



安徽农业大学  
Anhui Agricultural University

## 硕士学位论文

禽流感病毒 NP 蛋白和 HA1 蛋白  
纳米抗体的筛选及特性鉴定

Screening and identification of avian influenza virus  
NP and HA1 nanobodies

姓 名 \_\_\_\_\_ 梁世蕊 \_\_\_\_\_  
学 号 \_\_\_\_\_ 20720474 \_\_\_\_\_  
导 师 \_\_\_\_\_ 李郁 教授 \_\_\_\_\_  
合作导师 \_\_\_\_\_ 朱启运 研究员 \_\_\_\_\_  
专 业 \_\_\_\_\_ 动物性食品安全 \_\_\_\_\_  
研究方向 \_\_\_\_\_ 动物传染病 \_\_\_\_\_  
学 院 \_\_\_\_\_ 动物科技学院 \_\_\_\_\_

2023 年 6 月

中图分类号: \_\_\_\_\_

单位代码: 10364

UDC: \_\_\_\_\_

密 级: \_\_\_\_\_

# 安徽农业大学

## 硕士学位论文

### 禽流感病毒 NP 蛋白和 HA1 蛋白 纳米抗体的筛选及特性鉴定

#### Screening and identification of avian influenza virus NP and HA1 nanobodies

姓 名: 梁世蕊 学 号: 20720474

学 科 门 类: 农学 导 师: 李郁 教授

专 业 名 称: 动物性食品安全 合 作 导 师: 朱启运 研究员

学 院: 动物科技学院 研 究 方 向: 动物传染病

论文评阅人: \_\_\_\_\_ 答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

2023 年 6 月

A Dissertation Submitted to Anhui Agricultural University  
in Partial Fulfillment of the Requirements for  
the Master of Agriculture

Screening and identification of avian influenza  
virus NP and HA1 nanobodies

by

**Liang Shirui**

Supervised by

Prof. Li Yu

Majored in

Animal food safety

June, 2023

College

Hefei, Anhui, P.R.China

## 摘要

禽流感 (Avian influenza, AI) 是禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 感染禽类后引起的急性呼吸系统传染病。根据 AIV 表面糖蛋白血凝素 (Hemagglutinin, HA) 蛋白和神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA) 抗原性不同, 分为 18 种 HA 亚型 (HA1~HA18) 和 11 种 NA 亚型 (NA1~NA11)。近年来, H5N6 亚型 AIV 感染人类的事件频发, 威胁人类健康, 开发新型检测试剂更利于该病毒的监测工作。核蛋白 (Nucleoprotein, NP) 是 AIV 结构蛋白, HA1 蛋白位于 HA 蛋白的“头部”。两种蛋白与 AIV 的致病性密切相关, 是开发抗体的主要靶蛋白。传统抗体的制备技术要求高, 生物性质不稳定, 而纳米抗体 (Nanobody, Nb) 可快速制备、稳定性高。目前针对两种蛋白 Nb 的研究较少, 因此本研究通过噬菌体展示技术, 得到针对 NP 蛋白和 HA1 蛋白的 Nb, 对 Nb 生物特性进行初步研究, 为建立 H5N6 亚型 AIV 的检测方法提供新思路。

在 H5N6 亚型 AIV-NP 蛋白和 HA1 蛋白基础上, 开展以下试验: (1) 噬菌体文库建立: 使用 NP、HA1 蛋白免疫羊驼, 间接 ELISA 测定 IgG 抗体效价; 通过巢式 PCR 获得重链抗体可变区 (Variable domain of the heavy chain of heavy chain, VHH) 基因片段, 构建重组 pComb-VHH, 建立噬菌体展示文库, 测定阳性率及库容; (2) Nb 的筛选: 以 NP 蛋白和 HA1 蛋白作为靶向蛋白, 利用噬菌体展示技术对文库进行淘选, 滴度试验监测富集情况; 通过 Phage-ELISA、PCR 鉴定阳性噬菌体, 获得 Nb 氨基酸序列; (3) Nb 的获得: 构建 pcDNA3.1-Fc-Nb 重组质粒, 利用真核表达系统表达收获 Nb; (4) Nb 生物特性鉴定: 通过血凝抑制试验、间接 ELISA、蛋白免疫印迹试验、间接免疫荧光试验鉴定 Nb 的生物特性。

结果显示: (1) 测定羊驼体内 IgG 效价为 1: 128,000, 成功建立噬菌体展示文库, 文库的阳性率为 100%, 库容为  $1.5 \times 10^9$  cfu/mL; (2) 三轮筛选后, 获得 4 株 HA1-Nb、3 株 NP-Nb; (3) 各有 3 株 Nb 成功表达, 将其命名为 HA1-Nb1~HA1-Nb3、NP-Nb1~NP-Nb3; (4) 经鉴定, HA1-Nb1 血凝抑制效价为 1:  $2^8$ , 亲和力较好, 可特异性结合 H5N6 亚型 AIV-HA1 蛋白; NP-Nb1 亲和力较好, 可结合不同亚型流感病毒 NP 蛋白, 且能识别 H1N1、H3N2、H9N2 亚型流感病毒。

本研究成功建立多样性良好的驼源噬菌体展示文库, 通过噬菌体展示技术筛选, 得到具有良好的反应活性 HA1-Nb1、NP-Nb1, 为诊断 H5N6 亚型 AI 新方法的建立奠定了理论基础。

**关键词:** 禽流感病毒; H5N6 亚型; 噬菌体文库; 纳米抗体; 生物活性鉴定

## Abstract

Avian influenza (AI) is an acute respiratory infectious disease caused by Avian influenza virus (AIV). According to the antigenicity of AIV surface glycoproteins Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA), AIV can be divided into 18 HA subtypes (HA1-HA18) and 11 NA subtypes (NA1-NA11). In recent years, human infection of H5N6 AIV occurred frequently, which threatened human health. The development of new detection reagents is more conducive to the monitoring of this virus. Nucleoprotein (NP) is the structural protein of AIV, and HA1 protein is located at the “head” of HA protein. Both proteins are immunogenic. They are the main target proteins for the development of antibodies. Traditional antibody requires technical requirements and has unstable biological properties, while Nanobody (Nb) can be prepared quickly and has stability. In this study, we used phage display technology to obtain Nb against NP protein and HA1 protein to conduct a study on the biological activity of Nb. In order to provide a new idea for the prevention and control of H5N6 AI with Nb.

Based on the eukaryotic expression of H5N6 AIV-NP and HA1 proteins, the following experiments were carried out. (1) Construction of phage library: *Alpaca* was immunized with NP and HA1 proteins, and the IgG antibody titer was determined by indirect ELISA; the variable domain of the heavy chain of heavy chain (*VHH*) gene was obtained by nested PCR. The recombinant pComb-VHH was constructed and the phage display library was established. (2) Screening and expression of Nb: with NP and HA1 proteins as target proteins, the phage display was used to panning the library, and the enrichment was monitored by titer test, the positive phage was identified by phage-ELISA and PCR to obtain the target sequence. (3) Expression and purification of Nb: the pcDNA3.1-Fc-Nb recombinant plasmid was constructed, and Nb was obtained by expression and purification. (4) The biological activity of Nb was identified by hemagglutination inhibition test, indirect ELISA, Western blotting and indirect immunofluorescence assay.

The results showed that: (1) The titer of IgG antibody in serum was 1:128,000. The positive rate of phage display library was 100% and the capacity of phage display library was  $1.5 \times 10^9$  cfu/mL. (2) After three rounds of screening, 4 strains of HA1-Nb and 3 strains of NP-Nb were obtained. (3) 3 strains of Nb were successfully expressed, named HA1-Nb1-HA1-Nb3 and NP-Nb1-NP-Nb3. (4) The hemagglutination inhibition titer of HA1-Nb1 was 1:2<sup>8</sup>. HA1-Nb1 could specifically bind to H5N6 AIV-HA1 protein. NP-Nb1

had affinity and recognized NP proteins of different subtypes of influenza viruses broadly. Moreover, NP-Nb1 had binding activity with H1N1, H3N2 and H9N2 influenza viruses.

The diversity of *alpaca* derived phage display library was established, and HA1-Nb1 and NP-Nb1 with reaction activity were screened by phage display technology, which laid a foundation for the new idea of H5N6 AIV prevention .

**KEYWORDS:** avian influenza virus; H5N6; phage library; nanobody; biological activity identification

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 研究背景和意义.....	1
1.2 文献综述.....	2
1.2.1 H5N6 亚型 AI 流行病学概述.....	2
1.2.2 AIV 病原学概述.....	3
1.2.3 Nb 概述.....	7
1.2.4 Nb 筛选方法.....	8
1.2.5 Nb 的应用.....	10
1.3 研究思路和研究方法.....	10
第二章 材料与方法.....	12
2.1 材料.....	12
2.1.1 质粒、细胞、蛋白.....	12
2.1.2 毒株、实验动物.....	12
2.1.3 主要试剂.....	12
2.1.4 主要仪器.....	12
2.1.5 主要溶液配制.....	13
2.2 方法.....	14
2.2.1 NP 蛋白的表达.....	14
2.2.2 噬菌体展示文库的建立.....	18
2.2.3 抗 NP 蛋白、HA1 蛋白 Nb 的筛选.....	23
2.2.4 Nb 的特性鉴定.....	26
第三章 结果与分析.....	28
3.1 NP 蛋白表达.....	28
3.1.1 NP 重组质粒构建与验证.....	28
3.1.2 pcDNA3.1-NP 重组蛋白表达及纯化.....	28
3.2 噬菌体展示文库的建立.....	29
3.2.1 羊驼血清抗体效价检测.....	29
3.2.2 噬菌体文库构建.....	30
3.2.3 噬菌体展示文库的库容评估.....	31
3.3 Nb 的筛选.....	31
3.3.1 噬菌体文库的筛选.....	31
3.3.2 阳性噬菌体鉴定.....	32
3.3.3 Nb 基因的获得与分析.....	33
3.3.4 Nb 的表达与纯化.....	35

3.4 Nb 特性鉴定.....	36
3.4.1 血凝抑制效价测定.....	36
3.4.2 亲和力检测.....	37
3.4.3 蛋白免疫印迹特异性鉴定.....	37
3.4.4 间接免疫荧光试验特异性鉴定.....	39
第四章 讨论.....	40
4.1 NP 蛋白的真核表达.....	40
4.2 噬菌体展示抗体文库的建立.....	40
4.3 Nb 的筛选及表达.....	41
4.4 Nb 的特异性鉴定.....	42
第五章 结论.....	44
附录 NP 基因序列.....	45
参考文献.....	46



## 插图清单

图 3-1	pcDNA3.1-NP 质粒鉴定 .....	28
图 3-2	NP 蛋白鉴定 .....	29
图 3-3	免疫后血清效价测定 .....	30
图 3-4	VHH 基因获得 .....	30
图 3-5	噬菌体文库阳性率鉴定 .....	31
图 3-6	Phage-ELISA 结果 .....	32
图 3-7	阳性噬菌体 PCR 鉴定 .....	33
图 3-8	Nb 表达质粒构建 .....	34
图 3-9	HA1-Nb 氨基酸序列对比 .....	34
图 3-10	NP-Nb 氨基酸序列对比 .....	35
图 3-11	Nb 的表达与纯化 .....	36
图 3-12	Nb 最佳表达时间鉴定 .....	36
图 3-13	NP-Nb1 的识别能力鉴定 .....	38
图 3-14	HA1-Nb 的识别能力鉴定 .....	38
图 3-15	NP-Nb1 的结合活性鉴定 .....	39
图 3-16	HA1-Nb1 的结合活性鉴定 .....	39

## 附表清单

表 2-1	NP 重组质粒构建体系 .....	14
表 2-2	pcDNA3.1-NP 重组质粒 PCR 体系 .....	15
表 2-3	NP 重组质粒鉴定引物 .....	16
表 2-4	双酶切体系 .....	16
表 2-5	RNA 反转录体系 .....	19
表 2-6	巢式 PCR 鉴定引物 .....	19
表 2-7	巢式 PCR 扩增 IgG 体系 .....	20
表 2-8	巢式 PCR 扩增 VHH 体系 .....	20
表 2-9	同源重组连接体系 .....	21
表 2-10	噬菌体载体构建鉴定引物 .....	22
表 2-11	噬菌体载体构建鉴定体系与反应程序 .....	22
表 2-12	阳性克隆菌液 PCR 鉴定体系及反应程序 .....	24
续表 2-12	阳性克隆菌液 PCR 鉴定体系及反应程序 .....	25
表 3-1	靶向 NP 蛋白特异性噬菌体富集情况 .....	31
表 3-2	靶向 HA1 蛋白特异性噬菌体富集情况 .....	32
表 3-3	NP-Nb1~NP-Nb3 的 EC <sub>50</sub> .....	37
表 3-4	HA1-Nb1~HA1-Nb3 的血凝抑制效价和 EC <sub>50</sub> .....	37

## 主要缩写和符号表

英文缩写	英文全称	中文全称
AIV	Avian influenza virus	禽流感病毒
AI	Avian influenza	禽流感
HA	Hemagglutinin	血凝素蛋白
NP	Nucleoprotein	核糖核蛋白
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附反应
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
VHH	Variable domain of the heavy chain of heavy chain antibody	重链可变区
Nb	Nanobody	纳米抗体
WB	Western blot	蛋白免疫印迹试验
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
PB	Polymerase	聚合酶蛋白
M	Materix protein	基质蛋白
NS	Nonstructural	非结构蛋白
PBMC	Peripheral blood mono nuclear cell	外周血淋巴细胞
CDR	Complementarity determining regions	互补决定区
r/min	Rotation per minute	每分钟转速
cDNA	Complementary	互补 DNA
HEK293	Human embryonic kidney Cells	人胚肾细胞
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney cells	马-达二氏犬肾细胞
SDA-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
kDa	Kilodalton	千道尔顿
CFU	Colony forming unit	菌落形成单位
μg/mL	Microgram per milliliter	微克每毫升
μg/mg/g	Microgram/milligram/gram	微克/毫克/克
μL/mL/L	Microliter/milliliter/liliter	微升/毫升/升
s/min/h/d	Second/minute/hour/day	秒/分钟/小时/天
EC <sub>50</sub>	Concentration for 50% of maximal effect	半数有效最大浓度

# 第一章 绪论

## 1.1 研究背景和意义

H5N6 亚型禽流感 (Avian influenza, AI) 是我国人兽共患病重点防治病种。根据世界卫生组织 (World health organization, WHO) 最新标准, H5N6 亚型禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 是目前世界各国流行的 AIV 亚型之一, 且 H5N6 亚型 AIV 的基因变异明显, 内部出现了多个小分支<sup>[1]</sup>。H5N6 亚型 AIV 在感染宿主后, 有多种病毒蛋白参与反应过程, 其中血凝素蛋白 (Hemagglutinin, HA) 和核蛋白 (Nucleoprotein, NP) 起着相当重要的作用<sup>[2]</sup>, 该蛋白上的抗原位点的变化, 影响病毒的跨物种传播。有研究对 H5N6 亚型 AIV 新分支 HA 蛋白的受体进行分析, 结果显示, 该分支受体结合位点具有双受体结合特性, 即该毒株保留了对禽类 SA $\alpha$ 2-3Gal 唾液酸受体的亲和力, 但同时对人类 SA $\alpha$ 2-6Gal 唾液酸受体也有一定的亲和力<sup>[3]</sup>, 表明 H5N6 亚型 AIV 感染人类的能力在增强。有报道对 NP 蛋白突变毒株进行研究, 结果表明, NP 蛋白突变后加速了 AIV 的传播, 增强了在新宿主体内的适应性<sup>[4]</sup>。HA1 蛋白含有很多抗原表位, 免疫原性强, 具有病毒特异性, 是开发 AIV 特异性抗体的主要靶蛋白。NP 蛋白的免疫原性较强, 抗原表位保守, 是 AIV 的血清学监测中主要使用的靶蛋白。

目前, 靶向 NP 蛋白和 HA1 蛋白的抗体有单克隆抗体、多克隆抗体和基因工程抗体等, 并以它们为基础建立了多种血清学检测方法, 比较常见的有酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、胶体金免疫层析技术、病毒中和试验等。然而传统抗体制备方法复杂, 对实验人员的操作技术要求高, 抗体稳定性差, 无法制备高浓度、高纯度的抗体, 对保存条件要求较高, 无法满足实际应用的需求, 故急需开发一种新的抗体以满足生产实践需求。

1993 年科学家首次报道了骆驼中存在一种天然缺失轻链、通过重链上的可变区结合抗原的重链抗体 (Heavy chain antibodies, HCAb) <sup>[5]</sup>。在 HCAb 片段基础上开发了一种仅由重链可变区 (Variable domain of the heavy chain, VHH) 构成的抗体, 分子量及体积都极小, 仅为传统抗体大小的十分之一, 是目前已知最小的有活性、可与抗原结合的蛋白, 被称为纳米抗体 (Nanobody, Nb)。不同于传统抗体, Nb 抗原结合区仅由单个域组成, 分子量小, 组织渗透性高, 在体内可快速、均匀扩散, 利于其穿透组织发挥作用, 而且其基因可以进行进一步改造<sup>[6]</sup>。Nb 的性质稳定, 易储存, 可快速、大量制备, 因此, Nb 已被应用于病原检测、疾病治疗及生物医学研究等方向, 也用于禽类病毒病诊断中。有研究通过噬菌体展示技术筛选出针对新城疫病毒 NP 蛋白的 Nb, 将 Nb 与辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 融合表达, 基于

Nb-HRP 复合物，建立了竞争性 ELISA（Competitive ELISA, cELISA）检测方法<sup>[7]</sup>，敏感性、准确度均优于普通 ELISA 检测试剂盒。

目前 H5N6 亚型 AIV 持续威胁着养禽行业的发展及公共卫生安全，无论是对其检测还是疫苗的有效性均提出了更高的要求，亟需采取必要的应对措施。一方面应该加强对该病毒的监测，解析该病毒的进化变异规律，探究发生抗原变异的分子基础，从而实现对于疫情的预警；一方面应该加大检测试剂、疫苗、治疗药物等生物制剂的研究力度，做好对于该病毒多方位的防控工作。目前针对 H5N6 亚型 AIV Nb 研究较少，本研究以 H5N6 亚型 AIV-NP 蛋白和 HA1 蛋白为研究对象，建立噬菌体展示文库，从中筛选出特异性 Nb，对 Nb 的生物活性进行探究。拟为 H5N6 亚型 AIV 新型抗体的开发提供参考，为 AIV 的检测方法、抗原表位的研究奠定理论基础，最终为防控 H5N6 亚型 AI 提供新思路。

## 1.2 文献综述

### 1.2.1 H5N6 亚型 AI 流行病学概述

#### 1.2.1.1 H5N6 亚型 AI 的流行情况

1996 年，我国广东省分离出第一株 H5 亚型 AIV，命名为 A/goose/Guangdong/1。由于多次发生抗原漂移、基因重组变异，H5N6 亚型 AIV 已成为 H5 亚型中优势毒株。2008 年以来，H5N6 亚型 AIV 在亚洲、欧洲和北美的家禽养殖场中多次暴发疫情<sup>[8,9]</sup>。2013 年，在中国多省禽类养殖场中暴发疫情<sup>[10]</sup>，疫情分离出的 H5 亚型 AIV 均为变异株，包括 H5N6 亚型 AIV。

随着全球化进程加快，野生动物及动物产品跨境流动的幅度加大，在许多国家的家禽和野禽中仍可以发现类似 A/goose/Guangdong/1 的毒株。如今分离出的大多数毒株都归类为这个分支，包括埃及的 2.2.2.1 分支和孟加拉国、印度的 2.2.3.2a 分支<sup>[11]</sup>。第一次在亚洲出现的 2.3.4.4 分支被归类为 H5N6 亚型 AIV，它在中国各地传播，并传播到东南亚，造成鸟类死亡<sup>[12]</sup>。在过去十年中，2.3.4.4 分支 H5N6 亚型 AIV 在全球多个国家的家禽及野禽中引发了 14 次疫情<sup>[13]</sup>。在这期间，H5N6 亚型 AIV 发生了多次基因重组产生变异株，且变异株在家禽和野禽中均有传播<sup>[14]</sup>。

H5N6 亚型 AIV 不仅能感染家禽导致严重疾病，对家禽养殖造成巨大的影响，还可以感染人类引起严重的临床症状，甚至导致死亡。随着 H5N6 亚型 AIV 的流行蔓延，该病毒对于人类公共卫生的威胁越来越严重。

2015 年，云南省报告了一例患者感染 H5N6 亚型 AIV 的重症肺炎病例<sup>[15]</sup>，患者在确诊前不仅去过活禽市场，还曾在湿地保护区捕捉过野鸡。同年，湖南省一名女童出现了发烧和轻微的呼吸道症状<sup>[16]</sup>，通过咽拭子检查，确定该女童感染了 H5N6 亚型

AIV，这是第一例 H5N6 亚型 AIV 感染儿童的病例。同年，四川省报告了一例 H5N6 亚型 AIV 的感染病例<sup>[17]</sup>，患者因呼吸衰竭伴有严重肺炎导致死亡；广东省报告了一例 H5N6 亚型 AIV 感染病例<sup>[18]</sup>，从患者咽部的拭子样本中分离出来该病毒。2020 年 1 月~2023 年 2 月，我国报告共有 54 人感染 H5N6 亚型 AIV。2020 年共 2 人感染，其中 1 人死亡，死亡率为 50%；2021 年共 38 人感染，其中 10 人死亡，死亡率为 26.32%。2022 年 1 月~12 月共 14 人感染，其中 2 人死亡，死亡率为 14.29%。

### 1.2.1.2 H5N6 亚型 AI 预防现状

当 H5N6 亚型 AI 疫情暴发时，有的国家采取及时扑杀、烧毁和掩埋发病禽类的方法，同时实行清洁和大规模消毒的程序。在我国，农村家庭散养、家禽养殖场等养殖模式复杂，导致疫情防控难度加大。而且我国家禽饲养数量大、野生禽类生活环境复杂，无法完全隔断传播途径，仅靠扑杀等策略无法控制疫情的传播与流行。因此，我国主要以生物安全为基础，实行强制接种疫苗与扑杀相结合的免疫政策<sup>[19]</sup>。然而 H5N6 亚型 AIV 在传播过程中发生抗原漂移、基因突变等变异，导致初期强制免疫效果急剧下降，严重影响养禽业，需要尽快研发出通用性流感疫苗和不同亚型特异性疫苗以防范 AI 的大流行<sup>[20]</sup>。

目前针对 AIV 的检测方法有病原分离检测、血清学检测、分子生物学检测，其中血清学检测方法在临床诊断中应用广泛，检测方法包括血凝试验/血凝抑制试验、ELISA、胶体金免疫层析技术等。AIV 的 HA 蛋白可以使红细胞凝集，实验室经常将检测材料接种于鸡胚或细胞，经血凝/血凝抑制试验鉴定，但此方法比较耗费时间，灵敏度低，无法将其用于临床快速检测。ELISA 试验、胶体金免疫层析试验等试验是以抗体-抗原结合为基础建立，其灵敏度较高，易于操作，可同时检测大量样品，在短时间内可以获得结果，已经广泛地应用于 AIV 的临床检测。

WHO 等世界性组织已采取全球监测工作，以监测人类 H5N6 亚型 AIV 感染的发生情况，避免 H5N6 亚型 AIV 毒株在家禽中的广泛流行对人类公共卫生构成更大的威胁。WHO 目前的目标有：监测全球人类 H5N6 亚型 AIV 感染的发生情况；确定和描述新出现的致病毒株；监测 H5N6 亚型 AI 的异常发病率和死亡率；监测不同物种间 H5N6 亚型 AIV 的传播。H5N6 亚型 AIV 的监测工作有助于研究人员对重组事件有更深入的了解，为预测大流行毒株的疫苗开发提供帮助。

## 1.2.2 AIV 病原学概述

### 1.2.2.1 AIV 结构

AIV 是一种单股负链分节段 RNA 病毒，病毒常呈球形，新分离的毒株呈丝状<sup>[21]</sup>或者杆状，其直径为 80 nm-120 nm，表面有 10-12 nm 的钉状物或纤突<sup>[22]</sup>。病毒粒子大约由 0.8%-1.1%的 RNA，70%-75%的蛋白质、20%-24%的脂质和 5%-8%的碳水化

合物组成<sup>[23]</sup>。

AIV 基因组由 8 个 RNA 编码，可以转录翻译出 8 种病毒蛋白：HA 蛋白、NP 蛋白、神经氨酸酶（Neuraminidase, NA 蛋白）、聚合酶蛋白质（Polymerase, PB 蛋白）、基质蛋白（Matrix protein, M 蛋白）和非结构蛋白质（Nonstructural, NS 蛋白）<sup>[24]</sup>。根据 AIV 的糖蛋白-HA 蛋白和 NA 蛋白抗原性不同，可以分为不同的 HA 亚型和 NA 亚型。最新研究表明，已经鉴定出分为 18 种 HA 亚型（HA-H18）和 11 种 NA 亚型（N1-N11）。

AIV 病毒粒子主要包括囊膜和核衣壳两部分。基质蛋白构成了病毒外壳骨架，基质蛋白外有一层来自宿主细胞的脂质双分子层，即病毒囊膜。病毒囊膜由外到内的结构为糖蛋白层、类脂层、内膜蛋白（M 蛋白）层<sup>[25]</sup>。类脂层为脂质双层膜结构，两种蛋白刺突（HA 和 NA）则是镶嵌在其表面，构成了糖蛋白层。内膜蛋白位于核蛋白与脂双层膜之间，包裹在病毒核心外，与脂质双层膜的类脂紧密结合在一起。病毒颗粒最内部的核心区域是 8 个单股负链 RNA，基因组与核蛋白、聚合酶蛋白紧密结合，组成核糖核蛋白复合物（Ribonucleo protein complex, RNP）<sup>[26]</sup>。HA 均匀分布在病毒囊膜表面，NA 则常分布在病毒囊膜表面病毒粒子出芽时的出口附近。

### 1.2.2.2 AIV 的主要蛋白及其功能

#### （1）HA 蛋白

HA 蛋白是由 HA 基因编码而成的蛋白质，是 AIV 囊膜纤突的组成成分之一，是一个很典型的 I 型跨膜蛋白。在宿主细胞中 HA 蛋白头部由 3 个 HA1 分子组成，以三聚体形式存在，外观呈杆棒状；茎部由 3 个 HA2 分子构成，外观为长纤维状。HA 蛋白由 560 个氨基酸组成，紧接着信号肽的 300 多个氨基酸组成 HA1，羧基端的 200 多个氨基酸组成 HA2，HA1 与 HA2 之间有一个精氨酸，加工过程中被切除。切割后产生的 HA1 和 HA2 通过一个二硫键和许多共价键连接。HA1 蛋白中有受体结合位点，首要功能是与宿主细胞表面的糖蛋白或糖脂分子末端的唾液酸受体结合。HA 蛋白疏水的羧基端嵌入病毒囊膜中，亲水的氨基端突出于病毒颗粒的表面，形成纤突，通过与宿主细胞表面的唾液酸结合，促进病毒进入宿主细胞。HA1 和 HA2 通过共平移易位到内质网腔并最终转移到表面<sup>[26]</sup>。

针对 HA1 蛋白的抗体对于预防 AIV 感染至关重要，且 HA 切割位点中氨基酸的序列是影响病毒致病性重要因素之一<sup>[27]</sup>。

HA 蛋白的氨基端有一个信号肽（由 16 个疏水氨基酸组成）<sup>[28]</sup>。HA 蛋白在核糖体中合成后，以 HA0 前体蛋白的形式存在，之后进入内质网中，在分子伴侣协同作用下形成三聚体，通过糖基化、乙酰化等加工修饰、由信号肽酶切除信号肽后，通过高尔基体将其运输出细胞至细胞表面<sup>[29]</sup>。HA0 蛋白在感染宿主细胞过程中，蛋白酶在

其裂解位点将 HA0 切割为 HA1 和 HA2 两条肽链分子，在此基础上，病毒感染细胞后才会发挥作用<sup>[30]</sup>。据报道，HA 蛋白晶体结构已经被解析出来，最突出的特点是，即便氨基酸的序列同源性不高于 50%，但是其结构和功能依旧高度保守<sup>[31]</sup>。

HA 蛋白的受体结合特性是 AIV 跨宿主传播的重要因素，与人类流感大流行的病毒的产生有密切关系，其主要功能是促进受体结合和膜融合，并且可以在病毒颗粒出芽和形态发生过程中起重要的作用<sup>[32]</sup>。有报道以 HA 蛋白为基础构建的疫苗从不同亚型 AIV 中诱导出可中和 HA1 蛋白的抗体，接种疫苗的小鼠肺脏病毒滴度明显较低，病毒对于细胞的浸润水平与对照组接种普通疫苗的小鼠相似<sup>[33]</sup>。

## (2) NP 蛋白

NP 基因是 IAV 基因组的第五段，包括 1540 个核苷酸，编码得到 498 个氨基酸的 NP 蛋白。它是高度保守的，是 IV 感染细胞中表达最丰富的蛋白质。NP 蛋白是 T 淋巴细胞识别的主要抗原，具有 RNA 聚合酶活性，在病毒 mRNA、cRNA、vRNA 的合成过程中起重要作用<sup>[34]</sup>。NP 蛋白的主要功能之一是由 vRNA 介导的与 PB2 的“帽子”结构域的具有相互作用，这有利于宿主细胞核中 cRNA（转录）和 vRNA（复制）合成的快速启动<sup>[35]</sup>。NP 蛋白与 vRNA 的结合以非均匀的方式发生，是基因组包装<sup>[36]</sup>和维持 vRNPs 的稳定性和螺旋结构所必需的<sup>[37]</sup>。此外，NP 蛋白通过核输出信号（Nuclear export signal, NES）和核定位信号（Nuclear localization signal, NLS）<sup>[38]</sup>参与 vRNPs 的在细胞核内的转运过程，因此，对 AIV 的复制有重要促进作用。

由于 NP 蛋白具有多种功能，而且从不同宿主分离出来的不同亚型 AIV 毒株之间的序列高度保守，已经成为一个备受瞩目的抗病毒药物靶标蛋白。据报道，E339-R416 盐桥是形成 NP 蛋白多聚体结构所必需的，也是发挥 vRNP 活性所必需的，研究表明 E339A 和/或 R416A 位点突变后的 NP 蛋白功能可以抑制 AIV 的复制；根据 X 射线晶体学和电子显微镜观察，自然状态下病毒粒子中的 NP 蛋白以三聚体形式存在，而 E339A 和 R416A 位点突变体以单体形式存在<sup>[39]</sup>。因此，它们成为潜在的抗病毒药物靶点。2017 年报道发现了一串保守的 5 个氨基酸，并对 NP 结构域内由 Y289、K293、E294、Q308 和 N309 组成的保守的 5 个氨基酸区域进行了表征，并表明虽然单个突变体 Y289G、K293G、E294G、Q308G 和 N309G 仅在病毒 RNA 合成中发挥了冗余作用，但双突变体 K293G/E294G 在 mRNA 合成中表现出最明显的缺陷，这表明其可以成为的抗病毒目标，以减少 AIV 的复制<sup>[40]</sup>，而成为潜在的药物靶点。

此外，NP 也被认为与宿主的特异性有关。有报告提出，人类的粘病毒抗性蛋白（Myxo virus resistance protein A, MxA），是一种干扰素诱导的人类抗病毒蛋白，可能会限制 AIV 从禽类向人类的种间传播；然而，AIV 的适应性突变可能使它们能够逃避 MxA 的限制，因此，会促进种间传播。有报道 2009 年大流行的流感病毒 NP 的适应性突变使它们能够解除 MxA 的限制，从而造成中间传播<sup>[41]</sup>。因此，NP 蛋白在



AIV 的宿主特异性中发挥了重要作用。

### (3) NA 蛋白

NA 基因是 AIV 基因组的第六段基因组，由 1434 个核苷酸组成，编码成 469 个氨基酸的 NA 蛋白。NA 蛋白是一种同源四聚体表面糖蛋白，呈蘑菇状，四聚体的每个蛋白单体由头部、茎部、跨膜区组成，茎部结构域锚定在病毒粒子的膜上<sup>[42]</sup>。NA 的酶活性可裂解末端唾液酸，导致 AIV 感染细胞表面的糖缀合物被破坏，NA 可以清理宿主细胞通道<sup>[43]</sup>，子代病毒从感染的宿主细胞中释放，有利于病毒粒子在宿主体内的扩散。NA 还裂解哺乳动物的呼吸系统中粘蛋白和纤毛上存在的受体，导致病毒的子代从细胞中逃出<sup>[44]</sup>，引发上皮细胞中的 AIV 感染<sup>[45]</sup>，辅助病毒进入宿主细胞<sup>[46]</sup>。

HA 和 NA 之间需要相互作用，以感染宿主并产生子代<sup>[47, 48]</sup>。大多数流感病毒（Influenza virus, IV）毒株在 pH 值为 5.5-6.5 时 NA 的活性最强<sup>[49]</sup>；然而，据报道，少数 IV 在较低的 pH 值（4.0-5.0 之间）下依然具有稳定的 NA 活性。当处在较低 pH 环境中触发 HA 受体结合酶失活，从而导致 NA 活性显著降低，表明 NA 的酶功能依赖于 HA 受体是否结合<sup>[50]</sup>。NA 或 HA 的进化会对病毒的附着、复制或传播产生负面影响，则可能需要其他特定的突变来恢复活性<sup>[51]</sup>。当 LPAIV 当获得宿主受体结合活性的 NA 糖蛋白发生 D151G 单个氨基酸突变时<sup>[52]</sup>，可促进 NA 与人 $\alpha$ -2,6 以及禽 $\alpha$ -2,3 SA 受体的亲和力。据报道，NA 位点发生突变可以增强病毒与人类体内受体的结合能力，虽然不影响 AIV 感染禽的高致病能力，但 NA 突变调节了 AIV 在小鼠中的毒力和复制，总之，NA 突变在哺乳动物感染中发挥不同的作用，而不影响在禽体内的致病力或传播<sup>[53]</sup>。

### (4) PB 蛋白

聚合酶蛋白由三个亚基组成：PB1、PB2、PA，在宿主因子的参与下，共同完成病毒基因的转录和复制。PB1 基因是 AIV 基因组的第二段基因，包含 2316 个核苷酸，编码 1 个氨基酸的 PB1 蛋白。PB1 蛋白结合宿主细胞 5'端的帽状结构，以促进 mRNA 和 vRNA 的合成。在大多数 AIV 毒株中，PB1 基因还编码 PB2-F79 蛋白<sup>[54]</sup>。有些高致病性 AIV 毒株的 PB1 基因可以编码表达较长的 PB1-F2 蛋白多肽，该多肽包含约 90 个氨基酸<sup>[55]</sup>。PB1-F2 蛋白的表达可以通过上调聚合酶活性<sup>[56, 57]</sup>和诱导细胞凋亡来增强 AIV 的致病性<sup>[58]</sup>。

PB2 基因是 AIV 基因组的第一段基因，包含 2316 个核苷酸，它编码 759 个氨基酸的 PB2 蛋白。PB2 蛋白是由 N 端（PB1 结合位点）和 C 端（宿主蛋白互作域）组成，是 vRNP 复合物的组成部分<sup>[59]</sup>，也是 AIV 宿主范围、致病性、毒力的主要决定因素<sup>[60]</sup>。PB2 蛋白与 PB1 和 PA 亚基进入宿主细胞核的方式不同，它被单独转运到宿主细胞核<sup>[61]</sup>。PB2 蛋白与导入蛋白 $\alpha$ 1 结合介导病毒转运到宿主细胞核<sup>[62]</sup>。对 PB2 蛋白进行定位，显示该蛋白在 AIV 感染的宿主细胞线粒体中<sup>[63, 64]</sup>，调节 AIV 感染期间的

宿主细胞线粒体活力，以利用宿主细胞能源进行生长复制，造成宿主感染<sup>[65]</sup>。此外，PB2 具有“帽子”结构特定独立折叠结构域，可通过促进与宿主 mRNA 的 5' 端结合以来促进 RNA 的结合，这是在宿主细胞核中合成病毒 mRNA 所必需的。

PA 蛋白具有核酸内切酶活性、蛋白酶活性、核定位功能，可以结合 vRNA 和 cRNA 启动子，可以促进病毒基因组的转录和复制<sup>[66]</sup>。

#### (5) M 蛋白

M 基因是 AIV 基因组的第七段基因，由 1002 个核苷酸组成，转录翻译产生 2 种蛋白质：M1 蛋白、M2 蛋白。M1 蛋白是病毒包膜中最丰富的 AIV 蛋白，M1 蛋白在脂质包膜内部，在脂质膜正下方的薄膜层正是由它形成的<sup>[67]</sup>，其功能与维持病毒包膜形态结构相关。M1 蛋白从病毒粒子脂质膜中分解，导致 AIV 病毒粒子不稳定并进行分解，随后 vRNP 释放到宿主细胞质中<sup>[68]</sup>。组氨酸残基在病毒粒子进入宿主体内晚期后，充当 pH 传感器，感受到环境为低 pH 值时，病毒粒子的构象就会发生变化<sup>[69]</sup>。M1 蛋白的另一个关键功能是它介导在 vRNP 的核输出<sup>[70]</sup>，在 AIV 病毒粒子组装过程中起重要作用。M1 蛋白由于其具有膜结合能力，出芽病毒粒子的脂质包膜与其他成分之间的紧密相互作用<sup>[71]</sup>。

M2 蛋白以四聚体质子通道的形式存在<sup>[72]</sup>，并由剪接的 mRNA 编码而成<sup>[73]</sup>。M2 蛋白可以修饰包膜的表面，充当离子通道，在膜内病毒脱壳中发挥作用。病毒进入宿主细胞时，宿主体内低 pH 值环境触发细胞膜膜和病毒粒子的膜融合，随后打开 M2 质子通道，导致 vRNP 与 M1 蛋白解离，释放到宿主细胞质中<sup>[74]</sup>。M2 在 AIV 复制周期中的另一个基本功能是它参与病毒粒子出芽，在病毒粒子颈部的定位有助于出芽。M2 蛋白的免疫原性较弱，不会诱导产生中和抗体，但会减少病毒复制。

#### (6) NS 蛋白

由 NS 基因编码蛋白质有两种，NS1 和 NS2<sup>[75]</sup>。其中 NS1 是一种调节蛋白，具有多种功能，是 mRNA 剪接和翻译的调控原件，含量较少，可以与 RNP 结合，介导细胞核中新合成的 RNP 的输出<sup>[76]</sup>。在宿主细胞的抗病毒系统与病毒拮抗时起重要作用，与 AIV 毒株的致病性有直接关系。

### 1.2.3 Nb 概述

Nb 基因片段具有特殊结构，只包含 1 个铰链区、1 个 VHH 区和 2 个常规恒定区（CH2 与 CH3 区），VHH 区具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及与抗原的结合活性，其分子质量只有单克隆抗体的十分之一，是迄今为止获得的结构稳定且具有抗原结合活性的最小抗体单位<sup>[77]</sup>。

首先，Nb 的互补决定区 3（CDR3）比单克隆抗体的 VH 结构域（重链的可变结构域）相似甚至更长。前者由 3 到 28 个氨基酸（AA）组成，而后者只有 8 到 15

个 AA。其次, Nb 可以形成类似手指的结构, 以识别单克隆抗体无法获得的空腔或隐藏的表位。这一特性不仅增强了纳米抗体的结合亲和力和特异性, 而且还能够发现新的药理学靶标, 包括受体结合袋装位点或酶活性位点。第三, Nb 表现出优异的稳定性、亲水性和水溶性, 有助于在不同条件下保持其结合亲和力, 这可以通过在 CDR 区中突变关键 AA 来进一步加强。

综合来说, Nb 的优点包括分子质量小、体积小<sup>[78]</sup>, 耐热性强、稳定性高、组织穿透力强、抗原结合能力强、水溶性好、易于通过体外重组表达高质量稳定生产等<sup>[79]</sup>, 在疾病诊断、疾病治疗、病原检测、药物残留分析、环境监测等领域<sup>[80]</sup>具有巨大的应用潜力, 近年来受到了极大关注。

## 1.2.4 Nb 筛选方法

### 1.2.4.1 噬菌体展示技术

噬菌体展示技术是指把外源基因倒入噬菌体载体基因中, 使其与噬菌体外壳蛋白仪器融合表达, 并随着噬菌体组装过程在其头部完整表达并展示。利用噬菌体展示技术已成为筛选特异性 Nb 最常用的方法。

1997 年, Arbabi 等<sup>[81]</sup>通过噬菌体展示技术筛选到了第 1 株 Nb。首先使用抗原免疫骆驼科动物 4~5 次, 刺激骆驼科动物体内产生成熟的靶向抗原特异性抗体, 建立起抗体库, 再经过噬菌体展示技术对抗体库进行筛选, 以获得特异性强、亲和力高的抗体。操作流程包括: 采集外周血分离淋巴细胞 (Peripheral blood mono nuclear cell, PBMC), 提取 RNA, 逆转录合成 cDNA; 用巢式 PCR 扩增 VHH 基因并构建至噬菌体展示载体, 转化至大肠杆菌; 利用辅助噬菌体使抗体展示于噬菌体表面, 洗脱并扩增与靶抗原特异性结合的重组噬菌体, 并通过大量扩增、沉淀、溶解等操作获得重组噬菌体; 经过 3~5 轮生物富集筛选后, 即可获得特异性抗体。

噬菌体展示技术的核心是筛选抗体所用噬菌体的生物学。不同的噬菌体系统可用于噬菌体展示, 包括 T4、 $\lambda$  以及 M13 噬菌体<sup>[82]</sup>, 不同的噬菌体系统各有优缺点。然而, M13 噬菌体被广泛应用, M13 噬菌体属于一组丝状噬菌体<sup>[83]</sup>, 统称为 Ff 噬菌体<sup>[84]</sup>。F 噬菌体仅感染表达 F 毛的大肠杆菌菌株, 因为噬菌体对细菌的吸附需要噬菌体外壳蛋白与 F 毛尖端结合<sup>[85]</sup>。

构建抗体噬菌体展示文库可用于筛选不同的抗体, 包括重链人抗体片段、骆驼和鲨鱼抗体片段、单链抗体、二价单链抗体和全片段抗原结合抗体<sup>[86]</sup>。将这些抗体基因片段克隆于 M13 噬菌体的 G13P 基因上, 可以获得大量编码抗体片段的基因, 最后生成大型噬菌体展示抗体库, 从抗体库中筛选许多特异性不同的抗体<sup>[87]</sup>。

噬菌体展示技术筛选特异性抗体是一种高通量方法, 用于发现针对不同抗原的特异性抗体。该方法主要包括五轮步骤: 第一步是添加噬菌体文库, 其中将文库添加到

呈现抗原的孔或小瓶中，抗原呈递可以通过直接包被、吸附或通过捕获系统（如链霉亲和素-生物素<sup>[88]</sup>）来实现；第二步涉及结合，其中显示最高亲和力抗体的噬菌体结合抗原的表位，然后洗涤多次以去除非结合噬菌体；洗涤后，通过使用胰蛋白酶或其他洗脱方式（如稀酸或碱），通过消化将结合的噬菌体洗脱下来；消化结束后，没有结合抗体片段的噬菌体感染性消失，从而排除了没有结合抗体片段的抗体噬菌体的干扰；同时，添加辅助噬菌体以扩增大肠杆菌中洗脱的具有感染性的噬菌体。为了累积结合了高亲和力抗体片段的噬菌体，这五个步骤通常与新一轮淘选、扩增噬菌体的方法重复 1-3 次。最后通过滴定试验鉴定噬菌体聚集情况，监测噬菌体筛选数目进展，通过 phage-ELISA 试验用于确认阳性噬菌体。

#### 1.2.4.2 酵母双杂交筛选

酵母双杂交筛选是从免疫文库中筛选出高亲和力 Nb 的有效手段，其文库构建与噬菌体展示过程基本相同。使用酵母双杂交系统鉴定蛋白质-蛋白质相互作用基于 GAL4 转录因子的结构域结构<sup>[89]</sup>。可配对的蛋白质融合到 DNA 结合结构域上，可充当诱饵结构，候选交互器或潜在交互器库融合到激活域以充当猎物结构。含有诱饵和猎物结构的载体使酵母菌株 MaV203 分别在缺乏亮氨酸和色氨酸的培养基中生长，这可以用于代替抗生素来选择阳性转化子<sup>[90]</sup>。MaV203 酵母包含三个独立的报告基因的结构，在其启动子中含有 GAL4 结合结构域。编码的氨基酸在缺乏组氨酸或尿嘧啶的培养基上有生长的能力，或提供 $\beta$ -半乳糖苷酶活性。如果候选诱饵和猎物融合在酵母细胞核中有相互作用，则恢复 GAL4 活性并载入报告基因；如果没有相互作用，则没有报告基因活性。

简单来说，酵母双杂交筛选首先构建带有抗原基因的诱饵质粒，然后将诱饵菌与文库菌混合杂交，待杂交产物在显微镜下观察到三叶草样杂合体时，离心收集菌体涂布于选择性平板，如菌落生长且发蓝，则初步鉴定为阳性克隆；将文库质粒与诱饵质粒一同转化至感受态细胞中进行验证，对共转验证阳性的质粒进行测序，即可得到特异性 Nb 的基因序列。

#### 1.2.4.3 mRNA 展示技术

mRNA 展示技术又被称为核糖体展示技术，该技术的本质是利用形成的 mRNA-核糖体-蛋白质三聚体复合物（Protein-ribosome-mRNA, PRM），通过核糖体把新生蛋白和其 mRNA 联系起来。最早的 mRNA 展示系统利用 E.coli S30 进行肽的筛选<sup>[91]</sup>，合成的 DNA 文库编码氨基酸序列通过随机加入氯霉素终止翻译，产生多核糖体复合物。肽表位的特定复合物通过靶定抗体进行捕获，得到的多核糖体加入 EDTA 使其分解释放绑定的 mRNA，进而通过 RT-PCR 反转录成 cDNA。随着科学发展，研究出真核 mRNA 展示系统 ARM（antibody-ribosome-mRNA, ARM）被用于功能性单链抗体

片段的筛选<sup>[92]</sup>。通过删除终止密码子产生真核 PRM 复合物,产生的 PRM 复合物随后通过抗原包被的磁珠进行捕获,mRNA 通过 RT-PCR 无需解离核糖体复合物就可得到相应的 DNA。而特异抗体则可以从突变文库中进行富集,改进的 ARM 展示还可在 mRNA 中引入突变,用于体外蛋白质定向进化和酶的筛选<sup>[93]</sup>。

mRNA 展示作为体外展示技术,mRNA 展示技术可以在严苛的抗原结合条件下进行,以确保筛选到高度特异、稳定的结合对象<sup>[94]</sup>。

### 1.2.5 Nb 的应用

Nb 是来自驼类动物血清中的抗体,通过对 Nb 的基因组进行操纵、编辑,可以制备多价或者具有强特异性的 Nb,达到比传统抗体(多克隆抗体、单克隆抗体等)更强的效果。有研究构建了 H5N1 亚型 AIV 的噬菌体展示文库,筛选出抗 H5N1 亚型 AIV 的特异性 Nb,结果显示该 Nb 具有高亲和力和强反应能力,构建链霉素-生物素-Nb 复合蛋白,建立定向双抗体夹心 ELISA 方法,结果显示检测最低值为 14.1 ng<sup>[95]</sup>,而商用诊断试剂盒显示最低的检测浓度为 100 ng。

当 Nb 被用作药物治疗疾病时,与单克隆抗体的作用具有相似性,但也有不同点。与单克隆抗体相似,Nb 也可以与跨膜受体或者可溶性受体结合,结合后调节受体下游的信号通路。与单克隆抗体不同的是,Nb 含有较长的互补决定区(Complementarity determining regions, CDR)结构域,缺乏 Fc 结构域,单克隆抗体无法进行结合的表位,Nb 可以与其结合,这就促进了疫苗或者治疗性药物的新型靶点的研究<sup>[96]</sup>。最新研究表明,Nb 在对 AIV 的预防、治疗方面具有很大的潜力。有研究利用筛选得到 H5N1 亚型 AIV-HA 蛋白的 Nb,通过鼻内注射途径免疫实验小鼠,结果显示,Nb 免疫后的小鼠,能明显抑制 H5N1 亚型 AIV 在体内的复制,而且二价 Nb 免疫后的实验小鼠,比单价 Nb 免疫后的效果强 60 倍,明显抑制病毒在小鼠体内的复制<sup>[97]</sup>。另一项研究通过筛选获得 H5N2 亚型 AIV 的 Nb,对 Nb 基因序列进行编辑,添加一种特殊的线圈序列-异亮氨酸拉链结构域,构建具有三聚体平行构象的 Nb-异亮氨酸拉链结构域复合蛋白,结果显示,抗体复合物对于 H5N2 亚型 AIV 的中和能力有了显著提升,通过腹腔或鼻内注射免疫小鼠后,保护小鼠免受 H5N2 亚型 AIV 的致死性感染<sup>[98]</sup>。

## 1.3 研究思路和研究方法

在以上研究背景的基础上,本研究拟建立噬菌体展示文库,从中筛选得到具有良好反应特性的 Nb,从而为 H5N6 亚型 AIV 新型检测试剂的开发提供理论依据。

本研究利用 H5N6 亚型 AIV-NP 蛋白和 HA1 蛋白免疫羊驼,测定羊驼血清中 IgG 抗体效价;提取羊驼外周血淋巴细胞中的 RNA,巢式 PCR 扩增得到 *VHH* 基因,构建噬菌体展示文库,测定该文库库容量、阳性率;以 H5N6 亚型 AIV-NP 蛋白和 HA1

蛋白为靶向抗原蛋白，利用噬菌体展示技术进行筛选，获得特异性 Nb 序列；构建 Nb 真核表达重组质粒，进行分泌表达，纯化得到 Nb；通过血凝抑制试验、间接 ELISA、蛋白免疫印迹试验、间接免疫荧光试验对 Nb 的亲合力、特异性等生物活性进行鉴定，最终获得亲合力强、反应活性良好的 Nb，为 AIV 检测方法的开发提供生物原材料。

## 第二章 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 质粒、细胞、蛋白

HEK293T、HEK293F、A549、MDCK 细胞由中国农业科学院兰州兽医研究所动物病毒分子生态学创新团队保存，pRK-NP、pRK-HA1 质粒由中国农业科学院兰州兽医研究所动物病毒分子生态学创新团队构建保存，H5N6 AIV-HA1 蛋白由中国农业科学院兰州兽医研究所动物病毒分子生态学创新团队保存。

#### 2.1.2 毒株、实验动物

H1N1 亚型、H3N2 亚型和 H9N2 亚型流感病毒灭活毒株由中国农业科学院兰州兽医研究所动物病毒分子生态学创新团队分离鉴定并保存，羊驼购自于甘肃省武威市。

#### 2.1.3 主要试剂

DMSO、羊抗鼠 IgG-HRP 均购自 Sigma 公司；Clone easy 培养基购自博奥龙公司；脱脂乳购自 BD 公司；RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司；ELISA 板、DMEM 培养基购自 HyClone 公司；DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 OMEG 公司；DAPI 购自碧云天公司；脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司；NP 抗体购自 Sino Biological 公司；DNA Marker、预染蛋白质分子量标准购自 Takara 公司；限制性内切酶购自 NEB 公司；2×Taq 酶购自 Takara 公司；M-MLV 反转录酶购买于 Promega 公司；ECL 化学发光底物购自 Millipore 公司；Western 相关试剂购自碧云天生物技术公司；硝酸纤维素膜购自 Life Science 公司；DMEM、Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司；Ni Bestarose FF 层析介质、Protein A 抗体亲和介质购自博格隆公司；本研究所用引物均由北京擎科生物技术有限公司合成。

#### 2.1.4 主要仪器

生物安全柜购自苏州苏洁净化设备有限公司；高通量组织研磨器购自德国 QIAGEN 公司；高速低温离心机购自美国 Thermo Fisher 公司；蛋白电泳槽、转膜槽、微型垂直槽、多板灌胶器购自中国天能；e-Blot 电子压片成像仪购自伊宇特公司；蛋白凝胶电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司；PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司；光学倒置显微镜及荧光显微镜购自日本尼康公司；SX 型 X 光胶片洗片机购自泰兴市苏星有限公司；小型冷冻离心机、恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱、酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司；低

温高速离心机购自 Beckman 公司；电子天平购自 Sartorius 公司。

### 2.1.5 主要溶液配制

(1) 10×PBS (磷酸缓冲盐溶液)：称取 137 mM NaCl 80 g；7 mM KCl 2 g；10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 35.8 g；2 mM KH<sub>2</sub>PO 42.7 g；加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L，于室温保存。

(2) 1×PBST：量取 100 mL 10×PBS 溶液，吸取 1 mL Tween-20 试剂，加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L。

(3) Tris-HCl (1 M)：称取 121.1 g Tris，用 800 mL 蒸馏水溶解，加浓盐酸调 pH 至所需值。置于室温，使溶液冷却至室温后，方可最后调定 pH 值。加水定容至 1 L。分装后高压蒸汽灭菌，冷却后保存于室温。

(4) LB 液体培养基：称取 Yeast Extract 5 g；Tryptone 10 g；NaCl 10 g。高压蒸汽灭菌，冷却后保存于室温。加入抗生素后保存于 4℃。

(5) 卡那霉素 (1000×)：称取 1 g 卡那霉素溶于 10 mL 水，使用 0.22 μm 滤器过滤除菌分装保存于 -20℃。

(6) 10×TBS：称取 NaCl 35.064 g；Tris 9.68 g；使用浓盐酸调 pH7.6，定容分装后高压蒸汽灭菌，冷却后保存于室温。

(7) 1×TBST：量取 10×TBS 100 mL；Tween-20 1 mL；ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L。

(8) 50×TAE：称取 24.2 g Tris 碱；5.71 mL 冰乙酸；10 mL 0.5 M EDTA (pH8.0) 加入 ddH<sub>2</sub>O 定容于 1 L 后保存于室温，可重复使用 1-2 次。

(9) 5%脱脂牛奶：称取脱脂牛奶 2.5 g，加入 1×TBS 定容至 50 mL。

(10) 4%多聚甲醛：称取多聚甲醛 4 g，先加入 70 mL ddH<sub>2</sub>O，加入少量氢氧化钠固体使多聚甲醛粉末充分溶解，边加边混匀，待溶解完全后用浓盐酸调 pH 值至 7.0，最后加入 PBS 定容至 100 mL。注意：多聚甲醛对呼吸道、皮肤具有强烈刺激性，可致呼吸道过敏，眼睛灼伤。请在通风处配制，防止对自身呼吸道及皮肤造成损伤。

(11) 5×Running Buffer：称取 15 g Tris 碱，70 g 甘氨酸，5 g SDS，加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L 保存于室温。

(12) 10×Transfer Buffer：称取 144 g 甘氨酸；30 g Tris 碱；定容至 1 L 后保存于室温。

(13) 1×Transfer buffer (工作液)：量取 100 mL 10×Transfer buffer，200 mL 无水甲醇，加入 700 mL ddH<sub>2</sub>O。

(14) 1.5 M Tris-HCl (pH8.8)：称取 181.71 g Tris 碱，浓 HCl 调 pH8.8，加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L，分装后高压蒸汽灭菌，冷却后保存于室温。

(15) 1 M Tris-HCl (pH6.8)：称取 121.141 g Tris 碱，浓 HCl 调 pH6.8，加入 ddH<sub>2</sub>O 定容后高压蒸汽灭菌，冷却后保存于室温。



(16) 6×SDS Loading buffer for 100mL: 量取 30 mL 1 M Tris-HCl (pH6.8), 60 mL 甘油, 称取 12 g SDS, BPB (溴酚蓝) 600 mg, 加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 100 mL (工作液: 每 10 mL 6×SDS Loading buffer 加入 600 μL β-巯基乙醇配制后使用)。

(17) 考马斯亮蓝染色液: 称取 1 g 考马斯亮蓝 R-250 粉末, 量取 250 mL 异丙醇, 100 mL 冰醋酸, 加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L。

(18) 考马斯亮蓝脱色液: 量取冰醋酸 100 mL, 无水乙醇 50 mL, ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L。

(19) 10%AP (过硫酸胺): 称取 1 g 过硫酸胺定容于 10 mL 水, 保存于 4°C。

(20) 10%SDS: 称取 1g SDS 定容于 10 mL 水, 常温保存。

(21) 13 块 10% SDS-PAGE 胶: 分离胶配方: ddH<sub>2</sub>O 48 mL; 30%丙烯酰胺 39.6 mL; 1.5M Tris-HCl (pH8.8) 30 mL; 10%AP 1.2 mL; 10% SDS 1.2 mL; TEMED 48 μL; 浓缩胶配方: ddH<sub>2</sub>O 34 mL; 30%丙烯酰胺 8.3 mL; 1.0M Tris-HCl (pH6.8) 6.3 mL; 10%AP 0.5 mL; 10%SDS 0.5 mL; TEMED 50 μL。

## 2.2 方法

### 2.2.1 NP 蛋白的表达

#### 2.2.1.1 NP 载体重组质粒构建及验证

将 NP 基因序列进行密码子优化并合成, 通过同源重组与 pcDNA3.1 载体 (His 标签) 连接, 体系见表 2-1。

表 2-1 NP 重组质粒构建体系

Tab. 2-1 NP recombinant plasmid construction system

反应液体	加样体积
5×CE II buffer	4 μL
pcDNA3.1 载体	50-200 ng
NP	20-200 ng
Exnase II	2 μL
H <sub>2</sub> O	补足 20 μL

于冰上配制体系后, 用移液枪轻轻吹打混匀, 短暂离心后, 37°C, 30 min, 立即冰浴 5 min, 取 10 μL 产物加入冰上放置的 DH5α感受态细胞中, 冰浴 30 min, 42°C 金属浴 1 min, 冰上静置 5 min, 加入 700 μL 预热的液体无抗性 LB 培养基, 置于 37°C

恒温摇床中培养 45 min，取出 8,000 r/min 离心 2 min，弃掉 500  $\mu$ L 上清，吹打混匀沉淀，吸出 100  $\mu$ L 涂布含博来霉素（Phleomycin D1, Zeocin）抗性的固体平板培养基上，置于 37°C 恒温箱培养 16 h，挑取平板上的单克隆菌株接种于 Zeocin 抗性液体 LB 培养基中，37°C 恒温摇床中培养 16 h，取出提取质粒，操作如下：

- （1）将过夜培养的菌液转移至无菌 2 mL 离心管中，11,000 r/min 离心 2min 后，弃上清；
- （2）加入 250  $\mu$ L 溶液 I，涡旋震荡，充分混匀至管中无明显菌液沉淀；
- （3）向管中加入 250  $\mu$ L 溶液 II，轻轻混匀，静置 2-3 min，此时管中液体变得清澈；
- （4）加入 350  $\mu$ L 溶液 III，轻轻混匀，出现乳白色絮状物质，11,000 r/min 离心 10 min；
- （5）轻轻将上清液转移至吸附柱中，11,000 r/min 离心 1 min，弃收集液；
- （6）向吸附柱中加入约 500  $\mu$ L HBC Buffer，11,000 r/min 离心 1 min，弃收集液；
- （7）向吸附柱中加入约 700  $\mu$ L DNA Wash Buffer，11,000 r/min 离心 1 min，弃收集液，重复此步骤一次；
- （8）吸附柱于 12,000 r/min 空离 2 min。将吸附柱转移到新的 1.5 mL 离心管上，用 35-50  $\mu$ L 的 Elution Buffer 或者 ddH<sub>2</sub>O 溶解质粒。

将提取的质粒进行 PCR 鉴定，鉴定体系见表 2-2，NP 重组质粒鉴定引物见表 2-3。反应程序为 95°C 预变性 3 min，95°C 变性 1 min，58°C 退火 30 s，72°C 延伸 90 s，30 个循环，72°C 终延伸 10 min。

表 2-2 pcDNA3.1-NP 重组质粒 PCR 体系

Tab. 2-2 PCR system of pcDNA3.1-NP recombinant plasmid

反应液体	加样体积
2×Taq	10 $\mu$ L
NP-R	1 $\mu$ L
NP-F	1 $\mu$ L
pcDNA3.1-NP	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	补足 20 $\mu$ L

表 2-3 NP 重组质粒鉴定引物

Tab. 2-3 NP identification primers

引物名称	序列 (5'→3')
NP-F	GTCCAGTGTGGTGGAAATTCGCCACCATGTTCGTGTTTCCTTGTGCTTC TGCCGCTGGTGTTCATCTCAGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCTTA
NP-R	CGCGGGCCCTCTAGACTCGAGTCAGTGATGGTGGTGGT GGTGGTGGTGGTG ATTTTCAAACCTCTGCATTGTCTC

使用 *EcoR* I、*BsiW* I 进行双酶切鉴定，于冰上配制表 2-4 体系，加入所有液体后轻弹管壁混匀，瞬时离心将液体离心至管底，置于 37°C 金属浴 2 h，进行琼脂糖凝胶电泳。

表 2-4 双酶切体系

Tab. 2-4 Double digestion system

反应液体	加样体积
10× buffer	2.5 μL
pcDNA3.1-NP 质粒	1 μL
<i>EcoR</i> I	1 μL
<i>BsiW</i> I	1 μL
H <sub>2</sub> O	补足 20 μL

### 2.2.1.2 NP 重组蛋白的表达及纯化

取无菌的 1.5 mL EP 管，每管加入 500 μL Opti-MEM，每管加入 4 μg pcDNA3.1-NP 质粒，吹打混匀；另取无菌的 1.5 mL EP 管，每管加入 500 μL Opti-MEM 和 35 μL 转染试剂，轻轻吹打混匀，室温静置 5 min；将前两步的混合液移至同一管中，轻轻吹打混匀，于室温孵育 15 min；将反应混合液全部加入 HEK293F 细胞瓶中，置于 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培养 7 d 进行表达；4,000 r/min 离心 10 min 收获表达培养液，利用 Ni Bestarose FF 层析介质纯化目的蛋白。

纯化目的蛋白操作如下：

(1) 使用 0.45 μm 滤器过滤上清，取出 100 μL 作为挂柱前样品，剩余液体与 5 mL Ni Bestarose FF 层析介质在摇床上室温孵育 2 h，将孵育的上清自然流出，收集流出液体 100 μL 为挂柱后液体；

(2) 用 10 倍柱体积分含 20 mM 咪唑的洗涤液清洗，收集每次洗涤的液体，取 100 μL 为洗涤液体样品；

(3) 每次用 5 mL 含 80 mM、100 mM 咪唑的洗脱液洗脱柱子 5 次，收集每次的洗脱液，取 100  $\mu$ L 为洗脱液样品；

(4) 每次用 2 mL 含 500 mM 咪唑的洗脱液洗脱柱子 10 次，收集每次的洗脱液，取 100  $\mu$ L 为洗脱液样品。

进行 SDS-PAGE 电泳，收集表达蛋白：向洗脱液样品中加入 20  $\mu$ L 6 $\times$ Loading buffer 制样，100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min；将已配制的 10% 蛋白胶装入电泳槽内，加入新配制的 1 $\times$ running buffer，恒压 80 V 30 min，当样品电泳至分离胶与浓缩胶的分界线时，恒压 150 V 50 min；取出胶块，使用考马斯亮蓝染色、脱色液脱色，观察目标蛋白条带，取含有蛋白洗脱液合并，收获已纯化 NP 蛋白。

蛋白样品的透析及浓缩：取已纯化的蛋白样品，灌入透析袋中，放在 3 L 不含咪唑的平衡缓冲液中，置于 4 $^{\circ}$ C 透析；每 2 h 更换一次平衡缓冲液，换液 5 次；收集透析后样品，置于 100 倍蛋白体积的 8% PEG20000 溶液中，4 $^{\circ}$ C 2 h，能明显看到溶液浓缩后体积减少，利用 BCA 法测定蛋白浓度。

BCA 法测浓度的步骤如下：

(1) 将 BCA 试剂 A 与 BCA 试剂 B 按照 50:1 的比例混合，制备工作液；

(2) 取各个稀释浓度蛋白质标准品和待测蛋白质样品 25  $\mu$ L，加入到微孔板中，做 3 个平行孔重复；

(3) 在每一个孔中加入 200  $\mu$ L 工作液，并在震荡器震荡 30 s，使其充分混合；

(4) 将微孔板密封，在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min；

(5) 将微孔板冷却到室温。使用酶标仪，测量样品在 562 nm 或该波长附近的吸光值，将标准品在 562 nm 处经过空白校正的平均吸光值对其浓度 ( $\mu$ g/mL) 作图，绘制标准曲线，计算浓度。

### 2.2.1.3 NP 蛋白抗原性验证

蛋白免疫印迹试验 (Western blot) 验证 NP 蛋白抗原性，操作如下：

(1) SDS-PAGE 电泳结束后，分离两块胶板，在转膜夹中放置 1 层海绵、2 层滤纸、蛋白胶、硝酸纤维素膜、2 层滤纸、1 层海绵。放置每一层时，用滚筒轻轻碾压，赶走气泡。将转膜槽放入冰水混合物中冷却，按照黑色转膜夹对着黑色转膜槽、白色转膜夹对着红色转膜槽的原则，把转膜夹放入转膜槽内，加入新配制的 1 $\times$ Trans buffer，恒流 600 mA 90 min；

(2) 转膜结束后，将硝酸纤维素膜取出，印有蛋白的一面向上 (剪角做标记)，放入方盒中，加 10 mL 5% 的封闭液 (50 mL 1 $\times$ TBS 中加入 2.5 g 脱脂奶粉，充分溶解)，置于摇床上，室温封闭硝酸纤维素膜 1 h；

(3) 倒掉脱脂奶粉溶液，商用 NP 一抗孵育 (使用 5% 脱脂奶粉溶液 1:2,000 稀

释)，加入 5~10 mL，方盒加盖，放入 4°C 过夜；

(4) 用 0.1%TBST 洗掉没有特异性结合的一抗，每次置于摇床上洗涤 5 min，洗涤 3~5 次；

(5) 将 2 mL 鸡二抗（使用 5%脱脂奶粉溶液 1:500 稀释），倒在方盒中的硝酸纤维素膜上，摇床上室温孵育 30 min；

(6) 用 0.1%TBST 洗涤硝酸纤维素膜 3~5 次，每次 5 min，通过 ECL 化学发光底物结合进行显影，采集图像。

## 2.2.2 噬菌体展示文库的建立

### 2.2.2.1 免疫羊驼后血清效价检测

将 50  $\mu$ g 纯化后的 NP 蛋白与 HA1 蛋白与等体积的弗氏佐剂混合并乳化，采用颈部皮下多点注射免疫羊驼。每隔两周免疫一次，共免疫 5 次，首次免疫时佐剂选用弗氏完全佐剂，之后，使用弗氏不完全佐剂。在免疫结束后 7 d 采集静脉血，及时分离血清，利用间接 ELISA 试验检测血清中的 IgG 抗体效价，操作如下：

使用包被液稀释 NP 蛋白与 HA1 蛋白，100 ng/孔包被 ELISA 板，4°C 过夜，拍干包被液，每孔加入 200  $\mu$ L 0.05%PBST 洗 3 遍，拍干；每孔加入 200  $\mu$ L 2%BSA，37°C 孵育 1 h，弃掉封闭液，每孔加入 200  $\mu$ L 0.05%PBST 洗 3 遍，拍干；使用 PBS 将采集的新鲜血清，按照梯度稀释后，每孔 100  $\mu$ L 加入 ELISA 板中，37°C 孵育 1 h，每孔 200  $\mu$ L PBST 洗涤 ELISA 板 3 次，拍干；加入 1:4,000 稀释的羊驼 IgG（1:2,500 稀释）二抗，37°C 孵育 1 h，每孔 200  $\mu$ L 0.05%PBST 洗 3 遍，拍干；每孔加入 100  $\mu$ L TMB 显色液，室温避光放置 5-8 min；每孔加入 100  $\mu$ L 硫酸终止液终止反应；在 450 nm 波长处测定 OD 值。

### 2.2.2.2 噬菌体质粒与载体的同源重组连接

利用人外周血淋巴细胞分离液分离羊驼外周血淋巴细胞（PBMC），具体操作按照试剂盒按说明书。将分离获得的 PBMC 利用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，操作如下：

(1) 在新鲜外周血淋巴细胞中加入 3 倍体积裂解液，充分振荡混匀；

(2) 混匀后的样品室温放置 5 min，4°C 12,000 r/min 离心 5 min，将上清转入新的无 RNase 的离心管中；

(3) 加入 200  $\mu$ L 氯仿，盖紧盖子，震荡仪振荡 15 s，室温放置 3 min；

(4) 4°C 12,000 r/min 离心 10 min，此时样品分为三层，黄色为有机相，中间层和无色的水相，RNA 大部分存在于水相中。将水相吸出，转移至新的无 RNase 的离心管中；

(5) 缓慢加入 0.5 倍体积的无水乙醇，吹打混匀，有少量沉淀产生，将溶液和

沉淀仪器转移至吸附柱中，4°C 12,000 r/min 离心 1 min，可以分次将全部溶液转移至吸附柱中，离心后弃掉收集管中中的废液。

(6) 向吸附柱中加入 500  $\mu$ L 去蛋白液 RD (预先加入乙醇)，4°C 12,000 r/min 离心 1 min，弃掉废液，将吸附柱放入收集管中；

(7) 向吸附柱中加入 500  $\mu$ L 漂洗液 (预先加入乙醇)，室温静置 2 min 充分晾干残余液体，4°C 12,000 r/min 离心 1 min，弃掉废液；

(8) 将吸附柱转移至新的无 RNase 的离心管中，向吸附柱中加入 30-100  $\mu$ L RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，室温放置孵育 5 min，4°C 12,000 r/min 离心 2 min。

将提取的 RNA 反转录，于冰上配制 RNA 反转录体系 (见表 2-5)，轻弹混匀，瞬时离心，70°C 水浴中放置 5 min，取出放置冰上 10 min，获得 cDNA。

表 2-5 RNA 反转录体系

Tab. 2-5 RNA reverse transcription system

反应液体	加样体积
31 $\mu$ L RNA 溶液+2 $\mu$ L 引物	33 $\mu$ L
M-MLVRT	2 $\mu$ L
RRI	1 $\mu$ L
dNTP	4 $\mu$ L
M-MLVRT Buffer	10 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

根据 GenBank 上发表的 *VHH* 基因序列，设计用于扩增 *VHH* 片段的两对引物，引物序列见表 2-6，第一对引物是 *VHH-CH2-F* 和 *VHH-CH2-R*，用来扩增 *IgG*，*VHH-F* 和 *VHH-R* 是第二对引物，用来扩增 *VHH*，引物均由擎科生物技术有限公司合成。第一轮 PCR 按反应体系见表 2-7。反应程序为反应程序为 95°C 预变性 3 min，98°C 变性 10 s，55°C 退火 10 s，72°C 延伸 30 s，25 个循环，16°C 2 min。

表 2-6 巢式 PCR 鉴定引物

Tab. 2-6 The primers are used amplification and detection of nested PCR

引物名称	引物序列
<i>VHH-CH2-F</i>	GTCCTGGCTGCTCTTCT
<i>VHH-CH2-R</i>	GGTACGTGCTGTTGA
<i>VHH-F</i>	CTACAAATGCCTATGCATCCCAGGTGCAGCTCGTGGAGTC
<i>VHH-R</i>	AAACAACCTTCAACAGTGGAGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG

表 2-7 巢式 PCR 扩增 IgG 体系

Tab. 2-7 Nested PCR amplification of IgG system

反应液体	加样体积
2×Primer STAR max	25 μL
VHH-CH2-F	1 μL
VHH-CH2-R	1 μL
cDNA	1.5 μL
ddH <sub>2</sub> O	补足至 50 μL

第一步 PCR 的产物使用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定、分离，回收 PCR 产物；再以此胶回收产物为模板，进行第二轮 PCR 扩增，反应体系见表 2-8，反应程序为 95°C 预变性 3 min，98°C 变性 10 s，55°C 退火 20 s，72°C 延伸 30 s，25 个循环，16°C 2 min。结束后通过 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定条带，获得的 VHH 基因片段，再行切胶回收。

表 2-8 巢式 PCR 扩增 VHH 体系

Tab. 2-8 Nested PCR amplification of VHH gene system and reaction procedure

反应液体	加样体积
2×Prime STAR max	25 μL
VH	100 ng
VL	100 ng
VHH-F	1 μL
VHH-R	1 μL
cDNA	1.5 μL
ddH <sub>2</sub> O	补足至 50 μL

琼脂糖凝胶回收操作如下：

(1) 切下目的条带转移至 2 mL 离心管中，加入 600-700 μL Binding Buffer，65°C 金属浴 10 min，融化胶条；

(2) 待胶块充分融解后转移至试剂盒的吸附柱中，11,000 r/min 离心 1 min，弃掉收集管中的废液；

(3) 再次向吸附柱中加入 300 μL Binding Buffer 后，11,000 r/min 离心 1 min，弃掉收集管中的废液；

(4) 向吸附柱中加入 700 μL DNA Wash Buffer 后，10,000 r/min 离心 1 min，弃废液；

(5) 重复步骤 (4) 一次；

(6) 吸附柱于 12,000 r/min 空离 2 min，弃废液；

(7) 吸附柱转移至新的 1.5 mL 离心管, 向柱中央加入约 40  $\mu\text{L}$  Elution Buffer (或 ddH<sub>2</sub>O), 静置 1 min, 12,000 r/min 离心 2 min; 收集液保存备用。

将上述产物 *VHH* 和线性化的 pComb 噬菌体载体, 通过同源重组的方法进行连接, 同源重组体系见表 2-9。

表 2-9 同源重组连接体系

Tab. 2-9 Homologous recombination linkage system

反应液体	加样体积
5×CE II buffer	4 $\mu\text{L}$
pComb 载体	50-200 ng
<i>VHH</i>	20-200 ng
Exnase® II	2 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	补足 20 $\mu\text{L}$

于冰上配制体系后, 用移液枪轻轻吹打混匀, 短暂离心后, 37°C, 30 min, 立即冰浴 5 min。

### 2.2.2.3 超级感受态制备

取适量原始 SS 320 冻存菌液, 均匀涂布 2YT 无抗性平板, 37°C 恒温培养箱过夜培养; 用挑取形态良好的单克隆, 接种至适量液体 2YT 培养基中 (同时做阴性空白对照), 37°C 220 r/min 摇床培养 16 h (过夜培养); 取出过夜培养物, 按 1:100 比例接入新鲜 2YT 液体培养基中; 37°C 220 r/min 摇床培养 2~3 h, 每半小时测一次  $OD_{600\text{nm}}$  值, 当  $OD_{600\text{nm}}$  值约 0.3~0.4 时, 停止培养; 冰水浴 30 min (每步操作均应使细胞环境温度接近 0°C, 所有与细胞接触的容器、溶剂等物品均应提前预冷); 将细胞转移至适宜体积的离心管 (预冷) 中, 4°C 5,000  $\times\text{g}$  离心 10 min; 小心弃掉上清 (宁愿损失部分菌体, 也要尽量将上清弃除干净); 使用适量体积预冷的无菌双蒸水重悬细胞, 重复 4°C 5,000  $\times\text{g}$  离心 10 min 后, 尽可能的弃除上清, 重复 1 次, 再次洗涤细胞; 弃除上清, 并利用残余液体涡旋重悬细胞; 使用适量 10% 甘油溶液 (预冷) 重悬细胞, 再次 4°C 5,000  $\times\text{g}$  离心 10 min, 重复 1 次, 再次洗涤细胞; 弃除上清, 估计菌体体积, 加入等体积的 10% 甘油溶液, 使细胞浓度约为  $1\sim3\times 10^{10}$  细胞 / mL; 分装上述细胞悬液, 并使用干冰冻存于 -80°C。

### 2.2.2.4 噬菌体抗体文库的构建与收获

用移液枪在无菌环境中吸取 2.2.3.3 的回收产物于冰上加入 200~300  $\mu\text{L}$  SS320 超级感受态细胞中, 使用 2 mm 电转杯, 条件设置为 2.5 KV, 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ , 进行电转, 为确保电转效率, 可分 2 次进行电转。电转产物重悬于 20~30 mL 37°C 预热的 SOC/KO7



培养基中，置于 37°C 恒温活化 1 h，取 100  $\mu$ L 做 10 倍倍比稀释，选择适宜梯度，吸取 10  $\mu$ L 在含 Carb/Kan 抗生素 LB 固体培养基上进行滴度试验，剩余菌液接种至 200~500 mL 含 Carb/Kan 抗生素的 2YT 液体培养基中，37°C 220 r/min 培养 24 h。

对 LB 固体培养基中过夜生长的菌落进行计数，计算库容，并从平板上随机挑取 11 个单克隆接种于 200  $\mu$ L/管含 Carb 抗生素的液体培养基中，置于 37°C 220 r/min 摇床过夜培养，同时进行 PCR 鉴定，以统计重组效率。引物及鉴定体系见表 2-10、表 2-11，反应程序为 98°C 预变性 10 min，98°C 变性 10 s，58°C 退火 30 s，72°C 延伸 2 min，30 个循环，72°C 终延伸 10 min。

表 2-10 噬菌体载体构建鉴定引物

Tab. 2-10 Phage vector construction identification primers

引物名称	引物序列
pComb 载体-F	AAAGAATATCGCATTTCTTCTTGCATCT
pComb 载体-R	AGGAGACGGTGACCTGGGTCCCCTG

表 2-11 噬菌体载体构建鉴定体系与反应程序

Tab. 2-11 Overlap PCR of system and reaction procedure

反应液体	加样体积
2 $\times$ Taq Mix	10 $\mu$ L
pComb 载体-F	1 $\mu$ L
pComb 载体-R	1 $\mu$ L
单克隆菌液	4 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ L

取出培养产物，收集抗体库重组噬菌体，操作如下：

- (1) 每个库收集 200 mL 过夜培养的菌液，4°C 10,000 r/min 离心 10 min；
- (2) 收集上清，加入 1/4 倍体积的 PEG8000/NaCl，混匀，室温静置 10 min；
- (3) 将混合液离心，4°C 10,000 r/min，10min，弃上清，可见离心管管壁上有噬菌体沉淀；
- (4) 用 PBT 悬浮沉淀，注意轻轻吹打，防止破坏噬菌体；
- (5) 取上清，测定  $OD_{260nm}$  值，用 PBT 稀释，调节浓度至  $OD_{260nm}=4.0$ ；分装为 500  $\mu$ L/管，做好标记，保存于 -80°C。

## 2.2.3 抗 NP 蛋白、HA1 蛋白 Nb 的筛选

### 2.2.3.1 噬菌体文库的筛选与收集

取出获得的噬菌体库，筛选针对靶向 NP 蛋白、HA1 蛋白的 Nb，操作如下：

(1) 抗原铺板：取 100  $\mu\text{L}$  含有 5  $\mu\text{g}$  NP 蛋白、HA1 蛋白分别加入 96 孔板，第一轮每个蛋白包被 8 个孔（之后每一轮每个蛋白包被 1 个孔），置于 4 $^{\circ}\text{C}$ ，包被过夜；

(2) 宿主菌培养：取出冻存的 NEB 5 $\alpha$ F' 甘油菌接种于 5 mL 的新鲜含有 Tet 抗生素的 2YT 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$  220 r/min 摇床中培养，实时监测其  $OD_{600\text{nm}}$  值，待值为 0.1~0.15 时，取出，室温静置；

(3) 弃掉 96 孔板里的包被液，实验组（P 组）每孔加入 200  $\mu\text{L}$  1%PVA，同时设置空白对照（N 组）加入 200  $\mu\text{L}$  1%PVA，37 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中孵育 2 h；

(4) 倒扣弃掉封闭液，用 200  $\mu\text{L}$  0.1%PBST 清洗 4 次后，向实验组孔和空白对照孔中分别加入 100  $\mu\text{L}$  的噬菌体抗体库（保证  $OD_{260\text{nm}}$  的值为 2.0 左右抗体库），37 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱孵育 2 h；

(5) 弃掉抗体库液体，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  0.1%PBST，洗涤 8 次，拍干；

(6) 向孔中加入 100  $\mu\text{L}$  100 mM HCl，室温孵育 5 min，此 5 min，准备 EP 管，每个 EP 管加入 40  $\mu\text{L}$  的 1 M Tris-HCl，5 min 后将蛋白孔和 PVA 孔的液体分别吸入对应的每个 EP 管中，混匀；

(7) 将获得的噬菌体库加入到含 1 mL NEB 5 $\alpha$ F' 菌的 EP 管中，37 $^{\circ}\text{C}$  220 r/min，孵育 1 h；

(8) 1 h 后，向 EP 管中分别加入 1  $\mu\text{L}$  辅助噬菌体（终浓度为  $1 \times 10^{10}$  个/mL）于蛋白管的 EP 管中，37 $^{\circ}\text{C}$  220 r/min 孵育 1 h；

(9) 取出培养物，各取 20  $\mu\text{L}$  培养液进行 10 倍倍比的稀释，稀释  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  梯度，吸取 10  $\mu\text{L}$ ，在含 Carb 和 Kan 抗生素的 LB 固体平板上进行滴度实验，置于 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中过夜；

(10) 将 (9) 剩余培养液转入 35 mL 含 Carb/Kan 抗生素的 2YT 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$  220 r/min 摇床中过夜培养；

重复以上操作三轮，取出每轮筛选后滴度试验的平板，观察计数得到滴度试验的结果，比较每一轮的噬菌体富集程度，监测筛选结果。

收集富集的噬菌体抗体库方法如下：

(1) 取出过夜生长的菌液，做好标记，分别转入 50 mL 离心管中，4 $^{\circ}\text{C}$  10,000  $\times g$  离心 10 min，收集上清；

(2) 加入 1/4 体积预冷的 PEG8000/NaCl 溶液，轻轻振荡混匀，4 $^{\circ}\text{C}$  静置 10 min；

(3) 将混合液离心，4 $^{\circ}\text{C}$  12,000  $\times g$  离心 25 min，收集沉淀弃掉上清，可见离心

瓶壁上有噬菌体沉淀；

(4) 将沉淀再次离心，4°C 10,000 ×g 离心 3 min，使沉淀聚拢在离心管底部；

(5) 用移液枪去除所有上清残留，去除过程重复两次，因为在离心管静置的过程中，会有新的上清产生；

(6) 用 1 mL PBT 轻轻吹打悬浮沉淀，以防破坏噬菌体，将收集的噬菌体标记并存放于-80°C。

### 2.2.3.2 阳性噬菌体鉴定

选取富集现象明显的噬菌体稀释液，吸取 100 μL 涂布于固体培养基，37°C 培养箱过夜培养；取两块高压灭菌后的 96 孔细菌培养板，每孔加入 400 μL 含 Carb 和 Kan 抗生素的 2YT 液体培养基；从富集平板上随机挑取 90 个单菌落，每孔一个单菌落，接种于 96 孔培养板中，37°C 220 r/min 摇床中培养过夜；将菌液离心收获上清中噬菌体，Phage ELISA 鉴定出 P/N 值较大的噬菌体。Phage ELISA 具体操作如下：

用 100 ng/孔 H5N6 亚型 AIV 的 NP 蛋白、HA1 蛋白包被酶标板，4°C 孵育过夜；将酶标板倒扣去掉上清，每孔加入 200 μL 1%PVA，同时未包被蛋白的阴性对照组也加入 200 μL 1%PVA，37°C 封闭 2 小时；将 96 孔培养板离心，8,000 r/min，4°C 离心 10 min；2 h 后，弃掉酶标板中的上清液，用 300 μL PBST 清洗酶标板 3 次后甩干，每孔加入 50 μL 的噬菌体（即 96 孔细菌培养板的上清），室温摇床孵育 2 h；用 300 μL PBST 清洗酶标板 8 次，拍干，加入 HRP-M13 抗体（1: 2,500 稀释）100 μL/孔，37°C 孵育 1 h；弃掉酶标板中的上清液，用 PBST 清洗酶标板 5 次后拍干，每孔加入 100 μL TMB 显色液，室温避光反应 5~8 min；每孔加入 100 μL 硫酸终止液终止反应；在 450 nm 波长处测定各孔 OD 值。

### 2.2.3.3 Nb 基因的获得与分析

选取吸光度值较高的阳性克隆菌液保菌，吸取菌液进行 PCR 反应鉴定，反应体系见表 2-12，反应程序为 95°C 预变性 10 min，95°C 变性 10 s，58°C 退火 30 s，72°C 延伸 1 min，30 个循环，72°C 终延伸 10 min。扩增完进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，观察目的条带，进行凝胶回收。

表 2-12 阳性克隆菌液 PCR 鉴定体系及反应程序

Tab. 2-12 PCR identification system and reaction procedure of positive clonal bacteria

反应液体	加样体积
2×Taq Mix	10 μL
pComb 载体-F	1 μL
pComb 载体-R	1 μL

续表 2-12 阳性克隆菌液 PCR 鉴定体系及反应程序

Tab. 2-12 PCR identification system and reaction procedure of positive clonal bacteria

反应液体	加样体积
单克隆菌液	5 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	4 $\mu\text{L}$
总体积	20 $\mu\text{L}$

将回收后的基因片段与 pcDNA3.1-Fc (人) 真核表达载体同源重组连接, 吸取产物 10  $\mu\text{L}$  加入冰上放置的 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 冰浴 30 min, 42 $^{\circ}\text{C}$  金属浴 1 min, 冰上静置 5 min, 加入 700  $\mu\text{L}$  预热的液体无抗性 LB 培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温摇床中培养 45 min, 取出 8,000 r/min 离心 2 min, 弃掉 500  $\mu\text{L}$  上清, 吹打混匀沉淀, 吸出 100  $\mu\text{L}$  涂布含 Zeocin 的固体平板培养基上, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱培养 16 h, 挑取平板上的单克隆菌株接种于含 Zeocin 液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温摇床中培养 16 h, 提取质粒。

提取的质粒进行 PCR 扩增、1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 同时将质粒送于生物公司测定其序列, 通过 DNAMAN 软件进行分析。

#### 2.2.3.4 Nb 的表达与纯化

大量提取阳性质粒, 利用转染试剂将其转染至 HEK293F 细胞, 转染操作如 2.2.1.2。将转染后的细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$  5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5 d 后, 4,000 r/min 离心 10 min 收集上清, 利用 Protein A 纯化介质纯化目的抗体, 操作如下:

(1) 取出 5 mL 存于 20% 乙醇中的 Protein A 亲和层析介质, 装入蛋白纯化预装柱, 使用 3 倍体积蛋白纯化专用水冲洗介质 3 次, 冲洗掉 20% 乙醇, 洗涤液缓慢流出;

(2) 使用 5 倍体积的 binding buffer 溶液冲洗介质 3 次, 洗涤液缓慢流出;

(3) 将收的细胞上清经 0.22  $\mu\text{m}$  滤器滤过, 取 100  $\mu\text{L}$  为挂柱前样品, 与 Protein A 亲和层析介质室温摇床上孵育 2 h;

(4) 孵育结束后, 将上清自然流出, 取 100  $\mu\text{L}$  为挂柱后样品; 使用 5 倍体积的 binding buffer 溶液冲洗介质 3 次, 自然流出洗涤液;

(5) 每次使用 2 mL 0.1 M 甘氨酸溶液洗脱介质上结合的蛋白, 洗脱 15 次, 每次收集洗脱液, 从洗脱液中取 100  $\mu\text{L}$  为洗脱液样品;

(6) 使用 10 mL 0.1 M 甘氨酸孵育介质 10 min 后, 自然流出液体, 先用 20 mL 0.1 M 甘氨酸连续洗涤 3 次, 再使用 5 倍体积的 Binding buffer 溶液冲洗 3 次, 洗涤结束将介质保存于 5 mL 20% 乙醇中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$  放置。

向 100  $\mu\text{L}$  纯化样品中加入 20  $\mu\text{L}$  6 $\times$  Loading buffer, 100 $^{\circ}\text{C}$  金属浴 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色液染色 1 h、脱色液脱色, 分析目的条带, 收集含有目的条带的洗脱液, 即为纯化后的 Nb, 通过 BCA 法测定其浓度并标记, 存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2.2.4 Nb 的特性鉴定

### 2.2.4.1 血凝抑制效价测定

首先配制 1% 红细胞悬液：用 5 mL 注射器吸取 1 mL 抗凝剂（如枸橼酸钠、柠檬酸钠），夹取酒精棉球轻轻擦拭翅下静脉周围，采集 SPF 鸡的血液，采集结束立即轻轻充分混匀抗凝剂与血液；再将抗凝血缓慢转移至 50 mL 离心管中，补加 PBS 至 50 mL，轻轻混匀，2,000 r/min 离心 10 min，用微型台式真空泵吸弃上清液和红细胞上层的白细胞薄膜；加入 45 mL PBS 洗涤 3 次，每次上下缓慢颠倒（切忌用力过大或震荡使红细胞破裂），使其充分混匀，2,000 r/min 离心 10 min，吸弃上清液，重复洗涤 3 次；按照 1 mL 红细胞加入 100 mL PBS 的比例，将沉淀的红细胞配置成 1% 鸡红细胞悬液。

其次通过血凝试验测定灭活 AIV 病毒液的血凝效价：向血凝板中加入 25  $\mu$ L/孔 PBS，在第 1 孔加入 25  $\mu$ L 病毒液上清；从第 1 至 11 孔，连续 2 倍稀释，第 12 孔作阴性对照孔，每孔再加入 25  $\mu$ L PBS；每孔加入 25  $\mu$ L 1% 鸡红细胞，轻敲板底混匀；室温（20 $^{\circ}$ C）放置 15 min，读取血凝效价。

最后根据灭活 AIV 病毒液的血凝效价，计算并配制 4 个血凝单位病毒液，进行血凝抑制试验：向 96 孔凝集板中加入 25  $\mu$ L/孔的 PBS；第 1 孔加入 25  $\mu$ L 待检测 Nb，连续 2 倍稀释至倒数第 3 孔，倒数第 2 孔做为阳性对照，最后 1 孔留作阴性对照；除去最后 1 孔，其余每孔加入 25  $\mu$ L 4 单位病毒液，室温静置 15 min；每孔加入 25  $\mu$ L 1% 鸡红细胞，轻敲板底混匀，室温放置 15 min，观察现象，读取血凝抑制效价。

### 2.2.4.2 亲和力检测

用 100 ng/孔 NP 蛋白、HA1 蛋白及不同亚型流感病毒液包被酶标板，4 $^{\circ}$ C 过夜，拍干包被液；每孔加入 200  $\mu$ L 1% PVA 封闭酶标板，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h，弃掉封闭液，拍干；利用 PBS 将 Nb 进行 2 倍比稀释至  $2^{-8}$  后，100  $\mu$ L/孔加入酶标板，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h，200  $\mu$ L/孔 PBST 洗涤酶标板 3 次，拍干；加入 1:2,000 稀释的商品化 Fc-HRP 抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h，200  $\mu$ L/孔 PBST 洗涤酶标板 3 次，拍干；每孔加入 100  $\mu$ L TMB 显色液，室温避光放置 5-8 min；加入 100  $\mu$ L/孔硫酸终止液终止反应；在 450 nm 波长处测定 OD 值，计算半最大浓度（Concentration for 50% of maximal effect, EC<sub>50</sub>）。

### 2.2.4.3 特异性鉴定

取 200  $\mu$ L H1N1、H3N2、H9N2 亚型灭活流感病毒（Influenza virus, IV）颗粒，加入 40  $\mu$ L 6 $\times$  Loading buffer，100 $^{\circ}$ C 10 min 制样，以 NP-Nb1（1:200 稀释）为一抗，Fc-HRP（1:2,000 稀释）为二抗，进行 Western blot，操作同“2.2.1.3”，鉴定 NP-Nb 与不同 IV 颗粒的反应能力。

将 H1、H3、H5、H7、H9 亚型 AIV pRK-NP 和 pRK-HA1 质粒，转染至 HEK293T 细胞中，操作同“2.2.1.2”，培养 24 h 后收取样品，每 100  $\mu\text{L}$  加入 20  $\mu\text{L}$  2 $\times$ Loading buffer，100 $^{\circ}\text{C}$  10 min 制样。分别以 NP-Nb1、HA1-Nb1（1:200 稀释）为一抗，Fc-HRP（1:2,000 稀释）为二抗，进行 Western blot，操作同“2.2.1.3”，鉴定 HA1-Nb、NP-Nb 对于 HA1、NP 蛋白的识别能力。

#### 2.2.4.4 间接免疫荧光（IFA）鉴定

将生长状态良好的 MDCK 细胞铺入含有爬片的细胞板中，待细胞密度生长至 80%，将不同亚型 IV 的 NP 蛋白、HA1 蛋白真核表达质粒分别转染于细胞中，于 37 $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中孵育 24 h；取出细胞板，将培养基弃去，用 OPTI-MEM 或 1 $\times$ PBS 洗三次；用含有 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCK-trypsin 的 OPTI-MEM 稀释病毒液，感染 600  $\mu\text{L}$ /孔病毒液，于 37 $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中孵育 24 h 后进行 IFA 鉴定。

IFA 操作如下：

- （1）取出细胞，弃掉培养基，使用 PBS 洗涤细胞 2 次，每次 3 min；
- （2）每孔加入 500  $\mu\text{L}$  4%多聚甲醛，置于室温摇床，作用 50 min 固定细胞；
- （3）吸出多聚甲醛，使用 500  $\mu\text{L}$ /孔 PBS 轻洗细胞，每次 3 min，洗 3 次；
- （4）通透：加入 200  $\mu\text{L}$  0.5% TritonX-100，置于室温摇床反应 20 min，除去 TritonX-100，使用 500  $\mu\text{L}$ /孔 PBS 轻洗细胞，每次 3 min，洗 3 次；
- （5）封闭：加入 300  $\mu\text{L}$ /孔 10%的脱脂牛奶，置于室温摇床，封闭 30 min；
- （6）一抗：封闭结束后，使用 10%脱脂牛奶 1：200 稀释 Nb，每孔加入 500  $\mu\text{L}$ ，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜（或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h）；
- （7）除去一抗，使用 500  $\mu\text{L}$ /孔 PBS 轻洗细胞，置于摇床 5 min/次，洗 8 次；
- （8）二抗：加入 300  $\mu\text{L}$ /孔 FITC-Fc 荧光二抗（1:500 稀释），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min（从此步骤起，后面所有操作步骤都在较暗处避光进行）；
- （9）除去二抗，使用 PBS 轻洗细胞每次 5 min，洗 8 次；
- （10）DAPI 染色：加入 300  $\mu\text{L}$ /孔 DAPI（1:1,000 稀释），室温下避光孵育 5~10 min，除去显色工作液，使用 PBS 冲洗细胞每次 5 min，洗 8 次；
- （11）在载玻片上滴一滴封片剂，在无尘纸上吸干多余的水份，玻片的细胞面朝下，倾斜接触封片剂，缓慢放下不产生起泡为宜，避免碾压，再将另一侧轻轻放下使爬片贴在液滴上（取爬片时由于爬片与培养皿底结合较紧，张力较大，可将注射器针头针尖向背面做个小钩，这样将爬片轻轻勾起，用小镊子取出）。置于避光盒 4 $^{\circ}\text{C}$  保存，在荧光显微镜下观察并采集图像。

## 第三章 结果与分析

### 3.1 NP 蛋白表达

#### 3.1.1 NP 重组质粒构建与验证

将密码子优化后的 NP 基因片段通过同源重组与 pcDNA3.1-His 载体连接，得到连接产物 pcDNA3.1-NP，吸取连接产物加入 DH5 $\alpha$ 感受态细胞中转化，取 100  $\mu$ L 涂布于固体培养基平板上过夜培养，挑取单克隆菌落接种于 LB 液体培养基中，收取菌液提取质粒，PCR 鉴定结果详见图 3-1A，双酶切鉴定结果详见图 3-1B，同时将质粒送于生物公司测序。经 PCR 鉴定大小约为 1,500 bp 条带、双酶切鉴定得到大小约为 1,500 bp 的条带，符合预估大小，分析测序结果显示，NP 基因片段与 pcDNA3.1 载体成功连接，而且重组基因片段中没有密码子缺失、突变等情况，碱基序列与预测基本相同，将其命名为 pcDNA3.1-NP 质粒。

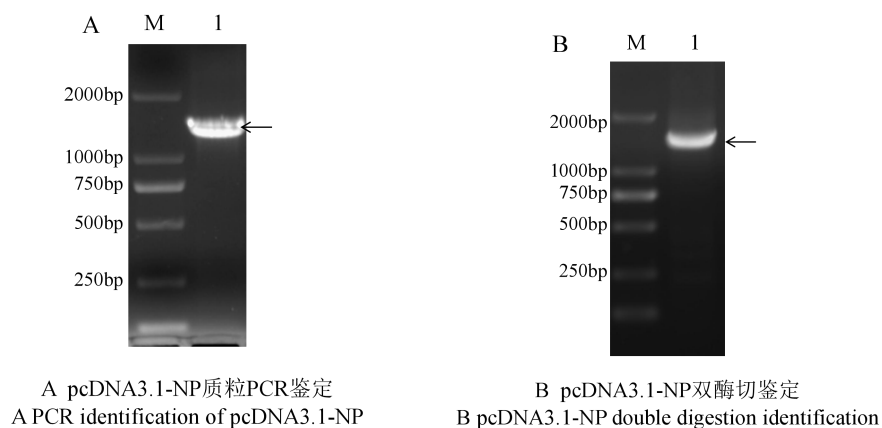


图 3-1 pcDNA3.1-NP 质粒鉴定

Fig. 3-1 Identification of pcDNA3.1-NP plasmid

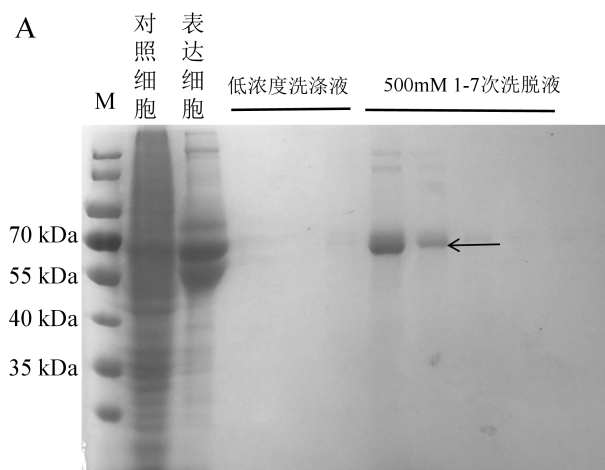
注：M：DNA 分子质量标准，A：pcDNA3.1-NP 质粒 PCR 鉴定；B：pcDNA3.1-NP 质粒双酶切鉴定结果。

Note: M: DL2000 Maker, A: PCR identification of pcDNA3.1-NP; B: pcDNA3.1-NP double digestion identification.

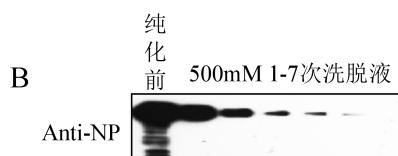
#### 3.1.2 pcDNA3.1-NP 重组蛋白表达及纯化

将阳性质粒转染于 HEK293F 细胞中，细胞培养箱培养 5 d 后，收取上清，经过 0.45  $\mu$ m 滤器过滤后，与介质混匀置于摇床上，室温孵育 2 h。使用 5 mL 含有 80、100mM 咪唑的洗涤液，分别洗脱介质 10 次，收集每次流穿液体，吸取 100  $\mu$ L 制样，为低浓度洗脱样品；使用 2 mL 含有 500 mM 咪唑的洗脱液，洗脱介质 7 次，收集每次流穿

液体，吸取 100  $\mu$ L 制样，为 500 mM 高浓度洗脱样品。进行 SDS-PAGE 电泳，结束后分别进行 Western blot 和考马斯亮蓝染色，结果详见图 3-2。与对照细胞相比，表达细胞中蛋白的含量明显增多，通过含有低浓度咪唑洗涤液的洗涤，将杂蛋白逐渐洗掉，通过 500 mM 咪唑的洗脱液洗脱，pcDNA3.1-NP 重组蛋白被洗脱下来，收集含有蛋白质的洗脱液样品，通过 BCA 方法测定其浓度为 256.45  $\mu$ g/mL。Western blot 结果显示，成功表达并纯化得到 NP 蛋白，并具有抗原性。



A NP蛋白纯化鉴定  
A Identification of NP purification



B NP蛋白抗原性鉴定  
B Identification of NP antigenicity

图 3-2 NP 蛋白鉴定

Fig. 3-2 Identification of NP

注：M：蛋白分子质量标准，A：NP 蛋白纯化鉴定结果；B：NP 蛋白抗原性鉴定。

Note: M: protein Maker, A: identification of NP purification; B: identification of NP antigenicity.

## 3.2 噬菌体展示文库的建立

### 3.2.1 羊驼血清抗体效价检测

将 NP 蛋白和 HA1 蛋白分别按照 1:1 比例与佐剂乳化后，免疫结束后第 7 d 采血，及时分离血清，利用间接 ELISA 试验检测血清中的抗体效价，结果详见图 3-3。与未免疫的血清对比，免疫后的血清中两种抗体效价为 1:128,000，达到 Nb 噬菌体展示文库的标准（抗体效价高于 1:64,000），可以建立噬菌体抗体库。



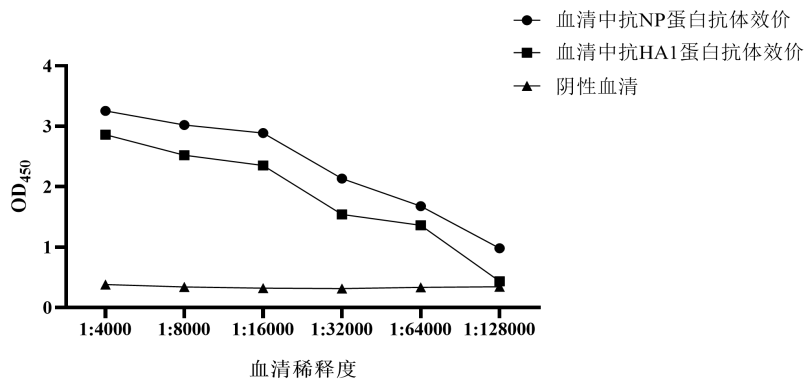


图 3-3 免疫后血清效价测定

Fig. 3-3 Post-immunization serum potency measurement

### 3.2.2 噬菌体文库构建

采集羊驼的外周血，及时分离外周血淋巴细胞。利用 RNA 提取试剂盒，严格按照说明书操作，提取外周血的总 RNA。以提取的总 RNA 为模板，反转录获得 cDNA，以 cDNA 为模板，再通过 PCR 扩增 *VHH* 基因。通过第一基因扩增，使用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定、分离，并进行胶回收，结果详见图 3-4A。可见分子量大小约为 700 bp，符合预估大小，切下目标条带，回收 PCR 产物得到 *IgG* 基因；以第一轮回收产物为模板，进行第二轮 PCR 扩增，结果详见图 3-4B，可见分子量大小约 400 bp 的 *VHH* 基因，符合预估大小，切下目标条带，回收 PCR 产物得到 *VHH* 基因片段；取第二轮 PCR 获得的产物即 *VHH* 基因片段进行下一步实验。

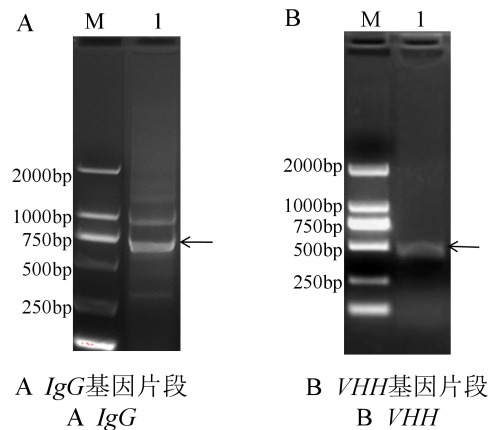


图 3-4 *VHH* 基因获得

Fig. 3-4 Identification of *VHH*

注：M: DNA 分子质量标准，A: *IgG* 基因；B: *VHH* 基因。

Note: M: DL2000 Maker; A: *IgG* genes; B: *VHH* genes.

### 3.2.3 噬菌体展示文库的库容评估

通过同源重组方法将 *VHH* 基因与线性化 pComb 载体连接, 将构建成功的噬菌体片段电转至预制的 SS320 大肠杆菌超级感受态细胞中, 培养至长出单克隆菌落并计数, 随机挑取 11 个单菌落进行 PCR 鉴定, 计算 *VHH* 基因插入效率, 结果详见图 3-5。在大约 500 bp 有一特异性条带, 符合目标大小, 说明随机挑取的 11 个单菌落均为阳性噬菌体, pComb-*VHH* 重组噬菌体构建成功, 效率为 100%, 计数得该噬菌体文库库容为  $1.5 \times 10^9$  cfu/mL。

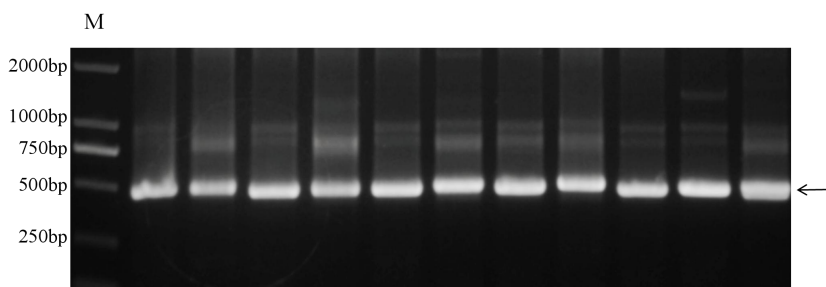


图 3-5 噬菌体文库阳性率鉴定

Fig. 3-5 Identification of phage library insertion rates

注: M: DNA 分子质量标准

Note: M: DL2000 Maker

## 3.3 Nb 的筛选

### 3.3.1 噬菌体文库的筛选

通过噬菌体展示法对文库进行 3 轮筛选, 将每次筛选后收获的噬菌体 (包括阴性对照) 进行 10 倍倍比稀释, 取  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  稀释液 10  $\mu$ L, 滴于含 Carb/Kan 抗生素的 2YT 固体培养基上, 使其自然流下, 置于 37°C 培养箱培养 24 h 后, 靶向 NP 特异性噬菌体富集结果详见表 3-1, 靶向 HA1 特异性噬菌体富集结果详见表 3-2。通过对  $10^{-2}$  稀释液的富集菌落进行计数, 在第二轮筛选中, 两个噬菌体文库都有较明显的富集。通过第三轮的筛选后, NP 蛋白第三轮筛选后的噬菌体富集数达到 23 cfu/ $\mu$ L, HA1 蛋白噬菌体文库富集数可达 18 cfu/ $\mu$ L。

表 3-1 靶向 NP 蛋白特异性噬菌体富集情况

Tab. 3-1 Enrichment of specific phage to NP protein

筛选轮数	辅助噬菌体 (cfu/ $\mu$ L)	阳性菌落富集 (cfu/ $\mu$ L)	阴性菌落富集 (cfu/ $\mu$ L)	阳性菌落富集/ 阴性菌落富集
第一轮	$1 \times 10^7$	$3.8 \times 10^3$	$3.1 \times 10^3$	1.23
第二轮	$1 \times 10^7$	$1.82 \times 10^3$	$4.02 \times 10^2$	4.53
第三轮	$1 \times 10^7$	23	3	7.67

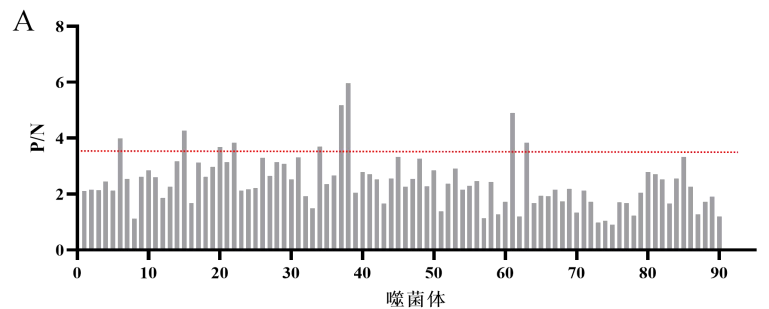
表 3-2 靶向 HA1 蛋白特异性噬菌体富集情况

Tab. 3-2 Enrichment of specific phage to HA1 protein

筛选轮数	辅助噬菌体 (cfu/ $\mu$ L)	阳性菌落富集 (cfu/ $\mu$ L)	阴性菌落富集 (cfu/ $\mu$ L)	阳性菌落富集/ 阴性菌落富集
第一轮	$1 \times 10^7$	$3.5 \times 10^3$	$2.1 \times 10^3$	1.67
第二轮	$1 \times 10^7$	$1.82 \times 10^3$	$2.32 \times 10^2$	7.84
第三轮	$1 \times 10^7$	18	2	9

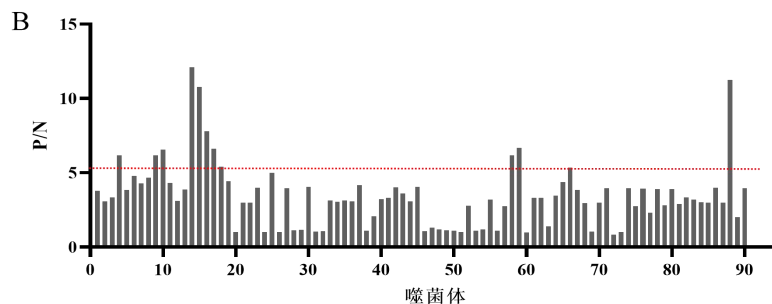
### 3.3.2 阳性噬菌体鉴定

筛选结束后，取第三轮的有明显富集现象的噬菌体扩大培养，随机挑取 90 个单菌落，接种于 96 孔细菌培养板的 2YT 液体培养基中，过夜培养后取出，收获上清中噬菌体，进行 Phage-ELISA 实验，实验组 (P) 与阴性对照 (N) 同时进行，终止反应，测定  $OD_{450nm}$  并计算 P/N 值。靶向 NP 蛋白的 90 个单克隆结果详见图 3-6A，选择 P/N 值  $>3.5$  的 10 个单克隆为阳性噬菌体，获得其基因；靶向 HA1 蛋白的 90 个单克隆结果详见图 3-6B，选择 P/N 值  $>5$  的 10 个单克隆为阳性噬菌体，获得其基因。



A 靶向NP蛋白阳性噬菌体Phage-ELISA鉴定

A Targeting NP protein-positive phage Phage-ELISA identification



B 靶向HA1蛋白阳性噬菌体Phage-ELISA鉴定

B Targeting HA1 protein-positive phage Phage-ELISA identification

图 3-6 Phage-ELISA 结果

Fig. 3-6 Results of Phage-ELISA

注：A：靶向 NP 的 90 个噬菌体 P/N 值；B：靶向 HA1 的 90 个噬菌体 P/N 值。

Note: A: P/N of targeting NP positive phages; B: P/N of targeting HA1 positive phages.

### 3.3.3 Nb 基因的获得与分析

根据 Phage-ELISA 结果，选出阳性噬菌体，吸取对应的菌液并做好标记，配制体系，进行 PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳鉴定，靶向 NP 的阳性噬菌体鉴定结果详见图 3-7A，靶向 HA1 的阳性噬菌体鉴定结果详见图 3-7B。在大约 400 bp 有一条带，与目标大小相符，目的基因扩增成功。使用干净的手术刀将目标条带切下，琼脂糖凝胶回收，获得噬菌体基因与 pcDNA3.1-Fc 表达载体通过同源重组连接，吸取产物转化，提取质粒，PCR 扩增后电泳鉴定，HA1-Nb 质粒鉴定结果详见图 3-8A，NP-Nb 质粒鉴定结果详见图 3-8B。在大约 400 bp 有一条带，与目标条带的大小相符，证明 10 个 Nb 基因与载体构建均成功。同时将质粒送于公司测序，得到 Nb 基因序列，通过 DNAMAN 软件进行分析。HA1-Nb 的 10 条氨基酸序列详见图 3-9，有 4 条氨基酸序列差异较大，NP-Nb 的 10 条氨基酸序列详见图 3-10，有 3 条氨基酸序列差异较大。

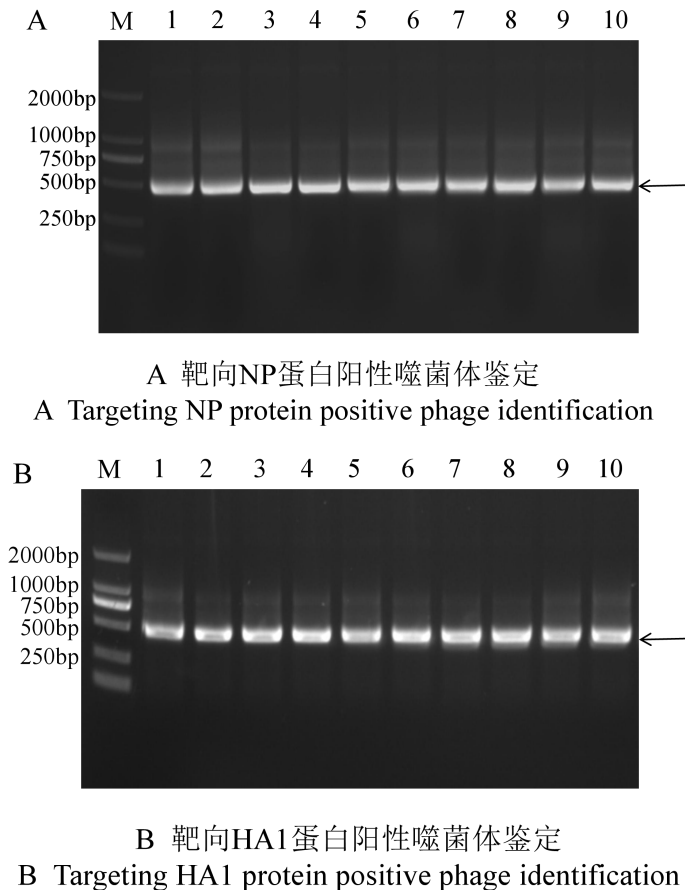
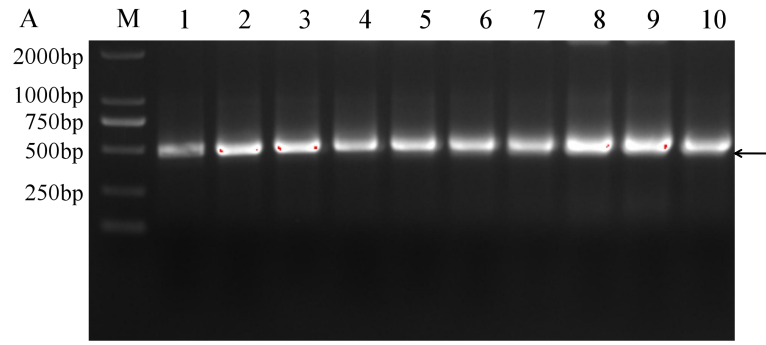


图 3-7 阳性噬菌体 PCR 鉴定

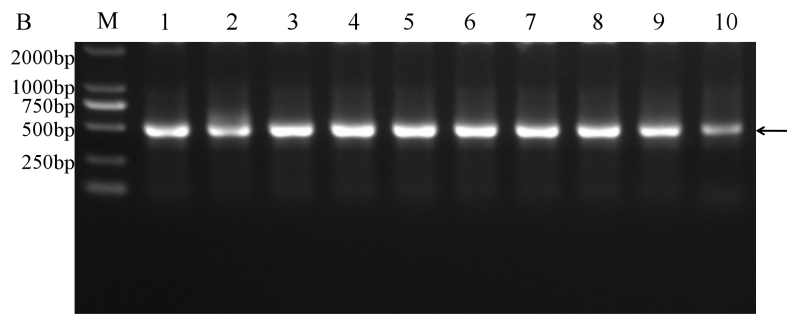
Fig. 3-7 PCR identification of positive phage

注：M：DNA 分子质量标准；A：1-10. NP-Nb P/N 值 > 3.5；B：1-10. HA1-Nb P/N > 5。

Note: M: DL2000 Maker; A: 1-10. NP-Nb P/N > 3.5; B: 1-10. HA1-Nb P/N > 5.



A HA1-Nb表达质粒构建  
A HA1 nanobodies expression plasmid construction



B NP-Nb表达质粒构建  
B NP nanobodies expression plasmid construction

图 3-8 Nb 表达质粒构建

Fig. 3-8 Nanobodies expression plasmid construction

注：M：DNA 分子质量标准；A：1~10.HA1-Nb 表达质粒；B：1~10.NP-Nb 表达质粒。

Note: M: DL2000 Maker; A: 1~10.HA1-Nb plasmids; B: 1~10.NP-Nb plasmid.

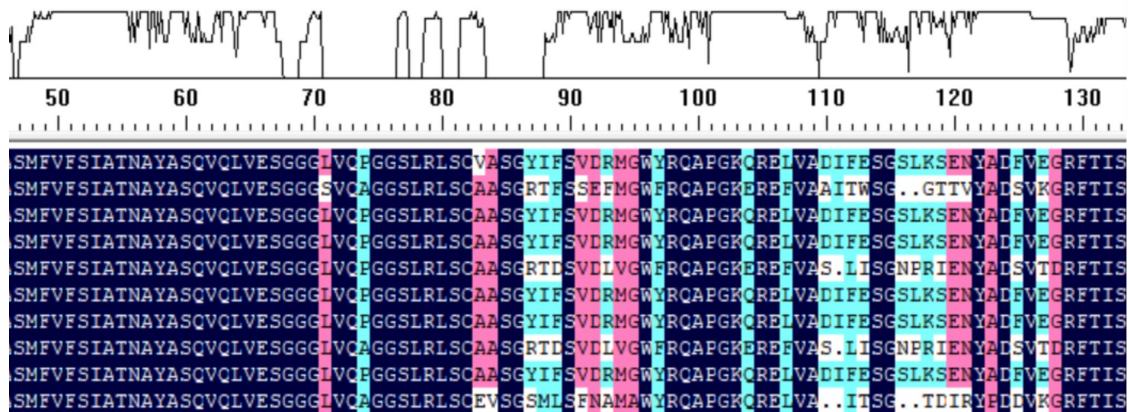


图 3-9 HA1-Nb 氨基酸序列对比

Fig. 3-9 HA1 protein nanobodies acid sequences

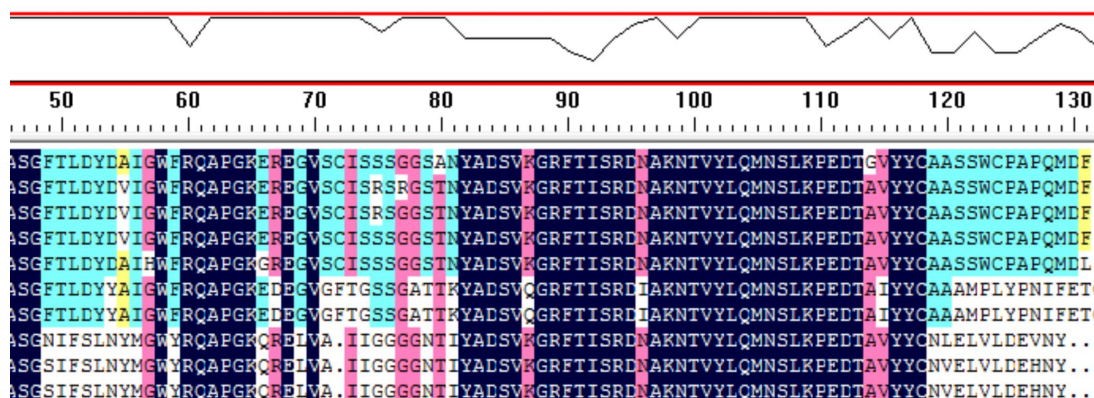
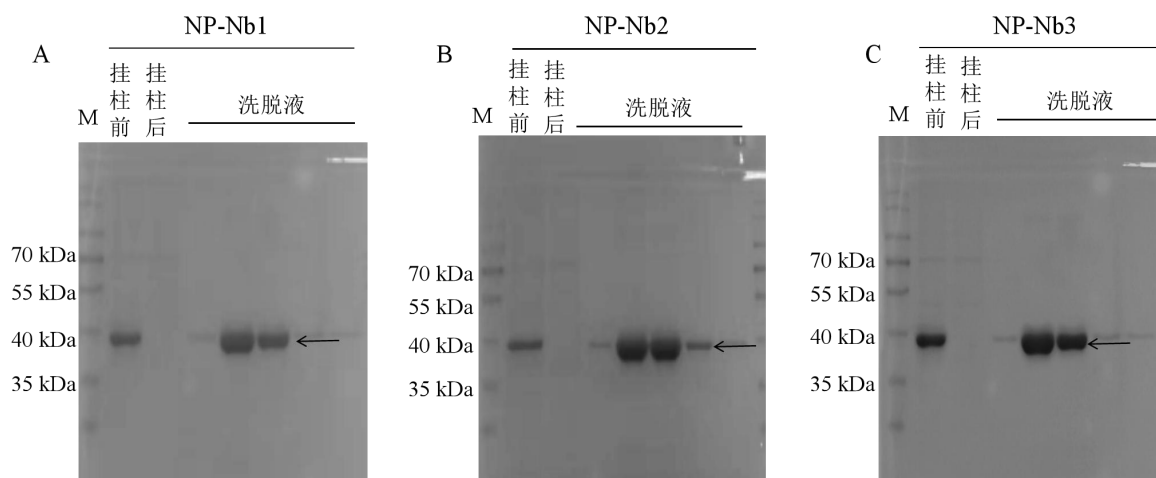


图 3-10 NP-Nb 氨基酸序列对比

Fig. 3-10 NP protein nanobodies acid sequences

### 3.3.4 Nb 的表达与纯化

选取 pcDNA3.1-Fc-Nb 阳性质粒转化于 DH5 $\alpha$ 感受态中，无菌操作大量提取质粒，取 4  $\mu$ g 转染于 HEK293F 悬浮细胞中，每隔 1 d 取样，培养 7 d 后收取样品，收取上清，灌装于透析袋，放入 binding buffer 中，置于 4 $^{\circ}$ C 透析，滤过除菌与 Protein A 介质室温孵育 2 h 后，进行纯化，收集洗脱液制样，SDS-PAGE 电泳后考马斯亮蓝染色，分别有 3 株可以在 HEK293F 细胞中表达，分别将它们命名为 NP-Nb1~NP-Nb3（结果详见图 3-11A~图 3-11C）、HA1-Nb1~HA1-Nb3（结果详见图 3-11D~图 3-11F）。通过纯化，将 Nb 洗脱分离，SDS-PAGE 得条带大小约为 40kDa，符合预期大小，成功纯化收获 Nb，利用 BCA 方法测量浓度。测定 NP-Nb1~NP-Nb3 浓度分别为 168.04  $\mu$ g/mL、183.55  $\mu$ g/mL、253.35  $\mu$ g/mL，HA1-Nb1~HA1-Nb3 浓度分别为 269.97  $\mu$ g/mL、285.48  $\mu$ g/mL、255.19  $\mu$ g/mL。



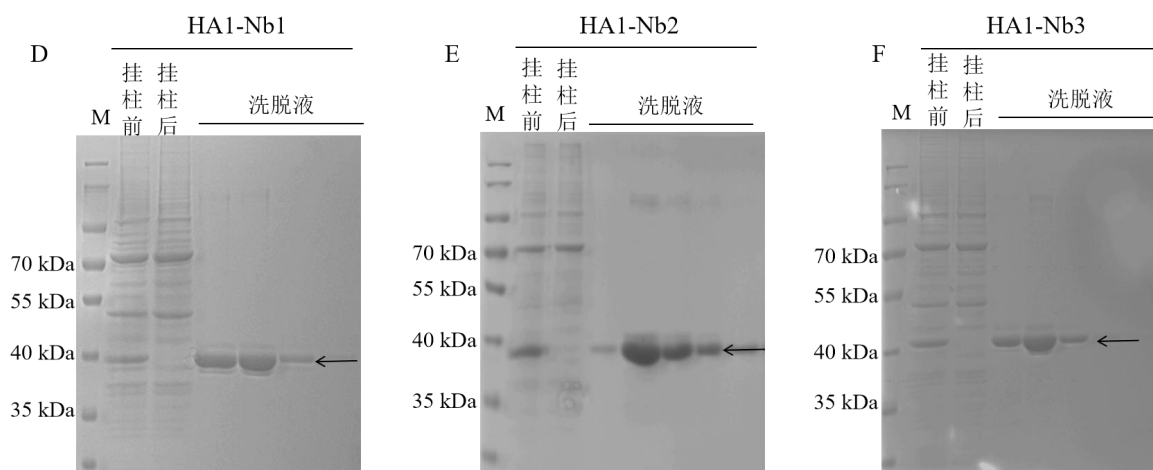


图 3-11 Nb 的表达与纯化

Fig. 3-11 Expression and purification of Nb

注：M：蛋白分子质量标准，A~B：NP-Nb 纯化鉴定；D~F：HA1-Nb 纯化鉴定。

Note: M: protein Maker. A~B: purification of NP-Nb; D~F: purification of HA1-Nb.

在表达 1-7 d 分别取样进行 SDS-PAGE 电泳后使用考马斯亮蓝染色，结果详见图 3-12。1 d 有微量表达，在 4 d 时，表达量最大，4 d~7 d，表达量没有明显增加，故后续进行抗体表达时，在第 4 d 收取样品，以节约时间、资源。

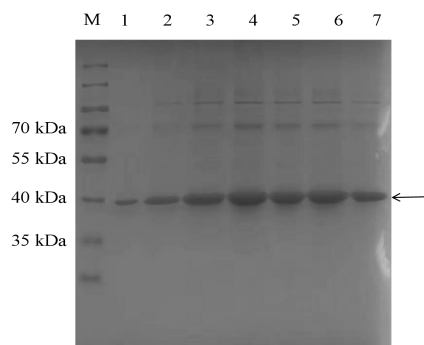


图 3-12 Nb 最佳表达时间鉴定

Fig. 3-12 Identification of optimal Nb expression time

注：M：蛋白分子质量标准；1-7：1-7 d 的细胞表达样品。

Note: M: protein Maker; 1-7: 1-7d Nb expression sample.

### 3.4 Nb 特性鉴定

#### 3.4.1 血凝抑制效价测定

测定灭活 AIV 病毒液的血凝效价为 1: 2<sup>9</sup>，于冰上制备新鲜的 4 单位抗原，进行血凝抑制试验，以测定 HA1-Nb1~HA1-Nb3 的血凝抑制效价，结果详见表 3-4。

HA1-Nb1 可与病毒结合，其血凝抑制效价为 1: 2<sup>8</sup>，有较强的血凝抑制活性，而 HA1-Nb2、HA1-Nb3 没有血凝抑制活性。

### 3.4.2 亲和力检测

分别使用 100 ng/孔 NP 蛋白、HA1 蛋白包被 ELISA 板，将 3 株 Nb 作为一抗进行 2 倍倍比稀释至 2<sup>-8</sup>，加入孔中，每个稀释度 3 个重复，37°C 孵育 1 h，加入 Fc-HRP 二抗，显色、终止后测定 OD<sub>450nm</sub> 值，计算 EC<sub>50</sub> 值。靶向 NP 蛋白的 3 株 Nb 结果详见表 3-3，NP-Nb1 的与 NP 蛋白反应的 EC<sub>50</sub> 值为 0.3959 μg/mL，与 H1N1、H3N2、H9N2 亚型 IV 反应的 EC<sub>50</sub> 值分别为 0.2272 μg/mL、0.5659 μg/mL、0.3761 μg/mL，亲和力较好。

靶向 HA1 蛋白的 3 株 Nb 结果详见表 3-4，HA1-Nb1 的 EC<sub>50</sub> 值最低，为 0.0413 μg/mL，亲和力较好。

表 3-3 NP-Nb1~NP-Nb3 的 EC<sub>50</sub>

Tab. 3-3 EC<sub>50</sub> of NP1-Nb1~NP-Nb3

纳米抗体	NP 蛋白-EC <sub>50</sub> (μg/mL)	H1N1-EC <sub>50</sub> (μg/mL)	H3N2-EC <sub>50</sub> (μg/mL)	H9N2-EC <sub>50</sub> (μg/mL)
NP-Nb1	0.3959	0.2272	0.5659	0.3761
NP-Nb2	8.5659	7.4281	5.7320	3.1697
NP-Nb3	9.6840	5.5003	6.9353	6.2728

表 3-4 HA1-Nb1~HA1-Nb3 的血凝抑制效价和 EC<sub>50</sub>

Tab. 3-4 HI and EC<sub>50</sub> of HA1-Nb1~HA1-Nb3

纳米抗体	血凝抑制效价	EC <sub>50</sub> (μg/mL)
HA1-Nb1	1: 2 <sup>8</sup>	0.041
HA1-Nb2	0	17.428
HA1-Nb3	0	11.384

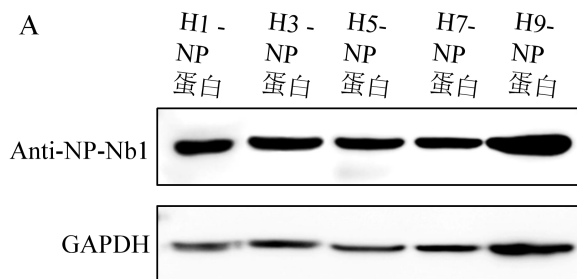
### 3.4.3 蛋白免疫印迹特异性鉴定

将 H1、H3、H5、H7、H9 亚型 IV pRK-NP 质粒转染至 HEK293T 细胞中表达，24 h 后制备样品，鉴定 NP-Nb1 对 NP 的反应能力，结果详见图 3-13A；使用 H1N1、H3N2、H9N2 亚型 IV 灭活颗粒为样品，检测 NP-Nb1 对蛋白与不同亚型 IV 颗粒反应能力，结果详见图 3-13B。NP-Nb1 可与 H1、H3、H5、H7、H9 亚型 AIV NP 蛋白结合，也可以与 H1N1、H3N2、H9N2 亚型流感病毒反应，且结合能力较好。

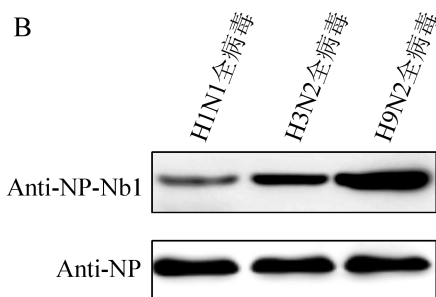
将 H1、H3、H5、H7、H9 亚型 IV pRK-HA1 质粒转染至 HEK293T 细胞，24 h 后收取样品并制备蛋白样品，检测 HA1-Nb1 对 H5N6 亚型 HA1 蛋白特异性识别能力，



结果详见图 3-14。HA1-Nb1 可以与 H5N6 亚型 AIV HA1 蛋白特异性结合，与 H1、H3、H7、H9 亚型 IV HA1 蛋白没有交叉反应能力。



A NP-Nb1 识别不同亚型流感病毒 NP 蛋白  
A NP-Nb1 recognizes different subtypes of NP proteins



B NP-Nb1 识别不同亚型流感病毒  
B NP-Nb1 recognizes different subtypes of influenza virus

图 3-13 NP-Nb1 的识别能力鉴定

Fig. 3-13 Identifies the recognition ability of NP-Nb1

注：A：NP-Nb1 可识别不同亚型病毒 NP 蛋白；B：NP-Nb1 可识别不同亚型病毒颗粒。

Note: A: NP-Nb1 recognizes different subtypes of NP proteins; B: NP-Nb1 recognizes different subtypes of influenza virus.

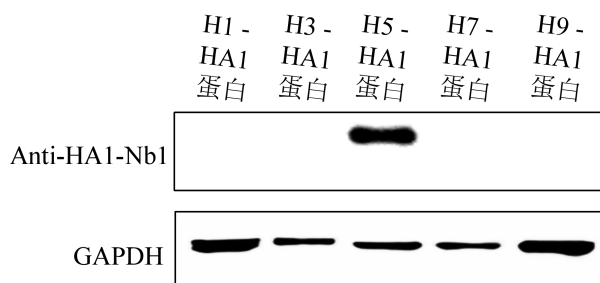


图 3-14 HA1-Nb 的识别能力鉴定

Fig. 3-14 The recognition ability of nanobodies

### 3.4.4 间接免疫荧光试验特异性鉴定

将 H1、H3、H5、H7、H9 亚型 IV pRK-NP 质粒转染于 MDCK 细胞中, 另用 H1N1、H3N2、H9N2 亚型 IV 感染 MDCK 细胞, 设置未感染的细胞为对照, NP-Nb1 进行 1:100 稀释作为一抗 4°C 过夜孵育。NP-Nb1 与 H1N1、H3N2、H9N2 亚型 IV 具有结合活性, 结果详见图 3-15A, 且可以广谱识别 H1、H3、H5、H7、H9 亚型 IV-NP 蛋白, 结果详见图 3-15B。

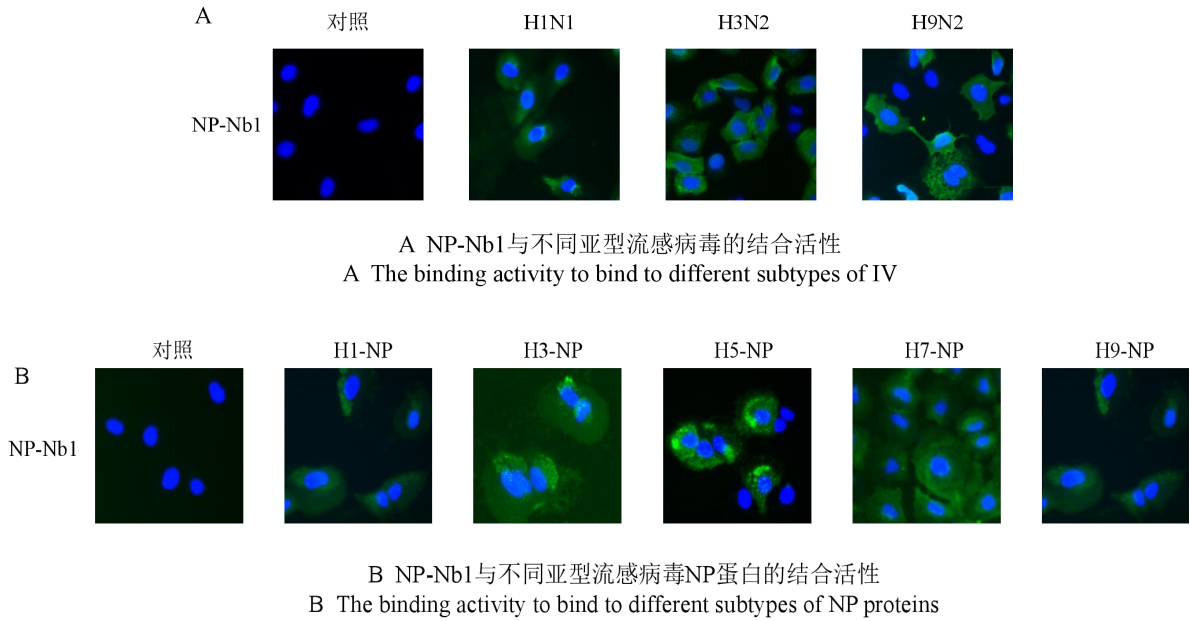


图 3-15 NP-Nb1 的结合活性鉴定

Fig. 3-15 Identification of the binding activity of NP-Nb1

将 H1、H3、H5、H7、H9 亚型 IV pRK-HA1 质粒转染于 MDCK 细胞中, 未转染的细胞设置为空载对照, HA1-Nb1 进行 1:100 稀释, 作为一抗 4°C 孵育过夜, 结果详见图 3-16。经鉴定, HA1-Nb1 可以特异性识别 H5N6 亚型 AIV-HA1 蛋白, 与 H1、H3、H7、H9 亚型 IV HA1 蛋白没有交叉反应。

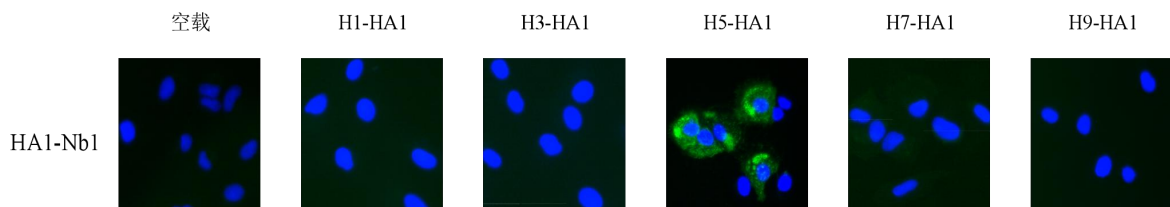


图 3-16 HA1-Nb1 的结合活性鉴定

Fig. 3-16 Identification of the binding activity of HA1-Nb1

## 第四章 讨论

自从 1997 年发生在香港地区的 AI 疫情以来, H5N6 亚型 AIV 多次在国内养殖场引发疫情, 截至目前, H5N6 亚型 AIV 依然是当前中国家禽养殖业中流行的优势毒株。近几年, 我国北京、安徽、湖北、重庆、江西、广东、云南等地陆续报道人类感染 H5N6 亚型 AIV 的病例<sup>[99]</sup>, 在深圳出现了人类感染 H5N6 亚型 AIV 重症去世的病例<sup>[100]</sup>。人类感染 H5N6 亚型 AIV 后病情较严重, 致死率高。H5N6 亚型 AIV 在我国活禽市场和家禽养殖场中持续流行, 不仅对动物养殖产业和动物健康危害巨大, 对人类健康和公共卫生的威胁不容小觑。虽然目前没有发现人与人之间的传播, 但是对于 H5N6 亚型 AIV 的监测工作不容懈怠, 需开发新型检测方法, 增大检测效率, 以进一步掌握病原学特点和流行病学特征。

### 4.1 NP 蛋白的真核表达

具有纯度较高、一定结构的蛋白是建立噬菌体筛选文库、筛选特异性 Nb 的前提, 所以目的蛋白的氨基酸密码子的优化对于蛋白的表达具有重要意义。根据密码子偏好性对 NP 蛋白基因序列进行编辑优化, 构建同源臂, 通过同源重组与表达载体连接得重组质粒, 这一步是最基础的也是最重要的一步, 重组质粒的是否构建成功、质粒序列是否发生突变对于蛋白表达来说十分关键, 否则目的基因无法在真核表达系统中转录翻译, 从而导致蛋白表达失败。哺乳动物细胞系统表达外源蛋白时, 对于外源蛋白的转录、翻译及翻译后加工、分泌等过程聚有先天的优势, 表达的蛋白理化性质几乎可以接近于天然蛋白, 且比起其他表达方式更加可靠、安全, 故本研究选择哺乳细胞表达系统表达的抗原蛋白进行实验。进行羊驼免疫、ELISA 等试验, 对抗原蛋白的浓度也有一定的要求, 选择方便、快捷的 Ni Best-rose FF (Fast Flow) 金属螯合层析介质进行纯化, 以得到浓度、纯度都较高的蛋白。

因本研究以求得到表达量高、可溶性好、接近天然蛋白结构的蛋白, 故选择利用哺乳细胞蛋白表达系统。以 pcDNA3.1 作为表达载体, 成功构建重组质粒, 转染至 293F 细胞中培养后, 进行纯化, 最终获得了浓度较高的 NP 蛋白, 纯化后及时将蛋白分装并冻存于 -80°C, 减少反复冻融导致的蛋白降解。

### 4.2 噬菌体展示抗体文库的建立

噬菌体展示技术最早出现于 1985 年, 该技术起初被用在蛋白质工程领域, 开启了新篇章, 很快, 随着科学研究的进步, 该技术也被应用于抗体工程领域。利用噬菌

体为载体,将外源抗体基因插入到噬菌体的外壳蛋白基因中,从而使外源蛋白随着外壳蛋白的表达而表达,最终展示于噬菌体的表面。已有多种病毒蛋白如猪流感病毒的 NP 蛋白、新城疫病毒 NP 蛋白等可以用来建立噬菌体展示文库,且从对应文库中筛选出特异性强的 Nb,建立文库的质量直接影响筛选抗体的特异性。

建立文库的基础则是需要使用浓度、纯度较高的抗原蛋白免疫羊驼,本研究使用经过乳化真核表达的 NP 蛋白、HA1 蛋白,多次免疫羊驼,刺激羊驼体内产生效价较高的抗体,以确保展示文库中包含抗体且具有多样性。本研究采取第 5 次免疫后的血清,其免疫效价达到 1:128,000,达到建立噬菌体文库的标准(抗体效价大于 1:64,000)。采集外周血淋巴细胞中的 RNA,通过巢式 PCR 的方法,增加噬菌体基因片段的插入效率,同时也可以提高噬菌体基因片段的特异性,经过电泳鉴定,目的条带符合预期大小,对目的片段进行胶回收,回收过程中应尽可能去除胶体,以得到较高浓度目的基因片段。通过同源重组方法,连接目的基因和载体,将连接产物通过电转转化于感受态细胞中,电转效率受多种因素影响,故有时需要优化电转程序。本研究中构建了来自于羊驼外周血淋巴细胞的抗体文库,通过对文库单菌落的 PCR 鉴定,外源基因插入率为 100%,插入率较高,且噬菌体文库的多样性较好。

### 4.3 Nb 的筛选及表达

针对特定抗原蛋白 Nb 的筛选,方法有噬菌体展示方法、mRNA 展示方法、酵母双杂交方法。有报道,通过噬菌体展示技术筛选出新城疫病毒的 NP 蛋白、牛病毒性腹泻病毒 E2 蛋白的 Nb<sup>[101, 102]</sup>,为 Nb 的筛选研究奠定了一定的基础。本研究利用噬菌体展示技术对文库进行筛选,以得到特异性 Nb,这种方法比传统方法的筛选更加简单、节约时间、更有效果。噬菌体展示技术的核心是噬菌体系统,包括 T4、 $\lambda$  以及 M13 噬菌体系统,不同系统的优缺点不同,其中 M13 噬菌体是目前应用最广泛的噬菌体,也是研究最深入的噬菌体。通过将抗体基因序列插入 M13 噬菌体的结构基因中,与噬菌体的外壳形成融合蛋白,伴随着下一代噬菌体外壳蛋白的表达而表达,从而实现目标抗体基因的表达。通过靶定抗原蛋白,再加入 M13 辅助噬菌体,从而实现特定蛋白的 Nb 的筛选<sup>[103]</sup>。

本研究选择真核表达的抗原蛋白为靶向,以增大淘选到目的抗体的概率,而且抗原蛋白的用量也对目的抗体的淘选有重要作用。故首轮淘筛加大投入的抗原蛋白量为 4  $\mu\text{g}$ ,第二轮、第三轮淘选加入的抗原蛋白量为 1  $\mu\text{g}$ ,随着淘选次数的增加,针对抗原蛋白的噬菌体的比例增高,故减少抗原蛋白用量依然可以淘选出目的噬菌体,且保证所获得噬菌体的特异性。在淘选过程中加入盐酸洗脱液,将非特异结合的、没有结合的噬菌体洗脱下来,更是增加了目的抗体的筛选效率。经过对淘选过程步骤的优化,

可以提高 Nb 的筛选效率，并且可以用此步骤筛选其他针对不同抗原蛋白的 Nb，增加了抗体文库的利用率。

在淘选靶向特定抗原蛋白的 Nb 时，分别使用 HA1 蛋白、NP 蛋白作为抗原蛋白，每次淘选后进行滴度试验，实时监控筛选进程。根据滴度试验，第一轮和第二轮的富集不明显，故没有进行 Phage-ELISA 和 PCR 鉴定。然而经过第三轮筛选后，滴度试验结果显示， $10^{-3}$  稀释液的实验组与对照组的富集情况对比明显，说明目的噬菌体出现大程度的富集。将富集的噬菌体扩增培养，取培养基中的噬菌体进行鉴定，结果显示，靶向 NP 蛋白 Nb 的 P/N 值总体较平均，为保证 Nb 的数量及特异性，最终选择 P/N 值  $>3.5$  的菌液中为阳性噬菌体；靶向 HA1 蛋白 Nb 的 Phage-ELISA 的 P/N 值普遍较高，说明噬菌体对于 HA1 蛋白的识别特异性较强，最终选择 P/N 值  $>5$  的菌液中为阳性噬菌体。

本研究中针对筛选出的 Nb 序列构建表达载体，将 Human-IgG-Fc 序列构建于 pcDNA3.1 载体中，加入的 Fc 片段既能保证 Nb 本身的功能特点不受影响，又增加了 Nb 的稳定性和半衰期，更是方便表达与纯化。将 Nb 序列与载体通过同源重组连接，进行 PCR 鉴定，并测序，分析结果可知，在第三轮淘选后，靶向抗原蛋白的 Nb 都有明显富集，对 Nb 的氨基酸序列分析，序列多样性较高，重复序列较少。将阳性噬菌体的质粒转染至 HEK293F 细胞中培养表达，分别有 3 株可以在细胞中表达。最终选择这 3 株 Nb 进行后续研究。为求得高效率、低成本的抗体表达，在表达过程中，每间隔 1 d 取样，共取 7 次。分析结果可知，表达量在 4 d 时最高，5、6、7 d 的表达量并没有明显增加。Protein A 是从金黄色葡萄球菌中分离出的细胞壁蛋白，主要通过 Fc 片段结合哺乳动物 IgG 片段，它包含 5 个 IgG 结合域，并且可以降低非特异性结合。目前，Protein A 亲和层析介常被用于从细胞培养液中分离纯化出各种类型的 IgG 或 IgG 片段，并且相关实验证明，Protein A 和 IgG 的相互作用仅涉及到 Fc 区域，不影响抗体 Fab 片段和抗原的结合<sup>[104]</sup>。本研究选择 Protein A 亲和层析介质对 HEK293F 细胞分泌表达的抗体进行纯化，以求高效、快捷、安全的得到抗体。最终对 Nb 的浓度通过 BCA 方法进行测量，结果显示最终浓度比较高。

#### 4.4 Nb 的特异性鉴定

抗体 (Antibody, Ab) 是机体 B 淋巴细胞收到抗原刺激后产生的特异性球蛋白。初次接触抗原刺激后，激发机体产生的特异性抗体亲和力低、持续性作用时间短；当同一抗原再次或多次刺激机体后，机体内会产生高亲和力、高效价、持续作用时间长的抗体。当机体内有特异的抗原产生刺激时，抗体会与其发生特异性结合反应，因此抗体被用来免疫学检测，并发挥重要作用。在 H5N6 亚型 AI 发生的早期阶段，如果

能快速诊断出，可以得到精确防控，防止疫情发生扩大，避免危害人类。现在大多检测试剂是依靠传统的特异性抗体对病毒的特定蛋白进行检测，然而有些传统抗体稳定性较弱，甚至失去生物结合特性，从而导致检测结果出现误差，错过防治 H5N6 亚型 AIV 的最佳时机。

本研究筛选出针对 H5N6 亚型 AIV 的 HA1 蛋白和 NP 蛋白的 Nb，并对其结合特异性、生物活性鉴定。HA1-Nb1 的血凝抑制效价为 1: 2<sup>8</sup>，能够与 H5N6 亚型 AIV 灭活病毒颗粒特异性结合。通过间接 ELISA，计算出 Nb 的 EC<sub>50</sub>，EC<sub>50</sub> 的值越小，表示 Nb 对于抗原的亲合力越好。分析结果可知，NP-Nb1 和 HA1-Nb1 的 EC<sub>50</sub> 值较低，表明这两株抗体均具有较高的亲合力。通过蛋白免疫印迹和间接免疫荧光试验鉴定，NP-Nb1 可以识别不同亚型流感病毒的 NP 蛋白及不同亚型的流感病毒，具有较好的广谱性；HA1-Nb1 可以特异性识别 H5N6 亚型 HA1 蛋白，与其他亚型 HA1 蛋白没有发生交叉反应，具有较好的特异性。

免疫学检测在 AIV 临床检测中应用广泛，比较常用的检测方法有血凝/血凝抑制试验、ELISA、胶体金免疫层析技术等。Nb 因其分子量小、特异性强、稳定性强、敏感性高，已经被用于多种禽病毒病的检测。据报道，以 H9N2 亚型 AIV-NP 蛋白为靶标，筛选出抗 H9N2 亚型 AIV-NP 蛋白的 Nb，与辣根过氧化物酶（Horseradish peroxidase, HRP）构建融合蛋白，建立了间接 ELISA 检测方法<sup>[105]</sup>，表现出高度灵敏性、特异性、可重复性和稳定性；还有报道以 H7N2 亚型 AIV 为靶标，利用噬菌体展示技术筛选出抗 H7N2 亚型 AIV 的 Nb，成功构建融合蛋白并建立了夹心 ELISA 检测方法<sup>[106]</sup>，表现出高准确度、强特异性。随着科学研究的进步发展，建立以 Nb 为基础的免疫学检测方法为大势所趋。本研究筛选得到的 2 株 Nb，其 CDR 区的结构可以识别传统抗体无法识别的表位，其稳定性、特异性、敏感性等方面优于传统抗体，有望成为药物治疗和诊断试剂的原材料。

## 第五章 结论

**5.1** 成功构建驼源 Nb 噬菌体展示文库，文库基因插入率为 100%，多样性好，库容为  $1.5 \times 10^9$  cfu/mL。

**5.2** 以 NP、HA1 蛋白为靶标蛋白，利用噬菌体展示技术进行三轮筛选，最终分别获得 3 株特异性 Nb。

**5.3** 通过试验鉴定，NP-Nb1 具有广谱性，HA1-Nb 具有特异性，两株 Nb 均具有反应活性。

## 附录

NP 基因序列:

ATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCTTATGAACAGATGGAAACTGGTGGAG  
AGCGCCAGAATGCTACTGAAATCAGGGCATCTGTTGGAAGAATGGTTAGTGGC  
ATTGGGAGGTTCTACATACAGATGTGCACAGAACTCAAACCTCAGTGACCATGA  
AGGGAGACTGATCCAGAACAGCATAACAATAGAGAGAATGGTACTTTCTGCAT  
TTGATGAAAGAAGGAACAGGTACCTGGAAGAGCACCCCAGTGCGGGGAAGGA  
CCCTAAGAAAACCTGGAGGTCCAATTTATCGGAGGAGAGACGGGAAATGGATG  
AGAGAGCTGATTTTGTACGACAAAGAAGAGATTAGGAGGATTTGGCGCCAAG  
CGAACAATGGAGAGGATGCAACTGCTGGTCTTACCCACCTGATGATATGGCAC  
TCCAACCTGAATGATGCCACATATCAGAGAACAAGAGCTCTCGTGCGTACCGG  
AATGGACCCCAGGATGTGCTCTCTAATGCAGGGATCAACTCTCCCGAGGAGAT  
CTGGAGCTGCTGGTGCAGCGGTGAAAGGGGTAGGAACAATGGTGTATGGAGCT  
GATTCGAATGATAAAACGAGGGATTAACGACCGGAATTTCTGGAGAGGGCGAA  
AATGGAAGAAGAACAAGGATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAG  
GGAAATTCCAAACAGCTGCACAAAGAGCAATGATGGATCAAGTGCGAGAGAG  
CAGAAATCCTGGGAATGCTGAAATTGAAGATCTCATTTTTCTGGCACGGTCTGC  
ACTCATCCTGAGAGGATCAGTGGCCATAAGTCCTGCTTGCCTGCTTGTGTGTA  
CGGACTTGCAGTGGCCAGTGGGTATGACTTCGAGAGAGAAGGATACTCTCTGG  
TTGGGATAGATCCTTTCCGTCTGCTTCAAACAGCCAGGTCTTTAGTCTCATT  
GACCAAATGAAAACCCAGCACATAAGAGTCAATTAGTGTGGATGGCATGCCAC  
TCTGCAGCATTGGAAGACCTCAGAGTCTCAAGTTTCATCAGAGGAACAAGAGT  
GGTCCCAAGAGGGCAGCTATCCACTAGAGGGGTTCAAATTGCTTCAAATGAGA  
ACATGGAAACAATGGACTCCAACACACTTGAACCTGAGAAGCAGATATTGGGCT  
ATAAGAACCAGGAGCGGAGGGGAACACCAACCAGCAGAGGGGCATCTGCAGGGC  
AGATCAGCGTTCAACCCACTTTCTCGGTGCAGAGAAACCTTCCCTTCGAAAGA  
GCGACCATTATGGCAGCATTGTCAGGAAATACTGAAGGCAGAACGTCCGACAT  
GAGGACAGAAATCATAAGAATGATGGAAAGTGCCAAACCAGAAGATGTGTCA  
TTCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGAT  
CGTGCCTTCCCTTTGACATGAATAATGAAGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGC  
AGAGGAGTATGACAATTA



## 参考文献

- [1] Bevins S N, Dusek R J, White C L, et al. Widespread detection of highly pathogenic H5 influenza viruses in wild birds from the Pacific Flyway of the United States[J]. *Scientific Reports*, 2016,69(1): 28980-28988.
- [2] Zhang W Q, Song S X, Wang T Z. Advances in the structure and function of pandemic A/H1N1/2009 influenza virus HA protein[J]. *Bing Du Xue Bao*, 2012,28(4): 444-452.
- [3] Gu W, Shi J, Cui P, et al. Novel H5N6 reassortants bearing the clade 2.3.4.4b HA gene of H5N8 virus have been detected in poultry and caused multiple human infections in China[J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2022,11(1): 1174-1185.
- [4] Ince W L, Gueye-Mbaye A, Bennink J R, et al. Reassortment complements spontaneous mutation in influenza A virus NP and M1 genes to accelerate adaptation to a new host[J]. *Journal of Virology*, 2013,87(8): 4330-4338.
- [5] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2013,829(6): 775-797.
- [6] Gibbs W W. Nanobodies[J]. *Scientific American*, 2005,293(2): 78-83.
- [7] Sheng Y, Wang K, Lu Q, et al. Nanobody-horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against Newcastle disease virus in the immunoassay[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2019,17(1): 35-41.
- [8] Lo F T, Zecchin B, Diallo A A, et al. Intercontinental Spread of Eurasian Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) to Senegal[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2022,28(1): 234-237.
- [9] Briand F, Niqueux E, Schmitz A, et al. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Spread by Short- and Long-Range Transmission, France, 2016-17[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2021,27(2): 508-516.
- [10] Wu H B, Lu R F, Peng X R, et al. Novel reassortant highly pathogenic H5N6 avian influenza viruses in poultry in China[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015,31(1):64-67.
- [11] Coelingh K L, Luke C J, Jin H, et al. Development of live attenuated influenza vaccines against pandemic influenza strains. *Expert Review of Vaccines*, 2014,13(7):855-871.
- [12] Laleye A T, Bianco A, Shittu I, et al. Genetic characterization of highly pathogenic avian Influenza H5Nx clade 2.3.4.4b reveals independent introductions in nigerian[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022,69(2): 423-433.
- [13] Pulit-Penalosa J A, Brock N, Pappas C, et al. Characterization of highly pathogenic avian influenza H5Nx viruses in the ferret model[J]. *Scientific reports*, 2020,10(1): 12700-12705.

- [14] De Wit E, Kawaoka Y, Jong M D, et al. Pathogenicity of highly pathogenic avian influenza virus in mammals[J]. *Vaccine*, 2008,26(4): 54-58.
- [15] He J, Duan J. First human case of avian influenza A (H5N6) in Yunnan province, China[J]. *SAGE Open Medical Case Reports*, 2015,3(1):1-2.
- [16] Chen T, Zhang R. Symptoms seem to be mild in children infected with avian influenza A (H5N6) and other subtypes[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2015,71(6): 702-703.
- [17] Pan M, Gao R B, Lv Q, et al. Human infection with a novel, highly pathogenic avian influenza A (H5N6) virus: Virological and clinical findings[J]. *Journal of Infection*, 2016,72(1): 52-59.
- [18] Shen Y Y, Ke C W, Li Q, et al. Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N6) Viruses in Humans, Guangdong, China, 2015[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016,22(8): 1507-1509.
- [19] 李殿龙. 高致病性禽流感诊断与防治[J]. *畜牧兽医科学*, 2019,(01): 102-103.
- [20] Villanueva-Cabezas J P, Coppo M, Durr P A, et al. Vaccine efficacy against Indonesian Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1: systematic review and meta-analysis[J]. *Vaccine*, 2017,35(37): 4859-4869.
- [21] Calder L J, Wasilewski S, Berriman J A, et al. Structural organization of a filamentous influenza A virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010,107(23): 10685-10690.
- [22] Xu R, Ekiert D C, Krause J C, et al. Structural Basis of Preexisting Immunity to the 2009 H1N1 Pandemic Influenza Virus[J]. *Science*, 2010,328(5976): 357-360.
- [23] Hutchinson E C, Charles P D, Hester S S, et al. Erratum: Conserved and host-specific features of influenza virion architecture[J]. *Nature Communications*, 2015,6(2): 6446-6447.
- [24] Park H C, Shin J, Cho S M, et al. PAIVS: prediction of avian influenza virus subtype[J]. *Genomics Inform*, 2020,18(1): 5-9.
- [25] Baudin F, Bach C, Cusack S, et al. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent[J]. *EMBO Journal*, 1994,13(13): 3158-3165.
- [26] Zhu W, Zhou J, Qin K, et al. A reporter system for assaying influenza virus RNP functionality based on secreted Gaussia luciferase activity[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011,8(1): 29-35.
- [27] Morel J, Sedano L, Lejal N, et al. The Influenza Virus RNA-Polymerase and the Host RNA-Polymerase II: RPB4 Is Targeted by a PB2 Domain That Is Involved in Viral Transcription[J]. *Viruses*, 2022,14(3): 518-529.
- [28] Thoennes S, Li Z N, Lee B J, et al. Analysis of residues near the fusion peptide in the influenza hemagglutinin structure for roles in triggering membrane fusion[J]. *Virology*, 2008,370(2): 403-414.
- [29] Baquero E, Albertini A A, Raux H, et al. Structural intermediates in the fusion-associated transition

- of vesiculovirus glycoprotein[J]. *EMBO Journal*, 2017,36(5): 679-692.
- [30] Wu N C, Wilson I A. Structural Biology of Influenza Hemagglutinin: An Amaranthine Adventure[J]. *Viruses*, 2020,12(9): 1053-1064.
- [31] Zost S J, Dong J, Gilchuk I M, et al. Canonical features of human antibodies recognizing the influenza hemagglutinin trimer interface[J]. *Journal Of Clinical Investigation*, 2021,131(15): 146791-146782.
- [32] Nuñez I A, Huang Y, Ross T M. Next-Generation Computationally Designed Influenza Hemagglutinin Vaccines Protect against H5Nx Virus Infections[J]. *Pathogens*, 2021,10(11): 1352-1363.
- [33] Makau J N, Watanabe K, Otaki H, et al. A Quinolinone Compound Inhibiting the Oligomerization of Nucleoprotein of Influenza A Virus Prevents the Selection of Escape Mutants[J]. *Viruses Basel*, 2020,12(3): 337-348.
- [34] Veler H, Fan H, Keown J R, et al. The C-Terminal Domains of the PB2 Subunit of the Influenza A Virus RNA Polymerase Directly Interact with Cellular GTPase Rab11a[J]. *Journal of Virology*, 2022,96(5): 197921-197932.
- [35] Labadie K, Afonso E D, Rameix-Welti M A, et al. Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells[J]. *Virology*, 2007,362(2): 271-282.
- [36] Walker A P, Sharps J, Fodor E. Mutation of an Influenza Virus Polymerase 3' RNA Promoter Binding Site Inhibits Transcription Elongation[J]. *Journal of Virology*, 2020,94(13): 420-498.
- [37] Ninpan K, Suptawiwat O, Boonarkart C, et al. Mutations in matrix protein 1 and nucleoprotein caused human-specific defects in nuclear exportation and viral assembly of an avian influenza H7N1 virus[J]. *Virus Research*, 2017,238(3): 49-62.
- [38] Hu Y, Sneyd H, Dekant R, et al. Influenza A Virus Nucleoprotein: A Highly Conserved Multi-Functional Viral Protein as a Hot Antiviral Drug Target[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2017,17(20): 2271-2285.
- [39] Davis A M, Ramirez J, Newcomb L L. Identification of influenza A nucleoprotein body domain residues essential for viral RNA expression expose antiviral target[J]. *Journal of Virology*, 2017,14(1): 22-34.
- [40] Zimmermann P, Manz B, Haller O, et al. The viral nucleoprotein determines Mx sensitivity of influenza A viruses[J]. *Journal of Infection*, 2011,85(16): 8133-8140.
- [41] Guo J, Huang S, Wen F. Identification of coevolution sites and evolution history for neuraminidase of human influenza A viruses[J]. *Journal of Infection*, 2020,80(2): 232-254.
- [42] Jayaraman A, Chandrasekaran A, Viswanathan K, et al. Decoding the distribution of glycan

- receptors for human-adapted influenza A viruses in ferret respiratory tract[J]. *PLoS One*, 2012,7(2): 27517-27528.
- [43] Vangeti S, Yu M, Smed-Sorensen A. Respiratory Mononuclear Phagocytes in Human Influenza A Virus Infection: Their Role in Immune Protection and As Targets of the Virus[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018,9(10): 1521-1534.
- [44] Meineke R, Rimmelzwaan G F, Elbahesh H. Influenza Virus Infections and Cellular Kinases[J]. *Viruses*, 2019,11(2): 171-182.
- [45] Correia V, Abecasis A B, Rebelo-De-Andrade H. Molecular footprints of selective pressure in the neuraminidase gene of currently circulating human influenza subtypes and lineages[J]. *Virology*, 2018,522(9): 122-130.
- [46] Li Y, Cao H, Dao N, et al. High-throughput neuraminidase substrate specificity study of human and avian influenza A viruses[J]. *Virology*, 2011,415(6): 12-19.
- [47] Dadonaite B, Gilbertson B, Knight M L, et al. The structure of the influenza A virus genome[J]. *Nature Microbiology*, 2019,4(11): 1781-1789.
- [48] Kaler L, Iverson E, Bader S, et al. Influenza A virus diffusion through mucus gel networks[J]. *Communications Biology*, 2022,5(1): 249-552.
- [49] Aso J, Kimura H, Ishii H, et al. Molecular evolution of the hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene in human respirovirus 3[J]. *Virus Research*, 2020,277(5): 824-832.
- [50] Bright R A, Carter D M, Crevar C J, et al. Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle[J]. *PLoS One*, 2008,3(1): 1501-1521.
- [51] Mohr P G, Deng Y M, Mckimm-Breschkin J L. The neuraminidases of MDCK grown human influenza A(H3N2) viruses isolated since 1994 can demonstrate receptor binding[J]. *Journal of Virology*, 2015,12(5): 67-79.
- [52] Harvey W T, Benton D J, Gregory V, et al. Identification of Low- and High-Impact Hemagglutinin Amino Acid Substitutions That Drive Antigenic Drift of Influenza A(H1N1) Viruses[J]. *PLOS Pathogens*, 2016,12(4): 5526-5539.
- [53] Scheibner D, Salaheldin A H, Bagato O, et al. Phenotypic effects of mutations observed in the neuraminidase of human origin H5N1 influenza A viruses[J]. *PLOS Pathogens*, 2023,19(2): 1135-1156.
- [54] Chanturiya A N, Basanez G, Schubert U, et al. PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes[J]. *Journal of Virology*, 2004,78(12): 6304-6312.
- [55] Xiao Y, Evseev D, Stevens C A, et al. Influenza PB1-F2 Inhibits Avian MAVS Signaling[J].

- Viruses, 2020,12(4): 409-420.
- [56] Chakrabarti A K, Pasricha G. An insight into the PB1F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses[J]. *Virology*, 2013,440(2): 97-104.
- [57] Kash J C, Tumpey T M, Prohl S C, et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus[J]. *Nature*, 2006,443(7111): 578-581.
- [58] Wang F, Liu G, Lu Y, et al. Acquisition of Avian-Origin PB1 Facilitates Viral RNA Synthesis by the 2009 Pandemic H1N1 Virus Polymerase[J]. *Viruses*, 2020,12(3): 266-283.
- [59] Eisfeld A J, Neumann G, Kawaoka Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015,13(1): 28-41.
- [60] Hengrung N, El Omari K, Martin I S, et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from influenza C virus[J]. *Nature*, 2015,527(7): 114-117.
- [61] Sasaki Y, Yoshino N, Okuwa T, et al. A mouse monoclonal antibody against influenza C virus attenuates acetaminophen-induced liver injury in mice[J]. *Scientific Reports*, 2021,11(1): 11816-11837.
- [62] Zhang M, Liu M, Bai S, et al. Influenza A Virus-Host Specificity: An Ongoing Cross-Talk Between Viral and Host Factors[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021,12(1): 777885-777898.
- [63] Thube M M, Shil P, Kasbe R, et al. Differences in Type I interferon response in human lung epithelial cells infected by highly pathogenic H5N1 and low pathogenic H1N1 avian influenza viruses[J]. *Virus Genes*, 2018,54(3): 414-423.
- [64] Carr S M, Carnero E, Garcia-Sastre A, et al. Characterization of a mitochondrion targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses[J]. *Virology*, 2006,344(2):492-508.
- [65] Gao Q X, Yang C, Ren C Y, et al. Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Delta Inhibits the Nuclear Import of the Nucleoprotein and PA-PB1 Heterodimer of Influenza A Virus[J]. *Journal Of Virology*, 2021,95(2): 1320-1391.
- [66] Qin T, Chen Y, Huangfu D, et al. PA-X protein of H1N1 subtype influenza virus disables the nasal mucosal dendritic cells for strengthening virulence[J]. *Virulence*, 2022,13(1): 1928-1942.
- [67] Halldorsson S, Sader K, Turner J, et al. In situ structure and organization of the influenza C virus surface glycoprotein[J]. *Nature Communications*, 2021,12(1): 1694-1708.
- [68] Shtykova E V, Dadinova L A, Fedorova N V, et al. Influenza virus Matrix Protein M1 preserves its conformation with pH, changing multimerization state at the priming stage due to electrostatics[J]. *Scientific Reports*, 2017,7(1): 16793-16809.
- [69] Menezes J C J M, Campos V R. Natural biflavonoids as potential therapeutic agents against microbial diseases[J]. *Science of The Total Environment*, 2021,769(1): 145168-145189.
- [70] Kordyukova L V, Shtykova E V, Baratova L A, et al. Matrix proteins of enveloped viruses: a case

- study of Influenza A virus M1 protein[J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019,37(3): 671-690.
- [71] Chiang M J, Musayev F N, Kosikova M, et al. Maintaining pH-dependent conformational flexibility of M1 is critical for efficient influenza A virus replication[J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2017,6(12): 108-125.
- [72] Brunotte L, Flies J, Bolte H, et al. The nuclear export protein of H5N1 influenza A viruses recruits Matrix 1 (M1) protein to the viral ribonucleoprotein to mediate nuclear export[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014,289(29): 20067-20077.
- [73] Manzoor R, Igarashi M, Takada A. Influenza A Virus M2 Protein: Roles from Ingress to Egress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017,18(12):2649-2653.
- [74] Evans T G, Bussey L, Eagling-Vose E, et al. Efficacy and safety of a universal influenza A vaccine (MVA-NP+M1) in adults when given after seasonal quadrivalent influenza vaccine immunisation (FLU009): a phase 2b, randomised, double-blind trial[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2022,22(6): 857-866.
- [75] Han C W, Jeong M S, Jang S B. Structure and Function of the Influenza A Virus Non-Structural Protein 1[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2019,29(8): 1184-1192.
- [76] Rosario-Ferreira N, Preto A J, Melo R, et al. The Central Role of Non-Structural Protein 1 (NS1) in Influenza Biology and Infection[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020,21(4): 1511-1523.
- [77] Hoey R, Eom H, Horn J. Structure and development of single domain antibodies as modules for therapeutics and diagnostics[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2019,244(17):1568-1576.
- [78] Stijlemans B, De Baetselier P, Caljon G, et al. Nanobodies As Tools to Understand, Diagnose, and Treat African Trypanosomiasis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017,8(1): 724-735.
- [79] Rahbarizadeh F, Rasae M J, Moghadam M F, et al. Production of novel recombinant single-domain antibodies against tandem repeat region of MUC1 mucin[J]. *Hybridoma And Hybridomics*, 2004,23(3): 151-159.
- [80] Pillay T S, Muyltermans S. Application of Single-Domain Antibodies ("Nanobodies") to Laboratory Diagnosis[J]. *Annals of Laboratory Medicine*, 2021,41(6): 549-558.
- [81] Ghahroudi M A, Desmyter A, Wyns L, et al. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies[J]. *Febs Letters*, 1997,414(3): 521-526.
- [82] Bazan J, Calkosinski I, Gamian A. Phage display-a powerful technique for immunotherapy: Introduction and potential of therapeutic applications[J]. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2012,8(12): 1817-1828.
- [83] P. H. Hofschneider. Untersuchungen über "kleine" E. coli K 12 Bakteriophagen[J]. *Zeitschrift für*

- Naturforschung B, 1963,18(3):56-67.
- [84] Rasched I, Oberer E. Ff coliphages: structural and functional relationships[J]. Nature Reviews Microbiology, 1986,50(4): 401-427.
- [85] Ocallaghan R, Bradley R, Paranchych W. The effect of M13 phage infection upon the F pili of E. coli[J]. Virology, 1973,54(1):220-229.
- [86] Mcllellan H, Armstrong M R, Birch P. Yeast Two-Hybrid Screening for Identification of Protein-Protein Interactions in Solanum tuberosum[J]. Methods in molecular biology, 2021,23(54): 95-110.
- [87] Condelipes P, Fontes P M, Godinho-Santos A, et al. Towards personalized antibody cancer therapy: development of a microfluidic cell culture device for antibody selection[J]. Lab On A Chip, 2022,22(23): 4717-4728.
- [88] Chen Y F, Liu X Y, Yang M Y, et al. Integration of genetically engineered virus nanofibers and fibrin to form injectable fibrous neuron-rich hydrogels and enable neural differentiation[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2023,11(4): 802-815.
- [89] Mcllellan H, Armstrong M R, Birch P R J. Yeast Two-Hybrid Screening for Identification of Protein-Protein Interactions in Solanum tuberosum[J]. Methods in molecular biology, 2021,2354: 95-110.
- [90] Lee M S, Kwon M H, Kim K H, et al. Selection of scFvs specific for HBV DNA polymerase using ribosome display[J]. Journal of Immunological Methods, 2004,284(1): 147-157.
- [91] Parola C, Neumeier D, Reddy S T. Integrating high-throughput screening and sequencing for monoclonal antibody discovery and engineering[J]. Immunology, 2018,153(1): 31-41.
- [92] Marco A. Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments[J]. Microbial Cell Factories, 2011,10(1): 44-58.
- [93] Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics[J]. Frontiers in Immunology, 2017,(22)8:1603-1615.
- [94] Matz H, Dooley H. Shark IgNAR-derived binding domains as potential diagnostic and therapeutic agents[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2019,90(1): 100-107.
- [95] Zhu M, Gong X, Hu Y, et al. Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1[J]. Journal of Translational Medicine, 2014,12(1): 352-369.
- [96] Jovcevska I, Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies[J]. BioDrugs, 2020,34(1): 11-26.
- [97] Ibanez L I, De Filette M, Hultberg A, et al. Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection[J]. Journal of Infectious Diseases, 2011,203(8):

1063-1072.

- [98] Tillib S V, Ivanova T I, Vasilev L A, et al. Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2)[J]. *Antiviral Research*, 2013,97(3): 245-254.
- [99] Gu W L, Shi J Z, Cui P F, et al. Novel H5N6 reassortants bearing the clade 2.3.4.4b HA gene of H5N8 virus have been detected in poultry and caused multiple human infections in China [J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2022, 5(04): 1-27.
- [100] 梁正林, 何建忠, 覃文富等. 广西贵港市首例人感染 H5N6 禽流感死亡病例的临床特点及流行病学分析[J]. *中国热带医学*, 2019,19(06):591-594.
- [101] Li T, Huang M, Xiao H, et al. Selection and characterization of specific nanobody against bovine virus diarrhea virus (BVDV) E2 protein[J]. *PLoS One*, 2017,12(6): 178469-178485.
- [102] Fan W, Ji P, Sun X, et al. Corrigendum: Screening and identification of nucleocapsid protein nanobodies that inhibited Newcastle disease virus replication in DF-1 cells[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022,13(01): 1045834-1045848.
- [103] Hoey R J, Eom H, Horn J R. Structure and development of single domain antibodies as modules for therapeutics and diagnostics[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2019,244(17): 1568-1576.
- [104] 冯利利. 链球菌蛋白 G IgG 结合域的结构优化与应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [105] Ji P, Wang K, Zhang L, et al. A new nanobody-enzyme fusion protein-linked immunoassay for detecting antibodies against influenza A virus in different species[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022,298(12): 102709-102724.
- [106] Gong X, Zhu M, Li G, et al. Specific determination of influenza H7N2 virus based on biotinylated single-domain antibody from a phage-displayed library[J]. *Analytical Biochemistry*, 2016,500(01): 66-72.