

技术与方法

杂交瘤技术简介

董志伟

(北京市肿瘤防治研究所)

一、什么是单克隆抗体

1975年 Köhler 和 Milstein 报告,将经绵羊红细胞免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合,获得可在体外连续培养并能分泌抗绵羊红细胞抗体的杂交瘤细胞株。该细胞株所分泌的抗体非常均一,为单克隆抗体。从此,采用杂交瘤细胞技术制备针对特定抗原的单克隆抗体的技术广泛地渗透到生物学和医学的各个领域,成为近代生物学研究技术的革命性突破之一。

事实上,单克隆的概念来源于 50 年代 Burnet 的无性繁殖细胞系选择假说。该假说认为,每一个抗体形成细胞(B 细胞)及其分化的后代(浆细胞),被称为一个克隆。它是只能产生一种针对单一抗原决定簇的抗体,而且这是遗传决定了的。在免疫过程中,一般抗原均含有多数决定簇,因此能刺激多个 B 细胞克隆产生反应,即使抗原含有单一决定簇,但仍能刺激与其亲和力不同的多个 B 细胞克隆产生反应,因此产生的抗体是多克隆的,其性质极不均一。

二、单克隆抗体的特点

采用杂交瘤细胞技术所制备的单克隆抗体与常规免疫所获得的多克隆抗体有很大的不同。首先单克隆抗体是针对单一抗原决定簇的,其抗体特异性以及其对抗原表面结构的分辨能力是多克隆抗体无法比拟的。其次,单克隆抗体与其对应抗原的亲和力是均一的。由于单克隆抗体的高度均一性,其生物学特性及物化特性亦不同于多克隆抗体。如单克隆 IgG,

其 Fc 片段可以具有固定补体、与 Fc 受体结合的功能,但亦可完全缺如;不象多克隆抗体,由于其含有各种 IgG 亚型,一般均具有这些功能。由于单克隆抗体仅与单一抗原决定簇结合,不易使抗原抗体结合形成方阵结构,因而不易形成沉淀、凝集等反应。此外,单克隆抗体对 pH、温度等因素亦较为敏感,易于变性。单克隆抗体为杂交瘤株所分泌,而该杂交瘤株可冰冻于液氮中长期保存,这就使单克隆抗体成为一种非常稳定的、可重复制备的试剂,它不象多克隆抗体,易受抗血清批号、被免疫动物的个体,及免疫吸附程序等的影响。产生单克隆抗体的杂交瘤株可在体外扩大培养,亦可由被接种小鼠的腹水及循环血中获得;因而一旦获得稳定的杂交瘤株,单克隆抗体的来源是无限制的。

三、生产单克隆抗体的杂交瘤技术

为了更好地理解杂交瘤技术,下面扼要地叙述细胞中 DNA 合成的过程。一般细胞通过两个途径合成 DNA。一是全合成过程,即由 CO₂、甘氨酸、天门冬氨酸、叶酸、NH₃ 等合成嘌呤和嘧啶,再合成 DNA;另一是旁路,由内源或外源性嘌呤(如次黄嘌呤)、嘧啶(如胸腺嘧啶)合成核苷酸,再合成 DNA。后一途径中,如利用次黄嘌呤,则需次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核苷转移酶(HPRT);如利用胸腺嘧啶,则需胸腺嘧啶激酶。氨基喋呤一类的抗代谢药物可阻断 DNA 的全合成过程,而 8-杂氮鸟嘌呤及 6-巯基嘌呤等药物可阻断 HPRT 阳性细胞的 DNA 合成旁路。HPRT 阴性的细胞不能通过旁路合成 DNA。

1. 杂交瘤株的来源

用于产生杂交瘤株的小鼠骨髓瘤株是来源于用矿物油注射 Balb/c 小鼠而诱导的浆细胞瘤 MOPC21。该细胞株经 8-杂氮鸟嘌呤筛选而得到 HPRT⁻ 的变种 P3/X63-Ag8。而后经筛选又得到目前常用的 HPRT⁻、且不分泌 Ig 的 NS1-Ag4-1 及 SP2/O-Ag14 等瘤株。小鼠脾细胞来源于经一定抗原免疫的 Balb/c 小鼠,一般于末次免疫后3—4天,取其脾脏制备细胞悬液备用。其中应含有能分泌抗特定抗原的 Ig 的浆细胞,这些细胞的 HPRT 是阳性的。

2. 细胞融合与培养

细胞杂交是将 HPRT⁻、不分泌 Ig 的小鼠骨髓瘤细胞与 HPRT⁺、分泌抗特定抗原的 Ig 的小鼠脾细胞在聚乙二醇 (PEG) 等促融合剂的作用下进行融合。而后给以含有次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸腺嘧啶的选择性培养基 (HAT)。在选择性培养基中,未融合的脾细胞及骨髓瘤细胞都将逐渐死亡。前者是由于正常细胞不能在体外培养中连续传代,后者是由于 HPRT⁻ 细胞不能在选择性培养基 HAT 中通过旁路合成 DNA,而 DNA 的全合成过程又受到氨基嘌呤的阻断。只有杂交瘤细胞,既具有骨髓瘤细胞可以在体外连续培养的特性,又具有脾细胞来源的 HPRT,可以通过旁路合成 DNA,从而能够在 HAT 培养基中不断繁殖。而其中的某些杂交瘤细胞具有分泌抗特定抗原的抗体的功能。

3. 筛选分泌特定抗体功能细胞

在具体操作中,已经融合并置于选择性培养基中的细胞是在多孔组织培养板中培养的。已经生长的细胞不一定都具有分泌特定抗体的功能,因此必须建立一定的筛选方法用以保留那些具有分泌特定抗体功能的细胞。由于检测的对象是被培养细胞的上清液,而样品数量又多达数百、数千,所以筛选的方法必须灵敏、快速、一次可测定大数量样品。目前常用的筛选方法是固相化的放射免疫法 (RIA) 或酶联免疫吸附法 (ELISA)。其基本步骤是将抗原吸附于多孔塑料板上,而后加入培养液的上清,如其中

含有针对该抗原的抗体(鼠 Ig),则此抗体将与固相化的抗原结合,然后再用放射性同位素或酶标记的抗鼠抗体显示该特异抗体的存在。如抗原为细胞,亦可将细胞交联于多孔塑料板上进行。

4. 克隆化

经筛选所保留的细胞群仍然是相当混杂的,其中只有少数细胞具有分泌特定抗体的功能。要获得稳定的、分泌特定单克隆抗体的细胞株,则必须使其“克隆化”。常用的方法是稀释法。将含有分泌特定抗体的细胞群稀释到一定浓度,再接种到多孔组织培养板中,使每孔含一个细胞。如此反复稀释、反复筛选即可得到纯净的分泌特定单克隆抗体的细胞株。稀释后的细胞应加入饲养细胞帮助生长。常用的饲养细胞有小鼠腹腔巨噬细胞,小鼠胸腺细胞及脾细胞等。

至此,通过融合、选择培养、筛选及克隆化等步骤,即可获得能在体外连续培养、可在液氮中无限期保存、分泌针对单一抗原决定簇的单克隆抗体的细胞株。将该细胞扩大培养可以得到一定量的单克隆抗体。事实上,将此细胞株接种于 Balb/c 小鼠或裸鼠,然后由其腹腔液及血循环中分离抗体是更为实际的获得大量单克隆抗体的途径。进一步的工作是用化学的或免疫化学的方法确定该细胞株所分泌的是单克隆抗体。经纯化的单克隆抗体,在区带电泳中是一个狭窄的带,而多克隆抗体是较为弥散的带,在免疫电泳中,单克隆抗体与对应的抗原可见对称的新月形的沉淀线;在免疫扩散中可证明单克隆抗体含有单一的重链及轻链。最为简洁明快的方法可能是等电聚焦电泳,单克隆抗体表现为 3—5 个非常接近的狭带,这是由于单克隆抗体在合成和代谢过程中形成的微差异性所致。

四、杂交瘤技术的应用

杂交瘤技术的第一个优点就是它提供的单克隆抗体具有高度的特异性和稳定性,有如化学试剂一般,且可大量制备。因此单克隆抗体

在很多应用中有代替常规抗血清的趋势。已经采用杂交瘤技术制备了针对人体多种血清成分、血型抗原、移植抗原、激素受体、神经介质、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)及各种微生物的单克隆抗体,且部分已经商品化。这些单克隆抗体的应用提高了检测方法的灵敏度及特异性,且不必顾虑抗血清批号的不同。如采用单克隆抗体检测肝炎B抗原,其最低限可达0.1 ng。

杂交瘤技术的另一个优点是可以从复杂的抗原系统中得到针对单一抗原的单克隆抗体,因此被广泛地用于细胞分化抗原及肿瘤表面抗原的研究。如 Schlossman 等制备的单克隆抗体可用以鉴别T细胞及B细胞,以及T细胞的亚群、T抑制细胞及T辅助细胞。Levy 等制备的单克隆抗体可以鉴别外周循环及骨髓中急性淋巴性白血病的恶性细胞。此外在病毒和寄生虫的研究中单克隆抗体的应用也很活跃。这对诊断方法的改进以及新的更有效的疫苗的制备都将是很有益的。

针对白血病、淋巴瘤表面抗原的单克隆抗体已被用于这些恶性疾病的治疗,但目前仅能使病情暂时缓解,而且反复应用后失效。单克

隆抗体还被用做特异的导向载体,如使之与植物毒素相结合,以期运载这些毒素到达特定部位杀伤肿瘤;标记用同位素,辅之以体外扫描技术,以期确定肿瘤的部位及大小或发现转移灶。如能制备人体来源的单克隆抗体,被动免疫必将得到更广泛的应用。这方面,Olsson 和 Kaplan 已经取得了初步成功。

杂交瘤技术应用的一个新方向是建立单克隆的功能细胞株。一些实验室已经获得了产生抑制因子的T细胞杂交瘤,以及具有巨噬细胞样性质的杂交瘤株。功能细胞株的建立可能导致采用B细胞,T细胞及巨噬细胞的均一群体进行细胞免疫重建,也可能获得分泌生长因子、激素,细胞分化产物的各种单克隆细胞株。

五、结 语

无疑,杂交瘤技术的应用已经改变了血清学分析和免疫化学技术的面貌,它对免疫学的深入研究是一个无比犀利的武器,对其他学科的研究也起着积极的推动作用。积极研究和应用这项技术对我国生物学和医学的发展是非常重要的。

甲胎蛋白放射免疫简易快速微量测定法

袁振铎 余永光 任淑卿 李丽娟

(北京市临床医学研究所生化研究室)

甲胎蛋白(AFP)是诊断原发性肝癌的比較可靠指标之一,而且也可参照它预测异常胎儿。为了简化测定手续,我们对放射免疫AFP硫酸铵沉淀法做了改进^[1],改进的方法具有简易、快速、微量的优点,更适于临床检测和大面积普查。

一、试 剂

1. 放射碘化甲胎蛋白的制备 用伊文氏兰作清蛋白区域指示剂,将胎儿心血清经聚丙烯

酰胺凝胶电泳分离得AFP初制品。其中含有清蛋白, α_1 -球蛋白等杂质。将初制品进行放射碘化(氯胺T氧化法),然后与兔抗正常人血清共同保温4小时,使被标记的清蛋白等杂质与相应抗体结合成复合物,最后用硫酸铵分部沉淀除去杂质,获得高纯度的放射碘化的AFP。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离AFP比亲和层析法温和,易得到高活性AFP抗原。在碘化过程中需注意保证最小体积反应物,最适pH,并要充分搅拌,方能获得高标记率及高产量。