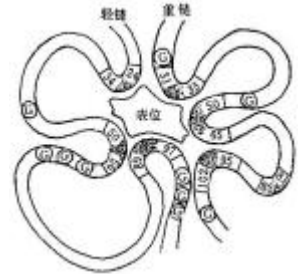


哺乳动物细胞重组抗体表达概述

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。



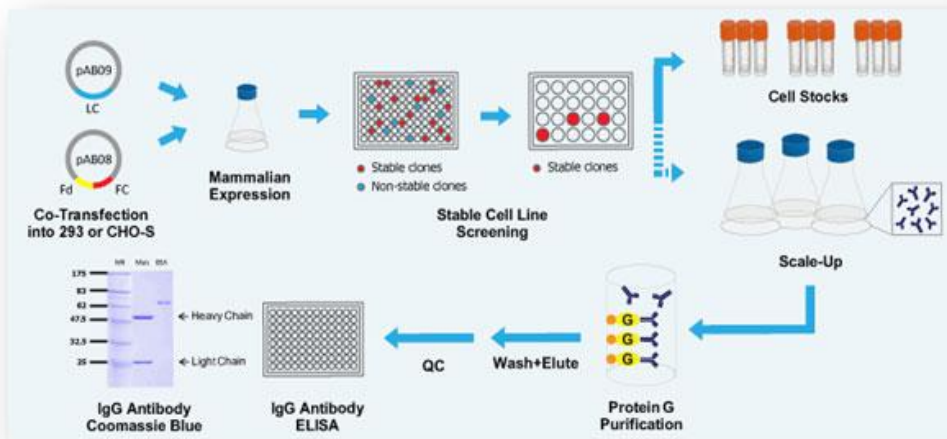
由多种 B 细胞产生,受到多种抗原决定簇刺激并可与多种抗原表位结合的抗体称为多

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。

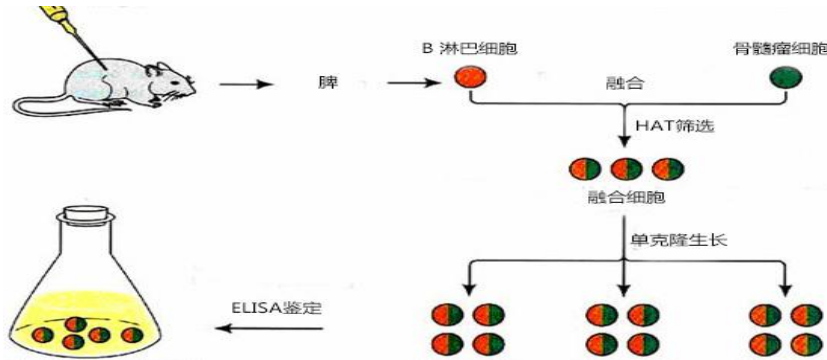
重组抗体和免疫抗体制备

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。

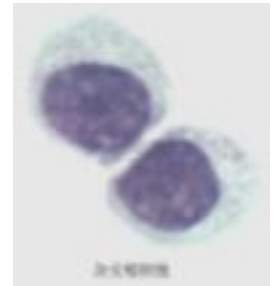
②未知序列的抗体大量生产，先刺激动物免疫系统得到少量抗体通过测序得到抗体序列，通过哺乳动物细胞重组抗体表达筛选稳定表达的细胞系，满足大量生产需求。

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。

