

目 录

一. 前 言

二. 淋巴细胞杂交瘤技术的发展与建立

1. 细胞融合技术的发展

2. 骨髓细胞系的建立

三. 筛选融合细胞的原理

四. 淋巴细胞杂交瘤制作过程及注意事项

1. 细胞融合前的准备

试剂的准备

淋巴细胞的准备

骨髓瘤细胞的准备

饲养细胞的准备

2. 淋巴细胞杂交瘤制作过程

细胞融合过程

测定杂交瘤的产物

单个细胞培养(克隆化)

单克隆抗体的大量制备

杂交瘤细胞的保存

杂交瘤抗体的保存

3. 单克隆杂交瘤细胞特征的检查

五. 淋巴细胞杂交瘤技术的主要优点及待解决的问题

六. 杂交瘤单克隆抗体的应用

淋巴细胞杂交瘤技术与单克隆抗体

刘启鼎

一、前言

淋巴细胞杂交瘤技术是在体细胞融合技术的基础上发展起来的。1975年Kohler和Milstein将P₁-X₆₃-Ag8细胞系（一种小鼠浆细胞瘤）与经绵羊红细胞免疫过的小鼠脾细胞，用仙台病使两者融合，发现融合的细胞能分泌抗绵羊红细胞抗体。这种融合细胞既具有瘤细胞能在培养基中大量繁殖的能力，同时也具备免疫小鼠细胞分泌抗体的特性，称为B淋巴细胞杂交瘤。如果瘤细胞与T淋巴细胞融合，产生T淋巴细胞杂交瘤，则具有T淋巴细胞部分的结构和功能。

B淋巴细胞杂交瘤经过单个细胞培养（克隆化）形成细胞系后，能分泌统一的抗体。抗体的结构、氨基酸顺序和特异性等都是一致的，而且在培养过程中，只要没有变异，不同时间分泌的抗体都能保持同样的结构和功能。这种抗体称为单克隆抗体，是用其他方法所不能得到的。过去用动物制备抗体，由于不同种动物甚至同种不同个体的动物有着遗传学的差异，所得的抗体在结构上就有所不同，即使纯种动物所产生的抗体也是多克隆的，具有多种多样的特异性，达不到统一，用这类抗体作血清学试验时，常出现交叉反应，效果不甚理想。淋巴细胞杂交瘤这一带有“突破性”的新技术的建立，立即引起科学家们的重视，成为用分子水平研究免疫学的一种精确工具，推动分子免疫学的发展，与DNA重组技术并列为生物学的两大重要进展。

1975年到1978年间，杂交瘤方面的主要工作是建立比较

稳定的融合方法。1978年在美国召开了淋巴细胞杂交瘤的国际性会议。世界卫生组织于1979年10月和11月举办了两期学习班，推广这一新技术。几年来，这一技术在全世界迅速发展，一些杂志纷纷发表有关淋巴细胞杂交瘤研究的综述。近年来国内不少单位在这方面的工作亦处于方兴未艾，并取得了一定的成果。现仅就杂交瘤技术的建立与发展及淋巴细胞杂交瘤在方法及应用方面的进展，作一简略的介绍。

二、淋巴细胞杂交瘤技术的建立与发展

1. 细胞融合技术的发展

1907年Harrison首先把细胞在体外培养成功。

1938年Muller首先描述脊椎动物肿瘤细胞在体外融合成多核细胞的现象。

1958年日本冈田氏用高浓度的仙台病毒在体外成功地融合了小鼠艾氏腹水瘤。

1961年Harski等人首先在两种不同类型的细胞的混合培养物中获得自发的融合细胞。

1962年Okada意外地发现，仙台病毒可以诱发体内艾氏腹水瘤细胞彼此融合，细胞融合技术才迅速发展起来。

1964年Littlefield创立使用HAT选择培养基是筛选融合细胞的有效方法。

1965年，Havris首先成功地使用仙台病毒使体外培养的人HeLa细胞与小鼠艾氏腹水瘤细胞融合，从而证明不同种动物的细胞融合形成具有抗亲代细胞双方特征的杂种细胞。

1973年Milstein和Cotton在研究抗体合成的遗传控制时发现，小鼠骨髓瘤细胞与大鼠骨髓瘤细胞融合而成的杂种细

胞，不受等位基因互斥的限制，共显地表达来自二个亲代细胞的信息，分泌三种免疫球蛋白分子：小鼠 Ig，大鼠 Ig，以及轻、重链分别来自二个亲代的杂交 Ig 分子。差不多与此同时，Schwaber 和 Cohen 使小鼠骨髓瘤细胞与人外周血细胞融合，也获得了同时分泌小鼠和人免疫球蛋白的杂交细胞。

上述实验结果的启迪，使直接导致了 1975 年 Kohler 和 Milstein 的巨大成功。

2. 骨髓瘤细胞系的建立

直到二十世纪五十年代，在多发性骨髓瘤和巨球蛋白白血病等单细胞系高免疫球蛋白白血病患者血清中，发现含量甚高的化学结构均一的免疫球蛋白。并且，可在某些品系的大鼠和小鼠中用矿物油诱发分泌各类免疫球蛋白的骨髓瘤，然后从带瘤动物血清、腹水和尿中获取大量均一的免疫球蛋白供化学分析之用。这才导致了随后以揭示免疫球蛋白基本结构为中心的一系列重要发展。

此后，许多学者都开始了试图在体外建立能分泌均一骨髓瘤蛋白的浆细胞瘤株都没有能找到。

到 1965 年 Sach 访问 Salk 研究所时，与 Haribata 等人一起试验，用矿物油刺激 Balb/c 小鼠使诱生出骨髓瘤，成功地建立了第一株能在体外分泌大量 IgG₁ 类型的小鼠骨髓瘤细胞系 MOFC-21 (B₁) 只因当时此株细胞未能从冰冻状态复活而未予报道。

1970 年 Haribata 和 Harris 重新建立 B₁ (现称 B₁K)，由于操作改进，细胞培养成功又能保存，这就为 Kohler 和 Milstein 的杰出发现奠定了基础。

1972年Milstein等从BaLb/c小鼠B₂骨髓瘤中用20 μ g/ml 8-氮鸟嘌呤(8-azaguanine)筛选出适于细胞融合用的新的骨髓瘤细胞株,称之为P₂-X₆₃-Ag8。近年来又不断筛选出许多新的小鼠。大鼠的骨髓瘤细胞株。

1978年4月,在美国召开的国际会议上,用于淋巴细胞杂交瘤的细胞系有5种。见表一。

表一 1978年以前,淋巴细胞杂交瘤所用细胞系

全名	简称	来源小鼠	特点
P ₂ -X ₆₃ -Ag8	X-63	BaLb/c	浆细胞瘤,分泌 μ ,K
P ₂ -NSI-1-Ag4-1	NS-1	BaLb/c	浆细胞瘤,产生K,但不分泌。
MPC-11-X ₆₃ -6TG	X-45	BaLb/c	浆细胞瘤,分泌 μ b,
BW _{1.17}	BW	AKR	K,胸腺淋巴肉瘤。
BI-4	EI-4	C ₃ ,BI	胸腺淋巴肉瘤

到1980年底,新筛选的小鼠骨髓瘤细胞系。见表二。

表二 1978-1980年间产生的新细胞系

名称	分泌产物	染色体数	标志	来源
SP2/O-Ag14	无	73	对20 μ g/ml 8-氮杂鸟嘌呤有抗力	巴塞尔研究所
P1-BWL-Ouab	μ 2a \cdot K	55	对30 μ g/ml BUDR及5 \times 10 ⁻³ M哇巴因有耐受力	巴塞尔研究所

(续表二)

NSI-Ag4-1-Ouab	胞内有K	65	对 $20\mu\text{g/ml}$ 8-氮杂鸟嘌呤和 2×10^{-5} M 哇巴因有耐受力	Salk 研究所
X-63-Ag8-653	无	65	对 $20\mu\text{g/ml}$ 8-氮杂鸟嘌呤有耐受力	Kohn 遗传研究所

三. 筛选融合细胞的原理

细胞的分裂和繁殖取决于DNA的合成和复制, 细胞中DNA的合成可通过两条途径推行。

1. 嘌呤和嘧啶生物合成DNA (主要途径), 可被叶酸的拮抗剂氨基嘌呤 (A) 所阻断。

2. 旁路合成途径 (或称补偿通路)

通过次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转化酶 (HGPRT) 和胸腺嘧啶核苷酸激酶 (TK)。细胞可利用外源性次黄嘌呤 (H) 和胸腺嘧啶核苷 (T) 合成DNA, 缺乏其中任一种酶DNA就不能进行。但当这种缺乏某一种酶的细胞与另一种能供这种酶的细胞融合, 细胞就能生存下来。

杂交瘤由瘤细胞和脾细胞融合而成。瘤细胞缺乏HGPRT酶, 但小鼠脾细胞中有此酶存在, 所以杂交瘤具备HGPRT酶, 在选择培养基, 即HAT培养基 [含有次黄嘌呤 (hypoxanthine), 氨基嘌呤 (aminopterin) 及胸腺嘧啶核苷 (thymidine)。] 中, 杂交瘤细胞可以利用挽救旁路合成嘌呤核苷酸, 同时也可利

用本身固有的胸腺嘧啶核苷酸激酶将胸腺嘧啶核苷合成胸腺嘧啶核苷酸。因此杂交瘤可以合成DNA。细胞可以繁殖成克隆。

四、淋巴细胞杂交瘤制作过程及注意事项

要建成淋巴细胞杂交瘤，需选择好瘤细胞和淋巴细胞，并以合适的融合剂使两者融合，递经培养后，筛选融合细胞，测定其产物，进而进行单个细胞培养，获得单克隆杂交瘤，接种动物或培养制取抗体。全过程较为复杂，兹分述如下：

1. 细胞融合前的准备工作

(1) 试剂的准备

RPMI 1640、HAT培养液、HT培养液、50%的聚乙二醇(PEG)、小牛血清、10%二甲基亚砷等。(见附录)

小牛血清(FCS)Ig含量低，一般不干扰单克隆抗体的检定，故常采用。但在使用前应先进行细胞生长有效试验，以选定优质小牛血清。

PEG PEG能使两个细胞的膜融合，但本身也有毒性，浓度愈高毒性愈大，但以分子量1000的PEG，浓度为50%时，融合率可达100%。融合用的PEG溶液的PH对融合率也有影响，PH为8.0~8.2时融合率最高。

(2) 淋巴细胞的准备

用于融合的免疫细胞主要来自脾脏。用特异方法免疫时，淋巴结或其它淋巴组织亦可采用。作小鼠骨髓瘤细胞融合时，最常用的是小鼠脾细胞，也可用大鼠或人的脾脏细胞或淋巴细胞。

按照Burnet的细胞系选择学说，一个B淋巴细胞只能产生一种抗体，其“后代”也只能产生同样的抗体。因为抗体是由DNA上的基因所决定，而基因是可以遗传的。在正常情况下，

小鼠脾中含有能产生各种不同抗体的B淋巴细胞。据估计，一只纯种小鼠体内可有 $1 \sim 5 \times 10^7$ 种不同抗体，即有 $1 \sim 5 \times 10^7$ 种不同的B淋巴细胞。因此如用正常小鼠的脾细胞与小鼠瘤细胞融合，能获得分泌某一种特定抗体的机会极小，仅为千万分之一。为了提高获得某种杂交瘤的机会，就需要设法增加小鼠体内分泌该种抗体的B淋巴细胞的数量。最常用的方法是用特定抗原多次免疫，使产生特异性抗体的B淋巴细胞大量增殖，因而增加与骨髓瘤细胞融合的机会。

免疫动物一般采用8~12周龄（或16~18克）的小鼠。免疫原的纯度并非绝对重要，但不应混合有杂物，以免干扰免疫反应和特异性抗体的测定。

免疫程序依不同抗原及经验而异。进行融合的最适时间是在加强免疫后的第3~4天，此时可使抗原最近激活的B淋巴细胞定位于脾脏。也可使记忆B细胞处在激活和分裂状态，这种状态的B细胞最易与骨髓瘤细胞融合。小鼠分泌抗体的高峰期（免疫后第7~8天）融合，并非形成杂交瘤的最佳期，特异性杂交细胞产生很少。

免疫的方法与途径很多，各实验室不同。下面介绍几种免疫抗原的免疫方案，供参考。

可溶性抗原或病毒颗粒抗原：第一次抗原（按蛋白质含量 $10 \sim 100 \mu\text{g}$ /只鼠）加入等量福氏完全佐剂，腹腔或皮下多点注射；2~4周后以同量抗原加等量福氏不完全佐剂腹腔注射；2~6周后，融合前3~4天腹腔用大剂量抗原连续免疫，然后取脾细胞进行融合。

细胞（表面）抗原：用完整细胞不加佐剂，第一次腹腔注射

2×10^7 细胞/只鼠；2~3周后腹腔重复一次；3周后再腹腔或静脉加强注射，3天后取脾融合。

小鼠可使用各种纯种，由于P₁细胞系来自BaLb/c小鼠，因此用BaLb/c小鼠的脾细胞可以免除组织配型不同所引起的排斥，形成的杂交瘤可以接种到BaLb/c小鼠以产生大量抗体。采用其他系小鼠的脾细胞，融合后形成的杂交瘤，如欲接种动物，就必须用裸鼠或BaLb/c与所用小鼠系杂交的第一代小鼠。

(3)骨髓瘤细胞的准备

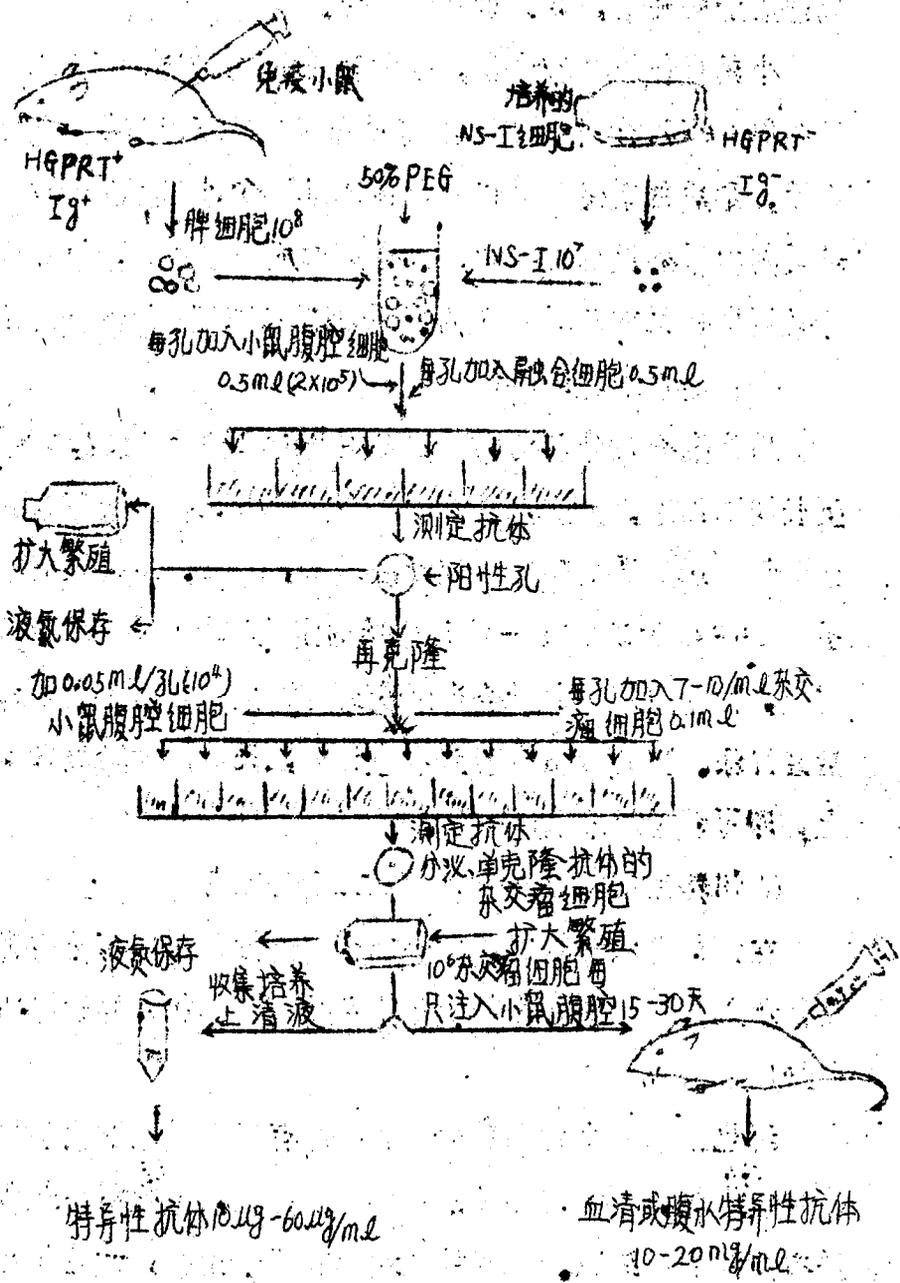
用于融合的骨髓瘤细胞，必须是对HAT敏感的，处于对数生长期的细胞。为此，最好于融合前一周，将骨髓瘤细胞转移至原用于筛选建系的碱基类似物致死剂，例如，B₁-X₆₃-Ag8瘤系为 $20 \mu\text{g/ml}$ 的8-氮鸟嘌呤的完全培养液中培养，而后逐步扩大，使细胞浓度于融合当天达到对数生长期的 $10^7/\text{ml}$ ，最后经洗涤，离心后用台盼兰染色计数，证明活细胞数在95%以上，即可制成悬液供融合用。

(4)饲养细胞(Feeder cell)的准备

在体外组织培养中，单个或少数分散的细胞不易生存与繁殖，必需加入其他活细胞才能使之生存并繁殖。加入的细胞叫做“饲养细胞”。

淋巴细胞杂交瘤常用的饲养细胞有腹腔巨噬细胞和胸腺细胞，为方便起见，通常多用小鼠腹腔渗出细胞，其中主要是巨噬细胞，并有少量淋巴细胞。加入巨噬细胞有二个作用，一是作为饲养细胞，一是清除培养中的死细胞，当杂交瘤生长不好，或由液氮复苏瘤细胞时加巨噬细胞可以加速瘤细胞的生长。

2. 淋巴细胞杂交瘤制作过程(参见图)



分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞产生程序图解

(1)细胞融合过程

(1) 将 10^8 个小鼠脾细胞与 10^7 个骨髓瘤细胞混合于 50 毫升离心管中，1000 转/分离心 10 分钟。

(11) 去上清，尽可能去得干净，用手指轻击离心管底部，使沉淀混匀如糊状，离心管置 37°C 水浴中。

(111) 加 50% PEG 融合剂 0.5 毫升 (37°C 予温)，用滴管缓慢滴入离心管中，在一分钟内滴完，在 37°C 水浴中边滴边摇动离心管，使细胞保持混匀状态。

(1V) 加完 PEG 后，将细胞悬液放在 37°C 水浴中静止 90 秒钟，立即在 2 分钟内，加入 15 毫升无血清的 RPMI - 1640 (37°C)，开始要一滴一滴加，由于 RPMI - 1640 的稀释使 PEG 停止作用。注意尽可能不搅动细胞。

(V) 1000 转/分，离心 7 分钟，去上清。加 25 毫升 HAT 培养液，轻轻混匀。将混悬液分装于已有巨噬细胞的 2 个 24 孔培养板中，每孔 0.5 毫升。培养板置 37°C，5% 的 CO_2 培养箱内孵育。

(VI) 每 3 天换一次 HAT 培养液，连续 2 周。经常记录杂交瘤是否出现，2 周后可改用 HT 培养液。

(2)测定杂交瘤的产物

在 HAT 培养液中，未融合的细胞逐渐死亡，大约在融合后 3~5 天，即可于逐渐清晰起来的背景上发现浑圆透亮的杂交瘤，待杂交瘤细胞克隆长至孔底 1/10 以上面积，即可取上清 中有无特异性抗体。对 T 淋巴细胞杂交瘤则要测试上清中 有无 T 淋巴细胞产物 (如淋巴因子、抑制因子等)，或测试杂交瘤表面上 有无 T 淋巴细胞的标志。

B淋巴细胞杂交瘤在培养中产生的抗体量不高，一般只有 $10 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 。由于融合时一个培养孔中可能有一种以上杂交瘤细胞，所以产生的特异性抗体的量就更少，必须用敏感的方法测试抗体。常用的有同位素法、酶标法(ELISA)、间接血凝法、间接免疫荧光法等；用以测试上清中的微量抗体。最好在不同间隔，每孔测2~3次，阳性孔保留，阴性孔可放弃。

(3)单个细胞培养(克隆化)

一旦确定有抗体活性的细胞，应立即进行克隆培养，以防止其它无关细胞过度生长而超越抗体产生细胞。由于一个培养孔中，不只存在一种杂交瘤，因此需要纯化，或克隆化，即选出单个细胞使之繁殖成一个细胞系，称之为一个克隆。这一细胞系所产生的抗体或表面标志都是均一的，纯的。

及时进行克隆化，在杂交瘤技术中是很重要的一环。一般分泌抗体的克隆都生长较慢，所以在发现上清出现特异性抗体后，要及早克隆化。融合后不久的杂交瘤染色体的数量还不稳定，还会继续丢失一部分染色体。及早克隆能防止其他杂交瘤的干扰，但形成克隆后，如有部分杂交瘤继续丢失染色体，还会使克隆化后的杂交瘤失去产生特异性抗体的能力。克隆化在长期培养中也会产生变异，使克隆不纯。因此，获得产生特异性抗体的克隆之后，要定期测定上清抗体的滴度，如滴度下降，就要再次进行克隆化，以保持原有杂交瘤的继续传代。

克隆化的方法：主要有(1)用显微操作技术，用毛细管选取一个细胞进行培养。(2)在琼脂中作特异性空斑，选取空斑中心的细胞作培养。(3)有限稀释法(最常用的方法)，将杂交瘤细胞稀释到7~10个/毫升，再分种于96孔培养板中，每孔0.1毫升，

经常观察孔中是否只有一个群落生长。(5)应用荧光激活分离器(FACS)将特异性杂交瘤细胞单个放入96孔培养板中。在克隆化时,一定要放入适量的饲养细胞,以协助杂交瘤生长繁殖。

获得单克隆杂交瘤后,可在培养中传代,同时要在液氮中低温保存,必要时可以接种Balb/c小鼠或裸鼠。

(4) 单克隆抗体的大量制备

(1) 体外培养 当杂交瘤细胞克隆化成功时,即可进行增殖。由于刚获得的杂交瘤细胞不能耐受稀释,因此培养物应逐步扩大。先将96孔培养板中抗体阳性细胞作1:3或1:5稀释,移至24孔的培养板中培养,再由24孔抗体阳性的细胞扩大到小瓶。培养时,最好先在孔或瓶中加入饲养细胞。培养液中的抗体浓度一般可达 $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

(11) 小鼠体内培养 将产生专一性抗体的杂交瘤细胞于同系小鼠或裸鼠作皮下或腹腔注射,杂交瘤在小鼠体内生长,可产生大量的抗体。若从血液中获得抗体,采血量有限,因此可采用一种能获得较大量腹水的方法,即先在小鼠腹腔内注射0.5 ml 降植烷(Pristane)或液体石蜡,1~2周后再于腹腔内注射 $10^2 \sim 10^3$ 杂交瘤细胞,2~4周后小鼠出现腹水。每只小鼠约可抽出5~10毫升腹水,腹水中抗体滴度很高,其单克隆抗体浓度可达 $1 \sim 10 \text{mg}/\text{ml}$ 。目前它已成为大量制备单克隆抗体的主要方法。

(5) 杂交瘤细胞的保存

杂交瘤细胞可用冷冻方法保存,经复苏后又可传代培养。这样使建立的专一性单克隆抗体的杂交瘤细胞株不至丢失而保存下来。

冻存液：小牛血清 9 份
二甲基亚砜 1 份
混合，高压灭菌后放 4℃ 备用

冻存方法：离心收集杂交瘤细胞，悬于冰冷的冻存液内，使每 ml 冻存液内含 $1 \sim 5 \times 10^6$ 细胞或 10^7 细胞，分装于冻存细胞保存瓶中，先将冻存瓶在 -40℃ 冰箱预冷 24 小时后再放液氮罐中保存。

(6) 杂交瘤抗体的保存

尽管抗体分子很稳定，但贮存不当则会丧失活性，切忌反复冻融冷冻干燥。一般将杂交瘤抗体分装小剂量冰存于 -70℃，只冻融一次。如为培养液上清，加入 0.1% NaH₂PO₄，4℃ 保存十分稳定。

3. 单克隆杂交瘤细胞特征的检查

(1) 染色体检查。当杂交细胞核内含有两亲代细胞的染色体特征和数量时，方可认定为杂交细胞。B 淋巴细胞的杂交瘤细胞，如为种内形成的，其染色体数应为双亲染色体之和或稍低。种间杂交形成的细胞。往往保存一种亲代的染色体而丢失另一亲代的染色体。T 淋巴细胞杂交瘤的染色体数目常低于双亲染色体之和，表明有染色体的丢失。

(2) 抗体蛋白特征检查：使用单克隆抗体时，一般不需要提纯。但瘤细胞分泌的 Ig 与脾细胞分泌的 Ig，其轻链、重链分子任意结合，可产生 16 种不同的免疫球蛋白分子，故需了解抗体球蛋白的类别、亚类、链组成、分子量等特征。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，等电聚焦电泳，放射免疫测定等都是较敏感的方法。

五. 淋巴细胞杂交瘤技术的主要优点及待解决的问题

优点：

1. 特异性高。同任何抗原如人体各种细胞、激素、酶类、动物、植物病原体和肿瘤细胞、异体蛋白或糖蛋白等，均可利用淋巴细胞杂交瘤技术获得相应的单克隆抗体。
 2. 纯度高。用此技术制备的单克隆抗体，化学结构完全相同。
 3. 来源充足、产量高。优质的杂交瘤株一旦成功就可源源不断提供大量的单克隆抗体可作为标准免疫学试剂使用。
 4. 可用不纯的抗原制备纯质的单克隆抗体。
 5. 杂交瘤细胞在体外培养过程中合成的抗体，极易通过在培养液中添加放射性同位素而获得标记。
 6. 若将生产单克隆抗体建成为新型产业，投资少，收效大。
- 尚待解决的问题：

1. 受免疫抗原的限制，难以得到优质的杂交瘤细胞。
2. 融合率较低，筛选工作量大。一些杂交瘤细胞在抗体分泌上显得很不稳定。
3. 尚需建立范围更为广泛，符合各种细胞融合要求的骨髓瘤系，特别是人的骨髓瘤系。
4. 制备中还有许多技术问题待进一步深入研究，如适合不同单克隆抗体特性的检测筛选方法。此外开展单克隆抗体工作所用的器皿、设备急需商品化、标准化。

六、杂交瘤单克隆抗体的应用

单克隆抗体技术自1975年问世以来，已在生物—医学的各个领域里获得了日益广泛的应用。世界上绝大多数免疫学实验室都已采用单克隆抗体作为研究试剂，研究可分为基础和应用两方面。基础研究包括对免疫细胞、免疫球蛋白、免疫遗传学和临床

免疫学等方面。因为单克隆抗体试剂具有针对病原体抗原成分中单个决定簇的特点，可用作对疾病的快速诊断，病原体精确分型，疫苗检验，抗原提纯和疫苗制造，流行病等方面的应用。

应用：

1. 微生物学

(1)细菌或病毒的鉴别诊断，分型和亚型诊断。

(2)细菌抗原体结构分析与提取；病毒蛋白结构分析和基因变化的研究。

(3)为DIA, ELISA 提供纯抗体。

(4)体内微量抗原的测定。

(5)有效保护性抗原的提纯；纯化菌苗；亚单位疫苗的研制。

(6)治疗用各种抗毒素。抗血清的纯化和效价的提高。

2. 寄生虫学

(1)免疫诊断和分型。对某些不易获得大量抗原材料，如宿主体内某一期的寄生虫或不能大量培养的寄生虫特别有价值。

(2)制成免疫吸附柱分离提纯抗原和功能的研究。

(3)鉴定寄生虫细胞膜上与宿主抗寄生免疫功能有关的抗原决定簇。

(4)研究对同一抗原产生的各种同种异型单克隆抗体作为效应分子对杀伤寄生虫的相对有效性。

(5)保护性抗体的研制

3. 免疫学

(1)细胞表面抗原决定簇的研究

(2)鉴别不同细胞的亚群，来源，分化过程和功能。

(3)识别细胞表面距离很近的或仅有微小差别的抗原决定簇，如

HLA 的 2A, B, C 和微球蛋白 M₁ 等。

(4) 抗体结构的研究

(5) 免疫球蛋白的生物合成和调控的研究。

4. 肿瘤学

(1) 利用单克隆抗体与肿瘤细胞相关抗原的特异结合力，对肿瘤病作早期诊断。

(2) 用放射性同位素标记后在血循环或组织内对肿瘤细胞作追踪检查，如肿瘤转移，扩散与病灶定位检查。为予后的判定提供资料。

(3) 对实体瘤可检查其扩散的部位和范围，以确定手术时机或化疗方案。

(4) 利用单克隆抗体检测某些癌的特异产物来作早期诊断。

(5) 若特异性抗体携带对细胞毒性作用很强的化学药物，或标记放射物，抗体就可聚集在肿瘤细胞上，起到“靶性药物疗法”的效果。

5. 组织移植

(1) 抗 HLA 的单克隆抗体可用于移植术的组织配型，在临床上可以提高器官移植的成功。

(2) 为组织分型提供无限量的高效价的诊断试剂，并可用于纯化和研究这些抗原的结构和生物学作用。

6. 其他

(1) 生化制剂的研究

(2) 抗原的提纯。

(3) 核酸与自家抗体：对 DNA，变性 DNA，核粒体 RNA 的单克隆抗体用以研究核酸的结构，自家抗体，以及自家抗原在机体

免疫应答的基础。

总之，许多科技工作者正在生物学和医学的各个领域积极努力使单克隆抗体这一新技术发挥最佳作用。其应用将日益广泛。

附录：试剂的配置

1. RPMI 1640 培养基的配制法：

RPMI 1640 粉	20.8 克
丙酮酸钠	0.22 克
Hepes	11.9 克
蒸馏水	2000 ml

溶解后，过滤除菌，分装，在 4℃ 中保存。

2. 200 mM L-谷酰胺的配制

L-谷酰胺	2.922 克
蒸馏水	100 ml

溶解后，过滤除菌，分装小瓶，每瓶 1 ml，在 -20℃ 保存。

3. 抗菌素的配制法：(10000 单位/ml)

青霉素	100 万单位
链霉素	100 万 μ g
灭菌蒸馏水	100 ml

溶解后，无菌手续分装小瓶，每瓶 1 ml，在 -20℃ 冰冻保存。

4. 两性霉素 B (25 μ g/ml) 配制方法：

两性霉素 B	2.5 mg
蒸馏水	100 ml

过滤除菌，分装小瓶，每瓶1ml，在-20°C保存。

5. 5%碳酸氢钠 (NaHCO₃) 配制方法:

NaHCO ₃	5 g
蒸馏水	100ml

8磅高压灭菌15分钟，分装小瓶，每瓶4.2ml，在4°C保存。

6. 次黄嘌呤及胸腺嘧啶核苷 (HT) 母液 (×100)

配制方法:

次黄嘌呤 (H) 10 ⁻³ M	136.1mg
胸腺嘧啶核苷 (T) 1.6×10 ⁻³ M	38.8mg
蒸馏水	100 ml

在45~50°C水浴箱溶解，过滤除菌，分装小试管内，每管1ml，在-20°C中保存。

7. 氨基喋呤 (A) 母液 (×100) 的配制方法:

氨基喋呤 4×10 ⁻³ M	1.76mg
蒸馏水	90ml
1N氢氧化钠	0.5ml

溶解后，加入

1N盐酸 (中和)	0.5ml
补充蒸馏水至	100ml

过滤除菌，分装小试管内，每管1ml，在-20°C保存。

8. RPMI 1640 完全培养基配制法:

RPMI 1640 培养液	100ml
L-谷酰胺 200mM	1ml

抗菌素 (青霉素+链霉素各10000单位/ml) 1ml

两性霉素 (25 μ g/ml)	1ml
5%碳酸氢钠	4.2ml
灭活小牛血清	15ml

9. HAT培养基的配制法:

RPMI 1640 完全培养基	100ml
100XHT 母液	1ml
100XA母液	1ml

10. HT培养基的配制法:

RPMI 1640 完全培养基	100ml
100XHT 母液	1ml

11. 无血清 RPMI 1640 的配制法:

RPMI 1640 培养液	100ml
L-谷酰胺 200mM	1ml
抗菌素 (青霉素+链霉素各 10000 单位)	1ml
5%碳酸氢钠	4.2ml

12. 50% 聚乙烯二醇 (PEG) 液的配制法: (w/v)

PEG	10g
-----	-----

8磅15分钟, 或者在开水中煮沸 30 分钟灭菌并融化, 冷至 50°C 时, 加入

RPMI 1640 无血清培养基	10ml
------------------	------

混合均匀, 分装小试管, 每管 0.5ml, 在冷冻中保存。

13. 0.15M pH7.2 枸橼酸钠 - PBS 配制法:

NaCl	6.4g
KCl	0.16g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.32g

KH_2PO_4 0.16g

枸橼酸钠 7.6g

蒸馏水 1000ml

8磅15分高压灭菌后，分装100ml一瓶，在4℃保存。

14. 10%二甲基亚砷细胞保存液配制法：二甲基亚砷，经8磅15分高压灭菌后，取1ml，加灭活小牛血清9ml，混匀后，在-4℃保存。

15. 8-氮杂鸟嘌呤液(X100)配制法。

8-氮杂鸟嘌呤 0.152g

0.36% NaHCO_3 1.0ml

4N NaOH 1.0ml

蒸馏水 100ml

过滤除菌，分装小瓶，每瓶1ml，在-4℃保存。

参 考 文 献

1. Kohler G et al: Nature 256: 495, 1975
2. Millstein C: Scientific American 243(4): 66, 1980.
3. Goding J W: J Immunol Methods 39: 285, 1980.
4. 刘尔翔: 《北京医学》2(4): 245, 1980.
5. 蔡玲民: 《微生物学免疫学译刊》3: 22, 1983.
6. 戴顺志: 《国外医学—免疫学分册》6(4): 169, 1983.
7. 卜凤荣: 《国外医学—免疫学分册》6(4) 179-183, 1983.

8. 刘尔翔:《杂交瘤技术在寄生虫病方面的应用》人民出版社1981。

9. Oxford J: J Hyg Camb 88: 361, 1982.

10. 桥本嘉幸: 免疫と疾患 5(2): 171, 1983.

[General Information]

书名=全国高校基础微生物学讲座及教学经验交流班 淋巴细胞杂交瘤技术与单克隆抗体

作者=复旦大学生物系微生物教研组

页数=22

SS号=11455530

出版日期=