

单克隆抗体制备实验

1. 案例概述	2
2. 实验设计	2
3. 小鼠免疫	2
4. 细胞融合	3
5. 阳性细胞株筛选	3
6. 阳性细胞株亚克隆（有限稀释法）	4
7. 细胞定株	4
8. 抗体制备	4
9. 抗体纯化	4
10. 抗体配对	5
10.1. 正反配对实验检测结果	5
10.2. 配对结果	6
11. 服务网址	6

1. 案例概述

某客户在制备配对的单克隆抗体时遇到困难，制备的抗体特异性和效价较低，且无法筛选得到配对的单克隆抗体。德泰生物接手该项目之后，仔细检查了客户提供的抗原和实验过程，发现客户制备的抗原纯度不高，并且免疫的小鼠数量太少，使得配对成功率降低。我们有针对性地制定了实验方案，对客户提供的抗原进行再次纯化，免疫小鼠的数量增加到 10 只，最终获得高质量的配对单抗与对应的杂交瘤细胞株。

2. 实验设计

由于客户提供的抗原纯度不够，在实验开始之前，我们对抗原进行了再次纯化，使抗原纯度达到 90%以上。将抗原注射到小鼠体内后，取小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合，HAT 培养基筛选杂交瘤细胞，ELISA 检测并筛选阳性细胞克隆，阳性孔进行 3 次有限稀释，扩大培养稳定的亚克隆，直至亚克隆细胞的上清阳性率达到 100%。再将阳性单克隆注入小鼠腹腔培养，最后取腹水用 Protein A/G 亲和层析，获得高质量的抗体。对得到的单克隆抗体编号，进行正反配对实验，根据结果筛选配对抗体。

3. 小鼠免疫

准备免疫小鼠的抗原、PBS（灭菌）溶液、弗氏完全佐剂以及 10 只健康小鼠。弗氏完全佐剂乳化以后，注射到小鼠腹腔，进行初次免疫。初次免疫结束两周后，进行第二次免疫。在二次免疫结束一周后，采血检测，再进行第三次免疫，并于一周后采血检测。融合前 2-3 天，进行最后一次免疫（直接注射，不加佐剂，不乳化）。

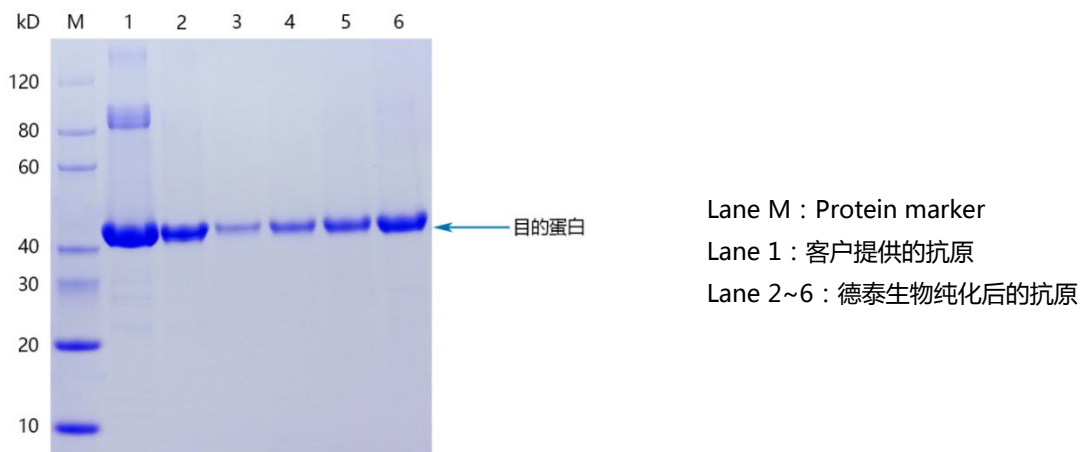


图 3-1 抗原蛋白的电泳检测结果

稀释倍数	OD值
1:200	4.423
1:600	3.945
1:1800	3.693
1:5400	3.588
1:16200	1.755
1:48600	0.933
1:145800	0.41
阴性对照	0.08

图 3-2 第三次免疫采血检测结果

4. 细胞融合

融合前铺饲养细胞板，用 SP2/0 复苏细胞，生长至对数生长期。再用 SP2/0 处理，将细胞吹散离心，用 DMEM 清洗后备用。处死小鼠，取小鼠脾细胞，使脾细胞与 SP2/0 混合，离心后弃上清，打散混合细胞。37°C 水浴，加入试剂处理后，再水浴静置 10min。10min 后离心，弃上清，加入 HAT 培养基。轻轻将细胞吹散，铺板，放入培养箱培养，融合 7-8 天后给细胞换液（HAT 培养基换成 HT 培养基），10 天后进行筛选检测。

5. 阳性细胞株筛选

提前包被好对应抗原板。全换液 2-3 天后进行整板检测。检测之后挑选阳性孔，确定后期亚克隆的细胞。

吸光值	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.913	1.286	1.152	0.917	2.636	0.698	0.938	0.894	0.686	0.807	1.025	2.64
B	1.227	0.243	0.351	0.539	0.611	0.203	2.896	2.635	0.701	1.946	0.837	0.469
C	0.326	0.341	0.312	3.416	0.491	0.419	0.442	3.378	2.499	0.523	2.745	0.344
D	0.368	0.303	3.158	0.243	0.374	0.489	0.497	0.55	0.411	0.535	0.927	0.547
E	0.32	0.257	0.229	0.236	0.289	0.343	3.244	0.296	0.353	0.334	0.483	0.437
F	0.386	0.288	0.284	0.355	0.35	2.09	0.654	0.225	0.455	1.442	0.335	0.505
G	0.307	2.185	0.381	0.224	0.376	0.335	0.645	0.313	1.503	0.387	1.299	0.449
H	0.322	0.418	0.391	0.41	0.447	0.727	1.038	3.287	0.464	0.658	1.766	4.632

表 5-1 整板检测结果（H12 孔为阳性对照），标红的孔为阳性孔

6. 阳性细胞株亚克隆（有限稀释法）

一般进行三次亚克隆，每次亚克隆前应提前铺好饲养细胞板，配制 HT 培养基。根据细胞计数结果进行亚克隆。每次亚克隆结束后（一般 7-10 天即可在板底看到单个克隆），挑检亚克隆板，对单克隆阳性细胞团进行再次的亚克隆。

7. 细胞定株

将第三次亚克隆后依然是阳性的单克隆细胞扩大培养。待细胞长满 96 孔板板底，转移细胞至 24 孔板进行培养。等到细胞再次长满 24 孔板板底，将细胞转移至 T25 细胞瓶中进行培养。一旦单克隆阳性细胞长满 T25 细胞瓶瓶底，冻存细胞，搜集细胞培养上清液用于检测效价。每一株细胞应多冻存几次，以防细胞株丢失。在细胞培养过程中，可收集腹水，腹水收集量为 10ml 左右。

8. 抗体制备

培养细胞到对数期以后，吹下细胞，离心、弃上清。加入基础培养基（不含 FBS）或灭菌 PBS 缓冲液并重悬，进行细胞计数，计算细胞量。向小鼠腹腔注射细胞（标准接种剂量是每只 0.5ml，提前 3-5 天向小鼠腹腔注射液体石蜡），7-10 天后收集腹水。一只小鼠一般可收集 2-3 次腹水，每次收集腹水时间间隔一天。腹水收集结束后，处死小鼠。

9. 抗体纯化

腹水收集后，离心，去除细胞、残渣、小颗粒物质以及脂肪滴等杂质，留上清。上清离心后，再用滤纸过滤 2-3 次，除去小油脂，再用 ProteinA 纯化抗体。

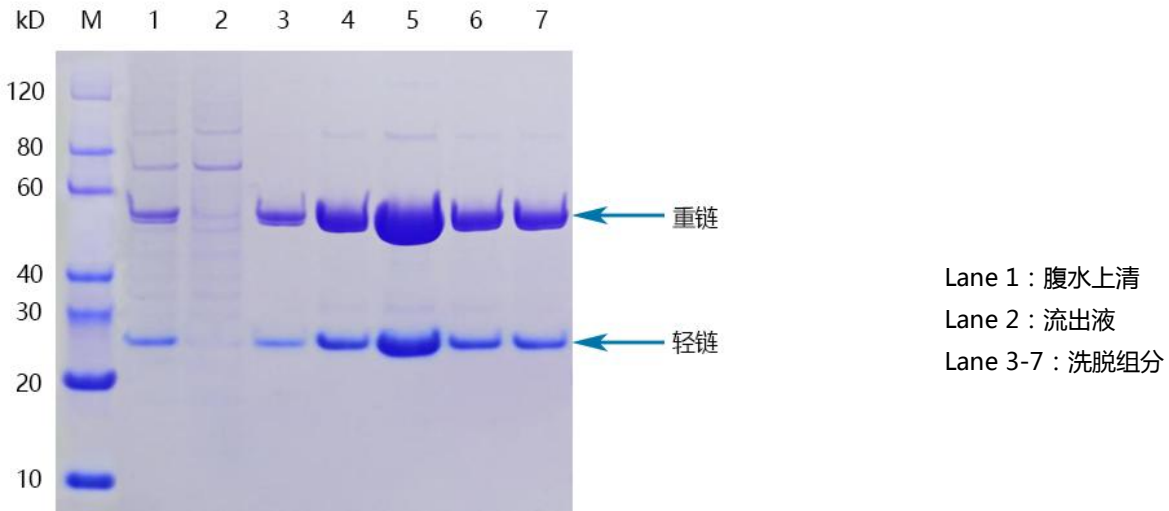


图 9-1 抗体纯化的电泳结果

10. 抗体配对

做双抗夹心 ELISA 实验来进行抗体配对。为验证两株抗体之间配对结果，对每株抗体编号，进行正反配对实验，根据正反配对实验的结果，找到配对抗体。

10.1. 正反配对实验检测结果

A 8F6D5与10株A抗体正反配对结果									
包被抗体 (mg/ml)	抗原浓度 (ng/ml)						blank	HRP抗体	ug/ml
	30.000	10.000	3.333	1.111	0.370	0.123			
8F6D5	0.462	0.362	0.276	0.27	0.478	0.219	0.018	1B8F7	0.3
	0.281	0.218	0.19	0.15	0.152	0.158		2A9G7	
	3.105	2.674	1.563	0.505	0.202	0.146		5C9E5	
	3.304	3.004	2.76	2.062	1.245	0.698		8C10C5	
	0.292	0.278	0.182	0.167	0.145	0.157		9A9D3	
	0.445	0.31	0.32	0.353	0.366	0.359		1B12H9	
	3.112	2.743	2	0.771	0.331	0.215		5A10G7	
	2.985	2.689	2.109	1.235	0.762	0.454		6H1E6	
	0.538	0.332	0.205	0.194	0.227	0.242		8F6D5	
	0.335	0.297	0.312	0.266	0.283	0.34		9C9H7	
1B8F7	1.517	0.71	0.346	0.298	0.173	0.228	8F6D5	0.017	
1B12H9	0.844	0.411	0.248	0.174	0.153	0.179			
2A9G7	1.167	0.617	0.249	0.167	0.13	0.116			
5A10G7	3.307	2.706	1.731	0.611	0.213	0.128			
5C9E5	2.855	1.705	0.683	0.334	0.147	0.178			
6H1E6	3.108	2.832	2.012	1.066	0.489	0.288			
8C10C5	3.085	3.284	2.793	2.481	0.915	0.308			
9A9D3	0.374	0.259	0.118	0.074	0.056	0.053			
9C9H7	0.525	0.263	0.123	0.087	0.063	0.081			

表 10-1 正反配对的 ELISA 检测结果

10.2. 配对结果

由表 10-1 的 ELISA 检测结果找到阳性的配对结果，根据阳性检测结果，寻找对应的抗体编号。筛选到的配对抗体如表 10-2 所示，一共筛选出 4 对配对抗体，编号如下：8F6D5-5C9E5、8F6D5-8C10C5、8F6D5-5A10G7 和 8F6D5-6H1E6。

	包被抗体编号	HRP 抗体编号	ELISA 检测结果 (抗原浓度单位 ng/ml)					
			30.000	10.000	3.333	1.111	0.370	0.123
配 对 结 果	8F6D5	5C9E5	3.105	2.674	1.563	0.505	0.202	0.146
		8C10C5	3.304	3.004	2.76	2.062	1.245	0.698
		5A10G7	3.112	2.743	2	0.771	0.331	0.215
		6H1E6	2.985	2.689	2.109	1.235	0.762	0.454
	5A10G7	8F6D5	3.307	2.706	1.731	0.611	0.213	0.128
	5C9E5		2.855	1.705	0.683	0.334	0.147	0.178
	6H1E6		3.108	2.832	2.012	1.066	0.489	0.288
	8C10C5		3.085	3.284	2.793	2.481	0.915	0.308

表 10-2 筛选出的配对抗体

11. 服务网址

www.detaibio.com/mouse-monoclonal-antibody-production-service.html