DOI:10.12441/spyswjs.20250305002 [文章编号] 1673-1689(2025)07-0031-10

基于噬菌体展示天然纳米抗体库的人源白脂素纳米抗体制备研究

梁 赟[1,2] 黄 一[1,2] 何庆华[1,3*]

(1. 南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室，江西 南昌 330047；2. 南昌大学食品学院，江西 南昌 330047；3. 南昌大学中德联合研究院，江西 南昌 330047)

摘要:【目的】白脂素(asprosin,ASP)是一种由原纤维蛋白1(FBN1)裂解产生的脂肪因子,其水平异常与2型糖尿病、肥胖症等疾病密切相关,对健康影响显著,因此对ASP的监测具有重要意义。作者旨在通过噬菌体展示技术筛选特异性结合ASP的纳米抗体,为ASP的研究提供一种新的抗体元件。**【方法】**利用在线工具ABCpred和NovoPro预测ASP的抗原表位,并与牛血清白蛋白(BSA)偶联作为包被抗原ASP-Epitope-BSA。通过5轮生物亲和淘选,从噬菌体展示天然纳米抗体库中筛选特异性结合ASP的纳米抗体。在大肠杆菌中诱导表达筛选出的纳米抗体,测定其与ASP-Epitope-BSA和ASP全抗原的半数效应浓度(EC_{50})并进行特异性分析。最后,进行同源建模和分子对接研究,分析纳米抗体与ASP的结合模式。**【结果】**作者成功筛选出1株特异性结合ASP的纳米抗体VHH-19,其在大肠杆菌中的诱导表达量为2.4 mg/dL(以LB培养基计)。性能鉴定结果显示,VHH-19与ASP-Epitope-BSA和ASP全抗原的EC_{50}分别为(87.49±0.27)、(128.94±0.48) ng/mL,且具有较好的特异性。同源建模和分子对接结果显示,ASP被吸附在由VHH-19的CDR1区、CDR3区形成的活性口袋内,形成一种夹心式结合模式,其中ASP的Try116、Gly126、Lys115、Glu124与VHH-19的Glu107、Arg31、Arg33分别形成氢键与静电相互作用。**【结论】**作者基于噬菌体展示天然纳米抗体库,通过生物亲和淘选方法快速筛选并获得了特异性结合ASP的纳米抗体VHH-19。

关键词:白脂素;纳米抗体;生物亲和淘选;分子对接

Preparation of Human Asprosin Nanobodies Based on a Natural Nanobody Phage Display Library

LIANG Yun[1,2] *HUANG Yi*[1,2] *HE Qinghua*[1,3*]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. College of Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Sino German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: [**Objective**] Asprosin (ASP), an adipokine produced from fibrillin-1 (FBN1) cleavage, is closely linked to type 2 diabetes mellitus and obesity when its level is abnormal, demonstrating significant effect on human health. Therefore, monitoring the ASP level is crucial. The author aims to screen the nanobodies specifically binding to ASP *via* phage display technology, offering a new antibody component for the research on ASP. [**Method**] The antigenic epitopes of ASP were predicted by the online tools ABCpred and NovoPro, and then coupled with bovine serum albumin (BSA) to form the coating antigen (ASP-Epitope-BSA). After five rounds of bio-panning, the nanobodies specifically binding to ASP were screened from a nanobody phage display library. The selected nanobodies were induced for expression in

基金项目:江西省“千人计划”人才培养项目(JXSQ2023201029)。

通信作者:何庆华(1980—),男,博士,研究员,博士研究生导师,主要从事工程抗体构建及其应用研究。E-mail:heqinghua@ncu.edu.cn

收稿日期:2025-03-05 **修回日期:**2025-04-01

Escherichia coli. The half median effect concentration (EC_{50}) values with ASP-Epitope-BSA and whole ASP antigen were determined, and the specificity was evaluated. Finally, homology modeling and molecular docking were performed to study the binding mode between the nanobody and ASP. [**Result**] One ASP-specific nanobody (VHH-19) was successfully screened out, with the induced expression level of 2.4 mg/dL in the LB culture with *Escherichia coli*. Performance evaluation showed that VHH-19 had EC_{50} values of (87.49±0.27) ng/mL and (128.94±0.48) ng/mL for ASP-Epitope-BSA and whole ASP antigen, respectively, demonstrating good specificity. Homology modeling and molecular docking revealed that ASP was adsorbed in an active pocket formed by the CDR1 and CDR3 regions of VHH-19, forming a sandwich-like binding mode. The Try116, Gly126, Lys115, and Glu124 of ASP form hydrogen bonds and electrostatic interactions with Glu107, Arg31, and Arg33 of VHH-19, respectively. [**Conclusion**] This study rapidly obtained the ASP-specific nanobody VHH-19 by bio-affinity panning based on a natural nanobody phage display library.
Keywords: asprosin; nanobody; biopanning; molecular docking

ASP 是 Romere 等[1]在新生儿早衰综合征（neonatal progeroid syndrome，NPS）患者中首次发现的一种禁食诱导型生糖脂肪因子，其为FBN1经蛋白酶介导的C末端裂解产物，相对分子质量约为25 000。ASP水平的变化与多种代谢性疾病密切相关，包括2型糖尿病、肥胖等[2]。研究表明，通过调节饮食结构，减少摄入高糖、高油食物，增加摄入富含膳食纤维的食物（如全谷物、蔬菜等），可以间接改善与ASP相关的代谢健康问题[3]。这些食物通过降低血糖应答[4]、增强饱腹感以及改善胰岛素敏感性[5]等机制，间接调节ASP的水平。人体内ASP的正常水平为（3.63±0.89）ng/mL[6]。其异常变化对健康具有显著影响[7]，因此对ASP水平的监控具有重要的科学研究及实际应用价值[8-10]。

基于抗原、抗体特异性识别与结合的免疫分析技术因高特异性、高灵敏度及操作简便等特点在食品营养、安全及健康监测领域中发挥着重要作用[11]。建立免疫分析技术的难点及关键在于需要制备出特异性强的抗体，目前ASP抗体的制备主要基于兔源或鼠源单克隆抗体，并且主要聚焦于治疗性抗体的开发[12]，但是国内关于ASP特异性抗体的研究较少。传统的单克隆抗体技术在免疫分析领域发挥着重要作用，然而也面临着制备周期长、无法精确识别特殊抗原表位[13]、需要动物免疫而面临的动物伦理等问题。

与传统单克隆抗体相比，纳米抗体可以通过噬菌体展示技术进行筛选，该技术简单、快速、经济[14]，并避免了使用杂交瘤技术时存在的生产周期长、成本高、遗传稳定性差等问题[15]。同时，纳米抗体体积小，这使它们能够识别传统抗体不易识别的隐蔽型抗原表位[16]，例如经常被聚糖掩盖的保守病毒结构域[17]。此外，纳米抗体在极端pH、温度和高离子强度下表现出高稳定性，使其具有更强的基质耐受性[18]。

作者通过抗原表位预测的方法分析ASP抗原表位，采用不经过动物免疫的方式，以ASP抗原表位为配体，投入噬菌体展示天然纳米抗体库，通过生物亲和淘选的方式获得特异性结合ASP特定抗原表位的纳米抗体；在此基础上通过原核表达的方式，实现了特异性结合ASP的纳米抗体的生物合成，采用间接ELISA法分析了纳米抗体的结合能力以及特异性；最后，采用同源建模和分子对接的方法，对纳米抗体与ASP的结合位点以及相互作用进行分析，为ASP的研究提供了一种新的抗体元件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

辅助噬菌体M13KO7、HRP标记小鼠抗M13二抗：成都阿帕克生物科技有限公司；噬菌体展示天然纳米抗体库：作者所在实验室构建[19]；大肠杆菌DH5α感受态细胞、大肠杆菌BL21（DE3）感受态细胞：生工生物工程（上海）股份有限公司；ASP重组抗原：美国MedChemexpress生物科技公司；Prime STAR HS DNA Polymerase、凝胶回收试剂盒、PCR纯化试剂盒：宝日医生物技术（北京）有限公司；T4 DNA连接酶、*Sfi* I限制性内切酶：美国NEB公司；质粒提取试剂盒：天根生化科技有限公司；BCA蛋白质质量浓度测定试剂盒：碧云天生物科技有限公司；Ni-NTA琼脂糖凝胶：美国Cytiva公司。

1.2 仪器与设备

酶标分析仪：MB-580型，深圳市汇松科技发展有限公司；电热恒温水槽：NK-420型，常州诺基仪器有限公司；干式恒温器：MK-20型，杭州奥盛仪器有限公司；高速冷冻离心机：D-37520型，美国Thermo Fisher Scientific公司；电子天平：PX224ZH

型，奥豪斯仪器有限公司；生物安全柜：MSC 1.2型，美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.3　方法

1.3.1　ASP抗原表位的预测

分别使用在线工具软件ABCpred（https://webs.itd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html）和NovoPro（https://www.novopro.cn/tools/peptide-antigen-design.html）预测ASP的抗原表位。在ABCpred和NovoPro软件中，将氨基酸长度均设置为16，阈值分别设置为0.80和0.51[20]。根据2种在线工具预测结果的评分筛选ASP的抗原表位。委托南京金斯瑞生物科技有限公司化学合成抗原表位，并将其与BSA进行偶联作为包被抗原ASP-Epitope-BSA。

1.3.2　生物亲和淘选

特异性结合ASP的纳米抗体的生物亲和淘选主要参考文献[21]的方法。首先，将20 μg/mL ASP-Epitope-BSA加入酶标孔中，4 ℃孵育过夜；用体积分数0.05%的PBST洗板3次，加入质量分数为3%的BSA-PBS封闭2 h；用体积分数为0.05%的PBST洗板3次，投入100 μL噬菌体展示天然纳米抗体库，37 ℃孵育1 h；用体积分数为0.05%的PBST洗板5次，加入甘氨酸-盐酸液（pH 2.2）洗脱7 min，并测定洗脱产物的滴度[22]。随后将洗脱产物加到5 mL处于对数生长期的大肠杆菌TG1中，37 ℃侵染30 min，然后加入M13KO7辅助噬菌体（M13KO7与TG1的感染复数为20∶1）进行救援[23]。离心收集菌体，使用LB/Amp/Kana培养基重悬，30 ℃、250 r/min下过夜培养。最后，离心收集上清液，使用PEG/NaCl纯化噬菌体，得到的产物用于下一轮淘选。按照以上步骤进行5轮淘选。

1.3.3　特异性结合ASP的纳米抗体的阳性克隆

从1.3.2中第5轮滴度测试平板中随机挑取96个单克隆菌落，接种于1 mL 2×YT/Amp培养基中，37 ℃、220 r/min下培养2 h；加入M13KO7辅助噬菌体，37 ℃静置30 min，随后37 ℃、220 r/min下振荡培养30 min。离心收集菌体，加入1 mL 2×YT/Amp/Kan培养基，30 ℃、250 r/min下过夜培养，在4 ℃以8 000 r/min离心10 min，收集单克隆噬菌体的扩增上清液。

将2 μg/mL ASP-Epitope-BSA加入酶标孔，以相同质量浓度的BSA为阴性对照；将收集的单克隆噬菌体扩增上清液作为一抗，HRP酶标记的鼠抗M13抗体（稀释比1∶10 000）作为二抗，进行Phage-ELISA鉴定[24]。将阳性OD_{450}值/阴性OD_{450}值≥2.1（P/N≥2.1）的克隆判定为阳性克隆，并进行测序，测序引物序列为：5′-AAGACAGCTATCGCGATTGCAG-3′。

1.3.4　特异性结合ASP的纳米抗体的表达和纯化

采用原核表达的方式进行纳米抗体的生物合成，首先构建原核表达载体pET-25b-VHH，具体方法为：以上述获得的单克隆阳性噬菌体菌液为模板，以P-F（GATATCCAGTTGCAGCTCGTGGAGTC）和P-R（CCCGTTTGATCTAAGAAGCGTAGTCCGGAACGTC）为引物扩增纳米抗体的基因序列；以pET-25b为模板，以V-F（CGCTTCTTAGATCAAACGGGCTAGCCAGCCAGAAC）和V-R（CCACGAGCTGCAACTGGATATCCATGGCCATCGCCGG）为引物扩增载体基因序列。通过琼脂糖凝胶电泳分离目标片段，回收纳米抗体、载体片段，使用重组酶在50 ℃下连接5 min；随后，将构建好的质粒热激转化（42 ℃，90 s）至大肠杆菌BL21（DE3）感受态细胞中，涂布于LB/Amp固体培养基上，37 ℃培养12 h。挑选单菌落进行菌落PCR分析，并选择阳性菌液进行测序验证。

选择测序正确的单克隆菌落接种于LB/Amp液体培养基，诱导表达的条件设定为：诱导温度25 ℃，IPTG诱导浓度0.1 mmol/L，诱导表达时间16 h。表达上清液通过Ni柱进行亲和层析纯化，采用梯度洗脱的方式，分别用10、20、50、100、200 mmol/L的咪唑溶液进行洗脱，并通过SDS-PAGE对洗脱产物进行鉴定。

1.3.5　特异性结合ASP的纳米抗体的性能分析

采用间接ELISA法对特异性结合ASP的纳米抗体的结合能力进行分析[25]。分别将ASP重组抗原、ASP-Epitope-BSA和BSA进行包被（从10 μg/mL开始3倍稀释），用质量分数为5%的脱脂奶粉进行封闭后，加入100 μg/mL原核表达的纳米抗体作为一抗，并以稀释比为1∶5 000的HRP酶标记的兔抗驼IgG作为二抗。加入TMB显色液显色7 min，终止反应后用酶标仪测定450 nm处吸光度，按照上述操作重复3次试验（n=3）。为进一步验证特异性结合ASP的纳米抗体的特异性，按照上述间接ELISA法分别设置蛋白络氨酸磷酸酶（IA-2）、酪蛋白及卵白蛋白（OVA）作为对照组进行特异性验证。

1.3.6 同源建模及分子对接

为进一步分析所获得的特异性结合ASP的纳米抗体与ASP抗原的结合位点及相互作用，在SWISS-MODEL[26]在线平台，使用BLAST功能对ASP和特异性结合ASP的纳米抗体的氨基酸序列进行序列同源性比对，并选择同源性较高的模板构建它们的三维结构模型。随后，将模型提交至UCLA-DOE LAB-SAVES v6.1在线平台，通过拉氏图[27]分析氨基酸二面角分布，并结合ERRAT[28]和Verify 3D[29]评分评估模型质量，以确定其可靠性，随后将可靠的ASP与特异性结合ASP的纳米抗体模型进行分子对接，使用ZDOCK服务器（zdock.umassmed.edu）[30]进行对接计算，选取结合自由能最低（评分最高）[31]的模型作为最终复合物结构，使用PyMOL和LigPlot+ v.2.2软件进行分子间相互作用分析。

1.4 数据处理

数据处理和图表绘制通过Excel 2021和Graphpad Prism 8.0.2进行，数据以平均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 ASP抗原表位的预测结果

作者选取了2个不同的表位预测网站进行ASP抗原表位的分析。2个网站均预测出4段可能为ASP抗原表位的氨基酸序列，并对每段进行了评分（见表1）。由NovoPro在线网站预测出的4段氨基酸序列的得分均为22分，且都包含了一段相同的氨基酸序列（YKKKELNQ），表明这4段序列均有成为ASP抗原表位的可能。此外，由ABCpred预测的抗原表位中，评分最高的一段氨基酸序列（0.90）也包含了YKKKELNQ序列。

根据已有报道，Romere等[1]以ASP抗原表位（KKKELNQLEDKYDKDYLSGELGDNLKMK）为免疫原，通过杂交瘤技术制备出ASP的中和抗体。作者预测得到的8种抗原表位中，表位2的氨基酸序列与该表位的氨基酸序列重合率最高，证实了该表位的合理性，因此选择表位2作为ASP的抗原表位，委托南京金斯瑞生物科技有限公司化学合成该段氨基酸，并将其与BSA进行偶联作为包被抗原ASP-Epitope-BSA。

表1 ASP抗原表位的预测结果

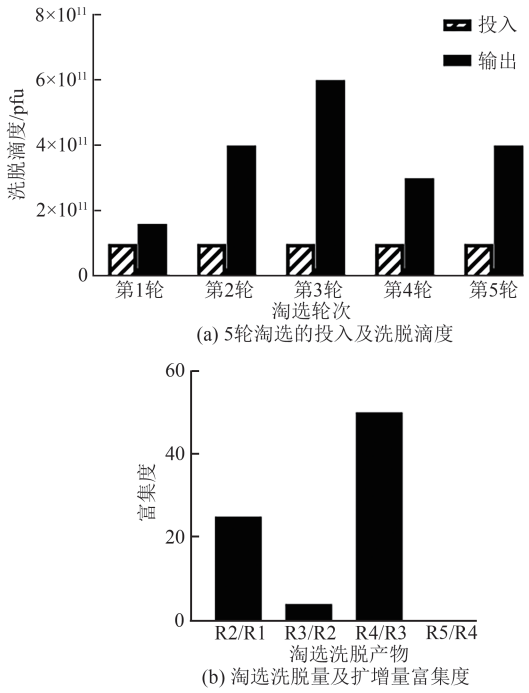
Table 1 Prediction results of asprosin epitopes

网站	名称	氨基酸序列	位置	得分
NovoPro	表位1	LYKKKELNQLEDKYDK	105~121	22
	表位2	YKKKELNQLEDKYDKD	106~122	22
	表位3	TPLYKKKELNQLEDKY	103~119	22
	表位4	PLYKKKELNQLEDKYD	104~119	22
ABCpred	表位5	LQISSTPLYKKKELNQ	98~114	0.90
	表位6	RYLIESGNEDGFFKIN	61~77	0.86
	表位7	HFTKKKPVAGTYSLQK	85~101	0.85
	表位8	DQSETEANVSLASWDV	12~28	0.83

2.2 特异性结合ASP的纳米抗体的生物亲和淘选结果

以ASP-Epitope-BSA为配体，投入噬菌体展示天然纳米抗体库进行了5轮生物亲和淘选。结果如图1所示，第2、3轮淘选出现了明显的富集，在第4轮达到最高，其回收率是第1轮淘选的50倍，表明特异性结合ASP的纳米抗体逐步增加，得到了有效富集。能够实现富集的原因在于试验条件、淘选过程和抗体亲和力提升的协同作用。在前4轮淘选中，逐轮降低配体的包被浓度、文库与配体的结合时间，增加文库结合后的洗涤次数，逐步去除非特异性噬菌体，富集特异性噬菌体，因此特异性噬菌体数量显著增加，实现了对特异性噬菌体的大量富集。

而第5轮的富集度有所下降，表明淘选轮数的不断增加并不能带来特定噬菌体的持续升高。第5轮淘选时，富集度的下降可能表明亲和力的提升达



(a) 5轮淘选的投入及洗脱滴度

(b) 淘选洗脱量及扩增量富集度

图1 特异性结合ASP的纳米抗体的生物亲和淘选结果

Fig. 1 Results of bio-panning for asprosin nanobodies specifically binding to ASP

到了一个平衡点，继续淘选并不能进一步提高亲和力，反而可能导致一些低亲和力的噬菌体被保留下来，影响整体的富集效果。因此，确定合适的淘选轮数对于获得高亲和力的纳米抗体至关重要，应根据回收率、富集度的变化合理调整试验条件，以提高淘选的特异性和效率。

2.3　特异性结合 ASP 的纳米抗体的阳性克隆

如图 2 所示，从第 5 轮滴度测试平板中随机挑取 96 个单克隆菌落，通过 Phage-ELISA 分析发现，其中 17 个单克隆（占 17.7%）能够与 ASP-Epitope-BSA 结合（OD_{450}值大于 1）。对这 17 个阳性克隆测序后得到 8 条不同的氨基酸序列，它们的 CDR1 区和 CDR3 区存在明显差异。进一步的间接 ELISA 分析结果显示，只有 1 个阳性克隆（VHH-19）能够特异性结合 ASP-Epitope-BSA。对 8 个氨基酸序列的分析表明，纳米抗体之间的差异主要体现在 CDR1 区和 CDR3 区的氨基酸种类和数目上，而这 2 个区正是决定纳米抗体

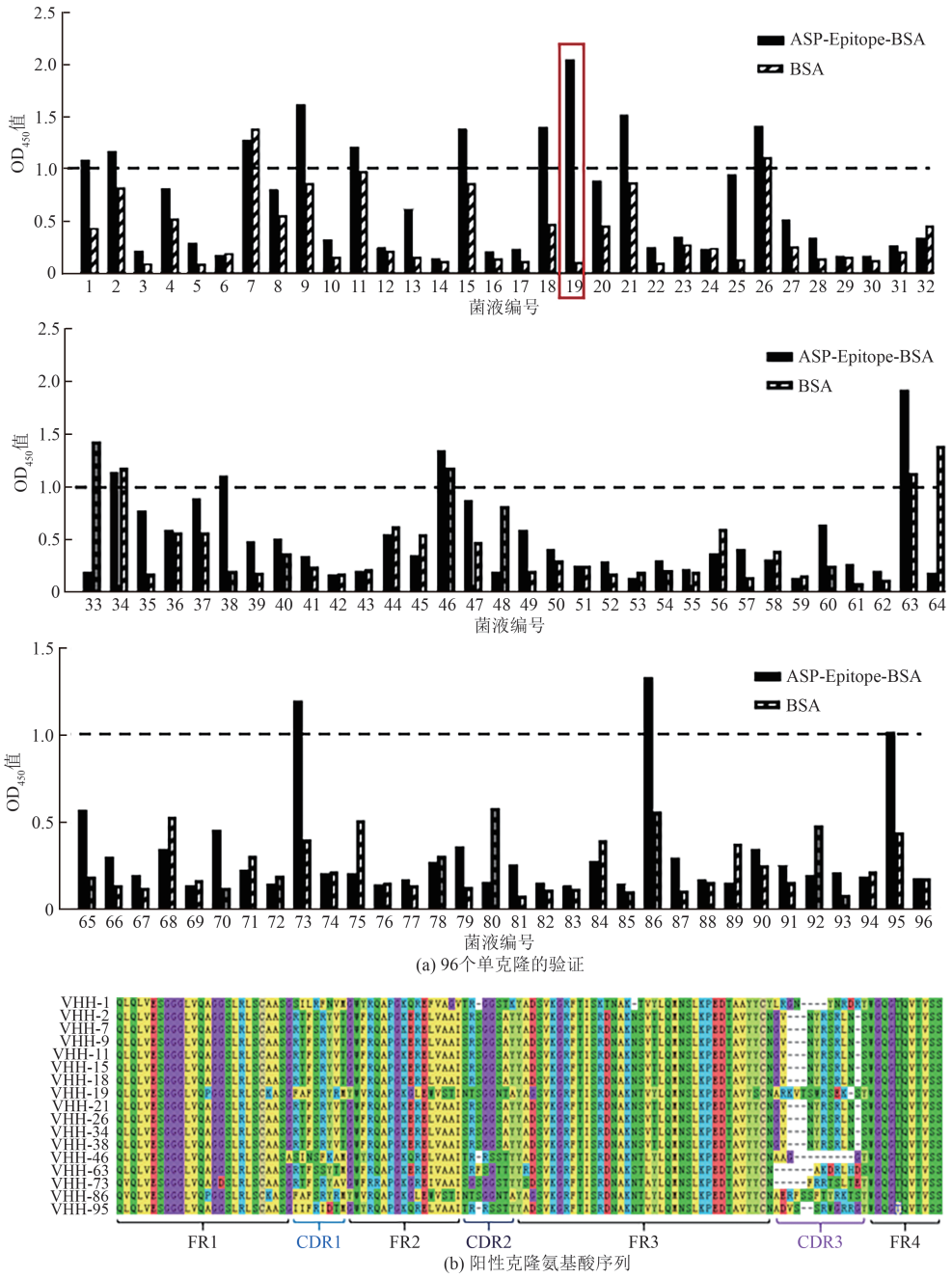


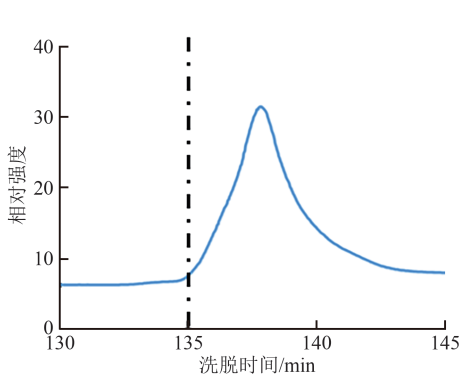
图 2　特异性结合 ASP 的纳米抗体阳性克隆的鉴定

Fig. 2　Identification of positive clones for nanobodies specifically binding to ASP

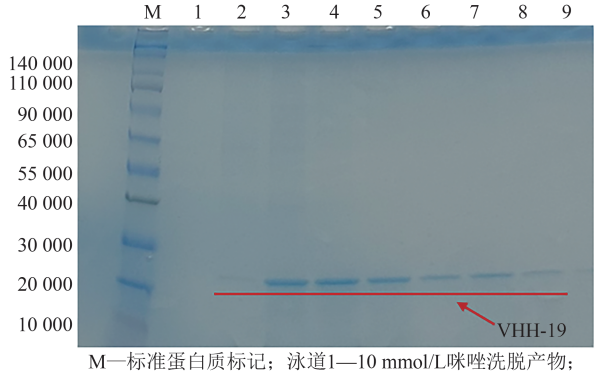
特异性的关键部分。其中，CDR1区相对保守，主要由非极性和极性中性氨基酸组成，平均长度为8个氨基酸；而CDR3区的氨基酸组成更为复杂，长度为10~14个氨基酸。CDR3区的长度和氨基酸种类对纳米抗体与抗原的结合具有重要影响。较长的CDR3区使纳米抗体能够深入抗原内部，识别隐藏的表位，从而增加结合的特异性和亲和力。同时，CDR3区复杂的氨基酸组成使其能够适应多样的抗原表位，进一步提高结合的特异性和亲和力。这种差异使CDR3区在抗原结合中具有更为复杂的功能需求。VHH-86和VHH-19的CDR3区氨基酸序列在数量和种类上均高于其他纳米抗体，两者的区别主要体现在CDR3区氨基酸的种类。然而只有VHH-19能够特异性结合ASP-Epitope-BSA，这表明VHH-19的CDR3区在其与抗原的结合中发挥着重要作用。

2.4 特异性结合ASP的纳米抗体的表达与纯化

为了原核表达特异性结合ASP的纳米抗体，将构建好的原核表达载体pET-25b-VHH-19转化至大肠杆菌BL21（DE3）感受态细胞中进行诱导表达，采用蛋白质纯化仪，通过Ni柱对表达产物进行纯化。如图3所示，当咪唑浓度为20 mmol/L时，280 nm波长下出现吸收峰。同步收集洗脱产物并通过SDS-PAGE对洗脱产物进行鉴定。结果显示，当咪唑浓度小于50 mmol/L时，洗脱产物中有多个条带，纳米抗体和非特异性蛋白质一同被洗脱；当咪唑浓度大于50 mmol/L时，随着咪唑浓度的提高，洗脱产物的条带逐渐单一，说明采用梯度洗脱的方式有利于得到纯度较高的纳米抗体。通过BCA试剂盒测定洗脱产物的蛋白质质量浓度，经计算得到：100 mL LB培养基中诱导表达的大肠杆菌可获得2.4 mg的纳米抗体。



(a) 洗脱产物的纳米抗体在280 nm波长的吸收峰



M—标准蛋白质标记；泳道1—10 mmol/L咪唑洗脱产物；泳道2—20 mmol/L咪唑洗脱产物；泳道3—50 mmol/L咪唑洗脱产物；泳道4~6—100 mmol/L咪唑洗脱产物；泳道7~9—200 mmol/L咪唑洗脱产物。

(b) SDS-PAGE验证洗脱产物

图3 纳米抗体原核表达洗脱产物的紫外吸收峰及SDS-PAGE分析

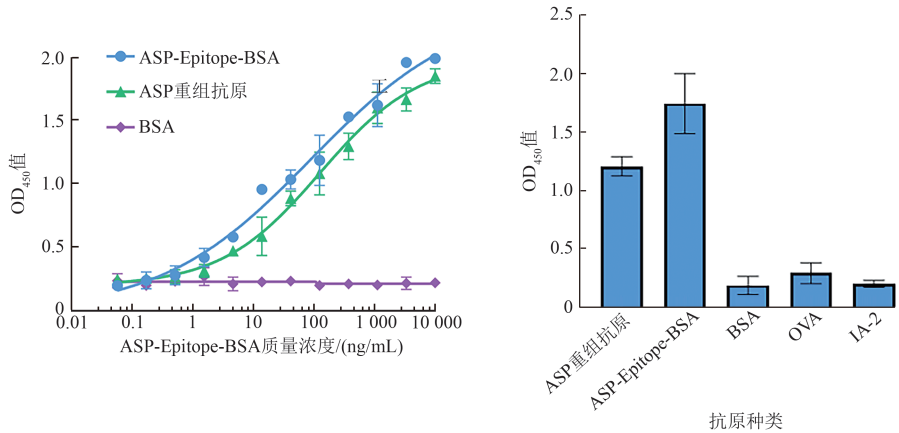
Fig. 3 UV absorption peak and SDS-PAGE of the eluate from prokaryotic expression of the nanobody

2.5 特异性结合ASP的纳米抗体的结合性能

通过间接ELISA法检测ASP-Epitope-BSA与VHH-19的结合能力，结果见图4（a）。随着ASP-Epitope-BSA质量浓度的提高，OD_{450}值也不断提高，ASP-Epitope-BSA达到饱和，其EC_{50}为（87.49±0.27）ng/mL。此外，VHH-19也能与ASP重组抗原结合，EC_{50}为（128.94±0.48）ng/mL，但在相同条件下，VHH-19与ASP重组抗原的结合能力略低于ASP-Epitope-BSA，这可能是因为在ASP的天然构象中，抗原表位存在一定的空间折叠，导致其与纳米抗体的结合位点部分遮蔽，从而影响了结合效率。相比之下，ASP-Epitope-BSA中的抗原表位能够完整暴露在BSA的表面，更有利于与VHH-19结合。如图4（b）所示，在VHH-19特异性验证的结果中，除了ASP-Epitope-BSA和ASP重组抗原外，其余组别的OD_{450}值均低于0.2，表明VHH-19对ASP抗原具有良好的特异性，且针对的是ASP的特定抗原表位。这种特异性使VHH-19在免疫分析应用中能够准确识别目标抗原，减少非特异性结合带来的干扰，提高检测的准确性和可靠性。

2.6 ASP与VHH-19的同源建模及分子对接

如图5所示，将ASP与VHH-19的序列进行Blast比对，分别以同源性最高的序列（PDB号分



(a) VHH-19的结合能力测定　　(b) VHH-19的特异性鉴定

图 4　特异性结合 ASP 的纳米抗体的结合性能

Fig. 4　Binding properties of the nanobody to asprosin

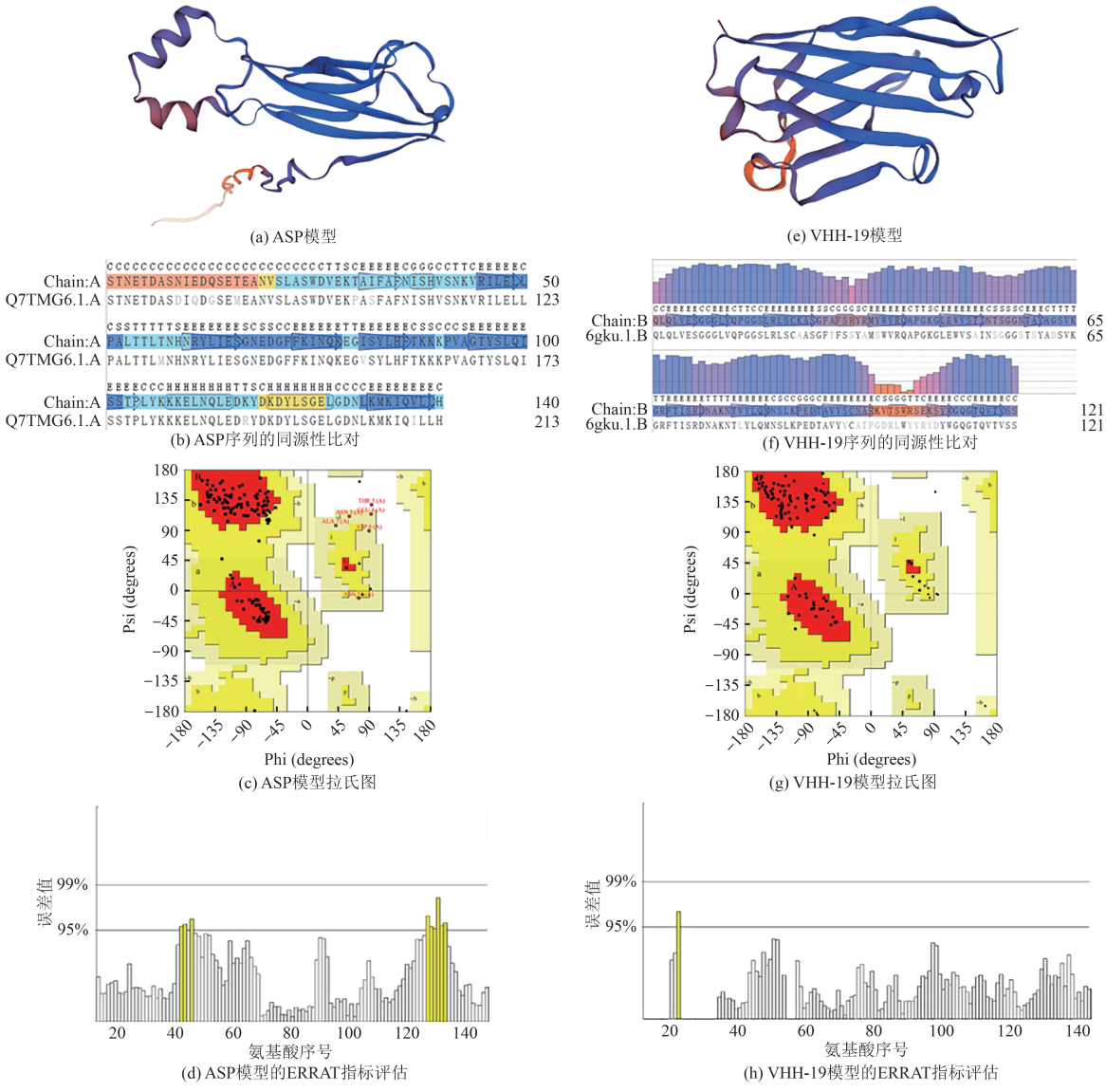


图 5　ASP 与 VHH-19 的模型评估

Fig. 5　Model evaluation of ASP and VHH-19

别为Q7TMG6和6GKU）为模板进行三维模型的构建。序列比对结果显示，ASP与Q7TMG6的序列同源性为92.86%，VHH-19与6GKU的序列同源性为79.34%，均高于50%的可靠性阈值，表明模型具有较高的可信度。通过拉氏图评估模型的结构合理性，ASP和VHH-19模型的氨基酸残基二面角均100%位于允许区域内，其中核心区占比分别为92.5%和93.1%，符合拉氏图评分标准（>90%的氨基酸残基位于核心区）。此外，ERRAT指标评估结果显示，ASP和VHH-19模型的得分分别为99.08分和92.04分，均高于85分的质量阈值，表明所建立的ASP和VHH-19模型在序列同源性、立体化学合理性和非键相互作用方面均表现出较高的质量，适用于后续分子对接研究。

基于同源建模获得了ASP和VHH-19的三维结构，并对ASP与VHH-19进行分子对接，见图6。对接结果显示，VHH-19的CDR3区和CDR1区共同形成一个疏水型的深凹槽（活性口袋），其中CDR3区的Phe104、Leu108和CDR1区的Trp32、Tyr34等疏水性残基贡献了活性口袋的疏水环境。ASP抗原表位在疏水性环境中被吸附在活性口袋内，形成一种夹心式结合模式。具体而言，VHH-19的CDR3区中的Glu107与ASP抗原表位中的Tyr116形成氢键，与Lys115形成静电相互作用；CDR1区中的Arg31与ASP抗原表位中的Gly126形成氢键，Arg33与ASP抗原表位中的Glu124形成静电相互作用。这些相互作用共同维持结合的稳定性，并促进了VHH-19与ASP的特异性结合。

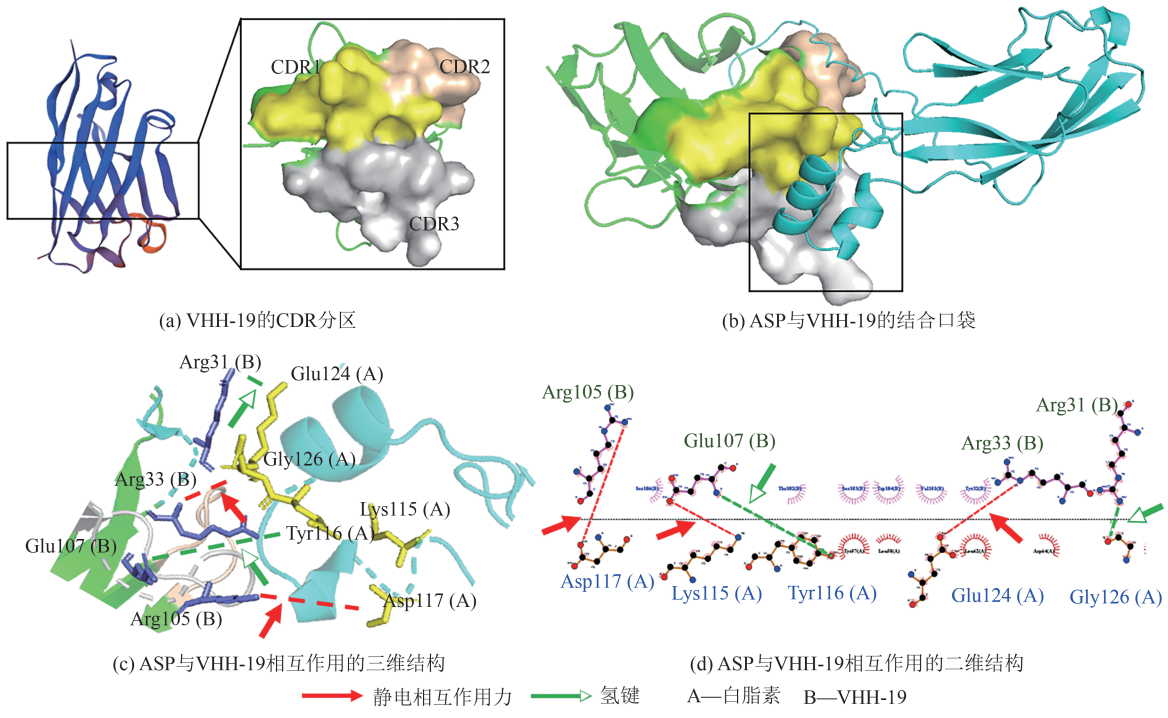


图6 ASP与VHH-19的同源建模及分子对接

Fig. 6 Homology modeling and molecular docking of asprosin with VHH-19

从结合模式来看，这种夹心式结合模式表明VHH-19能够紧密包裹ASP抗原表位，通过多个相互作用位点增强结合的稳定性和特异性。氢键和静电相互作用是主导的结合力，其中Glu107在CDR3区中发挥了关键作用，与ASP的Tyr116和Lys115形成双重相互作用，这不仅增加了结合强度，还提升了结合的特异性，使VHH-19能够准确识别ASP的特定抗原表位。此外，疏水作用也对结合稳定性有重要贡献，CDR1区和CDR3区的疏水性残基共同营造了一个疏水环境，使ASP抗原表位能够稳定嵌入其中，进一步增强了结合的牢固程度。

3 结论

作者利用噬菌体展示天然纳米抗体库，通过生

物亲和淘选方法成功筛选并制备了特异性结合ASP的纳米抗体VHH-19。该纳米抗体在大肠杆菌中的诱导表达量为2.4 mg/dL（以LB培养基计），对ASP-Epitope-BSA和ASP重组抗原的EC_{50}分别为（87.49±0.27）、（128.94±0.48）ng/mL，且具有较好的特异性。通过同源建模和分子对接发现，ASP结合在VHH-19的CDR1区和CDR3区形成的一个活性口袋内，构成夹心式结合模式，其中ASP的Try116、Gly126、Lys115、Glu124与VHH-19的Glu107、Arg31、Arg33分别形成氢键与静电相互作用。

该研究主要针对ASP纳米抗体的筛选和性能进行分析，对于其在免疫分析技术中的应用尚未进行深入探讨。在未来的研究中可采用亲和力成熟的方法，如定点突变或随机突变等进一步提升VHH-19与抗原的结合能力，亦可通过构建多价纳米抗体、纳米抗体与Fc片段的嵌合抗体等方法，提高其亲和力以及功能活性，增强VHH-19在检测中的灵敏度及治疗中的靶向效率。

参考文献

[1] ROMERE C，DUERRSCHMID C，BOURNAT J，et al. Asprosin，a fasting-induced glucogenic protein hormone[J]. Cell，2016，165(3)：566-579.

[2] DUERRSCHMID C，HE Y L，WANG C M，et al. Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone[J]. Nature Medicine，2017，23(12)：1444-1453.

[3] HOFFMANN J G，XIE W，CHOPRA A R. Energy regulation mechanism and therapeutic potential of asprosin[J]. Diabetes，2020，69(4)：559-566.

[4] LU Y L，YUAN W W，XIONG X W，et al. Asprosin aggravates vascular endothelial dysfunction *via* disturbing mitochondrial dynamics in obesity models[J]. Obesity，2023，31(3)：732-743.

[5] ZHANG L，CHEN C，ZHOU N，et al. Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride[J]. Clinica Chimica Acta，2019，489：183-188.

[6] 谢丽娟，张媛媛，冯宜娟，等. 白脂素生物学功能及其与代谢性疾病关系研究进展[J]. 生物技术，2023，33(4)：530-535.
XIE L J，ZHANG Y Y，FENG Y J，et al. Research progress on biological function of asprosin and its role in metabolic diseases[J]. Biotechnology，2023，33(4)：530-535.（in Chinese）

[7] YIN T T，CHEN S，ZENG G H，et al. Angiogenesis-browning interplay mediated by asprosin-knockout contributes to weight loss in mice with obesity[J]. International Journal of Molecular Sciences，2022，23(24)：16166.

[8] MISHRA I，XIE W R，BOURNAT J C，et al. Protein tyrosine phosphatase receptor δ serves as the orexigenic asprosin receptor[J]. Cell Metabolism，2022，34(4)：549-563.

[9] 杨硕，任明. 白脂素在心血管疾病中的作用[J]. 国际心血管病杂志，2024，51(2)：74-76.
YANG S，REN M. Research progress of asprosin and cardiovascular disease[J]. International Journal of Cardiovascular Disease，2024，51(2)：74-76.（in Chinese）

[10] HUANG Q Q，CHEN S，XIONG X W，et al. Asprosin exacerbates endothelium inflammation induced by hyperlipidemia through activating IKKβ-NF-κBp65 pathway[J]. Inflammation，2023，46(2)：623-638.

[11] PELTOMAA R，BARDERAS R，BENITO-PEÑA E，et al. Recombinant antibodies and their use for food immunoanalysis[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry，2022，414(1)：193-217.

[12] MISHRA I，DUERRSCHMID C，KU Z Q，et al. Asprosin-neutralizing antibodies as a treatment for metabolic syndrome[J]. eLife，2021，10：e63784.

[13] JOHNSON D E. Biotherapeutics：challenges and opportunities for predictive toxicology of monoclonal antibodies[J]. International Journal of Molecular Sciences，2018，19(11)：3685.

[14] RAMON A，ALI M，ATKINSON M，et al. Assessing antibody and nanobody nativeness for hit selection and humanization with AbNatiV[J]. Nature Machine Intelligence，2024，6(1)：74-91.

[15] ZHAO F C，SHI R R，LIU R X，et al. Application of phage-display developed antibody and antigen substitutes in immunoassays for small molecule contaminants analysis：a mini-review[J]. Food Chemistry，2021，339：128084.

[16] MUYLDERMANS S. Nanobodies：natural single-domain antibodies[J]. Annual Review of Biochemistry，2013，82：775-797.

[17] XU J L，XU K，JUNG S，et al. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants[J]. Nature，2021，595(7866)：278-282.

[18] KUNZ P，ORTALE A，MÜCKE N，et al. Nanobody stability engineering by employing the ΔT_m shift：a comparison with apparent rate constants of heat-induced aggregation[J]. Protein Engineering，Design and Selection，2019，32(5)：241-249.

[19] XIONG L，ZHANG X Q，XU Y，et al. Anti-idiotypic

VHH mediated environmentally friendly immunoassay for citrinin without mycotoxin[J]. Food and Agricultural Immunology,2020,31(1):968-984.

[20] 孙卓雅,王梦翔,宋金星,等. 非洲猪瘟病毒p10蛋白和p49蛋白的生物信息学分析及表位预测[J]. 江苏农业科学,2024,52(15):195-202.
SUN Z Y, WANG M X, SONG J X, et al. Bioinformatics analysis and epitope prediction of p10 and p49 proteins of African swine fever virus[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2024, 52(15): 195-202.(in Chinese)

[21] PÍREZ-SCHIRMER M, ROSSOTTI M, BADAGIAN N, et al. Comparison of three antihapten VHH selection strategies for the development of highly sensitive immunoassays for microcystins[J]. Analytical Chemistry, 2017,89(12):6800-6806.

[22] BEVER C R S, MAJKOVA Z, RADHAKRISHNAN R, et al. Development and utilization of camelid VHH antibodies from alpaca for 2,2',4,4'-tetrabrominated diphenyl ether detection[J]. Analytical Chemistry,2014, 86(15):7875-7882.

[23] 何婉钧,崔愷,张西倩,等. 驼源天然噬菌体纳米抗体文库的构建及抗CD22纳米抗体的筛选[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2025,41(3):254-261.
HE W J, CUI K, ZHANG X Q, et al. Construction of a camel-derived natural phage nanobody display library and screening of anti-CD22 nanobodies[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology,2025,41(3):254-261.(in Chinese)

[24] 张雨欣,陈雨,张凤,等. 基于噬菌体展示的阿达木单抗特异性结合肽筛选及其在药物检测中的应用[J]. 药学学报,2025,60(3):762-770.
ZHANG Y X, CHEN Y, ZHANG F, et al. Screening of adalimumab-specific binding peptides based on phage display and its application to drug detection[J]. Acta Pharmaceutica Sinica,2025,60(3):762-770.(in Chinese)

[25] 高艳春,王艳归,张玉秀,等. 靶向幽门螺杆菌UreB鲨鱼纳米抗体的筛选与鉴定[J]. 中国海洋药物,2024,43(4):35-41.
GAO Y C, WANG Y G, ZHANG Y X, et al. Screening and characterization of shark VNARs targeting *Helicobacter pylori* UreB[J]. Chinese Journal of Marine Drugs,2024,43(4):35-41.(in Chinese)

[26] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2018,46(1):W296-W303.

[27] LASKOWSKI R A, MACARTHUR M W, MOSS D S, et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures[J]. Journal of Applied Crystallography,1993,26(2):283-291.

[28] BINBAY F A, RATHOD D C, GEORGE A A P, et al. Quality assessment of selected protein structures derived from homology modeling and alphafold[J]. Pharmaceuticals,2023,16(12):1662.

[29] SHUKLA A, GUNDAMPATI R K, RAJASEKHAR C, et al. Homology modeling and molecular docking of heme peroxidase from *Euphorbia tirucalli*: substrate specificity and thiol inhibitor interactions[J]. Journal of Molecular Liquids,2016,220:383-394.

[30] WANG J W, KANG G B, YUAN H B, et al. Research progress and applications of multivalent, multispecific and modified nanobodies for disease treatment[J]. Frontiers in Immunology,2021,12:838082.

[31] SHI M S, CHEN T, WEI S P, et al. Molecular docking, molecular dynamics simulations, and free energy calculation insights into the binding mechanism between VS-4718 and focal adhesion kinase[J]. ACS Omega, 2022,7(36):32442-32456.

(责任编辑:史润东东)