

TẠO DÒNG TẾ BÀO HYBRIDOMA TIẾT KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG GÂY NGỪNG KẾT HỒNG CẦU CỦA NGƯỜI MANG KHÁNG NGUYÊN A

Nguyễn Thị Trung¹, Nguyễn Thị Hằng¹, Vũ Thị Thu Hằng², Lê Văn Phan^{2,3}, Trương Nam Hải¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Công ty Cổ phần phát triển công nghệ nông thôn RTD

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài: 29.7.2015

Ngày nhận đăng: 20.4.2016

TÓM TẮT

Xác định nhóm máu ABO là bắt buộc đối với người cho và người nhận máu trước khi truyền máu được quy định tại Điều a, Khoản 4, Điều 14 của Thông tư 26/2013/TT-BYT, ngày 16/9/2013. Theo đó, nhóm máu ABO phải được xác định bằng phương pháp huyết thanh mẫu và hồng cầu mẫu. Trong xét nghiệm y tế hiện nay người ta sử dụng kháng thể đơn dòng kháng A để xác định hồng cầu mang kháng nguyên A trên bề mặt. Cho đến nay, đã có nhiều công ty sản xuất và thương mại kháng thể đơn dòng kháng A trên thế giới, tuy nhiên chưa có đơn vị nào tại Việt Nam sản xuất kháng thể này. Do vậy, để chủ động công nghệ và nguồn sinh phẩm, chúng tôi đã nghiên cứu để tạo ra tế bào lai sản xuất kháng thể kháng nguyên A bằng công nghệ tế bào lai. Trong bài báo này, chúng tôi công bố việc tạo thành công dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu mang kháng nguyên A. Tế bào lai được tạo ra bằng cách lai tế bào lymphocyte B chuột (chuột Balb/c đã được gây miễn dịch bằng hồng cầu mẫu nhóm máu A) với tế bào myeloma chuột sp2/0 với sự có mặt của polyethylene glycol (PEG). Tế bào lai được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc hypoxanthine aminopterin thymine (HAT) ở 37°C và 5% CO₂. Kết quả là mười hai dòng tế bào lai đơn dòng sinh kháng thể gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu nhóm máu A được chọn lọc từ 1440 vị trí nuôi cấy. Dòng tế bào A6G11C9 được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Hiệu giá kháng thể của dòng tế bào này là 512, cường độ phản ứng tốt (+++), thời gian kháng thể gây ngưng kết hồng cầu khoảng 10 giây. Kháng thể do tế bào A6G11C9 sản xuất có thể sử dụng để tạo bộ sinh phẩm xác định nhóm máu ABO.

Từ khóa: Cường độ phản ứng kháng thể, độ đặc hiệu, kháng thể đơn dòng, kháng thể kháng A, nhóm máu A, tế bào lai

ĐẶT VẤN ĐỀ

Truyền máu là một kỹ thuật được dùng phổ biến trong y học hiện đại. Kỹ thuật này đã được nghiên cứu và đưa vào sử dụng cách đây hàng trăm năm. Tuy nhiên, có nhiều trường hợp bị tử vong do truyền máu mà không rõ nguyên nhân. Việc truyền máu trở nên an toàn hơn cho đến khi Karl Landsteiner phát hiện ra hệ nhóm máu ABO năm 1901 (Landsteiner, 1901). Các bệnh nhân bị chết hoặc bị các tai biến nghiêm trọng do nhận nhóm máu không tương hợp. Trên màng hồng cầu có hàng triệu kháng nguyên với hơn 300 kháng nguyên quy định nhóm máu thuộc 29 nhóm máu khác nhau (Daniels, 2006). Kháng nguyên A, B của hệ thống ABO có tính kháng nguyên mạnh nhất và đóng vai trò quan trọng nhất trong truyền máu, có bản chất là carbohydrate. Kháng nguyên A có đầu tận cùng là N-acetylgalactosamine (Levy *et al.*, 2001). Kháng nguyên trên màng hồng cầu là các kháng nguyên tự

thân và được bỏ qua bởi hệ miễn dịch. Tuy nhiên, hệ miễn dịch sẽ sản xuất các kháng thể chống lại các kháng nguyên khác với kháng nguyên tự thân của hồng cầu (Dean, 2005). Người nhóm máu A có kháng nguyên A trên hồng cầu và sản xuất kháng thể kháng B trong huyết thanh, người nhóm máu B có kháng nguyên B trên màng hồng cầu và sản xuất kháng thể kháng A trong huyết thanh (Kanrko *et al.*, 2003). Tai biến xảy ra khi truyền máu là do sự ngưng kết giữa hồng cầu người cho và kháng thể trong huyết thanh người nhận dẫn đến tắc mạch máu khi truyền máu. Vì thế trong thực hành truyền máu cần phải xác định nhóm máu của người cho và người nhận.

Cho đến những năm 80, thuốc thử xác định nhóm máu là huyết thanh đa dòng người hoặc động vật và dịch chiết lectin thực vật. Kohler và Milstein đã phát triển công nghệ tế bào lai giữa tế bào lách sản xuất kháng thể và tế bào myeloma tạo ra tế bào lai sản xuất lượng lớn kháng thể đơn dòng (Kohler,

Milstein, 1975; Kohler, Milstein, 1976; Kohler *et al.* 1976). Kháng thể đơn dòng được sản xuất bằng công nghệ tế bào lai có những đặc điểm ưu việt hơn như: có độ đặc hiệu cao, sản xuất kháng thể đồng nhất, có khả năng tái sản xuất nên giá thành thấp hơn (Voak *et al.*, 1980; Nelson *et al.*, 2000).

Kháng thể đơn dòng kháng A đã được nhiều công ty trên toàn thế giới sản xuất và thương mại như Anti-A của Biorad, Mỹ (www.biorad.com); Sanquin, Hà Lan (www.sanquin.nl/reagents); Diagast, Pháp (www.diagast.com); Biotech, Anh (www.biotech.com); Biotest, Đức (www.biotest.de); Mỗi năm Việt Nam phải nhập rất nhiều huyết thanh mẫu để phục vụ công tác định nhóm máu. Vì thế, chúng tôi đã sử dụng hồng cầu mẫu nhóm máu A của người Việt Nam gây miễn dịch cho chuột Balb/c, sau đó tế bào lymphocyte B của chuột đã gây miễn dịch được tách riêng và được cho dung hợp với tế bào myeloma chuột. Kết quả là chúng tôi đã sàng lọc được bào lai A6G11C9 sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu chứa kháng nguyên A. Dịch nuôi cấy dòng tế bào này có khả năng gây ngưng kết hồng cầu mẫu A ngay cả khi đã pha loãng 512 lần, cường độ phản ứng 3+ và thời gian ngưng kết 10 giây.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chuột Balb/c thuần chủng được sử dụng làm vật chủ để gây miễn dịch được mua từ Học viện Quân y.

Bộ hồng cầu mẫu ABO 5% được sử dụng làm vật liệu gây miễn dịch và kháng nguyên sàng lọc dòng tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu được mua từ Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương.

Dòng tế bào myeloma sp2/0 được sử dụng làm nguồn tế bào dung hợp do TS. Lê Văn Phan cung cấp.

Môi trường DMEM (Gibco, Mỹ); Huyết thanh bê FBS, tá chất hoàn toàn (FCA), tá chất không hoàn toàn (FIA), môi trường chọn lọc HAT (DMEM, 20% FBS, 1% HAT 50x), môi trường HT (DMEM, 20% FBS, 1% HT 50x), DMSO, PEG 50% 1500 (Sigma, Mỹ); Kit xác định loại globulin miễn dịch (Thermo, Mỹ); Bộ huyết thanh mẫu (BioRad, Pháp). Các hóa chất khác được mua từ hãng Merck, Đức.

Phương pháp gây miễn dịch cho chuột

Hồng cầu mẫu A 5% được gây nhũ với tá chất Freund theo tỉ lệ 1:1, tiêm 150 μ l vào hai gan bàn chân. Chuột được gây miễn dịch lần đầu sử dụng bổ trợ FCA, hai lần tiêm nhắc lại sử dụng bổ trợ FIA, khoảng cách giữa các lần tiêm là 3 ngày.

Dung hợp và tạo dòng tế bào lai

Chuẩn bị tế bào myeloma sp2/0 chuột

Tế bào myeloma sp2/0 chuột được nuôi cấy trong chai flask T75 cm² (DMEM +20% FBS), mật độ ban đầu 10⁵ tế bào/ml ba ngày trước khi dung hợp.

Dung hợp tế bào

Bốn ngày sau lần tiêm cuối cùng, chuột bị giết thu lách và hạch bẹn để tách tế bào lympho. Tế bào lympho và tế bào myeloma sp2/0 được trộn theo tỉ lệ 5:1, có mặt PEG1500 50%. Hỗn hợp được tái huyền phù trong môi trường HAT, chuyển 150 μ l vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng, nuôi ở 37°C, 5% CO₂. Sau 5 đến 7 ngày, thay môi trường nuôi bằng HT, nuôi tiếp ở 37°C, 5% CO₂.

Phản ứng ngưng kết hồng cầu

Sau 3 đến 5 ngày, thu dịch nuôi cấy để sàng lọc vị trí sinh kháng thể bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu. Chuyển 25 μ l dịch nuôi cấy vào một giếng của đĩa 96 giếng, thêm 25 μ l hồng cầu mẫu 2%, lắc nhẹ, để đĩa ở nhiệt độ phòng và đọc kết quả sau 30 phút bằng cách nghiêng đĩa một góc khoảng 45°.

Tạo dòng tế bào lai

Tế bào lai được tách dòng bằng phương pháp pha loãng tới hạn 3 nồng độ 50 cfu/ml, 10 cfu/ml và 5 cfu/ml. Kiểm tra tế bào lai đơn trong các giếng nuôi cấy bằng cách soi dưới kính hiển vi điện tử và kiểm tra sự sinh kháng thể bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu.

Xác định độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của kháng thể được xác định bằng phản ứng ngưng kết trực tiếp với các hồng cầu A, B, O. Kháng thể đặc hiệu khi chỉ gây ngưng kết một loại kháng nguyên có trên bề mặt hồng cầu.

Xác định hiệu giá

Xác định hiệu giá kháng thể bằng phản ứng ngưng kết trên đĩa 96 giếng đáy chữ V. Dịch nuôi cấy được pha loãng theo cơ số 2 bằng NaCl 0,9%, nhỏ vào mỗi giếng 25 μ l dịch pha loãng kháng thể. Thêm 25 μ l hồng cầu mẫu A 2% vào từng giếng, lắc nhẹ, để đĩa ở nhiệt độ phòng và đọc kết quả sau 30 phút.

Xác định cường độ và ái tính

Nhỏ 50 µl dịch nuôi cấy lên một tấm kính sạch, thêm 50 µl hồng cầu mẩu 10%, dùng đũa thủy tinh trộn đều. Dùng đồng hồ bấm giờ để xác định quan sát được tín hiệu đầu tiên của phản ứng ngưng kết. Sau 5 phút thì tiến hành đánh giá độ mạnh của phản ứng kháng nguyên - kháng thể: Nếu có một mảng ngưng kết và dịch trong xác định là 4+, có một vài mảng ngưng kết và dịch trong xác định là 3+, có một vài mảng ngưng kết nhỏ và dịch đục xác định là 2+, có nhiều mảng ngưng kết nhỏ và dịch đục xác định là 1+ và không ngưng kết xác định âm tính.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Gây miễn dịch cho chuột bằng hồng cầu mẩu A

Hồng cầu được tiêm hai lần liên tiếp vào phúc mạc chuột để chuột tạo lymphocyte B sản xuất kháng thể đã được mô tả trong nghiên cứu của Lundblad, 1963. Trong khi Lennox, 1982 dùng hồng cầu trộn với tá chất hoàn toàn tiêm lần đầu, hai lần sau dùng tá chất không hoàn toàn để tiêm vào phúc mạc chuột. Nghiên cứu có điểm khác với các nghiên cứu trước đó là chuột được tiêm 3 lần

vào gan bàn chân. Thời gian thu tế bào lymphocyte B dùng để dung hợp chỉ sau 10 ngày gây miễn dịch. Bằng cách này đã rút ngắn được chu kỳ tạo tế bào lai và sàng lọc các tế bào sinh kháng thể đặc hiệu.

Dung hợp và tạo dòng tế bào lai

Quy trình tạo tế bào lai được thực hiện theo nguyên lý cơ bản để tạo tế bào lai đã được mô tả bởi Köhler và Milstein năm 1975. Các tế bào myeloma thiếu hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase - HGPRT nên bị chết khi nuôi trong môi trường chọn lọc HAT. Các tế bào lách, hạch bẹn cũng không sống được trong môi trường nuôi cấy. Chỉ có tế bào lai mang đặc tính của cả tế bào myeloma và tế bào lympho B mới có khả năng sinh trưởng trong môi trường HAT (Littlefield, 1964).

Sự sinh trưởng của các tế bào lai trong các giếng nuôi cấy được quan sát sau hai ngày nuôi cấy dưới kính hiển vi soi ngược truyền qua. Sau 14 ngày dịch trong các giếng nuôi cấy được thu lại và kiểm tra sự sản sinh kháng thể kháng A bằng phương pháp ngưng kết hồng cầu trong đĩa nhựa. Kết quả được quan sát và ghi trong bảng 1.

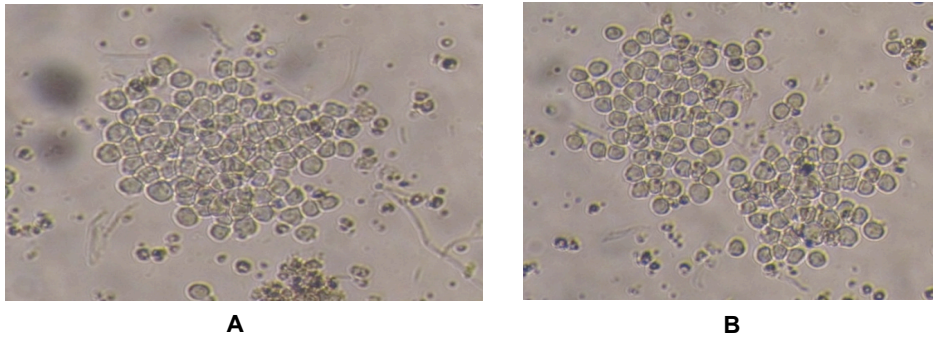
Bảng 1. Số vị trí hình thành tế bào lai và số tế bào lai tiết kháng thể kháng A.

Lần thí nghiệm	Tổng số giếng	Hình thành tế bào lai		Gây ngưng kết hồng cầu A	
		Số lượng	Tỉ lệ %	Số lượng	Tỉ lệ %
1	480	425	88,5	12	2,8
2	480	198	41,3	7	3,5
3	480	298	62,1	5	1,5
Tổng số	1440	912		24	
Trung bình		307±113,8	64,0±23,7	8±3,6	2,7±0,9

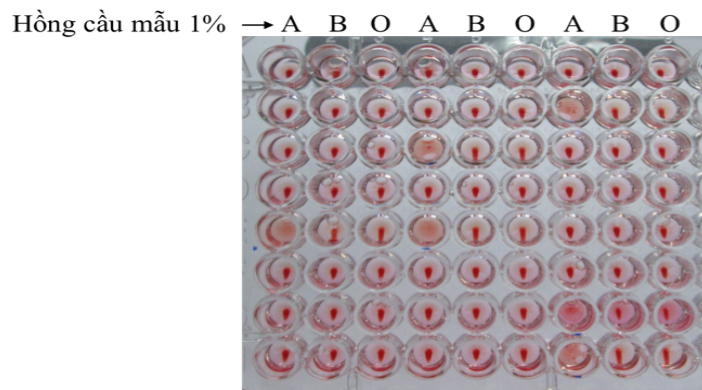
Kết quả ở bảng 1 chỉ ra rằng hiệu suất hình thành tế bào lai trong nghiên cứu này khá cao, trung bình 64,0±23,7%. Có những giếng chỉ chứa một tế bào lai (Hình 1A), nhưng có giếng chứa nhiều hơn một tế bào lai (Hình 1B). Các tế bào lai phát triển tự do, không bám vào đáy đĩa nuôi cấy, nên khi quan sát dưới kính hiển vi soi ngược chúng có hình cầu, các tế bào phát triển thành từng cụm (Hình 1). Chúng tôi đã thu được 24 vị trí có dịch nuôi cấy có gây ngưng kết hồng cầu A.

Trong nghiên cứu này tế bào lymphocyte B được thu từ lách và hạch bẹn của chuột như đã mô tả ở

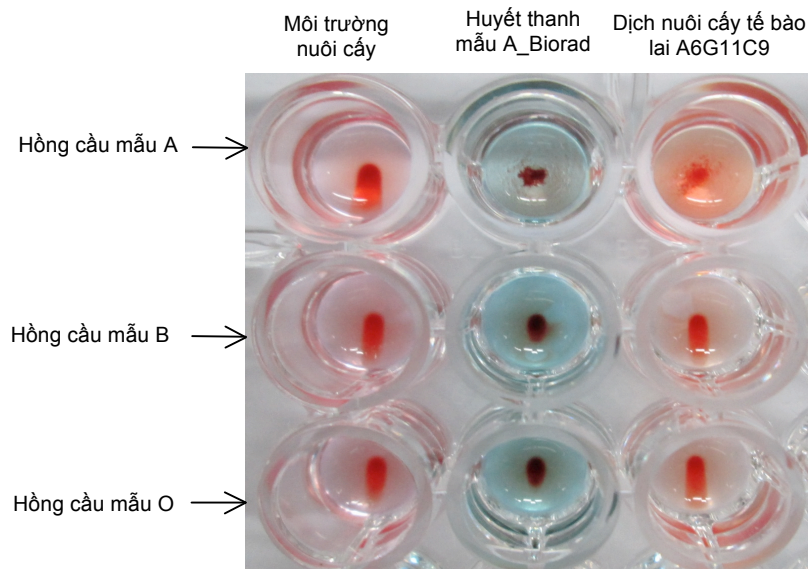
phần phương pháp. Các nghiên cứu trước đó chỉ sử dụng tế bào lymphocyte B từ lách để lai với tế bào myeloma (Lundblad, 1963; Lennox, 1982). Các tế bào tại vị trí có dịch nuôi cấy gây ngưng kết hồng cầu A được sàng lọc và tạo đơn dòng bằng phương pháp pha loãng tới hạn. Dịch nuôi cấy được kiểm tra khả năng gây ngưng kết cả ba loại hồng cầu mẩu A, B và O (thực hiện trên đĩa 96 giếng đáy chữ V). Kết quả là chúng tôi đã chọn lọc được những dòng tế bào đơn dòng sản xuất kháng thể kháng A chỉ ngưng kết hồng cầu A mà không gây ngưng kết hồng cầu B hoặc O (Hình 2). Dòng tế bào A6G11C9 được chọn để nghiên cứu tiếp.



Hình 1. Ảnh chụp tế bào lai sau 5 ngày nuôi cấy quan sát dưới kính hiển vi soi ngược truyền qua (độ phóng đại 10 lần). A - có 2 tế bào được hình thành trong một giếng nuôi cấy. B - có 1 tế bào lai phát triển trong giếng nuôi cấy.



Hình 2. Hình ảnh chụp sự ngưng kết hồng cầu của kháng thể trong dịch nuôi cấy tế bào lai với 3 loại hồng cầu mẫu A, B hoặc O. Vị trí có phản ứng ngưng kết: hồng cầu không lắng hoặc lắng tạo hình tròn khi nghiêng đĩa. Vị trí không có phản ứng ngưng kết: hồng cầu lắng tạo hình giọt nước khi nghiêng đĩa.



Hình 3. Ảnh chụp sự ngưng kết hồng cầu A, B và O của dịch sau 7 ngày nuôi cấy dòng tế bào lai A6G11C9. Hàng ngang 1, 2, 3: Hồng cầu mẫu A, B, O tương ứng. Cột dọc 1, 2, 3: môi trường nuôi cấy (đối chứng âm), huyết thanh mẫu anti-A (đối chứng dương), dịch nuôi cấy tế bào lai A6G11C9 tương ứng.

Hình 2 cho thấy rằng khi cho dịch nuôi cấy phản ứng với hồng cầu, nếu phản ứng xảy ra thì tại vị trí đó các tế bào hồng cầu liên kết với nhau tạo thành một cụm hoặc một mạng lưới trong giếng. Nếu khi nghiêng đĩa phản ứng mà các tế bào hồng cầu chảy thành hình giọt nước thì tại vị trí đó không có phản ứng ngưng kết xảy ra. Như vậy các vị trí E1, C4, E4, B7, G7 và H7 trên đĩa có hiện tượng ngưng kết xảy ra, tất cả các vị trí còn lại đều không có hiện tượng ngưng kết. Chứng tỏ các dòng tế bào tương ứng kiểm tra tại các vị trí có ngưng kết hồng cầu A đã tiết kháng thể đặc hiệu.

Kết quả ở hình 3 cho thấy dịch nuôi cấy dòng tế bào A6G11C9 đã gây ngưng kết hồng cầu A mà không ngưng kết hồng cầu B hoặc O giống như kết quả của phản ứng huyết thanh mẫu A với các hồng cầu mẫu A, B và O. Trong khi đối chứng âm là môi trường nuôi cấy không gây ngưng kết bất kỳ loại hồng cầu mẫu nào. Điều này chứng tỏ sự ngưng kết xảy ra khi cho dịch nuôi cấy tế bào lai A6G11C9 phản ứng với hồng cầu A là do tế bào lai A6G11C9 đã sinh kháng thể kháng A.



Hình 4. Ảnh chụp phản ứng ngưng kết hồng cầu mẫu A với huyết thanh mẫu (đối chứng dương) và dịch nuôi cấy trên phiến kính sau 5 phút. Cường độ phản ứng ngưng kết giữa huyết thanh mẫu anti-A và hồng cầu mẫu A là 4+, cường độ phản ứng giữa dịch nuôi cấy tế bào A6G11C9 và hồng cầu mẫu A là 3+ .

Kết quả ở hình 4 cho thấy rằng, huyết thanh mẫu A phản ứng với hồng cầu mẫu A tạo thành một đám ngưng kết dịch xung quanh trong (cường độ phản ứng ++++), trong khi dịch nuôi cấy tạo thành các đám ngưng kết nhỏ đối với hồng cầu A, dịch xung quanh trong suốt không có hồng cầu tự do (cường độ phản ứng +++). Theo quan sát của chúng tôi chỉ một giây sau khi trộn kháng thể kháng A với hồng cầu A đã quan sát được hiện tượng ngưng kết. Còn tín hiệu ngưng kết có được khi cho dịch nuôi cấy tế bào lai A6G11C9 phản ứng với hồng cầu A là khoảng 2 giây, chậm hơn so với huyết thanh mẫu.

Đối với các huyết thanh thương mại hiện nay thì cường độ phản ứng của kháng thể với hồng cầu mẫu A là ++++, phản ứng có thể quan sát được 3-8 giây. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Sadiq và đồng tác giả (2005), phản ứng có thể quan sát được trước 5 giây; nghiên cứu của Odeigah và đồng tác giả (1989), phản ứng có thể quan sát được ở thời điểm 9 - 12 giây.

Như vậy, kháng thể kháng A do dòng tế bào A6G11C9 sinh ra có triển vọng tốt để tạo chế phẩm xác định nhóm máu ABO. Các thử nghiệm trong công trình này đều sử dụng trực tiếp dịch nuôi cấy tế bào nên cường độ phản ứng chưa cao. Tuy nhiên, độ

đặc hiệu của phản ứng là điểm mấu chốt để chúng tôi lựa chọn dòng tế bào A6G11C9 cho các nghiên cứu sâu hơn.

KẾT LUẬN

Qua các kết quả thu được trong nghiên cứu này, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Có thể dùng tế bào hồng cầu để tiêm vào gan bàn chân chuột nhằm mục đích thu các tế bào lymphocyte B miễn cảm với kháng nguyên bề mặt hồng cầu.

Hiệu quả tạo tế bào lai đạt trung bình 64% khi sử dụng tế bào lymphocyte B tách từ lách và hạch bẹn của chuột đã gây miễn dịch dung hợp với tế bào myeloma chuột.

Đã tạo ra được mười hai dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu mang kháng nguyên A.

Dịch nuôi cấy của tế bào lai A6G11C9 gây ngưng kết đặc hiệu hồng cầu mẫu A, có thể quan sát được sau 3-8 giây phản ứng, cường độ phản ứng là 4+ sau 5 phút phản ứng.

Lời cảm ơn: Công trình sử dụng kinh phí đề tài KC.04.13/11-15 và trang thiết bị của Phòng TNTĐ Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCVN và Phòng kiểm nghiệm, Công ty CP phát triển công nghệ nông thôn RTD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Daniels G (2006) Structure and function of red cell surface antigens. *ISBT Sci Ser* 1: 3-8.

Dean L (2005) *Chapter 2: Blood group antigens are surface marker on the red blood cell. In the Blood Groups and Red Cell Antigens.* NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health.

Kanrko M, Kato Y, Horiuchi H, Osawa M (2003) Molecular characterization of a human monoclonal antibody to B antigen in ABO blood type. *Immunol Lett* 86(1): 45-51.

Köhler G, Howe SC, Milstein C (1976) Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol* 6(4): 292-295.

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

Köhler G, Milstein C (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 6(7): 511 - 519.

Landsteiner K (1901). Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Klin Wochr* 14: 1132-1134.

Levy M, Edelman L, Dighiero G (2001) Molecular characterization of a monoclonal murine anti-blood group A antibody. *Immunol Lett* 76(1): 15-23.

Littlefield JW (1964) Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in vitro and Their Presumed Recombinants. *Science* 145 (3633): 709-710.

Lundblad AK (1963) Monoclonal antibody formulation for diagnostic use, US 4618486.

Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Muray PG (2000) Demystified ... Monoclonal antibodies. *J Clin Pathol* 53(3): 111-117.

Odeigah PG (1989) Monoclonal antibodies in ABO serology: an evaluation. *East Afr Med J* 66(11): 764-768.

Thông tư 26/2013/TT-BYT, ngày 16/9/2016 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc hướng dẫn hoạt động truyền máu: 9.

Sadiq F, Tisent A, Habti N, Radallah D, Amrani N, Benchemsi N (2005) Production of a new anti-A monoclonal reagent. *Afr J Biotechnol* 4(8): 844-846.

Voak D, Sacks S, Alderson T, Takei F, Lennox E, Jarvis J, Milstein C, Darnborough J (1980). Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: Evaluation as a blood grouping reagent. *Vox Sanguinis* 39: 134-140.

CREATING THE HYBRIDOMA TO PRODUCE MONOCLONAL ANTIBODIES CAUSING THE AGGLUTINATION OF THE HUMAN RED BLOOD CELLS CONTAINING A ANTIGEN

Nguyen Thi Trung¹, Nguyen Thi Hang¹, Vu Thi Thu Hang², Le Van Phan^{2,3}, Truong Nam Hai[✉]

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Rural Technology Development JSC.

³Vietnam National University of Agriculture

SUMMARY

The determination of ABO blood group is obliged in many cases especially before blood transfusion, that is indicated at Point a, Clause 4, Article 14 Circular 26/2013/TT-BYT - Vietnam, date 09.16.2013. For this purpose, both standard sera (monoclonal antibodies) and standard red blood cells are common used but monoclonal antibodies are preferred. In Vietnam, monoclonal antibodies against ABO blood group are not available in domestic production. In this study, we succeeded in the generation of hybridoma cells secreting anti-A monoclonal antibody. Firstly, Balb/c mice were injected with Vietnamese human group A red blood cells to evoke B lymphocyte cells against A antigen present on the surface of the red blood cells. Afterward the lymphocytes were fused with sp2/0 myeloma cells in the presence of polyethylene glycol (PEG) to gain hybrid cells that were identified through ability to expand cells in a selective medium (hypoxanthine aminopterin

✉ Author for correspondence: Tel: +84-4-37917980; Fax: +84-4-37917980; E-mail: tnhai@ibt.ac.vn

thymine - HAT) at 37°C and 5% CO₂. During screening and isolation process, the positive clones were identified by agglutination test with standard group A red blood cells. Of the 1440 wells, 12 monoclonal hybrid clones were selected. The hybrid cell line (designated A6G11C9) was the best one secreting the highest anti-A monoclonal antibody into culture with the antibody titer of 512. The antibody showed good intensity (+++), and the agglutination was visible by 10 seconds. This antibody is the promising for ABO-grouping kit development.

Keywords: *Anti-A, blood group A, hybridomas, intensity, MAbs, specificity*