

瀋陽農業大學

碩士學位論文

布鲁氏菌 BP26 蛋白核糖体展示纳米抗体的筛
选、鉴定及其 ELISA 检测方法的建立

研 究 生：徐 曼

指 导 教 师：陈泽良 教授

专 业 名 称：预防兽医学

研 究 方 向：新发传染病

所 在 学 院：动物科学与医学学院

2024 年 6 月 6 日

DISSERTATION FOR MASTER

Screening and identification of Brucella BP26 protein
ribosome display nanobodies and the establishment of ELISA
detection methods

Candidate : Xu Man

Supervisor : Prof.Chen Zeliang

Speciality : Preventive Veterinary Medicine

Research Field: Emerging infectious diseases

College of Animal Science and Veterinary Medicine

Shenyang Agricultural University

June ,6 , 2024

目 录

第一章 文献综述	5
1.1 布鲁氏菌 BP26 蛋白的概述.....	5
1.1.1 布鲁氏菌概述.....	5
1.1.2 布鲁氏菌外膜蛋白.....	5
1.1.3 BP26 蛋白的概述.....	5
1.2 抗体库展示技术的概述.....	7
1.2.1 核糖体展示技术原理.....	8
1.2.2 核糖体展示技术流程.....	9
1.2.3 核糖体展示技术的应用.....	10
1.3 研究目的和意义.....	12
第二章 BP26 蛋白的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备	13
2.1 材料.....	13
2.1.1 载体、菌种、动物.....	13
2.1.2 试剂.....	13
2.1.3 耗材.....	15
2.1.4 仪器设备.....	16
2.2 方法.....	16
2.2.1 重组表达载体的构建.....	16
2.2.2 重组蛋白诱导表达.....	21
2.2.3 重组表达蛋白的纯化.....	22
2.2.4 BP26 蛋白多克隆抗体的制备与鉴定.....	25
2.3 结果.....	27
2.3.1 重组表达载体构建结果.....	27
2.3.2 蛋白诱导表达结果.....	28
2.3.3 蛋白纯化结果.....	29
2.3.4 纯化后的蛋白验证结果.....	29
2.3.5 多克隆抗体制备和鉴定结果.....	29
2.4 讨论.....	30
2.5 小结.....	32
第三章 BP26 蛋白特异性纳米抗体的筛选及表达鉴定	33
3.1 材料.....	33
3.1.1 试剂.....	33
3.1.2 耗材.....	34
3.1.3 仪器设备.....	34

3.1.4 溶液配制	34
3.2 方法	34
3.2.1 纳米抗体库的扩增	34
3.2.2 纳米抗体的体外转录翻译	35
3.2.3 体外筛选	36
3.2.4 抗 BP26 纳米抗体的构建	39
3.2.5 重组蛋白的诱导表达	40
3.2.6 纳米抗体的纯化及验证	40
3.2.7 纳米抗体的鉴定	40
3.3 结果	43
3.3.1 纳米抗体库的扩增结果	43
3.3.2 反转录后目的片段的扩增结果	44
3.3.3 重组表达载体构建结果	45
3.3.4 诱导表达结果	45
3.3.5 蛋白纯化结果	46
3.3.6 纳米抗体的鉴定结果	47
3.4 讨论	49
3.5 小结	50
第四章 纳米抗体竞争 ELISA 检测方法的建立	51
4.1 材料	51
4.1.1 试剂	51
4.1.2 耗材	51
4.1.3 仪器设备	51
4.2 方法	52
4.2.1 间接 ELISA 检测方法的建立	52
4.2.2 竞争 ELISA 检测方法的建立	52
4.2.3 两种检测方法的纳米抗体特异性检测	53
4.2.4 两种检测方法比较检测纳米抗体的最小工作浓度	53
4.3 结果	53
4.3.1 间接 ELISA 最佳重组蛋白最优包被浓度	53
4.3.2 间接 ELISA 最佳封闭液的确定	54
4.3.3 间接 ELISA 最佳二抗稀释倍数的确定	54
4.3.4 竞争 ELISA 最佳重组蛋白最优包被的浓度确定	55
4.3.5 竞争 ELISA 最佳封闭液的确定	55
4.3.6 竞争 ELISA 最佳二抗稀释倍数的确定	56
4.3.7 两种检测方法的纳米抗体特异性检测	56
4.3.8 两种检测方法比较检测纳米抗体的最小工作浓度	57
4.4 讨论	58

4.5 小结.....	59
结论.....	60
参考文献.....	61

摘 要

布鲁氏菌病是由不具备芽孢、荚膜和鞭毛结构的布鲁氏菌感染引起一种人兽共患的传染病，牛、羊、猪等牲畜均可感染该病，人感染布鲁氏菌的主要途径包括接触感染动物、摄入被污染的食物或饮水、呼吸道或皮肤伤口。该病具有传染性强的特点，不仅对养殖业造成经济损失，还严重威胁人类的安全。BP26 蛋白位于外膜表面，它在布鲁氏菌的致病过程中发挥着重要的作用，在受感染的动物中，BP26 蛋白是免疫原性较好的抗原，其诊断准确率达到 90 % 以上，可用于布鲁氏菌感染的诊断标志物，这一发现为相关疾病的防控提供了重要线索，对于病原体的识别与治疗具有重大意义。本研究以布鲁氏菌优势抗原 BP26 蛋白为靶标，利用核糖体展示技术从纳米抗体库中筛选出针对 BP26 的纳米抗体，为纳米抗体应用于布鲁氏菌病的预防诊断提供新途径。

首先，为了制备筛选纳米抗体需要大量的 BP26 蛋白，因此设计合成引物特异性扩增了 BP26 基因，将其插入到 pET-28a 载体，进行了 BP26 蛋白的表达纯化，并免疫动物制备多克隆抗体。结果显示，PCR 扩增出特定大小的条带；重组载体双酶切和 PCR 鉴定可以出现特异性条带，测序序列经 BLAST 比对，匹配度为 100 %；后续，对诱导表达的重组蛋白进行亲和纯化，Western-blot 验证，呈现为单一条带；利用 ImageJ 软件进行纯度分析显示，蛋白纯度达到 90.2 %，蛋白浓度约为 5 mg/mL；免疫家兔制备的多克隆抗体，其血清效价可达 $1:2^{10}$ ，显示出良好的反应原性。

接着，为了筛选 BP26 的纳米抗体，对纳米抗体的 CDR3 进行了 NNN 随机突变设计，利用核糖体展示平台，从纳米抗体库中筛选可与 BP26 结合的纳米抗体。8 轮筛选后，将最终产物反转录并扩增，构建重组表达载体，转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达纯化。经 BP26 为抗原的 ELISA 筛选特异性强、结合力高的纳米抗体。随后利用在线网站([Antibody Epitope Prediction \(immuneepitope.org\)](http://Antibody Epitope Prediction (immuneepitope.org)))进行 BP26 抗原表位预测，对其表位截断表达，判定纳米抗体的靶向表位；随后对纳米抗体进行不同温度和 pH 值的处理，判定其稳定性；最后对纳米抗体进行 FITC 荧光标记，孵育 PK-15 细胞，判定纳米抗体的细胞穿透性。结果表明，设计的库容量达到 2^{14} ；8 轮筛选后共筛选出 13 条不同序列的纳米抗体，ELISA 筛选得到两条与 BP26 结合力强的纳米抗体；纳米抗体的靶向表位为 VEISELSRPPMPMPI；纳米抗体在 4 °C-80 °C 或缓冲液 pH=1-13 范围内保存 30 min 仍具有结合活性，稳定性良好；与 PK-15 细胞共孵育 4 h 后，荧光显微镜下观察发现纳米抗体可进入细胞内，表现出较好的穿透性。

最后，为检测纳米抗体的含量，以 BP26 为包被抗原，优化抗原包被浓度、封闭液

和二抗稀释倍数等条件，初步建立了间接 ELISA 方法。结果表明，BP26 的包被浓度为 100 ng/mL，封闭液为 5 %脱脂奶粉，二抗稀释倍数为 1000，通过对梯度倍比稀释的纳米抗体的检测表明，间接 ELISA 检测最低浓度为 320 $\mu\text{g/mL}$ 但由于间接 ELISA 背景较高，实验误差较大，检测灵敏度低，而竞争 ELISA 在一定程度上可以检测浓度较低的目标物，因此建立了竞争 ELISA 检测方法。通过条件优化确定 BP26 的包被浓度为 10 ng/mL，封闭液为 5 %脱脂奶粉，二抗稀释倍数为 6000 倍。通过对梯度倍比稀释的纳米抗体的检测表明，竞争 ELISA 检测最低浓度为 12.8 $\mu\text{g/mL}$ 。竞争 ELISA 具有比间接 ELISA 更高的灵敏性。

综上所述，本研究通过核糖体展示技术成功筛选到针对 BP26 的纳米抗体，并对其靶向表位、稳定性等性质进行了鉴定，同时建立了检测纳米抗体的 ELISA 方法，为其利用建立了初步基础。

关键词：布鲁氏菌；BP26；纳米抗体；核糖体展示；鉴定；ELISA

Abstract

Brucellosis is a zoonotic infectious disease caused by infection of *Brucella* bacteria that does not have spores, capsule, and flagella structures, and can be infected by cattle, sheep, pigs and other livestock. The disease is highly contagious, which not only causes economic losses to the aquaculture industry, but also seriously threatens human safety. BP26 protein is located on the surface of the outer membrane, it plays an important role in the pathogenic process of *Brucella*, in infected animals, BP26 protein is an antigen with good immunogenicity, and its diagnostic accuracy reaches more than 90 %, which can be used as a diagnostic marker for *Brucella* infection, which provides important clues for the prevention and control of related diseases, and is of great significance for the identification and treatment of pathogens. In this study, the dominant antigen of *Brucella* was used as the target, and the nanobodies against BP26 were screened from the nanobody library by ribosome display technology, which provided a new way for the application of nanobodies in the prevention and diagnosis of brucellosis.

First of all, a large amount of BP26 protein is required to prepare screening nanobodies, so synthetic primers were designed to specifically amplify the BP26 gene, which was inserted into the pET-28a vector, the expression and purification of BP26 protein were carried out, and polyclonal antibodies were prepared by immunizing animals. The results showed that the PCR amplified the bands of a specific size, the recombinant vector could be identified by double digestion and PCR, and the sequencing sequences were aligned by BLAST with a match of 100 %; the recombinant protein was subsequently affinity purified and verified by Western-blot to present a single band; purity analysis by ImageJ software showed that the protein purity reached 90.2 %, and the protein concentration was about 5 mg/mL; Polyclonal antibody prepared by immunized rabbits has a serum titer of 1:2¹⁰, showing good reactogenicity.

Then, in order to screen the nanobodies of BP26, the CDR3 of the nanobodies was designed with NNN random mutations, and the ribosome display platform was used to screen the nanobodies that could bind to BP26 from the nanobody library. After 8 rounds of screening, the final product was reverse transcribed and amplified to construct a recombinant expression vector, which was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for induction expression purification. ELISA with BP26 as the antigen was used to screen for nanobodies with strong specificity and high binding power. Then, the online website (Antibody Epitope Prediction (immuneepitope.org)) was used to predict the epitope of BP26 antigen, and the epitope was truncated to determine the target epitope of the nanobody, and then the nanobody was treated with different temperatures and pH values to determine its stability, and finally the nanobody was fluorescently labeled with FITC and incubated with PK-15 cells to determine the cell

permeability of the nanobody. The results showed that the designed library capacity reached 214, a total of 13 nanobodies with different sequences were screened after 8 rounds of screening, and two nanobodies with strong binding to BP26 were screened by ELISA, the targeted epitope of the nanobodies was VEISELSRPPMPMPI, the nanobodies were stored at 4 °C-80 °C or buffer pH=1-13 for 30 min, and the nanobodies were still active and stable when stored in the range of 4 °C-80 °C or buffer pH=1-13, and after 4 h of co-incubation with PK-15 cells, the fluorescence microscope observed that the nanobodies could enter the cells and showed good penetration.

Finally, in order to detect the content of nanobodies, BP26 was used as the coating antigen, and the conditions such as antigen coating concentration, blocking solution and secondary antibody dilution factor were optimized, and an indirect ELISA method was preliminarily established. The results showed that the coating concentration of BP26 was 100 ng/mL, the blocking solution was 5 % skimmed milk powder, and the dilution factor of the secondary antibody was 1000, and the detection of the gradient dilution of nanobodies showed that the minimum concentration of indirect ELISA was 320 µg/mL, but due to the high background of indirect ELISA, the experimental error was large, and the detection sensitivity was low, while the competitive ELISA could detect the target with lower concentration to a certain extent, so the competitive ELISA detection method was established. The coating concentration of BP26 was 10 ng/mL, the blocking solution was 5 % skimmed milk powder, and the dilution factor of the secondary antibody was 6000-fold. Detection of gradient dilutions of nanobodies showed a minimum concentration of 12.8 µg/mL for competitive ELISA detection. Competitive ELISA have higher sensitivity than indirect ELISA.

In summary, in this study, the nanobodies against BP26 were successfully screened by ribosome display technology, and their targeted epitopes, stability and other properties were identified, and an ELISA method for the detection of nanobodies was established, which established a preliminary basis for its utilization.

Keywords: Brucella; BP26, Nanobody; Ribosome display; Identification; ELISA

第一章 文献综述

1.1 布鲁氏菌 BP26 蛋白的概述

1.1.1 布鲁氏菌概述

布鲁氏菌病, 又称布鲁氏病, 是由布鲁氏菌属的细菌引起的一种感染性疾病(田路路, 2021), 是我国重点防治的二类动物疫病(童志霞, 2018)。布鲁氏菌是一种体积较小、无荚膜、无芽孢的杆状革兰氏阴性细菌(Barros, N, et al, 2024), 体外的培养条件要求较高, 对温度和 pH 值都有一定的要求, 生长速度较慢, 需要较长时间才能形成典型的斑点状菌落, 在常规显微镜下难以观察到(崔志伟, 2022)。目前, 布鲁氏菌病是一种遍布全球的传染病(Al-Sanouri, T, et al, 2023), 许多国家和地区均有报道(Gao, S, et al, 2023), 据世界卫生组织预测, 每年全球有五十万到一百万人感染布鲁氏菌病, 其中大多数人生活在农村地区(Hlaing, S S, et al, 2024, Mbwambo, G A, et al, 2024)。人感染布鲁氏菌的主要症状是感染后会出现发烧、关节痛、乏力、头痛和盗汗等症状(Vives-Soto, M, et al, 2024), 其他可能出现包括淋巴结肿大、脾脏肿大、肝功能障碍和神经系统等症状(He, W J, et al, 2023, Liu, X, et al, 2023), 严重时还可造成器官损伤(Zangeneh, M, et al, 2023), 尤其对生育能力有不利的影响(何宗耀等, 2021)。由于布鲁氏菌的感染途径多样、症状复杂且易于被其他疾病所掩盖(Pritam, M, et al, 2024), 因此对于布鲁氏菌的研究十分必要。

1.1.2 布鲁氏菌外膜蛋白

布鲁氏菌的外膜蛋白(Outer Membrane Protein, OMP)是指存在于布鲁氏菌细胞外膜上的蛋白质(Stranahan, L W, et al, 2021, Yao, M, et al, 2022), 它们可以作为菌体的结构组成成分, 维持细胞的完整性和稳定性(王建玲, 2021)。此外, 这些外膜蛋白在布鲁氏菌的生存、致病性和免疫逃避等方面起着重要的作用(李瑞珍, 2022)。并且布鲁氏菌的外膜蛋白在疫苗研发和诊断方法的开发中还可以作为潜在的免疫原(Varikkodan, I, et al, 2024)。然而, 由于布鲁氏菌外膜蛋白结构复杂性种类多样, 其功能的研究目前还不是比较明确(Elbehiry, A, et al, 2023)。

1.1.3 BP26 蛋白的概述

1.1.3.1 BP26 基因大小、位置、理化性质

布鲁氏菌 BP26 蛋白也被称为 CP28 或 OMP28 (Azizpour, M M, et al, 2019), 主要存在于布鲁氏菌的外膜上, 具体来说外膜蛋白的一部分。布鲁氏菌的 BP26 基因全长

为 2,117,144 bp(2.1 Mb), 其分布在 I 号染色体 DNA 上, 起始位置是从染色体上的 558,481 至 557,732, BP26 基因由 750 bp 编码 250 Aa 的 BP26 蛋白, 推测分子大小(MW)为 26,552 Da, 等电点(pI)为 6.968(刘文兴, 2011, DelVecchio, V G, et al, 2002, Paulsen, I T, et al, 2002)。

1.1.3.2 BP26 蛋白的结构

1996 年, BP26 蛋白首次从布鲁氏菌 *S19* 基因组中利用分子生物学技术被分离出, 并且被推测可能是作为对不同动物布鲁氏菌病血清学的诊断的一种抗原。随着研究的不断深入, 在 2003 年, 研究人员使用特定的单克隆抗体和 DNA 重组技术成功克隆和表达了 BP26 蛋白, 分析了 BP26 蛋白的表位, 并发现 BP26 蛋白可以用于感染动物和接种疫苗动物之间的鉴别诊断。2013 年, 布鲁氏菌的外膜蛋白 BP26 被确定为主要的免疫显性抗原(Hans, R, et al, 2023), 并被广泛用于布鲁氏菌病的诊断标志物和疫苗接种(Genc, O, et al, 2012)。后来, 研究人员对其晶体结构进行更深入的研究, 通过电子显微镜分析发现, 八个 BP26 分子形成一个八聚体, 环绕中心形成一个空穴, 这一个八聚体结构在中心区域可以与另一个八聚体相互作用, 形成一个具有大内腔的筒状结构(图 1-1), 这对 BP26 蛋白的研究开辟了新思路。



图 1-1 BP26 的 3D 结构模型
Figure 1-1 3D structural model of BP26

1.1.3.3 BP26 蛋白的同源性

BP26 蛋白位于外膜表面, 它在布鲁氏菌的致病过程中发挥着重要的功能。在受感染的动物中, BP26 蛋白是免疫原性较好的抗原, 其诊断准确率达到 90 %以上(Genc, O, et al, 2012)。2011 年, 王军等人利用 GenBank 中的布鲁氏菌 BP26 基因设计了特异性引物, 并通过 PCR 扩增成功获取了 BP26 基因片段。后续, 他们对 BP26 的基因序列进行了比较分析, 得出结论, 在分离的菌株与参考菌株 *M5* 和 *S2* 的同源性为 100 %, 与参考菌株 *S19* 的同源性为 99.9 %, 结果表明这些基因在布鲁氏菌属中具有高度保守性(王军等, 2011), 该研究结果为进一步探究布鲁氏菌的遗传特性和种属鉴定提供了重要的数据支持。

1.1.3.4 BP26 蛋白的保守性

2013 年,刘文兴利用 DNASTAR 对 BP26 基因进行了分析,并对布鲁氏菌属、人苍白杆菌属、霍乱弧菌属、巴尔通体属的代表种进行了氨基酸序列同源性分析,通过比较不同细菌属的氨基酸序列,揭示了它们之间的相同和差异,在布鲁氏菌属细菌的各代表种中 BP26 蛋白是由高度保守的氨基酸组成,同源性达到了 97.6 %以上;与人苍白杆菌属和霍乱弧菌属代表种的同源性也超过 82 %;然而,与巴尔通体属代表种的同源性仅为 4.9 %,这一研究结果揭示了 BP26 蛋白在不同细菌之间的差异性,为布鲁氏菌及相关细菌的分类和鉴定提供了重要的参考依据(刘文兴, 2011)。

1.1.3.5 BP26 蛋白的功能

参与布鲁氏菌细胞的侵染:布鲁氏菌致病性的一个核心方面就是其在各种吞噬细胞和非吞噬细胞中入侵、黏附、复制的能力(Bialer, et al., 2020),BP26 蛋白是一种与细胞外基质(ECM)结合的蛋白质(ElTahir, Y,et al, 2019)。BP26 蛋白在促进布鲁氏菌与宿主细胞间的黏附和入侵起着重要的作用(ElTahir, Y,et al, 2020),这是布鲁氏菌感染过程中的关键步骤,使得布鲁氏菌能够进入宿主细胞内并建立感染(Marchesini, M I,et al, 2024)。此外,BP26 蛋白可能与其他蛋白质形成复杂的蛋白质网络,共同参与了这些过程。

参与免疫反应:BP26 蛋白是布鲁氏菌(*Brucella*)的外膜蛋白,它在布鲁氏菌感染的免疫反应中起到重要作用。当宿主感染布鲁氏菌时,免疫系统会产生针对 BP26 蛋白的免疫应答(Gupta, S,et al, 2019),BP26 蛋白可以激发宿主产生特异性抗体,抗体可以与 BP26 蛋白结合形成抗原-抗体复合物,当布鲁氏菌感染时,宿主免疫系统会识别 BP26 蛋白并产生特异性抗体,这些抗体可以通过多种机制来清除布鲁氏菌(Kazemi, D,et al, 2023),包括中和病原体、促进巨噬细胞吞噬和激活补系统等(Joshi, K,et al, 2024),以对抗布鲁氏菌的感染(Cloeckaert, A,et al, 2001)。

1.1.3.6 BP26 蛋白的应用

BP26 蛋白在布鲁氏菌病的治疗和诊断中发挥重要作用(Bai, Q,et al, 2021)。BP26 蛋白是一种重要的抗原蛋白可以作为布鲁氏菌感染的诊断标志物(Thepsuriyanont, P,et al, 2014),用于检测患者体液中的抗体水平,帮助医生进行疾病的诊断(Yin, D,et al, 2020)。此外,BP26 蛋白也被研究用于开发布鲁氏病的疫苗(Azizpour, M M,et al, 2019, Gupta, S,et al, 2019),通过诱导免疫系统产生针对 BP26 蛋白的抗体,从而增强机体对布鲁氏菌的免疫防御能力,达到预防和治疗的目的(Liu, W X,et al, 2011)。

1.2 抗体库展示技术的概述

随着分子生物学技术的不断发展,研究人员对于蛋白质工程和药物研发的需求日益

增加。在这一背景下,抗体库展示技术成为了一种重要的工具(Yang, Z,et al, 2023)。目前抗体库展示技术包含多种,其中最常用的包括噬菌体展示、酵母表面展示和核糖体展示。

噬菌体展示技术(Phage Display Technology)是通过利用噬菌体来作为载体展示蛋白质的一种技术(Chen, F,et al, 2024)。噬菌体是一种寄生于细菌中的病毒总称,它可以在感染细菌时将其自身基因组插入到宿主细菌的基因中并完成自身复制(Szadkowska, M,et al, 2023)。在噬菌体展示技术中,目标蛋白质或肽段的编码序列与噬菌体基因组中的外壳蛋白基因连接,形成噬菌体展示文库(Baurand, P E,et al, 2023)。随后,噬菌体感染宿主细菌,外壳蛋白与目标蛋白质或肽段相连,使其展示在噬菌体表面表达(范佳铭等, 2024, Lim, H T,et al, 2023),被展示的蛋白质具有较好的空间结构和生物活性,与天然的蛋白质结构十分相似(Frenzel, A,et al, 2016)。

酵母展示技术(Yeast Display Technology)是利用酵母细胞表面蛋白质与目标蛋白质相连,实现在酵母细胞表面展示的目的(Ming, K,et al, 2023)。酵母细胞作为真核细胞,具有复杂的细胞表面结构和后续的蛋白质修饰系统,使得酵母展示技术可以更好地模拟蛋白质的自然结构和功能(Cherf, G M,et al, 2015),酵母的细胞壁比较厚,一般为 0.1-0.3 μm ,对培养环境的适应力更强(Poulton, J S,et al, 2024)。在酵母展示技术中,目标蛋白质或肽段的编码序列与酵母表面蛋白质基因连接,形成酵母展示文库(Mei, M,et al, 2024)。

核糖体展示技术(Ribosome Display Technology)作为一种新型的蛋白质展示技术被广泛应用,其原理是利用核糖体复合物将蛋白质或肽段直接展示在核糖体上,经过多轮筛选,可以获得相应的抗体。与其他展示技术不同,核糖体展示技术可以在无需抗体或细胞表面蛋白质的情况下,直接展示蛋白质或肽段,并进行筛选和优化。

1.2.1 核糖体展示技术原理

核糖体展示技术基本原理是将目标蛋白质或肽段的编码序列与核糖体 RNA(rRNA)连接,形成核糖体展示文库(Zhao, X L,et al, 2009)。通过在核糖体上进行体外蛋白质的合成,将蛋白质或肽段与核糖体复合物结合,并形成稳定的 mRNA-核糖体-蛋白质三元复合物(Jia, B,et al, 2024)。随后,通过适当的筛选步骤,可以筛选出具有结合能力的蛋白质或肽段,核糖体展示技术可以实现高通量的抗原结合筛选,从而加快抗体或蛋白质的鉴定和优化过程,还可以通过基因工程技术对抗体或蛋白质进行定制,包括引入特定的突变或融合其他功能,以满足文库多样性的需求(Nakazawa, H,et al, 2023)。此技术可以完全在体外进行,避免了在生物细胞中的转化等步骤的进行,并且还可以进行毒素(Pacheco, S,et al, 2014)、对蛋白酶敏感和非天然或经化学修饰氨基酸的蛋白分子的筛选(Manandhar, Y,et al, 2017),并且在筛选中,利用 PCR 反应的突变技术,可以更好的提

升亲和力(Liu, Z Q, et al, 2005)。然而在筛选时,有时展示的蛋白质可能缺乏特异性,导致筛选出的结果不够准确有效,并且核糖体展示技术中对插入序列的长度和结构有一定的限制,可能会限制某些复杂或大型蛋白质的展示和筛选。

1.2.2 核糖体展示技术流程

核糖体展示技术的基本流程包括以下几部分(图 1-2):

(1) 构建核糖体展示文库:首先,根据需要展示的蛋白质或肽段的编码序列,将其与核糖体结合区域的基因连接。这样可以构建一个包含大量具有不同蛋白质或肽段编码序列的核糖体展示文库,为增加展示文库的库容,可以选择利用 NNN 法进行随机合成(Jia, B, et al, 2024)。

(2) 体外转录翻译:将核糖体展示文库中的 DNA 模板转录成 mRNA,并将其加入到体外翻译系统中。体外翻译系统包括核糖体、tRNA 和其他必要的蛋白质合成因子。

(3) 核糖体展示:在体外翻译过程中,核糖体会与 mRNA 模板结合,并且会通过 tRNA 转运子将特定氨基酸带入到蛋白质合成中。

(4) 筛选:根据需要,可以通过特定的方法筛选出具有结合能力蛋白质或肽段,筛选方式包括固相筛选和液相筛选(Jia, B, et al, 2024)。固相筛选时多用酶标板进行,但筛选目的蛋白结合时,可能存在与塑料表面的疏水作用,导致吸附在酶标板上的蛋白天然构象发生改变,筛选效率变低;液相筛选时则使用磁珠进行筛选,将目的蛋白吸附在磁珠上,可以较好的保证蛋白质的状态,筛选效率比较高。

(5) 验证与优化:筛选后的蛋白质或肽段可以进一步验证其结合能力,并根据需要进行优化,包括亲和力的增强、亚库筛选或其他改造方法。

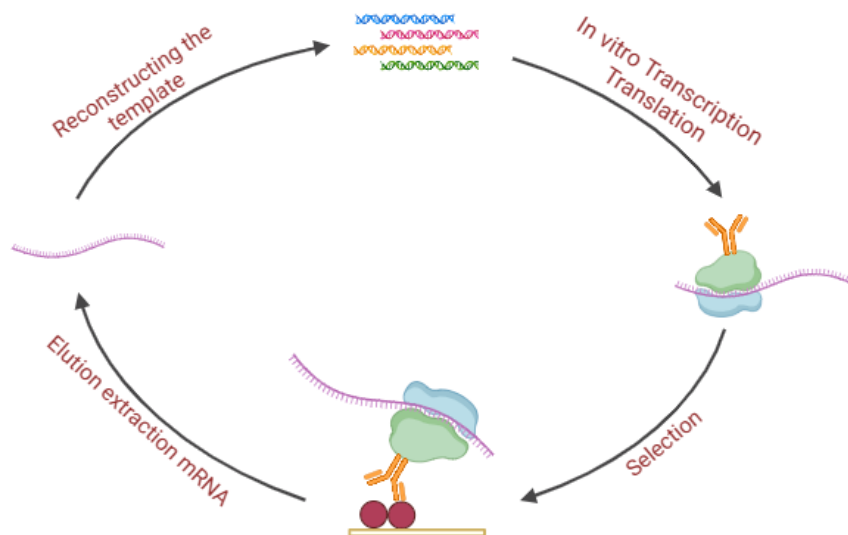


图 1-2 核糖体展示筛选过程

Figure 1-2 Ribosome display screening process

核糖体展示过程中,需要几个重要的元件来保证筛选出特异性更强的蛋白质(图 1-3),该模板主要由启动子(Promoter)、5'端的茎环结构(Stem-loop structure)、核糖体结合

位点(Ribosome Binding Site, RBS)、多克隆位点(Multiple Cloning Site, MCS)、目的基因序列、间隔区序列(Spacer Sequence)和 3'端的茎环结构构成, 这些元件在核糖体展示过程中缺一不可。启动子是一段可以与 RNA 聚合酶识别结合后开始进行转录的 DNA 序列, 可以增强转录反应, 产生更多的 mRNA; 茎环结构可以通过干扰 RNA 与蛋白的结合, 从而调节 RNA 的稳定性, 保证更好的进行转运, 从而防止 RNA 的降解; 核糖体结合位点是 mRNA 上的一段特定序列, 通过与核糖体上的 16SrRNA 互补配对, 帮助核糖体正确定位到起始位点, 保证 mRNA 可以在体外进行有效的翻译; 多克隆位点用于克隆和插入外源的 DNA 片段, 方便进行基因工程和分子生物学的研究, 对于后续目的基因的研究提供了基础; 间隔区序列可以使目的蛋白质进行正确的折叠, 并可与配体相互作用, 最终筛选出特异性的蛋白质, 保证蛋白质结构的稳定; 由于在设计元件时不引入终止密码子, 因此体外转录翻译时核糖体会停留在 mRNA 的 3'端, 并且编码的蛋白质也不会释放, 从而形成了 mRNA-核糖体-蛋白质这个稳定的三元复合物。

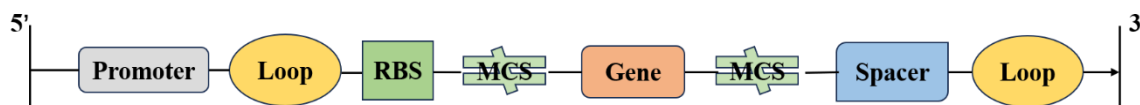


图 1-3 核糖体展示元件
Figure 1-3 Ribosome display elements

1.2.3 核糖体展示技术的应用

核糖体展示技术在蛋白质研究中应用广泛, 以下是一些核糖体展示技术的应用领域:

(1) 肽库筛选: 核糖体展示技术可以用于筛选具有特定功能的肽序列, 例如药物靶点识别(Dotter, H, et al, 2021)、酶抑制剂、细胞内信号传导等(Furuhashi, T, et al, 2023)。通过核糖体展示技术展示肽库中的肽序列, 可以筛选出具有特定结合活性或生物活性的肽分子。

(2) 蛋白质相互作用的研究: 核糖体展示技术在鉴定和研究蛋白质与其他的分子之间的相互作用也有应用(Ghani, S, et al, 2023, Tsuihiji, K, et al, 2022)。通过核糖体展示技术展示蛋白质库中的蛋白质变异体(Kong, W, et al, 2019), 可以筛选出与特定配体或蛋白质相互作用的蛋白质(Nakazawa, H, et al, 2023)。

(3) 蛋白质工程: 核糖体展示技术可以用于改造和优化蛋白质的性质和功能。通过核糖体展示技术展示蛋白质库中的蛋白质变异体(Li, D, et al, 2022), 可以筛选出具有特定性质的蛋白质。

(4) 抗体筛选: 核糖体展示技术用于筛选和优化高亲和力的抗体(Kunamneni, A, et al, 2023), 通过核糖体展示技术展示抗体库, 可以选择性地筛选出与目的抗原结合的抗体(Ghani, S, et al, 2024), 并进行亲和力的优化和功能改造(Chen, Y, et al, 2023)。

(5) 疫苗研究: 核糖体展示技术可以用于筛选和设计具有免疫原性的抗原或肽段, 用于疫苗研究和开发(Buzas, D, et al, 2023)。通过核糖体展示技术展示抗原库中的抗原肽

段(Garg, et al,2023), 从而可以选择性地筛选出具有免疫原性和免疫活性的肽段(Frank, A M,et al, 2020)。

1.3 研究目的和意义

布鲁氏菌病是一种慢性的细菌性传染病，广泛存在于牛、羊、猪等家畜以及人类中，对畜牧业和人类健康造成了严重威胁。随着经济发展和贸易增加，布鲁氏菌病的发病率呈上升趋势，但目前缺乏特效药物。因此，预防成为当前控制该病的主要手段。本研究选取了布鲁氏菌优势抗原 BP26 作为靶点，利用核糖体展示技术筛选并获得针对 BP26 的纳米抗体，为布鲁氏菌病的预防和治疗提供了新的思路和方法。

第二章 BP26 蛋白的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备

本章选取布鲁氏菌的优势抗原 BP26，设计特异性引物，通过 PCR 扩增的方式获得目的片段，再插入到 pET-28a 载体中，构建 pET-28a-BP26 重组蛋白，对重组蛋白进行诱导，选择最优诱导条件并进行亲和纯化，将纯化获得的目的蛋白与弗式佐剂充分混合后免疫实验动物家兔，获得多克隆抗体，并对三次免疫后的血清中的抗体进行效价测定，为后续筛选 BP26 蛋白的纳米抗体做好材料准备。

2.1 材料

2.1.1 载体、菌种、动物

本研究所用载体 pET-28a 和菌种大肠杆菌均来自实验室保存，实验动物(家兔)购买自辽宁长生生物技术股份有限公司。

2.1.2 试剂

2.1.2.1 商品化试剂

表 2-1 试剂
Table 2-1 Reagents

试剂名 Reagent name	生产厂家 Manufacturer
BL21(DE3)	北京全式金生物技术股份有限公司
固体培养基预混粉	北京索莱宝科技有限公司
PCR 酶	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
琼脂糖	莫纳生物科技有限公司
50×TAE	北京索莱宝科技有限公司
Good view	北京赛百盛基因技术有限公司
OXOID 酵母粉	Thermo Fisher Scientific Inc
OXOID 胰蛋白胨	Thermo Fisher Scientific Inc
氯化钠	西陇科学股份有限公司
30 %制胶液	北京索莱宝科技有限公司
1.5 M Tris-HCl(PH8.8)	北京索莱宝科技有限公司
1 M Tris-HCl(PH6.8)	北京索莱宝科技有限公司
TEMED	碧云天生物技术
SDS	北京索莱宝科技有限公司
TE 缓冲液	北京索莱宝科技有限公司
彩色凝胶染色液	武汉赛维尔生物科技有限公司
氯化钠	西陇科学股份有限公司
氯化钾	西陇科学股份有限公司
咪唑	西陇科学股份有限公司

第二章 BP26 蛋白的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备

试剂名 Reagent name	生产厂家 Manufacturer
PMSF	北京索莱宝科技有限公司
乙醚	西陇科学股份有限公司
弗氏不完全佐剂	北京博奥龙免疫技术有限公司
弗氏完全佐剂	北京博奥龙免疫技术有限公司
PBS 预制粉	北京索莱宝科技有限公司
新霉素	生工生物工程(上海)股份有限公司
IPTG	生工生物工程(上海)股份有限公司
甲醇	西陇科学股份有限公司
乙醇	西陇科学股份有限公司
冰醋酸	西陇科学股份有限公司
SDS	北京索莱宝科技有限公司
甘油	西陇科学股份有限公司
溴酚蓝	北京索莱宝科技有限公司
β -巯基乙醇	北京索莱宝科技有限公司
Tris	北京索莱宝科技有限公司
硫酸卡那霉素	生工生物工程(上海)股份有限公司
吐温-20	生工生物工程(上海)股份有限公司
R250	北京索莱宝科技有限公司
G250	北京索莱宝科技有限公司
EDTA	北京索莱宝科技有限公司
磷酸二氢钾	西陇科学股份有限公司
硫酸镁	西陇科学股份有限公司
硫酸镍	西陇科学股份有限公司
HRP 标记小鼠抗 His 单克隆抗体	生工生物工程(上海)股份有限公司
HRP 标记山羊抗兔 IgG	生工生物工程(上海)股份有限公司
HRP 标记兔抗小鼠 IgG	生工生物工程(上海)股份有限公司
质粒小提试剂盒	Thermo Fisher Scientific Inc
胶回收试剂盒	Thermo Fisher Scientific Inc
清洁试剂盒	爱思进生物技术(杭州)有限公司
可溶型单组分 TMB 底物溶液	天根生化科技(北京)有限公司
Pierce™ BCA 蛋白检测试剂盒	Thermo Fisher Scientific Inc

2.1.2.2 溶液配制

- (1) PBS: 取 PBS 粉末溶解于 1 L 的去离子水中, 4 °C 保存。
- (2) 0.1 M PMSF(苯甲基磺酰氟): 0.871 g PMSF 粉末溶于异丙醇溶液中, 定容至 50 mL。
- (3) 脱色液: 100 mL 冰醋酸、200 mL 无水乙醇, 加水定容至 1 L。
- (4) 5×电泳缓冲液 15.1 g Tris、94 g Gly、5 g SDS, 加水定容至 1 L。
- (5) PBST: 取 PBST 粉末溶解于 1 L 的去离子水中, 4 °C 保存。
- (6) Binding buffer(A Buffer): 20 mM Tris、0.5 M NaCl、30 mM 咪唑, pH 7.4。

- (7) Elution buffer(B Buffer): 20 mM Tris、0.5 M NaCl、0.5 M 咪唑, pH 7.4。
- (8) EDTA Buffer: 20 mM Tris、500 mM NaCl、50 mM EDTA, 溶于水, pH 7.4。
- (9) 咪唑 Buffer: 20 mM Tris、500 mM NaCl、500 mM 咪唑, 溶于水。
- (10) 0.1 M 硫酸镍溶液: 称取 13.14 g 硫酸镍晶体, 放入到 450 mL 去离子水中, 充分溶解后定容至 500 mL。
- (11) 1.2 %琼脂糖凝胶: 称取 2.4 g 琼脂糖粉末, 加入 1×TAE 定容到 200 mL, 加热充分溶解至溶液变成透明, 并产生较大气泡, 停止加热, 加入 20 μ L 核酸染料, 摇晃均匀后, 用封口膜封好放到避光处保存。
- (12) 新霉素(50 mg/mL): 0.5 g 硫酸新霉素粉末溶于 10 mL 高压去离子水, 过滤后使用。

2.1.3 耗材

表 2-2 耗材
Table 2-2 Consumables

耗材 Consumables	生产厂家 Manufacturer
1.5 mL、2 mL、5 mL、15 mL 离心管	兰杰柯科技有限公司
PCR 管	兰杰柯科技有限公司
1 mL、200 μ L、10 μ L 枪头	兰杰柯科技有限公司
枪头盒	南通冷欣生物科技有限公司
一次性培养皿	江苏晟康医疗用品有限公司
试管	天津天玻科技发展有限公司
一次性封口膜	parafilm
玻璃大平皿	昭昇玻璃科技有限公司
滤器	兰杰柯科技有限公司
50 mL、250 mL、500 mL 离心瓶	Thermo Fisher Scientific Inc
巴氏吸管	兰杰柯科技有限公司
50 mL、100 mL、250 mL 烧杯	四川蜀玻(集团)有限责任公司
涂布棒	泰州市智银丰实验器材有限公司
一次性注射器	江西丰临医用器械有限公司
脱脂棉	江西省华中纺织有限公司
防咬手套	临沂焊途安全科技有限公司
毛细管	南通医太科学仪器制造商
离心管架	海门市瑞博实验器材厂
医用三通	尚芯(衢州)医疗器械有限公司
HisTrap FF 预装柱	Cytiva
玻璃三角烧瓶	蜀牛玻璃仪器有限公司
涂布棒	蜀牛玻璃仪器有限公司
吊菌环	比克曼生物科技有限公司

2.1.4 仪器设备

表 2-3 仪器设备
Table 2-3 Instruments and equipments

设备名称 Equipment name	生产厂家 Manufacturer
水浴锅	国华电器有限公司
制冰机	上海比朗仪器制造有限公司
移液器	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
超净工作台	青岛海尔生物医疗股份有限公司
恒温摇床	苏州捷美电子有限公司
PCR 仪	Thermo Fisher Scientific Inc
纯水仪	RODI
低温超声破碎仪	聚能纳米生物科技有限公司
照胶仪	Omega
核酸电泳槽	北京市六一仪器厂
微波炉	格兰仕
电磁炉	美的
酶标仪	BioTek Instruments Inc
台式低温高速大容量离心机	Thermo Fisher Scientific Inc
涡旋振荡仪	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
低温超高压破碎仪	广州聚能纳米生物科技股份有限公司
蠕动泵	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
小型离心机	Thermo Fisher Scientific Inc
低温超高压破碎仪	广州聚能纳米生物科技股份有限公司
超声破碎仪	上海之信仪器有限公司
AKTApure	Cytiva
小型垂直电泳槽	Bio-Rad Laboratories
37 °C恒温培养箱	Thermo Fisher Scientific Inc
高速离心机	Thermo Fisher Scientific Inc
移液器	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
伯乐 Trans – Blot 半干转	Bio-Rad

2.2 方法

2.2.1 重组表达载体的构建

2.2.1.1 引物设计与合成

根据布鲁氏菌 BP26 核酸序列设计引物，并通过 NCBI 网站的 Primer-Blast 进行引物特异性比对，显示引物特异性良好，随后送至上海生工生物进行合成，引物的序列如下表 2-4。

表 2-4 引物设计
Table 2-4 Primer design

名称 Name	序列(5'-3') Suquence(5'-3')
BP26-F	tttt <i>CATATGC</i> AGGAAAACCAGATGACCACC
BP26-R	tttt <i>CTCGAG</i> TTTGATTTCGAAAACAACGTT

注：tttt：保护碱基；斜体字：酶切位点；

2.2.1.2 目的基因的扩增及回收

将合成的上下游引物 4000 rpm 离心 2 min 后，用 TE 缓冲液稀释到 10 μ M 作为储液浓度，进行反应体系的配制并进行 PCR 扩增，体系和反应程序如下表 2-5 和 2-6。

表 2-5 PCR 反应体系
Table 2-5 PCR reaction systems

组成 Composition	用量(μ L) Dosage(μ L)
BP26-F	1
BP26-R	1
2 $\times$ Primer Star Mix	10
dd H ₂ O	7
模板	1

表 2-6 PCR 反应程序
Table 2-6 PCR reaction procedures

程序 Program	温度 Temperature($^{\circ}$ C)	时间 Time	循环次数 Cycle index
预变性	95	3 min	1
变性	95	15 s	35
退火	58	15 s	35
延伸	72	30 s	35
再延伸	72	5 min	1

将提前配好的 1.2 %琼脂糖凝胶加热融化后，倒入已提前放好托胶板和梳子的制胶架中，待琼脂糖凝胶完全凝固后，取下梳子，将凝胶和托胶板一起转移到电泳槽中，电泳槽中提前加入能没过凝胶厚度的 1 $\times$ TAE 溶液，用移液器依次加入 DNA Marker(4 μ L)、阴性对照(5 μ L)和待检样本(5 μ L)到凝胶梳孔中，调整电源 120 V，时间 25 min 进行琼脂糖凝胶电泳，电泳结束后，观察结果，并进行结果的存储和记录。

将电泳后的 PCR 产物使用胶回收试剂盒进行回收，回收过程如下：

(1) 先用干净的手术刀片，在紫外灯光下切下含有荧光绿色的目的基因凝胶块，将凝胶放入已预先称重的 1.5 mL 离心管中，通过两次天平显示的差值，计算出凝胶的重量；

(2) 向 1.5 mL 离心管中按照体积：重量为 1：1 的比例加入试剂盒提供的结合液；

(3) 将上述含有凝胶的离心管在 56 $^{\circ}$ C 条件下放置，期间可以进行上下颠倒混匀，加快凝胶融化速度，直至胶块完全溶解；

- (4) 将溶解的凝胶溶液转移到含有吸附柱的收集管中，使用 $12000\times g$ 的离心力，离心 1 min，取下吸附柱，倒掉收集管中流出液后，将吸附柱重新放入收集管中；
- (5) 向吸附柱中加入 700 μL 漂洗液，再次使用 $12000\times g$ 的离心力，离心 1 min，倒掉流出液，并将吸附柱重新放回收集管中；
- (6) 将空的收集管 $12000\times g$ 的离心力，离心 1 min，以完全除去残留的漂洗液；
- (7) 将吸附柱放入新的 1.5 mL 离心管中，再向吸附柱中央的膜上加入 50 μL 已经提前回温至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的洗脱液， $12000\times g$ 离心 1 min；
- (8) 弃掉吸附柱，离心留下的 DNA 储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.1.3 质粒的提取

取实验室保存的含 pET-28a 的大肠杆菌，在超净工作台取 50 μL 菌液加入到 LB 液体培养基中， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 条件下过夜培养。次日，按照说明书进行质粒的提取。

质粒小提步骤如下：

- (1) 取过夜培养的菌液，5000 rpm 离心 10 min，保留沉淀，用 250 μL 重悬液，将收集的菌底重悬，此过程要重悬充分，避免有细胞团块；
- (2) 向细胞重悬液中加入 250 μL 裂解液，缓慢混匀离心管 5 次，使裂解更完全；
- (3) 再加入 350 μL 中和液，立即颠倒离心管 5 次；
- (4) $13000\times g$ 离心 5 min，彻底除去细胞碎片和染色体 DNA；
- (5) 将离心后上清液转移到离心柱中，避免吸入白色沉淀；
- (6) 离心 1 min，将离心出的流穿液倒掉，将离心柱重新放回到收集管中；
- (7) 加入 500 μL 漂洗液， $13000\times g$ 离心 30 s，倒掉流穿液，将离心柱重新放回收集管中；
- (8) 用 500 μL 漂洗液重复上述步骤一次；
- (9) 弃掉流穿液后，将离心管空离 1 min，以便彻底弃除残留的漂洗液；
- (10) 将离心柱放入到新的 1.5 mL 离心管中，向离心柱的膜中央加入 50 μL 预先热处理的洗脱液，室温下放置 2 min 后以 $13000\times g$ 的离心力离心 2 min；
- (11) 弃掉离心柱，将提纯的质粒 DNA 储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.1.4 双酶切

将胶回收的目的片段和提取的质粒冰上放置融化后，加入限制性内切酶和 Buffer，再将混合体系置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 金属浴酶切 3 h，酶切体系如下表 2-7 和 2-8。

表 2-7 目的片段酶切体系
Table 2-7 Target fragment digestion system

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
BP26	10
<i>Nde</i> I	2
<i>Xho</i> I	2
10×Qcut Buffer	2
dd H ₂ O	4

表 2-8 载体酶切体系
Table 2-8 Carrier enzyme digestion system

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
pET-28a	14
<i>Nde</i> I	2
<i>Xho</i> I	2
10×Qcut Buffer	2

将酶切后的载体使用胶回收试剂盒进行载体的回收，步骤同 2.2.1.2。

酶切后目的片段用清洁试剂盒进行清洁，清洁试剂盒步骤如下：

(1) 向反应后的体系中加入 3 个体积的 Buffer PCR-A(如果 Buffer PCR-A 的总体积不足 100 μL ，则加至 100 μL)，均匀混合后，转移到收集管中，11000×g 离心 60 s，弃掉流出液；

(2) 将离心柱放回收集管中，加入 700 μL Buffer W2 concentrate，11000×g 60 s 离心，弃掉流出液；

(3) 将离心柱放回收集管中，加入 400 μL Buffer W2 concentrate，11000×g 60 s 离心，弃掉流出液；

(4) 11000×g 离心 120 s，目的是防止体系中还有残留的乙醇影响 DNA 的纯度；

(5) 将离心柱放于新的 1.5 mL 离心管中，向膜中央加 20 μL 已经预热处理的洗脱液，室温静置 60 s 后，11000×g 60 s 离心洗脱 DNA；

(6) 将清洁后产物放-20 °C保存。

2.2.1.5 连接

将处理好的目的片段和载体 16 °C进行过夜连接，连接体系如下表 2-9。

表 2-9 连接体系
Table 2-9 Connection System

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
酶切后 BP26	3
酶切后 pET-28a	15
T4 连接酶	1
10×T4 Buffer	2.5
dd H ₂ O	3.5

2.2.1.6 转化

取过夜连接后的产物 5 μL ，转化到 BL21(DE3)中，转化步骤如下：

- (1) 将储存在- 80 $^{\circ}\text{C}$ 取出的 BL21(DE3)感受态细胞放在冰上使其融化；
- (2) 用移液器吸取 7 μL 连接后的产物，缓慢的加入到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中，冰浴 30 min；
- (3) 30 min 后，将混合物放入 42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 90 s，热激后再放回冰上冰浴 5 min；
- (4) 在超净工作台中吸取 LB 培养液 600 μL 加入到混有连接产物的感受态细胞中，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 的摇床中培养 1.5 h；
- (5) 培养后放入离心机中，4000 rpm，离心 5 min；
- (6) 将装有感受态细胞的 1.5 mL 离心管放入超净工作台中，弃掉 550 μL 上清液；
- (7) 用 200 μL 移液器将剩余溶液和菌体沉淀吹打混匀，转移到固体培养基中，涂抹至固体培养基表面无液体流动，倒置放于恒温培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h。

2.2.1.7 重组表达载体的验证

(1) PCR 验证

在超净工作台中用接种环尖端挑取转化后的单菌落，转移到如下预混体系中，退火温度 55 $^{\circ}\text{C}$ ，延伸时间 35 s，其它程序同表 2-5，进行 PCR 验证，验证体系见表 2-10。

表 2-10 PCR 验证体系
Table 2-10 PCR validation system

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
T7	1
T7t	1
2 $\times$ Taq Master Mix	10
dd H ₂ O	7
模板	7

(2) 双酶切验证

将 PCR 验证成功的单菌落在超净工作台中转移到终浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin 的培养基中过夜培养，次日取出菌液按照 3.2.1.3 中方法提质粒，使用 *Nde* I 和 *Xho* I 按照如下体系再次酶切，酶切操作同 3.2.1.4，酶切体系见表 2-11。

表 2-11 双酶切验证体系
Table 2-11 Double digestion validation system

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
pET-28a-BP26 重组质粒	10
<i>Nde</i> I	1
<i>Xho</i> I	1
dd H ₂ O	1.5
10 $\times$ Qcut Buffer	1.5

(3) 测序验证

将上述两种方法验证成功的菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

2.2.2 重组蛋白诱导表达

将鉴定成功的菌落用接菌环接种到含有 Kanamycin 的 LB 液体培养基进行单菌落的扩大培养。在超净工作台中取 300 μL 培养好的菌液进行光密度检测, 当 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 达到 0.6-0.8 时, 在超净工作台中, 取 1 mL 其中一管菌液放于离心管中, 制诱导前蛋白样, 其余菌液加入终浓度为 1 mM 的 IPTG 溶液, 并进行标记。将标记后的样本分别置于不同的温度条件下: 16 $^{\circ}\text{C}$ 、160 rpm; 25 $^{\circ}\text{C}$ 、160 rpm; 37 $^{\circ}\text{C}$ 、160 rpm, 并按照所需的诱导时间进行诱导(分别为 14 h、10 h、5 h)。次日, 取出各个诱导条件下的菌液, 转移到 5 mL 离心管中, 12000 rpm 离心 10 min, 弃掉上清液, 保留离心管中的菌体沉淀, 使用 1 mL PBS 吹打混匀, 将混合均匀后的菌液放置于冰盒上, 用超声破碎仪进行破碎, 工作 5 s, 休息 10 s, 重复操作 30 次。全部破碎完成后, 为避免蛋白的降解从而选择使用低温离心, 离心机设置为 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 $\times g$, 离心 5 min, 取 80 μL 上清液转移至干净的 1.5 mL 离心管中, 弃掉余下上清液, 再用 1 mL PBS 将沉淀吹打混匀, 取 80 μL 重悬的沉淀混合液, 做好标记, 加入 20 μL 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液。将未诱导的菌液进行离心, 8000 rpm, 离心 10 min, 保留菌体沉淀, 加入 100 μL 1 $\times$ 上样缓冲液充分重悬沉淀, 将装有制备好蛋白样的离心管放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 的金属浴中进行加热处理, 加热时间为 10 min, 使用离心机设定为 8000 rpm, 进行离心处理, 离心时间为 10 min, 将处理好的蛋白样暂放 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

配制聚丙烯酰胺凝胶, 组成成分见表 2-12 和 表 2-13。加入分离胶溶液后, 加入 1 mL 无水乙醇, 由于两种溶液的密度不同, 无水乙醇会全部位于分离胶上面, 使液面平齐, 待无水乙醇下的液面不流动, 用滤纸吸去多余的无水乙醇, 然后加入配置好的上层胶溶液, 并尽快插入所需孔数的加样梳, 放在水平的桌面上等待蛋白胶的凝固。凝固后安装电泳设备, 在内槽中加满电泳液, 外槽中将电泳液补齐至指定高度。拔出加样梳, 先加入 4 μL 蛋白 Marker, 再取 10 μL 离心后的蛋白样上清液依次加入蛋白胶中。连接好电源, 进行电泳。先 80 V 电泳 30 min, 将蛋白样品中的指示剂溴酚蓝从浓缩胶移动到分离胶液面, 切换至 120 V 电泳 60 min。小心取出凝胶, 用切胶铲切去边缘多余凝胶后, 放入到考马斯亮蓝染色液中进行染色, 常温水平摇床染色 15 min, 用水清洗掉多余的考马斯亮蓝染色液, 再转入脱色液中直至能明显看出条带。

表 2-12 浓缩胶溶液
Table 2-12 Stacking gel solution

各组分名称 Name of each component	含量(mL) Content(mL)
H ₂ O	1.1
30 % Acrylamide	2.5
1.5 M Tris-HCl(PH 8.8)	1.3
10 % SDS	0.05
10 % APS	0.05
TEMED	0.002

表 2-13 分离胶溶液
Table 2-13 Separation gel solution

各组分名称 Name of each component	含量(mL) Content(mL)
H ₂ O	1.4
30 % Acrylamide	0.33
1.0 M Tris-HCl(PH 6.8)	0.25
10 % SDS	0.02
10 % APS	0.02
TEMED	0.002

2.2.3 重组表达蛋白的纯化

2.2.3.1 样品预处理

(1) 进行大量培养前, 先培养 2 管 5 mL 的小试管菌液, 过夜培养使菌液变浑浊。在 1 L LB 液体培养基中分别加入终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 Kanamycin 的 LB 液体培养基进行单菌落的扩大培养, 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 培养 3 h; 3 h 后在超净工作台中取出 300 μL 的菌液放入酶标板中, 在 OD_{600nm} 吸光度下测值, 待测出的值在 0.6-0.8 时, 即可进行诱导表达, 加入 1 mL IPTG, 放入 25 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中 160 rpm 培养 10 h;

(2) 将诱导完成的菌液转到 500 mL 离心瓶, 5000 rpm, 离心 20 min, 保留离心后的菌底;

(3) 用约 50 mL PBS 溶解沉淀后转移到超速离心管中 12000 rpm, 离心 15 min, 弃掉上清液, 目的是洗掉多余残留的培养基(期间进行超低温细胞破碎仪的清洗, 首先将 20 % 的乙醇溶液排空, 后将机器内灌满过滤后的去离子水清洗机器三次, 最后一次用 A Buffer 进行润洗, 清洗过程中要保持压力为不高于 500 Pa, 使用后的处理步骤是先用过滤水清洗, 最后保存在 20 % 的乙醇中);

(4) 用约 30 mL A Buffer 溶解沉淀转移到超低温细胞破碎仪中, 加入 300 μL PMSF;

(5) 将机器调整至 1248 Pa, 进行破碎, 直至液体变得不再粘稠透亮;

(6) 将破碎后的菌液转入 50 mL 高速离心瓶中, 利用超速离心机 4 $^{\circ}\text{C}$, 13000 rpm, 离心 30 min, (低温的目的是防止蛋白降解, 超速可以使菌更充分的沉淀, 保证上清液的

中无破碎后的菌体)小心吸取上清液;上清液用 0.45 μm 的滤器过滤,保留过滤后的液体进行后续实验。

2.2.3.2 上样

(1) 蠕动泵处理预装柱:先用 0.22 μm 滤器过滤好的蒸馏水以 2 mL/min 的流速清洗 5 个柱体积,将预装柱里的 20 %乙醇冲洗干净,再用 A Buffer 以同样的流速将预装柱内充满 A Buffer,使得预装柱内的 Buffer 和上清液的 Buffer 一致。

(2) 上样:将蠕动泵速度调整至 1 mL/min 进行上样,使目的蛋白和标签填料可以更好的结合,并分别取上样前和流穿液制作蛋白样。

2.2.3.3 程序设置

按照预先设计好的程序进行梯度洗脱,洗脱程序如表 2-14。

表 2-14 程序设置
Table 2-14 Program Settings

	Type	Target % B(0-100)	Length(CV)
1	Step	5	5
2	Step	10	5
3	Liner	100	15

在冲洗完系统 A/B 泵后,连接预装柱,按设定程序进行洗脱,将洗脱完成后的蛋白进行 SDS-PAGE 验证。

2.2.3.4 预装柱的处理

将使用后的预装柱连接到蠕动泵上,调整流速 2 mL/min,所有经过柱子的溶液均需使用 0.22 μm 滤器过滤,切换溶液时均须暂停蠕动泵,以防止预装柱进气泡,按如下顺序表 2-15 处理柱子:

表 2-15 程序设置
Table 2-15 Program Settings

Step	Buffer	Length(CV)
1	dd H ₂ O	5
2	EDTA Buffer	5
3	dd H ₂ O	5
4	0.5 M NaOH	5
5	dd H ₂ O	5
6	0.1 M NiSO ₄	5
7	dd H ₂ O	5
8	Imidazole Buffer	5
9	dd H ₂ O	5

处理完成后保存在 20 %乙醇中接好柱子接口,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置保存。

2.2.3.5 蛋白浓缩换液

(1) 浓缩

由于 BP26 蛋白在天然状态下容易形成 8 聚体, 形成 8 聚体后蛋白为 200 kDa 左右, 超滤浓缩管的选择原则是不超过蛋白的 1/3, 根据实验室现有的条件, 选择 50 kDa 的超滤浓缩管, 可以把分子量小的杂蛋白滤除。取出 4 °C 保存的浓缩管, 将浓缩管内 20 % 乙醇倒掉, 用超纯水反复冲洗后离心两次以去除残留的 20 % 乙醇溶液。离心机提前预冷到 4 °C, 将纯化得到的蛋白转移至浓缩管中(加入的蛋白量不宜过多), 4 °C 3200 rpm 离心 5 min。取 200 μ L 1 $\times$ 考马斯亮蓝 G250 加入 1.5 mL 离心管中, 然后取浓缩管滤出液 50 μ L 加入到离心管中, 混匀后, 若 G250 不变蓝, 则说明浓缩管不漏液, 否则需要更换新的浓缩管。确定浓缩管不漏液后, 继续浓缩, 将两管蛋白总量浓缩至 1 mL 左右时结束浓缩。此过程需要全程保持低温在 4 °C 条件下离心。

(2) 换液

加上载体的 His 标签后, 该蛋白的等电点为 5.81, 选择与等电点相差 2 个 pH 左右的置换液会使蛋白较为稳定, 不易析出, 因此选择 pH 8.0 的 PBS 盐溶液(0.22 μ m 滤器过滤后使用)。本实验采取浓缩换液的方式置换, 取上述两管含有 1 mL 浓缩后蛋白的浓缩管, 首次先取 100 μ L 置换液, 用移液器缓慢地加入蛋白溶液中, 4 °C 3200 rpm 离心, 待离心至溶液剩余 1 mL 时, 再次重复上述操作。如果蛋白未发现析出, 后续可以将置换液缓慢从 200 μ L 加至 1 mL, 直到加入的置换液将蛋白原 Buffer 稀释到 500 倍以上时, 可以结束换液, 将置换后的蛋白用移液器吸出后加入适量高压后的甘油溶液, 液氮速冻后转移至 -80 °C 储存。

(3) 浓缩管处理

使用后的浓缩管, 用超纯水冲洗, 用移液器小心吹打, 以防蛋白碎片残留堵塞滤膜, 完成后将浓缩管转移至 0.1 M NaOH 溶液中浸泡 0.5 h 以上, 取出处理后的浓缩管, 放入到过滤好的蒸馏水中浸泡, 浸泡处理完成后, 离心三次后控干水分, 将浓缩管浸泡到 20 % 乙醇中, 放 4 °C 储存。

2.2.3.6 蛋白浓度的测定

按照 Thermo Pierce™ BCA 蛋白检测试剂盒说明书进行蛋白浓度的测定。最终经计算测得蛋白样品 OD_{562nm} 处 OD 值为 0.687 和 0.685, 经计算蛋白实际浓度约为 5 mg/mL。

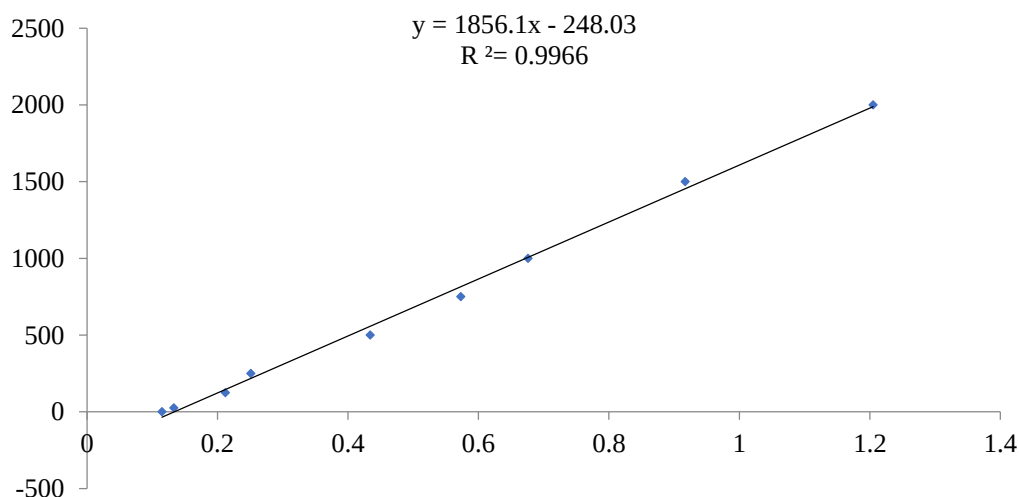


图 2-1 标准曲线
Figure 2-1 Standard curve

2.2.3.7 纯化后的蛋白 Western-blot 验证

蛋白胶配置过程同 2.2.2，取纯化后的蛋白制作蛋白样，电泳完成后，用切胶铲切去边缘多余凝胶，将凝胶转移至转印液中，用尺子测量切后凝胶的长和宽，根据长和宽剪出合适大小的 PVDF 膜 1 张和厚滤纸 2 张，将 PVDF 膜转移至甲醇中激活，将滤纸在转印液中浸泡，按照三明治法进行放置，取 1 片厚滤纸，控干水分，放置在电转仪上，将 PVDF 膜放置在滤纸上，并用赶气泡轮赶走气泡，然后取凝胶放置在 PVDF 膜上，去除气泡后，盖上另一片厚滤纸。盖上电转仪的盖子，15 V 转膜 40 min。

转膜结束后，将 PVDF 膜放入封闭液(5 %脱脂奶粉)中，置于 37 °C 恒温摇床中，设定为 40 rpm，封闭 2 h；封闭结束后，将 PVDF 膜转移到已稀释的 His 单抗中，保持在 37 °C 摇床中孵育 1.5 h；孵育结束后，用 PBST 中洗膜三次，每次 5 min，洗掉未结合的一抗；洗膜结束后将 PVDF 膜转移到用稀释好的鼠二抗中，37 °C 孵育 1 h，然后洗膜，过程同上；显色前，再将膜转移到避光处，提前配制好显色工作液(2 mL 反应液、40 μ L 的溶液 A、4 μ L 的溶液 C)并充分混匀，将显色工作液在避光条件下覆盖到膜上，在 37 °C 下低速振荡反应约 10 min，出现浅棕色的条带后倒掉反应液并使用蒸馏水洗掉多余的显色液；最后，扫描拍照记录实验结果。

2.2.4 BP26 蛋白多克隆抗体的制备与鉴定

2.2.4.1 动物免疫

取 1 只成年实验家兔，免疫前采血取血清记作未免血清。将纯化后的蛋白高速离心后，吸取上清液转移至另一个离心管中，用 BCA 试剂盒测蛋白浓度，操作过程同 2.2.3.6，根据测得的蛋白浓度，用过滤后的 PBS 稀释到 2 mg/mL，加入等量佐剂和千倍稀释的新霉素，并将其乳化彻底。将乳化好的亚单位疫苗通过皮下多点注射免疫家兔，1 mL/只，蛋白含量为 1 mg。在首次免疫中，使用弗氏完全佐剂作为辅助剂；在首次免疫间隔 2 周

进行第二次免疫，再次使用 1 mL 含有 1 mg 蛋白的免疫制剂，以皮下多点注射的方式进行免疫。在二三次免疫中，使用弗氏不完全佐剂作为辅助剂。

2.2.4.2 血清抗体效价的测定

(1) 包被蛋白：取浓缩后得到的 BP26 蛋白进行包被，以 1 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度将纯化后的 BP26 蛋白包被在酶标板上，按照 100 μL /孔的加样量加入到酶标板中，盖上一次封板膜，将酶标板放 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱反应 1.5 h；

(2) 洗板：取反应结束的酶标板，去除封板膜后放洗板机中用 PBST 溶液洗板，每次加入 300 μL ，洗 5 次；

(3) 封闭：将脱脂奶粉用 PBST 稀释到 5 % 的含量，取 300 μL 加入到上述处理好的酶标板中，盖上一次封板膜，将酶标板放 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱反应 1 h；

(4) 重复步骤 (2)；

(5) 孵育血清：将三免后的血清用 PBST 分别按照 1:2⁶、1:2⁷、1:2⁸、1:2⁹、1:2¹⁰、1:2¹¹、1:2¹²、1:2¹³、1:2¹⁴、1:2¹⁵、稀释血清，取 100 μL 稀释后的血清样本加入到酶标板中，盖上一次封板膜，将酶标板放 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱反应 1 h；

(6) 重复步骤 (2)；

(7) 孵育二抗：将羊抗兔二抗用 PBST 进行 2000 倍稀释后，每孔 100 μL 加入到酶标板中，盖上一次封板膜，将酶标板放 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱反应 0.5 h；

(8) 重复步骤 (2)；

(9) 显色：每孔加入 100 μL 已提前恢复至室温的 TMB 显色液，盖上一次封板膜避光反应 10 min 后，每孔加入 100 μL 1.8 M 硫酸进行终止显色，在 OD_{450nm} 处读数并进行血清效价分析。

2.2.4.3 多克隆抗体的验证

蛋白胶配置过程同 2.2.2，取纯化后的蛋白制作蛋白样，电泳完成后转膜，转膜操作见 2.2.3.7。

将 PVDF 膜放入封闭液中，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中，设定为 40 rpm，封闭 2 h；封闭结束后，将 PVDF 膜转移至封闭液稀释的小鼠免疫前和免疫后的血清中，血清与封闭液稀释比为 1: 200，37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 1 h；孵育结束后，用 PBST 中洗膜三次，每次 5 min，洗掉未结合的一抗；洗膜结束后将 PVDF 膜转移到用稀释好的兔二抗中，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，然后洗膜，过程同 2.2.3.7。

2.3 结果

2.3.1 重组表达载体构建结果

2.3.1.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增出 666 bp 的片段，无其它杂带，与目的片段大小一致，结果如图 2-2。

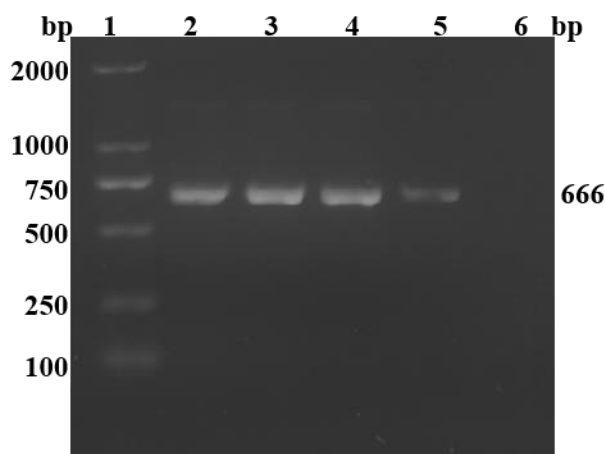


图 2-2 目的基因 PCR 扩增结果

Figure 2-2 PCR amplification results of the gene of interest

1: Marker; 2-5: 目的片段; 6: 阴性对照

1: Marker; 2-5: Target fragments; 6: Negative control

2.3.1.2 菌落 PCR 验证

经 PCR 验证，所选挑的 7 个单菌落均是阳性菌落，PCR 验证成功，结果如图 2-3。

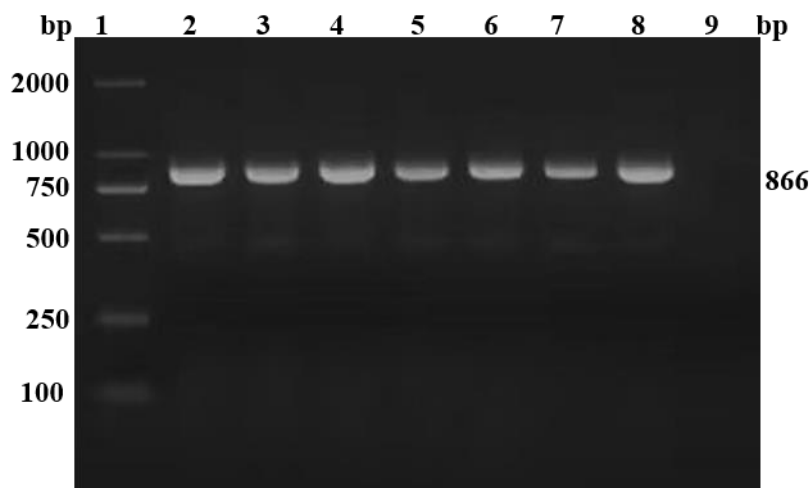


图 2-3 菌落 PCR 验证图

Figure 2-3 Colony PCR validation plot

1: DNA Marker; 2-8: 验证样品; 9: 阴性对照

1: DNA Marker; 2-10: Verify the sample; 9: Negative control

2.3.1.3 双酶切验证

经双酶切验证，成功切出 5282 bp 的 pET-28a 载体片段和 666 bp 的 BP26 基因片段，结果如图 2-4。

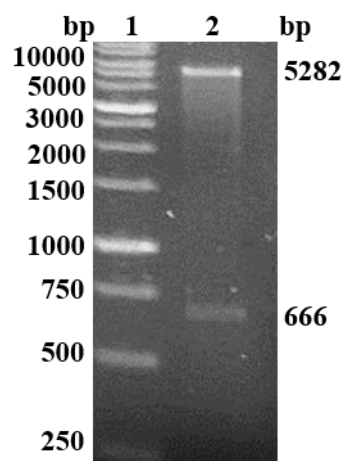


图 2-4 重组质粒双酶切验证

Figure 2-4 Recombinant plasmid double digestion validation

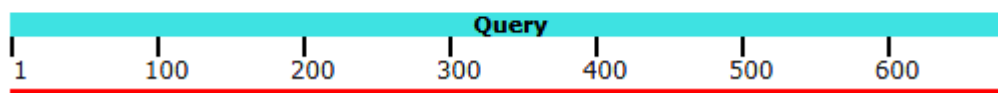
1: DNA Marker; 2: 双酶切电泳图

1: DNA Marker; 2: Double digestion electropherogram

2.3.1.4 测序验证

经 NCBI 中 BLAST 比较，公司测序反馈回来的序列与目的序列一致，测序验证成功，结果如图 2-5。

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



注：蓝为比对序列；红色为参考序列

图 2-5 测序验证

Figure 2-5 Sequencing validation

2.3.2 蛋白诱导表达结果

根据 SDS-PAGE 图分析，蛋白在 25 °C 的温度中表达量高，蛋白为可溶性表达，结果如图 2-6。

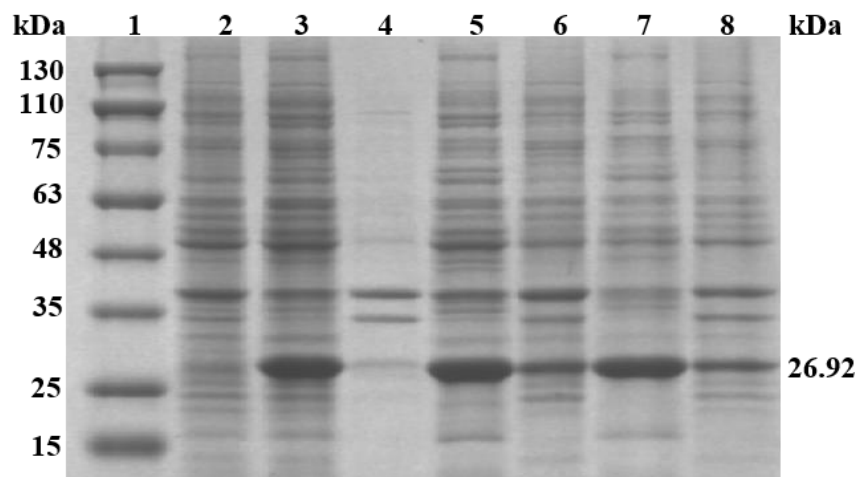


图 2-6 蛋白诱导表达

Figure 2-6 Protein-induced expression

1: Protein Marker; 2: 未诱导; 3: 16 °C LB 培养基诱导上清; 4: 16 °C LB 培养基诱导沉淀; 5: 25 °C LB 培养基诱导上清; 6: 25 °C LB 培养基诱导沉淀; 7: 37 °C LB 培养基诱导上清; 8: 37 °C LB 培养基诱导沉淀
1: Protein Marker; 2: Not induced; 3: 16 °C LB medium induces supernatant; 4: 16 °C LB medium induces precipitation; 5: 25 °C LB medium induces supernatant; 6: 25 °C LB medium induces precipitation; 7: 37 °C LB medium induces supernatant; 8: 37 °C LB medium induces precipitation

2.3.3 蛋白纯化结果

蛋白纯化后条带单一，无杂蛋白，使用 ImageJ 根据灰度值计算，蛋白纯度可达到 90.2 %，结果如图 2-7。

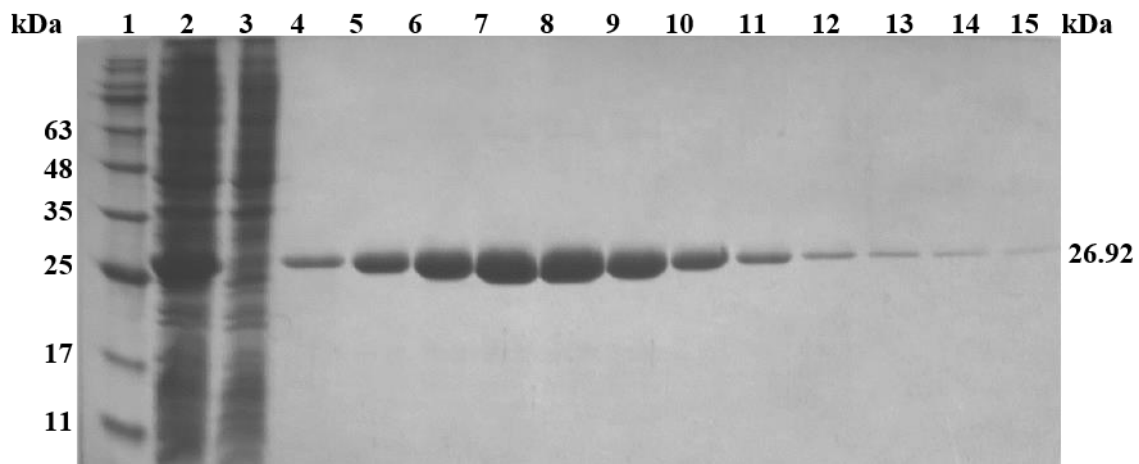


图 2-7 纯化 PAGE 图

Figure 2-7 Purified PAGE diagram

1: Protein Marker; 2: 上样前; 3: 流穿; 4-15: 梯度洗脱
1: Protein Marker; 2: Before loading the sample; 3: Flow through the sample; 4-15: Gradient elution samples

2.3.4 纯化后的蛋白验证结果

取纯化后的蛋白样进行 Western-blot 验证，经显色后，出现棕色且位置正确的条带，结果如图 2-8。

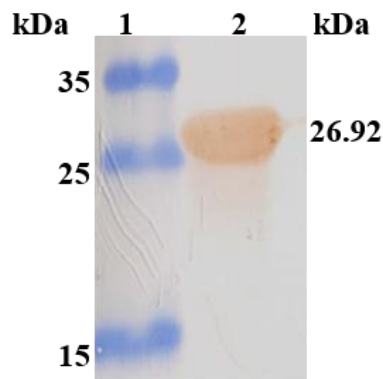


图 2-8 Western-blot 验证图

Figure 2-8: Western-blot verify diagram

1: Protein Marker; 2: 纯化蛋白样;
1: Protein Marker; 2: Purify protein samples

2.3.5 多克隆抗体制备和鉴定结果

2.3.5.1 血清抗体效价结果

以 $P/N \geq 2.0$ 的最大的抗体稀释度作为抗体效价值，三免后获得较高的抗体水平，血清抗体效价可以达到 $1:2^{10}$ 。

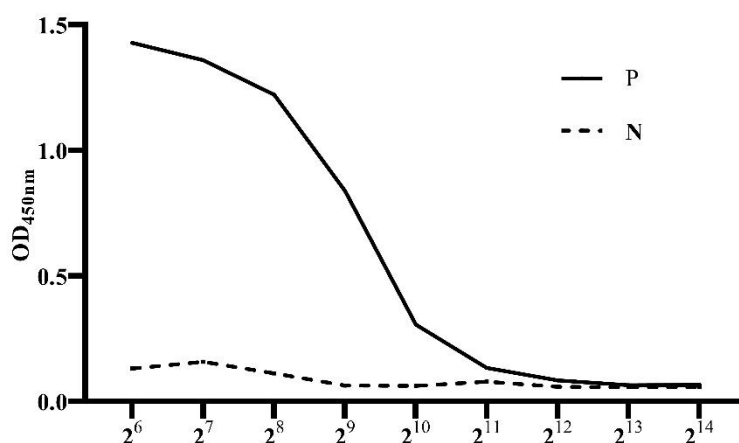


图 2-9 血清抗体效价
Figure 2-9 Serum antibody titer

2.3.5.2 多克隆抗体的验证结果

分别使用免疫前后家兔血清进行 Western-blot 验证，结果显示免疫后兔血清与 BP26 蛋白反应，证明通过免疫获得针对于 BP26 蛋白的多克隆抗体，结果如图 2-10。

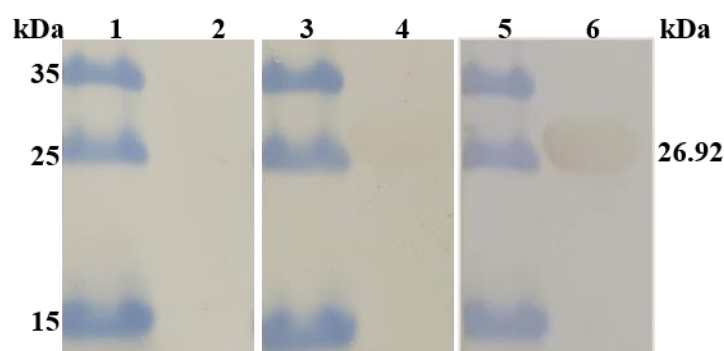


图 2-10 多克隆抗体的验证
Figure 2-10 Polyclonal antibody validation

1、3、5: Protein Marker; 2: 免疫前; 4: 第二次免疫后; 6: 第三次免疫后
1、3、5: Protein Marker; 2: Pre-immunization; 4: After the second immunization; 3: After the third immunization;

2.4 讨论

布鲁氏菌基因组拥有两个环状染色体，分别为大复制子和小复制子，总基因组大小为 3.3 Mb，该基因组的这种双环状染色体结构在细菌中较为罕见，为该菌属的独特特征。以 *B.melitensis* 16 M 株为例(Joshi, K,et al, 2024)，*B.melitensis* 16 M 菌株是 1973 年由 Meyer 从山羊体内分离得到的一株高毒力野生菌株，属于 *B.melitensis* 亚种，该菌株是羊的重要致病菌株之一，对畜牧业和人类健康造成潜在威胁(DelVecchio, V G,et al, 2002)。

布鲁氏菌病主要感染牛、羊、猪等家畜，也可感染人类，严重的危害着人类与动物的健康。动物感染时，会导致公畜睾丸炎，以至配种率下降，并带有关节炎关节肿胀的现象；母畜感染后会导致流产和不孕，还会引起母畜的乳腺炎和乳汁异常，动物感染后均可能出现的全身症状(Joshi, K,et al, 2024),包括体温升高、食欲不振、疲劳和体重下降等(Amini, M,et al, 2024)。有研究表明，布鲁氏菌对人类的危害是主要影响健康的年轻成年男性(Varikkodan, I,et al, 2024)，人感染布鲁氏菌病后会出现包括发热、头痛、乏力、关节疼痛、肌肉痛、盗汗、失眠等症状，这些症状可能持续数周至数月，并且可能反复发作。在一些情况下，布鲁氏菌感染可能引发慢性病变，对布鲁氏菌病的诊断和治疗都具有一定的挑战性，因此预防和控制布鲁氏菌病的发生就十分重要(Hashemzadeh, P,et al, 2023)，预防布鲁氏菌病的最佳方法是通过安全饮食和个人卫生措施降低感染该病的风险，包括避免食用生的或未煮熟的乳制品或受感染动物的肉类(De la Pena-Sosa, G,et al, 2024)，避免直接接触受布鲁氏菌病感染的动物(Bardenstein, S,et al, 2023)，以及加强个人卫生习惯，而对于农民、兽医和实验室工作人员等高危人群，应采取适当的个人防护措施(Govindasamy, K,et al, 2021, Hlaing, S S,et al, 2024, Mubanga, M,et al, 2021)。越来越多的研究人员投入到布鲁氏菌病的研究中，有研究者发现 BP26 蛋白是布鲁氏菌的一种免疫原性蛋白，BP26 蛋白的结构和功能使其在感染过程中起着关键作用。因此对其进行深入研究，理解布鲁氏菌病的发病机制以及疫苗研发具有重要意义。

本研究通过设计针对 BP26 蛋白的特异性引物扩增实验室保存的布鲁氏菌疫苗株 S2，该目的片段为 666 bp；利用基因工程技术对扩增出的目的片段与 pET-28a 载体进行重组表达载体的构建，最后转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中，对过夜培养得到的单菌落进行验证，利用通用引物进行 PCR 扩增，可以扩增出 866 bp 的条带；双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳，显示成功切出 666 bp 的 BP26 和 5282 bp 的 pET-28a；后将菌液进行测序验证，对测序结果进行序列比对，比对结果符合率为 100 %；对验证正确的菌株进行试表达，按照抗生素 1: 1000，菌液 1: 100 的比例加入到 5 mL LB 液体培养基中进行培养，待菌液 OD_{600nm} 为 0.6-0.8 时即可用 IPTG 进行诱导，确定好最佳的诱导条件以获取更多的蛋白，经试诱导后的 SDS-PAGE 和 Western-blot 结果分析，最终确定 25 °C 诱导 10 h 表达量较大，该蛋白带有 6× HIS 标签，利用镍柱进行亲和纯化。纯化前，首先进行菌液的大量培养，按照摸好的试诱导条件进行诱导。次日，离心收集菌底，用预冷处理 PBS 溶液重悬菌底，目的是洗掉多余的培养基，离心后将菌底重悬在平衡液中，进行破碎，使蛋白可以进行充分的裂解，后进行离心，取上清液进行镍柱纯化，本次纯化采用 AKTApure 机器纯化，利用不同梯度浓度的咪唑进行洗脱，对显示器上有峰值的收集管内取样，进行 SDS-PAGE，染色脱色后，对单一条带的收集管内的蛋白溶液利用超滤浓缩管进行浓缩，浓缩后换液到 PBS 里，利用 BCA 试剂盒测得该蛋白浓度为 5 mg/mL，并将浓缩后的蛋白进行 Western-blot 验证，在 26.92 kDa 处有明显棕色条带，将

处理后的蛋白保存在-80 °C冰箱中供后续实验使用。

本实验选择的实验动物是家兔，对家兔进行肌肉多点注射免疫，对三免后的兔子进行采血，测定抗体效价，以 $P/N \geq 2.0$ 的最大的抗体稀释度作为抗体效价值判定标准，三免后获得较高的抗体水平，血清抗体效价可以达到 $1:2^{10}$ ，经 Western-blot 验证，免疫效果较好，血清中含有大量抗体。

2.5 小结

- 1.成功构建出 pET-28a-BP26 重组质粒。
- 2.在 25 °C LB 培养基诱导 10 h 时表达量最高。
- 3.表达蛋白亲和纯化后，纯度达 90.2 %。
- 4.免疫家兔后，成功获得 BP26 蛋白的多克隆抗体。

第三章 BP26 蛋白特异性纳米抗体的筛选及表达鉴定

核糖体展示技术是一种重要的蛋白质展示和筛选技术，可以完全在体外进行，库容量较大，具有建库简单方便，筛选快速等优点。通过将表型(被展示的蛋白)和基因型(该目的蛋白的遗传信息)联系在一起，形成三元复合物，本章在前一章的基础上，以纯化后的 BP26 蛋白进行包被，利用 *E. coli* S30 Extract System 试剂盒将纳米抗体库进行体外转录翻译，并将翻译后的产物与 BP26 蛋白结合，经过多次筛选，将纳米抗体进行重组表达载体的构建，将测序正确的序列进行诱导表达，筛选特异性的纳米抗体，并对纳米抗体的性质进行鉴定。

3.1 材料

3.1.1 试剂

表 3-1 试剂
Table 3-1 Reagents

试剂 Reagent	厂家 Producer
MgCl ₂	沈阳化学试剂厂
吐温-20	生工生物工程(上海)股份有限公司
BSA	生工生物工程(上海)股份有限公司
DEPC 水	北京索莱宝科技有限公司
BSA	生工生物工程(上海)股份有限公司
HRP 标记兔抗鼠 IgG	生工生物工程(上海)股份有限公司
可溶型单组分 TMB 底物溶液	天根生化科技(北京)有限公司
硫酸	西陇科学股份有限公司
RNAiso Plus	宝日医生物技术北京有限公司
DMEM 细胞培养基	武汉普诺赛生命科技有限公司
胎牛血清	武汉普诺赛生命科技有限公司
双抗	生工生物工程(上海)股份有限公司
胰酶	武汉普诺赛生命科技有限公司
DMSO	生工生物工程(上海)股份有限公司
包被液	北京索莱宝生物科技公司
无水乙醇	西陇科学股份有限公司
异丙醇	西陇科学股份有限公司
氯仿	西陇科学股份有限公司
琼脂糖	生工生物工程(上海)股份有限公司
TAE	生工生物工程(上海)股份有限公司
TE	生工生物工程(上海)股份有限公司
<i>E. coli</i> S30 Extract System	Promega

3.1.2 耗材

表 3-2 耗材
Table 3-2 Consumables

耗材 Consumables	厂家 Producer
酶标板	生工生物工程(上海)股份有限公司
一次性封板膜	海克斯生选
1.5 mL、5 mL、10 mL、15 mL、50mL 离心管	北京兰杰柯科技有限公司
1 mL、200 μ L、10 μ L 枪头	北京兰杰柯科技有限公司
12 孔细胞爬片	北京索莱宝科技有限公司
细胞培养瓶	生工生物工程(上海)股份有限公司
巴氏管	生工生物工程(上海)股份有限公司

3.1.3 仪器设备

表 3-3 仪器设备
Table 3-3 Instruments and equipments

仪器 Apparatus	厂家 Producer
移液器	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
PCR 仪	Thermo Fisher Scientific Inc
酶标仪	BioTek Instruments, Inc
倒置荧光显微镜	德国徕卡
PH 仪	上海仪电科学仪器股份有限公司

3.1.4 溶液配制

- (1) PBSM: 在 RNAase-free 的 PBS 溶液中加入氯化镁至其终浓度为 5 mM。
- (2) PBST: 在 RNAase-free 的 PBS 溶液中加入吐温-20 至其终浓度为 0.05 %。
- (3) PBSMB: 在 RNAase-free 的 PBS 溶液中加入 5 mM $MgCl_2$ 和 3 % BSA。
- (4) EB: 在 RNAase-free 的 PBS 溶液中加入 50 mM EDTA。

3.2 方法

3.2.1 纳米抗体库的扩增

3.2.1.1 引物设计与合成

根据提供给公司合成的序列进行引物设计, 送至上海生工生物进行合成。引物序列如下表 3-4。

表 3-4 引物设计
Table 3-4 Primer design

名称	序列(5'-3')
Name	Sequence(5'-3')
VHH-F	tataTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGGGGAGACCACAACGGTTTCCCAGGAGGCCATGG AACAGGTTCA
CD-F	GTTACCGTTTCTTCTCTCGAGGCTTCCATTCTGGCTTTAATG
CD-R	CATTAAAGCCAGAATGGAAAGCCTCGAGAGAAGAAACGGTAAC
VHH-R	tataCCGCACACCAGTAAGGTGTGCGGTA

注: tata: 保护碱基; 斜体字: 酶切位点;

3.2.1.2 纳米抗体库的扩增及回收

将合成的上下游引物 4000 rpm 离心 2 min 后, 用 TE 缓冲液稀释到 10 μ M 作为储液浓度, 取稀释好的上下游引物、PCR Mix、水和模板配制反应体系, 进行 PCR 扩增, 体系和反应程序如下表 3-5 和表 3-6。

表 3-5 PCR 反应体系
Table 3-5 PCR reaction systems

组成	用量(μ L)
Composition	Dosage(μ L)
VHH-F	1
VHH-R	1
2 $\times$ Primer Star Mix	10
dd H ₂ O	7
模板	1

表 3-6 PCR 反应程序
Table 3-6 PCR reaction procedures

程序	温度	时间	循环次数
Program	Temperature($^{\circ}$ C)	Time	Cycle index
预变性	98	3 min	1
变性	98	15 s	30
退火	64	15 s	30
延伸	72	20 s	30
再延伸	72	2 min	1

将产物进行琼脂糖凝胶电泳观察并进行胶回收处理。

胶回收操作见 2.2.1.2。

3.2.2 纳米抗体的体外转录翻译

利用体外转录翻译试剂盒 *E. coli* S30 Extract System 进行试验操作, 将-80 $^{\circ}$ C 保存的试剂放于冰上, 全程保持低温环境, 使其在低温条件下融化, 反应体系如下表 3-7。

表 3-7 反应体系

Table 3-7 Reaction systems

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
DNA 模板	8
半胱氨酸	2.5
亮氨酸	2.5
S30 提取液	15
S30 不含氨基酸的预混液	20
DEPC 水	2

(1) 将配制好的溶液放在 1.5 mL 除酶离心管中, 轻轻涡旋, 然后在微型离心机中离心 5 s, 将涡旋挂壁的液体沉到管底, 使其充分反应;

(2) 37 °C 反应 2 h;

(3) 将反应后的产物置于冰上, 冰浴 5 min, 结束反应。

3.2.3 体外筛选

3.2.3.1 BP26 抗体的筛选

(1) 包被: 将 BP26 蛋白稀释至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被在酶标板中, 每孔加入 100 μL , 酶标板 4 °C 过夜包被; 次日, 用 PBSM 溶液进行洗涤, 洗三次, 每次 5 min;

(2) 封闭: 将洗涤后的酶标板拍干, 每孔 200 μL 加入 PBSMB 溶液封闭, 37 °C 静置 2 h(期间进行纳米抗体库的体外转录翻译实验);

(3) 洗涤: 封闭结束后用 PBSTM 溶液进行洗涤, 洗三次, 每次 5 min; 再用溶液 PBSM 洗涤两次, 拍干, 弃掉孔中残留的液体, 将酶标板放在冰上静置;

(4) 孵育: 将 50 μL 的 PBSMB 溶液加入到体外反应后的纳米抗体库, 用移液器轻轻混匀, 将混匀后的产物加入到已经预冷处理的微孔中, 4 °C 反应 2 h;

(5) 洗涤: 将孵育好的酶标板用 PBSTM 溶液进行洗涤, 洗三次, 每次 5 min, 用移液器小心弃掉微孔中残余的液体;

(6) 洗脱: 将已经预冷处理的 EB 溶液吸取 100 μL , 加入到微孔中, 在冰上轻轻震荡 10 min, 使洗脱更加充分, 将洗脱后含有 RNA 的溶液放入 1.5 mL 除酶离心管中, 冰上静置, 进行后续实验。

3.2.3.2 RNA 的提取

将上一步洗脱后的溶液放入 1.5 mL 除酶离心管中, 进行洗脱液中的 RNA 提取。因 RNA 极易降解, 因此后续 RNA 的提取均在低温条件下进行。

(1) 向上一步的洗脱液中加入 1 mL 的 RNAiso Plus 溶液, 混匀后用微型离心机进行瞬离, 将挂壁的 RNAiso Plus 和洗脱液沉于管底, 于冰上静置 5 min;

(2) 向混合液中加入 200 μL 预冷处理的三氯甲烷溶液, 剧烈震荡 30 s 后, 用微型离心机进行瞬离, 冰上静置 5 min;

(3) 静置后 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心, 12000 rpm 离心 15 min;

(4) 取出离心后的离心管, 此时溶液会分三层: 上层为无色透明的 RNA 溶液, 中间层为白色的蛋白质, 下层为红色的 DNA 溶液, 实验中, 使用移液器小心地抽取上层无色溶液, 并将其加入到一个新的 1.5 mL 除酶离心管中, 通常情况下, 抽取约 400 μL ;

(5) 向无色溶液中加入 500 μL 预冷处理的异丙醇溶液, 上下颠倒混匀后, 在冰上静置 10 min;

(6) 静置后 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心, 12000 rpm 离心 15 min;

(7) 弃掉离心后上清液, 并加入 1 mL 75 % 乙醇溶液;

(8) 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心, 12000 rpm 离心 15 min;

(9) 离心后倒掉上清液, 将离心管放在冰上静置 20 min 以上, 使乙醇全部挥发;

(10) 取 50 μL 预冷处理的 DEPC 水加入到离心管中, 用移液器轻轻吹打, 在冰上静置 20 min 进行 RNA 的溶解, 将溶解后的 RNA 溶液保存于在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中, 防止 RNA 的降解。

3.2.3.3 RNA 的反转录

反转录过程是将 RNA 转变成为 cDNA 的过程, 操作步骤如下:

(1) RNA 模板的变性

在 200 μL 的除酶离心管中加入 8 μL RNA 溶液, 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中加热 5 min, 使 RNA 完全变性, 加热后迅速放在冰上静置 2 min;

(2) 基因组 DNA 的去除

向下一步混合液中加入 2 μL 5 $\times$ gDNA wiper Mix 溶液, 轻轻吹打混匀, 于 42 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴加热 2 min;

(3) 配制第一链 cDNA 合成反应液

按照下表 3-8 加入合成反应液;

表 3-8 反应体系
Table 3-8 Reaction systems

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
上一步混合液	8
10 $\times$ RT Mix	2
HiScript III Enzyme Mix	2
Oligo(dT) ₂₀ VN	1
RNase-free dd H ₂ O	5

用移液器轻轻吹打混匀;

(4) 进行第一链 cDNA 合成反应

将上一步混合液进行反转录，程序如下表 3-9；

表 3-9 反应程序
Table 3-9 Reaction procedures

温度 Temperature(°C)	时间 Time
25	5 min
37	45 min
85	5 s
4	∞

将反应后的产物保存在-20 °C。

3.2.3.4 重新构建核糖体展示模板

(1) 以反转录后的产物模板，利用引物 VHH-F 和 CD-R 进行纳米抗体的扩增，体系和反应程序如下表 3-10 和 3-11。

表 3-10 PCR 反应体系
Table 3-10 PCR reaction systems

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
VHH-F	1
CD-R	1
2×Primer Star Mix	10
dd H ₂ O	7
模板	1

表 3-11 PCR 反应程序
Table 3-11 PCR reaction procedures

程序 Program	温度 Temperature(°C)	时间 Time	循环次数 Cycle index
预变性	98	3 min	1
变性	98	15 s	30
退火	64	15 s	30
延伸	72	20 s	30
再延伸	72	5 min	1

将扩增后的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，并进行胶回收。

胶回收操作见 2.2.1.2。

(2) 重叠 PCR 构建核糖体展示元件

将胶回收后的纳米抗体序列与间隔区进行重叠 PCR 扩增，利用引物 VHH-F 和 VHH-R 进行 PCR 扩增，体系和反应程序如下表 3-12 和 3-13。

表 3-12 PCR 反应体系
Table 3-12 PCR reaction systems

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
VHH-F	1
VHH-R	1
2×Primer Star Mix	10
dd H ₂ O	6
VHH	1
Spacer	1

表 3-13 PCR 反应程序
Table 3-13 PCR reaction procedures

程序 Program	温度 Temperature($^{\circ}\text{C}$)	时间 Time	循环次数 Cycle index
预变性	98	3 min	1
变性	98	15 s	30
退火	64	15 s	30
延伸	72	20 s	30
再延伸	72	5 min	1

将扩增后的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，并进行胶回收。

胶回收操作见 2.2.1.2。

(3) 将构建好的文库进行下一轮的筛选，为使纳米抗体的结合特异性更好，本次实验我们共进行 8 轮筛选。

3.2.4 抗 BP26 纳米抗体的构建

3.2.4.1 目的片段的扩增

将最后一轮筛选的纳米抗体片段进行 PCR 扩增，扩增体系和反应程序同 3.3.4.(1)。

3.2.4.2 双酶切

将胶回收的纳米抗体片段和载体质粒进行酶切，37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 3 h，酶切体系见表 3-14 和表 3-15。

表 3-14 目的片段酶切体系
Table 3-14 Target fragment digestion system

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
VHH	10
<i>Nco</i> I	2
<i>Xho</i> I	2
10×Qcut Buffer	2
dd H ₂ O	4

表 3-15 载体酶切体系
Table 3-15 Carrier enzyme digestion system

组成 Composition	用量(μL) Dosage(μL)
pET-28a	14
<i>Nco</i> I	2
<i>Xho</i> I	2
10 $\times$ Qcut Buffer	2

将酶切后的目的片段利用清洁试剂盒进行清洁，步骤同 2.2.1.4；酶切后的载体进行琼脂糖凝胶电泳，电泳后用胶回收试剂盒进行回收，步骤同 2.2.1.2。

3.2.4.3 连接

将酶切后的目的片段与载体进行连接，连接体系及操作步骤同 2.2.1.5。

3.2.4.4 转化

转化步骤同 2.2.1.6。

3.2.4.5 重组表达载体的验证

(1) PCR 验证

将转化培养出的单菌落进行全部 PCR 验证，步骤和反应体系同 2.2.1.7。

(2) 测序验证

挑取验证成功的单菌落，加入到 5 mL LB 液体培养基中，并加入 5 μL Kanamycin，37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 6 h 后，在超净工作台进行分装，并进行标记，送至上海生工生物公司进行测序，并进行序列比对。

3.2.5 重组蛋白的诱导表达

将序列比对成功的重组纳米抗体进行诱导表达，步骤同 2.2.2。

3.2.6 纳米抗体的纯化及验证

将序列比对成功的蛋白进行纯化，步骤同 2.2.3。

3.2.7 纳米抗体的鉴定

3.2.7.1 亲和力鉴定

将纯化后的全部纳米抗体稀释到 100 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度，利用 BP26 蛋白采取 ELISA 方法进行亲和力鉴定。

- (1) 包被：包被液将 BP26 蛋白稀释至 1 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度，37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 1 h；
- (2) 洗板：洗板机洗板五次，每次每孔加入 300 μL PBST 溶液，洗后拍干；
- (3) 封闭：5 % 的脱脂奶粉进行封闭，每孔 200 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h；

- (4) 洗板：步骤同上；
- (5) 孵育：加入稀释到相同浓度的不同纳米抗体 100 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h；
- (6) 洗板：步骤同上；
- (7) 孵育：每孔加入 5000 倍稀释的骆驼二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 0.5 h；
- (8) 洗板：步骤同上；
- (9) 显色：每孔加入 100 μL 显色液，室温避光放置 15 min；
- (10) 终止：每孔加入 100 μL 1.8 M 的硫酸溶液将反应终止，在 OD_{450nm} 处测值。

3.2.7.2 抗原表位鉴定

- (1) 利用在线软件 IEDB 对 BP26 蛋白进行抗原表位预测，引物设计如下表 3-16。

表 3-16 截短引物设计
Table 3-16 Truncated primer design

名称	序列
BP26-1-F	ttttGGATCCGGCGGCGGCGGTTCCGGCGGCGGCGGTTCCCAGGAAAACCAGATG
BP26-1-R	ttttTTACTCGAGACGAACACGAACGGTCAGGCT
BP26-2-F	ttttGGATCCGGCGGCGGCGGTTCCGGCGGCGGCGGTTCCGAACCTGGCAAACGTT
BP26-2-R	ttttTTACTCGAGCGCTTTCGCGATCGCGTTCGCA
BP26-3-F	ttttGGATCCGGCGGCGGCGGTTCCGGCGGCGGCGGTTCCAAAACCCTGGCGGAC
BP26-3-R	ttttTTACTCGAGTTTGATTTCGAAAACAACGTT
BP26-4-F	ttttGGATCCGGCGGCGGCGGTTCCGGCGGCGGCGGTTCCGAATTCGTTGAAATCA
BP26-4-R	ttttCTCGAGGTTATCCGGCGCCGAGCCAGCATGGTA

注：tttt：保护碱基；斜体字：酶切位点；加粗字：柔性 linker

- (2) 目的片段的扩增

利用特异性的引物进行扩增，扩增后进行胶回收，胶回收步骤同 2.2.1.2。

- (3) 重组表达载体的构建及纯化

由于截短部分的基因较少，表达的蛋白较小，不易纯化，因此将截短部分的 BP26 构建到 PGEX-6P-1 载体上，原理如图 3-1，实验步骤同 2.2.1。

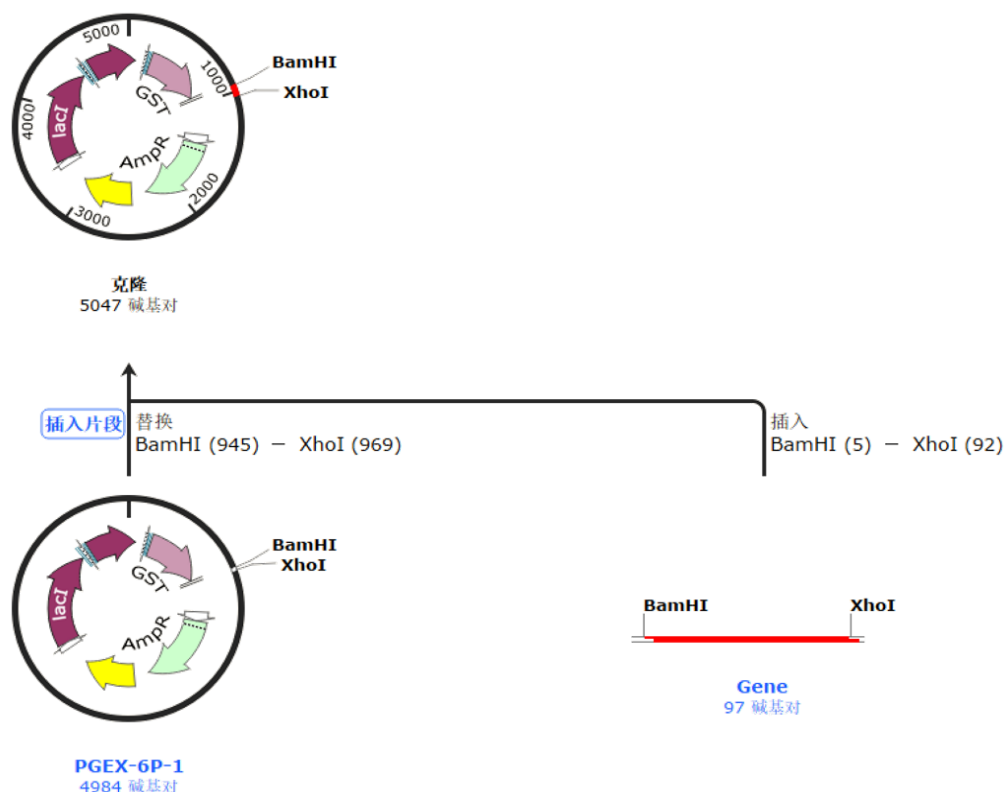


图 3-1 构建原理图

Figure 3-1 Build a schematic

(4) Western-blot 验证抗原表位

将纯化后的截短的 BP26-1、BP26-2、BP26-3、BP26-4、未截短的 PGEX-6P-1-BP26 与 5×蛋白上样缓冲液混合均匀后，100 °C煮沸 10 min，进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜结束后，将 PVDF 膜放入封闭液中，置于 37 °C恒温摇床中，设定为 40 rpm，封闭 2 h；封闭结束后加入纳米抗体稀释液，37 °C孵育 1 h，孵育结束后，用 PBST 中洗膜三次，每次 5 min，洗掉未结合的一抗；洗膜结束后将 PVDF 膜转移到用稀释好的骆驼二抗中，然后洗膜，显色步骤同 2.2.3.7。

3.2.7.3 稳定性鉴定

纳米抗体热稳定性分析：取 9 个 1.5 mL 离心管，每管加入 250 μ L 等浓度的纳米抗体，另取 9 个加稀释倍数相同的免疫血清，分别在 4 °C，25 °C，37 °C，50 °C，60 °C，70 °C，80 °C，90 °C，100 °C存放 30 min 后离心，取上清液加入到酶标板中，利用 ELISA 检测，比较不同温度下纳米抗体的稳定性；

纳米抗体的酸碱稳定性分析：取 7 个 1.5 mL 离心管，每管加入 250 μ L 相同浓度的纳米抗体，另取 9 个加稀释倍数相同的免疫血清，分别将 pH 调整至 1、3、5、7、9、11、13 存放 30 min 后离心，取上清液加入到酶标板中，利用 ELISA 检测，比较不同 pH 下纳米抗体的稳定性。

3.2.7.4 细胞穿透性鉴定

(1) 复苏前准备

先将细胞间的水浴锅升温至 37 °C，并将细胞复苏过程中使用的仪器溶液提前放入超净工作台中紫外灭菌 30 min。

(2) PK-15 细胞的复苏

从液氮中取出装有细胞的冻存管，将其放入 37 °C 水浴锅中，以加快融化速度；融化后，将细胞取出放入到新的离心管中，以 1000 rpm 的速度进行离心 5 min，离心后，小心用移液器吸取上清液并弃掉，接着用 1 mL 完全培养基轻轻反复多次吹打细胞沉淀，避免出现细胞团块，将细胞完全重悬后，用移液器轻轻吸取细胞悬液，转移到规格为 T 25 的细胞培养瓶中，再另外加入 5 mL 完全培养基，轻轻晃动，使细胞在瓶内分布均匀，将细胞培养瓶平放于条件为 37 °C、5 %CO₂ 的培养箱进行培养。次日，在电子显微镜下观察细胞的状态。待细胞生长至培养瓶容量的 80 %-90 % 时，进行传代培养，直至第四代，然后进行实验。

(3) 纳米抗体的荧光标记

将纯化后的纳米抗体利用超滤浓缩管换液至 CBS 溶液中，取 1 mg FITC 粉末溶于 1 mL DMSO 溶液中，将 FITC 溶液缓慢加入到纳米抗体中，4 °C 过夜缓慢旋转混匀，次日，将标记后的蛋白放于处理好的透析袋中，透析袋的外液为 PBS 缓冲液，目的是将未标记上的 FITC 置换出来，过夜避光换液后，12000 rpm 4 °C 离心 10 min，将降解的蛋白质沉淀弃掉，取上清液进行浓度的测定，后续进行与细胞共孵育实验。

(4) 纳米抗体入胞实验

用镊子小心夹取细胞爬片放入 12 孔细胞培养板中，过夜培养。次日进行换液，先将培养基弃掉，并用 PBS 轻轻清洗三次，用移液器弃掉多余的 PBS 溶液，将培养基中加入 FITC 标记的纳米抗体，混合均匀后加入到孔中，记为阳性，阴性对照为 PBS 与培养基的混合液，与细胞共孵育 4 h。4 h 后，取出 12 孔板，用巴氏管吸取 PBS 小心从孔壁加入，清洗三次后，加入 1 mL 4 % 的多聚甲醛溶液进行细胞的固定，10 min 后，用 PBS 轻轻清洗三次，每孔加入 200 μL 的 DAPI 染色，避光处反应 10 min，用 PBS 轻轻清洗三次后，将爬片小心取出，正置放入 60 °C 烘箱中，将多余的液体完全蒸干，用镊子取出爬片，将载玻片上加入 5 μL 荧光淬灭剂，将爬片倒放于载玻片上，显微镜下观察。

3.3 结果

3.3.1 纳米抗体库的扩增结果

PCR 扩增进行琼脂糖凝胶电泳，扩增出 810 bp 的条带，结果如图 3-2。

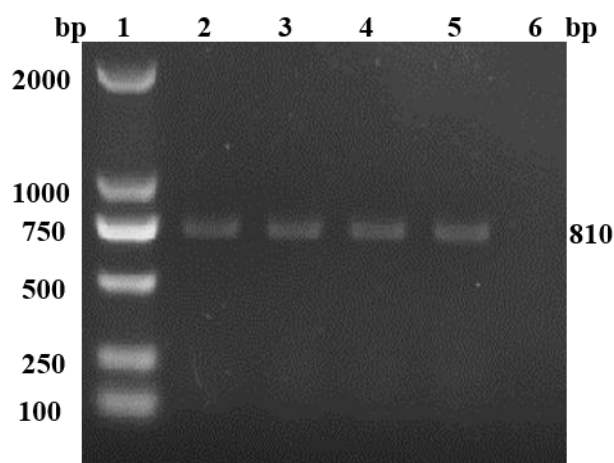


图 3-2 PCR 扩增图

Figure 3-2 PCR Amplification plot

1: DNA Marker; 2-6: 验证样品

1: DNA Marker; 2-6: Verify the sample;

3.3.2 反转录后目的片段的扩增结果

将 8 轮筛选后的反转录产物进行 PCR 扩增后，电泳验证，结果显示扩增出一条长约 504 bp 的条带，且无其他杂带，结果如图 3-3。

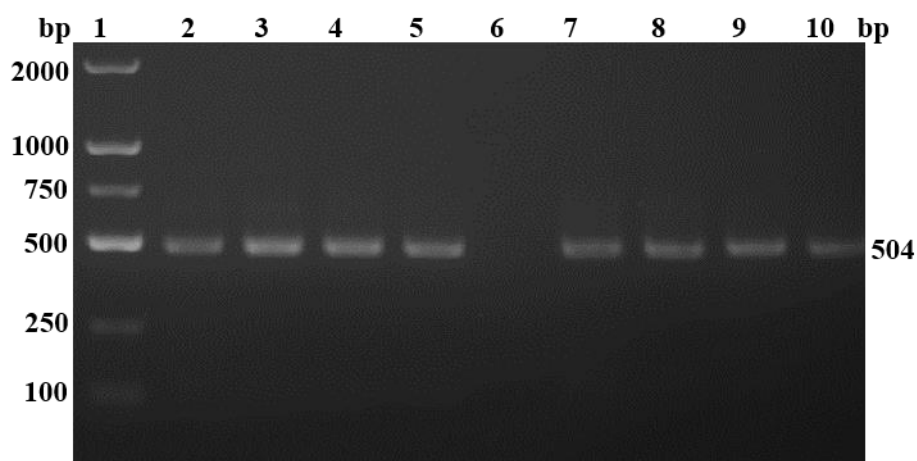


图 3-3 PCR 验证图

Figure 3-3 PCR validation plot

1: DNA Marker; 2-5: 验证样品; 6: 阴性对照; 7-10: 验证样品

1: DNA Marker; 2-5: Verify the sample; 6: Negative control; 7-10: Verify the sample

3.3.3 重组表达载体构建结果

3.3.3.1 单菌落验证结果

经 PCR 验证，部分菌落可以扩增出 504 bp 单一条带,结果如图 3-4。

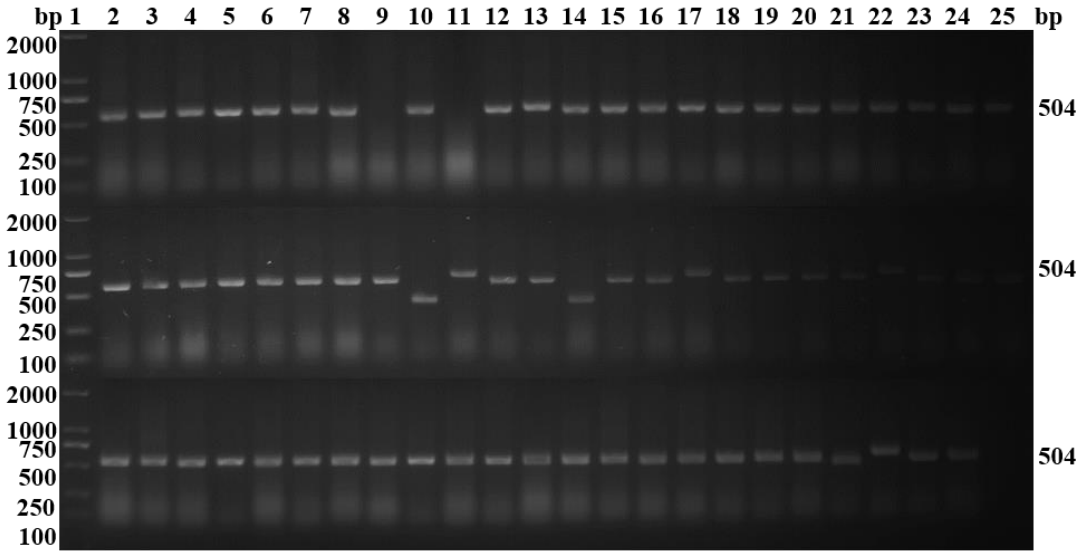


图 3-4 菌落 PCR 验证图
Figure 3-4 Colony PCR validation plot
1: DNA Marker; 2-8: 验证样品; 9: 阴性对照
1: DNA Marker; 2-10:Verify the sample; 9: Negative control

3.3.3.2 测序验证结果

将公司测序回来的结果全部翻译成氨基酸序列，与原始纳米抗体序列进行比对，去除中间存在终止密码子、氨基酸缺失和突变的序列，将序列进行最终比对，共有 13 条氨基酸序列不同的纳米抗体，结果如图 3-5。

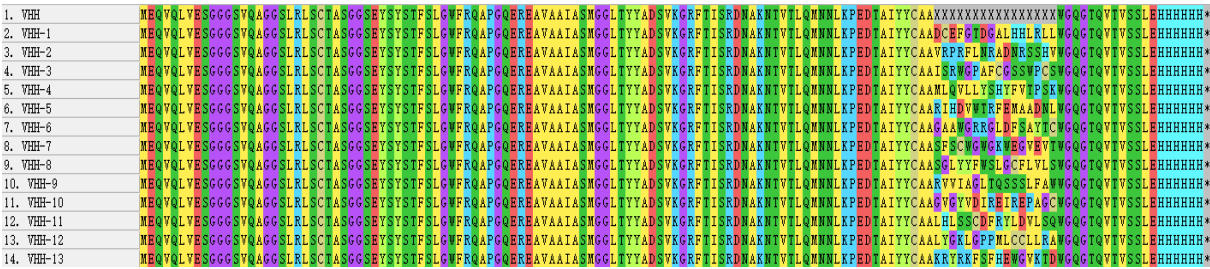


图 3-5 测序验证
Figure 3-5 Sequencing validation

3.3.4 诱导表达结果

根据 SDS-PAGE 图进行分析，蛋白在 25 °C 的温度中表达量高，蛋白为可溶性表达，结果如图 3-6。

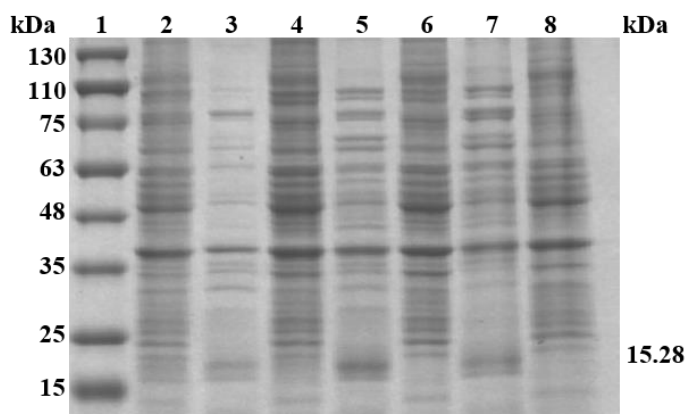


图 3-6 蛋白诱导表达

Figure 3-6 Protein-induced expression

1: Protein Marker; 2: 未诱导; 3: 16 °C LB 培养基诱导上清; 4: 16 °C LB 培养基诱导沉淀; 5: 25 °C LB 培养基诱导上清; 6: 25 °C LB 培养基诱导沉淀; 7: 37 °C LB 培养基诱导上清; 8: 37 °C LB 培养基诱导沉淀
 1: Protein Marker; 2: Not induced; 3: 16 °C LB medium induces supernatant; 4: 16 °C LB medium induces precipitation; 5: 25 °C LB medium induces supernatant; 6: 25 °C LB medium induces precipitation; 7: 37 °C LB medium induces supernatant; 8: 37 °C LB medium induces precipitation

3.3.5 蛋白纯化结果

将序列比对成功的蛋白进行纯化，纯化后进行 SDS-PAGE 及 Western-blot，结果如图 3-7 和图 3-8。

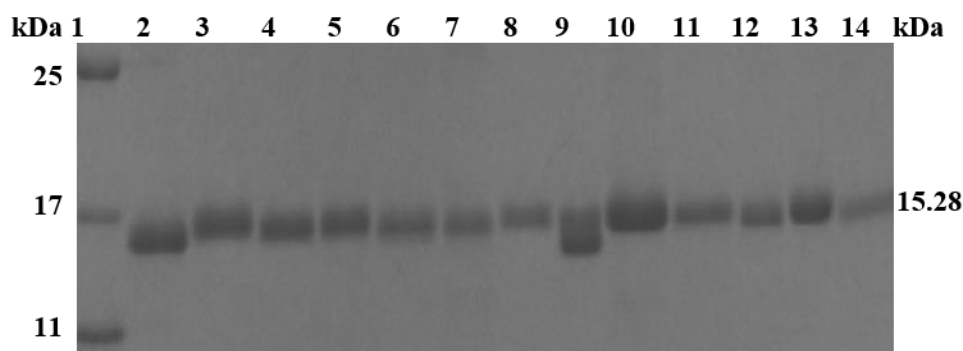


图 3-7 纯化 SDS-PAGE 图

Figure 3-7 Purified SDS-PAGE diagram

1: Protein Marker; 2-14: 不同的纳米抗体纯化
 1: Protein Marker; 2-14: Different nanobody purifications

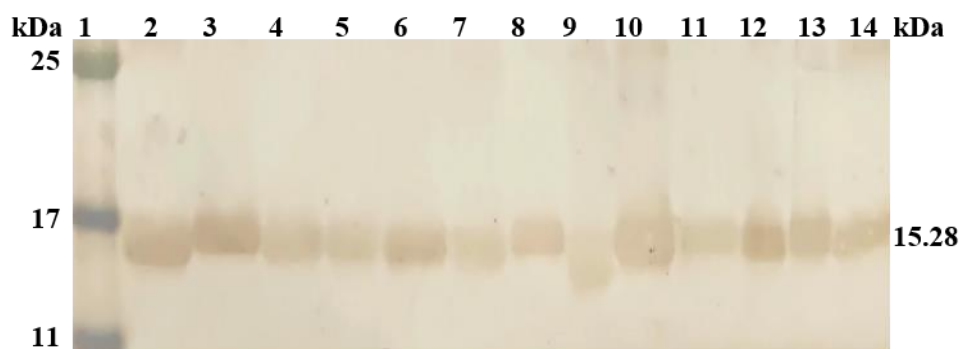


图 3-8 纯化 Western-blot 图

Figure 3-8 Purified Western-blot diagram

1: Protein Marker; 2-14: 不同的纳米抗体纯化
 1: Protein Marker; 2-14: Different nanobody purifications

3.3.6 纳米抗体的鉴定结果

3.3.6.1 亲和力鉴定结果

经 ELISA 数值分析, 将加入 PBS 的作为阴性对照, 经 P/N 值计算, 结果如图 3-9, 分析出 VHH-3 和 VHH-8 亲和力较好, 后续选择 VHH-8 进行实验。

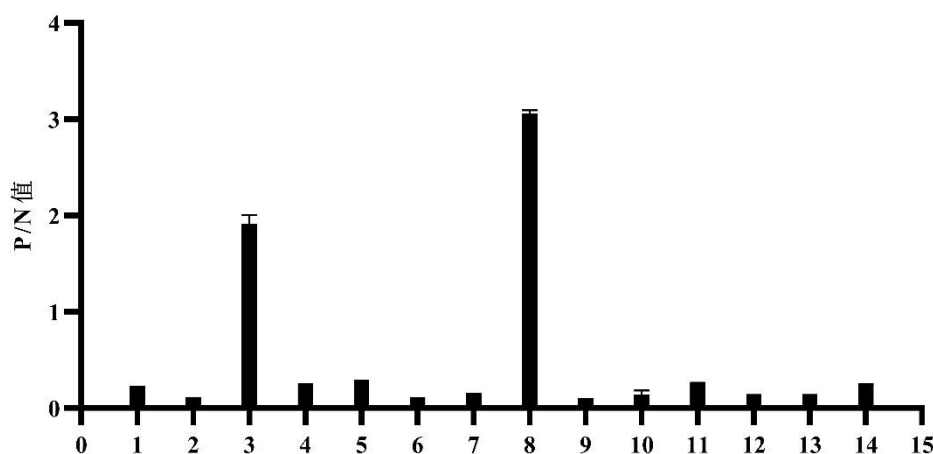


图 3-9 纳米抗体亲和力验证
Figure 3-9 Nanobody Affinity validation

3.3.6.2 抗原表位结果

(1) PCR 扩增, 经电泳后, 扩增出目的条带, 无其他杂带, 结果如图 3-10。

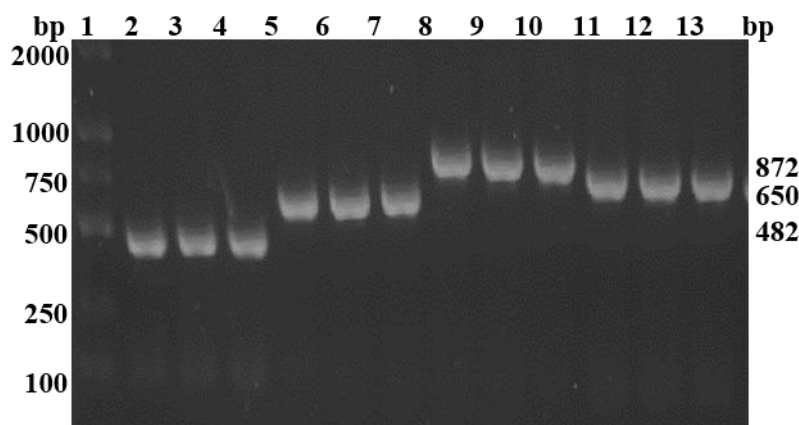


图 3-10 PCR 验证图

Figure 3-10 PCR validation plot

1: DNA Marker; 2-4: BP26-1 目的片段 482 bp; 5-7: BP26-2 目的片段 528 bp; 8-10: BP26-3 目的片段 872 bp;
11-13: BP26-4 目的片段 728 bp;
1: DNA Marker; 2-4: BP26-1 Target fragments 482 bp; 5-7: BP26-2 Target fragments 528 bp; 8-10: BP26-3 Target fragments 872 bp;
11-13: BP26-4 Target fragments 728 bp;

(2) Western-blot 验证抗原表位结果

经 DAB 试剂盒进行显色后, 发现在 BP26-4 处有明显的棕色条带如图 3-11, 蛋白大小与预测大小一致, 该截短部分蛋白的氨基酸序列为 VEISELSRPPMPMPI。



图 3-11 Western-blot 验证图

Figure 3-11 Western-blot validation plot

1: Protein Marker; 2: BP26 蛋白全长; 3: BP26-1 蛋白; 4: BP26-2 蛋白; 5: BP26-3 蛋白; 6: BP26-4 蛋白;
1: Protein Marker; 2: Full length of BP26 protein; 3: BP26-1 Protein; 4: BP26-2 Protein; 5: BP26-3 Protein; 6: BP26-4 Protein;

3.3.6.3 稳定性鉴定结果

经 ELISA 数值分析，纳米抗体在 4-80 °C 时，可稳定存在；纳米抗体在 pH=1-13 时可稳定存在，结果如图 3-12 和图 3-13。

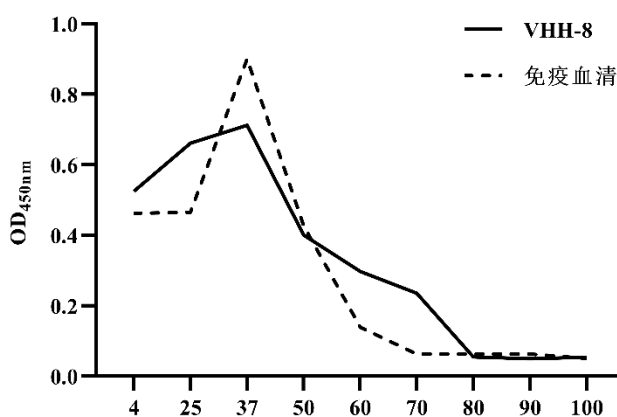


图 3-12 不同温度下数值

Figure 3-12 Values at Different Temperatures

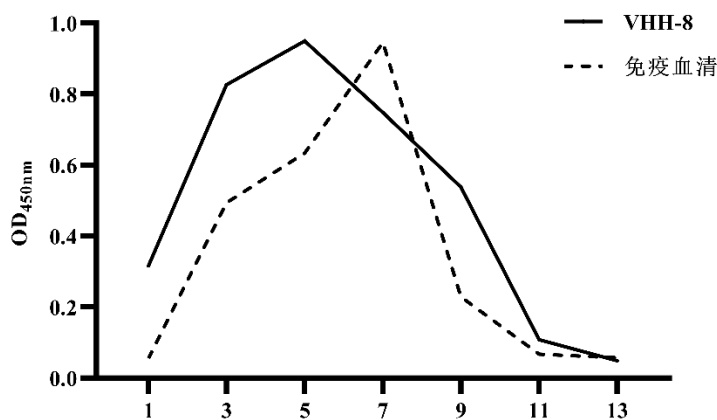
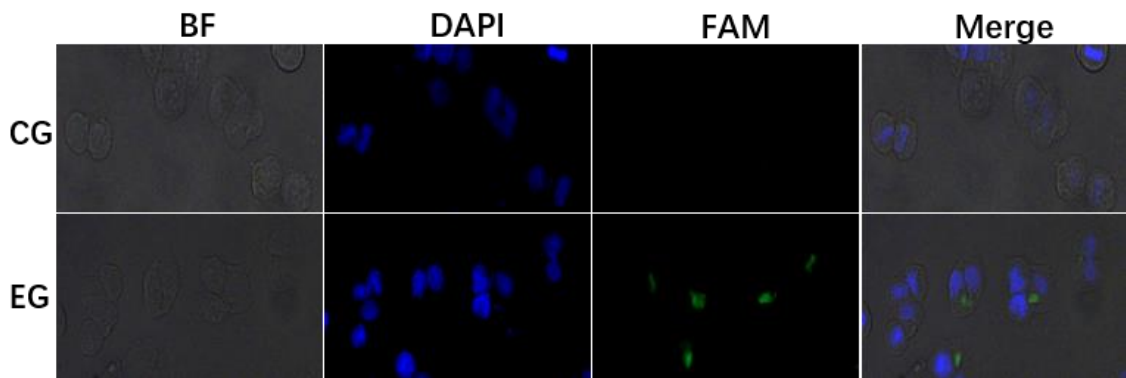


图 3-13 不同 pH 下数值

Figure 3-13 Values at Different pH

3.3.6.4 穿透性鉴定结果

通过荧光显微镜下进行观察，PK-15 的细胞核经 DAPI 染色后为蓝色，纳米抗体所带的荧光为绿色，利用软件 ImageJ 进行相互重叠后，可以看出纳米抗体可以透过细胞膜进入到细胞内，结果如图 3-14。



注：CG：对照组，不加纳米抗体；EG：实验组，加入荧光标记的纳米抗体

图 3-14 荧光显微镜观察结果
Figure 3-14 Fluorescence microscope results

3.4 讨论

核糖体展示技术是一种基于核糖体的体外展示技术，1994 年 Mattheakis 建立了多肽多聚核糖体展示技术，1997 年 Plückthun 等人在此前技术的基础上建立了核糖体展示技术(Hanes, J,et al, 1997)，该技术自建立以来，经过不断的完善创新，现在已经应用在各种医学领域。核糖体展示技术包括以下步骤，构建核糖体展示元件、抗体库的体外转录翻译、翻译后产物与目标蛋白结合、mRNA 的洗脱、反转录、重叠 PCR 构建核糖体展示元件(Li, H,et al, 2021)，原核系统进行筛选时由于内源性 Rnase 的影响，反应生成的 mRNA 比较容易降解，难以保持原有活力，因此在体外翻译之后应该迅速将产物放在冰上冷却并进行结合筛选，这样做会在减少 RNA 的降解同时还会提高核糖体的展示效率，更有利于筛选到特异性的抗体，同时还可以加入镁离子，保证核糖体的大小亚基不分离，保持其完整性(李敏，2015)。筛选过程中可以保持在含有 1 %-2 %脱脂奶粉和 0.2 %肝素的条件下，不仅有利于减少非特性的吸附还可以抑制核酸酶的活性，洗脱下来的 mRNA 必须要进行纯化操作以去除 DNA 模板，方便进行后续的逆转录和重叠 PCR 重新构建核糖体展示元件(Schrankel, C S,et al, 2019)。

纳米抗体，也被称为单域抗体，由重链只包含单个可变区域(VHH, variable domain of heavy chain)组成(Nasiri, F,et al, 2023)。纳米抗体是从骆驼、鲸鱼和其他鲸鱼科动物的血液中发现的(Minatel, V M,et al, 2023)，纳米抗体由三个抗原互补决定区(CDRs)和四个骨架区(FRs)构成(Thompson, M K,et al, 2024)，纳米抗体很小，只有 15 kDa 左右(Lan, Z,et al, 2023)，而常规的抗体为 150 kDa(Hamers-Casterman, C,et al, 1993)，纳米抗体具有高度稳定的理化特性，可以在 80 °C高温下和 pH=11 的溶液中仍具有结合活性，纳米

抗体在结构上是扁平状，在抗原亲和区形成凸环状结构(Stahler, T,et al, 2022)，更有利于与抗原的结合，并且纳米抗体的结构域比较单一，方便进行改造(Tang, X,et al, 2024)。目前纳米抗体因其低毒性，分子量较小和高度特异性等优点使其进入到大众的视野中(Laroche, A,et al, 2022)，在药物传递(Abdolvahab, M H,et al, 2024, Sakata, J,et al, 2024)、肿瘤治疗(Zhang, S,et al, 2024)等方面逐步研发使用。

本章通过人工改造纳米抗体的 CDR3，采用 NNN 法进行随机突变，送至金唯智公司进行合成，经计算文库多样性约为 10^{14} ，文库多样性好，将合成好的纳米抗体库利用 *E. coli* S30 Extract System 试剂盒进行体外转录翻译，将 BP26 蛋白包被在酶标板上进行固相筛选，筛选后提取 RNA，后续进行反转录和构建核糖体展示元件，本次共进行了 8 次筛选，将最后筛选后的基因片段构建到 pET-28a 上，转化后将单菌落 PCR 扩增进行琼脂糖凝胶电泳，将验证成功的单菌落送至生工生物(上海)公司测序，测序完成后进行序列比对，最终剩有 13 条纳米抗体，将这些纳米抗体进行亲和纯化，由于每条纳米抗体的 CDR3 处的氨基酸序列不同，并且在纳米抗体纯化和保存过程中，部分存在降解，因此经 SDS-PAGE 和 Western-blot 验证，纳米抗体的条带为位置存在细微差别，纯化后利用间接 ELISA 方法通过读取 OD_{450nm} 值来判定结合力，经 P/N 值计算，最终 VHH-3 和 VHH-8 结合效果较好，后续进行纳米抗体性质的鉴定。经鉴定，纳米抗体在温度 4-80 °C，在 pH=1-11 时仍具有结合活性；纳米抗体穿透力比较好，因此进行了抗体入胞实验，在共孵育 4 h 后，荧光标记的纳米抗体可以进入到上皮细胞 PK-15 中；对截短的 BP26 蛋白进行 Western-blot 验证，利用纳米抗体作为一抗进行孵育，结果显示纳米抗体与 BP26 结合的表位是 VEISELSRPPMPMPI。

3.5 小结

1. 利用BP26蛋白进行纳米抗体库的筛选，成功筛选到两条特异性好，结合力高的BP26的纳米抗体。
2. 该纳米抗体靶向表位为 VEISELSRPPMPMPI。
3. 对纳米抗体进行性质鉴定，纳米抗体的稳定性和细胞穿透性良好。

第四章 纳米抗体竞争 ELISA 检测方法的建立

酶联免疫吸附试验(ELISA)是利用抗原和抗体之间的特异性结合反应,通过检测酶标记物来产生可观察的信号。它具有高灵敏度、高特异性、可量化的结果和相对简单易行等优点。纳米抗体结构稳定,分子量较小,并且与抗原有较高的亲和力,本章在前两章的基础上,确定 ELISA 最佳反应条件,建立纳米抗体的竞争 ELISA 检测方法。

4.1 材料

4.1.1 试剂

表 4-1 试剂
Table 4-1 Reagents

试剂 Reagent	厂家 Producer
Na ₂ CO ₃	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
NaHCO ₃	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
MgCl ₂	沈阳化学试剂厂
石炭酸	生工生物工程(上海)股份有限公司
脱脂奶粉	北京索莱宝科技有限公司
明胶	上海麦克林生化科技有限公司
卵白蛋白	北京索莱宝科技有限公司
BSA	生工生物工程(上海)股份有限公司
可溶型单组分 TMB 底物溶液	天根生化科技(北京)有限公司
硫酸	西陇科学股份有限公司

4.1.2 耗材

表 4-2 耗材
Table 4-2 Consumables

耗材 Consumables	厂家 Producer
酶标板	生工生物工程(上海)股份有限公司
一次性封板膜	海克斯生选
1.5 mL、5 mL、10 mL、15 mL、50 mL 离心管	北京兰杰柯科技有限公司
1 mL、200 μ L、10 μ L 枪头	北京兰杰柯科技有限公司

4.1.3 仪器设备

表 4-3 仪器设备
Table 4-3 Instruments and equipments

仪器 Apparatus	厂家 Producer
排枪	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
洗板机	Thermo Fisher Scientific Inc
酶标仪	BioTek Instruments, Inc

4.2 方法

4.2.1 间接 ELISA 检测方法的建立

4.2.1.1 最佳重组蛋白最优包被浓度的确定

将重组蛋白 BP26 稀释至 10 ng/mL、100 ng/mL、1 μ g/mL、和 5 μ g/mL 的浓度加入到酶标板中，每孔加入 100 μ L 蛋白稀释液，37 $^{\circ}$ C 反应 1 h 后，用洗板机清洗 5 次，拍干后加入 200 μ L 的 5 % 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h，封闭结束进行洗板并将其拍干，后加入浓度为 500 μ g/mL 的纳米抗体一抗，然后加入稀释好的 1: 5000 的骆驼二抗，TMB 显色后，用 1.8 M 硫酸溶液终止显色，读取酶标仪 OD_{450nm} 数值，进行分析。

4.2.1.2 间接 ELISA 最佳封闭液的确定

用计算分析出的最优重组蛋白包被浓度包被酶标板，分别用 5 % 脱脂奶粉、1 % BSA、5 % OVA 和 3 % 明胶封闭，后加入浓度为 500 μ g/mL 的纳米抗体一抗，再加入稀释好的 1: 5000 的骆驼二抗，TMB 显色后，步骤同 4.2.1.1。

4.2.1.3 间接 ELISA 最佳二抗稀释倍数的确定

将重组蛋白用稀释至 100 ng/mL 的浓度，每孔加入 100 μ L 到酶标板中，包被 1 h，然后加入 200 μ L 的 5 % 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h，后加入浓度为 500 μ g/mL 的纳米抗体一抗加入到微孔中，将骆驼二抗进行 1000、2000、3000、4000、5000 倍稀释后，加入酶标板，TMB 显色后，步骤同 4.2.1.1。

4.2.2 竞争 ELISA 检测方法的建立

4.2.2.1 最佳重组蛋白最优包被浓度确定

将重组蛋白 BP26 用稀释至 10 ng/mL、100 ng/mL、1 μ g/mL、和 5 μ g/mL 的浓度加入到酶标板中，每孔加入 100 μ L 蛋白稀释液，37 $^{\circ}$ C 反应 1 h 后，用洗板机清洗 5 次，然后加入 200 μ L PBST 稀释的 5 % 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h，将纳米抗体和牛阳性血清 1: 1 稀释后加入到酶标板中，然后加入稀释好的 1: 4000 的牛二抗，步骤同 4.2.1.1。

4.2.2.2 竞争 ELISA 最佳封闭液的选确定

用计算分析出的最优重组蛋白包被浓度包被酶标板，分别用 5 % 脱脂奶粉、1 % BSA、1 % OVA 和 3 % 明胶封闭，封闭后用纳米抗体和牛血清混合液进行孵育，再加入稀释好的 1: 4000 的牛二抗，TMB 显色后，步骤同 4.2.1.1。

4.2.2.3 竞争 ELISA 最佳二抗稀释倍数的确定

将重组蛋白用稀释至 10 ng/mL 的浓度，每孔加入 100 μ L 到酶标板中，包被 1 h，

然后用 200 μL PBST 稀释的 5 %脱脂奶粉封闭, 封闭 2 h, 后用纳米抗体和牛血清混合液进行孵育, 将牛二抗进行 2000、4000、6000、8000 倍稀释后, 加入酶标板, TMB 显色后, 步骤同 4.2.1.1。

4.2.3 两种检测方法的纳米抗体特异性检测

使用两种检测方法同时进行 VHH-8 与兔血清、鼠血清、猪血清、鸡血清的检测, 读取 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, 进行分析。

4.2.4 两种检测方法比较检测纳米抗体的最小工作浓度

用建立好的竞争 ELISA 与间接 ELISA 检测 10 倍倍比稀释的纳米抗体, 测定两种检测方法的最小检测浓度, 分析它们的灵敏性。

4.3 结果

4.3.1 间接 ELISA 最佳重组蛋白最优包被浓度

对酶标仪读取的实验数值进行 P/N 值的计算分析, 取比值最大的作为最优的抗原包被浓度, 因此如图 4-1 分析, 最佳抗原包被浓度为 100 ng/mL 。

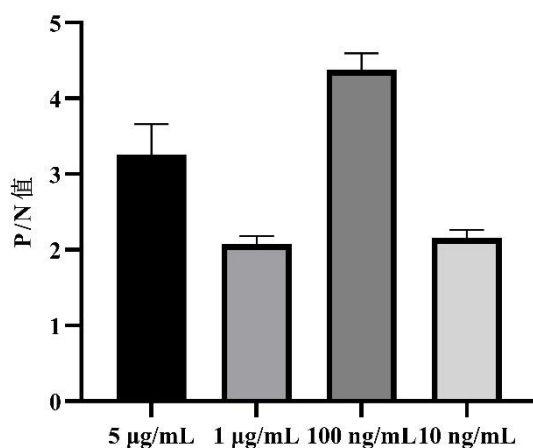


图 4-1 重组蛋白最优工作浓度的确定

Figure 4-1 Determination of optimal working concentration ratio of recombinant protein

4.3.2 间接 ELISA 最佳封闭液的确定

对酶标仪读取的实验数值进行 P/N 值计算，取比值最大的作为最优的封闭液，因此如图 4-2 分析，最佳的封闭液为 5 %脱脂奶粉。

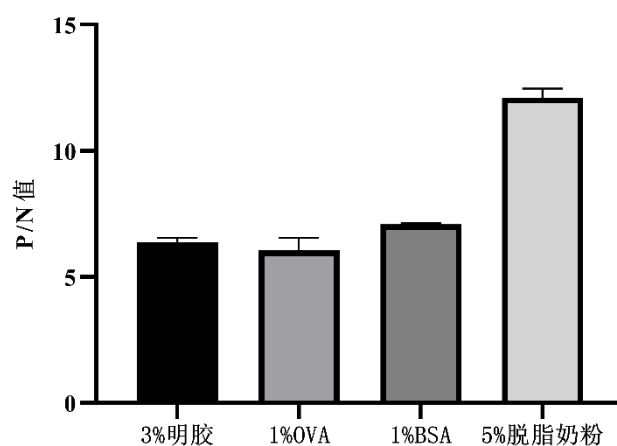


图 4-2 封闭液的选择

Figure 4-2 Selection of blocking solution

4.3.3 间接 ELISA 最佳二抗稀释倍数的确定

对酶标仪读取的实验数值进行 P/N 值计算，取比值最大作为最优的二抗稀释倍数，如图 4-3 分析，最佳的二抗稀释比为 1：1000。

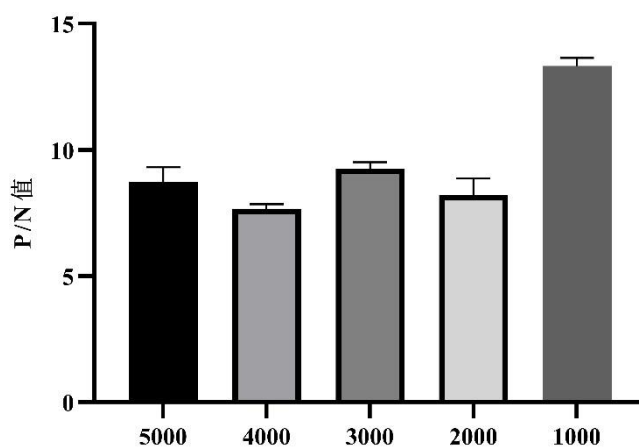


图 4-3 二抗浓度的确定

Figure 4-3 Determination of second antibody concentration

4.3.4 竞争 ELISA 最佳重组蛋白最优包被的浓度确定

对酶标仪读取的实验数值进行 PI 值计算，取比值最大的作为最优的抗原包被浓度如图 4-4 分析，最佳抗原包被浓度为 10 ng/mL。

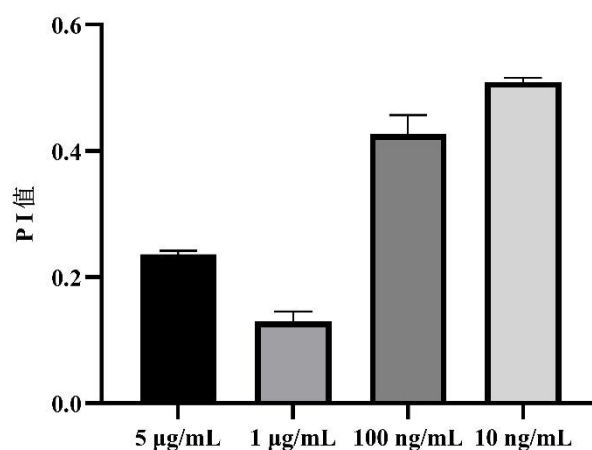


图 4-4 重组蛋白最优工作浓度的确定

Figure 4-4 Determination of optimal working concentration ratio of recombinant protein

4.3.5 竞争 ELISA 最佳封闭液的确定

对酶标仪读取的实验数值进行 PI 值计算，取比值最大的作为最优的封闭液，如图 4-5 分析，最佳的封闭液为 5 %脱脂奶粉。

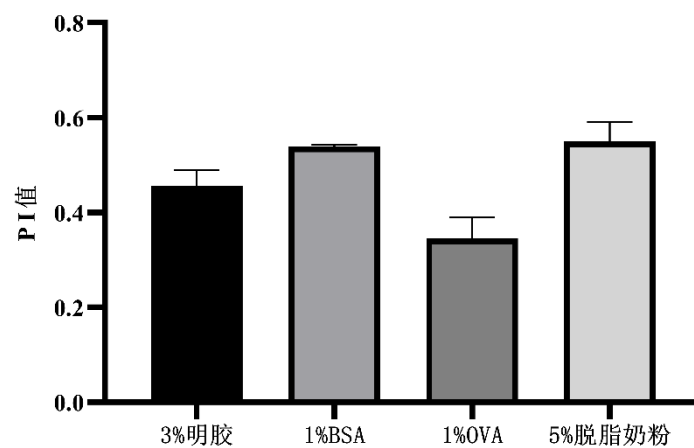


图 4-5 封闭液的选择

Figure 4-5 Selection of blocking solution

4.3.6 竞争 ELISA 最佳二抗稀释倍数的确定

对酶标仪读取的实验数值进行 PI 值计算,取比值最大的作为最优的二抗稀释倍数,因此如图 4-3 分析,最佳的二抗稀释比为 1: 6000。

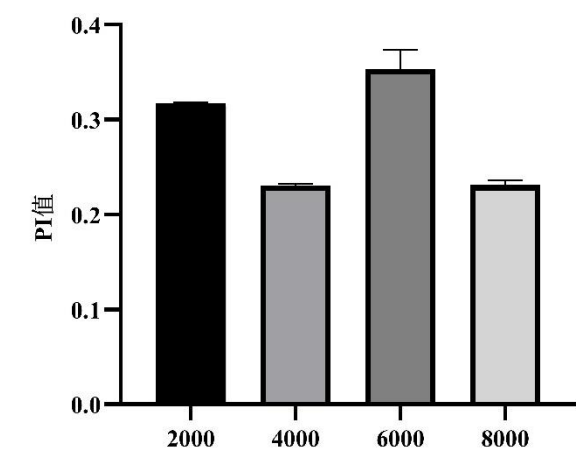


图 4-6 二抗浓度的确定

Figure 4-6 Determination of second antibody concentration

4.3.7 两种检测方法的纳米抗体特异性检测

对酶标仪读取的实验数值分析,发现两种检测方法的特异性较好,与兔血清、鼠血清、猪血清、鸡血清不反应。

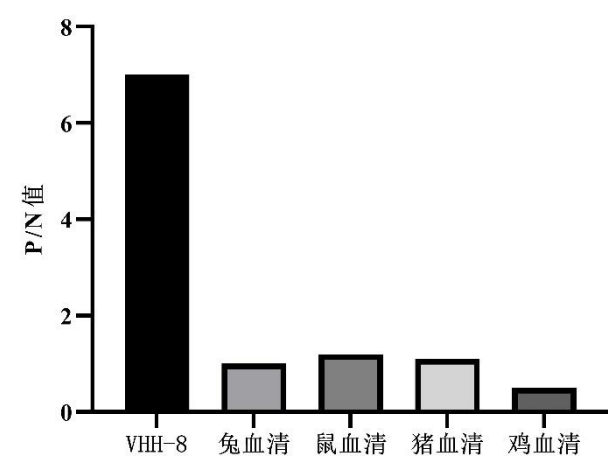


图 4-7 间接 ELISA 特异性检测

Figure 4-7 Indirect ELISA Specific assays

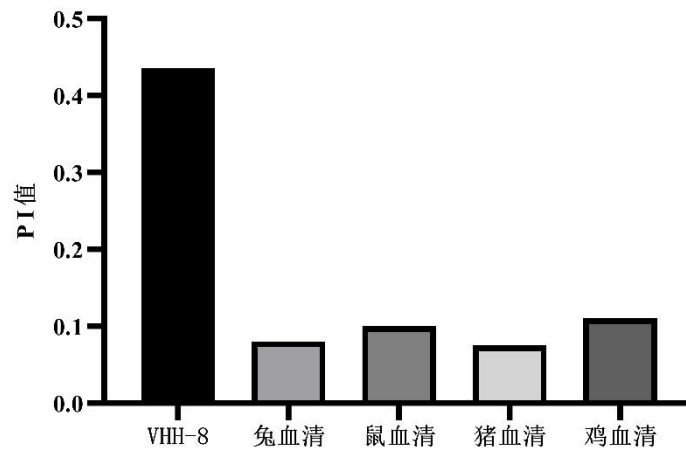


图 4-8 竞争 ELISA 特异性检测

Figure 4-7 Competitive ELISA Specific assays

4.3.8 两种检测方法比较检测纳米抗体的最小工作浓度

对酶标仪读取的实验数值分析,同时用两种检测方法检测纳米抗体的最小结合浓度,间接 ELISA 可以检测纳米抗体的浓度为 $320\ \mu\text{g/mL}$,竞争 ELISA 可以检测纳米抗体的浓度为 $12.8\ \mu\text{g/mL}$ 。

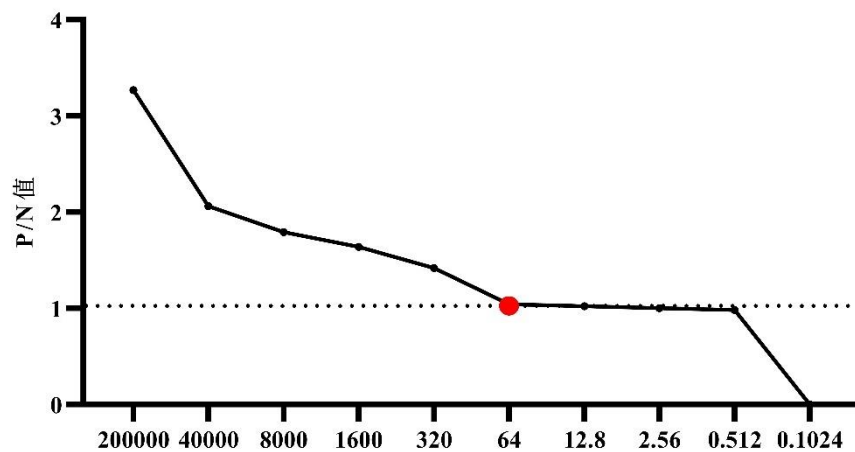


图 4-9 间接 ELISA 检测

Figure 4-9 Indirect ELISA detection

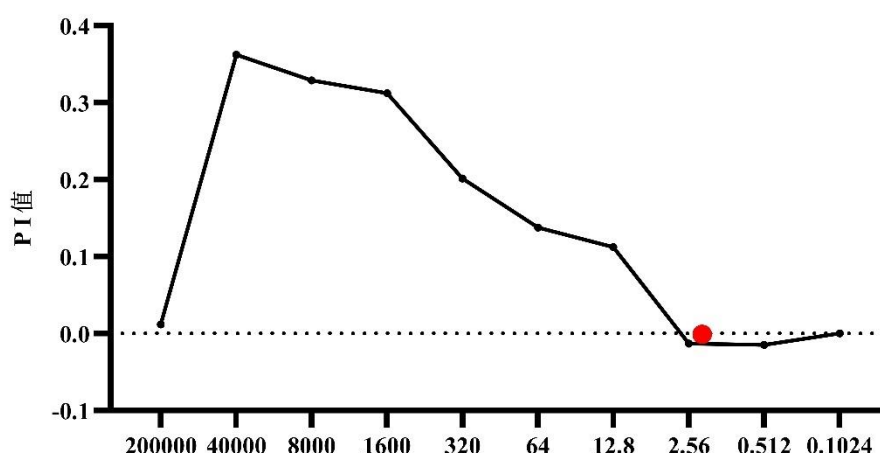


图 4-10 竞争 ELISA 检测

Figure 4-10 Competitive ELISA detection

4.4 讨论

酶联免疫吸附试验(ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)是基于酶与抗体或抗原的特异性结合的原理,通过颜色反应来检测目标物质的存在量,它具有高灵敏度、高特异性和操作简便等优点(Yang, G, et al, 2022),被广泛应用于医学诊断、生物学研究和药物开发等领域。目前已经被研发出 ELISA 检测方法有多种;直接 ELISA 是将特异性抗体与待测物直接结合,待测物可以是抗原或抗体,该方法简单快速,但灵敏度相对较低;间接 ELISA 使用两个抗体来检测待测物,首先,待测物与特异性的一抗结合,然后再加入与一抗发生结合的二抗,以产生可观察的信号,间接 ELISA 的一抗和二抗可以用于多个实验,比较节约成本;竞争 ELISA 用于测量样品中待测物的浓度,待测物与固定在微孔板上的抗原竞争结合,而已标记的抗原与待测物竞争结合(Zhou, J, et al, 2023),竞争 ELISA 在一定程度上可以检测浓度较低的目标物;阻断 ELISA 是另一种 ELISA 检测方法,用于检测和定量测量样品中特定抗原或抗体的存在和浓度,并通过添加阻断试剂来评估样品中的特异性结合(Guo, Z, et al, 2024),该方法可以减少非特异性结合,使结果更可信。

本研究先建立了间接 ELISA 检测方法,但由于检测的灵敏性比较低,二抗稀释倍数较小,背景较高,实验误差较大,而竞争 ELISA 可以在一定的条件下检测浓度较低的目标物,因此又建立了竞争 ELISA 检测方法,两种检测方法均将抗原稀释至 10 ng/mL、100 ng/mL、1 μ g/mL、和 5 μ g/mL 的浓度,封闭液使用 5 %脱脂奶粉、1 % BSA、1 % OVA 和 3 % 明胶封闭,二抗分别稀释,进行 P/N 值计算。最终确定间接 ELISA 检测方法中 BP26 包被浓度为 100 ng/mL,封闭液为 5 %脱脂奶粉,二抗的稀释倍数为 1000 倍;竞争 ELISA 检测方法中 BP26 包被浓度为 10 ng/mL,封闭液为 5 %脱脂奶粉,二抗的稀

释倍数为 6000 倍，通过对建立的两种方法比较，竞争 ELISA 更加节约成本，并且通过将纳米抗体进行梯度稀释，同时用两种检测方法检测纳米抗体的最小结合浓度，间接 ELISA 可以检测纳米抗体的浓度为 320 $\mu\text{g/mL}$ ，竞争 ELISA 可以检测纳米抗体的浓度为 12.8 $\mu\text{g/mL}$ ，就本实验而言，竞争 ELISA 具有较高的灵敏性。

4.5 小结

建立了间接 ELISA 和竞争 ELISA 两种检测方法检测纳米抗体，竞争 ELISA 的灵敏性更好。

结 论

1. 成功构建 pET-28a-BP26 重组表达载体,表达纯化后获得纯度良好的 BP26 蛋白;免疫家兔后获得高滴度的多克隆抗体。
2. 通过核糖体展示技术,成功筛选到针对于 BP26 蛋白的 VEISELSRPPMPMPI 表位的纳米抗体,稳定性和穿透性良好。
3. 建立了检测纳米抗体的间接 ELISA 和竞争 ELISA 方法,竞争 ELISA 能检测出更低浓度的纳米抗体,灵敏性较好。

参考文献

1. 崔志伟. 猪布鲁氏杆菌病的流行病学特征、诊断与防控[J]. 农业工程技术,2022,42(11):84-86.
2. 范佳铭, 龙丽瑾, 刘文韬等. 大容量天然鸡源噬菌体单链抗体库的构建[J]. 疾病监测,2024.
3. 何宗耀, 周志雄, 李文杰. 动物布鲁氏菌病的防治[J]. 畜禽业,2021,32(05):85-86.
4. 李敏. 核糖体展示纳米抗体文库的构建及HIF-1 α 纳米抗体的筛选[D].2015.天津大学.
5. 李瑞珍. 布鲁氏菌Omp25、RicA和BspB抑制cGAS-STING通路活化的分子机制研究[D].2022.西北农林科技大学.
6. 刘文兴. 布鲁氏菌标记疫苗(M5-90-26)的鉴别诊断及其bp26蛋白的免疫原性分析[D].2011.南京农业大学.
7. 田路路. 布鲁氏菌外膜蛋白16的原核表达及其抗体间接ELISA方法的建立[D].2021.西北农林科技大学.
8. 童志霞. 布鲁氏菌主要外膜蛋白对树突状细胞成熟度及抗原递呈的影响[D].2018.石河子大学.
9. 王建玲. 羊种布鲁氏菌外膜蛋白10抗原性研究及VirB8基因缺失株载体的构建[D].2021.青海大学.
10. 王军, 王瑞, 申之义等. 流产布鲁氏菌bp26和omp10基因的同源性分析[J]. 中国兽医科学,2011,41(01):25-30.
11. Chen Y, Shu X, Zhao Y, et al. Single chain antibody fragment display systems: a review[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao,2023,39(9):3681-3694.
12. He W J, Zhang P P, Wang D Q. A case of brucellosis complicated with capillary leak syndrome and multiple organ dysfunction syndrome[J]. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi,2023,41(9):685-688.
13. Liu Z Q, Sun Z H, Zheng P, et al. Directed evolution of D-lactonohydrolase by error prone PCR and DNA shuffling[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao,2005,21(5):773-781.
14. Tang X, Deng A, Chen W, et al. Advances in nanobody screening technology[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao,2024,40(2):350-366.
15. Zhao X L, Chen W Q, Li J M, et al. Preparation of human antibodies to TNF-alpha using ribosome display technology[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi,2009,25(2):145-149.
16. Abdolvahab M H, Karimi P, Mohajeri N, et al. Targeted drug delivery using nanobodies to deliver effective molecules to breast cancer cells: the most attractive application of nanobodies [J]. Cancer Cell Int,2024,24(1):67.
17. Al-Sanouri T, Khader Y, Hailat E, et al. Seroprevalence of Human Brucellosis among Syrian Refugees in Jordan, 2022[J]. J Pathog,2023,2023(2023):5885316.
18. Amini M, Alamian S, Talebhemmat M, et al. Equine brucellosis in Iran: serological, bacteriological and molecular analysis[J]. Vet Res Commun,2024.
19. Azizpour M M, Jafari P, Hoseini S D, et al. Cloning and Expression of B. mellitensis bp26 Gene in Lactococcus lactis as a Food Grade Vaccine[J]. Avicenna J Med Biotechnol,2019,11(3):264-267.
20. Bai Q, Li H, Wu X, et al. Comparative analysis of the main outer membrane proteins of Brucella in the diagnosis of brucellosis[J]. Biochem Biophys Res Commun,2021,560(2021):126-131.

21. Bardenstein S, Grupel D, Blum S E, et al. Public and animal health risks associated with spill over of *Brucella melitensis* into dairy farms[J]. *Microb Genom*,2023,9(4):mgen001014.
22. Barros N, Ribeiro M L, Freitas A R, et al. Serological and Molecular Survey of *Brucella* Species in Owners and Their Dogs Living on Island and Mainland Seashore Areas of Brazil[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*,2024,24(2):104-110.
23. Baurand P E, Balland J, Galli E, et al. New Anti-RSV Nucleoprotein Monoclonal Antibody Pairs Discovered Using Rabbit Phage Display Technology[J]. *Antibodies (Basel)*,2023,12(4):73.
24. Buzas D, Bunzel A H, Stauffer O, et al. In vitro generated antibodies guide thermostable AD Dimer nanoparticle design for nasal vaccination and passive immunization against SARS-CoV-2[J]. *Antib Ther*,2023,6(4):277-297.
25. Chen F, Liu Z, Kang W, et al. Single-domain antibodies against SARS-CoV-2 RBD from a two-stage phage screening of universal and focused synthetic libraries[J]. *BMC Infect Dis*,2024,24(1):199.
26. Cherf G M, Cochran J R. Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering[J]. *Methods Mol Biol*,2015,1319(2015):155-175.
27. Cloeckaert A, Baucheron S, Vizcaino N, et al. Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*,2001,8(4):772-775.
28. De la Pena-Sosa G, Cabello-Hernandez A I, Gomez-Ruiz R P, et al. Pituitary Abscess Causing Panhypopituitarism in a Patient With Neurobrucellosis: Case Report[J]. *AACE Clin Case Rep*,2024,10(1):10-13.
29. Delvecchio V G, Kapatral V, Elzer P, et al. The genome of *Brucella melitensis*[J]. *Vet Microbiol*,2002,90(1-4):587-592.
30. Dotter H, Boll M, Eder M, et al. Library and post-translational modifications of peptide-based display systems[J]. *Biotechnol Adv*,2021,47:107699.
31. Elbehiry A, Aldubaib M, Marzouk E, et al. The Development of Diagnostic and Vaccine Strategies for Early Detection and Control of Human Brucellosis, Particularly in Endemic Areas[J]. *Vaccines (Basel)*,2023,11(3):654.
32. Eltahir Y, Al-Araimi A, Nair R R, et al. Binding of *Brucella* protein, Bp26, to select extracellular matrix molecules[J]. *BMC Mol Cell Biol*,2019,20(1):55.
33. Eltahir Y, Al-Araimi A, Nair R R, et al. Correction to: Binding of *Brucella* protein, Bp26, to select extracellular matrix molecules[J]. *BMC Mol Cell Biol*,2020,21(1):16.
34. Frank A M, Weidner T, Brynza J, et al. CD8-Specific Designed Ankyrin Repeat Proteins Improve Selective Gene Delivery into Human and Primate T Lymphocytes[J]. *Hum Gene Ther*,2020,31(11-12):679-691.
35. Frenzel A, Schirrmann T, Hust M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy[J]. *MAbs*,2016,8(7):1177-1194.
36. Furuhashi T, Sakamoto K, Wada A. Genetic Code Expansion and a Photo-Cross-Linking Reaction Facilitate Ribosome Display Selections for Identifying a Wide Range of Affinity Peptides[J]. *Int J Mol Sci*,2023,24(21):15661.
37. Gao S, Peng R, Zeng Z, et al. Risk transboundary transmission areas and driving factors of brucellosis along the borders between China and Mongolia[J]. *Travel Med Infect Dis*,2023,56(20

- 23):102648.
38. Genc O, Buyuktanir O, Yurdusev N. Rapid immunofiltration assay based on colloidal gold-protein G conjugate as an alternative screening test for bovine and ovine brucellosis[J]. Trop Anim Health Prod,2012,44(2):213-215.
39. Ghani S, Bandehpour M, Yarian F, et al. Production of a Ribosome-Displayed Mouse scFv Antibody Against CD133, Analysis of Its Molecular Docking, and Molecular Dynamic Simulations of Their Interactions[J]. Appl Biochem Biotechnol,2023,196(3):1399-1418.
40. Ghani S, Bandehpour M, Yarian F, et al. Production of a Ribosome-Displayed Mouse scFv Antibody Against CD133, Analysis of Its Molecular Docking, and Molecular Dynamic Simulations of Their Interactions[J]. Appl Biochem Biotechnol,2024,196(3):1399-1418.
41. Govindasamy K, Etter E, Harris B N, et al. Knowledge of Brucellosis, Health-Seeking Behaviour, and Risk Factors for Brucella Infection amongst Workers on Cattle Farms in Gauteng, South Africa[J]. Pathogens,2021,10(11):1484.
42. Guo Z, Xu H, Zhang S, et al. Improved detection sensitivity of anti-PRV variant antibodies through preparation of anti-gB and anti-gE monoclonal antibodies and development of blocking ELISAs[J]. Int J Biol Macromol,2024,260(Pt 1):129425.
43. Gupta S, Singh D, Gupta M, et al. A combined subunit vaccine comprising BP26, Omp25 and L7/L12 against brucellosis[J]. Pathog Dis,2019,77(8):ftaa002.
44. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. Nature,1993,363(6428):446-448.
45. Hanes J, Pluckthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1997,94(10):4937-4942.
46. Hans R, Thavaselvam D. Immunoassay-based evaluation of rOmp28 protein as a candidate for the identification of Brucella species[J]. J Med Microbiol,2023,72(6):10-1099.
47. Hashemzadeh P, Nezhad S A, Khoshkhabar H. Immunoinformatics analysis of Brucella melitensis to approach a suitable vaccine against brucellosis[J]. J Genet Eng Biotechnol,2023,21(1):152.
48. Hlaing S S, Kubota S, Makita K, et al. Association of farmers' knowledge, attitude and practices with bovine brucellosis seroprevalence in Myanmar[J]. Anim Biosci,2024.
49. Jia B, Ojima-Kato T, Kojima T, et al. Rapid and cost-effective epitope mapping using PURE ribosome display coupled with next-generation sequencing and bioinformatics[J]. J Biosci Bioeng,2024,24(1723):2-8.
50. Joshi K, Mazumdar V, Nandi B R, et al. Brucella targets the host ubiquitin-specific protease, Usp8, through the effector protein, TcpB, for facilitating infection of macrophages[J]. Infect Immun,2024,92(2):e0028923.
51. Kazemi D, Doosti A, Shakhshi-Niaei M. Immunization of BALB/c mice with BAB1-0278: An initial investigation of a novel potential vaccine for brucellosis based on Lactococcus Lactis vector[J]. Microb Pathog,2023,185(2023):106417.
52. Kong W, Hayashi T, Fiches G, et al. Diversified Application of Barcoded PLATO (PLATO-B C) Platform for Identification of Protein Interactions[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics,2019,17(3):319-331.
53. Kunamneni A, Montera M A, Durvasula R, et al. Rapid Generation and Molecular Docking A

- analysis of Single-Chain Fragment Variable (scFv) Antibody Selected by Ribosome Display Targeting Cholecystokinin B Receptor (CCK-BR) for Reduction of Chronic Neuropathic Pain[J]. *Int J Mol Sci*,2023,24(13):11035.
54. Lan Z, Li L, Sun Y, et al. A procedure for producing an anti-AXL nanobody in *E. coli*[J]. *Protein Expr Purif*,2023,207(2023):106268.
 55. Laroche A, Orsini D M, Chalopin B, et al. Deep mutational engineering of broadly-neutralizing nanobodies accommodating SARS-CoV-1 and 2 antigenic drift[J]. *MAbs*,2022,14(1):2076775.
 56. Li D, Peng Q, Huang C, et al. Cytoplasmic Expression of Nanobodies with Formylglycine Generating Enzyme Tag and Conversion to a Bio-Orthogonal Aldehyde Group[J]. *Methods Mol Biol*,2022,2446(2022):357-371.
 57. Li H, Liu L, Ning B, et al. Selection of an artificial paraquat-specific binding protein from a ribosome display library based on a lipocalin scaffold[J]. *Biotechnol Appl Biochem*,2021,68(6):1372-1385.
 58. Lim H T, Kok B H, Leow C Y, et al. Exploring shark VNAR antibody against infectious diseases using phage display technology[J]. *Fish Shellfish Immunol*,2023,140(2023):108986.
 59. Liu W X, Hu S, Qiao Z J, et al. Expression, purification, and improved antigenic specificity of a truncated recombinant bp26 protein of *Brucella melitensis* M5-90: a potential antigen for differential serodiagnosis of brucellosis in sheep and goats[J]. *Biotechnol Appl Biochem*,2011,58(1):32-38.
 60. Liu X, Wang P, Shi Y, et al. (P)ppGpp synthetase Rsh participates in rifampicin tolerance of persister cells in *Brucella abortus* in vitro[J]. *Microb Pathog*,2023,183(2023):106310.
 61. Manandhar Y, Wang W, Inoue J, et al. Interactions of in vitro selected fluorogenic peptide aptamers with calmodulin[J]. *Biotechnol Lett*,2017,39(3):375-382.
 62. Marchesini M I, Spera J M, Comerci D J. The 'ins and outs' of *Brucella* intracellular journey [J]. *Curr Opin Microbiol*,2024,78:102427.
 63. Mbwapbo G A, van Zwetselaar M, Sonda T, et al. Complete genome sequence of *Brucella abortus* isolated from a human blood culture sample in Tanzania[J]. *Microbiol Resour Announc*, 2024,13(2):e0093023.
 64. Mei M, Lu M, Li S, et al. Development of nanobodies specific to clumping factors A of *Staphylococcus aureus* by yeast surface display[J]. *Int J Biol Macromol*,2024,259(Pt 2):129208.
 65. Minatel V M, Prudencio C R, Barraviera B, et al. Nanobodies: a promising approach to treatment of viral diseases[J]. *Front Immunol*,2023,14(2024):1303353.
 66. Ming K, Hu Y, Zhu M, et al. Development of nanobodies against *Staphylococcus enterotoxin B* through yeast surface display[J]. *Int J Biol Macromol*,2023,253(Pt 2):126822.
 67. Mubanga M, Mfuno R L, Kothowa J, et al. *Brucella* Seroprevalence and Associated Risk Factors in Occupationally Exposed Humans in Selected Districts of Southern Province, Zambia[J]. *Front Public Health*,2021,9(2021):745244.
 68. Nakazawa H, Katsuki T, Matsui T, et al. Synthesis of epitope-targeting nanobody based on native protein-protein interactions for FtsZ filamentation suppressor[J]. *Biotechnol J*,2023,18(11):e2300039.
 69. Nasiri F, Safarzadeh K P, Rahbarizadeh F. T-cells engineered with a novel VHH-based chimeric antigen receptor against CD19 exhibit comparable tumoricidal efficacy to their FMC63-base

- d counterparts[J]. *Front Immunol*,2023,14:1063838.
70. Pacheco S, Behar G, Maillason M, et al. Affinity transfer to the archaeal extremophilic Sac7 d protein by insertion of a CDR[J]. *Protein Eng Des Sel*,2014,27(10):431-438.
71. Paulsen I T, Seshadri R, Nelson K E, et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2002,99(20):13148-13153.
72. Poulton J S, Lamba S, Free M, et al. High-resolution epitope mapping of commercial antibodies to ANCA antigens by yeast surface display[J]. *J Immunol Methods*,2024,528:113654.
73. Pritam M, Kumar R. Pathophysiology, Current Therapeutic Options, Vaccine Candidates, and Drug Targets for Human Brucellosis[J]. *Curr Mol Pharmacol*,2024,17(1):e1874199800.
74. Sakata J, Tatsumi T, Sugiyama A, et al. Antibody-mimetic drug conjugate with efficient internalization activity using anti-HER2 VHH and duocarmycin[J]. *Protein Expr Purif*,2024,214(2024):106375.
75. Schrankel C S, Gokirmak T, Lee C W, et al. Generation, expression and utilization of single-domain antibodies for in vivo protein localization and manipulation in sea urchin embryos[J]. *Methods Cell Biol*,2019,151(2019):353-376.
76. Stahler T, Danquah W, Demeules M, et al. Development of Antibody and Nanobody Tools for P2X7[J]. *Methods Mol Biol*,2022,2510:99-127.
77. Stranahan L W, Arenas-Gamboa A M. When the Going Gets Rough: The Significance of *Brucella* Lipopolysaccharide Phenotype in Host-Pathogen Interactions[J]. *Front Microbiol*,2021,12(2021):713157.
78. Szadkowska M, Kocot A M, Sowik D, et al. Molecular characterization of the PhiKo endolysin from *Thermus thermophilus* HB27 bacteriophage phiKo and its cryptic lytic peptide RAP-29 [J]. *Front Microbiol*,2023,14(2024):1303794.
79. Thepsuriyanont P, Intarapuk A, Chanket P, et al. ELISA for brucellosis detection based on three *Brucella* recombinant proteins[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*,2014,45(1):130-141.
80. Thompson M K, Sharma N, Thorn A, et al. Deciphering the crystal structure of a novel nanobody against the NEIL1 DNA glycosylase[J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*,2024,80(Pt 2):137-146.
81. Tsuihiji K, Honda E, Kojoh K, et al. Rational Strategy for Designing Peptidomimetic Small Molecules Based on Cyclic Peptides Targeting Protein-Protein Interaction between CTLA-4 and B7-1[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*,2022,15(12):1506.
82. Varikkodan I, Naushad V A, Purayil N K, et al. Demographic characteristics, laboratory features and complications in 346 cases of brucellosis: A retrospective study from Qatar[J]. *IJID Reg*,2024,10(2024):18-23.
83. Vives-Soto M, Puerta-Garcia A, Rodriguez-Sanchez E, et al. What risk do *Brucella* vaccines pose to humans? A systematic review of the scientific literature on occupational exposure[J]. *PLoS Negl Trop Dis*,2024,18(1):e0011889.
84. Yang G, Zhou B, Chen K, et al. Diagnostic Performance of Competitive ELISA and Western Blot Methods for the Detection of Antibodies against *Theileria equi* and *Babesia caballi*[J]. *Microorganisms*,2022,11(1):21.

-
85. Yang Z, Wang C, Liu J, et al. In Silico-Ex Vitro Iteration Strategy for Affinity Maturation of Anti-Ricin Peptides and the SPR Biosensing Application[J]. *Toxins (Basel)*,2023,15(8):490.
 86. Yao M, Guo X, Wu X, et al. Evaluation of the Combined Use of Major Outer Membrane Proteins in the Serodiagnosis of Brucellosis[J]. *Infect Drug Resist*,2022,15(2022):4093-4100.
 87. Yin D, Bai Q, Zhang J, et al. A novel recombinant multiepitope protein candidate for the diagnosis of brucellosis: A pilot study[J]. *J Microbiol Methods*,2020,174(2020):105964.
 88. Zangeneh M, Rezvanfar K, Khosravani-Nejad Y, et al. Infection of tendon sheaths, joints, bursae, soft tissue, and tendon rupture by brucella: A case report[J]. *Clin Case Rep*,2023,11(11):e8157.
 89. Zhang S, Ma J, He L, et al. Generation and characterization of nanobodies targeting human pepsinogens[J]. *Protein Expr Purif*,2024,216(2024):106431.
 90. Zhou J, Ni Y, Wang D, et al. Development of a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Targeting the-p30 Protein for Detection of Antibodies against African Swine Fever Viruses[J]. *Viruses*,2023,15(1):154.