



动物检验检疫技术

专业教学资源库

# 单克隆抗体技术



# 目录

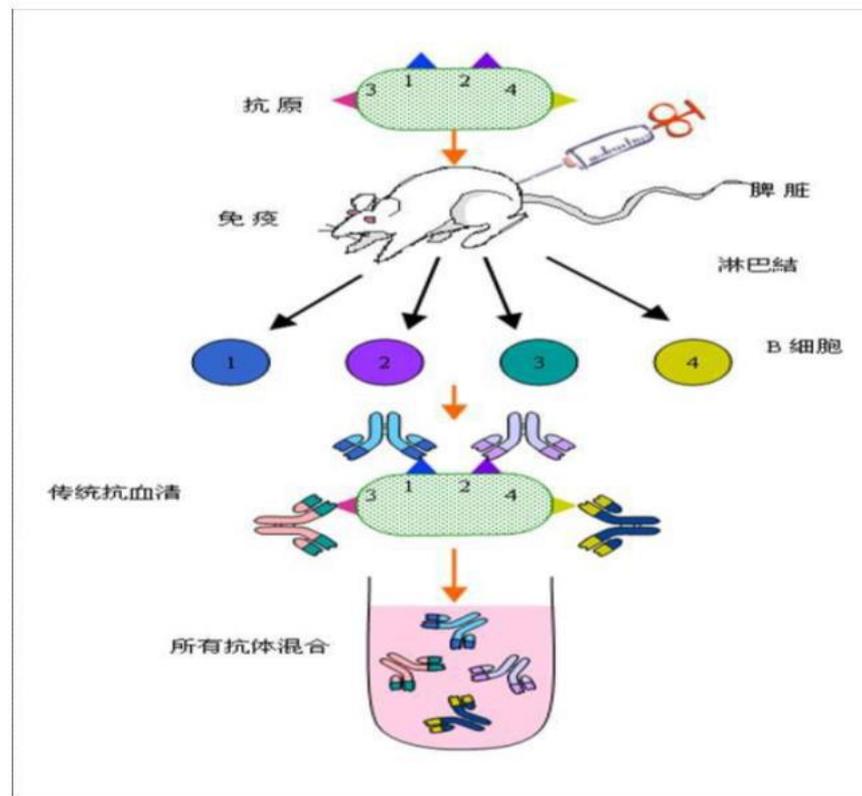
- ◆ 基本概念
- ◆ 杂交瘤技术的诞生及发展
- ◆ 杂交瘤技术的原理
- ◆ 杂交瘤技术的基本程序
- ◆ 单克隆抗体的生产



# 一、基本概念

- 多克隆抗体 (polyclonal antibody)

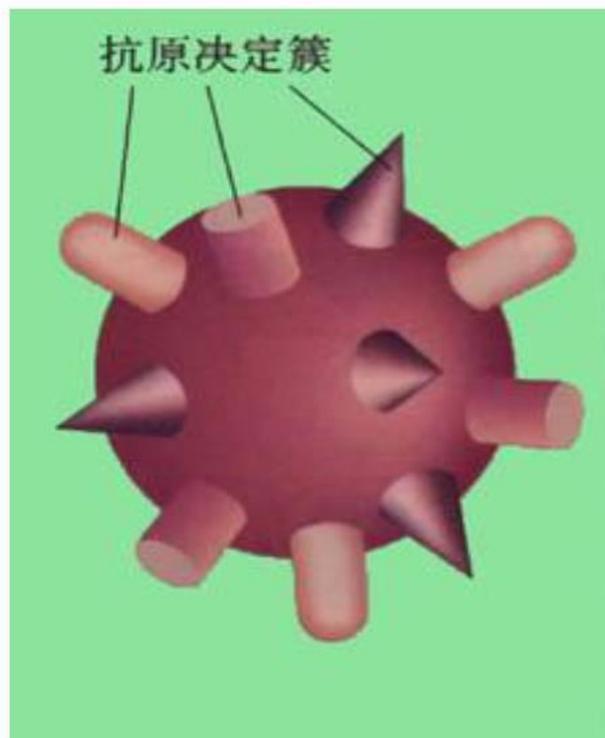
简称多抗，是**针对多个不同抗原决定簇**的抗体的混合物。

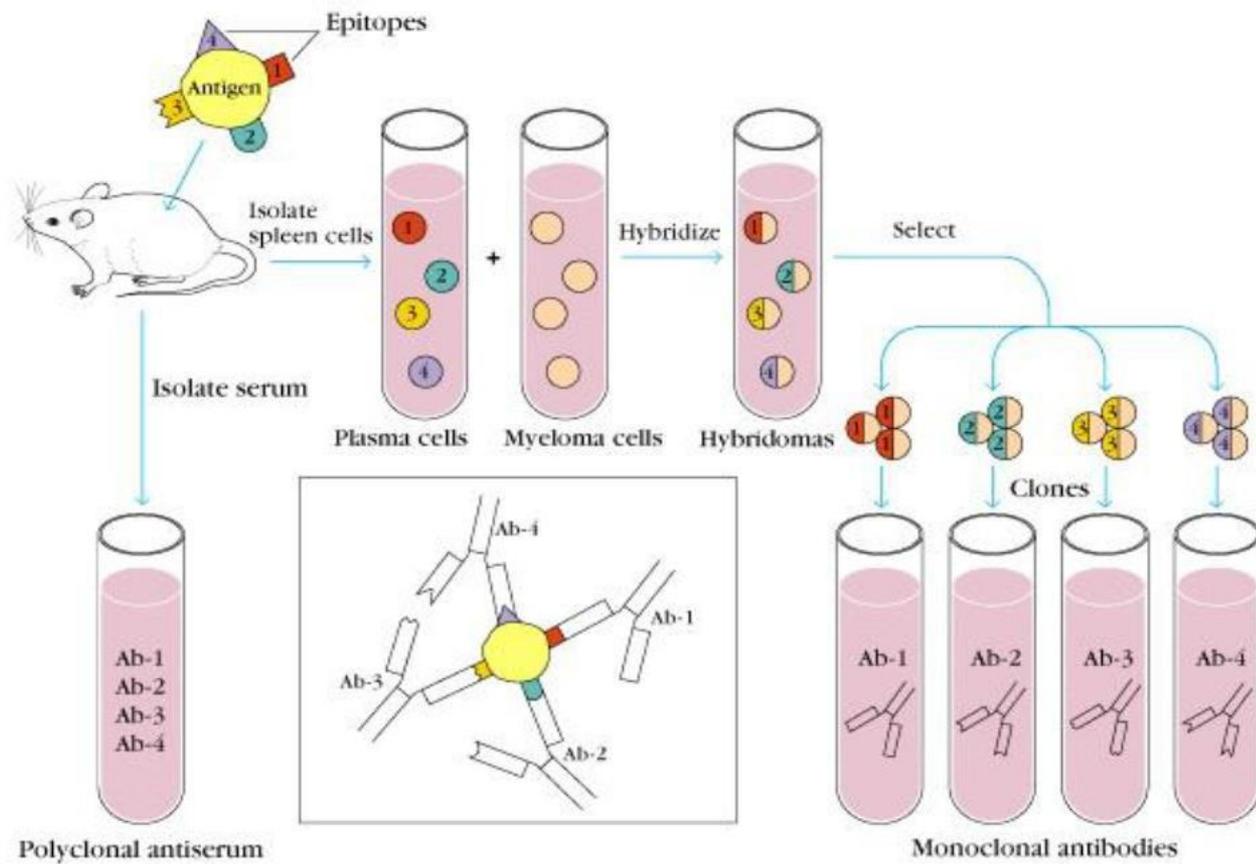




- 单克隆抗体 (monoclonal antibody)

简称单抗，是由一个B细胞克隆针对单一抗原决定簇产生的抗体。

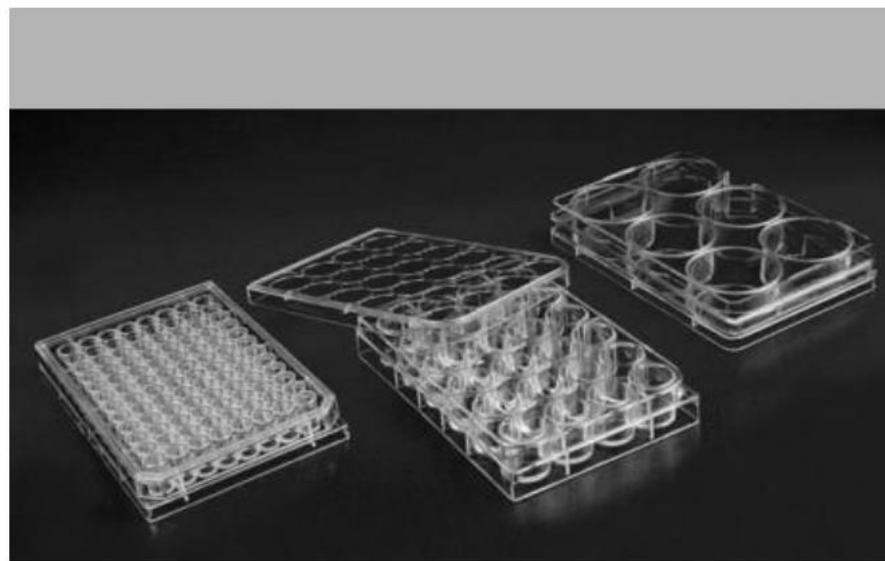
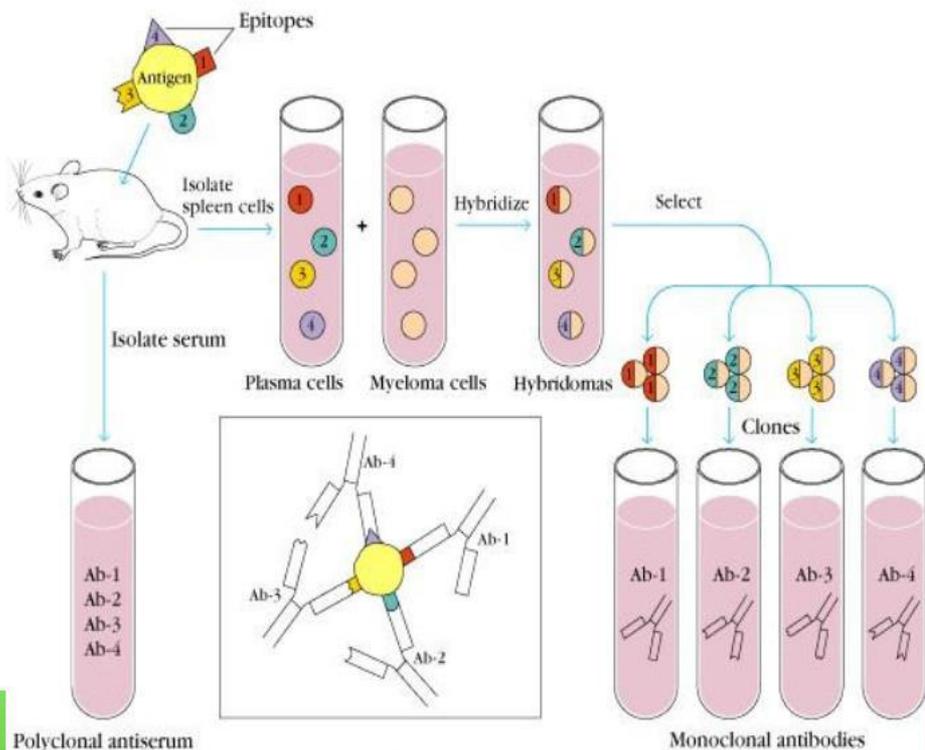






## ● 杂交瘤细胞系 (the hybridoma cell line)

既能像骨髓瘤细胞一样在体外培养中**无限制增殖**，又能像脾淋巴细胞那样**合成和分泌特异性抗体**，通过克隆化得到来自单个杂交瘤细胞的单克隆系，即杂交瘤细胞系。





## 二、杂交瘤技术的诞生及发展

### ◆ 杂交瘤技术的诞生

1975年8月7日，Koher和Mistein在英国《自然》杂志上发表了题为“分泌具有预定特异性抗体的融合细胞的持续性培养”的著名论文，通过骨髓瘤细胞与免疫绵羊红细胞的小鼠脾细胞融合，最终获得了很多能分泌抗绵羊红细胞抗体的克隆化杂交瘤细胞系。

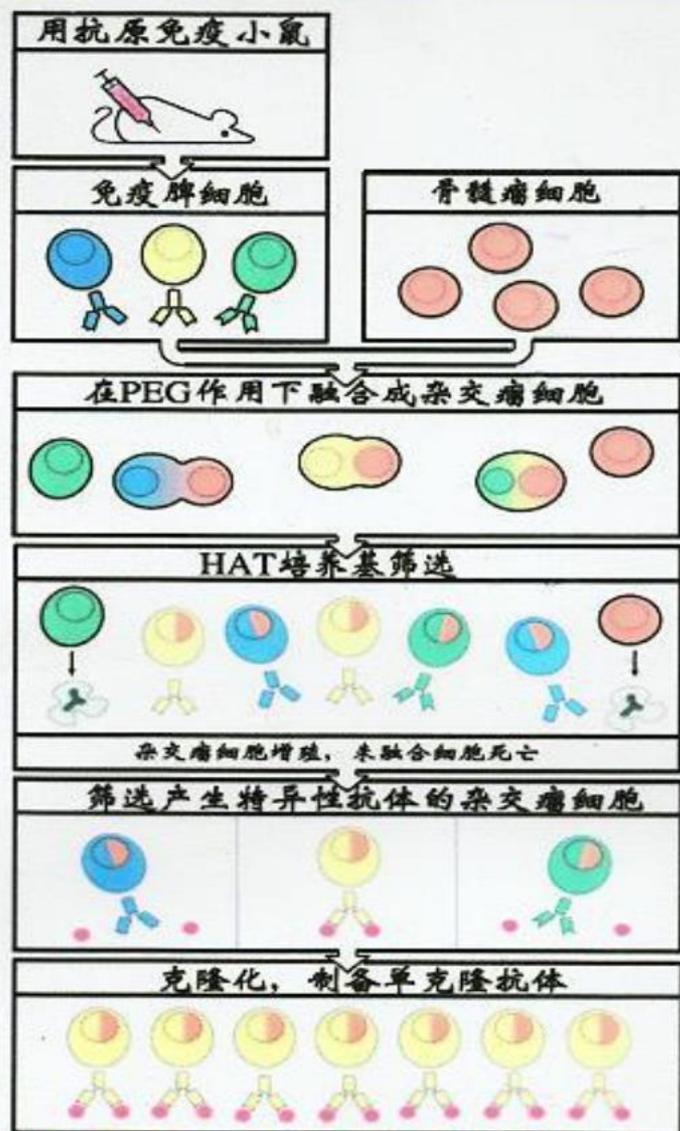
### ◆ 发展

融合剂：聚乙二醇（PEG）

建立的骨髓瘤细胞系：SP2/0-Ag14，X63-G8653，NS0/1等，后来又建立了大鼠、人和鸡等的骨髓瘤细胞系。



# 三、杂交瘤技术的原理



选择性培养基  
HAT





## 融合后形成的细胞种类

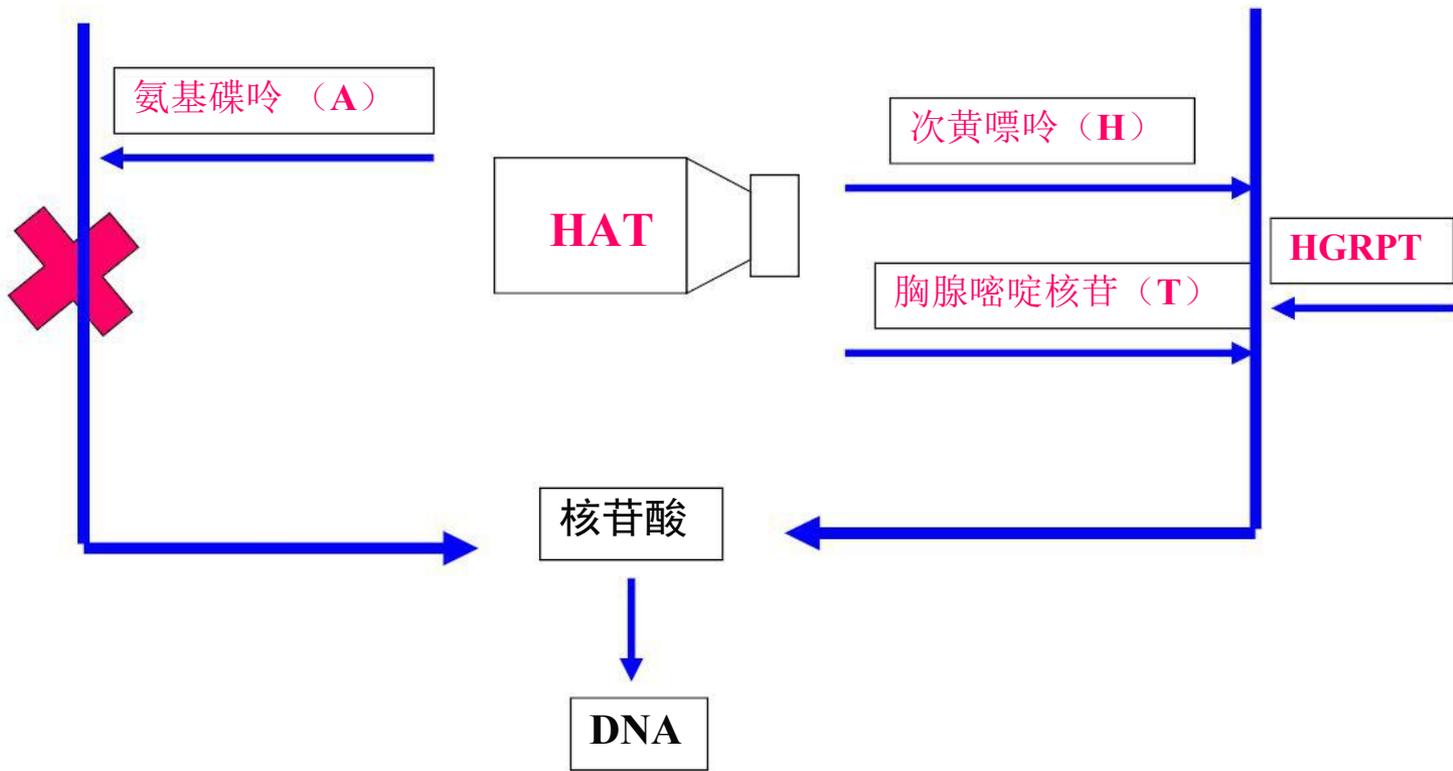
细胞种类	选择性培养基	HGPRT	细胞生长状态
脾细胞+骨髓瘤细胞	HAT	+	长期生长
脾细胞+脾细胞		+	短期生长
骨髓瘤细胞+骨髓瘤细胞		-	不能生长
脾细胞		+	短期生长
骨髓瘤细胞		-	不能生长



SP2/0细胞是缺陷性细胞，无HGRPT

细胞中核苷酸主要合成途径

细胞中核苷酸补救合成途径





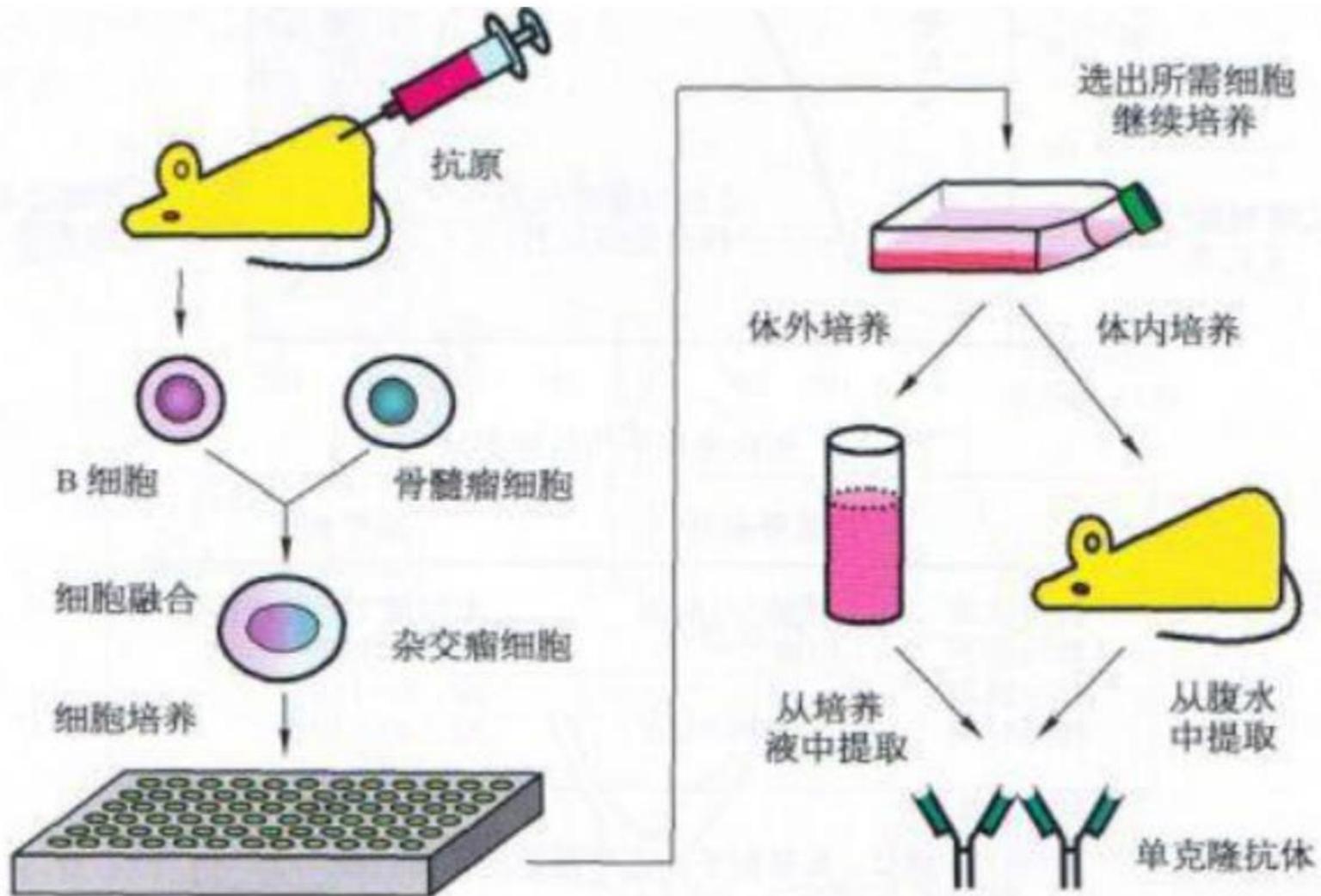
## 四、杂交瘤技术的基本程

### ● 用品

超净工作台、CO<sub>2</sub>培养箱、超低温冰箱、倒置显微镜、电子天平、液氮罐、离心机、纯水仪、水浴锅、融合管、细胞培养板、吸管、注射器、微量移液器、200目筛网、解剖器械、平皿、酶标仪、加样器、细胞计数板等。

### ● 步骤

动物免疫、细胞融合、杂交瘤细胞的筛选与检测、杂交瘤细胞的克隆化、细胞的冻存、单抗的鉴定等。



本页图片源自百度搜索



# 1.动物免疫

## 动物免疫

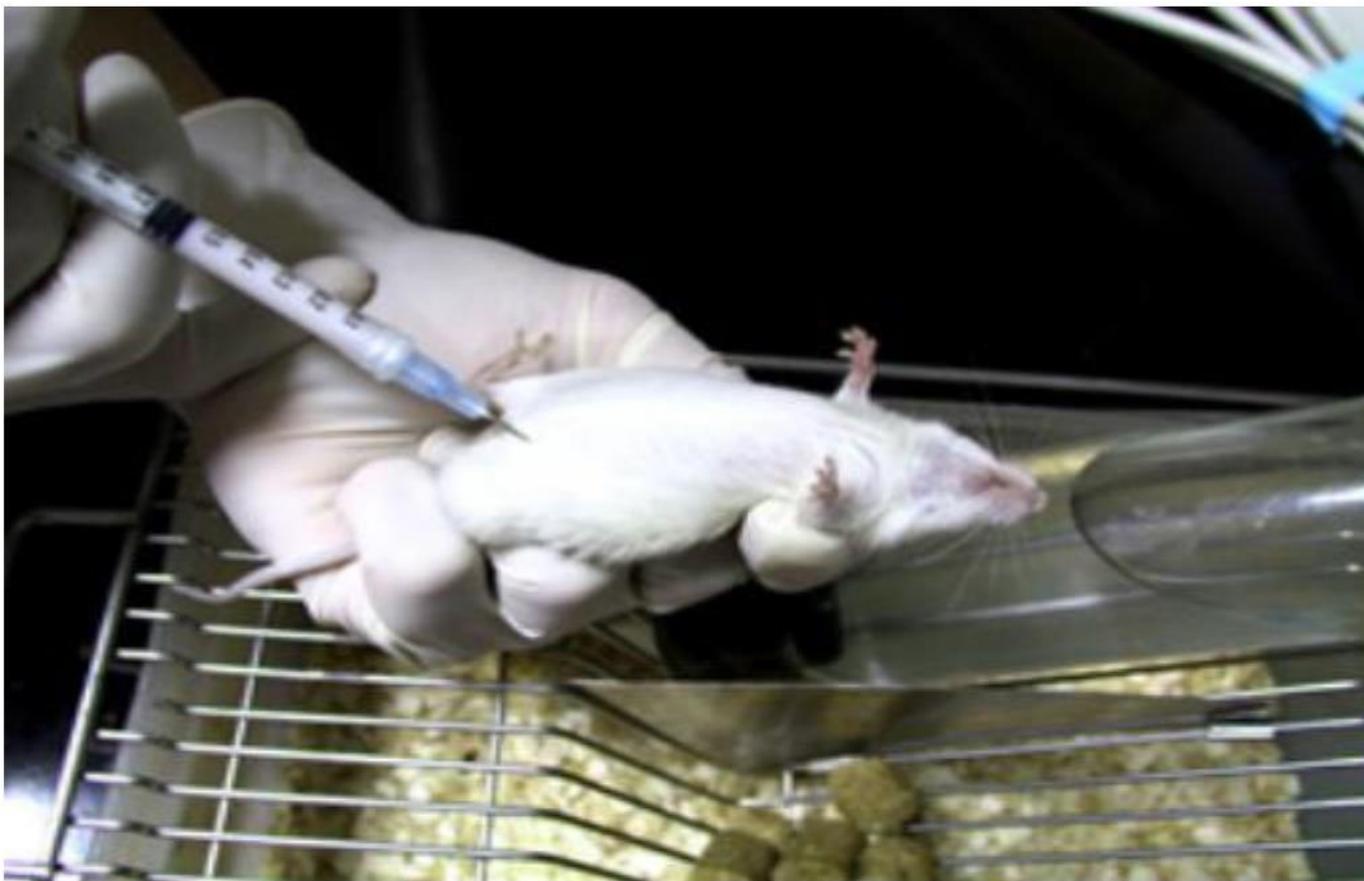
抗原制备——纯度、量

免疫动物——Balb/c小鼠、LOU/C大鼠

免疫程序的确定

免疫途径——皮下、肌肉、静脉、腹腔注射







## 2. 细胞融合

### 骨髓瘤细胞

**融合前，  
骨髓瘤细胞应处于  
对数生长期，  
复苏后的细胞  
至少要2周时间  
才适合融合。**

### 小鼠脾细胞

**加强免疫后的  
第三天应杀鼠  
取脾做细胞融合**

### 饲养细胞

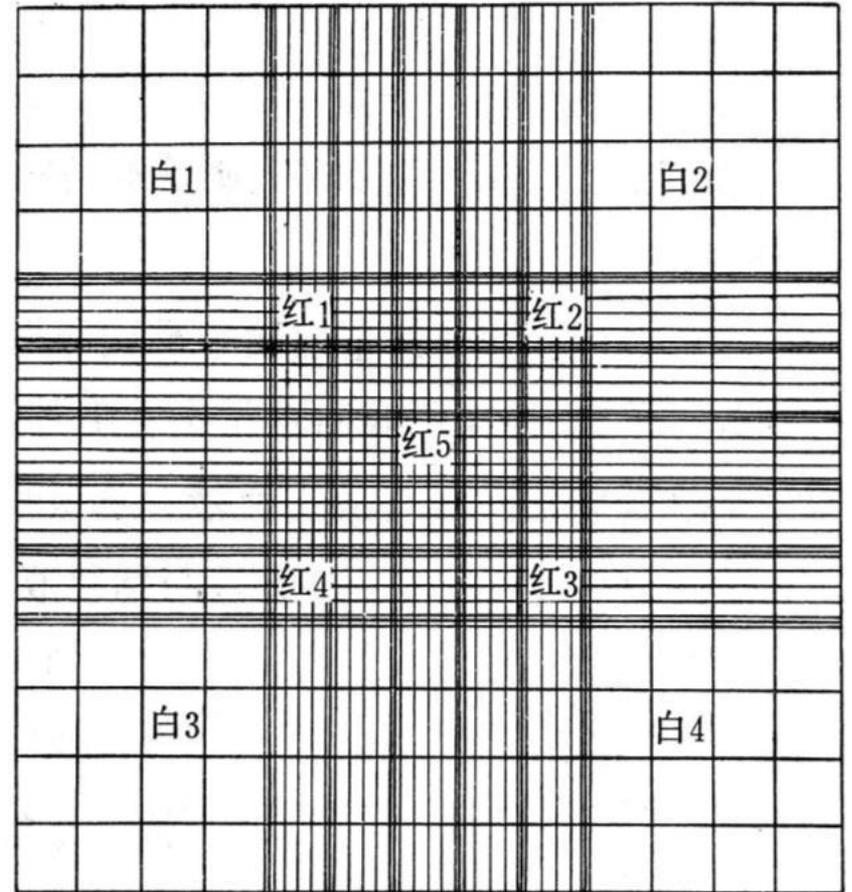
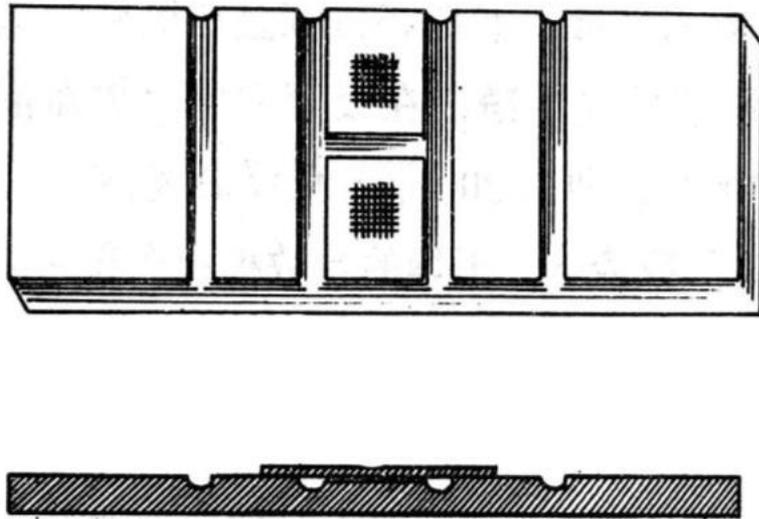
**选用腹腔渗出细胞，  
其中主要是  
巨噬细胞和  
淋巴细胞。**



## • ① 骨髓瘤细胞悬液的制备

- a. 将骨髓瘤细胞扩大培养，一般按照一块96孔板需要2-3瓶100mL细胞培养瓶培养的细胞进行准备。
- b. 融合时，将细胞从瓶壁吹下，收集于50mL融合管内。
- c. 1000r/min离心5-10min，弃去上清。
- d. 加入30mL不完全培养基同法离心洗涤一次，然后将细胞悬于10mL不完全培养基中混匀。
- e. 细胞计数。





**4个大方格细胞总数 × 105**

本页图片源自百度搜索

**4**



## • ② 脾淋巴细胞的准备

- a. 处死免疫过的Ba1b/c鼠，分离血清（摘眼球采血）。
- b. 小鼠放于75%酒精中浸泡消毒，取出固定于板上，在无菌条件下取脾。
- c. 洗涤脾脏。
- d. 制备脾细胞悬液。
- e. 过滤，收获脾细胞。1000r/min离心5-10min，弃去上清。
- f. 将脾细胞重新悬于10mL不完全培养基中，细胞计数。





### • ③ 饲养细胞的制备

- a. 拉颈处死小鼠，浸泡消毒。
- b. 超净台中，在小鼠腹部剪开一小口，剥开皮肤，露出腹膜。
- c. 用注射器取10mL不完全培养基注射至腹腔，用手指轻揉1min回抽腹腔液体，加入离心管。
- d. 离心，弃上清。用HAT培养液重新悬浮。
- e. 细胞计数，使每毫升含40万个活细胞。
- f. 96孔细胞板中，每孔滴加0.05ml，含2万个细胞，放入CO<sub>2</sub>培养箱培养，可供细胞融合和亚克隆之用。如果在融合后发现在培养孔中饲养细胞数量少，则可以在细胞换液时再加入一些。





- ④ 细胞融合原理

小鼠的骨髓瘤细胞与分泌某种抗体的B淋巴细胞在融合因子（PEG）的作用下产生融合，融合的细胞既具有肿瘤细胞易分裂增殖的特性，又具有B淋巴细胞分泌特异性抗体的能力，在HAT选择培养基中可以选择到杂交瘤细胞。通过在体外培养液中繁殖生长，收集细胞上清液便可得到单克隆抗体。



## • ⑤ 融合方法

- a. 将10<sup>8</sup>小鼠脾细胞与5×10<sup>7</sup>骨髓瘤细胞SP2/0，混合于一支50毫升融合管中，补加**不完全培养基**至30mL。
- b. 离心，弃上清液。
- c. 用手指轻叩离心管底部，使沉淀混匀，40℃水浴中预热。
- d. 将40℃水浴中保温的50%PEG 1mL，用滴管缓慢滴入离心管中，在60秒钟内滴完。
- e. 用吸管在**90秒内加20-30mL**预热至37℃的不完全培养基，室温静置10min。
- f. 离心，弃上清液。加HAT培养液吹打混匀，补加含腹腔细胞的HAT培养液。
- g. 分装96孔细胞板，每孔0.1-0.15mL。分装24孔板，每孔1-1.5mL，37℃ 5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育。
- h. 5天后，用HAT换出一半培养液，7-10天后用HT培养基换出HAT培养基。
- f. 经常观察杂交瘤细胞生长情况，待其长至孔底面积1/10以上时吸出上清供抗体检测。

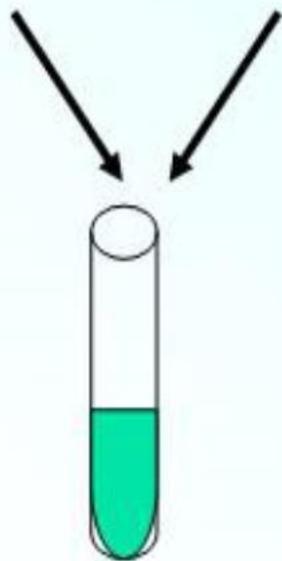


致敏淋巴细胞

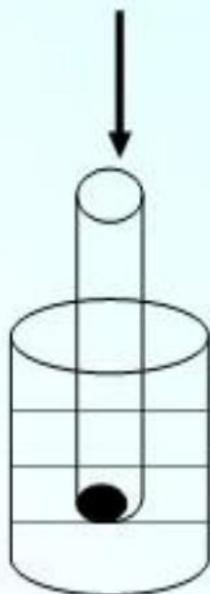
SP2/0细胞

50%PEG

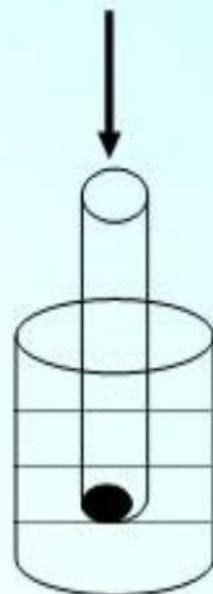
培养液



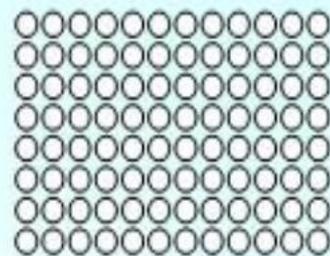
离心



37℃摇动



离心



HAT培养液悬浮细胞，置培养孔内

本页图片源自百度搜索



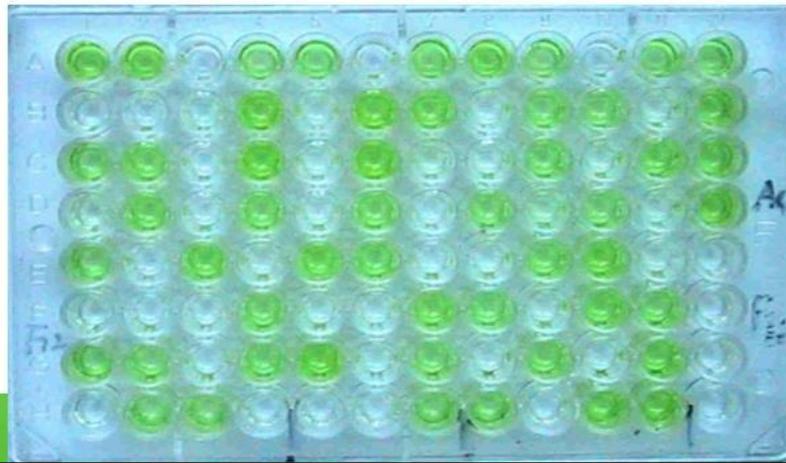
### 3. 杂交瘤细胞的筛选

- 筛选方法选择的原则

根据实验室的条件而定，选择具有快速、敏感、特异性强、花费小、简便、便于一次处理大量样品的检测方法。

- 常用的检测方法

间接ELISA、抗体捕捉ELISA、竞争 ELISA、Dot- ELISA、免疫组化染色法、间接免疫荧光法、间接血凝试验、放射免疫测定、血凝抑制试验等。





## 4. 杂交瘤细胞的克隆化

- 克隆化的原因

从原始孔中得到的阳性杂交瘤细胞，可能来源于**多个杂交瘤细胞**，因此他们所分泌的抗体是**不同质**的。为了得到完全同质的单克隆抗体，必须对杂交瘤细胞进行克隆化。

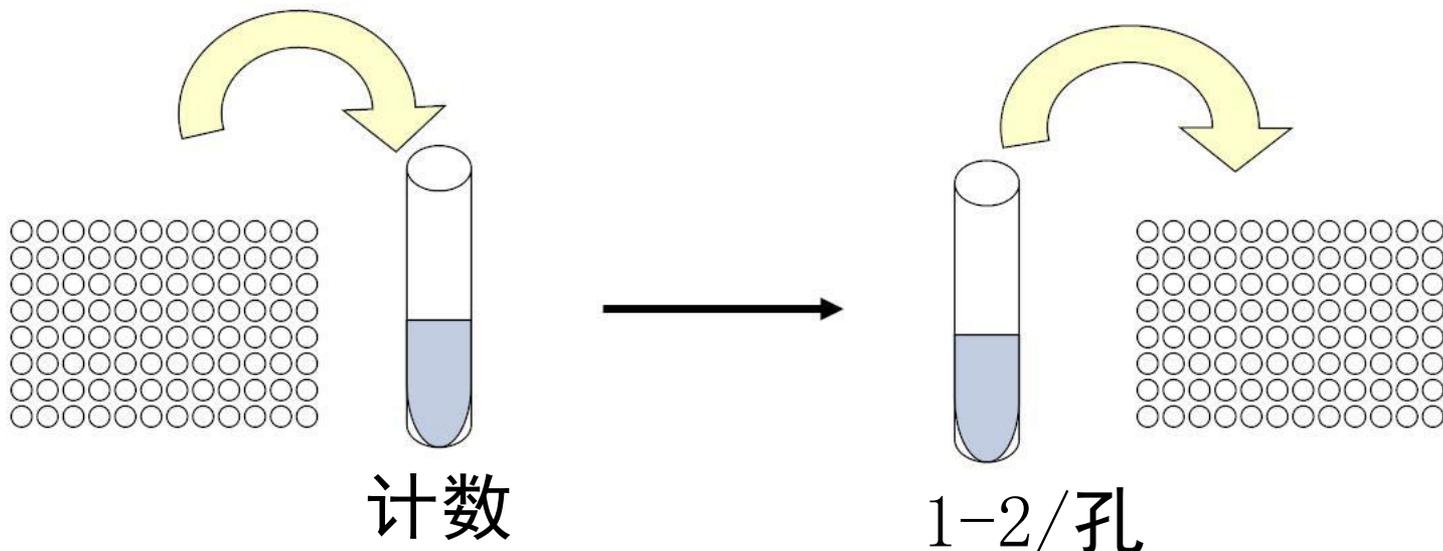
- 克隆化的方法

**有限稀释法**、软琼脂法、单细胞显微操作法、单克隆细胞集团显微操作法、荧光激活细胞分类仪分离法等。比较常用的是有限稀释法和软琼脂法。



- 有限稀释法（亚克隆，至少2次）

将待克隆化的杂交瘤细胞稀释成每毫升含10个、15个、20个细胞的稀释度，然后加入96孔板，每孔加0.1mL。同时补加腹腔细胞。37℃ 5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育7-10天，待出现肉眼可见的克隆即可检测抗体，做好标记。





- 5. 杂交瘤细胞的冻存与复苏
- 6. 单抗特性的鉴定

杂交瘤细胞染色体分析、单抗免疫球蛋白类和亚类的鉴定、单抗纯度的鉴定、单抗理化性质的鉴定、单抗反应性测定等。



# 五、单克隆抗体的生产

- 1. 单抗的大规模生产

目前大量制备单抗的方法主要有两大系统，**动物体内生产法和体外生产法**。



## • 动物体内生产法

一般采用成年BALB/C小鼠，体内注射适量降植烷或液体石蜡，大约7-10天后将杂交瘤细胞注射入小鼠的腹腔，观察小鼠腹水的产生情况。

如腹部明显膨大时，便可采集腹水。腹水离心后测定抗体效价，分装， $-70^{\circ}\text{C}$ 冻存储用。





## • 体外生产法

主要采用两种类型的杂交瘤细胞培养系统，一是悬浮培养系统，采用转瓶或发酵罐式的生物反应器；二是细胞固定化培养系统，包括中空纤维细胞培养系统和微囊化细胞培养系统。



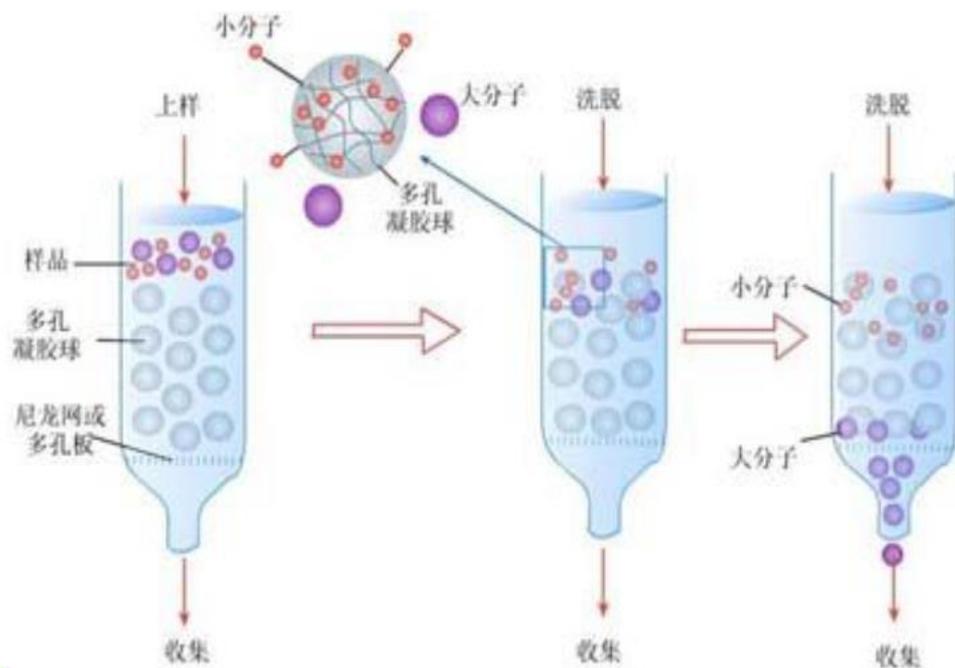
本页图片源自百度搜索

德泉兴业辽宁分公司



## • 2. 单抗的纯化

单抗的纯化方法有很多，应根据单抗的特性和实验条件选择适宜的方法，常采用的技术有：离子交换层析柱、凝胶过滤法、亲和层析等。



凝胶过滤





### • 3. 单抗的标记

目前动物用单抗在动物疫病诊断和检疫、妊娠检测、性别鉴定等方面有广泛的应用，大多以诊断试剂盒的形式提供，其中的核心试剂为标记的单抗。常见的标记方法有：酶标法、荧光素标记、同位素标记、生物素标记、金标记、化学发光标记、SPA标记、铁蛋白标记等。



动物检验检疫技术

专业教学资源库

Thank You!