

XÁC ĐỊNH LOẠI GLOBULIN MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG THỂ ĐƯỢC SINH RA TỪ TẾ BÀO HYBRIDOMA A6G11C9

Nguyễn Thị Trung, Trương Nam Hải

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: 17.01.2016

Ngày nhận đăng: 26.11.2016

TÓM TẮT

Công nghệ tế bào lai được các nhà khoa học phát triển từ năm 1975 để sản xuất các kháng thể đơn dòng. Bằng cách này một lượng lớn kháng thể mong muốn có thể được sản xuất một cách nhanh chóng và dễ dàng. Từ một dòng tế bào lai đơn, chúng sinh trưởng và phát triển nhằm sản xuất một loại kháng thể đồng nhất với số lượng đủ lớn để phục vụ nghiên cứu, điều trị và chẩn đoán. Lượng kháng thể được sinh ra phụ thuộc vào mật độ tế bào và thời gian nuôi cấy. Khả năng sinh trưởng của mỗi dòng tế bào lai phụ thuộc vào thành phần của các chất có trong môi trường nuôi cấy. Trong số đó, huyết thanh thai bò là được sử dụng thông dụng nhất trong số huyết thanh bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào in vitro. Bởi vì chúng chứa hàm lượng nhỏ kháng thể nhưng chứa nhiều nhân tố sinh trưởng. Trong bài báo trước chúng tôi đã công bố về việc tạo được dòng tế bào lai A6G11C9 tiết kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu mang kháng nguyên A. Trong nghiên cứu này, chúng tôi công bố các kết quả nghiên cứu về điều kiện nuôi cấy để thu được hiệu quả kháng thể cao và xác định loại globulin miễn dịch của kháng thể. Dòng tế bào lai A6G11C9 được nuôi trong môi trường DMEM bổ sung hàm lượng huyết thanh thai bò khác nhau. Kết quả chỉ ra rằng dòng tế bào này sinh trưởng trong môi trường DMEM chứa 10% huyết thanh thai bò nhanh hơn gấp 5 so với nuôi trong môi trường DMEM chứa 1% huyết thanh thai bò. Mật độ tế bào tối đa đạt được là 11.10^6 tế bào/ml sau khoảng 50 giờ nuôi cấy. Hiệu quả kháng thể đạt cực đại là 1/1024 sau khoảng 100 giờ nuôi cấy. Kháng thể đơn dòng sinh ra từ dòng tế bào A6G11C9 thuộc lớp IgM, chuỗi nhẹ kappa.

Từ khóa: Xác định loại kháng thể, kháng nguyên A, tế bào lai, kháng thể đơn dòng kháng A, nhóm máu A

MỞ ĐẦU

Năm 1901, Landsteiner phát hiện ra hiện tượng huyết thanh của người này có thể làm ngưng kết hồng cầu của người kia và ngược lại. Nguyên tắc trong thực hành truyền máu là không được đưa kháng nguyên vào cơ thể có kháng thể tương ứng và không được đưa kháng thể vào cơ thể có kháng nguyên tương ứng. Như vậy, nhất thiết phải xác định nhóm máu của người cho và người nhận trước khi truyền máu. Để xác định nhóm máu phải sử dụng phương pháp huyết thanh mẫu và hồng cầu mẫu (Thông tư 26/2013-TT-BYT). Bộ huyết thanh mẫu được sử dụng trong phương pháp huyết thanh mẫu chẩn đoán nhóm máu. Kháng thể đơn dòng do tế bào lai sản xuất đang được sử dụng rộng rãi làm huyết thanh mẫu xác định nhóm máu. Kháng thể đơn dòng sản sinh từ dòng tế bào lai có thể không phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng của tế bào hoặc

được sản xuất khi tế bào ở giai đoạn cân bằng (Boraston *et al.*, 1984; Reuveny *et al.*, 1985; van Wezel *et al.*, 1985; Reuveny *et al.*, 1986). Một số nghiên cứu chỉ ra tốc độ sản xuất kháng thể giảm khi tế bào đạt đến giai đoạn cân bằng (Merten *et al.*, 1985). Một số nghiên cứu khác chỉ ra tốc độ sản xuất kháng thể liên quan đến số lượng tế bào sống (Velez *et al.*, 1986; Renard *et al.*, 1988).

Kháng thể là các globulin miễn dịch, chủ yếu là IgM, IgG do các lympho bào sản xuất. Có thể sử dụng phương pháp đo dòng chảy tế bào để xác định lớp globulin miễn dịch đối với kháng thể nhóm máu ABO (Stussi *et al.*, 2005) hoặc phương pháp ELISA (Buchs, Nydegger, 1989; Rieben *et al.*, 1991). Các kết quả nhận được thấy rằng tới 96% số mẫu máu thí nghiệm chứa kháng thể kháng A là IgM, còn lại là IgG. Kháng thể IgM gây ngưng kết mạnh, chỉ cần 25 phân tử IgM đã có thể gây ngưng kết hồng cầu, trong

khi cần tới 200 phân tử IgG mới xảy ra phản ứng ngưng kết.

Kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên A do tế bào lai sản xuất đã được một số tác giả công bố (Sonneborn, 1993; Sadiq *et al.*, 2005). Kháng thể kháng A do tế bào lai sản xuất thuộc lớp IgM đã được công bố từ năm 1980 (Voak *et al.*, 1980); ái lực của kháng thể kháng A có thể nhỏ hơn 5 giây (Sadiq *et al.*, 2005), 9 - 12 giây (Odeigah, 1989). Phản ứng ngưng kết xảy ra tốt nhất ở pH trung tính và nhiệt độ phòng (Odeigah, 1989).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận được tốc độ sinh trưởng của dòng tế bào lai A6G11C9 trong môi trường DMEM, 10% FBS nhanh hơn gấp 5 so với nuôi trong môi trường DMEM, 1% FBS. Mật độ tế bào tối đa đo được là 11.10^6 tế bào/ml sau khoảng 50 giờ nuôi cấy. Hiệu giá kháng thể đạt cực đại là 2^9 (tương đương 25,6 μ g kháng thể trong 1 ml) sau khoảng 100 giờ nuôi cấy. Kháng thể đơn dòng sinh ra từ dòng tế bào A6G11C9 thuộc lớp IgM, chuỗi nhẹ kappa.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các dòng tế bào, hồng cầu mẫu, huyết thanh mẫu

Hồng cầu mẫu A, B, O mua từ Viện Huyết học và truyền máu Trung ương.

Huyết thanh mẫu anti-A, anti-B, anti-AB (Biorad, Pháp).

Dòng tế bào hybridoma A6G11C9 sinh kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu chứa kháng nguyên A do đề tài KC04.13/11-15 cung cấp.

Các loại hóa chất và môi trường nuôi cấy

Dung dịch PBS: 0,01 M đệm phosphate; 0,0027 M KCl; 0,137 M NaCl, pH 7,4, ở 25°C

Môi trường DMEM (Gibco, Mỹ), FBS (Sigma, Mỹ), gentamycine (Invitrogen, Mỹ)

Phản pháp nuôi cấy tế bào lai

Phục hồi tế bào

Ống giống tế bào A6G11C9 (chứa 10^5 tế bào/ml) được loại bỏ DMSO và chuyển vào chai T25 cm^2 chứa 5 ml môi trường DMEM+10% FBS, nuôi ở 37°C, 5% CO₂ trong thời gian 24 giờ.

Phương pháp cấy truyền tế bào

Chuyển toàn bộ 5 ml dung dịch tế bào sang chai

nuôi cấy T75 cm^2 mới đã chứa 16 ml môi trường DMEM + 10% FBS, nuôi tế bào ở 37°C, 5% CO₂.

Thu tế bào và dịch nuôi cấy: Chuyển dịch nuôi cấy sang ống falcon, ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút để thu dịch nổi kiểm tra kháng thể. Tế bào được thu lại để xác định mật độ tế bào trong quá trình nuôi cấy.

Xác định số lượng tế bào

Trộn tế bào với trypan blue 0,4% theo tỉ lệ 1:1. Nhỏ 10 μ l huyền phù tế bào vào buồng đếm. Quan sát dưới vật kính 10x, tập trung vào 4 ô vuông của buồng đếm: 1, 2, 3, 4. Tế bào sống không bắt màu của thuốc nhuộm trong khi tế bào chết bắt màu thuốc nhuộm nên có màu xanh.

Số lượng tế bào = số lượng tế bào trung bình trong 4 ô x hệ số pha loãng x 10^4 (tế bào/ml).

Phản ứng ngưng kết hồng cầu trong giếng của phiến nhựa

Kiểm tra theo hướng dẫn xác định nhóm máu ABO trong Thông tư 26/2013-TT-BYT có cải tiến. Các giếng của phiến nhựa được sử dụng để thực hiện phản ứng thay cho đá men hoặc ống nghiệm nhằm làm tăng công suất sàng lọc. Khi kiểm tra kháng thể của một số dòng cụ thể thì phản ứng ngưng kết được thực hiện trên phiến kính hoặc trong ống nghiệm. Quan sát hiện tượng xảy ra và ghi lại kết quả.

Nuôi cấy tế bào lai để thu kháng thể

Tế bào lai được nuôi cấy trong chai nuôi cấy T25 chứa 1/5 thể tích môi trường DMEM, mật độ tế bào ban đầu là 10^5 cfu/ml. Sau 92 giờ nuôi cấy, toàn bộ dịch nổi chứa kháng thể được thu lại bằng li tâm 1000 rpm, 2 phút.

Xác định loại globulin miễn dịch

Loại globulin miễn dịch của các kháng thể được xác định trực tiếp từ dịch nuôi cấy bằng bộ kit Pierce rapid ELISA mouse mAb isotyping kit (37503, Thermo, Mỹ) chứa 8 kháng kháng thể đã cố định sẵn trên phiến nhựa. Quy trình thực hiện như hướng dẫn của nhà cung cấp: Bổ sung 50 μ l dịch môi trường nuôi cấy đã pha loãng 1/50 vào 8 vị trí trên một cột của phiến nhựa đã phủ trước các kháng kháng thể (thứ tự từ trên xuống: anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa, anti-lambda). Bổ sung tiếp 50 μ l kháng thể kháng IgG, IgA, IgM của chuột cộng hợp HRP vào mỗi giếng, trộn đều bằng máy lắc và ủ đĩa trong 60 phút. Rửa đĩa 3 lần bằng 250 μ l dung dịch rửa. Thêm 75 μ l

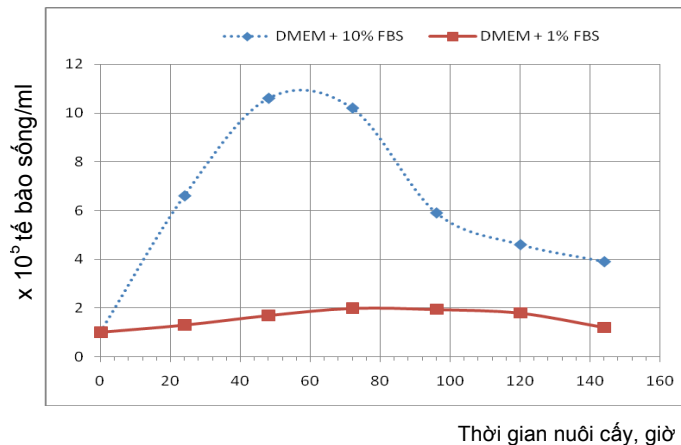
dung dịch TMB vào mỗi giếng, sau 15 bổ sung 75 μ l dung dịch dừng phản ứng. Đo độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm, nếu giá trị $OD_{450\text{ nm}} \geq 0,2$ thì tại vị trí đó cho kết quả dương tính.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự sinh trưởng của dòng tế bào lai A6G11C9

Sự sinh trưởng của dòng tế bào lai được nghiên cứu khi nuôi cấy trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS và DMEM bổ sung 1% FBS, ở 37°C, 5%CO₂. Mật độ tế bào lai ban đầu 10⁵ tế bào/ml (thời điểm 0 giờ), thể tích nuôi là ml môi trường/1 giếng của đĩa 24 giếng. Mật độ tế bào sống được xác định bằng phương pháp đếm sau mỗi 24 giờ (Hình 1). Dòng tế bào lai A6G11C9 sinh trưởng chậm khi nuôi cấy trong môi trường chứa ít FBS (nồng độ 1%). Nhưng tốc độ sinh trưởng tăng đáng kể khi tăng lượng FBS lên 10%. Trong môi trường chứa 1% FBS thì tế bào lai dần thích ứng với môi trường và phát triển, pha

tiềm năng kéo dài hơn trong môi trường chứa 10% FBS. Ở cả hai môi trường nghiên cứu đều không quan sát được pha ổn định của tế bào. Đối với môi trường chứa 1% FBS thì mật độ tế bào tối đa đạt được là 2.10⁵ tế bào/ml sau 70 giờ nuôi cấy, tốc độ sinh trưởng 0,006 h⁻¹, tế bào chết gần hết sau 150 giờ nuôi cấy. Trong khi nuôi cấy tế bào lai trong môi trường chứa 10% FBS thì mật độ tế bào tối đa là 11.10⁵ tế bào/ml sau 50 giờ nuôi cấy, tốc độ sinh trưởng của tế bào đạt 0,031 h⁻¹. Theo dõi sự phát triển của tế bào cho thấy sau 240 giờ nuôi cấy thì hầu như tế bào lai đều bị chết. Qua kết quả thu được cho thấy tốc độ sinh trưởng của tế bào trong môi trường chứa 10% FBS nhanh gấp 5 lần so với tốc độ sinh trưởng trong môi trường chứa 1% huyết thanh, mật độ tế bào cao gấp 5,5 lần. Huyết thanh bê là nguồn cung cấp các yếu tố sinh trưởng có tác động khác nhau đến sự biệt hóa của các dòng tế bào khác nhau. Như vậy, dòng tế bào lai A6G11C9 chịu sự tác động rõ rệt của nồng độ huyết thanh bê đến sự sinh trưởng và phát triển.



Hình 1. Mật độ tế bào lai A6G11C9 sinh trưởng trong môi trường DMEM+10% FBS và DMEM+1% FBS theo thời gian.

Song song với việc nghiên cứu sự sinh trưởng của tế bào thì dịch nuôi cấy tế bào cũng được thu lại để nghiên cứu mối quan hệ giữa mật độ tế bào, thời gian nuôi cấy và kháng thể đặc hiệu được sản sinh từ dòng tế bào lai A6G11C9. Hiệu giá kháng thể trong môi trường nuôi cấy theo thời gian được biểu thị ở hình 2.

Kết quả ở hình 2 chỉ ra rằng lượng kháng thể được sản xuất và gia tăng trong suốt pha lũy thừa của quá trình nuôi cấy. Hiệu giá kháng thể của dịch nuôi cấy tế bào lai A6G11C9 ở môi trường chứa 10% FBS đạt cực đại là 2¹⁰ (Hình 3) sau khoảng 100 giờ

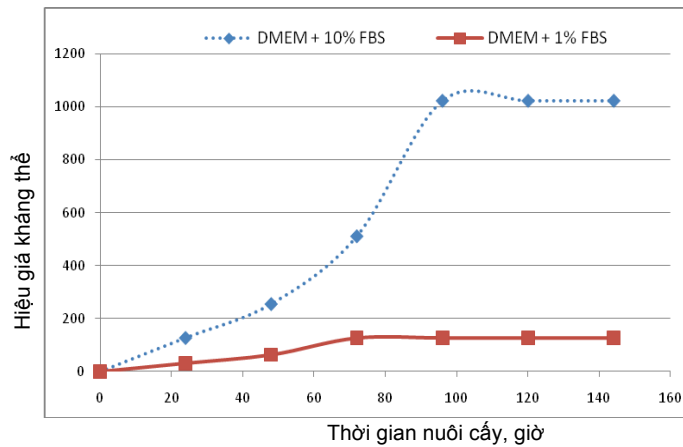
nuôi cấy. Hiệu giá kháng thể cực đại 2¹⁰ trong dịch nuôi cấy không thay đổi trong thời gian nuôi cấy nghiên cứu (đến 240 giờ). Đối với môi trường chứa 1% FBS thì hiệu giá kháng thể cực đại trong dịch nuôi cấy chỉ đạt là 2⁷ sau khoảng 50 giờ nuôi cấy.

Theo kết quả nghiên cứu này thì hiệu giá kháng thể trong dịch nuôi cấy đạt cực đại và duy trì ở mức độ cao trong suốt quá trình nuôi cấy mặc dù mật độ tế bào sống giảm đáng kể theo thời gian. Có thể sau khi đạt đến mật độ tối đa thì tế bào bắt đầu chết, khi chết thì tế bào bị ly giải và giải phóng kháng thể ra môi trường nuôi cấy. Bên cạnh đó một lượng tế bào

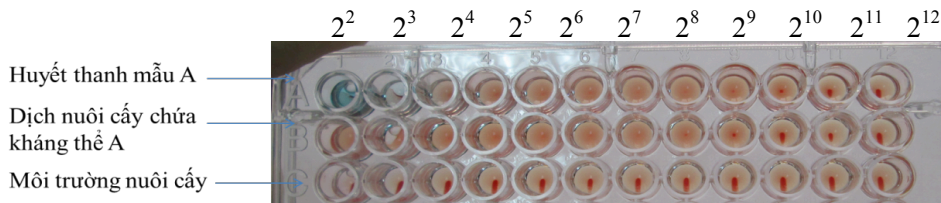
sống vẫn tiếp tục sinh trưởng để duy trì mật độ, một lượng tế bào già bị chết và bị phân giải làm cho lượng kháng thể trong dịch nuôi cấy được ổn định. Kết quả trên đây hoàn toàn phù hợp với kết quả thu được từ nghiên cứu của Sadetin và Bernhard, 1990.

Kết quả ở hình 4 cho thấy rằng khi cho dịch nuôi cấy phản ứng với hồng cầu mẫu A thì phản ứng ngưng kết rất mạnh. Kết quả đã tạo thành một đám ngưng kết duy nhất để kết tụ toàn bộ các tế bào hồng cầu trong phản ứng. Dịch xung quanh đám ngưng kết rất trong

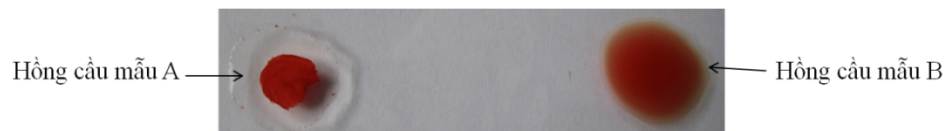
cho thấy không còn tế bào hồng cầu nào. Theo hướng dẫn đọc kết quả của phản ứng ngưng kết thì cường độ phản ứng tương đương 4+. Phản ứng bên phải ở hình 4 chỉ ra rằng dịch nuôi cấy không làm ngưng kết hồng cầu mẫu B. Thể hiện là các tế bào hồng cầu lơ lửng và khuếch tán đều trong dung dịch. Từ đó có thể kết luận rằng dịch nuôi cấy dòng tế bào A6G11C9 gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu chứa kháng nguyên A với cường độ mạnh. Kết quả ngưng kết này rất tương đồng với kết quả thu được từ các sinh phẩm thương mại.



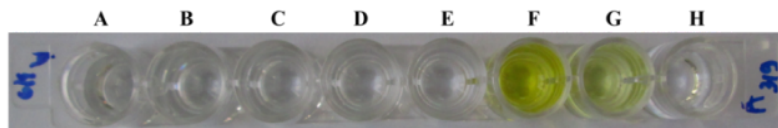
Hình 2. Hiệu giá kháng thể của dịch nuôi cấy tế bào A6G11C9 trong môi trường DMEM+1% FBS và DMEM+10% FBS theo thời gian.



Hình 3. Hiệu giá kháng thể của dịch nuôi cấy tế bào A6G11C9 trong môi trường DMEM+10% FBS thu tại thời điểm 96 giờ sau nuôi cấy.



Hình 4. Phản ứng ngưng kết hồng cầu của dịch nuôi cấy tế bào A6G11C9 trong môi trường DMEM+10% FBS thu tại thời điểm 96 giờ sau nuôi cấy.



Hình 5. Phản ứng Elisa xác định loại kháng thể miễn dịch của dòng tế bào A6G11C9.

Xác định loại globulin miễn dịch của kháng thể đơn dòng

Phương pháp ELISA đã được các tác giả Buchs, Nydegger (1989), Rieben (1991) sử dụng để xác định loại globulin miễn dịch. Bằng cách sử dụng các kháng thể đã biết trước để xác định kháng thể phản ứng. Trên cơ sở đó sẽ xác định được lớp của kháng thể tồn tại trong mẫu. Như đã nêu ở phần trên, kháng thể IgG và IgM đều có khả năng nhận biết kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu và gây ngưng kết hồng cầu. Tuy nhiên hiệu quả gây ngưng kết của kháng thể IgM cao hơn nhiều so với kháng thể IgG. Mục đích của nghiên cứu là tìm được dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng có khả năng gây ngưng kết tốt nhất hồng cầu chứa kháng nguyên A. Bởi vậy kháng thể do dòng tế bào lai sản xuất phải được xác định loại globulin miễn dịch. Kết quả ở hình 5 chỉ ra rằng vị trí F và G có phản ứng với kháng thể do tại các vị trí đó dung dịch chuyển màu vàng. Giá trị OD tại các vị trí phản ứng được đo ở bước sóng 450 nm (Bảng 1) để xác định phản ứng là âm tính hay dương tính.

Bảng 1. Giá trị OD₄₅₀ của phản ứng Elisa xác định loại kháng thể miễn dịch do dòng tế bào A6G11C9 sản xuất.

	OD ₄₅₀	A6G11C9
A	0,045	IgG1
B	0,043	IgG2a
C	0,041	IgG2b
D	0,046	IgG3
E	0,042	IgA
F	0,873	IgM
G	0,332	Kappa
H	0,046	Lamda

Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, nếu vị trí nào có giá trị OD tại 450 nm lớn hơn hoặc bằng giá trị 0,2 thì tại đó là dương tính nghĩa là chúng tương ứng với loại kháng thể đã được phủ lên giếng trước đó. Kết quả ở bảng 1 cho thấy giá trị OD₄₅₀ tại vị trí anti-IgM là 0,873 và vị trí anti-kappa đạt giá trị 0,33. Như vậy dòng tế bào A6G11C9 tiết kháng thể đơn dòng có chuỗi nặng là IgM, chuỗi nhẹ kappa.

Kết quả thu được hoàn toàn phù hợp với khả năng gây ngưng kết nhanh và mạnh của dịch nuôi cấy. Kháng thể IgM có 10 vị trí phản ứng nên khả năng bám bắt kháng nguyên của một IgM cao hơn IgG 5 lần. Chính vì thế khả năng gây ngưng kết tế

bào hồng cầu của kháng thể IgM cao hơn nhiều so với IgG.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Dòng tế bào lai A6G11C9 sinh trưởng tốt trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, tốc độ sinh trưởng cao hơn gấp 5 lần so với nuôi trong môi trường DMEM bổ sung 1% FBS.

Hiệu giá kháng thể của dịch nuôi cấy dòng tế bào lai A6G11C9 đạt cực đại là 2¹⁰ sau 100 giờ nuôi cấy.

Kháng thể đơn dòng sinh ra từ dòng tế bào lai A6G11C9 gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu chứa kháng nguyên A với cường độ mạnh.

Kháng thể đơn dòng sinh ra từ dòng tế bào lai A6G11C9 sinh ra thuộc lớp IgM, chuỗi nhẹ kappa.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng kinh phí của đề tài KC04.13/11-15 do Bộ Khoa học và Công nghệ tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Boraston R, Thompson PW, Garland S, Brich JR (1984) Growth and oxygen requirements of antibody producing mouse hybridoma cells in suspension culture. *Dev Biol Standard* 55: 103-111

Buchs JP, Nydegger UE (1989) Development of an ABO-ELISA for the quantitation of human blood group anti-A and anti-B IgM and IgG antibodies. *J Immunol Met* 118: 37-46.

Odeigah PG (1989) Monoclonal antibodies in ABO serology: an evaluation. *East Afr Med J* 66(11): 764-768.

Rieben R, Buchs JP, Flückiger E, Nydegger UE (1991) Antibodies to histo-blood group substances A and B: agglutination titers, Ig class, and IgG subclasses in healthy persons of different age categories. *Transfusion* 31(7): 607-615.

Sadiq F, Tisent A, Habti N, Radallah D, Amrani N, Benchemsi N (2005) Production of a new anti-A monoclonal reagent. *African J Biotechnol* 4(8): 844-846.

Sonneborn HH (1993) Monoclonal antibodies against red blood cell antigens used in routine practice and research. *Infusionsther Transfusionsmed. Suppl* 2: 41-46.

Stussi G, Huggel K, Lutz HU, Schanz U, Rieben R, Seebach

- JD (2005) Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method. *Br J Haematol* 130(6): 954-963.
- Voak D, Sacks S, Alderson T, Takei F, Lennox E, Jarvis J, Milstein C, Darnborough J (1980) Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: evaluating as a blood grouping reagent, *Vox Sang* 39(3):134-40.
- Reuveny S, Velez D, Riske F, Macmillan JD, Miller L (1985) Production of monoclonal antibodies in culture, *Dev Biol Standard* 60: 185-197.
- Reuveny S, Velez D, Macmillan JD, Miller L (1986) Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *J Immunol Method* 86: 53-59.
- Merten OW, Reiter S, Himmler G, Scheirer W, Katinger H (1985) Production kinetics of monoclonal antibodies. *Dev Biol Standard* 60: 439-227.
- van Wezel AL (1985) In *Animal Cell Biotechnology*, Eds Spier RE, Griffiths JB, Academic Press, London 1: 265-282.
- Velez D, Reuveny S, Miller L, MacMillan JD (1986) Kinetics of monoclonal antibody production in low serum growth medium. *J Immunol* 86: 45-52.
- Renard JM, Spagnoli R, Mazier C, Salles MF, Mandine E (1988) Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems. *Biotechnol Lett* 10: 91-96.
- Sadettin SO, Bernhard OP (1990) Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production, *J Biotechnol* 16: 259-278.

ISOTYPING ANTIBODIES PRODUCED FROM HYBRIDOMA A6G11C9

Nguyen Thi Trung, Truong Nam Hai

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Hybridoma technology was discovered in 1975 to produce the monoclonal antibodies. By this way, we can produce a desired antibody in large amounts. From a single hybrid cell line, they grow and develop to produce a monoclonal antibody with large enough quantities to use for the research, treatment and diagnosis. The level of the antibody producing is depended on the cell density and the incubation period. The growth capacity of each hybrid cell line depends on the composition of the substances in the culture medium of animal cells. Among them, fetal bovine serum is the most commonly used serum-supplement for the in vitro cell culture. This is due to it having a very low level of antibodies and containing more growth factors. In the previous studies, the hybrid cell line (designed A6G11C9) was the best one secreting the highest anti-A monoclonal antibodies, whose specificity agglutinated human red blood cells containing A antigen. This report showed the result of the study on the conditional culture and isotyping of the immunoglobulin. The hybrid cell line A6G11C9 was cultured in the DMEM medium with different level of fetal bovine serum. As the results, this hybridoma line grow in the DMEM medium containing 10% fetal bovine serum is five times faster than in the DMEM medium with 1% fetal bovine serum. The maximum of the cell density are 11.10^6 cells/ml after 50 hours inoculation. The maximum of the titer from culture supernatant are 1/1024 after 100 hours inoculation. The monoclonal antibodies derived from hybrid cell line A6G11C9 are IgM heavy chain and the kappa light chain.

Keywords: antibody isotyping, antigen A, hybridoma, anti-A monoclonal antibody, blood group A