

· 医药生物技术 ·

## SARS-CoV-2 中和纳米抗体在里氏木霉中的重组表达

张建慧<sup>1</sup>, 李佳骏<sup>2</sup>, 高丽伟<sup>1</sup>, Pankajkumar Ramdas Waghmare<sup>1</sup>, 曲径遥<sup>1</sup>, 刘国栋<sup>1</sup>

1 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237

2 山东大学 泰山学堂, 山东 青岛 266237

张建慧, 李佳骏, 高丽伟, Pankajkumar Ramdas Waghmare, 曲径遥, 刘国栋. SARS-CoV-2 中和纳米抗体在里氏木霉中的重组表达. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2250-2258.

ZHANG JH, LI JJ, GAO LW, WAGHMARE PR, QU JY, LIU GD. Expression of a SARS-CoV-2 neutralizing nanobody in *Trichoderma reesei*. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2250-2258.

**摘要:** 基于骆驼科动物单链抗体 VHH 结构域的纳米抗体具有分子量小、结构简单、溶解性好、稳定性强等多种优势, 可通过吸入给药, 在呼吸道病毒的防控中具有重要应用价值。里氏木霉是食品级的蛋白质生产宿主, 其纤维素酶分泌量可达到 80 g/L 以上, 有望用于药物蛋白的低成本生产。文中在密码子优化的基础上, 使用组成型强启动子 *Pcdna1*, 实现了 SARS-CoV-2 中和纳米抗体 Nb20 在里氏木霉中的重组表达。将 Nb20 与里氏木霉纤维二糖水解酶 CBH I 的 N 端片段融合表达, 并在二者间引入胞内 KEX2 蛋白酶切位点, 于葡萄糖培养基中摇瓶发酵 48 h 可生产出浓度为 47.4 mg/L 的 Nb20 蛋白。重组表达的纳米抗体能够与 SARS-CoV-2 刺突蛋白的受体结合区相结合, 有望用于新型冠状病毒的中和。以上结果显示, 里氏木霉在纳米抗体的重组表达中具有一定的应用潜力。

**关键词:** 纳米抗体; 里氏木霉; 重组表达; 新型冠状病毒

**Received:** September 6, 2021; **Accepted:** November 9, 2021; **Published online:** December 3, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900500); National Natural Science Foundation of China (32170037); General Project of Reformation in Education and Teaching in Shandong University, China (2020Y083); the Young Scholars Program of Shandong University, China (YSPSDU)

**Corresponding author:** LIU Guodong. E-mail: gdliu@sdu.edu.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2018YFA0900500); 国家自然科学基金 (32170037); 山东大学 2020 年教育教学改革研究一般项目 (2020Y083); 山东大学青年学者未来计划项目 (YSPSDU)

# Expression of a SARS-CoV-2 neutralizing nanobody in *Trichoderma reesei*

ZHANG Jianhui<sup>1</sup>, LI Jiajun<sup>2</sup>, GAO Liwei<sup>1</sup>, WAGHMARE Pankajkumar Ramdas<sup>1</sup>,  
QU Jingyao<sup>1</sup>, LIU Guodong<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

<sup>2</sup> Taishan College, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

**Abstract:** Nanobodies derived from camelid single-chain antibodies have the advantages of being small, simple, highly soluble and stable. Nanobodies can be administered by inhalation and therefore is potentially valuable for the prevention and control of respiratory viruses. *Trichoderma reesei* is a food-grade protein expression host with a cellulase production capacity of up to 80 g/L, which can be employed for low-cost production of therapeutic proteins. In this study, a codon-optimized SARS-CoV-2 neutralizing nanobody Nb20 was expressed in *T. reesei* under a strong constitutive promoter *Pcdna1*. Nb20 protein was fused downstream of the N-terminal fragment of cellobiohydrolase I, and the fusion protein can be intracellularly cleaved by the KEX2 protease to release Nb20. In a shake-flask fermentation using glucose medium, 47.4 mg/L Nb20 was detected in the culture after 48 h of cultivation. The expressed Nb20 showed the ability to interact with the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein, suggesting that it can be used for the neutralization of SARS-CoV-2. The results indicate that *T. reesei* has the potential for recombinant production of nanobodies.

**Keywords:** nanobody; *Trichoderma reesei*; recombinant expression; SARS-CoV-2

新型冠状病毒 (COVID-19) 疫情的暴发严重威胁了人类的健康。在对新型冠状病毒 SARS-CoV-2 的防治中,与病毒表面蛋白或其宿主细胞表面受体相结合的单克隆抗体 (monoclonal antibodies) 药物能够抑制病毒的入侵过程,具有机制清晰、特异性强、保护率高、易于重组表达制备等优点<sup>[1-2]</sup>。骆驼科动物等可产生天然缺失轻链的重链抗体,克隆其可变区得到的重链单域抗体 (variable domain of the heavy chain of heavy-chain antibody) 具有独立、稳定结合抗原的能力,因其分子大小仅为纳米级,故被称为纳米抗体 (nanobody, 简称 Nb)<sup>[3-4]</sup>。与传统抗体相比,纳米抗体具有水溶性好、稳定性高、组织渗透性强、免疫原性低

等优势,具有广泛的临床应用价值<sup>[5]</sup>。目前,基于对骆驼科动物的免疫实验或者对纳米抗体文库的筛选,已有多种可与 SARS-CoV-2 相结合的纳米抗体得到报道<sup>[6]</sup>。例如, Gai 等通过向骆驼注射 SARS-CoV-2 刺突蛋白 (spike) 的受体结合域 (receptor-binding domain, 简称 RBD) 并构建噬菌体展示文库,成功筛选到多种具有中和能力、能够阻断病毒入侵细胞的纳米抗体,半数中和剂量 (ND<sub>50</sub>) 为 0.55 μg/mL,在吸入式给药方面具有良好的应用前景<sup>[7]</sup>。

纳米抗体的高效、低成本表达制备是推动其临床应用的技术关键。与传统抗体不同,纳米抗体结构简单,一般不含 N-糖链,可在大肠杆菌、酵母、丝状真菌、动物细胞以及植物等

多种系统中进行表达<sup>[8]</sup>。其中,微生物表达系统具有周期短、成本低、产量高、技术成熟等优点。在毕赤酵母表达系统中,人源化 SARS-CoV-2 刺突蛋白纳米抗体 HuNb11-59 的产量在发酵 213 h 后可达到 20 g/L<sup>[7]</sup>。在泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 等丝状真菌表达系统中也已实现了纳米抗体的分泌表达,但其产量有待提升<sup>[9]</sup>。里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 是食品级的蛋白质表达宿主,已应用于纤维素酶、木聚糖酶、脂肪酶等的工业生产,纤维素酶胞外分泌量可达 80 g/L<sup>[10-11]</sup>。鉴于其高效的蛋白质表达分泌能力,已有研究者尝试并实现了抗体 Fab 片段、干扰素等药物相关蛋白在里氏木霉中的表达<sup>[12-13]</sup>。然而,目前尚未见到利用里氏木霉表达纳米抗体的报道。

Nb20 是美洲驼来源的高亲和性 SARS-CoV-2 刺突蛋白中和纳米抗体,其病毒半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 达到 0.048 nmol/L<sup>[14]</sup>。本研究使用组成型启动子 *Pcdna1* 在里氏木霉中表达 Nb20,并对其抗原结合能力进行初步检测,以期在里氏木霉中的高效表达提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司,用于质粒的克隆。里氏木霉菌株 QMP 为将 QM9414 菌株中 *pyr4* 基因敲除得到的尿嘧啶营养缺陷型突变体,用于纳米抗体的表达。pUC19-pyrG 质粒<sup>[15]</sup>用于表达载体的构建。

#### 1.1.2 试剂与培养基

改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。重组 SARS-CoV-2 刺突蛋白片段 RBD-SD1 (Arg319-Ser591)

购自上海近岸科技有限公司,C 末端含有 6×His 标签。镍-琼脂糖凝胶 6FF 和牛γ-球蛋白购自北京索莱宝科技有限公司。

生孢培养基 (g/L): 乳糖 5, 葡萄糖 15, 土豆 200, 琼脂粉 20, 115 °C 灭菌 30 min。发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 20, CaCl<sub>2</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5, 酵母粉 20, 115 °C 灭菌 30 min。依文中所述,部分发酵培养基中加入 10 g/L 蛋白胨。在用于尿嘧啶营养缺陷型菌株培养时,在生孢培养基及发酵培养基中加入 1 g/L 尿嘧啶。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Nb20 表达菌株的构建

首先,使用引物 *Pcdna1-F* 和 *Pcdna1-R*, 以里氏木霉基因组 DNA 为模板扩增 *cdna1* 基因启动子片段。使用引物 *TtrpC-F1* 和 *TtrpC-R1*, 以质粒 pSilent-1 为模板扩增构巢曲霉来源 *trpC* 基因终止子片段。通过重叠延伸 PCR 将两个片段融合,使二者之间含有 *Pst* I 酶切位点。然后,使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司 ClonExpress II One Step Cloning Kit 将上述融合产物克隆至 pUC19-pyrG 的 *Pst* I 位点,获得表达载体 p*Pcdna1-pyrG*。

使用密码子优化工具 JCat<sup>[16]</sup>, 按照黑曲霉 (*Aspergillus niger*) NRRL 3 的密码子偏好性设计纳米抗体 Nb20 的编码序列 (GenBank 登录号: MZ965028), 由苏州金唯智生物科技股份有限公司进行基因合成。使用引物 Nb1-F1 和 Nb1-R 扩增目标基因,再以该 PCR 产物为模板,使用引物 Nb1-F2 和 Nb1-R 扩增,得到 5'端与 CBHI 信号肽 (MYRKLAVISAFATARA) 编码序列融合的目的基因。此外,使用引物 CC-F 和 CC-R 扩增 CBHI 的 N 端部分编码区,使用 Nb2-F 和 Nb1-R 扩增 Nb20 编码基因,通过重叠延伸 PCR 将两个片段融合,使二者之间含有蛋白

酶 KEX2 识别位点 (NVISKR) 的编码序列<sup>[13]</sup>。使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 分别将上述两种基因克隆至载体 pPcdna1-pyrG, 得到重组表达质粒。以上步骤中所用引物的序列见表 1。

使用 *Nde* I 将重组表达质粒线性化, 通过原生质体转化方法将基因表达盒整合到里氏木霉 QMP 的染色体 DNA 上<sup>[17]</sup>。转化子复筛纯化后, 通过 PCR 及测序对其进行验证。

### 1.2.2 菌株的培养

将里氏木霉菌株接种至生孢培养基平板上, 30 °C 静置培养 5–7 d。使用含有 0.1 g/L 吐温 80 的生理盐水清洗孢子, 按孢子终浓度为 10<sup>6</sup>/mL 接种到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中, 置于 30 °C、200 r/min 条件下振荡培养。

### 1.2.3 蛋白电泳与浓度测定

将发酵液 7 500 r/min 离心 10 min 后, 取上清液, 使用浓度为 15% 的分离胶进行 SDS-PAGE, 使用考马斯亮蓝 R250 进行染色。使用颇尔生命科学公司 Macrosep<sup>®</sup> 30K 超滤离心管处理发酵 48 h 的上清液, 收集流穿组分, 再使用 Nanosep<sup>®</sup>

3K 超滤离心管对其进行浓缩。使用 Bradford 方法, 以牛  $\gamma$ -球蛋白为标准品测定浓缩后样品的蛋白浓度。使用 ImageJ 软件<sup>[18]</sup>测定蛋白电泳条带的灰度值, 代入以电泳显示单一条带、经梯度稀释的 Nb20 样品的条带灰度值绘制的标准曲线, 计算发酵液中 Nb20 蛋白的浓度。

### 1.2.4 质谱分析

将蛋白电泳条带切下, 由上海拜谱生物科技有限公司进行液相色谱-串联质谱联用分析。首先将蛋白质进行胶内胰蛋白酶酶解, 然后使用含 0.1% 三氟乙酸的 50% 乙腈溶液提取多肽, 干燥后使用 Easy-nLC 1200 与 Orbitrap Exploris 480 (Thermo Scientific) 系统联用进行检测。使用 Proteome Discoverer 软件提取质谱数据后, 使用 Sequest 搜索引擎对 Nb20 蛋白序列进行检索。检索参数为: 胰酶酶切, 最大漏切 2, 一级母离子质量误差为  $1 \times 10^{-5}$ , 二级碎片离子质量误差为 0.02 Da, 甲硫氨酸氧化和 N 端谷氨酰胺环化为可变修饰。

### 1.2.5 His Pull-down 实验

使用 10 倍凝胶体积的结合缓冲液 (20 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
Pcdna1-F	ACGCCAAGCTTGCATGCTGGTACATGGATCTCGAACTG
Pcdna1-R	TAACGTTAAGTGGATCCTGCAGGTTGAGAGAAGTTGTTGGATTG
TtrpC-F1	CAACTTCTCTCAACCTGCAGGATCCACTTAACGTTACTGAAATC
TtrpC-R1	GATCCTCTAGAGTCGACAACCCAGGGCTGGTGACGGAA
Nb1-F1	GGCCGTCATCTCGGCCTTCTTGGCCACAGCTCGTGCTCAGGTCCAGCTGGTTCGAGTC
Nb1-R	GTAACGTTAAGTGGATCCTAGGAGGAGACGGTGACCTGGG
Nb1-F2	CAACAACCTTCTCTCAACATGTATCGGAAGTTGGCCGTCATCTCGGCCTTCTTGGCCA
CC-F	CAACAACCTTCTCTCAACATGTATCGGAAGTTGGCCGTC
CC-R	CTGGCGCTTGAAATCACATTAGAGCTTCCAGTGGTAGTGGC
Nb2-F	TCTAATGTGATTTCCAAGCGCCAGGTCCAGCTGGTTCGAGTC

咪唑, pH 7.4) 洗涤镍-琼脂糖凝胶 6FF 三次, 加入浓度为 0.07 mg/mL 的带有 His 标签的 RBD-SD1 蛋白, 4 °C 轻摇孵育 30 min, 离心去除上清后, 使用 10 倍凝胶体积的结合缓冲液漂洗凝胶两次, 加入含有 Nb20 的里氏木霉发酵上清液, 4 °C 轻摇孵育 1 h, 离心去除上清后, 使用 10 倍凝胶体积的结合缓冲液漂洗凝胶两次, 最后使用洗脱缓冲液 (20 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 从凝胶上洗脱目标蛋白, 使用 SDS-PAGE 进行检测。在对照组中, 以结合缓冲液代替 RBD-SD1 蛋白, 其他步骤相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 融合表达策略对 Nb20 蛋白表达的影响

纤维二糖水解酶 I (CBH I) 是里氏木霉胞外分泌量最大的蛋白质, 包含 N 端催化结构域、柔性连接区和 C 端纤维素结合域 3 个区段。使用里氏木霉中的组成型强启动子 *PcdnaI*<sup>[19]</sup>, 分别使用两种策略进行 Nb20 的表达 (图 1A): (1) 将 CBH I 信号肽与 Nb20 融合表达, (2) 将

CBH I 的 N 端区段 (包含信号肽、催化域和连接区; 第 1-475 位氨基酸) 与 Nb20 融合表达。在第二种表达策略中, 在 Nb20 前引入 KEX2 蛋白酶切位点编码序列, 使整个蛋白在到达高尔基体后被切成两部分, 分别运输至胞外<sup>[13]</sup>。

对于两种表达策略, 分别随机选择两个转化子在发酵培养基中培养 36 h, 对发酵液上清进行 SDS-PAGE 分析 (图 1B)。第一种表达策略得到的 3-1 和 3-2 菌株的蛋白条带与出发菌株 QMP 类似, 而第二种表达策略得到的 4-4 和 4-6 菌株的发酵上清液中均出现了新的蛋白条带, 且在低分子量位置的条带与 Nb20 的理论分子量大小 (12.5 kDa) 相符。基于以上结果, 在以下实验中均使用第二种表达策略得到的 4-4 菌株进行蛋白的表达。

### 2.2 发酵条件对 Nb20 蛋白表达量的影响

图 1B 中推测为 Nb20 的蛋白条带与约 65 kDa 处条带 (推测为切割产生的 CBH I 的 N 端片段) 相比明显较弱, 说明 Nb20 可能受到了宿主蛋白酶的降解。因此, 向培养基中添加浓度为 10 g/L 的蛋白胨以尝试缓解目标蛋白的降解。如图 2A

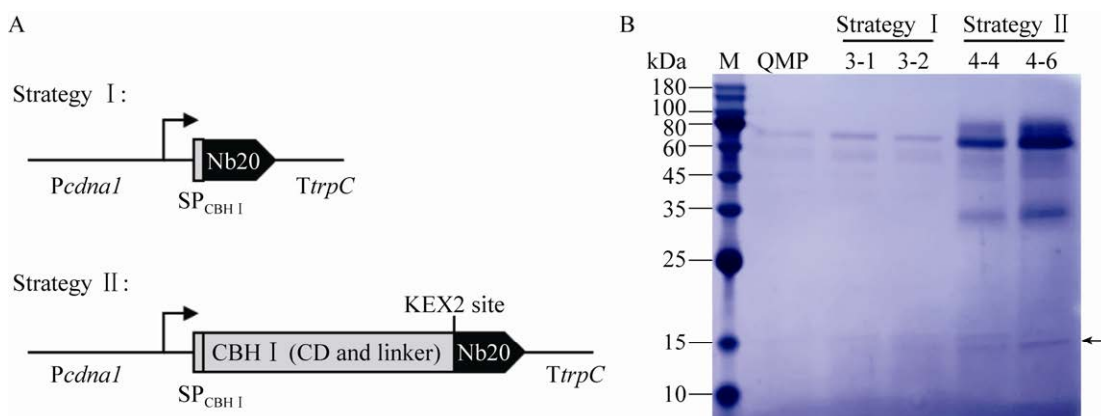


图 1 纳米抗体 Nb20 在里氏木霉中的重组表达

Figure 1 Expression of nanobody Nb20 in *Trichoderma reesei*. (A) Schematic illustration of gene expression cassettes. SP: signal peptide; CD: catalytic domain. (B) SDS-PAGE of the culture supernatants at 36 h. M: protein molecular weight marker. The arrow indicates the possible band of Nb20.

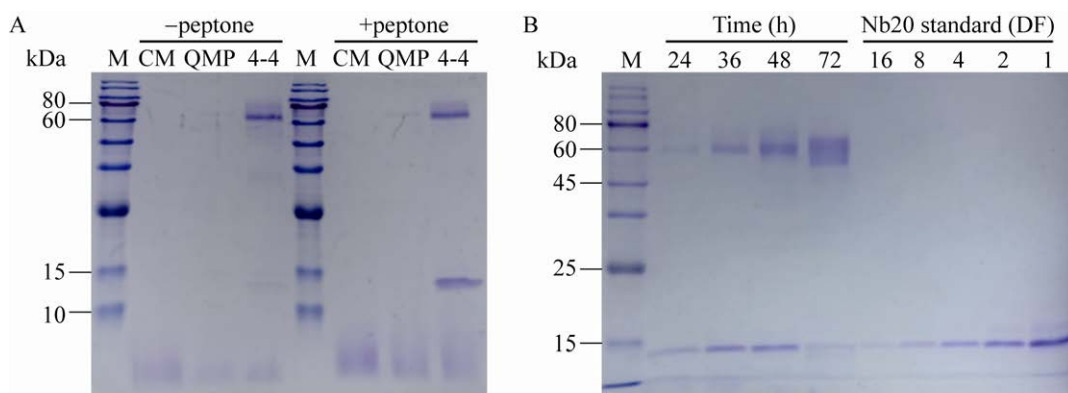


图 2 培养条件对 Nb20 蛋白表达量的影响

Figure 2 Effect of cultivation conditions on the production level of Nb20. (A) Effect of peptone supplementation. Samples were taken after 36 h of cultivation. CM: cultivation medium without inoculation. (B) Effect of cultivation time. Purified Nb20 of 126 mg/L was serially diluted and used as a loading standard. DF: dilution factor.

所示, 蛋白胨的添加的确显著提高了 36 h 时发酵液上清中 Nb20 条带的含量, 且减少了杂蛋白的产生。作为对照, 出发菌株 QMP 的发酵液上清中几乎检测不到分泌蛋白。进一步延长培养时间时, 发现目标蛋白浓度在 48 h 时变化不大, 而 72 h 时明显下降 (图 2B)。由于 36 h 时培养基中的葡萄糖已经耗尽, 推测发酵后期营养物质缺乏导致细胞合成某些蛋白酶, 进而导致了目标蛋白的降解。

由于发酵液中蛋白组成相对简单, CBH I 的 N 端片段与 Nb20 分子量差别较大, 使用超滤分离方式即可实现目标蛋白的初步纯化。以初步纯化的 Nb20 蛋白为标准品, 绘制了电泳条带灰度值与蛋白质浓度关系的线性标准曲线 ( $R^2=0.999$ ), 据此估算 48 h 时发酵液上清中 Nb20 的浓度为 47.4 mg/L。本次改造所获转化子的异源蛋白产量处于较低水平, 还需更有效的改造策略, 以获得高产的菌株。

### 2.3 重组表达 Nb20 的质谱鉴定

为了进一步对重组表达的 Nb20 蛋白进行确认, 将其电泳条带切下进行了液相色谱-串联

质谱分析。实验共检测到肽段谱图匹配 (peptide spectra match, 简称 PSM) 数 605 个, 匹配到 17 个肽段, 覆盖了该蛋白全部序列 (表 2)。由于 Nb20 蛋白的 N 端氨基酸为谷氨酰胺, 可能环化形成焦谷氨酸 (pyroglutamate), 因此在比对时考虑了这一修饰的可能性。的确, 与 N 端肽段 (第 1-19 位) 对应的 66 个 PSM 的二级谱图中 b 离子的质荷比支持其发生了环化修饰, 其余 11 个 PSM 的谱图支持其未发生该修饰。这一结果说明, 在重组表达 Nb20 中同样存在重组表达单克隆抗体中常见的 N 端修饰异质性<sup>[20]</sup>。

### 2.4 重组表达 Nb20 的抗原结合能力

Pull-down 技术是检测纳米抗体与抗原结合能力的常用方法<sup>[21-22]</sup>。在以带有 His 标签的 SARS-CoV-2 RBD-SD1 蛋白为诱饵进行 pull-down 实验时, 发酵液上清中的 Nb20 蛋白可被捕获到琼脂糖凝胶珠子上, 而 CBH I 的 N 端片段不被捕获 (图 3), 说明 RBD-SD1 能够与 Nb20 特异性结合。在不加 RBD-SD1 的对照组实验中, Nb20 蛋白与 CBH I 的 N 端片段均无法结合在珠子上, 说明珠子对 Nb20 不存在非特异性的吸附。

表 2 重组表达 Nb20 的串联质谱鉴定

Table 2 MS/MS identification of the recombinant Nb20

Peptide	Sequence	No. of peptide-spectrum matches
1-19	QVQLVESGGGLVQAGGSLR	11
1-19	(pE)VQLVESGGGLVQAGGSLR	66
1-31	(pE)VQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGAGAHR	1
20-31	LSCAVSGAGAHR	15
32-37	VGWFRR	9
37-43	RAPGKER	2
38-63	APGKEREVAAIGASGGMTNYLDSVK	4
42-63	EREFVAAIGASGGMTNYLDSVK	68
42-65	EREFVAAIGASGGMTNYLDSVKGR	64
44-63	EFVAAIGASGGMTNYLDSVK	162
44-65	EFVAAIGASGGMTNYLDSVKGR	147
44-70	EFVAAIGASGGMTNYLDSVKGRFTISR	16
64-70	GRFTISR	1
64-74	GRFTISRDNAK	1
66-74	FTISRDNAK	1
71-97	DNAKNTIYLQMNSLKPQDTAVYYCAAR	8
75-97	NTIYLQMNSLKPQDTAVYYCAAR	22
98-117	DIETAEYIYWGGGTQVTVSS	7

Note: pE: pyroglutamate.

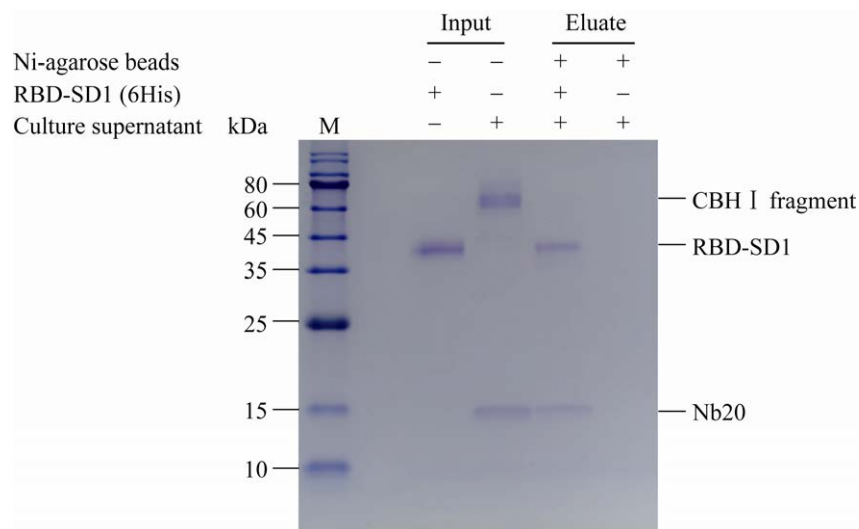


图 3 重组表达的 Nb20 与 SARS-CoV-2 RBD-SD1 的结合能力检测

Figure 3 Evaluation of the binding interaction between recombinant Nb20 and SARS-CoV-2 RBD-SD1. RBD-SD1 (6×His tagged) was used to pull down Nb20.



### 3 讨论

丝状真菌具有强大的蛋白分泌能力,已广泛应用于淀粉酶、纤维素酶等工业酶制剂的生产,但其在医药蛋白生产中的应用潜力尚未得到充分挖掘<sup>[23]</sup>。由于纳米抗体一般不存在N-糖基化,不需要考虑传统抗体重组表达中的糖链人源化问题,因此适宜在真菌细胞中对其进行表达。本研究使用丝状真菌中表达异源蛋白常用的融合表达策略<sup>[12,24]</sup>,在里氏木霉中成功表达了SARS-CoV-2刺突蛋白的中和纳米抗体Nb20,证明了使用这一宿主表达纳米抗体的可行性。胞外发酵液中蛋白组分简单,主要包含CBH I的N端片段与Nb20两个分子量差别较大的组分,有利于通过简单的超滤技术实现目标蛋白的分离纯化。在本研究的基础上,可以尝试对其他种类的纳米抗体、序列人源化纳米抗体及串联多价纳米抗体等进行表达,以进一步测试里氏木霉系统用于纳米抗体表达的通用性。

本研究对重组表达Nb20的串联质谱分析覆盖率达到了100%(表2),结果显示,除了真核生物中常见的N端谷氨酰胺环化以外,其余氨基酸残基上不存在其他修饰。结合pull-down实验的结果,本研究获得了具有正常的抗原结合功能的纳米抗体,但其与抗原结合的亲和性、对病毒感染细胞的阻断作用等仍有待进一步研究验证。

通过48 h的摇瓶发酵,本研究获得的纳米抗体Nb20的产量大约为47.4 mg/L,与多项在大肠杆菌、酵母、曲霉等宿主中表达纳米抗体的报道接近<sup>[8,25-26]</sup>。然而,与丝状真菌内源蛋白的表达量(通常在g/L级别)相比,Nb20的产量仍然比较低。其原因可能包括:1)目标蛋白编码基因的转录水平有待提高。本研究使用的*cdna1*基因启动子的效率比里氏木霉纤维素酶基

因启动子在诱导条件下的效率约低5-10倍<sup>[19]</sup>。因此,使用纤维素酶基因启动子(如*cbh1*基因的启动子)有望提高纳米抗体的表达水平。由于多种纤维素酶、半纤维素酶基因的表达存在共诱导现象,使用这类启动子时需要解决发酵液中非目标蛋白较多的“高背景”问题<sup>[27]</sup>。2)目标蛋白的降解问题未完全解决。尽管在添加蛋白胨的培养基中Nb20的产量有了显著提高,但在发酵后期仍然可以观察到其降解现象(图2)。蛋白酶分离纯化研究结果显示,里氏木霉中至少十几种蛋白酶对IgG抗体、干扰素 $\alpha$ 2b和胰岛素样生长因子具有降解作用,通过对蛋白酶编码基因的组合敲除或培养条件的改变可以显著降低蛋白酶的活性<sup>[13,28]</sup>。3)发酵策略有待优化。本研究将孢子直接接种至发酵培养基中,培养48 h时生物量仅为10.25 g/L,如果使用种子液接种,结合补料发酵和发酵参数的优化,有望进一步提高细胞浓度和目标蛋白的产量。

### REFERENCES

- [1] Cao Y, Su B, Guo X, et al. Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells. *Cell*, 2020, 182(1): 73-84.e16.
- [2] Du Y, Shi R, Zhang Y, et al. A broadly neutralizing humanized ACE2-targeting antibody against SARS-CoV-2 variants. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5000.
- [3] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448.
- [4] 姜忍忍, 许超, 周小理, 等. 纳米抗体的应用及其研究新进展. *生命的化学*, 2013, 33(3): 307-315.  
Jiang RR, Xu C, Zhou XL, et al. Application and the research progress of nanobodies. *Chem Life*, 2013, 33(3): 307-315 (in Chinese).
- [5] Van Bockstaele F, Holz JB, Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10(11): 1212-1224.
- [6] Valdez-Cruz NA, García-Hernández E, Espitia C, et al. Integrative overview of antibodies against



- SARS-CoV-2 and their possible applications in COVID-19 prophylaxis and treatment. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1): 88.
- [7] Gai J, Ma L, Li G, et al. A potent neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 with inhaled delivery potential. *Med Comm (Beijing)*, 2021, 2(1): 101-113.
- [8] Liu Y, Huang H. Expression of single-domain antibody in different systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(2): 539-551.
- [9] Hisada H, Tsutsumi H, Ishida H, et al. High production of llama variable heavy-chain antibody fragment (VHH) fused to various reader proteins by *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(2): 761-766.
- [10] Bischof RH, Ramoni J, Seiboth B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 106.
- [11] Fonseca LM, Parreiras LS, Murakami MT. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 93.
- [12] Nyssönen E, Penttilä M, Harkki A, et al. Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology (N Y)*, 1993, 11(5): 591-595.
- [13] Landowski CP, Mustalahti E, Wahl R, et al. Enabling low cost biopharmaceuticals: high level interferon alpha-2b production in *Trichoderma reesei*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 104.
- [14] Xiang Y, Nambulli S, Xiao Z, et al. Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2. *Science*, 2020, 370(6523): 1479-1484.
- [15] Waghmare PR, Waghmare PP, Gao L, et al. Efficient constitutive expression of cellulolytic enzymes in *Penicillium oxalicum* for improved efficiency of lignocellulose degradation. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31(5): 740-746.
- [16] Grote A, Hiller K, Scheer M, et al. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(web server issue): W526-W531.
- [17] Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, et al. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 1987, 61(2): 155-164.
- [18] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 2012, 9(7): 671-675.
- [19] Nakari-Setälä T, Penttilä M. Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(10): 3650-3655.
- [20] Dick LW, Kim C, Qiu D, et al. Determination of the origin of the N-terminal pyro-glutamate variation in monoclonal antibodies using model peptides. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 97(3): 544-553.
- [21] Ye G, Gallant J, Zheng J, et al. The development of nanosota-1 as anti-SARS-CoV-2 nanobody drug candidates. *eLife*, 2021, 10: e64815.
- [22] Kang G, Hu M, Ren H, et al. VHH212 nanobody targeting the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  suppresses angiogenesis and potentiates gemcitabine therapy in pancreatic cancer *in vivo*. *Cancer Biol Med*, 2021, 18(3): 772-787.
- [23] Su X, Schmitz G, Zhang M, et al. Heterologous gene expression in filamentous fungi. *Adv Appl Microbiol*, 2012, 81: 1-61.
- [24] Gouka RJ, Punt PJ, Van den Hondel CAMJJ. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47(1): 1-11.
- [25] De Meyer T, Laukens B, Nolf J, et al. Comparison of VHH-Fc antibody production in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Pichia pastoris*. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(7): 938-947.
- [26] Okazaki F, Aoki JI, Tabuchi S, et al. Efficient heterologous expression and secretion in *Aspergillus oryzae* of a llama variable heavy-chain antibody fragment V<sub>HH</sub> against EGFR. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 96(1): 81-88.
- [27] Rantasalo A, Vitikainen M, Paasikallio T, et al. Novel genetic tools that enable highly pure protein production in *Trichoderma reesei*. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5032.
- [28] Landowski CP, Huuskonen A, Wahl R, et al. Enabling low cost biopharmaceuticals: a systematic approach to delete proteases from a well-known protein production host *Trichoderma reesei*. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134723.

(本文责编 陈宏宇)