

张齐,张星星,钟发钢,等.抗 C 反应蛋白单域抗体噬菌体库的构建与初步鉴定[J].华中农业大学学报,2020,39(4):93-98.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.04.013

抗 C 反应蛋白单域抗体噬菌体库的构建与初步鉴定

张齐¹,张星星²,钟发钢²,王金泉¹,张小莺^{1,2,3}

1.新疆农业大学动物医学学院,乌鲁木齐 830000;

2.新疆农垦科学院/省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室,石河子 832000;

3.College of Veterinary Medicine, University of Guelph, Guelph, Canada, N1G 2W1

摘要 以 CRP 为免疫原免疫双峰驼后分离外周血淋巴细胞,提取总 RNA 后经逆转录制备 cDNA,通过巢式 PCR 实验获得目的基因片段并克隆至噬菌体 T7 载体臂上,构建原始噬菌体库。随后进行 4 轮生物淘选,通过 Phage-ELISA 鉴定淘选后的噬菌体库, BamHI、HindIII 双酶切构建了 pET-28a 与阳性克隆的重组质粒,转化入 BL21 菌株中进行低温诱导表达。经过 His-镍离子亲和层析柱纯化获得单域抗体,然后再用间接 ELISA 鉴定单域抗体与 CRP 的反应性。研究结果显示,试验成功构建了库容为 1.08×10^8 cfu 的抗 CRP 单域抗体噬菌体库,基因插入率为 96.43%(27/28)。生物淘选获得了 4 株与 CRP 特异性结合的阳性克隆,4 株阳性克隆表达载体构建成功,并在 BL21 细胞中成功表达单域抗体,分子质量约为 22 ku。经 ELISA 鉴定,4 个抗体均显示出高亲和力与特异性,其中 V2 与 V3 的抗体效价高达 1:3 200,证明该抗体能够适用于实际检测方法开发。

关键词 C 反应蛋白(CRP);单域抗体;噬菌体展示技术;原核表达;生物淘选

中图分类号 R 392 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)04-0093-06

在人体中,有许多急性期反应蛋白,反映血浆中炎症水平(急性期反应)的升高或降低。其中,C 反应蛋白(C-reactive protein,CRP)作为人体中最重要的、最敏感、最系统的炎症标志物,在血浆中的水平随着大量异物入侵、感染、组织损伤、肾脏和心血管疾病的发生而迅速升高^[1]。CRP 源于正五聚蛋白家族,由肝脏合成^[2-3]。CRP 血浆中的平均水平为 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但在细胞损伤或发生炎症反应时会增加至 100 倍以上^[4]。CRP 的临床诊断越来越受到重视,并且已经实际运用于多种疾病的诊断、治疗以及预后判断当中^[5],因此,针对 CRP 的诊断方法也在不断革新,目前绝大多数诊断方法依然依靠特异性抗体作为诊断工具,传统的鼠源单克隆抗体存在生产成本相对较高、耗时时间长以及大分子在进入体内的稳定性不佳等缺点,限制了它的应用。目前发现骆驼体内存在的单域抗体能够在生物学诊断中发挥良好的作用,并衍生为基因工程抗体的热点研究方向。

19 世纪初重链抗体首次于骆驼血清中发现,该抗体仅存于鲨鱼、骆驼等生物中,天然缺少 CH1 区域(重链第 1 恒定区)^[6-7],通过聚合酶链式反应(PCR)技术克隆重链可变区,所得的抗体称为单域抗体,又称 VHH 抗体(variable domain of heavy chain antibody,VHH)。VHH 与常规抗体相比具有众多优势,包括 VHH 能够更轻松地结合特定的抗原表位,识别隐藏的抗原;VHH 拥有较强的耐温性和酸碱耐受性;VHH 结构中的氨基酸由疏水性转变为亲水性,使 VHH 更容易实现可溶性表达;VHH 体积小并具有较强的穿透性,能够跨越机体的屏障系统并发挥作用^[8-9]。因此,VHH 广泛应用于食品检测、药物开发以及药学基础研究中。本研究以 CRP 为免疫原、噬菌体展示技术为基础,构建抗 CRP 驼源噬菌体 VHH 展示库,以 CRP 为抗原筛选特异性 VHH,以期获得抗 CRP 特异性驼源抗体,运用于实际检测工作。

收稿日期:2019-12-04

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31873006;31572556);乌鲁木齐市科技计划项目(P16130001);省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室优秀中青年人才培养引导计划专项(SKLSGHP2017A03)

张齐,硕士研究生.研究方向:基础兽医学. E-mail:13259850610@163.com

通信作者:王金泉,博士,教授.研究方向:动物解剖学和生理学. E-mail:523136221@qq.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1) 主要试剂: CRP (Meridian 公司), 1 岁龄双峰驼饲养于新疆石河子农垦科学院, 弗氏完全佐剂 (Sigma 公司), 弗氏不完全佐剂 (Sigma 公司), 抗骆驼二抗 (H&L, 赛默飞公司), 骆驼外周血淋巴细胞分离试剂盒 (索莱宝公司), RNA 提取试剂盒、DNA marker (天根生化科技公司), cDNA 反转录试剂盒 (康为试剂公司), PCR 酶 (TaKaRa 公司), 胶回收试剂盒 (Omega 公司), 限制性内切酶 (NEB 公司), T4 连接酶 (TaKaRa 公司), T7 噬菌体文库构建试剂盒 (Novagen 公司), T7 标签二抗 (Novagen 公司), His 标签二抗 (康为试剂公司), 质粒提取试剂盒 (Omega 公司), BL21 (DE3) 感受态细胞 (擎科生物公司), His 镍柱 (GE 公司)。

2) 仪器: 水平离心机、PCR 仪、生物安全柜、培养箱、核酸电泳仪、蛋白电泳仪、超声破碎仪、微量分光光度计、高速冷冻离心机、掌上离心机、酶标仪、凝胶成像分析系统、核酸定量仪。

1.2 方法

1) 骆驼的免疫及效价检测。将 CRP 蛋白以皮下注射的方式免疫双峰驼, 共免疫 5 次。1 mg CRP 蛋白与弗氏完全佐剂充分混匀, 进行首次免疫, 随后的 4 次加强免疫使用 750 μg CRP 蛋白与弗氏不完全佐剂的完全混匀物, 每次间隔 15 d, 同时收集血清以检测抗体效价。

2) 纳米抗体目的片段的获取。在第 5 次免疫 7 d 后采集骆驼抗凝血, 通过淋巴细胞分离试剂盒获取骆驼外周血淋巴细胞, RNA 提取试剂盒提取淋巴细胞总 RNA, 并使用反转录试剂盒对所得 RNA 进行反转录, 获得 cDNA, 通过巢式 PCR 获取 VHH 目的片段。第 1 轮扩增以反转录所得 cDNA 作为模板, 正向引物 Nested-1-up, 反向引物 Nested-1-down (Nested-1-up: GTCCTGGCTGCT CTTCTA-CAAGG, Nested-1-down: GGTACGTGC TGTT-GAACTGTTCC), 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳鉴定, 预期出现大小约为 900 bp 与 600 bp 的条带, 对 600 bp 的条带进行切胶回收。

第 2 轮以 600 bp 的条带为模板进行 PCR 扩增, 正向引物 Nested-2-up, 反向引物 Nested-2-down (Nested-2-up: CGAATTCGGGTGGTCAGGTG-CAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGG, Nested-2-down: CCAAGCTTTTATGAGGAGACGGT-GACCTGGGTCC), 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 1% 琼脂糖凝胶获取大小约 400 bp 的条带, 切胶回收, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3) T7 噬菌体文库的构建。使用 *EcoR* I 与 *Hind* III 酶切巢式 PCR 获得的 VHH 目的片段, 采用微量分光光度计进行浓度测定, 调整插入序列与载体质量比, 加入 T7Select10-3b 载体、VHH 片段和 T4 连接酶, 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 10 h。随后将 5 μL 重组 DNA 加到 25 μL T7 噬菌体包装物中, 22 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h 进行体外包装, 加入 270 μL 的 LB 液体培养基终止反应, 获得原始文库。取少量原始文库用 10 倍比稀释法进行噬菌体文库容量的测定, 剩余文库立即加入培养好的 BLT5403 宿主菌中进行扩增。添加 20% 无菌甘油至噬菌体扩增文库中, 充分混匀后 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4) 特异性 VHH 的生物淘选。CRP 抗原以每轮递减的方式包被, 将抗原包被于酶标板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBST 缓冲液 (PBS + Tween-20) 洗板 3 次, 以 5% 的脱脂牛奶每孔 200 μL 进行 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, PBST 洗板 4 次, 将 T7 噬菌体以每轮递减的方式投入酶标板中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育结合 1 h, PBST 洗板 8 次, 1% SDS 每孔 100 μL 加入酶标板, 室温孵育结合 15 min, 获取洗脱产物, 进行文库的扩增, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

5) Phage-ELISA 鉴定阳性克隆。从第 4 轮淘选的洗脱产物的滴定平板中挑取 96 个噬菌斑, 分别加入到 1 mL 的 BLT5403 宿主菌中进行扩增。将 CRP 以 3 μg 每孔包被于酶标板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBST 洗板 3 次, 以 5% 脱脂牛奶每孔 200 μL 进行 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, PBST 洗板 4 次, 加入 100 μL 噬菌体扩增液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗板 4 次, 加入抗 T7 二抗 (1 : 5 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗板 4 次, 加入 TMB 显色 10 min, 加入 H_2SO_4 (2 mol/L) 终止反应, 酶标仪记录吸光度值。选取 20 个吸光度值较高的阳性克隆菌液, 重复上述过程, 挑选 12 个阳性克

隆,送至擎科生物公司进行序列分析。

6)VHH的表达与纯化。以噬菌体扩增液为模板、Exp-up与Exp-down(Exp-up:CGGGATCCCAG-GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGRGGAGG, Exp-down:CCCAAGCTTTTATGAGGAGACGGTGAC-CTGGGT)为引物进行PCR实验,反应程序为:95℃预变性2min;95℃变性10s,69℃退火10s,72℃延伸30s,30个循环;72℃延伸2min,对约390bp的片段进行切胶回收。用BamH I与Hind III分别酶切片段与载体pET-28a,构建重组表达载体,转入BL21感受态细胞中,进行诱导表达,表达条件为:22℃,12h,诱导剂IPTG终浓度0.8mmol/L。使用超声破

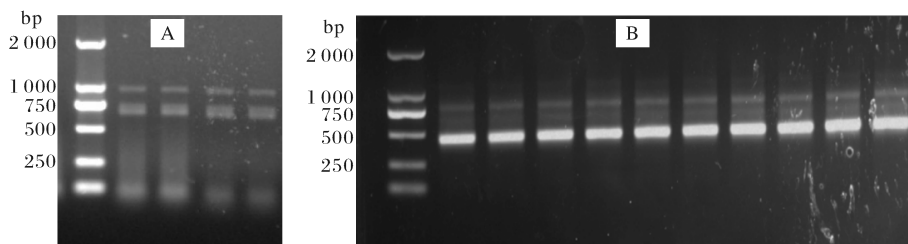
碎仪破碎菌体,收取上清进行His-镍离子亲和层析柱纯化,12% SDS-PAGE胶验证洗脱蛋白,并于-20℃保存。

7)VHH活性鉴定。采用间接ELISA鉴定,方法同本文材料与方法“1.2方法5)”。

2 结果与分析

2.1 VHH目的片段PCR扩增结果

经过5次免疫之后,骆驼抗血清效价达到1:640000,巢式PCR两步法成功获取目的片段。第1步获得约900bp和600bp的条带(图1A),第2步获得约400bp的条带(图1B)。



A:巢式PCR第一轮核酸电泳图 The first round of DNA electrophoresis of nested PCR; B:巢式PCR第二轮核酸电泳图 The second round of DNA electrophoresis of nested PCR.

图1 巢式PCR结果

Fig.1 Nested PCR results

2.2 噬菌体文库的构建与鉴定

原始文库库容大小为 1.08×10^8 cfu,经过扩增后库容达到 3.4×10^{12} cfu。菌斑PCR结果显示,随机挑取的28个单菌斑中只有1个菌落未扩增出约400bp的片段(图2),文库的插入率为96.43%。随机挑选其中的12个阳性克隆送至擎科生物公司测序,结果显示12个阳性克隆均测序成功,通过NCBI中Blast比对,噬菌体文库序列均为VHH序列。经过DNAMAN序列比对分析,显示所建噬菌体文库具有良好的多样性(图3)。

2.3 噬菌体库阳性克隆淘选结果

使用CRP蛋白作为抗原筛选,经过4轮淘选,

洗脱库容达到 4.5×10^8 cfu,为原始文库库容的数倍(表1)。从淘选的洗脱量以及回收率可以看出,特异性噬菌体得到有效富集。

表1 4轮筛选后噬菌体的富集度变化

Table 1 Phage enrichment changes after four rounds of screening

轮次 Rounds	抗原包被量/ μg Antigen coating amount	投入量/ cfu Inputs	洗脱量/ cfu Outputs	回收率 Recovery rate
1	20	1×10^{12}	4.45×10^9	4.45×10^{-3}
2	15	8×10^{11}	1.00×10^8	1.25×10^{-4}
3	10	4×10^{11}	7.50×10^7	1.88×10^{-4}
4	5	1×10^{11}	4.50×10^8	4.50×10^{-3}

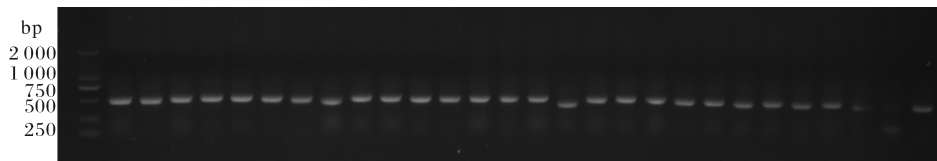


图2 原始文库滴定

Fig.2 Raw library titration

	<-----FR1----->	<---CDR1--->	<-----FR2----->	<---CDR2--->	<-----FR3----->		
	10	20	30	40	50	60	70
VHH-02.txt	QVQLVESGGSVQAGGSLRLS	CAASGFTNSRY	MAWFRQAPGKEREEVA	SISPSGLNTY	YTDSVKGRFTISRDNKNT		78
VHH-06.txt	-----v	---y-f-.tw	c-g-----f-s	v-qad-.s-a	-afp-s-----v-k-----		77
VHH-08.txt	-----	---l-i-.nt	cis--p-----w-	hvdtsf.s.g-l	-apf-----		77
VHH-17.txt	-----	g--y-d.-.	c-----g-	v-hsn-.l-s	-g--id-----k-i-		77
VHH-22.txt	-----	v--n-y-.gr	c-----a-g	f-ynd-g.lpi	-a-a-----q--v-k-		78
VHH-27.txt	-----	---l-y...s	c-g---v--f--w-	g-nsq-dgt-t	-a-----q--		76
VHH-29.txt	-----	---f-h-y-hhss-	c-g-----g-g-	a-dnv-.ris	-a-----k-s-----		78
VHH-38.txt	-----	---k--t	---fd.ds	d-g-s-----s-c-l-	t-dsd-.t-f	-sr--q-----q-----	77
VHH-45.txt	-----	pp-----a-	t-rdpyr.ag	clg-----g-	a-yipdg.t-	-a-----q-d-----	78
VHH-51.txt	-----	---m-----	i--aidr.s	c-g-s-----g-	t-yvgdgg-t-d	-a-----l-----	79
VHH-72.txt	-----	---l-p-----	---f-.nc	y-s-v-----gl-w-s	---ynd-r.y-	-a-----	78
VHH-93.txt	-----	---m-----	i--aidr.s	c-g-s-----g-	t-yvgdgg-t-d	-a-----l-----	79

	<-----CDR3----->	<---FR4--->					
	80	90	100	110	120	130	
VHH-02.txt	VYLQMNLSLKPEDTAMYYCA	KDS..RRN..YFEPSPNP...	DY	WGQGTQTVVSS			124
VHH-06.txt	m-----t-----	ar....wrp-csgsm....dy-					123
VHH-08.txt	md--k-n-----	ah.....n-csyty....qhr-		r-----			121
VHH-17.txt	l-----	ara.i-pwvpscgnll...rdyn-					129
VHH-22.txt	l---s-----	aaglgfcstt-cc-rtr...ytyne					130
VHH-27.txt	l--k-n-----	a..rgwspglgddyeycggeeynd					129
VHH-29.txt	l---d-----	as..vlvlnl.-eyey.....n-					124
VHH-38.txt	-----d--v--s-	prd....prwdgtcg.....e					119
VHH-45.txt	-----v-s-	aeg...dnpvrt-vaqc...dfa					126
VHH-51.txt	l---d-----g---	y...rpttggwscsfag....qwqs					127
VHH-72.txt	-----s---l---	tavgvg--sd-vr--lmig...yns					130
VHH-93.txt	l---d-----g---	y...rpttggwscsfag....qwqs					127

图 3 12 个单克隆噬菌斑序列分析

Fig.3 Sequence analysis of 12 monoclonal plaques

2.4 Phage-ELISA 鉴定结果

通过 Phage-ELISA 对挑取的 96 个单克隆噬菌斑进行鉴定,酶标仪测 OD₄₅₀ 值,结果显示,OD₄₅₀ 值

大于 1.0 的单克隆有 38 个(图 4,使用 GraphPad Prism 作图),说明经过 4 轮淘选,噬菌斑与抗原的结合性良好。

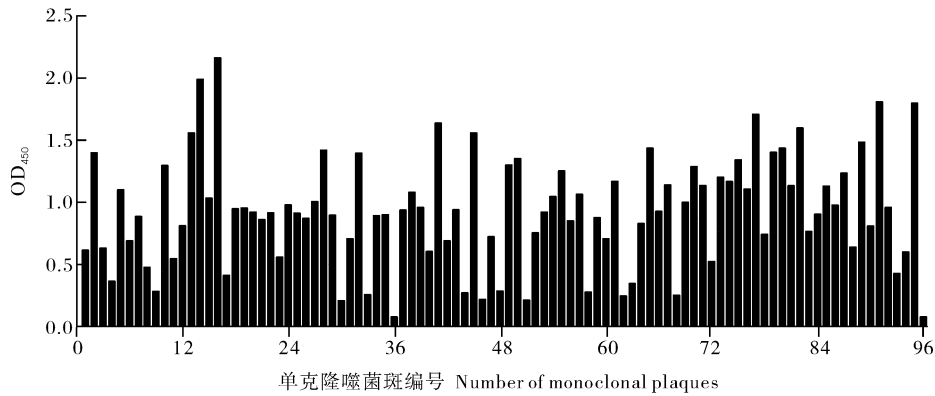


图 4 Phage-ELISA 检测 4 轮淘选后的单克隆噬菌斑

Fig.4 Phage-ELISA detection of monoclonal plaques after four rounds of panning

2.5 VHH 的表达与纯化

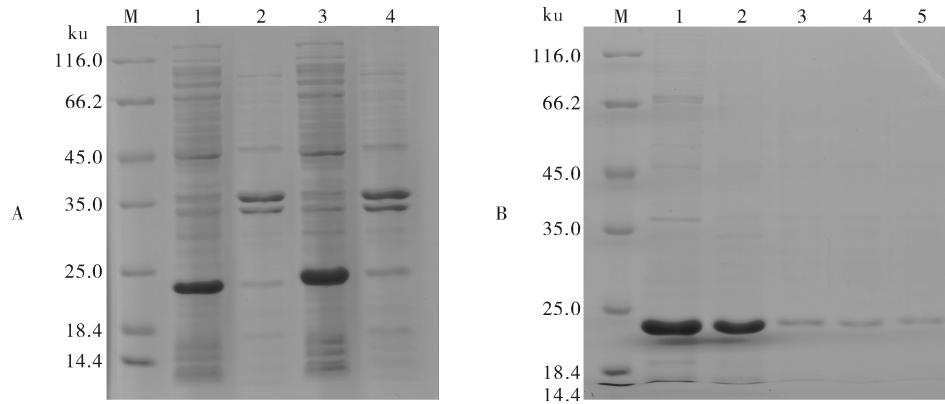
SDS-PAGE 结果显示,在低温诱导后,VHH 蛋白可溶性表达,超声后上清中可看到大量 VHH 蛋白(图 5A)。通过 His-镍柱纯化后的蛋白得到 1 条纯度很高的约 22 ku 的条带(图 5B),说明 VHH 纯化结果良好。

2.6 VHH 活性鉴定

选取 4 株阳性克隆进行表达,编号为 V1-V4。通过间接 ELISA 判断结合活性。结果显示 4 株抗体与 CRP 蛋白都有结合,其中 V2 和 V3 有更好的结合活性,效价达到了 1 : 3 200(图 6)。

3 讨论

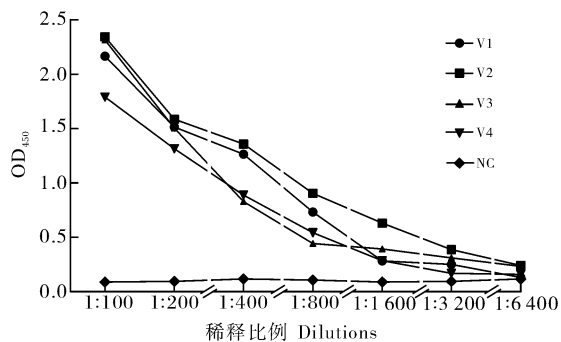
目前,抗体的小型化改造是一个热门的研究方向,因此诞生了 Fv 单域抗体和 Fab 抗体及 scFv 单链抗体等一系列小分子的基因工程抗体。但这些抗体普遍存在一些缺点如抗体水溶性差、易发生包涵体表达以及制备过程繁琐等^[10]。近年来,驼源单域抗体受到越来越多的关注,引起了全世界众多研究人员的兴趣并开始超越医学、农业甚至工业的许多领域^[11]。VHH 已经被证明是生物技术许多应用中高效和高价值的分子工具,其稳定的结构以及显著



A: M: Marker; 1, 3: 超声后上清 Supernatant after sonication; 2, 4: 超声后沉淀 Precipitation after sonication; B: M: Marker; 1-5: 洗脱液 Eluent.

图5 VHH原核表达(A)及纯化(B)

Fig.5 VHH prokaryotic expression(A) and purification(B)



V1-V4: 表达的 VHH 抗体 Expressed VHH antibody; NC: 阴性对照 Negative control.

图6 VHH间接ELISA实验

Fig.6 VHH indirect ELISA experiment

的特异性使得它们完全能够替代常规抗体^[12]。本研究依托 VHH 的优势,免疫骆驼并建立 VHH 噬菌体库,对评价文库最重要的指标库容量和阳性插入率进行测定,库容量为 1.08×10^8 ,阳性插入率达到 96.43%,研究结果显示,VHH 与其他工程抗体相比,从库容量相对较小的噬菌体展示文库中获得亲和力较高的 VHH 更为简便(scFv 一般为 $10^{10} \sim 10^{12}$ cfu,VHH 只需 $10^6 \sim 10^9$ cfu)^[13],因此,本研究建立的 VHH 噬菌体库完全满足后续实验需求。

本研究经原核表达获得 VHH 抗体,大小约 22 ku,与理论中 VHH 描述的分子质量稍有偏差,但是研究经过多次验证均为相同结果,对基因序列进行测序分析后,得出原因是实验室所用载体标签大小影响了总分子质量的大小,也与前人文章所得结果分子质量大小接近^[14],证明本试验成功表达 VHH 抗体。

多年来,CRP 已经成为用来检测全身炎症状况的通用的炎症标记物。随着时间的推移,CRP 检测已经出现了多种多样的技术革新,例如电化学生物传感器、纳米材料检测器等,这些检测方法都需要提供高质量的抗体作为研究工具。前人的研究已经获得了 CRP 的鼠源、兔源多克隆抗体,单克隆抗体以及杂交瘤抗体,本研究成功构建了抗 CRP 噬菌体抗体库,筛选出抗 CRP 的噬菌体,通过原核系统成功表达,获得 4 株与 CRP 特异性结合的 VHH。希望在后续实验中验证抗 CRP VHH 在实际检测中的可行性,并充分发挥 VHH 在检测方面的优势,为开发检测方法提供更可靠的抗体来源。

参考文献 References

- [1] PEPYS M B, HIRSCHFIELD G M. C-reactive protein: a critical update[J]. Journal of clinical investigation, 2003, 111(12): 1805-1812.
- [2] PEPYS M B, BALTZ M L. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (Pentaxins) and serum amyloid A protein[J]. Advances in immunology, 1983, 34: 141-212.
- [3] SHRIVE A K, GHEETHAM G M, HOLDEN D, et al. Three dimensional structure of human C-reactive protein[J]. Nature structural biology, 1996, 3(4): 346-354.
- [4] KATRIINA H, EBRAHIM S, LAWLOR D A. A systematic review of the association between circulating concentrations of C reactive protein and cancer[J]. British journal of social medicine, 2007, 61(9): 824-833.
- [5] 李晓阳, 郭学青. C 反应蛋白[J]. 河北医学, 2002, 8(9): 856-857. LI X Y, GUO X Q. C-reactive protein[J]. Hebei medical journal, 2002, 8(9): 856-857 (in Chinese).
- [6] HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCHE T, MUYLDER-

- MANS S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448.
- [7] GREENBERG A S, AVILA D, HUGHES M, et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks[J]. *Nature*, 1995, 374(6518): 168-173.
- [8] DESMYTER A, TRANSUE T R, GHARROUDI M A, et al. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme[J]. *Nat Struct Biol*, 1996, 3(9): 803-811.
- [9] MAGEZ S, BARAL T N, NGUYEN V K, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology[J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2009, 128(1/2/3): 178-183.
- [10] 夏雪琴, 木亚沙尔·买买提拉洪, 翟田甜, 等. 抗卵泡刺激素受体纳米抗体的制备及鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(8): 829-833. XIA X Q, MU YASSAR M, ZHAI T T, et al. Preparation and identification of anti-follicle-stimulating hormone receptor nanobodies[J]. *Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 2013, 29(8): 829-833 (in Chinese with English abstract).
- [11] HASSANZADEH-GHASSABEH G, DEVOOGDT N, DE PAUW P, et al. Nanobodies and their potential applications[J]. *Nanomedicine*, 2013, 8(6): 1013-1026.
- [12] MUYLDERMANS S. Nanobodies: natural single-domain antibodies[J]. *Annual review of biochemistry*, 2013, 82(1): 775-797.
- [13] LI J W, XIA L, SU Y, et al. Molecular imprint of enzyme active site by camel nanobodies: rapid and efficient approach to produce abzymes with alliinase activity[J]. *Journal of biological chemistry*, 2012, 287(17): 13713-13721.
- [14] 高小龙, 胡湘云, 付向晶, 等. 新城疫病毒 F 蛋白纳米抗体的筛选及活性鉴定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2016(8): 1645-1651. GAO X L, HU X Y, FU X J, et al. Screening and characterization of VHH against newcastle disease virus fusion protein[J]. *Chinese journal of animal and veterinary sciences*, 2016(8): 1645-1651 (in Chinese with English abstract).

Construction and identification of phage library of single domain antibody against C-reactive protein

ZHANG Qi¹, ZHANG Xingxing², ZHONG Fagang², WANG Jinqian¹, ZHANG Xiaoying^{1,2,3}

1. *College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China;*

2. *State Key Laboratory for Sheep Genetic Improvement and Healthy Production / Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China;*

3. *College of Veterinary Medicine, University of Guelph, Guelph, Canada, N1G 2W1*

Abstract After immunizing Bactrian camel with CRP as immunogen, the peripheral blood lymphocytes were isolated, the total RNA was extracted, and then the cDNA was obtained by reverse transcription. The target gene fragment was obtained by nested PCR and cloned on the arm of T7 vector of phage to construct the original phage library. After four rounds of biological panning, the phage library after panning was identified by Phage-ELISA. The recombinant plasmids of pET-28a and positive clones were constructed by *Bam*H I and *Hind* III double enzyme digestion and transformed into BL21 strain for low-temperature induction expression. The single domain antibody was purified by His-Ni affinity chromatography, and then the reactivity between the single domain antibody and CRP was identified by indirect ELISA. The results showed that the phage library with a capacity of 1.08×10^8 cfu was successfully constructed, and the gene insertion rate was 96.43% (27/28). Four positive clones were successfully constructed and expressed in BL21 cells. The molecular weight was about 22 ku. By ELISA, the four antibodies showed high affinity and specificity. The titer of V2 and V3 was 1 : 3 200, which proved that the antibody could be applied to the development of practical detection methods.

Keywords C-reactive protein (CRP); single domain antibody; phage display technology; prokaryotic expression; biopanning

(责任编辑:边书京)