

mAb亲和力成熟后续湿实验流程参考

本指南用于帮助理解在完成亲和力成熟计算设计后，如何开展后续文库构建、展示筛选、测序分析和候选验证。具体实验条件可根据抗体类型、抗原形式、亲和力范围和实验平台进行调整。

说明： 本指南所述文库构建、展示筛选、NGS测序与候选验证等湿实验均由用户自行执行；亲和力成熟服务交付计算设计结果、建库方案与NGS挑选方案，并提供方案层面的咨询支持。文中给出的库容、测序深度、抗原浓度等参数均为典型参考范围，请结合自身平台与试剂条件调整。

流程介绍

亲和力成熟计算设计流程：

1. 基于输入的母本抗体序列与位点设计参数，设计突变位点组合（子库）；
2. 预测结构与结合，对位点组合进行打分；
3. 以全部子库整体打分最大化（全局最优）输出推荐突变子库设计表。

概述

1.1 目标

从母本抗体出发，在保持特异性、表达性质与可开发性的前提下，筛选出亲和力（结合能力）提升的突变体。

1.2 策略

将计算报告推荐的突变位点组合（子库）以NNK简并方式建库，经酵母或噬菌体展示逐步加压筛选，并以NGS全程追踪富集、理性挑选候选；轻链与重链分库构建与筛选。展示平台可按下表选择：

场景/需求	推荐展示平台	说明
需定量区分亲和力梯度、按展示水平归一	酵母展示	FACS双色定量分选，降低高表达低亲和和假阳性
	噬菌体展示	库容可达 10^8 – 10^9 ，便于解离速率筛选

场景/需求	推荐展示平台	说明
需大库容、固/液相淘选或off-rate 加压		

流程总览： 计算设计 → 文库设计与合成 → 展示文库构建 → 筛选前预实验 → 展示筛选（酵母／噬菌体） → NGS追踪分析 → 单克隆验证 → 可溶性表达与功能验证

1.3 核心思路

计算端给出的是"值得进行突变组合探索的位点"，而非具体氨基酸；湿实验端通过在这些位点NNK多样化、展示富集与NGS分析，将筛选聚焦于模型预测的有益突变空间。建议保留报告推荐的全部子库（全局最优），并以NGS富集轨迹而非单一最终丰度作为候选挑选依据。

阶段一：母本序列构建与亲本预实验

在处理任何突变文库之前，应先确定母本序列并建立可靠的筛选基准。

2.1 母本scFv序列构建

首先将抗体重链和轻链序列构建为scFv形式。scFv通常由轻链、柔性linker和重链组成，也可根据载体或项目经验采用重链-linker-轻链的排列方式。常用linker包括(G4S)₄等柔性连接肽，有助于维持轻链和重链结构域之间的空间自由度。

确定全长scFv氨基酸序列后，建议根据后续展示体系进行密码子优化。例如，若采用酵母展示体系，可选择酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*作为优化宿主。最终获得的母本scFv DNA序列将作为突变文库设计、母本展示对照构建和后续实验验证的基础。

2.2 筛选前母本预实验

正式筛选文库前，建议先使用母本展示株或母本噬菌体进行小规模预实验。通过抗原浓度梯度检测母本抗体在不同浓度下的结合信号，并与空载体、无关抗体、未加抗原等阴性对照进行比较，可初步确定适合亲和力成熟筛选的抗原浓度范围。

由于本项目属于亲和力成熟文库，筛选目标不是从完全随机库中寻找结合克隆，而是在母本基础上筛选结合能力更优的变体。因此，第一轮筛选浓度和门控策略可参考母本信号设置，并适当比母本参照更严格，以优先富集在较低抗原浓度下仍保持较强结合信号的突变体。通过该预实验，通常可将筛选轮次控制在2-3轮。

决策点： 若母本在当前实验体系下无法重复出可检测的结合信号，应先优化实验条件（如抗原质量、标记方式、缓冲体系）后再进入文库筛选，不应直接筛选突变文库。

结果产出： 母本scFv DNA序列、母本展示对照，以及作为后续筛选参照的抗原浓度范围与门控基准。

阶段二：亲和力成熟文库设计与构建

3.1 文库设计与合成

完成亲和力成熟计算设计后，可在最终报告中的【详细突变结果与数据下载】章节查看并下载推荐的突变文库设计表。报告通常会以子库为单位给出推荐结果，每一行对应一个建议构建的突变子库，包含抗体链类型、子库ID、推荐突变位点、突变残基数和模型评分等信息。例如，报告可能推荐某一重链子库H1包含P100、S101、G31、L103四个突变位点，或某一轻链子库L1包含Q27、H98、S99、Y38四个突变位点。这里的"突变位点"表示模型认为值得进行局部多样化探索的位置组合，"分数"可作为不同子库优先级排序的参考。

需要注意的是，计算报告推荐的是"哪些位置值得突变组合探索"，而不是直接指定每个位点应突变成哪一种氨基酸。因此，在后续实验建库时，建议将报告推荐的氨基酸位点对应回母本scFv DNA序列中的相应密码子，并将这些密码子替换为NNK简并密码子。NNK可覆盖20种常见氨基酸，并相对减少终止密码子的比例，适合用于亲和力成熟文库构建。换言之，若某一子库推荐3个突变位点，则该子库通常对应3个NNK密码子；若推荐4个突变位点，则对应4个NNK密码子。

每个子库均应基于同一条母本scFv序列进行设计。除推荐突变位点被替换为NNK外，其余轻链、linker和重链序列应保持与母本一致，以便后续筛选结果能够明确归因于推荐位点组合的变化。设计完成后，每个子库应保持完整阅读框，不应引入额外插入、缺失或提前终止密码子。可将这些带有NNK位点的scFv DNA序列作为dsDNA片段提交合成，或根据具体平台拆分为适合克隆的片段形式进行合成。

强烈建议合成报告中推荐的全部子库。文库设计以全部子库作为整体进行打分最大化，得到的是全局最优方案，而非各子库各自最优；各子库在突变组合上相互补充，共同覆盖模型预测的有益突变空间。仅选取部分子库会破坏该全局配置、遗漏关键有益组合，降低亲和力成熟成功率，故推荐选用全部子库。若预算或实验规模确有限制，可结合模型评分、突变位点所在区域、结构合理性以及对轻链或重链的关注重点对子库排序后分批构建，并在条件允许时补齐其余子库。

为便于后续筛选和测序分析，建议将轻链突变子库和重链突变子库分别混合、分别建库、分别筛选。也就是说，报告中抗体链标注为Light的子库混合为轻链突变文库，抗体链标注为Heavy的子库混合为重链突变文库。这样既有助于分别评估轻链和重链突变对亲和力提升的贡献，也有助于后续NGS（高通量测序）追踪筛选过程中的突变比例变化。

从测序角度看，轻链和重链各自的可变区长度通常大致落在PE150双端测序能够覆盖或有效解析的范围内。即使个别片段略长、双端读长中间存在少量未覆盖区域，未覆盖部分也大多位于相对保守的FR区，而计算报告推荐的突变位点通常集中在更可能影响抗原结合的关键区域，因此仍然可以较高效地追踪主要突变组合的丰度变化。相反，如果将轻链和重链突变子库混合在同一个文库中，变异位点会分散在完整scFv的不同区域，常规短读长测序难以同时覆盖全部突变信息，也不利于准确判断不同突变组合在筛选过程中的富集趋势。因此，轻链和重链分开建库、分开筛选是更适合后续NGS分析和候选序列追踪的方案。

在混合不同子库时，应考虑不同NNK数量带来的理论多样性差异。含3个NNK位点的子库理论多样性约为 32^3 ，含4个NNK位点的子库理论多样性约为 32^4 ，后者约为前者的32倍。因此，如果希望不同具体变体在混合文库中具有尽可能接近的代表性，4个NNK位点子库的投入量可按约32倍于3个NNK位点子库的原则进行混合。实际操作中也可根据合成产物浓度、总量和后续建库规模进行适当调整。

3.2 母本展示对照与文库构建

在构建突变文库的同时，建议同步构建母本抗体展示对照。母本展示载体应与文库使用相同的scFv排列方式、linker、展示标签和载体骨架，仅不引入突变。母本对照可用于评估展示水平、抗原结合信号、染色条件和合适的筛选起始浓度。

突变文库可根据实验平台选择酵母展示、噬菌体展示或其他展示体系。若采用酵母展示，可选择pYD1、pCTcon2等常见载体；若采用噬菌体展示，可选择常见phagemid系统。文库构建过程中应保证实际库容充分覆盖理论多样性：由于NNK各氨基酸由1–3个密码子编码、出现频率并不均一，建议实际库容达到理论多样性的约5–10倍（例如4个NNK位点理论多样性约 10^6 ，酵母展示建议目标 $\geq 10^7$ 转化子，噬菌体展示通常可达 10^8 – 10^9 ），以降低转化瓶颈导致有益变体丢失的风险。此外，NNK每个位点约1/32为终止密码子（TAG）：在噬菌体展示中常用amber抑制菌株可读通，而在酵母展示中TAG为真终止子，含4个NNK位点的子库约12%克隆会被截短，估算库容与有效多样性时应计入该损耗。

轻链突变文库和重链突变文库建议从建库阶段开始分别编号、分别保存和分别质控，以保证后续筛选和NGS分析结果清晰可追溯。

结果产出：两类核心实验输入——一是轻链和重链各自的推荐子库设计方案；二是将推荐位点转换为NNK后的可合成文库序列。后续可基于这些序列进行展示载体克隆、酵母展示或噬菌体展示筛选、NGS富集分析以及候选抗体功能验证。

阶段三：展示筛选

突变文库可根据实验平台选择酵母展示或噬菌体展示进行亲和力成熟筛选，总体策略均为"较少轮次、逐步加压"，通常2–3轮。

4.1 酵母展示筛选策略

若采用酵母表面展示，建议将轻链突变文库和重链突变文库作为两个独立样本分别诱导、染色和分选。用于检测和分选的抗原通常需预先生物素化并配合荧光标记链霉亲和素（或直接荧光标记抗原），以便通过流式同时读取展示标签信号与抗原结合信号。总体策略为"较少轮次、逐步加压"：第一轮使用经母本预实验确定的合适抗原浓度，后续轮次逐渐降低抗原浓度（通常每轮下调约2-10倍），并持续回收抗原结合信号最强的一部分细胞。

筛选过程中应结合展示标签信号和抗原结合信号进行分析，尽量在展示水平可比的细胞群体中比较抗原结合强度，减少高表达但低亲和力克隆被误选的风险。分选门控可参考母本抗体和阴性对照信号位置，优先选择高于背景、并优于或偏向母本信号右侧的细胞群体。

每轮筛选后建议保留样本，用于后续NGS测序分析和必要时复盘。最终富集群体可进入单克隆挑取、Sanger测序和功能验证。

4.2 噬菌体展示筛选策略

除酵母展示外，也可采用噬菌体展示进行亲和力成熟筛选。噬菌体展示适合液相或固相淘选，便于通过降低抗原浓度、增加洗涤强度或引入竞争条件来提高筛选压力。

同样建议轻链突变文库和重链突变文库分别构建、分别筛选。母本噬菌体对照可用于判断抗原包被浓度、液相抗原浓度、洗涤强度和背景结合水平。对于亲和力成熟项目，通常采用2-3轮筛选即可。后续轮次可逐渐降低抗原浓度，或加入竞争筛选、off-rate（解离速率）筛选等策略，以优先富集解离更慢、结合更稳定的候选变体。

每轮筛选产物均建议保留样本，用于NGS测序和后续候选序列追踪。最终富集群体可挑取单克隆进行phage ELISA、Sanger测序和进一步验证。

结果产出：各轮筛选后的富集群体与系统保留的样本（初始文库、每轮产物、最终产物），供阶段四NGS分析与单克隆验证使用。

阶段四：NGS分析与候选验证

5.1 NGS测序与富集分析

建议在筛选过程中系统性保留初始文库、每轮筛选后的富集样本以及最终筛选产物，用于NGS测序分析。轻链文库和重链文库应分别测序和分析，以追踪不同突变组合在筛选过程中的丰度变化。为保证丰度轨迹可信，建议每个样本的测序深度充分覆盖预期独特组合（通常每样本约1-5 M reads，并使有效reads数达到预期组合数的10倍以上），其中初始文库可适当提高深度以确保低丰度组合也有覆盖。

NGS分析的重点包括：突变组合在初始文库中的覆盖情况、每轮筛选后的丰度、相对于初始文库或上一轮的富集倍数，以及是否存在连续富集趋势。通常优先关注初始有覆盖、随筛选轮次稳定富集、最终丰度较高，且在序列和结构上合理的候选突变组合。

NGS结果可帮助判断哪些突变组合真正随筛选压力富集，并为后续单克隆验证、组合突变设计和候选抗体优先级排序提供依据。

5.2 候选克隆的NGS综合分析与单克隆验证

在5.1群体富集分析的基础上，本节聚焦如何从富集群体中挑选并验证候选单克隆。直接从富集文库随机挑取单克隆存在较大随机性：挑中概率取决于克隆在文库中的丰度分布，而高丰度并不等同于高亲和力（展示／表达优势、扩增偏好等也会推高丰度）。因此建议以NGS数据为主线进行理性筛选，而非仅依赖随机挑取与最终丰度。

为此，建议对建库筛选前的初始文库及每一轮筛选产物均进行NGS测序（轻、重链文库分别测序），重建各突变组合在全过程中的丰度轨迹。测序完成后，对最后一轮富集的全部抗体综合考察以下指标：

- **相对母本序列的富集**：候选突变组合相对母本序列的丰度提升；
- **相对筛选前的富集倍数**：最终丰度相对于初始文库的富集倍数；
- **各轮次是否持续富集**：连续、单调富集比仅在某一轮突增更为可靠；
- **低抗原浓度下的富集状态**：在抗原逐轮降低的加压条件下仍持续富集者，更可能具有真正提高的亲和力。

综合上述指标优选候选突变组合后，挑取相应候选单克隆（挑取数量与母本抗体亲和力水平及NGS数据分析结果（如富集程度等）相关，可据此确定）进行Sanger测序确认突变组合并排除框移、终止密码子等异常，再通过流式复测（酵母展示）或phage ELISA（噬菌体展示）初步比较其与母本的展示水平和抗原结合信号，并完成亲和力（平衡解离常数KD及动力学参数kon/koff）定量验证。

完成验证后，可对确认有效的优选突变进行组合以追求更高亲和力。组合时建议优先选来自不同子库以及分别来自轻链、重链的优势突变体：因其通常作用于不同位点区域，有益效应更可能相互独立，更易实现叠加或协同提升。

5.3 可溶性抗体表达与功能验证

最终候选序列可根据项目需求转换为scFv、Fab或IgG等形式进行可溶性表达和功能验证。若最终应用形式为IgG，建议尽早在IgG格式下验证候选突变体的表达、稳定性、特异性和亲和力。

功能验证可根据项目需求选择ELISA、BLI、SPR、流式细胞结合实验或其他适合目标抗原形式的方法。对于亲和力成熟项目，除KD外，也建议关注kon和koff等动力学参数，尤其是

koff是否降低。最终候选抗体应同时满足结合能力提升、特异性保持、表达性质良好和后续开发可行性等要求。

结果产出： 经定量验证、相对母本亲和力提升且特异性与表达性质良好的候选抗体（必要时为组合突变体）。

6. 结果交付与后续支持

通过亲和力成熟计算流程，可获得基于计算设计的突变文库方案和候选突变组合推荐。结合后续展示筛选、NGS富集分析和单克隆验证，可形成从"计算设计"到"实验筛选"再到"候选抗体验证"的完整闭环。

根据项目合作范围，最终交付结果可包括轻链和重链的推荐突变位点、不同位点组合的详细信息（推荐子库及其位点组合）、建库方案以及NGS挑选方案。也可根据实验平台选择酵母展示、噬菌体展示或其他筛选体系开展后续实验。

7. 常见问题与注意事项

7.1 筛选后无富集或富集不明显

- 抗原失效：重新验证抗原活性与标记（生物素化效率、构象是否保持）。
- 首轮压力过高：R1即用过低抗原或过强洗涤可能丢失稀有变体，应循序加压。
- 展示/侵染效率低：检查诱导与展示水平、辅助噬菌体滴度与比例。
- 测序深度不足：提高每样本reads数（见5.1）。

7.2 富集克隆序列单一或高度偏向

- 可能发生"生物学优势"扩增（生长或展示快但不一定结合更好）；可增加筛选轮次中的抗原压力，或更换筛选策略。
- 以NGS富集轨迹（多轮持续富集、低抗原浓度下仍富集）而非单一最终丰度作为判断依据（见5.2）。

7.3 实际库容不足、有益变体丢失

- 提高转化效率并保证约 $5-10 \times$ 过采样（见3.2）。
- 酵母展示需注意NNK的TAG为真终止，含4个NNK位点的子库约12%克隆被截短，估算有效库容时应计入。

7.4 高表达、低亲和力克隆假阳性

- 在展示水平可比的细胞群体内比较抗原结合强度，采用双色门控归一（见4.1）。

7.5 NGS无法准确解析突变组合

- 确认测序读长与引物覆盖全部推荐位点；位点分散时按实际片段长度、读长与引物位置设计连读方案（见3.1）。