

## 小鼠单克隆抗体制备

小鼠单抗的制备流程主要包括：**抗原制备-小鼠免疫-细胞融合-细胞筛选-细胞亚克隆-腹水生产-腹水纯化**。小鼠单抗的抗原制备与小鼠免疫在多克隆抗体制备章节已经介绍，本章从细胞融合开始。

### PEG融合法获得单克隆抗体杂交瘤细胞

实验必备（以下器材/试剂必须准备齐全才可以开始操作）

器械名称	数量	备齐打√	试剂名称	数量	备齐打√
超净工作台	1台		75%乙醇	200ml	
水平离心机	1台		75%酒精棉球		
倒置相差显微镜	1台		1640不完全培养基	500ml	
血球/细胞计数板	1块		胎牛血清	50ml	
无菌手套	5副以上		50% PEG1450融合剂	1ml	
灭菌烧杯	3只以上		双抗（链霉素和青霉素）	2ml	
消毒的固定板	3套以上		HAT添加剂（50×）	4ml	
无菌固定针头	20支		HT添加剂（50×）	4ml	
1.5ml/15ml/50ml离心管	5套以上		0.4%台蓝染色液（PBS）		
排枪及各种规格移液器	1套以上		材料名称	数量	备齐打√
各种规格灭菌枪头	1套以上		冲击免疫好的Balb/c小鼠	1只	
无菌5~10ml注射器	2个		融合前1~3天冲击免疫，可选小鼠尾静脉或腹腔冲击，不加佐剂；		
灭菌镊子和剪刀	10把		空白鼠Balb/c	1只	
无菌止血钳	2把以上		用于制备饲养细胞，饲养细胞可以用脾脏也可以用腹腔细胞；		
灭菌匀浆器	3套以上		SP2/0细胞	1 × 10 <sup>5</sup> 左右	
灭菌细胞筛网	3把以上		SP2/0细胞获取方法：细胞传代或SP2/0接种到Balb/c小鼠皮下长出的实体瘤，花生米大小为宜。		
灭菌加样槽	5套以上				
灭菌大滤纸	5张				
灭菌滤纸条	20条				
96孔细胞培养板	10块				

实验前将实验要用到的离心管、离心管架、剪子、镊子、匀浆器、细胞筛网、培养皿、固定板等放入超净台，紫外照射30min左右。

### 试剂配制

- 1.实验前取PEG1450 1ml于无菌EP管37℃预温；
- 2.HAT完全培养基：20%胎牛血清+1%双抗（链霉素和青霉素）+1/50体积的HAT（50×）+1640不完全培养基，按每块96孔板20ml配制，于37℃预温；
- 3.分取50ml 1640不完全培养基37℃预温（融合后稀释PEG用）。

#### SOP21 饲养细胞的制备（可在融合前一天完成，亦可当天制备）

- 1.取空白Balb/c小鼠，眼球取血处死，将其浸入75%乙醇中5min，并且用镊子将其夹住在乙醇中不时搅动使其充分消毒。
- 2.将灭过菌的滤纸铺在固定板上（内面朝上），用镊子将老鼠从75%酒精中取出，沥干酒精。
- 3.取无菌固定针头将老鼠侧卧固定（身体左侧向上）在固定板上。
- 4.用灭菌镊子轻轻拉起老鼠的腹部皮肤，用灭菌剪刀从下往上剪开一道口子，沿口子将老鼠的皮肤撕开，将其固定（**注意：老鼠外侧皮毛不要接触内部**）。
- 5.取10ml 1640不完全培养基在干净的灭菌玻璃培养皿里，注射器吸取5ml培养基，用一个灭菌镊子轻轻提起老鼠的腹膜，将5ml培养基打入老鼠腹部，同时轻轻按摩老鼠的腹部1min后，将培养基回收，置于50ml无菌离心管中，再次吸取5ml培养基，可重复此步骤多次（此步为取腹腔细胞步骤，如不需则省略）。
- 6.取3~5ml 1640不完全培养基放入匀浆器中，用剪刀和镊子，将鼠腹腔剖开，取出其左侧的脾脏剪去表面脂肪，放进匀浆器中轻轻研磨。
- 7.将研磨的液体通过细胞筛网过滤掉块状物。
- 8.取3~5ml培养基冲洗匀浆器，再次过筛网。
- 9.将细胞筛网过滤的细胞吸入干净的50ml无菌离心管中，若取了腹腔细胞可合并置于50ml无菌离心管中，加1640不完全培养基至30ml，1,500rpm离心5min，弃上清。将沉淀重悬于HAT完全培养基，此时饲养细胞已制备好，可按10<sup>5</sup>/孔使用，于融合前一天铺板10<sup>5</sup>个/100μl/孔，亦可当天随融合细胞混合铺板。

**SOP22 单克隆抗体杂交瘤细胞融合**

**免疫脾细胞制备**

- 1.取免疫Balb/c小鼠，眼球取血处死，将其浸入75%乙醇中5min，并且用镊子将其夹住在75%乙醇中不时搅动使其充分消毒。
- 2.将灭过菌的滤纸铺在固定板上（内面朝上），用将老鼠从75%酒精中取出，沥干酒精。
- 3.取无菌固定针头将老鼠侧卧固定（身体左侧向上）在固定板上。
- 4.用灭菌镊子轻轻拉起老鼠的腹部皮肤，用灭菌剪刀从下往上剪开一道口子，沿口子将老鼠的皮肤撕开，将其固定（注意：老鼠外侧皮毛不要接触内部）。
- 5.取3~5ml 1640不完全培养基放入匀浆器中，用剪刀和镊子，将鼠腹腔剖开，取出其左侧的脾脏剪去表面脂肪，放进匀浆器中轻轻研磨。
- 6.将研磨的液体通过细胞筛网过滤掉块状物。
- 7.取3~5ml 1640不完全培养基冲洗匀浆器，再次过筛网。
- 8.将细胞筛网过滤的液体吸入干净的50ml无菌离心管中，置于50ml无菌离心管中，加1640不完全培养基至30ml，离心1,500rpm,5min，弃上清，1640不完全培养基重悬细胞沉淀，备用。

**SP2/0细胞制备**

如果SP2/0为培养细胞，直接吹打悬浮起来后离心即可计数使用。

如果为实体瘤SP2/0，按以下步骤操作：

- 1.取背部花生米大小实体瘤的Balb/c小鼠，眼球取血处死，将其浸入75%乙醇中5min，并且用镊子将其夹住在乙醇中搅动使其充分消毒。
- 2.将灭过菌的滤纸铺在固定板上（内面朝上），用镊子将老鼠从75%酒精中取出，沥干酒精。
- 3.取无菌固定针头将老鼠俯卧固定（身体背侧向上）在固定板上。
- 4.用灭菌镊子轻轻拉起老鼠的背部近尾侧皮肤，用灭菌剪刀从下往上剪开一道口子，沿口子将老鼠的皮肤撕开，将其固定（**注意：老鼠外侧皮毛不要接触内部**）。
- 5.用镊子和剪刀剪下实体瘤（**实体瘤以均匀棕白色，质地松软不液化为宜，液化部分多为死细胞**）放入匀浆器中加入3~5ml 1640不完全培养基研磨。

- 6.将研磨的细胞悬液通过细胞筛网过滤掉块状物。
  - 7.取3~5ml 1640不完全培养基冲洗匀浆器，再次过筛网。
  - 8.将经过细胞筛网过滤的液体吸入干净的50ml无菌离心管中，加培养基至30ml离心1,500rpm，5min，弃上清，1640不完全培养基重悬细胞沉淀，备用。
- 注：以上步骤可以同时进行，融合时细胞离体时间越短其融合效果越好。*

**细胞融合**

- 1.用1640不完全培养基将SP2/0细胞和免疫鼠脾细胞重悬，分别用血球计数板计数，按脾细胞：SP2/0细胞=1:3比例于50ml无菌离心管中混合，充分混合后加1640不完全培养基至40ml。
  - 2.离心1,500rpm 5min。
- 此时准备37℃的温水用于细胞融合时保湿。*
- 3.离心后弃上清以及管壁液体（可用灭菌吸水纸条吸干），轻轻敲打SP2/0细胞和免疫鼠细胞混合沉淀使其松动，将离心管底部浸入37℃温水中。
  - 4.从培养箱中取出已温育的1ml融合剂PEG1450，60s内均匀滴入细胞混合沉淀中（边滴加边转动离心管）。
  - 5.静置温育45s，取出37℃温箱中预热的1640不完全培养基，取1ml，60s均匀滴入沉淀中稀释PEG融合剂（边滴加边转动离心管），再取1ml，30s内均匀滴入，之后将剩余的45ml培养基全部慢慢滴入。

*注意：不要用力冲击！此步骤为稀释融合剂。*

- 6.轻轻颠倒混匀后，离心1,500rpm 5min，弃上清。
- 7.用含有饲养细胞和HAT完全培养基溶液200ml重悬细胞沉淀；若饲养细胞已提前铺板，则只需用100ml的HAT完全培养基溶液重悬。

*饲养细胞是一把双刃剑，可以辅助融合杂交瘤细胞生长，但是对于入门新手来说，如果操作不当除了增加污染的风险外，还可能由于使用量太少达不到辅助作用，或者使用量太大，与融合细胞争夺营养，对融合造成毁灭性破坏。*

福因德生物通过研究杂交瘤细胞生长的规律,发现对杂交瘤细胞生长促进作用最为显著的是IL-6,EGF、Insulin等，通过调配这些生长因子的比例和浓度，研发出**杂交瘤细胞培养添加剂**，使杂交瘤细胞处于最优生长环境，单抗初学者可以选择此产品，使用此产品后无需再添加饲养细胞，细胞融合后长出的细胞集落均匀，细胞孔背景干净。

货号	产品名称	规格	产品描述
MCC0010	Frdbio® 杂交瘤融合专用血清	100ml	融合率高, 10%使用即可, 无需添加饲养细胞。
MCC0011	Frdbio® PEG1450 融合剂	5 × 1ml	融合效率高, 对细胞无毒性。
MCC0022	Frdbio® SP2/0细胞	瓶	融合测试优化, 融合率高, 阳性率高, 抗体产量高。
MCC0012	Frdbio® 50 × HT添加剂	10ml	杂交瘤融合专用, 融合测试验证。
MCC0013	Frdbio® 50 × HAT添加剂	10ml	杂交瘤融合专用, 融合测试验证。
MCC0014	Frdbio® 10 × Hybridoma cell Medium supplement Frdbio® 10 × 杂交瘤培养基添加剂	100ml	杂交瘤融合和细胞亚克隆过程中添加此添加剂, 完美替代饲养细胞功能。
MCC0015	Frdbio® 0.4%台盼蓝(Trypan blue) 染液	10ml/100ml	细胞染色计数。
MCC0016	Frdbio® 1640培养基	500ml	批次稳定, 细胞生长状态好。
MCC0017	Frdbio® DMEM培养基	500ml	批次稳定, 细胞生长状态好。
MCC0018	Frdbio® 链霉素-青霉素	100ml	纯度高, 细胞毒性小。

更多信息, 请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

### SOP23 杂交瘤融合细胞铺板培养

#### A 96孔板液体培养

- 1.用排枪将重悬后的细胞均匀铺入96细胞培养板, 200μl/孔 (若饲养细胞已提前铺好, 则只需每孔加100μl即可);
- 2.铺好后置5% CO<sub>2</sub>, 37℃培养箱培养, 培养7天后, 用HAT完全培养基换液一半。

#### B 半固体培养基培养

- 1.取2%甲基纤维半固体培养基 (1 × 1640不完全培养基 + 1 × HAT + 1%双抗 + 20%胎牛血清) 20ml, 加入20ml融合细胞和饲养细胞悬液 (HAT完全培养基), 再加入2ml促进杂交瘤形成添加物因子, 充分混匀后, 倒入6孔板, 3ml/孔;
- 2.6孔板置5% CO<sub>2</sub>, 37℃培养箱培养, 长出白色集落, 挑取白色集落至含饲养细胞的96孔板中。

货号	产品名称	规格	产品描述
MCC0019	Frdbio® 杂交瘤半固体培养 (2%甲基纤维素)	10ml/50ml/100ml	细胞融合半固体培养或者亚克隆。

更多信息, 请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com

## 杂交瘤阳性细胞孔的筛选

阳性细胞孔的初步筛选一般采用间接ELISA法。

## 抗原最佳包被浓度的确定

参照SOP18间接ELISA法检测血清效价。

在进行杂交瘤细胞检测之前必须用阳性免疫血清建立好ELISA检测方法。

## 杂交瘤细胞孔的检测

按照最佳包被浓度包被ELISA板, 封板后, 取杂交瘤细胞细胞培养上清, 加入酶标板孔, 每孔100μl; 孵育洗涤后, 分别加入HRP标记羊抗小鼠, 底物显色, 读取OD值。

## 阳性细胞株/阳性孔的选取

选取阳性值最高的孔予以保留并进行亚克隆。

具体该选择保留多少孔根据项目实际需求决定。

**SOP24 杂交瘤细胞的亚克隆**

**1.培养基的配制**

第一次亚克隆，一般用HT完全培养基（含1×HT和20%胎牛血清的1640完全培养基），配制方法：20%胎牛血清+1%双抗(链霉素和青霉素，100×)+1/50体积的HT（50×）+1640不完全培养基。

**2.饲养细胞的准备**

参照以上“SOP21 饲养细胞的制备”相关内容，最后将细胞重悬在HT完全培养基，备用。

对于初学者建议选用杂交瘤培养添加剂(Frdbio,MCC0014)。

**3.细胞亚克隆**

阳性细胞稀释到平均每孔某个确定的个数，分种到含有饲养细胞的96孔板里，置于5% CO<sub>2</sub> 37℃细胞培养箱中培养，5天左右观察，选取只含有单集落细胞孔进行上清检测；如果单集落孔达到50%以上，且所选择的单集落孔检测的结果为100%阳性即可认为此细胞为单克隆细胞株，以杂交瘤细胞原始孔编号为其命名。将亚克隆后的细胞株放大，可进行腹水生产。如果检测结果达不到100%阳性则需要从本次亚克隆所获得细胞株中阳性值最高的孔继续进行第二次亚克隆。

细胞亚克隆的目的是为了得到单个细胞（单克隆）分裂生长的细胞，这样所产生的抗体的性质都是一样的。一般采用有限稀释法，当然也可以考虑半固体培养基法。半固体培养基法可参照以上“SOP23杂交瘤细胞铺板培养”的“B.半固体培养基培养”相关内容，本节内容主要介绍有限稀释法。

教科书和参考资料一般是建议将细胞稀释到平均每孔0.8个细胞，此时含有单个细胞的孔的概率最高；但是，这个方法并不科学，原因是不同实验体系对细胞生长的支持并不一样，并不是每孔单细胞都可以顺利存活成长起来，所以，每个实验室需要根据自己的实验体系测试最佳的单孔平均细胞个数。

亚克隆得到的细胞株需要进行多种实验条件的验证，ELISA验证只能算是筛选；常见的实验验证条件有免疫印迹（Western Blot），免疫荧光(IF)、免疫组化(IHC)等等，如果要进行下游产品开发还需要进行进一步实验。

**杂交瘤细胞株的冻存与复苏**

杂交瘤细胞冻存是单抗中重要环节。

**SOP25 单克隆杂交瘤细胞株冻存**

**1.**将处于对数生长期的杂交瘤细胞吹打重悬，1,500rpm离心5min，去除上清。

**2.**加入适量的细胞冻存液（10% DMSO，20%~50%胎牛血清，1640培养基），轻轻吹打重悬细胞，使终浓度达到 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个/ml。

**3.**将细胞分装入细胞专用冻存管，每管1.0~1.5ml，在管子上标准细胞名称、冻存日期和冻存人。

**4.**冻存降温程序：-1~-2℃/min；当温度达-25℃以下时，可增至-5℃~-10℃/min；到-100℃时，则可迅速浸入液氮中。

如果实验室的实验条件受限，可以采取以下的操作流程：-20℃冰箱2h，-70℃冰箱过夜，然后移入液氮中；还可以直接将细胞冻存管裹上厚厚的棉套，直接放入-80℃冰箱过夜，次日转入液氮保存。

细胞冻存中常用冻存液为DMSO,DMSO的纯度对冻存细胞至关重要，建议使用细胞冻存专用级别的。

细胞融合孔检测到阳性，如果来不及亚克隆往往只能忍痛看着细胞株丢失，福因德生物为了解决此类问题专门研发96孔板整板细胞冻存液，冻存液使用方便，加入冻存板直接放入-80℃冰箱即可。

货号	产品名称	规格	产品描述
MCC0078	Frdbio®细胞冻存液	5 × 10ml	即用型细胞冻存液，细胞存活率高。
MCC0079	Frdbio®细胞冻存专用DMSO	5 × 1ml	无菌低毒，经细胞冻存测试。
MCC0080	Frdbio® 2 × 细胞板细胞冻存液	5 × 10ml	适合整板冻存杂交瘤细胞。

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773； ✉ tech@friendbio.com

### SOP26 单克隆杂交瘤细胞株复苏

1. 从液氮容器中取出细胞冻存管，迅速浸入37℃温水中不断摇动令其尽快融化。
2. 待其完全融化，取出冻存管，打开盖子，吸取细胞悬液转移到离心管，并滴加10倍以上不完全培养基，混匀，1,500rpm离心5min。
3. 弃上清液，加入含10%胎牛血清完全培养基重悬细胞，计数，调整细胞密度，接种到培养瓶中，37℃培养箱静置培养。
4. 次日更换一次培养液，继续培养。

将冻存管放入液氮容器或从中取出时，要做好防护工作，以免冻伤。冻存和复苏最好用新配制的培养液。

## 单克隆抗体的生产

目前最常见的单克隆抗体生产主要是细胞培养发酵法和小鼠腹水生产法；细胞发酵生产法由于受到实验条件和生产成本的影响，一般的实验室还是更青睐于小鼠的腹水生产法。小鼠腹水生产法一般要先给小鼠腹腔注射降植烷、液体石蜡或者弗氏不完全佐剂，目前弗氏不完全佐剂应用的最多。并不是所有的细胞株注入小鼠的腹腔都能顺利产生腹水的，不产腹水除了跟细胞株、小鼠有关系外，还有很多不明原因，基于以上原因，Frdbio推出腹水强力诱导剂。

### SOP27 小鼠腹水生产

1. 提前一周小鼠腹腔注射0.5ml弗氏不完全佐剂。
2. 每只小鼠腹腔注射 $0.5 \sim 1.0 \times 10^7$ 处于对数生长期的杂交瘤细胞。
3. 7~15天小鼠腹部逐渐涨大，此时可以采用16号针头通过腹部穿刺抽取腹水，每次可取4~5ml，间隔2天左右可以再进行抽取，一般每只老鼠可以抽取2~3次。
4. 抽取的腹水需要及时离心，2,000rpm离心5min，吸取中间水相层。  
*抽取的腹水含有大量细胞、脂肪和油状弗氏佐剂。*
5. 脂质的去处：每10ml腹水加入150mg二氧化硅，摇动混匀孵育2h，2,000rpm离心20min，取上清。

货号	产品名称	规格	产品描述
MCC0088	Frdbio®腹水普通诱导剂	5 × 10ml	很大程度解决不产腹水顽疾。
MCC0089	Frdbio®腹水超强诱导剂	5 × 10ml	99%不产腹水顽疾都可以解决。

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773； ✉ tech@friendbio.com

## 单克隆抗体亚型鉴定

单克隆抗体经过几次亚克隆之后需要对亚型进行鉴定，鉴定之后对其理化性质更为熟悉，便于下游纯化和抗体保存和使用，小鼠抗体亚型主要有以下几类：IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA，其中前三种亚型抗体最多；最简单的检测方法是ELISA方法：抗原包被ELISA板子，封闭后加入单克隆抗体(细胞培养上清或者腹水)，最后分别加入HRP标记的羊抗小鼠抗体的特异性二抗，加入底物显色，单抗亚型与显色的亚型二抗对应。

标准的结果应该是只有某一种亚型的二抗显色，其他亚型不显色。如果其他亚型也显色，在排除系统操作误差之后应该考虑亚型二抗质量问题。系统问题主要排除封闭和二抗稀释度问题。所有的问题都排除了之后，如果还是同时多种亚型显色应该考虑单克隆细胞株是否为单克隆；如果是腹水用于检测有可能是腹水中含有一些自身抗体干扰，所以亚型鉴定一般最好使用细胞培养上清。

上文提到，亚型二抗试剂质量对亚型鉴定至关重要，所以建议客户选择高品质亚型试剂。

货号	产品名称	规格	产品描述
SAB90101H	Frdbio® HRP标记羊抗小鼠IgA	0.1ml/1ml	单抗亚型鉴定
SAB90102H	Frdbio® HRP标记羊抗小鼠IgG1	0.1ml/1ml	单抗亚型鉴定
SAB90103H	Frdbio® HRP标记羊抗小鼠IgG2a	0.1ml/1ml	单抗亚型鉴定
SAB90104H	Frdbio® HRP标记羊抗小鼠IgG2b	0.1ml/1ml	单抗亚型鉴定
SAB90105H	Frdbio® HRP标记羊抗小鼠IgG3	0.1ml/1ml	单抗亚型鉴定
SAB90106H	Frdbio® HRP标记羊抗小鼠IgM	0.1ml/1ml	单抗亚型鉴定
MKT90100H	Frdbio® 小鼠单抗亚型鉴定试剂盒	50T/100T	单抗亚型鉴定

服务编号	服务名称	服务描述
MBS0010	小鼠单克隆抗体制备服务	免疫5只Balb/c小鼠，重组蛋白ELISA效价不低于 $1:10^6$ ，多肽ELISA效价不低于 $1:10^5$ 。提供至少3株以上符合质检要求的单克隆细胞株

更多信息，请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773； ✉ tech@friendbio.com