

一种提高单克隆抗体产量的简易方法

近年来单克隆抗体已广泛应用于基础理论与临床应用研究。如何制备质量好产量高的单克隆抗体是当前各有关实验室研究的重要问题，通常用于生产单克隆抗体的方法有两种。

1、利用纯系小鼠生产免疫腹水，该法的优点是产量和效价高，但纯化困难，价格昂贵，生产周期长。

2、杂交瘤细胞常规体外培养法，此法虽然产量不高效价低，但不含正常小鼠免疫球蛋白，较易纯化且成本低，但此法若需大量生产则需特殊设备。最近有人报道用杂交瘤细胞培养也可提高单克隆抗体的产量且方法简便。经我们对 3 株抗人衰变加速因子（Decay-Accelerating Factor, DAF, CD55）单克隆抗体的制备和产量测定，获得较为满意的结果，现报道如下。

一、材料与方法

1、纯化抗原及抗体

纯化的可溶性重组 DAF 由英国 Reading 大学 Goodfellow 博士惠赠。抗人 DAF 单克隆抗体 IC6 培养上清（ $1\mu\text{g/ml}$ ）由日本 Fukushima 医学院 Fujita 博士惠赠。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG（工作浓度 1:1000），购自中山生物制品有限公司。

2、培养基

RPMI 1640（Gibco 产品），含 2mmol/L 谷氨酰胺， 100U/ml 青霉素， $100\mu\text{g/ml}$ 链霉素和 10%FCS。

3、杂交瘤细胞系

DA11、DG3、DG9 杂交瘤细胞均由本实验室建立，经 SP2 / 0 与免疫小鼠脾细胞融合筛选而成，抗体亚类均为 IgG1，能稳定分泌抗人 DAF 单克隆抗体。

4、平卧式常规法培养

将 DA11、DG3、DG9 杂交瘤细胞用常规细胞培养法培养在 25ml 的方瓶中加培养液 5ml，置 37°C 孵箱 3~4d 后，当瓶中只剩下少于 5%有活力的细胞时离心收集上清， -20°C 保存备用。

5、直立式培养

将 DA11、DG3、DG9 杂交瘤细胞常规培养在平卧式细胞培养瓶中直到细胞密度达 90%~95%时，补充培养液至瓶颈（总量为 30ml），加橡皮塞直立式放置在 37°C 孵箱中，每天观察细胞并晃动 1 次，可见死细胞不断脱落至瓶底，活细胞继续增殖，直到培养液变酸后离心收集上清， -20°C 保存备用。

6、标准曲线的制作

以不同浓度的 IC6 上清进行间接 ELISA（具体步骤见 7、），每一浓度重复 3 孔，测得 OD 值，进行回归分析，绘制标准曲线。

7、单克隆抗体含量测定采用间接 ELISA 法，具体步骤如下

- （1）包被纯化人 DAF 于 96 孔 ELISA 板，50 μl / 孔，4° C，18~24h。
- （2）用 0.02M PBS+0.05%Tween20（PBS-T）将板孔洗 3 次，3min / 次，空干，加入不同浓度的鼠抗人 DAF 单克隆抗体上清，50 μl / 孔，37° C 孵育 50min。
- （3）同上洗涤，加入 1：1000 羊抗鼠 IgG 酶标抗体，50 μl / 孔，37° C，50min。
- （4）同上洗涤，加入邻苯二胺-H2O2 溶液 37 度显色 20min 后，在 BIO-RAD Model 3550 自动酶联检测仪上选择 490nm 测 OD 值。平卧式与直立式培养收获的上清及 IC6 上清同时进行试验，以 SP2 / 0 骨髓瘤细胞上清作为阴性对照。根据标准曲线计算每种样品中的单抗含量。

二、结果与讨论

经统计学处理抗人 DAF 单克隆抗体 IC6 上清浓度在 0.001~0.1 μg / ml 之间时，其含量与 OD 值呈线性关系。分别将平卧式和直立式收获的。

细胞培养上清用间接 ELISA 法测定其效价及含量，结果 3 株杂交瘤细胞产生的抗人 DAF 单克隆抗体，其直立式培养上清的 OD 值均略高于平卧式培养的上清，将 3 株单克隆抗体的 OD 值从标准曲线上查得其含量，结果见表 1。直立式比平卧式产量提高 8~14 倍，与 Susan 等的结果相符。直立式的特点是培养液用量多，且在生长过程中死亡细胞不断脱落至瓶底。

表 1 平卧式与直立式培养单抗产量比较

Tab 1 Production of mAbs in horizontal and standing flask methods

Cell line	Horizontal culture		Standing culture	
	Ig concentration (μ g / ml)	Total yiele (μ g / falsk)	Ig concentration (μ g / ml)	Total yiele (μ g / falsk)
DG3	22. 97	114. 85	35. 89	1076. 7
DG9	26. 31	131. 55	37. 14	1114. 2
DA11	26. 91	134. 55	65. 45	1963. 5

使培养瓶留出更多的空间供活细胞生长而继续分泌抗体；平卧式培养，则死亡细胞占据空间影响活细胞的分裂增殖，需传代后方能继续增殖，增加污染机会及工作量。

由于本法无需特殊设备、简便易行、节省人力物力，减少污染机会，一般实验室可推广应用。