

高亲和力单克隆抗体制备问题及对策

一、单抗制备-骨髓瘤细胞 SP2/0 培养过程中遇到的问题及对策

1, 细胞长的慢或细胞死亡

正常生长情况下, 细胞一天传代一次, 生长越好, 贴壁越多

对策: ①培养基配方不对; ② 接种密度太低, 低于 10^4 的 4 次方; ③污染了支原体或者其他不明细菌, 支原体的现状是出现小黑点; 细菌污染是浑浊; 霉菌污染是出现白色肉眼可见菌落; 不明细菌污染出现砂状平铺背景, 视野发暗。④细胞瓶刷洗不干净

2, 细胞形态异常

正常生长情况下, 细胞浑圆, 透亮, 成对数生长, 生长越好, 贴壁多, 悬浮少

对策: ①培养基配方不对; ② 接种密度太低, 低于 10^4 的 4 次方; ③污染了支原体或者其他不明细菌, 支原体的现状是出现小黑点; 细菌污染是浑浊; 霉菌污染是出现白色肉眼可见菌落; 不明细菌污染出现砂状平铺背景, 视野发暗。④细胞瓶刷洗不干净

二、单抗制备-细胞融合筛选过程中遇到的问题及对策

1, 融合率低, 阳性孔少

①免疫的问题。由于免疫原性不强或者免疫途径不当造成免疫弱, 效价低。

②融合过程中温度、时间、PEG 分子量, 作用时间等。

③脾细胞是否取出了足够多的细胞, 有无组织碎片干扰。

④融合前骨髓瘤细胞生长状态是否完好, 细胞是否浑圆, 透亮, 成对数生长。

2, 单抗亲和力整体低

①免疫的问题。免疫途径不当或者免疫原问题。

②融合细胞筛选过程出现遗漏, 筛选方法不当或检测方法不当, 造成没有筛到高亲和力的融合细胞。

③由于亚克隆细胞生长环境不合适, 导致融合细胞染色体丢失, 分泌特性改变, 亲和力从高变低, 这时就需要及时更换培养液, 当细胞增长到一定密度的时候, 培养基就开始变颜色, 影响融合细胞的生长, 造成染色体丢失; 控制好细胞的密度, 密度过大使新加入的培养基不至于很快被消耗, 影响融合细胞的生长, 造成染色体丢失; 不要过于频繁操作细胞, 当细胞生长密度不是很大的时候, 不要频繁操作, 否则细胞容易出现死亡或者生长形态发生明显变化。

操作细致, 防止细胞被支原体等微生物污染。

3, 抗体亲和力从高变低

①没有及时更换培养液, 当细胞增长到一定密度的时候, 培养基就开始变颜色, 影响融合细胞的生长, 造成染色体丢失或者性状改变。

②控制好细胞的密度, 密度过大使新加入的培养基不至于很快被消耗, 影响融合细胞的生长, 造成染色体丢失或者性状改变。

③过于频繁操作细胞, 当细胞生长密度不是很大的时候, 不要频繁操作, 否则细胞容易出现死亡或者生长形态发生明显变化。

④细胞被支原体等微生物污染。

⑤亚克隆次数超过 5 次, 导致细胞生长环境经常被改变, 弱的阳性杂交瘤细胞染色体丢失或者性状改变。

三、单抗腹水制备过程中遇到的问题及对策

1, 腹水少或者无腹水产生

①致敏不正确，不正确的使用致敏剂，或者致敏时间与接种杂交瘤的时间相差太久，一般是7-14天，具体看小鼠的腹部情况。

②杂交瘤细胞或者致敏剂的接种位置不正确，没有打到腹腔，而是打到了皮下。

③接种的杂交瘤细胞数量太少，太多或者细胞状态不好。一般不50万个细胞左右为宜。

④建议使用母鼠或者生育过的母鼠制备腹水。

2，腹水没有效价

①制备腹水的杂交瘤极不稳定，打到小鼠身上之前就失去抗体分泌能力或者打到腹腔内就失去了分泌能力。

② 致敏小鼠时采用了错误的致敏剂。

③接种的杂交瘤细胞数量太少，或者细胞状态不好。

④ 由于注射方式和部位错误，形成了实体瘤。