

# 用于大量制备单克隆抗体的 B淋巴细胞杂交瘤技术(续)

黄嘉陵

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

### 三、杂交瘤细胞的选择性培养

由于脾细胞同骨髓瘤细胞的混合物,在经过上述融合处理后,不是所有的细胞都能融合。再加,细胞融合本身又是一随机过程,除脾、瘤二细胞间的融合外,还伴有脾细胞与脾细胞及瘤细胞与瘤细胞间的自身融合。因此,紧随细胞融合之后,即应迅速将其移入含有HAT(次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸腺嘧啶核苷)的选择性培养液进行培养,以除去那些未融合的及自身融合的细胞。

同正常细胞一样,普通瘤细胞除了可以利用谷氨酰胺和尿核苷单磷酸从头合成DNA这条核酸生物合成的主要途径之外,在该途径为HAT培养液中的氨基嘌呤(A)阻断时,还可以利用HAT培养液中现成的次黄嘌呤(H)和胸腺嘧啶核苷(T),借应急通路合成DNA。但是,用于融合的经嘌呤类似物8-氮鸟嘌呤或6-巯基鸟嘌呤筛选而得到的骨髓瘤系,均为缺乏应急通路所必需的次黄嘌呤磷酸核糖转化酶(HGPRT)的缺陷型,以致未融合的骨髓瘤细胞或其自身融合物,终因无法利用HAT培养液中的次黄嘌呤合成DNA而死亡。而脾细胞及其自身融合物,虽具HGPRT酶,却缺乏于组织培养条件下生长的能力,也相继于二周内死去。唯独脾细胞同骨髓瘤细胞融合而成的杂交瘤细胞,由于分别由二亲本细胞获得了应急通路所必需的HGPRT酶和在组织培养条件下生长的能力,而得以在HAT培养液中迅速增殖,最终被筛选出来。

选择性培养的方法,大体上可分为液体培养和软琼脂平板培养两类。液体培养法,系直接将细胞置于HAT培养液中进行培养,因其手续简便易行而被普遍采用。软琼脂平板培养法,则是将细胞铺在以HAT培养液为介质配制的软琼脂平板上进行培养。虽然制作平板较为费事,但是一旦制成用于培养后,一般在整个选择性培养期内即不再需要更换培养液。而且,此法还具有同时兼顾克隆化培养,甚至在某些抗原条件下可将抗体专一性检测也结合在一起进行的优点。因此,也不失为一个可供选择的好方法。

具体做法如下:

#### 1. 液体培养法

首先,将经过促融剂处理的细胞悬于500毫升HAT培养液,混匀后按每孔1毫升分注入20块24孔塑料培养板的480个已分别加有0.5毫升HAT培养液和 $10^5$ 小鼠腹腔巨噬细胞的培养孔,或悬于50毫升HAT培养液,按每孔0.1毫升分注入5块96孔塑料培养板的480个已分别加有0.1毫升HAT培养液和 $2 \times 10^4$ 小鼠腹腔巨噬细胞的培养孔,即可置 $37^\circ\text{C}$ 水蒸汽饱和的5% $\text{CO}_2$ 培养箱培养。然后,按半量换液法,每2—3天用外接吸气泵的吸管,斜倚在培养孔口,小心地由每孔吸去1/2体积的培液,再换入1/2体积新鲜的HAT培养液。同时,借倒置显微镜逐日或隔日检查并记录每个孔内细胞生长的情况。一般,经过3—5天培养,便逐步可由趋于死亡的未融合细胞或自身融合细胞的背景下,观察到浑圆透

亮、形以骨髓瘤细胞、不断增殖而成簇分布的杂交瘤细胞。大约10—14天后，骨髓瘤细胞、脾细胞及其各自的自身融合细胞均已死亡。阳性孔内的杂交瘤细胞再经HT培养液培养一周使细胞内残留的氨基嘌呤稀释之后，即可重新使用正常培养液进行培养。

## 2. 软琼脂平板培养法

一般用于杂交瘤细胞培养的平板，由低浓度的琼脂液铸成，其质柔软而呈半流体状，故称之为软琼脂平板。除此而外，由于纯化的琼脂糖多半不像琼脂那样含有影响细胞生长的硫酸多糖等毒性物质，且具有煮沸时不易产生泡沫、凝固点较高、易于扩散以及用于溶血空斑测定时斑点也较清晰等优点，所以也常被用以制作平板。

供铺制平板使用的容器，以底部平薄透亮而尤其适于倒置显微镜观察的6或9厘米直径的塑料培养皿效果最好。平板分上下两层：上层悬有经过融合处理的细胞，以浓度为0.25—0.30%的琼脂或琼脂糖为宜；下层为覆盖于皿底贴壁生长的大鼠胚胎成纤维细胞之上，或悬有正常小鼠脾细胞的饲养层，则以浓度为0.5—0.6%的琼脂或琼脂糖为宜。

铺制时，先将20毫升经过高压蒸汽灭菌的2.5%的琼脂或琼脂糖置于沸水浴，待其液化后再转入45℃水浴保温。同时，将78毫升HAT培养液同2毫升10倍浓度的HAT培养液混合，置于45℃水浴预热。随后，将两液混合，再放回45℃水浴保温，即为含0.5%琼脂或琼脂糖的HAT培养液。

然后，选取皿底的大鼠成纤维细胞已长至半满的6厘米培养皿10个，将原有的培养液吸净，分别注入5毫升上述含有0.5%琼脂或琼脂糖的HAT培养液，置水平台上15分钟使其固化。若采用正常小鼠脾细胞作为饲养细胞，则可按 $5 \times 10^5$ 脾细胞/毫升的最后浓度，预先将其悬于0.5%的琼脂或琼脂糖液，再注入培养皿使其固化。同时，通过离心收集继续融合处理后又经过5—20小时完全的DMEM培

养液培养的细胞，悬于5毫升预热至45℃的HAT培养液。随后，同等体积0.5%琼脂或琼脂糖的HAT培养液充分混合，按每皿1毫升均匀地铺至上述10个培养皿内的饲养层上，使其于室温固化之后，便可移入37℃水蒸汽饱和的5%CO<sub>2</sub>培养箱进行培养。同时，借倒置显微镜逐日或隔日检查并记录杂交瘤的生长情况。大约在经过3—5天的选择性培养之后，即可逐渐由随未融合细胞及自身融合细胞死亡而日显清晰的背景上，发现散在的不断增殖而成的杂交瘤细胞群落。

## 四、具有预定专一性的杂交瘤细胞的筛选

通过上述选择性培养而获得的杂交瘤细胞，并不都符合人们预定的要求，其中往往只有为数很少的一部分，其分泌抗体具有针对免疫原的预定专一性。因此，一般在液体培养的杂交瘤细胞铺满培养孔底1/10以上面积，或软琼脂平板培养的杂交瘤细胞长至肉眼可见大小的群落时，即可开始对其专一性进行检测，以便尽早作出取舍。

液体培养的杂交瘤细胞，通常以取出换液后3天以上的培养液进行检测最为简便。至于检测方法，原则上任何准确、快速而重复性又好的体液抗体测定法，也同样适用于培养液内抗体的测定。只是在实际应用时，尚须根据抗原的性质、抗体类型及所需灵敏度等具体情况来加以选择。例如，当抗原为可溶性而灵敏度又要求不高时，可选用手续简便的环状试验或琼脂扩散法；当灵敏度要求较高时，可改用免疫电泳、间接血凝、放射免疫或免疫酶标测定等灵敏度较高的方法；而当抗原为细胞或其他非溶性颗粒时，则除放射免疫和免疫酶标测定法外，还可采用特别适于检测细胞表面成分抗体的免疫荧光测定术。又如，基于补体依赖的抗体，在补体存在下，对于带有相应抗原的红细胞，淋巴细胞等靶细胞的溶解作用，不仅可借空斑测定，斑点试验，细胞毒或<sup>51</sup>Cr释放试验等技术，直接测定针对这些细胞抗原的抗

体, 甚至还可将半抗原或蛋白质抗原结合到羊红细胞上, 从而达到检测和筛选具有这些半抗原或蛋白质抗原专一性的杂交瘤细胞的目的。除此而外, 近年为适应大量检测需要而发展起来的, 借荧光激活细胞分类器(FACS)直接对细胞进行检测筛选的方法, 确实具有其他方法均无以伦比的惊人效率。但因设备昂贵, 而在目前国内条件下尚无普遍使用之可能。

至于培养在软琼脂平板上的杂交瘤细胞, 如抗原为红细胞、半抗原或蛋白质, 则可将细胞经8—10天培养, 长至肉眼可见大小的群落时, 按琼脂糖覆盖溶血法, 于6厘米培养皿的软琼脂平板上, 再覆加一层总量1.5毫升, 含有25%的红细胞或经半抗原、蛋白质抗原偶联的羊红细胞50微升, 新鲜的豚鼠血清100微升, 以及进行间接空斑测定时, 须外加的兔抗小鼠Ig血清15—50微升等测试剂的0.6%的琼脂糖液, 置水平台上使其固化。于37℃的5%CO<sub>2</sub>培养箱温育1—2小时之后, 取出观察。凡顶部区域出现溶血空斑者, 即为具有预定专一性的杂交瘤细胞。

此外, 当抗原为半抗原或蛋白质时, 还可采用微孔滤膜复制法, 在预先铺上一层1.2毫升0.72%的琼脂糖液作为保护层的平板上, 覆盖一张大小相同并经抗原吸附处理的微孔滤膜(0.45μm)。置37℃的5%CO<sub>2</sub>培养箱温育3—30小时, 待杂交瘤细胞分泌的专一性抗体为滤膜充分吸附之后, 即可揭下滤膜。使其吸附面朝上, 固定于一平皿底部。随即以0.25%经抗原偶联的羊红细胞悬液充满, 于室温静置1小时, 使红细胞自然沉降以铺满滤膜表面。然后, 以玻璃板封住皿口, 移入生理盐水。使滤膜吸附面朝下, 静置数分钟, 待非专一性附着的红细胞自然漂离之后, 即可移去玻璃板, 由生理盐水中取出平皿, 按滤膜上留下的红细胞凝集斑位置, 由软琼脂平板上找到与之对应的具有预定专一性的杂交瘤细胞群落。除此而外, 若改用放射性同位素标记的抗原或兔抗小鼠Ig来处理已吸附上抗体的微孔滤膜, 而后再

作放射自显影, 也同样可以收到满意的定位效果。

最后, 尚须特别加以提及的是, 杂交瘤细胞多半很不稳定。故除用以检测杂交瘤细胞专一性的方法, 必须早在融合实验开始前即加以建立, 以保证融合所得之杂交瘤细胞得以及时检测外, 一旦杂交瘤细胞通过2次以上检测, 而被作为阳性孔或阳性细胞群落筛选出来之后, 还必须尽早进行克隆化培养及冷冻保存。以免因染色体丢失、抗体重链基因分离, 或同一培养孔中其他非专一性杂交瘤细胞的过度生长, 而丧失原有的专一活性。为此, 对于只有一个群落的阳性孔里的杂交瘤细胞, 除可取出部分细胞用作克隆化培养外, 其余均可直接转入含有10<sup>6</sup>小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养细胞的小培养瓶, 扩大培养, 以便及时冻存。同时, 为了保险起见, 也还可以在原孔中留下少量细胞继续培养。而对于阳性孔内的群落数在一个以上的杂交瘤细胞, 或培养在软琼脂平板上的阳性细胞群落, 则最好借显微操作技术, 以一种头部呈直角弯曲的细口吸管, 将其按群落分别移入含有10<sup>5</sup>小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养细胞的24孔培养板的孔里, 稍加扩大, 并经再次检测显示阳性结果之后, 再进行克隆化培养及冷冻保存。

## 五、克隆化培养

所谓克隆(clone)系指由一个细胞增殖繁衍而来的一群细胞。始于单个阳性杂交瘤细胞的克隆化培养(cloning), 对于获取纯净均一的单克隆抗体来说, 无疑是继专一性杂交瘤细胞筛选之后的又一个不可缺少的重要步骤。不仅刚筛出的阳性杂交瘤细胞必须尽快进行这种克隆化培养; 即便早先已经克隆化了的阳性杂交瘤细胞, 在经过一段时期的培养之后, 也还会因体细胞突变或染色体丢失, 使部分细胞丧失产生抗体的能力, 而必须再次或反复多次进行这种克隆化培养, 即所谓再次克隆化培养(recloning)。

克隆化培养的方法,按照用以分离单个细胞的不同手段,大体上可分为显微操作法,软琼脂平板法,有限稀释法和以荧光激活细胞分类器进行分离等数种。但是,目前仅以软琼脂平板法和有限稀释法的使用较为广泛。

软琼脂平板法,是一种借助散在于软琼脂或软琼脂糖平板上的单个细胞的定位生长,而达到克隆化的方法。其具体做法,与《杂交瘤细胞的选择性培养》一节中所介绍的软琼脂平板培养法相同,在此不再赘述。如前所述,由于此法在某些抗原条件下,可以把克隆化培养与专一性检测结合在一起进行,因而具有效率较高及速变较快等显著的优点。然而,也有其不足之处。首先,克隆率不高(50%—0.01%),且随不同的杂交瘤细胞系而改变。其次,可在一个9厘米培养皿内的软琼脂平板上生长的克隆数,一般不得超过 $10^4$ ,也即此法仅适于专一性细胞比例不低于 $1/10^4$ 的克隆化培养。再加,在以琼脂糖覆盖溶血法进行检测时,可在一个平板上存在的阳性克隆数,最多也不得超过100—200个,否则阴性克隆也将为阳性克隆的溶血区所掩盖。总之,此法还不能说是一个理想的克隆化方法。

而有限稀释法则基于,通过适当稀释达到分离单个细胞进行培养的原理。首先,通过活体染色测出细胞悬液的准确浓度。而后,以完全的DMEM培养液将其稀释至每毫升含有7—8个细胞。再按每孔0.1毫升,分注入96孔板上已分别加有 $2 \times 10^4$ 小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养细胞的96个培养孔中。或通过稀释制备两种每毫升分别含有10个或5个细胞的悬液。再按每孔0.1毫升,将其分别注入96孔板上同样加有小鼠腹腔巨噬细胞的左右各48个培养孔中,使最终按统计学上的Poisson分布,达到约60%的培养孔仅含一个杂交瘤细胞。然后,再经倒置显微镜严格检查,即可排出确实只有一个细胞的培养孔,开始进行培养。通常,在经过10—14天培养,待克隆长至足够大小,并经检测选出抗体活性较高者之

后,即可直接将其转入含有饲养细胞的小培养瓶,扩大培养成为单克隆的杂交瘤细胞系,供大量冻存及制备单克隆抗体之用。

有限稀释法的最大优点在于:克隆率特高,几近100%。故此法特别适用于专一性细胞比例低于 $1/10^5$ ,或对组织培养条件适应性较差的那些杂交瘤细胞的克隆化培养。虽然,在因非专一性细胞过度生长而专一性细胞比例随之显著下降的情况下,进行这种培养时,必须反覆克隆多次方能奏效。以致将为此而耗费不少时间。然而,这却往往是最终建立单克隆的专一性杂交瘤细胞系的唯一方法。

## 六、杂交瘤细胞的冷冻保存

用于杂交瘤细胞冻存的培养液(冻存液),通常由9份完全的DMEM培养液或小牛血清,同1份冷冻保护剂DMSO(二甲亚砜)混合而成。DMSO应尽可能选用纯品。但因DMSO会损坏滤膜,而高压蒸汽又会破坏DMSO,故不宜借滤膜过滤或高压蒸汽进行消毒。再加,DMSO本身对于细菌的毒性作用已足以达到自身灭菌。因此,除冻存液可以通过过滤除菌外,一般均不必单独对DMSO进行灭菌处理。

冻存时,首先将离心收集的 $1-5 \times 10^6$ 杂交瘤细胞,悬于1毫升经冰浴预冷的冻存液,移入2毫升的塑料标本管,拧紧螺盖,或注入2毫升的硬质安瓿瓶,再进行熔封。然后,将其置入一冷冻控制器内,以 $1^\circ\text{C}/\text{分}$ 的速变降低管内温度至 $-40^\circ\text{C}$ ,再经液氮容器上部的气相液氮预冷20分钟,即可浸入液氮作长期保存。或放入一壁厚1厘米的泡沫塑料盒或以棉花充塞的纸盒,置于 $-70^\circ\text{C}$ 冰箱冷却24小时后,再转入液氮内进行保存。此外,在液氮供应出现困难时,则可将液氮保存的细胞,于冻结状态下,迅速转入 $-70^\circ\text{C}$ 或甚至 $-40^\circ\text{C}$ 冰箱进行保存。只要冰箱温度保持恒定,一般也还能再保存相当长的一段时间。

而在复苏时,只须将冻存的细胞由液氮内

取出,立即投入37℃水浴,震荡使之于1—2分钟内迅速融化。而后以50毫升预冷的培养液稀释,离心收集细胞。再经50毫升预冷的培养液洗涤一次之后,即可按活体染色计数结果,以利于细胞恢复的较高细胞浓度(约 $1-2 \times 10^5$ 细胞/毫升),将其悬于完全的DMEM培养液,进行培养。

### 七、单克隆抗体的大量制备

鉴于功能上稳定的杂交瘤细胞系的保持,至今仍然是杂交瘤工作的一大技术难题。故在一旦通过克隆化培养获得数量足够的单克隆细胞之后,除立即按上述方法冻存外,即应竭尽全力以尽快由此细胞大量制取单克隆抗体。这样,便很自然地提出了一个如何提高制备效率的方法学问题。

在体外培养条件下,使用旋转瓶大量培养单克隆细胞,而后由其培养液分离单克隆抗体的制备方法,虽然不会像体内培养那样遭到宿主免疫球蛋白的污染,但是要将小牛血清由培养液内除去,也不是那么轻而易举。除此而外,此法还有一大缺陷,即培养液内单克隆抗体的含量很低。一般,不过10—60微克/毫升,仅及效价甚低的血清抗体水平。因此,纵有1000毫升培养液,也至多只能从中获得10—60毫克单克隆抗体。于是,人们在进行大量制备时,便不得不成立升地大量繁殖细胞,以致细胞往往在繁殖到达所需数量之前,即已因过度生长而濒于死亡,或完全丧失了原有的专一活性。

相反,若将 $2 \times 10^6-10^7$ 单克隆细胞,由皮下植入同系或H-2相容的正常小鼠,则不仅可于植入后的10—14天内,于小鼠皮下成功地引出相应的移植性肿瘤,再供接种或培养之用。而且,可于瘤块出现后一段时期,通过多次采血获得单克隆抗体含量达到1—10毫克/毫升的血清。只是采血量十分有限。为此,如将相同数量的单克隆细胞,改种入早在3—10天前,即已经腹腔注射0.5毫升降植烷(Psis-

tane)或其他矿物油初次致敏的小鼠腹腔,便可克服这一不足之处。而可于接种后半个月左右时间内,通过穿刺获得大约5—10毫升其单克隆抗体浓度高达5—20毫克/毫升的腹水。再加,初次植入腹腔繁殖的单克隆细胞,多易于形成实体型瘤块,而使腹水量多少受到影响。此时,若改用上述已经初次移植适应的细胞重新接种,就可改变这一状况,而竟至可从小鼠获得多达10—20毫升的腹水。于是,单克隆的杂交瘤细胞,以腹水瘤形式于小鼠腹腔内迅速增殖,同时大量分泌抗体的这种惊人效率,便使其成为目前用以大量制取单克隆抗体的主要方法。

### 八、单克隆抗体的分离、纯化及其鉴定

虽然,单克隆抗体效价较高的培养液、血清或腹水,就某些用途而言,已经足够纯净。但是,其中仍然含有不少来自培养基、宿主或克隆细胞本身,包括一些未知专一性的免疫球蛋白分子在内的无关蛋白质。因而,往往还得再作进一步的分离和纯化。

同一般体液抗体的分离和纯化一样,无论培养液、血清或腹水中的单克隆抗体,均可首先采用半饱和的硫酸铵使其沉淀,而达到浓缩和初步纯化的目的。只是腹水最好是在预先经过高速离心和充分稀释,而成为不甚粘稠的清液之后,再作沉淀处理。然后,经过适当溶解和充分透析,即可进一步采用DEAE-Cellulose(DE52)及QAE-Sephadex A50层析柱,由其分离IgG类单克隆抗体,或通过Sephadex G200、Sephacryl S200或Bio-Gel P300等柱上的凝胶过滤及琼脂糖板电泳,分离IgM类单克隆抗体。

此外,基于免疫亲和层析术的高度专一开,则不仅可以用于各种不同类型小鼠Ig的抗体,分别同琼脂糖偶联而做成各种免疫吸附剂,直接由培养液、血清或腹水分离不同Ig类型的单克隆抗体;或分别通过金黄色葡萄球菌A蛋白—琼脂糖柱及精蛋白—琼脂糖柱上的

亲和层析, 直接分离 IgG 类及 IgM 类的单克隆抗体。而且, 还可以将各种蛋白质抗原或半抗原, 分别偶联到琼脂糖上; 或甚至把那些带有特定表面抗原的细胞, 也分别连接到适当的固体载体上, 做成各种高度专一的亲和层析柱。然后, 即可借此由培养液、血清或腹水直接分离得到, 与之对应的各种高度纯净的单克隆抗体, 而几无其他蛋白质的丝毫污染。

一般, 在通过上述一系列实验步骤, 而最终获得具有预定专一性的克隆细胞及由此而制备的单克隆抗体之后, 除克隆细胞可作染色体组型分析外, 还必须以  $^{14}\text{C}$ -亮氨酸或  $^{35}\text{S}$ -甲硫氨酸, 对克隆细胞于体外培养下合成的抗体进行标记。而后, 再于还原及非还原条件下, 使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电点聚焦, 对抗体进行 Ig 分型及重、轻链组成等分析。最后, 在通过鉴定证明, 确实具有单克隆抗体所特有的高度均一性, 而使其单克隆源性得到进一步肯定之后, 即可将其分装贮于  $-70^{\circ}\text{C}$  供用。

(续完)

### 参 考 文 献

- [1] Littleld, J. W. 1964 *Science* 145:709.
- [2] Köhler, G. and Milstein, C. 1975 *Nature* 256:495.
- [3] Davidson, R. L. and Gerald, P. S. 1976 *Somat. Cejj Genet.* 2:165.
- [4] Köhler, G. 1976 *Eur. J. Immunol.* 6:340.
- [5] Galfre, G. et al. 1977 *Nature* 266:550.
- [6] Herzenberg, L. A. et al. 1978 In *Handbook of Experimental Immunology* (D. W. Weir, ed.) 3rd ed. p. 25.1—25.7 Blackwell, Oxford.
- [7] Melchers, F. et al. 1978 In *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81.
- [8] Shulman, M. and Köhler, G. 1978 *Nature* 276:269.
- [9] Yelton, D. E. et al. 1978 *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81:1.
- [10] Galfre, G. et al. 1979 *Nature* 277:131.
- [11] Iscove, N. N. and Schreier. 1979 In *Immunological Methods* (I. Lefkovits and B. Pernis, eds.) p. 379—385 Academic Press, N. Y.
- [12] Köhler, G., *ibid.* p. 391—395.
- [13] Köhler, G., *ibid.* p. 397—401.
- [14] Kearney, J. S. et al. 1979 *J. Immunol.* 123:1548.
- [15] Milstein, C. et al. 1979 *Cell Biology International Reports* 3:1.
- [16] Parks, D. R. et al. 1979 *Pror. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76:1962.
- [17] Sharon, J. et al. 1979 *ibid.* 75:1420.
- [18] Shulman, M. and Köhler, G. 1979 In *Cells of Immunoglobulin Synthesis* (B. Pernis and H. J. Vogel, eds) p. 275—295. Academic Press, N. Y.
- [19] Fazeks de St. Groth, S. and Scheidegger, D. 1980 *J. Immunol. Meth.* 35:1.
- [20] Hudson, L. and Hay, F. C. 1980 *Practical Immunology*, 2nd. p. 303—327, Black will, Oxford.
- [21] *Hybridoma Techniques*. EMBO, SKMB Course 1980 Basel.
- [22] Kennett, R. H. et al. 1980 *Monoclonal antibodies; hybridomas; a new dimension in biological analysis*. Plenum, N. Y.
- [23] Mistein, C. and Lennox, E. 1980 *Curr. Top. Develop. Biol.* 14:1.
- [24] Olsson, L. and Kaplan, H. S. 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:5429.
- [25] Vernon T. Oi and Herzenberg, L. A. 1980 In *Selected methods in Cellular Immunology*, (B. B. Mishell and S. M. Shiigi, eds) p. 351—372. Freeman, San Francisco.
- [26] Wade, N. 1980 *Science* 208:692.
- [27] Roger, L. 1981 *Science* 212:767.