

分类号: Q813.1

单位代码: 10335

密 级: _____

学 号: Z12030192

浙江大学

硕士专业学位论文



中文论文题目: 兔骨髓瘤细胞和杂交瘤细胞的
无血清培养驯化研究

英文论文题目: Study on serum-free culture domestication for
rabbit myeloma and hybridoma cells

申请人姓名: 朱晓黎

指导教师: 林东强 教授

专业名称: 生物工程

研究方向: 细胞培养技术

所在学院: 化学工程与生物工程学院

论文提交日期 2017年10月

兔骨髓瘤细胞和杂交瘤细胞的

无血清培养驯化研究



论文作者签名: 朱晓黎

指导教师签名: 丁树云

论文评阅人 1: 谢志鹏/高工/杭州宝晶生物股份有限公司

评阅人 2: 陈波/高工/娃哈哈集团

评阅人 3: 匿名评阅

评阅人 4: _____

评阅人 5: _____

答辩委员会主席: 姚善经/教授/浙江大学

委员 1: 陈欢/副研究员/浙江天科高新技术发展有限公司

委员 2: 高兴荣/高工/华东医药股份有限公司

委员 3: 张其鑫/副教授/浙江大学

委员 4: 林东强/教授/浙江大学

委员 5: _____

答辩日期: 2017年12月6日

Study on serum-free culture domestication for

rabbit myeloma and hybridoma cells



Author's signature: Xiao-li Zhu

Supervisor's signature: D-Q

External Reviewers: Xie Zhi-Peng / Senior engineer /
Chen-Bo / Senior engineer /
Anonymous

Examining Committee Chairperson:

Shan-Jing Yao / Professor /

Examining Committee Members:

Huan-Chen / Associate Research Fellow /
Xing-Rong Gao / Senior engineer /
Qi-lei Zhang / Associate Professor /
Dong-Qiang Lin / Professor /

Date of oral defence: Dec. 6, 2017

致 谢

时光荏苒，我的在职硕士生涯已接近尾声。这五年的时光既漫长又短暂，虽然边工作边学习稍显忙碌，但其中却充满了收获和成长。在即将阔别之际，有诸多的不舍。几年来，感谢陪我一起度过美好时光的每位尊敬的老师、亲爱的同学和同事，正是你们的帮助，我才能克服困难，正是你们的指导，我才能解决疑惑，直到学业的顺利完成。

本论文是在我的导师林东强教授的殷切关怀和耐心指导下进行并完成的，衷心感谢林老师对我的淳淳教诲和悉心关怀。从课题的选择、实验的开展、论文的撰写，直至最终完成，林老师都始终给予我耐心的指导和支持，我取得的每一点成绩都凝聚着恩师的汗水和心血。林老师开阔的视野、严谨的治学态度、精益求精的工作作风，深深地感染和激励着我，帮助我以更加创新的思维来完成本职工作。在此谨向林老师致以衷心的感谢和崇高的敬意。

此外，对公司所有领导和实验室同事在平时开展相关工作中的支持和帮助表示感谢。感谢 Abcam 公司无菌室蒋忠根经理和郭森良组长对我研究课题提出的宝贵建议和指导，感谢 ELISA 检测实验组的沈平、流式细胞分析检测实验组的骆燕、重组开发实验组的葛江燕等对我研究课题的关心与帮助。无论工作多忙，他们不辞辛劳地为我提供无私的帮助，没有他们的热情付出就没有这篇论文的顺利完成。

感谢浙江大学给我在工作之余提供宝贵的学习机会，感谢浙江大学化学工程与生物工程学院给予我高等教育的资源和支持，感谢 12 级在职硕士班的全体同学陪我一起走过这段人生难忘的历程！

感谢我的家人常年对我的支持和理解！

最后，我要向在百忙之中参与审阅、评议本论文的各位老师，向参与本人论文答辩的各位老师表示由衷的感谢！

朱晓黎

2017 年 10 月

摘 要

单克隆抗体（简称单抗）用于检测特异性物质，已成为生物学、医学等领域的重要工具。兔单抗相较于鼠单抗具有更高的亲和力，广泛用于科研和疾病诊断试剂盒。体外杂交瘤细胞培养是单抗制备的重要途径，传统培养基需要加入血清，易造成批次间差异和培养体系的不稳定，且存在一定的污染风险。本文针对兔单抗制备的工程细胞株，包括兔骨髓瘤细胞株和融合后的杂交瘤细胞株，开展无血清培养驯化，以去除培养基中血清成分。

首先，选取四种不同种类的无血清培养基对兔骨髓瘤细胞株（240E-W2）进行无血清驯化培养，比较分析直接替换的速降方式和逐步替换的缓降方式，探讨不同驯化方式和不同的培养基的影响。发现 1640AB 培养基和 CD Hybridoma Medium 培养基按 1:1 配比，以缓降培养基内血清含量的方式，在贴壁培养的环境下从 9%血清含量降至 1%，经 72h 培养后细胞密度达 $4.0-5.0 \times 10^5$ 个/ml。其次，进行无血清悬浮培养驯化，提高初始接种密度为 1.2×10^5 个/ml，在悬浮培养条件下从 1%血清含量成功降至 0，经过 72h 培养后细胞密度可达 $4.0-6.0 \times 10^5$ 个/ml，细胞状态良好。对细胞株进行多次亚克隆，挑选出最稳定的适应于无血清培养的兔骨髓瘤细胞株（240E-W2-SFM），建库保持。进一步筛选无血清冻存液，进行冻存复苏测试，以确保无血清冻存方式对细胞的生理活性没有负面影响。最后，完全适应于无血清悬浮培养的兔骨髓瘤细胞株（240E-W2-SFM）与兔脾脏细胞进行融合，构建杂交瘤细胞株，进行常规 9%血清浓度培养和无血清同步维护对比，考察酶联免疫吸附阳性率，蛋白免疫印迹法阳性率、丢失率等，比较分析无血清培养对于杂交瘤细胞株的影响。结果表明，融合后的杂交瘤细胞株能完全适应 1:1 配比的 1640AB 和 CD Hybridoma Medium 无血清培养，阳性孔比例及分泌目标蛋白能力稳定，显示出良好的适应性和应用前景。

本论文围绕兔单抗制备的重要工程细胞株，从去除培养基中血清成分出发，对相关细胞株进行驯化及培养基选择优化，证实了兔单抗制备工艺无血清化的可行性，为进一步应用打下了良好基础。

关键词：单克隆抗体；兔骨髓瘤细胞；杂交瘤细胞；无血清培养；细胞驯化

Abstract

Monoclonal antibody (mAb) has become a key tool for the detection of specific substances in the field of biology and medicine. Rabbit mAb has a higher affinity than mAb and is widely used in the scientific research and disease diagnosis. Hybridoma cell culture in vitro is an important way to prepare mAb. Traditional culture medium needs the addition of serum, which would cause the difference between batches and the instability of culture system, and there is some risk of pollution. In this thesis, the engineering cell lines prepared for mAb, including rabbit myeloma cell lines and hybridoma cell lines, were domesticated in serum-free medium to remove the serum in the medium.

Firstly, four kinds of serum-free medium were selected to domesticate the rabbit myeloma cell line (240E-W2). Direct and gradual reduction modes were compared and evaluated to explore the effects of different acclimation methods and medium. It was found that 1640AB medium and CD Hybridoma Medium in a 1: 1 volume ratio could efficiently reduce the serum content in the gradual mode, and the content of serum was decreased from 9% to 1%. The cell density reached $4.0-5.0 \times 10^5$ cells/ml after 72 h culture.

Secondly, rabbit myeloma cell line (240E-W2) was tested in serum-free suspension culture. The initial inoculation density increased from 0.9×10^5 cells/ml to 1.2×10^5 cells/ml, and the content of serum was successfully decreased from 1% to 0. After 72 h culture cell density could reach $4.0-6.0 \times 10^5$ cells / ml and cell status was good. The cell line in serum-free medium was subcloned several times and the most stable myeloma cell line (240E-W2-SFM) was selected and maintained. Moreover, the appropriate serum-free cryoprotectant was selected, and the results of frozen recovery test indicated that there was no negative impact to the cell's physiological activity in serum-free cryopreservation.

Finally, rabbit myeloma cell lines in serum-free medium (240E-W2-SFM) were fused with rabbit spleen cells to construct hybridoma cell lines. The maintenance

effects with normal 9% serum medium and serum-free medium were compared. The positive rate of ELISA, WB test, the positive clone's loss rate and so on were analyzed. The results showed that the hybridoma cell lines could adapt to the serum-free culture with 1: 1 volume ratio of 1640AB and CD Hybridoma Medium . The proportion of positive clones was good and the ability of target protein secreting were stable, which demonstrated good adaptability and application prospect.

In this thesis, aiming to the removal of serum components in the engineering cell culture medium for rabbit mAb, the culture medium and domestication of cell lines and were optimized. The results indicated the feasibility of cell culture with serum-free medium for rabbit mAb preparation, which showed good potential for further applications.

Keywords: Monoclonal antibody; rabbit myeloma cell line; hybridoma cell line; serum-free culture; cell domestication

目 录

致 谢	I
摘 要	II
Abstract	III
符号表	VII
缩略语表	VIII
第一章 文献综述	1
1.1 引言	1
1.2 单抗制备工艺	1
1.2.1 单抗制备与体外细胞培养	2
1.2.2 体外细胞培养的培养基组成	3
1.2.3 培养基中血清对于细胞培养的影响	5
1.3 无血清培养基与细胞无血清驯化培养	6
1.3.1 无血清培养基的发展简述	6
1.3.2 无血清培养基的特点与分类	7
1.3.3 细胞株无血清驯化	8
1.4 兔单抗的特点优势	9
1.5 本文研究思路	10
第二章 兔骨髓瘤细胞的无血清驯化培养	12
2.1 引言	12
2.2 材料和方法	12
2.2.1 试剂与仪器	12
2.2.2 兔骨髓瘤细胞的无血清培养基贴壁培养驯化	13
2.2.3 兔骨髓瘤细胞的无血清培养基悬浮培养驯化	13
2.2.4 适应无血清培养的兔骨髓瘤细胞亚克隆筛选	14
2.2.5 无血清兔骨髓瘤细胞冻存复苏	14
2.2.6 分析方法	15
2.3 结果与讨论	16
2.3.1 兔骨髓瘤细胞的无血清培养基贴壁培养驯化	16
2.3.2 兔骨髓瘤细胞的无血清培养基悬浮培养驯化	24
2.3.3 兔骨髓瘤细胞的无血清培养亚克隆分析	27
2.3.4 兔骨髓瘤细胞的无血清冻存复苏分析	28
2.4 本章小结	31
第三章 无血清驯化后兔骨髓瘤细胞的生理活性	33
3.1 引言	33
3.2 材料和方法	33
3.2.1 试剂与仪器	33
3.2.2 生长能力及活性分析	34
3.2.3 细胞周期分析	34

3.2.4 内源性重链轻链以及特异性片段分析.....	35
3.2.5 细胞融合率及平均克隆数分析.....	38
3.3 结果与讨论.....	39
3.3.1 细胞生长能力及活性分析.....	39
3.3.2 细胞周期分析.....	41
3.3.3 细胞内源性重链轻链以及特异性片段分析.....	44
3.3.4 细胞融合率及平均克隆数分析.....	46
3.4 本章小结.....	49
第四章 杂交瘤细胞的无血清培养及其生理活性.....	50
4.1 引言.....	50
4.2 材料和方法.....	50
4.2.1 试剂与仪器.....	50
4.2.2 杂交瘤细胞初筛阶段融合率及阳性孔分析.....	50
4.2.3 杂交瘤细胞状态及存活率分析.....	51
4.2.4 杂交瘤细胞 WB 阳性率及强度丢失分析.....	51
4.2.5 分析方法.....	51
4.3 结果与讨论.....	52
4.3.1 杂交瘤细胞初筛阶段融合率及阳性孔分析.....	52
4.3.2 杂交瘤细胞状态及存活率分析.....	53
4.3.3 杂交瘤细胞 WB 阳性率及强度丢失分析.....	56
4.4 本章小结.....	59
第五章 结论与展望.....	60
5.1 结论.....	60
5.2 展望.....	61
参考文献.....	63
作者简介.....	68

符号表

符号表以字母表顺序为基准排列

C_0	初始接种活细胞密度 (cells·ml ⁻¹)
C_t	时间 t 时细胞密度 (cells·ml ⁻¹)
T	时间 (d)
V	细胞存活率 (%)
X_d	死细胞密度 (cells·ml ⁻¹)
X_v	活细胞密度 (cells·ml ⁻¹)
μ	细胞比生长速率 (d ⁻¹)

缩略语表

缩略语表以字母表顺序为基准排列

8-AZ	8-azaguanine	8 氮鸟嘌呤
CHO	chinese hamster ovary cell	中国仓鼠卵巢细胞
DMEM	dulbecco's modified eagle medium	DMEM 培养基
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay	酶联免疫反应
FBS	fatal bovine serum	胎牛血清
FDA	food and drug administration	食品药品监督管理局
HC	heavy chain	重链
HRP	horse radish peroxidase	辣根过氧化物酶
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IHC	immunohistochemistry	免疫组化
LC	light chain	轻链
mAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
MAT	monoclonal Antibody Technique	单克隆抗体技术
PCR	polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
WB	western blot	蛋白免疫印迹法

第一章 文献综述

1.1 引言

随着人类社会的迅速发展，环境污染问题日益严重，加之人们的不良生活作息以及工作压力加剧所引发的恶性肿瘤已成为危害人类健康与生命的重大疾病^[1,2]。单克隆抗体（Monoclonal Antibody, mAb）具有特异性强、靶向性好和毒副作用低等优点^[3,4]，已经作为一种新型的生物技术药物而广泛应用于癌症、自身免疫性和重大感染性等疾病的诊断和临床治疗，成为目前生物技术药物的主要发展方向^[5,6]。

从1986年第一种单抗药物开始进入市场至2017年8月，经FDA批准的单抗药物已达69个，并且有上百个相关药物正处于研发阶段。相对于小分子药物而言，单抗药物虽然总体数量不多，但在2016年世界销售排名前十的药物中占据6席，具有良好的发展前景。因此，保持着高速的市场增长规模^[7,8]。

动物细胞大规模高效培养已经成为单抗药物生产的关键技术^[9]。近年来，单抗药物的市场需求日益增长，作为商业化单抗生产的核心技术之一的大规模动物细胞培养必将成为抗体药物发展的新瓶颈。从21世纪开始，随着生命科学基础研究的不断深入，使得生物医药产业飞速发展，大面积细胞培养过程中含血清培养呈现出严重的不足^[10]，不仅增加了上游动物细胞体外培养工艺的成本和批次间的不稳定性，同时也加大了下游抗体分离纯化工艺中外源蛋白污染的风险。因此，动物细胞的无血清培养技术的研究日益引起同行专家的高度重视^[11,12]。

自从1976年Sat等研究人员发现GH3细胞能在添加了极少量生长因子的无血清培养基中维系生长后^[10,13]，细胞无血清培养技术开始逐渐完善和发展起来。2003年4月，Vera Baumans等组织召开了“改进体外培养技术方法，替换胎牛血清”的会议，开始号召在全球范围内减少胎牛血清的使用^[11,14]。目前，动物细胞体外无血清培养技术的应用水平已获得重大进步，且正处在全面飞速发展中，主要体现在培养基的开发研制、工程细胞株的驯化构建等方面^[13,15]。

然而,目前的技术仅做到对极有限细胞品种的无血清培养基的设计与优化,而政府及药物监管部门对培养基的使用要求也日益严格,开发出功能较完善、特征较鲜明的无血清培养基,驯化出能保持原有生理活性的适应于无血清培养的工程细胞株,成为当务之急[13,16]。

1.2 单抗制备工艺

1.2.1 单抗制备与体外细胞培养

单抗制备技术由1975年英国科学家 Milstein 和 Kohler 所发明^[17],生产工艺的关键在于将能分泌抗体的B淋巴细胞与肿瘤细胞进行杂交^[17,18],获得既能在体外无限增殖又能产生目的抗体的杂交瘤细胞,并以此获得所需的抗体^[19-22]。

目前常用的人用动物源单抗的制备主要分为体外法和体内法两大类,如图1.1所示。

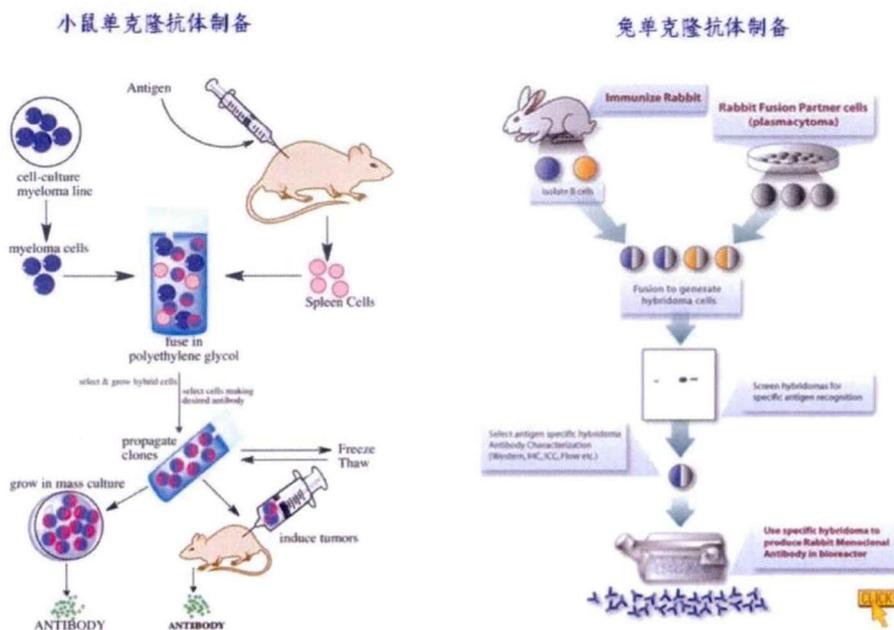


图1.1 抗体制备的传统方法

Fig. 1.1 Traditional production methods of immunoglobulin G (IgG)

体内法即腹水法,是指将杂交瘤细胞接种到小鼠或兔子等动物腹腔内,数天后通过收获腹水的方法提取单抗^[23,24]。该方法操作简单、成本较低、抗体产量大、浓度高^[25],通

常被实验室普遍采用。但是，通过该方法获得的抗体含有动物源性 IgG 的干扰，下游分离纯化较困难，容易引起外源性污染^[26]。除此之外，腹水法基本是全手工操作，不同批次间差异较大，质量难以控制，从而限制了腹水法在现代生物制药领域的大规模应用。因此，许多研究者逐渐开始转向体外法制备，并创建了许多不同种类的生产技术。

体外法是指从生物体外培养杂交瘤细胞，再从培养上清中提取纯化所需的目的单抗^[23, 27]。体外法制备工艺的建立通常包含四个阶段：选择合适的杂交瘤细胞系^[28]；杂交瘤细胞系体外培养条件的优化^[29-31]；选择合适的生物反应器和培养模式^[32]；建立成熟的下游分离纯化工艺^[33]。

1.2.2 体外细胞培养的培养基组成

培养基是维持细胞体外生存和增殖的重要基础^[13]，是细胞培养中的关键因素，通常可分为天然培养基和合成培养基两大类^[34, 35]。

天然培养基主要从动物体液或组织中分离提取而得，具有营养成分丰富，培养效果好等优点^[36]。缺点是成分复杂，来源受限。天然培养基种类很多，包括生物性液体（如血清）、组织浸出液（如胚胎浸出液）和凝固剂（如血浆）等^[37]。

合成培养基是指在体外进行人工模拟细胞体内生存环境，通过体外反复试验筛选后进行强化和重新组合而成的人工配制的培养基^[38]。合成培养基既给细胞提供了一个接近体内相似的生存环境，又具有便于标准化生产控制的特点^[39]，在很多方面相较于传统的天然培养基有着明显的优势。尽管当前商品化的合成培养基成分和含量已较为复杂，但仍然不能完全满足各种不同种类的体外培养细胞生长的所有需要^[40]，或多或少需要加入一定比例的天然培养基以作补充^[41]。当前的培养基多采用不同比例添加胎牛血清、小牛血清、马血清于基础培养基中配制而成。

虽然合成培养基的种类繁多，但基础培养基一般都含有糖类、氨基酸、无机盐、维生素和其它辅助因子等主要成分^[42-44]。以细胞培养中最常用的 DMEM 培养基为例，是一种含各种氨基酸和葡萄糖的培养基^[45]，分为高糖型（低于 4500 mg/L）和低糖型（低于 1000 mg/L）。高糖型通常用于生长速度较快、附着较困难的肿瘤细胞等。不过，培养基粉末配方大致相似，以 DMEM(A)和 DMEM(L)型培养基粉末为例，其具体成分如下表 1.1 和 1.2 所示。

表 1.1 DMEM (A) 细胞培养基 (粉末型) 成分表

Table. 1.1 Ingredients list of DMEM (A) cell culture medium (powder type)

序号	化合物名称	含量 (mg/L)	序号	化合物名称	含量 (mg/L)
1	无水氯化钙.2H ₂ O	265.00	18	L-丝氨酸	42.00
2	硝酸铁.9H ₂ O	0.10	19	L-苏氨酸	95.00
3	氯化钾	400.00	20	L-色氨酸	16.00
4	无水硫酸镁	97.67	21	L-酪氨酸	72.00
5	氯化钠	6400.00	22	L-缬氨酸	94.00
6	无水磷酸二氢钠	109.00	23	D-泛钙酸	4.00
7	丁二酸	75.00	24	酒石酸胆碱	7.20
8	丁二酸钠	100.00	25	叶酸	4.00
9	L-盐酸精氨酸	84.00	26	肌醇	7.20
10	L-盐酸胱氨酸	63.00	27	烟酰胺	4.00
11	甘氨酸	30.00	28	核黄素	0.40
12	L-盐酸组氨酸	42.00	29	盐酸硫胺	4.00
13	L-异亮氨酸	105.00	30	盐酸吡哆辛	4.00
14	L-亮氨酸	105.00	31	葡萄糖	1000.00
15	L-盐酸赖氨酸	146.00	32	丙酮酸钠	110.00
16	L-甲硫氨酸	30.00	33	酚红	930.00
17	L-苯丙氨酸	66.00			

表 1.2 DMEM (L) 细胞培养基 (粉末型) 成分表

Table. 1.2 Ingredients list of DMEM (L) cell culture medium (powder type)

序号	化合物名称	含量 (mg/L)	序号	化合物名称	含量 (mg/L)
1	无水氯化钙	200.00	16	L-丝氨酸	42.00
2	硝酸铁.9H ₂ O	0.10	17	L-苏氨酸	95.00
3	氯化钾	400.00	18	L-色氨酸	16.00
4	无水硫酸镁	97.67	19	L-络氨酸钠盐	104.00
5	氯化钠	6400.00	20	L-缬氨酸	94.00
6	无水磷酸二氢钠	125.00	21	D-泛钙酸	4.00
7	L-盐酸精氨酸	84.00	22	氯化胆碱	4.00
8	L-盐酸胱氨酸	63.00	23	叶酸	4.00
9	L-谷氨酰胺	584.00	24	肌醇	7.20
10	甘氨酸	30.00	25	烟酰胺	4.00
11	L-盐酸组氨酸	42.00	26	核黄素	0.40
12	L-异亮氨酸	105.00	27	盐酸硫胺	4.00
13	L-亮氨酸	105.00	28	盐酸吡哆辛	4.00
14	L-盐酸赖氨酸	146.00	29	葡萄糖	1000.00
15	L-甲硫氨酸	30.00	30	丙酮酸钠	110.00

1.2.3 培养基中血清对于细胞培养的影响

细胞培养技术是单抗制备工艺的核心技术，而细胞培养过程中培养基的质量又关键，培养基中所添加的动物血清对细胞的生长增殖有着至关重要的作用^[46-49]。

(1) 细胞培养过程中血清成分的主要功能

血清是极为复杂的混合物，具有非常重要的生物学功能，含有丰富的利于细胞生长所必需的营养成份及生长因子^[50]。有的具有促进细胞增殖的作用，能提供细胞生长所必需的基本营养物质，如糖类、氨基酸、维他命、无机盐、核酸衍生物等；有的提供激素以及各种生长因子，如类固醇激素（雌二醇、睾酮、孕酮）、胰岛素、肾上腺皮质激素，表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板生长因子等；有的提供细胞结合蛋白，可携带重要的低分子量物质，如转铁蛋白携带铁元素、白蛋白携带脂肪、维生素等，在细胞代谢过程中起重要作用^[51-53]。除此之外，血清还能提供促伸展因子，利于细胞贴壁而免受机械性损伤，对培养中的细胞起到保护作用^[54]。血清中还含有部分解毒的因子，能够维持培养基 pH 值的稳定并抑制蛋白酶的直接或间接酶解作用^[55]。

血清主要具有以下 6 种功能：

- 提供激素，维持细胞指数增长，补充基础培养基中缺少的主要营养成分和低分子营养物质^[56]；
- 提供能识别脂类、维他命、金属和其它激素等的结合蛋白，结合或调变其结合物质的活力；
- 有些情况下通过与有毒金属和热原质结合的方式起到解毒作用^[57]；
- 提供有利于细胞贴壁生长所需的因子^[56]；
- 起到酸碱度缓冲液作用；
- 提供蛋白酶抑制剂，使剩余的胰蛋白酶失活，保护细胞在传代时不受到损伤。

(2) 血清成分在细胞培养过程中的主要风险

由于动物血清的成份相当复杂，目前对其精准的成份分析、含量测定及作用机制尚不清楚^[58, 59]，尤其是一些多肽类生长因子、脂类和激素等尚未充分认识，给研究工作和药物开发带来许多困扰。

- 血清通常都是批量化生产，各批次间差异较大^[60]，要确保不同批次生产的血清质量的稳定性极为困难，从而使实验的连续性和标准化受到极大限制^[61]。
- 对大多数细胞而言，除了损伤愈合以及血液凝固过程，血清在正常的体内状态下不是其直接接触的生理液体，因此有可能引起某些细胞某种正常生理状态的改变。
- 血清可促进某些成纤维细胞的生长，同时也可抑制表皮细胞的生长^[36]。
- 血清有可能产生一些对细胞有毒性的物质，如多胺氧化酶，能与亚精胺、精胺反应形成有细胞毒性作用的聚精胺，抗体、补体、细菌毒素等都会严重影响细胞生长，甚至导致细胞死亡。
- 血清取材过程中有可能引起外源性支原体、病毒污染，从而对细胞培养产生污染的潜在影响^[36]。
- 血清来源有限，大规模生产越来越困难，价格高昂，是体外细胞培养成本控制的主要瓶颈之一。

因此，如何在细胞培养过程中降低或去除培养基内血清含量，成为细胞培养研究的主要发展趋势。

1.3 无血清培养基与细胞无血清驯化培养

1.3.1 无血清培养基的发展简述

上世纪五十年代初，合成培养基问世。但由于天然培养基中的一些组分不能被合成培养基完全代替，因此一般需要在合成培养基中添加一定量的血清。虽然血清可以支持细胞的生长，但其成分复杂并且不确定，这对产物分离、纯化和检测均会带来一定的困难。无血清培养更适用于生物制剂的生产过程^[10, 62]。因此，越来越多的科学家开始致力于无血清细胞培养平台的研究，无血清培养基的开发也就成为动物细胞培养领域的关键技术之一^[63-65]。

无血清培养基一般是在基础合成培养基里添加已知成分的血清替代物配制而成^[66]。无血清培养基发展迅速，已经报道了多种可以支持不同类型细胞生长的无血清培养基^[67, 68]。这些培养基多适用于杂交瘤细胞和 CHO 细胞培养^[65, 69]，培养基中蛋白的含量一般

比较高,致使成本升高,下游产物纯化的难度增加。因此,开发无蛋白、化学成分确定、成本低、易于分离纯化、适于工业化生产特点的无血清培养基,仍是科研工作者努力的目标^[67]。

目前,无血清培养基的研发已经进入化学成分确定、无动物源、无蛋白成份的第三阶段^[67],这是研究动物细胞生长、增殖、分化调节机制的有力工具^[70],同时也大大降低了下游产物分离纯化的难度。无动物源、无蛋白的无血清培养基目前在生物医药行业中的应用投入最为广泛。

1.3.2 无血清培养基的特点与分类

无血清培养基是指在不含有动物血清或其他生物提取液的情况下仍可以维持细胞在体外较长时间生长、繁殖的一种培养基^[71]。无血清培养基由于其组成成分明确,制备过程可控,已经得到广泛的应用。无血清培养也是阐明细胞生长、增殖、分化及基因表达调控等生物学基础研究的有力工具^[69]。

无血清培养技术的推广应用,在很大程度上可以避免传统含血清培养所带来的风险和不利影响。无血清培养基具有以下优缺点。

无血清培养基的优点:

- (1) 避免不同血清生产批次间的质量差异,提高细胞培养和实验结果的稳定性;
- (2) 避免血清对细胞造成的毒性作用和外源性污染风险;
- (3) 避免血清中的未知成分对实验结果准确性的影响;
- (4) 利于体外细胞培养的诱导分化;
- (5) 可提高产品的表达水平,并易于纯化。

无血清培养基的缺点:

- (1) 细胞在无血清培养基中由于缺乏血清的保护,更易受某些机械和化学因素的影响,有可能延长生长滞缓期,降低细胞的生长速率、最大细胞密度和细胞活性等;
- (2) 需要添加高成本的必须的生长因子和激素;
- (3) 对于细胞株的选择特异性较高,需要对每个不同的细胞系进行配方优化,加大开发难度^[66]。

目前,无血清培养基的研究主要包括不含有任何动物来源和不明确的添加组分两个

方向^[15]，因此，可以将无血清培养基大致分为以下四类：

(1) 一般意义上的无血清培养基：用牛血清白蛋白（BSA）、胰岛素、转铁蛋白等生物大分子，以及从血清中提取的去除蛋白质的混合脂类和水解蛋白等血清替代物配制而成的无血清培养基。其特点是培养基中的蛋白含量较高，添加物质的化学成分不明确，含有大量未知的动物来源蛋白^[69]。

(2) 无动物来源培养基：添加来源于重组蛋白或者蛋白水解物等无动物来源的无血清培养基。其特点是既能够满足生产重组药物的安全要求，又可以保障细胞体外稳定生长及增殖的需要。

(3) 无动物蛋白培养基：培养基完全不用动物来源的蛋白，但仍有部分来源于植物蛋白的水解片段或合成多肽片段等。其特点是培养基组分较稳定，但必须添加脂类前体和类固醇激素，并且对培养的细胞种类有高度的特异性，适用面比较有限^[72]。

(4) 化学组分限定培养基：添加的少量动物来源的蛋白水解物、蛋白都是成分明确的组分，是目前最为安全、最为理想的培养基，可以保证不同培养基生产批次的高度一致性。其特点是培养基的性质确定，生产便捷，质量可控^[66]。

1.3.3 细胞株无血清驯化

无血清培养基用于体外细胞培养有着明显的优势，但是也有不足之处。由于不同的无血清培养基对于不同的细胞株的适应具有一定的局限性^[23]，因此，对相应细胞系进行无血清培养适应性驯化成为细胞工程和抗体大规模无血清工业化生产的前提^[73, 74]。

杂交瘤细胞从含血清的培养基完全过渡到无血清或无蛋白的培养基通常要有一个逐渐适应的过程。同时，无血清培养下的杂交瘤细胞对环境的要求更加严苛，对有害物质更加敏感，更易受到机械和化学的损伤，生长速度和代谢能力也会产生相应变化。因此，在培养基设计、反应器开发和工艺放大中，必须充分考虑到这些情况，以寻求总体过程的最大优化^[75]。

建立一个无血清无蛋白培养基培养细胞的过程，除了确定合适的无血清无蛋白培养基以外，还必须留意以下几点：

1. 建立一个合理的从含血清到无血清培养的适应性驯化程序^[76]；

2. 适当提高培养细胞的接种密度^[77];
3. 选择合适的细胞抗损伤保护剂, 在含血清培养时选用的保护剂未必在无血清培养时适用;
4. 改良生物反应器, 降低物理性的剪切作用, 选择更高的过程控制精度^[85];
5. 添加更丰富的氨基酸和维生素;
6. 定期监测杂交瘤细胞系的遗传特性, 特别是分泌抗体的能力, 必要时进行亚克隆或启用新的种子库细胞以确保其具有稳定高效的抗体分泌能力^[77];
7. 选择合适的无血清冻存液, 建立液氮冻存细胞的方法和程序;
8. 适当提高无血清培养细胞所用容器、水以及化学品的洁净度;
9. 培养基的储存期相对缩短^[39]。

1.4 兔单抗

单抗已在生物医药研究、诊断和治疗领域成为必要的手段^{[78][79]}。目前商品化的单抗有数万种之多, 但其中绝大部分是鼠单抗。兔子是多克隆抗体制备中主要的动物宿主, 兔子个头较小, 繁殖周期短, 与大部分研究用模式生物有较大的种间距, 以及具有有非常成熟的抗体制备工艺^[80, 81]。

根据预测, 科研抗体市场将保持 6.2%的复合年均增长率 (CAGR), 2019 年市场规模预计达到 20 亿美元。从类型上来看, 多抗将持续占有超过 60%的市场份额, 其中兔源多抗压倒性的占据了 85%^[82]。

目前有数个研究对兔单抗和鼠单抗进行对比试验。2005 年, Rossi 等发表了一组比较研究, 以多种肿瘤组织和正常组织为实验材料, 检测常规的免疫组化诊断中孕激素受体、雌激素受体、cyclin D1、Ki-67、CD3、CD5、CD23 和 synaptophysin 的兔单抗和小鼠单抗的染色情况。结果表明, 和小鼠单抗相比, 兔单抗具有相似的特异性, 并且灵敏度更高, 平均比鼠单抗高 5 到 10 倍的的稀释比。此外, 一些情况下, 为了达到更好的染色效果, 也不需要抗原修复操作。2008 年, Rocha 等的研究也支持以上结论。不过, Vilches-Moure 和 Ramos-Vara 以甲醛固定和石蜡包埋的犬组织为实验材料时, 发

现兔单抗和小鼠单抗都识别 COX-2、Ki67、synaptophysin 和 vimentin, 但只有兔单抗能检测出 CD3、chromogranin A 和孕激素受体, 而只有小鼠单抗能检测出 CD79 a、calcitonin 和雌激素受体。

相较于鼠单抗而言, 兔单抗具有以下明显优势^[83]:

(1) 兔子的免疫系统能够识别更多种类的抗原表位, 尤其对于小分子抗原表位的免疫反应性要优于鼠类。

(2) 改善对啮齿动物蛋白的反应, 能识别许多在小鼠中不产生免疫的抗原。

(3) 亲和力高, 在免疫组化 (IHC) 中有更好的应用, 特异性一般强于鼠单抗。

(4) 由于兔子脾脏较大, 可以对脾脏细胞冻存后进行多次复苏融合, 使得高通量筛选融合细胞成为可能^[84]。

(5) 对于滋养层, 可以选用正常的脾细胞或胸腺细胞, 或者无滋养细胞的细胞因子, 抑或现成的杂交瘤培养基。

目前尚未开发出完全适应于兔骨髓瘤细胞和相应杂交瘤细胞的无血清培养基, 也未曾成功驯化出完全适应于无血清培养的兔骨髓瘤和杂交瘤细胞系^[23,29]。因此, 对于兔骨髓瘤细胞的无血清驯化培养研究十分重要。

1.5 本文研究思路

随着单抗在体外诊断和体内治疗中的广泛应用, 杂交瘤细胞的无血清无蛋白培养日益受到重视。本文讨论了杂交瘤细胞无血清无蛋白培养基的常用添加成分和它们的功能, 综述了用无血清无蛋白培养基培养骨髓瘤及杂交瘤细胞技术的进展。

目前, 小鼠骨髓瘤细胞株 (SP2/0) 已被成功驯化为无血清培养。然而, 鼠单抗的使用有其局限性, 难以用于小鼠自身蛋白的检测。这是由于正常情况下, 小鼠对自身蛋白存在耐受性, 一般无法对其产生免疫反应。相较于鼠单抗的局限性, 兔单抗有着明显的优势, 但是目前尚未开发出适应于兔骨髓瘤细胞和杂交瘤细胞无血清培养的培养基, 以及驯化成功的适应于无血清培养的兔骨髓瘤细胞。

本文在前期无血清细胞培养研究基础上, 以驯化兔骨髓瘤细胞 (240E-W2) 和兔杂交瘤细胞为目的, 考察商品化无血清培养基 F12、CD Hybridoma Medium 和本实验室自

行配制的无血清培养基的驯化效果，优化驯化条件，提高驯化效率，为兔单抗的无血清制备提供新思路。

研究内容包括以下三方面：

(1) 采用商业化的无血清杂交瘤培养基 F12、CD Hybridoma Medium 和本实验室自行配制的无血清培养基对兔骨髓瘤细胞 (240E-W2) 进行对比驯化，研究培养基、驯化程序、接种密度、培养方式、亚克隆筛选等相关因素的影响。优化驯化条件，提高驯化效率，确定合适的驯化方式，实现兔骨髓瘤细胞 (240E-W2) 无血清贴壁和悬浮培养的兔骨髓瘤细胞 (240E-W2-SFM) 的成功驯化。

(2) 对成功驯化的无血清培养的兔骨髓瘤细胞 (240E-W2-SFM) 进行生理活性分析。考察生长形态、生长能力、细胞周期与活性能力，对其与脾脏细胞的融合率及阳性孔数比例进行统计分析，比较驯化前后兔骨髓瘤细胞 (240E-W2) 生理特性的变化，探究驯化后的无血清培养的兔骨髓瘤细胞 (240E-W2-SFM) 用于单抗融合表达的可行性；

(3) 实现无血清培养的兔骨髓瘤细胞株 (240E-W2-SFM) 与兔脾脏细胞融合，对融合后的无血清培养兔杂交瘤细胞 (Hybridoma) 的生理活性进行分析，考察其存活率、抗体分泌能力、WB 阳性率及丢失情况，实现兔杂交瘤细胞的无血清培养，验证其抗体分泌过程的重复性和稳定性，评估无血清培养在兔单抗制备中的应用潜力。

第二章 兔骨髓瘤细胞的无血清驯化培养

2.1 引言

传统兔单抗制备的工程细胞株——兔骨髓瘤细胞株（240E-W2）生长速度、生理活性相对较稳定，需要在无血清培养基的基础上添加 9%浓度的血清才能正常生长。但是由于血清不同批次间的差异，导致不同批次间抗体质量变化，且会加大污染风险，同时给下游的分离纯化工艺带来一定的难度。除此之外，在一定程度上也加大了生产成本，限制其推广应用。因此，驯化可以适应于无血清生长的兔骨髓瘤细胞（240E-W2-SFM）用以单抗制备具有重要的意义。

本章以兔骨髓瘤细胞（240E-W2）为研究对象，采用商业化的无血清杂交瘤培养基 F12、CD Hybridoma Medium 和本实验室自行研发的无血清培养基 1640AB 培养基对兔骨髓瘤细胞株（240E-W2）进行对比驯化，考察不同培养基对细胞生长状态的影响，探讨驯化过程主要因素（包括培养基选择、驯化方式、接种密度、亚克隆筛选、无血清冻存液选择等），优化兔骨髓瘤细胞（240E-W2）的无血清驯化过程，验证兔骨髓瘤细胞（240E-W2）无血清培养的可行性。

2.2 材料和方法

2.2.1 试剂与仪器

兔骨髓瘤细胞 240E-W2：宜康（杭州）生物技术有限公司，专利细胞

1640AB 培养基：宜康（杭州）生物技术有限公司

F12 培养基、CD Hybridoma Medium 培养基：Gibco, USA

ATCC Serum Free Cell Freezing Medium：ATCC, USA

Quick Freezing-M (QFM)：北京博奥龙免疫技术有限公司

8-Azaguanine：SIGMA Life Science, USA

Spinner Flask: Bellco Biotechnology, USA.

Thermo Sorvall ST8 离心机: Thermo Fisher Scientific, USA.

Sanyo MCO-18AIC(UV) CO₂ 培养箱: SANYO Electric Co. Ltd., Japan

INTEGRA CELLSPIN 细胞培养磁力搅拌机: IBS, Switzerland.

2.2.2 兔骨髓瘤细胞的无血清培养基贴壁培养驯化

从液氮罐中复苏一管含血清培养的兔骨髓瘤细胞 (240E-W2), 待其生长速度及状态稳定后, 选取贴壁培养状态良好的对数生长期细胞, 1100 rpm、5min 离心分离, 选取 5 种不同种类的无血清培养基 (不含血清的 1640AB 培养基、1:1 的 1640AB 培养基和 CD Hybridoma Medium 培养基, 1:1 的 1640AB 培养基和 F12 培养基, 以及商业化的 CD Hybridoma Medium 培养基和 F12 培养基), 3 种不同浓度 (30%无血清培养基混合于添加 9%血清的 1640AB 培养基, 60%无血清培养基混合于添加 9%血清的 1640AB 培养基, 100%无血清培养基) 重悬兔骨髓瘤细胞, 进行平行对照测试, 统计生长曲线和存活率, 考察比较速降和缓降模式对兔骨髓瘤细胞生长能力的影响, 初步选择适应性最好的培养基进行进一步悬浮驯化。

兔骨髓瘤细胞以初始接种密度为 0.8×10^5 个 / ml 接种于 24 孔板内, 每种不同种类和浓度的培养基各接种 5 孔 (1ml/孔), 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 进行平行对照实验。每天对细胞生长状态、速度及存活率进行监测。

反复以上过程, 初步挑选出适应性最好的无血清培养基进行进一步驯化。

2.2.3 兔骨髓瘤细胞的无血清培养基悬浮培养驯化

选取适应性最好的 1:1 的 1640AB 和 CD Hybridoma Medium 培养基进行悬浮培养驯化试验。

低血清贴壁逐步适应方法: 正常含血清贴壁培养的兔骨髓瘤细胞在对数生长期将添加了 9% 血清的培养液更换为含有 5%血清的培养液, 促使细胞提前适应低浓度血清的营养条件。待细胞逐步长满培养皿表面后, 正常传代至含有 5%血清的培养液中生长, 3 次传代后, 兔骨髓瘤细胞已完全适应了含有 5%血清的培养条件。从含 5%血清的培养条件驯化至含 3%、2%、1%血清含量的培养方法基本同上, 但驯化传代次数逐渐增多。

无血清悬浮驯化适应方法：以适应了 1%血清培养条件的兔骨髓瘤细胞作为初始细胞，在经过硅化处理的 1000 ml 的 Spinner Flask 中进行无血清悬浮培养驯化适应，培养液为自行培养配制的 1:1 的 1640AB 和 CD Hybridoma Medium 培养基，细胞初始接种密度为 1.2×10^5 个/ml，转速为 33 rpm。每 3 天更换 1 次新鲜培养液，待细胞比生长速率恢复后开始进行接种传代，进一步强化驯化适应过程。

细胞培养每 24h 进行计数计活，观察细胞数量、活力及状态的变化。

2.2.4 适应无血清培养的兔骨髓瘤细胞亚克隆筛选

选取适应于无血清驯化培养后能稳定生长、状态良好的兔骨髓瘤细胞 (240E-W2-SFM)，密度控制在 $1.0-6.0 \times 10^5$ cells / ml，以双向稀释和有限稀释两种实验方法进行亚克隆筛选操作。

双向稀释：取一块 96 孔细胞培养板，每孔铺 100 μ l 无血清细胞培养液。取调整好状态后密度在 $1.0-6.0 \times 10^5$ 个 / ml 范围内的 240E-W2 细胞原液 100 μ l 于 A1 孔反复吹打 3 次，依次重复稀释至 A12 孔。再用 100 μ l 的 12 道手动移液器从 A 排反复吹打 3 次，依次重复稀释至 H 排。每孔补液 100 μ l，置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中静置培养，10 天后观察克隆生长情况。

有限稀释：取三块 96 孔细胞培养板，将调整好状态后密度在 $1.0-6.0 \times 10^5$ 个 / ml 范围内的 240E-W2 细胞原液以每孔 2 个、4 个、6 个细胞的密度进行梯度铺板，再每孔补液 100 μ l，置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中静置培养，10 天后观察克隆生长情况。

挑选状态良好，生长速度适中的单克隆进行扩大培养，待其生长状态稳定后用含 8-AZ 的培养液培养一周，再换回常规无血清培养液培养后冻存备份。

2.2.5 无血清兔骨髓瘤细胞冻存复苏

采用状态良好的适应于无血清培养的兔骨髓瘤细胞(240E-W2-SFM)作为研究对象，选取原冻存液 (DFBS) 和两种商业化无血清冻存液 (ATCC 和 Quick Freezing-M) 共三种冻存液进行平行对照试验，考察冻存效果。

(1) 原冻存液 (DFBS): 90%FBS (GIBCO) +10%DMSO. Sigma

(2) ATCC Serum Free Cell Freezing Medium (SFCFM): 以纯净水作为溶剂含有

DMSO 和甲基纤维素, 不含血清。ATCC, Lot: 62285360

(3) Quick Freezing-M (QFM): 以 DMEM 为母液, 含有 DMSO, 不含牛血清或其他蛋白成分。北京博奥龙免疫技术有限公司, Lot: K151020

冻存细胞的原理主要是冻存液中的 DMSO 可使溶液的冰点降低, 加之在程序降温中缓慢冻结的条件下, 细胞内水分透出, 减少冰晶形成, 从而降低细胞的损伤。评价冻存液的主要指标在于长时间冻存复苏后细胞的存活率以及状态恢复时间的长短。

在同等条件下, 利用三种不同的冻存液分别对适应于无血清培养的兔骨髓瘤细胞进行冻存, 每个对照设两组平行试验, 冻存后设置四个时间点 (冻存后第一个月、第三个月、第六个月和一年后) 复苏细胞观察状态, 并统计复苏后前三天的细胞存活率以及细胞恢复正常生长所需的时间。其中在第一个月的试验期间增设一组保存在液氮和-80℃冰箱中的对照。

冻存前细胞处理: 收集适量状态良好的适应于无血清培养的兔骨髓瘤细胞, 1100 rpm, 5min 离心分离后弃上清, 加入三种不同的冻存液后以 1.0×10^8 /ml/管进行冻存。

通过所得的数据比较选取一种最优的无血清冻存液。

2.2.6 分析方法

细胞数目、活力与生长动力学的测定方法如下:

(1) 细胞计数: 将培养好的半贴壁细胞用 10 ml 移液管轻柔吹打数次, 制成均匀的细胞悬液。取 0.5 ml 到 24 孔细胞培养板中的一孔里, 加入 0.5 ml 的 0.4% 台盼蓝染液, 染色 2~3min 后, 吸取少量细胞悬液到血球计数板上, 在显微镜下对每个样品分别计死细胞和活细胞数, 统计细胞存活率。

(2) 细胞存活率 V (%):

$$V = \frac{X_v}{X_v + X_d} \times 100\%$$

式中: V 为细胞存活率 (%), X_v 为活细胞密度 (cells/ml), X_d 为死细胞密度 (cells/ml)。

(3) 细胞的比生长速率 μ (d^{-1}):

$$\mu = \frac{1}{t} \times \ln \frac{C_t}{C_0}$$

式中: μ 为细胞比生长速率 (d^{-1}), t 为时间 (d), C_t 为时间 t 时细胞密度 (cells/ml), C_0

为初始接种活细胞密度 (cells/ml)。

在不同血清浓度的培养条件下生长的兔骨髓瘤细胞 (240E-W2), 观察细胞状态时置于倒置显微镜上, 以不同放大倍数的物镜观察其生长形态, 并拍照记录。

2.3 结果与讨论

2.3.1 兔骨髓瘤细胞的无血清培养基贴壁培养驯化

本文采用宜康生物技术公司实验室自行研发配制的无血清 1640AB 基础培养基 (含有碳酸氢钠、1640 粉末、维他命、氨基酸、丙酮酸钠盐、抗生素等基本营养成分, 不含血清成分)、Gibco 公司的 F12 和 CD Hybridoma Medium 这 3 种培养基进行无血清驯化测试。F12 培养基是动物细胞培养基, 成分复杂, 含有多种微量元素, 起初是作为一种无血清配方设计的, 现在常补加血清用于支持各种正常的和转化细胞的增殖。F12 培养基常和 DMEM 培养基以 1:1 的体积混合, 称为 DMEM/F12 培养基, 作为开发无血清配方的基础, 结合了 F12 (含有较丰富的成分) 和 DMEM (含有较高浓度的营养成分) 的双重优点。CD Hybridoma Medium 培养基则是 Gibco 公司专为杂交瘤细胞株开发的无动物来源化学培养基。目前, 市场上尚无适应于兔骨髓瘤细胞 (240E-W2) 无血清培养的培养基, 故综合考量后选取这几种较为合适的无血清培养基作为初步测试的培养基。

选取常规添加 9% 血清的 1640AB 培养基作为平行对照组, 在兔骨髓瘤细胞 (240E-W2) 贴壁培养无血清驯化阶段, 选取了 5 种无血清培养基进行测试研究, 即 1640AB 培养基、F12 培养基、CD Hybridoma Medium 培养基、体积比为 1:1 的 1640AB/CD Hybridoma Medium 培养基、体积比为 1:1 的 1640AB/F12 培养基。考察了不同无血清培养基对兔骨髓瘤细胞 (240E-W2) 驯化过程中细胞密度和存活率的影响, 结果见图 2.1、2.2、2.3 和 2.4。和对照组相比, 在无血清培养基含量为 30% 的条件下, 发现连续培养四天的细胞生长速度及密度基本保持一致, 无明显差异, 仅 F12 培养基从第三天开始细胞提前进入衰亡期, 存活率也有所下降。胞生长曲线总体整体呈现出典型的潜伏期、对数生长期、平缓期和衰亡期的趋势。

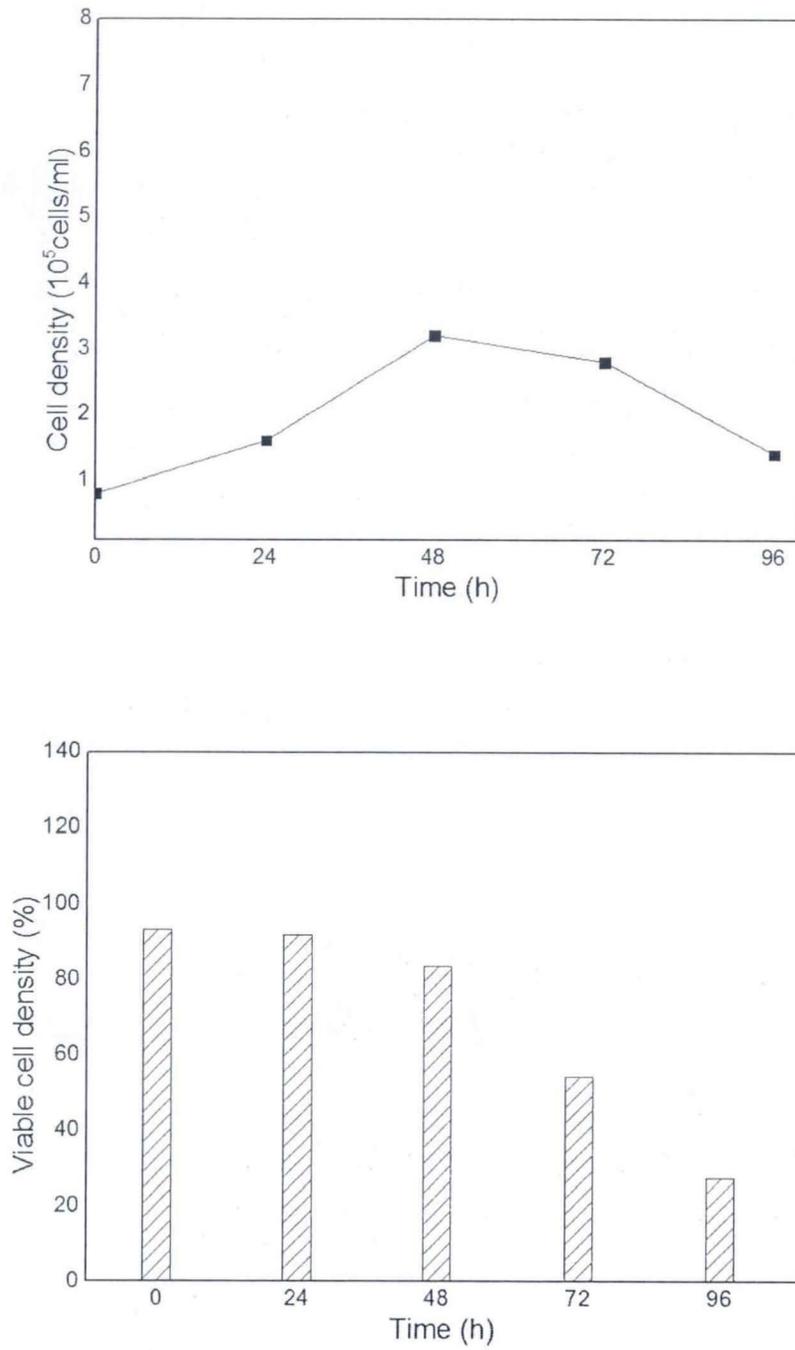


图 2.1 100%1640AB 无血清培养的 240E-W2 细胞生长曲线 (a) 和存活率(b)

Figure 2.1 Effects of 100% 1640AB with no serum on the cell density (a) and viable cell density (b)

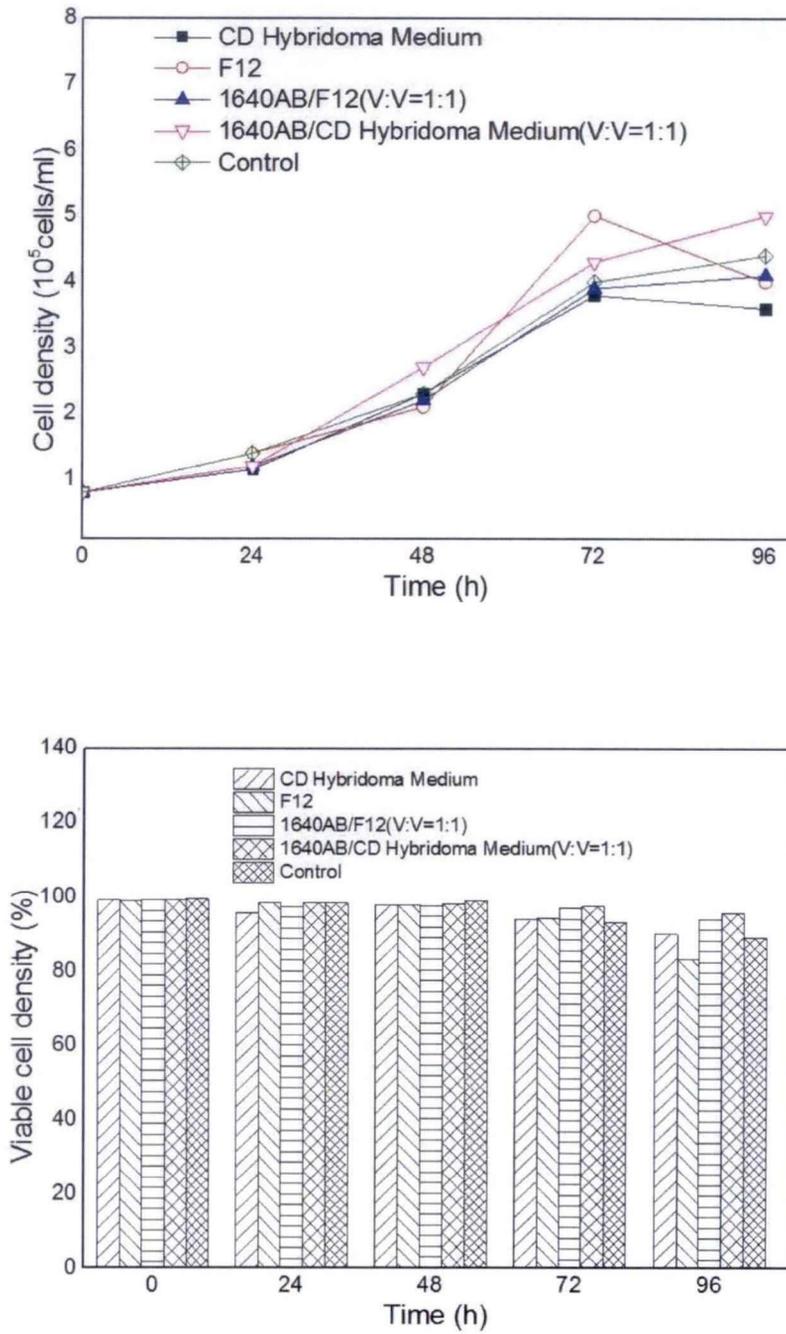


图 2.2 30% 血清培养的 240E-W2 细胞生长曲线 (a) 和存活率(b)比较

Figure 2.2 Effects of 30% SFM on the cell density (a) and viable cell density (b)

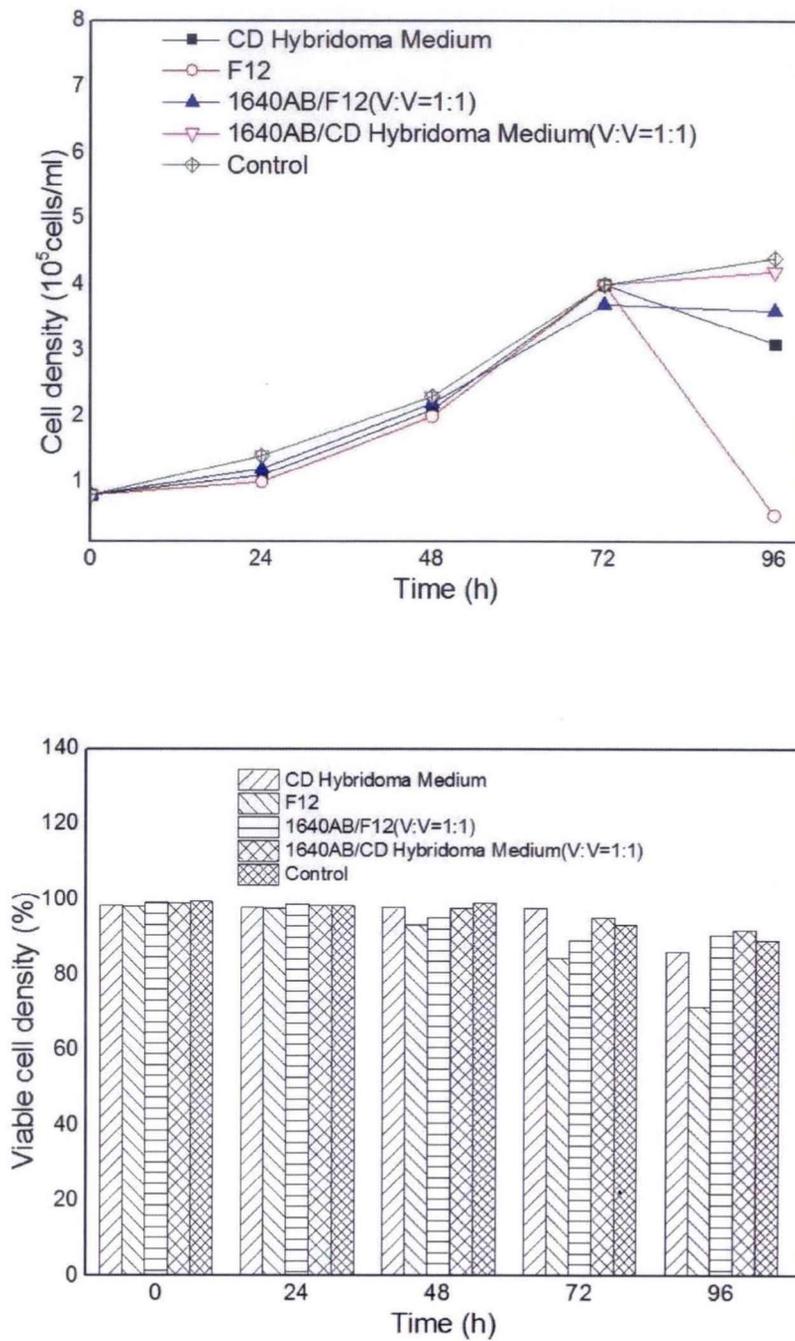


图 2.3 60%无血清培养的 240E-W2 细胞生长曲线 (a) 和存活率(b)比较

Figure 2.3 Effects of 60% SFM on the cell density (a) and viable cell density (b)

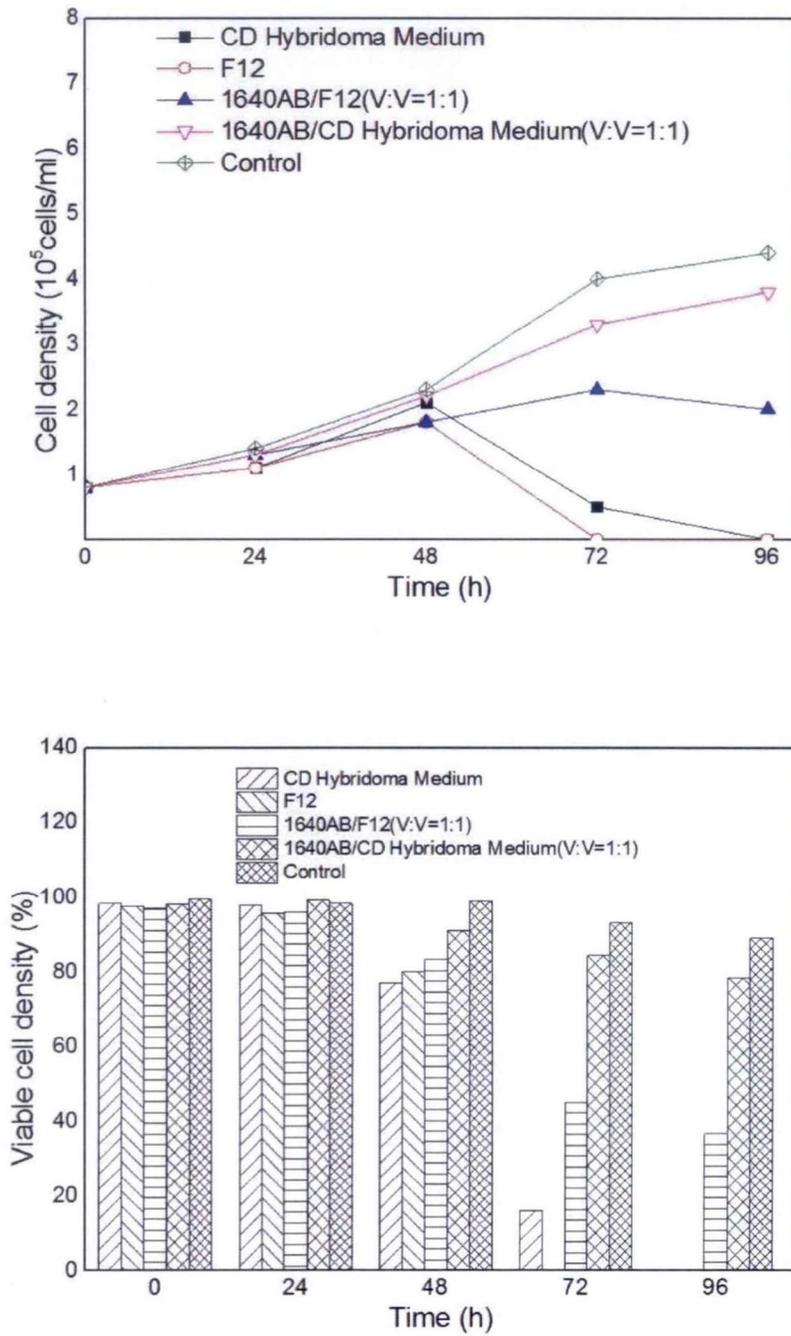


图 2.4 100%无血清培养的 240E-W2 细胞生长曲线 (a) 和存活率(b) 比较

Figure 2.4 Effects of 100% SFM on the cell density (a) and viable cell density (b)

直接在 1640AB 培养基中彻底去除血清，细胞生长能力明显降低，且细胞明显分化现象，故考虑添加商业化无血清培养基以改善细胞所需的必须营养成分较为合适。但是，随着商业化无血清培养基含量的逐渐加大，不同种类无血清培养基对于细胞培养的差异影响逐渐明显。结果见图 2.3 和图 2.4。在无血清培养基含量为 60% 的条件下，从第三天开始除了 1:1 的 1640AB/CD Hybridoma Medium 培养基与对照组生长趋势基本保持一致外，其余三种培养基均出现细胞提前进入衰亡期的现象，其中 F12 培养基最为明显，CD Hybridoma Medium 培养基次之。在无血清培养基含量为 100% 时，从第一天开始 F12 和 CD Hybridoma Medium 两种无血清培养基均逐渐出现全部死亡现象，其中 1:1 的 1640AB CD Hybridoma Medium 培养基表现最好，细胞密度略低于对照组。

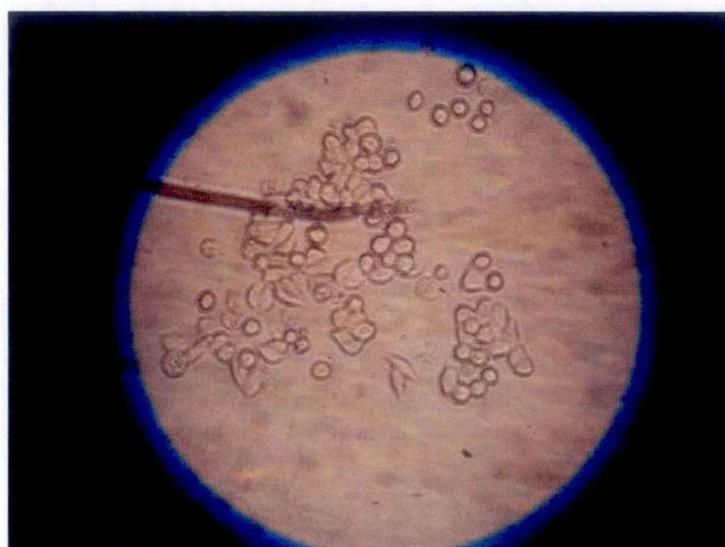
从不同浓度稀释的细胞存活率数据结果可见，1:1 的 1640AB/CD Hybridoma Medium 培养基综合结果较为理想，适合用于进一步驯化培养。

随着血清含量的下降，在无血清培养基含量为 100% 时，兔骨髓瘤细胞 (240E-W2) 的贴壁能力逐渐下降，最终呈现出部分细胞悬浮状态。到第四天观察时，除了 1:1 的 1640AB 和 CD Hybridoma Medium 培养基培养的细胞边缘较为光滑，相对接近于对照组，其余培养基内的细胞基本死亡。结果见图 2.5。

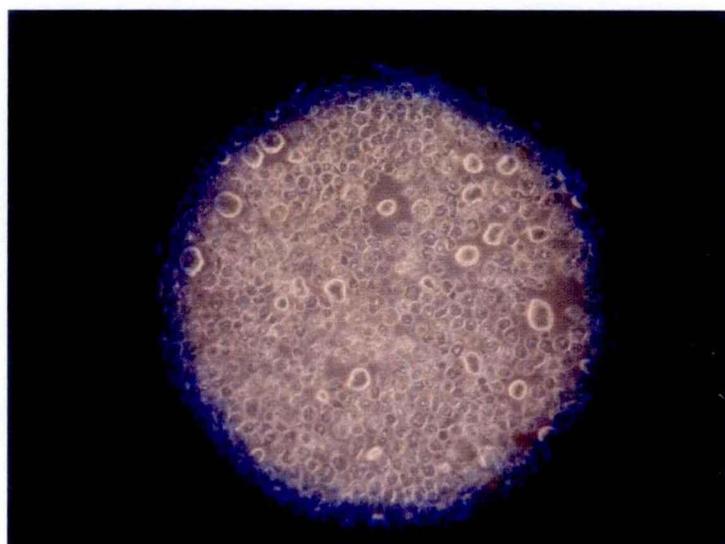
鉴于上述结果，初步确定 1:1 的 1640AB 和 CD Hybridoma Medium 培养基适应性强，可进一步进行悬浮培养驯化。



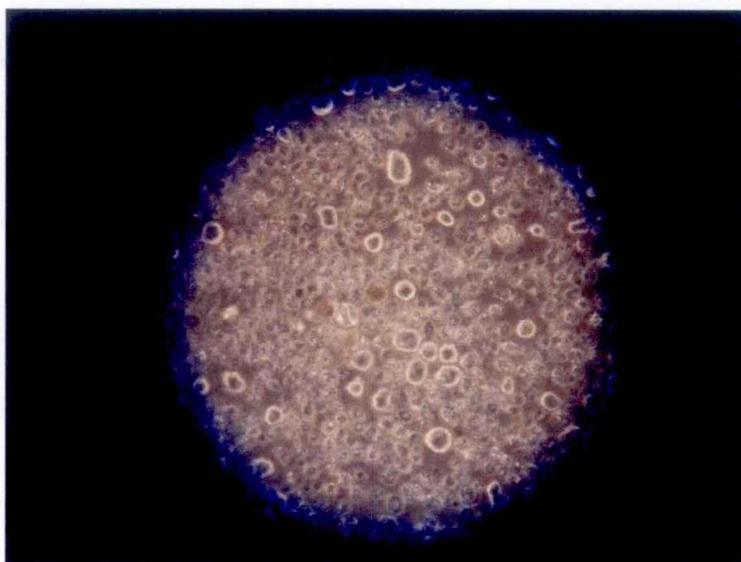
(a) 100% 1640AB with no serum (96h)



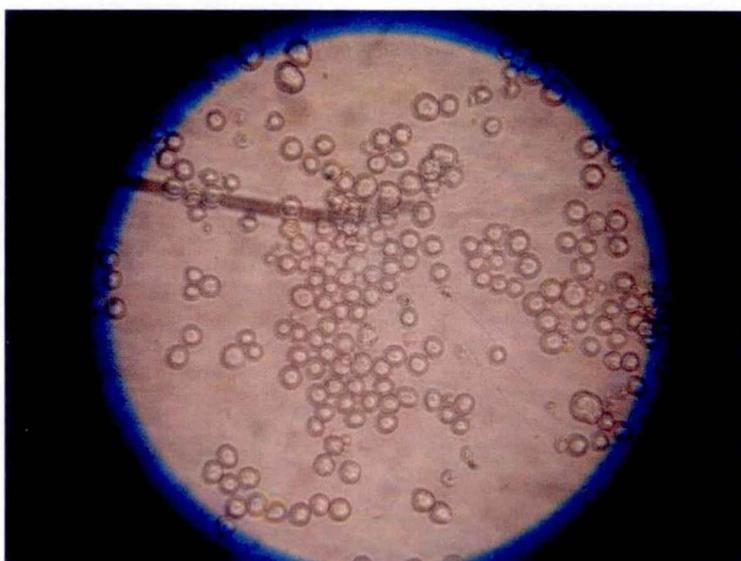
(b) 100% CD Hybridoma Medium (96h)



(c) 100% F12 medium (96h)



(d) 100% 1640AB/F12=1:1 (96h)



(e) 100% 1640AB/ CD Hybridoma Medium=1:1 (96h)



(f) 1640AB with 9% serum (96h)

图 2.5 不同无血清培养条件对 240E-W2 细胞生长状态的影响

Fig. 2.5 Effects of different serum free medium on the cell condition

分析原因可见，一方面由于商业化无血清培养基与常规 1640AB 无血清培养基添加 9% 浓度血清等体积混合后的培养液内含有少量适应性较好的 1640AB 基础培养基和血清成分，包括谷氨酰胺、氨基酸、HEPES 缓冲液、丙酮酸钠盐、维生素等多种营养成分，故相对于直接替换的 100% 商业化无血清培养基适应性更好；另一方面，在培养初期，细胞密度较小，对培养基内营养物质的需求较少，故没有明显差异，但从第二天起，细胞增殖速度加快，细胞密度较大，故出现由于营养成分不足而导致细胞提前进入衰亡期，存活率下降的现象。

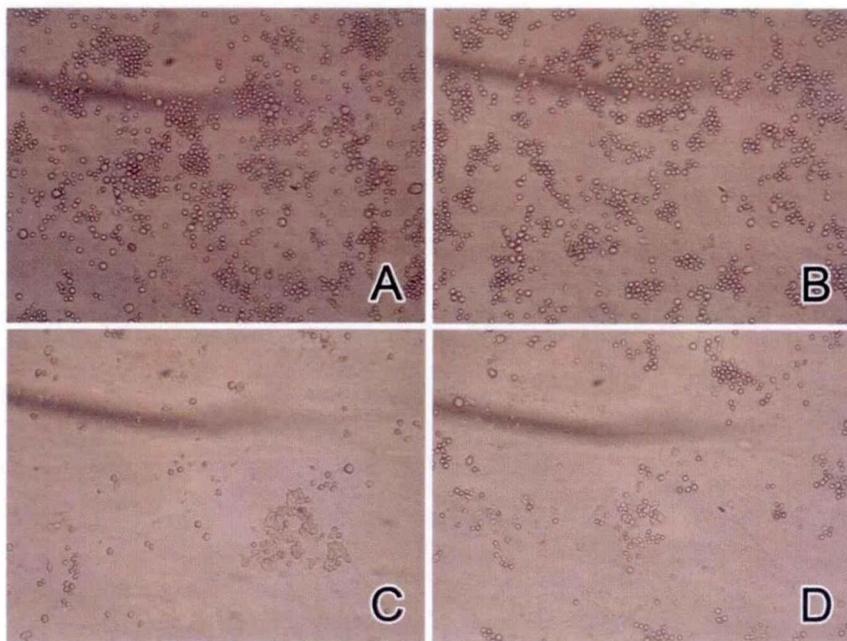
在同样 1:1 体积混合的商业化无血清培养基和 1640AB 培养基添加 9% 血清浓度的条件下，相较于 1:1 的 1640AB/F12 培养基而言，CD Hybridoma Medium 是 Gibco 公司专为骨髓瘤和杂交瘤细胞开发的无血清培养基，在必需营养成分和微量元素配比方面较 F12 无血清培养基更具有优势，故 1:1 的 1640AB/CD Hybridoma 培养基适应性更好。

2.3.2 兔骨髓瘤细胞的无血清培养基悬浮培养驯化

降低血清浓度的贴壁培养驯化初期，从 9% 血清浓度经 5% 再降至 3% 时，细胞并未表

現出不適宜，也未呈現出肉眼可見的差異，且生長速度也基本保持一致，結果見圖 2.6A 和 2.6B。隨着血清濃度的進一步降低，直至血清濃度為 1% 時，240E-W2 呈現出生長速度放緩，部分細胞開始衰亡甚至死亡的现象，結果見圖 2.6C。

經過次換液及多次傳代后，240E-W2 適應了僅含 1% 血清濃度的營養條件，生長速率逐漸恢復。但是細胞邊緣稍顯粗糙，貼壁較為松散，部分細胞呈現出单个懸浮現象，結果見圖 2.6D。



A. 9% 血清濃度的貼壁培養

B. 3% 血清濃度的貼壁培養

C. 1% 血清濃度的貼壁培養（生長放緩且死亡）

D. 1% 血清濃度的貼壁培養（生長恢復且）

圖 2.6 不同血清濃度下兔骨髓瘤細胞（240E-W2）貼壁培養的生長狀態

Fig. 2.6 240E-W2 cells growth state in different concentrations of serum

將基本適應了 1% 血清含量的 240E-W2 細胞轉入表面經過硅化處理的 Spinner Flask 中進行無血清懸浮培養的馴化適應，33 rpm、37°C、5%CO₂ 培養箱中培養，培養液徹底替換為 1:1 的 1640AB 和 CD Hybridoma Medium 無血清培養基。由於 240E-W2 細胞自身屬於半貼壁細胞，在常規添加 9% 血清濃度的 1640AB 培養基培養過程中可直接適應於

悬浮培养。替换成无血清培养基后，由于缺失了血清中利于细胞贴壁生长的因子，挑选悬浮细胞较多的细胞株直接进行悬浮培养，经长期传代处理后，适应于无血清培养的兔骨髓瘤细胞（240E-W2-SFM）呈现单细胞悬浮生长的状态，边缘光滑透亮清晰，大小基本均一，生长速度稳定，结果见图 2.7。取样后与对照组兔骨髓瘤细胞（240E-W2）状态（图 2.8）基本无差异。

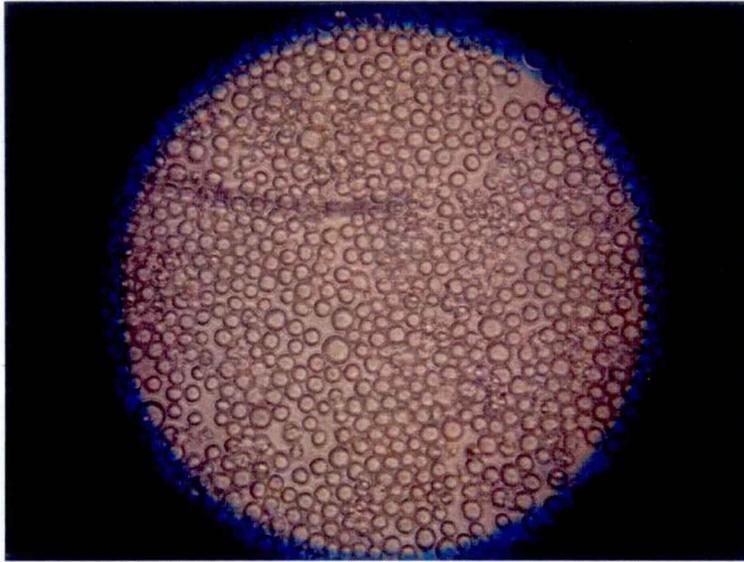


图 2.7 无血清悬浮培养下 240E-W2 细胞的生长状态

Fig. 2.7 240E-W2 cells growth state in serum free medium



图 2.8 9%血清悬浮培养下 240E-W2 细胞的生长状态

Fig. 2.8 240E-W2 cells growth state in 9% serum medium

在悬浮细胞培养驯化过程中，需要考虑多种因素。首先，细胞从贴壁到悬浮，细胞改变了存在的形态，要从常规细胞传代的过程中筛选出适合驯化的细胞。血清具有利于

细胞贴壁生长的功效，随着血清含量的下降，细胞贴壁能力逐渐降低，出现贴壁松散甚至部分悬浮状态。由于 240E-W2 细胞是半贴壁细胞，因此尽量选择悬浮细胞较多的细胞株进行进一步悬浮培养成功率相对较高。其次，为实现驯化的稳定性，在驯化过程中要控制好各项参数，如驯化时细胞活力要控制在 90% 以上，细胞初次从贴壁的培养皿里转入转瓶时需要适当提高初始接种密度，从 $0.8 \times 10^5/\text{ml}$ 上升至 $1.2 \times 10^5/\text{ml}$ ，转瓶的转速适当从 33 rpm 降至 30 rpm，以减少旋转剪切力对细胞造成的损伤，待其比生长速率恢复稳定后方可恢复 33 rpm 的常规转速。再者，需要保持细胞的表达特性不发生变化，驯化后的细胞增殖能力、复苏后细胞活力及生理活性都要满足大规模的生产需要等。

2.3.3 兔骨髓瘤细胞的无血清培养亚克隆分析

取完全适应且悬浮生长于 1:1 的 1640AB 和 CD Hybridoma Medium 无血清培养基中状态良好的 240E-W2-SFM，以双向稀释和有限稀释两种方法进行亚克隆操作，置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中静置培养，12 天后观察有限稀释法稀释后的 96 孔细胞培养板内克隆及单克隆生长状态。随着每孔铺板细胞数的增加，克隆率随之增加，但是单克隆率在 4 cells/well 的铺板条件下最具有优势。统计结果见表 2.1。

表 2.1 不同细胞数铺板后克隆率及单克隆率统计

Table 2.1 The clone rate and monoclonal rate in different cell numbers

Cell number/well (cells/well)	Clone rate (%)	Monoclonal rate (%)
2	48	39
4	63	51
6	81	33

挑选 96 孔细胞培养板中状态好、边缘光滑圆润、大小适中的单克隆孔，将其内细胞扩大培养至 6 孔细胞培养板中，待其稳定生长后替换培养液为无血清的 8-AZ 培养液培养一周，挑选状态优良的克隆株细胞再替换回 1:1 的 1640AB/CD Hybridoma Medium 无血清培养基进行培养。然后冻存于液氮罐中作为种子保存，并继续将其与兔脾脏细胞进行

融合操作, 根据融合结果挑选最佳的杂交瘤细胞株, 再对其进行 4 cells/well 的克隆筛, 重复此过程, 直至筛选出最佳的杂交瘤细胞株, 并对每次筛选得到的克隆细胞株进行冻存备份, 以用作后续筛选阳性种子细胞的备份, 可避免在筛选过程中浪费大量的时间做重复的工作。

2.3.4 兔骨髓瘤细胞的无血清冻存复苏分析

选取一种相同的冻存液: (1) 含 90%Gibco 血清和 10%DMSO 的原冻存液 (DFBS); (2) 以纯净水作为溶剂含有 DMSO 和甲基纤维素, 不含血清的 ATCC Serum Free Cell Freezing Medium 冻存液 (SFCFM); (3) 以 DMEM 为母液, 含有 DMSO, 不含牛血清或其他蛋白成分的 Quick Freezing-M 冻存液 (QFM)。分别冻存于 -80°C 和液氮中一个月后, 在 37°C 水浴中复苏细胞, 连续 3 天对细胞进行存活率统计并且观察细胞生长状态, 结果见图 2.9(a) 和 2.9(b)。

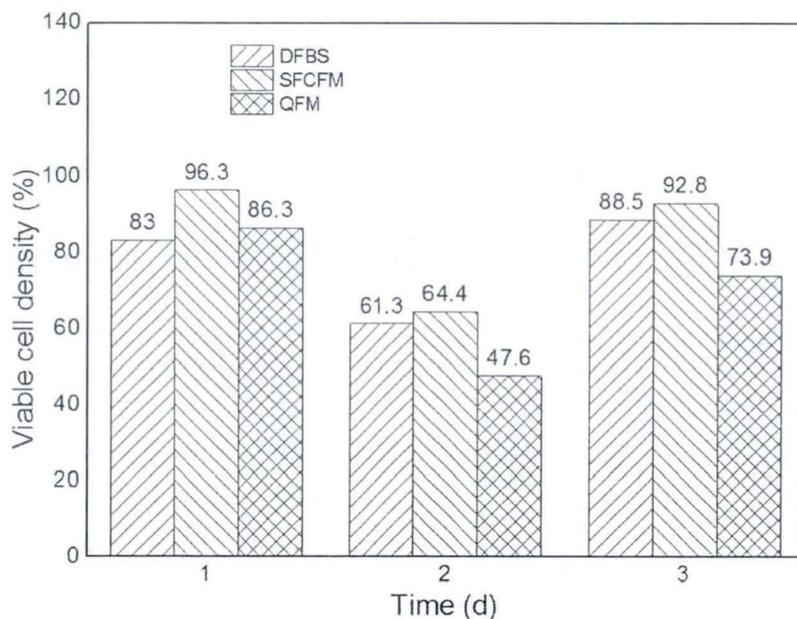


图 2.9(a) 不同冻存液 -80°C 冻存后一个月的细胞存活率

Fig. 2.9(a) Cell viability in different frozen solution after one month in -80°C

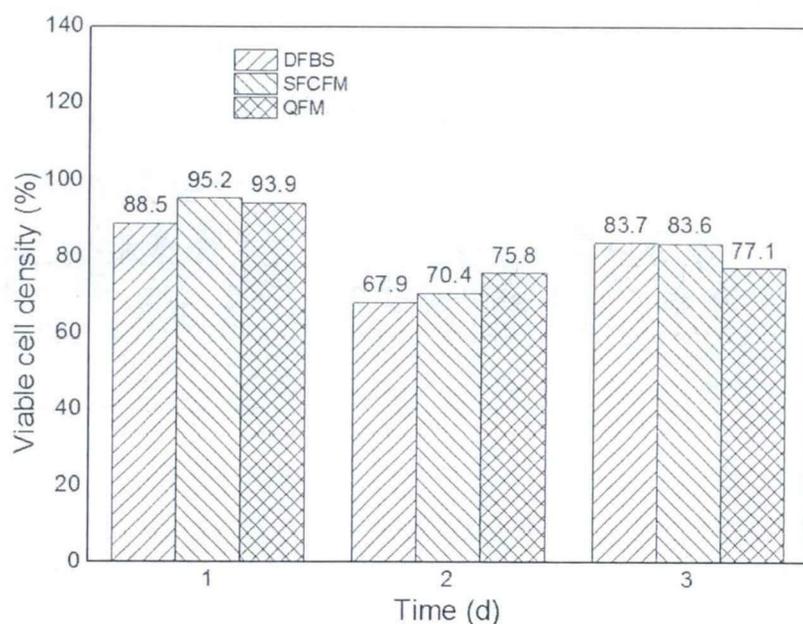


图 2.9(b) 不同冻存液液氮冻存后一个月的细胞存活率

Fig. 2.9(b) Cell viability in different frozen solution after one month in liquid nitrogen

可以发现，-80℃保存的细胞在复苏第二天时存活率较液氮保存的下降更为明显，但是第二天存活率上升速度又明显高于液氮保存的细胞。液氮保存的细胞在复苏三天内细胞存活率波动相对较小，冻存方式更为稳定。相对而言，SFCFM冻存液的冻存效果比较理想，-80℃保存复苏存活率前一天均略高于对照组，液氮保存复苏存活率前两天略高于对照组，第二天也与对照组类似。相对而言，QFM冻存液的稳定性略低于对照组，天内的细胞存活率也相对低于对照组。

结果表明，-80℃保存比液氮保存的细胞更容易调整状态进入正常的细胞周期，以现有的含血清冻存液 DFBS 作为参照，SFCFM 冻存液冻存的细胞更为稳定。三种冻存液冻存的细胞在保存于-80℃或液氮中一个月后复苏的存活率差异均不大，冻存的细胞在一个月内存移至液氮罐内长期保存，对细胞复苏存活率影响不大。

不同冻存液在液氮内保存，第三个月、第六个月、第十二个月分别复苏后前三天的细胞存活率见图 2.10-2.12。

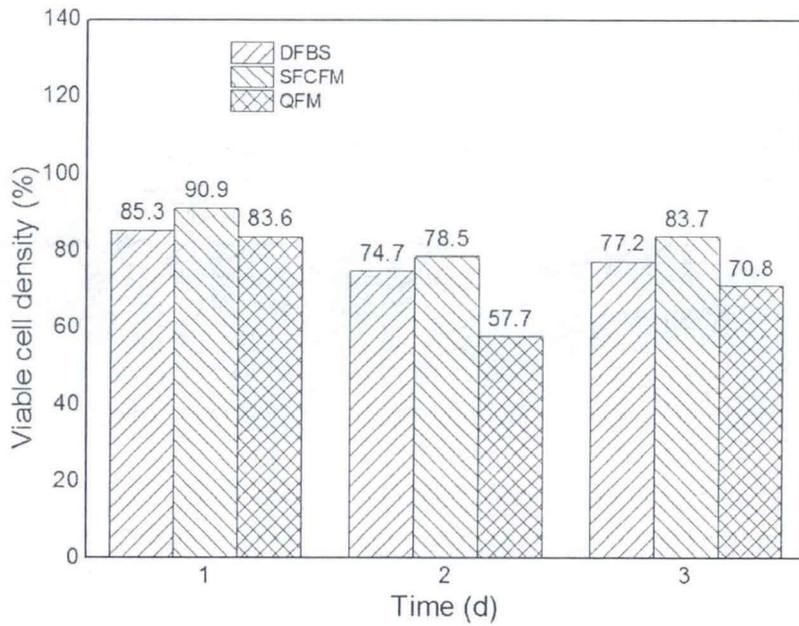


图 2.10 不同冻存液液氮冻存三个月复苏后前三天的细胞存活率

Fig. 2.10 Cell viability with different frozen solution in liquid nitrogen after 3 months

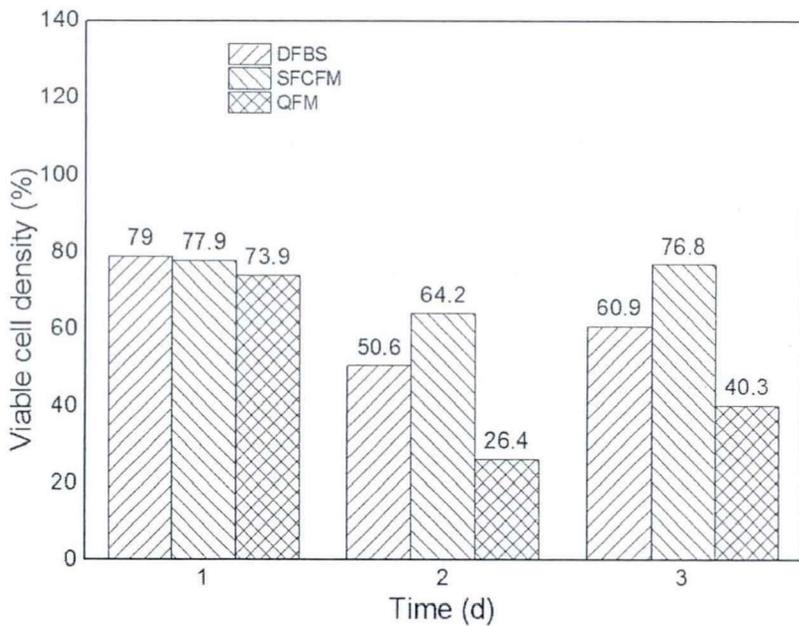


图 2.11 不同冻存液液氮冻存六个月复苏后前三天细胞存活率

Fig. 2.11 Cell viability with different frozen solution in liquid nitrogen after 6 months

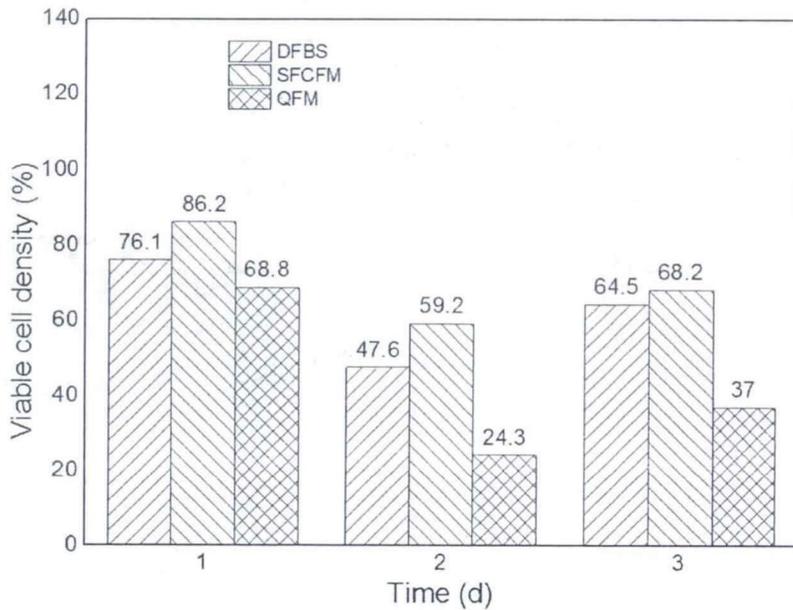


图 2.12 不同冻存液液氮冻存一年复苏后前三天的细胞存活率

Fig. 2.12 Cell viability with different frozen solution in liquid nitrogen after 12 months

可以发现，细胞保存在液氮中第一个月及第三个月复苏后存活率下降不明显，但在保存六个月之后复苏时存活率会明显下降，一年后存活率较六个月差异不大。以现有冻存液（DFBS）为参照，同等条件下用 SFCFM 冻存的细胞复苏后存活率最高，QFM 与现有冻存液相比复苏后存活率偏低，相对稳定性稍差。复苏后 24 小时内细胞处于调整状态，存活率相对较低，但是再之后的 24 小时细胞会调整好状态并进入正常细胞周期进行增殖。

结果表明，SFCFM 冻存液冻存的细胞复苏后存活率与恢复周期与现有含血清冻存液相似，3-4 天内增殖稳定，状态良好，可用来替代现有含血清冻存液的冻存方式。

2.4 本章小结

本章兔骨髓瘤细胞（240E-W2）的无血清培养驯化，采用商品化无血清培养基 CD Hybridoma Medium、F12、以及自行研发的 1640AB 无血清培养基按照体积比为 1:1 配置的 1640AB/F12 培养基和 1640AB/CD Hybridoma Medium 培养基进行对比驯化实验。

通过速降血清的方式,初步发现 1:1 的 1640AB/CD Hybridoma Medium 培养基适应性较好,进一步用缓降血清的方式从 1%血清含量继续降至完全无血清贴壁培养。对于贴壁转悬浮培养的驯化过程,细胞状态、初始接种密度、转速均对细胞有影响,尽量选择半贴壁状态中悬浮较多的细胞,适当升高初始接种密度,适当降低转速,待其生长能力恢复后再调整回正常转速,更容易适应悬浮培养。经优化,实现了兔骨髓瘤细胞对于 1:1 的 1640AB/CD Hybridoma Medium 无血清培养基的悬浮驯化培养。

通过反复亚克隆的方式筛选出性状稳定的适应于无血清培养的兔骨髓瘤细胞 (240E-W2-SFM),发现以每孔 4 个细胞的方式进行有限稀释法亚克隆,得到的克隆率和单克隆率最高,细胞状态最好。

考察了不同的无血清冻存液对于驯化后的细胞株冻存复苏的影响,确定 ATCC Serum Free Cell Freezing Medium 作为最合适的无血清冻存液,用于 240E-W2-SFM 细胞的长期保存,冻存一年后复苏存活率可达 68.2%,高于含血清冻存液对照将近 4 个百分点,且状态恢复时间与原冻存液相同。

结果表明,兔骨髓瘤细胞 (240E-W2) 从含血清培养方式驯化为无血清悬浮培养方式是切实可行的,为兔单抗的无血清生产提供了基础。不过,适应于无血清培养的兔骨髓瘤细胞 (240E-W2-SFM) 的生理活性等方面仍需进一步验证。

第三章 无血清驯化后兔骨髓瘤细胞的生理活性

3.1 引言

适应于无血清培养的兔骨髓瘤细胞（240E-W2-SFM），成功驯化后其生理活性是关键，应该具有和常规含血清培养的兔骨髓瘤细胞株（240E-W2）同样甚至更优的生长速度、比生长速率、存活率，以确保传代后具有足够的细胞密度用于与兔脾脏细胞进行融合，从而获得优良的兔杂交瘤工程细胞株，用于兔单抗制备。

细胞周期是指连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的全过程，主要分为分裂间期和分裂期两个阶段。流式细胞仪可以检测细胞周期，通过对凋亡期、G0/G1、S、G2/M、黏连体等各种不同时期DNA含量的检测，验证细胞的增殖能力，从而确定细胞的分裂能力和增殖活性。

成功驯化后的适应于无血清培养的240E-W2-SFM细胞还应不具有内源性重链和轻链，以确保融合后杂交瘤细胞所分泌的抗体具有特异性。可以通过RT-PCR对内源性重链轻链和240E-W2细胞的特异性片段进行重组扩增分析，以及与兔脾脏细胞的融合效率来进一步验证其作为兔单抗工程细胞株的可行性。

本章采用第二章驯化成功后的适应于无血清悬浮培养的240E-W2-SFM细胞与传统含血清培养的240E-W2细胞进行各方面生理活性的比较，探讨无血清悬浮培养的240E-W2-SFM作为新型兔骨髓瘤工程细胞株用于兔单抗生产的可行性。

3.2 材料和方法

3.2.1 试剂与仪器

TurboCapture tube、TCW buffer、Tris-Cl、RT 反应体系： QIAGEN, Germany

白金 Taq 酶、10×PCR buffer、dNTPs、primers： Thermo Fisher Scientific, USA

PEG SOLUTION 50% (w/v)： SIGMA Life Science, USA

FOETAL BOVINE SERUM: Hyclone, USA.

70%乙醇: 华东医药

RNaseA、PI: Abcam, England.

Olympus C5060-ADU 显微镜: Olympus, Japan.

Thermo LEGEND MICRO 17R 离心机: Thermo Fisher Scientific, USA.

BD FACSCanto II 流式细胞仪: Becton, Dickinson and Company, USA.

Thermo Forma SeriesII CO₂ 培养箱: Thermo Fisher Scientific, USA.

3.2.2 生长能力及活性分析

复苏完全适应于 1:1 的 1640AB/CD Hybridoma Medium 无血清培养基培养且生长状态良好的 240E-W2-SFM 细胞作为测试组, 同步复苏培养于常规添加 9%血清浓度的 240E-W2 细胞作为对照组。复苏后细胞分别转移至直径为 15 cm 塑料培养皿中, 补加 30 ml 不同的培养液, 37°C、5%CO₂ 培养箱中进行半贴壁培养对照实验。第二天换液, 每隔一天持续传代培养。

约两周后, 待细胞生长状态恢复稳定后, 扩增至 300 ml 转瓶中悬浮培养, 最终再扩增至 500 ml 转瓶中悬浮培养, 37°C、5%CO₂ 培养箱, 转速设置为 33 rpm。

悬浮培养时, 初始接种密度为 1.0×10^5 /ml, 连续四天计数计活, 观察细胞生长状态, 描绘生长曲线以及比生长速度对比图。

3.2.3 细胞周期分析

流式细胞仪检测细胞周期, 通过对凋亡期、G0/G1、S、G2/M、黏连体等各种不同时期 DNA 含量的检测, 进一步验证细胞的增殖能力, 从而确定细胞的分裂能力和增殖活性。取初次驯化成功、第一次细胞亚克隆 (1st-sub)、多次细胞亚克隆 (Nnd-sub) 以及冻存一年后的不同阶段的完全适应于 1:1 的 1640AB/CD Hybridoma Medium 无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞与正常添加 9%血清培养的 240E-W2 细胞进行对比试验, 检测细胞周期, 分析细胞的生长和增殖能力。

- (1) 用 20 ml 移液管充分吹匀处于对数生长期的细胞, 制备成单细胞悬液;
- (2) 转移至离心机, 200g, 离心 5min, 弃上清;

- (3) 加入 1*PBS, 200g, 离心 5min, 洗涤后弃上清;
- (4) 按照 1×10^6 cell/2ml 的比例加入预冷的 70%乙醇, 4℃固定 30min 或者 -20℃固定过夜;
- (5) 200g, 离心 5min, 弃上清;
- (6) 加入 1*PBS, 200g, 再次离心 5min, 洗涤后弃上清;
- (7) 按照 1×10^6 cell/500ul 的比例加入 PBS 重悬, 加入工作浓度为 20 μ g/ml 的 RNaseA, 37℃, 孵育 30min;
- (8) 200g, 离心 5min 后弃上清, 加入 1*PBS, 200g, 离心 5min, 洗涤后再次弃上清;
- (9) 加入工作浓度为 50 μ g/ml 的碘化丙啶染料 (PI) 于 100 μ l 的 1*PBS 中, 室温避光孵育 30min。
- (10) 流式细胞仪进行检测。

以标准程序用流式细胞仪检测, 一般计数 1 万个细胞, 结果用细胞周期拟和软件 FlowJo 分析。

3.2.4 内源性重链轻链以及特异性片段分析

取冻存一年后成功复苏的无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞与正常添加 9%血清培养的 240E-W2 细胞进行 PCR 对比试验, 检测细胞内源性重链轻链以及特异性片段的扩增情况, 验证无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞的特定基因序列与对照组细胞相近。

mRNA 提取和 RT-PCR, RT 反应体系见表 3.1, RT 反应程序见表 3.2。

- (1) 吸取 80 μ l 的 240E-W2 细胞裂解物到 TurboCapture tube, 用封口条封好并做好标记;
- (2) 25 $^{\circ}$ C, 100 rpm 孵育 90min, 使 mRNA 结合到管壁上;
- (3) 吸弃 240E-W2 细胞裂解物;
- (4) 用 100 μ l 的 TCW buffer 洗涤管子 3 次;
- (5) 留最后一次的 TCW buffer 在管中, 防止管子干掉, 临加 RT combine mix 前弃掉 TCW buffer;
- (6) 加入 80 μ l 预先配制好的 RT combine mix (on ice), 确定无气泡;
- (7) 用封口条封口, 放置到 PCR 仪上, 运行 RT 程序;
- (8) 等待程序结束, 吸弃管内的液体;

- (9) 用 100 μl 的 TCW buffer 或 10mM pH7.5 的 Tris-Cl 洗涤管子 3 次；
 (10) 保留最后一次洗涤液在管内，防止管子干掉。

表 3.1 RT-PCR 反应体系

Table 3.1 RT - PCR reaction system

组分	体积 (μl)
无 RNA 酶水	47.4
5*FS Buffer	16
25mM MgCl ₂	9.6
dNTP mix (10mM)	4
RNase 抑制剂	1
逆转录酶 ImpromII	2
Total	80

表 3.2 RT-PCR 反应程序

Table 3.2 RT - PCR reaction procedures

步骤	时间 (min)
42°C	60
70°C	15
4°C	forever

内源性重链(HC)轻链(LC)以及特异性片段(OJC-108/-109)PCR 操作：OYZ 引物 PCR 反应体系见表 3.3，OYZ 引物 PCR 反应程序见表 3.4，OJC-108/-109 引物序列见表 3.5

(1)取出所需试剂置于冰盒,按照 PCR 反应体系在冰上配制好 PCR Combine Mix for HC、LC 或 OJC-108/-109;

(2)吸出上述 TurboCapture 管里的最后一次洗涤液，并将管置于冰上；

(3)迅速加入反应体系；

(4)用封口条封口，放置到 PCR 仪上；

(5)运行 PCR-HF 程序；

(6)待程序运行完毕，把管内的 80 μl 反应产物转移到 1.5 ml 离心管内，标记 HC、

LC 或 OJC-108/-109;

(7) 用 100 μ l 10mM Tris-Cl 缓冲液 (pH 7.5) 洗涤管子 3 次, 并保留最后一次的洗涤液在管子里, 防止管子干掉。

(8) 用封口条封口, 将管子 4 $^{\circ}$ C 放置备用。

表 3.3 OYZ 引物 PCR 反应体系

Table 3.3 OYZ primer PCR reaction system

OYZ 引物 PCR 反应体系 (80 μ l)	
10 \times Buffer	8
Mg ²⁺	3.2
dNTPs(10mM)	1.6
F(3 μ M)	8
R(3 μ M)	8
Taq (high fidelity)	0.3
H ₂ O	50.9
Total	80

表 3.4 OYZ 引物反应程序

Table 3.4 OYZ primer PCR reaction procedures

OYZ 引物 PCR 反应程序		
94 $^{\circ}$ C	2min	
94 $^{\circ}$ C	30s	
58 $^{\circ}$ C	30s	35 cycles
68 $^{\circ}$ C	50s	
68 $^{\circ}$ C	7min	
4 $^{\circ}$ C	forever	

表 3.5 OJC-108 -109 引物序列

Table 3.5 OYZ primer sequence

Genscript Custom Primers			
Certificate of Analysis			
Order No. B22599	Date: 2013-08-30 16:43:41		Page: 1 - 1
Primer Name: OJC-108		Cat.No.: B22599-01	
Sequence (5' to 3'): 5'> TCCCACCATCTCCTGCTGAGC <3' ↓			
MW(g/mole): 6275.10	Primer Length: 21	%GC: 61.9	Modification: None
Package: 2 OD *1	Total Quantity: 2.0 OD	Tm: 60.8 °C	Extinction Coeff [L/(mole·cm)]: 180300
µmoles /OD: 5.55	µmoles: 11.09	Volume for 100 µM per package: 111 µl	µg/OD: 34.52 µg's: 69.04
Primer Name: OJC-109		Cat.No.: B22599-02	
Sequence (5' to 3'): 5'> GCTCTGGACGACCGGTGAGCCTGA <3' ↓			
MW(g/mole): 7324.83	Primer Length: 24	%GC: 66.7	Modification: None
Package: 2 OD *1	Total Quantity: 2.0 OD	Tm: 66.5 °C	Extinction Coeff [L/(mole·cm)]: 225800
µmoles /OD: 4.43	µmoles: 8.86	Volume for 100 µM per package: 68.6 µl	µg/OD: 32.75 µg's: 65.5

3.2.5 细胞融合率及平均克隆数分析

细胞融合就是在外力的作用下两个或两个以上的细胞融合成一个双核或多核的细胞的现象。对动物细胞而言，用聚乙二醇（PEG）介导细胞融合是最常用最简单的方法，优点是操作简单，易于获得融合体，融合效果好。进行动物细胞融合实验，一般的实验条件是 PEG 作为促融剂，融合温度为 37℃，反应时间不超过 3min。

细胞融合率的计算：在显微镜视野内，计数已发生融合的细胞核、未融合的细胞核数量，计算已融合的细胞核数占细胞核总数之百分比即为融合率，且进行多视野测定再加以平均统计。

$$\text{融合率} = \frac{\text{融合的细胞核数}}{\text{总细胞核数}} \times 100\%$$

实验数据均为三次实验结果得平均值。

使用无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞与正常添加 9% 血清培养的 240E-W2 细胞进行融合对比试验。每个脾脏细胞分别融合后铺 20 板 96 孔细胞培养板，10 天后进行换液，

继续培养 7 天后取适量细胞培养液上清, 进行 OD 值检测, 取脾脏细胞培养液上清作为阳性对照, 取 240E-W2 细胞培养液上清作为阴性对照, 统计 10 板细胞的阳性孔比例, 以验证驯化后的无血清培养基的 240E-W2-SFM 细胞在有效融合上的可行性, 考察不同培养方式的兔骨髓瘤细胞的有效融合效果。

3.3 结果与讨论

3.3.1 细胞生长能力及活性分析

考察在转瓶中无血清悬浮培养的 240E-W2-SFM 细胞的生长速度及存活率, 连续四次计数计活, 观察细胞状态, 并与正常添加 9% 血清浓度的培养液中悬浮培养的 240E-W2 细胞相比较。两种不同培养条件下的细胞密度变化和细胞存活率见图 3.1 和 3.2。根据公式 (1-1) 计算出细胞的比生长速率, 结果见图 3.3。

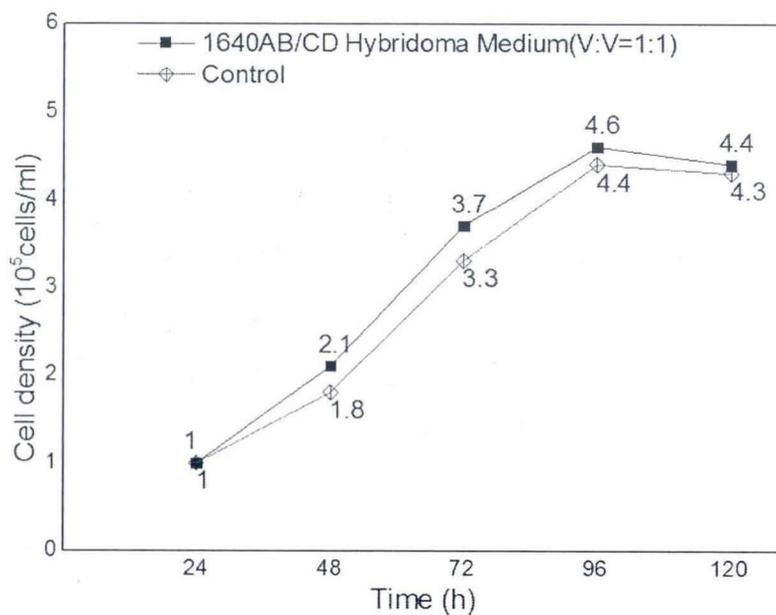


图 3.1 兔骨髓瘤细胞的生长曲线对比

Fig. 3.1 Growth curve of 240E-W2 cells in different mediums

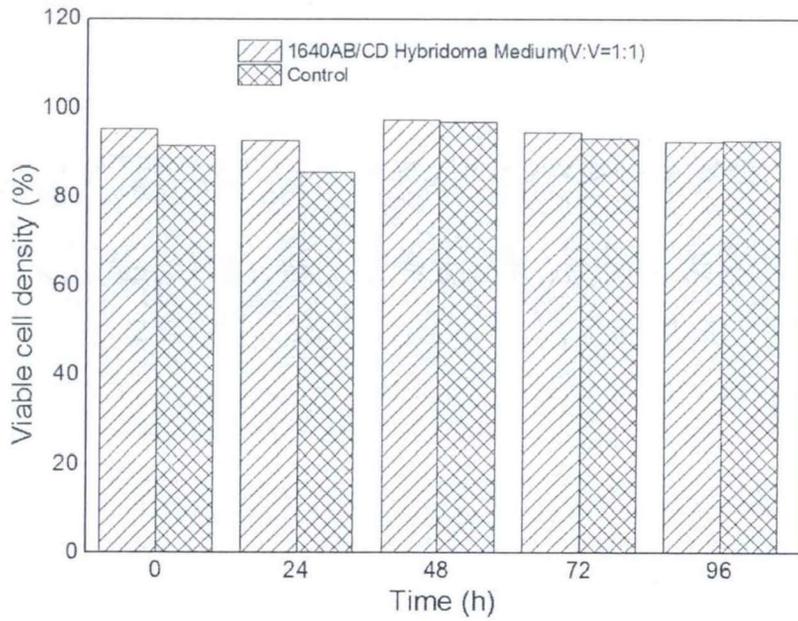


图 3.2 兔骨髓瘤细胞存活率对比

Fig. 3.2 Viable cell density of 240E-W2 cells in different mediums

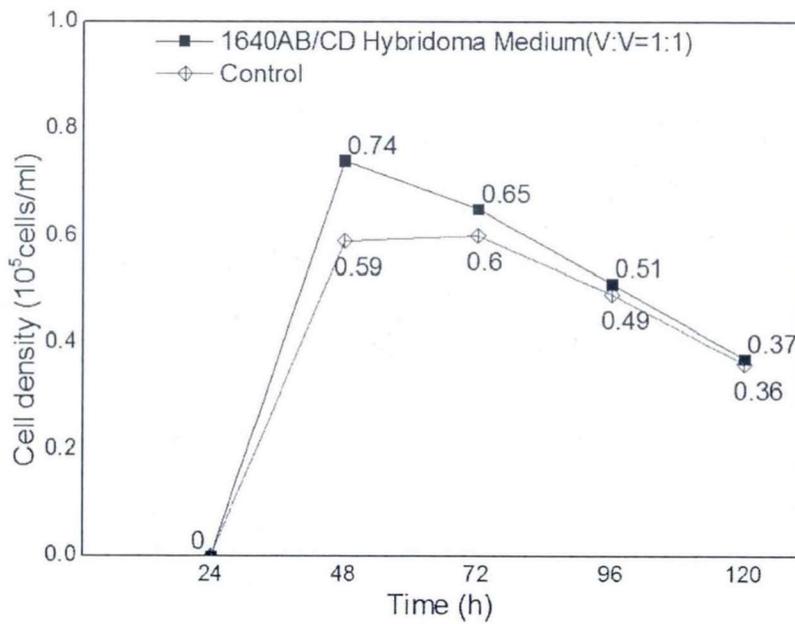


图 3.3 兔骨髓瘤细胞比生长速率对比

Fig. 3.3 Specific growth rates of 240E cells in different mediums

可以发现，对于兔骨髓瘤细胞（240E-W2），采用不同的培养基进行培养，细胞的生长情况也会稍有不同，但总体生长趋势相似，且在无血清培养基中培养的兔骨髓瘤细胞（240E-W2-SFM）生长速率略微高于对照组有血清培养基内的生长速率。两种不同的培养条件下，细胞密度基本都在第四天达到峰值，而后无血清培养基内细胞的比生长速率略微高于对照组，说明经过驯化后的无血清培养的 240E-W2-SFM 已完全适应了无血清培养模式。

3.3.2 细胞周期分析

对完全适应无血清培养 240E-W2-SFM 细胞的生长活力及状态的评估，除了通过生长曲线、比生长速率和存活率来考察，还需要通过细胞周期的分析来进一步验证。细胞周期指的是连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的整个过程，主要分为分裂间期和分裂期两个阶段。

考察了直接驯化成功后无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞、1st-sub 及 Nnd-sub 后无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞、冻存复苏后无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞，并与添加 9% 血清培养的 240E-W2 细胞进行对照，通过流式细胞仪对凋亡期、G0/G1、S、G2/M、黏连体等各种不同时期 DNA 含量的检测，验证其细胞活力及增殖能力，结果如图 3.4-3.8 所示，数据见表 3.6 所示。

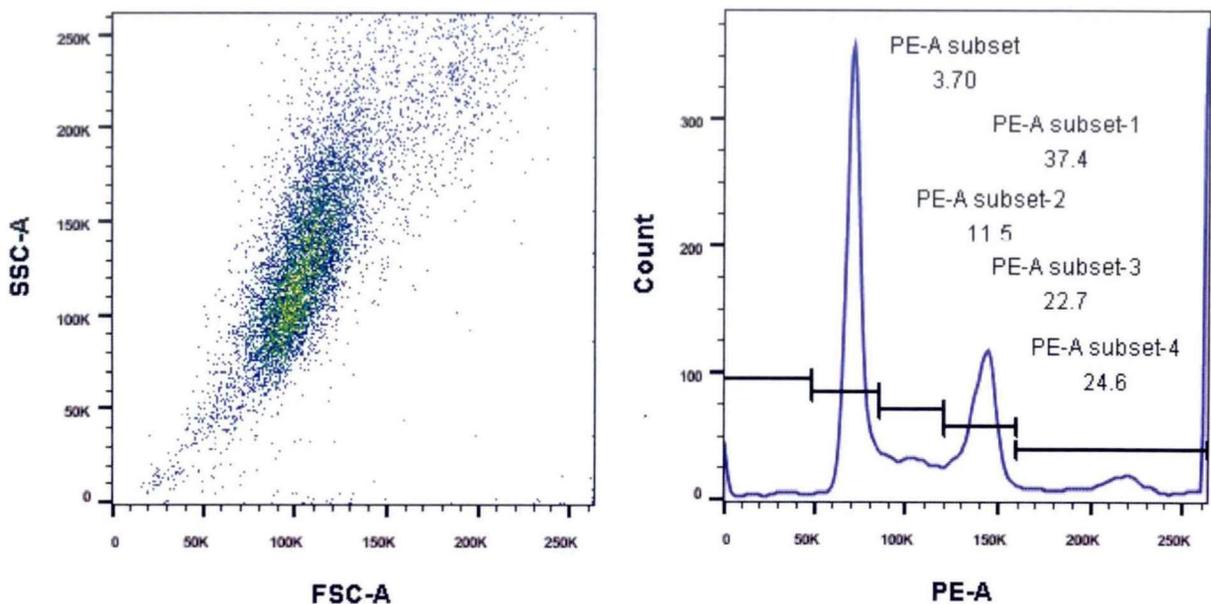


图 3.4 直接驯化成功后无血清培养 240E-W2 细胞周期

Fig. 3.4 Celleycle of directly domesticated 240E-W2 cells in SFM

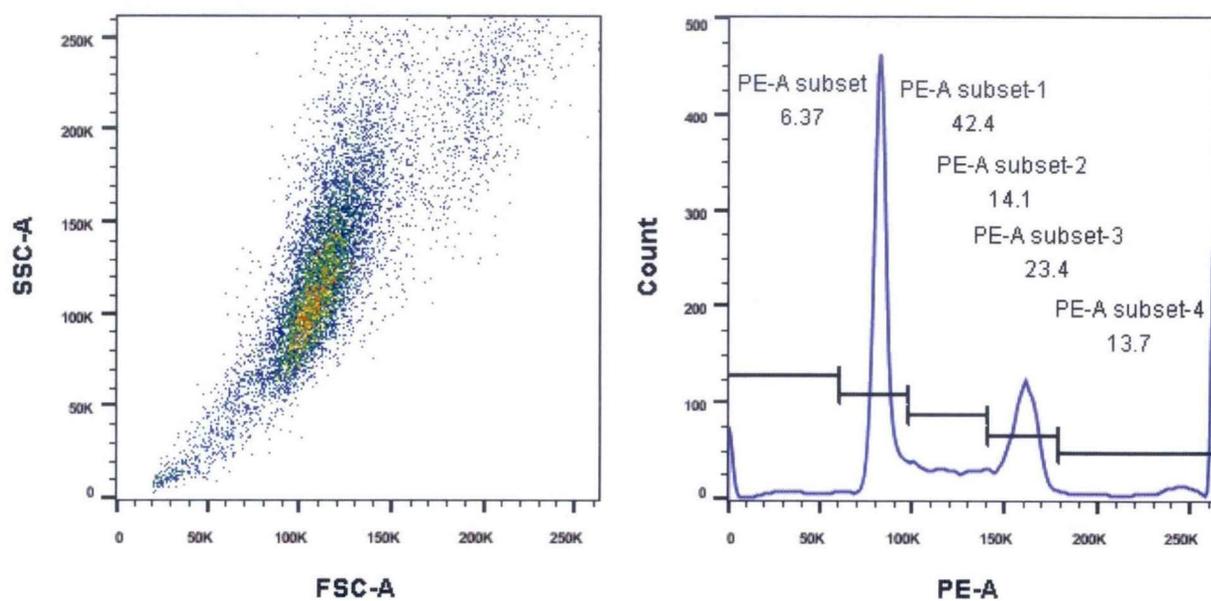


图 3.5 1st-sub 后无血清培养 240E-W2 细胞周期

Fig. 3.5 Cellcycle of 1st-sub 240E-W2 cells in SFM

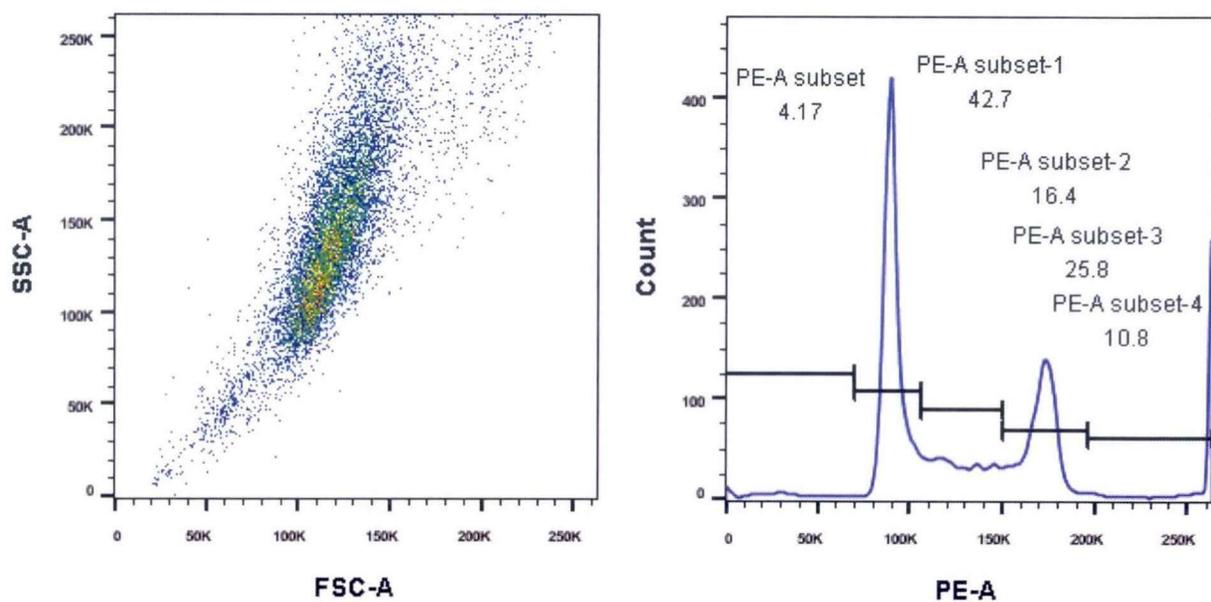


图 3.6 Nnd-sub 后无血清培养 240E-W2 细胞周期

Fig. 3.6 Cellcycle of Nnd-sub 240E-W2 cells in SFM

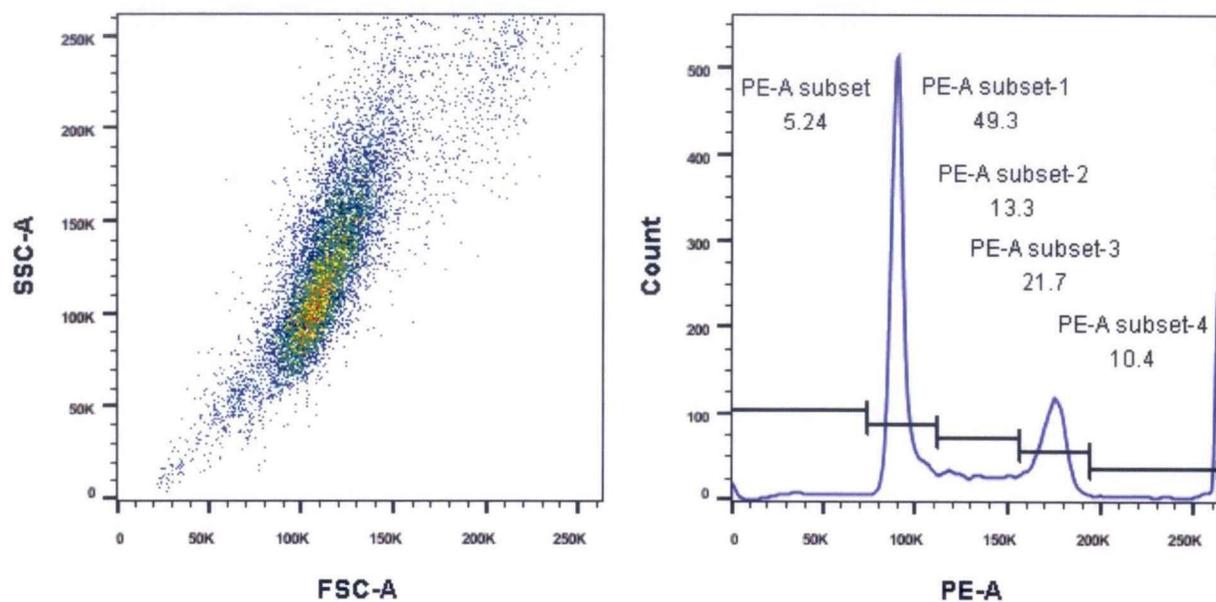


图 3.7 复苏后无血清培养 240E-W2-SFM 细胞周期

Fig. 3.7 Celcycle of resuscitated 240E-W2-SFM cells in SFM

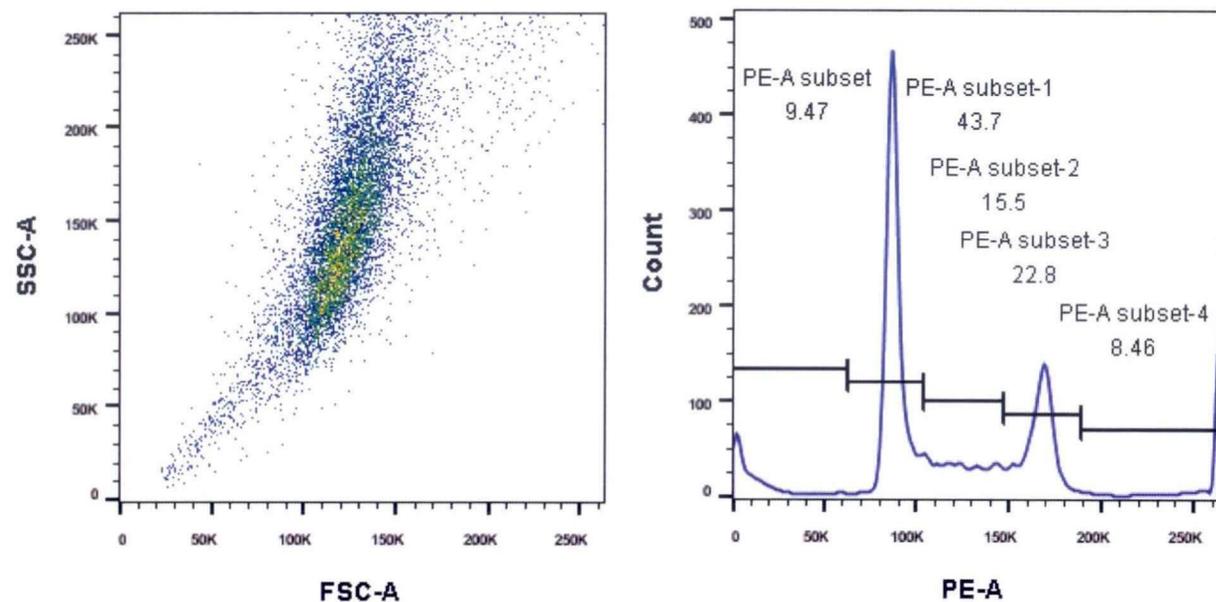


图 3.8 9%血清培养 240E-W2 细胞周期

Fig. 3.8 Celcycle of 240E-W2 cells in 9% serum medium

表 3.6 细胞周期的数据统计

Table. 3.61 Data statistics list of cellcycle of 240E-W2 cells under different conditions

	直接驯化	1 st -Sub 后	N nd -Sub 后	复苏后	对照
凋亡期	3.7	6.37	4.17	5.42	9.47
G0/G1 期	37.4	42.4	42.7	49.3	43.7
S 期	11.5	14.4	16.4	13.3	15.5
G2/M 期	22.7	23.4	25.8	21.7	22.8
粘连体	24.6	13.7	10.8	10.4	8.46

可以看出,直接驯化成功后的适应于无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞虽然生长速度和存活率相对稳定,但是由于缺乏血清的供应,粘连体较多,细胞接触抑制导致细胞活力稍显不足。随着亚克隆筛选次数的增加,优势细胞逐渐被筛选出来,细胞适应性逐渐变好,G0/G1 期、S 期和 G2/M 期细胞的比例均逐渐上升,而粘连体的细胞比例逐渐降低,凋亡期的细胞比例也相对稳定。冻存一年后复苏后的细胞,由于刚复苏,细胞活力尚未完全恢复,故 G0/G1 期细胞比例稍高而 S 期和 G2/M 期细胞比例稍低,但总体各个阶段的细胞比例与复苏前基本相似,可以证明无血清冻存对细胞状态及活力无显著影响,验证了本文冻存方式的可行性,且与对照组细胞基本相似。

结果表明,驯化成功的适应于无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞相对于含血清培养的 240E-W2 细胞来说,具有相似的生长状态和生长活力,适用于作为单抗制备的工程细胞株进行规模化融合应用。

3.3.3 细胞内源性重链轻链以及特异性片段分析

对于用作单抗制备的工程细胞株兔骨髓瘤细胞,需要不含有内源性重链和轻链,以保证通过融合而获得的单抗不被内源性重链和轻链干扰。利用特定的引物对其进行 PCR 扩增,可以有效鉴定驯化成功后的适应于无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞是否与原来含血清培养的 240E-W 细胞 2 具有相同的属性。图 3.9 为 240E-W2-SFM 的 RT-PCR 结果条带,图 3.10 为标准 Mark 条带图例。

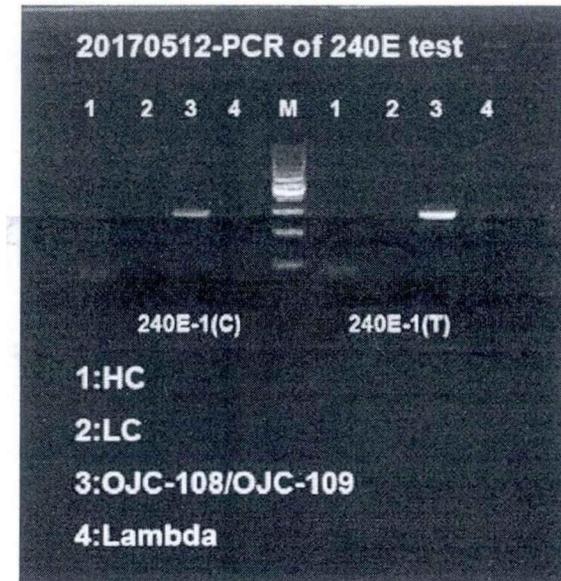


图 3.9 240E-W2 (9%-Serum) 和 240E-W2-SFM (None-Serum)PCR 比较

Fig. 3.9 PCR results of 240E-W2 (9%-Serum) and 240E-W2-SFM (None-Serum)

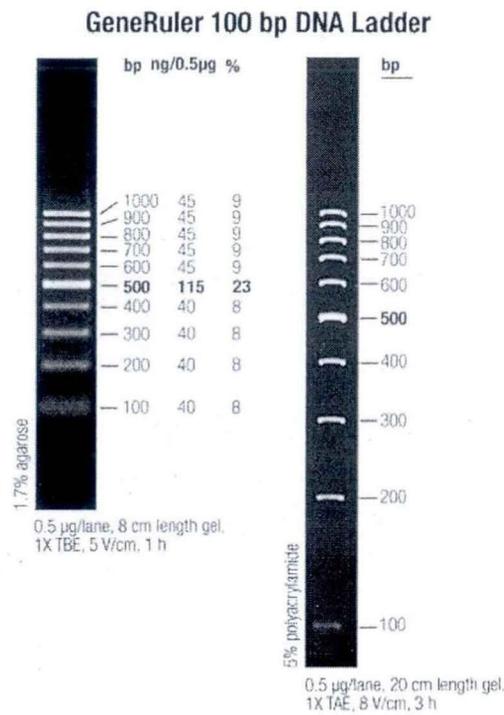


图 3.10 Mark 标记的标准条带图

Fig. 3.10 Standard chart of markers

对于兔骨髓瘤细胞驯化前后内源性重链、轻链以及特异性片段的 PCR 结果见图 3.9, Mark 标记标准条带见图 3.10。可以看出,在 PCR 结果中 Mark 条带中最亮的部分为 500bp, 而 240E-W2 轻链一般在 500 bp 左右,重链一般在 800 bp 左右,所制备的单抗一般具有特异性的 Lambda 链。从结果可见,驯化前后的兔骨髓瘤细胞均不含特异性的重链,也几乎无特异性的轻链,并且无特异性的 Lambda 链。但是兔骨髓瘤细胞特有的片段在适应无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞中表达比对照组更加明显。因此,可以进一步确认成功驯化后的 240E-W2-SFM 细胞作为单抗制备的工程细胞株不会产生内源性表达的干扰,且保持了原有细胞株的特异性。

3.3.4 细胞融合率及平均克隆数分析

为了进一步验证成功驯化后的 240E-W2-SFM 细胞作为单抗制备的工程细胞株和常规添加 9%血清培养的 240E-W2 细胞具有同样的融合效率,可以完全替代现有的细胞株,随机挑选了 4 个不同批次的兔骨髓瘤细胞与 24 个不同抗原免疫的兔脾脏细胞进行融合的对比实验。融合效率由融合后平均每板的融合率和克隆数来表征。

按照常规方法分别对同一种脾脏细胞与无血清和含 9%血清培养的兔骨髓瘤细胞株进行融合,前 10 板用无血清培养的 240E-W2-SFM 进行融合,作为测试组;后 10 板用常规的含 9%血清培养的 240E-W2 进行融合,作为对照组。第二天分别对应加入 100 μ l/孔 2 \times HAT 无血清培养基和 9%血清浓度的 1640AB 培养基,在相同的培养条件下培养,对比观察及记录相关实验数据。

融合十天后随机选取杂交瘤细胞进行融合率、克隆数及细胞生长状态观察,平均融合率、平均克隆数统计结果见表 3.2,不同批次兔骨髓瘤细胞用于融合的结果分析见表 3.3。根据 Pre-scr 检测结果用不同的培养基分别进行换液维护,在相同的培养条件下培养,等待一周后送检 Pri-scr,进一步对融合后的杂交瘤细胞生理活性进行分析。

3.2 融合率与克隆数统计结果

Table. 3.2 Statistical results of fusion rate and clone rate

项目号	240E 批号	测试融合率 (%)	对照融合率 (%)	测试克隆数	对照克隆数
YCA-7498	P-160208	80	80	216	232
YCA-9699	P-160208	99	96	272	248
YCA-9768	P-160229	85	88	168	208
YCA-9769	P-160229	99	99	288	328
YCA-8369(2)	P-160313	98	93	312	192
YCA-9616	P-160313	95	92	280	248
SIS-15	P-160306	90	86	208	152
YCA-9786	P-160229	76	85	112	208
YCA-10089	P-160208	89	91	232	288
YCA-10087	P-160208	95	95	280	272
YCA-9705	P-160306	98	97	328	360
YCA-7737	P-160306	77	81	152	184
YCA-9059	P-160313	96	94	320	304
YCA-8688	P-160313	99	98	344	360
YCA-9058	P-160208	88	90	240	296
YCA-10065	P-160229	92	90	312	288
YCA-9959	P-160229	85	87	192	216
YCA-9739	P-160208	66	68	88	104
YCA-6876(2)	P-160306	93	96	328	400
YCA-10098	P-160229	50	58	96	128
YCA-10099	P-160313	38	36	40	48
YCA-10039	P-160313	97	95	368	328
YCA-9986	P-160306	60	64	208	232
YCA-9345(2)	P-160306	90	92	312	360
平均值		84.8	85.5	237	249

表 3.3 不同批次 240E-W2 细胞融合效果统计

Table. 3.3 Statistical results of fusion effect with different batches of 240E-W2 cells

240E 批号	测试组融合率 (%)	对照组融合率 (%)	测试克隆数	对照克隆数
P-160208	86	87	221	240
P-160229	81	84	195	229
P-160306	85	86	256	281
P-160313	87	85	277	247
平均值	85	86	237	249

可以发现,融合十天后,以脾细胞-脾细胞、瘤细胞-瘤细胞、细胞多聚体、未融合的脾细胞和瘤细胞等形式存在的细胞体无需特别筛选,均已死亡。通过含有 3 种关键成分:次黄嘌呤(hypoxanthine)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸腺嘧啶核苷(thymidine)的 HAT 培养基筛选机制,未经融合的兔骨髓瘤细胞的核苷酸合成被抑制,从而达到去除未融合兔骨髓瘤细胞的目的。

细胞有两条基本途径合成嘌呤核苷酸,一条是从磷酸核糖、氨基酸、CO₂和 NH₃等化合物开始,叶酸作为辅酶,而氨基蝶呤是叶酸的拮抗剂,可阻断细胞通过这一途径合成核苷酸。另一条途径是利用已存在的碱基,经特异的磷酸核糖转移酶催化合成核苷酸,如次黄嘌呤经过次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)转变为嘌呤核苷酸。融合所用的 240E-W2 细胞是筛选出来的 HGPRT 缺陷细胞株,因此不能在 HAT 培养基中生长,而且不合成或不分泌免疫球蛋白。只有融合后的杂交瘤细胞具有亲代双方的遗传性能,可在 HAT 培养基中长期存活与繁殖,并分泌抗体。

因此,融合十天后,成功融合的杂交瘤细胞在 HAT 培养基中逐渐生长增殖,形成肉眼可见的杂交瘤克隆,可通过镜下观察,统计各个不同项目的平均融合率和克隆数,具体数据见表 3.3。

通过以上 24 个项目融合数据可见,无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞融合后平均每板融合率约为 84.8%,克隆数约为 237 个。含 9%血清浓度培养的 240E-W2 细胞平均每板融合率约为 85.4%,克隆数约为 249 个。测试组结果与对照组无明显差异,仅平均每板克隆数略小于对照组。

进一步对四个不同批次的兔骨髓瘤细胞进行分类统计,发现不同批次的细胞融合后平均融合率均保持在 80%左右,平均克隆数均保持在 200 个左右,与对照组基本无异。

综上所述,驯化后适应于无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞和驯化前的含 9%血清浓度培养的 240E-W2 细胞具有相似的融合能力,可作为单抗制备的工程细胞株。

3.4 本章小结

采用驯化成功的适应于无血清培养的 240E-W2-SFM,进行生长增殖能力、不同阶段的细胞周期、内源性重链轻链和特异性片段的 PCR 分析,并与驯化前含 9%血清培养的 240E-W2 进行比较。

考察了 240E-W2-SFM 细胞前五天的生长速度、细胞存活率以及比生长速率,均与驯化前含 9%血清培养的 240E-W2 细胞保持一致,且略高于对照组,说明 240E-W2-SFM 细胞生长状态已经完全适应无血清培养的环境。比较了直接驯化成功后无血清培养的 240E-W2-SFM、1st-sub 及 Nnd-sub 后无血清培养的 240E-W2-SFM、冻存复苏后无血清培养的 240E-W2-SFM 与对照含 9%血清培养的的 240E-W2 的细胞周期,发现随着亚克隆次数的增加,G0/G1 期、S 期和 G2/M 期细胞的比例均逐渐稳定上升,而粘连体的细胞比例逐渐降低,凋亡期的细胞比例也相对稳定,从生理活性上进一步验证驯化后适应于无血清培养的 240E-W2-SFM 可作为工程细胞株进行融合操作。通过 PCR 反应,证实了驯化后的 240E-W2-SFM 细胞不携带自身的重链和轻链,但是具有自身的特异性条带,并且通过一定量的项目融合,统计数据可见融合率与克隆数也保持稳定。结果表明,驯化后的无血清培养的 240E-W2-SFM 可作为工程细胞株,性能良好,显示出一定的应用前景。

第四章 杂交瘤细胞的无血清培养及其生理活性

4.1 引言

对于无血清驯化后的兔骨髓瘤细胞（240E-W2-SFM）用于融合得到的杂交瘤细胞系而言，融合率、存活率、Elisa 检测阳性孔比例、维护过程中阳性克隆丢失情况是关键。对比原有含 9%血清培养的杂交瘤细胞系，通过定期检测进一步鉴定抗体分泌的特异性也至关重要。

本章采用平行对照的实验方法，以无血清培养的 240E-W2-SFM 融合后的杂交瘤细胞作为测试组，以含 9%血清浓度培养的 240E-W2 融合后的杂交瘤细胞作为对照组，持续维护培养并定期收集上清进行 Elisa 以及 WB 检测，考察比较两组阳性孔比例、丢失率，探讨无血清培养的 240E-W2-SFM 作为新型兔单抗制备工程细胞系的应用前景。

4.2 材料和方法

4.2.1 试剂与仪器

TMB（3,3-5,5-四甲基联苯胺）、牛血清白蛋白：生工生物工程（上海）股份有限公司

碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG：Jackson

辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG：Abcam

吐温-20：BBI Life Science

96 孔高亲和度酶标板：杭州生友生物技术有限公司

酶标仪：Bio-Rad Model 680

PVDF 膜、chemiDocMP system 化学成像仪

4.2.2 杂交瘤细胞初筛阶段融合率及阳性孔分析

挑选 24 个不同抗原项目的兔脾脏细胞，同步用无血清和 9%血清浓度培养的兔骨髓

瘤细胞分别进行融合，前 10 板为无血清培养测试组，后 10 板为含 9% 血清浓度培养的对照组。十天后根据 Elisa 检测结果进行换液，换液七天后每板送检初筛，观察两组细胞的融合率、细胞生长状态及速度。每孔送样 70 μ l，对 Elisa 的阳性孔数结果进行统计，对比原来含 9% 血清浓度培养的细胞进行比较，记录结果。

4.2.3 杂交瘤细胞状态及存活率分析

选取 2 个不同抗原的项目，调整细胞株状态后进行平行对照实验，测试组为无血清培养，对照组加入 9% 血清浓度的培养液，每隔 3-4 天维护一次，并每周维护两次。

各细胞株连续维护近一个月，每次维护前分别对测试组、对照组进行细胞生长状态、细胞死亡情况进行观察记录，并对两组数据进行比较，统计实验结果。

4.2.4 杂交瘤细胞 WB 阳性率及强度丢失分析

挑选无血清培养和含 9% 血清浓度培养的 18 个平行对照项目，分别统计 40 个 Elisa 检测后阳性孔数中的 WB 阳性孔数目，对结果进行统计分析。

挑选两个不同项目的 4 个克隆各含 50%、20%、10%、1% WB 阳性细胞比例的多克隆进行测试，用无血清培养液及 9% 血清 1640AB 培养液进行长期维护，观察细胞存活率、WB 条带强度变化及 WB 阳性克隆丢失情况。对两组进行比较，统计实验结果。

4.2.5 分析方法

(1) 融合率对比：测试组及对照组进行对比统计，若测试组与对照组融合率及每孔克隆细胞生长状态无明显变化，则无血清培养不影响杂交瘤细胞克隆的形成及生长。

(2) Elisa 阳性孔数对比：测试组及对照组初筛阳性孔数目进行对比统计，若 Elisa 阳性孔数目及其杂交瘤细胞生长状态无明显变化，则无血清培养不影响有效融合。

(3) WB 阳性孔数对比：对 18 个项目的测试组及对照组 WB 阳性孔数目进行对比统计，若 WB 阳性孔数目及其杂交瘤细胞生长状态无明显变化，则无血清培养不影响细胞阳性孔丢失。

4.3 结果与讨论

4.3.1 杂交瘤细胞初筛阶段融合率及阳性孔分析

对于 24 个项目中融合的杂交瘤细胞进行平行对照培养 17 天后，送上清进行 Elisa 检测阳性孔，结果见表 4.1 和 4.2。

表 4.1 融合率、克隆数以及阳性孔数统计

Table. 4.1 Statistical results of fusion rate、clone rate and positive clone rate

项目号	240E 批号	测试 Elisa 阳性孔数	对照 Elisa 阳性孔数
YCA-7498	P-160208	2.8	2.3
YCA-9699	P-160208	3	3
YCA-9768	P-160229	2.5	2.6
YCA-9769	P-160229	1	1.2
YCA-8369(2)	P-160313	1.8	0.8
YCA-9616	P-160313	3.8	3.4
SIS-15	P-160306	4	2.9
YCA-9786	P-160229	2	2.6
YCA-10089	P-160208	2.5	2.5
YCA-10087	P-160208	4	4
YCA-9705	P-160306	2.8	3
YCA-7737	P-160306	2	2.6
YCA-9059	P-160313	2.2	2.2
YCA-8688	P-160313	3.4	3.5
YCA-9058	P-160208	3.8	3.3
YCA-10065	P-160229	3.4	3.4
YCA-9959	P-160229	3.2	3.6
YCA-9739	P-160208	1.8	0.8
YCA-6876(2)	P-160306	3.2	3.2
YCA-10098	P-160229	3.6	3
YCA-10099	P-160313	1	0.45
YCA-10039	P-160313	3.4	3.4
YCA-9986	P-160306	3	2.8
YCA-9345(2)	P-160306	3.2	3.2
平均值		2.8	2.7

表 4.2 不同批次 240E 融合效果统计结果

Table. 4.2 Statistical results of fusion effect with different batches of 240E

240E 批号	测试组融合率(%)	对照组融合率(%)	测试克隆数	对照克隆数	测试 Elisa 阳性孔数	对照 Elisa 阳性孔数
P-160208	86	87	221	240	3	2.7
P-160229	81	84	195	229	2.6	2.7
P-160306	85	86	256	281	3	3
P-160313	87	85	277	247	2.6	2.3
平均值	85	86	237	249	2.8	2.7

可以发现,无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞融合后平均每板 Elisa 阳性孔数约为 2.8 个,含 9%血清浓度培养的 240E-W2 细胞平均每板 Elisa 阳性孔数约为 2.7 个。测试组的 Elisa 阳性孔数略高于对照组,可见无血清培养并不影响杂交瘤细胞分泌抗体的能力。

进一步对四个不同批次的兔骨髓瘤细胞融合后的平均阳性孔数进行分类统计,可见 P-160208 和 P-160313 两个批次融合后测试组的平均阳性孔数均略高于对照组,P-160306 批次融合后测试组的平均阳性孔数均与对照组相同,仅 P-160229 批次融合后平均阳性孔数测试组略低于对照组,但基本无差异。

综上所述,驯化后适应于无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞和驯化前的含血清培养的 240E-W2 细胞具有相似的融合能力,并且分泌抗体的能力略微优于含 9%血清培养方式,进一步验证了无血清培养的 240E-W2-SFM 作为单抗制备工程细胞株的可行性。

4.3.2 杂交瘤细胞状态及存活率分析

分别选取 YCA-6177(2)和 YCA-9427 两个不同项目的单克隆进行对比维护,测试组为无血清培养,对照组为含 9%血清浓度培养,同步进行对比实验。其中 YCA-6177(2)每周维护一次,YCA-9427 每周维护两次,观察细胞状态及存活率,结果见图 4.1 和 4.2,数据统计见表 4.3。

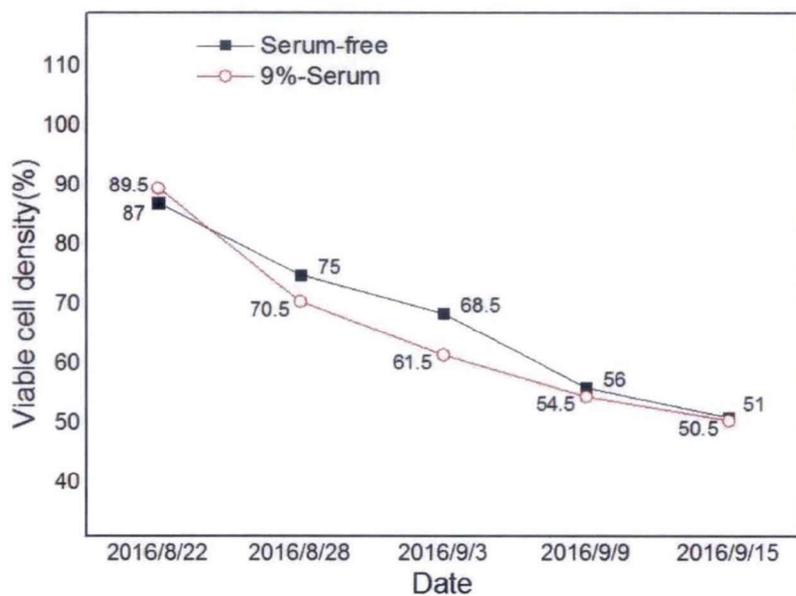


图 4.1 YCA-6177(2)-211-4 存活率对比

Fig. 4.1 YCA-6177(2)-211-4 viable cell density in different mediums

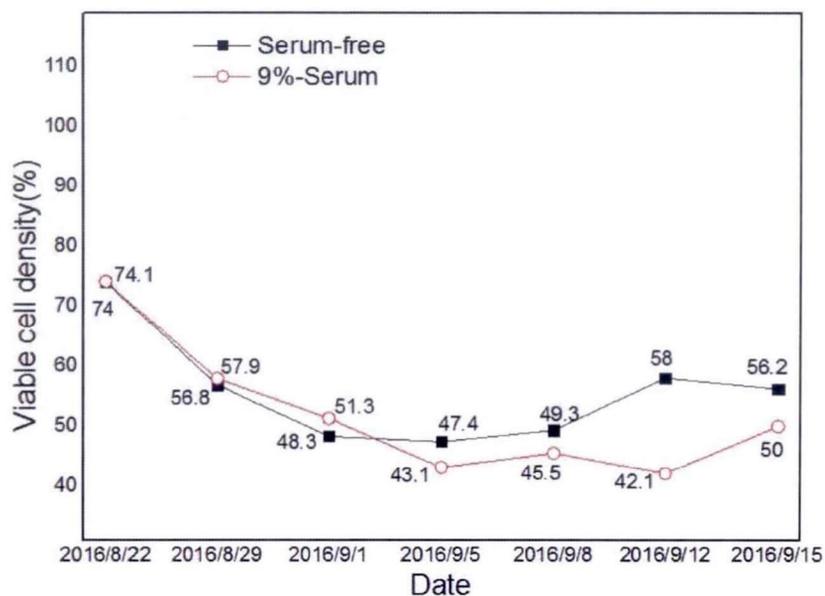


图 4.2 YCA-9427-34-5 存活率对比

Fig. 4.2 YCA-9427-34-5 viable cell density in different mediums

表 4.3 杂交瘤细胞存活率对比

Table. 4.3 Hybridoma viable cell density in different mediums

Date	YCA-6177(2)	YCA-6177(2)	YCA-9427	YCA-9427
	-211-4 (Serum-free)	-211-4 (9%-Serum)	-34-5 (Serum-free)	-34-5 (9%-Serum)
2016/8/22	87.0	89.5	74.0	74.1
2016/8/29	75.0	70.5	56.8	57.9
2016/9/1			48.3	51.3
2016/9/5	68.5	61.5	47.4	43.1
2016/9/8			49.3	45.5
2016/9/12	54.5	56.0	58.0	42.1
2016/9/15			56.2	50.0
2016/9/19	51.0	50.5		

可以看出，无血清的杂交瘤培养液和含 9% 血清的杂交瘤培养液对杂交瘤细胞维护过程中，杂交瘤细胞存活率逐步降低并趋于稳定（50% 左右）。说明开始细胞状态较好，随着细胞的不断维护，细胞不断分裂而不停堆积，导致细胞生长状态变差，且死细胞也同时逐渐增多并不断分解，最终活细胞和死细胞比例处于相对动态平衡。

以上两个项目中，无血清的杂交瘤培养液和含 9% 血清浓度的杂交瘤培养液对细胞存活率变化差异不明显，趋势相近，并随着细胞维护时间的推移，最终细胞存活率均趋于稳定。对于 YCA-9427-34-5，克隆用无血清培养四天后存活率反而有大幅度升高（从 49.3% 到 58%），这可能和无血清维护细胞相对生长速度偏慢，细胞堆积缓慢造成细胞死亡也缓慢，从而死细胞可能相应减少，而且四天后维护细胞状态亦保持较好，从而提高其存活率；而 9% 血清维护则从 45.5% 降至 42.1%，这可能和细胞生长过快，从而亦加速细胞堆积导致细胞死亡加快，引起存活率下降。

4.3.3 杂交瘤细胞 WB 阳性率及强度丢失分析

对于融合后的杂交瘤细胞分泌抗体能力的评价,除了 Elisa 检测阳性孔比例之外, WB 阳性率也至关重要。挑选 18 个项目融合后进行无血清培养和含 9%血清浓度培养对比,分别统计 40 孔 Elisa 阳性孔中 WB 检测的阳性孔数,具体结果如表 4.4。

表 4.4 WB 阳性孔数统计

Table. 4.4 Statistical results of WB positive clone

项目号	240E 批号	测试 WB 阳性孔数	对照 WB 阳性孔数
YCA-9786	P2-160229	14	15
YCA-9625	P2-160229	6	3
YCA-10089	P2-160229	21	16
YCA-10087	P2-160229	7	14
YCA-9705	P2-160306	17	10
YCA-7737	P2-160306	26	28
YCA-9059	P2-160306	19	15
YCA-8688	P2-160306	9	16
YCA-9058	P2-160229	27	15
YCA-10065	P2-160229	11	11
YCA-9959	P2-160229	13	15
YCA-9739	P2-160229	9	6
YCA-6876(2)	P2-160306	29	31
YCA-10098	P2-160229	23	17
YCA-10099	P1-160313	33	35
YCA-10039	P2-160306	20	24
YCA-9986	P2-160306	26	23
YCA-9345(2)	P2-160306	5	9
平均值		17.5	16.8

根据以上统计数据可见,无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞融合后筛选出的 40 孔 Elisa 阳性中,平均 WB 阳性孔数为 17.5 孔。而含 9%血清浓度培养的 240E-W2 细胞融合后筛选出的 40 孔 Elisa 阳性中,平均 WB 阳性孔数为 16.8 孔。对照组的 WB 阳性孔数略

高于测试组，基本上没有。进一步验证引自无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞融合后得到的杂交瘤细胞分泌抗体的能力不受影响。

评价融合后的杂交瘤细胞抗体分泌能力的指标除了 WB 阳性孔数之外，杂交瘤细胞在维护过程中其抗体分泌能力以及阳性克隆的去失率也极为重要。因此，通过维护过程中针对不同的维护时间血清中抗体 WB 条带分析可进一步确认无血清培养对于杂交瘤细胞的阳性克隆影响。

通过挑选两个不同滴度的 4 个克隆，阳性克隆比例呈现 50%、20%、10%、1% 的梯度维护实验进行测试，以无血清培养作为测试组，含 9% 血清浓度的 1640AB 培养基作为对照组，进行一个月的长期维护，观察 WB 条带强度变化及 WB 阳性克隆去失情况。对照组进行比较，结果见图 4.3-4.4。

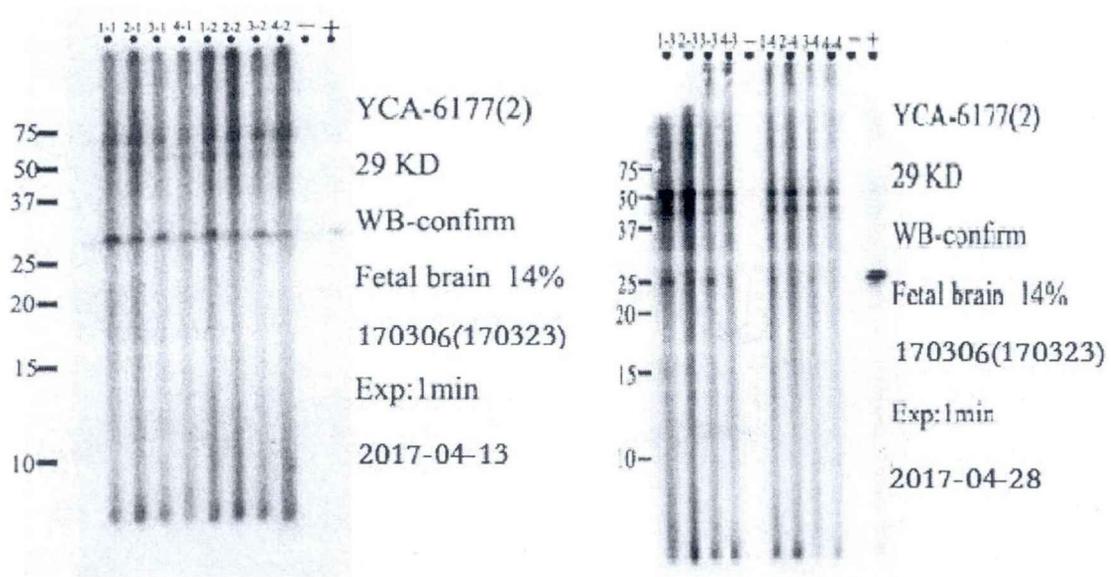


图 4.3 YCA-6177(2) 阳性克隆去失情况

Fig. 4.3 Positive clone loss of YCA-6177(2)

以上 YCA-6177 (2) WB 结果中，1-1、2-1 分别为无血清维护一周后，3-1、4-1 分别为 9% 血清维护一周后；1-2、2-2 分别为无血清维护两周后；3-2、4-2 分别为 9% 血清维护两周周后；1-3、2-3 分别为无血清维护三周后，3-3、4-3 分别为 9% 血清维护三周；1-4、2-4 分别为无血清维护四周后；3-4、4-4 分别为 9% 血清维护四周周后。(其中 1、2 号克隆分别含阳性细胞比例为 50%、20%)。

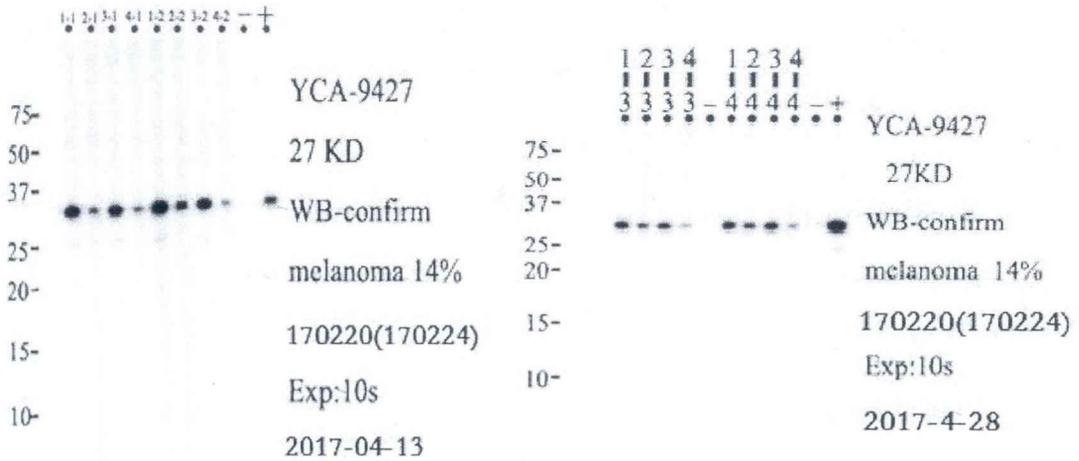


图 4.4 YCA-9427 阳性克隆丢失情况

Fig. 4.4 Positive clone loss of YCA-9427

以上 YCA-9427 WB 结果中, 1-1、2-1 分别为无血清维护一周后, 3-1、4-1 分别为 9% 血清维护一周后; 1-2、2-2 分别为无血清维护两周后; 3-2、4-2 分别为 9% 血清维护两周后; 1-3、2-3 分别为无血清维护三周后, 3-3、4-3 分别为 9% 血清维护三周后; 1-4、2-4 分别为无血清维护四周后; 3-4、4-4 分别为 9% 血清维护四周后。(其中 1、2 号克隆分别含阳性细胞比例为 10%、1%)。

通过以上 WB 检测, 无血清维护多克隆与 9% 血清维护多克隆对细胞抗体分泌能力及 WB 阳性强度变化无显著差异。甚至在维护的第二、第四周, 用无血清维护的多克隆 WB 强度略高于 9% 血清维护的多克隆。

在 YCA-6177(2) 中, 无血清维护三周的多克隆 WB 条带略强于 9% 血清维护的多克隆 WB 条带; 9% 血清维护四周的多克隆 WB 条带基本丢失, 但无血清维护的多克隆 WB 还略有阳性条带。这可能和无血清维护细胞时细胞生长较为缓慢, 从而导致阳性克隆细胞不易丢失有关。在 YCA-6177(2) 维护三周及四周后, 杂带较第一周和第二周明显增强, 说明阳性细胞和杂细胞在竞争性生长过程中, 杂细胞生长比阳性细胞更为有优势, 其条带逐渐增强, 阳性细胞条带逐渐减弱, 亦说明无血清培养可以延缓竞争性杂细胞的生长, 从而减少随着维护时间增加而导致的阳性细胞丢失的风险。

4.4 本章小结

本章采用无血清驯化后的 240E-W2-SFM 细胞与常规含 9%血清浓度培养的 240E-W2 细胞分别与相同的兔脾脏细胞进行融合, 对于融合后的杂交瘤细胞抗体分泌能力及阳性克隆在无血清培养基维护过程中的丢失情况进行分析, 探讨无血清培养杂交瘤细胞的可行性。

统计不同融合项目, 240E-W2-SFM 细胞融合后平均每板 Elisa 阳性孔数为 2.8 个, 240E-W2 细胞融合后平均每板 Elisa 阳性孔数为 2.7 个; 240E-W2-SFM 细胞融合后平均每 40 个 Elisa 阳性孔中 WB 阳性孔数为 17.5 个, 240E-W2 细胞融合后为 16.8 个。结果表明, 驯化后无血清培养的杂交瘤细胞分泌抗体的能力与含 9%血清浓度培养的杂交瘤细胞无差异, 且略优于含血清培养, 具有良好的应用前景。

评价无血清培养基维护杂交瘤细胞的过程中阳性细胞的丢失情况, 考察了不同维护频率对杂交瘤细胞存活率的影响, 发现无明显差异。在含 50%、20%、10%、1% 四种不同比例阳性细胞的维护过程中, 每周进行 WB 检测, 发现无血清维护多克隆与 9%血清维护多克隆对细胞抗体分泌能力及 WB 阳性强度变化无显著差异。维护三周后, 无血清培养基维护的 WB 检测条带反而强于含 9%血清浓度培养基维护的细胞, 可见无血清培养相应降低了杂细胞的竞争性生长, 对于维护过程中阳性细胞的稳定生长具有优势。

结果表明, 驯化后的无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞用于融合后的无血清培养杂交瘤细胞状态良好, 抗体分泌能力稳定, 且阳性克隆丢失率较低, 在兔单抗制备的无血清培养方面展现出一定的优势, 具有良好的应用前景。

第五章 结论与展望

5.1 结论

兔单抗具有巨大的市场需求和应用前景，兔单抗制备的典型方法是通过兔骨髓瘤细胞与脾脏细胞进行体外融合获得。目前兔单抗制备过程中细胞培养大都是采用含9%血清浓度的培养基，成本较高，批次间不稳定和外源性污染风险加大，因此驯化出适应于无血清培养的兔骨髓瘤细胞株具有重要的意义。本文以兔骨髓瘤细胞株（240E-W2）作为典型对象，围绕无血清驯化过程和驯化成功后的融合效率表征两方面，考察不同种类无血清培养基驯化的可行性，优化驯化过程，确定合适的冻存方式，并且评价其作为新型工程细胞株用于兔单抗制备过程的潜力。

主要结果如下：

(1) 兔骨髓瘤细胞株（240E-W2）的无血清培养驯化。采用商业化的两种无血清培养基 F12/CD Hybridoma Medium，以及自行研发的 1640AB 无血清培养基按照体积比为 1 : 1 配置的 1640AB /F12 培养基和 1640AB/CD Hybridoma Medium 培养基，分别进行驯化培养。通过血清速降方式选择适应性相对较好的 1640AB/ CD Hybridoma Medium 培养基作为合适选择，进一步通过血清缓降方式从 9%血清浓度下降到 1%血清浓度的贴壁培养。随着血清含量下降，细胞贴壁能力逐渐降低，呈现贴壁松散的状态。然后改变培养方式为转瓶中悬浮培养，成功从 1%血清浓度含量下降到完全无血清。在无血清培养 96 h 后，细胞从初始接种密度 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ 上升到 $4.4 \times 10^5/\text{ml}$ ，细胞存活率为 92.5%，生长状态良好，与对照组细胞生长速度及存活率相当。

(2) 无血清驯化后兔骨髓瘤细胞株（240E-W2-SFM）的生理活性验证。考察无血清冻存方式，发现 ATCC Serum Free Cell Freezing Medium 冻存液最为合适，液氮中冻存一年复苏后细胞存活率可达 68.2%，高于含血清冻存液对照组将近 4 个百分点，且增殖能力稳定。通过细胞周期分析发现，随着细胞亚克隆次数增多，无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞稳定性越高且活性越强，细胞粘连体逐渐降低，并且冻存一年后复苏的细胞活力没有下降。通过内源性 PCR 分析发现，无血清驯化后的兔骨髓瘤细胞株（240E-W2-SFM）具备原有细胞的特异性片段，且不含内源性重链和轻链，可作为工程细胞株进行进一步

融合制备杂交瘤细胞，用于表达单抗。

(3) 无血清驯化兔骨髓瘤细胞株 (240E-W2-SFM) 的融合效率验证。采用平行对照方式与兔脾脏细胞进行融合，无血清测试组的平均融合率为 84.8%，含 9% 血清浓度培养对照组为 85.8%；测试组的平均克隆数为 237，对照组为 249；测试组的平均每板阳性孔数为 2.8，对照组为 2.7。虽然无血清驯化的兔骨髓瘤细胞 (240E-W2-SFM) 融合率和克隆数略微低于 9% 血清浓度培养的对照组，但是其平均每板阳性克隆孔数与对照组相当，因此，无血清驯化后的兔骨髓瘤细胞株不影响其有效融合，具有良好的应用潜力。

(4) 杂交瘤细胞的无血清培养及生理活性验证。采用无血清驯化的兔骨髓瘤细胞 (240E-W2-SFM) 与兔脾脏细胞进行融合，对融合后的杂交瘤细胞的阳性率进行统计，与含 9% 血清浓度培养的杂交瘤细胞平行对照。测试组的 WB 阳性孔数为 17.5 孔，对照组为 16.8 孔。采用无血清培养基和含 9% 血清浓度的培养基分别维护杂交瘤细胞，统计两组杂交瘤细胞的存活率，发现两组杂交瘤细胞存活率变化趋势相近，均逐步降低并最终稳定在 50% 左右，在特定时间段内无血清维护的杂交瘤细胞存活率有所提高，结果优于对照组。通过长期维护对比，发现抗体分泌能力及 WB 阳性强度变化无显著差异。甚至在维护的第三、第四周，用无血清维护的多克隆 WB 强度略高于 9% 血清维护的多克隆。结果表明，无血清培养在抗体分泌能力和阳性克隆丢失上具有一定的优势。

5.2 展望

本文从兔单抗制备中无血清细胞培养出发，对兔骨髓瘤细胞 (240E-W2) 无血清驯化工艺进行了优化，获得无血清培养兔骨髓瘤细胞株 (240E-W2-SFM)，显示出作为兔单抗工程细胞株的应用潜力。但是，部分研究工作仍有待进一步深化和完善，主要包括以下几个方面：

(1) 无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞生长能力评价方面，除了常规的生长速率、存活率、生理活性之外，还应进一步动态追踪考察细胞培养基中各组分的变化情况，以便于特异性定期提供细胞培养所需的营养成分，改善无血清培养兔骨髓瘤细胞的生长环境。

(2) 无血清培养的 240E-W2-SFM 细胞生理活性表征方面, 由于设备有限, 本文仅从细胞周期和内源性 PCR 方面进行考察, 进一步对其进行荧光定量 PCR 测试和基因组测序, 以验证其驯化后自身性状稳定性, 将更为直观有效。

(3) 对于无血清培养的杂交瘤细胞融合后的效率评价, 有待进一步扩大项目种类和项目数量, 并且在下游分离纯化过程中与含血清培养的杂交瘤细胞进行进一步的对比测试, 以便于更加深入了解融合效率, 为其推广应用及稳定优化提供指导。

参考文献

- [1] Weiner G J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics.[J]. Nature Reviews Cancer, 2015, 15(6):361.
- [2] Lewus R A, Darcy P A, Lenhoff A M, et al. Interactions and phase behavior of a monoclonal antibody[J]. Biotechnology Progress, 2015, 27(1):280-289.
- [3] Sullivan D, Olsson A G, Scott R, et al. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on low-density lipoprotein cholesterol levels in statin-intolerant patients: the GAUSS randomized trial.[J]. Jama, 2012, 308(23):2497.
- [4] Li Z, Yao H, Guin S, Padhye SS, et al. Monoclonal antibody (mAb)-induced down-regulation of RON receptor tyrosine kinase diminishes tumorigenic activities of colon cancer cells.[J]. International Journal of Oncology, 2010, 37(2):473-482.
- [5] Lebkowski J S, Schain L R, Okarma T B. Serum-free culture of hematopoietic stem cells: a review. [J]. Stem Cells, 2010, 13(6):607-612.
- [6] 许峰. 基于工业化生产的治疗用单克隆抗体上游制备及放大工艺研究[D].苏州大学,2014.
- [7] Ecker D M, Jones S D, Levine H L. The therapeutic monoclonal antibody market.[J]. Mabs, 2015, 7(1):9-14.
- [8] 李婷婷. 我国与全球单克隆抗体药物产业的对比分析及发展趋势预测[D].山东大学,2014.
- [9] 梅建国,庄金秋,沈志强. 动物细胞无血清培养技术研究进展[J]. 生物技术,2010,20(03):87-89.
- [10] Leirskar J, Helgeland K. A methodologic study of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro.[J]. European Journal of Oral Sciences, 2010, 80(3):206-212.
- [11] 郑朝朝,杨保收,陈晓春,吴华伟,邓永,郁宏伟,李建丽,刘涛,梁武,朱秀同,邱贞娜,柳珊. 应用激流灌注式生物反应器培养动物疫苗研究进展[J]. 中国动物保健,2014,16(09):12-13.
- [12] 王永民,陈昭烈. 动物细胞无血清培养基的研究与设计方法[J]. 中国生物工程杂志,2007,(01):110-114.
- [13] 刘铮. 不同方法培养 Vero 细胞和甲型流感病毒 (H3N2) 的研究[D].中国协和医科大学,2009.
- [14] 万玉林. 低血清培养技术在口蹄疫疫苗生产中的应用研究[D].甘肃农业大学,2008.
- [15] Hideo Miki, Mutsumi Takagi. Design of serum-free medium for suspension culture of CHO cells on the basis of general commercial media.[J]. Cytotechnology, 2015, 67(4): 689-697.
- [16] 缪德年,陈溥言,缪德年,张秀根,姚惠娟,樊生超,张德明. 囊素和法氏囊超滤物对杂交瘤细胞抗体分泌的影响[J]. 上海农业学报,2002,(03):92-95.
- [17] 王捷,刘增田,杨太成,杨静,洗江,刘大志. 抗重组人骨唾液酸蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国生化药物杂志,2006,(06):323-325.
- [18] Shaw G R. Nonsecretory plasma cell myeloma--becoming even more rare with serum free light-chain assay: a brief review.[J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2006, 130(8):1212-5.
- [19] 吕信萍,吴静,陈京涛. 单个 B 细胞抗体制备技术及其在肝脏疾病中的应用[J]. 临床肝胆病杂志,2015,31(12):2104-2109.

- [20] 陈智胜. CRO/CMO 推动我国单抗生物医药产业的创新和高速发展[J]. 生物产业技术,2016,(01):7-10.
- [21] Aihara Y, Hayashi Y, Hirata M, et al. Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture.[J]. International Journal of Developmental Biology, 2010, 54(8-9):1287.
- [22] 程洪艳,冯捷,崔恒,成夜霞,付天云,吕晓红,叶雪. 卵巢癌单克隆抗体杂交瘤细胞 183B2 的无血清培养研究[J]. 中国妇产科临床杂志,2004,(05):374-377.
- [23] Lipschutz J H, Foster B A, Cunha G R. Differentiation of rat neonatal ventral prostates grown in a serum - free organ culture system[J]. Prostate, 2015, 32(1):35-42.
- [24] Ivanov D P, Parker T L, Walker D A, et al. In vitro co-culture model of medulloblastoma and human neural stem cells for drug delivery assessment.[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 205:3.
- [25] 杜春红, 宋志忠, 于国林. 单克隆抗体大量生产技术及研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3):248-249.
- [26] 郭挺伟. Luman-N-端融合蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[D].西北农林科技大学,2008.
- [27] Konno M, Hamazaki T S, Fukuda S, et al. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2010, 400(4):461.
- [28] 王祥斌,孔健. 体外培养杂交瘤细胞生产人用鼠源单克隆抗体[J]. 中国生物制品学杂志,2002,(05):315-318.
- [29] 王祥斌,孔健. C50株抗CEA杂交瘤细胞抗体生成动力学及体外培养条件的优化[J]. 中国生物制品学杂志,2003,(02):93-96.
- [30] 余丹. 抗NMDAR2B(phospho Y1070)兔单克隆抗体制备及初步鉴定[D].浙江大学,2016.
- [31] Wu J, Han D, Wei M, et al. Domestication of suspension CHO cells and its application in the expression of anti-PSMA antibody[J]. Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology, 2016, 32(1):1.
- [32] 黄亚杰, 朱光凯, 刘珊,等. 混合培养基模式培养杂交瘤细胞表达单克隆抗体[J]. 生物学杂志, 2016, 33(6):104-109.
- [33] 王兴洪. 浅谈生物工程中的培养基[J]. 生物学教学,2011,36(03):67-68.
- [34] 杨贝贝. 表达 rhTNFR-Fc 的重组 CHO 细胞悬浮驯化及培养工艺研究[D]. 河北科技大学, 2014.
- [35] 李浩. 人体外周血淋巴细胞培养基的质量体系标准化及其应用[D].中南大学,2007.
- [36] 魏庆嘉, 孙海艳. 动物细胞培养技术研究现状与思考[J]. 畜牧兽医科技信息, 2014(8):10-11.
- [37] 王兰. 版纳微型猪近交系骨髓间充质干细胞分化后的免疫原性和免疫调节作用[D]. 四川大学, 2006.
- [38] Lee J T, Leng Y, Chow K L, et al. Cell culture medium as an alternative to conventional simulated body fluid.[J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(6):2615-2622.
- [39] 许丹娜. 食蟹猴耳部成纤维细胞体外培养和增殖的初步研究[D].广西大学,2008.
- [40] 苏秋香, 王忠华, 刘伟,等. 血清类型对大鼠骨骼肌干细胞增殖的影响[J]. 沈阳医学院学报, 2006, 8(3):195-196.

- [41] 宋德刚. 表达嵌合性抗原受体的 T 淋巴细胞介导的肿瘤过继性免疫治疗作用的临床前研究[D]. 山东大学, 2011.
- [42] 李飞. 正确理解 B 细胞与 T 细胞的相互作用[J]. 生物学教学, 2011, 36(3):66-67.
- [43] 崔俊成. 人骨髓间充质干细胞无血清培养的实验研究[D]. 中南大学, 2008.
- [44] 陈永勤. MS 培养基凝固效果和高温灭菌后 pH 值变化的研究[J]. 湖北大学学报(白科版), 2001, 23(3):280-282.
- [45] Ninomiya H, Mizuno K, Terada R, et al. Improved efficiency of definitive endoderm induction from human induced pluripotent stem cells in feeder and serum-free culture system.[J]. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 2015, 51(1):1.
- [46] 任艳. 一种用于细胞培养的人血清制备方法[J]. 中国农学通报, 2008, (10):103-105.
- [47] 庄金秋, 梅建国, 管宇, 等. 新生牛血清促细胞生长活性检测方法的建立与应用[J]. 中国奶牛, 2011(6):31-37.
- [48] 马忠仁, 侯兰新, 冯玉萍, 等. 我国动物血清规模化生产的现状和质量控制[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2008, 29(1):43-46+84.
- [49] 李云剑, 林樾, 燕辛, 周宏初, 谭谦. 培养基血清浓度对人表皮干细胞增殖分化的影响[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20):3831-3833.
- [50] 赵秀梅, 冯文茹, 胡人杰. 异种动物血清对体外培养人肿瘤细胞生长的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(6):35-38.
- [51] 杨建业. 动物血清在兽医领域的应用[J]. 养殖技术顾问, 2010(8):84-84.
- [52] 杨银芬. 消化酶、血清和催乳素对奶牛乳腺上皮细胞培养的影响[D]. 内蒙古农业大学, 2012.
- [53] 杨永梅, 陈娟, 陈洋, 姜怀志. 小鼠卵巢颗粒细胞的优化培养[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(02):107-110.
- [54] 曹翠平, 吴小锋, 鲁兴萌. 昆虫细胞无血清培养[J]. 细胞生物学杂志, 2005, (02):127-132.
- [55] 马忠仁, 冯玉萍, 李倬, 乔自林, 侯兰新, 李明生, 冯若飞. 动物血清在细胞培养中的重要性及其质量控制标准[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2003, (03):56-58+87.
- [56] 房金波, 王丽. 培养液中不同浓度的小牛血清对前列腺癌细胞增殖的影响[J]. 实用肿瘤学杂志, 2002, (03):174-175.
- [57] 刘鸣昊. 芪珠方对肝纤维化大鼠 TGF- β 1/Smad 信号传导通路的影响[D]. 南京中医药大学, 2013.
- [58] 王飞翔, 贺慧霞, 刘嘉婧, 贾雅丽. 两种培养条件对牙周膜干细胞生物学特性影响的对比研究[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2016, 14(02):65-71.
- [59] 王赞. 猪乙型脑炎病毒 SC 株的分离鉴定及其部分生物学特性研究[D]. 四川农业大学, 2014.
- [60] 魏捷. 器官培养法保存角膜的内皮细胞活性研究及在基因转染和移植排斥研究中的应用[D]. 第二军医大学, 2009.
- [61] Cole S P, Vreeken E H, Roder J C. Antibody production by human X human hybridomas in serum-free medium[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1985, 78(2):271.
- [62] 赵逸超. 肝细胞的无血清培养研究[D]. 南方医科大学, 2012.
- [63] 段盼盼. Vero 细胞无血清培养基的研制及其在流感病毒培养中的应用[D]. 北京协和医学院, 2015.
- [64] 马爱瑛, 周栋, 李敏. CHO 工程细胞株低血清培养的初探[J]. 生物技术通报, 2009, (11):154-157.
- [65] 王晓南, 王丽环, 高鹏. 动物细胞无血清培养基的优势、特点与实验研究[J]. 亚太传统医

- 药,2009,5(02):21-23.
- [66] 商瑜, 张启明, 李悦,等. 动物细胞无血清培养基的发展和应用[J]. 陕西师范大学学报(白科版), 2015, 43(4):68-72.
- [67] Kawamoto T, Sato J D, Le A, et al. Development of a serum-free medium for growth of NS-1 mouse myeloma cells and its application to the isolation of NS-1 hybridomas.[J]. Analytical Biochemistry, 1983, 130(2):445.
- [68] 王伟. 动物无血清细胞培养基的研究现状及进展[J]. 科教文汇(下旬刊),2008,(10):275-276.
- [69] Altamirano C, Paredes C, Badillo J J C, et al. Improvement of CHO cell culture medium formulation.[J]. Biotechnology Progress, 2010, 16(1):69-75.
- [70] Hiroyoshi Hoshi, Yuji Takagi, Keizo Kobayashi, Masakazu Onodera, Taneaki Oikawa. Growth requirements and long-term subcultivation of bovine granulosa cells cultured in a serum-free medium. [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 1991, 27(7):578-584.
- [71] Hodaka Ikeda. Serum-free medium conditions for steroidogenesis of bovine follicular thecal cells cultured on collagen gel matrix. [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1990, 26(2):193-200.
- [72] Verma I, Rashid Z, Sikdar S K, et al. Efficient neural differentiation of mouse pluripotent stem cells in a serum-free medium and development of a novel strategy for enrichment of neural cells[J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2017, 61.
- [73] M. J. Keen, C. Hale. The use of serum-free medium for the production of functionally active humanised monoclonal antibody from NS0 mouse myeloma cells engineered using glutamine synthetase as a selectable marker. [J]. Cytotechnology, 1996, 18(3):207-217.
- [74] 张淑香,李东晓,朱明龙,谭文松,张嗣良. 杂交瘤细胞的无血清低蛋白培养[J]. 华东理工大学学报,2003,(04):372-375.
- [75] Noritsugu Yabe, Yutaka Matsuya, Isao Yamane, Mitsuru Takada. Enhanced formation of mouse hybridomas without hat treatment in a serum-free medium. [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1986, 22(7):363-368.
- [76] V. U. Tabakov, M. M. Litvina, J. V. Schepkina, A. A. Jarilin, V. V. Chestkov. Studying the Proliferation of Human Peripheral Blood T Lymphocytes in Serum-Free Medium. [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2009, 147(1):120-124.
- [77] JinQing Jiang,HaiTang Zhang,GuoYing Fan,JinYou Ma,ZiLiang Wang,JianHua Wang. Preparation of monoclonal antibody based indirect competitive ELISA for detecting 19-nortestosterone residue[J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(25):2698-2705.
- [78] Onda M, Willingham M, Nagata S, et al. New monoclonal antibodies to mesothelin useful for immunohistochemistry, fluorescence-activated cell sorting, Western blotting, and ELISA [J]. Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2005, 11(16):5840-6.
- [79] Chatterjee M, Ionan A, Draghici S, et al. Epitomics: global profiling of immune response to disease using protein microarrays. [J]. Omics A Journal of Integrative Biology, 2006, 10(4):499.
- [80] Liu N, Han Z, Lu L, et al. Development of a new rabbit monoclonal antibody and its based competitive

- indirect enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of sulfonamides. [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2013, 93(3):667.
- [81] Anonymous. Immunoglobulins; Epitomics Launches New Line of Rabbit Monoclonal Antibodies for the Anatomic Pathology Market.[J]. Science Letter, 2010.
- [82] 李剑. 抗 TRPM2 兔单克隆抗体制备及初步鉴定[D].浙江大学,2016.
- [83] 张建群. 莱克多巴胺兔单抗的制备与 ELISA 检测方法的建立[D]. 浙江大学, 2006.
- [84] Lebkowski J S, Schain L R, Okarma T B. Serum-free culture of hematopoietic stem cells: a review. [J]. Stem Cells, 2010, 13(6):607-612.

