

# 細胞融合與單株抗體

## Cell Fusion and Monoclonal Antibodies

國立台灣大學 生化科技學系 生化研究室 莊榮輝

### 基礎免疫學：

#### A) 脊椎動物體內有催毀外來入侵物體的免疫系統：

免疫反應可分成先天及後天兩大系統，又各有兩種方式，分別以細胞或分子去掃除入侵物。當入侵物太多時，即由先天免疫系統誘發後天免疫，開啟了更有效率、更為強大的防禦機制。

| 兩大系統  |    | 先天免疫系統  | 後天免疫系統                     |
|-------|----|---|----------------------------|
| 兩種方式  | 細胞 | 巨噬細胞 (Macrophage, $m\phi$ )<br>自然殺手細胞 (Natural killer cell, NK) | T細胞 $T_K, T_S, T_H$<br>B細胞 |
|       | 分子 | 干擾素 (Interferon)<br>溶菌酶 (Lysozyme)                              | 抗體 (Antibody, Ab)          |
| 擬人對比→ |    | 警察系統 (調查局)  | 軍事系統                       |

干擾素：遭病毒攻擊的細胞會放出干擾素，干擾素會活化免疫系統。

溶菌酶：在體表及淚液中溶解細菌細胞壁。

巨噬細胞：最基層的免疫細胞，是免疫系統的第一線防禦。

自然殺手細胞：可清除體內的癌細胞，是免疫監視系統。

#### B) 後天免疫反應的四個階段：

遭遇：巨噬細胞把抗原分解成小片段，專一地表現給 $T_H$ 細胞。

動員： $T_H$ 細胞動員 $T_K$ 細胞及B細胞，後者生產專一性抗體。

掃蕩：抗體及 $T_K$ 細胞攻擊入侵的抗原。

休止：完成清除抗原後，免疫細胞休息。

#### C) 後天免疫反應的兩大特點：

專一性：由甲抗原所誘導的免疫反應只對甲抗原有效。

記憶性：痊癒後若甲抗原再度入侵，可迅速動員掃蕩之。

#### D) 抗體是由B細胞所分泌的蛋白質：

抗體分子：由四條蛋白質長短鍊所組成（兩重兩輕）。

結合區：抗體分子上有兩個抗原結合區（二者相同）。

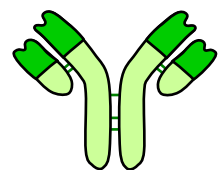
專一性：抗體與抗原結合極具專一性（如 lock & key 般吻合）。

抗體種類：IgG 是單一抗體分子，另有 IgM (五元體) 及 IgA (二元體)。

步兵單兵

裝甲兵

兩棲部隊



## 為何要使用單株抗體：

- 1) 抗原分子上可以誘導出抗體的部位或片段，特稱之為 抗原決定基 (antigenic determinant)；一個抗原分子上通常都有許多處抗原決定基，而每個決定基至少都可誘生出一種抗體；因此在傳統抗血清中，都含有許多種不同的抗體，分別對抗這些不同的決定基。
- 2) 對於分子構造相似的抗原，由於它們含有共同或相似的抗原決定基，所產生的抗血清對這兩種相似的抗原都會產生反應；因此在檢定此類抗原時，其專一性不很理想，常常會出現假陽性，也稱為 交叉反應性。同時又由於免疫動物的個別體質不同，對抗原的反應也有相當的差異，以致無法準確控制所得到每批抗血清 效價 的高低。
- 3) 血清中的每一種抗體是由單一個 B 細胞所分泌產生，若能把此 B 細胞由脾臟中挑出來，單獨培養成細胞株，則可得單一種類的抗體，只會對一種 抗原決定基 反應，其專一性極高。大量培養此細胞株，即可有品質一定、純度均一的抗體，此即為 單株抗體。
- 4) 然而 B 細胞不易在培養基中生長，雖然有人一直努力，想找出在體外培養脾臟細胞的條件，但結果均不甚理想，因此上述想法不易達成。
- 5) 癌細胞的生長不受控制，很容易在培養基中生長，有很多已經建立好的癌細胞株，其生長特性均已了解；若把癌細胞永續生長的特性，利用細胞融合法導入可生產有用抗體的 B 細胞中，則得到可在培養基中永久生長的 B 細胞株，此即 融合瘤 細胞株。
- 6) 廣義來說，細胞融合也可說是 基因重組 的一種，它是以融合兩種不同遺傳特性的細胞，來達成改變遺傳形質的目的。另外，微生物或植物的細胞，亦可以 原生質體 的形式互相融合，以改變其遺傳性質。

## 細胞融合法： 實際操作流程請參考 水稻蔗糖合成酶之研究 莊榮輝博士論文 p. 88-105

利用 polyethylene glycol (PEG) 進行小白鼠 脾臟細胞 與 骨髓癌細胞 融合，經過 篩選 及 單株化 後，可得到分泌有單株抗體的融合瘤細胞。

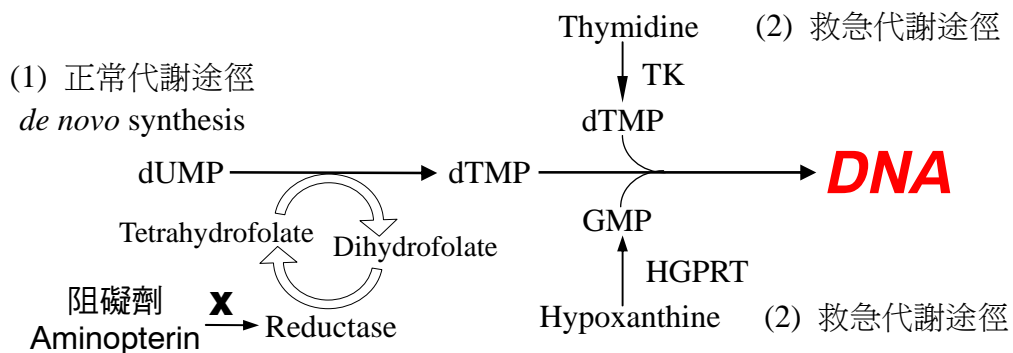
### A) 小白鼠免疫及脾臟細胞：

小白鼠 (BALB/c) 先以目標抗原 (如菌體) 免疫，抗原需加 佐劑 (adjuvant) 製成乳劑，打入小鼠體內慢慢釋出，誘使 B 細胞成熟增殖並生產抗體，然後取出脾細胞 (大多為 B 細胞) 與骨髓癌細胞進行細胞融合。近來有人直接取出健康的脾細胞，在試管中加入抗原進行體外免疫；或打開腹腔直接在脾臟注射抗原免疫。但除非抗原來源困難或有其它目的，一般仍採行舊法，因免疫反應的啟動機制非常複雜，不單是靠脾臟而已。

### B) 骨髓癌細胞 (NS-1)：

NS-1 是穩定的小白鼠 BALB/c 癌細胞株，除了能在培養基中永續生長外，尚

有一重要特性，其細胞缺乏兩種核酸代謝的重要酵素 (TK, thymidine kinase 及 HGPRT, hypoxanthine-guanine phospho ribosyltransferase)。一般細胞內的核酸合成路徑有兩條，如下圖 (1) 及 (2) 所示：



核酸的正常代謝途徑 (1) 若被 aminopterin 阻礙，可由 (2) 救急途徑 (salvage pathway) 取用 thymidine 及 hypoxanthine 來合成 DNA。但 NS-1 缺乏 TK 及 HGPRT 兩種酵素，因此在 aminopterin 存在下，NS-1 無法生長；正常細胞 (如 B 細胞) 則可經由 (2) 救急途徑 繼續生長。HAT 培養基因含有 aminopterin, thymidine 及 hypoxanthine，NS-1 在 HAT 中無法生長，除非經由細胞融合導入 TK 及 HGPRT 兩酵素的基因 (可由正常脾臟細胞得來)。

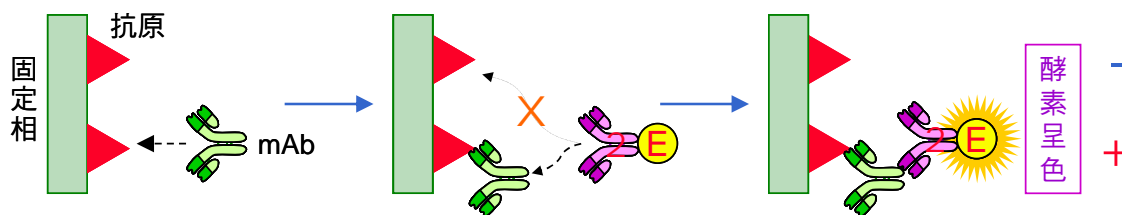
### C) 細胞融合：

小白鼠脾臟細胞⊕與 NS-1 細胞⊙以 PEG 進行融合，操作在 10 min 內完成，隨即把細胞平均分配在 96 槽細胞培養盤中。由於融合是隨機的，故可能的組合有：⊕-⊙, ⊕-⊕, ⊙-⊙, ⊕-⊕-⊕, ⊕-⊕-⊙....；只有同時含有⊕與⊙的融合細胞才會活下去：

- 1) 若只含 NS-1 (⊙, ⊙-⊙.....)，則在 HAT 中會因 DNA 合成抑制而死亡。
- 2) 若只含脾細胞 (⊕, ⊕-⊕, ⊕-⊕-⊕.....)，則在體外培養會漸漸死去。
- 3) 可能活下去的細胞 (⊕-⊙, ⊕-⊕-⊙, ⊙-⊙-⊕.....) 含有來自兩方的染色體，同源染色體可能發生基因重組，互換遺傳訊息；接下去的細胞分裂會排除多餘的染色體，一直到只剩一組染色體時才告穩定。在初期的分裂增殖過程中，失去含有重要基因染色體的子細胞可能會死去。成功穩定的融合細胞株會經由染色體的重組，得兼有雙方的特性：即可分泌抗體，亦可在培養基 HAT 中生長下去。

### D) 篩選方法：

- 1) 初步篩選：融合後馬上以 HAT 培養，能活下來的都是上述 B 細胞與 NS-1 的正確融合細胞，但此時細胞的遺傳背景尚未穩定。
- 2) 篩選專一性抗體：並非所有 B 細胞都會產生我們所要的抗體，小白鼠原先就存在許多 B 細胞株以對抗一般疾病；因此要用 酵素免疫分析法 (ELISA) 挑出專一性抗體 (請見下圖)。



- 3) 單株化： 這樣所挑出來的細胞株，也許仍含有兩群以上的細胞（為什麼？），因此要進行單株化；先將該細胞株稀釋，重新平分到 96 槽細胞培養盤中，以計算使得每槽中只含有一個細胞，俟其生長成群落後，再次以 ELISA 篩選專一性抗體。

### E) 抗體生產：

- 1) 可把挑選出來的融合細胞打入小鼠腹部，誘生腫瘤，然後收集所產生的腹水，腹水中的抗體濃度非常高，每 mL 可達數 mg。
- 2) 把融合細胞在大型培養槽中培養，收集培養液上清即得抗體，但每 mL 只得約數  $\mu\text{g}$ ，濃度較腹水稀約一千倍。
- 3) 所得到的抗體再經純化步驟，以除去雜質，可用下列各種方法的組合：
  - 硫酸銨分割： 收集約 40% 飽和度的沉澱，是最經濟、方便的方法。
  - 離子交換法： 用 DEAE 陰離子交換法，多用在純化 IgG。
  - 膠體過濾法： 以分子量的差異分割出各種抗體，多用在純化 IgM。
  - 親和層析法： 以 Protein A-吸著劑 專一性地吸住抗體分子 (IgG)。

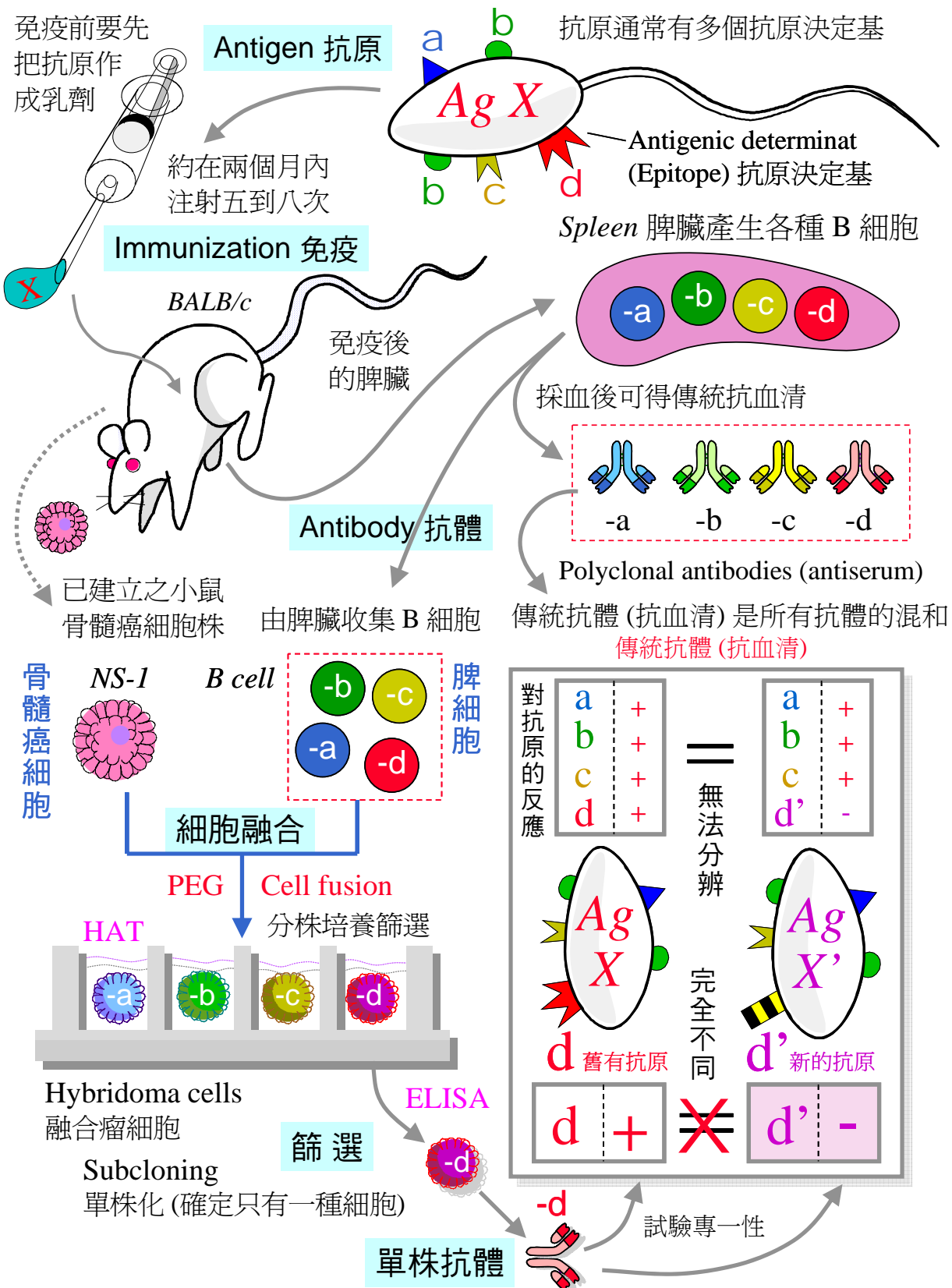
### 總結：

當單株抗體剛被發展出來時，人們因為它像巡弋飛彈般的準確性，而對其應用於癌症的治療方面抱以極高的希望；但是二十年來，並無突破性的進展。主要的原因，並不是單株抗體無法攻擊癌細胞，或者是單株抗體的專一性不夠；原因之一乃是癌細胞的變化實在太大，無法找出各種癌細胞的共同抗原，以製成通用的抗癌單株抗體。雖然如此，單株抗體並沒有失去其科學上或醫療上的價值，它仍然是一個有用的工具，可以辨認分子上細微的差異，而被應用在很多其他方面；是目前的生物技術產業上，極重要且獲利率高的科技。近年來，由於基因操作技術的發達，單株抗體因為其基因的修飾剪接，得以改造成各種形式，以致更適合於人體使用；同時，基礎醫學對癌症研究也有長足發展，單株抗體因此又被重用起來，請見 *Scientific American* (October 2001): Magic Bullets Fly Again，是單株抗體的全新熱潮。

### 參考文獻：

- Milstein C (1980) *Monoclonal Antibodies*. Scientific American **243** (October), p.56-64  
 Roitt I, Brostoff J, Male D (2001) *Immunology*. 6th ed, Mosby (最暢銷的基礎免疫學課本)  
 主要參考網頁：<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/monoclonal.htm>  
 漫畫網頁：迷爾使呆與突魔大王 <http://juang.bst.ntu.edu.tw/JRH/Tumor.htm>  
 漫畫網頁：細胞大戰 <http://juang.bst.ntu.edu.tw/JRH/Cellwar.htm>

### 如何製備單株抗體



Juang RH (2004)