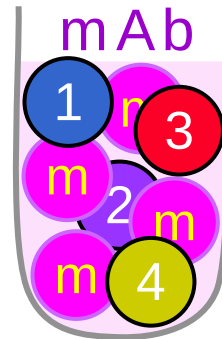
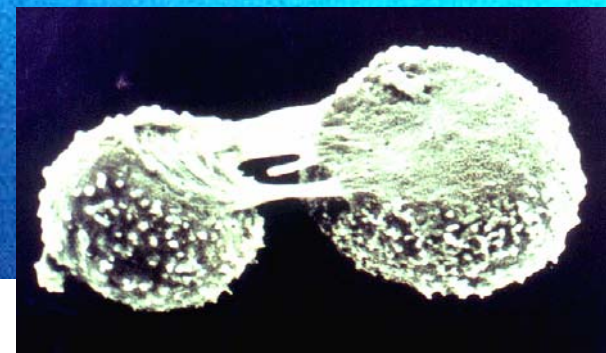
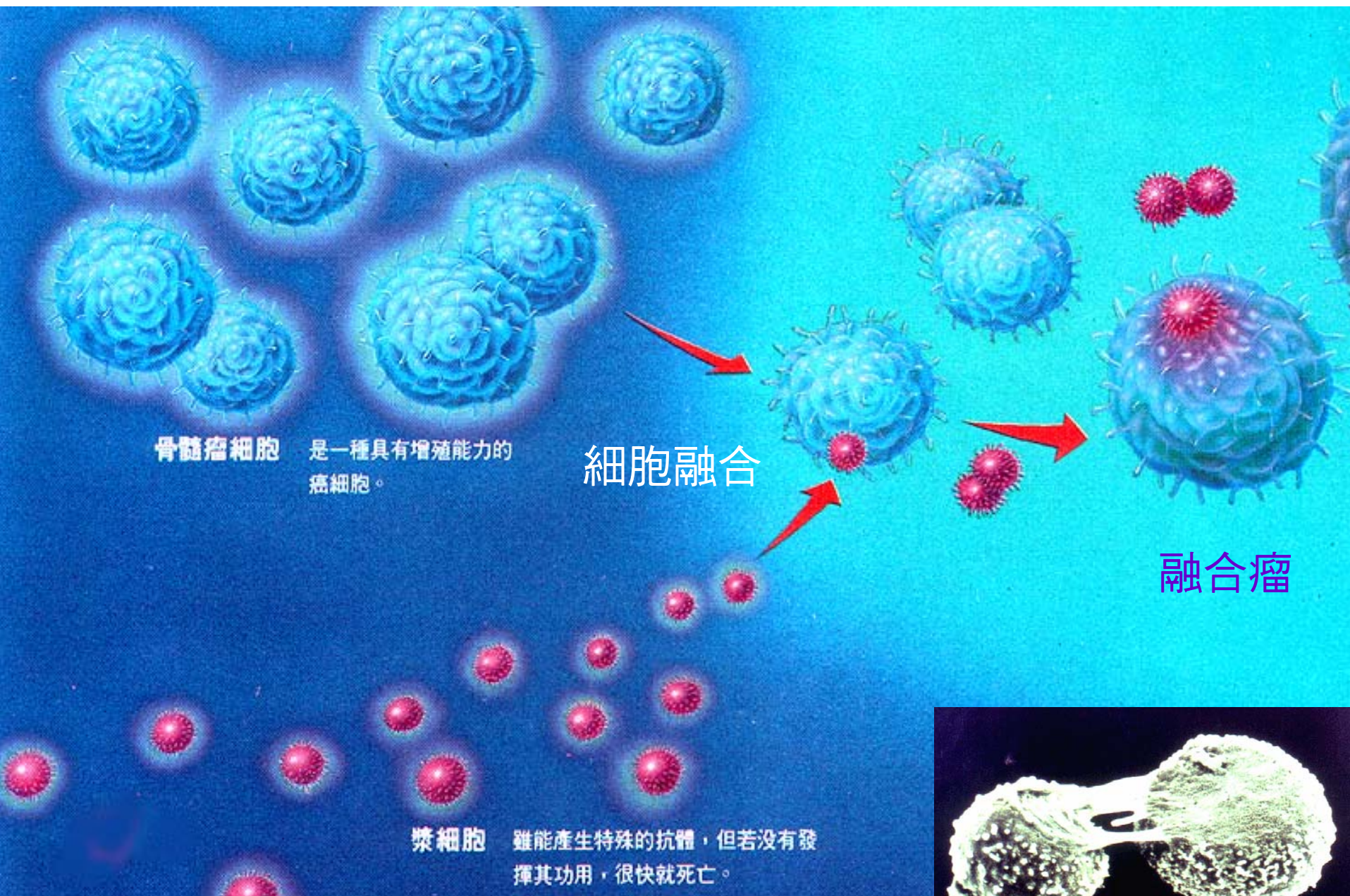


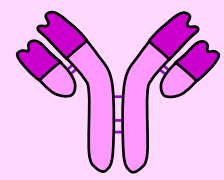
Hybridoma Technique

單株抗体

Monoclonal
Antibody

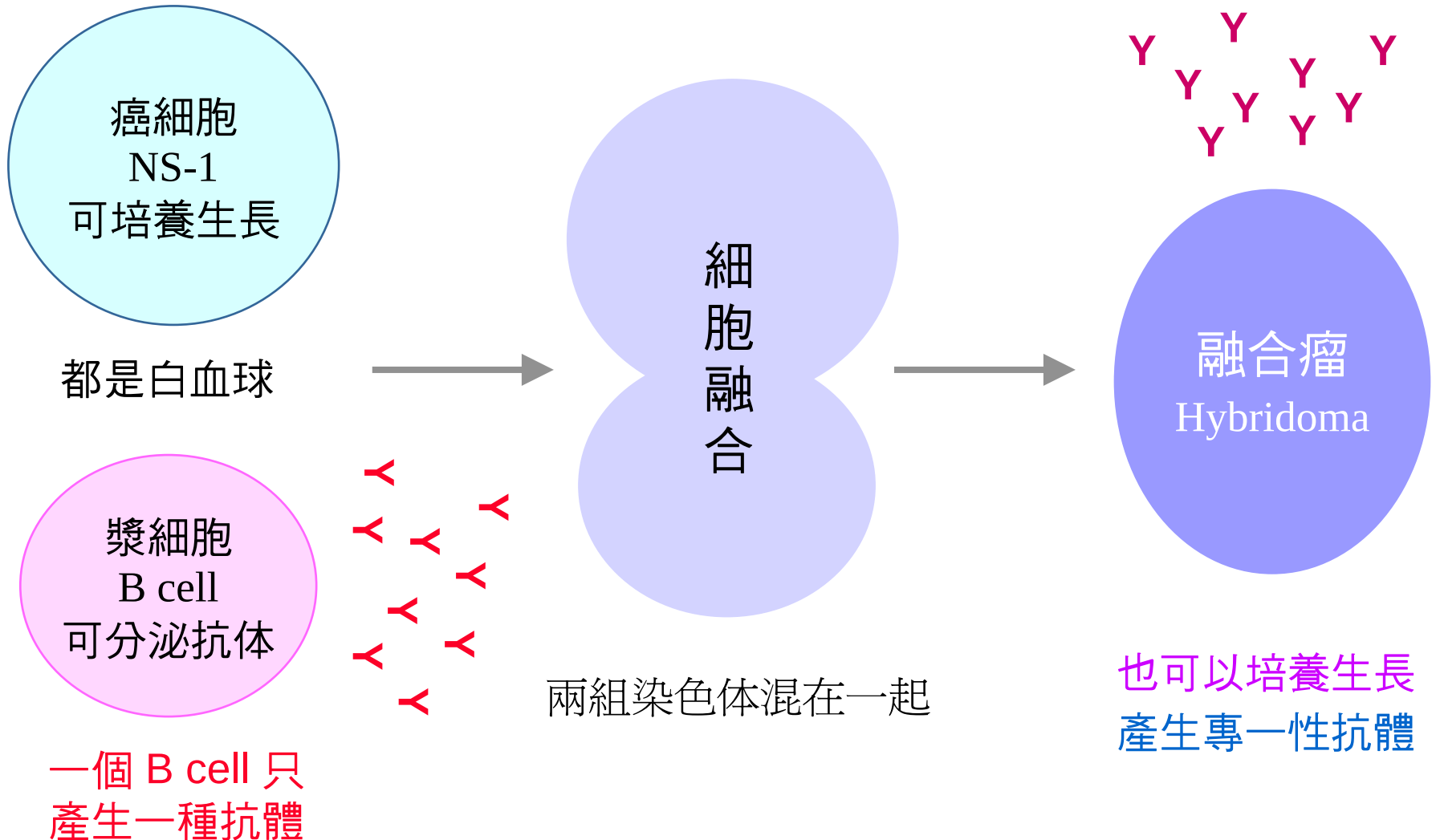




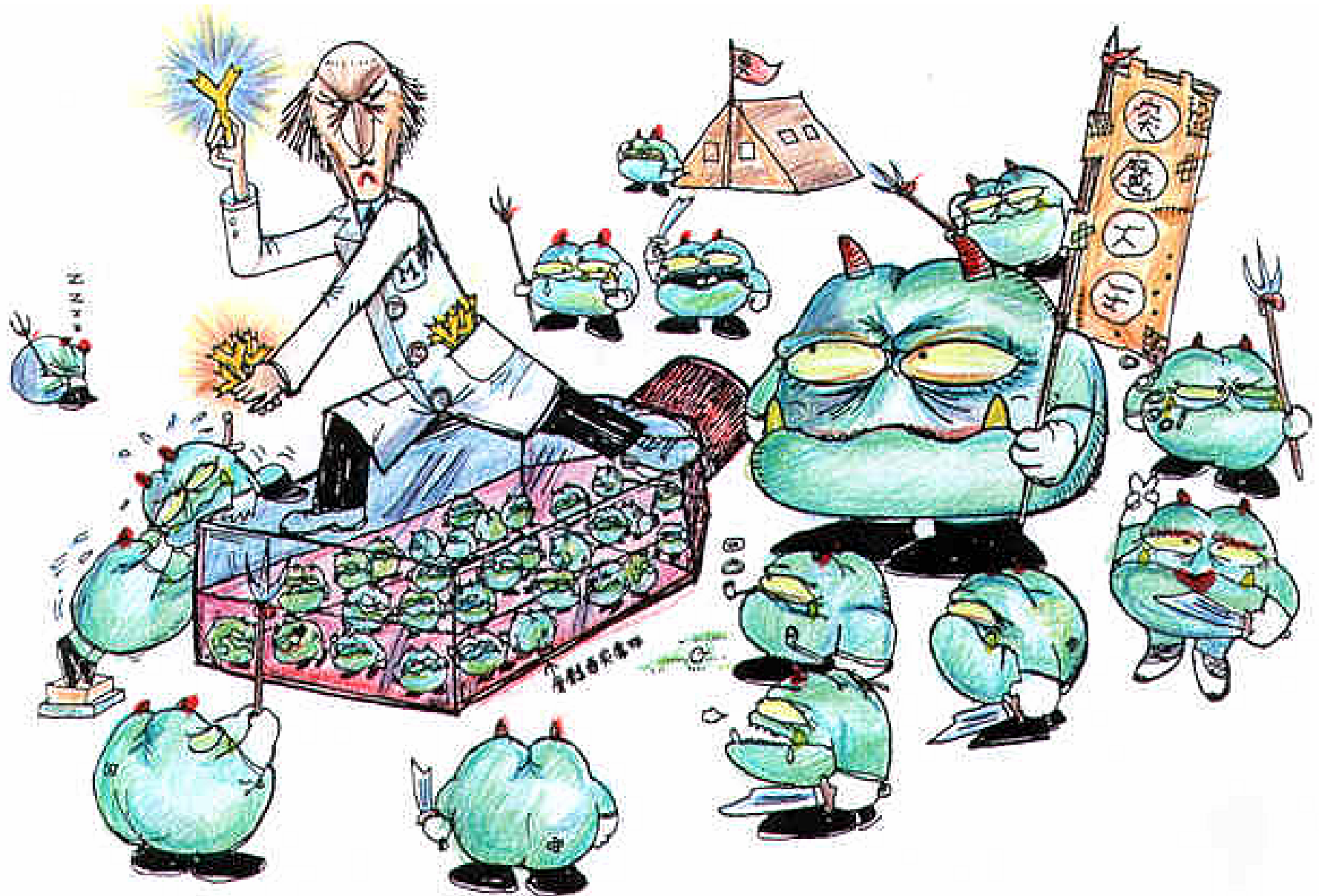


單株抗體

可生產有用抗體的 **淋巴細胞** 若與 **癌細胞** 融合，則形成穩定而可培養的細胞株。



迷爾使呆與突魔大王



外在環境的許多物質可引發免疫反應

過敏

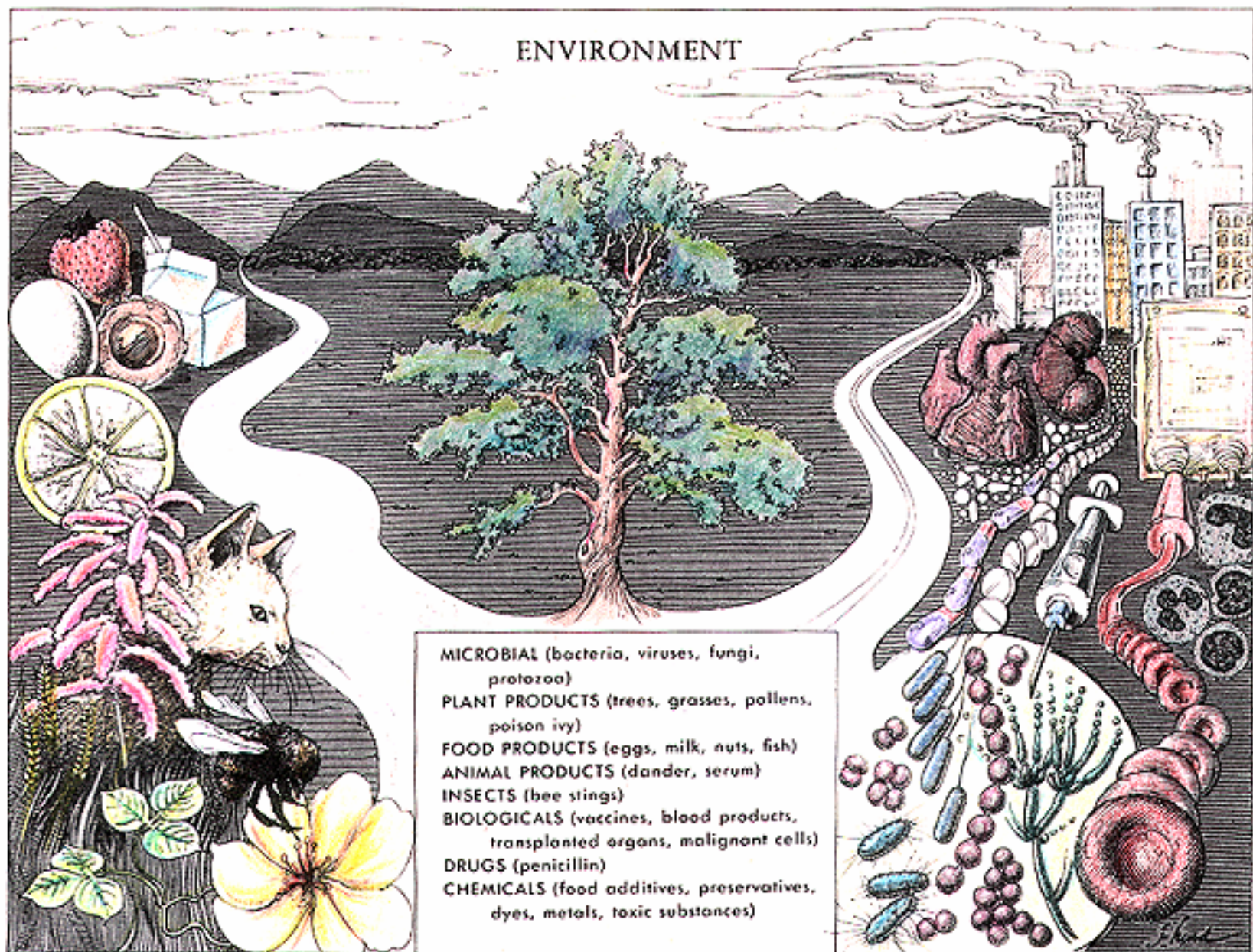
食物

動物

植物

花粉

昆蟲



污染

移植

藥物

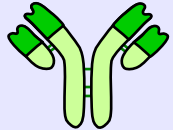
輸血

細菌

病毒

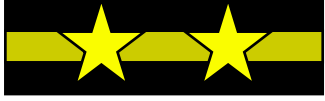
免疫系統

脊椎動物體內有催毀外來入侵物體的免疫系統

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, $m\phi$) 自然殺手細胞 (Natural killer cell, NK)	T 細胞 (T_H , T_S , T_K) ↓ B 細胞
	分子	干擾素 (Interferon) 溶菌酶 (Lysozyme)	生產 抗体 (Antibody, Ab) 
兩大系統 →		警察系統 (+ 調察局)	軍事系統

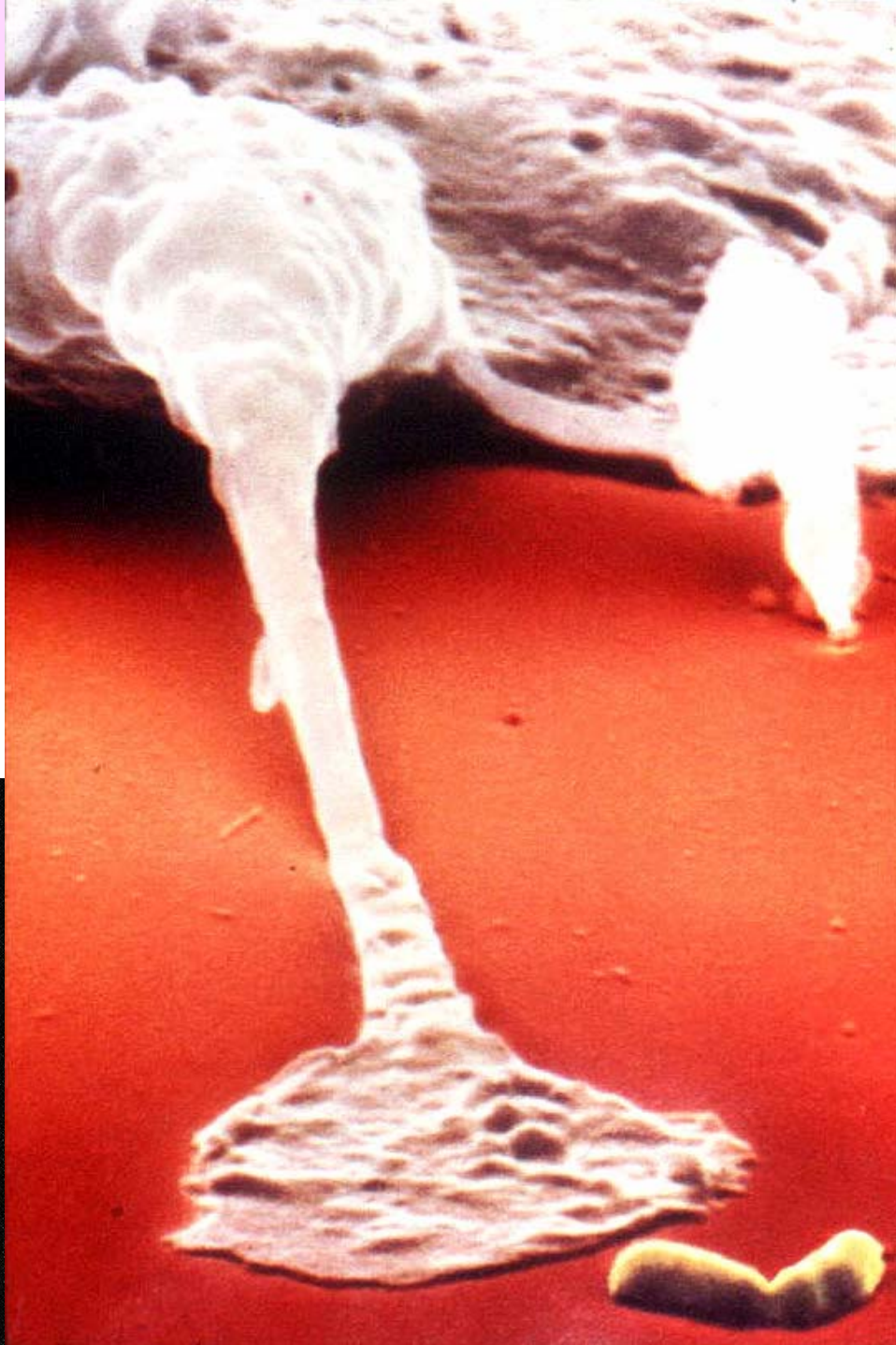
巨噬細胞

以變形運動捕捉細菌



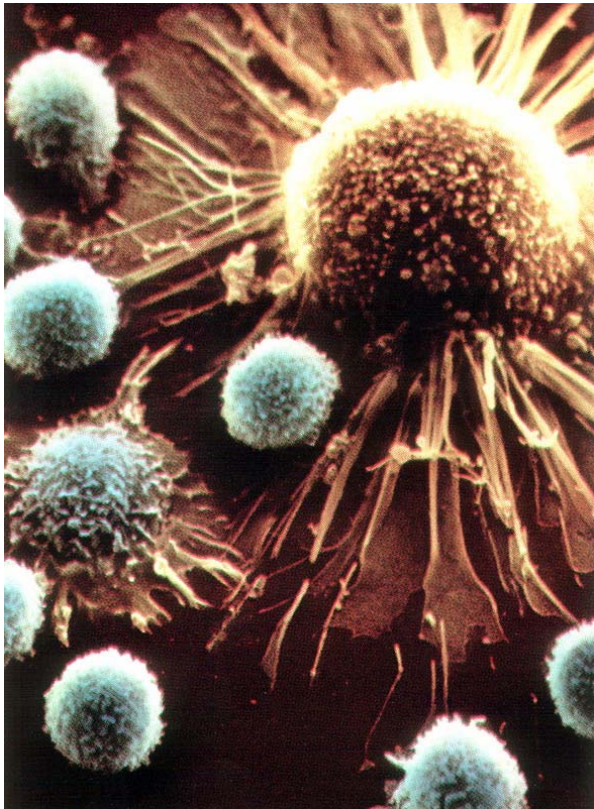
Lennart Nilsson / Everyday Science Explained. p.214

Lennart Nilsson / Goldsby et al (2000) *Kuby Immunology*. p.42



自然殺手細胞 監視並摧毀癌細胞

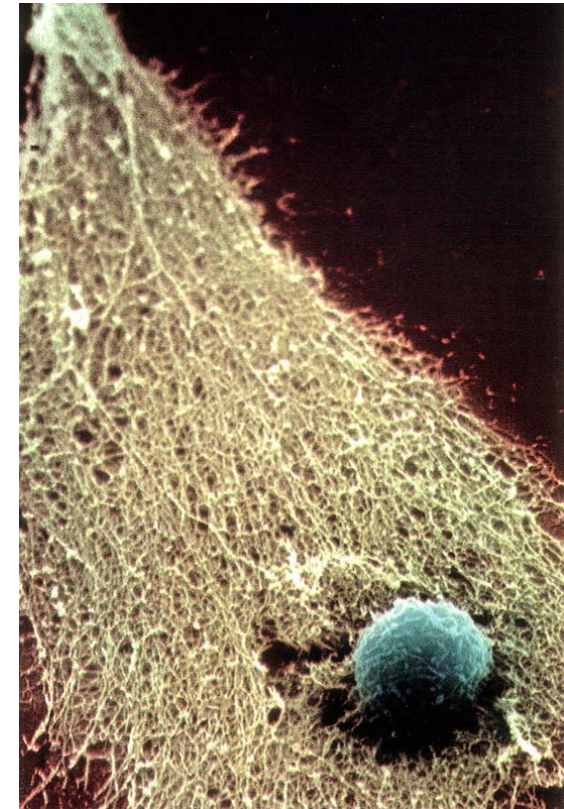
接觸



活化

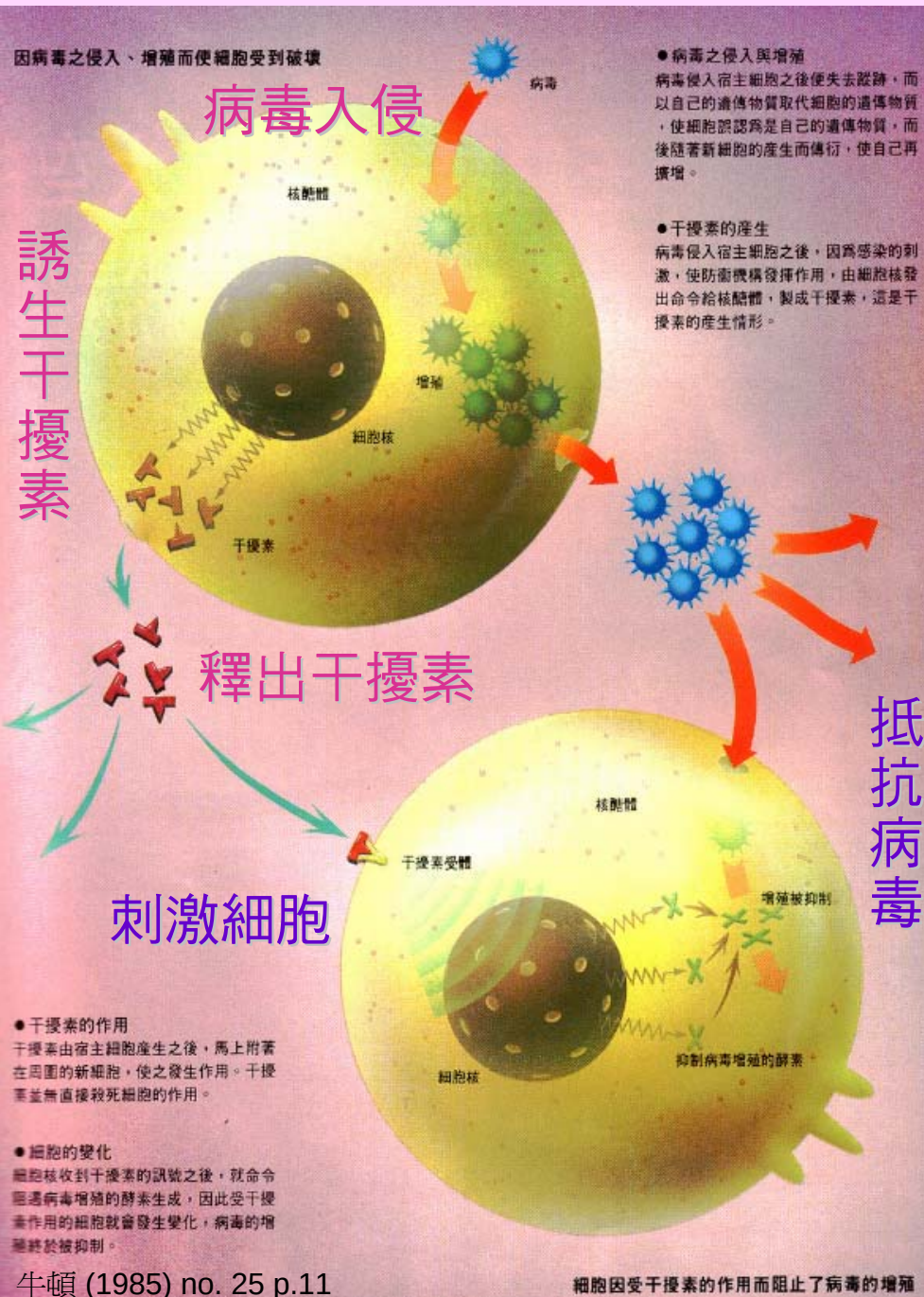


消滅

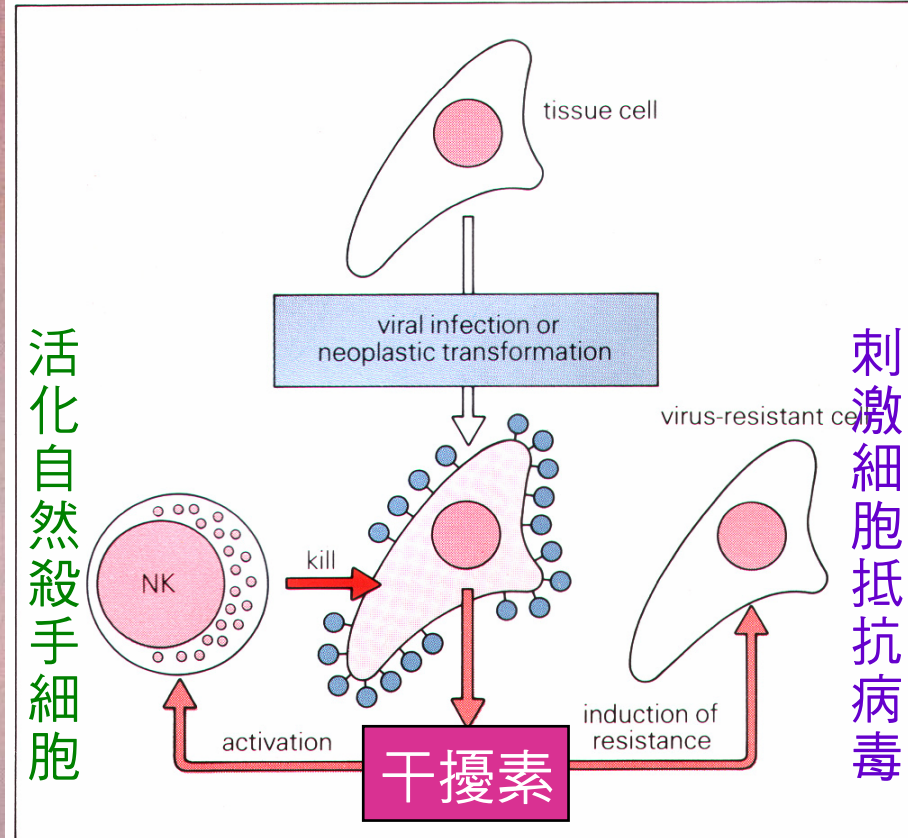


干擾素

白血球受病毒侵害後誘導產生
可刺激其他細胞防禦病毒
並增加自然殺手細胞的活性

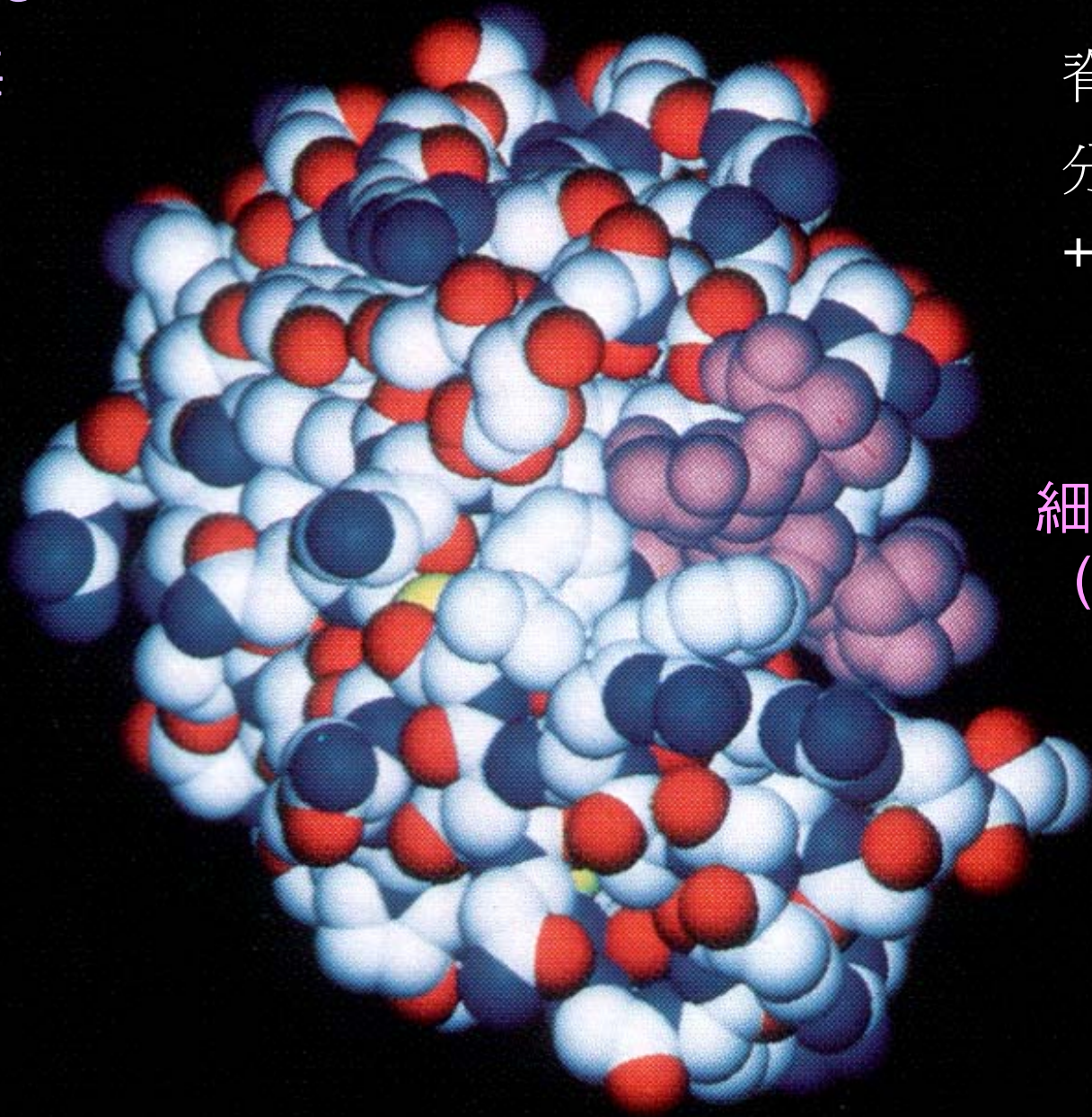


Roitt et al (1985) *Immunology*. 1.3



Lysozyme

溶菌酶



脊骨

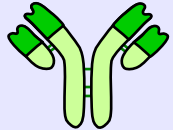
分子全貌

+ 基質

細菌細胞壁
(小部份)

免疫系統

脊椎動物體內有摧毀外來入侵物體的免疫系統

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, $m\phi$) 自然殺手細胞 (Natural killer cell, NK)	T 細胞 (T_H , T_S , T_K) ↓ B 細胞
	分子	干擾素 (Interferon) 溶菌酶 (Lysozyme)	生產 抗体 (Antibody, Ab) 
兩大系統 →		警察系統 (+ 調察局)	軍事系統

後天免疫反應的四個階段

1 遭遇

巨噬細胞把抗原分解，專一地表現給 T_H 細胞。

2 動員

T_H 細胞動員 T_K 細胞及 B 細胞，後者生產抗體。

3 掃蕩

抗體及 T_K 細胞攻擊入侵的抗原，並清除乾淨。

4 休止

完成清除抗原後，免疫細胞休息，但保持記憶。

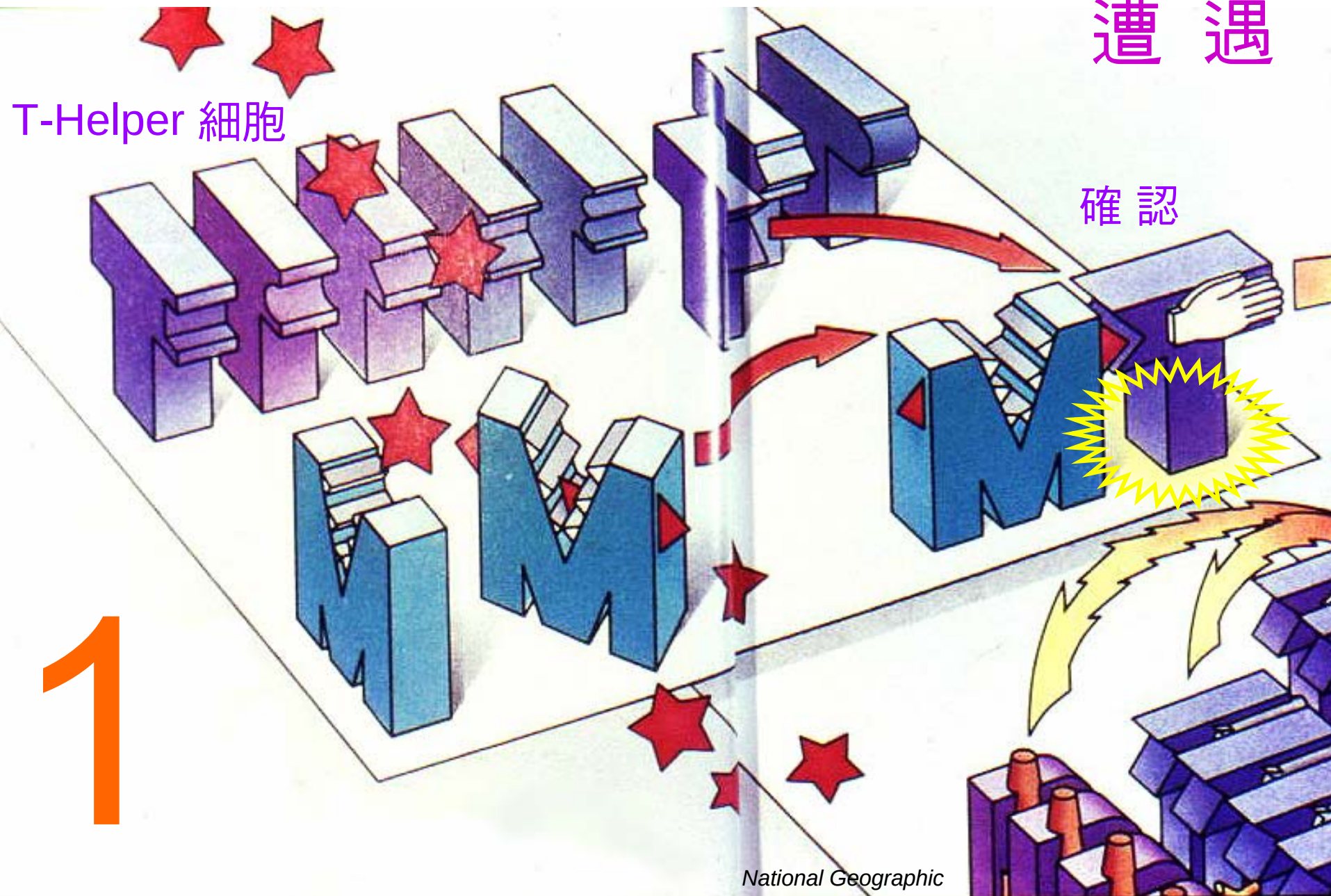
病毒

遭遇

T-Helper 細胞

確認

1

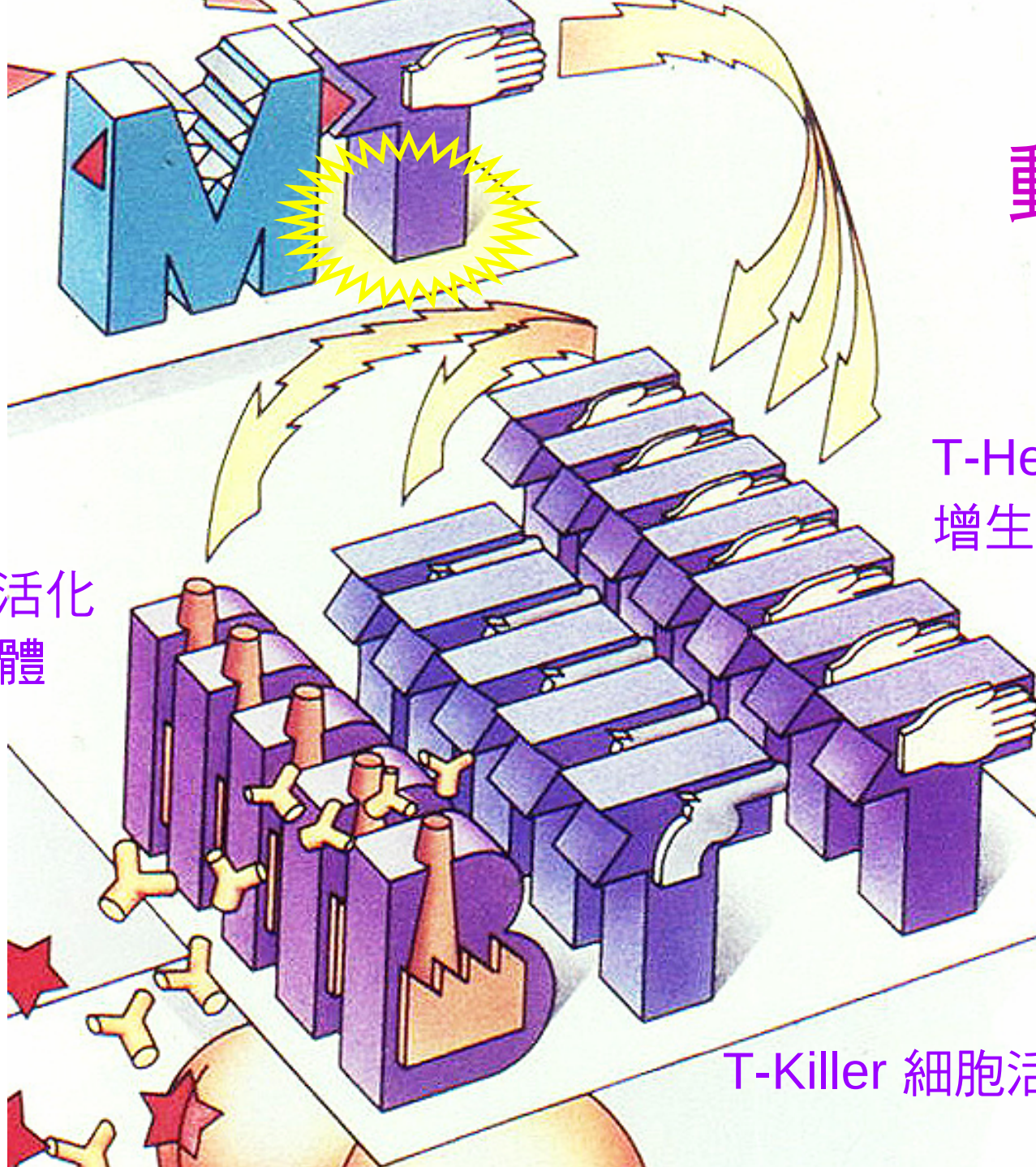


動員

T-Helper 細胞
增生

B 細胞活化
生產抗體

T-Killer 細胞活化增生



2

3

抗體抓住病毒

巨噬細胞吞噬之

T-Killer 細胞
掃蕩感染細胞

掃 蕩

休止

T-Suppressor



抑制各種
免疫細胞

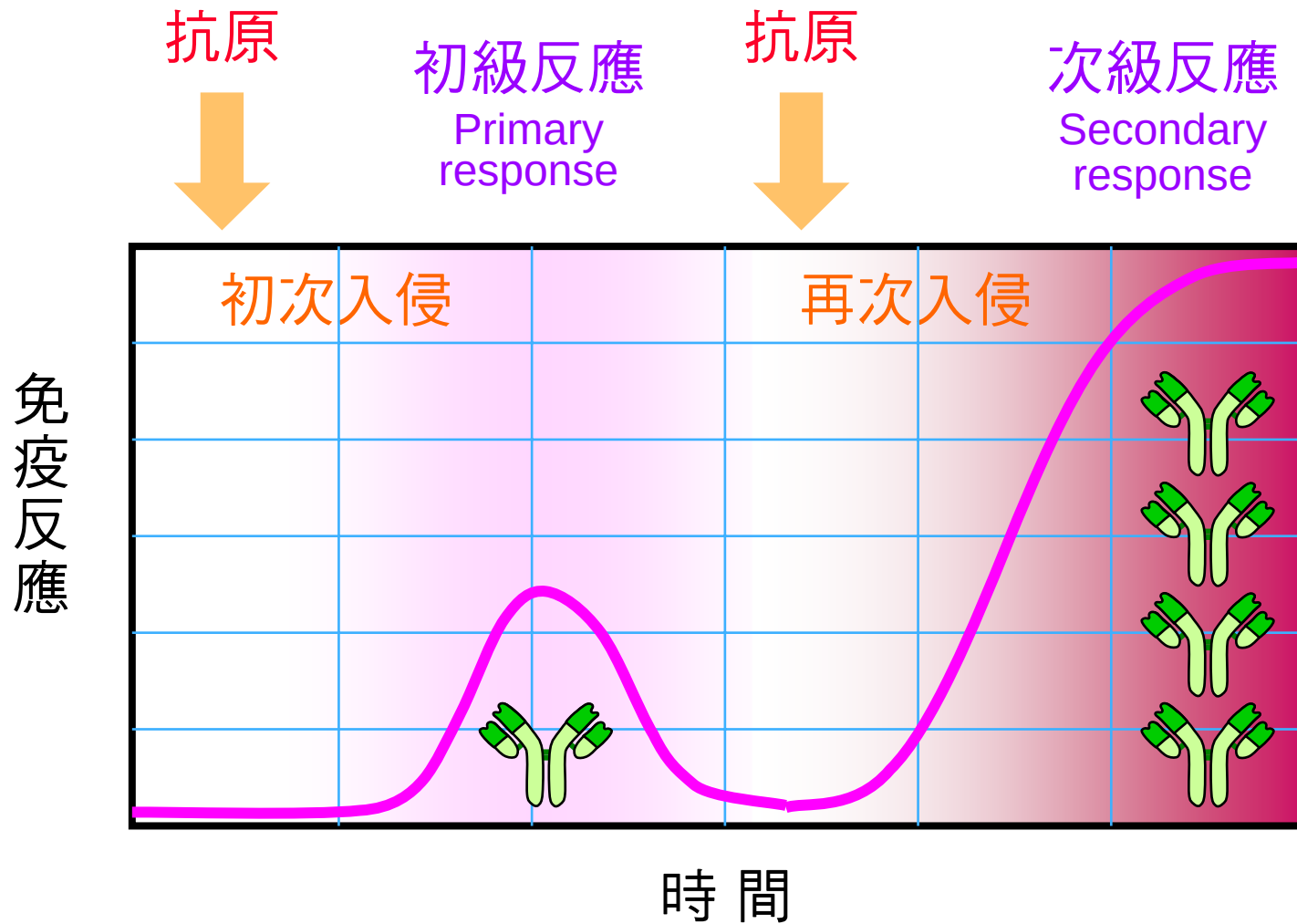


記憶細胞

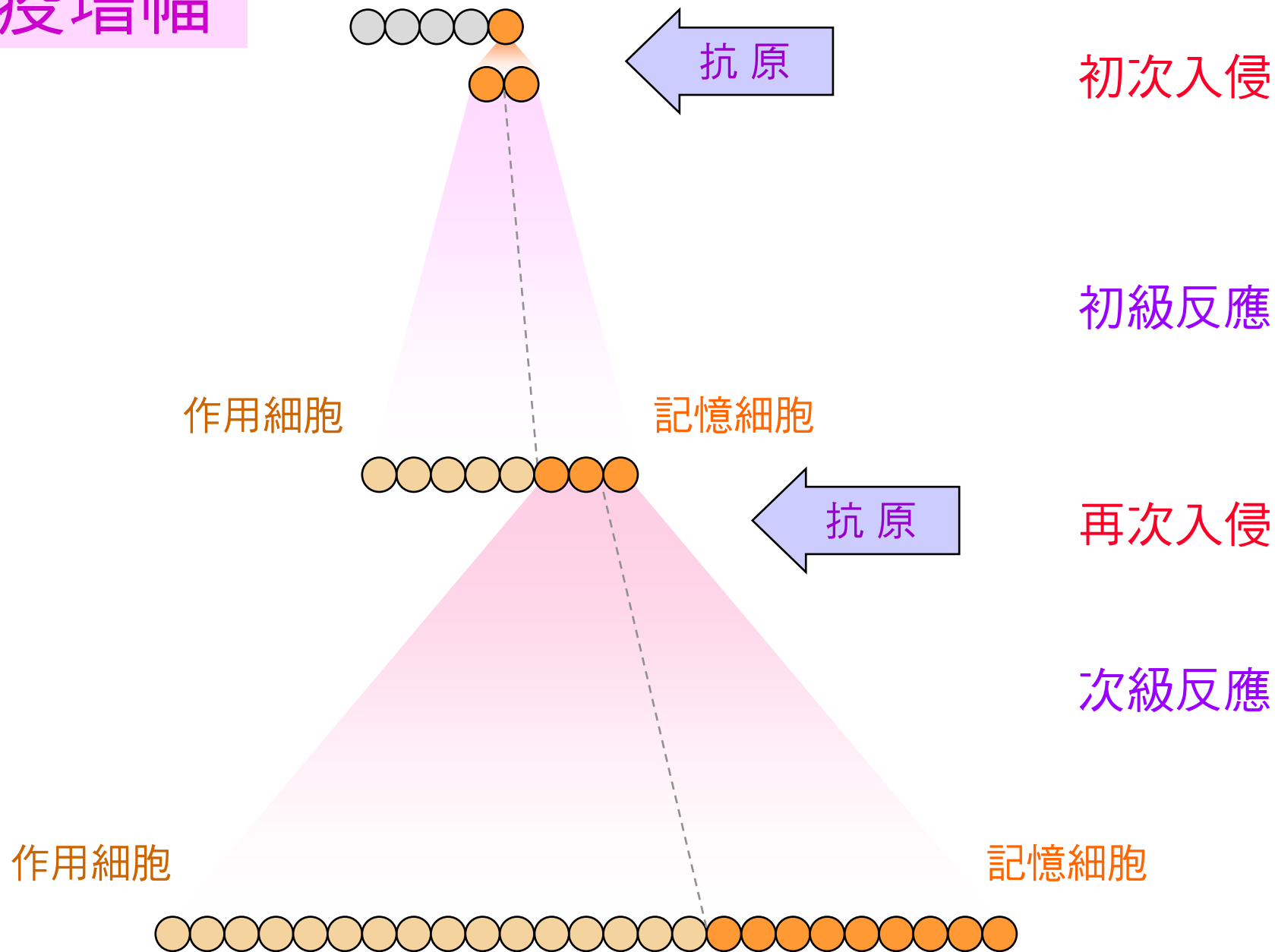


4

免疫反應的兩個階段



免疫增幅



後天免疫反應的兩大特點

Specificity

專一性

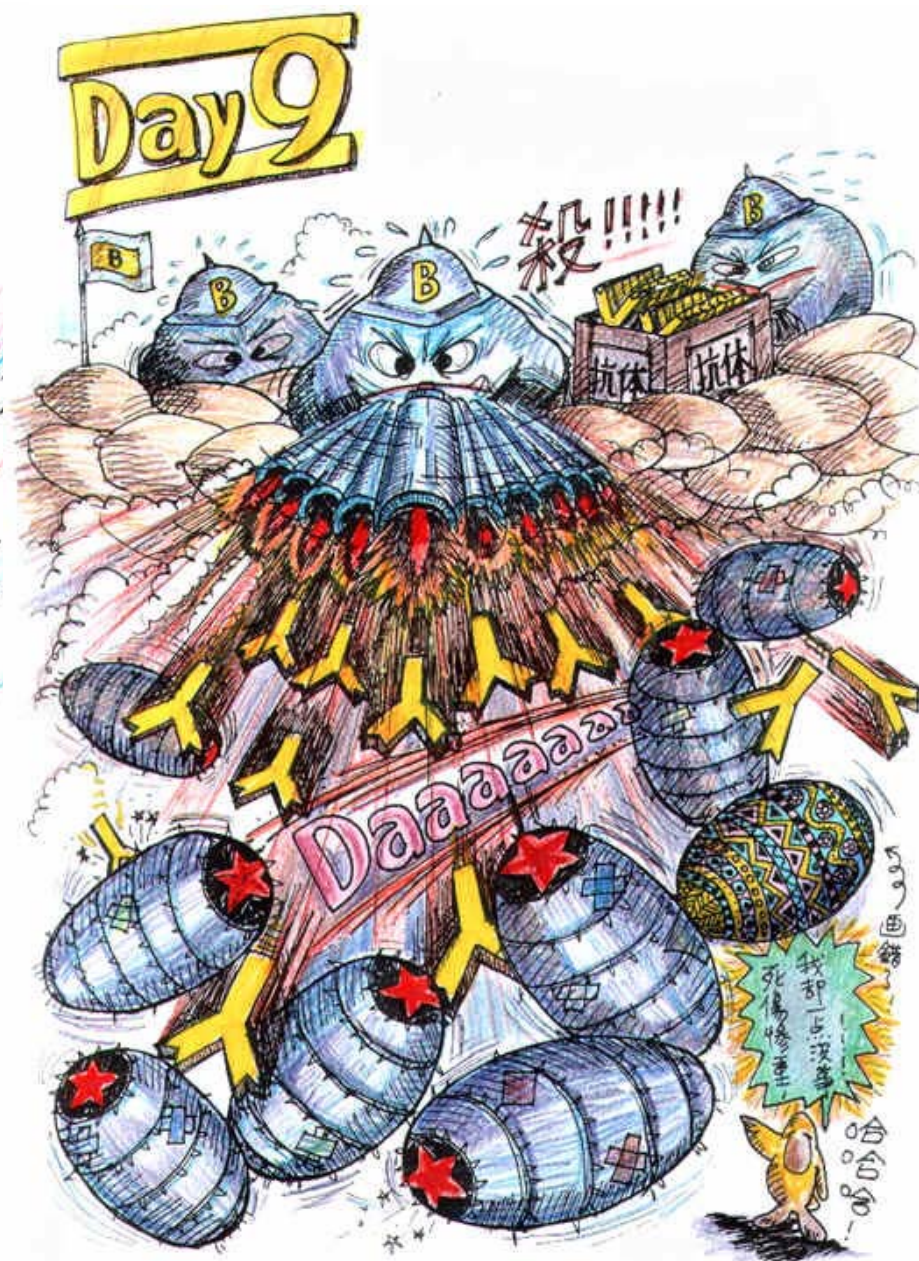
由甲抗原所誘導的免疫反應只對甲抗原有效。

Memory

記憶性

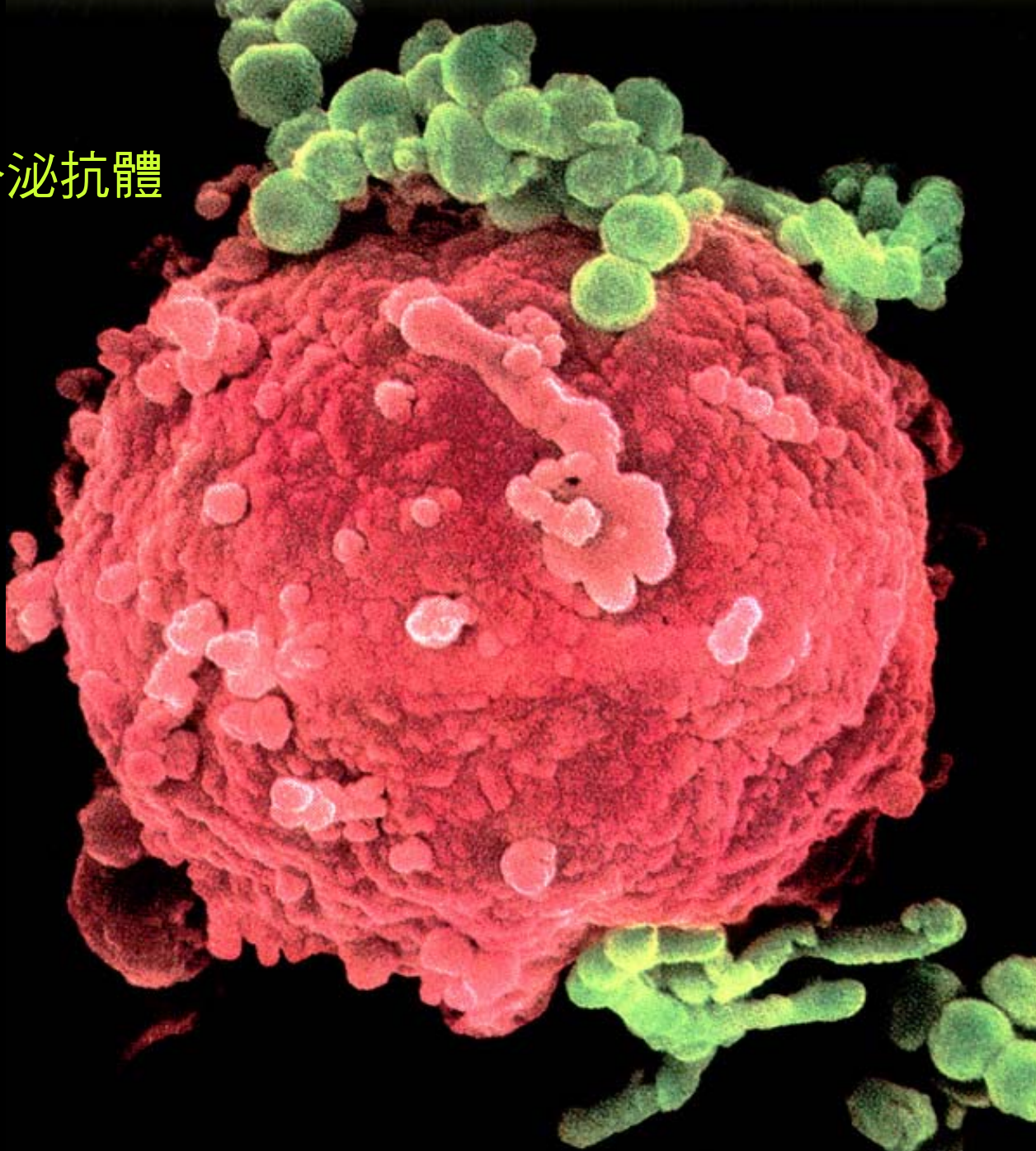
痊癒後若甲抗原再度入侵，可迅速動員掃蕩。

免疫系統漫畫



B 細胞分泌抗體

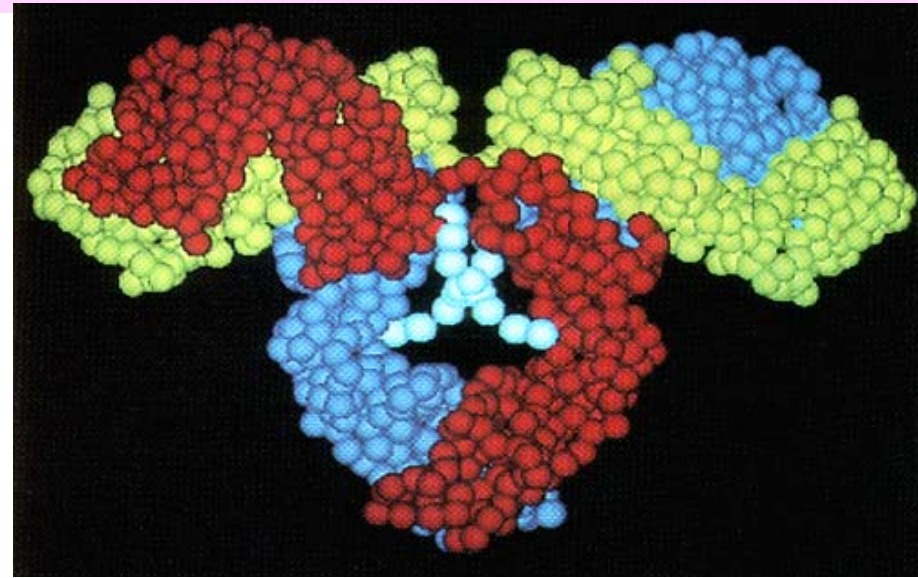
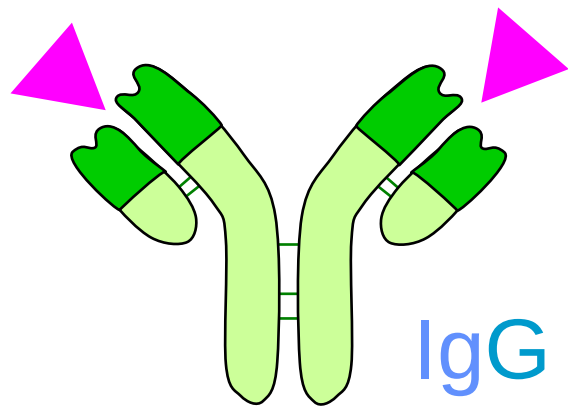
凝集細菌



如何凝集

抗體 是一種蛋白質

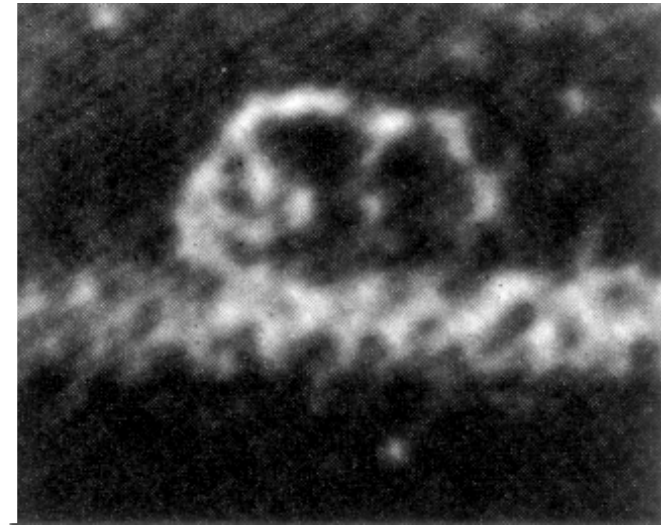
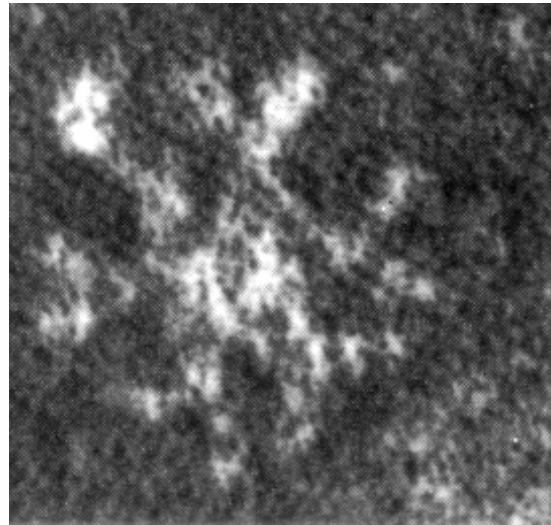
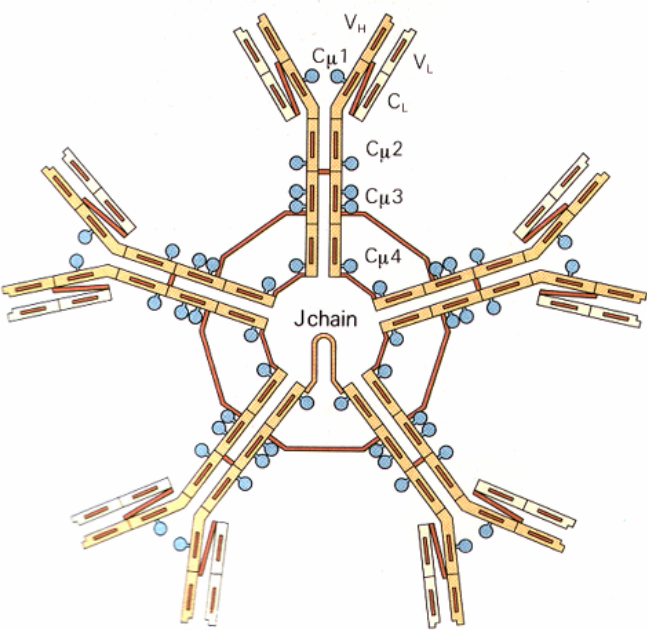
Davies et al (1977) PNAS / Roitt et al (2001) *Immunology*. p.73



- 抗體由四條 蛋白質 長短鍊所組成 (兩長兩短)
- 抗體分子上有兩個 抗原結合區 (二者相同) ▼
- 抗體與抗原結合是專一性的 (lock & key)

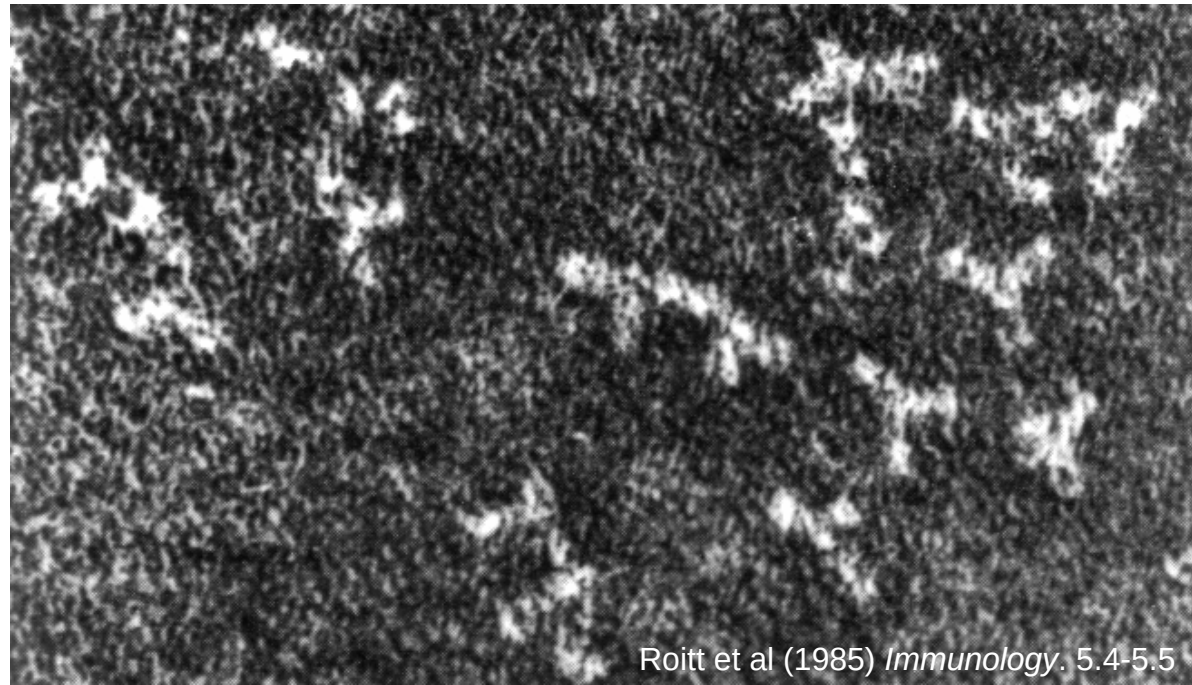
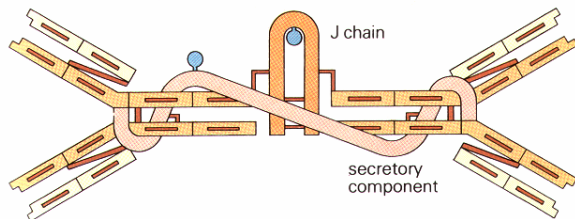
● IgG 是單一個抗體分子，另有 IgM (五元體) 及 IgA (二元體)

步兵單兵 裝甲兵 兩棲部隊

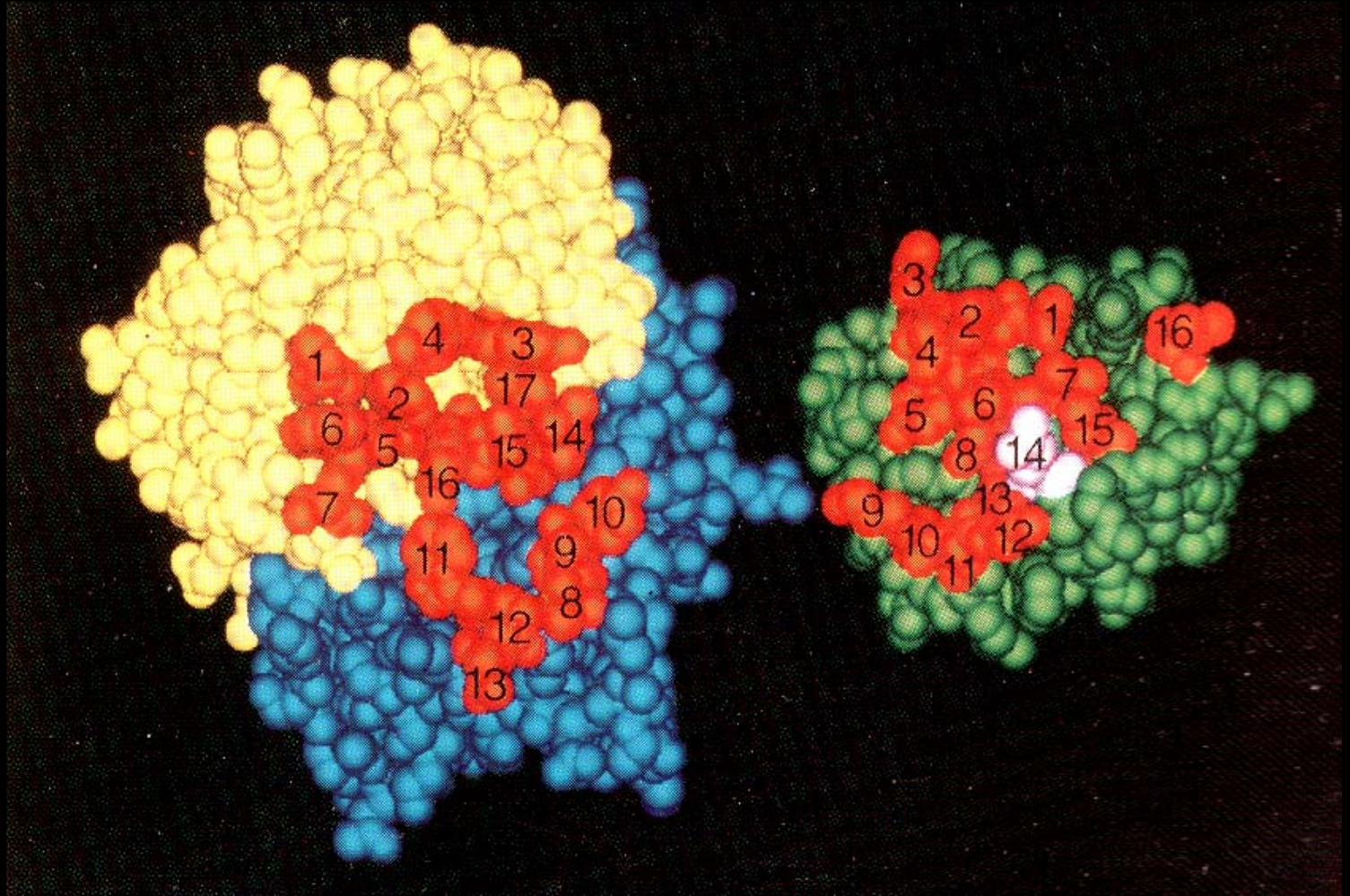


IgM 五元體

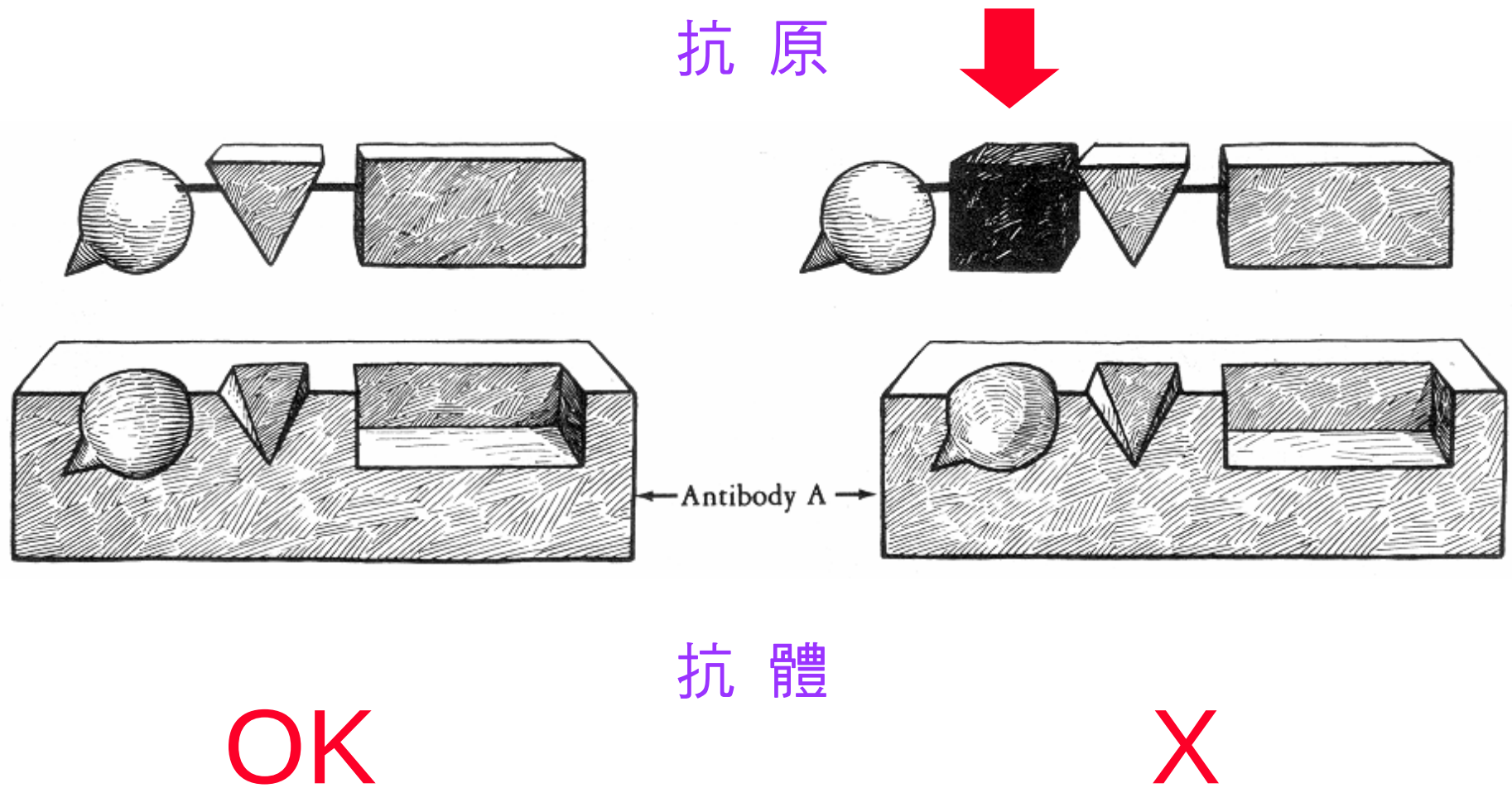
IgA 二元體



抗體結合區

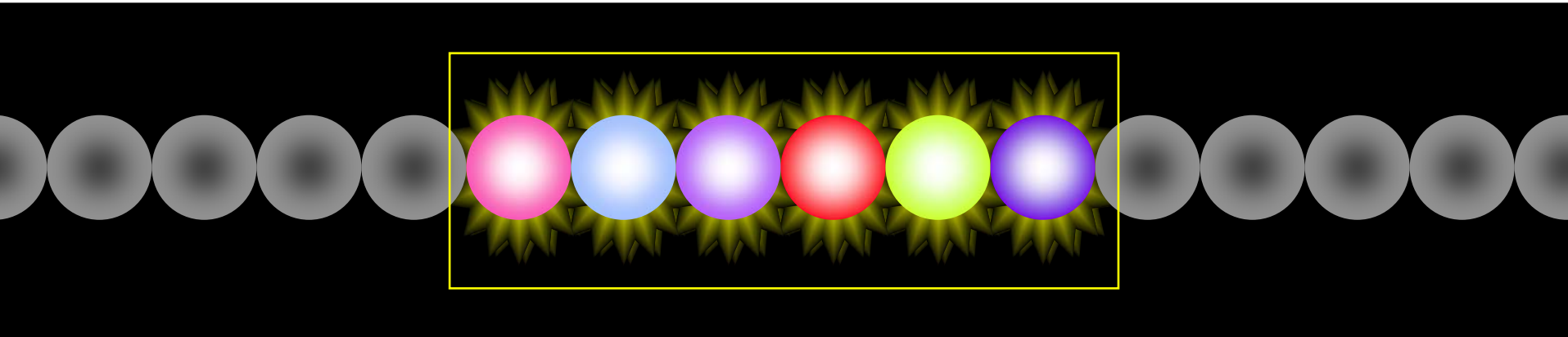


抗體與抗原的結合面有如互補的積木



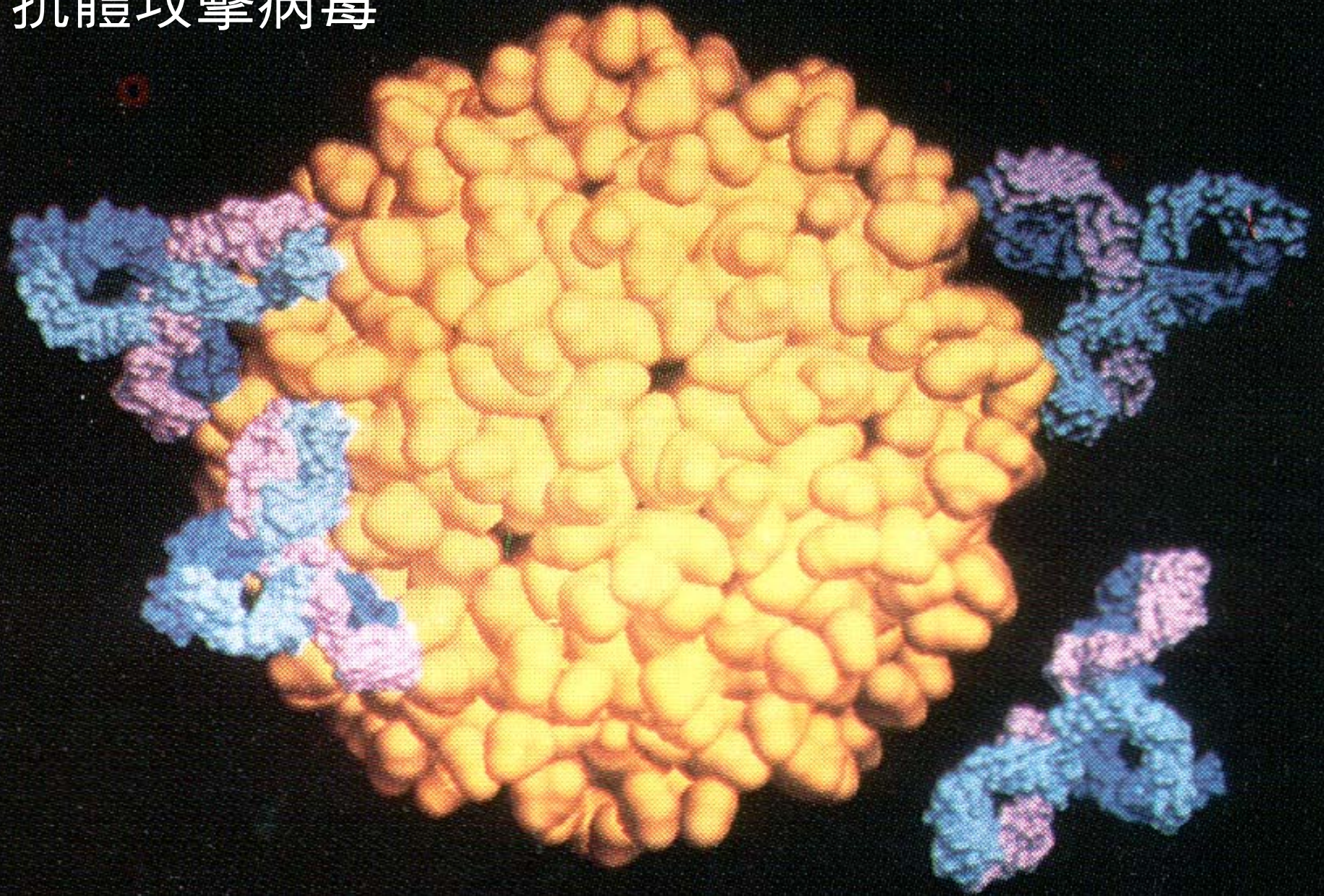
抗原決定基

- 一個抗原分子上可能有數個 抗原決定基
- 每個 抗原決定基 至少誘生一種專一性抗体

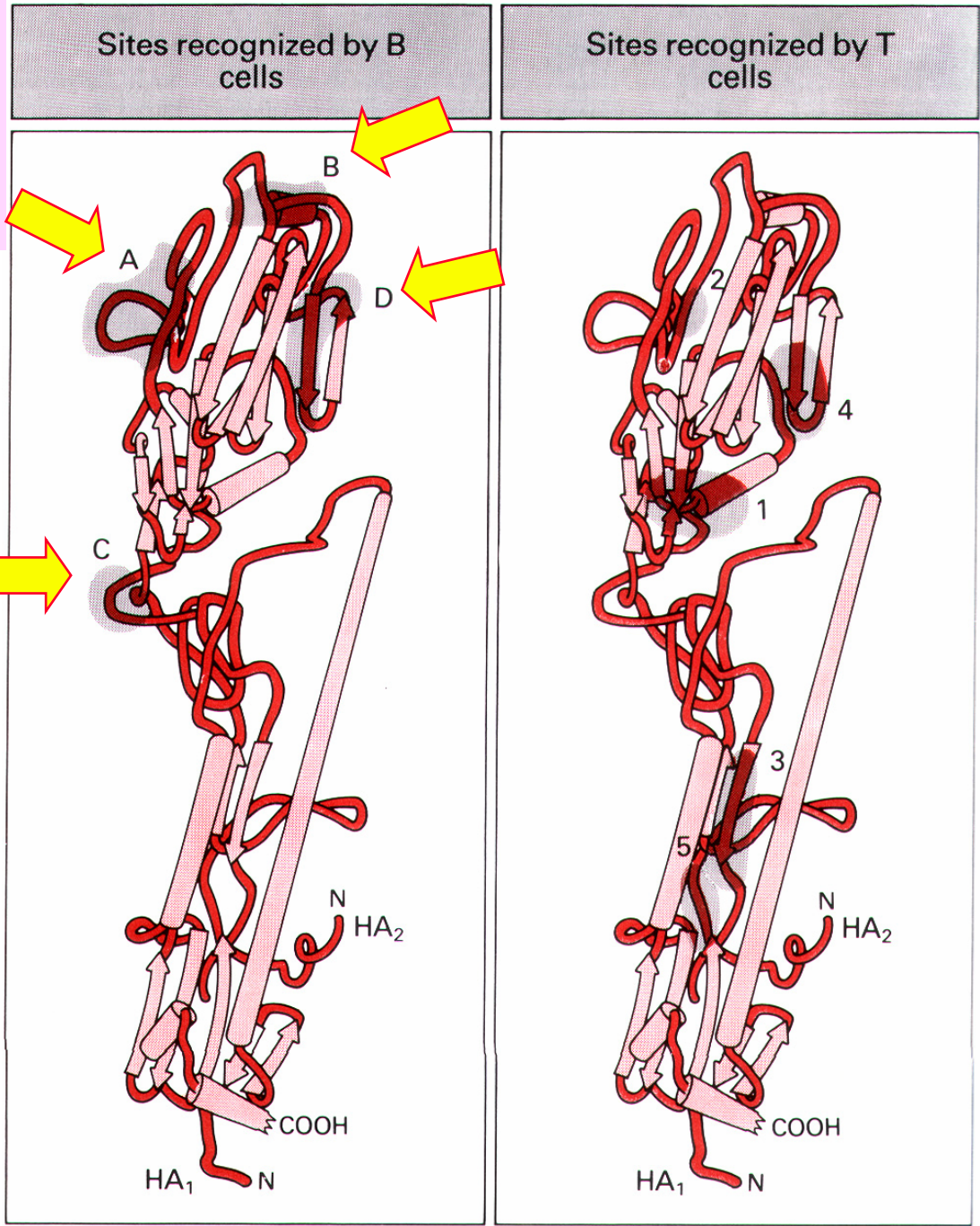


- 蛋白質性 抗原決定基 含有六個以上胺基酸

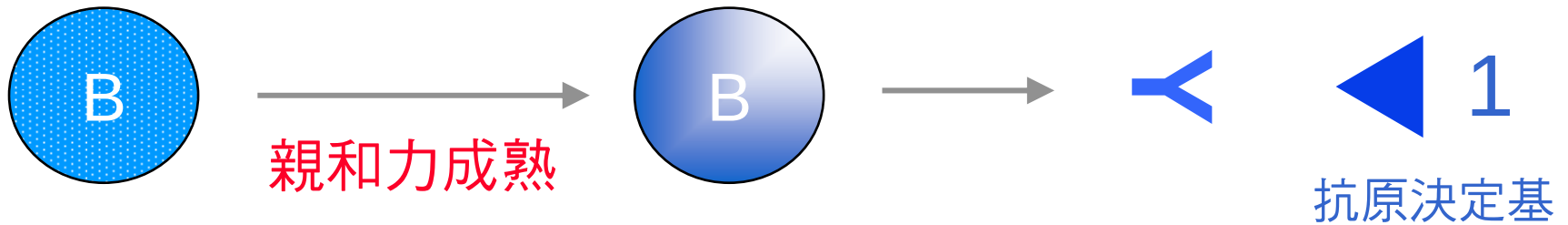
抗體攻擊病毒



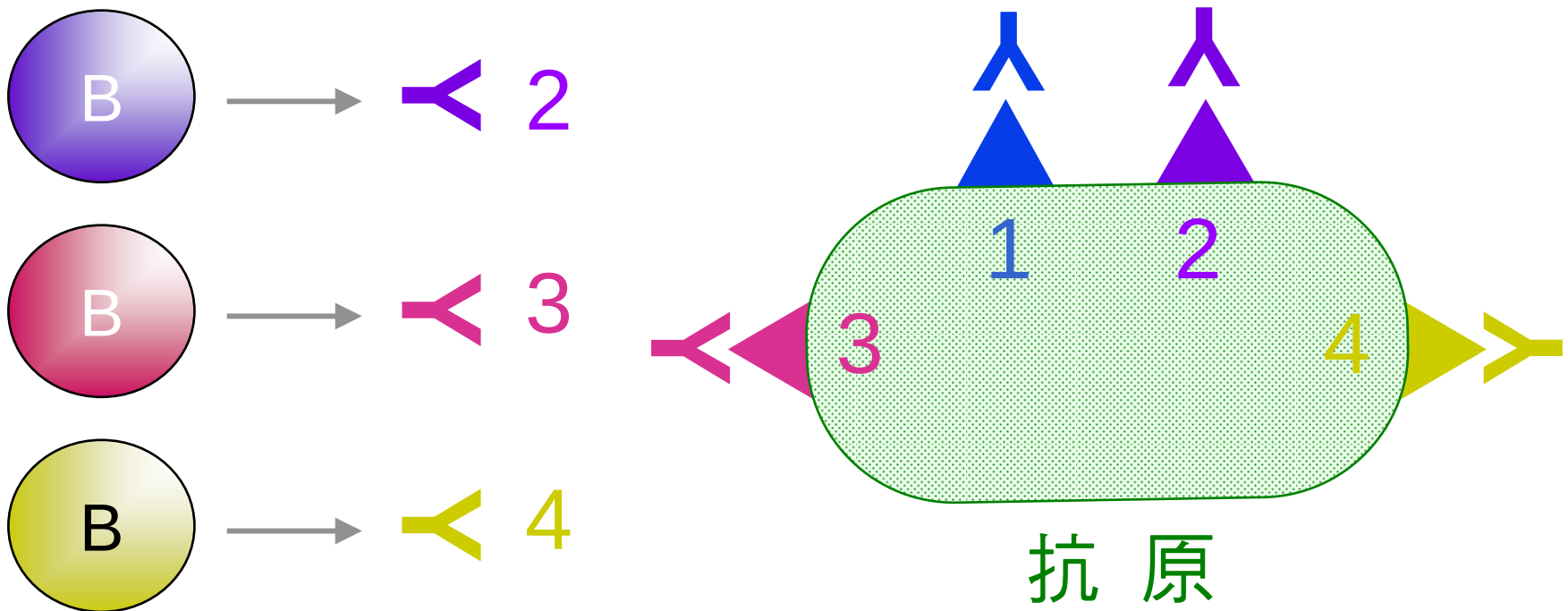
病毒表面分子
上有許多個
抗體結合區



● 一個 B 細胞只能生產一種抗体，對付某一 抗原決定基。



● 若有許多抗原決定基，則需許多株 B 細胞分別生產許多抗体。

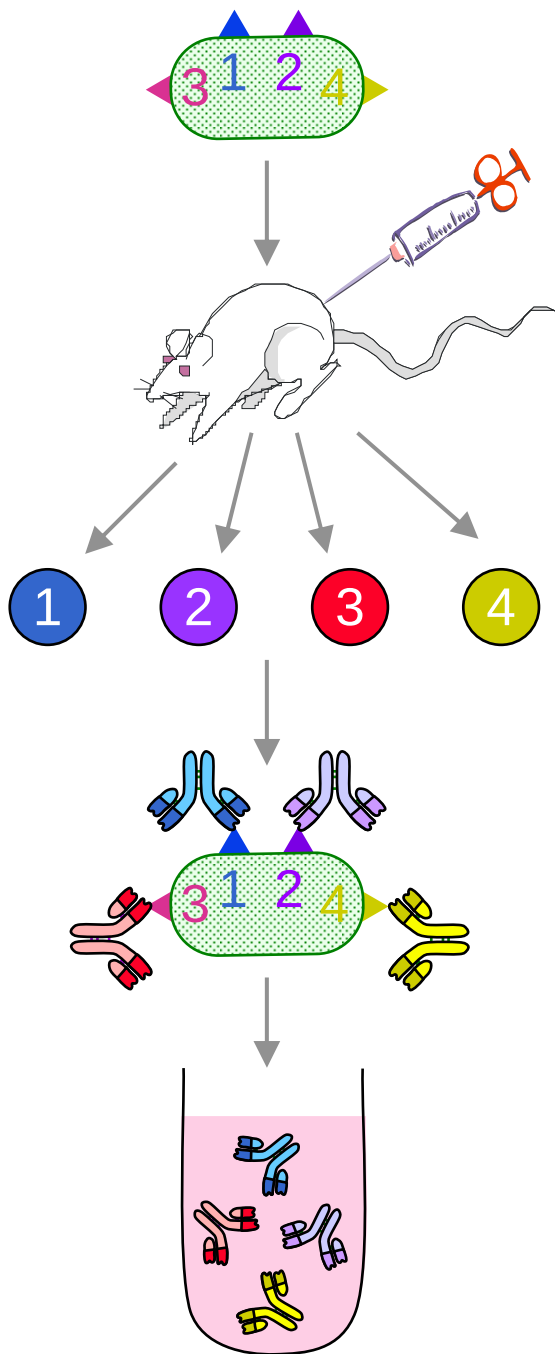


抗 原

免 疫

傳統抗血清

所有抗體混合



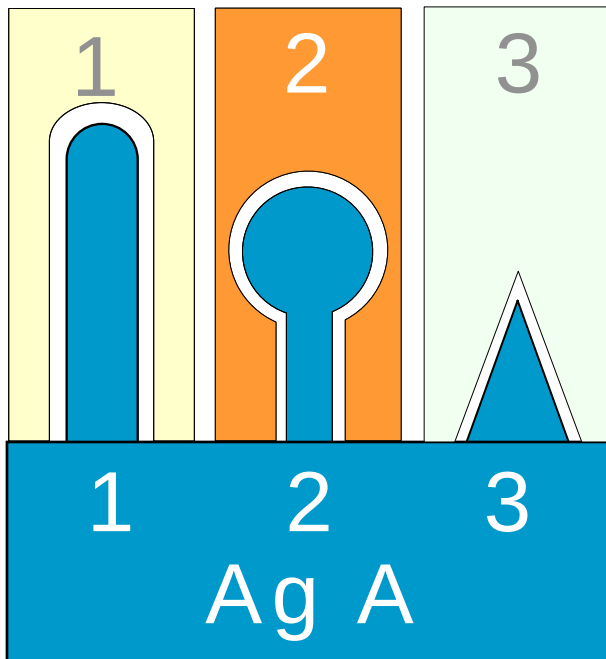
脾 臟

淋巴結

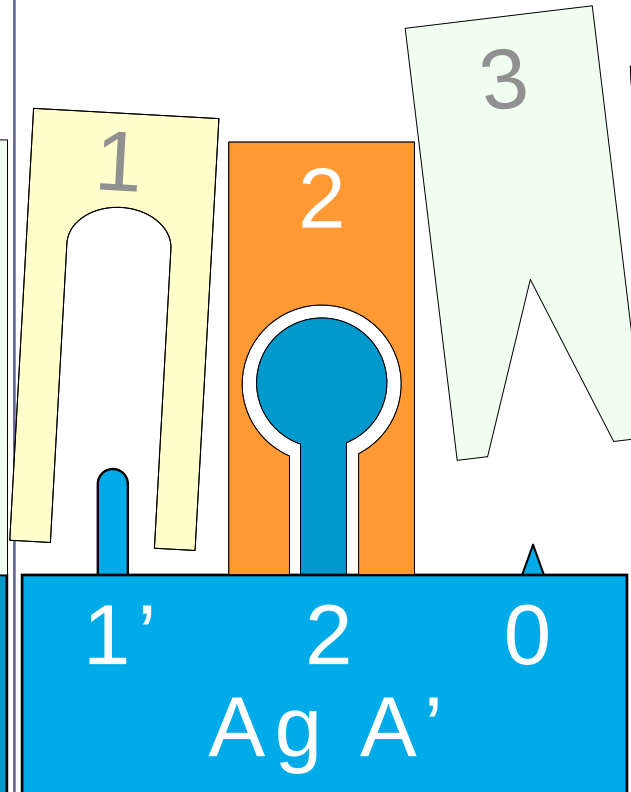
B 細胞

傳統抗血清的交叉反應

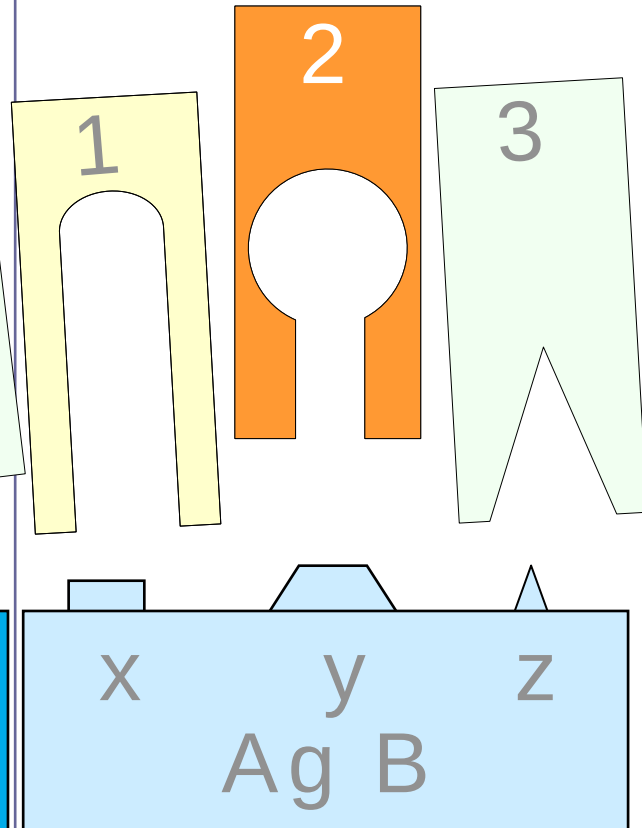
專一性反應

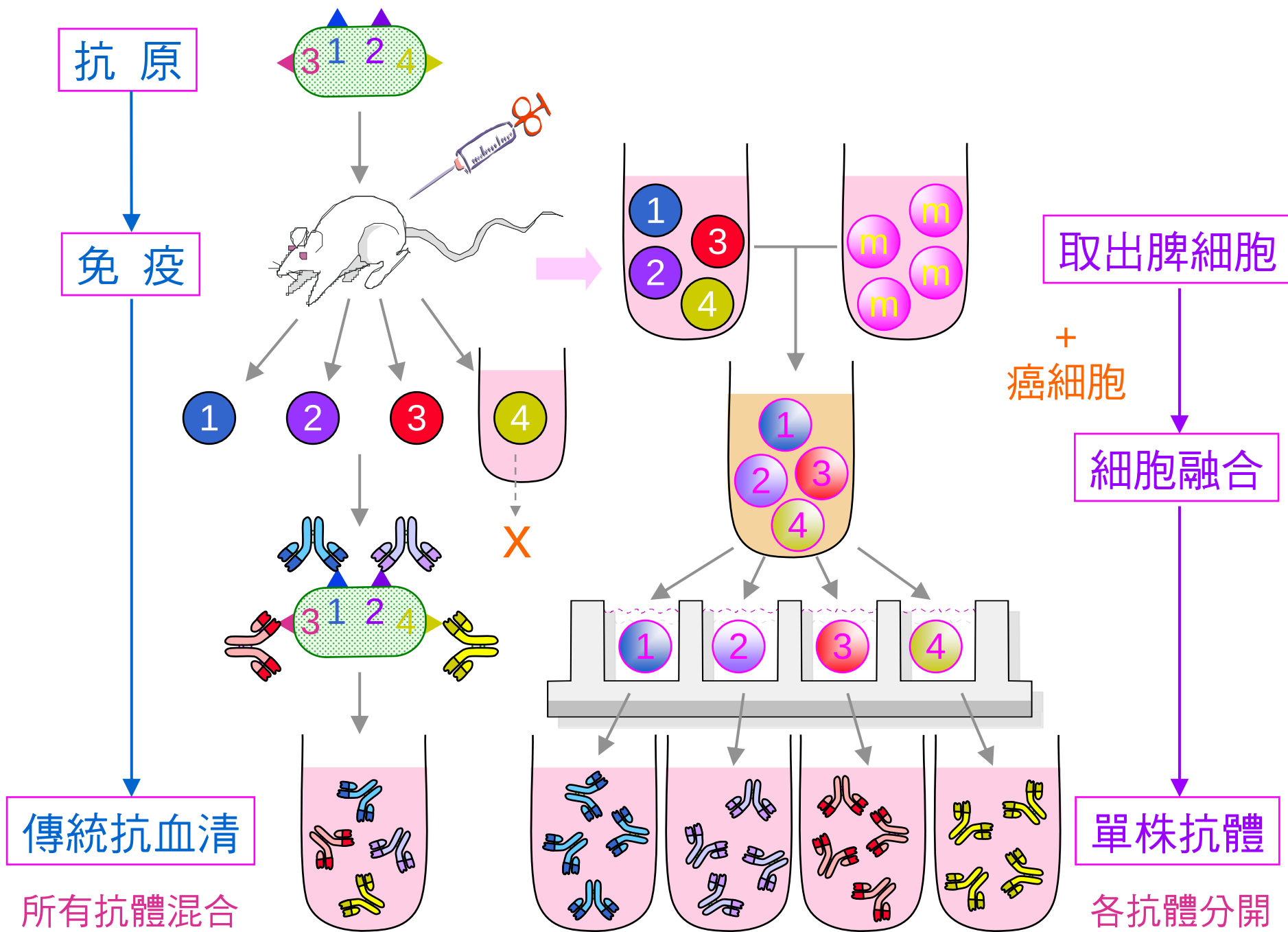


交叉反應



沒有反應

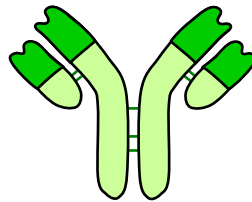




實驗步驟

細胞融合法

Cell Fusion



細胞融合 → 初步篩選 → 專一性篩選 → 單株化 → 抗体生產

PEG

HAT

ELISA

Limiting
dilution

Ascites
fluid

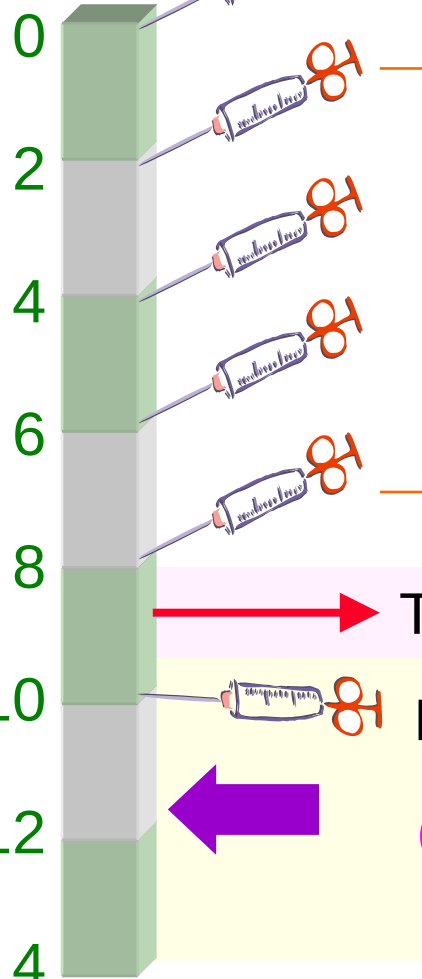
為科學犧牲受苦的小白鼠



BALB/c mouse

對所有為科學犧牲受苦的實驗動物們祝禱

小白鼠免疫流程



Antigen (50 μ g/mouse)
Emulsified in 0.5 mL
Freund's Complete Adjuvant

加佐劑製成乳劑

At least three booster shots,
same dose in 0.5 mL
Freund's **In**complete Adjuvant

Booster shots might be reduced
if **TiterMax** is use as adjuvant

試採血

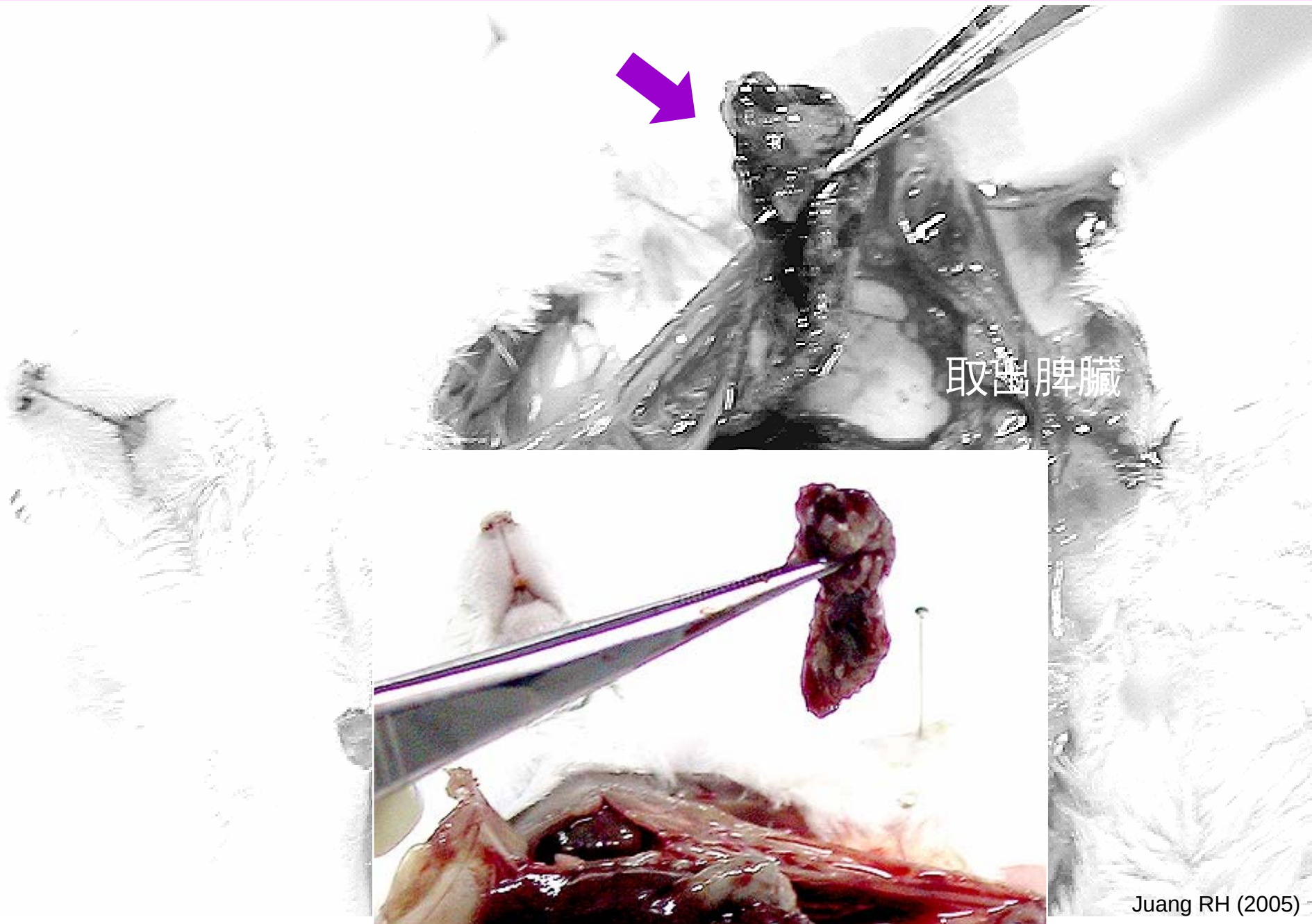
Trial Bleeding → Titer Determination

Final booster (soluble antigen)

Cell fusion

14
wk

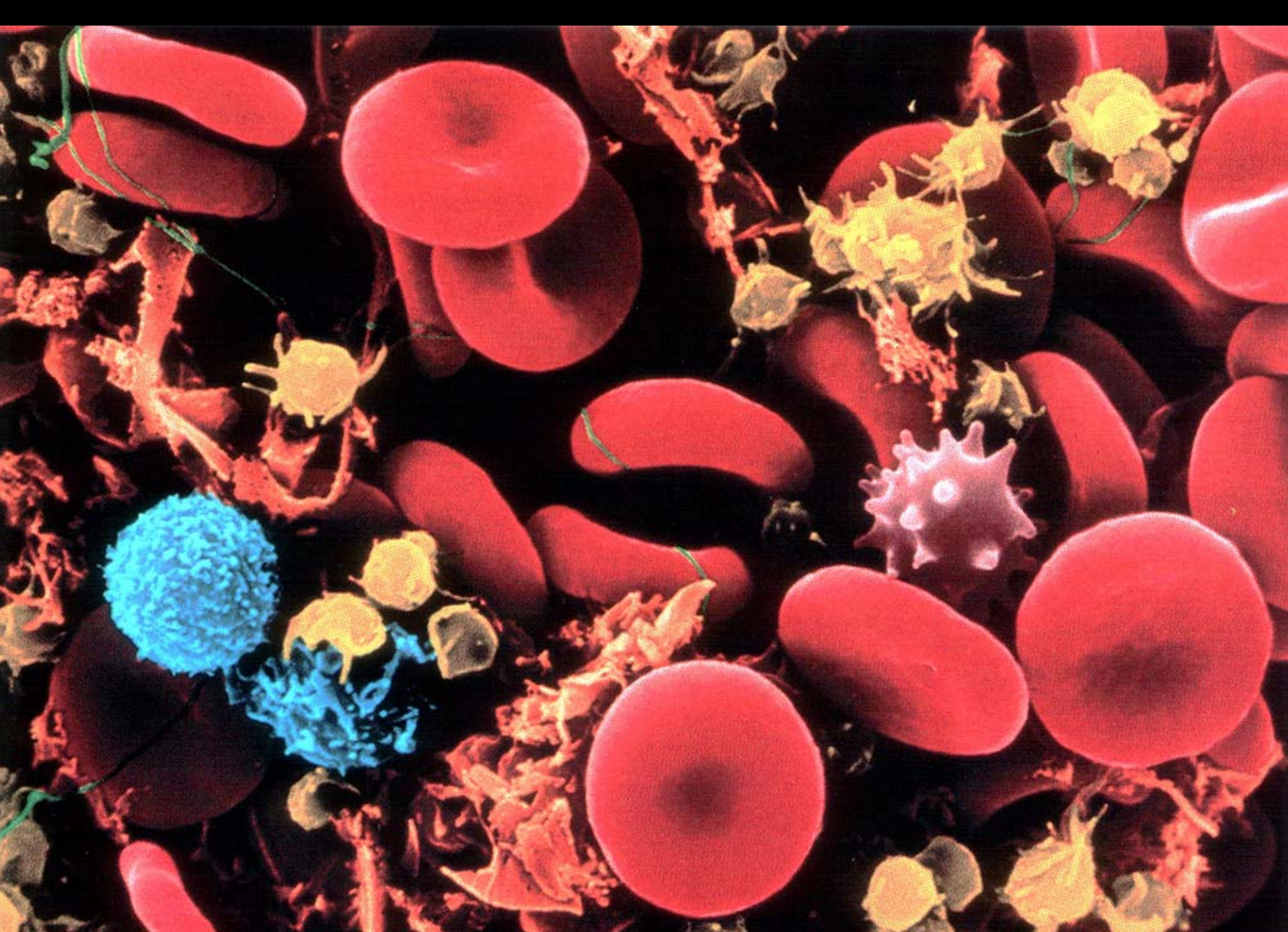
免疫後取出脾臟



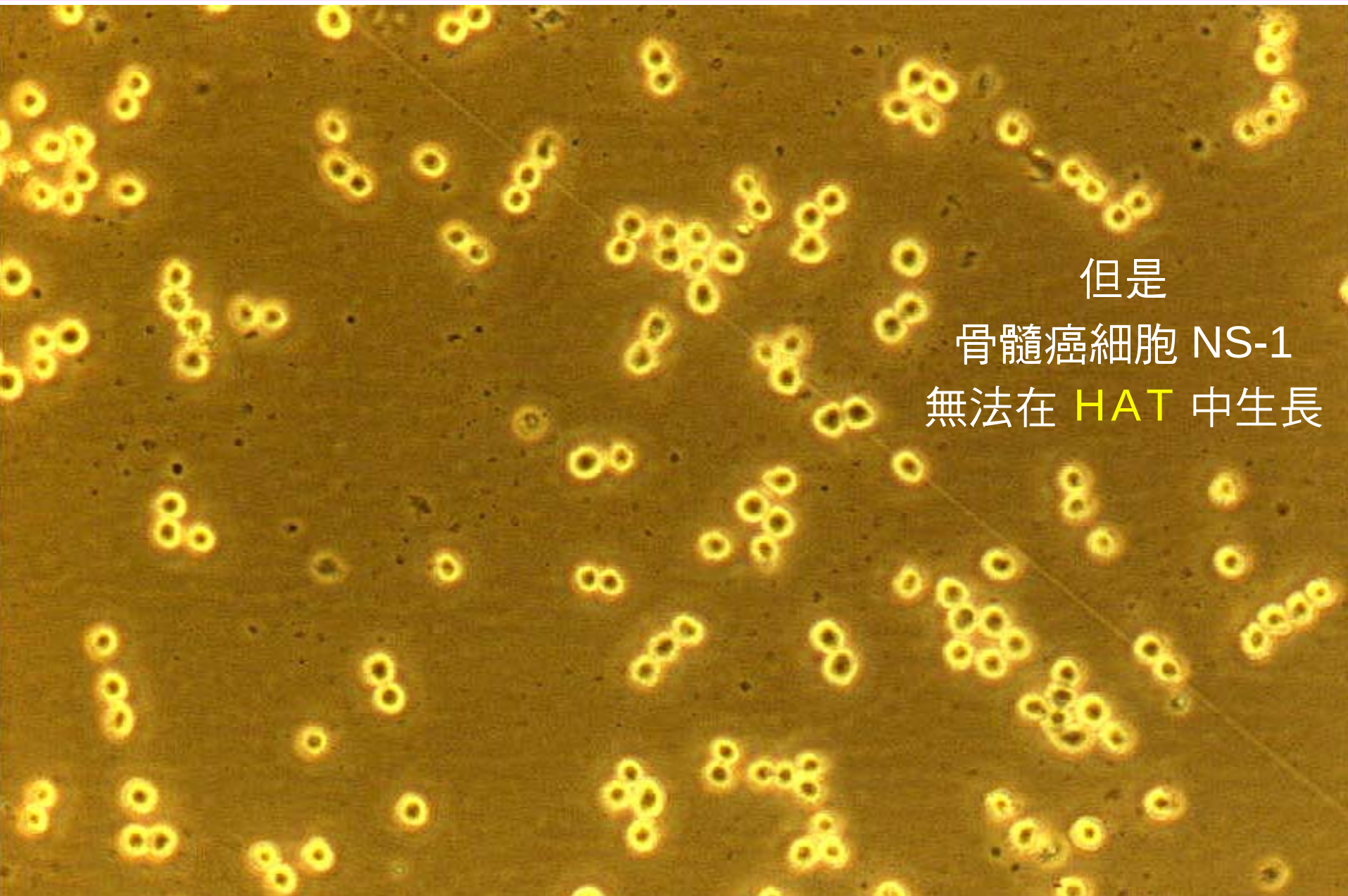
脾臟為 B 細胞集中地

取出脾臟內細胞





癌細胞可以在培養基中長久生長



但是
骨髓癌細胞 NS-1
無法在 **HAT** 中生長

以化學試劑將細胞融合

加入 PEG

細胞融合
2 min

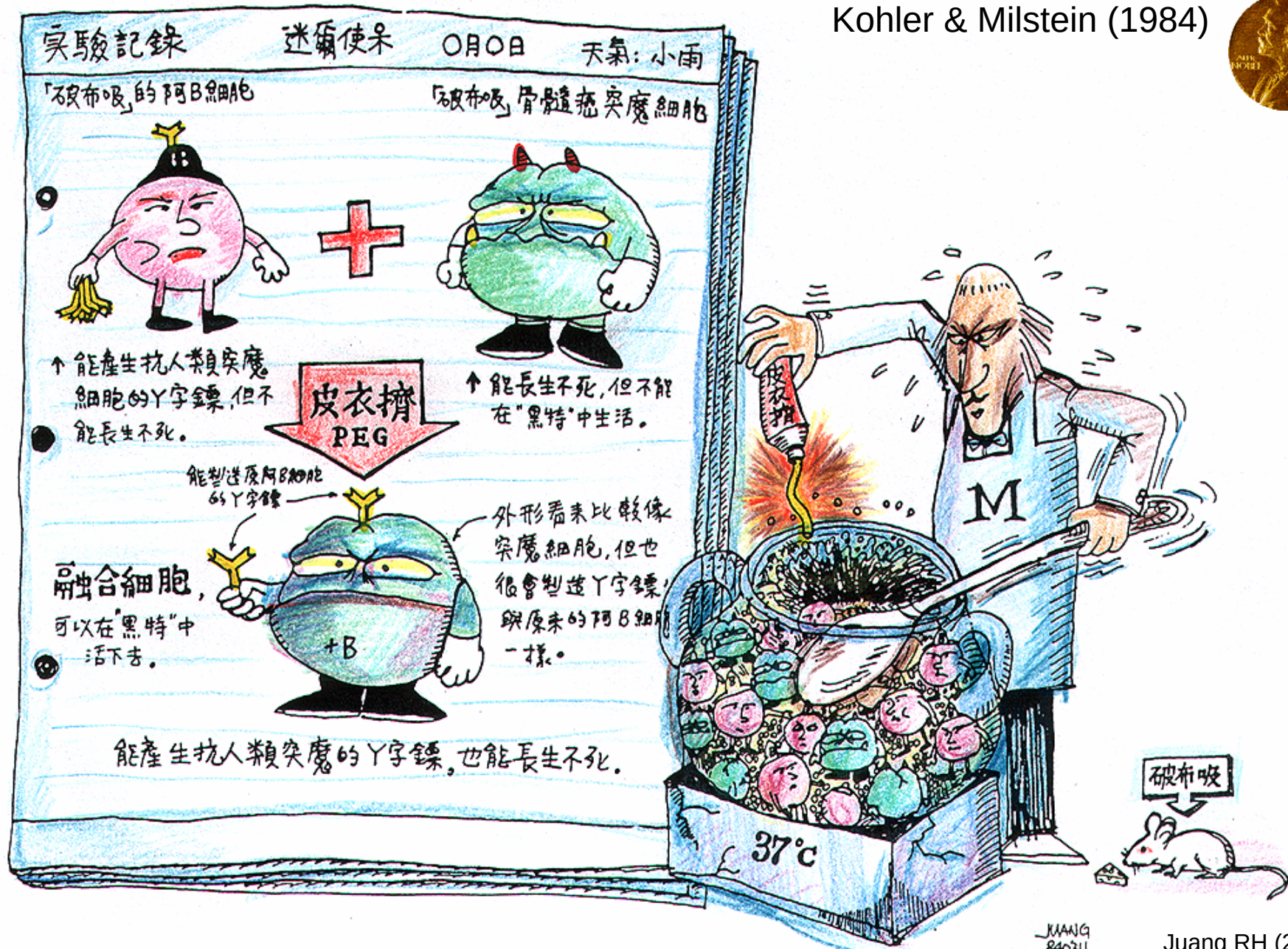
96 槽細胞培養盤



把融合後的細胞均分在培養盤的小槽中

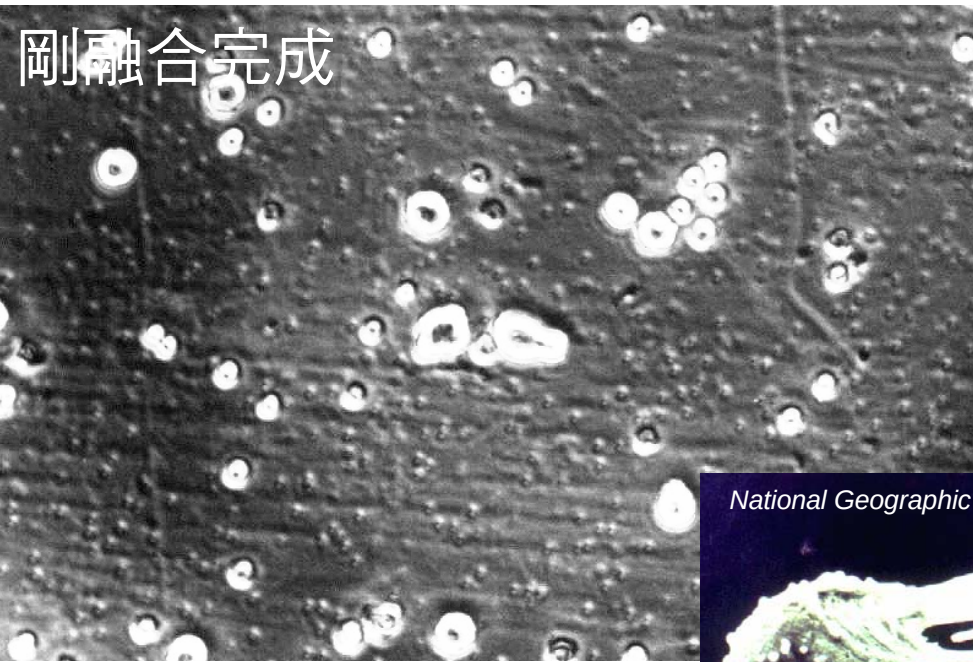
迷爾使呆的研究日誌

Kohler & Milstein (1984)

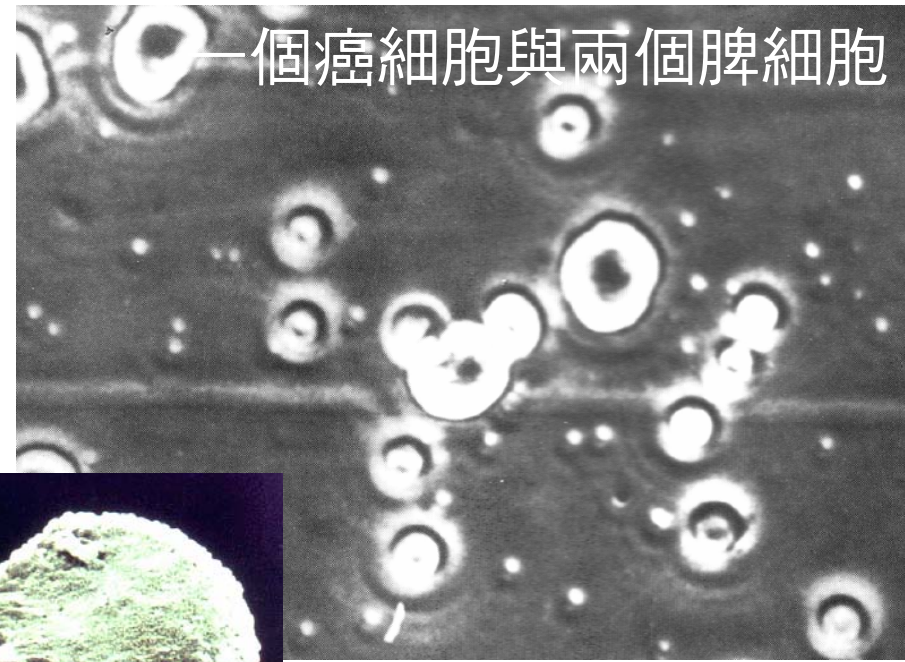


融合後的細胞生長情形

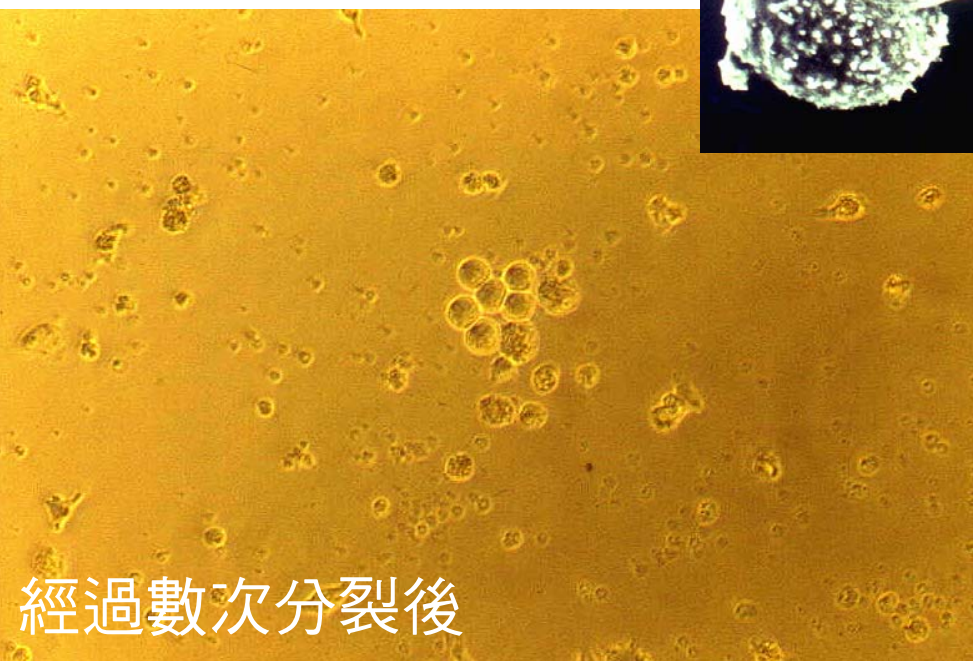
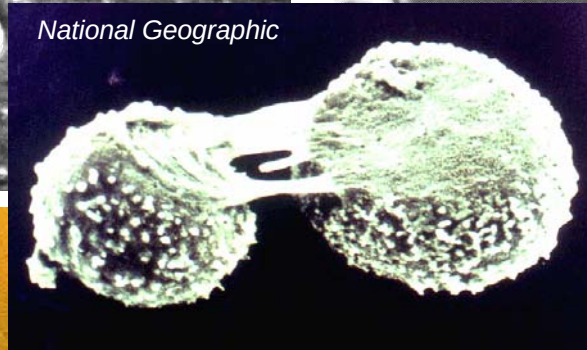
剛融合完成



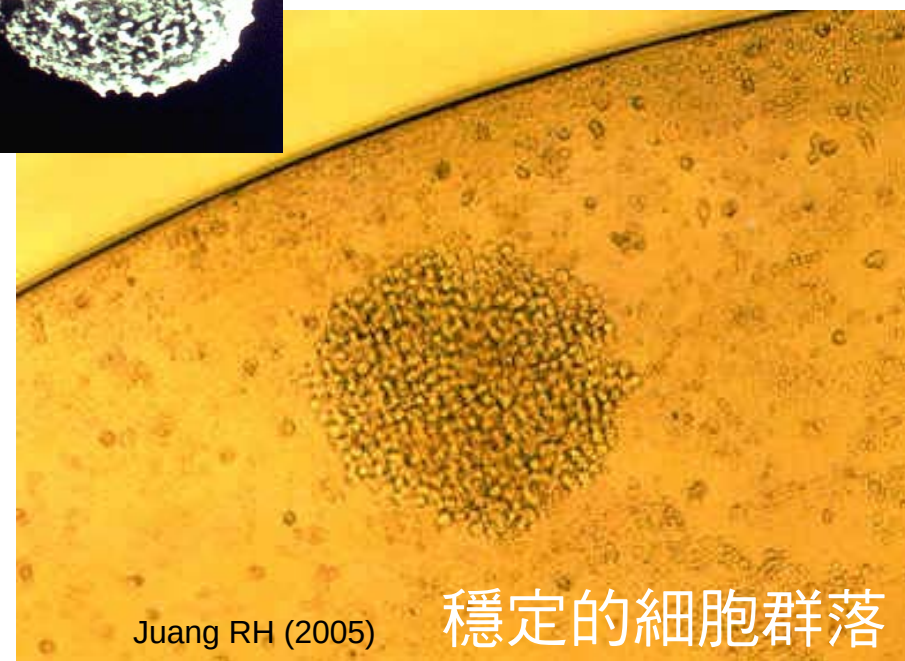
一個癌細胞與兩個脾細胞



National Geographic



經過數次分裂後



Juang RH (2005)

穩定的細胞群落

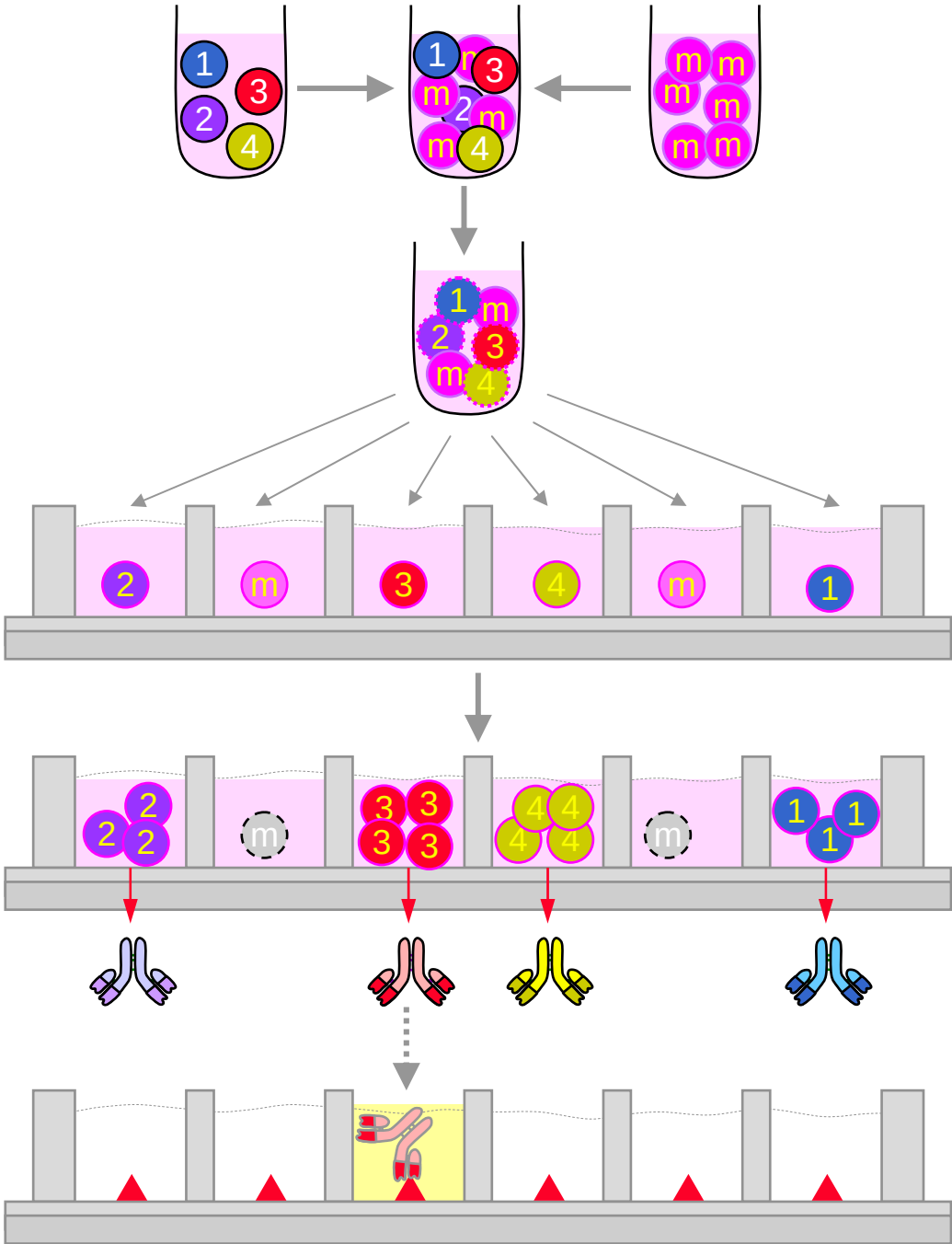
脾細胞

癌細胞

細胞融合

HAT
初步篩選

ELISA
抗體篩選



酵素免疫分析法

ELISA

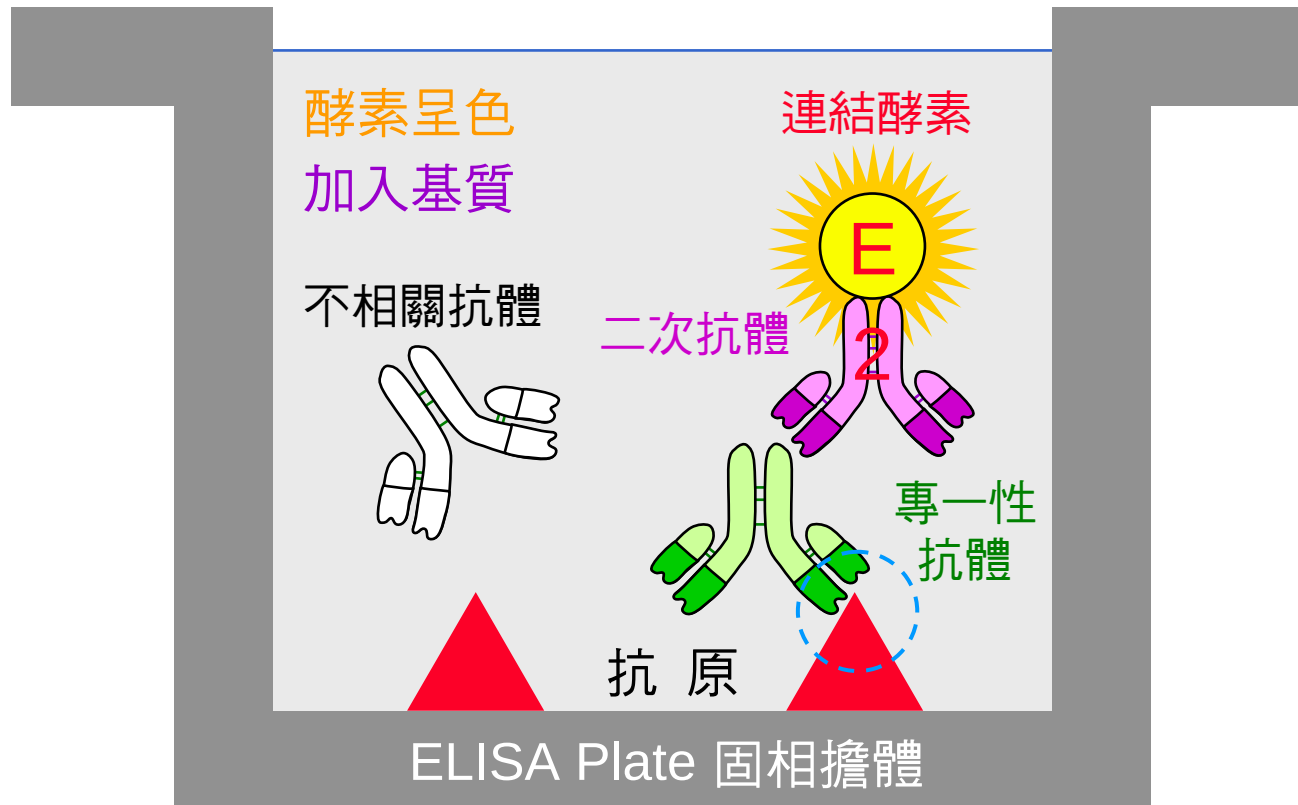
Enzyme-**L**inked **I**mmuno**s**orbent **A**ssay

EIA

Enzyme **I**mmuno**a**ssay

酵素免疫分析法可偵測 專一性 抗原或抗體

以酵素免疫分析法檢測樣本中的專一性抗體

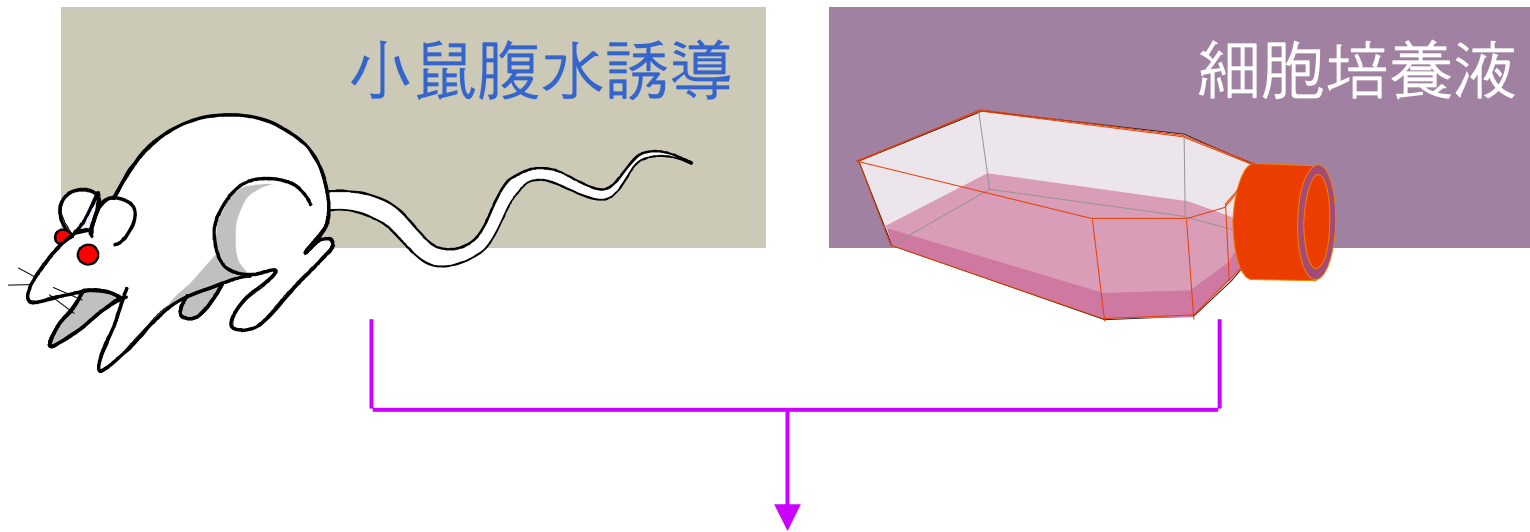


細胞穩定後擴大至 T-25 細胞瓶



在 T-75 培養小瓶中擴大細胞數目

單株抗體的生產與純化



純化方法

硫酸銨分劃 (40% 飽和度)

→ Ig

離子交換法 (DEAE)

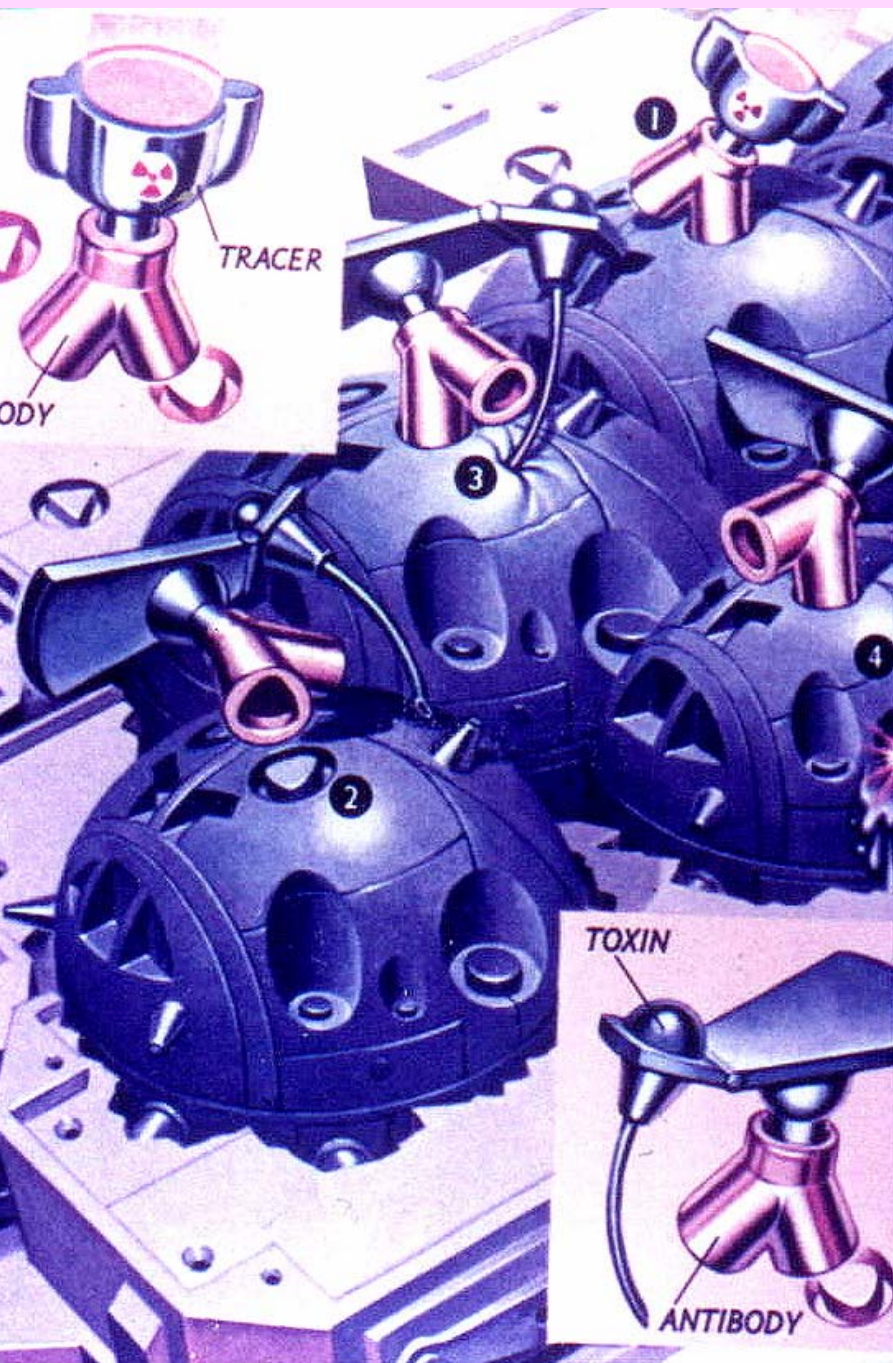
→ IgG

膠體過濾法 (Sephadex)

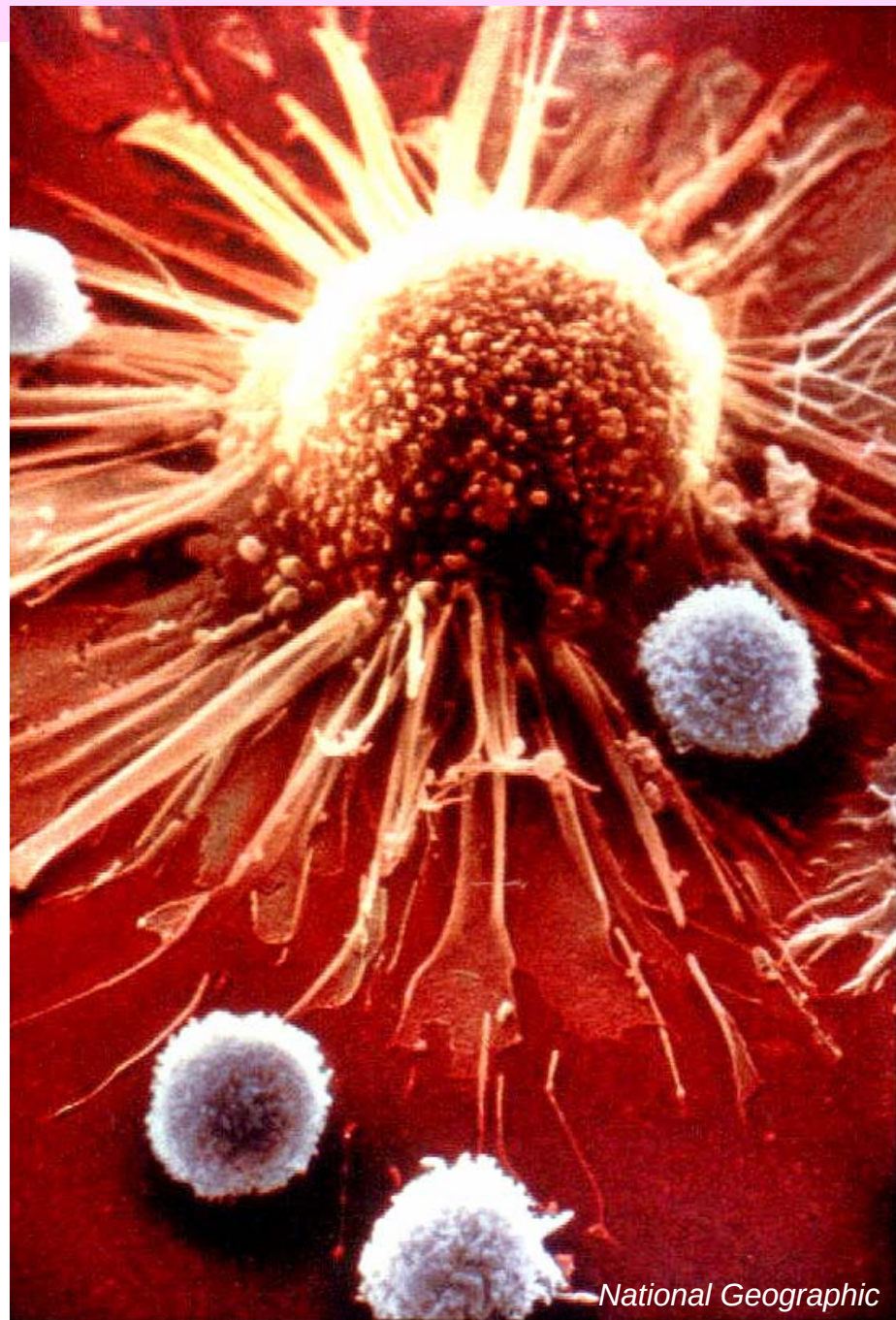
→ IgM

親和層析法 (Protein A)

→ IgG

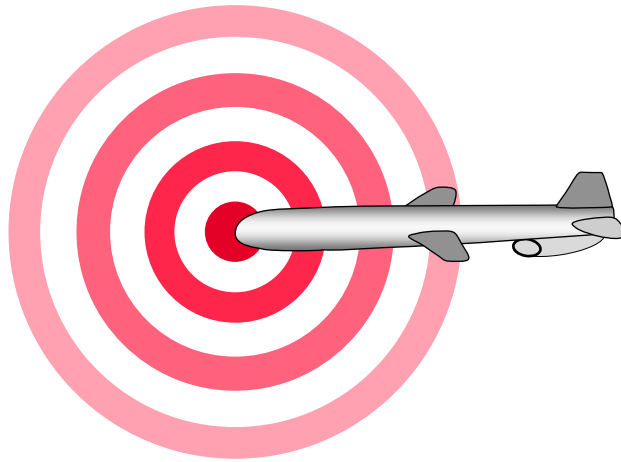


以單株抗體來清除體內癌細胞



單株抗體的高度專一性有很多用途

單株抗体 是對其抗原有極強 專一性的
魔彈 (Magic bullet) 或 巡弋飛彈



研 究
醫 療
檢 驗

以免疫轉印法偵測 特定抗原
以毒素連結抗体攻擊 病變細胞
以 ELISA 偵測特定 病原体

魔彈 再起

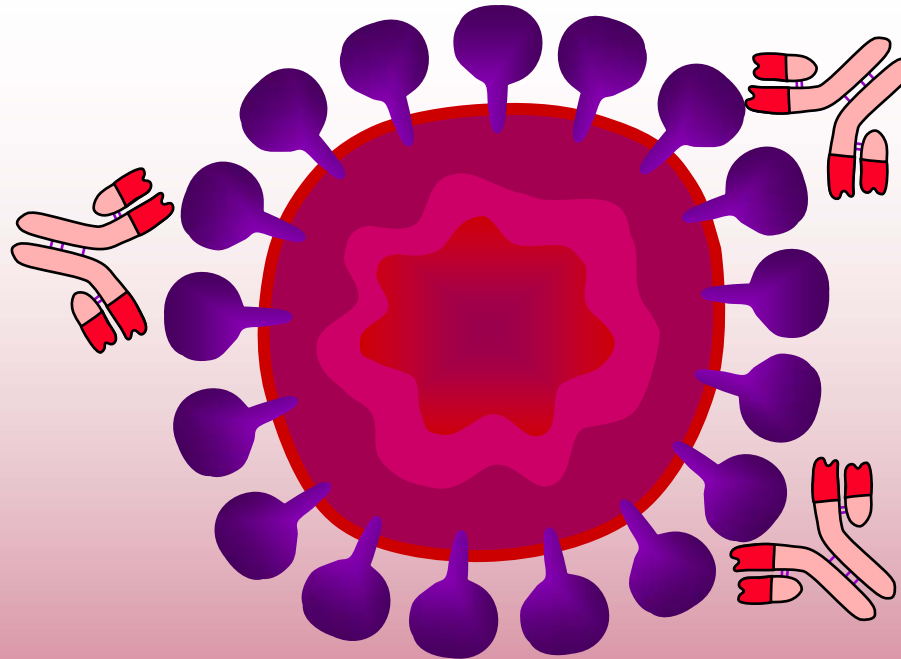
MAGIC BULLETS *Fly Again*

Molecular guided missiles called monoclonal antibodies were poised to shoot down cancer and a host of other diseases—until they crashed and burned. Now a new generation is soaring to market

By Carol Ezzell

製備抗 SARS 的單株抗體及應用

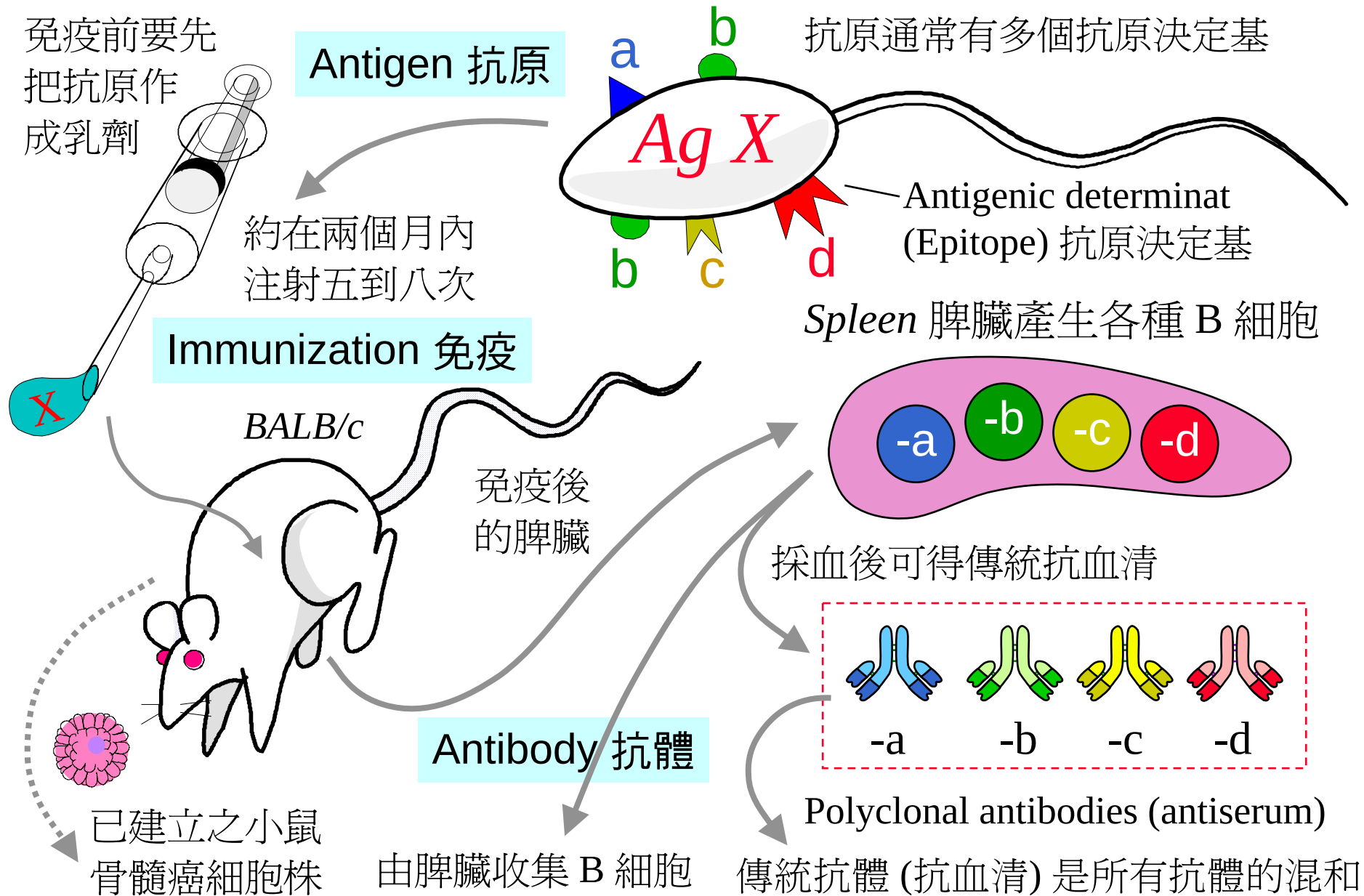
SARS-CoV



(+) RNA, 29,727 nt, 11 ORF

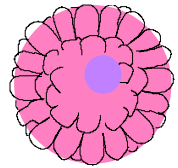
Science (2003) May

如何製備單株抗體 – 免疫產生專一性 B 細胞



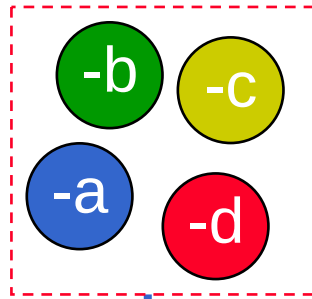
如何製備單株抗體 – 以細胞融合產生融合瘤

骨髓瘤細胞



NS-1

B cell



脾細胞

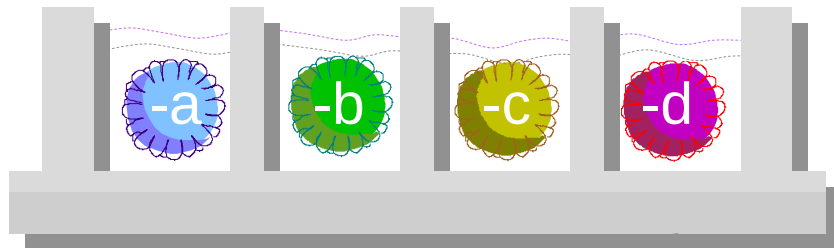
細胞融合

PEG

Cell fusion

分株培養篩選

HAT



Hybridoma cells

融合瘤細胞

Subcloning

單株化 (確定只有一種細胞)

篩選

ELISA



單株抗體

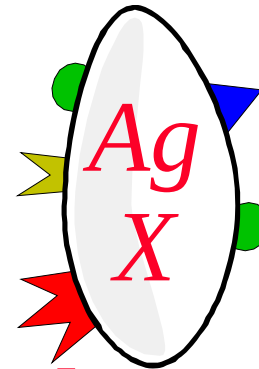
傳統抗體 (抗血清)

對抗原的反應

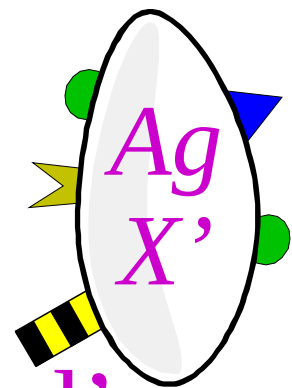
a	+
b	+
c	+
d	+

= 無法分辨

a	+
b	+
c	+
d'	-



d 舊有抗原



完全不同

d' 新的抗原

d	+
---	---

≠

d'	-
----	---



試驗專一性