

单细胞显微挑取仪用于杂交瘤技术制备单抗

宋其芳¹, 梁家杰¹, 何冠波², 唐勇^{1*}

(1.暨南大学生命科学与技术国家级实验教学示范中心, 广州 510632; 2.广东忠信生物科技有限公司, 广州 510000)

摘要: 高精度单细胞分离挑取技术及设备可在细胞工程研究中发挥重要作用。单抗广泛应用于疾病的治疗和诊断, 目前基于细胞融合与有限稀释的单抗制备技术操作繁琐、效率低下。单抗制备的核心在于准确识别与分离目标杂交瘤细胞, 本研究通过单细胞显微挑取仪精准挑取被原位染色的目标杂交瘤细胞或克隆, 分离后扩大培养即可获得单抗, 大幅提高了单抗制备效率。本研究所用仪器为国产首款单细胞挑取仪, 其在单抗领域的应用创新可作为示范案例, 体现了实验技术人员采用新仪器创新性解决专业问题的能力, 同时有助于国产仪器的示范推广。

关键词: 单细胞; 显微挑取仪; 单克隆抗体; 杂交瘤技术; 细胞染色

中图分类号: Q2-33

文献标识码: B

Single-cell micropicker was used to prepare monoclonal antibody in hybridoma technique

Song Qifang¹, Liang Jiajie¹, He guanbo², Tang Yong^{1*}

(1.National Experimental Teaching Demonstration Center of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Guangdong Zhongxin Biotech Co., Ltd, Guangzhou, 510000, China)

Abstract: High precision single cell separation and picking technology and equipment can play an important role in cell engineering research. Monoclonal antibodies are widely used in the treatment and diagnosis of diseases, but the current hybridoma monoclonal antibody preparation technology based on cell fusion and limited dilution has some problems such as cumbersome operation and low efficiency. The core of monoclonal antibody preparation lies in the accurate identification and separation of target hybridoma cells. In this study, the target hybridoma cells or clones stained in situ were accurately selected by single-cell micro-picking instrument, and the monoclonal antibody could be obtained by expanding culture after isolation, greatly improving the efficiency of monoclonal antibody preparation. The instrument used in this study is the first type

of single cell picking instrument made in China, and its application innovation in the field of monoclonal antibodies can be used as a demonstration case, reflecting the ability of experimental technicians to use new instruments to solve professional problems creatively, and contributing to the demonstration and promotion of domestic instruments.

Keywords: Single cell; Cell micropicker; Monoclonal antibody; Hybridoma technology; Cell stain

1 显微挑取技术及单细胞显微挑取仪

1.1 单细胞研究

高等生物由多种类型的细胞和组织组成，这些细胞和组织具有不同的基因表达谱。从感兴趣的组织获得精确的遗传和生化信息需要从整个生物体中分离出单一类型的细胞甚至单个细胞[1]。例如，在癌症研究中，为了进行遗传和表观遗传分析，必须从肿瘤中分离出异质癌细胞。可以说，单细胞的产生和分析对生命科学和生物医学研究的各个领域产生了越来越大的影响[2]。因此，单细胞测序技术自问世以来，一直是引领科研领域的主导风向标，单细胞技术在 2013 年被 Nature Methods 评选为年度技术，2018 年被 Science 评选为十大科学突破，单细胞多组学技术又被 Nature Methods 评为 2019 年年度技术方法[3]。以单个细胞为单位，解析基因表达测序、细胞的行为，都称为单细胞技术，可应用于人类的发育进化研究、产前基因诊断和各种疾病（比如肿瘤、感染、自身免疫病等）的病变部位细胞的亚群分组、最终实现疾病的精确个体化诊断靶向治疗，其在算法开发、具体应用场景的应用对接方面，都还有巨大的空间亟待挖掘。

1.2 单细胞分离技术

目前，单细胞的分离仍然是一项具有挑战性的技术任务，主要是产量和质量，换句话说，细胞的完整性和纯度，以及单细胞分离方法的通量和灵敏度，都会影响后续的单细胞培养和分析[4]。近些年，根据不同的科研应用场景已经发展出了各种各样的单细胞分离、分离和分选技术，这些技术可以根据它们的特点进行简单的分类：1) 有限稀释法；2) 荧光活化细胞分选；3) 微液滴分选；4) 激光捕获显微切割；5) 显微挑取技术。

有限稀释法是通过稀释细胞悬浮液来分离单个细胞的方法，由于细胞在悬浮液中的泊松分布[5]，当悬浮液被分成小体积(等分)时，高度稀释的样品中的细胞数量可低至每等分一个细胞。有限稀释法成本低、原理简单，常用于杂交瘤细胞、稳转细胞等筛选，但由于在等

物中获得单细胞的概率是统计性质的，效率很低，还需要再确认单细胞的性质。荧光活化细胞分选（Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS）主要是基于流式细胞术的分选技术，是一种基于荧光标记和荧光信号检测的高速、高通量的细胞分选技术，通过选择特定波长的荧光信号对细胞进行分析和分离[6]。除了流式细胞分选，近些年还出现了很多基于微流控芯片的 FACS 技术[7]。微液滴分选是基于液滴的微流体使用充满油的通道来容纳分离的水滴（类似于乳液），在这些液滴中，单个细胞被包含并隔离，从而实现单细胞分离[8]。FACS 和微液滴分选的最大优势是每秒高达数千个单细胞的巨大通量，但并不是严格的单细胞分离技术，换句话说可能会出现多细胞的情况，此外分选压力过大会导致分离后的细胞出现损伤，影响后续实验，因此它们不适用于某些细胞，特别是稀有细胞的分离。激光捕获显微切割（Laser capture microdissection, LCM）的基本原理是通过红外激光脉冲激活热塑膜（其最大吸收峰接近红外激光波长），在直视下选择性地目标细胞或组织碎片粘到该膜上[9]。尽管 LCM 可以精准地分离单个细胞，但因其仪器价格昂贵、激光会对细胞产生损伤、热塑膜影响后续分析等缺点，现在已经不多用于单细胞分离。显微挑取技术是近些年发展起来的能精准、无损分离单细胞的技术，其通过细胞大小孔径的拉针毛细管对单细胞进行负压吸取，从而达到 100% 精准度的单细胞分离[10]。

1.3 单细胞显微挑取仪的开发

显微挑取技术作为目前最精准的单细胞分离技术，已被广泛应用于肿瘤、免疫、生殖、病毒、植物、微生物等领域的单细胞研究。在 2009 年，汤富酬团队首先通过口控制拉针毛细管的负压（被称为口吸法）对胚胎的单个细胞进行分离并完成了首个单细胞全转录组的测序分析，自此之后，显微挑取单细胞技术走上了历史的舞台[11]。然而，很明显口吸法存在污染风险、无法精准控制压力、操作十分依赖经验等问题，难以推广到其他实验室进行此类实验。之后，有研究人员使用显微操作平台进行单细胞的挑取，显微操作平台主要是用于显微注射、体外受精等生殖实验，其精度很高，但价格昂贵、部件繁多、操作复杂，而且由于其构造到的限制，难挑取培养板中的细胞[12]。近些年，国外多家企业基于自身的技术沉淀开发出了全自动和半自动的单细胞显微挑取仪，包括德国 ALS 的 Cellclector™、匈牙利 CellSorter、德国 MMI 的 CellEctor、美国 NeuroInDx 的 Unipick™等，实现了单细胞分离的自动化、可视化，并迅速应用于单细胞研究中，并发表了大量高水平研究成果。然而这些进口仪器价格十分昂贵（80-500 万不等）且维修成本高，也不适用于中国人的操作习惯，容易发生移位、断针等情况，在实验过程中的体验不好，导致难以在国内的科研单位中使用，限制了国内单细胞研究的水平。

有鉴于此，我们历经多年，克服了诸多困难，开发出了国内首台单细胞显微挑取仪（图 1a），该仪器基于独特的真空驱动和细胞采集专利技术[13-16]，可以从贴壁、悬浮、三维等培养体系中精准、无损分离单细胞或细胞克隆。单细胞显微挑取仪对细胞大小的孔径的拉针毛细管提供精准的脉冲负压，从而完成细胞的获取，挑取过程如图 1b 所示，挑取后液量低至 40 nL，完全满足单细胞的下游研究。由于该仪器是直接挑取，压力温和，不会对细胞的活性产生影响，如图 1d 所示，单个杂交瘤被成功挑取出来后可顺利扩大培养，说明对细胞无损伤。此外，该仪器突破了国外的技术封锁，零部件实现了完全国产化，且针对国人的操作习惯进行深度优化和开发，避免了进口仪器的诸多问题，为我国在单细胞研究、细胞工程研究等领域的科研人员提供了更精准、更好用的工具，提升我国在这些领域的科研竞争力。

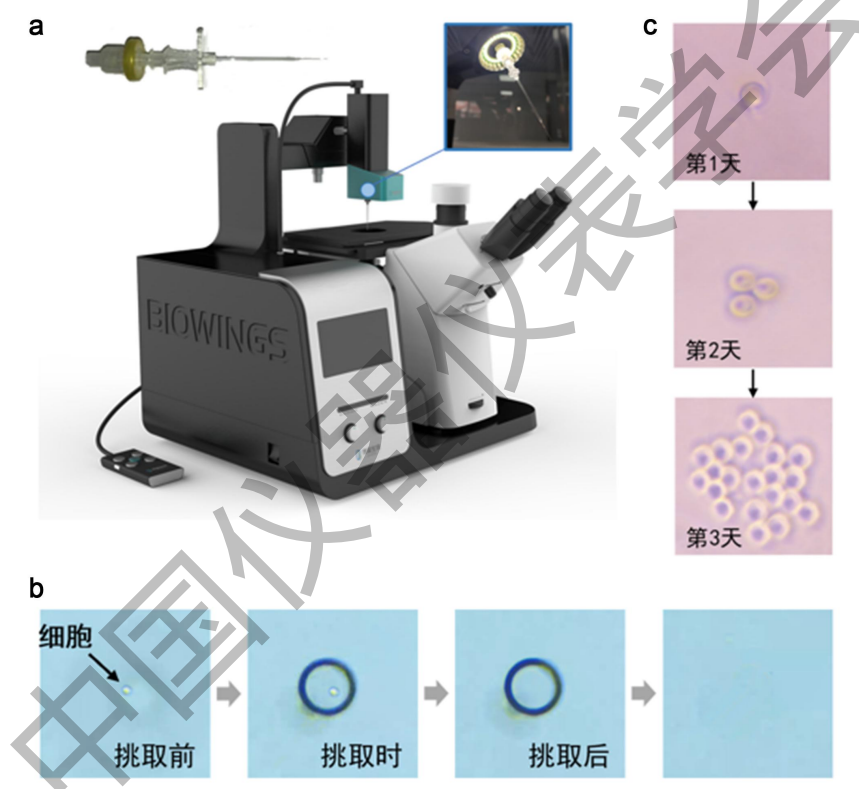


图 1 a) 显微细胞挑取仪的图片；b) 细胞挑取过程；c) 收集的单个杂交瘤细胞克隆化。

2 单细胞显微挑取仪应用于杂交瘤技术快速制备单克隆抗体

2.1 杂交瘤技术制备单克隆抗体

单克隆抗体是由单个 B 细胞克隆产生的抗体，这些抗体都与特定的抗原特异性结合，具有亲和力高、特异性好的特性，被广泛应用于疾病的诊断和治疗[17]。1890 年，Behring 和 Shibasaburo 首次在白喉动物模型研究中发现一种存在于血液中的中和物质并描述为抗体[18]。在 1947 年，Astrid Fagraeus 证明抗体是由适应性免疫系统中的浆细胞（效应 B 细胞）产生，随后，Nossal 证明了克隆选择学说，即单个 B 细胞克隆产生单一种特异性的

抗体[19]。1975年，Köhler 和 Milstein 发明了淋巴细胞杂交瘤技术来产生针对某种抗原的均质的高特异性的抗体——单克隆抗体，终于使制备纯一抗体的难题获得了解决，是整个生命科学发展的一个重要里程碑，为此也获得了 1984 年诺贝尔生理和医学奖[20]。

杂交瘤技术的基本原理是通过融合两种细胞而同时保持两者的主要特征，这两种细胞分别是经抗原免疫的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞。被特异性抗原免疫的小鼠脾细胞（B 淋巴细胞）的主要特征是它的抗体分泌功能，但不能在体外连续培养，小鼠骨髓瘤细胞则可在培养条件下无限分裂、增殖，即具有所谓永生性。在选择培养基的作用下，只有 B 细胞与骨髓瘤细胞融合的杂交细胞才能具有持续培养的能力，形成同时具备抗体分泌功能和保持细胞永生性两种特征的细胞克隆。然而，杂交瘤技术为筛选到需要的细胞株，需分离到单个抗体分泌阳性细胞进行培养，使用传统的有限稀释法需经过多次亚克隆-ELISA 检测，该方法具有以下问题：1) 概率事件，阳性率低；2) 有限稀释丢失大量阳性细胞；3) 需要 ELISA 反复检测上清，间接检测不直观，耗时耗力；4) 多次亚克隆培养造成开发周期长，效率低。如何高效、准确、无损地分离出单个抗原特异性抗体分泌杂交瘤细胞，是目前杂交瘤技术制备单抗中迫切需要解决的难题[21]。

2.2 细胞表面免疫荧光吸附（CSFIA）技术

杂交瘤技术制备单抗的关键在于准确区分单个抗体分泌阴性和阳性细胞克隆，而传统的方法中融合后的杂交瘤是混合细胞群，检测培养板孔上清没有办法区分阴阳性细胞，因此只能采用有限稀释法进行单细胞分离，再进行克隆化检测上清，从而区分阴阳性细胞，这决定了需要反复稀释-克隆化-检测多达三轮以上，才可以获得抗体分泌阳性的单克隆细胞株。为了克服无法快速区分阴阳性细胞的难点，我们开发了细胞表面免疫荧光吸附（CSFIA）技术，如图 2a 所示，我们发明了一种双亲分子，其 NHS 端可以与蛋白质的羧基偶联，油烯端可以插入到细胞膜的磷脂双分子层中，通过这种双亲分子就可以实现把抗原锚定在细胞膜表面，一旦抗体从杂交瘤细胞分泌出来，马上会被细胞膜表面的抗原捕捉，最后简单地通过偶联荧光染料的二抗对细胞进行染色，抗原特异性的抗体分泌阳性细胞表面就会显示荧光（图 2b）[22-25]。该方法可在细胞融合后短时间使用，此时细胞还是单细胞或小细胞团状态，如果能在此时把强荧光的单细胞精准分离出来进行扩大培养，即为阳性单克隆，这样就无需再进行有限稀释亚克隆-ELISA 检测，可有效解决存在的问题。此外，该技术也可以用于筛选对抗体阳性的杂交瘤细胞和未经融合的抗体分泌阳性的浆细胞[26-28]。

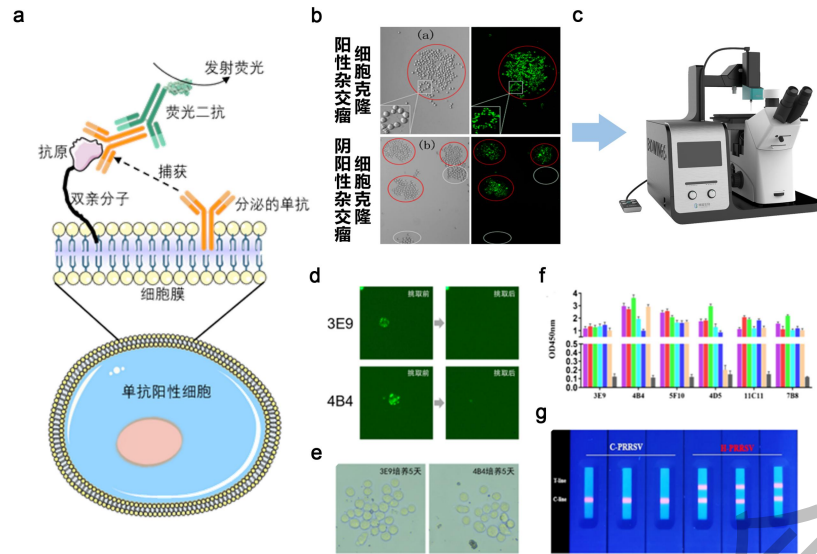


图 2 a) 细胞表面免疫荧光吸附技术原理; b) 荧光染色后 c) 使用单细胞显微挑取仪进行挑取; d) 杂交瘤染色后强荧光的两个细胞挑取; e) 挑取细胞克隆化; f) 一轮融合挑取细胞克隆化检测上清效价; g) 筛选配对抗体建立免疫层析试纸条。

2.3 单细胞显微挑取仪结合 CSFIA 技术快速制备单抗

开发的 CFFIA 技术可以把单个抗体分泌阴性和阳性细胞克隆通过荧光区分开, 区分后只要把细胞分离出来就可以扩大培养为单克隆细胞株, 因此我们使用开发的单细胞显微挑取仪, 对染色后的荧光杂交瘤细胞进行挑取 (图 2c)。免疫 PRRSV 抗原蛋白的小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合, 融合后使用细胞表面免疫荧光吸附技术对杂交瘤进行染色, 染色后在荧光显微镜下观察, 对强荧光细胞 (抗体分泌阳性细胞) 进行挑取 (图 2d), 挑取后进行克隆化培养, 成功长出细胞团 (图 2e)。对这些细胞进行扩大培养后, 取细胞上清检测抗体效价, 均表现出较高的效价 (图 2f), 成功获得单克隆抗体细胞株。同时也可以利用细胞表面免疫荧光吸附技术进行对抗体的筛选, 筛选到的对抗体可用于建立免疫层析试纸条鉴别检测 C-PRRSV 和 H-PRRSV (图 2g)。

3 总结

总的来说, 为了让国内的科研人员能把单细胞精准地分离出来, 加速单细胞研究, 我们开发了全国产的首台单细胞显微挑取仪并推向市场, 已经推向了多家知名的实验机构, 在各个领域得到了多种应用验证。在单抗开发领域, 我们针对目前单抗制备过程中普遍存在的困难和问题进行克服, 开发了细胞表面免疫荧光吸附技术, 可以快速、原位区分单抗阴阳性细胞, 大大节省了人力、时间和成本, 再使用单细胞显微挑取仪对阳性细胞进行阳性细胞挑取,

先了单抗的快速制备。本案例充分体现了实验技术人员解决专业问题的能力，同时有助于国产仪器的示范推广。

参考文献:

- [1]Macaulay I C, Voet T. Single cell genomics: advances and future perspectives[J]. PLoS Genet, 2014, 10(1): e1004126.
- [2]Blainey P C, Quake S R. Dissecting genomic diversity, one cell at a time[J]. Nat. Methods, 2014, 11(1): 19-21.
- [3]Teichmann S, Efreanova M. Method of the Year 2019: single-cell multimodal omics[J]. Nat. Methods, 2020, 17(1): 2020.
- [4]Pensold D, Zimmer-Bensch G. Methods for single-cell isolation and preparation[M]//Yu B, Zhang J, Zeng Y, *et al.* Single-cell Sequencing and Methylation. Advances in Experimental Medicine and Biology, Singapore: Springer, 2020, 1255: 7-27.
- [5] Staszewski R. Cloning by limiting dilution: An improved estimate that an interesting culture is monoclonal[J]. Yale J. Biol. Med, 1984, 57(6), 865-868.
- [6]Herzenberg L A, Parks D, Sahaf B, *et al.* The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: A view from Stanford[J]. Clin. Chem, 2002, 48(10), 1819-1827.
- [7]Van Lent J, Breukers J, Ven K, *et al.* Miniaturized single-cell technologies for monoclonal antibody discovery[J]. Lab. Chip, 2021, 21(19): 3627-3654.
- [8]Brouzes E, Medkova M, Savenelli N, *et al.* Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening[J]. PNAS, 2009, 106(34): 14195-14200.
- [9]Emmert-Buck M R, Bonner R F, Smith P D, *et al.* Laser capture microdissection[J]. Science, 1996, 274(5289): 998-1001.
- [10]Hempel C M, Sugino K, Nelson S B. A manual method for the purification of fluorescently labeled neurons from the mammalian brain[J]. Nat. protocols, 2007, 2(11): 2924-2929.
- [11]Tang F, Barbacioru C, Wang Y, *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. Nat. methods, 2009, 6(5): 377-382.
- [12]Hedlund E, Deng Q. Single-cell RNA sequencing: technical advancements and biological applications[J]. Mol. Aspect. Med, 2018, 59: 36-46.

- [13]何冠波,冯梅,何浩荣等. 一种细胞取样装置: CN217809424U[P]. 2022-11-15.
- [14]何冠波,冯梅,何浩荣等. 一种具有升降功能的挑取细胞的装置: CN217757473U[P]. 2022-11-08.
- [15]何冠波,何浩荣,冯梅. 一种挑取贴壁细胞团的装置: CN215924923U[P]. 2022-03-01.
- [16]唐勇,何冠波,梁家杰. 细胞提取仪: CN307137417S[P]. 2022-03-01.
- [17]Nelson A L, Dhimolea E, Reichert J M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics[J]. *Nat. Rev. Drug. Discov*, 2010, 9(10): 767-774.
- [18]Behring E V. Ueber das zustandekommen der diphtherie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren[J]. *Dtsch. Med. Wochenschr*, 1890, 16(49): 1113-1114.
- [19]Fagraeus A. Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro[J]. *Nature*, 1947, 159(4041): 499.
- [20]Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [21]Tiller T. Single B cell antibody technologies[J]. *New biotechnology*, 2011, 28(5): 453-457.
- [22]Li X, Bian H, Yu S, *et al.* A rapid method for antigen-specific Hybridoma clone isolation[J]. *Anal. Chem*, 2018, 90(3): 2224-2229.
- [23]Bian H, Xu F, Jia Y, *et al.* A new immunochromatographic assay for on-site detection of porcine epidemic diarrhea virus based on monoclonal antibodies prepared by using cell surface fluorescence immunosorbent assay[J]. *BMC vet. res*, 2019, 15: 1-10.
- [24]Xie K, Chen H, Peng B, *et al.* On-site determination of classical swine fever virus (CSFV) by a fluorescent microsphere-based lateral flow immunoassay strip (FM-LFIAs) based on monoclonal antibodies[J]. *Anal. Lett*, 2021, 54(14): 2347-2362.
- [25]唐勇,蓝彩凤,李秀清. 一种筛选分泌特异性单克隆抗体杂交瘤细胞的方法与应用: CN104977408B[P]. 2016-09-14.
- [26]Jin Z, Wang L, Cao D, *et al.* A new method for rapid screening of hybridoma cell clones secreting paired antibodies using sandwich cell surface fluorescence immunosorbent assay[J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1163: 338493.
- [27]唐勇,梁家杰,王兆广. 一种同时筛选记忆 B 细胞和浆细胞的高效筛选技术及应用: CN115166241B[P]. 2023-03-24.

[28]唐勇,梁家杰,高智星. 一种高效获得特异性全人单克隆抗体基因的方法和应用:

CN115125251A[P]. 2022-09-30.

中国仪器仪表表学会