



甘靖凡, 黄嘉馨, 吉艳红, 王丹, 张博, 朱启运, 亓文宝, 徐帅. 鸡白细胞介素 18 纳米抗体的筛选与评价[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(11): 126-135.
GAN Jingfan, HUANG Jiaxin, JI Yanhong, WANG Dan, ZHANG Bo, ZHU Qiyun, QI Wenbao, XU Shuai. Screening and identification of nanobodies against chicken interleukin-18[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(11): 126-135.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.11.10

鸡白细胞介素 18 纳米抗体的筛选与评价

甘靖凡^{1,2} 黄嘉馨¹ 吉艳红¹ 王丹¹ 张博¹ 朱启运¹ 亓文宝² 徐帅^{1*}
(1. 中国农业科学院 兰州兽医研究所/兰州大学动物医学与生物安全学院/动物疫病防控全国重点实验室, 兰州 730046;
2. 华南农业大学 兽医学院/动物疫病防控全国重点实验室, 广州 510642)

摘要 为制备特异性识别鸡白细胞介素 18(Chicken Interleukin-18, chIL-18)的纳米抗体,本研究构建了 chIL-18 蛋白表达重组质粒并制备出 chIL-18 蛋白,利用 chIL-18 蛋白免疫羊驼,扩增羊驼外周血淋巴细胞的抗体基因重链可变区,构建 chIL-18 Nb 噬菌体展示文库。以 chIL-18 蛋白为靶标抗原对文库进行富集淘选,克隆与 chIL-18 蛋白反应阳性的重组噬菌体 Nb 序列,并将其构建到载体上进行 Nb 表达。对 chIL-18 Nb 进行生物学活性检测后将生物学活性最优的 chIL-18 Nb 进行初步应用评价。结果表明:1)本研究成功构建了库容量为 6×10^8 PFU/mL 的 chIL-18 Nb 噬菌体展示文库;2)获得 5 株具有良好反应活性、特异性和结合活性的 chIL-18 Nb,其中 Nb1 生物学活性最佳,满足 Western blot 和 IFA 等试验抗体应用要求。综上,该研究首次获得与 chIL-18 蛋白特异性反应的 Nb,为后续 chIL-18 定量检测方法的建立及生物学功能的研究提供材料支持。

关键词 鸡白细胞介素 18; 纳米抗体; 噬菌体展示技术; 特性鉴定

中图分类号 S852.4

文章编号 1007-4333(2025)11-0126-10

文献标志码 A

Screening and identification of nanobodies against chicken interleukin-18

GAN Jingfan^{1,2}, HUANG Jiaxin¹, JI Yanhong¹, WANG Dan¹, ZHANG Bo¹, ZHU Qiyun¹,
QI Wenbao², XU Shuai^{1*}

(1. Lanzhou Veterinary Research Institute/College of Animal Medicine and Biosafety, Lanzhou University/National Key Laboratory of Prevention and Control of Animal Disease, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China;

2. College of Veterinary Medicine/ State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract In order to generate a nanobody (Nb) that specifically recognizes chicken interleukin-18 (chIL-18), this study constructed a recombinant plasmid expressing chIL-18 protein and produced chIL-18 protein. The chIL-18 protein was used to immunize alpacas, and the variable regions of the heavy chain of the antibody genes from the peripheral blood lymphocytes of the immunized alpacas were amplified to construct a chIL-18 Nb phage display library. The library was enriched and selected using chIL-18 protein as the target antigen, and the sequences of the recombinant phage Nb that reacted positively with chIL-18 protein were cloned and expressed on the vector. Furthermore, after conducting biological activity tests on chIL-18 Nb, a preliminary application

收稿日期: 2025-02-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172820, 32272972); 兰州市科技计划项目(2024-02-15)

第一作者: 甘靖凡(ORCID:0009-0007-1129-5595), 硕士研究生, E-mail: gjf001006@163.com

通讯作者: 徐帅(ORCID:0009-0008-5345-773X), 副研究员, 主要从事动物流感病毒与宿主相互作用研究, E-mail: xushuai@caas.cn

evaluation was carried out on the chIL-18 Nb with the best biological activity. The results were as follows: 1) In this study, a chIL-18 Nb phage display library with a capacity of 6×10^8 PFU/mL was successfully constructed; 2) Five chIL-18 Nbs with good reactivity, specificity and binding activity were obtained, among which Nb1 had the best biological activity and met the requirements for antibody application in western blot and IFA tests. This study was the first to obtain the Nb specifically reacted with chIL-18 protein, which laid a foundation for subsequent establishment of quantitative detection methods for chIL-18 and the research about the biological functions of chIL-18.

Keywords chicken interleukin-18; nanobody; phage display; characterization

白细胞介素 18 (Interleukin-18, IL-18), 又名干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ) 诱导剂, 是一种细胞因子, 属于白细胞介素家族, 具有广泛的生物学活性, 在介导细胞免疫、炎症反应、自身免疫疾病以及抗肿瘤、调节机体代谢等方面具有重要作用^[1]。家禽体内存在的鸡白细胞介素 18 (Chicken Interleukin 18, chIL-18) 在家禽免疫学中具有重要的研究价值。chIL-18 位于鸡 24 号染色体上, CDS 全长大小约 597 bp, 蛋白分子量为 23 ku 左右^[2]。chIL-18 作为鸡 IFN- γ 分泌的重要上游调控分子, 是家禽免疫应答的重要分子标志物。chIL-18 本身应用广泛, 在抗病毒功能上, chIL-18 不仅能作为多种病毒疫苗的佐剂, 还可用作口服剂, 具有明显提高机体抗体水平, 增强淋巴细胞增殖能力, 有效保护鸡群抵抗病毒感染的效果^[3-6]。2006 年, 李宏梅等^[1]对重组 chIL-18 蛋白进行了生物活性检测, 此后有关 chIL-18 基因与功能的研究逐渐成为热点。相关研究人员也开始针对 chIL-18 研发特异性抗体, 以期 chIL-18 生物学功能及应用研究提供重要的基础材料。2012 年, 李行等^[7]制备出 chIL-18 单克隆抗体, 该抗体经 Western blot 能识别 chIL-18 原核表达蛋白以及鸡体内 chIL-18 蛋白; 2022 年, 郑孟加等^[8]制备出 2 株识别 chIL-18 不同表位的单克隆抗体。目前, 所研发的 chIL-18 抗体种类单一, 市售针对 chIL-18 蛋白的抗体也仅有单克隆抗体和多克隆抗体。

纳米抗体是一种单域抗体, 尺寸在纳米级别, 天然存在于骆驼科动物及鲨鱼等体内。Nb 是抗体中最小的抗原结合单位, 其可变抗原抗体结合区域具有多种长度和结构, 因此表现出对抗原高度的特异性和亲和力^[9]。目前, 已研发的家禽细胞因子抗体主要为单克隆抗体, 还未有制备家禽细胞因子 Nb 的相关研究。与单克隆抗体相比, 更小分子量的 Nb 具有相对容易渗透到组织中的优势, 如穿过血脑屏

障进行脑部治疗等^[10]。在保持与抗原高度亲和力的同时, Nb 的 CDR3 区能与抗原的裂缝和空腔结合, 可识别到单克隆抗体难以识别的隐匿抗原表位^[11]。在高温、非生理 pH 值以及化学变性剂和蛋白酶等的作用下, Nb 可以保持大部分抗原结合能力, 从而可以进行更严苛的化学修饰^[12-13]。在制造成本上, 相比于通过 CHO 细胞生产的单克隆抗体, Nb 可在大肠杆菌或酵母中表达, 大大降低了生产成本。目前, Nb 已广泛应用于抗病毒、肿瘤治疗等生物医学领域中^[14]。

本研究利用真核表达的 chIL-18 免疫羊驼, 构建 Nb 噬菌体展示文库, 通过噬菌体展示技术以原核表达的 chIL-18 为靶标抗原进行液相淘选, 获得 chIL-18 Nb, 鉴定其生物学活性并进行初步应用评价, 为后续 chIL-18 家禽免疫学研究和 chIL-18 双抗夹心 ELISA 等定量检测方法的建立提供了材料支持。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和实验动物

本实验室通过反向遗传操作技术制备新城疫 MG7 低致病力毒株^[15]。流感病毒 PR8 毒株、pComb 噬菌体载体、pcDNA3.1 真核表达载体、Phage 真核表达载体、pCold-His-AVI 原核表达载体、人胚胎肾细胞 293T (HEK-293T) 和 293F (HEK-293F) 细胞、鸡胚成纤维细胞 (DF1) 细胞由中国农业科学院兰州兽医研究所动物病毒分子生态学创新团队保存; *E. coli* BL21 和 *E. coli* DH5 α 感受态细胞购于大连宝生物工程有限公司; *E. coli* ss320 感受态细胞、M13KO7 辅助噬菌体购于 NEB 公司; 羊驼购于甘肃省武威市。

1.2 主要试剂

链霉亲和素磁珠 Streptavidin Magnetic Beads 购于碧云天公司; Protein A 纯化介质购于伯格隆生物公司; 人外周血淋巴细胞分离试剂盒购于索莱宝

公司;HRP 标记的鼠抗 M13KO7 抗体、HRP 标记的羊抗人 IgG-Fc 抗体购于义翘神州公司。

1.3 chIL-18 质粒构建及蛋白表达

采集低致病力毒株新城疫 MG7 感染雏鸡的免疫器官,提取总 RNA 反转录成 cDNA,以此为模板用高保真 DNA 聚合酶、chIL-18-F (序列为 AGCTGTGAAGAGATCGCTGTGTGTGCAGTACGGCTTAGAG) 和 chIL-18-R (序列为 ATCATAGGTTGTGCCTTTTCATTATGACTTGTTACGAATTT)引物扩增 chIL-18 基因序列后,分别同源重组到线性化的 Phage 真核表达载体和 pCold-His-AVI 原核表达载体上。将构建成功的 chIL-18 真核表达重组质粒转染人胚胎肾细胞 293T、chIL-18 原核表达重组质粒转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,分别表达真核及原核 chIL-18 蛋白。利用亲和层析方法,对 chIL-18 真核表达蛋白和原核表达蛋白进行纯化,并通过 SDS-PAGE 进行鉴定。

1.4 羊驼免疫及抗体效价检测

将纯化的 100 μg chIL-18 真核表达蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀并乳化用于对羊驼进行首次

免疫,此后几次免疫则使用弗氏不完全佐剂进行乳化。采用颈部皮下分点注射对羊驼进行 4 次免疫,每次免疫间隔 14 d。首次免疫前先采血、分离血清作为阴性血清对照。第四次免疫 14 d 后采血,分离血清检测抗体效价,以 100 ng/孔 chIL-18 真核表达蛋白包被 ELISA 酶标板,羊驼血清为一抗,HRP 标记的 Goat Anti-Alpaca IgG 抗体作为酶标二抗,通过间接 ELISA 方法测定羊驼中 chIL-18 蛋白的抗体效价。当阳性 OD₄₅₀/阴性 OD₄₅₀≥2.1 (P/N≥2.1) 时判断为阳性,抗体效价达到 1:64 000 时满足建立噬菌体展示文库标准。

1.5 chIL-18 Nb 噬菌体展示文库构建及多样性鉴定

噬菌体抗体展示文库构建方法如前所述^[16],巢式 PCR 方法引物信息见表 1。取 100 μL 保留的原始库菌液,用 SOC 培养基 10 倍稀释至 10⁻³,分别取 10 μL 10⁻¹~10⁻³ 的稀释液滴于 Carb/Kana 2YT 固体培养基过夜培养,计算噬菌体抗体展示文库的库容;同时取一定量稀释液涂于 Carb/Kana 2YT 固体培养基,过夜培养后,随机挑取 30 个单克隆,分析噬菌体展示文库的多样性。

表 1 巢式 PCR 引物信息
Table 1 Primers used for nested PCR

引物 Primer	引物序列 (5'→3') Primer sequences (5'→3')	目的片段长度/bp Target fragment length
IgG-F	GTCCTGGCTGCTCTTCT	750
IgG-R	GGTACGTGCTGTTGA	
VHH-F	CTACAAATGCCTATGCATCCCAGGTGCAGCTCGTGGGAGTC	500
VHH-R	AAACAAC TTTCAACAGTGGAGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG	

1.6 chIL-18 蛋白噬菌体文库的淘选

将纯化的带有 AVI-tag 的 chIL-18 原核表达蛋白与链霉亲和素磁珠 4 ℃ 过夜偶联,空白对照组不加入蛋白,弃去上清。加入高浓度 BSA 封闭液,室温封闭 2 h 后弃掉上清。同时将噬菌体抗体库与链霉亲和素磁珠室温预处理 2 h。将 chIL-18 原核表达蛋白-链霉亲和素磁珠结合物加入预处理后的噬菌体抗体库,4 ℃ 过夜孵育,弃去上清。分别加入低浓度和高浓度洗涤液洗涤数次,弃液。加入 0.1 mol/L 甘氨酸 (pH 2.0) 洗脱 5 min 后用适量 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中和。将洗脱液加入新鲜活化至对数期的 NEB5α' 宿主菌中,220 r/min,37 ℃ 培养 1 h,再

加入适量 M13KO7 辅助噬菌体拯救 1.5 h。取 100 μL 菌液十倍稀释至 10⁻³,分别取 10 μL 10⁻¹~10⁻³ 稀释液滴于 Carb/Kana 2YT 固体培养基,其余菌液扩大至 35 mL Carb/Kana 2YT 培养基,220 r/min,37 ℃ 过夜培养。获得第一轮噬菌体 Nb 展示文库。重复上述操作,共进行 4 轮淘选。

取适量有富集现象的噬菌体 Nb 展示文库的稀释菌液涂于 Carb/Kana 2YT 固体培养基,37 ℃ 过夜培养,随机挑取 90 个单克隆接种到含有适量 Carb/Kana 2YT 培养基的深孔板中,并留 6 个孔作为空白对照,220 r/min,37 ℃ 过夜培养。将纯化的 chIL-18 原核表达蛋白作为抗原,按 100 ng/孔包被酶标板并

做 PBS 空白对照组,离心过夜培养的菌液,上清作为检测一抗,HRP 标记的鼠抗 M13KO7 抗体为酶标二抗,通过间接 ELISA 试验,以阳性 $OD_{450}/$ 阴性 $OD_{450} \geq 2.1$ ($P/N \geq 2.1$) 时判断为阳性,从而初步确定与 chIL-18 蛋白反应的阳性噬菌体单克隆。

1.7 chIL-18 重组 Nb 序列分析与表达

重组 Nb 序列分析与表达方法如前所述^[16],扩增 Nb 序列的引物为 Nb-F (序列为 TCCAGTGTGGAATTCGCCACCAAAAAGAA TATCGCATTTCTTCTTGCATCT)、Nb-R (序列 TCTAGACTCGAGTCAGTGATGGTGGTGGT GGTGGTGGTGGTGTGAGGAGACGGTGACC TGGG)。将扩增出的阳性噬菌体单克隆基因利用同源重组方法连接到含有人源 Fc 序列的 pcDNA3.1-Fc 真核表达载体上,并使用构建的重组质粒转染 HEK-293F 细胞中进行表达。

1.8 chIL-18 重组 Nb 的反应活性鉴定

将 chIL-18 真核表达蛋白包被酶标板,同时设置阴性对照和空白对照,4℃ 过夜孵育后 PBST 洗涤 1 次;3% BSA 37℃ 封闭 1.5 h;分别加入纯化的 Nb (1:1 000 稀释),37℃ 孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次;加入 HRP 标记的羊抗人 IgG-Fc (1:8 000 稀释),37℃ 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次;加入 TMB 显色液,反应一定时间;加入 2 mol/L 浓硫酸终止液后进行 OD_{450} 测定,以阳性 $OD_{450}/$ 阴性 $OD_{450} \geq 2.1$ ($P/N \geq 2.1$) 时判断为阳性,确定与 chIL-18 具有反应活性的 Nb。

1.9 chIL-18 重组 Nb 的特异性鉴定

将 chIL-18 碱基序列与鸡白介素家族其他细胞因子的碱基序列进行同源性分析。分别设置鸡 IL-6、鸡 IL-8、鸡 IL-10 为阴性对照进行 SDS-PAGE,300 mA 恒流转膜 1 h 后,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,将纯化的 Nb (1:1 000 稀释) 作为一抗,HRP 标记的羊抗人 IgG-Fc (1:5 000 稀释) 为酶标二抗,进行蛋白免疫印迹试验。

1.10 chIL-18 重组 Nb 的结合活性鉴定

用 chIL-18 真核表达蛋白包被酶标板,同时设置阴性对照和空白对照,4℃ 过夜孵育后 PBST 洗涤 1 次;3% BSA 37℃ 封闭 1.5 h;分别加入梯度稀释后的 Nb,37℃ 孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次;加入 HRP 标记的羊抗人 IgG-Fc (1:8 000 稀释),37℃ 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次;加入 TMB 显色液,反应一定时间;加入 2 mol/L 浓硫酸终止液后进行 OD_{450} 测

定,通过 EC_{50} Calculator 软件计算 EC_{50} 。

1.11 chIL-18 Nb1 的初步应用

分别用新城疫 MG7 低致病力毒株和流感 PR8 毒株感染 DF1 细胞,同时设置阴性对照,18 h 后用 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,再用 0.5% 的 Triton-100 和 10% 脱脂奶粉的混合溶液室温通透并封闭 1 h,将纯化的 Nb1 (1:200) 作为一抗,Cy3 标记的小鼠抗人 IgG-Fc (1:300) 为酶标二抗,进行间接免疫荧光试验。

将 1 μ g、2 μ g chIL-18 真核表达重组质粒分别转染 HEK-293T 细胞,同时设置空载体质粒为阴性对照,进行 SDS-PAGE,300 mA 恒流转膜 1 h 后,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,将纯化的 Nb1 (1:1 000 稀释) 和鼠源 Flag 标签抗体 (1:1 000) 作为一抗,并分别用 HRP 标记的羊抗人 IgG-Fc (1:5 000) 和 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG (1:5 000) 为酶标二抗,进行蛋白免疫印迹试验。

2 结果与分析

2.1 chIL-18 目的基因扩增及蛋白纯化

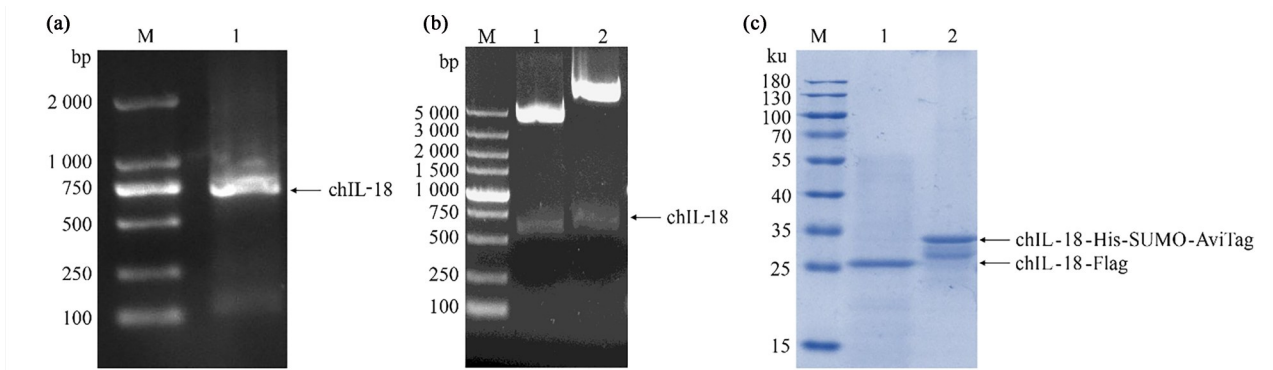
提取感染新城疫病毒 MG7 株的雏鸡免疫器官的总 RNA 反转录成 cDNA,以此为模板扩增出 chIL-18 基因。结果显示,由于增加了载体同源臂序列以及标签,故在接近 750 bp 处出现目的条带 (图 1(a)),与预期相符,表明 chIL-18 基因扩增成功。经酶切鉴定,表明 chIL-18 重组质粒构建成功 (图 1(b))。表达构建成功的 chIL-18 真核及原核表达重组质粒,获得 chIL-18 真核和原核表达蛋白,并利用亲和层析法对 chIL-18 蛋白进行纯化。经 SDS-PAGE 分析显示,在 25 ku 左右出现目的条带,与预期条带大小一致 (图 1(c)),表明 chIL-18 蛋白纯化成功。

2.2 羊驼免疫血清抗体效价检测

通过间接 ELISA 方法检测羊驼血清抗体效价,结果显示第四次免疫后羊驼血清中针对 chIL-18 蛋白产生的抗体效价达到 1:64 000 (图 2),达到建立噬菌体展示文库标准。

2.3 chIL-18 Nb 噬菌体抗体库的构建及鉴定

利用巢式 PCR 方法,第一轮 PCR 扩增得到目的条带大小约 750 bp (图 3(a)),胶回收进行第二轮 PCR 扩增获得大小约为 400 bp 的 VHH 基因 (图 3(b))。获得原始噬菌体抗体展示文库后,将稀释后的原始库菌液进行固体培养基滴板,隔日计数单克隆数目 (图 3(c)),



(a)chIL-18目的基因扩增(M:DNA分子质量标准;1:ch-IL18);(b)chIL-18重组质粒酶切验证(M:DNA分子质量标准;1:pCold-chIL-18原核表达重组质粒酶切鉴定;2:Phage-chIL-18真核表达重组质粒酶切鉴定);(c)chIL-18真核及原核蛋白纯化(M:蛋白质分子质量标准;1:chIL-18真核蛋白纯化鉴定;2:chIL-18原核蛋白纯化鉴定)。

(a)Amplification of the chIL-18 gene (M: DL2000 DNA Marker; 1: Recombinant chIL-18 gene); (b)Verification of chIL-18 recombinant plasmid digestion (M: DNA molecular quality standard; 1: Identification of pCold-chIL-18 prokaryotic expression recombinant plasmid digestion; 2: Identification of Phage-chIL-18 eukaryotic expression recombinant plasmid digestion); (c)Purification of chIL-18 eukaryotic and prokaryotic protein, (M: Protein molecular weight Marker; 1: Purification and identification of chIL-18 eukaryotic protein; 2: Purification and identification of chIL-18 prokaryotic protein).

图1 chIL-18重组质粒构建及蛋白纯化

Fig. 1 Construction of chIL-18 recombinant plasmid and purification of chIL-18 protein

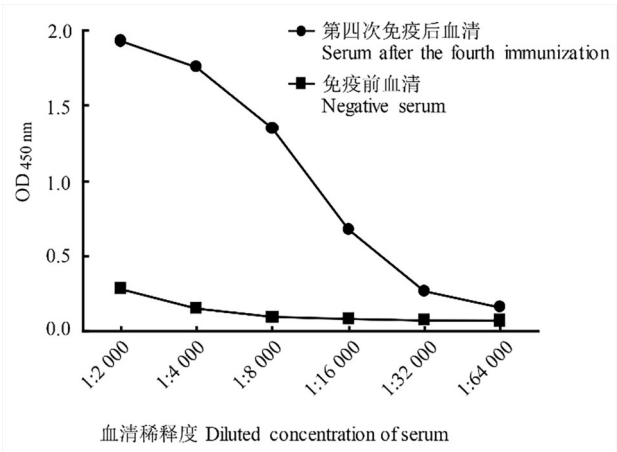


图2 针对chIL-18特异性IgG抗体效价测定

Fig. 2 Determination of the titer of specific IgG antibody against chIL-18

结果显示,原始抗体库容量为 6×10^8 CFU/mL。随机挑取30个单克隆,提取质粒送测,结果显示,符合Nb基因的序列共有20个。利用MEGA软件分析氨基酸序列,结果显示,20个VHH序列均不相同(图3(d)),表明构建的Nb噬菌体展示文库多样性较好,可进行下一步淘选。

2.4 chIL-18特异性重组噬菌体的富集淘选

以chIL-18原核表达蛋白为靶标抗原进行4轮淘选,结果显示,与无抗原空白对照相比(图4(a)),在 10^{-3} 稀释度特异性重组噬菌体存在明显富集现象。随机挑取90个单克隆,培养后进行间接ELISA检测,设置无抗原空白对照,以 $P/N\geq2.1$ 判断为阳

性,结果显示,90株单克隆均为阳性单克隆(图4(b))。

2.5 chIL-18重组Nb序列分析及表达

以 $P/N\geq2.1$ 为标准,挑选2.4中11株阳性噬菌体进行菌液PCR,并以pcDNA3.1-Fc为载体,构建真核表达重组质粒后送测。通过MEGA软件进行氨基酸分析,结果表明有6株Nb序列不同(图5(a))。将6株Nb进行表达,通过SDS-PAGE分析。结果显示,在40ku左右出现目的条带,与预期条带大小一致,有5株Nb为可溶性表达(图5(b)),编号分别为Nb1、Nb2、Nb3、Nb4和Nb5。

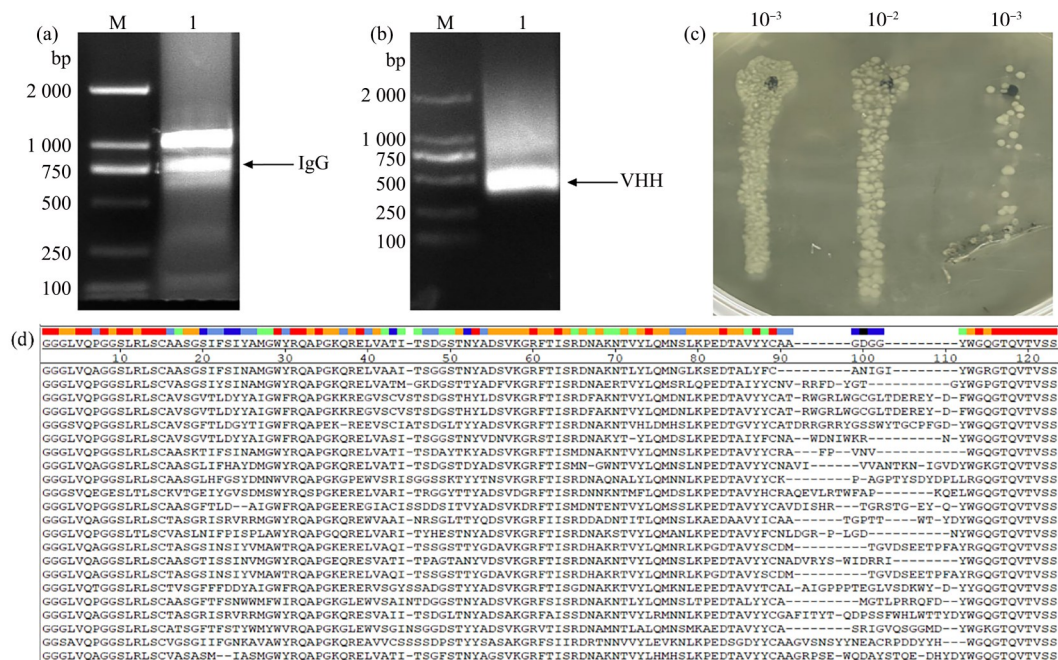


图 3 chIL-18 Nb 噬菌体展示文库的构建

Fig. 3 Construction of the chIL-18 Nb phage display library

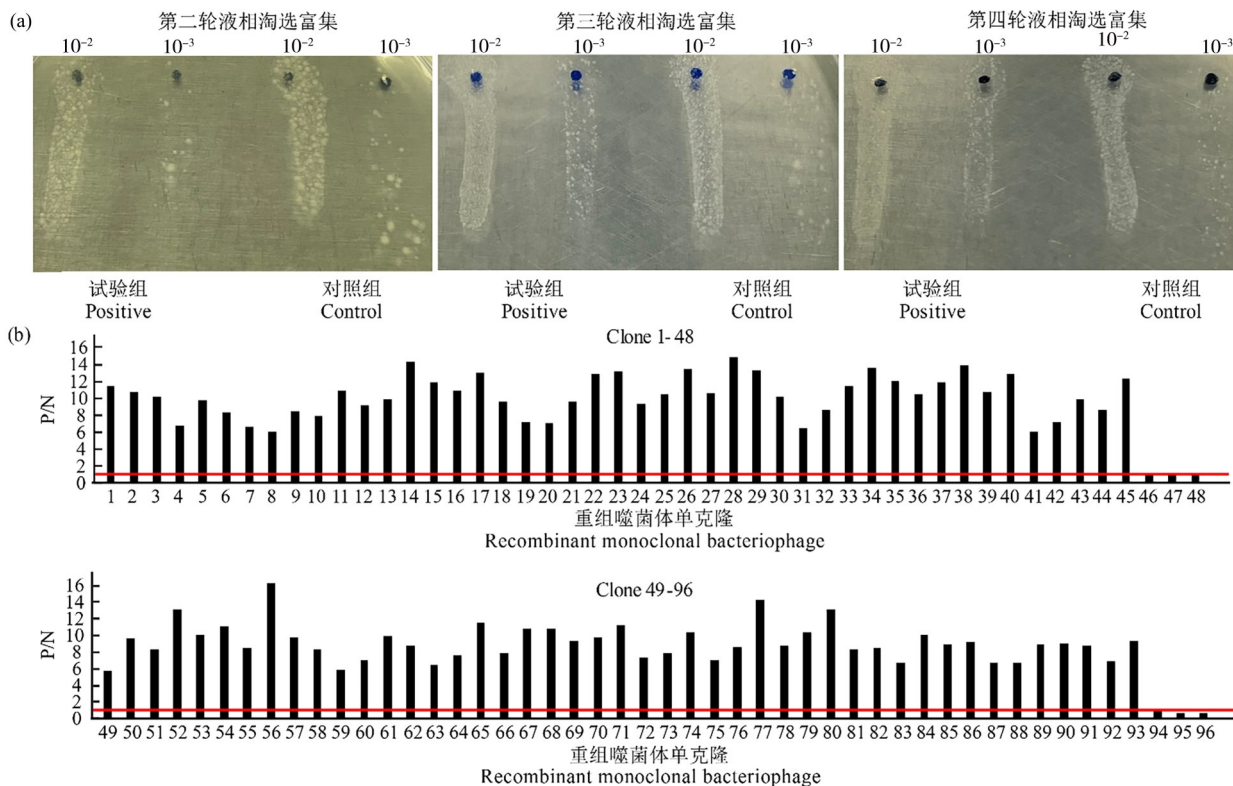
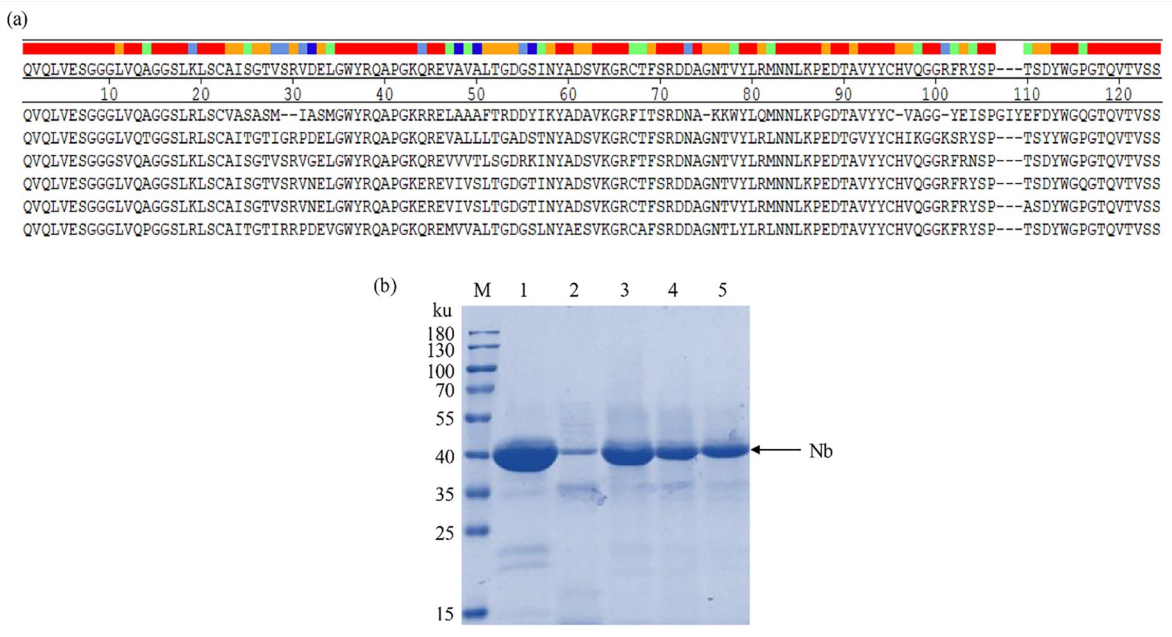


图 4 chIL-18 特异性噬菌体淘选与富集

Fig. 4 Panning and enrichment of chIL-18 specific phage



(a)Nb氨基酸序列分析;(b)Nb表达结果(M:蛋白质分子质量标准;泳道1~5:筛选的5株Nb,数字为Nb编号)。
(a) Amino acid sequence analysis of Nbs;(b) Expression results of Nbs (M: Protein marker; Lanes 1-5: 5 screened Nbs)。

图5 chIL-18重组Nb序列分析及表达

Fig. 5 Sequence analysis and expression of chIL-18 recombinant Nbs

2.6 chIL-18重组Nb的反应活性检测

chIL-18真核表达蛋白包被ELISA酶标板,同时设置鸡IL-6蛋白阴性对照及空白对照,加入纯化

的5株Nb进行ELISA检测。结果显示(图6):根据 $P/N \geq 2.1$ 判断为阳性,确定5株Nb(Nb1、Nb2、Nb3、Nb4和Nb5)与chIL-18蛋白均能反应。

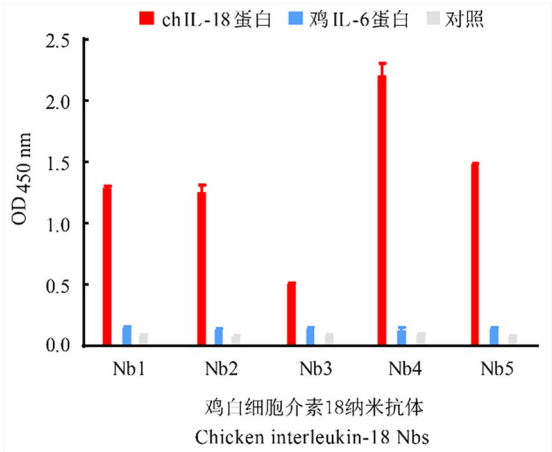


图6 ELISA验证chIL-18重组Nb反应活性

Fig. 6 The reactivity of chIL-18 recombinant Nbs identified by ELISA

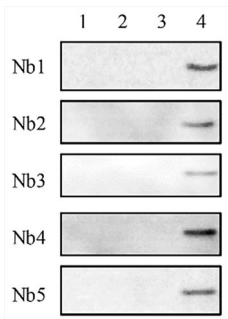
2.7 chIL-18重组Nb的特异性检测

纯化chIL-18真核表达蛋白,以鸡IL-6蛋白、鸡IL-8蛋白和鸡IL-10蛋白为阴性对照,以纯化的5株Nb作为一抗进行孵育。Western blot检测结果显示,5株Nb均与chIL-18真核表达蛋白发生特异

性反应,与阴性对照不反应(图7)。

2.8 chIL-18重组Nb的结合活性检测

利用ELISA方法验证5株Nb与chIL-18真核表达蛋白的结合活性,计算 EC_{50} 值。结果显示,Nb1结合活性最好,达到9.1 pg/mL,其他Nb结合活性



1: 鸡 IL-6 蛋白; 2: 鸡 IL-8 蛋白; 3: 鸡 IL-10 蛋白; 4: chIL-18 蛋白。
1: Chicken IL -6 protein; 2: Chicken IL -8 protein; 3: Chicken IL -10 protein; 4: Chicken IL -18 protein.

图 7 chIL-18 重组 Nb 特异性检测

Fig. 7 Specificity detection of chIL-18 recombinant Nbs

为 16.73~35.12 pg/mL(表 2)。

2.9 chIL-18 Nb1 的初步应用评价

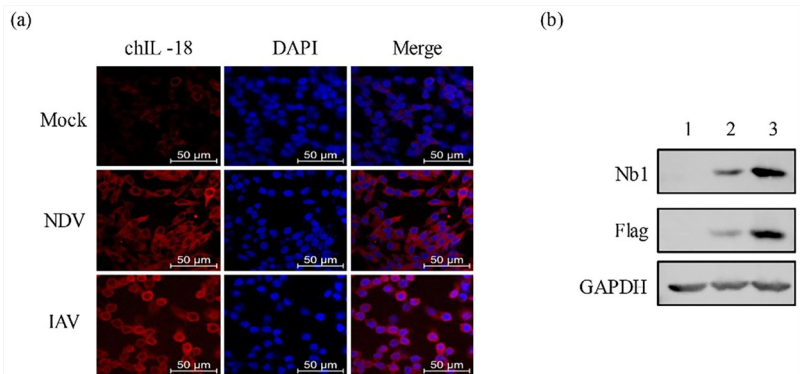
利用 IFA 和 Western blot 方法验证 Nb1 是否能

表 2 chIL-18 重组 Nb 结合活性检测

Table 2 Binding activity detection of chIL-18 recombinant Nbs

纳米抗体 Nanobody	EC ₅₀ / (pg/mL)
Nb1	9.10
Nb2	22.56
Nb3	16.73
Nb4	35.12
Nb5	32.99

够用于 chIL-18 蛋白的间接免疫荧光和蛋白免疫印迹试验。结果显示,病毒感染后 DF1 细胞中 chIL-18 表达增加,Nb1 代表的荧光强度增加;随着蛋白含量的增加,Nb1 代表的显色条带强度也随之增加(图 8)。



(a) IFA 检测 Nb1 识别病毒感染细胞中 chIL-18 蛋白结果; (b) Nb1 识别变性 chIL-18 蛋白结果(1: 空载体; 2: 1 μg chIL-18 质粒; 3: 2 μg chIL-18 质粒)。
(a) Nb1 recognized chIL-18 protein induced by viruses infection; (b) Nb1 identified denatured chIL-18 protein, (Lane 1: empty vector, Lane 2: 1 μg chIL-18 plasmid, Lane 3: 2 μg chIL-18 plasmid).

图 8 chIL-18 Nb1 初步应用评价

Fig. 8 Preliminary application evaluation of chIL-18 Nb1

3 讨论

现有研究中,李行^[7]利用传统杂交瘤技术制备的 chIL-18 单克隆抗体并未有特异性、亲和力等抗体特性评价,仅有 Western blot 的初步应用,证明该单克隆抗体能识别变性后的 chIL-18。郑孟加等^[8]制备出 2 株识别 chIL-18 不同表位的单克隆抗体,其中 Kd 最小的为 4.4×10^{-12} mol/L,但缺乏 chIL-18 单克隆抗体的应用评价数据。本研究筛选获得 5 株序列不同的 Nb,其中 Nb1 的各项特性均表现优异,而在结合活性上更展示出了显著优势,Nb1 的

EC₅₀ 为 9.1 pg/mL。但本研究未对 Nb 的亲和力进行评价。另外,本研究还采用病毒感染的 DF1 细胞和转染 chIL-18 重组质粒的 293T 细胞对 Nb1 进行初步应用评价,表明 Nb1 能满足 Western blot 和 IFA 等试验抗体应用要求。但未对 Nb1 进行临床样品的应用评价,故而 Nb1 在临床使用中的表现情况还有待考察。此外,本研究未将 Nb1 与以往研究中的 chIL-18 抗体进行生物特性的横向对比,因此目前仅能在试验数据上进行初步对比,而无法在本质上说明各抗体间的优劣。

噬菌体展示技术的淘选策略主要分为固相和

液相2种。在固相淘选中,靶标抗原被固定在酶标板上与特异性噬菌体结合,这种方式会导致靶标抗原的部分抗体结合表位被遮盖。本研究利用液相淘选技术,将生物素标记的靶标抗原和噬菌体抗体文库一同孵育,通过链霉亲和素磁珠结合靶标抗原的生物素标签,富集被捕获的抗原噬菌体结合物^[17]。理论上,该淘选方法弥补了固相淘选方法部分遮盖靶标抗原表位的缺点,能够对靶标抗原表位进行充分的暴露,并且由于磁珠的表面积更大,液相淘选技术还能大幅度提高筛选到的抗体数量。然而本研究筛选到并能成功重组表达的chIL-18 Nb仅在氨基酸水平上存在不同,识别的均为同一个chIL-18表位,表位多样性不足。对此存在三方面猜想:首先,chIL-18蛋白分子量小导致抗体可识别的表位少,而筛选到的抗体所识别的表位是chIL-18的优势表位,且识别优势表位的抗体相较于其他抗体具有更高亲和力,在四轮液相淘选压力下,亲和力不足的抗体被洗涤脱落,最终仅留下识别优势表位的抗体;其次,筛选到的可能识别chIL-18不同表位的抗体无法通过哺乳动物真核表达系统表达,从而导致了部分抗体的丢失;最后,为节约成本而选用chIL-18原核表达蛋白进行淘选,可能会由于原核表达蛋白本身蛋白修饰不完整,导致所能筛选到的抗体多样性减少。

综上所述,本研究采用纯化的chIL-18真核表达蛋白多次免疫羊驼,构建chIL-18噬菌体展示文库,利用液相淘选方法获得5株Nb。最终鉴定发现Nb1具有较强的反应活性、特异性和结合活性,适用于多种实验室应用场景。因此,本研究能够为后续家禽免疫研究、chIL-18定量检测试剂盒和治疗药物的研发提供生物材料支持。

参考文献 References

- [1] 李宏梅. 重组鸡白细胞介素18生物学活性检测及其对鸡免疫影响的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006
Li H M. Study on the biological activities assay of recombined chicken interleukin-18 and its effect on chicken immunity[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2006 (in Chinese)
- [2] 胡敬东. 鸡白细胞介素18成熟蛋白基因克隆与表达的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2004
Hu J D. Study on cloning and expression of chicken interleukin 18 mature protein gene [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2004 (in Chinese)
- [3] Wang Z N, Wang Y, Sun C, Zhao X H, Sun M, Gao X Y, Jia F T, Zhang T Y, Ge C B, Zhang X, Zhang M L, Yang G L, Wang J Z, Huang H B, Shi C W, Yang W T, Cao X, Wang N, Zeng Y, Wang C F, Jiang Y L. Protection against genotype VII Newcastle disease virus challenge by a minicircle DNA vaccine coexpressing F protein and chicken IL-18 adjuvant [J]. *Veterinary Microbiology*, 2022, 270: 109474
- [4] Chen H Y, Shang Y H, Yao H X, Cui B A, Zhang H Y, Wang Z X, Wang Y D, Chao A J, Duan T Y. Immune responses of chickens inoculated with a recombinant fowlpox vaccine coexpressing HA of H9N2 avian influenza virus and chicken IL-18[J]. *Antiviral Research*, 2011, 91(1): 50-56
- [5] Eldaghayes I, Rothwell L, Skinner M, Dayhum A, Kaiser P. Efficacy of fowlpox virus vector vaccine expressing VP2 and chicken interleukin-18 in the protection against infectious bursal disease virus[J]. *Vaccines*, 2023, 11(11): 1716
- [6] Zhang Z, Huang H B, Jiang Y L, Liu J, Gao X, Liu Y, Yang W T, Shi C W, Wang D, Wang J Z, Kang Y H, Wang C F, Yang G L. Immunological evaluation of invasive *Lactobacillus plantarum* co-expressing EtMIC2 and chicken interleukin-18 against *Eimeria tenella*[J]. *Parasitology Research*, 2020, 119(9): 2885-2895
- [7] 李行. 稳定表达鸡IL-18蛋白细胞系的建立及鸡IL-18单克隆抗体的制备[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012
Li H. Stable expression of chicken interleukin-18 in a eukaryotic system and generation of monoclonal antibodies against chicken interleukin-18[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2012 (in Chinese)
- [8] 郑孟加, 马萌, 王永强, 高丽, 曹红, 李淑芹, 李晓齐, 郑世军. 鸡白细胞介素18单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(9): 29-33
Zheng M J, Ma M, Wang Y Q, Gao L, Cao H, Li S Q, Li X Q, Zheng S J. Preparation and identification of monoclonal antibodies against chIL-18[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2022, 58(9): 29-33
- [9] Liu M, Li L, Jin D, Liu Y Z. Nanobody-a versatile tool for cancer diagnosis and therapeutics[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2021, 13(4): e1697
- [10] Pothin E, Lesuisse D, Lafaye P. Brain delivery of single-domain antibodies: A focus on VHH and VNAR[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(10)
- [11] 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
- [12] Jindal V, Khoury J, Gupta R, Jaimesi I. Current status of chimeric antigen receptor T-cell therapy in multiple myeloma [J]. *American Journal of Clinical Oncology*, 2020, 43(5): 371-377
- [13] De Vos J, Devoogdt N, Lahoutte T, Muyldermans S. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical *in vivo* molecular imaging applications: Adjusting the bullet to its target [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2013, 13(8): 1149-1160
- [14] Bathula N V, Bommadevara H, Hayes J M. Nanobodies: The future of antibody-based immune therapeutics [J]. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2021, 36(2): 109-122
- [15] Ji Y H, Liu T, Du Y Y, Cui X L, Yu Q Z, Wang Z X, Zhang J J, Li Y, Zhu Q Y. A novel genotype VII Newcastle disease virus vaccine candidate generated by mutation in the L and F genes confers improved protection in chickens[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 216: 99-106
- [16] 王丹, 吉艳红, 梁世蕊, 杨洁, 朱启运. 新型鹅星状病毒ORF2蛋白纳米抗体的筛选及鉴定[J]. 中国农业科学, 2023, 56(24): 4956-4966

Wang D, Ji Y H, Liang S R, Yang J, Zhu Q Y. Screening and identification of nanobodies against novel goose astrovirus ORF2 protein [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56(24): 4956-4966

[17] Zhang Y. Evolution of phage display libraries for therapeutic antibody discovery[J]. *mAbs*, 2023, 15(1): 2213793

责任编辑:秦梅



第一作者简介：甘靖凡，硕士研究生，就读于华南农业大学兽医学院。参与国家重点研发项目（2022YFD1801003）。2023—2024 年度获“中国农业科学院兰州兽医研究所“大华农”奖学金评选三等奖”。



通讯作者简介：徐帅，副研究员，硕士生导师，中国农业科学院兰州兽医研究所动物病毒分子生态学创新团队骨干。主要从事动物流感病毒与宿主相互作用研究。主持国家自然科学基金面上/青年项目、甘肃省联合科研基金项目、中国农业科学院“青年创新专项”等项目。以第一或通讯作者在国际知名期刊 *PNAS*、*Autophagy*、*PLoS Pathogens*、*Emerging Microbes Infections*、*Journal of Virology* 等发表研究性论文十余篇。