

## ClonePix 结合 CloneSelect Imager 技术加强开发

### 病毒特异性的杂交瘤细胞

双链 DNA 病毒引起人类大多数疾病。疱疹病毒和腺病毒家族和乳头瘤病毒在人体中会产生相似的症状。而且，由于病毒抗原基因组的保守，对于特殊病毒的血清学和蛋白诊断确认是非常复杂的。高度的蛋白同源性和血清交叉反应导致双链 DNA 病毒物种之间区分是非常困难的。本研究的目的是发现识别最优的分泌高度特异性、无交叉反应的单克隆抗体的细胞系，用于生物治疗的开发。

ClonePix 系统用来高通量从母本的杂交瘤细胞中（历史数据表明母本的细胞系产量少于 1mg/L 的单抗）筛选数以百计的亚克隆。分泌高 IgG 的活细胞进一步用客观评价细胞生长的 CloneSelect Imager 系统来评估。高效自动化克隆选择技术旨在挽回高滴度的杂交瘤细胞系，这些细胞系能生产抗原高特异性的抗体。ClonePix 和 CloneSelect Imager 配套技术为免疫诊断技术发展提供了足够的病毒抗原的特异性抗体。

### 优势

- 相比传统方法，能够筛选更多克隆，增加发现稀有、高产分泌子的可能性
- 独特的流程生产高滴度的杂交瘤细胞
- 增加发现最优细胞生产器的可能性

### 材料

- ClonePix System (Molecular Devices, LLC)
- CloneSelect Imager (Molecular Devices, LLC)
- CloneMedia Semi-Solid Media for hybridomas/myelomas (Molecular Devices, LLC Cat #K8600/K8610)
- CloneDetect Reagent, Mouse IgG (H+L) Specific, Fluorescein (Molecular Devices, LLC Cat #K8220)

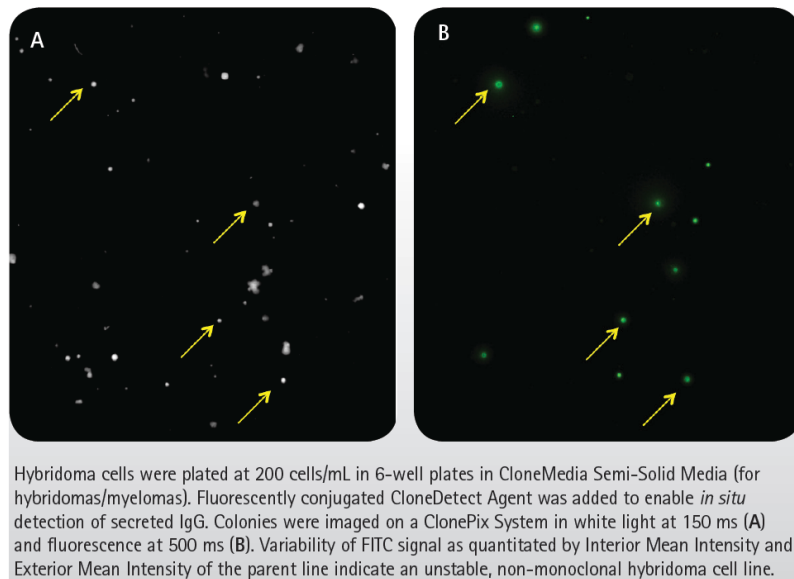
### 挽救低产量的杂交瘤细胞

传统杂交瘤开发的方法涉及骨髓瘤细胞和抗原免疫过的宿主脾细胞的化学介导融合过程。融合的杂交瘤细胞经历了众所周知漫长和低效率的有限稀释法的选择过程，接着用 ELISA 方法筛选分离出有限数目的抗原特异性单克隆杂交瘤细胞。太长的时间战线（超过 30 周）和大量的处理过程，使有限稀释法产生不能准确量化活性和生产力的低滴度细胞系。

最早的双链 DNA 病毒特异性杂交瘤细胞系是 1990s 用有限稀释方法开发的，但是筛选的杂交瘤细胞单克隆性和稳定性都不是很好。用不同的血清和培养基组分进行多年的重复培

养（静态的和旋转的），这些克隆表现出不稳定（图1）。而且，抗体的产率从来没有超过3mg/L。由于在preps中能观察的差别巨大的聚集物，使得纯化的IgG的质量很难保持一致性。

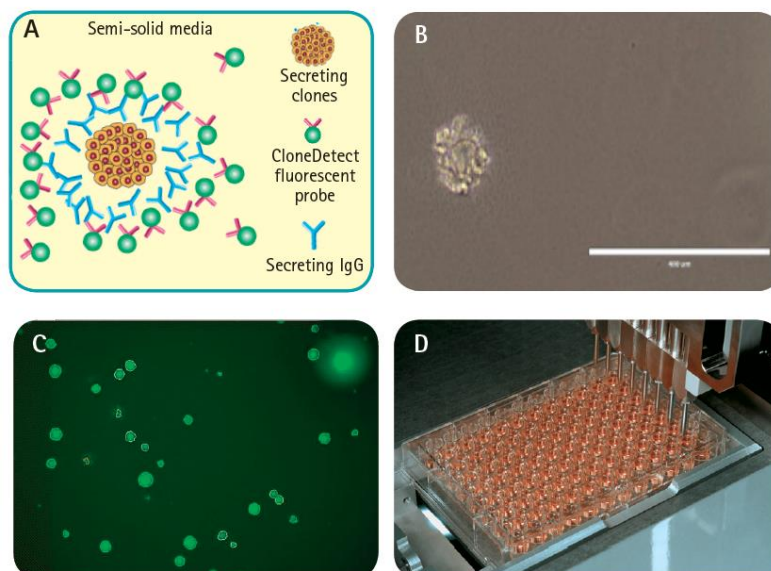
Figure 1. Visualization of IgG secretion in parental hybridoma cell line suggests only a small subset (~7%) is producing ds-DNA virus-specific antibody



通过亚克隆高滴度抗体的亲本细胞系，挽回和稳定特异性的杂交瘤细胞系。ClonePix技术平台利用半固体培养基和CloneDetect无标记检测技术重筛了大量以前融合的杂交瘤细胞（图2），显示了明显的技术优势。

ClonePix高通量筛选方法能够从低产的亲本克隆细胞中挽回高产、稳定的细胞。

Figure 2. ClonePix Technology Principle



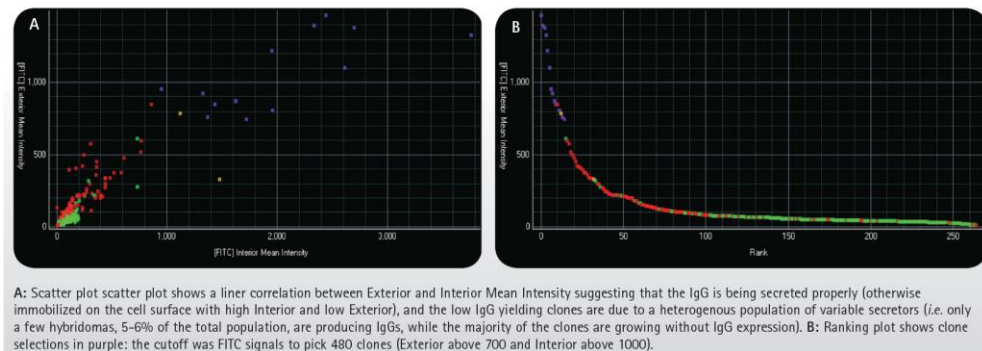
A: Concept overview of antibody detection from individual hybridoma clones grown suspended in a methylcellulose matrix. B: Whitelight image of precipitated antibody sequestered around a growing hybridoma clone. C: ClonePix System detection and selection of acceptable target clones. D: ClonePix System automated picking and transfer of isolated target clones to destination plates.

## 快速分离分泌抗体的高产克隆

ClonePix系统在流程效率和成本节约方面显示了显著改善，增加了发现稀有分泌子的概率。因此，ClonePix2技术单克隆抗体产生的时间减少到有限稀释法的一半。

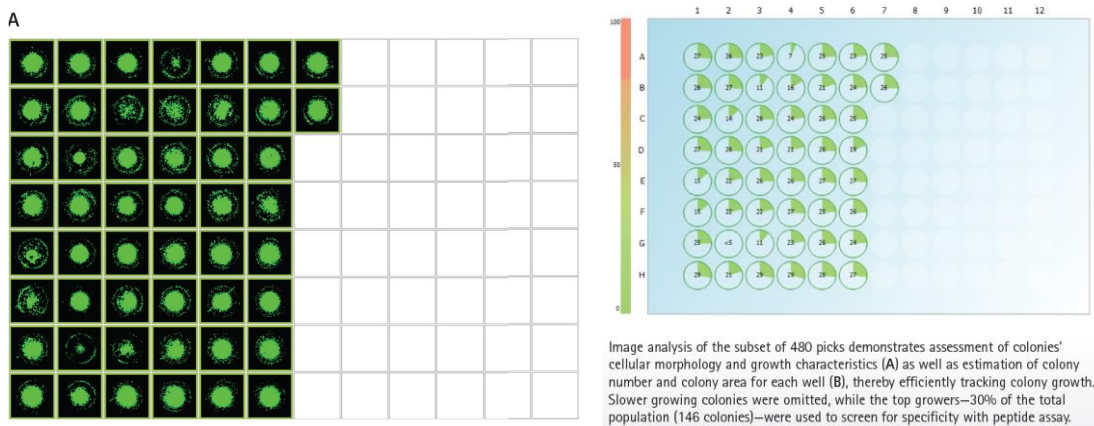
在这个过程中，首先扩增亲本杂交瘤克隆的数量，然后 ClonePix 分析和挑选想要的克隆。配合使用 FITC 标记的 CloneDetect 试剂，ClonePix 系统成像和分析荧光强度。FITC 阳性克隆根据克隆外部平均荧光强度由高到低进行排序。总之，仅仅 5-6% 的 480-FITC 的阳性克隆被挑取。相比大的、快速生长的阴性克隆（70-150 个细胞）（图 3），大多数高分泌的克隆更小（40-60 个细胞）。

Figure 3. Detection and selection of viable, high secreting colonies using ClonePix Software analysis



480 个高产克隆从半固体培养基挑取到 5 块 96 孔含 200- $\mu$ L 液体培养基的微孔板中，培养 3 天。为了客观和定量评估细胞数，使用 CloneSelect Imager 系统成像 96 孔板中的克隆。超快的成像速度（96 孔板小于 90sec）能够快速监控和评估 5 天克隆的生长。通过有效的利用 CloneSelect Imager 的成像，分离到前 146 个生长速度快的克隆（图 4）。

Figure 4. CloneSelect Imager Software analysis enables identification of optimally growing clones



## 筛选和识别中试规模分析的亚克隆

用合成的具有抗体表位的多肽，对筛选到的前 146 生长速率的克隆进行抗原特异性分析。多肽和抗体显示了很强的亲和性，完全符合前期研究的阐释，因此，合成的多肽用来筛选新的，具有高抗体亲和性的亚克隆。

生物素标记的多肽加载在含链霉素的微孔板表面，再加 146 个没有稀释的杂交瘤细胞上清液，测定 IgG 的结合能力。从中选取了前 7 个显示了最优结合力的特殊亚克隆。

## 高 IgG 分泌亚克隆的中试规模生产

7 个高价值特异的亚克隆在液体培养基规模化生产。这些克隆被扩增，一旦获得足够的培养基体积，5 个亚克隆被冷冻用于将来的研究参考。而剩下的 2 个高亲和/高 IgG 分泌克隆继续扩增 2-3 周，直到完成中试生产（1 升）

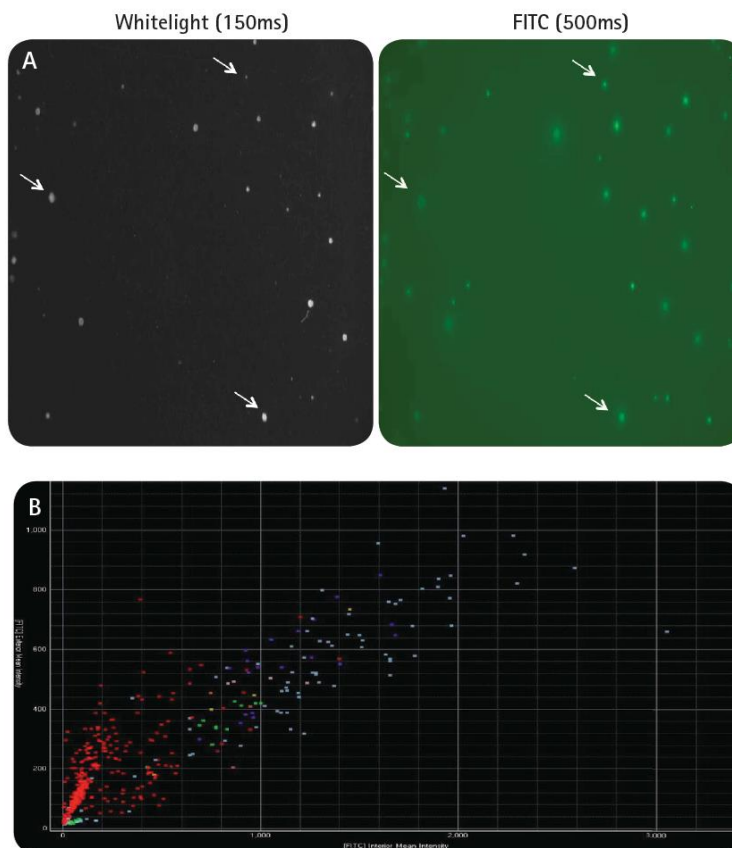
## 挽救低产量杂交瘤细胞的工作流程

为了识别用于发展高级诊断的双链 DNA 病毒特异抗体的亚克隆，ClonePix 技术筛选 480FITC 阳性的杂交瘤克隆，基于半固体培养基技术和 FITC 标记的 CloneDetect 试剂。CloneSelect Imager 识别了其中 146 个快速生产的克隆，7 个高产量的克隆被确认和目标多肽具有高度的特异性。选择其中的 2 个亚克隆进行中试生产和剩余的 5 个作为细胞银行。这个流程降低了杂交瘤细胞的筛选时间，最多为常规有限稀释法筛选时间的 50%，而且筛选了强健的目标克隆细胞作为其他附加的研究和生产。

## 单克隆的验证和 IgG 分泌子的均一化

ClonePix 系统再克隆和特异性确认之后，2 个亚克隆扩增，重新种到具有 CloneDetect 试剂的半固体培养基的 6 孔板中。ClonePix 系统成像和分析表明克隆正常的分泌了 IgG，同时，通过均相均一化过程，能观察到高产 IgG 的克隆（图 5）。

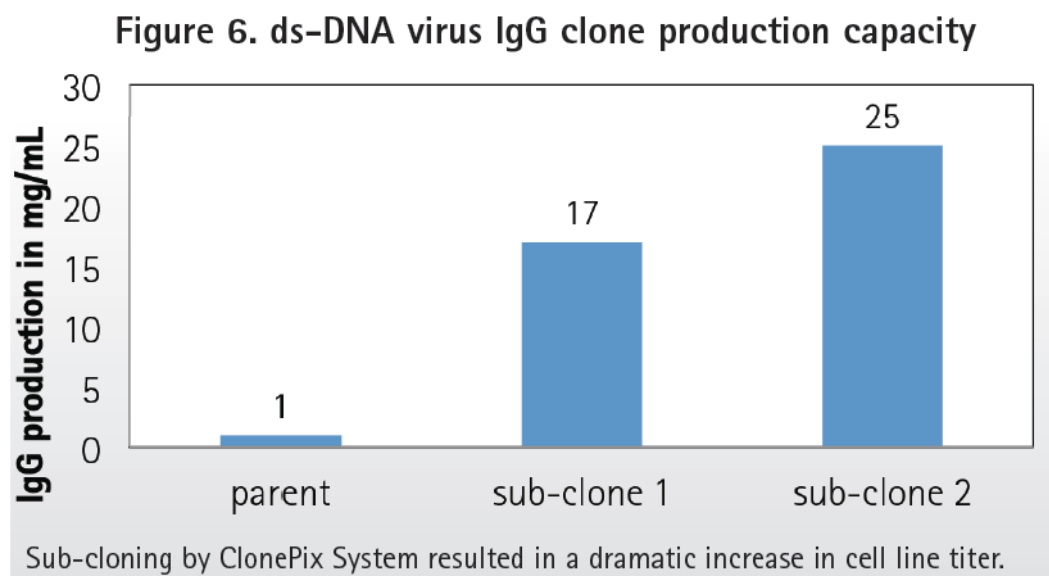
Figure 5. Sub-cloning of parental hybridoma by ClonePix results in uniform IgG secretion at higher yields



A subset data for one sub-clone is shown. A: A significant improvement in % FITC-positive colonies as a result of sub-cloning is observed as compared to the parental clone (Figure 1 A, B). IgG secretion was detected at seven days growth by 100 U/ mL of CloneDetect Reagent. B: Scatter plot shows a linear correlation between Exterior and Interior Mean Intensity; the slope is shifted towards the Y-axis indicating greater uniformity, while more clones in upper quadrants signify the presence of higher FITC positive clones.

## 新双链 DNA 病毒杂交瘤细胞亚克隆的生产能力

利用 ClonePix 技术重新筛选低产量的亲本克隆。高产、稳定的亚克隆被挽回。Protein G 纯化单克隆抗体，定量总产量。相比亲本克隆的历史产量 (~1mg/L)，新的亚克隆细胞 IgG 的产量明显地增加 (17-25mg/L)，图 6 显示。



## 结论

ClonePix 技术改善了筛选时间周期和亚克隆杂交瘤细胞的质量，降低手动操作。而且，CloneMatrix Media 和 CloneDetect 试剂提高了分泌克隆的生长和检测灵敏度。ClonePix 的数据表明亲本的低生产力源于小数目生产抗体的细胞被快速、无生产抗体能力的细胞压制。

相比亲本杂交瘤细胞的产量 (0.5-1mg/L)，结合 CloneSelect Imager 的使用，ClonePix 系统被证明是能识别高产 (17-25mg/L)、高亲和力杂交瘤细胞亚克隆的强有力工具。因此，该技术有助于推进双链 DNA 病毒特异性的新治疗性抗体的发展。

需要了解更多信息，请联系 AbiPointe Biotechnology, [Info@abipointe.com](mailto:Info@abipointe.com)