

洪伟鸣,郭子杰,李睿婷,等.猪源唾液酸黏附素受体的表达及其纳米抗体筛选[J].江苏农业科学,2023,51(4):186-190.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.04.027

猪源唾液酸黏附素受体的表达及其纳米抗体筛选

洪伟鸣,郭子杰,李睿婷,李玲,徐海,张亮,宋亮

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:为制备特异性结合猪源 Sn 受体的纳米抗体分子,采用人工合成猪肺泡巨噬细胞 Sn 受体胞外区(*Sn4D*)基因序列,将其克隆至 pET-30a 载体中,并在大肠杆菌中诱导表达 Sn4D 蛋白;经 Ni 柱纯化的 Sn4D 蛋白作为靶标分子,在 T7 噬菌体展示的纳米抗体文库中进行 3 轮亲和筛选;然后从筛选产物中挑选单克隆噬菌体进行亲和力、特异性鉴定。结果显示,成功构建了 pET-30a-*Sn4D* 重组表达载体,并诱导表达出约 50 ku 的目标蛋白,Western-blot 显示该蛋白具有良好的反应活性;经过 3 轮亲和筛选,投入产出比逐渐升高,并从筛选产物中鉴定出 6 株特异性结合 Sn4D 的纳米抗体分子。该纳米抗体分子的获得为今后进一步开展抗病毒活性的研究奠定了良好基础。

关键词:猪繁殖与呼吸综合征病毒;Sn 受体;纳米抗体;亲和筛选

中图分类号:S852.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)04-0186-05

病毒受体是指在宿主细胞内部或者细胞膜表面可特异性地与病毒结合,并促使病毒感染的糖类、脂类以及蛋白质类分子单体或复合物,其主要功能是识别细胞内外的病毒粒子并与之结合^[1]。当前研究较为深入的病毒受体已达 30 多种,其中,唾液酸黏附素(Sialoadhesin,Sn),又被称为 Siglec-1 或者 CD169,是一种巨噬细胞限制的 I 型跨膜糖蛋白,属于唾液酸凝集素受体家族^[2-3]。猪源 Sn 是猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)入侵宿主的特异性细胞受体之一^[4],PRRSV 与 Sn 受体的结合增强了病毒向细胞表面的聚集,然后由网格蛋白介导内吞作用进入细胞^[5]。由于 Sn 受体在 PRRSV 感染

宿主过程中发挥着重要作用,使其成为了抗 PRRSV 药物研究的重要靶点。

早期研究表明,利用完整的靶细胞或者靶细胞膜免疫小鼠可筛选出能够阻断病毒结合的抗体。在研究 PRRSV 与巨噬细胞互作的过程中,发现 2 个肺泡巨噬细胞特异性单克隆抗体(mAb41D3、mAb41D5)能够阻断 PRRSV 的感染^[6]。因此,分离纯化细胞表面的病毒受体分子,再制备针对受体的单克隆抗体,通过特异性单克隆抗体竞争性阻断病毒与受体的结合,是开发抗病毒药物的重要策略之一^[7]。由于病毒受体分子在细胞表面丰度较低,其占比不足细胞膜总蛋白的万分之一,并且多为整合蛋白的形式包埋于脂质双层膜中,因此直接分离纯化受体分子的可操作性不强^[8]。以猪源 Sn 受体为例,其完整的分子结构包含 17 个结构域,又可分为胞外区、跨膜区和胞内区 3 个部分,其中胞外区具有免疫球蛋白样结构的区域是病毒结合位点^[9]。利用基因工程方法表达 Sn 受体胞外区蛋白分子,用于制备特异性抗体是值得尝试的途径。

收稿日期:2022-05-07

基金项目:江苏省高等学校大学生创新创业训练计划(编号:202112806010Y)。

作者简介:洪伟鸣(1981—),男,江苏泰州人,硕士,副教授,主要从事兽用生物药物研发,E-mail:jsahvc@163.com;共同第一作者:郭子杰(2002—),男,江苏扬州人,畜牧兽医专业在校。

通信作者:洪伟鸣,E-mail:jsahvc@163.com。

[25]黄强,文超良,孙从佼,等.鸡肠道微生物组成及其影响因素[J].中国家禽,2021,43(8):96-105.

[26]王晶,戴东,武书庚,等.鸡肠道微生物演替与早期定植的研究进展[J].生物技术通报,2020,36(2):1-8.

[27]黄永平,魏学强,马煜辉,等.乳杆菌属在抗细菌生物膜相关感染中的研究进展[J].重庆医学,2020,49(10):1697-1701.

[28]李仲兴,王秀华,赵建宏,等.用 M—H 琼脂进行五味子、白芍对 252 株临床菌株的体外抗菌效果观察[J].中医药研究,2000

(4):44-46.

[29]马廉兰,李娟,刘志春,等.五味子等中草药对肠道致病菌和条件致病菌的抗菌作用[J].赣南医学院学报,2003,23(3):241-244.

[30]袁昌衡,周启贵,杨飞,等.80 种中药水煎液对淋球菌的抑制试验[J].中国医院药学杂志,1997,17(11):508-509.

[31]李平兰,时向东,吕燕妮,等.常见中草药对两种肠道有益菌体外生长的影响[J].中国农业大学学报,2003,8(5):33-36.

纳米抗体是一种新型的基因工程抗体,因其天然缺失轻链,分子大小为纳米级,故被称为纳米抗体^[10]。相比传统抗体而言,纳米抗体因其分子量小、稳定性强、亲和力高、组织穿透力强、易于生产和制备等诸多优势,在疾病诊断、治疗和预防领域得到广泛应用^[11]。因此,本研究通过大肠杆菌表达系统制备 Sn 受体胞外区作为目标分子,利用 T7 噬菌体展示的纳米抗体文库中对其进行亲和筛选,以获得特异性结合 Sn 受体的纳米抗体分子,旨在为后续开展抗病毒活性研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌株与载体:DH5a、BL21 - DE3 大肠杆菌感受态细胞,购于诺唯赞公司;纳米抗体 T7 噬菌体展示文库、pET - 30a(+)载体由笔者所在实验室保存。主要试剂:限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、*T₄* DNA 连接酶均为宝生物公司产品;胶回收试剂盒为 QIAGEN 公司产品;SDS - PAGE 凝胶制备试剂盒,购自天根公司;HisTrap HP 层析柱,购自美国 GE 公司;其余试剂均为分析纯。主要仪器:台式离心机,购自美国 Beck - man 公司;BTX 电转化仪、PCR 仪,购自宝生物公司;Geldoc - It Imaging System,购自美国 UVP 公司。

1.2 重组表达载体 pET - 30a - Sn4D 的构建

参考 GenBank 中上传的猪源 Sn 序列,并根据大肠杆菌表达系统进行密码子优化,由金斯瑞公司合成 Sn 受体 4 个免疫球蛋白样结构域(Sn4D)基因序列,并在该基因序列的上下游分别添加 *Nde* I、*Xho* I 限制性酶切位点。利用上述酶切位点将 Sn4D 基因插入原核表达载体 pET - 30a(+),双酶切鉴定和测序分析,将鉴定正确的重组载体命名为 pET - 30a - Sn4D 并导入 BL21 - DE3 感受态细胞,冻存备用。

1.3 Sn4D 蛋白的表达与纯化

挑取携带重组表达载体 pET - 30a - Sn4D 的大肠杆菌单菌落,37 ℃ 摇床过夜培养,次日按 1 : 100 比例转接新鲜 LB(Kan⁺)培养液,37 ℃ 摇床培养至菌液 $D_{600\text{ nm}} = 0.5$,加入 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L,继续诱导培养 5 h,收获细菌,SDS - PAGE 鉴定 Sn4D 蛋白表达情况。利用 HRP Anti - 6X His Tag 抗体,Western - blot 鉴定纯化蛋白的反应活性。根据 HisTrap HP 说明书,纯化目的蛋白,经 NanoDrop

测定蛋白浓度。

1.4 纳米抗体文库筛选 Sn4D 特异性结合抗体

取 10 μL 纯化的 Sn4D 蛋白(100 $\mu\text{g/mL}$)加入到 900 μL NaHCO₃(1 mol/L, pH 值 = 8.6)包被缓冲液中,100 μL /孔包被酶标板,放置 4 ℃ 过夜。次日, PBST 缓冲液洗涤酶标板 1 次,加入 5% BSA 封闭液,37 ℃ 封闭 2 h, PBST 缓冲液洗板 3 次。用包被缓冲液调整纳米抗体 T7 噬菌体展示文库至 1×10^{11} PFU/mL 浓度,每孔加入 100 μL 并于 37 ℃ 孵育 1 h,使纳米抗体与 Sn4D 蛋白充分作用。回收反应溶液, PBST 洗涤酶标板 10 次,然后每孔加入 100 μL 1% SDS 溶液洗脱与靶蛋白结合的噬菌体。取 10 μL 洗脱产物经双层琼脂夹心法测定噬菌体滴度,剩余洗脱产物加入至对数生长早期的 BL21 宿主细菌中进行扩增,直至宿主细菌完全裂解。PEG - NaCl 法回收扩增的噬菌体,调整回收的噬菌体浓度,重复上述筛选步骤 2 次,每轮筛选逐步降低 Sn4D 蛋白包被量,同时增加 PBST 中 Tween - 20 浓度,以获得高亲和力的纳米抗体。利用公式:产出比 = (洗脱噬菌体量/投入噬菌体量) \times 100%, 计算每一轮筛选的得率。

1.5 阳性噬菌体的鉴定

测定第 3 轮洗脱产物的滴度并从平板上随机挑取 72 个单克隆噬斑,用 T7 噬菌体特异性引物 T7 Select UP Primer 5' - GGAGCTGTCTGATTCCAGTC - 3' 和 T7 Select DOWN Primer 5' - AACCCCTCAAGAC CCGTTTA - 3' 进行噬斑 PCR 鉴定。挑选 PCR 阳性扩增产物送金斯瑞公司测序分析,用 DNASTAR 软件分析纳米抗体氨基酸序列。

1.6 纳米抗体与 Sn4D 结合的亲和力、特异性测定

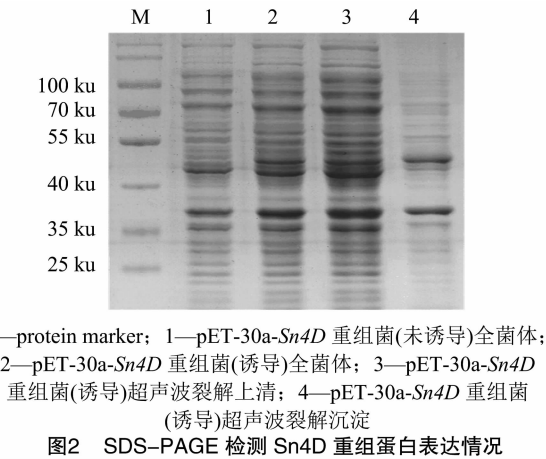
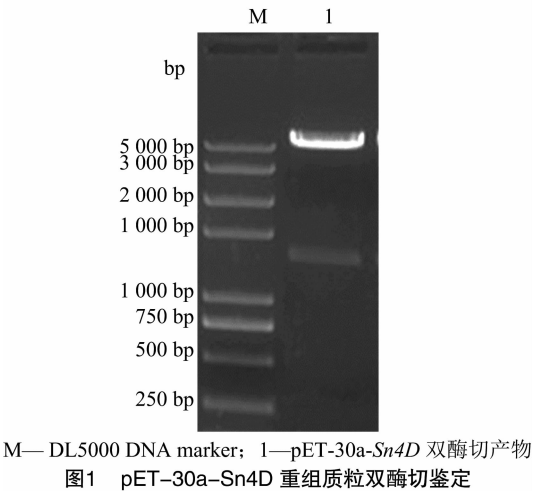
根据序列分析结果,选取展示不同纳米抗体的噬菌体进行培养,回收噬菌体扩增产物,并统一调整浓度至 1×10^{10} PFU/mL。分别向包被 Sn4D、BSA (50 ng/孔)酶标板中依次加入 100 μL 噬菌体。37 ℃ 孵育 1 h 后,弃去反应液, PBST 洗涤酶标板 10 次,然后每孔加入 100 μL 1% SDS 溶液洗脱与蛋白结合的噬菌体。双层琼脂法测定洗脱产物中噬菌体滴度,将 Sn4D 孔洗脱噬菌体量设为 *P*、BSA 孔洗脱噬菌体量设为 *N*,计算 *P/N* 值,比较不同纳米抗体与目标蛋白结合的特异性及亲和力强弱。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的构建与蛋白表达

将人工合成的 *Sn4D* 基因插入原核表达载体

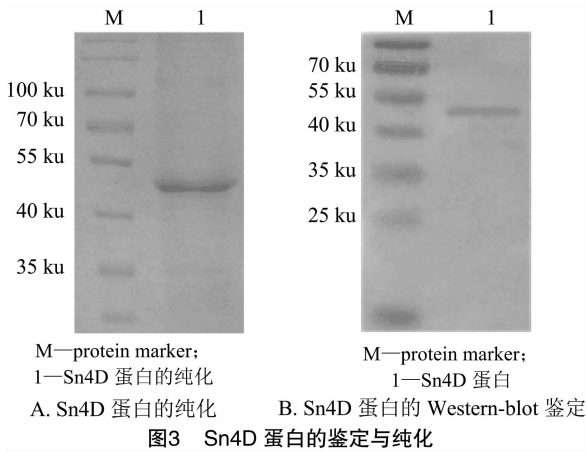
pET - 30a (+) 构建重组表达载体 pET - 30a - *Sn4D*。由图 1 可知,通过 *Nde* I、*Xho* I 双酶切鉴定切出约 1 300 bp 目的条带,大小与预计相符合。序列测定结果显示,插入的 *Sn4D* 基因片段序列完全正确,阅读框无移码。IPTG 诱导携带重组表达载体的大肠杆菌。由图 2 可知,SDS - PAGE 检测可见大小约 50 ku 的疑似 *Sn4D* 蛋白表达,通过超声波破碎



分析发现该蛋白主要以包涵体的形式存在。

2.2 *Sn4D* 蛋白鉴定与纯化

由图 3 可知,将回收 *Sn4D* 包涵体通过变复性处理,然后经 HisTrap HP 柱纯化得到条带相对单一的纯蛋白(图 3 - A);Western - blot 检测显示,目标蛋白与 HRP Anti - 6X His Tag 抗体呈现良好的反应性(图 3 - B)。将 Ni 柱纯化回收的蛋白经 NanoDrop 测定含量,并调整浓度至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, - 80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。



2.3 *Sn4D* 特异性重组噬菌体筛选

将纯化后的 *Sn4D* 蛋白作为靶分子并包被在固相载体上,使 T7 噬菌体展示的纳米抗体与之结合。由表 1 可知,筛选过程中包被的靶分子用量逐轮降低,而洗涤液 PBST 中 Tween - 20 含量逐渐升高,通过加压筛选有利于获得高亲和的纳米抗体分子。第 1 轮筛选产出比仅为 0. 072%,而第 2 轮筛选则提高到 1. 27%,第 3 轮进一步降低了投入噬菌体的量,但仍有 1. 13% 产出比,因此经过 3 轮筛选特异性结合 *Sn4D* 蛋白的噬菌体得到有效富集。

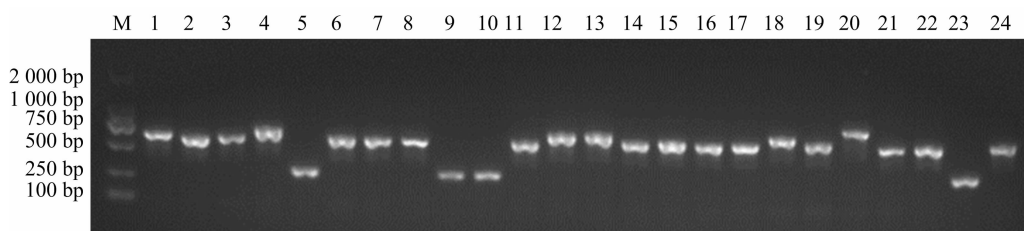
表 1 亲和筛选过程中噬菌体的富集

亲和筛选 (轮)	<i>Sn4D</i> (ng)	Tween - 20 (%)	投入噬菌体量 (PFU)	洗脱噬菌体量 (PFU)	产出比 (%)
1	100	0.05	1.0×10^{10}	7.2×10^6	0.072
2	50	0.10	1.0×10^{10}	1.27×10^8	1.270
3	25	0.20	1.0×10^9	1.13×10^7	1.130

2.4 单克隆噬菌体的鉴定

纳米抗体基因插入在 T7 噬菌体衣壳蛋白 p10B 基因下游,融合表达的衣壳蛋白在组装成 T7 噬菌体头部的同时将纳米抗体展示于表面。通过 PCR 方法检测插入位点的纳米抗体基因。由图 4 可知,

携带纳米抗体基因的噬菌体 PCR 可扩增出约 750 bp 条带,而未携带纳米抗体基因的噬菌体仅扩增出 250 bp 条带。从第三轮洗脱产物中随机挑选 72 个单克隆噬菌斑进行 PCR 鉴定,共计鉴定得到 63 个携带纳米抗体基因的噬菌体。将 PCR 产物进



M—DNA marker; 1~24—24 个单克隆噬菌体

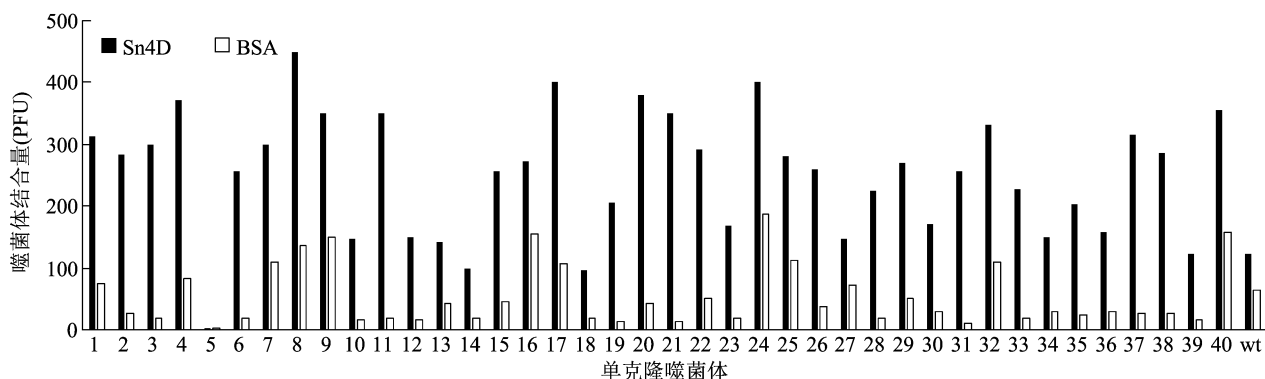
图4 单克隆噬菌体 PCR 鉴定

行序列测定,通过比对纳米抗体氨基酸序列,获得 42 个不同氨基酸组成的纳米抗体。

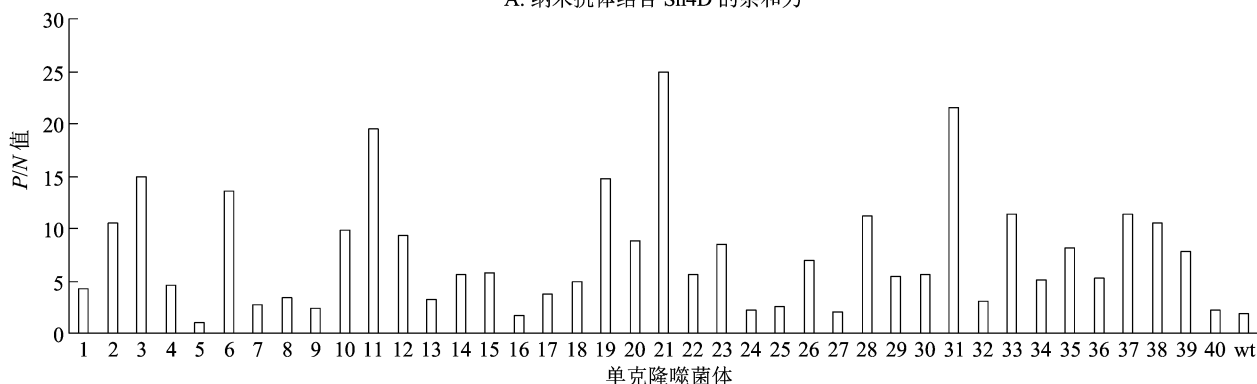
2.5 纳米抗体亲和力、特异性检测

选取 40 株展示不同纳米抗体的 T7 噬菌体分别与 Sn4D、BSA 相作用。通过比较不同株噬菌体与 Sn4D 结合数量的多少,以此评价其展示的纳米抗体分子与 Sn4D 结合能力的强弱;比较同一株噬菌体

分别与 Sn4D、BSA 结合数量的比值,以此来判定其展示的纳米抗体与 Sn4D 结合的特异性。由图 5 可知,第 9、24 株噬菌体虽然能够高亲和力地结合 Sn4D,但也能高效结合 BSA(图 5 - A),因此其展示的纳米抗体特异性较低(图 5 - B);第 11、21、31 株噬菌体仅与 Sn4D 有高亲和力结合,而不与 BSA 结合,表现出良好的亲和力与特异性。



A. 纳米抗体结合 Sn4D 的亲和力



B. 纳米抗体结合 Sn4D 的特异性

图5 纳米抗体结合 Sn4D 的亲和力、特异性检测

3 讨论

Sn 受体由部分分化的巨噬细胞亚群表达,而猪源 Sn 受体仅存在于肺泡巨噬细胞(PAM)上^[12],从细胞中直接分离、纯化难度较大。因此,本研究中截取与病毒互作的 Sn4D 结构域,并在大肠杆菌表达系统中实现了高效表达。虽然原核表达系统缺

乏加工、折叠以及修饰等功能,但可快速制备高纯度的靶标蛋白,这可为纳米抗体文库的淘选奠定良好的基础。

纳米抗体是一种发现于骆驼科、鲨鱼科的重链抗体,相比传统抗体而言有着许多无可比拟的优势,在抗病毒研究中的得到广泛应用。Liu 等以 PRRSV 相对保守的 Nsp-9 蛋白为靶标,从噬菌体

展示文库中筛选出 8 株抗 PRRSV Nsp-9 蛋白的纳米抗体,然后构建 MARC-145 细胞系来稳定表达活性最好的 Nb6 株纳米抗体,发现该细胞系可以抑制 PRRSV 基因组复制与转录,感染病毒后不出现病变^[13]。本研究利用已构建的羊驼纳米抗体 T7 噬菌体展示文库^[14],针对 Sn4D 蛋白开展 3 轮亲和筛选,通过降低靶标蛋白包被量、提高洗涤缓冲液中吐温含量等手段,加压筛选能够高亲和力结合 Sn4D 蛋白的纳米抗体分子。由表 1 可知,产出比在逐轮升高,目的噬菌体得到了有效富集。由于纳米抗体分子大约包含 150 个氨基酸,在 T7 噬菌体表面展示构成一定的空间位阻,随着次级文库的反复扩增,部分噬菌体克隆可能会出现纳米抗体基因丢失的现象,因此需要对筛选产物中噬菌体单克隆进行鉴定,以确定纳米抗体分子的完整性。由图 4 可知,约 15% 的噬菌体克隆丢失了纳米抗体基因。

采用固相载体包被靶标蛋白的方式进行亲和筛选,筛选体系中除了 Sn4D 靶标蛋白,还有 BSA 封闭蛋白,因此洗脱产物中的噬菌体可能针对 Sn4D 和 BSA 同时进行了有效富集,有必要分别测定单克隆噬菌体与 Sn4D、BSA 结合的特异性以及结合能力的强弱。由图 5 可知,第 9、24 株噬菌体能够同时高亲和力地结合 Sn4D、BSA 蛋白,故其结合的特异性不强;而第 11、21、31 株噬菌体仅与 Sn4D 高亲和力结合,显示出良好的特异性。考虑到原核表达的 Sn4D 蛋白与 PAM 细胞表面的天然 Sn 蛋白存在构象差异,因此仍需要制备 PAM 细胞,对筛选到的纳米抗体分子做进一步的亲和力、特异性鉴定。

本研究通过构建原核重组表达载体,制备高纯度 Sn4D 受体蛋白作为靶标,经过 3 轮亲和筛选成功获得 6 株能够高亲和力、特异性结合 Sn4D 蛋白的纳米抗体分子,为后续进一步开展抗病毒活性研究奠定了坚实基础。

参考文献:

- [1]徐 雷,冯若飞,马忠仁. 病毒受体研究进展[J]. 动物医学进展,2015,36(2):88-92.
- [2]de Schryver M, Leemans A, Pintelon I, et al. Comparative analysis of

- the internalization of the macrophage receptor sialoadhesin in human and mouse primary macrophages and cell lines[J]. Immunobiology, 2017,222(6):797-806.
- [3]O'Neill A S G, van den Berg T K, Mullen G E D. Sialoadhesin - a macrophage - restricted marker of immunoregulation and inflammation [J]. Immunology, 2013,138(3):198-207.
- [4]叶梦雪,朱建中,陈南华. 猪繁殖与呼吸综合征病毒受体及其在病毒感染中的作用研究进展[J]. 动物医学进展,2020,41(12):102-107.
- [5]Jiang Y B, Khan F A, Pandupuspitasari N S, et al. Analysis of the binding sites of porcine sialoadhesin receptor with PRRSV [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013,14(12):23955-23979.
- [6]Vanderheijden N, Delputte P L, Favoreel H W, et al. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages[J]. Journal of Virology, 2003,77(15):8207-8215.
- [7]Simmons J G, Hutt - Fletcher L M, Fowler E, et al. Studies of the Epstein - Barr virus receptor found on Raji cells. I. Extraction of receptor and preparation of anti - receptor antibody[J]. Journal of Immunology, 1983,130(3):1303-1308.
- [8]Morrison K A, Wood L, Edler K J, et al. Membrane extraction with styrene - maleic acid copolymer results in insulin receptor autophosphorylation in the absence of ligand[J]. Scientific Reports, 2022,12(1):3532.
- [9]May A P, Jones E Y. Sialoadhesin structure [J]. Results and Problems in Cell Differentiation, 2001,33:139-151.
- [10]Liu B Y, Yang D W. Easily established and multifunctional synthetic nanobody libraries as research tools [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022,23(3):1482.
- [11]Pablo Salvador J, Vilaplana L, Pilar Marco M. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019,411(9):1703-1713.
- [12]Sun W, Xie Z, Zhang S, et al. Identification of the porcine sialoadhesin gene promoter region and its cell - specific expression in porcine alveolar macrophage cells[J]. Genetics and Molecular Research, 2014,13(4):9615-9621.
- [13]Liu H L, Wang Y, Duan H, et al. An intracellularly expressed Nsp9 - specific nanobody in MARC - 145 cells inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication [J]. Veterinary Microbiology, 2015,181(3/4):252-260.
- [14]徐 海,王 健,郭长明,等. 单域抗体 T7 噬菌体展示文库构建与鉴定[J]. 浙江农业学报,2021,33(1):27-33.