• 医药生物技术 •

血红蛋白驼源纳米抗体的筛选与表征

钟宁¹, 雷雯惠¹, 刘祖英¹, 谢晓筱¹, 张凌晶¹, 金腾川², 曹敏杰¹, 陈玉磊^{1*}

1 集美大学 海洋食品与生物工程学院,福建 厦门 361021
 2 中国科学技术大学 基础医学院,安徽 合肥 230027

钟宁, 雷雯惠, 刘祖英, 谢晓筱, 张凌晶, 金腾川, 曹敏杰, 陈玉磊. 血红蛋白驼源纳米抗体的筛选与表征[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1515-1534.

ZHONG Ning, LEI Wenhui, LIU Zuying, XIE Xiaoxiao, ZHANG Lingjing, JIN Tengchuan, CAO Minjie, CHEN Yulei. Screening and characterization of camelid-derived nanobodies against hemoglobin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1515-1534.

摘 要:血红蛋白是红细胞内的主要蛋白质,负责在血液中运输氧气。从贫血的诊断到血液疾病的 筛查,血红蛋白浓度的测定在医疗诊断和健康管理中发挥着不可替代的作用。基于抗原-抗体相互作 用的免疫学检测方法具有高灵敏度和准确性。为了开发具有高特异性和高亲和力的抗体,提高血红 蛋白检测的准确性,本研究将人血红蛋白免疫双峰驼并构建噬菌体展示纳米抗体文库,应用固相筛 选法进行抗体筛选,并探明筛选得到的纳米抗体与血红蛋白的结合活性。首先,将人血红蛋白免疫 双峰驼,并构建了库容量为2.85×10⁸菌落形成单位(colony forming unit, CFU)的纳米抗体文库。其次, 经过3轮"吸附-洗脱-富集"实验淘选,得到10条血红蛋白特异性纳米抗体序列,并对其进行真核表 达。最后,使用酶联免疫吸附实验和生物膜干涉技术表征纳米抗体的理化稳定性、结合活性和特异 性。结果表明,纳米抗体在20-40°C温度范围内具有较好的稳定性;当pH值为7.0时,纳米抗体结 合活性最高;纳米抗体在20-40°C温度范围内具有较好的稳定性;当pH值为7.0时,纳米抗体结 合活性最高;纳米抗体可耐受10%的甲醇溶液。其中,纳米抗体VHH-12与血红蛋白结合活性最高, 其半数最大效应浓度值(half maximal effective concentration, ECso)为10.63 nmol/L,平衡解离常数 (equilibrium dissociation constant, K_D)为2.94×10⁻⁷ mol/L。VHH-12 与卵清蛋白、牛血清蛋白等 8 种蛋 白质均无交叉反应性,与猪、羊、兔、牛血红蛋白表现出一定的交叉反应性。本研究成功淘选出1条血 红蛋白特异性高亲和力纳米抗体,有望应用于疾病诊断和健康监测。 关键词:血红蛋白;驼源纳米抗体;筛选;结合活性

资助项目:国家自然科学基金(82272301,31870731);福建省自然科学基金(2021J01838)

*Corresponding author. E-mail: ylchen@jmu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82272301, 31870731) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (2021J01838).

Received: 2024-09-25; Accepted: 2025-02-18; Published online: 2025-02-21

Screening and characterization of camelid-derived nanobodies against hemoglobin

ZHONG Ning¹, LEI Wenhui¹, LIU Zuying¹, XIE Xiaoxiao¹, ZHANG Lingjing¹, JIN Tengchuan², CAO Minjie¹, CHEN Yulei^{1*}

1 College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China 2 School of Basic Medical Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, Anhui, China

Abstract: Hemoglobin, the principal protein in red blood cells, is crucial for oxygen transport in the bloodstream. The quantification of hemoglobin concentration is indispensable in medical diagnostics and health management, which encompass the diagnosis of anemia and the screening of various blood disorders. Immunological methods, based on antigen-antibody interactions, are distinguished by their high sensitivity and accuracy. Consequently, it is necessary to develop hemoglobin-specific antibodies characterized by high specificity and affinity to enhance detection accuracy. In this study, we immunized a Bactrian camel (Camelus bactrianus) with human hemoglobin and subsequently constructed a nanobody library. Utilizing a solid-phase screening method, we selected nanobodies and evaluated the binding activity of the screened nanobodies to hemoglobin. Initially, human hemoglobin was used to immunize a Bactrian camel. Following four immunization sessions, blood was withdrawn from the jugular vein, and a nanobody library with a capacity of 2.85×10⁸ colony forming units (CFU) was generated. Subsequently, ten hemoglobin-specific nanobody sequences were identified through three rounds of adsorption-elution-enrichment assays, and these nanobodies were subjected to eukaryotic expression. Finally, enzyme-linked immunosorbent assay and biolayer interferometry were employed to evaluate the stability, binding activity, and specificity of these nanobodies. The results demonstrated that the nanobodies maintained robust binding activity within the temperature range of 20-40 °C and exhibited the highest binding activity at pH 7.0. Furthermore, the nanobodies were capable of tolerating a 10% methanol solution. Notably, among the nanobodies tested, VHH-12 displayed the highest binding activity to hemoglobin, with a half maximal effective concentration (EC₅₀) of 10.63 nmol/L and a equilibrium dissociation constant (K_D) of 2.94×10⁻⁷ mol/L. VHH-12 exhibited no cross-reactivity with a panel of eight proteins, such as ovalbumin and bovine serum albumin, while demonstrating partial cross-reactivity with hemoglobin derived from porcine, goat, rabbit, and bovine sources. In this study, a hemoglobin-specific high-affinity nanobody was successfully isolated, demonstrating potential applications in disease diagnosis and health monitoring.

Keywords: hemoglobin; camel-derived nanobodies; screening; binding activity

血细胞主要由红细胞、白细胞及血小板构成,红细胞占比最高(约 45%)。红细胞内的血 红蛋白(hemoglobin)为关键成分,是含铁氧转运 金属蛋白,约占红细胞干重的 95%^[1]。血红蛋 白广泛存在于几乎所有脊椎动物红细胞及部分 无脊椎动物组织中^[2],体现了其在生物界的重 要性。人类血红蛋白为 α 和 β 珠蛋白对称配对 的四聚体^[3],分子量约为 64.5 kDa。4 个亚基两 两结构相似且大小大致相同,每个亚基在分子可触及的缝隙中都有 1 个含铁的血红素,该血 红素基团能够结合红细胞内的 1 个氧分子^[4], 使得血红蛋白在人体中起着运输氧气的重要作 用^[5]。此外,血红蛋白还具有免疫调节^[6]、信号 传导及抗菌等多元作用^[7]。

在临床检验中, 血红蛋白含量变化对诊断 疾病、评估预后和监测治疗至关重要。了解血 红蛋白含量与疾病之间的关系,可以及时改进 检测方法,提供更准确的诊断和治疗方案。血 红蛋白是评估贫血、白血病和多发性红细胞症 等血液系统疾病的生物标志物^[8]。在胃肠道疾 病,尤其是结肠癌的诊断中,人类血红蛋白作 为检测靶点得到了广泛应用。粪便血红蛋白免 疫化学检测是常用的无创检测方法,可有效降 低结直肠癌的死亡风险^[9]。Nakamura 等^[10]研究 表明,血红蛋白水平和动脉血氧分压直接影响 慢性肺气肿患者的肺动脉压力和肺血管阻力。 在帕金森病的确诊过程中,血红蛋白检测对于 判定该疾病的生物标志物是否纯净起着至关重 要的作用,而且也是判断唾液样本是否受血液 污染的关键环节[11-12]。此外,血红蛋白检测对 手术中输血需求评估尤为关键,且血红蛋白浓 度变化与术后谵妄显著相关,维持正常血红蛋 白水平对预防谵妄具有重要作用[13]。血红蛋白 水平已被确定为肿瘤患者死亡的独立预测指 标。Hohneck 等^[14]深入探讨了肿瘤患者血红蛋 白水平对患者预后的潜在影响,研究结论表明, 低血红蛋白水平是癌症患者死亡率的独立预测 因素,也被用作评估烧伤深度的诊断指标。 Wong 等^[15]通过在大鼠身上制造不同程度的烧 伤损伤, 收集血液样本并测量血浆中游离血红 蛋白的水平;利用血浆游离血红蛋白作为一种 新的诊断指标,用于评估烧伤损伤的深度。鉴 于血红蛋白在健康管理和疾病预防中的关键 作用,亟需实时准确监测血红蛋白浓度的方法, 以优化临床决策,提升医疗服务质量。

目前, 血红蛋白浓度的测定方法主要包括 电泳法、液相色谱法、吸光光度法、电化学方 法、分光光度法和免疫法等。传统的电泳方法 分辨率不够高,对于某些异常血红蛋白的分离 效果不佳,可能导致漏检或误判^[16]。液相色谱 法样品处理繁琐,结果解读需要专业的知识和 经验,且仪器维护成本高[17]。电化学方法依赖 血红蛋白中亚铁离子的还原性,但血红蛋白属 于大分子蛋白质,铁离子被包裹于血红素中, 无法直接与电极进行电子交换[18]。用于血红蛋 白含量检测的传统方法干扰因素较多[19],尤其 是吸光值检测方法,其易受血红蛋白家族其他 成员、试剂、仪器等因素干扰,导致结果出现 较大偏差^[20]。基于单克隆抗体的免疫法灵敏度 和特异性高,且不受饮食和相关药物的影响, 在生物医学研究和临床诊断中发挥着不可替 代的作用^[21]。Sonezaki 等^[22]利用表面等离子体 共振(surface plasmon resonance, SPR)生物传感 器检测血红蛋白单克隆抗体与人类血红蛋白 之间的相互作用。另一项研究侧重于利用免疫 层析技术检测血迹中的变性血红蛋白^[23]。目 前,便携式的免疫层析试纸在隐血检测中表现 出了较高的准确性与快速性,在隐血检测领域 的巨大潜力和应用前景[24]。目前,胶体金免疫 层析技术的应用显著提升了人类粪便样本中 血红蛋白的检出率^[25]。Miura 等^[9]成功开发了 一种基于抗体-酶复合物 (antibody-enzyme complex, AEC)的人类血红蛋白检测方法, 该方 法利用多聚体结构的二价 AEC 提高了检测灵 敏度,并结合磁珠建立了一种快速、免清洗的 电化学与免疫学相结合的检测系统,这项技术 可用于床旁检测血红蛋白和其他多聚物生物 标志物中。

1993年, Hamers 团队研究发现, 骆驼科动 物已经进化出了哺乳动物中独特的双重抗体系 统[26]。在这一系统中,骆驼的血清中不仅包含了 由经典的4条肽链组成的常规抗体,还演变出了 一种完全由2条相同的重链组成的独特抗体,这 类抗体被称为重链抗体(heavy-chain antibody, HCAb)。从重链抗体中又衍生出了一种特殊的 抗体形式,即重链单域抗体(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH), 分子 量仅为15 kDa,是具备抗原结合能力的最小抗 体单位^[26]。VHH 与抗原的特异性结合主要依赖 于3个高度可变区域,这些区域被称为互补决定 域(complementarity-determining region, CDR)^[27]。 VHH 能够高效结合抗原,主要归因于 CDR1 的 结构变异以及 CDR3 长度的增加和序列多样 性^[28-29]。在与人和小鼠重链可变区(variable heavy chain, VH)中的 CDR3 区域相比较时, VHH 的 CDR3 区域更长,其平均长度为18个氨基酸^[30]。 某些 VHH 的 CDR3 区域长度甚至超过 25 个氨 基酸^[31],这一特性为它们提供了独特的抗原结 合能力。此外, VHH 的 CDR1 和 CDR3 区域由 一个二硫键连接,其较长的 CDR3 区域可以形 成凸起的环形区域[32],可深入到抗原缝隙及隐蔽 表位,从而表现出较强的特异性和亲和力,潜在 地增加了互补位构象的多样性,这使 VHH 在诊断 与治疗应用方面具备独特优势^[33]。p24 衣壳蛋白是 人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)感染的最早的蛋白质生物标 志物, Gray 等^[34]使用该蛋白免疫美洲驼, 得到 高亲和力纳米抗体, K_D值达到 10⁻¹⁰ mol/L, 有 潜力开发为第 4 代 HIV-1 检测试剂。宫颈癌是 世界上女性第二大常见癌症,几乎所有宫颈癌都 与人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感 染有关。Li 等^[35]率先报道了针对 HPV16 型 E7 蛋白的纳米抗体制备及其应用研究,这些纳米

抗体有望成为诊断与治疗 HPV16 相关疾病的 首选生物分子制剂。Wang 等^[36]还系统地综述了 纳米抗体在类风湿关节炎、获得性血栓性血小 板减少性紫癜、系统性红斑狼疮和银屑病等多 种自身免疫性疾病治疗中的应用。纳米抗体通 过靶向这些疾病的靶点分子,有效抑制自身免 疫反应,提高患者的生活质量。

本研究将人血红蛋白免疫双峰驼,构建 VHH 免疫文库并进行生物淘选,共筛选得到 10条人血红蛋白特异性 VHH;通过体外表达和 纯化获得重组 VHH-Fc 融合蛋白,并对其结合 活性和理化稳定性进行了详细表征;研究结果 不仅可为精准测定人血红蛋白浓度提供了强有 力的工具,同时也可为高亲和力 VHH 的筛选及 靶向药物的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

血红蛋白由厦门市波生生物技术有限公司 提供; pR2、KM13 辅助噬菌体、大肠杆菌 (Escherichia coli) TG1 菌株、pTT5-TEV-Fc 表达 载体、5×T5 核酸外切酶和 HEK 293F 细胞均为 本实验室保存: E. coli DH5α 感受态细胞和脱脂 奶粉购自生工生物工程(上海)股份有限公司; SMM 293-T II 培养基和 Anti-M13 Antibody (HRP)购自北京义翘神州科技股份有限公司;三 抗(青霉素-链霉素-庆大霉素)购自北京索莱宝 科技有限公司;转染试剂 PEI MAX-转染级线性 聚乙烯亚胺盐酸盐购自上海曼博生物医药科技 有限公司; 总 RNA 提取试剂盒 II、RNase-Free DNase I Set、Cycle Pure Kit 购自欧米茄生物技 术公司;分子克隆所用基因克隆酶均购自宝生 物工程(大连)有限公司; 弗氏佐剂、溴酚蓝、聚 乙二醇(polyethylene glycol, PEG)均购自西格玛 奥德里奇(上海)贸易有限公司;质粒小提试剂盒

购自天根生化科技(北京)有限公司;胶回收试剂 盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;Uniclone One Step Seamless Cloning Kit Ver. 2 购自北京 金沙生物科技有限公司; Goat pAb to Hu IgG (HRP)购自艾博抗(上海)贸易有限公司; ECL 显 色剂购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司; TMB 显色液购自上海碧云天生物技术股份有 限公司;限制性内切酶 Sal I-HF、Not I-HF 等及 其反应体系购自纽英伦生物技术(北京)有限公 司; 氨苄青霉素购自上海麦克林生化科技股份 有限公司; 氢氧化钠、EDTA、醋酸、Tween-20 购自上海沪试实验室器材股份有限公司; 蛋白 胨、酵母提取物购自赛默飞世尔科技公司;考 马斯亮蓝购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公 司: Tris、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、SDS 购自合肥兰杰柯科技有限公司;浓硫酸购自西陇 科学股份有限公司; Biotinylation Kit 购自江苏博 美达生命科学有限公司。

1.2 双峰驼免疫

选取一只养殖于内蒙古骆驼试验场的体重 适中、精力充沛的健康成年双峰驼(Camelus bactrianus)。将 500 µg 血红蛋白与等量的弗氏 佐剂充分乳化,第 1 次免疫采用皮下注射,第 2-4 次采用肌肉注射,4 次免疫间隔时间分别为 20、60、40 d。首次免疫采用弗氏完全佐剂, 后续采用弗氏不完全佐剂。在骆驼免疫后的第 135 天,使用采血针采集双峰驼的颈静脉血, 利用 Ficoll 溶液分离得到淋巴细胞。本研究涉 及的所有动物实验均严格按照实验动物福利伦 理要求进行。动物实验方案已通过安徽金百奥 生物科技有限公司实验动物伦理委员会审查 (批准号: GB202306061448005)。

1.3 VHH 免疫文库构建

取免疫后的淋巴细胞,提取 RNA,反转录为 cDNA,以其为模板,使用 VHH 特异性引物

(5'-GCTGCACAGCCTGCTATGGCACAGTGCA GCTCGTGGAGTCTGGG-3'和 5'-GAGTTTTTG TTCGGCTGCTGCTGAGGAGACGGTGACCTG GGTCCC-3')扩增得到 VHH 片段。以 pR2 噬菌 粒为模板,用 pR2 特异性引物(5'-AGCAGCCGA ACAAAAACTCATCTCAGAAGAG-3'和 5'-CC ATAGCAGGCTGTGCAGCATAGAAAGGTACC-3')扩增得到 pR2 片段,并用 Dpn I 限制性内切 酶酶切 pR2 模板。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶 电泳鉴定,使用胶回收试剂盒进行回收。使用 Uniclone One Step Seamless Cloning Kit Ver. 2 连接酶将 VHH 片段与 pR2 载体于 50 ℃条件下 连接1h,回收连接产物,并电转化至对数生长 期的 E. coli TG1 细胞中(2 500 V, 5 ms)。电击后 的细胞转至 20 mL 2×YT 无菌液体培养基中, 37 ℃、200 r/min 振荡培养 1 h。培养结束后分别 取 2、0.2、0.02 µL 原液(梯度稀释法)涂布于 9 cm LB 培养基/0.1%氨苄西林(ampicillin, Amp)/2% 葡萄糖平板中, 37 ℃倒置过夜培养 13 h 后计 数,计算库容量大小,并从平板中随机挑取 10个单菌落进行菌落 PCR 鉴定。其余菌液全部 涂布于若干 15 cm LB/0.1% Amp/2%葡萄糖平 板中, 37 ℃倒置培养 13 h 后, 刮取菌苔置于含 20%甘油的 2×YT 液体培养基中,-80 ℃冰箱保 存备用,此为原始抗体库。

1.4 噬菌体扩增

将上述原始抗体库接种至 100 mL 2×YT/ 0.1% Amp/2%葡萄糖液体培养基中,调整初始 *OD*₆₀₀ 约为 0.1,37 ℃、200 r/min 振荡培养至 *OD*₆₀₀ 约为 0.5,加入 10¹⁰ 空斑形成单位(plaque forming unit, PFU)的 KM13 辅助噬菌体。37 ℃ 静置 45 min 后,将培养物转移至离心管中, 5 500 r/min 室温离心 10 min,弃上清,用 200 mL 2×YT/0.1% Amp/0.1% 卡 那 霉素 (kanamycin, Kan)液体培养基重悬菌体,25 ℃、220 r/min 培 养 16 h。将培养物转移至离心管中,5 500 r/min、

窗: 010-64807509

4 ℃离心 30 min, 收集上清并加入 0.25 倍体积的 20% PEG/NaCl 溶液(W/V), 颠倒混匀, 冰浴 1 h 使噬菌体析出。5 500 r/min、4 ℃离心 30 min, 弃上清, 用无菌 PBS 重悬沉淀。将上清液转移 至新的离心管中,得到噬菌体文库,测量 *OD*₂₆₀ 值并计算滴度。滴度计算公式为: *OD*₂₆₀×稀释 倍数×22.14×10¹⁰, 单位为 PFU/mL。

1.5 生物淘选

使用 TNE (Tris-NaCl-EDTA)缓冲液,将血 红蛋白抗原稀释至 0.1 mg/mL, 取 100 μL 于免 疫板中,4℃静置过夜,同时在另一免疫板中 加入 100 µL TNE 缓冲液作为阴性对照。结束后 弃免疫板中液体,加入 280 µL PBS 缓冲液,甩 干, 重复3次, 加入280 µL MPBS (PBS, 包含 5%脱脂奶粉), 室温静置 2 h。每孔加入 280 μL PBST (PBS, 包含 0.1% Tween-20), 重复 4 次, 每免疫孔中加入 1×10¹¹ PFU 的噬菌体,80 r/min 振荡孵育1h。加入280 µL PBST 缓冲液,重复 20次,洗去非特异性结合的噬菌体。用100 µL 0.1 mg/mL 胰蛋白酶振荡孵育 1 h, 洗脱结合的 噬菌体。取 10 µL 洗脱噬菌体感染 990 µL E. coli TG1 (OD₆₀₀≈0.5), 37 ℃水浴 45 min, 取部分菌 液梯度稀释后涂布 LB/Amp 琼脂平板,剩余菌 液离心后涂布于 LB/0.1% Amp 琼脂平板。计数 各稀释梯度在涂布平板上的克隆子,将全菌板 刮下作为第1轮淘选后的文库。共进行3轮生 物淘选, 计算得到回收率和富集度。

1.6 噬菌体酶联免疫吸附试验(phage ELISA)

从第 3 轮淘选的阳性平板中随机挑取若干 个克隆子于 100 μL 2×YT/Amp/2%葡萄糖培养 基中, 37 ℃、250 r/min 培养 6-8 h,取其中 5 μL 菌液加入到 100 μL 2×YT/0.1% Amp/2%葡萄 糖/KM13 培养基中, 37 ℃、250 r/min 培养 1.5 h, 37 ℃静置 45 min。每孔弃 50 μL 菌液,离心收 集细菌沉淀,去除上清,每孔加入 200 μL 2×YT/Amp/Kan/0.1%葡萄糖培养基,25 ℃、250 r/min 培养 20 h。培养结束后,5 500 r/min、4 ℃离心 30 min,收集上清,即为单克隆噬菌体样品。

使用 TNE 缓冲液,将血红蛋白稀释至 1 µg/mL, 100 µL/孔加入至免疫板中,4 ℃静置过夜。甩 干,加入280 µL PBS 缓冲液,甩干,重复2次, 加入 280 µL MPBS (5%脱脂奶粉)于室温静置 2h。甩干,加入 280 µL PBS 缓冲液,重复 2次。 将以上制备的单克隆噬菌体样品和 MPBS 溶液 以 1:3 的比例混匀,每孔加入 100 µL, 80 r/min 振荡孵育1h。甩干,加入280 µL PBST 缓冲液, 重复4次。加入100 µL/孔 Anti-M13 二抗(HRP), 振荡孵育1h。甩干,加入280 µLPBST缓冲液, 重复3次。加入100 μL/孔 TMB 显色剂进行检 测,加入 50 µL/孔 1 mol/L H₂SO₄终止反应,测 定 OD_{450} 值。将血红蛋白组 OD_{450} 值记为 P, 阴 性 OD450 值记为 N,将 P/N 数值大于 10 记为阳 性克隆,送至厦门铂瑞生物科技有限公司进行 基因测序,测序所使用的引物序列为: 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGA-3'。

1.7 VHH 的生物信息学分析

将测序结果进行碱基和氨基酸序列比对分 析,并去除重复序列。将筛选到的具有不同 CDR3区的序列利用Megalin软件(ClustalW法) 进行系统发育树和序列同源性分析,并通过 Expasy 网站(https://web.expasy.org/protparam/) 分析 VHH 的分子量、等电点和消光系数等理化 性质。

使用 AlphaFold2 软件进行 VHH 三级结构 的预测,利用 PyMOL 2.4.0 软件分析 VHH 二级 结构和三级结构。人血红蛋白结构(PDB 登录 号:1KD2)由 PDB 公开数据库下载获取,与预 测的 VHH 三级结构进行后续的分子对接。使用 Cluspro 2.0 在线网站进行刚性对接,调整 2 个 蛋白的初始构象,去除多余的水分子,使用 PyMOL 2.4.0 软件可视化对接结果,使用 PDBePISA 在线网站分析蛋白质之间相互作用 成键情况。

1.8 VHH 重组表达与纯化

利用特异性引物(5'-AAGTCAAGCTGCTC TCTGGGCGTCGACCAGGTGCAGCTCGTGG AG-3')从阳性噬菌体中扩增 VHH 序列,将其克 隆到含有 IgG-Fc 区的哺乳动物真核表达载体 中,大量抽提质粒,转染 HEK 293F 细胞,振 荡培养 5–7 d。结束后,4℃离心 15 min 收集上 清液。rProtein A 预装柱(Cytiva)纯化 VHH-Fc 融合蛋白,使用 SDS-PAGE 鉴定 VHH-Fc 融合 蛋白纯度及分子量大小。

1.9 VHH 稳定性分析

使用间接 ELISA 检测 VHH-Fc 融合蛋白热 稳定性、酸碱稳定性和有机溶剂耐受性。为确 定抗原与 VHH-Fc 的最佳浓度,采用棋盘格滴 定法,具体步骤如下:将血红蛋白和 VHH 梯度 稀释至一系列浓度点,包括 0.125、0.250、0.500、 1.00、2.50 和 5.00 µg/mL。具体实验步骤与 1.6 相同,使用羊抗人 IgG (HRP)二抗,并测定 OD450。OD450 值接近 1 时所对应的血红蛋白和 VHH-Fc浓度即为最佳浓度,2倍最佳浓度即为 工作浓度,以此为基础进行后续实验。将 VHH-Fc 在 20、30、40、50、60、70、80 ℃下 孵育 10 min, 结束后恢复至室温, 具体实验操 作同 1.6, 每孔加入 100 μL 羊抗人 IgG (HRP) 二抗振荡孵育 1 h, 测定 OD450。将 VHH-Fc 在 50 ℃下孵育 0、10、20、30、40、50、60 min 后恢复至室温,方法同上,测定 OD450。将 VHH-Fc 在 pH 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 的 PBS 缓冲液中于冰面孵育1h,使用 pH 7.0 的 PBS 缓 冲液稀释至工作浓度,方法同上,测定 OD450。

将 VHH-Fc 于 0、10%、20%、40%、60%、80% 有机溶剂(甲醇、乙腈、丙酮、二甲基亚砜)中, 在冰面孵育 1 h,之后使用 pH 7.0 的 PBS 将其 稀释至工作浓度,方法同上,测定 *OD*450。

1.10 VHH 粒径与电位分析

将 VHH-Fc 蛋白稀释至 0.5 mg/mL,放入样 品池中,平衡时间为 120 s,测量温度 25 ℃, 每个样品经过 3 轮重复扫描,每轮扫描 20 次, 粒径、粒径分布和其多分散性指数(polydispersity index, PdI)结果为 3 轮的平均值。

设置样品平衡时间为 60 s, 在 25 ℃下进行 检测, 每轮扫描 11 次, 每个样品经过 3 轮重复 扫描, 每个样品重复 3 次, Zeta 电位(Zeta potential)结果为 3 次重复的平均值。

1.11 斑点印迹(dot blot)

将血红蛋白按照以下浓度梯度和顺序(无 蛋白、血红蛋白原液、1:5、1:10、1:20)点在硝 酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC)上,烘 干,使用加入 5%脱脂奶粉的 Tris-HCl 缓冲盐溶 液(Tris buffered saline, TBS)溶液室温封闭 2 h, TBS 溶液洗去未结合的血红蛋白,加入 VHH-Fc 溶液,常温振荡孵育 1 h,洗去多余抗体,加入 羊抗人 IgG (HRP)二抗,洗去多余二抗,使用 ELC 显色剂进行化学发光检测。

1.12 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation)

使用 BeaverBeads[™]磁珠,按照说明书进行 磁珠预处理,将 VHH-Fc 与磁珠常温孵育 1 h, 洗去未结合的 VHH-Fc,再加入血红蛋白溶液, 4℃振荡孵育 1 h,洗去未结合的蛋白。利用洗 脱 液 对 磁 珠 进 行 洗 脱 ,将洗 脱 样 品 进 行 SDS-PAGE 分析。

1.13 非竞争 ELSIA

使用间接 ELISA 检测 VHH-Fc 与血红蛋白的结合活性。将血红蛋白溶液包被于免疫板上,设置阴性对照(无蛋白),使用 5% MPBS 将

纳米抗体从 10^4 梯度稀释至 10^{-3} (或 10^3 nmol/L 连 续稀释至 10^{-3} nmol/L),共设置 15(13)个浓度,方 法同 1.6。测定 *OD*₄₅₀,计算 VHH-Fc 的 EC₅₀ 值。

1.14 生物膜干涉技术

将待检测的纳米抗体和血红蛋白抗原预先 置换至 PBST 缓冲体系中(10 mmol/L PBS, 0.02% Tween-20, pH 调至 7.4)。对于链霉亲和 素(streptavidin, SA)传感器上固定的血红蛋白 抗原,采用生物素化标记以进行识别,具体步 骤如下:将 NHS-PEG12-Biotin 溶解在二甲基亚 砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中, 配制成浓度为 10 mmol/L 的储备溶液。随后,按照生物素与 蛋白的摩尔比 1:1 的比例, 在抗原蛋白溶液中 加入生物素储备溶液,并在室温下避光静置1h 以完成生物素化反应。之后,利用 PD MiniTrap[™] G-25 脱盐柱对反应混合物进行脱盐处理, 收集 脱盐后的流出液,并测定其中生物素化蛋白的 浓度。用 PBST 缓冲液稀释生物素化后的血红 蛋白至 300-500 nmol/L。提前将 SA 传感器置 于 200 µL 0.02% PBST 缓冲液中预湿 10 min, 随后将 SA 传感器安装至仪器上,加样方式设 置为滴加(drop)模式,上样量为4µL。固化时间 为 180 s, 直至结合信号大于 1.0。抗体结合与 解离时间均为480s,共设置4个抗体浓度。

1.15 VHH 特异性分析

将新型冠状病毒受体结合域(receptor binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2 RBD)、 SARS冠状病毒受体结合域(SARS RBD)、副溶 血性弧菌耐热直接溶血素(thermo-stable direct hemolysin, TDH)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、绿 色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)、基 质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1, MMP-1)、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO) 这9种蛋白包被到平板上,使用 VHH-12-Fc 进行孵育,具体实验操作同 1.9,测定 *OD*450。

将人血红蛋白、猪血红蛋白、羊血红蛋白、 兔血红蛋白、牛血红蛋白包被在平板上,方法 同上,测定 *OD*450。

1.16 数据处理与分析

使用 GraphPad Prism 9.5.1 软件分析统计数 据和绘图,采用单向方差进行差异显著性分析 (P<0.05 为显著差异),所有数据均显示为 3 次 重复的平均值±标准差(mean±SD)。

2 结果与分析

2.1 噬菌体展示纳米抗体文库的构建

将血红蛋白免疫双峰驼,免疫结束后颈静脉采血,分离淋巴细胞后提取总 RNA,随即反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,扩增 VHH 基因,进行琼脂糖凝胶电泳验证,结果如图 1A所示,VHH 基因的大小约 360 bp,与预期 VHH 基因大小相符。以 pR2 噬菌粒为模板,经过 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳验证。结果如图 1B 所示,pR2 扩增产物为线性化结构,大小为4 600 bp。采用无缝克隆技术连接 VHH 扩增产物与线性化的 pR2 载体,电转化至 TG1 感受态细胞,随机挑选 10 个克隆子进行菌落 PCR 检测,结果如图 1C 所示,构建的噬菌体抗体文库的插入率为 100%。通过计数菌落得出构建的骆驼抗体文库容量为 2.85×10⁸ CFU,所构建的抗体文库满足噬菌体筛选的条件。

2.2 血红蛋白特异性纳米抗体的淘选

为了筛选出血红蛋白特异性的 VHH,使用 固相抗原结合方法进行 3 轮淘选。在筛选过程 中,加入特定量的噬菌体与抗原进行孵育,低 亲和力的噬菌体会被洗涤缓冲液冲洗去除,高 亲和力的噬菌体与抗原结合紧密。噬菌体的筛 选效果通常通过观察每轮筛选过程中菌落的富

集程度进行评估。为了量化每轮筛选过程中噬 菌体的总量,统计培养板上的菌落数,随后计 算得到回收率和富集度。结果如表1所示,随 着筛选轮次的增加,回收率从 4.35×10⁻⁶递增至 2.25×10⁻⁴, 而富集度逐渐增加至 51.7 倍。第 3 轮 筛选的回收率是首轮筛选回收率的51倍,表明 血红蛋白特异性噬菌体得到有效富集。

从双峰驼噬菌体抗体文库中挑取 1 728 个 克隆子进行 phage ELISA 检测,结果如图 2A 所 示,将克隆子对血红蛋白组的 OD450 值记为 P, 对阴性组的 OD450 值记为 N, P/N 比值越高则表 示噬菌体的特异性越高。将 P/N>10 的克隆子进 行测序分析, 剔除重复序列后共筛选到 10 株不 完全一致的 VHH 序列,将其分别命名为 VHH-1、VHH-3、VHH-12、VHH-23、VHH-24、 VHH-26、VHH-27、VHH-59、VHH-60和VHH-77 (图 2B)。以上 10 条 VHH 在 CDR1 和 CDR3 区 域具有显著的差异,如图 2B 和 2C 所示, CDR1 区最长为 14 个氨基酸, CDR3 区最长为 23 个 氨基酸,这种差异性与 VHH 的特异性和亲和力 紧密相关。值得注意的是,这些 VHH 在 FR2 区共同拥有4个特征性的氨基酸,分别是37、 44、45 和 47 位的氨基酸,这些氨基酸对于 VHH 卓越的稳定性至关重要。



驼源纳米抗体文库的构建 A: VHH 基因。M: DNA marker DL2000; 泳道1和2: VHH 片段。 冬 1 B: pR2 载体的扩增和酶切。M: DNA marker DL5000; 泳道 1: 扩增的线性化 pR2 载体; 泳道 2: 线 性化 pR2 载体的酶切产物。C: 菌落 PCR 鉴定文库中的菌落。M: DNA marker DL2000; 泳道 1-10: 10个菌落的扩增片段。

Figure 1 Construction of a camelid-derived VHH library. A: Amplification of the VHH gene. M: DNA marker DL2000; Lane 1 and 2: Amplified VHH fragments. B: Amplification and enzymatic cleavage of the pR2 vector. M: DNA marker DL5000; Lane 1: Amplified linearized pR2 vector; Lane 2: Enzyme digestion of linearized pR2 vector. C: Colony PCR identification of colonies within the library. M: DNA marker DL2000; Lanes 1-10: Amplified VHH fragments from 10 colonies.

Table 1	Enrichment of camelid-derived VHHs								
Round	Hemoglobin ($\mu g/mL$)	Input (CFU)	Output (CFU)	Recovery	Degree of enrichment (fold)				
1	100	1.0×10^{11}	4.35×10 ⁵	4.35×10 ⁻⁶	N.A.				
2	50	1.0×10^{11}	3.97×10^{6}	3.97×10^{-5}	9.13				
3	10	1.0×10 ¹¹	2.25×10^{7}	2.25×10 ⁻⁴	51.7				

表1 驼源纳米抗体的富集

Table 1	Enrichment	of came	lid-d	lerived	VHE
	Linnennen	or came	nu-c	iciivcu	V 1 1 1

N.A. means not available.

2.3 血红蛋白纳米抗体序列分析

利用 Expasy 在线网站预测 VHH 的理化性质, 结果如表 2 所示, VHH 分子量为 12.98–14.38 kDa, 等电点为 6.78–9.65; 预测亲水性平均系数(grand average of hydropathicity, GRAVY)值均为负值,表明 VHH 的亲水性均良好。使用 MegAlign 软件对这 10 条 VHH 序列进行系统发育树和同源性分析。使用 W 算法绘制系统发育树,结果如图 3A、





Figure 2 Screening of camelid-derived VHHs targeting hemoglobin. A: Monoclonal phage enzyme-linked immunosorbent assay. B: Multiple sequence alignment of VHHs, with asterisks indicating the four characteristic amino acids in the FR2 region. C: Length analysis of the VHH CDR1 and CDR3 regions.

表 2 VHH 理化性质预测

rable 2 Prediction of physicochemical properties of v F	Table 2	e 2 Prediction o	f physicoc	hemical pro	operties of	: VHHs
---	---------	------------------	------------	-------------	-------------	--------

VHH	ξ molar	pI	Mr (kDa)	GRAVY	Instability index
	(L/(mol·cm))				
VHH-1	32 507	6.78	13.93	-0.521	32.07
VHH-3	26 990	8.51	13.90	-0.379	37.32
VHH-12	25 565	9.65	14.17	-0.400	50.61
VHH-23	26 992	8.51	13.09	-0.379	37.32
VHH-24	30 035	8.39	14.31	-0.564	44.60
VHH-26	27 055	8.95	13.67	-0.429	30.52
VHH-27	42 462	9.48	14.38	-0.344	37.36
VHH-59	40 973	8.60	13.41	-0.340	35.26
VHH-60	47 962	9.17	12.98	-0.347	34.36
VHH-77	31 525	7.82	13.64	-0.373	27.24

ξ: Molar absorption coefficient.

http://journals.im.ac.cn/cjbcn



图 3 VHH 序列分析 A:系统发育树;B:同源性分析。

Figure 3 Sequence analysis of VHHs. A: Phylogenetic tree; B: Homology analysis.

3B 所示,各 VHH 之间同源性较高。其中,VHH-27 和 VHH-60 亲缘关系最近,序列相似性为 85.1%,同时与 VHH-59 聚为一支。

使用 AlphaFold2 对 VHH 进行三级结构预测, 得到的数据由 PyMOL 2.4.0 软件进行分析。VHH 二级结构数据组成如表 3 所示,α-螺旋结构占比为 2.27%-9.23%,β-折叠结构占比为 46.21%-59.52%, 环状结构占比为 34.92%-51.52%。VHH 三级结构 如图 4 所示,在建模过程中,框架区有助于维持 变量区的结构稳定性和抗原结合能力,其结构相

表 3 VHH 二级结构组成

Table 3Analysis of the secondary structurecomposition in VHHs

VHH	α-helix (%)	β-sheet (%)	Loop (%)
VHH-1	7.14	54.76	38.10
VHH-3	4.96	49.59	45.45
VHH-12	2.27	46.21	51.52
VHH-23	2.52	56.30	41.18
VHH-24	5.56	59.52	34.92
VHH-26	2.36	53.54	44.10
VHH-27	9.23	51.54	39.23
VHH-59	4.92	54.10	40.98
VHH-60	2.48	50.41	47.11
VHH-77	4.76	52.38	42.86

对保守, VHH 具有较长的 CDR3 区,可以形成 独特的凸环结构。这种结构使得纳米抗体能够深 入抗原内部,更好地识别和结合那些隐藏表位。

2.4 纳米抗体与血红蛋白的分子对接

使用 ClusPro 2.0 对 VHH 与人血红蛋白进 行分子对接,每次对接生成 30 个集群,其中能 量得分最低的结构被选定为最终的对接结果。 采用 PyMOL 2.4.0 软件展示对接结果,并利用 PDBePISA 工具分析分子间相互作用的残基及其 相互作用力(表 4)。研究发现,VHH 与人血红蛋 白之间的主要相互作用力为氢键,少部分则为盐 桥,而 CDR3 区域在 VHH 与人血红蛋白结合中发 挥了重要作用(图 5)。具体而言,在 VHH-3、 VHH-23、VHH-26、VHH-27、VHH-59 和 VHH-77 与血红蛋白复合物中,存在以下氢键相互作用: Arg31-Phe122、Arg31-Gln127、Phe117-Arg30、 Pro114-His116 以及 His103-Gln131。在 VHH-1、 VHH-24 和 VHH-60 与血红蛋白复合物中,则观察到 Lys40-His46 和 Tyr42-Asp99 之间的氢键相互作用。

2.5 纳米抗体真核表达与纯化

将以上 10 条 VHH 序列构建至 pTT5-TEV-Fc 真核表达载体中,将重组质粒进行大量抽 提,使用聚醚酰亚胺(polyetherimide, PEI)将重组 质粒转染入 HEK 293F 细胞中进行表达,收集转 染 5-7 d 后的细胞培养上清液,经 rProtein A 柱 纯化得到 VHH-Fc 融合蛋白。SDS-PAGE 结果 显示,VHH-Fc 融合蛋白的分子量大小为 40 kDa (图 6)。由于重组抗体带有 Fc 结构域,其分子 量大小约为 25 kDa,而 VHH 分子量约为 15 kDa, 两者相加的理论分子量与电泳结果相符。对抗 体产量进行计算,VHH-Fc 的产量为 0.4-118 mg/L。 其中 VHH-59-Fc 融合蛋白的产量为 118 mg/L, 为大规模生产提供了可能。



Figure 4 The predicted three-dimensional structure of VHHs. The yellow segment denotes the four characteristic amino acids within the FR2 region, while the red segment represents the CDR3 region.

表 4 VHH 与血红蛋白相互作用情况

Table 4 Interaction between VHH and hemoglobin

			C	/							
Docking complexes of	VHH-1	VHH-3	VHH-2	VHH-23	VHH-24	VHH-26	VHH-27	VHH-59	VHH-60	VHH-77	
VHH-hemoglobin											
Lowest energy	-884.3	-722.7	-941.2	-789.9	-824.8	-704.1	-814.3	-916.9	-1 002.4	-643.5	
VHH interface area (Å)	1 047.4	1 122.0	1 255.0	1 257.8	863.5	1 097.4	1 102.1	973.1	948.3	1 199.9	
Hemoglobin interface area (Å)	1 130.6	1 179.0	1 201.1	1 209.5	980.9	1 079.7	1 039.5	923.7	1 001.8	1 271.5	
Number of residues on VHH interface	27	37	27	32	26	35	29	27	28	37	
Number of residues on hemoglobin interface	25	29	37	34	23	28	31	29	24	33	
Number of salt bridges	4	1	0	3	3	0	3	0	2	1	
Number of hydrogen bonds	11	7	11	12	8	8	8	6	9	7	



VHH-77-hemoglobin

图 5 VHH 与血红蛋白的分子对接结果 VHH-1 (A)、VHH-3 (B)、VHH-12 (C)、VHH-23 (D)、VHH-24 (E)、VHH-26 (F)、VHH-27 (G)、VHH-59 (H)、VHH-60 (I)、VHH-77 (J)与血红蛋白的对接结果。左侧 为 VHH 与血红蛋白的对接模型,右侧为相互作用的氨基酸残基和相互作用力,数字表示键长。

Figure 5 Molecular docking of VHH with hemoglobin. The docking results for VHH-1 (A), VHH-3 (B), VHH-12 (C), VHH-23 (D), VHH-24 (E), VHH-26 (F), VHH-27 (G), VHH-59 (H), VHH-60 (I), and VHH-77 (J). The left panel displays the docking configurations of VHH with hemoglobin, while the right panel elucidates the interacting amino acid residues and the interaction forces, including the specified bond lengths.



图 6 VHH-Fc 融合蛋白纯化结果 Figure 6 Purification of VHH-Fc fusions.

2.6 血红蛋白特异性纳米抗体的表征

2.6.1 纳米抗体理化稳定性的表征

抗体的热稳定性是其维持生物活性功能的 重要因素之一,在较高的温度环境下,抗体结 构常常会发生不可逆的变化,导致其活性的丧 失。根据棋盘格滴定法确定出最优血红蛋白抗原 浓度为 0.5 μg/mL,最优 VHH 浓度为 2.5 μg/mL。 首先,采用 7 个不同的温度(20、30、40、50、 60、70、80 °C)对 VHH-Fc 进行处理, 通过非竞 争 ELISA 方法测定其结合活性。将处理后的 VHH-Fc 与未经处理的 VHH-Fc 进行对比,结 果如图 7A 所示, 在温度从 20 ℃升至 40 ℃的 过程中, VHH-Fc 与血红蛋白的结合能力几乎 保持不变: 然而, 在 40-80 ℃的温度范围内, VHH-Fc 与血红蛋白的结合能力逐渐降低。除 VHH-23-Fc 外, VHH-Fc 在 50 ℃解育 10 min 后仍具有 60%以上结合能力。将 VHH-Fc 在 50 ℃孵育不同时间(0-60 min),并测定其剩余 结合活性,结果如图 7A 右图所示。VHH-Fc 在 50 ℃处理 10 min 过程中, 抗原结合能力迅速降 低;随着孵育时间延长,结合能力持续下降, 孵育 60 min 后保持 20%结合活性。由此发现, VHH-Fc 热稳定性较好,在 20-40 ℃之间具有 较高结合活性, 80 ℃处理 10 min 和 50 ℃处理 1h后仍有一定的结合能力。



图 7 VHH-Fc 的理化稳定性 A: 热稳定性; B: pH 稳定性; C: 有机试剂耐受性。 Figure 7 Physicochemical stability of VHH-Fc. A: Thermal stability; B: pH stability; C: Stability in the presence of organic reagents.

一般情况下,抗体抗原结合的 pH 范围在 6.0-9.0 之间, pH 影响抗原抗体结合而不会导 致抗体不可逆变性。先将 VHH-Fc 在从低到高 的 5 个 pH (3.0、5.0、7.0、9.0、11.0)缓冲液中 孵育1h, 然后在 pH 为 7.0 的条件下检测处理 后的 VHH-Fc 与血红蛋白的结合能力。结果如 图 7B 所示, VHH-Fc 与血红蛋白的结合活性在 极端 pH 条件下会受到显著影响,无论是过酸 还是过碱的环境均不利于其结合效能的维持。 弱碱的 pH 环境下, VHH-Fc 与血红蛋白的结 合能力变化较小,但是在强碱性环境(pH 11.0) 下仅能保持 45%-68%的结合活性。VHH-Fc 在 酸性 pH (pH 5.0)条件下结合能力较差,在强酸 条件(pH 3.0)下仍能保持 38%-59%的结合活 性。总体而言, VHH-Fc在 pH 7.0条件下结合 活性最强,在酸性、碱性条件下结合活性显著 降低。

鉴于 VHH 在有机溶剂中的耐受性已有文 献记载,本研究选取了4种常见的有机溶剂(甲 醇、乙腈、丙酮、DMSO)评估 VHH-Fc 的耐受 程度。配制了6个不同浓度(0、10%、20%、40%、 60%、80%)的溶液,结果如图7C 所示,VHH-Fc 对甲醇的耐受性最佳,在10%甲醇溶液中仍能 保持 48%-78%的结合活性;而对于丙酮、乙腈 和 DMSO 的耐受性则较为相似,在 10%的有机 试剂溶液中,VHH 的结合活性均在 40%以下。 总体而言,VHH-Fc 展现出广泛的有机溶剂耐 受性,特别是在甲醇溶剂中表现突出。

2.6.2 动态光散射分析纳米抗体的粒径和 电位

利用粒度电位仪动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测定 VHH-Fc 的粒径大小,结果显示, VHH-Fc 的粒径主要集中在 96-215 nm 范围内(图 8A),且 PdI 介于 0.4-0.6 之间(表 5),反映了 VHH-Fc 的较好分散性。进一步分析可知,所测样品 VHH-Fc 具有定义明确的平均流体动力学直径和球形核壳结构。本研究还测定了 VHH-Fc 的 Zeta 电位,其值在-0.71 至-6.70 mV 之间(图 8B),这一结果表明,在中性条件下,VHH-Fc 表面带有较多负电荷。

2.7 纳米抗体与血红蛋白结合活性分析

利用免疫斑点试验定性分析制备的 VHH-Fc 对血红蛋白的结合能力。将不同比例 稀释的血红蛋白点在 NC 膜上,依次与 VHH-Fc 和羊抗人 IgG (HRP)二抗孵育 1 h。结果显示, 10 株 VHH-Fc 抗体均能与血红蛋白结合,其中





Figure 8 Particle size distribution (A) and zeta potential (B) of VHH-Fc.

VHH-59-Fc 和 VHH-12-Fc 能结合各个浓度的血 红蛋白, VHH-12-Fc 结合能力最强(图 9A)。以

表 5 VHH-Fc 的平均粒径	-
------------------	---

Tab	le :	5	The	mean	particle	e size	of	VHH-	Fc
-----	------	---	-----	------	----------	--------	----	------	----

VHH	Particle size (nm)	PdI
VHH-1-Fc	170.10±1.27°	$0.41{\pm}0.07^{ab}$
VHH-3-Fc	210.17 ± 9.83^{a}	$0.58{\pm}0.03^{\rm a}$
VHH-12-Fc	$187.85{\pm}1.77^{b}$	$0.47{\pm}0.03^{ab}$
VHH-23-Fc	164.31±4.35°	$0.31{\pm}0.04^{b}$
VHH-24-Fc	168.25±8.53°	$0.48{\pm}0.09^{ab}$
VHH-26-Fc	96.41±1.89 ^e	$0.41{\pm}0.02^{ab}$
VHH-27-Fc	215.38±4.69ª	$0.47{\pm}0.08^{ab}$
VHH-59-Fc	213.46±4.33ª	$0.39{\pm}0.08^{b}$
VHH-60-Fc	$142.32{\pm}7.52^{d}$	$0.57{\pm}0.08^{a}$
VHH-77-Fc	106.27±8.19e	$0.62{\pm}0.07^a$

The data were expressed as the mean \pm SD of three independent replicates. Means in the same column with different superscript letters were significantly different (*P*< 0.05).

上结果表明,在驼源 VHH-Fc 免疫文库中能淘 选出血红蛋白特异性的 VHH-Fc。用免疫共沉 淀法检测了 VHH-Fc 与血红蛋白的结合情况。 结果如图 9B 所示,10 个 VHH-Fc 抗体均能与 血红蛋白抗原结合。

进一步评估 VHH-Fc 融合蛋白与血红蛋白的结合亲和力,利用 EC₅₀ 值作为初步指标。结果如图 9C 所示,VHH-12-Fc 对血红蛋白的结合能力较强,EC₅₀ 值为 10.63 nmol/L,其次为VHH-59-Fc,而其他 VHH-Fc 与血红蛋白的结合能力较弱。利用生物膜干涉(biolayer interferometry, BLI)技术测定 VHH-12-Fc 与血红蛋白抗原的结合动力学参数,根据软件拟合VHH-12-Fc 抗体的 K_D 值为 2.94×10⁻⁷ mol/L (图 9D),表明该纳米抗体对血红蛋白抗原展现出较强的亲和力。



图 9 VHH 与血红蛋白结合活性分析 A:斑点印迹分析; B:免疫沉淀试验; C:非竞争性 ELISA; D: 生物膜干涉技术。

Figure 9 Evaluation of VHHs binding activity with hemoglobin using various techniques. A: Dot blot analysis; B: Immunoprecipitation assay; C: Noncompetitive ELISA; D: Biolayer interference technique.

2.8 纳米抗体结合特异性分析

将实验室保存的 SARS-CoV-2 RBD、SARS RBD, TDH, OVA, BSA, GFP, MMP-1, PPO 和人血红蛋白包被于96孔免疫板中,通过非竞 争 ELISA 方法测定 VHH-12-Fc 的结合活性。结 果如图 10A 所示,除了血红蛋白组外,其余组 别的 OD450 值均低于 0.1, 这一结果充分体现了 VHH-12-Fc 对血红蛋白的特异性结合活性。此 外, 检测了 VHH-12-Fc 与不同哺乳动物来源血 红蛋白的结合活性。结果显示, VHH-12-Fc 与 人血红蛋白结合活性最高,与猪、羊、兔、牛 血红蛋白表现出一定的交叉反应性,结合活性 约为 50% (图 10B)。血红蛋白是一种在红细胞 中运输氧气的蛋白质,其基本结构和功能在不 同哺乳动物之间存在较高的相似性。这种相似 性为纳米抗体提供了与其他哺乳动物血红蛋白 结合的可能性。

3 讨论与结论

血红蛋白作为众多疾病的生物标志物之 一,对于疾病的早期预防、检测和后期治疗有

重要意义。近年来,越来越多的研究聚焦于血 红蛋白浓度检测,特别是趋向于便携、灵敏、 快速、低成本的检测方式。目前,单克隆抗体 应用于检测及诊断治疗方面的研究较多, 但是 在治疗和检测的应用中逐渐暴露出诸多局限 性。例如, 传统单克隆抗体因其庞大的分子量 (约 150 kDa)而导致组织穿透力不佳、免疫原性 较强,同时其人源化过程复杂、制备技术繁琐、 成本高昂。相较之下,小分子纳米抗体因其较 小的分子量(约 15 kDa)展现出独特的优势,目 前小分子纳米抗体的应用还在起步阶段。纳米 抗体天然存在于骆驼科及鲨鱼科动物血清中, 而随着噬菌体展示技术的发展, 纳米抗体文库 是纳米抗体筛选的主要来源[37], 全合成抗体展 示库的应用逐渐增多,多样性高且能避免免疫 动物过程,但会面临产出的抗体亲和力低、特 异性不高等问题。相对而言,免疫文库则是通 过动物对特定抗原的免疫反应来构建,能够筛 选出亲和力和特异性更高的抗体^[38]。

纳米抗体库容量可达到 10⁸-10⁹ 的规模,序 列多样性超过 95%。鉴于 VHH 的独特结构,



图 10 VHH-12-Fc 特异性分析 A: VHH-12-Fc 与 SARS-CoV-2 RBD、SARS RBD、TDH、OVA、 BSA、GFP、MMP-1、PPO 和人血红蛋白的结合活性。B: VHH-12-Fc 与人、猪、山羊、兔和牛血红蛋 白的结合活性。Hb 为血红蛋白。

Figure 10 Specificity of VHH-12-Fc. A: Binding activity of VHH-12-Fc with SARS-CoV-2 RBD, SARS RBD, TDH, OVA, BSA, GFP, MMP-1, PPO and human hemoglobin. B: Binding activity of VHH-12-Fc with hemoglobin from human, porcine, goat, rabbit and bovine. Hb: Hemoglobin.

其仅包含单一结构域,故即便在库容缩减至 10⁶ 级别时,依然能够成功筛选出具备高度特异性的纳米抗体^[39]。本研究通过血红蛋白免疫双峰 驼后构建了噬菌体展示纳米抗体文库,其库容 量达 2.85×10⁸ CFU,VHH 片段的插入率为 100%,文库质量较好,采用生物淘洗和噬菌体 单克隆 ELISA 鉴定,成功筛选出 10 株 VHH, 其相对分子质量约为 15 kDa。本研究将 VHH 与 Fc 片段融合表达,制备更加稳定的融合蛋白 抗体。经验证,VHH-Fc 融合蛋白特异性和亲 和力均良好,其中纳米抗体 VHH-12 具有较强 的结合活性, EC₅₀值为 10.63 nmol/L,K_D值为 2.94×10⁻⁷ mol/L,显示筛选的抗血红蛋白纳米抗 体在血红蛋白检测中具有潜在应用价值。

东南大学 HUA 团队将体外表达的 HPV16 E7 蛋白免疫双峰驼,筛选出特异性纳米抗体,KD 值为 7.5×10^{-7} mol/L,且该抗体具有很好的热稳定 性[35]。孙山[40]通过构建双峰驼天然纳米抗体库, 筛选出一株抗鼠伤寒沙门氏菌 FlgE 纳米抗体,其 EC₅₀值为 2.89 nmol/L, K_D值为 3.374×10⁻⁸ mol/L, 该抗原具有较高的结合活性和特异性,是相关抗 体制备及疫苗研发的优秀候选蛋白。本研究制备 的纳米抗体在 20-40 ℃之间抗原结合活性最佳, 在 pH 7.0-9.0 之间能维持较好的结合活性,并可 耐受 10%的甲醇溶液。周惠^[41]将麦草畏为抗原免 疫骆驼,制备纳米抗体的最佳甲醇耐受浓度为 10%, 最佳 pH 值为 8.0, 随着温度的升高, VHH 在 95 ℃ 孵育 5 min 和 85 ℃ 孵育 60 min 下仍能与 抗原结合。AKAZAWA-OGAWA 等^[42]将纳米抗体 溶液在37℃下储存1年,结果发现纳米抗体仍 然保持了完整的抗原结合活性。Baudhuin 等^[43]研 究发现,抗 HER2 和抗 MMR 纳米抗体冻干粉 在 2-8 ℃条件下可稳定储存至少 12 个月, 甚至 在长达 18 个月的储存期间也表现出良好的稳 定性,没有观察到任何聚集、降解或活性丧失

现象。纳米抗体能够在长期低温保存过程中维 持其效能,从而显著提升了其在运输、应用及 存储环节中的便利性与可行性。

本研究制备的纳米抗体与文献报道的其他 靶点蛋白的驼源纳米抗体相比^[44],其亲和能力 仍待提高。分析原因如下:(1)人源血红蛋白结 构复杂,可能存在多个表位,但并非所有表位都 能有效诱导高亲和力抗体的产生;(2)将人源的血 红蛋白免疫同为哺乳动物的双峰驼,其免疫原性 较弱,机体产生免疫反应较差,导致筛选出纳米 抗体的亲和力不理想,后续可优化抗原处理工艺, 确保抗原的纯度、稳定性和免疫原性;(3)调整免 疫剂量、免疫次数以及免疫间隔时间,以诱导驼 体产生更高亲和力的抗体。此外,可通过使用 Linker 蛋白连接 2 个或 3 个 VHH,制备二聚体或 三聚体纳米抗体,进一步提高抗体的结合能力。

未来研究将聚焦纳米抗体在血红蛋白检测 上的应用。对所构建的文库进行更多次筛选, 以期筛选到更多具有高亲和力的纳米抗体。同 时,加强抗体稳定性处理,确保存储运输中的 优异性能。此外,探索检测技术,以开发高效、 便捷、经济的检测方案,推动抗血红蛋白纳米抗 体在疾病诊断和健康监测领域取得新突破。

作者贡献声明

钟宁:方案设计、实验操作、初稿写作; 雷雯惠:方案设计、实验操作;刘祖英:数据 管理、实验操作、提供材料;谢晓筱:数据管 理、实验操作;张凌晶:数据管理、提供材料; 金腾川:方案设计、稿件润色修改;曹敏杰: 提供材料、稿件润色修改;陈玉磊:数据管理、 方案设计、经费支持、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告 工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] HAMIDI M, TAJERZADEH H. Carrier erythrocytes: an overview[J]. Drug Delivery, 2003, 10(1): 9-20.
- [2] JÖNSSON K, HUNT TK, MATHES SJ. Oxygen as an isolated variable influences resistance to infection[J]. Annals of Surgery, 1988, 208(6): 783-787.
- [3] SCHECHTER AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine[J]. Blood, 2008, 112(10): 3927-3938.
- [4] LEI CH, WOLLENBERGER U, BISTOLAS N, GUISEPPI-ELIE A, SCHELLER FW. Electron transfer of hemoglobin at electrodes modified with colloidal clay nanoparticles[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002, 372(2): 235-239.
- [5] ANDRADE CT, BARROS LAM, LIMA MCP, AZERO EG. Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2004, 34(4): 233-240.
- [6] DARBONNE WC, RICE GC, MOHLER MA, APPLE T, HÉBERT CA, VALENTE AJ, BAKER JB. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin[J]. Journal of Clinical Investigation, 1991, 88(4): 1362-1369.
- [7] COATES CJ, DECKER H. Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017, 74(2): 293-317.
- [8] DEL CASTILLO BUSTO ME, MONTES-BAYÓN M, AÑÓN E, SANZ-MEDEL A. Simultaneous determination of glycated haemoglobin, a long term biomarker of diabetes mellitus, and total haemoglobin by isotope dilution and HPLC-ICP-MS[J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2008, 23(5): 758-764.
- [9] MIURA D, KIMURA H, TSUGAWA W, IKEBUKURO K, SODE K, ASANO R. Rapid, convenient, and highly sensitive detection of human hemoglobin in serum using a high-affinity bivalent antibody-enzyme complex[J]. Talanta, 2021, 234: 122638.
- [10] NAKAMURA A, KASAMATSU N, HASHIZUME I, SHIRAI T, HANZAWA S, MOMIKI S, SASAKI K, KINOSHITA M, OKADA O, TATSUMI K, KURIYAMA T. Effects of hemoglobin on pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular resistance in patients with chronic emphysema[J]. Respiration, 2000, 67(5): 502-506.
- [11] HONG Z, SHI M, CHUNG KA, QUINN JF, PESKIND ER, GALASKO D, JANKOVIC J, ZABETIAN CP, LEVERENZ JB, BAIRD G, MONTINE TJ, HANCOCK AM, HWANG H, PAN C, BRADNER J, KANG UJ, JENSEN PH, ZHANG J. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease[J]. Brain, 2010, 133(Pt 3): 713-726.
- [12] KANG JH, KHO HS. Blood contamination in salivary diagnostics: current methods and their limitations[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2019, 57(8): 1115-1124.
- [13] LIU YM, HUANG H, GAO J, ZHOU J, CHU HC. Hemoglobin concentration and post-operative delirium in elderly patients undergoing femoral neck fracture surgery[J]. Frontiers in Medicine, 2022, 8: 780196.
- [14] HOHNECK A, ROSENKAIMER S, SIEBURG T,

HOLZWARTH J, HOFHEINZ RD, AKIN I, BORGGREFE M, GERHARDS S. Prognostic impact of pretherapeutic hemoglobin levels on all-cause mortality in cardiooncology[J]. Anticancer Research, 2021, 41(1): 369-378.

- [15] WONG CH, SONG C, HENG KS, KEE IHC, TIEN SL, KUMARASINGHE P, KHIN LW, TAN KC. Plasma free hemoglobin: a novel diagnostic test for assessment of the depth of burn injury[J]. Plastic and Reconstructive Surgery, 2006, 117(4): 1206-1213.
- [16] 周剑英,谢杏梅,李东至,李坚,廖灿,王婷.应用 毛细管电泳法和高效液相色谱法对血红蛋白定量的 对比研究[J].临床血液学杂志(输血与检验版),2013, 26(2):100-101,104.
 ZHOU JY, XIE XM, LI DZ, LI J, LIAO C, WANG T. Comparison of automated capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography on quantitative study of hemoglobin[J]. Journal of Clinical Hematology (Blood Transfusion and Laboratory Edition), 2013, 26(2): 100-101, 104 (in Chinese).
- [17] 涂佳丽,王云光,张超,鲍明泽.基于液相色谱的糖化血红蛋白浓度的检测[J].微计算机信息,2011,27(5):97-98,46.
 TU JL, WANG YG, ZHANG C, BAO MZ. A way based anion-exchange to measure the concentration of the HbA1c in the blood[J]. Microcomputer Information, 2011, 27(5):97-98,46 (in Chinese).
- [18] 何雨. 基于电化学原理的血红蛋白快速检测方法研究[D]. 杭州:浙江大学, 2017.
 HE Y. Study on rapid detection method of hemoglobin based on electrochemical principle[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017 (in Chinese).
- [19] 苏少华. 免疫比浊法检测血浆肌红蛋白的方法研究[J].
 实用医技杂志, 2015, 22(5): 525-526.
 SU SH. Study on the method of detecting plasma myoglobin by immunoturbidimetry[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2015, 22(5): 525-526 (in Chinese).
- [20] 陈雨京.《血红蛋白含量测定》实验综述报告[J]. 科技视界, 2015(6): 150-151.
 CHEN YJ. Summary report on the experiment of hemoglobin content determination[J]. Science and Technology Vision, 2015(6): 150-151 (in Chinese).
- [21] 杜小粉, 董全. 酶联免疫吸附分析技术及其在食品农药 残留检测中的应用[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 330-333. DU XF, DONG Q. Application of enzyme-linked immunosorbent assay in detection of pesticide residues in foods[J]. Food Science, 2009, 30(17): 330-333 (in Chinese).
- [22] SONEZAKI S, YAGI S, OGAWA E, KONDO A. Analysis of the interaction between monoclonal antibodies and human hemoglobin (native and cross-linked) using a surface plasmon resonance (SPR) biosensor[J]. Journal of Immunological Methods, 2000, 238(1/2): 99-106.
- [23] MURAHASHI M, MAKINODAN M, YUI M, HIBI T, KOBAYASHI M. Immunochromatographic detection of human hemoglobin from deteriorated bloodstains due to methamphetamine contamination, aging, and heating[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412(23): 5799-5809.
- [24] YE YY, DENG Y, MAO JJ, YAN Q, HUANG YD, ZHANG J, ZHENG J, LI Y, CHEN WX. Development

of a combined human transferrin-hemoglobin lateral immunochromatographic assay for accurate and rapid fecal occult blood test[J]. Clinical Laboratory, 2018, 64(5): 805-813.

- [25] 唐嘉, 袁超璐, 乐美君, 杜佳南, 王加斌, 龚海平, 袁军岳, 郑平安. 抗人血红蛋白胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(9): 789-793. TANG J, YUAN CL, LE MJ, DU JN, WANG JB, GONG HP, YUAN JY, ZHENG PA. Preparation of anti-human hemoglobin colloidal gold immunochromatography test strip[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2019, 35(9): 789-793 (in Chinese).
- [26] HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCH T, MUYLDERMANS S, ROBINSON G, HAMERS C, SONGA EB, BENDAHMAN N, HAMERS R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. Nature, 1993, 363(6428): 446-448.
- [27] 孙山, 谭星, 庞晓燕, 李敏, 郝秀静. 纳米抗体技术应用的最新进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 855-867. SUN S, TAN X, PANG XY, LI M, HAO XJ. Recent advances in the application of nanobody technology: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(3): 855-867 (in Chinese).
- [28] DE GENST E, SILENCE K, DECANNIERE K, CONRATH K, LORIS R, KINNE J, MUYLDERMANS S, WYNS L. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(12): 4586-4591.
- [29] MITCHELL LS, COLWELL LJ. Analysis of nanobody paratopes reveals greater diversity than classical antibodies[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 2018, 31(7/8): 267-275.
- [30] LI XY, DUAN XB, YANG K, ZHANG W, ZHANG CJ, FU LF, REN Z, WANG CX, WU JH, LU RX, YE YR, HE MY, NIE C, YANG NB, WANG J, YANG HM, LIU X, TAN W. Comparative analysis of immune repertoires between Bactrian camel's conventional and heavy-chain antibodies[J]. Public Library of Science ONE, 2016, 11(9): e0161801.
- [31] KÖNNING D, ZIELONKA S, GRZESCHIK J, EMPTING M, VALLDORF B, KRAH S, SCHRÖTER C, SELLMANN C, HOCK B, KOLMAR H. Camelid and shark single domain antibodies: structural features and therapeutic potential[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2017, 45: 10-16.
- [32] SIONTOROU CG. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy[J]. International Journal of Nanomedicine, 2013, 8: 4215-4227.
 [33] HARMSEN MM, DE HAARD HJ. Properties,
- [33] HARMSEN MM, DE HAARD HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(1): 13-22.
- [34] GRAY ER, BROOKES JC, CAILLAT C, TURBÉ V, WEBB BLJ, GRANGER LA, MILLER BS, MCCOY LE, EL KHATTABI M, VERRIPS CT, WEISS RA, DUFFY DM, WEISSENHORN W, MCKENDRY RA. Unravelling the molecular basis of high affinity nanobodies against HIV p24: *in vitro* functional, structural, and *in silico* insights[J]. ACS Infectious Diseases, 2017, 3(7): 479-491.

- [35] LI SF, ZHANG W, JIANG KP, SHAN HT, SHI MK, CHEN BJ, HUA ZC. Nanobody against the E7 oncoprotein of human papillomavirus 16[J]. Molecular Immunology, 2019, 109: 12-19.
- [36] WANG L, LUO R, ZHANG WL, JIANG HY, YU YK, ZHOU WH, ZHANG F, MA J, MEI L. Nanobody: as versatile tool emerging in autoimmune diseases[J]. Smart Materials in Medicine, 2024, 5(4): 501-513.
- [37] 王馨悦,韩秋雪,王振山,魚翠翠,毕津豪,许梦园, 赵永坤,冯娜,王铁成,迟航,杨松涛,夏咸柱.
 SARS-CoV-2 核糖体展示纳米抗体文库的构建与筛 选[J]. 中国病原生物学杂志,2022,17(3):249-253.
 WANG XY, HAN QX, WANG ZS, JIAO CC, BI JH, XU MY, ZHAO YK, FENG N, WANG TC, CHI H, YANG ST, XIA XZ. Construction and screening of SARS-CoV-2 ribosomal display nanobody library[J]. Journal of Pathogen Biology, 2022, 17(3): 249-253 (in Chinese).
- [38] KUPSCH JM, TIDMAN NH, KANG NV, TRUMAN H, HAMILTON S, PATEL N, NEWTON BISHOP JA, LEIGH IM, CROWE JS. Isolation of human tumor-specific antibodies by selection of an antibody phage library on melanoma cells[J]. Clinical Cancer Research, 1999, 5(4): 925-931.
- [39] 任泓睿, 贾琼, 王家庆, 田婧婧, 李荣杰, 郝花花, 李建丽, 渠志灿, 范瑞文. 胰腺多肽纳米抗体的制备及结合活性分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024: 1-13. REN HR, JIA Q, WANG JQ, TIAN JJ, LI RJ, HAO HH, LI JL, QU ZC, FAN RW. Preparation of pancreatic polypeptide nanobody and the analysis of binding activity[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2024: 1-13 (in Chinese).
- [40] 孙山. 驼源天然纳米抗体库的构建及鼠伤寒沙门氏菌 FlgE 蛋白纳米抗体的筛选[D]. 银川: 宁夏大学, 2023. SUN S. Construction of natural nano-antibody library from camel and screening of nano-antibody against FlgE protein of Salmonella typhimurium[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2023 (in Chinese).
- [41] 周惠.麦草畏纳米抗体的制备及其免疫分析方法研究[D].保定:河北农业大学,2023.
 ZHOU H. Preparation of dicamba nano-antibody and study on its immunoassay method[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2023 (in Chinese).
- [42] AKAZAWA-OGAWA Y, TAKASHIMA M, LEE YH, IKEGAMI T, GOTO Y, UEGAKI K, HAGIHARA Y. Heat-induced irreversible denaturation of the camelid single domain VHH antibody is governed by chemical modifications[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(22): 15666-15679.
- [43] BAUDHUIN H, van BOCKSTAL PJ, de BEER T, VANEYCKEN I, BRIDOUX J, RAES G, CAVELIERS V, KEYAERTS M, DEVOOGDT N, LAHOUTTE T, XAVIER C. Lyophilization of NOTA-sdAbs: first step towards a cold diagnostic kit for 68Ga-labeling[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2021, 166: 194-204.
- [44] 王玥,李峥,陈慧,张建民,何维. 抗人转化生长因子 β1 纳米抗体的制备及功能鉴定[J]. 基础医学与临床, 2020, 40(5): 632-638.
 WANG Y, LI Z, CHEN H, ZHANG JM, HE W. Preparation and functional identification of anti-human transforming growth factor β1 nanobodies[J]. Basic and Clinical Medicine, 2020, 40(5): 632-638 (in Chinese).