

## 酶解法与表达系统制备 Fab 流程简述

### 酶解法制备 Fab

#### 利用木瓜蛋白酶生产 Fab 片段

取实验室自制的抗体或 IgG 粉末置于 0.01mol/L 的 PBS ( pH=7.4 ) 中透析 3h , 调整抗体浓度 1mg/mg。

将木瓜蛋白酶干粉溶于活化溶液 ( 0.1mol/L PBS , pH=7.4 , 其中加入 0.2mol/L EDTA 和 0.01mol/L 半胱氨酸 ) , 配置成 1mg/mL 的溶液。37°C活化 20min。

将木瓜蛋白酶与抗体溶液按 1:10 的比例混合 , 在 37°C下反应 6h。

将反应完产物使用 10kDa 的超滤管在 4000rpm ,4°C下超滤 ,除去木瓜蛋白酶 ,同时替换溶剂为 0.01mol/L 的 PBS ( pH=7.4 ) , 溶解后的溶液即为 Fab 片段与 Fc 片段的混合物。

对酶解产物进行纯化。

#### 利用胃蛋白酶生产 F ( ab' )<sub>2</sub> 并进一步生产 Fab' 片段

- 将 IgG 粉末 100mg , 溶于 2 mL 0.1 mol/L pH4.0 醋酸缓冲液。溶液稍成白浊 , 30°C , 保温 10min
- 取结晶胃蛋白酶 1.5 mg , 溶于 1.5 mL 0.1 mol/L pH4.0 醋酸缓冲液 , 加于步骤 1 的溶液中 , 于 30°C作用 16h
- 用 0.1 mol/L pH8.0 PBS 透析一夜
- 加入硫醇 , 使成 0.1 mol/L , 在室温下搅拌 30min
- 加入 1 mol/L 的碘乙酰胺 ( Iodoacetamide ) 使成为 0.1 mol/L , 室温下搅拌 1h
- 用 0.01 mol/L PBS 1000L 透析过夜 , 3000r/min , 离心 30min , 去沉淀
- 把上清过 SephadexG100 (40cm×2.0cm)以 0.1 mol/L PBS 洗脱
- 以每管 6mL 收集 , 约在第 8 管开始 , Fab' 片段被洗脱
- 测 OD<sub>280nm</sub> , 将 Fab' 管合并 , 浓缩、冻干
- 如制备 F(ab' )<sub>2</sub> , 上述 4 ~ 6 步骤则可以省略

### Fab 片段制备 ( 大肠杆菌表达系统 )

以嵌合抗 CD 20 抗体 Fab 片段在大肠杆菌中表达为例<sup>[1]</sup>(下文中提到的载体与表达菌株均由该实验室自行构建)

## 表达载体构建

- 利用 PCR 法从抗 CD<sub>20</sub>ScFv 表达载体上扩增 V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> 基因，经琼脂糖电泳分离纯化后，分别以限制性内切酶 MluI+ApaI、MluI+StyI 消化，然后重组到带有人免疫球蛋白相应 CH<sub>1</sub>、C<sub>L</sub> 的 pYZH1、pYZL 载体相应的内切酶位点中，得到重组子 pYZH1cd20、pYZLcd20。
- 用所得的重组子转化大肠杆菌菌株，扩增培养后提取 pYZLcd20、pYZH1cd20 质粒，分别以限制性内切酶 MluI+NheI，SpeI+SphI 消化 pYZLcd20、pYZH1cd20。
- 琼脂糖电泳分离纯化含 V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub> 的相应 DNA 片断，利用 NheI、SpeI 同裂酶的特点，将这两个片断和经 MluI+SphI 消化所得的 pYZF 载体片断连接成抗 CD<sub>20</sub>Fab 表达载体 pYZF1cd20。

## 可溶性表达及分离纯化

- 将载体 pYZF1cd20 转入大肠杆菌菌株，经筛选与扩大培养后，挑取阳性克隆单菌落接种 5 ml 含氨苄青霉素 50 µg/ml 的 2×YT 培养基（蛋白胨 6%，酵母膏 1%，氯化钠 0.5%，pH7.4），37°C，200 r/min，振荡培养 6 h，至 OD<sub>600</sub> = 0.6；6 000 r/min、4°C 离心 10 min 收集菌株。
- 将菌株重新悬浮于 20 ml 含氨苄青霉素 50 µg/ml 的 AP<sub>5</sub> 培养基（每 1 000 ml 含酸水解酪蛋白 11 g，酵母膏 0.6 g，硫酸镁 0.19 g，葡萄糖 1.5 g，氯化铵 1.07 g，氯化钾 3.73 g，氯化钠 1.2 g，1 mol/L 三乙醇胺(pH7.4)120 ml，过滤灭菌），30°C，250 r/min，振荡培养 20 h；6 000 r/min、4°C 离心 10 min 收集菌体。
- 将菌体于 -20°C 冻存 1 h，化冻后加 1 ml 细菌周质腔蛋白提取液，混匀，置于 4°C 轻摇 1 h，12 000 r/min，4°C 离心 20 min，取上清。
- 用 Protein G Agrose 亲和柱分离纯化 Fab。

## 蛋白质印迹实验(Western-blot)

## Fab 片段制备（哺乳动物表达系统）

利用哺乳动物表达系统进行 Fab 片段制备的表达流程为我司内部资料。如需制备服务，请查看[抗体片段制备服务页面](#)

## 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。

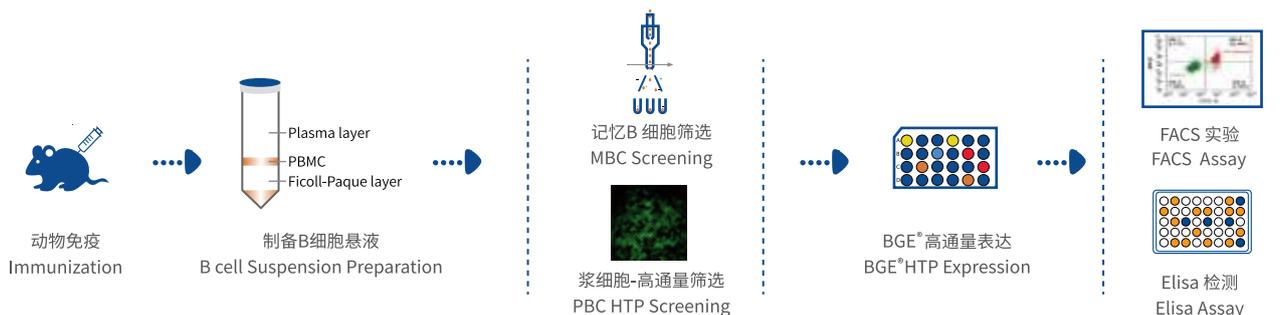
#### 平台优势

- 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')<sub>2</sub>、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

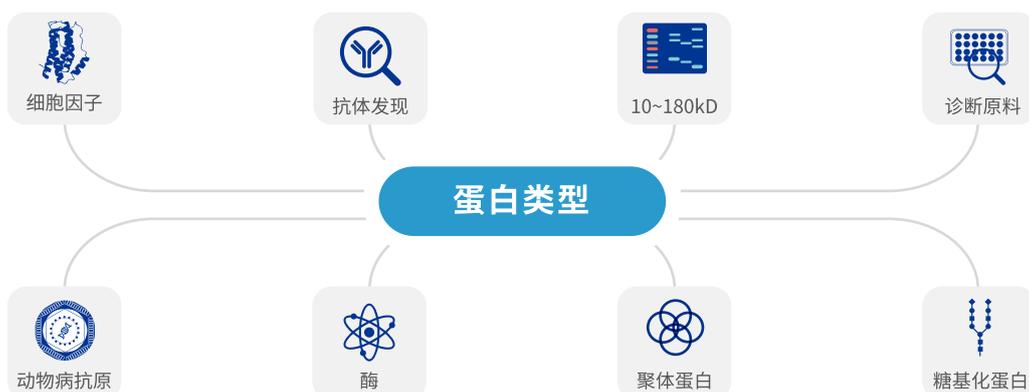


Recombinant Protein Expression Service

## 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。

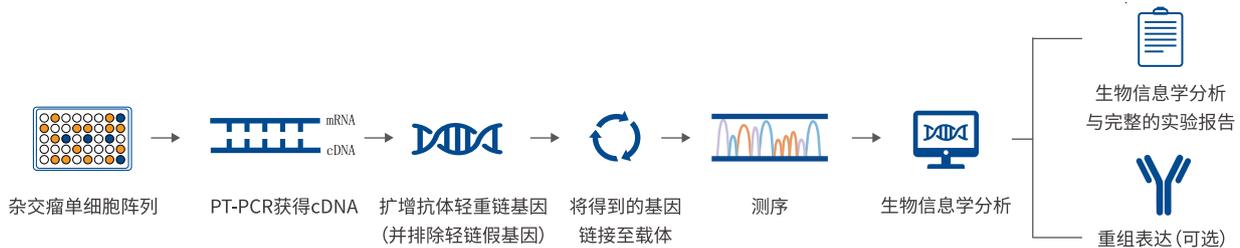
### 应用场景

- 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



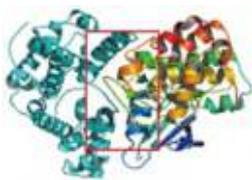
# 5

Biomolecular Interaction Analysis Service

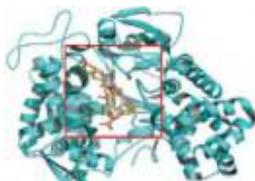
## 分子间相互作用检测

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。

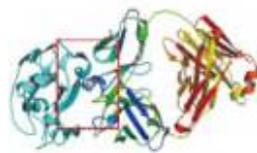
### 检测范围



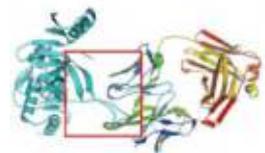
蛋白和蛋白



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

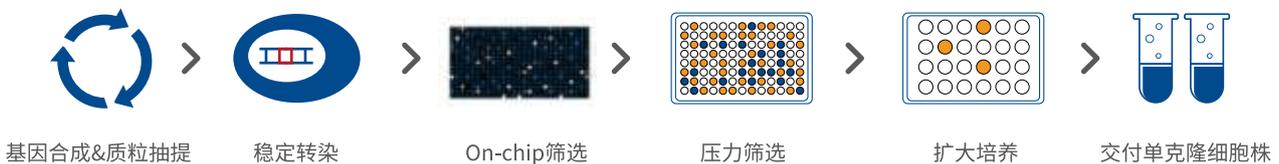
## 生产型稳转细胞株构建

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



### 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