

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.006

· 基础研究 ·

人乳头瘤病毒16型纳米抗体的筛选及鉴定

王若瑜¹, 白崇智^{1,2}, 仲启明¹, 范瑞文², 牛林茹³, 韩鹏程⁴(1. 山西省中医药研究院 中心实验室, 山西 太原 030000; 2. 山西农业大学 羊驼生物工程实验室, 山西 太谷 030801; 3. 君研生物科技(山西)有限公司, 山西 太原 030000; 4. 东南大学附属中大医院医学院, 江苏 南京 210000)

[摘要] **目的:** 构建人乳头瘤病毒16型(HPV16) L1蛋白纳米抗体初级文库, 通过筛选鉴定获得一株 HPV16 L1 特异性纳米抗体。**方法:** 以 HPV 16 L1 蛋白为抗原对羊驼进行免疫, 采用噬菌体展示技术构建初级抗体文库。经3轮淘选, 采用 ELISA 法鉴定阳性克隆, 将阳性反应最强克隆的 VHH 序列进行真核表达。经亲和纯化、凝胶过滤层析纯化、SDS-PAGE 和 WB 法鉴定, 获得目的纳米抗体; 采用表面等离子共振 (SPR) 技术检测纳米抗体与 HPV 16 L1 蛋白之间的亲和力, CCK-8 法检测纳米抗体对人永生角质细胞 HaCat 的毒性, 荧光素酶报告基因实验检测纳米抗体对 HPV 16 假病毒的中和活性。**结果:** 初级文库库容为 1.304×10^{10} , 丰度为 6.5×10^9 个/mL, ELISA 法鉴定获得 36 个阳性克隆。表达、纯化获得蛋白单体与二聚体, 经鉴定为目的纳米抗体(命名为 Nb)。Nb 与 HPV 16 L1 蛋白结合的亲和力为 35.41 nmol/L。Nb 实验组 HaCat 细胞增殖活力与空白组没有显著差异 ($P > 0.05$)。与阴性组比较, 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ Nb 均能抑制假病毒感染 293FT 细胞 (均 $P < 0.01$)。**结论:** 成功获得一株纯度较好、亲和力较高, 对上皮细胞没有明显毒性作用、有效抑制 HPV 16 假病毒感染 293FT 细胞的纳米抗体 Nb, 为防治 HPV 16 感染提供了有效的候选抗体类药物。

[关键词] 人乳头瘤病毒 16 型; 噬菌体展示技术; 纳米抗体; 亲和力

[中图分类号] S852 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024) 12-1211-07

Screening and identification of nanobody against human papillomavirus 16

WANG Ruoyu¹, BAI Chongzhi^{1,2}, ZHONG Qiming¹, FAN Ruiwen², NIU Linru³, HAN Pengcheng⁴(1. Central Laboratory, Shanxi Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030000, Shanxi, China; 2. Alpaca Bioengineering Laboratory, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China; 3. Junyan Biosciences Co., Ltd., Taiyuan 030000, Shanxi, China; 4. School of Medicine, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjin 210000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a primary nanobody library for human papillomavirus 16 (HPV16) L1 protein and obtain a nanobody specific to HPV16 L1 through selection and identification. **Methods:** HPV16 L1 protein was used as antigen to immunize alpaca, and a primary antibody library was constructed using phage display technology. After three rounds of screening, positive clones were identified by ELISA. The VHH sequence of the strongest positive clone was used for eukaryotic expression. The target nanobody was obtained after affinity purification, gel filtration chromatography, SDS PAGE and WB identification. The affinity between the nanobody and HPV16 L1 protein was evaluated using surface plasmon resonance (SPR) technology. The cytotoxicity of the nanobody was detected using CCK-8 assay. The neutralizing activity of nanobody against HPV16 pseudovirus was detected using a luciferase reporter gene assay. **Results:** The primary library was constructed with a capacity of 1.304×10^{10} and an abundance of 6.5×10^9 clones / mL. ELISA identified 36 positive clones. Protein monomer and dimers were expressed and purified, and the target nanobody (designated as "Nb") was successfully identified. The binding affinity of Nb to HPV16 L1 protein was 35.41 nmol/L. There was no significant difference in HaCat cell proliferation activity between Nb group and blank group ($P > 0.05$). Compared to the negative group, both 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ Nb inhibited pseudovirus infection in 293FT cells (all $P < 0.01$). **Conclusion:** This study successfully obtained a nanobody with high purity and strong affinity that exhibited no cytotoxicity to epithelial cells and effectively inhibited HPV16 pseudovirus infection in 293FT cells. The nanobody provides a promising candidate antibody-based drug for the prevention and treatment of HPV 16 infection.

[Key words] human papillomavirus 16 (HPV16); phage display technology; nanobody; affinity

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(12): 1211-1217. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.006]

[基金项目] 山西省科学技术厅重点研发计划项目(No. 202220130501015); 山西省科学技术厅基础研究计划项目(No. 202303021212353); 山西省中医药管理局科研课题(No. 2023ZYA2002); 山西省卫生健康委员会科研课题(No. 2022107)

[作者简介] 王若瑜(1990—), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事 HPV 感染及宫颈癌防治相关研究。E-mail: wangry2301@163.com

[通信作者] 白崇智, E-mail: baicz@im.ac.cn

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种表皮及黏膜鳞状上皮易感的环状DNA病毒。中国不同地区健康女性HPV感染率为15%~28%,感染型以HPV 16和HPV 52为主^[1]。HPV持续感染是宫颈癌的主要病因,其中70%~84%的宫颈癌发病与HPV 16、18型感染相关^[2]。L1蛋白是HPV衣壳的主要结构蛋白,含有多个抗原表位,具有较强免疫原性,且没有复制能力和感染能力,在预防和治疗HPV感染药物开发中发挥重要作用^[3-4]。科学家在骆驼科动物体内发现天然缺失轻链,仅由重链可变区组成的抗体,即纳米抗体^[5]。源于驼类的纳米抗体与人同源性高达80%,其在人体内表现出低免疫原性,更易于人源化^[6],又可以在体外单独而稳定地存在,逐渐成为疫苗及药物开发十分具有潜力的方向。相较于传统抗体,纳米抗体具有相对分子质量小、易于改造和连接、溶解性好、亲和力高、可以结合传统抗体不易到达的表位等优势^[7]。可通过从骆驼科动物的外周血中分离序列并克隆到载体上,建立纳米抗体初级文库,借助噬菌体展示技术筛选出亲和力高、特异性强的纳米抗体^[8]。由于纳米抗体没有轻链,在利用噬菌体展示技术制备时,避免了轻重链错配问题,降低了生产的难度与成本^[9-11]。本研究以HPV 16 L1蛋白为抗原,采用噬菌体展示技术构建纳米抗体初级文库,筛选得到与HPV 16 L1蛋白特异性结合的纳米抗体并检测该纳米抗体与HPV 16 L1蛋白的亲和力,期望为HPV 16感染防治药物开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

雄性羊驼,2岁龄,体况优良,饲养于山西农业大学羊驼养殖中心,实验方案经山西省中医药研究院医学伦理委员会批准(伦理审批号:SZYLY2023KY-0105);COVID-19受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)免疫羊驼血清及COVID-19纳米抗体2F2E5由本实验室留存^[12];人永生化角质细胞HaCat、HEK 293F细胞和人293T细胞均购自ATCC细胞库。

pCAGGS载体购自武汉淼灵生物科技有限公司,镍离子亲和层析柱(HisTrap HP 5 mL)、凝胶过滤层析柱和Chip CM5芯片均购自Cytiva公司,完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂购自Sigma公司,外周血淋巴细胞分离液、ELISA包被液、ELISA终止液、TMB单组分显色液均购自北京索莱宝科技有限公司,HRP标记的山羊抗美洲驼IgG购自Abcam公司,反转录试剂盒购自康为世纪公司,DNA产物纯化试剂盒购自TaKaRa公司,TG1菌株和KM13辅助噬菌体购自北京宝科维食安生物技术有限公司,HRP标记鼠抗

M13抗体购自北京义翘神州公司,小鼠抗His-tag单克隆抗体和兔抗小鼠IgG-HRP购自南京信帆生物技术有限公司,Lipofectamine™2000购自Thermo公司,结构基因表达质粒和报告质粒由通用生物(南京)有限公司合成, Jess™全自动蛋白表达分析系统购自美国R&D Systems公司,Biacore T200表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)系统购自GE Healthcare公司。

1.2 抗原蛋白制备

在HPV 16 L1蛋白编码序列(L1, GenBank登录号No. AAC09292, 1879-2385)的3'端连接组氨酸标签以及翻译终止密码子TGA,通过限制性内切酶位点EcoR I和Xho I构建入pCAGGS载体中并转染HEK 293F细胞,置于37 °C、5% CO₂培养箱中振荡培养,进行真核表达。收集上清液,10 000 × g离心30 min,0.22 μm滤膜过滤后,经镍离子亲和层析[洗脱缓冲液:20 mmol/L Tris (pH 8.0)、150 mmol/L NaCl、30 mmol/L 咪唑]和凝胶过滤层析(Superdex™ 75 Hiload column)[缓冲液:20 mmol/L Tris (pH 8.0)、150 mmol/L NaCl;流速1 mL/min]纯化,纯化后的蛋白经SDS-PAGE鉴定后于-80 °C保存备用。

1.3 纳米抗体文库构建及库容丰度测定

挑选体况良好的雄性羊驼,将HPV 16 L1抗原蛋白100 μg用PBS稀释至100 μg/mL。采用肩胛部皮下多点注射法对羊驼进行免疫。第1次免疫使用完全弗氏佐剂;之后每2周进行一次免疫,使用不完全弗氏佐剂。第5次免疫后,采集羊驼血液、分离血清,用ELISA检测血清中HPV 16 L1抗体水平,以评价免疫效果。ELISA实验分为5组:空白组、RBD组(COVID-19 RBD免疫羊驼血清)、L1血清组(免疫后血清)、纯化L1血清组(免疫后经protein A吸附柱纯化血清),每组设置10、100、200倍3个血清稀释倍数。包被ELISA板时,空白组只加包被液,其余实验组加入稀释后的HPV 16 L1蛋白和包被液至ELISA板中进行包被。一抗为梯度稀释后的血清,二抗为HRP标记的山羊抗美洲驼(llama)IgG。反应结束后加入TMB-过氧化氢尿素溶液显色,37 °C避光显色15 min后终止反应,酶标仪测定450 nm波长处各组光密度(D)值。

第6次免疫12 d后,取羊驼颈静脉血,与PBS按1:1的比例混合后缓慢加入淋巴细胞分离液中,离心后吸取PBMC层。将分离的PBMC依照RNA提取试剂盒说明书提取总RNA。以提取的总RNA为模板,采用长链cDNA反转录试剂盒合成cDNA。以cDNA为模板,使用特异性引物CALL001和CALL002进行第一轮PCR,其中Call001-F对应羊驼

抗体的前导序列(leader)区,Call002-R对应羊驼抗体的第二恒定区(CH2)。对PCR反应产物中700 bp核酸片段进行回收作为第二轮PCR的模板。使用巢式引物VHH-BACK和PMCF进行第二轮PCR,扩增纳米抗体(VHH)序列,回收纯化400 bp大小片段。PCR反应体系为cDNA 2 μ L,正、反向引物各1 μ L, Taq Green PCR Mix 25 μ L,去离子水21 μ L。PCR引物序列见表1。

表1 引物序列

| 引物名称 | 序列(5'-3') |
|---------|--|
| CALL001 | GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG |
| CALL002 | GGT ACGTGCTGTTGAACTGTTCC |
| VHH-BA | GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG |
| PMCF | CTAGTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCT GGGT |
| MP57 | TTATGCTTCCGGCTCGTATG |
| GIII | CCACAGACAGCCCTCATAG |

将纯化后的VHH片段和载体pMES4连接后,电转入感受态E.coli TG1菌。取200 μ L转化后菌液测定库容,剩余菌液均匀涂布到含氨苄青霉素的固体培养板,37 $^{\circ}$ C过夜培养后收取菌落,即为HPV 16 L1蛋白纳米抗体初级文库。

电转后的菌液依照 10^{-1} ~ 10^{-8} 梯度稀释,每个稀释度各取100 μ L菌液涂布于固体培养板,37 $^{\circ}$ C培养过夜后统计梯度稀释培养板的菌落,计算文库库容。

梯度稀释初级文库菌液,稀释度从 10^{-4} ~ 10^{-10} ;每个稀释度各取100 μ L菌液涂布于固体培养板,37 $^{\circ}$ C培养过夜后统计梯度板的菌落,计算文库丰度。

1.4 纳米抗体文库筛选

向初级文库中加入KM13辅助噬菌体,过夜培养后收集噬菌体颗粒。用PBS重悬噬菌体颗粒,与5% (w/v)脱脂牛奶等体积混合,加至包被了HPV 16 L1抗原的ELISA板中,室温下反应1 h,弃去上清液, PBS清洗2次。用0.2 mmol/L甘氨酸洗脱特异性结合的噬菌体,之后用Tris-HCl中和洗脱下来的噬菌体。用洗脱的噬菌体感染E.coli TG1菌以扩增抗体文库,进行下一轮的淘选,方法同上,共进行3轮淘选。用第3轮淘选的噬菌体感染TG1菌,将菌液涂布于2YTAG固体培养板,随机挑取98个单克隆移入培养液中,37 $^{\circ}$ C下振荡培养后转移至96孔深孔板中,加入KM13辅助噬菌体,过夜培养使噬菌体释放至上清液中。吸取上清液,分别加至HPV 16 L1抗原预包被的ELISA板中,反应过夜后加入偶联了HRP的抗M13噬菌体抗体作为二抗,ELISA实验检测阳性克

隆,以P(待测样本-空白对照)/N(阴性对照-空白对照) ≥ 3 的克隆为阳性^[13]。取对阳性反应最强的菌株,使用特异性引物MP57和GIII对质粒进行测序(引物序列见表1),获得质粒中编码VHH的序列,即HPV 16 L1蛋白纳米抗体的核心编码序列。

1.5 纳米抗体制备与鉴定

将HPV 16 L1蛋白纳米抗体核心序列与组氨酸标签及翻译终止密码子TGA连接,构建入pCAGGS质粒,转入HEK 293F细胞中进行表达。收集培养后的上清液,经镍离子亲和层析和凝胶过滤层析(SuperdexTM 75 Hiload column)纯化。方法同上(1.2节)。纯化后的蛋白经SDS-PAGE和WB鉴定。使用全自动蛋白表达分析系统进行WB鉴定^[14],小鼠抗His-tag单克隆抗体为一抗,兔抗小鼠IgG-HRP为二抗。

1.6 SPR法检测纳米抗体与HPV 16 L1蛋白亲和力

将HPV 16 L1蛋白固定在Chip CM5芯片上,缓冲体系为PBST溶液(10 mmol/L Na₂HPO₄、2 mmol/L KH₂PO₄、137 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、0.005% Tween 20, pH 7.4)。利用PBST溶液将纳米抗体由160 nmol/L倍比稀释至5 nmol/L,由低浓度到高浓度依次上样,通过SPR系统检测纳米抗体与HPV 16 L1的结合动力学。结合数据通过BiacoreTM T200评估软件拟合Langmuir结合方程。

1.7 CCK-8法检测纳米抗体对HaCat细胞增殖的影响

将HaCat细胞密度调整为 1×10^6 个/mL,每孔100 μ L铺于96孔板中。纳米抗体溶液经0.22 μ m滤膜过滤除菌后,用含10%胎牛血清的DMEM稀释至0.02、0.2、2 μ mol/L。取100 μ L稀释后的纳米抗体溶液加入HaCat细胞中,每个浓度3个复孔,空白组加入等体积PBS。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养24 h后,依照CCK-8试剂盒说明书检测HaCat细胞的增殖水平。

1.8 荧光素酶报告基因实验检测纳米抗体对HPV 16假病毒的中和活性

将293FT细胞以 1×10^5 个/mL的密度接种于96孔板中,用DMEM培养液按 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 倍稀释HPV 16假病毒,取100 μ L病毒液处理293FT细胞,37 $^{\circ}$ C下处理72 h后,于倒置荧光显微镜下观察,出现1个以上病变细胞则为阳性孔。用Reed-Muench方法计算细胞培养半数感染量(TCID50),即病毒感染一半细胞时的病毒稀释度,TCID50终点稀释比例为1:1 000。

将293FT细胞以 1×10^5 个/mL的密度铺于6孔板中,待细胞生长至密度约为70%,将结构基因表达质粒和报告质粒利用LipofectamineTM2000共转染至

293FT细胞。将转染好的293FT细胞以 1×10^4 个/mL的密度接种于96孔板。用含10%胎牛血清的DMEM连续稀释纳米抗体,浓度为1、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\mu\text{mol/L}$ 。依次将稀释好的Nb纳米抗体与假病毒(稀释比例1:1 000)加入96孔板,以COVID-19 RBD抗体2F2E5蛋白与假病毒组为阴性对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 处理1 h。取上述混合液100 μL 加入293FT细胞孔中,37 $^{\circ}\text{C}$ 处理24 h后,荧光显微镜下观察绿色荧光(报告基因产生),采用CQ1共聚焦定量图像细胞仪(Yokogawa)显微读数法检测,拍照计数,统计细胞数量。每组至少3个重复。未加纳米抗体的已感染细胞中和率为0%,未感染的细胞为100%中和。采用GraphPad Prism 8软件绘制统计图。

1.9 统计学处理

利用SPSS 16.0软件进行统计处理。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对羊驼血清组间比较和细胞增殖活力组间比较进行单因素方差分析检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学

意义。

2 结果

2.1 HPV 16 L1 抗原蛋白免疫羊驼产生相应抗体

HPV 16 L1 蛋白经凝胶过滤层析纯化(图1A)及SDS-PAGE鉴定(图1B),结果显示,HPV 16 L1 蛋白分子量为56 000左右,获得较纯的L1蛋白,可用于免疫羊驼。ELISA检测HPV 16 L1 蛋白免疫羊驼血清结果(图1C)显示,空白组未被包被L1抗原蛋白,RBD血清组含COVID-19 RBD蛋白纳米抗体,不含L1蛋白抗体。RBD血清组和空白组光密度值差异不显著,无阳性反应($P > 0.05$)。与空白组相比,免疫后全血清组和纯化血清组在不同稀释倍数均具有阳性反应($P < 0.01$),表明免疫羊驼产生了HPV 16 L1 蛋白抗体,可用于后续文库构建。同时相同稀释倍数下,纯化后血清光密度值低于全血清,表明羊驼免疫后,同时产生抗L1蛋白的重链抗体和传统抗体。

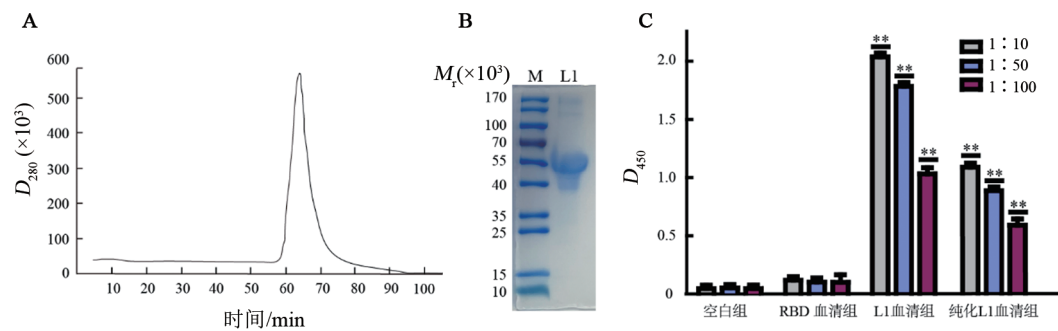


图1 HPV16 L1蛋白的纯化、鉴定及免疫活性检测。RBD血清组(COVID-19RBD免疫羊驼血清);L1血清组(免疫后血清);纯化L1血清组(纯化后的免疫血清)。与空白组相比,** $P < 0.01$ 。

图1 HPV16 L1蛋白的纯化、鉴定及免疫活性检测

2.2 成功构建抗HPV 16 L1 蛋白纳米抗体文库并筛选获得阳性克隆

分离免疫后羊驼的淋巴细胞,经细胞计数仪检测,共获得 7×10^7 个细胞。琼脂糖凝胶电泳检测2次PCR的产物,结果(图2A)显示,第一轮PCR扩增了传统抗体(900 bp)和重链抗体(700 bp)的VHH片段。第二轮PCR产物大小约400 bp,与目的片段大小一致。获得的VHH片段和载体连接转入*E.coli* TG1细菌构建HPV 16 L1 蛋白纳米抗体初级文库。 10^5 稀释度平板上有163个单克隆,文库库容为 $800 \times 163 \times 10^5 = 1.304 \times 10^{10}$ (图2B)。 1×10^6 次丰度平板上有大约650个克隆,文库丰度为 $650 \times 10 \times 10^6 = 6.5 \times 10^9$ 个/mL(图2B)。初级纳米抗体文库经过3轮淘选获得HPV 16 L1 纳米抗体,ELISA鉴定结果如图2C所示,98个单克隆抗体共筛选得到36个阳性克隆。

2.3 表达纯化及鉴定纳米抗体

阳性克隆的VHH序列经真核细胞表达,经亲和层析、凝胶过滤层析,获得纯度较高的蛋白单体与二聚体(图3A)。收集纯化后的蛋白,经SDS-PAGE(图3B)和WB(图3C)鉴定,纯化得到蛋白分子量约为13 000,与预期分子量一致。以上结果表明获得了纯度较好的目的纳米抗体(Nb)。

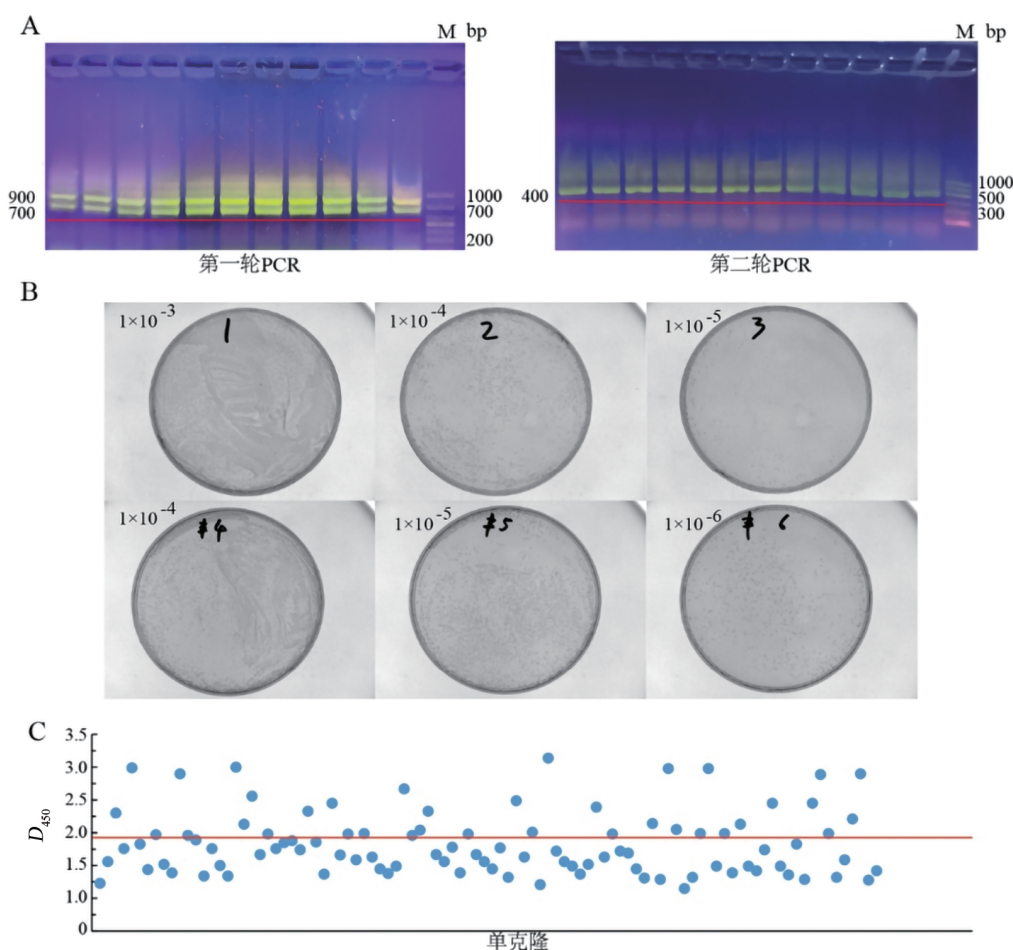
2.4 纳米抗体Nb具有较高的HPV 16 L1 蛋白亲和力且对HaCat细胞没有明显毒性

抗体的亲和力反映抗体与抗原之间结合能力的强弱。平衡解离常数(KD)通常用来评估抗体亲和力大小。KD值越低,抗体亲和力越高,抗体结合抗原能力越强。SPR检测Nb亲和力结果如图4A所示:阴性对照2F2E5与L1蛋白没有结合。Nb与HPV 16 L1 抗原蛋白结合的平衡解离常数为35.41 nmol/L,具有较高亲和力。CCK-8法测定了Nb对HaCat细胞的毒

性,以空白组为参照计算不同浓度Nb干预后HaCat细胞的相对增殖率,结果(图4B)显示,实验组HaCat细胞活力与空白组相比没有显著性差异($P > 0.05$),说明Nb对上皮细胞没有明显的毒性作用。

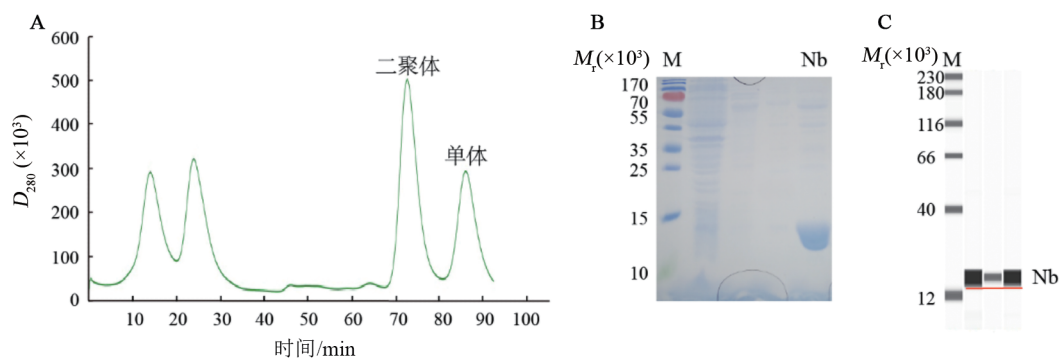
2.5 纳米抗体Nb中和HPV 16假病毒感染293FT细胞

荧光显微镜下观察HPV 16假病毒感染293FT细胞,结果如图5所示,与2F2E5阴性组相比,0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ Nb均能有效抑制假病毒感染293FT细胞。假病毒-荧光素酶报告基因实验结果进一步表明纳米抗体Nb通过与HPV 16 L1蛋白的结合,从而中和HPV 16假病毒。



A:凝胶电泳检测VHH序列扩增;B:HPV 16 LI-VHH初级文库库容及丰度;C:ELISA法鉴定阳性克隆, $D_{450} \geq 1.96$ 为阳性克隆。

图2 HPV 16 LI-VHH 纳米抗体文库构建、库容丰度测定及筛选



A:纳米抗体Nb纯化结果;B:SDS-PAGE 鉴定Nb蛋白;C:WB法鉴定Nb蛋白。M: 蛋白质分子量标准。

图3 纳米抗体Nb的纯化与鉴定

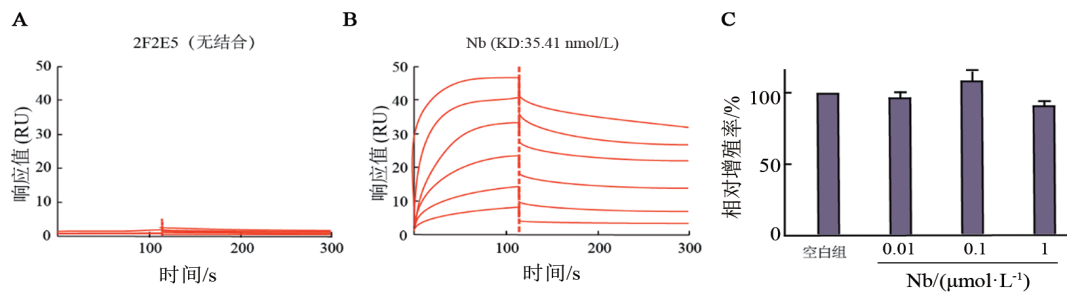
3 讨论

宫颈癌是全球女性第四常见的恶性肿瘤,中国

每年新增病例人数约14万,病死人数约3.7万^[15]。中国宫颈癌疾病负担逐年上升,发病年龄峰值年轻化、患者生存率有待提高^[16]。作为目前唯一病因明确的

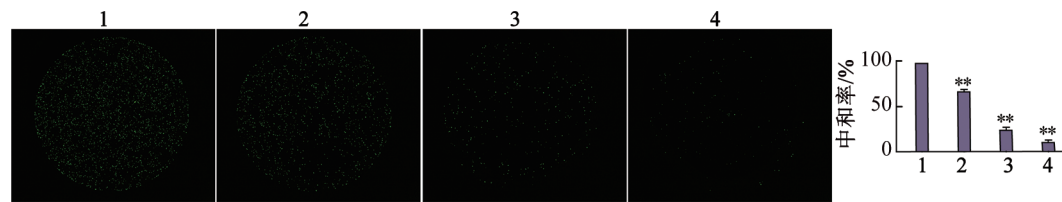
癌症,疫苗作为一级预防可以直接从源头上阻止 HPV 感染,从而控制宫颈癌以及癌前病变的发生^[17]。目前有 6 种 HPV 疫苗获批上市,都是基于 HPV L1 蛋白组装成病毒样颗粒的预防性疫苗。预防性疫苗可以有效预防 HPV 部分型别的感染,并不具有治疗效果,无法防止已经存在的 HPV 感染进展为恶性肿瘤。此外,通过体外制备大量传统抗体作用于皮肤黏膜,可以快速中和 HPV,但由于传统抗体 pH、温度稳定性

差,无法在黏膜表面形成持久的保护机制^[18]。本研究利用 HPV 16 L1 蛋白免疫羊驼,通过噬菌体展示技术构建了库容 1.304×10^{10} ,丰度 6.5×10^9 个/mL 的纳米抗体初级文库。初级抗体文库经过 3 轮淘选,ELISA 鉴定获得 36 个阳性克隆。选取阳性反应最强的菌株,测序构建重组质粒进行真核表达。经凝胶过滤层析纯化,SDS-PAGE 和 WB 鉴定,获得了纯度较好的纳米抗体(Nb)。



A、B: SPR 系统检测 Nb 与 HPV 16 L1 蛋白亲和力(2F2E5 为阴性对照);C: CCK-8 法检测 Nb 对 HaCat 细胞的毒性。

图4 纳米抗体 Nb 的亲和力与细胞毒性



1: 2F2E5 (1 $\mu\text{mol/L}$); 2: Nb (0.0625 $\mu\text{mol/L}$); 3: Nb (0.125 $\mu\text{mol/L}$); 4: Nb (1 $\mu\text{mol/L}$)。与 2F2E5 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图5 纳米抗体 Nb 中和 HPV 16 假病毒感染 293FT 细胞的荧光图像($\times 100$)

纳米抗体仅由重链可变区组成,分子质量约为 15 000,仅为传统抗体的 1/10。纳米抗体由 9 个相互平行的 β 折叠链反向折叠形成,并通过链之间形成氢键和二硫键连接起来^[19]。保守二硫键的存在与纳米抗体对高温抵抗能力密切相关。纳米抗体骨架区的 4 个亲水性氨基酸取代了传统抗体中的疏水氨基酸,溶解性增强,药物利用率提高^[20]。这些优势使得纳米抗体成为感染性疾病、肿瘤和免疫疾病防治领域的研究热点。VANMARSENILLE 等^[21]开发了 6 个具有广泛特异性的纳米抗体,通过识别空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌外膜蛋白,导致弯曲杆菌属细胞凝集,抑制弯曲杆菌属在鸡肠道内的定植,阻断细菌传播,达到预防弯曲杆菌属感染的目的。AMCHESLAVSKY 等^[22]筛选了对 11 种主要致病性产肠毒素大肠杆菌具有体外交叉保护效力的纳米抗体,经胃给药,在小鼠模型中显示出显著减少细菌定植的作用。ZHENG^[12]等利用 SARS-

CoV-2 刺突蛋白 RBD 免疫羊驼,筛选出对 SARS-CoV-2 具有高亲和力的纳米抗体。纳米抗体 H11-H4 与 SARS-CoV-2 RBD 平衡解离常数为 12 nmol/L,通过阻断 RBD 与人体血管紧张素转换酶 2 受体结合从而中和病毒^[23]。本研究获得的纳米抗体 Nb 与 HPV 16 L1 抗原蛋白结合的平衡解离常数为 35.41 nmol/L,具有较高亲和力。0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ Nb 均能抑制假病毒感染 293FT 细胞。纳米抗体 Nb 通过与 HPV 16 L1 蛋白结合,阻断 HPV 16 假病毒感染 293T 细胞。Nb 对上皮永生化 HaCat 细胞没有明显的毒性作用。

综上所述,本研究成功筛选到 1 株具有较高亲和力的 HPV 16 纳米抗体,可以有效抑制 HPV 16 假病毒侵染 293FT 细胞。同时,纳米抗体 Nb 的结构及其与 HPV 16 L1 抗原蛋白的结合位点尚不明确,还有待进一步研究。后期将继续研究 Nb 与 HPV 16 L1 抗原蛋白作用的分子学机制,为将纳米抗体 Nb 开发为预防和治疗 HPV 16 感染的潜在药物奠定基础。

[参考文献]

- [1] 李甜甜, 武丽, 吕霄, 等. 人乳头瘤病毒的感染现状及免疫治疗研究进展[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(18): 2862-2867. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2019.18.007.
- [2] MOLINA M A, STEENBERGEN R D M, PUMPE A, *et al.* HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait[J]. Trends Mol Med, 2024, 30(9): 890-902. DOI:10.1016/j.MOLMED.2024.05.009.
- [3] WEILAND T, ZGUBIC J, BRCIC L, *et al.* Detection of antibody subclasses IgA, IgM and IgG against HPV L1 in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma patients: a pilot study[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2024, 281(5): 2637-2644. DOI:10.1007/s00405-024-08537-9.
- [4] TU H F, WONG M, TSENG S H, *et al.* Virus-like particle vaccine displaying an external, membrane adjacent MUC16 epitope elicits ovarian cancer-reactive antibodies[J/OL]. J Ovarian Res, 2024, 17(1): 19 [2024-08-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38225646/>. DOI:10.1186/s13048-023-01325-9.
- [5] FOLEY J F. Nanobody pharmacology[J/OL]. Sci Signal, 2024, 17(837): eadq4734 [2024-08-08]. <https://doi.org/10.1126/scisignal.adq4734>. DOI:10.1126/scisignal.adq4734.
- [6] BATHULA N V, BOMMADEVARA H, HAYES J M. Nanobodies: the future of antibody-based immune therapeutics[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2021, 36(2): 109-122. DOI:10.1089/cbr.2020.3941.
- [7] MUYLDERMANS S. Applications of nanobodies[J]. Annu Rev Anim Biosci, 2021, 9: 401-421. DOI: 10.1146/annurev-animal-021419-083831.
- [8] HU Y Z, LIU C X, MUYLDERMANS S. Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy[J/OL]. Front Immunol, 2017, 8: 1442 [2024-08-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29163515/>. DOI:10.3389/fimmu.2017.01442.
- [9] SHARIFI J, KHIREHGESH M R, AKBARI B, *et al.* Paper title "Hu7CG2: a novel humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) biparatopic nanobody"[J]. Mol Biotechnol, 2021, 63(6): 525-533. DOI:10.1007/s12033-021-00317-8.
- [10] DONG J B, HUANG B, JIA Z J, *et al.* Development of multi-specific humanized llama antibodies blocking SARS-CoV-2/ACE2 interaction with high affinity and avidity[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 1034-1036. DOI:10.1080/22221751.2020.1768806.
- [11] BAO G F, TANG M, ZHAO J, *et al.* Nanobody: a promising toolkit for molecular imaging and disease therapy[J/OL]. EJNMMI Res, 2021, 11(1): 6 [2024-08-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33464410/>. DOI:10.1186/s13550-021-00750-5.
- [12] ZHENG L H, WANG H F, LIU X Y, *et al.* A panel of multivalent nanobodies broadly neutralizing Omicron subvariants and recombinant[J/OL]. J Med Virol, 2024, 96(3): e29528[2024-08-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38501378/>. DOI: 10.1002/jmv.29528.
- [13] 贾琼, 金聪刚, 胡世雄, 等. 丝裂原活化蛋白激酶 15 纳米抗体的制备及其在 B16-F10 黑色素瘤细胞生长过程中的抑制作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, 40(1): 72-80. DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2023.12.1297.
- [14] TABEBORDBAR M, ZHU K X, CHENG J K W, *et al.* In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells[J]. Science, 2016, 351(6271): 407-411. DOI:10.1126/science.aad5177.
- [15] 周琦, 吴小华, 刘继红, 等. 宫颈癌诊断与治疗指南(第四版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(6): 613-622. DOI:10.19538/j.fk2018060111.
- [16] 王苏蒙, 闫慧姣, 任文辉, 等. 中国宫颈癌防控进展[J]. 中国预防医学杂志, 2023, 24(12): 1366-1370. DOI: 10.16506/j.1009-6639.2023.12.017.
- [17] 卢林丽, 方佳琦, 阴建, 等. 人乳头瘤病毒疫苗的研究现状与展望[J]. 中国肿瘤, 2024, 33(2): 153-160. DOI:10.11735/j.issn.1004-0242.2024.02.A011.
- [18] AGHBASH P S, HEMMAT N, FATHI H, *et al.* Monoclonal antibodies in cervical malignancy-related HPV[J/OL]. Front Oncol, 2022, 12: 904790 [2024-08-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36276117/>. DOI:10.3389/fonc.2022.904790.
- [19] 何晓婷, 董洁娴, 沈兴, 等. 纳米抗体的稳定性及其结构基础研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2022, 49(6): 1004-1017. DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0171.
- [20] SCHUMACHER D, HELMA J, SCHNEIDER A F L, *et al.* Nanobodies: chemical functionalization strategies and intracellular applications[J]. Angew Chem Int Ed, 2018, 57(9): 2314-2333. DOI: 10.1002/anie.201708459.
- [21] VANMARSENILLE C, DÍAZ DEL OLMO I, ELSEVIERS J, *et al.* Nanobodies targeting conserved epitopes on the major outer membrane protein of *Campylobacter* as potential tools for control of *Campylobacter* colonization[J]. Vet Res, 2017, 48(1): 86. DOI: 10.1186/s13567-017-0491-9.
- [22] AMCHESLAVSKY A, WALLACE A L, EJEMEL M, *et al.* Anti-CfaE nanobodies provide broad cross-protection against major pathogenic enterotoxigenic *Escherichia coli* strains, with implications for vaccine design[J/OL]. Sci Rep, 2021, 11(1): 2751 [2024-08-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33531570/>. DOI: 10.1038/s41598-021-81895-0.
- [23] HUO J D, LE BAS A, RUZA R R, *et al.* Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2[J]. Nat Struct Mol Biol, 2020, 27(9): 846-854. DOI: 10.1038/s41594-020-0469-6.

[收稿日期] 2024-08-08

[修回日期] 2024-10-22

[本文编辑] 黄静怡