

分类号：

U D C :

密级：

学号：417900210006

南昌大学硕士研究生

学位论文

兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的构建及鉴定

Construction and Identification of Rabbit Anti-adiponectin Phage

Display Fab Antibody Library

叶 敏

培养单位（院、系）：食品学院

指导教师姓名、职称：何庆华 研究员

指导教师姓名、职称：刘师文 副研究员

专业学位种类：生物与医药

专业领域名称：

论文答辩日期：2024 年 5 月 26 日

答辩委员会主席：

评阅人：

2024 年 6 月 4 日

摘要

脂联素与糖尿病、癌症和心血管疾病等多种疾病的发生、发展及转化有着密切的联系。基于免疫分析技术，定量检测脂联素水平对评估相关疾病具有极其重要的意义。目前，国内外主要采用基因工程与杂交瘤技术相结合的方法获得能分泌抗人脂联素球状域的鼠源单克隆抗体的细胞株。据报道，相较于鼠源抗体，兔源抗体具有亲和力强、免疫分析性能优良等优点，本研究为获得兔源脂联素多克隆抗体与单克隆抗体，探究了免疫佐剂与免疫剂量对多克隆抗体效价的影响，开展了兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的构建与淘选，以期为脂联素免疫分析方法的建立提供一种新型的兔源 Fab 抗体免疫分析元件。本研究取得的主要研究进展如下：

1) 基于实验室前期获得的人脂联素球状域蛋白 (gad)，按照不同的免疫剂量与佐剂将兔分为三组进行免疫，检测每轮免疫后血清中抗体效价动态变化。基于 Protein A 层析柱与抗原免疫亲和柱纯化，开展纯化后多克隆抗体与重组 gad 蛋白的结合活性研究。SDS-PAGE 与间接 ELISA 等检测结果显示，抗原免疫亲和纯化可有效提高多克隆抗体中的特异性抗体富集。

2) 基于基因重组技术，以获取的三组免疫后兔的 cDNA 基因为模板，得到编码 Fab 抗体的基因。基于噬菌体展示技术，以噬菌粒 pComb3XTT 为展示载体，制备了库容为 6×10^6 PFU 的兔源抗脂联素 Fab 噬菌粒文库。通过 Sanger 测序技术评估免疫库的质量，多样性良好，插入率为 85.4%，文库有效库容为 5.1×10^6 PFU。基于辅助噬菌体 VCSM13 协助噬菌粒展示 Fab 抗体，制备出滴度为 5.5×10^{13} PFU/mL 的兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体文库。

3) 基于构建的兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库，开展了兔源抗脂联素 Fab 抗体的固相亲和淘选。经过四轮亲和淘选，筛选出 3 种能与重组 gad 蛋白结合的兔源脂联素 Fab 抗体，并发现采用增加洗涤强度、更换封闭剂和改变结合时间等淘选策略能够有效地去除非特异性的 Fab 抗体。

关键词：脂联素多克隆抗体；脂联素单克隆抗体；Fab 抗体；噬菌体展示抗体库

ABSTRACT

Adiponectin is closely related to the occurrence, development and transformation of many diseases such as diabetes, cancer and cardiovascular disease. Based on immunoassay technology, the quantitative detection of adiponectin levels is of great significance for the assessment of related diseases. At present, the combination of genetic engineering and hybridoma technique has been used to obtain murine monoclonal antibody against human adiponectin globules. It has been reported that compared with murine antibodies, rabbit-derived antibodies have strong affinity and excellent immunoassay performance. In order to obtain rabbit-derived adiponectin polyclonal antibodies and monoclonal antibodies, this study investigated the effects of immune adjuvant and dose on the titer of polyclonal antibodies, and carried out the construction and selection of rabbit-derived anti-adiponectin phage Fab antibody library. In order to provide a novel rabbit Fab antibody immunoassay element for the establishment of adiponectin immunoassay method, the main research progress achieved in this study is as follows:

1) Based on the human adiponectin globular domain protein (gad) obtained in the laboratory, rabbits were divided into three groups for immunization according to different immunization doses and adjuvants, and the dynamic change of antibody titer in serum after each round of immunization was detected. Based on the purification of Protein A chromatography column and antigen immunoaffinity column, the binding activity of purified polyclonal antibody and recombinant gad protein was studied. The results of SDS-PAGE and indirect ELISA showed that antigen immunoaffinity purification could effectively improve the specific antibody enrichment of polyclonal antibody.

2) Based on gene recombination technology, cDNA genes of three groups of immunized rabbits were obtained as templates to obtain genes encoding Fab antibodies. Based on phage display technology, rabbit anti-adiponectin Fab phage library was prepared with phage granule pComb3XTT as display vector with a storage capacity of

6×10^6 PFU. The quality of the immune library was evaluated by Sanger sequencing technology. The diversity reached 100%, the insertion rate was 85.4%, and the effective library capacity was 5.1×10^6 PFU. A library of anti-adiponectin phage Fab antibody with titer of 5.5×10^{13} PFU/mL was prepared based on helper phage VCSM13 to assist phage to display Fab antibody.

3) Based on the constructed rabbit-derived anti-adiponectin Fab antibody library, the fixation and selection of rabbit-derived anti-adiponectin Fab antibody were carried out. After four cycles of affinity panning, three kinds of rabbit adiponectin Fab antibodies that can bind to recombinant gad protein were screened, and it was found that non-specific Fab antibodies could be effectively removed by increasing the washing intensity, changing the sealing agent and changing the binding time.

Key words: adiponectin polyclonal antibody; adiponectin monoclonal antibody; Fab antibody; phage display antibody library

缩略语

英文缩写	英文全称	中文全称
gad	globular domain of adiponectin	脂联素球状域蛋白
mAb	Monoclonal Antibody	单克隆抗体
pAb	Polyclonal antibody	多克隆抗体
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫分析法
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
Kana	Kanamycin	卡那霉素
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid	互补脱氧核糖核酸
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
LB	Luria Bertani Medium	LB 培养基
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
CDR	Complementarity Determining Region	互补决定区
OD	Optical Density	吸光度
TMB	Tetramethyl Benzidine	四甲基联苯胺
HRP	Horse Radish Peroxidase	辣根过氧化物酶

目 录

第 1 章 引言.....	1
1.1 人脂联素简介.....	1
1.1.1 人脂联素的结构.....	1
1.1.2 人脂联素与疾病.....	2
1.1.3 脂联素抗体研究现状.....	3
1.2 兔源抗体.....	4
1.2.1 兔多克隆抗体.....	4
1.2.2 兔单克隆抗体.....	4
1.2.3 兔单克隆抗体制备技术.....	5
1.3 研究内容和意义.....	9
1.3.1 研究意义.....	9
1.3.2 研究内容.....	9
1.4 技术路线.....	10
第 2 章 脂联素兔源多克隆抗体的制备	11
2.1 材料与仪器.....	11
2.1.1 主要仪器设备.....	11
2.1.2 主要试剂.....	12
2.1.3 主要试剂配置方法.....	12
2.1.4 实验动物.....	12
2.2 实验方法.....	12
2.2.1 动物免疫.....	12
2.2.2 脂联素多克隆抗体血清的纯化与鉴定	14
2.2.3 抗原免疫亲和柱的制备与多抗纯化.....	15
2.3 结果与分析.....	16
2.3.1 不同免疫剂量及免疫佐剂对兔血清抗体效价的影响	16
2.3.2 脂联素多抗血清的纯化与鉴定.....	18
2.3.3 抗原免疫亲和柱的制备与多抗纯化.....	20
2.4 讨论.....	23
2.5 小结.....	24
第 3 章 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的构建及鉴定	26
3.1 材料与仪器.....	26
3.1.1 引物设计与合成.....	26
3.1.2 主要仪器设备.....	28
3.1.3 主要试剂.....	28

3.1.4 主要试剂配置方法.....	28
3.2 实验方法.....	28
3.2.1 抗体基因获取.....	28
3.2.2 抗体 Fab 基因的获取.....	30
3.2.3 构建 pComb3XTT-Fab 重组质粒.....	33
3.2.4 重组质粒 pComb3XTT-Fab 的转化与鉴定.....	34
3.2.5 文库质量鉴定.....	36
3.2.6 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的救援与库容测定 ..	37
3.3 结果与分析.....	38
3.3.1 总 RNA 提取	38
3.3.2 三轮 PCR 拼接 Fab 基因	39
3.3.3 pComb3XTT-Fab 载体的制备与转化	41
3.3.4 噬菌体 Fab 抗体库的构建.....	43
3.3.5 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的救援与库容测定 ..	45
3.4 讨论.....	45
3.5 小结.....	46
第 4 章 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体的筛选及鉴定	47
4.1 材料与仪器.....	47
4.1.1 主要仪器设备.....	47
4.1.2 主要试剂.....	48
4.1.3 主要试剂配置方法.....	48
4.2 实验方法.....	48
4.2.1 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的富集筛选	48
4.2.2 兔源抗脂联素噬菌体 Fab 抗体单克隆鉴定与分析	49
4.3 结果与分析.....	51
4.3.1 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体文库的淘选	51
4.3.2 噬菌体克隆的结合活性鉴定.....	52
4.3.3 阳性噬菌体克隆的特异性鉴定.....	53
4.3.4 夹心 ELISA 验证噬菌体展示兔源抗脂联素 Fab 抗体	55
4.4 讨论.....	55
4.5 小结.....	56
第 5 章 结论与展望	57
5.1 结论.....	57
5.2 展望.....	58
参考文献.....	59
附录.....	64

第1章 引言

1.1 人脂联素简介

脂肪组织不仅是能量的储存场所，还是一个调节内分泌、主动参与能量代谢平衡的内分泌器官，分泌很多脂肪因子进入血液循环，包括瘦素^[1]、脂联素^[2]（adiponectin, ADPN）、白介素、肿瘤坏死因子、抵抗素和内脂素等。其中脂联素主要由脂肪组织中的脂肪细胞产生和分泌，其在血浆中的浓度是脂肪细胞分泌脂肪因子中最高的，大约占总血浆蛋白的 0.01%，浓度约为 5-30 mg/L^[3]。脂联素在被肝细胞清除之前，对多个器官如肝脏^[4]、肾脏^[5]、血管^[6]、骨^[7]和免疫细胞^[8]等展示出其多效性作用，包括增强胰岛素敏感性、抗糖尿病、抗肥胖、抗炎、抗动脉粥样硬化以及对心脏和神经的保护等^[9]。

1.1.1 人脂联素的结构

脂联素于 1995 年首次被发现，编码该蛋白的基因位于 3q27 染色体上^[10]。人体内的 ADPN 基因共编码 244 个氨基酸，分子量约 28 kDa，没有跨膜疏水区，天然的 ADPN 蛋白由四个部分组成，包括氨基端的信号肽序列、22 个胶原重复序列和羧基端的球状域结构^[11]，其中羧基端的球状域（globular domain of adiponectin, gAd）是 ADPN 蛋白的主要功能结构域，表现出比脂联素全长蛋白更广泛的生物学活性^[12]。

脂联素具有三聚体（LMW），六聚体（MMW）和多聚体结构（HMW）。ADPN 的单体形式只存在于脂肪细胞中，在血液循环中尚未检测到。仅有 10% 左右的 ADPN 以三聚体（LMW）的形式存在，80% 的 ADPN 是以多聚体（HMW）的形式存在^[11]。有研究表明，脂联素可能因其多种程度的内在不稳定性而在一系列人类疾病中发挥作用^[13]。

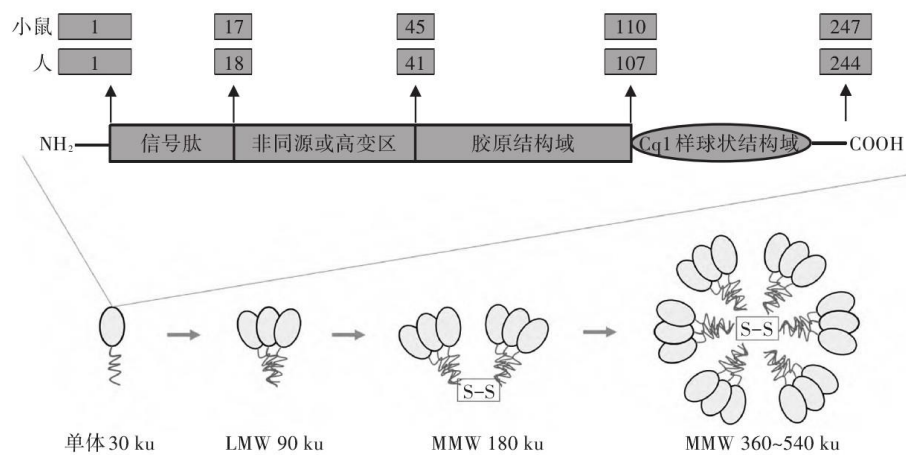


图 1.1 脂联素结构图^[14]

Figure 1.1 Structure diagram of adiponectin^[14]

1.1.2 人脂联素与疾病

1.1.2.1 脂联素与Ⅱ型糖尿病

根据世界卫生组织（WHO）的数据，2023 年全球超过 10 亿人患有肥胖症。肥胖被认为是糖尿病的危险因素之一^[15]，尤其是Ⅱ型糖尿病^[16]。肥胖导致胰岛素抵抗，使身体无法有效利用胰岛素降低血糖水平，最终可能诱发糖尿病。据统计，全球Ⅱ型糖尿病患者比例正在上升，2010 年约为 6.5%(2.85 亿人)，预计到 2030 年将上升至 7%(4.39 亿人)。

研究发现^[17]日本人群的血浆脂联素含量与身体质量指数有关系，相较于体瘦者，肥胖者通常脂联素浓度较低。Weyer^[18]等人研究发现，不同种群的耐糖量不同导致脂联素血症存在差异，可能与空腹胰岛素血症和（或）胰岛素敏感性有关。在不同种族中，具有 Ⅱ 型糖尿病、动脉粥样硬化以及肥胖倾向的人群通常表现出低脂联素血症。胰岛素抵抗和空腹胰岛素血症与肥胖和血糖有关，但与脂联素浓度的关系更为密切。由此推断，胰岛素抵抗和高胰岛素血症主要导致肥胖和 Ⅱ 型糖尿病患者中的低脂联素血症。

1.1.2.2 脂联素与癌症

肥胖已被确认为多种恶性肿瘤的关键风险因素，脂肪细胞分泌的脂肪因子

脂联素，在肥胖相关疾病和癌症防护中具有重要作用。肥胖导致脂肪细胞因子的失调来影响癌症的进展，其中包括增加致癌的脂肪因子瘦素的产生，同时减少脂联素的产生。研究发现，脂联素不仅调控葡萄糖和脂质代谢，还是生殖系统正常功能的基础^[19]。脂联素的低表达与乳腺癌^[20, 21]的发生相关，同时增加患子宫癌的风险，尤其是在 65 岁以下的女性中。此外，脂联素还能抑制胃癌和肝肿瘤的发生^[22]，降低肝癌的风险。

1.1.2.3 脂联素与心血管疾病

脂联素在压力条件下通过多种机制保护心血管组织，包括抑制促炎和肥大反应，以及刺激内皮细胞反应。这些作用主要由于脂联素调节 AMP 激活的蛋白激酶^[23]等信号分子。研究表明，每升高 1 $\mu\text{g/mL}$ 的脂联素浓度，心血管病发生的危险性会降低 3%^[17]。因此，脂联素可能是心血管疾病的有希望的治疗靶标。在细胞和分子水平上，脂联素具有抗凋亡、抗氧化和抗炎作用，有助于减轻心血管疾病的发病机制^[24, 25]。这些发现为研究和开发针对心血管疾病的治疗策略提供了重要的理论基础。

1.1.3 脂联素抗体研究现状

脂联素与糖尿病、癌症、心血管疾病等众多疾病的发生、发展及转化有着紧密的联系，脂联素水平变化在疾病发生过程中起着重要的作用，所以定量检测脂联素水平对于这些疾病的评估和诊断具有重大意义。然而，在开发能够实际应用于脂联素检测的有效抗体方法较为单一。目前，国内外的研究主要采用基因工程技术结合杂交瘤技术获得鼠源的脂联素抗体。例如本实验室马珍珍^[11]构建不同的真核和原核表达载体来表达人脂联素球状区蛋白，免疫小鼠后利用杂交瘤技术获得 8 株鼠源特异性分泌抗 gAd 抗体的杂交瘤细胞株，赵满仓^[26]通过提取分泌抗脂联素单克隆抗体杂交瘤细胞株的总 RNA，将扩增并拼接的单链抗体基因插入 pUC19 质粒中转化大肠杆菌 JM109，成功获得了脂联素单链抗体。尽管如此，兔源的脂联素抗体由于兔源骨髓瘤细胞的专利保护等因素，目前还没有文献进行报道。

1.2 兔源抗体

抗体在科研及医药学研究中发挥越来越大的作用^[27]，特别是在肿瘤免疫学领域，单链可变片段（scFvs）、抗体-药物偶联物（ADC）、双特异性抗体等 mAb 及其变体作为领先的治疗性生物药物越来越重要^[28]。实验动物的选择对抗体的发展也具有重要作用。其中，兔单克隆抗体(MAb)以其高亲和力，强特异性，易于人源化等优势被广泛应用^[29]。

1.2.1 兔多克隆抗体

多克隆抗体因其制备成本低廉和制备过程相对简单，一直被广泛用作生物医学研究和临床检测中的重要工具^[30]。特别是在免疫学技术中，如免疫组化（IHC）、蛋白质印迹（Western blot）和流式细胞术等。其中兔源多克隆抗体因其制备成本低廉，体系健全且抗兔二抗产品丰富而倍受青睐。例如袁露^[31]等人制备兔抗小鼠含 IQ 基序及泛素结构域蛋白(IQUB)多克隆抗体，在 ELISA 检测显示出极高的抗体效价，达到 1：1000000，可用于 Western blot 及免疫荧光组织化学染色。Khalaf^[32]等人制备的兔抗 Nbs 多克隆抗体经过亲和纯化后，性能可与商业化的抗 6×His 抗体相媲美。然而，多克隆抗体由于是从动物的血清中提取的，含有针对同一抗原的多种抗体，可能导致非特异性结合。此外，由于每一批次的抗体是从不同时间点或不同个体的动物中提取的，这可能导致批次间的差异，影响实验结果的重复性和可靠性^[33]。

1.2.2 兔单克隆抗体

兔单克隆抗体根据重链的不同可以分为 IgG、IgM、IgA、IgE 以及 IgD 5 种类别^[34]。兔的 IgG 与鼠的 IgG 不同，小鼠 IgG 亚型有 IgG1，IgG2a，IgG2b，IgG2c 和 IgG3，大鼠有 IgG1，IgG2a，IgG2b 和 IgG2c，而兔只有一种 IgG 亚型^[35]。兔 IgG 分子量约 150 kDa，由两条相同的轻链与重链组成，兔轻链与鼠一样又分为 κ 型与 λ 型，但兔有两条 κ 型轻链， $\kappa 1$ 和 $\kappa 2$ 。 $\kappa 1$ 轻链还含有一条连接 VL 和 CL 的二硫键^[36]，这种二硫键可能有助于兔抗体的稳定性。

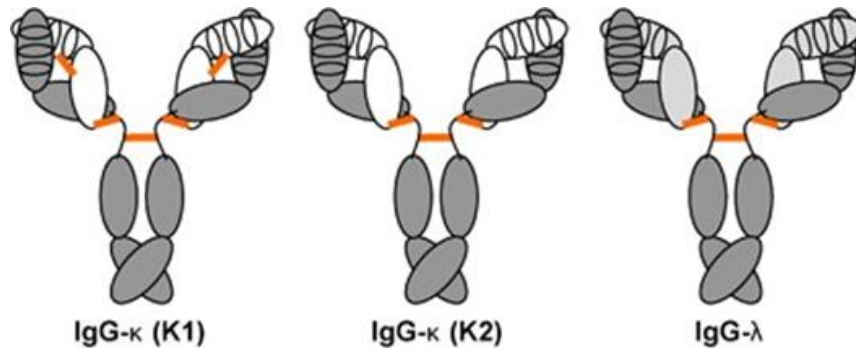


图 1.2 IgG 格式的天然兔抗体示意图^[36]

Figure 1.2 Schematic diagram of a native rabbit antibody in IgG format^[36]

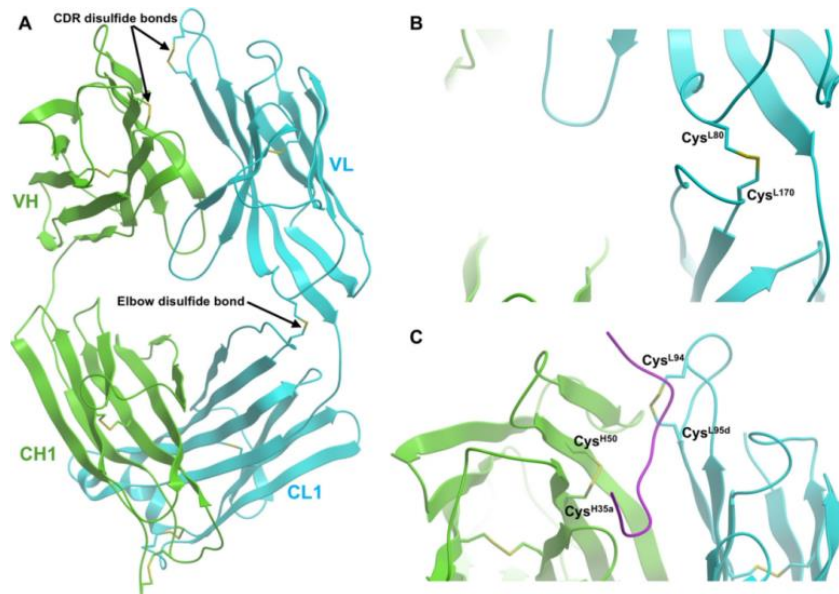


图 1.3 兔抗体的结构特征^[37]

Figure 1.3 Structural characteristics of rabbit antibodies^[37]

1.2.3 兔单克隆抗体制备技术

目前，应用较为广泛的单克隆抗体制备技术包括杂交瘤技术、噬菌体展示技术和单个 B 细胞抗体制备技术。此外，嵌合抗体技术、转基因小鼠技术、核糖体展示技术、酵母细胞展示技术等也可用于单克隆抗体的制备^[38]。

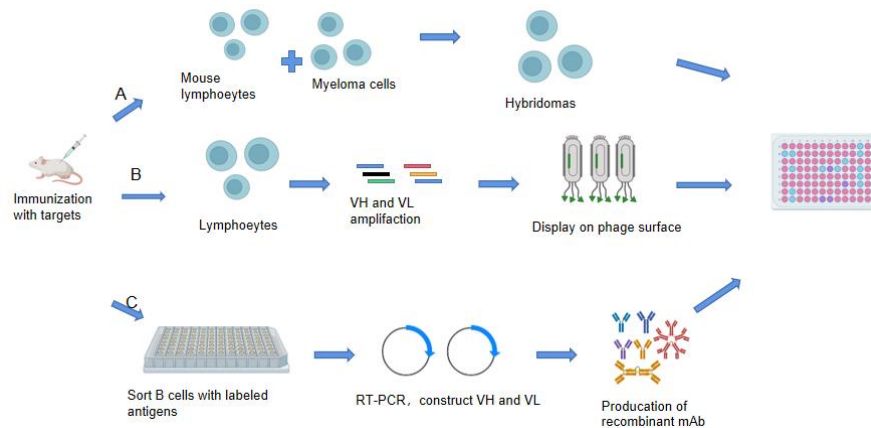


图 1.4 单克隆抗体制备方法

Figure 1.4 Monoclonal antibody preparation method

1.2.3.1 兔杂交瘤技术

鼠源单抗的主要缺陷包括小鼠免疫系统无法识别某些免疫原，尤其是鼠源性的免疫原，以及其亲和性不如人源抗体高。而兔单抗具有高抗体产量、高亲和性、长期稳定性、适用性广泛和抗体多样性等优势。兔杂交瘤技术适用于大规模的抗体制备，并具有较高的亲和性和特异性，在抗体制备领域具有重要的应用价值。然而，兔杂交瘤技术一直存在缺少兔骨髓瘤细胞系的问题。直到 1995 年，Knight^[39]等人获得了一株名为 240E-1 的骨髓瘤细胞系，为兔杂交瘤技术的发展提供了重要进展。但 240E-1 细胞株经过数次传代或亚克隆后杂交瘤逐渐失去分泌抗体的能力，细胞株本身也会表达内源性的兔 IgG^[40]。到 2007 年，Huang^[41]发现一株不带有内源 IgG 重链基因的细胞株 240E-W2，提高了融合效率以及杂交瘤阳性率。

除治疗用途外，通过杂交瘤技术生成的兔单克隆抗体已成为诊断应用和实验室研究中的重要试剂。例如，郑晓文^[42]通过细胞融合筛选得到了 7 株稳定表达的兔源抗 rHBcAg 单克隆细胞。范海潮^[43]开发了一个能应用于多物种(人、小鼠和大鼠)的特异性 CD163 兔单克隆抗体，填补了商品化优质 CD163 兔单克隆抗体的空白。

1.2.3.2 兔源噬菌体展示抗体技术

噬菌体展示是一种基于噬菌体 DNA 基因修饰的分子技术，目的是通过将肽、蛋白质或抗体片段与噬菌体外壳蛋白之一结合，从而在噬菌体表面展示肽、蛋

白质或抗体片段^[44]。这种方法的出现解决了杂交瘤技术中缺乏骨髓瘤细胞的问题，操作步骤简单，可以生产出应用于临床的人源化单克隆抗体。目前美国食品药品监督管理局已经批准了 10 多个噬菌体展示技术生产的抗体投放市场^[45]。

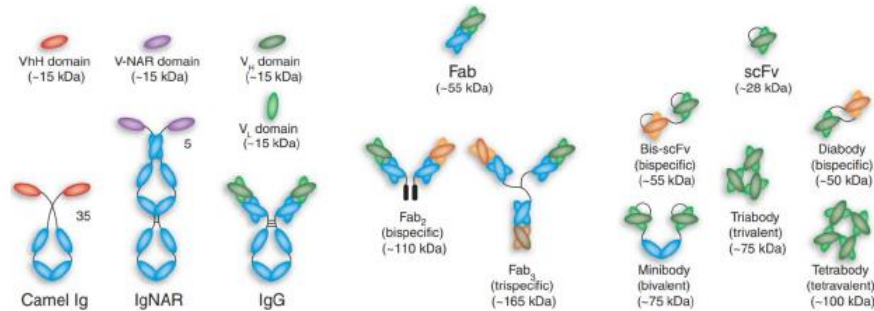


图 1.5 不同形式抗体示意图^[46]

Figure 1.5 Schematic diagram of different forms of antibodies^[46]

多年来，由于杂交瘤技术难以成功产生兔单克隆抗体，因此通过噬菌体展示技术获得兔源抗体的探索方向变得更为明确。噬菌体展示抗体技术主要以 scFv 和 Fab 形式进行展示。例如，Peng^[29]等人制备天然噬菌体展示 Fab 抗体库，成功筛选出具有潜在癌症治疗用途的兔单克隆抗体。Xu^[47]等人制备免疫噬菌体展示单链抗体文库，筛选到 16 个兔源苏云金芽孢杆菌 Cry1F 毒素单链抗体。值得注意的是，由于与表达大肠杆菌中的兔恒定区相比^[48, 49]，人源化抗体的表达水平更高，由兔可变结构区 VL 和 VH 分别与人恒定域 CL 和 CH1 重组融合组成 Fab 片段抗体，可以降低其异源性而作用于人体。Rader^[50]等人报道了第一批嵌合和人源化兔单克隆抗体，现已发表了许多人源化兔单克隆抗体并获得了专利。

1.2.3.3 兔源单个 B 细胞抗体技术

单个 B 细胞抗体技术是一种表达单个抗原特异性 B 细胞抗体的基因技术，仅需较少的细胞，即可高效、快速分离出潜在的单克隆抗体^[51]。此外，与噬菌体展示抗体库的随机配对不同的是，该方法保留了生物介导的重链和轻链可变区的配对^[52]。该技术的主要流程包括：免疫特定抗原；鉴定和分离外周血或淋巴组织中特异性 B 细胞；单细胞逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）获取抗体的重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）基因并克隆；在真核系统中表达抗体；抗体的纯化及其特性的鉴定^[38]。

因为相对容易提取免疫淋巴 B 细胞，使得兔成为了单个 B 细胞抗体技术制

备单克隆抗体的理想动物模型之一。通过单个 B 细胞抗体技术，Sun 等^[53]从甲型 H5N1 禽流感病毒感染者中分离出的交叉中和抗血凝素抗体，Kimura 等^[54]开发了抗 ASGM1 的兔单克隆抗体。陈苏星^[55]通过流式细胞术分离出能够产生识别人源 cGAS 蛋白的 B 细胞，通过真核系统中表达出兔抗人 cGAS 单克隆抗体。有报道通过荧光激活细胞分选（FACS）或手动显微操作从抗原特异性记忆 B 细胞或浆细胞中生成兔 mAb，并在原核、真核或无细胞表达系统中表达重组 mAb^[56]。这些技术平台已被证明是高效和稳定的，可以在 1 周内从免疫兔中产生大量抗原特异性重组抗体，从而促进了兔单克隆抗体的生产。

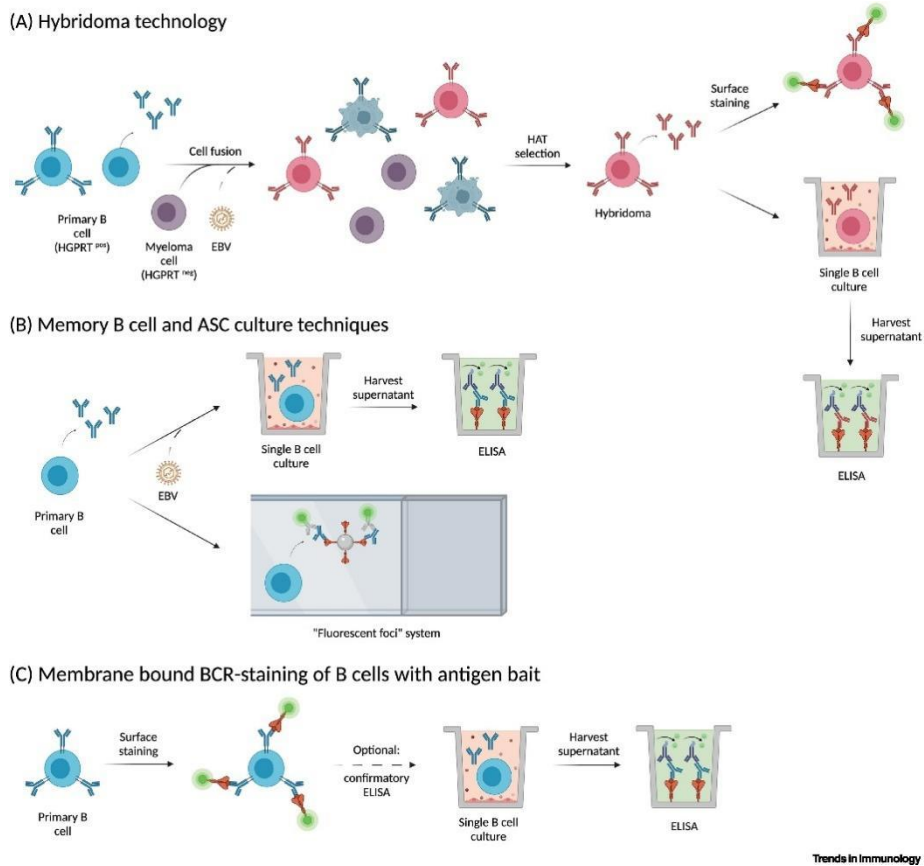


图 1.6 使用常规细胞培养设备的单 B 细胞筛选技术^[57]

Figure 1.6 Single B cell screening technique using conventional cell culture equipment^[57]

1.3 研究内容和意义

1.3.1 研究意义

脂联素与糖尿病、癌症和心血管疾病等多种疾病的发生、发展及转化有着密切的联系。因此，定量检测脂联素水平对评估相关疾病具有极其重要的意义。但是目前国内外多使用杂交瘤技术制备抗人脂联素的鼠源单克隆抗体。相较于鼠源抗体，兔源抗体具有高亲和力，强特异性，易于人源化等优点^[29]。目前，国内外对兔作为免疫动物制备脂联素抗体的相关报道较少，利用噬菌体展示技术筛选抗脂联素高亲和力 Fab 抗体具有较好的应用前景。因此，本研究将基因工程技术和噬菌体展示技术相结合，制备兔源抗脂联素多克隆抗体并构建兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库。以筛选抗脂联素 Fab 抗体为目的，探讨利用噬菌体展示技术筛选兔源抗脂联素高亲和力 Fab 抗体的可行性。

1.3.2 研究内容

本研究将实验室前期制备的脂联素重组 gad 蛋白免疫新西兰大白兔，制备兔源抗脂联素多克隆抗体并构建兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库，筛选兔源脂联素高亲和力 Fab 抗体，探讨利用噬菌体展示技术筛选兔源抗脂联素高亲和力 Fab 抗体的可行性。主要内容如下：

1.3.2.1 脂联素兔多克隆抗体的制备

以实验室前期获得的人脂联素球状域蛋白（gad）为免疫原，采用间接 ELISA 方法探究免疫佐剂与剂量对新西兰兔血清中抗体效价的影响，为下一步免疫抗体库的构建提供原料；基于 Protein A 层析柱纯化与抗原免疫亲和纯化方法，对免疫血清进行纯化，采用 SDS-PAGE 电泳、ELISA 等方式鉴定不同纯化方法得到的兔源脂联素多克隆抗体的性能，为脂联素（ADPN）蛋白功能的深入研究奠定基础，

1.3.2.2 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体文库的构建

基于基因工程与噬菌体展示技术，从免疫的兔血中提取外周血淋巴细胞，三轮 PCR 扩增获取 Fab 抗体基因插入到 pComb3XTT 噬菌粒载体中，制备兔源

抗脂联素噬菌粒展示 Fab 文库，鉴定多样性、库容量和插入率对噬菌粒文库进行表征；用辅助噬菌体 VCSM13 协助噬菌粒展示 Fab 抗体，最终制备出兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体文库。

1.3.2.3 脂联素兔源 Fab 的淘选与鉴定

基于 1.3.2.2 构建的兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库，以重组 gad 蛋白为靶抗原，开展兔源抗脂联素 Fab 抗体的固相亲和淘选，采用 Phage-ELISA 鉴定筛选出的噬菌体展示兔源抗脂联素 Fab 抗体阳性克隆。

1.4 技术路线

本研究的技术路线如下图 1.7 所示。

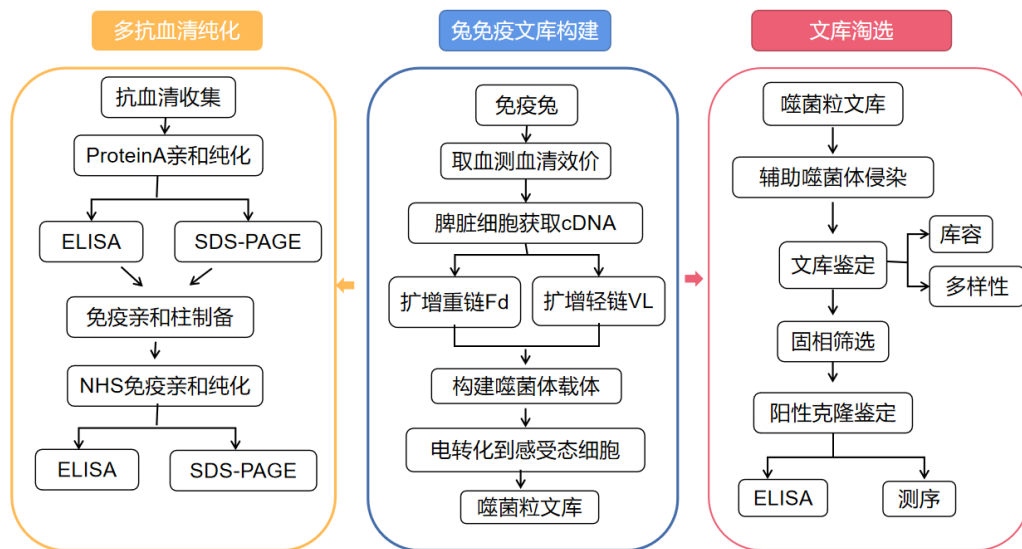


图 1.7 技术路线

Figure 1.7 Technical route

第2章 脂联素兔源多克隆抗体的制备

为制备兔源脂联素（ADPN）多克隆抗体，本章以实验室前期获得的人脂联素球状域蛋白（gad）为免疫原，按照不同免疫剂量和佐剂将新西兰白兔分为三组进行免疫，经过 3-4 次免疫后采集兔血清，用 Protein A 层析柱纯化柱对所得抗血清进行了 IgG 亚型抗体富集，接着通过 NHS 活化的琼脂糖树脂偶联重组 gad 蛋白制备免疫亲和柱，并对 IgG 抗血清进行抗原抗体亲和纯化。采用 SDS-PAGE 电泳、ELISA 等方式对不同组兔源脂联素多克隆抗体进行性能鉴定。

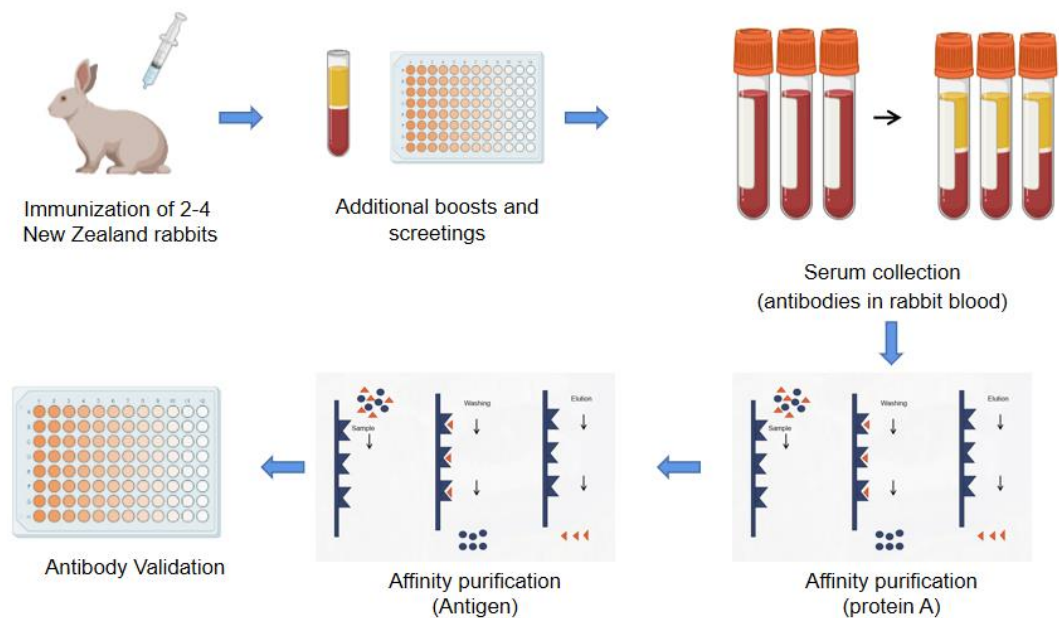


图 2.1 制备兔抗 gad 蛋白多克隆抗体的流程示意图

Figure 2.1: Flow chart for the preparation of a rabbit anti-GAD protein polyclonal antibody

2.1 材料与仪器

2.1.1 主要仪器设备

见附录（1）

2.1.2 主要试剂

见附录（2）

2.1.3 主要试剂配置方法

见附录（3）

2.1.4 实验动物

6 只新西兰白兔购自南昌市永润科技有限公司，3 月龄，体重约 2 公斤。

2.2 实验方法

2.2.1 动物免疫

2.2.1.1 动物免疫方法

- 1) 将 6 只新西兰白兔在相同的环境条件下饲养一周，待生长稳定并适应环境后随机分为 3 组，分别为弗式佐剂高剂量组，弗式佐剂低剂量组，Quick Antibody 水佐剂组。
- 2) 脂联素球状域(gad)蛋白为实验室保存蛋白，浓度为 0.5 mg/mL 分装保存于-80℃超低温冰箱。初次免疫之前取兔耳静脉取血作为后续实验的阴性对照。按照如表 2.1 所示方式对三组兔进行免疫。弗式佐剂组通过弗式佐剂与抗原震荡乳化处理后人工背部皮下多点注射方式进行免疫，每次间隔 14 天。Quick Antibody 水佐剂组参照说明书进行免疫，佐剂与抗原混匀后快速注射后腿肌肉进行免疫，每次免疫间隔 21 天。加强免疫之后 3 天，终取血获取免疫血清。
- 3) 心脏采血^[58]：终免疫三天后进行心脏取血。将兔仰卧固定在手术台上，将心脏周围被毛剪去，并用酒精消毒皮肤，在第三肋间胸骨左缘 3 毫米处注射针垂直刺入心脏进行采血收集血清。

表 2.1 兔免疫方法

Table 2.1 Rabbit immunization methods

免疫次数	弗式佐剂低剂量组	弗式佐剂高剂量组	Quick Antibody 水佐剂组
一次免疫	200 μg 抗原+等体积弗式完全佐剂	500 μg 抗原+等体积弗式完全佐剂	50 μg 抗原+等体积 Quick Antibody 水佐剂
二次免疫	100 μg 抗原+等体积弗式不完全佐剂	250 μg 抗原+等体积弗式不完全佐剂	50 μg 抗原+等体积 Quick Antibody 水佐剂
三次免疫	100 μg 抗原+等体积弗式不完全佐剂	250 μg 抗原+等体积弗式不完全佐剂	50 μg 抗原+等体积 Quick Antibody 水佐剂
四次免疫	/	250 μg 抗原+等体积弗式佐剂	/
终免疫	200 μg 抗原+等体积 PBS	500 μg 抗原+等体积 PBS	50 μg 抗原+等体积 PBS

2.2.1.2 脂联素球状域 (gad) 蛋白免疫兔子效价的测定

参考游凯豪^[59]方法采用间接 ELISA 测定每只兔子每轮免疫后血清中抗脂联素抗体的效价。每组两只兔子血清稀释后检测 OD_{450} 的平均值作为最后的检测结果。

- 1) 用 $1\times\text{PBS}$ 稀释脂联素球状域 gad 蛋白至 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$, $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, 4°C 过夜包被;
- 2) $0.05\%\text{PBST}$ 洗涤并拍干, 重复 3 遍, 加入 4% 脱脂牛奶, $300\text{ }\mu\text{L/孔}$, 37°C , 2 h ;
- 3) $0.05\%\text{PBST}$ 洗涤并拍干, 重复 3 遍, 血清用 $1\times\text{PBS}$ 梯度稀释, $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, 37°C , 30 min ;
- 4) $0.05\%\text{PBST}$ 洗涤并拍干, 重复 3 遍, 每孔加入稀释倍数 1: 2000 的羊抗兔二抗 (HRP)。 $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, 37°C , 30 min ;
- 5) $0.05\%\text{PBST}$ 洗涤并拍干, 重复 3 遍, 向每个板孔内加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ TMB 显色液, 37°C 孵育 7 min , 向孔内加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ H_2SO_4 (2 mol/L) 终止显色, 随后立即转移至全波长酶标仪上测定 OD_{450} 。

2.2.2 脂联素多克隆抗体血清的纯化与鉴定

2.2.2.1 Protein A 层析柱纯化血清

参考耐碱重组蛋白 A 琼脂糖纯化树脂说明书进行纯化，具体操作步骤如下：

- 1) 装柱：首先加入 2 mL 结合缓冲液到 6 mL 亲和层析柱中，迅速用移液管将 4 mL 混匀的 Protein A 层析柱纯化树脂转移到柱中，然后再加入 20 mL 的结合缓冲液进行平衡；
- 2) 样品处理：2 mL 血清用同体积的平衡 Buffer 稀释，确保样品溶液有合适的离子强度和 pH 值，过 0.22 μm 滤膜；
- 3) 上样：堵住柱子下口，上样，堵住放入 4℃冰箱静置 10 min，取出待样品流出（重复 3~4 次）；
- 4) 洗杂：加 20 mL 平衡 Buffer 洗去杂蛋白；
- 5) 洗脱：用 18 mL 洗脱 Buffer 洗脱，用中和 Buffer 调 pH 到 7~7.4；
- 6) 超滤：获得的蛋白用 30 kDa 超滤管超滤，配平后 6000 g、15 min 离心进行浓缩和脱盐处理；
- 7) 透析：离心结束后丢弃滤出液，收集管内液体至透析袋中，使用 800 mL 1×PBS 溶液放置 4℃冰箱进行脱盐透析 3 天，每隔 3 h 更换一次透析液，透析结束后得到的抗体保存于 4℃冰箱备用；
- 8) 层析柱依次使用 10 mL 结合缓冲液和 10 mL 超纯水洗涤，用约 4 mL 20% 乙醇溶液封柱，放置 4℃冰箱保存。

2.2.2.2 SDS-PAGE 检测 Protein A 层析柱纯化后脂联素多克隆抗体

- 1) 通过 BCA 蛋白浓度定量试剂盒测定其浓度。
- 2) 将多抗稀释至 1 mg/mL，每组多抗取 10 μL 产物和 1 μL 10×Loading buffer 混匀进行跑胶。电泳仪参数设置为 220 V，35 mA，电泳 45 min。
- 3) 预制胶加入考马斯亮蓝溶液在微波炉低温加热 5 min 染色，用 10%乙酸溶液微波炉加热 5 min 洗涤 2 次，观察条带位置。

2.2.2.3 Protein A 层析柱纯化脂联素多克隆抗体的结合活性验证

间接 ELISA 测定 Protein A 层析柱纯化多抗与重组 gad 蛋白的结合活性。

- 1) 包板：抗原浓度稀释到 1 $\mu\text{g/mL}$ ，梯度稀释，100 μL /孔，37℃孵育 2 h；

0.05%PBST 洗板 3-4 次;

- 2) 封闭: 配置 5 %脱脂牛奶, 300 μ L/孔; 0.05%PBST 洗板 3-4 次;
- 3) 一抗: 血清用 1 $\times$ PBS 梯度稀释, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C, 30 min; 0.05%PBST 洗板 3-4 次, 未免疫兔血清 Protein A 层析柱纯化多抗作为阴性对照, 1 $\times$ PBS 作为空白对照;
- 4) 加羊抗兔二抗: 用 1 $\times$ PBS 稀释到 1: 20000。100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C, 30 min; 0.05%PBST 洗板 3-4 次;
- 5) 显色: TMB A 液与 TMB B 液 1: 1 混匀, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C, 7 min;
- 6) 终止: 每孔加入 50 μ L 2 M H_2SO_4 终止后立即转移至全波长酶标仪上测定 OD₄₅₀。

2.2.3 抗原免疫亲和柱的制备与多抗纯化

2.2.3.1 抗原免疫亲和柱的制备

参考 NHS 活化琼脂糖说明书将人脂联素球状域(gad)蛋白与 NHS 活化树脂共价偶联, 具体操作如下:

- 1) 准备三管重组 gad 蛋白抗原, 2 mg/管, 调节 pH 至 6.5、7.5、8.5;
- 2) 准备三根 6 mL 亲和层析柱空柱, 分别加入 1 mL NHS 活化树脂, 平衡柱至室温, 使树脂自然沉降;
- 3) 加入 1 mM 盐酸洗涤树脂三次, 每次 3 mL, 使树脂自然沉降。再用 1 $\times$ PBS 洗涤树脂三次, 每次 3 mL, 使树脂自然沉降;
- 4) 封好柱顶端和底端, 将 4 mL 抗原投入亲和层析柱中, 室温振荡偶联 4 h;
- 5) 偶联完后, 收集流穿液 A, 并用 10 mL 的 1 $\times$ PBS 洗涤, 加入 2 mL 封闭液进行封闭, 室温振荡偶联 1 h;
- 6) 封闭完后, 流出封闭液并去除, 加入三倍柱体积的去离子水洗涤树脂;
- 7) 树脂洗涤分别通过洗涤液 1(0.1 M 碳酸钠, 0.5 M 氯化钠, pH4.0)、洗涤液 2(0.18 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH8.0)和去离子水顺序洗涤两次;
- 8) 层析柱用约 3 mL 乙醇 (20%) 溶液封柱, 于 4 $^{\circ}$ C 储存

2.2.3.2 抗原免疫亲和柱纯化多抗

取出 2.2.3.1 制备的抗原免疫亲和柱, 流去封闭液后加入 10 mL 的超纯水洗

涤，待其自然沉降后再加入 10 mL 结合缓冲液平衡柱子。后续操作步骤同 2.2.2.1

2.2.3.3 SDS-PAGE 检测抗原免疫亲和纯化后的脂联素多克隆抗体

操作步骤同 2.2.2.2

2.2.3.4 抗原免疫亲和纯化后的脂联素多克隆抗体结合活性验证

操作步骤同 2.2.2.3

2.3 结果与分析

2.3.1 不同免疫剂量及免疫佐剂对兔血清抗体效价的影响

以人脂联素球状域蛋白（gad）为免疫抗原，将制备好的三组脂联素多抗血清用不同比例稀释后作为一抗进行间接 ELISA 效价检测抗体效价。以 $P/N > 2.1$ （ P =样品 OD_{450} 值减去空白对照 OD_{450} 值对照； N =阴 OD_{450} 值减去空白对照 OD_{450} 值）且 OD_{450} 数值大于 0.25 的标准来检测抗体的效价^[60]。由图 2.2-4 可见，随着抗体稀释倍数增大， OD_{450} 吸光值减小，符合趋势。弗式佐剂低剂量组（图 2.2）、弗式佐剂高剂量组（图 2.3）和 Quick Antibody 水佐剂组（图 2.4）三组兔免疫血清相较于阴性对照在多轮免疫后效价稳步提升。

弗式佐剂低剂量组在第二轮免疫之后就产生了较高的特异性，第三轮免疫没有明显提升，最终免疫效价达到 1: 256000。弗式佐剂高剂量组比弗式佐剂低剂量组免疫剂量高将近 1 倍，但是 ELISA 结果显示第三、四轮免疫后抗体效价差异不大，四轮免疫后血清效价为 1: 128000。由此可见不是免疫剂量越高则特异性越好，有时候剂量加大可能造成免疫耐受。Quick Antibody 水佐剂组参照说明书进行三次免疫，每次抗原量 50 μ g，最终效价为 1: 64000。结果显示，弗式佐剂乳化抗原免疫后，免疫效果明显优于水溶性佐剂。

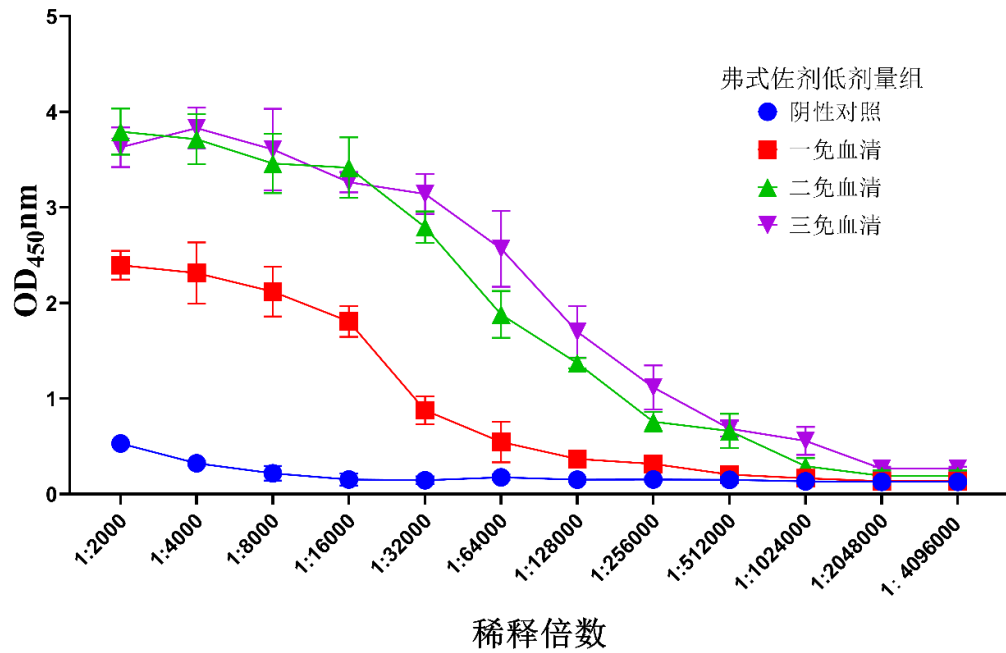


图 2.2 弗式佐剂低剂量组血清效价

Figure 2.2 Serum titers in the low-dose group of the evipotent adjuvant

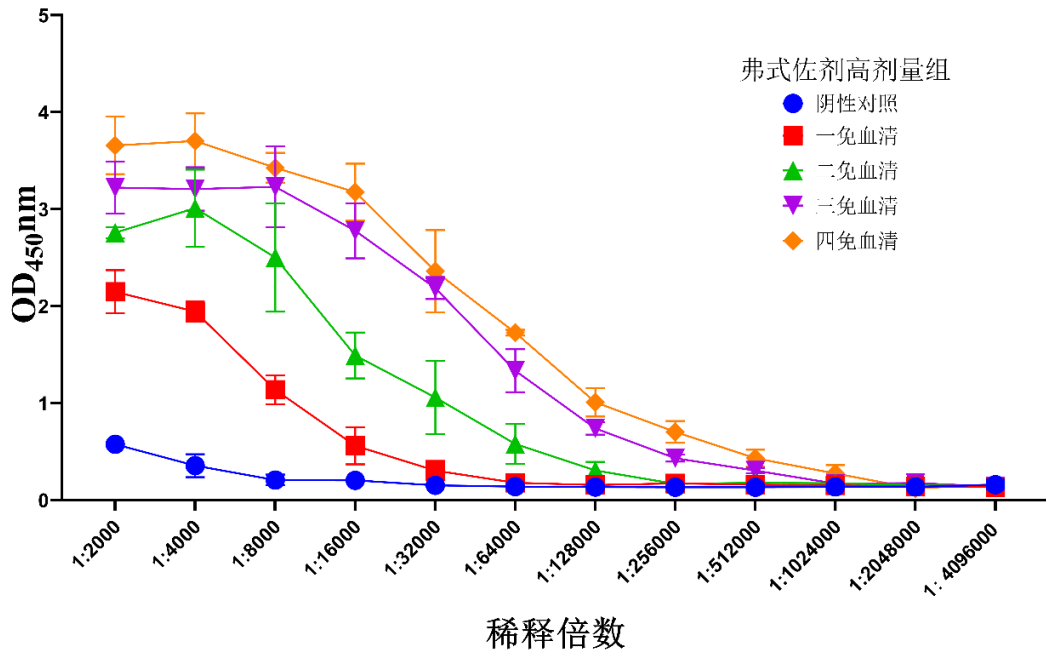


图 2.3 弗式佐剂高剂量组血清效价

Figure 2.3 Serum titers in the high-dose group of the Ephesian adjuvant

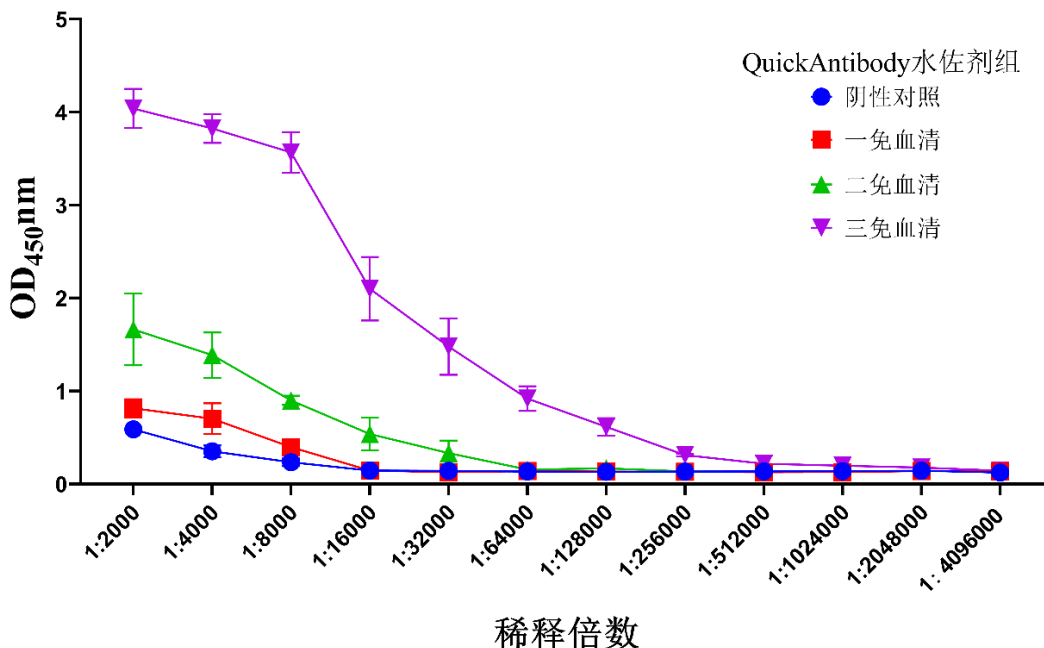


图 2.4 Quick Antibody 水佐剂组血清效价

Figure 2.4 Serum titers of Quick Antibody water adjuvant group

2.3.2 脂联素多抗血清的纯化与鉴定

2.3.2.1 SDS-PAGE 检测 Protein A 层析柱纯化脂联素多克隆抗体

利用间接 ELISA 法对抗血清的效价进行检测，显示六只新西兰兔均免疫成功。多克隆抗体可识别一个抗原的多个表位，使用 Protein A 层析柱对收集的抗血清进行纯化，发现三组 Protein A 层析柱纯化多抗（图 2.5-B）均存在一定杂蛋白。将弗式佐剂低剂量组原始血清、柱洗脱液、洗杂液和流穿液跑胶验证柱纯化结果。如图 2.5-A 所示，未经纯化的兔血清含有较多的杂蛋白（泳道 1），通过 image J 软件分析目的蛋白灰度值为 20%。血清通过 Protein A 层析柱纯化后得到了纯度较高的 IgG（泳道 4），灰度值为 89%。纯化多抗和还原性缓冲液混合跑胶时，在 50 KDa 和 25 KDa 处出现两条带（泳道 5），符合抗体的基本结构，轻链条带有扩散状态，可能是因为样品处于高盐缓冲液中所导致。

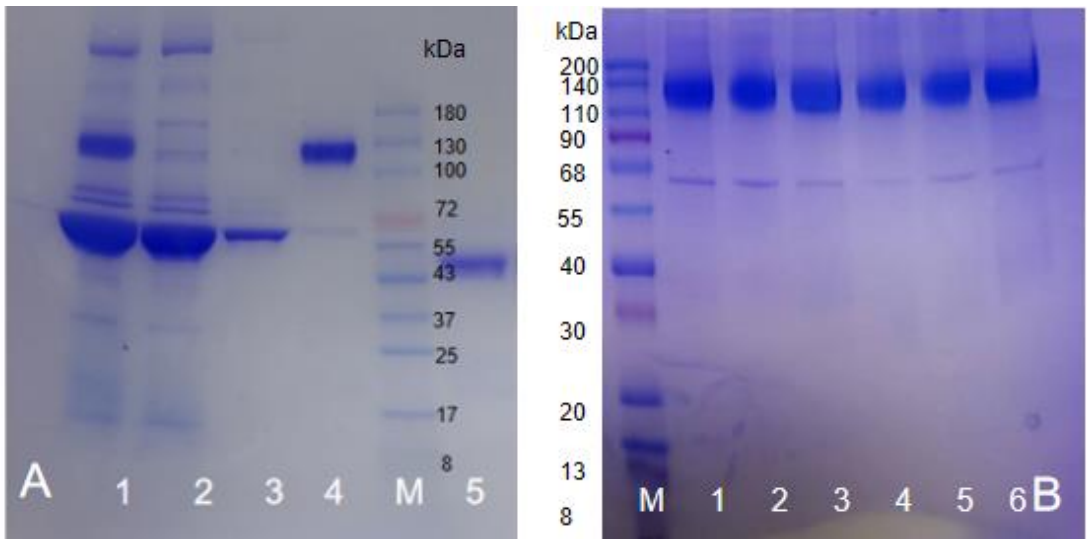


图 2.5 SDS-PAGE 验证 Protein A 层析柱纯化兔多抗

A:泳道 1: 原始血清; 泳道 2: 流穿液; 泳道 3: 洗杂液; 泳道 4: 洗脱液; 泳道 5: 洗脱液 (还原); 泳道 M: 蛋白 8-180 KDa marker ;B: 泳道 1-2: 弗式佐剂低剂量组; 泳道 3-4: 弗式佐剂高剂量组; 泳道 5-6: Quick Antibody 水佐剂组; 泳道 M: 8-200 KDa 蛋白 marker

Figure 2.5 SDS-PAGE validation of purified rabbit polyclonal antibody on Protein A column

A:Lane 1: original serum; Lane 2: flow fluid; Lane 3: wash liquid; Lane 4: eluent; Lane 5: Eluent (reduction); Lane M: Protein 8-180 KDa marker;B: Lane 1-2: Frances adjuvant low dose group; Lane 3-4: Freudian adjuvant high dose group; Lanes 5-6: Quick Antibody Water adjuvant group; Lane M: 8-200 KDa protein marker

由表 2.2 可见，三组免疫兔多抗血清各 2 mL 经过 Protein A 层析柱亲和纯化后，约得到 16-20 mg 蛋白。由此可知，兔血清中 IgG 亚型抗体含量约为 9 mg/mL。

表 2.2 兔多抗血清经 Protein A 层析柱纯化后效果

Table 2.2 Effect of rabbit polyantiserum purified by Protein A chromatography column

血清	纯化血清体积(mL)	纯化后总蛋白(mg)
弗式佐剂低剂量组	2	19.08
	2	16.2
弗式佐剂高剂量组	2	16.56
	2	17.28
Quick Antibody 水佐剂组	2	20.52
	2	18.45

2.3.2.2 Protein A 纯化脂联素多克隆抗体与重组 gad 蛋白结合活性验证

Protein A 层析纯化柱对所得抗血清进行了 IgG 亚型抗体的富集。对 Protein A 层析柱纯化后的三组多克隆抗体进行间接 ELISA 检测，未免疫血清 Protein A 层析柱纯化多克隆抗体作为阴性对照， $1\times\text{PBS}$ 作为空白对照。由图 2.6 可见，随着纯化多抗稀释度不断增加，测得的 OD_{450} 值不断减小。Quick Antibody 水佐剂组多抗浓度在 60 ng/mL 时，仍与重组 gad 蛋白有较强的结合活性，弗式佐剂组多抗浓度在 30 ng/mL 时，仍有较强的结合活性。这也进一步证明了 Quick Antibody 水佐剂组免疫抗血清效价低于弗式佐剂组。

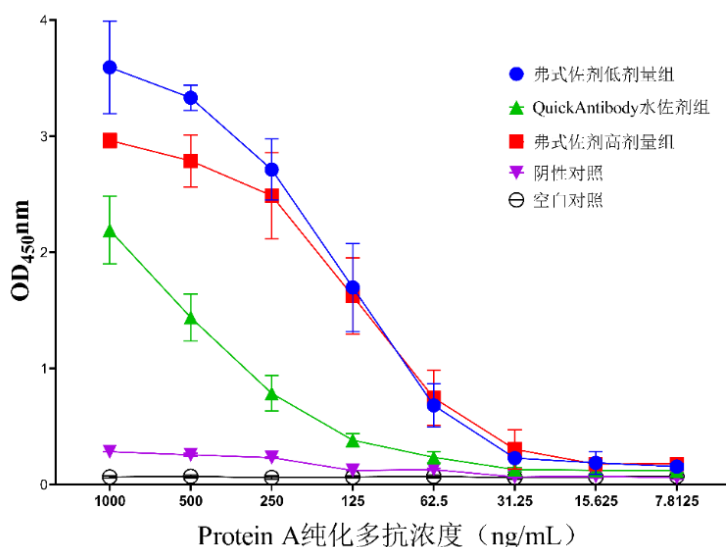


图 2.6 Protein A 层析柱纯化脂联素多抗的抗原结合活性 ELISA 检测

Figure 2.6 ELISA detection of antigen-binding activity of purified adiponectin polyclonal antibody on Protein A chromatography column

2.3.3 抗原免疫亲和柱的制备与多抗纯化

2.3.3.1 抗原免疫亲和柱的制备

将 2 mg 的重组 gad 蛋白与 NHS 活化树脂在不同 pH 条件下进行偶联，BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测投入前及流穿液 A 的蛋白浓度，测得重组 gad 抗原与 NHS 活化树脂在 pH 为 6.5、7.5 和 8.5 的结合率分别是 48.5%、63.5%和 59%。由此可知， 0.5 mg/mL 人脂联素球状域蛋白(gad)与 NHS 活化树脂在 $\text{pH}=7.5$ 时偶联效果最好,最大吸附量为 $127\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

表 2.3 NHS 免疫亲和柱在不同 pH 条件下结合率

Table 2.3 Binding rates of NHS immunoaffinity columns at different pH conditions

pH	抗原投入量 (mg)	抗原结合量 (mg)	结合率
6.5	2	0.97	48.5%
7.5	2	1.27	63.5%
8.5	2	1.18	59%

2.3.3.2 SDS-PAGE 检测抗原免疫亲和纯化后脂联素多克隆抗体

由表 2.4 可见, 2 mg 的兔多克隆抗体经过抗原免疫亲和柱纯化, 可实现对 IgG 抗血清进行特异性抗体的富集, 通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒可估算弗式佐剂组能富集约 20-30% 的特异性抗体, 水溶性佐剂能富集约 10% 的特异性抗体。

表 2.4 三组多克隆抗体抗原免疫亲和纯化的富集率

Table 2.4 Polyclonal antibody antigen immunoaffinity enrichment rate after purification

血清	纯化前蛋白含量 (mg)	纯化后总蛋白含量(mg)	富集率 (%)
弗式佐剂低剂量组	2	0.45	22.5
	2	0.56	28
弗式佐剂高剂量组	2	0.57	28.5
	2	0.48	24
Quick Antibody 水佐 剂组	2	0.25	12.5
	2	0.20	10

由图 2.7 可见, 兔血清经 Protein A 亲和层析纯化, 再经过抗原免疫亲和柱纯化, 抗体纯度由约 80% 上升至 100%, 去除了一些杂蛋白。

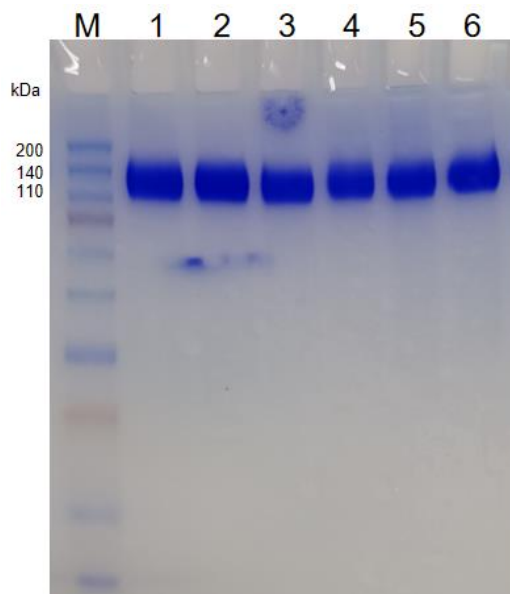


图 2.7 SDS-PAGE 验证抗原亲和纯化多克隆抗体

泳道 1-2: 弗式佐剂低剂量组; 泳道 3-4: 弗式佐剂高剂量组;

泳道 5-6: Quick Antibody 水佐剂组; 泳道 M: 8-200 KDa 蛋白 marker

Figure 2.7 SDS-PAGE validation of antigen affinity purified polyclonal antibody

Lane 1-2: Frances adjuvant low dose group; Lane 3-4: Freudian adjuvant high dose group;

Lane 5-6: Quick Antibody Water adjuvant group; Lane M: 8-200 KDa protein marker

2.3.3.3 抗原免疫亲和纯化后脂联素多克隆抗体结合活性验证

对 Protein A 层析柱纯化的 3 种多克隆抗体再进行抗原免疫亲和柱纯化, 基于间接 ELISA 检测鉴定其结合活性变化。由图 2.8 可见, 三组抗原免疫亲和纯化多抗在浓度 3 ng/mL 时仍有一定的结合活性。发现对比 Protein A 层析柱纯化多抗 (图 2.6), 抗原免疫亲和纯化多抗与重组 gad 蛋白结合活性提高了一个数量级。Quick Antibody 水佐剂组富集度虽然不如弗式佐剂组, 结合活性却提高了更多。由此可见, 抗原免疫亲和纯化对多克隆抗体进行了有效的脂联素特异性抗体富集。

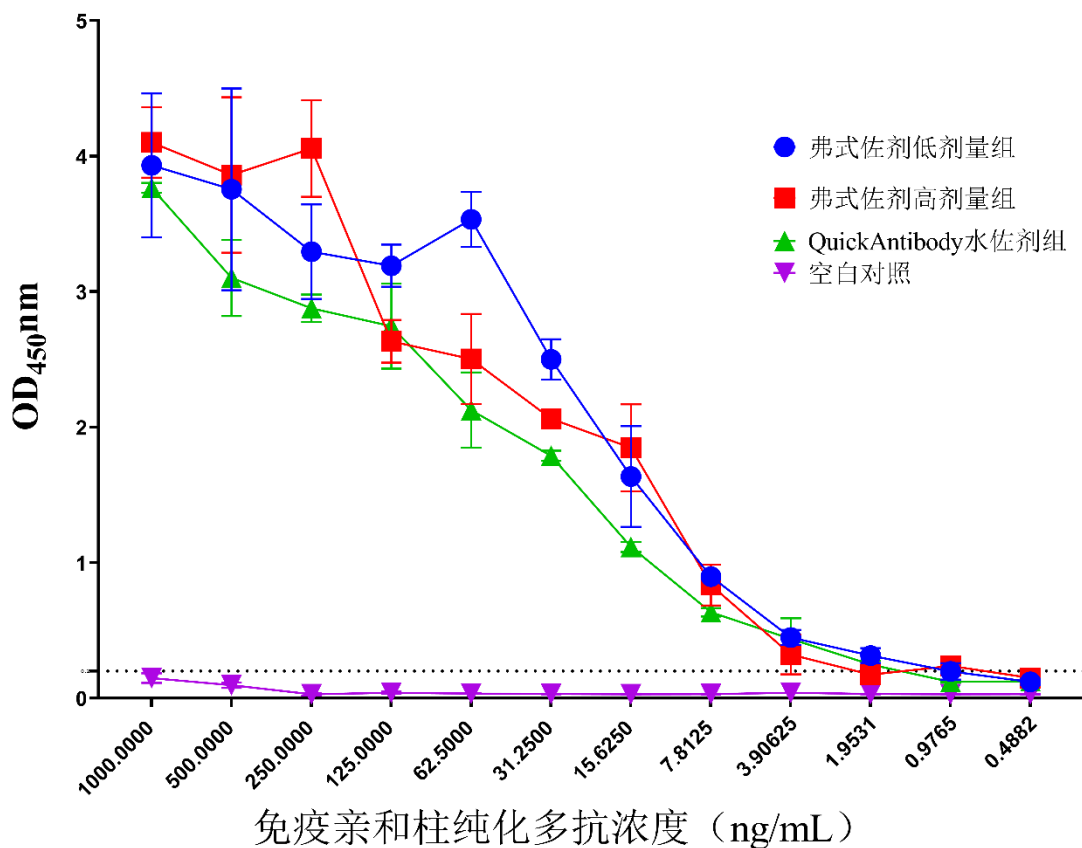


图 2.8 抗原免疫亲和纯化后脂联素多抗结合活性的 ELISA 检测结果

Figure 2.8 ELISA results of adiponectin polyanti-binding activity after purification of antigen immunoaffinity

2.4 讨论

佐剂是增强和调节疫苗抗原免疫反应的免疫刺激物，与抗原一起使用能产生更强的免疫反应。根据疫苗佐剂的成分性状不同，佐剂可分为油性佐剂^[61]和水性佐剂。水性佐剂包括矿物质佐剂、中药佐剂^[62]、细胞因子佐剂^[63]和脂质体^[64]等。油性佐剂包括矿物油佐剂、非矿物油佐剂。矿物油佐剂以弗氏佐剂最为经典，但毒性大、稳定性差，难以长期保存，常常引起局部肉芽肿和无菌性脓肿^[65]。QuickAntibody 水佐剂有无需乳化、不破坏抗原构象、安全无毒且抗原用量少等优点。所以本章采用两种不同的免疫佐剂将实验兔分为弗式佐剂组与 Quick Antibody 水佐剂组进行免疫。同时考虑到免疫与抗原性强弱、分子量大小、

免疫时间和免疫剂量^[66]等有关, 剂量加大极易造成免疫耐受(免疫抑制)^[67]。因此, 将弗式佐剂组按照不同的免疫剂量分为弗式佐剂低剂量组与弗式佐剂高剂量组。经免疫并采集兔血清, ELISA 数据结果显示: 弗式佐剂免疫效果明显优于博奥龙水溶性佐剂, 且免疫剂量不是越高越好, 可能会引起免疫耐受。六只兔免疫效价均高于 1: 64000 可满足构建噬菌体展示库的要求, 但是弗式佐剂三轮免疫效果比水佐剂更好。值得注意的是随着基因工程技术和生物技术的飞速发展, 新型疫苗逐步被开发出来, 新型疫苗佐剂种类繁多, 功能各不相同且机制较为复杂, 可分为新型油乳佐剂、脂质体佐剂、CpG 寡核苷酸佐剂、细胞因子佐剂^[68]、Fab 佐剂、mRNA 佐剂^[69]及多糖佐剂^[70]等。后期还可对新型佐剂的免疫效果开展进一步的深入研究。

免疫获得的抗血清为了尽量除去与目的抗体不相关的成分, 可通过亲和层析、蛋白 A/G 层析、离心浓缩或超滤等方法进行纯化处理。兔源多克隆抗体多用 protein A 亲和层析纯化柱纯化^[71], 商业化抗体多数通过免疫亲和纯化得到。抗原亲和层析法一般通过抗原与琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶和纤维素等载体共价偶联到一起, 当多抗血清在柱子中流动时, 可高效、特异性地纯化和富集目标分析物^[72]。NHS 活化的琼脂糖树脂能与蛋白质产生伯胺反应形成稳定的酰胺键的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)官能团, 为抗体、抗原或其他生物分子的亲和纯化提供了有价值的方法。耦合反应在 pH 为 7~9 的无胺缓冲液中进行, 耦合反应的结合率一般大于 80%。本研究将重组 gad 蛋白与 NHS 活化树脂共价偶联, 发现 0.5 mg/mL 人脂联素球状域蛋白(gad)与 NHS 活化树脂在 pH=7.5 时偶联效果最好, 结合率为 63.5%。耦合反应的结合率达不到预期猜测与抗原的浓度有很大的关系, 实验室制备的脂联素球状域蛋白抗原在浓度超过 0.6 mg/mL 时就会过饱和呈结晶状, 所以在提升免疫亲和纯化柱性能的后续工作中, 需要考虑提高脂联素抗原蛋白的浓度的同时确保蛋白不失活。

2.5 小结

将重组 gad 蛋白联合弗式佐剂或水溶性佐剂, 按照不同的免疫剂量与佐剂将兔分为三组进行免疫, 检测每轮免疫后血清中抗体效价动态变化。基于 Protein A 层析柱与抗原免疫亲和柱, 对终免疫血清进行纯化, 鉴定不同纯化方法得到的兔源脂联素多克隆抗体的性能, 研究结果如下:

1) 间接 ELISA 结果显示三组兔血液中的抗体效价逐轮提高,表明新西兰兔得到了有效免疫。弗式佐剂低剂量组、弗式佐剂高剂量组和 Quick Antibody 水佐剂组免疫后血清抗体效价分别为 1: 256000、1: 128000 和 1: 64000。弗式佐剂免疫效果明显优于水溶性佐剂,且免疫剂量不是越高越好,可能会引起免疫耐受。六只兔免疫效价均高于 1: 64000,可满足构建噬菌体展示库的要求。

2) 用 Protein A 层析柱纯化柱对所得抗血清进行了 IgG 亚型抗体富集,兔血清中 IgG 亚型抗体含量约为 9 mg/mL,通过 image J 软件分析目的蛋白灰度值从 20%增加到 89%,抗血清中大部分的杂蛋白和非目标抗体基本被去除。间接 ELISA 检测发现,Quick Antibody 水佐剂组多抗浓度在 60 ng/mL 时,与重组 gad 蛋白有较强的结合活性,而弗式佐剂组多抗浓度在 30 ng/mL 时,仍有较强的结合活性。这也进一步证明了 Quick Antibody 水佐剂组免疫抗血清效价低于弗式佐剂组。

3) 通过 NHS 活化的琼脂糖树脂偶联重组 gad 蛋白制备免疫亲和柱,发现 0.5 mg/mL 重组 gad 蛋白与 NHS 活化树脂在 pH=7.5 时偶联效果最好,最大吸附量为 127 μ g/mL。用制备的抗原免疫亲和柱对 IgG 抗血清进行抗原免疫亲和纯化,抗体纯度由 89%上升至 100%。弗式佐剂组能富集约 20-30%的特异性抗体,水溶性佐剂能富集约 10%的特异性抗体。间接 ELISA 结果显示抗原免疫亲和纯化多抗浓度在 3 ng/mL 时,与重组 gad 蛋白仍有较强的结合活性。对比 Protein A 层析柱纯化多抗,三组抗原免疫亲和纯化多抗与抗原的结合活性均提高了一个数量级。综上所述,抗原免疫亲和纯化对多克隆抗体中的特异性脂联素抗体进行了有效富集。

第3章 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的构建及鉴定

基于基因重组技术，以获取的三组免疫后兔的 cDNA 基因为模板，得到编码 Fab 抗体的基因。基于噬菌体展示技术，以噬菌粒 pComb3XTT 为展示载体，制备兔源抗脂联素噬菌粒展示 Fab 文库，鉴定多样性、库容量和插入率对噬菌粒文库进行表征。用辅助噬菌体 VCSM13 协助噬菌粒展示 Fab 抗体，最终制备出兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体文库。抗体文库构建过程如下图 3.1 所示。

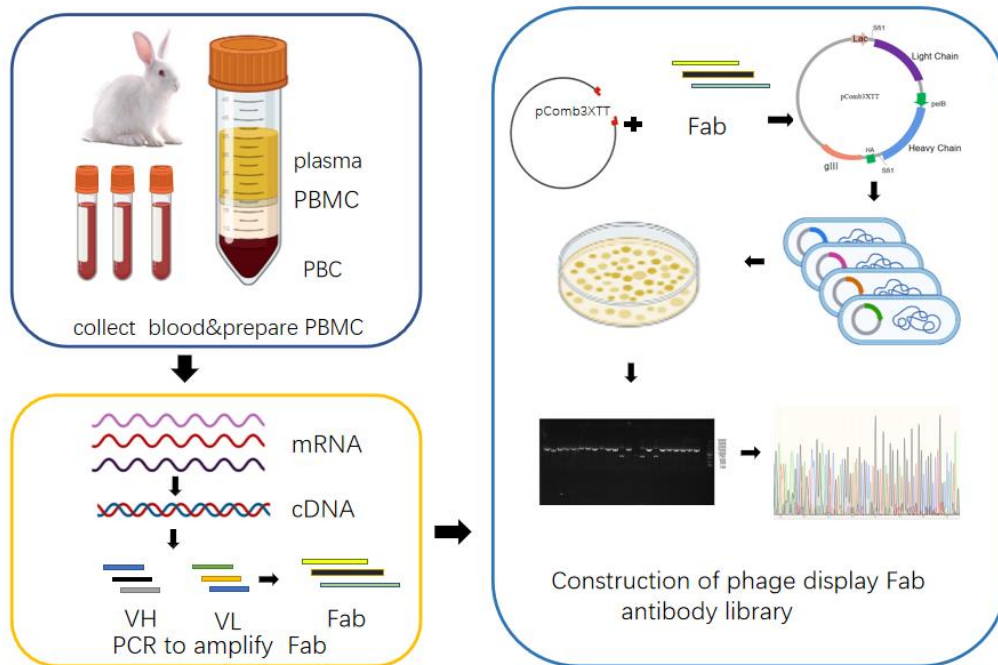


图 3.1 脂联素 Fab 噬菌体抗体库的构建流程示意图

Figure 3.1 Schematic diagram of adiponectin Fab phage antibody library construction

3.1 材料与仪器

3.1.1 引物设计与合成

抗体的可变区序列的引物参考 Phage display^[73]书中关于兔源噬菌体展示技

术所用引物，见表 3.1-2。引物序列均送至通用生物有限公司进行合成。

表 3.1 文库构建所用引物

Table 3.1 Primers used for library construction

引物	序列 (5'-3')	备注
RVH1	GCCCAACCAGCCATGGCCCAGGAGCAGCTGAAGGAG	
RVH2	GCCCAACCAGCCATGGCCCAGGAGCAGCTGRTGGAG	
RVH3	GCCCAACCAGCCATGGCCCAGGAGCAGCTGGAGGAGTCC	兔源抗体重链可变区上游
RVH4	GCCCAACCAGCCATGGCCCAGTCGSTGGAGGAGTCC	引物
RVH5	GCCCAACCAGCCATGGCCCAGTCGGTGAAGGAGTCC	
RVH6	GCCCAACCAGCCATGGCCCAGCAGCTGGAGCAGTCC	
RJH1	TGGGCCCTTGGTGGAGGCTGARGAGAYGGTGACCAGGGT	兔源抗体重链可变区下游 引物
RVK1	TAATTGGCCCAGGCGGCCGACCCTATGCTGACCCAG	
RVK2	TAATTGGCCCAGGCGGCCGATGTCGTGATGACCCAG	
RVK3	TAATTGGCCCAGGCGGCCGAGCCGTGCTGACCCAG	
RVK4	TAATTGGCCCAGGCGGCCGCCATCGATATGACCCAG	兔源抗体轻链可变区上游
RVK5	TAATTGGCCCAGGCGGCCGCCAAGTGCTGACCCAG	引物
RVK6	TAATTGGCCCAGGCGGCCGCCCTTGTGATGACCCAG	
RVK7	TAATTGGCCCAGGCGGCCGCTCAAGTGCTGACCCAG	
RVK8	TAATTGGCCCAGGCGGCCTATGTCATGATGACCCAG	
RJK1-b	AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTTCACATTGGT	
RJK2-b	AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTYGACSACCACCTYGGT	兔源抗体轻链可变区下游
RJK3-b	AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTAGGATCTCCAGCTCGGT	引物
RJK4-b	AGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATYTCCASCTTGGT	
HIgCH1-f	GCCTCCACCAAGGGCCCA	人 CH1 基因上游引物
dpseq	AGAAGCGTAGTCCGGAACG	人 CH1 基因下游引物
HKC-f	ACTGTGGCTGCACCATCTG	人 C κ 基因上游引物
Lead-b	GGCCATGGCTGGTTGGGC	人 C κ 基因下游引物

表 3.2 菌落 PCR 验证所用引物

Table 3.2 Primers used for PCR validation of colonies

名称	序列 ((5'-3'))	备注
OMP	AAGACAGCTATCGCGATTGCAG	用于菌落 PCR 上游引物
gIII ^F	GCCCCCTTATTAGCGTTTGCCATC	用于菌落 PCR 下游引物

3.1.2 主要仪器设备

参见附录 (1)

3.1.3 主要试剂

参见附录 (2)

3.1.4 主要试剂配置方法

参见附录 (3)

3.2 实验方法

3.2.1 抗体基因获取

3.2.1.1 兔外周血淋巴细胞的获取

参考游凯豪^[59]论文中提取外周血淋巴细胞方法进行操作, 具体步骤如下:

- 1) 每只兔子终免疫后取 20 mL 新鲜全血与等体积的 1×PBS 混匀稀释;
- 2) 提前灭菌的离心管加 3 mL 兔外周血淋巴细胞分离液, 小心吸取等体积稀释后的血液样本加于分离液液面上, 室温 2500 rpm/min 水平离心 15 min;
- 3) 离心后溶液由上至下分为五层。第三层乳白色物质就是外周血淋巴细胞层, 用吸管小心吸取乳白色细胞层到另一 100 mL 离心管中;
- 4) 往离心管中加入约 40 mL 的 1×PBS 混匀细胞, 2800 rpm/min, 离心

18 min;

- 5) 弃上清, 加入约 5 mL 的 1xPBS 混匀细胞, 2800 rpm/min, 离心 18 min;
- 6) 弃上清, 用 0.5 mL 的 1xPBS 重悬细胞, 放置 4℃ 备用, 马上进行下一步 RNA 的提取。

3.2.1.2 总 RNA 提取

得到外周血淋巴细胞之后参考李蓉芳^[74]实验方法提取 RNA, 具体实验步骤如下:

- 1) 每 10^7 个细胞加入 1 mL Trizol 到 1.5 mL (DEPC 水处理过的) 离心管, 放至冰面静置 10 min;
- 2) 每管加入 200 μ L 氯仿, 用力振荡至充分乳化, 室温静置 3 min;
- 3) 8000 rpm/min, 4℃, 10 min, 可见分为三层, 取最上层上清于新 1.5 mL 离心管中;
- 4) 加入等体积预冷的异丙醇, 上下轻轻颠倒混匀, 放至冰面静置 10 min;
- 5) 4℃, 8000 rpm/min, 离心 10 min, 可见明显的白膜在离心管底部;
- 6) 吸弃上清, 每管补加 1 mL 75% 乙醇 (DEPC 水配制), 上下颠倒使白色沉淀漂浮于乙醇中, 静置 5 min;
- 7) 7500 rpm/min, 离心 5 min, 4℃, 抽弃上清, 离心管置于超净工作台通风干燥 5 min;
- 8) 每管加入 60 μ L DEPC 水重悬沉淀, 可用手指弹匀, 分装放于 -80℃ 冰箱保存备用;
- 9) 取 RNA 5 μ L 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 电压 120 V、15 min 后在紫外灯下观察拍照。

3.2.1.3 cDNA 的合成

得到淋巴细胞的总 RNA 后, 参照李蓉芳^[74]方法将提取得到的 RNA 逆转录成 cDNA, 总反应分两步进行, 具体操作步骤如下:

- 1) gDNA 消化

在无菌管中依次加入以下试剂混合 42℃, 2 min

表 3.3 外周血淋巴细胞合成 cDNA 的反应体系一

Table 3.3 Response system 1 for cDNA synthesis by peripheral blood lymphocytes

组分	体积
5×gDNA Digester Mix	3 μL
Total RNA	5 μg
RNase free H ₂ O	Up to 15 μL

2) 逆转录

表 3.4 外周血淋巴细胞合成 cDNA 的反应体系二

Table 3.4 Reaction system 2 for cDNA synthesis in peripheral blood lymphocytes

组分	体积
上一步反应液	15 μL
10×Hifair III Super Buffer	2 μL
10×Hifair III RT Enzyme Mix	1 μL
Origo Primers	1 μL
RNase free H ₂ O	Up to 20 μL

充分混匀后，置于 PCR 仪内，设置反应参数为 25°C，5 min；55°C，60 min；85°C，5 min。反应结束后取出，-20°C 保存。

3.2.2 抗体 Fab 基因的获取

第一轮 PCR 扩增重链可变区基因 VH、轻链可变区基因 VL 以及 pComb3XTT 载体上存在的人源恒定区基因 CH1、Cκ，第二轮 Overlap-PCR 将可变区与恒定区结合组装成重链 Fd 与轻链基因，第三轮 Overlap-PCR 将两者连接成 Fab 基因，所需要的引物如表 3.1 所示，流程图如图 3.2 所示，具体操作步骤如下：

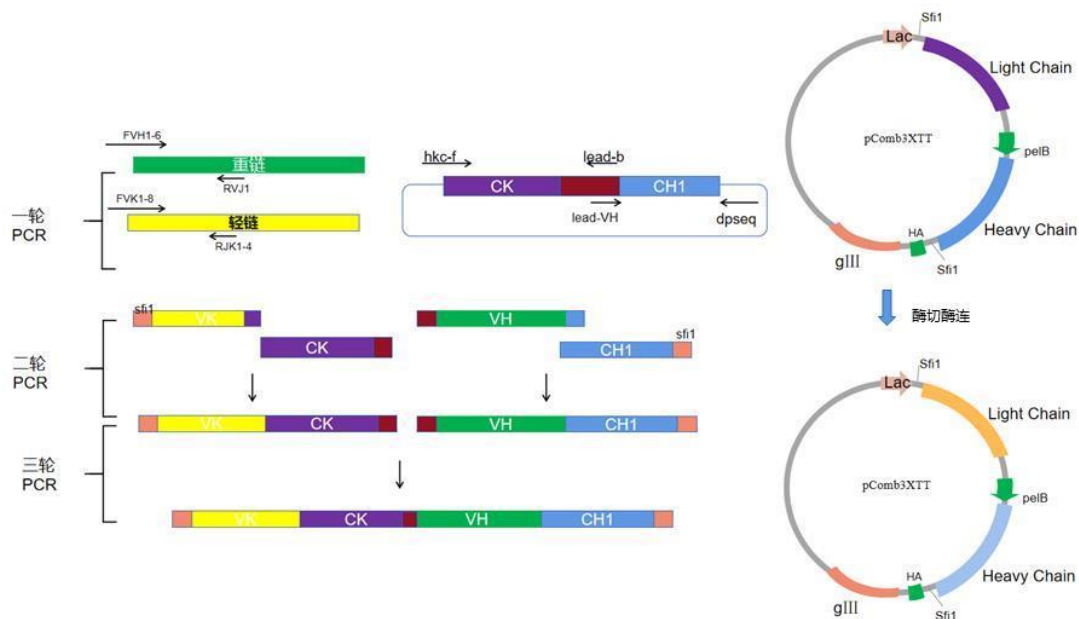


图 3.2 三轮 PCR 获取目的基因 Fab 流程图

Figure 3.2 Flow chart of Fab acquisition of target gene by three rounds of PCR

1) 第一轮 PCR: 扩增人源重、轻链可变区及人恒定区 CH1、C κ 。

以含有 6 只新西兰兔的 cDNA 样本作为第一轮 PCR 的模板, 用表 3.1 所列出的引物对 RVH1-6/RJH1 共 6 组扩增兔源重链 VH 基因, 引物对 RVK1-8/RJH1-4 共 8 组 (RJH1-4 混合后使用) 扩增兔源轻链 V κ 基因, 引物对 HIgCH1-f/dpseq 扩增人恒定区 CH1 基因, 引物对 HKC-f/Lead-b 扩增人恒定区 C κ 基因。将所有的 VH、V κ 、CH1 和 C κ 基因 PCR 产物各自混合, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切下目的条带, 使用胶回收试剂盒进行纯化。PCR 体系(表 3.5)及条件(表 3.6)如下。

表 3.5 第一轮 PCR 反应体系

Table 3.5 First round PCR reaction system

组分	体积
2 $\times$ taq 酶	3 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
cDNA	1 μ L
RNase free H ₂ O	Up to 10 μ L

表 3.6 PCR 扩增反应程序

Table 3.6 PCR amplification reaction procedure

反应过程	温度	时间	循环数
预变性	94℃	2 min	1
变性	94℃	10 s	25
退火	56℃	10 s	
延伸	72℃	30 s	
终延伸	72℃	7 min	1

2) 第二轮 PCR: 获取 Fd 与轻链基因。

将上一轮收集到的 VH 和 CH1、VK 和 Ck 基因分别作为第二轮 PCR 的模板, 通过引物对 RSC-SF/dpseq 连接 VH 和 CH1 基因得到 Fd 基因, 通过引物对 lead-Vh/Lead-b 连接 VK 和 Ck 基因得到 κ 链基因, 将所有的 Fd、 κ 链基因各自混合, 1%琼脂糖凝胶电泳, 切下目的条带, 使用胶回收试剂盒进行纯化。PCR 体系(表 3.7)及程序(表 3.8-9)如下。

表 3.7 第二轮 PCR 反应体系

Table 3.7 Second round PCR reaction system

组分	体系
5xPrimer STAR Buffer	10 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
模板 1	25 ng
模板 2	25 ng
Primer STAR HS DNA polymerase(2.5u/ μ L)	0.5 μ L
dNTP Mixture	4 μ L
无菌水	Up to 50 μ L

表 3.8 PCR 扩增反应程序一

Table 3.8 PCR amplification reaction procedure 1

反应过程	温度	时间	循环数
预变性	94℃	2 min	1
变性	94℃	10 s	8
退火	56℃	10 s	
延伸	72℃	30 s	
终延伸	72℃	7 min	1

反应结束后在 PCR 管中加入上下游引物继续扩增，程序设定如表 3.9

表 3.9 PCR 扩增反应程序二

Table 3.9 PCR amplification procedure II

反应过程	温度	时间	循环数
预变性	94℃	2 min	1
变性	94℃	10 s	25
退火	56℃	10 s	
延伸	72℃	30 s	
终延伸	72℃	7 min	1

3) 第三轮 PCR：获取 Fab 基因

将上一轮收集到的 Fd、 κ 链基因作为第二轮 PCR 的模板，通过引物对 RSC-SF/dpseq 连接 Fd 和 κ 链基因得到 Fab 基因，将所有的 Fab 基因混合，1% 琼脂糖凝胶电泳，切下目的条带，使用胶回收试剂盒进行纯化。PCR 体系与反应程序和第二轮 PCR 相同。

3.2.3 构建 pComb3XTT-Fab 重组质粒

3.2.3.1 噬菌粒载体 pComb3XTT 质粒 DNA 的制备

提前一天接种保存 pComb3XTT 甘油菌 20 μ L 到 5 mL 含 1/1000 氨苄青霉素的 LB 液体培养基，37℃，220 rpm 过夜，第二天按照天根质粒小提试剂盒说明书提质粒。

3.2.3.2 表达载体 pComb3XTT 与目的基因 Fab 的酶切

使用 Sfi I 酶对 pComb3XTT 和 3.3.3 制备的 Fab 基因进行酶切。在 50℃ 的金属浴中酶切 12 小时，载体酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切程度，对酶切产物进行凝胶回收。Fab 基因酶切产物直接用片段回收试剂盒进行回收，随后检测两者核酸浓度。酶切体系见表 3.10。

表 3.10 噬菌粒及 PCR 产物 SfiI 酶切体系

Table 3.10 SfiI digestion system of phagocytic granules and PCR products

组分	体系
SfiI 慢切酶	10 μ L
10 $\times$ M Buffer	10 μ L
pComb3XTT/Fab	10 μ g
无菌水	Up to 500 μ L

3.2.3.3 酶连 pComb3XTT-Fab 重组质粒

将上一步酶切回收的噬菌体载体及目的基因 Fab 酶切产物用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 金属浴孵育 16 h 进行连接。连接体系如下表 3.11。DNA 片段回收试剂盒回收连接产物，将酶连产物全部进行电转化。

表 3.11 连接反应体系

Table 3.11 Connection reaction system

组分	体系
T4 DNA 酶	10 μ L
10 $\times$ T4 Ligase Buffer	10 μ L
pComb3XTT/SfiI	1.4 μ g
Fab/SfiI	1.3 μ g
RNase free H ₂ O	Up to 10 μ L

3.2.4 重组质粒 pComb3XTT-Fab 的转化与鉴定

3.2.4.1 感受态细胞 TG1 的制备与鉴定

参考^[75]张芸实验方法制备感受态细胞 TG1，具体步骤如下：

- 1) 使用接种环将保存的 E.coli TG1 菌液划线至 LB 无抗固体平板上，37℃ 培养过夜。第二天，挑取单个菌落加入 LB 液体培养基中，在 37℃、

220 rpm 条件下振荡培养 12 小时；

- 2) 过夜培养 Ecoli TG1 菌液 500 μL 加到 50 mL 的 LB 液体培养基里，共接种 4 瓶 50 mL LB 的液体培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ ，220 rpm，摇菌约 3h 直至 $\text{OD}_{600} \approx 0.5$ ；
- 3) 将装有培养物的锥形瓶置于冰上，静置 20 分钟后，转移至预先冷却的 4 个无菌 100mL 离心管中。将离心管对称放置在低温离心机中，以每分钟 4000 rpm 的速度，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 15 分钟；
- 4) 在无菌操作台上弃去上清，并将四管菌液用 2 mL 预冷 10%甘油水重悬并合并到一个无菌 100 mL 离心管中，再补齐至 50 mL，4000rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15min；
- 5) 去上清，用 50 mL 预冷 10%甘油水重悬沉淀，4000 rpm/min，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min；
- 6) 弃掉上清，加入 1 mL 预冷 10%甘油水重悬菌体，每管分装 100 μL 放置冰上静置 15 min，放置-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存；
- 7) 取两管制备好的 TG1 感受态细胞 100 μL 放置于冰上融化后加入质粒电转验证其转化效率；
- 8) 将 pComb3XTT 质粒稀释至 1 ng/ μL ，加入 1 μL 质粒（空白对照不加质粒）至感受态细胞后轻轻混匀，冰上放置 30 min，沿管壁加入预冷的电转杯中（空白对照不加质粒）；
- 9) 快速擦干电击杯外壁水渍置于电转仪中，设置电压 2500 v，电击恒压时间 5.0 ms 左右；
- 10) 加入 900 μL 提前 42 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 LB 液体培养基，放置床摇 37 $^{\circ}\text{C}$ ，180 rpm 震荡复苏培养 45 min；
- 11) 菌液稀释 10 倍后取出 100 μL 涂布含 1/1000 氨苄青霉素的 LB 平板，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱倒置培养过夜。次日计算感受态细胞转化效率

3.2.4.2 pComb3XTT-Fab 重组质粒电转到大肠杆菌

参考刘传勇^[76]实验方法进行转化，具体步骤如下：

- 1) 从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出制备好的 TG1 感受态细胞 100-300 μL 放置于冰上 10min，加入 pComb3XTT-Fab 质粒 100ng-1 μg 后轻轻混匀，置于冰上静置 30 min；

- 2) 沿管壁加入提前预冷的电转杯中, 快速擦干电击杯外壁水渍置于电转仪中, 设置电压 2500 v, 电击恒压时间 5.0 ms 左右;
- 3) 加入提前预热的 2×YT 液体培养基至电转杯中, 收集到 50 mL 锥形瓶里, 37℃, 180 rpm 复苏 1 h;
- 4) 复苏好的菌液涂布于 8 块直径 150 mm 含 1/1000 氨苄青霉素的 2×YT 大平板, 37℃培养 12-16 h。取 10 μL 梯度稀释测库容。

3.2.4.3 文库收集

将转化后的涂布平板用 10 mL 2×YT 培养基刮洗菌落, 将菌落收集至 100 mL 离心管中, 4000 rpm/min, 5 min 离心后将菌体浓缩到 5 mL。离心后加入终浓度为 25%的甘油, 每管分装 1 mL。

3.2.5 文库质量鉴定

3.2.5.1 库容计算

电转化菌液取 10 μL 梯度稀释涂布于 90 mm 含 1/1000 氨苄青霉素的 LB 平板测定库容, 37℃恒温培养箱倒置培养过夜, 根据菌落数稀释梯度计算库容量。

3.2.5.2 菌落 PCR 验证插入率

从测定库容的平板上(菌落数 30~300CFU)随机挑取 48 个单克隆进行菌落 PCR 验证文库的片段插入率, 用引物对 Omp/gIII^F 进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳验证插入率, 体系(表 3.12)如下。程序设定如表 3.6。

表 3.12 菌落 PCR 反应体系

Table 3.12 Colony PCR reaction system

组分	体积
2×Taq 酶	3 μL
Omp	1 μL
gIII ^F	1 μL
单菌落	-
RNase free H ₂ O	Up to 10 μL

3.2.5.3 多样性验证

将菌落 PCR 测定为阳性的克隆送测序, 根据核酸序列翻译出氨基酸序列,

采用 Snap Gene 软件进行多序列比对分析, 用 NCBI 软件对抗体序列进行框架分析。

3.2.6 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的救援与库容测定

3.2.6.1 辅助噬菌体 VCSM13 的制备

3.2.6.1.1 辅助噬菌体 VCSM13 滴度检测

- 1) 超净工作台上用接种环在火焰中灼烧, 待自然凉却后取大肠杆菌 TG1 甘油菌, 在 LB 平板划线, 放置 37°C 烘箱培养 12~16 h;
- 2) 次日挑取单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中, 37°C, 220 rpm 摇菌 6~8 h, 冰浴 20 min, 4°C 保存备用;
- 3) 融化 3 mL 顶层培养基, 47°C 水浴保温备用;
- 4) 取 10 μ L 辅助噬菌体原种用 990 μ L 1 $\times$ PBS 稀释至 10^{-2} , 再用 1 $\times$ PBS 分别将辅助噬菌体稀释 10^{-4} 、 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 倍。取 10 μ L 稀释液加入 100 μ L 上述大肠杆菌 TG1 中, 将混合物在 37°C 的烘箱中放置 15 分钟;
- 5) 吸取上述感染物到 LB 平板上, 加入玻璃珠盖上玻璃盖后摇晃至液体消失, 倒出玻璃珠。平板放置 37 摄氏度培养过夜
- 6) 选择空斑数 100-500 的平板计算滴度。噬菌体滴度 (PFU/mL) = 平板空斑数 $\times$ (1000 μ L/10 μ L) / 噬菌体稀释倍数

3.2.6.1.2 辅助噬菌体 VCSM13 的扩增

参考游凯豪^[59]方法对辅助噬菌体进行扩增

- 1) 挑取噬菌斑到 5 mL LB 液体培养基进行辅助噬菌体的扩增, 加入 200 μ L 上述 TG1 菌液, 置于 37°C, 220 rpm, 30 min, 加入千分之五的卡那抗性, 37°C 静置 30 min, 再放置摇床 37°C, 220 rpm 震荡过夜;
- 2) 过夜培养噬菌体每 500 μ L 到 50 mL 含 1/1000 卡那霉素的 LB 液体培养基, 30°C, 250 rpm 震荡过夜;
- 3) 将过夜培养物转至 100 mL 灭菌离心管中, 4°C, 8000 rpm/min 离心 20 min, 将上清转移至新 100 mL 离心管, 加入 1/5 体积的 PEG/NaCl, 混匀后置于 4°C 静置 4 h;
- 4) 4°C, 8000 rpm/min 离心 20 min, 去除上清, 用 1 mL 1 $\times$ PBS 重悬白色

沉淀，加入 200 μL 的 PEG/NaCl，混匀后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h；

- 5) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，8000 rpm/min 离心 20 min，去除上清，将沉淀悬浮于 200 μL 1 $\times$ PBS 中，即为辅助噬菌体 VCSM13 扩增产物。按照 3.2.6.1.1 测定滴度。

3.2.6.2 噬菌体文库的救援

- 1) 接种至少 10 倍库容量的活细胞于 20 mL 含 1/1000 氨苄青霉素、2% 葡萄糖的 2 $\times$ YT 液体培养基，30 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌 2~2.5 h 至 $\text{OD}_{600}\approx 0.5$ ；
- 2) 按照感染复数 $\text{MOI}\approx 20:1$ 加入辅助噬菌体 VCSM13，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置感染 15 min，在放到摇床 37 $^{\circ}\text{C}$ ，220 rpm 震荡 45 min；
- 3) 将上述感染培养物放置灭菌 100 mL 离心管，3000g 离心 10min 去除上清；
- 4) 用 200 mL 含 1/1000 氨苄青霉素、卡那毒素的 2 $\times$ YT 液体培养基重悬沉淀，30 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈震荡过夜；
- 5) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，3000 g，20 min 离心取上清，加入 1/5 体积的 PEG/NaCl，混匀后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 4 h；
- 6) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，8000 rpm/min 离心 20 min，去除上清，用 1 mL 1 $\times$ PBS 重悬白色沉淀，加入 200 μL 的 PEG/NaCl，混匀后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h；
- 7) 4 $^{\circ}\text{C}$ ，8000 rpm/min 离心 20 min，去除上清，将沉淀悬浮于 200 μL 1 $\times$ PBS 中，即为兔源抗脂联素噬菌体文库。

3.2.6.3 噬菌体文库库容测定

操作步骤同 3.2.6.1.1

3.3 结果与分析.

3.3.1 总 RNA 提取

提取六只兔外周血淋巴细胞中的总 RNA 混合后，采用 Nanodrop 1000 对总 RNA 进行定量测定，测得其 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.83$ ，浓度为 2711 ng/ μL ，数值在正常范围内。提取得到的 RNA 经琼脂糖凝胶鉴定显示，28 S、18 S、5 S 处的条带清晰，即提取的 RNA 完整性较好（图 3.3），可以作为下一步逆转录的模板合成

cDNA。逆转录成 cDNA 后测得其 $OD_{260}/OD_{280}=1.88$ ，浓度为 $853.9\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

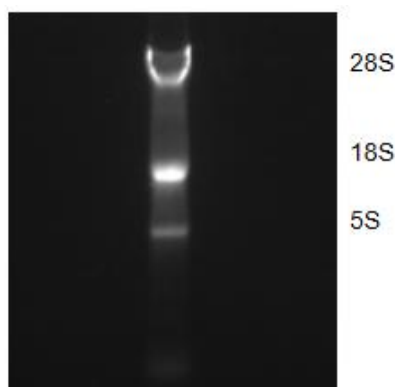


图 3.3 外周血淋巴细胞提取总 RNA 电泳结果

Figure 3.3 Total RNA electrophoresis results of peripheral blood lymphocyte extraction

3.3.2 三轮 PCR 拼接 Fab 基因

图 3.4 为人抗体恒定区 CH1 和 C κ 基因扩增结果电泳图，在 350 bp 左右附近出现目的条带，目的条带上还有一条浅的约 5000 bp 的条带是载体模板。图 3.5 为 6 对重链，8 对轻链的可变区基因扩增结果电泳图，可见 350 bp 左右的目
的条带出现，且浓度不一，与兔源总基因库中每个引物对的含量不同有关。胶回收后用作原料进行后续 PCR。

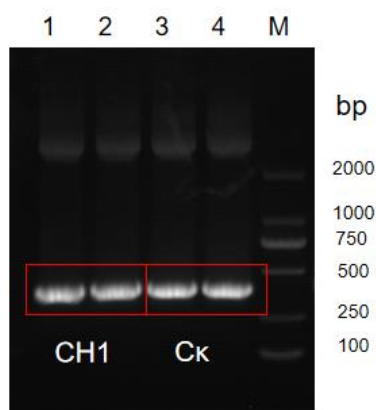


图 3.4 人轻链恒定区 (C κ) 与人重链恒定区 (CH1) 基因的 PCR 扩增结果

Figure 3.4 PCR amplification results of human light chain constant region (C κ) and human heavy chain constant region (CH1) genes

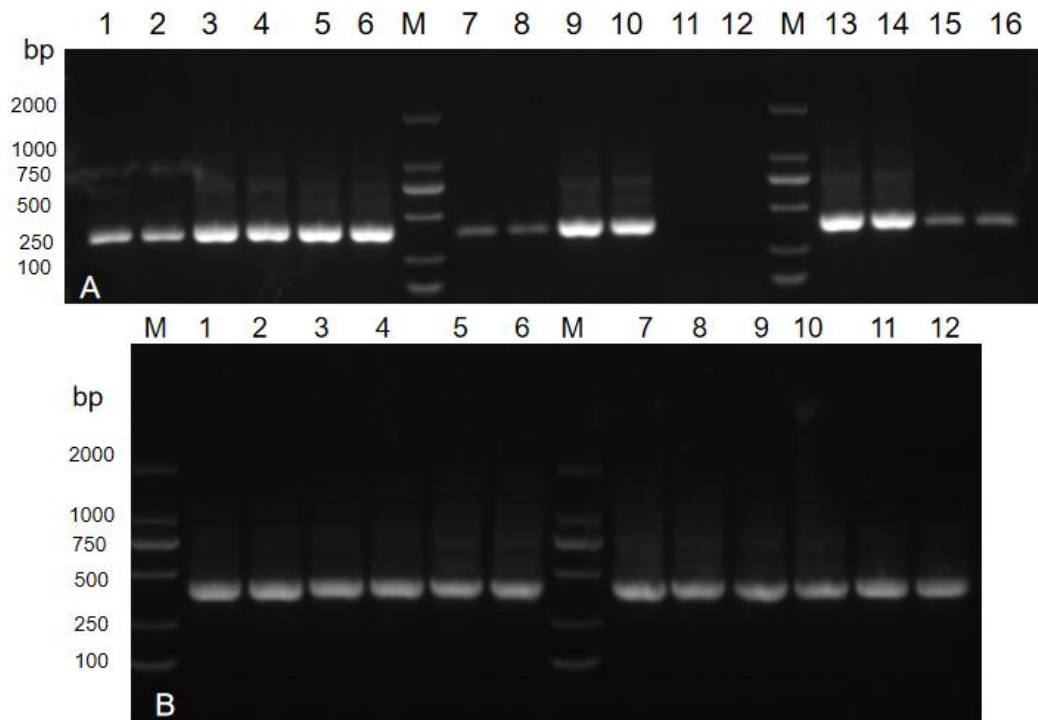


图 3.5 兔抗体重、轻链可变区基因的 PCR 扩增结果

A:泳道 1-16: 轻链可变区 VK1-VK8 引物对 PCR 产物; 泳道 M: 2000 DNA marker

B: 泳道 1 -12: 重链可变区 VH1-VH6 引物对 PCR 产物; 泳道 M: 2000 DNA marker

Figure 3.5 PCR amplification results of variable genes of heavy and light chains of rabbit antibodies

A:Lane 1-16: light chain variable region VK1-VK8 primers to PCR products; Lane M: 2000 DNA marker B:Lane 1-12: heavy chain variable region VH1-VH6 primers to PCR products; Lane M: 2000 DNA marker

如图 3.6, 重叠 PCR 分别将轻链的可变区 V_{κ} 与载体上人源恒定区 C_{κ} 连接成 κ 链、重链的可变区 V_H 与载体上人源恒定区 CH_1 区连接成重链 Fd。第二轮重叠 PCR 连接轻链和 Fd 基因, 扩增得到 Fab 基因。可见 Fab 为 1600 bp 左右。

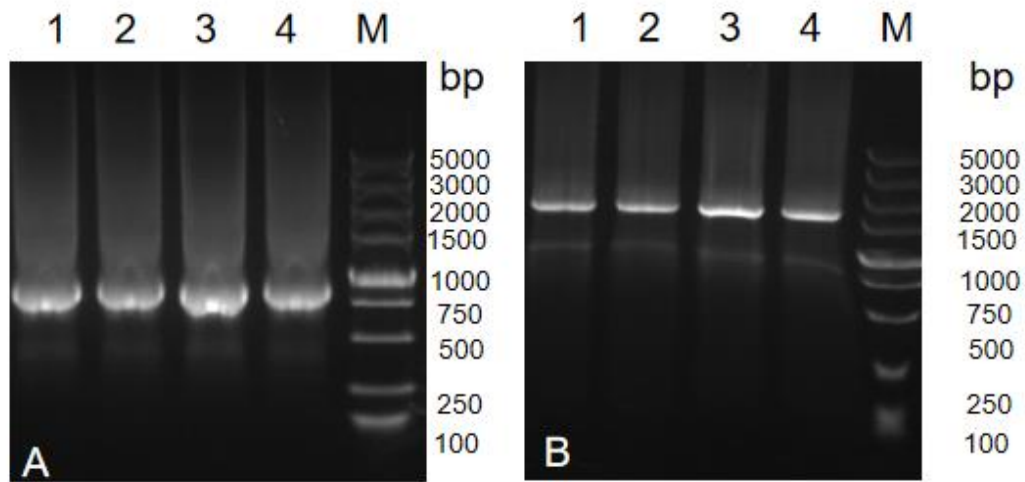


图 3.6 兔抗体重链 Fd 基因、轻链 K 基因和 Fab 基因的 PCR 扩增结果

A: 泳道 1-2: 重链 Fd 基因; 泳道 3-4: 轻链 K 基因; 泳道 M: 5000 DNA marker; B: 泳道 1-4: Fab 基因; 泳道 M: 5000 DNA marker

Figure 3.6 PCR amplification of heavy chain Fd gene, light chain K gene and Fab gene of rabbit antibody

A: Lane 1-2: Heavy chain Fd gene; Lane 3-4: Light chain K gene; Lane M: 5000 DNA marker; B: Lane 1-4: Fab gene; Lane M: 5000 DNA marker

3.3.3 pComb3XTT-Fab 载体的制备与转化

感受态细胞 $1\ \mu\text{g}$ 质粒转入 $100\ \mu\text{L}$ 感受态细胞后用 LB 补足到 $1\ \text{mL}$, 37°C 摇菌 $45\ \text{min}$ 后菌液稀释 10 倍。取 $100\ \mu\text{L}$ 涂布至含 $1/1000$ 氨苄青霉素的 LB 固体平板 37°C 过夜培养, 如图 3.7 可见空白对照不长单克隆菌落, 实验组约长 700 个单克隆菌落, 测得制备的 TG1 感受态细胞转化效率为 $700\ \text{CFU}/0.01\ \text{ng}=7\times 10^7\ \text{CFU}/\mu\text{g}$ 。

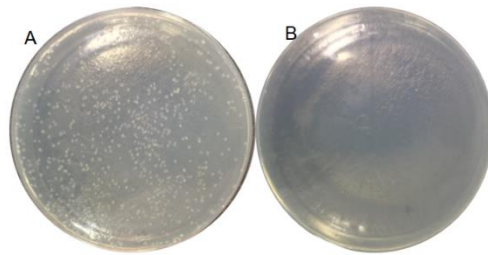


图 3.7 感受态细胞 TG1 转化平板

A:实验组; B: 空白对照组

Figure 3.7 TG1 transformation plate of receptive cells

A: experimental group; B: Blank control group

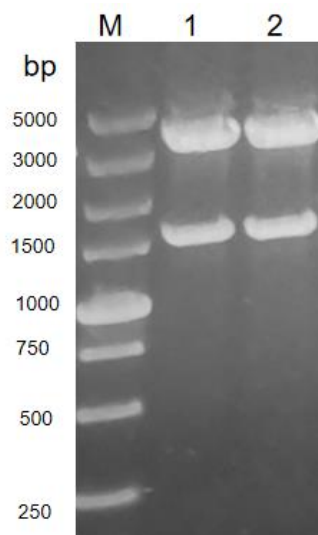


图 3.8 琼脂糖凝胶电泳验证 pComb3XTT 酶切 Fab 片段

泳道 1-2: 载体 pComb3XTT 酶切; 泳道 M: 5000 DNA marker

Figure 3.8 Fab fragment cleavage verified by pComb3XTT by agarose gel electrophoresis

Lane 1-2: Carrier pComb3XTT enzyme digestion; Lane M: 5000 DNA marker

将质粒 pComb3XTT 用 *sfi* I 慢切酶进行酶切(见图 3.8), 酶切后可见约 1500 bp 条带与 3300 bp 条带, 将 3300 bp 产物割胶回收。Fab 片段酶切产物通过 DNA 片段纯化试剂盒进行回收, 回收完纯化产物经 T4 连接酶连接后, 再用 DNA 片段纯化试剂盒纯化一次降低盐离子浓度, 提高电转效率。将连接好的 pComb3XTT-Fab 通过多次电转全部转化到制备好的感受态细胞 TG1 中。

3.3.4 噬菌体 Fab 抗体库的构建

3.3.4.1 库容计算

将 10 μL 噬菌粒文库原液稀释 10、100、1000 倍，测定噬菌粒文库滴度，以菌落数为 30-300 的平板为准统计独立菌落数，计算文库库容量为 5.0×10^5 PFU。经过二十次电转化得到了一个库容为 6×10^6 PFU 库容的免疫 Fab 抗体库。

3.3.4.2 噬菌体 Fab 抗体库重组率测定

随机挑取 48 个单克隆进行菌落 PCR 验证，结果如下图 3.9 所示，PCR 产物在琼脂糖凝胶上大部分只出现一条带，扩增条带约为 1500 bp，Fab 抗体基因插入率为 $41/48=85.4\%$ 。

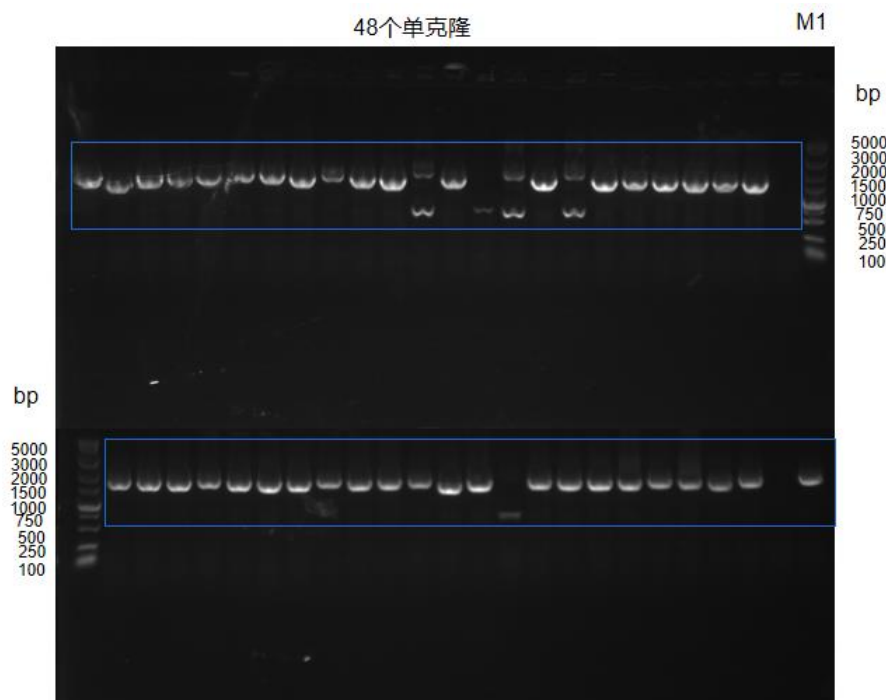


图 3.9 菌落 PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3.9 Colony PCR agarose gel electrophoresis

3.3.4.3 多样性验证

随机挑取 20 个菌落 PCR 阳性单克隆测序，分别接种及扩增后送公司测序，采用 Snap Gene 和 NCBI 基因分析软件分析测序结果，将 DNA 序列翻译成氨基酸序列，进行序列比对，测序结果显示全部转化子均含有编码 Fab 的基因序列，

序列正确率为 100% (图 3.13-14), 均为独立不重复序列, 提示多样性良好。

表 3.13 轻链基因可变区序列分析

Table 3.13 light chain gene variable region sequence analysis

轻链	CDR1	CDR2	CDR3
1	QSLYNSKN	YAS	QGTYSSTGWYAT
2	QSVYRNNY	RAS	AGGWQTSSDNRA
3	ESIGNA	RAS	QSNYYGSYSDCDYS
4	ETIGNA	GTS	LGEFSCSSGDCRA
6	ETIYNN	WAS	QGEFSCSSADCRA
7	ESVYSN	RAS	AGGYSGHIFA
8	QSIGSN	YAS	QSYDYISNSTDNA
9	QSVYKNDE	KAS	LGEFSCSSGDCRA
10	QSVYEANC	LAS	AGGYNGDIYT
11	HSVSRAY	GTS	QQYGGSPW
12	KSVFFNNR	GAS	AGGYSSSDNT
13	QSVASNNL	SAS	LGTYSADAGA
14	QSLYKNNQ	DAS	AGDFGGWVLS
15	QSVYEANC	LAS	AGGYNGDIYT
16	QSVYNNNN	QAS	LGTYDCSGADCSA
17	RTIGSS	RAS	QYTDGGGSNT
18	QSIGTN	GIW	QCTDYSKSV DGA
19	QSVHNNNW	KAS	AGDYS DVS DNA
20	QSSQSVWSNND	QTS	LGVKSWDDDGTA

表 3.14 重链基因可变区序列分析

Table 3.14 Sequence analysis of variable regions of heavy chain genes

重链	CDR1	CDR2	CDR3
1	GFSLSSYH	IYTGNSGST	ARDDVRSNGWQFNL
2	GFTLSSND	IYVGSSGT	VRNWGL
3	GFTISSYH	INTGGS	ARDRGSSGWSDLNI
4	GFSFSYYH	IYAGTIGST	ARGSSATAYALNI
5	GIDLSSYA	ISSSGST	ARNTGDKYDLHRLDL
6	GFSLSNYH	IKSGGST	ARGTTDVSYGSAL
7	GIDLSSYV	ISRTGNT	ARDSVGSSGDLELDL
8	GFSFSSNY	IYAGTIGST	ARDIYAGSDTYIDL
9	GFSFSYYH	INTDGST	ARGAGSSSV
10	GFTISHYV	IEAGGSA	ARGWP GDYIDPGI
11	GIDLSSNA	ISSSGST	ARDIDYGPAL
12	GSDISSYA	IGAGGST	ARVVD SYDYGM DP
13	GFSLSSNA	IEPDGSA	GRGGYGGYGGNI
14	GFSFSSSFY	IYAADIGNT	ARGSSATAYALNI
15	GFSFSSGY	INIDGSA	ARVSYTDYDYL
16	GLDFSSSYW	IYAGKGS	ATKFNYGDSSYLHL
17	GFSLSSAA	ISYGGST	ARYGVSSGYWTGLDL
18	GFSFSNYYY	IDTSHAIT	ARSGSSVYTYFNI
19	GFTISHYV	IEAGGSA	ARGSVGSSGDLELDL
20	GSFISSYA	IYSGKGS	ARGAGGSSV

3.3.5 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的救援与库容测定

3.3.5.1 辅助噬菌体 VCSM13 滴度测定

对扩增的辅助噬菌体分别以 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 进行梯度稀释，各取 10 μL 感染 200 μL 对数生长期的 TG1，与上层琼脂混匀后铺于无抗生素的 LB 平板，37°C 倒置培养，第二天对形成的噬菌斑计数，并根据公式计算得出辅助噬菌体 VCSM13 的滴度为 $240 \times 10^9 \times 100 = 2.4 \times 10^{13}$ PFU/mL。

3.3.5.2 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的滴度测定

从制备的兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 噬菌粒文库中取 50 倍库容量的细胞到 LB 液体培养基中。培养至对数生长期后，用 VCSM13 辅助噬菌体辅助组装成完整的噬菌体并扩增，最终获得文库滴度为 5.5×10^{13} PFU/mL 的兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库，可继续用于后续脂联素特异性 Fab 抗体的亲和淘选。

3.4 讨论

噬菌体展示抗体技术在单克隆抗体的开发、抗体的人源化、以及亲和力进化等方面扮演着重要角色。该技术主要侧重于展示抗体可变区或抗原结合片段，即 scFv 或者 Fab 片段，此外，有研究发现一种新的噬菌体展示系统，能够在 M13 噬菌体上展示完整的 IgG 抗体^[77]。其中噬菌体展示 Fab 抗体的构建方法主要有两种：一种方法是通过四个酶切位点分别将重、轻链基因克隆到表达载体中，从而建立 Fab 抗体库。另一种方法是通过重叠延伸拼接法将重、轻链基因拼接后 Fab 片段后同时克隆入表达载体^[78]。第二种方法是构建抗体库的常用方法，它避免了多次转化可能导致丢失抗体多样性基因的问题，因此更为稳定和可靠。兔抗体轻链亚型中 90%~95% 都是 κ 型^[35]，故本研究只设计兔源 κ 型轻链引物对 κ 型轻链进行扩增及展示筛选。展示 Fab 所用的载体 pComb3XTT^[79]相较于 pComb3 载体多了一段人破伤风毒素 Fab 基因，可获得人 κ 轻链恒定区和重链恒定区 CH1 序列。将人恒定区序列与兔可变区结合成人-兔嵌合 Fab 抗体，筛选得到的特异性抗体可通过改造表达出完整的人兔嵌合抗体，使得人源序列占整个抗体的 70% 左右，可降低了抗体的 HAMA 效应。

能否得到特异性强、亲和力高的噬菌体抗体，主要取决于噬菌体抗体库的

质量和筛选策略。一个优质的抗体库应该具有足够大的库容量和良好的多样性。库容的大小主要受大肠杆菌转化效率的限制。一般感受态细胞的转化效率需达到 10^9 CFU/ μ g 才能满足建库要求^[78]，文献报道天然抗体文库库容一般达到 10^8 PFU 即可筛选出特异性抗体，而免疫文库因为已经高度富含靶标结合物，库容在 10^6 PFU 即可筛选出特异性抗体。范献军^[80]构建 10^5 PFU 库容免疫库也可以筛选到特异性单链抗体。本研究总共收集到 6 只免疫高效价的兔 DNA 样本，一定程度上丰富了文库多样性，同时制备的电转感受态细胞转化效率达到 7×10^7 CFU/ μ g。为了得到最大库容量，将连接产物经过了 20 次电转化，获得了超过 6×10^6 PFU 库容的文库，插入率为 85.4%，多样性良好。经重组率和多样性鉴定，文库有效库容为 5.1×10^6 PFU。

3.5 小结

基于基因工程与噬菌体展示技术，从免疫的兔血中提取外周血淋巴细胞，获取兔源 DNA 基因库，三轮 PCR 扩增获取 Fab 抗体基因插入到 pComb3XTT 噬菌粒载体中，制备兔源抗脂联素噬菌粒展示 Fab 文库并进行表征，用辅助噬菌体 VCSM13 协助噬菌粒展示 Fab 抗体，制备出兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体文库，为后期兔源抗脂联素 Fab 抗体的生物淘选提供了基础。研究结果如下：

1) 提取六只兔外周血淋巴细胞中的总 RNA，浓度为 2711 ng/ μ L。通过反转录获得浓度为 853.9 ng/ μ L 的 cDNA，以此为模板扩增兔源抗体重、轻链可变区序列 VH 和 VK，与 pComb3XTT 载体上的人恒定区基因 CH1、CK 进行两轮重叠延伸 PCR 扩增得到 Fab 抗体的编码基因。基于基因重组技术，构建了 pComb3XTT-Fab 噬菌粒重组载体，成功制备了库容为 6×10^6 PFU 的兔源抗脂联素 Fab 噬菌粒文库。

2) 通过测序技术评估了免疫库的构建质量，测序多样性良好，插入率为 85.4%，文库有效库容为 5.1×10^6 PFU。加入辅助噬菌体 VCSM13 协助噬菌粒展示 Fab 抗体，制备出滴度为 5.5×10^{13} PFU/mL 的兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体文库。

第 4 章 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体的筛选及鉴定

在制备兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的基础上，本章使用重组 gad 蛋白作为靶抗原，通过优化洗涤缓冲液、洗涤次数、结合时间等亲和淘选条件进行固相亲和淘选兔源抗脂联素 Fab 抗体。经过四轮生物亲和淘选后采用间接 Phage-ELISA 进行鉴定，将阳性噬菌体克隆进行 DNA 测序，获得兔源抗脂联素 Fab 抗体的基因编码序列。固相亲和淘选的流程如下图 4.1 所示。

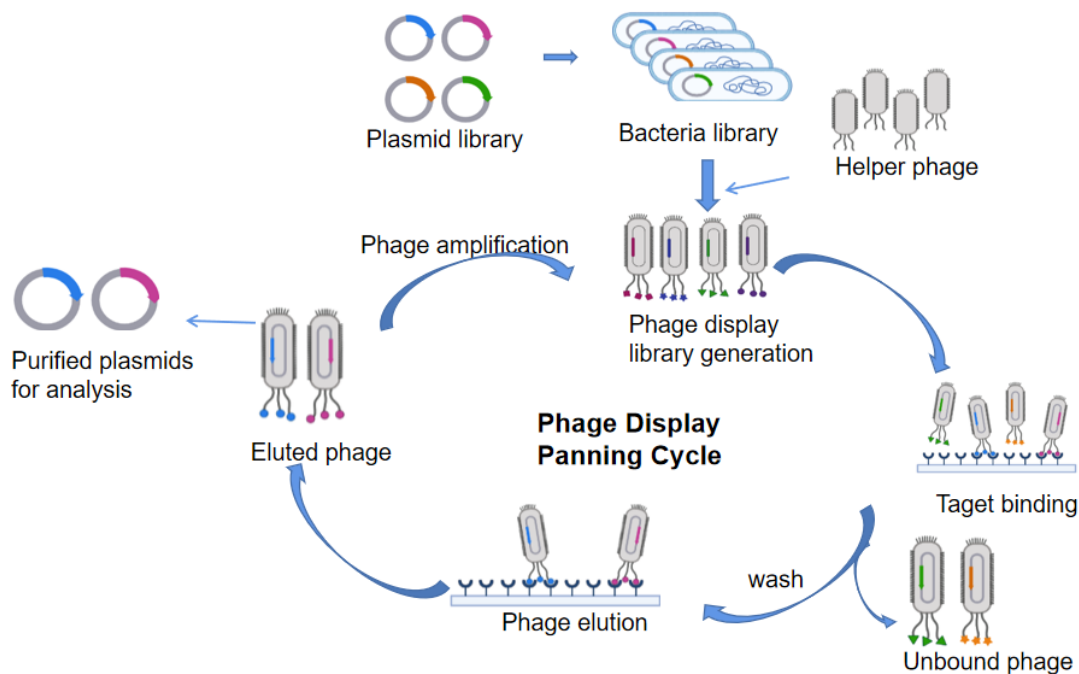


图 4.1 噬菌体展示抗脂联素抗体的筛选流程示意图

Figure 4.1 Flowchart of phage display anti-adiponectin antibody screening

4.1 材料与仪器

4.1.1 主要仪器设备

参见附录（1）

4.1.2 主要试剂

参见附录（2）

4.1.3 主要试剂配置方法

参见附录（3）

4.2 实验方法

4.2.1 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的富集筛选

基于降低重组 gad 蛋白每轮包被浓度，以及采用 BSA 与 OVA 交替封闭、增加洗涤次数和降低每轮噬菌体展示兔源 Fab 抗体与重组 gad 蛋白结合孵育的时间等方法，可以去除结合能力不强的噬菌体展示 Fab 抗体。通过酸洗的方式，可以保留下结合能力强的噬菌体展示脂联素兔源 Fab 抗体，结合多轮噬菌体结合-洗涤-洗脱的固相亲和淘选的方法进行噬菌体展示脂联素兔源 Fab 抗体淘选，具体固相亲和淘选的条件见下表 4.1。

表 4.1 兔源抗脂联素 Fab 抗体淘选条件

Table 4.1 Panning conditions for anti-adiponectin Fab antibody from rabbits

淘选轮次	文库投入量 (PFU)	重组 gad 蛋白包被浓度 (μg/mL)	封闭液	PBST 洗涤次数	PBS 洗涤次数	文库结合时间 (h)
1	2.0×10^{12}	100	BSA	3	3	1.5
2		50	OVA	6	6	1.0
3		20	BSA	9	9	0.5
4		10	OVA	12	12	0.5

- 1) 在超净工作台内先用无菌超纯水清洗三遍后续需要用到的酶标板孔，然后打开紫外灯，紫外光照射清洗之后的空的酶标板孔 30min；
- 2) 包被：取重组 gad 蛋白抗原稀释至包被浓度，加入酶标板(100 μL/孔)，酶标板放入无菌的包装盒中，放入 4℃冰箱包被过夜；
- 3) 封闭：吸出包被液，加入 300 μL 无菌 1×PBS 溶液，轻轻晃动酶标板 10 s，在无菌的纸张上拍干进行洗涤，连续洗涤 3 次，加入封闭液（3%

BSA 与 3% OVA 进行交替封闭), 300 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中封闭 2 h;

- 4) 结合: 吸出封闭液, 用 1 $\times$ PBS 洗板 3 次, 加入 100 μL 噬菌体展示文库, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5-1.5 h;
- 5) 洗涤: 吸出未结合的噬菌体, 用 PBST 洗板 3~12 次, 再用 1 $\times$ PBS 洗板 3~12 次;
- 6) 洗脱: 酶标板种加入 100 μL Gly-HCl, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱 8 min, 用移液器反复吹吸数次;
- 7) 中和: 吸出孔中被吹打下来的噬菌体液体至离心管, 用中和缓冲液调节 pH 至 7.0。留 10 μL 用于滴度测定。

4.2.1.1 中和洗脱液的扩增与纯化

- 1) 洗脱液中加入 5 mL 大肠杆菌 TG1 培养物 ($\text{OD}_{600} \approx 0.5$), 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱静置 15 min 进行侵染, 摇床 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 震荡培养 45 min;
- 2) 将培养物加入到 20 mL 含 1/1000 氨苄青霉素的 2 $\times$ YT 液体培养基, 摇床 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 培养 2 h;
- 3) 按照感染复数 $\text{MOI} \approx 20:1$ 加入辅助噬菌体 VCSM13, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置感染 15 min, 放到摇床 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm 震荡 45 min;
- 4) 后续纯化步骤同 3.2.6.1.2

4.2.2 兔源抗脂联素噬菌体 Fab 抗体单克隆鉴定与分析

4.2.2.1 兔源抗脂联素噬菌体 Fab 抗体单克隆救援

参考游凯豪^[59]方法对第三、四轮洗脱滴度板上噬菌体 Fab 抗体单克隆进行救援, 具体步骤如下:

- 1) 无菌环境下分装含 1/1000 氨苄青霉素, 2%葡萄糖的 LB 液体培养基于 1.5 mL 离心管, 每管 0.9 mL;
- 2) 从测定洗脱物滴度转接的平板上, 随机挑取 48 个单菌落接种于上述 LB 培养基种, 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 rpm, 过夜培养;
- 3) 过夜产物取 50 μL 接种至含 1/1000 氨苄青霉素, 2%葡萄糖的 LB 液体

培养基, 37°C摇床 220 rpm 培养约 6 h 至 $OD_{600} \approx 0.5$;

- 4) 加入辅助噬菌体 VCSM13 (感染复数 $MOI \approx 1:1$), 37°C, 220 rpm 摇床培养 1 h;
- 5) 3000 g, 离心 10 min。用等体积含 1/1000 氨苄青霉素、卡那毒素的 LB 液体培养基重悬细胞。30°C, 250 rpm, 培养 5~8 h;
- 6) 4°C, 8000 rpm/min, 10 min, 取上清。加入 1/5 体积 PEG-NaCl 溶液, 4°C冰箱放置 2 h;
- 7) 重复离心后弃上清。沉淀用 0.2 mL $1 \times$ PBS 重悬, 按照 3.2.6.1.1 方法测定滴度。

4.2.2.2 间接 Phage-ELISA 检测噬菌体单克隆

参考王显显^[81]实验方法, 通过间接 Phage-ELISA 对第三、四轮洗脱滴度板上挑取单克隆进行鉴定。

- 1) 用 $1 \times$ PBS 将重组 gad 抗原稀释至 1 μ g/mL。96 孔酶标板中, 加入抗原稀释液 100 μ L/孔, 4°C包被过夜;
- 2) 0.05%PBST 洗板 3 次, 5%脱脂奶粉封闭, 300 μ L/孔, 37°C封闭 2 h;
- 3) 0.05%PBST 洗板 3 次, 孔中加入经 PEG-NaCl 纯化的噬菌体, 100 μ L/孔, 37°C, 1 h, 实验设定阴性对照和空白对照 (表 4.2);
- 4) 0.05%PBST 洗板 6 次, 加入稀释倍数为 1: 5000 的 Anti-M13 Bacteriophage Antibody VHH 抗体 (HRP), 100 μ L/孔, 37°C, 1 h;
- 5) 0.05%PBST 洗板 6 次, 加入显色工作液 100 μ L/孔, 37°C, 30 min;
- 6) 50 μ L/孔, 2 M 硫酸终止反应, 测定 450 nm 吸光值。
- 7) 挑选 Phage-ELISA 检测为阳性的单个菌落, 接种到含有 1/1000 氨苄青霉素的 1 mL LB 液体培养基中。在 37°C、220 rpm 的条件下培养 6~8 小时, 送测序。采用 Snap Gene 软件进行多序列比对分析, 用 NCBI 软件进行抗体框架结构分析。

4.2.3 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体阳性噬菌粒克隆鉴定

4.2.3.1 间接 Phage-ELISA 检测阳性克隆结合特异性

对筛选出的噬菌体展示兔源抗脂联素 Fab 抗体阳性克隆按照 4.2.2.1 进行救

援,噬菌体扩增滴度统一稀释至 10^{12} PFU/mL 进行后续检测。

- 1) 操作步骤同 4.2.2.2, 包被抗原添加 BSA、OVA 蛋白浓度为 $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的阴性对照, 对筛选出的噬菌体阳性克隆与抗原结合活性进行验证。
- 2) 包被 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的重组 gad 蛋白, 梯度稀释筛选出的噬菌体阳性克隆进行进一步特异性验证, 其他操作步骤同 4.2.2.2

4.2.3.2 夹心 Phage-ELISA 检测兔源抗脂联素噬菌体 Fab 抗体阳性克隆

- 1) 用 $1\times\text{PBS}$ 将 2.2.2.1 制备的弗式佐剂低剂量组脂联素多抗血清稀释至 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$, $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, 包被过夜;
- 2) $0.05\%\text{PBST}$ 洗板, 4% 脱脂奶粉 $300\text{ }\mu\text{L/孔}$, 封闭 2 h ;
- 3) $0.05\%\text{PBST}$ 洗板 3 次, 将脂联素抗原梯度稀释至 10 、 5 、 2.5 、 1.25 、 0.725 、 0.3625 、 0.1812 、 0.0906 ng/mL , $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, 37°C , 60 min ;
- 4) $0.05\%\text{PBST}$ 洗板 3 次, 孔中加入梯度稀释的噬菌体, $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, 37°C , 1 h , 设置辅助噬菌体 VCSM13 作为阴性对照, $1\times\text{PBS}$ 作为空白对照。
- 5) 后续步骤同 4.2.2.2。

4.3 结果与分析

4.3.1 兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体文库的淘选

四轮固相淘选实验数据如下表 4.2 所示, 第一轮噬菌体洗脱滴度较低为 1.4×10^5 PFU, 到了第二轮升高到 3.8×10^6 PFU, 回收率从 7×10^{-8} 提高到 1.9×10^{-6} , 富集度为 14.28 。随着筛选条件的严格化, 第四轮固相筛选富集度仅为 1.85 。综上所述, 兔源脂联素 Fab 噬菌体得到了有效富集, 采用的增加洗涤强度、更换封闭剂和改变结合时间等淘选策略能够有效的去除非特异性的脂联素 Fab 抗体。

表 4.2 四轮固相亲和淘选中噬菌体的回收和富集

Table 4.2 Recovery and enrichment of phages during four rounds of fixation and panning

淘选轮次	噬菌体投入量(PFU)	回收量(PFU)	回收率	富集度
1	2.0×10^{12}	1.4×10^5	7×10^{-8}	/
2	2.0×10^{12}	3.8×10^6	1.9×10^{-6}	14.28
3	2.0×10^{12}	7×10^7	3.5×10^{-5}	18.4
4	2.0×10^{12}	1.3×10^7	6.5×10^{-5}	1.85

注：回收率=回收量/投入量；富集度=后一轮回收率/前一轮回收率

Note: Recovery rate = recovery amount/input amount; Enrichment = last round recovery/previous round recovery

4.3.2 噬菌体克隆的结合活性鉴定

对兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体文库进行四轮淘选，从第三、四轮测洗脱量的平板上各随机挑取 36 个噬菌粒克隆进行救援（第三轮滴度板挑取单克隆命名为 Z-3-X，第四轮滴度板挑取单克隆命名为 Z-4-X）。通过间接 Phage-ELISA 鉴定噬菌体与重组 gad 蛋白结合活性，实验组数据 OD 值比阴性组数据大于 2.1 即为阳性。实验结果如下图 4.2 所示，第三、四轮各 36 个噬菌体展示兔源脂联素 Fab 抗体中的阳性率从 78% 上升到 93.75%，表明与重组 gad 蛋白结合的噬菌体得到有效富集。

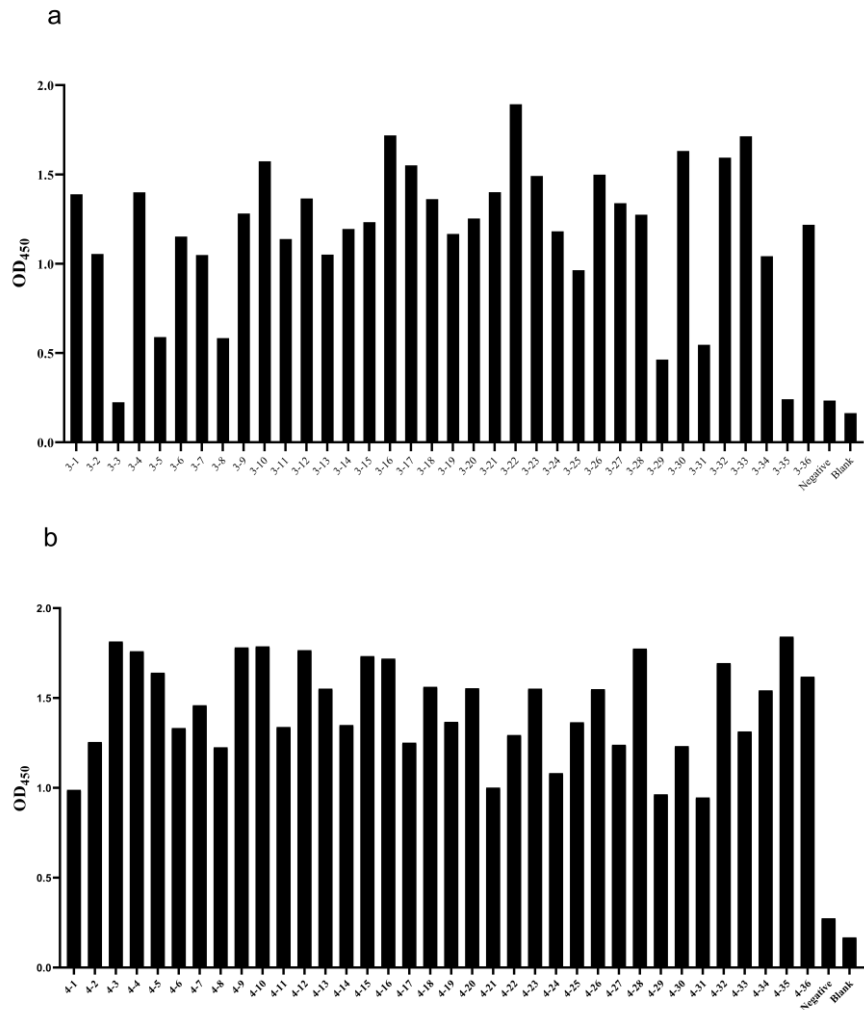


图 4.2 噬菌体展示脂联素 Fab 抗体淘选的单克隆鉴定

a: 第三轮淘选单克隆; b: 第四轮淘选单克隆

Figure 4.2 Monoclonal identification of phage display adiponectin Fab antibody panning

a: The third round of panning monoclonal; b: The fourth round of panning monoclonal

4.3.3 阳性噬菌体克隆的特异性鉴定

对 4.3.2 所有阳性噬菌体克隆进行测序，测序结果经 Snap Gene 进行多序列对比分析，挑选出 3 种含有不同 Fab 抗体基因序列且具备较强结合能力的阳性噬菌体克隆，命名为 Z-3-1、Z-3-10、Z-3-36。通过 Phage-ELISA 检测这三种噬菌体与重组 gad 蛋白、BSA 与 OVA 的结合活性。实验结果如下图 4.3 所示，3

种阳性噬菌体克隆与重组 gad 蛋白抗原 ELISA 检测 OD₄₅₀ 值都高于 BSA、OVA 蛋白，表明其与重组 gad 蛋白具有一定的结合特异性。噬菌体与 BSA、OVA 也有结合，可能与噬菌体本身展示 gIII 蛋白有关。

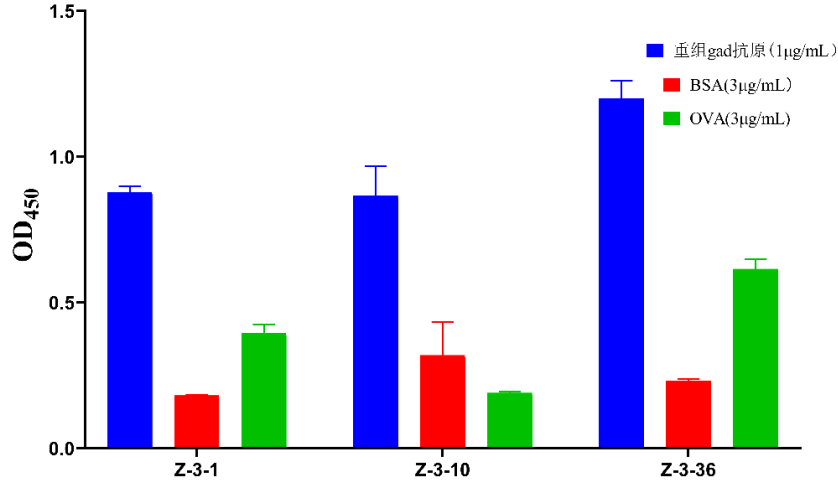


图 4.3 间接 Phage-ELISA 鉴定阳性克隆的特异性

Figure 4.3 Specificity of positive clones identified by indirect Phage-ELISA

包被 1 µg/mL 的重组 gad 抗原，梯度稀释三种噬菌体为检测抗体进行间接 Phage-ELISA，实验结果如下图 4.4 所示，检测 OD₄₅₀ 值随稀释梯度逐渐降低，并在稀释 128 倍时与阴性对照（辅助噬菌体 VCSM13）趋于一致。综上所述，3 种阳性噬菌体克隆与脂联素球状域蛋白（gad）抗原具有一定的结合特异性。

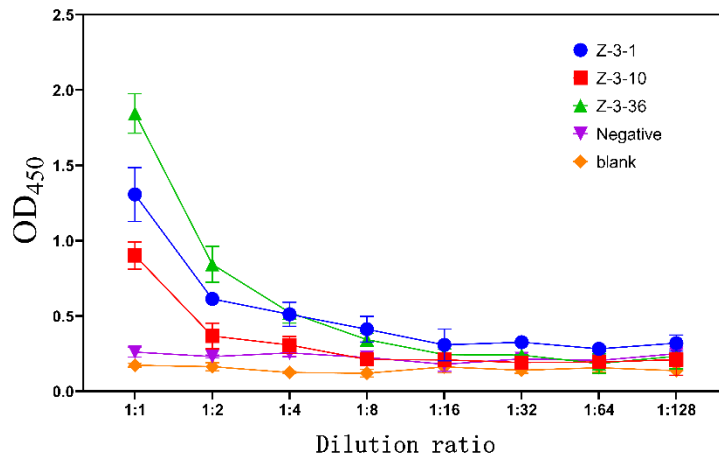


图 4.4 间接 Phage-ELISA 鉴定阳性克隆的结合活性

Figure 4.4 Binding activity of positive clones identified by indirect Phage-ELISA

4.3.4 夹心 ELISA 验证噬菌体展示兔源抗脂联素 Fab 抗体

包被 10 $\mu\text{g/mL}$ 2.2.2.1 制备的弗式佐剂低剂量组脂联素血清，加入梯度稀释重组 gad 抗原，以及 3 种兔源脂联素 Fab 抗体阳性克隆形成“抗体-抗原-抗体”夹心结构进行 Phage-ELISA 检测，实验结果如下图 4.5 所示。与阴性对照 VCSM13 对比，三种兔源 Fab 抗体均显示出与包被抗体优良的配对结合性能，在重组 gad 抗原浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时仍有一定的结合活性，其中 Z-3-36 与包被抗体的配对结合能力最强。

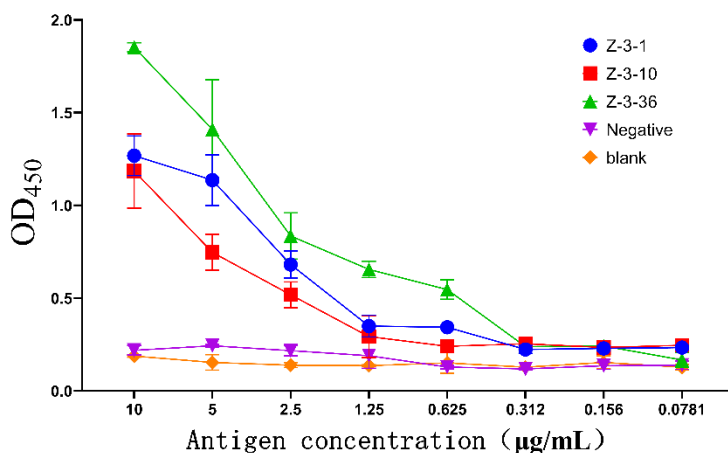


图 4.5 夹心 Phage-ELISA 鉴定阳性克隆的结合活性

Figure 4.5 Binding activity of positive clones identified by sandwich Phage-ELISA

4.4 讨论

噬菌体展示是一种基于噬菌体 DNA 基因修饰的分子技术，目的是通过将肽、蛋白质或抗体片段与噬菌体外壳蛋白之一结合，从而在噬菌体表面表达肽、蛋白质或抗体片段^[44]。辅助噬菌体能包装噬菌体的 DNA，并将成熟的病毒粒子与目的蛋白片段组装起来，作为其主要或次要外壳蛋白的一部分。在酶标板或免疫管中包被靶标 DNA 或蛋白，展示蛋白能与靶标结合的噬菌体被留下，其他噬菌体被清洗除去。留下的噬菌体被洗脱后，通过辅助噬菌体感染细菌来产生更多的噬菌体，以达到富集的目的。这些步骤的重复循环称为“淘选”，指通过去除阴性克隆来富集阳性克隆。

合适的筛选严谨度对于特异性抗体的富集至关重要。如果筛选严谨度过低,可能导致亲和噬菌体的富集过程缓慢,需要增加筛选次数。而筛选严谨度高,则可以获得高亲和力的噬菌体抗体,但也容易丢失一些表达较低但特异性较高的克隆,其中可能包含亲和性极高的目的噬菌体^[78]。在较小的抗体库中,可以在前几轮采用中等严谨度的筛选,有利于避免丢失高亲和性但低表达的克隆;而在较大的抗体库中,则可以采用较高的严谨度,以更快地富集亲和性克隆。这样的策略可以帮助有效地富集特异性和高亲和力的抗体^[82]。本研究逐轮增加筛选严谨度,在4轮筛选过程中,抗原包被量由100 $\mu\text{g/mL}$ 逐轮递减直至用到第四轮10 $\mu\text{g/mL}$ 。同时洗涤次数逐轮增加,第一轮洗涤次数是3次增加至第四轮12次。

本论文只完成了抗体的筛选以及初步鉴定,后期还需要将 Fab 抗体进行表达或者构建脂联素全长抗体并表达,以便消除噬菌体本身 gIII蛋白可能带来的背景信号。

4.5 小结

以重组 gad 蛋白为靶抗原,针对第三章构建的兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体文库进行固相亲和淘选,采用 Phage-ELISA 鉴定筛选出的噬菌体展示脂联素 Fab 阳性克隆。实验结果如下:

1) 采用增加洗涤强度、更换封闭剂和改变结合时间等淘选策略进行四轮固相筛选后,富集度达到486。从第3、4轮的噬菌体洗脱滴度板各随机挑取36个单克隆,进行间接 Phage-ELISA 鉴定。结果显示,第3、4轮的噬菌体阳性率达到78%和93.75%。综上所述,采用的淘选策略能够有效的去除非特异性的脂联素 Fab 抗体,展示脂联素 Fab 抗体噬菌体得到了有效富集。

2) 将噬菌体阳性克隆进行测序,多序列分析共筛选出3种能与重组 gad 蛋白特异性结合的兔源脂联素 Fab 抗体,命名为 Z-3-1、Z-3-10 和 Z-3-36,成功解析出兔源抗脂联素 Fab 抗体的编码基因序列。通过 Phage-ELISA 检测3种阳性噬菌体克隆与重组 gad 蛋白具有一定的结合特异性。结果表明成功富集了具有特异性结合能力的兔源抗脂联素 Fab 抗体,为进一步表达纯化兔源脂联素 Fab 抗体提供了重要的基础。

第5章 结论与展望

5.1 结论

免疫获得的抗血清为了尽量除去抗血清中与目的抗体不相关的成分,可通过亲和层析、蛋白 A/G 层析、离心浓缩或超滤等方法进行纯化处理。兔源多克隆抗体用 protein A 亲和层析纯化柱纯化^[71],商业化抗体多数通过抗原亲和纯化得到。NHS 活化的琼脂糖树脂将蛋白质简单有效地共价固定到珠粒-糖链载体上,为抗体、抗原或其他生物分子的亲和纯化提供了有价值的方法。蛋白质或其他分子上的氨基能与活化的(aminose)琼脂糖产生伯胺反应形成稳定的酰胺键的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)官能团。耦合反应在 pH 为 7~9 的无胺缓冲液中进行。不管配体的分子量或等电点(PI)耦合反应的效率一般大于 80%。本实验将重组 gad 蛋白与 NHS 活化树脂共价偶联,发现 0.5 mg/mL 人脂联素球状域蛋白(gad)与 NHS 活化树脂在 pH=7.5 时偶联效果最好,最大吸附量为 127 µg/mL。但是耦合反应的效率达不到预期,猜测与抗原的浓度有很大的关系,实验室制备的脂联素球状域蛋白抗原在浓度超过 0.6 mg/mL 时就会过饱和呈结晶状,所以在提升免疫亲和纯化柱性能的后续工作中,需要考虑提高蛋白浓度的同时确保脂联素抗原蛋白不失活。

为了筛选到高亲和力的脂联素 Fab 抗体,需要构建一个大型多样化的抗体文库,查阅文献天然抗体文库库容一般达到 10^8 即可筛选出特异性抗体。免疫文库不需要和天然文库一样大,因为免疫的库已经高度富含靶标结合物。然而,文库在构建过程中会打乱完整 B 细胞内存在的天然 VH-VL 对,所得的文库是随机组合的 VH 和 VL 的连接物。单个 B 细胞抗体技术是一种表达单个抗原特异性 B 细胞抗体的基因技术,仅需较少的细胞,即可高效、快速分离出潜在的单克隆抗体^[51]。此外,与噬菌体展示抗体库的随机配对不同的是,该方法保留了生物介导的重链和轻链可变区的原始配对^[52]。故后续可考虑通过单个 B 细胞抗体技术结合噬菌体展示技术进行筛选,可能有更大的机率获得天然配对的特异性抗体。

本研究在制备兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的基础上,通过使用脂

联素球状域蛋白作为靶抗原,结合固相亲和淘选技术,优化了洗涤缓冲液、洗涤次数、结合时间等亲和淘选条件。经过四轮生物亲和淘选,并通过间接 Phage-ELISA 鉴定,结果显示第四轮的噬菌体阳性率达到 93.75%。最终筛选出 3 种能与重组 gad 蛋白特异性结合的脂联素兔源 Fab 抗体。通过对阳性噬菌粒进行 DNA 测序,分析出这三种兔源脂联素 Fab 抗体的编码基因序列。本论文只完成了抗体的筛选以及初步鉴定,后期还需要将 Fab 抗体进行表达或者直接构建脂联素全长抗体并表达,以便消除噬菌体本身 gIII 蛋白可能带来的背景信号。

5.2 展望

1) 本研究涉及脂联素多克隆抗体的制备与纯化以及兔源抗脂联素 Fab 抗体库制备与筛选全过程,包含不同免疫剂量及免疫佐剂对兔血清抗体效价的影响研究、抗原免疫亲和柱的制备、抗血清不同纯化方式结合活性比较、兔源抗脂联素噬菌体展示 Fab 抗体库的构建、兔源脂联素 Fab 抗体生物亲和淘选等,研究的周期较长,研究深度有待加强。比如噬菌体展示 Fab 抗体库的库容的提升、免疫亲和柱偶联条件的优化、抗体库质量的进一步验证和 Fab 抗体亲和淘选条件的优化研究等。

2) 本研究淘选出了 3 种噬菌体展示兔源脂联素 Fab 抗体阳性克隆,但是阳性克隆的特异性不高,与 BSA、OVA 蛋白的 ELISA 数值显示也有结合。后期需要将 Fab 抗体进行表达或者直接构建脂联素全长抗体并表达,以便消除噬菌体本身 gIII 蛋白可能带来的背景信号,进一步验证这 3 种兔源脂联素 Fab 抗体的特异性。

参考文献

- [1] Shklyayev S S, Melnichenko G A, Volevodz N N, et al. Adiponectin: a pleiotropic hormone with multifaceted roles [J]. Problems of Endocrinology, 2021, 67(6): 98-112.
- [2] Straub L G, Scherer P E. Metabolic Messengers: adiponectin [J]. Nature Metabolism, 2019, 1(3): 334-339.
- [3] Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients [J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2000, 20(6): 1595-1599.
- [4] Mavilia M G, Wu G Y. Liver and serum adiponectin levels in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Journal of Digestive Diseases, 2021, 22(4): 214-221.
- [5] Przybycinski J, Dziedziczko V, Puchalowicz K, et al. Adiponectin in Chronic Kidney Disease [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(24): 9375.
- [6] Hafiane A. Adiponectin-mediated regulation of the adiponectin cascade in cardiovascular disease: Updates [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2023, 694: 149406.
- [7] Adiponectin signalling in bone homeostasis, with age and in disease [J]. Bone Research, 2021, 9(1): 11.
- [8] Gao M, Cui D, Xie J. The role of adiponectin for immune cell function in metabolic diseases [J]. Diabetes Obesity & Metabolism, 2023, 25(9): 2427-2438.
- [9] Esmaili S, Hemmati M, Karamian M. Physiological role of adiponectin in different tissues: a review [J]. Archives of Physiology and Biochemistry, 2020, 126(1): 67-73.
- [10] Vionnet N, Hani E, Dupont S, et al. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites:: Evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24 [J]. American Journal of Human Genetics, 2000, 67(6): 1470-1480.
- [11] 马珍珍. 重组人脂联素蛋白的原核、哺乳动物细胞表达及其单克隆抗体制备的研究 [D]. 南昌大学, 2022.
- [12] Scherer P E, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(45): 26746-26749.
- [13] Andel M, Drent M L, Herwaarden A E, et al. A method comparison of total and HMW adiponectin: HMW/total adiponectin ratio varies versus total adiponectin, independent of clinical condition [J]. Clinica Chimica Acta, 2016, 465: 30-33.
- [14] 宋海杰, 张彦华, 张娜, 等. 脂联素及其受体对动物繁殖机能调控研究进展 [J]. 中国家禽, 2022, 44: 94-99.

- [15] Cheng K K Y, Lam K S L, Wang B, et al. Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin [J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2014, 28(1): 3-13.
- [16] Hu Z, Li C, Wu T, et al. Sulfathiazole treats type 2 diabetes by restoring metabolism through activating CYP19A1 [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 2023, 1867(3): 130303.
- [17] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 1999, 257(1): 255.
- [18] C W, T F, S T, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia [J]. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2001, 86(5): 1930-1935.
- [19] 刘俊杰, 朱娟英. 脂联素对乳腺癌肥胖患者的相关研究进展 [J]. *中国实用医药*, 2024, 19: 164-167.
- [20] Naimo G D, Paoli A, Giordano F, et al. Unraveling the Role of Adiponectin Receptors in Obesity-Related Breast Cancer [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(10): 8907.
- [21] Slabuszezewska-Jozwiak A, Lukaszuk A, Janicka-Kosnik M, et al. Role of Leptin and Adiponectin in Endometrial Cancer [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10): 5307.
- [22] Kordafshari M, Nourian M, Mehrvar N, et al. Expression of AdipoR1 and AdipoR2 and Serum Level of Adiponectin in Gastric Cancer [J]. *Gastrointestinal tumors*, 2020, 7(4): 103-109.
- [23] Kawada T. Serum adiponectin and cardiovascular disease: mechanism of the association [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2018, 175(15): 3184-3184.
- [24] Woodward L, Akoumianakis I, Antoniadis C. Unravelling the adiponectin paradox: novel roles of adiponectin in the regulation of cardiovascular disease [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2017, 174(22): 4007-4020.
- [25] Lee S, Kwak H-B. Role of adiponectin in metabolic and cardiovascular disease [J]. *Journal of exercise rehabilitation*, 2014, 10(2): 54-59.
- [26] 赵满仓, 张艳, 刘晶, 等. 脂联素单链抗体基因的克隆及表达 [J]. *河北医药*, 2009, 31: 643-645.
- [27] 樊恒达, 郭学涛. 单克隆抗体药物在医药洁净厂房的设计要点分析 [J]. *化工与医药工程*, 2022, 43: 40-45.
- [28] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018 [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(12): 1136-1145.
- [29] Peng H, Nerreter T, Chang J, et al. Mining Naive Rabbit Antibody Repertoires by Phage Display for Monoclonal Antibodies of Therapeutic Utility [J]. *Journal of Molecular Biology*,

- 2017, 429(19): 2954-2973.
- [30] 王金辉. 动物源性多克隆抗体制备方法及其应用 [J]. 现代畜牧兽医, 2023, 412: 85-88.
- [31] 袁露, 徐文华, 葛婷婷, 等. 兔抗小鼠含 IQ 基序及泛素结构域蛋白(IQUB)多克隆抗体的制备和应用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2023, 39: 846-851.
- [32] Khalaf H-E, Al-Bouqae H, Hwijeh M, et al. Characterization of rabbit polyclonal antibody against camel recombinant nanobodies [J]. Open Life Sciences, 2022, 17(1): 659-675.
- [33] Ascoli C A, Aggeler B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies [J]. Biotechniques, 2018, 65(3): 127-136.
- [34] 李婷婷, 崔慧斐. 兔单克隆抗体的发展及应用前景 [J]. 食品与药品, 2012, 14: 373-376.
- [35] G M R, Dennis L, L K K. B cell and antibody repertoire development in rabbits: the requirement of gut-associated lymphoid tissues [J]. Developmental and comparative immunology, 2006, 30(1-2): 137-153.
- [36] Rader C, Weber J, Peng H. From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies [J]. Experimental and Molecular Medicine, 2017, 49(3): 305.
- [37] Esteves P J, Abrantes J, Baldauf H-M, et al. The wide utility of rabbits as models of human diseases [J]. Experimental and Molecular Medicine, 2018, 50(5): 1-10.
- [38] 武荣飞, 杨溢, 王鹏志, 等. 单克隆抗体制备技术最新研究进展 [J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44: 333-337+343.
- [39] L K K, A C M. Generating the antibody repertoire in rabbit [J]. Advances in immunology, 1994, 56: 179-218.
- [40] Liguori M J, Velk J A H, Ostrow D H. Recombinant Human Interleukin-6 Enhances the Immunoglobulin Secretion of a Rabbit-Rabbit Hybridoma [J]. Hybridoma, 2001, 20(3): 189-198.
- [41] Zhida H, Weimin Z, Yongmei M, et al. Development of new rabbit monoclonal antibody to progesterone receptor (Clone SP2): no heat pretreatment but effective for paraffin section immunohistochemistry [J]. Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM, 2006, 14(2): 229-233.
- [42] 郑晓文. 乙肝核心抗原双抗体夹心酶联免疫方法的建立 [D]. 广州医科大学, 2021.
- [43] 范海潮. 抗 CD163 兔单克隆抗体的开发及鉴定 [D]. 浙江大学, 2017.
- [44] Jaroszewicz W, Morcinek-Orlowska J, Pierzynowska K, et al. Phage display and other peptide display technologies [J]. Fems Microbiology Reviews, 2022, 46(2): 52.
- [45] Kaplon H, Reichert J M. Antibodies to watch in 2018 [J]. mAbs, 2018, 10(2): 183-203.
- [46] 王沁芸. 雌酮孕酮尿液代谢物基因工程抗体的筛选与鉴定 [D]. 江苏大学, 2020.
- [47] Xu C, Zhang C, Zhong J, et al. Construction of an Immunized Rabbit Phage Display Library for Selecting High Activity against *Bacillus thuringiensis* CryI F Toxin Single-Chain Antibodies [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(29): 6016-6022.
- [48] Sherry C X, Yvonne L, L C D, et al. Isolation and characterization of rabbit single chain antibodies to human Reg Ialpha protein [J]. Journal of immunological methods, 2002, 266(1-

- 2): 197-207.
- [49] Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Rabbit monoclonal Fab derived from a phage display library [J]. *Journal of immunological methods*, 1998, 213(2): 201-212.
- [50] C R, G R, S N, et al. The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2000, 275(18): 13668.
- [51] Tiller T. Single B cell antibody technologies [J]. *New Biotechnology*, 2011, 28(5): 453-457.
- [52] 迟象阳, 于长明, 陈薇. 单个 B 细胞抗体制备技术及应用 [J]. *生物工程学报*, 2012, 28: 651-660.
- [53] Sun Y, Cao Y, Li Z, et al. Cross-neutralizing Anti-hemagglutinin Antibodies Isolated from Patients Infected with Avian Influenza A (H5N1) Virus [J]. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 2020, 33(2): 103-113.
- [54] Kimura T, Ohta S, Murayama H. Establishment of anti-asialo-GM1 rabbit monoclonal antibodies capable of reducing natural killer cell activity in mice [J]. *PloS one*, 2023, 18(10): e0292514.
- [55] 陈苏星. B 细胞克隆技术用于 cGAS 单克隆抗体的筛选 [D]. 福建师范大学, 2020.
- [56] Clargo A M, Hudson A R, Ndlovu W, et al. The rapid generation of recombinant functional monoclonal antibodies from individual, antigen-specific bone marrow-derived plasma cells isolated using a novel fluorescence-based method [J]. *mAbs*, 2014, 6(1): 143-159.
- [57] Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery [J]. *Trends in Immunology*, 2021, 42(12): 1143-1158.
- [58] 阎晓红. 基层动物防疫员的采血技术 [J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2017, 33: 218-219.
- [59] 游凯豪. 降钙素原纳米抗体的筛选与多价生物合成研究 [D]. 南昌大学, 2022.
- [60] 王远卓, 魏博帆, 陈莹, 等. 家蚕常用内参蛋白多克隆抗体的制备及应用比较分析 [J]. *蚕业科学*, 2018, 44: 859-866.
- [61] Huang Z, Gong H, Sun Q, et al. Research progress on emulsion vaccine adjuvants [J]. *Heliyon*, 2024, 10(3): e24662.
- [62] Jing J, Zhu C, Gong R, et al. Research progress on the active ingredients of traditional Chinese medicine in the intervention of atherosclerosis: A promising natural immunotherapeutic adjuvant [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 159: 114201.
- [63] Guo M, Li C. An overview of cytokine used as adjuvants in fish: current state and future trends [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(2): 996-1014.
- [64] Moradi M, Vahedi F, Abbassioun A, et al. Liposomal delivery system/adjuvant for tuberculosis vaccine [J]. *Immunity Inflammation and Disease*, 2023, 11(6): 867.
- [65] 钱忠辉, 张华弟, 葛宇燕, 等. 兽用疫苗佐剂的研究进展 [J]. *国外畜牧学(猪与禽)*, 2023, 43: 74-78.
- [66] Hu, J G, Ide, et al. Studies on the optimal immunization schedule of the mouse as an experimental animal. The effect of antigen dose and adjuvant type [J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1989, 37(11): 3042-3046.

- [67] 夏娜, 赵同渊, 申茂欣, 等. 小剂量动物疫苗不同免疫剂量对免疫效果的影响 [J]. 中国畜禽种业, 2023, 19: 102-105.
- [68] Rahman T, Das A, Abir M H, et al. Cytokines and their role as immunotherapeutics and vaccine Adjuvants: The emerging concepts [J]. Cytokine, 2023, 169: 156268.
- [69] Ni L. Advances in mRNA-Based Cancer Vaccines [J]. Vaccines, 2023, 11(10): 1599.
- [70] Yang K, Song H, Shi X, et al. Preparation of a polysaccharide adjuvant and its application in the production of a foot-and-mouth disease virus-like particles vaccine [J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 184: 108479.
- [71] 杨宇轩, 袁红, 焦云娟, 等. 骆驼 FGF21 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 中国兽医科学, 1-10.
- [72] Ertekin O, Kaymak T, Pirincci S S, et al. Aflatoxin-specific monoclonal antibody selection for immunoaffinity column development [J]. Biotechniques, 2019, 66(6): 261-268.
- [73] Thi Thu Ha N, Lee J S, Shim H. Construction of Rabbit Immune Antibody Libraries [M]//Hust M, Lim TS. Phage Display:Methods and Protocols. 2018: 133-146.
- [74] 李蓉芳. 赭曲霉毒素 A 重组抗体的构建及其在哺乳动物细胞 (Expi 293F) 中的表达研究 [D]. 南昌大学, 2023.
- [75] 张芸. 兔源单链抗体噬菌体库的构建及抗雌激素受体抗体的筛选 [D]. 福州大学, 2018.
- [76] 刘传勇. 基于羊驼天然纳米抗体指导的合成纳米抗体文库的构建、鉴定及应用 [D]. 2023.
- [77] Zhang L, Cong Y, Li H, et al. Construction of a full-length antibody phage display vector [J]. Journal of Immunological Methods, 2021, 494.
- [78] 刘冬兰. 人源特异性抗 3 型、7 型腺病毒 Fab 噬菌体抗体库的构建及筛选 [D]. 广州医科大学, 2017.
- [79] Rader C. The pComb3 Phagemid Family of Phage Display Vectors [J]. Cold Spring Harbor protocols, 2023, 494: 113052.
- [80] 范献军. T7 噬菌体展示免疫抗体库筛选阿特拉津 scFv 抗体的研究 [D]. 华中农业大学, 2011.
- [81] 王显显. 谷物样品中基于抗独特型纳米抗体噬菌体的玉米赤霉烯酮超灵敏荧光定量 PCR 方法的建立 [D]. 南昌大学, 2016.
- [82] 高鹏, 胡立勇, 钱钰, 等. 噬菌体抗体库筛选技术 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12: 4577-4583.

附录

(1) 主要仪器设备

高速冷冻离心机	Thermo Fisher Scientific
全波长酶标仪	Thermo Fisher Scientific
恒温培养箱	日本 SANYO
超纯水仪	Millipore 公司
微量移液器	Thermo Fisher Scientific
凝胶成像系统	Tanon
稳压电泳仪 (DYY-III)	日本 SANYO
恒温水浴锅	常州诺基仪器有限公司
超净工作台	Thermo Fisher Scientific
96 孔酶标板	依科赛公司

(2) 主要材料

Ecoli DH5a	本实验室保存
氯化钾 (分析纯)	西陇科学股份有限公司
Ecoli TG1	本实验室保存
Tryptone	Oxoid
琼脂粉	江西倍晟科技有限公司
Yeast Extract	Oxoid
脱脂奶粉	上海生工生物工程股份有限公司
完全弗氏佐剂	Sigma 公司
Quick Antibody-Rabbit 8W	苏州博特龙免疫技术有限公司
不完全弗氏佐剂	Sigma 公司
12% SDS-PAGE 预制胶	上海文渊阁生物科技有限公司
Goat Anti-Rabbit IgG antibody (HRP)	GeneTex
Protein A 亲和层析柱	上海生工生物工程股份有限公司

NHS-Activated Sefinose TM 4 Fast Flow	上海源叶生物科技有限公司
氨苄青霉素	上海生工生物工程股份有限公司
十二水合磷酸氢二钠（分析纯）	西陇科学股份有限公司
卡那霉素	江西爱思博生物技术有限公司
磷酸二氢钾（分析纯）	西陇科学股份有限公司
葡萄糖	西陇科学股份有限公司
兔外周血淋巴细胞分离试剂盒	Solarbio
Trizol	Takara
YeaRed 无毒核酸染料	上海翌圣生物科技有限公司
氯仿	西陇科学股份有限公司
sfi I快切酶	Takara
异丙醇	西陇科学股份有限公司
DL2000 DNA Marker	Takara
Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒	上海翌圣生物科技有限公司
氯仿	西陇科学股份有限公司
Prime STAR HS DNA Polymerase	南京诺唯赞生物科技有限公司
胶回收试剂盒	宝日医生物技术有限公司
TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0	Takara
DL5000 DNA Marker	Takara

（3）主要试剂配置方法

- Protein A 层析柱/免疫亲和柱平衡缓冲液：4.38g NaCl，3.58 g Na₂HPO₄ · 12H₂O，用 400 mL 蒸馏水溶解后调节 pH 值至 7.0，定容至 500 mL，0.22 μm 滤膜过滤
- Protein A 层析柱/免疫亲和柱中和缓冲液：60.5 g Tris-HCl，用 400 mL 蒸馏水溶解后调 pH 值至 8.5，定容至 500 mL，0.22 μm 滤膜过滤
- Protein A 层析柱/免疫亲和柱洗脱缓冲液：3 g 甘氨酸，用 350 mL 蒸馏水溶解后调 pH 值至 3.0，定容至 400 mL，0.22 μm 滤膜过滤

- 1×PBS: 8 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 2.9 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.2 g KCl 于 800 mL 超纯水中, 超声 30 s 后定容至 1 L, pH 调至 7.4, 放置室温备用
- 0.05% PBST: 取 1 mL Tween-20 加入 2000mL 1×PBS 中, 混匀后使用
- 2 M 浓硫酸终止液: 取 10 mL 浓硫酸, 缓慢地边搅拌边加入 80 mL 超纯水
- 2×YT 液体培养基: 16.0 g Tryptone, 10.0 g Yeast Extract, 5.0 g NaCl, 用 800 mL 的蒸馏水进行溶解, 调 pH 值至 7.4, 定容至 1000 mL, 每 50 mL 分装到 250 mL 锥形瓶, 121°C, 20 min 高压灭菌
- 2×YT 固体培养基: 同液体培养基配置方法, 配方中多添加 15 g 琼脂粉
- 1.5%琼脂糖凝胶: 0.4 g 琼脂粉溶于 60 mL 0.5×TBE 缓冲液中, 加热煮至沸腾, 冷却至室温后加入 6 μL YeaRed 无毒核酸染料
- 5×TBE: 54 g Tris, 3.72 g EDTA-Na₂, 27.5 g 硼酸溶于 1000 mL 超纯水中