

计算设计后的湿实验参考指南

流程介绍:

- 基于输入的抗体序列和CDR设计参数, 设计突变位点组合;
- 预测复合物结构, 对位点组合排序;
- 根据实验条件, 筛选符合目标的序列。

概述

本指南旨在指导研发人员对经过计算设计生成的抗体CDR突变体 (Mutants) 进行湿实验验证。

- 1.1 目标:** 筛选出具有序列一致性低于特定阈值且保持或提升亲和力/功能的候选分子。
- 1.2 策略:** 根据每个CDR区域的突变体数量选择相应的合成与验证策略

Mutants 数量 (每个 CDR)	推荐策略	合成方式	实验平台
< 20 个	直接重组表达	基因合成/定点突变	哺乳动物细胞 (CHO/293)
20 - 100 个	库构建与筛选	柱引物	噬菌体展示 (Phage Display)
> 100 个	库构建与筛选	Oligo Pool (芯片合成)	噬菌体展示 (Phage Display)

1.3 核心思路

- 预实验: 确立亲本抗体 (Parental Antibody) 的基准数据。
- 小规模突变 (<20): 直接构建全长抗体或Fab, 点对点验证, 优选最佳CDR组合成"新亲本"。
- 大规模突变 (>20): 基于"新亲本"骨架, 利用噬菌体展示技术对高多样性CDR进行高通量筛选。

阶段一：亲本预实验

在处理任何变体之前，必须建立可靠的测试基准。

- **2.1 目的：**确保亲本抗体在特定的实验体系下具有可检测的活性，并作为后续筛选的参照物 (Benchmark) 。
- **2.2 操作步骤：**
 - **展示效率验证（若进行噬菌体筛选）：**构建亲本scFv/Fab噬菌体（推荐用scFv形式），检测其噬菌体展示水平。
 - **结合活性验证：**ELISA/SPR/BLI：验证亲本对靶点的EC50或KD值，推荐用BLI进行结合活性验证；FACS：若靶点为膜蛋白，验证亲本在阳性细胞上的结合曲线。
- **2.3 决策点：**若亲本本身来源于展示筛选且数据详实，可跳过此步；若亲本无法重复出结合活性，需先优化实验条件（如抗原质量、Buffer配方），不可直接进行突变体筛选。

阶段二：小规模突变体验证 (<20 Mutants/CDR)

针对突变数量较少（如H1=15, L1=10等）的情况，采用中低通量重组表达策略。

- **3.1 载体构建与表达**
 - **形式选择：**
 - hIgG1 (推荐)：半衰期长，稳定性好，便于纯化和后续检测。
 - Fab/scFv：若需快速筛选，可选择较小片段，但需注意亲和力可能与全长有差异。
 - **构建策略：**每个重组质粒包含1种CDR的单一突变
 - **表达体系：**推荐使用 ExpiCHO 或 Expi293 瞬转表达系统。
 - **规模：**4mL - 10mL 培养体系通常可获得足够进行初筛的蛋白量 (0.5-2 mg) 。
- **3.2 活性评估与筛选**
 - **纯化：**Protein A/G 亲和纯化，建议进行一步SEC或通过SDS-PAGE确认纯度 >90%。
 - **检测方法：**
 - 可溶性抗原：使用 Biacore (SPR) 或 Octet (BLI) 进行单浓度或多浓度动力学检测。
 - 细胞表面抗原：使用流式细胞术 (FACS) 检测 MFI 值。
 - **筛选标准：**
 - 产量与质量：剔除表达量极低或聚体严重的突变体。
 - 亲和力：选择结合活性与亲本相当（3倍内）或更优的突变体。

- **结果产出：**将各CDR区域表现最好的突变序列组合，构建"新亲本"，作为下一阶段大规模筛选的骨架。

阶段三：大规模突变体筛选 (>20 Mutants/CDR)

针对多样性较高的CDR区域，采用噬菌体展示技术进行高通量筛选。

• 4.1 突变文库引物设计与合成

- **骨架选择：**使用阶段二确定的"新亲本"作为模板。
- **合成策略对比：**
 - 柱引物合成20-100 mutants CDR
 - Oligopool (芯片合成寡核苷酸池)合成>100 mutants CDR

• 4.2 文库构建

- **片段组装：**使用 重叠延伸PCR (SOE-PCR) 将突变的CDR片段与骨架拼接。形式：推荐 scFv (Linker: (G4S)3)。关键点：scFv片段两端需包含与噬菌粒载体 (Phagemid) 匹配的同源臂 (>15bp)，以便进行同源重组。
- **载体连接：**推荐方法：同源重组 (如Gibson Assembly / In-Fusion)，效率远高于传统酶切连接。备选方法：双酶切连接 (SfiI/NotI 等)。
- **转化与建库：**电转：首选 TG1感受态细胞，确保转化效率 >1E8 以覆盖文库多样性。化学转：仅在多样性极低 (<1E5) 时使用。
- **文库质控 (QC)：**
 - 库容 (Library Size)：通过梯度稀释涂板计算转化子总数。
 - 准确性 (Accuracy)：随机挑取 24-48 个单克隆进行 Sanger测序。
 - 合格标准：正确读框率 >50% (理想 >70%)，且包含设计的突变位点。
 - 插入率：菌落PCR检测空载率。

• 4.3 噬菌体展示筛选

- **筛选轮次：**通常进行 3-4 轮筛选。
- **抗原形式与策略：**
 - **可溶性抗原：**固相筛选：包被免疫管/酶标板 (容易暴露表位，但可能导致抗原变性)。液相筛选：生物素化抗原 + 磁珠拉取 (保持抗原天然构象，推荐)。
 - **跨膜/复杂抗原：**细胞筛选：过表达细胞株 (+) vs 空白细胞株 (-)。仿生膜系统：使用 Nanodisc 或 VLP 呈递抗原，结合磁珠筛选。

- **交叉筛选策略**: 海选方案不局限于一种筛选策略, 除了纯固相、液相或细胞筛选外, 也可以设置固液、固相/细胞交叉筛选策略, 以富集特异性强且针对天然构象的抗体。
- **筛选压力**: 逐轮降低抗原浓度 (如 100nM -> 10nM -> 1nM) 或增加洗涤次数, 以富集高亲和力克隆。
- **4.4 结果鉴定**
 - **富集检测 (Polyclonal ELISA/FACS)**: 检测每一轮 Phage Pool 的结合信号, 确认是否有富集趋势。
 - **单克隆筛选 (Monoclonal Screening)**: 从富集明显的轮次 (通常为R3或R4) 挑取 96-384 个单克隆。制备单克隆噬菌体上清, 进行 ELISA 或 FACS单克隆初筛。
 - **测序与分析**: 对阳性克隆进行 Sanger 测序, 分析CDR序列, 去除重复序列, 确定Unique Hits。

阶段四: 最终验证 (候选分子确认)

对筛选出的 Unique Hits 进行类似于"阶段二"的详细验证。

- **5.1 全长/Fab重组表达**: 将 scFv 序列转回哺乳动物表达载体。
- **5.2 纯化与质控**: SEC-HPLC 分析纯度及聚体比例。
- **5.3 精确亲和力测定**:
 - 使用 Biacore/Octet 测定 $K_{on}/K_{off}/K_D$, 或用FACS检测EC50。
 - 与亲本抗体进行 Head-to-Head 比较。
- **5.4 功能实验**: 根据项目需求, 进行体外药效 (如阻断实验、细胞杀伤等) 或表位竞争实验 (Binning) 。

常见问题与注意事项

6.1 QC 测序准确性低:

- 检查引物合成质量 (尤其是长引物) 。
- 优化 PCR 条件, 减少非特异性扩增。
- 若是 Oligopool, 检查扩增循环数是否过高导致偏差。

6.2 筛选后无富集：

- 抗原失效：重新验证抗原活性。
- 洗涤过强：如果在R1就使用剧烈洗涤，可能丢失稀有克隆。
- 展示效率低：检查辅助噬菌体滴度或 Helper Phage 比例。

6.3 阳性克隆序列单一：

- 可能发生了"生物学优势"扩增（某克隆生长极快但不一定结合好）。建议增加筛选轮次中的抗原压力，或换用不同的筛选策略。