

用于大量制备单克隆抗体的 B 淋巴细胞杂交瘤技术

黄 嘉 陵

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

用于大量制备单克隆抗体的 B 淋巴细胞杂交瘤技术,是当今生物学领域中可以和 DNA 重组技术相提并论的又一重大成就。

众所周知,动物对于特定抗原刺激的抗体应答反应极为复杂。由于种类繁多的大量免疫应答细胞共同活动的结果,每一种抗原均可为其不同抗原决定簇的各种抗体所识别,而每一抗原决定簇又可为多种抗体所识别。据估计,纯系小鼠的抗体库范围位于 1×10^7 — 5×10^7 间,每个抗原决定簇可为多达 1000—8000 种的不同抗体所识别。但在实际工作中分析小鼠对于这些抗原的反应时,却往往仅能测出其中的 5—10 种抗体,不过是抗体总库中的一个随机样品而已。天然抗体系统所特有的这种高度复杂性和异质性,便决定了很难或根本不可能由此制备可重复的针对某一特定抗原决定簇的抗体制剂。这就是为什么长期以来体液抗体的用途受到严重限制的主要原因。

然而, Milstein 和 Köhler 于 1975 年在体细胞杂交技术基础上创立的淋巴细胞杂交瘤技术,却从根本上解决了这一难题,终将免疫学家多年来渴望获取纯净均一的单一抗体的梦想变成了现实。他们使已适应体外培养的小鼠骨髓瘤细胞同经绵羊红细胞免疫的小鼠脾细胞融合,发现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,又具有亲本瘤细胞在体外培养中或作为移植瘤在小鼠体内不断增殖繁衍的特性。于是,在一般培养中不易存活的分泌特异抗体的 B 淋巴细胞,通过与相应的骨

髓瘤细胞融合,便成了“永生”的抗体形成细胞。而且,无论抗原复杂性以及淋巴细胞供者的整体免疫状态如何,只要具有产生针对这种抗原的抗体的 B 淋巴细胞,均可借此融合而获得无限繁殖和永久产生该抗体的能力。这种融合细胞就称之为 B 淋巴细胞杂交瘤细胞。通过克隆化培养,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的小鼠腹水或血清中,获得大量的分别针对各抗原决定簇的化学结构完全相同的单一抗体。此即所谓单克隆或单株抗体。

由于淋巴细胞杂交瘤技术具有制备的抗体纯度高,专一性强和重复性好,以及适于由未纯化的抗原大量制备等显著的优点,因而在短短的几年时间里,即已被广泛地用于制备各种单克隆抗体,而迅速地发展成为免疫学以及涉及免疫学的医学、细胞和分子生物学领域中的一场革命。最近,在探索用于融合的人体浆细胞瘤系方面的成功,为单克隆抗体直接用于人类疾病的诊治,特别是人类恶性肿瘤的免疫诊断,以至最终实现免疫治疗,开辟了更为广阔的前景。

本刊去年发表的译著“单克隆抗体和细胞表面抗原”一文,对于淋巴细胞杂交瘤技术的原理和某些应用已有详细论述。本文仅结合个人的一些实践,就此技术的基本方法作一概述。

一、溶液、培养液和细胞悬液的制备

1. 完全的 DMEM 培养液 (Dulbecco's modified Eagle's Medium)

Journal of Virology 27:701.

[4] Sutcliffe, J. G. 1978 *nucleic Acids research* 5/8:2721—2728,

[5] Sutcliffe, J. G. and F. M. Ausubel. *Genetic engineering*, Chapter 4: Plasmid cloning vectors, p 94—96,

由400毫升DMEM培养液同5毫升100mM的丙酮酸钠、5毫升10,000单位/毫升的青霉素—链霉素液、5毫升200mM的L-谷氨酰胺、0.25毫升0.1M的2-巯基乙醇、100毫升灭活的小牛血清混合而成。可贮于4℃达6周之久。

2. 次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷(HT)的100倍贮液

称取次黄嘌呤136.1毫克和胸腺嘧啶核苷37.8毫克,在45—50℃水浴中溶于100毫升重蒸水。除菌过滤,按每管5毫升分别注入小试管,贮于-20℃。

3. 氨基嘌呤(A)的100倍贮液

称取氨基嘌呤1.76毫克,溶于含有0.5毫升1N NaOH的100毫升重蒸水中。以0.5毫升1N HCl中和,除菌过滤,按每管5毫升分别注入小试管,避光贮于-20℃。

4. HAT培养液

取500毫升完全的DMEM培养液,分别加入上述HT贮液和A贮液各5毫升。

5. HT培养液

取500毫升完全的DMEM培养液,加入上述HT贮液5毫升。

6. GKN溶液

称取8克NaCl、0.4克KCl、1.77克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.69克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、2克葡萄糖和0.01克酚红溶于1升重蒸水,过滤除菌,贮于4℃。

7. 50%的聚乙二醇(PEG)溶液

加热使PEG融化并经高压蒸汽或水浴沸腾30分钟灭菌。待冷至50℃后,加入等体积预热至50℃的GKN液或无血清的DMEM培养液。混匀,按每管0.5毫升分装,贮于-20℃。

8. 细胞悬液

(1) 骨髓瘤细胞 用于融合的骨髓瘤细胞必须是纯净的处于对数生长期的细胞。为此,最好在融合前一周,将骨髓瘤细胞转移至含有原用于筛选建系的碱基类似物致死剂(例如,

P3-X63-Ag8瘤系为20微克/毫升的8-氮鸟嘌呤, MPC11-45.6TG瘤系为5微克/毫升的6-巯基鸟嘌呤)的完全DMEM培养液中培养,而后逐步扩大,使细胞浓度于融合当天达到对数生长期时的 10^5 细胞/毫升。最后,于 $200 \times g$ 离心10分钟收集细胞,用GKN溶液洗涤一次,并经台盼蓝染色计数证明活细胞数在95%以上之后,即可悬于10毫升GKN液供融合之用。

(2) 免疫小鼠脾细胞 取8—12周龄、最好与骨髓瘤细胞同系之小鼠。于初次免疫后3—4天或再次免疫后第3天,拉颈处死。经70%酒精浸泡消毒后,于严格的消毒条件下打开腹腔,取出脾脏,放入冰浴上盛有10毫升GKN溶液的培养皿中。然后,去除粘附的脂肪或结缔组织,将脾脏放在小烧杯口的90目尼龙布上,剪碎。在滴加GKN溶液的同时,以注射器柄轻轻研压脾块,即可由尼龙布下收集到均匀的脾细胞悬液。如于GKN溶液中将脾脏纵切为二,用弯头镊轻轻挤压,使脾细胞外逸,或切去脾端,用小刮勺在脾膜上反复梳理,使脾细胞由端口释放出来。而后,移入离心管,在冰浴中静置2—3分钟,借自然沉降以除去脾细胞团块,也同样可以得到均匀的脾细胞悬液。混杂在悬液中的红细胞,一般可用5毫升预冷的0.83% NH_4Cl 溶液悬浮,于冰浴中静置10分钟即可使其破裂而除去。最后,于室温 $170 \times g$ 离心15分钟或 $200 \times g$ 离心10分钟收集脾细胞。再用GKN液洗涤一次,并经台盼蓝液染色计数证明活细胞占95%以上之后,即可悬于10毫升GKN液供融合之用。通常,可由一个小鼠脾脏获得 5×10^7 — 2×10^8 脾细胞。

(3) 小鼠腹腔巨噬细胞 取12周龄以上最好与骨髓瘤细胞同系之小鼠。雄鼠腹腔脂肪较多,在用注射器吸回液体时,易使针头堵塞,故以选用雌鼠为宜。小鼠在拉颈处死后,同样以70%酒精进行消毒。然后,剪开腹部皮肤,用镊子拉起腹壁,以注射器向腹腔注入大约

4.5 毫升 $0.34M$ 蔗糖液或无血清的 DMEM 培养液(而注射器内留下的 0.5 毫升液体则可供排除针头堵塞之用)。在用镊子轻轻按摩腹部之后,立即用原注射器将注入的液体吸回,移入离心管,于 $400 \times g$ (使用 $0.34M$ 蔗糖液时)或 $200 \times g$ (使用 DMEM 培养液时)离心 10 分钟以收集细胞。通常,可由一只成年小鼠获得总数约为 3×10^6 的腹腔巨噬细胞。最后,将其悬于 HAT 培养液,使浓度为 2×10^5 细胞/毫升。再按每孔 0.5 毫升分入 24 孔塑料培养板,或按每孔 0.1 毫升分入 96 孔塑料培养板的各个培养孔中,置 $37^\circ C$ 水蒸汽饱和的含 5% CO_2 的培养箱中温育,即可供杂交瘤细胞的选择性培养或克隆化培养之用。

二、细胞融合

从细胞融合开始直至最终获得一定量的单克隆抗体,其间要经过为期数月的一系列实验步骤(见图 1)。以下将首先就关键性的第一步——细胞融合实验的各主要方面作一介绍:

1. 动物的选择

动物的选择,主要取决于用于融合的瘤系。迄今具有使用价值的瘤系,仍限于大鼠和小鼠的骨髓瘤细胞系。虽然最近在建立兔和人的瘤系方面已取得重大进展,但至今尚未到达可以普遍加以使用的程度。至于小鼠骨髓瘤细胞与兔或人淋巴细胞的种间融合,也远不如小鼠骨髓瘤细胞与大鼠淋巴细胞的融合那么来得有效。因此,目前的最好选择,似乎还是小鼠。况且,在已建立的小鼠骨髓瘤细胞系中,有的已完全丧失了产生自身 Ig 的能力。而各类小鼠 IgG 又均能同金黄色葡萄球菌的 A 蛋白结合,这对于抗体的纯化也甚为有利。

迄今采用的小鼠骨髓瘤细胞系,均来自 BALB/C 品系的小鼠。故以 BALB/C 小鼠淋巴细胞与其融合所得之杂交瘤细胞,在注入小鼠腹腔之后,即作为该系小鼠的肿瘤而生长,同时产生高效价的腹水。若 BALB/C 小鼠对一特定抗原不产生最适免疫反应,则可改用其

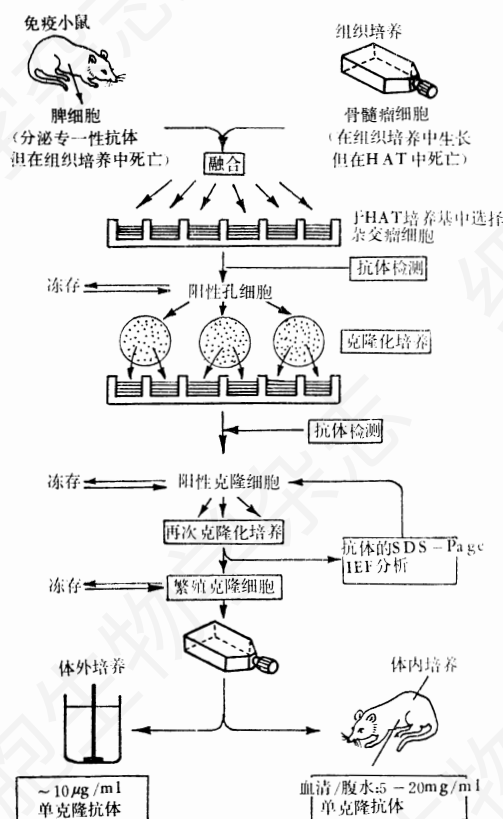


图 1 单克隆抗体制备实验流程图

它品系(如 C57BL/6 或 NEB)的小鼠。一般,采用雌鼠,以 8—12 周龄为宜。

2. 免疫

一般不必进行高度免疫。如抗原为可溶性,可先由腹腔注入混有 2×10^8 灭活的百日咳杆菌、经明矾沉淀的 100 微克抗原(蛋白),进行初次免疫。1—3 周后,再由腹腔注入同样混有灭活的百日咳杆菌的 10 微克抗原的水溶液;或 4—6 周后由腹腔或静脉注入含有 100—200 微克抗原的生理盐水液,作为加强注射。若改用完全佐剂对抗原液作乳化处理,而后再进行免疫,也同样可以收到满意的效果。如抗原为细胞,则可由腹腔注入 2×10^7 细胞,2—3 周后重复注射一次,3 周后再注入相同剂量的细胞进行加强。一般,加强注射最好通过腹腔或静脉进行,以确保抗原到达脾脏。若需进行高度免疫,则以小鼠于最后一次加强注射前有 4 周时间的休息为宜。

至于什么时期的B淋巴细胞最易于与骨髓瘤细胞融合,目前还不甚清楚。一些观察表明,阳性杂交瘤细胞出现的高峰与小鼠血清内专一抗体的效价水平不相平行,多半位于血清抗体高峰出现之前不久。所以,通常于初次免疫后3—4天或加强注射后第3天,取脾进行融合。而且,最好一次免疫3只小鼠,以其混合脾细胞进行融合,或各取一个脾脏分别进行三个独立的融合实验,以弥补单用一个脾脏时可能出现的不足之处。

此外,如主要免疫反应出现在淋巴结,则可改用淋巴结细胞进行融合。如果小鼠对特定抗原不产生体液抗体,便难以获得专一性的杂交瘤细胞。此时,在体外以抗原刺激已接触过抗原的脾细胞,或将此脾细胞同抗原一起移入经过照射的宿主小鼠,则可能有助于专一性B淋巴细胞的进一步富集。

3. 用于融合的主要瘤系

杂交瘤工作早期采用的小鼠骨髓瘤系,主要系源于MOPC-21(又称P3)的P3-X63-Ag8(IgG₁,K)和MPC-11(IgG2b,K)。此后,为避免骨髓瘤细胞自身免疫球蛋白的干扰,进一步从这些瘤系筛选到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。

表1中所列,即为迄今已成功地用于融合的主要骨髓瘤细胞系。虽然在一个实验中同时对这些瘤系进行比较的情形很少,但据一些研究者报道,其融合率似无显著的差异。只是瘤细胞系本身会发生改变,或融合率下降或抗体合成不稳定。因此,在初次融合时,切忌单用一种瘤系,而至少必须选用3种不同的瘤系分别进行融合。然后,从中排出结果最佳者大量冰存,以供往后融合之用

表1 用于融合的主要骨髓瘤细胞系

系 名	染 色 体 数	Ig	来 源
P3-X63-Ag8	65	γ_1 ,K	MOPC-21
P3-NSI-Ag4/1	65	K, 非分泌型	X 63
P3-X 63-Ag 8.6.5.3	58	不 合 成	X 63-Ag8
Sp 2/0-Ag14	72	不 合 成	(X63-Ag8×BALB/C) 杂交瘤
FO	72	不 合 成	Sp2/0-Ag14 克隆
S194/5 XXO.BU.1		不 合 成	BALB/C 小鼠
MPC 11-45.6 TG 1.7	62	γ_{2b} ,K	BALB/C 小鼠
210.RCY 3.Ag 1.2.3	39	K	Lou 大鼠

上述这些瘤系的细胞,均可用完全的DMEM培养液或同样补以20%小牛血清的RPMI培养液培养。除部分瘤系(如NSI)对pH偏碱的培养液耐受性较差,而必须在7%的CO₂条件下培养之外,大多采用5%的CO₂进行培养。通常,细胞在浓度低于10⁴细胞/毫升时生长很慢,而于10⁴—5×10⁵细胞/毫升时达到最适生长。然而,一旦达到最高浓度5×10⁵细胞/毫升之后,细胞成活率即迅速下降。因此,一般必须视细胞的生长情况,每2—3天进行一次传代或扩大培养。

4. 促融剂

杂交瘤技术是在体细胞杂交技术的基础上发展起来的。关于细胞融合机理、促融剂种类及其优缺点,本刊1979年发表的“细胞杂交研究的一些进展”一文,已作了系统的阐述。

同体细胞融合一样,杂交瘤工作早期使用的促融剂——灭活的仙台病毒,已逐渐为化学促融剂聚乙二醇(PEG)所取代。Davidson等于1976年建立的,以PEG诱发哺乳类细胞融合的方法,也同样适用于淋巴细胞同瘤细胞的融合。他们通过实验证明,平均分子量400—

6000 的各种 PEG, 在 40—60% 的浓度范围内, 均能使细胞融合, 唯融合率的高低依分子量和浓度的不同而各异。一般, PEG 的分子量和浓度越大, 其融合率越高, 但其细胞毒性和粘度也随之增大。所以, 在 PEG 浓度为 40、45 和 50% 时, 以 PEG1000 的融合效果最佳; 而当浓度增至 55 和 60% 时, 则转变为 PEG400 最好。不过, 若将两者相比, 仍以浓度 50% 的 PEG1000 的融合率居高, 且受残留培养液稀释而至融合率下降的影响最小。此即大多乐于采用浓度 50% 的 PEG1000 或 PEG1500 作为融合剂的主要原因。

为将 PEG 的毒性作用减至最低, 除必须注意选择适当分子量的 PEG 和最适浓度之外, 还必须严格控制 PEG 处理的时间。通常, 以 PEG 处理细胞 1—2 分钟, 而后通过立即离心或加液稀释, 以及及时终止 PEG 的作用。至于浓度 50% 的 PEG 对于蛋白质的凝固作用, 通过使用无血清的 DMEM 培养液或 GKN 溶液即可加以避免。

此外, 由于 PEG 溶液的 pH 值常随其批号或配制后的存放而改变, 且据 Sharon 等报道, 以 pH8.0—8.2 的 PEG 溶液进行融合时的融合率最高, 故以临用前再对其 pH 值进行一次检测为宜。

5. 饲养细胞(Feeder Cell)

在组织培养中, 单个或少数分散的细胞多半不易成活, 通常必须加入其他活细胞方能使之繁殖。这种被加入的活细胞即称之为“饲养细胞”。同样, 在杂交瘤细胞筛选、扩大和克隆化培养过程中, 也必须加入这种饲养细胞或培养过饲养细胞的“适应性培养液”(Conditioned Medium)。

通常被采用的饲养细胞, 主要有小鼠腹腔巨噬细胞、小鼠脾脏细胞、小鼠胸腺细胞和传代培养的大鼠胚胎成纤维细胞等数种。前三种细胞均不会在组织培养条件下繁殖, 故尤其适用于液体培养的杂交瘤细胞。其中又以小鼠腹腔巨噬细胞的使用最为普遍。而大鼠胚胎成纤

维细胞却具有在组织培养条件下分裂增殖的能力, 则仅适用于以软琼脂平板法培养杂交瘤细胞时铺于平板底部。看来, 无论采用哪一种饲养细胞, 似乎均能收到满意的效果, 只是人们习惯于使用自己用熟了的那种饲养细胞而已。

6. 一种行之有效的细胞融合方法

迄今文献中所见之融合方法, 并非全然相同。例如, 融合时的温度条件, 就有室温和 37℃ 之别; 而用于融合的脾细胞和瘤细胞数, 则更有 1:1、1:2、1:4 和 1:10 等完全不同的配比。但就多数报道的融合率而言, 似乎在上述条件下并无显著的差异。现仅将由 EMBO-SKMB 去年举办的“杂交瘤技术讲座”推荐, 并经我们试用证明明确属行之有效的一种融合方法, 略述如下:

如图所示, 首先将悬于 GKN 液中的 10^8 脾细胞同 5×10^7 骨髓瘤细胞, 混合于 50 毫升

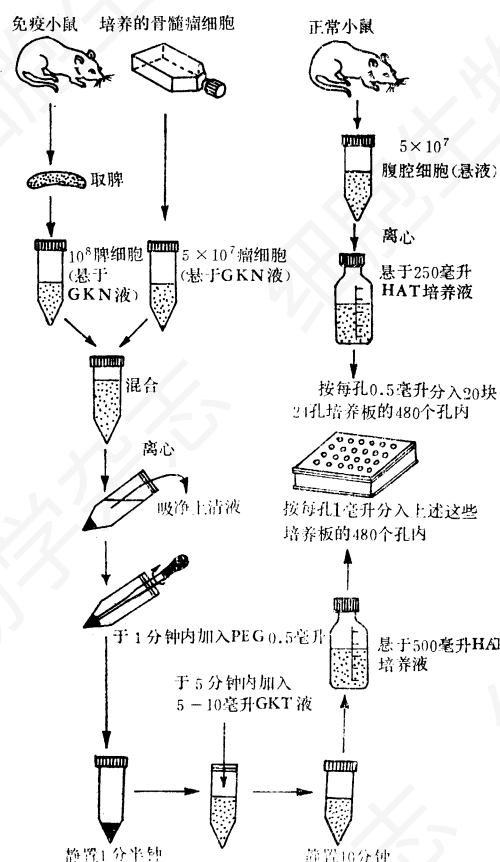


图 2 细胞融合方法示意图

的锥底离心管。然后,以 GKN 液充满,于 170—200 $\times$ g 离心 10 分钟。吸净上清液,以免残液稀释随后加入的 PEG 而降低细胞融合率。继以手指轻击管壁,使管底的细胞沉淀混匀如糊。而后,在轻轻振摇下,于室温 1 分钟内逐滴加入 50% 的 PEG 0.5 毫升。或将移液管直接插入沉淀,边加边搅拌,使细胞尽可能保持均匀悬浮状态。随后将细胞悬液于室温静

置 90 秒钟。再于 5 分钟内开始逐滴地慢慢加入 5—10 毫升 GKN 液,以及时终止 PEG 的作用。最后,让悬液静置 10 分钟,再经 10 毫升移液管轻轻吹打数次使细胞团块分散之后,即可使用加有饲养细胞的 HAT 培养基,开始杂交瘤细胞的选择性培养。

(未完待续)

叶秀珍等:

图版说明

- 图 1 兔红细胞 折光性强,凹形。位相差显微照相 $\times 1200$
- 图 2 兔红细胞血影 绝大部分为圆形,暗灰色,折光性弱。位相差显微照相 $\times 1200$
- 图 3 兔红细胞血影与人肝癌细胞(BEL-7402)融合后,血影与细胞紧密凝聚,有些血影正与细胞进行融合,两者尚可辨认,位相差显微照相 $\times 1200$
- 图 4 装载 FITC-白蛋白抗体的血影 显均质荧光,荧光显微照相 $\times 300$
- 图 5 人肝癌细胞(BEL-7402)与装载 FITC-白蛋白抗体的血影融合后部分细胞质荧光反应呈阳性。荧光显微照相 $\times 420$
- 图 6 大鼠肝癌细胞(CBRH-19)与装载 FITC-白蛋白抗体的血影融合后,部分细胞质荧光反应强阳性。荧光显微照相 $\times 420$
- 图 7 装载印度墨汁颗粒的血影 血影内有细颗粒,较粗大的颗粒位于血影膜上(箭头)。位相差显微照相 $\times 1600$
- 图 8 人肝癌细胞(BEL-7402)与装载印度墨汁颗粒的血影融合后有细颗粒出现在肝癌细胞胞质内位相差显微照相 $\times 1200$
- 图 9 与血影融合后的人肝癌细胞(BEL-7402)继续培养 20 小时,胞质内尚可见细的墨汁颗粒,甲醇-冰醋酸(3:1)固定 Giemsa 染色 $\times 600$