

抗幽门螺杆菌 UreB 重组全人源化单域抗体的基因工程表达及分子改造

王雪芳^{1,2}, 赵 阳^{1,2}, 刘竹青^{1,2}, 郭 乐³, 仲飞亮^{1,2}, 罗学刚^{1,2*}

(¹ 天津科技大学生物工程学院工业发酵微生物教育部重点实验室暨 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457; ² 生物工程国家级实验教学示范中心, 天津 300457; ³ 宁夏医科大学检验学院宁夏临床病原微生物重点实验室, 银川 750004)

摘 要 为了构建针对幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 脲酶的单域抗体的基因工程表达系统。首先利用 Pymol、I-TASSER 和 ClusPro2 等 AI 辅助工具分析比较了不同抗体与 Hp 脲酶亚单位 B (UreB) 之间的分子间作用力, 确定了 VL 全人源化单域抗体 UreBAb 作为重点研究对象。根据大肠埃希菌密码子偏好性优化了 UreBAb 基因序列, 并将其分别插入 pET28a、pE-SUMO 等表达载体, 转化大肠埃希菌 Rosetta(DE3) 获得了重组表达菌株, 通过 IPTG 诱导制备重组抗体蛋白, 并利用提取的 Hp 脲酶作为抗原, 分析验证了重组表达抗体的活性。SDS-PAGE 检测结果显示 UreBAb 和 SUMO-UreBAb 均获得了正确的表达, 纯化后的蛋白产率分别为 0.34 和 0.41 mg/mL。单向免疫扩散实验结果证实这两种重组表达抗体均与 Hp UreB 抗原具有良好的亲和力, 对脲酶的抑制率分别为 51.27% 和 74.07%。进而, 结合 AlphaFold2、clustpro2、mCSM-AB、OSPREY 和 FoldX 等人工智能工具, 评估分析了影响抗原-抗体复合物稳定性的关键位点及其突变策略, 随后进一步构建了 9 个 UreBAb 进化突变体表达菌株, 活性分析结果显示, 这些突变体与抗原的结合活性均得到了提高, 其中以 I107W 突变体的活性提升最为显著, 相较于野生型 UreBAb, 提高了 24.95%。本研究为 Hp 全人源化单域抗体的开发奠定了良好的基础。

关键词 幽门螺杆菌; 脲酶; 全人源化单域抗体; 基因工程; AI 辅助分子改造

中图分类号 Q786 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)05-0666-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023122903

引用本文 王雪芳, 赵阳, 刘竹青, 等. 抗幽门螺杆菌 UreB 重组全人源化单域抗体的基因工程表达及分子改造 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(5): 666 – 672.

Cite this article as: WANG Xuefang, ZHAO Yang, LIU Zhuqing, et al. Genetic engineering and molecular modification of recombinant fully humanized single-domain antibody against *Helicobacter pylori* UreB[J]. J China Pharm Univ, 2024, 55(5): 666 – 672.

Genetic engineering and molecular modification of recombinant fully humanized single-domain antibody against *Helicobacter pylori* UreB

WANG Xuefang^{1,2}, ZHAO Yang^{1,2}, LIU Zhuqing^{1,2}, GUO Le³, ZHONG Feiliang^{1,2}, LUO Xuegang^{1,2*}

¹Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of the Ministry of Education and Key Laboratory of Industrial Microbiology of Tianjin, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457; ²National Demonstration Center for Experimental Bioengineering Education, Tianjin 300457; ³Ningxia Key Laboratory of Clinical Pathogenic Microorganisms, School of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China

Abstract To construct a recombinant expression system for a single-domain antibody targeting the urease of *Helicobacter pylori* (Hp), this study employed several strategies. First, using artificial intelligence (AI) auxiliary tools such as Pymol, I-TASSER, and ClusPro2, the molecular interactions between different antibodies and Hp urease subunit B (UreB) were analyzed. The fully humanized single-domain antibody UreBAb was identified as the primary research target. Next, the UreBAb gene sequence was optimized based on *Escherichia coli* codon preferences, and was inserted into expression vectors such as pET28a and pE-SUMO. The resulting recombinant

收稿日期 2023-12-29 * 通信作者 Tel: 022-60601104 E-mail: luoxuegang@hotmail.com

基金项目 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2020BFG02012); 国家重点研发计划项目 (2018YFA0901700; 2017YFD0400303)

expression strains were obtained by transforming *Escherichia coli* Rosetta(DE3). Recombinant antibody proteins were prepared through IPTG induction, and its activity was detected using extracted Hp urease as the antigen. SDS-PAGE analysis confirmed the correct expression of both UreBAb and SUMO-UreBAb, with protein yields of 0.34 mg/mL and 0.41 mg/mL, respectively. Unidirectional immunodiffusion experiments further confirmed that both recombinant antibodies exhibited strong affinity for Hp UreB antigen, with inhibition rates of 51.27% and 74.07%, respectively. Additionally, leveraging artificial intelligence tools such as AlphaFold2, cluspro2, mCSM-AB, OSPREY, and FoldX, the study evaluated and analyzed key binding sites and mutational strategies affecting the stability of the antigen-antibody complex. Subsequently, nine UreBAb evolution mutants were constructed, and their binding activities with the antigen were enhanced. Among these, the I107W mutant showed the most significant improvement, achieving a 24.95% increase compared to the wild-type UreBAb. This research lays a solid foundation for the development of fully humanized single-domain antibodies against Hp.

Key words *Helicobacter pylori*; urease; fully human single domain antibody; genetic engineering; AI-assisted molecular modification

This study was supported by the Key Research and Development Project of Ningxia Hui Autonomous Region (2020BFG02012) and the National Key Research and Development Program Project (2018YFA0901700; 2017YFD0400303)

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种微需氧的革兰氏阴性菌,定植在人和动物的胃中,形成慢性感染,是人类最常见的寄生细菌之一。Hp 可导致多种上消化道疾病,如慢性胃炎、消化性溃疡病、胃黏膜相关的淋巴样组织淋巴瘤(MALT)和胃癌^[1]。全世界每年有 70 多万人死于胃癌^[2],因此世界卫生组织建议考虑根除 Hp 以降低胃癌的风险^[3]。

目前,抗生素治疗是主要的 Hp 治疗方案,但存在耐药性、不利的胃酸环境、不良反应等问题^[4]。因此,发现和开发新的抗 Hp 药物变得越来越重要。研究表明,特异性抗体能有效抑制多种消化道病原体感染,在控制或治疗 Hp 感染方面也具有重要应用潜力^[5],小型化、人源化和功能化是当前基因工程抗体药物的三大主要发展趋势。小分子抗体主要包括 Fab 抗体、单链抗体(ScFv)、超变区多肽(MRU)、单域抗体等^[6]。这些小分子抗体相较于传统抗体,具备亲和力高、相对分子质量小、稳定性强、渗透性强、易于制备等优势^[7]。其中,单域抗体通常仅含有 VH 或 VL 一个功能结构域,目前被认为是保持了良好抗原识别和亲和力的最小抗体单位^[8],可以用作直接应对 Hp 等病原体和疾病进行靶向治疗的有力工具。

近年来,计算机人工智能(AI)辅助分析在药物研发中应用广泛^[9]。与传统改造方法相比,通过计算机 AI 辅助改造抗体将极大地节省时间和经济成本,能在短时间内高效获得改良后的突变体,并且能够更直观地分析抗体-抗原之间的作用关系。本

研究首先应用 Pymol、I-TASSER 和 ClusPro2 等 AI 软件比较分析不同小分子抗体与 Hp 脲酶亚单位 B(UreB)的分子间作用力,优选亲和力最佳的研究对象,然后构建其基因工程表达系统,明确其表达效率及生物活性,进而应用 Alpha Fold2、mCSM-AB、OSPREY、FoldX 等 AI 技术,对影响抗原-抗体复合物稳定性的关键位点进行分析并指导设计进化突变策略,再次构建系列突变体基因工程表达系统,通过对表达产物的分析比较,最终获得活性显著提升的进化突变体基因工程表达菌株,从而为抗 Hp 单域抗体的开发奠定良好的基础。

1 材 料

1.1 主要试剂

微需氧产气袋(日本三菱公司);幽门螺杆菌培养添加剂、幽门螺杆菌固体培养基(青岛海博生物技术有限公司);酚红指示剂、二硫苏糖醇(DTT)、苯酚红试剂、尿素(北京索莱宝科技有限公司);*Bam*H I 限制性内切酶及 *Xho* I 限制性内切酶(美国 Thermo Scientific 公司);PCR 引物和基因合成以及序列测序均由金唯智生物科技有限公司(苏州)完成。

1.2 仪 器

琼脂糖凝胶水平电泳槽(上海伯乐生命医学有限公司)、高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司)、琼脂糖水平电泳仪(北京六一仪器厂)、UV-3200 紫外可见分光光度(上海美谱达仪器有限公司)、PCR 仪

(美国 Bio-Rad Laboratories 公司)。

1.3 菌种和载体

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株、Rosetta (DE3) 菌株以及 pET28a、pE-SUMO 等质粒均由本实验室保存。

2 方法

2.1 Hp 脲酶的提取

从 Hp 培养物 (4 $^{\circ}\text{C}$, 6000 r/min, 10 min) 中收集菌体, 用 0.05 mol/L PBS 缓冲液洗涤菌体两遍后, 用 0.05 mol/L PBS 缓冲液及蛋白酶抑制剂混悬菌体, 超声破碎菌体后 4 $^{\circ}\text{C}$, 8000 r/min, 20 min, 收集上清液, 并透析 24 h。

2.2 抗 Hp 脲酶单域抗体的 AI 辅助筛选

本研究首先结合文献及数据库调研^[10-11], 并从中分析获得了 3 条抗 Hp 脲酶的小分子抗体, 分别为 SCFV (GenBank 序列号 LC373564.1)、Fab 片段 (GenBank 序列号 LC373561.1)、VL 全人源化单域抗体 (GenBank 序列号 LC375193.1), 利用 ClusPro2 软件进行 UreB-抗体的对接预测, 通过 Pymol 软件进行分子间作用力分析, 氢键筛选范围 $\leq 3\text{\AA}$ 。

2.3 表达载体的构建

抗 Hp UreB 单域抗体 (UreBAb) 的序列, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成 pUC57-UreBAb

克隆载体, 将目的片段 PCR 扩增后与 pET28a、pE-SUMO 质粒分别使用 *Bam*H I、*Xho* I 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 双酶切 2 h, 电泳后回收, 使用 T4 DNA 连接酶 25 $^{\circ}\text{C}$ 连接 1 h, 转化进 DH5 α 感受态, 挑取转化子进行验证, 将正确的菌株送测。设计合成引物如表 1 所示。

2.4 UreBAb 的外源表达、纯化

把 pET28a-UreBAb、pE-SUMO-UreBAb 成功鉴定的重组菌培养 4 h 后, 加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L), 于 20 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 条件下进行诱导培养 20 h。离心收集菌体, 超声破碎, 低温离心收集上清液, 弃沉淀。取上清液, 用 60 mol/L 咪唑进行 Ni-NTA 亲和色谱纯化目标蛋白。将纯化后的蛋白 15% SDS-PAGE 分析, 并使用 Bradford 对蛋白定量。

2.5 免疫扩散实验

将 1% 的脲酶与琼脂糖混匀, 浇注成板并在凝固后用牛津杯在平板上打孔, 孔中分别加入 UreBAb、SUMO-UreBAb 100 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下静止反应 24~36 h, 此时脲酶会向孔的四周扩散并与琼脂中的 UreBAb、SUMO-UreBAb 结合, 形成白色沉淀环。

2.6 重组 UreBAb 对 Hp 脲酶活性抑制率的测定

将 Hp 脲酶 50 μL 和抗体 50 μL 混合, 在 96 孔微量滴定板中于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。然后向上述混合物中加入酚红指示剂 100 μL , 并在 23 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h 以上, 在 550 nm 处测量显色, 并计算抑制率。

Table 1 Primers used in plasmids construction

Primer	Primer sequence(5'→3')	Purpose
pET28a-UreBAb-F	CGCGGATCC ACCGATATTCAGATGACG	Used to amplify the target gene UreBAb
pET28a-UreBAb-R	CCGCTCGAGATGATGATGATGATGATGCGC	
K43T-F	CAGCAGAAACCGGGACCGCGCCGAAACTGCTGATTTATG	Mutation for K43T and K43M
K43M-F	CAGCTATCTGAACTGGTATCAGCAGATGCCGGGCAAAGCGCC	
K43L-F	CAGCTATCTGAACTGGTATCAGCAGCTGCCGGGCAAAGCGCC	
K43-R	CAGCAGTTTCGGCGCCGTGCCCGTTTCTGCTGATACC	
E82W-R	ATAGGTCGCAAAATCCCACGGCTGCAGGCTACTAATGGTCA	Mutation for E82W
E82W-F	AGTAGCTGCAGCCGTGGGATTTTGCAGCTATTATTGTCAGCAGT	
I107P-F	CTTTGGCCAAGGCACCAAAGTGAACCGAAACGCGCGCGGCG	Mutation for I107P, I107W, and I107F
I107W-F	GGCACCAAAGTGGAATGGAAACGCGCGGCGCG	
I107F-F	GGCACCAAAGTGGAATTTAAACGCGCGGCGCG	
I107-R	CGCCGCGCGCGTTTAAATTCACCTTTGGTGCC	
R109N-F	AAAGTGGAATTAATAACGCGCGGCGCGCATCA	Mutation for R109N and R109P
R109P-F	AAAGTGGAATTAATAACGCGCGGCGCGCATCA	
R109-R	ATGATGCGCCGCGCGGTTTAAATTCACCTTTGGTGCCCTTGCC	

Note: Underlined bases are enzyme cleavage sites, while bolded ones are protective bases

2.7 AI 辅助抗体进化突变分析与设计

利用 Alpha fold2 对 UreBAb 结构进行同源建模^[12],评估后进行模拟蛋白对接,从 PDB 数据库获取抗原 Hp 脲酶 6EHW 的 pdb 文件,除去离子等干扰因素后,使用 ClusPro2 进行模拟对接。对突变位点的分析,为了尽可能避免漏掉关键氨基酸位点,本研究同时选择 Interprosulf 和 Pymol 两种方法来分析确定突变位点。进而,对重组单域抗体进行突变评估,通过 3 种鉴定方法(i-mutant、FlodX 和 mCMS-AB)^[13],将筛选出的位点突变成其他 19 种氨基酸。

2.8 数据分析

用 GraphPad Prism5 软件进行数据统计学分析,对两组样本采用 Student's *t*-test 比较差异显著

性, $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结 果

3.1 抗 Hp 脲酶小分子抗体的筛选及与脲酶 (UreB) 对接的构效关系分析

首先,利用 Pymol、I-TASSER 及 ClusPro2 等软件,对 UreB 与 SCFV、Fab 片段抗体、VL 全人源化单域抗体等不同小分子抗体之间的分子间作用力进行分析。结果显示 VL 全人源化单域抗体与 UreB 间的相互作用力显著强于 SCFV 和 Fab,其结构与 PDB 数据库中的 6EHW 结构模型的匹配评分最高(图 1),因此,后续重点选择此抗体进行研究,为方便表述,在下面的研究中把该抗体命名为 UreBAb。

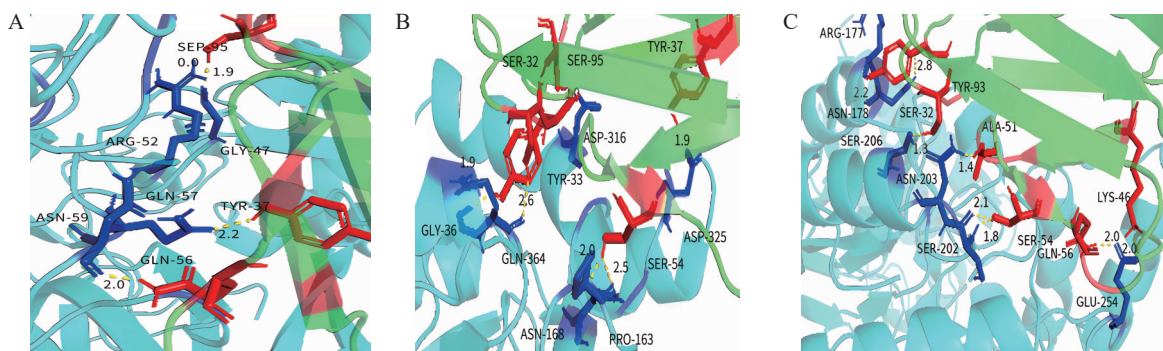


Figure 1 Three-dimensional docking prediction analysis of antibody and UreB (Pymol)

A: Prediction of docking between Fab and UreB; B: Prediction of docking between SCFV and UreB; C: Prediction of docking between engineered VL and UreB

3.2 抗 Hp 脲酶 UreBAb 基因工程重组菌株的构建及其表达与纯化

如图 2-A 和图 2-B 所示,在成功扩增目的基因 UreBAb 后,进一步构建了 pE-SUMO-UreBAb、pET 28a-UreBAb 重组质粒,并通过测序确认了序列的准确性。由图 2-C 和图 2-D 可知,经过 ITPG 于 20 °C, 200 r/min 诱导 15 h 后,转入 pE-SUMO-UreBAb、pET28a-UreBAb 的重组大肠埃希菌 Rosetta(DE3) 均可检测到目的蛋白的表达,亲和色谱纯化后通过 Quick Start Bradford 蛋白定量,结果显示 SUMO-UreBAb、UreBAb 的重组蛋白产率分别为 0.41 和 0.34 mg/mL。

3.3 重组单域抗体与脲酶的亲和力及抑制活性分析

如图 3-A 和图 3-B 所示,基因工程表达产物 SUMO-UreBAb、UreBAb 与脲酶孵育后,均有白色

沉淀环形成,证明重组抗体可以和脲酶抗原具有良好的亲和力。此外,为进一步证明抗体 SUMO-UreBAb、UreAb 对脲酶的抑制活性,分析了其对脲酶分解尿素能力的影响。由于脲酶能分解尿素产生碱,会造成 pH 的变化,这种变化可通过酚红试剂的颜色变化进行观测,并可以测定 550 nm 处吸收度变化进行定量分析。由图 3-C 可得出,重组 SUMO-UreBAb、UreBAb 可以有效地中和脲酶,使之活性降低。

为了进一步比较 SUMO-UreBAb、UreBAb 的活性特点,将纯化后的产物与脲酶按 1:1 的量分别在 4 °C、16 °C、23 °C、30 °C 孵育过夜,后加入尿素、酚红等反应 6~10 h。结果如图 4 所示,重组 SUMO-UreBAb 和 UreBAb 在 23 °C 抑制效率最高,分别为 74.07% 和 51.27%。

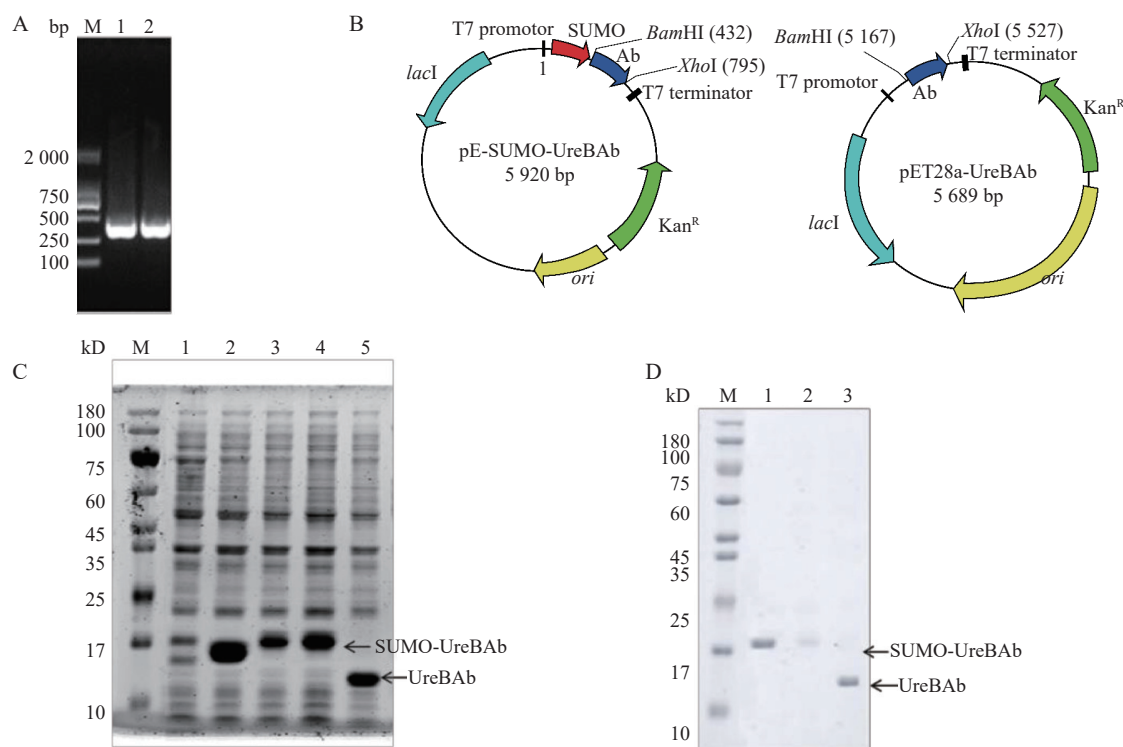


Figure 2 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant expression plasmid of UreBAb

A: PCR verification of the transformant (M: DNA 2000bp marker; 1: pE-SUMO-UreBAb; 2: pET28a-UreBAb); B: Schematic diagram of plasmid pE-SUMO-UreBAb and pET28a-UreBAb; C: Total protein of recombinant *E. coli* carrying pE-SUMO-UreBAb and pET28a-UreBAb (20 °C, 15 h) (M: Protein Marker; 1: pET28a; 2: pE-SUMO; 3-4: Different concentrations of pE-SUMO-UreBAb; 5: pET28a-UreBAb); D: Purified SUMO-UreBAb and UreBAb (M: Protein Marker; 1-2: Purification of SUMO-UreBAb at different concentrations; 3: Purified UreBAb)

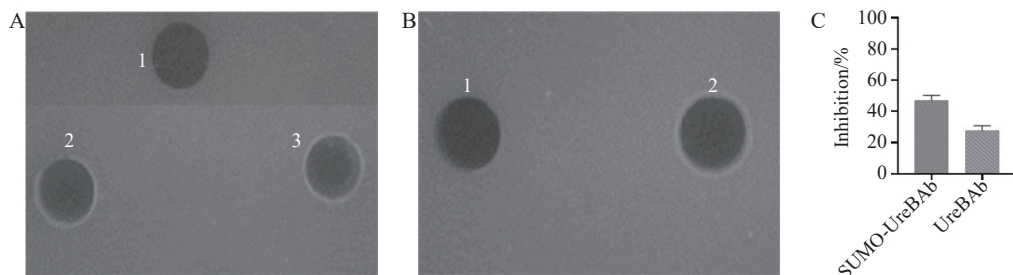


Figure 3 Affinity and activity analysis of recombinant SUMO-UreBAb and UreBAb with urease ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: Affinity of recombinant SUMO-UreBAb with urease (1: PBS; 2-3: SUMO-UreBAb); B: Affinity of r UreBAb with urease (1: PBS; 2: UreBAb); C: Analysis of the effect of recombinant SUMO-UreBAb and UreBAb on urease activity

3.4 单域抗体分子动力学分析及其进化设计

为了进一步提升单域抗体的活性,应用 AI 工具对其进行了同源建模及分子动力学分析。首先,运用 ClusPro2 对抗体-抗原复合物进行对接,分析了其三维结构(图 5-A)。在这个结构中,脲酶被灰色标识,抗体则以蓝色呈现。其中,红色部分代表了预测的对接位点,这些位点是通过 Pymol 及 Interprosulf 精确预测出的距离不超过 5Å 的氨基酸残基。其次,如图 5-B 所示,韦恩图中蓝色代表

mCSM-AB、黄色代表 FoldX、绿色代表 i-mutant,三者交叉部分表示通过 3 轮不同计算后所共有的进化突变关键位点情况。这 9 个 AI 预测推荐突变体分别为 K43L、K43T、K43M、E82W、I107P、I107W、I107F、R109P、R109N。

3.5 单域抗体突变体表达菌株的构建、重组表达及其活性分析

为了验证 AI 预测突变体的活性,本研究进一步构建了上述 9 种不同的突变体,PCR 及测序结果

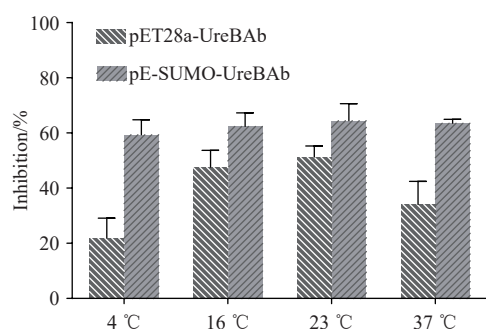


Figure 4 Inhibition rate of SUMO-UreBAb and UreBAb against urease antigen at different temperatures ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

均显示构建成功(图 6)。

转化获得重组表达菌株并经诱导表达后,9 种突变体重组蛋白质均得到了良好的表达(图 7-A)。进一步分析显示,9 种重组单域抗体突变体与抗原的结合及抑制活性均得到了提高,其中最为显著的是 107 位点的异亮氨酸突变为色氨酸的突变体 I107W,与原始抗体 UreBAb 相比,其结合活性提高了 24.95%,达到了 66.57%。

4 讨论

Hp 会导致严重的健康问题,抗体治疗可以有效避免传统抗生素治疗带来的危害,本研究中的单

域抗体能特异性针对 Hp 的脲酶,脲酶作为 Hp 的关键酶,是其生存不可或缺的部分。它可以把体液中的尿素分解并产生大量的氨,来缓冲胞质和胞外的 pH^[14-15]。这样一方面可以中和胃酸以保护自己免受杀灭,同时也使胃黏液细胞减少分泌黏液,造成黏液层变薄^[16]。

本研究结合 AI 分析,优选了抗 Hp 单域抗体,并构建了系列基因工程表达菌株。尽管 SUMO 标签可能有助于提高蛋白的溶解度和稳定性,但单点突变通常是为了研究特定氨基酸残基对蛋白质功能的影响。因此在后续单点突变的过程中,使用的不带标签的 Ab 可以确保任何观察到的功能变化都是由突变引起的,并且可以简化纯化过程,减少生产成本,避免潜在后续研究中产生免疫原性问题等。根据抗原抗体复合物三维结构进行的 AI 分析结果显示,I107 位点位于 UreAb 的活性口袋,位点 107 与抗原的位点 541Y 之间存在氢键作用,经过重组表达及活性分析,也证实 107 位点的异亮氨酸突变为色氨酸后单域抗体对 Hp 的抑制率的确得到了显著的提升。究其原因,可能是因为异亮氨酸到色氨酸的突变增强了氢键作用,且引起了疏水性和结构上的差异变化。异亮氨酸通常具有较高的亲疏水性,而色氨酸的大芳香环状结构可能与脲酶形

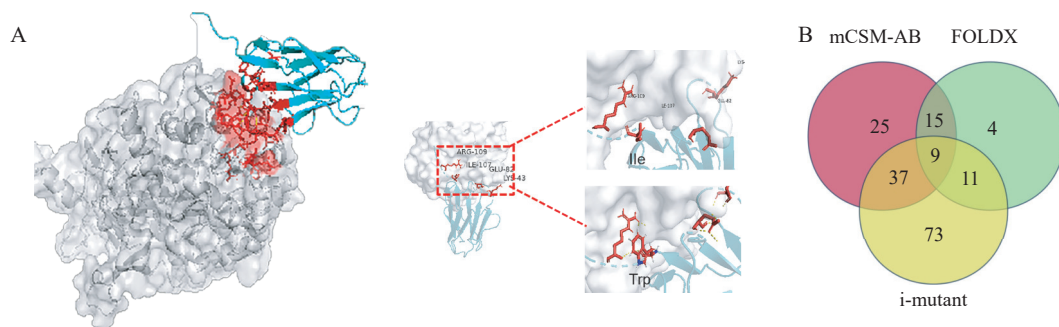


Figure 5 Rational mutation of UreBAb based on AI analysis

A: Structure of antigen-antibody docking complex (the red part is the predicted binding site); B: Prediction sites of mCSM-AB, FoldX, and i-mutant

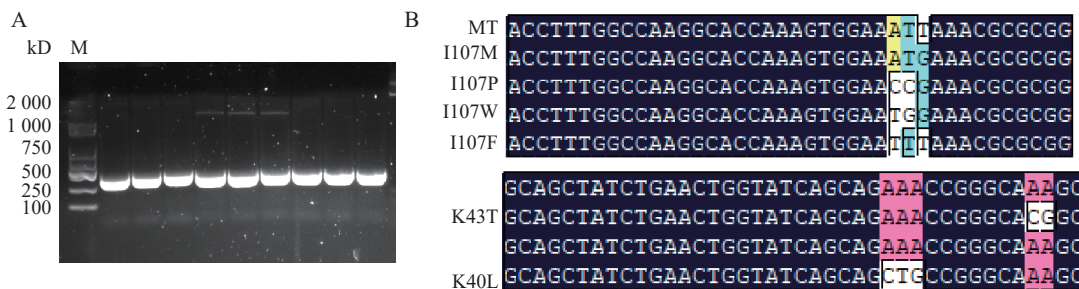


Figure 6 PCR and sequencing analysis for UreBAb mutations

A: PCR analysis of mutation clones; B: Sequencing confirmation of the UreBAb mutants

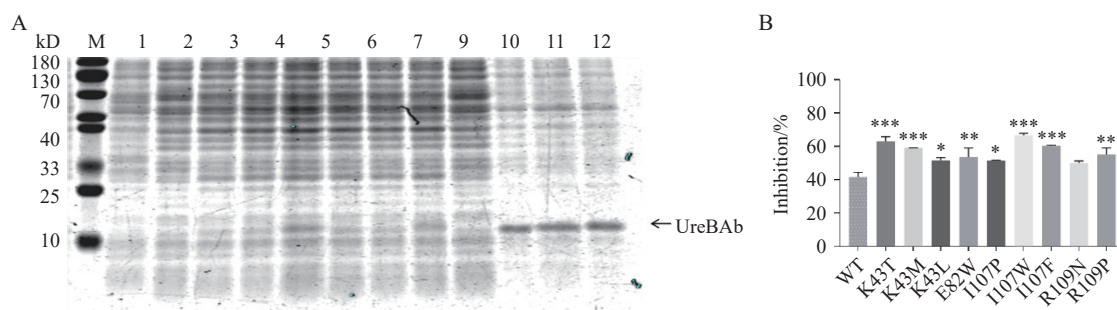


Figure 7 Recombinant expression and activity analysis of mutated UreABs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A: SDS-PAGE analysis of recombinant wild-type UreBAb and 9 mutant UreABs (M: Protein Marker; 1:Blank Control;2-3:WT; 4: K43M; 5: K43L; 6: E82W; 7: I107P; 8: R109P; 9: R109N; 10: K43T; 11: I107W; 12: I107F); B: Antigen (urease) inhibition rate of UreBAb and 9 mutants at 37 °C
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs UreBAb

成更紧密的结合。此外,蛋白质结构变化也可能影响了抗体的功能性区域,使其更有效地与脲酶相互作用。

此外,大肠埃希菌虽然是目前最为成熟的基因工程表达体系,但其安全性依然存在不足,所表达的重组单域抗体必须进行分离纯化后方可应用。而 Hp 作为一种经口而入的胃内寄生性病原体,如能实现单域抗体的口服递送及病灶原位拮抗,将具有重要的意义。未来的研究中,本课题组将在进一步优化大肠埃希菌表达工艺的同时,构建益生菌等更安全、更便捷的重组表达系统,以探索抗 Hp 单域抗体的口服递送。

References

- [1] Luo JS, He M, Yang GQ. Clinical diagnosis, formation mechanism and clinical treatment of gastric cancer[J]. *Genomics Appl Bio*(基因组学与应用生物学), 2021, **40**(2): 936-940.
- [2] Banks M, Graham D, Jansen M, et al. British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of patients at risk of gastric adenocarcinoma[J]. *Gut*, 2019, **68**(9): 1545-1575.
- [3] Malfertheiner P, Camargo MC, El-Omar E, et al. *Helicobacter pylori* infection[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2023, **9**(1): 19.
- [4] Tshibangu-Kabamba E, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance—from biology to clinical implications[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, **18**: 613-629.
- [5] Boquet P, Ricci V. Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin[J]. *Trends Microbiol*, 2012, **20**(4): 165-174.
- [6] Qin Q, Liu H, He WB, et al. Single Domain Antibody application in bacterial infection diagnosis and neutralization[J]. *Front Immunol*, 2022, **13**: 1014377.
- [7] Rossotti MA, Bélanger K, Henry KA, et al. Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies[J]. *FEBS J*, 2022, **289**(14): 4304-4327.
- [8] Wang Y, Zhao YJ, Li S. Application of nano-antibodies in the study of g protein-coupled receptors[J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2022, **57**(4): 990-1001.
- [9] Barderas R, Desmet J, Timmerman P, et al. Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(26): 9029-9034.
- [10] Fouladi M, Sarhadi S, Tohidkia M, et al. Selection of a fully human single domain antibody specific to *Helicobacter pylori* urease[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, **103**(8): 3407-3420.
- [11] Fahimi F, Sarhaddi S, Fouladi M, et al. Phage display-derived antibody fragments against conserved regions of VacA toxin of *Helicobacter pylori*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, **102**(16): 6899-6913.
- [12] Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, et al. ColabFold: making protein folding accessible to all[J]. *Nat Methods*, 2022, **19**(6): 679-682.
- [13] Cheng X, Wang JW, Kang GB, et al. Homology modeling-based in silico affinity maturation improves the affinity of a nanobody[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(17): 4187.
- [14] Elbehiry A, Marzouk E, Aldubaib M, et al. *Helicobacter pylori* infection: current status and future prospects on diagnostic, therapeutic and control challenges[J]. *Antibiotics*, 2023, **12**(2): 191.
- [15] De Brito BB, Da Silva FAF, Soares AS, et al. *Helicobacter pylori* pathogenesis and clinical management of gastric infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, **25**(37): 5578-5589.
- [16] Yu HZ, H J, Li BC, et al. Effect of carboxymethyl chitosan bismuth salt on gastric ulcer of *Helicobacter pylori* in rats[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2008, **39**(2): 174-177.