



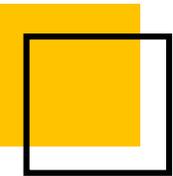
2024

转人Ig基因小鼠

检验与生物技术学院 陈瑶

回答的关键问题

- 一. 为什么要制备转人Ig基因小鼠?
- 二. 转人Ig基因小鼠和转某抗体基因小鼠有什么区别?
- 三. 为了实现转人Ig基因小鼠要做什么技术准备?
- 四. 构建转人Ig基因小鼠的基本流程是什么?
- 五. 如何鉴定转人Ig基因小鼠构建成功?



一、为什么要制备转人Ig基因小鼠？

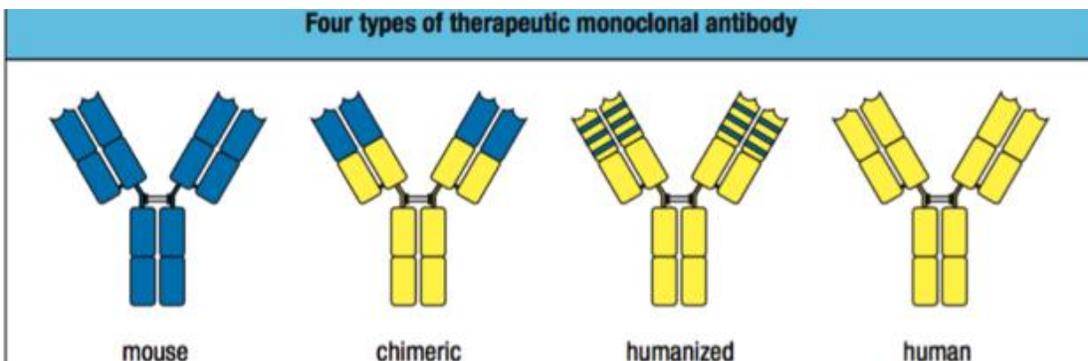
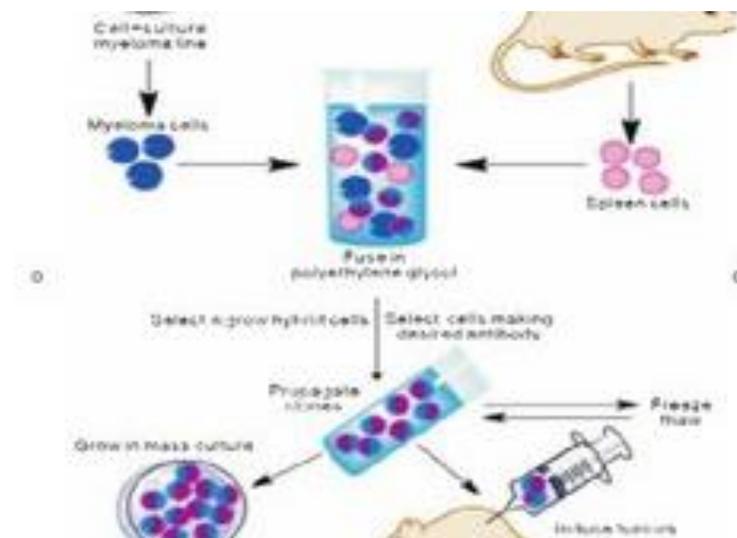
基因工程抗体的难关：

- 人源性或者人源化
- 人源化之后的高亲和力
- 人源化之后的高亲和力的基础上的高功能性

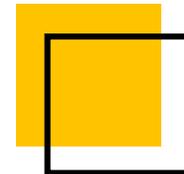


一.为什么要制备转人Ig基因小鼠?

鼠单抗的人源化改造

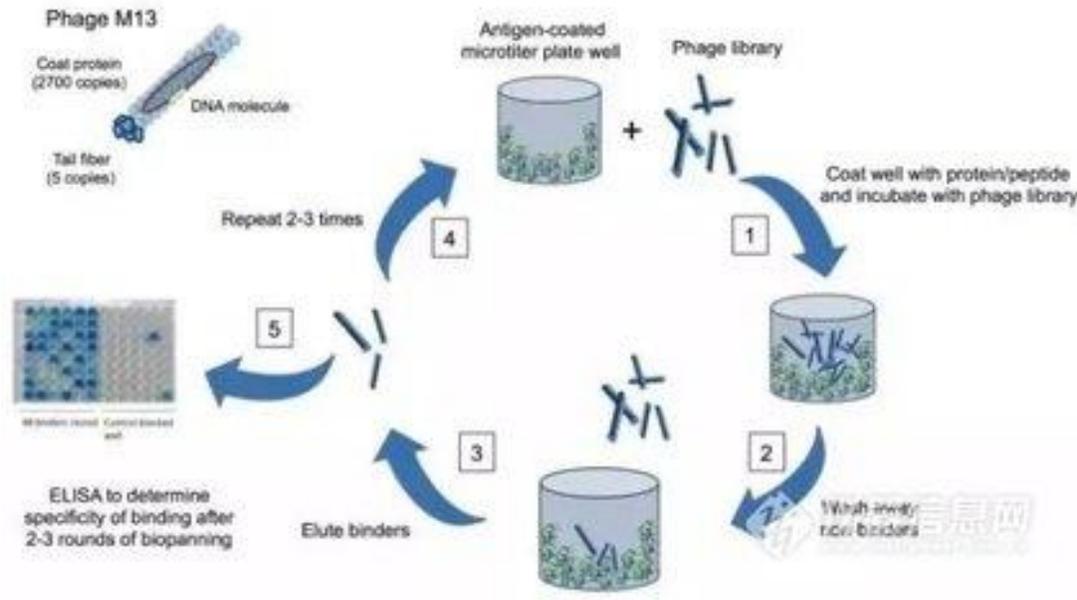


在小鼠体内利用小鼠免疫系统获得的高亲和力抗体在体外进行人源化改造。

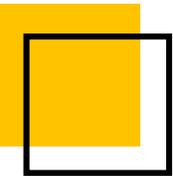


一.为什么要制备转人Ig基因小鼠?

抗体库技术



人源性抗体基因通过体外重排，突变，和淘选，进行亲和力成熟。



一. 为什么要制备转人Ig基因小鼠？

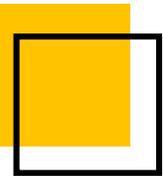
人源化鼠抗体

抗体库技术

抗体的亲和力和人源化被分开进行

人源化和亲和力成熟相互干扰

抗体形成的过程被在体外简约化，模拟化



一.为什么要制备转人Ig基因小鼠?

- 转人Ig基因小鼠的定义:

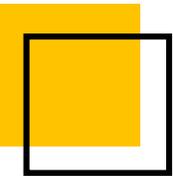
利用小鼠作为模式生物进行转基因改造,使用人的Ig基因替代小鼠的Ig基因, 使小鼠的免疫系统活化的时候,能够产生人源性的抗体。

一.为什么要制备转人Ig基因小鼠?

**转人Ig基因小鼠的设计目标:
实现抗体基因的人源性和抗体亲和力小鼠体内成熟的统一**

- 1.基因基础是完全人源的
- 2.免疫和抗体生成的过程是真实的
- 3.抗体是具有免疫记忆的, 亲和力成熟的, 可用于进一步生物学抗体的制备的。

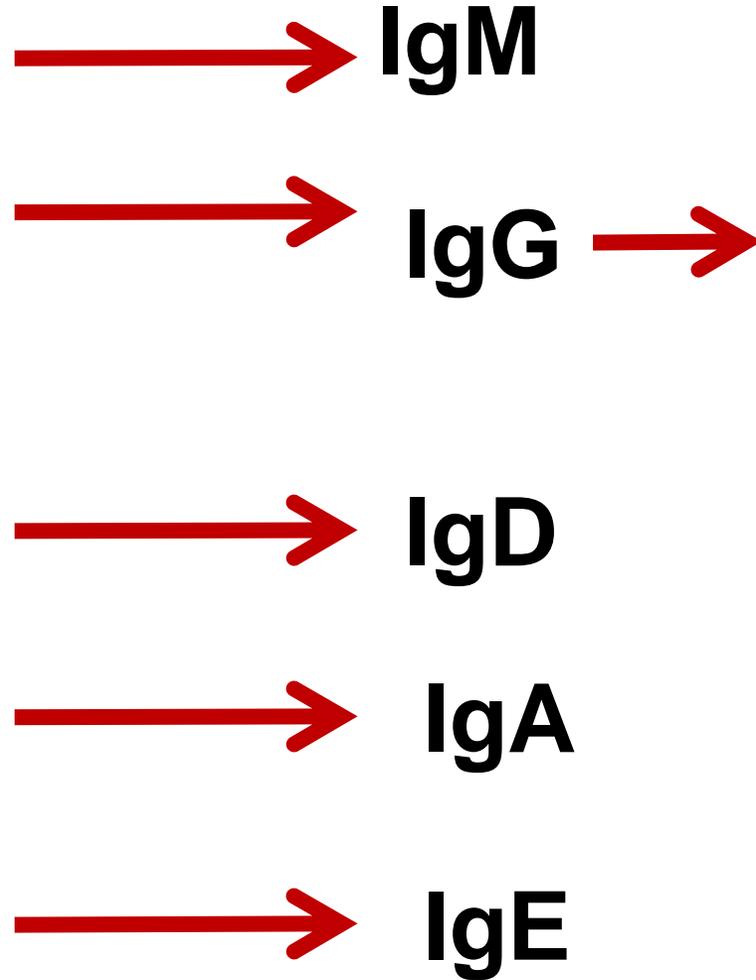
利用小鼠作为模式生物, 生产完全人源性的, 高亲和力的, 具有完整功能性的人抗体。



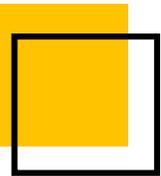
理想的转人Ig基因小鼠



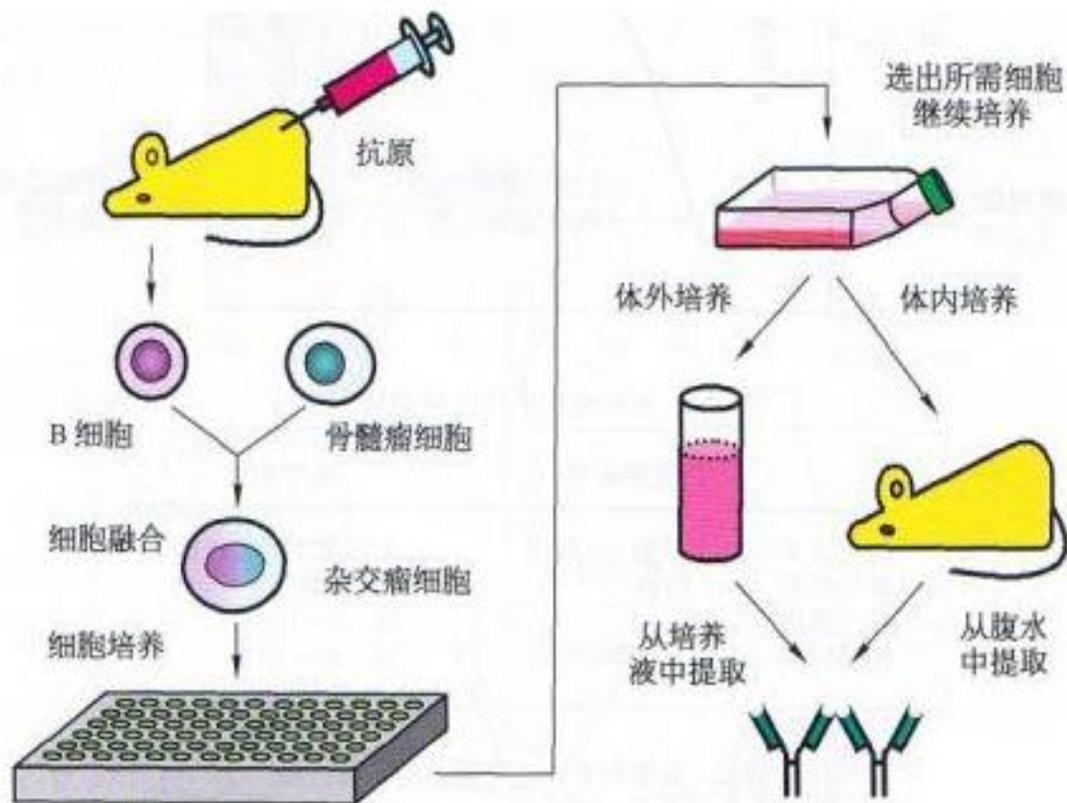
完全模拟了正常抗体产生的过程



- 1.亲和力成熟过的
- 2.针对同一抗原不同表位的
- 3.具有完整功能性的



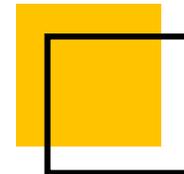
基于转人Ig基因小鼠的人源单克隆抗体



任何一种抗原免疫转基因小鼠后，均可以获得各种类型的免疫成熟的抗体。

结合单克隆抗体技术，均可以持续，稳定，制备高质量的人源单克隆抗体。

人源的单克隆抗体



二、转人Ig基因小鼠和转某抗体基因小鼠有什么区别？

抗体生物反应器：

是指通过基因工程途径，将针对某一抗原的特异性抗体基因导入动物体内，通过大规模饲养生产抗体的方法的方法生产抗体。

转**某**抗体基因小鼠=某抗体的生物反应器生产



二.转人Ig基因小鼠和转某抗体基因小鼠有什么区别？

某

抗体基因导入受精卵

将携带抗体基因的胚胎移植至孕牛

在乳腺中高效表达

蛋白转化

抗体基因

抗体 ← mRNA

转基因牛

目的蛋白

蛋白纯化

制药

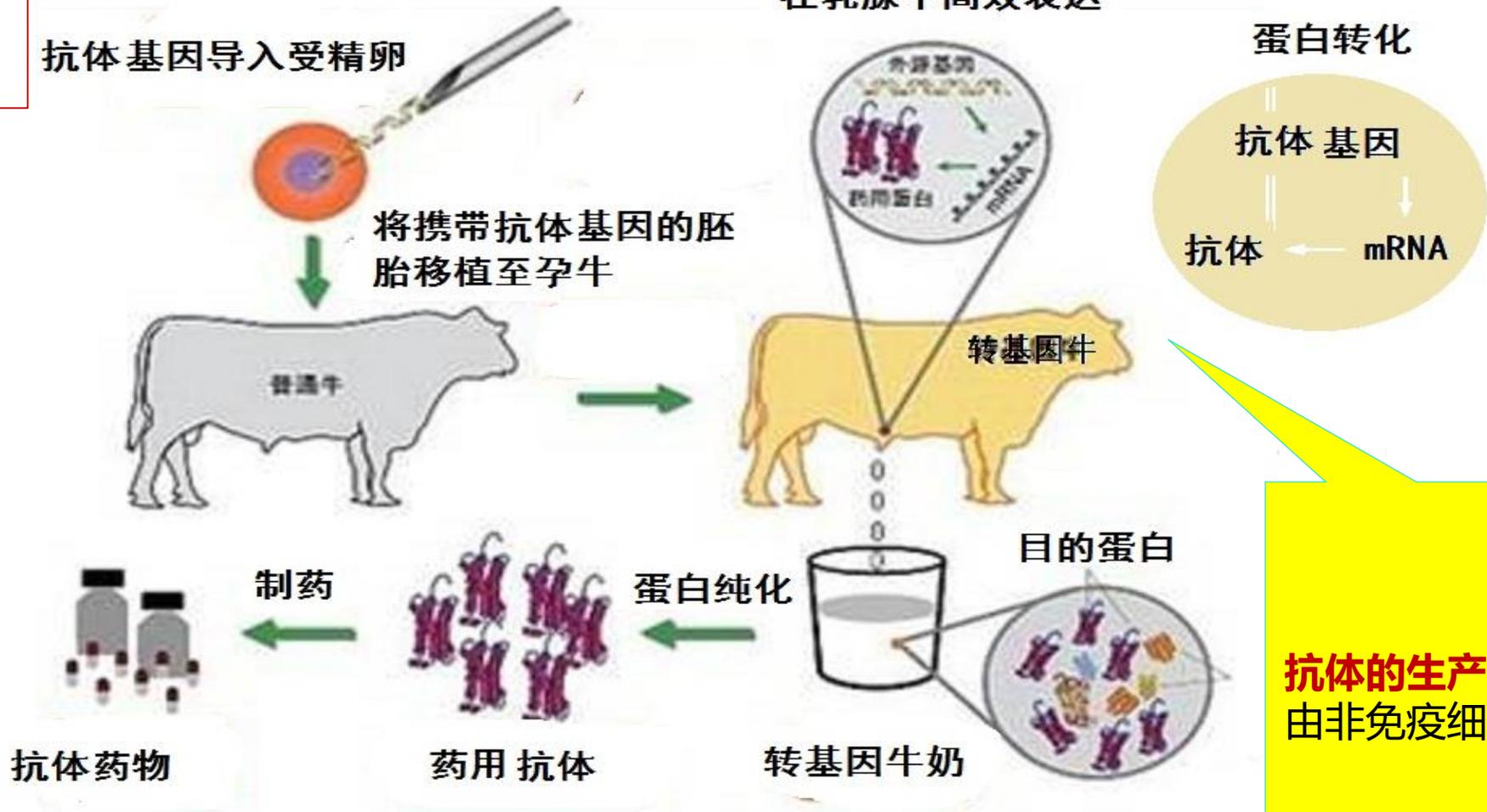
抗体药物

药用抗体

转基因牛奶

抗体的生产：抗体由非免疫细胞生产

抗体基因的来源：经过体内亲和力成熟，体外人源化。或者经过抗体库淘选后获得的抗体基因。



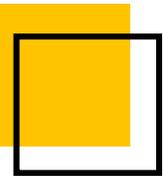
转某抗体基因小鼠的优缺点

优点

- 1.效益好，效果持续；
- 2.下游操作简单，可直接应用，生物安全性高。

缺点

- 1.只能产生针对一个抗原一个表位的抗体；
- 2.制备成本高



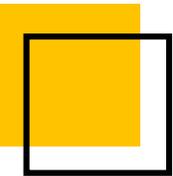
2.转人Ig基因小鼠和转XX抗体基因小鼠有什么区别？

转**某**抗体基因小鼠

- 1.针对某一抗原某一表位；
- 2.**工程学**的方法制备抗体。

转人Ig基因小鼠

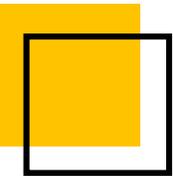
- 1.针对任何抗原任何表位；
- 2.属于**免疫学**的方法去制备抗体



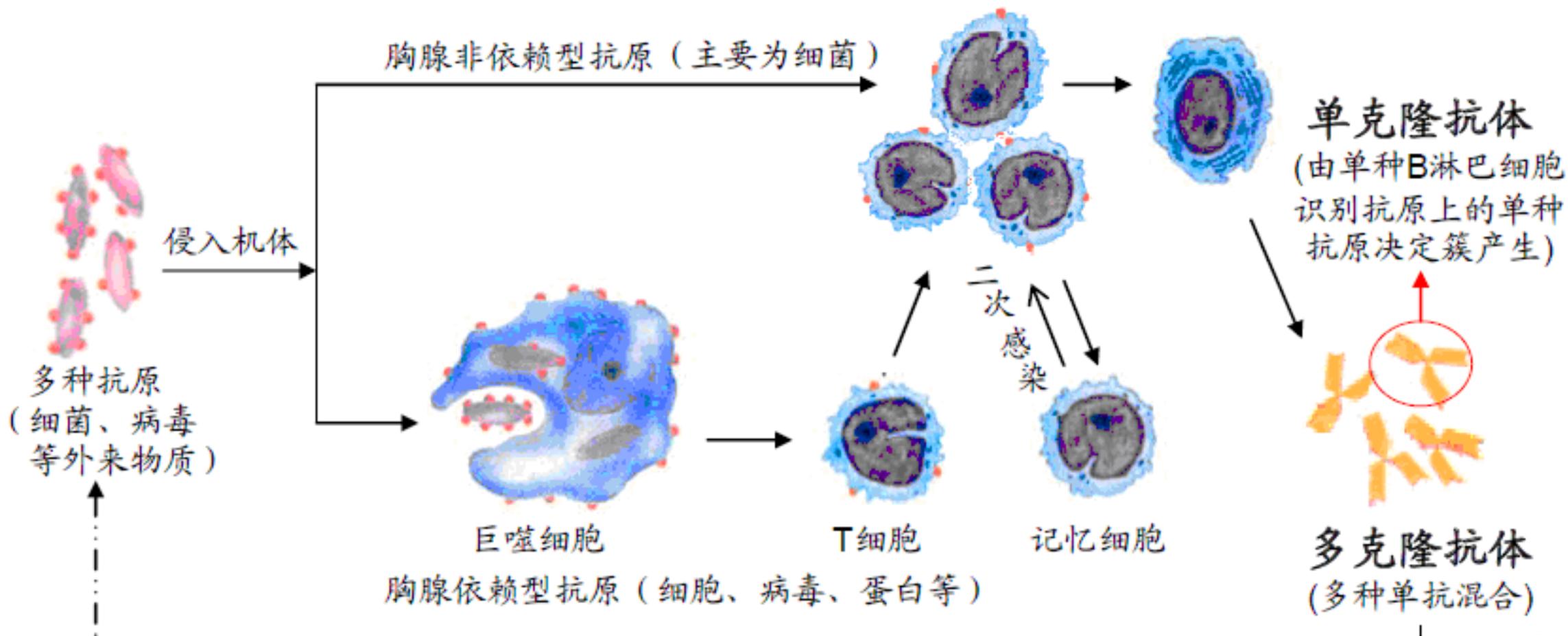
三.为了实现转人Ig基因小鼠要做什么准备?

- **转人Ig基因小鼠的技术储备:**

1. 了解Ig基因以及抗体成熟的相关机制
2. 如何实现人Ig基因的导入
3. 如何实现小鼠内源性Ig基因剔除
4. 如何进行转人Ig基因小鼠的构建
5. 如何对子代转基因鼠进行鉴定



抗体生成是一个过程



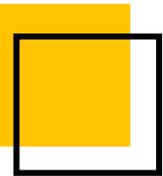
1. 了解Ig基因以及抗体成熟的相关机制

抗体的生成不是简单的基因表达！

- 一. 抗原的提呈
- 二. MHC限制性
- 三. 免疫记忆的形成
- 四. 基因重排，高频突变等带来的亲和力成熟

转人Ig小鼠构建目的是要保证人源性抗体基因能在小鼠体内实现抗体生成复杂的**生物学过程**。

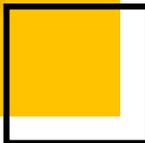
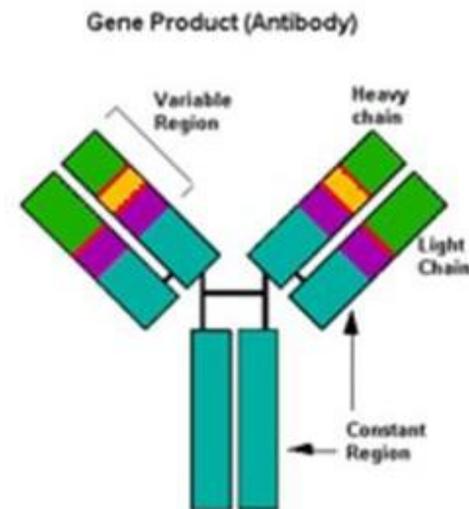
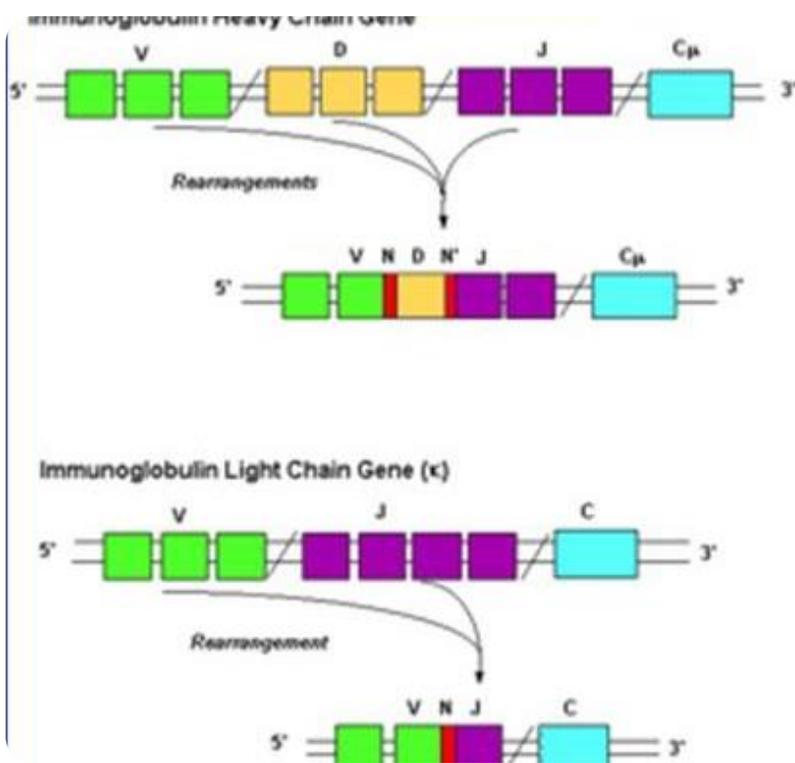
产生这些复杂的生物学过程的基础是**庞大的胚系Ig基因**



抗体的基因的组成和结构



抗体的复杂功能，
是建立在具有庞大的
基因数据支持的基础
上的。



带着以下观点，进入课程学习：

- 带着以下观点，进入课程学习：

1. 抗体基因是一群功能丰富，结构复杂多变的巨大基因。
2. 转人Ig基因动物的构建，需要将与抗体生成，抗体类别转化，抗体亲和力成熟相关的所有基因进行有效的功能协调。
3. 不仅要**将抗体基因转入**，还需要**抗体基因在受体动物体内实现完整的功能性**。

- 基因工程抗体和转基因动物的区别：

- 基因工程抗体提取的是抗体基因的mRNA

- 转Ig基因动物所需的抗体基因：

- DNA

编码所有抗体基因的外显子和内含子的总和。

一些与抗体表达相关的辅助基因的导入，也将有助于人抗体在鼠体内的生成。

“

2.构建一只转人Ig基因小鼠至少需要转入以下的编码基因：

2.1 Ig亲和力成熟和类别转换需要的所有基因：

- 不同类型的重链和轻链，如 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ，对应IgA、IgD、IgE、IgG和IgM五种抗体。轻链分： κ 或 λ 型。多为 κ 抗体。

以实现抗体的亲和力成熟和类别转换

”

胚系Ig基因在基因组中以**基因簇**(gene clusters)的形式存在。

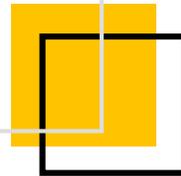
重链基因簇(IGH): 含V, D, J, C基因片段
IGHV, IGHD, IGHJ, IGHC

κ轻链基因簇(IGK): 含V, J, C基因片段
IGKV, IGKJ, IGKC

λ轻链基因簇(IGL): 含V, J, C基因片段
IGLV, IGLJ, IGLC

2.1 Ig亲和力和成熟和类别转换需要的所有基因：

- **可变区：**
- 免疫球蛋白重链(IgH)基因中的 VH, DH 与 JH 多样性的可变区基因片段；
- **恒定区：**
- 为 B 细胞发育和初始免疫反应传递信号的重链恒定区 C μ 基因 (IgM) ；
- 发生二次免疫应答必需的至少一个重链恒定区 C γ 基因(IgG)，对免疫反应精细调控
- 和更广泛初始免疫反应(B细胞分化)起重要作用的重链恒定区C δ 基因(IgD)

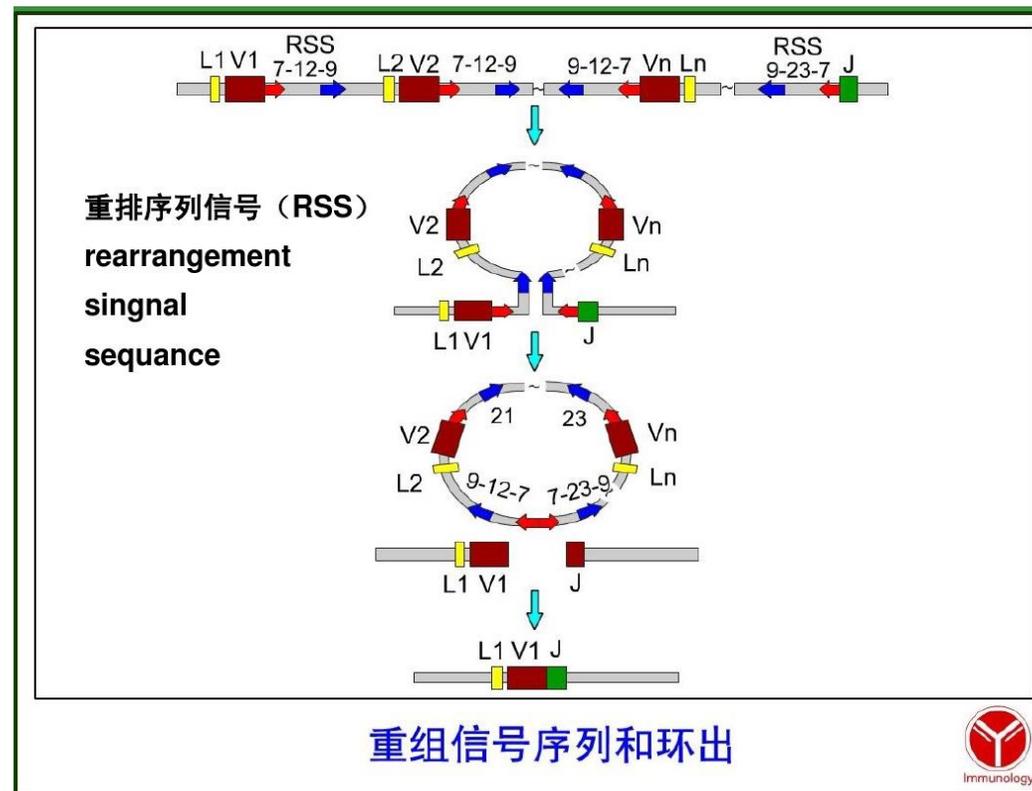


2.2 构建一只转人Ig基因小鼠所需的非编码序列：

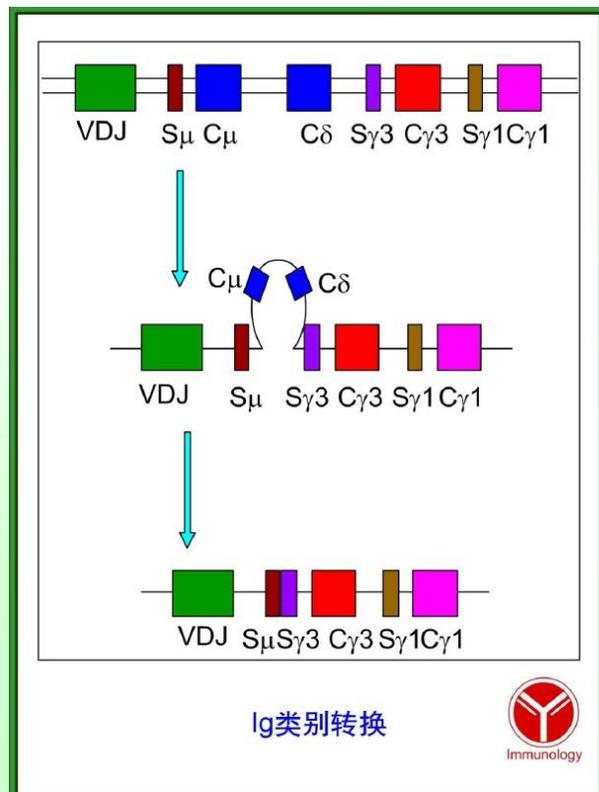
例如： 基因重排需要的基因：

- 基因片段两侧的保守序列——**重组信号序列** (rearrangement signal sequence, RSS)

帮助抗体产生免疫记忆及亲和力成熟



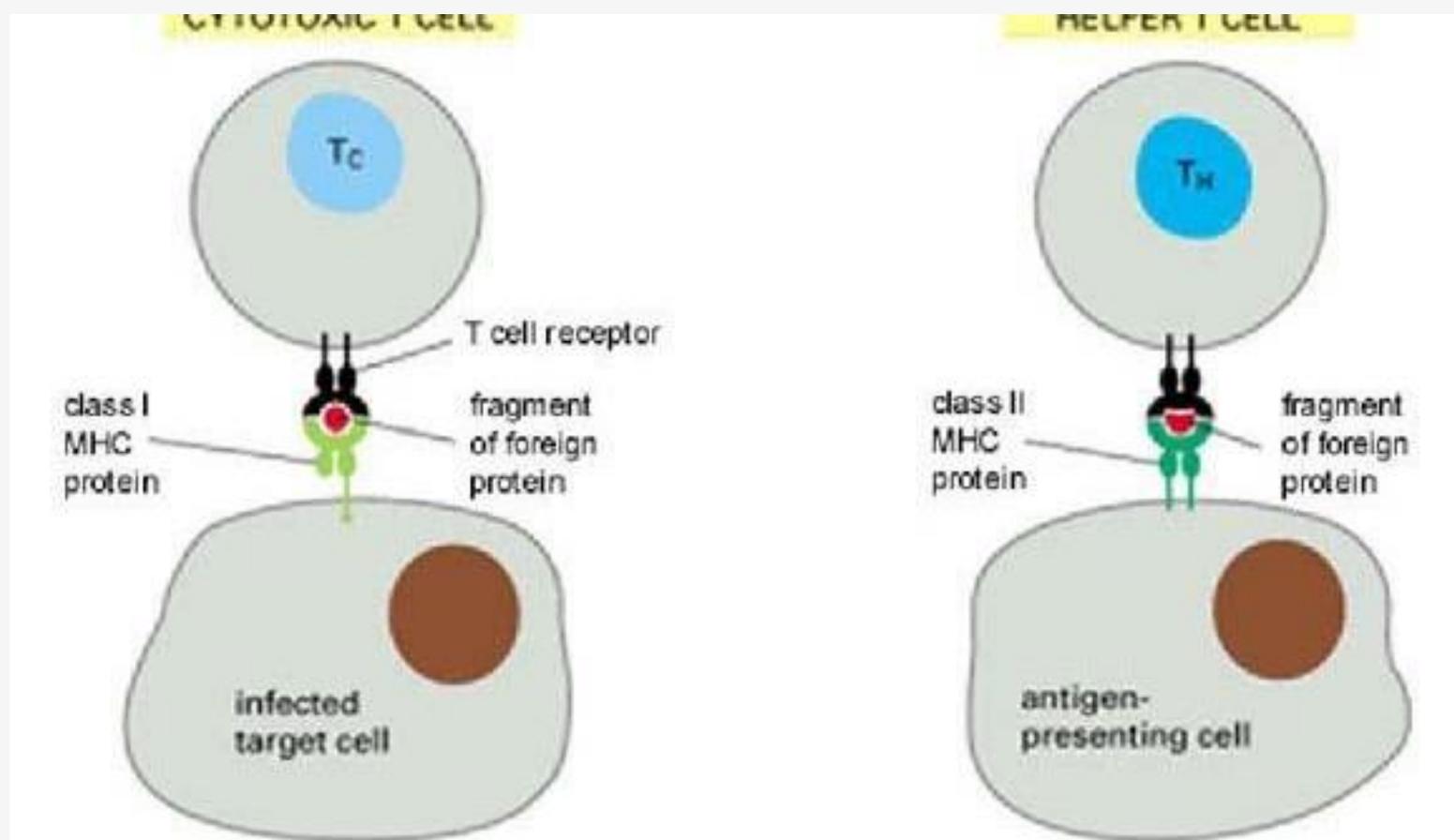
构建一只转人Ig基因小鼠所需的非编码序列：



例如：转换区 (switch region)：

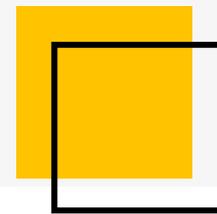
对抗体基因进行复杂调控的顺式作用元件，包括但不限于内含子与增强子，以及各种顺式作用元件。

2.3 影响抗体成熟度和功能的相关基因：



- 举例：免疫相关基因：
抗原提呈所需的组织相容性基因：

MHC I ,MHC II 等。
有效的抗原提呈

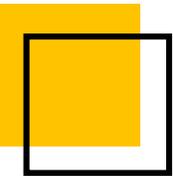
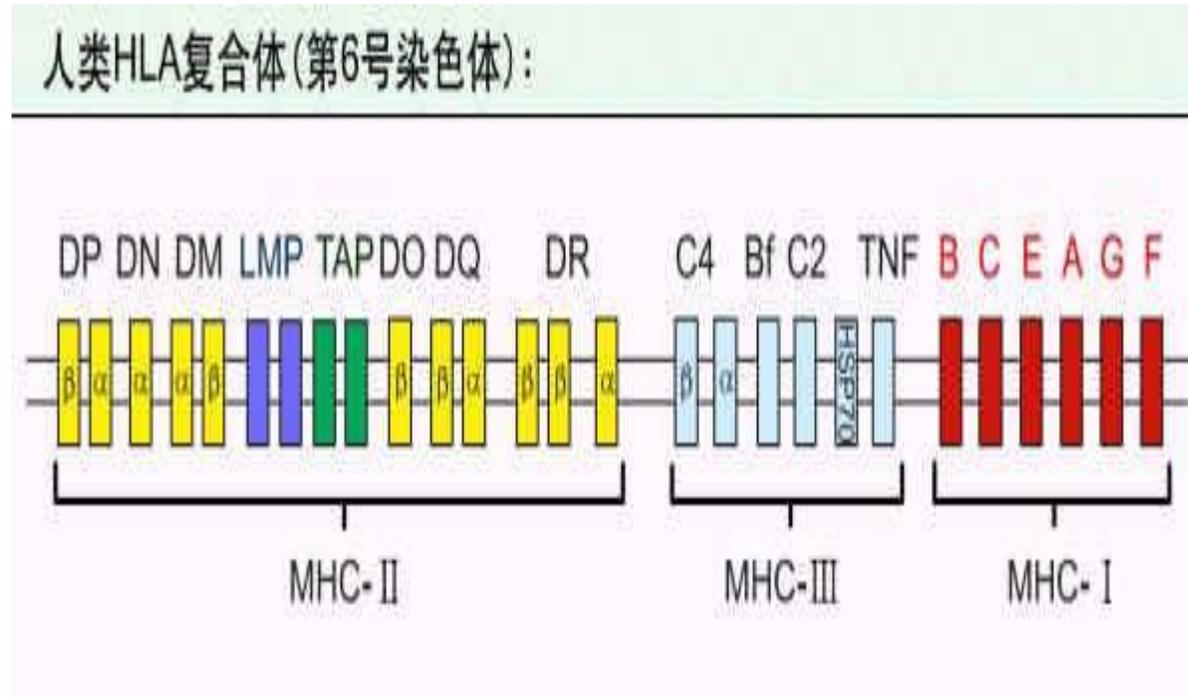


MHC 主要组织相关性抗原 (HLA)

HLA复合体位于第6号染色体短臂上大约4000kb范围内，由一群密切连锁的基因组成。

多基因性:基因复合体由多个紧密相邻的基因座位组成，其编码产物具有相同或相似的功能。

4000kb范围内，由一群密切连锁的基因组成。**HLA复合体**是迄今已知的人体最复杂的基因体系。



3.总结：抗体功能基因组

免疫相关基因：

1. 不同类型的重链和轻链，如H, λ , κ , μ , γ 等。与类别转换和亲和力成熟相关的区域。
2. 主要的组织相容性复合物，如MHC I、II；
3. CD抗原，如CD7,CD23,CD89,CD59等等。
4. 其他基因，如协同刺激因子B7/CD28等等
 - 关注这些基因与宿主小鼠免疫体系的兼容性；

与免疫成熟相关的精细免疫调控所需的顺式作用元件

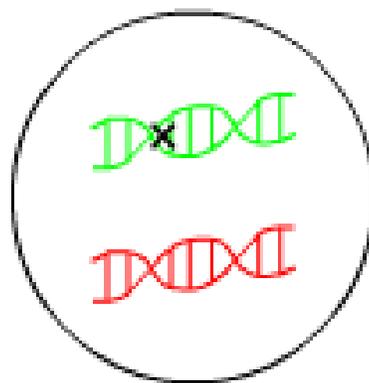
- 内含子及下游增强子原件
- 转换区调控序列
- 外显子两端保守序列
 - 免疫相关调控基因
 - ①指导抗体基因片段进行转座重排的基因
 - ②指导产生记忆免疫细胞的基因

四、自身Ig基因敲除小鼠的构建

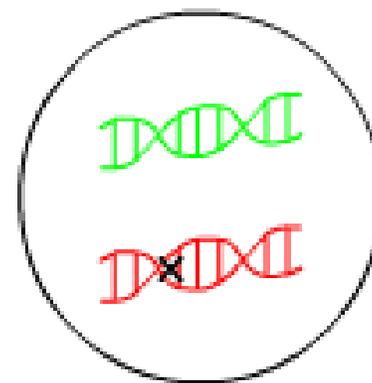
mlg^{-/-}

1.构建自身Ig基因剔除小鼠的原因

小鼠内源性Ig基因的存在，将导致在抗原刺激的时候，优先产生鼠源性抗体。



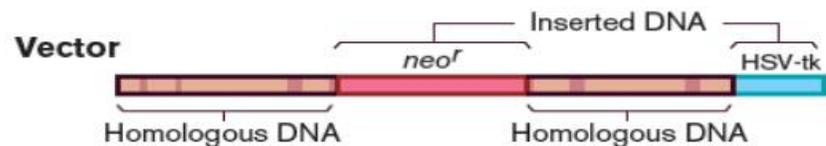
ΔJ_H



ΔC_K

为了让小鼠的免疫系统充分动员生产人抗体，因此必须抑制内源性鼠抗体的生成。

通过基因打靶技术，精确，干净地抑制内源性Ig基因的表达。

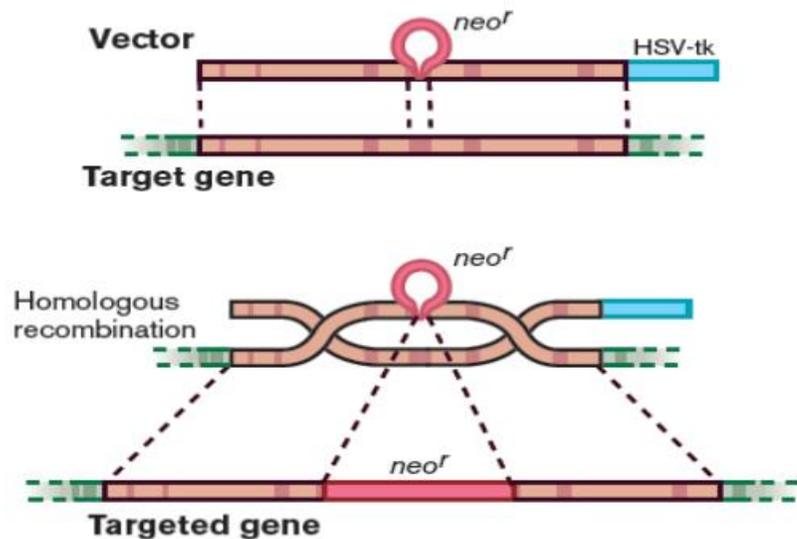


Construction of targeting vector

The vector contains pieces of DNA that are homologous to the target gene, as well as inserted DNA which changes the target gene and allows for positive-negative selection.

ES cell transfection

The cellular machinery for homologous recombination allows the targeting vector to find and recombine with the target gene.

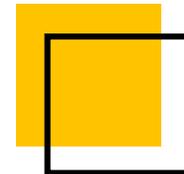
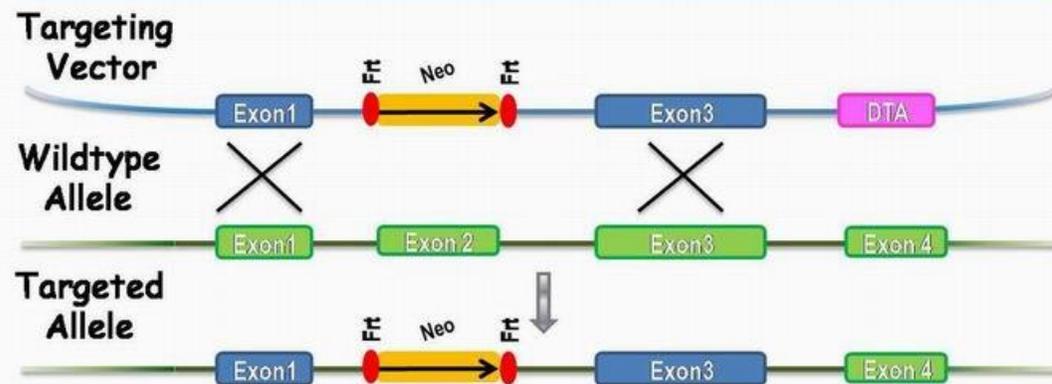


2..利用基因打靶技术剔除小鼠内源性Ig基因

在**同源重组**基础上，利用**正反向双筛**的方法获得正确重组的细胞克隆。

准确敲除内源性（鼠源性）抗体基因

Conventional Knockout



2.利用ES细胞培养技术扩大培养阳性细胞

在同源重组基础上，利用正反向双筛的方法获得正确重组的细胞克隆，可通过**ES细胞培养**增殖。

- 用于鉴定 (RT-PCR,原位杂交)
- 用于保存
- 用于移植

优势:

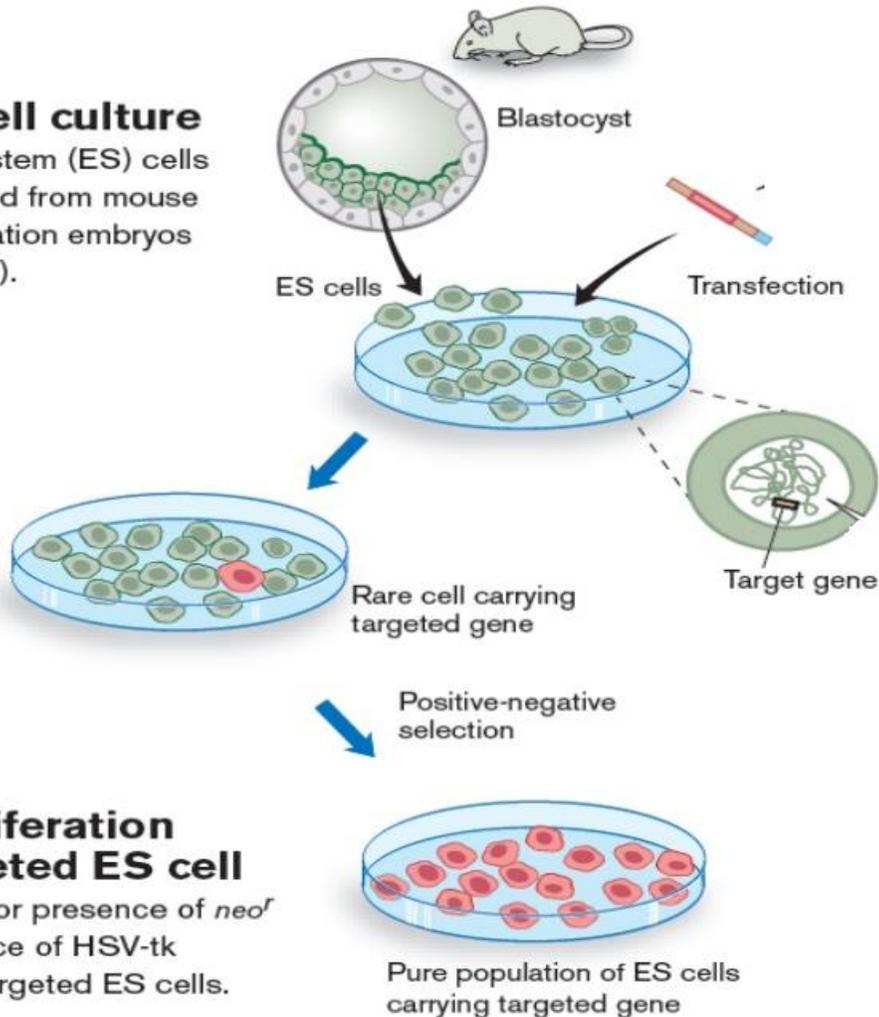
外源基因整合情况的可控性高。

可预先在细胞水平检测外源基因的拷贝数、定位、表达的水平及插入的稳定性。

外源基因导入ES细胞的方法多样，细胞鉴定及筛选方便。

ES cell culture

Embryonic stem (ES) cells are cultivated from mouse pre-implantation embryos (blastocysts).



Proliferation of targeted ES cell

Selection for presence of *neo^r* and absence of HSV-tk enriches targeted ES cells.

Pure population of ES cells carrying targeted gene

内源性鼠抗体基因跨度大，具有大量的启动子和调控元件，需要**多位点多次进行基因编辑**，才能有效敲除内源性鼠抗体基因的功能。

因此适于体外基因工程操作的胚胎干细胞，是转基因的首选。

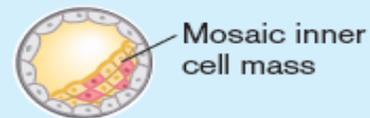
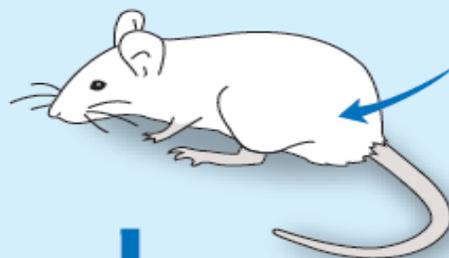
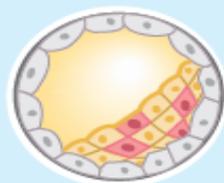
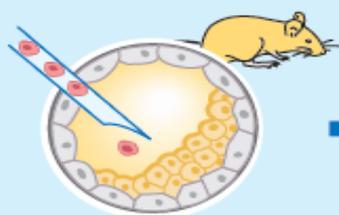
3.阳性ES导入囊胚后构建嵌合体子代小鼠，并经过杂交获得相应的纯系子代

5. Injection of ES cells into blastocysts

The targeted ES cells are injected into blastocysts...

...where they mix and form a mosaic with the cells of the inner cell mass from which the embryo develops.

The injected blastocysts are implanted into a surrogate mother where they develop into mosaic embryos.



6. Birth and breeding of mosaic mice

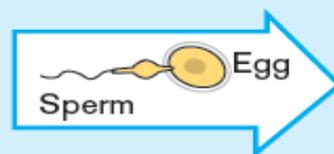
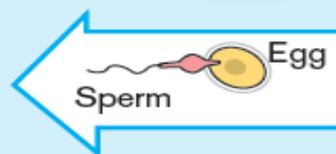
The mosaic mice mate with normal mice to produce both gene targeted and normal offspring.



Born mosaic mice



Gene targeted mice – called "knockout mice" when the targeted gene is inactivated

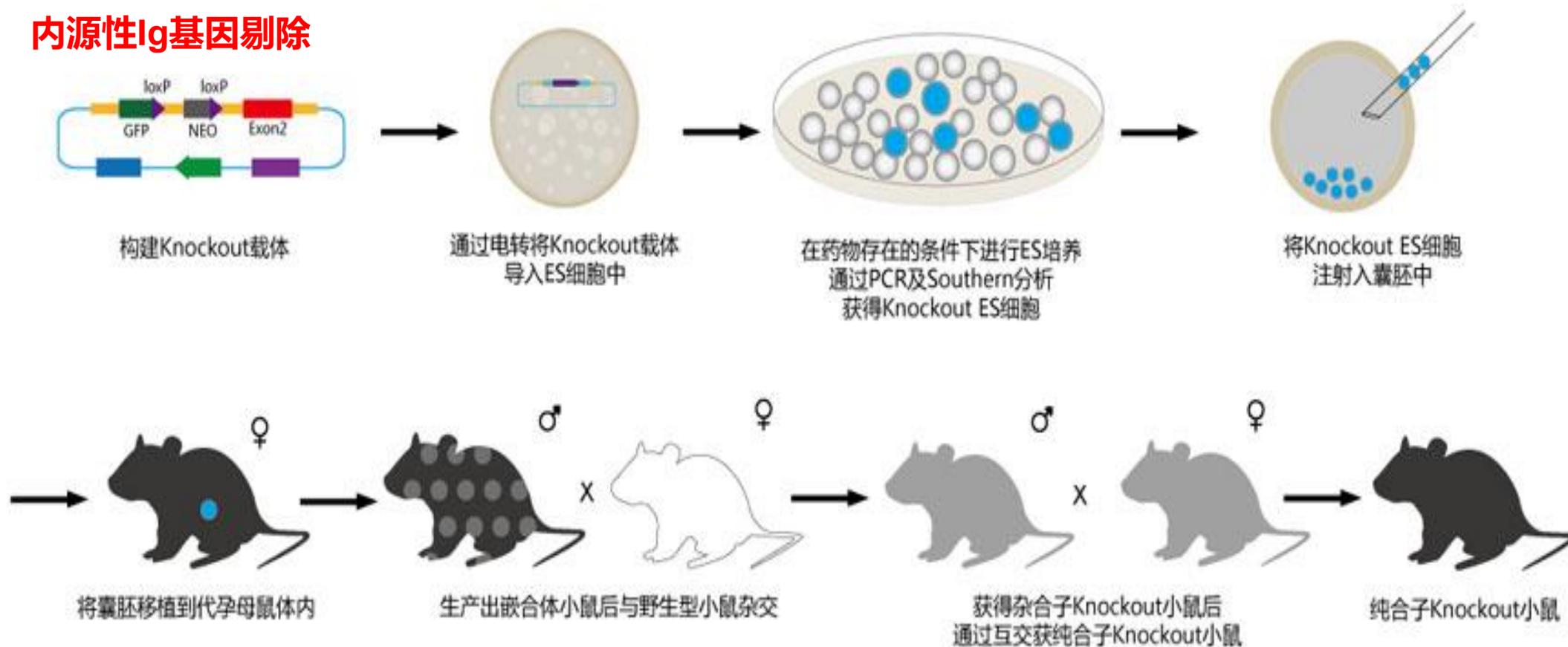


Normal mice



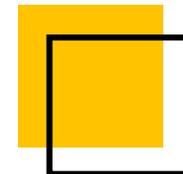
自身Ig基因剔除小鼠的构建全流程

内源性Ig基因剔除

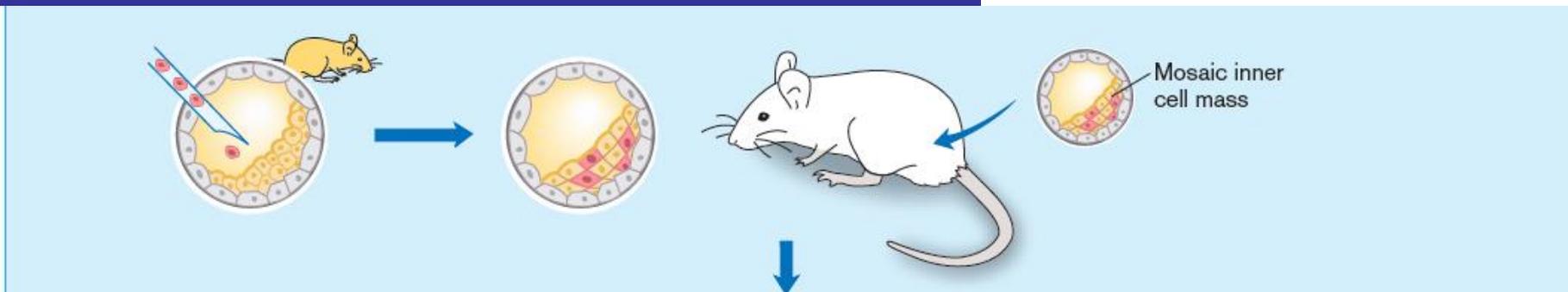


4.基于ES细胞的嵌合体生物:

所得个体为嵌合体

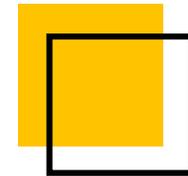


4.1 基于ES细胞的嵌合体动物



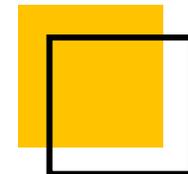
组织和器官的细胞由含有两个或两个以上基因型构建而成的完整个体，称为**基因嵌合体** (chimaera) 或**嵌合体动物**。

免疫学上的涵义则指一个机体身上有两种或两种以上染色体组成不同的细胞系同时存在，彼此能够耐受，不产生排斥反应，相互间处在嵌合状态。



嵌合体的转基因动物

- ❖ 把ES细胞或EG细胞注入胚泡，使其与正常胚胎结合在一起，并参与宿主胚胎的发育，则可形成嵌合体动物的各种组织和器官。
- ❖ 转基因动物子代一部分组织器官源自正常胚胎；一部分组织器官源自经过基因改造的ES细胞和自身胚胎的杂合细胞。



杂合子和嵌合体动物的区别

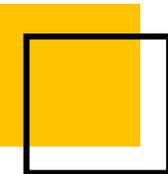
杂合子:生物只有一套基因组，基因组中有**两套基因**，一套来自父亲，一套来自母亲



+



灰鼠



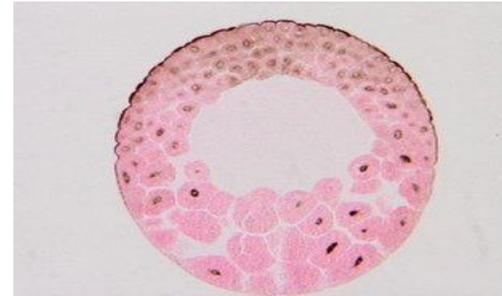
杂合子和嵌合体动物的区别

嵌合子:生物体内有**两种来源的细胞**,也就是两套完全不一样的基因组,一种来自ES,一种来自囊胚。



黑鼠来源的ES

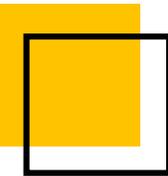
+



白鼠来源的囊胚



花鼠

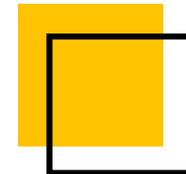


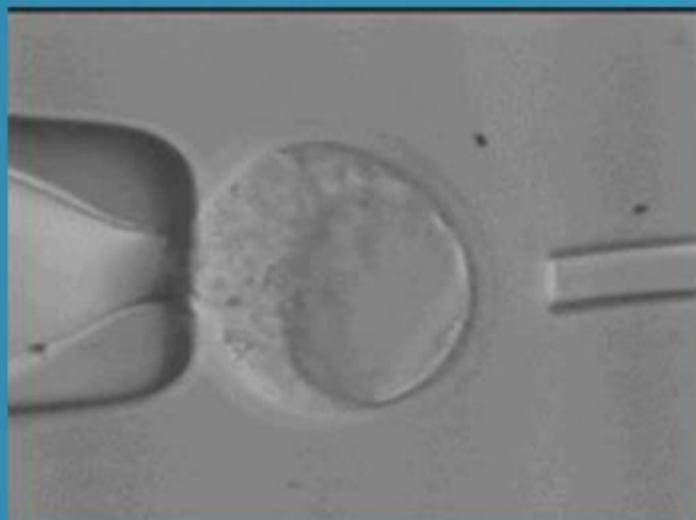
杂合子和嵌合体动物的区别

嵌合子生物所有的器官都可能由两种细胞组成，也可能只有部分器官是两种细胞组成。

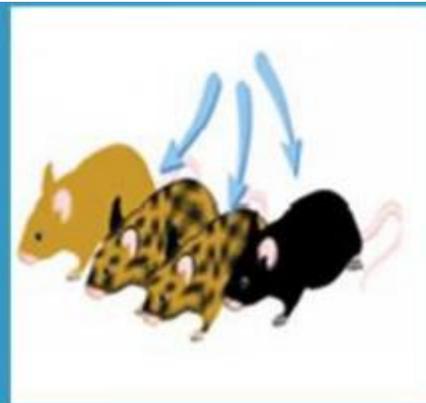


但是白细胞和黑细胞之间并没有遗传物质的交换

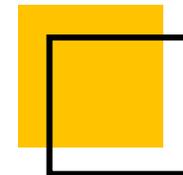




胚胎干细胞显微注射



从嵌和动物到转基因动物，还需要进一步的种系建立



4.2 嵌合体小鼠的鉴定和转基因小鼠建系

嵌合体小鼠的构建：

供体：主要是来源于129系灰色小鼠或者是Babc系小白鼠

受体：主要是C57BL/6系的黑色小鼠。

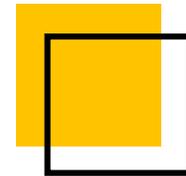
一旦形成了嵌和小鼠，可以通过子代小鼠的外貌特征予以判断

毛色，眼睛的颜色等。
譬如129/C57BL/6嵌和，
可以生成经典的黑灰条纹
小鼠。



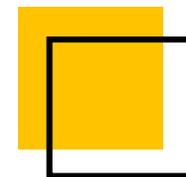
C57

嵌合鼠





经典的黑灰条纹



4.2 嵌合体小鼠的鉴定和转基因小鼠建系



嵌合体小鼠的构建只是转基因小鼠种系建立的第一步：

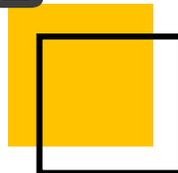
1.嵌合体小鼠的构建成功只能说明外源基因已经导入了小鼠体内。

2.需要通过回交来证明外源基因已经导入了**生殖细胞**

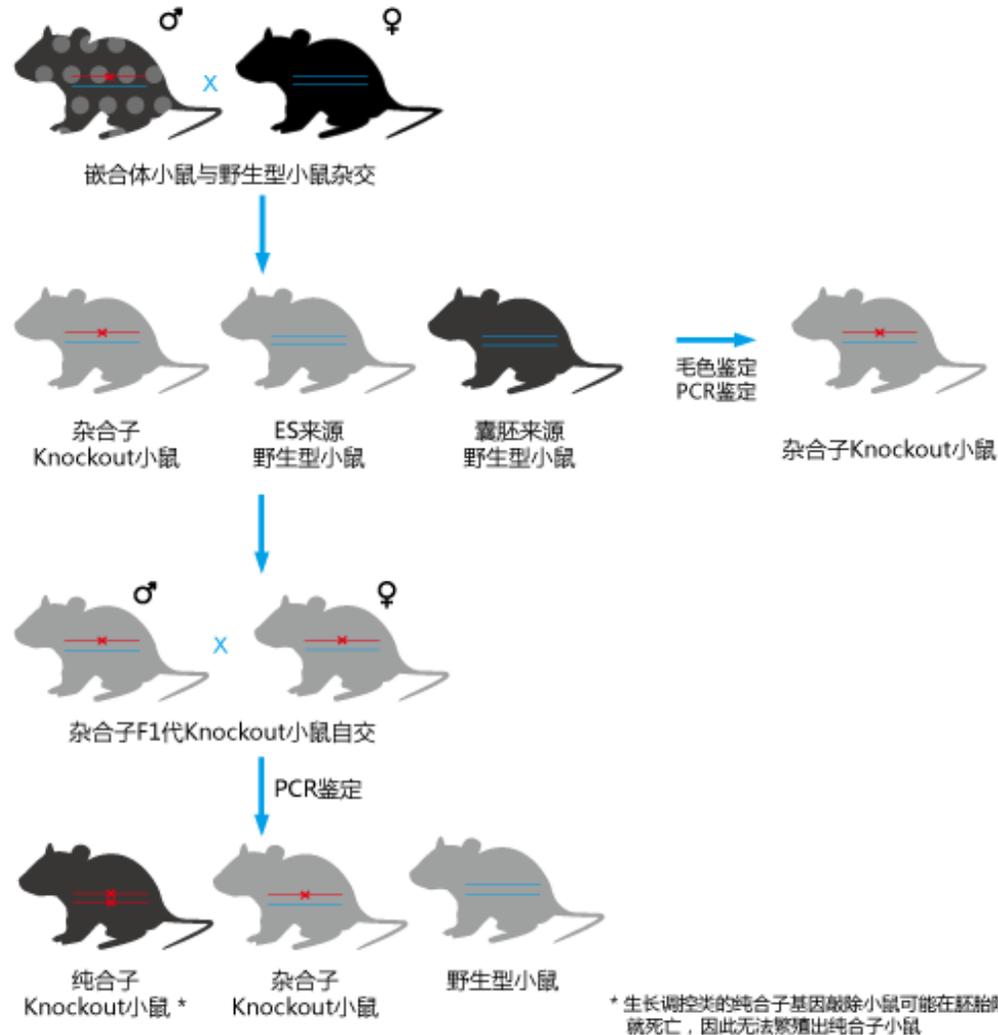


嵌合体小鼠与C57（黑）回交

灰色毛皮是显性基因，如果子代为灰色小鼠说明外源基因已经导入了生殖细胞。



knockout纯合子小鼠的构建:

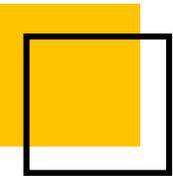


第一步：
嵌合体小鼠与受体小鼠回交

第二步：
杂合子F1代自交

第三步：
纯合子F2代反复自交建立种系

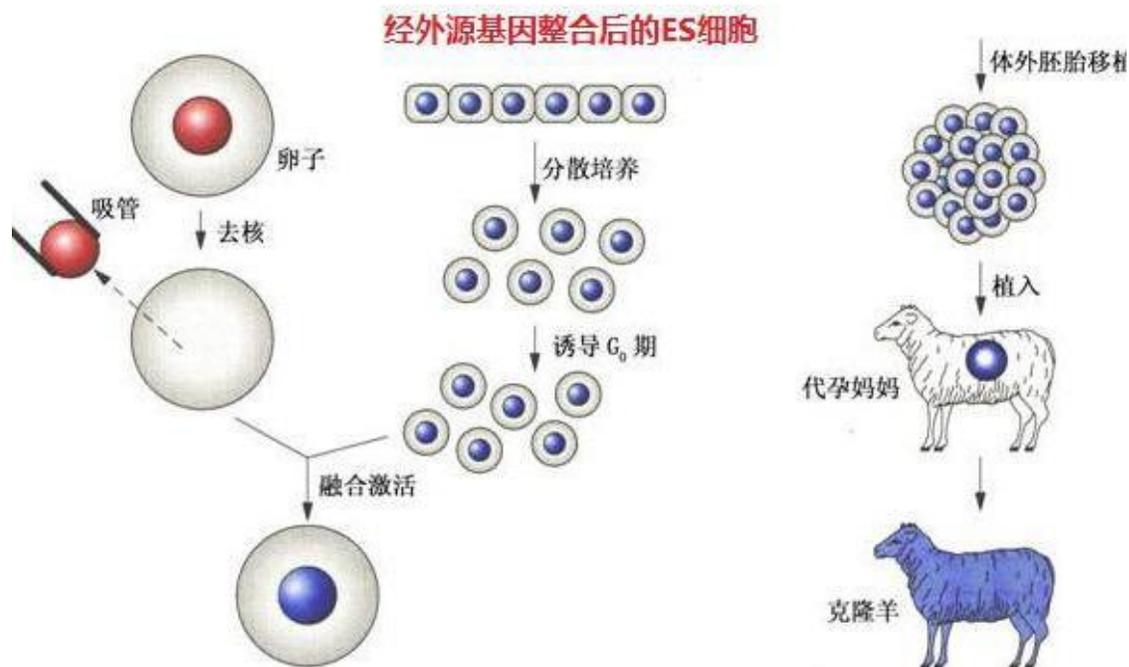
建立在转基因整合到生殖细胞的基础上



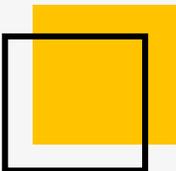
4.3 基于ES细胞的体细胞核移植

集合了ES细胞和卵细胞的双重优点：

- ES细胞：
 - 可体外扩增，提供大量可供实验的供体细胞
 - 可进行细胞学操作，可鉴定外源基因的整合情况（是否正确插入，拷贝数多少，插入的位置等等）
- 受精卵细胞：
 - 直接生成转基因动物，**不经历嵌合体过程。**



基于ES细胞的细胞核移植，由于ES存在多向潜能性，因此体细胞移植的成活率和外源基因的整合效果，明显好于一般的体细胞移植。



4.3 基于ES细胞的体细胞核移植

- 一．将构建好的敲除Ig基因的ES细胞核分离出来
- 二．将受精卵的细胞核剔除
- 三．将ES细胞的细胞核导入无核受精卵形成新的细胞（细胞核移植）
- 四．将受精卵导入代孕母鼠
- 五．产生子代

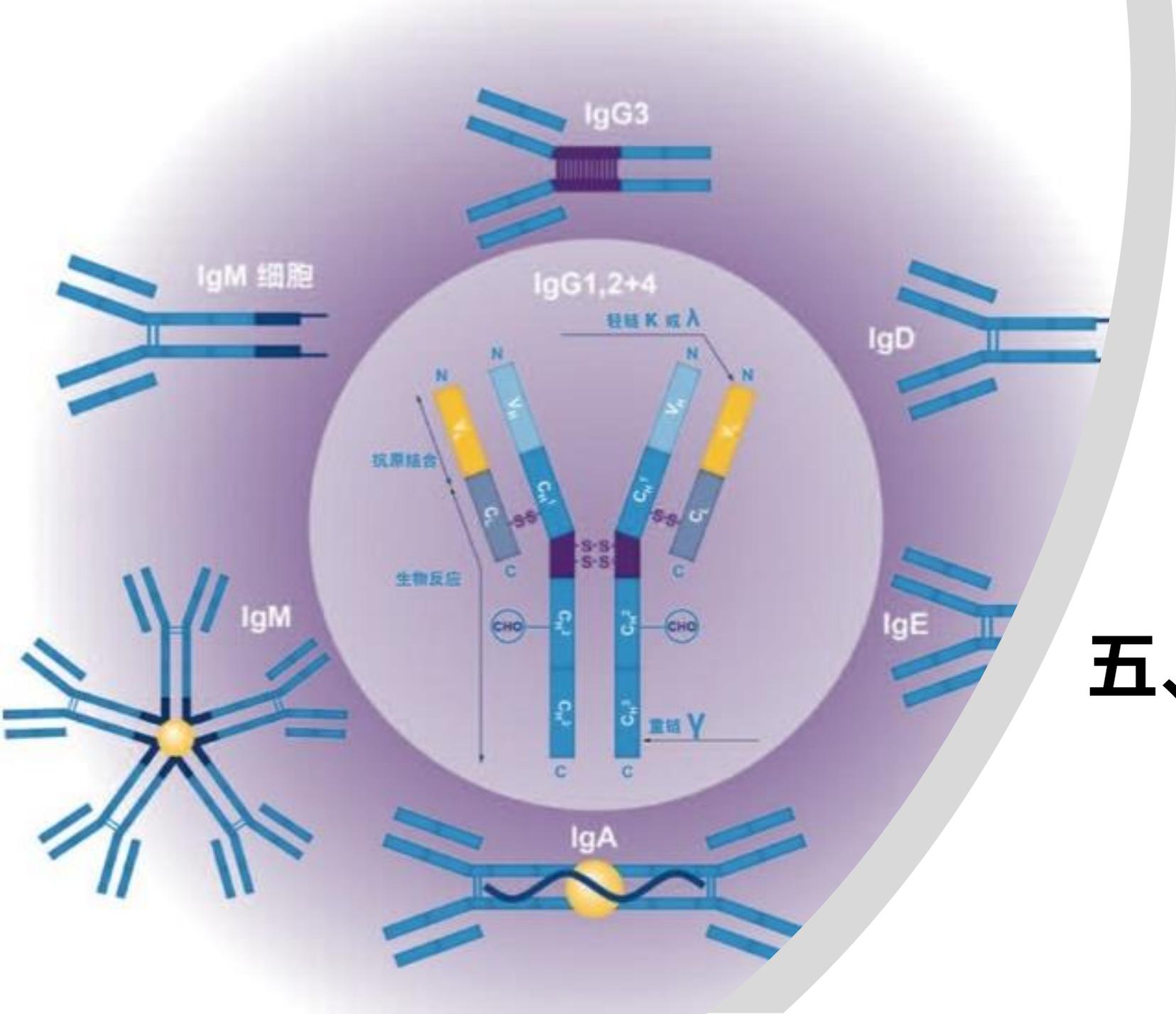


自身Ig基因剔除小鼠的构建的总结

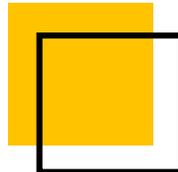
- 自身Ig基因剔除小鼠的构建的技术基础
- **基因打靶技术**
- **ES细胞培养技术**
- **ES细胞囊胚移植技术**

自身Ig基因剔除小鼠的构建的原理和目标

在ES细胞可以在体外基因工程操作和大规模扩增的基础上，通过基因打靶技术多位点多次敲除小鼠自身Ig基因，在ES细胞上实现小鼠自身Ig基因的剔除，并通过囊胚移植的方式建立转基因小鼠。



五、人Ig基因的导入



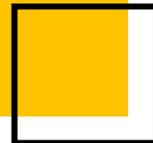
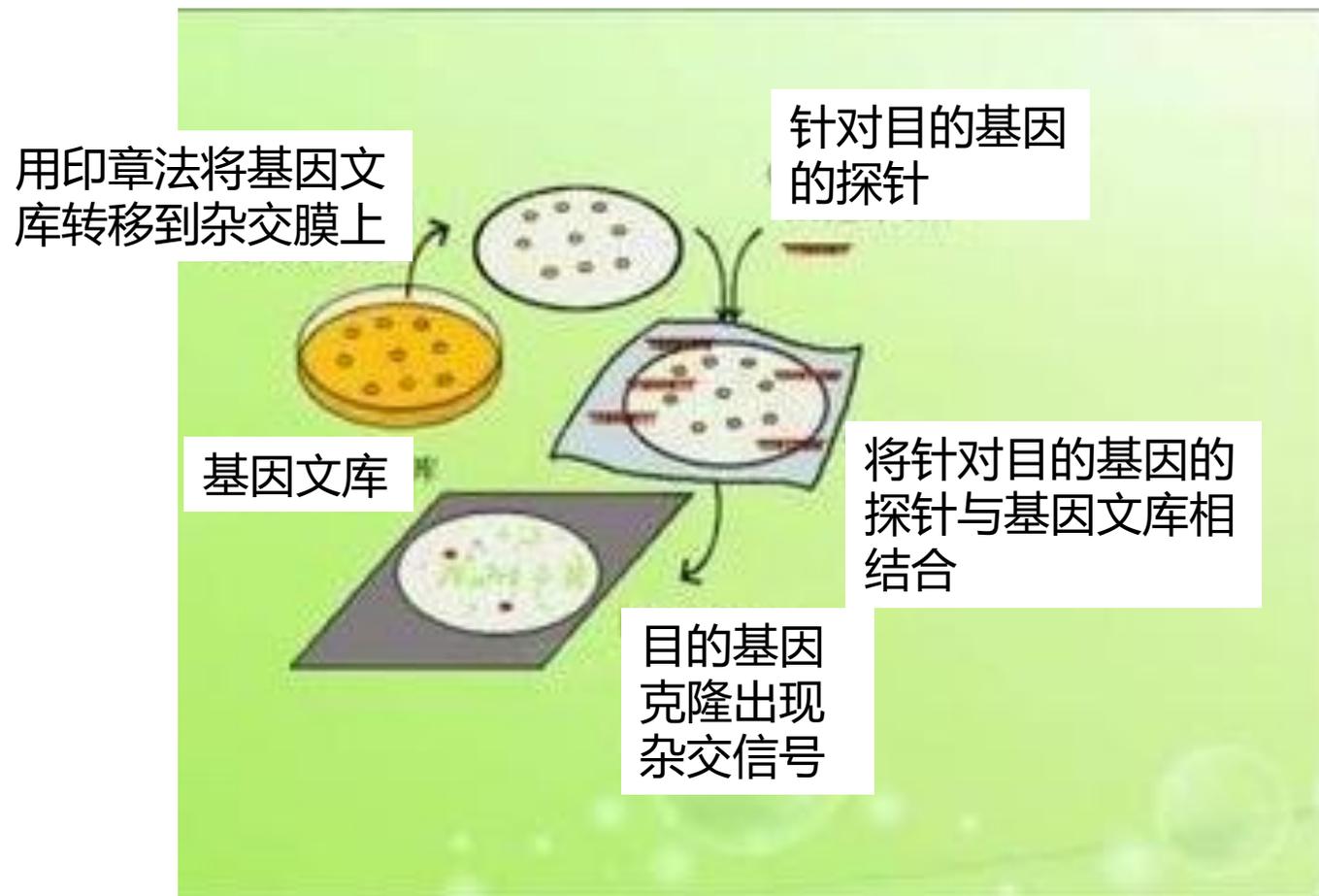
1. 获取分散的抗体基因

人类基因组库

基因文库

人第14号染色体基因组文库	IgH基因
人第2号染色体基因组文库	Igk基因
人第22号染色体基因组文库	Igλ基因

抗体基因分散存储在染色体基因文库中，呈现分散和片段化的情况。
需要使用探针将所需的抗体片段钓取克隆出来。



转基因和基因工程抗体钓取抗体基因的区别：

基因工程抗体：

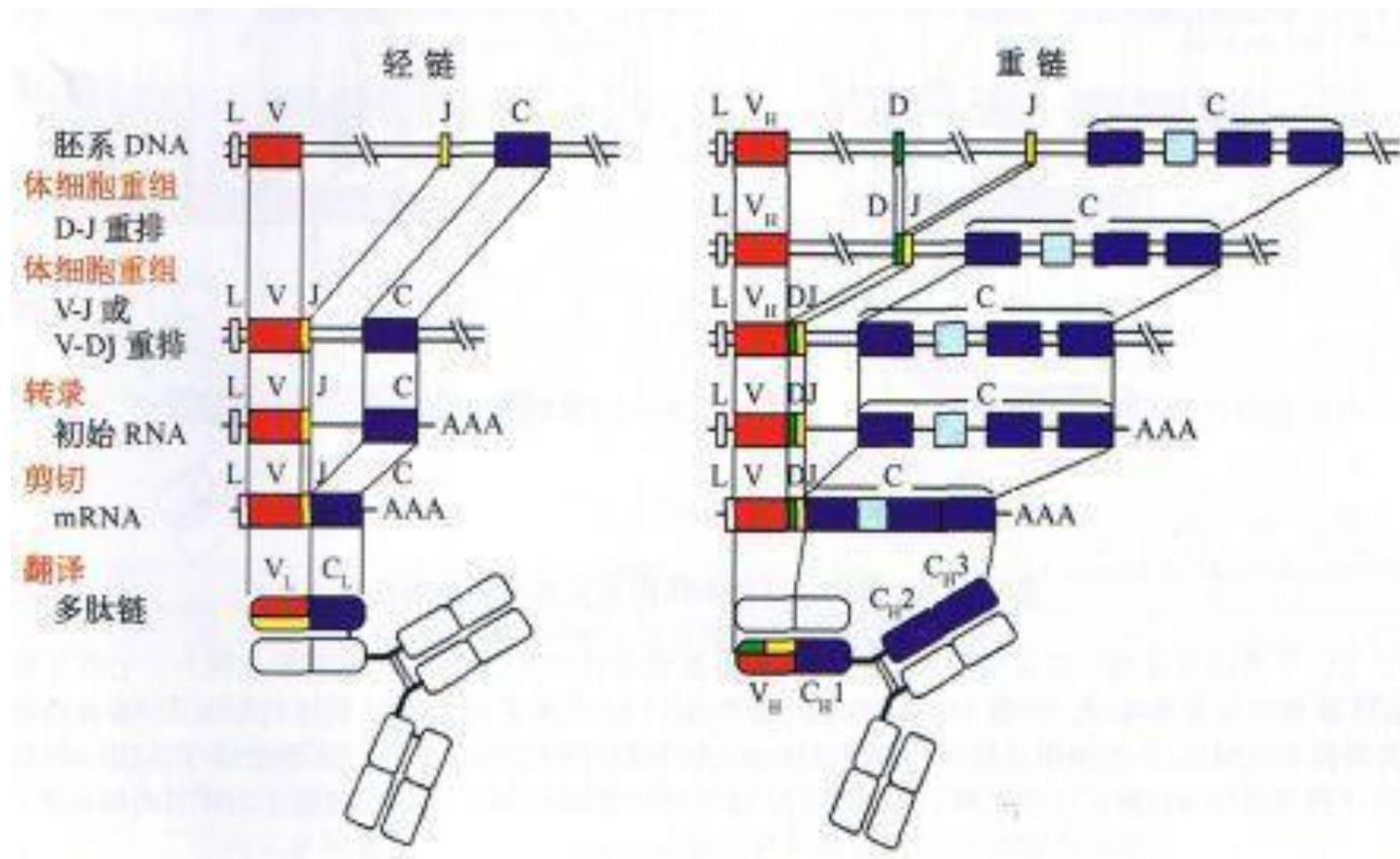
- 靶标：RNA
- 内容：针对某一抗原表位的抗体基因（不含内含子）
- 钓取方法：基于多重引物的RT-PCR

● 转基因抗体：

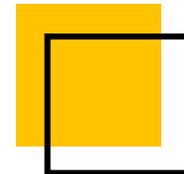
- 靶标：DNA（基因组）
- 内容：免疫细胞内天然抗体的存在形式，包括Ig编码序列（内含子，外显子），免疫调控序列等等。
- 钓取方法：基于探针的大片段钓取

2.如何构建转基因片段

形成有完全功能的抗体，需要大量的基因信息，包括抗体的合成，抗体类别的转换，抗体亲和力的变化等等。



通过整理和拼接构建处于胚系构型(germline configuration)的人Ig基因:



2. 转基因片段的导入方法

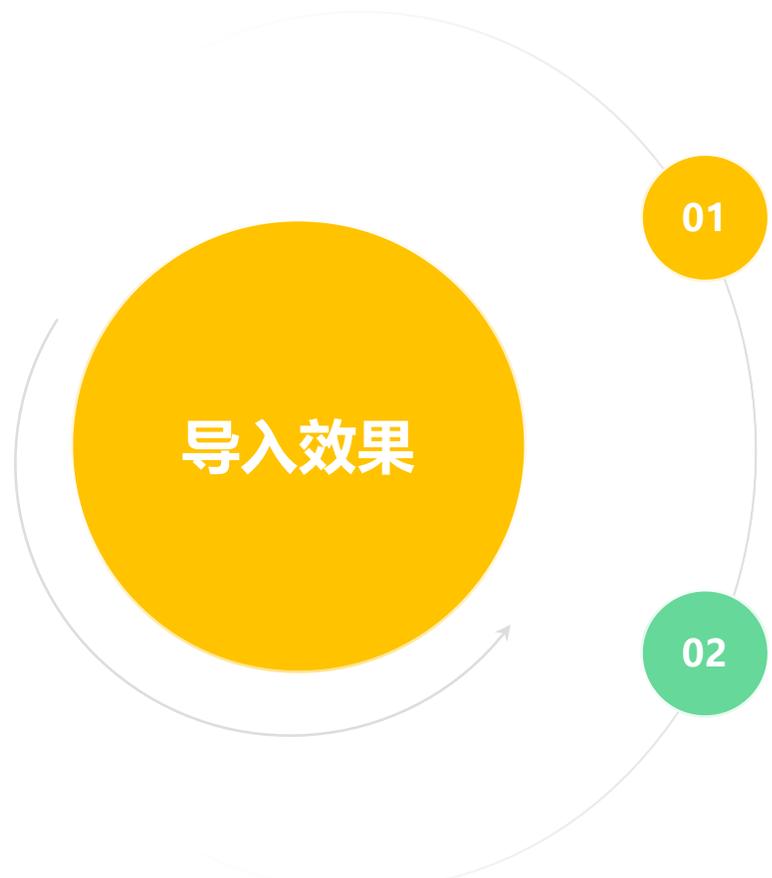
● 2.1 1985年基因小位点法(miniloci);

- 将Ig基因片段V/D/J/C（去除内含子）人工地缀合在一起 (25kb);
- 获得一系列能够产生Ig μ 的转基因小鼠。
- 仅仅用于对可变区重要片段的克隆，主要用于VDJ重排的验证。
- 此实验奠定了转人Ig基因小鼠产生人抗体的基础。

● 2.2 1991年PI噬菌体载体法

- 应用PI噬菌体为载体，可承载稍大DNA片段；
- 可有效防止其断裂。能够有效响应抗原的刺激；
- 产生重排的抗体，但是产生的抗体质量尚未达到大规模免疫的需要。(100kb)

噬菌体法Ig基因导入的效果：



抗体亲和力不足

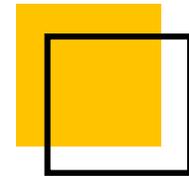
重组技术的限制，无法完整导入基因座，使得人抗体的多样性不够。

产生嵌合抗体

小鼠体内的抗体基因没有灭活或者灭活不充分。

加强大片段的导入，更完整基因信息的提供。
基于同源重组的内源性鼠Ig基因的敲除

抗体基因表达、轻重链组装、等位基因排斥、类型转换、以及基因重排、体细胞突变、亲和力成熟等，抗体水平可以达到小鼠的生理水平。



噬菌体法代表动物：HuMAb-Mouse™

人重链基因座由一个200kb的DNA片段组成，包含4个功能性VH片段、15个D片段、6个J片段以及 μ , $\gamma 1$ 编码外显子及二者相应的转变区，同时还带有一个 $J\mu$ 内含子的增强子以及大鼠3'重链增强子

轻链基因座由一个230kb的DNA片段组成，包含4个功能性Vk片段、5个J片段、1个Ck外显子以及内含子及下游增强子元件。

显微注射

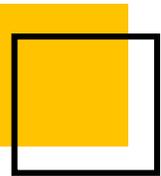
受精卵

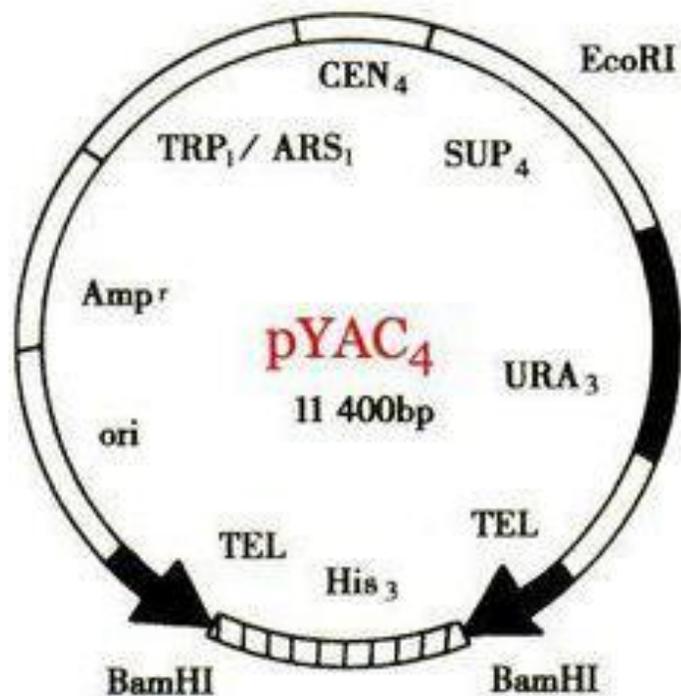


自身Ig基因剔除小鼠

最终双转基因/双突变小鼠能够表达人IgM，并且能够发生抗体类型转换及体细胞突变过程，产生IgGk。

已经有多于个基于该平台的抗体获得FDA批准上市





2.3 基于YAC酵母染色体的转基因小鼠

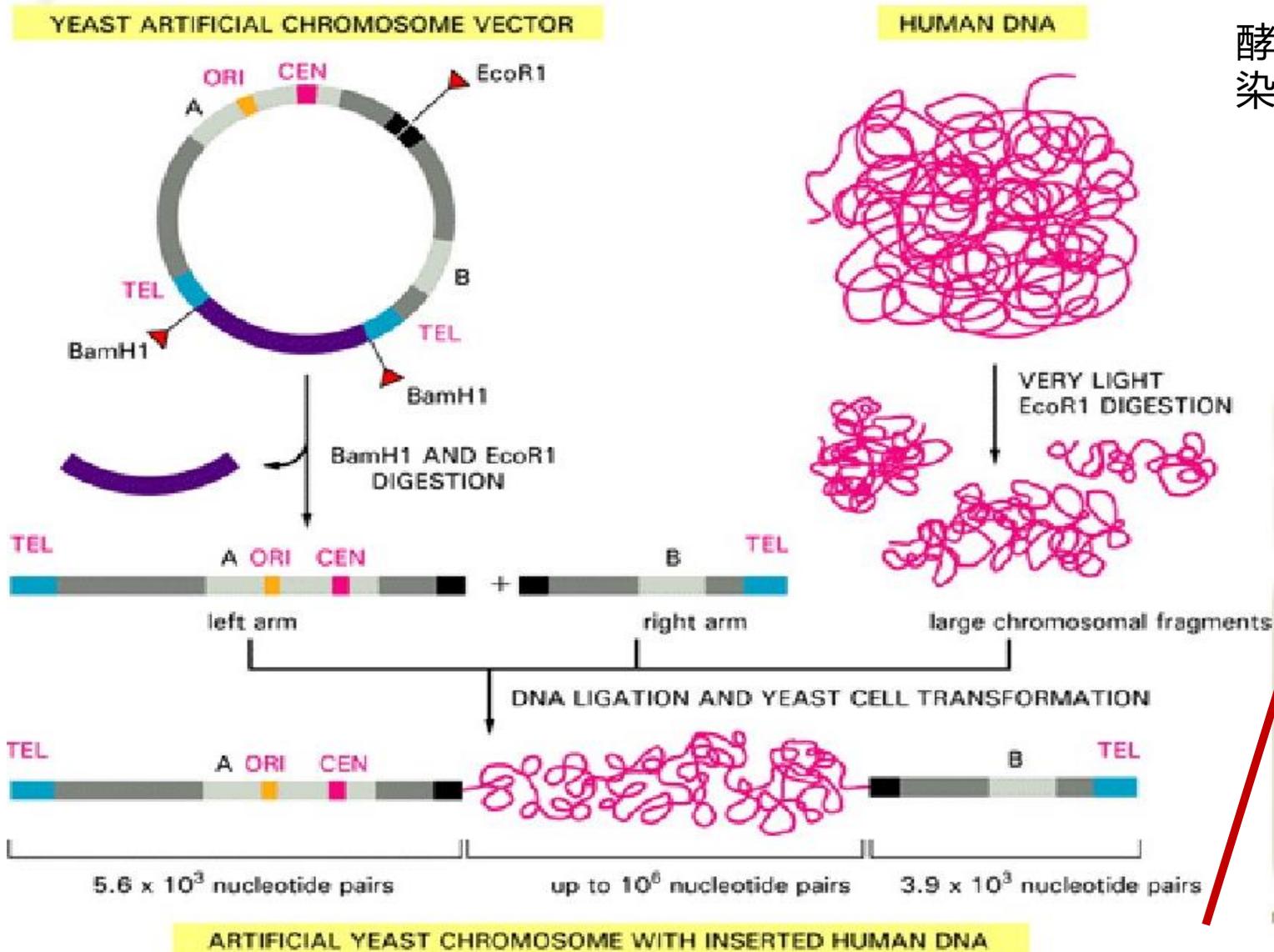
YAC 文库装载的 DNA 片段的大小一般可达 200-500kb，有的可达 1Mb 以上，甚至达到 2Mb

YAC 文库装载的基因不是连续的，完整的；

抗体基因往往被分割在多个YAC克隆上，需要进行相应的整理和拼接

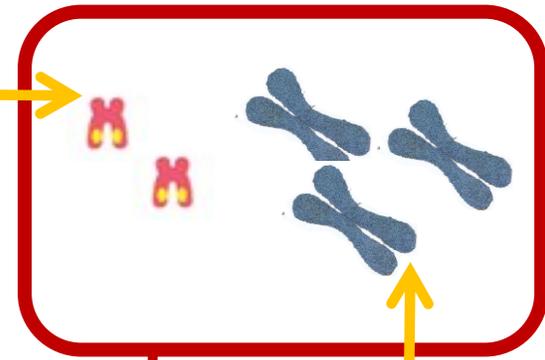
YAC 文库往往需要进行亚克隆才能具有穿梭功能以及同源重组的功能

2.3. 1YAC为基础的大片段的转移;



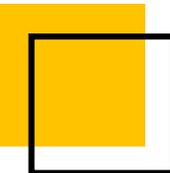
酵母人工染色体

酵母细胞



酵母自身染色体

携带Ig基因的酵母人工染色体



2.3.1 YAC为基础的大片段的转移;

裂解酵母细胞，收集染色体

电转移

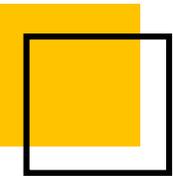
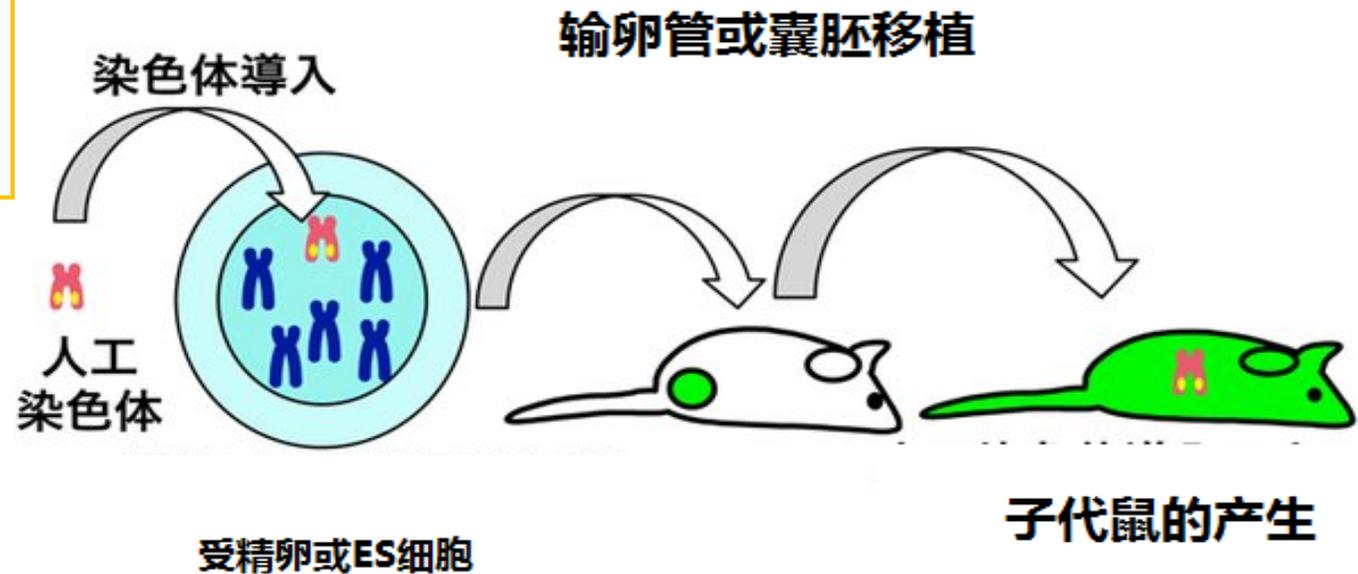
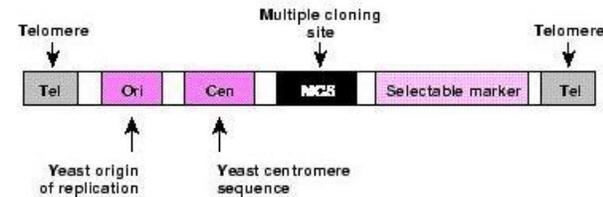
脂质体

微细胞转移

将抗体基因导入靶细胞

鉴定 (原位杂交, 测序,
SOUTHERN BLOT,
NORTHERN BLOT)

9.29 YEAST ARTIFICIAL CHROMOSOME



YAC法代表动物：Xenomouse 小鼠

重链包含34个V区基因、所有的重链D区和J区，以及C γ 2、C μ 和C δ 基因，共66个功能基因；（1020kb）

轻链包含18个V区基因、所有的5个J区，C κ 基因，共32个功能基因(800kb)

全部人Ig λ 基因

显微注射

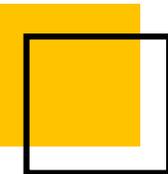
受精卵



自身Ig基因剔除小鼠

该品系小鼠经免疫后可以产生高亲和力的全人IgG K和IgG λ ，比例为60：40。

XenoMouse@小鼠基因非常稳定，是目前应用最广的人抗体转基因小鼠



2.3.2 YAC为基础的转基因小鼠的构建;

Xenomouse 小鼠

利用YAC 转入220kb Ig μ 基因片段



IgM
50 μ g/ml



无抗体类别转换
效价较低

利用YAC 转入220kb Ig μ 基因片段
入自身Ig基因敲除的小鼠



IgM
350 μ g/ml



无抗体类别转换
效价显著增高

利用YAC 转入Vk800kb和
VH1020kb Ig基因片段入自身Ig
基因敲除的小鼠
66种V区, 所有的D区, 所有的J
区以及C μ 和C γ



IgM
700 μ g/ml
IgG
600 μ g/ml



抗体类别转换
抗体效价明显增高

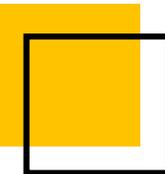
二次免疫



IgG
2000 μ g/ml



免疫记忆



2.3.3 Xenomouse 小鼠带来的启示

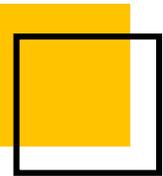
1. YAC转人Ig基因小鼠完全可以实现抗体基因的导入，重排，抗体类型转化，亲和力成熟，以及人源化抗体的制备。
2. 导入的Ig基因片段越大，涵盖范围越广，人Ig产量就越高，产生的抗体类型就越多，亲和力就越高。
3. 自身Ig基因剔除小鼠将为人Ig基因在小鼠体内功能性表达提供基础。

2.3.4 YAC技术的不足之处

容量依旧不足，人IgH较完整的基因片段应该包括恒定区和全部的可变区，大约覆盖最少IgH1.5Mb;人Igk2.0Mb，Igλ1Mb; 需要将多个小YAC重叠连接才能覆盖较大的抗体基因。

嵌合染色体带来**不必要（酵母）的序列**插入

YAC带来的**缺失（deletion）和基因重排（rearrangement）**的现象。



TC mouse™

2.4 人类人工染色体

Human artificial chromosome (HAC)

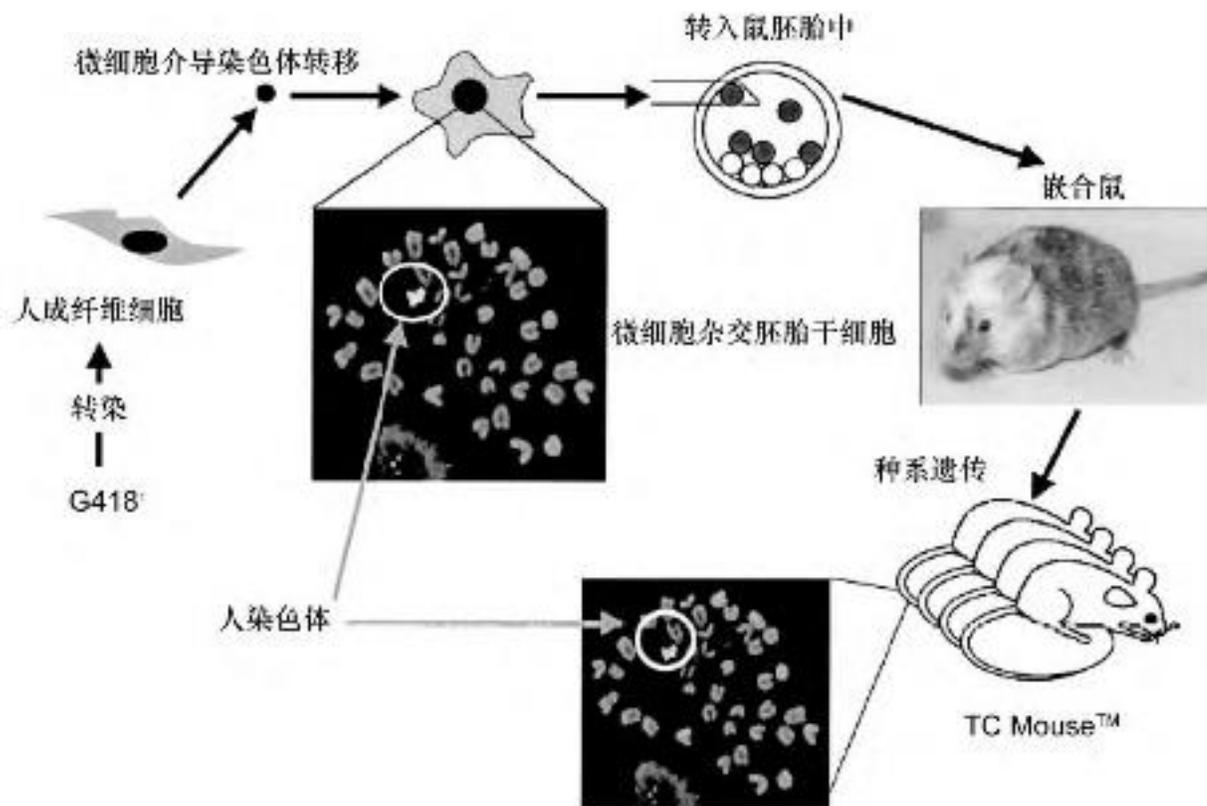


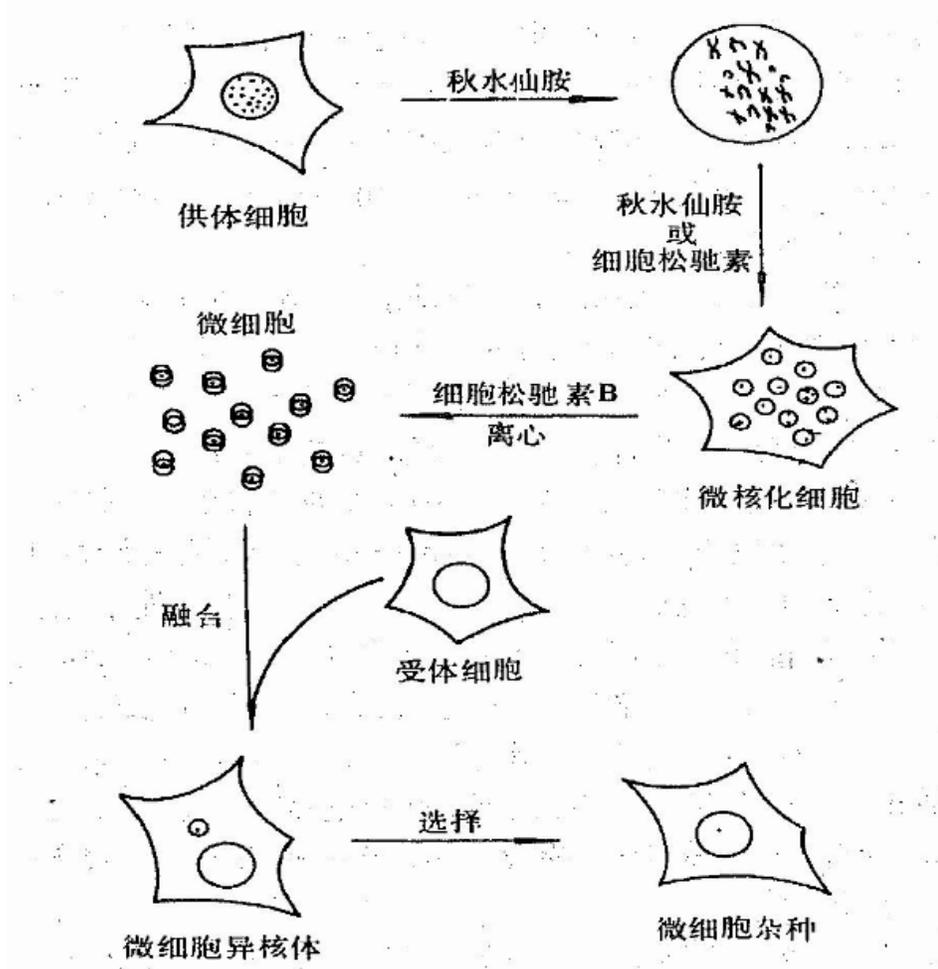
图1 TC Mouse™的构建过程^[21]

大片段完整基因簇的导入（未经重排的完整IgH和Igκ完整基因座，IgH1.5Mb；人Igκ2.0Mb）

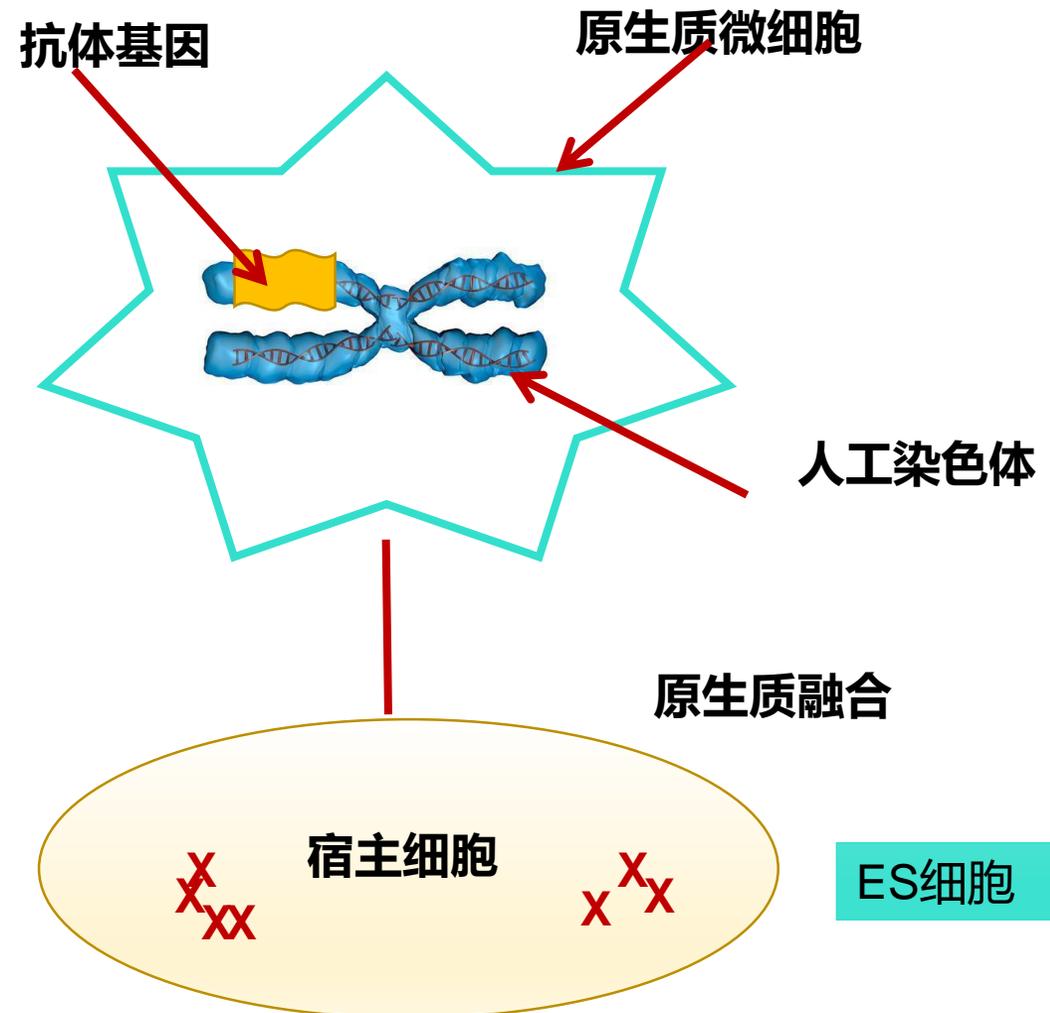
减少酵母染色体污染以及YAC带来的缺失（deletion）和基因重排（rearrangement）的现象。

巨大的人工染色体在宿主有丝分裂的时候易于丢失，尤其是Igκ片段经常性损失。可通过与较稳定的YAC转基因小鼠杂交来获得尽可能多的Ig胚系基因。

2.5 微细胞介导的转染色体技术 (MMGT)



TC mouse



人类人工染色体代表性小鼠：TC mous™

人类重链基因座的染色体片段(IgH, 约1.5Mb)

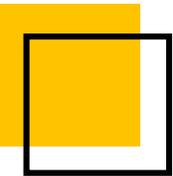
人类轻链基因座的染色体片段(IgG k, 约2 Mb)



TC mous™

产生的IgM和IgA含有鼠源的J区，所以并不是真正意义上的全人源的转基因小鼠。该品系小鼠由于转入的人类IgG K染色体片段欠稳定。

人类人工染色体导入的片段更大，可以进行完整基因座位的转移，但是大片段转移可能会带来染色质的不稳定。



KM Mouse™



TC mouse™

基于转染色体技术, TC小鼠携带完整的人免疫球蛋白IgH和Igk基因座 (IgH 1.5Mb; Igk 2Mb; Igλ 1Mb)
独立的转染色体在小鼠进行有丝分裂与减数分裂的过程中会丢失基因片段

杂交



KM Mouse™

转染色体技术

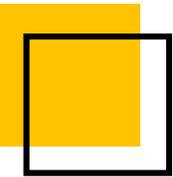
包含了 TC Mouse™ 的 IgH 与 HuMAb-Mouse™ 的 Igk 基因,

整合了 TC Mouse™ IgH 的多样性与HuMAb-Mouse™ Igk 的稳定性, 能产生大部分的 Ig 亚类 (IgG1 ~ IgG4 以及 IgA)



HuMAb-Mouse™

Igk的稳定性



3.转基因小鼠制备技术的三大技术体系的总结：

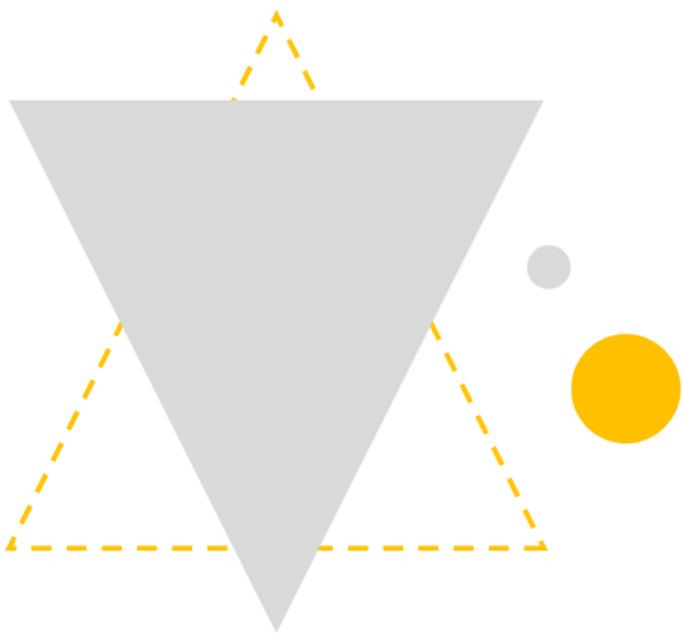
基于这 3 代技术所获得的转基因小鼠之间可以互相杂交育种，从而获得新的具有更多优良性状的转基因小鼠

- 一． 微基因座（小位点法，PI噬菌体转座法）
- 二． 人工染色体技术（YAC,BAC,HAC）
- 三． 基于微细胞转染色体法



三种转Ig基因小鼠的共同特点

- 一. 为了开发全人源的抗体药物，在上世纪90年代，随着转基因基因的发展，多个生物技术公司成功构建了转入人抗体基因的小鼠（如XenoMouse®，HuMAb® Mouse，KM™ mouse 和Kymouse™ 等）。其中前三种转基因小鼠的构建尽管这些转人抗体基因小鼠在构建的细节上有些不同，但这些小鼠都具有一些共同特征，包括：
1. 通过敲除JH和/或CH基因，小鼠内源性重链基因位点（locus）被灭活。
 2. 通过敲除JK和/或CK基因，小鼠内源性kappa轻链基因位点（locus）被灭活。但小鼠的Lambda轻链基因位点依然保留。
 3. 人抗体重链基因，包括主要的VH基因，所有的D基因和JH，C μ 基因，C δ 基因，和至少一个 C γ 基因，以及相应的表达调控元件，被成功的转入小鼠基因组。
 4. 人抗体kappa轻链基因，包括主要的Vk基因，所有的Jk基因和CK基因，以及相应表达调控元件，被成功的转入小鼠基因组。



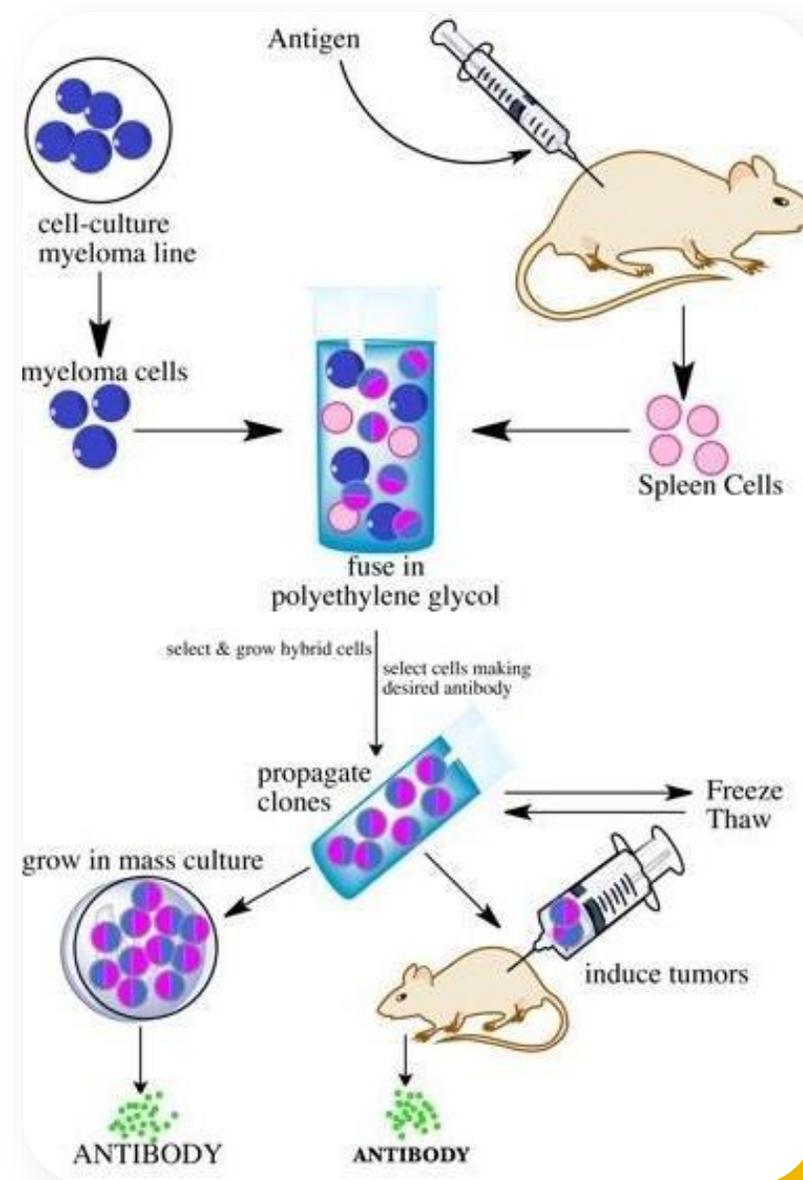
4.基于转人Ig基因小鼠技术的嵌合抗体的制备

反向嵌合抗体

基于转人Ig基因小鼠技术的完整抗体的制备

XenoMouse 与 HuMAb-Mouse TM 技术可在小鼠免疫后通过杂交瘤制备全人源单抗用于前期的药物研究；生产完整的四链二价抗体

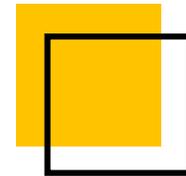
免疫方法制备抗体通量小；价格昂贵



两个新问题：

转基因小鼠抗体是否可以工程化生产？

是否可以利用转基因小鼠制备小分子抗体？



反向嵌合抗体

4.1 VelocImmune™ mouse

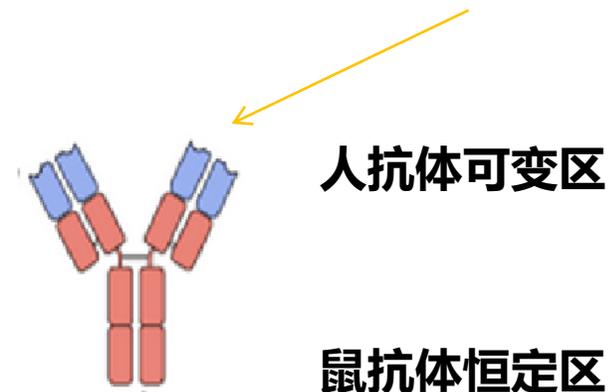
大约3Mb的完整小鼠IgH与Igk基因被删除；

然后利用同源重组技术将携带人基因组DNA的BACs原位插入功能结构区域；

靶向插入之后，大约1.0Mb DNA的人VH-DH-JH与大约0.5Mb DNA的Vk-Jk的基因被导入小鼠。下游为完整的内源性小鼠恒定区与顺式调控元件的编码区；



VelocImmune™ mouse



人抗体可变区

鼠抗体恒定区

4.1.1 反向嵌合抗体的优点：

- 导入的片段小于之前的转基因小鼠
- 保持了鼠源性的恒定区和FC段

- 鼠源性恒定区参与免疫信号传导
- 鼠源性恒定区参与B细胞与其他免疫细胞的相互作用。
- 鼠源性的恒定区抗体基因更有利于在免疫成熟的过程中形成更强大的免疫反应，产生更高质量的抗体。

4.1.2 反向嵌合抗体的缺点：

反向嵌合抗体可能遇到人鼠嵌合抗体同样的问题。

人源性可变区和鼠源性恒定共同构成的抗体在进行人源化改造的时候，导致抗体空间构象变化，降低抗体效能。

抗体基因重链的结构远比轻链复杂，而且在维持抗体空间构架上的作用更大。

Fd=人源性重链VH+CH1+鼠源性铰链区

完全人源性轻链

+

鼠源性FC

形成反向嵌合抗体，提取Fd与轻链之后，可以去除绝大部分鼠源性部分，获得较好的人源性抗体进行基因工程生产。

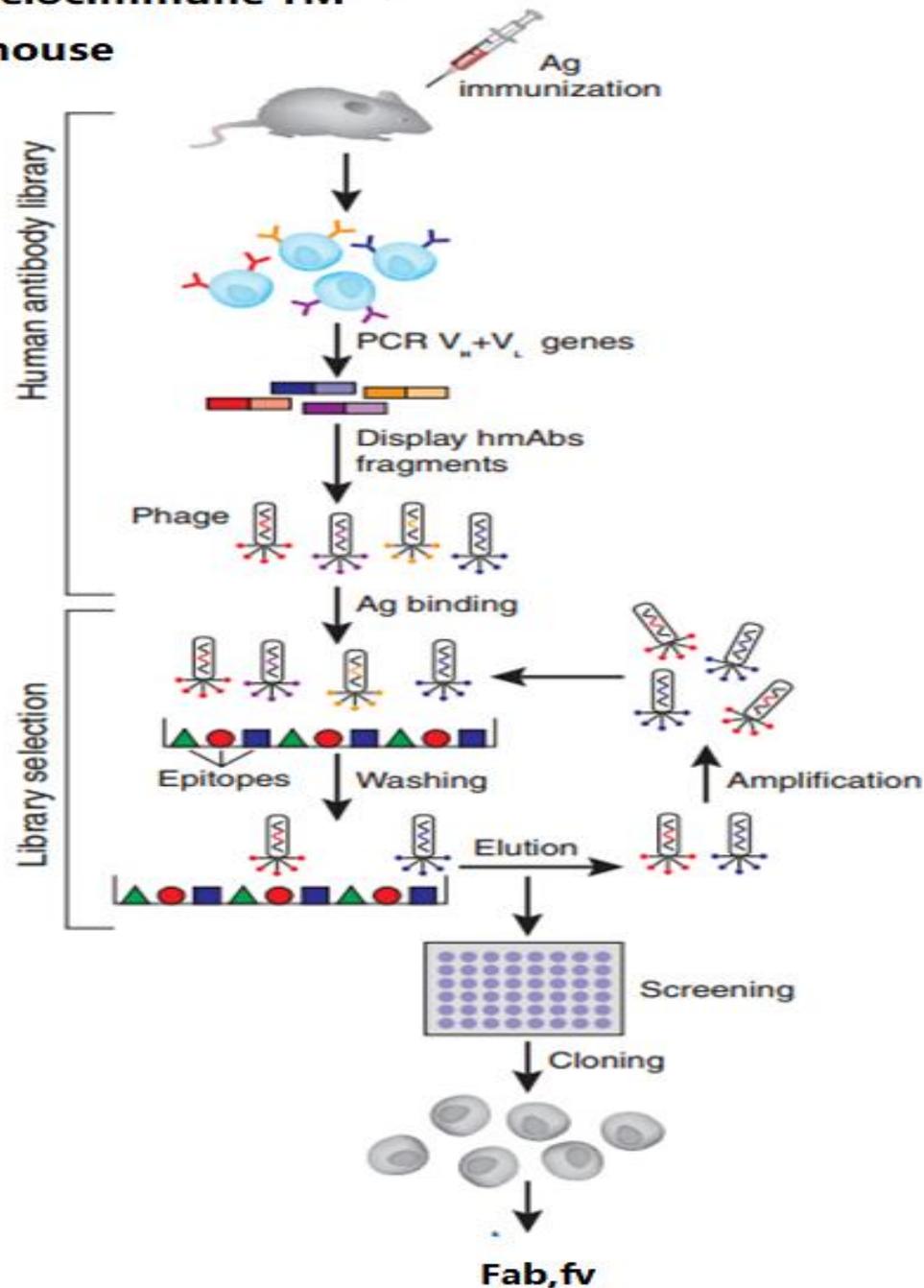
4.1.3 基于VelocImmune™ mouse的工程化抗体生产

建立免疫文库：

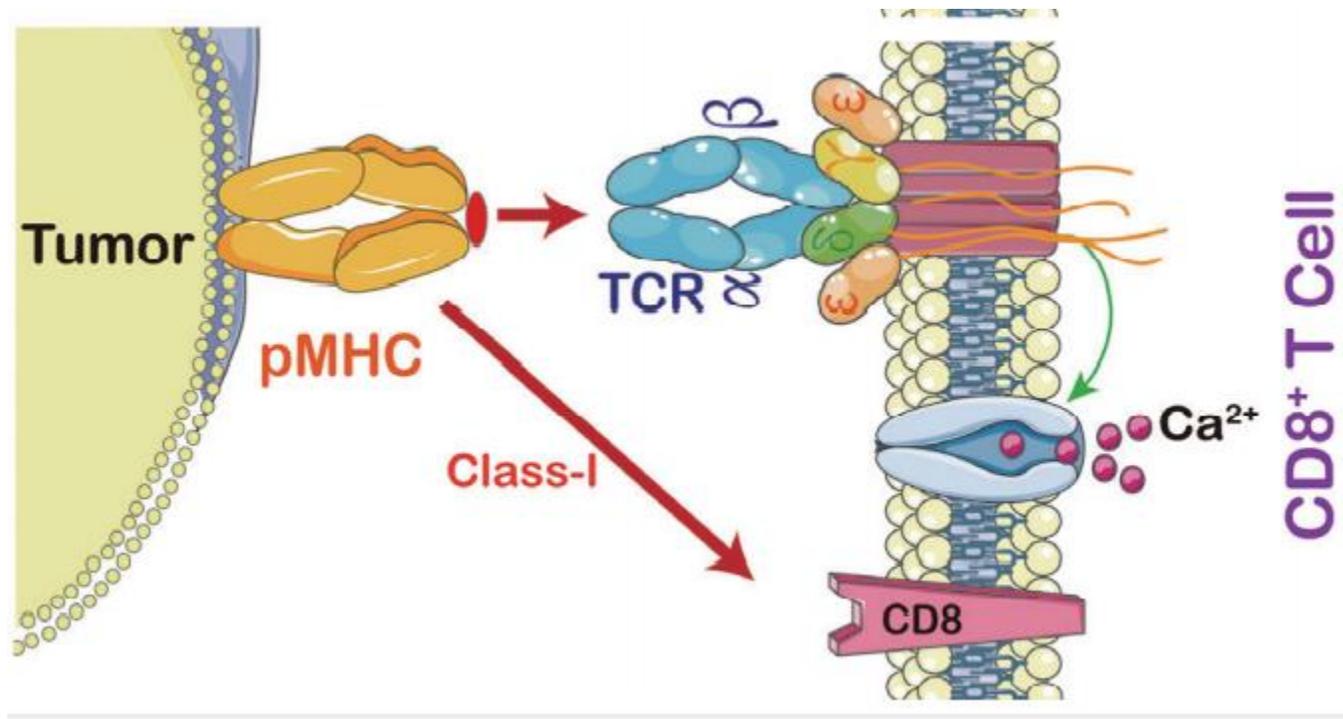
- 可以通过多次加强免疫建立针对特异性抗原的免疫反应
- 可以通过抗体库技术快速淘选特异性的抗体
- 具有动物免疫和抗体库技术的双重优点

VelocImmune™

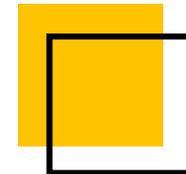
mouse



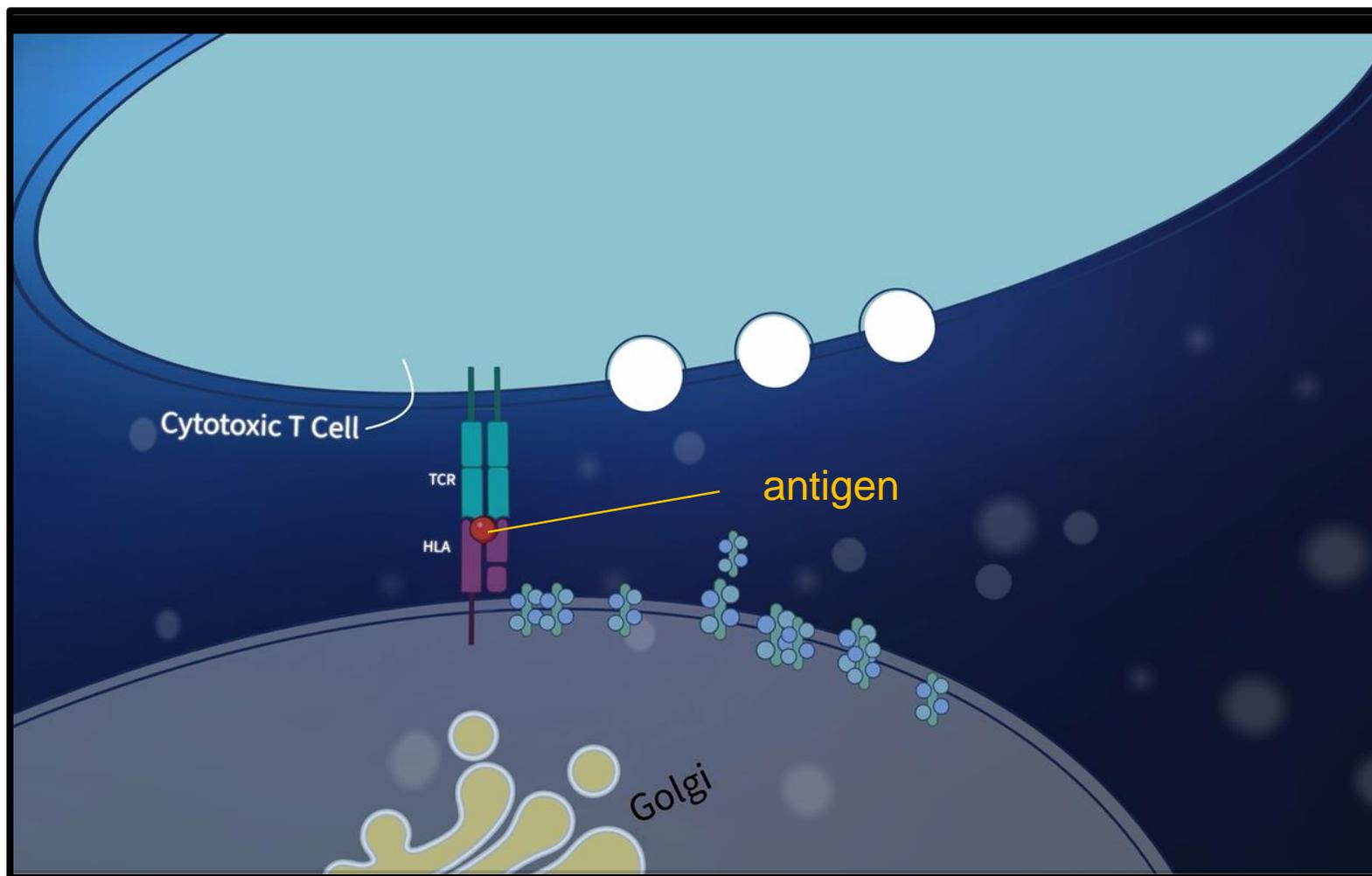
5. 基于转基因小鼠的TCR疗法



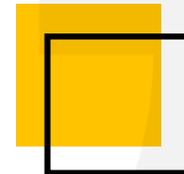
- TCR是识别细胞内靶抗原并激活细胞免疫的基础。



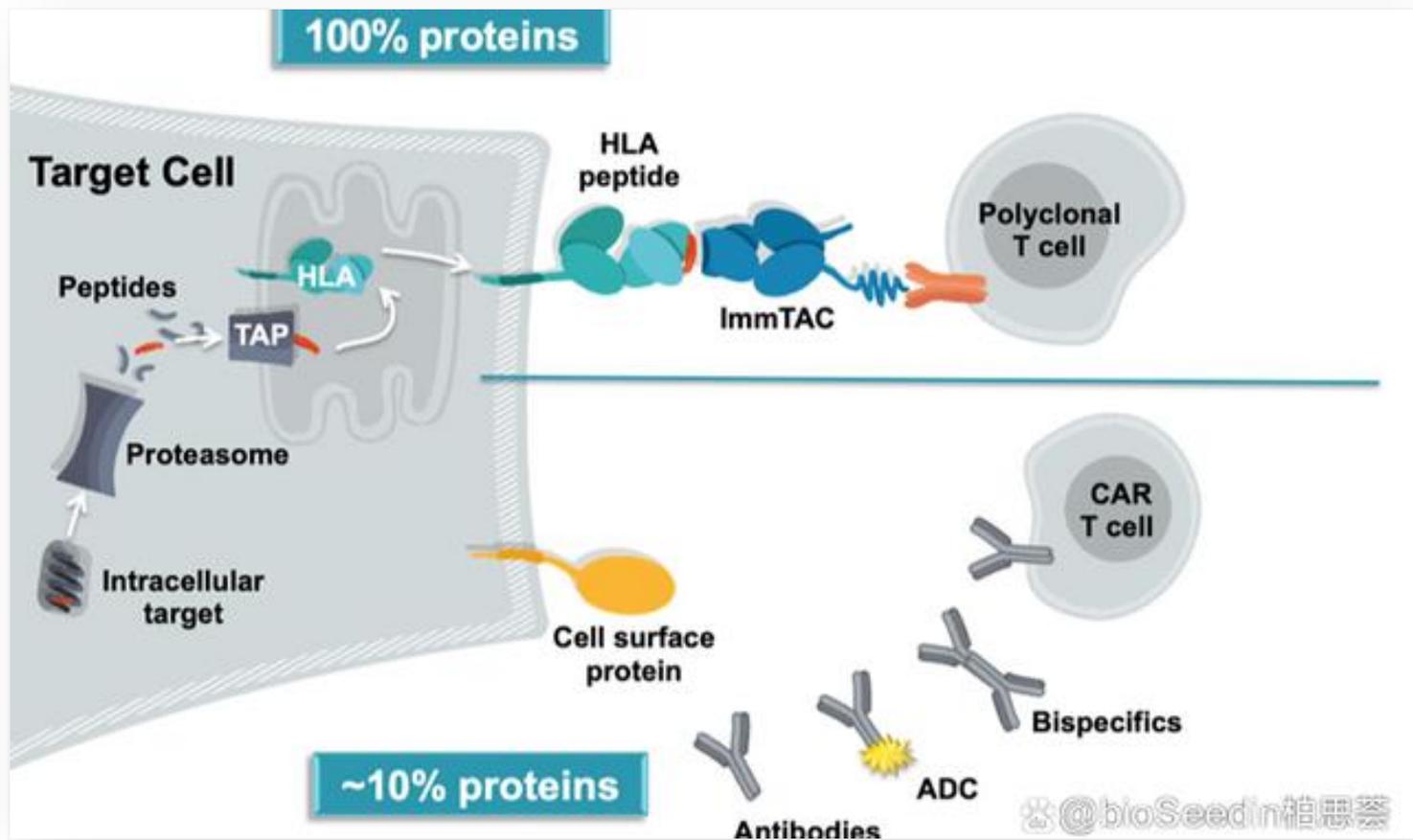
5.1 TCR疗法的原理



TCR通过识别特定的主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complexes, MHC) 和其呈递的胞内多肽形成的复合物 (MHC-antigen-peptide, MAP), 并结合T细胞上的CD3募集T细胞, 以实现肿瘤杀伤作用。

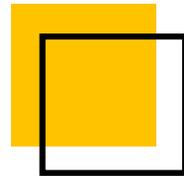


5.2 TCR抗体与现有抗体的区别

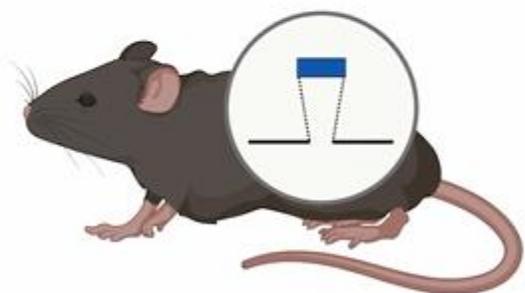


相比于CAR-T:

CAR只能与细胞表面上的抗原结合，可用靶标是非常少；
而**TCR**可以靶向胞内抗原，在靶点选择的数量上可能是CAR-T药物以及T细胞抗体药物（TCE）的9-10倍。



5.2 基于转基因小鼠的TCR制备

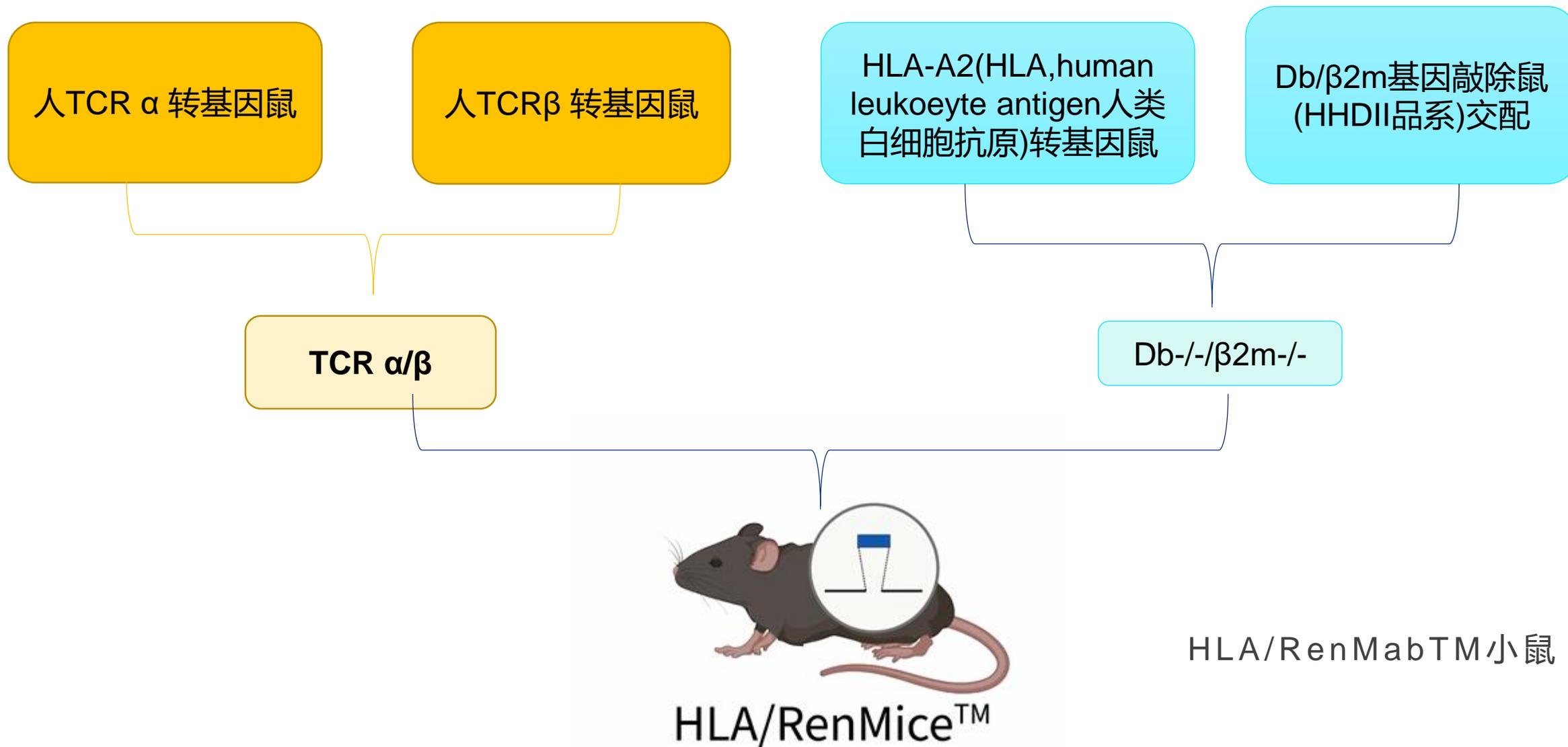


HLA/RenMice™

TCR对相应抗原的亲合力通常很低，造成了肿瘤细胞的免疫逃逸。

小鼠的免疫系统与人类极为相似，但小鼠许多肿瘤抗原的蛋白质序列与人类不同，因而为诱导和分离高活性肿瘤抗原特异性T细胞提供了条件。

5.2.1 HLA/RenMabTM小鼠的构建



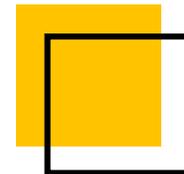
HLA/RenMab™小鼠是通过转基因技术将HLA基因引入RenMab™小鼠体内得到的转基因动物

- HLA/RenMab™小鼠其特点主要体现在以下几个方面：
- RenMab™小鼠的免疫系统发育正常。
- HLA基因在小鼠体内发挥着抗原呈递的作用，使得HLA/RenMab™小鼠能够模拟人类免疫系统的部分功能。
- HLA/RenMab™小鼠在器官发育上与野生型小鼠保持一致，具有较高的生理稳定性。

总的来说，HLA/RenMab™小鼠具有正常的免疫系统发育、稳定的生理特性和特殊的遗传背景，使其在免疫学研究和药物研发等领域具有独特的优势和应用价值。

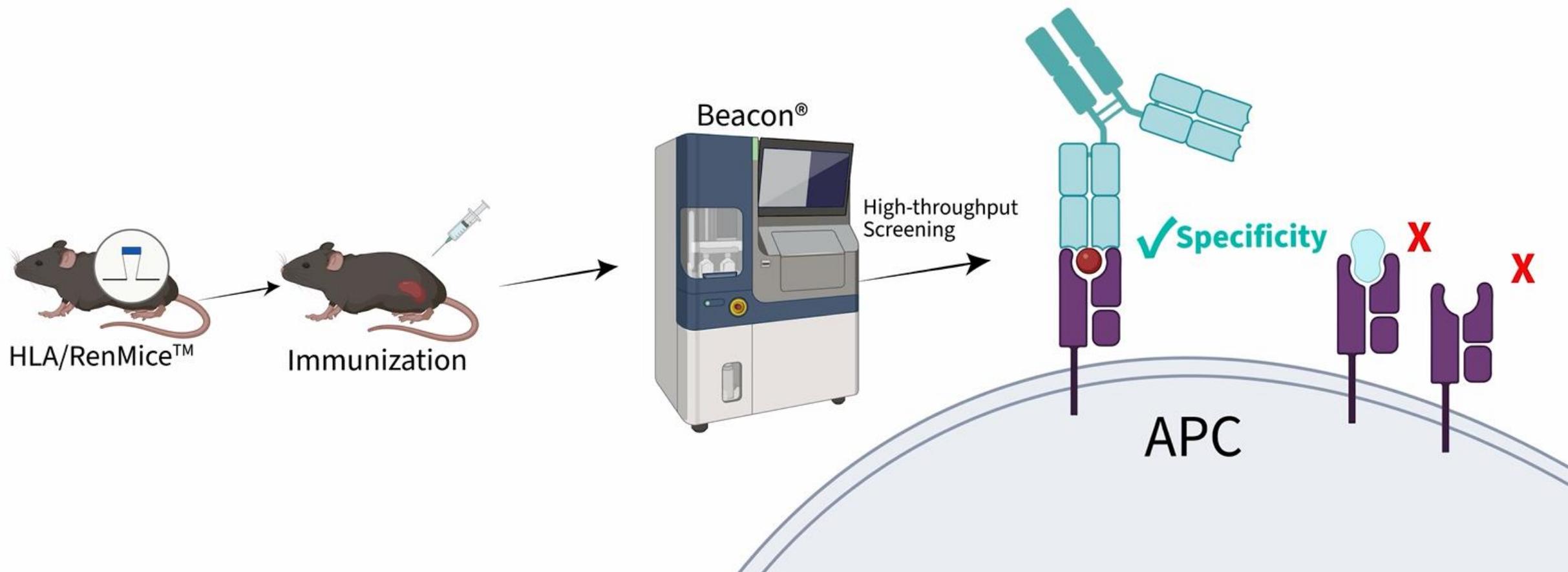


HLA/RenMice™

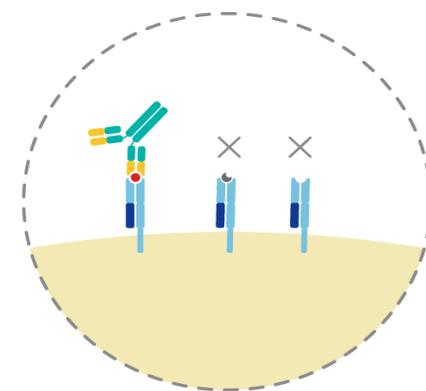
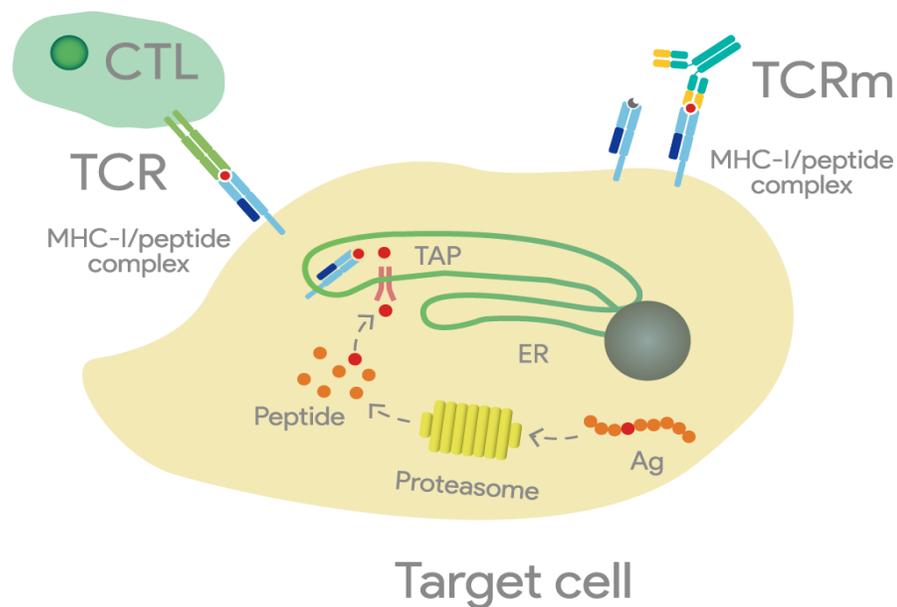
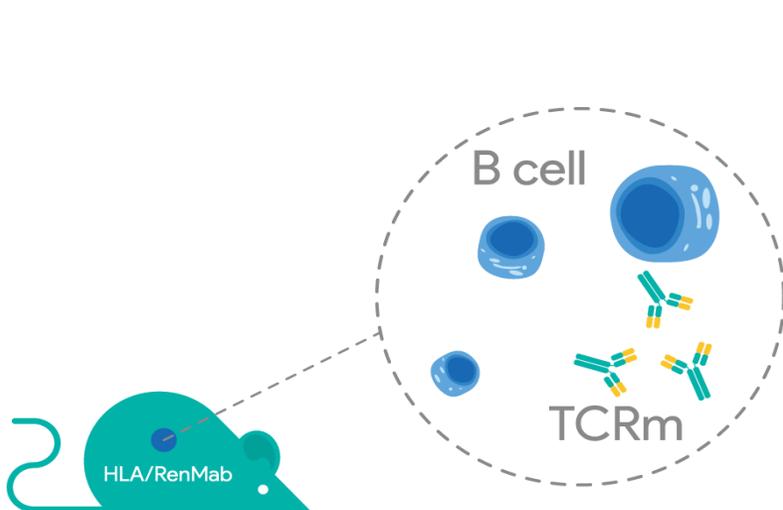


5.2.2 基于HLA/RenMab™小鼠的TCR筛选

Beacon单细胞光导系统通过光信号的发射和接收来确定抗体的存在及其与靶细胞的相互作用。它利用荧光共振能量转移原理，能够准确评估抗体的性能，包括亲和力、内化能力、稳定性等关键参数。



基于HLA/RenMabTM小鼠的TCR筛选的优点



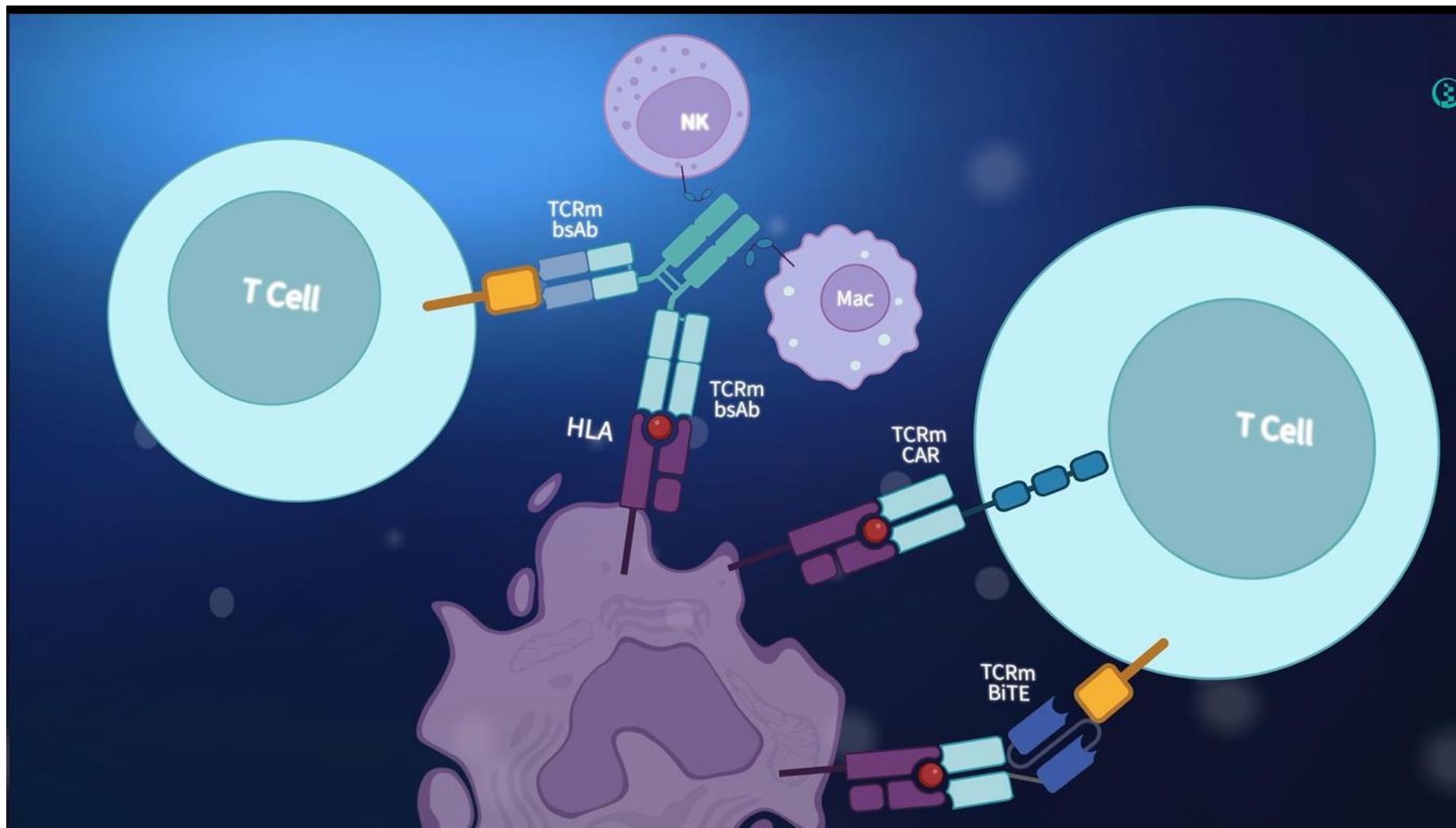
基于RenMice小鼠深度改造，
保证序列多样性，高亲和力和高特异性

使其精准识别MHC-
antigen-pep-tide(MAP)表
位并产生针对胞内抗原的
全人抗体序列

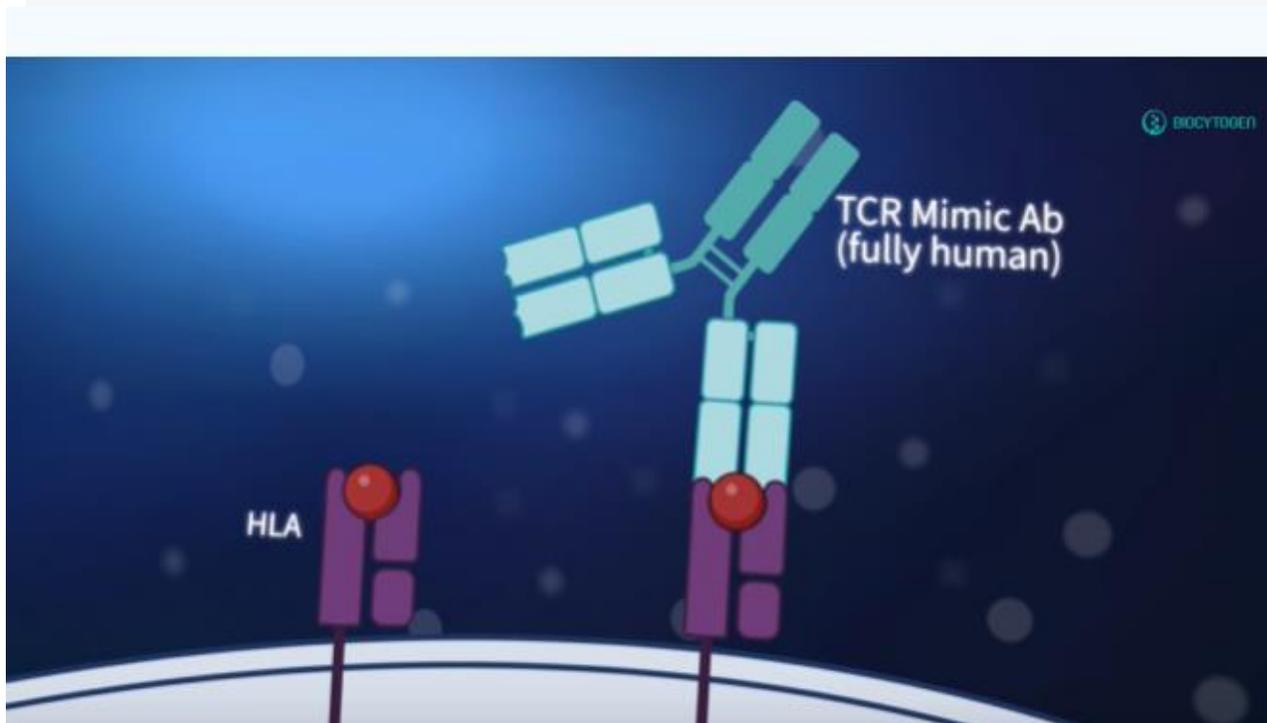
依托于Beacon技术的快速抗
体发现和高通量序列分析，
极大的缩短了抗体发现周期

5.2.3 基于TCR的免疫细胞疗法

TCRm-bsAb
TCRm-CAR
TCRm-BiTE



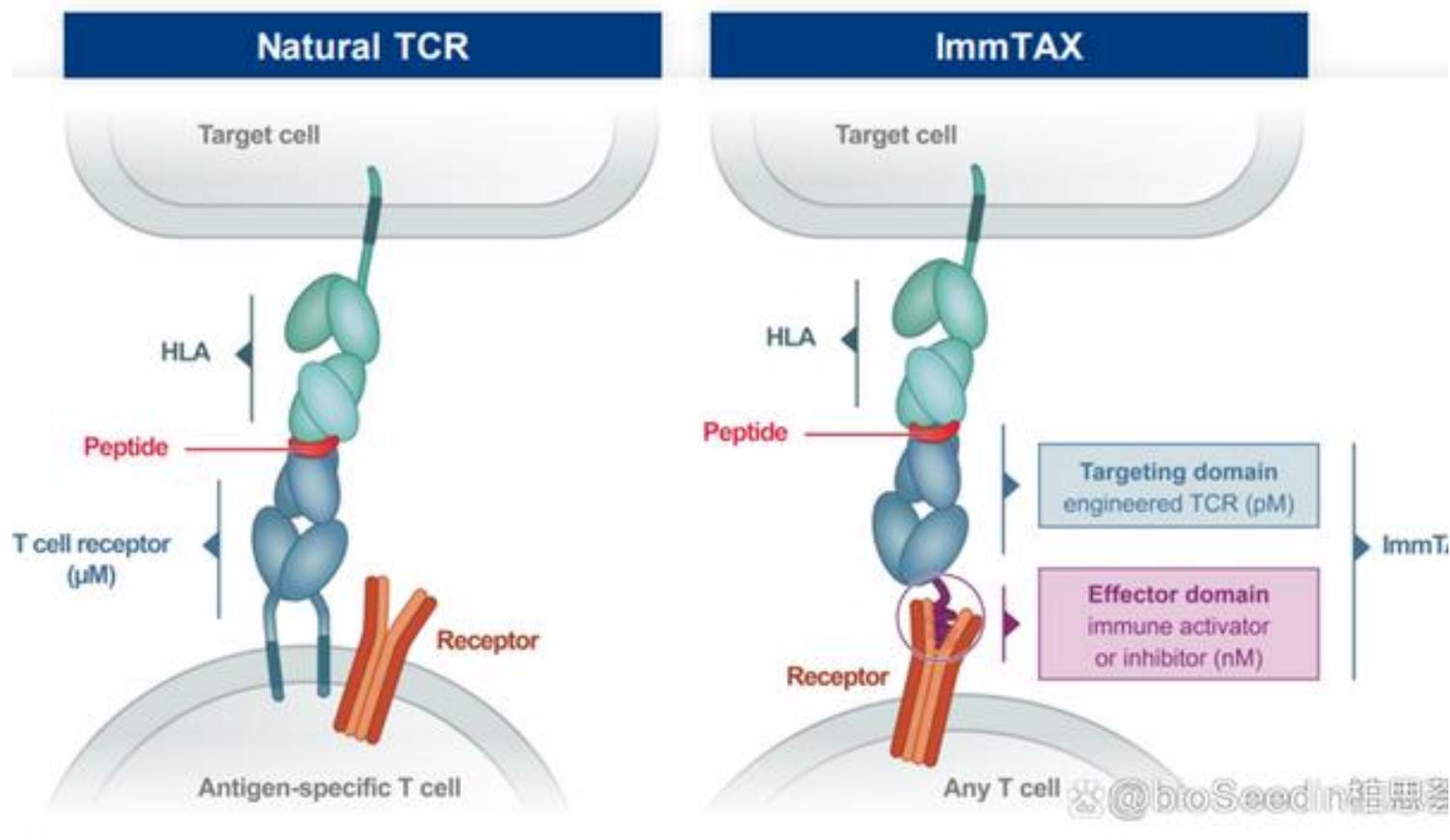
5.3 类TCR抗体技术



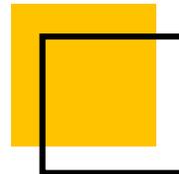
TCR样抗体 (TCR-like antibodies)：基于TCR识别抗原的能力，构建的基因工程抗体。

TCR样抗体，也被称为TCR模拟 (TCRm) 抗体或TCR-like抗体，是一类能识别肿瘤细胞表面多肽/MHC复合物的特殊抗体。这类抗体模拟了T细胞受体 (TCR) 的功能，能够识别并结合肿瘤表面的pMHC复合物，进而发挥对肿瘤细胞的检测和杀伤作用。

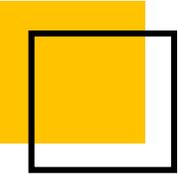
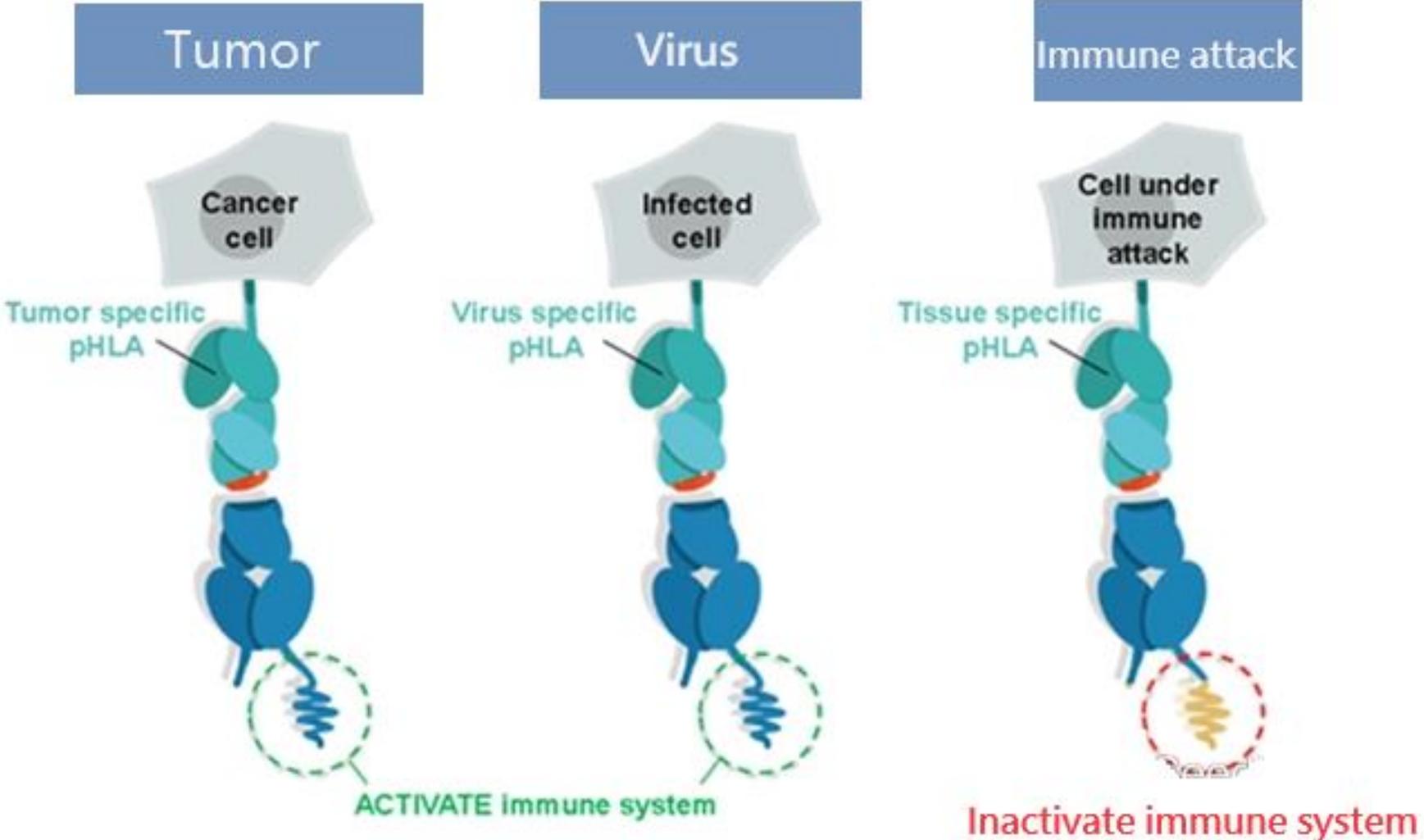
TCRm弥补了TCR-T细胞治疗的一些局限性：



- 自体TCR-T往往成本高昂，制备复杂，并且部分患者不适宜单采，导致这一方法可及性较差。
- 对于一些适应症比如慢性感染，TCR-T也并不适用，可能会在回输后大量扩增，迅速杀伤肝脏细胞，导致爆发性肝衰竭。

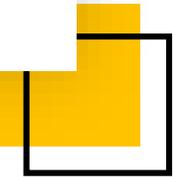


基于天然天然TCR增强的与效应子片段 (nM水平亲和力) 偶联成双特异性的分子, 用于肿瘤治疗, 传染病治疗, 以及免疫性疾病的靶向性抑制。





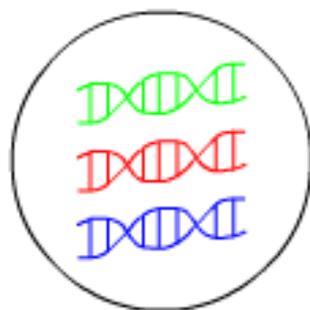
六、转基因的实施和转基因小鼠种系的构建



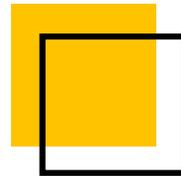
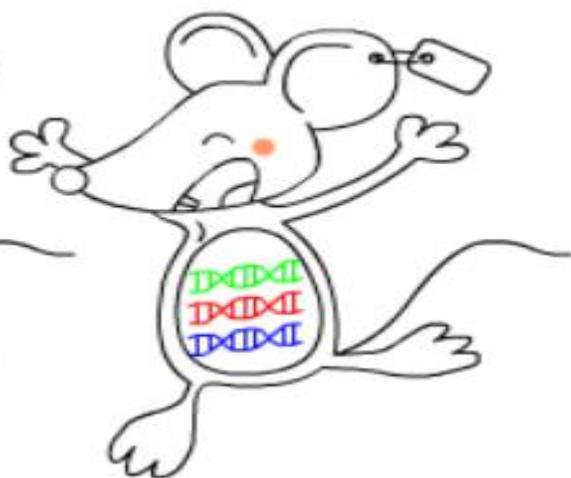
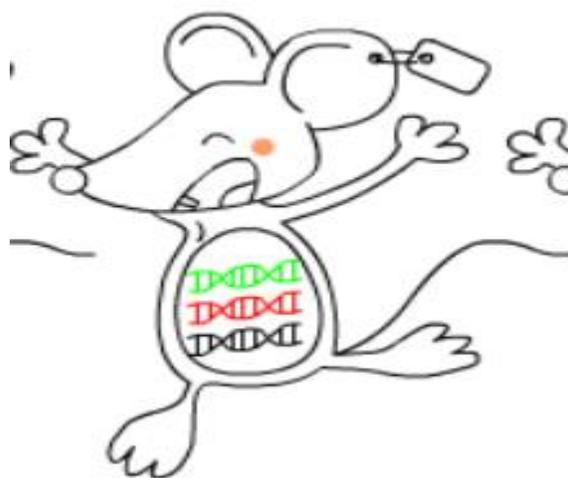
一、基于受精卵的转Ig基因动物的构建



+human IgH



+human IgK



一、基于受精卵的转Ig基因动物的构建

显微注射法：

直接用注射的方式将Ig基因注入受精卵的细胞核内



1.显微注射法：

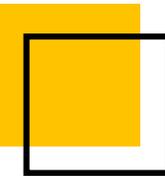
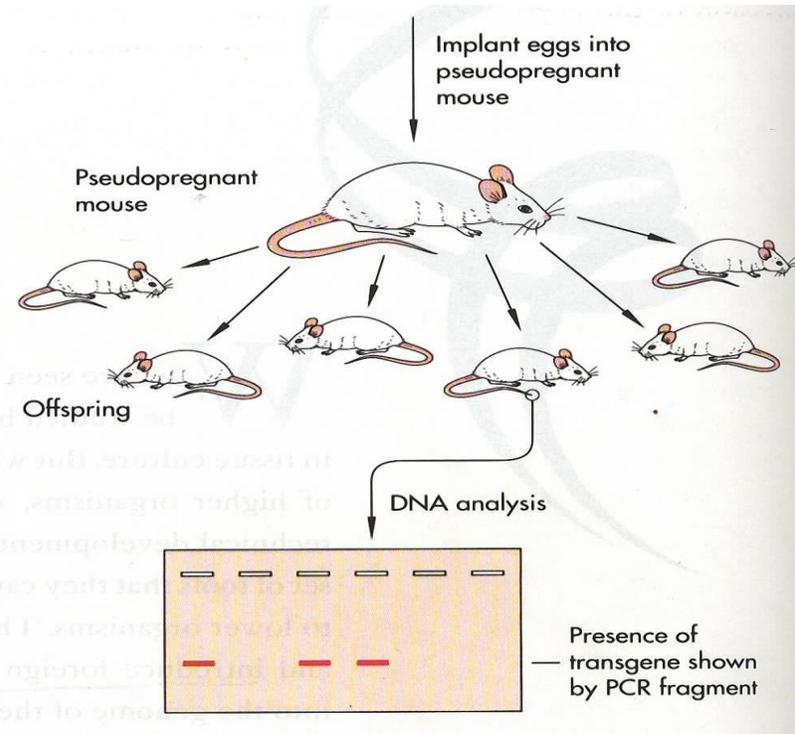
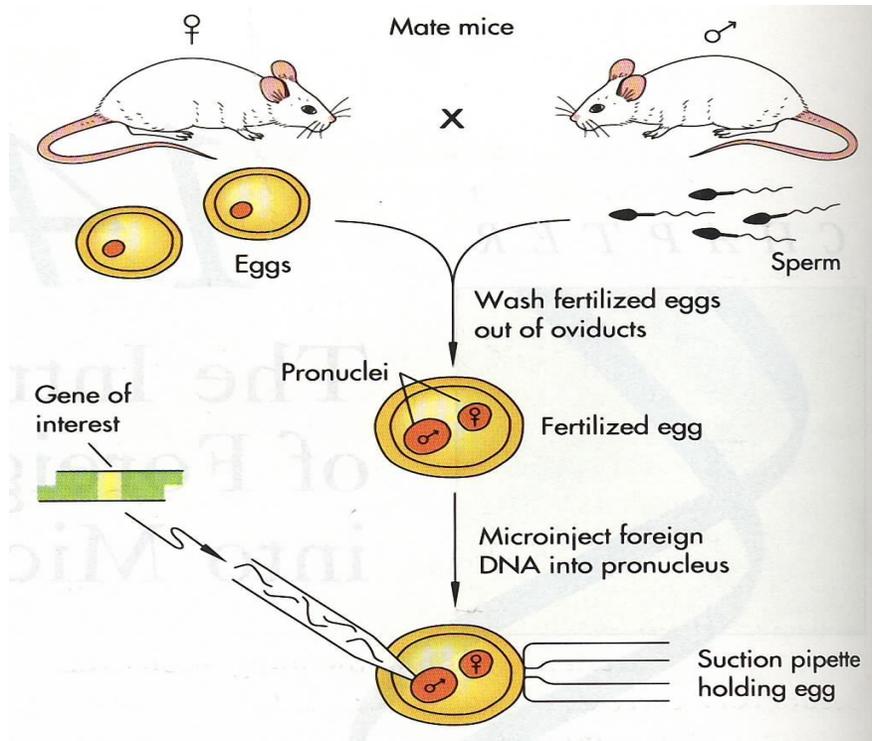
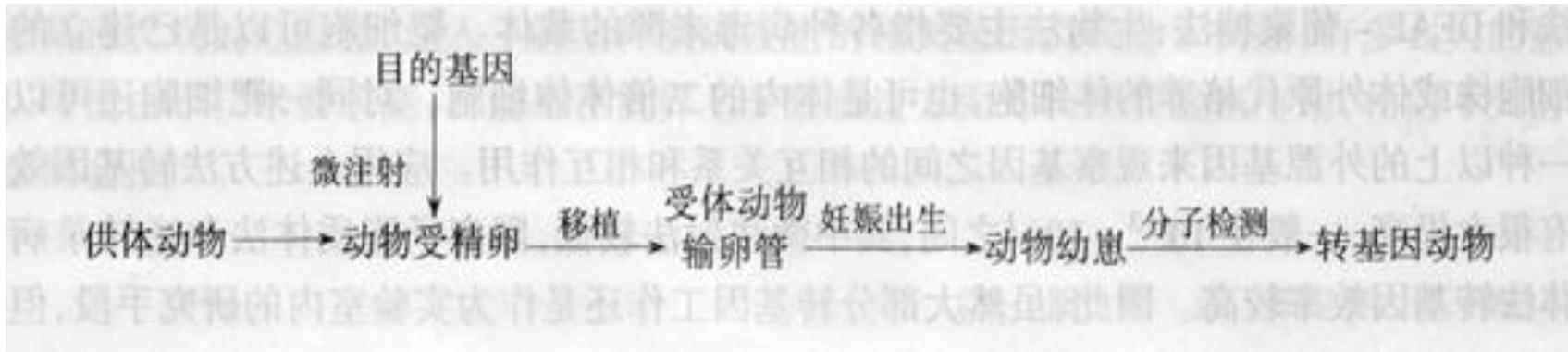
定义：

用显微注射仪将外源基因直接注射入实验动物受精卵中，外源基因整合到DNA中，或者可以稳定遗传，从而得到转基因动物。

优点：导入速度快，直观，对DNA大小无限制，不需要载体，整合效率较高，它可以直接获得纯系。

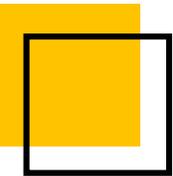
缺点：需要贵重精密仪器，技术操作较难，一次只能操作一个细胞，并且外源基因的整合位点和整合的拷贝数都无法控制。

2. 受精卵接收显微注射制备转基因动物的技术路线



3.实验程序：

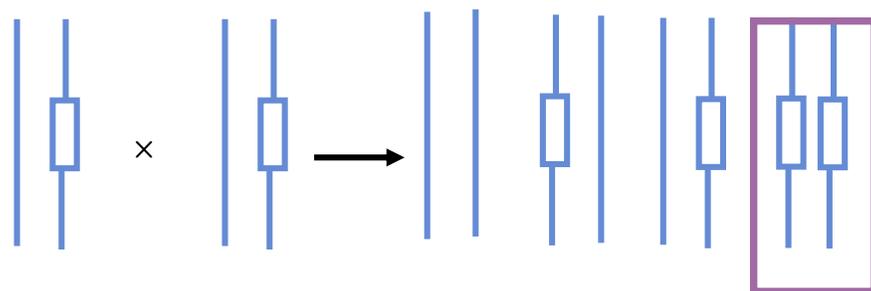
1. 显微注射DNA的制备与纯化
2. 鼠的种类、安置与饲养
3. 超排卵与取卵
4. 显微注射
5. 卵的转移
6. 转基因鼠系的建立



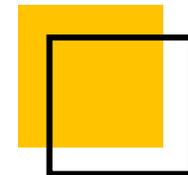
4. 通过繁育建立转基因小鼠品系

针对受精卵制备的转基因小鼠

- (1) 互交得到转基因纯合子小鼠
- (2) 回交至少10代建立纯系转基因小鼠

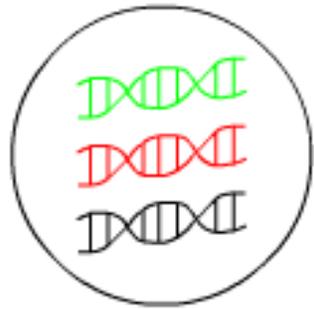


$$F_0^{\sigma} \times F_0^{\text{♀}} \rightarrow F_1$$

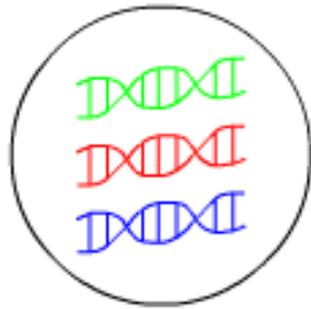


5. 转人Ig基因鼠的产生和鉴定

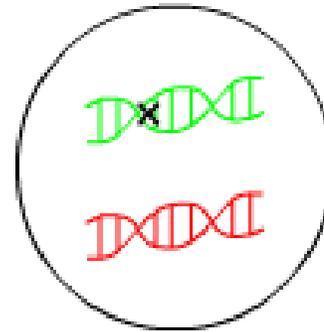
5.1 构建成功的转Ig基因小鼠需要构建四种纯系子代



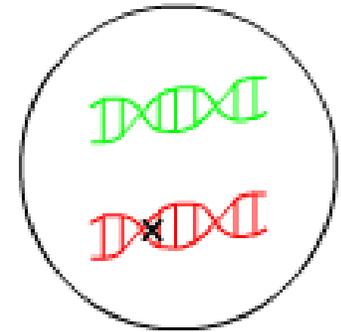
+human IgH



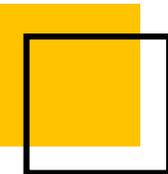
+human IgK



ΔJ_H



ΔC_K



通过回交后杂交的方法建立纯系转基因小鼠

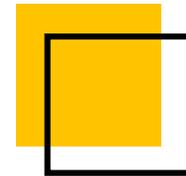


重链敲除

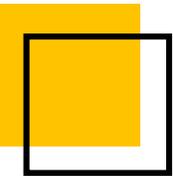
轻链敲除

人IgH敲入

人Igκ敲入



5.2 转人Ig基因小鼠品系的建立流程



纯合子的构建模式

第一代:

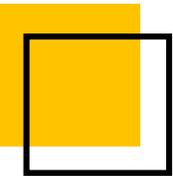
- 鼠A (MH (+) ML (-)) , 鼠B (MH (-) ML (+))
鼠C (HH (+) MH (+) L (+)) 鼠D (HL (+) MH (+) L (+))

第二代:

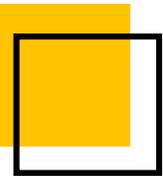
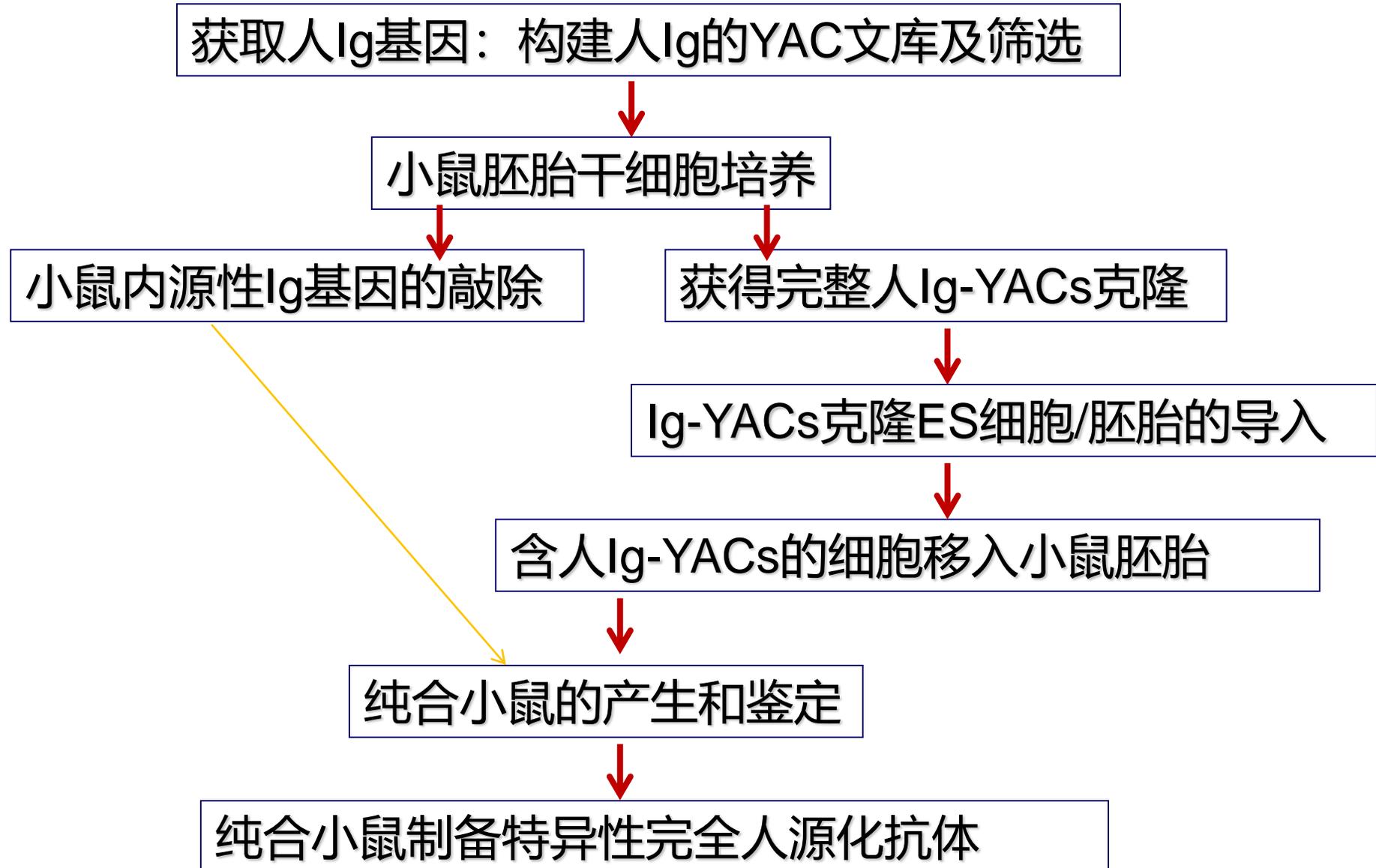
A×B=鼠E (MH (-) ML (-)) C×D=鼠F (HH (+) HL (+) MH (+) L (+))

第三代:

鼠E×F=鼠G (HH (+) HL (+) MH (-) L (-))



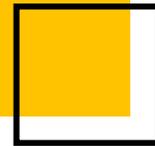
5.3 转人Ig基因小鼠技术流程





6. 子代鼠的鉴定

看外貌：如果是用ES细胞制备的小鼠，那么根据供体小鼠和受体小鼠外貌上的差异进行筛选。



6. 子代鼠的鉴定

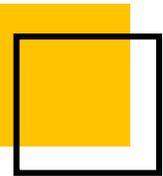
6.1 外源基因导入和内源基因剔除的效果鉴定的时间节点：

时机：

- ES细胞导入之前
- 鼠胚胎导入之前
- 幼鼠

6.2 检测靶标：

- DNA
- RNA
- 完整细胞



6.3 子代鼠的鉴定方法

01

1、PCR结合测序 (部分片段或者完整片段)

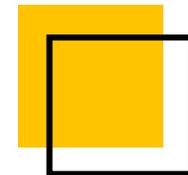
02

2、核酸杂交技术 (基于碱基互补配对)

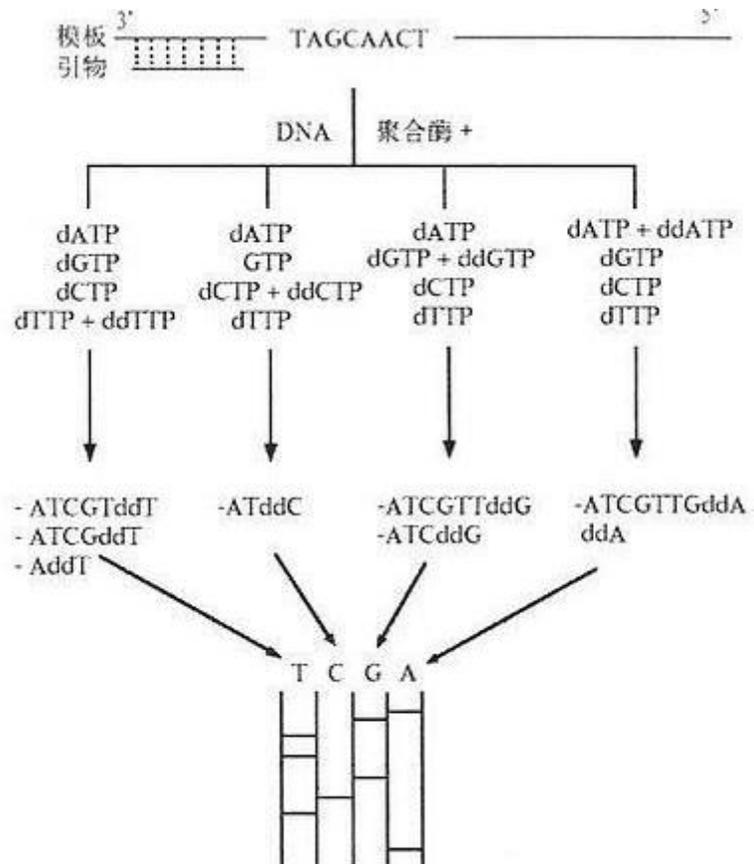
Southern杂交

Northern杂交

原位杂交

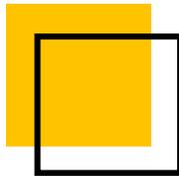


序列测定



高通量测序可以对插入的片段的质量提供更快更多的评价

确认插入的外源基因的正确和完整



Southern杂交

是southern于1975年创建用以鉴定**DNA**中某一特定的基因片段的技术，也称为Southern印迹（Southern Blot）。

通过标记的探针DNA与靶DNA结合，检测目的基因的**存在及大小**。

Northern杂交

也称为Northern印迹

(Northern Blot)，用以检测某一特定的**RNA**（通常是mRNA）片段的**存在及表达量**。

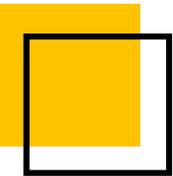
因与DNA的杂交（Southern杂交）相对应，故被趣称为Northern杂交。



原位杂交

细胞或染色体的原位杂交，用于基因定位。

确定插入的粗略位置，排除基因组外整合



6.4 子代鼠的鉴定的结论

- 通过上述方法
- 可以评价：
 1. 是否得到转基因鼠
 2. 外源基因是否完整
 3. 外源基因插入的拷贝数
 4. 染色体基因打靶的效果

6.4 子代鼠的鉴定的结论

生产性能的鉴定（所生产的抗体质量的鉴定）

IL-8抗原：

1. 抗体效价： 1×10^9 M.
2. 抗体类型：IgM,IgG(以及各种抗体亚类)BCR（是否免疫器官和免疫细胞都表达人源性的BCR）
3. 抗体效能：体外阻断IL-8对中性粒细胞的激活作用
 - ① 体内抑制IL-8刺激产生的炎症反应
 - ② 适合作为炎症疾病抑制剂

转人Ig基因小鼠与其他人源化或者人源性抗体的优势与缺点对比:

优势

1.所生产的抗体的功效是最好的

小鼠识别抗原和免疫动员的体系是完整的。体内生成抗体，经历正常的装配和成熟过程，保证抗体具有较高的亲和力和特异性。

一旦形成良好的转人Ig基因小鼠种系，再制备抗体相对快速。

2.可生产均有完整功能的人源性抗体

包含恒定区

3.可生成不同类型的人源性抗体

具有抗体类别转换的能力，可生成IgM，IgA等多聚体抗体

劣势

1.小鼠种系构建困难

小鼠免疫系统和人Ig基因的融合性问题，庞大的人Ig基因稳定导入的问题。转基因动物的稳定性问题。

2.免疫耐受

小鼠与人亲缘性关系很近，人源性抗原难以产生强烈的免疫反应。

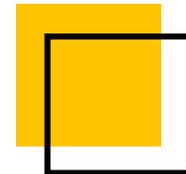
3.鼠源性抗体的干扰问题

稳定彻底敲除鼠源性Ig.

4.无法进行毒性抗原的免疫。

表 1 FDA 批准上市的全人源单抗(截止 2015 年 12 底)

上市年份	名称	靶标	适应症	来源
2015	Necitumumab	EGFR	非小细胞肺癌	噬菌体文库 ^[9]
2015	Daratumumab	CD38	多发性骨髓瘤	HuMAb TM [10]
2015	Evolocumab	PCSK9	高胆固醇血症	XenoMouse [®] [11]
2015	Alirocumab	PCSK9	高胆固醇血症	VelocImmune TM [12]
2014	Cosentyx (Secukinumab)	IL-17A	银屑病	HuMAb TM [13]
2014	Opdivo (Nivolumab)	PD-1	黑色素瘤	HuMAb TM [14]
2014	Cyramza (Ramucirumab)	EGFR2	晚期胃癌	噬菌体文库 ^[15]
2012	Abthrax (Raxibacumab)	炭疽毒素 PA	炭疽感染	噬菌体文库
2011	Yervoy (Ipilimumab)	CTLA-4/CD152	黑色素瘤	HuMAb TM
2011	Benlysta (Belimumab)	Blys	系统性红斑狼疮	噬菌体文库
2010	Prolia (Denosumab)	RANKL	骨质疏松症	XenoMouse [®]
2009	Arzerra (Ofatumumab)	CD20	淋巴细胞白血病	HuMAb TM
2009	Stelara (Ustekinumab)	IL-12/IL-23	银屑病	HuMAb TM
2009	Ilaris (Canakinumab)	IL-1 β	Cryopyrin 蛋白相关综合征	HuMAb TM
2009	Simponi (Golimumab)	TNF- α	类风湿性关节炎	XenoMouse [®]
2006	Vectibix (Panitumumab)	EGFR	结直肠癌	XenoMouse [®]
2002	Humira (Adalimumab)	TNF- α	类风湿关节炎	噬菌体文库



Thanks

谢谢!

复习:

- 名词解释:
- 同源重组
- 胚胎干细胞
- HOLIDAY 结构
- 基因打靶
- YAC染色体技术
- 简述
- 同源重组的正反向筛选
- 同源重组嵌合体动物的制备流程
- 转基因小鼠的鉴定步骤和方法