

DOI:10.13350/j.cjpb.220301

• 论著 •

# SARS-CoV-2 核糖体展示纳米抗体文库的构建与筛选

王馨悦<sup>1,2</sup>, 韩秋雪<sup>2,3</sup>, 王振山<sup>2,4</sup>, 焦翠翠<sup>5</sup>, 毕津豪<sup>2,4</sup>, 许梦园<sup>2,5</sup>, 赵永坤<sup>2</sup>, 冯娜<sup>2</sup>, 王铁成<sup>2</sup>, 迟航<sup>2\*\*</sup>, 杨松涛<sup>2\*\*</sup>, 夏咸柱<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江哈尔滨 150036; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 北京协和医学院比较医学中心; 4. 吉林农业大学动物医学院; 5. 吉林大学动物医学学院)

**【摘要】** **目的** 通过核糖体展示技术构建一个库容量大、多样性好的严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2) 特异性纳米抗体文库; 利用真核表达系统表达并制备具有筛选质量的 SARS-CoV-2 受体结合域 (Receptor Binding Domain, RBD) 蛋白, 并作为钓饵蛋白应用于纳米抗体的筛选。 **方法** 利用多种 SARS-CoV-2 特异性免疫原免疫羊驼, 分离高免疫羊驼外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMCs), 提取总 RNA 并反转录获得 cDNA, 通过巢式 PCR 扩增纳米抗体基因, 同时引入核糖体文库所需要的展示元件。利用重叠延伸 PCR 将 VHH 片段与间隔序列 gene-III 连接, 构建核糖体展示纳米抗体文库。利用 Expi293F 哺乳动物细胞表达 SARS-CoV-2 RBD 蛋白, 通过 StrepTrap HP 亲和柱纯化重组蛋白, 将其作为钓饵蛋白对所构建的纳米抗体文库进行四轮特异性筛选。 **结果** 成功构建核糖体展示纳米抗体文库, 该文库的多样性高、完整性好, 有效库容为  $1.12 \times 10^{13}$ 。利用哺乳动物细胞表达系统表达出 SARS-CoV-2 RBD 蛋白, 纯度高达 97.5%。通过对核糖体纳米抗体文库进行四轮特异性筛选, 获得纳米抗体的基因序列, 经鉴定序列多样性丰富。 **结论** 成功构建 SARS-CoV-2 核糖体展示纳米抗体文库, 制备出具有筛选质量的抗原并应用于抗体库的筛选, 获得结构完整且序列多样性丰富的纳米抗体基因序列, 为 SARS-CoV-2 纳米抗体的获得奠定了研究基础。

**【关键词】** 新型冠状病毒; 纳米抗体; 核糖体展示; 抗体库; 真核表达

**【中图分类号】** R373.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)03-0249-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Mar;17(3):249-253.]

## Construction and screening of SARS-CoV-2 ribosomal display nanobody library

WANG Xin-yue<sup>1,2</sup>, HAN Qiu-xue<sup>2,3</sup>, WANG Zhen-shan<sup>2,4</sup>, JIAO Cui-cui<sup>5</sup>, BI Jin-hao<sup>2</sup>, XU Meng-yuan<sup>2,5</sup>, ZHAO Yong-kun<sup>2</sup>, FENG Na<sup>2</sup>, WANG Tie-cheng<sup>2</sup>, CHI Hang<sup>2</sup>, YANG Song-tao<sup>2</sup>, XIA Xian-zhu<sup>1,2</sup> (1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150036, China; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; 3. Peking Union Medical College Beijing; 4. College of Veterinary Medicine, Jilin Agricultural University; 5. College of Veterinary Medicine, Jilin University) \*\*

**【Abstract】** **Objective** To construct a large and diverse library of nanobody to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) using ribosomal display technology, in addition, SARS-CoV-2 specific antigen with screening quality was obtained by eukaryotic expression, and it was used in the screening of nano antibodies. **Methods** In the current study, alpacas were immunized with a variety of SARS-CoV-2 specific immunogens. One-week post the sixth immunization, peripheral blood Mononuclear cells (PBMCs) of the hyper-immune alpaca was collected, total RNA was extracted and then cDNA was obtained by reversed transcription. Alpaca variable domains of heavy-chain-only antibodies (VHHs) genes were amplified using a two-step nested PCR approach, and the display elements needed for ribosome display were also introduced. A ribosome display alpaca VHH library was constructed by linking VHH fragment with spacer gene-III by overlapping extended PCR. The SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain (RBD) protein was further expressed in Expi293F mammalian cells and purified by StrepTrap HP affinity column. Then the purified RBD was used as antigen bait to select the VHH library. A total of four rounds of screening was conducted. **Results** The ribosome display alpaca VHH library was successfully constructed. The library was identified to be of high diversity and integrity, with an effective library capacity of  $1.12 \times 10^{13}$ . SARS-CoV-2 RBD protein was successfully expressed by mammalian expression system with a purity over 97.5%. The VHH sequences were successfully obtained by four rounds of specific screening, and the identified sequences were rich in diversity. **Conclusion** The SARS-CoV-2 ribosome display alpaca VHH library was successfully constructed, and the antigens with screening quality were prepared and applied to the screening of the antibody library. Finally, the complete structure and rich sequence diversity of nano antibody gene sequence were ob-

\* **【基金项目】** 第五批吉林省青年科技人才托举工程项目(No. QT202115)。

\*\* **【通讯作者】** 夏咸柱, E-mail: xiaxzh@cae.cn; 杨松涛, E-mail: yst62041@163.com; 迟航, E-mail: ch\_amms@163.com

**【作者简介】** 王馨悦(1997-), 女, 吉林通化人, 硕士研究生, 主要从事动物病毒学相关研究。E-mail: wangxinyue970121@126.com

tained, which laid a foundation for the subsequent acquisition of SARS-CoV-2 nanobodies.

**【Key words】** SARS-CoV-2; nanobody; ribosome display; antibody library; eukaryotic expression.

新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)是由新型冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2)所引起的一种呼吸道传染病<sup>[1]</sup>。2020年3月11日,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)宣布 COVID-19 全球大流行。截至到2022年1月2日,新冠肺炎已经导致全球2.89亿人次感染,死亡540万例<sup>[2]</sup>,感染病例分布212个国家,防控形势十分严峻。

当前,国内外应对 COVID-19 以疫苗免疫接种为主要预防手段,然而接种疫苗后的保护期以及疫苗的安全性仍需持续关注<sup>[3]</sup>。与常规治疗药物相比,抗体药物由于靶向性强、特异性好、疗效显著和毒副作用低等特点,近年来在临床中的应用逐渐增多,为疾病的预防和治疗提供了新的选择。抗体小型化是抗体药物的发展方向之一,骆驼科动物(骆驼、羊驼等)及鲨鱼体内存在一种仅有重链二聚体的免疫球蛋白,基于重链抗体可变区制备的纳米抗体(nanobodies, Nbs),又被称为 VHH 抗体(heavy-chain variable domains, VHHs)。纳米抗体具有水溶性好、稳定性强、易表达、特异性和亲和力高、对人的免疫原性低等诸多优点,已显示出广阔的前景。纳米抗体分子质量仅为15 ku,是传统全分子抗体分子质量的十分之一,是具有完整结构功能的最小抗原结合片段。纳米抗体的开发与传统的杂交瘤细胞制备单克隆抗体不同,一般通过非免疫纳米抗体文库或免疫纳米抗体文库进行筛选。常用的纳米抗体文库构建技术包括噬菌体展示技术、核糖体展示技术、酵母展示技术等,其中核糖体展示技术是一种利用功能性蛋白质相互作用筛选的技术,将 mRNA 与其转录翻译后正确折叠的蛋白质共同连接在核糖体上,形成“mRNA-核糖体-蛋白质”三元复合物,实现了基因型与表型的偶联。与噬菌体展示和酵母展示等抗体库技术相比,核糖体展示技术具有易于建库、库容量大、易于筛选、全程在体外操作且多样性好等优势<sup>[4]</sup>,已广泛应用于小分子抗体的筛选和进化<sup>[5-8]</sup>。

本研究基于核糖体展示技术构建 SARS-CoV-2 纳米抗体文库,通过真核表达获得具有筛选质量的特异性抗原,并将其应用于 SARS-CoV-2 纳米抗体的筛选,以期获得结构完整且序列多样性的纳米抗体基因序列,为 SARS-CoV-2 纳米抗体药物研发奠定基础。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

#### 1.1 质粒、菌株和细胞 pcDNA3.1-SECD 重组质

粒, pCAGGS 载体质粒, *E. coli* JM109 感受态细胞以及哺乳动物 Expi293F 细胞由中国农业科学院长春兽医研究所动物病毒学与特种动物疫病学实验室保存。

**1.2 实验动物** 两周岁龄雌性澳洲羊驼,饲养于山西太原七峰山羊驼养殖场。

**1.3 主要试剂** DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, 限制性内切酶 EcoR I 和 Kpn I 购于美国 NEB 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Thermo 公司; 氨苄青霉素, 异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG), β-半乳糖苷酶的显色底物(X-gal), PBS 粉末和脱脂奶粉购自北京索莱宝科技有限公司; 预染蛋白 Marker 购于上海雅酶生物医药科技有限公司; Trans5K DNA Marker, Trans2K DNA Marker, Trans DNA Marker I 购自北京全式金生物技术有限公司, StrepTrap HP 纯化柱购于美国 GE 公司; Costar96 孔板购自美国 Corning Incorporated 公司。

PBST 溶液: 11.2 g PBS 粉末和 0.5 mL 吐温 20, 用 DEPC 水定容至 1 L; PBSM 溶液: 5.6 g PBS 粉末和 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 用 DEPC 水定容至 500 mL; PBSTM 溶液: 于 PBST 中加入 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>; PBSMBH 溶液: 9 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、3% BSA、2.5 mg/ml 肝素钠和 5.6 g PBS 粉末, 用 DEPC 水定容至 500 mL; 筛选封闭液: 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、3% BSA、2.5 mg/ml 肝素钠和 5.6 g PBS 粉末, 用 DEPC 水定容至 500 mL; EB 缓冲液: 100 mmol/L EDTA、10 μg/ml 酿酒酵母 RNA, 5.6 g PBS 粉末, 用 DEPC 水定容至 500 mL。

## 2 方法

**2.1 高免羊驼 PBMCs 的分离与 cDNA 的合成** 两周岁龄雌性澳洲羊驼用 SARS-CoV-2 特异性免疫原免疫, 将 4 只健康的羊驼随机分为 2 组, 实验组 2 只羊驼采用颈部多点注射 mRNA 疫苗 200 μg/只/次、DNA 疫苗 1 mg/只/次和 RBD 蛋白 240 μg/只·次, 对照组 2 只羊驼注射相同体积 PBS, 间隔 3 周免疫一次, 共计免疫 6 次。于末次免疫后 1 周从羊驼颈静脉采血 40 ml, 使用 SepTube 分离管分离单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMCs), 在无 RNA 酶环境利用 Trizol 法提取总 RNA, 使用 SUPERSCRIPT III 1<sup>ST</sup> STRAND 试剂盒反转录为 cDNA。

**2.2 核糖体展示文库的构建与库容鉴定** 实验所需引物由上海生工生物工程有限公司合成<sup>[9]</sup>, 引物序列见表 1。以合成的 cDNA 为模板, 以 CH2-R 和 Al-pVh-LD 为引物通过巢式 PCR 扩增重链可变区前的

信号肽区和CH2恒定区,扩增片段约为700 bp。反应条件:95 °C 15 min;94 °C 1 min,67 °C 1 min,72 °C 1 min,共35个循环;72 °C 10 min。胶回收PCR产物为模板,以AlpVh-FR1-Fnew、P4-L和P4-S为引物扩增重链可变区的框架区和铰链区,扩增的VHH基因片段约为450 bp。反应条件:98 °C 10 s;98 °C 10 s,55 °C 5 s,72 °C 1 min,共5个循环;98 °C 10 s,64 °C 5 s,72 °C 1 min,共30个循环;72 °C 8 min。以M13丝状噬菌体(M13KO7)基因为模板,P5和P6-new为引物扩增间隔区 gene III片段,大小约为330 bp。反应条件:98 °C 10 s;98 °C 10 s,55 °C 5 s,72 °C 5 s,共5个循环;98 °C 10 s,68 °C 5 s,72 °C 1 min,共30个循环;72 °C 8 min。通过重叠延伸PCR(Gene splicing by overlap extension PCR, SOE PCR)将等摩尔浓度的VHH与gene III基因片段组装成为VHH-gene III核糖体展示文库。反应条件:98 °C 10 s;98 °C 10 s,68 °C 5 s,72 °C 1 min,共30个循环;72 °C 8 min。文库基因片段大小约为800 bp。最终合成的文库置于-80 °C保存备用。

根据构建核糖体展示文库的DNA的质量和碱基数计算文库的库容大小<sup>[10]</sup>,计算公式如下:1 μg 1000bp DNA = 1.52 pmol = 9.1 × 10<sup>11</sup>。核糖体展示文库的库容 = (1000/800) × 9.1 × 10<sup>11</sup> × DNA的质量

**2.3 SARS-CoV-2 RBD蛋白表达、纯化和鉴定** 以pcDNA3.1-SECD质粒为模板,利用Primer Premier 5.0软件设计引物并引入EcoR I、Kpn I酶切位点,tPA信号肽,TwinStrep标签等元件。引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表1。以pcDNA3.1-SECD为模板,利用引物RBD-F和RBD-RPCR扩增RBD基因,经过EcoR I、Kpn I酶切位点克隆到pCAGGS载体中,得到pCAGGS-RBD重组质粒并测序。当细胞密度达3.0 × 10<sup>6</sup>个/mL,将鉴定正确的pCAGGS-RBD重组质粒瞬时转染到Expi293F细胞中,转染质粒浓度为1 μg/mL,终体积为1.5 mL;在脂质体组加入80 μL的Reagent试剂,用Opti-MEM定容至1.5 mL,室温孵育5 min。将质粒混合物加入脂质体组中,室温孵育25 min,将质粒-脂质体混合液滴加到Expi293F哺乳动物细胞中,培养18 h后加入增强剂,6 d后收取细胞上清和细胞,通过Western blot检测蛋白表达情况。根据StrepTrap HP亲和纯化说明书对收获的哺乳动物细胞上清蛋白进行纯化,收集流穿液、洗涤液和洗脱液。

**2.4 核糖体展示纳米抗体文库的筛选与序列鉴定** 以SARS-CoV-2 RBD蛋白包被96孔板,包被浓度为100 μg/mL,200 μL/孔,同时设置对照孔,4 °C包被过夜。弃去包被液后每孔用预冷的PBSM溶液洗涤3

次,每次3 min。加入含5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>的PB-SMBH溶液,200 μL/孔,室温封闭2 h。弃去封闭液,用预冷的PBSTM溶液清洗3次,再用预冷的PBSM洗涤2次,冰上预冷20 min,使用TNT T7 Quick for PCR DNA试剂盒同步进行文库翻译,将翻译结束的文库加入到封闭好的孔中,100 μL/孔,4 °C孵育2 h。弃去文库,用预冷的PBSTM溶液清洗3次,再用预冷的PBSM洗涤2次,加入EB缓冲液,200 μL/孔,置于42 °C水浴5 min,以洗脱mRNA,使用HP RNA Isolation Kit提取上清中的mRNA。纯化后的mRNA反转录成cDNA。重复以上文库构建步骤,重新构建VHH-gene III文库。构建的文库经过NanoDrop定量,在相同的数量级下进行下一轮筛选,共计进行四轮筛选。将筛选后平末端的纳米抗体展示文库添加A尾,并连接至pMD-20T载体,挑选单克隆委托吉林库美生物科技有限公司测序。

表1 引物信息

Table 1 Quote sequence information

引物名称 Name	序列大小 Size(bp)	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
AlpVh-LD	18	CTTGGTGGTCCTGGCTGC
CH2-R	23	GGTACGTGCTGTTGAACCTGTCC
AlpVh-FR1-Fnew	84	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGA ACAGCCACCATGGGCCAGCCGGCCatgg ccCAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG
P4-L	46	ATGATGATGATGTTGCGGCCGCTGG TTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG
P4-S	45	ATGATGATGATGTTGCGGCCGCGCT GGGGTCTTCGCTGTGGTGGC
P5	50	CGGCCCAACATCATCATCATCA TCATCATCATGCTTTCCATTCTGG
P6-new	48	ATATATATAGGCCACCCGTGAAGG TGAGCAGCAGCACCGTAATCAGT CCGGAATTCGCCACCATGGACGCCAT- GAAGCGGG
RBD-F	106	GCCTCTGCTGTGTTCTGCTGCTCTGC GGCGCGTGTTCGTGAGTAACTCGAG GGTCCAACCAACAGAGAGCA
RBD-R	36	CGGGGTACCAGTTCACACACTTG TTCTTCACCAG

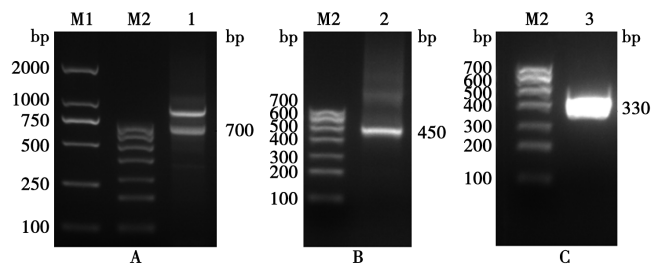
## 结果

### 1 SARS-CoV-2核糖体展示纳米抗体文库的构建与鉴定

以反转录得到的cDNA的第一链为模板进行第一轮PCR,扩增出700 bp的目的基因片段(图1A)。再以第一轮PCR纯化后的产物为模板进行第二轮PCR,扩增得到VHH基因片段,大小约为450 bp(图1B)。以丝状噬菌体M13KO7的基因组为模板扩增出330 bp的目的片段(图1C)。与预期结果一致。

以等摩尔的第二轮PCR产物与gene III胶回收产物为模板构建VHH-gene III连接产物,PCR检测目的基因片段约为800 bp(图2),SARS-CoV-2核糖体展

示纳米抗体文库构建成功。根据公式计算 SARS-CoV-2 RBD 纳米抗体核糖体文库的库容为  $1.12 \times 10^{13}$ , 高于核糖体展示文库最低库容  $10^{12}$ , 表明构建的核糖体展示纳米抗体文库库容良好, 可用于纳米抗体的筛选。

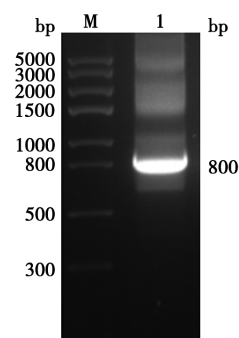


M1 Trans2K DNA 标志物 M2 Trans DNA 标志物 I 1 第一轮 PCR 扩增产物 2 VHH 扩增产物 3 gene III 扩增产物  
图 1 VHH 和 gene III PCR 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳分析  
M1 Trans2K DNA Marker M2 Trans DNA Marker I 1 The first round of PCR amplification products 2 VHH of PCR amplification products 3 Gene III of PCR amplification products  
Fig. 1 Results of PCR amplification VHH and gene III

## 2 SARS-CoV-2 RBD 蛋白的真核表达、纯化和鉴定

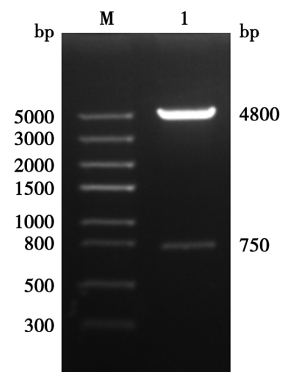
SARS-CoV-2 RBD 经 EcoR I 和 Kpn I 双酶切得到 4 800 bp 的载体片段和 750 bp 的 SARS-CoV-2 RBD 目的基因 (图 3)。对目的基因片段测序, 经 Megalign 软件比对与构建 SARS-CoV-2 RBD 的原序列同源性为 100%, 与预期一致, 表明 SARS-CoV-2 RBD 重组质粒构建成功。

Western blot 结果显示, 构建的 SARS-CoV-2 RBD 重组质粒可以在 Expi293F 哺乳动物细胞中表达 30ku 的 SARS-CoV-2 RBD 蛋白, 且该蛋白主要存在于细胞上清中 (图 4)。

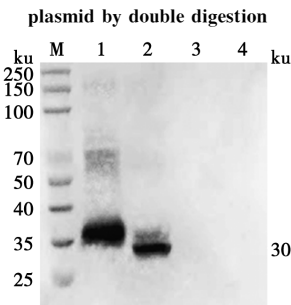


M Trans5K DNA 标志物 1 SOE-PCR 构建核糖体展示文库产物  
图 2 SOE-PCR 扩增核糖体展示文库  
M Trans5K DNA Marker 1 Construction of ribosomal display library products by SOE-PCR  
Fig. 2 SOE-PCR amplified ribosome display library results

取 SARS-CoV-2 RBD 蛋白进行纯化, SDS-PAGE 分析纯化的 SARS-CoV-2 RBD 为单一 30 ku 蛋白条带 (图 5)。薄层扫描分析 SARS-CoV-2 RBD 蛋白纯度为 97.5%, 可作为钓饵蛋白用于纳米抗体的筛选。



M Trans5K DNA 标志物 1 pCAGGS-RBD 重组质粒双酶切  
图 3 SARS-CoV-2 RBD 重组质粒双酶切鉴定  
M Trans5K DNA Marker 1 pCAGGS-RBD double digestion product  
Fig. 3 Identification of SARS-CoV-2 RBD recombinant plasmid by double digestion



M 蛋白分子质量标准 1 转染 SARS-CoV-2 RBD 重组质粒细胞上清 2 转染 SARS-CoV-2 RBD 重组质粒细胞裂解产物 3 转染 pCAGGS 空载体质粒细胞上清 4 转染 pCAGGS 空载体质粒细胞裂解产物  
图 4 SARS-CoV-2 RBD 表达蛋白的 Western blot 分析  
M Protein Ladder Marker 1 Protein expression of recombinant cell supernatant transfected with SARS-CoV-2 RBD 2 Protein expression of SARS-CoV-2 RBD recombinant plasmid cell lysate transfected 3 Protein expression of cell supernatant transfected with pCAGGS 4 Protein expression of cell lysate transfected with pCAGGS  
Fig. 4 Western blot identify the expression of SARS-COV-2 RBD protein

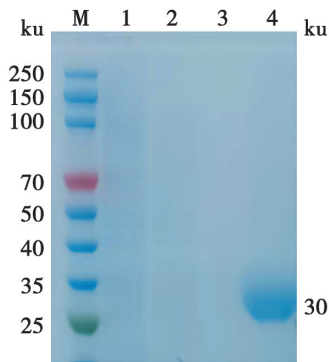
## 3 SARS-CoV-2 RBD 特异性纳米抗体的筛选与序列鉴定

对构建的 SARS-CoV-2 核糖体展示纳米抗体文库进行鉴定, 经 MEGA7 软件构建进化树对纳米抗体序列进行系统分类。随机挑选的 45 个单克隆基因序列间差异较大且不存在相同序列, 表明经特异性筛选获得的纳米抗体基因序列具有良好的多样性 (图 6)。

## 讨论

当前, 新型冠状病毒肺炎仍在全球广泛流行, 严重威胁人类健康与公共卫生安全。抗体药物具有特异性高、可快速引起机体的被动免疫反应等优点, 近年来越来越地被应用于传染病的治疗。与传统的全分子抗体相比, 纳米抗体分子质量更小, 易于体外改造和优化, 与靶点结合能力强、稳定性高。纳米抗体的互补决定 3 区 (complementarity determining region 3, CDR3) 长度为 16~24 个氨基酸, 而人抗体的重链可变区序列 CDR3 区为 9~12 个氨基酸, 因此纳米抗体更

容易形成“凸环”结构,与抗原特异性结合的能力更强<sup>[11]</sup>,本研究获得 37 条 VHH 抗体基因序列,其中有 15 条大于 13 个氨基酸,占比约为 40%,具有纳米文库的典型特征<sup>[12]</sup>。



M 蛋白分子质量标准 1 柱前上清 2 流穿液 3 洗涤液 4 洗脱液

图 5 纯化 SARS-CoV-2 RBD 蛋白的 SDS-PAGE 分析

M Protein Ladder Markerr 1 Unpurified cell supernatant 2 Fluid flow 3 Washing liquid 4 Eluent

Fig. 5 The purification results of SARS-COV-2 RBD protein were identified by SDS-PAGE

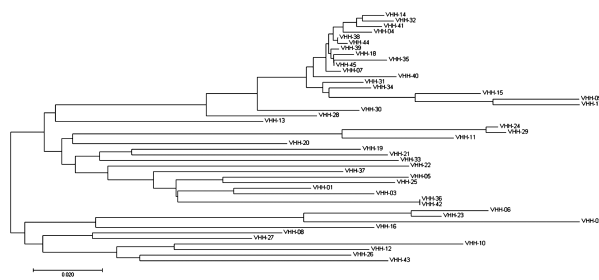


图 6 纳米抗体基因序列多样性分析

Fig. 6 Analysis of gene sequence diversity of nanobody

目前较为常见的抗体展示文库有核糖体展示文库、噬菌体展示文库和酵母展示文库<sup>[13]</sup>,核糖体展示文库技术与其他展示文库技术相比建库更为简便快捷,不仅突破了库容受限于转化效率的技术瓶颈,所构建展示库容量大。此外,由于核糖体展示技术的目的基因扩增和文库的筛选都是体外进行,不需要转化大肠埃希菌杆菌进行克隆和表达,因此通过倾向错误 PCR(error-prone PCR)和 DNA 改组(DNA shuffling)等方法,更容易引入突变,可在每一轮构建文库和回收 mRNA 时通过 PCR 技术对文库进行抗体体外定向进化,更有利于抗体的亲和力成熟<sup>[14]</sup>。快速制备出安全有效的抗体药物对疫情的控制具有重要的意义。本研究利用核糖体展示文库筛选抗体基因的方法有望成为应对突发疫病的重要工具<sup>[15]</sup>。

值得注意的是,由于核糖体展示文库的构建在体外进行,因此对于实验室的洁净程度和操作规范要求更高,PBMCs 分离以及 cDNA 合成均需在生物安全柜或超净工作台内进行,以防止细胞的污染和 RNA

的降解。对于核糖体展示文库的保存也应十分注意,文库中的游离片段由于缺少载体的保护,体外稳定性较差,所以应短时间保存于-80℃以下的超低温环境中,并尽快应用于抗体文库筛选试验,保存时间过长很可能造成核糖体展示文库的基因突变,并影响体外转录翻译的效率。

本研究成功构建 SARS-CoV-2 核糖体展示纳米抗体文库,有效库容为  $1.12 \times 10^{13}$ ,经鉴定构建的纳米抗体文库完整性好。利用哺乳动物表达系统成功表达出纯度为 97.5% 的 SARS-CoV-2 RBD 蛋白,将其作为钓饵蛋白对纳米抗体文库进行四轮特异性筛选,获得结构完整且序列多样性丰富的纳米抗体基因序列,为 SARS-CoV-2 纳米抗体的获得奠定了基础。本研究所建立的实验流程也可针对其他病原的纳米抗体文库的构建与筛选提供参考。

#### 【参考文献】

- [1] 李天志,徐国纲. 新型冠状病毒肺炎诊治研究进展[J]. 解放军医学杂志,2020,45(03):260-264.
- [2] Weekly epidemiological update on COVID-19 - 6 January 2022 [EB/OL] <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19-6-january-2022>.
- [3] 朱瑶,韦意娜,孙畅,等. 新型冠状病毒肺炎疫苗研究进展[J]. 预防医学,2021,33(2):143-148.
- [4] Pluckthun A. Ribosome display: a perspective[J]. Methods Mol Biol,2012(805):3-28.
- [5] Yau KYF, Groves MAT, Li S, et al. Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library[J]. J Immunol Methods,2003,281(1-2):161-175.
- [6] 单海涛. 骆驼抗人 TNF- $\alpha$  的 VHH 抗体的制备及其应用研究[D]. 南京:东南大学,2016.
- [7] Hanes J, Pluckthun A. *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94(10):4937-4942.
- [8] Rader C. Antibody libraries in drug and target discovery[J]. Drug Discov Today,2001,6(1):36-43.
- [9] 李敏. 核糖体展示纳米抗体文库的构建及 HIF-1 $\alpha$  纳米抗体的筛选[D]. 天津:天津大学,2015.
- [10] 李若微. 核糖体展示天然纳米抗体文库筛选 HIF-1 $\alpha$  单域重链抗体的应用基础研究[D]. 天津:天津大学,2018.
- [11] Muyldermans S. Nanobodies; natural single-domain antibodies [J]. Annu Rev Biochem,2013(82):775-797.
- [12] Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, et al. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains [J]. Protein Eng, 1994,7(9):1129-1135.
- [13] Veugelen S, Dewilde M, De Strooper B, et al. Screening and characterization strategies for nanobodies targeting membrane proteins[J]. Methods Enzymol,2017(584):59-97.
- [14] 朱姜. 核糖体展示 ScFv 文库的构建及使用核糖体展示技术筛选 壬基酚抗体[D]. 扬州:扬州大学,2008.
- [15] Groves M, Lane S, Douthwaite J, et al. Affinity maturation of phage display antibody populations using ribosome display[J]. J Immunol Methods,2006,313(1-2):129-139.

【收稿日期】 2022-01-19 【修回日期】 2022-03-15