

DOI:10.13350/j.cjpb.220304

• 论著 •

抗鼠疫菌保护性抗原 V 抗体的筛选与鉴定

谢青,李志颖,张卫,郭家正,黄莺,王茜,陈蕾,张艺潇,陆健昇*,杨志新*

(军事科学院军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

【摘要】 目的 构建纳米抗体噬菌体展示库,筛选抗鼠疫菌中和抗体,为鼠疫防治药物研制奠定基础。**方法** 重组鼠疫菌保护性抗原 V 蛋白免疫双峰驼,分离外周血单核细胞,提取 RNA,构建纳米抗体噬菌体展示库。以 V 蛋白为抗原对抗体库进行 3 轮固相筛选,挑选单克隆 phage-ELISA 鉴定,然后将富集的纳米抗体进行表达、纯化及评价。**结果** 成功构建了库容量为 1.9×10^8 的抗鼠疫菌 V 蛋白纳米抗体噬菌体展示库。经过 3 轮筛选,获得 8 种抗体序列,表达和纯化后经 ELISA 检测,8 株纳米抗体针对鼠疫菌 V 蛋白特异性良好且结合活性高。动物实验表明其中一株纳米抗体 VHH-hFc6 对鼠疫菌 201 株气溶胶攻击的保护率为 33%。**结论** 成功构建了抗鼠疫菌保护性抗原 V 蛋白的纳米抗体噬菌体展示库,筛选出 8 株抗 V 蛋白特异性纳米抗体,其中一株具有良好的中和活性。

【关键词】 鼠疫菌;V 抗原;纳米抗体;中和抗体

【中图分类号】 R378.6

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)03-0266-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Mar;17(3):266-271.]

Screening and identification of monoclonal antibodies against protective V antigen of *Yersinia pestis*

XIE Qing, LI Zhi-ying, ZHANG Wei, GUO Jia-zheng, HUANG Ying, WANG Xi, CHEN Lei, ZHANG Yi-xiao, LU Jian-sheng, YANG Zhi-xin (Institute of Biotechnology, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective To construct a Nanobody(Nb) phage display library to screen neutralizing antibodies against *Yersinia pestis* in order to facilitate the development of preventive and therapeutic drugs against plagues. **Methods** The bactrian camel was immunized with recombinant *Yersinia pestis* protective antigen V protein. Peripheral blood lymphocytes were isolated, total RNA was extracted, and a phage display library was constructed. Then, protein V was used as an antigen to screen the antibody library for three rounds, and phage-ELISA was used for monoclonal identification. The specificity and binding activity of the antibodies were identified by ELISA after the expression and purification of the enriched Nbs. And the neutralizing activity of the antibody in vivo was evaluated by the mouse protection experiment. **Results** The phage antibody library with effective library capacity of 1.9×10^8 and good diversity of nanobody against *Y. pestis* V protein was successfully constructed. Three rounds of screening were performed on the antibody library, and a 666-fold enrichment for specific phage antibodies was achieved. Through phage-ELISA identification and sequence analysis, two groups of phage Nanobody sequences with completely different sequences were obtained. They were successfully transformed into fusion proteins linked to human Fc, and were expressed and purified, named VHH-hFc-1~8 respectively. The eight nanobodies showed good specificities and high binding activity against *Y. pestis* V protein by ELISA. Further animal experiments showed that one of the nanobodies named VHH-hFc6 could produce 33% protection against *Y. pestis* 201 aerosol attack. The EC_{50} value of this nanobody was determined by ELISA to be 2.452 ng/mL. **Conclusion** A nanobody library against V protein has been successfully constructed, and eight specific nanobodies against *Y. pestis* protective antigen V protein have been screened, one of which has good neutralizing activity.

【Key words】 *Yersinia pestis*; V antigen; nanobody; neutralizing antibody

* 鼠疫是由鼠疫耶尔森菌引起的一种人畜共患性传染病,分为腺鼠疫、肺鼠疫和败血症型鼠疫三种类型,其传染性强,病程进展快,病死率极高^[1]。历史上曾发生过 3 次鼠疫大流行,导致 2 亿多人死亡,尽管近年来因为医疗卫生条件的改善和公众对传染病的认识的提高,鼠疫的发病率降低,但因鼠疫自然疫源地广泛,仍然很难彻底消灭,比如目前我国仍有 11 个鼠疫自然疫源地,人间鼠疫时有发生^[2]。2019 年 11 月 12 日,北

京市确诊来自内蒙古锡林郭勒盟苏尼特左旗的 2 例肺鼠疫病例。同时鼠疫也是一种潜在的生物恐怖剂和生物战剂^[3]。因此,为了有效防范和控制鼠疫疫情,有必

* **【通讯作者】** 陆健昇, E-mail: lujiansheng2008@163.com
杨志新, E-mail: yy_xiao@126.com

【作者简介】 谢青(1991-),女,山东临沂人,硕士研究生,主要从事生物安全方面的研究。E-mail: xqqwll0801@163.com

要建立全方位、多层次的防治措施。

目前针对鼠疫的治疗方法主要是抗生素治疗,但在马达加斯加已从人类鼠疫患者身上发现了具有多重耐药性的鼠疫耶尔森氏菌分离株^[4-5],因此除了抗生素外急需研究新的鼠疫治疗方法^[6]。鉴于此,以单克隆抗体为代表的特异、快速被动免疫治疗措施备受关注。已有研究表明,V抗原是鼠疫菌重要的保护性抗原,同时也是重要的毒力因子和低钙反应调节因子,具有良好的免疫原性和抗细胞吞噬作用^[7-9]。

在骆驼科动物体内同时存在两种免疫球蛋白,一种是传统抗体,一种是天然缺失轻链的重链抗体(heavy chain antibodies, HCAbs)。克隆重链抗体可变区得到的即是纳米抗体(Variable domain of heavy-chain antibody, VHH)^[10-11]。纳米抗体具有分子质量小、水溶性好、结合能力高、免疫原性低和便于工程化改造等优势,在抗体药物研发领域具有广阔前景。本实验以鼠疫菌保护性抗原V为抗原,通过免疫双峰驼构建纳米抗体噬菌体展示库并进行筛选,以期获得具有中和活性的抗鼠疫菌保护性抗原V蛋白的纳米抗体,为进一步开发预防和治疗鼠疫菌感染的抗体药物奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 试剂材料 重组鼠疫V蛋白,重组鼠疫F蛋白和EHC蛋白为本实验室制备;表达载体pTSE-hFc,噬菌粒载体pADSCFV-S,大肠埃希菌TG1,辅助噬菌体M13KO7,FreeStyle™ HEK293-F细胞由本实验室保存;鼠疫菌201株由军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所保存;HRP标记抗M13单抗购自义翘神州有限公司;HRP标记兔抗骆驼IgG和HRP标记山羊抗人IgG购自中杉金桥有限公司;RNA提取试剂盒购自美国Omega公司;SuperScript III First-Strand试剂盒购自美国Invitrogen公司;质粒提取试剂盒购自天根公司。

1.2 实验动物 成年雄性双峰驼,3岁龄,体重约为360 kg。

2 方法

2.1 骆驼免疫及血清抗体效价测定 取重组鼠疫菌V蛋白与佐剂等体积混合,双峰驼皮下多点免疫,免疫间隔为14 d,共5次免疫,每次免疫剂量为800 μg。初次免疫使用完全弗氏佐剂,第2-5次使用不完全弗氏佐剂。免疫接种前采集骆驼静脉血,分离血清,作为基础血清。

第3次和第4次免疫后各采集骆驼静脉血5 mL,分离血清,采用ELISA方法测定抗体效价。V蛋白包

被浓度为2 μg/mL,100 μL/孔。待检测骆驼血清从1:100起作倍比稀释,共稀释16个滴度。二抗HRP标记兔抗美洲驼IgG稀释度为1:5 000。骆驼免疫前基础血清作为阴性对照。OPD显色后用酶标仪检测492 nm/630 nm处的吸光值。

2.2 噬菌体纳米抗体展示库的构建 免疫完成后采集骆驼全血50 mL,利用淋巴细胞分离试剂盒完成对淋巴细胞的分离并提取总RNA。用随机引物按照反转录试剂盒进行反转录,获得cDNA。第1轮PCR:以合成的cDNA为模板,以设计的IgG特异性上游引物CALL001和下游引物CALL002^[12]PCR扩增抗体前导肽至CH2区序列;第2轮PCR:以回收的第一轮PCR产物为模板,以设计的VHH上游引物VHH-F和下游引物VHH-R PCR扩增VHH片段。回收PCR产物,双酶切后插入经同样酶切的噬菌粒载体pADSCFV-S,连接产物电击转化大肠埃希菌感受态细胞TG1,涂布2YT-GA(G:葡萄糖A:氨苄)琼脂平板,于37℃倒置培养过夜,次日作菌落计数并挑菌落测序用于判断纳米抗体噬菌体展示库质量和计算库容量。引物信息见表1。

表1 引物信息
Table 1 informations of primer sequence

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence
CALL001	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG
CALL002	GGTACGTGCTGTTGAAGTGTTC
VHH-F	CGGCCATGGCGGTCTCTAGCTGCTCTCACTG
VHH-R	TCCCGCGGCCGTGACWGGGTGAGAYGGGTGAC

2.3 特异性抗体的富集与筛选 用重组鼠疫菌V蛋白包被免疫管进行固相筛选,洗脱噬菌体感染E. coli TG1,取菌液涂板计算产出,其余全部涂2YT-GA平板,再次进行纳米抗体展示库的呈现和筛选,共进行3轮次筛选。

3轮筛选完成后用V蛋白为抗原进行phage-ELISA鉴定,无关抗原作阴性对照,A值为阴性对照3倍及以上视为阳性克隆,计算阳性率。将第3轮筛选后所有阳性克隆送六合华大公司测序,用IMGT/V-QUEST和DNAClub软件分析抗体序列。

2.4 抗体的表达与纯化 以筛选出的阳性克隆为模板,设计引物扩增VHH基因片段,插入含有人源抗体恒定区基因片段的表达载体pTSE-hFc,构建VHH-hFc融合蛋白表达质粒,转染FreeStyle™ HEK293-F进行表达,表达上清用1 mL HiTrap™ MabSelect Xtra柱进行纯化,收集洗脱峰置换至PBS溶液,15% SDS-PAGE电泳分析目的蛋白。

2.5 抗体特异性检测 采用ELISA法。分别将重组鼠疫菌V蛋白和无关抗原用底物包被缓冲液稀释至2

$\mu\text{g/mL}$, $100\ \mu\text{L/孔}$ 包被 96 孔酶标板, 同时设置空白孔对照, $4\ ^\circ\text{C}$ 包被过夜, PBST 洗涤 3 次; 2% 脱脂牛奶 $37\ ^\circ\text{C}$ 封闭 2 h, 弃封闭液; 加入 $5\ \mu\text{g/mL}$ 的待测抗体, $100\ \mu\text{L/孔}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 1.5 h, PBST 洗涤 6 次; 加入 1:5000 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG, $100\ \mu\text{L/孔}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 45 min, PBST 洗板 6 次; 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ OPD 显色液, 避光显色 10 min, 加入 2mol/L H_2SO_4 终止反应, 用酶标仪测定 492 nm/630 nm 处吸光度(A)值。

2.6 抗体结合活性测定 同 2.5 方法。重组鼠疫苗 V 蛋白包被浓度为 $2\ \mu\text{g/mL}$, 空白对照为 PBS。待测抗体 3 倍梯度稀释, 共 15 个浓度梯度。二抗为 HRP 标记的山羊抗人 IgG, OPD 显色, 酶标仪测定 492 nm/630 nm 处吸光度(A)值。

2.7 体内中和活性检测 取 200 CFU($10\times\text{LD}_{50}$) 的鼠疫苗 201 株^[13-15] 以液体气溶胶肺递送方式攻毒小鼠, 24 h 后通过尾静脉对小鼠注射待测抗体 $400\ \mu\text{g}$ ($100\ \mu\text{L}$), 观察并记录攻毒后 14 d 内各组小鼠生存情况, 绘制生存曲线。

2.8 统计学分析 统计学分析及制图均采用 Graph-Pad Prism 8.0 完成。实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 显著性分析采用单因素方差分析或 t 检验, 生存曲线显著性分析采用 Log-Rank 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1 免疫骆驼血清效价

以 V 蛋白包被酶标板, 采用间接 ELISA 法测定免疫骆驼血清中针对 V 抗原的特异性抗体水平, 结果如图 1。免疫后双峰驼血清抗 V 特异性抗体滴度明显增加, 效价达 1:102 400, 可用于抗 V 特异性纳米抗体噬菌体展示库的构建。

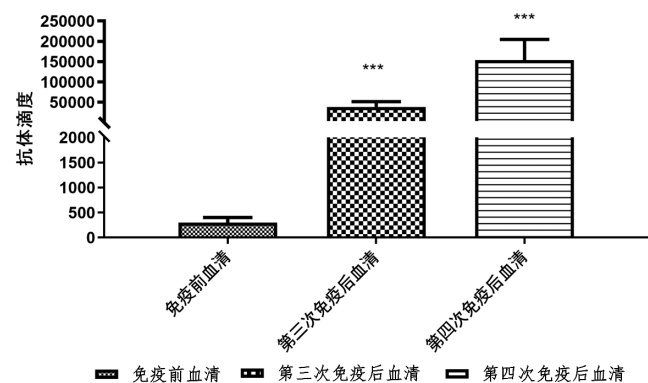


图 1 骆驼血清中抗 V 特异性抗体滴度

Fig. 1 Anti-V specific antibody titers in the serum of camel

2 纳米抗体噬菌体展示库的构建及鉴定

分离获得骆驼外周血淋巴细胞 2.6×10^7 个, 提取

总 RNA, 反转录合成 cDNA, 利用特异性引物通过巢式 PCR 扩增获得 VHH 片段。第 1 轮 PCR 扩增获得前导序列至 CH2 区片段, 传统抗体的该片段约为 900 bp, 重链抗体的该片段约为 700 bp。第 2 轮 PCR 扩增 VHH 基因 FR1-FR4 基因片段约为 450 bp(图 2), 与预期相符。将 VHH 基因克隆至 pADSCFV-S 噬菌粒载体上, 电转 TG1 后涂布 $2\times\text{YTGA}$ 平板, 次日对不同稀释倍数对照质粒和连接产物平板中的单菌落进行计数, 纳米抗体噬菌体展示库原始库容量为 1.9×10^8 。挑取 16 个单克隆进行 PCR 鉴定(图 3)并测序, 结果显示均成功插入 VHH 片段且各序列均不相同(图 4), 正确插入率为 100%, 多样性良好, 有效库容量为 1.9×10^8 。

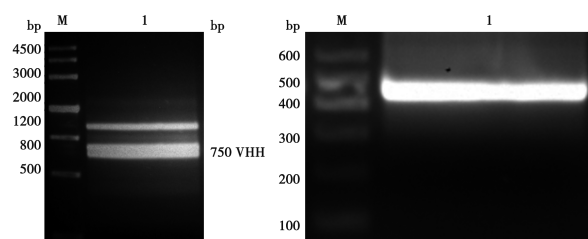


图 2 PCR 扩增 VHH 片段

Fig. 2 VHH PCR amplification results

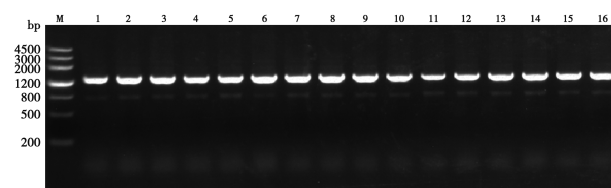


图 3 纳米抗体噬菌体展示库正确插入率检测

Fig. 3 Detection of correct insertion rate of antibody library

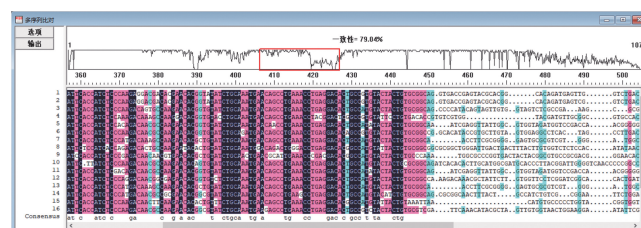


图 4 初级纳米抗体噬菌体展示库多样性分析

Fig. 4 Diversity analysis of primary phage antibody library

3 纳米抗体噬菌体展示库的富集筛选

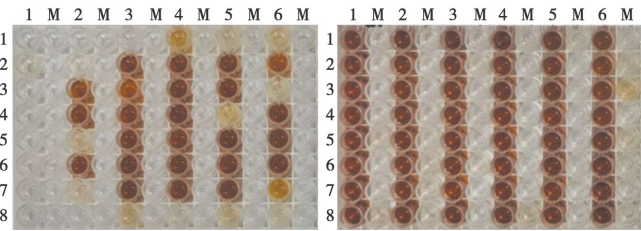
以 V 蛋白为抗原包被免疫管进行特异性抗体筛选。一方面, 降低每一轮包被抗原的浓度, 另一方面增加每一轮洗涤的次数, 以达到富集特异性抗体的目的。对噬菌体抗体库共进行 3 轮筛选, 记录每轮噬菌体投入量产出量, 计算回收率(相对产量)。纳米抗体噬菌体展示库富集分析如表 2。每轮回收率都有提高, 经

过 3 轮筛选特异性抗体达到 666 倍富集。

表 2 纳米抗体噬菌体展示库富集分析 Table 2 Enrichment analysis of phage nano-antibody library					
筛选轮数 Screening rounds	投入量 (CFU/mL) Input	产出量 (CFU/mL) Output	产出量/ 投入量 Output/ input	富集倍数 Enrichment factor	
				N/1	N/2
1	5.0×10^{11}	9.0×10^5	1.5×10^{-6}		
2	3.0×10^{11}	1.4×10^7	4.6×10^{-5}	31	
3	1.0×10^{11}	1.0×10^8	1.0×10^{-3}	666	22

4 阳性克隆的 Phage ELISA 鉴定及序列分析

通过 Phage ELISA 对 1 轮和 3 轮洗脱的重组噬菌体进行鉴定,结果见图 5,重组噬菌体阳性率显著提高。从第 3 轮淘洗的细菌平板上挑取鉴定的 96 个单克隆菌落均为特异性结合 V 的阳性克隆,阳性率为 100%(图 6)。全部阳性克隆菌液送六合华大公司测序,有 61 个是正确 VHH 序列,DNAMAN 软件比对分析抗体序列如表 3,通过 IMGT/V-QUEST 网站分析分别属于 8 个不同基因组,且互相之间存在明显差异,分别将其命名为 V-VHH-1、V-VHH-2、V-VHH-3、V-VHH-4、V-VHH-5、V-VHH-6、V-VHH-7、V-VHH-8。



A 第 1 轮筛选 B 第 3 轮筛选 1~6 包被 V 蛋白 M 无关蛋白混合物。
图 5 纳米抗体噬菌体展示库的筛选
A The first round of screening B The third round of screening
1-6 Coated with V protein M Coated with the mix of unrelated proteins

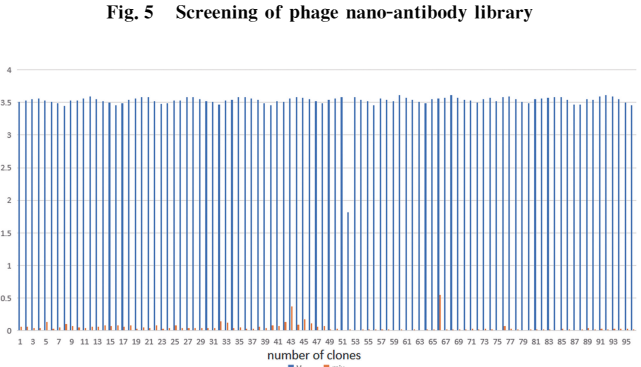


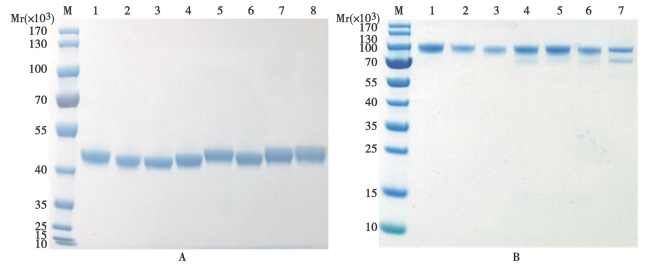
图 6 重组噬菌体 phage-ELISA 检测
Fig. 6 Detection of phage-ELISA to recombinant phage

表 3 抗体序列分析 Table 3 Antibody sequence analysis				
噬菌体抗体 Phage antibodie	数量(株) Quantity (strain)	重复率(%) Repetition rate	基因来源 Genetic	同源性 (%) Homology
V-VHH-1	26	42.62 (26/61)	Vicpac IGHV3S53 * 01 F	61.4
V-VHH-2	7	11.48 (7/61)	Vicpac IGHV3S28 * 01 F	82.64
V-VHH-3	4	11.48 (7/61)	Vicpac IGHV3S53 * 01 F	68.03
V-VHH-4	7	3.28 (2/61)	Vicpac IGHV3S54 * 01 F	86.46
V-VHH-5	2	16.39 (10/61)	Vicpac IGHV3S28 * 01F	82.29
V-VHH-6	10	6.56 (4/61)	Vicpac IGHV3S55 * 01 F	85.04
V-VHH-7	4	4.92 (3/61)	Vicpac IGHV3S54 * 01 F	87.50
V-VHH-8	1	3.28 (2/61)	Vicpac IGHV3S29 * 01 F	63.86

5 抗体表达质粒的构建及抗体的表达与纯化

纳米抗体分子质量小,单体分子半衰期短。为了延长纳米抗体的半衰期,将扩增 VHH 的基因插入携带人抗体重链恒定区基因的表达式载体 pTSE-hFc 中构建重组质粒进行表达,以获得 VHH-hFc 的融合蛋白,分别命名为 VHH-hFc1、VHH-hFc2、VHH-hFc3、VHH-hFc4、VHH-hFc5、VHH-hFc6、VHH-hFc7 和 VHH-hFc8。

将构建的 8 株抗体质粒分别转染 FreeStyle™ HEK293-F 细胞进行表达,离心收集上清,HiTrap™ MabSelect Xtra 柱纯化抗体蛋白,15% SDS-PAGE 电泳检测,结果显示 8 个样品蛋白分子质量均为 45 ku (图 7),与理论分子质量一致,且背景无明显杂带。利用 Gelpro32 软件计算蛋白纯度为 99%。



A 还原性 SDS-PAGE B 非还原性 SDS-PAGE M 蛋白分子质量标准 1~8 VHH-hFc1-8 纯化产物
图 7 SDS-PAGE 分析蛋白纯化结果
A Non-reducing SDS-PAGE B Reducing SDS-PAGE M Protein marker 1-8 Purified protein of VHH-hFc1-8
Fig. 7 SDS-PAGE analysis of protein purification results

6 抗体的鉴定

6.1 特异性 采用间接 ELISA 检测 8 株纳米抗体的与抗原的结合特性,结果如图 8。8 株抗体均能与 V 抗原特异性结合,VHH-hFc2、VHH-hFc4 和 VHH-hFc8 与鼠疫 F 抗原具有微弱结合,所有抗体均不与重组 BHc 抗原等非鼠疫抗原结合,表明获得的 8 株抗体针对鼠疫抗原均具有良好特异性。

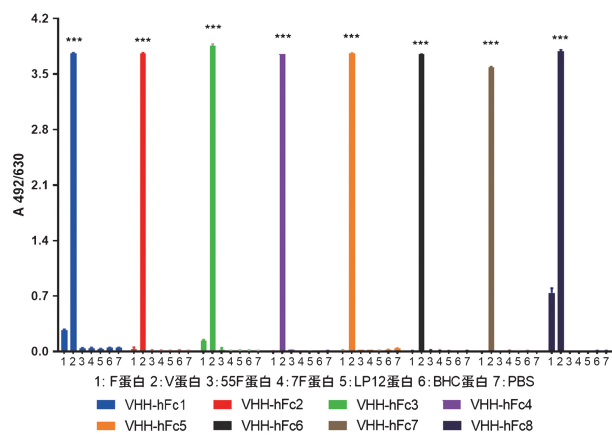


图 8 抗体特异性检测
Fig. 8 Detection of antibodies specificity

6.2 结合活性 采用间接 ELISA 法检测 8 株纳米抗体的与抗原的结合活性, GraphPad Prism 8.0 拟合结合曲线(图 9)并计算出 8 株抗体与 V 蛋白的 EC_{50} 值均可达到 ng/mL 水平, 其中 VHH-hFc6 亲和力最高, 可以达到 $2.452 ng/mL$ 。

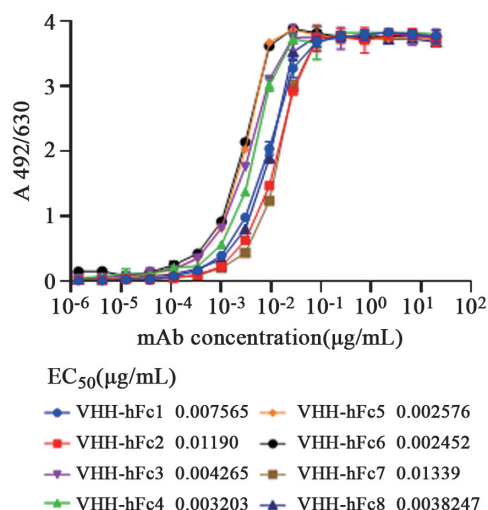


图 9 抗体结合活性检测
Fig. 9 Detection of antibodies binding activity

6.3 体内中和活性 挑选结合活性最高的 3 株抗体 VHH-hFc4、VHH-hFc5、VHH-hFc6 通过动物试验检测中和活性, 结果如表 4 和图 10。在 $10 \times LD_{50}$ 鼠疫菌 201 株攻毒下, 对照组小鼠在攻毒后 4 d 内全部死亡, 平均存活时间为 3.8 d。VHH-hFc6 组至实验结束仍有 2 只小鼠存活, 存活率为 33.3% (2/6), VHH-hFc4 和 VHH-hFc5 组小鼠分别在攻毒后 8 d 和 13 d 内全部死亡, 但均可延长小鼠平均存活时间。采用 Log-rank (Kaplan-Meier 生存分析法) 检验评价与对照组比较的保护效果差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 4 抗体被动保护小鼠效力试验结果

抗体名称 Antibody name	抗体剂量 (ug) Antibody dose	存活/总数 Survival/total	存活率 (%) Survival rate	平均存活天数(d) Mean survival days
VHH-hFc4	400	0/6	0.00	5.0±1.6
VHH-hFc5	400	0/6	0.00	6.5±3.3
VHH-hFc6	400	2/6	33.33	10.7±3.3
PBS	-	0/6	0.00	3.6±0.5

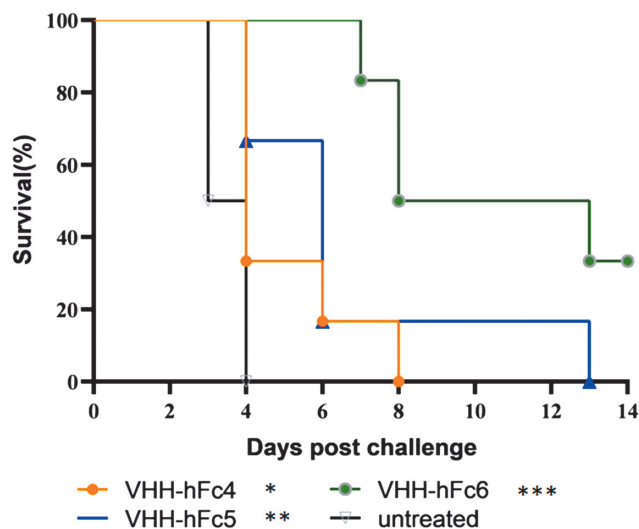


图 10 抗体被动保护小鼠生存曲线
Fig. 10 Survival curve of mice passively protected by antibodies

讨论

历史上曾出现过 3 次鼠疫大流行, 造成人类生命财产严重损失^[16]。目前, 鼠疫主要依靠抗生素治疗, 链霉素是世界卫生组织(WHO)推荐治疗鼠疫最有效的药物, 特别是对肺鼠疫的治疗^[17]。然而, 鼠疫多重耐药菌株的分离引起人们对鼠疫菌耐药性的重视。因此, 研制抗生素以外的鼠疫药物具有重要意义。研究表明, 单克隆抗体可用于治疗鼠疫^[18-21]。2010 年, Xiao 等^[20]从非免疫人源噬菌体文库中筛选出一株抗 F1 人源单抗(m252)和两株抗 LcrvV 人源单抗(m253, m254), 单独使用两株抗 LcrvV 人源单抗时不具保护作用, 而与抗 F1 人源单抗联合使用时保护率可达 83%。提示筛选针对 F1 和 V 抗原的单抗能获得具有保护效果的中和单抗, 可用于鼠疫的特异性治疗。因此, 中和单抗有望成为鼠疫的特异性治疗药物。

相对于传统抗体, 纳米抗体分子质量小, 具有更好的溶解性、稳定性以及较好的结合活性, 且在序列和结构上与人源抗体的重链可变区具有较高的同源性。同时基于其结构简单, 便于构建多价抗体, 可由原核表达获得, 生产成本低, 组织穿透力强等特点, 因此纳米抗体已广泛应用于抗体药物研发。而利用纳米抗体噬菌体展示库技术制备功能性纳米抗体是目前疾病诊断

和治疗用抗体药物研发的重要途径。骆驼体内重链抗体含量高,有利于纳米抗体的研发和生产,因此本研究选择骆驼作为实验动物进行免疫研制纳米抗体。但纳米抗体也存在一些劣势,比如半衰期短,在体内易被清除,从目前已进入临床阶段的情况来看,纳米抗体主要以双价、多价、PEG 修饰、Fc 融合以及白蛋白融合等方法出现,这样不仅可以增加药物的疗效,也可以延长药物半衰期^[22-23]。本研究通过免疫骆驼构建纳米抗体噬菌体展示库,将筛选的 VHH 抗体片段与带有人重链恒定区基因的表达式质粒融合,构建重组纳米抗体,以延长半衰期,表达纯化的 8 株抗体经 ELISA 检测均具有良好的特异性和亲和力。体内活性评价显示其中 VHH-hFc6 抗体在鼠疫菌气溶胶攻击时可对小鼠提供部分保护,另外两株抗体 VHH-hFc4 和 VHH-hFc5 可延长小鼠存活时间。本研究筛选的单克隆抗体显示了一定的中和活性,有望作为鼠疫的治疗或预防性抗体进行进一步开发。

【参考文献】

- [1] Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague [J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(1): 35-66.
- [2] Luo HM, Dong XQ, Li FR, et al. A cluster of primary pneumonic plague transmitted in a truck cab in a new enzootic focus in China [J]. Am J Trop Med Hyg, 2013, 88(5): 923-928.
- [3] Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, et al. Plague as a biological weapon: Medical and public health management [J]. JAMA: J Am Med Assoc, 2000, 283(17): 2281-2290.
- [4] Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk [J]. PLoS One, 2007, 2(3): e309.
- [5] Galimand M, Guioule A, Gerbaud G, et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid [J]. N Engl J Med, 1997, 337(10): 677-680.
- [6] Anisimov AP, Amoako KK. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(11): 1461-1475.
- [7] Eisele NA, Anderson DM. Dual-function antibodies to *Yersinia pestis* LcrV required for pulmonary clearance of plague [J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(12): 1720-1727.
- [8] d'Arco C, McCormick AA, Arnaboldi PM. Single-dose intranasal subunit vaccine rapidly clears secondary sepsis in a high-dose pneumonic plague infection [J]. Vaccine, 2021, 39(9): 1435-1444.
- [9] Do Y, Koh H, Park CG, et al. Targeting of LcrV virulence protein from *Yersinia pestis* to dendritic cells protects mice against pneumonic plague [J]. Eur J Immunol, 2010, 40(10): 2791-2796.
- [10] Harmsen MM, Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 77(1): 13-22.
- [11] Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology [J]. Veter Immunol Immunopathol, 2009, 128(1-3): 178-183.
- [12] Pardon E, Laeremans T, Triest S, et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology [J]. Nat Protoc, 2014, 9(3): 674-693.
- [13] Zhou D, Tong Z, Song Y, et al. Genetics of Metabolic Variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus [J]. J Bacteriol, 2004, 186(15): 5147-5152.
- [14] Tian G, Qi Z, Qiu Y, et al. Comparison of virulence between the *Yersinia pestis* Microtus 201, an avirulent strain to humans, and the vaccine strain EV in rhesus macaques, *Macaca mulatta* [J]. Human Vaccine Immun, 2014, 10(12): 3552-3560.
- [15] Song Y, Tong Z, Wang J, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans [J]. DNA Res, 2004, 11(3): 179-197.
- [16] Ansari I, Grier G, Byers M. Deliberate release: Plague-A review [J]. J Biosaf Biosecur, 2020, 2(1): 10-22.
- [17] Carruthers JD, Fagien S, Joseph JH, et al. Daxibotulinumtoxin A for injection for the treatment of glabellar lines: Results from each of two multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 studies (Sakura 1 and Sakura 2) [J]. Plast Reconstr Surg, 2020, 145(1): 45-58.
- [18] Hill J, Copse C, Leary S, et al. Synergistic protection of mice against plague with monoclonal antibodies specific for the F1 and V antigens of *Yersinia pestis* [J]. Infect Immun, 2003, 71(4): 2234-2238.
- [19] Lillo AM, Velappan N, Kelliher JM, et al. Development of anti-*Yersinia pestis* human antibodies with features required for diagnostic and therapeutic applications [J]. Immunotargets Ther, 2020(9): 299-316.
- [20] Xiao X, Zhu Z, Dankmeyer JL, et al. Human anti-plague monoclonal antibodies protect mice from *Yersinia pestis* in a bubonic plague model [J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13047.
- [21] Anderson GW JR, Worsham PL, Bolt CR, et al. Protection of mice from fatal bubonic and pneumonic plague by passive immunization with monoclonal antibodies against the F1 protein of *Yersinia pestis* [J]. Am J Trop Med Hyg, 1997, 56(4): 471-473.
- [22] Soetens E, Ballegeer M, Saelens X. An inside job: Applications of intracellular single domain antibodies [J]. Biomolecules, 2020, 10(12): 1663.
- [23] 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.

【收稿日期】 2022-01-30 【修回日期】 2022-03-10