

# 第四章 細胞培養及單株抗體 製備法

---

<b>4.1</b>	<b>細胞培養方法</b> .....	89
4.1.1	細胞培養室及儀器	89
4.1.2	用具	90
4.1.3	純水與培養液	92
4.1.4	滅菌與無菌操作	93
4.1.5	骨髓癌細胞之培養	93
4.1.6	細胞保存法	94
4.1.6.1	細胞冷凍法	94
4.1.6.2	細胞解凍法	95
4.1.7	污染及其防治	95
<b>4.2</b>	<b>細胞融合法</b> .....	96
4.2.1	老鼠免疫及脾細胞之收集	96
4.2.2	細胞融合	98
4.2.3	篩選	99
4.2.3.1	HAT 篩選	99
4.2.3.2	ELISA 篩選及 1 ml 培養	100
4.2.4	單株化	100
<b>4.3</b>	<b>單株抗體的生產與檢定</b> .....	102
4.3.1	培養基法	102
4.3.2	老鼠腹水產生法	102
4.3.3	單株抗體之純化	102
4.3.4	單株抗體之檢定	103
<b>4.4</b>	<b>單株抗體之應用</b> .....	103
4.4.1	放射性標識法	103
4.4.1.1	以 $^3\text{H}$ -Leu 生合成標示抗體	103
4.4.1.2	以 Chloramine-T 氧化法以 $^{125}\text{I}$ 標識	104
4.4.2	親和度測定法	104
4.4.2.1	相對親和度測定法	104
4.4.2.2	Scatchard 圖示法	105
4.4.3	單株抗體對抗原酵素活性之影響	105

---

融合瘤技術發展至今已十年，雖然十年來已有一套完整的操作法，但在實際進行時，每個實驗室均得自行建立其系統，各自有不同的問題。由培養細胞開始，經細胞融合以至單株化，全程時間很長，操作方法種類繁多，工作量亦不少，任何一處失誤均導致失敗。我們從建立細胞培養室開始，嘗試這整個過程，點滴地累積下經驗。本章以蔗糖合成酶為例，敘述本實驗室所建立的方法，包括：(一)細胞培養，(二)細胞融合，(三)篩選及單株化，(四)抗體純化，及(五)單株抗體之應用。

## 4.1 細胞培養方法

完善的細胞培養設備是進入細胞融合工作的第一步。

### 4.1.1 細胞培養室及儀器：

我們的細胞培養室由暗室改裝而成，整個地板鋪上厚塑膠布，配置如圖 4.1。暗室入口有兩道門 (a 及 a')，其間有一緩衝小室 (b)，在此換上拖鞋 (c)，除去外套，臨時垃圾筒亦可放此小室。另有 CO<sub>2</sub> 鋼筒 (d)，引管線進入室內的 CO<sub>2</sub> 恒溫箱 (e)。培養室內右邊工作枱有倒立式顯微鏡 (f) 及水平氣流無菌操作箱 (g, laminar flow hood)；此一區域用透明膠布 (h) 懸空隔離，從門口起延伸到室內中央。另外需要 37°C 水浴 (i)，及一貯藏用的鐵櫃 (j)。室內空氣由一冷氣機 (k) 與外界流通，進入室內的空氣沒有經過過濾為一缺憾。故在無菌操作時，最好能暫時停止冷氣機運轉。離心機 (l) 因空間限制只得放在室外，亦不甚理想。高壓滅菌釜及動物室則應儘量遠離培養室。另外，由於兩扇門均非拉門 (sliding door)，開關之際易造成氣流混亂，要小心進出。雖然如此設備並不十分理想，但我們兩三年來並無發生重大的污染情形。以下列出所需的儀器。

#### [儀器]

#### 1. 倒立式顯微鏡 (inverted microscope)：

Nikon Diaphot 型，使用情形相當滿意，附有照相設備，有一立刻放大四倍的裝置，非常方便觀察。

#### 2. CO<sub>2</sub> 恒溫箱：Forma Model 3158，使用情形良好。須備 CO<sub>2</sub> 鋼筒，引管注入恒溫箱

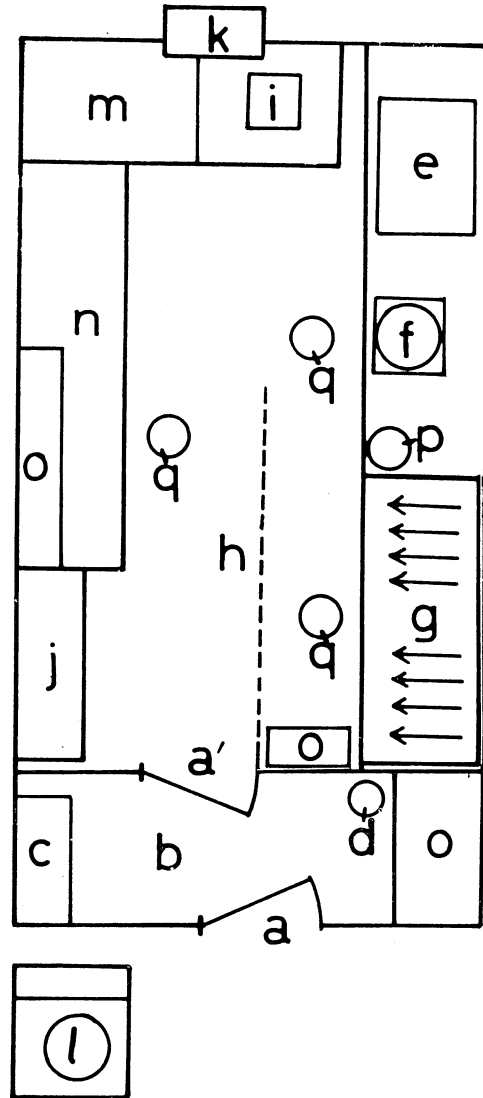


圖 4.1 細胞培養室：a, a'：門扇，b：緩衝小室，c：拖鞋架，d：CO<sub>2</sub>鋼筒，e：CO<sub>2</sub>恒溫箱，f：倒立式顯微鏡，g：水平氣流無菌操作箱，h：透明膠布帷幕，i：37°C水浴，j：貯藏鐵櫃，k：冷氣機，l：離心機，m：水槽，n：工作枱，o：雜物架，p：蠕動式幫浦，q：凳子

#### 4.1.2 用具

，CO<sub>2</sub> 的壓力調在 1 kg/m<sup>2</sup> 左右。CO<sub>2</sub> 有自動閥控制進出，調在 7%。若停電時正在注入 CO<sub>2</sub>，則 CO<sub>2</sub> 會一直漏出，須以人工關上。停電後箱內溫度下降甚慢，若不開啓箱門，一天內僅下降數度。其溫度調在 37°C，並在箱內最下層放一方盆（略小於底面積），內盛去離子水（加 SDS 成 0.1% 防腐劑），保持箱內濕度。

3. 水平氣流無菌操作箱：臺灣海天製造（14 HT-24），使用情形良好。預濾板每使用 300 小時應換新，無菌過濾片（HEPA）則大約 3,000 小時才換新，視環境空氣而定。處理對人體有害的物質，不可使用此型操作箱，應改用垂直氣流者。
4. 離心機：一般桌上型離心機即可，但須可容納 50 ml 離心管。我們用較大型的 International Centrifuge 廠的 Universal Model UV。
5. 蠕動式幫浦：過濾培養基用，我們用 Millipore 產品（XX80 000 00）。
6. 37°C 恒溫水浴：一般實驗室使用者即可。
7. 高壓滅菌釜：臺製，注意釜內的水要用去離子水，經常清洗換水。
8. 液態氮貯藏桶及 -70°C 冰箱：均為貯藏細胞用，注意要定期檢查液態氮是否揮發殆盡，及時補充。

#### [註]

1. 培養室內的 CO<sub>2</sub> 或臭氣濃度均相當高，要注意空氣之交換；小心 CO<sub>2</sub> 鋼筒有無漏氣。
2. 清掃培養室最好用真空吸塵器，以免塵土飛揚。

#### 4.1.2 用具：

##### A. 塑膠製品：

培養細胞的器具全部使用塑膠製品，不再回收使用。我們使用 Nunc 系統的產品，均以放射線滅菌處理過。

1. 96 槽培養盤（96W 盤）：8 橫列×12 直行，單片無菌包裝，有蓋。
2. 24 槽培養盤（24W 盤）：4 橫列×6 直行，單片無菌包裝，有蓋。

3. T 培養瓶（T-flask）：依底面積大小分成三種，分別為 25 cm<sup>2</sup>（T-25），80 cm<sup>2</sup>（T-80），175 cm<sup>2</sup>（T-175）。以 T-25 最常用，T-80 次之。
4. 離心管：50 ml 及 11 ml 兩種，大多用前者。
5. 培養皿：使用直徑為 6 cm 者，用量小。
6. 冷凍小瓶（cryotube）：液態氮冷藏細胞時使用，容納體積 2.0 ml。

使用上述製品並無甚大困難或缺點，唯 96W 或 24W 盤的單片包裝要注意包裝的塑膠袋有無破洞。

##### B. 玻璃用具：

1. 血清瓶：有甚多廠牌，大部分瓶口均不能乾淨俐落地倒出液體。有一種廣口血清瓶（Bibby，德國製，Pyrex 玻璃），其瓶口有一圈塑膠唇，唇口很利，可以切斷液體流路，傾倒時相當方便。此圈塑膠唇並可自由取下或裝上。體積有 50, 100, 250, 500, 1,000 ml 或更大，但以 250 ml 者使用最多。
2. 血球計：美國光學 AO 產品，一或二片。
3. 吸管（pipette）：我們只用 10 ml 吸管，塞好棉花裝在不銹鋼罐內殺菌。小體積樣品（1 ml 以下）大多用自動吸管比較方便。細胞融合時要用一隻 1 ml 吸管，可使用無菌單隻包裝的塑膠製品，用後丟棄。
4. 滴管（dropper, Pasteur pipette）：使用量很大，以 Kimax 5¼ in. 者為標準規格，定做如圖 4.2A 的玻璃容器，可以裝在裏面

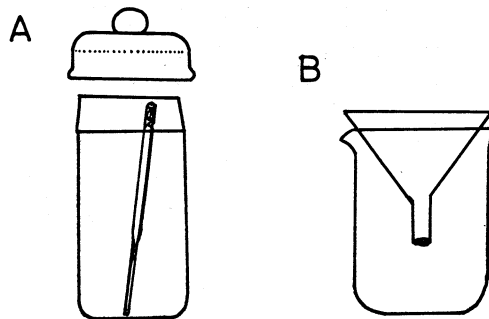


圖 4.2 A：裝滴管的玻璃容器，B：廢液收集槽。

殺菌，使用方便。以玻璃製為佳，可隨時檢查乾淨與否，並避免金屬離子污染。

5. 廢液收集槽：以一隻漏斗及燒杯組成，如圖 4. 2B，漏斗口太長的話要鋸短。在無菌操作箱中收集廢液用，每次用完立刻清洗乾淨，以 75% 酒精噴過後置 UV 燈下殺菌即可。

### C. 無菌過濾用具：

1. 玻璃薄膜濾器：如圖 4. 3A，使用 47 mm 濾膜 (0.2  $\mu$ M, Millipore 之 Durapore)。注意有些廠牌的濾膜含有微量潤滑劑 (Triton)，過濾時會溶入培養液中。濾膜裝在玻璃濾器 (glass filter apparatus) 上，高壓蒸氣滅菌後使用。過濾時以減壓使培養液濾過薄膜，每次大約可過濾 1~2 升。
2. Sterivex (Millipore)：上述玻璃濾器以減壓過濾，會影響含有碳酸氫鈉培養液的 pH，且過濾裝置得每次滅菌很不方便。Sterivex (圖 4. 3B) 為一薄膜卡式圓筒，培養液以幫浦推送，經過圓筒中的薄膜後，直接滴入一無菌血清瓶中。每次可處理 2~5 升培養液。

3. Millex (Millipore)：，接在針筒，直接以推管加壓過濾。凡小體積樣品，由 1~50 ml 均可用之。圖 4. 3C。

### D. 一般用具：最好勿與外界流通使用。

1. 自動吸管 (autopipet)：使用 Gilson 的 20, 200, 1,000  $\mu$ l 三種自動吸管。吸管頭有黃藍二色，必須用可滅菌的專用盒子裝好，高壓蒸氣滅菌。Treff 或 Flow 均有此種專用外盒。
2. 酒精 (75%)：裝在洗瓶內，供做桌面擦拭之用，要明顯標示內容物為酒精。另以塑膠製噴霧瓶 (家庭澆花用) 裝之，供做雙手消毒噴霧用。
3. 酒精燈：裝 95% 酒精，勿誤用 75% 者。
4. 橡皮頭：選用小的橡皮頭 (2 ml)，使用大號 (4 ml) 者，易遭污染。每次用後集中以 75% 酒精浸過，放在圓培養盤內加蓋備用。橡皮頭經常是污染的來源。
5. 其他：紙質口罩、衛生紙、馬錶、塑膠針筒、一般用剪刀、簽字筆、標籤紙等最好專用一套，外科手術手套沒有使用必要。

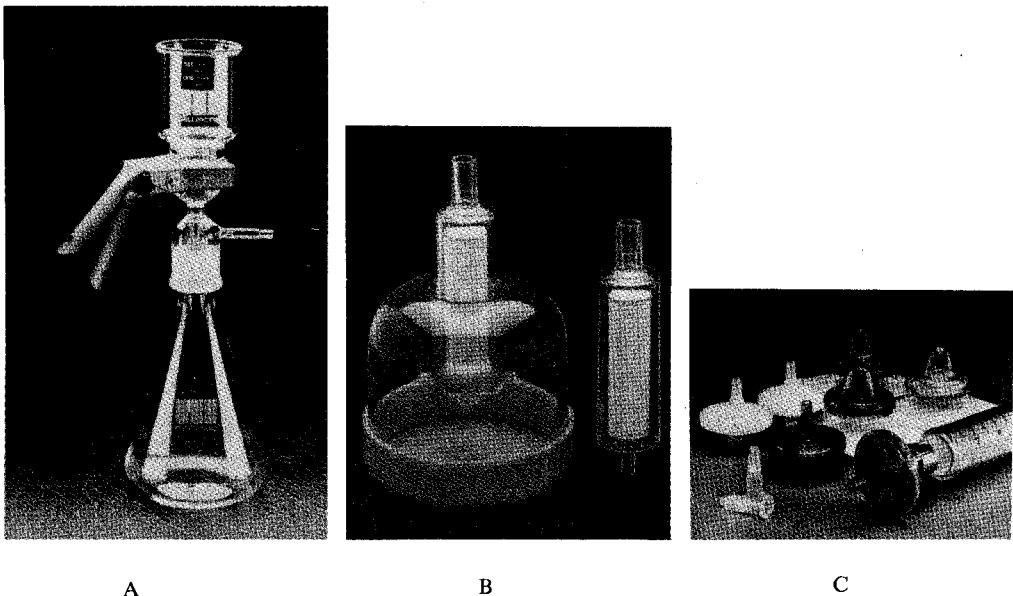


圖 4. 3 無菌過濾用具：(照片取自 Millipore 目錄, MCO83)

A：玻璃薄膜濾器，B：Sterivex，C：Millex。

### 4.1.3 純水與培養液

#### 4.1.3 純水與培養液：

培養液是細胞賴以爲生的營養來源，而純水更是組成培養液最重要的成分。純水與培養液的重要性在細胞融合實驗裏更形突出。

A. 純水：本實驗室的純水製造以 Millipore 系統進行，如圖 4.4 所示。自來水以幫浦打入預濾匣 (a)，除去泥砂，經過活性碳匣 (b) 除去水中離子(主要去除氯離子)，再過另一預濾匣 (c) 後，通入 TFC 逆滲透 (reverse osmosis, RO) 管柱 (d)，可除去 95% 離子，其水質約等於一次蒸餾水 (稱 RO 水)，一般化學反應或洗滌器具均使用之。RO 水貯於一大水槽 (e，約有 150 升)，需要時再以幫浦 (f) 打入由四隻卡匣組成的 Milli-Q 系統，第一支爲活性碳匣 (g)，接著兩隻爲混床式離子交換匣 (h, i)，最後一隻爲 Organex-Q (j)，可除去最後所殘餘的一些有機物質，然後經過一超微濾膜 (0.22  $\mu$ M, k)，即得電阻係數可達 18 megaohm/cm 的高級純水 (稱爲 Milli-Q 水)。RO 水製造速度很快，約每小時 60 升；Milli-Q 則較慢，視最後超微濾膜 (k) 的阻塞情形而定。大約每 1~2 個月換一隻預濾匣 (a)，每 1~2 年換一隻 RO 管柱 (d)，每隻 RO 管柱約七萬元臺幣 (1984 年)。Milli-Q 系統的卡匣則較耐用，但最後的 0.22  $\mu$ M 濾

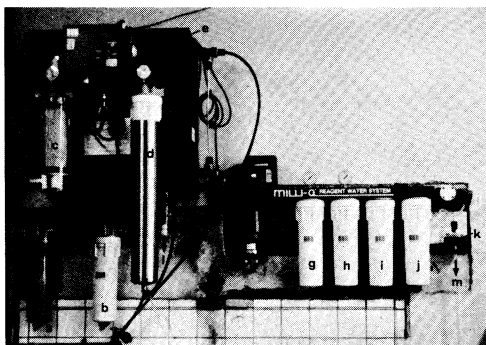


圖 4.4 Millipore 純水製造系統：

a. 預濾匣, b. 活性碳匣, c. 預濾匣, d. RO 管柱, e. 貯水槽, f. 幫浦, g. 活性碳匣, h. 及 i. 混床式離子交換匣, j. Organex-Q 匣, k. 超微濾膜。其中可由 l 處接得 RO 水，或由 m 處接得 Milli-Q 水。

膜 (k) 則有時易阻塞。注意 RO 管柱不能有氯離子進入，故第一隻活性碳匣 (b) 的保護極爲重要。Milli-Q 水可用來做 HPLC 之用，配製細胞培養液亦無任何問題。惟 RO 水或 Milli-Q 水均不宜久貯，最好每天新鮮製造之。而整個系統最好每天都能開動，久不用反而易使卡匣長菌而降低純化效率。

#### B. 培養液及添加試劑：

1. RPMI 1640 及 RPMIX：做爲細胞培養液，使用 Flow (10-605-20) 含有 20 mM HEPES 的 RPMI 1640。每包粉末溶入 800 ml Milli-Q 水中，再加 4 ml 1N HCl (Merck)，溶液顏色由洋紅轉成橘黃，加蓋攪拌 30~60 分鐘，仍多少有少量固體物質不溶，可不理之。再加入 2 克  $\text{NaHCO}_3$  (Merck)，及 Milli-Q 水至 1 l 後，以 Sterivex 過濾。配製此培養液的要點在其 pH，若室溫 (25°C) 下的 pH 爲 7.5 左右，則在 37°C 下的 pH 爲 7.3~7.35 之間。顏色爲 pH 的指示，應隨時注意顏色的變化，顏色不對的培養液一定有問題。使用時分裝入 250 ml 血清瓶中，每瓶只裝 170 ml 左右，以便添加 10~15% FCS，及 glutamine, pyruvate 及抗生素等 (各佔 1% 體積，見下述)，成爲 200 ml 的完全培養基 (complete RPMI 1640, 簡爲 RPMIX)。
2. 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS)：是支持細胞生長最重要的因子，尤其是融合細胞在初期培養時所用的 FCS，一定要經過特別檢定，確定其能支持單一細胞的生長。爲避免嘗試錯誤，最好用專供融合用的 FCS，其價格約爲一般品的兩倍。我們使用澳洲 Commonwealth Serum Laboratory (CSL) 的 Hybriserum，效果極佳。FCS 貯於 -20°C，解凍後會有沉澱產生，對實驗無妨，不要誤爲污染。使用前應充分混勻，加 10~15% 到 RPMI 1640 中。勿重覆冰凍解凍。
3. Glutamine：由於 glutamine 在稀溶液中的

半衰期只有兩週，故須添加新鮮者。以 584 mg glutamine (Flow, 15-801-15) 溶於 20 ml Milli-Q 水後，以 Millex 過濾，可貯於 4°C。此為 100× 溶液，每 100 ml 培養液中加 1 ml。勿用品質不佳的 glutamine 配製。

4. **Pyruvate**：使用 Flow 的 Sod. pyruvate 溶液 (100 mM, 16-820-49)，每 100 ml 培養液中加 1 ml，4°C 保存。
5. **抗生素**：使用 Flow 的 Penicillin (5,000 IU/ml) 及 Streptomycin (5,000 µg/ml) 混合液 (16-700-49)，每 100 ml 培養液中加 1 ml。

#### 4. 1. 4 滅菌及無菌操作：

**A. 滅菌**：所有用具，除了已標明為無菌包裝外，均得徹底經過滅菌處理。血清瓶、滴管或吸管均浸在 2~5% 的 Extran (Merck) 或 7X (Flow, Linbro) 過夜後，以自來水徹底沖過，再以 RO 水洗之，最後用 Milli-Q 水沖數次，在 80°C 烘箱烘乾，注意大部分瓶蓋不能耐 100°C 以上的熱度。血清瓶加蓋後包以鋁箔紙（蓋子鬆開），滴管及吸管塞好棉花後裝入專用容器，經高壓蒸氣滅菌 (121°C, 20 分鐘)，取出後在 80°C 烘箱烘乾，約需一天才能完全除去瓶內的水分。俟完全乾燥後才能取出，上緊瓶蓋，置室溫下回溫後放入貯藏櫃。烘箱最好有專用者，其他物品的蒸氣可能對這些瓶子造成化學污染。玻璃器在使用前應在無菌箱內仔細檢查有無可見的污染。若玻璃器無塑膠附屬品，或為鐵器，則可用 160°C 乾熱滅菌 1 小時。

#### **B. 無菌操作：**

1. 無菌操作箱不使用時，均以紫外線照射桌面。桌面上不可堆積任何用品，我們在操作後，桌面一律全清，以 75% 酒精擦拭一遍。
2. 操作前先除去外套、手錶，不可穿毛衣等易飛揚出纖維的衣物，長袖須捲起，以酒精消毒至手肘部分，操作時最好戴口罩。
3. 操作時關操作箱紫外燈，開送風機，約十分

鐘後，以 75% 酒精擦拭桌面後即可開始。

4. 事先把所有使用物品依序排好在操作檯上，較高的物品儘量往兩邊角落放，以免擾亂氣流。拿物品時（尤其是取液體時），不要經過另一物品開口的上方。
5. 滴管使用完馬上浸入一裝有 800 ml 水的燒杯，集中後當天清洗之。新開封的滴管均要如上述方法洗過才可進行滅菌。
6. 由血清瓶內倒出液體前，最好在瓶口以酒精燈燒過；倒完後若有液體流出瓶口，則以酒精潤濕衛生紙擦之再行燒過瓶口。瓶口有塑膠圈的，不可燒之，但這種瓶子一般都能倒得俐落。
7. 取下的瓶蓋，開口朝下放在桌面，我們規定均放在最裏面的一小區域，專供放置瓶蓋之用。放過瓶蓋的地方，不宜再放別的瓶蓋，怕有污染可能，除非重新以酒精擦過桌面。
8. 自動吸管在使用前先以酒精擦拭過表面，尤其是尖端處要小心擦過。然後在無菌氣流中慢慢吸放若干下，再行使用。
9. 由盒子中取用自動吸管頭時，不可用手拿，一定要以鑷子夾之，鑷子先以酒精燈燒過。取用吸管或滴管時亦然。
10. 以滴管或吸管吸取液體時，勿吸取太多以免觸及棉花，不但易污染，且棉花沾濕後不易吸放液體。
11. T 培養瓶為塑膠品，傾倒液體相當容易，但若流出瓶口時，只能以酒精衛生紙擦之，燒瓶口會把塑膠掉掉。
12. 培養液由一瓶傾倒至另一瓶時，瓶口不可相接。尤其若是二者互有污染顧忌時，更要小心。
13. 操作者頭部不可伸入無菌箱中，亦勿用力呼吸或大聲談話。任何疑似污染的地區或物品，馬上以 75% 酒精擦拭之。
14. 由外界取入無菌區的瓶子或物品，均得先以 75% 酒精擦過。由動物室進入無菌室，亦得特別小心。

#### 4. 1. 5 骨髓癌細胞之培養：

我們用 NS-1 (小鼠骨髓癌細胞株) 與免疫

#### 4.1.6 細胞保存法

過的小鼠脾細胞進行融合，前者由中央研究院呂勝春博士取得。取回經若干次傳接 (passage 或 transfer)，俟細胞生長穩定後，進行 NS-1 生長速率的觀察。

##### [方法]

1. 計算細胞數目。如圖 4.5，若血球計中央小格部分內的細胞數目為  $X$  個，則細胞的密度為每  $ml$  含  $X \times 10^4$  個。注意活細胞外表圓滿，亮度較亮；死細胞則較暗淡而不規則。可用 Trypan blue (2%之PBS 溶液) 染色，死細胞可被染料染上，不予計入。若一細胞羣落中死細胞數目太多，則應檢討之。取樣時，以滴管沖下所有附在器壁上的細胞，混合成均勻懸濁液，以滴管取出儘快注入血球計中，注意 NS-1 在溶液中很容易沉降。
2. 以 RPMIX 稀釋到  $4 \times 10^4/ml$ ，共 10  $ml$ 。在 T-25 中培養。
3. 以後每 24 小時計算一次。

##### [註]

1. 以 NS-1 為例，可得如圖 4.6 的生長曲線，第一、二天為遲滯期 (lag phase)，第三、四天為增長

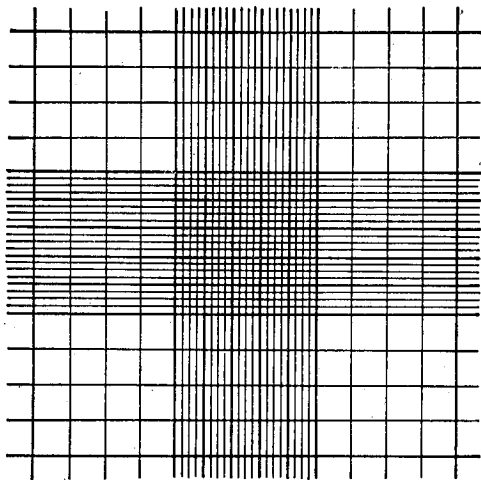


圖 4.5 血球計：

可分為如井字形的九格；中央部分再細分小格，有  $(4 \times 4) \times (5 \times 5) = 400$  小格，此 400 小格內的細胞數若為  $X$  個，則此樣本的密度為每  $ml$  含  $X \times 10^4$  個細胞。

期 (log phase)，第四天以後為飽和期 (plateau 或 stationary phase)，細胞開始死亡，密度有下降趨勢。

2. 一般細胞株生長在增長期中點 (大約三天)，即應傳接，做  $1/10 \sim 1/50$  的稀釋，換新培養基。細胞不可使之過度生長到飽和期。
3. 打算用來做細胞培養的細胞，其密度不可超過每  $ml$   $80 \times 10^4$  個，並且在前一天以新鮮 RPMIX 換掉  $1/2$  或  $1/3$  的培養基。
4. 若細胞生長緩慢，異於常態，則可能培養基出問題，或有微生物污染。

#### 4.1.6 細胞保存法：

獲得細胞株或融合瘤株後，應儘速冷凍保存之。

##### 4.1.6.1 細胞冷凍法：

細胞可用 dimethyl sulfoxide (DMSO) 或甘油長期保存在液態氮中，雖亦可保存在  $-70^\circ C$  冰箱中，但只能保存數週。

##### [儀器]

1.  $-70^\circ C$  冷凍箱 (Forma 8333 型)。
2. 液態氮及鋼瓶 (Union Carbide, 34XT 長

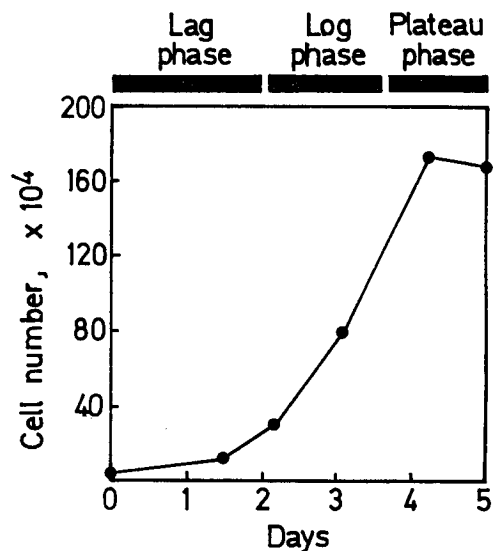


圖 4.6 骨髓瘤細胞株 NS-1 的生長曲線：

前兩天為遲滯期 (lag phase)，第三、四天為增長期 (log phase)，以後為飽和期 (plateau 或 stationary phase)。

期保存用)。

### 3. 冷凍小瓶 (cryotube)，普利龍架。

#### [試劑]

1. **DMSO 保存液**：使用前才配製。取 DMSO (Merck, 9678) 1 ml 慢慢滴入盛有 3 ml RPMIX 的離心管中，邊滴邊搖，會放熱。再加入 4 ml FCS 後，置冰上冷卻。每一冷凍小瓶需 1 ml。

#### [方法]

1. 欲冷凍的細胞之密度大約每 ml 含  $50 \times 10^4$  個，操作前一天應換 1/2~1/3 培養液。
2. 沖下細胞，計數得所需個數。離心 ( $\sim 200 \times g$ ) 去上清。
3. 慢慢滴入 DMSO 保存液，使成均勻懸濁液。每  $5 \times 10^6$  個細胞加 1 ml DMSO 保存液，大約剛好需一個 T-25 的細胞。
4. 每 1 ml 懸濁液裝入一支冷凍小瓶中，封口後置碎冰上。
5. 插入普利龍架內，置  $-70^\circ\text{C}$  冷凍箱。
6. 過夜後，手戴粗布手套，迅速取出放入液態氮中。

#### [註]

1. 欲冰凍細胞的生長要良好，密度勿太密。懸濁於 DMSO 保存液後的密度不可低於每 ml  $10^6$  個，否則無法存活，每小瓶以 1 ml 為宜。
2. 細胞懸濁於 DMSO 後，要立刻置碎冰上。儘速裝入普利龍中，普利龍要包住小瓶，底部亦勿露空。
3. 操作液態氮貯藏品一定要戴粗布手套。液態氮鋼瓶中各種細胞的貯藏位置要詳細記錄，以便取出時能迅速找到。最好用個人電腦管理，可用 dBASE。

#### 4. 1. 6. 2 細胞解凍法：

一批細胞經冷凍後，最好在數日後取出一瓶做解凍試驗，看細胞的存活率如何。

#### [方法]

1. 先準備好  $37^\circ\text{C}$  水浴，若干 RPMI 1640 及 RPMIX (不用加溫)。
2. 取出冷凍小瓶，立刻在  $37^\circ\text{C}$  水浴中解凍，

在分鐘內完成解凍。

3. 外表以酒精擦拭過，小心打開瓶口。
4. 一滴一滴慢慢加入 1 ml RPMI 1640，一邊緩緩混合均勻。
5. 移入離心管中，慢慢再加入 8 ml 之 RPMI 1640，一邊混合均勻。
6. 低速離心 ( $\sim 200 \times g$ )，去掉上清。
7. 細胞小心懸濁於 10 ml RPMIX，置入 T-25 中培養。
8. 在 T-25 中即可觀察細胞存活情形。有一部分細胞會死去，好的冷凍細胞約有 80% 以上是活的，可以用 Trypan blue 染色法判斷。
9. 次日若細胞液甚為混濁，有許多死細胞及細胞碎片，則輕搖一下 T-25，倒去懸浮細胞碎片及培養液，再加入 10 ml 的新鮮 RPMIX ( $37^\circ\text{C}$ )。
10. 穩定生長以後，依一般操作法傳接下去。

#### 4. 1. 7 污染及其防治：

- A. **微生物污染**：由於培養液中已含有抗生素 Penicillin 及 Streptomycin，故通常污染都不是細菌，大部分是黴菌。另外無法以一般顯微鏡直接觀察到的是 mycoplasma，要用特殊的染色法才能看到。酵母菌也是污染的來源之一，故要與實驗室中進行的酵母菌實驗小心隔離。污染均由肉眼或顯微鏡觀察發現。當培養液呈混濁或異常的黃顏色時，可能已有嚴重污染。顯微鏡觀察則要小心，有些污染物與細胞碎片或顆粒很難分辨。

#### B. 污染的途徑：

1. **操作者的污染**：操作習慣不良是最主要的污染原因。藉著樣本吸取、傾倒、傳接等操作，無時不有污染的機會。操作者務必要有完善的訓練，養成良好的操作習慣。
2. **用具污染**：玻器、用具等消毒不完全或貯藏不良，尤其高壓蒸氣滅菌後殘餘的水分若未能乾燥完全，則污染的機會大增。
3. **培養液污染**：培養液過濾不當可能造成污染，在無菌過濾後可倒取少量培養液先行培養



## 4.2 細胞融合法

看看，若不長菌才予使用。不過此法亦非絕對可靠。

4. 無菌操作箱：應定期檢查，確定吹出的空氣為無菌。
5. CO<sub>2</sub> 恒溫箱：對一個空氣進出不經過濾的培養室而言 CO<sub>2</sub> 恒溫箱非常容易長微生物。箱內電扇（在上方 CO<sub>2</sub> 進入之處）附近，以及板架（shelf）上，要經常檢查之。大約每個月應該全清一次，拆下所有板架，以酒精擦拭過，嚴重的地方要徹底洗濯。
6. 動物室：來往於培養室與動物室之間要特別小心，勿帶入污染物。

## 4.2 細胞融合法

以製備單株抗體為目的，進行將骨髓瘤細胞 NS-1 與經過免疫之老鼠脾細胞的融合。

### 4.2.1 老鼠免疫及脾細胞收集：

我們採傳統的乳劑型抗原腹腔注射法進行免疫，近來雖有人直接以健康脾細胞進行試管中免疫，但效果不甚佳，僅限定於如抗原很難取得等特殊情況<sup>(19)</sup>。

#### 〔老鼠〕

用 BALB/c 小鼠，注意其品系要純。約四週到六週大小。一起免疫三至五隻，每次以一或二隻進行融合試驗，可省去下次實驗時的免疫期間。

#### 〔方法〕

##### A. 免疫：

1. 抗原：以 SS-5 根據 3.1.1 小節的抗原乳劑處理法做成乳劑，每隻小鼠需 0.3~0.5ml，蛋白質量約為 100~200 μg。第一次注射以 Freund 氏完全佐劑做成乳劑，以後各次用不完全佐劑。
2. 注射時，左手戴粗布手套，以拇指、食指抓住鼠頭耳朵後面的部分，翻過來以中指、無

名指抵住鼠背，而以小指夾住鼠尾，腹部朝上。右手持針筒，在老鼠右下腹的地方刺入，勿刺及內臟，推注 0.3~0.5 ml（圖 4.7）。

3. 以後每隔二至四週打一次。在融合實驗前三天，一般均以溶態抗原（不加佐劑，溶於 PBS 中）做尾靜脈注射。尾靜脈不易打成功，我們發現有無打成功對實驗結果無甚大影響，故不再打靜脈。有人在第一次免疫後 14 天打尾靜脈後三天即行融合。
4. 通常我們在一或三個月內，免疫三到六次，隨時可供做細胞融合之用。
5. 在免疫過程中，可以由尾靜脈或眼窩抽血，測其抗體效價。不過這些抽血方法均不易，故我們在取其脾臟時，順便取出血液，供測效價之用。



圖 4.7 BALB/c 小鼠腹腔注射抗原乳液。

##### B. 脾細胞收集：

1. 準備解剖器具如下：

一般手術剪刀	2 把
眼科手術剪刀（直尖）	3 把
鑷子（尖頭）	3 支
鑷子（鈍頭）	3 支

另可準備止血鉗一或二把。

2. 以上清洗乾淨後可以高壓滅菌、乾熱或酒精焰滅菌，放冷後使用。
3. 在無菌操作箱內把用具布置好。
4. 小鼠以乙醚昏迷之，可再拉斷頸柱（cervical dislocation）殺死。在鉛箔上以 75% 酒精噴灑全身，浸濕數分鐘後，以衛生紙擦乾。

5. 固定在一塊約  $15\text{ cm} \times 15\text{ cm}$  的普利龍板上，使其左腹向上。熟練的話可不用固定。有人先剃去左腹部的毛，但事實上有無剃毛影響不大，且剃毛經常造成毛髮飛揚，反難以處理，故我們均不剃之。
6. 雙手再消毒後，開始解剖。如圖 4. 8。
7. 先把腹部的表皮如圖 4. 8A 中(1)的地方橫剪開，最好剪向背部大約至腎臟的地方，再直剪(2)。打開成爲一個三角形區域(圖 4. 8B)。注意只要剪開表皮，勿傷及真皮；剪刀、鑷子等亦應盡量勿觸及真皮表面。
8. 透過真皮，可以看到脾臟，先判定脾臟的位置。換一套剪刀鑷子，以尖頭鑷子挑起圖 4. 8B 中打×的地方，使成一帳篷樣，以眼科剪刀小心剪一開口，向背部方向剪去，鑷子仍把真皮挑高，勿落下，撥開真皮。
9. 可看到一深紅色長條的脾臟，換一套鑷子(鈍頭)及眼科剪刀。以鑷子夾起脾臟，用剪刀剪開下面黏附著的組織，取出脾臟。
10. 先浸入一個裝有 RPMI 1640 的培養皿中，除去白色的結締組織。再換到另一個裝有  $10\text{ ml}$  RPMI 1640 的培養皿中。
11. 以鑷子夾住，用針頭密密麻麻地在脾臟穿刺。然後以針頭吸血中的 RPMI 1640，注入脾臟內，細胞紛紛由小孔中沖出。
12. 徹底洗出脾臟內的細胞，到最後只剩一空囊，以滴管吸取此細胞液，裝入一小離心管( $11\text{ ml}$ )中，靜置 5 分鐘。
13. 小塊組織碎片會沉到管底，用滴管吸出上清，放到大離心管( $50\text{ ml}$ )中，以 RPMI 1640 洗一次。
14. 加入  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $0.85\%$  水溶液)若干  $\text{ml}$ ，均勻懸濁之，在室溫下置約 10 分鐘，溶去紅血球。
16. 以 RPMI 1640 洗三次，計細胞數，每個脾臟大約都有  $10^8$  個脾細胞。準備進行細胞融合。

## 〔註〕

1. 免疫很久或較多次的小鼠，脾臟腫大，約爲健康者的三倍。有些會黏在腹膜或真皮上，非常難取下。

此時只得耐心地將脾臟與其他組織剪開。

2. 脾細胞較骨髓瘤細胞輕，離心時間可能要加長些，注意離心後的上清是否澄清。
3. 取完脾臟後，可在腹腔中剪斷任一血管，收集流出的血液，以測抗體效價。

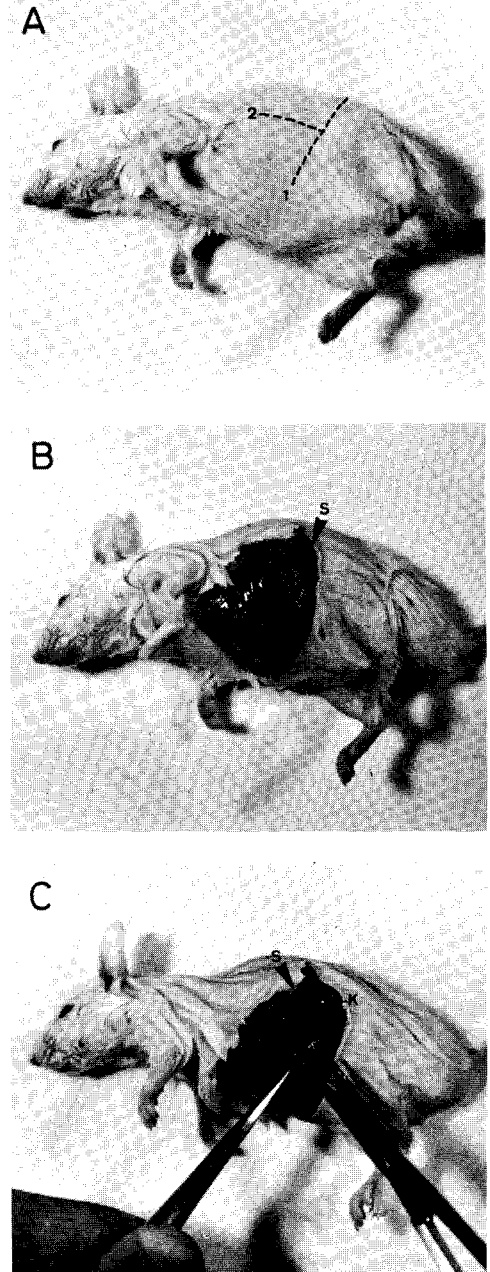


圖 4. 8 小鼠脾臟取法，詳細步驟請見本文。  
(S：脾臟，K：腎臟，L：肝臟)

## 4.2.2 細胞融合

### 4.2.2 細胞融合：

我們決定細胞融合進行的時機，完全視骨髓瘤細胞 NS-1 的生長情形而定。小鼠距最近一次免疫最好在一週左右，如上法取出脾細胞。

#### [準備]

1. **NS-1 細胞**：如 4.1.5 小節所述培養 NS-1 細胞，一次融合需  $2\sim 5\times 10^7$  個細胞，密度以  $30\sim 50\times 10^4$  個/ml 計，則需約 100 ml，大約兩個 T-80 培養瓶。融合前密切觀察細胞是否健康；並在細胞密度約為  $20\times 10^4$  個/ml 時，倒去 1/3~1/2 培養液（勿懸濁之），換新 RPMIX。大約在 24 小時之內，細胞密度達  $30\sim 60\times 10^4$  個/ml 時，可做融合。
2. **脾細胞**：取法如上小節，脾細胞勿放置過久。
3. **Polyethylene glycol (PEG)**：PEG 500~6,000 均有人用來融合，最常用的是 1,500 及 3,000。不過最重要的影響因素是其中所含醛類不純物的多寡<sup>(20)</sup>，這隨着廠牌、品級及批數不同而異，一般均得先行試過融合效果如何，我們用 Merck 的 PEG 1,500。取 1 克 PEG 1,500，裝在 50 ml 血清瓶，高壓滅菌 ( $121^\circ\text{C}$ , 20 分鐘) 成爲液體後，室溫下放冷，再加 1 ml RPMI 1640，共得 2 ml 50% PEG (W/V)，每次均新鮮配製，保持在  $37^\circ\text{C}$  備用。有人使用 35% PEG 以超微濾膜過濾滅菌，據稱可提高融合率。
4. **HT**：使用 Flow 16-809-49，爲  $50\times$  溶液 (100 ml 水中含 hypoxanthine 68 mg 及 thymidine 19.4 mg)，自行配製時可在  $70\sim 80^\circ\text{C}$  溶之，無菌過濾。使用時，取 2 ml 加入 98 ml RPMIX；成爲 HT-RPMIX。HT 貯存於  $-20^\circ\text{C}$ 。
5. **HAT**：使用 Flow 16-808-48，爲  $50\times$  溶液 (與 HT 同，另加 aminopterin 0.88 mg)。Aminopterin 不易溶，可以 1 N NaOH 數滴溶之，再以 HCl 中和，無菌過濾。HAT 於  $-20^\circ\text{C}$  貯存，解凍後易生固體沉

澱，懸濁後取出加入培養基中會溶解。使用時取 2 ml HAT 加入 98 ml RPMIX，成爲 HAT-RPMIX，避光貯存。

6. **其他用具**：馬錶、塑膠無菌 1 ml 吸管及 RPMI 1640。

#### [方法]

1. 收集 NS-1 細胞，以 RPMI 1640 洗三次後，取出  $2\sim 5\times 10^7$  個細胞。一般 NS-1 與脾細胞數目的比爲 1:3 到 1:10 之間。融合在 50 ml 離心管中進行。
2. 把 NS-1 與上述脾細胞混合一起，離心下來，倒去上清。
3. 利用管壁殘餘的培養液，把細胞均勻打散。
4. 準備馬錶，開始融合。離心管放在一裝有  $37^\circ\text{C}$  水的燒杯內，一邊搖動一邊加入 1 ml PEG；慢慢在 1 分鐘內加完，注意混合一定要均勻。
5. 再均勻搖動 1 分鐘。
6. 緩緩在 2 分鐘內以滴管再滴入 2 ml RPMI 1640，邊加邊混合均勻，漸漸稀釋掉 PEG。
7. 同法，再於 2 分鐘內滴入 8 ml RPMI 1640。
8. 離心 ( $\sim 200\times g$ ) 10 分鐘，去上清。
9. 加入 30 ml HAT-RPMIX，輕輕混合使成爲均勻懸滴液，勿用滴管用力吸放。
10. 將此離心管連同細胞，置  $37^\circ\text{C}$  恆溫箱 1~2 小時。
11. 均勻混合，均分到三片 96W 培養盤，用滴管分注，大約每槽 3~4 滴。離心管內的懸濁液要不時搖動混合均勻。
12. 三片 96W 培養盤置  $\text{CO}_2$  恆溫箱培養，融合之日爲零日 (Day 0, DO)。

#### [註]

1. 步驟 9 的懸濁液可取出一滴置載玻片上觀察，看有無連在一起的細胞。NS-1 較大，脾細胞較小，一大一小的連結體才是所要的融合細胞 (圖 4.9)。若爲成功的融合，則此種連體細胞的密度大增；若沒看到任何連體細胞，則可能融合沒有成功。次日所有連體細胞均不見，可能合併在一起了。
2. 細胞與 PEG 接觸時間只約 6 分鐘，太長久對細胞有害。此 6 分鐘內離心管要不時搖動，混合均勻。

3. 近來發展有電氣融合法<sup>(21)</sup>，融合效率較高，但需一部融合儀器，甚為昂貴，我們沒有試過。
4. 最後放入 96W 培養盤的細胞數目與密度相當重要，依上述方式進行大致在每一槽中加有  $4 \times 10^5$  個細胞 (0.1 ml 體積)。

#### 4.2.3 篩選：

融合細胞後，先以 HAT 選出融合成功的細胞，再以 ELISA 選出分泌有專一性抗體者，並立刻擴大為 1 ml 培養，以便儘早進行單株化。

##### 4.2.3.1 HAT 篩選：

融合後，加入 HAT-RPMIX 即開始初步篩選。只有 NS-1 與脾細胞的融合細胞才能存活下來。HAT 篩選的這段時期（第一週）是成敗關鍵所在，要非常小心照顧，才有高的融合存活率。

##### [方法]

1. 融合次日 (D1)，以倒立式顯微鏡觀察，槽內佈滿細胞，看不出融合情況如何。每槽小心滴入 3 滴 HT-RPMIX，盡量不要把細胞弄混亂。此 3 滴亦可分在 D1 及 D2 加入。
2. D2 或 D3 時，可以看到有二元體或三元體 (dimer 或 trimer) 的細胞出現，數目非常多，每槽約十多處，其中只有一或數處會繼

續存活下來。

3. D3 及 D5 時，小心每槽吸出 0.1 ml 培養液上清，加入 0.1 ml 新鮮 HT-RPMIX。這段時間，大部分細胞漸漸死去，有希望的羣落可長至數十個細胞。
4. D7，羣落較大的已可用肉眼看到，但大部分仍得用顯微鏡觀察。
5. D8 及以後的三或四週，每隔三~四天換 0.1 ml HT-RPMIX。
6. 約在融合後二~三週內，生長可趨穩定。長有羣落的槽數，一般在 30% 以上，有高達 90% 者。我們尚無法掌握穩定的高融合率的操作條件。

##### [註]

1. 我們在第一次加 HAT-RPMIX 之後，就不再加 HAT-RPMIX，改用 HT-RPMIX。因 HAT 中 aminopterin 的量是實際有效量的 400 倍，故在經過五、六次換培養基後，仍有數倍的效力；其時已過兩週，沒有融合成功的細胞，早已死光。
2. Aminopterin 對細胞生長有抑制作用，故在融合後逐漸稀釋之，有助於融合細胞的生長；但 HT-RPMIX 要一直用到單株建立完成，才換成一般 RPMIX。
3. 第一週內，換培養基要非常小心，因剛生長起來的小細胞羣落若被弄散，很可能無法再生長起來。
4. 在換培養液時，每槽取出 0.1 ml，所用自動吸管頭並不每槽換新。因除非太用力吸上或吸管頭伸入太深，否則不會吸到槽底的細胞而造成污染。依我們的經驗，似乎沒有發生過疑似污染的情形。



圖 4.9 融合後不久所出現的融合細胞：

- A：兩個 NS-1 融合在一起  
 B：一個 NS-1 與一個脾細胞融合  
 C：一個 NS-1 與兩個脾細胞融合

#### 4.2.4 單株化

5. 這段期間一定要特別小心，並注意：
  - (a) 培養液一定要完全沒有問題，尤其要用最好的 FCS，其他的添加物若出問題，也會使融合細胞死去。
  - (b) 儘量不要打擾細胞的生長，沖散細胞羣落，單一個細胞很難再長成羣落（因這時陪伴著生長的 NS-1 或脾細胞已漸死去）。
  - (c) 換培養液時，其量不得超過一半。
  - (d) D0~D5 之間，NS-1 仍部分生長著，會消耗養份，故應充分供應之。有人在 D1, D2, D3 均添加新培養液。

##### 4.2.3.2 ELISA 篩選及 1ml 培養：

一週後若細胞羣落够大的話，可開始以 ELISA 測培養液中的抗體。若有所要的專一性抗體，則可挑出擴大於 1 ml 槽中培養。

##### A. ELISA 篩選：

1. D8 以後，每三到四天換一次培養液，保留取出的培養液。每槽取出上清 0.1 ml 置入一新的培養盤之對應位置槽內，不管槽中有無細胞羣落，所有培養槽均進行 ELISA。
2. 取出的樣品 0.1 ml，加明膠 NET 液 0.2 ml，混合均勻，稀釋了三倍成爲 0.3 ml，以便 ELISA 做二重複之用。
3. 取已吸附有抗原的 EIA 盤，把樣品加入對應位置的槽內，每槽 0.1 ml，應做二重複。故若有三片培養盤，則共需六片 EIA 盤。
4. 加膠布封口後，37°C 反應 30 分鐘，4°C 反應 30~60 分鐘。
5. 吸去樣品液，PBST 洗三次。加 0.1 ml HRP-2nd Ab，使用山羊抗小鼠 Ig (G,A 及 M) 的二次抗體，寫爲 HRP-GAM (goat anti-mouse)，以明膠 NET 稀釋爲 1:2,000。同上步驟反應。
6. 反應後吸去 HRP-GAM，以 PBST 洗四次，用 OPD 0.15 ml 呈色。以上 ELISA 操作要點詳見 3.4 節。
7. 由呈色判讀結果，一定要二重複的兩個對應槽均有相同程度的呈色才能判爲正反應。呈色的強弱表示抗體量的多寡或親和力的強弱。若呈色雖弱，但二重複均有呈色，則爲正反應；呈色再強，但另一相對樣品毫不呈色，則可能爲污染。呈色判定，用肉眼即可，

使用 EIA 光度計亦可。

8. 每盤大約可得一至數個正反應槽，在培養盤蓋子劃圈做記號，時時觀察之。ELISA 要連續進行三至四次或更多。有些正反應槽出現較慢，有些出現過後又不見了。不過大致來說均相當穩定，在整個過程中的 ELISA 結果均差不多。
9. 正反應槽的羣落若長得差不多（肉眼可見程度），應儘快擴大到 1 ml 培養槽（24 W 培養槽）。

##### B. 1 ml 培養槽 (24 W)：

10. 小心把槽中的細胞懸濁之，勿污染四周各槽，注入含有 1.0 ml RPMIX 的 1 ml 槽中。
11. 在 1 ml 槽中懸濁均勻後，再加數滴回原 96 W 盤中。
12. 24 W 及 96 W 培養盤應同時培養，以免 1 ml 培養失敗而失去細胞株。

##### [註]

1. 在細胞融合實驗開始以前，就要先建立好 ELISA 系統，否則很難順利地完成篩選。
2. 擴大爲 1 ml 培養時，一般均可不加飼餵細胞層 (feeder layer)，但若有較不易生長的細胞株，則可考慮加之。飼餵細胞層的做法見下述 (4.2.4)。
3. 1 ml 培養是重要的過渡階段，俟細胞生長起來後，要儘快再種入 T-25 (10 ml 培養液) 中，以便冷凍保存在液態氮中。同時可由 1 ml 培養中取出細胞進行單株化，單株化的進行越早越好，以免所要的細胞株被生長較旺的雜株淘汰掉。

#### 4.2.4 單株化：

當 96 W 或 24 W 培養盤中所要的細胞株有足够的數目，應儘速進行單株化。我們以限數稀釋法 (limiting dilution) 進行，一般加有飼餵層細胞。另外有人用軟質洋菜 (soft agar) 法進行單株化。

##### A. 飼餵細胞 (feeder cell)：

可使用胸腺細胞 (thymocytes)，正常脾細胞或腹腔細胞。一般我們用胸腺細胞。

1. 取一隻約四至六週大的小鼠，可以不用 BALB/c。

2. 可以 4. 2. 1. B 的方法收集脾細胞，當做飼餵層（每槽添加  $10^5$  個）。
3. 或可取胸腺，收集胸腺細胞。胸腺的取法如圖 4. 10 所示。老鼠前肢固定後，以 75%

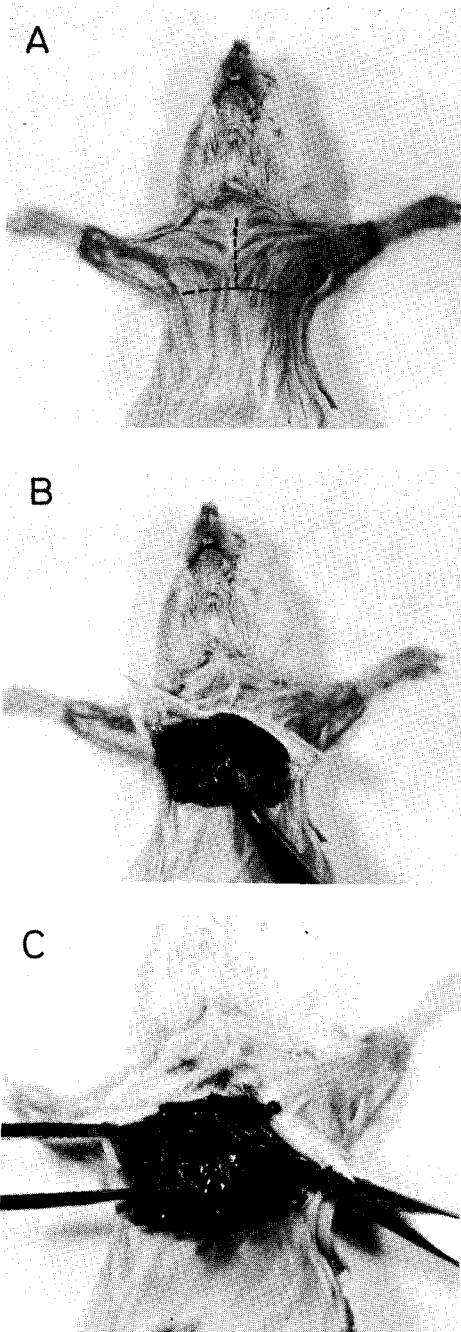


圖 4. 10 胸腺取法，詳細方法請見本文，箭頭指處即為胸腺。

酒精消毒，如圖 A 剪開表皮，張開露出真皮，可看到胸骨及肋骨。

4. 換用眼科剪刀，小心在胸骨（約第二或第三肋骨處）橫剪開來（圖 B），勿剪太深。血管很容易剪破，一旦出血很難找到胸腺。
5. 延著胸骨往上剪，露出白色的胸腺（圖 C）。有兩片，覆蓋在心臟上方。
6. 以鑷子夾起胸腺，剪斷下面的連結組織，取出泡在 RPMI 1640 中。
7. 以注射針頭密集穿刺，胸腺細胞紛紛釋出。
8. 收集後以 RPMI 1640 洗兩次，即可使用，每個胸腺可得  $10^8$  個細胞。
9. 在顯微鏡下觀察，除了少數紅血球外，幾乎全是淋巴細胞（T-cell）。

#### B. 限數稀釋法：

一個細胞株在一片 96W 培養盤做單株化的限數稀釋。我們習慣半數的槽（A~D 列）中每槽含 2 個細胞，另半數的槽（E~H 列）每槽含 1 個細胞。生長不佳的細胞株，可能要提高細胞的密度到每槽 2~6 個融合細胞。

1. 先數好原細胞培養中的細胞密度，以 RPMI 1640 稀釋為每 *ml* 含 1,500 個融合細胞。
2. 上述 (A) 的胸腺細胞離心下來，去掉上清，以 10 *ml* RPMIX 懸濁之，取其中 7.5 *ml* 與 0.1 *ml* 步驟 1 的融合細胞混合，則每 *mi* 含有 20 個融合細胞。
3. 一邊混合，一邊在 96W 培養盤的 A~D 列中，每槽加 0.1 *ml*（含 2 個融合細胞）。
4. 剩下的 2.5 *ml*，與其餘的胸腺細胞（2.5 *ml*）混合一起，共得 5 *ml*。
5. 在 E~H 列中，每槽加 0.1 *ml*（含 1 個融合細胞）。
6. 置入 CO<sub>2</sub> 恆溫箱中培養。

#### C. 單株化細胞：

1. 開始培養限數稀釋培養盤的前幾天內，看不到融合細胞，全部都是飼餵細胞。通常不添加或換培養液，尤其在前數目，儘量勿擾亂細胞。
2. 大約在一週後，可見羣落出現，飼餵細胞也

### 4.3 單株抗體的生產與檢定

大部分死去散掉。此時仔細以顯微鏡觀察各槽，選出只長有一個完整圓型羣落的槽，剔除羣落不完整或有兩個以上羣落的槽。

3. 俟這些羣落長大後，做 ELISA，測定抗體的有無。
4. 確定為單一羣落，且有抗體產生的槽，選 3~6 槽繼續擴大為 1 ml 培養，再擴大到 T-25 培養瓶。
5. 儘快做細胞冷凍，保存在液態氮中。每一株至少要有 6 個冷凍小瓶，最好能分在不同的液態氮鋼桶中貯存。
6. 這段期間可把 HT-RPMIX 改為一般的 RPMIX，但要漸漸改變，不可一下子把 HT-RPMIX 換成 RPMIX。

#### [註]

1. 若使用良好的 FCS，則有些較易生長的融合細胞可不加飼餵細胞，完全決定於細胞的生長情況與 FCS 的品質。
2. 即使得到單株化細胞，生長數十代後，也許有可能又產生一些旁株，不生產專一性抗體，則要再以限數稀釋法進行單株化。很難確定細胞株到何時才穩定下來，故各個階段的細胞都應冰凍冷藏，以防生產專一性抗體的特質消失。

### 4.3 單株抗體的生產與檢定

融合細胞株建立後，可以開始大量生產單株抗體。一般在實驗室內可以：(-)大量培養細胞，純化培養液中的抗體；或(+)把細胞打入小鼠中，使之產生腹水。後者的抗體濃度約為前者的 1,000 倍，每 ml 可達數 mg。

#### 4.3.1 培養基法：

以 T-80 或 T-175 大量培養，T-80 每瓶可收 50 ml 上清液，T-175 可收約 100 ml。培養時讓細胞一直長過飽和期到開始死亡時。離心去掉細胞，收集上清，大約每 ml 含 5~50  $\mu$ g 抗體，視細胞株而異。上清最好先以硫酸銨沉澱下免疫球蛋白部分，準備進行進一步純化。

#### 4.3.2 老鼠腹水產生法：

1. 取 BALB/c 小鼠若干隻，每隻腹腔注射 0.5 ml Pristane (2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane, Sigma, T-7640)。
2. 10 天後，取融合癌細胞，離心去上清，懸濁於 0.5 ml RPMIX 中，打入上述小鼠腹腔。每隻小鼠需  $10^6 \sim 10^7$  個細胞 (大約一個 T-25 培養瓶)。
3. 經一或二週後，小鼠腹部開始脹大，可抽腹水。取 19 號塑膠針頭，剪去塑膠接頭，插入小鼠腹腔，腹水馬上滴出，以離心管接之，收到不再滴出為止。
4. 若插入後，腹水不滴出，可輕旋轉針頭，可能是內臟壓住針頭入口，旋開即可。
5. 抽過腹水的小鼠尚能生存數日，視情況可再抽取至死亡為止。或來不及抽而死去，若剛死不久，亦可如上法抽之，或剖開腹部收集。
6. 若處理不便，可把小鼠先以乙醚麻醉殺死後抽之。
7. 腹水離心去掉紅血球，顏色由淡黃到淡紅不一，有些則呈白濁。可加三倍 PBS 稀釋後以硫酸銨沉澱，或直接置  $-20^\circ\text{C}$  保存。
8. 有些小鼠不產生腹水，可能對融合細胞產生了抗體，若再次打入細胞，則會過敏死亡。

#### 4.3.3 單株抗體純化：

單株抗體亦可以 3.2 節的方法進行純化，不過若抗體為 IgG1，則以 Protein A-Sepharose CL-6B 進行親和層析法最為方便。

#### [試劑]

同 2.2.5 小節試劑中的各種 pH 緩衝液。

#### [方法]

1. 取 Protein A-Sepharose CL-6B (Pharmacia) 1.5 克，先在 PB-8.0 中膨潤 15 分鐘，約得 5 ml。
2. 在玻璃濾器中以 PB-8.0 300 ml 洗過，裝入管柱中。

3. 5 ml Protein A-Sepharose CL-6B 約可吸著 100 mg IgG, 但對 IgG1 吸著力較弱, 約只有 50 mg。
4. 樣品最好經過 PB-8.0 透析, 尤其含有硫酸銨者。樣品通過管柱兩次, 以 PB-8.0 洗之, 直到  $A^{280nm}$  無吸光。
5. 以 CP-6.0 緩衝液溶離之, 可得 IgG1 的蛋白質尖峯; 以 CP-4.5 溶離, 可得 IgG2a 及 IgG3, 有一些 IgG1; 以 CP-3.0 溶離, 可得 IgG2b 及一些 IgG2a。
6. 收集 IgG1 或其他所要的蛋白質尖峯, pH 可視需要調回中性。
7. 管柱以 PB-8.0 平衡之, 可重複使用。長久不用時, 應取出管柱, 加  $\text{NaN}_3$  至 0.1%, 置  $4^\circ\text{C}$  保存。

#### 4.3.4 單株抗體之檢定:

通常單株抗體不會與抗原在洋菜膠上產生沉澱線, 但對同一抗原的數種單株抗體混合一起後, 也許會與抗原產生沉澱線。單株抗體的純度可以 SDS-PAGE 或等電聚焦法檢定之。在篩選時所做的 ELISA 即可檢定其對抗原的專一性。但所用抗原的純度若不高, 或其中夾雜有微量但抗原性很强的物質, 則篩選到的單株細胞要很小心地檢定其專一性。抗體所屬的 class 與 subclass 的決定, 或其輕鏈種類 ( $\gamma$  或  $\kappa$ ) 的判別, 均可用 ELISA 法得之, 但要有其專一性二次抗體。

單株性 (monoclonality) 的檢定極為重要。單株化的抗體一定只屬一種 class, subclass 或輕鏈。培養中的細胞種類也只有一種, 可分析染色體數目來判定 (本實驗未進行此項分析)。另外, 以單株抗體做抗原胜肽圖的免疫轉印 (見 3.5 節), 比較兩單株抗體所得的圖譜, 可以區別二單株抗體的異同。

## 4.4 單株抗體之應用

應用單株抗體可以進行專一性極高的 ELISA, 分析兩個構造很近似, 但不完全相同的抗原。

以單株抗體製成的親和吸着劑, 可以用來純化不易由一般方法純化得的抗原。另外, 對抗原胜肽圖譜的檢定, 單株抗體可檢出特殊抗原決定基 (determinants 或 epitopes) 的分佈。這些方法在以上各章中均有詳細說明。以下分述其他有關的實驗方法及其應用。

### 4.4.1 放射性標幟法:

抗體可直接以  $^{125}\text{I}$  經氧化反應或用  $^3\text{H-Leu}$  以生合成法標幟。一般而言, 後者所得的放射性比活性太低, 應用上較有限。但以  $^{125}\text{I}$  標幟, 則也許會對抗體造成傷害, 影響其與抗原之結合能力。

#### 4.4.1.1 以 $^3\text{H-Leu}$ 生合成標幟抗體<sup>(22)</sup>:

[試劑及材料]

1. 細胞: 單株融合細胞, 生長到密度為每 ml 含 30~50 個細胞時。
2. 透析之 FCS: 取小量 FCS, 對 PBS 透析, 再行無菌過濾。
3. 無 Leu 培養液: 取 Eagle's MEM (GIBCO, 320-1895, 不含 leucine) 26 ml 加 3 ml 上述透析之 FCS 後再加 glutamine, pyruvate, 及 Penicillin-Streptomycin (見 4.1.3) 各 0.3 ml。
4.  $^3\text{H-Leu}$ : NEN (NET-460) 1.0 mCi/ml, 146.5 Ci/mmol。
5. Leucine: 50 mM 水溶液, 無菌過濾。
6. PBS-X: PBS 含 0.5% Triton X-100。

[方法]

1. 收集細胞, 離心 ( $\sim 200 \times g$ ) 10 分鐘, 除去上清。
2. 加 0.9 ml 無 Leu 培養液, 及 0.1 ml  $^3\text{H-Leu}$ , 混合均勻。
3. 培養 8 小時後, 加 Leu (50 mM) 20  $\mu\text{l}$ , 繼續培養 1~3 小時。
4. 離心倒出上清保留 (標為 S)。
5. 細胞加 1 ml PBS-X 懸濁後,  $4^\circ\text{C}$  放過夜。
6. 離心 ( $\sim 10,000 \times g$ ) 5 分鐘, 取上清 (標為



#### 4.4.2 親和度測定法

C)。

##### [註]

1. 上述 S 與 C 均含有放射性抗體，但以 C 含量較多。
2. 所得放射性抗體可加到吸附有抗原的 EIA 盤 (PV 材質) 內 (每槽 50 $\mu$ l)，做結合試驗。反應後吸去抗體，以 PBST 洗數次，涼乾後一槽一槽剪下，分別放入閃爍計數瓶，加 8 ml toluene 基的閃爍計數液，在  $\beta$  計數器中計數。要做固相不吸附有抗原的對照組。
3. 因比活性太低，用  $^3\text{H}$ -Leu 標示的抗體無法做 Scatchard plot 的實驗，但可用來做各單株抗體對抗原結合時，互相間的抑制情形。

##### 4.4.1.2 以 chloramine-T 氧化法用 $^{125}\text{I}$ 標幟<sup>(23)</sup>：

以  $^{125}\text{I}$  標幟蛋白質可得到很高的放射線比活性，所用的 chloramine-T 法相當方便，但此氧化反應可能對抗體有所損害，尤其是單株抗體。抗體蛋白質需經純化，純度越高越好，不能含有  $\text{NaN}_3$ ，2-mercapthanol 或其他還原劑。由於反應中會釋出碘，故要在抽氣室中進行。

##### [試劑]

1. 單株抗體：每次反應 10  $\mu\text{g}$ ，可溶在 Tris 緩衝液，pH 在 7~8 之間。
2. Tris 緩衝液：1 M pH 8.0。
3.  $^{125}\text{I}$ ：鈉鹽，NEN (NEZ 033A) 17.4 Ci/mg, 100 mCi/ml。
4. Tyrosine：10 mM 水溶液。
5. Chloramine-T：2.5 mg/ml 水溶液，新鮮製備。

##### [方法]

1. 先以 10 ml 吸管做成一隻簡便管柱，填充 10 ml Sephadex G-25，以 PBS (含 0.1% BSA) 平衡之。
2. 如下添加反應混合液：

抗體	10 $\mu\text{g}$	約 13 $\mu\text{l}$
Tris (1 M)		2 $\mu\text{l}$
$^{125}\text{I}$	100 $\mu\text{Ci}$	1 $\mu\text{l}$
chloramine-T	10 $\mu\text{g}$	4 $\mu\text{l}$
共		約 20 $\mu\text{l}$

最後才加 chloramine-T，一加入混合後，立刻加入 2  $\mu\text{l}$  tyrosine (10 mM) 混合均勻。

3. 通入 Sephadex G-25 管柱，每 ml 收集一支，以蓋氏計數器測放射性强弱。
4.  $^{125}\text{I}$ -抗體大約在 5 ml 的地方流出，收集之。

##### [註]

1. 收到的  $^{125}\text{I}$ -抗體應做「TCA 沉澱試驗」：取 1~2  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$ -抗體，加 0.2 ml BSA (0.25 mg/ml) 後，再加 0.2 ml TCA (10%三氯乙酸)，混合使沉澱後置 4°C 30 分鐘。離心 (~10,000 $\times$ g) 5 分鐘，上清 (S) 及沉澱 (P) 分測放射性。則

$$\text{TCA 沉澱物的放射性百分比} = \frac{P}{P+S} \times 100\%$$

一般均在 50~90% 之間。

2. 此反應非常快，chloramine-T 加入混合反應後，立刻加 tyrosine 下去中止反應。
3. 計算  $^{125}\text{I}$ -抗體的比活性：設共收集得 x  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$ -抗體，取 1  $\mu\text{l}$  計數為 y cpm，所用抗體量為 z  $\mu\text{g}$ ，計數效率為 e，則：

$$^{125}\text{I-抗體之比活性} = \frac{x \cdot y}{2.2 \times 10^6 \times z \times e} (\mu\text{Ci}/\mu\text{g})。$$

#### 4.4.2 親和度測定法：

有兩個方法可得知抗體與抗原親和度的大小。其一以 ELISA (或 RIA) 測定相對親和度<sup>(24)</sup>，另一則以 RIA 進行 Scatchard 分析。以 RIA 進行時，必須把抗體標以  $^{125}\text{I}$ ，對抗體的親和度有無影響則無從得知。

##### 4.4.2.1 相對親和度測定<sup>(24)</sup>：

以不同稀釋度的單株抗體與定量的固相抗原進行反應，再以酵素二次抗體呈色，作圖後可比較二抗體對同一抗原的相對親和度；亦可比較一抗體對二相關構造抗原的相對親和度。此法相當方便，但不能求得解離常數 (dissociation constant, Kd)。

##### [方法]

1. 在平底 EIA 盤 (PS 材質) 上，以抗原進行吸附、填塞 (方法見 3.4.2)。
2. 取單株抗體，純度越高越好，做各濃度的稀

- 釋，大約在  $10\text{ ng/ml}$  到  $0.1\text{ mg/ml}$  之間。
3. 各濃度抗體取  $0.1\text{ ml}$  到 EIA 盤內反應， $37^\circ\text{C}$  30 分鐘後  $4^\circ\text{C}$  1 小時，需封盤面。
  4. 洗去抗體，以 HRP-2nd Ab 加入各  $0.1\text{ ml}$  反應同上。
  5. 洗去 HRP-2nd Ab，加入 OPD  $0.15\text{ ml}$ ，呈色後在 EIA 光度計中測吸光。以上有關 ELISA 之反應，方法均同前述（3.4 節）。
  6. 以吸光度為縱座標，抗體濃度為橫座標作圖。親和度越大的，則越少量抗體就能達到越高的呈色。

#### 4. 4. 2. 2 Scatchard 圖示法<sup>(25)</sup>：

以  $^{125}\text{I}$  標識的抗體對固相抗原進行反應，測反應後游離及吸附在固相的放射線量，以 Scatchard 圖示法可以求得抗體的親和度，以解離常數  $K_d$  表示之。

#### [方法]

1. 在 U 型底 EIA 盤 (PV 材質) 上，以抗原做吸附、填塞 (方法見 3.4.2)。
2. 取  $^{125}\text{I}$ -抗體以各種稀釋加入 EIA 盤內反應，體積為  $0.1\text{ ml}$ ，放射性強度由 40,000 到 4,000,000 *cpm*。

3. 膠布封口後， $37^\circ\text{C}$  反應 30 分鐘， $4^\circ\text{C}$  置 1 小時。
4. 反應後，吸出每槽中的反應液，注入一塑膠試管 (可供測  $\gamma$  放射線者)。每槽再加入  $0.1\text{ ml}$  PBST 洗之，洗液再吸出放入同一塑膠試管中，此為游離抗體 (F)。然後 PBST 洗四次，洗液不收。
5. EIA 盤涼乾後剪開，每一槽放入一塑膠試管，此為結合到抗原上的抗體 (B)。
6. 以上 F 及 B 均以  $\gamma$  計數器測放射線。
7. 作圖，縱座標為 B/F，橫座標為 B 的 *mole* 數，可由抗體的比活性求得。取一直線，斜率的負倒數即為  $K_d$ ，單位為 *mole*。

#### 4. 4. 3 單株抗體對抗原酵素活性之影響：

先把抗原酵素與單株抗體混合反應，再測酵素活性，看抗體對酵素活性有無抑制作用。

#### [方法]

1. 抗體  $50\ \mu\text{l}$  (可試不同濃度) 加酵素液  $50\ \mu\text{l}$ ，混合後在  $37^\circ\text{C}$  反應 1 小時， $4^\circ\text{C}$  置 1 小時。酵素活性不宜太高，需預先調整之。
2. 反應後，直接測酵素活性，與不加抗體的酵素活性比較。