

# 抗 H5N1 病毒嵌合 IgA 抗体基因的构建及其在 CHO 细胞中的表达

张宝中<sup>1,2</sup>, 张昕<sup>1</sup>, 陈万荣<sup>1</sup>, 刘大斌<sup>1</sup>, 王盛<sup>1</sup>, 安小平<sup>1</sup>, 冉多良<sup>2</sup>, 赵光宇<sup>1</sup>, 周育森<sup>1</sup>, 童贻刚<sup>1</sup>

1 军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

2 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052

**摘要:** 为了表达具有中和活性的抗禽流感 H5N1 病毒人-鼠嵌合 IgA 抗体, 采用 RT-PCR 法克隆具有中和活性的抗禽流感 H5N1-HA 鼠源单克隆抗体的轻重链可变区基因及相应的信号肽编码序列, 分别与人免疫球蛋白 IgA2 重链恒定区、Kappa 恒定区基因拼接, 构建表达质粒 pEF-IGHA9 和 pEF-IGK9, 共转染二氢叶酸还原酶缺陷型 CHO(CHO-dhfr<sup>-</sup>)细胞, 用 ELISA 检测培养上清中嵌合 IgA 抗体的表达, 对纯化的嵌合抗体进行 SDS-PAGE、Western blotting 印迹分析。结果成功地在 CHO 细胞中表达了抗禽流感 H5N1 病毒人-鼠嵌合 IgA 抗体, 为制备抗 H5N1 重组分泌型 IgA 预防性抗体制剂奠定了良好的基础。

**关键词:** H5N1 病毒, 免疫球蛋白基因, 嵌合 IgA 抗体, CHO 细胞

## Construction of anti-H5N1 virus chimeric IgA antibody gene and its expression in CHO cells

Baozhong Zhang<sup>1,2</sup>, Xin Zhang<sup>1</sup>, Wanrong Chen<sup>1</sup>, Dabin Liu<sup>1</sup>, Sheng Wang<sup>1</sup>, Xiaoping An<sup>1</sup>, Duoliang Ran<sup>2</sup>, Guangyu Zhao<sup>1</sup>, Yusen Zhou<sup>1</sup>, and Yigang Tong<sup>1</sup>

1 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

2 College of Veterinary Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

**Abstract:** To express human-mouse chimeric IgA antibody directed against H5N1 virus, an anti-H5N1 chimeric IgA antibody gene was constructed by joining the light and heavy chain variable region genes and the corresponding signal peptide coding sequences of the anti-H5N1 mouse monoclonal antibody H5N1-HA with the coding sequences of the constant region of the human IgA2 heavy chain and Kappa chain respectively. Then the full-length chimeric light and heavy chain expressing plasmids pEF-IGHA9 and pEF-IGK9 were constructed and transfected into the CHO/dhfr<sup>-</sup> cells. The chimeric IgA antibody expression was confirmed by ELISA, SDS-PAGE and Western blotting. The successful expression of this anti-H5N1 chimeric IgA may help to provide a stand for developing passive immunological agents for H5N1 virus infection prophylaxis.

**Keywords:** H5N1 virus, immunoglobulin gene, chimeric IgA antibodies, CHO cells

**Received:** December 10, 2008; **Accepted:** March 2, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30872223), National Key Technology Research and Development Program (No. 2006BAD06A15).

**Corresponding author:** Yigang Tong. Tel: +86-10-66948407; E-mail: tong.yigang@gmail.com

国家自然科学基金项目(No. 30872223), 国家科技支撑计划项目(No. 2006BAD06A15)资助。

禽流感(Avian influenza)是对人类健康和社会发展构成极大威胁的重要病毒性传染病。当前,由 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒引发的人禽流感对人类的生存造成了极大的威胁。据 WHO 报道,截至 2008 年 2 月 28 日,全世界已确诊 369 人感染 H5N1 亚型高致病性禽流感,死亡 234 人,病死率超过 60%<sup>[1]</sup>。WHO 预测下一次流感大流行不是有和无的问题,而是早和晚的问题。为此,发展人禽流感阻断技术,进行人禽流感的综合防控,成为世界各国的迫切需求。预防性抗体制剂作为一种被动免疫防护手段,可以弥补传统疫苗免疫的不足,且使用之后立刻产生防护效果,尤其适合于重点人群的紧急防护。在各种类型的抗体中,分泌型 IgA 抗体(SIgA)与其他类型的抗体相比,在结构和功能上具有显著的特点:分泌型 IgA 含有 4 个抗原结合位点(四价)<sup>[2]</sup>,因此对抗原具有更高的亲和力;耐多种蛋白酶的分泌片的包裹使分泌型 IgA 具有较高的稳定性,而且分泌片上的糖基粘附于粘膜上皮更使抗体分子整齐的排列在粘膜表面,形成隔离保护层,可有效地阻止病毒的入侵。大量证据表明分泌型 IgA 具有很强的抗感染能力<sup>[3]</sup>,由于禽流感是一种呼吸道传染病,其感染途径主要是呼吸道或消化道,通过粘膜侵入,因此在病毒感染发生的最早阶段采取措施,极可能最有效地抵抗病毒,最大限度的降低病毒感染的感染。呼吸道或消化道是一种特殊的环境,与体内环境不同,分泌型 IgA 在这里发挥主导作用。通过滴鼻/喷雾或口服即可给药,无需注射,这样的用药

方式更加安全和方便。因此,研究呼吸道或消化道分泌型 IgA 对禽流感病感染的阻断作用,具有潜在的应用价值,值得探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、细胞及主要试剂

分泌具有中和活性的抗禽流感 H5N1-HA 鼠源单克隆抗体杂交瘤细胞系由本实验室陈万荣主任提供;二氢叶酸还原酶(DHFR)缺陷型中华仓鼠卵巢细胞系(CHO-dhfr<sup>-</sup>)由本室保存;表达载体 pEF-dhfr-neo 由本室构建<sup>[4]</sup>;PGEM-T-Easy-IGHA 和 PGEM-T-Easy-CK 本室构建<sup>[5]</sup>;DNA 工具酶购自 Promega 公司;LipofectiAMINE<sup>TM</sup> 2000 Regent 购自 Gibco BRL 公司;本研究使用的抗体均购自 Sigma 公司;Protein L 亲和层析柱填料购自 Pierce 公司;实验所设计的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成(表 1)。

### 1.2 H5N1-HA 单抗 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 基因的克隆及序列分析

用 Trizol 试剂从抗禽流感 H5N1 鼠源单克隆抗体杂交瘤细胞中提取总 RNA。使用 TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)一步法扩增重链可变区的基因(含前导序列)。具体体系如下:10 × One Step RNA PCR Buffer 5 μL, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)10 μL, dNTP(各 10 mmol/L) 5 μL, RNase Inhibitor(40 U/μL) 1 μL, AMV RTase XL(5 U/μL) 1 μL, AMV-Optimized *Taq* (5 U/μL) 1 μL, 引物(10 μmol/L)mVH-f-ATG 和 mVH-r (或 mVK-f-ATG 和 mVK-r)各 2 μL, RNA 模板 5 μL, RNase Free ddH<sub>2</sub>O 补至 50 μL。按以下条件进行

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Primer	Sequence (5'-3')
mVH-f-ATG	ATGGRATGGAGCTGGATCTT
mVH-r	ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
mVK-f-ATG	ATGGAGWCAGACACACTCCT
mVK-r	GGATACAGTTGGTGCAGCATC
IGA-mVHhCHf	TCTCCTCAGCATCCCCGACCAGCCCCAA
IGA-mVHhCHr	TCGGGGATGCTGAGGAGACGGTGA CTGA
IGA-Hf-EcoRI	CGGAATTCACCACCATGGGATGGAGCTGGATCT
IGA-Hr-XbaI	GCTCTAGATCAGTAGCAGGTGCCGTCCA
IGA-mVKhCKf	AATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCT
IGA-mVKhCKr	CCACAGTTCGTTTGATTTCCAGCTTGGT
IGA-Kf-EcoRI	CGGAATTCACCACCATGGAGACAGACACTCCT
IGA-Kr-XbaI	GCTCTAGACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGA

RT-PCR 反应: 50°C 反转录 30 min, 94°C RTase 2 min; 变性 94°C 变性 10 s, 65°C 退火 20 s, 72°C 延伸 150 s, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min。将扩增的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离、纯化、克隆到 pMD18-T 载体上进行 DNA 序列分析。

### 1.3 人-鼠嵌合 IgA 抗体表达质粒的构建

使用 *EcoR* I 从 PGEM-T-Easy-IGHA 消化出约 1400 bp 目的基因 *IGHA* 片段, 切胶纯化回收; 同时使用 *EcoR* I 和 *Sal* I 从质粒 pMD18-T-mVH 消化出约 400 bp 目的基因 *mVH* 片段, 切胶纯化回收。将纯化回收的 *IGHA* 基因和 *mVH* 基因混合做融合 PCR 第 1 轮反应的模板, 取 2  $\mu$ L 混合物作为融合 PCR 反应的模板; 同时将 IGA-mVHhChf, IGA-mVHhChr, IGA-Hf-EcoRI, IGA-Hr-XbaI 4 条引物混匀, 取 2  $\mu$ L 混合物作为引物, 反应总体积 25  $\mu$ L, 反应条件为: 预变性 94°C 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 进行 15 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min。在第 2 轮 PCR 反应中, 取第 1 轮 PCR 反应产物 1  $\mu$ L 做模板, 用 IGA-Hf-EcoR I 和 IGA-Hr-Xba I 作为正、反向引物做一个 50  $\mu$ L 反应体系, 预变性 94°C 5 min; 94°C 变性 30 s, 62°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 进行 35 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min。将融合扩增的 PCR 产物纯化回收后克隆到 pMD18-T 载体再挑选阳性克隆命名为 T-CHI-mVH-IGHA; 然后使用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切质粒 T-CHI-mVH-IGHA, 回收 1800 bp 的嵌合重链基因片段, 与经相同酶切表达载体 pEF-dhfr-Neo(B8)相连, 完成重链真核表达质粒 pEF-IGHA9 构建(图 1)。

使用 *EcoR* I 从 PGEM-T-Easy-CK 消化出约 400 bp *Kappa* 恒定区基因片段, 切胶纯化回收; 同时使用 *EcoR* I 和 *Sal* I 从质粒 pMD18-T-mVK 消化出约 400 bp 基因 *mVK* 片段, 切胶纯化回收。将纯化回收的 *Kappa* 链恒定区基因和 *mVK* 基因混合取 2  $\mu$ L 做融合 PCR 第 1 轮反应的模板, 同时将 IGA-mVKhCKf, IGA-mVKhCKr, IGA-Kf-EcoRI 和 IGA-Kr-XbaI 4 条引物混匀, 取 2  $\mu$ L 混合物作为引物, 反应总体积 25  $\mu$ L, 反应条件为: 预变性 94°C 3 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s, 进行 20 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min。在第 2 轮 PCR 反应中, 取第 1 轮 PCR 反应产物 2  $\mu$ L 做模板, 用 IGA-Kf-EcoR I 和 IGA-Kr-Xba I 作为正、反向引物

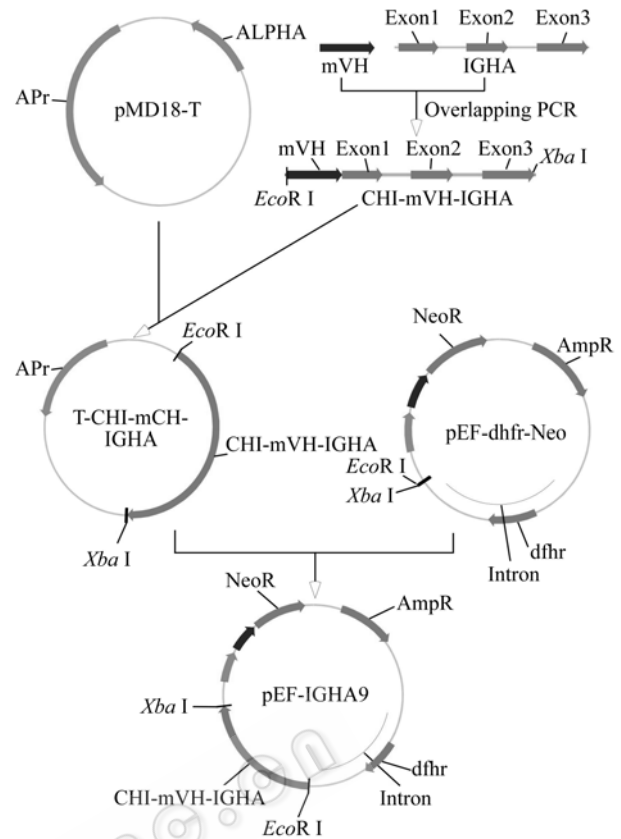


图 1 重链表达质粒构建过程示意图

Fig. 1 Construction of heavy chain expression plasmid.

做一个 50  $\mu$ L 反应体系, 预变性 94°C 3 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s, 进行 35 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min。将融合扩增的 PCR 产物纯化回收后克隆到 pMD18-T 载体, 再挑选阳性克隆命名为 T-CHI-mVK-IGK; 然后使用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切质粒 T-CHI-mVK-IGK, 回收 700 bp 的嵌合轻链基因片段, 与经相同酶切表达载体 pEF-dhfr-neo 相连, 完成轻链真核表达质粒 pEF-IGK9 构建(图 2)。

### 1.4 CHO-dhfr<sup>-</sup>细胞的转染及阳性克隆的筛选

取轻重链表达质粒各 2  $\mu$ g 加到 100  $\mu$ L 无血清和无抗生素培养液 DMEM 中, 取 LipofectiAMINE<sup>TM</sup> 2000 4  $\mu$ L 加到 100  $\mu$ L 无血清和抗生素的培养液, 室温孵育 5 min, 将二者混合, 室温放置 20 min。静置期间, 用无血清和抗生素的 DMEM 培养液每次 1 mL 洗涤细胞 2 次, 最后加 0.2 mL 的无血清和双抗的 DMEM 培养液到六孔板细胞中。将 LipofectiAMINE<sup>TM</sup> 2000 和 DNA 的混合物滴加到培养板。于 5% CO<sub>2</sub>、37°C 孵箱培养 6 h, 吸弃上清, 加入含 10% 胎牛血清的非选择培养液培养(含次黄嘌呤、胸腺嘧啶) 48~72 h。

取上清进行 ELISA 检测。检测阳性后进行克隆化培养(换选择培养基即无次黄嘌呤、胸腺嘧啶的 DMEM)。挑取阳性克隆用 MTX 加压进一步提高表达量。

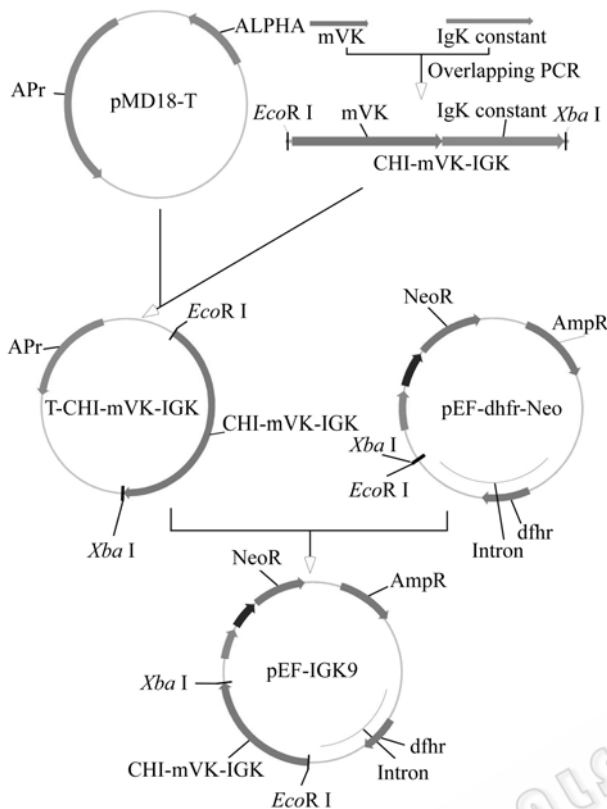


图 2 轻链表达质粒构建过程示意图  
Fig. 2 Construction of light chain expression plasmid.

### 1.5 嵌合 IgA 抗体的 ELISA 检测

抗人 Kappa 链单克隆抗体以 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包被酶联板, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 次日用 5% 脱脂奶(TBST 溶解)封闭液 37 $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h 后洗板, 加入转染培养的细胞上清后 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 洗板, 加入 1:1000 稀释 HRP 标记的羊抗人 IgA  $\alpha$  链抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后洗板、显色、酶标仪测  $OD_{450}$ 。其中阳性对照为人血清, 阴性对照为未转染的细胞培养上清。

### 1.6 嵌合 IgA 抗体的纯化及 SDS-PAGE 和 Western blotting 印迹

收集工程细胞系培养上清经 Protein L(专一性结合人源抗体 Kappa 链)亲和层析柱纯化目的 IgA 抗体, 阳性对照用人血清 IgA 从 0.5 mL 正常人血清经 Protein L 亲和层析柱中纯化而来。分别取 10  $\mu\text{L}$  样品进行还原和 SDS-PAGE 电泳, 以考马斯亮兰 R250 染色。取 10  $\mu\text{L}$  样品进行还原 SDS-PAGE 电泳后转

移到硝酸纤维素膜上, 一抗分别用鼠抗人 Kappa 链(1:1500)和 IgA  $\alpha$  链(1:1000)的单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(1:2000), 以 DAB 显色。SDS-PAGE 和 Western blotting 印迹操作见参考文献[6]。

## 2 结果

### 2.1 H5N1-HA 单抗 $V_L$ 和 $V_H$ 基因的克隆及 DNA 序列分析

用引物 mVH-f-ATG、mVH-r 和 mVK-f-ATG、mVK-r 分别从 H5N1-HA 杂交瘤细胞的总 RNA 中用 RT-PCR 扩增  $V_K$  和  $V_H$  基因, 均能有效扩增出目的条带(图 3)。PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体上进行序列分析, 经分析为小鼠免疫球蛋白基因, 重链可变区共有 414 个碱基, 前 57 个核苷酸编码 19 个氨基酸前导序列, 其  $V_H$  属于 IgHV 家族, D 段来自 IgHV 家族, J 段来自 IgHV 家族; 轻链可变区共有 393 个碱基, 前 60 个核苷酸编码 20 个氨基酸前导序列, V 段为 IgKV 家族, J 段为 IgKJ 家族。

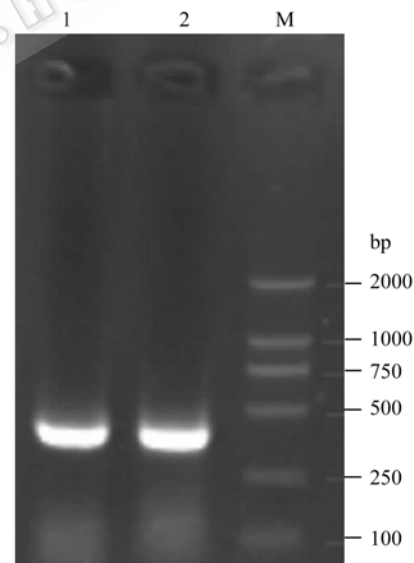


图 3 抗 H5N1 鼠单抗基因轻、重链可变区 PCR 产物的电泳图

Fig. 3 Amplification of light and heavy chain variable regions of anti-H5N1 monoclonal antibody gene. 1: heavy chain variable region; 2: light chain variable region; M: DNA marker DL2000.

分别构建了轻链表达质粒 pEF-IGK9 和重链表达质粒 pEF-IGHA9, 表达质粒中均含有二氢叶酸还原酶基因和 Neomycin 基因, 在 CHO-dhfr<sup>-</sup>细胞中, 可通过撤去次黄嘌呤和胸腺嘧啶进行选择, 同时也

可用 G418 进行筛选。轻链表达质粒 pEF-IGK9 使用 *Xba* I 和 *Hind* III 消化应切出 3019 bp、2071 bp、1299 bp 和 864 bp 四条 DNA 条带(图 4A); 重链表达质粒 pEF-IGHA9 使用 *Xba* I 和 *Eco*R I 消化应切出 6596 bp 和 1885 bp 两条 DNA 条带(图 4B)。

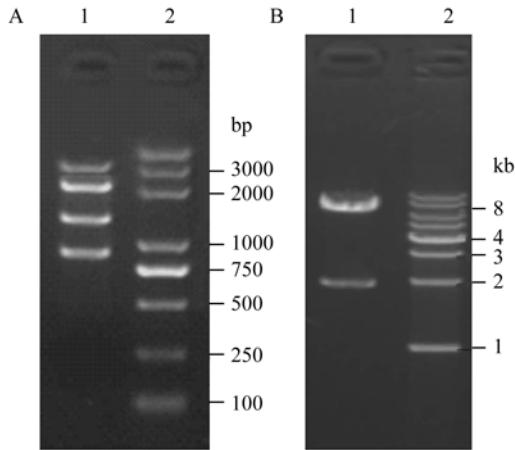


图 4 轻链、重链表达质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Restriction of light and heavy chain expression plasmids. (A) Light chain expression plasmids. 1: light chain expression plasmid; 2: DNA molecular weight marker DL2000Plus. (B) Heavy chain expression plasmids. 1: heavy chain expression plasmid; 2: DNA molecular weight marker 1 kb ladders.

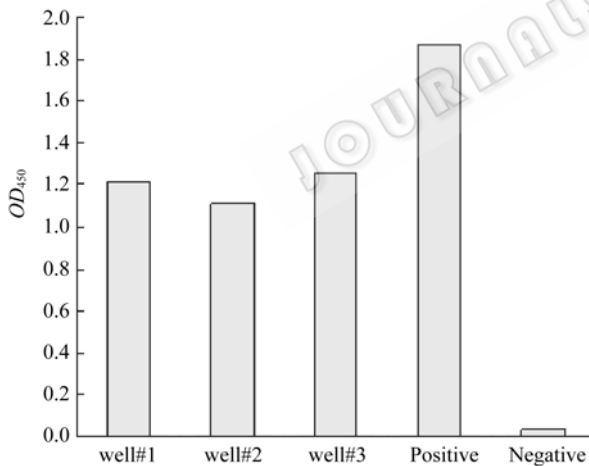


图 5 轻重链表达质粒共转染 CHO 细胞表达 IgA 的 ELISA 检测结果

Fig. 5 ELISA analysis of recombinant IgA produced by CHO cotransfected with light and heavy chain expression plasmids. Well #1-3: the supernatant of cotransfected CHO cells; Positive: human serum as positive control; Negative: normal cell supernatant control.

## 2.4 嵌合 IgA 抗体的检测及特性分析

使用抗人 Kappa 链单克隆抗体包被酶联板, 加

入待测的细胞上清和阴阳对照, 二抗为 HRP 标记的羊抗人 IgA(a)抗体, 能有效地检测到嵌合 IgA 抗体的分泌(图 5)。检测的阳性进行克隆化培养(换选择培养基即无次黄嘌呤、胸腺嘧啶的 DMEM)。挑取阳性克隆用 MTX 加压进一步提高表达量, 收集细胞培养上清进行纯化, 纯化后的嵌合 IgA 抗体进行 SDS-PAGE 电泳鉴定, 在还原 SDS-PAGE 中显示 2 条带, 重链约 55 kD, 轻链约为 25 kD, 与人血 IgA 的带型一致(图 6)。在对嵌合 IgA 抗体还原的 Western blotting 印迹分析中一抗分别为 Kappa 和 IgA(a)的单克隆抗体进行鉴定, 结果显示与对照一致的带型(图 8)。

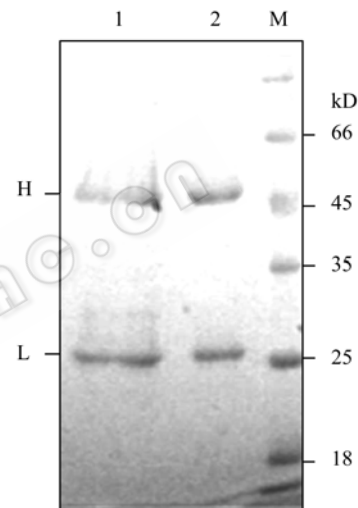


图 6 纯化的重组 IgA 抗体 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified recombinant IgA. 1: human serum IgA as control; 2: recombinant IgA; 3: protein molecular weight markers.

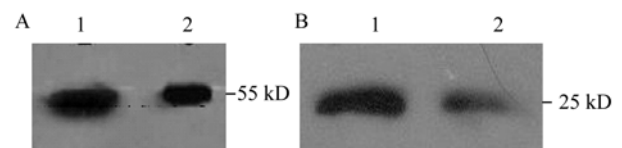


图 7 重组 IgA 抗体 Western blotting 鉴定

Fig. 7 Western blotting analysis of recombinant IgA. (A) IgA heavy chain. 1: human serum IgA as control; 2: recombinant IgA. (B) Kappa chain. 1: human serum IgA as control; 2: recombinant IgA.

## 3 讨论

由 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒引发的人禽流感对人类的生存造成了极大的威胁。为此, 发展

人禽流感阻断技术, 进行人禽流感的综合防控, 成为世界各国的迫切需求, 但是目前人用禽流感疫苗上存在一些问题, 全世界仅有一种人用禽流感疫苗。预防性抗体制剂作为一种被动免疫防护手段, 可以弥补传统疫苗免疫的不足, 可以在使用之后立刻产生防护效果, 尤其适合于重点人群的紧急保护。本研究构建人-鼠嵌合抗体基因, 保留了亲本鼠源可变区, 维持其原有特异性和中和活性, 恒定区换成人源则减少了异源性。考虑到恒定区基因组序列的内含子中可能含有能够提高抗体表达的增强子样序列, 因此扩增了人 IgA2 重链恒定区基因组基因 (IGHA2), 构建了恒定区为基因组序列的轻重链表达质粒, 共转染到 CHO 细胞, 72 h 后检测培养上清 (瞬时表达) 及选择培养液选择出的转染细胞培养液上清, 均检测到人 IgA 抗体的表达。本实验应用双抗夹心 ELISA 法检测抗体的表达, 用鼠抗人 Kappa 链单克隆抗体包被酶联板, HRP 标记的羊抗人  $\alpha$  链做二抗, 不仅具有较高的灵敏性和特异性, 而且可以同时检测轻重链的表达, 淘汰那些只表达重链或轻链的克隆。构建的表达质粒 pEF-dhfr-neo 含有 DHFR 基因, 所用细胞系为 DHFR 缺陷株, 在培养液中添加甲氨蝶呤可使 DHFR 基因及其两侧序列得到扩增, 增加嵌合抗体的拷贝数而提高表达量。继续提高 MTX 的浓度, 在  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 浓度下筛选表达量高的克隆, 扩大培养收集上清进行纯化。SDS-PAGE 和 Western blotting 印迹实验验证所表达的抗 H5N1 的嵌合 IgA 抗体。

国外一些研究小组已经成功在体外组装完整的 SIgA 抗体分子<sup>[7-10]</sup>。本研究通过重轻链表达质粒共转染 CHO 细胞成功表达单体 IgA, 为进一步建立高效表达 SIgA 抗体的细胞系和开发出针对 H5N1 高致病性禽流感的预防性 SIgA 抗体制剂奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] WHO: Cumulative number of confirmed human cases of Avian influenza A/(H5N1) reported to WHO. 2008. [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2008\\_02\\_28/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_02_28/en/index.html).
- [2] Ma JK, Hiatt A, Hein M, *et al.* Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, 1995, **268**(5211): 716-719.
- [3] Hammarstrom L, Weiner CK. Targeted antibodies in dairy-based products. *Adv Exp Med Biol*, 2008, **606**(12): 321-343.
- [4] Liu GQ, Chen XM, Xu J, *et al.* Construction of a CHO cell expression vector carrying coamplification gene. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2000, **16**(1): 17v20.  
刘国奇, 陈小密, 徐静, 等. 携带共扩增基因的 CHO 细胞表达载体的构建. *细胞与分子免疫学杂志*, 2000, **16**(1): 17-20.
- [5] Zhang BZ, An XP, Zhang X, *et al.* Cloning of genes by genomic DNA splicing for secretory IgA production. *China Biotechnol*, 2008, **28**(6): 1-6.  
张宝中, 安小平, 张昕, 等. 用基因组 DNA 剪接技术克隆 SIgA 相关基因. *中国生物工程杂志*, 2008, **28**(6): 1-6.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 880-897.
- [7] Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, *et al.* Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med*, 1998, **4**(5): 601-606.
- [8] Johansen FE, Natvig I, Norderhaug M, *et al.* Brandtzaeg: Recombinant expression of polymeric IgA: incorporation of J chain and secretory component of human origin. *Eur J Immunol*, 1999, **29**(2): 1701170-17011708.
- [9] Berdoz J, Blanc CT, Reinhardt M, *et al.* *In vitro* comparison of the antigen-binding and stability properties of the various molecular forms of IgA antibodies assembled and produced in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(6): 3029-3034.
- [10] Chintalacheruvu KR, Gurbaxani B, Morrison SL. Incomplete assembly of IgA2m(2) in Chinese hamster ovary cells. *Mol Immunol*, 2007, **44**(13): 3445-3452.