

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.05.02

# 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白特异性 纳米抗体的原核表达研究

王长江<sup>1</sup>, 曲光刚<sup>1,2\*</sup>, 武曰星<sup>1</sup>, 赵中伟<sup>1</sup>, 郭广君<sup>2</sup>, 全洪坤<sup>3</sup>, 韩强<sup>1</sup>, 沈志强<sup>1,2\*</sup>

(1. 山东绿都生物科技有限公司, 山东滨州 256600; 2. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东滨州 256600; 3. 中国农业大学, 北京 100000)

[收稿日期] 2020-02-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 05-0010-08 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为利用大肠埃希菌表达猪圆环病毒 2 型 (PCV2) Cap 蛋白特异性纳米抗体, 并对其抗原结合活性进行鉴定, 以 Cap 蛋白特异性纳米抗体基因 (*vhh<sub>cap</sub>*) 序列为模板, 利用 Primer 5.0 软件设计一对通用 *vhh<sub>cap</sub>* 特异性扩增引物, 通过 PCR 方法扩增 *vhh<sub>cap</sub>* 基因片段, 经双酶切处理后分别克隆到 pCold-SUMO 和 pET-32a(+) 载体上, 转化宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3), 使用 IPTG 进行诱导表达, 表达产物通过 Ni<sup>2+</sup> 亲和层析柱进行纯化, 经 SDS-PAGE 分析和 Western blotting 鉴定, 同时使用 ELISA 方法对两种载体表达的纳米抗体 ELISA 效价进行检测和对比分析。SDS-PAGE 结果显示 pCold-SUMO 和 pET-32a(+) 载体均能实现 VHH<sub>cap</sub> 纳米抗体重组蛋白的原核可溶性表达, Western blotting 表明纳米抗体重组蛋白可通过 6 × His-Tag 进行检测; ELISA 结果显示 pCold-SUMO 载体表达的纳米抗体重组蛋白效价为 1:500, ELISA 效价明显高于 pET-32a(+) 载体表达产物。PCV2 Cap 特异性纳米抗体成功表达为 PCV2 检测及治疗用新型的抗体开发奠定了基础。

**[关键词]** 猪圆环病毒 2 型; 纳米抗体; 原核表达; ELISA 效价

## Prokaryotic Expression of Specific Nanobody against Porcine Circovirus Type 2 Cap Protein

WANG Chang-jiang<sup>1</sup>, QU Guang-gang<sup>1,2\*</sup>, WU Yue-xing<sup>1</sup>, ZHAO Zhong-wei<sup>1</sup>,GUO Guang-jun<sup>2</sup>, QUAN Hong-kun<sup>3</sup>, HAN Qiang<sup>1</sup>, SHEN Zhi-qiang<sup>1,2\*</sup>

(1. Shandong LvDu Bio-Science and Technology Co., Ltd, Binzhou, Shandong 256600, China;

2. Shandong Binzhou Animal Science &amp; Veterinary Medicine Academy, Binzhou, Shandong 256600, China;

3. China Agricultural University, Beijing 100000, China)

Corresponding authors: SHEN Zhi-qiang, E-mail: bzshenzq@163.com; QU Guang-gang, E-mail: guanggangqu@163.com

**Abstract:** One strain of nanobody sequence acquired from previous studies was used to express specific nanobody against porcine circovirus type 2 Cap protein by prokaryotic expression system of *E. coli* and its antigen binding

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2018PC027); 山东省重点研发计划 (2017JHZ007)

作者简介: 王长江, 硕士, 助理研究员, 从事纳米抗体研制及应用研究。

通讯作者: 沈志强, E-mail: bzshenzq@163.com; 曲光刚, E-mail: guanggangqu@163.com

activity was analyzed. A pair of specific universal primers was designed according to the nanobody sequence by using software Primer 5.0 and the target sequence fragment was amplified by PCR method. The amplified target DNA was digested by restriction enzymes and then was cloned into vector pCold - SUMO and pET32a(+) to generate *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO and *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+), respectively. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) separately. Recombinant bacteria was induced by IPTG, respectively. Expression products were purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography column. These specimens were analyzed by SDS - PAGE. The purified recombinant nanobody protein was further identified by Western blotting and its antigen binding activity was analyzed by ELISA method. SDS - PAGE results showed that VHH<sub>cap</sub> recombinant protein was expressed in soluble form by vector pCold - SUMO and pET32a(+). Western blotting result indicated that purified VHH<sub>cap</sub> recombinant protein reacted well with 6 × His - Tag. And ELISA result demonstrated that the antigen binding activity titer of VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO was 1:500 and it was better than that of VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+). This study provided a basis for the development of novel antibodies for PCV2 detection and treatment.

**Key words:** porcine circovirus type 2; nanobody; prokaryotic expression; ELISA titer

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)属于圆环病毒科、圆环病毒属,病毒粒子呈 20 面体对称结构,无囊膜<sup>[1]</sup>。目前已发现的猪圆环病毒有 PCV1、PCV2 和 PCV3 三种基因型,以 PCV2 对养猪业造成的危害最为严重,是断奶仔猪多系统衰竭综合征、皮炎和肾病综合征等疾病的主要病原<sup>[2-3]</sup>。PCV2 基因组全长约 1.76 kb,包括 11 个开放性阅读框<sup>[4]</sup>(Open Reading Framework, ORF),其中 ORF2 编码的 Cap 蛋白是 PCV2 主要的结构蛋白和免疫相关蛋白<sup>[5]</sup>。Cap 蛋白相对分子质量约 27.8 ku,具有很好的免疫原性<sup>[6-7]</sup>,在 PCV2 的感染和机体免疫过程中起重要作用,因此 Cap 蛋白是研制亚单位疫苗或使用免疫学方法检测 PCV2 的首选靶抗原。

目前已经报道的可供 Cap 蛋白抗原表位分析、PCV2 鉴别诊断的特异性抗体均为传统的全分子抗体<sup>[8-11]</sup>,这类抗体蛋白相对分子质量大且热稳定性较差,通过哺乳动物细胞制备导致生产成本较高。1993 年比利时科学家 Hamers 报道在骆驼体内存在一种天然缺失轻链的重链抗体<sup>[12]</sup>,克隆其可变区可得到只有重链可变区的单域抗体(Variable domain of heavy chain of heavy chain antibody, VHH),相对分子质量约 15 ku,仅为传统全分子抗体相对分子质量的 1/10,也被称为纳米抗体。与传统全分子抗体相比,纳米抗体具有相对分子质量

小、结构简单、热稳定性好、能在大肠杆菌和酵母细胞中快速大量表达的优点<sup>[13]</sup>,因此受到越来越多的关注。纳米抗体的这些特点使其成为 PCV2 抗原检测或治疗性抗体药物的理想选择。本研究利用大肠埃希菌原核表达系统对淘洗获得的 PCV2 Cap 蛋白特异性纳米抗体序列(*vhh<sub>cap</sub>*)进行了克隆表达,以期 PCV2 检测、治疗用新型纳米抗体工具开发提供实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 菌株与载体 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞、*E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞、原核表达载体 pCold - SUMO、pET32a(+)均由山东省滨州畜牧兽医研究院保存。

1.2 主要试剂 2 × Taq PCR MasterMix 购自天根生化科技有限公司;T4 DNA 连接酶、*Bam*H I 限制性内切酶、*Hind* III 限制性内切酶均购自 NEB 公司;DL 2000 Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒小量提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega Bio - Tek 公司;Unstained Protein MW Marker 购自赛默飞世尔公司;氨苄青霉素(Ampicillin)为 SIGMA 公司产品;Ni<sup>2+</sup> - NTA 亲和层析柱为常州天地人和生物科技有限公司产品;Anti His - tag (HRP)鼠源单抗购自康为世纪生物科技有限公司;猪圆环病毒 Cap 蛋白由山东绿都生物科技有限公

司制备;ECL 发光试剂为北京赛智产品;其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.3 方法

1.3.1 *vhh<sub>cap</sub>* 基因片段扩增 根据前期淘洗筛选获得的 60 株 PCV2 Cap 蛋白纳米抗体基因(*vhh<sub>cap</sub>*)序列,使用 Primer premier 5.0 软件设计一对通用 *vhh<sub>cap</sub>* 特异性扩增引物,引物上、下游 5' 端分别加入 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶酶切位点,用于扩增克隆到 pCold - SUMO 和 pET - 32a(+) 载体上的 *vhh* 片段。引物送上海捷瑞生物工程有限公司进行合成。

以其中 1 株 *vhh<sub>cap</sub>* 为模板,利用上述引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:*vhh<sub>cap</sub>* 模板 1 μL、上下游引物各 1 μL、2 × Taq PCR MasterMix 25 μL、ddH<sub>2</sub>O 22 μL。PCR 反应条件为:95 °C 5 min,95 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 45 s,30 cycles,72 °C 10 min。PCR 反应结束后将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,鉴定片段大小;将鉴定正确的 PCR 产物割胶回收。

1.3.2 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO 和 *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+) 重组表达载体构建 将 *vhh<sub>cap</sub>* 目的基因和 pCold - SUMO 质粒分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,纯化后使用 T4 DNA 连接酶连接,构建 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO 重组质粒;连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,涂布 Amp 抗性平板,过夜培养后挑取单菌落,进行菌液 PCR 鉴定。从菌液 PCR 鉴定为阳性的重组菌中提取质粒,即为构建成功的 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO 重组质粒。

*vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+) 重组表达载体的构建方法同上。

1.3.3 VHH<sub>cap</sub> 重组蛋白诱导表达 将 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO 和 *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+) 重组质粒分别转入 *E. coli* BL21(DE3),按 1% 比例将过夜培养的重组菌转接到 5 mL 新鲜 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约 0.6 时进行诱导表达,以不加诱导剂的菌液作为阴性表达对照。*vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO/BL21 诱导条件为:IPTG 终浓度 1 mmol/L,16 °C 160 r/min 诱导表达 5 h;*vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21 诱导条件为:IPTG 终浓度 1 mmol/L,30 °C

160 r/min 诱导表达 5 h。诱导表达完成后收集菌体沉淀并超声破碎,将超声破碎后的样品离心,分离上清和沉淀,分别变性处理后进行 SDS - PAGE 分析。

1.3.4 VHH<sub>cap</sub> 重组蛋白纯化 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO/BL21 和 *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21 重组菌同时进行诱导表达,按 1% 比例分别将过夜培养的重组菌接种到 500 mL 新鲜 LB 培养基中,诱导表达条件同 1.3.3。表达完成后将菌体超声破碎,离心分别收集上清和沉淀;超声上清采用 Ni<sup>2+</sup> - NTA 亲和层析柱进行纯化,操作方法参考产品说明书进行。对纯化后重组蛋白进行 SDS - PAGE 分析并用 BCA 试剂盒测定浓度。

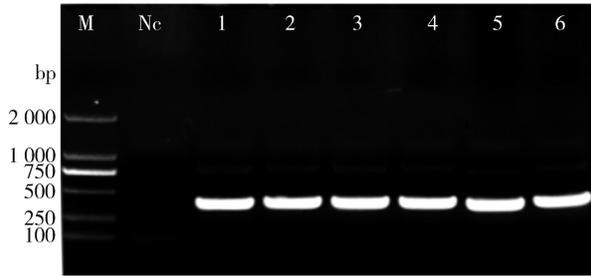
1.3.5 Western blotting 分析 采用 Western blotting 对表达的纳米抗体重组蛋白鉴定。将纯化后的重组蛋白进行 SDS - PAGE 电泳后转移至醋酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后洗涤 5 次,加入 1:2000 稀释的 Anti His - tag (HRP) 鼠源单抗,室温孵育 1 h,0.05% PBST 洗涤 5 次后使用 ECL 化学发光显色液显色 1 min 并拍照观察。

1.3.6 VHH<sub>cap</sub> 纳米抗体 ELISA 效价分析 两种载体表达的 VHH<sub>cap</sub> 重组蛋白纯化后使用 BCA 试剂盒测定浓度,通过间接 ELISA 法对两种 VHH<sub>cap</sub> 重组蛋白进行效价分析,并做对比分析。以 PCV2 Cap 蛋白作为抗原包被 96 孔酶标板,包被浓度为 10 μg/mL,每孔加入 200 μL 3% MPBS 进行封闭,两种 VHH<sub>cap</sub> 重组蛋白分别调整至相同浓度水平后进行梯度稀释,分别以梯度稀释的两种 VHH<sub>cap</sub> 重组蛋白作为一抗,分别以未诱导的 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO/BL21 和 *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21 超声上清稀释 50 倍作为阴性对照,37 °C 孵育 1 h;洗涤后使用 1:2000 稀释的 Anti His - tag (HRP) 鼠源单抗 37 °C 孵育 1 h;洗涤后加入 TMB 底物显色液室温显色 15 min,显色完成后加入终止液,酶标仪读取 450 nm 波长处吸光值。

## 2 结果与分析

2.1 *vhh<sub>cap</sub>* 目的基因扩增 测序结果表明,淘洗获得的该株 *vhh<sub>cap</sub>* 序列长度为 408 bp,编码 136 个氨基酸,CDR3 区域包含 19 个氨基酸残基,与 NCBI 数

数据库序列比对结果显示匹配序列均为羊驼或骆驼重链抗体可变区序列。PCR 产物电泳结果显示,扩增条带大小约 400 bp,与预期条带大小一致(图 1)。



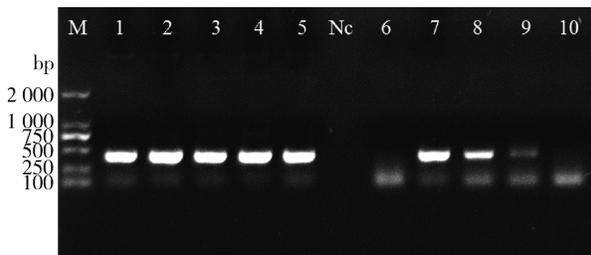
M: DL 2000 DNA Marker; Nc: PCR 阴性对照;  
1 - 6: *vhh<sub>cap</sub>* PCR 扩增产物

M: DL 2000 DNA Marker; Nc: negative control;  
1 - 6: PCR products of *vhh<sub>cap</sub>* segment

图 1 *vhh<sub>cap</sub>* 基因片段 PCR 扩增结果

Fig 1 Agarose gel electrophoresis results of PCR products

2.2 重组表达载体构建 *vhh<sub>cap</sub>* 目的片段分别与 pCold - SUMO 和 pET32a(+) 载体连接,连接产物分别转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,从过夜培养后的平板上随机挑取单菌落进行 PCR 鉴定,阳性重组菌 PCR 产物出现约 400 bp 的特异性扩增条带(图 2)。



M: DL 2000 DNA Marker; Nc: PCR 阴性对照;  
1 - 5: *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO/DH5 $\alpha$  重组菌 PCR 鉴定产物;  
6 - 10: *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/DH5 $\alpha$  重组菌 PCR 鉴定产物

M: DL 2000 DNA Marker; Nc: PCR negative control;  
1 - 5: PCR products of *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO/DH5 $\alpha$   
recombinant bacteria; 6 - 10: PCR products of  
*vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/DH5 $\alpha$  recombinant bacteria;

图 2 重组菌菌液 PCR 鉴定结果

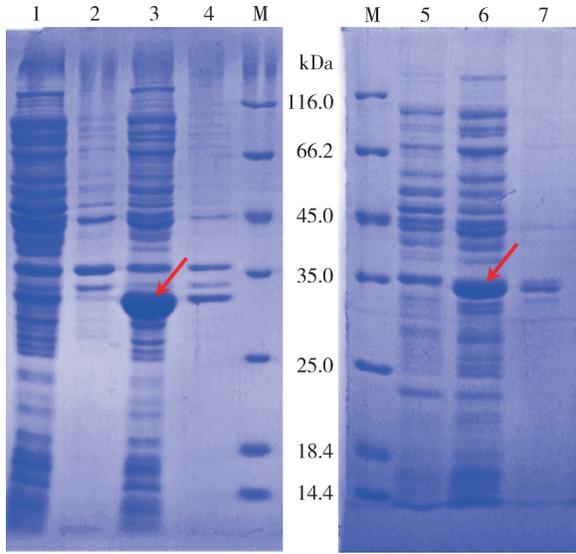
Fig 2 Identification of recombinant bacteria by  
PCR method

2.3 VHH<sub>cap</sub> 纳米抗体蛋白表达、纯化 经鉴定正确的 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO 和 *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+) 重组质粒分别转化 *E. coli* BL21 (DE3) 进行诱导表达。SDS - PAGE 结果显示, VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 重组蛋白为可溶性表达,在聚丙烯酰胺凝胶上呈现为约 30 ku 的蛋白条带(图 3,泳道 3),与预期目的蛋白大小相符;而未诱导菌在该位置无蛋白条带(图 3,泳道 1 和 2); VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 重组蛋白同样为可溶性表达,表达产物相对分子质量大于 VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 重组蛋白,蛋白条带位置略低于 35 ku(图 3,泳道 6)。

按优化后的最佳表达条件分别利用 pCold - SUMO 和 pET32a(+) 载体对 VHH<sub>cap</sub> 纳米抗体重组蛋白进行大量表达,并使用 Ni<sup>2+</sup> 亲和层析柱进行纯化。取纯化前样品、流穿液以及纯化后的蛋白样品进行 SDS - PAGE 分析,结果显示,经亲和层析纯化后蛋白条带与未纯化的纳米抗体重组蛋白大小一致(图 4 - 图 5),流穿液中虽有少量目的蛋白存在,但大量 VHH<sub>cap</sub> 纳米抗体重组蛋白存在于洗脱液中,表明 VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 和 VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 重组蛋白均纯化成功。

2.4 Western blotting 分析 将纯化后的 VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 和 VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 纳米抗体重组蛋白分别进行 Western blotting 分析,结果显示,两种原核表达载体表达的 VHH<sub>cap</sub> 纳米抗体重组蛋白与抗 His 单克隆抗体反应活性良好, VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 在约 30 ku 处可见一条明显的条带(图 6,泳道 2), VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 重组蛋白条带大小约 35 ku(图 6,泳道 1、3 和 4),蛋白条带位置与 SDS - PAGE 结果一致,进一步确认纯化后的蛋白为含 His - Tag 的 VHH<sub>cap</sub> 纳米抗体重组蛋白,同时也表明可以利用 His - Tag 通过间接 ELISA 方法测定重组纳米抗体的反应活性。

2.5 不同表达载体对 VHH<sub>cap</sub> 纳米抗体活性的影响 纯化后的 VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 和 VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 重组蛋白分别经 BCA 方法测定浓度,并将两种重组蛋白调整至相同初始浓度水平后再进行梯度稀释,然后与固相包被的 Cap 蛋白进行抗



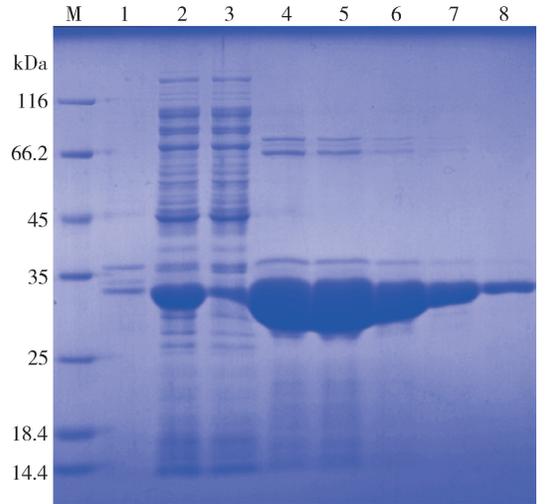
M: 蛋白 Marker; 1: 未诱导 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO / BL21 超声上清; 2: 未诱导 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO / BL21 超声沉淀; 3: 诱导 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO / BL21 超声上清; 4: 诱导 *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO 超声沉淀; 5: 未诱导 *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21; 6: 诱导 *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21 超声上清; 7: 诱导 *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21 超声沉淀

M: Protein Marker; 1: supernatant after ultrasonication of non-induced *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO / BL21; 2: precipitation after ultrasonication of non-induced *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO / BL21; 3: supernatant after ultrasonication of induced *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO / BL21; 4: precipitation after ultrasonication of induced *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO / BL21; 5: non-induced *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21; 6: supernatant after ultrasonication of induced *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21; 7: precipitation after ultrasonication of induced *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21

图 3 两种表达载体对 VHH<sub>cap</sub> 重组蛋白表达结果 SDS - PAGE 分析

Fig 3 SDS - PAGE analysis of VHH<sub>cap</sub> protein expressed by different vector

体—抗原反应。以 OD<sub>450</sub> 大于阴性对照吸光值 3 倍以上作为阳性判定标准, 间接 ELISA 试验结果显示, VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 纳米抗体重组蛋白 ELISA 效价为 1: 500, 而 VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 纳米抗体重组蛋白效价为 1: 250(图 7)。相同浓度水平下 VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 重组蛋白的效价水平平均高于 VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 重组蛋白, 推测不同原核表



M: 蛋白 Marker; 1: 菌体超声破碎后离心沉淀; 2: 菌体超声破碎后离心上清; 3: 蛋白过柱流穿液; 4 - 8: 亲和层析纯化后的 VHH<sub>cap</sub> 蛋白

M: Protein Marker; 1: precipitation after ultrasonication of induced *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO / BL21; 2: supernatant after ultrasonication of induced *vhh<sub>cap</sub>* - pCold - SUMO / BL21;

3: flow-through of supernatant of cell lysate during loading;

4 - 8: VHH<sub>cap</sub> recombinant protein after affinity purification

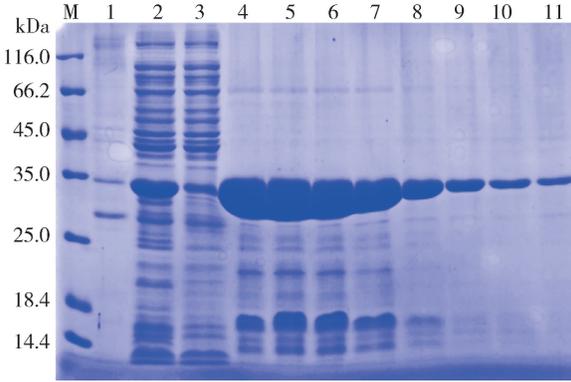
图 4 VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 重组蛋白纯化结果 SDS - PAGE 分析

Fig 4 SDS - PAGE analysis of VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO recombinant protein after purification

达载体可能对纳米抗体重组蛋白与抗原的结合活性产生影响。

### 3 讨论与结论

PCV2 导致的猪圆环病毒相关疾病每年给养猪业造成巨大经济损失<sup>[1, 14]</sup>, 因此建立高效的 PCV2 诊断和治疗方法对该病毒的综合防控具有重要意义。纳米抗体技术的发展为 PCV2 的检测与治疗提供了有力工具。纳米抗体相对分子质量更小<sup>[15]</sup>的特点使其能够识别传统全分子抗体无法识别的隐蔽表位或小表位; 同时, 纳米抗体对热和酸碱有更强的抵抗力, 稳定性更强<sup>[16]</sup>, 克服了传统抗体在使用过程中必须低温存储的劣势。将高密度纳米抗体固定于固相载体, 良好的特异性使其具有避开复杂样本中的干扰因素结合更多配体的能力<sup>[17]</sup>, 能够捕捉微量抗原, 可以极大提高检测的灵敏度。



M: 蛋白 Marker; 1: 菌体超声破碎后离心沉淀;

2: 菌体超声破碎后离心上清;

3: 蛋白过柱流穿液; 4-11: 亲和层析纯化后的 VHH<sub>cap</sub> 蛋白

M: Protein Marker; 1: precipitation after ultrasonication of induced *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21; 2: supernatant after ultrasonication of induced *vhh<sub>cap</sub>* - pET32a(+)/BL21;

3: flow-through of supernatant of cell lysate during loading;

4-11: VHH<sub>cap</sub> recombinant protein after affinity purification

图 5 VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 重组蛋白

纯化结果 SDS - PAGE 分析

Fig 5 SDS - PAGE analysis of VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) recombinant protein after purification

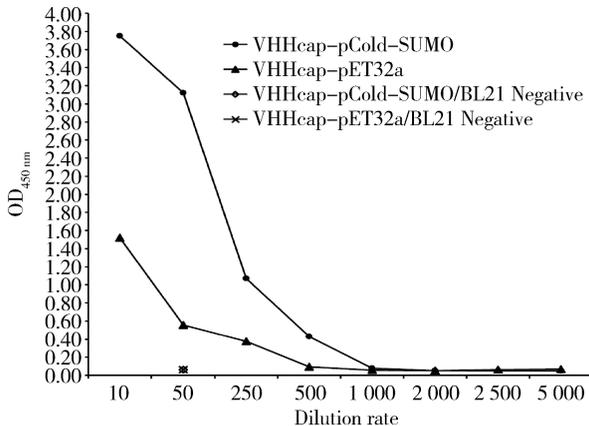
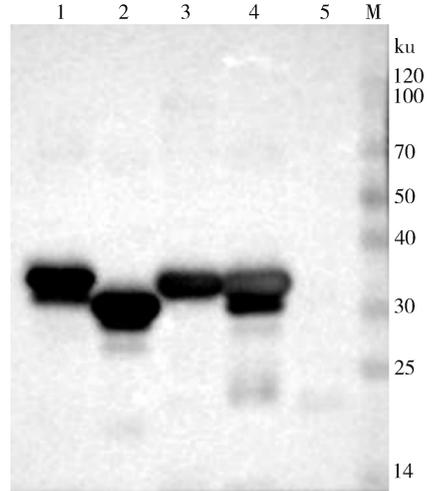


图 7 不同载体表达的 VHH<sub>cap</sub> ELISA 反应效价鉴定

Fig 7 ELISA titer identification of VHH<sub>cap</sub> expressed by different vector

本研究利用原核表达系统对 PCV2 Cap 特异性纳米抗体进行了表达制备,并比较了两种不同原核表达载体对纳米抗体 ELISA 效价的影响。结果显示,该纳米抗体片段在 pCold - SUMO 和 pET32a(+)



M: 预染蛋白 Marker; 1: VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 重组蛋白;

2: VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 重组蛋白;

3-4: VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 重组蛋白; 5: 阴性对照

M: prestained Marker; 1: VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) recombinant nanobody;

2: VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO recombinant nanobody;

3-4: VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) recombinant nanobody;

5: Negative control

图 6 VHH<sub>cap</sub> 纳米抗体重组蛋白 Western blotting 分析

Fig 6 Western blotting analysis of VHH<sub>cap</sub> recombinant protein

载体中均为可溶性表达,但两种不同载体表达的纳米抗体重组蛋白的 ELISA 效价存在差异:相同浓度条件下,VHH<sub>cap</sub> - pCold - SUMO 重组蛋白的 ELISA 效价大于 VHH<sub>cap</sub> - pET32a(+) 重组蛋白。本研究中两种载体表达的纳米抗体重组蛋白均通过 His 标签进行纯化,SUMO 蛋白作为重组蛋白表达的融合标签和分子伴侣,能够促进靶蛋白的正确折叠、提高重组蛋白的可溶性。有研究表明 SUMO 标签与 MBP 和 His 标签相比更适合作为纳米抗体原核表达的标签<sup>[18]</sup>,本研究得到的结果与之相符。

由于纳米抗体基因为真核序列,利用大肠埃希菌表达纳米抗体基因过程中,大肠埃希菌与真核生物在密码子偏好性方面的差异可能导致纳米抗体重组蛋白不能正常表达。例如李玲霞等<sup>[19]</sup>利用大肠埃希菌表达抗 CD133 纳米抗体过程中多个纳米抗体序列未能表达,而冯凡等<sup>[20]</sup>利用大肠埃希菌

表达了抗黄曲霉素 B1 独特型纳米抗体,表达产物主要以包涵体形式存在。本研究过程中也出现 Cap 蛋白特异性纳米抗体序列未能表达的现象,对于这部分纳米抗体序列,可以尝试通过密码子优化的方法使其正确表达。另外,从 Cap 特异性纳米抗体的 ELISA 反应效价来看,本研究制备的纳米抗体效价最高仅能到 1:500,后续研究需要进一步对淘洗出的纳米抗体序列进行表达与活性筛选,并将其制备成双价或多价纳米抗体,以进一步提高其亲和活性。

总之,纳米抗体由于其分子量小、特异性强、稳定性好、免疫原性低等独特优势,在疾病检测和治疗等方面已经被广泛应用<sup>[21]</sup>,而在畜牧兽医及食品安全领域的应用则刚处于起步阶段。本研究通过大肠埃希菌原核表达系统实现了 PCV2 Cap 蛋白特异性纳米抗体的高效可溶性表达,为 PCV2 的检测及治疗提供了新型抗体工具。

## 参考文献:

- [1] Segalés J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2005, 6(2): 119 - 142.
- [2] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2000, 12(1): 3 - 14.
- [3] Chae C. A review of porcine circovirus 2 - associated syndromes and diseases [J]. *The Veterinary Journal*, 2005, 169 (3): 326 - 336.
- [4] 代振江, 王伟丞, 曾智勇, 等. 猪圆环病毒基因组结构与功能研究进展 [J]. *畜牧与兽医*, 2016, 3: 151 - 154.  
Dai Z J, Wang W C, Zeng Z Y, *et al.* Research progress in the structure and function of porcine circovirus genome [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 3: 151 - 154.
- [5] Wang X, Jiang W, Jiang P, *et al.* Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice [J]. *Vaccine*, 2006, 24 (16): 3374 - 3380.
- [6] Song Y, Jin M, Zhang S, *et al.* Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2 [J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 119(2 - 4): 97 - 104.
- [7] Li P - C, Qiao X - W, Zheng Q - S, *et al.* Immunogenicity and immunoprotection of porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap protein displayed by *Lactococcus lactis* [J]. *Vaccine*, 2016, 34 (5): 696 - 702.
- [8] Gu Y, Zheng D, Jin Y, *et al.* Development of a monoclonal antibody against porcine circovirus 2 Cap protein [J]. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2016, 35 (4): 227 - 230.
- [9] Li X, Bai Y, Zhang H, *et al.* Production of a monoclonal antibody against porcine circovirus type 3 cap protein [J]. *Journal of Virological Methods*, 2018, 261: 10 - 13.
- [10] 曲芹芹, 何乃珠, 涂伟, 等. 猪圆环病毒重组 Cap 蛋白单克隆抗体的制备及初步应用 [J]. *中国兽医学报*, 2014, 7: 1053 - 1058, 1071.  
Qu X Q, He N Z, Tu W, *et al.* Development of monoclonal antibodies against porcine circovirus type 2 and their primary application [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 7: 1053 - 1058, 1071.
- [11] 梁武, 孙艳, 吕茂杰, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白单克隆抗体的制备 [J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 7: 1674 - 1679.  
Liang W, Sun Y, Lv M J, *et al.* Preparation of monoclonal antibodies against porcine circovirus type 2 Cap protein [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 7: 1674 - 1679.
- [12] Hamers - Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains [J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446.
- [13] Wagner H, Wehrle S, Weiss E, *et al.* A two - step approach for the design and generation of nanobodies [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3444.
- [14] Blanchard P, Mahé D, Cariolet R, *et al.* Protection of swine against post - weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins [J]. *Vaccine*, 2003, 21(31): 4565 - 4575.
- [15] Arbabi - Ghahroudi M. Camelid single - domain antibodies: historical perspective and future outlook [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8(1589).
- [16] Salvador J P, Vilaplana L, Marco M P. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(9): 1703 - 1713.
- [17] 孔庆明, 姚亚波, 陈睿, 等. 纳米抗体及其在诊断检测中的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2014, 30(9): 1351 - 1361.  
Kong Q M, Yao Y B, Chen R, *et al.* Progress in nanobody and its application in diagnosis [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2014, 30(9): 1351 - 1361.
- [18] 黄迪. 纳米抗体三种原核表达系统的比较及耐热性研究

- [D]. 西北农林科技大学, 2014.
- Huang D. Comparison of three prokaryotic expression systems and research on heat resistance of nanobody [D]. Northwest A&F University, 2014.
- [19] 李玲霞, 翟田甜, 马晓玲, 等. 抗 CD133 纳米抗体的分离与鉴定[J]. 生物技术, 2016, 1: 87 - 92.
- Li L X, Zhai T T, Ma X L, *et al.* Isolation and identification of a nanobody which bound with human CD133 [J]. *Biotechnology*, 2016, 1: 87 - 92.
- [20] 冯凡, 许杨, 王丹, 等. 抗黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 独特型纳米抗体的表达及复性[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4: 1222 - 1227.
- Feng F, Xu Y, Wang D, *et al.* Prokaryotic expression and renaturation of anti - idiotype nanobody against aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2013, 4: 1222 - 1227.
- [21] Hassanzadeh - Ghassabeh G, Devoogdt N, De Pauw P, *et al.* Nanobodies and their potential applications [J]. *Nanomedicine*, 2013, 8(6): 1013 - 1026.

(编辑:李文平)