DOI:10.12441/spyswjs.20260209001 [文章编号] 1673-1689(2026)04-0051-10

基于哺乳动物细胞的牛免疫球蛋白G重组表达及其纳米抗体的制备研究

钟于红[1,2] 蔡 冲[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】利用哺乳动物细胞重组表达系统制备牛免疫球蛋白G(Immunoglobulin G,IgG)全长及片段抗体,并基于噬菌体展示技术筛选特异性识别牛IgG的高亲和力纳米抗体,为牛IgG的检测及功能研究提供新型抗体工具。**【方法】**通过检索牛IgG编码基因序列,将牛IgG的CH片段、Fc片段、CH3片段和CL片段克隆到pTT5真核表达载体,并在Expi293F细胞中进行高效表达。使用天然牛血清和重组表达的Fc片段作为包被抗原,通过3轮亲和淘选,从噬菌体展示天然纳米抗体库中筛选特异性结合牛IgG的纳米抗体。在Rosetta大肠杆菌中对阳性克隆进行诱导表达,并分析其与其他物种IgG的特异性及结合位点。**【结果】**构建了牛IgG的CH片段、Fc片段、CH3片段和CL片段表达载体,实现了牛IgG全长及重、轻链片段在Expi293F细胞中的高效重组表达,利用噬菌体展示天然纳米抗体库,以天然牛血清为靶标,通过生物亲和淘选方法成功筛选并制备了特异性识别牛IgG的纳米抗体。**【结论】**基于噬菌体展示技术,通过3轮亲和淘选策略快速筛选获得了2株靶向牛IgG的高特异性纳米抗体,对其重组表达并验证了活性,为后续牛乳或牛肉类制品掺假检测方法的建立提供参考。

关键词:牛免疫球蛋白G;真核表达;纳米抗体;生物亲和淘选

Study on Recombinant Expression of Bovine Immunoglobulin G in Mammalian Cells and Preparation of Nanobodies Against Bovine IgG

ZHONG Yuhong[1,2] *CAI Chong*[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**] This study prepared full-length and fragment antibodies of bovine immunoglobulin G (IgG) with a mammalian cell recombinant expression system and screened high-affinity nanobodies that specifically recognize bovine IgG based on phage display technology, aiming to provide new antibody tools for the detection and functional study of bovine IgG. [**Method**] By retrieving the bovine IgG gene sequences, the CH fragment, Fc fragment, CH3 fragment, and CL fragment of bovine IgG were cloned into the pTT5 eukaryotic expression vector and efficiently expressed in Expi293F cells. With natural bovine serum and recombinant Fc fragment as coating antigens, three rounds of biopanning were performed to screen for the nanobodies that

基金项目:江西省“双千计划”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应用研究。E-mail:heqinghua@ncu.edu.cn

收稿日期:2026-02-09 **修回日期:**2026-03-03

specifically bound bovine IgG from a phage-displayed nanobody natural library. Positive clones were induced for expression in *Escherichia coli* Rosetta, and their specificity to IgG of other species as well as binding sites were determined. [**Result**] The expression vectors for the CH fragment, Fc fragment, CH3 fragment, and CL fragment of bovine IgG were constructed, and efficient recombinant expression of full-length bovine IgG as well as heavy and light chain fragments was achieved in Expi293F cells. The specific nanobodies recognizing bovine IgG were successfully screened from a phage-displayed natural nanobody library through biopanning with natural bovine serum as the target and prepared. [**Conclusion**] On the basis of phage display technology, two nanobodies with high specificity targeting bovine IgG were screened through a three-round biopanning strategy, and their recombinant expression and activity verification were successfully completed. This can provide a reference for subsequent adulteration detection in milk or beef products.

Keywords: bovine immunoglobulin G; eukaryotic expression; nanobody; biopanning

牛Ig是牛体内的一种重要抗体蛋白，其中IgG占总Ig的70%~80%。现有研究表明，牛IgG具有营养、免疫调节及抗菌等活性，因此其在食品科学的基础研究及应用领域中得到广泛应用[1]。例如，研究IgG在酸性（如胃酸）或高温加工（如巴氏消毒）环境下的构象变化[2]，将有助于理解IgG如何在消化道中保留活性，帮助优化食品加工条件以保留IgG的活性[3-4]。此外，基于Ig具有的物种特异性，也常用作物种鉴定的生物标志物[5]，主要是在开发特异性结合IgG的抗体的基础上，采用免疫分析方法实现对特定IgG的识别与检测，以此来鉴别待测品的物种来源，如基于Ig检测的肉类掺假免疫分析测定方法，可用于检测食品中非法添加的猪肉和鸡肉[6-7]。除肉类检测外，牛IgG还可用于乳制品掺假的免疫检测[8]，主要用于甄别高值乳制品，例如羊奶、驼奶、羊驼奶中是否掺杂普通牛乳[9]。

因此制备具有物种独特性及组成均一的牛IgG，并在此基础上开发抗牛IgG的抗体，对于开展基于牛IgG的基础与应用研究具有重要作用。然而，传统的牛IgG主要依赖于动物来源，受牛体健康、季节和饲养条件影响[10]，产量不稳定且成本高，动物来源IgG还可能携带病原体（如朊病毒或细菌），面临生物安全风险[11]。此外，目前抗牛IgG的抗体主要是多克隆抗体或基于鼠源的单克隆抗体[12]。多克隆抗体虽然制备较为简单，但存在交叉反应率高、重现性差等缺陷。单克隆抗体技术虽在免疫分析中占据重要地位，却面临着制备耗时长、对特殊抗原表位识别精度不足的挑战[13]，同时还面临动物福利等问题。

重组Ig制备技术是指通过基因工程技术在宿主细胞（如细菌、酵母、哺乳动物细胞或植物细胞）中表达和生产Ig全长或其片段，这种方法不同于传统从血清中提取Ig[14]，而是利用分子生物学手段“重构”Ig的基因，实现大规模生产Ig，具有生产效率高、产品性能均一、污染风险小等优点。其中，采用哺乳动物细胞表达系统，还能保持Ig完成正确的蛋白质折叠、组装以及物种特异性的糖基化修饰，从而确保重组表达的IgG维持其固有的构象完整性、稳定性及生物活性[15]。相比传统的单克隆抗体，纳米抗体相对分子质量约15 000，是传统单克隆抗体的1/10，具有更强的组织穿透力和均匀分布能力，能识别传统抗体难以触及的抗原沟槽和裂隙[16-17]，同时纳米抗体可通过噬菌体展示技术筛选获得，制备流程大幅简化，更加经济高效且易于大规模生产，已在诊断和治疗等多领域展现广阔应用前景[18]。

作者旨在实现牛IgG全长及其重、轻链片段在哺乳动物细胞中的重组表达，在此基础上基于噬菌体展示天然纳米抗体库，筛选可特异性结合牛IgG恒定区的纳米抗体，以期为牛IgG的研究提供关键的标准品及识别元件。首先检索牛IgG编码基因序列，构建牛IgG重、轻链全长及恒定区片段真核表达载体，通过Expi293F哺乳动物细胞表达系统实现牛IgG全长及其重、轻链片段的高效表达。以牛IgG为固相靶标，对噬菌体展示天然纳米抗体库实施3轮亲和淘选，获得特异性结合牛IgG恒定区的纳米抗体。牛IgG全长及重、轻链片段表达鉴定和抗牛IgG纳米抗体制备流程见图1。

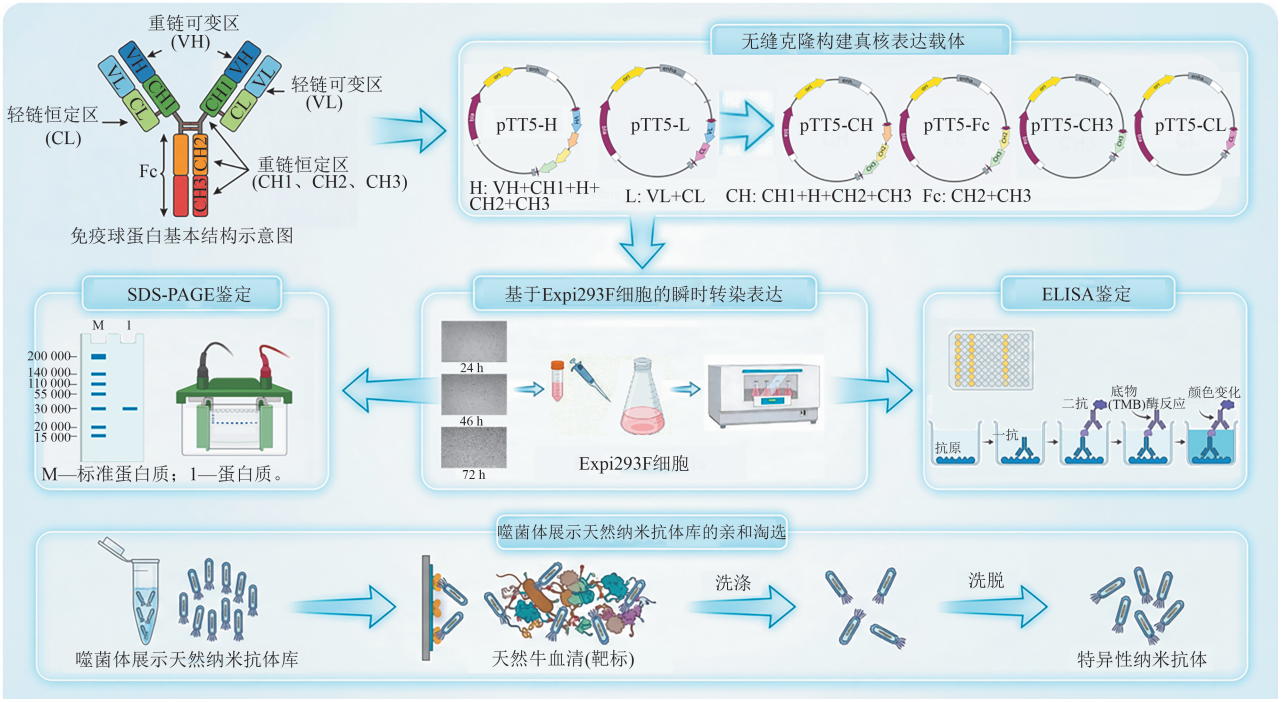


图1　牛IgG全长及重、轻链片段表达鉴定和抗牛IgG纳米抗体制备流程示意图

Fig. 1　Expression identification of full-length bovine IgG and its heavy and light chain fragments and preparation process of anti-bovine IgG nanobodies

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

质粒提取试剂盒、无内毒素质粒小提中量试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司；Prime STAR HS DNA Polymerase、凝胶回收试剂盒、DPN I酶：宝日医生物技术（北京）有限公司；无缝克隆连接试剂盒：翌圣生物科技（上海）股份有限公司；大肠杆菌DH5α感受态细胞：上海生工生物工程有限公司；Expi293F细胞：美国Thermo Fisher Scientific公司；Opti-MEM I减血清培养基：英潍捷基上海贸易有限公司；PEI：南京禾鸣英固生物科技有限公司；OPM-293 Hi-exp：上海奥浦迈生物科技股份有限公司；成牛血清：上海爱必信生物科技有限公司；其他物种IgG：均由各物种血清经Protein G柱纯化后获得；小鼠抗牛单克隆抗体-HRP：北京索莱宝科技有限公司；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]；BCA蛋白质浓度测定试剂盒：碧云天生物科技有限公司；Ni Sepharose Excel填料：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　牛IgG序列的同源性分析

使用在线网站IMGT（https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/LocusGenes/index.phphash=&species=bovine）和NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）搜索牛IgG的恒定区氨基酸序列，分析对比其同源性，进行不同亚型间和不同物种间的序列比对。

1.3.2　牛IgG全长及其重、轻链片段表达载体的构建

将1.3.1分析选定后的荷斯坦奶牛IgG重链和轻链氨基酸序列委托通用生物（安徽）股份有限公司合成至真核表达载体pTT5上，并将其合成质粒分别命名为pTT5-H（VH＋CH1＋H＋CH2＋CH3）和pTT5-L（VL＋CL）。

为构建牛IgG的重链恒定区全长（CH片段、CH1+H+CH2+CH3片段）、Fc片段（CH2+CH3片段）和CH3片段表达载体，以pTT5-H质粒为模板通过无缝克隆的方式构建pTT5-CH、pTT5-Fc和pTT5-CH3重链片段表达载体。同时，牛IgG的轻链恒定区全长（CL片段）表达载体构建方式与重链片段表达载体一致，模板换为pTT5-L质粒以获得pTT5-CL轻链片段表达载体。

表1 牛IgG重、轻链片段表达载体构建的引物及验证引物

Table 1 Primers for constructing and validating expression vectors of bovine IgG heavy and light chain fragments

引物名称	5′—3′	用途
BH-pTT5-CH1	GTGAGGGCCGCTAGCACAACAGCCCCTAAGGTG	构建CH片段（CH1-CH3片段）表达载体
BH-CH	CTGTTGTGCTAGCGGCCCTCACCCCAGTCAG	构建CH片段（CH1-CH3片段）表达载体
BH-pTT5-CH2	GTGAGGGCCCCACCTGAATTGCCTGGCG	构建Fc片段（CH2-CH3片段）表达载体
BH-Fc	GCAATTCAGGTGGGGCCCTCACCCCAGTCAG	构建Fc片段（CH2-CH3片段）表达载体
pTT5-BCH3	GGCAGGGCCGGCCCTCACCCCAGTCAG	构建CH3片段表达载体
BH-CH3	GTGAGGGCCGGCCCTGCCAGAGAAC	构建CH3片段表达载体
BL-pTT5	GTGAGGGCCGGCCAGCCTAAGTCTCCTCCTAG	构建CL片段表达载体
BL-Cλ	CTTAGGCTGGCCGGCCCTCACCCCAGTCAG	构建CL片段表达载体
pTT5-F	GCATGCACAGCTCAGCACTG	菌落PCR验证引物
pTT5-R	ATCTCCGAGGGATCTCGACCA	菌落PCR验证引物

1.3.3 牛IgG全长及其重、轻链片段的重组表达和纯化

采用Expi293F细胞进行牛IgG全长及重、轻链片段的重组表达，细胞的复苏、传代和瞬时转染等参考王何瑶[20]的步骤进行。首先复苏Expi293F细胞，培养72 h，细胞生长状态良好且密度达到3×10^6个/mL后，以此细胞进行1∶10传代，稳定传代2~3次后，计算细胞存活率及密度。当细胞存活率在95%以上时，可进行瞬时转染操作。

牛IgG全长的重组表达使用pTT5-H质粒和pTT5-L质粒共转染，2种质粒质量比1∶2。以30 mL转染体系为例，共投入质粒60 μg，转染时先将孵育液与转染试剂PEI进行吹打混匀，再加入质粒进行吹打，静置15 min后，画“8”字或者打圈的方式滴加进Expi293F细胞中，放入摇床中进行培养。实时检测细胞状态及细胞存活率，待细胞存活率降至60%后，使用Ni-NTA亲和柱对其进行纯化，最终通过SDS-PAGE电泳和ELISA对洗脱产物进行鉴定。

牛IgG的轻链全长、Fc片段、CH3片段和CL片段转染步骤与牛IgG全长的表达步骤一致，不同点在于不需要与其他质粒进行共转染，30 mL转染体系中质粒投入量为60 μg。牛IgG的CH片段的重组表达使用pTT5-CH质粒和pTT5-CL质粒共转染，2种质粒质量比1∶1。

1.3.4 抗牛IgG纳米抗体的生物亲和淘选

参考文献[21]中的生物亲和淘选方法，以天然牛血清为靶标，投入噬菌体展示天然纳米抗体库进行3轮生物亲和淘选，随着淘选轮次的增加，筛选压力逐步增大。为获得特异性识别牛IgG的纳米抗体，实现广谱性的检测功能，淘选产物结合位点应在恒定区片段上。在第1、2轮淘选时只包被天然牛血清，富集所有能与天然牛血清结合的纳米抗体；在第2轮淘选时加入猪IgG作为阴性对照，鼠IgG作为负筛抗原；为了获得特异性识别Fc片段的纳米抗体，在第3轮时加入重组表达的Fc片段作为包被抗原进行生物亲和淘选。

1.3.5 抗牛IgG纳米抗体的阳性克隆鉴定

从1.3.4中第1、3轮滴度测定平板中随机挑取180个单克隆，先包被天然牛血清和重组表达的Fc片段进行初筛，将阳性OD_{450}/阴性$OD_{450}\geq2.1$（$P/N\geq2.1$）的克隆判定为阳性克隆并测序，测序引物序列为：5′-AAGACAGCTATCGCGATTGCAG-3′。对不同序列的阳性纳米抗体进行phage-ELISA鉴定，同时鉴定包被牛IgG全长及重组表达的各片段的结合能力以及包被不同物种IgG的特异性。

1.3.6 抗牛IgG纳米抗体的表达和纯化

使用无缝克隆的方法将纳米抗体阳性克隆序列构建到pET-25b载体上，利用Rosetta表达菌株进行原核表达，借助6×His标签通过Ni-NTA亲和

柱对表达产物进行纯化，纯化时在过柱液中加入终浓度为10 mmol/L的咪唑洗脱液，以减少非特异性吸附，重复上柱2~3次后，使用梯度洗脱（20、50、100、200 mmol/L咪唑溶液）的方式收集表达产物，然后通过SDS-PAGE电泳和ELISA对洗脱产物进行鉴定。

1.3.7　抗牛IgG纳米抗体的性能鉴定

包被天然牛血清、重组表达的牛IgG全长及其片段（CH片段、Fc片段、CH3片段和CL片段），采用间接ELISA对抗牛IgG纳米抗体的结合位点进行鉴定；为进一步验证抗牛IgG纳米抗体的特异性，按照上述间接ELISA方法，分别设置其他物种IgG（兔IgG、猪IgG、人IgG、鼠IgG等）、质量分数1.5% BSA-PBS、质量分数1% OVA-PBS作为对照组进行特异性验证。

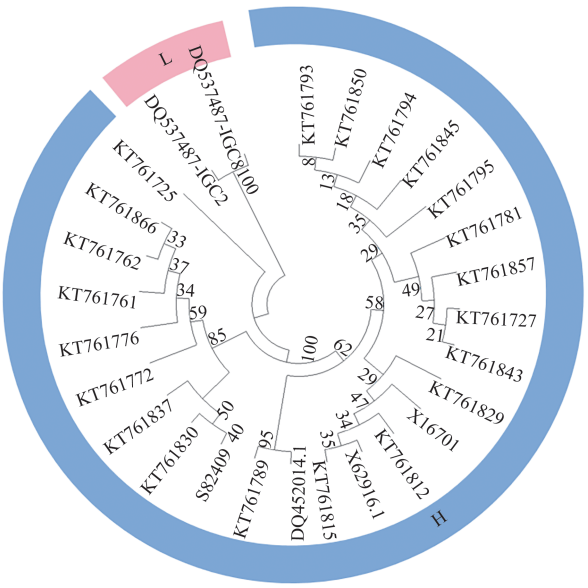
1.4　数据处理

数据处理和图表绘制通过Excel 2021和Graphpad prism 8.0.1进行，数据以平均值±标准差表示。

2　结果与讨论

2.1　牛IgG序列的同源性分析

以荷斯坦奶牛为研究对象，经国际免疫遗传学信息系统（IMGT）和美国国家生物技术信息中心（NCBI）公共数据库查询，排除不同的可变区序列，选取25条不同的IgG重链序列和2条轻链序列，见图2。对于IgG重链序列，铰链区原始序列为：5′-DPRCKTTCDCCP-3′，筛选共计发现7条独立的IgG重链序列[22]。KT761866因系统发育位置深、序列保守性高且与轻链进化历史兼容，选定作为牛IgG重链全长代表模式序列。选定牛Ig中高表达的λ基因[23]中DQ537487-IGLC8作为牛IgG轻链全长代表模式序列，用于后续重组表达的牛IgG的重、轻链全长抗体片段的氨基酸序列，见图3。



H—牛IgG重链氨基酸序列；L—牛IgG轻链氨基酸序列。

图2　牛IgG重、轻链氨基酸序列的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of bovine IgG heavy and light chain amino acid sequences

2.2　牛IgG全长序列的重组表达及鉴定

牛IgG重、轻链全长序列委托通用生物（安徽）股份有限公司合成并连接至pTT5载体上，结果见图4（a）。使用pTT5质粒特异性引物进行PCR扩增后，目的条带大小符合预期，见图4（b）。同时，对冻存的Expi293F细胞进行复苏，稳定传代2次后进行转染，将pTT5-H质粒和pTT5-L质粒瞬时转染至细胞存活率达98.2%和细胞密度为3.1×10^{6}个/mL的Expi293F细胞中。如图4（c）所示，对转染后1~7 d的Expi293F细胞存活率和密度进行监测发现，细胞密度逐渐增大且在第4天达到峰值，随转染时间延长细胞存活率逐步下降，培养至第5天时细胞存活率降至70%，收集细胞上清液进行蛋白质纯化。

使用Ni-NTA亲和柱对带有6×His标签的重组IgG全长和重、轻链全长进行纯化，SDS-PAGE结果见图4（d）。IgG全长在β-巯基乙醇作用下解开二硫键，还原为重链全长（相对分子质量约为60 000）和轻链全长（相对分子质量约为28 000）。重链全长抗体片段单独质粒顺转后无法表达，推测可能是缺乏轻链的正确折叠协助。轻链全长与IgG全长中轻链大小一致。通过BCA蛋白质检测试剂盒分析，重组IgG的产量为12.11 mg/L；轻链全长的产量为12.80 mg/L。如图4（e）~（f）所示，采用间接ELISA法对重组表达的IgG全长和轻链全长进行鉴定，结果显示，重组表达的IgG全长和轻链全长能够与小鼠抗牛IgG单克隆抗-HRP体结合，同时重组IgG只与小鼠抗牛IgG单克隆抗体-HRP结合。

2.3　牛IgG重、轻链片段的重组表达及鉴定

以前期合成的pTT5-H质粒和pTT5-L质粒为模板，构建牛IgG的CH片段、Fc片段、CH3片段和CL片段至pTT5载体，并瞬时转染至Expi293F细胞中，见图5（a）~（b）。后续步骤与2.2一致，图5（c）为

1	QVQLRESGPS	LVKPSQTLSL	TCTVSGFSLV	SYGVNWVRQA	PGKALECLGG	IDNFGNVAYN 60
61	PTMKSRLSIT	KDNSKSQVSL	SLGSVTAEDT	ATYYCAKDLV	AINTHQGEAC	SGFLGRYGGV 120
121	DAWGQGLLVT	VSSASTTAPK	VYPLSSCCGD	KSSSTVTLGC	LVSSYMPEPV	TVTWNSGALK 180
181	SGVHTFPAVL	QSSGLYSLSS	MVTVPGSSSG	QTFTCNVAHP	ASSTKVDKAV	DPRCKTTCDC 240
241	CPPPELPGGP	SVFIFPPKPK	DTLTISGTPE	VTCVVVDVGH	DDPEVKFSWF	VDDVEVNTAT 300
301	TKPREEQFNS	TYRVVSALRI	QHQDWTGGKE	FKCKVHNEGL	PAPIVRTISR	TKGPAREPQV 360
361	YVLAPPQEEL	SKSTVSLTCM	VTSFYPDYIA	VEWQRNGQPE	SEDKYGTTPP	QLDADGSYFL 420
421	YSRLRVDRNS	WQEGDTYTCV	VMHEALHNHY	TQKSTSKSAG	K	

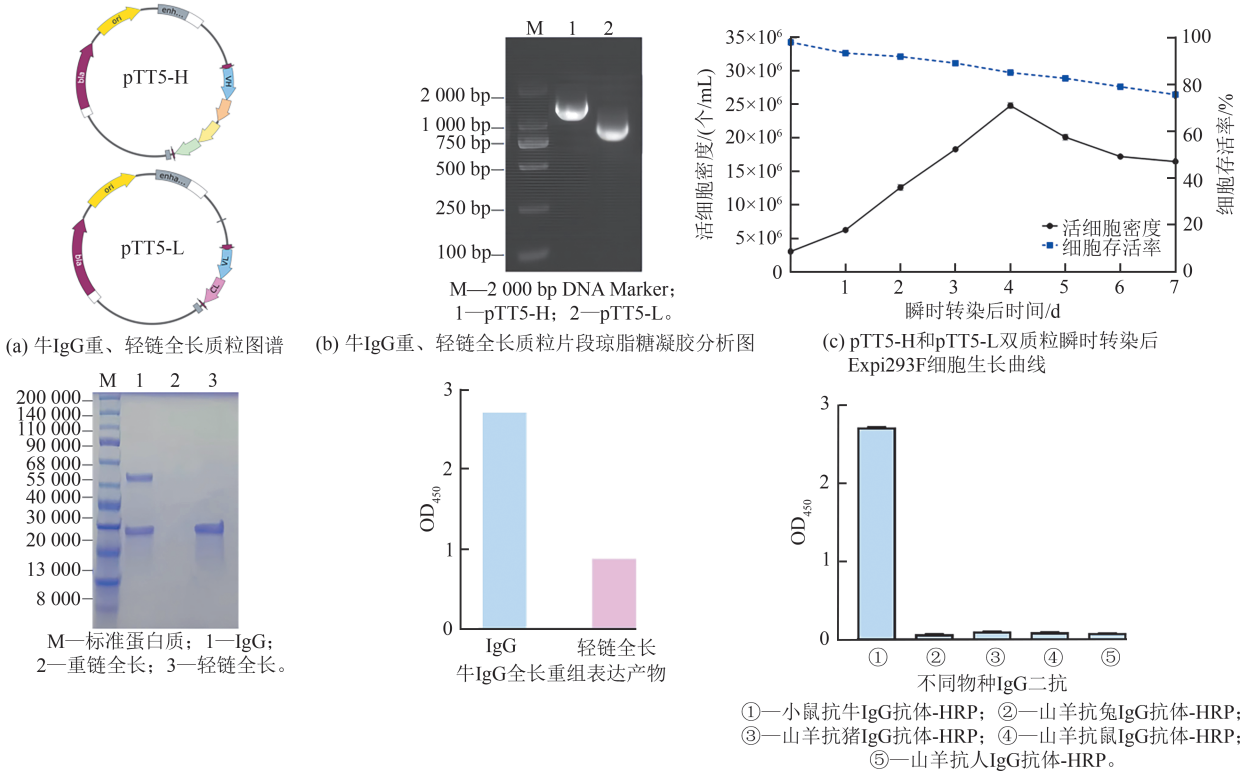
(a) KT761866氨基酸序列

1	QAVLGQPSSV	SGSLGQRVSI	TCSGSSSNIG	TYGVEWYQQV	PGSGLRTIIY	GSNSRPSGVP 60
61	DRFSGSKSGN	TATLTISSLQ	AEDEADYFCA	AGDSSSRGAV	FGSGTTLTAL	GQPKSPPSVT 120
121	LFPPSTEELN	GNKATLVCLI	SDFYPGSVTV	VWKADGSTIT	RNVETTRASK	QSNSKYAASS 180
181	YLSLTSSDWK	SKGSYSCEVT	HEGSTVTKTV	KPSECS		

(b) DQ537487-IGLC8氨基酸序列

图 3　用于重组表达的牛 IgG 重、轻链全长氨基酸序列

Fig. 3　Full-length amino acid sequences of bovine IgG heavy and light chains for recombinant expression



(a) 牛IgG重、轻链全长质粒图谱

(b) 牛IgG重、轻链全长质粒片段琼脂糖凝胶分析图

M—2 000 bp DNA Marker；1—pTT5-H；2—pTT5-L。

(c) pTT5-H和pTT5-L双质粒瞬时转染后Expi293F细胞生长曲线

M—标准蛋白质；1—IgG；2—重链全长；3—轻链全长。

(d) 牛IgG全长重组表达的SDS-PAGE鉴定

(e) 间接ELISA鉴定牛IgG全长重组表达产物的结合能力

①—小鼠抗牛IgG抗体-HRP；②—山羊抗兔IgG抗体-HRP；③—山羊抗猪IgG抗体-HRP；④—山羊抗鼠IgG抗体-HRP；⑤—山羊抗人IgG抗体-HRP。

(f) 间接ELISA鉴定重组牛IgG全长的特异性

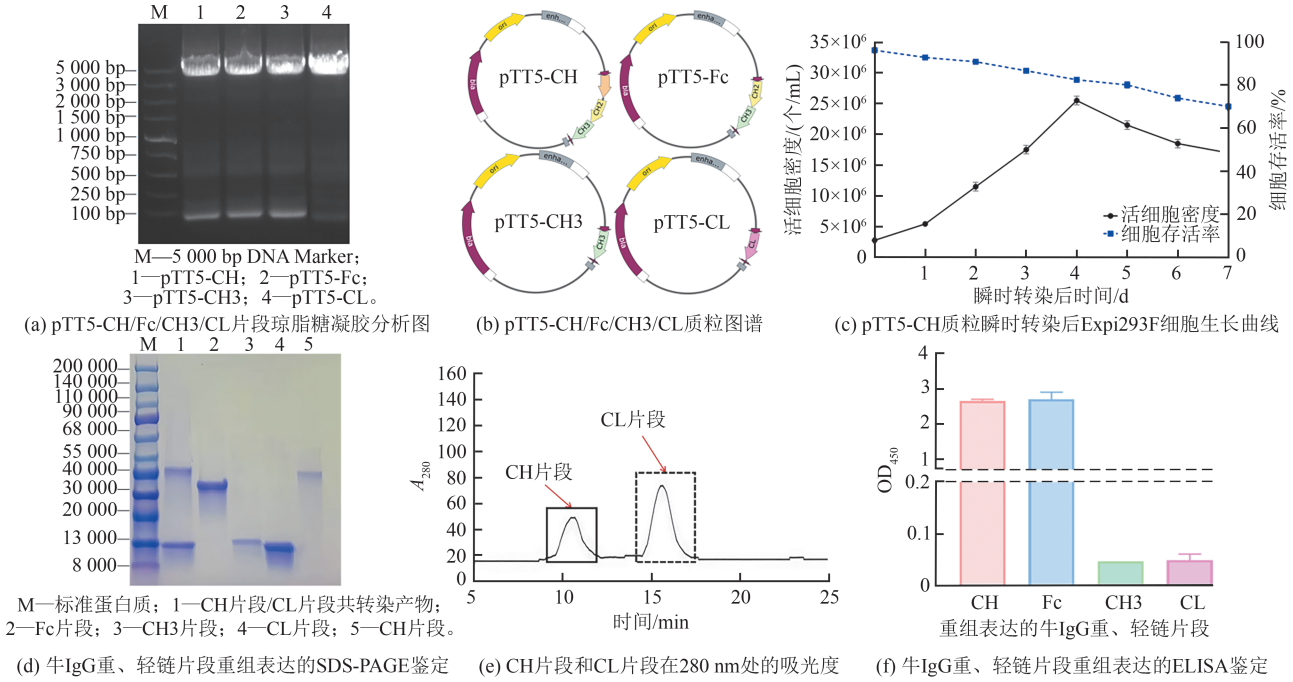
图 4　牛 IgG 全长的重组表达及鉴定

Fig. 4　Recombinant expression and identification of full-length bovine IgG

瞬时转染后细胞存活率和密度情况，曲线趋势与表达牛 IgG 全长总体趋势一致。

通过 Ni-NTA 亲和柱对 4 种重组表达重、轻链抗体片段进行纯化。如图 5(d)所示，SDS-PAGE 法鉴定出 CH 片段(相对分子质量约为 45 000)、Fc 片段(相对分子质量约为 35 000)、CH3 片段(相对分子

质量约为13 000）和CL片段（相对分子质量约为13 000）。FC片段因存在糖基化修饰，因此大于理论预测值，其余片段与预测相符。同时，使用SEC柱从全长抗体中分离出难以独立表达的CH片段，见图5（e）。将表达出的4种重、轻链片段进行ELISA鉴定，结果见图5（f）。重组表达的CH片段和Fc片段能够与HRP标记的小鼠抗牛IgG单克隆抗体结合，而重组表达的CH3片段和CL片段不能结合，推测商业化HRP标记的小鼠抗牛IgG单克隆抗体结合位点在CH2片段上。



M—5 000 bp DNA Marker；1—pTT5-CH；2—pTT5-Fc；3—pTT5-CH3；4—pTT5-CL。

(a) pTT5-CH/Fc/CH3/CL片段琼脂糖凝胶分析图　(b) pTT5-CH/Fc/CH3/CL质粒图谱　(c) pTT5-CH质粒瞬时转染后Expi293F细胞生长曲线

M—标准蛋白质；1—CH片段/CL片段共转染产物；2—Fc片段；3—CH3片段；4—CL片段；5—CH片段。

(d) 牛IgG重、轻链片段重组表达的SDS-PAGE鉴定　(e) CH片段和CL片段在280 nm处的吸光度　(f) 牛IgG重、轻链片段重组表达的ELISA鉴定

图5　牛IgG重、轻链片段的重组表达及鉴定

Fig. 5　Recombinant expression and identification of bovine IgG heavy and light chain fragments

2.4　抗牛IgG纳米抗体的生物亲和淘选

使用噬菌体展示天然纳米抗体库淘选抗牛IgG纳米抗体。天然牛血清来源于经Protein G柱纯化后获得的成牛血清，为了获得可以与天然牛血清结合的特异性纳米抗体，首先使用天然牛血清作为第1、2轮筛选靶标物。随后为了减弱天然牛血清中可变区的影响，筛选重链恒定区特异性抗体，使用作者重组表达的Fc片段作为第3轮筛选的靶标物。按照“结合-洗脱-富集”的生物亲和淘选策略进行3轮淘选，淘选策略见表2，滴度结果见图6。第2轮淘选时加入负筛，天然牛血清包被质量浓度降至10 μg/mL，结合时间1 h，体积分数0.05% PBST洗涤次数增加至15次，滴度随着筛选压力的增大明显下降。在第3轮淘选时包被抗原更换为重组表达的Fc片段，包被质量浓度为5 μg/mL，为防止筛选压力过大、回收率过低，结合温度和时间与第2轮淘选保持一致，体积分数0.05% PBST洗涤次数增加至20次，结果显示回收率增加，富集度明显上升。

表2　抗牛IgG纳米抗体3轮淘选策略

Table 2　Three-round biopanning screening strategy for anti-bovine IgG nanobodies

淘选轮次	包被抗原	包被质量浓度/（μg/mL）	洗涤次数 PBST＋PBS	结合温度及时间
1	天然牛血清	20	10+3	37 ℃，2 h
2	天然牛血清	10	15+3	37 ℃，1 h
3	重组Fc片段	5	20+3	37 ℃，1 h

2.5　抗牛IgG纳米抗体的阳性克隆鉴定

挑取180个单克隆经phage-ELISA初筛后，共获得32个具有不同序列的阳性纳米抗体。如图7（a）~（c）所示，通过鉴定阳性纳米抗体与牛IgG全长（包括天然IgG和重组IgG）及各片段的结合能力和特异性，发现其中87.5%能与天然牛血清结合，56.3%能与重组牛IgG结合，21.9%能与重组Fc片段结合，6.3%能与天然牛血清、重组牛IgG和

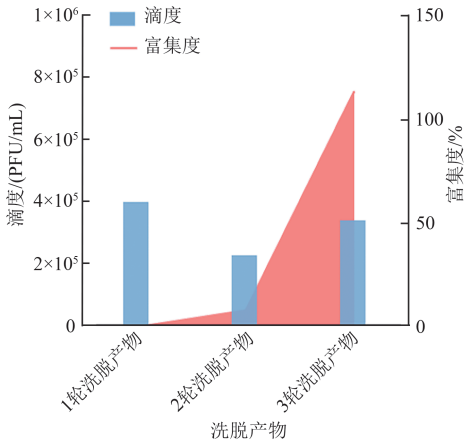


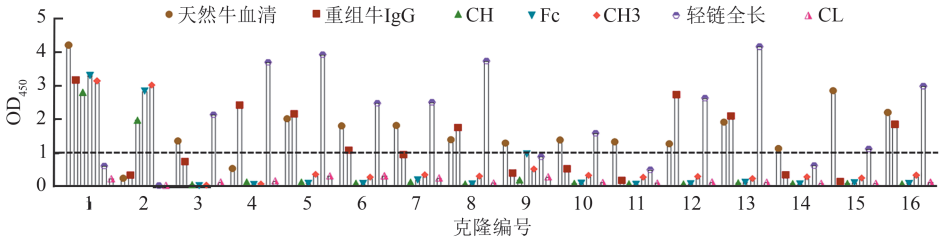
图 6　抗牛 IgG 纳米抗体 3 轮生物亲和淘选结果

Fig. 6　Biopanning results of anti-bovine IgG nanobodies

重组 Fc 片段结合，而不与其他物种 IgG、BSA 和 OVA 结合。2 个阳性纳米抗体单克隆（1、27）测序结果见图 7（d），分别命名为 VHH-1 和 VHH-27，FR 区高度保守，CDR 区高度可变。

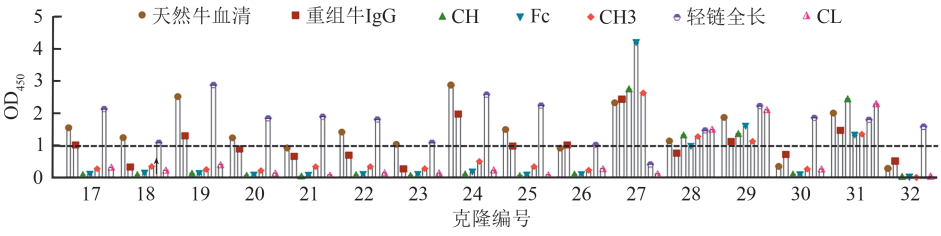
2.6　抗牛 IgG 纳米抗体的表达纯化及性能鉴定

将阳性纳米抗体序列构建到 pET-25b 载体上，经 Rosetta 大肠杆菌表达后，通过 SDS-PAGE 法检测到相对分子质量约 15 000 的纳米抗体，见图 8（a）。后续将含目的条带的洗脱液进行超滤浓缩处理，经计算 VHH-1 表达量为 0.47 mg/L、VHH-27 表达量为 0.51 mg/L。将获得的纳米抗体进行 ELISA 鉴定，结果见图 8（b）。表达的 VHH-1 和



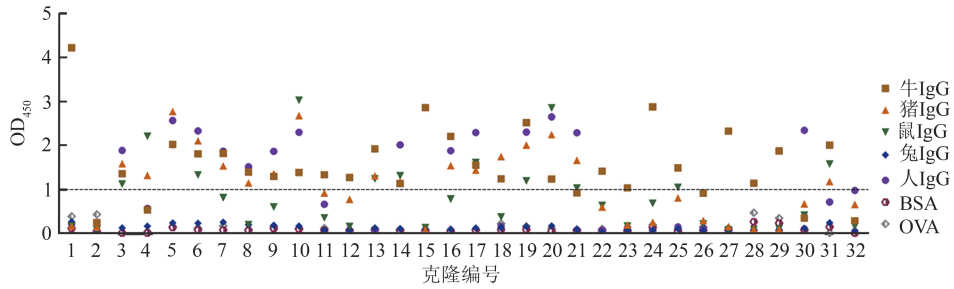
1号克隆代表与牛IgG结合的阳性克隆。

(a) phage-ELISA鉴定纳米抗体与牛IgG全长及各片段结合能力(1~16号克隆)



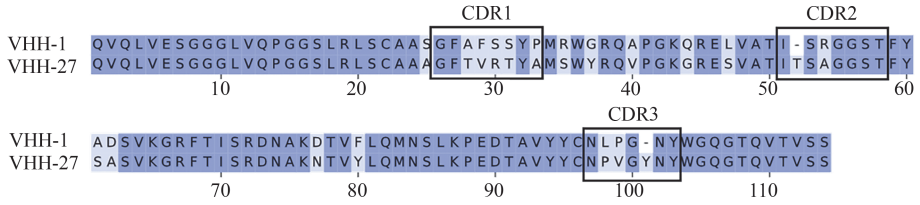
27号克隆代表与牛IgG结合的阳性克隆。

(b) phage-ELISA鉴定纳米抗体与牛IgG全长及各片段结合能力(17~32号克隆)



牛IgG—天然牛血清；1号和27号克隆代表与牛IgG特异性结合的阳性克隆。

(c) phage-ELISA鉴定纳米抗体特异性



(d) 阳性纳米抗体序列比对结果

图 7　噬菌体展示天然纳米抗体单克隆的筛选与鉴定

Fig. 7　Screening and identification of monoclonal nanobodies through phage display

VHH-27与重组表达的Fc片段和CH3片段结合，推测其识别位点在CH3片段上。VHH-1与重组Fc片段的结合是VHH-27的2.0倍，与重组CH3片段的结合是VHH-27的1.3倍。

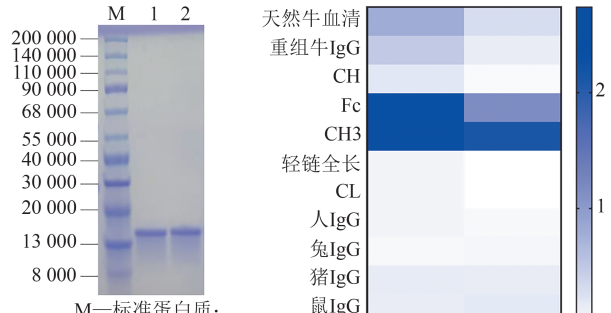


图8　纳米抗体原核表达的SDS-PAGE及ELISA鉴定

Fig. 8　SDS-PAGE and ELISA identification of prokaryotically expressed nanobodies

3　结论

牛IgG作为牛体内占比高达70%~80%的主要抗体蛋白，凭借其营养、免疫调节及抗菌等多元生物学功能，在食品科学领域展现出重要的基础研究价值与广阔的应用前景。基于牛IgG所具有的物种特异性，其已成为物种鉴定的关键生物标志物，通过开发特异性抗体并结合免疫分析方法，可实现对牛IgG的精准识别与检测。为满足牛IgG基础与应用研究中对标准品的迫切需求，制备具有物种独特性及组成均一的牛IgG并开发相应抗体显得尤为重要。作者采用哺乳动物细胞表达系统可确保重组IgG及重、轻链片段完成正确的折叠、组装及糖基化修饰，维持其天然构象与生物活性。结果表明，重组表达的牛IgG全长、轻链全长、CH片段和Fc片段能够与小鼠抗牛IgG单克隆抗体-HRP结合。

现有抗牛IgG抗体主要是多克隆抗体及鼠源单克隆抗体，主要面临交叉反应率高、重现性差、制备周期长、表位识别精度不足及动物福利等问题。作者采用噬菌体展示技术筛选纳米抗体可有效规避传统单克隆抗体制备周期长、动物伦理限制等局限，且所获纳米抗体兼具相对分子质量小、稳定性高及可识别隐蔽抗原表位等独特优势。在第1、2轮以天然牛血清为包被抗原，富集所有能与天然牛血清结合的纳米抗体，建立广谱性抗体库；随后，在第3轮引入重组表达的Fc片段作为包被抗原进行定向淘选，筛选特异性识别恒定区片段的纳米抗体。作者成功筛选了2株（VHH-1和VHH-27）能与天然牛血清、重组牛IgG和重组Fc片段结合，而不与其他物种IgG、BSA和OVA结合的纳米抗体。

作者构建了牛IgG重、轻链片段表达载体，实现了牛IgG全长及重、轻链片段在Expi293F细胞中的高效重组表达，利用噬菌体展示天然纳米抗体库，以天然牛血清、重组表达的Fc片段为靶标，通过生物亲和淘选方法成功筛选了2株特异性识别牛IgG的纳米抗体，可为后续牛乳或牛肉类制品掺假检测提供参考。

参考文献

[1] POONIA A，SHIVA. Bioactive compounds，nutritional profile and health benefits of colostrum：a review[J]. Food Production，Processing and Nutrition，2022，4(1)：26.

[2] 刘伟. 牛初乳免疫球蛋白(IgG)稳定性的研究及改善[D]. 北京：中国农业大学，2005.

[3] MA Y，HOU Y M，XIE K，et al. Digestive differences in immunoglobulin G and lactoferrin among human，bovine，and caprine milk following *in vitro* digestion[J]. International Dairy Journal，2021，120：105081.

[4] CHEN C C，TU Y Y，CHANG H M. Thermal stability of bovine milk immunoglobulin G（IgG）and the effect of added thermal protectants on the stability[J]. Journal of Food Science，2000，65(2)：188-193.

[5] HENDRICKSON O D，ZVEREVA E A，DZANTIEV B B，et al. Novel immunochromatographic estimation of lamb content in meat products using IgG as biomarker[J]. Journal of Food Composition and Analysis，2023，116：105025.

[6] HENDRICKSON O D，ZVEREVA E A，DZANTIEV B B，et al. Sensitive lateral flow immunoassay for the detection of pork additives in raw and cooked meat products[J]. Food Chemistry，2021，359：129927.

[7] HENDRICKSON O D，ZVEREVA E A，VOSTRIKOVA N L，et al. Lateral flow immunoassay for sensitive detection of undeclared chicken meat in meat products[J]. Food Chemistry，2021，344：128598.

[8] DIMITRIOU L，KOUREAS M，PAPPAS C S，et al. Chemometric classification of feta cheese authenticity *via*

ATR-FTIR spectroscopy[J]. Applied Sciences, 2025, 15(15): 8272.
[9] HAJI A, DESALEGN K, HASSEN H. Selected food items adulteration, their impacts on public health, and detection methods: a review [J]. Food Science & Nutrition, 2023, 11(12): 7534-7545.
[10] RAMANI A, TAHERABBAS S, MANIK S. Bovine colostrum as a promising nutraceutical: a systematic review[J]. Sustainable Food Technology, 2024, 2(3): 531-547.
[11] TAHIR W, DUDAS S, ANDERSON R, et al. Canadian 2021 h-type bovine spongiform encephalopathy case associated with a novel E211K polymorphism in prion protein gene[J]. Prion, 2025, 19(1): 36-49.
[12] SRIKUMARAN S, KLUEVER E A, ONISK D V, et al. Quantitation of bovine immunoglobulins in culture fluids by use of sandwich radioimmunoassay with monoclonal antibodies[J]. American Journal of Veterinary Research, 1991, 52(2): 243-246.
[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] CHU W N, SRIPADA S A, REESE H R, et al. Purification of polyclonal immunoglobulin G from human serum using peptide-based adsorbents [J]. AIChE Journal, 2021, 67(12): e17482.
[15] YU X T, ZHANG X, XU J J, et al. Generation of recombinant antibodies by mammalian expression system for detecting *S*-metolachlor in environmental waters[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 418: 126305.
[16] HENNIGAN J N, MENACHO-MELGAR R, SARKAR P, et al. Scalable, robust, high-throughput expression & purification of nanobodies enabled by 2-stage dynamic control[J]. Metabolic Engineering, 2024, 85: 116-130.
[17] 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.
[18] MEJIAS-GOMEZ O, BRAGHETTO M, SØRENSEN M K D, et al. Deep mining of antibody phage-display selections using oxford nanopore technologies and dual unique molecular identifiers[J]. New Biotechnology, 2024, 80: 56-68.
[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] 王何瑶. 玉米赤霉烯酮、呕吐毒素重组单克隆抗体的构建及表达研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2024.
[21] 蒋红欣. 噬菌体天然抗体库淘选及筛选方法的优化[D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
[22] ZHAO Y F, KACSKOVICS I, RABBANI H, et al. Physical mapping of the bovine immunoglobulin heavy chain constant region gene locus [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(37): 35024-35032.
[23] CHEN L M, LI M, LI Q, et al. Characterization of the bovine immunoglobulin lambda light chain constant IGLC genes[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2008, 124(3/4): 284-294.