



孙鑫,杨利,郭东辉,等.猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白特异性纳米抗体的筛选与鉴定研究[J].南京农业大学学报,2024,47(5):941-947.
SUN Xin, YANG Li, GUO Donghui, et al. Research of screening and identification of nanobodies against porcine CD205 CysR-FN II protein[J].
Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(5): 941-947.

猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白特异性纳米抗体的筛选 与鉴定研究

孙鑫^{1,2}, 杨利^{1,3}, 郭东辉⁴, 马旭东⁵, 杜露平^{1,3}, 侯立婷^{1,3},
陈瑾^{1,3}, 冯秀丽², 郑其升^{1,3}, 程海卫^{1,3*}

(1.江苏省农业科学院动物免疫工程研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心/江苏省食品质量与安全重点实验室,江苏南京 210014;2.南京农业大学动物医学院,江苏南京 210095;3.兽用生物制品国泰(泰州)技术创新中心,江苏泰州 225300;4.河南祺祥生物科技有限公司,河南焦作 454950;5.中国热带农业科学院广州实验站,广东广州 510140)

摘要: [目的]猪 CD205 分子作为猪树突状细胞(DC)特异性的抗原提呈受体,在抗原提呈过程中起关键作用。本研究通过噬菌体展示技术针对猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白进行筛选以获得其特异性的纳米抗体,为猪 CD205 靶向抗原提呈研究奠定基础。[方法]利用前期制备的猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白进行羊驼免疫,经 6 次皮下免疫后采集羊驼外周血淋巴细胞,提取总 RNA 后反转录获得 cDNA,经 PCR 扩增编码纳米抗体的基因片段,构建猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白噬菌体展示纳米抗体基因文库,再运用噬菌体展示技术针对猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白进行亲和筛选,随机挑选单克隆菌落并使用 Phage-ELISA 方法鉴定出针对猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白的特异性纳米抗体。[结果]4 轮亲和筛选后,通过 Phage-ELISA 方法鉴定和序列比对分析,共成功获得 12 个猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白特异性纳米抗体,其相对分子质量约为 17×10^3 。[结论]本研究成功筛选并获得猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白特异性的纳米抗体。

关键词:猪;CD205;CysR-FN II;纳米抗体;噬菌体展示

中图分类号:S852.4

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)05-0941-07

Research of screening and identification of nanobodies against porcine CD205 CysR-FN II protein

SUN Xin^{1,2}, YANG Li^{1,3}, GUO Donghui⁴, MA Xudong⁵, DU Luping^{1,3}, HOU Liting^{1,3},
CHEN Jin^{1,3}, FENG Xiuli², ZHENG Qisheng^{1,3}, CHENG Haiwei^{1,3*}

(1. Institute of Veterinary Immunology & Engineering/National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals/Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China; 4. Henan Qixiang Biotechnology Co., Ltd., Jiaozuo 454950, China; 5. Guangzhou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Guangzhou 510140, China)

Abstract: [Objectives] Porcine CD205, as a receptor specific to porcine dendritic cells (DC), played a key role in the antigen presentation. In this study, nanobodies against porcine CD205 CysR-FN II protein were screened by phage display technology, which laid a foundation for the research of porcine CD205-targeted antigen presentation. [Methods] CysR-FN II protein of porcine CD205 molecule prepared in the previous research was used for the immunization of alpacas. After subcutaneous immunization for 6 times, peripheral blood lymphocytes of alpaca were collected, their total RNA was extracted and cDNA was obtained by reverse transcription. The gene fragments encoding nanobodies were obtained by PCR amplification, and the porcine CD205 phage display nanobody library was constructed. Bio-spannings were performed by phage display technology and monoclonal colonies were randomly selected to screen specific nanobodies against porcine CD205 CysR-FN II protein by Phage-ELISA. [Results] After 4 rounds of bio-spanning, a total of 12 porcine CD205 CysR-FN II protein specific nanobodies were selected by Phage-ELISA and sequence analysis with their molecular weight about 17×10^3 . [Conclusions] This study successfully selected and obtained porcine CD205 CysR-FN II protein specific nanobodies.

Keywords: porcine; CD205; CysR-FN II; nanobody; phage display

收稿日期:2023-08-07

基金项目:国家自然科学基金项目(32102690);“十四五”重点研发计划项目(2022YFD1800800)

*通信作者:程海卫,副研究员,主要从事兽用疫苗免疫增强技术研究,E-mail:chw5673@126.com。

树突状细胞(dendritic cells, DC)作为专职抗原提呈细胞,在免疫反应激活过程中发挥着关键作用。CD205 分子高表达于 DC,在其他细胞低表达,甚至不表达^[1-3]。目前 CD205 分子是机体淋巴器官 T 细胞区域 DC 中表达最广泛的唯一受体^[4],对抗原的捕获、加工、处理和提呈发挥着重要作用。研究显示,鸡卵白蛋白抗原(ovalbumin, OVA)经 CD205 靶向后,抗原提呈效率得到显著提高,大大减少抗原用量^[5];乙肝病毒 preS 蛋白经 CD205 靶向后可以产生较好的抗体反应,对乙肝病毒产生一定的防治效果^[6];CD205 靶向在抗病毒感染和肿瘤治疗方面取得了较好的研究进展,是目前新型疫苗研究热点之一,多个 CD205 靶向型人用疫苗已进入临床试验阶段^[7-8]。目前,抗原的 CD205 靶向主要是利用其特异性的单克隆抗体或单链抗体来实现,而关于 CD205 的纳米抗体尚未见报道。

纳米抗体(nanobody, Nb)是目前已发现的具有完整功能的最小抗原结合分子,因其具有天然缺失重链可变区的结构域与恒定区的第一结构域,与传统的单克隆抗体和单链抗体相比,其相对分子质量更小(约 15×10^3),免疫原性更低,稳定性更高,易于制备,在研制治疗性抗体和检测诊断试剂方面具有较好的应用前景^[9-11]。通过基因工程改造的多价和多特异纳米抗体,解决了单价纳米抗体血清稳定性差、体内半衰期短等不足,同时又可以利用不同的靶点协同促进免疫反应,被许多权威研究机构认为是治疗癌症的潜在应用药物^[12]。本研究选择猪 CD205 分子的 CysR-FN II 蛋白为研究对象,通过构建噬菌体展示纳米抗体基因文库,经过多轮亲和筛选,利用 Phage-ELISA 方法对猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白特异性的纳米抗体进行筛选及鉴定,为猪 CD205 靶向抗原提呈的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物和主要试剂 大肠杆菌 TG1、辅助噬菌体 M13KO7、pMECS 噬菌粒载体、猪 CD205 CysR-FN II 蛋白为本课题组保存^[13];HRP 标记 anti-M13 phage 抗体购于成都临界点生物科技有限公司。试验动物为 3 只 2 周龄雌性羊驼,由南京市红山动物园提供并饲养。

1.1.2 PCR 引物 目的基因扩增通用引物(表 1)由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物 Primers	序列 Sequences(5'→3')	引物 Primers	序列 Sequences(5'→3')
CALL001	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG	VHH-For	CTAGT <u>G</u> CGGCGCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGT
CALL002	GGTACGTGCTGTTGAACTGTCC	MP57	TTATGCTTCCGGCTCGTATG
VHH-Back	GATGTCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG	G III	CCACAGACAGCCCTCATAG

注:下划线处分别为 *Pst* I 和 *Not* I 酶切位点。

Note: The underlines indicate the *Pst* I and *Not* I enzyme cleavage sites, respectively.

1.2 噬菌体展示纳米抗体文库的构建

1.2.1 动物免疫 利用本课题组保存的猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白(1 mg)与等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,对 3 只雌性羊驼进行免疫,每周免疫 1 次,共 6 次。最后一次免疫后第 3 天抽取羊驼外周血,用 Ficoll-Paque Plus 获得羊驼外周血淋巴细胞,提取总 RNA 并反转录获得 cDNA。

1.2.2 抗猪 CD205 噬菌体展示纳米抗体文库的构建 以 1.2.1 节获得的 cDNA 为模板,利用表 1 所示引物进行 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 以 CALL001 和 CALL002 为上、下游引物,回收 700 bp 左右的目的条带后进行纯化;以此纯化产物为模板,以 VHH-Back(含 *Pst* I 酶切位点)和 VHH-For(含 *Not* I 酶切位点)为上、下游引物进行第 2 轮 PCR 扩增,回收约 400 bp 的目的条带。条带经 *Pst* I 和 *Not* I 双酶切后插入 pMECS 载体,次日将连接产物电转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,然后均匀涂布含葡萄糖和氨苄青霉素的 LB 固体平皿,37 °C 培养过夜后收集菌落备用。

1.2.3 文库库容及多样性鉴定 利用 1.2.2 节所构建的噬菌体展示纳米抗体文库进行倍比稀释,均匀涂布含葡萄糖和氨苄青霉素的 LB 固体平皿,37 °C 培养过夜后进行菌落计数,计算出所构建文库的库容。随机挑选 23 个单克隆菌落,使用引物 MP57 和 G III 进行 PCR 扩增,鉴定文库的插入率。将阳性克隆送上海生工生物工程有限公司进行测序分析,利用 MegAlign 软件对测试结果进行比对分析,验证所构建文库的多样性。

1.3 纳米抗体的筛选与鉴定

1.3.1 亲和筛选 使用 1.2.2 节所构建的噬菌体展示纳米抗体文库,经扩大培养、噬菌体侵染、浓缩纯化及滴度判定后用于第 1 轮亲和筛选;利用猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作为包被抗原,并设置未包被抗原的对照组,每孔 $100 \mu\text{L}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。次日,用 $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 封闭 2 h,使用 PBST 缓冲液清洗 5 次后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 稀释后的文库, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h。PBST 缓冲液清洗 10 次后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 三乙胺,室温静置 10 min,加入 $200 \mu\text{L}$ $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl(pH7.4) 进行中和,收集洗脱液进行滴定,计算回收率。重复上述亲和筛选 3 次。4 轮亲和筛选流程如表 2 所示。

表 2 四轮亲和筛选流程

Table 2 Schematic representation of the four rounds of bio-spanning

轮次 No. of rounds	包被抗原浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ Concentration of coated antigens	封闭液 Blocking solutions	投入噬菌体数/PFU Quantity of phages input	Tween-20 含量/% Content of tween-20	PBST 洗涤次数 Washing times
1	10	$50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉	2.8×10^{12}	0.10	10
2	8	$30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA	2.0×10^{12}	0.20	15
3	6	$30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ OVA	2.0×10^{12}	0.50	20
4	4	$30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA	2.0×10^{12}	0.75	25

注:BSA:牛血清白蛋白 Bovine albumin;OVA:卵白蛋白 Ovalbumin;脱脂奶粉:Skim milk powder.

1.3.2 猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白纳米抗体的鉴定 利用猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)作为包被抗原,并设置未包被抗原的对照组,每孔 $100 \mu\text{L}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。在各轮次亲和筛选的洗脱产物中随机挑选 200 个单克隆菌落,分别接种 96 孔板, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 振荡培养 3 h,再向每孔加入约 1.0×10^9 PFU 的辅助噬菌体 M13K07,培养过夜。次日,将 96 孔板进行离心,取 $100 \mu\text{L}$ 离心后的上清液用于 Phage-ELISA 检测。PBST 缓冲液清洗 5~8 次后,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 1:5 000 倍稀释的 HRP 标记 anti-M13 phage 抗体, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。使用 PBST 缓冲液清洗 5~8 次后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 新配制的 TMB 显色液,室温避光显色 15 min。每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 终止液,测定其 D_{450} 。将 D_{450} 值大于对照孔 3 倍以上的阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序,根据测序结果进行氨基酸序列分析。

1.3.3 猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白纳米抗体的表达与纯化 提取上述阳性克隆质粒,转化大肠杆菌 WK6 感受态细胞,再进行菌落 PCR 扩增、双酶切验证及序列测定分析,然后将相应阳性克隆接种含氨苄青霉素的 LB 液体培养基, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 振荡培养至对数期,加入终浓度为 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG), $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜诱导表达。次日,离心收集菌体后进行高压破碎,使用 Ni^{2+} 亲和层析柱对表达产物进行纯化及 SDS-PAGE、Western blot 鉴定。

2 结果与分析

2.1 羊驼特异性抗体的获得

用本课题组保存的猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白免疫羊驼,6 次免疫后利用间接 ELISA 方法检测羊驼血清中特异性抗体的效价。结果如图 1 所示,羊驼抗体效价达 1:512 000,满足建库要求。

2.2 噬菌体展示纳米抗体文库的鉴定

6 次免疫后采集羊驼外周血淋巴细胞,提取总 RNA 并反转录获得 cDNA,以其为模板进行 PCR 扩增。从图 2 可知:第 1 轮 PCR 扩增获得多个条带,其中 700 bp 左右的条带为重链抗体条带;第 2 轮 PCR 扩增获得 400 bp 左右的目的条带,即为纳米抗体基因片段。通过平板计数测定库容约为 $2.13 \times 10^8 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。任意选择 23 个单克隆菌落进行 PCR 扩增,均可获得大小约为 750 bp 的目的条带,表明所构建的文库中目的基因的插入率为

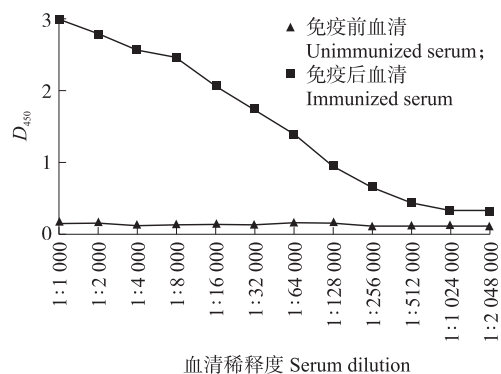


图 1 ELISA 检测羊驼血清中猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白特异性抗体效价

Fig. 1 Detection of porcine CD205 CysR-FN II protein specific antibody titers in alpaca sera by ELISA

100%(图 3)。序列比对分析结果(图 4)显示,所测试克隆的序列框架结构完整,其中 CDR3 区的氨基酸种类及数量均存在较大差异,表明所构建的文库具有较好的多样性。

2.3 纳米抗体的筛选

以制备的猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白为包被抗原,经过 4 轮亲和筛选,结果如表 3 所示。随着包被抗原浓度的降低,解离产物丰度逐渐增加,抗猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白的特异性噬菌体比例逐渐升高,表明抗猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白的特异性纳米抗体得到富集。

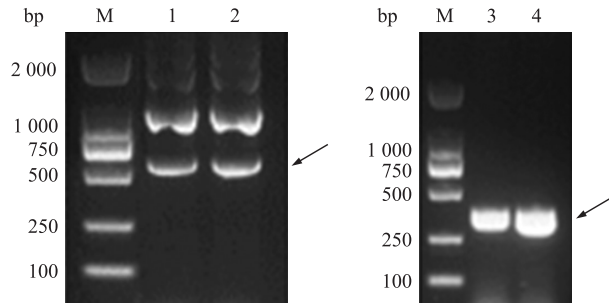


图 2 纳米抗体基因片段的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR amplification product of nanobody gene fragments

M. DNA marker (DL2000); 1~2. 第 1 轮 PCR 产物 PCR product of the first round 1; 3~4. 第 2 轮 PCR 产物 PCR product of the second round.

箭头示纳米抗体基因片段 Arrows indicate gene fragments.

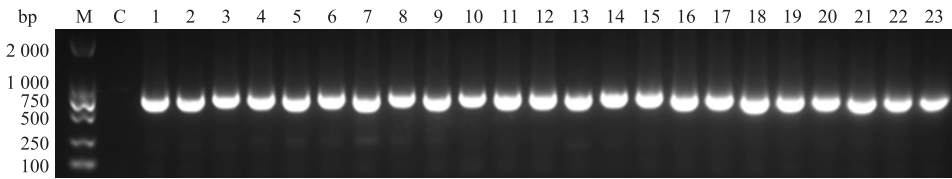


图 3 噬菌体展示纳米抗体基因文库阳性率的鉴定

Fig. 3 Identification of positive rate of phage display nanobody gene library

M. DNA marker (DL2000); C. 空白对照孔 Control; 1~23. 随机挑选的单克隆菌落 The randomly selected monoclonal colonies.

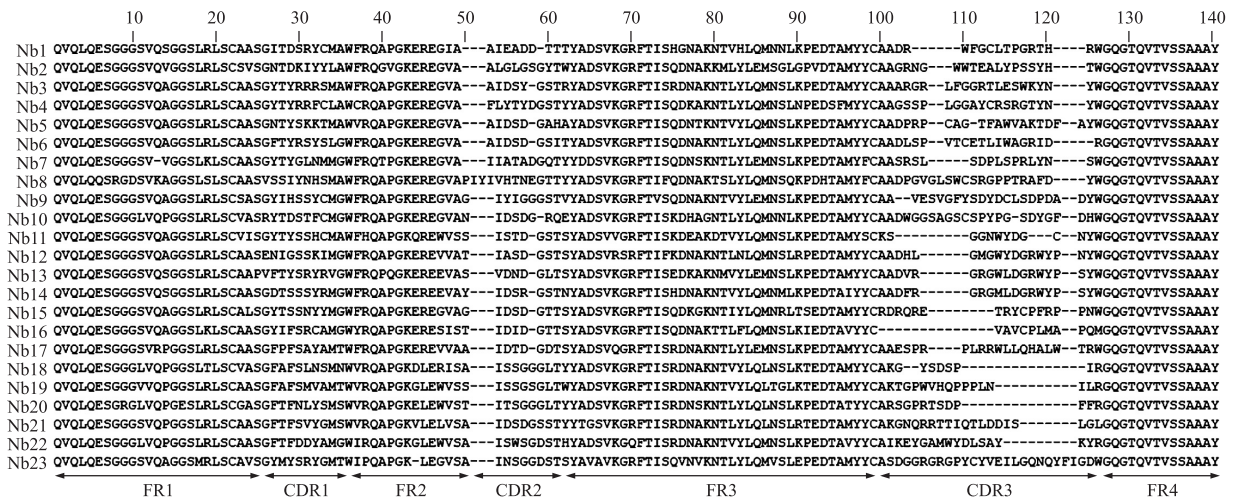


图 4 23 个随机挑选的单克隆菌落序列比对结果

Fig. 4 Sequence alignment of the 23 randomly selected monoclonal colonies

FR; Framework region; CDR; Complementarity-determining region.

表 3 猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白特异性噬菌体富集

Table 3 Enrichment of phage particles displaying specific anti-porcine CD205 CysR-FN II protein nanobodies

Table with 6 columns: 筛选轮次 (No. of rounds), 包被抗原浓度/(mg·mL⁻¹) (Concentration of coated antigens), 投入文库量/PFU (Quantity of library input), 未结合文库量/PFU (Quantity of library unbound), 洗涤产物量/PFU (Washing product), 解离产物量/PFU (Dissociation product). Rows show data for 4 rounds of selection.

2.4 纳米抗体的鉴定

自第 3 轮、第 4 轮亲和筛选后洗脱产物中随机挑取 200 个单克隆菌落,经辅助噬菌体 M13KO7 侵染后获得展示不同纳米抗体的噬菌体。利用噬菌体进行 Phage-ELISA,结果如图 5 所示,共有 19 个单克隆菌落可以与 CD205 CysR-FN II 蛋白发生特异性结合。经序列测定后根据纳米抗体 CDR3 区域进行氨基酸序列比对,结果如图 6 所示,共筛选出 12 个针对猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白的特异性纳米抗体。

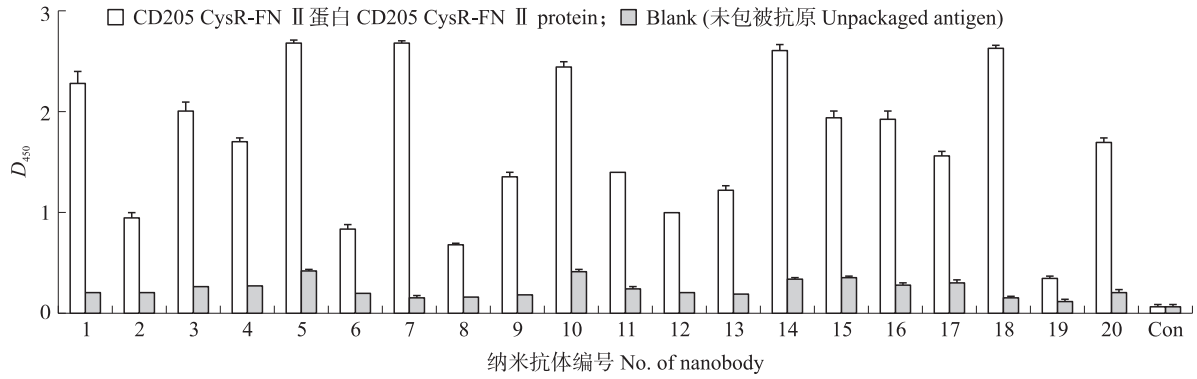


图 5 不同纳米抗体与猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白结合活性的 Phage-ELISA 检测

Fig. 5 Detection of the binding activity of different nanobodies to porcine CD205 CysR-FN II protein by Phage-ELISA

Con:空白对照组 The control group.

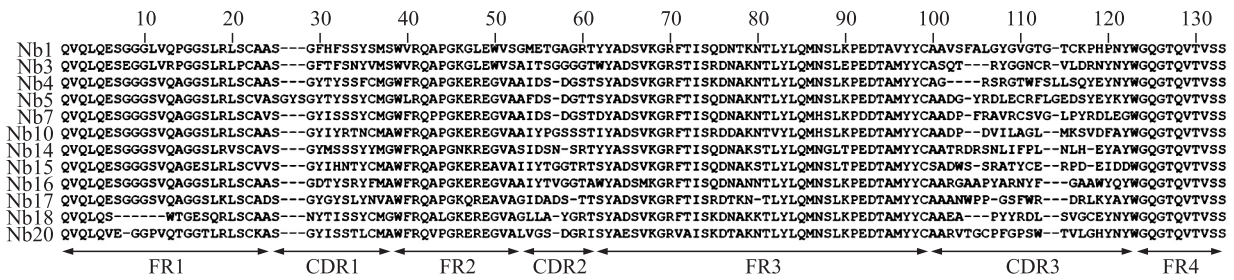


图 6 12 个抗猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白纳米抗体序列比对结果

Fig. 6 Sequence alignment of the 12 anti-porcine CD205 CysR-FN II protein nanobodies

2.5 纳米抗体的表达与纯化

将特异性纳米抗体质粒转化大肠杆菌 WK6,进行蛋白诱导表达及纯化,再分别使用含不同终浓度(40、60、80 和 100 mmol·L⁻¹)咪唑的洗脱液进行洗脱,摸索出最适合的纯化条件。结果表明,含 80 mmol·L⁻¹咪唑的洗脱液的除杂效果最佳。纯化后的纳米抗体蛋白经 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定,结果如图 7 所示,在相对分子质量约 17×10³ 处出现目的条带,纯度在 90% 以上。

3 讨论

作为首个报道的树突状细胞特异性的抗原提呈受体,CD205 对抗原的捕获、加工、处理和提呈发挥着重要作用。在畜牧兽医领域,有关 CD205 靶向的研究与日俱增,但由于物种以及不同的靶标抗原,引起的免疫效应差别较大^[14-17]。目前 CD205 靶向抗原提呈的作用机

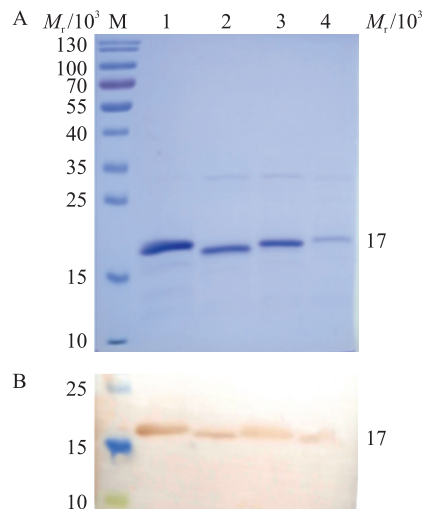


图 7 纳米抗体纯化的鉴定

Fig. 7 The identification of the different nanobodies purification

A. SDS-PAGE 鉴定 SDS-PAGE detection; B. Western blot 鉴定 Western blot detection. M. 蛋白标准品 Protein marker; 1~4. 纯化后的不同纳米抗体 Different purified nanobodies.

制仍不清楚,当前研究所采用的靶标抗原也存在一些不足,如大部分研究采用蛋白质或多肽作为靶标抗原,而蛋白质或多肽由于其自身的缺陷和不足,常常不能引起较为理想的免疫反应^[18];树突状细胞靶向主要是利用树突状细胞特异性受体所对应的传统抗体(如单克隆抗体或单链抗体),通过基因片段融合表达或者采用化学方法偶联等途径,实现与蛋白质或多肽的组装,但在实际操作过程中容易影响抗原的天然结构。因此,如何设计更加高效的靶标抗原,摸索更加切实可行的靶向策略,对于进一步改善 CD205 靶向免疫效应有着重要作用。

纳米抗体基于其诸多天然优势,在树突状细胞靶向研究方面已经展现了极好的应用价值。研究表明,利用 CD36、CD11b 和 MHC II 的特异性纳米抗体先后实现了 OVA、酵母泛素、绿色荧光蛋白和流感病毒 HA 的小鼠树突状细胞靶向,并引起了较好的免疫效应,成功建立了针对流感病毒的攻毒保护效力^[19]。借助小鼠 CD206 特异性纳米抗体成功将纳米凝胶和报告基因靶向提呈至树突状细胞^[20],而有关猪 CD205 特异性纳米抗体的研究至今未见报道。本研究利用前期所制备的猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白^[13]免疫羊驼,成功构建了猪 CD205 噬菌体展示纳米抗体文库,库容达 2.13×10^8 CFU·mL⁻¹,满足建库要求。先后进行 4 轮亲和筛选,随着筛选轮次的增加,以及包被抗原浓度的依次降低,解离产物的丰度逐渐增加,表明抗猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白的特异性纳米抗体得到明显富集,随机挑选单克隆菌落进行 Phage-ELISA 鉴定,共成功获得 12 个猪 CD205 分子 CysR-FN II 蛋白的特异性纳米抗体。这为下一步开展猪 CD205 靶向以及抗原提呈机制研究奠定基础。本研究后续将针对猪 CD205 靶向以及抗原提呈的作用机制展开系列研究,为新型、高效猪用树突状细胞靶向型疫苗的研究及临床应用提供物质基础。

参考文献 References:

- [1] Witmer-Pack M D, Swiggard W J, Mirza A, et al. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression *in situ* in lymphoid and nonlymphoid tissues[J]. Cellular Immunology, 1995, 163(1): 157-162.
- [2] Kato M, Neil T K, Clark G J, et al. cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells[J]. Immunogenetics, 1998, 47(6): 442-450.
- [3] East L, Isacke C M. The mannose receptor family[J]. Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects, 2002, 1572(2/3): 364-386.
- [4] Kato M, McDonald K J, Khan S, et al. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes[J]. International Immunology, 2006, 18(6): 857-869.
- [5] Bonifaz L C, Bonnyay D P, Charalambous A, et al. *In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2004, 199(6): 815-824.
- [6] Jing M Z, Wang J, Zhu S L, et al. Development of a more efficient hepatitis B virus vaccine by targeting hepatitis B virus preS to dendritic cells[J]. Vaccine, 2016, 34(4): 516-522.
- [7] Dhodapkar M V, Sznol M, Zhao B W, et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205[J]. Science Translational Medicine, 2014, 6(232): 232ra51.
- [8] Leleux J, Atalis A, Roy K. Engineering immunity: modulating dendritic cell subsets and lymph node response to direct immune-polarization and vaccine efficacy[J]. Journal of Controlled Release, 2015, 219: 610-621.
- [9] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. Nature, 1993, 363: 446-448.
- [10] Yang E Y, Shah K. Nanobodies: next generation of cancer diagnostics and therapeutics[J]. Frontiers in Oncology, 2020, 10: 1182.
- [11] 景添, 陈凤强, 冯皓, 等. 纳米抗体在家畜传染病防治中应用的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(2): 135-140.
Jing T, Chen F Q, Feng H, et al. Progress in research on application of nanobodies in prevention and treatment of infectious diseases in livestock[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 54(2): 135-140 (in Chinese with English abstract).
- [12] Ma L L, Gai J W, Qiao P, et al. A novel bispecific nanobody with PD-L1/TIGIT dual immune checkpoint blockade[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 531(2): 144-151.
- [13] 高文昊, 杜露平, 侯立婷, 等. 猪 CD205 分子 CysR-FN II 截短基因的克隆表达及应用[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(5): 1272-1277.
Gao W H, Du L P, Hou L T, et al. Cloning, expression and application of CysR-FN II truncated gene of porcine CD205[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2022, 38(5): 1272-1277 (in Chinese with English abstract).
- [14] Njongmeta L M, Bray J, Davies C J, et al. CD205 antigen targeting combined with dendritic cell recruitment factors and antigen-linked CD40L activation primes and expands significant antigen-specific antibody and CD4⁺T cell responses following DNA vaccination of outbred animals[J]. Vaccine, 2012, 30(9): 1624-1635.
- [15] Jáuregui-Zúñiga D, Pedraza-Escalona M, Espino-Solís G P, et al. Targeting antigens to Dec-205 on dendritic cells induces a higher immune response in chickens: hemagglutinin of avian influenza virus example[J]. Research in Veterinary Science, 2017, 111: 55-62.
- [16] Chrun T, Lacôte S, Urien C, et al. A DNA vaccine encoding the gn ectodomain of rift valley fever virus protects mice via a humoral response decreased by DEC205 targeting[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 860.

- [17] Bustamante-Córdova L, Reséndiz-Sandoval M, Hernández J. Evaluation of a recombinant mouse X pig chimeric anti-porcine DEC205 antibody fused with structural and nonstructural peptides of PRRS virus[J]. *Vaccines*, 2019, 7(2):43.
- [18] 杜露平, 侯立婷, 于晓明, 等. 免疫增强剂 CVC1302 辅助抗原诱导小鼠机体产生长效体液免疫应答的研究[J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45(3):597-603. DOI:10.7685/jnau.202106002.
Du L P, Hou L T, Yu X M, et al. The mechanism of immunopotentiator CVC1302 in promoting long-term humoral immune responses in mice[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(3):597-603 (in Chinese with English abstract).
- [19] Duarte J N, Cragolini J J, Swee L K, et al. Generation of immunity against pathogens via single-domain antibody-antigen constructs[J]. *Journal of Immunology*, 2016, 197(12):4838-4847.
- [20] de Vlaeminck Y, Lecocq Q, Giron P, et al. Single-domain antibody fusion proteins can target and shuttle functional proteins into macrophage mannose receptor expressing macrophages[J]. *Journal of Controlled Release*, 2019, 299:107-120.

责任编辑:周广礼