

杂交瘤细胞克隆化的常用方法

杂交瘤克隆化一般是指将抗体阳性孔进行克隆化。因为经过 HAT 筛选后的杂交瘤克隆不能保证一个孔内只有一个克隆,在实际工作中,可能会有数个甚至更多的克隆,要想将这些细胞彼此分开就需要克隆化。克隆化的方法很多,有有限稀释法、软琼脂法、单细胞显微操作法、单克隆细胞集团显微操作法和荧光激活细胞分类仪 (FACS) 分离法。这里介绍最简单也是使用最广泛的前两种方法:

有限稀释法

材料

96 孔细胞培养板、HT 培养基、活力强的杂交瘤细胞、小鼠腹腔细胞

方法

1. 制备小鼠腹腔巨噬细胞 (饲养细胞) ;
2. 制备待克隆的杂交瘤细胞悬液,用含 20%血清的 HT 培养基稀释至每毫升含 2.5、15、50 个细胞 3 种不同的稀释度 ;
3. 按照每毫升加入 5×10^4 - 1×10^5 细胞的比例,在上述杂交瘤细胞悬液中分别加入腹腔巨噬细胞 ;
4. 进行杂交瘤细胞 96 孔板分装,每个稀释度 32 孔,每孔量为 0.2ml,每孔的杂交瘤细胞数分别为 0.5、3 和 10 ;
5. 37°C、7.5% CO₂ 湿润培养 7-10 天,出现肉眼可见的克隆即可检测抗体 ;在倒置显微镜下观察,标出只有单个克隆生长的阳性孔,再次进行克隆
6. 重复上述步骤 3~5 次,直至阳性孔率 100%
7. 进行抗体检测、细胞扩大培养并冻存。

说明 : 本法中 (b) (c) (d) 等步骤也可简化为将计数后的杂交瘤细胞准确的进行系列稀释,直至每毫升含 10 个细胞,按每孔接种 0.1ml 细胞悬液,即每孔含 1 个细胞。

软琼脂法

材料

HT 培养基（双倍浓度）、小鼠腹腔细胞、灭菌平皿、活力很好的杂交瘤细胞、45℃水浴、2%琼脂糖生理盐水（用 0.15mol/L NaCl 配置的 2.0%琼脂糖，称取 2.0g 细胞培养用琼脂糖，悬浮于 100ml 0.15mol/L NaCl，121℃高压灭菌 15 分钟，分装 10ml 小瓶，冷却后 4℃保存）

方法

1. 在培养皿中制备单层饲养细胞（小鼠腹腔细胞）；
2. 临用前将 2.0%琼脂糖生理盐水溶液与等量双倍浓度的 HT 培养液混匀，配成 1%琼脂糖培养液，45℃水浴中温育；
3. 制备杂交瘤细胞悬液：吸取平皿上层培养液，加入 1%琼脂糖培养液 3ml，室温 10 min；
4. 取杂交瘤细胞悬液 1ml，加入 1%琼脂糖培养液 1ml 混匀，铺于培养皿上层；
5. 37℃、7.5% CO₂湿润培养 7-14 天，克隆生长至 2mm 时，用毛细吸管吸出克隆，直接转种于含有饲养细胞的 24 孔板，扩大培养；
6. 吸取上清，检测抗体，阳性孔可继续克隆化，或扩大培养、冻存。

注意事项

杂交瘤细胞的克隆化需尽早进行，避免其他细胞影响了抗体分泌细胞的生长。

注意无菌操作，一旦发现污染必须及时处理。

做克隆化培养的小牛血清必须是优质血清。

每次克隆化得到的阳性亚克隆，在继续进行克隆化或扩大培养的同时，应及时冻存几支。

更多阅读

[杂交瘤单抗制备实验流程](#)

[单克隆抗体分类及单抗发展历程](#)

相关服务

[单克隆抗体制备服务](#)

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

平台优势



支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫



记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性



单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失



重轻链天然配对,亲和力更优



高通量,周期短,单抗发现快至29天



ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



小鼠



兔



羊驼



人源化小鼠



猪



犬

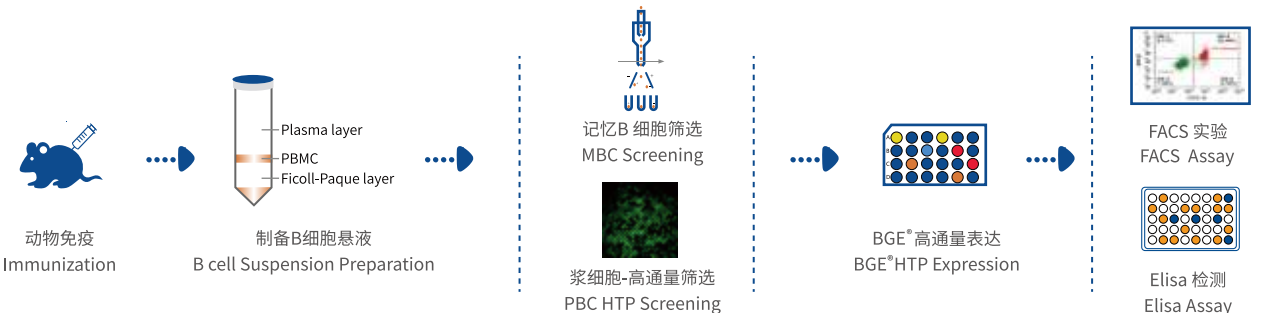


绵羊



人

服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

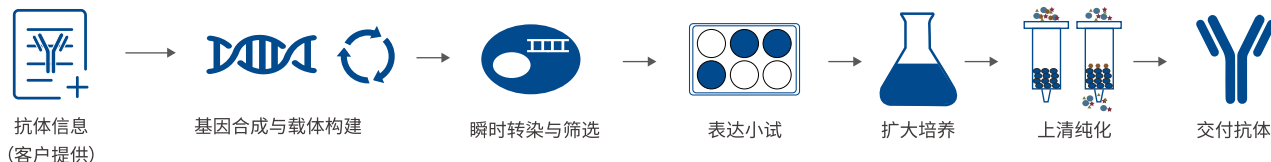
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

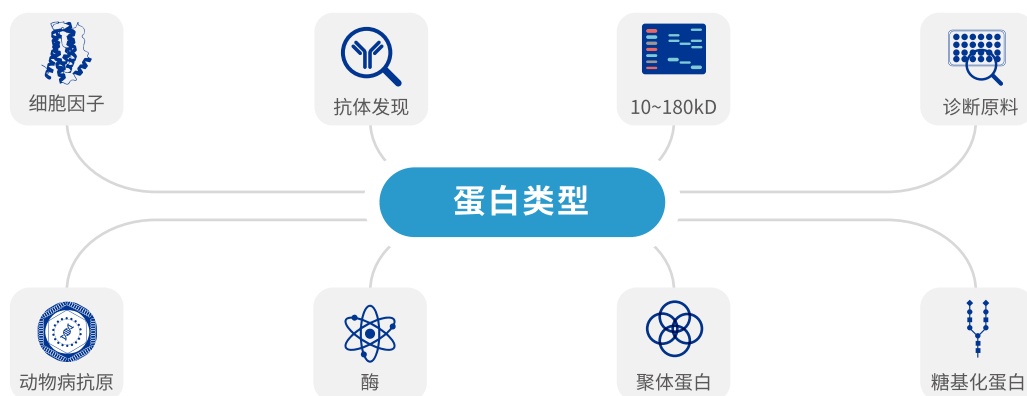


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4 Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

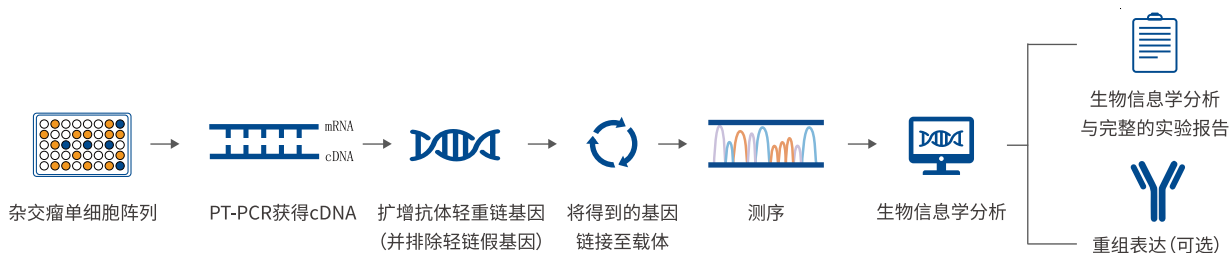
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程

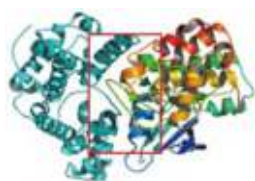


5 Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



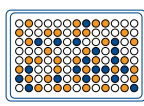
基因合成&质粒抽提



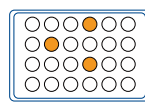
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L