

抗体制备

From Gene To Antibody

普健生物（武汉）科技有限公司

陈青

AtaGenix Laboratories





蛋白重组表达

XtenCHO高密度表达系统

昆虫杆状病毒表达系统

稳定细胞株构建

抗体定制服务

兔单克隆抗体制备

纳米抗体制备

抗体对开发

重组抗体表达

嵌合抗体生产

抗体片段生产

大规模重组抗体生产

抗体药物开发

人源化抗体

双特异性抗体

抗独特型抗体

普健生物（武汉）科技有限公司

始于2012，一站式抗体发现整体解决方案

3551光谷人才计划

——2013年

高新技术企业

——2017年

光谷瞪羚企业

——2018年

武汉国家生物产业基地
抗体发现与筛选公共服务平台

——2022年

目录

| CONTENTS |

-01-

普健生物抗体开发平台概况



-02-

单克隆抗体制备



-03-

多克隆抗体制备



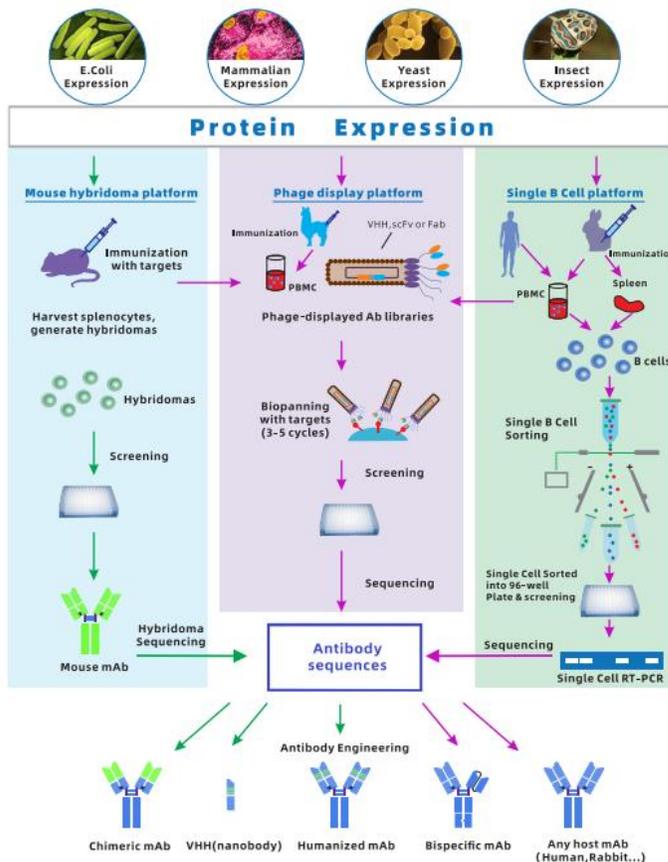
-04-

抗体开发一站式服务





抗体发现与筛选平台



核心技术

蛋白开发平台

大肠杆菌可溶性蛋白表达体系
 Xten™系列高效哺乳动物细胞表达体系
 MHC多肽复合物表达体系
 多聚体定向表达体系
 大蛋白/跨膜蛋白表达体系

抗体发现平台

Xten™ Mab Single B cell 筛选技术
 千亿级纳米抗体库
 噬菌体建库&多种筛选方案
 杂交瘤电融合技术
 IF/IHC/FC/Func/化学发光等筛选平台

重组抗体表达平台

自主改造专用pATX系列表达载体
 自主改造XtenCHO™细胞
 高密度转染技术

抗体工程平台

抗体工程分子建模及抗体人源化设计
 双特异性抗体设计
 稳转平台：独有pATX-GS系列表达载体及GS敲除细胞系

01

单克隆抗体-杂交瘤技术



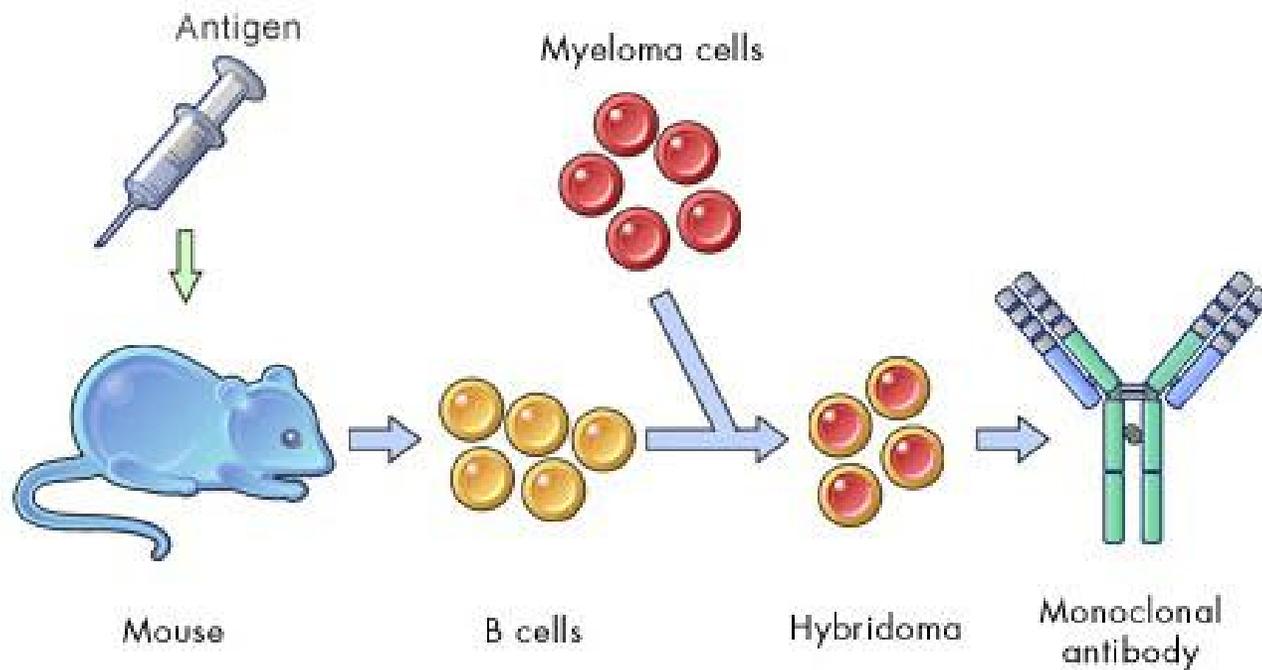
一、单克隆抗体概念

单克隆抗体的概念：单克隆抗体是指由单一B 细胞克隆产生只识别单一抗原表位的抗体。该类抗体氨基酸序列一致，高度专一，易于纯化，可用于免疫学检测和特异性治疗等各个方面。传统的单克隆抗体生产主要通过B 细胞杂交瘤技术产生，随着现代生物技术的发展，噬菌体展示技术、人源抗体转基因小鼠、单B细胞抗体技术等多种技术可产生单克隆抗体的制备。



二、杂交瘤技术

杂交瘤技术：是一种将B细胞与骨髓瘤细胞融合生产小鼠单克隆抗体的传统方法，是目前应用最广泛的单克隆生产技术。在这种技术中，首先收集免疫小鼠的B淋巴细胞，并将其与BALB/c小鼠骨髓瘤细胞融合，从而形成永生化的杂交瘤细胞。然后筛选杂交瘤细胞，鉴定出能生产特异性抗体的单克隆细胞株。



三、单克隆抗体制备的基本流程



动物免疫

免疫动物是用目的抗原免疫小鼠，使小鼠产生致敏B淋巴细胞的过程。一般选用6-8周龄雌性Balb/c小鼠，按照预先制定的免疫方案进行免疫注射。抗原通过血液循环或淋巴循环进入外周免疫器官，刺激相应B淋巴细胞克隆，使其活化、增殖，并分化成为致敏B淋巴细胞。



细胞融合

PEG改变细胞的膜结构，使两细胞相互接触部位的膜脂双层中磷脂分子发生疏散、进而使其结构发生重排，再加上膜脂双层的相互亲合以及彼此间表面张力的作用，引起相临的重排质膜在修复时相互合并在一起，使两细胞的胞质沟通，从而造成相互接触的细胞之间发生融合

细胞电融合主要是利用一种一定值的频率、电压的交流电场，使处于一定间隔的，平行的两电极间的原生质体排列成串珠状。再利用一定值的高压直流脉冲电场对细胞膜造成可逆击穿，从而诱导相互接触的细胞发生融合。



杂交瘤筛选与克隆化

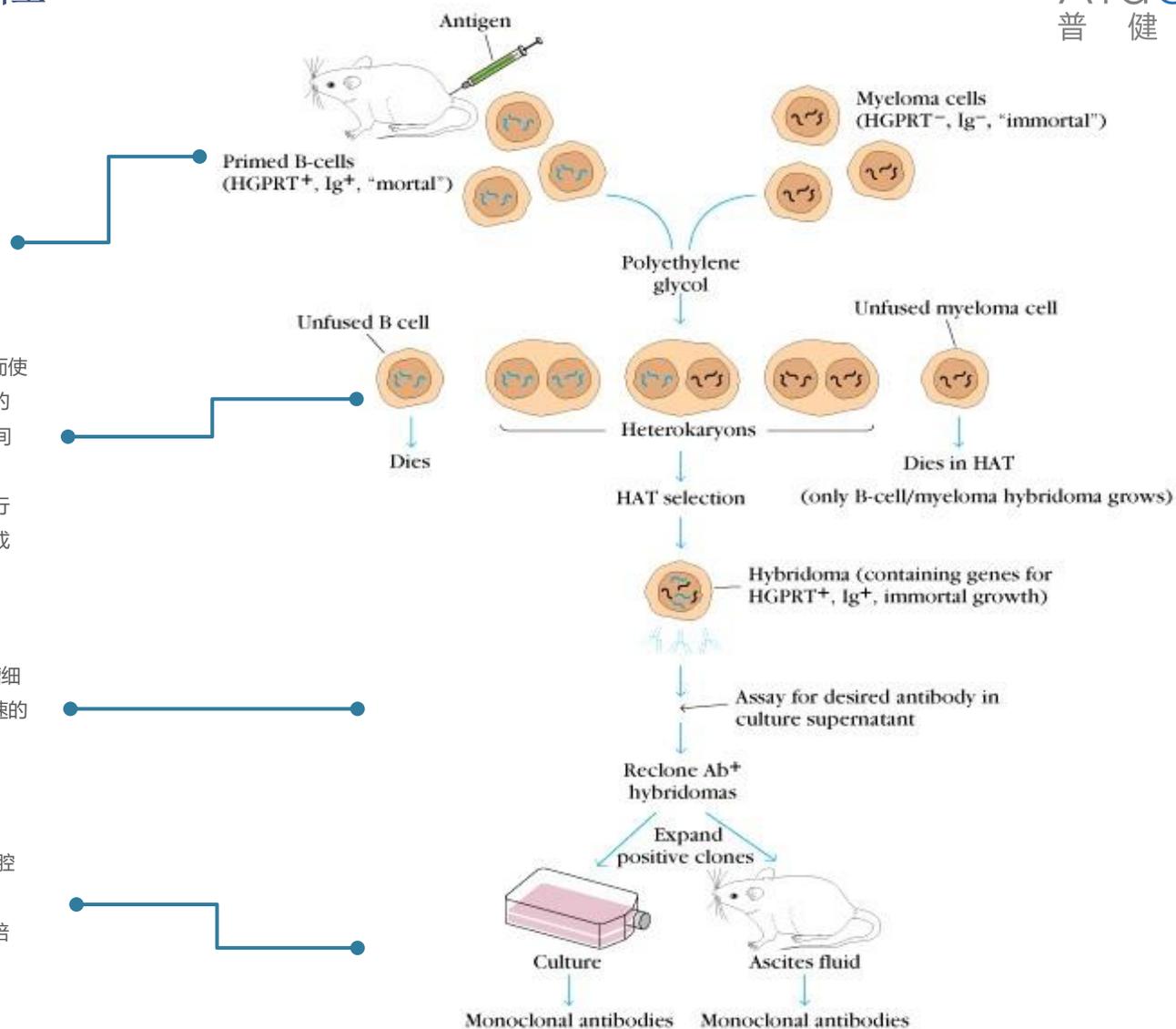
融合细胞经过 HAT 培养后，最终能长出来的就都是杂交瘤细胞了，但是这些杂交瘤细胞中也分很多种，有的是不分泌抗体的，有的分泌抗体，我们需要的杂交瘤细胞快速的检测并分离的过程就叫杂交瘤细胞的筛选与克隆化。



抗体的大量制备

小鼠腹水诱生法就是将杂交瘤细胞注入到预处理后的小鼠腹腔，一段时间后小鼠腹腔就会长出大量腹水，腹水中含有高浓度的抗体。

另一种方法是体外发酵培养法，就是将杂交瘤细胞驯化后在发酵罐中高密度培养，培养一段时间后，培养基中就含有大量的抗体了。





细胞融合

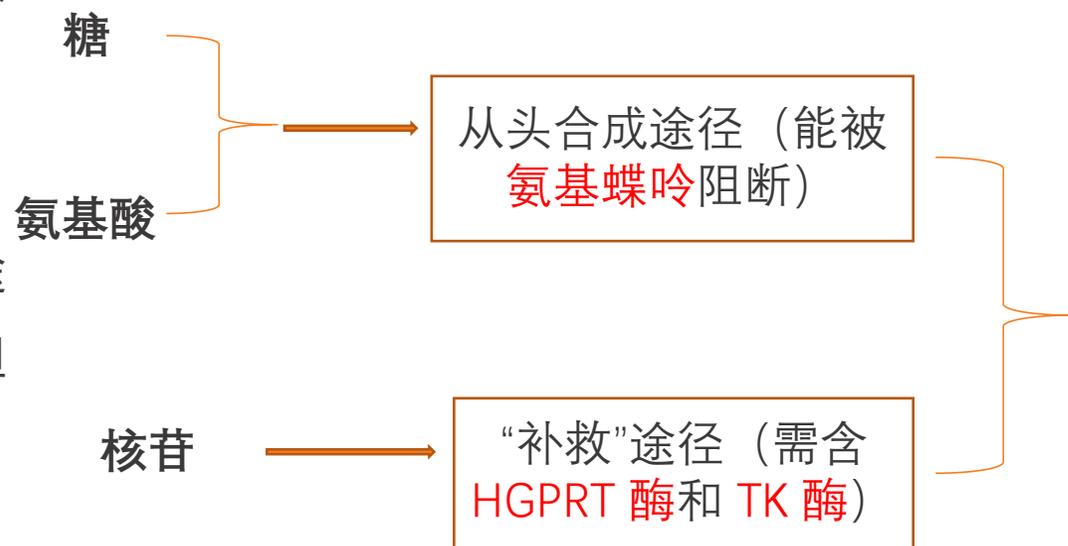
融合方法	PEG, 聚乙二醇	电融合
优点	一次能操作大量细胞进行融合, 成本较低。	融合率高, 实验由程序控制, 稳定。
缺点	需要人手工操作, 实验误差较大, 融合率低。	设备昂贵



杂交瘤筛选原理

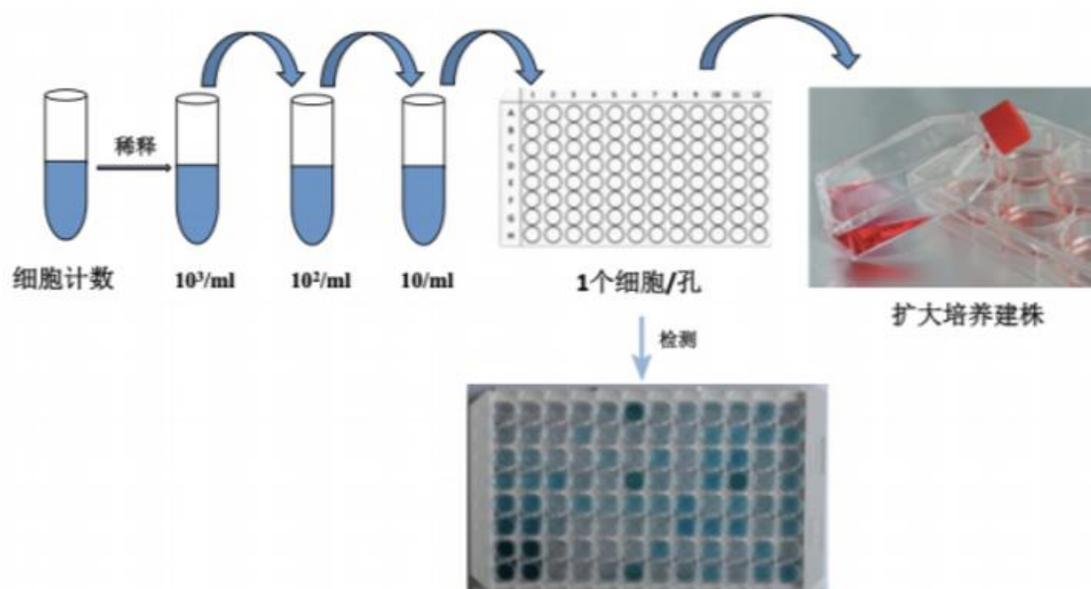
➤➤➤ 哺乳动物细胞 DNA 的合成途径有两条，一是从头合成途径，一是补救途径。

➤➤➤ 在氨基蝶呤 A 存在的情况下，DNA 从头合成途径被阻断，细胞只能以补救途径合成 DNA。但是走补救途径需要两个特殊的酶，就是 HGPRT 酶和 TK 酶，由于我们选择的骨髓瘤细胞缺乏 HGPRT 酶，补救途径也走不通，因此在氨基蝶呤 A 存在的情况下未融合骨髓瘤细胞只有死亡。



杂交瘤筛选与克隆化

有限稀释法就是将细胞计数后逐级稀释，直到将该浓度的细胞铺在 96 孔板里后，每个孔中就只有一个细胞就行了。将 96 孔板里的细胞培养一段时间后，用 ELISA 检测上清，如果是阳性，就表示该细胞克隆是阳性克隆，细胞扩大后就可以用于抗体生产了。一般来说，为充分保证所选细胞的纯度，需要连续进行 2~3 次克隆化后，所选细胞才会用于扩大生产抗体。





02

多 克 隆 抗 体

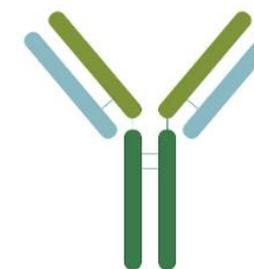
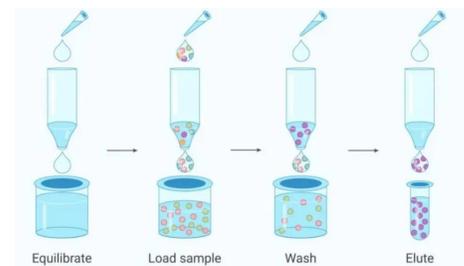
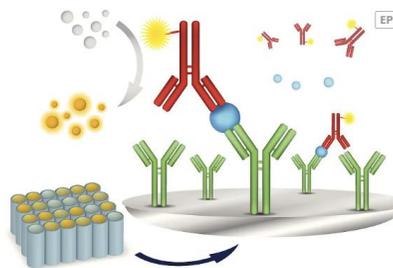
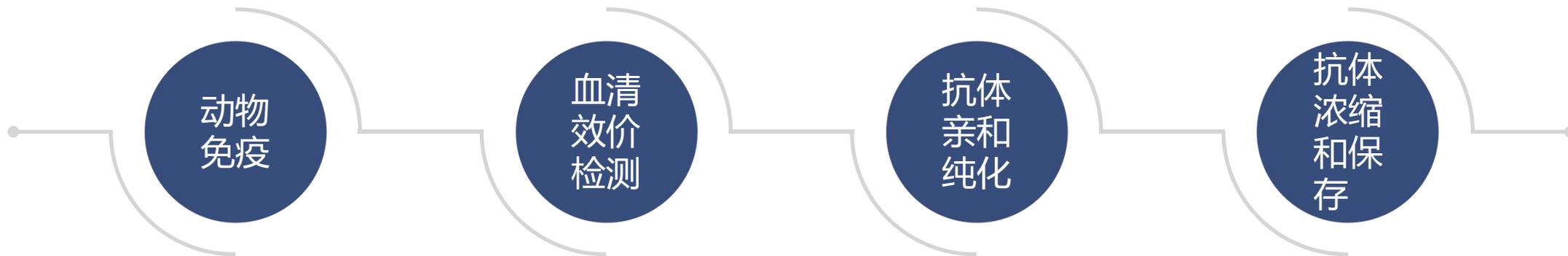


一、多克隆抗体基本原理

多克隆抗体是指由多个B 细胞克隆产生的抗体，可识别多种抗原表位，是一组单克隆抗体混合的产物，可直接由抗原免疫获得。多克隆抗体主要存在于免疫后的机体血清中，又称抗血清。由于这种抗体是针对多种抗原表位的，所以特异性不高，其应用也受到一定的限制。



二、多克隆抗体制备的基本流程





动物免疫

1

免疫动物的选择：抗原来源与动物种属的关系:抗原的来源与免疫动物种免疫源性越强,免疫效果越好,而同种系或亲缘关系越近,免疫效果越差。

2

动物个体的选择：适龄、健康、体重符合要求的正常动物(以雄性为佳) ;抗体需要量少时,选用家兔、豚鼠和鸡等小动物;抗体需要量大时,可选用绵羊、山羊、马、驴等大动物。



血清效价检测

- **酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上, 利用抗原抗体特异性结合进行免疫反应的定性和定量检测方法。**
- 将抗原或抗体吸附到固相载体上。
- 加入待检样品以及后续试剂。
- 温育。
- 洗涤去掉游离未结合的反应物。
- 加入酶检测底物。
- 结果的判读。



IgG类抗体纯化：

对于IgG的纯化，大部分情况下我们都会选择使用Protein A或Protein G进行亲和层析。因为它们对于IgG的Fc段具有特异性的亲和作用，而对于其他杂蛋白没有或者只有很弱的结合。

特异性抗体纯化：

利用抗原为配体的亲和纯化被称之为抗原亲和纯化，是一种高度纯化蛋白类生物大分子的有效手段。使用这种方法，抗原将替代亲和配体，被化学偶联在凝胶介质上。目标抗体将特异性结合抗原，最终洗脱获得目标抗体。



抗体保存

4°C保存 (6个月)

低温保存 (-70°C~-20°C, 5年)

真空干燥保存 (5~10年)

注意事项:

- 1, 保存需要过滤除菌
- 2, 保存液含防腐剂
- 3, 避免反复冻融 (分装)



多克隆抗体

制备成本低廉

制备速度较快

产生大量的非特异性抗体

识别任一抗原上的多个表位

批次间可能存在差异

单克隆抗体

制备成本高

需要较长的时间制备杂交瘤细胞

产生大量的特异性抗体

仅识别一个抗原上的单一表位

制备的杂交瘤细胞为持续且可再生的单克隆抗体来源，
批次间差异较小



抗体开发下游平台



抗体质检平台

SPR分子互作分析平台、SEC-HPLC检测平台、DSF热稳定性分析、流式分析平台及体外药效检测平台。

稳转细胞株

CHO/GS 筛选平台，抗体稳转细胞株开发工艺成熟稳定

人源化抗体

由专家团队进行人源化序列设计（有上市抗体药物设计经验）

抗体表达

自主开发的XtenCHO抗体表达系统，既可以实现高通量表达，又可以进行放大生成。

谢 谢 观 看！

网址：www.atagenix.cn

邮箱：Sales@atagenix.com

武汉市东湖新技术开发区神墩四路666号C栋

