



# 条纹斑竹鲨的抗乙肝表面抗原的单域抗体 筛选与重组抗体活性探究

王 婵, 钟 波, 吕正兵, 王 磊, 陈剑清  
(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 对免疫 HBsAg-ad 亚型抗原的条纹斑竹鲨中血清、脾脏和淋巴细胞进行多组学测序结果综合分析筛选出特异性序列, 构建重组表达质粒 pET-Duet-his-sumo-Anti-HBsAg-S1、pET-Duet-his-sumo-Anti-HBsAg-S2, 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3), 并诱导表达以及纯化重组单域抗体, 通过 ELISA 和细胞水平检测重组单域抗体的活性。结果表明: 通过生物信息学分析筛选出 2 条特异性序列, 在 16 °C、0.5 mmol/L 诱导剂条件下可获得 2 mg/mL 以上的重组蛋白; ELISA 检测显示均与 HBsAg 具有较好的结合力, 细胞水平活性分析得到 Anti-HBsAg-S1 具有较好的病毒抑制效果和生物学活性。该研究结果对其他抗原的特异性抗体筛选提供理论参考。

**关键词:** 单域抗体; 条纹斑竹鲨; 乙肝表面抗原; 新抗原受体可变区; 重组表达  
**中图分类号:** Q51                      **文献标志码:** A                      **文章编号:** 1673-3851 (2022) 01-0115-08

## The screening of Anti-HBsAg single domain antibody from *Chiloscyllium plagiosum* and the study on the activity of recombinant antibody

WANG Chan, ZHONG Bo, LÜ Zhengbing, WANG Lei, CHEN Jianqing  
(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** The serum, spleen and lymphocytes of *Chiloscyllium plagiosum* immune to HBsAg-ad subtype antigen were subjected to multi-omics sequencing and the specific sequences were screened from the comprehensively analyzed results. Recombinant expression plasmids pET-Duet-his-sumo-Anti-HBsAg-S1 and pET-Duet-his-sumo-Anti-HBsAg-S2 (S1 and S2 represent sequences) were established and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), respectively. Through induction expression and purification of the recombinant single-domain antibody, its activity was detected by ELISA and cell level. The results showed that two specific sequences were screened by bioinformatics analysis, and the recombinant protein above 2 mg/mL could be obtained under the effect of 16 °C and 0.5 mmol/L inducer. ELISA showed that all had good binding with HBsAg. Cell level activity analysis showed that anti-HBsAg-S1 had good virus inhibitory effect and biological activity. The results of this study hopefully provide a theoretical reference for the screening of specific antibodies of other antigens.

**Key words:** single-domain antibody; *Chiloscyllium plagiosum*; Hepatitis B surface antigen; VNAR; recombinant expression

## 0 引言

乙型病毒性肝炎(简称乙肝)是由乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)侵染生命体而导致的一种疾病。在人体感染 HBV 后,急性乙型肝炎容易转变成慢性乙型肝炎,甚至转变成肝硬化或肝细胞癌[1]。在全球范围内,病毒性肝炎造成的死亡人数正在增加,预计到 2040 年,该数字将上升 60%[2]。目前,乙肝的治疗主要以抗病毒药物为主,而关于直接使用抗体作为治疗剂的研究还很少,其原因主要是普通双链抗体分子量大,免疫原性强,且抗体制备量低、过程复杂[3]。

单克隆抗体是生物技术中最成功的发现之一,并被用作基础生物化学、生物传感、诊断和治疗人类疾病的关键试剂[4-5]。单克隆抗体具有较多优点,但仍有一定的局限性[6-7],而分子量较小的天然重链抗体受到广泛研究。鲨鱼新抗原受体可变区(Variable domain of the new antigen receptor, VNAR)和骆驼重链可变区片段(Variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH)都是新分离出的单体结合结构域[8-11]。单域抗体大小仅为 12~15 kDa,在诊断和治疗应用方面都是潜在的、具有吸引力的免疫球蛋白替代品[8, 12-14]。免疫球蛋白新抗原受体(Immunoglobulin new antigen receptor, IgNAR)存在于软骨鱼类中,在护士鲨(*Ginglymostoma cirratum*)中首次被分离出来,后续又在条纹斑竹鲨(*Chiloscyllium plagiosum*)等体内被发现[15-19]。相比于传统的抗体,VNAR 具有优良的稳定性和溶解性[20],小尺寸和穿透能力使其有可能进入致密组织[21]。VNAR 具有与抗原裂隙结合和阻断酶的活性位点的倾向,有利于其在体内更稳定的存在,且对多种抗原裂解酶的活性位点具有高的结合亲和力[22]。鲨鱼在系统发育上不同于哺乳动物,因此最大限度地发挥了靶向免疫原性的潜力[23-24],通过动物免疫方式也可以获得靶特异性和高亲和力的抗体[25]。

本文通过对免疫 HBsAg-ad 亚型抗原的条纹斑竹鲨多组学测序结果的综合分析,获得特异性单域抗体基因序列,利用原核表达得到抗 HBsAg 的单域抗体,并测定重组抗体的结合力和生物学活性。本文结果为开发慢性乙型病毒性肝炎相关诊断试剂和治疗药物提供实验思路和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

条纹斑竹鲨由福建兴国海洋农场提供,平均体长 40 cm;鲨鱼饲养设备由浙江理工大学生物化学研究所提供;大肠杆菌 BL21(DE3)、pET-Duet-his-sumo 载体由本实验室保存;HepG2-NTCP 细胞和病毒颗粒由中山大学刘宽程博士提供。

HBsAg-ad 购自北京百桥瑞景生物技术有限公司,鼠抗 HBsAg(H2F4)/HRP 购于 Bioss 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购于 Takara 公司,DMEM/F12 培养基、胎牛血清、含 EDTA 胰酶、青霉素链霉素双抗购于 Gibco 公司,DMSO 购于 MP 生物医疗公司,PEG 购于阿拉丁,PVDF 膜、蛋白裂解液和 PMSF 购于 Thermo 公司,ELISA 酶标条、Sumo 蛋白酶与 Buffer 购于索莱宝公司,0.1% 明胶溶液购于 Millipore 公司,乙型肝炎病毒 e 抗原检测试剂盒和乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒购于上海科华生物工程股份有限公司。

### 1.2 鲨鱼免疫与抗体筛选

购买的鲨鱼在人工配制的海水中适应 7 d,待生命状态稳定后免疫 HBsAg-ad 抗原,选择腹部皮下多点注射方法进行免疫,每隔 15 d 进行一次免疫,共免疫 4 次,每次免疫前在鲨鱼尾静脉取血,分离血清,样品送至杭州景杰生物科技有限公司进行质谱检测。在首次免疫后第 60 天,最后一次取血分离淋巴细胞并解剖鲨鱼取脾脏,鲨鱼脾脏和淋巴细胞进行转录组检测,并进行分析,筛选出数据库中免疫相关的序列,分别获得免疫相关的转录组数据和质谱数据。使用鲨鱼脾脏和淋巴细胞提取的 RNA 进行反转录扩增,扩增出仅含有 IgNAR 可变区的序列,对数据库中的序列进行汇总分析,并对其中不同序列的数量进行统计。通过对三个数据库进行综合分析,获得在免疫鲨鱼中特异性增加的 VNAR 序列。

### 1.3 载体构建与诱导表达

将筛选出的 VNAR 氨基酸残基序列以 pET-Duet-his-sumo 为表达载体进行 Anti-HBsAg-S1、Anti-HBsAg-S2 全基因合成,将含有目的基因的工程菌活化,转接到新鲜的含有氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)的 LB 液体培养基中,37℃、220 r/min 培养过夜并提取质粒,取 2~5  $\mu$ L 重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态中,在含有 Amp 抗性的 LB 固体平板上挑取 2~3 个单菌落,转接到 5 mL 含有 5  $\mu$ L Amp 的新鲜 LB 液体培养

基中, 37 °C、220 r/min 培养 3~4 h, 当菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.5~0.6 时加入不同量 IPTG 诱导剂, 使得终浓度分别为 1.0 mmol/L 和 0.5 mmol/L, 以不加诱导剂的空白对照。分别在 37、16 °C 温度下诱导表达, 取 1 mL 菌液, 剩余菌液 12000 r/min 离心去除上清, PBS 清洗并溶解沉淀, 冰浴条件下超声破碎处理, 12000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清和沉淀, 根据 SDS-PAGE 结果选择最佳诱导表达浓度温度和 IPTG 浓度, 扩大培养。

#### 1.4 蛋白纯化与酶切

将扩大培养得到的菌体上清用 0.45 μm 滤膜过滤后加入到平衡后的镍柱中, 摇床 4 °C 孵育过夜, 用不同浓度 (50、100、150、200、250、300、400 mmol/L 和 500 mmol/L) 咪唑 Lysis Buffer 依次洗脱蛋白, 根据 SDS-PAGE 结果确定最佳洗脱浓度。收集最佳咪唑浓度的蛋白洗脱液, 10 kDa 超滤管 4000 r/min、4 °C 浓缩至 1~2 mL, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 根据蛋白浓度用 Sumo 酶 4 °C 酶切浓缩后抗体过夜, 再次用镍柱纯化酶切后蛋白, 3 kDa 超滤管浓缩得到最终重组抗体, BCA 试剂盒蛋白定量, -80 °C 存放备用。

#### 1.5 单域抗体广谱结合活性测定

用抗原包被液将纯化后的蛋白分别稀释为 500、250、100、50、10 μg/mL 和 5 μg/mL 等不同的浓度, 在 ELISA 板中每孔加入 100 μL 稀释好的蛋白, 设置不含蛋白的空白对照孔, 4 °C 冰箱包被过夜。移除包被液, PBST 缓冲液清洗板条 3 次, 每孔加入 300 μL, 每次 5 min。移去洗涤液, 将板子拍干后每孔加入 300 μL 的封闭液, 37 °C 孵育 2 h。移除封闭液, PBST 洗 3 次。将板子拍干后, 每孔加入 100 μL 浓度为 2 μg/mL 的 HBsAg 抗原, 37 °C 孵育 2 h, PBST 洗 4 次。每孔加入稀释后 (1:5000) 鼠抗 HBsAg/HRP 二抗 100 μL, 37 °C 孵育 2 h, PBST 洗 4 次。每孔加入 100 μL TMB 显色液, 震荡均匀后 37 °C 避光孵育 15 min。每孔加入 50 μL 浓度为 2 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止液, 震荡均匀。酶标仪测定 OD<sub>450</sub> 值, 样品孔的 OD 值高于对照孔的 2.1 倍时可判定该结果为阳性。

#### 1.6 HBV 病毒颗粒感染细胞

用 0.1% 明胶处理培养皿 30 min, 复苏 HepG2-NTCP 细胞, 待细胞长到 80% 汇合度时传代。将 12 孔板预先用明胶处理, 每孔铺细胞 5×10<sup>5</sup> 个, 共铺 8 组, 每组 3 个复孔。待细胞长至 80% 汇合度时进行感染, 取不同浓度重组抗体 30 μL 于 EP 管中, 同

时加入感染混合液 (50 倍稀释病毒粒子 40 μL、40% PEG 40 μL、DMSO 6 μL 和 DMEM/F12 194 μL), 对照组用 PBS 代替抗体, 其余成分相同, 使得抗体终浓度分别为 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup> mg/mL 和 10<sup>-3</sup> mg/mL, 37 °C 孵育 1 h 后感染细胞, 16 h 后弃去感染液, 用温 HBSS 清洗 4 次细胞, 加入新的含有 2.5% DMSO 的细胞培养基。

#### 1.7 细胞上清 HBsAg 和 HBeAg 检测

在细胞感染后的第 3、6 天收集细胞上清, 用乙型肝炎病毒 e 抗原检测试剂盒、乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒测定收集的上清中乙肝病毒 e 抗原和 s 抗原的含量, 第 3 天收完上清后再加入新的含有 2.5% DMSO 的培养基。酶标仪测定 OD<sub>450</sub> 值, 先用空白孔校零后测定。OD 值 ≥ COV 值时检测结果为阳性 (COV 为阴性对照平均 OD 值 × 2.1)。

#### 1.8 Western Blot 测定乙肝病毒核心蛋白表达量

细胞感染后第 6 天, 收集上清, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 弃去 PBS 后每孔加入含有 PMSF 的细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 12000 r/min 离心 20 min, 收集上清, BCA 试剂盒蛋白定量。每孔蛋白上样量 30 μg, 先进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 100 V, 湿转转膜 90 min。在蛋白大小为 25~35 kDa 时将 PVDF 膜裁为两半, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜 2 次, 每次 3 min。以抗 HBc 为一抗, 内参为 β-actin, 4 °C 孵育过夜; 羊抗兔二抗 (1:5000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 化学发光显影。

## 2 结果与分析

#### 2.1 特异性抗体序列筛选

分析转录组文库结果, 筛选得到免疫相关的差异基因, 并翻译为氨基酸序列, 命名为筛选文库 1 (Different\_gene\_pep); 对比分析 VNAR 高通量测序文库, 获得实验组差异序列, 翻译为氨基酸序列, 得到 VNAR 差异蛋白库, 命名为筛选文库 2 (Different\_VNAR\_pep)。使用 BioEdit 软件将筛选文库 1 和筛选文库 2 进行 blast 分析, 找到共有序列, 并确定到筛选文库 2 中具体蛋白名称及出现频率。使用 BioEdit 软件将质谱检测中确定的免疫相关差异肽段与筛选文库 2 进行比对, 找到共有序列, 并确定到该文库中具体蛋白名称以及出现频率。将这 2 个数据库结合起来进行分析, 得到 2 条可能的能与 HBsAg 结合的 VNAR 氨基酸序列, 结果如表 1 所示。通过免疫, 可以产生 IgNAR 并释放到血清

中;生成 IgNAR 的转录本可以存在于脾脏、淋巴细胞中,并被相应抗体检测到。通过数据库的综合分析,大大增加了筛选到的 VNAR 的准确性,减少了

需要筛选的 VNAR 数量,有利于特异性 VNAR 的快速筛选,同时为后续筛选其他抗原对应的 VNAR 提供有效参考。

表 1 筛选出的 VNAR 蛋白氨基酸序列

基因名称	氨基酸序列
Anti-HBsAg-S1	NVFTQRVEQTPTTTTKEAGESLTINCVLKGSRYALCKTYWYFTKKGATKKESLTNGGRYSVTMN KASKSFLLGISDLRVEDSGTYNCKAYSSGYTVHCDTGGQYYEGGGTILTVKPGKQSPPIISLHYSAT
Anti-HBsAg-S2	NVFTQRVEQTPTTTTKEAGESLTINCVLKASTYKLCNTYWYFTKKGATKKENLTNGGRYSVTMN KASKSFSRLRISDLRVEDSGTYHCKASTAGVTCTLKLGYDYEGGGTILTVKRGKQSPPIISLHYSAT

2.2 重组蛋白诱导表达

图 1 为 37 ℃ 诱导温度下,重组蛋白 Anti-HBsAg-S1 和 Anti-HBsAg-S2 的表达情况。由图 1 可知,在该温度下,蛋白主要以包涵体形式存在,可能是温度过高使得蛋白错误折叠。图 2 为 16 ℃ 诱导温度下,重组蛋白 Anti-HBsAg-S1 和 Anti-HBsAg-S2 的表达情况。图 1 和图 2 显示,16 ℃ 时两个重组蛋白在上清中均有表达,但表达量较低,因此需要后续扩大培养来增加上清中重组蛋白的表达量,与 Vera 等<sup>[26]</sup>的结果相符合,降低温度可以提高蛋白的正确折叠与表达;由于 IPTG 对菌株也有一定的毒性,如果浓度过高,不仅会杀死细胞,还会造成较多包涵体的形成。因此选择 16 ℃、0.5 mmol/L IPTG 浓度作为扩大培养的最优条件。

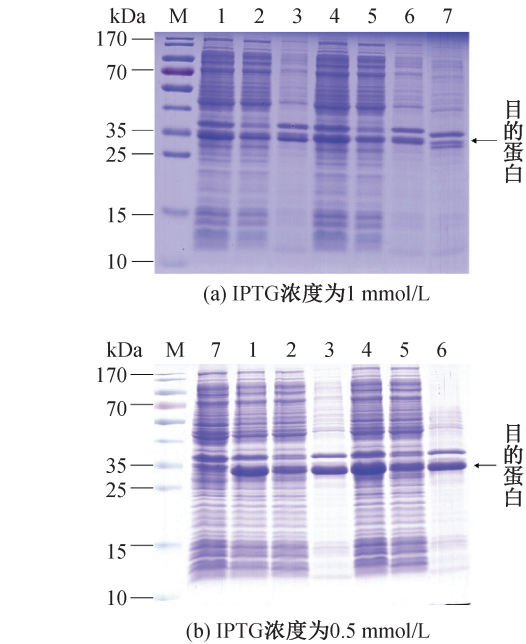


图 2 Anti-HBsAg-S1 和 Anti-HBsAg-S2 16 ℃ 诱导表达结果电泳图

注:M 为 26616 蛋白预染 Marker;1—3 为重组蛋白 Anti-HBsAg-S1, 4—6 为重组蛋白 Anti-HBsAg-S2;7 为诱导前全菌,1、4 为诱导后全菌,2、5 为超声破碎后上清,3、6 为超声破碎后沉淀。

2.3 蛋白纯化与酶切结果

Anti-HBsAg-S1 和 Anti-HBsAg-S2 蛋白通过用不同浓度的咪唑 Lysis Buffer 洗脱和 SDS-PAGE 结果如图 3 所示。图 3 表明,最适洗脱杂蛋白的浓度为 50 mmol/L,最适洗脱目的蛋白浓度为 250 mmol/L。在后续蛋白纯化过程中,按照该浓度洗脱目的蛋白进行纯化,透析超滤纯化后蛋白 SDS-PAGE 电泳结果如图 3(a)所示,BCA 试剂盒测得重组蛋白浓度分别为 2.388 mg/mL 和 2.904 mg/mL,用 PBS 将蛋白稀释为 2 mg/mL 进行酶切,酶切后的蛋白再次纯化后电泳结果如图 3(b)所示。

2.4 广谱 ELISA 结合活性结果

重组蛋白 Anti-HBsAg-S1 和 Anti-HBsAg-S2 与乙肝表面抗原的 ELISA 实验结果如图 4 所示。

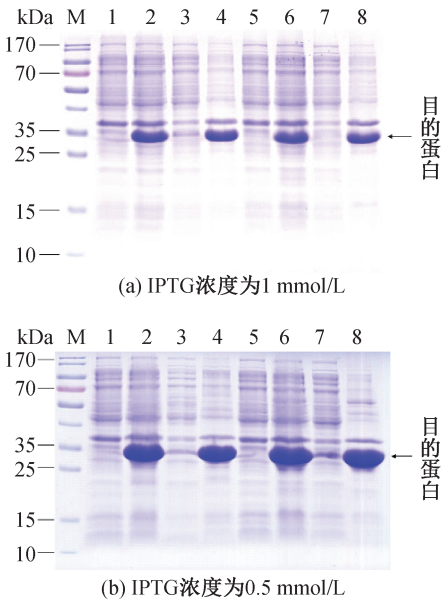


图 1 Anti-HBsAg-S1 和 Anti-HBsAg-S2 37 ℃ 诱导表达结果电泳图

注:M 为 26616 蛋白预染 Marker;1—4 为重组蛋白 Anti-HBsAg-S1;5—8 为重组蛋白 Anti-HBsAg-S2;1、5 为诱导前全菌;2、6 为诱导后全菌;3、7 为超声破碎后上清;4、8 为超声破碎后沉淀。



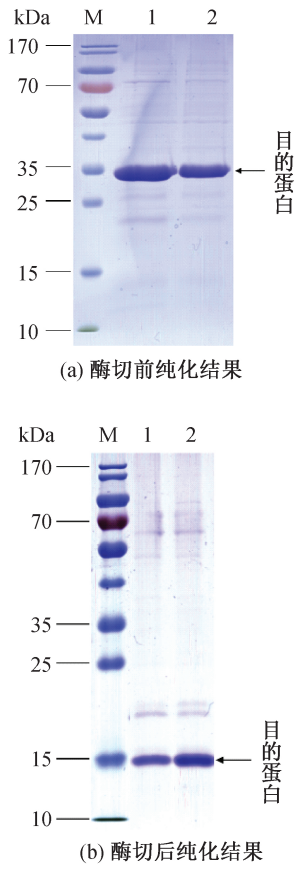


图 3  纯化后单域抗体电泳图

注：M 为 26616 蛋白预染 Marker；1 为重组蛋白 Anti-HBsAg-S1，2 为重组蛋白 Anti-HBsAg-S2。

由图 4 可以看出，两个单域抗体在 500、250、100  $\mu\text{g/mL}$  和 50  $\mu\text{g/mL}$  浓度下均有阳性率 ( $\text{OD}_{450}$  值为对照组 2.1 倍以上)，重组蛋白 Anti-HBsAg-S1 最高  $\text{OD}_{450}$  可达 0.64，且 Anti-HBsAg-S1 在浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  时仍有阳性率，两个单域抗体均有较好的结合活性，最适浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 细胞上清中 HBsAg 和 HBeAg 表达量

HepG2-NTCP 细胞在感染 HBV 病毒以后将会在细胞上清中产生主要标志物 HBsAg 和 HBeAg<sup>[27]</sup>。在病毒感染后的第 3 天和第 6 天收集细胞上清，利用 ELISA 试剂测定 HBsAg 表达量，结果如图 5 所示。由图 5 可知，第 3 天时重组蛋白 Anti-HBsAg-S1 在  $10^{-2}$  mg/m 和  $10^{-1}$  mg/mL 浓度下 HBsAg 表达量与加了病毒和 PBS 的对照组相比显著降低，在  $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$  mg/mL 和  $10^{-1}$  mg/mL 浓度下抑制率分别为 6.62%、18.97% 和 29.36%，重组蛋白 Anti-HBsAg-S2 不仅没有抑制作用，可能还促进病毒的复制。第 6 天重组蛋白 Anti-HBsAg-S1 在  $10^{-1}$  mg/mL 和  $10^{-2}$  mg/mL 较高两个浓度下起到抑制作用，分别为 20.18% 和 10.66%。

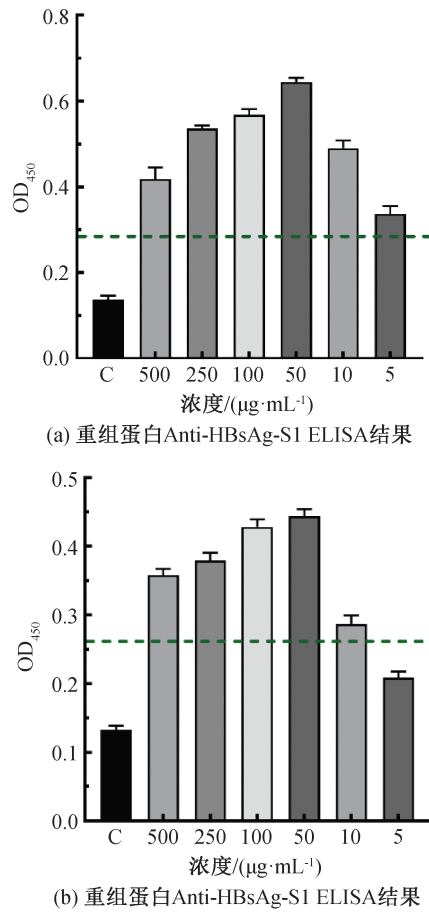


图 4  重组蛋白 ELISA 结果

注：虚线以上代表阳性结果。

病毒感染后的第 3 天和第 6 天收集细胞上清，利用 ELISA 试剂测定 HBeAg 表达量，结果如图 6 所示。图 6 表明，在整个感染过程中，HBeAg 的表达量呈增加趋势，说明病毒处于一个持续复制的过程，所有实验组 HBeAg 表达量降低，在第 3 天抑制率最高达到了 55.32%；第 6 天时，与第 3 天相比 HBeAg 的抑制率呈现降低趋势，在  $10^{-1}$  mg/mL 浓度下两个单域抗体的抑制率达到最大，分别为 36.34%、17.6%，综合分析可知 Anti-HBsAg-S1 的效果好。

2.6 乙肝病毒核心蛋白表达量

第 6 天收集细胞用于提取总蛋白，定量后通过 Western Blot 来检测不同浓度重组抗体处理组 HepG2-NTCP 细胞总蛋白中乙肝病毒核蛋白的表达情况，并计算条带的灰度值，结果如图 7 所示。由图 7 可知抗体 Anti-HBsAg-S1 经过与病毒的共孵育处理后感染细胞，使细胞中 HBc 蛋白的表达量有所降低。在  $10^{-2}$  mg/mL 和  $10^{-1}$  mg/mL 浓度时，与对照组有显著差异，单域抗体 Anti-HBsAg-S2 处理后细胞中 HBc 表达量没有降低，与上清中

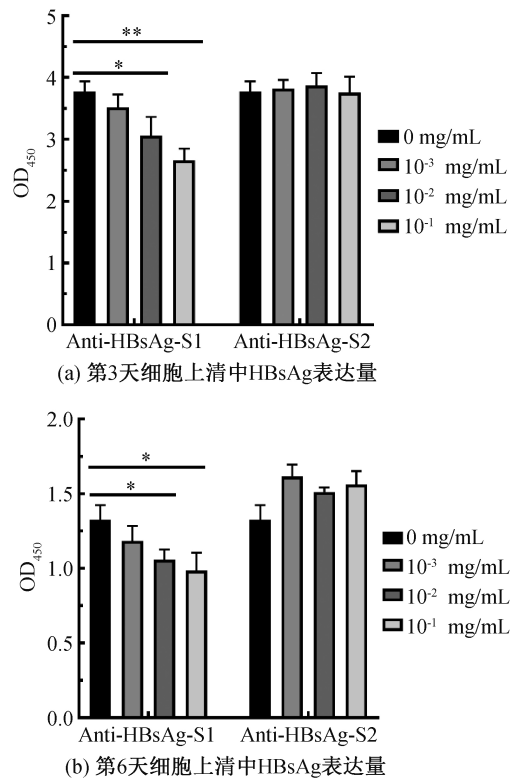


图5 不同时间段上清中HBsAg表达量

注：\*代表 $p<0.05$ ，\*\*代表 $p<0.01$ 。

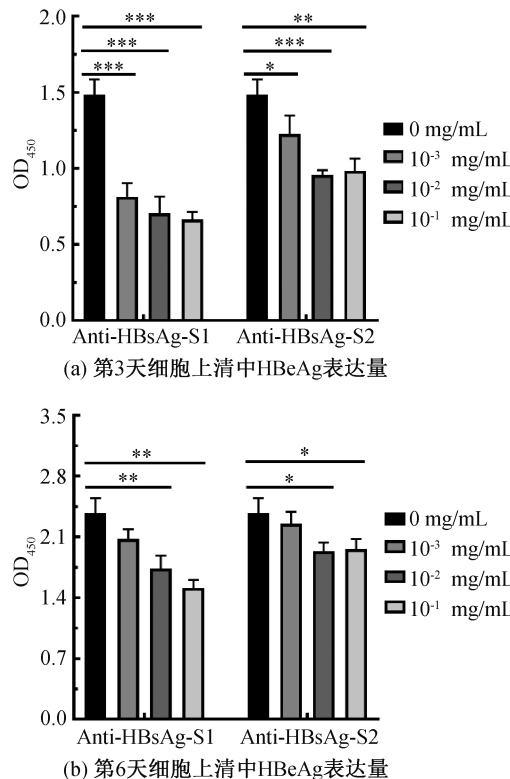


图6 不同时间段上清中HBeAg表达量

注：\*代表 $p<0.05$ ，\*\*代表 $p<0.01$ ，\*\*\*代表 $p<0.001$ 。

HBsAg 表达量结果一致,说明抗体 Anti-HBsAg-S1 可能对病毒的感染和复制起到一定的抑制作用,但具体的机制还有待进一步研究。

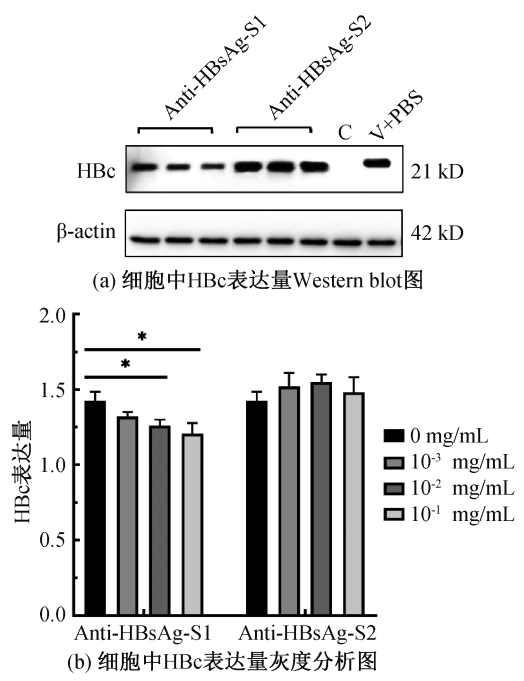


图7 VNAR对细胞中HBc表达的影响

注：\*代表 $p<0.05$ 。

3 讨论

选择合适的表达系统对于确保功能性 VNAR 蛋白生产的溶解性和正确折叠有非常关键的作用<sup>[25, 28]</sup>。细菌表达系统通常是分子生物学实验室和生物技术工业中的首选,快速生长、高水平的蛋白质生产及多重表达筛选和蛋白质生产的能力使它可以生产用于一系列生物应用的重组蛋白,大肠杆菌中实现蛋白质翻译后修饰的机制不太复杂,而缺乏翻译后修饰的真核生物伴侣会导致蛋白质错误折叠和聚集<sup>[29]</sup>,因此本文选择大肠杆菌表达体系来对单域抗体进行重组表达。HBsAg 表达与病毒的 DNA 转录过程有关,乙肝表面抗原蛋白主要来自 cccDNA 转录产物的翻译和宿主体内基因已经整合的 HBV 核苷酸转录产物的翻译<sup>[30]</sup>,因此本文中 HBsAg 在第 4~6 天内表达量的减少可能是由于其转录过程活跃度降低,mRNA 数量的降低,间接说明了 cccDNA 表达量的减少<sup>[31]</sup>。利用抗体效应功能的被动免疫疗法可能有助于直接清除循环病毒、病毒抗原或产生病毒的细胞。因此利用 VNAR 的优势来开发调节细胞 HBsAg 和 HBeAg 表达量的抗病毒药物是提高治疗效果、避免慢性乙肝进展的有价值治疗手段,为探究单域抗体在病毒预防感染方面提供了思路和方法,同时也可利用其与 HBsAg 较好的结合力来开发更加便捷灵敏的乙肝病毒检测试剂盒。

## 4 结 论

本文通过免疫条纹斑竹鲨筛选出特异性抗 HBsAg 的 VNAR 序列, 利用原核系统重组表达了单域抗体, 并进行活性探究, 获得以下主要结果:

a) 利用该体系针对 HBsAg 的单域抗体基因的筛选方法是可行的, 由此筛选出 2 条特异性 VNAR 序列。

b) 利用原核表达体系, 通过增加促溶标签, 在 16 °C、0.5 mmol/L IPTG 条件下诱导表达出单域抗体, 且浓度高于 2 mg/mL。

c) 纯化后的特异性单域抗体 ELISA 和细胞水平检测得到一个活性较好的重组域单域抗体 Anti-HBsAg-S1。

综上所述, 本文利用条纹斑竹鲨系统发育的优势筛选出单域抗体基因, 分析了其对乙肝病毒的结合活性和抑制作用, 为针对乙肝病毒诊断试剂的开发和治疗药物的研究提供了新的方法和思路。

## 参考文献:

[1] Demosthenes J P, Sachithanandham J, Fletcher G J, et al. Characteristics of treatment-naïve HBV-infected individuals with HIV-1 coinfection: A cross-sectional study from South India[J]. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2019, 37(2): 219-224.

[2] Foreman K J, Marquez N, Dolgert A, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016 - 40 for 195 countries and territories[J]. *The Lancet*, 2018, 392 (10159): 2052-2090.

[3] Li C, Wang Y, Liu T T, et al. An *E. coli* -produced single-chain variable fragment (scFv) targeting hepatitis B virus surface protein potently inhibited virion secretion [J]. *Antiviral Research*, 2019, 162(1): 118-129.

[4] Zhang L, Sang W O. Production and characterization of monoclonal antibodies against primo vascular system of rat[J]. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 2020, 13(3): 110-115.

[5] Tai W, Zhang X, He Y, et al. Identification of SARS-CoV RBD-targeting monoclonal antibodies with cross-reactive or neutralizing activity against SARS-CoV-2[J]. *Antiviral Research*, 2020, 179(1): 1-23.

[6] Pimm M V. Drug-mono-clonal antibody conjugates for cancer therapy: potentials and limitations[J]. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System*, 1988, 5

(3): 189-227.

[7] Cruz E, Kayser V. Monoclonal antibody therapy of solid tumors: clinical limitations and novel strategies to enhance treatment efficacy[J]. *Biologics*, 2019, 13(1): 33-51.

[8] Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, et al. Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity[J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 2009, 198(3): 157-174.

[9] Saerens D, Pellis M, Loris R, et al. Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 352(3): 597-607.

[10] Zare H, Aghamollaei H, Hosseindokht M, et al. Nanobodies, the potent agents to detect and treat the coronavirus infections: A systematic review [J]. *Molecular Cellular Probes*, 2021, 55(5): 1-15.

[11] 洪梦佳, 任清榆, 金佳柯, 等. 单域抗体的研究进展[J]. *药物生物技术*, 2018, 25(6): 556-560.

[12] Muyldermans S, Baral T, Retamozzo V, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 128(1/2/3): 178-183.

[13] Chowdhury P S, Wu H. Tailor-made antibody therapeutics[J]. *Methods*, 2005, 36(1): 11-24.

[14] Qiu L, Feng Y, Ma X, et al. A camel anti-lysozyme CDR3 only domain antibody selected from phage display VHH library acts as potent lysozyme inhibitor [J]. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 2017, 49(6): 513-519.

[15] Camacho-Villegas T, Mata-Gonzalez T, Paniagua-Solis J, et al. Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from *Heterodontus francisci* shark: A potential therapeutic use[J]. *Mabs*, 2013, 5(1): 80-85.

[16] Dooley H, Stanfield R L, Brady R A, et al. First molecular and biochemical analysis of in vivo affinity maturation in an ectothermic vertebrate [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(6): 5632-5632.

[17] Liu J L, Anderson G P, Delehanty J B, et al. Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naïve shark library[J]. *Molecular immunology*, 2007, 44(7): 1775-1783.

[18] Nuttall S D, Krishnan U V, Hattarki M, et al. Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries[J]. *Molecular Immunology*, 2001, 38 (4): 313-326.

- [19] Ohtani M, Hikima J I, Jung T S, et al. Construction of an artificially randomized IgNAR phage display library: Screening of variable regions that bind to hen egg white lysozyme[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(1): 56-62.
- [20] Simmons D P, Abregu F A, Krishnan U V, et al. Dimerisation strategies for shark IgNAR single domain antibody fragments [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2006, 315(1): 171-184.
- [21] Irving R A, Coia G, Roberts A, et al. Ribosome display and affinity maturation: From antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2001, 248(1-2): 31-45.
- [22] Stanfield R, Dooley H, Flajnik M, et al. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme[J]. *Science*, 2004, 305(5691): 1770-1773.
- [23] Muller M R, O'Dwyer R, Kovaleva M, et al. Generation and isolation of target-specific single-domain antibodies from shark immune repertoires[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 907(1): 177-194.
- [24] Juma S N, Gong X X, Hu S J, et al. Shark New Antigen Receptor (IgNAR): Structure, characteristics and potential biomedical applications[J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1140(1-13).
- [25] Dooley H, Flajnik M F, Porter A J. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display[J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(1): 25-33.
- [26] Vera A, Gonzalez-Montalban N, Aris A, et al. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(6): 1101-1106.
- [27] 王晓芳, 范学工, 黄泽炳, 等. 化学合成多肽体外抗 HBV 复制的研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(10): 893-901.
- [28] Griffiths K, Dolezal O, Parisi K, et al. Shark variable new antigen receptor (VNAR) single domain antibody fragments: Stability and diagnostic applications [J]. *Antibodies*, 2013, 2(4): 66-81.
- [29] Marco A D. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8(26): 1-18.
- [30] Kumar R, Perez-Del-Pulgar S, Testoni B, et al. Clinical relevance of the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA[J]. *Liver International*, 2016, 36(S1): 72-77.
- [31] 谢培琳, 张欣欣. 乙型肝炎表面抗原生物学功能的研究进展[J]. *中国病毒杂志*, 2020, 10(5): 333-336.

(责任编辑:张会巍)