



福建农林大学

## 硕士专业学位论文

### 高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体 结构分析与研制

学位类别：生物与医药硕士

专业领域：生物技术与工程

研究方向：生物技术与工程

学生姓名：杨斌晖

指导教师：孙岩松 研究员

完成时间：二〇二三年六月

**Structure Analysis and Preparation of  
Nano-antibody Specific for Receptor  
Binding Domain of Highly Pathogenic  
Coronavirus**

**By**

**Binhui Yang**

**Supervised by Prof. YansongSUN**

**A Thesis Submitted to  
Fujian Agriculture and Forestry University  
in Partial Fulfillment of the Requirements  
for  
Professional Master's Degree Biology  
and Medicine**

**College of Life science  
Fujian Agriculture and Forestry University  
Fujian, P.R. China**

**Completion Date (June,2023)**

**Commencement Date (July,2023)**

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 高致病冠状病毒的概述.....	1
1.2 纳米抗体的概述.....	2
1.3 蛋白块(PB)概述.....	5
1.4 噬菌体展示技术的概述.....	5
1.5 本文研究目的及意义.....	6
第二章 高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体的结构分析.....	7
2.1 引言.....	7
2.2 实验方法.....	7
2.3 实验结果.....	7
2.4 讨论.....	14
2.5 本章小结.....	14
第三章 新型冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体的制备.....	15
3.1 引言.....	15
3.2 实验材料.....	15
3.2.1 细菌、噬菌体和质粒.....	15
3.2.2 细胞.....	15
3.2.3 蛋白质.....	15
3.2.4 主要试剂(盒).....	16
3.2.5 主要仪器.....	16
3.3 实验方法.....	16
3.3.1 SARS-CoV-2 RBD 蛋白特异性纳米抗体库的构建.....	16
3.3.2 SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白特异性纳米抗体的筛选.....	23
3.3.3 SARS-CoV-2 奥密克戎株 RBD 蛋白特异性纳米抗体的筛选.....	27
3.3.4 SARS-CoV-2 德尔塔株 RBD 蛋白特异性纳米抗体的筛选.....	27
3.3.5 抗 SARS-CoV-2 特异性纳米抗体的选取与制备.....	27
3.3.6 抗 SARS-CoV-2 特异性抗体的生物学功能评价.....	28
3.4 实验结果.....	30
3.5 讨论.....	41
3.6 本章小结.....	41
第四章 结论与展望.....	43
4.1 结论.....	43

4.2 展望.....	43
参考文献.....	45

## 缩略语表

缩写	英文名称	中文名称
293T	293T cell line	人肾上皮传代细胞系
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CoV	coronavirus	冠状病毒
CDR	complementary determine region	互补决定区
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	互补脱氧核糖核酸
CoV	coronavirus	冠状病毒
ELISA	enzyme-linked immune sorbent assay	酶联免疫吸附试验
EC <sub>50</sub>	concentration for 50% of maximal effect	半最大效应浓度
FR	framework region	骨架区
HCAb	heavy-chain antibody	重链抗体
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
Huh-7	Huh-7 cell line	人肝癌细胞系
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
MERS	Middle East respiratory syndrome	中东呼吸综合征
min	minute	分钟
mg	milligram	毫克
mL	milliliter	毫升
mM	millimole per liter	毫摩尔每升
ng	nanogram	纳克
OD	optical density	吸光度
PB	protein Block	蛋白块
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PBST	phosphate-buffered solution with tween-20	含吐温-20 的磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PDB	Protein Data Bank	蛋白质结构数据库
RMSD	Root Mean Squared Deviation	均方根偏差
RBD	receptor-binding domain	受体结合区
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
SA	structural alphabet	结构字母表
s	second	秒
SARS	severe acute respiratory syndrome	严重急性呼吸综合征
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TCID <sub>50</sub>	50% tissue culture infective dose	半数组织细胞感染量
μg	micro gramme	微克
μL	micro liter	微升
VH	variable domain of the heavy chain	重链可变区

缩略语表

---

VHH	variable domain of the heavy chain of the heavy-chain antibody	重链抗体的重链可变 区
WT	wild type	野生型

---

## 摘要

高致病冠状病毒是极具传染性的病毒，它能够迅速传播并对人类健康构成严重的威胁，自 2003 年的非典型肺炎以来，高致病冠状病毒已经引起了三次大规模的疾病暴发，其一是 2003 年由严重急性呼吸综合征冠状病毒（SARS-CoV）引起的非典型肺炎，其二是 2012 年由中东呼吸综合征冠状病毒（Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV）引起的中东呼吸综合征，其三是 2019 年由新型冠状病毒（SARS-CoV-2）引起的新冠肺炎。为了应对这些疾病的挑战，研究人员正在密切关注高致病冠状病毒的刺突蛋白上的受体结合区（RBD），这个区域是介导病毒和细胞表面受体 ACE2 结合的关键区域，也是诱导中和抗体和发展疫苗的重要靶标。通过研究高致病冠状病毒的受体结合区，研究人员可以设计出诱导中和抗体的疫苗，帮助人类更有效地应对高致病冠状病毒的威胁。

中和抗体的应用是预防和控制传染病非常有效的手段之一。冠状病毒刺突蛋白上的受体结合区（RBD）能够强烈地诱导机体产生保护性抗体，不仅是发展疫苗的重要靶抗原，也是抗体研究的重要靶点。目前，针对高致病冠状病毒 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 的单克隆抗体研究较多，包括人源抗体、鼠源抗体和人源化抗体等。在骆驼体内天然存在一种不含轻链和重链第一恒定区的重链抗体，其重链可变区（VHH）的晶体直径为 2.5 nm，长 4 nm，分子量只有 15 kDa，是目前已知最小的抗原结合单位，被称为纳米抗体。与传统的全分子抗体相比，纳米抗体不仅保留了较高的抗原亲和力和特异性，而且具有分子量低、易于制备、免疫原性低、组织渗透力强等优点，可以用于多种疾病的治疗，具有广泛的应用前景。目前对高致病冠状病毒 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 的纳米抗体结构和性质研究极少，因此，本研究以蛋白块（PB）、Python 语言为工具对收集的数据集中具有代表性的 10 株高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体相对保守的 FR 区进行分析，并且针对新突发的 SARS-CoV-2，

以病毒受体结合区为靶点，开展 SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体研究。

本研究包括以下两个内容。

### 1. 高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体结构分析

VHH 是骆驼重链抗体 (HCAb) 的抗原结合区域，也被称为纳米抗体。由于其体积小、溶解度高、稳定性好、对抗原具有较高的亲和力和特异性，因此在生物医药领域应用广泛。VHH 是由 4 个恒定的 FR 区和 3 个可变的 CDR 区连接的，CDR 区是一个高度可变的区域，提供与表位的相互作用。实际上，VHH 结构虽然数量众多，但很少进行系统的结构分析。本研究使用蛋白块和 Python 语言对 VHH 的 FR 区结构多样性进行分析，结果表明，每个 FR 区都表现出少量的结构变体模式。

### 2. SARS-CoV-2 受体结合区特异性纳米抗体研究

我们采用了 SARS-CoV-2 德尔塔变异株 RBD 蛋白为抗原免疫羊驼，采集其外周血单个核细胞建立了纳米抗体噬菌体展示库。随后我们分别以 SARS-CoV-2 野生型 RBD、德尔塔 RBD、BA.1 RBD 蛋白为抗原综合筛选出 10 株候选纳米抗体。我们通过 ELISA 测定了纳米抗体与 SARS-CoV-2 野生型 RBD、BA.1 RBD、B.1.1.529 RBD 蛋白的结合力，利用生物膜层干涉技术测定了这些抗体与 SARS-CoV-2 野生型 RBD、BA.1 RBD、B.1.1.529 RBD 蛋白的亲和力，之后通过假病毒中和试验验证了这些抗体的中和活性。

综上，本研究对高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体的结构进行整体分析，借助蛋白块和 Python 语言对 10 株代表性的高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体的 FR 区进行全面分析，随后以 SARS-CoV-2 德尔塔变异株 RBD 蛋白为靶点，借助噬菌体展示技术建立噬菌体展示库，以原始株和多种变异株 RBD 蛋白作为抗原进行筛选，筛选到 10 株具有亲和力的纳米抗体。之后通过酶联免疫吸附试验、生物膜层干涉试验、假病毒中和试验等评价它们的生物学功能。这项研究为发展抗高致病冠状病毒治疗药物奠定了基础，为发展多功能抗体提供了一种策略。



**关键词：**冠状病毒；纳米抗体；结构分析；受体结合区

## Abstract

Highly pathogenic coronaviruses are highly contagious viruses that can spread rapidly and pose a serious threat to human health. Since SARS in 2003, highly pathogenic coronaviruses have caused three large-scale disease outbreaks, One is atypical pneumonia caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) in 2003, and the other is Middle East respiratory syndrome coronavirus (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV) in 2012. Respiratory syndrome, the third is the COVID-19 caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) in 2019. In order to meet the challenges of these diseases, researchers are paying close attention to the receptor binding domain (RBD) on the spike protein of highly pathogenic coronaviruses. An important target for neutralizing antibodies and the development of vaccines. By studying the receptor-binding domain of highly pathogenic coronaviruses, researchers can design vaccines that induce neutralizing antibodies to help humans deal with the threat of highly pathogenic coronaviruses more effectively.

The application of neutralizing antibodies is one of the very effective means to prevent and control infectious diseases. The receptor binding domain (RBD) on the coronavirus spike protein can strongly induce the body to produce protective antibodies, which is not only an important

target antigen for the development of vaccines, but also an important target for antibody research. At present, there are many studies on monoclonal antibodies against highly pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2, including human antibodies, murine antibodies, and humanized antibodies. A heavy chain antibody that does not contain the light chain and the first constant domain of the heavy chain naturally exists in camels. The crystals of the heavy chain variable domain (VHH) have a diameter of 2.5 nm, a length of 4 nm, and a molecular weight of only 15 kDa. The smallest known antigen-binding unit is called a nanobody. Compared with traditional full-molecular antibodies, nanobodies not only retain higher antigen affinity and specificity, but also have the advantages of low molecular weight, easy preparation, low immunogenicity, and strong tissue penetration, and can be used for the treatment of various diseases. treatment has broad application prospects. At present, there are very few studies on the structure and properties of nanobodies against highly pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2. Therefore, this study used protein block (PB) and Python language as tools to analyze the relatively conserved FR domains of 10 representative highly pathogenic coronavirus receptor binding domain-specific nanobodies in the collected data set, and targeted the new the sudden SARS-CoV-2, targeting the virus receptor binding domain, carried out research on

SARS-CoV-2 RBD-specific nanobodies.

This research includes the following two contents.

1. Structural analysis of highly pathogenic coronavirus receptor binding domain-specific nanobodies

VHH is the antigen-binding domain of camelid heavy chain antibodies (HCAbs), also known as nanobodies. Because of its small size, high solubility, good stability, and high affinity and specificity for antigens, it is widely used in the field of biomedicine. The VHH is connected by 4 constant FR domains and 3 variable CDR domains, a highly variable domain that provides interaction with epitopes. In fact, although there are a large number of VHH structures, systematic structural analysis is rarely carried out. In this study, the structural diversity of the FR domains of VHHs was analyzed using protein blocks and Python language, and the results showed that each FR domain exhibited a small number of structural variant patterns.

2. Research on SARS-CoV-2 receptor binding domain-specific nanobodies

We used the RBD protein of the delta variant of SARS-CoV-2 as an antigen to immunize alpacas, and collected peripheral blood mononuclear cells to establish a nanobody phage display library. Then we comprehensively screened 10 candidate nanobodies using SARS-CoV-2 WT RBD, Delta RBD, and BA.1 RBD proteins as antigens. We

determined the binding ability of nanobodies to SARS-CoV-2 WT RBD, BA.1 RBD, and B.1.1.529 RBD proteins by ELISA, and determined the binding ability of these antibodies to SARS-CoV-2 WT proteins by using biofilm interferometry. Affinity of type RBD, BA.1 RBD, B.1.1.529 RBD proteins. The neutralizing activity of these antibodies was then verified by pseudovirus neutralization assays.

In summary, this study conducted an overall analysis of the structure of highly pathogenic coronavirus receptor binding domain-specific nanobodies, A comprehensive analysis of the FR domains of 10 representative highly pathogenic coronavirus receptor binding domain-specific nanobodies with the help of protein blocks and Python language, Then, targeting the RBD protein of the delta mutant strain of SARS-CoV-2, a phage display library was established with the help of phage display technology, and the original strain and various mutant strain RBD proteins were used as antigens for screening, and 10 nanobodies with affinity were screened. Afterwards, their biological functions were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, biofilm layer interference test, and pseudovirus neutralization test. This study lays the foundation for the development of therapeutic drugs against highly pathogenic coronaviruses and provides a strategy for the development of multifunctional antibodies.

**Key words:** coronavirus; nanobody; structural analysis; receptor binding domain

## 第一章 绪论

### 1.1 高致病冠状病毒的概述

自 2019 年底爆发新冠疫情以来，这项全球范围内的公共卫生紧急事件引起了人们的高度关注。这项由高致病冠状病毒 SARS-CoV-2 引起的疾病，被称为 COVID-19 (coronavirus disease 2019) [1]，对世界卫生和经济系统产生了极大的影响。高致病冠状病毒是一类具有很高致病性和死亡率的病毒，严重威胁全球公共卫生和人类生命安全。

冠状病毒是一种 RNA 病毒，是人畜共患病的主要病原体之一[2]。它们以其独特的球形外壳和钩状突起而闻名，这些突起在电子显微镜下形成了一种“冠状”形状，因此得名，图 1-1 为其结构图。冠状病毒的一些亚型已知能够对人类产生危害，例如 SARS-CoV、MERS-CoV 以及 SARS-CoV-2，这些病毒均为高致病冠状病毒家族成员。高致病冠状病毒与其他冠状病毒相比，具有更强的传染性和致病性[4]。SARS-CoV 和 MERS-CoV 已经造成了全球范围内的大规模爆发，尤其是 SARS-CoV，它在 2002-2003 年间爆发了一次全球性的 SARS 流行病，感染了超过 8000 人，导致超过 800 人死亡[3]。与此同时，SARS-CoV-2 的爆发迅速地成为全球范围内的公共卫生紧急事件。截至目前，全球已经有超过 6.7 亿人感染了 COVID-19[4,5]，导致数百万人死亡[6]。这种高度传染性和致病性的冠状病毒引起了世界范围内的警惕和恐慌，许多国家采取了一系列的防控措施来遏制其传播。研究高致病冠状病毒的潜在风险和威胁已成为当今公共卫生领域的一个重要研究方向。科学家们正在开展广泛的研究，以深入了解这些病毒的传染性、致病性和病理特征，以及它们的进化和传播模式。这些研究将有助于制定更有效的预防和控制策略，以应对未来可能的高致病性冠状病毒爆发。

高致病冠状病毒的病理特征包括呼吸系统感染、炎症反应、肺炎和急性呼吸窘迫综合征等，这些病理特征可能导致重症甚至死亡。此外，高致病冠状病毒的传播途径主要包括飞沫传播、接触传播和气溶胶传播等，这些传播途径都具有一定的传染性和致病性，对公共卫生造成了巨大的挑战。

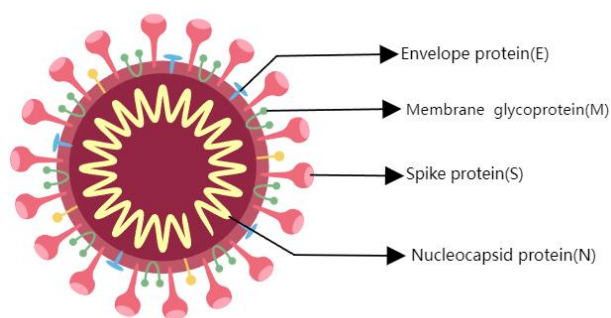


图 1-1 冠状病毒结构示意图

Figure 1-1 Schematic diagram of coronavirus structure

## 1.2 纳米抗体的概述

1993 年, C. Hamers-Casterman 等<sup>[7]</sup>首次报道了在骆驼体内天然存在的一种新型抗体, 该抗体的轻链和重链第一恒定区缺失, 被称为重链抗体 (Heavy-chain antibody, HCAb)。重链抗体广泛存在于多种偶蹄目胼足亚目骆驼科动物体内, 如单峰驼、原驼、羊驼等。克隆重链抗体的 VHH 可得单域抗体 (Single domain antibody, sdAb), 其晶体直径为 2.5 nm, 长 4 nm, 相对分子质量约 15 kDa, 也称纳米抗体 (Nanobody, Nb), 是目前可与抗原结合的最小片段。重链抗体和纳米抗体的结构示意图如图 1-2 所示。此后, 在一些软骨鱼类如护士鲨等体内也发现了类似的轻链缺失的重链抗体<sup>[8]</sup>, 称为新抗原受体 (New antigen receptor, NAR)。

纳米抗体的晶体结构一般呈椭圆形, 直径 2.5 nm, 长 4 nm, 分子量在 10~15 kDa 左右<sup>[9]</sup>, 是目前存在的具有完全功能的最小的抗体。与常规抗体的重链可变区结构类似, 纳米抗体也由四个骨架区 (Framework region, FR) 和三个互补决定区 (Complementary-determining region, CDR) 组成。

驼源 VHH 基因和人 VH 基因的相似度达到 80%~90%<sup>[10]</sup>, 两者的主要区别有:

(1) 多数纳米抗体在 CDR3 和 CDR1 之间有一个额外的二硫键, 后者能够稳定 CDR3 形成的凸环结构, 从而降低其与抗原的结合能<sup>[11]</sup>;

(2) VHH 的 CDR1 和 CDR3 比 VH 的更长, 人和鼠 VH 的 CDR3 的平均长度分别为 14 个和 12 个, 而 VHH 的为 16~18 个<sup>[12]</sup>, 这为 VHH 深入抗原分子内部、识别隐匿抗原奠定了结构基础; 并且纳米抗体的 CDR3 通常在抗体抗原相互作用中起核心作用<sup>[13]</sup>;



(3) 传统抗体 FR2 中有 4 个疏水性氨基酸 (V37、G44、L45 和 W47) 在进化中是相当保守的, 而在 VHH 中则为亲水性氨基酸 (F37、E44、R45 和 G47), 这增加了 VHH 的溶解性<sup>[14]</sup>, 使得 VHH 在溶液中相对稳定, 不易发生聚集。

与传统抗体相比, 纳米抗体具有以下几个特点:

(1) 纳米抗体具有小分子量和高渗透性。它是目前已知相对分子质量最小的抗体, 完整的常规抗体分子约为 150 kDa, 单链可变区片段 (single-chain variable fragment, scFv) 约为 30 kDa, 而纳米抗体约为 15 kDa。其较小的相对分子质量使之具有较强的组织渗透性, 能够渗透到细胞间隙和组织中<sup>[15]</sup>, 还能通过血脑屏障等<sup>[16, 17]</sup>。

(2) 水溶性好。由于纳米抗体的 FR2 中一些亲水性氨基酸取代疏水性氨基酸, 使纳米抗体的水溶性增加, 在溶液中具有较好的亲水性<sup>[18]</sup>, 且不易发生聚集反应。

(3) 稳定性好。纳米抗体可在 -20℃ 环境下保持活性数年, 4℃ 条件下稳定储存数月, 也可在 37℃ 的 PBS 缓冲液中保持活性大于 1 周。Dumoulin 等<sup>[19]</sup>对纳米抗体进行 90℃ 高温处理, 检测高温对其结合活性的影响, 结果发现纳米抗体活性并未受到影响, 而同样处理的传统抗体却已失活。这个优点对于抗体的保存和运输具有十分重要的价值。除了具有热稳定性外, 纳米抗体对于蛋白变性剂, 如尿素、盐酸胍和乳酸胺等也表现出较高的耐受性。在化学及热变性后, 纳米抗体能够重新折叠, 并且在 CDR1 与 CDR3 间重新形成一个二硫键, 提高了其结构的稳定性, 保障了其功能活性的稳定<sup>[20]</sup>。

(4) 抗原识别能力强。与 VH 相比, VHH 的 CDR1 和 CDR3 均较长。从纳米抗体的晶体结构看, 突出的 CDR3 环非常稳定, 因为它通过半胱氨酸残基与 CDR1 或 FR2 上的半胱氨酸残基形成二硫键<sup>[21]</sup>, 这个额外的二硫键也是纳米抗体稳定性好的原因之一。传统抗体的抗原结合位点是凹陷或平面的, 所以只能识别平面或凸起的抗原。而纳米抗体由于这个突出的 CDR3 环, 使得它能够结合凹进去的抗原表位, 因此纳米抗体能够特异性识别一些隐匿的抗原表位, 而这是传统抗体无法实现的<sup>[22]</sup>。

(5) 易于表达。除了哺乳动物细胞, 纳米抗体还可以在细菌、酵母等生物体大量表达, 即便是在细菌中也能够形成二硫键, 也无需考虑轻重链配对的问题, 因此可保证目标纳米抗体结构的正确性和功能的完整性<sup>[23]</sup>。如在大肠埃希菌表达系统中, 其表达量在培养基中可以达到 1~10 mg/L, 并且在酵母、植物、昆虫和哺乳动物细胞中的表达效率也非常高<sup>[24]</sup>。

纳米抗体的应用非常广泛主要包括下面几点:

(1) 用于科学研究。蛋白质是高度动态的分子, 有时候很难形成晶体<sup>[25]</sup>。可以针对要解析结构的蛋白质, 筛选其纳米抗体, 当纳米抗体与靶蛋白相互作用

时，能够降低靶蛋白的动态状态，将其固定在两者的相互作用的构象中，有助于晶体的形成。例如，Tobias Kromann-Hansen 等<sup>[26]</sup>筛选出了尿激酶型纤溶酶原激活剂的活性位点纳米抗体和变构位点纳米抗体，两种抗体将尿激酶型纤溶酶原激活剂固定在不同的状态，从而解析了其在不同状态下的构象。带有特殊标签的纳米抗体在细胞内可以将抗原重新定位到特定的细胞区域。Ulrich Rothbauer<sup>[27]</sup>等筛选出了一个绿色荧光蛋白（GFP）抗体，该抗体可以与细胞蛋白融合，异位召集 GFP 融合蛋白，从而达到靶向操纵活细胞中的细胞器（或细胞结构）及其活动的作用。

（2）用于疾病诊断。目前已经报道了很多基于纳米抗体的体内外诊断研究。Francisco J Morales-Yanez 等<sup>[28]</sup>开发了弓形体特异性纳米抗体，通过 ELISA 的方法能够检测低至 0.65 ng/mL 的弓形体抗原。纳米抗体分子量小，穿透力强，因此以放射性元素标记的纳米抗体可以作为显影剂，能够在血液中快速清除，减少辐射；纳米抗体还能穿过致密组织，对深层的病变进行显影定位。

（3）用于治疗。纳米抗体可以用于多种疾病的治疗。卡普赛珠单抗（Caplacizumab）是第一个基于纳米抗体的治疗药物，其分别于 2018 年底和 2019 年初获得欧洲药品管理局和美国食品药品监督管理局的批准。该抗体靶向血管性血友病因子（von willebrand factor, v WF），防止 v WF 介导的血小板粘附，从而达到治疗疾病的效果。Laursen N 等<sup>[29]</sup>筛选了靶向流感多个表位的多结构域的纳米抗体，将它们组合后表现出增强的病毒交叉反应性和效力。与腺相关病毒介导的基因递送技术相结合，是一种预防流感病毒和其他高度可变病原体感染的有效策略。

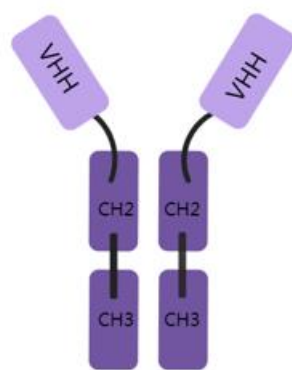


图 1-2 重链抗体的结构示意图

Figure 1-2 Schematic diagram of heavy chain antibody structure

### 1.3 蛋白块 (PB) 概述

蛋白质是高度动态的大分子,为了分析其内在的灵活性,计算生物学家经常使用分子动力学 (MD) (MD)进行模拟分析。对蛋白结构弹性分析的方法有多种,例如通过多个蛋白分子动力学的均方根波动 (RMSF) (RMSF)或单一蛋白结构的正模态分析 (NMA) (NMA)<sup>[30]</sup>。我们使用“结构字母” (SAs) (SAs)来表示蛋白质的三维结构<sup>[31,32]</sup>。SAs 能够近似表征蛋白质骨架的构象,并将蛋白质的局部结构转换为一维序列。蛋白块 ((Protein Block), PB 就是 SAs 其中一种。PB 由 16 个块组成,它是通过对一个代表性的非冗余蛋白质结构数据库进行无监督训练设计而成的。PB 是由一组描述蛋白质主链的二面角定义的,这使得 PB 能够表征局部蛋白质的结构。PB 由 a 至 p 的 16 的字母组成, m 和 d 可以分别近似代表中心 $\alpha$ -螺旋和中心 $\beta$ -折叠; PB a 至 c 主要代表 $\beta$ -折叠的 N 端帽结构; PB e 和 f 对应 C 端帽结构; PB g 到 j 对应于无规卷曲; k 和 l 对应于 $\alpha$ -螺旋的 N 端帽结构; PB n 到 p 对应于 C 端帽结构<sup>[33]</sup>。

PB 已经被证明在降低蛋白结构的复杂性方面是有效的并且已经在相关研究领域广泛应用。例如,使用 PB 分析蛋白间的相互作用时,提出跨膜蛋白的结构模型,重建球状蛋白的结构,设计肽段,定义结合位点,进行局部蛋白质构象预测,预测 $\beta$ -转角<sup>[34, 35, 36]</sup>,并了解由于 $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 人整合素突变引起的蛋白局部构象变化<sup>[37, 38]</sup>等。

PB 也可以用来比较和叠加蛋白质结构,例如: iPBA 和 mulPBA<sup>[39]</sup>,相比其他的叠加方法这些方法得到的叠加结构更加可靠。PB 还能通过序列预测蛋白质结构以及预测蛋白质骨架的弹性状况。

将基于 PB 的方法应用于结构生物学领域,如 DARC 蛋白、人 $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 整合素和 KISSR1 蛋白,突出了 PB 在分析大蛋白结构局部形变的实用性<sup>[40, 41]</sup>。

### 1.4 噬菌体展示技术的概述

噬菌体展示技术是一种用于展示蛋白质、多肽或其他生物分子的技术,利用噬菌体的表面展示外来蛋白质或多肽。这种技术可以用于生物学研究、药物开发、疫苗制备等领域。

噬菌体展示技术的原理是利用噬菌体基因组的某些区域(通常是 pIII 或 pVIII 基因)来插入外来蛋白质或多肽编码序列,并将其表达在噬菌体表面。这样,通过对噬菌体表面的筛选,就可以筛选出具有特定功能或结构的蛋白质或多肽。

噬菌体展示技术主要有两种形式：**pIII 展示**和**pVIII 展示**。**pIII 展示**是通过将外来蛋白质或多肽插入噬菌体 **pIII** 基因中，使其表达在噬菌体表面。**pVIII 展示**是通过将外来蛋白质或多肽插入 **pVIII** 基因中，使其在噬菌体表面形成展示复合物。

噬菌体展示技术有许多应用，包括疫苗开发、抗体库筛选、酶学研究和药物发现等。在疫苗开发方面，噬菌体展示技术可以用于展示病原体表面蛋白质的免疫原性决定簇，从而诱导免疫反应。在抗体库筛选方面，噬菌体展示技术可以用于筛选具有特定亲和力的抗体。在药物发现方面，噬菌体展示技术可以用于鉴定针对特定受体或蛋白质的高亲和力分子。

**构建噬菌体展示文库：**将外来蛋白质或多肽编码序列插入噬菌体基因组的某个区域（通常是 **pIII** 或 **pVIII** 基因），构建噬菌体展示文库。**噬菌体表面展示：**通过感染宿主细菌，并表达噬菌体基因组中的外来蛋白质或多肽编码序列，使其表现在噬菌体表面。**筛选：**通过对噬菌体表面进行筛选，筛选出具有特定功能或结构的蛋白质或多肽。**鉴定：**对筛选出的蛋白质或多肽进行鉴定和验证。

总的来说，噬菌体展示技术具有高效、快速、灵敏和可重复性的特点，可以用于高通量的筛选和鉴定。与传统的蛋白质展示技术相比，噬菌体展示技术具有更高的展示效率和更大的展示容量，同时还可以通过基因工程技术进行定点插入和灵活调节展示蛋白的表达量。因此，噬菌体展示技术已成为生物医学领域和生物技术领域中重要的研究工具。

## 1.5 本文研究目的及意义

本研究以高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体为研究对象，使用 Python 语言中蛋白块为工具对十株代表性的纳米抗体相对稳定的框架区进行分析，接下来使用 SARS-CoV-2 德尔塔变异株的 RBD 蛋白免疫羊驼利用噬菌体展示技术建立纳米抗体库，使用原始株 RBD 蛋白和多种变异株 RBD 蛋白为抗原进行筛选，筛选出 10 株高亲和力的纳米抗体。随后使用 ELISA、生物膜层干涉技术和假病毒中和试验评估它们的生物学功能。本研究为发展抗高致病冠状病毒治疗药物奠定了基础，为研究抗原抗体的相互作用机制提供了一种策略。

## 第二章 高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体的结构分析

### 2.1 引言

VHH 是骆驼重链抗体 (HCAb) 的抗原结合区域。由于其体积小、溶解度高、稳定性好、对抗原具有较高的亲和力和特异性,因此在生物医学领域有着广泛的应用。VHH 是由恒定的框架区域 (FR) 和互补决定区域 (CDR) 连接的,CDR 区是一个高度可变的区域,提供与表位的相互作用。实际上,VHH 结构虽然数量众多,但很少对其进行系统的结构分析。本研究使用结构字母表对 VHH 的 FR 结构多样性进行分析,以高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体为例,结果表明,每个 FR 区的结构都存在变化,即使是稳定的 FR 区也存在柔性区域。

### 2.2 实验方法

在 PDB 数据库中通过关键词搜索找到目标蛋白结构文件并下载;使用 ClustalO 软件对 VHH 进行比对;使用 MulPBA 对 VHH 的序列和 PB 进行比对;使用 Python 语言、WebLogo 对 VHH 的结构进行分析;使用网站“<https://www.novopro.cn/tools/cdr.html>”根据 IMGT 方案对抗体的 FR 区进行区分。

### 2.3 实验结果

#### 2.3.1 数据的选择

##### 1. 10 株代表序列的选择

在数据库中搜索关键词找到了 89 个蛋白结构文件,删除相同序列相同结构的文件后得到 67 个独特的完整结构,对这 67 个 VHH 的氨基酸序列使用 Clustal O 软件进行比对,根据系统发育树选择了 10 株能带表整个数据集的 VHH 结构文件 PDB ID 及链如下:6WARB、7R4ID、7OLZB、7VQ0D、7Q3RG、7KN5D、7LX5C、7N8IH、7C8WA、7Z6VX。

##### 2. FR 区的区分

我们在 PDB 数据库中下载上面抗体的 FASTA 格式文件，随后使用网站“<https://www.novopro.cn/tools/cdr.html>”根据 IMGT 的方法对这 10 株代表性 VHH 的 FR 区进行区分，FR1 区和 FR4 区我们只分析了所有 VHH 都拥有的位点，区分结果如表 2-1、表 2-2、表 2-3、表 2-4 所示：

表 2-1 10 株 VHH FR1 区对应的氨基酸序列

Table 2-1 Amino acid sequences corresponding to FR1 region of 10 VHH strains

PDB id、Chain	FR1
6WARB	VQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVAS
7R4ID	VQLVESGGGSVQAGGSLKLSCAAS
7OLZB	VQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
7VQ0D	VQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVAS
7Q3RG	VQLVESGGGTVPGGSLRLSCEVS
7KN5D	VQLVETGGGFVQPGGSLRLSCAAS
7LX5C	VQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAVS
7N8IH	VQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS
7C8WA	VQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
7Z6VX	VQLVESGGGLMQAGGSLRLSCAVS

表 2-2 10 株 VHH FR2 区对应的氨基酸序列

Table 2-2 Amino acid sequences corresponding to FR2 region of 10 VHH strains

PDB ID、Chain	FR2
6WARB	MDWYRQAPGKQRELVAG
7R4ID	IGWFRQAPGQEREGVAA
7OLZB	LGWFRQAPRKEREFVAA
7VQ0D	IVWFRQAPGKERKFVAA
7Q3RG	MGWDRQAPGKQRELVAT
7KN5D	IGWFRQAPGKEREGVSC
7LX5C	IGWFRQAPGKEREGVSC
7N8IH	MHWVRQAPGKGLEWVAF
7C8WA	MEWYRQAPGKEREGVAA
7Z6VX	MGWFRQAPGKEREFVAA

表 2-3 10 株 VHH FR3 区对应的氨基酸序列

Table 2-3 Amino acid sequences corresponding to FR3 region of 10 VHH strains

PDB ID、Chain	FR3
6WARB	NYGDFVKGRFTISRDNANTVYVLQMDSLKPEDTAVYYC
7R4ID	YYSDSVKGRFTISGDNAKNTVSLQMNSLLPKDTAVYYC
7OLZB	YYADSVKGRFTISRDNANTVYVLQMNSLKPEDTAVYSC
7VQ0D	AYAESVKGRFTISRDNANTVHLQMNSLKPEDTAVYYC
7Q3RG	AYAESVKGRFTISRDNANTVHLQMNSLKPEDTAVYYC
7KN5D	YYSDSVKGRFTISRDNANTVYVLQMNSLKPEDTAVYYC

7LX5C	KYADSVKGRFTASRDNAKNTFYLQMNSLKPEDTAVYYC
7N8IH	YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMKSLRAEDTAVYYC
7C8WA	RYADSVKGRFTISRDNKNTVYLYLQMNSLKPEDTAVYYC
7Z6VX	YYADSVKGRFTISRDKAKNTVYLYLQMNSLKYEDTAVYYC

表 2-4 10 株 VHH FR4 区对应的氨基酸序列

Table 2-4 Amino acid sequences corresponding to FR4 region of 10 VHH strains

PDB ID、Chain	FR4
6WARB	WGHGTQVTVS
7R4ID	WGQGTQVTVS
7OLZB	WGQGTQVTVS
7VQ0D	WGKGTQVTVS
7Q3RG	WGQGTQVTVS
7KN5D	WGKGTQVTVS
7LX5C	WGKGTQVTVS
7N8IH	WGQGLVTVS
7C8WA	DYQGTQVTVS
7Z6VX	WGQGTQVTVS

我们在 MulPBA 上输入 PDB ID 及链根据上一步区分的 FR 区得到对应的 PB 结果如表 2-5、表 2-6、表 2-7、表 2-8 所示：

表 2-5 FR1 区对应的 PB

Table 2-5 PB Corresponding to FR Region 1

PDB ID、Chain	FR1
6WARB	zzddehiacddehiacdddddfb
7R4ID	zcddehiacddehiacdddddeh
7OLZB	zdddehiacddehiacddddded
7VQ0D	zccdeejiaddehiacddddddd
7Q3RG	zdddeeedjddehiacddddded
7KN5D	zdddehiacddehiacdddddeh
7LX5C	zdddehiacddehiacdddddeh
7N8IH	zdddehiacddehiacdddddeh
7C8WA	zcddeeedjddehiacdddddeh
7Z6VX	zdddehiacddehiacddddded

表 2-6 FR2 区对应的 PB

Table 2-6 PB Corresponding to FR Region 2

PDB ID、Chain	FR2
6WARB	cdddddehiacdffbdc
7R4ID	ddddddflccddfbdc
7OLZB	dddddehiacdffbdc
7VQ0D	dddddehiacdffbdc
7Q3RG	cddddflccddfbdc

7KN5D	dddddehiacddfbc
7LX5C	dddddehiacddfbc
7N8IH	dddddehiacddfbc
7C8WA	dddddehiacddfbc
7Z6VX	dddddehiacddfbc

表 2-7 FR3 区对应的 PB

Table 2-7 PB Corresponding to FR Region 3

PDB ID、Chain	FR3
6WARB	ddfkbghkacdddfklopacddehiafklgccddd
7R4ID	ddfklmmpccdddfknopadddfhiaaklgccddd
7OLZB	ddfklgojaccdddfklopacddehiafklgccddd
7VQ0D	ddfklgokacdddfknopacddehiafklgccddd
7Q3RG	ddfklgojaccdddfkbccdddehiafklgccddd
7KN5D	ddfklgojaccdddfkbccdddehiafklgccddd
7LX5C	ddfklgojaccdddfkbccdddehiafklgccddd
7N8IH	ddfklgojaccdddfklopacddehiafklgccddd
7C8WA	ddfklgokacdddfklopacddehiafklgccddd
7Z6VX	ddfklgokacdddfknopacddehiafklncddd

表 2-8 FR4 区对应的 PB

Table 2-8 PB Corresponding to FR Region 4

PDB ID、Chain	FR4
6WARB	cebiaddde
7R4ID	debjadddz
7OLZB	cebpaddzz
7VQ0D	dfbpcfbcd
7Q3RG	debiadddz
7KN5D	cebjadddz
7LX5C	cebiadddz
7N8IH	debpaddzz
7C8WA	zzzzcdddf
7Z6VX	cebjcddde

### 2.3.2 FR 区的分析

我们通过命令 `pip install --user pbxplore` 在 Python 中安装 PBxplore, 在 PDB 数据库中根据 PDB id 6WAR 找到 B 链并下载对应的 mmCIF 结构文件, 在 Terminal 输入以下指令 `PBassign -p 6war.PBxplore.cif -o 6war` 能够得到名为 6war.PB 的 fasta 格式文件, 用记事本打开这个文件用 FR1 对应的 PB 替换原文件的内容, 并且修改文件名为 `fr1.PB`, 输入指令 `PBcount -fr1.PB.fasta -o fr1` 命令行生成的文



件 `fr1.PB.count` 包含一个 2D 矩阵, 该矩阵有 16 列与 PB 数量相同以及与 FR1 残基数目相同的行数, 之后输入指令 `PBstat -f fr1.PB.count -o fr1 --map`, 就绘制出了 10 个 VHH 抗体 FR1 区的 PB 分布, 如图 2-1A 所示, FR2、FR3、FR4 使用了同样的方法绘制分布热图分别如图 2-1B、图 2-1C、图 2-1D 所示。

从图 2-1 中可以看出 FR1 区的 10 号位点到 22 号位点, FR2 区的 2 号位点到 6 号位点, 11 号位点到 17 号位点, FR3 区的 10 号位点到 16 号位点, FR4 区的 3 号位点和 8 号位点的 PB 都是相同的, 因此可以认为这些区域是刚性的, 相反例如 FR3 区的 18, 19 号位残基对应的 PB 数量多可以认为这些区域是柔性的。

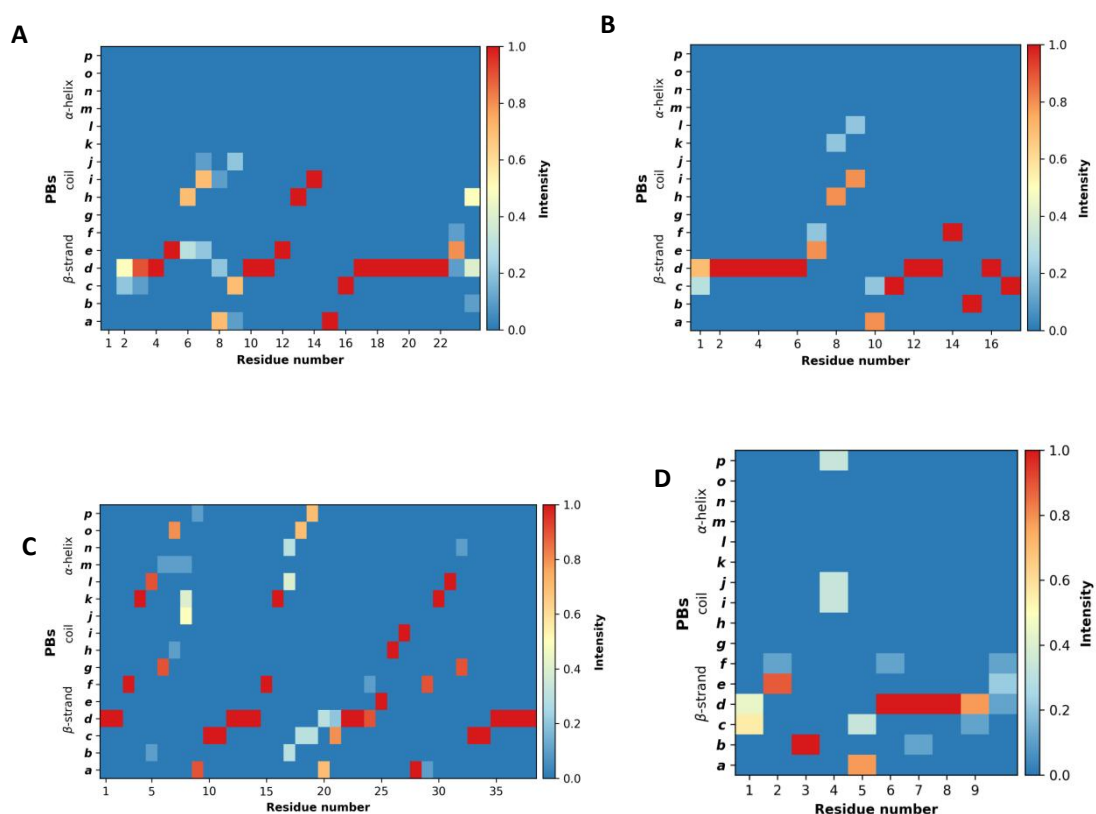


图 2-1 FR1、FR2、FR3、FR4 各个残基位点的 PB 分布

Figure 2-1 PB distribution of each residue position of FR1, FR2, FR3 and FR4

$N_{eq}$  是类似于熵的统计测量, 并且与给定残基的灵活性有关。值越高, 骨架越灵活。FR1 区对应的  $N_{eq}$  从命令获得: `PBstat -f fr1.PB.count -o fr1 --neq`. 输出文件 `fr1.PB.Neq` 包含两列, 分别对应于 FR1 区的残基编号和  $N_{eq}$  值。如图 2-2 A 所示, 其他 FR 区的  $N_{eq}$  分布图的作图方法的方法同上。

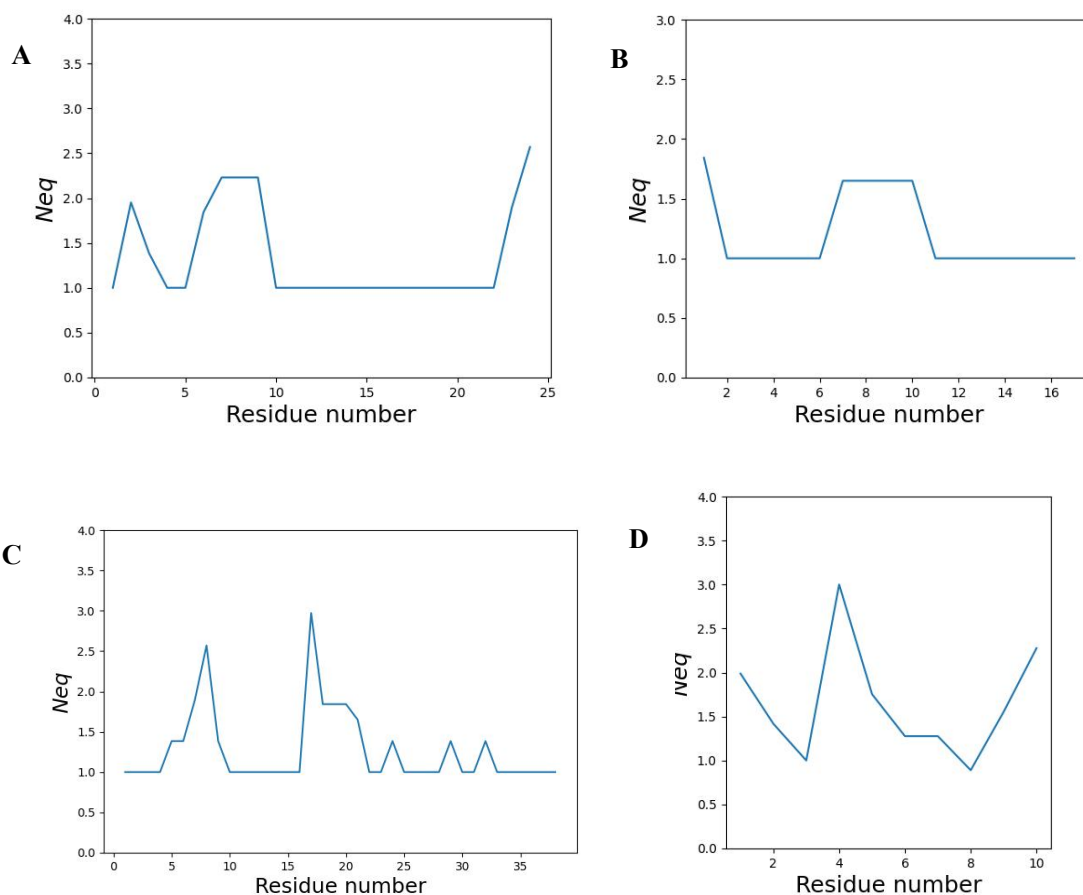


图 2-2 FR1、FR2、FR3、FR4 各个残基位点的  $N_{eq}$  分布  
Figure 2-2  $N_{eq}$  distribution of each residue position of FR1, FR2, FR3 and FR4

通过  $N_{eq}$  分布图 2-2 我们能够清楚的看到刚性区域和柔性区域, 如 FR1 的 10 号位到 22 号位是刚性区域, FR3 区的 18 号位点是柔性区域, 前者  $N_{eq}$  值较低, 后者  $N_{eq}$  值较高。使用 PB 允许我们区分柔性残基和刚性残基而  $N_{eq}$  是一个可变形性和灵活性的度量。

$N_{eq}$  分析侧重于氨基酸的灵活性, Weblogo 的分析可以展现 PB 的多样性及其在蛋白质序列中给定位置的频率, 用 `PBstat -f fr1.PB.count -o fr1 --logo` 命令做了 FR1 区的 Weblogo 分析如图 2-3 A 所示, 其他区的分析的方法同上。

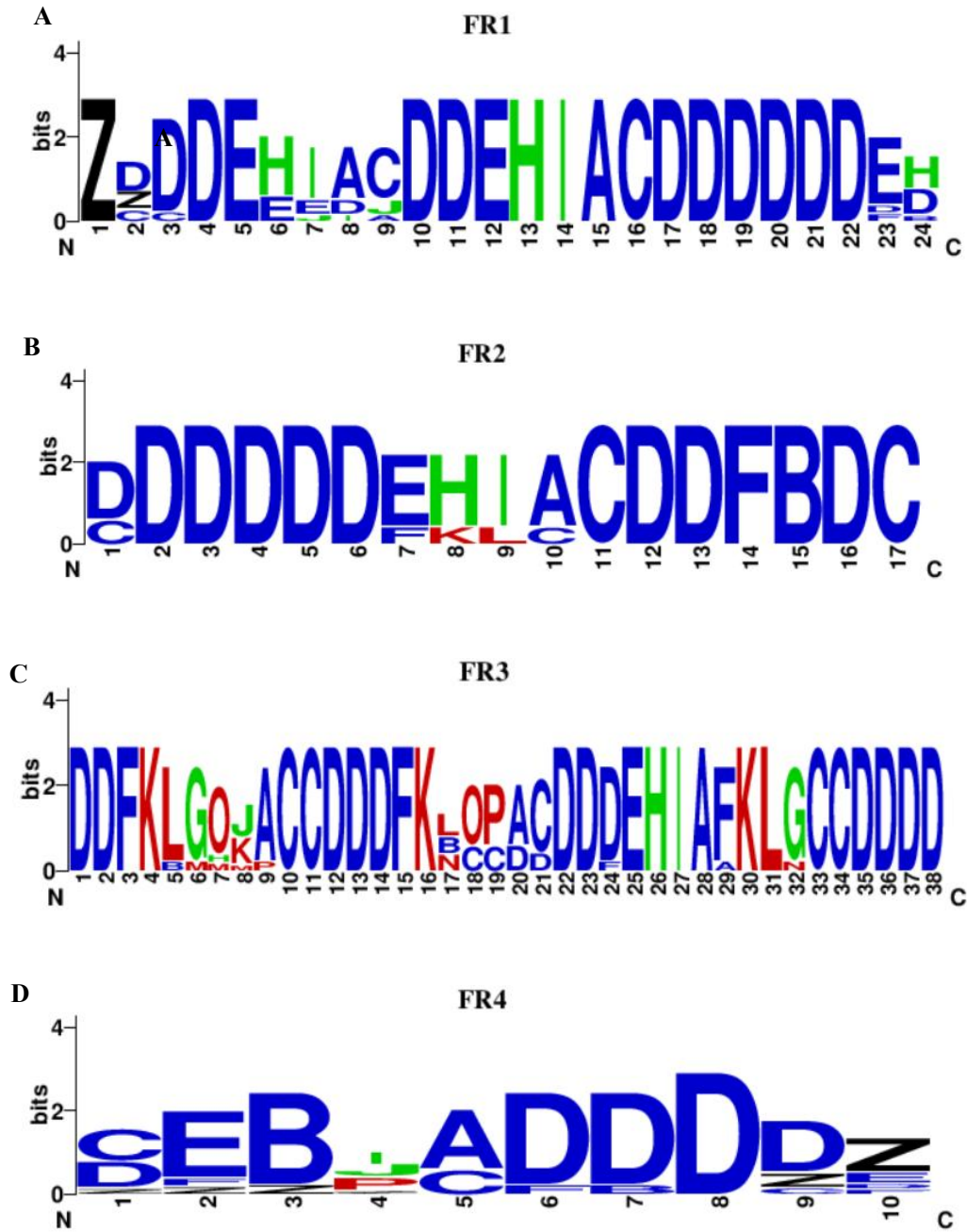


图 2-3 FR1、FR2、FR3、FR4 Weblogo 分布图  
Figure 2-3 Distribution of Weblogo of FR1, FR2, FR3 and FR4

Weblogo 分布表示给定位置的 PB，可以看出 FR1 区的刚性区域 10 至 22 号残基位点的 PB 分别为 DDEHIACDDDDDD 而 FR3 区柔性残基 17 号残基位点与 PB (1, b, n) 相关联，图红色的 PB 对应于  $\alpha$ -螺旋，蓝色的 PB 对应于  $\beta$ -折叠，绿色的 PB 对应于无规卷曲。

## 2.4 讨论

在本部分的研究中使用了蛋白块 (PB) 对 10 株代表性的高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体的 FR 区进行全面分析, 可以看出每个 FR 都有结构变异模式并且氨基酸序列的组成和抗体的构象变化没有直接的联系。使用生物信息学的方法对抗体的结构进行分析可以使我们更加深入的了解氨基酸序列与三维结构之间的关系, 从而更好的对抗体进行人源化改造, 最近有人提出了一种硅基方法来制定框架, 以适应其他 CDR 区域<sup>[42,43]</sup>, 它将同源性建模与模拟退火相结合, 利用计算导出的抗体同源结构来人源化小鼠抗体。然而, 使用这种方法在药用抗体的框架制定中发现了许多缺点<sup>[44,45]</sup>。

与传统抗体相比纳米抗体的分子量小、溶解度高、稳定性强, 具有更加丰富的生物学用途, 例如基于纳米抗体的固体肿瘤癌症治疗<sup>[46,47,48]</sup>。然而通过分析纳米抗体的结构进一步研究其特点的研究却很少。例如, 用于移植 VHH 非标准抗原结合环的通用 VHH 框架的鉴定<sup>[49,50]</sup>。

比较分子模型研究表明, 即使采用非常复杂的方法, 如 Rosetta Antibody, 也很难建立 VHH 的模型<sup>[51,52]</sup>, 我们的研究发现由于 FR 区柔性区域的存在我们很难为 VHH 的结构进行建模。在本研究中, 我们尝试使用 PB 分析高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体的较为稳定的 FR 区, 可以看出, 即使是稳定的 FR 区也存在柔性区域这项研究为抗体改造提供了研究方向, PB 是一种非常有用的工具, 与传统的工具相比它的精度高, PB 在比对蛋白质结构和分析抗体骨架灵活性方面非常有用<sup>[53,54,55,56]</sup>。

## 2.5 本章小结

1. PDB 数据库中找到了 67 个高致病冠状病毒受体结合区纳米抗体的结构文件, 使用 Clustal O 软件对这 67 株抗体进行比对, 从系统发育树中找到了能代表整个数据集的 10 株纳米抗体。

2. 使用 PB 为工具分析了 10 株代表性的纳米抗体 FR 区的结构动力学和变形性, 分别使用 PB 热力学分布图、 $N_{eq}$  分布图、Weblogo 分布图对这 10 株纳米抗体的 FR 区进行全面分析得出纳米抗体 FR2 区的 2 至 6 号残基所处的区域为刚性区, 11 至 17 号残基处于柔性区, 即使是稳定 FR 区也存在柔性区域, 这项研究为抗体的同源建模及人源化改造提供了研究方向。

## 第三章 新型冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体的制备

### 3.1 引言

2020 年以来, 由 SARS-CoV-2 引起的新型冠状病毒传染病(COVID-19)在全球暴发流行, 研究发现 SARS-CoV-2 主要侵入人体呼吸道上皮细胞, 最常见的症状为发烧、咳嗽、呼吸困难、身体疲乏, 疾病发展严重时可引起肺泡损伤, 进而导致呼吸衰竭, 还会引起急性肾损伤、心肌炎和心力衰竭等, 因此发展抗 SARS-CoV-2 抗体是新冠疫情防控研究的重要内容。相较于传统的全分子抗体, 纳米抗体作为一种小分子抗体, 具有结合能力好、穿透力强、容易改造等优点, 并且有望发展为喷雾或吸入给药, 在针对 SARS-CoV-2 的抗体药物研发中具有重要的意义。此部分, 我们以 SARS-CoV-2 德尔塔变异株 RBD 蛋白免疫羊驼, 利用噬菌体展示技术建立 SARS-CoV-2 RBD 蛋白特异性纳米抗体库, 并从中筛选出十株候选纳米抗体阳性克隆, 随后对其进行了重组抗体蛋白表达和生物学功能分析。

### 3.2 实验材料

#### 3.2.1 细菌、噬菌体和质粒

(1) 酵母系统重组表达的 SARS-CoV-2 RBD 蛋白由军事医学研究院生物工程研究所吴军研究员惠赠。TG1 菌株、KM13 辅助噬菌体本室保存。

(2) 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (BC102)、BL21 (DE3) (BC201) 购自博迈德公司。

(3) pFUSE-IgG1-Fc2 真核表达载体购自 Thermofisher。

#### 3.2.2 细胞

ACE2-293T (人肾上皮细胞) 细胞由本实验室保存。细胞使用 10%FBS (索莱宝) 的 DMEM (Thermofisher) 完全培养基培养。在真核表达蛋白时使用无任何添加物的 DMEM 培养基。

#### 3.2.3 蛋白质

WT RBD Protein (博奥森)、德尔塔 RBD Protein (义翘神州)、BA.1 RBD

Protein（本室保存）、B.1.1.529 RBD Protein（义翹神州）、hACE2-hFc（本室保存）。

### 3.2.4 主要试剂（盒）

PCR Master Mix（Thermofisher, K1072）、胶回收试剂盒（全式金, EG101）、*Bam*HI、*Sbf*I、*Not* I、*Pst* I等核酸内切酶及 Buffer（NEB）、胶回收试剂盒（天根 DP204）、T4 连接酶（Thermofisher, EL0016）、质粒小提试剂盒（全式金, EM101）、质粒大提试剂盒（天根, DP117）、无酶水（天根, RT121）、96 孔酶标板（CORNING, 9018）、ELISA 包被液（索莱宝, C1050）、BSA（索莱宝, A8020）、TMB 显色液（索莱宝, PR1200）、ELISA 终止液（索莱宝, C1058）、PBS（Gibco, C10010500BT）、DMEM 培养基（Gibco, 11995081）、荧光素酶底物（Perkin Elmer, 6066761）AmMag™ Protein A Magnetic Beads（金斯瑞, L00695）、PEI MAX（polysciences, 24765-1）、FreeStyle™293Expression Medium（Gibco, 12338018）、青霉素/链霉素（Gibco, 15070063）、胰酶（Gibco, 25200056）、胎牛血清（PAN, P30-3302）、BA.1.529 假病毒（诺唯赞, DD1568）、B.1.617 假病毒（诺唯赞, DD1752）。

FITC 偶联的兔抗人 IgG-Fc 抗体（博奥龙技术有限公司, BF05010）、HRP 偶联的山羊抗人 IgG-Fc 抗体（Immuno Research, 109-035-008）、Goat anti-Llama IgG (H+L) Secondary Antibody [HRP]（abcam, ab112786）、M13 Bacteriophage antibody (HRP)（义翹, 11973-MM05T）、HRP-anti-human Fc(1:5000)（Cat: 109-035-098, Jackson Immuno Research）。

### 3.2.5 主要仪器

生物安全柜（NUAURE）、通风柜（北票长城）、电热恒温培养箱（精宏）、水浴锅（长风）、恒温摇床（太仓）、生物显微镜、超净工作台、电子天平（越平）、蓝光切胶仪（生工生物工程股份有限公司, G500312）、漩涡混匀仪（Scilogex）、PCR 仪（Applied BioSystems）、超速离心机、高压灭菌锅（YAMATO）、多功能酶标仪（Bio Teck）、快速湿转仪（GenScript）、蛋白染色仪器（GenScript）、凝胶成像仪（勤翔）。

## 3.3 实验方法

### 3.3.1 SARS-CoV-2 RBD 蛋白特异性纳米抗体库的构建

### (1) 羊驼的免疫

使用 SARS-CoV-2 德尔塔变异株 RBD 蛋白免疫羊驼。将 0.8 mg RBD 蛋白使用 1 mL PBS 稀释，然后加入等体积佐剂（初次免疫使用完全弗氏佐剂，之后的免疫使用不完全弗氏佐剂），使用乳化仪对其进行中等强度的乳化，时常 6 min。

### (2) 血清抗体滴度鉴定

对羊驼进行免疫前，先从其颈静脉采血 2 mL，室温静置数小时，观察血液自然凝固后进行血清分离。步骤如下：

- a. 用收集管收集分离的血清在离心机上离心（ $1200\times g$ ，室温，8 min）；
- b. 离心完成后吸取上清至新的离心管中，继续离心（ $5000\times g$ ，室温，10 min）；
- c. 吸取上清液至新的离心管中；
- d. 将分离的上清保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  中。

使用 ELISA 对上一步骤中分离的血清进行 SARS-CoV-2 RBD 特异性抗体滴度测定：

- a. 往 96 孔酶标板中加入 50  $\mu\text{L}$  浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 SARS-CoV-2 RBD 蛋白， $4^{\circ}\text{C}$  过夜；
- b. 次日弃去每孔中的蛋白，每孔加入 150  $\mu\text{L}$  的 PBST 对 96 孔酶标板清洗，弃掉 PBST，清洗次数为 3 次，之后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  封闭液， $37^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h 并且弃去孔中封闭液；
- c. 使用 PBST 洗板三次，在加入 96 孔酶标板中以每孔 50  $\mu\text{L}$  的量加入梯度稀释的羊驼血清， $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h；
- d. 弃去血清，使用 PBST 洗板三次，之后以 1: 10000 的比例加入抗体稀释液稀释的 Goat anti-Llama IgG (H+L) Secondary Antibody [HRP] 抗体， $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h；
- e. 弃去孔内液体，使用 PBST 洗板三次，加入 TMB 单组份显色液，每孔 100  $\mu\text{L}$ ，避光显色 3 min；
- f. 每孔 100  $\mu\text{L}$  的量加入终止液终止反应，在酶标仪上读取 450 nm 处吸光度。

### (3) 羊驼外周血单个核细胞（PBMC）的分离

最后一次免疫后 10 d，采集羊驼抗凝血，使用 Ficoll 密度梯度离心法分离其外周血单个核细胞，具体步骤如下：

- a. 从羊驼的颈静脉使用 EDTA-K2 的抗凝管采集血液 60 mL，轻轻混匀使血液与抗凝剂充分混合；
- b. 加入等量的 PBS 与采集血液混匀；
- c. 取 6 个 50 mL 离心管，每个离心管加入 15 mL Ficoll 淋巴细胞分离液，将

该管倾斜 45°，小心加入上述稀释的血液 20 mL，然后离心（300×g，20℃，30 min）；

d. 从上至下依次为血浆、PBMC、粒细胞、红细胞，吸取 PBMC 于新的离心管中；

e. 使用 30 mL 的 PBS 清洗 PBMC 三次；

f. 用显微镜对 PBMC 进行计数后，我们使用 6 mL Trizol 重悬细胞，25℃ 反应 8 min；

g. 将混合液按 1 mL/支分装并保存于-80℃。

#### （4）总 RNA 的提取

使用 Trizol 法提取 PBMC 的总 RNA，步骤如下：

a. 取经 Trizol 处理的 1 只 1 mL 的 PBMC，分装成两管，每管 500 μL；

b. 每管加入 500 μL Trizol，于 25℃ 裂解 8 min；

c. 往裂解后的溶液中加入 200 μL 氯仿，混匀后于 25℃ 静置 60 s，然后离心（12000×g，4℃，10 min）；

d. 取一个 1.5 mL 离心管，吸取 500 μL 上清液于新的 1.5 mL 离心管中，加入 500 μL 异丙醇，于 25℃ 静置 10 min，然后离心（12000×g，4℃，10 min），弃上清；

e. 使用 75%酒精重悬沉淀，然后离心（7500×g，4℃，5 min）弃上清，如此洗涤两次；

f. 最后一次洗涤弃上清后吸尽液体，将离心管开盖置于超净台晾 5 min 使乙醇充分挥发；

g. 在每管中加入 50 μL 55℃ 的无 RNA 酶水重悬沉淀，并置于 55℃ 金属浴放置 5 min；

h. 将两管 RNA 合并混匀，测浓度。

#### （5）cDNA 的合成

使用反转录试剂盒，按照表 3-1 以 RNA 为模板合成 cDNA：

表 3-1 反转录体系 1

Table 3-1 Reverse transcription system1

名称	体积（质量）
总 RNA	5 μg
Oligo(dT)1 8 primer	1 μL
D/RNase-free water	To12 μL

反应条件为：65℃ 孵育 5 min。



再按表 3-2 进行反转录：

表 3-2 反转录体系 2

Table 3-2 Reverse transcription system2

名称	体积 (质量)
5× Reaction Buffer	4 μL
RNase Inhibitor	1 μL
10 mM dNTP Mix	2 μL
Revert Aid M-MuLV RT	1 μL

在 PCR 仪中，42℃ 反应 1 h，70℃ 反应 5 min，之后于 -4℃ 保存。

(6) 重链抗体的重链可变区 (VHH) 基因的扩增

按照表 3-3 进行第一轮 PCR：

表 3-3 一轮 PCR 反应体系

Table 3-3 One-round PCR reaction system

名称	体积 (质量)
CALL01-Leader	1 μL
CALL02-CH2	1 μL
cDNA	6 μL
DreamTaq Master Mix	20 μL
DNA/RNase-free water	12 μL

按以下条件进行 PCR 反应。

95℃	3 min	1	
95℃	30 s	} ×25	
55℃	60 s		
72℃	45 s		
72℃	10 min	1	
4℃	∞		

将上一步 PCR 产物跑胶，于蓝光切胶仪中切取 700 bp 大小左右片段，使用胶回收试剂盒进行回收，测浓度。随后把胶回收的产物作为模板按照表 3-4 进行第下轮 PCR：

表 3-4 二轮 PCR 反应体系

Table 3-4 Two-round PCR reaction system

名称	体积 (质量)
VHH-Back	0.5 μL
pMCF primer	0.5 μL
第一轮 PCR 胶回收产物	8 μL

DreamTaq Master Mix	15 $\mu$ L
DNA/RNase-free water	6 $\mu$ L

按以下条件进行 PCR 反应:

95°C	3 min	1	
95°C	30 s	} ×25	
65°C	30 s		
72°C	30 s		
72°C	10 min	1	
4°C	$\infty$		

以第二轮 PCR 的产物为模板, 按照表 3-5 进行第三轮 PCR:

表 3-5 三轮 PCR 反应体系

Table 3-4 Three-round PCR reaction system

名称	体积 (质量)
VHH-Back	1 $\mu$ L
PMCF primer	1 $\mu$ L
第一轮 PCR 胶回收产物	8 $\mu$ L
DreamTaq Master Mix	15 $\mu$ L
DNA/RNase-free water	5 $\mu$ L

按以下条件进行 PCR 反应:

95°C	3 min	1	
95°C	30 s	} ×25	
65°C	30 s		
72°C	30 s		
72°C	10 min	1	
4°C	$\infty$		

将上一步 PCR 产物跑胶, 于蓝光切胶仪中切取 400 bp 左右片段, 使用胶回收试剂盒回收, 并测浓度, 回收产物为 VHH 基因片段。

### (7) 纳米抗体基因片段的酶切及连接

按照表 3-6 的酶切体系使用相应内切酶分别对 VHH 基因片段和噬菌粒载体 pMECS 进行酶切:

表 3-6 VHH 酶切体系

Table 3-6 VHH digestion system

名称	体积 (质量)
10 x Cutsmart Buffer	60 $\mu$ L

VHH 基因片段	12 $\mu\text{g}$
<i>SbfI</i>	9 $\mu\text{L}$
<i>NotI</i>	9 $\mu\text{L}$
DNA/RNase-free water	To 600 $\mu\text{L}$

噬菌体载体酶切体系如表 3-7 所示：

表 3-7 噬菌体载体酶切体系

Table 3-7 Phage vector digestion system

名称	体积 (质量)
10 x Cutsmart Buffer	40 $\mu\text{L}$
PMECS 载体	35 $\mu\text{g}$
<i>PstI</i>	5 $\mu\text{L}$
<i>NotI</i>	5 $\mu\text{L}$
DNA/RNase-free water	To 400 $\mu\text{L}$

上述体系混匀于 37℃ 酶切 16 h。用胶回收试剂盒回收酶切产物并且测产物的浓度。随后使用 T4 连接酶将 VHH 基因片段和载体进行连接体系如表 3-8 所示，连接条件为：4℃ 孵育过夜。

表 3-8 酶切产物连接体系

Table 3-8 Ligation System of Enzyme Digestion Products

名称	体积 (质量)
VHH 酶切片段	2.2 $\mu\text{g}$
T4 DNA 连接酶 Buffer	10 $\mu\text{L}$
pMECS 酶切片段	6.2 $\mu\text{g}$
T4 DNA 连接酶	15 $\mu\text{L}$
DNA/RNase-free water	To 200 $\mu\text{L}$

#### (8) TG1 感受态细胞的电转化

使用电转仪将重组噬菌粒电转化至 TG1 感受态细胞，为了保证感受态细胞较好的转化效率，应该保持感受态的低温状态（冰上操作），其具体步骤如下：

- a. 50  $\mu\text{L}$  的产物加入至 1000  $\mu\text{L}$  TG1 感受态细胞中轻轻混匀，随后取 60  $\mu\text{L}$  混匀后的感受态细胞加入到电转杯中；
- b. 使用烧杯准备适量碎冰，把电转杯置于冰上孵育 10 min；
- c. 用纸巾擦干电转杯外围的冰水，把电转杯置于电转仪内设置电压为 1800 V 进行电击；
- d. 电转完成后，取出电转杯，往电转杯加入 940  $\mu\text{L}$  的提前备好的 SOC 培养基，混匀后转移至 50 mL 离心管中于全温振荡器中 37℃，150 r 培养 1 h；

e. 1 h 后取 100  $\mu\text{L}$  菌液, 用 2 $\times$ YT 液体培养基作  $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$  六个稀释度稀释, 每个稀释度取 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于 2 $\times$ YTAG 固体培养板 (90 mm), 并各设置一个重复板, 倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$  孵箱培养过夜;

f. 我们将 50 mL 离心管于高速离心机中按照 3300 $\times$ g 离心 10 min 后弃去上清;

g. 使用 8 mL SOC 液体培养基重悬沉淀, 吸 200  $\mu\text{L}$  涂布于 2 $\times$ YTAG 固体培养基上, 室温放置 10 min, 随后倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$  电热恒温箱培养 16 h。

#### (9) 文库菌的收集与保存

待 2 $\times$ YTAG 固体培养板上长满菌落时, 菌落由于十分密集而形成一层“菌膜”, 收集此菌膜即为文库菌, 具体步骤如下:

a. 取新鲜制备的 TG1 电转感受态细胞 1625  $\mu\text{L}$  与 100  $\mu\text{L}$  纯化的连接产物小心混匀, 取 69  $\mu\text{L}$  加入到电转杯中, 轻弹杯底保证混合物沉到底部且没有气泡;

b. 将电转杯置于冰上孵育 10 min;

c. 擦干电转杯外围, 置于电转仪内进行电击, 电压为 1800 V;

d. 电击完成, 迅速取出电转杯, 立即加入 940  $\mu\text{L}$  室温的 SOC, 轻轻吹匀后转移至 50 mL 离心管中;

e. 将离心管置于 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 1 h;

f. 取 100  $\mu\text{L}$  菌液, 用 2 $\times$ YT 液体培养基作  $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$  六个稀释度稀释, 每个稀释度取 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于 2 $\times$ YTAG 固体培养板 (90 mm), 并各设置一个重复板, 倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$  孵箱培养过夜 (此步骤为抗体文库库容大小的测定);

g. 将 50 mL 离心管离心 (3300 $\times$ g, RT, 10 min) 弃去上清;

h. 用 8 mL SOC 重悬沉淀, 涂布于 2 $\times$ YTAG 固体培养板 (150 mm), 每个板涂 200  $\mu\text{L}$ , 倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$  孵箱培养过夜。

#### (10) 文库菌的收集与保存

待 2 $\times$ YTAG 固体培养板上长满菌落时, 菌落由于十分密集而形成一层“菌膜”, 收集此菌膜即为文库菌, 具体步骤如下:

a. 在长满菌落的 2 $\times$ YTAG 固体培养板上加 5 mL 2 $\times$ YT 液体培养基, 然后用细胞推刮器轻轻刮落菌落, 收集菌液于 250 mL 离心瓶中;

b. 再加 5 mL 2 $\times$ YT 液体培养基洗涤培养板, 同样收集于离心瓶中, 以最大限度地减小菌落的损失;

c. 将离心瓶离心 (3300 $\times$ g, RT, 10 min) 弃去上清;

d. 使用 40 mL 2 $\times$ YT 液体培养基重悬沉淀, 然后加入适当体积的 60% (v/v) 甘油充分混匀, 使得甘油的终浓度为 15%, 此即为抗体文库菌;

- e. 取 100  $\mu\text{L}$  抗体文库菌, 用  $2\times\text{YT}$  液体培养基作  $10^{-4}\sim 10^{-9}$  六个稀释度稀释, 每个稀释度取 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于  $2\times\text{YTAG}$  固体培养板 (90 mm), 并各设置一个重复板, 倒置于  $30^\circ\text{C}$  孵箱培养过夜 (此步骤为测定抗体文库丰度的测定);
- f. 将剩余菌液分装并冻存于  $-80^\circ\text{C}$ 。

#### (11) 抗体库质量分析

通过抗体库的库容、丰度、VHH 插入率和多样性来评估抗体库的质量。在测定板于  $37^\circ\text{C}$  电热恒温箱培养过夜后, 对测定板上的菌落进行计数和计算后可得到文库的库容和丰度, VHH 片段的插入率和多样性可用以下步骤测定:

- a. 准备一个灭菌后的 15 mL 离心管, 离心管中加入 5 mL  $2\times\text{YTAG}$  液体培养基, 之后从库容测定板上随机挑取 48 个单克隆菌落接种于培养基中于全温振荡器  $37^\circ\text{C}$  振荡培养约 12 h;
- b. 进行菌液 PCR 鉴定;
- c. 将剩余菌液进行测序;
- d. 分析测序结果, 计算 VHH 插入率和多样性。

### 3.3.2 SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白特异性纳米抗体的筛选

#### (1) 噬菌体抗体库的筛选

噬菌体抗体库的筛选主要包括噬菌体的扩增、拯救、吸附、洗脱和感染等步骤。

首先将含噬菌粒的 TG1 进行扩增, 然后加入辅助菌体协助噬菌体抗体的包装, 然后从中分离出噬菌体抗体, 具体步骤为:

- a. 第一日晚, 取 400  $\mu\text{L}$  SARS-CoV-2 德尔塔 RBD 蛋白特异性纳米抗体文库菌接种于 100 mL  $2\times\text{YTAG}$  液体培养基中, 于  $37^\circ\text{C}$  振荡培养至菌液  $\text{OD}_{600}$  约为 0.5;
- b. 加入 KM13 辅助噬菌体, 于全温振荡器中  $37^\circ\text{C}$  振荡 30 min;
- c. 将菌液转移至离心瓶中离心 ( $3300\times\text{g}$ , 室温, 10 min), 弃去培养基上清;
- d. 用 100 mL  $2\times\text{YTAK}$  液体培养基重悬细菌沉淀, 然后置于  $30^\circ\text{C}$  振荡培养过夜;
- e. 第二日上午将菌液转移至离心瓶中离心 ( $3300\times\text{g}$ , 室温, 10 min), 然后将上清转移至新的离心瓶中;
- f. 向上清中加入 1/5 体积 (20 mL) 的 PEG/NaCl 溶液, 混合均匀后置于冰上静置 70 min;

g. 待冰浴完成后离心（ $12000\times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$ ， $30\text{ min}$ ），离心完毕可在底部看到少许白色沉淀，此沉淀即为噬菌体；

h. 小心弃去上清，然后再次离心（ $12000\times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$ ， $2\text{ min}$ ），尽量吸弃残留液体；

i. 使用  $2.6\text{ mL}$  PBS 重悬白色沉淀，然后转移至  $1.5\text{ mL}$  离心管中继续离心（ $12000\times g$ ， $4^{\circ}\text{C}$ ， $10\text{ min}$ ）；

j. 将上清转移至新的离心管中，此即为拯救噬菌体，将其置于  $4^{\circ}\text{C}$  待用。

其次是将噬菌体抗体吸附到包被有 SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白的免疫管上，经过洗涤去掉非特异性结合、亲和力较低的噬菌体抗体，然后使用强力的洗脱试剂将特异性结合、亲和力较高的噬菌体抗体洗脱下来，并用后者感染 TG1，具体步骤如下：

a. 使用 SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白包被免疫管，缓冲液为 ELISA 包被液，包被浓度为  $8\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，体积为  $2\text{ mL}$ ， $4^{\circ}\text{C}$  静置  $12\text{ h}$ ；

b. 第二日上午，弃去免疫管内液体，使用 PBS 洗涤免疫管 3 次；

c. 免疫管中加入  $4\text{ mL}$  MPBS，室温孵育  $2\text{ h}$ ；

d. 取出  $2.4\text{ mL}$  拯救噬菌体（剩余拯救噬菌体置于  $4^{\circ}\text{C}$  保存用于测定其滴度）同  $1.6\text{ mL}$  MPBS 混匀，室温孵育  $1\text{ h}$ ；

e. 再次使用 PBS 洗涤免疫管 3 次，然后在免疫管中加入  $2\text{ mL}$  上述经 MPBS 封闭过的拯救噬菌体；

f. 把免疫管放置于恒温孵育箱中  $25^{\circ}\text{C}$  下孵育  $2\text{ h}$ ；

g. 使用 PBST 洗涤免疫管 10 次，再使用 PBS 洗涤免疫管 10 次；

h. 向免疫管中加入  $2\text{ mL}$   $100\text{ mM}$  TEA（三乙胺）溶液（现时配制，现时使用），室温轻轻摇晃  $15\text{ min}$ ；

i. 再向免疫管中加入  $2\text{ mL}$  Tris-HCl 溶液混合均匀，此即为洗脱噬菌体；

j. 将洗脱噬菌体转移至  $50\text{ mL}$  圆底离心管，加入  $16\text{ mL}$   $\text{OD}_{600}$  约  $0.5$  的 TG1 菌液，免疫管中也加入  $4\text{ mL}$  该菌液；

k. 将离心管和免疫管置于  $37^{\circ}\text{C}$  水浴  $30\text{ min}$ ；

l. 将两管菌液混合，取  $100\text{ }\mu\text{L}$  用于洗脱噬菌体滴度的测定，剩余菌液离心（ $3300\times g$ ，室温， $10\text{ min}$ ）并弃上清；

m. 用  $500\text{ }\mu\text{L}$   $2\times\text{YT}$  液体培养基重悬细菌沉淀，然后均匀涂布于 5 个  $150\text{ mm}$  大小的  $2\times\text{YTAG}$  固体培养板，倒置于  $30^{\circ}\text{C}$  孵箱培养过夜；

然后是收集经噬菌体抗体感染的 TG1 具体步骤如下：

a. 至第三日，固体培养板上已经长出十分密集的菌落，形成一层“菌膜”，向培养板上添加  $5\text{ mL}$   $2\times\text{YT}$  液体培养基，使用细胞刮刀刮落菌落，将其收集到  $50\text{ mL}$  离心管中；

- b. 重复上述步骤，把菌落收集到离心管中；
- c. 将离心管离心（3300×g，室温，10 min）并弃去上清；
- d. 使用 4 mL 2×YT 液体培养基重悬沉淀，然后加入适当体积的 60% (v/v) 甘油，使得甘油的终浓度为 15% (v/v)；
- e. 将上述菌液分装并保存于-80℃。

筛选过程中用到了 TG1 菌液，其操作流程大致如下：

- a. 第一日上午，使用接种环蘸取 TG1 甘油菌，在 M9 固体培养板上划线，将其倒置于 37℃ 孵箱静置培养；
- b. 第二日上午，挑取 TG1 单克隆接种于 5 mL 2×YT 液体培养基，置于 37℃ 摇床振荡培养；
- c. 待菌液 OD<sub>600</sub> 达到约 0.5 时，取适量菌液接种到 25 mL 2×YT 液体培养基，置于 37℃ 摇床振荡培养，使其在使用时 OD<sub>600</sub> 约为 0.5。

为了对筛选终点进行评估，我们对拯救噬菌体和洗脱噬菌体进行滴度测定，步骤如下：

- a. 使用 2×YT 液体培养基将保留的拯救噬菌体进行十倍连续梯度稀释；
- b. 选择 10<sup>-7</sup>~10<sup>-11</sup> 五个稀释度（后续筛选过程中该稀释度可根据实际情况进行调整），每个稀释度取 10 μL 与 190 μL OD<sub>600</sub> 约为 0.5 的 TG1 菌液混合均匀并于 37℃ 水浴 30 min；
- c. 取 100 μL 混合液均匀涂布于 90 mm 大小的 2×YTAG 固体培养板，倒置于 30℃ 孵箱培养过夜

洗脱噬菌体滴度的测定步骤如下：

- a. 使用 2×YT 液体培养基将保留的用于测定洗脱噬菌体滴度的菌液进行十倍连续梯度稀释；
- b. 一般选择 10<sup>-1</sup>~10<sup>-5</sup> 五个稀释度（后续筛选过程中该稀释度可根据实际情况进行调整），每个稀释度取 100 μL 均匀涂布于 90 mm 大小的 2×YTAG 固体培养板，倒置于 30℃ 孵箱培养过夜。

(2) SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白特异性纳米抗体筛选的单克隆噬菌体制备单克隆噬菌体制备的步骤如下：

- a. 在第四轮筛选时，当固体培养板培养过夜后，不同稀释度的培养板菌落的密集程度不同，随机选择菌落相对稀疏的培养板，选择培养板上相对孤立的单克隆菌落，随机挑取 92 个菌落，接种于 96 孔深孔板，每孔内已预先加入 180 μL 2×YTAG 液体培养基，于 37℃ 振荡培养 8 h；
- b. 从每孔中取 20 μL 菌液转接到新的 96 孔深孔板中，每孔内已预先加入 180 μL 2×YTAG 液体培养基，于 37℃ 振荡培养；

- c. 原 96 孔深孔板则加入 60  $\mu\text{L}$  60%甘油，甘油终浓度约为 15%，然后冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$ ；
- d. 新的 96 孔板于全温振荡器中  $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养 1 h 后，往 96 孔板中每孔加入 50  $\mu\text{L}$  KM13 辅助噬菌体（1: 200）；
- e. 先于  $37^{\circ}\text{C}$  静止 30 min，然后于  $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养 30 min；
- f. 将深孔板离心（ $1800\times g$ ，室温，10 min），吸弃上清，每孔加入 400  $\mu\text{L}$   $2\times\text{YTAK}$  液体培养基重悬细菌沉淀，于  $30^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜；
- g. 第二日将深孔板离心（ $2500\times g$ ，室温，10 min），从每孔中吸取 250  $\mu\text{L}$  上清转移到新的深孔板中；
- h. 加入等体积含 6% BSA 的 PBS，室温孵育 1 h，用于下一步的鉴定。

(3) SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白特异性纳米抗体筛选的单克隆噬菌体鉴定通过 ELISA 对 SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白特异性纳米抗体筛选的单克隆噬菌体进行鉴定，步骤如下：

- a. 往 96 孔板加入浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  50  $\mu\text{L}$  的 SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白和 BSA 蛋白，置于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱 12 h；
- b. 12 h 后使用移液器洗取 96 孔板中的液体并弃掉，使用移液器往 96 孔板中每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的 PBST，静置 3 min，弃去孔中液体，随后使用移液器往每孔加入 100  $\mu\text{L}$  封闭液，把 96 孔板置于恒温培养箱中  $37^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h；
- c. 弃去封闭液，使用移液枪往 96 孔板中每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的 PBST，静置 3 min，弃去孔中液体，每孔加入 50  $\mu\text{L}$  经封闭液封闭的噬菌体上清，置于  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h；
- d. 1 h 后使用移液器吸取 96 孔板中液体并弃掉，使用移液枪往 96 孔板中每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的 PBST，静置 3 min，弃去孔中液体，重复 6 次，随后往每孔加入 50  $\mu\text{L}$  的抗 M13 噬菌体抗体，置于恒温孵育箱  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 45 min；
- e. 随后使用移液器吸取 96 孔板中液体并弃掉，使用移液枪往 96 孔板中每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的 PBST，静置 3 min，弃去孔中液体，重复 6 次，随后往每孔中加入 50  $\mu\text{L}$  显色液，置于恒温孵育箱  $25^{\circ}\text{C}$  孵育约 2 min；
- f. 使用移液枪往每孔加入 50  $\mu\text{L}$  ELISA 终止液，在酶标仪上读取  $\text{OD}_{450}$ 。

(4) SARS-CoV-2 WT RBD 蛋白特异性纳米抗体基因的获取

以 SARS-CoV-2 WT RBD 蛋白包被的噬菌体 ELISA  $\text{OD}_{450}$  值减去对应的以 BSA 蛋白包被的噬菌体 ELISA  $\text{OD}_{450}$  值，将差值较高者对应的菌液送至测序公司进行测序并要求返还质粒，作为后续扩增纳米抗体基因时使用的模板。取测序结果合格的序列信息，去掉载体部分的序列后得到纳米抗体基因序列。把抗体的基



因序列两端添加酶切位点以及 kozak 序列合成后构建到载体 pFUSE-IgG1-Fc2 中为真核表达做准备。

### 3.3.3 SARS-CoV-2 奥密克戎株 RBD 蛋白特异性纳米抗体的筛选

以奥密克戎变异株 RBD 蛋白对抗体库进行筛选，步骤基本同前，将包被抗原替换为 SARS-CoV-2 奥密克戎变异株 RBD 蛋白。

### 3.3.4 SARS-CoV-2 德尔塔株 RBD 蛋白特异性纳米抗体的筛选

以德尔塔变异株 RBD 蛋白为抗原对抗体库进行筛选，步骤基本同前，将包被抗原替换为德尔塔变异株 RBD 蛋白。

### 3.3.5 抗 SARS-CoV-2 特异性纳米抗体的选取与制备

#### (1) 真核表达的步骤如下

a. 接种  $2 \times 10^7$  个 293T 细胞与 15 cm 培养皿中，用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养， $37^{\circ}\text{C}$ ， $5\%\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 12 h；

b. 按质粒质量：PEI 体积=1：3 的比例，所需质粒 36  $\mu\text{g}$ 、108  $\mu\text{L}$  PEI 分别加入 1.5 mL DMEM 培养基中，混匀后室温静置 5 min，将两个混合液混匀，室温静置 15 min 后加到细胞培养基中， $37^{\circ}\text{C}$ ， $5\%\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 12 h；

c. 12 h 后，弃去原有培养基，换为 30 mL FreeStyle™293Expression Medium 培养基，72 h 后收集上清。

#### (2) 纯化

蛋白纯化使用的是金斯瑞的 AmMag™ Protein A Magnetic Beads

a. 根据预估发酵液中的抗体浓度和体积计算抗体总量；

b. 根据抗体总量及磁珠工作载量，计算所需磁珠量；

c. 将磁珠充分混匀，用移液器吸取所需体积置于 50 mL 离心管中，用磁力架将磁珠吸至管壁，倒去上清；

d. 向离心管中加入 10 MV（MV 指纯磁珠体积）体积的 PBS 重悬磁珠，用磁力架将磁珠吸附至离心管壁倒去上清。加入 PBS 重复清洗磁珠 2 次。加入 10 MV 体积的 ddH<sub>2</sub>O 重悬磁珠，用磁力架将磁珠吸附至离心管壁倒去上清；

e. 向离心管中加入 10 MV 体积 0.1 mol/L NaOH 溶液，放入摇床或旋转培养器中室温孵育 1 h（如过不需要控内毒，可省去此步骤）；

f. 用磁力架将磁珠吸附至管壁倒去上清液，加入 10 MV 体积的 PBS 重悬磁珠用磁力架将磁珠吸附至管壁，倒去上清液，再重复使用 PBS 清洗磁珠 2 次；

g. 用移液枪吸取 MV 体积的 PBS 将磁珠重悬，用移液器吸出加入至待纯化的发酵中在摇床或旋转培养器中进行孵育 2 h；

h. 洗杂：磁力底座吸附磁珠，弃上清或转入干净的烧杯中，重复操作数次，至吸附全部磁珠，加 10 MV 洗涤缓冲液，充分洗涤磁珠，将离心管置于磁力底座上吸附磁珠，弃上清；重复洗涤 2 次。加 10 MV ddH<sub>2</sub>O 充分洗涤磁珠，根据以上步骤，弃上清；

i. 洗脱：用移液枪吸去残留在管底的洗涤液。加入适量洗脱缓冲液，充分混匀后置于无磁底座或试管架上静止孵 5 min，孵育期间重悬磁珠 3 次；

j. 收样：将离心管置于磁力架上吸附磁珠，用移液枪将上清转入干净的 EP 管或离心管中；重复洗脱 2 次；

k. 中和：加入适量中和液，混匀中和，进行下一步实验。

### (3) 纳米抗体的电泳检测和浓度测定

根据 Bradford 蛋白质定量试剂盒说明书上的步骤对纳米抗体的浓度进行测定，细节如下：

a. 我们将 1 mg/mL 牛血清白蛋白 0、1、2、3、4、5、6、7  $\mu$ L 分别加入到 96 孔板中，需要设置复孔，之后在每孔中加入一定量的 PBS 使得每孔总体积为 15  $\mu$ L；

b. 取待测抗体按 2、5、10  $\mu$ L 分别加入到 96 孔板中，之后在每孔中加入一定量的 PBS 使得每孔总体积为 15  $\mu$ L；

c. 使用移液枪往孔中加入 285  $\mu$ L 考马斯亮蓝染液，轻轻晃动 96 孔板使之混匀，静置 5 min；

d. (4) 5 min 把 96 孔板放入多功能酶标仪，测定其 595 nm 处的吸光度值；

e. 以 BSA 孔的吸光度值为横坐标，蛋白质总量为纵坐标，绘制标准曲线计算其浓度；

f. 之后对纳米抗体进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western blot 实验，随后将纳米抗体分装并保存于 -4 $^{\circ}$ C。

### 3.3.6 抗 SARS-CoV-2 特异性抗体的生物学功能评价

#### (1) 酶联免疫吸附试验

a. 使用 ELISA 包被液稀释蛋白使其浓度为 1  $\mu$ g/mL，使用移液枪吸取 50  $\mu$ L 稀释后的蛋白加入 96 孔板，置入 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 12 h；

- b. 12 h 后使用移液枪吸取孔中液体，弃掉，吸取 200  $\mu\text{L}$  PBST 加入 96 孔板中，静置 3 min，弃掉液体，重复 3 次，拍干孔中残余液体后使用移液枪往每孔中加入加入 100  $\mu\text{L}$  封闭液，把 96 孔板置入恒温孵育箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h；
- c. 1 h 后吸取 200  $\mu\text{L}$  PBST 加入 96 孔板中，静置 3 min，弃掉液体重复 3 次；
- d. 取 2 个灭菌后的 96 孔板，用于抗体等比稀释，使用移液枪吸取 50  $\mu\text{L}$  稀释好的抗体转移至 96 孔板中，把 96 孔板置入恒温孵育箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h；
- e. 吸取 200  $\mu\text{L}$  PBST 加入 96 孔板中，静置 3 min，弃掉液体，重复 3 次；
- f. 使用稀释液稀释抗体，把稀释后的抗体加入 96 孔酶标板中，把 96 孔板置入恒温孵育箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min；
- g. 吸取 200  $\mu\text{L}$  PBST 加入 96 孔板中，静置 3 min，弃掉液体，重复 3 次；
- h. 使用移液枪往 96 孔板中加入 50  $\mu\text{L}$  TMB 单组分显色液，把 96 孔板置入恒温孵育箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min；
- i. 5 min 后，使用移液枪往 96 孔板中每孔加入 50  $\mu\text{L}$  ELISA 终止液；
- j. 把 96 孔板置入多功能酶标仪读取 450 nm 处的吸光度值。

## (2) 生物膜层干涉实验

- a. 使用分子相互作用分析仪 Gator 进行分析，打开软件，预热一定的时间；
- b. 使用 K Buffer 将 SARS-CoV-2 RBD 蛋白稀释至 100 nM，将纳米抗体从 50 nM 开始进行连续二倍梯度稀释，共做 7 个稀释度；
- c. 按照布局加好各种缓冲液、样品及 Anti-His 探针，运行 Kinetics 模块；
- d. 在 K Buffer 中预湿探针 10 min（振荡器的振荡速度，除了在结合抗原时为 400 rpm 外，其余均为 1000 rpm）；
- e. 在 Baseline 孔中平衡 120 s；
- f. 在 Loading 孔中结合 S1 蛋白至干涉波长位移约为 0.8 nm；
- g. 在 K Buffer 孔中再次平衡 60 s；
- h. 在结合孔中结合抗体；
- i. 在曲线相对平稳时在解离孔中解离 600 s；
- j. 利用软件计算平衡解离常数。

## (3) 假病毒中和试验

- a. 使用移液枪往灭菌后的 96 孔中加 50  $\mu\text{L}$  DMEM；
- b. 随后往第二列孔中加入浓度为 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的待测样本 25  $\mu\text{L}$ ，使用移液枪吹打混匀后吸取 25  $\mu\text{L}$  到后一列；
- c. 设置对照：第 11 列为细胞对照，第 12 列孔为病毒对照；

- d. 使用移液枪往 2 至 11 列孔中加 1000 倍 TCID<sub>50</sub> 的假病毒 100 μL，把 96 孔板置于 37℃ 恒温孵育箱中孵育 1 h；
- e. 取出 96 孔板往 96 孔板中加入 100 μL ACE2-293T 细胞；
- f. 把 96 孔板放入 CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 48 h，往中间 60 孔中吸取 150 μL 的培养液弃去，随后往每孔中加入 100 μL 底物，置入恒温培养箱 25℃ 孵育 2 min；
- g. 取出 96 孔板，准备一个新 96 孔板，使用移液枪吸取 150 μL 转移至新 96 孔中，在多功能酶标仪中测发光；
- h. 计算假病毒抑制率；
- i. 使用 Graph Pad Prism 计算抗体的半数效应浓度（EC<sub>50</sub>）。

### 3.4 实验结果

#### 3.4.1 SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体库的构建

##### (1) 羊驼血清 SARS-CoV-2 RBD 特异性抗体滴度测定

免疫前和每次免疫后两周我们在羊驼颈静脉处进行采血，通过 ELISA 检测羊驼血清抗体滴度。以免疫前 OD<sub>450</sub> 均值的 2.1 倍为 cut off 值，计算各次免疫后羊驼血清滴度，其结果如图 3-1 所示：

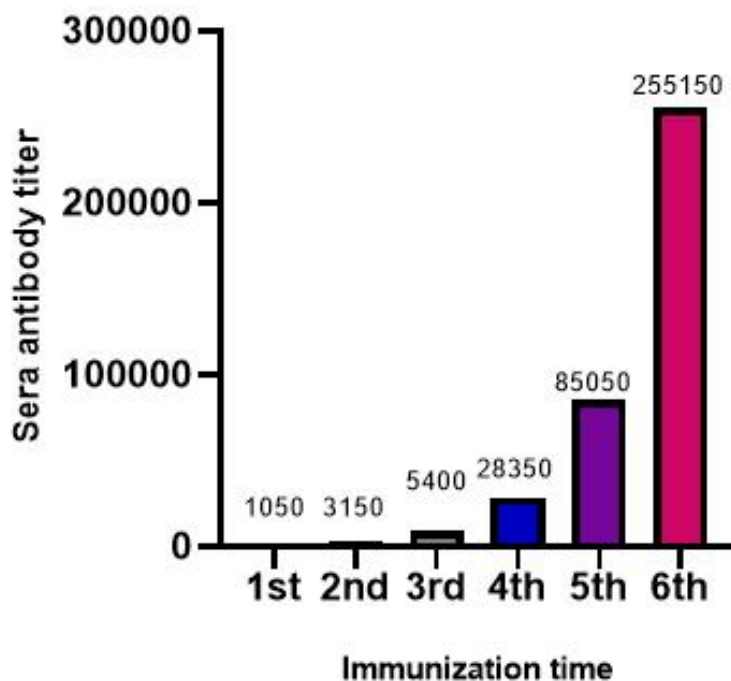


图 3-1 羊驼免疫后血清抗体效价测定

Figure 3-1 Determination of serum antibody titer after alpaca immunization

可以看到，随着免疫次数的增加，羊驼血清中 SARS-CoV-2 RBD 特异性抗体滴度逐渐升高，第 4 次免疫达到 1:28350，继续加强免疫第六次免疫已经达到 1: 255150 因此可以进行下一步的采血、构建抗体库。

## (2) SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体库的构建

最后一次免疫后 10 d，从羊驼颈静脉采集 60 mL 抗凝血，分离 PBMC。然后使用 Trizol 提取了总 RNA，以 mRNA 为模板，分别使用引物 oligo (dT) 23VN 及 Random P (9N) 进行反转录合成 cDNA。可以在琼脂糖凝胶上分离出两个带，其中一个带的大小约为 900 bp，它包含了常规抗体的重链可变区到第二个恒定区的基因。另一个带的大小约为 700 bp，它包含了重链抗体的重链可变区到第二个恒定区的基因。从回收的重链抗体基因中提取模板，使用 VHH-Back 和 pMCF 引物扩增纳米抗体基因。

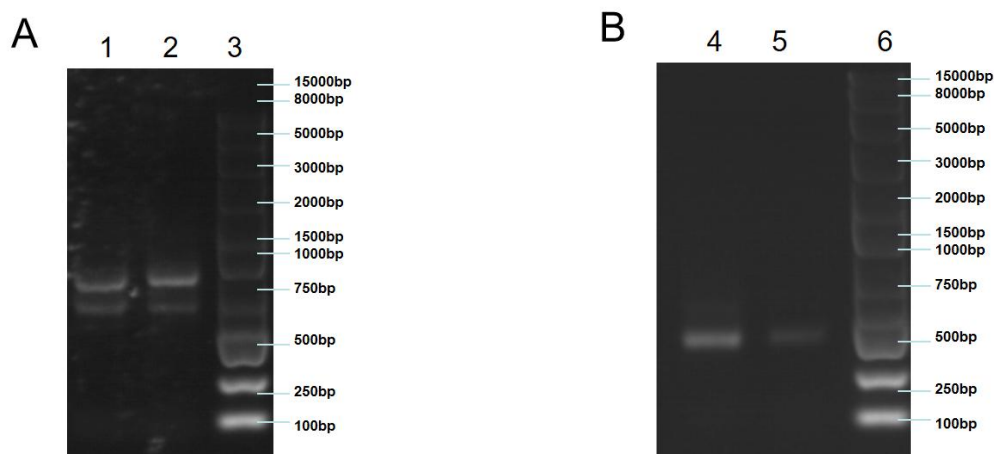


图 3-2 A 为使用 oligo (dT) 23VN 引物和 Random P (9N) 引物扩增抗体的重链的可变区至第二恒定区基因电泳图。第二条泳道的条带约 900 bp，为重链抗体基因；第一条泳道的的条带约 700 bp 为 VHH 基因。图 B 为使用 VHH-Back 引物和 pMCF primer 引物扩增的纳米抗体基因电泳图。

Figure. 3-2 A is an electropherogram of the variable region to the second constant region of the heavy chain of an antibody amplified using oligo (dT) 23VN and Random P (9N). The band of the second lane is about 900 bp, which is the heavy chain antibody gene; The band of about 700 bp in the first lane is the VHH gene. Panel B is an electropherogram of Nanobody genes amplified using VHH-Back and PMCF primers.

3、6: Marker; 1、2、4、5: oligo (dT) 23VN 引物、Random P (9N) 引物、VHH-Back 引物、pMCF primer 引物 PCR 条带

扩增纳米抗体基因后,使用 *Pst* I 和 *Not* I 酶对噬菌粒载体 pMECS 进行酶切,同时使用 *Sbf* I 和 *Not* I 酶对 VHH 抗体片段进行酶切。将酶切产物使用胶纯化试剂盒进行回收。接下来,使用 T4 连接酶将酶切后的纳米抗体基因和载体连接起来,并使用 DNA 抽提试剂纯化连接产物。将连接产物通过电转化的方式转化至 TG1 中。在培养基上孵育过夜后,收集菌落即可得到抗体库。

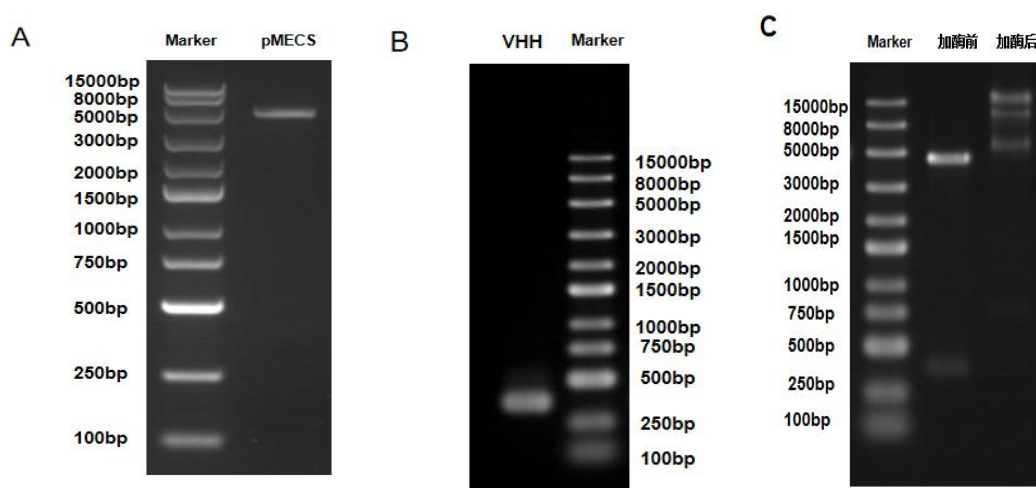


图 3-3 A 为噬菌粒载体 pMECS 使用 *Pst* I、*Not* I 酶进行酶切后的电泳图,图 B 为 VHH 抗体片段使用 *Sbf* I、*Not* I 进行酶切后的电泳图,图 C 为 T4 连接酶连接酶切产物的电泳图。  
Figure. 3-3 A is an electropherogram of the phagemid vector pMECS after being digested with *Pst* I and *Not* I, Figure. B is an electropherogram of the VHH antibody fragment after being digested with *Sbf* I and *Not* I, and Figure. C is an electropherogram of the T4 ligase ligation product.

### (3) SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体库的质量评估

自建库随机送测菌样 48 个,1 个反应无信号,47 个 (98%) 为完整抗体序列,具体 ORF 比对情况如图 3-4: 其中有 5 个序列特征分析为 VH 片段,42 个 (89.4%) 为完整 VHH 片段,实际有效库容:  $2.14 \times 10^8$  cfu (个)。综上所述,所建立的 SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体库具有较好的质量,可以进行下一步 SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体的筛选工作。



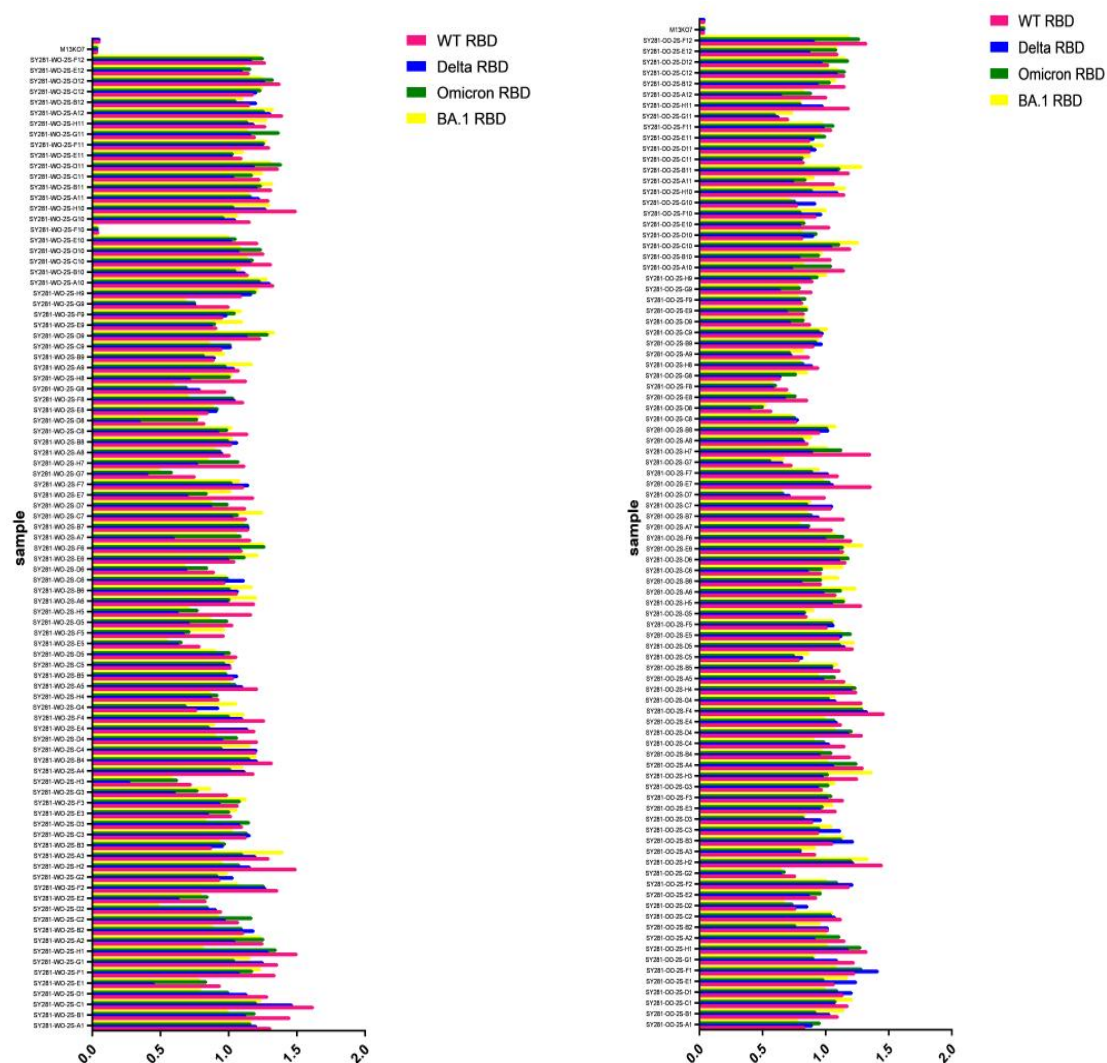


图 3-5. SARS-CoV-2 野生型 RBD、奥密克戎 RBD 蛋白筛选的单克隆噬菌体抗体 ELISA 鉴定

Figure 3-5. ELISA identification of SARS-CoV-2 野生型 RBD and 奥密克戎 RBD screened monoclonal phage antibodies.

### (2) SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体的选取与制备

筛选共获得了 183 个具有良好测序结果的克隆。接着，对这些克隆进行比对分析，将氨基酸序列相同或相似的氨基酸分为一类。为了构建纳米抗体基因，从每个类别中选取一个代表性的氨基酸序列，将其克隆进 pFUSE-IgG1-Fc2 表达载体，然后将表达载体转染至 293T 细胞中，表达抗体蛋白，然后使用 AmMag<sup>TM</sup> Protein A Magnetic Beads 进行纯化。其中有 10 株抗体（命名为 A1、A2、A4、A11、D5、A10、C7、C1、C2 和 H7）纯化后的抗体纯度相对较好，浓度分别为：0.7 mg/mL（A1）、0.8 mg/mL（A2）、1 mg/mL（A4）、0.8 mg/mL（A11）、1 mg/mL（D5）、0.7 mg/mL（A10）、1 mg/mL（C7）、0.9 mg/mL（C1）、1mg/mL（C2）、1.2 mg/mL（H7）。将纯化后的 10 株纳米抗体进行 SDS-PAGE 电泳以



及 Western Blot 鉴定其大小和纯度，其结果如图 3-6 所示：

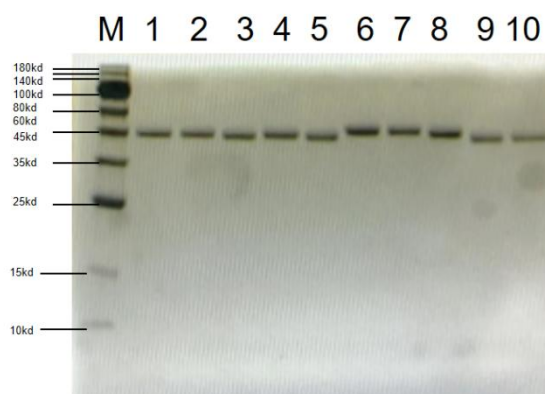
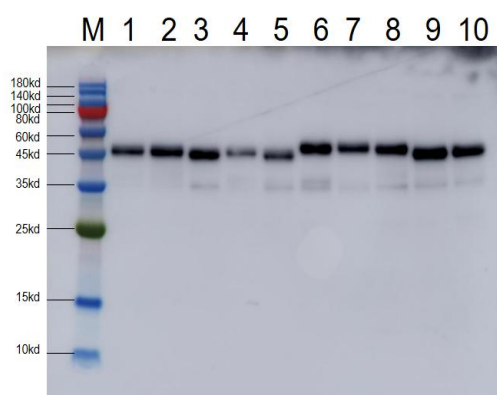


图 3-6 10 株纳米抗体 SDS-PAGE 电泳图及 Western Blot 图

Figure 3-6 SDS-PAGE Electropherograms and Western Blot of 10 Nanobodies



M:Marker; 1-10: A1、A2、A4、A11、D5、A10、C7、C1、C2、H7

### 3.4.3 SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体的生物学特征分析

#### (1) 结合活性测定

通过 ELISA 分别测定了 10 株纳米抗体（A1、A2、A4、A10、A11、C7、D5、H7、C1、C2）与 SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白和两株奥密克戎变异株 BA.1、B.1.1.529 的 RBD 蛋白的结合活性，其结果如图 3-9 所示，可以看到筛选的几株抗体分别与 SARS-CoV-2 野生型 RBD、BA.1 RBD、B.1.1.529 RBD 蛋白具有较好的结合活性，使用 Graph Pad Prism 算得其半数效应浓度（EC<sub>50</sub>）见表 3-9:

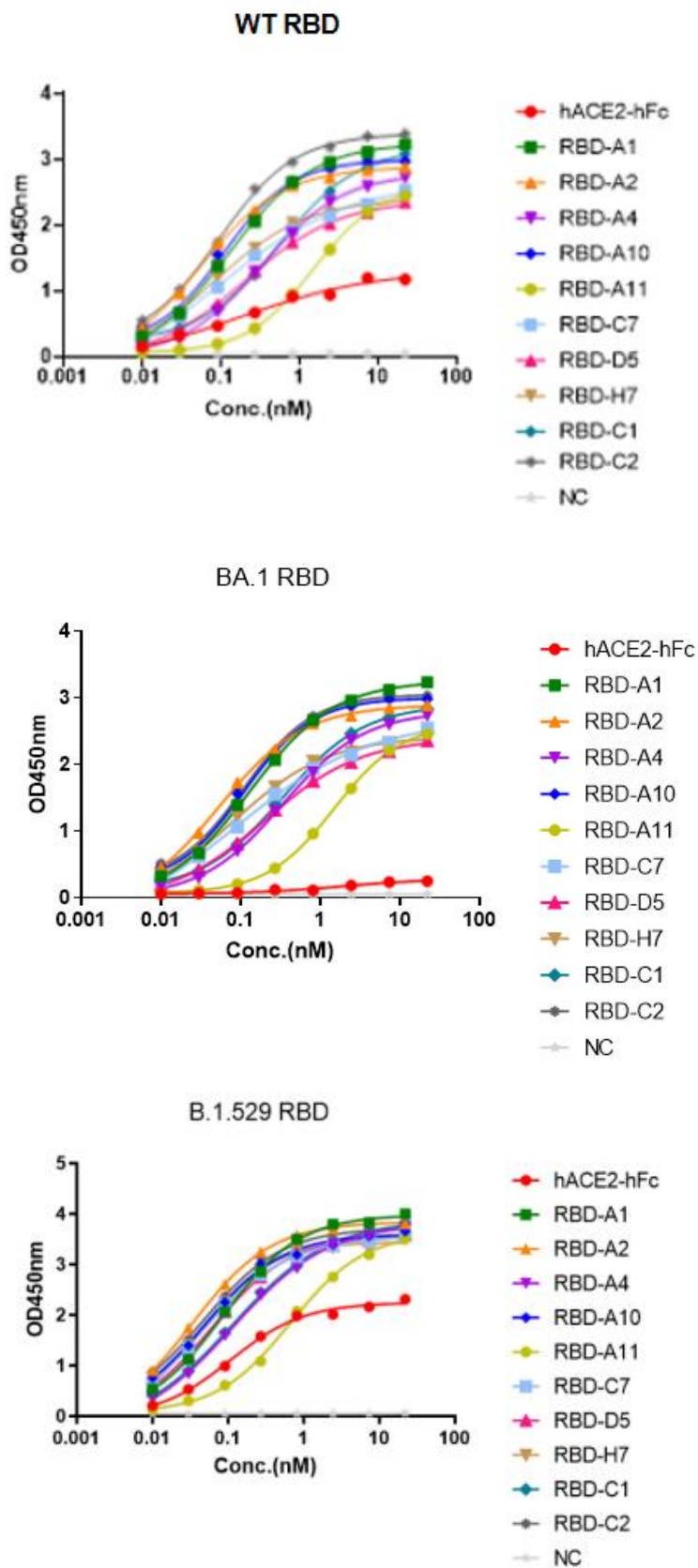


图 3-9 纳米抗体 ELISA 鉴定试验

Figure 3-9 Nanobody ELISA Identification Test

表 3-9 抗体与变异株 RBD 的半数效应浓度

Table 3-9 Median effective concentration of antibody and mutant RBD

抗体	野生型半数效应浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	BA.1 半数效应浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	B.1.1.529 半数效应浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
A1	0.1955	0.1301	0.08484
A2	0.103	0.05329	0.03372
A4	0.5475	0.3366	0.114
A10	0.09309	0.1104	0.04798
A11	1.562	1.501	0.6697
C1	0.5475	0.3366	0.1140
C2	0.09309	0.1104	0.4798
C7	0.08286	0.08762	0.03628
D5	0.1905	0.2025	0.06077
H7	0.08905	0.08328	0.05316

## (2) 亲和活性测定

通过生物膜层干涉技术测定了几株 ELISA 结合较强的候选分子检测抗体与 SARS-CoV-2 RBD 的平衡解离常数。光纤材质抗 his 探针的末端结合 SARS-CoV-2 野生型 RBD、B.1.1.529 RBD 和 BA.1 RBD 蛋白时（带有 his 标签）会形成一层生物膜。当入射光到达该膜层时，会发生透射和反射，从而形成干涉光波。当抗体与 RBD 蛋白结合时，会导致探针末端生物膜的厚度发生改变，从而导致干涉光波发生相对位移。光谱仪会检测到这种位移并形成干涉光谱。实时的干涉光谱位移可以通过 Gator 软件进行曲线拟合，并呈现为干涉图谱。该图谱可以用于显示抗体与蛋白质相互作用的结果。在此过程中，测量结果是以曲线的形式呈现的，其拟合曲线如图 3-7 所示，我们选择 ELISA 结合较强的候选分子（A1、A2、A4、A10、A11、C7、D5、H7）检测通过 Gator 软件导出待测纳米抗体分别与 BA.1 RBD、B.1.1.529 RBD、野生型 RBD 的 Response 值如表 3-9 所示，通过 Response 值我们可以看到即使是 ELISA 结果较好的 A2、A10、C7、H7 这四株纳米抗体也与野生型 RBD 无结合信号，而 A11 对奥密克戎变异株 BA.1 RBD 有结合信号，A2、A10、C7、H7 对奥密克戎变异株 B.1.1.529 RBD 有结合信号原因可能是我们使用德尔塔变异株 RBD 蛋白免疫羊驼使用噬菌体展示技术建立的纳米抗体库中的纳米抗体对原始株无亲和活性而对变异株有一定的亲和活性。

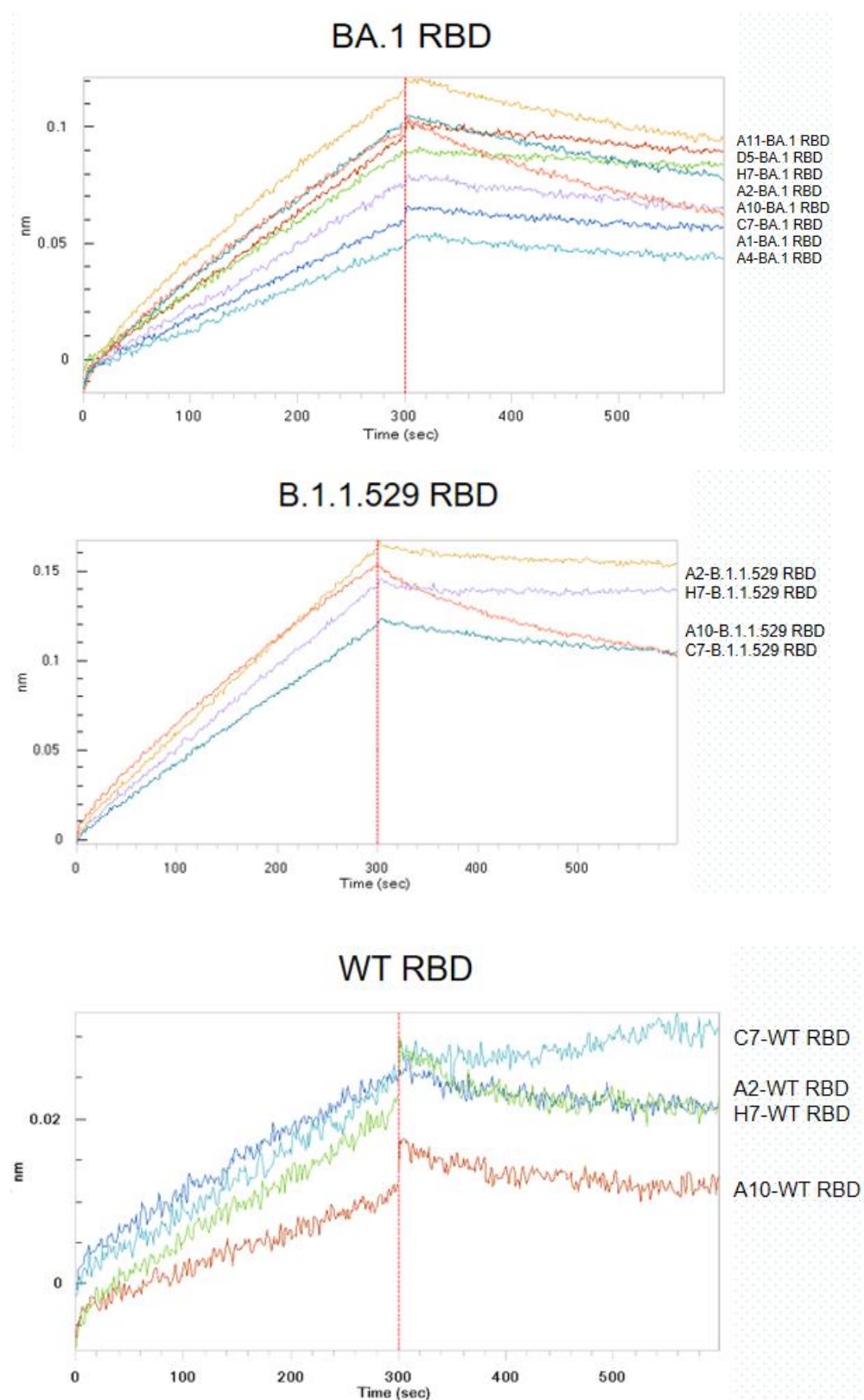


图 3-7 生物膜干涉试验  
Figure 3-7 Biofilm interference test

表 3-9 生物膜干涉试验

Table 3-9 biofilm interference test

Sample ID	Loading Sample ID	Conc. (nM)	Response
BA.1-RBD	A1	60	0.058
BA.1-RBD	A2	60	0.0928
BA.1-RBD	A4	60	0.047
BA.1-RBD	A10	60	0.0872
BA.1-RBD	A11	60	0.1124
BA.1-RBD	C7	60	0.0739
BA.1-RBD	D5	60	0.0992
BA.1-RBD	H7	60	0.0959
B.1.1.529 RBD	A2	100	0.1593
B.1.1.529 RBD	A10	100	0.1395
B.1.1.529 RBD	C7	100	0.1169
B.1.1.529 RBD	H7	100	0.1505
WT RBD	A2	100	0.0247
WT RBD	A10	100	0.0109
WT RBD	C7	100	0.0249
WT RBD	H7	100	0.0206

随后我们又检测了 C1、C2 抗体分别与原始株 RBD 和奥密克戎变异株 BA.1 RBD 的亲合活性，拟合成的曲线如图 3-8 所示，表 3-10 中 Response 值显示 C1 和 C2 与野生型 RBD 蛋白无结合信号，C1 与 BA.1 RBD 蛋白有信号。

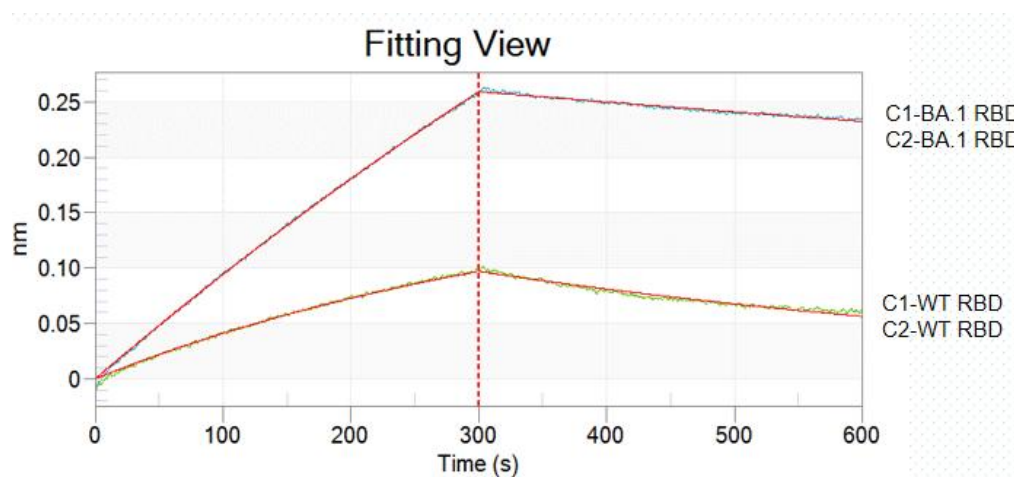


图 3-8 C1、C2 生物膜干涉试验

Figure 3-8 C1 and C2 Biofilm Interference Test

表 3-10 C1、C2 生物膜干涉试验

Table 3-10 biofilm interference test

Sample ID	Loading Sample ID	Conc. (nM)	Response
WT RBD	C1	60	0.0058
WT RBD	C2	60	-0.0045
BA.1 RBD	C1	60	0.2528
BA.1 RBD	C2	60	0.0961

### (3) 假病毒中和活性测定

为了测试使用德尔塔变异株 RBD 蛋白筛选出的这十株纳米抗体的中和活性, 我们使用了奥密克戎变异株和德尔塔变异株的假病毒进行中和试验。这些假病毒带有刺突蛋白, 可以与 ACE2-293T 细胞结合, 使假病毒基因组进入细胞内, 并表达荧光素酶基因。当荧光素酶与底物结合时, 它会发光并被仪器检测到, 其发光强度与假病毒的数量成正比, 从而间接反映了进入细胞的假病毒数量。中和活性的结果以抑制率表示, 通过扣除细胞背景值, 计算出加入抗体孔与未加入抗体孔之间相对光单位的减少率。我们使用成组 t 检验对阳性对照和待测抗体的假病毒中和活性进行了分析, 其结果如图 3-10 所示。首先先计算使用奥密克戎变异株假病毒测定抗体的中和活性的 P 值, 通过 GraphPad 算得其 P 值分别为 0.0022、0.0010、0.1460、0.0129、0.0068、0.0002、<0.0001、<0.0001、0.0004、<0.0001 差异具有统计学意义, 只有 A4 对应的 P 值 >0.05, 说明抗体 A1、A2、A10、A11、C1、C2、C7、D5、H7 抗体与奥密克戎变异株假病毒有一定的中和活性, 同理可以看出 A2、A4、A10、A11、C2、C7、H7 与德尔塔变异株假病毒有一定的中和活性。

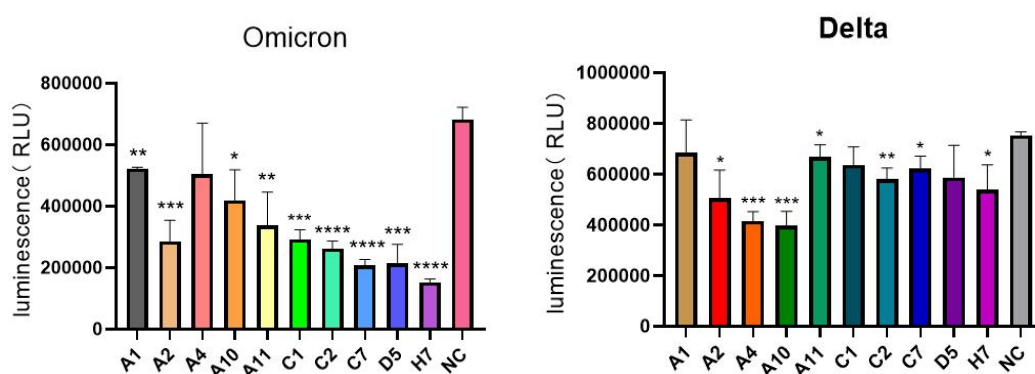


图 3-10 纳米抗体假病毒中和鉴定试验

Figure 3-10 Nanobody pseudovirus neutralization identification test

\*P<0.05;\*\*P<0.01;\*\*\*P<0.001;\*\*\*\*P<0.0001

### 3.5 讨论

本部分研究以德尔塔变异株 RBD 蛋白为抗原对羊驼进行了 6 次免疫,借助噬菌体展示技术建立了 SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体库。然后以不同变异株的 RBD 蛋白为抗原进行筛选,通过 ELISA 筛选出 10 株代表性纳米抗体阳性克隆。将纳米抗体基因构建入 pFUSE-IgG1-Fc2 载体,利用 293T 细胞进行重组纳米抗体蛋白表达,最终制备了 10 个纯度较好的重组纳米抗体蛋白。通过 ELISA、生物膜层干涉实验、假病毒中和试验等表征了这些抗体的抗原结合性、亲和力和中和活性。

纳米抗体分子量小,作为治疗药物而言有一定的缺陷。由于纳米抗体分子量在 15 kDa 左右,而肾清除率的临界值为 50 kDa<sup>[57,58]</sup>,因此纳米抗体能够通过肾小球滤膜,导致其在血液中存在的时间很短。针对这个不足,目前发展出了一些长效化的方法,主要包括聚乙二醇化、与 Fc 或人血清白蛋白融合等。本实验选择了与 Fc 融合表达,一方面,与 Fc 融合表达后其二聚体分子量在 50 kDa 左右;另一方面,Fc 能够与血管内皮细胞表达的新生儿受体 Fc Rn 相互作用,保护抗体不受降解<sup>[59,60,61]</sup>。

本部分运用噬菌体展示技术,实现了从羊驼免疫到抗体评价的一套完整技术流程,形成了今后制备其它病原纳米抗体时可以借鉴和参考的技术方法。本部分选择 ELISA 检测时具有结合活性的候选纳米抗体分子进行亲和力检测,结果显示与 SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白无亲和力,与 BA.1 及 B.1.1.529 毒株 RBD 蛋白存在亲和力<sup>[62]</sup>。这种抗体与原始株 RBD 蛋白的亲和力与结合活性不一致的结果表明,RBD 变异即使保持了抗原抗体的结合活性,但可以使中和抗体失效,这与真实世界中 RBD 中和抗体在病毒变异后中和病毒效果下降一致<sup>[63,64]</sup>。假病毒中和试验结果表明,部分筛选出的候选纳米抗体能够对德尔塔和奥密克戎变异株的 RBD 存在交叉中和活性,表明虽然不同变异株的 RBD 存在差异,但也存在能够诱导交叉中和抗体的保守表位,这些表位不仅有利于发展保守中和抗体,也有助于设计出具有交叉保护作用的疫苗<sup>[65,66]</sup>。

### 3.6 本章小结

(1) 使用 SARS-CoV-2 RBD 蛋白免疫羊驼通过噬菌体展示技术构建 SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体库。

(2) 分别使用 SARS-CoV-2 野生型 RBD、德尔塔 RBD、奥密克戎 RBD 蛋白在 SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体库进行筛选,三轮筛选过后鉴定出了

10 株高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体，并使用真核表达系统表达这 10 株抗体。

(3) 利用 ELISA、生物膜层干涉实验、假病毒中和试验对 10 株高致病冠状病毒受体结合区特异性纳米抗体做进一步的生物学特征分析得出使用德尔塔变异株 RBD 蛋白免疫羊驼使用噬菌体展示技术建立的纳米抗体库中筛选出的 10 株 RBD 蛋白特异性纳米抗体与野生型 RBD 蛋白无结合信号而对奥密克戎、德尔塔变异株 RBD 蛋白有结合信号，使用变异株假病毒验证了这些抗体对奥密克戎变异株有一定的中和活性。



## 第四章 结论与展望

### 4.1 结论

为了开发抗高致病冠状病毒的候选治疗药物，我们使用 PB 对 10 株代表性的高致病冠状病毒纳米抗体的结构进行分析，随后我们以 SARS-CoV-2 德尔塔变异株的 RBD 为靶点，利用噬菌体展示技术，开展了抗 SARS-CoV-2 的纳米中和抗体的研究，主要结论如下：

(1) 使用蛋白块 (PB) 对 10 株代表性的抗高致病冠状病毒 VHH 的 FR 区进行分析。我们在 PDB 数据库中找到 67 株抗高致病冠状病毒 VHH，随后使用 Clustal O 软件进行多重比对找出了 10 株代表性的抗体并且区分出抗体的 FR 区，之后使用 MulPBA 等软件对这 10 株代表性抗体的 FR 区的一级结构和空间结构进行比对分析发现即使是稳定的 FR 区也存在柔性区域。

(2) 研制出 10 株 SARS-CoV-2 RBD 蛋白特异性纳米抗体 A1、A2、A4、A10、A11、C7、D5、H7、C1、C2。我们使用 SARS-CoV-2 德尔塔变异株 RBD 蛋白免疫羊驼，利用噬菌体展示技术建立了特异性纳米抗体库，随后我们通过使用 SARS-CoV-2 野生型 RBD、奥密克戎 RBD 和德尔塔 RBD 蛋白进行筛选，筛选出了 10 株高致病冠状病毒 RBD 蛋白特异性纳米抗体，使用 ELISA 检测出这 10 株抗体与野生型 RBD、BA.1 RBD、B.1.1.529 RBD 蛋白具有较好的结合活性，使用生物膜层干涉实验检测出这些抗体与变异株 BA.1、B.1.1.529RBD 蛋白有一定的亲和活性，通过假病毒中和试验检测出这些抗体对奥密克戎变异株假病毒有一定的中和活性。

### 4.2 展望

本研究使用蛋白块对 10 株 RBD 特异性纳米抗体的结构进行分析，使用噬菌体展示技术建立了 RBD 特异性纳米抗体库并从中筛选出了 10 株 RBD 特异性纳米抗体本研究为纳米抗体的结构分析及研制提供了一定的理论基础和实践参考，同时在研究工作的展开中总结了一些经验教训。使用不同变异株的 RBD 蛋白为抗原筛选出一系列的纳米抗体，这些抗体对 SARS-CoV-2 野生型 RBD 蛋白无亲和活性，但对两种变异株有一定的亲和活性，这与真实世界中 RBD 中和抗体在病毒变异后中和病毒效果下降一致，在第三章讨论部分有虽谈及但还要通过实验的方法去证明。

COVID-19 给全世界敲响了警钟，对高致病冠状病毒的预防和控制不容忽视，然而到目前为止我们对冠状病毒的认识仍不够充分。从 SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 综合来看，高致病冠状病毒在其病毒结构、传播途径、致病机制、预防和治疗措施等许多方面具有很高的相似性。因此本研究不仅对抗体的人源化改造和开发抗 SARS-CoV-2 的治疗药物具有十分重要的意义，还对 MERS-CoV 和 SARS-CoV 以及未来可能出现的其他高致病冠状病毒的防治措施也具有深刻的指导意义。随着人们对病毒研究的不断深入，相信未来人类一定能够从容应对包括冠状病毒在内的所有病毒。

## 参考文献

- [1] Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 [J]. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19(3):141-154.
- [2] Haider Najmul, Rothman-Ostrow Peregrine, Osman Abdinasir Yusuf, et al. COVID-19-Zoonosis or Emerging Infectious Disease[J]. *Frontiers in Public Health*, 2020, 8:596944.
- [3] Wada Masami, Lokugamage Kumari G, Nakagawa Keisuke, et al. Interplay between coronavirus, a cytoplasmic RNA virus, and nonsense-mediated mRNA decay pathway[J]. *PNAS*, 2018, 115(43):E10157-E10166.
- [4] Reusken Chantal B E M, Schilp Chrispijn, Raj V Stalin, et al. MERS-CoV Infection of Alpaca in a Region Where MERS-CoV is Endemic[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(6):1129-31.
- [5] Inandiklioğlu Nihal, Akkoc Tunc. Immune Responses to SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020, 1288:5-12.
- [6] Fillon Mike. New studies examine COVID-19 risks among cancer patients[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2022, 72(4):305-307.
- [7] Spinelli S, Frenken L G, Hermans P, et al. Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(6):1217-22.
- [8] Kovaleva Marina, Ferguson Laura, Steven John, et al. Shark variable new antigen receptor biologics - a novel technology platform for therapeutic drug development[J]. *Expert Opinion on biological therapy*, 2014, 14(10):1527-39.
- [9] Mitchell Laura S, Colwell Lucy J. Comparative analysis of nanobody sequence and structure data[J]. *Proteins*, 2018, 86(7):697-706.
- [10] 郭婷, 张宇昊, 马良. 纳米抗体的特性及其应用研究进展 [J]. *食品科学*. 2013, 34(3): 294-297.
- [11] 崔华清, 王清明, 基于重链抗体构建的单域抗体研究进展 [J]. *生物工程学报*. 2005, 21(3): 497-501
- [12] Khodabakhsh F, Behdani M, Rami A, et al. Single-Domain Antibodies or Nanobodies: A Class of Next-Generation Antibodies [J]. *Int Rev Immunol.* 2018; 37(6):316-322.
- [13] Moradi-Kalbolandi Shima, Sharifi-K Azadeh, Darvishi Behrad, et al. Evaluation the potential of recombinant anti-CD3 nanobody on immunomodulatory function[J]. *Molecular Immunology*, 2019, 118:174-181.
- [14] Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh Gh G, et al. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels [J]. *Int J Cancer.* 2002; 98(3):456-462.

- [15] Muruganandam A, Tanha J, Narang S, et al. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium [J]. *FASEB J*. 2002; 16(2):240-242.
- [16] Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P, et al. The blood-brain barrier transmigration single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells [J]. *J Neurochem*. 2005; 95(4):1201-1214.
- [17] Conrath K, Vincke C, Stijlemans B, et al. Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH [J]. *J Mol Biol*. 2005; 350(1):112-125.
- [18] Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, et al. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies [J]. *FEBS Lett*. 1997; 414(3):521-526.
- [19] Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability [J]. *Protein Sci*. 2002; 11(3):500-515.
- [20] Govaert J, Pellis M, Deschacht N, et al. Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments [J]. *J Biol Chem*. 2012; 287(3):1970-1979.
- [21] Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity [J]. *Med Microbiol Immunol*. 2009; 198(3): 157-174.
- [22] Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 77(1): 13-22.
- [23] Muyldermans S. Applications of Nanobodies [J]. *Annu Rev Anim Biosci*. 2021; 9: 401-421.1,2
- [24] Kromann-Hansen T, Louise Lange E, Peter Sørensen H, et al. Discovery of a novel conformational equilibrium in urokinase-type plasminogen activator [J]. *Sci Rep*. 2017; 7(1):3385. Published 2017 Jun 13.
- [25] Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, et al. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins [J]. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7(2): 282-289.
- [26] Morales-Yanez FJ, Sariago I, Vincke C, et al. An innovative approach in the detection of *Toxocara canis* excretory/secretory antigens using specific nanobodies [J]. *Int J Parasitol*. 2019; 49(8):635-645.
- [27] Chakravarty R, Goel S, Cai W. Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging? [J]. *Theranostics*. 2014; 4(4):386-398. Published 2014 Jan 29.
- [28] aursen NS, Friesen RHE, Zhu X, et al. Universal protection against influenza infection by a

- multidomain antibody to influenza hemagglutinin [J]. *Science*. 2018; 362(6414): 598-602.
- [29] Frauenfelder H, Sligar S G, Wolynes P G. The energy landscapes and motions of proteins[J]. *Science*, 1991, 254(5038):1598-603.
- [30] Atilgan Ali Rana, Turgut Deniz, Atilgan Canan. Screened nonbonded interactions in native proteins manipulate optimal paths for robust residue communication[J]. *Biophysical Journal*, 2007, 92(9):3052-62.
- [31] Laine Elodie, Auclair Christian, Tchertanov Luba. Allosteric communication across the native and mutated KIT receptor tyrosine kinase[J]. *PLoS Computational Biology*, 2012, 8(8):e1002661.
- [32] de Brevern A G, Etchebest C, Hazout S. Bayesian probabilistic approach for predicting backbone structures in terms of protein blocks[J]. *Proteins*, 2000, 41(3):271-87.
- [33] de Brevern Alexandre G. New assessment of a structural alphabet[J]. *In silico biology*, 2005, 5(3):283-9.
- [34] Etchebest Catherine, Benros Cristina, Hazout Serge, et al. A structural alphabet for local protein structures: improved prediction methods[J]. *Proteins*, 2005, 59(4):810-27.
- [35] Joseph Agnel Praveen, Agarwal Garima, Mahajan Swapnil, et al. A short survey on protein blocks[J]. *Biophysical reviews*, 2010, 2(3):137-147.
- [36] Joseph Agnel Praveen, Srinivasan N, de Brevern Alexandre G. Improvement of protein structure comparison using a structural alphabet[J]. *Biochimie*, 2011, 93(9):1434-45.
- [37] Faure Guilhem, Bornot Aurélie, de Brevern Alexandre G. Protein contacts, inter-residue interactions and side-chain modelling[J]. *Biochimie*, 2007, 90(4):626-39.
- [38] Hairul Bahara Nur Hidayah, Tye Gee Jun, Choong Yee Siew, et al. Phage display antibodies for diagnostic applications[J]. *Biologicals*, 2013, 41(4):209-16.
- [39] Rahbarnia Leila, Farajnia Safar, Babaei Hossein, et al. Evolution of phage display technology: from discovery to application[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2016, 25(3):216-224.
- [40] Jara-Acevedo Ricardo, Díez Paula, González-González María, et al. Screening Phage-Display Antibody Libraries Using Protein Arrays[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1701:365-380.
- [41] White Brandy, Huh Ian, Brooks Cory L. Structure of a VHH isolated from a naïve phage display library[J]. *BMC Research Notes*, 2019, 12(1):154.
- [42] Sircar Aroop, Sanni Kayode A, Shi Jiye, et al. Analysis and modeling of the variable region of camelid single-domain antibodies[J]. *Journal of Immunology*, 2011, 186(11):6357-67.
- [43] Shirai Hiroki, Prades Catherine, Vita Randi, et al. Antibody informatics for drug discovery[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1844(11):2002-2015.
- [44] Kijanka Marta, Dorresteijn Bram, Oliveira Sabrina, et al. Nanobody-based cancer therapy of

- solid tumors[J]. *Nanomedicine*, 2015, 10(1):161-74.
- [45] Dumoulin Mireille, Conrath Katja, Van Meirhaeghe Annemie, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability[J]. *Protein Science*, 2002, 11(3):500-15.
- [46] Saerens Dirk, Pellis Mireille, Loris Remy, et al. Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 352(3):597-607.
- [47] Li Mingxi, Ren Yifei, Aw Zhen Qin, et al. Broadly neutralizing and protective nanobodies against SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1, BA.2, and BA.4/5 and diverse sarbecoviruses[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1):7957.
- [48] Kamegawa Akiko, Suzuki Shota, Suzuki Hiroshi, et al. Structural analysis of the water channel AQP2 by single-particle cryo-EM[J]. *Journal of Structural Biology*, 2023, 215(3):107984.
- [49] Leighton Gage O, Shang Shengzhe, Hageman Sean, et al. Analysis of the complex between MBD2 and the histone deacetylase core of NuRD reveals key interactions critical for gene silencing[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(33):e2307287120.
- [50] Derry Alexander, Carpenter Kristy A, Altman Russ B. Training data composition affects performance of protein structure analysis algorithms[J]. *Pacific Symposium on Biocomputing*. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 2022, 27:10-21.
- [51] Xu Jinbo, Wang Sheng. Analysis of distance-based protein structure prediction by deep learning in CASP13[J]. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 2019, 87(12):1069-1081.
- [52] Lin Tung-Yi, Hua Wei-Jyun, Yeh Hsin, et al. Functional proteomic analysis reveals that fungal immunomodulatory protein reduced expressions of heat shock proteins correlates to apoptosis in lung cancer cells[J]. *Phytomedicine*, 2021, 80:153384.
- [53] Davis Emily H, Barrett Alan D T. Structure-Function of the Yellow Fever Virus Envelope Protein: Analysis of Antibody Epitopes[J]. *Viral Immunology*, 2020, 33(1):12-21.
- [54] Liu Lucy L, Wang Libo, Zonderman Jeffrey, et al. Automated, High-Throughput Infrared Spectroscopy for Secondary Structure Analysis of Protein Biopharmaceuticals[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 109(10):3223-3230.
- [55] Zhu Xinliang, Yu Fengchao, Yang Zhu, et al. In planta chemical cross-linking and mass spectrometry analysis of protein structure and interaction in Arabidopsis[J]. *Proteomics*, 2016, 16(13):1915-27.
- [56] Stiffler Michael A, Poelwijk Frank J, Brock Kelly P, et al. Protein Structure from Experimental Evolution[J]. *Cell Systems*, 2019, 10(1):15-24.e5.

- [57] Reusken Chantal B E M, Schilp Chrispijn, Raj V Stalin, et al. MERS-CoV Infection of Alpaca in a Region Where MERS-CoV is Endemic[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(6):1129-31.
- [58] Xu Jiabao, Zhao Shizhe, Teng Tieshan, et al. Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV[J]. *Viruses*, 2020, 12(2):244.
- [59] Ma Cuiqing, Su Shan, Wang Jiachao, et al. From SARS-CoV to SARS-CoV-2: safety and broad-spectrum are important for coronavirus vaccine development[J]. *Microbes and Infection*, 2020, 22(6-7):245-253.
- [60] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies [J]. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82:775-797.
- [61] 陈丽颖, 王艳玲, 杨国宇, 胡广超. 新生儿 Fc 受体的研究进展 [J]. *河南农业大学学报*. 2007; 41(4): 469-474.
- [62] Santos A, Macedo de Souza Brandão A P, Hryniewicz B M, et al. COVID-19 impedimetric biosensor based on polypyrrole nanotubes, nickel hydroxide and VHH antibody fragment: specific, sensitive, and rapid viral detection in saliva samples[J]. *Materials Today Chemistry*, 2023, 30:101597.
- [63] Shen Andrew M, Malekshah Obeid M, Pogrebyak Natalia, et al. Plant-derived single domain COVID-19 antibodies[J]. *Journal of Controlled Release*, 2023, 359:1-11.
- [64] Jarvas Gabor, Szerenyi Dora, Jankovics Hajnalka, et al. Microbead-based extracorporeal immuno-affinity virus capture: a feasibility study to address the SARS-CoV-2 pandemic[J]. *Mikrochimica Acta*, 2023, 190(3):95.
- [65] Andrés Cristina, Piñana Maria, Borrás-Bermejo Blanca, et al. A year living with SARS-CoV-2: an epidemiological overview of viral lineage circulation by whole-genome sequencing in Barcelona city (Catalonia, Spain)[J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2022, 11(1):172-181.
- [66] Ma Chengbao, Chen Xianying, Mei Fanghua, et al. Drastic decline in sera neutralization against SARS-CoV-2 Omicron variant in Wuhan COVID-19 convalescents[J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2022, 11(1):567-572.