

单克隆抗体的制备过程

1975 年 Kohler 和 Milstein 发现将小鼠骨髓瘤细胞与和绵羊红细胞免疫的小脾细胞进行融合，形成的杂交瘤细胞既可产生抗体，又可无性繁殖，从而创立了单克隆抗体杂交瘤技术。这一技术上的突破使血清学的研究进入了一个高度精确的新纪元。

采用杂交瘤技术制备单克隆抗体包括动物免疫、细胞融合、选择杂交瘤、检测抗体、杂交瘤细胞的克隆化、冻存以及单克隆抗体的大量生产，要经过几个月的一系列实验步骤。

主要仪器设备：

超净工作台、CO₂ 恒温培养箱、超低温冰箱（-70℃）、倒置显微镜、精密天平或电子天平、液氮罐、离心机（水平转子，4000r/min）、37℃水浴箱、纯水装置、滤器、真空泵等。其需要的主要器械包括：100ml、50ml、25ml 细胞培养瓶，10ml、1ml 刻度吸管，试管，滴管（弯头、直头），平皿，烧杯，500ml、250ml、100ml 盐水瓶，青霉素小瓶，10ml、5ml、1ml 注射器等，96 孔、24 孔细胞培养板，融合管（50ml 圆底带盖玻璃或塑料离心管），眼科剪刀，眼科镊，血细胞计数板，可调微量加样器（~50ul，~200ul，~1000ul），弯头针头，200 目筛网，小鼠固定装置等。此外，一般的单克隆抗体制备方法大同小异。

杂交瘤技术制备单克隆抗体的主要步骤包括：

- （1）抗原制备；
- （2）免疫动物；
- （3）免疫脾细胞和骨髓瘤细胞的制备；
- （4）细胞融合；
- （5）杂交瘤细胞的选择培养；
- （6）杂交瘤细胞的筛选；
- （7）杂交瘤细胞的克隆化；
- （8）单克隆抗体的检定；

(9) 分泌单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立;

(10) 单克隆抗体的大量制备。

下面简要介绍单克隆抗体的制备过程:

1、免疫动物 免疫动物是用目的抗原免疫小鼠,使小鼠产生致敏 B 淋巴细胞的过程。一般选用 6-8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,按照预先制定的免疫方案进行免疫注射。抗原通过血液循环或淋巴循环进入外周免疫器官,刺激相应 B 淋巴细胞克隆,使其活化、增殖,并分化成为致敏 B 淋巴细胞。

2、细胞融合 采用眼球摘除放血法处死小鼠,无菌操作取出脾脏,在平皿内挤压研磨,制备脾细胞悬液。将准备好的同系骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞按一定比例混合,并加入促融合剂聚乙二醇。在聚乙二醇作用下,各种淋巴细胞可与骨髓瘤细胞发生融合,形成杂交瘤细胞。

3、选择性培养 选择性培养的目的是筛选融合的杂交瘤细胞,一般采用 HAT 选择性培养基。在 HAT 培养基中,未融合的骨髓瘤细胞因缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶,不能利用补救途径合成 DNA 而死亡。未融合的淋巴细胞虽具有次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶,但其本身不能在体外长期存活也逐渐死亡。只有融合的杂交瘤细胞由于从脾细胞获得了次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶,并具有骨髓瘤细胞能无限增殖的特性,因此能在 HAT 培养基中存活和增殖。

4、杂交瘤阳性克隆的筛选与克隆化 在 HAT 培养基中生长的杂交瘤细胞,只有少数是分泌预定特异性单克隆抗体的细胞,因此,必须进行筛选和克隆化。通常采用有限稀释法进行杂交瘤细胞的克隆化培养。采用灵敏、快速、特异的免疫学方法,筛选出能产生所需单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞,并进行克隆扩增。经过全面鉴定其所分泌单克隆抗体的免疫球蛋白类型、亚类、特异性、亲和力、识别抗原的表位及其分子量后,及时进行冻存。

5、单克隆抗体的大量制备 单克隆抗体的大量制备重要采用动物体内诱生法和体外培养法。

(1) 体内诱生法 取 Balb/c 小鼠,首先腹腔注射 0.5ml 液体石蜡或降植烷进行预处理。1-2 周后,腹腔内接种杂交瘤细胞。杂交瘤细胞在小鼠腹腔内增殖,并产生和分泌单克隆抗体。约 1-2 周,可见小鼠腹部膨大。用注射器抽取腹水,即可获得大量单克隆抗体。

(2) 体外培养法 将杂交瘤细胞置于培养瓶中进行培养。在培养过程中,杂交瘤细胞产生并分泌单克隆抗体,收集培养上清液,离心去除细胞及其碎片,即可获得所需要的单克隆抗体。但这种方法产生的抗体量有限。近年来,各种新型培养技术和装置不断出现,大大提高了抗体的生产量。

具体方法:

方法:

动物的选择与免疫

1. 动物的选择

纯种 BALB/C 小鼠，较温顺，离窝的活动范围小，体弱，食量及排污较小，一般环境洁净的实验室均能饲养成活。目前开展杂交瘤技术的实验室多选用纯种 BALB/C 小鼠。

2. 免疫方案

选择合适的免疫方案对于细胞融合杂交的成功，获得高质量的 McAb 至关重要。一般在融合前两个月左右根据确立免疫方案开始初次免疫，免疫方案应根据抗原的特性不同而定。

（1）可溶性抗原免疫原性较弱，一般要加佐剂，半抗原应先制备免疫原，再加佐剂。常用佐剂：福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂。

初次免疫 抗原 $1\sim 50\ \mu\text{g}$ 加福氏完全佐剂皮下多点注射或脾内注射（一般 $0.8\sim 1\text{ml}, 0.2\text{ml}/\text{点}$ ）

↓ 3 周后

第二次免疫 剂量同上，加福氏不完全佐剂皮下或 ip（腹腔内注射）（ip 剂量不宜超过 0.5ml ）

↓ 3 周后

第三次免疫 剂量同一，不加佐剂，ip（5~7 天后采血测其效价）

↓ 2~3 周

加强免疫，剂量 $50\sim 500\ \mu\text{g}$ 为宜，ip 或 iv（静脉内注射）

↓ 3 天后

取脾融合

目前，用于可溶性抗原（特别是一些弱抗原）的免疫方案也不断有所更新，如：①将可溶性抗原颗粒化或固相化，一方面增强了抗原的免疫原性，另一方面可降低抗原的使用量。②改变抗原注入的途径，基础免疫可直接采用脾内注射。③使用细胞因子作为佐剂，提高机体的免疫应答水平，增强免疫细胞对抗原的反应性。

（2）颗粒抗原免疫性强，不加佐剂就可获得很好的免疫效果。以细胞性抗原为例，免疫时要求抗原量为 $1\sim 2\times 10^7$ 个细胞。

初次免疫 $1\times 10^7/0.5\text{ml}$ ip

↓ 2~3 周后

第二次免疫 $1\times 10^7/0.5\text{ml}$ ip

↓ 3 周后

加强免疫（融合前三天） $1\times 10^7/0.5\text{ml}$ ip 或 iv

↓

取脾融合

细胞融合

细胞融合前准备

1. 骨髓瘤细胞系的选择：骨髓瘤细胞应和免疫动物属于同一品系，这样杂交融合率高，也便于接种杂交瘤在同一品系小鼠腹腔内产生大量 **McAb**。常用的骨髓瘤细胞系见下表。

用于融合试验的主要骨髓瘤细胞系

名称	来源	耐受药物	Ig 链
			H L
P3/X63-Ag8(X63)	BALB/C 骨髓瘤 MOPC-21	8-氮鸟嘌呤	r1 K
P3/X63-Ag8.653(X63-Ag8.653)	P3/X63-Ag8	8-氮鸟嘌呤	— —
P3/NSI-1-Ag4-1(NS-1)	P3/X63-Ag8	8-氮鸟嘌呤	— K（不分泌型）
P3/X63-Ag8.Ul(P3Ul)	（X63×BALB/C 脾细胞）杂交瘤	8-氮鸟嘌呤	— —
SP2/0-Ag14(SP2/0)	（X63×BALB/C 脾细胞）杂交瘤	8-氮鸟嘌呤	— —
F0	BALB/C 骨髓瘤	8-氮鸟嘌呤	— —
S194/5.XXO.BU.1	P3/X63-Ag8	尿嘧啶核苷	— —
MPC11-45.6TG1.7	BALB/C 骨髓瘤 MPC-11	6-巯鸟嘌呤	r2b K
210.RCY3.Ag1.2.3	LOU 大鼠骨髓瘤 R210	8-氮鸟嘌呤	— K
GM15006TG-A12	人骨髓瘤 GM1500	6-巯鸟嘌呤	r1 K
U-266AR	人骨髓瘤 U-266	8-氮鸟嘌呤	ε λ

骨髓瘤细胞的培养可用一般的培养液，如 RPMI1640，DMEM 培养基。小牛血清的浓度一般在 10%~20%，细胞浓度以 104~5×105/ml 为宜，最大浓度不得超过 106/ml。当细胞处于对数生长的中期时，可按 1：3~1：10 的比例传代。每 3~5 天传代一次。细胞在传代过程中，部分细胞可能有返祖现象，应定期用 8-氮鸟嘌呤进行处理，使生存的细胞对 HAT 呈均一的敏感性。

2. 饲养细胞：在组织培养中，单个或少数分散的细胞不易生长繁殖，若加入其它活细胞，则可促进这些细胞生长繁殖，所加入的这种细胞数被称为饲养细胞。在制备 **McAb** 的过程中，许多环节需要加饲养细胞，如在杂交瘤细胞筛选、克隆化和扩大培养过程中，加入饲养细胞是十分必要的。常用的饲养细胞有：小鼠腹腔巨噬细胞（较为常用）、小鼠脾脏细胞或胸腺细胞。也有人用小鼠成纤维细胞系 3T3 经放射线照射后作为饲养细胞。饲养细胞的量为一般为 2×10^4 或 10^5 细胞/孔。

细胞融合的步骤

1. 制备饲养细胞层：一般选用小鼠腹腔巨噬细胞。

与免疫小鼠相同品系的小鼠，常用 BALB/C 小鼠，6~10 周

↓

拉颈处死，浸泡在 75%酒精内，3~5min

↓

用无菌剪刀剪开皮肤，暴露腹膜

↓

用无菌注射器注入 5~6ml 预冷的培养液（严禁刺破肠管）

↓

反复冲洗，吸出冲洗液

↓

冲洗液放入 10ml 离心管，1200rpm/分离 5~6min

↓

用 20%小牛血清（NCS）或胎牛血清（FCS）的培养液混悬，调整细胞数至 $1 \times 10^5/\text{ml}$

↓

加入 96 孔板， $100 \mu\text{l}/\text{孔}$

↓

放入 37. °C CO₂ 孵箱培养

2. 制备免疫脾细胞

最后一次加强免疫 3 天后小鼠拉颈处死

↓

无菌取脾脏，培养液洗一次

↓

脾脏研碎，过不锈钢筛网

↓

离心，细胞用培养液洗 2 次

↓

计数

↓

取 10⁸ 脾淋巴细胞悬液备用

3. 制备骨髓瘤细胞

取对数生长骨髓瘤细胞离心

↓

用无血清培养液洗 2 次

↓

计数，取得 ×10⁷ 细胞备用

4. 融合

(1) 将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1: 10 或 1: 5 的比例混合在一起，在 50ml 离心管中用无血清不完全培养液洗 1 次，离心，1200rpm, 8min; 弃上清，用吸管吸净残留液体，以免影响聚乙二醇 (PEG) 浓度。轻轻弹击离心管底，使细胞沉淀略松动。

(2) 90s 内加入 37℃ 预温的 1ml 45%PEG (分子量 4000) 溶液，边加边轻微摇动。37℃ 水浴作用 90s。

(3) 加 37℃ 预温的不完全培养液以终止 PEG 作用，每隔 2min 分别加入 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 和 6ml。

(4) 离心，800rpm, 6min。

(5) 充上清，用含 20% 小牛血清 HAT 选择培养液重悬。

(6) 将上述细胞，加到已有饲养细胞层的 96 孔板内，每孔加 100 μ l。一般一个免疫脾脏可接种 4 块 96 孔板。

(7) 将培养板置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。

选择杂交瘤细胞及抗体检测

1. HAT 选择杂交瘤细胞

脾细胞和骨髓瘤细胞经 PEG 处理后，形成多种细胞的混合体，只有脾细胞与骨髓瘤细胞形成的杂交瘤细胞才有意义。在 HAT 选择培养液中培养时，由于骨髓瘤细胞缺乏胸苷激酶或次黄嘌呤鸟嘌呤核糖转移酶，故不能生长繁殖，而杂交瘤细胞具有上述两种酶，在 HAT 选择培养液可以生长繁殖。

在用 HAT 选择培养 1~2 天内，将有大量瘤细胞死亡，3~4 天后瘤细胞消失，杂交细胞形成小集落，HAT 选择培养液维持 7~10 天后应换用 HT 培养液，再维持 2 周，改用一般培养液。在上述选择培养期间，杂交瘤细胞布满孔底 1/10 面积时，即可开始检测特异性抗体，筛选出所需要的杂交瘤细胞系。在选择培养期间，一般每 2~3 天换一半培养液。

2. 抗体的检测

检测抗体的方法应根据抗原的性质、抗体的类型不同，选择不同的筛选方法，一般以快速、简便、特异、敏感的方法为原则。

常用的方法有：

- (1) 放射免疫测定 (RIA) 可用于可溶性抗原、细胞 McAb 的检测
- (2) 。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 可用于可溶性抗原、细胞和病毒等 McAb 的检测。
- (3) 免疫荧光试验适合于细胞表面抗原的 McAb 的检测。
- (4) 其它如间接血凝试验、细胞毒性试验、旋转粘附双层吸附试验等。

杂交瘤的克隆化

杂交瘤克隆化一般是指将抗体阳性孔进行克隆化。因为经过 HAT 筛选后的杂交瘤克隆不能保证一个孔内只有一个克隆。在实际工作中，可能会有数个甚至更多的克隆，可能包括抗体分泌细胞、抗体非分泌细胞、所需要的抗体 (特异性抗体) 分泌细胞和其它无关抗体的分泌细胞。要想将这

些细胞彼此分开就需要克隆化。克隆化的原则是，对于检测抗体阳性的杂交克隆尽早进行克隆化，否则抗体分泌的细胞会被抗体非分泌的细胞所抑制，因为抗体非分泌细胞的生长速度比抗体分泌的细胞生长速度快，二者竞争的结果会使抗体分泌的细胞丢失。即使克隆化过的杂交瘤细胞也需要定期的再克隆，以防止杂交瘤细胞的突变或染色体丢失，从而丧失产生抗体的能力。

克隆化的方法很多，最常用的是有限稀释法和软琼脂平板法。

1. 有限稀释法克隆

- (1) 克隆前 1 天制备饲养细胞层（同细胞融合）。
- (2) 将要克隆的杂交瘤细胞从培养孔内轻轻吹干，计数。
- (3) 调整细胞为 3~10 个细胞/ml。
- (4) 取头天准备的饲养细胞层的细胞培养板，每孔加入稀释细胞 100 μ l。孵育于 37℃、5%CO₂ 孵箱中。
- (5) 在第 7 天换液，以后每 2~3 天换液 1 次。
- (6) 8~9 天可见细胞克隆形成，及时检测抗体活性。
- (7) 将阳性孔的细胞移至 24 孔板中扩大培养。
- (8) 每个克隆应尽快冻存。

2. 软琼脂培养法克隆

- (1) 软琼脂的配制：含有 20%NCS（小牛血清）的 2 倍浓缩的 RPMI1640。
 - ①1%琼脂水溶液：高压灭菌，42℃预热。
 - ②0.5%琼脂：由 1 份 1%琼脂加 1 份含 20%小牛血清的 2 倍浓缩的 RPMI1640 配制而成。置 42℃保温。
- (2) 用上述 0.5%琼脂液（含有饲养细胞）15ml 倾注于直径为 9cm 的平皿中，在室温中待凝固后作为基底层备用。
- (3) 按 100/ml，500/ml 或 5000/ml 等浓度配制需克隆的细胞悬液。
- (4) 1ml 0.5%琼脂液（42℃预热）在室温中分别与 1ml 不同浓度的细胞悬液相混合。
- (5) 混匀后立倾注于琼脂基底层上，在室温中 10min，使其凝固，孵育于 37℃、5%CO₂ 孵箱中。

(6) 4~5 天后即可见针尖大小白色克隆, 7~10 天后, 直接移种至含饲养细胞的 24 孔中进行培养。

(7) 检测抗体, 扩大培养, 必要是地再克隆化。

杂交瘤细胞的冻存与复苏

1. 杂交瘤细胞的冻存

及时冻存原始孔的杂交瘤细胞每次克隆化得到的亚克隆细胞是十分重要的。因为在没有建立一个稳定分泌抗体的细胞系的时候, 细胞的培养过程中随时可能发生细胞的污染、分泌抗体能力的丧失等等。如果没有原始细胞的冻存, 则可因上述意外而前功尽弃。

杂交瘤细胞的冻存方法同其他细胞系的冻存方法一样, 原则上细胞应在每支安瓿含 1×10^6 以上, 但对原始孔的杂交瘤细胞可以因培养环境不同而改变, 在 24 孔培养板中培养, 当长满孔底时, 一孔就可以装一支安瓿冻存。

细胞冻存液: 50%小牛血清; 40%不完全培养液; 10%DMSO (二甲基亚砷)。

冻存液最好预冷, 操作动作轻柔、迅速。冻存时从室温可立即降至 0°C 后放入 -70°C 超低温冰箱, 次日转入液氮中。也可用细胞冻存装置进行冻存。冻存细胞要定期复苏, 检查细胞的活性和分泌抗体的稳定性, 在液氮中细胞可保存数年或更长时间。

2. 细胞复苏方法

将玻璃安瓿自液氮中小心取出, 放 37°C 水浴中, 在 1min 内使冻存的细胞解冻, 将细胞用完全培养液洗涤两次, 然后移入头天已制备好的饲养层细胞的培养瓶内, 置 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养, 当细胞形成集落时, 检测抗体活性。

单克隆抗体的大量生产

大量生产单克隆抗体的方法主要有两种:

1. 体外使用旋转培养管大量培养杂交瘤细胞, 从一清液中获取单克隆抗体。但此方法产量低, 一般培养液内抗体含量为 $10 \sim 60 \mu\text{g/ml}$, 如果大量生产, 费用较高。

2. 体内接种杂交瘤细胞，制备腹水或血清。

(1) 实体瘤法：对数生长期的杂交瘤细胞按 $1\sim 3\times 10^7/\text{ml}$ 接种于小鼠背部皮下，每处注射 0.2ml,共 2~4 点。待肿瘤达到一定大小后（一般 10~20 天）则可采血，从血清中获得单克隆抗体的含量可达到 $1\sim 10\text{mg/ml}$ 。但采血量有限。

(2) 腹水的制备：常规是先腹腔注射 0.5ml Pristane (降植烷)或液体石蜡于 BALB/C 鼠，1~2 周后腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞，接种细胞 7~10 天后可产生腹水，密切观察动物的健康状况与腹水征象，待腹水尽可能多，而小鼠濒于死亡之前，处死小鼠，用滴管将腹水吸入试管中，一般一只小鼠可获 5~10ml 腹水。也可用注射器抽提腹水，可反复收集数次。腹水中单克隆抗体含量可达到 $5\sim 10\text{mg/ml}$ ，这是目前最常用的方法，还可将腹水中细胞冻存起来，复苏后转种小鼠腹腔则产生腹水块、量多。

单克隆抗体的鉴定

对制备的 McAb 进行系统的鉴定是十分必要的，应做下述几个方面的鉴定：

1. 抗体特异性的鉴定

除用免疫原（抗原）进行抗体的检测外，还应该用与其抗原成分相关的其它抗原进行交叉试验，方法可用 ELISA、IFA 法。例如：①制备抗黑色素瘤细胞的 McAb，除用黑色素瘤细胞反应外，还应该用其它脏器的肿瘤细胞和正常细胞进行交叉反应，以便挑选肿瘤特异性或肿瘤相关抗原的单克隆抗体。②制备抗重组的细胞因子的单克隆抗体，应首先考虑是否与表达菌株的蛋白有交叉反应，其次是与其它细胞因子间有无交叉。

2. McAb 的 Ig 类与亚类的鉴定

一般在用酶标或荧光素标记的第二抗体进行筛选时已经基本上确定了抗体的 Ig 类型。如果用的是酶标或荧光素标记的兔抗鼠 IgG 或 IgM，则检测出来的抗体一般是 IgG 类或 IgM 类。至于亚类则需要用标准抗亚类血清系统作双扩或夹心 ELISA 来确定。在作双扩试验时，如加入适量的 PEG（3%），更有利于沉淀线的形成。

3. McAb 中和活性的鉴定

用动物或细胞的保护实验来确定 McAb 的生物学活性。例如，如果确定抗病毒 McAb 的中和活性，则可用抗体和病毒同时接种于易感的动物或敏感的细胞，来观察动物或细胞是否得到抗体的保护。

4. McAb 识别抗原表位的鉴定

用竞争结合试验，测相加指数的方法，测定 **McAb** 所识别抗原位点，来确定 **McAb** 的识别的表位是否相同。

5. **McAb** 亲合力的鉴定

用 **ELISA** 或 **RIA** 竞争结合试验来确定 **McAb** 与相应抗原结合的亲合力。