

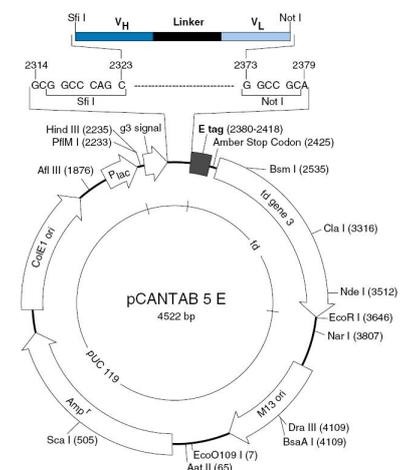
## 噬菌体表面展示制备 scFv

单链抗体 (scFv) 是由抗体重、轻链的可变区基因通过一段编码约 5-25 个 AA 的连接肽基因 (linker) 拼接后表达形成的重组蛋白。scFv 具有分子量小、组织穿透力强、体内循环半衰期短、免疫原性低、易于进行基因工程改进等优点, 在疾病临床诊断、治疗、预防等方面具有重要作用。利用[噬菌体展示技术](#), 可以制备得到高亲和力、结构稳定的 scFv 抗体。本文对常用的 scFv 噬菌体展示系统及 scFv 噬菌体抗体库构建筛选做一介绍。

### pCANTAB 5E 噬菌体展示系统

人们利用噬菌体展示技术制备 scFv 噬菌体抗体库, 经噬菌体抗体库筛选得到的噬菌体抗体通常具有较高的稳定性。pCANTAB 5E 噬菌体展示系统是 scfv 噬菌体表面展示最常用的系统, 该系统由噬菌粒载体 (pCANTAB 5E)、宿主菌 (大肠杆菌 TG1、HB2151 等)、辅助噬菌体 M13K07 等部分组成。

**噬菌粒载体:** pCANTAB 5E 是 scFv 噬菌体表面展示最常用的噬菌粒载体, 大小为 4522bp, 具体图谱及酶切位点如右所示:



**宿主菌:** pCANTAB 5E 系统中宿主菌有大肠杆菌 TG1 及大肠杆菌 HB2151 两种, 噬菌粒侵染两种宿主菌会得到两种不同的产物, 侵染大肠杆菌 TG1 最终可得到 scfv-pIII 融合蛋白, 侵染大肠杆菌 HB2151 最终可得到可溶性的 scFv 蛋白。原因是在噬菌粒载体的目的基因插入位点末端有一段 E-Tag 短肽, 短肽后有琥珀终止密码子, TG1 菌株对琥珀终止密码子具有抑制性, 蛋白翻译可通过琥珀终止密码继续翻译下游的 PIII 基因, 最终产生 scfv-pIII 融合蛋白, HB2151 为非抑制株大肠杆菌, 蛋白的合成在 ScFv 基因后即停止, 最终会得到可溶性的 scFv 蛋白。

**辅助噬菌体:** M13K07 辅助噬菌体是 pCANTAB 5E 噬菌体展示系统的重要组成部分。噬菌体转入宿主细胞后想要顺利传代必须要有辅助噬菌体的参与。

### scFv 噬菌体抗体库构建及筛选

#### 1. 制备 scFv 基因库

收集目标抗体宿主的免疫细胞 (B 淋巴细胞、致敏 B 淋巴细胞、非致敏 B 淋巴细胞等), 提取总 RNA, 经 RT-PCR 分别扩增出抗体的 VH 和 VL 编码基因, 纯化回收 VH 和 VL 片段, 使用 Linker 引物将全套 VH 和 VL 基因随机拼接成 scFv 基因库。

VH 和 VL 的拼接方法目前有两种:

- 将 Linker 设计在表达载体上,两端各有限制性内切酶酶切位点供 VH 和 VL 插入;
- 把 Linker 的编码序列分别设计在扩增 VH 和 VL 引物中,用 PCR 直接合成 ScFv 基因 :VH 和 VL 通过 Linker 互补序列,互为引物及模板合成完整的 ScFv 基因,再以两端的引物进行 PCR 扩增得到大量的 ScFv 基因产物。该方法被称为重叠延伸拼接法( splicing by overlap extension,SOE)

## 2. 将 scFv 基因转入噬菌体

将 scFv 基因转入噬菌体内,可以直接将 scFv 基因转到噬菌体基因上,也可以将 scFv 基因转入噬菌粒载体中。通常直接将 scFv 基因转入噬菌体体内的效率很低,比较常用的是第二种方式,将 scFv 基因连接至 pCANTAB 5E 载体上,构建噬菌粒。

## 3. 侵染宿主菌

噬菌粒构建完成后,便可进行宿主菌的侵染。宿主菌有大肠杆菌 TG1 及大肠杆菌 HB2151 两种,如果宿主为 TG1,最终得到 scfv-pIII 融合蛋白,并展示在噬菌体表面。如果宿主为 HB2151,最终得到 scFv 蛋白,ScFv 蛋白被排到细胞周质空间,因为缺少 pIII 基因结构域而不能连接到噬菌粒颗粒上,经扩大培养可溶性抗体片段在周质空间积累并溢至培养液中。

噬菌粒转入宿主菌后,可在宿主菌体内自我复制,但由于缺少必要的功能基因,噬菌粒无法合成单链 DNA、无法进行传代。为了使噬菌体顺利传代,在宿主菌生长至对数生长期后,需要进行辅助噬菌体超染。辅助噬菌体可以为噬菌粒提供必要的功能基因(pII 蛋白、包装蛋白等),促使质粒合成单链 DNA 并完成传代。( [辅助噬菌体工作原理](#) )

## 4. 获得 scFv 抗体库

辅助噬菌体超染宿主菌后,噬菌体开始传代并裂解宿主菌,培养过夜离心收集上清即可获得噬菌体 scFv 抗体库;

## 5. 筛选噬菌体抗体库,得到高亲和力的 scFv

以靶蛋白为固定相,以抗体库为流动相,经过一段时间的共同孵育后,洗去未结合的游离噬菌体,然后以竞争受体洗脱下与靶分子结合吸附的噬菌体,洗脱的噬菌体感染宿主菌后经繁殖扩增,进行下一轮洗脱,经过 3 轮~5 轮的“吸附-洗脱-扩增”后,即可筛选出与靶蛋白具有高亲和性且结构稳定的 scFv 蛋白。

## 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。

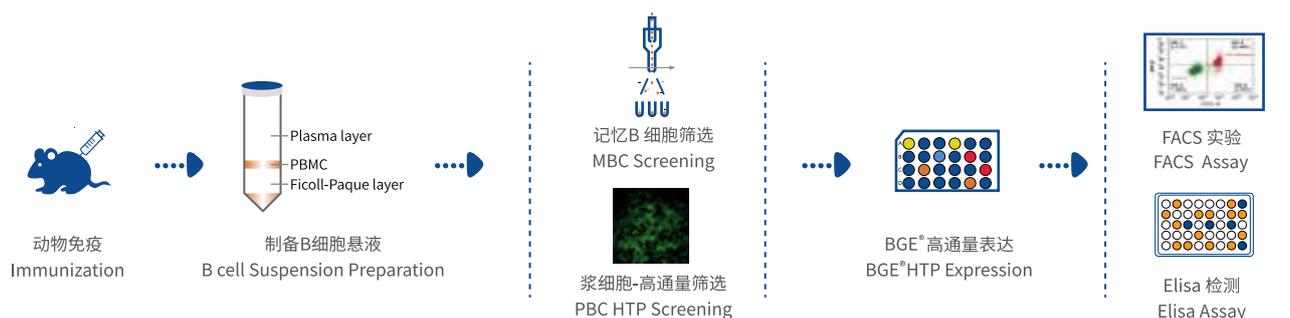
#### 平台优势

- 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

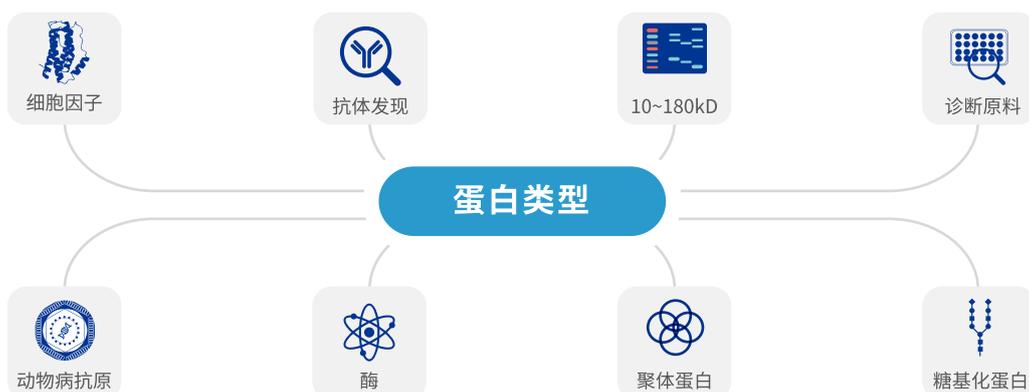


Recombinant Protein Expression Service

## 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。

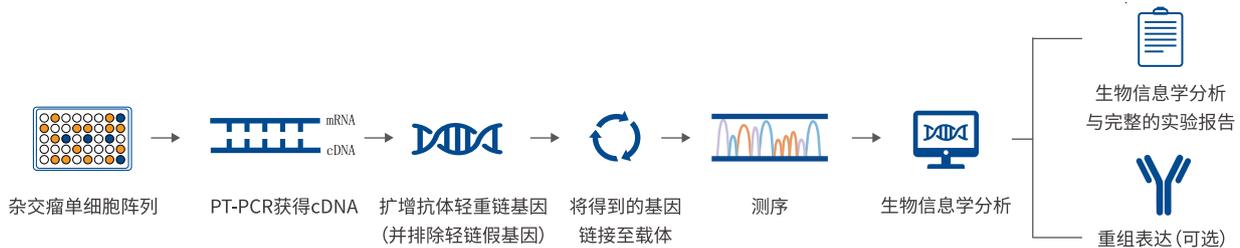
### 应用场景

- 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



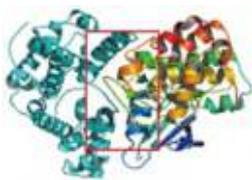
# 5

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。

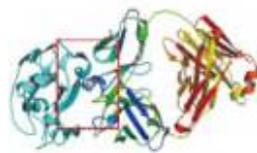
### 检测范围



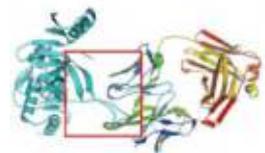
蛋白和蛋白



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



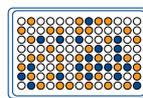
基因合成&质粒抽提



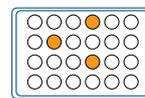
稳定转染



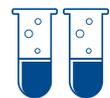
On-chip筛选



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