

## NGHIÊN CỨU TẠO TẾ BÀO LAI SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG GÂY NGỪNG KẾT HỒNG CẦU NHÓM MÁU B

Lê Văn Phan<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Trung<sup>2</sup>, Trương Nam Hải<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup>Công ty Cổ phần phát triển công nghệ nông thôn (RTD)

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: tnhai@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 02.4.2016

Ngày nhận đăng: 30.12.2016

### TÓM TẮT

Sự không phù hợp các nhóm máu của hệ thống nhóm máu ABO là rào cản lớn trong liệu pháp truyền máu. Định nhóm máu hệ ABO cho tất cả những người cho máu và người nhận máu là cách thức duy nhất để đảm bảo an toàn toàn cao nhất cho những người nhận máu trong quá trình truyền máu. Định nhóm máu hệ ABO phải được thực hiện bằng cả hai phương pháp huyết thanh mẫu và hoặc hồng cầu mẫu. Ngày nay, khi áp dụng phương pháp huyết thanh mẫu, kháng thể đơn dòng thường được sử dụng để nhận diện kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên tại Việt Nam, công nghệ tế bào lai đã được ứng dụng thành công để tạo và sàng lọc các tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu B. Sau khi được phân lập từ lách và hạch bẹn của chuột BALB/c đã được gây miễn dịch bằng hồng cầu người nhóm B, tế bào lympho B được dung hợp với tế bào myeloma sp2/0. Kết quả nhận được 10 dòng tế bào lai đơn dòng B4D6C6, B4D6E2, B4D10C9, B4D10B6, B4D10D5, B4D10D6, B4D10E4, B4H6C5, B8F6B6, B8F6D4 được sàng lọc bằng phương pháp ngưng kết đặc hiệu hồng cầu mẫu nhóm B. Trong số chúng, dòng tế bào lai B4D10C9 là dòng tế bào tiết kháng thể đơn dòng tốt nhất vào môi trường nuôi, thể hiện bằng hiệu giá kháng thể đạt 1/256, do đó dòng tế bào này được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Phương pháp ELISA đã giúp xác định phân lớp kháng thể đơn dòng kháng B sinh ra từ dòng tế bào B4D10C9. Kết quả là kháng thể đơn dòng trên chứa chuỗi nặng IgM và chuỗi nhẹ kappa. Kháng thể đơn dòng thuộc lớp IgM có khả năng gây ngưng kết hồng cầu tốt hơn kháng thể thuộc lớp IgG đến 25 lần. Việc sàng lọc được kháng thể đơn dòng thuộc lớp IgM là điểm nổi bật nhất của nghiên cứu này.

**Từ khóa:** Anti-B, nhóm máu B, tế bào lai, kháng thể đơn dòng, hạch lympho chuột

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Truyền máu là một kỹ thuật được dùng phổ biến trong y học hiện đại. Sự không tương thích về nhóm máu ABO là rào cản lớn có thể gây chết người trong quá trình truyền máu điều trị bệnh. Tất cả những người cho máu và những người nhận máu phải được định nhóm máu vì đây là cách thức duy nhất đem đến độ an toàn cao nhất cho những người bệnh (Lennox, Voak, 1988). Theo quy định của Bộ Y tế năm 2013, mẫu máu hệ ABO phải được định nhóm bằng phương pháp huyết thanh mẫu và hồng cầu mẫu. Người ta sử dụng các kháng thể đã biết cho phản ứng ngưng kết với hồng cầu cần kiểm tra trong phương pháp huyết thanh mẫu định nhóm máu hệ ABO. Có hai kiểu phản ứng ngưng kết để định nhóm hồng cầu: một là ngưng kết trên phiến kính, hai là

ngưng kết hồng cầu trong ống nghiệm (Dunsford, 1967). Trước những năm 1980, các kháng thể dùng để định nhóm hồng cầu được tách từ máu của những người tình nguyện cho máu, vì thế số lượng kháng thể không nhiều (Lennox, Voak, 1988). Kohler và Milstein đã phát triển công nghệ tế bào lai giữa tế bào lympho B từ lách chuột sản xuất kháng thể và tế bào myeloma tạo ra tế bào lai sản xuất lượng lớn kháng thể đơn dòng (Kohler, Milstein, 1975; Kohler, Milstein, 1976; Kohler *et al.* 1976). Năm 1995, các nhà nghiên cứu Nhật Bản lần đầu tiên công bố việc sử dụng các tế bào lympho B từ hạch bẹn của chuột để tạo tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng (Kishiro *et al.*, 1995). Năm 2006, Sado và đồng tác giả đã công bố việc sử dụng tế bào lympho B từ hạch bẹn sẽ tạo ra tỉ lệ tế bào lai sản xuất kháng thể mong muốn cao hơn 10 lần so với việc sử dụng tế bào

lympho B từ lách (Sado *et al.*, 2006).

Kháng thể đơn dòng dùng để định nhóm máu A được công bố lần đầu tiên năm 1980 (Voak *et al.*, 1980) và kháng thể đơn dòng dùng để định nhóm máu B công bố lần đầu năm 1981 (Sacks, Lenox, 1981). Năm 1988, Lennox, Voak công bố việc tạo kháng thể để xác định nhóm máu AB bằng cách trộn một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng kháng A và một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng kháng B với nhau (Lennox, Voak, 1988). Việc sử dụng kháng thể đơn dòng để định nhóm máu là ứng dụng đầu tiên của kháng thể đơn dòng trong lĩnh vực chẩn đoán và điều trị (Lara, 2014). Công ty Celltech của Anh là công ty đầu tiên sản xuất và thương mại hóa sản phẩm kháng thể đơn dòng định nhóm máu. Cho đến nay có rất nhiều công ty sản xuất và thương mại sinh phẩm này, có thể kể đến Biorad, Mỹ ([www.biorad.com](http://www.biorad.com)); Sanquin, Hà Lan ([www.sanquin.nl/reagents](http://www.sanquin.nl/reagents)); Diagast, Pháp ([www.diagast.com](http://www.diagast.com)); Biotech, Anh ([www.biotech.com](http://www.biotech.com)); Biotest, Đức ([www.biotest.de](http://www.biotest.de)). Nhu cầu huyết thanh mẫu để định nhóm máu ở Việt Nam là rất lớn. Hàng năm cần tới 300 đến 500 lít huyết thanh mẫu để định nhóm máu cho các đơn vị máu thu gom từ những người hiến máu (năm 2014 cả nước đã tiếp nhận 1,054 triệu đơn vị truyền máu). Bên cạnh đó, số lượng người bệnh cần được định nhóm máu nhiều hơn nhiều lần so với số đơn vị máu thu gom. Số lượng sinh phẩm này phải nhập ngoại hoàn toàn vì Việt Nam chưa sản xuất được.

Đứng trước thực tế trên, nhóm nghiên cứu đã sử dụng hồng cầu người Việt Nam để gây miễn dịch cho chuột nhằm tạo được tế bào sản xuất kháng thể. Tế bào lympho B đã được tách chiết từ lách và hạch bẹn của chuột được dung hợp với tế bào myeloma dưới sự tác dụng của polyethylen glycol. Kết quả là chúng tôi đã tạo được tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu chứa kháng nguyên B. Hiệu giá kháng thể trong dịch nuôi cấy tế bào là 1/512, cường độ phản ứng 3+, thời gian ngưng kết 10 giây. Kháng thể kháng B sinh ra từ dòng tế bào lai thuộc lớp IgM, chuỗi nhẹ kappa.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chuột BALB/c đực 6 tuần tuổi sử dụng làm vật chủ để gây miễn dịch do Học viện Quân Y cung cấp.

Bộ hồng cầu mẫu ABO 5% sử dụng làm vật liệu gây miễn dịch và kháng nguyên sàng lọc dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu do Viện huyết

học và truyền máu Trung ương cung cấp.

Dòng tế bào myeloma sp2/0 được sử dụng làm nguồn tế bào dung hợp do TS. Lê Văn Phan cung cấp.

Môi trường DMEM (Gibco, Mỹ); Huyết thanh bê FBS, tá chất hoàn toàn (FCA), tá chất không hoàn toàn (FIA), môi trường chọn lọc HAT (DMEM, 20% FBS, 1% HAT 50x), môi trường HT (DMEM, 20% FBS, 1% HT 50x), DMSO, PEG 50% 1500 (Sigma, Mỹ); Kit ELISA xác định phân lớp kháng thể (Thermo, Mỹ); Bộ huyết thanh mẫu (Biorad, Pháp). Các hóa chất khác được mua từ hãng Merck, Đức.

### Phương pháp gây miễn dịch cho chuột

Hồng cầu mẫu B được sử dụng làm vật liệu gây miễn dịch cho chuột để tạo ra các tế bào lympho chuột sản xuất kháng thể đơn dòng kháng B. Quy trình gây miễn dịch cho chuột được thực hiện theo mô tả của Nguyễn Thị Trung và đồng tác giả công bố năm 2016 (Nguyễn Thị Trung *et al.*, 2016).

### Dung hợp và tạo dòng tế bào lai

#### Chuẩn bị tế bào myeloma sp2/0 chuột

Tế bào myeloma sp2/0 chuột được nuôi trong môi trường DMEM +20% FBS (chai T75 cm<sup>2</sup>), mật độ ban đầu 10<sup>5</sup> tế bào/ml hai ngày trước khi tiến hành thí nghiệm dung hợp tế bào.

#### Dung hợp tế bào

Bốn ngày sau lần tiêm cuối cùng, chuột bị giết thu lách và hạch bẹn để tách tế bào lympho B. Tế bào lympho B và tế bào myeloma sp2/0 được trộn theo tỉ lệ 5:1, có mặt PEG1500 50%. Hỗn hợp được tái huyền phù trong môi trường HAT, chuyển 150  $\mu$ l vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng, nuôi ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sau 5 đến 7 ngày, thay môi trường nuôi bằng HT, nuôi tiếp ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### Phản ứng ngưng kết hồng cầu trong các giếng của phiến nhựa

25  $\mu$ l dịch từ mỗi giếng nuôi cấy hỗn hợp tế bào lai sau 3 đến 5 ngày nuôi được chuyển sang các giếng của đĩa 96 giếng tương ứng. Thêm 25  $\mu$ l hồng cầu mẫu 2%, lắc nhẹ, để đĩa ở nhiệt độ phòng và đọc kết quả sau 30 phút bằng cách nghiêng đĩa một góc khoảng 45°.

#### Tạo dòng tế bào lai

Tế bào lai được tách dòng bằng phương pháp pha loãng tới hạn 3 nồng độ 50 tế bào/ml, 10 tế bào/ml và 5 tế bào/ml. Kiểm tra tế bào lai đơn trong các giếng nuôi cấy bằng cách soi dưới kính hiển vi điện tử soi ngược truyền qua và kiểm tra sự sinh

kháng thể bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu.

### Xác định một số tính chất của kháng thể đơn dòng do dòng tế bào lai sản xuất

#### Xác định khả năng gây ngưng kết đặc hiệu

Độ đặc hiệu của kháng thể được xác định bằng phản ứng ngưng kết trực tiếp với các hồng cầu mẫu A, B, O. Kháng thể đặc hiệu khi chỉ nhận biết một loại kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu.

#### Xác định hiệu giá kháng thể

Hiệu giá kháng thể trong dịch nuôi cấy được xác định bằng phản ứng ngưng kết trên đĩa 96 giếng đáy chữ V khi dịch nuôi cấy được pha loãng theo cơ số 2 bằng NaCl 0,9%. 25 µl dịch pha loãng kháng thể được nhỏ vào các giếng của phiến nhựa, thêm 25 µl hồng cầu mẫu B 2% vào từng giếng, lắc nhẹ, để đĩa ở nhiệt độ phòng và đọc kết quả sau 30 phút.

#### Xác định cường độ và ái tính

Thực hiện thí nghiệm ngưng kết hồng cầu trên phiến kính, nồng độ hồng cầu mẫu là 10%. Sử dụng đồng hồ bấm giây để xác định thời điểm quan sát được tín hiệu đầu tiên của phản ứng ngưng kết. Sau 5 phút phản ứng đánh giá cường độ phản ứng: Có một mảng ngưng kết, dịch trong - 4+; có một vài mảng ngưng kết, dịch trong - 3+; có một vài mảng ngưng kết nhỏ, dịch đục - 2+; có nhiều mảng ngưng kết nhỏ, dịch đục - 1+ và không ngưng kết là âm tính.

### Xác định phân lớp kháng thể đơn dòng do dòng tế bào lai sản xuất

Phân lớp kháng thể đơn dòng được xác định bằng phương pháp ELISA sử dụng các kháng thể đã biết gắn sẵn lên các giếng của phiến nhựa vì

lượng. Kit ELISA xác định phân lớp kháng thể của hãng Piere được sử dụng để xác định phân lớp kháng thể dòng. Quy trình thí nghiệm thực hiện theo hướng dẫn chi tiết của nhà sản xuất.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Gây miễn dịch cho chuột bằng hồng cầu mẫu B

Hồng cầu B được trộn với tá chất và tiêm vào hai gan bàn chân chuột BALB/c như mô tả ở phần phương pháp. Mười ngày kể từ lần đầu tiên gây miễn dịch, chuột được giết và thu lách và hạch lympho bẹn. Giải phẫu chuột nhận thấy cả hai hạch bẹn của chuột đều tăng kích thước so với chuột đối chứng. Theo Sado và đồng tác giả cộng sự thì hai hạch này của chuột chứa khoảng  $1 \times 10^7$  đến  $2 \times 10^7$  tế bào lympho B ở ngày thứ 14 sau gây miễn dịch (Sado *et al.*, 2006). Các nghiên cứu trước đó chỉ sử dụng hồng cầu nhũ hóa trong tá chất và tiêm hai lần vào phúc mạc chuột (Lundblad, 1963), hoặc tiêm 3 lần trong lần đầu sử dụng tá chất hoàn toàn, hai lần sau dùng tá chất không hoàn toàn để tiêm vào phúc mạc chuột.

### Dung hợp và tạo dòng tế bào lai

Tế bào lympho B được tách từ lách và hạch bẹn của các chuột đã được gây miễn dịch. Tế bào myeloma đã được chuẩn bị trước 2 ngày trước khi tiến hành dung hợp tế bào. Quy trình tạo tế bào lai được thực hiện theo nguyên lý cơ bản để tạo tế bào lai đã được mô tả bởi Köhler và Milstein năm 1975. Sự hình thành và phát triển của tế bào lai ở các giếng nuôi cấy được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược truyền qua. Kết quả hình thành tế bào lai và khả năng sinh kháng thể đặc hiệu được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1.** Tỷ lệ hình thành tế bào lai và khả năng sinh kháng thể đặc hiệu.

Lần thí nghiệm	Tổng số giếng	Hình thành tế bào lai		Gây ngưng kết hồng cầu B	
		Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %
1	384	310	80,7	8	2,6
2	384	345	89,8	12	3,5
3	384	380	98,9	11	2,9
Tổng số	1152	1035		31	
Trung bình		345 ± 12	89,9 ± 3,0	10 ± 1	3,0 ± 0,15

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, hiệu suất tạo tế bào lai rất cao, đạt đến  $89,9 \pm 3,0\%$ . Trong số đó có 31 vị trí đã sinh kháng thể gây ngưng kết hồng cầu mẫu B. Các tế bào lai đã hình thành và phân chia thành nhóm các tế

bào sau 2 ngày được nuôi cấy trong môi trường HAT (Hình 1A). Sau 4 ngày nuôi cấy thì các tế bào này phát triển thành một cụm to hơn, số lượng tế bào nhiều hơn (Hình 1B). Các tế bào này tiếp tục phát triển và được

quan sát sau 6 ngày (Hình 1C) và sau 10 ngày (Hình 1D). Sau 10 ngày nuôi cấy, tế bào lai đã phát triển thành một cụm lớn gồm rất nhiều tế bào và bắt đầu bị phân tán do tác động cơ học trong quá trình thay thế môi trường HT cho môi trường HAT. Trong môi trường HAT chỉ có tế bào lai mang đặc tính của cả tế bào myeloma và tế bào lympho B mới có khả năng sinh trưởng. Các tế bào myeloma thiếu enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase - HGPRT nên bị chết. tế bào lympho B đã ở giai đoạn cuối của quá trình biệt hóa nên không sống được trong môi trường nuôi cấy (Littlefield, 1964).

Kết quả này hoàn toàn phù hợp với công bố của Kishiro *et al.*, 1995 và Sado *et al.*, 2006. Các tác giả này đã sử dụng hạch lympho ben để dung hợp tạo tế bào lai và tiêm vào gan bàn chân hoặc gốc đuôi để gây miễn dịch cho chuột. Trong khi Lundblad *et al.*, 1963 chỉ sử dụng tế bào lympho B từ lách để lai với tế bào myeloma. Bên cạnh đó, Kishino *et al.*, 1995 và Sado *et al.*, 2006 đã chứng minh có thể gây miễn dịch cho chuột một hoặc nhiều lần và sử dụng tế bào lympho của hạch ben trong thời gian 14 đến 21 ngày thì hiệu suất tạo tế bào lai khá cao. Cao hơn tới 10 lần so với gây miễn dịch cho chuột theo các con đường khác và sử dụng tế bào lách trong thời gian từ 60 đến 90 ngày sau tiêm.

Các tế bào tại các vị trí mà dịch nuôi cấy ngưng kết với hồng cầu mẫu B được làm đơn dòng bằng phương pháp pha loãng tới hạn. Dịch nuôi cấy tại các vị trí chỉ chứa một tế bào lai được cho phản ứng với cả ba loại hồng cầu mẫu A, B và O. Nếu là kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên B thì dịch nuôi cấy chỉ làm ngưng kết hồng cầu mẫu B mà không làm ngưng kết với hồng cầu mẫu A hoặc O. Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, 10 dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng B là B4D6C6, B4D6E2, B4D10C9, B4D10B6, B4D10D5, B4D10D6, B4D10E4, B4H6C5, B8F6B6, B8F6D4 đã phân lập được, trong đó dòng tế bào B4D10C9 được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

Hàm lượng kháng thể được đánh giá thông qua xác định hiệu giá kháng thể. Dịch nuôi cấy dòng tế bào B4D10C9 được xác định hiệu giá kháng thể trong dịch nuôi để có cái nhìn sơ bộ về khả năng sản xuất kháng thể của dòng tế bào lai này. Dịch nuôi cấy tế bào lai sẽ được pha loãng với nước muối sinh lý theo cơ số 2 từ 1 đến 1/4096, bổ sung thêm hồng cầu mẫu B 1% với thể tích tương đương và để yên 30 phút sau đó đọc kết quả. Hiệu giá kháng thể đơn dòng do dòng tế bào lai B4D10C9 sản xuất là 1/256, trong khi hiệu

giá kháng thể trong huyết thanh mẫu (Biorad) là 1/512 (Hình 2). Kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của Iyer, 2006 và Abhyankar, 2012. Hiệu giá của các dòng tế bào sinh kháng thể kháng B cũng đã được một số tác giả Iyer, 2006 đã tạo ra dòng tế bào 2C4D5F10 sản xuất kháng thể đơn dòng kháng B gây ngưng kết hồng cầu mẫu B ở độ pha loãng 128 lần. Trong khi Abhyankar, 2012 đã tạo ra dòng tế bào 3D5D7G2 sản xuất kháng thể kháng B với hiệu giá 1/512. Như vậy, khả năng sản xuất kháng thể kháng B của dòng tế bào B4D10C9 là khá tốt.

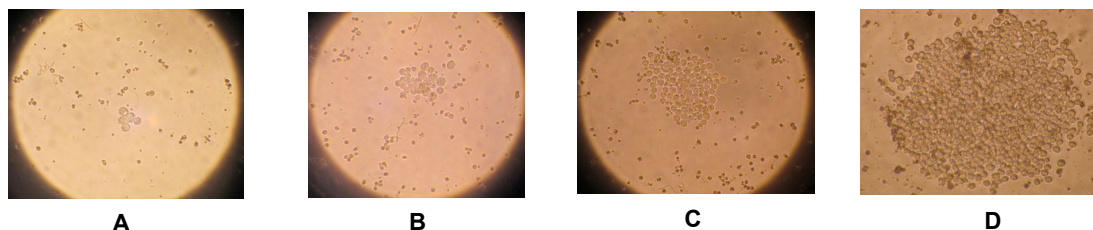
Độ đặc hiệu của kháng thể do dòng tế bào lai B4D10C9 sản xuất được kiểm tra bằng cách cho phản ứng với 3 hồng cầu mẫu A, B, O. Kết quả ở hình 3 chỉ ra dịch nuôi cấy tế bào B4D10C9 chỉ gây ngưng kết hồng cầu B mà không gây ngưng kết hồng cầu A và O. Kết quả này tương tự như kết quả phản ứng của anti-B (biorad) với các hồng cầu mẫu A, B, O. Trong khi dịch nuôi cấy không chứa kháng thể nên không phản ứng ngưng kết với bất kỳ hồng cầu mẫu nào đem kiểm tra.

Loại globulin miễn dịch của kháng thể do dòng tế bào B4D10C9 sinh ra được xác định bằng kit ELISA của Piere. Các kháng thể kháng các immunoglobon được gắn sẵn trong các giếng của phiên nhựa từ các giếng A-H. Theo quy trình thì dịch nuôi cấy sẽ được bổ sung vào các giếng, kháng thể thuộc loại nào sẽ gắn kết với kháng thể phù hợp. Kết quả ở hình 4, cho thấy tại các vị trí F và G có phản ứng xảy ra, màu của dung dịch tại các giếng này chuyển từ không màu thành vàng và vàng nhạt.

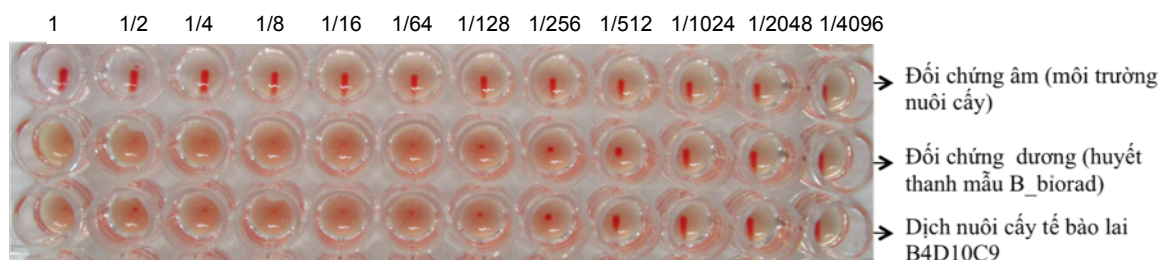
Giá trị OD tại các vị trí này đo được ở bước sóng 450 nm được trình bày trong bảng 2. Có hai vị trí cho giá trị OD<sub>450</sub> > 0,2 tương ứng với hai vị trí đối màu quan sát được. Hai vị trí này tương ứng với kháng thể kháng B chứa chuỗi nặng IgM và chuỗi nhẹ kappa.

**Bảng 2.** Giá trị OD<sub>450</sub> của phản ứng ELISA xác định phân lớp kháng thể do dòng tế bào B4D10C9 sản xuất.

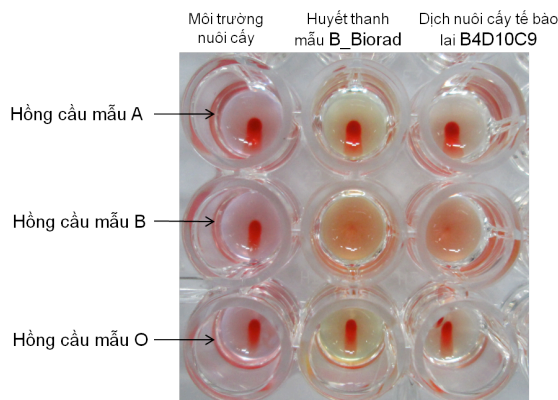
	Giá trị OD <sub>450</sub>	Phân lớp kháng thể
A	0,054	IgG1
B	0,042	IgG2a
C	0,041	IgG2b
D	0,053	IgG3
E	0,040	IgA
F	<b>0,668</b>	<b>IgM</b>
G	<b>0,284</b>	<b>Kappa</b>
H	0,040	Lamda



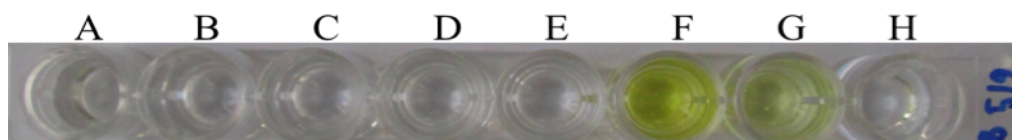
**Hình 1.** Ảnh chụp tế bào lai quan sát dưới kính hiển vi soi ngược truyền qua (độ phóng đại 10 lần). A. sau 2 ngày nuôi cấy; B. sau 4 ngày nuôi cấy; C. sau 6 ngày nuôi cấy; D. sau 10 ngày nuôi cấy tế bào sau dung hợp trong môi trường HAT/HT.



**Hình 2.** Ảnh chụp kết quả xác định hiệu giá kháng thể kháng B bằng phương pháp pha loãng huyết thanh/dịch nuôi cấy theo cơ số 2. Hàng trên cùng là phản ứng ngưng kết hồng cầu của môi trường nuôi cấy với hồng cầu mẫu B 2% (đối chứng âm); Hàng giữa là phản ứng ngưng kết hồng cầu của huyết thanh mẫu anti-B (bioRad) với hồng cầu mẫu B 2% (đối chứng dương); Hàng dưới là phản ứng ngưng kết của dịch nuôi cấy tế bào B4D10C9 với hồng cầu mẫu B 2%; Số thứ tự từ 1 đến 12 tương ứng với độ pha loãng kháng thể từ 1 lần đến 4096 lần.



**Hình 3.** Ảnh chụp sự ngưng kết hồng cầu A, B và O của dịch sau 7 ngày nuôi cấy dòng tế bào lai B4D10C9. Hàng ngang 1, 2, 3: Hồng cầu mẫu A, B, O tương ứng. Cột dọc 1, 2, 3: môi trường nuôi cấy (đối chứng âm), huyết thanh mẫu anti-B (đối chứng dương), dịch nuôi cấy tế bào lai B4D10C9 tương ứng.



**Hình 4.** Phản ứng ELISA xác định loại kháng thể miễn dịch của kháng thể do dòng tế bào B4D10C9 sản xuất.

Việc dòng tế bào B4D10C9 sản xuất kháng thể IgM là hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu của Sado *et al.*, 2006, ông đã chỉ ra rằng việc thu hoạch tế bào lympho ở thời điểm sớm hơn thì tỉ lệ tế bào lai sinh kháng thể IgM sẽ cao hơn. Nếu tế bào lympho được thu ở thời điểm 28 ngày sau gây miễn dịch chuột thì tỉ lệ thu được tế bào lai sản xuất kháng thể IgM chỉ bằng 1/10 thời điểm 10 ngày. Mặt khác trong nghiên cứu này phản ứng ngưng kết hồng cầu đã được sử dụng để sàng lọc kháng thể đặc hiệu. Kháng thể IgM có 10 vị trí bám kháng nguyên trong khi kháng nguyên IgG chỉ có hai vị trí bám cho kháng nguyên. Dòng tế bào sinh kháng thể IgM sẽ gây ngưng kết hồng cầu mạnh hơn dòng sinh kháng thể IgG nên sẽ được sàng lọc.

## KẾT LUẬN

Chúng tôi đã ứng dụng thành công quy trình gây miễn dịch cho chuột để tạo ra các tế bào lympho B miễn cảm. Hiệu quả tạo tế bào lai đạt trung bình trên 90% khi sử dụng tế bào lympho B tách từ lách và hạch bẹn của chuột đã gây miễn dịch dung hợp với tế bào myeloma chuột.

Đã sàng lọc được 10 dòng tế bào lai B4D6C6, B4D6E2, B4D10C9, B4D10B6, B4D10D5, B4D10D6, B4D10E4, B4H6C5, B8F6B6, B8F6D4 sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu mang kháng nguyên B.

Tế bào lai B4D10C9 sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu mẫu B. Hiệu giá kháng thể trong dịch nuôi đạt 1/256.

Kháng thể kháng B do dòng tế bào B4D10C9 sản xuất thuộc phân lớp IgM và chứa chuỗi nhẹ kappa.

**Lời cảm ơn:** Công trình sử dụng kinh phí 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 KHCVN và Phòng kiểm nghiệm, Công ty CP phát triển công nghệ nông thôn RTD.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abhyankar AV (2012) Indigenously developed monoclonal antibody specific for human blood group B, *J*

*Hematol Malign.* 2:18-24.

Dunsford F, Bowley C (1967) *Techniques in blood grouping*, 2nd ed. Oliver and Boyd, Edinburg.

Iyer YS, Vasantha K, Manisha P, Jadhav S, Gupte SC, Mohanty D (2006) Production of murine monoclonal anti-B. *Indian J Med Res.* 123(4): 561-4.

Kishiro Y, Kagawa M, Naito I, Sado Y (1995) A novel method of preparing rat-monoclonal antibody-producing hybridomas by using rat medial iliac lymph node cells. *Cell Struct Funct.* 20: 151-156.

Köhler G, Howe SC, Milstein C (1976) Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol.* 6(4): 292-295.

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

Köhler G, Milstein C (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol.* 6(7): 511-519.

Lara M (2014) Monoclonal antibodies and the transformation of blood typing. *J mAbs* 6(6): 1362-1367.

Lennox ES, Voak D (1988) Blood cell grouping reagent. *EU Patent* 0103620-B1.

Littlefield JW (1964) Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in vitro and Their Presumed Recombinants. *Science* 145 (3633): 709-710.

Lundblad AK (1963) Monoclonal antibody formulation for diagnostic use, *US Patent* 4618486.

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 của người mang kháng nguyên A. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 14 (3): 411-417.

Sacks SH, Lennox ES (1981) Monoclonal anti-B as a new blood typing reagent. *Vox Sang.* 40: 99-104.

Sado Y, Inoue S, Tomono Y, Omori H (2006) Lymphocytes from enlarged iliac lymph nodes as fusion partners for the production of monoclonal antibodies after a single tail base immunization attempt. *Acta Histochem Cytochem.* 39: 89-94.

Voak D, Sacks S, Alderson T, Takei F, Lennox E, Jarvis J, Milstein C, Darnborough J (1980) Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: Evaluation as a blood grouping reagent. *Vox Sang.* 39: 134-140.

## **STUDY ON CREATING THE HYBRIDOMA FOR PRODUCING A MONOCLONAL ANTIBODY THAT CAUSES AGGLUTINATION OF THE RED BLOOD CELL B GROUP**

**Le Van Phan<sup>1</sup>, Nguyen Thi Trung<sup>2</sup>, Truong Nam Hai<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Rural Technology Development JSC.*

<sup>2</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### **SUMMARY**

ABO incompatibility is a potential lethal barrier in transfusion therapy. ABO blood cell grouping for all of the donors and potential recipients is the unique way for ensuring the highest safety for potential recipients in blood transfusion. ABO blood cell grouping must be performed by both of the serum sample method and erythrocytes sample method. Nowadays, when applying the serum sample method, the monoclonal antibodies are commonly used to identify the antigens on the surface of the red blood cells. In this study, for the first time in Vietnam, the hybridoma technology was successfully developed and screened hybrid cells for producing monoclonal antibody specifically agglutinated with red blood cells B group. After being isolated from spleen and iliac lymph node of the human red blood cells B group immunized BALB/c mice, the lymphocytes B was fused with myeloma sp2/0. As the results, 10 single hybrid cell lines B4D6C6, B4D6E2, B4D10C9, B4D10B6, B4D10D5, B4D10D6, B4D10E4, B4H6C5, B8F6B6, B8F6D4 have been screened by a specific agglutination with sample red blood cells group B. Among them, the hybrid cell line B4D10C9 was the best secreting anti-B monoclonal antibody into culture, that presented by antibody titer reached 1/256, hence it was selected for further studies. The ELISA method helped to isotype the anti-B monoclonal antibody which was produced from B4D10C9 hybridoma. As a result, the anti-B monoclonal antibody contained IgM heavy chains and kappa light chains. The IgM antibody could be able to agglutinate red blood cells 25 times more than IgG antibody. The success of screening B4D10C9 hybridoma producing IgM monoclonal antibody is the most significant result of this study.

**Keywords:** *Anti-B, blood group B, hybridomas, mAbs, mouse lympho node*