

---

## 重组抗体表达实验

1. 案例概述	2
2. 实验设计	2
3. 密码子优化	2
4. 基因合成与测序验证	3
5. 质粒酶切	3
6. 转染级质粒制备	4
6.1. 质粒扩增	4
6.2. 质粒抽提	4
7. 瞬时转染	5
8. 抗体 Protein A 亲和纯化	5
9. 其他种类重组抗体的表达纯化	6
10. 服务网址	8

德泰生物拥有自建的 cGMP 标准的百级洁净细胞房，重组抗体表达经验丰富，成功率高。德泰自主研发的密码子优化软件 MaxCodon™，可以对抗体的基因序列进行优化，提高重组抗体的表达效率。我们的重组抗体表达量高达毫克至克级。为了保障消费者的权益，德泰生物推出了保证型重组抗体表达服务，承诺不成功不收费。如果制备的抗体达不到交付标准，就免收包括基因合成在内的所有费用。

## 1. 案例概述

某客户在表达纯化重组抗体过程中，遇到了抗体不表达的问题。在接手项目之后，公司根据以往的经验，同时查阅了大量文献资料，制定详细可靠的实验方案，最终交付客户高质量的重组抗体。

## 2. 实验设计

以 MaxCodon™ 软件对抗体的基因序列进行分析优化，全基因合成后，将抗体轻链重链基因分别插入到高表达载体 proEM 中。酶切以及测序进行验证，确认插入成功之后，将含有目的基因的载体转到克隆菌株 DH5a 中。扩增之后抽提质粒，去除内毒素，得到转染级质粒。把质粒转到哺乳动物细胞 CHO 中进行瞬时表达，最后利用 Protein A 亲和层析纯化重组抗体蛋白。

## 3. 密码子优化

CAI (密码子适应指数)，可以用来预测外源基因的表达水平，优化 CAI 能够提高蛋白质表达效率。MaxCodon™ 用同义密码子替换作为手段，以使用频率更高的同义密码子替换掉稀有密码子。在提高 CAI (密码子适应指数) 同时，软件还对 mRNA 二级结构进行预测，减少 mRNA 二级结构数量 (详细过程见密码子优化案例)。

分析客户提供的抗体序列后发现，其密码子与宿主细胞密码子的使用偏性相差不大，CAI 为 0.84，但 mRNA 二级结构较多，在优化其基因序列，减少其 mRNA 二级结构数量之后，进行下一步基因合成。

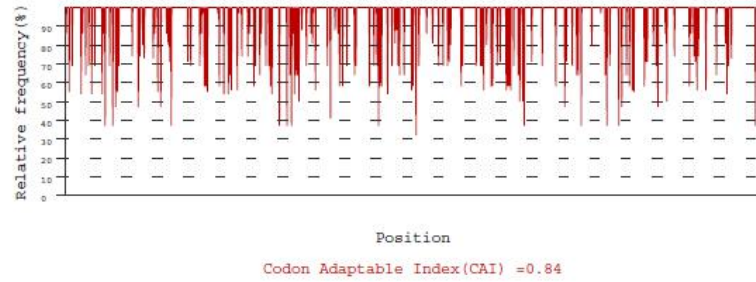


图 3-1 原始序列 CAI 计算结果

#### 4. 基因合成与测序验证

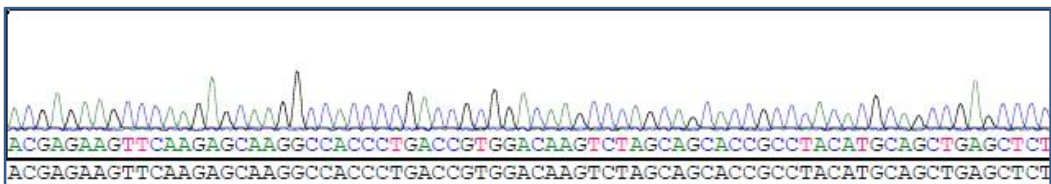


图 4-1 测序结果

#### 5. 质粒酶切

将目的基因插入到表达载体以后，双酶切验证质粒载体中是否存在目的基因，确认之后再行下一步实验。

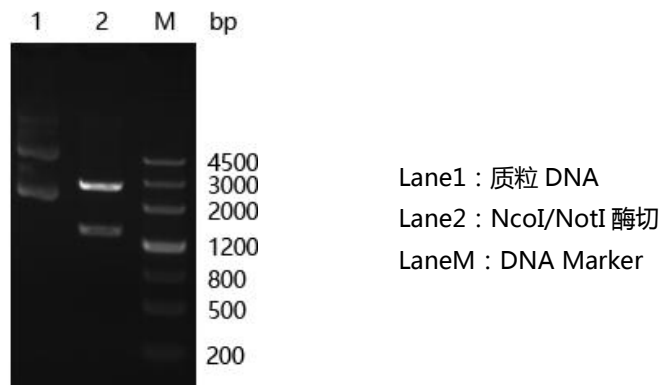


图 5-1 重链质粒酶切

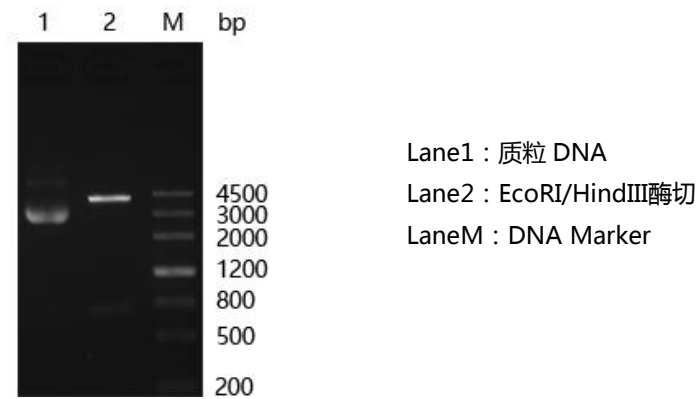


图 5-2 轻链质粒酶切

## 6. 转染级质粒制备

### 6.1. 质粒扩增

冻干的质粒离心后用 TE 复溶。分别吸取抗体的轻重链表达质粒，与 DH5a 感受态细胞混合，冰浴静置，水浴锅中热激 90s，再次冰浴静置，加入 LB 液体培养基，摇床培养。培养后离心，留取部分上清，重悬沉淀，取悬液涂在含有氨苄抗性的平板上，培养箱培养。从培养板上挑取单克隆到 LB 培养基中，培养 8h 后按比例接种到培养基中，相同条件下培养 16h。

### 6.2. 质粒抽提

试剂盒抽提质粒，由于细菌中的内毒素会对哺乳动物细胞造成伤害，抽提过程中需要去除内毒素。质粒抽提完成之后，1%琼脂糖凝胶分析质粒 DNA 的质量，鲎试剂检测质粒的内毒素水平。

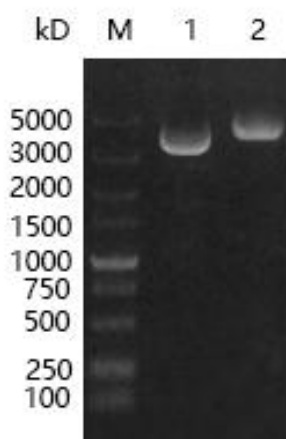


图 7-1 琼脂糖凝胶分析抽提质粒

Lane M: DNA marker

Lane 1: 转染级轻链质粒

Lane 2: 转染级重链质粒

图 6-1 质粒电泳结果

检测内容	转染级质粒标准	Light Chain 质粒检测结果	Heavy Chain 质粒检测结果
A260/A280	1.8-2.0	1.93	1.92
内毒素	内毒素 < 0.05EU/ug	鲎试剂检测， 内毒素 < 0.05EU/ug	鲎试剂检测， 内毒素 < 0.05EU/ug
无菌检测	无菌	LB 平板检测，无菌落	LB 平板检测，无菌落

表 6-1 转染级质粒 DNA 质粒质量测定

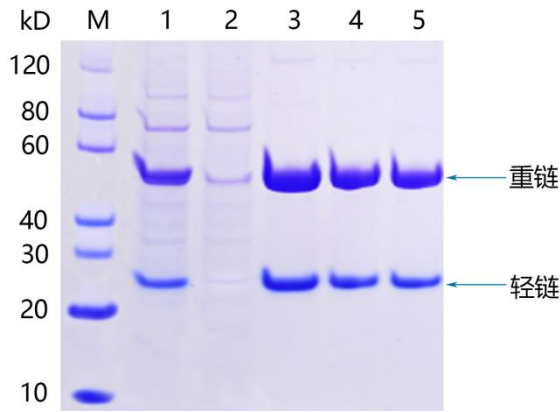
## 7. 瞬时转染

转染前 2 天，将悬浮培养至 1L 的细胞，置于培养箱中培养。转染试剂与待转染细胞混合，放入培养箱中培养，约 5-6 天后，取出细胞培养物，离心，收集上清。

## 8. 抗体 Protein A 亲和纯化

取转染培养 6 天后的细胞培养液离心，收集上清液用膜过滤，将过滤后的上清液透析，SDS-PAGE 电泳检

测得到的流出液，缓冲液 PBS 过柱冲洗。最后用浓度 0.1M 甘氨酸溶液，pH 3.0 条件下洗脱。收集洗脱样品，SDS-PAGE 电泳检测纯化后的抗体。



重组抗体表达纯化检测结果

Lane M: SDS-PAGE Protein Marker

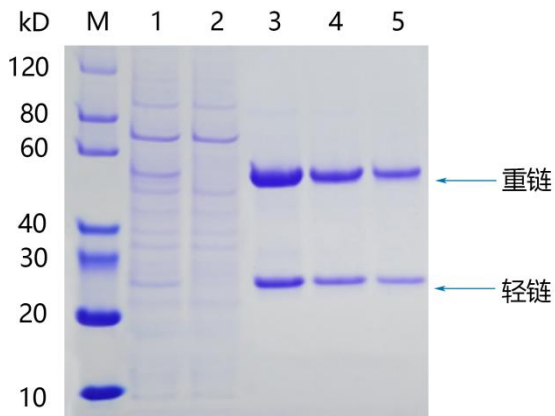
Lane 1: 细胞培养上清

Lane 2: 流出液

Lane 3-5: 洗脱组分

图 8-1 重组抗体表达纯化

## 9. 其他种类重组抗体的表达纯化



全长抗体表达纯化

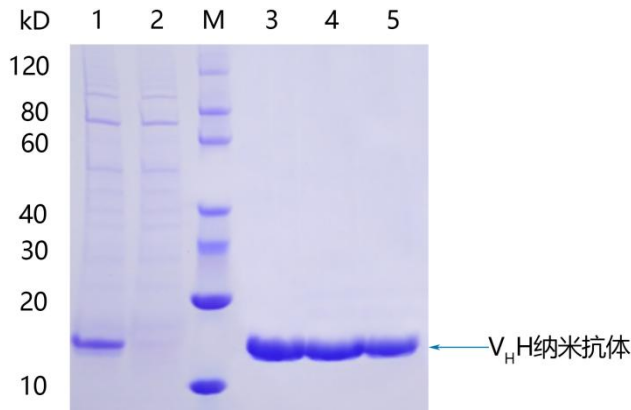
Lane M: SDS-PAGE Protein Marker

Lane 1: 细胞培养上清

Lane 2: 流出液

Lane 3-5: 洗脱组分

图 9-1 全长抗体表达纯化



VHH 纳米抗体表达纯化

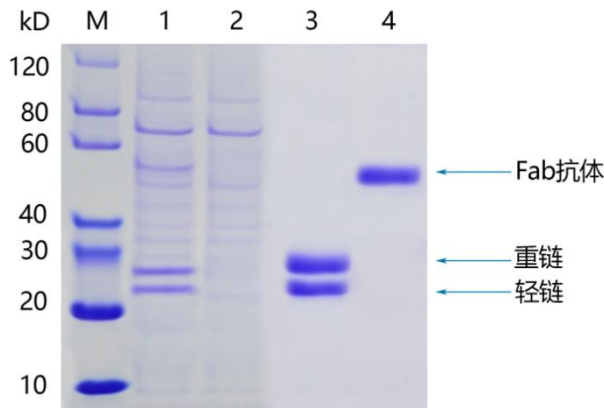
Lane M: SDS-PAGE Protein Marker

Lane 1: 细胞培养上清

Lane 2: 流出液

Lane 3-5: 洗脱组分

图 9-2 VHH 纳米抗体表达纯化



Fab 抗体表达纯化

Lane M: SDS-PAGE Protein Marker

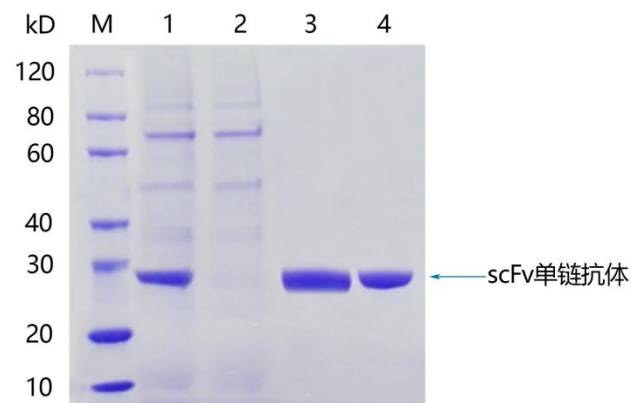
Lane 1: 细胞培养上清

Lane 2: 流出液

Lane 3: 洗脱组分 (还原)

Lane 4: 洗脱组分 (非还原)

图 9-3 Fab 抗体表达纯化



scFV 单链抗体表达纯化

Lane M: SDS-PAGE Protein Marker

Lane 1: 细胞培养上清

Lane 2: 流出液

Lane 3-4: 洗脱组分

图 9-4 scFV 单链抗体表达纯化

## 10. 服务网址

[www.detaibio.com/mammalian-cell-recombinant-antibody.html](http://www.detaibio.com/mammalian-cell-recombinant-antibody.html)