

刘金凤, 吴健敏, 覃绍敏, 等. 抗猪瘟病毒单链抗体基因的构建及其推导的蛋白质三级结构的分子模拟[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 817-823.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.017

抗猪瘟病毒单链抗体基因的构建及其推导的蛋白质三级结构的分子模拟

刘金凤, 吴健敏, 覃绍敏, 白安斌, 陈凤莲, 曹颖颖

(广西壮族自治区兽医研究所, 广西 南宁 530001)

摘要: 为利用抗猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)单链抗体基因(*ScFv*)建立 CSFV 病原快速检测方法, 以抗猪瘟病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增重链可变区基因(*VH*)和轻链可变区基因(*VL*), 以柔性多肽(Gly_4Ser_3)为接头(Linker), 经重叠延伸反应将 *VH*/*VL* 基因拼接为完整的 *CSFV-ScFv* 基因, 并进行克隆、测序分析。结果显示, 所克隆单链抗体基因全长 732 bp, 包括 363 bp 的 *VH*、45 bp 的 Linker 和 324 bp 的 *VL*, 为 *VH*-Linker-*VL* 结构, 编码的氨基酸序列含有明确的互补决定区(CDR)和框架区(FR)以及特征性的半胱氨酸残基, 并与多种鼠源单链抗体基因高度同源, 具有重组功能性鼠源抗体可变区特征。对 *CSFV-ScFv* 基因所编码蛋白质三级结构进行预测, 显示其形成口袋样形状的空间构象, 理论上具有良好的抗原结合活性。表明本研究成功构建了 *CSFV-ScFv* 基因。

关键词: 猪瘟病毒; 单链抗体; 序列分析; 分子模拟

中图分类号: S852.65⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2015)04-0817-07

Construction of single chain antibody gene of anti-CSFV and homology modeling of 3D structure of deduced protein

LIU Jin-feng, WU Jian-min, QIN Shao-min, BAI An-bin, CHEN Feng-lian, CAO Ying-ying

(Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

Abstract: To establish a quick detection assay for classical swine fever virus (CSFV) by using single-chain fragment variable (*ScFv*) gene, total RNA was first abstracted from the hybridoma cell anti-CSFV14 which could secrete anti-CSFV antibody in order to amplify *VH* and *VL* genes in variable regions by RT-PCR. Next, with the flexible polypeptide Gly_4Ser_3 as the linker, the *VL* and *VH* genes were spliced into a full length of *CSFV-ScFv* by means of splicing overlap extension PCR. Then, the full length of *CSFV-ScFv* was sequenced following cloning. The cloned *CSFV-ScFv* gene showed a structure of *VH*-Linker-*VL*, with a full length of 732 bp, including the *VH* of 363 bp, the linker of 45 bp and the *VL* of 324 bp. It was featured by an explicit complementarity determining region (CDR), a framework region (FR) and characteristic cysteine residues, and was highly homologous to various mouse-borne single-chain genes, indicative of the characteristics of functionally recombinant mouse-borne antibody variable fragments. The computer graphic modeling of its protein 3D structure predicted a

pocket-shaped spatial configuration, suggestive of a strong antigen binding activity theoretically. The results demonstrated the successful construction of *CSFV-ScFv* gene in this research.

Key words: classical swine fever virus (CSFV); single-chain variable fragment (*ScFv*); sequence analysis; homology modeling

收稿日期: 2014-12-10

基金项目: 广西科技攻关与新产品试制项目(桂科攻 1123007-3)

作者简介: 刘金凤(1986-), 女, 广西容县人, 硕士, 研究实习员, 从事动物传染病与分子免疫学研究。(Tel) 13407723103; (E-mail) fjinliu@163.com

通讯作者: 吴健敏, (E-mail) wu-jm20@163.com

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种以高热、出血及高死亡率为特征的接触性烈性传染病,在世界范围内广泛流行,一旦暴发将会对当地养猪业造成毁灭性的打击,已成为危害全球养猪生产的重要经济性疫病之一^[1-4]。在中国,虽然依靠兔化弱毒疫苗免疫,较好地控制了猪瘟的大规模流行,但零散发生仍然存在,并且发病特点发生了变化。为此,对猪瘟的防治依旧面临着严峻的挑战,而在猪瘟的综合防治中,如何快速、准确诊断具有非常重要意义。

免疫学检测是病原微生物诊断的主要手段,其关键技术在于获得高效的可用于检测的抗体。目前,以单链抗体为代表的基因重组抗体技术为抗体的制备提供了新途径。单链抗体(ScFv)是由免疫球蛋白的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)通过一段连接肽连接形成的单一肽链重组蛋白质,它具有完全抗原结合位点的最小抗体片段,分子量小、渗透性高,特异性强,而且抗体的亲和力和特异性在制备过程中均能较为容易控制,因此在免疫学检测与医学诊断中具有重要的应用价值和广泛的应用前景^[5-7]。本研究在获得分泌抗猪瘟病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株的基础上,利用基因工程方法扩增了抗体可变区基因 VH 和 VL,组装成单链抗体基因(CSFV-ScFv),并进行克隆和测序鉴定,同时利用计

算机软件对 CSFV-ScFv 基因及其所编码蛋白质的性质进行详尽分析,为进一步建立以单链抗体技术为支撑的 CSFV 病原快速检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

抗 CSFV 单克隆抗体杂交瘤细胞株 anti-CSFV14^[8]、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由广西兽医研究所诊治中心实验室制备与保存;pMD18-T 载体、DNA marker、限制性内切酶、RevertAidM-MuLV Reverse Transcriptase、*pfu* 聚合酶、*Ex Taq* DNA Master Mix、RNase 抑制剂购自 TaKaRa 公司,质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒购自北京天根生物公司,TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,酵母抽提物及胰蛋白胨购自 OXID 公司,其他生化试剂均为国产分析纯级产品。

1.2 引物及 Linker 设计

参照文献[9]设计鼠源抗体重链及轻链可变区的扩增引物,连接肽 Linker 采用文献[10]报道的较常用的 (Gly₄Ser)₃ 形式;将 Linker 设计在 VH 基因的下游引物和 VL 基因的上游引物,并分别在两端引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Not* I,序列由北京博迈德基因有限公司合成,具体如表 1。

表 1 CSFV-ScFv 基因引物序列

Table 1 The primer sequences of CSFV-ScFv gene

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增基因片段
VH-F	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGCCCC	VH
VH-B	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG	
VL-F	CCGTTTYYAKYTCCARCTTKGTSCC	VL
VL-B	GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA	
VH-F1	<u>GGATCC</u> CAGGTGCAACTGCAGGAGTCTG	VH-Linker
VH-Linker-B	CGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTGACCGT	Linker-VL
Linker-VL-F	GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTGACATTGAGCTCACCCAG	
VL-B1	<u>GCGGCCGCCCGTTT</u> CAGTTCCAGCTTT	

下划线部分为酶切位点。

1.3 杂交瘤细胞总 RNA 提取及 cDNA 合成

PRRSV 杂交瘤细胞株 anti-CSFV14 复苏培养,待细胞长至对数生长期,细胞计数约 8×10^7 时,1 200 r/min 离心 3 ~ 5 min 收集细胞,在无 RNA 酶的条件下按 TRIzol 试剂盒操作说明书提取细胞总 RNA,并

取少量总 RNA 用紫外分光光度仪进行纯度和浓度鉴定。反转录过程按 TaKaRa 逆转录酶(*M-MuLV*)产品说明书进行。

1.4 VH 和 VL 基因的扩增

以合成 cDNA 第一链为模板,分别以 VH 基因

上、下游引物(VH-B、VH-F)和VL基因上、下游引物(VL-B和VL-F)扩增VH基因和VL基因。PCR反应体系按常规比例配成50 μ l(反应程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min)。取5 μ l PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,切胶回收获得VH和VL基因,并直接进行DNA测序。

1.5 全长CSFV-ScFv基因的扩增

以上述的纯化产物为模板,用引物VH-F1、VH-Linker-B和Linker-VL-F、VL-B1分别进行VH-Linker和Linker-VL序列的扩增(反应体系和反应程序同方法1.4),PCR产物经电泳鉴定后进行纯化回收。取纯化产物等摩尔混合,通过PCR反应完成VH-Linker-VL片段的预拼接(预拼接程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,10个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min),再以2 μ l预拼接产物为模板,用VH-F1、VL-B1引物进行VH-Linker-VL全长基因的拼接,拼接程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物经电泳鉴定后进行纯化回收,获得VH-Linker-VL全长基因片段。

1.6 CSFV-ScFv基因的克隆与鉴定

将全长ScFv纯化回收后与pMD-18T载体连接,连接体系与程序参考载体说明书。将连接产物按常规方法转化DH5a感受态细胞,挑取单菌落提取质粒,经过BamHI与NotI酶切鉴定正确的重组质粒pMD-CSFV-ScFv送至北京华大公司进行核酸序列测定分析。

1.7 CSFV-ScFv基因所编码的蛋白质的结构预测

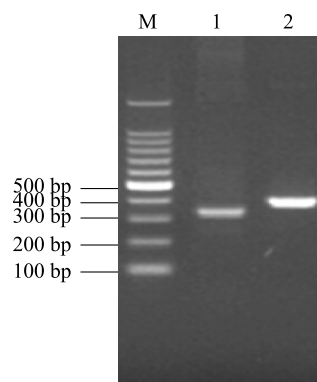
基于CSFV-ScFv基因的核苷酸序列,利用Edit-Seq推导其氨基酸序列,利用NCBI的blast、Igbblast进行氨基酸序列的同源性分析和IgG结构域分析,利用ExPASy服务器上的ProtParam软件分析CSFV-ScFv分子理化性质,利用NPSA在线服务器预测CSFV-ScFv二级结构,最后采用SWISS-Model在线服务器预测CSFV-ScFv三级结构,并进行同源建模。

2 结果

2.1 VH、VL基因片段的扩增

提取对数生长期的抗PRRSV单克隆抗体杂交瘤细胞anti-CSFV14的总RNA,测定其浓度为1 262

ng/ μ l。以此RNA为模板扩增VH和VL基因,扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳分析,结果(图1)显示,获得预期的约363 bp的VH基因和约324 bp的VL基因。



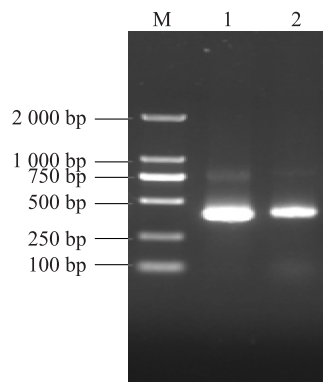
M:100 bp DNA ladder。1:VL;2:VH。

图1 CSFV VH、VL基因扩增结果

Fig.1 PCR amplified products of CSFV VH and VL genes

2.2 全长CSFV-ScFv基因的扩增拼接

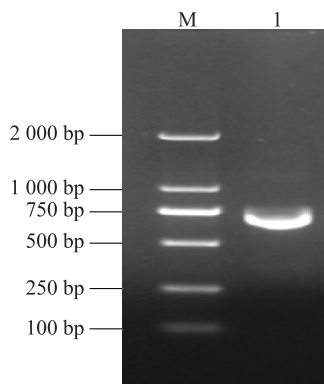
以纯化的VH与VL基因为模板分别扩增出长约410 bp的VH-Linker及长约369 bp的Linker-VL基因片段(图2),将VH-Linker与Linker-VL等量混合,在PCR反应中完成VH-Linker-VL的预拼接,再以预拼接产物为模板进行VH-Linker-VL全基因的拼接扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定,获得预期长约730 bp的目的基因(图3)。



M:DL2000 DNA marker;1:Linker-VL;2:VH-Linker。

图2 VH-Linker、Linker-VL基因扩增结果

Fig.2 PCR amplified products of VH-Linker and Linker-VL genes



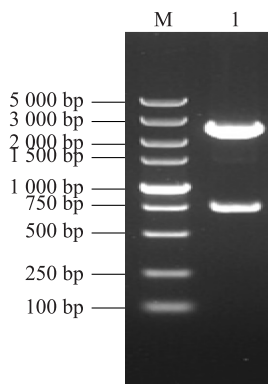
M: DL2000 DNA marker; 1: CSFV-ScFv。

图 3 全长 CSFV-ScFv 基因扩增结果

Fig. 3 PCR amplified products of full-length CSFV-ScFv gene

2.3 CSFV-ScFv 基因的克隆及酶切鉴定

将纯化的 CSFV-ScFv 基因与 pMD-18T 载体进行连接, 转化感受态细胞, 提取单菌落质粒, 经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切鉴定后, 发现重组质粒 pMD-CSFV-ScFv 可切出约 730 bp 的外源基因片段 (图 4)。



M: DL5000 DNA marker; 1: pMD-CSFV-ScFv *Bam*H I/*Not* I。

图 4 pMD-CSFV-ScFv 重组质粒的酶切鉴定结果

Fig. 4 Identification of pMD-CSFV-ScFv recombinant plasmid

2.4 CSFV-ScFv 重组质粒的测序及分析

将酶切鉴定正确的重组质粒进行序列测定, 结果显示所扩增的单链抗体基因全长 732 bp, 由预期的 *VH* 基因、*VL* 基因和 Linker 组成, 其中 *VH* 基因位于 Linker 的上游, 大小为 363 bp, 为一开放阅读框, 不含终止密码子, 可编码 121 个氨基酸; 序列中有明确的 3 个互补决定区 (CDR) 和 4 个框架区 (FR), 第 22、96 位的氨基酸残基为抗体可变区特征性的半胱

氨酸残基, 核苷酸序列与鼠源的重链可变区框架相似率最高达 90.28%, 表明 *VH* 基因所编码的氨基酸序列符合鼠抗体可变区基因特征。*VL* 基因则位于 Linker 下游, 长 324 bp, 基因内无终止密码子, 编码 108 个氨基酸, 序列中亦有明确的 CDRs 和 FRs, 抗体可变区特征性的半胱氨酸残基位于第 23、88 位, 核苷酸序列与鼠源的轻链可变区框架相似率最高达 92.83%, 表明 *VL* 基因所编码的氨基酸序列符合鼠抗体可变区特征。Linker 大小为 45 bp, 编码 15 个氨基酸残基。序列详见图 5。

2.5 CSFV-ScFv 蛋白质结构的分析预测

2.5.1 CSFV-ScFv 氨基酸序列比对分析 将 *VH*、*VL* 及 *ScFv* 基因编码的氨基酸序列经 NCBIblastp 检索分析, 发现了 IgG 典型的可变区结构域 (IGV), 并与多种已登录的鼠单链抗体同源性很高, 与 *ScFv* anti-White Spot Syndrome Virus (AAY88909.1) 同源性最高达 79%, 具有鼠源单链抗体可变区的所有特征。

2.5.2 CSFV-ScFv 蛋白质理化性质与二级结构预测分析 用蛋白质序列分析软件分析蛋白质理化性质, 并对其二级结构进行预测分析。CSFV-ScFv 基因所编码蛋白质分子式为 $C_{1164}H_{1767}N_{317}O_{363}S_8$, 原子数 3 619, 理论相对分子质量为 26 266.2, 等电点为 8.93, 不稳定系数为 35.05, 为不稳定蛋白质, 疏水氨基酸 92 个, 占 37.7%, 亲水性评估值为 -0.425, 为亲水性蛋白质。二级结构预测结果显示, 该蛋白质主要由 β -片层和无规则卷曲组成。其中, 17 个氨基酸残基可形成 α 螺旋, 占 6.97%, 92 个氨基酸残基形成自由伸展, 占 37.70%, 135 个氨基酸残基可形成无规则卷曲, 占 55.33%, Linker 呈无规则卷曲 (图 6)。

2.5.3 CSFV-ScFv 蛋白质三级结构分子建模 经序列比对发现 *2gki.1* 所编码的氨基酸序列与目的基因 CSFV-ScFv 所编码的氨基酸序列同源性可达到 72.20%, 根据同源建模的思路, 运用 SWISS-Model 软件进行同源建模, 模拟 CSFV-ScFv 蛋白质三级结构, 模拟结构可靠。结果显示, 重链可变区主要由 10 个 β 片层折叠形成, 轻链可变区主要由 11 个 β 片层折叠形成。三级结构中连接肽无规则卷曲形成索状结构, 将 *VH* 和 *VL* 牵拉而相互靠近, 形成一个口袋样形状的沟槽结构, 以利于抗原结合 (图 7), 理论上具有良好的抗原结合活性。


```

1  CAGGTGCAACTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGCTCTGCAAGGCTTCT
1  Q V Q L Q E S G A E L A R P G A S V K L S © K A S
76  GGCTACACCTTTACTAGCTACTGGATGCAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGGGCT
26  G Y T F T S Y W M Q W V K Q R P G Q G L E W I G A
      CDR1
151  ATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAGGTACACTCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAATCC
21  I Y P G D G D T R Y T Q K F K G K A T L T A D K S
      CDR2
226  TCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCTTGGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGCGAATTA
76  S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y Y © A S E L
301  CTACGGCTACGTGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGT
101  L R L R A Y A M D Y W G Q G T T V T V S S G G G G
      CDR3
376  TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGTGGCATTGGGCTCACCCAGTCTCCAAATTCATGTCCACATCA
126  S G G G S G G G S W H W A H P V S K F M S T S
      Linker
451  GTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAAAAA
151  V G D R V S I T © K A S Q D V S T A V A W Y Q Q K
      CDR1
526  CCAGGGCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC
176  P G Q S P K L L I Y W A S T R H T G V P D R F T G
      CDR2
601  AGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTGAG
201  S G S G T D Y T L T I S S V Q A E D L A L Y Y © Q
676  CAACATTATAGCACTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGGACAAAGCTGGAAGTGAACG
226  Q H Y S T P W T F G G G T K L E L K R
      CDR3

```

圆圈所示为半胱氨酸残基,横线所示为 Linker 接头 (Gly₄Ser)₃ 和 CDR 区。

图5 CSFV-ScFv 基因及其所推导的氨基酸序列

Fig.5 The CSFV-ScFv gene and its deduced amino acid sequence

```

      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
QVQLQESGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPQGGLGWIGAIYPGDGDTTRYTKQFKGKATL
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
TADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCASELLRLRAYAMDYWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGHWA
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
HPVSKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDYTLT
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
ISSVQAEDLALYYCQHYSTPWTFGGGTKLELKR
cccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc

```

图6 CSFV-ScFv 蛋白质二级结构预测

Fig.6 The prediction of secondary structure of CSFV-ScFv protein

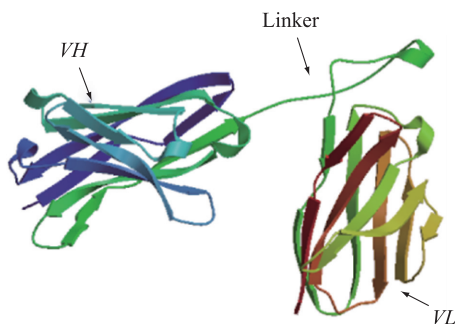


图7 CSFV-ScFv 蛋白质三级结构同源建模

Fig.7 The 3D structure homology modeling of CSFV-ScFv protein

3 讨论

抗体在免疫学检测的应用由来已久,早在 19 世纪末,人们就能通过免疫动物获得抗血清。1975 年, Kohler 等^[11]建立的 B 淋巴杂交瘤细胞技术更是抗体生产的重大技术革命,不仅为医学与生物学研究开创了新纪元,也为临床疫病的诊断和治疗提供了新的工具。然而由于单克隆抗体制备过程复杂,价格昂贵,很大程度上限制了它的临床使用。随着基因工程抗体技术的发展,单链抗体技术走进了人们的视野,单链抗体由于分子量小,穿透性强,免疫

原性低,体内易于清除,利于进行基因工程操作,在疾病预防、诊断和治疗中显示了巨大的应用前景。以单链抗体替代传统的 IgG 抗体为检测元件应用于病原微生物的检测具有明显的优势。与传统单抗比,单链抗体制备简单,成本低廉而又具有亲代抗体的全部抗原结合位点,Nimmagadda 等^[12]以 HAV-ScFv 基因为基础建立的免疫捕获 ELISA 检测方法,与商业化单克隆抗体检测试剂盒应用效果无明显的差异,证实单链抗体具有亲本抗体相同的免疫活性。此外,单链抗体基因工程操作更简便,其 N 端或 C 端可与其他分子拼接构建双功能分子,除替代传统抗体用于建立 ELISA 等检测方法外,还可应用于疫病的快速检测领域,如覃绍敏等^[13]以抗人红细胞单链抗体与猪瘟 E2 基因融合蛋白质为基础建立的红细胞凝集试验可快速、简便、准确地进行猪瘟抗体的检测。目前,国内外学者已经研制出多种单链抗体基因,并应用于临床^[14-15]。

本研究在前期的试验中获得 1 株高亲和力的抗猪瘟 E2 蛋白质单克隆抗体杂交瘤细胞 anti-CSFV14 的基础上,通过合成通用引物,分别进行单克隆抗体的重链和轻链可变区基因的扩增,并进行测序。测序结果用 IMGT 数据库、NCBI 数据库平台提供的在线分析工具进行验证,通过分析,证实了基因序列的正确性,并根据分析的结果重新设计了后续的引物进行 VH 基因、VL 基因的修正以及 CSFV-ScFv 基因全长的拼接克隆及结构预测分析。

单链抗体的表达量及其免疫活性和其构建方法密切相关,不同的连接顺序会影响 ScFv 的二聚或多聚化的行为^[16],进而影响单链抗体表达产量及其三维空间构象的形成,最终影响单链抗体的生物活性。很多研究结果表明,VL-Linker-VH 的连接方式可表现出更强的形成高分子聚合物的趋势,在进行分泌表达时其表达量要高于 VH-Linker-VL 的 10~20 倍,但 VH-Linker-VL 基因表达的蛋白质要比 VL-Linker-VH 基因表达的蛋白质显示出更大的结合活性^[17-18],因此,基于抗体活性效价考虑,我们选取了亲和力较好的 VH-Linker-VL 连接方式构建 CSFV-ScFv 基因。Linker 的设计对保持亲本抗体的亲和力有重要影响,它必须能使 VH 和 VL 易于自由折叠,使抗原结合位点处于适当的构型,并不引起其分子动力学改变,避免对抗原结合部位造成干扰。目前报道使用最多的 Linker 是 Huston 根据 X 线晶体衍

射分析抗体可变区结构及计算机辅助分析结果设计的 15 肽序列 (Gly₄Ser)₃,该序列已经有许多成功应用的报道,因此本研究中亦选用此序列。

蛋白质同源建模是基于查询的蛋白质氨基酸序列与已知蛋白质氨基酸序列显著的相似性来预测蛋白质三维结构的方法,是一种可靠的、广泛接受的具有实用性的结构预测技术。通常蛋白质的氨基酸序列间相似度应高于 30%,表示空间结构相似,低于 30% 时,序列比对时会搜索到大量的非相关蛋白质,难以用于同源建模^[19]。我们对所得到的 CSFV-ScFv 基因进行同源建模分析时,搜索到的模型蛋白质与靶蛋白质的相似度为 72.20%,所以对靶蛋白质的模拟结果可靠度高。从模拟结果可看出,CSFV-ScFv 属于 β -片层结构,其相邻的两条 β -链反向平行,形成由轻链连接的 β -片层结构,两个片层之间通过疏水作用和二硫键稳定。ScFv 的理化性质分析可知,ScFv 为不稳定蛋白质。此外,从蛋白质的三级结构还可看出,目的蛋白质的 VH 和 VL 结构域相互靠近,形成一个相对致密的分子,Linker 则游离在外,使 VH 和 VL 形成一个口袋结构,这样的结构可能有利于抗体识别和结合抗原。

参考文献:

- [1] MOENNIG V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy[J]. Veterinary Microbiology, 2000, 73(2): 93-102.
- [2] 华利忠,吴文开,邵国青. 发酵床与传统水冲圈模式下猪瘟、蓝耳病及口蹄疫血清抗体差异调查[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 178-180.
- [3] 王风云,林峰,陈玉霞,等. 猪瘟与猪链球菌病混合感染的诊断与防治[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 183-185.
- [4] 谭菊,李巨银,黄东璋,等. 猪瘟与附红细胞体病混合感染的诊治[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 181-182.
- [5] LI A, LI Z, WANG Y, et al. Construction and expression of a single chain antibody mimicing human ovarian cancer antigen CA125[J]. Cell Mol Immunol, 2006, 3(1): 59-62.
- [6] 秦丽莉,蒋春明. 单链抗体研究进展及其在医学中的应用[J]. 国外医学:放射医学核医学分册, 2006, 29(6): 255-257.
- [7] 沈倍奋,陈志南,刘民培. 重组抗体[M]. 北京:科学出版社, 2005: 347-351.
- [8] 毛燕. 广西猪瘟病毒分子流行病学调查及单克隆抗体的制备[D]. 南宁:广西大学, 2012.
- [9] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京:科学出版社, 2001: 87.

- [10] HUSTON J S, LEVINSON D, MUDGETT-HUNTER M, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988,85(16): 5879-5883.
- [11] KOHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256(5517): 495-497.
- [12] NIMMAGADDA S V, AAVULA S M, BIRADHAR N, et al. Development of recombinant single-chain variable fragment against hepatitis A virus and its use in quantification of hepatitis A antigen [J]. Biologicals, 2012,40(4): 299-308.
- [13] 覃绍敏,白安斌,吴健敏,等. 抗人红细胞单链抗体与猪瘟 E2 蛋白双功能融合蛋白的构建及生物学活性检测[J]. 生物工程学报, 2010, 26(1): 28-34.
- [14] CLACKSON T, HOOGENBOOM H R, GRIFFITHS A D, et al. Making antibody fragments using phage display libraries[J]. Nature, 1991, 325(6336): 624-628.
- [15] SUN C, WIRSCHING P, JANDA K D. Enabling ScFvs as multi-drug carriers: A dendritic approach[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003, 11(8): 1761-1768.
- [16] DOLEZAL O, PEARCE L A, LAWRENCE L J, et al. ScFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: shortening of the linker in single-chain Fv fragment assembled in VL to VH orientation drives the formation of dimers, trimers, tetramers and higher molecular mass multimers [J]. Protein Engineering, 2000, 13(8): 565-574.
- [17] GENG S, FENG J, LI Y, et al. Binding activity difference of anti-CD20 ScFv-Fc fusion protein derived from variable domain exchange[J]. Cell Mol Immunol, 2006,3(6): 439-43.
- [18] PLÜCKTHUN A,PACK P. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments[J]. Immunotechnology, 1997, 3(2): 83-105.
- [19] JIN X. Essential bioinformatics[M]. New York: Cambridge University Press,2006:173-230.

(责任编辑:袁 伟)