

单克隆抗体技术在生物化学中的应用

沈 倍 奋

(解放军军事医学科学院基础医学所,北京)

单克隆抗体技术是近年来医学上的一项重大突破^[1]。新技术的发展明显地促进了从有机体、细胞、组织或生物液中纯化和鉴定某些分子的工作。

单克隆抗体技术主要是将小鼠骨髓瘤细胞和免疫动物的脾细胞融合产生杂交瘤细胞。因为骨髓瘤细胞是一单个的恶变细胞增殖的克隆化细胞,在体外有无限增殖力。它好像多发性骨髓瘤病人产生单一个的免疫球蛋白一样,可以分泌大量化学结构均一的免疫球蛋白,但其特异性难以测知。而经抗原激活的B细胞虽然能产生针对抗原的高度特异的抗体,但它在体外不能增殖。融合的杂交瘤细胞结合了二者的特点,既能增殖又能分泌特异性抗体。产生单克隆抗体的简单过程如下:

P₃ × 63/Ag8 小鼠骨髓瘤细胞+从免疫的BALB/C小鼠来的脾细胞→在PEG 1000 中融

合→在 HAT 培养液中选择融合的杂交瘤(8—10 天)→产生可见的杂交瘤集落→从培养上清液中筛选产生有关抗体的杂交瘤集落→通过有限稀释法进行克隆化→反复克隆化后,选择产生理想单克隆抗体的克隆→一部分留做大量培养,或注入小鼠体内产生腹水。

根据杂交瘤产生的原理,单克隆抗体具有下面几个主要特点:

1. 单克隆抗体是抗单个抗原决定簇的均一抗体 根据免疫学上的克隆选择学说,一个抗原只能使其相应的一个B细胞克隆增殖与分化,而一个B细胞克隆只能产生一种独特的特异性抗体,这些抗体都具有相同的氨基酸顺序和相同的结合特性。因此当我们用某一种细胞作为抗原时,如果细胞表面有20种不同的抗原决定簇,采用杂交瘤技术就有可能得到20个杂交瘤克隆。尽管每一个克隆产生的抗体都能与

表 1 单克隆抗体与普通抗体主要性质比较

性 质	普 通 抗 体	单 克 隆 抗 体	
		腹 水	培 养 上 清 液
抗体含量	0.1—1.0mg/ml	0.5—5mg/ml	5—25μg/ml
无关的免疫球蛋白	10mg/ml	0.5—1mg/ml	原则上没有
其他血清蛋白	存 在	少量存在	只有小牛血清
结合特性	与所有抗原决定簇结合	只与抗原中某一成分上的单个抗原决定簇结合	
特异性和亲和力的重复性	每批都不一样	不 变	
与其他抗原的交叉反应	与带有共同抗原决定簇的抗原反应	除非结合到一个共同的抗原决定簇上,一般无交叉反应	
与抗原的沉淀反应	有	无	
免疫球蛋白的类和亚类	所有类和亚类的混合	只有一种亚类	

这种细胞起反应,但它们只是分别针对某一种抗原决定簇的。换句话说,如果我们得到了20种不同的杂交瘤克隆,说明细胞表面至少有20个不同的抗原决定簇。以往用各种化学和物理方法检测出细胞表面每一个单个的抗原决定簇几乎毫无可能,用杂交瘤方法得到一个单克隆抗体就能找出一个抗原决定簇,而且它有可能对含量很少或抗原性很弱的抗原决定簇产生抗体。

2. 可以无限地、大量地产生特异性抗体

当得到稳定的杂交瘤细胞系时,可以用大量培养或给小鼠注射产生腹水制备大量抗体,而且杂交瘤细胞系可在液氮中长期保存。

3. 只要采取适当的筛选、鉴定方法可以用不纯的抗原制备纯抗体 由于产生单克隆抗体的原理和方法与产生普通抗体不同,因此单克隆抗体在某些性质上优于普通抗体(见表1)^[2]。

利用杂交瘤技术生产单克隆抗体使人类第一次有可能“制造”纯一的,不断产生的抗体。用它作工具有可能研究蛋白质的结构和功能,也可以分离纯化复杂的、一般方法不容易分离的蛋白质,或发现一些新的成份。

下面简述单克隆抗体在生物化学中的应用。

1. 利用单克隆抗体在复杂的混合物中测定某一组分的含量

因单克隆抗体具有在复杂的生物系统中鉴别某一单个抗原决定簇的独特能力,因此有可能利用它在复杂的混合物中测定某一组分的含量。例如在短杆菌肽抗菌素发酵过程中,研究短杆菌肽合成酶含量的变化,以往首先必须取菌体,用超声波将其粉碎,然后用硫酸铵沉淀,凝胶过滤、离子交换层析等方法将酶初步纯化,再进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,通过电泳谱的扫描来定酶含量,既费时,定量时误差又大。当得到了抗短杆菌肽合成酶的单克隆抗体时,就可以利用竞争性酶联免疫吸附试验直接从菌体匀浆液中测定酶含量^[3]。

在真菌毒素如黄曲霉毒素的检测中,利用抗黄曲霉B₁的单克隆抗体及放射免疫测定法可

在一小时内测出几十份样品中毒素的含量,灵敏度阈值约50PG。最近 Aage Haugen 等报道了一个抗黄曲霉素与DNA加合物的单克隆抗体,它与游离的黄曲霉素或其他黄曲霉素的衍生物之间没有交叉反应。利用这个单克隆抗体测定人不同组织中黄曲霉素-DNA加合物的含量可作为组织癌变的早期诊断。

2. 利用单克隆抗体的亲和柱分离、纯化蛋白质

因单克隆抗体能识别出复杂系统中的单个成份,所以只要我们得到了针对某一成份的单克隆抗体就有可能利用它做成亲和层析柱,在复杂的混合物中分离、纯化这一特定的成份。或从混合物中特异性地除去某一成份,从而可以研究这一成份的功能或与其他组分的相互关系。

在这方面一个典型例子是用单克隆抗体大量纯化人的白细胞干扰素^[5]。目前干扰素在临床上作为抗肿瘤和病毒的制剂,大规模制备和纯化是一个需要解决的问题。以前也曾想用抗人干扰素的普通抗体做成的亲和层析柱,作为一步纯化干扰素的方法。但在产生抗体时因为干扰素含量很低,制备和纯化过程较复杂,虽然最后能得到纯的干扰素,但要制备足以免疫羊或马这样动物的干扰素仍有一定困难,不易得到理想的抗体。而用单克隆抗体技术并不需要用纯抗原免疫动物。只需干扰素含量小于1%的蛋白质混合物免疫小鼠,然后与骨髓瘤细胞融合,以病毒核酸合成量的测定作为初筛方法,从杂交瘤中得到几个阳性克隆。经过再克隆及鉴定了杂交瘤细胞产生的抗干扰素抗体的特异性后,将瘤细胞注入小鼠体内,从腹水中制备大量抗体,提纯的IgG与CNBr-Sephrose相接做成亲和层析柱,受刺激的Namalwa细胞培养上清液除去了在pH2时沉淀的物质后,直接通过亲和柱使粗制的干扰素纯化5000倍(表2)。

从复杂混合物中除去某一成份的例子是用单克隆抗体免疫亲和柱,制备无凝血因子9的人血浆^[6]。诊断血液性疾病或血友病分类时需要这种无凝血因子9的血浆。用普通方法制备

表2 用免疫吸附柱纯化干扰素粗制品

	上柱前	上柱后
体积(ml)	100	0.5
干扰素滴度(U/ml)	7.2×10^4	1.4×10^7
总单位	7.2×10^6	7.0×10^6
A ₂₈₀	2.2	0.09
总蛋白量(mg)	220	0.04
比活性(U/mg)	3.3×10^4	1.8×10^8
纯化倍数	1	5300
产 量	100	97

抗凝血因子9的抗体,其主要困难是制备抗原。A. H. Goodall等利用杂交瘤技术得到一个抗凝血因子9的单克隆抗体,称为RFF-IX/1。280毫升血浆经过RFF-IX/1亲和柱可除去99%凝血因子9,而其他凝血因子不受影响(表3)。

表3 经RFF-IX/1亲和柱,血浆中凝血因子活性的变化

凝血因子	活性单位/100毫升	
	进柱前	流出液
II	79	73.6
V	57	60.5
VII	142	150
VIII	64	54
IX	82	<1
X	100	100
XI	98.5	93

单克隆抗体亲和层析技术本身是比较简单的,但有些问题必须充分考虑到,否则常常会导致失败。

(1) 从腹水中提取和纯化免疫球蛋白时,要经常测定特异性Ig是否存在,因为有些单克隆抗体的性质与一般Ig不同,如不经常测定而按常规方法操作容易丢失。

(2) 抗原的溶解 大部分单克隆抗体是抗细胞膜上的某些蛋白质,嵌在脂质层中的蛋白质可用二种方法溶解。一是在严格控制条件下,用蛋白质水解酶水解膜上的蛋白质;二是用去垢剂如脱氧胆酸、NP₄₀、Triton X-100等。在试用这些去垢剂时要注意溶液的pH、离子强度及去垢剂的浓度,否则会引起抗原或抗体变性。

(3) 抗体的亲和力太低或通过连接步骤使

抗体变性,必须区分上述二种情况,亲和力低是单克隆抗体内在的问题,对于这种抗体一般不宜做亲和层析柱。如果连接过程使抗体变性则可采用Protein A或抗抗体。

(4) 层析过程中也可能发生抗原滞留在柱上洗不下来,或洗脱下来的抗原变性失去原有的活性。必须充分考虑以上问题才能使亲和层析法成功地用于分离、纯化抗原。

3. 利用单克隆抗体研究蛋白质的结构和功能

用抗原免疫动物会产生针对抗原分子上不同决定簇的各种抗体。由于抗原分子上各决定簇之间有差异,反映在针对不同决定簇的抗体也有差异,这种差异表现在对决定簇的特异性及不同亲和力上。而单克隆抗体只与抗原分子上的一个决定簇结合,因此用一个抗原得到的一组单克隆抗体间的差异反映了抗原分子上不同决定簇之间的差异。有些抗体能干与某些生物活性,而另一些则无此作用。因此用这样一组抗体可以研究抗原的结构和功能。例如用单克隆抗体和蛋白质图谱技术研究乙酰胆碱受体的结构和功能^{[7][8]},以前用激动剂、拮抗剂、蛇毒和标记试剂作为探针探查乙酰胆碱受体上乙酰胆碱结合部位,但它们不能作为探查阳离子通道和受体大分子上另一些部位的探针。因此对乙酰胆碱受体大分子表面结构仍有待进一步研究。

自从单克隆抗体技术问世以来,已有一些实验室利用它研究乙酰胆碱受体(AchR),目前已经得到的抗AchR的单克隆抗体有70多个。因为单克隆抗体是抗大分子上单个抗原决定簇的抗体,所以它们是非常好的探针,可以用来研究AchR分子表面不同的结构,通过这些抗体阻断AchR的某些功能,也可以了解它的结构和功能之间的关系。

研究的第一步是确定这些单克隆抗体与AchR分子上哪些部位相结合。主要方法有以下几种。

(1) 用¹²⁵I-标记抗原,然后用蛋白水解酶将抗原水解成不同大小的片断,水解液与某个单

克隆抗体孵育,洗去未结合的抗体,加入连接第二抗体的 Sepharose 4B, 使它与第一抗体结合,然后将与第一抗体结合的抗原片断洗脱下来,在还原条件下进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,染色、干燥后在 X 光片上进行自显影。从自显影谱上可以确定哪一个分子量的蛋白质片断与加入的单克隆抗体反应。

(2) 用蛋白水解酶水解抗原,水解液进行 SDS 电泳,将电泳胶上的蛋白质区带转移到硝酸纤维素纸上,然后浸入含 BSA 和单克隆抗体的溶液中,作用一定时间后,洗涤,再浸入用放射性同位素标记的第二抗体或 A 蛋白中,作用后充分洗涤,然后在 X 光片上进行自显影。能显影的区带也就是能与加入的单克隆抗体反应的蛋白质片断。

(3) 比较简单的方法是将抗原的水解液进行 SDS 电泳,切割下不同的蛋白质区带,用缓冲液将蛋白质浸泡出来,再进行 ELISA 试验,以确定哪一个蛋白质片断与哪个单克隆抗体反应。

用上述方法得到经木瓜蛋白酶水解 AchR α 亚单位的单克隆抗体图谱 mapping (图 1)。

区带号	mAb 特异性	电泳谱	M.W
α	A11		40 — 完整的 α 亚单位
PA 5,6,8(A11)			34 — 含碳水化合物
PB 5,8,19(A11)			27 — 可被 MBTA 标记
PC 6,16			17 — 含碳水化合物
PD 5,8,19(3,6,10,13)			12
PE 6,16			10 — 含少量碳水化合物
PF 5,8,19 (3,10,13)			9
PG 8(6,10,13)			

图 1 木瓜蛋白酶水解 α 亚单位后的单克隆抗体 mapping 图谱

结果反映了不同单克隆抗体对 α 亚单位上不同部位的特异性以及这些部位蛋白质片断的初步性质。

此外比较了 AchR 含量丰富的膜微囊中及溶解在 1% Triton 或 1% 胆酸钠、或胆酸钠与脂质中的 AchR 与不同单克隆抗体的结合能力。mAb6 与天然的 AchR 及溶解在去垢剂中的 AchR 都能很好结合,说明它所针对的

抗原决定簇至少有一部分是暴露在受体外部。mAb3, 5, 19 与溶解在去垢剂中的 AchR 结合很好,但与天然的 AchR 结合差,mAb8 与溶解在 Triton 中的 AchR 结合好,几乎不与天然受体反应。单克隆抗体与天然 AchR 及溶解在去垢剂中的 AchR 结合能力不同,反映了它们所针对的抗原决定簇在细胞膜上的位置不同。与天然受体结合差的 mAb 所针对的决定簇可能受其他决定簇或膜的空间位阻的影响,即处于比较隐蔽的位置。

针对不同亚单位的单克隆抗体之间存在交叉反应,经过氨基酸顺序分析证明所有亚单位在 N-末端 57 个氨基酸之间有相似的排列。

已经确定了特异性的单克隆抗体,在大鼠上试验它们转移实验性重症肌无力的能力,或在肌肉细胞培养物中诱导 AchR 抗原的变化,及在重组 AchR 上阻断由氨甲酰胆碱诱导的 $^{22}\text{Na}^+$ 通透性增高,从而了解结构与功能的关系。

4. 利用单克隆抗体作为探针确定生物大分子在细胞内的位置

若能产生对某些分子如核酸、蛋白质、糖等的单克隆抗体,则对这些分子本身的研究以及利用它作为免疫试剂都有很大的作用。

考虑到目前对高等生物细胞的蛋白质定位还很了解。可用一些高度专一的单克隆抗体接上荧光物质作为探针来确定相应蛋白质在细胞中的位置。例如用细胞杂交技术得到 16 个抗 DNA 聚合酶 α 的单克隆抗体^[9],它们与 DNA 聚合酶 β 和 γ 都没有交叉反应,利用其中一些抗体和免疫过氧化物酶方法进行细胞化学研究,确定了这些酶在核质内的分布。处于有丝分裂的细胞中可以清楚地检测到 DNA 聚合酶 α ,当核膜消失时酶就分布到整个细胞浆内,这种特异性强的探针有利于了解复杂的哺乳动物 DNA 复制的生化机制。

5. 其他方面的应用

单克隆抗体也被用来作为研究激素受体的工具。过去研究激素和受体相互作用是采用将激素标上放射性元素,然后用它检测受体,在分离提取受体时跟踪受体的纯化程度及在靶细

胞里的生化反应。但激素与受体以非共价键结合,在实验过程中会发生移位或因受体蛋白变性而失去与激素结合的能力,而且标记的激素往往不能检测出刚合成的受体,因为它们尚未获得与激素结合的能力。对于已经结合激素的受体同样不能检查出来,理想的检查受体蛋白的方法必须不受上述因素的影响。用常规方法免疫得到的抗雌二醇-受体复合物的抗体,虽然对雌激素受体是特异的,但又与各种被试动物的生殖组织和肿瘤中的雌激素受体反应,由于这种抗体的异质性,对研究受体结构和功能以及受体蛋白在细胞内的定位等带来一定困难。相反利用杂交瘤技术得到的抗雌激素受体蛋白的单克隆抗体特异性强,可以用于研究不同种属间受体蛋白的异同,以及受体分子的结构和功能^[10]。人雌激素受体的单克隆抗体可以用它分析乳腺癌病人的雌激素受体,作为癌症预后和治疗的指标。

杂交瘤技术也已经用于小分子抗原,例如胰岛素、胸腺血清因子(FTS)^[11]等。将合成的FTS接到载体蛋白上免疫小鼠,然后取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合,得到抗FTS的单克隆抗体,它与其它胸腺肽——胸腺素、促胸腺素片断(TP₁)、泛素等无交叉反应。利用它作为探针可研究FTS在组织中的分布,特别是胸腺中的分布,也可以做成免疫吸附柱纯化FTS分子,或做成放射免疫测定箱作临床观察用。由于单克隆抗体的均一性及无限产生的特点,作为一种试剂可以标准化,因此进行放射免疫测定所用的常规血清将逐步为单克隆抗体取代。

单克隆抗体的优点在某种意义上又成了它的缺点^[12],由于这种同质纯抗体只能识别免疫原上一个单一的位点,它们不能与大多数抗原形成复杂的网络,因此单克隆抗体不能用在以沉淀反应为基本原理的检测方法,如双扩散、免疫电泳等;单克隆抗体具有局限的生物活性、固定的亲和性,不能识别具有同样决定簇的不同抗原,因此对单克隆抗体来说这种交叉反应性是无法用吸收的办法除掉;它们的反应也更多地受pH、温度、抗原/抗体比例等的影响。

单克隆抗体技术在生物化学中的应用还处于起始阶段,但已显示出某些其他方法所不能达到的优点。特别是在蛋白质结构和功能、细胞表面分子的研究中将成为一个特有的工具。

参 考 文 献

- [1] Köhler, G. et al.: *Nature*, **256**, 495, 1975.
- [2] Paul, A. W. Edwards et al.: *Biochem. J.*, **200** (1), 1, 1981.
- [3] 沈倍奋等:《内部资料》, 1982.
- [4] Aage Haugen et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4124, 1981.
- [5] David, S. Secher et al.: *Nature*, **285**, 446, 1980.
- [6] Goodall, A. H. et al.: *Blood*, **59** (3), 664, 1982.
- [7] William, J. Gullick et al.: *Biochemistry*, **20**, 2173, 1981.
- [8] Jon Lindstrom et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **377**, 1, 1981.
- [9] Shigeaki Tanaka et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, (14), 8386, 1982.
- [10] Geoffrey, L. Greene et al.: *J. Steroid Biochem.*, **16**, 353, 1982.
- [11] Ohga, K. et al.: *Clin. Exp. Immuno.*, **47** (3), 1982.
- [12] Joseph, M. Davie et al.: *Pharma. Rev.*, **34** (1), 115, 1982.

[本文于1983年5月11日收到]

固氮酶催化乙炔还原的色谱测定

蔡 玉 奎

(福建物质结构研究所, 福州)

一般认为¹⁵N₂同位素示踪技术是研究固氮作用最可靠的方法。Dilworth^[1] 1965年发现乙炔也是固氮微生物的一种底物,报道了巴

氏梭菌粗提液能还原乙炔为乙烯。Hardy和Knight^[2]最先用氢火焰离子化气相色谱法测定了还原反应的产物。此后,这一方法便成了研