Original article

Stability of anti-N clone 1391G2 antibody secreting cell line

Siriporn Ponsen*, Kallaya Kerdkaewngam

Antiserum and standard cell preparation section, National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

Abstract

Background: Cell line secreted anti-N (1391G2) is a murine monoclonal hybridoma cell that Antiserum and standard cell preparation section, National Blood Centre, Thai Red Cross Society used for culture and expand in large scale for harvest supernatant to produce blood group reagent anti-N for distributing to blood bank and hospital in Thailand. Therefore, this cell line must be regularly tested for stability of antibody secreting.
Objectives: This study aimed to maintained and select perfectly cell line secreted anti-N (1391G2) 3 generations.
Methods: Cell line secreted anti-N 1st generation namely 1391G2 was thawed from liquid nitrogen and selected the best single cell line with character of good growth rate and high titer antibody secreting using limiting dilution method. After that, selected cell line will be frozen in liquid nitrogen for 7 days. In addition, the 1st generation cell line that separated from freezing was cultured for harvest supernatant to serology test. The 2nd generation cell line was thawed after frozen for 7 days for limiting dilution method again until 3rd generation. Serology test of supernatant from all generation cell line consisted of antibody identification with panel cell and antibody titration with red blood cell group O that has M-N+ and M+N+ antigen.
Results: Anti-N cell line 3 generations stably expressed anti-N which antibody titer with M-N+ and M+N+ were 128 and 64, respectively.
Conclusion: All generation of anti-N titer was comparable to American Association of Blood Banks (AABB) standard. This result validates the quality of anti-N production for blood typing reagent from Nation blood center, Thai red cross society to ensure safety of blood donation and transfer process.

proof version

Keywords: Blood grouping anti-N, murine monoclonal antibody.

***Correspondence to:** Siriporn Ponsen,* Antiserum and standard cell preparation section, National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.
E-mail: phasai_nang@hotmail.com
Received: June 21, 2023
Revised: September 4, 2023
Accepted: October 26, 2023

Open Access 2023 Ponsen et al ., published by Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาความเสถียรในการสร้างแอนติบอดีของเซลล์สายพันธุ์ anti-N โคลน 1391G2

ศิริพร พลเสน*, กัลยา เกิดแก้วงาม

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ ประเทศไทย

บทคัดย่อ

เหตุผลในการทำวิจัย: เซลล์สายพันธุ์ anti-N โคลน 1391G2 เป็นเซลล์ไฮบริโดมาชนิด murine monoclonal ที่ทางฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ใช้เป็นเซลล์สายพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงขยายเพื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ มาผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-N สำหรับจำหน่ายและใช้ในงานธนาคารเลือดทั่วประเทศ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องทดสอบความเสถียรของเซลล์สายพันธุ์อย่างสม่ำเสมอ

วัตถุประสงค์: เพื่อทดสอบความเสถียรในการผลิตแอนติบอดีของเซลล์สายพันธุ์ anti-N โคลน 1391G2 หลังการเก็บรักษาโดยการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวตลอดการเลี้ยงขยาย 3 รุ่น

วิธีการทำวิจัย: นำเซลล์สายพันธุ์ anti-N โคลน 1391G2 ที่เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว มาเพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์เดี่ยวที่มีความสามารถผลิตแอนติบอดีสูงด้วยวิธีเจือจางลดสัดส่วน จากนั้นตรวจแยกชนิดแอนติบอดี และทดสอบคุณสมบัติทางซีโรโลยี แบ่งเซลล์สายพันธุ์ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งเก็บรักษาโดยการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว เพื่อใช้เป็นเซลล์สายพันธุ์รุ่นที่ 2 ส่วนที่สองนำเซลล์สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงขยายและทดสอบความเสถียรในการผลิตแอนติบอดี พร้อมทั้งทดสอบคุณสมบัติทางซีโรโลยีของแอนติบอดีที่ผลิตได้ สำหรับเซลล์สายพันธุ์รุ่นที่ 2 เมื่อเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวครบ 7 วัน จึงนำมาทดสอบเพื่อคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์เดี่ยว โดยวิธีการเดียวกันกับเซลล์สายพันธุ์ anti-N โคลน 1391G2 ทำซ้ำจนได้เซลล์สายพันธุ์ที่ 4 ทั้งนี้การทดสอบคุณสมบัติทางซีโรโลยีของน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ anti-N ทั้ง 3 รุ่น ประกอบด้วยการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีและการทดสอบหาความแรงของแอนติบอดี

ผลการศึกษา: ผลการคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ anti-N ทั้ง 3 รุ่น มีความเสถียรในการสร้างแอนติบอดีที่มีความแรงต่อเซลล์เม็ดโลหิตแดง M-N+ และ M+N+ เท่ากับ 128 และ 64 ตามลำดับ

สรุป: เซลล์สายพันธุ์ anti-N ทั้ง 3 รุ่นสามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความแรงสอดคล้องตามมาตรฐาน American association of blood banks (AABB) และเหมาะสมในการนำมาผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-N ที่มีประสิทธิภาพสำหรับตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดโลหิตแดงเพื่อรักษาคุณภาพมาตรฐานการตรวจหมู่โลหิตที่ปลอดภัยแก่ผู้รับโลหิต

คำสำคัญ: น้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-N, มิวรีนโมโนโคลนัลแอนติบอดี.

proof version

เซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) หรือเซลล์ลูกผสมที่ได้จากการนำเซลล์มะเร็ง (myeloma) มาเชื่อมกับเซลล์เม็ดโลหิตขาวชนิด B cell (B lymphocyte) ที่สร้างแอนติบอดี โดยใช้สาร polyethylene glycol (PEG) เป็นตัวช่วยในการเชื่อมเซลล์ (fusion) ซึ่งวิธีนี้ถูกค้นพบและประสบความสำเร็จครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2518 โดย Kohler G, Milstein C.[1] หลังจากนั้นก็มีการพัฒนามาตามลำดับทั้งต่างประเทศและในประเทศไทย[2-9] แต่เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีหรือเรียกว่าเซลล์สายพันธุ์ (cell line) มาแล้วก็อาจมีทั้งเซลล์ชนิดที่สร้างและไม่สร้างแอนติบอดีปะปนอยู่ในคราวเดียวกัน ดังนั้น จึงต้องมีการคัดเลือกเฉพาะเซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีที่มีความแรงตามมาตรฐาน และยังต้องเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ดี รวมถึงที่สำคัญต้องเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่มีความเสถียรในการสร้างแอนติบอดี กล่าวคือมีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความแรงสม่ำเสมอไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงขยายไปกี่รอบวงจรชีวิตก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเสถียรของเซลล์สายพันธุ์ anti-N โคลน 1391G2 ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ชนิด murine monoclonal ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ใช้เป็นเซลล์สายพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงขยายเพื่อผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-N จำหน่ายให้กับทางโรงพยาบาลหรือหน่วยงานอื่น ๆ เพื่อใช้ในงานธนาคารเลือดในปัจจุบัน การคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ที่ดีจำเป็นต้องอาศัยวิธีการเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) เพื่อให้ได้เซลล์สายพันธุ์ที่เป็นเซลล์เดี่ยว (mono clone) และเพื่อไม่ให้มีเซลล์ที่ไม่สร้างแอนติบอดีปนเปื้อน เนื่องจากหากเซลล์สายพันธุ์ที่ได้ไม่ใช่เซลล์เดี่ยวจะเกิดปัญหาตามมา ในกรณีที่มีทั้งเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่ดีและที่สร้างแอนติบอดีไม่ดีหรือไม่สร้างเลยปนเปื้อน เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงขยายเพื่อเพิ่มจำนวนในปริมาณมาก เซลล์ที่ไม่สร้างแอนติบอดีจะแย่งอาหารเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี เนื่องจากเจริญเติบโตดีและเร็วกว่า เมื่ออาหารหมดเซลล์สายพันธุ์ทั้งหมดจะตาย จึงส่งผลให้ความแรงแอนติบอดีต่ำกว่ามาตรฐาน เพราะเซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีเติบโตช้ากว่าและขาดอาหาร ดังนั้น การคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ด้วยวิธีเจือจางลดสัดส่วนจึงมีความสำคัญมาก และควรทำสม่ำเสมอทุก 6 เดือน และนอกจากนี้ควรทำทุกครั้งที่มีการนำเซลล์สายพันธุ์ออกจากไนโตรเจนเหลวเพื่อเพาะเลี้ยงขยายในปริมาณมาก

วัสดุและวิธีการทดลอง

การเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์หลังนำออกจากไนโตรเจนเหลว

การทดลองนี้ใช้เซลล์สายพันธุ์ชนิด murine monoclonal ซึ่งเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่ได้จากการเชื่อมระหว่างเซลล์มะเร็งของหนู (SP2O) กับเซลล์เม็ดโลหิตขาวชนิด B cell จากเซลล์ม้ามหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้น โดยขั้นตอนแรกจะนำเซลล์สายพันธุ์ anti-N รุ่นที่ 1 ชื่อโคลน 1391G2 ที่เก็บแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด HT (HT medium) ที่มี fetal bovine serum (FBS) เข้มข้นร้อยละ 10 ใน tissue culture flask ขนาดพื้นที่ 25 cm^2 ภายใต้อุณหภูมิ 37°C และมีคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 จนกระทั่งเซลล์สายพันธุ์มีลักษณะรูปร่างกลมสวย มีความวาวและไม่มีเซลล์ตายปะปน

การนับเซลล์และการเจือจางลดสัดส่วน [10]

ดูดเซลล์สายพันธุ์ที่ต้องการนับมาย้อมด้วย methylene blue เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่มีชีวิต (live cell) และเซลล์ตาย (dead cell) จากนั้นนับเซลล์เป็นด้วย hemocytometer และคำนวณความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 1 เซลล์ต่อหลุม ดูดเซลล์ที่คำนวณได้ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเจือจางลดสัดส่วนเซลล์สายพันธุ์โดยจะเลี้ยงใน 96 well plate จำนวน 10 plate และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นหยดเซลล์ลงใน 96 well plate และนำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) เพื่อตรวจสอบว่ามีเซลล์สายพันธุ์อยู่ 1 เซลล์ต่อหลุมตามที่คำนวณหรือไม่ เพราะหากไม่ตรวจสอบว่าหลุมใดมีมากกว่า 1 เซลล์ และเมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นบางครั้งเซลล์ 2 เซลล์อาจจะโตจนมารวมกันเป็น 1 โคโลนี (colony) และทำให้เกิดความเข้าใจผิดว่าโคโลนีที่เห็นเกิดจากเซลล์เพียง 1 เซลล์ จากนั้นนำเซลล์สายพันธุ์ใน 96 well plate ไปเลี้ยงในตู้บ่มชนิดที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 และมีอุณหภูมิ 37°C (CO_2 incubator) และเซลล์สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน **(รูปที่ 1)**

การคัดเลือกเซลล์และการเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวน

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ได้ประมาณ 7 ถึง 14 วันจะสังเกตเห็นโคโลนี จึงทดสอบน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์กับสารละลายเซลล์เม็ดโลหิตแดงหมู่โอที่มีแอนติเจน M-N+ เข้มข้นร้อยละ 2 จากนั้นเลือกเซลล์สายพันธุ์ในหลุมที่ให้ผล

proof version

agglutination 3 - 4 บวก เติบโตได้ดีและมีเพียง 1 โคโลนีต่อหลุม จำนวน 10 หลุม เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวนต่อใน 24 well plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด HT ที่มี FBS เข้มข้นร้อยละ 10 หลังจากนั้นเมื่อเซลล์สายพันธุ์เพิ่มจำนวนและมีขนาดโคโลนีประมาณ 3 ใน 4 ของพื้นที่ก้นหลุม **(รูปที่ 2)** จึงทดสอบน้ำเลี้ยงเซลล์กับสารละลายเซลล์เม็ดโลหิตแดงหมู่โอที่มีแอนติเจน M-N+เข้มข้นร้อยละ 2 อีกครั้ง เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีได้ดีเพียง 1 หลุม และแบ่งเซลล์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้เป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เก็บรักษาโดยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำออกมาทดสอบเพื่อคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ในรุ่นถัดไปและตั้งชื่อโคลนที่แช่แข็งตามหมายเลขหลุมของ 96 well plate หลุมที่เซลล์นั้นๆอยู่ เช่น 1391G21E11 และระบุเซลล์นี้เป็น “เซลล์สายพันธุ์รุ่นที่ 2” สำหรับเซลล์ส่วนที่ 2 นำไปเพาะเลี้ยงขยายเพื่อเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์สำหรับทดสอบทางซีโรโลยี ซึ่งประกอบด้วยการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีด้วย panel cell และทดสอบความแรงแอนติบอดีกับเซลล์เม็ดโลหิตแดงหมู่โอที่มีแอนติเจน M-N+ และ M+N+ ครบ 7 วันให้นำเซลล์รุ่นที่ 2 ที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อคัดแยกและทดสอบการเติบโตของเซลล์การผลิตแอนติบอดีและคุณสมบัติทางซีโรโลยีเช่นเดียวกับเซลล์สายพันธุ์รุ่นที่ 1 ทำซ้ำจนได้เซลล์สายพันธุ์รุ่นที่ 4

การทดสอบทางซีโรโลยี

ตรวจแยกชนิดแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ anti-N ชื่อโคลน 1391G2 ด้วย panel cell ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot 65110 Exp 15 DEC 2022) **(รูปที่ 3)** และแปลผล โดยใช้น้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-N ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot 65020 Exp 25 FEB 2024) เป็น positive control นอกจากนี้ทดสอบหาความแรงแอนติบอดีด้วยวิธี two-fold serial dilution กับสารละลายเซลล์เม็ดโลหิตแดงหมู่โอที่มีแอนติเจน M-N+ และ M+N+ โดยใช้น้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-N ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (Lot 65020 Exp 25 FEB 2024) เป็น positive control ทำการทดสอบซ้ำกับเซลล์สายพันธุ์รุ่น 1, 2 และ 3

proof version

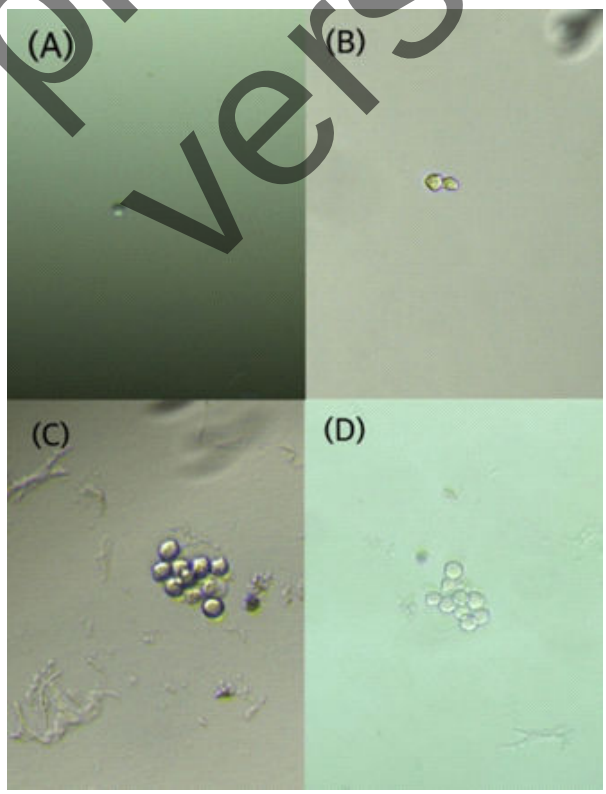

Figure 1. Growth and development of cell line; **(A)** is single cell line at day 1; **(B)** is cell division at day 2; **(C)** is colony of cell line at day 6; and **(D)** is colony of cell line at day 7 - 10.

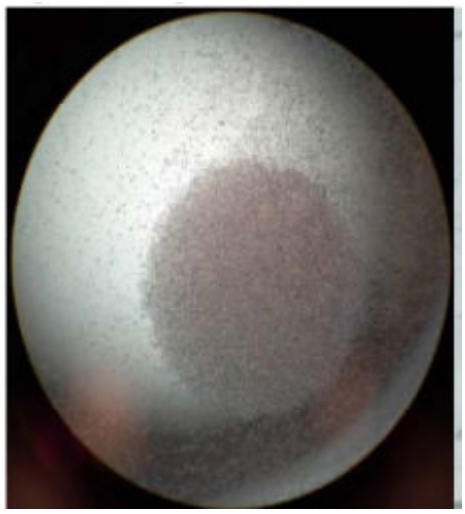

Figure 2. Cell line at day 7 - 14 that has 3 in 4 of 24 well plate bottom area and supernatant is ready to harvest for serological test.

proof version

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ
สภากาชาดไทย

National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Panel Cells for Antibody Identification

Lot No. 65110 Expiry Date : 15 DEC 2022

Systems / Cell No.	Rh									MNS					P1PK	Lewis		Kidd		Duffy		Kell		Diego		Xg^a	Comments	Test Results				
	Wiener	Fisher	D	C	E	c	e	f	C^w	M	N	S	s	Mi^a	P1	Le^a	Le^b	Jk^a	Jk^b	Fy^a	Fy^b	K	k	Di^a	Di^b							
O1	R1R1	DCe/DCe	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+						
O2	R1R1	DCe/DCe	+	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+						
O3	R1R1	DCe/DCe	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	+	0						
O4	R1R1	DCe/DCe	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+						
O5	R1r	DCe/-ce	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0						
O6	R1Rz	DCe/DCE	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	W						
O7	R2R2	DcE/DcE	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+						
O8	R2R2	DcE/DcE	+	0	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0						
O9	rr	-ce/-ce	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+						
O10	r'r'	-Ce/-Ce	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	W	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0						
O11	r''r	-cE/-ce	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+						

Remarks : NT = Not Tested

f antigen เป็น compound antigen ซึ่งแสดงออกเมื่อแอนติเจน c และ e อยู่บนโครโมโซมข้างเดียวกัน (cis)

Patient		
Direct Antiglobulin Test		
Polyspecific	Anti-IgG	Anti-C3d

Additional Cells
Patient's Cells

Tested by : ..... Date : .....

Antiserum and Standard Cells Preparation Section (Tel. 0-2251-3111 ext 1706)

Figure 3. Panel cell for antibody identification Lot 65110 Exp15 DEC 2022 product of National blood centre, Thai red cross society.

ผลการศึกษา

ความเสถียรของเซลล์สายพันธุ์ในกระบวนการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตมีความสำคัญในงานด้านโลหิตวิทยาเป็นอย่างมาก จากการศึกษาเซลล์สายพันธุ์ anti-N พบว่าเป็นเซลล์สายพันธุ์ที่มีความเสถียรในการสร้างแอนติบอดีเมื่อผ่านการเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวนถึง 3 รุ่น และเมื่อตรวจแยกชนิดแอนติบอดีด้วย panel cell ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย พบว่าเซลล์สายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือก เมื่อเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน และจำนวนโคลนที่เพิ่มจากเซลล์สายพันธุ์แช่แข็งนั้นให้ผลเป็น anti-N คิดเป็นร้อยละ 100 จากเซลล์สายพันธุ์รุ่น 1, 2 และ 3 (**ตารางที่ 1**) อีกทั้งผลความแรงแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ทุกโคลนในทุกรอบการเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวนมีความแรงกับเซลล์ M-N+ และ M+N+ เท่ากับ 128 และ 64 ตามลำดับ (**ตารางที่ 2**) ซึ่งความแรงแอนติบอดีดังกล่าวเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ Americanassociation of blood banks (AABB) ที่กำหนดว่าน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-N ต้องมีความแรงกับเซลล์ M+N+ ไม่น้อยกว่า 4 [11] ทั้งนี้ เมื่อเก็บรักษาเซลล์สายพันธุ์โดยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ผู้วิจัยจึงแนะนำให้มีการเจือจางลดสัดส่วนเพื่อคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ที่ดีทุก 6 เดือน และในกรณีเซลล์สายพันธุ์ที่เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลานาน ควรทำการเจือจางลดสัดส่วนทุกครั้งที่มีการนำเซลล์สายพันธุ์ออกจากไนโตรเจนเหลวเพื่อมาเพาะเลี้ยงขยายในปริมาณมาก ซึ่งวิธีการคัดเลือกเซลล์เดี่ยวนี้สามารถใช้ได้กับเซลล์สายพันธุ์ทั้งชนิด murine และ human monoclonal

proof version

Table 1. Antibody identification of supernatant from 3 generations cell line anti-N with panel cell from National blood center, Thai red cross society.

	Panel cell number (Lot 65110 Exp 15 DEC 2022)											
Clone name (generation)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	conclusion
1391G2 (1st generation)	4+	0	4+	4+	4+	0	4+	4+	0	0	4+	Anti-N
1391G21E11 (2nd generation)	4+	0	4+	4+	4+	0	4+	4+	0	0	4+	Anti-N
1391G21E111C6 (3rd generation)	4+	0	4+	4+	4+	0	4+	4+	0	0	4+	Anti-N
Control Lot 65020 Exp 24 FEB 24	4+	0	4+	4+	4+	0	4+	4+	0	0	4+	Anti-N

Exp : Expiration date

Table 2. Comparison of anti-N titer from 3 different stable cell line supernatant and anti-N reagent of National blood centre, Thai red cross society.

Clone name	Cells	Temp	Incubate time	Neat	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	Titer
1391G2	M-N+	RT	5 mins	12	12	12	12	10	8	8	5	0	0	0	0	128
	M+N+	RT	5 mins	12	12	12	10	8	8	5	0	0	0	0	0	64
1391G21E11	M-N+	RT	5 mins	12	12	12	12	12	10	8	5	0	0	0	0	128
	M+N+	RT	5 mins	12	12	12	10	8	8	5	0	0	0	0	0	64
1391G21E111C6	M-N+	RT	5 mins	12	12	12	12	10	10	8	5	0	0	0	0	128
	M+N+	RT	5 mins	12	12	12	12	10	8	5	0	0	0	0	0	64
ControlLot 65020	M-N+	RT	5 mins	12	12	12	10	8	5	0	0	0	0	0	0	32
	M+N+	RT	5 mins	12	10	10	8	5	5	0	0	0	0	0	0	32

RT: Room temperature

Temp: Temperature

สรุป

เซลล์สายพันธุ์ anti-N โคลน 1391G2 มีความสามารถเติบโตได้ดีและเสถียรในการสร้างแอนติบอดีเมื่อเพาะเลี้ยงขยายเป็นเซลล์สายพันธุ์รุ่นที่ 1, 2 และ 3 พบว่าความแรงของแอนติบอดีกับเซลล์ M-N+ และ M+N+ เท่ากับ 128 และ 64 ตามลำดับ ความแรงแอนติบอดีเป็นไปตามมาตรฐาน AABB และจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าควรมีการคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ที่ดีด้วยวิธีการเจือจางสัดส่วนทุกครั้งเมื่อนำเซลล์สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวนปริมาณมาก เพื่อคัดเลือกเซลล์สายพันธุ์ที่สร้างแอนติบอดีสูง ช่วยลดขั้นตอนการนำน้ำเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ไปทำให้เข้มข้น เนื่องจากทำให้สูญเสียน้ำเลี้ยงเซลล์บางส่วนและเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตด้วยเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวนุชนาฏ เปรมประยูร และนางสาวดุษฎี ภูรีกุล ที่ให้คำปรึกษาด้านการทดสอบทางซีโรโลยีพร้อมทั้งให้ความช่วยเหลืองานทดสอบซีโรโลยีด้วยดีเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7.
2. Voak D, Sack S, Alderson T, Takei F, Lennox E, Jarvis J, et al. Monoclonal anti- A from a hybrid myeloma: evaluation as a blood grouping reagent. Vox Sang 1980;39:134-40.
3. Phikulsod S, Poltien R, Uthid K, Tubrod J. Monoclonal blood grouping reagents prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society: I mouse response to immunization with different quantity and sources of B antigens. J Hematol Transfus Med 1991;1:299-307.
4. Phikulsod S, Poltien R, Uthid K, Kaewkitiroj P, Tingtoy U, Tubrod J. Monoclonal blood grouping reagents prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society: II the study of the efficacy of the monoclonal anti-B compared with commercial monoclonal reagents and conventional polyclonal anti-B. J Hematol Transfus Med 1992;2:295-302.
5. Phikulsod S, Poltien R, Kaewkitiroj P, Uthid K, Tingtoy U, Tubrod J. Monoclonal anti-A reagent using hybridoma technique prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society. J Hematol Transfus Med 1992;2:373-81.
6. Tubrod J, Meesoontorn R, Sirisomboon P, Phikulsod S. The efficacy of monoclonal anti-A, anti-B, anti-A,B produced by National Blood Centre, TRCS. J Hematol Transfus Med 1995;5:180-85.
7. Kaewmongkol R, Tingtoy U, Sakuldamrongpanich T. Production of blood grouping monoclonal anti-A,B reagent using hybridoma technique. J Hematol Transfus Med 2000;10:175-81.
8. Sakuldamrongpanich T. Monoclonal Antibody Blood Grouping reagent. J Hematol Transfus Med 2002;12: 235-43.
9. Kerdkaewngam K, Posen S, Phonimit S, Tingtoy U, Phikulsod S. Generating the hybridoma cell line by murine monoclonal hybridoma technology for production anti-M and anti-N blood group phenotyping reagent. J Hematol Transfus Med 2014;24:361-9.
10. Ponsen S, Phonimit S, Premprayoon N, Tingtoy U. Production of anti-D human monoclonal antibody (IgM) using human monoclonal hybridoma technique. Chula Med Bull 2019;1:147-54.
11. Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD. Technical Manual. 16th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2008.

proof version