

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2019.11.01

# 猪圆环病毒 2 型特异性纳米抗体文库的构建及鉴定

王长江<sup>1</sup>, 曲光刚<sup>1,2\*</sup>, 武曰星<sup>1</sup>, 管宇<sup>2</sup>, 魏凤<sup>2</sup>, 侯运专<sup>3</sup>, 赵中伟<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. 华中农业大学, 武汉 43000)

[收稿日期] 2019-07-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2019)11-0001-08 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为构建猪圆环病毒 2 型(PCV2)特异性纳米抗体文库,并对其库容和多样性进行鉴定分析,使用 PCV2 全病毒灭活疫苗免疫羊驼,经四次免疫后采血分离外周血淋巴细胞,提取总 RNA,通过 RT-PCR 反转录合成 cDNA;根据羊驼重链抗体基因序列设计特异性引物,通过巢式 PCR 扩增羊驼单域重链抗体(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH)基因片段 *vhh*,并将其克隆到噬菌粒载体 pCANTAB 5E 中,构建 pCANTAB-*vhh* 重组质粒;通过电穿孔法将重组质粒导入 *E. coli* TG1 获得抗 PCV2 特异性纳米抗体基因文库。文库菌梯度稀释后计数单克隆菌落数,并通过菌液 PCR 鉴定重组菌阳性率,计算抗体文库库容量;对 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行测序,分析抗体文库多样性。结果显示,构建的 PCV2 特异性纳米抗体文库重组菌阳性率为 92.0%,库容量为  $2.75 \times 10^{10}$  CFU/mL;测序后序列比对分析结果表明,纳米抗体文库包含的基因序列具有丰富的多样性。本研究成功构建了 PCV2 特异性纳米抗体文库,且文库质量满足后续试验要求,为进一步获得针对 PCV2 抗原的纳米抗体奠定了基础。

**[关键词]** 猪圆环病毒 2 型;羊驼;纳米抗体文库;抗体库容量;多样性

## Construction and Characterization of Specific Nanobody Library against PCV2

WANG Chang-jiang<sup>1</sup>, QU Guang-gang<sup>1,2\*</sup>, WU Yue-xing<sup>1</sup>, GUAN Yu<sup>2</sup>,  
WEI Feng<sup>2</sup>, HOU Yun-zhuan<sup>3</sup>, ZHAO Zhong-wei<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. Huazhong Agriculture University, Wuhan 430000, China)

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

**Abstract:** To construct specific nanobody library against PCV2 and to characterize its capacity and diversity, a female alpaca was immunized with inactivated PCV2. Anticoagulated blood was collected after the fourth

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相关研究。

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

immunization, and peripheral blood lymphocyte was separated, followed by extraction of total RNA, and then cDNA was synthesized by reverse transcription – polymerase chain reaction (RT – PCR) method. Specific primers were designed according to literature data and heavy chain antibody gene sequences of alpaca published in GenBank and were used to amplify variable domain of heavy chain of heavy – chain antibody gene segment (*vhh*) by nested PCR. And then the *vhh* segment was cloned into phagemid vector pCANTAB 5E to construct pCANTAB – *vhh* recombinant plasmid, which was then transformed into *E. coli* TG1 by electroporation. For calculating the capacity of the nanobody library against PCV2, library bacteria monoclonal colony number was counted after gradient dilution and positive rate of library bacteria was identified by PCR method. Positive recombinant plasmid was extracted and was sequenced. The results showed that the positive rate of antibody library recombinant bacteria was 92.0% and the nanobody library capacity was  $2.75 \times 10^{10}$  CFU/mL. Sequences alignment analysis results indicated that the nanobody library contained abundant diversity of gene sequences. This study successfully constructed a specific nanobody library against PCV2 and the quality of the library met the requirement of subsequent research, which made it possible for further obtaining high affinity nanobody against PCV2.

**Key words:** PCV2; Alpaca; nanobody library; capacity of antibody library; diversity

猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 属于圆环病毒科圆环病毒属, 病毒粒子呈二十面体对称结构, 无囊膜, 其基因组为单股环状负链 DNA<sup>[1]</sup>。PCV2 是引起猪皮炎肾病综合征、断奶仔猪多系统衰竭综合征和母猪繁殖障碍等相关综合征的致病原<sup>[2-3]</sup>。PCV2 和由它引发的疾病每年给养猪业造成巨大经济损失, 严重阻碍了我国养猪产业的发展<sup>[4-5]</sup>。因此, 研制抗 PCV2 的特异性抗体对于探索 PCV2 的快速诊断及治疗具有重要意义。

1993 年, 比利时学者 Hamers – Casterman 等报道骆驼中存在天然缺失轻链的重链抗体<sup>[6]</sup>, 随后发现在羊驼和一些软骨鱼等动物体内也存在类似的抗体<sup>[7-8]</sup>。克隆重链抗体的可变区可得到只由一个重链可变区构成的单域抗体 (variable domain of heavy chain of heavy – chain antibody, VHH)<sup>[9]</sup>, 由于 VHH 相对分子质量约为 15 kD, 仅为常规抗体的 1/10, 因此也被称为纳米抗体, 它是目前天然来源的相对分子质量最小的抗体<sup>[10]</sup>。纳米抗体由于其理化性质稳定<sup>[11]</sup>、易于基因操作和克隆<sup>[12]</sup>等优势, 在疾病诊断、分子检测和治疗等方面受到广泛关

注。目前纳米抗体主要通过噬菌体展示技术获得<sup>[13]</sup>, 该技术通过 PCR 扩增出抗体的全套可变区基因, 并将其克隆到噬菌粒载体上, 利用 *E. coli* 构建包含纳米抗体全部基因序列的抗体文库; 辅助噬菌体感染纳米抗体文库后释放包含有重组噬菌粒的噬菌体, 形成噬菌体抗体文库, VHH 表达在重组噬菌体表面, 该技术将表型与基因型直接联系在一起, 将抗体识别抗原的能力与噬菌体扩增的能力结合在一起<sup>[14]</sup>, 对特异性抗体的筛选更为高效; 噬菌体抗体库技术与杂交瘤单克隆抗体技术相比操作更为简便, 因此在生物技术领域极具应用前景<sup>[15]</sup>。本研究利用分子生物学技术构建了 PCV2 特异性纳米抗体文库, 并对文库相关指标进行了鉴定分析, 为进一步研究筛选抗 PCV2 特异性纳米抗体奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年羊驼 1 只, 此前未经过任何主动免疫 (山东绿都生物科技有限公司饲养)。

1.2 主要试剂 *E. coli* TG1 菌株、pCANTAB 5E 载体由山东省滨州畜牧兽医研究院购买保存;

PCV2 全病毒灭活疫苗由山东绿都生物科技有限公司提供; Ficoll - paque plus 购自 GE 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Plus Mini Kit) 和 DNA 纯化回收试剂盒购自 QIAGEN 公司; 反转录试剂盒为赛默飞公司产品; 2 × Taq PCR MasterMix 为天根公司产品; *Sfi* I、*Not* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自 NEB; 琼脂糖为 Biowest 产品; 核酸提取试剂、甘油购自索莱宝生物科技有限公司; 氨苄西林钠、硫酸卡那霉素均购自 Sigma 公司; 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均为 OMEGA 公司产品; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

**1.3 引物设计** 根据 Maass 和 Harmsen 等<sup>[9-10,16]</sup> 文献报道使用的引物并做适当修改, 设计两对特异性的引物扩增羊驼重链抗体基因片段。文库构建及鉴定所用引物如表 1 所示。其中 VHH1 - F 位于抗体编码区的前导序列保守区, VHH1 - R 位于抗体 CH2 结构域高度保守区, 该对引物用于扩增大小分别为 900 bp 的 *vh* - CH1 - CH2 片段和约 700 bp 的 *vh* - CH2 片段; VHH2 - F 和 VHH2 - R 用于从 700 bp 的 *vh* - CH2 片段中扩增得到约 400 bp 的羊驼重链抗体重链可变区 *vh* 片段, 两对引物分别在抗体结构中的位置如图 1 所示。VHH - Detc - F、VHH - Detc - R 为 pCANTAB 5E 载体上的通用引物, 用于文库质量的 PCR 鉴定。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 1 文库构建及鉴定引物

Tab 1 Primers used for library construction and characterization

引物名称	引物序列(5' - 3')
VHH1-F	GTGCTCTGGCTGCTCT
VHH1-R	CGCCATCAATRTACCACTTGA
VHH2-F	CTGGCCCAGCCGGCCGAGTGTCAGCTGCTGGACTCTGG
VHH2-R	ATTTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCAGGCTC
VHH-Detc-F	CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC
VHH-Detc-R	CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC

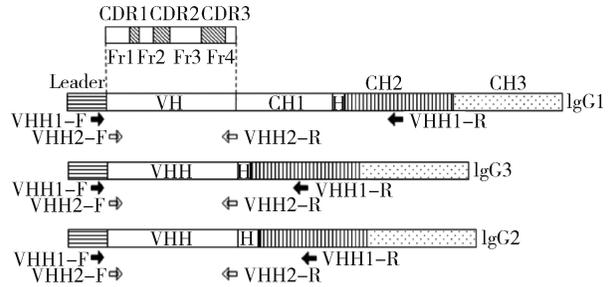


图 1 vhh 扩增引物在 IgG 抗体结构所在位置示意图<sup>[17]</sup>

Fig 1 Diagram of the location of vhh amplification primers in IgG antibody structure<sup>[17]</sup>

1.4 方法

**1.4.1 羊驼免疫及外周血淋巴细胞分离** 将 PCV2 全病毒灭活疫苗通过背部皮下多点注射的方式对羊驼进行免疫, 共免疫 4 次, 免疫间隔为 14 d; 每次免疫结束后跟踪观察注射包块吸收情况以及羊驼健康状态。第 4 次免疫结束后 1 周采血, 采用 ELISA 方法检测免疫抗体效价。通过颈部静脉采集羊驼外周血 20 mL, 通过密度梯度离心方法分离外周血淋巴细胞, 计数后直接用于提取总 RNA, 剩余细胞沉淀于 -80 °C 冻存。

**1.4.2 淋巴细胞总 RNA 提取及 cDNA 合成** 使用 QIAGEN 总 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Plus Mini Kit) 提取淋巴细胞总 RNA, 具体操作参照试剂盒说明书进行。总 RNA 使用 NanoDrop 2000 测定浓度后, 直接用于反转录合成第一链。

使用 Thermo 反转录试剂盒进行 cDNA 第一链合成, 反应体系为: 总 RNA 2 μL、Oligo(dT)<sub>18</sub> 1 μL、nuclease-free water 9 μL; 65 °C 5 min, 然后立即在冰上冷却; 再向以上反应体系中加入 5 × Reaction Buffer 4 μL、Ribolock RNase Inhibitor 1 μL、10 mmol/L dNTP Mix 2 μL、RevertAid M - MuLV RT 1 μL; 42 °C 60 min, 70 °C 5 min, 10 °C 保存; 反应结束后 cDNA 于 -80 °C 保存或立即用于第一轮 PCR 反应。

**1.4.3 vhh 基因扩增** 利用巢式 PCR 通过两轮 PCR 反应扩增羊驼重链抗体的可变区编码基因, 第一轮 PCR 反应以 cDNA 作为模板, 使用 VHH1 - F 和 VHH1 - R 引物进行扩增反应, 反应程序为 94 °C

5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 50 s, 30 个循环, 72 °C 10 min。反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 切取约 700 bp 片段, 使用 OMEGA 胶回收试剂盒回收纯化目的片段。

第一轮 PCR 产物适当稀释后作为第二轮 PCR 反应的模板, 使用引物 VHH2 - F 和 VHH2 - R 进行扩增反应, 反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 50 s, 30 个循环, 72 °C 10 min。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定目的条带, 预期条带大小约 400 bp。使用胶回收试剂盒回收纯化目的条带, 于 -20 °C 保存备用。

1.4.4 噬菌粒重组载体构建 将 *vhh* 目的基因片段与 pCANTAB 5E 噬菌粒载体分别使用 *Sfi* I 和 *Not* I 限制性内切酶双酶切, 经琼脂糖凝胶回收; 使用 *T<sub>4</sub>* DNA 连接酶将纯化的 *vhh* 目的基因片段与双酶切处理后的噬菌粒载体 pCANTAB 5E 连接。将连接产物经电穿孔法转入新制备的 *E. coli* TG1 感受态细胞中, 电穿孔仪设置电压为 1.8 kV, 电转化完成后 37 °C 200 r/min 振荡培养 1 h, 取 100 μL 进行梯度稀释计算电转化效率; 剩余菌液涂布氨苄抗性固体平板, 30 °C 过夜培养。

1.4.5 纳米抗体文库的库容及多样性鉴定 使用 LB 培养基冲洗平板上固化的菌落并收集到 250 mL 灭菌锥形瓶中, 取 100 μL 菌液进行梯度稀释后涂布氨苄抗性平板, 过夜培养后计数各稀释度平板上的菌落数, 根据菌落数及稀释倍数计算抗体文库的库容; 随机挑取 50 个单菌落分别于 5 mL LB 培养基中过夜培养, 以过夜培养的菌液作为模板, 使用 VHH - Detc - F 和 VHH - Detc - R 引物进行 PCR 反应, 鉴定阳性克隆比例。将阳性克隆菌提取质粒后送上海生工生物工程有限公司测序, 鉴定抗体文库基因序列多样性。剩余菌液加入终浓度为 20% 的甘油, 混匀后分装, 于 -80 °C 冻存。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCV2 灭活全病毒免疫羊驼后血清抗体效价

第 4 次免疫结束 1 周后采血分离抗血清, 进行倍比稀释, 以 PCV2 Cap 蛋白包被 ELISA 96 孔板, 以免疫 PCV2 全病毒灭活疫苗前分离的羊驼血清 500 倍

稀释后作为阴性对照, 通过间接 ELISA 方法检测免疫后羊驼血清 IgG 抗体水平。结果显示, 第 4 次免疫后, 羊驼血清 PCV2 IgG 抗体效价可达 1: 50000 以上 (图 2), 血清抗体水平符合构建纳米抗体文库标准。

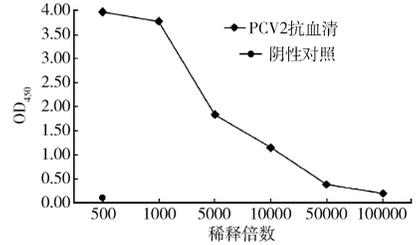
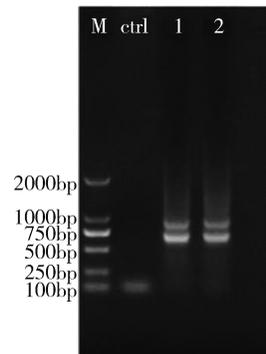


图 2 PCV2 灭活全病毒免疫羊驼后血清抗体效价  
Fig 2 Serum antibody level of alpaca after immunized with PCV2 inactivated virus

2.2 外周血淋巴细胞分离及总 RNA 提取 使用淋巴细胞分离液从 20 mL 羊驼抗凝外周血中分离到约  $7.5 \times 10^7$  单个核细胞。使用 QIAGEN 总 RNA 提取试剂盒提取的 RNA 总量为 25.9 μg, A260 nm/A280 nm 值为 1.99, 满足建库要求。剩余淋巴细胞于 -80 °C 冻存备用。

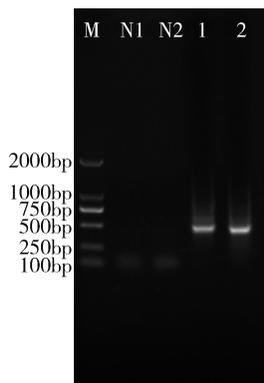
2.3 *vhh* 目的基因扩增 以制备的 cDNA 为模板, 使用 VHH1 - F 和 VHH1 - R 引物进行第一轮 PCR 扩增反应, PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果见图 3。第一轮 PCR 产物包括大小分别为 900 bp 和 700 bp 的两种特异性片段。



M: DL2000 Marker; ctrl: PCR 阴性对照; 1 - 2: 第一轮 PCR 产物  
M: DL2000 Marker; ctrl: PCR negative control;  
1 - 2: the first round PCR products

图 3 第一轮 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果  
Fig 3 Agarose gel electrophoresis of the first round PCR products

割胶回收第一轮 PCR 产物中的 700 bp 片段, 纯化后以此为模板, 使用 VHH2 - F 和 VHH2 - R 引物进行第二轮 PCR 扩增反应。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 第二轮 PCR 产物大小约为 400 bp (图 4), 与预期片段大小一致。



M: DL2000 Marker; N1 ~ N2: PCR 阴性对照;

1 - 2: 第二轮 PCR 产物

M: DL2000 Marker; N1 ~ N2: PCR negative control;

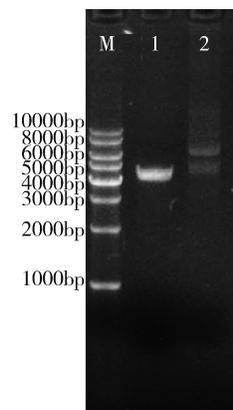
1 - 2: the second round PCR products

图 4 第二轮 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 4 Agarose gel electrophoresis of the second round PCR products

**2.4 pCANTAB - vhh 重组质粒构建** 第二轮 PCR 产物经纯化后与噬菌粒载体 pCANTAB 5E 分别经 *Sfi* I 和 *Not* I 限制性内切酶双酶切, 使用 DNA 纯化回收试剂盒回收双酶切后的 *vhh* 目的片段和 pCANTAB 5E 载体, 定量后使用 T4 DNA 连接酶连接过夜。连接产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示连接产物包含大小分别为约 7000 bp 和 5000 bp 的两条带 (图 5)。其中 5000 bp 条带与重组质粒预期大小一致, 可判断 *vhh* 目的基因与 pCANTAB 5E 载体连接成功。

**2.5 纳米抗体文库阳性率、库容鉴定** 将连接产物通过电穿孔转入新鲜制备的 *E. coli* TG1 感受态细胞中, 电转化后获得转化子数为  $1.34 \times 10^8$  CFU/mL, 转化效率约  $1.5 \times 10^8$  CFU/ $\mu$ g DNA。转化子涂布氨苄抗性平板, 30 °C 过夜培养后收获平板上的菌落, 最终收获转化重组子数为  $3.01 \times 10^{10}$  CFU/mL。从稀释后菌液涂布的抗性平板上随机挑



M: 1 kb ladder; 1: 双酶切后的 pCANTAB 5E 载体;

2: *vhh* 与 pCANTAB 5E 连接产物

M: 1 kb ladder; 1: double - digested pCANTAB 5E vector;

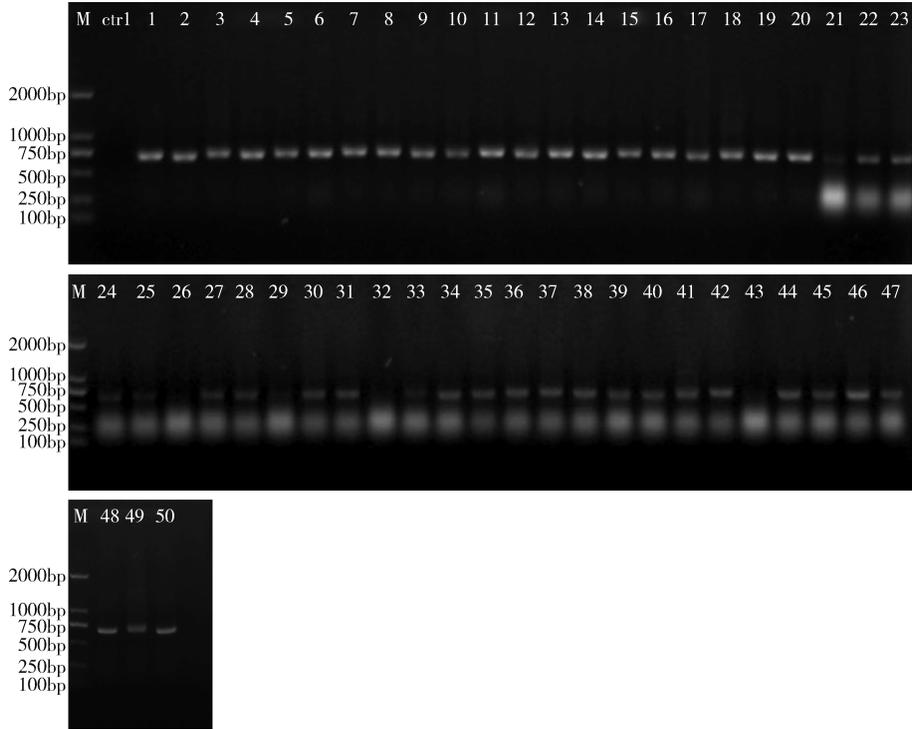
2: ligation product

图 5 连接产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 5 Agarose gel electrophoresis of ligation product

取 50 个单菌落进行 PCR 鉴定, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示其中有 4 个为阴性 (图 6, 26 号、29 号、32 号和 43 号), 其余均扩增出约 700 bp 的预期大小条带 (图 6), 阳性率为 92.0%, 计算最终库容大小为  $2.77 \times 10^{10}$  CFU/mL。

**2.6 纳米抗体文库多样性鉴定** 对鉴定为阳性的菌液提取质粒后测序, 并将测序结果分别与 NCBI 数据库进行 BLAST 比对分析, 结果显示所有匹配序列均为羊驼或骆驼重链抗体可变区序列, 序列一致性比率在 79% ~ 97% 之间, 表明该抗体文库为重链抗体基因文库。测序序列之间比对结果如图 7 所示, 16 个测序序列均为独立克隆, 其 CDR3 区的氨基酸种类和包含的氨基酸残基数均有较大差异, 表明该纳米抗体文库基因序列中 CDR3 区氨基酸序列种类丰富, 所构建的 PCV2 纳米抗体文库具有很好的多样性。其中编号为 01、02、03 和 10 的测序序列, CDR3 区包含 20 个以上的氨基酸残基, 符合纳米抗体具有较长 CDR3 区的典型特征; 另外, 所有测序序列的第 39 位、第 46 位、第 47 位和第 49 位氨基酸残基种类符合纳米抗体的氨基酸结构特征<sup>[18]</sup>, 进一步证明了所构建的抗体文库确为纳米抗体文库。

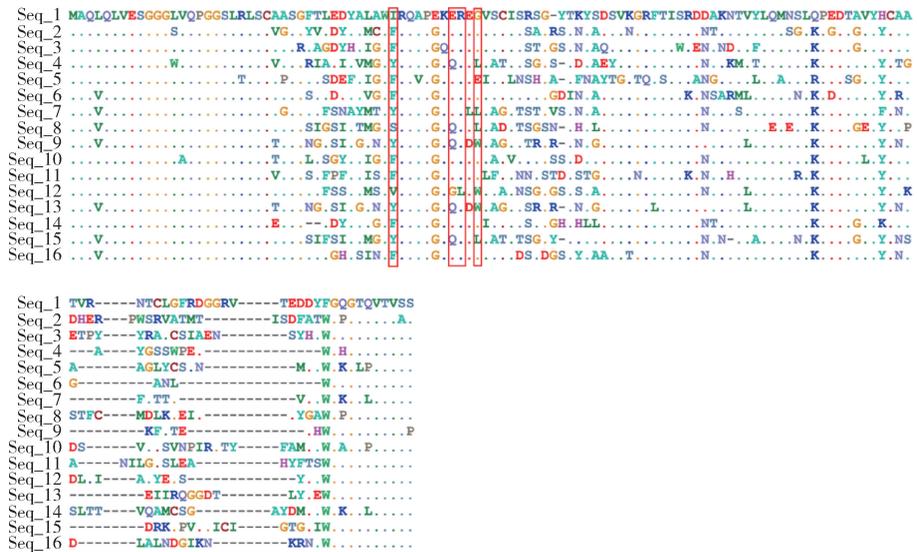


M; DL2000 Marker; ctrl: PCR 阴性对照; 1 - 50: 菌液 PCR 结果

M; DL2000 Marker; ctrl: negative control; 1 - 50: PCR products of randomly picked colonies

图 6 纳米抗体文库菌液 PCR 鉴定结果

Fig 6 PCR identification results of nanobody library



“.”表示该序列氨基酸与首行序列完全相同;“-”表示该位置氨基酸缺失;英文字母表示测序序列在该位置氨基酸残基具有差异  
“.” represents that the amino acids of all sequences in this site are the same;“-” represents that there are amino acids deletion in this site;

Letters represent that the amino acids in this site are different

图 7 纳米抗体文库序列多样性分析

Fig 7 Sequence diversity analysis of PCV2 nanobody library

### 3 讨论与结论

PCV2 是引起断奶仔猪多系统衰竭综合征等相关疾病的主要病原<sup>[19]</sup>,PCV2 及其导致的多种病原体的共同感染每年给养猪业造成巨大经济损失。目前虽已有各种类型的疫苗用于 PCV2 的防控,但是建立高效的 PCV2 感染的检测方法对 PCV2 的综合防控同样具有重要意义。近年来已有许多国内外学者开展了 PCV2 单克隆抗体的研制工作<sup>[20-22]</sup>,与传统多克隆抗体和单克隆抗体相比,纳米抗体相对分子质量更小、特异性和稳定性好、制备周期相对较短、在识别传统抗体无法识别的隐蔽表位或小表位等方面更具优势。本研究构建了高质量纳米抗体文库,为筛选抗 PCV2 特异性纳米抗体提供原始材料。

根据抗体基因来源动物是否经过免疫,纳米抗体文库可分为免疫抗体文库和非免疫抗体文库<sup>[23]</sup>,本研究构建的特异性纳米抗体文库来源于经 PCV2 免疫的羊驼,属于免疫抗体文库。动物免疫后血清抗体水平反映了特异性抗原激发免疫反应的程度,同时也能间接反映经特异性抗原介导活化、增殖的淋巴细胞的数目。本研究分离免疫羊驼外周血淋巴细胞后,通过巢式 PCR 扩增出 *vhh* 目的基因片段,并将其克隆到 pCANTAB 5E 载体上,连接产物琼脂糖凝胶电泳结果出现两条带,推测是由于重组质粒的构象差异导致在凝胶中的迁移速率不同所致。

本研究所构建的纳米抗体文库,文库菌阳性重组率为 92.0%,符合纳米抗体文库质量要求;16 个随机测序序列均为独立克隆,与 NCBI 数据库进行 BLAST 比对分析,结果显示目的基因均与羊驼或骆驼重链抗体重链可变区序列特征匹配,表明本研究所构建的抗体文库为重链抗体基因文库;在结构方面,纳米抗体的典型特征之一是具有较长的 CDR1 和 CDR3,CDR3 平均长度为 16~18 个氨基酸<sup>[24-25]</sup>,较长的 CDR3 有助于维持纳米抗体结构的稳定性、增加其特异性和亲和力。与传统抗体相比,纳米抗体在 FR2 区存在 4 个特征性氨基酸,Phe/Tyr39、Glu/Gln46、Arg47 和 Gly/Phe/Leu49,这

四个特征性氨基酸残基能够阻止 VH 与 VL 结合,增加纳米抗体的可溶性、降低其聚合性<sup>[6,25]</sup>。本研究中随机挑取的 16 个单克隆的氨基酸序列符合纳米抗体的氨基酸序列结构特征,纳米抗体文库包含序列多样性良好。

纳米抗体文库的库容大小、抗体基因多样性是衡量抗体文库质量的重要指标<sup>[26]</sup>,对后续淘洗出的特异性纳米抗体的亲和力具有决定作用<sup>[27]</sup>。对于天然抗体库而言,淘洗到高亲和力抗体 ( $K_d$   $10^{-8} \sim 10^{-10}$  M) 要求库容达到  $10^9$  以上<sup>[28]</sup>;而免疫库中包含的可变区基因是经过重排及亲和力成熟后的序列,与非免疫抗体文库相比,淘洗到高亲和力纳米抗体对库容要求相对较低。本研究构建的纳米抗体文库库容达到  $2.77 \times 10^{10}$  CFU/mL,文库包含大量已经被诱导的 PCV2 特异性抗体基因,抗原针对性强,有助于淘洗到高亲和力 PCV2 特异性纳米抗体。

综上所述,本研究成功构建了羊驼来源的 PCV2 特异性纳米抗体文库,并对文库库容和序列多样性进行了鉴定,为进一步筛选抗 PCV2 相关抗原的高亲和力纳米抗体奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 龙冬梅,汤德元,黄涛,等.猪圆环病毒病 2 型诊断技术的研究进展[J].猪业科学,2017,7:113-117.  
Long D M, Tang D Y, Huang T, et al. Progress in diagnostic techniques for porcine circovirus type 2 [J]. Swine Industry Science, 2017, 7: 113-117.
- [2] Allan G, Mc Neilly F, Meehan B, et al. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland [J]. Veterinary Microbiology, 1999, 66(2): 115-123.
- [3] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2000, 12(1): 3-14.
- [4] 何小莉,梁海英,曾智勇,等.猪圆环病毒研究进展[J].猪业科学,2018,9:103-107.  
He X L, Lang H Y, Zeng Z Y, et al. Research progress of porcine circovirus [J]. Swine Industry Science, 2018, 9: 103-107.
- [5] 郑艺杰,王艺娟.猪瘟和猪圆环病毒 2 型混合感染流行病学调查[J].中国畜禽种业,2018,6:20-22.

- Zheng Y J, Wang Y J. Epidemiological investigation of mixed infection of swine fever and porcine circovirus type 2 [J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2018, 6: 20–22.
- [6] Hamers – Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains [J]. Nature, 1993, 363(6428): 446–448.
- [7] Hassanzadeh – Ghassabeh G, Devoogdt N, De Pauw P, *et al.* Nanobodies and their potential applications [J]. Nanomedicine, 2013, 8(6): 1013–1026.
- [8] Deffar K, Shi H, Li L, *et al.* Nanobodies – the new concept in antibody engineering [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(12): 2645–2652
- [9] Maass D R, Sepulveda J, Pernthaner A, *et al.* Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs) [J]. Journal of Immunological Methods, 2007, 324(1/2): 13–25.
- [10] Maass D R, Sepulveda J, Pernthaner A, *et al.* Antibody repertoire development in camelids [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2006, 30(1/2): 187–198.
- [11] 郭婷, 张宇昊, 马良. 纳米抗体的特性及其应用研究进展 [J]. 食品科学, 2013, 34(3): 294–297.
- Guo T, Zhang Y H, Ma L. Properties and application prospects of nano – antibody in food industry [J]. Food Science, 2013, 34(3): 294–297.
- [12] Mizukami M, Tokunaga H, Onishi H, *et al.* Highly efficient production of VHH antibody fragments in Brevibacillus choshinensis expression system [J]. Protein Expression and Purification, 2015, 105: 23–32.
- [13] Mizukami M, Tokunaga H, Onishi H, *et al.* Camelid nanobodies: killing two birds with one stone [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2015, 32: 1–8.
- [14] 蔡尽忠. 噬菌体抗体库技术概述 [J]. 生物学教学, 2017, 5: 4–7.
- Cai J Z. Overview of phage antibody library technology [J]. Biology Teaching, 2017, 5: 4–7.
- [15] De Meyer T, Muyldermans S, Depicker A. Nanobody – based products as research and diagnostic tools [J]. Trends in Biotechnology, 2014, 32(5): 263–270.
- [16] Hamsen M M, Ruuls R C, Nijman I J, *et al.* Llama heavy – chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features [J]. Molecular Immunology, 2000, 37(10): 579–590.
- [17] Pardon E, Laeremans T, Triest S, *et al.* A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology [J]. Nature Protocols, 2014, 9(3): 674–693.
- [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 system and research on heat resistance of nanobody [D]. Northwest A&F University, 2014.
- [19] 贾贝贝, 刘兴友, 刘长明. 猪圆环病毒引发的断奶仔猪多系统衰竭综合征致病机理 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(9): 21–26.
- Jia B B, Liu X Y, Liu C M. Pathogenesis of postweaning multisystem wasting syndrome caused by porcine circovirus [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(9): 21–26.
- [20] 安春敬, 李祥敏, 张华伟, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(10): 32–37.
- An C J, Li X M, Zhang H W, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibodies against ORF2 of porcine circovirus type 2 [J]. Progress In Veterinary Medicine, 2017, 38(10): 32–37.
- [21] Gu Y, Zheng D, Jin Y, *et al.* Development of a monoclonal antibody against porcine circovirus2 Cap protein [J]. Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 2016, 35(4): 227–230.
- [22] McNeilly F, McNair I, Mackie D P, *et al.* Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2 [J]. Archives of Virology, 2001, 146(5): 909–922.
- [23] Romao E, Morales – Yanez F, Hu Y, *et al.* Identification of useful nanobodies by phage display of immune single domain libraries derived from camelid heavy chain antibodies [J]. Current Pharmaceutical Design, 2016, 22(43): 6500–6518.
- [24] Nguyen V K, Hamers R, Wyns L, *et al.* Camel heavy – chain antibodies; diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen – binding repertoire [J]. The EMBO Journal, 2000, 19(5): 921–930.
- [25] Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, *et al.* Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains [J]. Protein Engineering, Design and Selection, 1994, 7(9): 1129–1135.
- [26] 吴小平, 阎锡蕴. 噬菌体抗体库技术制备高亲和力和人抗体 [J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(3): 29–32.
- Wu X P, Yan X Y. Preparation of high affinity human antibody by phage antibody library technology [J]. Journal of Chinese Biotechnology, 2002, 22(3): 29–32.
- [27] Revets H, De Baetselier P, Muyldermans S. Nanobodies as novel agents for cancer therapy [J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2005, 5(1): 111–124.
- [28] Adams G P, Schier R. Generating improved single – chain Fv molecules for tumor targeting [J]. Journal of Immunological Methods, 1999, 231(1/2): 249–260.