



# 一种快速生成纳米抗体的可靠方法

A robust method for the rapid generation of nanobodies

【亲和生命】

发明人：亲和（武汉）生命科技有限公司

发明创造名称：一种 Pfu DNA 聚合酶纳米抗体及制备方法和应用

参考文献：He, Lichun & Tao, Zhiqing & Wang, Huan & Zhao, Xiaoling & Zhang, Juan & Jiang, Guosheng & Yu, Bin & Yihao, Chen & Zhu, Mingjun & Long, Junli & Yin, Lei & Zhang, Xu & Liu, Maili. (2023). A robust method for the rapid generation of nanobodies. 10.1101/2023.02.15.528753.

亲和生命创始人禾立春教授科研团队于 2023 年 2 月 16 日在线发表了一篇题为“A robust method for the rapid generation of nanobodies”的研究论文，并于 6 月 28 号通过审核。该方法是一种低设备依赖、不造成文库多样性损失、稳定的高通量( $>10^5$ )，并且可同时筛选和表达纳米抗体的方法。

纳米抗体作为一种可塑性强、较为新颖的抗原识别和调控的工具，具备小尺寸、易表达和筛选及改造、高亲性和稳定性等优势。随着纳米抗体在生物医学和科学应用中的增长，如何快速且稳定的筛选和生产纳米抗体成为了众多科研项目的一个难点。

## 传统方法筛选纳米抗体的局限性

目前纳米抗体的筛选主要通过噬菌体展示技术和酵母表面展示技术完成。噬菌体展示技术基于原核表达体系，对来源真核的纳米抗体存在密码子偏好性等问题，无法让有些目标抗体得到有效展示，亦或展示的蛋白有毒，导致克隆丢失，从而限制了文库的多样性。同时噬菌体展示所承载的分子量有限，分子量太大会影响噬菌体的侵染与包装。虽然酵母展示可以有效解决上述问题，但其需要昂贵的流式细胞仪，阻碍了该方法的广泛应用。另外，无论是噬菌体还是酵母展示技术，过程中必须经过细菌或细胞转化，若要进一步表达，后续还需要将目的基因构建至表达载体，整个周期耗时较长。

## 新策略中纳米抗体在培养基中的分泌表达

新策略采用大肠杆菌作为宿主，有数据表明将蛋白质（HdeA, Spy, Im7）与 PelB 信号肽结合，可以使蛋白分泌到培养基中，有效避免毒性问题。为了观察纳米抗体是否具有同样的表现，研究者在纳米抗体的 N 端融合了 PelB 信号肽和 6×His 标签，构建表达载体 Modified pet-22b（图 1B）。实验显示所有随机选择的 5 个纳米抗体均分泌到培养基中（图 1C），证明纳米抗体分泌表达的可行性。这种将纳米抗体分泌到培养基中的方式，使用相同的表达载体和宿主细胞整合了纳米抗体的筛选和纯化，大大减少了发现特异性纳米抗体所需的时间。

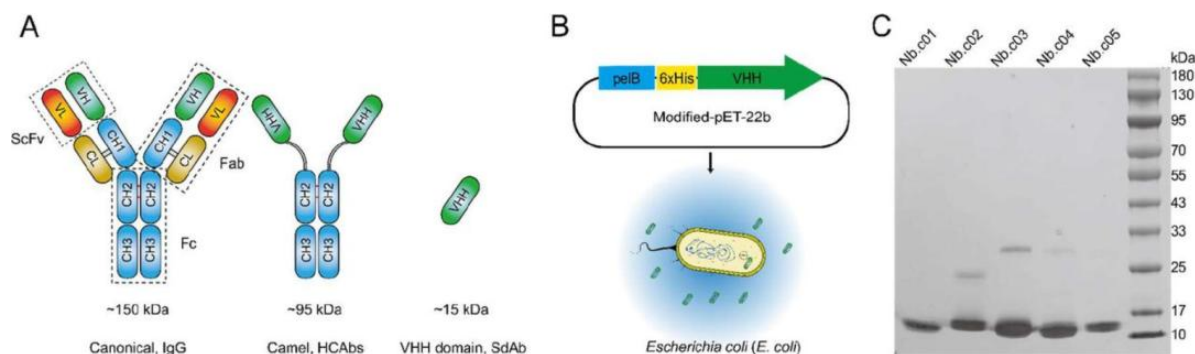


图 1. 纳米抗体与传统抗体相比的独特性 (A).传统抗体、骆驼血清重链抗体和重链抗体 (VHH) 可变片段 (也称为纳米抗体或单域抗体 SdAb) 的结构示意图。(B).表达和分泌纳米抗体的 pET-22b 载体的构建及修饰。(C) SDS-PAGE 观察几种纳米抗体可分泌到细胞内的培养基中。(取细胞培养液上清液 10 倍浓缩进行 SDS-PAGE 分析。)

## 新策略的高通量纳米抗体筛选与分离

骆驼科动物在单次免疫后，外周血中分泌抗原特异性免疫球蛋白 G (IgG) 的 B 细胞的数量从  $10^4$ - $10^6$  不等。然而，将大肠杆菌表达的免疫文库稀释为每孔单细胞，进行特异性单克隆纳米抗体的筛选方法，面临着低通量的问题。为了解决这个问题，新策略中将每个孔的  $10^n$  个克隆数混合一起（为了计算方便，将 96 孔板近似看做 100 孔板），这样，一个 96 孔板就可以达到  $10^{n+2}$  的筛选吞吐量。一旦确定有阳性克隆的孔，取出 m 个克隆与新鲜培养基混合，重新均匀分布到新的 96 孔板中，用于下一轮分离特异性单克隆的纳米抗体。从阳性孔中得到的克隆 (m) 遵循泊松方程：

$$P(X) = \frac{\lambda^x}{x!} e^{-\lambda}, \quad \lambda = m * 10^{-n} \quad (1)$$

其中 P (X) 是获得 X 个阳性克隆的概率；λ 是指定分裂 (m) 中获得阳性克隆数的期望值，为分裂克隆数 (m) 与获得阳性克隆的概率的乘积；e 是自然对数， $e \approx 2.718$ 。那么在得到的克隆 (m) 中至少有一个阳性克隆的概率，可以用方程(2)计算，用于下一轮筛选的分布和再生：

$$P(x \geq 1) = 1 - P(x \leq 0) = 1 - \sum_{i=0}^0 P(x = i) = 1 - \sum_{i=0}^0 \frac{\lambda^0}{0!} e^{-\lambda} \quad (2)$$

当 λ 分别为 5、10 和 20 时，在分离的克隆 (m) 中至少有一个阳性克隆的概率分别为 0.993262、0.999955 和 0.999999。在下一轮分离中，阳性克隆的数量将分别增加 20、10 和 5 倍。较高的 λ 值有助于避免阳性克隆在筛选过程中被淘汰。然而，考虑到每轮筛选阳性克隆的富集因子，在随后的研究中使用的 λ 值为 10。

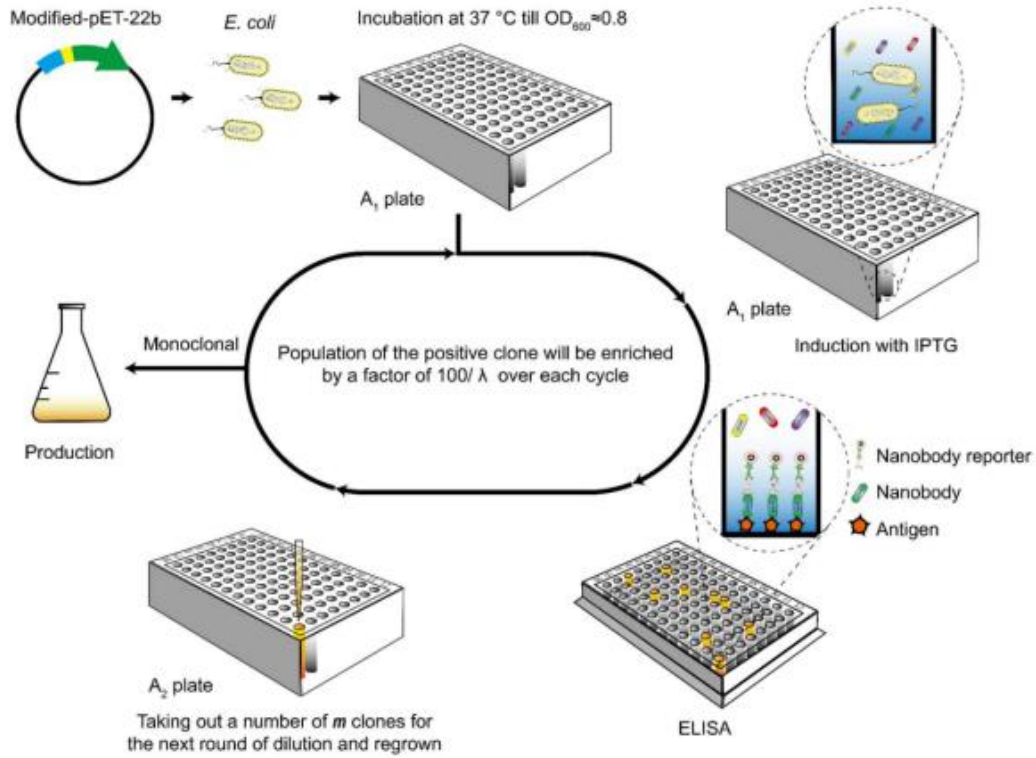


图 2. 根据泊松分布规律, 通过重复的细胞分裂和再生长循环, 整合分离和表达特异性结合的单克隆纳米抗体的方案, 在丰富阳性克隆种群的同时也避免了阳性克隆的丢失。

### 用两个免疫文库评估新策略的性能

为了评估上述新策略的性能, 分别用纯化的 DR5 和 Pfu DNA 聚合酶免疫两只羊驼, 从淋巴细胞中提取总 mRNA, 用巢式 PCR 扩增来自两个免疫 cDNA 文库的 VHH 基因片段, 然后将其克隆到修饰的 pet22b 分泌载体中并转化至大肠杆菌。将 103 个克隆接种于 A1 板进行第一轮筛选: 用 0.5mM IPTG 诱导 12h, 离心收集上清液进行 ELISA 检测, 鉴定阳性克隆, 结果如图 3 (A-D) :

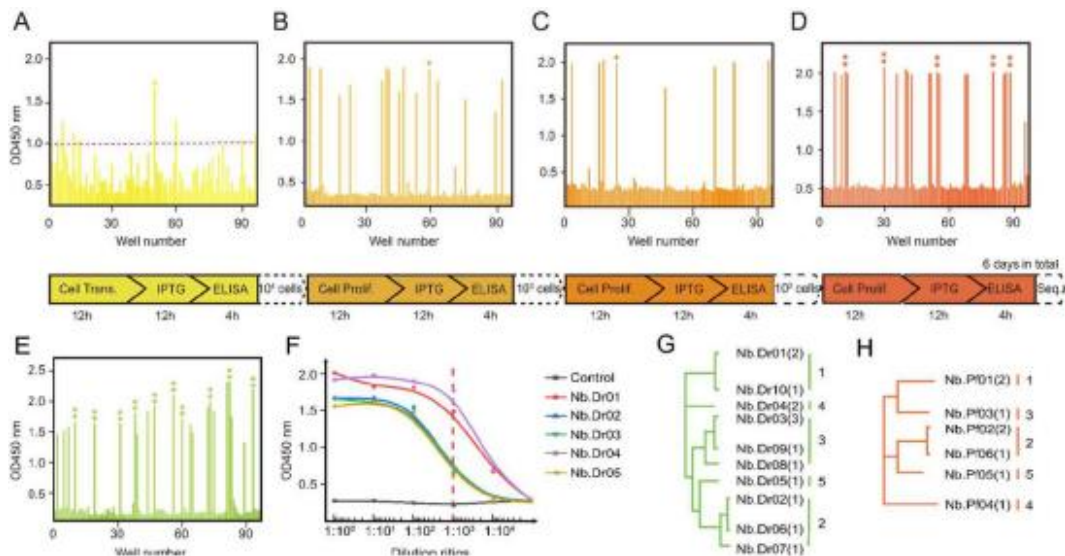


图 3. 抗 Pfu DNA 聚合酶和 DR5 的纳米抗体的分离及纳米抗体培养基上清液的 ELISA 结果。(A-C)用 ELISA 法检测不同纳米抗体表达克隆的上清液对 Pfu DNA 聚合酶的信号。\*表示阳性，进入下一轮筛选。(D-E)分别用 ELISA 法检测抗 Pfu DNA 聚合酶(D)和 DR5 (E)的单个纳米抗体表达克隆的上清液。‡ 表示分离到的单克隆进行测序。F. 将不同 DR5 纳米抗体表达克隆的上清液分别按 1: 10<sup>1</sup>、1: 10<sup>2</sup>、1: 10<sup>3</sup> 和 1: 10<sup>4</sup> 的比例稀释后，用 ELISA 检测其上清液。(G-H)进化树，分别显示 Pfu DNA 聚合酶(H)和 DR5 (G)，不同纳米抗体之间的遗传距离。

### 新策略中分离纳米抗体的高通量及亲和力验证

接下来研究者将 5 个 DR5 特异性纳米抗体的上清液进行稀释，证明系统中纳米抗体的分泌水平很高，可以达到每个 96 孔板 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> 的吞吐量。通过等温滴定量热法分析纳米抗体的亲和力，结果表明，5 个分离的 DR5 纳米抗体与 DR5 的结合亲和力在 18 $\mu$ M~54 $\mu$ M 之间，4 个分离的 Pfu 纳米抗体与 Pfu DNA 聚合酶的结合亲和力在 33 $\mu$ M~35 $\mu$ M 之间。

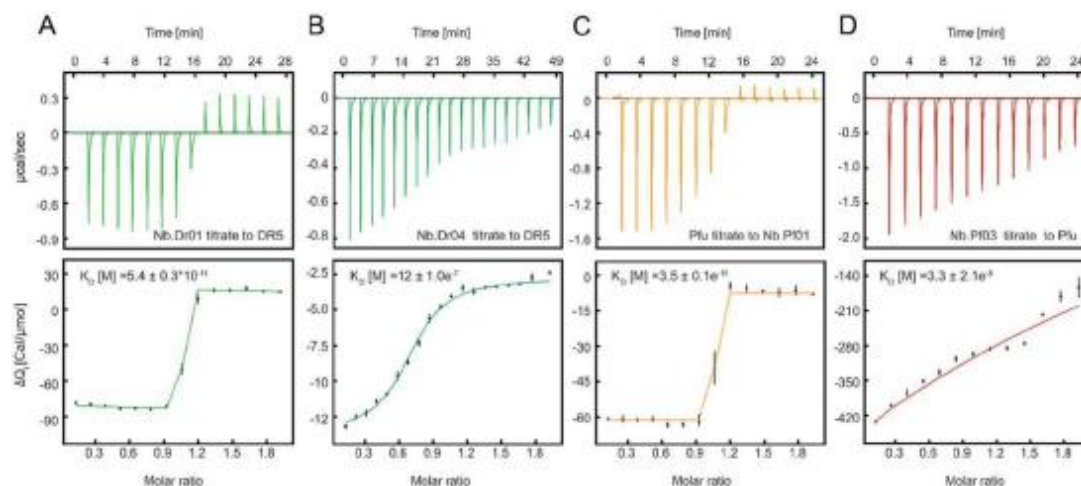


图 4.分离的纳米抗体与其目标蛋白结合亲和力的测定。对抗 DR5 蛋白的两个单克隆纳米抗体 (A-B) 和两个抗 Pfu DNA 聚合酶的纳米抗体 (C-D) 的 ITC 测量的代表性结果。

此外，研究者通过核磁共振波谱进一步分析所得到的纳米抗体的多样性，根据相互竞争关系，所有 5 个 Pfu 纳米抗体的结合位点的示意图如下：



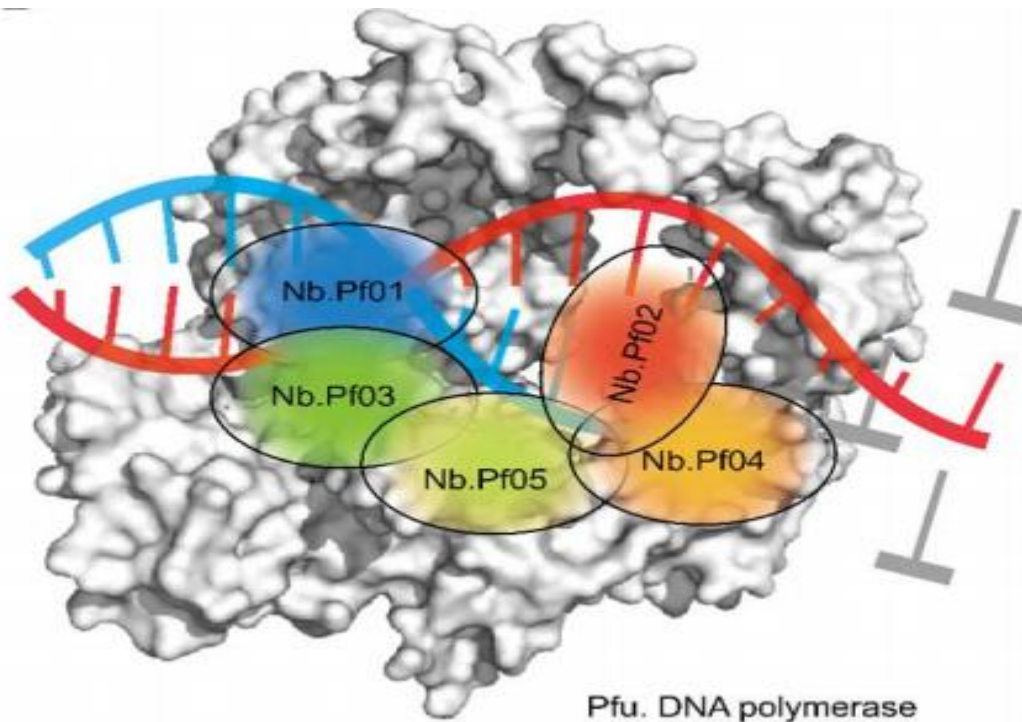


图 5.Pfu 纳米抗体结合表位重叠情况

对于 DR5 和 Pfu DNA 聚合酶，分离的纳米抗体显示了极其广泛的结合亲和力，从几十个  $\mu\text{M}$  到  $\text{pM}$ ，跨越近 7 个数量级；分离的 Nb-pfu 经验证也具备不同的亲和表位；表明此方法在分离具有广泛结合亲和力的纳米抗体方面的普遍适用性。

### 小结

快速分离靶向特异性纳米抗体对于研究和治疗都是至关重要的。研究者利用纳米抗体的小分子量和表达的可行性，综合筛选和表达特定纳米抗体的方法，省去将纳米抗体亚克隆到表达载体中的步骤，整个工作可在产生免疫反应后的 8-9 天内完成，显著简化纳米抗体的生产。此外，该方法可以不需要特殊的仪器设备，极大降低纳米抗体筛选成本，且最高筛选通量为  $10^6$  每 96 孔板，与常用的噬菌体展示方法相比，避免了人工丢失文库多样性的问题。综上，此策略可以用于快速分离与目标蛋白具有广泛结合亲和力的纳米抗体。

- THE END-

### 关于亲和生命

亲和（武汉）生命科技有限公司成立于 2022 年，公司致力于关键酶、关键抗体及生化试剂的产品研发、生产和市场应用服务。公司坚持底层创新，依托 AI 辅助蛋白质设计和 NMR 指导蛋白质定向进化平台的强大创新能力，持续推进在科研用酶、诊断用酶、转基因植物酶以及小纳抗体（面向细胞治疗、多特异性抗体、抗体介导蛋白质降解等应用方向）方面的技术创新和产品开发。

亲和生命着眼于绿色生产、人类健康、科技研发的需求，秉承工匠精神，以“High Quality Enzyme, High Affinity Antibody”为己任，立志做世界一流品质的产品，为科研、生产、生活提供更好的选择，助力绿色制造及人类社会可持续发展。

## 亲和生命热销产品

AFFINIBODY  
免染PAGE胶一步法制备试剂盒

紫外成像 一步制胶 恒压 安全无毒

免染上层胶缓冲液 40 mL  
免染上层胶缓冲液 40 mL  
免染下层胶缓冲液A 125 mL  
免染下层胶缓冲液 125 mL

大中华区  
✉ info@affinibody.com  
☎ +86 18513969691/+86 13120444153  
🌐 www.affinibody.com

欧洲区  
✉ info@affinibody.ch  
☎ +41763290285/+4176389241  
🌐 www.affinibody.com

官方公众号

//// 亲和生命明星产品合集 ////

在短短的一年内，亲和生命已经陆续推出了多个系列的产品，得到了用户和市场的广泛赞誉和好评。

## 公司二维码