



黄婧洁, 林鹭, 顾雅妮, 潘晓乐, 李建成. 小分子单克隆抗体筛选技术的研究进展[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(10):230-240.

HUANG Jingjie, LIN Ao, GU Yani, PAN Xiaole, LI Jiancheng. Research progress in small molecule monoclonal antibody screening technologies[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(10):230-240.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.10.17

小分子单克隆抗体筛选技术的研究进展

黄婧洁^{1,2} 林鹭¹ 顾雅妮¹ 潘晓乐² 李建成^{1,2}

(1. 中国农业大学 动物医学院/兽医公共卫生与安全国家重点实验室/动物源性食品安全检测技术北京市重点实验室, 北京 100193;

2. 中国农业大学 三亚研究院/海南省食品安全监测及检测技术创新中心, 海南 572025)

摘要 在痕量小分子化合物检测中, 单克隆抗体的快速高效筛选是提高检测灵敏度的关键。传统杂交瘤技术和噬菌体展示技术因筛选周期长, 阳性克隆率低, 难以满足快速检测的迫切需求。相比之下, 单B细胞技术的出现为小分子单克隆抗体筛选提供了更高效的解决方案。本文系统分析了3种主流抗体筛选技术(杂交瘤、噬菌体展示和单B细胞技术)的机制差异, 并重点探讨了单B细胞技术在小分子单克隆抗体筛选中的应用进展。针对记忆B细胞(Memory B cells, MBCs), 通常采用荧光激活细胞分选结合抗原探针标记实现高效分选; 针对缺乏表面结合表位的抗体分泌细胞(Antibody-secreting cells, ASCs), 通过微流控芯片结合分泌抗体-抗原荧光成像实现无标记细胞分选, 显著提升抗体筛选效率。综上, 单B细胞技术在缩短抗体开发周期、保留天然亲和力以及实现跨物种抗体开发中都展现出显著优势。未来技术突破需聚焦低成本高通量微流控芯片的开发, 构建深度学习驱动的智能抗体筛选体系, 为食品安全检测提供高特异性、高亲和力的抗体工具, 推动抗体工程技术迈向精准化与智能化新阶段。

关键词 单B细胞技术; 传统杂交瘤技术; 噬菌体展示技术; 小分子化合物; 单克隆抗体

中图分类号 S859.84

文章编号 1007-4333(2025)10-0230-11

文献标志码 A

Research progress in small molecule monoclonal antibody screening technologies

HUANG Jingjie^{1,2}, LIN Ao¹, GU Yani¹, PAN Xiaole², LI Jiancheng^{1,2}

(1. College of Veterinary Medicine/National Key Laboratory of Veterinary Public Health and Safety/Beijing Key Laboratory of Detection Technology for Animal-Derived Food Safety, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Sanya Research Institute/Hainan Technology Innovation Center for Food Safety Surveillance and Detection, China Agricultural University, Hainan 572025, China)

Abstract In the detection of trace small molecule compounds, the rapid and efficient screening of monoclonal antibodies is the key to improve the detection sensitivity. Traditional hybridoma techniques and phage display techniques are difficult to meet the urgent need for rapid detection due to their long screening cycles and low positive clone rates. In contrast, the emergence of single B-cell technology provides a more efficient solution for the screening of small molecule monoclonal antibodies. This article systematically analyzes the mechanistic differences among three mainstream antibody screening technologies (hybridoma, phage display, and single B-cell technology), focusing on advancements in single B-cell technology for small-molecule monoclonal antibody screening. For memory B cells (MBCs), fluorescence-activated cell sorting combined with antigen

收稿日期: 2025-02-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972738)

第一作者: 黄婧洁(ORCID:0000-0002-2183-4712), 博士研究生, E-mail: h15081883875@163.com

通讯作者: 李建成(ORCID:0009-0002-9908-2714), 副教授, 主要从事兽药残留检测与风险评估研究, E-mail: horse20@cau.edu.cn

probe labeling enables efficient selection. For antibody-secreting cells (ASCs) lacking surface binding epitopes, label-free cell sorting is achieved through microfluidic chips integrated with secreted antibody-antigen fluorescence imaging, significantly enhancing antibody screening efficiency. In summary, single B-cell technology demonstrates significant advantages in shortening the antibody development cycles, preserving natural affinity, and enabling cross-species antibody development. Future technological breakthroughs should focus on developing low-cost, high-throughput microfluidic chips and constructing deep learning-driven intelligent antibody screening systems to provide highly specific and high-affinity antibodies tools for food safety detection, propelling antibody engineering technology into a new era of precision and intelligence.

Keywords single B cell technology; traditional hybridoma technology; phage display technology; small-molecule compounds; monoclonal antibody

小分子化合物的痕量检测在农业、食品安全、环境监测及医学诊断等领域均具有重要意义。单克隆抗体(Monoclonal antibodies, mAbs)作为分子识别领域的精准“生物探针”,在小分子化合物的免疫检测领域始终发挥不可替代的作用。其凭借与抗原表位的特异性结合能力,可实现对复杂基质中痕量小分子靶标(如抗生素、农药、兽药、环境污染物及重金属等,分子量 $<1\ 000\ \text{ku}$)的超灵敏检测,已成为酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、侧流免疫层析(Lateral flow immunoassay, LFIA)等免疫分析技术的核心试剂。在生物医学领域,mAbs更是疾病诊断、靶向治疗及机制研究的基石,近20年来,凭借其高特异性、高灵敏度和批次均一性等优势,mAbs在肿瘤靶向治疗和自身免疫疾病领域取得突破性进展。截至2021年6月,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已批准104种治疗性单克隆抗体上市^[1]。我国在政策支持下也实现了抗体药物的跨越式发展^[2],不仅关键技术环节的创新能力提升,产业化体系也更趋完善,为小分子化合物的快速、灵敏检测提供了技术支撑。

随着抗体工程技术的迭代,针对小分子化合物检测的单克隆抗体制备策略呈现多元化发展。传统杂交瘤技术作为单抗制备的奠基性技术,通过脾B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合实现抗体的永生分泌,但其长达4~6个月的制备周期、低效的亚克隆筛选流程以及依赖于啮齿类骨髓瘤细胞,严重限制了跨物种抗体开发。并且受小分子结构类似物和载体蛋白表位的干扰,易导致抗体的交叉反应,从而影响检测特异性。为突破这一瓶颈,噬菌体展示技术通过体外构建 10^{11} 容量的抗体文库,结合固相

生物淘选策略,实现了跨物种高亲和力抗体的筛选,例如针对广谱抗菌作用的氟喹诺酮类药物抗体的开发,使检测灵敏度提高近10倍^[3]。然而,该技术依赖原核表达系统,可能导致抗体糖基化修饰缺失,且文库构建成本高昂,难以满足小分子抗体的大规模制备需求。近年来,单B细胞技术凭借其精准靶向性成为研究热点,通过荧光激活细胞分选或微流控芯片捕获抗原特异性单B细胞,直接扩增抗体基因以获取目标抗体。该技术保留了天然配对的重链/轻链基因,较传统杂交瘤技术和噬菌体展示技术更具靶向性。值得注意的是,筛选策略的差异直接影响抗体亲和力及表达水平。本文综述了传统杂交瘤技术、噬菌体展示技术、单B细胞技术3种主流单克隆抗体筛选技术的优劣势,并重点探讨了单B细胞技术在小分子单克隆抗体筛选中的应用进展。单B细胞技术凭借其高通量筛选能力、天然抗体配对优势以及对复杂靶点的适应性,正在逐步成为小分子抗体开发的核心工具。尽管其在技术成本与标准化流程上仍需优化,但随着微流控芯片、单细胞测序等技术的整合,该技术有望在更多领域展现其独特价值。本文旨在推动小分子抗体的高效、精准与快速开发,并为相关研究提供理论指导。

1 传统杂交瘤技术

由于B淋巴细胞难以长期体外培养,抗原特异性抗体的筛选研究长期面临技术瓶颈。1975年,Köhler与Milstein^[4]开创性地提出杂交瘤技术,通过融合骨髓瘤细胞的无限增殖能力与抗原激活B淋巴细胞的抗体分泌功能,实现了融合细胞的体外永生,这一突破为小分子单克隆抗体的规模化生产奠定了技术基础。该技术标准化流程包括:1)人工设

计半抗原与免疫原制备;2)动物免疫(通常为BALB/c小鼠,免疫周期7~8周);3)细胞融合(化学融合^[5]、电融合^[6]或仙台病毒介导融合^[7]);4)HAT选择性培养清除未融合HGPRT⁻骨髓瘤细胞^[8];5)2~3轮有限稀释法结合ELISA筛选单克隆杂交瘤^[9];6)体内诱生法生产抗体,如图1所示。基于该技术,已成功开发出针对糠氨酸^[10]、莫能菌素^[11]和桔霉素^[12]等环境污染物的单克隆抗体,实现了小分子的残留检测。尽管该技术凭借成熟的工艺流程和高纯度抗体生产能力在小分子抗体开发中占据重要地位,但核心环节中的有限稀释法面临制备周期冗长、阳性克隆筛选效率低、高亲和力克隆易丢失的技术瓶颈。

为此,研究者开发了多维杂交瘤筛选创新策略:

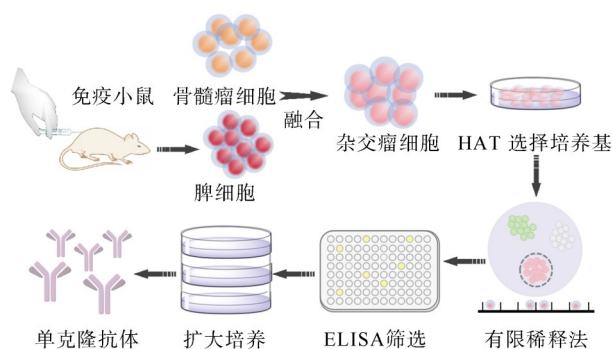


图1 杂交瘤技术筛选单克隆抗体流程图

Fig. 1 Hybridoma technology screening process for monoclonal antibodies

2 噬菌体展示技术

1985年,Smith^[17]通过将外源蛋白片段与噬菌体衣壳蛋白基因融合表达,成功实现了外源蛋白在噬菌体表面的定向展示(图2),标志着噬菌体展示技术的诞生。该技术的核心在于将蛋白质表型(抗体结合能力)与其基因型(抗体编码序列)直接关联。随着技术的迭代升级,当前已发展出基于微流控芯片的高通量生物淘选系统,单次筛选通量可达 10^{11} 个克隆,显著提升了抗原特异性抗体的筛选效率^[18]。在基于噬菌体展示的小分子单克隆抗体技术领域,多项研究展现了该技术的创新潜力。Zhao等^[19]通过构建抗玉米赤霉烯酮单链抗体库,结合磁性免疫复合体识别策略,成功建立了非竞争检测体系,使检测灵敏度较传统竞争法提升112倍。González-Techera等^[20]则充分发挥该技术基因型-

1)采用半固体甲基纤维素培养基的物理屏障特性,结合自动化成像系统实现单克隆原位可视化筛选,显著提升了杂交瘤细胞的阳性克隆率^[13];2)通过生物素化抗原与链霉亲和素-荧光探针复合物放大信号标记膜表面受体,高效分选阳性杂交瘤细胞^[14];3)借助集成化微流控平台(如CellenOneTM)同步完成细胞培养、ELISA检测及单克隆提取,将筛选周期缩短至72 h^[15];4)利用单细胞分泌组纳米阱阵列定量单个杂交瘤抗体分泌量,定向筛选高产克隆^[16]。

然而,传统杂交瘤技术仍受限于啮齿类动物的免疫体系,且在缺乏永生融合伴侣细胞的物种中适用性受限,严重制约了跨物种抗体的开发效率。因此,亟需构建一种跨物种兼容的新型抗体开发策略以突破现有技术局限。

表型联动的核心优势,采用特异性环肽替代传统免疫复合体抗体,开发出一种新型非竞争性小分子检测平台,在单克隆抗体体系中实现检测信号的放大。值得关注的是,基于纳米抗体的筛选技术也取得了重要进展,有研究以羊驼为实验对象,经过多轮亲和淘选,成功获得了黄曲霉毒素特异性纳米抗体^[21],向妍^[22]同样利用该方法成功筛选出3株靶向苯并[a]芘的高亲和力纳米抗体序列,其热稳定优于传统单抗,为复杂基质中小分子污染物的精准检测提供参考。

噬菌体展示技术凭借高建库容量(较传统杂交瘤技术高5~6个数量级)和突破免疫耐受的体外筛选特性,在弱免疫原性或高毒性抗原的抗体制备中展现出独特优势,并能将制备周期缩短至数周。该技术催生了首个全人源单抗Adalimumab(2021年销售额207亿美元)的里程碑药物^[23],并通过与单细

胞测序^[24]、深度突变扫描^[25]等技术融合,推动了蛋白质互作网络与抗体进化机制的深入研究。然而,该技术在小型抗体制备中存在显著局限性,由于小分子通常需偶联载体蛋白以增强免疫原性,但偶联位点的随机性易导致关键表位被掩蔽,影响抗体识别特异性,并且高亲和力抗体在固相筛选过程中易丢失且稀有克隆富集困难进一步降低筛选效率。

此外,小分子抗体的开发需要优先保留天然重链/轻链配对,而 scFv/Fab 文库中重链/轻链的非天然随机组合往往会破坏抗体结构的完整性,降低亲和力。尽管微流控-NGS 联用等创新方案正不断提升筛选精度,未来或将实现抗体亲和力成熟的体外智能优化,但当前技术仍需克服小分子靶点的表位识别单一、载体干扰及文库多样性控制等挑战。

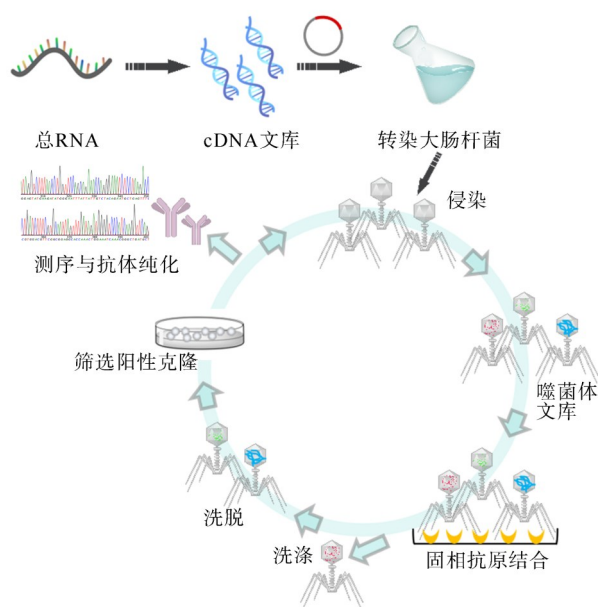


图 2 噬菌体展示技术筛选单克隆抗体的流程图

Fig. 2 Phage display technology screening process for monoclonal antibodies

3 单 B 细胞抗体技术

单 B 细胞技术作为一种新型抗体筛选技术,通过直接捕获天然配对的 B 细胞受体 (B-cell receptor, BCR) 基因,有效克服了传统杂交瘤技术因缺乏融合伴侣细胞导致跨物种兼容性不足的问题,同时避免了噬菌体展示技术中重链/轻链的随机组合产生非天然配对的缺陷。其核心优势体现在以下三方面:1) 跨物种兼容性,可直接从兔、羊驼或人源 B 细胞中分离抗原特异性抗体,突破啮齿类模型的限制;2) 保留天然重链/轻链配对,通过单细胞 RT-PCR 获得单细胞水平 V(D)J 基因全长序列信息;3) 显著缩短抗体开发周期。可在 2~3 周内获得天然配对的完整抗体,且阳性克隆捕获率较传统方法提升 10 倍以上^[26]。该技术基于 B 细胞激活后的生物学特性,当 BCR 识别抗原后,启动克隆扩增、亲和力成熟及抗体类别转换等关键生物学过

程^[27-28],最终分化为记忆 B 细胞 (Memory B cells, MBCs) 和抗体分泌细胞 (Antibody-secreting cells, ASCs),其中, MBCs 通过生发中心外途径在二次抗原暴露时快速分化为高亲和力 ASCs^[29-30],为高效抗体筛选提供了生物学基础。根据 IMGT 数据库中物种特异性 V(D)J 基因序列信息,在 V 基因的前导区设计上游引物,恒定区保守区设计下游引物,通过巢式或半巢式 PCR 扩增低丰度单细胞的 V(D)J 全长序列。结合哺乳动物细胞真核表达系统,可高效表达并纯化高纯度全长单克隆抗体。尽管单 B 细胞技术在小型抗体开发中展现显著优势,其广泛应用仍受限于高筛选成本和对专用仪器的依赖。未来需聚焦低成本微流控芯片的开发,以及自动化高通量筛选系统的集成,以推动技术全流程智能化,为食品安全检测提供更高效率的抗体开发工具。

3.1 荧光激活细胞分选

荧光激活细胞分选 (Fluorescence-activated cell

sorting, FACS)基于荧光标记抗原与BCR的特异性结合,实现对抗原特异性记忆B细胞的精准分选,分选原理如图3所示。其标准化流程包括:1)荧光标记的靶抗原与MBCs共孵育;2)多色激光流式细胞仪检测抗原-BCR复合物信号;3)液滴静电偏转分选目标细胞;4)单细胞RT-PCR扩增抗体重链/轻链可变区基因;5)重组抗体表达与功能验证^[31-32]。该技术在细胞富集、筛选后再培养等方面展现出显著优势,能够满足高通量、高细胞活性和多参数信息提取的细胞分选需求^[33]。例如,Starkie等^[34]通过物种特异性表面标志物的多参数流式分选策略,实现了抗原特异性记忆B细胞的精准分选,从而显著提升了兔源单克隆抗体的跨物种开发效率。然而,该技术依赖膜表面标志物的间接识别模式存在灵敏度限制^[35],难以直接分选缺乏

表面标记的抗体分泌细胞(如兔浆细胞和部分杂交瘤细胞标志物)。针对这一挑战,Kurosawa等^[36]基于ASCs具有活跃抗体分泌功能的特性,创新性地开发了内质网示踪染料(ER-Tracker)联合荧光标记抗原的双信号策略,实现了对目标ASCs的精准分选。此外,新兴无标记成像技术通过定量相位成像解析细胞折射率差异或采用时间拉伸光谱技术(每秒百万帧成像速率)实现亚细胞结构动态追踪,显著提升稀有细胞识别精度^[37]。对此Li等^[15]进一步结合共聚焦激光扫描显微镜,通过三维空间定位实现了小分子半抗原特异性杂交瘤细胞的高精度挑选,大大提高了单克隆抗体的筛选效率。尽管面临技术挑战,FACS技术仍凭借其高通量、高纯度分选能力,在B细胞研究领域保持不可替代的地位,是当前B细胞亚群筛选不可或缺的工具。

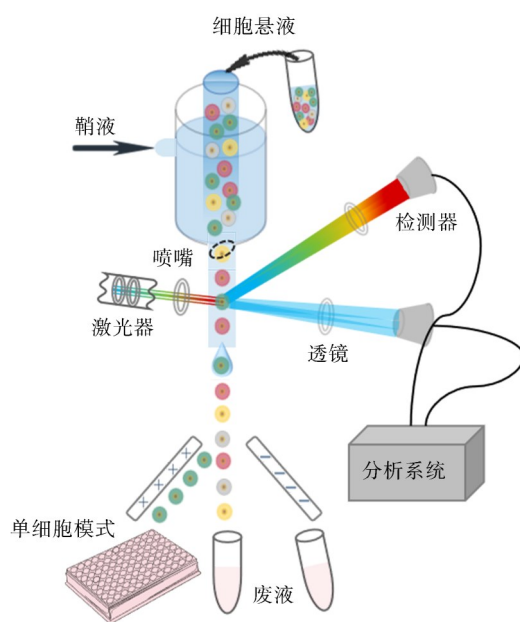


图3 单B细胞荧光激活细胞分选的原理图

Fig. 3 Principle schematic of fluorescence-activated cell sorting for single B cells

3.2 微流控技术

20世纪末,Harrison等^[38]提出的微全分析系统以微通道为结构特征,开创了微芯片技术的新纪元。该技术依托于微流控芯片,实现了对微量液体的精细控制,并能与多种检测手段联合使用。相较于荧光激活细胞分选,微流控技术展现出若干关键优势:1)采用密封式系统,有效防止外界污染;2)高精度显微成像能够在操作过程中减少细胞的损伤,适用于需要保持细胞活力的应用场景;3)以极低的样本与试剂消耗完

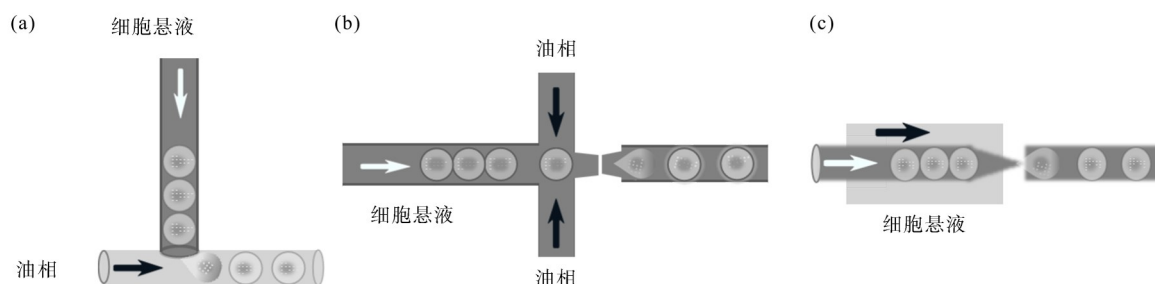
成高精度流体管理任务。此外,微流控芯片可灵活设计,能选择和组合多种单细胞分析、分选方案,实现高通量并行分析,动态监测单细胞变化,其体积小便于集成,易于实现自动化,更易普及和推广^[39-40]。2002年,Unger等^[41]在*Science*上发表了关于利用微流控芯片实现大规模集成的微阀和微泵技术的研究,这项工作让学术界认识到微流控芯片不再局限于分析化学领域,而是展现出更广泛的价值和潜力。目前微流控技术已经广泛用于细胞分选和单细胞分析,为稀有细胞

的获取和单细胞水平上的免疫分析方法的建立提供了契机。同时微流控芯片技术根据其分隔细胞的载体不同,形成了微液滴、微孔和微坝等微结构的微流控单细胞操控体系。

3.2.1 液滴微流控技术

液滴微流控技术是基于油水不混溶性特性,利用油相包裹含水相,并借助微通道内流体动力学剪切力作用将细胞悬浮液离散化为单分散的微液滴,图4展示了3种典型液滴生成通道结构。每个液滴视为一个独立微反应器,从而实现单细胞包裹和分离。有研究表明该技术的试剂消耗量可降至传统方法的1/100以下,同时液滴生成通量可达到每秒 $10^3 \sim 10^4$ 个^[42-43]。凭借单细胞隔离、并行化处理及超低样本需求等优势,该技术已成为单细胞转录组测序、酶活性筛选及稀有细胞分选的核心技术平台^[44]。Hosokawa等^[45]开发了一种多通道液滴融合系统,实现了单细胞全基因组扩增与测序文库制备的全流程集成。Ali Khorshidi等^[46]将荧光寿命成像显微术与液滴

微流控结合,通过实时监测 HEK293T 细胞凋亡过程中线粒体膜电位变化,极大地提高了分析效率。Sesen等^[47]提出了一种双模式(明场与荧光场)细胞成像的液滴微流控-单细胞分选技术,通过高速摄像头对流动液滴进行实时图像采集与分析,成功将目标细胞的分选纯度提升到85%。Yang等^[48]创新性地将酶联荧光信号放大系统整合至液滴平台,实现了低丰度细胞表面标记物的单细胞定量分析。液滴微流控技术以高通量、低消耗和单细胞解析能力,在抗体开发中展现出显著优势,尤其在快速筛选和动态监测方面表现突出。但其仍面临两大核心挑战:1)液滴空载率较高,且多细胞包裹率随细胞浓度升高呈指数增长;2)液滴破裂后细胞丢失率高,难以实现长时程单细胞行为连续观测。针对上述问题,近期有研究提出"细胞自包裹"策略^[49]:利用CD45抗体修饰的磁珠与B细胞表面抗原特异性结合,使细胞-磁珠复合体直接作为液滴成核位点,显著提升有效包裹率,并实现了磁控式液滴的定向回收。



(a) T型结构; (b) 流动聚焦结构; (c) 共轴聚焦结构。
(a) T-junction structure; (b) Flow-focusing structure; (c) Coaxial focusing structure.

图4 3种常见微流控液滴生成通道的结构

Fig. 4 Structural designs of three common microfluidic droplet-generating channels

3.2.2 微孔阵列技术

微孔阵列技术以芯片上装载的数以万计个微孔作为分隔细胞的载体,基于泊松分布原理随机分配细胞,并结合离心和显微成像技术直接观察单细胞占位,最终实现单细胞的精准捕获,如图5所示。该技术将细胞孵育与检测集成于同一芯片上,简化了分选流程^[50-51]。此外,可以通过优化微孔的形状、材质,或借助离心辅助等外力操作将细胞限制在微孔中,可进一步提高单细胞的捕获效率。例如,Yoshimura等^[52]开发的聚苯乙烯微孔阵列芯片包含

3万个微孔,实现了小鼠脾淋巴细胞80%的单细胞捕获率;Park等^[53]通过离心优化将单细胞捕获率提升至90%以上;商业化平台如BD Rhapsody™(整合mRNA捕获磁珠)和CellCelector™(纳米孔阵列与荧光定位),进一步推动了该技术的标准化,基于CellCelector™平台,Li等^[54]实现了兔脾脏淋巴细胞中单个抗体分泌细胞的可视化捕获,通过筛选分泌莱克多巴胺特异性抗体的ASCs,成功获得高亲和力兔源单克隆抗体。凸显了该技术在稀有细胞分选中的优势,并突破了兔骨髓瘤细胞使用受限的难

题,大大缩短了小分子兔单克隆抗体制备周期。但相较于液滴微流控技术,微孔阵列的通量较低(1万~20万细胞/芯片)。未来技术趋势应着眼于优化微孔结构与多组学整合,提升细胞上样通量与功能适用性,通过提高细胞通量,微孔阵列技术有望成为最有前景的单B细胞分选技术之一。

3.2.3 微坝阵列技术

微坝阵列微流控芯片是基于流体动力学原理设计与细胞尺寸匹配的微坝结构,在通道内形成局部低剪切区,在层流剪切力下,尺寸与微坝不匹配的细胞被排出,而匹配的目标细胞被选择性截留在微坝间隙

中^[55],通过“无细胞状态”与“细胞捕获状态”对比,突出芯片功能差异(图6)。饶成飞等^[56]搭建了3种具有不同尺寸的微坝结构,通过计算流体力学模拟和优化流体剪切力,有效分离出不同尺寸细胞。李涛^[57]进一步利用该技术从全血中富集靶细胞,有效排除了血液中其他杂质的干扰。然而,该技术依赖细胞物理尺寸,难以区分不同表面标志物的同尺寸细胞亚群(如记忆B细胞与抗体分泌细胞),导致单B细胞分选特异性受限。未来可以将微坝的流体动力学预富集与微孔静态单细胞分离相结合,构建尺寸筛选与功能验证的双重系统,从而提升抗原特异性单B细胞的分选效率。

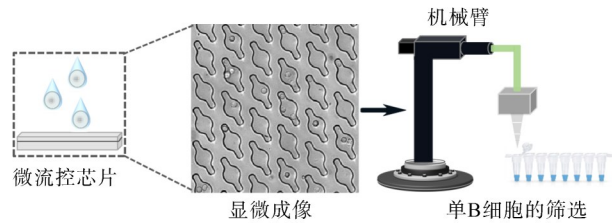


图5 微孔阵列芯片的单B细胞分离示意图

Fig. 5 Schematic diagram of single B cells isolation using a microwell array chip

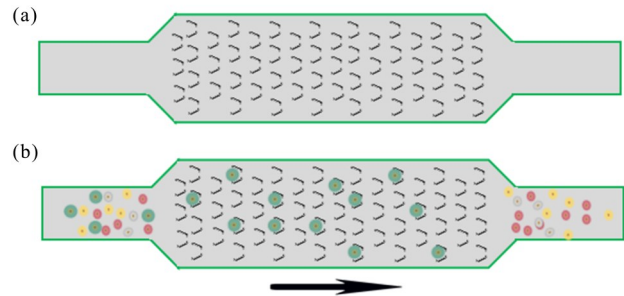


图6 无细胞微坝阵列芯片结构(a)和捕获细胞后的微坝阵列芯片结构(b)

Fig. 6 Cell-free microdam array chip structure (a) and microdam array chip structure after cell capture (b)

4 其他单克隆抗体筛选技术

4.1 免疫磁珠分选技术(MACS)

MACS是基于抗原-抗体特异性结合原理^[58],通过将超顺磁性纳米颗粒(直径50~200 nm)表面偶联特异性抗体,实现对靶细胞的快速富集。Magbanua等^[59]创新性地将MACS与FACS联用,建立了两步细胞分选策略,首先利用CD45磁珠负向筛选去除造血系单个核细胞,再以EpCAM磁珠正向富集循环肿瘤细胞(Circulating tumor cells, CTCs),最终分选获得73%的活细胞群。Leyendeckers等^[60]采用类似策略,在甲状腺疾病患

者外周血中检测到甲状腺过氧化物酶特异性IgG⁺记忆B细胞(阳性率65%),其分选成本仅为FACS的1/5。尽管MACS对细胞损伤较小,但对低丰度细胞分选效率有限,且磁珠脱落可能干扰下游单细胞测序,因此MACS更适用于靶细胞的预富集或与其他单细胞技术联用。

4.2 酵母展示技术

酵母展示技术是一种真核表达系统的抗体工程平台,该技术通过将抗体基因与酵母表面锚定蛋白融合表达,实现了目标蛋白在酵母细胞壁的定向展示与功能筛选。相较于噬菌体展示技术,其核心优势在于真核生物的内质网-高尔基体系统可介导

抗体的正确折叠及翻译后修饰(如糖基化),从而更精准地模拟哺乳动物细胞表达的抗体构象,筛选具有高亲和力和特异性的抗体或抗体片段。Fux 等^[61]利用酵母展示技术成功筛选出 LPS 特异性人类单链抗体片段可变片段(Single chain fragment of variation, scFv),其中 2 种 scFv-Fc 融合蛋白在去除水溶液中的内毒素方面表现出优于商业多克隆抗体的效果,表明该技术在生产单克隆抗体分子方面有很大潜力。但其建库成本较噬菌体展示较高,未来通过 CRISPR 介导的体内突变技术或可大幅降低文库构建成本。

5 抗体筛选技术的多维评估

表 1 系统性对比了杂交瘤技术、噬菌体展示与单 B 细胞技术这三大主流单抗筛选技术的核心参数。尽管 3 种技术均能筛选抗原特异性单克隆抗体,但在时间成本、技术原理、抗体亲和力与应用场景上存在显著差异。1)传统杂交瘤技术依托有限稀释法进行亚克隆筛选,存在周期长、工作量大,跨物种适应性低等局限,但仍可筛选到高亲和力抗体,适用于稳定细胞系构建;2)噬菌体展示技术通

过体外构建 $10^{10}\sim 10^{11}$ 的抗体库突破物种限制,但在小分子抗体的亲和力优化上需要更多的淘选步骤,且因重链/轻链随机组合导致亲和力损失;3)单 B 细胞技术通过精准捕获天然配对抗体和高效开发流程,解决了传统技术的核心难点。尽管面临成本与自动化瓶颈,但其在跨物种适用性、稀有抗体发现等方面的潜力,使其有望成为食品安全与精准医学领域的核心工具。该技术实现路径呈现细胞表型依赖性分化,其中 BCR 高表达的内存 B 细胞适用 FACS,对于 BCR 低表达或缺失的抗体分泌细胞则更适合微流控芯片耦合分泌抗体原位检测实现无标记分选。值得关注的是,Dippong 等^[62]通过半抗原-辣根过氧化物酶偶联物作为信号放大体系,锚定于杂交瘤细胞膜表面,成功突破传统杂交瘤技术对小分子抗原的筛选瓶颈,证实跨技术融合创新的可行性。因此在制定抗体筛选策略时,要综合考量目标细胞表型特征(BCR 表达丰度和分泌活性)、分选技术特异性参数(细胞通量、细胞纯度和细胞活率)以及下游应用需求(高亲和力小分子抗体需保留天然重轻链配对)这三大要素,构建适配性最优的抗体筛选技术体系。

表 1 3 种单抗筛选技术的参数对比
Table 1 Parameter comparison of 3 monoclonal antibody screening techniques

技术指标 Technical parameter	传统杂交瘤技术 Traditional hybridoma technology	噬菌体展示 Phage display technology	单 B 细胞技术 Single B cell technology
建库通量 Libraryconstruction throughput	$10^3\sim 10^4$	$10^{10}\sim 10^{11}$	$10^4\sim 10^5$
制备周期 Production cycle	4~6 个月	4~6 周	2~3 周
稀有克隆捕获率 Rare clone capture rate	<0.1%	0.5%~2%	5%~15%
天然 VH/VL 配对 Native VH/VL pairing	保留	丢失	保留
抗体亲和力 Antibody affinity	高	相对较低	高
设备成本 Equipment cost	50 000~100 000	50 000~200 000	500 000~1000 000

6 展 望

小分子单克隆抗体筛选技术因其在农药残留、真菌毒素及环境污染物检测中的关键作用,已成为

食品安全与生物分析领域的研发热点。然而,从庞大的异质性 B 淋巴细胞群体中筛选分泌目标抗体的单个 B 细胞仍面临技术挑战。传统的有限稀释法虽可获得高亲和力抗体,但有效克隆的占比低,且开

发周期长达4~6个月,难以满足快速检测需求。荧光激活细胞分选和微流控技术等单B细胞分选技术通过精准捕获功能性B细胞,并结合单细胞V(D)J测序保留天然重链/轻链配对的优势,显著提升了小分子抗体开发效率。然而,荧光激活细胞分选的液滴偏转过程导致细胞活性降低,可能导致关键克隆丢失,而微流控芯片虽能实现温和分选,但受限于分选通量,并且无论是仪器本身还是配套芯片的价格都较高,在一定程度上限制了大规模应用。针对小分子半抗原免疫原性弱、需严格控制交叉反应等核心难点,未来抗体筛选技术突破需聚焦于3个方面:1)开发高细胞通量、低筛选成本且无损的功能性B细胞分选技术平台;2)通过深度学习解析抗原表位与抗体CDR区结合规律,构建完善的抗体筛选体系;3)整合自动化设备,实现从半抗原设计到高敏抗体筛选的全流程智能化,为痕量小分子污染物的精准监测提供更高效率的解决方案。

参考文献 Reference

- [1] Mullard A. FDA approves 100th monoclonal antibody product[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(7): 491-495
- [2] 付志浩, 徐刚领, 黄琛, 于传飞, 王兰, 王军志. 单克隆抗体药物研发进展[J]. *中国药事*, 2021, 35(11): 1253-1268
Fu Z H, Xu G L, Huang J, Yu C F, Wang L, Wang J Z. Progresses in research and development of monoclonal antibodies [J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2021, 35(11): 1253-1268 (in Chinese)
- [3] Wen K, Nölke G, Schillberg S, Wang Z H, Zhang S X, Wu C M, Jiang H Y, Meng H, Shen J Z. Improved fluoroquinolone detection in ELISA through engineering of a broad-specific single-chain variable fragment binding simultaneously to 20 fluoroquinolones[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403(9): 2771-2783
- [4] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497
- [5] Yu X C, McGraw P A, House F S, Crowe J E. An optimized electrofusion-based protocol for generating virus-specific human monoclonal antibodies[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2008, 336(2): 142-151
- [6] Rems L, ULaj M, Kandušer M, Reberšek M, MiklavčičlavkPucihar G. Cell electrofusion using nanosecond electric pulses[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3382
- [7] Moraes J Z, Hamaguchi B, Braggion C, Speciale E R, Cesar F B V, Soares G F D S, Osaki J H, Pereira T M, Aguiar R B. Hybridoma technology: Is it still useful[J]. *Current Research in Immunology*, 2021, 2: 32-40
- [8] de Almeida R, Nakamura C N, de Lima Fontes M, Deffune E, Felisbino S L, Kaneno R, Fovaro W J, Billis A, Cerri M O, Fusco-Almeida A M, Mendes Giannini M J, Moroz A. Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies[J]. *mAbs*, 2018, 10(1): 46-54
- [9] Staszewski R. Cloning by limiting dilution: An improved estimate that an interesting culture is monoclonal[J]. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 1984, 57(6): 865-868
- [10] Yang M, Jia R, Liu Y, Tang H, Wu H, Yuan J, Wang R. High-sensitivity and rapid immunoassays for furosine detection based on monoclonal antibody 1C3[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 309(Pt 4): 143126
- [11] Huang J J, Lin A, Gu Y N, Pan X L, Ma X C, Qing Y Z, Li J C. Fluorescence-activated cell sorting-based efficient screening of monensin monoclonal antibodies and applications in lateral flow immunoassay[J]. *Talanta*, 2025, 293: 128128
- [12] Yang X D, Qu Y, Wang C C, Wu L H, Hu X F. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay based on a monoclonal antibody for the rapid detection of citrinin in wine[J]. *Foods*, 2024, 14(1): 27
- [13] Wang L, Wang J L, Li J H, Walz T, Collier B S. Studies of protein disulfide isomerase (PDI) binding to platelets and production of a murine monoclonal antibody (MAb) to integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ that inhibits PDI binding and platelet aggregation[J]. *Blood*, 2023, 142: 1200
- [14] Akagi S, Nakajima C, Tanaka Y, Kurihara Y. Flow cytometry-based method for rapid and high-throughput screening of hybridoma cells secreting monoclonal antibody[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 125(4): 464-469
- [15] Li Y, Yang L, Yu W B, Yu X Z, Wen K, Shao B, Sun J F, Shen J Z, Wang Z H. Highly efficient and precise two-step cell selection method for tetramethylenedisulfotetramine-specific monoclonal antibody production[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424: 127689
- [16] Choi J H, Ogunniyi A O, Du M, Du M N, Kretschmann M, Eberhardt J, Love J C. Development and optimization of a process for automated recovery of single cells identified by microengraving[J]. *Biotechnology Progress*, 2010, 26(3): 888-895
- [17] Smith G P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317
- [18] Lillo A M, Velappan N, Kelliher J M, Watts A J, Merriman S P, Vuyisich G, Lilley L M, Coombs K E, Mastren T, Teshima M, Stein B W, Wagner G L, Iyer S, Bradbury A R M, Harris J F, Dichosa A E, Kozimor S A. Development of anti-*Yersinia pestis* human antibodies with features required for diagnostic and therapeutic applications[J]. *ImmunoTargets and Therapy*, 2020, 9: 299-316
- [19] Zhao F C, Wang G Q, Cao X R, Song W X, Guo M, Wang H M, Yang Z Y. Non-competitive immunoassay for Zearalenone based on phage display developed recombinant antibody and anti-immunocomplex peptide[J]. *Food Chemistry*, 2025, 472: 142943
- [20] González-Techera A, Kim H J, Gee S J, Last J A, Hammock B D, González-Sapientia G. Polyclonal antibody-based noncompetitive immunoassay for small analytes developed with short peptide loops isolated from phage libraries [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(23): 9191-9196
- [21] 何婷. 黄曲霉毒素纳米抗体研制及其免疫分析技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
He T. Preparation of nanoantibody against aflatoxin and study on its immunoassay technology[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016 (in Chinese)
- [22] 向妍. 苯并[a]芘纳米抗体的制备及其ELISA方法的建立[D]. 武汉: 湖北大学, 2024
Xiang Y. Preparation of benzo[a]pyrene nano-antibodies and establishment of ELISA methods[D]. Wuhan: Hubei University, 2024 (in Chinese)
- [23] Frenzel A, Schirrmann T, Hust M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy[J]. *mAbs*, 2016, 8(7): 1177-1194
- [24] Sidhu S S, Koide S. Phage display for engineering and analyzing protein

- interaction interfaces[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2007, 17(4): 481-487
- [25] 余秋凡, 陶焱场, 李靖欣, 王圆媛, 张黎, 朱凤才. 高通量表达系统在 EV71 单链抗体表达中的应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2019, 6: 641-645
- Yu Q F, Tao Y S, Li J X, Wang Y Y, Zhang L, Zhu F C. Construction and application of EV71 ScFv high-throughput cassette expression system[J]. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2019, 6: 641-645 (in Chinese)
- [26] Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery[J]. *Trends in Immunology*, 2021, 42(12): 1143-1158
- [27] Torres R M, Flaswinkel H, Reth M, Rajewsky K. Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex [J]. *Science*, 1996, 272(5269): 1804-1808
- [28] 陈阳, 刘彤, 张佳琦, 廖化新, 林跃智, 王晓钧, 王亚玉. 基于单个 B 细胞抗体基因扩增技术筛选马 IgG1 单克隆抗体[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(4): 17-23
- Chen Y, Liu T, Zhang J Q, Liao H X, Lin Y Z, Wang X J, Wang Y Y. Screening of monoclonal antibodies targeting the equine IgG1 based on single B cell antibodies gene amplification technology[J]. *China Biotechnology*, 2022, 42(4): 17-23 (in Chinese)
- [29] Nutt S L, Hodgkin P D, Tarlinton D M, Corcoran L M. The generation of antibody-secreting plasma cells[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(3): 160-171
- [30] Weisel F, Shlomchik M. Memory B cells of mice and humans[J]. *Annual Review of Immunology*, 2017, 35: 255-284
- [31] Garg G, Patel P, Das Gupta G, Das Kurmi B. A review on working principle and advanced applications of fluorescence activated cell sorting machine (FACS)[J]. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2024, 20(2): 85-97
- [32] Soares R, Martins V C, Macedo R, Cardoso F A, Martins S A M, Caetano D M, Fonseca P H, Silvério V, Cardoso S, Freitas P P. Go with the flow: Advances and trends in magnetic flow cytometry [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(9): 1839-1862
- [33] Kasai Y, Leipe C, Saito M, Kitagawa H, Lauterbach S, Brauer A, Tarasov P E, Goslar T, Arai F, Sakuma S. Breakthrough in purification of fossil pollen for dating of sediments by a new large-particle on-chip sorter[J]. *Science Advances*, 2021, 7(16): eabe7327
- [34] Starkie O D, Compson E J, Rapecki S, Lightwood J D. Generation of Recombinant Monoclonal Antibodies from Immunised Mice and Rabbits via Flow Cytometry and Sorting of Antigen-Specific IgG⁺ Memory B Cells[J]. *PLoS ONE*, 2017, 11(3): e0152282
- [35] Wang Y, Ji Y T, Wharfe E S, Meadows R S, March P, Goodacre R, Xu J, Huang W E. Raman activated cell ejection for isolation of single cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(22): 10697-10701
- [36] Kurosawa N, Yoshioka M, Fujimoto R, Yamagishi F, Isobe M. Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals [J]. *BMC Biology*, 2012, 10: 80
- [37] Lau A K S, Shum H C, Wong K K Y, Tsia K K. Optofluidic time-stretch imaging for single-cell analysis of monoclonal antibodies from a microfluidic platform[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(10): 1743-1756
- [38] Harrison D J, Manz A, Fan Z H, Luedi H, Widmer H M. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip [J]. *Analytical Chemistry*, 1992, 64(17): 1926-1932
- [39] Gong Y L, Fan N, Yang X, Peng B, Jiang H. New advances in microfluidic flow cytometry[J]. *Electrophoresis*, 2018
- [40] Stavakis S, Holzner G, Choo J, DeMello A. High-throughput microfluidic imaging flow cytometry[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 55: 36-43
- [41] Unger M A, Chou H P, Thorsen T, Scherer A, Quake S R. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography[J]. *Science*, 2000, 288(5463): 113-116
- [42] Shang L R, Cheng Y, Zhao Y J. Emerging droplet microfluidics [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(12): 7964-8040
- [43] Elvira K S, Gielen F, Tsai S S H, Nightingale A M. Materials and methods for droplet microfluidic device fabrication[J]. *Lab on a Chip*, 2022, 22(5): 859-875
- [44] Ding Y, Howes P D, DeMello A J. Recent advances in droplet microfluidics [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(1): 132-149
- [45] Hosokawa M, Nishikawa Y, Kogawa M, Takeyama H. Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 5199
- [46] Ali Khorshidi M, Rajeswari P K P, Wahlby C, Joensson H N, Andersson Svahn H. Automated analysis of dynamic behavior of single cells in picoliter droplets[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(5): 931-937
- [47] Sesen M, Whyte G. Image-based single cell sorting automation in droplet microfluidics[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 8736
- [48] Yang X L, Liu W H, Chan D C H, Ahmed S U, Wang H S, Wang Z J, Nemr C R, Kelley S O. Fluorescent droplet cytometry for on-cell phenotype tracking[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(35): 14805-14809
- [49] 丛丽丽. 液滴微流控耦合光谱与成像技术用于单细胞细胞因子的分析[D]. 长春: 吉林大学, 2023
- Cong L L. Analysis of cytokines in single cells by droplet microfluidic coupling spectroscopy and imaging technology[D]. Changchun: Jilin University, 2023 (in Chinese)
- [50] Su S H, Song Y J, Newstead M W, Cai T, Wu M X, Stephens A, Singer B H, Kurabayashi K. Ultrasensitive multiparameter phenotyping of rare cells using an integrated digital-molecular-counting microfluidic well plate[J]. *Small*, 2021, 17(31): e2101743
- [51] Kim S. E, Kim H, Doh J. Single cell arrays of hematological cancer cells for assessment of lymphocyte cytotoxicity dynamics, serial killing, and extracellular molecules[J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(11): 2009-2018
- [52] Yoshimura Y, Fujii C, Tomita M, Mizutani F, Yasukawa T. Array of single-cell pairs on a microwell array based on positive dielectrophoresis [J]. *Chemistry Letters*, 2014, 43(7): 980-981
- [53] Park J, Park C, Sugitani Y, Fujii T, Kim S H. An electroactive microwell array device to realize simultaneous trapping of single cancer cells and clusters [J]. *Lab on a Chip*, 2022, 22(16): 3000-3007
- [54] Li Y, Liu M G, Kong Y H, Guo L N, Yu X Z, Yu W B, Shen J Z, Wen K, Wang Z H. Significantly improved detection performances of immunoassay for ractopamine in urine based on highly urea-tolerant rabbit monoclonal antibody[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2022, 168: 113358
- [55] Storti F, Bonfadini S, Criante L. Simplified 3D hydrodynamic flow focusing for lab-on-chip single particle study[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 14671
- [56] 饶成飞, 杨铎. 单细胞捕捉微流控芯片设计及流场分析[J]. 机电工程技术, 2021, 50(10): 73-76
- Rao C F, Yang Y. Design and flow field analysis of single-cell capture microfluidic chip[J]. *Mechanical & Electrical Engineering Technology*, 2021, 50(10): 73-76 (in Chinese)
- [57] 李涛. 基于微流体及尺寸差异的白细胞分选及 FISH 检测研究[D]. 武汉: 武汉纺织大学, 2021
- Li T. Microfluidics and size differences based on sorting and FISH detection for white blood cells[D]. Wuhan: Wuhan Textile University, 2021 (in

Chinese)

- [58] Czétány P, Balló A, Márk L, Török A, Szántó Á, Máté G. An alternative application of magnetic-activated cell sorting: CD45 and CD235a based purification of semen and testicular tissue samples[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(7): 3627
- [59] Magbanua M J M, Park J W. Isolation of circulating tumor cells by immunomagnetic enrichment and fluorescence-activated cell sorting (IE/FACS) for molecular profiling[J]. *Methods*, 2013, 64(2): 114-118
- [60] Leyendeckers H, Voth E, Schicha H, Hunzelmann N, Banga P, Schmitz J. Frequent detection of thyroid peroxidase-specific IgG+ memory B cells in blood of patients with autoimmune thyroid disease[J]. *European Journal of Immunology*, 2002, 32(11): 3126-3132
- [61] Fux A C, Casonato Melo C, Schlaes L, Burzan N B, Felsberger A, Gessner I, Fauerbach J A, Horejs-Hoeck J, Droste M, Siewert C. Generation of endotoxin-specific monoclonal antibodies by phage and yeast display for capturing endotoxin[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(4): 2297
- [62] Dippong M, Carl P, Lenz C, Schenk J A, Hoffmann K, Schwaar T, Schneider R J, Kuhne M. Hapten-specific single-cell selection of hybridoma clones by fluorescence-activated cell sorting for the generation of monoclonal antibodies[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(7): 4007-4012

责任编辑:秦梅



第一作者简介:黄婧洁,中国农业大学在读博士研究生。参与国家重点研发计划(2018YFC1602301-4)和国家自然科学基金面上项目(31972738),主要从事兽药残留快速检测技术的研究。读博期间,以第一作者(含共同)发表SCI论文3篇,授权发明专利3项,并连续三年获中国农业大学校级三好学生荣誉称号。



通讯作者简介:李建成,博士,副教授。主要从事兽医药物代谢动力学和等效性、兽药残留检测与风险评估等方面的研究。近年来先后承担及参加科研课题10余项,其中主持国家自然科学基金面上项目1项,主持“十一五”、“十二五”国家科技支撑计划项目子课题2项,作为学术骨干参加了973项目、863项目、国家自然科学基金重点项目、创新团队发展计划项目、十五国家科技攻关计划项目、“十一五”、“十二五”科技支撑计划项目、国家食品安全重大科技专项、农业农村部专项等课题,已发表学术论文20余篇(其中SCI收录10余篇),申请发明专利7项。参与的课题《玉米赤霉醇和氯霉素等17种重要药物残留检测技术研究》于2006年获得了北京市科学技术一等奖。参与的“动物源性食品安全检测与控制技术研究团队”获得中华农业科技奖的优秀创新团队奖。