



彭元昊,王维,韩海棠,张然,赵要风. 基于基因编辑动物模型筛选纳米抗体的研究进展[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(10): 214-229.
PENG Yuanhao, WANG Wei, HAN Haitang, ZHANG Ran, ZHAO Yaofeng. Advances in nanobody screening based on gene-edited animal models[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(10): 214-229.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.10.16

基于基因编辑动物模型筛选纳米抗体的研究进展

彭元昊 王 维 韩海棠 张 然 赵要风*

(中国农业大学 生物学院, 北京 100193)

摘 要 为深入了解基于基因编辑动物筛选纳米抗体(nanobodies, Nbs)的动物模型构建方法和纳米抗体展示筛选策略及应用现状,以“纳米抗体”、“重链抗体”和“基因编辑”等作为关键词,在Pubmed、Web of Science等数据库中检索1970—2025年已发表的相关文献,从纳米抗体的结构特点、文库构建、展示筛选、生物应用和基因编辑动物模型等方面进行系统分析和总结,并对基因编辑策略优化及未来纳米抗体的研发应用进行展望。结果表明:1)与传统抗体相比,纳米抗体具备分子量小、结构稳定、特异性高、渗透性强和生产成本低等优势。2)可以通过构建纳米抗体文库(免疫文库、天然文库与合成文库)并结合噬菌体、酵母和核糖体展示等技术筛选获得纳米抗体。3)纳米抗体已在病原体痕量检测、荧光示踪成像以及肿瘤治疗等领域广泛应用,具备良好的产业化潜力。4)利用异源、内源及人源化基因编辑动物模型筛选纳米抗体,可有效替代驼科动物或软骨鱼类,解决饲养成本高及免疫周期长的限制。综上,通过基因编辑动物模型筛选纳米抗体不仅开辟了低成本小动物筛选模型的新路径,也为跨物种人源化纳米抗体的高效制备及筛选提供了可行方案。

关键词 纳米抗体; 文库构建; 展示筛选; 生物应用; 基因编辑动物模型

中图分类号 Q74

文章编号 1007-4333(2025)10-0214-16

文献标志码 A

Advances in nanobody screening based on gene-edited animal models

PENG Yuanhao, WANG Wei, HAN Haitang, ZHANG Ran, ZHAO Yaofeng*

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract To gain an in-depth understanding of the construction methods of animal models for nanobody screening based on gene-edited animal models, the strategies for nanobody display screening and the current status of nanobody applications, this study is conducted by taking “nanobody”, “heavy-chain-only antibody” and “gene editing” as keywords to search papers published in PubMed and Web of Science (1970-2025). The review systematically analyzes and summarizes the structural characteristics of nanobodies, library construction, display-based screening, biological applications, and gene-edited animal models. The optimization of gene-editing strategies and prospects for nanobody development and application are explored. The results indicate that: 1) Compared with conventional antibodies, nanobodies have advantages including small molecular weight, high structural stability, strong antigen-binding specificity, enhanced tissue penetration, and low production cost. 2) Nanobodies can be efficiently obtained through the construction of nanobody libraries (immune, naïve, and synthetic libraries) combined with display technologies such as phage, yeast, and ribosome display. 3) Nanobodies have been widely applied in pathogen trace detection, fluorescent imaging, and tumor therapy,

收稿日期: 2025-08-04

基金项目: 国家自然科学基金(32272839); 国家杰出青年科学基金(30725029)

第一作者: 彭元昊(ORCID: 0009-0008-3098-3163), 博士研究生, E-mail: 714006810@qq.com

通讯作者: 赵要风(ORCID: 0000-0003-4499-8610), 教授, 主要从事动物免疫遗传学研究, E-mail: yaofengzhao@cau.edu.cn

demonstrating significant industrialization potential. 4) The use of gene-edited animal models, whether heterologous, endogenous, or humanized, for nanobody screening can effectively replace camelid or cartilaginous fish models to solve the limitations such as high breeding costs and long immunization cycles. In summary, screening nanobodies through gene-edited animal models not only opens a new avenue for establishing low-cost, small-animal screening models, but also provides a feasible approach for the efficient preparation and selection of cross-species humanized nanobodies.

Keywords nanobodies; library construction; display-based screening; biomedical applications; gene-edited animal models

纳米抗体(nanobodies, Nbs)通常特指来源于驼科动物(如骆驼、羊驼等)的重链抗体(heavy-chain-only antibody, HCAb)的可变区片段,即 VHH(variable domain of heavy chain of HCAb)。与之类似,软骨鱼体内也存在一种天然重链抗体,其可变区被称为 V-NAR(variable domain of new antigen receptor),其序列与骆驼中重链抗体的 VHH 不同,但结构和功能存在趋同进化^[1]。相较于经典抗体,纳米抗体具有分子量小(约 15 kU)、亲水性强、稳定性高、免疫原性低等优势。由于纳米抗体易于进行基因工程改造,且具备表达效率高、生产成本低等特点,其也在药物开发中展现出了更强的可及性和商业化价值^[2]。因此,开展关于纳米抗体在开发应用中如何进一步降低成本及通过小动物模型获得纳米抗体的相关研究,对推动其商品化应用具有重要意义。

目前,纳米抗体已广泛应用于生物研究、疾病诊断、肿瘤治疗等领域。2019 年,美国食品药品监督管理局(Unatied States Food and Drug Administration, FDA)批准了世界上第一个基于纳米抗体的药物‘Caplacizumab’,其靶向血管性血友病因子的 A1 结构域,用于治疗获得性血栓性血小板减少性紫癜(acquired thrombotic thrombocytopenic purpura, aTTP)。随后不久,用于治疗类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的纳米抗体药物‘Ozoralizumab’也被批准使用,目前仍有多款纳米抗体药物正处于不同临床试验阶段^[3-5]。虽然纳米抗体已在多个领域展现出广泛的应用前景,但是其筛选仍主要依赖驼科动物和软骨鱼类。由于此类动物饲养成本及免疫成本均较高,极大地制约了纳米抗体的规模化开发及广泛应用。近年来,构建小型化的纳米抗体筛选动物模型成为研究热点,目前针对该领域综合分析的研究鲜见报道。本研究检索相关文献总结了纳米抗体的基本结构特点、文库

构建与展示筛选技术及其相关生物应用的研究进展,系统分析了基因编辑动物模型在纳米抗体筛选中的技术路径,重点梳理该领域的新型策略和最新成果,旨在阐明筛选纳米抗体的小动物模型基因编辑方法和纳米抗体的展示筛选策略以及相关应用研究现状,以期建立低成本、高通量和人源化的纳米抗体筛选平台提供参考。

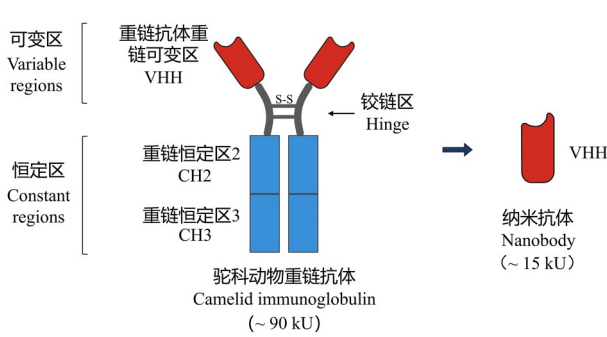
1 纳米抗体结构

免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)由 B 淋巴细胞产生,分为膜型和分泌型 2 种,其中在 B 细胞表面表达的是膜结合型免疫球蛋白(membrane-bound immunoglobulin),称为 B 细胞表面受体(B cell receptor, BCR);由 B 细胞分化的浆细胞所产生的是分泌型免疫球蛋白(secreted immunoglobulin),即抗体,这二者的区别仅在于 BCR 相比抗体在其编码序列的 3'端多了 1 段跨膜序列^[6]。经典的免疫球蛋白呈“Y”字型结构,是由 2 条相同的重链和 2 条相同的轻链通过二硫键构成的异源四聚体。其中,重链和轻链的氨基端结构域称为可变区,是免疫球蛋白识别和结合抗原的关键区域;而重链和轻链的羧基端结构域称为恒定区,负责与其他效应分子或细胞结合发挥功能。

1993 年,Hamers-Casterman 等^[7]首次报道,驼科(Camelidae)动物中存在 1 种与传统抗体不同的新型抗体,其分子量较传统抗体更小,仅约 90 kU。1995 年,Greenberg 等^[8]研究发现,铰口鲨(*Ginglymostoma cirratum*)体内也存在类似的小分子抗体,其可变区与 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)的可变区具有一定相似性,从而被命名为新抗原受体(new antigen receptor, NAR)。但在后续研究中发现其与免疫球蛋白存在类似的结构和功能,因此重新命名为免疫球蛋白新型抗原受体(immunoglobulin novel antigen receptor,

IgNAR)^[9]。这类分子量较小的抗体仅由2条相同重链构成,其天然缺失重链CH1结构域和轻链,因此被称为重链抗体。重链抗体的氨基端也被称为可变区,同样可发挥识别和结合抗原的功能^[10]。通过对重链抗体的VHH进行基因克隆和表达,获得单域抗体(single domain antibodies, sdAbs),单独便可发挥结合抗原的作用,且这种单域抗体的分子大小在纳米尺度,因此又被称为纳米抗体^[11-12](图1)。重链抗体可变区的结构与传统抗体重链可变区(variable domain of heavy chain, VH)相同,由3个决定抗原特异性的高变区,又称互补决定区(complementarity-determining region, CDR)和4个保守的框架区(framework region, FR)组成^[13-14]。

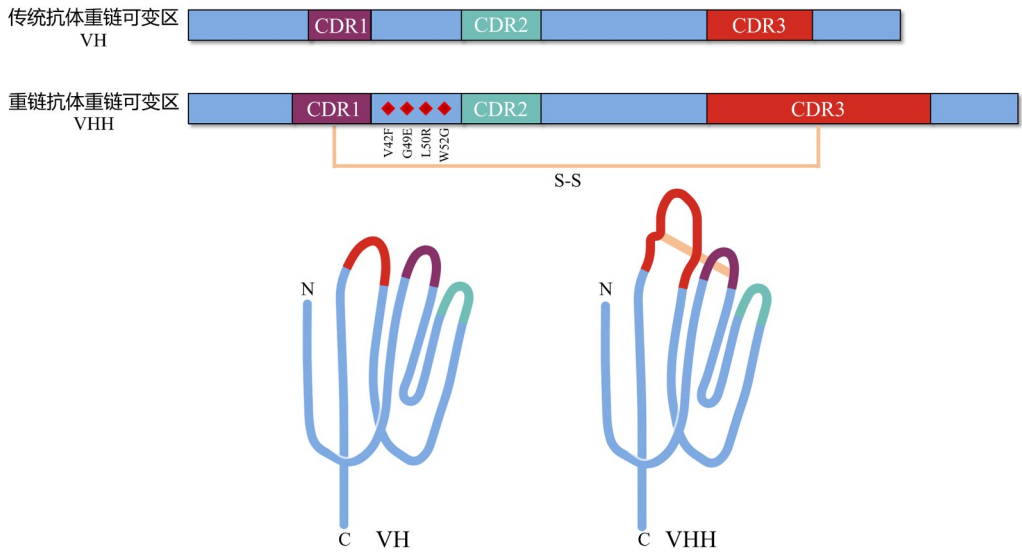
传统抗体主要依赖6个CDR区域参与抗原识别,而纳米抗体因为缺失轻链,仅依赖3个CDR区域结合抗原。相较于传统抗体,纳米抗体拥有更长的CDR1和CDR3区域,且具备更丰富的序列多样性,从而增强其与抗原结合的能力^[16]。通过分析CDR区序列信息,人和小鼠来源的抗体CDR3平均氨基酸数量为12~14个,而纳米抗体的CDR3平均氨基酸数量可达16~18个,较多的氨基酸数量使其



数据结果来源于文献[15]。
The data are from the study by [15].
图1 驼科动物重链抗体和纳米抗体结构

Fig. 1 Schematic diagram of camelid heavy chain-only antibody and nanobody structure

折叠形成1个凸起的环状,能够增加与抗原的接触面积^[17]。这一特性不仅扩展了纳米抗体的靶点识别范围,也赋予了其在新型纳米抗体药物领域开发的巨大潜力,如开发病毒检测试剂盒,酶抑制剂等^[18-19]。另外,纳米抗体的CDR1和CDR3上存在半胱氨酸残基,可以形成二硫键,降低CDR3区域的柔性,维持空间结构稳定,使其能够在更复杂的环境下发挥作用(图2)^[20]。



数据结果来源于文献[20]。
The data are from the study by [20].
图2 传统抗体VH结构和重链抗体VHH结构

Fig. 2 Schematic diagram of conventional antibody VH structure and heavy chain-only antibody VHH structure

纳米抗体除了3个CDR区发挥与抗原结合的功能外,4个FR区也帮助其维持结构的稳定性。传

统抗体重链FR2区富含疏水性氨基酸,其中V42、G49、L50和W52这4个位点在与轻链的结合中起

关键作用,这种疏水作用不仅有助于减弱蛋白整体的亲水性,而且可以帮助提高蛋白的整体稳定性(图2)。相比之下,纳米抗体的FR2区发生了由疏水性到亲水性氨基酸的突变(V42→F42、G49→E49、L50→R50、W52→G52),使得该区域由疏水性变为亲水性,从而提高了纳米抗体的水溶性^[21]。另外,亲水性增强的同时,还能减少抗体在表达和应用过程中出现错误性聚集,防止纳米抗体免疫活性降低,从而进一步提升纳米抗体的稳定性。

2 纳米抗体特点与优势

2.1 分子量小、免疫原性低

相较于传统抗体约150 kU的分子量,纳米抗体分子量仅约15 kU。而免疫原性的强弱与蛋白分子量大小存在相关性,较小的分子量其免疫原性一般也较弱^[22-23]。同时,纳米抗体的VHH与人类抗体的VH保守FR区具有较高同源性^[24],相比之下,传统的鼠源或兔源抗体往往需进行人源化处理以降低其免疫原性,这一特性进一步导致纳米抗体免疫原性更低,从而降低其在治疗疾病中引发不良反应的风险。有多项研究证实,接种纳米抗体未能引起免疫应答,这证明了纳米抗体对人体的低免疫原性^[25-27]。此外,由于纳米抗体仅由重链抗体可变区组成,不包括恒定区,所以可以偶联人的免疫球蛋白恒定区将其人源化,进一步降低纳米抗体的免疫原性,使其在人体疾病治疗中的副作用大幅降低^[28]。

2.2 稳定性高、水溶性强

纳米抗体通过其CDR1、CDR3和FR2上存在的半胱氨酸残基,可以形成链间二硫键,从而帮助其获得较高的稳定性,使其可以耐受温度、有机溶剂、酸碱环境等多种不利因素的影响^[29-30]。另外,纳米抗体FR2结构域部分保守的疏水性氨基酸残基突变为亲水性氨基酸残基,这增加了纳米抗体的水溶性,使其更不容易发生抗体聚集^[31]。已有相关研究发现,将开发的纳米抗体进行5轮反复冻融,或者在室温(25℃)下存放2个月,甚至在70℃下暴露1h后,纳米抗体仍然可以与目标抗原结合,结合活性达100%^[32-33]。部分纳米抗体也可以在极端酸碱环境下发挥作用,Tu等^[34]所开发的检测牛奶中李斯特菌的纳米抗体‘L5-78’在pH 2~6条件下孵育过夜,仍能保持70%的活性;并且在尿素浓度为4 mol/L

及以下时,该抗体的检测灵敏度仍不受影响。

2.3 特异性强、亲和力高

纳米抗体主要依靠CDR3与抗原识别并结合,其CDR3的氨基酸数量较传统抗体更多,较多的氨基酸帮助CDR3形成较长的指状凸环,允许纳米抗体识别抗原表面的狭小空隙以及更深层的表位,从而使纳米抗体具有更强的抗原结合特异性^[13]。此外,纳米抗体虽然较传统抗体只有单独的VHH与抗原结合,但其亲和力仍可以达到与传统抗体相近的纳摩尔(10^{-9} mol/L)级别。并且,纳米抗体因其分子量较小的优势,可以将2个或多个不同的纳米抗体偶联在一起,以多价形式生产,从而实现抗体的多价性、多特异性和多竞争性,进一步提高了纳米抗体对抗原的亲和力和灵敏度^[35]。

2.4 组织渗透性强、半衰期短

纳米抗体分子量和体积较小,直径仅约2.5 nm,长度仅约4.0 nm,使其组织穿透性较强,可以作为药物或者示踪剂穿过血脑屏障^[36-38]。同时,较小的体积使得纳米抗体的半衰期较短,从而使纳米抗体药物或示踪剂在到达目标抗原位置并发挥相关作用后迅速代谢,减少药物在体内的残留,从而降低药物带来的副作用,进一步提高了纳米抗体作为示踪剂和药物递送剂的优势^[39]。

2.5 生产成本低

传统的单克隆抗体因为其复杂的结构,需要依赖真核表达系统对其进行翻译后修饰才可使蛋白正确折叠,形成功能正常的抗体。整个过程需要复杂的步骤,且难度较大、产量较低、成本较高。纳米抗体因其分子量小,蛋白结构简单,仅依靠原核表达系统便可进行功能性生产,与真核表达相比,原核表达工艺相对简单,便于在工厂内进行大规模生产,并且后续对纳米抗体的修饰和纯化也相对简单^[40]。因此,纳米抗体的工业化生产成本更低。

3 纳米抗体文库构建与展示筛选

3.1 纳米抗体文库

为了获得纳米抗体,首先需要构建纳米抗体文库,进而借助多种展示筛选手段获得纳米抗体序列,最后采用不同的表达系统生产纳米抗体。目前,构建纳米抗体文库的类型主要有3种:免疫文库、天然文库和合成文库^[41]。

3.1.1 免疫文库

免疫文库是通过使用特异性抗原对骆驼科动物或鲨鱼科动物进行多轮免疫,抗原进入免疫动物体内后持续刺激B细胞,诱导其增殖分化为浆细胞,从而产生具有高亲和力的抗原特异性抗体;随后从外周血中分离淋巴细胞,提取RNA并反转录为cDNA,利用巢式PCR扩增VHH序列最终完成免疫文库的构建。通常考虑到动物的个体多样性,会通过增加免疫动物的数量来提高文库的序列多样性,进而提高获得抗原特异性纳米抗体的可能性^[17]。因此,对比其他文库,免疫文库的序列特异性更高,获得高亲和力纳米抗体的可能性也更高。但是免疫文库也存在许多弊端,例如免疫周期长,一般达到较高免疫反应水平需要4~6周;骆驼或鲨鱼体型较大,免疫操作困难;需要的抗原量较大,导致免疫成本增加^[2]。

3.1.2 天然文库

天然文库主要从未免疫动物的外周血或淋巴组织中获得,其主要依赖于免疫系统天然形成的、广泛的VHH序列多样性,且理论上天然文库可以产生针对各种抗原的纳米抗体。天然文库的构建同样需从骆驼科或者鲨鱼科动物的外周血获得淋巴细胞,提取RNA并反转录为cDNA扩增VHH片段,但无需进行免疫。因为天然文库无需免疫,所以其更适合免疫原性低的抗原(如RNA或DNA等不能顺利引发免疫反应的抗原)或者本身危害性极大且可能造成环境污染的毒性抗原的筛选。另外,由于无需免疫,文库构建时间仅需2周左右,极大地缩短了生产周期,可降低成本^[42]。但是,天然文库利用的是动物天然产生的抗体多样性,所以需要大量的淋巴细胞来增加VHH序列多样性,以避免因淋巴细胞多样性较少,导致所构建的天然文库的多样性较低。已有研究指出,美洲驼(*Lama glama*)血液中淋巴细胞数约为 10^6 个/mL,且其中表达重链抗体的B细胞只占一小部分,所以需要采集 >10 L的血液才可构建 10^{10} 级别库容的天然文库^[43-44]。

3.1.3 合成文库

无论是传统抗体还是纳米抗体,抗体的多样性都与动物天然形成的抗体库大小关联密切,并且后续抗体还会经过配对、折叠、修饰进一步增加其多样性^[41]。合成文库就是在体外对这一过程进行模

拟,首先保持抗体共同结构如保守的FR区不变,保证纳米抗体结构的完整性,进而利用简并密码子对某些寡核苷酸进行随机改变,增删VHH中CDR区的核苷酸多样性和序列长度,最终构建针对特定抗原的纳米抗体合成文库。人工合成文库可以快速生成大量特异性纳米抗体,并且可以根据需要定制化调整特异性和亲和力^[45]。

3.2 纳米抗体文库展示筛选技术

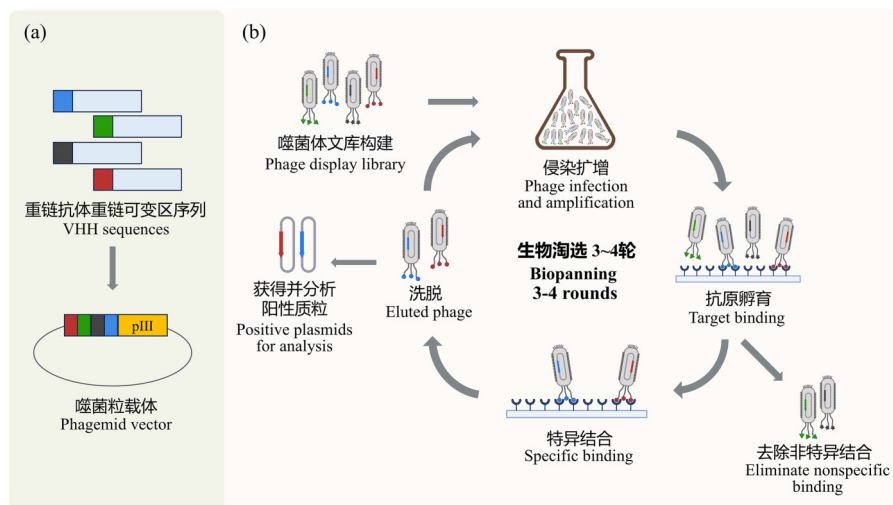
3.2.1 噬菌体展示筛选

噬菌体展示(phage display)技术最早由Smith等^[46]提出,噬菌体展示主要是将抗体片段(如VHH)编码序列插入到噬菌体衣壳蛋白基因中,使抗体序列与pIII蛋白融合进而展示在噬菌体表面,实现表型与基因型的物理连接。噬菌体是噬菌体展示筛选的关键,主要包括M13丝状噬菌体、T4噬菌体和 λ 噬菌体,其中M13噬菌体是噬菌体展示技术中最常用的载体之一^[47]。M13噬菌体可以将外源DNA长片段整合到其基因组内,与编码外壳蛋白G3P的基因相融合,使外源蛋白展示在噬菌体表面^[48]。

在获得可变区文库后,将其克隆至噬菌体载体,随后将载体电转入大肠杆菌感受态细胞中获得初级菌库。由于噬菌体载体缺少噬菌体的部分功能基因,只能复制无法侵染,所以需要另外添加辅助噬菌体对其进行救援,最常用的辅助噬菌体是M13KO7,该辅助噬菌体携带噬菌体的其他所有结构蛋白,如pII、pV、pVIII等,可帮助组装完整可侵染的噬菌体,从而获得噬菌体展示文库。随后在固相载体上固定靶标抗原,利用噬菌体所展示出的抗体与之结合,然后利用极性洗脱和竞争性洗脱手段进行多轮筛选,最终富集到特异性结合靶标抗原的高亲和力噬菌体,进一步对噬菌体克隆进行测序即可获得相应纳米抗体序列(图3)。

3.2.2 酵母展示筛选

纳米抗体展示筛选相关技术主要依赖原核表达系统对纳米抗体进行表达展示,虽然对于大多数纳米抗体来说无需翻译后修饰,但仍有部分特殊的纳米抗体需要真核表达系统对其进行正确折叠才可以发挥功能,进而被成功筛选出来。酵母展示就是利用可以进行真核表达的酵母与VHH结合,使其翻译后表达更接近天然来源的蛋白,尤其适用于功能复杂的VHH表达^[50]。



数据结果来源于文献[49]。

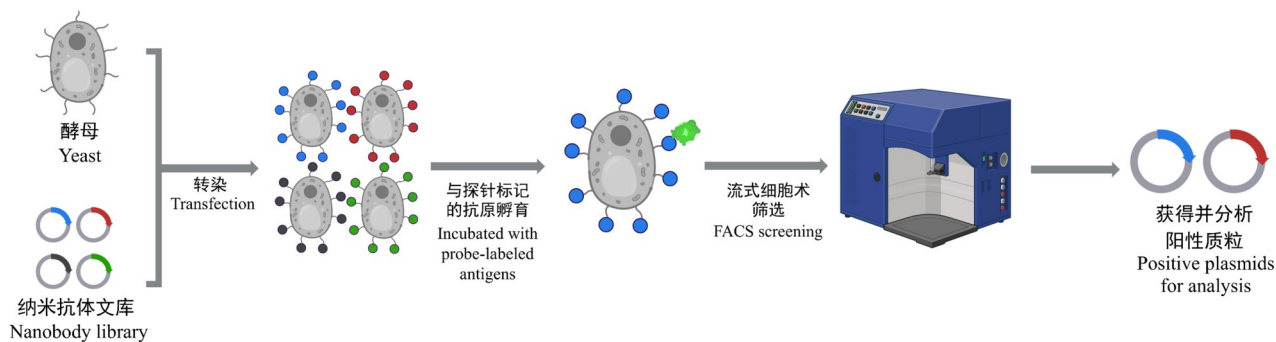
The data are from the study by [49].

图 3 噬菌体展示筛选

Fig. 3 Phage display screening

常用于纳米抗体展示的酵母主要包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*), 其中酿酒酵母是应用最广泛的物种^[51]。该系统利用酿酒酵母细胞表面 α -凝集素粘附受体进行蛋白展示, 该受体由 2 种分泌蛋白 Aga1p 和 Aga2p 组成, Aga1p 和 Aga2p 之间通过二硫键结合。通过将需要展示的抗体融合在 Aga2p 羧基端, 即可

将抗体固定于细胞表面, 实现抗体的展示。筛选过程中通过磁性细胞分选 (magnetic cell sorting, MACS) 可有效剔除非特异性结合背景, 流式细胞术 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 则可以实现对高亲和力克隆的精细选择。通过几轮磁选和荧光基团标记筛选, 即可获得高亲和力、高特异性纳米抗体序列^[52] (图 4)。



数据结果来源于文献[53]。

The data are from the study by [53].

图 4 酵母展示筛选

Fig. 4 Yeast display screening

虽然酵母展示可以帮助蛋白进行正确的折叠和翻译后修饰, 但是也存在发生错误折叠而导致抗体功能丧失的问题^[50]。另外, 纳米抗体在酵母展示过程中经历翻译后修饰可能会发生 N-糖基化, 这可

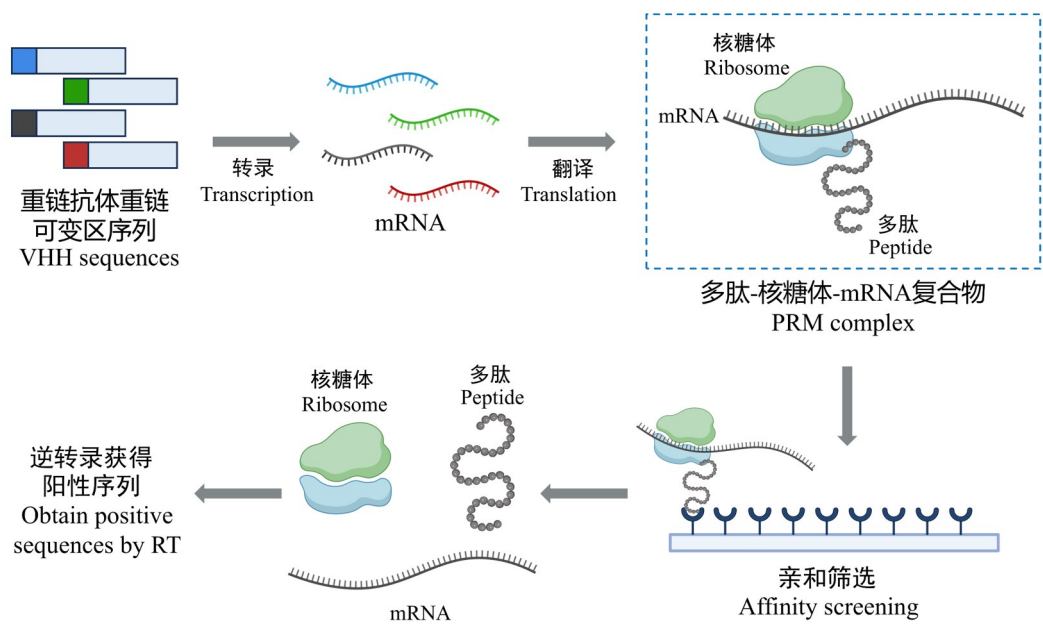
能会降低纳米抗体对抗原的结合能力, 并增加免疫原性^[54]。

3.2.3 核糖体展示筛选

核糖体展示是一种完全无细胞的体外展示技

术,通过形成多肽-核糖体-mRNA (peptide ribosome mRNA, PRM)三元复合物,实现基因型与表型的直接耦合。该系统主要由DNA文库的构建、体外转录和翻译、mRNA的筛选和恢复以及基于PCR扩增的再筛选组成^[55]。核糖体展示筛选基本原理是利用缺乏终止密码子的mRNA,在

无细胞翻译体系中合成抗体多肽,使其与翻译中未解离的核糖体及mRNA共同形成稳定的PRM复合物,随后与固相结合抗原完成亲和筛选,多轮循环后,结合的肽链被回收,通过将其mRNA逆转录和PCR扩增,获得高亲和力的纳米抗体序列^[56](图5)。



数据结果来源于文献[55]。
The data are from the study by [55].

图5 核糖体展示筛选

Fig. 5 Ribosome display screening

该系统省略了细胞培养和转染步骤,避免了细胞转化带来的限制,可缩短高亲和力纳米抗体的筛选周期。且核糖体展示系统文库容量极大,可达 10^{12} 及以上,远超酵母展示($10^6\sim10^7$),进而增加筛选到阳性纳米抗体的可能性^[57]。此外,该系统在体外环境中进行,便于引入定向或随机突变,提高纳米抗体的多样性^[58]。不过,核糖体展示筛选仍面临一些挑战,主要包括PRM复合物的不稳定性以及RNase污染等,因此,试验必须在RNase-free环境中进行^[59]。

3.2.4 哺乳动物细胞展示筛选

哺乳动物细胞展示可以利用高效的蛋白折叠机制对抗体结构进行天然正确的折叠,并提供复杂的N型和O型糖基化等多种翻译后加工功能,使展示的抗体具备更好的溶解度和稳定性,并在哺乳动物细胞中稳定且高水平的表达分泌,进而在后续筛选过程中更好地发挥功能^[60]。哺乳动物细胞展示

筛选流程与酵母展示筛选类似,首先将目的片段与载体骨架连接并转入表达细胞系,构建哺乳动物细胞表面展示的纳米抗体库;随后采用FACS对细胞文库进行多轮筛选和富集,最终得到与靶标蛋白特异性结合且亲和力较高的抗体^[61]。

然而,哺乳动物细胞展示的最大缺陷是其展示库容仅约 10^8 ,难以构建与噬菌体展示相当的库容^[60]。另外,在转染过程中可能出现多个纳米抗体编码基因进入单个细胞,对后续筛选造成干扰。总之,哺乳动物细胞展示筛选涉及复杂的技术、较长的时间以及较高的筛选成本,在一定程度上限制了该技术的广泛应用。

3.2.5 植物展示表达系统

植物展示表达系统是利用植物作为表达工具使纳米抗体在植物中展示与表达,其不仅易于转化和规模化生产,而且也可以进行一定的翻译后修

饰。当前,纳米抗体在植物中展示表达系统主要包括植物病毒展示系统和植物瞬时或稳定表达系统。植物病毒展示系统是通过将 VHH 基因融合至植物病毒衣壳蛋白中,如马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX)或烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV),再借助农杆菌介导的病毒感染在植物体内组装出展示 VHH 的病毒样颗粒(viral nanoparticles, VNP),从而实现纳米抗体展示以及与靶标结合筛选。Merwaiss 等^[62]构建了 PVX-VHH 植物系统,并成功在本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)中表达针对 SARS-CoV-2 抗原的纳米抗体。植物瞬时或稳定表达系统常利用农杆菌介导将 VHH 或 VHH-Fc 导入植物中进行过表达,不仅能在短期内高效获得可溶性纳米抗体,还可通过稳定的转基因技术实现长期表达,用于功能验证、抗病性评价及下游应用开发。Pitino 等^[63]通过在烟草中瞬时表达,成功获取了针对 SARS-CoV-2 刺突蛋白的 VHH 纳米抗体,且具备相应功效。

4 纳米抗体的应用

4.1 生物检测

目前市场上的疾病诊断试剂盒都是依赖抗原抗体反应,相比于这些试剂盒使用的传统抗体,纳米抗体较高的稳定性和特异性可以更有效地检测抗原并开发相关试剂盒。Sun 等^[64]开发了 1 种基于竞争性酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)的纳米抗体,将其与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)偶联,可同时检测 1 型和 2 型 PRRSV,具有较高的灵敏性、特异性。大肠杆菌 O157:H7 是一种主要的食源性病原体,即便在极低浓度下也可能引发严重疾病^[65]。He 等^[66]筛选获得了多种针对 O157:H7 的纳米抗体,并在实际食品基质中(如牛肉末、橙汁和牛奶)成功检测到了低至 5 CFU/mL 的人工添加菌量。Li 等^[67]利用 AlphaFold 模型将已有纳米抗体修饰更改,转化为可与恩诺沙星结合的高亲和力纳米抗体,其平衡解离常数达到 10^{-9} mol/L 级别,成功实现在 20~30 min 对海水鱼体内恩诺沙星的检测,其检出限(limit of detection, LOD)低至 59.97 $\mu\text{g/kg}$ 。

4.2 生物成像

由于纳米抗体具备组织渗透性强、半衰期短等优点,适合偶联一些特定的小分子或化学试剂在体内对病灶部位进行生物成像,有助于更好地追踪人体疾病的病理变化从而辅助治疗。Lauwers 等^[68]开发了一种靶向 CD163 的纳米抗体示踪剂,可以利用 PET/CT(positron emission tomography/computed tomography)或 SPECT/CT(single-photon emission computed tomography/computed tomography)对 CD163⁺巨噬细胞特异性成像,区分 Lewis 肺癌-卵白蛋白肿瘤模型中免疫应答和非免疫应答状态。另外, Barykina 等^[69]研究开发了一种近红外荧光纳米抗体探针(near-infrared fluorescent nanobodies, NIR-Fbs),其可以对绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)及其延伸探针(如信号传感器 GCaMP6)进行高特异性、无背景的可视化成像,并已成功在小鼠体感皮层中特异性标记表达 GCaMP6 的神经元群体,同时记录该信号,实现比值式深脑活体成像。

4.3 疾病治疗

纳米抗体已广泛应用于治疗各种生物疾病,尤其在肿瘤治疗方面。目前,胰腺癌(pancreatic adenocarcinoma, PAAD)存在预后不良、治疗方案有限等问题,间皮素(mesothelin, MSLN)是一种在 PAAD 中表达的抗原,其作为一种潜在的精准治疗靶点已有大量的研究报道, Yi 等^[70]开发了一种抗 MSLN 纳米抗体‘D3 Nb’,它具有高亲和力($KD=2.2\times 10^{-9}$ mol/L),可与 MSLN 阳性癌细胞结合,下调 PAAD 致癌的关键驱动因子纤连蛋白 1(fibronectin 1, FN1),抑制胰腺癌肿瘤发展。Yang 等^[71]利用合成纳米抗体文库筛选出一种可识别猴痘病毒(mpox virus, MPXV)的纳米抗体‘M1R-01’,其能交叉中和猴痘病毒和牛痘病毒且成功在小鼠体内治疗牛痘病毒的感染。Chen 等^[72]分离纯化得到了一种特异性识别甲型流感病毒 H7 亚型血凝素(hemagglutinin, HA)的纳米抗体‘E10’,其靶向 HA 头部的 1 个保守区域,可跨亚型在 H7N9 与人类病毒 H1N1 和 H3N2 之间产生交叉反应,提供免疫保护。

5 利用基因编辑动物模型筛选纳米抗体

5.1 异源基因编辑动物模型

在进行异源编辑筛选纳米抗体研究之前,首先

需要在细胞水平验证重链抗体的表达情况。Nguyen等^[73]将鸡卵清溶菌酶(hen-egg lysozyme, HEL)特异性的单峰驼重链抗体可变区基因片段导入不表达内源免疫球蛋白重链和轻链的小鼠骨髓瘤细胞系中,筛选获得稳定表达单峰驼重链抗体的

杂交瘤细胞。ELISA结果证实可在细胞上清液中检测到HEL特异性重链抗体,成功实现体外条件下在非驼源细胞系中驼科动物IgG2a型重链抗体的异源表达,为后续通过基因编辑获得体内可生产重链抗体动物奠定了基础(表1)。

表1 异源基因编辑动物模型在纳米抗体筛选中的应用策略
Table 1 Strategies in nanobody screening using heterologous gene-edited animal models

基因编辑策略 Gene editing strategy	构建方法 Construction method	抗体类型 Antibody type	文献 Reference
驼科动物转基因 Camelid transgenesis	将HEL特异性 $\gamma 2a$ 单峰驼重链抗体可变区基因片段导入不表达内源性免疫球蛋白重链和轻链的小鼠骨髓瘤细胞系。	重链抗体型 IgG2a	[73]
	将HEL特异性 $\gamma 2a$ 单峰驼重链抗体胚系基因转入小鼠受精卵,得到cam小鼠,再与 μ MT小鼠交配获得cam/ μ MT小鼠模型。	重链抗体型 IgG2a	[74]
	将来自多只羊驼、单峰驼和双峰驼的VHH基因整合并插入到小鼠胚胎干细胞的VH基因位点,删除小鼠内源 μ 和 $\gamma 1$ 基因中的CH1外显子,获得‘纳米小鼠’模型。	重链抗体型 IgG1	[75]
	在美洲驼IgH基因座前插入5个最常用的VHH基因,删除 μ 基因的CH1外显子,用IgG2b基因座替换IgD假基因,并在3'位点插入小鼠基因座控制区的核心元件,最后将编码美洲驼IgM的CH3、CH4、跨膜区和胞质区的外显子替换为鼠源的相应序列,将以上BAC线性化导入小鼠受精卵,得到转基因小鼠,再与 μ MT小鼠交配,获得‘驼鼠’模型。	重链抗体型 IgG2b	[76]

在上述研究基础上,Zou等^[74]将HEL特异性单峰驼的 $\gamma 2a$ 重链抗体基因转入小鼠的受精卵中,得到cam小鼠。待其发育成熟后与删除 μ 基因跨膜区从而使B细胞被阻滞至preB细胞阶段的 μ MT小鼠交配得到cam/ μ MT小鼠。该小鼠 $\gamma 2a$ 基因可以在缺乏CH1外显子的情况下完成正确拼接,并能够在血清中检测到HEL特异性重链抗体(表1)。流式细胞术检测发现,外源驼科重链抗体基因的引入可以拯救 μ MT小鼠B细胞发育阻滞问题,并将脾脏中B细胞的比例恢复至正常小鼠的1/2。综上,成功通过转基因技术在小鼠体内转入驼科动物异源重链抗体基因,进而表达相应的重链抗体,且转入的重链抗体基因可以帮助小鼠淋巴细胞的发育和B细胞的增殖,这为在小鼠体内表达重链抗体提供了理论指导。

目前,驼科动物VHH转基因小鼠已逐渐被广泛应用。Xu等^[75]将驼科动物约25 kb的VHH基因整合并插入小鼠胚胎干细胞的VH基因位点处取代鼠源VH基因。另外,模仿驼科动物重链抗体缺失CH1外显子的机制,将内源 μ 和 $\gamma 1$ 基因中CH1外显

子删除,最终获得产重链抗体的小鼠模型,称为‘纳米小鼠’(表1)。使用SARS-CoV-2的受体结构域(receptor-binding domain, RBD)以及刺突蛋白对‘纳米小鼠’进行多次免疫,成功获得2个纳米抗体‘Nb12’和‘Nb30’。‘Nb12’可以通过识别冠状病毒中高度保守的RBD区域来规避抗原漂移。‘Nb30’几乎只针对受体结构域-血管紧张素转化酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)界面,当其以同源三聚体形式表达时,可对突变病原体具有完全中和活性。这些抗体与RBD的结合能力均较强,亲和力常数低于 3×10^{-10} mol/L,已达到商业化水平。

另外,Eden等^[76]通过基因工程手段获得美洲驼免疫球蛋白重链(IgH)基因座,利用BAC重组技术结合多种优化方法获得改造后的TE03 BAC。将线性化的TE03 BAC注射到小鼠受精卵中,成功构建了一种只表达美洲驼重链抗体的转基因小鼠模型,称为‘驼鼠’(表1)。该小鼠模型只表达羊驼的IgH基因,不与小鼠Ig κ 或Ig λ 轻链结合,且能够完成有效的免疫应答。利用非复制型AAV8、SARS-CoV-

2 的受体结合域、小鼠和人的 IgE 免疫‘驼鼠’，均可产生较高水平的特异性抗体，结合杂交瘤、噬菌体展示筛选、单 B 细胞筛选技术，或将纳米抗体库直接克隆至哺乳动物细胞表达载体，能够成功筛选到抗原特异性的纳米抗体。因此，可以利用异源基因编辑小鼠模型替代骆驼科动物，打造出一个更为灵活、经济且易于操作的纳米抗体筛选平台。

5.2 内源基因编辑动物模型

除了上述通过在小鼠体内转入异源骆驼科动物重链基因来表达重链抗体的方法外，有研究尝试模仿天然重链抗体的产生机制，对小鼠等小动物模型的内源重链恒定区基因进行编辑产生重链抗体进而筛选纳米抗体。Zhang 等^[77]通过同源重组法对小鼠的胚胎干

细胞进行基因编辑，删除 $\gamma 1$ 基因的 CH1 外显子获得目的小鼠，称为 HG1 小鼠，其血清中可检测到 IgG1 型重链抗体，且自身不结合轻链（表 2）。然而，基因修饰导致 HG1 小鼠 IgG1 的表达低于野生型小鼠，其他亚型的免疫球蛋白浓度在 HG1 小鼠中则有不同程度升高。使用 OVA 对 HG1 小鼠免疫后发现，与野生型小鼠相比，HG1 小鼠的免疫反应也较弱。通过噬菌体展示筛选技术，可以从免疫小鼠中筛选到抗原特异性的纳米抗体，且能够有效地识别抗原蛋白。但是所筛选出的纳米抗体特异性较弱，亲和力较商业化抗体仍存在差距，但已证明通过基因工程改造可以实现小鼠体内功能性重链抗体表达的可行性，为纳米抗体的获取提供了新的技术路径。

表 2 内源基因编辑动物模型在纳米抗体筛选中的应用策略

Table 2 Strategies in nanobody screening using endogenous gene-edited animal models

基因编辑策略 Gene editing strategy	构建方法 Construction method	抗体类型 Antibody type	文献 Reference
小鼠内源基因编辑 Mouse endogenous gene editing	将小鼠 $\gamma 1$ 基因的 CH1 外显子删除，获得 HG1 小鼠模型。	重链抗体型 IgG1	[77]
大鼠内源基因编辑 Rat endogenous gene editing	将大鼠 $\gamma 2a$ 基因的 CH1 外显子删除，获得 HG1 大鼠模型。	重链抗体型 IgG2a	[78]

为了排除由于小鼠内源 V 基因数量较少，即小鼠 V 基因表达谱并不适用于纳米抗体的表达从而导致 HG1 小鼠在免疫时对特定抗原的免疫反应较弱这一因素。Li 等^[78]使用 V 基因丰富的大鼠作为研究对象，按照相似的基因编辑策略删除了大鼠中表达量最高的 $\gamma 2a$ 基因的 CH1 外显子，获得了可以表达 IgG2a 型重链抗体的 HG1 大鼠（表 2）。使用 OVA、KLH 和 EWL 对其进行免疫，结果与 HG1 小鼠相似，与野生型大鼠相比 HG1 大鼠免疫反应较弱。通过噬菌体展示筛选技术，成功筛选获得针对 KLH 和 EWL 的特异性纳米抗体，但其亲和力也远低于商业化单克隆抗体。该研究进一步证明了 CH1 外显子的简单去除并不能保证功能性重链抗体的大量表达。

5.3 人源化基因编辑动物模型

基于上述在小鼠中进行异源或内源基因编辑后产生重链抗体从而筛选纳米抗体的基础，已有研究报道，在小鼠体内进行了人源化重链抗体的表达。Janssens 等^[79]将羊驼的 VHH 基因和人的 DH、JH 以及删除了 CH1 外显子的 μ 或 γ 基因组

合，然后将其转入小鼠受精卵中，待发育成熟后与 μ MT 小鼠交配得到目的小鼠。由于基因转录剪接问题，该研究共产生了 3 种不同的小鼠模型：MG Δ 、G Δ 和 M Δ G Δ 小鼠。其中 MG Δ 小鼠删除了 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 基因的 CH1 外显子，理论上可以表达经典的 IgM 和重链抗体型 IgG2 和 IgG3，G Δ 小鼠删除了 μ 、 δ 以及 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 基因的 CH1 外显子，理论上只表达重链抗体型 IgG2 和 IgG3，但不表达 IgM 和 IgD；M Δ G Δ 小鼠删除了 μ 基因和 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 基因的 CH1 外显子，理论上可以表达重链抗体型 IgM、IgG2 和 IgG3。将以上 3 个小鼠模型分别与 μ MT 小鼠交配发现，M Δ G Δ / μ MT 小鼠和 G Δ / μ MT 小鼠脾脏 B 细胞的发育得到了不同程度的回补，表达的 HCAb IgM 和 IgG 可以代替小鼠的 pre-BCR 发挥作用促进 B 细胞正常发育。但是 MG Δ / μ MT 小鼠脾脏 B 细胞发育出现异常，体内几乎检测不到表达 IgG⁺ B 细胞（表 3）。后期使用不同的抗原对 G Δ / μ MT 小鼠进行免疫并筛选纳米抗体，发现 G Δ 小鼠可以利用骆驼科动物可变区基因完成 V(D)J 重组和体细胞超突变过程，而且筛选获得

的纳米抗体针对特异性抗原具备较高的亲和力(KD=1.9×10⁻⁹ mol/L)。

在已有的GΔ转基因小鼠模型基础上,Drabek等^[80]进一步构建了一种全人源化重链抗体转基因小鼠4HVVH,该小鼠模型通过用人源的4个VH基因(VH3-11、VH3-23、VH3-53和VH1-46)替代美洲驼的VHH1和VHH2序列,另外包含人的DH、JH基因和缺失CH1外显子的γ2、γ3基因,以及人免疫球蛋白3'末端的调控元件区域(3' Locus control region, 3'LCR),从而实现了人源重链抗体的有效表达。该小鼠可以正常产生人源重链抗体,并可以拯救μMT小鼠B细胞的发育(表3)。为了验证该模型筛选人源化纳米抗体的可行性,使用HA(X-31株)对4HVVH小鼠进行免疫,成功筛选得到18种可显著抑制流感病毒对MDCK细胞感染的纳米抗体。该研究不仅验证了全人源化重链抗体转基因小鼠的可行性和有效性,还建立了1套基于高通量筛选流程的纳米抗体获得平台,为后续开发全人源化治

疗性纳米抗体提供了重要基础。

大鼠也可以作为表达人源化重链抗体的模式动物,Clarke等^[81]开发了1种人源化大鼠动物模型UniRats。由于人类VH基因座过于庞大,便将包含人重链V区的BAC克隆拆分为两部分,随后通过显微注射导入受精卵中,同时敲除了大鼠自身的Igκ和Igλ基因座。为增强重链抗体的表达效率,进一步删除了大鼠的μ和δ基因,Sμ区直接连接Cγ区,并删除了γ2a、γ1和γ2b基因中的CH1外显子。此外,在J4区引入W101R点突变以降低抗体疏水性,促进可溶性表达。构建获得的'HC27'和'HC31'2个品系转基因大鼠,统一命名为UniRats(表3)。流式细胞术分析发现,在脾脏、骨髓及淋巴结中均可检测到大量IgG2a⁺ B细胞,且整体B细胞发育与野生型大鼠相当,说明改造后的UniRats大鼠B细胞发育和浆细胞分化未受影响。然后,使用20余种不同抗原对UniRats进行免疫,并通过高通量测序技术(next-generation sequencing, NGS)对淋巴结B细

表3 人源化基因编辑动物模型在纳米抗体筛选中的应用策略

Table 3 Strategies in nanobody screening using humanized gene-edited animal models

基因编辑策略 Gene editing strategy	构建方法 Construction method	抗体类型 Antibody type	文献 Reference
人类和驼科动物转基因结合小鼠内源基因编辑 Combination of human/camelid transgenesis and mouse endogenous gene editing	将羊驼的VHH基因和人的DH、JH以及删除了CH1外显子的μ或者γ基因组合,然后转入小鼠受精卵,待出生并发育成熟后与μMT小鼠交配获得目的小鼠:MGΔ、GΔ和MΔGΔ小鼠模型。	MΔGΔ/μMT小鼠: 重链抗体型IgG; GΔ/μMT小鼠: 重链抗体型IgG; MGΔ/μMT小鼠: 几乎检测不到表达IgG ⁺ B细胞	[79]
人类和驼科动物转基因 Human/camelid transgenesis	使用人源的4个VH基因替代美洲驼VHH基因,删除γ2、γ3基因的CH1外显子,增加人的DH、JH基因和人免疫球蛋白3'LCR,获得转基因小鼠再与μMT小鼠交配获得4HVVH小鼠模型。	重链抗体型IgG	[80]
人类转基因结合大鼠内源基因编辑 Combination of human transgenesis and rat endogenous gene editing	将人源VH基因通过BAC克隆引入大鼠胚胎,删除大鼠内源的κ、λ、μ、δ基因以及γ2a、γ1和γ2b基因中的CH1外显子,并在J4区引入W101R点突变,获得UniRats大鼠模型。	重链抗体型IgG	[81]
人类转基因结合鸡内源基因编辑 Combination of human transgenesis and chicken endogenous gene editing	将人源VH3-23/JH4可变区序列导入鸡的重链基因位点,删除鸡内源V、D、J基因,引入驼科动物的稳定性突变和一组基于人源序列构建的假基因,并在轻链位点插入仅含恒定区的截短轻链,获得OmnidAb鸡模型。	重链抗体型IgY	[82]

胞的免疫球蛋白转录本进行分析,结果显示其 VH 基因的使用偏好与人类相似,尤其偏好使用 IgHV3 和 IgHV4 家族。此外,又用 10 种重组蛋白进行免疫,共获得了约 2 600 种候选抗体,经 ELISA 筛选获得具有纳摩尔级别亲和力的特异性人源化纳米抗体。该研究构建了能够表达多样化人类 VH、DH、JH 基因且可产生功能性重链抗体的转基因大鼠,为人源化纳米抗体的快速筛选和开发提供了重要平台与技术支持。

另外,为构建表达人源化重链抗体的新型动物模型,Vuong 等^[82]开发了转基因鸡模型 *OmnidAb*。鸡作为表达人源化抗体动物具有多个独特优势:鸡与人类的种属进化距离较远,免疫耐受较低,更易避免发生免疫排斥反应;鸡的抗体多样性依赖于基因转换而非 V(D)J 重排,通过引入人源假基因可实现抗体在体内的持续优化,从而获得结构多样、功能丰富的抗体库;且鸡源抗体 IgY 的 Fc 结构域不能激活人类补体系统,不能与类风湿因子结合,也不与人抗鼠抗体和人红细胞的 A/B 凝集原发生反应,有利于后续抗体工程化过程中的背景抑制和平台兼容。*OmnidAb* 动物模型通过将预重排的人源 VH3-23/JH4 可变区序列(命名为 VHH3)引入鸡的重链基因位点,删除鸡内源的 V、D、J 基因,同时引入 10 个源自骆驼科动物的稳定性突变,使其稳定表达纳米抗体。为了模拟鸡体内天然的基因转换机制,扩大抗体库多样性,又导入一组基于人源序列构建的假基因阵列,使抗体可变区在体内持续获得重组与优化。同时在轻链位点插入仅含恒定区的截短轻链转基因(truncated light chain, tLCi),以期促进重链抗体的分泌(表 3)。使用人粒细胞蛋白(progranulin, PGRN)或人自然杀伤细胞受体(natural killer cell p46-related protein, NKp46)对 *OmnidAb* 进行免疫,筛选得到具有广泛覆盖表位的纳米抗体。这一研究证明了 *OmnidAb* 模型在快速构建人源化纳米抗体库方面的可行性,拓宽了动物模型在抗体药物开发中的应用边界。

6 总结与展望

纳米抗体以其分子量小、稳定性强、亲和力高和较低的生产成本等卓越特性,正逐步在生物诊断、生物成像和疾病治疗等多个领域取代传统抗体,成为新一代生物分子工具。为解决因免疫骆驼科

动物所带来的成本问题,已有许多研究尝试通过基因编辑技术在小鼠和大鼠等小型哺乳动物中表达重链抗体,从而替代传统的骆驼科动物,这为纳米抗体技术的开发和推广带来了极大的便利。

尽管纳米抗体的开发应用已取得了诸多成果,但仍面临一系列的挑战。目前,关于纳米抗体的筛选大多是利用免疫文库,而良好的免疫反应是构建免疫文库的重要前提。相比常用的弗式佐剂,锰盐溶液已被证明可以更好地刺激小鼠对多种融合蛋白抗原(包括 T 细胞依赖和非依赖抗原)产生免疫应答,因此可以尝试更换不同的佐剂诱导宿主产生更高的免疫反应^[83]。同时,利用纳米抗体稳定性高、表达简便的优势,可以尝试将其开发为口服制剂、吸入剂,或结合益生菌系统进行体内表达,这也为疾病防控提供了新路径^[84]。随着人工智能辅助设计的发展,可以利用人工智能(如 AlphaFold3)对已经获得的纳米抗体氨基酸序列进行定制化改造,进一步提高亲和力,甚至直接预测纳米抗体序列,可更加高效精准地筛选与优化纳米抗体^[85]。

在通过基因编辑获得表达重链抗体的小动物模型方面,尽管已有多项研究成功构建了可用于筛选功能性纳米抗体的转基因小鼠模型,如‘纳米小鼠’和‘骆驼鼠’,但这一策略仍存在一定的改进空间。例如,当前模型大多仅整合了部分骆驼科动物的 VHH 基因,尚未覆盖天然骆驼科抗体库的完整多样性。后续工作可通过引入规模更大、来源更广泛的骆驼科动物 VHH 基因库,构建骆驼科全基因 VHH 嵌合小鼠,以进一步拓展免疫应答的广度和深度。同样,对于人源化基因编辑相关动物模型大多只引入了有限数量的人类 VH、DH、JH 基因片段,未来可采用先进的技术(如人工染色体、染色体工程)导入更大规模的人类免疫球蛋白重链基因以提高抗体库的多样性,覆盖更多免疫表位,避免文库限制。部分研究已尝试引入了 3'LCR 增强子区域或在 J 区引入氨基酸突变增强抗体的可溶性表达^[80],后续可进一步筛选优化表达调控元件,引入人工增强子,对关键氨基酸进行突变以提升外源基因的转录效率和抗体的分泌能力。另外,通过编辑内源基因获得的 HG1 小鼠及大鼠体内重链抗体型 IgG 表达量显著低于野生型小鼠,且其他经典 IgG 亚型均有不同程度的升高,这可能是由于 IgG1 或 IgG2a 作为表达量最高的亚型在表达缺陷时,其他 IgG 亚型出现

了一定程度的亚型补偿效应^[77-78]。后续可以尝试将轻链 Ig κ 和 Ig λ 删除,以消除亚型补偿效应。根据之前的研究,G Δ 小鼠和 UniRats 大鼠均删除了动物内源的 μ 和 δ 基因,将删除了 CH1 外显子的 γ 基因提前,从而可成功表达较高水平的重链抗体型 IgG,表明 IgG 或许可以替代 IgM 帮助 B 细胞正常发育,使 B 细胞增殖分化为浆细胞,从而产生抗体^[79,81]。按照相似的构建策略,可以尝试保留小鼠的轻链,删除 μ 、 δ 及 γ 基因的 CH1 外显子,从而得到可以表达多种重链抗体亚型的小鼠模型;或者在删除 μ 、 δ 基因的基础上,删除 $\gamma 1$ 基因的 CH1 外显子和其他所有 γ 基因,得到只表达 IgG1 型重链抗体的小鼠模型。

另外,可变区基因的多样性会影响抗体产生的多样性,目前有研究发现,牛体内具有超长的 DH 基因片段,可形成超长 CDRH3 结构域,产生“Knob-Stalk”结构,对于识别复杂隐蔽的抗原位点发挥着重要作用^[86]。未来也可以尝试将牛的 DH 基因片段引入小动物模型,结合内源基因编辑表达重链抗体的技术,获得免疫反应丰富、抗体种类多样的新型纳米抗体筛选平台。由于当前模型多以小鼠为宿主,其抗体成熟机制与骆驼科动物仍存在一定差异,后续研究可考虑引入骆驼科动物特有的辅助因子或重塑小鼠的免疫微环境,使其与天然骆驼科动物抗体表达更相似,提高抗体的亲和力和特异性。

未来,纳米抗体可以结合蛋白质工程、人工智能以及自动化筛选和生产等技术,有望在小分子检测、个体化治疗、靶向递送及新兴疾病防控等方面发挥更大作用,成为精准医学和生物工程领域的重要支柱。

参考文献 References

- [1] Flajnik M F, Deschacht N, Muyldermans S. A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels? [J/OL]. *PLoS Biology*, (2011-08-02). DOI: 10.1371/journal.pbio.1001120
- [2] 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
- [3] Hou J, Du K, Li J, Li Z, Cao S, Zhang S, Huang W, Liu H, Yang X, Sun S, Mo S, Qin T, Zhang X, Yin S, Nie X, Lu X. Research trends in the use of nanobodies for cancer therapy[J/OL]. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, (2025-05-10). DOI: 10.1016/j.jconrel.2025.01.045
- [4] Keam S J. Ozoralizumab; First approval[J]. *Drugs*, 2023, 83(1): 87-92
- [5] Scully M, Cataland S R, Peyvandi F, Coppo P, Knöbl P, Kremer Hovinga J A, Metjian A, de la Rubia J, Pavenski K, Callewaert F, Biswas D, De Winter H, Zeldin R K. Caplacizumab treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2019, 380(4): 335-346
- [6] Schroeder H W Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins [J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125(S2): S41-S52
- [7] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa E B, Bendahman N, Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448
- [8] Greenberg A S, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney E C, Flajnik M F. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks[J]. *Nature*, 1995, 374(6518): 168-173
- [9] Roux K H, Greenberg A S, Greene L, Strelets L, Avila D, McKinney E C, Flajnik M F. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(20): 11804-11809
- [10] Cheloha R W, Harmand T J, Wijne C, Schwartz T U, Ploegh H L. Exploring cellular biochemistry with nanobodies [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(45): 15307-15327
- [11] De Meyer T, Muyldermans S, Depicker A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools[J]. *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(5): 263-270
- [12] Muyldermans S, Baral T N, Retamozzo V C, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, Leonhardt H, Magez S, Nguyen V K, Revets H, Rothbauer U, Stijlemans B, Tillib S, Wernery U, Wyns L, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Saerens D. Camelid immunoglobulins and nanobody technology [J]. *Veterinary Immunology And Immunopathology*, 2009, 128(1-3): 178-183
- [13] Muyldermans S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82: 775-797
- [14] Ingram J R, Schmidt F I, Ploegh H L. Exploiting nanobodies' singular traits [J]. *Annual Review of Immunology*, 2018, 36: 695-715
- [15] Frecot D I, Froehlich T, Rothbauer U. 30 years of nanobodies-An ongoing success story of small binders in biological research[J/OL]. *Journal of Cell Science*, (2023-11-08). DOI: 10.1242/jcs.261395
- [16] Nguyen V K, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S. Camel heavy-chain antibodies: Diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire[J]. *EMBO Journal*, 2000, 19(5): 921-930
- [17] De Genst E, Saerens D, Muyldermans S, Conrath K. Antibody repertoire development in camelids[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30(1-2): 187-198
- [18] Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: The superfluous luxury of paired domains[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26(4): 230-235
- [19] Mitchell L S, Colwell L J. Comparative analysis of nanobody sequence and structure data[J]. *Proteins*, 2018, 86(7): 697-706
- [20] Li C, Tang Z R, Hu Z X, Wang Y W, Yang X M, Mo F Z, Lu X L. Natural single-domain antibody-nanobody: A novel concept in the antibody field[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2018, 14(1): 1-19
- [21] Conrath K E, Wernery U, Muyldermans S, Nguyen V K. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003, 27(2): 87-103
- [22] Howard J G, Zola H, Christie G H, Courtenay B M. Studies on immunological paralysis V: The influence of molecular weight on the

- immunogenicity, tolerogenicity and antibody-neutralizing activity of the 3 pneumococcal polysaccharide[J]. *Immunology*, 1971, 21(3): 535-546
- [23] Wadhwa M, Knezevic I, Kang H N, Thorpe R. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility[J]. *Biologicals*, 2015, 43(5): 298-306
- [24] Rossotti M A, Bélanger K, Henry K A, Tanha J. Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies[J]. *The FEBS Journal*, 2022, 289(14): 4304-4327
- [25] Coppieters K, Dreier T, Silence K, de Haard H, Lauwereys M, Casteels P, Beirnaert E, Jonckheere H, van De Wiele C, Staelens L, Hostens J, Revets H, Remaut E, Elewaut D, Rottiers P. Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2006, 54(6): 1856-1866
- [26] Baral T N, Magez S, Stijlemans B, Conrath K, Vanhollebeke B, Pays E, Muyldermans S, de Baetselier P. Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor[J]. *Nature Medicine*, 2006, 12(5): 580-584
- [27] Ackaert C, Smiejewska N, Xavier C, Sterckx Y G J, Denies S, Stijlemans B, Elkrim Y, Devoogdt N, Caveliers V, Lahoutte T, Muyldermans S, Breckpot K, Keyaerts M. Immunogenicity risk profile of nanobodies[J/OL]. *Frontiers in Immunology*, (2021-03-09). DOI: 10.3389/fimmu.2021.632687
- [28] Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(5): 3273-3284
- [29] Pérez J M, Renisio J G, Prompers J J, van Platerink C J, Cambillau C, Darbon H, Frenken L G. Thermal unfolding of a llama antibody fragment: A two-state reversible process[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(1): 74-83
- [30] Hussack G, Hiram T, Ding W, MacKenzie R, Tanha J. Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability[J/OL]. *PLoS One*, (2011-11-30). DOI: 10.1371/journal.pone.0028218
- [31] Nguyen V K, Desmyter A, Muyldermans S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae[J]. *Advances in Immunology*, 2001, 79: 261-296
- [32] Wu X L, Wang Y X, Cheng L, Ni F F, Zhu L J, Ma S, Huang B L, Ji M M, Hu H M, Li Y C, Xu S J, Shi H X, Zhang D D, Liu L S, Nawaz W, Hu Q X, Ye S, Liu Y L, Wu Z W. Short-term instantaneous prophylaxis and efficient treatment against SARS-CoV-2 in hACE2 mice conferred by an intranasal nanobody (Nb22)[J/OL]. *Frontiers in Immunology*, (2022-03-17). DOI: 10.3389/fimmu.2022.865401
- [33] Wu X L, Cheng L, Fu M, Huang B L, Zhu L J, Xu S J, Shi H X, Zhang D D, Yuan H Y, Nawaz W, Yang P, Hu Q X, Liu Y L, Wu Z W. A potent bispecific nanobody protects hACE2 mice against SARS-CoV-2 infection via intranasal administration [J/OL]. *Cell Reports*, (2021-10-06). DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109869
- [34] Tu Z, Chen Q, Li Y P, Xiong Y H, Xu Y, Hu N, Tao Y. Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk[J]. *Analytical Biochemistry*, 2016, 493: 1-7
- [35] Zhu L J, Huang B L, Wang X Y, Ni F F, Ao M J, Wang R K, Zheng B, Chen C, Xue J, Zhu L, Yang C B, Shi L G, Geng S Y, Hu J Q, Yang M S, Zhang D D, Yang P, Li M M, Li Y C, Hu Q X, Ye S, Zheng P, Wei H X, Wu Z W, Zhang L Q, Wang Y X, Liu Y L, Wu X L. Highly potent and broadly neutralizing anti-CD4 trimeric nanobodies inhibit HIV-1 infection by inducing CD4 conformational alteration[J/OL]. *Nature Communications*, (2024-08-13). DOI: 10.1038/s41467-024-51414-6
- [36] Yang E Y, Shah K. Nanobodies: Next generation of cancer diagnostics and therapeutics[J/OL]. *Frontiers in Oncology*, (2020-07-23). DOI: 10.3389/fonc.2020.01182
- [37] Ruiz-López E, Schuhmacher A J. Transportation of single-domain antibodies through the blood-brain barrier[J/OL]. *Biomolecules*, (2021-07-31). DOI: 10.3390/biom11081131
- [38] Richards D A. Exploring alternative antibody scaffolds: Antibody fragments and antibody mimics for targeted drug delivery[J]. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2018, 30: 35-46
- [39] Xavier C, Blykers A, Vaneycken I, D'huyvetter M, Heemskerk J, Lahoutte T, Devoogdt N, Caveliers V. (18)F-nanobody for PET imaging of HER2 overexpressing tumors[J]. *Nuclear Medicine and Biology*, 2016, 43(4): 247-252
- [40] Saerens D, Ghassabeh G H, Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8(5): 600-608
- [41] Muyldermans S. A guide to: Generation and design of nanobodies[J]. *The FEBS Journal*, 2021, 288(7): 2084-2102
- [42] Wang Y Z, Fan Z, Shao L, Kong X W, Hou X J, Tian D R, Sun Y, Xiao Y Z. Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2016, 11: 3287-3303
- [43] Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium[J]. *FASEB Journal*, 2002, 16(2): 240-242
- [44] Yan K Y F, Groves M A T, Li S H, Sheedy C, Lee H, Tanha J, MacKenzie C R, Jermutus L, Hall J C. Selection of hapten-specific single-domain antibodies from a non-immunized llama ribosome display library[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2003, 281(1-2): 161-175
- [45] Yan J R, Li G H, Hu Y H, Ou W J, Wan Y K. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications [J/OL]. *Journal of Translational Medicine*, (2014-12-10). DOI: 10.1186/s12967-014-0343-6
- [46] Smith G P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317
- [47] Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. Phage display: A powerful technique for immunotherapy: 2 Vaccine delivery [J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2012, 8(12): 1829-1835
- [48] Jaroszewicz W, Morcinek-Orłowska J, Pierzynowska K, Gaffke L, Węgrzyn G. Phage display and other peptide display technologies[J/OL]. *FEMS Microbiology Reviews*, (2022-03-03). DOI: 10.1093/femsre/fuab052
- [49] Mustafa M I, Alzebair A A, Mohammed A. Development of recombinant antibody by yeast surface display technology[J/OL]. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, (2024-01-20). DOI: 10.1016/j.crphar.2024.100174
- [50] Mahdavi S Z B, Oroojalian F, Eyvazi S, Hejazi M, Baradaran B, Pouladi N, Tohidkia M R, Mokhtarzadeh A, Muyldermans S. An overview on display systems (phage, bacterial, and yeast display) for production of anticancer antibodies: Advantages and disadvantages[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 208: 421-442
- [51] Li Y B, Wang X, Zhou N Y, Ding J M. Yeast surface display technology: Mechanisms, applications, and perspectives [J/OL]. *Biotechnology Advances*, (2024-08-06). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2024.108422
- [52] Lu C F, Montijn R C, Brown J L, Klis F, Kurjan J, Bussey H, Lipke P N. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall[J]. *The Journal*

- of Cell Biology*, 1995, 128(3): 333-340
- [53] Zhang Q, Zhang N, Xiao H, Wang C, He L. Small antibodies with big applications: Nanobody-based cancer diagnostics and therapeutics[J/OL]. *Cancers*, (2023-11-29). DOI: 10.3390/cancers15235639
- [54] De Meyer T, Laukens B, Nolf J, Van Lerberge E, De Rycke R, De Beuckelaer A, De Buck S, Callewaert N, Depicker A. Comparison of VHH-Fc antibody production in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Pichia pastoris*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(7): 938-947
- [55] Li R W, Kang G B, Hu M, Huang H. Ribosome display: A potent display technology used for selecting and evolving specific binders with desired properties[J]. *Molecular Biotechnology*, 2019, 61(1): 60-71
- [56] Thom G, Groves M. Ribosome display[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 901: 101-161
- [57] Kunamneni A, Ogaugwu C, Bradfute S, Durvasula R. Ribosome display technology: Applications in disease diagnosis and control[J/OL]. *Antibodies*, (2020-06-27). DOI: 10.3390/antib9030028
- [58] Zahnd C, Amstutz P, Plückthun A. Ribosome display: Selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(3): 269-279
- [59] Gan R, Jewett M C. Evolution of translation initiation sequences using in vitro yeast ribosome display[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(8): 1777-1786
- [60] King D J, Bowers P M, Kehry M R, Horlick R A. Mammalian cell display and somatic hypermutation in vitro for human antibody discovery[J]. *Current Drug Discovery Technologies*, 2014, 11(1): 56-64
- [61] Zhou C, Jacobsen F W, Cai L, Chen Q, Shen W D. Development of a novel mammalian cell surface antibody display platform[J]. *mAbs*, 2010, 2(5): 508-518
- [62] Merwaiss F, Lozano-Sanchez E, Zulaica J, Rusu L, Vazquez-Vilar M, Orzáez D, Rodrigo G, Geller R, Daròs J A. Plant virus-derived nanoparticles decorated with genetically encoded SARS-CoV-2 nanobodies display enhanced neutralizing activity[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(4): 876-891
- [63] Pitino M, Fleites L A, Shrum L, Heck M, Shatters R G, Jr. Plant production of high affinity nanobodies that block SARS-CoV-2 spike protein binding with its receptor, human angiotensin converting enzyme[J/OL]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, (2022-12-23). DOI: 10.3389/fbioe.2022.1045337
- [64] Sun M X, Cao D, Zhao M, Zhu X L, Sun Y, Wang Q, Zhang H L, Yang Y B, Tian X X, Wang H W, Cai X H, An T Q. Nanobody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J/OL]. *International Journal of Biological Macromolecules*, (2025-05-14). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.144248
- [65] Rani A, Ravindran V B, Surapaneni A, Mantri N, Ball A S. Review: Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157: H7 in food and water[J/OL]. *International Journal of Food Microbiology*, (2021-01-02). DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109233
- [66] He Q Y, Pan J K, Xu Z H, Hammock B D, Li D Y. Development of a nanobody-based immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 in food samples[J/OL]. *Food Chemistry*, (2025-05-01). DOI: 10.1016/j.foodchem.2025.142987
- [67] Li G Q, Liu C, Qiu S, Wei L, Cao L M, Wang K Q, Wang X D, Lin H, Sui J X. From non-affinity to high-affinity: Rapid preparation of nanobodies utilizing high-precision alphafold and structural-interaction analysis for detection of enrofloxacin in marine fish[J/OL]. *Journal of Hazardous Materials*, (2025-05-05). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2025.137394
- [68] Lauwers Y, De Groof T W M, Vincke C, Van Craenenbroeck J, Jumapili N A, Barthelmess R M, Courtoy G, Waelpuut W, De Pauw T, Raes G, Devoogdt N, Van Ginderachter J A. Imaging of tumor-associated macrophage dynamics during immunotherapy using a CD163-specific nanobody-based immunotracer[J/OL]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (2024-12-24). DOI: 10.1073/pnas.2409668121
- [69] Barykina N V, Carey E M, Oliynyk O S, Nimmerjahn A, Verkhusha V V. Destabilized near-infrared fluorescent nanobodies enable background-free targeting of GFP-based biosensors for imaging and manipulation[J/OL]. *Nature Communications*, (2024-09-06). DOI: 10.1038/s41467-024-51857-x
- [70] Yi S, Noh K, Kim H, Jung E, Kim S, Lee J, Guk K, Choi J, Lim E K, Kim S, Park H, Lim J H, Jung C R, Kang T, Jung J. Advancing pancreatic cancer therapy by mesothelin-specific nanobody conjugation[J/OL]. *Molecular Cancer*, (2025-04-24). DOI: 10.1186/s12943-025-02325-7
- [71] Yang X H, Guo L, Duan H R, Fan M, Xu F W, Chi X J, Pan S N, Liu X Y, Zhang X H, Gao P X, Zhang F Y, Wang X Y, Guo F, Ge J W, Ren L L, Yang W. Identification of neutralizing nanobodies protecting against poxvirus infection[J/OL]. *Cell Discovery*, (2025-03-25). DOI: 10.1038/s41421-025-00771-7
- [72] Chen Z S, Huang H C, Wang X K, Schön K, Jia Y E, Lebens M, Besavilla D F, Murti J R, Ji Y H, Sarshad A A, Deng G H, Zhu Q Y, Angeletti D. Influenza A virus H7 nanobody recognizes a conserved immunodominant epitope on hemagglutinin head and confers heterosubtypic protection[J/OL]. *Nature Communications*, (2025-01-09). DOI: 10.1038/s41467-024-55193-y
- [73] Nguyen V K, Zou X G, Lauwereys M, Brys L, Brüggemann M, Muyldermans S. Heavy-chain only antibodies derived from dromedary are secreted and displayed by mouse B cells[J]. *Immunology*, 2003, 109(1): 93-101
- [74] Zou X G, Smith J A, Nguyen V K, Ren L M, Luyten K, Muyldermans S, Brüggemann M. Expression of a dromedary heavy chain-only antibody and B cell development in the mouse[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 175(6): 3769-3779
- [75] Xu J L, Xu K, Jung S, Conte A, Lieberman J, Muecksch F, Lorenzi J C C, Park S, Schmidt F, Wang Z J, Huang Y X, Luo Y, Nair M S, Wang P F, Schulz J E, Tessarollo L, Bylund T, Chuang G Y, Olia A S, Stephens T, Teng I T, Tsybovsky Y, Zhou T Q, Munster V, Ho D D, Hatzioannou T, Bieniasz P D, Nussenzweig M C, Kwong P D, Casellas R. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants[J]. *Nature*, 2021, 595(7866): 278-282
- [76] Eden T, Schaffrath A Z, Wesolowski J, Stähler T, Tode N, Richter N, Schäfer W, Hambach J, Hermans-Borgmeyer I, Woens J, Le Gall C M, Wendler S, Linke-Winnebeck C, Stobbe M, Budnicki I, Wanney A, Heitz Y, Schimmelpfennig L, Schweitzer L, Zimmer D, Stahl E, Seyfried F, Gebhardt A J, Dieckow L, Riecken K, Fehse B, Bannas P, Magnus T, Verdoes M, Figdor C G, Hartlepp K F, Schleier H, Fünér J, Tomas N M, Haag F, Rissiek B, Mann A M, Menzel S, Koch-Nolte F. Generation of nanobodies from transgenic 'LamaMice' lacking an endogenous immunoglobulin repertoire[J/OL]. *Nature Communications*, (2024-06-13). DOI: 10.1038/s41467-024-48735-x
- [77] Zhang T Y, Cheng X Q, Yu D, Lin F Y, Hou N, Cheng X, Hao S S, Wei J J, Ma L, Fu Y B, Ma Y H, Ren L M, Han H T, Yu S Y, Yang X, Zhao Y F. Genetic removal of the CHI exon enables the production of heavy chain-only IgG in mice[J/OL]. *Frontiers in Immunology*, (2018-09-25). DOI: 10.3389/fimmu.2018.02202

- [78] Li Z R, Zhang M, Zheng S N, Song Y, Cheng X Q, Yu D, Du L J, Ren L M, Han H T, Zhao Y F. Genetic removal of the CH1 exon leads to the production of hypofunctional heavy chain-only IgG2a in rats[J]. *Transgenic Research*, 2020, 29(2): 199-213
- [79] Janssens R, Dekker S, Hendriks R W, Panayotou G, van Remoortere A, San J K, Grosveld F, Drabek D. Generation of heavy-chain-only antibodies in mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(41): 15130-15135
- [80] Drabek D, Janssens R, De Boer E, Rademaker R, Kloess J, Skehel J, Grosveld F. Expression cloning and production of human heavy-chain-only antibodies from murine transgenic plasma cells [J/OL]. *Frontiers in Immunology*, (2016-12-19). DOI: 10.3389/fimmu.2016.00619
- [81] Clarke S C, Ma B, Trinklein N D, Schellenberger U, Osborn M J, Ouisse L H, Boudreau A, Davison L M, Harris K E, Ugamraj H S, Balasubramani A, Dang K H, Jorgensen B, Ogana H A N, Pham D T, Pratap P P, Sankaran P, Anegon I, van Schooten W C, Brüggemann M, Buelow R, Force Aldred S. Multispecific antibody development platform based on human heavy chain antibodies[J/OL]. *Frontiers in Immunology*, (2019-01-07). DOI: 10.3389/fimmu.2018.03037
- [82] Vuong C N, Reynolds K M, Rivera G S, Zeng B S, Karimpourkalou Z, Norng M, Zhang Y L, Chowdhury R, Pedersen D, Pantoja M, Collarini E, Garimalla S, Izquierdo S, Vajda E G, Antonio B, Srivastava D B, Van De Lavoie M C, Abdiche Y, Harriman W, Leighton P A. Heavy chain-only antibodies with a stabilized human VH in transgenic chickens for therapeutic antibody discovery [J/OL]. *mAbs*, (2024-11-28). DOI: 10.1080/19420862.2024.2435476.
- [83] Zhang R, Wang C G, Guan Y K, Wei X M, Sha M Y, Yi M R, Jing M, Lv M Z, Guo W, Xu J, Wan Y, Jia X M, Jiang Z F. Manganese salts function as potent adjuvants[J]. *Cellular and Molecular Immunology*, 2021, 18(5): 1222-1234
- [84] Jiang W N, Huang C D, Muyldermans S, Jia L Y. Small but mighty: Nanobodies in the fight against infectious diseases[J/OL]. *Biomolecules*, (2025-04-23). DOI: 10.3390/biom15050610
- [85] Liu J W, Wu L, Xie A Q, Liu W C, He Z, Wan Y, Mao W J. Unveiling the new chapter in nanobody engineering: Advances in traditional construction and AI-driven optimization[J/OL]. *Journal of Nanobiotechnology*, (2025-02-06). DOI: 10.1186/s12951-025-03169-5
- [86] Wang F, Ekiert D C, Ahmad I, Yu W L, Zhang Y, Bazirgan O, Torkamani A, Raudsepp T, Mwangi W, Criscitiello M F, Wilson I A, Schultz P G, Smider V V. Reshaping antibody diversity[J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1379-1393

责任编辑: 吕晓梅



第一作者简介: 彭元昊, 中国农业大学生物学院生物学专业博士研究生。参与国家杰出青年科学基金(30725029)和国家自然科学基金面上项目(32272839)。2024年获得中国农业大学博士二等学业奖学金。



通讯作者简介: 赵要风, 博士, 中国农业大学生物学院教授, 博士生导师, 畜禽生物育种全国重点实验室主任。现任中国农业生物技术学会动物生物技术分会理事长、中国生物化学与分子生物学学会农业分会副主任委员等职。主要从事动物免疫遗传学研究, 2006年回国后, 先后主持国家级课题 10 余项, 在 *Nature Genetics*、*PNAS* 等国际刊物发表 SCI 论文 130 余篇。获国家技术发明二等奖、“国家杰出青年科学基金”、“万人计划”科技创新领军人才、“神农英才”领军人才等奖励和荣誉称号。