘤细胞需要尽快克隆化培养,即使早已克隆化了的阳性杂交瘤细胞也需再次或多次进行克隆化培养。因为经过一段时间培养后会因体细胞突变或染色体丢失使部分细胞丧失产生抗体的能力。

4. 单克隆抗体的大量制备

目前用于大量制备单克隆抗体的主要方法是在小鼠体内注入致癌物质,如降植烷或矿物油后再植入单克隆细胞以诱发腹水瘤,通过穿刺,每只小鼠可获得 10—20 ml 腹水,其单克隆抗体的浓度可高达 5—20

mg/ml。

5. 单克隆抗体的分离、纯化和鉴定

单克隆抗体虽然已很纯净,但仍含有一些来自培养基、宿主和克隆细胞本身的无关蛋白质,需进一步分离纯化。和纯化其它体液抗体一样,可根据不同的纯度要求采用不同的纯化方法,如离子交换层析、亲和层析等。最好以 ¹⁴C-亮氨酸或 ³⁵S 甲硫氨酸标记克隆细胞在体外培养下产生的单克隆抗体,然后以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对抗体进行免疫球蛋白分型及重、轻链组成分析。通过鉴定,单克隆抗体的高度均一性得以肯定即可贮存于低温备用。

三、单克隆抗体技术的应用前景

由于单克隆抗体的纯度高、特异性高、重复性高,并能无限制地提供抗体来源,因而引起生物学、医学界的广泛注意,促使很多学科迅猛发展。

1. 抗原的研究:单克隆抗体不仅对特定抗原分子专一,而且对抗原分子的某一特定部位专一。能用纯化的抗原生产抗体,也可用未经分离的细胞提取物作为混合抗原得到某一种单一抗原的抗体。即使免疫源是极复杂的各种分子或决定簇的混合体都可得到针对单一抗原决定簇或分子的抗体。这就为发现某种新的抗原物质提供了可能性。

在肿瘤细胞表面抗原的研究中,已试制成针对肿瘤抗原的单克隆抗体,有的已有效地用于诊断和治疗。如用同位素标记的肿瘤抗原的单克隆抗体已用于小鼠体内肿瘤的测定及转移灶的诊断,恶性黑色素瘤的单克隆抗体细胞株中有一株已能用于诊断。可以预料,利用单克隆抗体技术诊断人体肿瘤已为期不远。

在对细胞表面成份的研究中发现,一个抗体在一个细胞上仅与 5,000 个分子结合,而一个主要糖蛋白单克隆抗体则可与细胞上 60 万个分子结合,甚至可鉴别次要的膜分子及异杂混合细胞中亚群细胞上的抗原,区分各细胞间细微的差异。利用小鼠和大鼠的淋巴细胞单克隆抗体所识别的淋巴细胞造血系统的分化抗原,可将淋巴细胞分成不同的亚群,可用以鉴定淋巴细胞的功能。小鼠淋巴细胞单克隆抗体还可用于诊断小鼠正常血液中淋巴细胞表面所没有的抗原,从而早期诊断小鼠的白血病。有些抗原在细胞表面的遗传结构也可用单克隆抗体进行分析。用单克隆抗体还可确定有关基因在染色体上的位置和同种抗原的遗传规律。

很多种植物病毒的单克隆抗体已在一些国家获得。无疑,这不仅可成功地用于植物病毒病害的免疫诊断、病毒鉴定;在病毒株系间细微差别的发现继而在病毒分类上也将显示出巨大的生命力。

2. 在免疫移植的研究方面:当单克隆抗体技术问世以后,人们曾希望这种抗体能形成对癌细胞的“识别和破坏”系统,从而消灭癌细胞,遗憾的是,从小鼠的瘤系得来的单克隆抗体起不了这一作用,因为它们会作

为异物被人体的免疫系统所排斥。近几年来,为了征服人类最危险的疾病——癌症,建立了人和兔的单克隆抗体瘤系,从人体细胞制取单克隆抗体以克服人体的排异问题。剑桥大学路得维格癌症研究所想用单克隆抗体治疗一种脑恶性肿瘤——神经胶质瘤。在这种瘤中发现被浸润的淋巴细胞,证明患者体内存在专对恶性肿瘤细胞的免疫防御体系。他们把从神经胶质瘤中取出的淋巴细胞和人骨髓瘤细胞进行融合,得到杂交瘤细胞。这种杂交瘤细胞和小鼠的杂交瘤细胞一样,既能在体内或体外生长,又能产生专对神经胶质瘤的抗体。这种单克隆抗体具有辨认神经胶质瘤的能力,又不会被患者的免疫系统所排斥,因为它们和患者自身淋巴细胞所产生的免疫球蛋白相同。他们给患者研制了一种装置,部分植入体内。在此装置内,杂交瘤细胞和体液由过滤器隔开,但与体液相接触。患者体内的热气流使杂交瘤细胞得以生存,从而产生单克隆抗体。这些能辨认神经胶质瘤的抗体较小,能够穿过过滤器进入患者血液,而恶性肿瘤细胞却不能进入。此实验用以证实单克隆抗体在病人体内是否追捕神经胶质瘤,还可籍同位素示踪检测单克隆抗体进入肿瘤的途径和治愈剂量。如果将单克隆抗体作为载体让有效

抗癌药物直接攻击肿瘤,还可收到能强烈杀死肿瘤细胞而对人体损伤极小的效果。

据报道,在器官移植方面,能识别移植抗原的单克隆抗体和移植器官一起移入宿主体内,可同时抑制宿主对移植细胞的体液免疫和细胞免疫反应,克服宿主对移植细胞的排斥现象。

3. 其它方面: 特异性单克隆抗体的应用,不仅在寄生虫、细菌、病毒的分类和诊断方面发挥作用,对病毒的深入研究还可找出对抗体中和作用最强的抗原决定簇,从而使单克隆抗体发展成为一种疫苗,用以预防人类及动物的病毒病害。

英国剑桥动物生理研究所的研究人员还发现,对小鼠的孕酮素腺注射单克隆抗体能阻止小鼠怀孕。这可能是单克隆抗体阻止受精卵在子宫内着床。这一研究工作对控制人口增长的意义是可想而知的。

参 考 文 献

- [1] Köhler, G. and C. Milstein: *Nature*, 256: 495, 1975.
- [2] 黄嘉陵: 细胞生物学杂志, 3—4 期, 1981 年。

* HAT 培养液: DMEM 培养液加次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷培养液以及氨基嘌呤。