## 復旦大學

## 本科毕业论文



论文题目: 特异识别哮喘相关蛋白 Galectin-10 的纳米抗体的筛 选和验证

姓 名: 牟坤汀 学 号: 18307110473

院 系:生命科学学院

专 业:生物科学

指导教师: 丁澦 职 称: 教授

单 位:复旦大学生命科学学院

完成日期: 2022 年 5 月 29 日

# 特异结合哮喘相关蛋白 Galectin-10 的纳米抗体的筛选和验证

完成人

牟坤汀

指导小组成员

丁瀩 教授

## 目 录

摘要	į	I
Abst	tract	ІІ
<b>一、</b>	前	言1
	1.1	哮喘的现状及哮喘药物发展的现状1
	1.2	Galectin-10 及其与呼吸系统疾病的关系
	1.3	纳米抗体 3
		1.3.1 单链抗体的发现
		1.3.2 纳米抗体的特点
		1.3.3 纳米抗体的应用前景
	1.4	Gal10 特异性抗体 5
	1.5	总结和展望 5
_,	材料	与方法7
	2.1	实验材料
		2.1.1 菌株、质粒载体
		2.1.2 蛋白质表达纯化相关材料
	2.2	试剂
		2.2.1 分子克隆相关试剂及试剂盒
		2.2.2 表达和纯化实验相关试剂
		2.2.3 其他常用试剂
	2.3	溶液以及培养基配制

	2.3.1 培养基9
	2.3.2 琼脂糖凝胶
	2.3.3 Ni-NTA 亲和层析纯化相关试剂
	2.3.4 阴离子交换层析(Q 柱)纯化相关试剂 10
	2.3.5 分子筛层析以及 FSEC 相关试剂10
	2.3.6 蛋白电泳相关试剂10
2.4	实验仪器与设备11
	2.4.1 实验室常用仪器11
	2.4.2 离心机
	2.4.3 电泳仪
	2.4.4 溶液配制辅助仪器
	2.4.5 蛋白纯化使用仪器12
	2.4.6 蛋白分子相互作用分析仪器12
	2.4.7 蛋白 Tm 值分析仪器12
2.5	实验软件12
	2.5.1 本地软件
	2.5.2 在线软件
2.6	实验方法
	2.6.1 分子克隆获得质粒表达载体
	2.6.2 蛋白质表达纯化
	2.6.3 质谱鉴定
	2.6.4 目的抗体的筛选

		2.6.5 Octet RED96 进行抗原抗体相互作用验证21	
		2.6.6 FSEC 进行抗原抗体相互作用验证	ı
		2.6.7 NanoDSF 寻找 Gal10 纯化最适缓冲体系	i
		2.6.8 Gal10 体外结晶24	4
三、	研究	飞结果	5
	3.1	抗原 Galectin-10 的原核表达与纯化	5
		3.1.1 Gal10 初步纯化以及质谱验证2	:5
		3.1.2 NanoDSF 确定 Gal10 最适纯化条件	6
		3.1.3 高纯度 Gal10 抗原的获得	7
		3.1.4 分别表达纯化带有 SUMO 标签和 His 标签的 Gal10 2	!8
	3.2	目的抗体筛选2	28
	3.3	纳米抗体的原核表达与纯化	30
	3.4	Galectin-10 与纳米抗体共表达	32
	3.5	Galectin-10 与其纳米抗体相互作用探究	13
		3.5.1 Octet RED96 测试 Gal10 与不同纳米抗体的结合解离常数 3	3
		3.5.2 Gal10 与不同纳米抗体复合物稳定性测试	4
		3.5.3 Octet RED96 重复测试	5
	3.6	Galectin-10 体外结晶获得	16
四、	讨	论	7
参考	<b>⋚文</b> 南	<b>:</b> : : : : : : : : : : : : : : : : : :	9
劲诅	4	$\it \Delta$	1

## 摘要

哮喘是一种难以根治的慢性气道炎症,已成为急需关注和处理的公共卫生和 医疗重要问题之一。最近发表于 Science 的研究表明 Charcot-Levden 晶体(CLCs) 是引起炎症的根源,而其组成成分 Galectin-10 (Gal10) 可能成为治疗相关疾病 的重要靶点。通过设计特异性单克降抗体溶解 CLCs, 研究人员能够明显缓解哮 喘小鼠的相关症状,但单克隆抗体存在保存困难,生产和运输成本高等问题,需 要成本更低的治疗方法来解决这一难题。纳米抗体与传统抗体相比具有特异性强、 稳定性高等优势,近年已成为研究热点。因此,我们希望筛选可溶解 CLCs 的纳 米抗体,从而为哮喘治疗提供新方案。由于 Gal10 在浓度高时极易沉淀,因此本 研究首先对 Gal10 的缓冲条件和纯化方案进行了优化,探索最优的蛋白表达纯化 流程。此外,我们也利用 Gal10 容易自发结晶的特性在体外成功获得了大量 CLCs 微晶,可用于抗体的功能验证。之后,我们利用纯化得到的 Gal10 蛋白筛选到了 可能与其存在相互作用的十种不同的纳米抗体,并尝试了抗原抗体单独表达和共 表达两种纯化方案。最后,我们利用 Octet RED96、FSEC 等方法进行了抗原抗 体相互作用测试。虽然相互作用测试显示已筛得的抗体并不能与 Gal10 稳定结 合,但该方法为哮喘疾病的治疗提供了新的思路。通过构建更大库容量的纳米抗 体库,我们也许能最终筛选出最优的抑制 CLCs 形成的纳米抗体,最终为哮喘等 呼吸道疾病的治疗提供新方案。

关键词: 哮喘, 呼吸系统疾病, Galectin-10, 纳米抗体

#### **Abstract**

Asthma is a kind of chronic airway inflammation that is difficult to cure, which has become one of the public health issues urgently waiting to be solved. A recent study published in Science suggests that Galectin-10 (Gal10), the component of Charcot-Leyden crystals (CLCs), is an essential target for the treatment of the disease. By creating specific monoclonal antibodies to dissolve the CLCs, researchers could alleviate asthma symptoms in mice significantly. However, monoclonal antibodies are expensive to produce, transport, and preserve, so the need for lower-cost drugs is urgent. Compared with traditional antibody, nanobody has the advantages of strong specificity and high stability. The development of nanobody drugs has become one of the research focuses currently. Therefore, we hope to screen nanobodies that can dissolve CLCs, and thus provide new treatment options for asthma. Since Gal10 tends to precipitate at high concentration, we first optimized the buffer conditions and purification scheme of Gal10 to explore the optimal protein expression and purification process. In addition, we successfully obtained CLC microcrystals in vitro thanks to Gallo's nature of spontaneous crystallization, which can be used for functional verification of nanobodies. After that, we screened 10 different nanobodies that might interact with Gal10, and tried to purify them alone or with Gal10. Finally, we used Octet RED96 and FSEC to test the antigen-antibody interaction. Although interaction tests showed that these antibodies did not bind stably to Gal10, this method provided new ideas for the treatment of asthma. By building nanobody libraries with a more extensive library capacity, we may finally get the optimal nanobodies to inhibit the formation of CLCs and ultimately provide a new possible approach for the treatment of respiratory diseases.

Keywords: asthma, respiratory disease, Galectin-10, nanobody

### 一、前言

#### 1.1 哮喘的现状及哮喘药物发展的现状

哮喘是一种人群中普遍发生的异质性疾病,具有慢性气道炎症等特征,常表现为胸闷、气短、呼吸不畅等呼吸系统相关症状。然而,这一疾病的致病因素复杂,环境过敏原暴露、病毒性呼吸道感染<sup>[1]</sup>等因素均可能导致哮喘的发生。据统计,在我国 20 岁以上人群中,哮喘患者人数已达 4570 万,患病率约为 4.2%<sup>[2]</sup>,可以说哮喘已经成为急需关注和处理的公共卫生和医疗问题之一。但目前的治疗方案多仅能防止症状加重和复发,仍缺乏有效的方法根治这一疾病。

哮喘的治疗药物很多,并且有吸入、口服、静脉注射等多种给药方式。利用β2 受体激动剂、抗胆碱能药物、茶碱类药物等支气管舒张剂松弛气道平滑肌是目前常用的一种治疗策略,通常用于哮喘的急性发作。但这类药物没有从根源上解决问题,仅仅只能在疾病发作时进行被动的治疗,无法对疾病进行控制。吸入性糖皮质激素是目前最有效的控制性治疗药品,能够从根源上控制哮喘的发作。通过吸入用药,药物就能直接作用于呼吸道和肺部,所产生的身体不良反应很小,治疗方法也比较简单直接,是首选的用药途径。但皮质类固醇激素的局部治疗可能导致念珠菌病、喉咙肿痛以及发音困难等上呼吸道副作用,长期激素治疗也可能抑制儿童的生长<sup>[3]</sup>。因此,副作用更低的吸入式药物有极度广阔的应用前景。

#### 1.2 Galectin-10 及其与呼吸系统疾病的关系

1853年,Charcot 医生在哮喘病人的痰液中发现了一种六边形、双锥体形状的结晶。1872年,Leyden 医生也在哮喘病人的痰液中观察到了类似的结晶,这种晶体随后就被命名为 Charcot-Leyden 晶体 (CLCs) [4]。这是一种罕见的蛋白质在体内自发结晶的现象,在之后的一百多年内,研究人员对这一晶体进行了大量的研究。近几十年,科学家发现 CLCs 的组成成分是一种叫作 Galectin-10(Gal10)的分泌蛋白。Gal10是一种在嗜酸性和嗜碱性粒细胞中都十分丰富的蛋白,其形成与嗜酸性粒细胞有着密切的关系。在病原体、寄生虫感染等嗜酸性粒细胞介导的炎症中也发现了 CLCs。

关于 Gal10 在体内的自发结晶现象,研究人员已经开展了大量的研究。研究人员发现,在质膜解体后,嗜酸性粒细胞就会将 Gal10 分泌到细胞外形成 CLCs,但是添加包括血浆和红细胞分解产物在内的物质就可以有效防止 CLCs 的形成<sup>[5]</sup>。这些结果表明,Gal10 能够与细胞内的某些分子结合,并且拥挤的细胞内环境可能会限制 Gal10 的分子间的相互作用,从而抑制结晶。

尽管已经被报道超过 160 年,Gal10 蛋白在体内的功能及其作用的分子机制还有待进一步研究,目前比较公认的是 Gal10 蛋白在抑制 T 细胞的功能上有重要作用。对 Gal10 蛋白在细胞中定位的研究暗示着这一蛋白可能在体内发挥着更多功能。近期有研究表明 Gal10 蛋白主要分布在嗜酸性粒细胞的细胞核中<sup>[6]</sup>,这暗示着 Gal10 可以被主动运输到核区内,并在调节转录和翻译的过程中存在着一定的作用。此外,也有研究报道了 Gal10 在嗜酸性粒细胞的分化过程中发挥了重要功能<sup>[7]</sup>。这些研究表明 Gal10 蛋白在嗜酸性粒细胞在体内发挥功能以及 T 细胞相关的免疫中有十分重要的意义。在这种情况下,直接对局部蛋白质进行抑制的治疗方案或许是一种更好的选择。

2019年 Science 报道了 Emma K. Persson 等人的研究结果<sup>[8]</sup>,他们发现 CLCs 不只是在炎症和过敏性疾病中"出现"而已,这种蛋白质结晶就是引起炎症的根源。通过一系列的荧光标记、高分辨率分析等方法,研究人员在结构上分析引发 Gal10 自发结晶的可能位点,并设计突变体验证,最终发现 Tyr<sup>69</sup>→Glu 突变可以导致 Gal10 失去自发结晶特性,确定了 Gal10 自发结晶的关键位点为 Tyr<sup>69</sup>。研究人员 利用大肠杆菌制备出与天然 CLCs 相同的 Gal10 蛋白晶体,将这种晶体注射到小鼠体内可以诱导正常小鼠表现出哮喘的症状,而不能自发结晶的突变 Gal10 蛋白则不能引起相关症状。

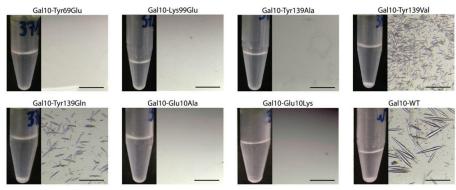


图 1 Gal10 不同突变体的自结晶特性[8]

借助光学显微镜比较 Gal10 的一组突变变体的自结晶行为。每张图片代表具有相同结果的两个重复实验(n=2)。比例尺, $500\mu m$ 

此外,他们还筛选出了针对结晶 Gal10 的单克隆抗体。在用 Gal10 晶体诱导产生哮喘的小鼠模型中,使用这种溶解 CLCs 的抗体后,小鼠的肺部炎症得到抑制,产生的黏液也明显减少。这一研究为医治相关疾病提供了可能的新方案。但单克隆抗体分子尺寸大、生产成本高、稳定性差等缺点限制了它们的实际应用价值,需要成本更低、稳定性更强的药物来解决这一难题。

#### 1.3 纳米抗体

#### 1.3.1 单链抗体的发现

在生物学及医学领域,抗体由于其高亲和力、高特异性等优良特性得到了广泛的应用。我们平时所说的抗体多指单克隆抗体,但这种抗体分子量较大,并且往往生产、保存困难<sup>[9]</sup>。传统的免疫球蛋白 IgG 分别由 2 条重链和 2 条轻链构成,2 条重链之间及重链与轻链之间都是通过二硫键进行连接,最终形成一个 Y字型结构。重链包括 CH1、CH2 和 CH3 三个可变区和 VH 恒定区。轻链也包括可变区和恒定区(如图 2 所示),其恒定区和可变区都只有一个,分别为 CL 和 VL。可变区中有部分氨基酸容易发生突变,被称为高变区,位于抗体两臂的末端。这部分结构决定了免疫球蛋白 IgG 的抗原特异性<sup>[10]</sup>。

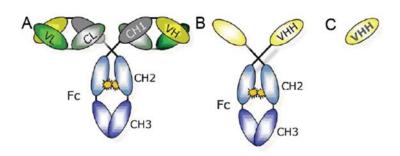


图 2 不同抗体的结构示意图[11]

(A)传统抗体结构; (B)重链抗体结构; (C)可结合抗原的最小稳定结构 VHH,即纳米抗体

20世纪 90 年代,研究人员在骆驼科动物的血清中最先发现了一种天然缺少轻链的抗体<sup>[12]</sup>,后来在鲨鱼、蝠鲼和鳐鱼等软骨鱼类的体内也陆续发现了该结构 <sup>[13,14]</sup>。这种抗体并没有因为缺少轻链而丧失功能或相互聚集成块,相反,它依然保留了抗原结合区域和对抗原的高亲和力<sup>[15]</sup>。更重要的是其可变区被单独表达出来时,依然具有相当好的稳定性和抗原亲和力,这种抗体也就是我们现在常说的纳米抗体(nanobody)。

#### 1.3.2 纳米抗体的特点

VHH 是自然界中目前已知最小的抗原结合单位,其长度只有 4nm,分子量仅 15kD,称为纳米抗体(nanobody)。该抗体只有一个结构域,没有传统抗体的 Fc 段(如图 2 所示)。这种特殊的结构使得纳米抗体具备一些特殊的性质,例如低免疫原性、高亲和力、高稳定性、高水溶性等,在表达制备上也具备明显的优势<sup>[16]</sup>。因此,纳米抗体药物往往能直接口服,并且极易吸收,这对于临床药物的研发无疑是非常重要的。

#### 1.3.3 纳米抗体的应用前景

纳米抗体的优良特性使其作为靶向药在医药领域前景广阔,目前也已有将纳米抗体应用于临床的尝试。赛诺菲公司研制了获得性血栓性血小板减少性紫癜的纳米抗体药物 Cablivi,已在 III 期临床研究数据上显示出了积极效果<sup>[17,18]</sup>,并得到多国卫生部批准。国内医药公司开发的 PD-L1 单域抗体 KN035 也已作为全球首个皮下注射纳米抗体的新药,向国家药品监督管理局提交了上市申请。

在新冠病毒疫苗研发过程中,纳米抗体药物也发挥了重要的作用。复旦大学应天雷教授等人针对新冠病毒筛选出了一系列纳米抗体<sup>[19]</sup>。2020年11月19日,由匹兹堡大学医学院时毅教授领衔的研究团队利用羊驼免疫也发现了一系列纳米抗体<sup>[20]</sup>。这些纳米抗体不但在中和新冠病毒上展现出了极强的能力,而且可以室温保存6周,展现出了极大的治疗优势。

#### 1.4 Gal10 特异性抗体

2019年,Emma K. Persson 等人[1][1][1][1][8]用 Gal10 晶体对骆驼进行免疫。对比免疫前后的血清,Gal10 特异性抗体的含量有明显提升。随后,利用噬菌体展示筛选实验、酶联免疫吸附实验(ELISA)以及表面等离振子共振(SPR)等技术,研究人员成功筛选到了高亲和力的 Gal10 反应性单链可变片段(scFv)。之后,利用 SIMPLE 抗体平台,研究人员将其改造为常规的小鼠和人源化 IgG,从而设计治疗性抗体。利用结晶机器人在体外测定这些抗体阻断 Gal10 自结晶的潜力,最终研究人员筛选得到 3 种单克隆抗体 1D11、4E8 和 6F5。在体外形成的 Gal10 晶体中分别添加这些单克隆抗体,都可以在两小时内将已经形成的 Gal10 晶体溶解,而在同型对照中观察不到溶解现象。同时,在尘螨诱导的哮喘小鼠模型中,效果最好的 1D11 也明显抑制了 CLCs 的促炎作用。除此之外,为研究抗体介导的晶体溶解,实验人员分析了与 Gal10 形成复合体的克隆 1D11、4E8 和 6F5 的

Fab 片段的晶体结构,发现 Gal10 上每个抗体结合的关键位点都位于 Tyr<sup>69</sup>,这些 Tyr<sup>69</sup>残基暴露在 CLCs 双锥末端的晶格平面中,抗体直接与 Tyr<sup>69</sup>残基结合,最 终介导了晶体的溶解。这些研究证明了利用 Gal10 特异性抗体溶解 CLCs 晶体治疗相关疾病的可行性,为哮喘治疗提供了新的思路。

#### 1.5 总结和展望

CLCs 晶体是一种罕见的能够在体内自发结晶的晶体,已有研究表明该晶体与呼吸道炎症等多种嗜酸性粒细胞介导的炎症有着密切的关系。目前研究人员已经筛选出了针对结晶 Gal10 的单克隆抗体,在哮喘的小鼠模型中,这种溶解 CLCs 的抗体能够明显抑制小鼠的肺部炎症,黏液分泌也明显减少。但单克隆抗体药物在生产、使用等环节都存在一些问题,因此,我们设想在前期 Emma K. Persson等对 CLC 晶体研究的基础上,表达纯化得到 Gal10 蛋白作为筛选纳米抗体的抗原,之后利用高容量纳米抗体库筛选出与 Gal10 蛋白存在相互作用的纳米抗体,并进行相互作用验证。我们希望最终能开发出应用于临床治疗哮喘、过敏性鼻炎等呼吸道炎症的低成本纳米抗体药物,为哮喘治疗寻找新方案。

## 二、材料与方法

#### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 菌株、质粒载体

大肠杆菌(E.~coli) $DH5\alpha$  感受态细胞由实验室制备,用于分子克隆和抽提质粒,-80 °C 保存。

*E. coli* 菌株 BL21 (DE3)和 Rosetta (DE3)由实验室制备,用于目的蛋白的表达, -80 °C 保存。

pSUMO 原核表达载体具有卡那霉素(Kana)抗性,表达的蛋白带有 SUMOtag,可用 ULP1 酶切去。

pT7N10C6 原核表达载体由商品化 pET21a 载体改造而来,具有氨苄青霉素 (Amp) 抗性,表达的蛋白带有 10 imesHis-tag,可用 TEV 酶切去。

#### 2.1.2 蛋白质表达纯化相关材料

超滤管,购自 Millipore 公司

蛋白电泳预制胶(12%和15%),购自万生昊天公司

NDB/DB04-B型层析空柱,购自无锡天演公司

Ni Sepharose 6 Fast Flow, 购自 GE 公司

Ni-NTA Purose 6 Fast Flow,购自江苏千纯生物科技有限公司

Superdex75/200 Increase, 购自 GE 公司

NTA Biosensor, 购自 ForteBio 公司

greiner PN655209, 购自 ForteBio 公司

#### 2.2 试剂

#### 2.2.1 分子克隆相关试剂及试剂盒

2×Premix Taq 酶,购自 TaKaRa 公司

BamHI/XholI/NdeI/HindIII 限制性内切酶及缓冲液,均购自 TaKaRa 公司

T4 DNA Ligase 及缓冲液,购自 TaKaRa 公司

PCR 产物清洁回收、切胶回收、质粒抽提试剂盒,均购自 Axygen 公司

DNA Marker, 购自 TaKaRa 公司

DNA 染料,购自赛百盛公司

DNA 电泳所用琼脂糖为 Regular Argarose G-10,购自 BIOWEST 公司 DNA 电泳缓冲液母液为 Tris-乙酸电泳缓冲液(50×TAE)购自源叶生物公司

#### 2.2.2 表达和纯化实验相关试剂

氨苄青霉素 (Amp) 及硫酸卡那霉素 (Kana), 购自上海生工

TEV 酶,实验室自制

ULP1酶,实验室自制

蛋白质分子量标签 (Marker), 购自 TaKaRa 公司

蛋白质染料,购自上海生工

#### 2.2.3 其他常用试剂

实验室常用酸、碱、盐,均购自国药试剂

5-Iodacetamidofluorescein (5-IAF), CAS: 63368-54-7, MW: 515.25, 用于荧光标记 Galectin-10, 购自 MedChemExpress (MCE)

LB 培养基,购自上海万宏生物科技有限公司

#### 2.3 溶液以及培养基配制

#### 2.3.1 培养基

表 1 LB 液体培养基和固体培养基

组成	液体培养基	固体培养基
培养基粉末	25 g	12.5 g
琼脂糖	_	5 g
抗生素	_	600-700 μL
总体积	1000 mL	500 mL

注: 培养基配制好后 121 °C高温灭菌 25 min; 灭菌后待培养基冷却到 60~70 °C再加入 抗生素, 抗生素略过量; 其他成分添加完后剩余体积用水补齐。

#### 2.3.2 琼脂糖凝胶

表 2 琼脂糖凝胶 (1%)

组成	比例 (%)	
琼脂糖	1	
1×TAE 缓冲液	100	
GelRed 核酸染料(10000×)	0.01	

#### 2.3.3 Ni-NTA 亲和层析纯化相关试剂

表 3 Ni-NTA 亲和层析纯化相关试剂

组成	NiA	NiB (洗脱液)	NiC
NaCl	150 mM	150 mM	1 M
咪唑	20 mM	300 mM	20 mM
100%甘油	5 %	5 %	5 %
Tris-HCl 缓冲液	50 mM	50 mM	50 M

#### 2.3.4 阴离子交换层析(Q柱)纯化相关试剂

表 4 阴离子交换层析相关试剂

组成	QA	QB(洗脱液)
NaCl	-	1 M
100%甘油	5 %	5 %
Tris-HCl 缓冲液	50 mM	50 M

#### 2.3.5 分子筛层析以及 FSEC 相关试剂

表 5 分子筛层析以及 FSEC 相关试剂

组成	HEPES Buffer	醋酸铵 Buffer	Tris Buffer
NaCl	150 mM		150 mM
HEPES 缓冲液	20 mM		-
Tris-HCl 缓冲液	-	-	50 mM
醋酸铵缓冲液	-	10 mM	-

#### 2.3.6 蛋白电泳相关试剂

表 6 考马斯亮蓝染/脱色相关试剂

组成	染色液(900 mL)	脱色液(1L)
冰醋酸	100 mL	80 mL
乙醇	400 mL	250 mL
考马斯亮蓝 R250	2.5 g	_
ddH2O	400 mL	680mL

#### 2.4 实验仪器与设备

#### 2.4.1 实验常用仪器

pH 计: Eppendorf Mastercycler Gradient

PCR 仪、紫外凝胶成像仪: Bio-Rad 公司

NanoDrop: Thermo Fisher Scientific 公司

#### 2.4.2 离心机

Eppendorf 公司, Thermo Fisher Scientific 公司, Hitachi 公司

#### 2.4.3 电泳仪

SDS-PAGE 电泳仪及 TAE 凝胶电泳仪: Bio-Rad 公司

#### 2.4.4 溶液配制辅助仪器

磁力搅拌器、真空抽滤仪

#### 2.4.5 蛋白纯化使用仪器

破菌机: JNBIO 公司, JN-02C 低温超高压连续流细胞破碎机 快速液相色谱系统: GE 公司, 型号 ÄKTA Pure, ÄKTA Go

#### 2.4.6 蛋白分子相互作用分析仪器

动力学参数测定仪器: ForteBio 公司,型号 Octet RED96 FSEC 仪器: GE 公司 ÄKTA,配制 I/O-box 模块

#### 2.4.7 蛋白 Tm 值分析仪器

NanoDSF: NanoTemper 公司, 型号 Prometheus NT.Plex

#### 2.5 实验软件

#### 2.5.1 本地软件

GraphPad Prism 6.0,用于实验数据的做图分析

BioEdit 7.0,用于对测序数据进行初步分析,采用 ClustalW Multiple alignment 进行多条序列的比对

Octet Data Acquisition software,用于实时收集 Octet RED96 测得的数据Octet Data Analysis software,用于分析 Octet RED96 测得的数据MEGA-X 10.0,用于多条序列亲缘关系的分析以及进化树的绘制

#### 2.5.2 在线软件

NovoPro 反向核酸互补转换网页

NCBI 序列比对网页

ExPASy分析已知氨基酸序列的蛋白质基本信息

#### 2.6 实验方法

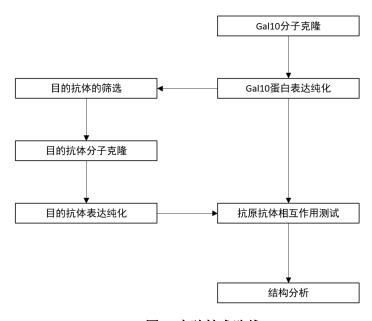


图 3 实验技术路线

实验技术概览如图所示,首先通过分子克隆、蛋白表达纯化获得 Galectin-10 抗原。之后进行目的抗体的筛选,并根据目的抗体序列进行分子克隆、蛋白表达纯化获得目的抗体,并进行抗原抗体相互作用测试。未来条件允许还将进行蛋白质结晶以及结构分析

#### 2.6.1 分子克隆获得质粒表达载体

#### 2.6.1.1 全基因合成以及引物设计

在 UniProt 网站上查找 Galectin-10 的蛋白质序列,去掉第一个甲硫氨酸后由 武汉金开瑞生物工程有限公司进行序列优化,并进行全基因合成(前后分别加装 BamH I 和 Xhol I 的酶切位点),具体序列信息见附录 1。根据序列信息设计 PCR 引物如下:

表 7 Galectin-10 分子克隆引物设计

名称	序列
Gal_BamHI	5'-CGCGGATCCAGCCTGCTG-3'
Gal_XholI	5'-TATCTGAAACGTTAACTCGAGCGG-3'
$H_Gal_BamHI$	5'-CGCGGATCCGAGAACCTGTACTTCCAAGGGA
	GCCTGCTGCCGGTTCCG-3'

目的抗体由深圳抗体生命科技有限公司进行筛选,并进行序列测定。由于抗体两端序列相对保守,因此根据序列信息设计 PCR 引物如下:

表 8 目的抗体分子克隆引物设计

名称	序列
P_BamHI	5'-CGCGGATCCGCGGTGCAGCTGGTGGAG-3'
F10_BamHI	5'-CGCGGATCCGCGGTGCAGCTGATGGAG-3'
P_XholI	5'-GTCTCCTCAGGCGCACGCTAACTCGAGCGG-3'

共表达载体所需引物序列如下(G10/F10/E1/A10 由公司序列优化后直接全基因合成,因此两端序列不同,需要重新设计引物):

表 9 共表达载体构建引物设计

名称	序列
Nb N	5'-GGAATTCCATATGGCGGTGCAGCTGGTGGAG-3'

Nb_C	5'-CCGCTCGAGTTATGAGGAGACGGTGACCTG-3'
Gal_N	5'-CGCGGATCCAGCCTGCTGCCGGTT-3'
Gal_C	5'-CCCAAGCTTTTAACGTTTCAGATAGCTCAC-3'
F10_N	5'-GGAATTCCATATGGCAGTTCAGCTGATGGAA-3'
F10_C	5'-CCGCTCGAGTTAGCTACTCACCGTAACCTG-3'
G10_N	5'-GGAATTCCATATGGCCGTTCAGCTGGTGGAA-3'
G10_C	5'-CCGCTCGAGTTAGCTTGACACCGTCACCTG-3'
A10_N	5'-GGAATTCCATATGGCAGTTCAGTTAGTGGAA-3'
A10_C	5'-CCGCTCGAGTTAGCTACTCACCGTCACCTG-3'
E1_N	5'-GGAATTCCATATGGCTGTTCAGCTGGTTGAA-3'
E1_C	5'-CCGCTCGAGTTAAGAGGAGACTGTCACCTG-3'

#### 2.6.1.2 PCR 及 PCR 清洁回收获得目的基因片段

按照下表配制 PCR 体系,之后设定程序进行 PCR 扩增。Gal10 需要扩增出两种片段,一种两端仅有酶切位点,分别以 Gal\_BamHI 和 Gal\_XholI 作为 5'和 3'引物扩增,用于加装到 pSUMO 载体上;另一种在 5'端有 TEV 酶酶切位点的序列,分别以 H\_Gal\_BamHI 和 Gal\_XholI 作为 5'和 3'引物扩增,用于加装到pT7N10C6 载体上。目的抗体中,F10 分别以 F10\_BamHI 和 P\_XholI 作为 5'和 3'引物进行扩增。

表 10 PCR 体系

组成	体积(μL)
5'引物	1
3'引物	1
模板 (菌液或质粒)	1
2×Taq Mix 酶(或 KOD 酶)	25
$ddH_2O$	22

注: 引物工作浓度 10 μM

表 11 PCR 扩增过程

步骤	步骤    时间		温度
预变性		3 min	95 °C
	变性	30 s	95 °C
循环 30 次	退火	30 s	根据引物 Tm 值设定, 一般比引物 Tm 值低 55-65 ℃
	延伸	30 s	72 °C
充分延伸		10 min	72 °C
冷却保存		$\infty$	16 °C

初次实验在 PCR 后可以取少量产物进行电泳检测,具体过程见 2.1.5。PCR 扩增后按照试剂盒说明书进行 PCR 清洁回收。

#### 2.6.1.3 质粒抽提

利用实验室已有的菌种提取 pSUMO 和 pT7N10C6 质粒,其中 pSUMO 载体用于 Gal10 和目的抗体的分子克隆,pT7N10C6 载体用于仅含 His-tag 的 Gal10 的分子克隆。质粒抽提按照试剂盒说明书进行操作。

#### 2.6.1.4 双酶切

按照下表配制双酶切体系,对 PCR 扩增片段和质粒载体进行酶切,37°C 恒温酶切约4h。

表 12 双酶切体系 (40 µL)

组成	体积(μL)
BamHI核酸内切酶	1
Xhol I 核酸内切酶	1
10×K Buffer	4
PCR 扩增片段或质粒载体	34

#### 2.6.1.5 DNA 凝胶电泳以及切胶回收

按照表 2 所示的方法配制 1%的琼脂糖凝胶,将混有 10×loading Buffer 的样

品上样,120 V 电泳约 35 min,之后按照试剂盒说明书进行回收。

#### 2.6.1.6 连接

按照下表配制连接体系,室温静置 1 h 以上将目的片段与载体进行连接。

表 13 连接体系 (10 µL)

组成	
目的片段	5 μL
载体	3 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
10×T4 DNA Ligase Buffer	1 μL

#### 2.6.1.7 连接产物的转化

将连接产物或 1-2  $\mu$ L 目的质粒加入感受态细胞中。冰浴约 40 min 后 42 °C 热激 90 s,之后冰浴 5 min。随后,加入 500  $\mu$ L 无抗 LB 培养基,37 °C 恒温振荡培养约 45 min。细菌大量扩增后,8000 rpm 离心 1 min 沉淀菌体,并弃去 500  $\mu$ L 上清。重悬沉淀的菌体,转移到事先温育过的平板上,涂布均匀后 37 °C 倒置培养约 12 h。

#### 2.6.1.8 连接产物鉴定

挑取平板上生长的单个菌落至 LB 液体培养基,37°C 恒温振荡培养至溶液变浑浊。由生物公司对菌液进行测序,并进行序列比对,将正确克隆的质粒保存用于后续实验。

#### 2.6.2 蛋白质表达纯化

#### 2.6.2.1 IPTG 诱导目的蛋白表达

将构建好的质粒参考 2.1.7 中的操作转化到表达菌中,培养 12 h 后挑取菌落,在 1 L 对应抗性 LB 液体培养基中 37 °C 振荡培养至 OD 值为 0.6~0.8,之后降温到 22 °C 培养 30 min,之后加入 200  $\mu$ L 1 M 的 IPTG 诱导蛋白表达,16~18 h 后 5000 rpm 离心 15 min 收集菌体沉淀,即可进行长期保存或蛋白纯化。

#### 2.6.2.2 目的蛋白的纯化

#### 1) 蛋白样品的准备

向收集的菌体沉淀中加入 20~30 mL NiA Buffer 重悬菌块,之后用高压破菌机在 1000 bar 下破碎菌体,重复 3~5 次。将破碎后的菌液在 18000 rpm 下离心 1 h 后收集上清,用于进行后续蛋白的纯化。取 20 μL 破碎后的菌液和上清用于后续电泳验证。

#### 2) Ni-NTA 亲和层析

采用重力柱对蛋白进行初步纯化。初次使用时,在 70 mL 空柱中加入约 7.5 mL 柱介质,原有液体流出后用 NiA Buffer 平衡。若有装好的重力柱也可用 EDTA 除镍并重生后再用 NiA Buffer 平衡。平衡好后将破菌后的上清与柱介质混合,结合约 30 min 后收集流出液用于后续电泳验证。待液体全部流出后,用 20 mL NiC Buffer 洗去非特异性结合的蛋白,并用 NiA Buffer 重新平衡柱介质。

为了得到含标签的目的蛋白,下面用 20~25 mL NiB Buffer 洗脱目的蛋白, 收集流出液并取约 20 μL 用于后续电泳验证。目的蛋白浓缩后冻存在-80 °C,以 待后续使用。

为了得到不含标签的目的蛋白,在用 NiC Buffer 洗去非特异性结合的蛋白并用 NiA Buffer 重新平衡后,向柱中加入约 5 mg ULP1 酶(用于 pSUMO 载体表达的蛋白标签的酶切)或 TEV 酶(用于 pT7N10C6 载体表达的蛋白标签的酶切)。室温酶切 2 h 以上或在 4 °C 酶切过夜后收集流出液作为目的蛋白。之后用 20~25 mL NiB Buffer 洗脱吸附在柱介质上的蛋白,收集流出液。取约 20  $\mu$ L 目的蛋白、NiB Buffer 洗脱液和少量酶用于后续电泳验证。目的蛋白浓缩后冻存在-80 °C,以待后续使用。

#### 3) 阴离子交换层析

为了得到纯度较高的 Gal10 蛋白作为抗原,在 Ni-NTA 亲和层析后采用阴离子交换层析对目的蛋白进行进一步纯化。为了使上样溶液低盐,在 Ni-NTA 亲和层析时用 QA Buffer 进行平衡以及柱上切,收集流出液即为低盐溶液中的目的蛋

白。此外,也可以将目的蛋白浓缩后用大量 OA Buffer 进行稀释。

上样前先用 QA 平衡系统和柱子,根据蛋白溶液体积设定上样量,并按照柱子的要求设定流速和柱压上限。设定梯度洗脱结合在柱介质上的蛋白,其中 QB 含量从 0%逐渐增大到 100%,收集洗脱的蛋白。

测试发现,在 pH 9.0 时,Gal10 与离子交换柱结合不强,上样后部分会从流出液中直接流出。在蛋白溶液中添加 0.2 mM TCEP 后,Gal10 不与离子交换柱结合而直接流出,杂蛋白均与离子交换柱结合。将 Q 柱用 QA Buffer 平衡后上样,收集流出液即为纯化的 Gal10 蛋白。也可不添加 TCEP,收集洗脱的少量 Gal10 蛋白。

#### 4) 分子筛层析

分子筛层析用于除去不同分子量的杂蛋白并更换蛋白所处的缓冲液体系,根据需要选择合适的缓冲液。在上样前用合适的分子筛 Buffer 平衡系统和柱子,流速 0.5 mL/min,压力上限为 3 MPa。之后上样 0.5 mL或 1 mL,用分子筛 Buffer 洗脱蛋白,收集出峰处的样品并取少量进行电泳验证。

#### 5) 除盐柱

除盐柱可用于更换蛋白所处的缓冲液体系。用 20 mL缓冲液平衡 5 mL HiTrap Desalting 除盐柱,之后上样 1.5 mL,用 2 mL 缓冲液洗脱目的蛋白,收集流出液即为在不同缓冲体系下的目的蛋白。

#### 6) SDS-PAGE 电泳检测

按照比例将蛋白样品与 5×SDS-PAGE loading buffer 混合, 95 °C 金属浴 5 min。将预制胶安装好后,将样品 12000 rpm 离心 1 min 后上样,150 V 电泳约 40 min。电泳结束后染色、脱色,扫描记录结果。

#### 2.6.3 质谱鉴定

Gal10 蛋白纯化后进行分子筛层析更换缓冲液为醋酸铵 Buffer, 收集出峰处的蛋白进行电泳检测,将纯度较高的蛋白测定浓度后由公司完成质谱鉴定。

#### 2.6.4 目的抗体的筛选

Gal10蛋白在纯化后进行分子筛层析更换缓冲液为HEPES Buffer,共得到1.3 mg 纯度较高的蛋白。深圳康体生命科技有限公司以此为抗原进行了羊驼天然库抗体的筛选。

#### 2.6.5 Octet RED96 进行抗原抗体相互作用验证

#### 2.6.5.1 实验准备

参考 2.2 纯化 Gal10 和筛选到的纳米抗体,其中 Gal10 带有 SUMO 标签,纳米抗体不带有任何标签。将 Ni-NTA 亲和层析纯化后的蛋白进行浓缩,取其中 1.5 ml 用除盐柱或分子筛换 Buffer 为 20 mM HEPES 8.52,150 mM NaCl (记作 Buffer 1)。用 Nano Drop 测定收集到的蛋白的浓度,并结合蛋白的消光系数和分子量计算蛋白的摩尔浓度(参数由 ExPASy 网站测定,详见附录 2)。向 Buffer 1 添加 Tween-20 至终浓度为 0.02%,记作 Buffer 2。向预湿板(greinier PN655209)中加入 200 μL 每孔 Buffer 2,将传感器放到预湿孔对应位置的传感器盘上,浸润 30 min 以上。用 Buffer 2 将 Gal10 稀释到 500 nM,纳米抗体稀释到 2000 nM,准备加入样品板中。

在样品板的第 1、3 列加入 200  $\mu$ L 每孔的 Buffer 2,第 2 列加入 Gal10,用于设定 Baseline 以及让 Gal10 与传感器结合。第 10、11、12 列分别加 200  $\mu$ L 每 孔的 Buffer 2、10 mM pH 1.7 Gly 和 10 mM NiCl<sub>2</sub>,用于传感器再生。中间各列间隔加入 200  $\mu$ L 每孔的纳米抗体和 Buffer 2,用于抗原与抗体的结合和解离。其中纳米抗体在第 1 行为 2000 nM,最后一行为 Buffer 2,其余各行依次稀释为 1000 nM,500 nM,250 nM,125 nM,62.5 nM,31.25 nM。样品板和传感器盘分别放在机器的对应位置,准备设定程序开始测定。

#### 2.6.5.2 程序设定

选择对应位置的传感器并设定样品板后,对于每一组抗原抗体的相互作用测试设定程序如下,实验温度为37°C。运行程序,得到以\*.fmf后缀的原始数据文件。

表 14 Octet RED96 程序设定

N	Data Name	Assay Time(s)	Shake speed(rpm)	Step Type Name
1	Baseline	60	1000	Baseline
2	Loading	180	1000	Loading
3	Association	300	1000	Association
4	Dissociation	600	1000	Dissociation
5	Custom	5	1000	Custom
6	Regeneration	5	1000	Custom
7	Neutralization	5	1000	Custom
8	Recharging	60	1000	Custom

#### 2.6.5.3 结果分析

测量结束后,打开数据分析软件对结果进行分析,重要参数设定如下:

表 15 Octet RED96 结果分析参数设定

Processing Parameters			
Subtraction Type:	Reference Wells		
Align Y:	Yes		
	Step to Align:		
	Time (seconds):	55	59.8
Inter-step Correction:	Association		
S-G Filtering	ON		
Analysis Parameters			
Step to Analyze	Association & Dissociation	on	
Model:	1 to 1		
Fitting	Global		
	Group By:	Color	
	Rmax	Linked	
Window of Interest:	Association (secs):	0	300
	Dissociation (secs):	0	600

Steady State Analysis		
	Fit using Data	Req

#### 2.6.6 FSEC 进行抗原抗体相互作用验证

Gal10 进行 5-IAF 荧光标记后利用除盐柱去除过量荧光小分子,之后按照 1:5 的摩尔比对 Gal10 和纳米抗体进行混合(100μL 体系),在冰上避光结合两小时以上。之后对蛋白进行 25000rpm 超速离心处理 20min,吸取上层 80μL 运行 FSEC 程序。缓冲液与分子筛缓冲液成分相同。

#### 2.6.7 NanoDSF 寻找 Gal10 纯化最适缓冲体系

使用 Ni-NTA 亲和层析对 Gal10 进行纯化,纯化得到的蛋白浓度 0.35mg/ml。 之后配制母液,并将 45μL 蛋白与 5μL 不同浓度的盐溶液混合,缓冲液成分如下:

盐 母液 100mM 150mM 200mM 250mM 400mM 500mM Na2SO4 1M MgCl2 4M NaHCO3 1M KH2PO4 1.5M NaH2PO4 2.5M √ Na2S2O3 2.5MKC1 2.5MNaC1 5M

表 16 NanoDSF 缓冲液配制

在测试 pH 对 Gal10 稳定性的影响时,直接将 45μL 蛋白与 5μL 结晶试剂盒 pH 缓冲液混合。反应体系配制好后将样品离心,并吸取到毛细管中,运行 NanoDSF 程序进行测试。

#### 2.6.8 Gal10 体外结晶

使用 Ni-NTA 亲和层析对 His-Gal10 进行纯化,并尽可能对其进行浓缩。之后向体系中加入 1μL TEV 酶,置于 4℃环境保存至观察到溶液浑浊。

## 三、研究结果

#### 3.1 抗原 Galectin-10 的原核表达与纯化

参考 UniProt 网站上查找到的 Gal10 的蛋白质序列构建 pSUMO 载体和 pT7N10C6 载体的分子克隆,并进行测序验证。目的蛋白 Gal10 在 22 ℃ 经 IPTG 诱导表达,之后尝试不同方法纯化并进行验证。

#### 3.1.1 Gal10 初步纯化以及质谱验证

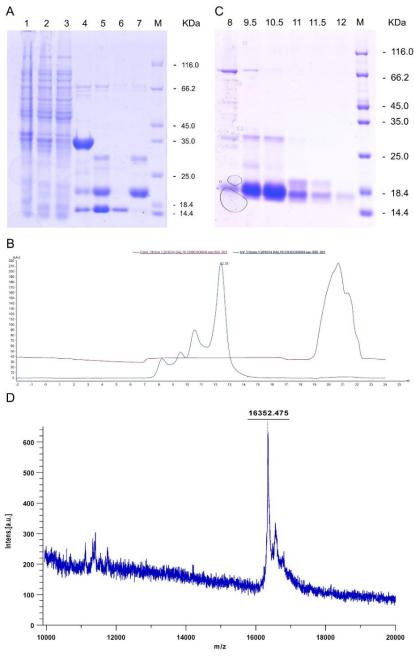


图 4 Gal10 质谱验证

(A) Ni-NTA 亲和层析初步纯化 Gal10。Gal10 理论分子量为 16.3 kDa, 缓冲液 pH 为 8.5。

1. 诱导后全菌; 2. 诱导后上清; 3. Ni-NTA 亲和层析上样流过液; 4. Ni-NTA 亲和层析 NiB 洗脱液; 5. ULP1 酶切后上样液; 6.ULP1 酶切后 Ni-NTA 亲和层析上样流过液; 7. ULP1 酶切后 Ni-NTA 亲和层析 NiB 洗脱液; M 为分子量标签 26610; (B) 分子筛层析纯化 Gal10 并更换缓冲体系。缓冲液采用醋酸铵 Buffer,横坐标为洗脱体积,纵坐标为 UV 值,蓝线为记录到的 UV 值,紫线为记录到的盐浓度;每0.5 mL 收集一管;(C) SDS-PAGE 检验分子筛层析纯化结果。M 为分子量标签 26610,其他列上端数字对应开始收集时的洗脱体积;(D) 质谱鉴定结果。取分子筛层析 12~12.5 ml 处收集的蛋白进行质谱鉴定,测得纯化的蛋白分子量约 16.3 kDa

首先使用 Ni-NTA 亲和层析对 Gal10 进行初步纯化(图 4A)。使用高咪唑缓冲液洗下 SUMO-Gal10 后利用 ULP1 酶进行过夜酶切,之后再次流过 Ni 柱去除标签,得到流出液即为目的蛋白。为了验证 Ni-NTA 亲和层析得到的蛋白为 Gal10,我们利用分子筛层析将缓冲体系更换为醋酸铵 Buffer(图 4B、C),选择纯度较高的蛋白进行质谱鉴定(图 4D),测得的蛋白分子量约为 16.3 kDa,与 Gal10 的理论分子量吻合。

#### 3.1.2 NanoDSF 确定 Gal10 最适纯化条件

由于 Gal10 具有高浓度自发结晶的特性,不利于我们对蛋白进行浓缩保存以及更精细的纯化,因此我们利用 NanoDSF 测定了 Gal10 在不同缓冲液条件下的稳定性,希望以此寻找最适的缓冲液组分。我们尝试更改了缓冲液的盐浓度、PH值以及盐的种类,结果如图 5 所示。

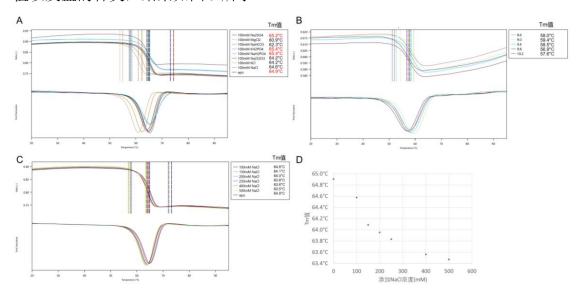


图 5 NanoDSF 确定 Gal10 最适纯化条件

(A) 不同盐种类时 NanoDSF 结果; (B) 不同缓冲液 pH 值时 NanoDSF 结果; (C) 不同盐浓度下 NanoDSF 结果; (D) Tm 值随盐浓度变化曲线。apo 为不添加盐的阴性对照

从上图可以看出,除 Mg 离子会导致 Gal10 稳定性降低外,其他盐都对 Gal10 稳定性无特别明显的影响(图 5 A)。在 pH 为 9.0 的情况下 Gal10 更加稳定(图

5 B),并且随着盐浓度的提高,Gal10 的稳定性会逐渐下降(图 5 C、D)。综合考虑实验的可行性、蛋白稳定性等因素,在后续实验中我们使用含 100 mM NaCl的 pH 9.0 Tris 缓冲液对 Gal10 进行纯化。但这一纯化条件并没有使 Gal10 的稳定性有特别明显的提高,在后续实验中还需设计其他方案使 Gal10 在浓缩过程中保持稳定而不结晶。

#### 3.1.3 高纯度 Gal10 抗原的获得

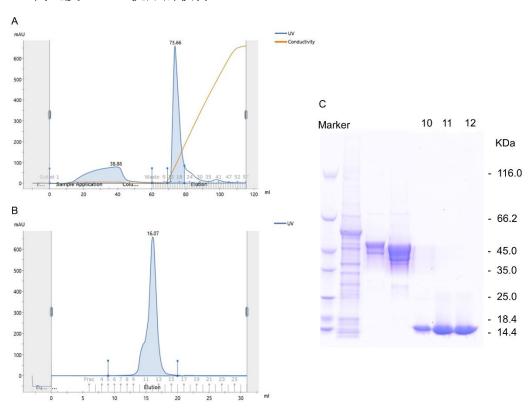


图 6 Gal10 抗原纯化

(A) 阴离子交换层析纯化 Gal10。Gal10 理论分子量 16.3 kDa,缓冲液 pH 为 8.5,横坐标为洗脱体积,纵坐标为 UV 值,黄线为记录到的盐浓度,蓝线为记录到的 UV 值;(B) 分子筛层析纯化 Gal10。缓冲液为 HEPES 缓冲液(详见 1.4.5),pH 7.5。横坐标为洗脱体积,纵坐标为 UV 值;(C)SDS-PAGE 检验分子筛层析纯化结果。Marker 为分子量标签 Cat: 26610,其他数字代表开始收集时的洗脱体积

纳米抗体的筛选需要更高纯度的 Gal10 抗原,从而降低假阳性的发生率。因此,我们在 Ni-NTA 亲和层析的基础上还需要通过分子筛层析等对抗原 Gal10 进行更精细的纯化。此外,由于 Gal10 在浓度高时容易自发结晶,因此也需要一个更加温和的条件对 Gal10 进行浓缩。我们尝试了包括降低离心速度、添加 TCEP等在内的多种方法,但效果均不理想。阴离子交换层析可以将目的蛋白在一个小体系中洗脱下来,在纯化的同时也能达到浓缩的目的。因此,我们最终的纯化流

程共包括 Ni-NTA 亲和层析、阴离子交换层析(图 5 A)和分子筛层析(图 5 B) 三个步骤。Ni-NTA 亲和层析得到的目的蛋白在透析或低速浓缩更换为低盐缓冲液后进行阴离子交换层析,在缓冲体系 pH 为 9.0 且不添加 TCEP 时,大部分蛋白能够与柱介质结合,但仍存在少部分损失(图 5 A)。收集洗脱的目的蛋白直接进行分子筛层析,经过 SDS-PAGE 验证,可以看到分子筛层析流出的第 11~12 mL、12~13 mL 蛋白为纯度很高的 Gal10(图 5 C)。我们以此为抗原进行了纳米抗体的筛选,筛选结果见 3.2。

#### 3.1.4 分别表达纯化带有 SUMO 标签和 His 标签的 Gal10

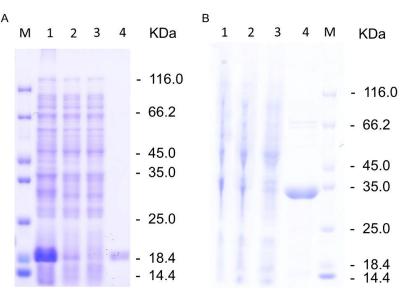


图 7 His-Gal10 和 SUMO-Gal10 的纯化

(A) Ni-NTA 亲和层析纯化 His-Gal10。His-Gal10 的理论分子量为 18.5 kDa,缓冲液 pH 为 8.5。1. 诱导后全菌; 2. 诱导后上清; 3. Ni-NTA 亲和层析上样流过液; 4. Ni-NTA 亲和层析 NiB 洗脱液; M 为分子量标签 26610; (B) Ni-NTA 亲和层析纯化 SUMO-Gal10。SUMO-Gal10 的理论分子量为 30.1 kDa。1. 诱导后全菌; 2. 诱导后上清; 3. Ni-NTA 亲和层析上样流过液; 4. Ni-NTA 亲和层析 NiB 洗脱液; M 为分子量标签 26610

后续的抗原与抗体相互测试需要使用保留 His-tag 或 SUMO-tag 的 Gal10 蛋白,Gal10 的体外结晶也需要预先得到高浓度的 His-Gal10 蛋白,因此我们又使用 Ni-NTA 亲和层析纯化得到了带有 His-tag(图 7A)和 SUMO-tag(图 7B)的 Gal10 蛋白。蛋白分子量分别在 18KDa 和 30KDa 左右,与理论计算结果相符。

#### 3.2 目的抗体筛选

我们使用之前纯化得到的高纯度 Gal10 首先进行天然噬菌体库筛选, 筛选结果如下:

表 17 Gal10 天然库筛选效价

筛选轮数	输入效价	筛选效价	对照效价	富集程度	相差倍数
第1轮	1.52×10 <sup>12</sup>	4.00×10 <sup>8</sup>	-	2.63×10 <sup>-4</sup>	-
第2轮	$8.00 \times 10^{11}$	$2.80 \times 10^{10}$	2.00×10 <sup>8</sup>	3.50×10 <sup>-2</sup>	140
第3轮	3.00×10 <sup>11</sup>	$2.80 \times 10^{10}$	1.20×10 <sup>9</sup>	9.33×10 <sup>-2</sup>	23

筛选 3 轮后, 富集程度达到 10<sup>-2</sup>, 之后使用第三轮噬菌体洗脱液铺板挑取单 克隆进行 ELISA 验证, 其中 18 个克隆可能为阳性克隆(即标颜色的)。

表 18 Gal10 天然库单克隆 ELISA 读数首次验证

	P1	-1	P1	1-2		P1-3		P1-4		P1-5		P1-6	
吸光值	抗原	BSA	抗原	BSA	抗原	BSA	抗原	BSA	抗原	BSA	抗原	BSA	
A	1.6627	0.2106	0.9528	0.6088	0.5142	0.1687	1.4126	1.3278	0.1793	0.2772	0.3062	0.1286	
В	1.7529	1.6154	1.2008	0.8418	1.0845	0.6119	1.7065	0.9028	0.6370	0.2752	1.3133	1.0238	
C	0.6549	0.3088	0.2972	0.4792	0.4970	0.2759	1.6208	1.0783	2.1478	2.2498	2.1510	2.0599	
D	1.5079	1.4341	0.6265	0.4497	0.9078	1.0458	0.4260	0.2481	1.5604	1.5446	1.2987	0.3167	
E	1.3195	0.1188	1.3342	0.8841	1.9858	1.9767	1.7722	1.5131	0.0789	0.3122	0.3102	0.2180	
F	1.3631	1.3033	1.4653	0.9087	1.8794	1.6668	1.1507	1.0432	1.6337	0.7349	0.4253	0.3293	
G	0.3636	0.1473	0.1939	0.1045	1.8043	1.2890	1.3360	1.5607	1.3090	0.9113	0.3284	0.2442	
Н	0.9593	0.7572	0.3580	0.3737	1.0096	0.4811	1.0255	0.8885	1.9937	1.4073	1.9198	1.9157	
	P1	-7	P1	-8	P1-9		P1-10		P1-11		P1-12		
吸光值	抗原	BSA	抗原	BSA	抗原	BSA	抗原	BSA	抗原	BSA	抗原	BSA	
A	0.3334	0.0900	1.2840	1.0078	1.5095	1.3921	1.8436	0.5193	1.9120	1.5640	0.8560	0.5341	
В	1.5746	1.2329	1.6349	1.1567	1.7747	1.7161	0.7555	0.2292	0.5186	0.1275	1.4712	1.4201	
C	0.1995	0.1825	0.4005	0.2956	0.6226	0.7788	0.7642	0.2797	0.4872	0.2171	0.8430	0.3515	
D	1.6216	0.4451	1.4784	1.1651	1.4090	1.1396	0.5867	0.4155	0.3053	0.2470	1.5216	1.5030	
E	1.3247	0.4636	2.1351	1.8895	1.7346	1.5175	0.9729	0.1185	0.5178	0.6170	1.4094	1.2859	
F	1.7104	1.5433	2.2794	1.5805	1.7125	1.6101	0.8110	0.1465	1.1680	0.7516	1.7380	1.4307	
G	1.5716	1.0257	1.0132	0.3908	0.4024	0.3728	0.7484	0.5068	0.3940	0.2381	0.3271	0.0577	
Н	2.1882	2.0997	1.5274	0.7162	1.0964	0.6688	<mark>0.6971</mark>	0.1597	0.1318	0.0660	1.3278	0.2777	

为了进一步验证这 18 个克隆是否真为阳性,接下来进行二次 ELISA 验证。

样品编号	抗原	BSA	样品编号	抗原	BSA	样品编号	抗原	BSA
P1-A1	1.7139	0.1267	P1-A10	0.9197	0.3405	P1-G12	0.9455	0.6802
P1-E1	1.4489	0.3585	P1-B10	0.3858	0.1110	P1-H12	0.6398	0.1992
P1-A3	0.5893	0.3326	P1-C10	1.4010	0.8871			
P1-D6	1.0025	0.4249	P1-E10	0.4100	0.1041			
P1-A7	0.1942	0.2653	P1-F10	1.1345	0.5588			
P1-D7	0.6962	0.4683	P1-G10	0.6412	0.2425			
P1-E7	1.3134	0.7304	P1-H10	0.5356	0.1108			
P1-G8	1.2258	0.8066	P1-B11	0.7726	0.3765			

表 19 Gal10 天然库单克隆 ELISA 读数二次验证

结合第一次验证结果,共筛选到 11 个可能的阳性克隆(标有颜色的)。对阳性克隆进行测序,得到 10 条独立序列。采用 NJ 法构建纳米抗体的系统发育树,结果如下:

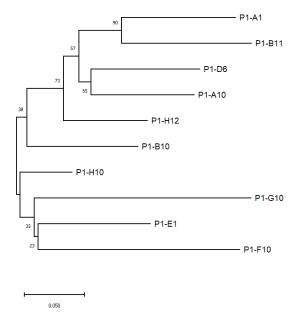


图 8 纳米抗体系统发育树

采用 NJ 法构建,利用 Bootstrap 法进行检验,Bootstrap 值为 1500

#### 3.3 纳米抗体的原核表达与纯化

通过筛选共得到十种不同的纳米抗体,之后进行分子克隆将其编码片段加装到 pSUMO 载体上。纳米抗体均在 20°C 环境下经 IPTG 诱导表达。利用 Ni-NTA

亲和层析对其进行初步纯化,结果如下:

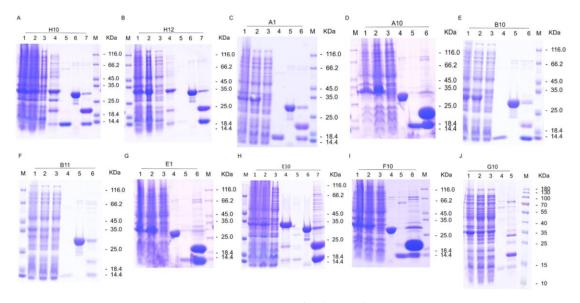


图 9 Ni-NTA 亲和层析纯化纳米抗体

A-J 分别为 H10、B10、A1、A10、B10、B11、E1、E10、F10 和 G10 的纯化结果,纳米抗体分子量均在 14KDa 左右,M 为分子量标签 26610

使用 Ni-NTA 亲和层析,我们纯化得到了一系列 14KDa 左右的纳米抗体(图9),可以浓缩后更换缓冲体系用于 Gal10 与其纳米抗体的相互作用探究。但在酶切后的 NiB 洗脱液中还存在大量目的蛋白,这导致我们在纳米抗体的纯化过程中也存在一定损失,需要之后进行优化。此外,E10 中还有少量杂蛋白,根据分子量判断可能是 SUMO-E10。SUMO-tag 的存在会影响 Octet RED96 中抗原与抗体的相互作用测试结果,因此还需要采用分子筛层析对其进行进一步纯化。

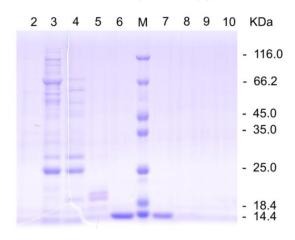


图 10 E10 分子筛层析纯化结果

M 为分子量标签 26610,其他数字对应收集的管数,每 2 mL 收集一管。缓冲液为 HEPES 缓冲液,pH 8.52

分子筛层析纯化后,第6、7管流出液为纯度较高的纳米抗体 E10,以此进

行纳米抗体相互作用的探究。

#### 3.4 Galectin-10 与纳米抗体共表达

在对 Gal10 和纳米抗体的纯化过程中主要存在以下两个问题: 首先, Gal10 在高浓度时不稳定,容易形成自发结晶,不便于浓缩到高浓度进行后续分子筛层析等纯化过程;此外,纳米抗体与 Ni 介质存在一定非特异性结合,这导致酶切后的 NiB 洗脱液中还有大量目的蛋白,造成了大量损失。综合考虑以上两个问题,我们设计了纳米抗体与 Gal10 共表达的实验方案,利用二者的相互作用达到彼此稳定的目的,直接纯化获得复合物并减少样品损失。在同一载体上同时插入Gal10 和 Nb 的序列,其中 Gal10 带有 SUMO-tag,可以被 ULP1 酶切去,而 Nb 不含标签,通过与 Gal10 形成复合物被一同纯化。我们成功构建了 10 种纳米抗体与 Gal10 共表达的载体,并对 F10/Gal10 以及 G10/Gal10 复合物进行了诱导表达以及初步纯化,结果如图 11 所示。

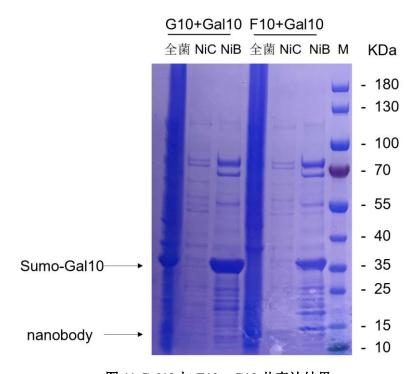


图 11 Gal10 与 F10、G10 共表达结果

M 为分子量标签 26616,全菌为诱导后全菌,NiC 为 Ni-NTA 亲和层析 NiC 洗脱液,NiB 为 Ni-NTA 亲和层次 NiB 洗脱液。左侧两个箭头标注了 SUMO-Gal10 和纳米抗体的大致位置

在 NiB 洗脱液中可以明显看到 SUMO-Gal10 的条带,但纳米抗体的条带却很浅或几乎没有。可能有两个原因导致了这一结果,即纳米抗体没有表达,或纳米抗体与 Gal10 不能形成稳定复合物。胶图上诱导后全菌这一泳道中纳米抗体的

条带并不明显,不能确定是否表达。下面希望通过一系列相互作用测试纳米抗体是否能与 Gal10 形成稳定的复合物。

#### 3.5 Galectin-10 与其纳米抗体相互作用研究

#### 3.5.1 Octet RED96 测试 Gal10 与不同纳米抗体的结合解离常数

为了减少测试时缓冲液不同带来的干扰,在 Octet 测试前用除盐柱将缓冲体系统一更换为 20 mM pH 8.52 HEPES,150 mM NaCl。由于 His-Gal10 在更换缓冲体系后沉淀,因此以 SUMO-Gal10 作为抗原进行测试。同时,测试与 Gal10 无明显相互作用的 Nb2 和抗原的结合解离曲线作为阴性对照。测试结果如下:

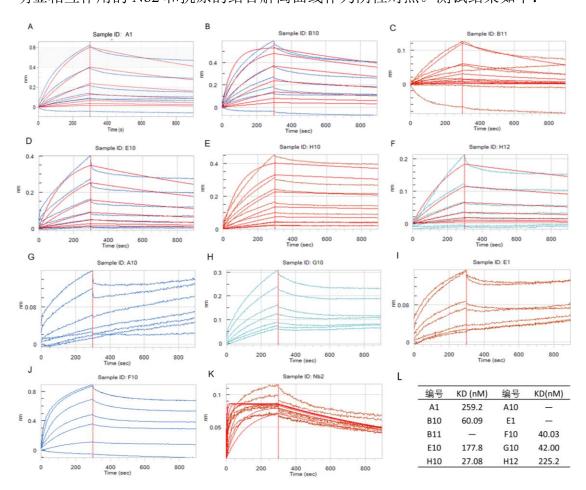


图 12 Gal10 与其纳米抗体 Octet RED96 相互作用测试

A-J 分别为 A1、B10、B11、E10、H10、H12、A10、G10、E1、F10 与 SUMO-Gal10 的结合解离曲线;(K)Nb2 与 SUMO-Gal10 的结合解离曲线,作为阴性对照。以上图像横坐标为时间(s),纵坐标为浓度(nM);(L)为部分纳米抗体与 SUMO-Gal10 相互作用的结合解离常数

由图 12 可以看出, Nb2 与 Gal10 明显不存在相互作用。此外, A10、E1、B11 与 Gal10 的相互作用也很微弱。通过软件分析其他纳米抗体与 Gal10 的相互

作用的 KD 值,均在纳摩尔级别。因此,Gal10 与筛选到的十种纳米抗体均存在一定程度的相互作用,但相对而言其与 A10、E1 和 B11 的相互作用更加微弱,不适合进行后续研究。下面使用分子筛层析和 FSEC 对各种纳米抗体是否能与Gal10 结合形成稳定的复合物进行分析。

#### 3.5.2 Gal10 与不同纳米抗体复合物稳定性测试

首先使用 Superdex75 分子筛层析测试 F10 与 Gal10 混合后能否形成分子量 更大的复合物。F10 与 Gal10 均使用 Ni-NTA 亲和层析进行初步纯化,之后二者 按照 1.5:1 的比例进行混合并进行分子筛层析。分子筛层析以及 SDS-PAGE 结果 如图 13 所示。图中共有三个比较明显的峰,其中第一个峰为杂蛋白,第二个峰 对应的分子量约 16KDa,判断为 Gal10,第三个峰对应的分子量小于 15KDa,判断应该是 F10。因此,F10 与 Gal10 混合后并不能形成稳定的复合物。

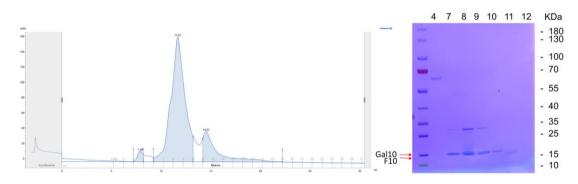


图 13 Gal10 与 F10 复合物分子筛层析结果

左图为分子筛层析结果,横坐标为洗脱体积 (ml), 纵坐标 mAU 值; 右图为分子筛层析流 出液 SDS-PAGE 结果,数字对应收集的管数,分子量标签为 26616

为了高通量测试其他纳米抗体与 Gal10 是否能形成稳定复合物,我们之后又进行了 FSEC 测试(图 14)。在对 Gal10 进行 5-IAF 荧光标记后,将其与不同纳米抗体按照 1:5 的比例进行混合,之后通过 FSEC 观察 Gal10 是否与纳米抗体形成了分子量更大的复合物,即相对于 Gal10 出峰位置发生位移。由图 14 可以看出,各种纳米抗体并不能与 Gal10 形成稳定的复合物,同时添加多个纳米抗体也并不能增强纳米抗体与 Gal10 结合的稳定性。这一结果与 3.5.1 中 Octet 测试的结果并不一致。为排除纯化产物中可能存在的 SUMO-Nb 对 Octet 结果造成的干扰,因此对 Gal10 及其纳米抗体重新进行了纯化以及 Octet 测试,验证该结果的可重复性。

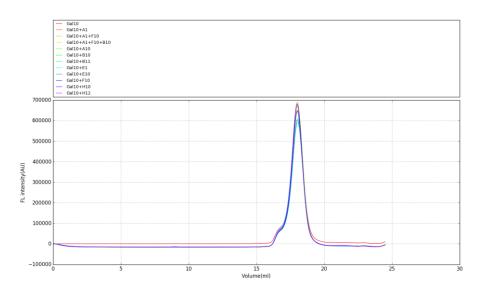


图 14 Gal10 与其纳米抗体 FSEC 相互作用测试

横坐标为洗脱体积 (ml),纵坐标为荧光信号强度 (AU)。相对于不添加纳米抗体的 Gal10,各种纳米抗体均不能使出峰位置发生明显偏移

#### 3.5.3 Octet RED96 重复测试

为验证 Octet RED96 结果的可靠性,之后对 Gal10 及其纳米抗体重新进行了 纯化以及 Octet 测试,结果如图 15 和表 20 所示。由于 G10 产量过低,因此并没 有对其进行测试。在剩余的 9 种纳米抗体中,除 A10 外,各种纳米抗体均与 Gal10 存在纳摩尔级别的相互作用。因此,我们筛选到的纳米抗体多与 Gal10 存在相互 作用,但二者的亲和力可能比较微弱,不足以形成稳定的复合物用于结晶解析结构。

表 20 纳米抗体与 Gal10 的解离常数

Nanobody	KD (M)	KD Error	kon(1/Ms)	kon Error	kdis(1/s)	kdis Error	Full R^2
A1	1.53E-07	3.82E-09	3.84E+03	7.48E+01	5.86E-04	9.12E-06	0.9726
E1	5.76E-08	2.09E-09	1.24E+03	1.54E+01	7.11E-05	2.42E-06	0.9988
H12	9.99E-08	1.97E-09	3.18E+03	3.92E+01	3.18E-04	4.90E-06	0.9912
B11	7.64E-08	2.49E-09	2.27E+03	3.83E+01	1.74E-04	4.85E-06	0.9877
F10	8.50E-08	1.60E-09	4.11E+03	4.65E+01	3.50E-04	5.24E-06	0.9879
B10	5.78E-08	1.16E-09	3.83E+03	3.67E+01	2.21E-04	3.89E-06	0.991
A10	<1.0E-12	1.07E-09	1.07E+04	2.36E+02	<1.0E-07		0.9323
H10	<1.0E-12	5.09E-10	2.96E+03	1.27E+01	<1.0E-07		0.9993
E10	3.66E-08	9.36E-10	1.91E+03	1.26E+01	6.98E-05	1.73E-06	0.999

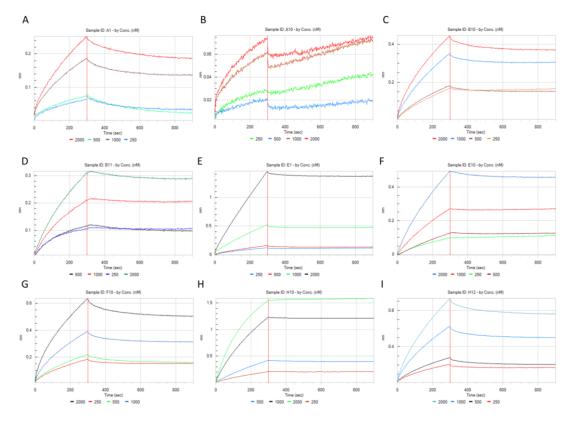
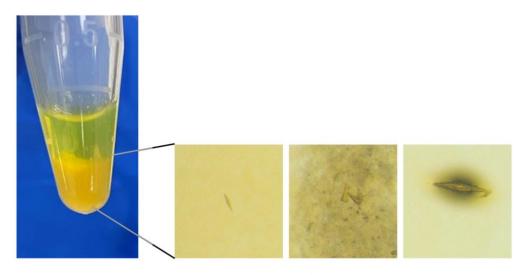


图 15 Gal10 与其纳米抗体 Octet RED96 相互作用测试

A-I 分别为 A1、A10、B10、B11、E1、E10、F10、H10、H12 与 SUMO-Gal10 的结合解离曲线。以上图像横坐标为时间(s),纵坐标为浓度(nM);(J)为部分纳米抗体与 SUMO-Gal10 相互作用的结合解离常数

#### 3.6 Galectin-10 体外结晶获得

为了验证 Gal10 在高浓度时形成的沉淀是否与 Gal10 自发结晶有关,并尝试在体外条件下获得大量 CLC 晶体用于纳米抗体溶解晶体的功能验证,因此我们又对 His-Gal10 进行了纯化。His-tag 的存在提高了 Gal10 的稳定性,因此可以将 His-Gal10 浓缩到较高的浓度。之后加入 TEV 酶将 His-tag 切去,在 4°C环境下过夜。为了便于观察,我们使用 5-IAF 对 His-Gal10 预先进行了荧光标记。第二天并没有观察到溶液变浑浊,但在大约一个月后可以观察到反应体系中有明显沉淀,在显微镜下观察也可以看到有微小结晶形成(图 16)。因此,Gal10 沉淀的确与其自发结晶有关。但由于我们筛选到的纳米抗体都不能与 Gal10 形成稳定的复合物,因此并没有进行纳米抗体溶解 CLC 结晶等功能验证。



**图 16 Gal10 体外结晶** 左侧为沉淀的 Gal10 蛋白,右侧为显微镜下观察到的 CLC 结晶

### 四、讨 论

哮喘是人群中比较常见的一种呼吸系统疾病,但由于其发病原因复杂,更加有效的治疗方案仍有待我们的开发。近年来有研究发现 Gal10 在体内自发结晶可能是哮喘发病的根源之一<sup>[8]</sup>,利用抗体溶解 Gal10 蛋白形成的晶体或许能成为相关药物研发的一个方向。本研究对 Gal10 的表达纯化条件和流程进行了优化,并以 Gal10 蛋白作为抗原筛选到了 10 个与其可能存在相互作用的纳米抗体。在构建克隆表达载体后,我们成功诱导表达并纯化了这些纳米抗体。Octet RED96 相互作用测试验证了这些纳米抗体与 Gal10 存在一定程度的相互作用,但分子筛层析以及 FSEC 的结果表明这些纳米抗体与 Gal10 不足以形成稳定的复合物。如果要将其开发为哮喘治疗药物,也许还需要重新进行筛选,或对上述纳米抗体进行结构优化。

在 Gal10 和纳米抗体的纯化过程中,都存在产物损失大的问题。Gal10 浓缩后会沉淀,因此浓缩就势必会造成浪费,但不浓缩也会导致后续试验操作繁琐。我们使用 NanoDSF 测试探究了缓冲液成分对 Gal10 稳定性的影响,并对 Gal10 缓冲体系成分进行了优化,但 Gal10 浓缩的上限依然在 1-2mg/ml。纳米抗体使用 Ni 柱纯化时会与柱介质存在一定程度的非特异性结合,我们尝试借助 Gal10 与纳米抗体共表达降低非特异性结合导致的损失,但由于二者不能形成复合物,因此结果也并不理想。通过提高洗脱液盐浓度、改变咪唑浓度以及更换纯化方式等也许能彻底解决这一问题。

我们前后共进行了两次 Octet RED96 相互作用测试,测得的纳米抗体与 Gal10 相互作用的结合解离常数大致都在纳摩尔级别,但也有部分结果并不一致。 如第一次测试显示 E1、B11 与 Gal10 的相互作用很微弱,但第二次测试显示二 者也与 Gal10 存在纳摩尔级别的相互作用。这可能是由于抗原性质不稳定、浓度测定不准确、SUMO-tag 蛋白去除不彻底等原因导致的。此外,FSEC 和分子筛层析均不能观察到纳米抗体与 Gal10 复合物的形成,共表达纯化也仅得到了 SUMO-Gal10,这说明 Octet RED96 测试中纳摩尔级别的相互作用对于抗原和抗体的相互作用来说可能还是不够稳定,该测试结果的参考价值还有待商榷。

在 Gal10 抗原的制备过程中多次发现蛋白沉淀的问题,这可能与 Gal10 性质不稳定,在纯化的过程中自发结晶有关。由于在浓缩的过程中机械力可能对晶体

结构造成破坏,不便于我们对此进行验证,因此我们也尝试进行了 Gal10 体外结晶。在沉淀中的确能够观察到 CLC 微晶的形成,但由于筛选到的纳米抗体与 Gal10 的亲和力不高,我们并没有尝试使用纳米抗体溶解 CLC 微晶。

本研究对 Gal10 的纯化条件进行了优化,尝试筛选了与其可能存在相互作用的纳米抗体,并进行了一系列相互作用验证。虽然我们的研究并没有筛选到符合预期的纳米抗体,但共表达、Octet RED96、体外结晶等尝试为之后纳米抗体与Gal10 的相互作用测试以及纳米抗体功能验证提供了很好的思路。通过构建更高库容量的纳米抗体库进行筛选,我们也许最终能够筛选到符合预期的抗体药物。

## 参考文献

- 1. Castillo J.R., Peters S.P., and Busse W.W. Asthma Exacerbations: Pathogenesis, Prevention, and Treatment [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2017, 5(4): 918-27.
- 2. Huang K, Yang T, Xu J, Yang L, Zhao J, Zhang X, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. Lancet, 2019, 394(10196): 407-18.
- 3. Axelsson I., Naumburg E., Prietsch S.O. and Zhang L. Inhaled corticosteroids in children with persistent asthma: effects of different drugs and delivery devices on growth [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2019, 6(6): Cd010126.
- 4. Su J. A Brief History of Charcot-Leyden Crystal Protein/Galectin-10 Research [J]. Molecules, 2018, 23(11).
- 5. Ueki S., Miyabe Y., Yamamoto Y., Fukuchi M., Hirokawa M., Spencer L.A., et al. Charcot-Leyden Crystals in Eosinophilic Inflammation: Active Cytolysis Leads to Crystal Formation [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2019, 19(8): 35.
- 6. Su J, Gao J, Si Y, Cui L, Song C, Wang Y, et al. Galectin-10: a new structural type of prototype galectin dimer and effects on saccharide ligand binding [J]. Glycobiology, 2018, 28(3): 159-68.
- 7. Grozdanovic M.M., Doyle C.B., Liu L, Maybruck B.T., Kwatia M.A., Thiyagarajan N., et al. Charcot-Leyden crystal protein/galectin-10 interacts with cationic ribonucleases and is required for eosinophil granulogenesis [J]. J Allergy Clin Immunol, 2020, 146(2): 377-89.e10.
- 8. Persson E.K., Verstraete K., Heyndrickx I., Gevaert E., Aegeter H., Percier J.M., et al. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment [J]. Science, 2019, 364(6442).
- 9. Fridy P.C., Li Y, Keegan S., Thompson M.K., Nudelman I., Scheid J.F., et al. A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires [J]. Nat Methods, 2014, 11(12): 1253-60.
- 10. Harmsen M.M. and De Haard H.J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 77(1): 13-22.
- 11. 姜忍忍, 许超, 周小理, 姚刚. 纳米抗体的应用及其研究新进展[J].生命的化学,2013,33(03):307-315.
- 12. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains [J]. Nature, 1993, 363(6428): 446-8.
- 13. Douady C.J., Dosay M., Shivji M.S. and Stanhope M.J. Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of Batoidea (rays and skates) as derived sharks [J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 26(2): 215-21.
- 14. Konning D., Zielonka S., Grzeschik J., Empting M., Valldorf B., Krah S., et al. Camelid and shark single domain antibodies: structural features and therapeutic potential [J]. Curr Opin Struct Biol, 2017, 45: 10-6.
- 15. Nguyen V.K., Hamers R., Wyns L. and Muyldermans S. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies [J]. Mol Immunol, 1999, 36(8): 515-24.
- 16. Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies [J]. Annu Rev Biochem, 2013, 82: 775-97.

- 17. Scully M., Cataland S.R., Peyvandi F., Coppo P., Knobl P., Kremer Hovinga J.A., et al. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura [J]. N Engl J Med, 2019, 380(4): 335-46.
- 18. Peyvandi F., Scully M., Kremer Hovinga J.A., Cataland S., Knobl P., Wu H, et al. Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura [J]. N Engl J Med, 2016, 374(6): 511-22.
- 19. Wu Y, Li C, Xia S, Tian X, Kong Y, Wang Z, et al. Identification of Human Single-Domain Antibodies against SARS-CoV-2 [J]. Cell Host Microbe, 2020, 27(6): 891-8.e5.
- 20. Schoof M., Faust B., Saunders R.A., Sangwan S., Rezelj V., Hoppe N., et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike [J]. Science, 2020, 370(6523): 1473-9.