



杨利,杜露平,侯立婷,张浩明,于晓明,李兰,乔绪稳,张元鹏,秦竹,王义伟,郑其升,陈瑾,程海卫.猪XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白的制备与鉴定[J].
中国农业大学学报,2025,30(01):131-141.

YANG Li, DU Luping, HOU Liting, ZHANG Haoming, YU Xiaoming, LI Lan, QIAO Xuwen, ZHANG Yuanpeng, QIN Zhu, WANG Yiwei, ZHENG Qisheng,
CHEN Jin, CHENG Haiwei. Preparation and identification of porcine XCR1/FMDV bispecific nanobody fusion protein [J]. *Journal of China Agricultural
University*, 2025, 30(01): 131-141.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.01.11

猪 XCR1/FMDV 双特异纳米抗体融合蛋白的制备与鉴定

杨利^{1,2} 杜露平^{1,2} 侯立婷^{1,2} 张浩明^{1,2} 于晓明^{1,2} 李兰^{1,2} 乔绪稳^{1,2}
张元鹏^{1,2} 秦竹^{1,2} 王义伟^{1,2} 郑其升^{1,2} 陈瑾^{1,2} 程海卫^{1,2*}

(1. 江苏省农业科学院 动物免疫工程研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心/江苏省食品质量与安全重点实验室 南京 210014;

2. 兽用生物制品(泰州)国泰技术创新中心 江苏 泰州 225300)

摘要 为通过将FMDV抗原靶向提呈至猪DC细胞进而提高疫苗免疫效力,本研究利用原核系统表达了猪XCR1目的蛋白,以该蛋白为免疫原免疫羊驼,提取其外周血淋巴细胞的总mRNA并反转录为cDNA,构建噬菌体展示纳米抗体文库,经过3轮亲和筛选获得猪XCR1特异性纳米抗体;利用SOE-PCR技术将该纳米抗体和猪O型FMDV特异性纳米抗体Nb205连接,构建XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白。结果表明:1)成功原核表达猪XCR1目的蛋白,SDS-PAGE和Western blot结果显示,其相对分子量大小约35 ku,符合预期。2)羊驼血清效价为1:64 000,满足建库要求;构建的噬菌体展示文库库容量约为 1.91×10^8 CFU/mL,插入率为91.3%,多样性好;经3轮亲和筛选成功获得了纳米抗体Nb75,间接ELISA结果显示该纳米抗体能特异性与XCR1结合。3)利用SOE-PCR技术成功构建XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白Nb75-205;SDS-PAGE和Western blot显示,该蛋白在大肠杆菌中可溶性表达,且呈现二聚体结构,间接ELISA结果显示Nb75-205能同时与XCR1目的蛋白和FMDV抗原结合。综上,本研究采用噬菌体展示技术成功获得猪XCR1特异性纳米抗体,并构建XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白Nb75-205,且该蛋白为天然二聚体结构,与XCR1目的蛋白和FMDV抗原均具有较好的结合活性,为进一步开展FMDV抗原的猪XCR1靶向提呈研究奠定基础。

关键词 趋化因子受体1;双特异纳米抗体;二聚体;FMDV

中图分类号 S852.4

文章编号 1007-4333(2025)01-0131-11

文献标志码 A

Preparation and identification of porcine XCR1/FMDV bispecific nanobody fusion protein

YANG Li^{1,2}, DU Luping^{1,2}, HOU Liting^{1,2}, ZHANG Haoming^{1,2}, YU Xiaoming^{1,2}, LI Lan^{1,2},
QIAO Xuwen^{1,2}, ZHANG Yuanpeng^{1,2}, QIN Zhu^{1,2}, WANG Yiwei^{1,2}, ZHENG Qisheng^{1,2},
CHEN Jin^{1,2}, CHENG Haiwei^{1,2*}

(1. Institute of Veterinary Immunology & Engineering/National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary
Biologicals/Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing
210014, China;

2. GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China)

收稿日期: 2024-02-23

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20231389);国家自然科学基金项目(32102690);“十四五”重点研发专项(2022YFD1800800)

第一作者: 杨利(ORCID:0009-0008-8615-9317),助理研究员,主要从事食品安全、动物疫病检测及诊断研究, E-mail: yangli411041@126.com

通讯作者: 程海卫(ORCID:0009-0000-4615-0483),副研究员,主要从事疫苗免疫增强技术研究与应用, E-mail: chw5673@126.com

Abstract In order to enhance the immune efficacy of FMDV vaccine by targeting FMDV to porcine dendritic cells, the target protein XCR1 was expressed using prokaryotic expression technology. Subsequently, alpacas were immunized with XCR1 as an immunogen. The total mRNA of peripheral blood lymphocytes of alpacas was extracted and reverse-transcribed into cDNA. A phage display nanobody library was constructed and XCR1-specific nanobodies were obtained after three rounds of affinity screening. Following this, a bispecific nanobody Nb75-205 targeting both XCR1 and FMDV was constructed by connecting Nb75 with Nb205 anti-FMDV nanobody using SOE-PCR technique. The results showed that: 1) The target protein XCR1 was successfully obtained, SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the molecular weight of this protein was about 35 ku, as expected. 2) Antibody titers of alpacas were 1: 64 000, meeting the requirement for database construction. The phage display library size was approximately 1.91×10^8 CFU/mL, with an insertion rate of 91.3% and good diversity. After three rounds of affinity screening, the nanobody Nb75 was successfully obtained which could specifically bind to XCR1 as detected by Indirect ELISA. 3) The XCR1/FMDV bispecific nanobody Nb75-205 was constructed through SOE-PCR technique. SDS-PAGE and Western blot results demonstrated that this fusion protein could be expressed in a soluble form in *Escherichia coli*, with a dimeric structure. Indirect ELISA results indicated that Nb75-205 was capable of binding to both XCR1 target protein and FMDV antigen. In summary, anti-porcine XCR1 nanobody was successfully obtained by phage screening technology, and XCR1/FMDV bispecific nanobody Nb75-205 was successfully constructed through SOE-PCR technology in this study. Nb75-205 was a dimer and could react with both XCR1 and FMDV, which laid a foundation for the further study on the presentation of FMDV targeted by porcine XCR1.

Keywords chemokine(C-motif)receptor 1; bispecific nanobody; dimeric protein; FMDV

趋化因子受体1(Chemokine(C-motif)receptor 1, XCR1),属于趋化因子受体家族,作为传统1型树突状细胞(Conventional dendritic cells 1, cDC1)特异性的抗原提呈受体,特异性表达于cDC1表面,且在T细胞、B细胞、自然杀伤细胞(Natural killer cells, NK)、粒细胞、单核细胞和浆细胞样DC(Plasmacytoid dendritic cells, pDC)均不表达,是DC表面高度保守的跨物种分子^[1],在抗原提呈过程中发挥着重要作用。研究显示,与非靶向抗原相比较,通过将抗原靶向至XCR1,可以提高抗原提呈效率,激活CD4⁺和CD8⁺T细胞应答,在抗病毒感染和肿瘤治疗方面取得了较好的研究进展^[2-5],XCR1靶向人用疫苗也已进入临床试验阶段^[1, 6-7]。猪FMD疫苗在口蹄疫防控中发挥着重要作用,但仍存在抗原免疫剂量较大、不能诱导有效的细胞免疫等不足。XCR1靶向在兽医领域研究日益受到关注,作为新型FMD疫苗研发的一个重要方向,通过将FMDV的OB7蛋白靶向至XCR1,可以在牛体内产生较好的中和抗体水平,但攻毒保护率最高为80%^[8]。目前,抗原的XCR1靶向主要是利用其相应的配体或特异性的单克隆抗体和单链抗体,通过化学偶联或基因融合表达的方法与抗原进行组装

而实现^[9-11],该过程较为繁琐,易影响抗原结构,且现有研究均采用FMDV蛋白质抗原作为靶向抗原,其抗原表位有限,往往不能产生较为理想的免疫效果^[8]。因此,设计更加有效的靶向抗原、探索新的抗原组装策略,对于改善XCR1靶向FMDV的免疫效力具有重要意义。纳米抗体(Nanobody, Nb)作为目前已知的具有完整功能的最小抗原结合片段,与传统抗体相比,具有相对分子质量小(约15 ku)、免疫原性低、亲和性高等特点,已被广泛应用于疾病的诊断、治疗及靶向药物的研制^[12]。纳米抗体在DC靶向研究方面已表现出了较好的应用前景。研究表明,通过制备针对MHCII、CD11b和CD36的特异性纳米抗体,采用流感病毒HA进行DC靶向研究,均可以产生较好的免疫反应,且可以在小鼠体内产生针对流感病毒的攻毒保护作用^[13]。关于XCR1的纳米抗体未见报道。

本研究拟利用噬菌体展示技术筛选获得针对猪XCR1的特异性纳米抗体,代替传统的单克隆抗体及单链抗体,并通过PA连接肽将猪XCR1特异性纳米抗体和猪O型FMDV特异性纳米抗体连接,制备XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白,避免化学偶联或基因融合表达等传统靶向技术对于

FMDV 抗原结构的影响,同时利用双特异纳米抗体的桥联作用,实现 FMDV 全病毒代替蛋白质抗原进行靶向,突破 FMDV 蛋白质抗原表位的单一性和局限性,充分发挥全病毒完整抗原表位的潜能,进一步提高 FMDV 抗原的免疫效力,为进一步开展猪 XCR1 靶向 FMDV 抗原提呈、解析其靶向提呈作用机制奠定了基础,也为新型 FMD 疫苗设计提供思路 and 参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌、质粒、病毒、实验动物和主要试剂

大肠杆菌 BL21、DH5 α 、WK6、TG1 和质粒 pET-32a、pMECS 均由本团队保存,猪 O 型口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 灭活

抗原由中农威特生物科技股份有限公司惠赠,猪 O 型 FMDV 纳米抗体 Nb205^[14]和连接肽 PA^[14]由本团队筛选获得,3 只 2 周龄雌性羊驼由南京市红山动物园提供并饲养。RNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司;DNA Marker DL2 000、DNA Marker DL10 000、限制性内切酶、T4 连接酶、反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;Anti-HA tag 鼠单抗购自北京康为世纪公司, Anti-his 鼠单抗及 HRP 标记羊抗鼠 IgG (H+L)二抗均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.1.2 PCR 引物的合成

根据 NCBI 公布的猪 XCR1 基因序列(登录号为 NM_001001622.1),以及本团队保存的 Nb205、PA 和 Nb75 的基因序列设计引物(表 1),并交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 本试验所用引物序列信息
Table 1 Information of sequences of primers used in this study

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Sequences of primers (5'-3')	退火温度 / $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	产物大小 /bp Product length
<i>XCR1</i>	F: GGATCCATGGAGCCCTCAGATATCCCAGAGT R: TTCGAATCAATAGAATGAGGTGCCCTCATAG	65.0	930
<i>VH-Linge</i>	F: GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG R: GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC	61.3	750
<i>pMECS</i>	F: TTATGCTTCCGGCTCGTATG R: CCACAGACAGCCCTCATAG	53.1	750
<i>VHH</i>	F: GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG R: CTAGTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGT	68.0	350
<i>Nb75</i>	F: CAGGTGCAGCTGCAGGAGT R: TTTTAACGGTATAGGTGGTTCGGGCAACCCGGACACCTCATGGT TGAGGAGACGGTGACCT	59.1	350
<i>PA</i>	F: CCGAAAAGCTGCGACAGGGGGCCAT R: TGCAGCTGCACCTGTGGGCAACGCC	65.0	300
<i>Nb205</i>	F: CAGGGGGCCATGCGGGCGTTGCCCACAGGTGCAGCTGCAGGA GTCTGGGG R: TCTAGATGAGGAGACGGTGACCTGGGTCCCC	68.0	350

1.2 猪XCR1目的蛋白的原核表达

1.2.1 重组表达载体的构建

利用 TRIzol 法提取猪脾脏组织的总 RNA,使用反转录试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模版,采用 XCR1 的上下游引物进行 PCR 扩增。将 PCR 扩增产物回收后采用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切。利用 T4 DNA 连接酶将目的基因与 pET-32a 载体连接,转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,涂布在含有氨苄青霉素抗性的 LB 平板上,37℃培养过夜后随机挑选单菌落进行 PCR 鉴定,选择阳性克隆送上海生工生物有限公司测序鉴定。

1.2.2 目的蛋白的表达及纯化

将 1.2.1 测序正确的阳性克隆接种至含有氨苄青霉素的 LB 培养液中,37℃培养过夜,次日以 1:500 比例接种至 LB 培养液中,37℃ 200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.5 时(约 3.5 h),加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行 28℃低温过夜诱导,诱导结束后收集菌体,用 PBS 重悬后进行超声破碎,离心收集上清。采用 Ni-NTA 亲和层析柱对上清进行纯化,利用 SDS-PAGE 和 Western blot 对纯化后的猪 XCR1 目的蛋白进行鉴定。

1.3 猪XCR1目的蛋白特异性纳米抗体的获得

1.3.1 动物免疫

取纯化后的猪 XCR1 目的蛋白(1 mg)与弗氏完全佐剂等体积混合进行乳化,对 3 只雌性羊驼进行颈部皮下多点免疫;每周免疫一次,每只羊驼免疫 1 mg,共免疫 6 次。采用间接 ELISA 方法测定羊驼血清中抗体效价。

1.3.2 VHH噬菌体展示文库的构建

6 免后第 3 天分离羊驼外周血淋巴细胞,提取其

总 RNA 并反转录为 cDNA,以该 cDNA 为模版,分别利用 VH-Linge 和 VHH 的上下游引物进行巢氏 PCR 扩增,获得大小约为 350 bp 的 VHH 片段,经 *Pst* I 和 *Not* I 双酶切后连入 pMECS 载体,并转化至大肠杆菌 TG1 感受态细胞中,37℃培养过夜后,随机挑选单克隆菌落,以 VHH 的上、下游引物进行 PCR 鉴定。收集上述平板中的菌落,加入终浓度为 30% 的甘油,分装保存于:−80℃备用。

1.3.3 文库库容及多样性鉴定

利用 1.3.2 所构建的噬菌体展示纳米抗体文库进行倍比稀释,并均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板,37℃培养过夜后进行菌落计数,计算出所构建文库的库容,并随机挑选 23 个单克隆菌落,使用载体特异性引物 pMECS 进行 PCR 扩增,鉴定文库的插入率,并将阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析,利用 MegAlign 软件对测试结果进行比对分析,验证所构建文库的多样性。

1.3.4 猪XCR1目的蛋白特异性纳米抗体的筛选

利用 1.3.2 所构建的噬菌体展示纳米抗体文库,经扩大培养、噬菌体侵染、浓缩纯化及滴度判定后用于第一轮亲和筛选。利用纯化后的猪 XCR1 目的蛋白作为包被抗原,并设置未包被抗原的对照组,每孔 100 μL,4℃过夜;次日采用 5% 脱脂乳进行封闭,PBST 洗涤 5 遍后,每孔加入 100 μL 稀释后的噬菌体展示文库,室温作用 1 h,PBST 洗涤 5 遍后,每孔加入 100 μL 浓度为 100 mmol/L 的三乙胺溶液,室温静置 10 min,加入 200 μL 1 mol/L 的 Tris-HCl(pH 7.4)进行中和,收集洗脱液进行滴定,计算回收率。重复上述亲和筛选 2 次,3 轮亲和筛选流程如表 2 所示。

表 2 3 轮亲和筛选流程
Table 2 Schematic representation of three rounds of bio-spanning

轮次 No. of rounds	包被抗原浓度/ (μg/mL) Concentration of coated antigen	封闭液 Blocking solution	投入噬菌体数量 (10 ¹² PFU) Quantity of phages input	PBST(Tween-20 浓 度)/% Concentration of Tween-20	PBST 洗板 次数 Washing time
1	1	5% Skim milk powder-PBST	2.25	0.1	10
2	0.5	3% BSA-PBST	2.25	0.25	15
3	0.25	3% OVA-PBST	2.25	0.5	20

1.3.5 猪XCR1目的蛋白特异性纳米抗体的鉴定

利用纯化后的猪XCR1目的蛋白(1 μg/mL)作为包被抗原,并设置未包被抗原的对照组,每孔100 μL,4℃过夜;在各轮次亲和筛选的洗脱产物中随机挑选95个单克隆菌落,分别接种至96孔板37℃振荡培养3 h,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,进行28℃低温过夜诱导,诱导结束后裂解菌体,离心收集上清,获得纳米抗体粗提物,将各纳米抗体粗提物依次编号为1~95;次日采用5%脱脂乳封闭抗原包被板,PBST洗涤5遍后,分别取100 μL纳米抗体粗提物依次加入各酶标孔,室温孵育1 h;PBST洗涤5次后加入100 μL 1:2 000稀释的Mouse anti-HA抗体,室温孵育1 h;PBST洗涤5次后加入100 μL 1:2 000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG(H+L)二抗,室温孵育1 h;PBST洗涤5次后加入TMB显色液,37℃孵育15 min;每孔各加50 μL 2 mol/L的硫酸溶液终止反应,测定其OD₄₅₀值。当样品孔OD₄₅₀数值大于对照孔2.5倍以上时判为阳性,并送至生工生物有工程(上海)有限公司测序,根据测序结果进行氨基酸序列分析。

1.4 XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白的制备

1.4.1 XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白重组表达载体的构建

以表达猪XCR1特异性纳米抗体Nb75的质粒为模板,采用Nb75的上、下游引物扩增出纳米抗体Nb75的基因片段;以FMDV纳米抗体Nb205的质粒为模板,采用Nb205的上、下游引物,扩增出纳米抗体Nb205的基因片段。以扩增的Nb75、Nb205和PA基因片段为模板,通过重叠延伸拼接(Splicing by Overlap Extension, SOE) PCR构建双特异纳米抗体片段Nb75-205。Nb75-205经Pst I和Xba I双酶切后,插入到pMECS载体中,并转化至大肠杆菌WK6感受态细胞中,37℃培养过夜。随机挑选单个菌落,经PCR鉴定及测序分析后获得表达双特异纳米抗体的重组菌。

1.4.2 XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白的表达与纯化

将1.4.1获得的重组菌接种至含氨苄青霉素的LB培养液中,37℃培养过夜,次日以1:500的比例接种至TB培养液,37℃200 r/min振荡培养至OD₆₀₀值达到0.5时(约3.5 h),加入终浓度为

1 mmol/L的IPTG进行28℃低温过夜诱导,诱导结束后收集菌体,用PBS重悬后进行超声破碎,离心收集上清。采用Ni-NTA亲和层析柱对上清进行纯化,利用SDS-PAGE和Western blot对纯化后的目的蛋白进行鉴定,为验证所表达的双特异纳米抗体Nb75-205是否为二聚体结构,设置不添加还原剂β-巯基乙醇的样品对照组。

1.4.3 XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白结合活性的鉴定

分别利用纯化后的猪XCR1目的蛋白(1 μg/mL)和猪O型FMDV灭活抗原(1 μg/mL)作为包被抗原,并设置未包被抗原的对照组,每孔100 μL,4℃过夜;次日采用5%脱脂乳进行封闭,PBST洗涤5遍后,每孔分别加入100 μL 1 μg/mL的纯化后的Nb75-205,同时分别设置加入Nb75和Nb205的对照组,37℃孵育1 h;PBST洗涤5次后加入100 μL 1:2 000稀释的Mouse anti-his抗体,37℃孵育1 h;PBST洗涤5次后加入100 μL 1:5 000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG(H+L)二抗,37℃孵育1 h;PBST洗涤5次后加入TMB显色液,37℃孵育15 min;每孔各加50 μL 2 mol/L的硫酸溶液终止反应,测定各孔OD₄₅₀值。

2 结果与分析

2.1 猪XCR1目的蛋白的表达及纯化

以猪脾脏组织来源的cDNA为模板进行PCR扩增,获得目的基因序列,并用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,片段长度930 bp,符合预期目的。测序验证正确的猪XCR1重组表达菌,经诱导表达和镍柱纯化,得到纯化后的猪XCR1目的蛋白,经SDS-PAGE和Western blot鉴定,如图1所示,猪XCR1目的蛋白相对分子量大小约为35 ku,与预期大小一致,纯度在90%以上。

2.2 噬菌体展示纳米抗体文库的构建

利用猪XCR1目的蛋白免疫羊驼,图2为羊驼免疫程序图及噬菌体展示纳米抗体文库构建策略图。经6次免疫后,使用间接ELISA方法测定其抗体效价。如图3所示,羊驼抗体效价可达1:64 000,满足建库要求。采集6免后的羊驼外周血淋巴细胞,提取总RNA,经反转录获得cDNA,并以其为模板进行PCR扩增,获得纳米抗体基因片段,经酶切、连接和转化后,获得噬菌体展示纳米抗体文库。通

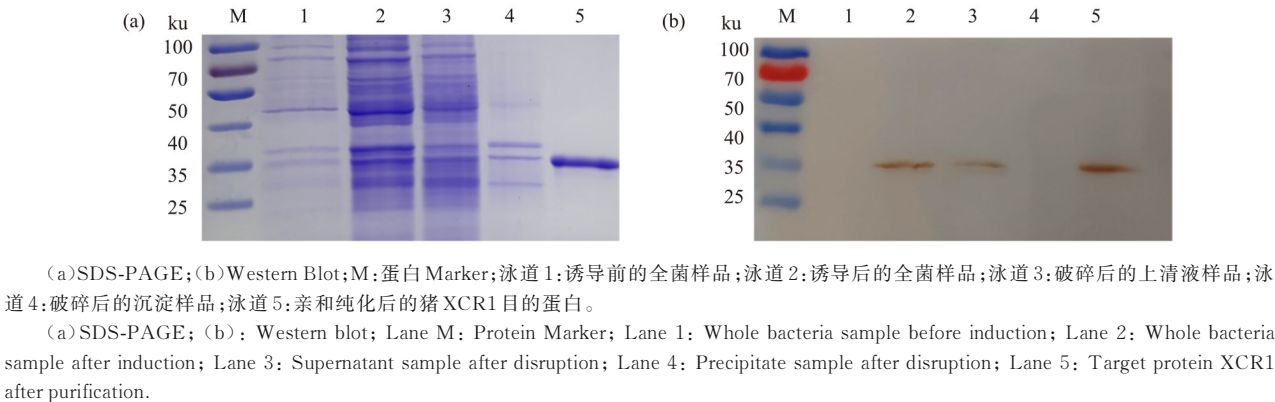
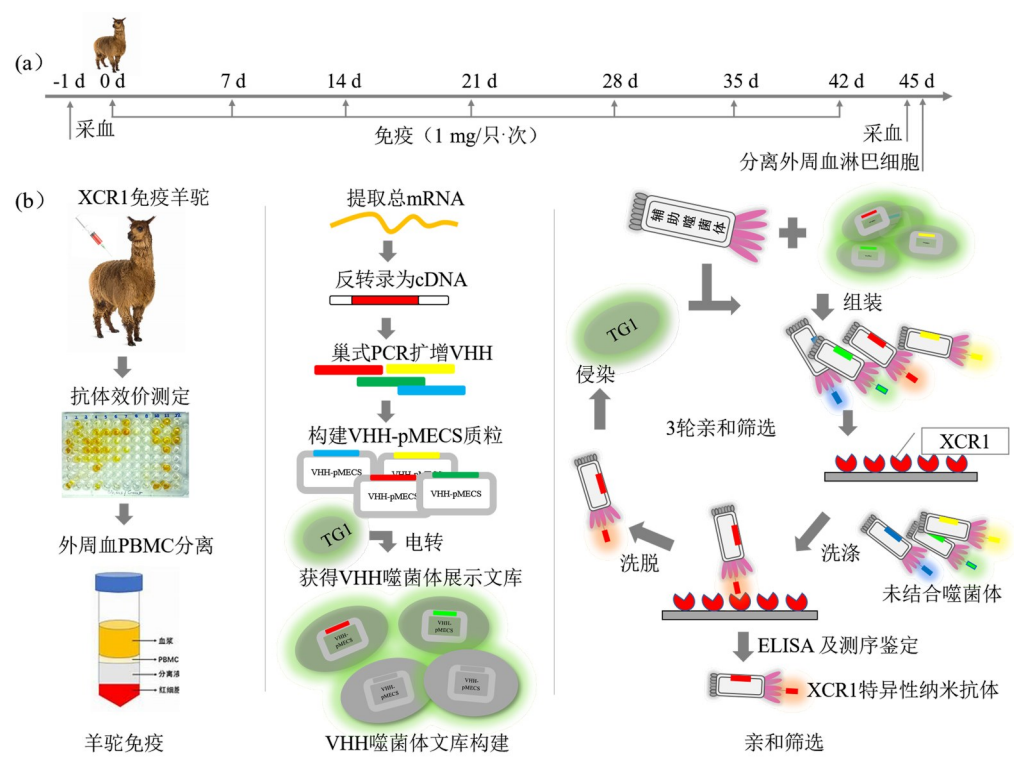


图 1 猪 XCR1 目的蛋白的表达及纯化鉴定

Fig. 1 Identification of expression and purification of the target protein XCR1 of porcine



(a) 羊驼免疫程序图; (b) 噬菌体展示纳米抗体文库构建策略图。

(a) Schematic for the vaccination procedures of alpacas; (b) Schematic for the construction of phage display nanobody library.

图 2 羊驼免疫程序图及噬菌体展示纳米抗体文库构建策略图

Fig. 2 Schematic for the vaccination procedures of alpacas and the construction of phage display nanobody library

过平板计数,测得库容约为 1.91×10^8 CFU/mL,任意选择 23 个单克隆菌落进行 PCR 扩增,其中 21 个单克隆可扩增出大小约为 750 bp 的目的条带,表明所构建的文库中目的基因的插入率为 91.3% (图 4),序列比对分析结果显示 (图 5),所测试克隆的序列框架结构完整,其中 CDR3 区的氨基酸种类及数量均存在较大差异,表明所构建的文库具有较好的

多样性。

2.3 纳米抗体的筛选与鉴定

利用纯化后的猪 XCR1 目的蛋白作为包被抗原,经过 3 轮亲和筛选后,抗猪 XCR1 目的蛋白的特异性噬菌体的富集率分别为 6.4×10^{-8} 、 4.27×10^{-6} 和 2.8×10^{-5} ,第三轮的富集率约为第一轮 437 倍,表明抗猪 XCR1 目的蛋白的纳米抗体得到了很大程

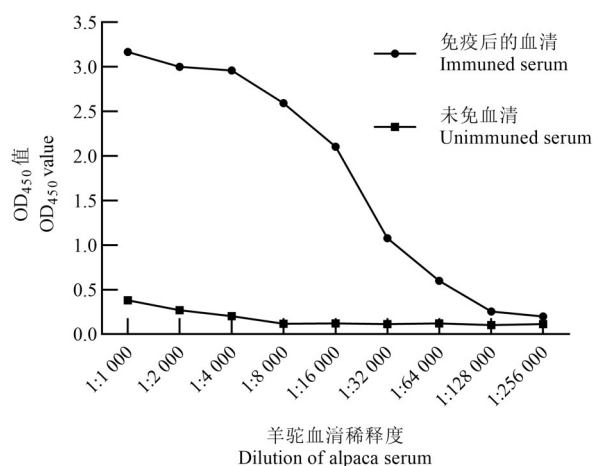


图 3 间接 ELISA 方法检测羊驼血清的抗体效价

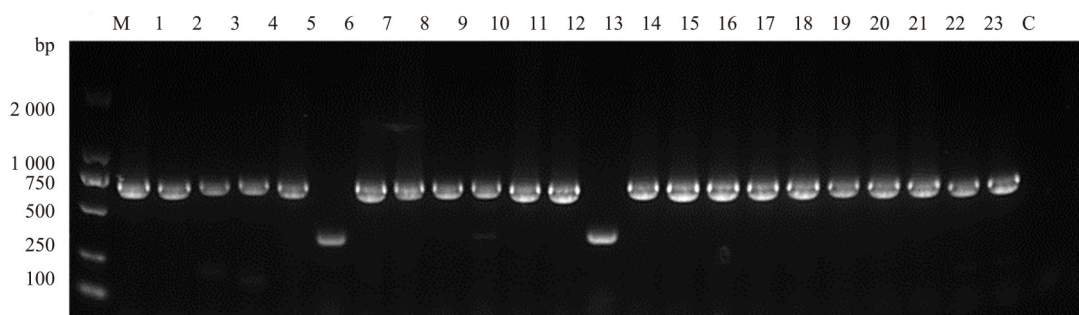
Fig. 3 Detection of antibody titers in alpaca serum by indirect ELISA

度的富集(表 3)。自第二轮、第三轮亲和筛选后的洗脱产物中随机挑选 95 个单克隆菌落进行间接

ELISA 鉴定,并选取其他任一含 his 标签的蛋白作为对照。如图 6 所示,共有 5 个单克隆菌落可以与猪 XCR1 目的蛋白发生特异性的结合,经序列测定后,根据纳米抗体 CDR3 区域进行氨基酸序列比对,如图 7 所示,共筛选出 5 个针对猪 XCR1 目的蛋白的特异性纳米抗体,选取 OD₄₅₀ 数值最高的 Nb75 纳米抗体进行后续试验。

2.4 XCR1/FMDV 双特异纳米抗体重组表达载体的构建

分别以 Nb75、连接肽 PA 和 Nb205 的基因片段为模版,采用 SOE-PCR 方法将其连接,获得 XCR1/FMDV 双特异纳米抗体串联基因片段,如图 8 所示,串联基因片段大小为 1 000 bp 左右,与预期大小一致。上述串联基因片段经双酶切后插入 pMECS 载体,转化至大肠杆菌 WK6 感受态细胞后,获得重组表达载体,随后对质粒进行酶切验证,



M: DL2 000 DNA Marker; 1~23: 随机挑选的单克隆菌落; C: 对照样品。

Lane M: DL2 000 DNA Marker; Lane 1-23: Clones selected randomly from phage display nanobody library; Lane C: Control.

图 4 噬菌体展示纳米抗体文库插入率的鉴定

Fig. 4 Identification of insertion rate of phage display nanobody library



图 5 随机挑选单克隆菌落序列比对分析

Fig. 5 Sequence alignment of the randomly selected monoclonal colonies

表3 猪XCR1目的蛋白特异性噬菌体富集情况
Table 3 Enrichment of phage particles displaying specific anti-porcine XCR1

筛选轮次 No. of rounds	包被抗原浓度/(μg/mL) Concentration of coated antigen	投入文库量/10 ¹² PFU Quantity of library input	解离产物/PFU Dissociation product	富集率 Degree of enrichment
1	1	2.25	1.45×10 ⁵	6.4×10 ⁻⁸
	0	2.25	3.3×10 ⁵	1.46×10 ⁻⁷
2	0.5	2.25	9.6×10 ⁶	4.27×10 ⁻⁶
	0	2.25	2.0×10 ⁶	8.9×10 ⁻⁷
3	0.25	2.25	6.3×10 ⁷	2.8×10 ⁻⁵
	0	2.25	1.59×10 ⁶	7.07×10 ⁻⁷

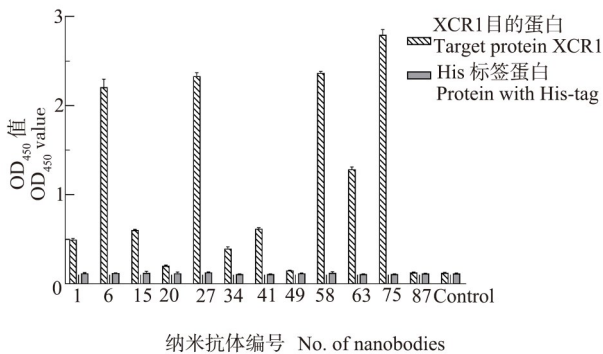


图6 间接ELISA方法检测不同纳米抗体与猪XCR1目的蛋白的结合活性

Fig. 6 Detection of the binding activity of different nanobodies to porcine by indirect ELISA

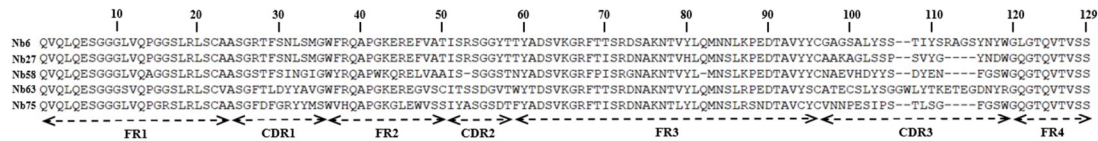


图7 5个猪XCR1目的蛋白特异性纳米抗体序列比对分析
Fig. 7 Sequence alignment of the 5 anti-porcine XCR1 protein nanobodies

2.6 XCR1/FMDV 双特异纳米抗体融合蛋白结合活性的鉴定

采用间接ELISA方法鉴定所制备的XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白与猪XCR1目的蛋白和猪O型口蹄疫病毒灭活抗原的结合特性,如图10显示,所制备的XCR1/FMDV双特异纳米抗体融合蛋白与猪XCR1目的蛋白和猪O型FMDV灭活抗原均具有较好的结合活性,其结合活性与单价纳米抗体对照组无明显差异,表明所制备的

载体片段及目的基因片段大小相符合,表明重组表达载体构建成功。

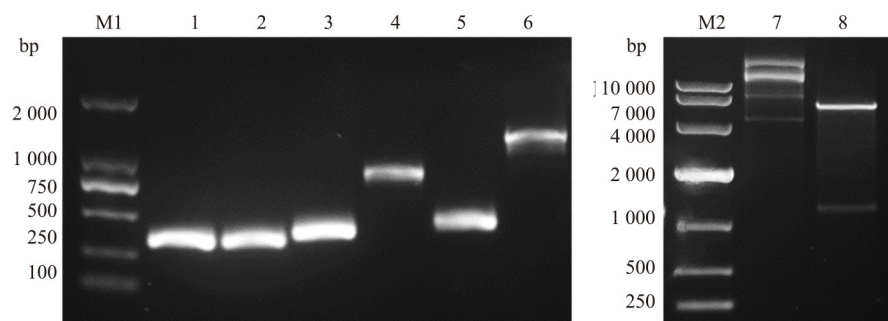
2.5 XCR1/FMDV 双特异纳米抗体融合蛋白的表达与纯化

将pMECS-Nb75-205重组表达菌接种TB培养基,经诱导表达和镍柱纯化后,得到纯化的目的蛋白Nb75-205,同时设立不添加β-巯基乙醇的对照组,经SDS-PAGE和Western blot鉴定,如图9所示,目的蛋白相对分子量大小约为35 ku,与预期大小一致,纯度在90%以上,而未添加β-巯基乙醇的对照组相对分子量大小约为70 ku,表明目的蛋白为二聚体结构。

XCR1/FMDV 双特异纳米抗体融合蛋白展现了与单价纳米抗体相类似的作用功能,与目的抗原均具有较好的结合活性。

3 讨论

cDC可捕获外源物质并将其提呈至抗原特异性T细胞,对于细胞免疫的启动和体液免疫中抗体的极化均具有重要作用^[2,15]。cDC根据功能不同可分为cDC1和cDC2^[16],cDC2主要诱导CD4⁺T细胞

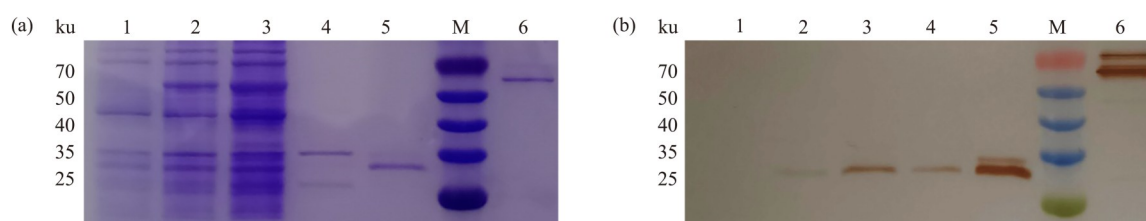


M1: DL2 000 DNA Marker; M2: DL10 000 DNA Marker; 1: Nb75 扩增产物; 2: PA 扩增产物; 3: Nb205 扩增产物; 4: Nb75-PA 扩增产物; 5: Linker-Nb205 扩增产物; 6: Nb75-205 扩增产物; 7: 未经酶切的 pMECS-Nb75-205 重组质粒; 8: 双酶切后的 pMECS-Nb75-205 重组质粒。

Lane M1: DL2 000 DNA Marker; Lane M2: DL10 000 DNA Marker; Lane 1: Nb75 gene of porcine amplified by PCR; Lane 2: PA gene amplified by PCR; Lane 3: Nb205 gene amplified by PCR; Lane 4: Nb75-PA gene amplified by SOE-PCR; Lane 5: Linker-Nb205 gene amplified by SOE-PCR; Lane 6: Nb75-205 gene amplified by PCR; Lane 7: Recombinant expression plasmid pMECS-Nb75-205 without restriction enzyme digestion; Lane 8: The product of recombinant expression plasmid pMECS-Nb75-205 with restriction enzymes digestion.

图 8 Nb75-205 基因片段的扩增及重组表达载体的构建

Fig. 8 Amplification of Nb75-205 and construction of the recombinant expression plasmid



(a) SDS-PAGE 鉴定; (b) Western blot 鉴定; M: 蛋白 Marker; 1: 诱导前的全菌样品; 2: 诱导后的全菌样品; 3: 破碎后的上清液样品; 4: 破碎后的沉淀样品; 5: 亲和纯化后的 Nb75-205; 6: 未经 β -巯基乙醇处理的亲和纯化 Nb75-205。

(a) Results analyzed by SDS-PAGE; (b) Results analyzed by western blot; Lane M: Protein Marker; Lane 1: Whole bacteria sample before induction; Lane 2: Whole bacteria sample after induction; Lane 3: Supernatant sample after disruption; Lane 4: Precipitate sample after disruption; Lane 5: Nb75-205 after purification; Lane 6: Nb75-205 after purification without being treated by β -mercaptoethanol.

图 9 Nb75-205 目的蛋白的表达及纯化鉴定

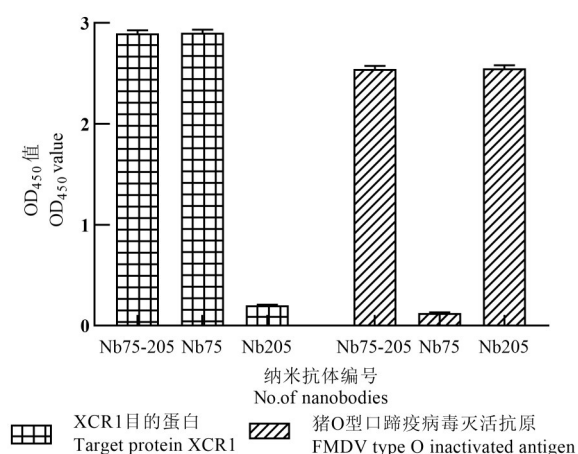
Fig. 9 Identification of the expression and purification of the Nb75-205

向 Th2 转化,产生以 IgG1 为主导的体液免疫反应;而 cDC1 不但可以诱导 CD4⁺T 细胞向 Th1 转化,产生以 IgG2a 为主导的体液免疫,还可以将抗原交叉提呈至 CD8⁺T 细胞,增强细胞毒性免疫应答^[1-2, 17]。

将抗原靶向至 DC 细胞是提高疫苗抗原免疫效率的有效途径。XCR1 作为 cDC1 特异性的抗原提呈受体,在抗原提呈过程中发挥着重要作用。研究显示,与非靶向抗原相比较,通过将黑色素瘤抗原和胸腺瘤抗原靶向至 XCR1,可以引起 IFN- γ ⁺CD8⁺T 细胞应答,诱导抗原特异性细胞毒性 T 细胞反应 (Cytotoxic lymphocyte, CTL),抑制黑色素瘤及胸腺瘤生长^[3];通过将流感病毒 HA 抗原靶向至 XCR1,可以诱导较高的 IFN- γ ⁺CD8⁺T 细胞反应以及较强的细胞毒性,提升小鼠体内生发中心 B 细胞以及长寿浆细胞比例,提高特异性抗体水平,产

生攻毒保护作用^[1-2, 4];通过将新型冠状病毒 S 蛋白靶向至 XCR1,可以在小鼠体内诱导产生特异性中和抗体以及 T 细胞免疫应答,并提高骨髓中长寿浆细胞比例^[5]。上述研究报道显示,XCR1 靶向抗原提呈在抗病毒感染和肿瘤治疗方面具有很大潜力,已成为新型疫苗制剂研发与应用领域的前沿热点。

抗原的 DC 靶向主要是通过化学偶联或基因融合表达的方法,将 DC 表面受体相应的配体或特异性抗体与抗原进行组装,该过程较为繁琐,易影响抗原结构。此外,由于物种、靶向抗原以及靶向策略的不同,产生的免疫效果也不尽相同,现有研究均采用蛋白质抗原作为靶向抗原,由于蛋白质抗原的抗原表位有限,往往不能产生较为理想的免疫效果^[8]。因此,设计更加有效的靶向抗原、探索新的抗原组装策略,对于改善 XCR1 靶向免疫效力具有重



纳米 Nb75-205: XCR1/FMDV 双特异纳米抗体; Nb75: XCR1 特异性纳米抗体; Nb205: O 型 FMDV 特异性纳米抗体。

Nb75-205: XCR1/FMDV bispecific nanobody; Nb75: nanobody anti-XCR1; Nb205: nanobody anti-FMDV type O.

图 10 间接 ELISA 检测 Nb75-205 与 XCR1 和 FMDV 的反应性能

Fig. 10 Reactivity of Nb75-205 with XCR1 and FMDV detected by indirect ELISA

要意义。为实现猪 O 型 FMDV 抗原的猪 XCR1 靶向,本研究尝试利用抗原与抗体的特异性结合以及双特异纳米抗体的桥联作用,实现猪 O 型 FMDV 抗原的猪 XCR1 靶向,先后利用重组表达的猪 XCR1 目的蛋白对羊驼进行免疫,构建了噬菌体展示纳米抗体基因文库,经 3 轮亲和筛选及 ELISA 鉴定后,获得了多个猪 XCR1 目的蛋白的特异性纳米抗体,并将纳米抗体 Nb75 与猪 O 型 FMDV 纳米抗体 Nb205 融合表达,制备双特异性纳米抗体 Nb75-205 融合蛋白,该融合蛋白不仅可以在大肠杆菌中实现可溶性表达,还具有二聚体结构;与此同时,Nb75-205 能同时与 XCR1 目的蛋白和猪 O 型 FMDV 特异性结合,且结合活性与 Nb75 和 Nb205 无明显差异。Fossum 等^[1]在研究中报道,较单体结构 C11A-HA 而言,二聚体结构 XCL1-HA 不仅能诱导机体产生高水平的 IgG2a 抗体,还能激活 CTL 反应,这为本研究后续开展 FMDV 抗原靶向至猪 XCR1 提高 FMDV 抗原免疫效力的研究提供了可能性。本研究以纳米抗体为技术手段,代替传统的单克隆抗体及单链抗体,通过构建 Nb75-205 双特异性纳米抗体融合蛋白,可以采用 FMDV 全病毒代替蛋白质抗原进行 XCR1 靶向,发挥全病毒天然抗原表位的优势,同时避免化学偶联和基因融合表达方法对抗原

结构的影响,同时,本研究获得的双特异性纳米抗体 Nb75-205 融合蛋白只需要与抗原孵育后就可以直接使用,操作简便快捷,适用于兽医临床应用场景。预期研究结果,与非靶向 FMDV 抗原相比较,通过将 FMDV 抗原靶向至猪 XCR1,可以大幅提高抗原的提呈效率,诱导产生更高的抗体水平以及细胞免疫应答,减少临床中抗原的免疫剂量和免疫频次,为新型 FMD 疫苗设计提供思路 and 参考。

4 结论

本研究利用噬菌体展示技术获得了抗猪 XCR1 的纳米抗体 Nb75,采用连接肽将 Nb75 和抗猪 O 型 FMDV 纳米抗体 Nb205 连接,构建了双特异性纳米抗体 Nb75-205 融合蛋白,经鉴定 Nb75-205 为天然二聚体结构,可同时与 XCR1 和 FMDV 发生特异性结合,为进一步解析猪 XCR1 靶向提呈 FMDV 抗原的作用机制奠定了基础,也为新型 FMD 疫苗设计提供思路 and 参考。

参考文献 References

- [1] Fossum E, Grødeland G, Terhorst D, Tveita A A, Vikse E, Mjaaland S, Henri S, Malissen B, Bogen B. Vaccine molecules targeting xcr1 on cross-presenting DCs induce protective CD8⁺ T-cell responses against influenza virus [J]. *European Journal of Immunology*, 2015, 45 (2): 624-635
- [2] Tesfaye D Y, Bobic S, Lysén A, Huszthy P C, Gudjonsson A, Braathén R, Bogen B, Fossum E. Targeting Xcr1 on dendritic cells rapidly induce Th1-associated immune responses that contribute to protection against influenza infection [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 752714
- [3] Mizumoto Y, Hemmi H, Katsuda M, Miyazawa M, Kitahata Y, Miyamoto A, Nakamori M, Ojima T, Matsuda K, Nakamura M, Hayata K, Fukuda-Ohta Y, Sugiyama M, Ohta T, Orimo T, Okura S, Sasaki I, Tamada K, Yamaue H, Kaisho T. Anticancer effects of chemokine-directed antigen delivery to a cross-presenting dendritic cell subset with immune checkpoint blockade [J]. *British Journal of Cancer*, 2020, 122 (8): 1185-1193
- [4] Fossum E, Tesfaye D Y, Bobic S, Gudjonsson A, Braathén R, Lahoud M H, Caminschi I, Bogen B. Targeting antigens to different receptors on conventional type 1 dendritic cells impacts the immune response [J]. *Journal of Immunology*, 2020, 205 (3): 661-673
- [5] Qi H L, Sun Z J, Yao Y L, Chen L G, Su X C. Immunogenicity of the Xcl1-SARS-CoV-2 spike fusion DNA vaccine for COVID-19 [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10 (3): 407
- [6] Audsley K M, McDonnell A M, Waithman J. Cross-presenting XCR1⁺ dendritic cells as targets for cancer immunotherapy [J]. *Cells*, 2020, 9 (3): 565
- [7] Hartung E, Becker M, Bachem A, Reeg N, Jäkel A, Hutloff A, Weber H, Weise C, Giesecke C, Henn V, Gurka S, Anastasiadis K, Mages H W, Kroczeck R A. Induction of potent CD8 T cell cytotoxicity by specific targeting of antigen to cross-presenting dendritic cells in vivo via murine or human XCR1 [J]. *Journal of Immunology*, 2015, 194 (3): 1069-1079

- [8] 李坤. 牛外周血树突状细胞亚群鉴定及抗原靶向递呈研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017
- Li K. Identification of Dendritic Cells Subsets in Peripheral Blood and Development of Strategies for Targeted Antigen Presentation in Cattle [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017 (in Chinese)
- [9] Bourque J, Hawiger D. Applications of antibody-based antigen delivery targeted to dendritic cells in vivo[J]. *Antibodies (Basel)*, 2022, 11(1):8
- [10] Melgoza-González E A, Reséndiz-Sandoval M, Hinojosa-Trujillo D, Hernández-Valenzuela S, García-Vega M, Mata-Haro V, Tepale-Segura A, Bonifaz L C, Perez-Torres A, Hernández J. Antigen targeting of porcine skin DEC205⁺ dendritic cells[J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10(5): 684
- [11] Feng Y Y, Fan J, Wu D Y, Liu Q Q, Li H Y, Zhang X N, Li S, Tang F, Liu Z W, Zhang L Z, Feng H B. DEC-205 receptor targeted poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles containing *Eucommia ulmoides* polysaccharide enhances the immune response of foot-and-mouth disease vaccine in mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 227:576-589
- [12] Muyldermans S. Applications of nanobodies [J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2021, 9:401-421
- [13] Duarte J N, Cragnolini J J, Sweet L K, Bilate A M, Bader J, Ingram J R, Rashidfarrokhi A, Fang T, Schiepers A, Hanke L, Ploegh H L. Generation of immunity against pathogens via single-domain antibody-antigen constructs[J]. *Journal of Immunology* 2016, 197(12):4838-4847
- [14] Cheng H W, Chen J, Cai Z Z, Du L P, Hou J B, Qiao X W, Zheng Q S. Development of GEM-PA-nanotrap for purification of foot-and-mouth disease virus[J]. *Vaccine*, 2019, 37(24):3205-3213
- [15] Fossum E, Tesfaye D Y, Bobic S, Gudjonsson A, Braathen R, Lahoud M H, Caminschi I, Bogen B. Targeting antigens to different receptors on conventional type 1 dendritic cells impacts the immune response [J]. *Journal of Immunology*, 2020, 205(3): 661-673
- [16] Sulczewski F B, Maqueda-Alfaro R A, Alcántara-Hernández M, Perez O A, Saravanan S, Yun T J, Seong D, Arroyo Hornero R, Raquer-McKay H M, Esteva E, Lanza Z R, Leylek R A, Adams N M, Das A, Rahman A H, Gottfried-Blackmore A, Reizis B, Idoyaga J. Transitional dendritic cells are distinct from conventional DC2 precursors and mediate proinflammatory antiviral responses [J]. *Nature immunology*, 2023, 24(8):1265-1280
- [17] Edwards J C, Everett H E, Pedrera M, Mokhtar H, Marchi E, Soldevila F, Kaveh D A, Hogarth P J, Johns H L, Nunez-García J, Steinbach F, Crooke H R, Graham S P. CD1⁺ and CD1⁺ porcine blood dendritic cells are enriched for the orthologues of the two major mammalian conventional subsets[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7:40942

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 杨利, 硕士, 助理研究员, 主要从事食品安全、动物疫病检测及诊断研究, 发表论文 10 篇, 申请发明专利授权 8 项, 参与科研项目 6 项, 其中江苏省成果转化 1 项(BA2010150), 中科院院地合作项目 2 项, 江苏省科技计划项目 1 项(BE2008661), 江苏省自主创新 1 项(CX(21)3135), 江苏省自然科学基金项目 1 项(BK20231389)。开发的多项检测试剂盒及抗体制剂已通过销售、技术服务等方式在各企业及高校单位使用。



通讯作者简介: 程海卫, 博士, 副研究员, 主要从事疫苗免疫增强技术研究与应用, 南京农业大学硕士研究生导师, *Veterinary Vaccine* 和 *Zoonoses* 期刊青年编委。主持或参加国家自然科学基金面上项目、国家自然科学基金青年基金、江苏省重点研发计划、江苏省自然科学基金面上项目、江苏省农业自主创新资金等省部级课题 8 项, 相关研究成果已发表研究论文 10 余篇, 申请发明专利 8 项, 获发明专利授权 6 项, 英国 PCT 专利 1 项, 作为主要完成人完成的“猪圆环病毒 2 型灭活疫苗及其制备方法”等多项技术实现转让, 取得良好的经济和社会效益。