

DOI: 10.13376/j.cbls/2017046

文章编号: 1004-0374(2017)04-0349-07

B-LCLs及其在单克隆抗体生产中的应用

刘 玺^{1,2,3}, 陈新文^{1*}, 段子渊^{2*}

(1 中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学研究中心, 武汉 430071; 2 中国科学院遗传与发育生物学研究所遗传资源研究中心, 北京 100101; 3 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: B 淋巴母细胞系 (B-LCLs) 体外可以无限增殖, 为很多实验持续提供基因型和表型匹配的原材料, 极大地促进了生物医学研究的发展。近年来, B-LCLs 在单克隆抗体的生产、人类全基因组分析等方面得到重要应用, 成为遗传进化研究的重要资源。现对 B 淋巴母细胞系及其在单克隆抗体生产中的应用作一简述。

关键词: EB 病毒; B 淋巴母细胞系; 单克隆抗体

中图分类号: R392.11 **文献标志码:** A

B-LCLs and its application in the production of monoclonal antibody

LIU Xi^{1,2,3}, CHEN Xin-Wen^{1*}, DUAN Zi-Yuan^{2*}

(1 Molecular Virology Research Center, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2 Genetic Resource Research Center, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: B lymphoblastoid cell lines (B-LCLs), which can proliferate indefinitely *in vitro*, fulfil the requirement of constant supply of starting material with matching genotypes and phenotypes for variety of assays, substantially accelerating the process of biomedical investigations. In recent years, its utility for producing monoclonal antibody and analyzing the whole human genome has extensively been documented. B-LCLs are increasingly being considered as an important resource for genetic and functional research. This article reviews the B-LCLs and its application in the production of monoclonal antibody.

Key words: EBV; B-LCLs; monoclonal antibody

B 淋巴母细胞系 (B lymphoblastoid cell lines, B-LCLs) 是 EBV (Epstein Barr virus) 感染 B 细胞后永生化的体外培养 B 淋巴细胞系, 可在体外无限增殖。近年来, B-LCLs 作为遗传资源和功能研究的重要载体越来越受到重视, 在人类全基因组分析、人类基因库的建立、单克隆抗体的制备中也用到 B-LCLs。

1 EB病毒

1.1 EB病毒概况

EB 病毒是由 Epstein 和 Barr 于 1964 年首次成功地从体外悬浮培养 Burkitt 非洲儿童淋巴瘤细胞 (又名 EB 细胞) 中分离得到, 因此该病毒被命

名为 Epstein-Barr virus (EBV)。EBV^[1] 属于 4 型 γ 疱疹病毒, 世界上 90% 以上人都感染 EBV, 一旦潜伏感染, 宿主将终身携带病毒, 无法彻底清除。EBV 感染导致包括肿瘤在内的多种疾病, 据报道世界上 2% 的肿瘤发生与 EBV 有关^[2], 如 B 细胞淋巴瘤、结外 NK/T 细胞淋巴瘤、鼻咽癌、胃癌等。据英国癌症研究中心估计, 全球每年有 11 万 ~20 万新增 EBV 相关的癌症患者^[3]。

收稿日期: 2016-09-11; 修回日期: 2016-10-18

基金项目: 中国科学院重点部署项目(KFZD-SW-205)

*通信作者: 陈新文, E-mail: chenxw@wh.iov.cn; Tel: 027-87199106; 段子渊, E-mail: zyduan@genetics.ac.cn; Tel: 010-64803631

EBV 的生命周期分为潜伏和裂解两个阶段。在潜伏阶段,病毒基因组以染色质外游离体形式存在,仅表达少数基因。根据潜伏阶段病毒产物的不同,分为3个主要潜伏时期(表1)。潜伏I期(发现于生发中心记忆或者分化的B细胞)只表达EBV核心抗原1(EBNA1);潜伏II期(发现于生发中心B细胞)表达EBNA1和潜伏膜蛋白(LMPs);潜伏III期(发现于EBV感染的原初B细胞和激活的B淋巴母细胞)表达所有的病毒潜伏基因。病毒的裂解增殖发生在感染的B细胞分化为浆细胞的过程中。在裂解阶段,病毒基因组为线性,复制并组装成新的病毒粒子,最终释放,被感染的细胞由于细胞毒作用而死亡。

1.2 EB病毒转化B细胞的机制

EBV可以转化静息状态的B细胞为无限增殖的淋巴母细胞系。EBV主要通过病毒表面的糖蛋白gp350与B细胞表面的受体CD21/CR2结合而感染B细胞^[5],同时通过另一个糖蛋白gp42以人类白细胞抗原(HLA)作为共受体感染B细胞^[6]。

B-LCLs属于潜伏III期EBV感染,表达一系列病毒潜伏基因。体外EBV转化B细胞是基于LMPs和EBNAs的协同作用。LMP1是EBV转化B细胞的致癌过程中必不可少的病毒癌蛋白^[7],敲除LMP1可造成B细胞转化和LCLs培养的失败。LMP1的功能类似于组成性激活肿瘤坏死因子受体(TNFR)——CD40,激活B细胞的CD40L信号通路^[8]。LMP1强烈激活NF- κ B、p38和JNK信号通路,且NF- κ B信号通路的激活是B细胞永生化的必需^[9]。LMP1还诱导细胞表面分子(如CD23、CD40和CD44)和细胞黏附分子(如LFA1、ICAM1和LFA3)的克隆扩增和表达^[10],这些分子都有利于EBV的潜伏感染和B细胞永生化的。LMP2A模仿组成性活化的B细胞受体,通过聚合下游含有SH2结构域的酪氨酸激酶,包括Lyn和Syk,促进PI3K的活性^[11]。LMP2A可以通过PKC活性增强胞内钙离子水平,从而抑制BCR信号通路^[12]。当BCR交叉连

接激活B细胞时,LMP2B由于缺少募集Lyn和Syk的N末端结构域,可以调节LMP2A的活性^[13]。因此,LMP2s协同作用调节EBV的潜伏感染。

EBNAs靶向一系列生物学过程,包括基因表达、肿瘤抑制和细胞周期调控等。EBNA1靶向游离至宿主染色体,并在S期募集DNA复制,从而有利于病毒DNA的复制^[14]。EBNA2刺激双向病毒潜伏期C启动子和LMP2A启动子的表达,从而反式激活LMP1和LMP2A^[15]。EBNA2还刺激c-myc、CD21、EBI1等基因的表达,但是被EBNA2直接激活的胞内基因并未完全阐明。尽管并不直接与DNA结合,EBNA2通过阻碍DNA结合蛋白CBF1反式激活靶向基因。EBNA2/CBF1复合物通过EBNA2C末端酸性激活结构域募集基因转录机器的组分,诱导Notch信号活性^[16]。EBNA3s靶向病毒和宿主的染色质位点,抑制EBNA2靶向基因,即细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p16INK4A、凋亡诱导蛋白Bim,从而有利于细胞的扩增和存活。

EBV编码一系列非编码RNA,包括miRNA,这些RNA分子对EBV的潜伏和持续感染也发挥重要作用;但是,需要进一步系统探索EBV基因调控特点,对理解EB病毒转化B细胞的复杂机制及EBV相关疾病的分子病理学具有重要意义。

2 B淋巴母细胞系(B-LCLs)

B-LCLs的体细胞突变率只有0.3%^[17],基因型和表型的改变几乎可以忽略不计,同时具有较强的增殖能力,可以无限制地提供DNA、RNA、蛋白质等生物分子,为分子和功能实验提供良好的体外研究模型。

2.1 B-LCLs的生物学特点

LCLs的表面标志表型为CD19⁺CD3⁻CD56⁻,平均倍增时间(population doublings, PD)为24h。由于白细胞黏附分子功能抗原1(LFA-1)和细胞间黏附分子1(ICAM-1)的表达^[17-18],细胞成簇生长,表现典型的玫瑰花环形态,肉眼可见的白色集落。

表1 潜伏阶段EBV相关潜伏基因的表达^[14]

潜伏时期	EBV基因的表达							相关疾病
	EBERs	EBNA1	EBNA2	EBNA3s	EBNA-LP	LMP1	LMP2	
I	+	+	-	-	-	-	-	Burkitt淋巴瘤
II	+	+	-	-	-	+	+	鼻咽癌、慢性活动性EBV感染
III	+	+	+	+	+	+	+	传染性单核细胞增多症、移植后淋巴增殖性疾病

注: +: 基因表达; -: 基因不表达。

当 B-LCLs 的 PD 很大并维持二倍体核型且不致瘤时, 认为其为永生化细胞系。然而, 把 B-LCLs 称为永生化细胞系并不准确, 因为大多数 B-LCLs 最终都会死亡, 因此将端粒酶活性低且端粒随着细胞分裂而变短的 B-LCLs 称为前永生化 (preimmortal) B-LCLs; 相反, 把端粒酶活性高并伴随着某些基因的下调和突变的 B-LCLs 称为后永生化 (post immortal) B-LCLs。后永生化 LCLs (> 180 PD, 具有高端粒酶活性) 又可以分为 1、2 (在琼脂上形成菌落) 和 3 (在琼脂上形成菌落且裸鼠致瘤) 三个阶段^[18]。B-LCLs 推荐使用时长为 2~3 个月, 远远低于 180 PD, 以减弱细胞培养过程中的遗传不稳定性 and EBV 诱导的改变对实验结果的影响^[19]。

2.2 B-LCLs在遗传与功能研究中的应用

B-LCLs 可以在体外长期培养, 并保持与母本淋巴细胞的相似性, 因此, 被用于各种各样的研究中。在 PubMed 数据库中输入关键词“lymphoblastoid cell lines”检索到大约 8 500 多篇文献, 但是这些文献中有 10%~15% 的报道是关于 T 细胞或者其他淋巴来源的细胞系^[20]。因此, 有将近 7 000 篇 EBV 相关 LCLs 的文献报道。

这些文献中, 包括以 B-LCLs 作为生物大分子材料, 如 DNA (包括线粒体 DNA)、RNA 和蛋白质进行的研究^[19, 21]。从 B-LCLs 中分离的 DNA 广泛应用于突变分析, 如利用帕金森患者来源的 B-LCLs

的 DNA 筛选 PRKN 基因和 DJ-1 基因的突变^[22-23]。除了 DNA, B-LCLs 的 RNA 也用于突变的筛选。B-LCLs 的 RNA 可被用来检测 ALS2 基因的剪接突变^[24]。在一个自闭症研究中, 患者 B-LCLs 的 RNA 用于芯片分析同卵双胞胎的基因表达差异^[25]。B-LCLs 表达神经元中的很多蛋白, 如淀粉样前体蛋白 (APP)、 α -突触核蛋白, 由于 B-LCLs 与神经元之间某些基因表达和调节的相似性, B-LCLs 被认为可作为神经系统疾病研究中的替代细胞^[26]。除此之外, 还有一些报道用 B-LCLs 测定 DNA 损伤、修复以及凋亡^[27-28]。Hussain 和 Mulherkar^[20]认为, 这些报道中有将近 65% 以 B-LCLs 为模型进行的研究, 其他 35% 是一些基本病毒学研究。从这些发表的文献中可以看出, B-LCLs 在过去十年中得到了广泛的应用, B-LCLs 在抗体相关领域也得到重要应用 (图 1)。

3 B-LCLs在单克隆抗体生产中的应用

B-LCLs 在免疫遗传学领域也有广泛的应用: EBV 相关疾病的病原学研究、多种遗传疾病的 DNA 或细胞来源、人类基因库的建立、单克隆抗体的制备和作为抗原呈递细胞。利用 B-LCLs 生产单克隆抗体与传统的杂交瘤技术、噬菌体抗体库技术等相比, 最大的优点在于无需进行特异免疫即可利用人类 B 细胞生产低亲和力的抗体, 可在一定程

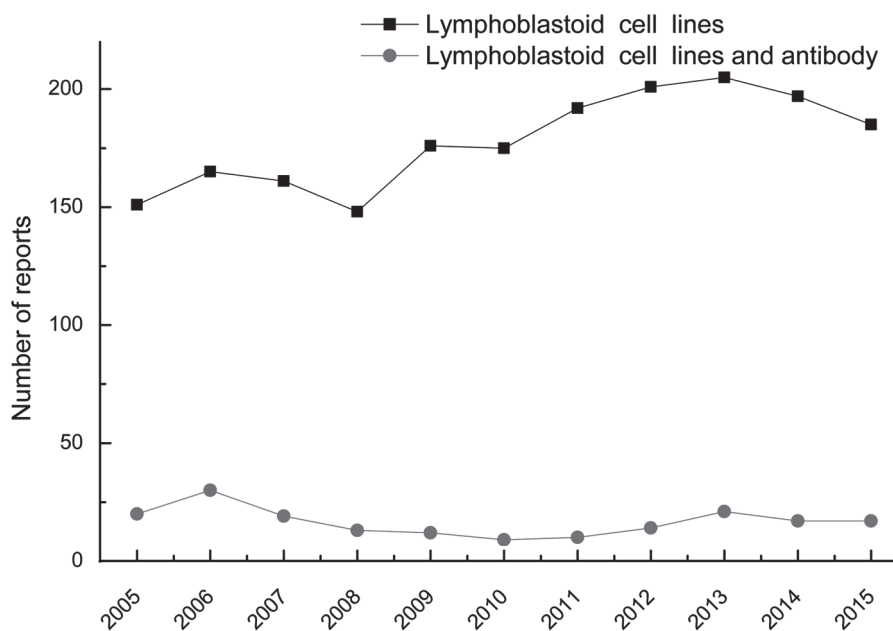


图1 过去十年间B-LCLs在不同研究及抗体相关研究中的应用

度上反映免疫应答的特异性和多样性^[29]。

3.1 单克隆抗体研究进展

从动物或者人类高敏血清中分离的多克隆抗体可以保护机体免受病原菌侵害,这一方法广泛用于疾病的预防和治疗^[30]。1975年,德国科学家 Kohler 和英国科学家 Milstein 利用杂交瘤技术将产生抗体的 B 淋巴细胞同骨髓瘤细胞融合,成功地建立了单克隆抗体制备技术^[31],开创了从多克隆抗体到单克隆抗体的新时代。单克隆抗体具有特异性高、纯度高、理化性质单一、重复性强且可大量生产等优点^[32]。由于单克隆抗体在生命科学领域的巨大贡献,此技术获得 1984 年的诺贝尔生理学或医学奖。

单克隆抗体的发展经历了鼠源抗体、人鼠嵌合抗体、人源化抗体、抗体分子片段等不同的阶段。2000 年以来,随着分子生物学技术的蓬勃发展和免疫学基础研究的深入,转基因小鼠生产人源化抗体技术平台和噬菌体展示等技术的成熟,使全人单克隆抗体制备迅速发展。单克隆抗体作为研究工具极大地促进了生命科学的快速发展,作为一类重要的生物医药产品,如今更是疾病诊断和治疗中不可或缺的有效手段之一。在过去 15 年间, FDA 已经批准了 31 种治疗性单克隆抗体药物,还有另 2 种已经完成 3 期临床,在 FDA 审批阶段;全人单克隆抗体是靶向治疗发展最快,也是最有前景的药物之一。

3.2 B-LCLs在单克隆抗体生产中的应用

目前生产单克隆抗体的方法可以分为:杂交瘤法、抗体展示文库法、B 细胞克隆增殖法和单细胞 PCR 法。B-LCLs 在单克隆抗体制备的不同方法中均有应用,可作为杂交瘤方法中的细胞来源,也可以用于直接生产单克隆抗体,或作为单细胞 RT-PCR 方法中的细胞来源。

Rosen 等^[33]首先发现 EBV 永生化的 B-LCLs 可以在体外产生多克隆抗体。随后,Steinitz 等^[34]发现 EBV 转化的 B-LCLs 产生的抗体具有抗原特异性,这为 B-LCLs 在单克隆抗体生产中的应用奠定了基础。Kozbor 等^[35]将产生抗破伤风毒素抗体的 EBV 转化 B 细胞系 B6 与小鼠骨髓瘤细胞融合,杂交瘤细胞稳定地分泌高于 10 倍亲本细胞的抗破伤风毒素抗体 (IgMκ)。Yu 等^[36]利用电融合技术将骨髓瘤细胞 HMMA 2.5 与 B-LCLs 融合,产生的杂交瘤分泌两种主要呼吸道病原菌的全人单克隆抗体。Smith 等^[37-38]在 CpG、环孢霉素 (cyclosporine) 和 Chk2i 条件下,用 EBV 转化外周血单核细胞 (PBMC),通过 ELISA 及流式细胞术筛选出登革热病毒阳性

细胞系,然后与 HMMA2.5 融合,经验证杂交瘤细胞产生广谱的抗登革热病毒的单克隆抗体。利用杂交瘤技术生产单克隆抗体的主要优点是抗体来源于天然 B 细胞,保留了全长抗体的真实序列和 DNA 配对^[39]。但是,杂交瘤技术还存在很多缺点,如劳动量大、融合率低、操作不方便等。

B 细胞克隆增殖法与杂交瘤技术相比,具有快速高效获得特异性中和抗体、取材方便、劳动量小等优点。虽然 EBV 可以永生外周血 B 细胞,但是存在永生效率低,抗体产量低等问题^[34]。Traggiai 等^[40]发现添加 CpG 可以提高转化效率,同时通过磁珠和流式分选出 IgG⁺ 记忆 B 细胞,在 CpG 和饲养细胞的条件下,EBV 永生 B 细胞,待 B-LCLs 大量增殖,直接筛选中和活性的 SARS 冠状病毒抗体,提供了一种从免疫供体记忆细胞库中快速高效筛选中和抗体的方法。随后,Traggiai^[41]又详述了这一方法在 B 细胞库分析及单克隆抗体的制备中的应用。同样地,Simmons 等^[42]通过流式分选 CD22⁺IgM⁺IgD⁺IgA⁺B 细胞,在 CpG 和饲养细胞条件下,EBV 永生 B 细胞,14 d 后检测上清中 H5N1 禽流感病毒的中和抗体活性。之后,富集培养具有中和活性的 B 细胞克隆,纯化并验证该中和抗体在小鼠中的预防和治疗效果。Wang 等^[43]通过大规模筛选 B-LCLs 悬浮物中 HA 的中和活性,生产 H1N1 流感病毒的中和抗体。Harada 等^[44]利用 IL-6、CpG 和 CD40L 刺激 EBV 永生化的 B 细胞,使其作为体外免疫的宿主细胞生产抗原特异性的抗体。利用 B-LCLs 单克隆抗体可以快速产生大量抗体,产生的抗体可用于体外功能实验,如中和实验和生产自身免疫疾病相关抗体,避免抗原的自身反应性危害^[29]。然而,利用 EBV 永生 B 细胞产生抗体的最大问题在于分离纯化抗体用于人类治疗^[45]。根据国际标准治疗性抗体的生产细胞不能含有 EBV 及其他人类病毒。此外,B-LCLs 产生的抗体并不稳定,目前虽有实验室研究进展,但临床进展缓慢。

利用单细胞 RT-PCR 法将 IgG 的重链和轻链基因分别克隆至表达载体,然后转入细胞进行纯化分离,从而生产单克隆抗体是 2008 年以来的一个研究热点^[46-48],但是这种方法存在一些问题,如 B 细胞数目少,得到的 IgG 量很少,过程繁琐且工作量大,产生的可能并不是目的抗体^[49]。此外,在靶向抗原未知或不可用时,用标记的抗原分选 B 细胞并不可行^[50]。由于 B-LCLs 可以大量增殖,且产生针对特定抗原的抗体,B-LCLs 代替 B 细胞进行 RT-

PCR 实验可以极大地提高效率和减少工作量。Warter 等^[51]结合了 B 细胞克隆增殖法和单细胞 RT-PCR 法, EBV 感染激活 CD19⁺ B 细胞后, 根据结合和中和实验, 单克隆化基孔肯雅病毒抗体阳性的 B 细胞群, 直接 RT-PCR 获得抗体的重链和轻链基因, 克隆至质粒 pPMhIgG1 共转染 HEK293TPM1 细胞, 通过一系列功能实验验证其具有广谱中和活性。Hu 等^[52]在 EBV 转化和单克隆化后, RT-PCR 扩增 VH、Vk 和 Vλ 基因分别插入载体卡盒 pMT/Bip/γ1、pMT/Bip/κ1 和 pMT/Bip/λ1 构建重链和轻链的基因文库, 并验证其广谱中和活性。Maskus 等^[53]在 EBV 转化后将 IgG 重链和轻链可变区克隆至植物表达载体, 转染烟草, 并验证纯化裂殖子表面蛋白 10 (MSP10) 抗体的特异性和亲和力。Nogales-Gadea 等^[54]以方法学的形式描述了从 PBMC 中获得人 IgG 单克隆抗体的方法。B-LCLs 作为单细胞 RT-PCR 方法中的细胞来源, 不仅可以分泌大量抗体, 而且持续表达 BCR; 同时可以用不同方法筛选抗原特异性细胞, 且尚未发现 EBV 永生化 B 细胞发生体细胞突变的证据^[50]。

目前充分发掘人的抗体基因储库获得抗体基因研究方法众多。从人的免疫系统获得抗体基因, 称之为天然储库, 开发手段有杂交瘤技术、B 细胞克隆增殖技术、单细胞 RT-PCR 技术及各种展示技术。另有人工合成抗体库, 可以用噬菌体展示等技术筛选, 有报道可不经筛选, 利用生物信息学分析抗体重链、轻链在浆细胞的表达频率, 通过配对抗体重链和轻链, 获得特异性的单克隆抗体的方法^[55]。

利用 B-LCLs 生产单克隆抗体在实验室研究阶段已经取得极大进展, 但是不同方法仍存在一些亟待解决的问题, 仍需要充分发掘人的抗体基因储库获得抗体基因。因此, 建成 B-LCLs 及实现 B-LCLs 的单克隆化培养是利用 B-LCLs 生产单克隆抗体的最基本条件, 也是建立应用 B-LCLs 制备单克隆抗体平台的基础性工作。

4 结论与展望

B-LCLs, 与母本淋巴细胞在分子和功能上都 很相似, 作为生物分子资源广泛应用于免疫学和流行病学研究中。然而, 不同实验室建立 B-LCLs 的实验条件和方法不同, 因此, 有必要对 EBV 永生化外周血 B 淋巴细胞过程进行优化, 建立一整套相对标准化的建系流程, 这对于体外利用和研究 B 淋巴细胞具有重要理论意义和实际应用价值, 有利于

B-LCLs 作为一种研究模型在遗传免疫等生物学领域中的应用, 有利于利用 B-LCLs 生产单克隆抗体。

[参 考 文 献]

- [1] Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, 1964, 1: 702-3
- [2] Munz C. Dendritic cells during Epstein Barr virus infection. *Front Microbiol*, 2014, 5: 308
- [3] Developing a vaccine for the Epstein-Barr virus could prevent up to 200,000 cancers globally say experts, 2014 [EB/OL]. www.cancerresearchuk.org.
- [4] Kuppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3: 801-12
- [5] Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, et al. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol*, 1987, 6: 1416-20
- [6] Borza CM, Hutt-Fletcher LM. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, 2002, 8: 594-9
- [7] Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 757-68
- [8] Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, et al. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*, 1995, 80: 389-99
- [9] Gewurz BE, Mar JC, Padi M, et al. Canonical NF-κB activation is essential for Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 TES2/CTAR2 gene regulation. *J Virol*, 2011, 85: 6764-73
- [10] Dolcetti R, Giunco S, Dal Col J, et al. Epstein-Barr virus and telomerase: from cell immortalization to therapy. *Infect Agent Cancer*, 2014, 9: 8
- [11] Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2001, 1: 75-82
- [12] Kempkes B, Robertson ES. Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Curr Opin Virol*, 2015, 14: 138-44
- [13] Longnecker R. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res*, 2000, 79: 175-200
- [14] Price AM, Luftig MA. Dynamic Epstein-Barr virus gene expression on the path to B-cell transformation. *Adv Virus Res*, 2014, 88: 279-313
- [15] Gordadze AV, Onunwor CW, Peng R, et al. EBNA2 amino acids 3 to 30 are required for induction of LMP-1 and immortalization maintenance. *J Virol*, 2004, 78: 3919-29
- [16] Wang L, Grossman SR, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 430-5
- [17] Mohyuddin A, Ayub Q, Siddiqi S, et al. Genetic instability in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Biochim*

- Biophys Acta, 2004, 1670: 81-3
- [18] Sugimoto M, Tahara H, Ide T, et al. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*, 2004, 64: 3361-4
- [19] Sie L, Loong S, Tan EK. Utility of lymphoblastoid cell lines. *J Neurosci Res*, 2009, 87: 1953-9
- [20] Hussain T, Mulherkar R. Lymphoblastoid cell lines: a continuous *in vitro* source of cells to study carcinogen sensitivity and DNA repair. *Int J Mol Cell Med*, 2012, 1: 75-87
- [21] Kassaoui K, Habbe N, Mullendore ME, et al. Mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer*, 2006, 37: 57-64
- [22] Wu RM, Bounds R, Lincoln S, et al. Parkin mutations and early-onset parkinsonism in a Taiwanese cohort. *Arch Neurol*, 2005, 62: 82-7
- [23] Lockhart PJ, Lincoln S, Hulihan M, et al. DJ-1 mutations are a rare cause of recessively inherited early onset parkinsonism mediated by loss of protein function. *J Med Genet*, 2004, 41: e22
- [24] Hand CK, Devon RS, Gros-Louis F, et al. Mutation screening of the ALS2 gene in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, 2003, 60: 1768-71
- [25] Hu VW, Frank BC, Heine S, et al. Gene expression profiling of lymphoblastoid cell lines from monozygotic twins discordant in severity of autism reveals differential regulation of neurologically relevant genes. *BMC Genomics*, 2006, 7: 118
- [26] Arosio B, Annoni G, Vergani C, et al. Fibroblasts from Alzheimer's disease donors do not differ from controls in response to heat shock. *Neurosci Lett*, 1998, 256: 25-8
- [27] Kennedy DO, Agrawal M, Shen J, et al. DNA repair capacity of lymphoblastoid cell lines from sisters discordant for breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97: 127-32
- [28] Thierfelder N, Demuth I, Burghardt N, et al. Extreme variation in apoptosis capacity amongst lymphoid cells of Nijmegen breakage syndrome patients. *Eur J Cell Biol*, 2008, 87: 111-21
- [29] Fraussen J, Vrolix K, Martinez-Martinez P, et al. A novel method for making human monoclonal antibodies. *J Autoimmun*, 2010, 35: 130-4
- [30] Keller MA, Stiehm ER. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13: 602-14
- [31] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 495-7
- [32] 刘萍, 陈苗苗, 刘学荣, 等. 单克隆抗体研究进展. *中国畜牧兽医*, 2012, 39: 67-70
- [33] Rosen A, Gergely P, Jondal M, et al. Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of human lymphocytes *in vitro*. *Nature*, 1977, 267: 52-4
- [34] Steinitz M, Klein G, Koskimies S, et al. EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*, 1977, 269: 420-2
- [35] Kozbor D, Roder JC, Chang TH, et al. Human anti-tetanus toxoid monoclonal antibody secreted by EBV-transformed human B cells fused with murine myeloma. *Hybridoma*, 1982, 1: 323-8
- [36] Yu XC, McGraw PA, House FS, et al. An optimized electrofusion-based protocol for generating virus-specific human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*, 2008, 336: 142-51
- [37] Smith SA, Zhou Y, Olivarez NP, et al. Persistence of circulating memory B cell clones with potential for dengue virus disease enhancement for decades following infection. *J Virol*, 2012, 86: 2665-75
- [38] Smith SA, de Alwis AR, Kose N, et al. Isolation of dengue virus-specific memory B cells with live virus antigen from human subjects following natural infection reveals the presence of diverse novel functional groups of antibody clones. *J Virol*, 2014, 88: 12233-41
- [39] Smith SA, Crowe JE Jr. Use of human hybridoma technology to isolate human monoclonal antibodies. *Microbiol Spectr*, 2015, 3: AID-0027-2014
- [40] Traggiai E, Becker S, Subbarao K, et al. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med*, 2004, 10: 871-5
- [41] Traggiai E. immortalization of human B cells: analysis of B cell repertoire and production of human monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol*, 2012, 901: 161-70
- [42] Simmons CP, Bernasconi NL, Suguitan AL, et al. Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza. *PLoS Med*, 2007, 4: e178
- [43] Wang H, Ma C, Lu Y, et al. Generation of human neutralizing monoclonal antibodies against the 2009 pandemic H1N1 virus from peripheral blood memory B lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, 2013, 10: 403-12
- [44] Harada G, Matsumoto SE, Yamashita M, et al. *In vitro* immunization of Epstein-Barr virus-immortalized B cells augments antigen-specific antibody production. *Cytotechnology*, 2013, 65: 979-83
- [45] Glukhova XA, Prusakova OV, Trizna JA, et al. Updates on the production of therapeutic antibodies using human hybridoma technique. *Curr Pharm Des*, 2016, 22: 870-8
- [46] Wrammert J, Smith K, Miller J, et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*, 2008, 453: 667-71
- [47] Smith K, Garman L, Wrammert J, et al. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nat Protoc*, 2009, 4: 372-84
- [48] Hu W, Chen A, Miao Y, et al. Fully human broadly neutralizing monoclonal antibodies against influenza A viruses generated from the memory B cells of a 2009 pandemic H1N1 influenza vaccine recipient. *Virology*, 2013, 435: 320-8
- [49] Huang J, Doria-Rose NA, Longo NS, et al. Isolation of human monoclonal antibodies from peripheral blood B cells. *Nat Protoc*, 2013, 8: 1907-15
- [50] Corti D, Lanzavecchia A. Efficient methods to isolate human monoclonal antibodies from memory B cells and

- plasma cells. *Microbiol Spectr*, 2014, 2: AID-0018-2014
- [51] Warter L, Lee CY, Thiagarajan R, et al. Chikungunya virus envelope-specific human monoclonal antibodies with broad neutralization potency. *J Immunol*, 2011, 186: 3258-64
- [52] Hu H, Voss J, Zhang G, et al. A human antibody recognizing a conserved epitope of H5 hemagglutinin broadly neutralizes highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses. *J Virol*, 2012, 86: 2978-89
- [53] Maskus DJ, Bethke S, Seidel M, et al. Isolation, production and characterization of fully human monoclonal antibodies directed to *Plasmodium falciparum* MSP10. *Malar J*, 2015, 14: 276
- [54] Nogales-Gadea G, Saxena A, Hoffmann C, et al. Generation of recombinant human IgG monoclonal antibodies from immortalized sorted B cells. *J Vis Exp*, 2015, (100): e52830
- [55] Reddy ST, Ge X, Miklos AE, et al. Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 965-9