

稳定表达可视化 hFcRn 的 MDCK 细胞株构建

康赐明¹ 陈远志² 王一文¹ 周兵² 游敏¹ 罗文新^{2*} 夏宁邵^{1*}

(1. 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 厦门大学 生命科学学院 福建 厦门 361102;
2. 厦门大学 公共卫生学院 福建 厦门 361102)

摘要: [目的]建立稳定表达融合 EGFP 的人新生儿 Fc 受体(hFcRn)的 MDCK 细胞株。[方法]构建重组慢病毒质粒 pEGFP-hFcRn,采用四质粒包装系统共转染 HEK 293T 细胞生产重组慢病毒,感染 MDCK 细胞后对 EGFP 阳性细胞进行流式单细胞分选;通过 Western Blot 及 EGFP- β_2m 荧光共定位验证 hFcRn 的完整性,并用流式细胞仪检测 hFcRn 与人 IgG 的结合活性。[结果]测序结果表明成功构建 pEGFP-FcRn 慢病毒表达载体;感染后 EGFP 阳性 MDCK 细胞比例约为 26.5%,流式单细胞分选后得到纯阳性细胞;荧光共定位及 Western Blot 均检测到 hFcRn 的完整表达;流式分析表明细胞株上的 hFcRn 与 IgG 存在 pH 依赖性结合。[结论]成功获得稳定表达具有生物活性的可视化 hFcRn 的 MDCK 细胞株。

关键词: 慢病毒表达载体,EGFP,新生儿 Fc 受体,MDCK,pH 依赖性

中图分类号:Q87 文献标识码:A DOI:10.16519/j.cnki.1004-311x.2017.02.0021

Establishment of MDCK cell lines which stably express visualable human neonatal Fc receptor

Ciming Kang¹, Yuanzhi Chen², Yiwen Wang¹, Bin Zhou², Min You¹,
Wenxin Luo^{2*}, Ningshao Xia^{1*}

(1. National Institute of Diagnostics Vaccine Development in Infectious Disease School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract [Objective] To establish MDCK cell line stably expressing EGFP-human neonatal Fc receptor(hFcRn) fusion protein. [Methods] The lentiviral expression vector for EGFP-hFcRn fusion protein was constructed. Generating by co-transfection of four-plasmids into HEK 293T cells, the lentivirus particles were used to infect MDCK cell line. EGFP positive single cell was obtained by FACS, and then FcRn expression was identified by fluorescence co-location with EGFP- β_2m and confirmed by Western Blot. Flow cytometry was used to detect binding activity of hFcRn and human IgG. [Results] DNA sequencing demonstrated that the lentivirus vector pEGFP-FcRn was constructed successfully. The percentage of EGFP-positive cells was about 26.5% after infection. Expression of the complete protein was detected through fluorescence co-location and Western Blot, respectively. Flow cytometry analysis showed that the cell lines could pH-dependently capture human IgG. [Conclusion] MDCK cell line stably expressing functional visualable hFcRn was established.

Keywords: lentiviral vector,EGFP,FcRn,MDCK,pH-dependent

人新生儿 Fc 受体(human neonatal Fc receptor, hFcRn)是由与 MHC-I 类分子相似的 α 链(alpha-chain)和 β 链(β_2 微球蛋白, β_2 -microglobulin 即 β_2m)这两个大小亚基组成的异源二聚体,具有 pH 依赖性结合 IgG 型抗体的特性,是维持体内

IgG 型免疫球蛋白代谢水平的关键受体^[1-2]。近年来,改善 IgG 型治疗性抗体药物的半衰期已成为抗体工程领域的研究热点之一。利用 Fc 基因工程改造提高 hFcRn 与 IgG 的结合能力,是延长抗体半衰期的重要手段。稳定表达膜型 hFcRn 的工程细胞株

收稿日期:2016-11-09;修回日期:2017-01-09

基金项目:国家自然科学基金项目“结构生物学指导的 HBV 治疗性抗体人源化及其关键技术研究”,No.31600748 “抗呼吸道合胞病毒高中和活性抗体的保护机制研究”,No.81401668 “基于广谱中和单抗的通用型流感疫苗设计及其结构基础研究”,No.31670934)

作者简介:康赐明(1991-),男,在读硕士生,研究方向:抗体工程,发表论文 1 篇,Email:670914150@qq.com。

* 通讯作者:罗文新(1970-),女,博士,副教授,研究方向:病毒学,Email:wxluo@xmu.edu.cn。

* 博导作者:夏宁邵(1964-),男,教授,研究方向:诊断与疫苗研制,发表论文 170 余篇,主持获得国家技术发明二等奖、国家科技进步二等奖、中国专利金奖、求是奖等 10 余项科技奖励,授权专利 28 项。

相比于表面等离子共振等包被可溶性 hFcRn 的体外结合活性试验,能够更好地模拟生理条件下 hFcRn 与 IgG 的相互作用^[3-4]。

目前,国内尚无 hFcRn 稳转细胞株的报道。国外已报道的工程细胞株包括 HEK 293T 细胞^[3,5]、CHO K1 细胞^[6]和犬胚肾上皮细胞(Madin-Darby Canine Kidney, MDCK)^[7]等。MDCK 细胞相对于其它细胞系而言应用范围更广,不仅可用于 Fc 改造变体的评估,还能进行模拟粘膜上皮细胞转运抗体等相关基础研究^[8]。融合 EGFP 的 hFcRn 受体并不影响 hFcRn 的生物学活性^[5,9],而且可以使 hFcRn 达到可视化的效果,同时方便细胞株的筛选与检测。为了克服 MDCK 转染效率低的局限,本研究通过构建 pEGFP-hFcRn 融合蛋白慢病毒表达载体,用该载体与病毒包装质粒共转染 HEK 293T 细胞,再利用其生产的慢病毒感染 MDCK 细胞,从而筛选出稳定表达 hFcRn 受体的 MDCK 细胞株,为进一步研究 hFcRn 介导 IgG 型免疫球蛋白的细胞转运及评价 Fc 变体的改造效果奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

183pBOBI CS2.0 慢病毒表达载体和慢病毒包装相关质粒(pMDL 质粒、VSV-G 质粒和 REV 质粒)由厦门大学生命科学学院韩家淮实验室提供;HEK 293T 细胞、MDCK 细胞由笔者实验室保存;大肠杆菌感受态 DH5 α 为笔者实验室自制。

1.1.2 试剂

DNA 聚合酶等 PCR 相关试剂均购自 Termol 公司;限制性内切酶购自 Fermentas 公司;Gibson 装配预混试剂购自 NEB 公司;质粒提取和 DNA 凝胶回收试剂盒均购自天根公司;DNA 测序和引物合成均由华大基因公司完成;转染试剂 Lipofectamine 2000 购买自 Invitrogen 公司;相关标记二抗购买自 BD 公司。

1.1.3 仪器

凝胶成像分析仪(美国 UVI 公司);T3 型 PCR 仪(德国 Biometra 公司);倒置荧光显微镜(日本尼康公司);Aria III 流式细胞仪(美国 BD 公司);高内涵成像分析仪(美国 GE 公司)。

1.1.4 培养基

胎牛血清(FBS)和 DMEM 细胞培养基购自 Gib-

co 公司。

1.2 方法

1.2.1 pEGFP-hFcRn 融合蛋白慢病毒表达载体的构建

根据 PubMed 上 EGFP 和 hFcRn 基因序列(包括 FCGRT、P55899 和 β_2m , P61769),以及 183 pBOBI CS 2.0 载体上的酶切位点,FCGRT 和 β_2m 之间用 P2A 剪切肽连接,进行引物设计:hFcRn 信号肽序列(signal sequence, ss)(片段 1,大小约 110 bp)扩增引物:1-F: 5'-AGGTTAACTCTAGAGAATTCG-GATCCATGGGGGTCCCGCGGCCCTCAG-3'; 1-R: 5'-GGGAGCCTGGGCGCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3'; EGFP(片段 2,大小约 700 bp)扩增引物:2-F: 5'-GGGAGCCTGGGCGCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT-3'; 2-R: 5'-GCATGGACGAGCTGTACAAGGAAAGCCACCTCTCCCTCCT-3'; FCGRT(片段 3,大小约 1000 bp)扩增引物:3-F: 5'-GCATGGACGAGCTGTACAAGGAAAGCCACCTCTCCCTCCT-3'; 3-R: 5'-ATGTGATTCCAGCCACCGCCGGAAGCGGAGCTACTAACTT-3'; 带 P2A 的 β_2m (片段 4,大小约 450 bp)扩增引物:4-F1: 5'-CT-GCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGTCTCGCTCCGTGGC-3'; 4-F2: 5'-TCCAGCCACCGCCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGA-3'; 4-R: 5'-GTGGGATCGAGACATGTAAGTTCGAGCCATGGAAGCTTGATATCTA-3'。

以 FCGRT- β_2m 的 cDNA(厦门大学生命科学学院韩家淮实验室馈赠)和含 EGFP 基因的质粒(实验室自有)为模板,分别扩增出上述 4 个片段,再利用搭桥 PCR 以片段 1 和片段 2 扩增出片段 12(大小约 800 bp)、片段 3 和片段 4 扩增出片段 34(大小约 1450 bp),最终片段 12 和片段 34 扩增出 EGFP-hFcRn 基因片段(大小约 2250 bp)。片段 PCR 扩增条件为 98 °C 预变性 5 min, 98 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 s ~ 150 s(视片段长度而定), 25 个循环, 72 °C 延伸 5 min; 搭桥 PCR 扩增条件为: 98 °C 预变性 5 min, 98 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s ~ 150 s(视片段长度而定), 5 个循环, 72 °C 延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳并回收 PCR 产物。

将 183 pBOBI CS 2.0 载体用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,回收载体片段后,同 EGFP-hFcRn 片

段进行 Gibson 装配连接, 转化 *DH5 α* 后提取质粒并送测序。将测序正确的载体命名为“pEGFP-hFcRn”。

1.2.2 稳转 EGFP-hFcRn 的 MDCK 细胞株的建立

慢病毒包装细胞采用培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基的 HEK 293T 细胞。取 1.5 μ g 的 pEGFP-hFcRn 质粒与 1.5 μ g 病毒包装质粒 (0.75 μ g pMDL 质粒, 0.45 μ g VSV-G 质粒和 0.3 μ g REV 质粒) 在无血清培养基中与 7.5 μ L Lipofectamine 2000 混合 (对照组为 PBS), 室温孵育 15 min, 然后转染到预先铺好 HEK 293T 的 6 孔板中, 12 h 后更换培养基, 继续孵育 24 h 后即可收集包含有病毒的培养上清, -80°C 保存。

MDCK 细胞的培养条件同样为含 10% FBS 的 DMEM 培养基。在 6 孔板中培养 MDCK 细胞至 40% 密度时, 换液并加入 16 μ g 的 Polybrene 以及 200 μ L 含病毒的培养上清, 在 37°C 条件下 2 500 r/min 离心 30 min, 培养 12 h 后换液。待细胞生长状态良好时, 用流式细胞仪进行单细胞流式分选至 96 孔板。2 w 后扩大培养并用流式细胞仪分析筛选出 EGFP 阳性的单克隆细胞群。

1.2.3 Western Blot

用 RIPA 分别溶解 EGFP-hFcRn 稳转细胞株和 MDCK 细胞, 采用 BCA 法定量细胞蛋白, 取 150 μ g 进行还原性 SDS-PAGE, 电泳后使用电转仪转膜, 再用 5% 脱脂奶粉 37°C 封闭 1 h 后加入 rabbit anti-human FcRn α chain 抗体 (1:500) 和 rabbit anti-human $\beta_2\text{m}$ 抗体 (1:200) 37°C 孵育 1 h 后, PBST 洗涤 3 次, 每次间隔 5 min, 加入 HRP 偶联鼠抗兔二抗 (1:2 500) 37°C 孵育 0.5 h 后用 PBST 洗涤 3 次, 每次间隔 5 min, 最后显色并拍照。同时以 β -actin 作内参照, 取 120 μ g 细胞蛋白, 先后孵育 mouse anti- β -actin 抗体 (1:500) 和 HRP 偶联羊抗鼠二抗 (1:2 500)。

1.2.4 $\beta_2\text{m}$ 亚基与 EGFP 荧光活细胞内共定位

将 EGFP-hFcRn 稳转细胞株培养在 96 孔板中, 荧光染色前先用无菌的 PBS 洗 2 遍, 再加入 DMEM 和 PE anti-human $\beta_2\text{m}$ 抗体在 37°C 培养箱孵育 30 min, 用无菌的 PBS 洗 3 遍, 放入高内涵成像仪内, 在活细胞观察条件 (37°C , 5% CO_2) 下, 选取 63 倍油镜, 用共聚焦模式观察并成像保存。

1.2.5 EGFP-hFcRn 稳转细胞株与 IgG 的 pH 依赖结合活性检测

胰酶消化 EGFP-hFcRn 稳转细胞后, 用含 1%

BSA 的 PBS 将细胞分成 3 管并离心洗涤 2 次, 一管加入 PBS (1% BSA) 作为空白对照, 一管加入含 1 μ g Dylight 594-human IgG 的 PBS (1% BSA, pH 7.4), 另外一管加入含 1 μ g Dylight 594-human IgG 的 PBS (1% BSA, pH 6.0)。 4°C 避光孵育 1 h 后, 分别用对应 pH 的 PBS (1% BSA) 离心洗涤 2 次。最后用相应 pH 的 PBS 重悬进行流式分析。相关流式单参数直方图和平均荧光强度 (Mean fluorescence intensity, MFI) 的计算由流式分析软件 FlowJo 7.6.1 处理获得。

2 结果与分析

2.1 pEGFP-hFcRn 融合蛋白慢病毒表达载体的构建

pEGFP-hFcRn 融合蛋白慢病毒表达载体的构建策略如图 1A。FcRn 是 I 型跨膜糖蛋白, 其大亚基靠近 C 端有一个穿膜区, EGFP 融合在大亚基的 N 端。hFcRn 的两个大小亚基分别由 *FCGRT* 基因和 $\beta_2\text{m}$ 基因编码, 两者中间以剪切肽 P2A 的基因连接。在 hFcRn 信号肽序列 (ss) 后依次接入 EGFP、FCGRT、P2A 以及 $\beta_2\text{m}$, 构成 EGFP-hFcRn 目的基因片段。各个部分的片段扩增详见“材料与方法 1.2.1”。经过两轮搭桥 PCR, 最终获得条带大小正确 (约 2 250 bp) 的目的片段 (图 1B)。将目的片段接入双酶切过的 183 pBOBI CS 2.0 载体中, 测序结果显示与设计的模板序列相同, pEGFP-hFcRn 慢病毒表达载体构建成功。

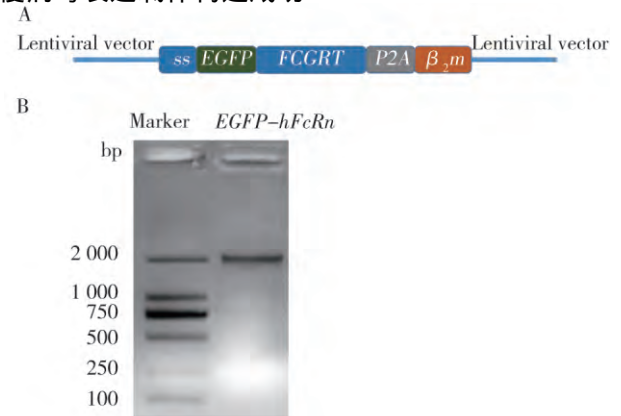


图 1 pEGFP-hFcRn 慢病毒表达载体的构建

A: EGFP-hFcRn 慢病毒表达载体的质粒设计; B: EGFP-hFcRn 片段 PCR 扩增。

Fig. 1 Construction of pEGFP-hFcRn lentiviral expression vector

A: Plasmid design of EGFP-hFcRn on lentiviral expression vector;

B: PCR of EGFP-hFcRn.

2.2 稳转 EGFP-hFcRn 的 MDCK 细胞株构建

用 pEGFP-hFcRn 融合蛋白慢病毒表达载体和病毒包装质粒共同转染 HEK 293T 细胞, 36 h 后在荧光显微镜下可观察到绿色荧光(图 2A)。收集含病毒的细胞上清并感染 MDCK 细胞, 24 h 后在显微镜下可以观察到绿色荧光(图 2B), 表明感染成功。

待细胞生长状态良好后, 用流式细胞仪选取 EGFP 阳性的门进行单细胞流式分选至 96 孔板, 图 2C 所示感染后 EGFP 阳性细胞比例为 26.5%。2w 后, 用荧光显微镜观察筛选出 EGFP 阳性的细胞群, 扩大培养后流式荧光分析可见整个细胞群基本为 EGFP 阳性(图 2C)。

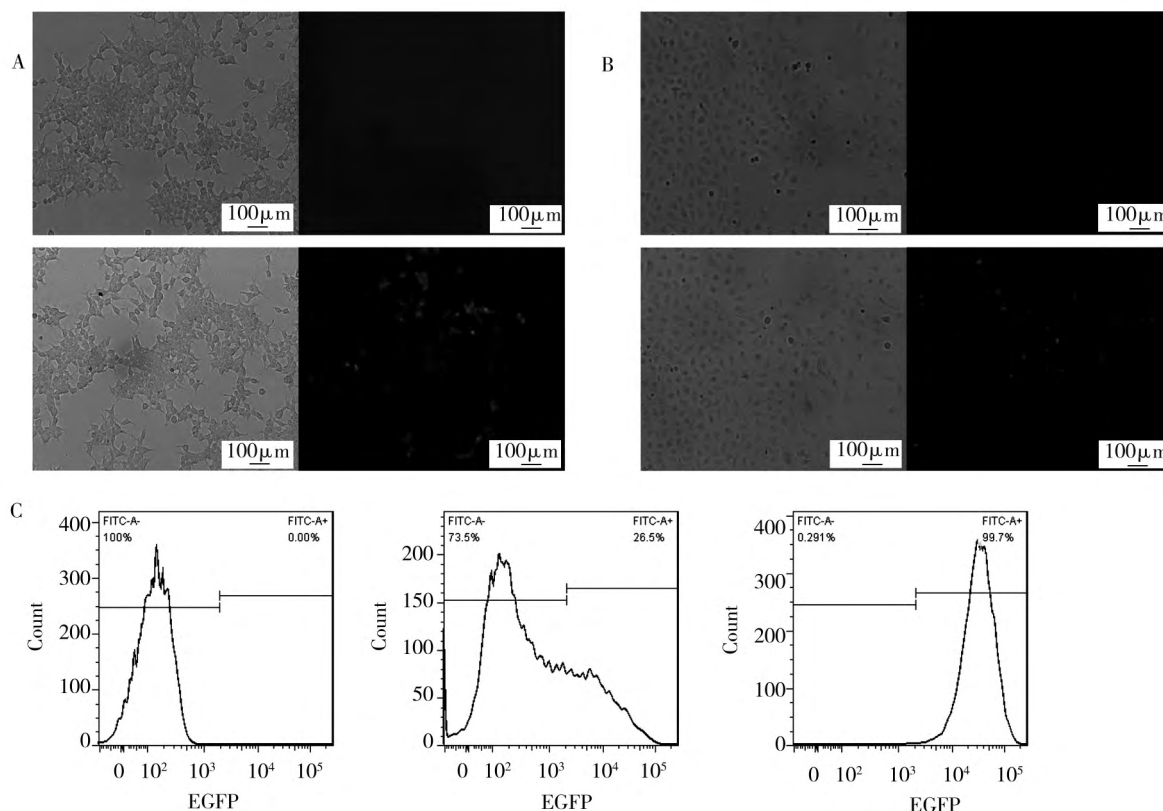


图 2 稳转 EGFP-hFcRn 的 MDCK 细胞株的建立

A: 293T 细胞(上: control; 下: EGFP-hFcRn); B: MDCK 细胞(上: control; 下: EGFP-hFcRn); C: 流式单细胞分选(左: 未经感染的 MDCK; 中: 慢病毒感染后的 MDCK; 右: 中图阳性门单细胞分选获得的 MDCK 细胞株)。

Fig. 2 Establishment of stably-expressed EGFP-hFcRn MDCK cell lines

A: 293T (up: control; down: EGFP-hFcRn); B: MDCK (up: control; down: EGFP-hFcRn); C: FACS single cell sort (left: MDCK without infection; middle: MDCK after infection; right: single clone MDCK from positive gate in middle picture).

2.3 Western Blot 检测 EGFP-hFcRn 融合蛋白在 MDCK 细胞株中的表达

裂解稳转 EGFP-hFcRn 的 MDCK 细胞株, 分别用兔抗人 FcRn α 链和 β_2m 的抗体进行细胞裂解液的 Western Blot 检测。结果表明(图 3), 与对照细胞相比, EGFP 阳性的细胞株出现 hFcRn 大小亚基的条带。其中, 融合了 EGFP(分子量约 27 kDa) 的 α 链(分子量约 46 kDa) 条带出现在 72 kDa 左右的位置, 而 β 链(β_2m , 分子量约 12 kDa) 的条带出现在 12 kDa 的正确位置上。

2.4 β_2m 亚基与 EGFP-hFcRn 在活细胞内的荧光共定位

利用共聚焦荧光显微镜进行活细胞荧光共定位, 可以验证 hFcRn 的两个大小亚基是否形成异源二聚体。用 EGFP 发出的绿色荧光指示 hFcRn 的 α 链, 红色荧光标记的抗 β_2m 抗体指示 β 链, 如图 4 所示, 红色的荧光点基本都与绿色的荧光点重叠, 表明 hFcRn 组装完整。

2.5 EGFP-hFcRn 稳转细胞株 hFcRn 受体的功能检测

在 pH 7.4、6.0 条件下, 用流式细胞仪分析 Dylight-

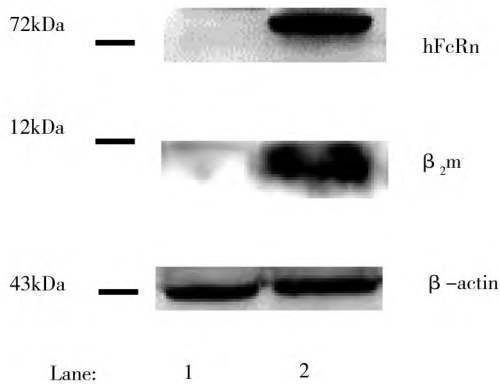


图3 Western Blot 验证 EGFP-hFcRn 融合蛋白在 MDCK 细胞中的表达

1: Control 组; 2: EGFP-hFcRn 组。

Fig. 3 Expression of EGFP-hFcRn fusion protein in MDCK cells confirmed by Western Blot

1: Control group; 2: EGFP-hFcRn group.

594 红色荧光标记的人 IgG 型免疫球蛋白和稳转细胞株上 hFcRn 受体的结合活性。如图 5 所示, 在 pH 6.0, EGFP-hFcRn 稳转细胞株上的 hFcRn 受体能够明显地捕获人 IgG 型免疫球蛋白 (MFI 值 1 376), 而在 pH 7.4 下检测不到二者结合 (MFI 值为 435, 空白对照为 374)。因此, EGFP-hFcRn 稳转细胞株上的 hFcRn 受体能够 pH 依赖性地结合人 IgG 型免疫球蛋白, 具有正常 hFcRn 的生物活性。

3 讨论

FcRn 是负责 IgG 型免疫球蛋白在造血细胞和血管等内皮细胞胞内转运的受体, 是影响 IgG 在组织间的分布以及维持 IgG 在血清中高滴度和长半衰期的内在因素^[2]。近年来, 稳转 FcRn 的工程细胞

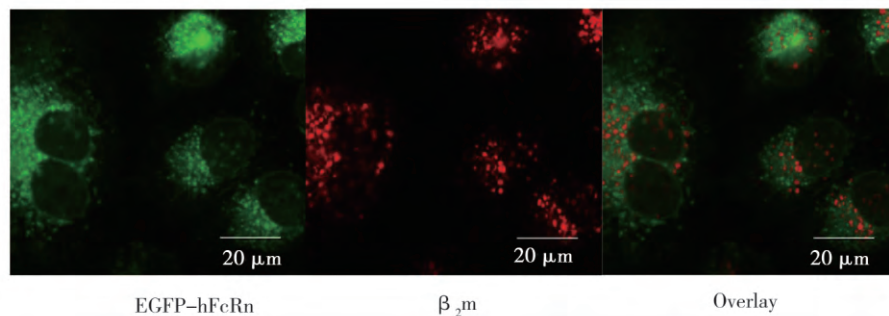


图4 活细胞内 hFcRn α 链和 β_2m 荧光共定位

绿色: EGFP; 红色: β_2m 。

Fig. 4 Fluorescent co-location of hFcRn α chain and β_2m in live cells

Green: EGFP-hFcRn; Red: β_2m .

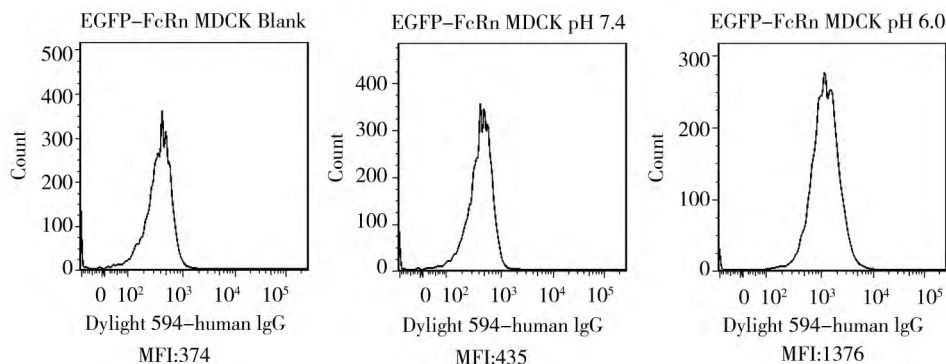


图5 流式细胞仪检测 EGFP-hFcRn MDCK 细胞株上 hFcRn 受体与 IgG 的结合活性

Fig. 5 Binding activity of hFcRn on EGFP-hFcRn MDCK cell lines with IgG analyzed by flow cytometry

株主要应用于 IgG 半衰期相关的 Fc 改造效果评估以及 FcRn 功能相关的研究, 采用的稳转细胞类型包括 HEK 293T 细胞、CHO K1 细胞和 MDCK 细胞

等^[5-7, 10]。MDCK 细胞系相比于 HEK 293T 细胞系和 CHO K1 细胞系具有以下优势: (1) 细胞贴壁牢固, 有利于进行死细胞或活体细胞染色而不容易被

洗脱;(2) MDCK 属于上皮细胞,能够形成紧密连接的极性单层细胞,可以作为评价治疗性抗体等药物跨膜转运的细胞模型。相对不足的是,MDCK 的普通转染效率远低于 HEK 293T 和 CHO K1。

本研究首次结合慢病毒表达系统和流式单细胞分选的方式获得稳定表达 EGFP-hFcRn 单克隆 MDCK 细胞株。在已报道的文献中,转染策略基本为普通的双质粒转染(分别包含大小亚基),再通过药物加压筛选^[5-9]。慢病毒载体对 MDCK 具有良好的感染能力,并且相比非病毒介导的基因整合更为稳定高效^[11]。融合荧光蛋白的筛选方式相对药物筛选而言,在不影响目的蛋白生物学功能的前提下,不仅可以更为直观地判断目的基因的表达情况,实现目的蛋白在细胞内的可视化,还能进行稳转细胞的单细胞分选,缩短筛选时间,同时单克隆细胞群的个体差异较小,更利于细胞株的质控和应用。由于 FcRn 通过两个亚基非共价结合组成,利用 P2A 剪切肽的连接,可以实现单个载体表达 FcRn 异源二聚体蛋白。P2A 来源于猪肠道病毒,是由 20 个左右的氨基酸组成的短肽^[12]。通过 P2A 编码的基因将两个目的基因连接在同一个开放阅读框里,在翻译过程中 P2A 会自剪切,从而实现上下游两个基因的等量独立表达^[12]。从 Western Blot 结果可以看出大小亚基均有表达,并且大亚基的条带大小包括了 EGFP 蛋白,表明融合蛋白成功表达。从 β_2m 小亚基的荧光共定位可以直观地看出 FcRn 主要分布于细胞内,与文献报道一致^[13]。pH 依赖性结合实验也证实了 EGFP 的融合不会影响 FcRn 的生物学活性。

4 结论

构建了 pEGFP-hFcRn 慢病毒表达载体,通过慢病毒的有效感染(EGFP 阳性细胞约 26.5%)以及流式单细胞分选,成功获得稳定表达具有生物活性的可视化 hFcRn 的 MDCK 细胞株。

致谢:感谢厦门大学生命科学学院韩家准教授提供慢病毒表达载体并进行慢病毒包装的指导,以及相关 cDNA 的馈赠!

参考文献

- [1] Simister N E, Mostov K E. An Fc receptor structurally related to MHC Class I antigens [J]. *Nature*, 1989, 337(6203): 184-187.
- [2] Martins J P, Kennedy P J, Santos H A, et al. A comprehensive review of the neonatal Fc receptor and its application in drug delivery [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 161: 22-39.
- [3] Mathur A, Arora T, Liu L, et al. Qualification of a homogeneous cell-based neonatal Fc receptor (FcRn) binding assay and its application to studies on Fc functionality of IgG-based therapeutics [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2013, 390(1-2): 81-91.
- [4] Datta-Mannan A, Wroblewski V J. Application of FcRn binding assays to guide mAb development [J]. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, 2014, 42(11): 1867-1872.
- [5] Christianson G J, Sun V Z, Akilesh S, et al. Monoclonal antibodies directed against human FcRn and their applications [J]. *mAbs*, 2012, 4(2): 208-216.
- [6] Lu Y, Vermees J M, Chiang N, et al. Identification of IgG(1) variants with increased affinity to Fc γ R IIIa and unaltered affinity to Fc γ R I and FcRn: comparison of soluble receptor-based and cell-based binding assays [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2011, 365(1-2): 132-141.
- [7] Ko S Y, Pegu A, Rudicell R S, et al. Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection [J]. *Nature*, 2014, 514(7524): 642-645.
- [8] Claypool S M, Dickinson B L, Yoshida M, et al. Functional reconstitution of human FcRn in Madin-darby canine kidney cells requires co-expressed human beta 2-microglobulin [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(31): 28038-28050.
- [9] Devanaboyina S C, Lynch S M, Ober R J, et al. The effect of pH dependence of antibody-antigen interactions on subcellular trafficking dynamics [J]. *mAbs*, 2013, 5(6): 851-859.
- [10] Monnet C, Jorieux S, Souyris N, et al. Combined glyco- and protein-Fc engineering simultaneously enhance cytotoxicity and half-life of a therapeutic antibody [J]. *mAbs*, 2014, 6(2): 422-436.
- [11] 谢宝明,于国伟,冷世鑫,等.慢病毒介导稳定表达 FRT-LacZ 基因的 MDCK 细胞株构建 [J]. *生物技术*, 2016, 26(1): 23-28, 69.
- [12] Chng J, Wang T, Nian R, et al. Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells [J]. *mAbs*, 2015, 7(2): 403-412.
- [13] Ober R J, Martinez C, Vaccaro C, et al. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC Class I-related receptor, FcRn [J]. *The Journal of Immunology*, 2004, 172(4): 2021-2029.