

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG DÒNG TẾ BÀO LAI A6G11C9 ĐỂ SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG GÂY NGUNG KẾT HỒNG CẦU CHỨA KHÁNG NGUYÊN A

Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

TÓM TẮT: Hầu hết các huyết thanh mẫu định nhóm máu hệ ABO đang lưu hành trên thị trường đều có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng. Các kháng thể đơn dòng được sản xuất bởi các dòng tế bào lai theo phương pháp nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy hoặc nuôi tế bào trong xoang bụng chuột để tạo dịch băng chứa kháng thể. Trước đây, chúng tôi đã tạo được dòng tế bào lai A6G11C9 sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu kháng nguyên A trên màng hồng cầu. Tế bào lai này được hình thành bằng cách dung hợp giữa tế bào lymphocyte B chuột sinh kháng thể kháng A với tế bào myeloma sp2/0 chuột. Kháng thể sinh ra từ dòng tế bào lai A6G11C9 đã được chứng minh là gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu mang kháng nguyên A với cường độ cao. Dòng tế bào này sinh trưởng và sinh kháng thể ổn định khi thử nghiệm qua các đời nuôi cấy. Việc nghiên cứu hoàn thiện quy trình để sản xuất một lượng lớn kháng thể theo phương pháp nuôi cấy trong môi trường với hiệu quả cao và ổn định được công bố trong công trình này. Đầu tiên, tế bào lai đang lưu giữ đông lạnh được nuôi cấy để đánh thức tế bào. Sau đó, chúng được cấy truyền lần thứ nhất để tạo đủ sinh khối phục vụ nuôi lượng lớn hơn. Sinh khối tế bào tiếp tục được cấy truyền lần thứ 2 vào môi trường DMEM chứa 10% huyết thanh bê trong thời gian 10 ngày. Dịch nuôi tế bào lai chứa kháng thể được thu lại bằng cách li tâm để loại bỏ tế bào trong dịch nuôi. Hàm lượng kháng thể trong dịch nuôi được cô đặc và loại bỏ chất chỉ thị màu phenol đỏ trong môi trường nuôi bằng cách tủa với NH_4SO_4 50% bão hòa. Dịch nuôi cấy tế bào đã cô đặc 5 lần phản ứng ngưng kết tốt với hồng cầu chứa kháng nguyên A. 150 ml dung dịch kháng thể cô đặc đã được sản xuất. Hiệu quả kháng thể trong dịch nuôi cấy cô đặc 5 lần là 1/512. Cường độ phản ứng ngưng kết hồng cầu A của dịch nuôi cấy cô đặc 5 lần là 4+.

Từ khóa: Hiệu giá kháng thể, kháng thể đơn dòng kháng A, nhóm máu A, nhóm máu AB, tế bào lai

MỞ ĐẦU

Truyền máu là dịch vụ không thể thiếu tại bất kỳ một bệnh viện nào. Để đảm bảo an toàn trong truyền máu nhóm máu của người cho và người nhận cần được kiểm tra và kết luận là tương thích. Để định nhóm máu bằng phương pháp huyết thanh mẫu cần có bộ huyết thanh chuẩn. Toàn bộ huyết thanh mẫu đang được sử dụng ở Việt Nam đều được nhập khẩu từ nước ngoài. Ở Việt Nam, nhóm nghiên cứu tại Viện Công nghệ sinh học đã tạo được tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng A và tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng B (Nguyễn Thị Trung và nnk., 2016).

Có thể sử dụng phương pháp in vivo hoặc in vitro để sản xuất các kháng thể đơn dòng từ dòng tế bào lai. Trước những năm 1990 phương pháp in vivo được sử dụng rộng rãi để sản xuất kháng thể đơn dòng. Đây là phương pháp khá đơn giản trong thao tác, rẻ tiền và thu được hàm lượng kháng thể cao (Kohler & Meilstein, 1975;

Bruce et al., 2002). Nhưng ngày nay, phương pháp in vitro được sử dụng rộng rãi để sản xuất trên 90% các loại kháng thể đơn dòng phục vụ cho nhu cầu nghiên cứu, chẩn đoán và điều trị. Phương pháp này không cần sử dụng chuột làm vật chủ cho tế bào sinh trưởng, không cần tinh sạch để loại bỏ kháng thể chuột nhiễm vào kháng thể trong quá trình sản xuất (Peterson & Peavey, 1998). Thông thường thì tế bào lai được nuôi trong môi trường có huyết thanh bào thai bò (nồng độ khoảng 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Điều này dẫn đến có kháng thể miễn dịch bò trong sản phẩm kháng thể (Darby et al., 1993). Để khắc phục hoặc hạn chế nhược điểm này, một số công ty đã phát triển môi trường không sử dụng huyết thanh để nuôi cấy tế bào lai (Federspiel et al., 1991; Tarleton & Beyer, 1991; Velez et al., 1986).

Công trình này công bố quy trình nuôi cấy tế bào lai A6G11C9 để thu được kháng thể với hàm lượng cao nhất. Dung dịch NH_4SO_4 nồng

độ cuối cùng là 50% bão hòa được dùng để tủa kháng thể kháng A trong dịch nuôi cấy. Kháng thể kháng A trong dịch nuôi cấy được cô đặc 5 lần có hiệu giá kháng thể là 1/512 và cường độ phản ứng ngưng kết hồng cầu A là 4+.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Bộ hồng cầu mẫu gồm: hồng cầu mẫu A (5%), hồng cầu mẫu B (5%), hồng cầu mẫu O (5%) sử dụng để kiểm tra độ đặc của kháng thể đơn dòng tạo ra được mua từ Viện huyết học và truyền máu Trung ương.

Dòng tế bào lai A6G11C9 là sản phẩm của đề tài KC04.13/11-15 được sử dụng để nghiên cứu sản xuất kháng thể đơn dòng kháng A.

Bộ huyết thanh mẫu gồm anti-A, anti-B, anti-AB được mua của công ty Biorad (Pháp) làm đối chứng dương trong các thí nghiệm nghiên cứu.

Môi trường DMEM (Gibco, Mỹ); Huyết thanh bê FBS, các hóa chất khác được mua từ hãng Merck, Đức.

Phương pháp nuôi cấy tế bào để thu kháng thể

Một đợt nuôi cấy tế bào lai để thu nhận kháng thể sẽ sử dụng một ống giống tế bào lai bảo quản trong nitơ lỏng (-196°C). Tế bào được nuôi cấy theo quy trình sau:

Phục hồi tế bào: Ống giống tế bào (mật độ $2,5 \cdot 10^6$ tế bào/ml) bảo quản trong nitơ lỏng được chuyển vào bể ổn nhiệt ở nhiệt độ 37°C để rã đông. Khi ống tế bào đã tan đá hoàn toàn, khử trùng phía ngoài ống bằng cồn 70%, sau đó chuyển toàn bộ tế bào trong ống giống sang falcon 15 ml đã chứa 10 ml môi trường DMEM. Ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút để thu cặn tế bào. Cặn tế bào được hòa vào 5 ml môi trường DMEM + 10% FBS và chuyển vào chai T25 cm², tế bào được nuôi ở 37°C, 5% CO₂, thời gian 24 giờ.

Cấy truyền lần 1: Tế bào lai đã sinh trưởng và tạo thành một lớp đơn liên tục trên bề mặt chai T25 cm² sau 24 giờ tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 5%CO₂. Tế bào được thu lại bằng ly tâm và tạo huyền phù trong môi trường DMEM+10% FBS sao cho mật độ tế bào ban đầu là 10⁵ tế bào/ml, chuyển sang chai T75 cm². Tế bào được nuôi ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂

trong thời gian 48 giờ.

Cấy truyền lần 2: Sau 48 giờ sau cấy truyền lần 1, tế bào được cấy truyền một lần nữa với tỷ lệ cấy truyền 1/10 trong môi trường DMEM+10% FBS. Tế bào được nuôi ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂ trong thời gian 10 ngày.

Thu nhận kháng thể: Dịch nuôi được ly tâm 5000 vòng/phút để loại bỏ cặn tế bào. Thu dịch nổi, chuyển vào chai duran 1000 ml, bổ sung NaN₃ nồng độ cuối cùng là 0,01%, bảo quản kháng thể ở nhiệt độ 2-8°C.

Phương pháp ngưng kết hồng cầu

Phương pháp chuẩn bị hồng cầu: Chuyển toàn bộ dung dịch hồng cầu mẫu 5% trong lọ thủy tinh vào ống falcon 15 ml, ly tâm 1000 vòng/phút, 10 phút. Loại bỏ dịch nổi, thu cặn hồng cầu và tái huyền phù vào 10 ml NaCl 0,9%, ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi, thu cặn hồng cầu. Lặp lại bước này 3 lần cho đến khi rửa hết sắc tố do hồng cầu vỡ giải phóng ra. Pha hồng cầu về nồng độ 1%, 2%, 5% hoặc 10% tùy theo mục đích sử dụng bằng NaCl 0,9%.

Phản ứng ngưng kết hồng cầu trong các giếng đáy V/U của phiến nhựa: 25 µl dịch nuôi cấy tế bào/huyết thanh mẫu/kháng thể được chuyển vào một giếng của đĩa 96 giếng, bổ sung 25 µl hồng cầu mẫu 1-2%, lắc nhẹ và để ở nhiệt độ phòng 30 phút. Đọc kết quả bằng cách nghiêng đĩa 45 độ.

Phản ứng ngưng kết hồng cầu trên phiến kính/đá men: Chọn 3 vị trí ngang hàng trên phiến kính cách nhau khoảng 5-6 cm. Nhỏ vào mỗi vị trí một giọt hồng cầu mẫu 10% theo thứ tự: vị trí 1 là hồng cầu mẫu A, vị trí 2 là hồng cầu mẫu B, vị trí 3 là hồng cầu mẫu O. Nhỏ thêm một giọt dịch nuôi cấy/huyết thanh mẫu/kháng thể vào 3 vị trí hồng cầu mẫu ở trên. Dùng que thủy tinh trộn đều, lắc nhẹ phiến kính liên tục trong vòng 2-3 phút, đọc và ghi kết quả.

Phương pháp xác định độ đặc hiệu của kháng thể

Độ đặc hiệu của kháng thể (hoặc dịch nuôi cấy tế bào) được xác định bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu với các loại hồng cầu mẫu A, B và O. Thực hiện theo quy định tại Thông tư 26/2013-TT-BYT, 29/3/2013, xác định độ đặc

hiệu kháng thể bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu trên đĩa men hoặc phiến kính. Quan sát và đọc kết quả.

Phương pháp xác định hiệu giá kháng thể

Theo hướng dẫn của WHO (2006) hiệu giá kháng thể là độ pha loãng cao nhất mà tại đó phản ứng ngưng kết hồng cầu vẫn còn quan sát được. Xác định hiệu giá kháng thể bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu trên đĩa 96 giếng, đáy chữ V. Một mẫu tiên hành trên một hàng của 1 đĩa 96 đáy chữ V. Nhỏ vào mỗi giếng của đĩa 25 μ l nước muối sinh lý. Đối với mẫu 1: bổ sung 25 μ l dịch nuôi cấy vào giếng đầu tiên của cột 1, trộn đều với nước muối sinh lý trong giếng (dịch nuôi cấy bị pha loãng 1/2); sau đó chuyển 25 μ l từ giếng đầu sang giếng thứ 2 (dịch nuôi cấy bị pha loãng 1/4), làm tương tự cho đến giếng cuối của hàng đó bỏ đi 25 μ l; Đối chứng dương là huyết thanh mẫu (Biorad) và đối chứng âm là môi trường DMEM + 10% FBS. Bổ sung 25 μ l hồng cầu mẫu 2% vào mỗi giếng, trộn đều và để ở nhiệt độ phòng 30 phút, quan sát kết quả bằng cách nghiêng đĩa 30°.

Phương pháp loại phenol đỏ ra khỏi dịch nuôi cấy

Dịch nuôi cấy tế bào lai được bằng NH_4SO_4 đến nồng độ 50% bão hòa: Bổ sung từ từ dung dịch NH_4SO_4 100% bão hòa vào dịch nuôi cấy tế bào lai theo tỷ lệ 1:1, sử dụng khuấy từ để trộn đều NH_4SO_4 và dịch nuôi cấy (tiên hành ở 4°C). Sau khi bổ sung hết lượng NH_4SO_4 100% thì hỗn hợp dung dịch tủa được để ở 4°C trong thời gian 3 giờ. Ly tâm 8000 vòng/phút trong 20 phút để thu tủa. Rửa tủa 2 lần với NH_4SO_4 50% bão hòa, tái huyền phù trong PBS 1x (0,01% NaN_3) với thể tích bằng 1/10 thể tích ban đầu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu loại bỏ phenol đỏ trong dịch nuôi chứa kháng thể

Môi trường DMEM (Gibco, Hoa Kỳ) chứa chất chỉ thị là phenol đỏ được sử dụng trong nuôi cấy tế bào lai, nuôi cấy tế bào để sản xuất kháng thể. Màu đỏ trong môi trường nuôi cấy sẽ giảm dần theo thời gian nuôi (hình 1). Trong quá trình nuôi cấy, sự trao đổi chất của các tế bào làm sản sinh các hợp chất thứ cấp có tính

axit nên môi trường bị axit hóa. Mặt khác mật độ tế bào quá cao, nuôi cấy trong thời gian dài và trong điều kiện nồng độ O_2 thấp dẫn đến sản sinh axit lactic cũng dẫn đến môi trường bị axit. Phenol đỏ sẽ bị chuyển từ màu đỏ đến màu vàng khi pH của môi trường nuôi giảm từ cao đến thấp (chuyển từ bazơ sang axit).

Để loại bỏ phenol đỏ phương pháp đơn giản nhất là tủa bằng NH_4SO_4 . Dịch nuôi cấy chứa kháng thể được tủa với NH_4SO_4 ở các nồng độ bão hòa là 30%, 40%, 50%, 60%, 70% để tìm nồng độ mà tại đó kháng thể tủa nhiều nhất. Cả tủa và dịch nổi được thu lại để thực hiện phản ứng ngưng kết hồng cầu nhằm xác định nồng độ NH_4SO_4 bão hòa mà tại đó lượng kháng thể tủa nhiều nhất (hình 2).

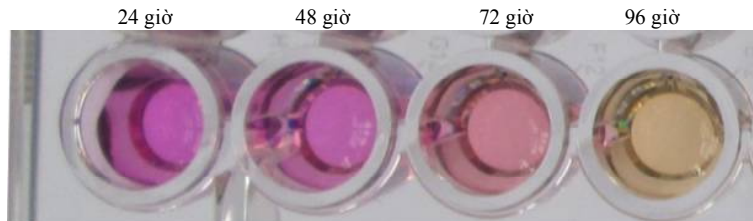
Kết quả ở hình 2 cho thấy, gần như không có hiện tượng ngưng kết xảy ra đối với dịch kháng thể khi tủa ở nồng độ NH_4SO_4 30% bão hòa, trong khi dịch nổi lại gây ngưng kết hồng cầu mẫu A. Điều này chứng tỏ kháng thể kháng A không bị NH_4SO_4 tủa ở nồng độ 30% bão hòa. Ở nồng độ NH_4SO_4 40% bão hòa phần lớn kháng thể kháng A đã được tủa thể hiện là cả dịch hòa cạn tủa và dịch nổi đều gây ngưng kết hồng cầu mẫu A. Tuy nhiên, phần dịch nổi chỉ chứa khá ít kháng thể do kết quả phản ứng ngưng kết hồng cầu xảy ra với cường độ yếu. Ở các nồng độ NH_4SO_4 50%, 60% và 70% bão hòa phản ứng ngưng kết hồng cầu chỉ xảy ra ở dịch hòa tủa mà không xảy ra ở dịch nổi. Điều này chứng tỏ kháng thể đã được tủa gần như hoàn toàn ở nồng độ NH_4SO_4 50% bão hòa.

Để thấy rõ khả năng loại bỏ phenol bằng phương pháp tủa NH_4SO_4 50% bão hòa, một lượng nhỏ dịch nuôi được thu lại sau khi tế bào phát triển đến pha log. Thời điểm này dịch nuôi vẫn còn màu đỏ của chỉ thị phenol đỏ rõ ràng. Quy trình xử lý tủa được thực hiện như đã trình bày ở phần phương pháp. Tủa chứa kháng thể được hoàn nguyên trong dịch PBS (hình 2).

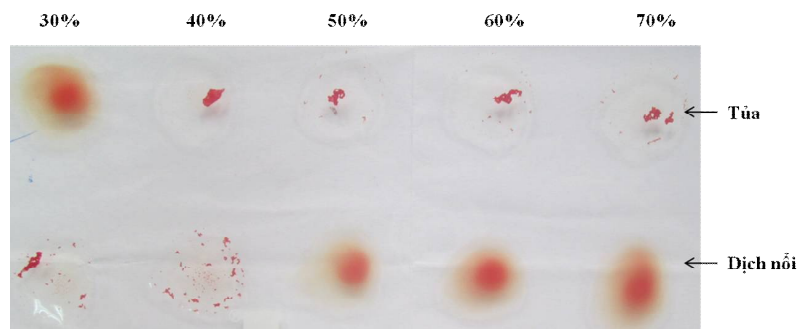
Dịch nuôi được thu lại có màu hồng vàng, làm ảnh hưởng đến khả năng quan sát sự ngưng kết hồng cầu (hình 2A). Đặc biệt với các hồng cầu chứa kháng nguyên yếu màu của phenol đỏ có thể cản trở việc đọc chính xác kết quả. Bên cạnh đó, chất chỉ thị này còn bị thay đổi màu sắc khi hòa trong dịch chứa pH khác

nhau. Cặn thu được sau khi rửa với NH_4SO_4 50% bão hòa vẫn còn màu hồng vàng (hình 2B), được rửa 2 lần bằng NH_4SO_4 50% bão hòa thì màu hồng giảm đi (hình 2C). Rửa được hoàn nguyên vào dung dịch PBS chứa 0,01% NaN_3 ,

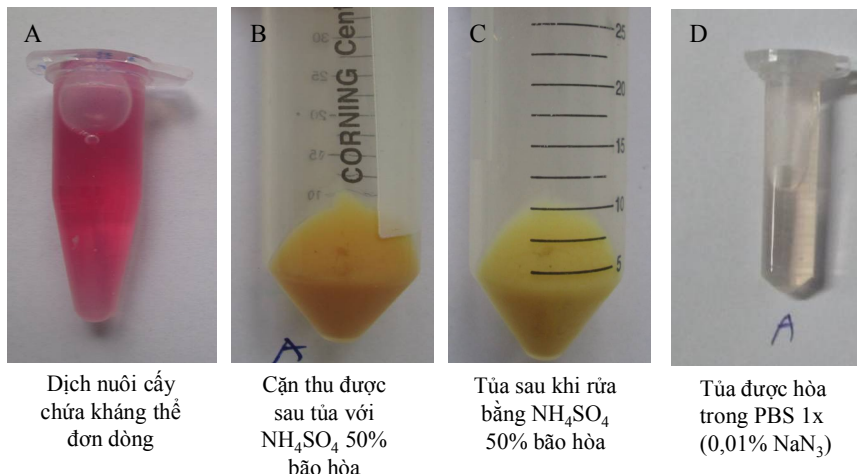
pH=7,4 (hình 2D) tạo thành dung dịch không màu và trong suốt. Bằng phương pháp rửa bởi NH_4SO_4 50% bão hòa đã loại bỏ được chất chỉ thị phenol đỏ khỏi dịch nuôi cấy .



Hình 1. Sự thay đổi màu sắc môi trường nuôi cấy tế bào A6G11C9 theo thời gian nuôi



Hình 2. Phản ứng ngưng kết hồng cầu của dịch kháng thể rửa ở nồng độ NH_4SO_4 bão hòa khác nhau với hồng cầu mẫu A



Hình 3. Loại phenol đỏ trong dịch nuôi tế bào để thu dịch kháng thể

Xác định thể tích hoàn nguyên kháng thể thích hợp

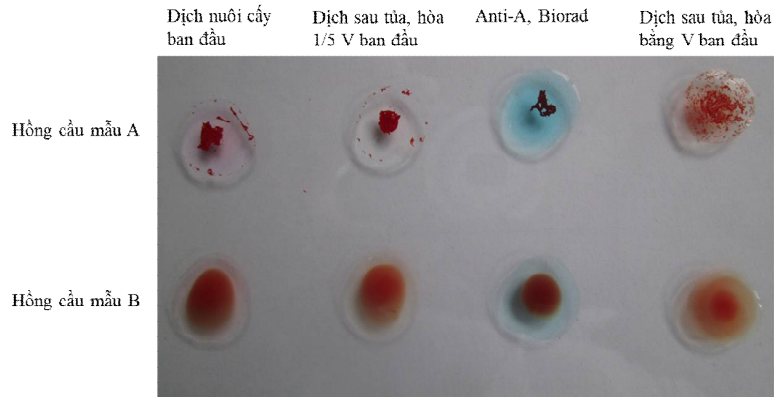
Kháng nguyên sau khi hoàn nguyên trong PBS 1x (0,01% NaN_3) được kiểm tra khả năng gây ngưng kết hồng cầu mẫu A và hồng cầu

mẫu B (hình 4).

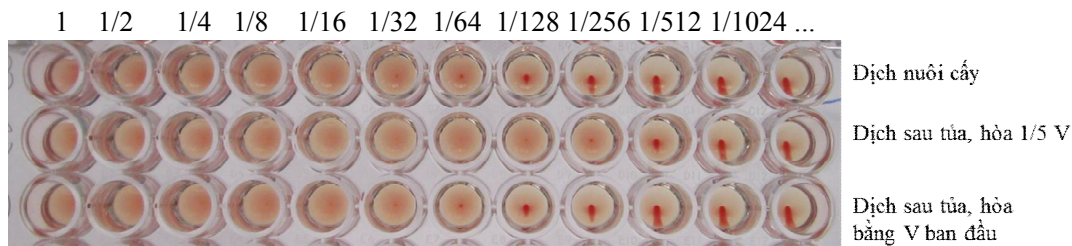
Kết quả ở hình 4 cho thấy, kháng thể trong dịch nuôi cấy chỉ gây ngưng kết hồng cầu A mà không gây ngưng kết hồng cầu B. Sau khi loại phenol đỏ, rửa chứa kháng thể được hoàn

nguyên về thể tích bằng với ban đầu hoặc 1/5 thể tích ban đầu. Khi dịch kháng thể không được cô đặc hay pha loãng sau khi loại phenol có cường độ phản ứng ngưng kết yếu hơn dịch nuôi cấy. Nhưng với dịch kháng thể được cô đặc 5 lần, cường độ ngưng kết mạnh hơn so với

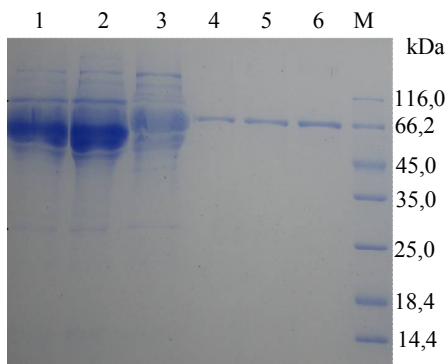
dịch nuôi. Đã thu được 700 ml dịch nuôi cấy tế bào A6G11C9 và rửa bằng NH_4SO_4 50% bão hòa để loại bỏ phenol đỏ và cô đặc kháng thể đơn dòng. Kết quả thu được 150 ml dung dịch kháng thể kháng A.



Hình 4. Phản ứng ngưng kết hồng cầu của kháng thể kháng A trước và sau khi

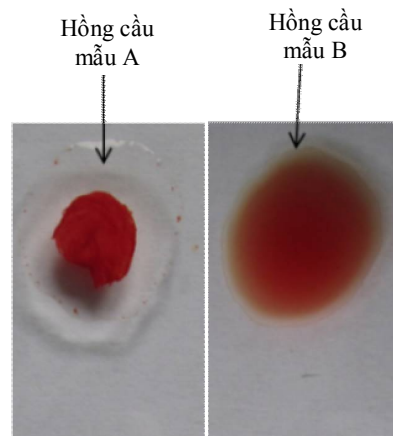


Hình 5. Hiệu giá kháng thể kháng A trước và sau khi rửa NH_4SO_4



Hình 6. Kết quả điện di dịch chứa kháng thể đặc hiệu kháng A trên SDS-PAGE để xác định hàm lượng kháng thể đặc hiệu

Đường chạy 1: Môi trường DMEM+10%FBS; 2: Dịch nuôi tế bào lai; 3: Dịch kháng thể hoàn nguyên nguyên thể tích, 4-6: BSA tương ứng với nồng độ 30-50 $\mu\text{g/ml}$; M: Marker.



Hình 7. Cường độ phản ứng ngưng kết hồng cầu của kháng thể kháng A

Xác định hiệu giá kháng thể

Dịch kháng thể chuẩn bị ở trên được xác định hiệu giá kháng thể để xem mức độ phản ứng ngưng kết của từng loại dịch kháng thể đối với hồng cầu A (hình 5).

Kết quả ở hình 5 đã chỉ ra hiệu giá kháng thể trong dịch cô đặc và dịch nuôi như nhau, đều đạt 1/128. Nhưng hiệu giá kháng thể ở dịch cô đặc 5 lần là 1/512, tăng 4 lần so với hiệu giá kháng thể ở dịch nuôi. Qua kết quả này có thể kết luận việc sử dụng NH_4SO_4 để tủa kháng thể trong dịch nuôi không làm ảnh hưởng đến khả năng gây ngưng kết hồng cầu của kháng thể. Đồng thời quy trình tủa kháng thể làm kháng thể bị hao hụt một lượng không đáng kể.

Điện di SDS-PAGE kiểm tra các protein trong dịch kháng thể

Đối với cùng một kháng thể ở các thí nghiệm khác nhau nhưng có hiệu giá như nhau với hàm lượng kháng thể giống nhau trong các dịch. Nhưng kết quả ở hình 4 cho thấy, cường độ kháng thể trong dịch hoàn nguyên thể tích yếu hơn so với dịch nuôi. Vậy thành phần nào trong dịch nuôi cấy đã ảnh hưởng đến cường độ của phản ứng ngưng kết hồng cầu? Các dung dịch được điện di trên SDS-PAGE để kiểm tra các thành phần có trong đó (hình 6)

Kết quả ở hình 6 cho thấy, hàm lượng BSA trong dịch kháng thể giảm rõ rệt sau tủa. BSA được biết là một yếu tố có tác dụng làm giảm zeta điện thế màng tế bào hồng cầu, làm tăng sự gắn kết giữa hồng cầu với kháng thể nên làm cho tế bào hồng cầu dễ bị ngưng kết hơn (Pollack & Reckel, 1977). Vì vậy, hàm lượng BSA giảm đi đã làm giảm cường độ của phản ứng giữ kháng thể kháng A và hồng cầu mang kháng nguyên A.

Xác định cường độ phản ứng kháng thể

Dung dịch kháng thể được cho phản ứng với hồng cầu mẫu 10% theo như phương pháp đã trình bày (hình 7). Kết quả kháng thể đã gây ngưng kết hoàn toàn hồng cầu mẫu A tạo thành một đám duy nhất, dịch xung quanh trong. Cường độ phản ứng ngưng kết hồng cầu A là 4+, trong khi dịch kháng thể này không gây ngưng kết hồng cầu mẫu B.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được, có thể rút ra kết luận:

Quy trình thu nhận kháng thể đơn dòng kháng A từ dịch nuôi cấy tế bào lai A6G11C9 đã được hoàn thiện. Kháng thể kháng A được thu lại bằng cách tủa với NH_4SO_4 nồng độ cuối cùng là 50% bão hòa. Kháng thể được cô đặc 5 lần so với thể tích dịch nuôi cấy ban đầu có hiệu giá kháng thể là 1/512 và cường độ phản ứng ngưng kết hồng cầu A là 4+.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hỗ trợ về kinh phí từ đề tài KC.04.13/11-15 và trang thiết bị của Phòng TNTĐ Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bruce M. P., Boyd V., Duch C., White J. R., 2002. Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies- Alternatives to ascites production in mice. *J Immunol Methods*, 264(1-2): 59-68.
- Darby C. R., Hamano K., Wood K. J., 1993. Purification of monoclonal antibodies from tissue culture medium depleted of IgG. *J. Immunol. Methods*, 159: 125
- Federspiel G., Mccullough K. C., Kihm U., 1991. Hybridoma antibody production in vitro in type II serum-free medium using Nutridoma-SP supplements. Comparisons with in vivo methods. *J. Immunol. Methods*, 145(1-2): 213-221.
- Köhler G., Milstein C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256(5517): 495
- Nguyễn Thị Trung, Nguyễn Thị Hằng, Vũ Thị Thu Hằng, Lê Văn Phan, Trương Nam Hải, 2016. Tạo dòng tế bào hybridoma tiết kháng thể đơn dòng gây ngưng kết hồng cầu người mang kháng nguyên A. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 14(3): 1-8.
- Peterson N. C., Peavey J. E., 1998. Comparison of in vitro monoclonal antibody production methods with an in vivo ascites production

- technique. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 37(5): 61-66.
- Pollack W., Reckel R. P., 1977. A reappraisal of the forces involved in hemagglutination. *Int Arch Allergy Appl Immunol.*, 54(1): 29-42.
- Tarleton R. L., Beyer A. M., 1991. Medium-scale production and purification of monoclonal antibodies in protein-free medium. *Biotechniques*, 11(5): 590-593.
- Velez D., Reuveny S., Miller L., MacMillan J. D., 1986. Kinetics of monoclonal antibody production in low serum growth medium. *J. Immunol.*, 86(1): 45-52.
- World Health Organization, 2006. International standards for minimum potency of anti-A and anti-B blood grouping reagents, <http://www.who.int/bloodproducts/cs/062053antiaantib.pdf>, mục 7, phụ lục 2: Reference method for testing the candidate minimum potency reference preparations for anti-A and anti-B, 47-49.

STUDY ON USING THE HYBRID CELL A6G11C9 TO PRODUCE THE ANTI-A MONOCLONAL ANTIBODY THAT AGGLUNATING A ANTIGEN ON THE SURFACE OF RED BLOOD CELLS

Nguyen Thi Trung, Truong Nam Hai

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Almost of the ABO blood grouping reagents is being trading derive from the monoclonal antibodies. There are two methods to produce the monoclonal antibodies from hybridoma lines, which were in vitro method (hybridoma cultured in the medium) and in vivo method (hybridoma cultured in the mice intra-abdominal). In Vietnam, Nguyen Thi Trung and co-authors was succesfully screened in hybridoma cell line A6G11C9 which generating of the anti A monoclonal antibody agglutinated A antigen on the surface of red blood cells. The fusion of mouse lymphocyte B generated anti-A antibody with mouse myeloma sp2/0 is formed that hybrid cell lines. The anti-A monoclonal antibody is produced from hybridoma cell line A6G11C9 have been highly intensive confirmed. It is capability of growth and anti B monoclonal antibody producing stability through the generations. In this study, the process to produce large amounts of monoclonal antibodies from B4D10C9 hybridoma by in vitro method are published. Firstly, hybridoma cells are stored in liquid nitrogen to wake by culture in medium. Then, First, hybrid cells are stored frozen in liquid nitrogen to wake cultured cells. Then, they were first inoculated to produce enough biomass to serve a larger scale. Cell biomass continues to be second inoculated into DMEM containing 10% fetal bovin serum for 10 days. The culture medium contained anti-A monoclonal antibodies were collected by centrifugation to remove cells. The anti-A monoclonal antibody levels in culture medium was concentrated and remove phenol red indicator by the precipitation with NH_4SO_4 50% saturated. The anti-A monoclonal antibody solution at 5 times concentrated have been better agglutinated with erythrocytes containing A antigen than monoclonal antibody solution non-concentration. 150 ml of concentrated antibodies were produced. Antibody titer of the anti-A monoclonal antibodies in the concentrated 5 times solution was 1/512. The intensity of the reaction anti-A monoclonal antibody with red blood cell containing A antigen was 4+.

Keyword: Antibody titer, anti-A monoclonal antibody, blood group A, bloodgroup AB, hybridoma

Citation: Nguyen Thi Trung, Truong Nam Hai, 2018. Study on using the hybrid cell A6G11C9 to produce the anti-a monoclonal antibody that agglunating a antigen on the surface of red blood cells. *Tap chi Sinh hoc*, 40(1): 25-31. DOI: 10.15625/0866-7160/v40n1.9154.

**Corresponding author:* tnhai@ibt.ac.vn

Received 12 January 2017, accepted 20 December 2017