



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103483449 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201310362878. 5

(22) 申请日 2013. 08. 20

(71) 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街 59 号

(72) 发明人 尹杰超 周兵 李天鹤 李德山
张瑛杰 张立夏

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

A61K 39/42 (2006. 01)

A61P 31/14 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书10页
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

两种 scFv 抗体、其编码基因及其在制备治疗或预防鸡传染性法氏囊病制剂中的应用

(57) 摘要

本发明公布了两种 scFv 抗体、其编码基因及其在制备治疗或预防鸡传染性法氏囊病制剂中的应用。发明提供了两种单链抗体(即 scFv 抗体), scFv 抗体具有与 IBDV 结构蛋白 2(VP2)蛋白及多种 IBDV 毒株特异性结合的能力,可阻断 IBDV 对鸡胚成纤维细胞产生细胞病变(CPE),可保护 IBDV 感染的青年鸡。免疫血清和卵黄抗体在使用过程中存在制备繁琐、生产成本低、效果不稳定,工业化生产质量难以控制及引发水平传播疾病等弊端。本发明提供的 scFv 抗体可以克服上述弊端,具有特异性强、治疗效果好,工业化生产质量可控,避免了卵黄抗体引起的水平传播疾病等优点,将在 IBDV 的防治史上,乃至整个动物病毒病的防治史上开辟了一个新的局面。

1. 两种单链抗体,包括由重链可变区、轻链可变区以及它们之间的连接区组成;

所述 IBDV-VP2 scFv29 抗体重链可变区为如下(a)或(b):(a)由序列表中序列 1 自 N 末端第 1-129 位氨基酸残基组成的蛋白质;(b)将(a)经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质;

所述 IBDV-VP2 scFv29 抗体轻链可变区为如下(c)或(d):(c)由序列表中序列 1 自 N 末端第 145-250 位氨基酸残基组成的蛋白质;(d)将(c)经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质;

所述 IBDV-VP2 scFv30 抗体重链可变区为如下(a')或(b'):(a')由序列表中序列 1 自 N 末端第 1-135 位氨基酸残基组成的蛋白质;(b')将(a')经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质;

所述 IBDV-VP2 scFv30 抗体轻链可变区为如下(c')或(d'):(c')由序列表中序列 1 自 N 末端第 151-255 位氨基酸残基组成的蛋白质;(d')将(c')经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质。

2. 如权利要求 1 所述的两种单链抗体,其特征在于:

所述 IBDV-VP2 scFv29 单链抗体为如下(e)或(f):(e)由序列表中序列 1 所示的蛋白质;(f)将(e)经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质;

所述 IBDV-VP2 scFv30 单链抗体为如下(e')或(f'):(e')由序列表中序列 3 所示的蛋白质;(f')将(e')经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质。

3. 编码权利要求 1 或 2 所述单链抗体的基因。

4. 如权利要求 3 所述的基因,其特征在于:

所述 IBDV-VP2 scFv29 单链抗体基因中,编码所述重链可变区的 DNA 分子为如下(1)或(2)或(3):(1)序列表的序列 2 自 5' 末端第 1-387 位核苷酸所示的 DNA 分子;(2)在严格条件下与(1)限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(3)与(1)限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;

所述 IBDV-VP2 scFv29 单链抗体基因中,编码所述轻链可变区的 DNA 分子为如下(4)或(5)或(6):(4)序列表的序列 2 自 5' 末端第 433-753 位核苷酸所示的 DNA 分子;(5)在严格条件下与(4)限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(6)与(4)限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;

所述 IBDV-VP2 scFv30 单链抗体基因中,编码所述重链可变区的 DNA 分子为如下(1')或(2')或(3'):(1')序列表的序列 4 自 5' 末端第 1-405 位核苷酸所示的 DNA 分子;(2')在严格条件下与(1')限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(3')与(1')限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;

所述 IBDV-VP2 scFv30 单链抗体基因中,编码所述轻链可变区的 DNA 分子为如下(4)或(5)或(6):(4)序列表的序列 2 自 5' 末端第 451-768 位核苷酸所示的 DNA 分子;(5)在严格条件下与(4)限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(6)与(4)限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子。

5. 如权利要求 4 所述的基因,其特征在于:

所述 IBDV-VP2 scFv29 单链抗体基因为如下(7)或(8)或(9)或(10):(7)序列表的序列 2 自 5' 末端第 1-753 位核苷酸所示的 DNA 分子;(8)序列表的序列 2 所示的 DNA 分子;(9)在严格条件下与(7)或(8)限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(10)与(7)或(8)限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;

所述 IBDV-VP2 scFv30 单链抗体基因为如下(7')或(8')或(9')或(10'):(7')序列表的序列 4 自 5' 末端第 1-768 位核苷酸所示的 DNA 分子;(8')序列表的序列 2 所示的 DNA 分子;(9')在严格条件下与(7')或(8')限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(10')与(7)或(8')限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子。

6. 含有权利要求 3 至 5 中任一所述基因的表达盒、重组载体、转基因细胞系或重组菌。

7. 基于权利要求 1 或 2 所述单链抗体的其它形式的抗体。

8. 权利要求 1 所述单链抗体、权利要求 2 所述单链抗体或权利要求 7 所述抗体在制备产品中的应用;所述产品的功能为如下(I)、(II)或(III)或(IV):(I)检测传染性法氏囊病病毒;(II)辅助鉴定传染性法氏囊病病毒;(III)预防和/或治疗传染性法氏囊病病毒引起的疾病;(IV)预防和/或治疗传染性法氏囊病。

9. 含有权利要求 1 所述单链抗体、权利要求 2 所述单链抗体或权利要求 7 所述抗体的产品;所述产品的功能为如下(I)、(II)或(III)或(IV):(I)检测传染性法氏囊病病毒;(II)辅助鉴定传染性法氏囊病病毒;(III)预防和/或治疗传染性法氏囊病病毒引起的疾病;(IV)预防和/或治疗传染性法氏囊病。

10. 权利要求 1 所述单链抗体、权利要求 2 所述单链抗体或权利要求 7 所述抗体在辅助鉴定传染性法氏囊病病毒中的应用。

两种 scFv 抗体、其编码基因及其在制备治疗或预防鸡传染性法氏囊病制剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及两种 scFv 抗体、其编码基因及其在制备治疗或预防鸡传染性法氏囊病制剂中的应用。

背景技术

[0002] 鸡传染性法氏囊病(Infectious Bursal Disease, IBD)是由鸡传染性法氏囊病病毒(Infectious Bursal Disease Virus, IBDV)引起的一种急性、高度接触性鸡传染病,具有传播速度快、传染性强、感染率及死亡率均高的特点。该病给养禽业造成重大经济损失。

[0003] IBDV可在雏鸡法氏囊中的淋巴细胞,尤其是B淋巴细胞中迅速繁殖,促使B淋巴细胞凋亡,法氏囊极度萎缩,最终导致免疫缺陷和免疫抑制。因此极易造成细菌(大肠杆菌和沙门氏菌)的继发感染,同时可还造成其他疫苗的免疫失败。多克隆抗体(高免血清和卵黄抗体)是目前有效的治疗手段,在发病早期治疗效果良好,但是由于工业化生产可控性差和存在水平传播疾病(鸡白痢、霉形体、减蛋综合症和禽白血病)以及由一些非特异性抗体引起的过敏性反应等原因而受到限制。

[0004] 基因工程抗体即将抗体的基因按不同需要进行加工、改造和重新装配,然后导入适当的受体细胞中进行表达的抗体分子。在原核细胞中表达基因工程抗体目前技术已经相对成熟,可实现工业化的生产,产品质量可控均一。同时原核表达系统不存在水平传播传染性疾病的危险。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供两种单链抗体(scFv 抗体)、其编码基因及其在制备治疗或预防鸡传染性法氏囊病制剂中的应用。

[0006] 本发明提供了两种单链抗体,命名为 IBDV-VP2 scFv29 抗体和 IBDV-VP2 scFv30 抗体,包括由重链可变区、轻链可变区以及它们之间的连接区组成;

所述 IBDV-VP2 scFv29 抗体的重链可变区为如下(a)或(b):(a)由序列表中序列 1 自 N 末端第 1-129 位氨基酸残基组成的蛋白质;(b)将(a)经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质;

所述 IBDV-VP2 scFv29 抗体轻链可变区为如下(c)或(d):(c)由序列表中序列 1 自 N 末端第 145-250 位氨基酸残基组成的蛋白质;(d)将(c)经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质。

[0007] 所述单链抗体 IBDV-VP2 scFv29 具体可为如下(e)或(f):(e)由序列表中序列 1 所示的蛋白质;(f)将(e)经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质。

[0008] 编码所述单链抗体 IBDV-VP2 scFv29 的基因也属于本发明的保护范围。

[0009] 所述单链抗体 IBDV-VP2 scFv29 基因中,编码所述重链可变区的 DNA 分子为如下

(1)或(2)或(3):(1)序列表的序列 2 自 5' 末端第 1-387 位核苷酸所示的 DNA 分子;(2)在严格条件下与(1)限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(3)与(1)限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子。

[0010] 所述单链抗体 IBDV-VP2 scFv29 基因中,编码所述轻链可变区的 DNA 分子为如下(4)或(5)或(6):(4)序列表的序列 2 自 5' 末端第 433-753 位核苷酸所示的 DNA 分子;(5)在严格条件下与(4)限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(6)与(4)限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子。

[0011] 所述单链抗体 IBDV-VP2 scFv29 基因具体可为如下(7)或(8)或(9)或(10):(7)序列表的序列 2 自 5' 末端第 1-753 位核苷酸所示的 DNA 分子;(8)序列表的序列 2 所示的 DNA 分子;(9)在严格条件下与(7)或(8)限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(10)与(7)或(8)限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子。

[0012] 所述 IBDV-VP2 scFv30 抗体的重链可变区为如下(a')或(b'):(a')由序列表中序列 3 自 N 末端第 1-135 位氨基酸残基组成的蛋白质;(b')将(a')经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质;

所述 IBDV-VP2 scFv30 抗体轻链可变区为如下(c')或(d'):(c')由序列表中序列 3 自 N 末端第 151-255 位氨基酸残基组成的蛋白质;(d')将(c')经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质。

[0013] 所述单链抗体 IBDV-VP2 scFv30 具体可为如下(e')或(f'):(e')由序列表中序列 3 所示的蛋白质;(f')将(e')经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且具有相同活性的由其衍生的蛋白质。

[0014] 编码所述单链抗体 IBDV-VP2 scFv30 的基因也属于本发明的保护范围。

[0015] 所述单链抗体 IBDV-VP2 scFv30 基因中,编码所述重链可变区的 DNA 分子为如下(1')或(2')或(3'):(1')序列表的序列 4 自 5' 末端第 1-405 位核苷酸所示的 DNA 分子;(2')在严格条件下与(1')限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(3')与(1')限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子。

[0016] 所述单链抗体 IBDV-VP2 scFv30 基因中,编码所述轻链可变区的 DNA 分子为如下(4')或(5')或(6'):(4')序列表的序列 4 自 5' 末端第 451-768 位核苷酸所示的 DNA 分子;(5')在严格条件下与(4')限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(6')与(4')限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子。

[0017] 所述单链抗体 IBDV-VP2 scFv30 基因具体可为如下(7')或(8')或(9')或(10'):(7')序列表的序列 4 自 5' 末端第 1-768 位核苷酸所示的 DNA 分子;(8')序列表的序列 2 所示的 DNA 分子;(9')在严格条件下与(7')或(8')限定的 DNA 序列杂交且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子;(10')与(7')或(8')限定的 DNA 序列至少具有 90% 以上同源性且编码具有相同活性的蛋白的 DNA 分子。

[0018] 上述严格条件可为在 6×SSC,0.5% SDS 的溶液中,在 65°C 下杂交,然后用 2×SSC、0.1% SDS 和 1×SSC、0.1% SDS 各洗膜一次。

[0019] 含有以上任一所述基因的表达盒、重组载体、转基因细胞系或重组菌均属于本发明的保护范围。

[0020] 基于所述两种单链抗体的其它形式的抗体也属于本发明的保护范围。所述其它形式的抗体可为 Fab 形式的抗体、IgG 形式的抗体等。

[0021] 本发明还保护所述单链抗体或所述其它形式的抗体在制备产品中的应用；所述产品的功能为如下(I)、(II)或(III)或(IV)：(I)检测鸡传染性法氏囊病病毒；(II)辅助鉴定鸡传染性法氏囊病病毒；(III)预防和/或治疗鸡传染性法氏囊病；(IV)预防和/或治疗由鸡传染性法氏囊病病毒诱发的其它疾病。

[0022] 含有所述单链抗体或所述其它形式的抗体的产品也属于本发明的保护范围；所述产品的功能为如下(I)、(II)或(III)或(IV)：(I)检测传染性法氏囊病病毒；(II)辅助鉴定传染性法氏囊病病毒；(III)预防和/或治疗传染性法氏囊病病毒引起的疾病；(IV)预防和/或治疗传染性法氏囊病。

[0023] 本发明还保护所述单链抗体或所述其它形式的抗体在辅助鉴定传染性法氏囊病病毒中的应用。所述应用为非疾病诊断方法。

[0024] 本发明提供了两种单链抗体(即 scFv 抗体)，scFv 抗体具有与 IBDV 结构蛋白 2 (VP2)蛋白及多种 IBDV 毒株特异性结合的能力，可阻断 IBDV 对鸡胚成纤维细胞产生细胞病变(CPE)，可保护 IBDV 感染的青年鸡。免疫血清和卵黄抗体在使用过程中存在制备繁琐、生产成本低、效果不稳定，工业化生产质量难以控制及引发水平传播疾病等弊端。本发明提供的 scFv 抗体可以克服上述弊端，具有特异性强、治疗效果好，工业化生产质量可控，避免了卵黄抗体引起的水平传播疾病等优点，将在 IBDV 的防制史上，乃至整个动物病毒病的防治史上开辟了一个新的局面。

附图说明

[0025] 图 1 为 IBDV-VP2 scFv29 和 IBDV-VP2 scFv30 抗体溶液的 SDS-PAGE 图谱。

[0026] 图 2 为两种 scFv 抗体溶液的 SEC-HPLC 图谱。

[0027] 图 3 为 ELISA 检测两种 scFv 抗体对 VP2 蛋白的特异性和亲和力的结果。

[0028] 图 4 为 ELISA 检测两种 scFv 抗体对不同 IBDV 病毒的特异性和亲和力结果。

具体实施方式

[0029] 以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。

[0030] pET-27b(+) 载体：购自 Novagen 公司，Cat. No. 69337-3。大肠杆菌 Rosetta：购自 Novagen 公司，Cat. No. 71403-4。DF1 细胞(鸡成纤维细胞)：购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心，Cat. No. 3131C0001000400030。SPF 雏鸡：购自哈尔滨兽医研究所。鸡新城疫灭活疫苗(La Sota 株)，购买自哈兽研维科生物公司，编号 080012008。

[0031] 鸡传染性法氏囊病活疫苗(Gt 株)：哈兽研维科生物公司，编号 080012122。鸡传染性法氏囊病中等毒力活疫苗(NF8 株)：扬州威克生物工程有限公司，编号 101042056。鸡传

染性法氏囊病活疫苗(1-65株):Shafit InterGumboro,编号 S20651010A。鸡传染性法氏囊病活疫苗(BJ836株):上海海利生物药品有限公司,编号 090202026。鸡传染性法氏囊病活疫苗(MB株):ABIC,编号 20621150B。鸡传染性法氏囊病活疫苗(B87株):湖南省中岸生物药业有限公司,编号 180022026。

[0032] 质粒 pHisSUMO:参考文献:姜媛媛,尹成凯,李晋南,任桂萍,张薇,李德山. 利用 SUMO 融合系统高效表达可溶性重组蛋白的研究. 东北农业大学学报, 2008, 39(10): 57-62;李璐,尹成凯,李德山. 高效表达可溶性重组蛋白表达载体——pHisSUMO. 生物技术, 2009, 19(3): 11-14.。

[0033] 包被液(pH9.6):取 Na_2CO_3 0.15g、 NaHCO_3 0.293g,溶于水并用水定容至 100mL。

[0034] PBS 缓冲液:取 NaCl 8g、 KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58g、 KH_2PO_4 0.24g,溶于 1L 水。

[0035] 实施例 1:scFv 抗体(单链抗体)及其编码基因的发现

1、抗体库的构建

取 IBDV 免疫后的鸡脾脏,提取 RNA 后反转录成 cDNA。根据 GenBank 上的抗体序列,设计出克隆抗体可变区的基因引物,以 cDNA 为模板,使用 PCR 的方法克隆抗体可变区。将 VH 与 VL 片段分别插入到 pTlinker 载体的 Linker 的上游和下游,构建出 scFv 抗体库。将 scFv 抗体库进行酶切并与细菌展示载体 pBSD 进行连接,构建抗 IBDV 抗体的细菌表面展示文库。VH 约 380bp、VL 约 320bp, VH-Tlinker-VL 约 740bp;

2、抗体库的筛选

收集转化后全部克隆,经 IPTG (0.25mmol/ml)诱导 4h,经 EDTA- MgCl_2 处理,与 FITC 标记的 VP2 蛋白孵育 1h, PBS 洗涤后利用流式细胞仪对其进行筛选;

经三轮筛选后,得到两个与 FITC 标记的 VP2 蛋白具有结合能力的单链抗体,将其命名为 IBDV-VP2 scFv29 抗体和 IBDV-VP2 scFv30 抗体;

IBDV-VP2 scFv29 抗体(为单链抗体,又称 scFv 蛋白)如序列表的序列 1 所示,其编码基因如序列表的序列 2 所示;

IBDV-VP2 scFv30 抗体(为单链抗体,又称 scFv 蛋白)如序列表的序列 3 所示,其编码基因如序列表的序列 4 所示。

[0036] 实施例 2、scFv 抗体的制备

1、合成序列表的序列 2 所示的双链 DNA 分子;

2、以步骤 1 合成的双链 DNA 分子为模板,用 F1 和 R1 组成的引物以流式筛选阳性菌所提取质粒为模板进行 PCR 扩增,得到 PCR 扩增产物;

F1 :5' - CATGCCATGGGCCGTGACGTTGGACGAG-3' ;

R1 :5' - CCCAAGCTTTTAACTAGGACGGTCAGGG-3 ;

3、用限制性内切酶 *Nco*I 和 *Hind*III 双酶切步骤 2 的 PCR 扩增产物,回收酶切产物;

4、用限制性内切酶 *Nco*I 和 *Hind*III 双酶切 pET-27b(+) 载体,回收约 5367bp 的载体骨架;

5、将步骤 3 的酶切产物和步骤 4 的载体骨架连接,得到重组质粒。根据测序结果,对重组质粒进行结构描述如下:在 pET-27b(+) 载体的 *Nco*I 和 *Hind*III 酶切位点之间插入了序列表的序列 2 所示的双链 DNA 分子;

6、将步骤 5 得到的重组质粒导入大肠杆菌 Rosetta, 得到重组菌;

7、将步骤 6 得到的重组菌接种至含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、100r/min 振荡培养至 OD_{600nm}=0.35; 加入 IPTG 并使其浓度为 0.25mmol/L, 37 $^{\circ}$ C、100r/min 振荡培养 4h;

8、取 25L 完成步骤 7 的培养体系, 4 $^{\circ}$ C、4000r/min 离心 30min 并收集菌体沉淀;

9、取步骤 8 得到的菌体沉淀, 用 PBS 缓冲液重悬, 加入溶菌酶溶液(购自 Amresco)并使溶菌酶的浓度为 1mg/ml, 4 $^{\circ}$ C 放置 1h, 然后进行超声破碎(25 瓦的功率, 3min), 4 $^{\circ}$ C、10000g 离心 30min, 收集沉淀;

10、使用 AKTA Purifier 100 蛋白层析系统(购自 GE 公司)纯化目的蛋白

取步骤 9 得到的沉淀, 用 100 毫升溶解缓冲液(8mol/L 尿素水溶液, pH8.0)充分溶解, 然后上样于 HiLoad 16/60 Superdex75 pg 柱子(购自 GE 公司), 然后用 500 毫升复性缓冲液(2mol/L 尿素水溶液, pH8.0)洗脱并收集过柱后的洗脱液, 然后在 PBS 缓冲液中透析过夜, 得到溶液即为 scFv 抗体溶液。所有步骤均在 4 $^{\circ}$ C 环境下。scFv 抗体溶液的 SDS-PAGE 图谱见图 1, 显示约为 28KD 的条带, 与预期相符;

11、取步骤 10 得到的 scFv 抗体溶液, 进行 SEC-HPLC 分析

硅胶填充物, 型号为 G-3000swx1; 将 scFv 抗体溶液上样后, 用流速为 0.5ml/min 的洗脱液(pH8.0, 溶剂为水, 含 50mM Na₃PO₄ 和 150mM NaCl)进行洗脱。SEC-HPLC 图谱见图 2, 目的蛋白的纯度可达 90%。

[0037] 实施例 3、VP2 蛋白的制备

一、重组质粒的构建

1、合成序列表的序列 6 所示的 IBDV vp2 双链 DNA 分子;

2、以步骤合成的双链 DNA 分子为模板, 用 F2 和 R2 组成的引物对 vp2 进行 PCR 扩增, 得到 PCR 扩增产物;

F2 :5' -GAAGACTTAGGT ACAAACCTGCAAGATCAA-3' ;

R2 :5' -GGATCCTTATGCTCCTGCAATCTTCAG-3' ;

3、用限制性内切酶 *Bbs* I 和 *Bam*HI 双酶切步骤 3 的 PCR 扩增产物, 回收酶切产物;

4、用限制性内切酶 *Bbs* I 和 *Bam*HI 双酶切质粒 pHisSUMO, 回收约 5700bp 的载体骨架;

5、将步骤 3 的酶切产物和步骤 4 的载体骨架连接, 得到重组质粒。重组质粒中, VP2 蛋白的编码基因和载体骨架上的分子伴侣 SUMO 的编码序列、以及载体骨架上的 His 标签的编码序列(位于 SUMO 的编码序列的上游, 由 6 个组氨酸残基组成)融合, 形成融合基因, 表达融合蛋白(融合蛋白自 N 端至 C 端依次为 His 标签、分子伴侣 SUMO 和 VP2 蛋白)。

[0038] 二、VP2 蛋白的制备和纯化

1、将步骤一得到的重组质粒导入大肠杆菌 Rosetta, 得到重组菌;

2、将步骤 1 得到的重组菌接种至含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、100r/min 振荡培养至 OD_{600nm}=0.35; 加入 IPTG 并使其浓度为 0.4mmol/L, 25 $^{\circ}$ C、65r/min 振荡培养 10h;

3、取完成步骤 2 的培养体系, 4 $^{\circ}$ C、4000r/min 离心 30min, 并收集菌体沉淀;

4、取步骤 3 得到的菌体沉淀, 用 Binding buffer 重悬, 加入溶菌酶溶液(购自 Amresco)并使溶菌酶的浓度为 1mg/ml, 4 $^{\circ}$ C 放置 1h, 然后进行超声破碎(25 瓦的功率, 3min), 4 $^{\circ}$ C、

10000g 离心 30min, 收集上清液;

5、取步骤 4 得到的上清液, 进行 HisTrap™ FF crude column 亲和层析;

柱子型号为: 柱长 0.7cm, 柱高 2.5cm;

上样量为 10ml;

洗脱过程: 先用 5 倍柱体积的杂蛋白洗脱液(溶剂为水, 含有如下浓度的各个溶质: 40mmol/L 咪唑、500mmol/L NaCl 和 50mmol/L Na_3PO_4 ; pH7.4) 洗脱以去除杂蛋白, 流速为 1ml/min; 然后用 3 倍柱体积的目的蛋白洗脱液(溶剂为水, 含有如下浓度的各个溶质: 500mmol/L 咪唑、500mmol/L NaCl 和 50mmol/L Na_3PO_4 ; pH7.4) 洗脱, 流速为 1ml/min, 280nm 波长监测, 收集目标峰(即峰值高于 80mAU 的峰), 即为融合蛋白溶液;

6、采用 HiPrep™ 26/10 Desalting 将步骤 5 得到的融合蛋白溶液进行脱盐;

7、取步骤 6 得到的溶液, 用 SUMO 蛋白酶 I(SUMO 蛋白酶 I 与融合蛋白的摩尔比为 1:50) 和终浓度为 2mmol/L 的 DTT 4℃切割过夜;

8、取步骤 7 得到的溶液, 进行 HisTrap™ FF crude column 亲和层析。

[0039] 柱子型号为: 柱长 0.7cm, 柱高 2.5cm;

上样量为 15ml, 280nm 波长监测, 收集目标峰(即峰值高于 30mAU 的峰), 即为 VP2 蛋白溶液。将 VP2 蛋白溶液进行聚丙烯酰胺电泳, 显示分子量约为 42kDa 的单一蛋白条带, 回收蛋白条带并测序, N 端前 15 个氨基酸残基如序列列表的序列 5 自 N 末端第 1 至 15 位氨基酸残基所示。

[0040] 实施例 4、ELISA 检测 scFv 抗体的亲和力和特异性

一、ELISA 检测 IBDV-VP2 scFv29 和 IBDV-VP2 scFv30 抗体对 VP2 蛋白的特异性和亲和力;

1、分别用蛋白浓度为 300 $\mu\text{g/ml}$ 、60 $\mu\text{g/ml}$ 、12 $\mu\text{g/ml}$ 、2.4 $\mu\text{g/ml}$ 的 scFv 抗体溶液(即实施例 2 制备的 scFv 抗体溶液, 用包被液调整蛋白浓度)包被酶标板, 4℃过夜, 然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 2min;

2、每孔加入 100 μl 蛋白浓度为 40 $\mu\text{g/ml}$ 的 VP2 蛋白溶液(即实施例 3 制备的 VP2 蛋白溶液, 用 PBS 缓冲液调整蛋白浓度), 37℃孵育 1h, 然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 2min;

3、加入卵黄抗体(B87 株免疫蛋鸡得到的, 工作浓度为 1:200 倍稀释), 37℃孵育 1h, 然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 2min;

4、加入 HRP 标记的兔抗鸡抗体(Cat. No. 11-7018 购自 eBioscience 公司, 工作浓度为 1:7500 倍稀释), 37℃孵育 1h, 然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 2min;

5、加入 TMB 底物显色液, 37℃避光显色 5min;

6、每孔加入 50 μl 12mol/L 的 H_2SO_4 水溶液, 用酶标仪于波长 450nm 下检测 OD 值;

设置用等体积的 PBS 缓冲液代替步骤 1 中的 scFv 抗体溶液、步骤 2 中的 VP2 蛋白溶液和步骤 3 中的卵黄抗体的 PBS 组。步骤 1 中用蛋白浓度为 300 $\mu\text{g/ml}$ 的 scFv 抗体溶液包被酶标板时: 设置步骤 2 中不加入 VP2 蛋白溶液的对照组 1, 步骤 3 中不加入卵黄抗体的对照组 2, 步骤 2 中不加入 VP2 蛋白溶液且步骤 3 中不加入卵黄抗体的对照组 3, 用等体积且等蛋白浓度的 BSA 溶液代替 VP2 蛋白溶液的对照组 4;

每个处理设置 3 个复孔;

结果见图 3。ELISA 结果表明, IBDV-VP2 scFv29 和 IBDV-VP2 scFv30 抗体可以与 VP2

蛋白特异性结合。

[0041] 二、ELISA 检测 sIBDV-VP2 scFv29 和 IBDV-VP2 scFv30 抗体对不同 IBDV 病毒的特异性和亲和力

1、用蛋白浓度为 300 μ g/ml 的 scFv 抗体溶液(即实施例 2 制备的 scFv 抗体溶液,用包被液调整蛋白浓度)包被酶标板,4 $^{\circ}$ C 过夜,然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 2min ;

2、每孔加入 100 μ l IBDV 病毒液(病毒滴度为 100TCID₅₀, TCID₅₀=10^{-6.8}/0.1ml),37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 2min ;

3、加入卵黄抗体(B87 株免疫蛋鸡得到的,工作浓度为 1:200 倍稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 2min ;

4、加入 HRP 标记的兔抗鸡抗体(Cat. No. 11-7018 购自 eBioscience 公司,工作浓度为 1:7500 倍稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,然后用 PBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 2min ;

5、加入 TMB 底物显色液,37 $^{\circ}$ C 避光显色 5min ;

6、每孔加入 50 μ l 2mol/L 的 H₂SO₄ 水溶液,用酶标仪于波长 450nm 下检测 OD 值 ;

分别采用如下 IBDV 的毒株进行上述实验 :Gt 株、NF8 株、1-65 株、BJ836 株、MB 株、B87 株 ;

设置用等体积的 PBS 缓冲液代替步骤 1 中的 scFv 抗体溶液、步骤 2 中的 IBDV 病毒液和步骤 3 中的卵黄抗体的 PBS 组。设置步骤 2 中不加入 IBDV 病毒液的对照组 1,步骤 3 中不加入卵黄抗体的对照组 2,步骤 2 中不加入 IBDV 病毒液且步骤 3 中不加入卵黄抗体的对照组 3,用等体积等滴度的新城疫病毒液代替 IBDV 病毒液的对照组 4 ;

每个处理设置 3 个复孔 ;

结果见图 4。ELISA 结果表明,IBDV-VP2 scFv29 和 IBDV-VP2 scFv30 抗体可以与不同 IBDV 毒株特异性结合,对不同的 IBDV 毒株具有不同的亲和力。

[0042] 实施例 5、IBDV-VP2 scFv29 和 IBDV-VP2 scFv30 抗体的中和活性

一、IBDV 滴度的测定

将处于对数生长期的 DF1 细胞接种于 96 孔细胞培养板,将用 DMEM 培养基 10¹ 至 10¹¹ 梯度稀释的 IBDV 病毒液(B87 株)接种到单层细胞中(每孔 100 μ l),每一稀释度接种 8 个细胞孔 ;设置不加入 IBDV 病毒液的对照组。将细胞培养板放到细胞培养箱中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养,连续观察 7 天,每天记录细胞生长状态。计算病毒滴度,第 7 天结果见表 1。

[0043] 表 1 IBDV 滴度的测定的结果

| 稀释度 | 出现 CPE 的细胞孔的数目 | 未出现 CPE 的细胞孔的数目 | CPE 百分比 |
|------------------|----------------|-----------------|---------|
| 10 ¹ | 8 | 0 | 100% |
| 10 ² | 8 | 0 | 100% |
| 10 ³ | 8 | 0 | 100% |
| 10 ⁴ | 8 | 0 | 100% |
| 10 ⁵ | 8 | 0 | 100% |
| 10 ⁶ | 4 | 4 | 50% |
| 10 ⁷ | 3 | 5 | 37.5% |
| 10 ⁸ | 0 | 8 | 0% |
| 10 ⁹ | 0 | 8 | 0% |
| 10 ¹⁰ | 0 | 8 | 0% |
| 10 ¹¹ | 0 | 8 | 0% |
| 10 ¹² | 0 | 8 | 0% |

按照 Reed-Muench 两氏法计算 $TCID_{50}=10^{-6.8}/0.1\text{ml}$ 。

[0044] 二、scFv 抗体的中和活性

将处于对数生长期的 DF1 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 将用 DMEM 培养基梯度稀释后的 scFv 抗体溶液(即实施例 2 制备的 scFv 抗体溶液)和 100 $TCID_{50}$ 的 IBDV 病毒液(B87 株)等体积混合并 37℃ 孵育 1h, 然后接种到单层细胞中, 每一梯度接种 8 个细胞孔; 设置不加入病毒液的对照组和不加入 scFv 抗体溶液的对照组。将细胞培养板放到细培养箱中, 37℃, 5% CO_2 培养连续观察 7 天, 每天记录细胞生长状态。第 7 天结果见表 2a 和 2b。

[0045] 表 2a IBDV-VP2 scFv29 抗体中和活性的测定结果

| 梯度稀释后的 scFv 抗体溶液中的蛋白浓度 ($\mu\text{g/ml}$) | CPE 百分比(%) |
|---|------------|
| 300 | 0 |
| 150 | 0 |
| 75 | 0 |
| 37.5 | 0 |
| 18.75 | 0 |
| 9.375 | 0 |
| 4.688 | 100 |
| 2.344 | 100 |
| 1.172 | 100 |
| 0.586 | 100 |

结果表明, IBDV-VP2 scFv29 抗体具有中和活性, 阻断或抑制 CPE 的最小蛋白浓度为 9.375 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0046]

表 2b IBDV-VP2 scFv30 抗体中和活性的测定结果

| 梯度稀释后的 scFv 抗体溶液中的蛋白浓度 ($\mu\text{g/ml}$) | CPE 百分比 (%) |
|---|-------------|
| 300 | 0 |
| 150 | 0 |
| 75 | 0 |
| 37.5 | 0 |
| 18.75 | 0 |
| 9.375 | 0 |
| 4.688 | 0 |
| 2.344 | 100 |
| 1.172 | 100 |
| 0.586 | 100 |

结果表明, IBDV-VP2 scFv29 抗体具有中和活性, 阻断或抑制 CPE 的最小蛋白浓度为 $4.688 \mu\text{g/ml}$ 。

[0047] 实施例 6、scFv 抗体对 IBDV 感染鸡的保护作用

传染性法氏囊病病毒 HB/11 株; 参考文献: 黄显明、张小飞、丁美娟、尹秀凤、许秀梅、王伟、靳宇田, 传染性法氏囊病病毒强毒株 HB/11 的分离与鉴定, 《中国动物传染病学报》2012 年第 5 期, 8-11 页。

[0048] 一、安全性检测

取 10 只 13 日龄 SPF 雏鸡, 分别胸肌注射蛋白浓度为 2mg/ml 的 scFv 抗体溶液(即实施例 2 制备的 scFv 抗体溶液, 用 PBS 缓冲液调整蛋白浓度), 每只 1ml , 观察 14 天。无注射局部及全身不良反应。

[0049] 二、IBDV 半致死率的测定

取 9 日龄的鸡胚, 分成 9 组, 每组 10 只, 第 1 组至第 8 组, 分别注射 $200 \mu\text{L}$ 用 PBS 缓冲液稀释后的稀释梯度为 10^1 - 10^8 的传染性法氏囊病病毒 HB/11 株病毒液, 第 9 组为生理盐水的对照组(每胚注射 $200 \mu\text{L}$ 生理盐水)。观察 3-6 天, 记录鸡胚存活情况;

6 天后的半致死率为 $10^{5.5}\text{EID}_{50}$ 。

[0050] 三、抗体效力试验

13 日龄 SPF 鸡分为五组, 每组 10 只;

第一组: 每只胸肌注射 0.2ml PBS 缓冲液;

第二组: 接种 B87 株病毒液(每 0.2ml 含有的病毒剂量为 $10^{4.0}\text{EID}_{50}$), 每只胸肌注射 0.2ml ;

第三组: 每只胸肌注射 scFv 抗体溶液(1mg 蛋白 / kg 体重), 每只注射 0.2ml ;

第四组: 每只胸肌注射 scFv 抗体溶液(0.5mg 蛋白 / kg 体重), 每只注射 0.2ml ;

第五组: 每只胸肌注射 scFv 抗体溶液(0.1mg 蛋白 / kg 体重), 每只注射 0.2ml 。

[0051] 免疫 21 天后检测中和抗体效价并接种传染性法氏囊病病毒 HB/11 株病毒液(每只胸肌注射 0.2ml , 含有的病毒剂量为 $10^{5.5}\text{EID}_{50}$) 进行攻毒;

中和抗体效价的测定方法(微量滴定法): (1) 取血清, 56°C 水浴灭活 30min , 自然冷却, 用 Hank's 血清作 2 倍系列稀释(从 $1:2$ 稀释到 $1:4096$), 每种稀释液加入等体积病毒悬液

(100TCID₅₀/ml)充分震荡混合,37℃培养 1h;将(2)鸡成纤维细胞接种于细胞培养板,每孔 100 微升,每孔加入 100 微升步骤(1)得到的混合液;设置不加入病毒悬液的对照组和不加入血清的对照组;37℃,5% CO₂ 培养,连续观察 3-5 天,若抗体有中和活性,则 DF1 细胞不会出现病变,计算第 7 天的抗体效价(即能抑制 DF1 细胞发生病变的最大稀释度)。结果见表 3a 和 3b;

攻毒 72h 后,统计每组中死亡鸡的只数。结果见表 3a 和 3b;

表 3a IBDV-VP2 scFv29 抗体效价结果和每组的死亡鸡数

| 组别 | 中和抗体效价 | 死亡鸡数 |
|-----|--------------------|------|
| 第一组 | 1: 2 ³ | 6/10 |
| 第二组 | 1: 2 ¹² | 0/10 |
| 第三组 | 1: 2 ⁷ | 3/10 |
| 第四组 | 1: 2 ⁵ | 4/10 |
| 第五组 | 1: 2 ⁴ | 6/10 |

表 3b IBDV-VP2 scFv30 抗体效价结果和每组的死亡鸡数

| 组别 | 中和抗体效价 | 死亡鸡数 |
|-----|--------------------|------|
| 第一组 | 1: 2 ³ | 6/10 |
| 第二组 | 1: 2 ¹² | 0/10 |
| 第三组 | 1: 2 ⁸ | 2/10 |
| 第四组 | 1: 2 ⁷ | 4/10 |
| 第五组 | 1: 2 ⁵ | 4/10 |

序列表

序列 1、IBDV-VP2 scFv29 抗体 VH-linker-VL 蛋白质氨基酸序列

AVTLDEPGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSDRGMGWMRQAPGRGLEWVASINGAGSYTYYPAPVKGRATISR
DNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTIFYCAKSAYGTTTWSGCI AKDVDTWGHGTEVIVSSASGGGGSGGGGSGGGGSALTQP
SSVSANLGGTVEITCSGSSGSYGWYQQKSPGSAPVTLIYYNNKRPSDVPSRFSGSRSGSTATLITIGVQAEDAIFYF
CGGYDSSAAYVGFAGTTLTVLG

双下划线的部分为 linker

序列 2:IBDV-VP2 scFv29 抗体 VH-linker-VL 基因核苷酸序列

GCCGTGACGTTGGACGAGCCCGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCC
TCCGGTTACCTTCAGTGACCGTGGCATGGGATGGATGCGCCAGGCGCCTGGCAGGGGGCTGGAGTGGGTGCGGAG
TATTAATGGTGTGGTAGTTACACATACTACGCGCCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGC
AGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTTCTGCGCCAAAAGTGCTTAT
GGTACTACTACTTGGAGTGGTTGTATTGCTAAAGATGTCGACACATGGGGCCACGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTC
CGCTAGCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCGGTGGTGGTGGATCCGCGCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGT
CAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCGAGATCACCTGCTCCGGGAGTAGTGGCAGCTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCT
CCTGGCAGTGCCCCTGTCACTCTGATCTATTACAACAACAAGAGACCCTCGGACGTCCCTCAGATTCTCCGGTTC
CAGATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACGAGGCTGTCTATTTCTGTGGTGGCT
ACGACAGCAGTGCTGCTTATGTTGGTATATTTGGGGCCGGGACAACCTGACCGTCCCTAGGTTAA

序列 3、IBDV-VP2 scFv30 抗体 VH-linker-VL 蛋白质氨基酸序列

AVTLDEPGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAGIYSSGSSTYYAPAVKGRATISR
DNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKAGSGYCGWSAYGYGCAAYPGNIDAWGHGTEVIVSSASGGGGSGGGGSGGGG
SALTQPSPVSANPGETVKITCSGGYSNYGWYQQKSPASAPVTVIYDNNKRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQA
EDEAVYYCGSRDSNYIGIFGATTLTVLG

双下划线的部分为 linker

序列 4:IBDV-VP2 scFv30 抗体 VH-linker-VL 基因核苷酸序列

GCCGTGACGTTGGACGAGCCCGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGTCTCGTCTGCAAGGC
CTCCGGTTACCTTCAGCAGTTACGCCATGCACTGGGTGCGACAGGCGCCCGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGG
GGTATTTACAGCAGTGGTAGTAGCACATACTACGCGCCGGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCAGAGGGACAACG
GGCAGAGCACAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCCAAAAGCTGG
TAGTGGTTACTGTGGTTGGAGTGTACGGTTACGGTTGTGCTGCTTATCCTGGTAACATCGACGCATGGGGCCA
CGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCCGCTAGCGGTGGTGGTGGTTCGGTGGTGGTGGTTCGGTGGTGGTGGATC
CGCGCTGACTCAGCCGTCCCCGGTGTGAGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGTTACAG
CAACTACTATGGCTGGTATCAGCAGAAGTCTCCTGCCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCTATGACAACAACAAGAG
ACCCTCGGACATCCCTTCTCGATTCTCCGGTCCAAATCCGGCTCCACGGGCACATTAACCATCACTGGGGTCCA

AGCCGAGGACGAGGCCGTCTATTACTGTGGGAGCAGGGACAGCAACTATATTGGTATATTTGGGGCCGGGACAAC
CCTGACCGTCCTAGGTAA

序列 5、IBDV VP2 蛋白氨基酸序列

TNLQDQTQQIVPFIRSLLMPTTGPASIPDDTLEKHTLRSETSTYNLTVGDTGSGLIVFFPGFPGSIVGAHYT
LQSNNGNYKFDQMLLTAQNLPASNYCRLVSRSLTVRSSTLPGGVYALNGTINAVTFQGSLELTDVSYNGLMSATAN
INDKIGNVLVGEVTVLSLPTSVDLGYVRLGDPIPAIGLDPKMOVATCDSSDRPRVYITITAANDYQFSSQYQAGGVTI
TLFSANIDAITSLSIGGELVFTSVQGLILGATIYLIIGFDGTAVITRAVAADNGLTAGTDNLMPFNIVIPTSEITQP
ITSIKLEIVTSKSGGQAGDQMSWSASGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVAYERVATGSVVTVAGVSNFELIPNPELAK
NLITEYGRFDPGAMNYTKLILSERDRLGIKTVWPTREYTFREYFMEVADLNSPLKIAGA

序列 6、IBDV vp2 基因核苷酸序列

ATGACAAACCTGCAAGATCAAACCCAACAGATTGTTCCGTTTCATACGGAGCCTTCTGATGCCAACAACCGGA
CCGGCGTCCATTCCGGACGACACCCCTAGAGAAGCACACTCTCAGGTCAGAGACCTCGACCTACAATTTGACTGTGGG
GGACACAGGGTCAGGGCTAATTGTCTTTTTCCCTGGTTTCCCTGGCTCAATTGTGGGTGCTCACTACACACTGCAGA
GCAATGGGAACACAAGTTCGATCAGATGCTCCTGACTGCCAGAACCTACCGGCCAGCTACAACACTACTGCAGGCTA
GTGAGTCGGAGTCTCACAGTGAGGTCAAGCACACTCCCTGGTGGCGTTTATGCATTAACGGAACCATAAACGCCGT
GACCTTCCAAGGAAGCCTGAGTGAAGTACAGATGTTAGCTACAAATGGGTTGATGTCTGCGACGGCCAACATCAACG
ACAAAATCGGGAACGTCCTAGTAGGGGAAGGGGTAAGTGTCCCTCAGCTTACCCACATCATATGATCTGGGGTATGTG
AGACTCGGTGACCCCATTTCCCGCTATAGGGCTTGACCCAAAGATGGTAGCAACATGTGACAGCAGTGATAGGCCAG
AGTCTACACCATAACTGCAGCCAATGACTACCAATTCATCACAGTACCAAGCAGGTGGAGTGACAATCACACTGT
TCTCAGCAAACATCGATGCCATCACAAGCCTCAGCATCGGGGGAGAACTTGTGTTTCAAACAAGCGTCCAAGGCCTT
ATACTGGGCGCTACCATCTACCTTATAGGCTTCGATGGGACTGCGGTAATCACCAGAGCTGTGGCCGCAGACAATGG
GCTAACGGCCGGCACTGACAACCTTATGCCATTCAATATTGTGATTCCAACCAGCGAGATAACCCAGCCAATCACAT
CCATCAAACCTGGAGATAGTTACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGCGGGGGATCAGATGTGATGGTCAGCAAGTGGGAGC
CTAGCAGTGACGATCCACGGTGGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTCCCCTCACACTAGTAGCCTACGAAAGAGTGGC
TACAGGATCTGTGTTACGGTCGCCGGGTGAGCAACTTCGAGCTGATCCCAAATCCTGAACTAGCAAAGAACCTGA
TCACAGAATACGGCCGATTTGACCCAGGGCCATGAACTACACAAAACCTGATACTGAGTGAGAGGGACCGTCTTGGC
ATCAAGACCGTGTGGCCAACAAGGGAGTACACCGACTTTCGCGAGTACTTTATGGAGGTGGCCGACCTCAACTCTCC
CCTGAAGATTGCAGGAGCA

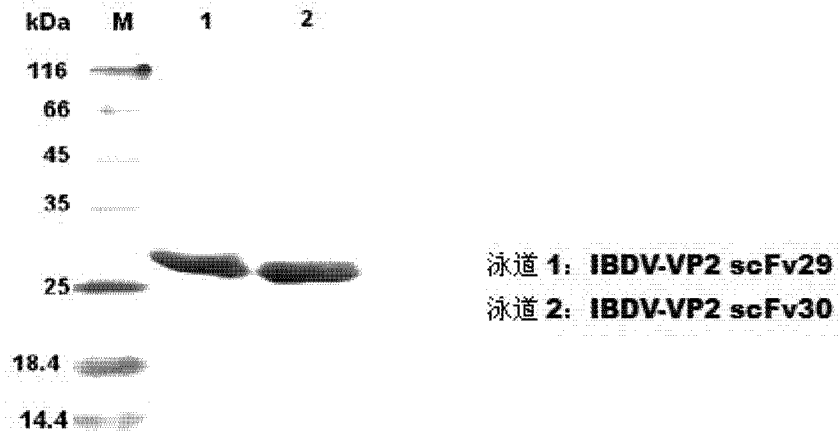
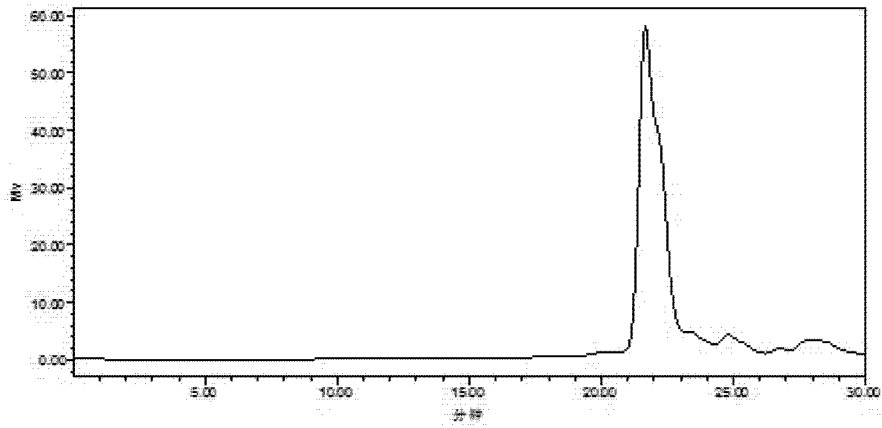


图 1

A: IBDV-VP2 scFv29SEC-HPLC 图谱



B: IBDV-VP2 scFv30SEC-HPLC 图谱

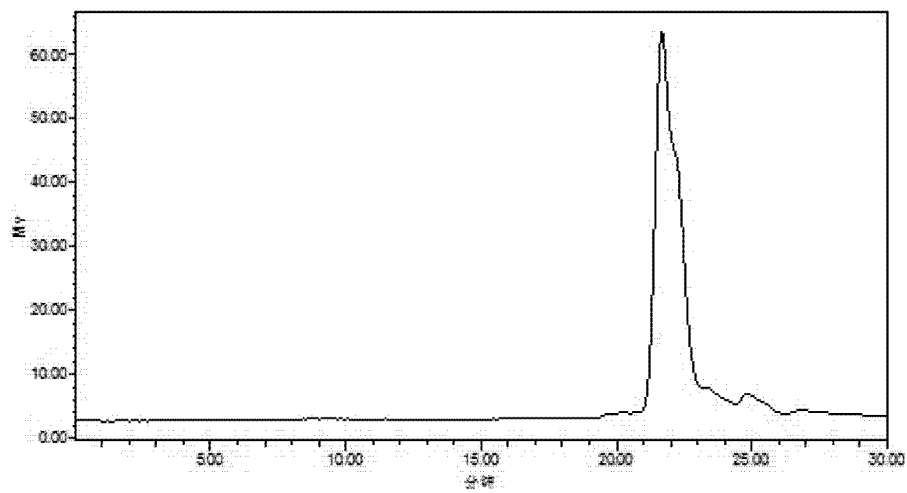
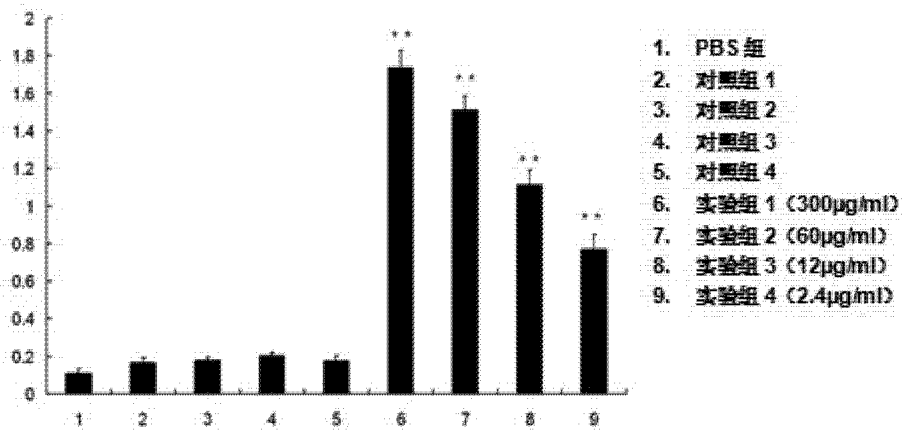


图 2

A、IBDV-WP2 scFv29 对 WP2 蛋白的特异性和亲和力 ELISA 结果



B、IBDV-WP2 scFv30 对 WP2 蛋白的特异性和亲和力 ELISA 结果

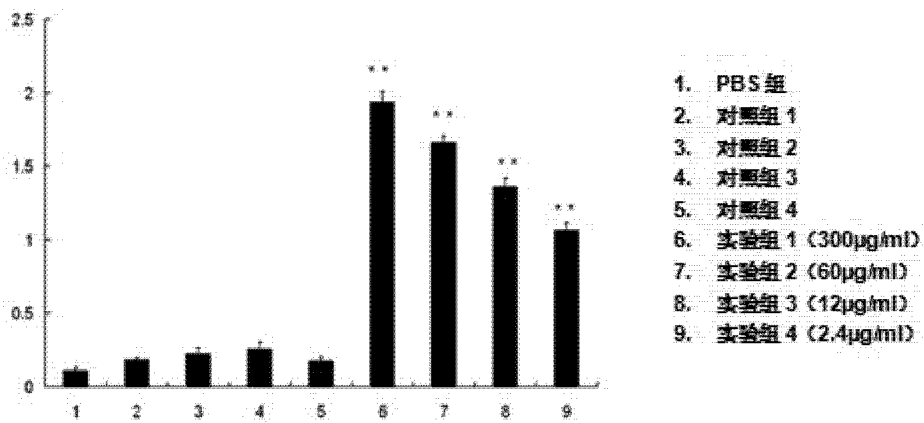
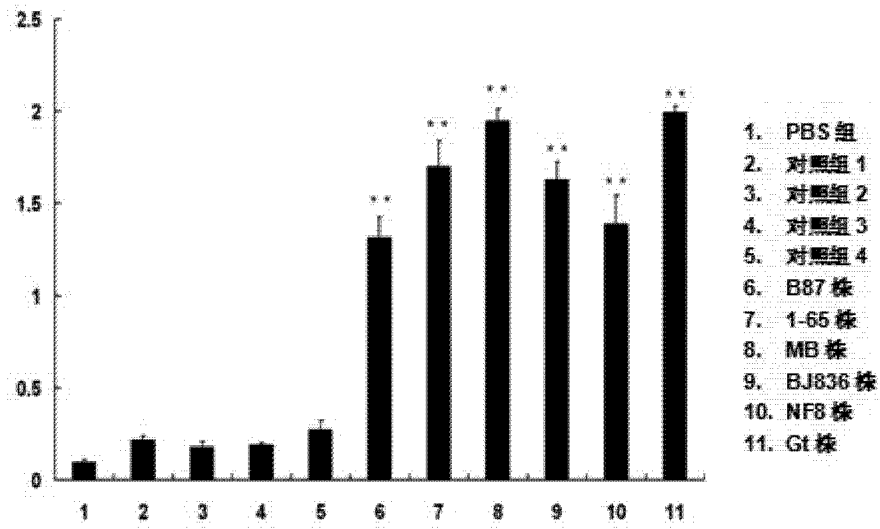


图 3

A、IBDV-VP2 scFv29 抗体对不同 IBDV 病毒的特异性和亲和力的结果



B、IBDV-VP2 scFv30 抗体对不同 IBDV 病毒的特异性和亲和力的结果

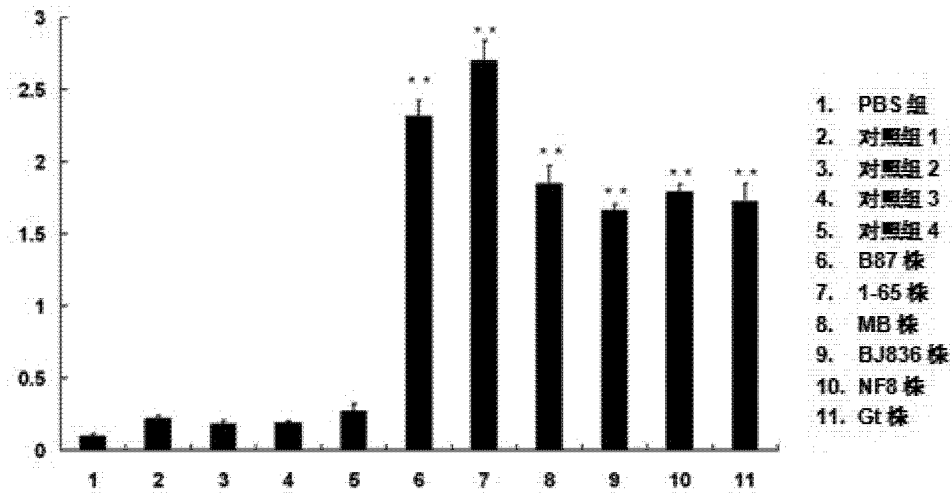


图 4