

第四章 抗体制药

4.2 单克隆抗体及其制备

一、课程目标

1) 知识学习目标

重点：单克隆抗体及其制备工艺流程

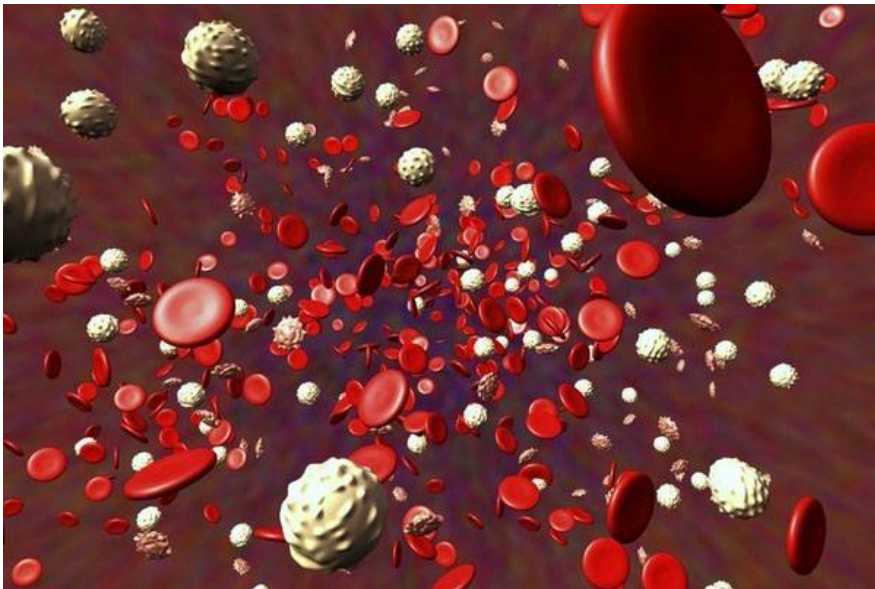
难点：单克隆抗体的制备

2) 思政育人

免疫功能两面性，细胞因子风暴，促使学生逐步学会用辩证方法去思考问题，树立辩证唯物主义世界。

二、思政案例

细胞因子风暴：“细胞因子风暴”，主要是指免疫系统反应过度，其实质是过多的“细胞因子”诱导免疫系统激活大量的免疫细胞。



三、课程组织

引入：单克隆抗体是将抗体产生细胞与具有无限增殖能力的骨髓瘤细胞相融合，通过有限稀释法及克隆化使杂交瘤细胞成为纯一的单克隆细胞系而产生的。

知识点讲解：抗原与动物免疫

1、抗原的制备

制备特定抗原的单克隆抗体,首先要制备用于免疫的适当抗原,再用抗原进行动物免疫。有的抗原可以用化学合成,地高辛多数抗原物为混合物须经免疫、筛选、克隆化;而恶性肿瘤细胞的表面抗原的单克隆抗体时,则需要有整个肿瘤细胞作为免疫原,制备出仅存在于肿瘤细胞而不存在于正常细胞上的表面标志分子的单克隆抗体。

为使杂交瘤细胞稳定,免疫动物和骨髓瘤细胞供体同一品系动物进行免疫。目前常用的骨髓瘤细胞系多来自 BALB/c 小鼠和 LOU 大鼠,因此免疫动物也采用相应的品系。

课程思政: 免疫系统针对抗原产生抗体,但过犹不及,过度免疫会对机体造成损伤。

目的:促使学生逐步学会用辩证方法去思考问题,树立辩证唯物主义世界。

2、免疫的方法采用体内免疫法和体外免疫法。

(1) 体内免疫法

适用于免疫原性强、抗原量较多时应用,一般用 8~12 周龄雌性鼠。

颗粒性抗原(如细菌细胞抗原)的免疫原性强,可不加佐剂,直接注入腹腔 10⁷ 个细胞进行初次免疫,间隔 1~3 周,再追加免疫 1~2 次。可溶性抗原按每只小鼠 10~100 μ g 抗原与福氏完全佐剂(由于不同个体对同一抗原的反应性不同,而且不同抗原产生免疫反应的能力也有强有弱,因此常常在注射抗原的同时,加入能增强抗原的抗原性物质,以刺激机体产生较强的免疫反应,这种物质称为免疫佐剂)等量混合后注入腹腔内,进行初次免疫,间隔 2~4 周,再用不加佐剂原抗原追加免疫 1~2 次。一般再采脾细胞前 3 日由静脉注射最后一次抗原,刺激 B 细胞分裂。

脾(脾脏是人体重要的免疫器官,也是最大的免疫器官)内免疫法即在麻醉下直接将 0.1~0.2ml 抗原注入脾脏进行免疫。细胞抗原需 10⁵ 个,可溶性抗原需 10 μ g。

(2) 体外免疫法

体外免疫法用于不能采用体内免疫的情况下,如制备人源性单克隆抗体,免疫源性极弱,易引起免疫抑制。

优点:需抗原量少,免疫期短,干扰因素少。

体外免疫法:用 4~8 周龄 BALB/c 小鼠的脾脏制成单细胞悬液,再加入适当抗原使其浓度达 0.5~5 μ g/ml,在 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 下培养 4~5 天,再分离脾细胞,进行细胞融合。

知识点二讲解:细胞融合与杂交瘤细胞的选择性培养

1、细胞融合的方法

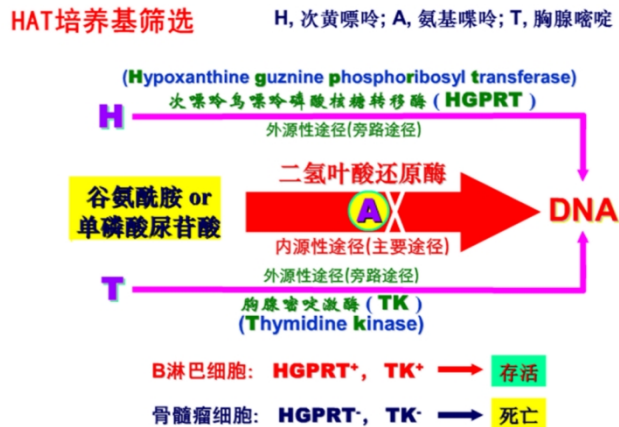
取脾细胞（ 1×10^8 ）与骨髓瘤细胞（ 2×10^7 ）混合，聚乙二醇诱导下融合，2 分钟，然后用培养液将融合液缓慢稀释。

用于细胞融合的骨髓瘤细胞应具有融合率高，自身不分泌抗体，所产生的杂交瘤细胞分泌抗体能力强，长期稳定。

PEG 相对分子量 4000，浓度为 50%；二甲基亚砜增加融合率。

细胞融合后可产生多种融合，脾—脾、脾—瘤、瘤—瘤融合细胞，以及未融合的细胞。

2、杂交瘤细胞的选择性培养



培养基为 HAT 培养液。次黄嘌呤（H）氨基喋呤（A）胸腺嘧啶（T）配制。HAT 选择性培养基：细胞的 DNA 生物合成有两条途径，一条是生物合成的主要途径，即由氨基酸及其小分子化合物合成核苷酸，进而合成 DNA。在这一合成途径中，叶酸作为重要的辅酶。另一途径为辅助途径，以次黄嘌呤和胸腺嘧啶为原料，在次黄嘌呤-鸟嘌呤核苷酸转换酶(HGPRT)或胸腺嘧啶激酶（TK）的催化作用下合成 DNA。HAT 培养基中含有氨基喋呤（为叶酸拮抗剂），故所有细胞的 DNA 主要合成途径均被阻断，只能通过辅助进行 DNA 的合成。HGPRT 缺陷型或 TK 缺陷型的骨髓瘤细胞在 HAT 培养基中因不能通过旁路合成 DNA 而死亡。脾细胞虽有 HGPRT 或 TK，但不能在体外长期培养繁殖，一般在 2 周内死亡。而杂交瘤细胞因从脾细胞获得 HGPRT 或 TK，可通过旁路合成 DNA，同时又具备肿瘤细胞的特点，在体外培养中可以长期繁殖生长。饲养细胞：在体外的细胞培养中，单个的或数量很少的细胞不易生存与繁殖，必须加入其它活的细胞才能使其生长繁殖，加入的细胞称之为饲养细胞（Feeder cell）。

先用 HAT 培养液培养一周，杀死肿瘤细胞；第二周用 HT 培养液，使融合细胞通过正

常的 DNA 合成途径进行合成；第三周开始用完全培养液进行培养。

知识点三讲解：筛选阳性克隆与克隆化

筛选阳性克隆常用检测方法：

酶免疫技术（ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay）：可以定量，也可以定性。

免疫荧光技术：以荧光素为标记，与已知的抗体（或抗原）结合，但不影响其免疫活性。然后将荧光素标记的抗体作为标准试剂，用于检测和鉴定未知的抗原。在荧光显微镜下，可以直接观察呈特异荧光的抗原抗体复合物及其存在部位。

克隆化是指单个细胞通过无性繁殖而获得细胞集团的整个培养过程。常用有限稀释法和软琼脂法。

知识点四讲解：杂交瘤细胞与抗体性状的鉴定

杂交瘤细胞鉴定：染色体分析。它是鉴定的客观指标，了解分泌抗体的能力。

单抗进行 Ig 类和亚类鉴定：亲和力、特异性、纯度、分子量测定。

知识点五讲解：单克隆抗体的大量制备

体外培养法：细胞培养可获的 10 μ g/mL 抗体

体内诱生法：可获得 5~20mg/mL 抗体，用 BALB/c 小鼠。

膦脂烷（破坏腹腔内膜）→接种杂交瘤细胞→取腹水→离心→上清。

知识点六讲解：单克隆抗体的纯化

依单抗 IgG 类和亚类不同，选各种不同的纯化方法。按理化性质和生物学功能，可将其分为 IgG、IgA、IgM、IgE、IgD 五类

体内诱生法单克隆抗体的纯化方法：

1、澄清和沉淀处理

离心 取上清，超滤，盐析。

2、分离

(1)凝胶过滤

IgG IgM 单抗纯化。

(2)阴离子交换层析

IgG 单抗纯化。

(3)亲和层析

IgG 单抗纯化。