



单克隆抗体和细胞表面抗原*

C. Milstein, G. Galfre,

D. S. Secher and T. Springer

如果一支动物被注射了异种或同种异系的另一支动物的细胞时,就会产生抗体应答反应。这种反应包括产生针对注入细胞的循环抗体。细胞含有大量的表面抗原,即能为反应动物的免疫系统识别为非自身的结构。每一种抗原能被针对其不同区域(即独立的抗原决定簇)的各种抗体所识别,但是每个抗原区又能被许多针对重迭决定簇的抗体识别,甚至同一个决定簇还常常被几个抗体结构识别。这样,就产生了免疫系统所特有的极为复杂和高度异质性的反应。根据克隆选择学说,每一个产生抗体的克隆由特定抗原所选择,进一步繁殖,产生一种预先决定的抗体结构(Burnet, 1969)。因此,这种异质性是由应答细胞克隆的极大的复杂性确立的。

免疫球蛋白生成细胞的肿瘤,或者像人类的骨髓瘤那样自发产生,或者能实验诱发。这些肿瘤产生并分泌大量的骨髓瘤蛋白——一种抗体活性未知的免疫球蛋白。因此,骨髓瘤蛋白是针对未知抗原随机集合的一群抗体。然而,长期以来骨髓瘤蛋白是制备纯Ig的唯一来源,由于这一原因,它也是结构研究方面的一种非常宝贵的工具。

抗体是由轻链(L链)和重链(H链)组成的。每条链均由两个片段组成,我们称其中一个片段为可变区,另一片段为恒定区(Hilschmann & Craig, 1965)。抗体结合点由可变区的氨基酸顺序所规定,而后者决定着免疫系统的蛋白质结构特性中独特的多样性。V-区由多个V-基因编码,而C-区能由单个基因编码(Milstein, 1967)的认识,必然导致了在基因组内V-和C-基因应是分开出现的假定(Dreyer & Bennett, 1965)。目前这一假定已更直接地从骨髓瘤和胚胎或其他组织的DNA的限制性内切酶解片段之间的差异得到了支持。因此,在分化的某阶段发生了与抗体合成有关的DNA重排。但是,即使在骨髓瘤细胞中,在这种重排发生过后,V-和C-区的DNA顺序仍不是啮接的(Tonegawa等人, 1976; Rab-

bits & Forster, 1978; Brack & Tonegawa, 1977)。另一方面,mRNA的顺序分析表明V-和C-顺序之间是不间断的,并且蛋白是从一个连续的mRNA上转译下来的(Milstein等人, 1974)。所以,在不连续的骨髓瘤的V-和C-区DNA上的转录与连续的mRNA表达之间的某一步骤发生了最终的重排或拼接。

杂交骨髓瘤细胞与V-C整合的特异性

我们进一步知道拼接或重排是顺式的,就是说它不涉及V-和C-区前体RNA或DNA分子库的产生。这是从Cotton & Milstein (1973)的一个关于形成杂交细胞的实验得知的,这种杂交细胞能表达Kappa轻链之不同的两套V-和C-区。用来自小鼠和大鼠的细胞进行的试验保证了C-区的差别(图1)。图1所描述的实验必须是在小鼠和大鼠细胞间进行,因为小鼠的Kappa轻链的C-区没有已知的遗传标记,从而不可能在小鼠的两个不同C_x-区之间找到差异。

重链的标记则简单得多,因为所有类别和亚类的重链都共有V_H-区。因而,即使在同一品系的小鼠之内,也能检测出合成两种不同重链的细胞上V_H和C_H的不同组合的随机表达。循此思路做的实验肯定了在图1实验中得出的一般结论(Köhler & Milstein, 1975; Milstein等人, 1977; Margulis等人, 1977)。

最近,这类观察已扩展到大量用其他骨髓瘤及抗体生成细胞(包括不同型别和重链类别)进行的例子了。在有些实验中,人们曾尽力去诱导反式整合,但未获成功。换言之,表达两种免疫球蛋白,其中一种是属于能溶绵羊红血细胞的μ类,另一种是属于无抗体活性的IgG1的杂种细胞,仍保持分别独立的表达。

* 经作者与出版者许可,翻版自Ciba Foundation Symposium No 66 "Human biology: Possibilities and realities" Excerpta Medica, Amsterdam,

从 10^5 个克隆中,找不出一个 IgG1 分子中有抗 SRBC 活性的克隆。用抗 TNP 抗体生成的杂种细胞进行试验,也获得类似的结果(Milstein 等人,1977,以及未发表的实验)。

小鼠—大鼠骨髓瘤杂种细胞

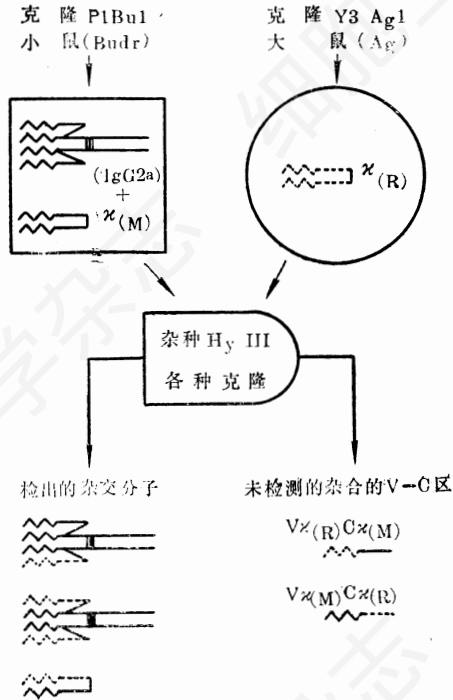


图 1 抗体基因在杂交骨髓瘤细胞中的共显性的顺式表达

资料来自 Cotton & Milstein(1973),图解复制自 Milstein & Köhler(1977)。

通过细胞融合获得抗体生成细胞株

两个免疫球蛋白生成细胞的融合引起两种免疫球蛋白的共显性表达。表现出 H-和 L-链的不同组合的混合分子是由杂种细胞产生的,而不是由混合的细胞群产生的,这表明它们是在细胞内形成的(Cotton & Milstein,1973; Köhler & Milstein, 1975)。这些实验提示骨髓瘤细胞可能和另一种抗体形成细胞形成杂种细胞,骨髓瘤细胞产生的免疫球蛋白的抗体活性虽不清楚,但有在培养中永久生长的能力,而另一种细胞能产生很明确的抗体,但是它作为动物的抗体生成细胞,其寿命是有限的(Köhler & Milstein, 1975)。

这种融合(图 2)产生的永久的杂交细胞株,能够在组织培养中以及作为移植瘤永久地生长,它具有产生由正常接触过抗原的亲代细胞表达的特异抗体的能力。以这种方式产生的第一种抗体是抗 SRBC 和抗 TNP 半抗原的(Köhler & Milstein, 1975, 1976; Milstein & Köhler, 1977)。融合技术经过技术上的改进,引进筛选和纯化有活性的克隆的方法,已被用来产生分泌针对大鼠主组织相容性复合体的细胞表面抗原的单克隆抗体的杂交骨髓瘤(Galfre 等人,1977)。此后,还生产了大量的它种抗体(表 I),所得到的结果已成为最近一次讨论会的主题。1978年4月在 Bethesda 举行的关于 T 和 B 淋巴细胞瘤的功能特性的这次讨论会的会议录正编入“Current Topics in Microbiology and Immunology”一书中。迄今积累的经验趋于表明这一操作程序是十分普遍适用的,凡动物能产生的任何抗体,也都能通过骨髓瘤杂交株制备成单克隆抗体。

抗 SRBC 的杂交细胞

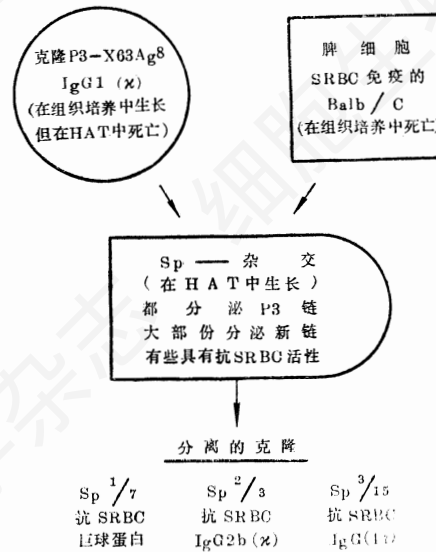


图 2 将寿命短暂的脾细胞之产生特异抗体的能力在永久的组织培养细胞株中固定下来

对这种技术的兴趣主要出于两个基本考虑。首先,由一个单一克隆所产生的单克隆抗体是一种很明确的化学物质,而不是那种因免疫动物,甚至因每次放血而异的不明确的异质性混合物。这些永久的培养细胞能无限地提供化学结构完全相同的抗体。其次,这

表 I 采用杂交—骨髓瘤技术产生的单克隆抗体的例子

抗下列抗原的抗体:

红血细胞(绵羊、人)
半抗原(TNP, NP)
蛋白质(γ -球蛋白)
碳水化合物(细菌的细胞壁、福斯曼抗原)
酶(过氧化酶、溶菌酶)
病毒(流行性感冒)
主组织相容性抗原
其他细胞表面成份(分化抗原)

种技术对于用未纯化的抗原来制备纯的抗体是极为理想的。

从不纯抗原制备纯抗体

如引言中所指出的那样, 动物对特定抗原刺激的抗体应答反应是非常复杂的。当把一种动物的细胞注射到另一种动物体内时, 尤其是这样。免疫动物的血清含有许多针对细胞表面多种组分的抗体。产生多个抗体以针对单个抗原, 甚至针对单个抗原决定簇也是很可能的(图 3)。

还有一个更有趣的复杂情况。免疫用的细胞本身是类型不同的细胞构成的复杂细胞群。所以图 3 中

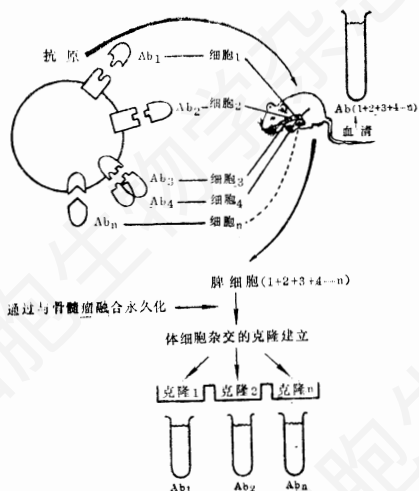


图 3 动物和杂种骨髓瘤的抗体生成

从杂种骨髓瘤融合细胞中分离出的克隆, 使可能从复杂的混合抗原开始, 来制备针对单个抗原决定簇的单特异性的纯抗体。

作为免疫原的假设细胞所示的抗原结构, 因细胞类型不同而略有不同。这些抗原存在于某些类型的细胞中, 但不存在于另外一些中, 称为分化抗原。据此我们可以识别并将一种细胞与它种细胞分离开来。只能通过细胞表面的抗原特征来加以区别的细胞异性的一个极端例子, 是那些仅仅在它们合成的受体(抗体)的结构方面有所不同的 B 细胞。

如此复杂的抗原刺激的结果, 是更为复杂的抗体应答反应。如此复杂的抗体混合物的用途受到严重的限制, 并且需要大量的提纯工作。然而, 每个抗体生成细胞却被指定去合成单种抗体。通过与骨髓瘤融合, 就可以将个别细胞一时性表达的特征以永久的杂种细胞培养物的形式固定下来。这类培养物可采用通常的细胞培养技术, 因此可通过继代建株 (subcloning) 来使其纯化和稳定(图 3)。通过分离分析, 能够得到亚克隆, 从而排除与抗体活性无关的骨髓瘤成分 (Köhler & Milstein, 1976; Milstein 等人, 1977)。最终产物是一批永久的细胞株, 其中每一株产生一种不同的单克隆抗体。

大鼠、人和小鼠的分化抗原

产生分化抗原的这类研究, 首先是用于获取大鼠细胞膜 (Williams 等人, 1977) 和人类扁桃腺细胞 (Barnstable 等人, 1978) 的小鼠抗体。表 I 中列举一些已经建立的克隆以及它们的特性。我对这些不作深入的讨论, 因为有关它们的细节在上述参考文献中都能找到。

更近的实验包括产生小鼠分化抗原的单克隆抗体。通过常规方法已描述的分化抗原约有 20 种。通过用异属免疫制备的单克隆抗体的随机混合物来得到能发现新抗原的频率的资料是很有趣的。用小鼠脾细胞免疫大鼠, 将免疫的大鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤 NST/1-Ag4-1 融合。融合后亦即将细胞群分成许多数量的培养物。两周后, 所有培养中的杂交株均得以生长, 其上清液中的抗体的存在可通过将用过的培养液与靶细胞(此例中为小鼠脾细胞)混合来加以测试。几乎所有培养物中的已结合的大鼠抗体的存在均由 ^{125}I -抗大鼠 Ig 所证实(图 4)。由于有这样多的阳性培养物, 我们一方面进一步扩大培养, 一方面冰冻贮存以供日后研究。这样就让生长最旺盛的克隆在培养中占优势, 并且随机地纯化和研究了十种不同的杂交克隆。有些克隆抗体与脾细胞的结合很弱。只有当我们开始用几组肿瘤细胞进行工作时, 它们真正的意义

才显示出来了 (Stern 等人, 1978; Springer 等人, 1978a)。

表 I 总结了分离的抗体及其靶抗原的特性。该表指明十个单克隆抗体可分为四类。在各类之中, 抗体本身之间的差异能根据几方面的性质, 特别是分离链的电泳特性给以证实 (Springer 等人, 1978a)。它们全都是分化抗原。以前用同种异体免疫方法均未将它们辨认出来, 虽然其中一种可能是和用化学和免疫学方法检出的一种主要的碘化的膜组分相同的成份 (与 M1/9.3 和 M1/89.18 反应的成份)。福斯曼抗原是一种嗜异性的抗原, 这在文献中早已有记载 (Humphrey & White, 1963)。另外两种抗原在细胞上的分布非常有趣。尤其是其中之一——M1/70.15——似乎存在于巨噬细胞及其前体中。我们能指出两者之间有趣的关系, 即它们在巨噬细胞与其前体中的表达在量上成反比。例如从单核细胞分化为腹腔渗出液的巨噬细胞, 伴有 M1/70 所识别的抗原的显著增加,

然而 M1/69.19 所识别的抗原情况似正相反。因此, 看来随机得到的单克隆抗体是检测具有新抗原性的表面成份的一种有用的方法。将脾脏用来作融合的大鼠的抗血清与单克隆抗体所沉淀的 ^{125}I -标记膜成份作一比较, 前者显示出的带远比单克隆抗体的为多 (图 5)。因此, 在上述实验中, 迄今所分离的杂种克隆仅代表许多对免疫起应答反应的克隆中的少数几个。

单克隆抗体的应用为分化抗原表达的定量研究引入了一种更可靠的工具。荧光激活细胞分类器 (Loken & Herzenberg, 1975) 这类仪器能测量大量的单个细胞的荧光强度, 并可对各细胞中的抗原的表达进行定量比较。同时, 通过光散射还能测量细胞的大小。

这两种参数的同时显示为细胞亚群的分析增加了一个新的量纲。这在图 6 中得到清楚的说明, 图中不同的亚群是由单克隆抗体以及双维图或细胞指纹图谱的方式很清楚地给以确定的。这样的细胞指纹图谱一般

表 I 大鼠和人的细胞表面抗原的单克隆抗体

小鼠抗大鼠*

克 隆	靶 抗 原	组 织	细胞的识别	抗 体
W 3/13		淋巴样的 骨髓 脑	T 细胞 髓样的(?)	IgG
W 3/25 HL		淋巴样的	T 细胞亚群 (包括**辅助和 GVH 功能细胞)	IgGI
W 3/15 HLK		血液 骨髓 胸腺	红细胞 红细胞样的(?) 前体细胞	IgG
W 3/4 HLK		淋巴样的	B 细胞	IgM
小鼠抗人***				
W 6/1 HLK	A 血型	血 液	红 细 胞	IgM
W 6/32 HLK	HLA	广泛分布	广泛分布	IgG 2
W 6/34 HLK	由染色体11 控制的 (糖类?)	广泛分布	广泛分布	IgG 2

参考文献: * Williams 等人(1977)。

** White 等人(1978)。

*** Barnstable 等人(1978)。

表 II 抗小鼠分化抗原的大鼠单克隆抗体

克 隆	抗 体	细胞的识别	抗 原	120 °C 时抗原的稳定性
M 1/9.3 M 1/89.18	IgG IgG	白 细 胞	210,000 M.W.*	不 稳 定
M 1/70	IgG	巨噬细胞 及其前体	190,000 M.W.* 105,000 M.W.	不 稳 定
M 1/75	IgG	MRBC. 不位于胸腺细胞上	无碘化的成份**	稳 定
M 1/69	IgG	MRBC 和大部分		
M 1/22.54	IgG	白细胞、胸腺		
M 1/89.1 M 1/9.47	IgG IgG	细胞但不是外周T细胞		
M 1/22.25 M 1/87	IgM IgM	绵羊 RBC 但 MRBC 无 小鼠畸胎瘤 小的细胞亚群和早期胚胎**	福斯曼抗原	稳 定

* 免疫沉淀物用 SDS-PAGE 分析。

+ 这类抗体本身之间竞争与小鼠红血细胞(MRBC)结合。

** Stern 等人(1978) Willison 和 Stern(1978)。

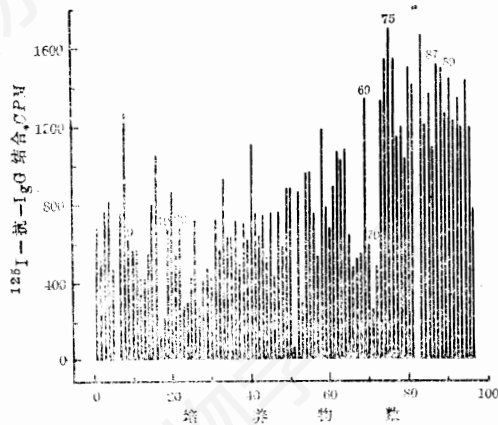


图 4 大鼠抗小鼠杂交骨髓瘤上清液的脾细胞结合活性

数字是指本次实验取得的杂种克隆的培养标数。可用来鉴定抗原靶和抗原的变异以及确定新的细胞亚群。

W3/13 可在胸导管T细胞上见到, 亦存在于骨髓细胞的一类亚群细胞(可能是髓细胞样)和脑细胞上, 但在B细胞上则未发现(表 II)。

M1/22.25 在脾细胞的小亚群(显然是准成红血球)上表达, 并且在畸胎瘤上和4天的小鼠胚胎细胞上(但不在这一时期之前)表达极强(表 II)。M1/69 在大部分白细胞和胸腺细胞中, 但在密切相关的外周

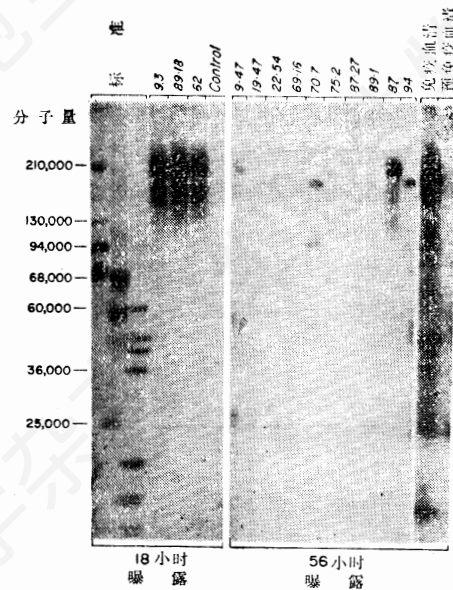


图 5 供脾(作融合)动物的血清中抗体克隆前后的培养物上清液所沉淀的表面分子

刀豆球蛋白A刺激后的脾细胞, 经乳过氧化物酶和 ¹²⁵I 表面标记, 用 Triton X-100 溶解后用抗大鼠 IgG 沉淀而预先除去杂质。随后的专一性免疫沉淀物还原后通过 SDS-PAGE 加以分析。数字是指图 4 培养物上清液的标数, 点后的数字表示个体克隆的标数。

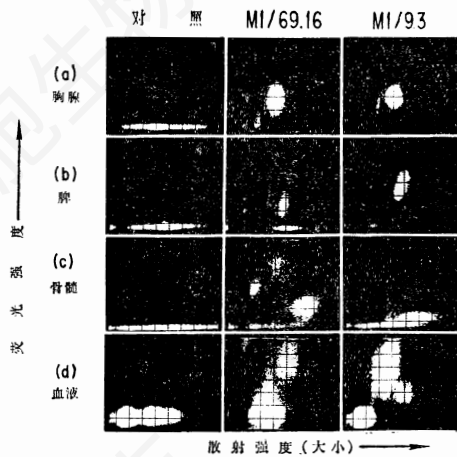


图6 骨髓和血液细胞的指纹图谱

骨髓细胞和血液，通过 Isopaque-Ficoll 沉降除尽红细胞，用单克隆培养物上清液加以标记，接着用抗大鼠 IgG 的荧光抗体处理

T 细胞中表达。因此，这些抗原由单克隆抗体在不同的细胞亚群，并常常是完全无关的细胞群中检出。一种动物的细胞表面抗原因而可能常常在不同细胞群上呈镶嵌体样的表达，这种镶嵌体的模式与其说是个别抗原本身的特性，倒不如说是个别细胞类型的特性。这种类型的表达突出了杂种骨髓瘤方法的重要性以及用与免疫原不同的组织或细胞对抗血清吸收的方法的局限性。

融合双方细胞和分化功能的表达

杂交实验有一个方面，从最初起就使我们困惑。获得所想要的杂交骨髓瘤比我们想像的要容易得多。我们很快就弄清楚了，这是由于表现分泌抗体表型的杂种细胞受到某种形式的选择或富集的缘故(Köhler & Milstein, 1975, 1976)。虽然用于杂交的脾细胞中分泌免疫球蛋白的细胞约占 5%，而所得分泌免疫球蛋白的杂交克隆的比例却大大超过 50% (表 IV)。其次，如果用 SRBC 免疫小鼠，1% 以下的脾细胞可能分泌抗 SRBC，然而分泌抗 SRBC 的杂交克隆的比例却为 10%。两种情况下富集因子都约为 10 倍。

用于杂交的亲代细胞是一种骨髓瘤。然而，当采用其他类型的亲代细胞时，其结果就截然不同了。换句话说，脾细胞与骨髓瘤株杂交或与 T 淋巴瘤株杂交，在第一种情况下导致脾抗体生成选择性的表达，而在第二种情况下，这种表型则不表达。反之，当用 T 淋巴瘤，而不是骨髓瘤作为融合的一方时，T 细胞抗原 Thy-1 以永久杂交株的形式表达，选择性地在脾细胞中重现了(表 IV)。功能的这种选择性重现可能部分地由于表型的不相容性，因为在 T 淋巴瘤和骨髓瘤之间融合产生的杂种里 Thy-1 受到抑制。但骨髓瘤功能保持(Ig 分泌)的事实提示这不是唯一的解释(Köhler 等人, 1977a)。

表 IV 分化功能在已建立的杂种中的选择性固定

亲代和杂交株	细胞表型			
	分泌的 Ig		Thy-1 表面抗原	
	亲代骨髓瘤	其他 Ig	Thy-1, 1	Thy-1, 2
X 63 (骨髓瘤)	>95%	0	0	0
(X 63 × 脾) 杂交 *	>90%	~65%	0	0
脾	0	~5%	0	~40%
(BW × 脾) 杂交 **	0	0	>90%	~70%
BW (T 淋巴瘤)	0	0	>95%	0

0 指迄今未检出过。

所用的脾来自适当的小鼠品系。更多的细节见在原始文献。

* Köhler 等人, 1977a。

** Goldsby 等人, 1977; Hämmerling, 1977; Köhler 等人, 1977b。

展 望

我们叙述过的技术和结果,看来在人类生物学和人类遗传学的基础及应用方面,提供了新的前景和一些大有希望的远景(表V)。尤其是细胞融合技术普遍应用于以永久的组织培养株的形式使短暂的分化功能得以再现的探索性研究,看来是值得进行的。迄今所得到的结果有力地支持我们的推测(Köhler等人,1977a),对短暂的分化功能的再现来说,重要的是采用在表型上带有所讨论的特性类似的细胞株。

表 V 一些未来的展望

1. 抗病毒的抗体(供诊断和治疗之用);
2. 供器官移植用的世界标准试剂;
3. 供临床生化用的诊断试剂;
4. 细胞表面的生物化学和遗传学;
5. 亲和层析;
6. 在永久细胞株中固定其他分化功能(T-细胞,产生激素,等等)

[译自 Cell Biology International Reports, Vol. 3, № 1, 1979. 王珮瑜译 王亚辉校]

离体授粉导致玉米颖果的发育

B. G. Gengenbach

摘 要

从田间生长的玉米植株的未授粉果穗(雌花序)上切取完整子房,并将其接种于培养皿内特定的琼脂-基本培养基上。向露在培养皿外面的花丝(花柱)末端进行授粉,导致46%的子房受精。随后谷粒(颖果)发育的程度是多样的。授粉后40天,一些谷粒仅有胚的发育,而另一些谷粒则有胚和不同程度的胚乳的发育:大约5%的子房发育成正常的谷粒;60%的具有一些胚乳的谷粒能在实验室发芽条件下萌发,70%的从仅具有胚的谷粒上切取的胚能在培养基上萌发。

1962年用罂粟(*Papaver somniferum*)^[4]为材料首次报道了切取下来的植物子房离体授粉、受精并相继培养发育的胚。以后用代表双子叶植物7个属的一些种进行了类似的实验^[3,7-11]。这一技术已被用以克服月夜花矮牵牛(*Petunia axillaris*)的自交不亲和性^[6],获得所期望的异株女娄菜(*Melandrium album*)与红花女娄菜(*M. rubrum*)和夏弗塔雪轮(*Silene schafta*)之间的杂种^[10],并诱导锦花沟酸浆(*Mimulus luteus*)的单倍体孤雌生殖^[2]。

据作者了解,任何单子叶植物的离体子房或胚珠在体外授粉,并成功地受精方面的工作,尚未有报道。Zubkova和Sladky^[11]报道毛地黄(*Digitalis*

purpurea)和玉米离体胚珠在体外授粉后不能发育。本文报道了玉米离体子房体外受精、发育并获得胚和成熟谷粒(颖果)的过程。

玉米自交系A619的果穗(雌花序)在花丝(花柱)抽出之前套上袋子。于花丝抽出后2—6天从田间生长的植株上摘取套袋的未授粉果穗。将刚从苞叶中抽出的花丝用解剖刀削掉,用手剥去外苞叶,并在层流接种室(laminar-flow transfer chamber)*内用消毒过的镊子去掉内苞叶。从此时起果穗的所有处理都采用火焰消毒过的器具。果穗的顶端应保持向下,以使花丝不致紊乱。在两双行子房之间分开花丝,并用解剖刀沿着该线路切入达穗轴(花序轴)髓组织深度的一半。在双行子房的另一侧进行同样的切割,并将带有完整花丝的双行子房块从果穗上取下。这种附着于子房基部的穗轴楔形块再切成每行具有5个子房的双行子房块。几乎所有这种子房块都取自果穗的中部,以使子房的大小相对一致。将2或3个的上述子房块接种于盛有50毫升琼脂-基本培养基的100毫米×25毫米培养皿内,穗轴部分栽进培养基里,而将花丝展放于培养皿边缘上,以便在培养皿的盖子盖上后,授粉可在培养皿外面进行。外露的花丝修剪到2—3厘米长,并从A619植株刚伸出的花药采集新

* 校对者注:即超净工作台或超净工作室。