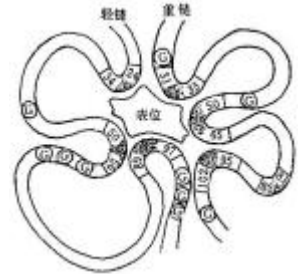


哺乳动物细胞重组抗体表达概述

单抗和多抗定义

蛋白结构表面可以使免疫系统产生抗体的区域叫抗原决定簇(又称抗原表位见右图)。它一般由 6-12 个氨基酸或碳水基团组成,可以由连续序列组成或不连续的蛋白质三级结构组成。一个抗原可以有許多不同的抗原决定簇,因此,机体可以产生多种不同的抗体。由单一 B 淋巴细胞产生仅识别一特定抗原表位的抗体,称为单克隆抗体。



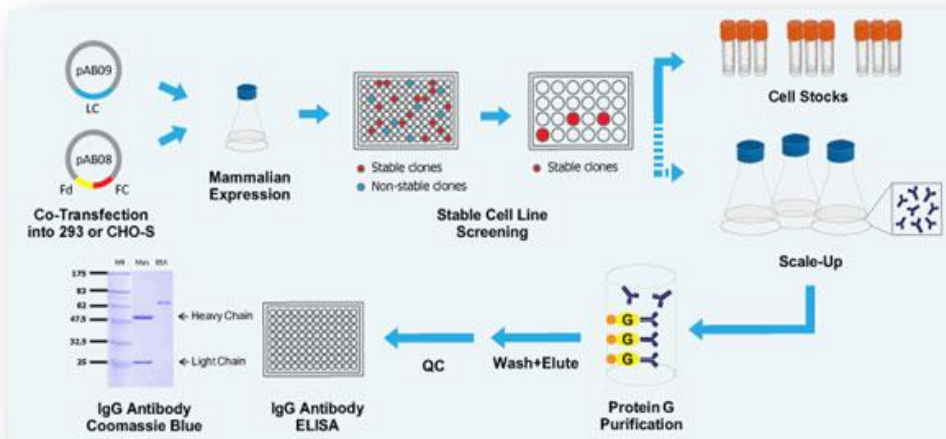
由多种 B 细胞产生,受到多种抗原决定簇刺激并可与多种抗原表位结合的抗体称为多

克隆抗体。单抗与多抗的区别可参考单抗与多抗的区别。重组抗体生产根据基因序列制备得到单抗,通过构建稳定表达细胞系满足对抗体量的生产。

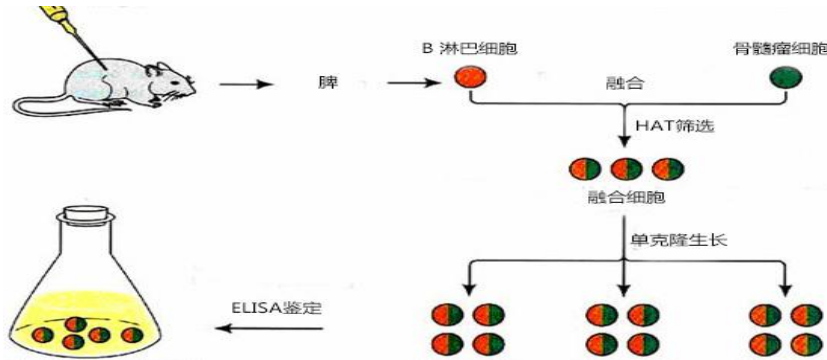
重组抗体和免疫抗体制备

抗体的生产有两种方式。①利用重组蛋白的方式获取接近天然条件下的重组蛋白(或多肽),通过刺激动物免疫系统,最终获得抗体。②利用哺乳动物细胞生产,在已知抗体基因序列的前提下,将基因序列克隆到相应载体上,进行重组抗体的表达。刺激动物免疫系统可以生产单抗或多抗,这种方法成功率高且抗体效价较好。而通过序列进行 [重组抗体表达](#),针对特定基因只能生产单抗。两种生产方式在作用原理和流程等方面都有一定的区别和联系,具体如下:

一、生产流程



哺乳动物细胞重组抗体生产



刺激动物免疫系统制备单抗

两种方式制备单抗综述

1. 抗原的制备：通过刺激动物免疫系统生产单抗前提是要获得抗原，抗原可以是可溶性蛋白，多肽。可溶性蛋白通过重组蛋白生产得到。多肽作为抗原与载体偶联免疫小鼠，用多肽进行筛选，如不能进行抗体筛选，需偶联另一种载体进行筛选；
2. 免疫动物：免疫动物一般选用 6 周龄的小鼠，根据自己制定的实验方案操作。用已经制备的抗原免疫小鼠，使其分泌 B 淋巴细胞，进行下一步的融合；
3. 细胞融合：实验前准备好骨髓瘤细胞，骨髓瘤细胞与 B 淋巴细胞按照一定的比例融合，形成杂交瘤细胞；
4. 杂交瘤细胞选择培养筛选：用 HAT 筛选①培养基筛选融合成功的杂交瘤细胞；
5. 融合细胞的单克隆生长鉴定：采用有限稀释法或其他方法进行杂交瘤细胞的克隆培养，通过鉴定最终得到能够生产单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞。

哺乳动物重组抗体在以上流程的基础上进行

1. 构建稳定表达细胞系：对上述实验得到的抗体测序得到抗体的序列，利用哺乳动物细胞生产重组抗体的方式表达，筛选可稳定表达的细胞系。
2. 单克隆抗体的大量制备：筛选出能够稳定生产的细胞系，满足后续对抗体的大量需求，节约后续实验时间。

二、制备单抗的原理

哺乳动物细胞重组抗体表达

传统的生产抗体的方式是用抗原刺激动物免疫系统，这种方式需先制备抗原，且利用这种方法生产抗体难以满足大量的生产（需求大量的实验耗材和时间）。而哺乳动物细胞生产抗体的方式有一定的优势。①已知抗体的基因序列，将序列克隆到表达载体上，导入到哺乳动物细胞体内培养，通过一系列的筛选简单最终获得能够稳定生产此抗体基因的的稳定细胞系，这一过程需要大量的时间，才能筛选出足够稳定表达的细胞系，并能够在后续实验中稳定长期生产。

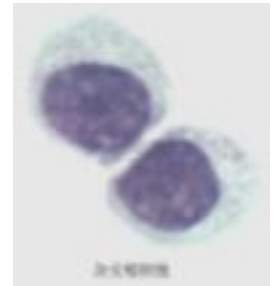
②未知序列的抗体大量生产，先刺激动物免疫系统得到少量抗体通过测序得到抗体序列，通过哺乳动物细胞重组抗体表达筛选稳定表达的细胞系，满足大量生产需求。

刺激动物免疫系统制备抗体

制备抗原，用抗原刺激动物免疫系统，将抗原处理过的 B 细胞和骨髓瘤细胞融合，融合后的细胞既具有 B 细胞合成专一抗体的特性同时又能够无限增殖（B 淋巴细胞不能再体外生长，应用杂交瘤技术可使其在体外无限增殖）。经过 HAT 筛选，体外培养融合成功的细胞或在体内腹水培养，单克隆生长，最终进行抗体检测。刺激动物免疫系统生产抗体需要制备抗原，抗原可通过重组蛋白生产的方式获得，通过先获得抗原再生产抗体。

HAT 培养基筛选杂交瘤细胞的原理

细胞融合是一个随机的过程，融合后可能会出现细胞有杂交瘤细胞，融合的脾细胞与脾细胞，融合的瘤细胞与瘤细胞，未融合的脾细胞，未融合的瘤细胞以及细胞多聚体。那么，如何才能筛选出杂交瘤细胞？对于正常的脾细胞，它在培养基中的存活期为 7-14 天，因此无需特别筛选，细胞的多聚体也容易死去，只有未融合的瘤细胞需要特别筛选除去。



选择培养基有三种关键成分：次黄嘌呤（hypoxanthine, H），氨基喋呤（aminopterin, A），胸腺嘧啶脱氧核苷（thymidine, T），故称为 HAT 培养基。

细胞 DNA 合成有两个途径：

A.主要途径：由糖，磷酸，氨基酸，CO₂，NH₃ 等化合物合成核苷酸，进而合成 DNA，叶酸作为重要的辅酶参与这一合成过程。而氨基喋呤是叶酸的拮抗物，可以阻断杂交瘤和瘤细胞通过这一途径合成核苷酸。

B.应急途径：在次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷共同存在的情况下，经过次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖转移酶（HGPRT）和胸腺嘧啶核苷激酶（TK）共同催化合成 DNA。而瘤细胞是该两种酶的缺陷型，因此不能再 HAT 培养基上生长，不合成或不分泌免疫球蛋白，只有融合的杂交瘤细胞具有脾细胞和瘤细胞的遗传性能，可以通过应急途径合成 DNA，在 HAT 培养基上长期存活，繁殖和分泌抗体。

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

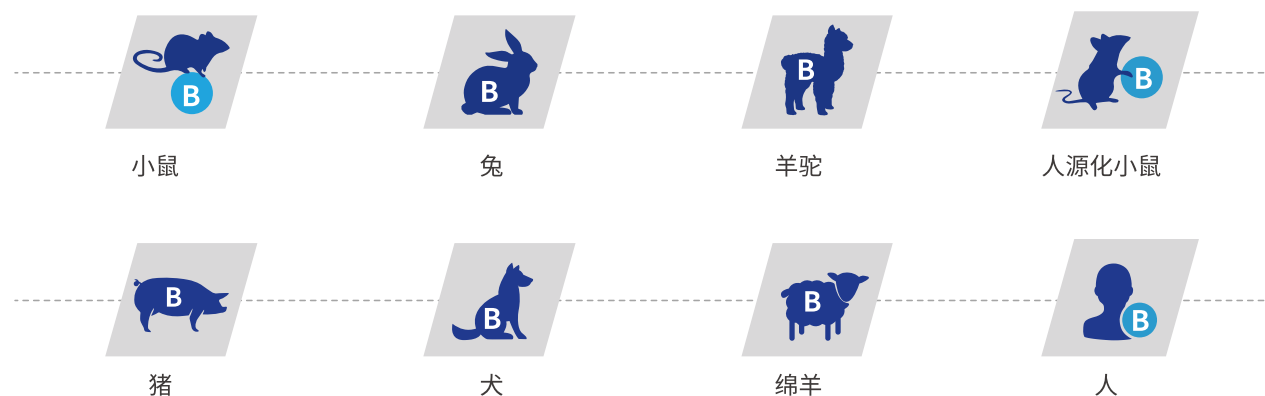
SingleB® 单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

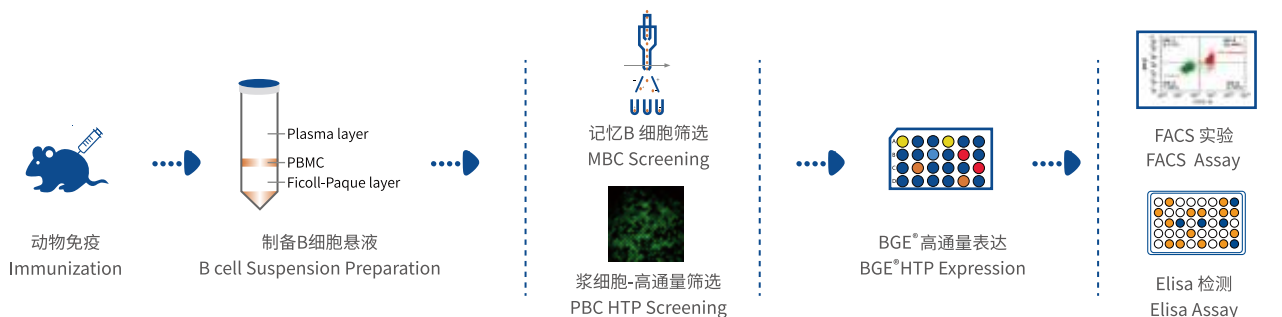
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

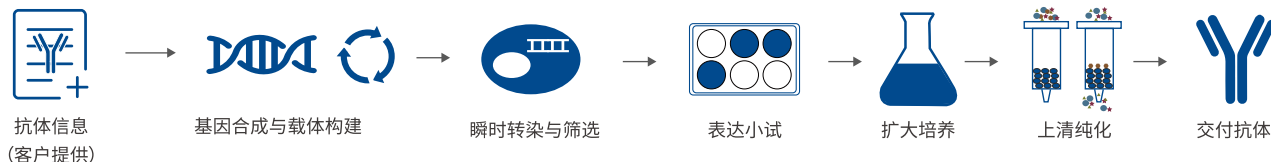
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

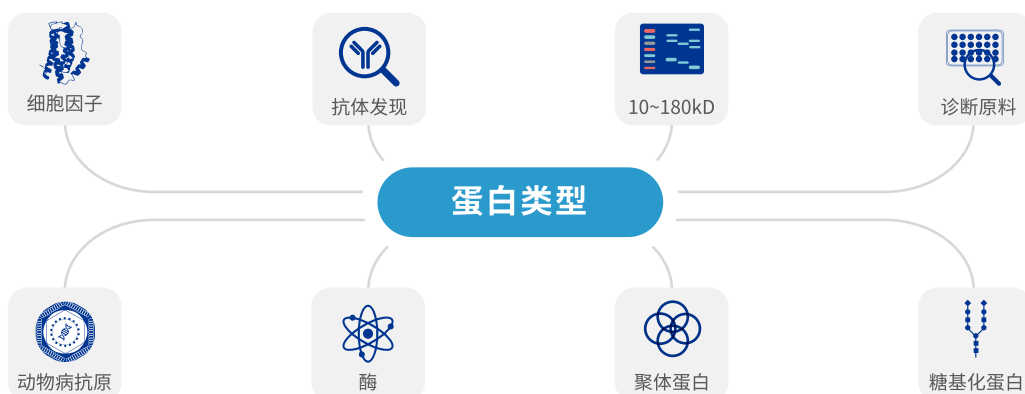


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

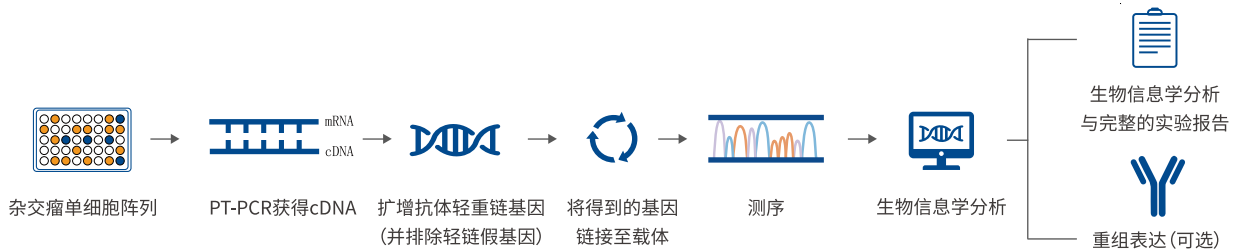
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



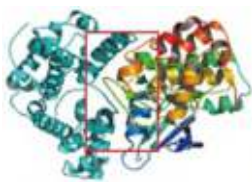
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



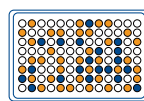
基因合成&质粒抽提



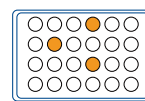
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L