

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA DÒNG TẾ BÀO LAI B4D10C9 SINH KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG GÂY NGỪNG KẾT KHÁNG NGUYÊN B TRÊN BỀ MẶT HỒNG CẦU

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: 16.9.2016

Ngày nhận đăng : 20.5.2017

TÓM TẮT

Dòng tế bào lai B4D10C9 sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu mang kháng nguyên B thuộc lớp IgM và chuỗi nhẹ kappa đã được tạo ra trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi. Trong công trình nghiên cứu này, các đặc điểm sinh học của dòng tế bào lai B4D10C9 như khả năng sinh trưởng, sinh kháng thể, sự ổn định về sinh trưởng và sinh kháng thể của dòng tế bào này được công bố. Dòng tế bào lai sinh trưởng tốt trong môi trường DMEM bổ sung huyết thanh bê đến nồng độ cuối cùng là 1% và 10%. Tuy nhiên, khi nuôi trong môi trường chứa 10% huyết thanh bê thì mật độ tế bào tối đa đạt $9,9 \times 10^5$ tế bào/ml sau 50 giờ nuôi cấy. Hiệu giá kháng thể tối đa trong dịch nuôi cấy đạt 1/512 sau thời điểm 150 giờ nuôi cấy. Nhưng nuôi dòng tế bào này trong môi trường bổ sung 1% huyết thanh bê thì mật độ tế bào tối đa đạt $3,4 \times 10^5$ tế bào/ml sau 72 giờ nuôi cấy. Hiệu giá kháng thể đạt cực đại là 1/64 kể từ thời điểm sau 50 giờ nuôi cấy. Tế bào được nuôi cấy qua 3 thế hệ khác nhau và đánh giá khả năng sinh kháng thể của chúng qua từng thế hệ. Kết quả là, dòng tế bào này sinh trưởng và tiết kháng thể ổn định qua các thế hệ nuôi cấy. Hàm lượng kháng thể trong môi trường nuôi thu tại thời điểm 150 giờ nuôi cấy tương đương 100 $\mu\text{g/ml}$. Như vậy, tế bào lai B4D10C9 sinh trưởng và tiết kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên B tốt hơn khi nuôi trong môi trường DMEM chứa 10% huyết thanh bê. Việc bảo quản, lưu giữ và phục hồi không làm ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và sinh kháng thể của dòng tế bào này.

Từ khóa: Kháng thể đơn dòng kháng B, nhóm máu B, tế bào lai, hiệu giá kháng thể, mật độ tế bào

ĐẶT VẤN ĐỀ

Phát hiện ra nhóm máu A, B, O của Landsteiner năm 1901 là bước tiến rất quan trọng trong dịch vụ truyền máu, bởi vì việc xác định được chính xác nhóm máu của người cho và người nhận đảm bảo an toàn trong truyền máu. Kháng nguyên A, B có mặt trên bề mặt tế bào hồng cầu. Người ta thường sử dụng huyết thanh mẫu (chính là các kháng thể đơn dòng đã biết) để xác định các kháng nguyên này tồn tại hay không tồn tại trên bề mặt hồng cầu. Ở Việt Nam, toàn bộ huyết thanh mẫu đều được nhập khẩu từ các công ty của nước ngoài sản xuất. Hiện chưa có đơn vị nào phát triển kháng thể đơn dòng từ nguồn kháng nguyên đặc thù của Việt Nam để sử dụng làm huyết thanh mẫu định nhóm máu. Do đó, chúng tôi tiến hành các nghiên cứu để phát triển một dòng tế bào lai có thể sản xuất kháng thể đơn dòng đặc thù cho quần thể người Việt. Kháng thể này sẽ được nghiên cứu để phục vụ cho mục đích chẩn đoán nhóm máu. Bằng

công nghệ tế bào lai đã được Kohler và Milstein công bố năm 1975 dòng tế bào lai đơn đã được sàng lọc để sản xuất kháng thể đơn dòng chỉ nhận biết một loại epitope duy nhất. Voak *et al.* (1980) công bố sản xuất được kháng thể đơn dòng kháng A từ tế bào lai. Năm 1982, Gaur đã tạo được kháng thể đơn dòng kháng B dùng làm chất định nhóm máu mà Voak *et al.* (1980) đã nghiên cứu phát triển kháng thể kháng A và kháng B với giá thành hạ. Năm 1984, Fletcher *et al.* cũng đã phát triển thành công các kháng thể đơn dòng đặc hiệu nhóm máu A, B. Năm 2006, Iyer *et al.* đã tạo ra dòng tế bào lai 2C4D5F10 sản xuất kháng thể đơn dòng kháng B có ái tính và độ đặc hiệu cao. Năm 2012, Abhyankar *et al.* đã công bố sàng lọc được dòng tế bào lai 3D5D7G2 sản xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu hồng cầu B. Đặc biệt, đây là dòng tế bào đầu tiên được phát triển ở Ấn Độ sử dụng nguồn kháng nguyên là hồng cầu người bản địa. Giá thành của kháng thể đơn dòng mà công trình công bố chỉ bằng 1/5 giá thành thương mại.

Tại Việt Nam, Nguyễn Thị Trung *et al.* (2016) đã công bố tạo được dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết nhóm máu kháng nguyên A. Sau đó, Nguyễn Thị Trung *et al.* (2016), công bố tạo được dòng tế bào B4D10C9 sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết hồng cầu mang kháng nguyên B. Dòng tế bào lai được tạo ra cần được kiểm tra độ ổn định về khả năng sinh trưởng và khả năng tiết kháng thể trước khi được sử dụng để sản xuất kháng thể. Kháng thể đơn dòng được sinh ra với hàm lượng cao trong dịch nuôi cấy là đích mà tất cả các nhà sản xuất quan tâm. Vì thế, dòng tế bào lai B4D10C9 được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau để tìm điều kiện tế bào sinh trưởng ổn định hơn, tiết kháng thể ổn định và ở mức độ cao. Kháng thể đơn dòng trong dịch nuôi được cô đặc và kiểm tra khả năng gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu.

Trong công trình này, các đặc điểm sinh học của dòng tế bào lai B4D10C9 được công bố. Tế bào lai B4D10C9 sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, hiệu giá kháng thể là 1/512. Hàm lượng kháng thể trong dịch nuôi cấy khoảng 100 µg/ml. Dòng tế bào này sinh trưởng ổn định, cường độ phản ứng ngưng kết hồng cầu B của dịch nuôi cấy tế bào qua 3 thế hệ là không đổi. Tế bào đã được lưu trữ, bảo quản và hồi phục để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

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 được mua từ Viện huyết học và truyền máu Trung ương.

Dòng tế bào lai B4D10C9 là sản phẩm của đề tài KC04.13/11-15 được sử dụng để nghiên cứu các đặc tính của chúng.

Môi trường DMEM (Gibco, Mỹ); Huyết thanh bê FBS, tá chất hoàn toàn (FCA), tá chất không hoàn toàn (FIA); Bộ huyết thanh mẫu (Biorad, Pháp). Các hóa chất khác được mua từ hãng Merck, Đức.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phục hồi tế bào

Ống giống tế bào (chứa 10^5 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% và

chuyển toàn bộ tế bào trong ống giống sang ống 15 ml đã chứa sẵn 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, nuôi ở 37°C, 5% CO₂ trong thời gian 24 giờ.

Phương pháp cấy truyền tế bào

Khi tế bào đã sinh trưởng thành một lớp đơn liên tục (monolayer) thì tiến hành cấy truyền tế bào sang chai nuôi cấy mới. Lắc mạnh chai nuôi cấy để tế bào tách khỏi bề mặt chai nuôi cấy. Trộn đều tế bào trong chai và chuyển một thể tích huyền phù tế bào sang chai nuôi cấy mới đã có sẵn lượng 5 ml môi trường DMEM + 10% FBS nhất định (tỉ lệ cấy truyền là 1/5). Tế bào được nuôi ở 37°C, 5% CO₂.

Phản ứng ngưng kết hồng cầu trên phiến kính

Chọn 2 vị trí 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. Nhỏ thêm một giọt dịch nuôi cấy/huyết thanh mẫu/kháng thể vào 2 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.

Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển của tế bào lai

Phục hồi tế bào lai từ ống giống bảo quản trong nitơ lỏng -196°C. Cấy truyền tế bào ra chai T75 cm² để thu lượng lớn tế bào cấy dùng cho cấy chuyển để lập đường cong sinh trưởng. Xác định lượng số lượng tế bào và chuẩn bị 12 ml huyền phù tế bào lai với mật độ 10^5 tế bào/ml. Chuyển 1 ml huyền phù tế bào vào mỗi giếng của đĩa nuôi cấy 24 giếng. Nuôi tế bào ở 37°C, 5% CO₂. Cứ sau 24 giờ toàn bộ tế bào và dịch nuôi trong một giếng của đĩa được thu lại, xác định mật độ tế bào sống và thu dịch nuôi cấy dùng cho các phân tích sau này.

Số thế hệ là số lần mà tế bào phân chia (g) thì:

$$Nt = No.2^g \rightarrow g = \log(Nt/No)/\log 2 = (\log Nt - \log No)/\log 2$$

Tốc độ sinh trưởng (k) là số thế hệ sinh ra trong một đơn vị thời gian (thường dùng đơn vị một giờ): $k = g/t = (\log Nt - \log No)/(t \cdot \log 2)$

Nên thời gian thế hệ là thời gian cần thiết để số lượng quần thể tăng lên gấp đôi: $T = 1/k$. Trong đó: t: thời gian nuôi cấy; Nt: số lượng tế bào ở thời điểm t; No: số lượng tế bào ban đầu

Xác định nồng độ kháng thể trong dịch nuôi cấy bằng so sánh với nồng độ BSA

Chuẩn bị dung dịch BSA 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 $\mu\text{g/ml}$ để làm nồng độ chuẩn. Dịch nuôi cấy tế bào lai qua 3 thể hệ và dải nồng độ BSA chuẩn được điện di trên gel SDS-PAGE. Sau đó so sánh băng protein kháng thể ở 3 thể hệ với băng BSA chuẩn để xác định tương đối hàm lượng kháng thể có trong dịch nuôi cấy tế bào lai.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

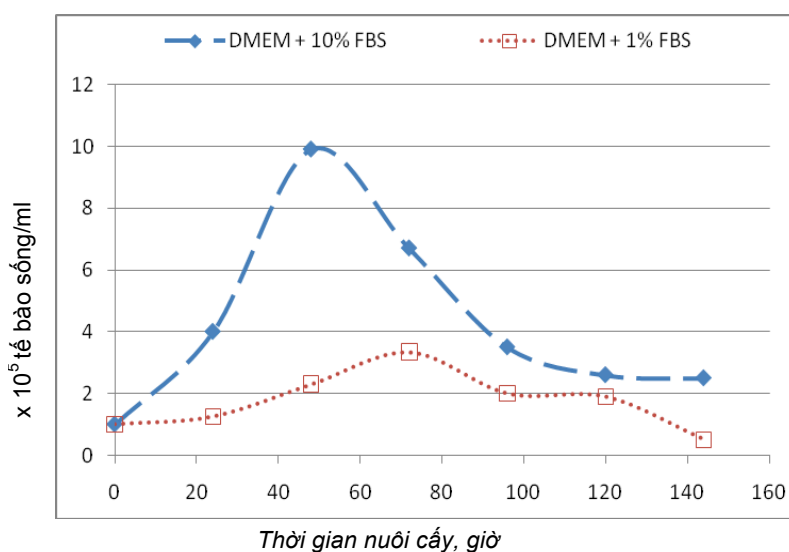
Khả năng sinh trưởng của tế bào lai B4D10C9

Tế bào lai B4D10C9 được nuôi trong hai môi trường khác nhau: DMEM bổ sung 1% FBS và DMEM bổ sung 10% FBS với mật độ ban đầu 10^5 tế bào/ml. Không quan sát thấy pha tiềm phát và pha cân bằng trong đường cong sinh trưởng đối với môi trường chứa 10% FBS. Mật độ tế bào tối đa đạt được là $9,9 \cdot 10^5$ tế bào/ml ở thời điểm sau 48 giờ nuôi cấy.

Tốc độ sinh trưởng trung bình là $0,030 \text{ h}^{-1}$, sau đó số lượng tế bào sống giảm dần và hầu hết tế bào chết sau 150 giờ (Hình 1).

Trong môi trường chứa 1% FBS thì tế bào lai B4D10C9 sinh trưởng chậm nên pha tiềm phát kéo dài, không quan sát được pha cân bằng trong đường cong sinh trưởng. Mật độ tế bào tối đa đạt $3,4 \cdot 10^5$ tế bào/ml sau khoảng 72 giờ nuôi cấy với tốc độ sinh trưởng trung bình $0,011 \text{ h}^{-1}$. Toàn bộ tế bào chết sau 144 giờ nuôi cấy (Hình 1). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Sadettin, Bernhard (1990), các tác giả đã chỉ ra là khi nồng độ FBS trong môi trường nghiên cứu cao hơn thì mật độ tế bào lai 167.4 G5.3 cũng cao hơn.

Tốc độ sinh trưởng của dòng tế bào lai B4D10C9 trong môi trường chứa 10% FBS cao hơn trong môi trường chứa 1% FBS là 3 lần. Mật độ tế bào tối đa thu được cũng cao hơn 3 lần, nhưng thời gian đạt mật độ tối đa ở môi trường chứa 10% FBS nhanh hơn 24 giờ.



Hình 1. Đồ thị biểu diễn mật độ tế bào lai B4D10C9 sinh trưởng trong môi trường DMEM+10% FBS và DMEM+1% FBS theo thời gian.

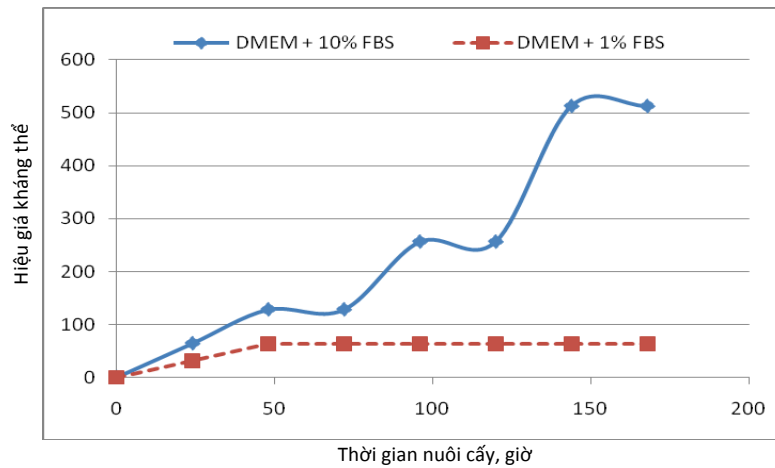
Khả năng sản xuất kháng thể của dòng tế bào lai B4D11C9

Như trên đã trình bày, mật độ tế bào tối đa đạt được khác nhau khi nuôi tế bào lai B4D10C9 trong môi trường chứa nồng độ FBS khác nhau. Mật độ tối đa của tế bào có thể liên quan chặt chẽ đến lượng kháng thể đơn dòng kháng B do chính dòng tế bào này sinh ra.

Hình 2 trình bày đồ thị hiệu giá kháng thể xác định được tại cùng thời điểm thu mẫu xác định mật độ tế bào. Kết quả nhận được cho thấy, kháng thể đơn dòng kháng B được sản xuất bởi dòng tế bào lai B4D10C9 hình thành trong suốt quá trình sinh trưởng của tế bào. Hiệu giá kháng thể đơn dòng đạt cực đại vào cuối pha suy vong, tương đương với thời điểm 144 giờ sau nuôi cấy. Hiệu giá kháng thể cực đại từ dòng tế bào lai

B4D10C9 trong môi trường chứa 10% FBS là 1/512. Dòng tế bào lai B4D10C9 trong môi trường chứa 1%

FBS sinh ra kháng thể với hiệu giá kháng thể cực đại là 1/64 sau thời điểm nuôi cấy 50 giờ (Hình 2).



Hình 2. Đồ thị biểu diễn hiệu giá kháng thể của dịch nuôi cấy tế bào B4D10C9 trong môi trường DMEM+1% FBS và DMEM+10% FBS theo thời gian.

Kết quả trình bày ở hình 2 đã chỉ ra rằng thời điểm hàm lượng kháng thể cao nhất không trùng với thời điểm mật độ tế bào cao nhất. Tế bào sinh trưởng tạo mật độ tối đa rồi chết, có thể sự chết của tế bào đã làm giải phóng một lượng lớn kháng thể vào môi trường nuôi cấy.

Sự ổn định về sinh trưởng và phát triển của dòng tế bào B4D10C9

Kết quả ở bảng 1 cho thấy mật độ tế bào sống đạt được sau 48 giờ nuôi cấy ở các thế hệ thứ nhất, thứ hai và thứ 3 tương ứng là $(1,000 \pm 0,037) \times 10^6$;

$(0,985 \pm 0,025) \times 10^6$; $(0,990 \pm 0,035) \times 10^6$ tế bào/ml. Như vậy, tế bào lai B4D10C9 sinh trưởng khá ổn định qua các thế hệ nuôi cấy (Hình 3).

Dịch nuôi cấy tế bào B4D10C9 ở từng thế hệ được thu vào thời điểm 48 giờ (trùng thời điểm chụp ảnh tế bào) để kiểm tra cường độ phản ứng ngưng kết hồng cầu. Cường độ ngưng kết hồng cầu B giữa dịch nuôi cấy tế bào B4D10C9 ở cả 3 thế hệ là như nhau và đều đạt 3+ (Hình 4). Như vậy, khả năng sản xuất kháng thể của dòng tế bào lai B4D10C9 là khá ổn định qua 3 thế hệ nuôi cấy.

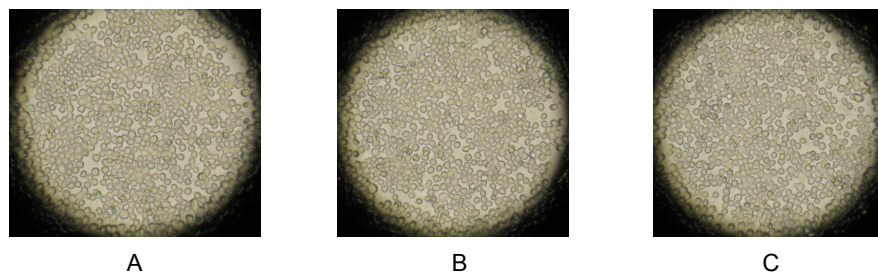
Bảng 1. Mật độ tế bào B4D10C9 sống tại thời điểm 48 giờ nuôi cấy (tế bào/ml).

	Thế hệ thứ 1	Thế hệ thứ 2	Thế hệ thứ 3
Đếm lần 1	48×2.10^4	49×2.10^4	50×2.10^4
Đếm lần 2	52×2.10^4	48×2.10^4	47×2.10^4
Đếm lần 3	51×2.10^4	49×2.10^4	50×2.10^4
Đếm lần 4	49×2.10^4	51×2.10^4	52×2.10^4
Trung bình	$(1,000 \pm 0,037) \times 10^6$	$(0,985 \pm 0,025) \times 10^6$	$(0,990 \pm 0,035) \times 10^6$

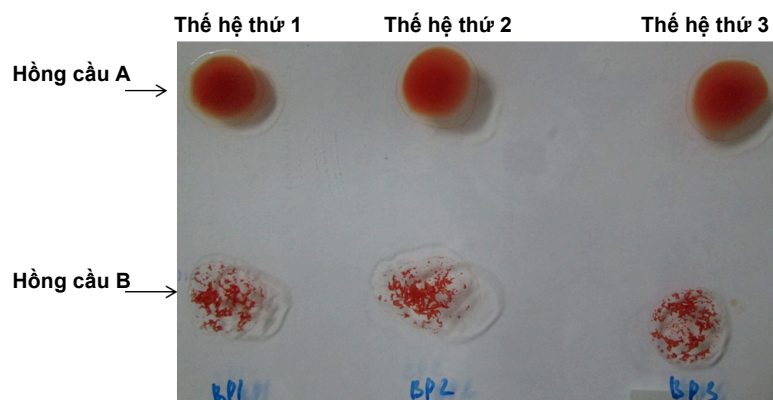
Hàm lượng kháng thể đơn dòng do tế bào B4D10C9 sinh ra

Ban đầu kháng thể được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực để thu kháng thể đặc hiệu. Do kháng thể cần tinh sạch phải tồn tại trong dịch cấy có pH2 một thời gian ngắn, điều này làm cho khả năng ngưng kết hồng cầu của kháng thể đó xảy ra rất yếu. Mặt khác khối lượng kháng

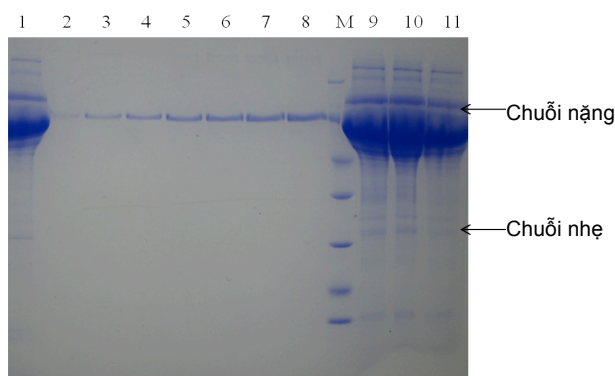
thể thu được không nhiều (các kết quả không được trình bày ở đây). Do đó, phương pháp so sánh băng protein trên gel SDS-PAGE giữa protein trong dịch nuôi và băng BSA ở các nồng độ khác nhau 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 µg/ml được sử dụng để xác định tương đối hàm lượng kháng thể. Dịch nuôi cấy tế bào lai được pha loãng 5 lần sau đó chạy điện di cùng với dãy BSA chuẩn (Hình 5).



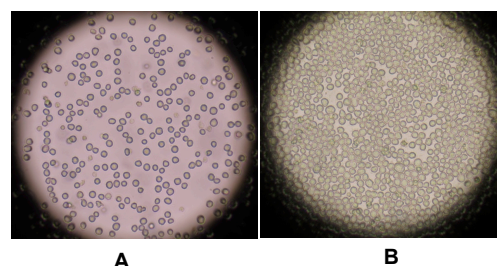
Hình 3. Hình ảnh tế bào lai B4D10C9 quan sát được dưới kính hiển vi soi ngược ở thời điểm 48 giờ sau nuôi cấy (độ phóng đại 1000 lần: thị kính 20 lần, vật kính 10 lần, máy ảnh 5 lần). A: thể hệ thứ 1; B: thể hệ thứ 2 và C: thể hệ thứ 3.



Hình 4. Phản ứng ngưng kết hồng cầu của dịch nuôi tế bào B4D10C9 (thu tại thời điểm 48 giờ, hồng cầu mẫu 10%).



Hình 5. Điện di SDS-PAGE xác định hàm lượng kháng thể kháng B trong dịch nuôi cấy tế bào B4D10C9. 1: Môi trường DMEM+10%FBS; 2-8: BSA hàm lượng tương ứng 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 µg/ml. 9-11: Dịch nuôi cấy tế bào lai B4D10C9 tương ứng với các thể hệ thứ nhất, thứ hai và thứ ba; M: Marker.



Hình 6. Ảnh chụp sự phát triển của tế bào B4D10C9 tại thời điểm mở giống (A) và sau 48 giờ nuôi cấy (B).

Nghiên cứu lưu trữ tế bào lai B4D10C9

Tỷ lệ tế bào B4D10C9 phát triển sau 48 giờ nuôi cấy được thể hiện trong bảng 3. Số liệu thu được trong bảng 3 cho thấy tỷ lệ tế bào sống sót trong các thí nghiệm rất cao, đạt trung bình ở các lần thí

nghiệm là 91,98%. Kết quả chỉ ra rằng tế bào lai B4D10C9 phục hồi tốt sau khi được lưu giữ, quy trình bảo quản tế bào lai của chúng tôi sử dụng đạt yêu cầu. Sự phát triển của tế bào lai B4D10C9 trong chai nuôi cấy sau 48 giờ nuôi cấy được minh họa ở

hình 6. Ở thời điểm mở giống các tế bào lai phân bố rải rác trên bề mặt chai nuôi cấy (Hình 6A). Sau 48 giờ nuôi cấy, các tế bào đã sinh trưởng mạnh, phân chia tạo thành một lớp tế bào phủ kín bề mặt nuôi cấy.

Bảng 3. Tỷ lệ sống của tế bào lai B4D10C9 sau bảo quản.

Thí nghiệm	Tình trạng tế bào (số lượng/ô đếm)	
	Tế bào sống	Tế bào chết
Chai nuôi 1	25,3 ± 3,8	2,3 ± 1,7
Chai nuôi 2	26,8 ± 4,6	2,5 ± 1,3
Chai nuôi 3	25,0 ± 6,5	2,0 ± 1,8
Trung bình	25,7 ± 1,0	2,3 ± 0,3
Tỷ lệ sống	91,89%	

KẾT LUẬN

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

Tế bào lai B4D10C9 sản xuất được 100 µg/ml kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên B sau 150 giờ nuôi cấy trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS. Mật độ tế bào tối đa đạt được là 6x10⁶ tế bào/ml sau 50 giờ nuôi cấy. Hiệu giá kháng thể tối đa trong dịch nuôi cấy đạt 2⁹ sau thời điểm 150 giờ nuôi cấy.

Dòng tế bào B4D10C9 sinh trưởng và phát triển ổn định qua 3 thế hệ. Việc bảo quản, lưu giữ và phục hồi không làm ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và sinh kháng thể của dòng tế bào này.

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 Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abhyankar AV (2012) Indigenously developed monoclonal antibody specific for human blood group B. *Journal of Hematological Malignancies* 2: 18–24.

Fletcher A, Harbour C, de Zwart R (1984) Monoclonal antibodies specific for blood groups A and B. *Aust J Exp Biol Med Sci* 62: 421–428.

Gaur V, (1982) Monoclonal anti-B as a new blood typing reagent. *Vox Sanguinis* 42(2): 110–111.

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): 561–564.

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

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): 411–417.

Sadettin SO, Bernhard OP (1990) Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production. *J Biotechnol* 16: 259–278.

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 Sanguinis* 39: 134–140.

Voak D, Lennox E, Sacks S, Milstein C, Darnborough J (1982) Monoclonal anti-A and anti-B: development as cost-effective reagents. *Med Lab Sci* 39(2): 109–122.

STUDY ON SOME PROPERTIES OF THE HYBRID CELL B4D10C9 PRODUCING THE ANTI B MONOCLONAL ANTIBODY WHICH WAS AGGLUTINATED THE B ANTIGENS ON THE SURFACE OF RED BLOOD CELLS

Nguyen Thi Trung, Trương Nam Hai

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The B4D10C9 hybridoma cell line producing the monoclonal antibody which was specifically agglutinated red blood cells B group, belongs to the IgM class and kappa light chains that have been created in our previous study. This study presents some biological characteristics of B4D10C9 such as the capability of

growth, anti B monoclonal antibody producing, the stability of growth and cell line and antibody secreting of this cell line. The hybridoma cells grew well in the DMEM medium added with fetal bovine serum (FBS) at the final concentration of 1% or 10%. However, the maximum density of cells reached $9,9 \times 10^5$ cells per ml after 50 hours post incubation only when it was cultured in the medium containing 10% of FBS. The maximum antibody titers in the supernatant that collected after 150 hours of culture reached 1/512. In contrast to that, the maximum density of cells only reached $3,4 \times 10^5$ cells/ml after 72 hours post incubation when was cultured in DMEM medium containing 1% FBS. The maximum antibody titer was 1/64 after 50 hours post incubation. These cells were cultured through 3 different generations and the ability of antibody production in each generation was evaluated. As a result, this cell line had continuous growth stability and antibody secretion through 3 generations. The quantity of monoclonal antibody obtained from the supenantant of the culture medium at 150 hours of incubation was about 100 micrograms per ml. Thus, the growth of the cell line B4D10C9 and its ability of secretion of anti B monoclonal antibody were better when was cultured in the DMEM medium containing 10% fetal bovine serum. Preservation, storage and recovery does not affect to the growth and antibody producing of this cell line.

Keywords: *antibody titer, cell density, hybridoma, monoclonal antibody, red blood cells B group.*