

全人源化单克隆抗体制备技术（转基因小鼠）

摘要：本文对全人源化单克隆抗体制备技术中的转基因小鼠技术进行概述和整理，主要内容包括转基因小鼠制备全人单抗原原理简介，优缺点的对比以及四种常用的实验方法介绍。

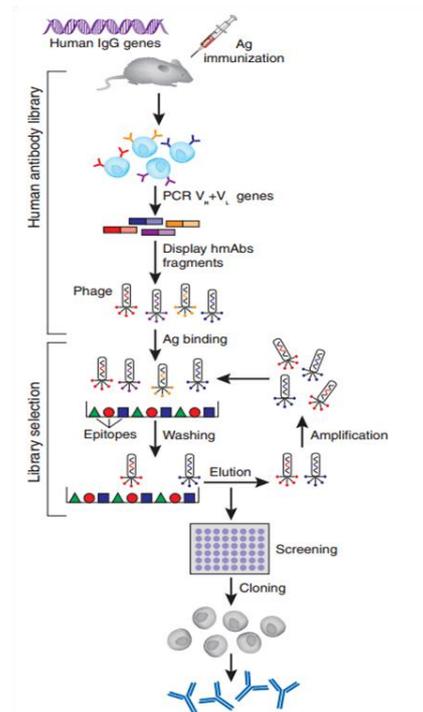
转基因小鼠制备全人单抗原原理简介

转基因小鼠制备全人源抗体的实验原理是：在抗体生成过程不是从普通小鼠开始，而是从鼠抗体生成基因被相应人基因所取代的小鼠开始。该方法要求人的抗体基因片段在小鼠体内必须进行较为有效的重排与表达，并且这些片段能与小鼠细胞的免疫系统信号机制相互作用，使得小鼠在受抗原刺激后，这些人抗基因片段能被选择，表达并活化 B 细胞分泌人抗体。其基本方法是采用在鼠胚胎干细胞（ES）中的同源重组来使得鼠原有基因缺失，再通过显微注射等技术将重建的人源抗体胚系基因微位点转入小鼠体内，最终由 mAb 的杂交瘤分泌出全人序列的抗体。

优势与缺点对比

转基因小鼠制备全人源抗体的主要优点是，其功效要优于其他生产抗正常人体蛋白 mAb 技术。小鼠识别抗原和动员抗该抗原的抗体系统仍保持完整，容易把人体蛋白识别为异物。而且，由于抗体是在体内产生，经历正常装配和成熟过程，从而保证成品具有较高的靶结合亲和力。另一方面，用转基因小鼠生产候选 mAb 药物时间较短，费用较低。

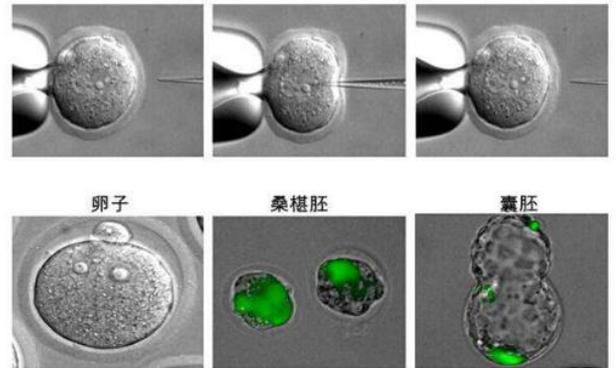
转基因小鼠技术目前主要存在以下几个问题。一是免疫耐受的问题，虽然可以通过免疫佐剂的使用和免疫方法的改进来提高免疫反应强度，但对于一些人类抗原仍然较难获得高亲和力抗体；二是上述提到的存在鼠源抗体干扰的问题；三是存在对毒性抗原较难进行免疫等问题。



常用的技术方法

1.原核显微注射法

该法又称 DNA 显微注射法,即通过显微操作仪将外源基因直接用注射器注入受精卵,利用外源基因整合到 DNA 中,再通过胚胎移植技术将转基因胚胎移植到代孕受体动物子宫中,经过体内发育获得转基因动物。该方法的特点是外源基因的导入整合效率较高,不需要载体,直接转移目的基因,目的基因的长度可达 200kb,较少产生嵌合体等。它可以直接获得纯系,所以实验周期短。

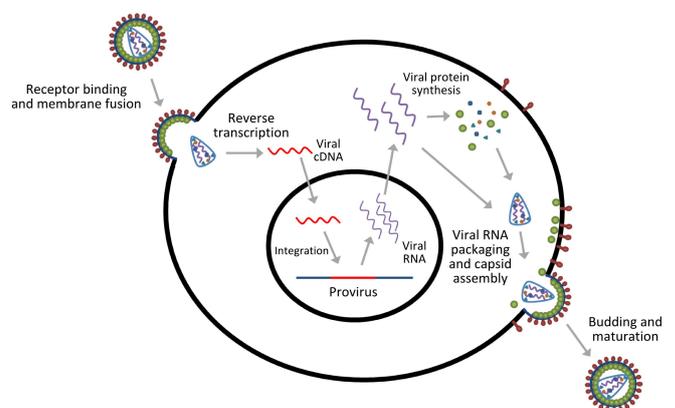


然而该方法有一些缺点使其很难在大动物中广泛应用:(1)显微操作仪器昂贵;(2)技术操作复杂,要求经过专门训练的技术人员操作仪器;(3)显微注射导入的外源基因在基因组中随机整合,可能导致内源性功能基因突变或者激活一些致癌基因,无法调控外源基因在基因组中的整合数目(拷贝数);(4)外源基因整合效率较低,构建转基因大动物成本较高;(5)只能实现目的基因的整合,不能进行基因敲除研究。尽管如此,在体细胞核移植技术出现前,显微注射法是被广泛使用和效果最好的转基因技术。

2.逆转录病毒载体法

逆转录病毒感染法是最早被用于制备转基因动物的方法。常用的病毒载体包括逆转录病毒载体和慢病毒载体。

该方法首先将目的基因片段克隆至病毒载体的长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)的下游,利用病毒系统将含有目的基因的载体包装成高滴度的病毒颗粒,以该病毒颗粒感染动物受精卵或者胚胎,也可以直接将胚胎与能释放逆转录病毒的单层培养细胞共孵育以达到感染的目的,通过病毒将外源目的基因插入整合到宿主基因组 DNA



中去。这种逆转录病毒被用重组 DNA 技术修饰后作为基因载体在应用中优于微注射法之处为：无需重排，可在整合点整合转移基因的单个拷贝；将胚胎置于高浓度病毒容器中，或者与被感染的细胞体外共同培养，或微注射鸡胚盘里，整合有逆转录病毒的 DNA 的胚胎率高。但是逆转录病毒载体具有感染宿主较窄，产生嵌合体动物的概率高等缺点，限制了其在转基因动物制备中的应用。随着病毒载体的发展，目前慢病毒载体逐渐成为病毒载体法的主导方法。

与一般的逆转录病毒载体法相比，慢病毒载体法具有感染宿主范围广，可感染几乎所有类型的细胞(分裂细胞和非分裂细胞)，一般对细胞的感染力可达 90%以上，具有较强的基因组整合能力。外源基因整合进入基因组，可以稳定遗传。2010 年，刘明军等利用慢病毒载体法制备转基因绵羊，对新生的 162 只羔羊进行检测，发现其中 92 只为转基因羔羊，平均转基因效率高达 56.8%，显示出慢病毒法高效制备转基因动物的优势。但是慢病毒自身有潜在的致癌性，安全性有待提高，病毒载体容量不够大，目前只能插入小于 10kb 的外源基因。

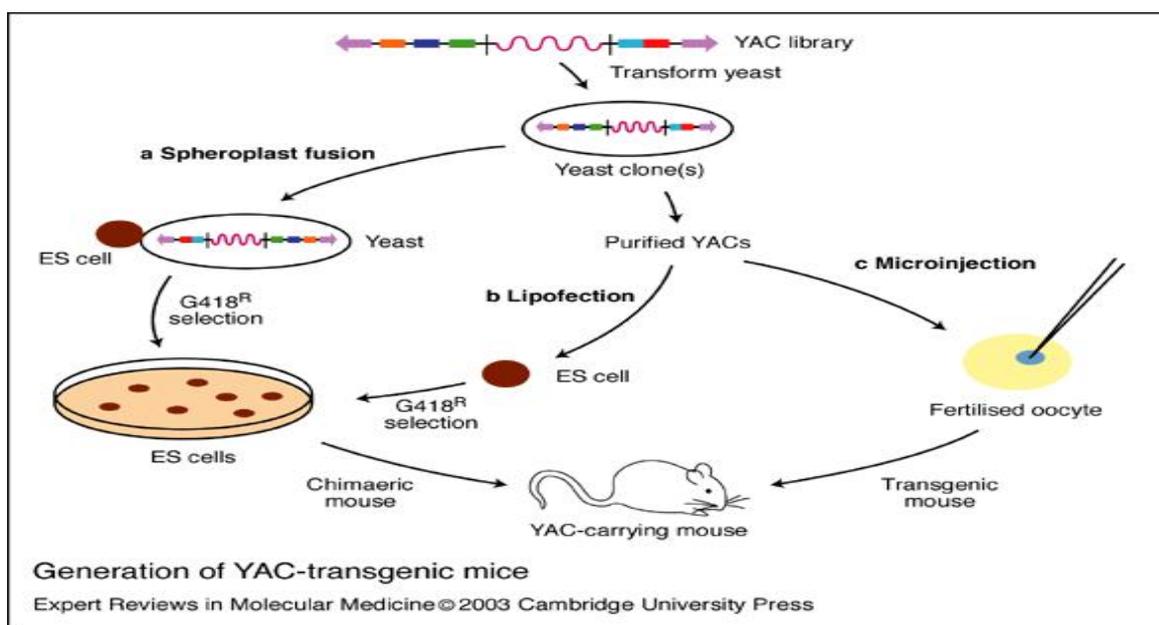
3.精子介导法

近年来利用精子作为外源基因的载体来建立转基因动物极为引人注目。其方法就是将成熟的精子与外源 DNA 进行预培养之后，使精子有能力携带外源 DNA 进入卵子中，使之受精，并使外源 DNA 整合于染色体中。精子携带 DNA 主要是通过三种途径来完成，即将外源 DNA 与精子共孵育、电穿孔导入法和脂质体传染法。该方法简单、方便，依靠生理受精过程，免去了原核的损伤。1989 年 Lavitrano 等首次利用小鼠附睾精子与 DNA 温育产生转基因小鼠。转基因效率高达 30%，外源基因稳定整合到生殖细胞中，由此获得了转基因株系。所以这些引起了广大科研工作者的极大兴趣，以精子作为载体、针对不同动物品种的研究工作相继展开。

4.酵母人工染色体法

YAC 系统是 1987 年发展起来的。该技术主要是将未重排的人类免疫蛋白胚系基因，首先构建成酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC)，并把其转入小鼠即可获得分泌人抗体的转基因鼠。Mendez 等采用改进的细胞融合法：去掉含有 YAC 的酵母细胞壁，使其球状原生质与鼠胚胎干细胞(ES 融合)。然后把整合有目的基因的 ES 细胞导入小鼠囊胚，使之发育为嵌合体小鼠，再通过转基因鼠间反复交筛选，最终可获得分泌完全人抗体的小鼠。

分别以人白细胞介素-8(IL-8)、表皮生长因子受体(EGFR)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和淋巴细胞表面抗原(CD4)等抗原免疫该鼠,再取其脾细胞以杂交瘤技术与鼠骨髓瘤细胞融合。经筛选获得针对上述抗原的分泌高效价人抗体的杂交瘤细胞株。该技术明显优于微基因重组法,所获抗体的亲和力显著提高。但由于大量 Ig 相邻基因片段的同源重组过程复杂,以及包含所有 Ig 恒定区基因的 YAC 克隆困难,到目前还不可能把所有人 Ig 基因转入小鼠,故产生的抗体类型有限,仅能产生 IgM 和 IgG2。



参考资料：

- 1.孙志伟, 王双, 陈惠鹏. 转基因小鼠在抗体药物研发中的应用. 军事医学科学院生物工程研究所, 2012
- 2.吴玉龙, 赵冬梅. 全人源抗体制备技术研究进展. 滨州医学院人体寄生虫学教研室, 2005
- 3.王锋, 倪培华, 宋巍, 周同. 利用转基因小鼠及转染色体小鼠产生人抗体的研究进展. 上海第二医科大学附属瑞金医院, 2001

相关阅读

[人鼠嵌合单克隆抗体构建原则与实验案例](#)

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

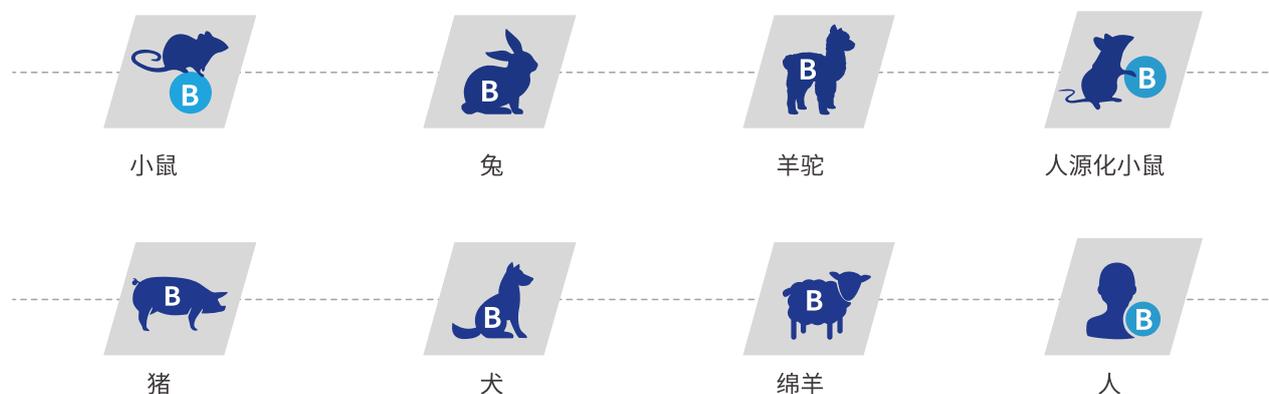
SingleB®单B细胞快速单抗发现

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。

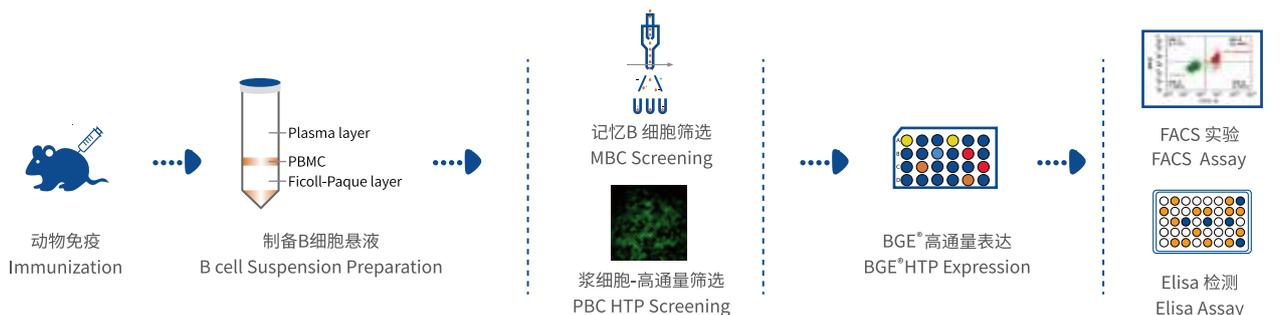
平台优势

- 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

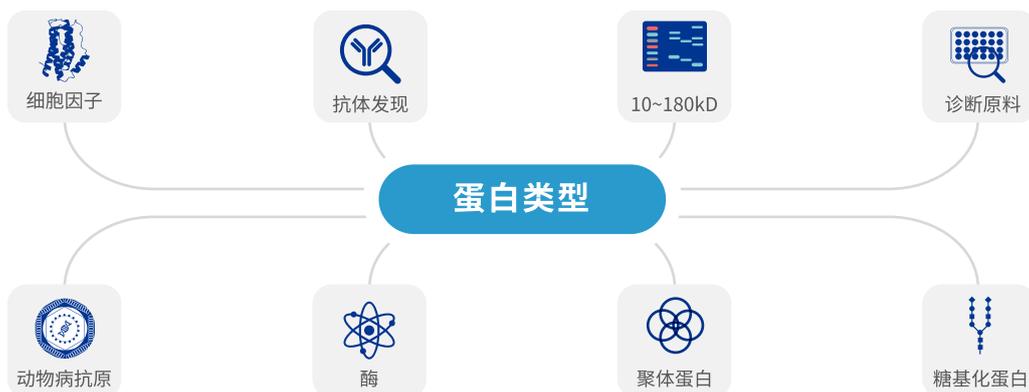


Recombinant Protein Expression Service

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。

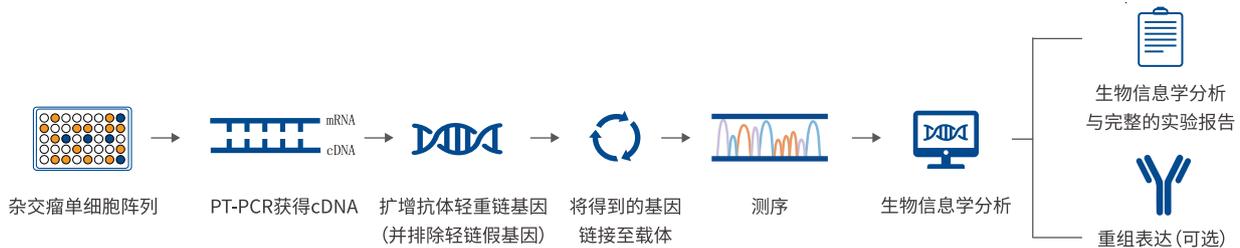
应用场景

- 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



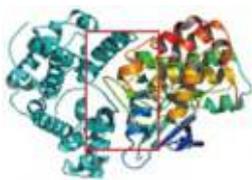
5

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。

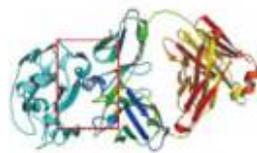
检测范围



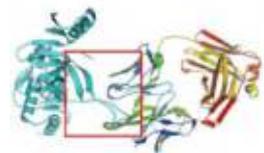
蛋白和蛋白



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



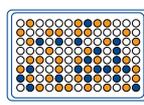
基因合成&质粒抽提



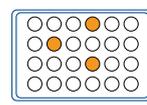
稳定转染



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