

# 鲨源单域抗体的特点及研究进展

祝天赐

浙江理工大学生命科学与医药学院, 浙江 杭州

收稿日期: 2022年5月22日; 录用日期: 2022年6月17日; 发布日期: 2022年6月27日

## 摘要

抗体从发现至今一直都是热门研究领域, 自免疫检查点机制被发现后, 关于能够阻断关键通路的抗体的研究更是呈现爆发性增长。随着研究的深入, 单抗因其分子量偏大, 穿透性差而影响了其在临床上的广泛应用, 故研发一类分子量更小、穿透力更强的抗体进行靶向治疗成为抗体研究领域的重要热点。鲨鱼等软骨鱼类产生的IgNAR抗体是一种仅有重链的抗体, 其可变区VNAR是目前已知的最小的完整抗原结合单位, 是极具潜力能够取代传统单抗的新型抗体药物。本文对鲨源单域抗体的特点以及各种突出于常规抗体的优势以及筛选方法进行了综述, 并对鲨源单域抗体的未来前景进行了展望。

## 关键词

鲨鱼, 单域抗体, IgNAR, VNAR

# Characteristics and Research Progress of Single Domain Antibody from Shark

Tianci Zhu

School of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou Zhejiang

Received: May 22<sup>nd</sup>, 2022; accepted: Jun. 17<sup>th</sup>, 2022; published: Jun. 27<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

Antibodies have always been a hot research field since their discovery. After the discovery of the autoimmune checkpoint mechanism, the research on the key molecule antibodies has shown explosive growth. With the development of research, single domain antibodies have been widely used in clinical practice due to their large molecular weight and poor penetration. Therefore, developing a class of antibodies with smaller molecular weight and stronger penetration for targeted therapy has become an important focus in the field of antibody research and development. The IgNAR produced by cartilaginous fish such as shark is a heavy chain only antibody, and its variable

**region VNAR is the smallest complete antigen-binding unit known so far. It is a new type of antibody-drug with great potential to replace traditional single domain antibodies. In this paper, the characteristics, advantages and screening methods of shark-derived single domain antibodies are reviewed, and the future prospects of shark-derived single domain antibodies are prospected.**

## Keywords

**Shark, Single Domain Antibodies, IgNAR, VNAR**

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

抗体(Antibody, Ab)是目前临床广泛使用的生物技术药物[1],其本质是一类免疫球蛋白,主要分为 IgG、IgA、IgE、IgD、IgM 五类。这五类常规抗体均由重链(Heavy chain, H)与轻链(Light chain, L)构成,无论这几类抗体是以单体、二聚体、或者五聚体的形式存在,它们都必须保存完整的轻链与重链才能发挥应有的效果[2]。随着时间的推移,关于常规抗体的研发取得了很大的成功,单抗技术与多抗技术广泛地应用于许多生物领域,但由于免疫球蛋白 IgG 分子很大(约为 150 kDa),是一个依靠共价键连接的四聚体,必须有重链和轻链配对才能形成两个抗原结合位点,使得免疫球蛋白结合部位的大小很难降低到 30 kDa 以下,这让单抗很难作用于一些需要更小分子才能进入的地方。这些局限性迫使人们不得不将目光转向其他新型抗体。

1993 年首次报道了骆驼体内存在一类仅含有重链的抗体[3],被命名为 HcABs (Heavy-chain Antibodies),后续研究发现这类抗体出现在所有骆驼科生物之中[4]。骆驼体内 HcABs 的发现极大地激起了人们寻找新型抗体的热情。在两年之后,人们在鲨鱼体内再次发现了仅重链抗体[5],通过对这种抗体的研究发现这是一种全新的免疫球蛋白类型,其广泛存在于以鲨鱼代表的软骨鱼类之中[6],并将之命名为免疫球蛋白新抗原受体(Immunoglobulin New Antigen Receptor, IgNAR)。

## 2. 鲨源单域抗体的特点

### 2.1. 尺寸小

在未发现鲨鱼体内的 IgNAR 抗体之前,已知最小的能与抗原特异性结合的单位的是骆驼 HcABs 抗体的可变区 VHH,大小约为 15 kDa。最小的 VNAR 约为 12 kDa 左右[7],VNAR 相对于 VHH 缺少了互补决定簇 2 [8] (Complementary Determining Region 2, CDR2),它的互补决定簇 3 (Complementary Determining Region 3, CDR3)虽然比常规抗体的 CDR3 区稍长但是序列长度还是存在不确定性,有的只有几个氨基酸残基,有的却高达二十多个氨基酸残基[9]。VNAR 因为其大小的优势而具备更强的穿透性,将会比常规抗体更容易渗透进实体肿瘤或者达到血脑屏障。

### 2.2. 稳定性强

鲨鱼等软骨鱼体液环境相较于哺乳动物来说是非常恶劣的,Chris M Wood 等人就发现鲨鱼体液中含有浓度很高的尿素[10]。鲨鱼 IgNAR 能够在高尿素的环境下稳定存在并且能够发挥出良好的结合能力,必然会比哺乳动物 IgG 抗体和 hcIgG 具有更强的稳定性。而且加上 VNAR 抗体的 CDR1 与 CDR3 区存在

的半胱氨酸所形成的环间二硫键[11] [12] [13], VNAR 抗体能够拥有比常规抗体更高的热稳定性, Dumoulin M 就曾用实验证明一些单域抗体可以耐受 2.3~3.3 mol/L 的盐酸胍以及 60°C~80°C 的高温[14]。除此之外, 还有研究发现 VNAR 相较于常规抗体多包含 1 个额外的盐桥和延伸的疏水核。通过实验将这些结构转移到人抗体的可变区之后, 可显著提高其稳定性[15]。

### 2.3. 亲和力强

相较于常规抗体必须有轻链和重链相组合才能发挥结合抗原的作用, VNAR 抗体可以单独与抗原进行结合, 在空间上没有受到太多的限制。再加上 VNAR 抗体较长的 CDR3 能够形成一个稳定的凸环结构[16], 这个结构能够帮助 VNAR 抗体充分深入抗原的裂隙之中与抗原结合, 结合更牢固, 大大加强了 VNAR 抗体对于抗原的亲和力。

## 3. 鲨源单域抗体的优势

### 3.1. 更强的成药性

VNAR 抗体相对常规抗体具备更强的成药性。鲨鱼属于软骨鱼, 和人的同源性相差巨大。相比较骆驼科动物, 人源抗原在刺激鲨鱼时具有更高的免疫原性, VNAR 的特异性也更强, 因此效果更好。同时, 由于 VNAR 的大小比 IgG 的 V 区和 hIgG 的 VHH 都要更加小, 因此可以更加容易穿透血脑屏障, 达到常规抗体所到达不了的一些肿瘤位置并深入肿瘤内部, 达到更好的治疗效果。

### 3.2. 更低的成本

VNAR 抗体相对于常规抗体所具有的一大优势就是其缺少复杂的修饰。多抗的制备离不开生物体, 单抗的制备离不开杂交瘤细胞系, 这些都是因为常规抗体发挥作用不仅需要完整的轻链和重链, 而且肽链之间的各种复杂的化学修饰也是必需的, 要想完成这些修饰必须要经过生物体或者细胞才能完成。而 VNAR 中仅仅存在半胱氨酸之间形成的二硫键来维持构型[17], 能够在包括原核表达系统在内的多种表达系统中高效表达[18]。有研究表明, 经过调试后 VNAR 抗体在大肠杆菌中的表达量可达 5~10 mg/L [19]。更值得一提的是, VNAR 在真核表达系统中的表达量甚至能达到 100 mg/L 甚至更高, 而且表达产品的纯度也是相当的高。Ablynx 公司就曾利用酵母反应器可一种 VNAR 抗体的表达量提升到了 0.5 g/L。这相对于多抗和单抗的制备来说工艺简单太多, 经济成本也减少了太多。VNAR 抗体生产成本如此之低, 有利于大规模生产用于开发治疗性抗体药物、诊断试剂、亲和纯化基质和科学研究等领域。

### 3.3. 更易改造

VNAR 抗体的全长不过 100 到 120 个氨基酸残基, 远远少于单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)的氨基酸残基数。这使得更加容易对 VNAR 进行改造[20], 无论是对 CDR 区进行定点突变来筛选亲和力更强的突变体[21]还是人源化改造[22]成完全人类抗体的成本都会比改造常规抗体更低, 而且过程会更加简单、快速。

## 4. 鲨源单域抗体的筛选方法

IgNAR 抗体的提取方法基本和骆驼科 HCAb 的提取方法相类似, 通常可采用标准的免疫程序(完全和不完全弗氏佐剂先后与免疫原混合分 3~4 次免疫动物)免疫单只软骨鱼类, 获得滴度较好的特异性单域重链抗体[23]。值得一提的是, 不同于骆驼科 HCAb 的提取仅来自羊驼等少数几种骆驼科生物[24], 目前用于 VNAR 开发的鲨鱼种类不到 10 种, 且未见鳐源 VNAR 的报道, 而现存板鳃亚纲鱼类超过千余种(鲨总目约 450 种[25], 鳐总目约 560 种[26]), 能够为 VNAR 的研究提供极为丰富的材料。目前为了筛选针

对相应靶点的 VNAR 是在免疫完成后通过提取相应的 PBMC 细胞或者脾脏组织获得 RNA 转录本再扩增出 VNAR 序列进行筛选, 筛选方法在下文中进行综述。

#### 4.1. 组学分析法

目前比较简单的筛选 VNAR 的方法是组学分析[27]。IgNAR 抗体也是免疫系统的一环, 通过抗原免疫原性刺激鲨鱼免疫系统使其产生对应的抗体后取出脾脏并提取 mRNA 进行转录组测序, 特异性抗体所对应的 mRNA 相对于未免疫的鲨鱼中 mRNA 的表达会上调, 根据基因的差异筛选出可能的 IgNAR, 同时制备抗原的亲层析柱, 用这个亲和层析柱调取实验组鲨鱼血清里的 IgNAR 并进行质谱鉴定。根据转录组数据和质谱数据的双重比对最终能够筛选到能够和抗原特异性结合的 IgNAR。这种方法的优势在于筛选十分简单且成本较低, 无论是转录组分析、抗原亲和柱以及质谱的花费都不算太高, 不需要花费巨额的经费去建立专门的平台, 而且这些数据不仅可以帮助筛选 VNAR 也能帮助分析 VNAR 的结构与功能。但是这种方法存在太多的不确定性, 首先转录组文库是靠计算机模拟拼接而成, 序列不一定准确, 而且血清中抗体浓度太低, 亲和层析柱挂住特异性抗体的几率太小, 还有一个问题就是无法预知筛选到 VNAR 序列的结合活性。在实验建立开始研究 IgNAR 抗体的初期没有仪器及相关平台和充足经费的情况下, 采用这种方法进行研究可以用较小的投资获得较大的回报。

#### 4.2. 噬菌体展示技术

目前主流的 VNAR 抗体筛选方法为噬菌体展示法[28]。在完成鲨鱼的免疫之后, 获得其血液中的 PBMC 细胞或者脾脏来提取 RNA, 再利用特异性的引物将 VNAR 基因序列克隆至噬菌粒载体, VNAR 抗体会跟其他噬菌体蛋白一样表达在噬菌体的表面, 然后通过 ELISA 结合实验筛选出能够和抗原特异性结合的噬菌体, 对噬菌体进行测序即可得到对应的 VNAR 序列。这种方法的好处在于能够观察到 VNAR 序列是否能够与抗原结合, 且避免了庞大的数据分析工作, 能够准确无误地筛选到需要的 VNAR 抗体序列。最初的噬菌体展示技术只能构建出 VNAR 的天然文库, 后续还有人通过设计包含不同 CDR 区的引物进行 Overlap PCR 建库[29], 这种方式使得 VNAR 抗体的两个 CDR 区能够进行自由组合, 从而构建出半合成的 VNAR 文库, 极大地丰富了 VNAR 的种类, 为筛选到高亲和力的 VNAR 提供了方便。

噬菌体展示技术除了可以应用于上述所说的免疫库之外还可以用于建立天然库和半合成文库[30]。Feng 等[31]曾经用 6 条护士鲨构建过噬菌体展示的天然库, 该天然库不仅库容达到了  $10^{10}$  这个数量级, 而且多样性十分丰富, 作者从该库中淘选到了许多对应各种各样靶点的抗体, 其中比较知名的靶点有 GPC3、HER2、PD1、PE38 等。值得一提的是, 在筛选到的多条针对 PE38 的 VNAR 抗体中有一条的亲合力达到了  $10.1 \text{ nmol/L}$ 。构建半合成库的基础是源于 VNAR 抗体 CDR3 区的高度突变率, 将整个 VNAR 抗体作为框架, 然后对 CDR3 区进行随机化拼接, 由于 CDR3 区长度足够长, 也能得到一个较为丰富的噬菌体文库, 同时这一方法也可作为一种亲和成熟的策略被应用于随机突变筛选亲和力更强的 VNAR 抗体。在 2001 年就有科学家根据这一方法建立了半合成库并筛选到了一个与 AMA1 蛋白亲和力高达  $200 \text{ nm/L}$  的 VNAR 抗体[32]。

#### 4.3. 酵母展示技术

酵母展示技术的原理[33] [34]与噬菌体展示类似, 通过将外源基因导入到酵母之中后利用酵母细胞内蛋白转运机制(GPI 锚定)使靶蛋白表达并定位于酵母细胞表面, 然后通过筛选获得想要的目的抗体。相比于噬菌体展示技术, 因为酵母属于真核细胞, 抗体的翻译后修饰相比原核表达会复杂很多, 这能使得抗体表现得更加稳定。而且通过流式细胞分选这种方法来筛选酵母库比噬菌体展示的筛选方法可控性更高[35]。但是不得不提的是酵母展示库的库容一般不会太高, 虽然已有科学家的实验证明酵母抗体库的库容

可以提高到  $10^{10}$  CFU 水平[36], 但是目前噬菌体抗体库的库容已经可以达到  $10^{11}$  CFU, 两者之间直接相差了 10 倍。还有最重要的一点就是单个酵母细胞上表达的并不止一种抗体[37], 有时候会出现一个酵母细胞能够结合多种抗原的现象, 这样可能还会导致筛选到的抗体的亲和力不如预期。

#### 4.4. 10×单细胞测序技术

10×单细胞测序技术[38] [39], 它的主体是一台测序机器, 可以将细胞一个一个的分开, 然后单独获得每一个细胞的独立信息。这样只要能能够提供确认产生了免疫反应的鲨鱼脾脏或者 PBMC 转录本, 就能分离获得所有能够产生抗体的浆细胞以及 B 细胞的数据, 再利用这些数据就能很快地找出能够与免疫抗原特异性结合的 VNAR 抗体序列。10×单细胞测序技术现在还是一个刚刚兴起的技术, 一方面这个技术相对于传统的转录组测序能够帮助我们更快的锁定我们所需要的序列, 但是另一方面其高昂的花费还是会令一些研究人员望而却步。

#### 4.5. 其他技术

除了上述方法之外, 还可以被应用于单域抗体筛选的方法就是核糖体展示[40] [41]与 mRNA 展示[42] [43], 1997 年, Pluckthun 实验室建立了体外筛选完整功能蛋白的新技术——核糖体展示技术, 其主要流程为, 首先构建核糖体展示的 DNA 模板, 然后依次体外转录、体外翻译和亲和筛选。转录产物 mRNA 不含任何终止密码, 在体外翻译过程中核糖体会停留在 mRNA 的 3'末端, 使目的基因的翻译产物展示在核糖体表面, 并形成“mRNA-蛋白质-核糖体”三元复合物, 采用洗脱缓冲液使核糖体解离, 释放 mRNA, 后者经过纯化后用作 RT-PCR 的模板, 重新引入核糖体展示的各种必需元件、进行下一循环的富集和选择, 最终筛选出高亲和力的目标分子。mRNA 展示的原理也与核糖体展示相类似, 因此不再过多赘述。

### 5. 总结与展望

单克隆抗体依旧是目前为止最具市场的抗体药物, 这主要是因为其能够特异性结合目标蛋白以及干预疾病相关生物过程的内在能力。然而, 这个“魔法药物”也有其局限性。单抗的大小和结构的复杂性会限制它们在某些疾病类型和疾病部位中的应用, 与此同时单抗较高的生产成本也使得单抗的发展进入瓶颈。鲨鱼单域抗体作为一种最具希望的替代方案, 与常规抗体相比具有特殊的优势, 包括更小的尺寸、更易探测隐蔽表位、相对较低的生产成本和人为改进的空间。在不久的将来一定会有替代单抗的一天。

从单域抗体被发现至今已经有很多个年头了, 这些年里骆驼源单域抗体的确在生物学和医学领域的很多方面实现了应用[44], 不仅促进了某些技术的更新, 同时也为疾病的治疗和诊断提供了新的可能性。但是对于鲨鱼单域抗体的研究, 国内外尤其是国内依旧还是太少, VNAR 抗体所表现的一系列优点都证明其在免疫以及治疗的领域绝对有着非常好的应用前景。可能是由于目前的各种技术手段对于平台以及成本都具有一定的要求, 加上 VNAR 抗体许多的相关机制尚不明确使得很多研究人员很难开展实验。但相信随着时间的推移以及技术的进步, 由骆驼 VHH 引起的单域抗体热潮会逐渐转向 VNAR 抗体, VNAR 的来源会变得更加丰富, 筛选手段会更加多变, 同时有望进一步丰富抗体小型化的理论基础。

#### 参考文献

- [1] Weiner, L.M., Murray, J.C. and Shuptrine, C.W. (2012) Antibody-Based Immunotherapy of Cancer. *Cell*, **148**, 1081-1084. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.034>
- [2] Smith, G.P., Hood, L. and Fitch, W.M. (1971) Antibody Diversity. *Annual Review of Biochemistry*, **40**, 969-1012. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.40.070171.004541>
- [3] Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., et al. (1993) Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains. *Nature*, **363**, 446-448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>

- [4] Muyldermans, S. and Lauwereys, M.J. (1999) Unique Single-Domain Antigen Binding Fragments Derived from Naturally Occurring Camel Heavy-Chain Antibodies. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, **12**, 131-140. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199903/04\)12:2<131::AID-JMR454>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199903/04)12:2<131::AID-JMR454>3.0.CO;2-M)
- [5] Greenberg, A.S., Avila, D., Hughes, M., et al. (1995) A New Antigen Receptor Gene Family That Undergoes Rearrangement and Extensive Somatic Diversification in Sharks. *Nature*, **374**, 168-173. <https://doi.org/10.1038/374168a0>
- [6] Crouch, K., Smith, L., Williams, R., et al. (2013) Humoral Immune Response of the Small-Spotted Catshark, *Scyliorhinus canicula*. *Fish & Shellfish Immunology*, **34**, 1158-1169. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.025>
- [7] Stanfield, R., Dooley, H., Flajnik, M., et al. (2004) Crystal Structure of a Shark Single-Domain Antibody V Region in Complex with Lysozyme. *Science (New York, NY)*, **305**, 1770-1773. <https://doi.org/10.1126/science.1101148>
- [8] Liu, J., Anderson, G., Delehanty, J., et al. (2007) Selection of Cholera Toxin Specific IgNAR Single-Domain Antibodies from a Naïve Shark Library. *Molecular Immunology*, **44**, 1775-1783. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.07.299>
- [9] Fennell, B., Darmanin-Sheehan, A., Hufton, S., et al. (2010) Dissection of the IgNAR V Domain: Molecular Scanning and Orthologue Database Mining Define Novel IgNAR Hallmarks and Affinity Maturation Mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, **400**, 155-170. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.061>
- [10] Lauwereys, M., Arbabi, G.M., Desmyter, A., et al. (1998) Potent Enzyme Inhibitors Derived from Dromedary Heavy-Chain Antibodies. *EMBO Journal*, **17**, 3512-3520. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3512>
- [11] Streltsov, V.A., Varghese, J.N., Carmichael, J.A., et al. (2004) Structural Evidence for Evolution of Shark Ig New Antigen Receptor Variable Domain Antibodies from a Cell-Surface Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 12444-12449. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403509101>
- [12] Streltsov, V.A., Carmichael, J.A. and Nuttall, S.D. (2005) Structure of a Shark IgNAR Antibody Variable Domain and Modeling of an Early-Developmental Isotype. *Protein Science*, **14**, 2901-2909. <https://doi.org/10.1110/ps.051709505>
- [13] Griffiths, K., Dolezal, O., Parisi, K., et al. (2013) Shark Variable New Antigen Receptor (VNAR) Single Domain Antibody Fragments: Stability and Diagnostic Applications. *Antibodies*, **2**, 66-81. <https://doi.org/10.3390/antib2010066>
- [14] Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., et al. (2002) Single-Domain Antibody Fragments with High Conformational Stability. *Protein Science*, **11**, 500-515. <https://doi.org/10.1110/ps.34602>
- [15] Feige, M.J., Grawert, M.A., Marcinowski, M., et al. (2014) The Structural Analysis of Shark IgNAR Antibodies Reveals Evolutionary Principles of Immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 8155-8160. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321502111>
- [16] Genst, E.D., Saelens, D., Muyldermans, S., et al. (2006) Antibody Repertoire Development in Camelids. *Developmental & Comparative Immunology*, **30**, 187-198. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.010>
- [17] Hussack, G., Hiramata, T., Ding, W., et al. (2011) Engineered Single-Domain Antibodies with High Protease Resistance and Thermal Stability. *PLOS ONE*, **6**, e28218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028218>
- [18] Khosroshahi, S.A., Farajnia, S., Ghiamirad, M., et al. (2016) Development and Evaluation of a Single Domain Antibody against Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *Protein Expression and Purification*, **120**, 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.12.005>
- [19] Nuttall, S.D., Humberstone, K.S., Krishnan, U.V., et al. (2004) Selection and Affinity Maturation of IgNAR Variable Domains Targeting *Plasmodium falciparum* AMA1. *Proteins*, **55**, 187-197. <https://doi.org/10.1002/prot.20005>
- [20] Vincke, C., Loris, R., Saelens, D., et al. (2009) General Strategy to Humanize a Camelid Single-Domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 3273-3284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806889200>
- [21] Dooley, H. (2022) Generation of VNAR Libraries from Immunized Sharks and Selection of Target-Specific Clones. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, **24**, 57-72. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1944-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1944-5_4)
- [22] Rossotti, M., BeLanger, K., Henry, K., et al. (2021) Immunogenicity and Humanization of Single-Domain Antibodies. *FEBS Journal*, **12**, 33-37. <https://doi.org/10.1111/febs.15809>
- [23] Riechmann, L. and Muyldermans, S. (1999) Single Domain Antibodies: Comparison of Camel VH and Camelised Human VH Domains. *Journal of Immunological Methods*, **231**, 25-38. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00138-6)
- [24] Muyldermans, S. (2013) Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, **82**, 775-797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- [25] Criscitiello, M.F. (2014) What the Shark Immune System Can and Cannot Provide for the Expanding Design Landscape of Immunotherapy. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **9**, 725-739. <https://doi.org/10.1517/17460441.2014.920818>
- [26] Nelson, J.S., Grande, T.C. and Wilson, M.V. (2016) *Fishes of the World*. 5th Edition, John Wiley & Sons, Hoboken. <https://doi.org/10.1002/9781119174844>
- [27] 张文杰. 来源于条纹斑竹鲨抗 HBsAg 单域抗体的筛选及重组抗体的活性研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江

理工大学, 2020.

- [28] Esparza, T., Martin, N., Anderson, G., *et al.* (2020) High Affinity Nanobodies Block SARS-CoV-2 Spike Receptor Binding Domain Interaction with Human Angiotensin Converting Enzyme. *Scientific Reports*, **10**, Article No. 22370. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79036-0>
- [29] Sevy, A., Chen, M., Castor, M., *et al.* (2020) Structure- and Sequence-Based Design of Synthetic Single-Domain Antibody Libraries. *Protein Engineering, Design and Selection*, **33**, 32-38. <https://doi.org/10.1093/protein/gzaa028>
- [30] 刘星, 陈奇. 鲨源单域抗体的研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1069-1082.
- [31] Feng, M.Q., Bian, H.J., Wu, X.L., *et al.* (2019) Construction and Next-Generation Sequencing Analysis of a Large Phage-Displayed VNAR Single-Domain Antibody Library from Six Naive Nurse Sharks. *Antibody Therapeutics*, **2**, 1-11. <https://doi.org/10.1093/abt/tby011>
- [32] Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Hattarki, M., *et al.* (2001) Isolation of the New Antigen Receptor from Wobbegong Sharks, and Use as a Scaffold for the Display of Protein Loop Libraries. *Molecular Immunology*, **38**, 313-326. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00057-8](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00057-8)
- [33] 康晓圳, 曹佳莉, 张保惠, 袁权. 单域抗体的研究和应用进展[J]. 生物工程学报, 2018, 34(12): 1974-1984.
- [34] 叶波, 林影, 韩双艳. 酵母细胞表面展示系统的研究进展及其应用[J]. 工业微生物, 2007, 37(6): 56-61.
- [35] Sheehan, J. and Marasco, W.A. (2015) Phage and Yeast Display. *Microbiology Spectrum*, **3**, AID-0028-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0028-2014>
- [36] Mazor, Y., van Blarcom, T., Mabry, R., *et al.* (2007) Isolation of Engineered, Full-Length Antibodies from Libraries Expressed in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, **25**, 563-565. <https://doi.org/10.1038/nbt1296>
- [37] Boder, E.T., Raeeszadeh-Sarmazdeh, M. and Price, J.V. (2012) Engineering Antibodies by Yeast Display. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **526**, 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.03.009>
- [38] Kang, M., Choi, Y., Kim, H., *et al.* (2022) Single-Cell RNA-Sequencing of *Nicotiana attenuata* Corolla Cells Reveals the Biosynthetic Pathway of a Floral Scent. *New Phytologist*, **234**, 527-544. <https://doi.org/10.1111/nph.17992>
- [39] 徐志伟, 袁观斗, 吕军, 何松青. 单细胞测序和空间转录组技术在肝病研究中的应用进展[J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(4): 810-813.
- [40] 郭园. 核糖体展示研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 22-27.
- [41] 郑磊, 李前伟. 核糖体展示技术的研究与应用现状[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(19): 3753-3756+3763.
- [42] 张万巧, 王建, 贺福初. mRNA 展示技术[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006(8): 795-799.
- [43] 卢明锋. 体外展示技术研究进展[J]. 生命科学, 2010, 22(8): 823-830.
- [44] 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(3): 307-315.