

单个 B 细胞抗体制备技术及应用

迟象阳, 于长明, 陈薇

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

迟象阳, 于长明, 陈薇. 单个 B 细胞抗体制备技术及应用. 生物工程学报, 2012, 28(6): 651-660.

Chi XY, Yu CM, Chen W. Single B cell monoclonal antibody technologies and applications. Chin J Biotech, 2012, 28(6): 651-660.

摘要: 单克隆抗体是现代生命科学研究的重要工具, 为许多领域的发展作出了不可估量的贡献。随着 PCR 技术和单克隆抗体技术的发展和成熟, 单个 B 细胞抗体制备技术迅速兴起。该技术能够对单个的抗原特异性 B 细胞进行抗体基因的体外克隆和表达, 保证了轻重链可变区的天然配对, 相较于传统的抗体制备技术具有效率高、全人源、基因多样性更丰富等优势。单个 B 细胞抗体制备技术已成为制备全人抗体的热门方法, 同时也促进了包括抗体发生成熟、疫苗保护机制、疫苗开发、肿瘤及自身免疫疾病等免疫学相关研究。文中就单个 B 细胞抗体制备技术的过程及应用作简要综述。

关键词: 单克隆抗体, 单个 B 细胞, 免疫球蛋白基因, 逆转录 PCR

Single B cell monoclonal antibody technologies and applications

Xiangyang Chi, Changming Yu, and Wei Chen

Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

Abstract: Monoclonal antibodies (mAbs) contribute a lot to the development of numerous fields in life science as a pivotal tool in modern biological research. Development of the PCR methods and maturation of antibody production have made it possible to generate mAbs from single human B cells by single cell RT-PCR with successional cloning and expression *in vitro*. Compared to traditional monoclonal antibody technologies, single B cell technologies require relatively fewer cells, which are highly efficient in obtaining specific mAbs in a rapid way with preservation of the natural heavy and

Received: November 30, 2011; **Accepted:** February 14, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81172980), National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 81025018).

Corresponding author: Wei Chen. Tel: +86-10-66948565; E-mail: chenwei0226@yahoo.com.cn
Changming Yu. Tel: +86-10-66948692; E-mail: yuchangming@126.com

国家自然科学基金 (No. 81172980), 国家杰出青年科学基金 (No. 81025018) 资助。

light chain pairing. With so many advantages, single B cell technologies have been proved to be an attractive approach for retrieval of naive and antigen-experienced antibody repertoires generated *in vivo*, design of rationale structure-based vaccine, evaluation and development of basic B cell biology concepts in health and autoimmunity, and prevention of infectious diseases by passive immunization and therapy for disorders. Accordingly, this review introduced recent progresses in the single B cell technologies for generating monoclonal antibodies and applications.

Keywords: monoclonal antibody, single B cell, immunoglobulin gene, RT-PCR

单克隆抗体技术是现代生命科学研究的重要工具,自1975年杂交瘤单克隆抗体技术的出现,单克隆抗体迅速在生命科学研究和临床检测诊断中得到了广泛的应用,为许多领域的发展作出了不可估量的贡献。目前单克隆抗体制备技术有杂交瘤技术、EBV转化B淋巴细胞技术、噬菌体展示技术、转基因小鼠技术以及单个B细胞抗体制备技术等^[1]。

传统的鼠杂交瘤单克隆抗体技术的基本过程是将来源于免疫接种过的小鼠的B细胞与骨髓瘤细胞融合,继而筛选出既能无限增殖又能分泌抗体的鼠杂交融合细胞,但是这种方法得到的鼠源抗体免疫原性高、半衰期短,往往临床疗效不显著。即使是对鼠源单克隆抗体进行完全人源化的基因工程改造,也不可能完全消除鼠源单抗的免疫原性,对临床疗效的改善依然有限^[2]。

为了减少鼠杂交瘤抗体和人源化抗体的免疫原性,提高抗体生物效应,许多研究者尝试各种方法来获得全人抗体。其中人杂交瘤技术是在鼠杂交瘤技术的基础上发展的一种抗体制备技术,这种方法是将免疫过的人或鼠B细胞与人骨髓瘤细胞融合从而获得无限传代且能分泌抗体的杂交融合细胞,该技术虽然克服了鼠杂交瘤技术免疫原性等不足,但是仍有较多局限,如人骨髓瘤细胞系非常有限、细胞融合成功率低且容易造成染色体丢失等^[3]。针对于以上缺陷,研究者

利用EB病毒(Epstein-Barr Virus, EBV)在体外能感染正常静止的B细胞,使它们变成永生化的淋巴细胞系这一特性,制备分泌人单抗的杂交瘤细胞,即EBV转化B细胞技术。然而,EBV转化B细胞株不是恶性肿瘤细胞,较难克隆且抗体产量低,因而仍然没有得到广泛应用^[4]。

噬菌体展示技术是目前广泛应用的体外筛选人源抗原特异性抗体可变区基因的一种方法,噬菌体展示是将抗体DNA序列插入到噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置,使抗体随噬菌体的重新组装而展示到噬菌体表面的生物技术^[5]。这种方法无需B细胞培养过程、较为简单,但是得到的抗体并非在人体中表达,可能导致构象改变从而丢失抗原特异性,并且由于抗体重链和轻链随机组合,无法保持抗体重链轻链的天然配对^[6]。

除此之外,转基因鼠抗体制备技术在破坏鼠内源抗体基因后导入人抗体基因,进而用目标抗原免疫转基因鼠并在其体内表达人源抗体,这种方法得到的抗体产量和亲和力较高,但是鼠与人类免疫系统组成上的差异限制了其应用前景^[7]。

近几年来新兴的单个B细胞抗体制备技术是一种体外克隆和表达单个抗原特异性B细胞抗体基因技术,这种方法保留了轻重链可变区的天然配对,具有基因多样性好、效率高、全人源、需要的细胞量少等优势。以下将详细介绍单个B细胞抗体制备技术及其应用。

1 单个 B 细胞抗体制备技术过程

1.1 鉴定和分离单个 B 细胞

抗体基因的来源随研究目的差异而不同。Wrarmert 等^[8]制备的抗 H1N1 抗体是从外周血中分离浆细胞 (Plasma cells) 获得; Morris 等^[9]则通过分离外周血单个记忆 B 细胞 (Memory B cells) 得到抗 HIV 抗体; Wardemann 等^[10]为研究人自身反应抗体的结构和规律, 从正常人骨髓中分离前 B 细胞制备自身反应抗体。

在样品丰富的情况下, 为提高特异性抗体得率, 可以在分离 B 细胞之前先通过密度梯度法^[11-12], 或流式细胞分选^[13]从外周血中粗分离 B 淋巴细胞, 以 ELISPOT 进行抗原特异性细胞丰度的评价, 从而选择含抗原特异性抗体浓度较高的血样进行后续抗体制备^[8,14-16]。也有文献以 ELISA 法直接比较不同供血者的血样中含特异性抗体的浓度, 如 Gilbert 等^[11]利用基于细胞的 ELISA 技术(Cell based ELISA)估计血样中抗肿瘤抗体的含量。

单个 B 细胞分离可分随机分离和抗原特异性分离, 前者只需分离 B 细胞, 操作简单, 但是随机分离适用于抗原特异性抗体浓度较高的血样, 通常来自于疫苗接种者或患者, 以尽量减轻后续抗体特异性鉴定的工作量^[8,17-19]。后者需分离抗原特异性 B 细胞, 操作较复杂, 尤其适合抗肿瘤抗体、自身免疫抗体等特异性抗体含量较低的情况^[9-11,15]。

随机 B 细胞分离的方法主要有显微操作法 (Micromanipulation)、激光捕获显微切割法 (Laser capture microdissection, LCM)、荧光激活细胞分选法 (Fluorescence-activated cell sorting,

FACS), 见表 1。显微操作法是在镜下用显微操作仪人工分离 B 细胞, 虽然该方法无需特殊设备、操作简单但是分离效率低, 且分离细胞种类有限; 激光捕获显微切割法的基本过程是将事先经组织化学、免疫组化或免疫荧光方法染色的样品切片, 在显微激光切割系统下观察细胞形态和染色情况并获取单细胞群或单细胞。该方法的特点是操作简单, 定位准确, 能在目视下从样品中特异挑选同类细胞乃至单一细胞并剔除杂质成分, 但是该技术制样复杂, 无法自动化在短时间内获取大量单个 B 细胞; 荧光激活细胞分选法以荧光剂和细胞分选仪为基础, 用激光束激发单行流动的细胞上结合的抗体所偶联的荧光素, 根据产生的荧光信号对细胞进行自动分析或分选。虽然操作较为复杂, 对设备和样品的要求较高, 但荧光激活细胞分选能够自动化, 从而快速准确分选或分析细胞, 是目前应用最为广泛的细胞分离方法之一。

目前普遍运用于抗原特异性单个 B 细胞分离的方法包括: 荧光标记抗原多参数细胞分选法 (Fluorochrome-labeled antigens via multi-parameter, FACS)、抗原标记磁珠分选法 (Antigen-coated magnetic beads)、微雕法 (Microengraving) 以及细胞微阵列芯片法 (Cell-based micro-array chip systems)。荧光标记抗原多参数细胞分选法与荧光激活细胞分选法类似, 二者差异在于前者在加入用于标记 B 细胞表面抗原的荧光抗体之外, 还需加入荧光标记的目标抗原用来结合 B 细胞表面的膜抗体, 以分选目标抗原特异性的 B 细胞。它可以高速分析上万个细胞, 并能同时从一个细胞中测得多个参数, 此技术不仅提高分离细胞的纯度, 而且可以得到更多的细胞信息, 分选各个

时期的 B 细胞用于不同的研究方向。该方法具有速度快、精度高、自动化程度高等优点,已成为当代最先进的细胞定量分析分选技术。抗原标记磁珠分选法基本原理是基于细胞表面目标抗原特异性抗体能与连接有磁珠的目标抗原相结合,在外加磁场中,通过目标抗原与磁珠相连的细胞被吸附而滞留在磁场中,无该种表面特异性抗体的细胞由于不能与连接着磁珠的目标抗原结合而没有磁性,不在磁场中停留,从而使细胞得以分离。这种方法可以在几分钟内从复杂的细胞混合物中分离出高纯度的细胞,在流式分选单细胞前可用磁珠分选法进行预分离,但是由于磁珠影响细胞生物活性因而不利于分离后培养与操作;

微雕法基于软光刻 (Soft lithographic) 微阵列芯片识别、恢复和克隆产生抗原特异性抗体的 B 细胞,刺激多克隆 B 细胞产生抗体并将其逐个置于芯片孔内,将该芯片转印至相应的蛋白芯片后,即可用荧光标记的目标抗原识别特异性抗体,进而显微操作将检测到的分泌目标抗原特异性抗体 B 细胞转移到细胞培养皿中进行后续克隆操作。微阵列芯片法同微雕法具有高通量 (每个芯片分选细胞量高达 10 万个细胞)、快速、成本低、可直接从多克隆 B 细胞中分选并鉴定抗体分泌 B 细胞等优点。另外, Jin 等^[20]通过酶联免疫斑点微阵列芯片法 (Immunospot array assay on a chip, ISAAC) 高通量制备流感抗体, ISAAC 法

表 1 单个 B 细胞分选方法

Table 1 Approaches of single B cell isolation

	Approaches	Advantages	Disadvantages	References
Random isolation	Micromanipulation	Low equipment requirements Simple operation	Low efficiency Limited types of isolated cells	[21-23]
	Laser capture microdissection	High position accuracy Simple operation	Low efficiency Complicated process of sample preparation	[24-26]
	Fluorescence-activated cell sorting	High accuracy and efficiency High degree of automation	Complicated operation High equipment requirements	[8,10,12,18-19, 27-28]
Antigen-selective isolation	Fluorochrome-labeled antigens via multi-parameter	High accuracy and efficiency High degree of automation High-throughput and multi-parameter Capability of isolating B cells at different stages	Complicated operation High equipment requirements	[6,11,14-15, 29-32]
	Antigen-coated magnetic beads	High purity Mostly used in pre-isolation of fluorescence-activated cell sorting	High cost Limited bioactivities	[15,18,28, 33-34]
	Microengraving/Cell-based micro-array chip systems	High accuracy and efficiency Low cost Early and rapid identification of antibody-secreting cells	Complicated operation	[13,20,35-39]

是微阵列芯片法的延伸和补充,该方法用包被于芯片表面的抗免疫球蛋白抗体来代替微雕法转印蛋白芯片的过程,抗免疫球蛋白抗体能够快速捕捉抗体分泌 B 细胞分泌的抗体,进而用生物素标记的目标抗原识别特异性抗体,从而达到筛选并分离特异性抗体分泌 B 细胞的目的。ISAAC 法较微雕法另一改进在于,前者能在同一块芯片上筛选针对多种不同目标抗原的特异性抗体,简化了实验过程且更加高效,是目前前景非常广阔的分选 B 细胞方法。

1.2 扩增和克隆抗体基因

经典克隆未知抗体基因的方法比如 cDNA 文库筛选^[40-41]等有着共同的弊病,即实验操作繁琐,周期较长、工作量大。近些年来随着 PCR 技术的快速兴起和成熟,单个 B 细胞抗体基因的扩增和克隆也随之发展。

细胞分选时,通常需将单个 B 细胞分至内含适量细胞裂解液、RNA 酶抑制剂和 PCR 反应试剂的适当容器中,如 96 孔板。由于单个细胞内 RNA 含量少,适当的容器可以方便大批量操作、防止样品损失或交叉污染。另外,不同类型 B 细胞抗体分泌能力差异明显,如抗体分泌 B 细胞中抗体基因转录本含量远高于记忆 B 细胞,因此从抗体分泌 B 细胞中更容易扩增得到抗体基因。

通常从单个 B 细胞中扩增未知抗体基因,需使用合适的引物进行巢式或半巢式逆转录 PCR (Nested or semi-nested RT-PCR),该过程要求引物具有通用性、灵敏性、特异性,能避免非特异性扩增又能扩增出完整的抗体基因序列,因此合理设计引物序列至关重要。通常针对抗体重链轻链可变区不同前导序列设计前向引物的混合物,反

向引物特异性互补于抗体恒定区。根据实验目的,如果分离和扩增不同同种型的抗体,反向引物则是特异性互补于各种同种型抗体恒定区的混合物^[42-45]。除此之外,为方便重叠延伸 PCR 重组和酶切克隆抗体重链轻链可变区基因,前向引物 5'端和反向引物 3'端需要包含限制性内切酶位点。虽然该方法已被应用证实能扩增出部分抗体序列,但产物的多样性仍受限于前向引物结合序列的非保守性,理论上是无法涵盖所有分选到的 B 细胞中功能性抗体基因^[9,12,15,19,25,27]。此外,这种基于混合引物的多重 PCR 反应体系复杂,在扩增效率、特异性以及抗体基因表达谱的还原 (Repertoire retrieve) 上都可能存在问题。

Ozawa 等^[23]通过 5' RACE (5' rapid amplification of cDNA ends) 方法成功扩增出抗体基因编码框 5'端的完整序列,该方法通过针对不同同种型抗体恒定区保守序列的特异性反向引物序列 GSP 引物混合物,直接从细胞中 RT-PCR 合成 cDNA 第一链,对第一链加多聚 G 尾后,继续用一条带有下游巢式 PCR 引物互补序列和多聚 C 的前向引物 AP 合成第二链,进而利用针对 AP 和恒定区保守序列的特异性引物混合物进行两步巢式 PCR,更加特异地扩增出目的基因。传统的 5' RACE 法扩增未知基因的细胞含量要求较高,Ozawa 提出的单个 B 细胞 5' RACE 材料要求少至仅需一个细胞,且可能扩增出多种前向引物混合物 PCR 的方法无法扩增出的抗体基因,另外过程中无需纯化 PCR 产物,省略了复杂的前向引物混合物,大大简化了反应体系^[14,20,22,46]。

扩增出的抗体基因片段用重叠延伸 PCR 方

法连接成 scFv、scAb、Fab 等形式^[47], 酶切将其连接至原核或真核表达载体中。Liao 等^[19]构建的线性表达框 (Linear expression cassettes) 包含有抗体转录和翻译所有必需的功能元件: CMV 启动子 (CMV promoter)、抗体前导序列 (Ig leader sequences)、IgG1 重链或轻链恒定区基因 (Constant region of IgG1 heavy- or Ig light-chain)、多聚 A 尾 (poly(A) tail)、可替换重链和轻链可变区基因 (Substitutable V_H or V_L genes)。这个方法无需克隆过程, 直接转染到哺乳动物细胞中表达, 便于高通量快速高效筛选鉴定和分析特异性抗体^[9,14]。

对抗体基因扩增产物测序得到的结果, 可在相应数据库中, 如 IMGT V-QUEST (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/)、IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) 评价 V-D-J 基因完整性, 分析其插入、缺失和突变情况。

1.3 表达、筛选和鉴定抗原特异性抗体

鉴定抗体的抗原特异性和生物活性前需将携带有抗体基因的表达载体在相应系统中表达, 最简单常用的是原核表达系统^[8,15,22,25,27], 如 *Escherichia coli*, 相较而言, 真核表达系统尤其是哺乳动物细胞表达系统更有利于抗体的加工修饰, 其产物的生物活性可靠性更高^[12-13,17,39,46], 常用的有 HEK293 和 CHO 等细胞系。通过亲和层析和离子交换层析纯化到的抗体, 可通过 SDS-PAGE^[14]、Western blotting^[9,14-15]、ELISA^[16,18,32] 等常规方法筛选和鉴定抗体, 也可通过免疫沉淀 (Immunoprecipitation)^[16]、空斑法 (Plaque assay)^[8]、空斑减少中和测定法 (PRNT50 assay)^[8]、流式分析法 (FACS analysis)^[8]、活细

胞成像测定法 (Live cell imaging assays)^[11]、体内药物活性测定法^[8]等方法进一步测定抗体与抗原的特异性、亲和力以及中和活性保护活性等生物学特性。

2 单个 B 细胞抗体制备技术应用

单克隆抗体技术是现代生命科学研究的重要工具, 其在蛋白质的结构与功能研究、疾病诊断、药效学及临床应用等方面有着不可或缺的作用。近年来, 随着分子生物学和细胞生物学的发展, 单个 B 细胞抗体制备技术开始兴起, 并逐渐得到广泛应用。单个 B 细胞抗体技术制备的单克隆抗体所具有的全人源性、自身高度特异性和均一性的特点在治疗病原微生物感染、肿瘤、自身免疫性疾病和器官移植等方面显出了独特的优势和良好的应用前景。目前单个 B 细胞抗体制备技术已广泛应用于以下几方面。

2.1 病原微生物感染治疗

其他抗体制备技术如噬菌体展示、转基因鼠等只能研究有限种类的 B 细胞, 而单个 B 细胞抗体制备技术帮助人们在病人感染或免疫几个月甚至多年后仍然能够快速分离到记忆 B 细胞制备单抗, 与此同时人们能够从基因水平更加深入了解和阐释人类免疫系统机制。单个 B 细胞技术已用于制备抵抗病原微生物感染的高度特异性人源抗体, 如 HIV 抗体^[48-50]、破伤风抗体^[51-52]、乙肝抗体^[46]、流感抗体^[16-17]等。Morris 等^[9]从 HIV-1 疫苗接种者外周血中分离单个 B 细胞, 并克隆得到能识别 HIV-1 gp41 保守位点且中和多株 HIV-1 的抗体, 并研究得出结论在 HIV-1 gp41 包被蛋白的 C 端存在多免疫原性靶点, 为 HIV-1

疫苗设计提供帮助。Wrarmert 等^[8]通过单个 B 细胞抗体制备技术,从 H1N1 感染患者外周血中成功制备了针对 H1N1 病毒基因保守区的中和性抗体,动物保护实验发现用于测试的具有代表性的 3 株抗体在小鼠感染 H1N1 后 70 h 后仍然都能起到保护作用,并且 3 株抗体能抵抗绝大多数 H1N1、H5N1 病毒株。Liao 等^[19]从单个 B 细胞中扩增流感抗体基因,将其连接至线性表达框并直接转化到哺乳动物细胞中表达,仅用 6 d 从分选的 24 个细胞中扩增出 9 对完整的抗体基因并表达,并成功筛选到 5 个高亲和力人流感单克隆抗体。Jin 等^[20]通过酶联免疫斑点微阵列芯片分选法,仅用 7 d 同时从一批人外周血中分别筛选出 63 个流感特异性抗体分泌 B 细胞和 104 个乙肝特异性抗体分泌 B 细胞,从中成功制备了 19 株流感和 45 株乙肝中和性单克隆抗体。因此,单个 B 细胞抗体制备技术能够高效高通量制备高亲和力人单克隆抗体。

2.2 自身免疫疾病检测和治理

在肿瘤检测和治疗方面,单个 B 细胞技术同样发挥着其他技术难以比肩的重大作用,Wang 等^[26]通过该技术发现表现为葡萄膜炎症状的玻璃体视网膜淋巴瘤患者的 IgH 基因和 T 细胞受体 (TCR) 基因重排,以此建立了一种新型的高灵敏度高特异性的初期玻璃体视网膜淋巴瘤检测方法。Gilbert 等^[11]在单个 B 细胞技术的基础上建立了新型的基于细胞 ELISA (Cell-based ELISA) 得到对黑色素瘤细胞具有杀伤作用的抗黑色素瘤抗体,同时发现该抗体在黑色素瘤患者体内含量远远高于其在正常人体内的含量。

2.3 人类免疫系统研究

单个 B 细胞抗体制备技术最突出的应用在于治疗和研究自身免疫性疾病和人类免疫系统。单个 B 细胞抗体制备技术能够分离到人体内任意时期的 B 细胞,使得详细深入地研究人体免疫系统各个阶段功能和机理成为可能。Scheel 等^[25]发现在风湿性关节炎患者滑液组织中存在持续激活特定 B 细胞的现象,使得滑液组织处大量浆细胞富集,由此得出结论认为出现淋巴细胞渗入情况的关节炎患者,可通过早期 B 细胞排除治疗法减轻浆细胞堆积的症状。Wardemann 等^[10]从健康人体内克隆出单个 B 细胞抗体基因并对此进行分析和研究发现,骨髓中初期生成的大部分 B 细胞都具有自身免疫特异性,从而推论在抗体发生过程中可能存在两个排除自身免疫的检查点:一个位于骨髓,另一个位于 B 细胞发生免疫耐受的外周组织。

从上述对单个 B 细胞抗体制备技术应用简述中可以看到,单个 B 细胞技术具有效率高、全人源、基因多样性更丰富等优势。但到目前为止,单个 B 细胞抗体制备技术的应用潜力还远远没有发挥出来,单个 B 细胞抗体制备技术仍受到一些现实条件的约束,如高通量 PCR 抗体基因扩增技术仍不够完善、某些目标抗原难以制备、合适的人源供体需求量较多等,但是在过去十年里,单个 B 细胞抗体制备技术已经成为制备人源抗体的热门方法,同时也促进了包括抗体发生成熟、疫苗保护机制、疫苗开发、肿瘤及自身免疫疾病等免疫学相关研究。随着 B 细胞分选技术、后续 PCR 扩增基因方法以及抗体基因高通量分析鉴定等方法的成熟和完善,未来单个 B 细胞抗体制备技术将在诊断、药效学及临床应用中发挥

前所未有的重大作用,引领新型治疗性抗体研究的崭新时代。

REFERENCES

- [1] Wang SX. Advances in the production of human monoclonal antibodies. *Antibody Technol J*, 2011, 1: 1–4.
- [2] Sullivan M, Kaur K, Pauli N, et al. Harnessing the immune system's arsenal: producing human monoclonal antibodies for therapeutics and investigating immune responses. *F1000 Biol Rep*, 2011, 3: 17.
- [3] Crowe JE Jr. Recent advances in the study of human antibody responses to influenza virus using optimized human hybridoma approaches. *Vaccine*, 2009, 27(Suppl 6): G47–G51.
- [4] Steinitz M. Three decades of human monoclonal antibodies: past, present and future developments. *Hum Antibodies*, 2009, 18(1/2): 1–10.
- [5] Yamashita M, Katakura Y, Shirahata S. Recent advances in the generation of human monoclonal antibody. *Cytotechnology*, 2007, 55(2/3): 55–60.
- [6] Meijer PJ, Andersen PS, Haahr Hansen M, et al. Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing. *J Mol Biol*, 2006, 358(3): 764–772.
- [7] He Y, Honnen WJ, Krachmarov CP, et al. Efficient isolation of novel human monoclonal antibodies with neutralizing activity against HIV-1 from transgenic mice expressing human Ig loci. *J Immunol*, 2002, 169(1): 595–605.
- [8] Wrammert J, Koutsonanos D, Li GM, et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J Exp Med*, 2011, 208(1): 181–193.
- [9] Morris L, Chen X, Alam M, et al. Isolation of a human anti-HIV gp41 membrane proximal region neutralizing antibody by antigen-specific single B cell sorting. *PLoS One*, 2011, 6(9): e23532.
- [10] Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, et al. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*, 2003, 301(5638): 1374–1377.
- [11] Gilbert AE, Karagiannis P, Dodev T, et al. Monitoring the systemic human memory B cell compartment of melanoma patients for anti-tumor IgG antibodies. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19330.
- [12] Smith K, Garman L, Wrammert J, et al. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nat Protoc*, 2009, 4(3): 372–384.
- [13] Tajiri K, Kishi H, Tokimitsu Y, et al. Cell-microarray analysis of antigen-specific B-cells: single cell analysis of antigen receptor expression and specificity. *Cytometry A*, 2007, 71(11): 961–967.
- [14] Di Niro R, Mesin L, Raki M, et al. Rapid generation of rotavirus-specific human monoclonal antibodies from small-intestinal mucosa. *J Immunol*, 2010, 185(9): 5377–5383.
- [15] Iizuka A, Komiyama M, Tai S, et al. Identification of cytomegalovirus (CMV) pp65 antigen-specific human monoclonal antibodies using single B cell-based antibody gene cloning from melanoma patients. *Immunol Lett*, 2011, 135(1/2): 64–73.
- [16] Wrammert J, Smith K, Miller J, et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*, 2008, 453(7195): 667–671.
- [17] Corti D, Voss J, Gamblin SJ, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*, 2011, 333(6044): 850–856.
- [18] Menard L, Samuels J, Ng YS, et al. Inflammation-independent defective early B cell tolerance checkpoints in rheumatoid arthritis. *Arth Rheum*, 2011, 63(5): 1237–1245.
- [19] Liao HX, Levesque MC, Nagel A, et al. High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies. *J Virol Methods*, 2009,

- 158(1/2): 171–179.
- [20] Jin A, Ozawa T, Tajiri K, et al. A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nat Med*, 2009, 15(9): 1088–1092.
- [21] Kupperts R, Zhao M, Hansmann ML, et al. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J*, 1993, 12(13): 4955–4967.
- [22] Kurosawa N, Yoshioka M, Isobe M. Target-selective homologous recombination cloning for high-throughput generation of monoclonal antibodies from single plasma cells. *BMC Biotechnol*, 2011, 11(1): 39.
- [23] Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A. Amplification and analysis of cDNA generated from a single cell by 5'-RACE: application to isolation of antibody heavy and light chain variable gene sequences from single B cells. *Biotechniques*, 2006, 40(4): 469–470, 472, 474 passim.
- [24] Obiakor H, Sehgal D, Dasso JF, et al. A comparison of hydraulic and laser capture microdissection methods for collection of single B cells, PCR, and sequencing of antibody VDJ. *Anal Biochem*, 2002, 306(1): 55–62.
- [25] Scheel T, Gursche A, Zacher J, et al. V-region gene analysis of locally defined synovial B and plasma cells reveals selected B cell expansion and accumulation of plasma cell clones in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(1): 63–72.
- [26] Wang Y, Shen D, Wang VM, et al. Molecular biomarkers for the diagnosis of primary vitreoretinal lymphoma. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(9): 5684–5697.
- [27] Tiller T, Meffre E, Yurasov S, et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods*, 2008, 329(1/2): 112–124.
- [28] Meyers G, Ng YS, Bannock JM, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for B-cell tolerance in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(28): 11554–11559.
- [29] Battye FL, Light A, Tarlinton DM. Single cell sorting and cloning. *J Immunol Methods*, 2000, 243(1/2): 25–32.
- [30] Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, et al. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem*, 2002, 48(10): 1819–1827.
- [31] Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, et al. A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. *J Immunol Meth*, 2009, 343(2): 65–67.
- [32] Scheeren FA, van Geelen CM, Yasuda E, et al. Antigen-specific monoclonal antibodies isolated from B cells expressing constitutively active STAT5. *PLoS One*, 2011, 6(4): e17189.
- [33] Lagerkvist AC, Furebring C, Borrebaeck CA. Single, antigen-specific B cells used to generate Fab fragments using CD40-mediated amplification or direct PCR cloning. *Biotechniques*, 1995, 18(5): 862–869.
- [34] Lundkvist A, Hörling J, Athlin L, et al. Neutralizing human monoclonal antibodies against Puumala virus, causative agent of nephropathia epidemica: a novel method using antigen-coated magnetic beads for specific B cell isolation. *J Gen Virol*, 1993, 74 (Pt 7): 1303–1310.
- [35] Ogunniyi AO, Story CM, Papa E, et al. Screening individual hybridomas by microengraving to discover monoclonal antibodies. *Nat Protoc*, 2009, 4(5): 767–782.
- [36] Choi JH, Ogunniyi AO, Du M, et al. Development and optimization of a process for automated recovery of single cells identified by microengraving. *Biotechnol Prog*, 2010, 26(3): 888–895.
- [37] Love JC, Ronan JL, Grotenbreg GM, et al. A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(6): 703–707.

- [38] Park S, Kim W, Kim Y, et al. Array-based analysis of secreted glycoproteins for rapid selection of a single cell producing a glycoprotein with desired glycosylation. *Anal Chem*, 2010, 82(13): 5830–5837.
- [39] Tokimitsu Y, Kishi H, Kondo S, et al. Single lymphocyte analysis with a microwell array chip. *Cytometry A*, 2007, 71(12): 1003–1010.
- [40] Ramer SW, Elledge SJ, Davis RW. Dominant genetics using a yeast genomic library under the control of a strong inducible promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(23): 11589–11593.
- [41] Sastry L, Alting-Mees M, Huse WD, et al. Cloning of the immunological repertoire in *Escherichia coli* for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(15): 5728–5732.
- [42] Marks JD, Tristem M, Karpas A, et al. Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur J Immunol*, 1991, 21(4): 985–991.
- [43] Masri SA, Rast H, Hu WG, et al. Cloning and expression in *E. coli* of a functional Fab fragment obtained from single human lymphocyte against *anthrax toxin*. *Mol Immunol*, 2007, 44(8): 2101–2106.
- [44] Wang X, Stollar BD. Human immunoglobulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR. *J Immunol Methods*, 2000, 244(1/2): 217–225.
- [45] Wilson PC, de Bouteiller O, Liu YJ, et al. Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med*, 1998, 187(1): 59–70.
- [46] Tajiri K, Ozawa T, Jin A, et al. Analysis of the epitope and neutralizing capacity of human monoclonal antibodies induced by hepatitis B vaccine. *Antiviral Res*, 2010, 87(1): 40–49.
- [47] Maynard JA, Maassen CBM, Leppla SH, et al. Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(6): 597–601.
- [48] Scheid JF, Mouquet H, Ueberheide B, et al. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science*, 2011, 333(6049): 1633–1637.
- [49] Hicar MD, Kalams SA, Spearman PW, et al. Emerging studies of human HIV-specific antibody repertoires. *Vaccine*, 2010, 28(Suppl 2): B18–B23.
- [50] Doria-Rose NA, Connors M. Antibody-secreting B cells in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*, 2009, 4(5): 426–430.
- [51] de Kruif J, Kramer A, Visser T, et al. Human immunoglobulin repertoires against tetanus toxoid contain a large and diverse fraction of high-affinity promiscuous V_H genes. *J Mol Biol*, 2009, 387(3): 548–558.
- [52] Poulsen TR, Meijer PJ, Jensen A, et al. Kinetic, affinity, and diversity limits of human polyclonal antibody responses against tetanus toxoid. *J Immunol*, 2007, 179(6): 3841–3850.