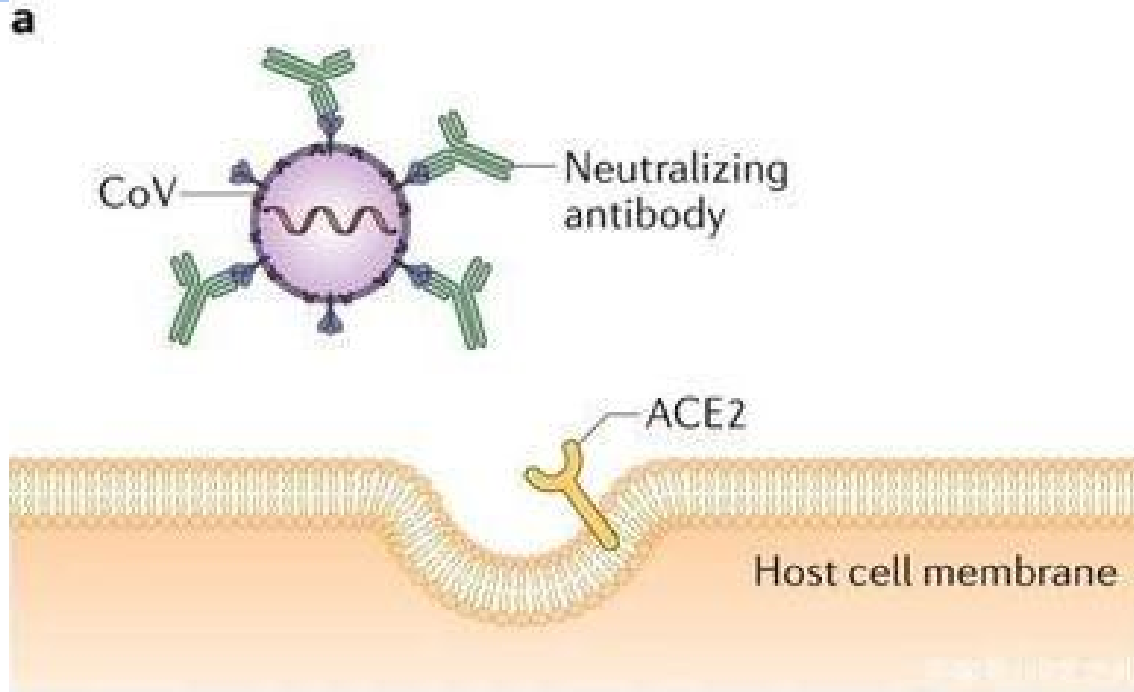


高通量单细胞测序的 抗体基因筛选

检验与生物技术学院 陈瑶



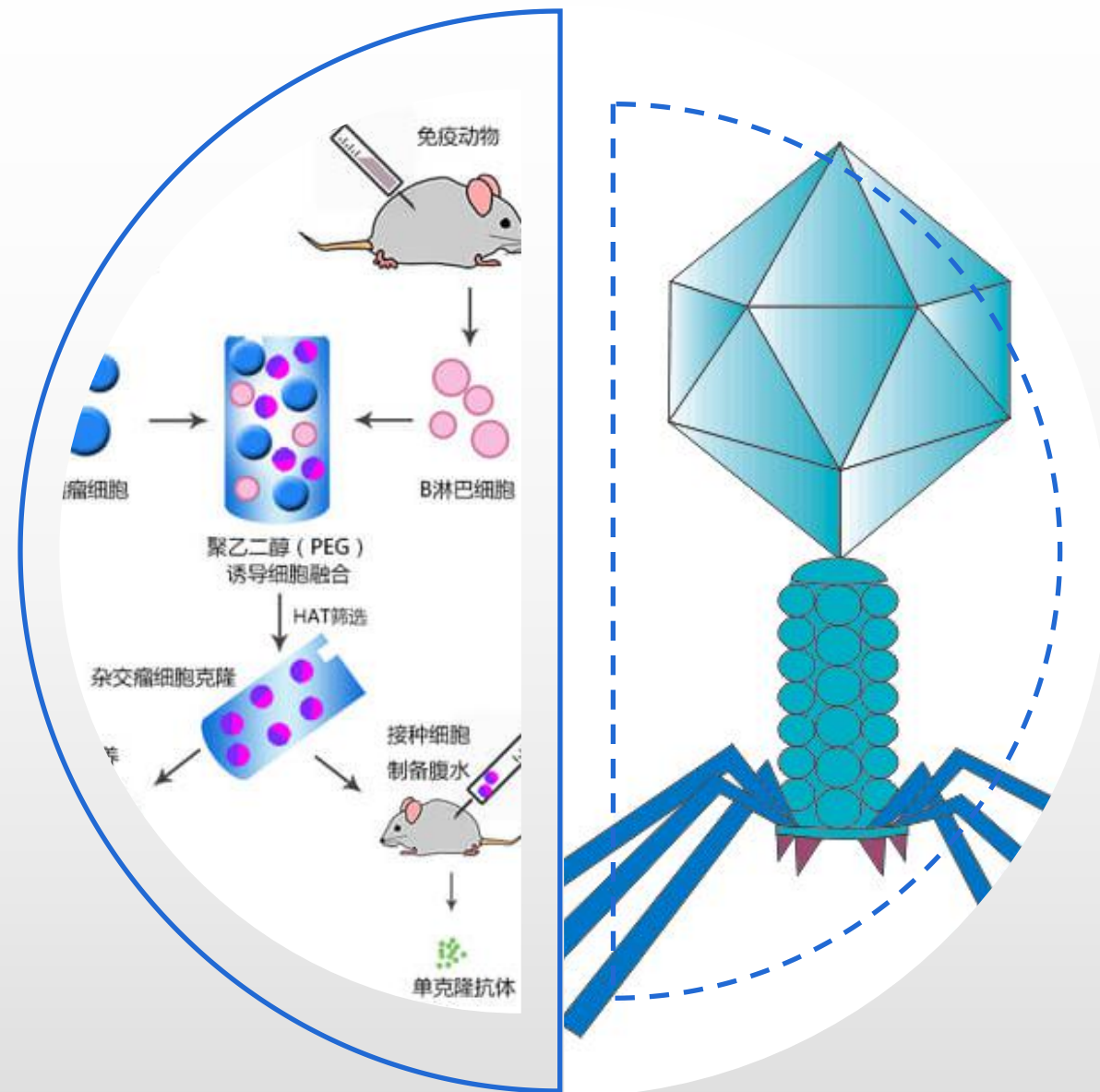
中和抗体是传染性疾病治疗的重要方向



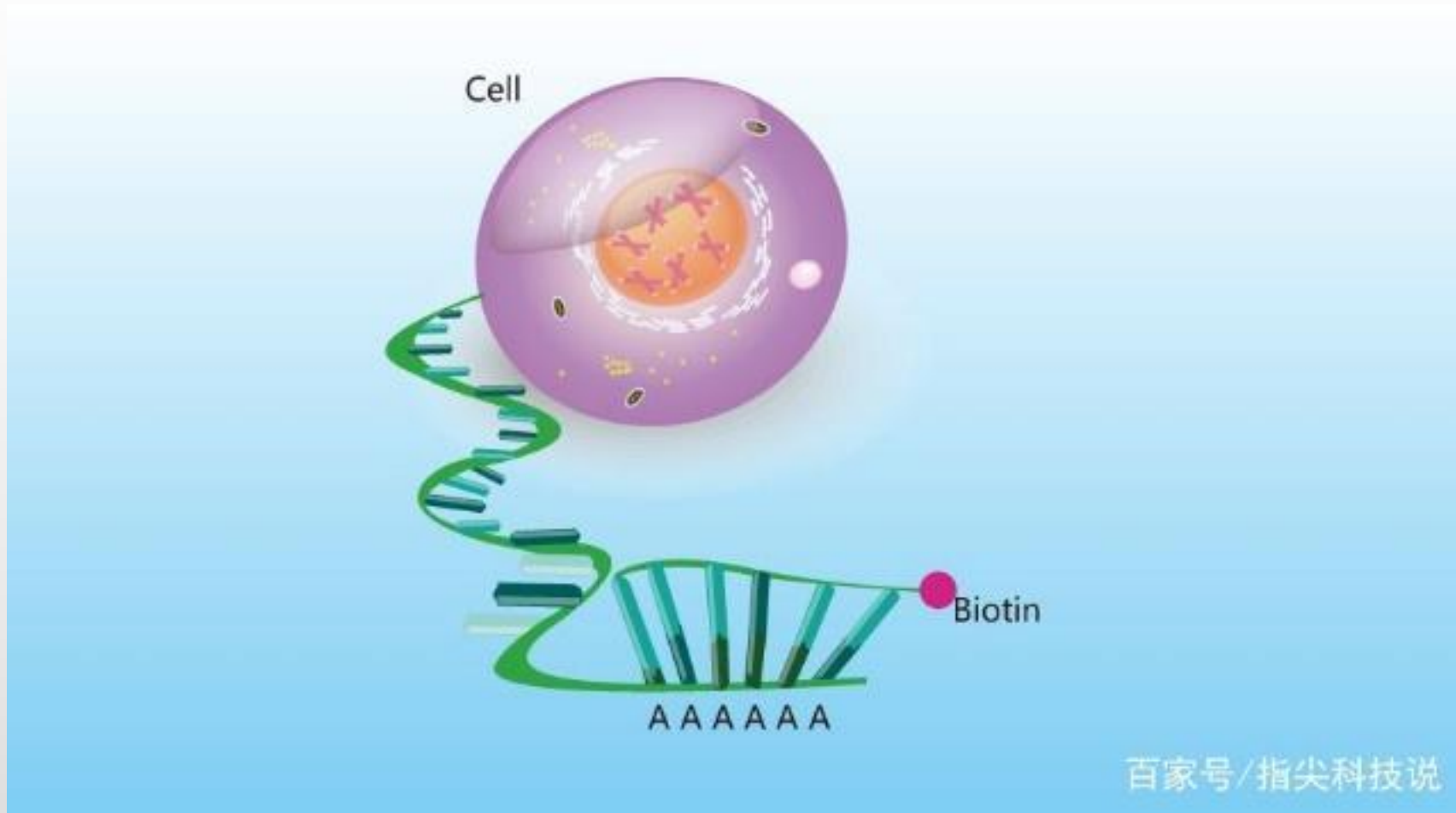
中和抗体是**B淋巴细胞**产生的某些抗体，能够与病原微生物表面的**抗原结合**，从而**阻止该病原微生物黏附靶细胞受体**，防止侵入细胞。中和抗体是治疗和预防感染性疾病的一个重要方向。但是如何获得特异性好的强效中和抗体是困难的，且时间较长。

中和抗体的主要筛选方法

- 一. 单克隆抗体的建立
- 二. 噬菌体文库

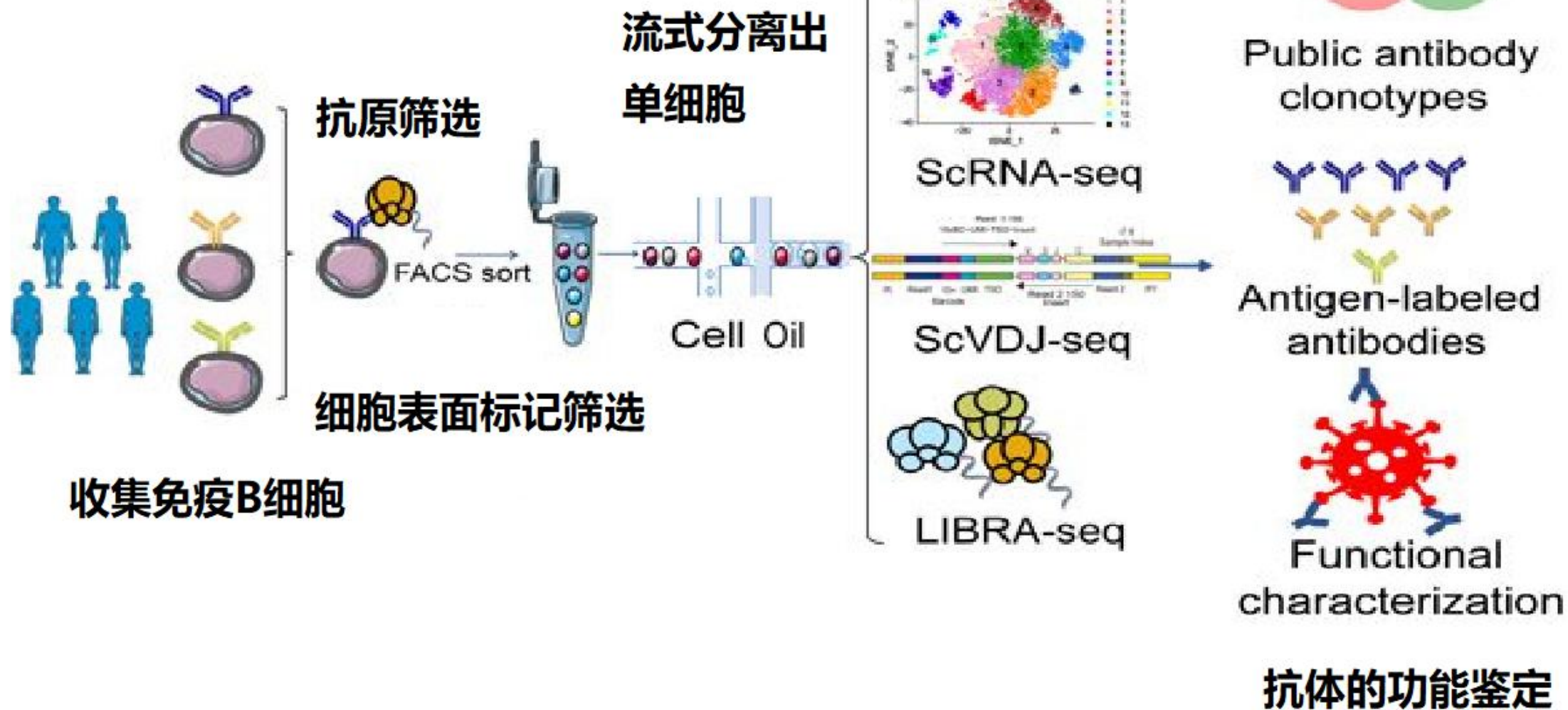


基于单细胞测序的抗体基因的筛选



单细胞测序

抗体的亲和力鉴定



Article

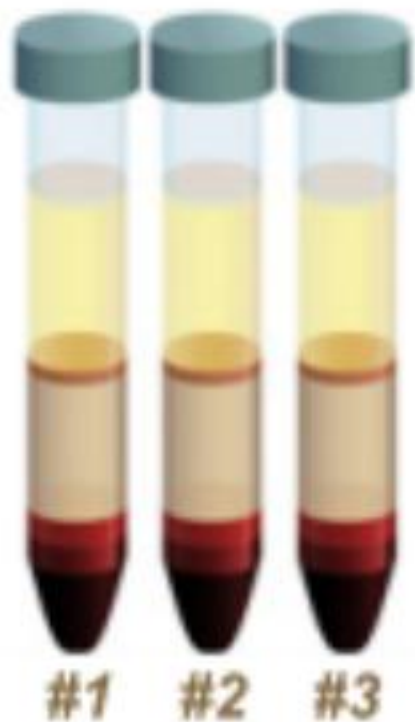
Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells

Yunlong Cao,^{1,10} Bin Su,^{2,10} Xianghua Guo,^{2,10} Wenjie Sun,^{1,10} Yongqiang Deng,^{3,10} Linlin Bao,^{4,10} Qinyu Zhu,^{5,6,10} Xu Zhang,⁷ Yinghui Zheng,¹ Chenyang Geng,¹ Xiaoran Chai,¹ Runsheng He,¹ Xiaofeng Li,³ Qi Lv,⁴ Hua Zhu,⁴ Wei Deng,⁴ Yanfeng Xu,⁴ Yanjun Wang,² Luxin Qiao,² Yafang Tan,³ Liyang Song,^{1,5} Guopeng Wang,⁵ Xiaoxia Du,^{1,5} Ning Gao,^{6,8} Jiangning Liu,⁴ Junyu Xiao,^{5,6} Xiao-dong Su,^{1,5} Zongmin Du,³ Yingmei Feng,² Chuan Qin,^{4,*} Chengfeng Qin,^{3,*} Ronghua Jin,^{2,*} and X. Sunney Xie^{1,6,9,11,*}

Advanced Innovation Center for Genomics (ICG) & Biomedical Pioneering Innovation Center (BIOPIC), Peking University, Beijing, China

通过恢复期患者 B 细胞的高通量单细胞测序鉴定出针对 SARS-CoV-2 的强效中和抗体

如何获得针对新冠病毒的记忆性B细胞



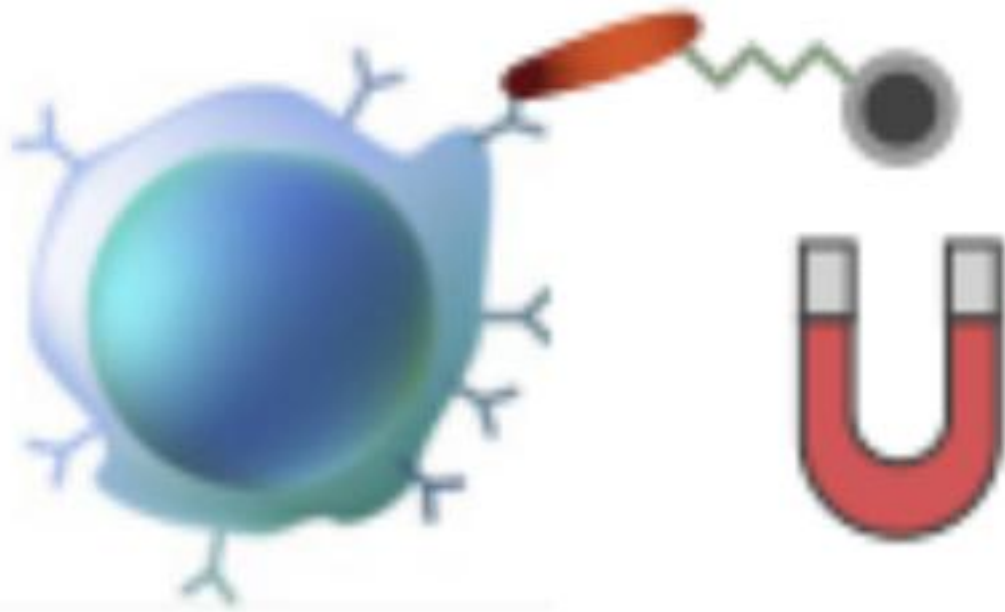
PBMCs isolation

1. 样本来源

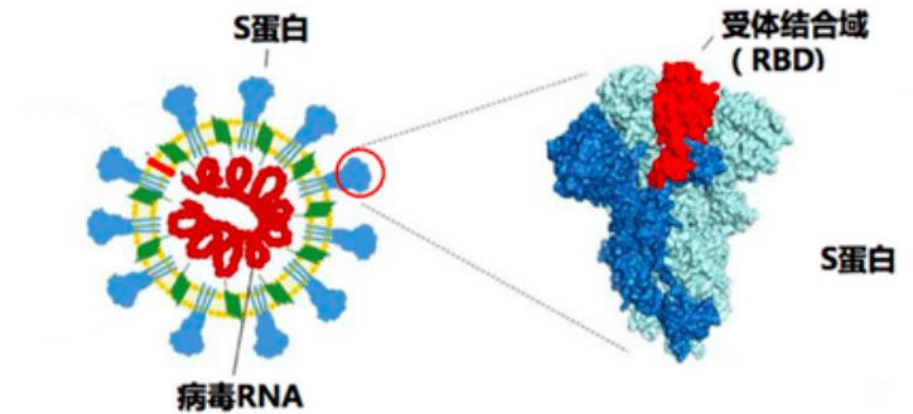
来自新冠康复病人的外周血单个核细胞
(PBMCs)

如何获得针对新冠病毒的记忆性B细胞

抗原筛选单个核细胞



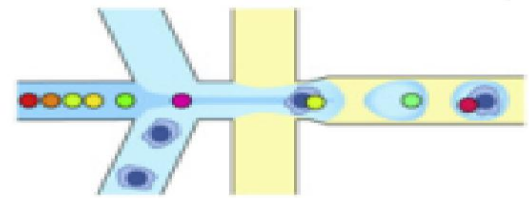
**Spike/RBD protein
pulldown**



如何获得针对新冠病毒的记忆性B细胞



CD27+ pulldown



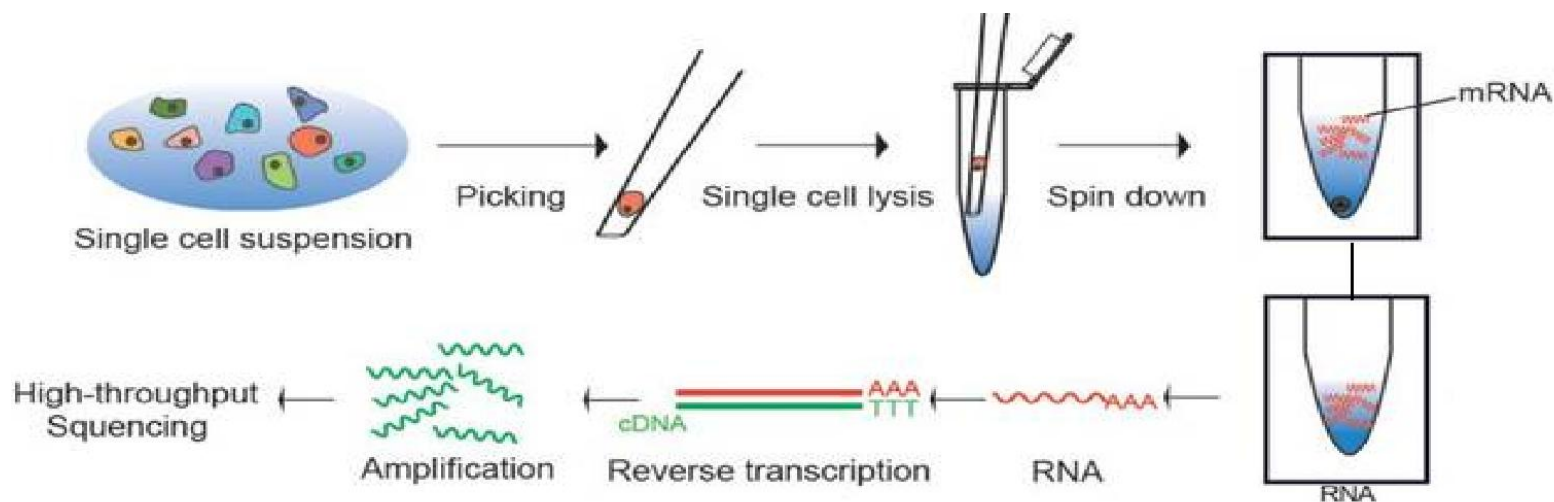
Flow Cytometry

进一步根据B细胞表面分子标记对分离获得的淋巴细胞进行荧光标记 (CD19^{high}/CD20^{low to negative}/CD3^{negative}/CD27^{high}/CD38^{high}) ,其中CD27是记忆性B细胞的重要标记。

最后通过流式细胞术获得既针对新冠病毒S蛋白又具有记忆性B细胞标记的单B细胞

表面分子标记技术获得记忆性B细胞

单个B细胞的分离和测序

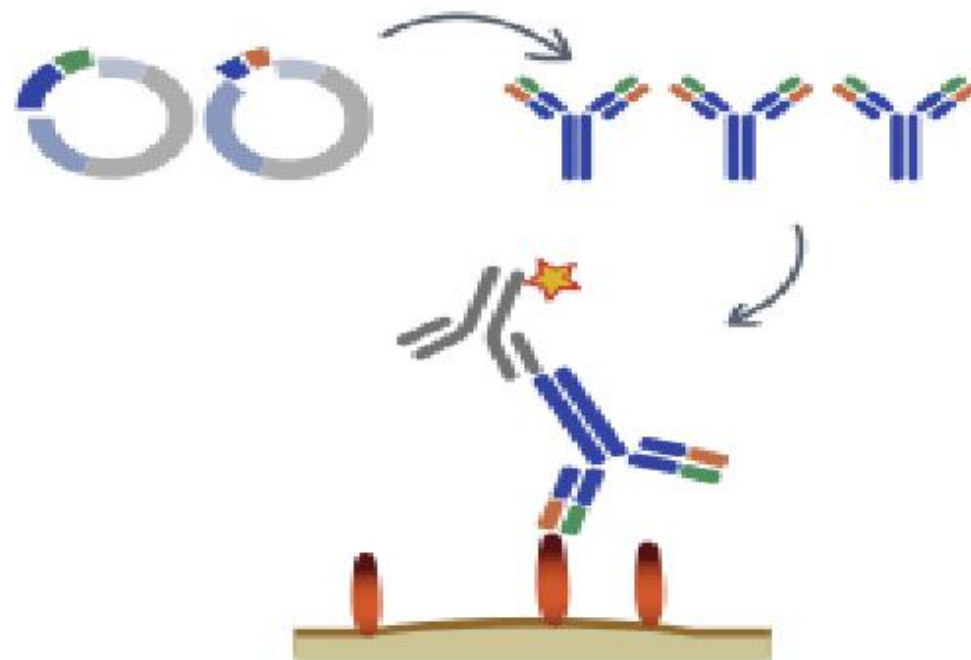


单细胞测序分析

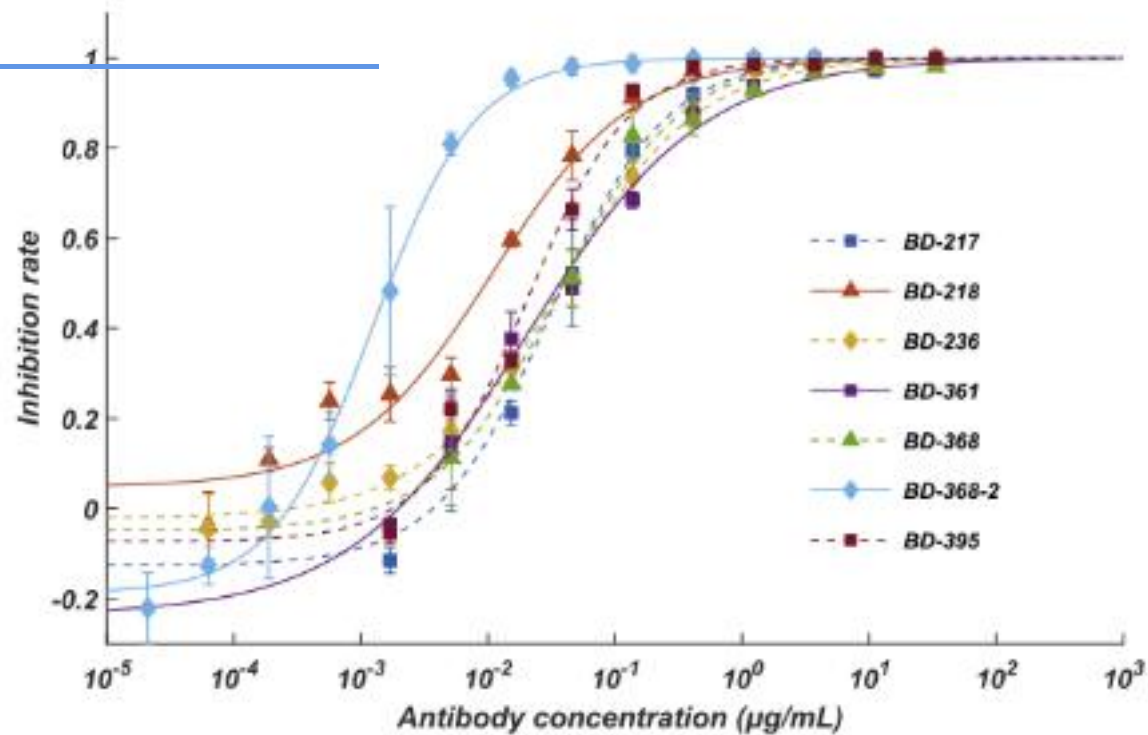
- 一. 单细胞的标记;
- 二. 单细胞裂解液提取RNA;
- 三. 逆转录后建库进行测序

抗体的表达和鉴定

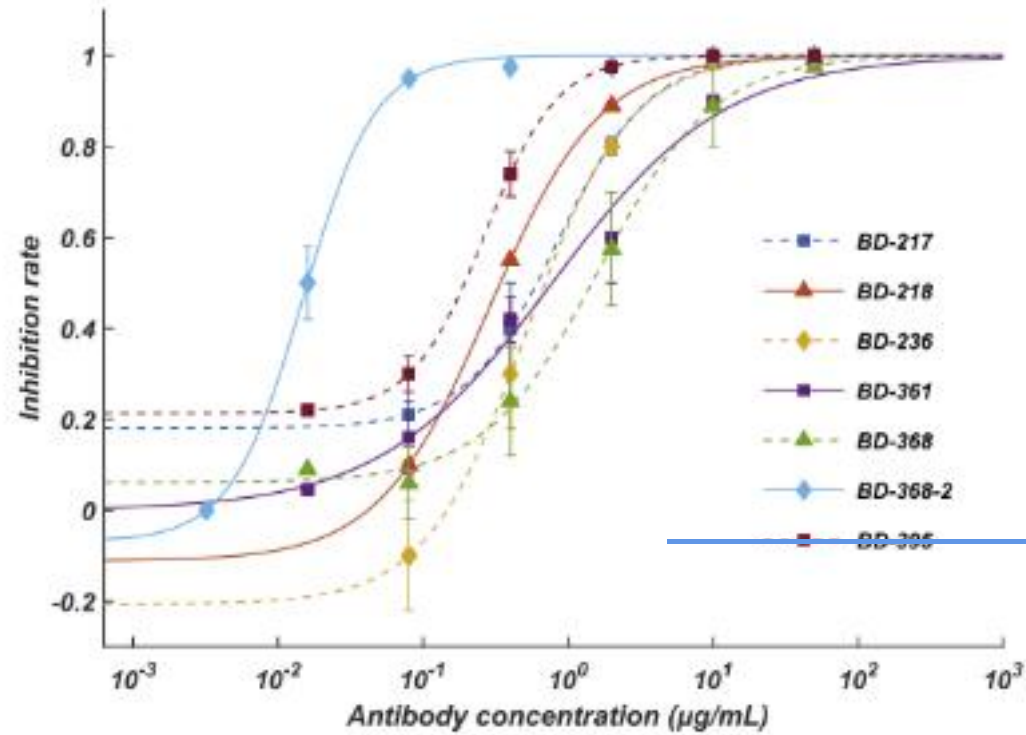
1 抗体的表达和亲和力鉴定



Antibody expression and affinity

A**Pseudovirus neutralization**

假病毒

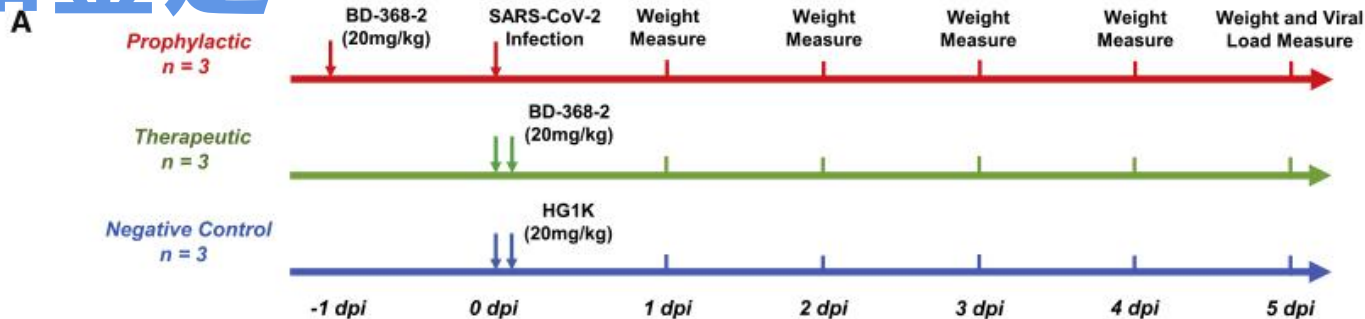
B**Authentic virus neutralization**

真病毒

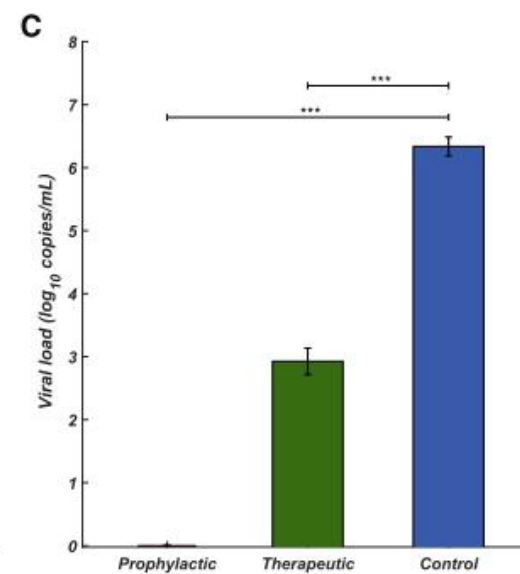
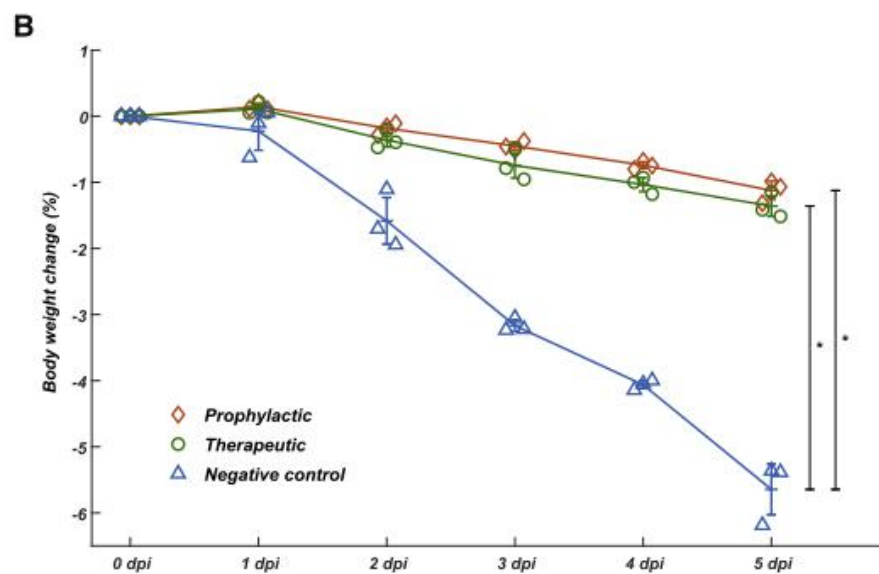
抗体的表达和鉴定

2. 体外中核试验

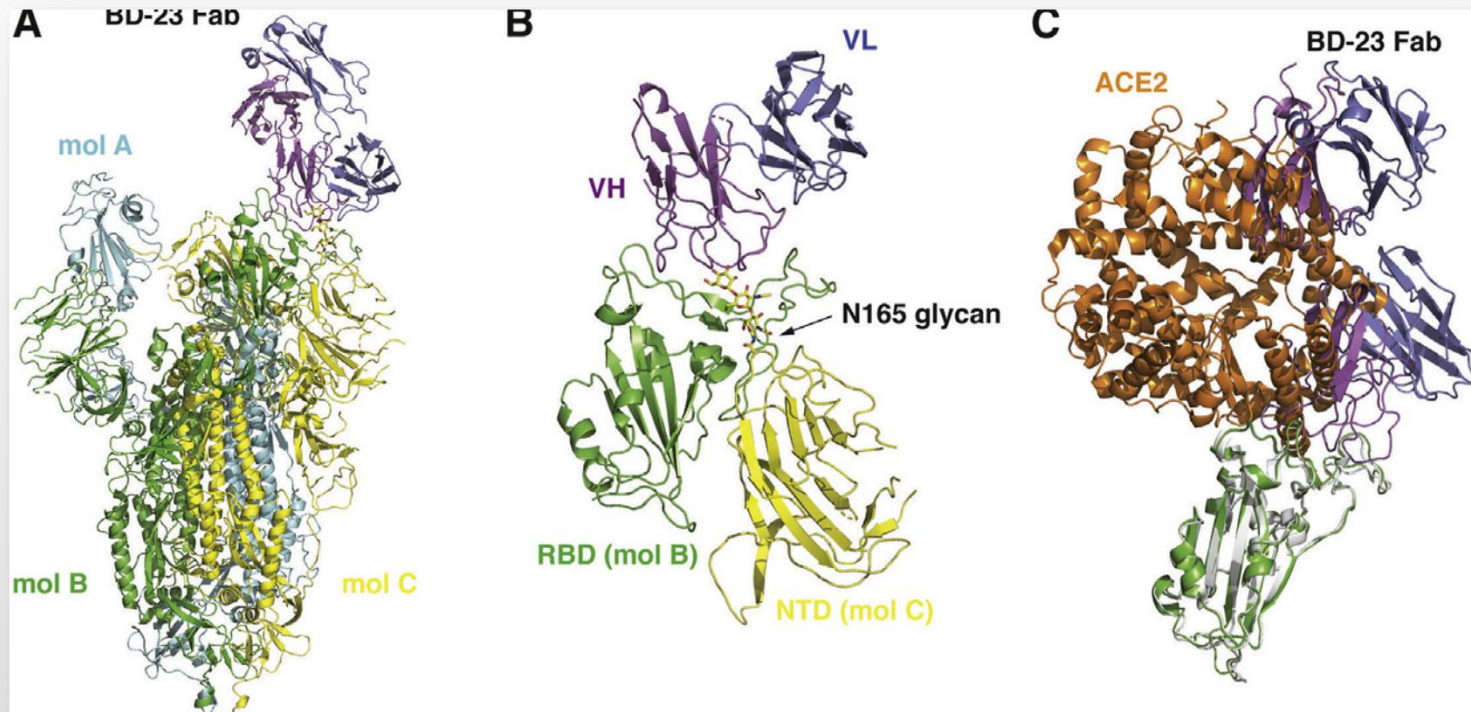
抗体的表达和鉴定



3.体内中和实验



BD23-Fab 与 Spike 三聚体复合物的空间结构



利用冷冻电镜，观察到 RBD/ACE2 复合物的晶体结构覆盖在 RBD/BD-Fab 结构上。BD-Fab 会与 ACE2 发生碰撞，因此阻断 RBD 和 ACE2 之间的相互作用。

与现有抗体基因获取技术的对比

单克隆抗体技术

1. 必须经鼠抗体人源化改造
2. 通量低
3. 制备周期长

噬菌体抗体库技术

1. 无法体内成熟
2. 载体较为原始

单细胞测序技术

1. 通量大
2. 人源性
3. 周期短
4. 技术难度大



高通量单细胞测序的抗体基因 筛选的应用

逐渐从实验室研究转向快速制备抗体药物



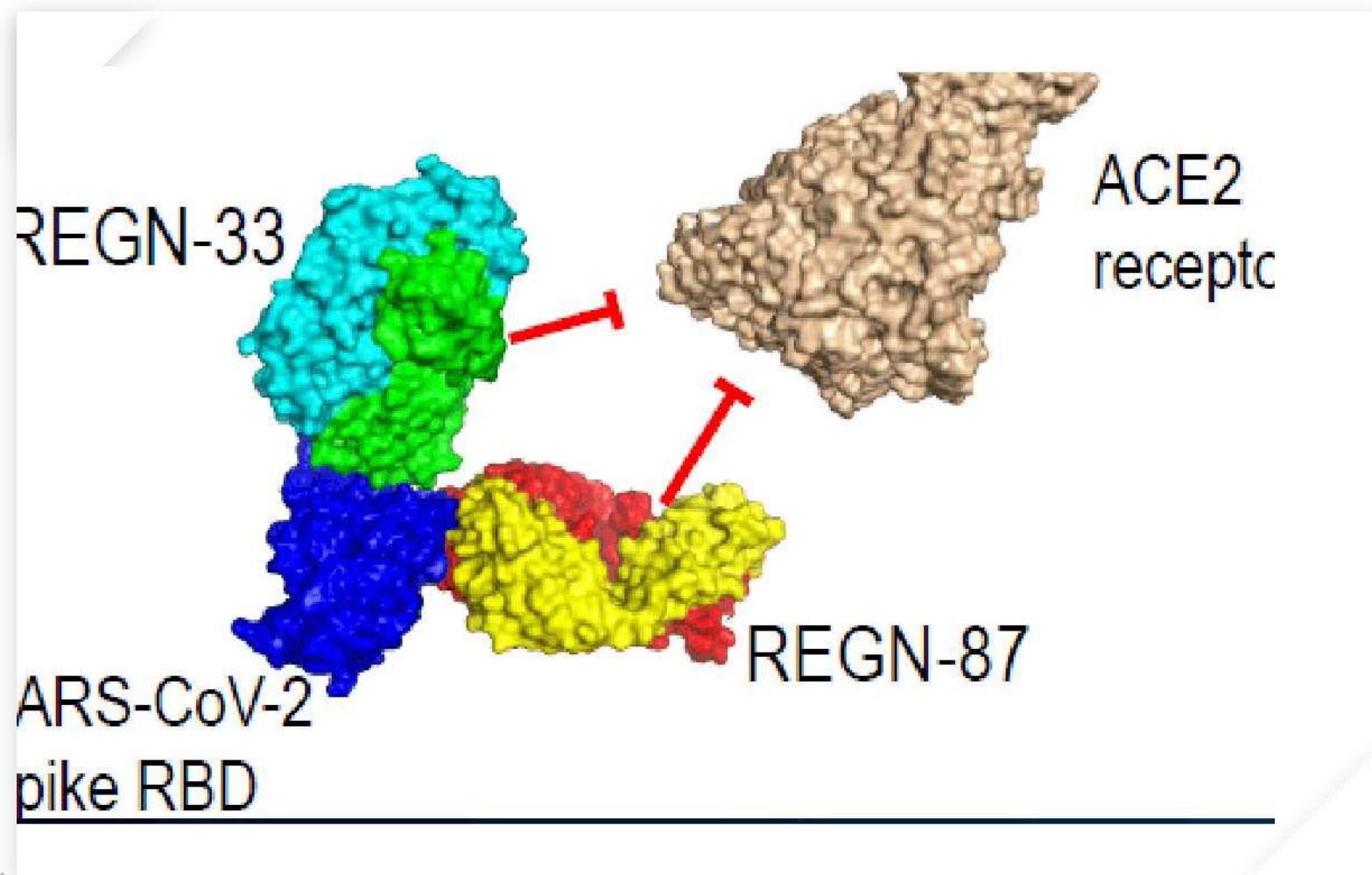
单细胞测序抗体的 实际应用

在预防和治疗均有明显
效果



美国总统特朗普表示，再生元(REGN.US)制造的混合抗体 (REGN-COV2) 是他康复的“关键”。

REGN-COV2包含单细胞测序筛选的抗体



REGN-COV2由两种中和抗体组成：

REGN10987来自转基因小鼠

REGN10933来自**康复者免疫细胞测序**



谢谢观看

