

关于单克隆抗体

—Watson 教授的学术报告之二

美国冷泉港实验室主任 J. D. Watson 教授 (DNA 双螺旋结构模型建立者之一) 于 1981 年底在中国科学院生物物理研究所曾作过两次学术报告, 其中《肿瘤与 DNA》一讲已在本刊上一期发表, 现在再将《单克隆抗体》一讲刊出, 供参考。

——编者

近几年在冷泉港实验室所作的另一项工作是用一些高度专一性的单克隆抗体来探索细胞的结构。我们所以这样做, 是考虑到对比较高等的生物细胞中的蛋白质定位很不了解。我们试图把荧光物质缚到抗体上面, 用这些荧光标记的抗体作为工具 (探针) 来确定相应蛋白质在细胞中的位置。我们早期的工作大约是在六年前作的, 当时所用的是一些普通的抗体。在这种情况下如果把细胞里的蛋白走个 SDS 凝胶电泳, 我们发现那些同细胞运动有关的蛋白质含量最多, 比如一些肌肉蛋白 Actin、myosin 以及 tropomyosin 这类分子。最早的实验是用 Actin 作的。经 SDS 凝胶电泳纯化后将 Actin 从胶中取出来, 再用此 Actin 去免疫兔子制备抗体, 然后将这个抗体加到细胞膜已破裂、固定了的细胞中, 我们观察到抗 Actin 的抗体都是一些长形的东西, 看上去像非常细小的肌纤维。做成这个实验对我们来说是很幸运的, 因为后来发现要得到 Actin 的抗体很困难, 比如要得到兔抗小鼠的 Actin 抗体就很难, 因为 Actin 是非常保守的蛋白分子 (注: 即不是一个很好的抗原)。事实上后来很多人按我们的样子作类似的工作都没有得到成功。

后来, 我们应用了一种新的技术——单克隆抗体技术来得到特异性很高的抗体。在一个普通的免疫反应中, 当你用 Actin 免疫兔子, 在兔子的脾脏中有大量不同的细胞, 在每种类型的细胞中都产生抗体, 而对于给定的产生抗体的细胞, 只产生一种类型的抗体。如果在兔子中大量的细胞产生各自的抗体, 那么我们所得到的免疫血清是很多不同类型抗体的混合物, 这些抗体是对抗原表面的不同部位产生反应而形成的。

为了获得一个均一的抗体, 我们必须从一种或一类细胞中制备。在兔的脾脏中含有产生各色各样抗体

的细胞, 我们必须把这些细胞一个一个地分开, 取出单一的细胞进行培养、繁殖, 来制备抗体。遗憾的是正常的细胞经过几代繁殖后很容易死亡, 给实验造成困难。但人们发现癌细胞同普通的细胞不一样, 可以不断传代, 保持不死。正是根据这个道理 1975 年在英国剑桥工作的二位科学家 Milstein 和 Köhler 用细胞融合的办法解决了这一难题。他们想, 如果将产生抗体的正常细胞同肿瘤细胞融合, 或许可以得到一个容易传代培养的并能产生特异性抗体的细胞。

他们的实验是用纯化的抗原来免疫小鼠, 重复注射好多次, 这样鼠就会产生抗这个抗原的抗体。一般说在脾脏中有大量不同的细胞, 每一种细胞都产生不同的抗体。比如说你用 Myosin 分子作抗原, 因为一个蛋白质的分子上有数目不等的抗原决定簇, 那么对于此分子不同的部位而言就产生不同的抗体——也就是说鼠的脾脏细胞就会相应地产生不同的抗体。如果我们想得到一个抗体, 使特定的细胞在培养的条件下活一段时间就够了, 并不要求其无限地活下去; 但如果想得到一个能长期产生抗体的细胞株, 我们就采用细胞融合的办法, 将所要的单个细胞同肿瘤细胞融合, 经融合后的细胞就含有两套染色体, 成为一个杂种细胞。这种细胞有一种容易失去它的染色体的倾向, 因此它的染色体数目不一定是准确的 $4N$, 而常常维持在 $4N-2N$ 之间。如果最终的细胞含有原来产生抗体的细胞染色体的话, 那么这种细胞还可以再产生抗体, 并在培养基上不断地培养下去, 无终止地进行繁殖。因此如果你得到一个抗 Actin 的单克隆的话, 就可以长期地延续下去, 不需要再做了。

有时也会丢失产生抗体的 $2N$ 染色体, 这样细胞就失去产生抗体的能力。不过在我们的实验中很少出现这种情况。

产生单克隆抗体的一个简单的办法是取一个通过与肿瘤细胞融合得到的杂交细胞注入小鼠的腹腔中, 这样小鼠就会长瘤, 从一个小鼠的腹水中可以得到 1 克的产生抗体的细胞。从一个小鼠的腹水中可以得到 5—10mg 的纯抗体。一般说来有这个数量就可以作不少的研究了。当你做出了一个单克隆抗体后, 就可以用同样的方法做其他蛋白质的抗体, 然后就可以用荧光标记的办法来确定相应蛋白质在细胞中的分布和准确

的位置。从理论上听起来做这种实验相当容易,但实际上做这种细胞融合的工作,要得到相当稳定的细胞并不是很容易的事情。如果是一个非常努力的科学家,一年之内可以得到5—20个比较好的结果。

常规的抗体是一个抗体的混合物,它们是由各种产生抗体的细胞产生的;它们都有专一性,但常常跟其他种之间产生交叉反应。一个单克隆抗体假定同一个抗原上的四个氨基酸反应,这四个氨基酸对于各种种属来讲可能是共同的,或只对鸡来说是特异性的;而我们常常见到的是从鸡的蛋白质作的单克隆抗体只对鸡的有专一性反应,而对人或哺乳类动物就没有专一性反应。如果你有 ala-glu-cys-pben 序列,可能在好几种蛋白质中都存在这一序列,所以在理论上而言,单克隆抗体有时也不是完全专一的,也和它不相关的抗原起反应。但在实际工作中我们发现其相当专一,很少看到其发生交叉反应。如前所述,做单克隆抗体并不是很容易的事,因为如果你当初用于免疫的抗原不是一个很纯的产物,而存在其它蛋白质的污染(这种污染那怕只有5%),结果你所得到的抗体可能就不是你想要得到的,而是由于污染的蛋白质所造成的抗体。因此在得到单克隆抗体之后,必须最后检查一下此抗体对原来抗原的专一性如何。综上所述,目前要得到单克隆抗体有二种方法:细胞培养法及注射杂种细胞到小鼠腹腔中,从腹水中制备单克隆抗体。一般人们常采用后一种方法,因为此法可以得到大量的产物。

在冷泉港实验室用单克隆抗体技术对肌肉细胞蛋白及神经系统细胞的蛋白进行了研究:分离纯化了一些肌肉蛋白质的单克隆抗体(如抗 myosin、tropomyosin、troponin 的单克隆抗体),经荧光标记后同肌纤维起反应,确定这些蛋白在细胞中的精细位置、走向及相互关

系。例如可以得到抗 tropomyosin 的不同的单克隆抗体,当同 tropomyosin 反应时,发现不同的抗体同 tropomyosin 不同的部位起反应。人们用下列的方法来确定一个单克隆抗体的专一性:将蛋白走个 SDS 凝胶电泳,然后将蛋白从凝胶上转移到滤纸上,再同单克隆抗体反应(单克隆抗体预先用放射性进行标记),如果我们转移到滤纸上的蛋白同特定单克隆抗体产生免疫反应,通过放射自显影,就可以确定其专一性。也可以将所要分析的蛋白质走二维凝胶电泳,再同单克隆抗体反应,用此方法可鉴定一些不为我们所了解的新的蛋白质。虽然说用蛋白质混合物作抗体要特别小心,但有时我们有意地专门用不纯的蛋白质来做单克隆抗体,因为我们一旦偶然间得到一个未知蛋白质的单克隆抗体,我们就可对此蛋白质进行定位,进一步研究其在各种细胞中的分布以及功能特性。目前冷泉港实验室把主要的力量放到研究细胞骨架的蛋白质上,因为认为在细胞骨架上可能存在少量的蛋白质,这些蛋白质对细胞骨架的功能可能是很重要的。

神经系统中有很多神经细胞,以不同的方式连接起来,它们有非常高度的专一性。神经细胞这种高度的专一性是生物学研究中的基本问题。人们推测这可能同神经细胞的表面有关,不同类型的神经细胞在其表面有不同的蛋白质分子,这些不同的分子在互识别和专一性的传导,连接可能起着重要的作用。冷泉港实验室也应用单克隆抗体技术对蚂蟥神经系统各种神经细胞的专一性及各种有关蛋白质的分布、特性及功能进行研究。

[静国忠整理]

科技消息

单克隆抗体产生技术展望

单克隆抗体产生技术是均匀抗体,其优点是:1. 不是非均一的;2. 可以获得同一产物是无限量的;3. 可以用不纯的抗原得到纯的抗体。其缺点是:1. 固定的亲和性;2. 局限的生物活性;3. 缺乏凝集和沉淀活性。

目前产生单克隆抗体的方法有三种:

1. 敏化淋巴细胞与骨髓瘤细胞瘤细胞融合(包括血清免疫,细胞融合,抗体测定,离体及活体 expansion, 杂交细胞冷冻与贮存)。

2. 离体敏化淋巴细胞转化。

3. 敏化淋巴细胞与长期培养的 β 淋巴细胞融合。

单克隆抗体的特殊应用有:1. 免疫组织配伍或抗原分化,2. 分化肿瘤或在 allogenic 系统不具有免疫性

能的细胞表面抗原,3. 病毒与细菌抗原,4. 单一抗性的决定因子(determinates)对应于广谱的蛋白质、核酸及多糖等。

此种技术的发展前景包括离体敏感性人淋巴及人单克隆抗体扩大产物用于整体诊断、免疫治疗及治疗用载体。与 Xenogenic elicited 抗体相反,整体应用人单克隆抗体不会发生血清病及 Anaphylactic 反应。今后人克隆抗体的需要有:1. 毒素及感染剂的被动免疫;2. 免疫学的 modulator 到抗原移植, idiotypic site 在另外抗体及细胞表面受体;3. 特异肿瘤抗体用于治疗及放射免疫 scintigraphy;4. modulator 或中和药物及激素。

[摘自 Clin. Chem., 27(6), 981, 1981.]