

第四章

單株抗體之製備及檢定

第一節 細胞融合及單株化（方法 4.2 節）

由動物免疫到單株化完成是個漫長又繁複的歷程。表三列出大略的工作時間表，從免疫開始，最順利的話，也要兩個月才能得到單株融合細胞，再需一個月才能得到足量的抗體。其技術上的操作問題在方法中有詳細說明，下面就表三的工作分期，說明一些原則與結果。

第一期（預備工作）：

BALB/c 小鼠免疫無甚大問題，抗原可不必太純。酵素免疫分析應在融合前建立完成，其抗原純度要求則較高，不純的抗原可能篩選出不對的細胞株。融合的成敗在這段時期已決定其半，尤其要注意 NS-1 的生長情形，不健康的細胞不可能有好的融合結果。在融合前數日應仔細觀察細胞，勿使生長過度，並在融合前一天換新一半培養液。健康的 NS-1 應當是生長迅速，外表圓滿而光亮。

第二期（細胞融合）：

細胞融合一般不會有太大困難，但融合劑 Polyethylene glycol 的品質甚為重要。融合後一小時內觀察有無二元體或三元體細胞出現（見方法圖 4.9），可做為融合成敗指標。

表三 融合瘤實驗工作時間表

分期	名稱	天數*	工作重點
第一期	預備工作	D(-30) 或更早 D(-7) D(-1)	動物免疫開始 (BALB/c 小鼠) 酵素免疫分析法建立 骨髓瘤細胞 (NS-1) 培養 準備融合, NS-1 培養基換新一半
第二期	細胞融合	D0	細胞融合, HAT 篩選開始
第三期	HAT 篩選	D1 } D7 }	HAT 篩選, 給予充分養分 (改用 HT) 注意細胞生長情況
第四期	ELISA 篩選	D8 } D21 }	以 ELISA 選出(+)反應槽 → 1 ml 培養 細胞凍藏 ← T-25 培養
第五期	單株化	D14 } D28 } 或更晚	↓ 限數稀釋法 ↓ 單株細胞
第六期	抗體生產	D28 }	↓ Pristane 一週前 ↓ 注射 BALB/c ← T-25 培養 → 細胞凍藏 ↓ 腹水 ↓ 抗體純化 ← 培養液 T-80/175 培養

* 以融合之日為起始日 (D0). D0 以前以負數表示。

第三期 (HAT 篩選) :

融合後之第一週是決定一個融合細胞羣落繼續生長或逐漸衰亡的關鍵時刻。此時細胞對養分的要求程度最高, 注意水質、胎牛血清 (FCS) 及其他添加物的品質。若每槽所加入細胞數目過多, 則應多換新幾次培養基 (尤其是前數日); 但又得小心儘量勿打散細胞羣落, 尤其是剛長出來含二到十個細胞的小羣落最忌打散。我們在加了第一次的 HAT 後即不再用, 改加 HT 培養液。由結果看來仍可抑制 NS-1 的生長, 而對融合細胞有助長之功效。

第四期 (ELISA 篩選) :

融合細胞之羣落渡過第一週後, 就比較穩定下來, 但舊羣落死亡與新羣落的出現仍

時可得見。俟羣落長到大約肉眼可見的大小，即可進行 ELISA 篩選。很多實驗因沒有完善的 ELISA 系統而告失敗，因為無法確定所篩到的細胞是否的確分泌所要的抗體。一旦得到 ELISA 為 (+) 的細胞株，應儘速擴大生長，一邊做單株化，一邊先行冷凍保存。

第五期（單株化）：

越往後，其工作量越多。單株化的工作相當繁重，但若細胞不儘速單株化，則很有可能被不產生所要抗體的雜株細胞所淘汰。一旦獲得單株細胞，立予冷凍保存。

第六期（抗體生產）：

以小鼠產生腹水的方式是最經濟的途徑，每 *ml* 腹水所含抗體量等於一升培養基中所含者（約 1~10 *mg*），每隻小鼠可得數 *ml* 腹水。抗體的純化，先經硫酸銨分劃後，再以 Protein A 親和層析法進行；若屬 IgM，則以 Sephacryl 進行膠體過濾。純化得之抗體一般貯存在 -20°C，但發現有些抗體不耐冷凍，效價下降甚多。

我們以水稻 SS-5 免疫 BALB/c 小鼠後，取其脾細胞（約 8×10^7 個）與 1.4×10^7 個 NS-1 混合，以 50% PEG 1,500 進行融合，培養在兩片 96W 培養盤中；一週後一片有 90% 的槽長有大的細胞羣落，另一片有 50%。以 ELISA 篩選出分泌有抗 SS-5 抗體的細胞，前後共篩得十數株，經單株化後穩定下來的有六株。在單株化過程中，有時分泌抗 SS 抗體的能力會消失掉（圖 20）。此六株分別為 A1, A10, A12, D8, D9 及 C3，先以 ELISA 決定其抗體 class 均為 IgG（圖 21）。再經檢定全為 IgG1 subclass，且均含 κ 輕鏈（由永進生物科技公司代檢）。

第二節 單株抗體之純化（方法 3.2）

以培養基法或小鼠腹水產生法大量製備單株抗體，先以硫酸銨沉澱後再以 Protein A 親和吸着劑純化，由於六株抗體均為 IgG1，故可以較溫和的條件（pH 6.0）溶離下來。所得抗體純度相當高（圖 22），除了 A10 外均得純質 IgG。而 A1 及 A10 的輕鏈分子量較高，可能源自 NS-1 細胞⁽³⁶⁾。

第三節 單株抗體之酵素免疫分析檢定（方法 3.4）

以單株抗體與吸附在固相上的抗原 SS 結合後，再以酵素二次抗體的連結體（HRP-

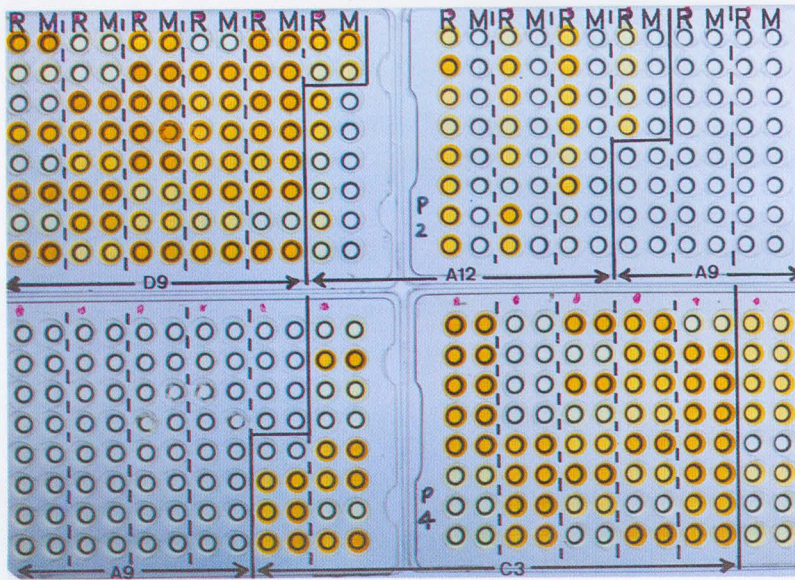


圖20 以限數稀釋法進行單株化，用 ELISA 檢示所選出的細胞株。有些細胞株 (A9) 完全喪失分泌專一性抗體的能力；有些則只有少部分細胞失去，其餘均還能分泌專一性抗體，吸附在 EIA 盤上的抗原有水稻 (R) 及玉米 (M) 的 SS-5。可以很清楚地看到 A12 只對水稻 SS 反應，對玉米者一點都不呈色。由正反應各槽中再挑出若干較強反應者進行擴大培養，儘快冷凍保存之。

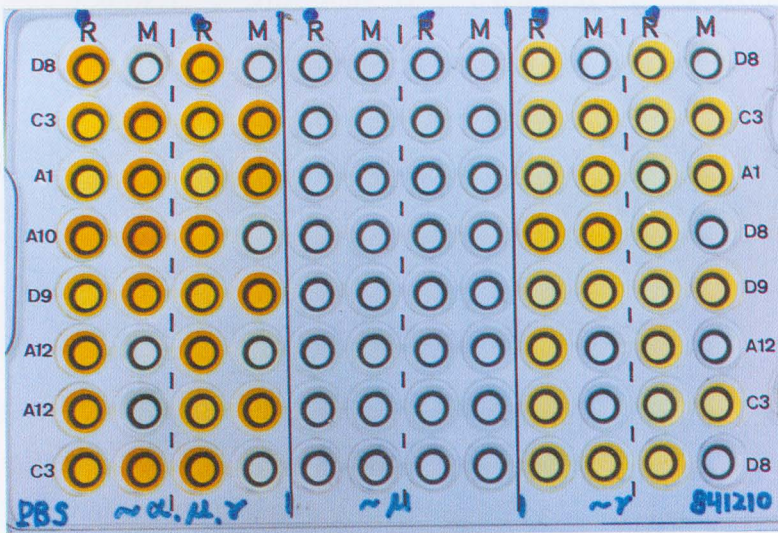


圖21 六株單株抗體以 ELISA 檢定其 class：

EIA 盤以水稻 (R) 及玉米 (M) 的 SS-5 吸附後，以單株抗體與之反應，再分別以二次抗體的酵素結合體進行反應：

行 1~4：抗小鼠 α , μ , γ 重鏈

行 5~8：抗小鼠 μ 重鏈

行 9~12：抗小鼠 γ 重鏈

結果判定所有六株抗體全部屬於 IgG。

2nd Ab) 進行呈色。所得到結果與使用傳統抗體者有些差異，可對抗原抗體反應的機制有進一步的瞭解：

抗原吸附液的 pH： 我們以 pH 9.7 (Tris-HCl) 及 7.0 (PBS) 兩種條件做抗原的吸附，結果發現 pH 不同，對最後的呈色結果有相當的影響 (圖 23)。A1, A10, A12 三株抗體與在 pH 9.7 下吸附的抗原結合後呈色較強，而 D8, D9, C3 則與 pH 7.0 者呈色較強。由於呈色是與結合到固相上的抗體量成正比，故呈色強弱間接反映出固相上可與抗體結合的抗原量之多寡。因此推想可能 pH 影響了吸附在固相上抗原的構形，而使抗原性有所改變；或者影響不同抗原吸附在固相的量所造成的。此一現象對單株抗體的篩選之影響相當大，因為固相上抗原的性質若改變，會導致篩選方向的不同。就酵素免疫法而言，更需考慮所造成的後果，因為此現象不但影響 EIA 的靈敏度與專一性，在比較單株抗體對抗原的結合能力時，會因固相上抗原在吸附時受 pH 的影響所呈現不同的結合力而有偏差。

相對親和度 (方法 4.4.2.1)： 分別以水稻及玉米之 SS-5 於中性 pH 吸附到 EIA 盤後，取各單株抗體以各種稀釋濃度與之反應，然後再加入 HRP-2nd Ab 檢示結合到固相抗原上抗體的量。結果如圖 24 所示，抗體對來源不同的 SS 有不同的親和力，可分為三組：

第一組： A1, A10。對水稻或玉米 SS-5 均有相當高的親和力，二者相差不多。

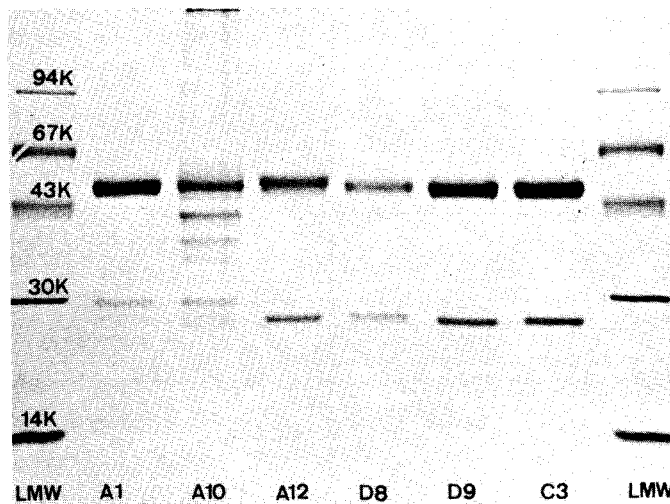


圖22 純化後的各單株抗體：

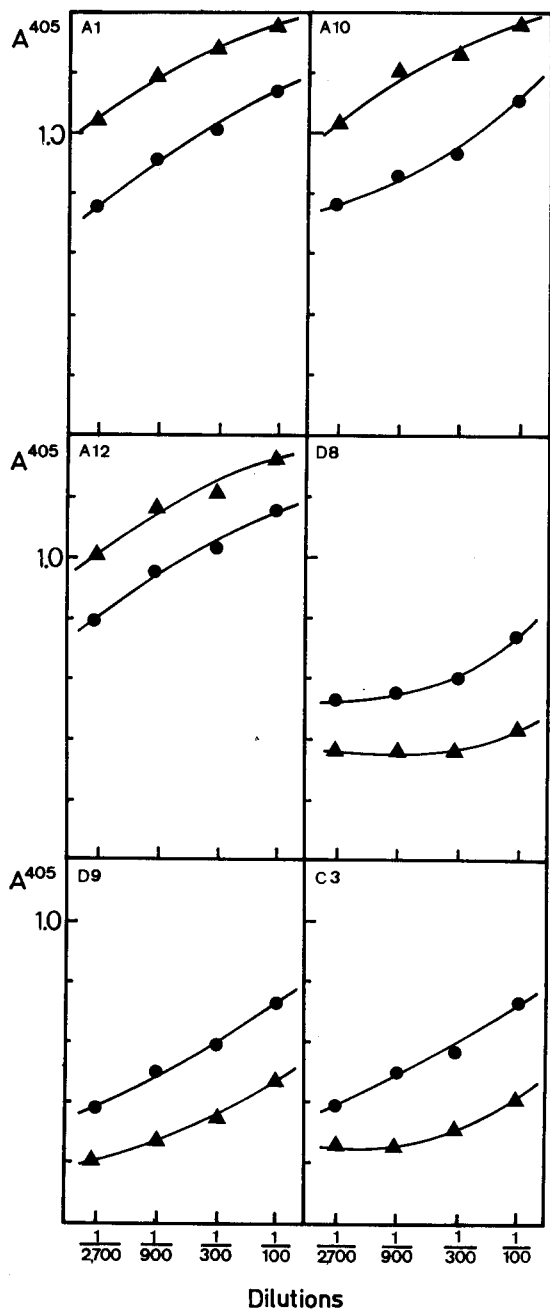
重鏈分子量均在 54,000 左右；輕鏈分子量有 26,500 及 29,000 兩種，後者可能由骨髓瘤細胞來的。除了 A10 以外，均為均質 IgG。膠體為 SDS 梯度 8~18% 膠片，以硝酸銀染色。LMW 為標準分子量蛋白質。

第四章 單株抗體之製備及檢定

第二組： A12, D8。對水稻 SS-5 大過玉米者。

第三組： D9, C3對玉米 SS-5 大過水稻者。

由於所用單株抗體均已經純化，可以絕對量來比較，故以此做為相對親和度的測定，相當可靠。第一組對兩種 SS-5 均有高度親和力，後來發現是未知蛋白質 P56 之強抗原



不同 pH 下的吸附反應，對最後呈色有相當的影響。抗原 SS-5 分別在 pH 9.7 (三角) 或 7.0 (圓形) 下進行吸附，經洗濯及填塞後，再加入各單株抗體反應，以 HRP-2nd Ab 檢示結合抗體的量。橫軸為所加入單株抗體的稀釋度，各抗體的原液吸光度 (280 nm) 為：A1 (1.1), A10 (0.72), A12 (1.0), D8 (0.55), D9 (1.1), C3 (1.0)。

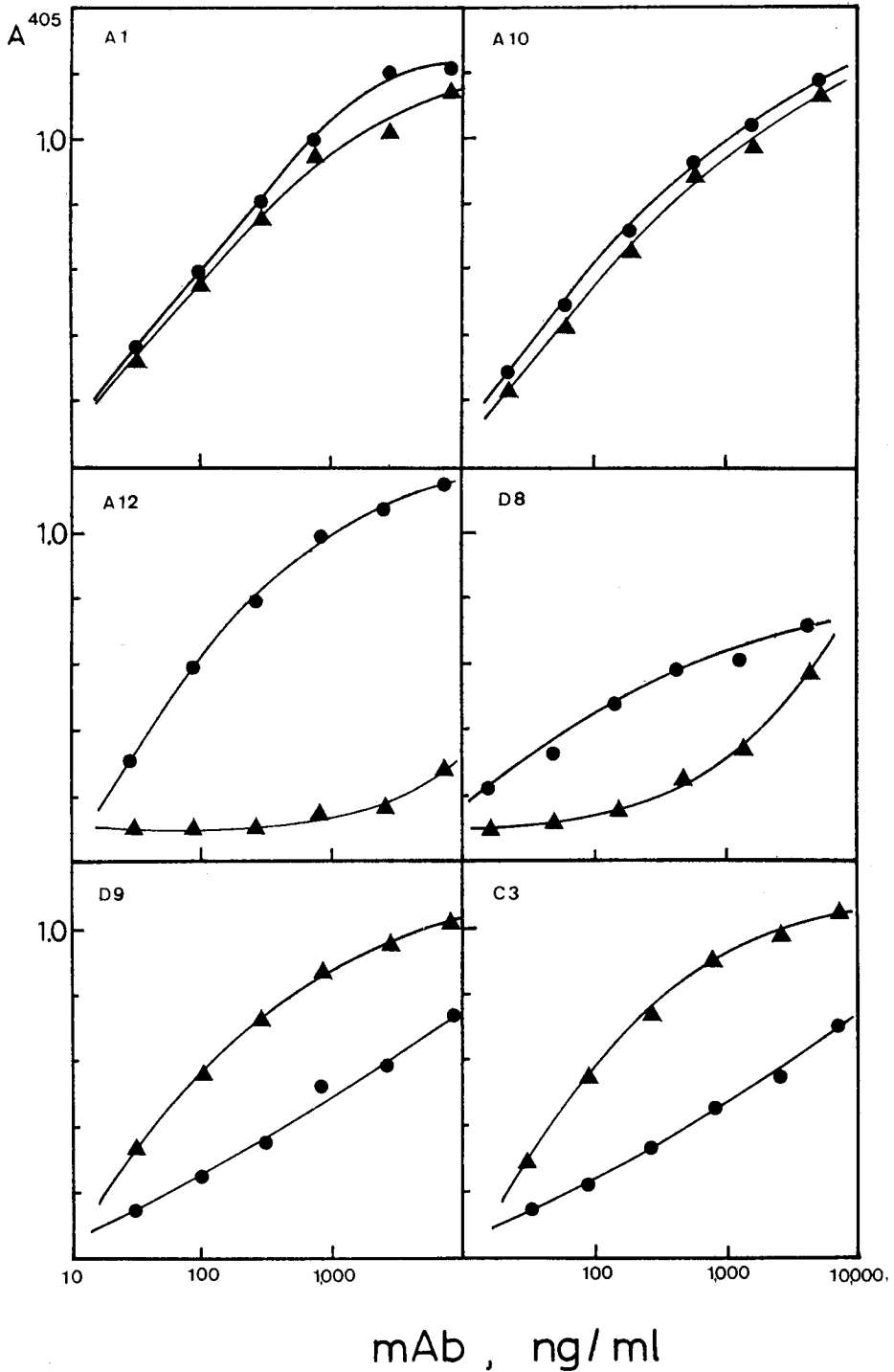


圖24 六株單株抗體對水稻(圓點)或玉米(三角) SS-5 的相對親和度比較。反應呈色後，吸光值高者，判為較高的相對親和度。

性所造成，將於下章敘述。第二組的兩種抗體，可以看出只對水稻抗原有專一性的親和力，尤其 A12 對玉米 SS-5 幾乎不反應；D8 顯然對二者的親和力亦有相當的差異。比較令人意外的是第三組兩株抗體，反而對玉米 SS-5 有較高的親和力，而此抗體原是用水稻 SS-5 去免疫的。雖然已有報告⁽³⁷⁾指出，單株抗體很可能會對毫不相關的物質有親和力（如圖 25）。但 SS 的情形又有別於此，因水稻與玉米的 SS 有相當高的相似性，很可能由水稻 SS 抗原基 a 所誘導的抗體 Ab，對玉米 SS 上對應的抗原決定基 A 有較強的親和力（如圖 26）。這種較強親和力的產生除了如圖 26 的構形上的契合之外，也很可能是 A 中有某一個胺基酸與 a 不同，但更能與 Ab 產生親和力。若果真如此，則可以 Jerne 的 Clonal Selection 的抗體生成理論^(38,39) 予以合理解釋，我們的觀察亦可謂此理論的間接證明。另一個可能則如圖 27 所示，玉米 SS 分子上有較多處的抗原決定基（a 與 b）可與抗體反應，a 與 b 可以有或沒有抗原性質的關係。不過由於此二種 SS 在分子構造的相似性，若玉米 SS 上有這麼一個額外的 b 抗原決定基，

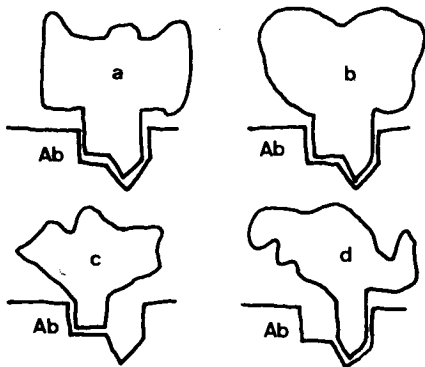


圖25 由抗原 a 所誘導出來的單株抗體 (Ab)，可能會與毫不相關的 b 結合，a 與 b 碰巧有完全相同的抗原決定基。另一種情形是由 c 所誘導的抗體，也能與另一物質 d 結合，但 c 與 d 可能沒有任何相似的抗原決定基。（取自：Nature, Vol. 296 p. 200, 1982）。

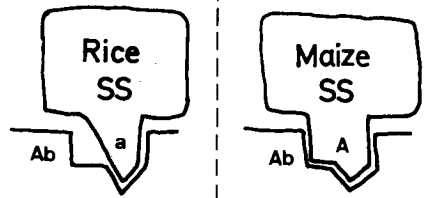


圖26 由水稻 SS 上抗原基 a 所誘導的抗體 (Ab)，也許與玉米 SS 分子上對應抗原基 A 有較契合的分子構形，因此有較強的親和度。也有可能 A 與 a 的構形類似，但抗原基上的某個胺基酸與 a 不同，而更能與 Ab 產生親和力。

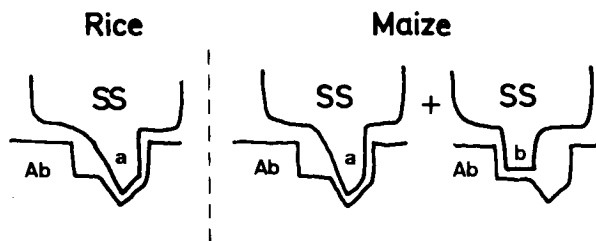


圖27 在玉米 SS 上也許有一個額外的抗原決定基 b，可與由水稻 SS 上抗原基 a 所誘導的抗體 (Ab) 反應。因此總和 a 與 b 抗原基，玉米比水稻顯現較強的親和力。

則水稻 SS 亦可能有之。

第四節 單株抗體之免疫轉印檢定

以單株抗體進行水稻及玉米 SS-5 胜肽的免疫轉印（方法 3.5 節），得如圖 28 的結果。同樣可把單株抗體分成三組：

第一組： A1, A10。對胜肽中的一個分子量 56,000 色帶呈色特別強，將在下章討論。

第二組： A12, D8。對水稻的胜肽結合較強，其中 D8 只對水稻的胜肽有反應。

第三組： D9, C3。對水稻及玉米 SS 均有結合。

經比較可知以上三組抗體間均有不同的圖譜，表示此三組細胞株互不相同，此觀察與上一節相對親和度的結果相吻合。第二組中的兩株，其圖譜有顯著的不同，故可推測 A12 與 D8 是相異的細胞株所產生者。佐以圖 24 的相對親和度結果，二者對兩種 SS 的相對親和度亦有明顯的差異，故可支持前述推測。但第一組的 A1 及 A10 之間或第三組的 D9 及 C3 之間，則有相似的圖譜，可能各源自同一細胞株。二者在圖 24 的相對親和度測定上，亦有相似的結果。

因此胜肽免疫轉印法提供了一個檢定單株抗體的方法，以辨讀其免疫轉印圖譜來判定兩株抗體的異同。若二者圖譜相異，則可說此二抗體必源自不同細胞株；但若二者圖譜相同，却不能說此二抗體一定源自相同的細胞株。因為也許有二細胞株分泌對同一抗原決定基的抗體。雖然如此，把對抗相同決定基的二細胞株，在免疫功能上視為相同 (identical)，也未嘗不可。

第五節 其他檢定結果

所有六株抗體均不會抑制抗原酵素的活性，如表四所示。傳統血清則有部分抑制作用，但在稀濃度 (1:50) 時，則反而有點活化的現象，部分單株抗體亦然。這個結果與本實驗室以前的觀察⁽²⁵⁾一致。可能是因為 SS 的受質為蔗糖等小分子，單株抗體僅結合在有限的抗原決定基上，對酵素的活性無妨，不成立體障礙，甚或對 SS 的安定性有所貢獻。

所得各株單株抗體在雙向擴散上均不對 SS 產生沉澱線，混合在一起亦然（結果未

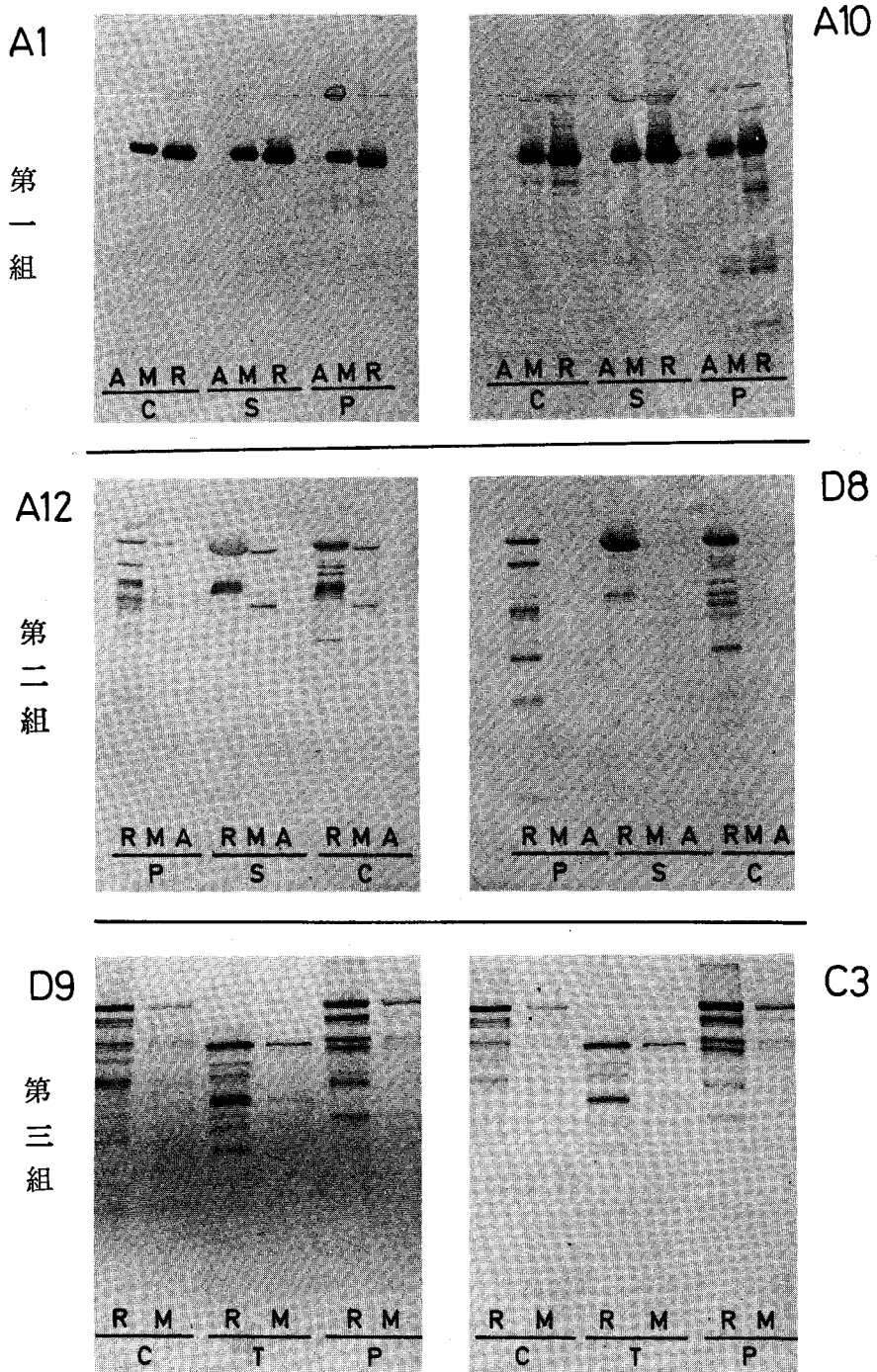


圖28 六株單株抗體對 SS 胜肽圖譜的免疫染色。水稻 (R) 或玉米 (M) SS-5 經蛋白質水解酶水解後，以 SDS-梯度 (8~18%) 膠體電泳分離，以電泳轉印法印到硝化纖維紙上後，加入各單株抗體反應，以 HRP-2nd Ab 檢示具抗原性的胜肽。所用蛋白質水解酶為 Trypsin (T), Chymotrypsin (C), Papain (P) 或 Subtilisin (S)。以白蛋白 (A) 經過完全同樣處理，檢示非專一性呈色幾乎為零。

表四 抗體對酵素 (SS) 活性的影響

	單株抗體 或血清之 稀釋度 (a)	酵 素 活 性 百 分 比(b)						兔子抗 SS 血清
		A1	A10	A12	D8	D9	C3	
水 稻 SS	1:50	100	98	106	132	103	105	112
	原 液	104	99	107	103	107	106	81
玉 米 SS	1:50	105	102	104	102	106	101	119
	原 液	113	108	119	109	116	108	66

(a)各單株抗體原液的吸光度 (280 nm) 如下：A1 (1.1), A10 (0.72), A11 (1.0), D8 (0.55), D9 (1.1), C3 (1.0)。

(b)以不加有抗體的水稻或玉米 SS-5 之活性為 100%。各取 0.3 (水稻) 或 0.4 (玉米) OD 活性單位的 SS，加入抗體後進行活性測定。

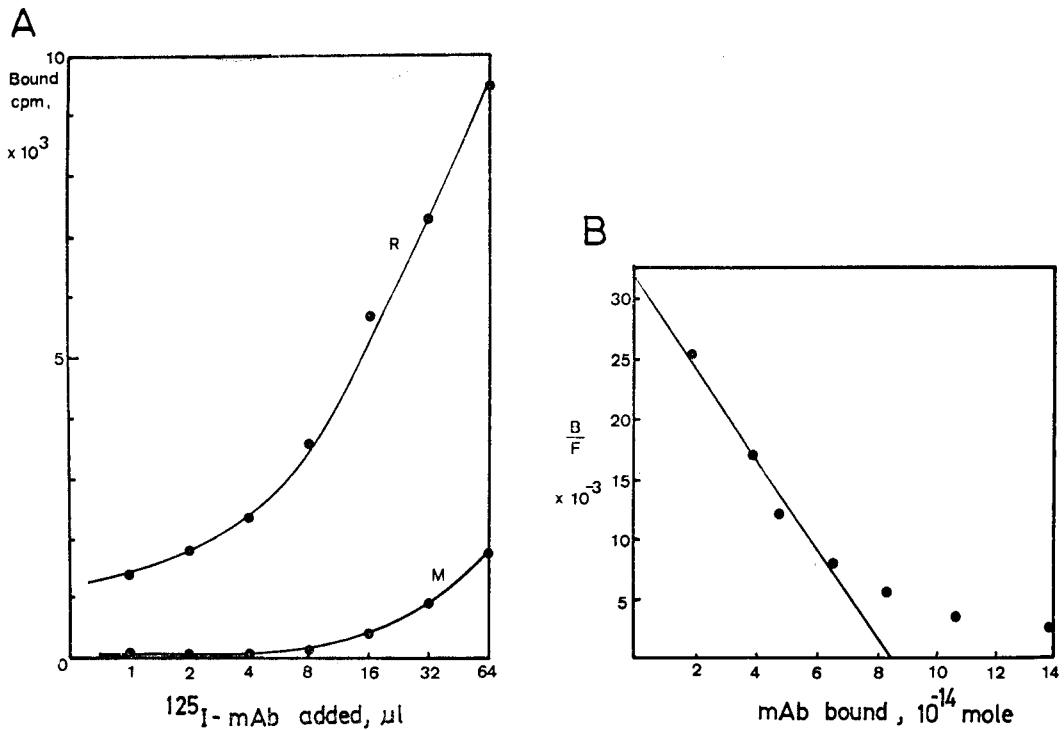


圖29 以放射性免疫分析法進行抗原抗體結合試驗。抗原 SS-5 吸附在固相 (PV, EIA 盤) 後，以 ¹²⁵I 標識的單株抗體 (A12) 加入反應。每 µl ¹²⁵I-mAb 約有 50,000 cpm。

A. ¹²⁵I-mAb 對水稻或玉米 SS 的結合情形，結果與 ELISA 相同。

B. 以 Scatchard 圖示法求親和度 (Kd=2.8 pmole)。

表)。

以 ^{125}I 標識單株抗體時，發現 chloramine-T 氧化法可能對部分抗體有所影響，只有 A12 一株較為正常。以放射性免疫分析方式進行抗原抗體結合試驗，結果如圖 29。與 ELISA 結果一樣 A12 只對水稻 SS 有結合 (圖 29A)，經 Scatchard 圖示法 (圖 29B) 可求得水稻 SS 與 A12 抗體間的親和度 (Kd) 為 2.8 *pmole* (或 $K_A=3.6 \times 10^{11} M^{-1}$)。