



猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白单链抗体的制备及鉴定

顾小玉^{1,2}, 贾雪寅^{1,2}, 刘小惠^{1,2}, 于学祥^{1,2,3,4}, 李文涛^{1,2,3,4,5}, 何启盖^{1,2,3,4*}

(1. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070; 2. 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 武汉 430070;
3. 农业农村部兽用诊断制剂创制重点实验室, 武汉 430070; 4. 国家伪狂犬病参考实验室, 武汉 430070;
5. 湖北江夏实验室, 武汉 430200)

摘要: 2011年以来,我国新流行的猪伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)变异毒株大大增加了该病毒抗体的检测工作量,阻断ELISA试剂盒的大量使用增加了对单克隆抗体的需求量,但杂交瘤细胞在传代过程中容易失去抗体分泌能力。本研究旨在基于单克隆抗体制备出具有良好结合活性、可在原核系统大量表达的单链抗体(scFv)。本研究将原核表达的PRV gE蛋白免疫小鼠,经细胞融合及筛选得到稳定分泌针对PRV gE蛋白单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞,以阳性杂交瘤细胞的cDNA为模板扩增得到抗体可变区序列,将重链和轻链可变区序列由Linker连接得到scFv基因,克隆到pET-28a质粒进行原核表达,对得到的重组抗体进行鉴定。结果显示:本研究获得了一株特异性针对PRV gE蛋白的单克隆抗体7B7,以7B7杂交瘤细胞的cDNA为模板,成功制备了能够特异性与PRV gE蛋白反应的单链抗体,并且能够通过原核表达系统进行表达。本研究为猪伪狂犬病病毒新型检测方法的开发提供了基础。

关键词: 猪伪狂犬病; gE蛋白; 单链抗体

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0317-10

Preparation and Identification of Single Chain Variable Fragment Antibodies against gE Protein of Pseudorabies Virus

GU Xiaoyu^{1,2}, JIA Xueyin^{1,2}, LIU Xiaohui^{1,2}, YU Xuexiang^{1,2,3,4}, LI Wentao^{1,2,3,4,5}, HE Qigai^{1,2,3,4*}

(1. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China; 3. Key Laboratory of Development of Veterinary Diagnostic Products of the Ministry Agricultural and Rural Affairs, Wuhan 40030, China;
4. National Reference Laboratory for Pseudorabies, Wuhan 40030, China;
5. Hubei Jiangxia Laboratory, Wuhan 430200, China)

Abstract: Since 2011, the new outbreak of pseudorabies virus (PRV) variant strain in China has greatly increased the detection workload of the virus. At present, the widely use of blocking ELISA kits has raised the greater demand for monoclonal antibodies. However, hybridoma cells often lose antibody secretion capacity during passages. This study aimed to prepare single-chain fragment variable with good binding activity on the basis of monoclonal antibody and achieve large-scale production via prokaryotic expression system, providing a foundation for novel detection methods. The prokaryotically expressed PRV gE protein was used to immunize mice. Positive hybridoma cells

收稿日期: 2025-03-18

基金项目: 国家生猪产业技术体系(CARS-35); 湖北省自然科学基金(2024AFB172); 国家重点研发计划(2024YFD1800500)

作者简介: 顾小玉, 硕士生, 主要从事猪伪狂犬病病毒研究, E-mail: guxiaoyu@webmail.hzau.edu.cn

* 通信作者: 何启盖, 主要从事猪传染病防控与净化研究, E-mail: he628@mail.hzau.edu.cn

stably secreting anti-PRV gE mabs were obtained through cell fusion and screening. The cDNA of the positive hybridoma cells was used as a template to amplify the variable region sequence of antibody, and the scFv gene was constructed by linking the variable regions of heavy and light chain with a Linker peptide. The scFv gene was cloned into pET-28a plasmid for prokaryotic expression to produce the recombinant antibody. A monoclonal antibody 7B7 specific to the gE protein of PRV was successfully screened. Using the cDNA of 7B7 hybridoma cells as a template, a single chain fragment variable capable of specifically reacting with PRV gE was successfully prepared which can be expressed by prokaryotic expression system, providing a basis for the development of new detection methods for PRV.

Keywords: pseudorabies virus; gE protein; single chain fragment variable

*** Corresponding author:** HE Qigai, E-mail: he628@mail.hzau.edu.cn

猪伪狂犬病(pseudorabies, PR)是由猪伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)引起的多种家畜及野生动物感染的急性、热性传染病^[1]。该病造成仔猪高热、食欲减退、神经障碍、呼吸困难等症状,妊娠母猪感染多发生繁殖障碍,如流产、产死胎和木乃伊胎,种公猪感染后睾丸肿胀、萎缩,种用性能降低和丧失^[2]。多数国家采用基因缺失疫苗和鉴别诊断方法结合的策略净化了伪狂犬病,我国猪场伪狂犬病流行情况也得到了有效控制,但2011年变异毒株的出现,使我国多地猪场暴发猪伪狂犬病,如研究人员在2019—2023年从广西819份疑似感染病料中分离出了36株PRV毒株,其中30株与变异毒株同源性高^[3];同时,2023年,天津分离到的基因II型TJ bd 2023毒株,主要毒力基因发生了突变,具有高致病性^[4]。本实验室分离鉴定了PRV HNX毒株(登录号:KM189912.1)。变异毒株流行率高、流行范围广,病毒传播速度快^[5],毒力普遍增强^[6],且混合感染现象越来越严重,给我国养殖业带来了巨大的经济损失。

单链抗体(single chain fragment variable, scFv)是由抗体重链可变区(variable domain of heavy chains, V_H)和轻链可变区(variable domain of light chains, V_L)通过连接肽连接形成的基因工程抗体^[7],连接短肽(linker)由15~20个氨基酸组成,通常为一段由3个Gly和Ser组成的重复短肽,称为 $(Gly_3Ser)_3$,连接肽在单链抗体的折叠方式和溶解度等方面起着重要作用^[8]。相较于完整的单克隆抗体,单链抗体的分子质量更小,穿透力更强,能够穿透组织和血管到达病灶位置,临床上可用于偶联药物提高治疗效果^[9-10],由于分子量小,它能从血液和非目标组织中快速清除^[11];同时由于单链抗体包含

轻链可变区和重链可变区,其抗原结合位点与单克隆抗体相同,能够特异性结合抗原;加之单链抗体不含Fc片段,免疫原性降低而特异性升高^[12];在检测方面,单链抗体的特异性比全链抗体高8倍~16倍;单链抗体还可通过蛋白表达系统进行制备,产量更高,成本更低,同时减少了实验动物的使用^[13-14];将scFv作为成像探针可以定向检测靶向抗原,快速作出诊断,例如带6×His标签的单链抗体能够特异性地检测痤疮丙酸杆菌和绿脓杆菌^[15]。由于单链抗体有着独特优势,其在各类动物疾病的防控中有较大的应用价值。

猪伪狂犬病病毒gE蛋白为非必需囊膜蛋白,与病毒毒力相关^[16]。多数国家通过免疫gE基因缺失疫苗配合使用鉴别诊断方法完成了对猪伪狂犬病的净化。本研究以gE蛋白免疫小鼠,筛选能稳定分泌特异性识别gE蛋白抗体的杂交瘤细胞,设计引物,以杂交瘤细胞cDNA为模板扩增得到scFv序列,经过原核表达得到具有良好反应活性的单链抗体。

1 材料与方法

1.1 材料

猪肾上皮细胞(PK-15)、SP2/0骨髓瘤细胞和PRV HNX毒株(登录号:KM189912.1)均由本实验室保存,大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞购自上海昂羽生物技术有限公司,PRV HNX pET28a-gE表达质粒由本实验室构建和保存。三周两针快速单抗制备佐剂(QuickAntibody-Mouse3W)购自博奥龙生物科技有限公司。HRP-conjugated Mouse anti His-Tag mAb(货号:AE028)、ABflo 488-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L)(货号:AS076)和

HRP Goat Anti-Swine IgG (H+L) (货号:AS004) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PRV gE 蛋白的原核表达及纯化 将带有原核表达质粒 PRV HNX pET28a-gE 的大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞吸取适量至 LB(Kana) 中振荡培养至菌液 OD_{600nm} 值为 0.6 左右,加入 0.4 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 于 16 °C 诱导表达 20 h。同时,使用含有 pET-28a 空载体的菌作空白对照。将诱导好的菌液使用超声破碎仪进行破碎、离心,收集上清液和沉淀。对包涵体蛋白使用尿素变性复性的方法进行纯化^[17]。将纯化前以及纯化后的样品进行 SDS-PAGE,将凝胶上的蛋白样品转印至 PVDF 膜上,以 PRV 感染阳性猪血清为一抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗猪抗体为二抗进行 Western blot 试验。

1.2.2 小鼠免疫与抗体水平测定 采用三周快速免疫佐剂制备免疫原进行免疫:按每次免疫小鼠需 100 μL 计算,首先用生理盐水稀释抗原(1~5 μg 用量)至 50 μL,再与相同体积佐剂迅速混匀。通过后肢肌肉注射免疫小鼠,每只小鼠 100 μL;第 14 天按同样的方法加强免疫一针;第 21 天采微量尾血进行 ELISA 测定,抗体滴度达到 1:10 000 后可取小鼠脾细胞进行细胞融合,否则需要加强免疫。加强免疫时每只小鼠腹腔注射抗原 10 μg,不加任何佐剂。

1.2.3 间接 ELISA 主要步骤 以 PRV gE 蛋白为抗原按 1 μg·mL⁻¹ 的浓度于 4 °C 包被酶标板 16 h,每孔 100 μL;用 50 g·L⁻¹ 脱脂奶封闭酶标板,每孔 200 μL,37 °C,孵育 2 h,用 PBST 清洗,加入稀释的待检血清,每孔 100 μL,于 37 °C 孵育 1 h,洗板后加入 1:10 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,每孔 100 μL,37 °C 孵育 45 min;洗板后每孔加入底物四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine,TMB)100 μL,室温下避光显色 15 min,加入终止液,测定 OD_{450nm} 值。

1.2.4 细胞融合及杂交瘤细胞株的筛选 无菌摘取小鼠脾脏提取脾细胞,与 SP2/0 骨髓瘤细胞在 PEG4000 的作用下进行细胞融合,将融合的细胞加入带有饲养细胞的 96 孔板上,用带有 HAT 的完全 1640 培养基进行培养,融合后第 7 天将培养液半量换成带 HT 的完全 1640 培养基,第 9 天将培养液均换成带 HT 的完全 1640 培养基。观察细胞集落大小,在长至孔的 1/4 时用间接 ELISA 检测细胞上清,筛选 ELISA 阳性孔;对 ELISA 阳性孔吸取上清

进行间接免疫荧光试验验证。

1.2.5 间接免疫荧光试验步骤 将 PK-15 细胞接种到 96 孔板中,待细胞长至 70% 时按 200 TCID₅₀ 接种 PRV HNX 毒株;待细胞出现明显细胞病变时弃掉培养基,加入 4 mL·L⁻¹ 多聚甲醛固定细胞 10 min,PBST 清洗三次,加入 50 g·L⁻¹ BSA 于 37 °C 封闭 2 h,加入 ELISA 阳性细胞孔的上清(作为一抗),37 °C 孵育 1 h;二抗为 1:200 稀释的 AF488 荧光染料偶联的羊抗鼠 IgG 抗体,避光孵育 1 h;加入 1:10 000 稀释的 DAPI 室温避光孵育 10 min;PBST 洗三次加入适量 PBS,于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.6 V_H 及 V_L 基因的扩增 通过 Trizol 法提取分泌单抗的杂交瘤细胞的总 RNA 后,反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板,用引物(表 1)分别进行扩增抗体轻链、重链可变区基因。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,30 个循环;72 °C 终延伸 7 min。

1.2.7 pET28a-scFv 基因的构建及 scFv 基因的表达 将测序得到的 V_H、V_L 基因之间加入连接肽序列,进行密码子优化后送擎科生物科技公司合成。将 scFv 基因和 pET-28a 载体均用 BamH I 和 Hind III 限制性内切酶 37 °C 双酶切 1 h。胶回收纯化后使用 T4 连接酶 16 °C 连接 2 h,采用热激法转化至 DH5α,再涂布 LA(Kana)固体培养基;第二天挑取单菌落,用 T7 通用引物进行菌液 PCR,条带大小正确后送至擎科生物科技公司进行测序。将测序正确的质粒转化至 BL21(DE3)感受态细胞中,在 37 °C 振荡培养至 OD_{600nm} 约为 0.6 时,加入 0.01 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 于 37 °C 振荡培养 6 h。将诱导好的菌液使用超声破碎仪破碎后分别收集上清液和沉淀,进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.8 重组抗体 ELISA 检验 将 PRV 病毒粒子按 3 μg·mL⁻¹、PRV gE 蛋白按照 1 μg·mL⁻¹ 包被 ELISA 板,加入制备的重组抗体为一抗,二抗为 1:5 000 稀释的 HRP 标记的鼠抗 His 标签抗体,其他步骤同“1.2.3”。

2 结果

2.1 PRV gE 蛋白的原核表达及纯化

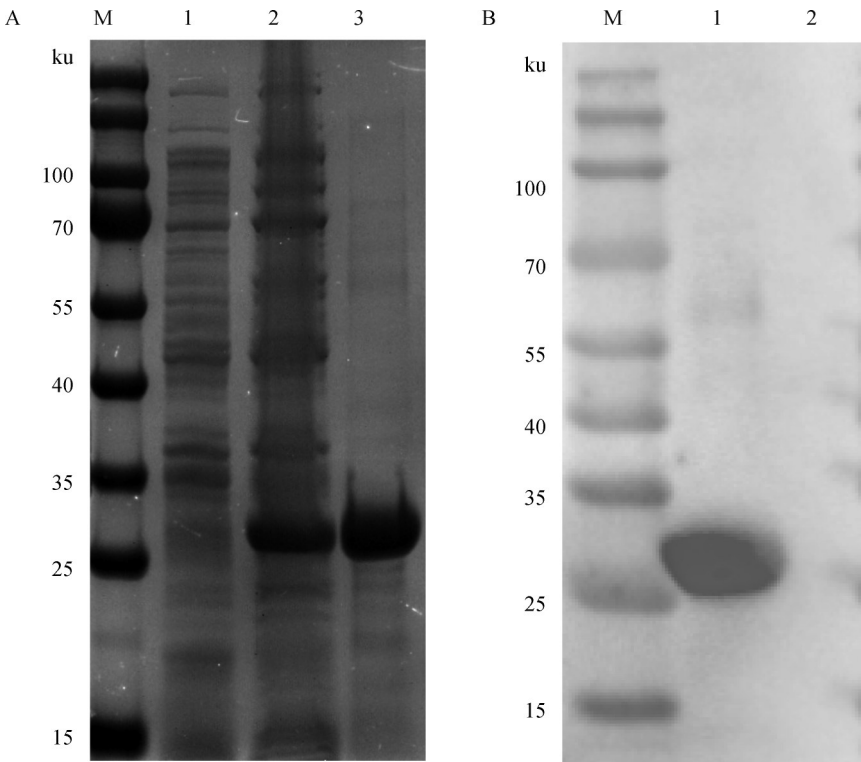
将纯化前的表达菌液与纯化后得到的蛋白制样进行 SDS-PAGE 试验,结果如图 1A。由图可知,纯化前目的菌表达蛋白的条带大小在 26 ku 处,空载菌作为阴性对照,没有该条带;且纯化后可得

表 1 抗体轻链、重链可变区扩增引物序列

Table 1 Primer sequences for amplifying the variable domains of light and heavy chains of antibody

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer sequences
LF1	TGACCAAGCTTGCGGCCGCGGATACAGTTGGTGCAGCATC
LF2	GATRTTKTGATGACCCARASTCCACT
LR1	TACAHHATCCACGCGTACAAATTGTTCTCACCCAGTCT
LR2	CCGTTTGATTTCAGCTTGGTGCC
LR3	CCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC
LR4	CCGTTTTATTTCCAACCTTGTCCC
LR5	CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC
HF1	GGCCAGTGGATAAAGCTTTGGGGGTGTCGTTTTGGC
HF2	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC
HR1	GAATAGGCCATGGCGGAGGTCCAGCTGCAACAATCT
HR2	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG

R,K,S,H,M,W 代表简并碱基;R=A/G,K=G/T,S=G/C,H=A/T/C,M=A/C,W=A/T
R, K, S, H, M, W represent degenerate bases; R=A/G, K=G/T, S=G/C, H=A/T/C, M=A/C, W=A/T



A. SDS-PAGE[M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 阴性对照(空载大肠杆菌);2. 未纯化蛋白;3. 纯化后 gE 蛋白];B. Western blot(M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 纯化后 gE 蛋白;2. 阴性对照)
A. SDS-PAGE (M. Protein marker; 1. Negative control (*E. coli* BL21); 2. Unpurified protein; 3. Purified gE protein); B. Western blot (M. Protein marker; 1. Purified gE protein; 2. Negative control)

图 1 PRV gE 蛋白的纯化及鉴定

Fig. 1 Purification and identification of PRV gE protein

到大小相同的单一条带。将得到的目的蛋白与空
载菌均进行制样,并以 PRV 阳性血清为一抗, HRP 偶联的山羊抗猪抗体为二抗做 Western blot, 结果如图 1B。由图可知,目的蛋白在 26 ku 处与

抗体发生反应产生明显条带,不含目的片段的空载菌作为阴性对照组则没有此条带,表明 gE 蛋白正确表达。

2.2 单克隆抗体的鉴定

用筛选得到的杂交瘤细胞接种小鼠,制备的腹水使用间接 ELISA 方法进行效价测定,得出单抗

7B7 株的腹水效价约为 1:102 400;并鉴定出该株抗体为 IgM,轻链为 κ 链。

IFA 结果显示(图 2),单克隆抗体 7B7 能够与感染了 PRV HNX 的 PK-15 细胞发生特异性结合反应,发出绿色荧光;而与未感染病毒的 PK-15 细胞不发生特异性结合反应,观察无绿色荧光。

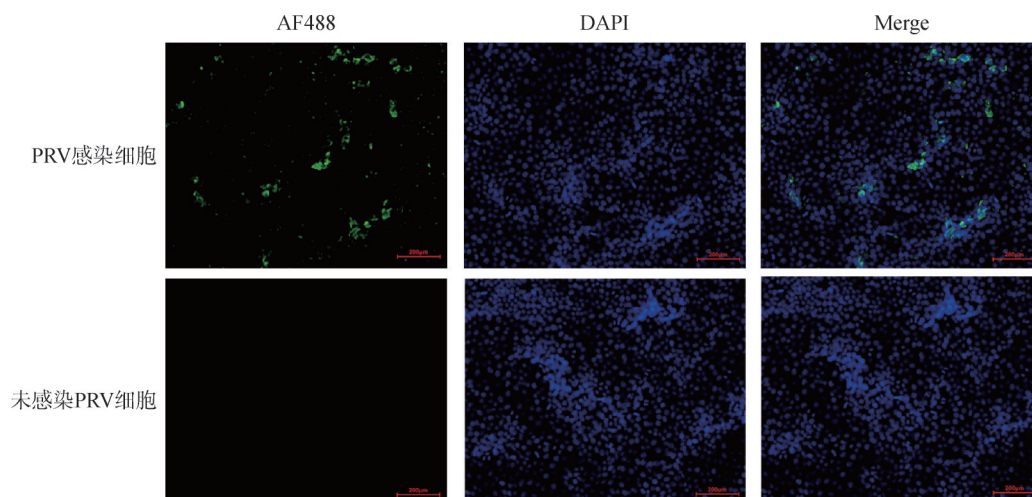
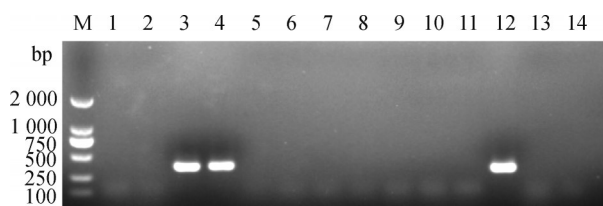


图 2 单抗间接免疫荧光鉴定(标尺=200 μm)

Fig. 2 Indirect immunofluorescence identification of monoclonal antibody (bar=200 μm)

2.3 V_H 、 V_L 基因的扩增

将上游引物与下游引物组合进行 PCR 反应,由泳道 3、4 可知引物 LR4、LR5 与 LF2 可扩增出 V_H 基因,大小为 330 bp,泳道 12 扩增出条带表明引物 HF2 与 HR2 可扩增出 V_L 基因,大小为 339 bp。



M. DNA 相对分子质量标准;1. LR1-LF1; 2. LR2-LF2; 3. LR3-LF2; 4. LR4-LF2; 5. LR5-LF2; 6. LR1-LF2; 7. LR2-LF1; 8. LR3-LF1; 9. LR4-LF1; 10. LR5-LF1; 11. HF1-HR1; 12. HF2-HR2; 13. HF1-HR2; 14. HF2-HR1

图 3 抗体轻链可变区、重链可变区编码序列的扩增

Fig. 3 Amplification of V_L and V_H domain encoding monoclonal antibody

2.4 抗体序列分析

使用 IMGT 网站对所得单链抗体序列进行分析,抗体重链可变区大小为 330 bp,重链可变区序列为有效 IGH 重排序列,可正常翻译为功能性抗体,该序列与 IGHV1-9*02E 相似性达到了 97.64%;抗体轻链可变区大小为 345 bp,为有效 IGK 重排序列,可以正常翻译,与 IGKV-117*01F 相似性高达 98.30%。

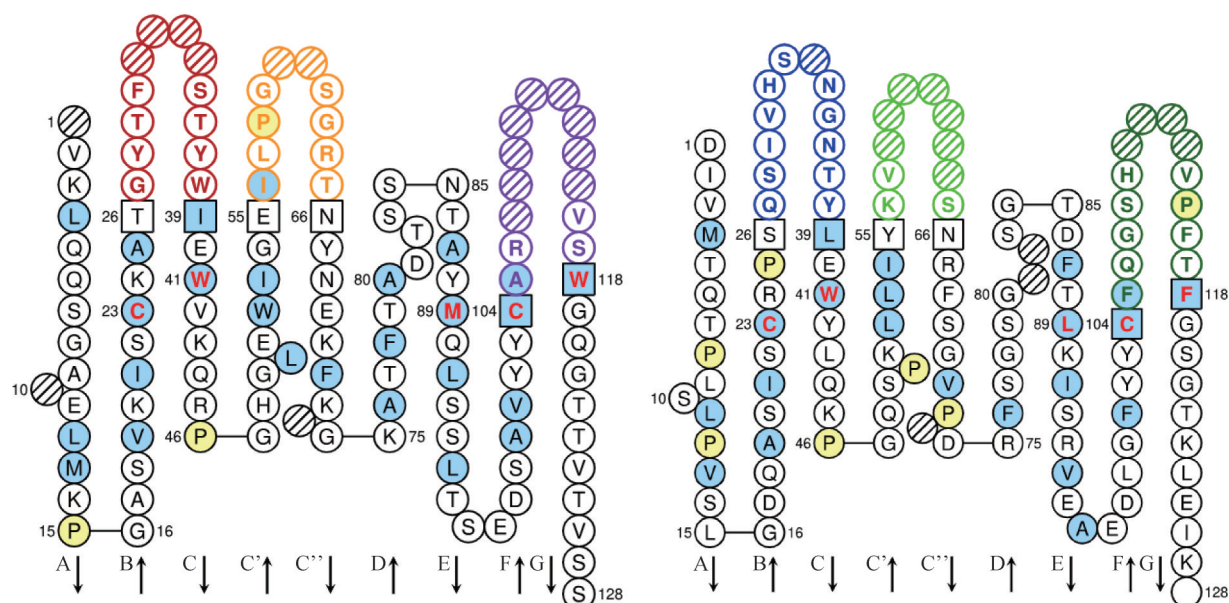
根据 IMGT Collier de Perles 图(图 4)显示,轻重链可变区均有完整的 CDR 区结构,可变区中含有 9 个反向平行 β 折叠片层结构,这些片层通过链内二硫键紧密结合,形成球状的 F_v 段。

2.5 pET28a-scFv 质粒的构建

在 V_H 、 V_L 基因之间加入连接肽序列后进行密码子优化,送至北京擎科生物科技股份有限公司进行 scFv 基因合成;将 scFv 基因经过酶切酶连后转入 pET-28a 表达载体,经酶切鉴定得到大小为 714 bp 的目的基因片段以及 5 614 bp 的载体片段,重组质粒大小为 6 328 bp,与预期相符。

2.6 scFv 抗体的表达

将重组质粒 pET28a-scFv 转化至 BL21(DE3)中使用 0.01 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进

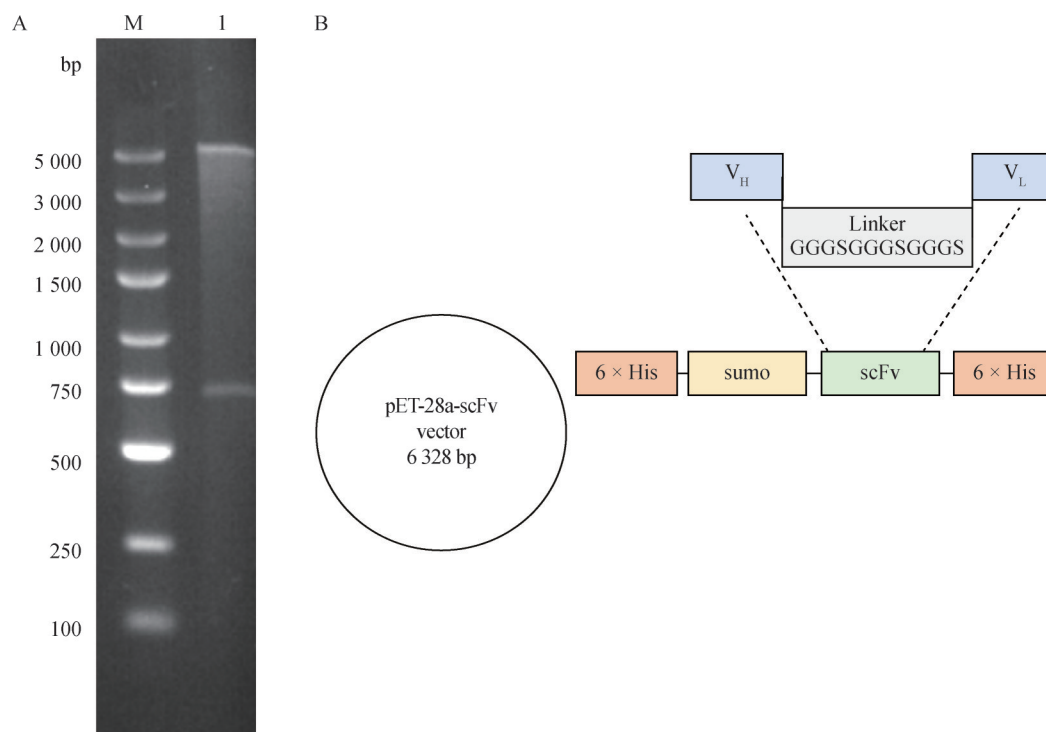


红色区域. 重链 CDR1 区; 橙色区域. 重链 CDR2 区; 紫色区域. 重链 CDR3 区; 蓝色区域. 轻链 CDR1 区; 浅绿色区域. 轻链 CDR2 区; 深绿色区域. 轻链 CDR3 区

Red region. CDR1 (heavy chain); Orange region. CDR2 (heavy chain); Purple region. CDR3 (heavy chain); Blue region. CDR1 (light chain); Light green region. CDR2 (light chain); Heavy green region. CDR3 (light chain)

图 4 IMGT Collier de Perles 图

Fig. 4 IMGT Collier de Perles on one layer



M. DNA 相对分子质量标准; 1. 重组质粒 pET28a-scFv 双酶切产物

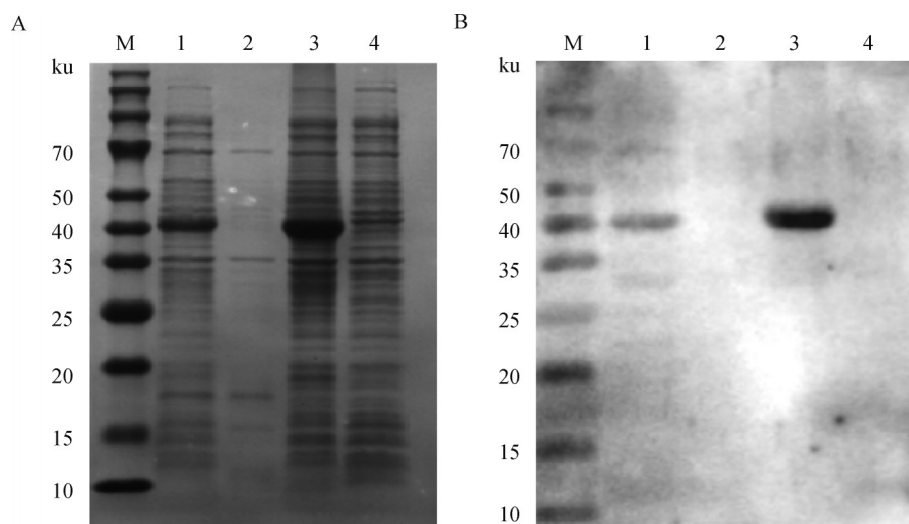
M. DNA marker; 1. Double enzyme digestion product of recombinant plasmid pET28a-scFv

图 5 pET28a-scFv 质粒的双酶切验证 (A) 及质粒结构示意图 (B)

Fig. 5 Verification of pET28a-scFv double enzyme digestion (A) and schematic diagram of plasmid construction (B)

行诱导表达。由图 6A 可知,在该条件下成功诱导表达了大小约为 40 ku 的重组蛋白,对菌液进行破碎,并对破碎前菌液、破碎后上清、破碎后沉淀和不含目的片段的空载菌进行 SDS-PAGE 鉴定,可以看出蛋白主要表达在沉淀中,上清中几乎无表达,且空载菌中无表达;Western blot 结果显示(图 6B),表

达出的蛋白能与辣根过氧化物酶标记的抗 His 标签兔单克隆抗体发生反应,在 40 ku 处出现条带,不含目的片段的空载菌阴性对照组则没有条带;综上,经过 IPTG 诱导重组抗体可成功表达,并主要表达在沉淀中,重组抗体大小为 40 ku。



A. SDS-PAGE; B. Western blot; M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 诱导蛋白; 2. 破碎后的上清; 3. 破碎后的沉淀; 4. 空白菌对照

A. SDS-PAGE; B. Western blot; M. Protein marker; 1. Induced recombinant protein; 2. Supernatant of recombinant protein after ultrasonic treatment; 3. Precipitation of recombinant protein after ultrasonic treatment; 4. Control

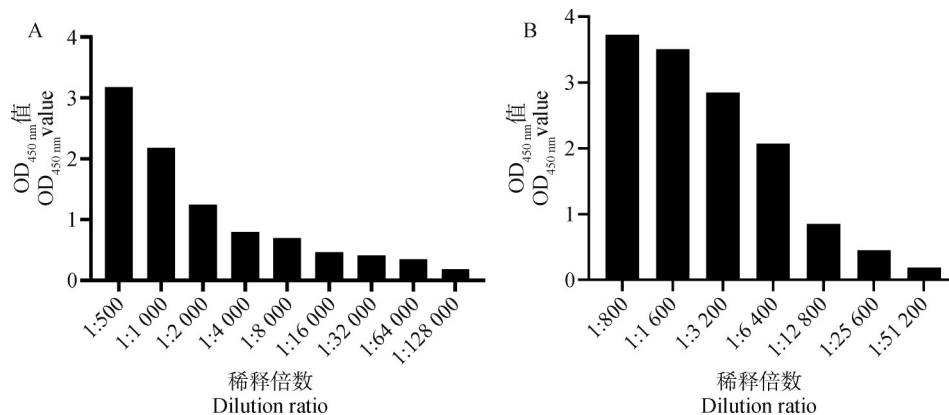
图 6 重组抗体的诱导表达及 Western blot 鉴定

Fig. 6 Expression and Western blot identification of recombinant protein

2.7 scFv 抗体反应活性的检测

为进一步验证抗体的反应活性,分别以病毒粒子($3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 gE 蛋白($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)包被 ELISA

板,进行间接 ELISA 试验,结果如图 7,表明抗体与病毒粒子和 gE 蛋白均表现出良好的结合活性,并呈现剂量依赖性。



A. 单链抗体与 PRV 病毒粒子反应; B. 单链抗体与 PRV gE 蛋白反应

A. scFv reacts with PRV particles; B. scFv reacts with PRV gE protein

图 7 抗 gE 蛋白 scFv 活性的 ELISA 检测结果

Fig. 7 Results of ELISA detection of anti-gE scFv activity

将 PRV HNX 毒株接种 PK-15 细胞,同时设置不接毒的阴性对照,以表达的单链抗体作为一抗进行间接免疫荧光试验,可见重组抗体能够与接种了

PRV HNX 毒株的 PK-15 细胞反应发出特异性绿色荧光,而不与未接毒的 PK-15 细胞反应,表明所制备抗体能够与感染状态下的病毒反应。

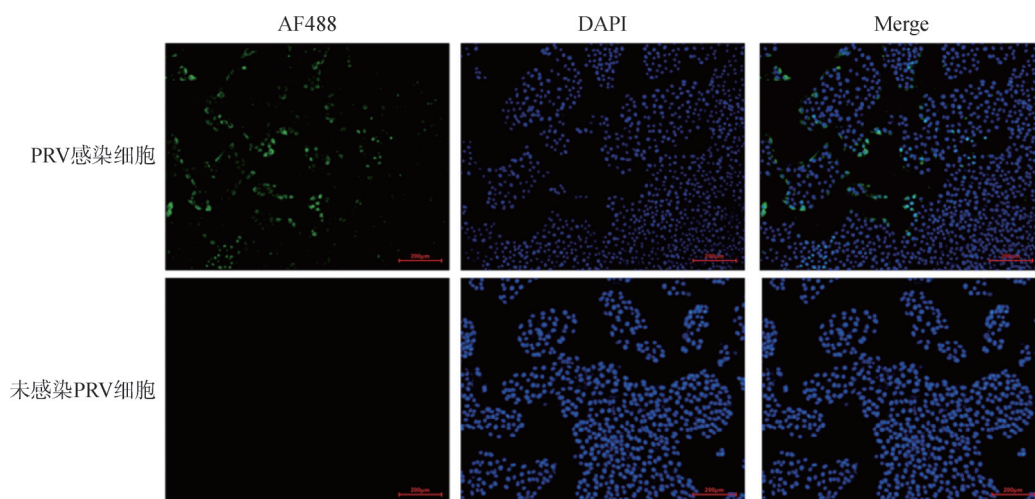


图8 重组抗体识别感染细胞中的狂犬病病毒的间接免疫荧光图(标尺=200 μm)

Fig. 8 IFA of recombinant antibodies reacting with PRV in the infected cells (bar=200 μm)

3 讨 论

自然界中多种动物均可以感染伪狂犬病病毒,但猪是该病毒的唯一自然宿主^[18]。PRV 主要引起猪发生临床感染和潜伏感染,新生仔猪感染后主要出现颤抖、抽搐、运动不协调和麻痹等神经症状,死亡率接近 100%;母猪及种公猪出现繁殖障碍,母猪出现流产、产死胎和弱胎,种公猪性欲减退,精液质量降低^[19]。猪伪狂犬病的主要传染源是感染了伪狂犬病病毒的患病猪或带毒猪,病毒可通过直接接触传播、空气传播和食物传播^[20]。2011 年以来全国一些猪场再次暴发猪伪狂犬病,这次暴发的猪伪狂犬病病毒存在毒力更强、传播范围更广、混合感染严重以及疫苗不能提供完全的保护等特点^[21],使我国猪伪狂犬病净化进程大大减慢。

与完整的天然抗体相比,单链抗体分子质量小,只含有可变区而不含与抗原结合无关的结构;由于其抗原结合位点与完整抗体相同,因此能够特异性结合抗原;单链抗体分子质量小,穿透力强,能够穿透组织或血管壁到达病灶位置^[22];同时生产方便,能够在多种表达系统中表达,成本更低^[23];特异性高、免疫原性低,易于人工体外操作,最常见的是在大肠杆菌中进行表达,宿主菌经裂解后可得到可溶性抗体^[24]。但本研究所表达的抗体为包涵体蛋

白,与前人的研究一致^[25-26],但以包涵体的形式进行表达容易对抗体的结合活性造成影响,且相较于上清蛋白产量会降低,推测原因为大肠杆菌内的还原环境不利于二硫键的正确折叠,后续将进一步使用改造后细胞质内为氧化环境的菌株进行表达,如 SHuffle 菌株,以期显著提高含有二硫键重组抗体的可溶性表达^[13]。

Sapats 等^[27]用 scFv 表达的抗体对高致病型、变异型和经典型的鸡传染性法囊病毒 (IBDV) 进行了 ELISA 检测,在用 ELISA (基于单克隆抗体) 检测的阴性样品中,用单链抗体则可检测出一个阳性样品。同时用 ELISA 方法评估它的特异性、灵敏度时,发现它能检测到所有类型的 IBDV,且灵敏度比单克隆抗体高 8 到 16 倍,可以用于建立 ELISA 方法。还可将单链抗体与其他蛋白融合表达, Martin 等^[28]、Rajabi 等^[29]将单链抗体与碱性磷酸酶进行偶联,增加了单链抗体的稳定性又保持了结合活性,在检测过程中可以不需要其他二抗,可直接检测底物。本研究所制备的单链抗体能够与蛋白以及病毒结合,并呈现剂量依赖性,具有良好结合活性,后续可将单链抗体与标记物进行偶联,运用于检测方法的建立。该抗体可使用原核表达系统进行表达,克服了单克隆抗体制备周期长、制备工艺复杂,腹水制备成本高以及杂交瘤细胞容易失去抗体分泌

能力的缺点^[30]。同时该抗体靶向 PRV gE 蛋白,能够用以区分疫苗免疫和野毒感染产生的抗体,基于该抗体建立诊断方法在伪狂犬病净化方面有着广阔的应用前景。

4 结 论

本研究通过免疫 PRV gE 蛋白,将小鼠免疫脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合,采用间接免疫荧光及 ELISA 试验对杂交瘤细胞进行筛选,并通过两次亚克隆,成功获得一株稳定分泌抗 PRV gE 蛋白抗体的杂交瘤细胞 7B7,并以该株杂交瘤细胞的 cDNA 为模板扩增得到抗体轻链可变区和重链可变区,用 Linker 连接后得到 scFv 基因,将 scFv 基因转入大肠杆菌进行原核表达,得到了具有良好结合活性的重组抗体。

参考文献(References):

- [1] 蔡 丹. 猪伪狂犬病的诊断与防控[J]. 畜牧兽医科技信息, 2023(2):139-141.
CAI D. Diagnosis and prevention and control of porcine pseudorabies[J]. *Animal Veterinary Technology Information*, 2023(2):139-141. (in Chinese)
- [2] 王 维. 猪伪狂犬疾病防控策略[J]. 吉林畜牧兽医, 2023, 44(9):29-30.
WANG W. Strategies for prevention and control of swine pseudorabies disease[J]. *Jilin Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 44(9):29-30. (in Chinese)
- [3] HUANG X, QIN S, WANG X, et al. Molecular epidemiological and genetic characterization of pseudorabies virus in Guangxi, China[J]. *Arch Virol*, 2023, 168(12):285.
- [4] CHENG X, CHENG N, YANG C, et al. Emergence and etiological characteristics of novel genotype II pseudorabies virus variant with high pathogenicity in Tianjin, China[J]. *Microb Pathog*, 2024, 197:107061.
- [5] BO Z, LI X. A review of pseudorabies virus variants: Genomics, vaccination, transmission, and zoonotic potential[J]. *Viruses*, 2022, 14(5):1003.
- [6] 刘运超, 杨素珍, 尚延丽, 等. 伪狂犬病病毒研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2024, 56(2):124-130.
LIU Y C, YANG S Z, SHANG Y L, et al. Progress in the study of pseudorabies virus[J]. *Animal Husbandry Veterinary Medicine*, 2024, 56(2):124-130. (in Chinese)
- [7] ALFTHAN K, TAKKINEN K, SIZMANN D, et al. Properties of a single-chain antibody containing different linker peptides[J]. *Protein Eng*, 1995, 8(7):725-731.
- [8] ARSLAN M, KARADAG M, ONAL E, et al. Effect of non-repetitive linker on *in vitro* and *in vivo* properties of an anti-VEGF scFv[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):5449.
- [9] 林 鹏, 钱 菁, 冯 强, 等. 单链抗体的制备及其在肿瘤诊疗中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(6):76-86.
LIN P, QIAN J, FENG Q, et al. Preparation of single chain antibody and its application in tumor diagnosis and treatment[J]. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2023, 43(6):76-86. (in Chinese)
- [10] 薛丽娜, 张艾立, 楼晓昆, 等. 单链抗体融合蛋白抗肿瘤的研究进展[J]. 浙江医学, 2022, 44(5):552-556.
XUE L N, ZHANG A L, LOU X K et al. Research progress of single chain antibody fusion protein anti-tumor[J]. *Zhejiang Medical*, 2022, 44(5):552-556. (in Chinese)
- [11] GEZEHAGN K G, TESSEMA T S. The potential of single-chain variable fragment antibody: Role in future therapeutic and diagnostic biologics [J]. *J Immunol Res*, 2024, 2024:1804038.
- [12] 陈 遥, 舒星富, 赵 钰, 等. 单链抗体展示系统研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9):3681-3694.
CHEN Y, SHU X F, ZHAO Y, et al. Research progress of single-chain antibody display system[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(09):3681-3694. (in Chinese)
- [13] SANDOMENICO A, SIVACCUMAR J P, RUVO M. Evolution of *Escherichia coli* expression system in producing antibody recombinant fragments [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17):6324.
- [14] ONG H K, NGUYEN N, BI J, et al. Vector design for enhancing expression level and assembly of knob-into-hole based FabscFv-Fc bispecific antibodies in CHO cells[J]. *Antib Ther*, 2022, 5(4):288-300.
- [15] MIN T T, YAMABHAI M. Human hexa-histidine-tagged single-chain variable fragments for bioimaging of bacterial infections [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(1):762-774.
- [16] 刘 涛, 赵京媛, 孙晓成. 猪伪狂犬疫苗研究进展[J]. 兽医导刊, 2012(12):72-74.
LIU T, ZHAO J Y, SUN X C. Research progress of porcine pseudorabies vaccine[J]. *Veterinary Journal*,

- 2012(12):72-74. (in Chinese)
- [17] 樊国燕, 胡平. 鸡传染性法式囊病毒 VP2 原核表达蛋白的纯化和复性[J]. 安徽农业科学, 2008(18): 7639-7641.
- FAN G Y, HU P. Purification and replication of prokaryotic protein of chicken infectious bursal virus VP2[J]. *Anhui Agricultural Science*, 2008(18): 7639-7641. (in Chinese)
- [18] 张明悦, 王贵升. 猪伪狂犬病研究进展[J]. 中国动物保健, 2024, 26(5): 3-5.
- ZHANG M Y, WANG G S. Research progress of porcine pseudorabies [J]. *Animal Health in China*, 2024, 26(5): 3-5. (in Chinese)
- [19] HAHN E C, PAGE G R, HAHN P S, et al. Mechanisms of transmission of Aujeszky's disease virus originating from feral swine in the USA[J]. *Vet Microbiol*, 1997, 55(1): 123-130.
- [20] 姚玲. 猪伪狂犬病的诊治[J]. 养殖与饲料, 2024, 23(4): 81-83.
- YAO L. Prevention and treatment of porcine pseudorabies. [J] *Breeding and feed*, 2024, 23 (4) : 81-83. (in Chinese)
- [21] 邵金龙. 对猪伪狂犬病的再认识及防控技术[J]. 福建畜牧兽医, 2025, 47(1): 41-43.
- SHAO J L. Re-understanding and prevention and control technology of porcine pseudorabies [J]. *Fujian animal husbandry veterinarian*, 2025, 47 (1) : 41-43. (in Chinese)
- [22] YANG J L, LIU D X, ZHEN S J, et al. A novel anti-p21Ras scFv antibody reacting specifically with human tumour cell lines and primary tumour tissues[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 131.
- [23] WANG Y, YUAN W, GUO S, et al. A 33-residue peptide tag increases solubility and stability of *Escherichia coli* produced single-chain antibody fragments [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4614.
- [24] YAGHOOBIZADEH F, ARDAKANI M R, RANJBAR M M, et al. Expression, purification, and study on the efficiency of a new potent recombinant scFv antibody against the SARS-CoV-2 spike RBD in *E. coli* BL21 [J]. *Protein Expr Purif*, 2023, 203: 106210.
- [25] 刘雅坤, 毕振威, 夏兴霞, 等. 抗犬瘟热病毒犬源化嵌合单链抗体 scFv-Fc 的制备与活性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(12): 5762-5773.
- LIU Y K, BI Z W, XIA X X, et al. Preparation and activity analysis of canine-derived chimeric single-chain antibody scFv-Fc against canine distemper virus [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2024, 55 (12): 5762-5773. (in Chinese)
- [26] 杜晨暄, 邹亚文, 张颜, 等. 非洲猪瘟病毒 CD2v 蛋白单链抗体的制备及鉴定[J]. 中国兽医科学, 2024, 54(11): 1465-1472.
- DU C X, ZHOU Y W, ZHANG Y, et al. Preparation and characterization of single-chain antibodies against CD2v protein of African swine fever virus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2024, 54 (11) : 1465-1472. (in Chinese).
- [27] SAPATS S, GOULD G, TRINIDAD L, et al. An ELISA for detection of infectious bursal disease virus and differentiation of very virulent strains based on single chain recombinant chicken antibodies [J]. *Avian Pathol*, 2005, 34(6): 449-455.
- [28] MARTIN C D, ROJAS G, MITCHELL J N, et al. A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies [J]. *BMC Biotechnology*, 2006, 6(1): 46.
- [29] RAJABI N, SAFARNEJAD M R, RAKHSHANDEHROO F, et al. Developing of specific monoclonal recombinant antibody fused to alkaline phosphatase (AP) for one-step detection of fig mosaic virus [J]. *Biotech*, 2022, 12(4): 88.
- [30] WANG R, HUANG A, LIU L, et al. Construction of a single chain variable fragment antibody (scFv) against tetrodotoxin (TTX) and its interaction with TTX [J]. *Toxicon*, 2014, 83: 22-34.

(编辑 白永平)