基于流式技术的哺乳动物细胞抗体进化平台的构建

Establishment of Mammalian Cell Platforms for Antibody Evolution Based on Flow Cytometry

安莉莉, 陈川, 罗蕊琪, 赵云, 杭海英*

蛋白质与多肽药物所重点实验室, 蛋白质与多肽药物所重点实验室, 北京

* 通讯作者邮箱: hh91@sun5.ibp.ac.cn

引用格式: 安莉莉, 陈川, 罗蕊琪, 赵云, 杭海英. (2019). 基于流式技术的哺乳动物细胞抗体进化平台的构建. *Bio-101* e1010336. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010336.

How to cite: An, L. L., Chen, C., Luo, R. Q., Zhao, Y. and Hang, H. Y. (2019). Establishment of Mammalian Cell Platforms for Antibody Evolution Based on Flow Cytometry. *Bio-101* e1010336. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010336. (in Chinese)

摘要: 活化诱导的胞嘧啶脱氨基酶 (activation induced deaminase, AID) 可引发 B 细胞抗体基因的高频突变 (SHM), 是 B 细胞内抗体多样性产生的一个重要机制。研究发现, 在细菌或非 B 细胞 (成纤维细胞, H1299 细胞等) 中过表达 AID, 也可导致高表达基因产生高频的 SHM 样突变。基于 AID 基因这一作用特点, 结合流式细胞分选技术的应用, 研究者建立了哺乳动物细胞抗体展示与体细胞高频突变结合的抗体进化平台, 用于抗体或蛋白的优化。为建立这一平台, 我们实验室构建了一株 CHO 细胞克隆 (CHO-puro 细胞), 该细胞株在染色体特定位点嵌入了单一的基因表达框, 基因框外侧含有两个不同重组序列的 DNA, 便于快捷插入欲优化的抗体基因, 且该位点使得插入的抗体基因能够高水平和稳定地表达。我们将以抗 TNF α 抗体的亲和力优化为例, 详细介绍这一技术。首先, 我们将 TNF α 抗体基因插入上面所述的 CHO 细胞克隆单一的基因表达框中, 获得能够高水平且稳定展示 TNF α 抗体的 CHO 细胞株; 然后, 将 AID 表达质粒转入 CHO 细胞株, 使 TNF α 抗体基因发生突变, 随着细胞的增殖, 自然形成突变抗体库; 经过几轮的流式细胞分选-细胞增殖, 可获得具有更高亲和力的抗 TNF α 抗体突变体。该技术可用于获得具有更高亲和力, 特异性和稳定性的抗体, 以及基于细胞表面展示和生物大分子相互作用的其他蛋白特性的优化。

关键词: 活化诱导的胞嘧啶脱氨基酶, 体细胞高频突变, 抗体进化, 亲和力成熟

材料与试剂

1. 培养皿
2. 0.45 μm 滤膜
3. 抗 HA-PE 抗体 (Abcam, catalog number: ab72564)
4. T4 DNA 连接酶 (Thermo Scientific)
5. 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)
6. EcoRI
7. XhoI
8. 胎牛血清 (FCS, HyClone)
9. Anti-hFc (human Fc) kinetic grade biosensors (ForteBio, catalog number: 18-5060)
10. 细胞:
 - CHO/dhFr-细胞, 购自上海中国科学院细胞库
 - CHO-puro 细胞, 在染色体特定位点嵌入了单一的基因高表达框的 CHO/dhFr-细胞, 由杭海英实验室建立 (Chen 等, 2016)
 - FreeStyle™ MAX 293F 细胞, 购自 Invitrogen
11. 质粒:
 - PET28a (+) - GFP-TNF α , 用于大肠杆菌中表达 GFP-TNF α 蛋白
 - pF2AC, 用于在 CHO 细胞中共表达 Flpo 和 iCre 重组酶的质粒
 - pFAbL, 用于将抗体 (TNF α 抗体) 基因通过重组替换插入 CHO-puro 细胞基因组单一的基因表达框中
 - pCEP-Neo-mAID, 用于在 CHO 细胞中表达 mAID
 - pCEP4-scFv-hFC, 用于在 FreeStyle™ MAX 293F 细胞中表达 scFv-hFc 融合蛋白

以上为实验室已构建质粒, 详细请参考实验室已发表文章 (Chen 等, 2012 和 2016)
12. Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)
13. 0.1 mM 次黄嘌呤
14. 0.016 mM 胸苷 (HT, Gibco)

15. PBS
16. 异丙醇
17. 胰蛋白胨
18. 酵母提取物
19. 卡那霉素
20. 氯化钠
21. 苯乙磺酰氟 (PMSF)
22. Tris-Cl
23. 甘油
24. 咪唑
25. 新霉素
26. Bradford 蛋白质检测试剂盒 (Bio-Rad)
27. Ni Sepharose High Performance column (Amersham Biosciences)
28. 线性聚乙烯亚胺 25,000 (PEI) (Polysciences)
29. Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM, HyClone)
30. Free-Style™ 293 表达培养基 (Invitrogen)
31. Opti-MEM® I 减血清培养基 (Gibco)
32. OptiPRO™ SFM 无血清培养基 (Gibco)
33. Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega)
34. Phusion 高保真 PCR 试剂盒 (NEB)
35. AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit (Axygen)
36. LB 培养基 (见溶液配方)
37. 50 mg/ml 卡那霉素 (见溶液配方)
38. 100 mM 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) (见溶液配方)
39. 100 mM 苯基甲磺酰氟 (PMSF) (见溶液配方)
40. 结合缓冲液 (见溶液配方)
41. IMDM 完全培养液 (见溶液配方)
42. 100 mg/ml 新霉素 (见溶液配方)

仪器设备

1. 超声仪 (南京鑫辰生物科技有限公司)
2. 恒温振荡培养箱 (HZQ-X100)
3. Steri-Cycle CO₂ 培养箱 (Thermo)
4. Shaker-Incubator Lab-Therm / LT-XC (Kuhner, 瑞士)
5. FACSCalibur (BD)
6. FACS Aria™ IIIu (BD)
7. S1000™ 热循环仪 (Bio-Rad)
8. CHB-100 恒温金属浴 (Bioer)
9. Nanodrop ND-1000 分光光度计 (Thermo Scientific)
10. Octet 生物分子相互作用技术平台 (ForteBio Octet, USA)
11. 离心机

实验步骤

首先, 我们通过重组替换获得能够稳定高水平展示抗 TNF α 抗体的 CHO 细胞株; 然后, 将 AID 表达质粒转染入该细胞株, 使抗 TNF α 抗体基因发生突变; 经过几轮的流式细胞分选-细胞增殖, 可获得具有更高亲和力的 TNF α 抗体突变体 (Chen 等, 2016)。

1. 表达和纯化 GFP-TNF α 抗原

GFP-TNF α 融合蛋白将被用于抗 TNF α 抗体的筛选 (见注意事项 1)。

1.1 将带有 His-GFP-TNF α 表达质粒的 Rosetta 单菌落挑入 5 ml LB 培养基, 加 50 μ g/ml 卡那霉素, 37 °C, 200 rpm 振荡过夜。

1.2 取 2 ml 过夜活化菌至 200 ml 新鲜 LB 培养基中, 加 50 μ g/ml 卡那霉素, 37 °C, 200 rpm 振荡至菌液 OD₆₀₀ 达到 0.5~0.6。

1.3 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mM, 16 °C, 200 rpm 振荡 11 小时。

1.4 菌液 2,600 $\times$ g 离心 10 分钟, 弃上清, 收获细菌。

1.5 将菌体重悬于 4 °C 预冷的含有 2 mM PMSF 的 10 ml PBS 中。

1.6 4 °C 超声破碎, 16,000 $\times$ g 离心 30 分钟, 收取上清。

1.7 将上清添加到填有硫酸镍 (NiSO₄) 的 Sepharose High Performance (Amersham Bioscience) 的层析柱中。

1.8 用分别含有 30、60、90、和 250 mM 咪唑的结合缓冲液洗脱, 收集洗脱液。

1.9 洗脱液浓缩后，用 Bradford 蛋白质检测试剂盒 (Bio-Rad) 检测蛋白浓度，SDS-PAGE 检测蛋白纯度。

注：在大多数情况下，GFP-TNF α 的纯度大于 90%。

2. 稳定高水平展示抗 TNF α 抗体的 CHO 细胞株构建

我们实验室已构建了 CHO-puro 细胞株，该细胞株在染色体特定位点嵌入了单一的基因表达框，能够高表达抗性基因 (puroR)。基因框外侧含有两个不同重组序列的 DNA，故 puroR 可以被不同的目标 DNA 片段替换。作为一个例子，我们用抗 TNF α 抗体基因替换了 puroR，获得了在细胞膜表面稳定高水平展示抗 TNF α 抗体的 CHO 细胞株，用于抗 TNF α 抗体的进化 (见注意事项 2)。

2.1 细胞培养：

- 1) CHO-puro 细胞培养于 CO₂ 培养箱，37 °C，5% CO₂。
- 2) 每 2~3 天传代。
- 3) 转染前一天，接种 2×10^6 个细胞于 10 cm 细胞培养皿。

2.2 转染：

质粒 pFAbL (用于将抗 TNF α 抗体基因替换 puroR) 和质粒 pF2AC (用于表达 Flpo 和 iCre 重组酶) 共同转染 CHO-puro 细胞。转染液制备如下：

- 1) 16 μ g pF2AC + 4 μ g pFAbL + 1.2 ml Opti-MEM® 减血清培养基，轻轻混匀。
- 2) 40 μ l Lipofectamine™ 2000 + 1.2 ml Opti-MEM® 减血清培养基，轻轻混匀。室温孵育 5 分钟。
- 3) 将前两步中的稀释液轻轻混合，室温孵育 25 分钟。
- 4) 吸走 CHO-puro 细胞培养皿中的培养基，用 PBS 洗 CHO-puro 细胞三次，吸尽 PBS。加入 4 ml Opti-MEM® 减血清培养基。
- 5) 将 2.4 ml 转染液 (来自步骤 3) 加入细胞培养皿，轻轻晃匀。
- 6) 细胞在 CO₂ 培养箱中，37 °C 孵育 6 小时。

2.3 细胞扩增：

- 1) 转染后 6 小时，将细胞扩入 4 个 10 cm 培养皿。
- 2) 细胞扩增 2 天。

2.4 流式分选:

- 1) 胰酶消化细胞 (10 cm 培养皿中加 2 ml 胰酶), 37 °C 孵育 2~3 分钟, 细胞脱落后加入含 10% 血清的培养基终止胰酶作用 (见注意事项 3), 300 × g 离心 3 分钟, 收获细胞。
- 2) PBS 洗细胞: 用 PBS 重悬细胞沉淀, 300 × g 离心 3 分钟, 吸出 PBS。
- 3) 细胞标记抗体: 用 Opti-MEM® 减血清培养基稀释 PE 标记的抗 HA 抗体 (1:250, 抗 TNFα 抗体带有 HA 标签), 配制成抗体染色液。所有收获的细胞加入 1 ml 抗体染色液, 4 °C, 25 分钟。
- 4) PBS 洗细胞 3 次。
- 5) 1 ml Opti-MEM® 减血清培养基重悬细胞。
- 6) 用流式细胞仪 FACS Aria™ Illu, 分选出 PE 荧光信号最强的细胞群 (表达抗 TNFα 抗体的细胞群)。

2.5 分选后的细胞扩增:

分选的表达抗 TNFα 抗体的细胞 (CHO-TNFAb) 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养扩增。

3. 抗 TNFα 抗体的亲和力成熟

经过几轮的流式细胞分选-细胞增殖, 可获得具有更高亲和力的抗 TNFα 抗体突变体, 具体实验步骤如下:

3.1 转染:

抗 TNFα 抗体亲和力成熟的每轮步骤中, 均需要用表达 AID 的质粒 pCEP-Neo-mAID 转染 CHO-TNFAb 细胞。

- 1) 转染前一天, 接种 3 × 10⁵ 个 CHO-TNFAb 细胞于 6 孔板中。
- 2) 2 μg pCEP-Neo-mAID + 150 μl Opti-MEM® 减血清培养基, 轻轻混匀。
- 3) 5 μl Lipofectamine™ 2000 + 150 μl Opti-MEM® 减血清培养基, 轻轻混匀。室温孵育 5 分钟。
- 4) 将前两步中的稀释液轻轻混合, 室温孵育 25 分钟。
- 5) 吸走 CHO-TNFAb 细胞培养皿中的培养基, 用 PBS 洗 CHO-TNFAb 细胞三次, 吸尽 PBS。加入 1 ml Opti-MEM® 减血清培养基。

6) 将 300 μ l 转染液 (来自步骤 4) 加入细胞培养皿, 轻轻晃匀。

7) 细胞在 CO₂ 培养箱中, 37 °C 孵育 5 小时。

3.2 细胞扩增:

AID 表达质粒 (pCEP-Neo-mAID) 带新霉素抗性基因, 转染后的细胞在含新霉素的培养基中培养 7 天, 以使表达 AID 的细胞扩增。

1) 转染后 5 小时, 将 6 孔板中的细胞扩入 2 个 10 cm 培养皿。

2) 加入新霉素至终浓度 1 mg/ml。

3) 每 2~3 天传代一次, 大约 7 天后, 细胞数达到约 6×10^7 。

3.3 展示高亲和力抗体的细胞富集:

扩增后的细胞标记 PE 偶联的抗 HA 抗体 (抗 TNF α 抗体带 HA 标签, 该抗体用于检测细胞上抗体展示水平) 和 GFP-TNF α 抗原 (用于检测细胞上抗体与抗原结合的能力)。用流式细胞仪分选出 GFP/PE 荧光信号比例最高的细胞群 (最高的 0.02%, 约 20,000 个细胞), 具体实验步骤如下:

1) 胰酶消化细胞 (10 cm 培养皿中加 2 ml 胰酶), 37 °C 孵育 2~3 分钟, 细胞脱落后加入含 10% 血清的培养基终止胰酶作用 (见注意事项 3), 300 $\times g$ 离心 3 分钟, 收获细胞。

2) PBS 洗细胞: 用 PBS 重悬细胞沉淀, 300 $\times g$ 离心 3 分钟, 吸出 PBS。

3) 细胞标记: 用 Opti-MEM[®] 减血清培养基稀释 PE 偶联的抗 HA 抗体 (1:250) 和 GFP-TNF α (0.2 mg/ml), 配制成抗体染色液。所有收获的细胞加入 2 ml 抗体染色液, 4 °C, 25 分钟。

4) PBS 洗细胞 3 次。

5) 2 ml Opti-MEM[®] 减血清培养基重悬细胞。

6) 用流式细胞仪分选出 GFP/PE 荧光信号比例 (“抗原结合/抗体展示”比例) 最高的细胞群 (最高的 0.02%, 约 20,000 个细胞, 图 1, Chen 等, 2016)。

图 1. 抗体亲和力成熟。经 AID 突变 7 天后，流式分选出“抗原结合/抗体展示”比例最高的细胞群 (最高的 0.02%，约 20,000 个细胞)。A. 框选出主细胞团 (P1)，去除死细胞；B. 对于 P1 细胞群，进一步框选出较小的细胞群 (P2)，去除二联体细胞或多联体细胞及较大的细胞；C. 对于 P2 细胞群，分选出“抗原结合/抗体展示”比例最高的细胞群 (最高的 0.02%，约 20,000 个细胞，P3)。该图来源于我们以前发表的文章 (Chen 等，2016)。

3.4 分选后细胞扩增：

分选的 CHO-TNFAb 细胞在 37 °C，5% CO₂ 培养箱中培养扩增。3 天后细胞数量将达到 200,000 左右，然后用表达 AID 的质粒转染 CHO-TNFAb 细胞，进行下一轮亲和力成熟。

4. 抗 TNF α 抗体突变体检测

4.1 收获 CHO-TNFAb 细胞。

4.2 用 Wizard® SV Genomic DNA Purification System 提取细胞基因组 DNA，具体操作按照说明书进行。用 Nanodrop ND-1000 分光光度计测定 DNA 浓度，将其调整为 100 ng/ μ l。

4.3 从基因组 DNA 扩增抗体基因片段。

扩增引物：

T7-P1: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGC-3'

TM-P2: 5'-CTAACGTGGCTTCTTCTGCCAAAGC-3'

PCR 反应体系 (50 μ l):

10 μ l 5 $\times$ HF 缓冲液

1 μ l 10 mM dNTPs

1.5 μ l DMSO

0.5 μ l Phusion® 高保真 DNA 聚合酶

2.0 μ l 正向引物 (10 μ M)

2.0 μ l 反向引物 (10 μ M)

29 μ l 去离子水 (不含核酸酶)

4 μ l DNA 模板 (100 ng/ μ l)

PCR 运行程序：

98 °C，3 分钟

98 °C，30 秒；61 °C，30 秒；72 °C，35 秒。30 个循环

72 °C，10 分钟

4 °C 保持

4.4 使用 AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit 纯化扩增的 DNA 片段 (1,077 bp)。

- 4.5 纯化的 DNA 扩增片段和 pCDNA3.1 质粒用 EcoRI 和 XhoI 双酶切, 37 °C, 2 小时, 然后用 AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit 纯化酶切后的 DNA 片段和质粒。
- 4.6 酶切后的 DNA 片段和质粒连接: 使用 T4 DNA 连接酶, 16 °C 反应 4 小时。
- 4.7 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞。在每轮分选后, 按上述步骤克隆抗体基因, 并对 50 个克隆进行测序 (见注意事项 4)。由于每轮的流式细胞分选细胞增殖具有迭代效应, 导致抗体亲和力增加的有益突变将被富集。
5. 使用流式细胞仪检测抗 TNF α 抗体突变体与 GFP-TNF α 抗原的结合能力 (见注意事项 5)
 - 5.1 细胞培养:
 - 1) CHO/dhFr-细胞培养于 CO₂ 培养箱, 37 °C, 5% CO₂。
 - 2) 每 2~3 天传代。
 - 3) 转染前一天, 接种 2×10^5 个细胞于 6 孔板中。
 - 5.2 转染:

用表达抗 TNF α 抗体突变体的 pCDNA3.1 质粒转染 CHO/dhFr-细胞。

 - 1) 2 μ g 质粒 DNA + 150 μ l Opti-MEM® 减血清培养基, 轻轻混匀。
 - 2) 5 μ l Lipofectamine™ 2000 + 150 μ l Opti-MEM® 减血清培养基, 轻轻混匀。室温孵育 5 分钟。
 - 3) 将前两步中的稀释液轻轻混合, 室温孵育 25 分钟。
 - 4) 吸走 CHO/dhFr-细胞培养皿中的培养基, 用 PBS 洗 CHO/dhFr-细胞三次, 吸尽 PBS。加入 1 ml Opti-MEM® 减血清培养基。
 - 4) 将 300 μ l 转染液 (来自步骤 3) 加入细胞培养皿, 轻轻晃匀。
 - 5) 细胞在 CO₂ 培养箱中, 37 °C 孵育 5 小时。吸走转染液加入细胞培养基。
 - 5.3 流式检测:
 - 1) 转染后两天, 胰酶消化细胞 (六孔板每孔加 0.5 ml 胰酶), 37 °C 孵育 2~3 分钟, 细胞脱落后加入含 10% 血清的培养基终止胰酶作用 (见注意事项 3), 300 $\times$ g 离心 3 分钟, 收获细胞。
 - 2) PBS 洗细胞: 用 PBS 重悬细胞沉淀, 300 $\times$ g 离心 3 分钟 吸出 PBS。

- 3) 细胞标记 用 Opti-MEM® 减血清培养基稀释 PE 偶联的抗 HA 抗体 (1:250) 和 GFP-TNF α (0.2 mg/ml)，配制成抗体染色液。每孔细胞加入 100 μ l 抗体染色液，4 °C 反应 25 分钟。
- 4) PBS 洗细胞 3 次。
- 5) 0.4 ml Opti-MEM® 减血清培养基重悬细胞，进行流式检测。图 2 显示突变抗体结合 GFP-TNF α 的能力高于野生型抗体，即这些突变抗体展示细胞的“抗原结合/抗体展示”比例大于野生型抗体展示细胞的“抗原结合/抗体展示”比例 (Chen 等，2016)。

图 2. 流式检测抗体突变体的抗原结合能力. 野生型抗体作为对照 (WT)。结果显示 7 个抗体突变体具有比野生型 (WT) 更高的抗原结合能力。该图来源于我们以前发表的文章 (Chen 等，2016)。

6. Octet 分子相互作用技术平台检测抗体亲和力

为进一步确认流式检测中显示的抗 TNF α 抗体突变体结合 GFP-TNF α 的能力高于野生型抗体，将图 2 显示的七个抗体突变体基因亚克隆到 pCEP4 质粒，转染 293F 细胞，表达纯化出 scFv-Fc 融合蛋白，用 Octet 分子相互作用技术平台检测其亲和力。

6.1 细胞培养：

- 1) FreeStyle™ MAX 293F 细胞用 FreeStyle™ 293 Expression Medium 培养基培养，37 °C，5% CO₂ 培养箱，120 rpm 转速下摇瓶培养。
- 2) 每 2~3 天传代。
- 3) 转染前一天，将 293F 细胞按 8×10^5 /ml 接种于 30 ml FreeStyle™ 293 Expression Medium 培养基中，使转染时，细胞密度达到 1.2×10^6 /ml。

6.2 转染：

- 1) 45 µg 质粒 DNA + 2 ml OptiPRO™ SFM Serum Free 培养基，轻轻混匀。
- 2) 在上一步中加入 60 µl PEI 试剂，轻轻混匀。室温孵育 10 分钟。
- 3) 将转染液（来自步骤 2）加入 293F 细胞摇瓶中。
- 4) 细胞 37 °C，5% CO₂ 培养箱，120 rpm 转速下振荡培养。

6.3 scFv-Fc 的表达和纯化：

- 1) 转染 3 天后，将摇瓶内的细胞和培养基倒入 50 ml 离心管中。300 × g 离心 3 分钟，去掉细胞，将培养上清倒入新的 50 ml 离心管中。
- 2) 4 °C，7,000 × g 离心 10 分钟，去掉培养基中的杂质，将培养上清倒入新的 50 ml 离心管中。培养上清用 0.45 µm 的滤膜过滤。
- 3) 用 30 KDa 浓缩管，4,000 × g，4 °C 离心浓缩，使 30 ml 上清液浓缩至约 1.5 ml。
- 4) SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色估计抗体浓度，用 FreeStyle™ 293 Expression Medium 培养基将抗体浓度调整到 100 µg/ml。

6.4 Octet 分子相互作用技术平台检测抗体亲和力

- 1) 将上述抗体溶液用抗人 Fc 片段动能传感器 [Anti-hFc kinetic grade biosensors (ForteBio:18-5060,USA)] 检测抗体的亲和力。
- 2) 检测条件为：(i) 基线 (baseline) 240 s；(ii) 上样 (loading) 240 s；(iii) 基线 (baseline) 180 s；(iv) 结合 (association) 120 s，结合过程中 GFP-TNFα 抗原浓度分别为 1,600 nM, 800 nM, 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM；(v) 解离 (dissociation) 180 s。
- 3) K_{on} 和 K_{off} 由系统软件根据结合和解离曲线拟合得到，亲和力常数 (K_d) 通过 K_{off}/K_{on} 计算得出。野生型及七个突变的抗 TNFα 抗体 K_d 值如表 1 所

示。该结果进一步确认了抗 TNF α 抗体突变体结合 GFP-TNF α 抗原的亲合力高于野生型抗体。

表 1. 抗体亲和力

clone	mutation	K _D (M)	K _{off} (1/s)	K _{on} (1/MS)
WT	No	7.82E-09	5.29E-04	6.76E+04
S1-26	A229T	5.69E-09	4.07E-04	7.15E+04
S2-17	N33K	4.34E-09	2.58E-04	5.96E+04
S3-19	A145V	2.12E-09	1.57E-04	7.40E+04
S2-23	N33K+ A145V	1.25E-09	9.78E-05	7.81E+04
S3-18	A145V+ M211I	1.32E-09	1.04E-04	7.87E+04
S4-10	N33K+H212N	2.88E-09	1.66E-04	5.77E+04
S5-8	N33K+ A145V+ M211I	5.20E-10	3.94E-05	7.84E+04

注: 该表来源于我们以前发表的文章 (Chen 等, 2016)。

注意事项

1. 本例中, 用于筛选抗 TNF α 抗体的抗原是 GFP-TNF α 融合蛋白。该融合蛋白在大肠杆菌中表达, TNF α 直接加在了标签蛋白 GFP 的 C 端, 中间没加 linker。我们前期的工作证实, 该融合蛋白作为抗原, 可以成功筛选出具有更高亲和力的抗 TNF α 抗体突变体。对于其他抗原抗体对, 表达用于筛选抗体的抗原时, 需考虑标签蛋白的选择, 标签蛋白与抗原的连接方式, 中间是否加 linker, 选择什么样的 Linker 等, 以保证抗原结构的正确。
2. 该过程的图示请见我们之前发表的文章 (Chen 等, 2016)。对于抗体展示细胞, 以下两点需要注意:
 - 1) 为使抗体的基因型和表型有效对应, 每个细胞中抗体表达基因应为单拷贝;
 - 2) 由于 AID 酶的作用特性, 基因的转录水平越高, 其突变率越高, 故需要进化的抗体基因在细胞中应该是高转录的。

3. 使用胰酶消化细胞时需要注意，有些细胞表面展示的抗体对胰酶敏感，故需做预实验确定胰酶消化的最佳条件。对于那些对胰酶特别敏感的抗体，我们推荐用 0.02% EDTA，37 °C，5 分钟消化 CHO 细胞。
4. 对于亲和力成熟的前两轮“流式细胞分选-细胞增殖”，建议对 100 或 150 个克隆进行测序。
5. AID 酶的作用靶点不仅局限于抗体基因，故我们在抗体亲和力成熟过程中流式检测到的抗体亲和力的改变可能不是因为抗体本身的突变，而是抗体展示细胞发生了改变。为排除这一可能，需要构建突变抗体表达质粒，瞬时转染没有经过 AID 处理的初始 CHO/dhFr-细胞，检测其与抗原的结合能力。

溶液配方

1. LB 培养基

10 g/l 胰蛋白胨

5 g/l 酵母提取物

5 g/l NaCl

2. 50 mg/ml 卡那霉素

将 2.5 g 卡那霉素溶于 50 ml 双蒸水 (ddH₂O)

3. 100 mM 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)

1.2 g IPTG 溶于 50 ml ddH₂O

4. 100 mM 苯基甲磺酰氟 (PMSF)

0.174 g PMSF 溶于 10 ml 异丙醇中

5. 结合缓冲液

500 mM NaCl

20 mM Tris-Cl

10%甘油

5 mM 咪唑

pH 7.9

6. IMDM 完全培养液

用于培养 CHO/dhFr-细胞，CHO-puro 细胞和其他来于 CHO/dhFr-细胞的细胞

10% 胎牛血清

0.1 mM 次黄嘌呤

0.016 mM 胸苷

7. 100 mg/ml 新霉素

将 1 g 新霉素溶于 50 ml 无菌双蒸水中

致谢

相关工作得到中国科学院，北京市科委和国家自然科学基金的支持。本文实验方案改编自本实验室的发表文章 Chen 等 (2012)，Chen 等 (2016) 和 An 等 (2018)。

参考文献

1. An, L., Chen, C., Luo, R., Zhao, Y. and Hang, H. (2018). [Activation-induced cytidine deaminase aided *in vitro* antibody evolution](#). *Methods Mol Biol* 1707: 1-14.
2. Chen, C., Li, N., Zhao, Y. and Hang, H. (2016). [Coupling recombinase-mediated cassette exchange with somatic hypermutation for antibody affinity maturation in CHO cells](#). *Biotechnol Bioeng* 113(1): 39-51.
3. Chen, S., Qiu, J., Chen, C., Liu, C., Liu, Y., An, L., Jia, J., Tang, J., Wu, L. and Hang, H. (2012). [Affinity maturation of anti-TNF-alpha scFv with somatic hypermutation in non-B cells](#). *Protein Cell* 3(6): 460-469.