

高杨, 禹爱兵, 邹雪, 等. 噬菌体展示技术在动物疾病诊断中的应用进展 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 131-137.

GAO Y, YU A B, ZOU X, et al. Progress on the application of phage display technology in animal disease diagnosis [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 131-137.

噬菌体展示技术在动物疾病诊断中的应用进展

高杨^{1,2}, 禹爱兵², 邹雪¹, 荆学毅¹, 何惠媛¹, 武立壮¹, 洪亮^{1,2*}

(1. 天津农学院动物科学与动物医学学院/天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室, 天津 300392;

2. 天津市现代天骄农业科技有限公司/天津市绿色生态饲料重点实验室, 天津 301800)

摘要: 噬菌体展示技术是利用噬菌体将外源肽或蛋白基因融合表达在其表面的新技术。目前, 该技术广泛用于鉴定有特定功能的靶分子, 在抗原表位分析、治疗细菌或病毒感染、特异性抗体的制备、酶制剂的筛选等方面发挥着重要作用。本文综述了该技术在兽医病原微生物诊断方面的应用, 以期为该技术在兽医领域的应用与发展提供理论及技术参考。

关键词: 噬菌体展示技术; 筛选; 病原; 诊断; 动物疾病

中图分类号: S854.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)01-0131-07

Progress on the application of phage display technology in animal disease diagnosis

GAO Yang^{1,2}, YU Aibing², ZOU Xue¹, JING Xueyi¹, HE Huiyuan¹, WU Lizhuang¹, HONG Liang^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University/Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Healthy Husbandry, Tianjin 300392, China;

2. Tianjin Modern Tianjiao Agricultural Technology Co., Ltd., /Tianjin Key Laboratory of Green Ecological Feed, Tianjin 301800, China)

Abstract: Phage display is a new technology that utilizes phage to express exogenous peptide or protein gene fusions on its surface. Currently, phage display technology is extensively employed in the identification of target molecules with specific functions. This technology also plays a vital role in antigenic epitope analysis, therapy for bacterial or viral infections, preparation of specific antibodies, and screening of enzyme preparations. This paper reviews the application of this technology to veterinary pathogenic microbiological diagnosis, with a view to providing theoretical and technical references for the application and development of this technology in the veterinary field.

Keywords: phage display technology; screening; pathogen; diagnosis; animal disease

噬菌体展示技术 (phage display technology) 是一种筛选技术, 其本质是将不同的外源基因插入到噬菌体载体中。随着噬菌体的传代, 插入的外源蛋白基因会在噬菌体的表面表达, 形成噬菌体文库^[1]。通过利用噬菌体文库, 可以筛选出具有特定结构或功能的蛋白质, 从而高效、快速地得到与该蛋白高度亲和的抗体。筛选出的蛋白质还可以进一步用于生物学功能

的研究。近年来, 噬菌体展示技术在动物疾病的诊断和治疗方面展现出广阔的前景。它可以替代传统抗生素疗法或与抗生素联合使用。本文总结了噬菌体展示技术在动物疾病诊断领域的研究进展, 旨在为噬菌体展示技术在畜牧业的应用与发展提供参考。

1 噬菌体及噬菌体展示技术

噬菌体是由蛋白质外壳包裹着遗传物质的病毒, 它能够感染细菌并将其 DNA 整合到宿主基因组中, 成为宿主的一部分进行复制, 或者在宿主体内复制增殖, 最终将宿主菌裂解并释放出子代噬菌体。噬菌体根据其自身的吸附位点和宿主细菌表面受体结构的不同而表现出高度的特异性, 使得每种噬菌体仅能感染单一或者同一亚型的细菌^[2], 从而使其能够精准地攻击目标细菌, 而不会影响宿主的其他有益细菌或细

收稿日期: 2024-03-15; 修回日期: 2024-11-04

基金项目: 天津市研究生科研创新项目 (2021XY036); 天津市绿色生态饲料重点实验室开放课题项目 (TJ202301); 天津市科技计划项目 (23ZYCGSN00280); 天津市生猪产业技术体系创新团队项目 (HTPRS2024006)

第一作者: 高杨, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 洪亮, 讲师, 研究方向为抗生素替代剂, E-mail:

hongl0626@163.com。

胞^[3]。噬菌体展示技术是一种利用噬菌体作为载体，展示目标蛋白或肽段的方法。其原理是将目标蛋白或肽段的基因与噬菌体表面蛋白的基因进行融合，形成重组噬菌体。这些重组噬菌体在宿主细菌中复制时，目标蛋白或肽段会与噬菌体表面蛋白一同表达，并以相似的方式展示在噬菌体表面。通过对噬菌体库进行筛选，可以选择出表面展示目标蛋白的噬菌体克隆，从而实现目标蛋白的分离、鉴定以及功能研究，图 1 为使用 Biorender 软件绘制的技术路线图。它与传统的诊断和治疗方法相比，噬菌体展示技术具有成本

低、通量高、操作简单、时效快等优点^[4-6]。

噬菌体展示系统在基因组大小、展示蛋白、外源蛋白大小和展示拷贝数等方面存在差异，具体见表 1。根据噬菌体的类型，常见的噬菌体展示系统包括单链丝状噬菌体（M13）、T4 噬菌体、T7 噬菌体和 λ 噬菌体展示系统^[7]。其中，M13 噬菌体展示系统是目前应用最广泛的系统，因为它仅感染表达 F 菌毛（带有 F 质粒，能产生性菌毛）的大肠杆菌菌株，而噬菌体的外壳蛋白需要与 F 菌毛的末端结合才能吸附细菌^[8]。

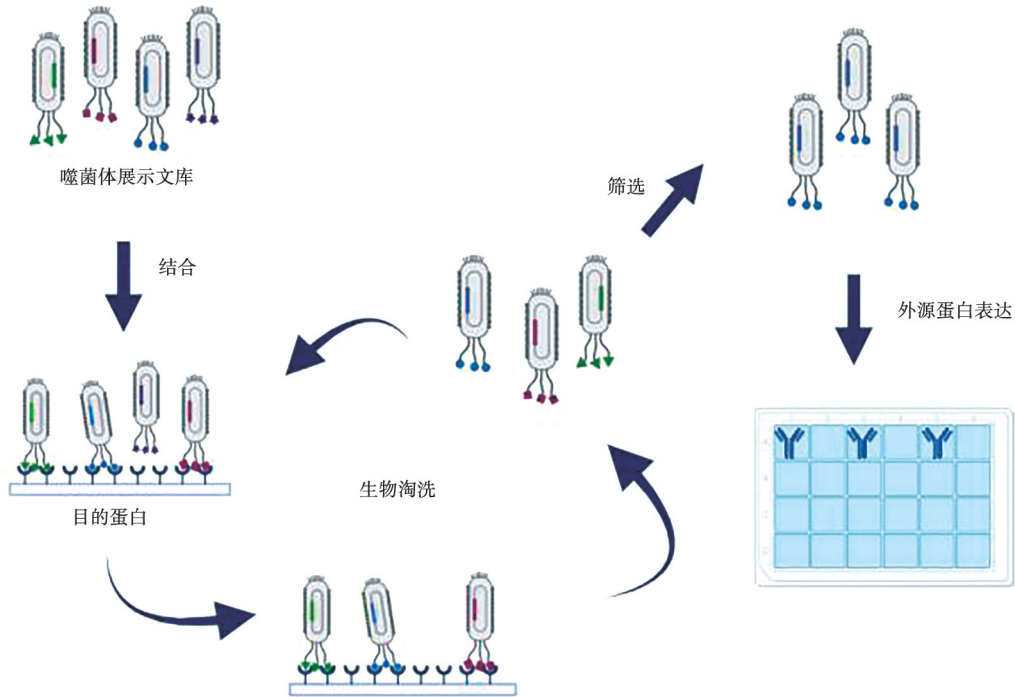


图 1 噬菌体展示技术路线示意

表 1 各类噬菌体展示系统的区别^[9-11]

噬菌体类型	基因结构	展示蛋白	蛋白质量	拷贝数
M13	单链环状 DNA 基因组，主要包含 P III、P VIII、P VII、P VIII、P IX 基因编码衣壳蛋白	P III 蛋白的 N 端；P VIII 蛋白的 N 端	42 kDa；5.2 kDa 以上	3~5 个；2 700 个
T4	双链线形 DNA，呈环状排列，主要包括 SOC 和 HOC 两种非必需外壳蛋白	SOC 蛋白的 C 端；HOC 蛋白的 C 端	9 kDa；40 kDa	较多拷贝（具体的蛋白质分子质量取决于展示的蛋白或肽段）
T7	线性双链 DNA，主要包括 10A（344 个氨基酸残基）和 10B（397 个氨基酸残基）两种衣壳蛋白	10B 蛋白的 C 端	T7 噬菌体的展示系统多样化，通常每个颗粒中有数十至数百个蛋白质展示位点	高，中，低拷贝（具体的蛋白质分子质量取决于展示的蛋白或肽段）
λ	两端是未闭合的线性双链 DNA，末端是长为 12 个核苷酸的互补单链，主要包括头部组装必需蛋白（D 蛋白）和尾部蛋白（V 蛋白）	D 蛋白的 N 端或 C 端；V 蛋白的羧基端折叠区	100 kDa 以上	405 个；192 个

2 噬菌体展示技术在动物疾病诊断上的应用

噬菌体展示技术被定义为一种简单而有效的功能基因组学研究方法,用于筛选和识别多种分子靶标的特定配体^[12]。噬菌体展示肽库不仅能够展示在丝状噬菌体表面展示大型肽和蛋白,因其几乎对任何目标都具有高亲和力和特异性,还能够选择特异性靶向肽。该技术不仅能够筛选出线性表位,还可以筛选出构象表位。而且利用这种方法,可以无需提前了解目标蛋白质的氨基酸序列,直接从随机肽库中找到与抗原表位一级结构完全匹配的肽段。该技术还能筛选出与任何序列缺乏同源性的三维结构模拟肽^[13]。构建的噬菌体随机肽库可应用于抗原表位筛选、病原体检测、抗体开发、疫苗研发等多方面领域。

动物疾病诊断是疾病预防治疗的重要环节,它既能诊断出疾病的类型、性质,又能发现疾病的早期症状,为早期积极治疗提供科学依据。正确的疾病诊断可以有效地提高疾病治疗的成功率,减少疾病的传播,减少人力物力的投入,降低畜牧养殖业的经济损失。因此,研发和推广一种或多种高效、准确、低成本的诊断技术对于提升或保障畜牧养殖业的经济效益非常重要。噬菌体展示技术作为近几年来崭露头角的新兴技术,可以将所展示在噬菌体表面的蛋白质与抗体特异性的结合,从而快速准确地对目的蛋白进行检测和识别。因此,噬菌体展示技术在经济动物疾病诊断方面具有巨大潜力。

2.1 在牛病诊断方面

2.1.1 牛病毒性腹泻

牛病毒性腹泻 (bovine viral diarrhea, BVD) 是由牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 感染引起的接触性传染病。BVDV 能够感染牛、羊、猪等多种动物的肠道^[14-15]。陈鑫焯^[16]利用 M13 噬菌体展示文库进行 3 轮亲和淘选,并对第 3 轮洗脱物进行了滴定试验,随机筛选了 100 个噬菌体克隆,并对其进行测序,结果显示: P3 特殊序列 (未公开) 的占比最高为 35%; 随后,合成了 P3 多肽并与牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 偶联, Western blot 鉴定发现,该多肽与 BVDV 抗血清可以特异性结合; 采取 Dot-blot in well ECL 方法进行了 3 轮筛选,所得到的针对病毒表位的抗体能与 BVDV 特异性结合。这一研究结果证明了用噬菌体展示技术筛选 BVDV 模拟表位及病毒表位的可行性,为后续研究诊断 BVD 提供了一定参考依据。

2.1.2 口蹄疫

口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引

起的一种极具破坏性的病毒性疾病,主要感染牛的口腔、脚趾、乳房和舌面等部位。口蹄疫病毒共有 7 种血清型,包括 O 型、A 型、C 型、亚洲 1 型、SAT 1 型、SAT 2 型和 SAT 3 型^[17]。Sukyo 等^[18]从 FMDV 免疫牛中构建了 M13 噬菌体展示的单链抗体 (scFv) 文库,并对灭活的 O 型和 A 型 FMDV 进行了 2 次独立的筛选,通过 ELISA 对具有针对血清型 (O 或 A) 特异性且高亲和力的 scFv 抗体以及针对泛血清型特异性的抗体进行了筛选验证。结果显示, BvOA1 (氨基酸序列: AKYAGDHGISGDCYAFVGVYVDA), BvOA7 (氨基酸序列: AKNMGDMGSCYAWANGYVDA) 和 BvOA18 (氨基酸序列: AKGYDAGYTADCIYDYGGRERYVDA) 这 3 个克隆对 O 型和 A 型抗原具有良好的结合活性。另外, BvO17 (氨基酸序列: AKCSHEYANYACYDFEDESIFYDA) 和 BvO22 (氨基酸序列: AKEADDDADHCADLDI) 对于 O 型抗原表现出特异性结合活性。而 BvA3 (氨基酸序列: YNYVDT) 是唯一一个对 A 型抗原具有优先结合活性的克隆。进一步使用 FMDV O 型特异性抗体 BvO17 作为 cELISA 检测试剂,成功检测出接种 FMDV 疫苗的牛以及攻毒的猪血清样品中的 FMDV O 型抗体,且灵敏度甚至高于基于小鼠制备的 FMDV O 型抗体商用检测试剂盒。这些研究结果证实了通过噬菌体展示技术筛选 FMDV 抗体可用于诊断 FMD 的可行性。

2.1.3 奶牛乳腺炎

奶牛乳腺炎 (bovine mastitis) 是影响奶牛乳腺健康的主要疾病之一^[19-20]。金黄色葡萄球菌是引起奶牛乳腺炎的主要病原菌之一,其耐药株的出现给临床治疗带来了巨大的挑战,且治疗后容易复发^[21]。Wang 等^[22]采用奶牛外周血淋巴细胞和金黄色葡萄球菌诱导乳腺炎的 cDNA,构建了牛 scFv 噬菌体展示肽库,筛选出 8 株对金黄色葡萄球菌抗原具有高度亲和力的 scFv,通过小鼠模型证实了 scFvs 对金黄色葡萄球菌诱导的乳腺炎有着保护作用。因此,通过构建牛源噬菌体展示文库,有助于发现和新型牛源单链病毒抗体,并有望成为预防和治疗金黄色葡萄球菌诱导引起的奶牛乳腺炎的新型药剂。

2.1.4 牛冠状病毒病

牛冠状病毒病 (bovine coronavirus disease, BCoV) 是由牛冠状病毒 (bovine coronavirus, BCoV) 引起的一种综合性疾病^[23]。BCoV 是导致犊牛腹泻的主要病原之一,常与其他病原体混合感染,引起牛群肠道和呼吸道双重症状^[24]。肖丽荣^[25]通过采用 BCoV N 基因进行纯化表达,构建了 BCoV N 蛋白噬菌体单链抗体库。经过 4 轮的淘洗,筛选出了 32 株具有高度亲和力的单链抗体。再通过 PCR 鉴定

和测序的验证, 确认所筛选到的单抗基因的准确性。最后, 从中挑选出 5 株亲和力较高的单抗检测其噬菌体抗体的结合活性, 结果显示, 阳性单链抗体 ScFv-154 (VH: IGHV5-9 * 02F ARQGITTVPFDY, VL: IGV9-129 * 01F LQYASSPYT) 与 N 蛋白的结合活性较高, 为未来抗牛冠状病毒病疫苗的研发奠定了基础。

2.2 在猪病诊断方面

2.2.1 猪流行性腹泻

猪流行性腹泻病 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种急性、高度接触性传播的肠道疾病, 主要影响仔猪^[26]。PEDV 可分为 2 个基因型, 即 Group 1 型 (G1, 经典毒株) 和 Group 2 型 (G2, 变异毒株), 其中以 G2 型为主^[27]。王天宇等^[28]利用 PEDV S1 蛋白构建了 VHH 噬菌体展示文库, 并通过 3 轮亲和淘选从中筛选出了 6 株针对 PEDV S 蛋白的纳米抗体, 分别命名为 Nb1~6; 随后, 利用 ELISA 验证了这些筛选得到的纳米抗体的特异性和结合力, 发现 Nb3 (氨基酸序列: QVQLQ-ESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFTFSNYGANWVPQAPG-KVREFVSSITGATRYAASVKG) 具有最强的特异性和结合力; 最后, 通过 Western blot 和间接免疫荧光试验 (IFA) 验证了纳米抗体 Nb3 与 PEDV 的结合活性, 结果显示, 纳米抗体 Nb3 与 PEDV 具有良好的结合活性, 表明 Nb3 可以用于 PEDV 的诊断。

2.2.2 非洲猪瘟

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起的一种对家猪和野猪极具致命性和破坏性的疾病之一, ASFV 主要通过呼吸道进入猪体内, 通过淋巴和血液循环传播到全身各部位^[29-30]。Zhao 等^[31]利用重组蛋白 p30、p72 和 K205R 免疫双峰骆驼, 成功构建了 1 个含有 ASFV 蛋白特异性 Nbs 的高质量 M13 噬菌体展示文库。通过噬菌体展示技术初步鉴定出 19 个 ASFV p30 特异性纳米抗体。经过试验, 利用噬菌体文库所筛选出的纳米抗体 Nb17 和 Nb30 可用作免疫传感器, 并应用于三明治 ELISA, 以检测临床标本中的 ASFV。与传统检测方法相比, 这种技术具有高度的特异性和灵敏度, 能够准确识别 ASFV 或其相关抗原, 避免了误检和漏检的问题。

2.2.3 猪轮状病毒病

猪轮状病毒病是由猪轮状病毒 (porcine rotavirus, PoRV) 引起的猪急性肠道传染病, 其中断奶仔猪最易感^[32]。任晓峰等^[33]利用 M13 噬菌体展示技术对 PoRV VP7 单克隆抗体进行配体筛选, 经过 4

轮筛选, 随机挑选阳性克隆进行扩增, 进行 ELISA 鉴定, 同时提取这些克隆的基因组 DNA 进行测序。试验结果显示, 有 10 个阳性噬菌体亲和肽具有相同的外源肽序列 (VPLGTDNGDIWV), 并且与目标分子具有很高的亲和力; 进一步再将阳性噬菌体亲和肽与 VP7 蛋白进行序列比对, 发现十二肽中有 4 个氨基酸具有一定的相似性; 此外, 通过 ELISA 试验证明, 筛选出的亲和多肽可以竞争性地抑制 PoRV 感染细胞, 因此, 通过噬菌体展示技术确定的这 4 个氨基酸构成的基序很有可能作为猪轮状病毒 VP7 蛋白的一个模拟表位。该研究为后续 PoRV 的诊断提供了一定的思路。

2.2.4 猪繁殖与呼吸综合征

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine respiratory and reproductive syndrom, prrs) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine respiratory and reproductive syndrome virus, PRRSV) 引起的一种病毒性传染病, 主要以呼吸道感染为主^[34]。侯凤香等^[35]采用 PRRSV ORF1b 的 CTD 蛋白结构域作为筛选靶标, ORF1b 所表达的蛋白在 PRRSV 入侵细胞后参与病毒复制过程。通过对这一蛋白结构域的筛选, 筛选出能与其结合并改变其构象或封闭其功能位点的多肽分子。试验证明, 针对 CTD 的多肽分子 (P1~P11) 能够有效地抑制病毒复制, 其中以 P1 效果最好。采用 MTT 法进一步验证所筛选的多肽分子 P1 (氨基酸序列为: NLR-RRRPHMOMK) 是一种高效低毒的抗 PRRSV 多肽。综上结果证明, 通过噬菌体展示技术所筛选出来的阳性克隆在 PRRS 的临床治疗上有广阔的研究潜力与应用前景。

2.2.5 猪链球菌病

猪链球菌病 (swine streptococcosis) 是一种由多种链球菌引起的人兽共患传染病, 主要通过鼻咽部的黏膜侵入猪体内, 导致疾病发生。根据不同的荚膜抗原可分为 29 个型, 其中 2 型毒力最强^[36-38]。杨宝玲^[39]利用猪链球菌 2 型标准株获得 SsMps 蛋白, 通过细胞融合、克隆和筛选等技术, 在小鼠模型中成功获得了针对 SsMps 重组蛋白的抗体 1D9, 这是一种重组蛋白的单克隆抗体; 随后, 利用随机十二肽噬菌体展示肽库, 通过 3 轮淘洗, 筛选出了 18 株能够有效结合单抗 1D9 的阳性噬菌体; 测序比对的结果显示, 其中 7 株噬菌体展示展示的十二肽序列为 LPQRRQT-RIMII, 2 株序列为 RRHTTRKRLKLT, 这些序列分别与 SsMps 蛋白的部分氨基酸序列 (162~183 位、44~466 位) 有一定的相似度, 因此推测单抗 1D9 可能与 SsMps 蛋白的抗原表位的识别位点在上述位置。该项研究发为后续的疾病诊断、疫苗研发、抗体制备打

下了基础。

2.3 在禽病诊断方面

2.3.1 鸡传染性支气管炎

鸡传染性支气管炎 (infectious bronchitis, IB) 是由传染性支气管炎病毒 (infectious bronchitis virus, IBV) 引起的一种急性、高度接触性呼吸道传染病^[40-41]。Zou 等^[42]通过 M13 噬菌体展示肽库筛选和肽段扫描的方法, 发现了 IBV S1 亚基中 2 个线性 B 细胞表位的氨基酸序列, 分别是 87PPQGMAW93 和 412IQTRTEP418, 这 2 个表位分别能够被单克隆抗体 1D5 和 6A12 所识别; 进一步的经序列比较发现, 表位 412IQTRTEP418 在 IBV 是保守的, 而表位 87PPQGMAW93 在 IBV 中是相对可变的。该研究结果表明, 通过噬菌体展示文库筛选出的新型单克隆抗体和抗原表位将有助于开发 IBV 感染的诊断方法。

2.3.2 禽流感

禽流感 (avian influenza, AI), 又称禽流行性感 冒, 是由不同亚型的 A 型流感病毒引起的一种禽类 烈性传染病, 主要危害畜禽呼吸系统^[43]。为了构建 最有用的文库, Pitaksajjakul 等^[44]采用 H5N1 禽流 感病毒的 HA (H5) 重组蛋白免疫鸡, 以此来构建鸡/ 人嵌合 Fab 噬菌体展示文库; 随后再利用该文库筛 选出 9 个特异性 Fab 单克隆抗体, 命名为 H5 Fab 1~H5 Fab9, 通过采用 Western blot 来验证它们与亚基的 特异性结合, 并通过免疫荧光试验来进一步验证它们 的结合特异性。试验结果显示, 其中 3 个单抗 (H5 Fab1、H5 Fab5 和 H5 Fab6) 对 H5N1 病毒具有高度 特异性。这项研究证明了通过构建噬菌体展示文库来 筛选抗 H5N1 单抗方法的可行性, 为后续开发 H5N1 检测试剂提供了良好的参考依据。

2.3.3 鸡传染性法氏囊病

鸡传染性法氏囊病 (infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的一种急性、高度接触性 传染病, 鸡群主要通过消化道、呼吸道或者眼结膜感 染^[45-47]。Luo 等^[48]从鸡法氏囊细胞中分离出总 mRNA, 并通过合成 cDNA 的方式构建了 T7 噬菌体 衍生载体, 从而建立了噬菌体展示文库; 通过该文库 进行了病毒结合筛选, 成功分离出了表面免疫球蛋白 M (sIgM) 作为可能的候选结合位点; 进一步利用鸡 法氏囊淋巴瘤 DT40 细胞研究 sIgM 与 IBDV 的相互 作用, 采用 Western blot 方法检测在大肠杆菌中是否 能够特异性地表达 λ 轻链。研究结果显示, sIgM 轻 链能够以与毒力无关的方式特异性地与 IBDV 相互 作用, 且大多数 IBDV 与 DT40 细胞的结合可以被 sIgM 特异性单克隆抗体抑制, 从而降低 IBDV 在体外的感

染性; 此外, 无论 IBDV 毒力如何, sIgM 的 λ 轻链都 能特异性地与其结合。因此, 在今后的研究中可以利 用这类抗体研发出新型高效制剂。

2.3.4 鸭病毒性肝炎

鸭病毒性肝炎 (duck virus hepatitis, DVH) 是由 鸭肝炎病毒 (duck hepatitis virus, DHV) 引起的一种 急性、高度传染性疾病, 主要通过呼吸道或消化道感 染^[49]。目前已知有 3 种类型的 DVH, 其中 II 型和 III 型主要分布在欧美地区, I 型主要流行于亚洲地 区^[50-51]。Wang 等^[52]从鸭肝炎病毒 I 型 (DHAV-1) VP3 蛋白免疫小鼠脾脏中提取总 RNA, 构建了 1 个 M13 噬菌体抗体文库, 其中包含了 DHAV-1 VP3 蛋 白的免疫单链可变片段抗体 (scFv); 随后使用 ELISA 方法评估这些可溶性抗体的结合能力、特异性 和中和性。研究结果显示, 筛选出的 7 株 VP3 特异 性 scFv (A1、A2、A3、A5、B2、B5、B7) 具有较 高的敏感性和特异性, 能够与 DHAV-1 结合。这项 研究利用噬菌体展示技术成功发现了具有 VP3 特异 性的 DHAV-1 scFv 抗体, 为预防和治疗鸭病毒性肝 炎提供了一定的理论基础。

目前针对类似上述的这些疾病诊断方法主要采用 PCR 检测、病毒分离、血清学检测、免疫组化检测 和病理学检测等。然而, 这些传统方法在特异性限制 (无法有效区分不同亚型或变异株的病毒, 影响检测 结果的正确性), 检测灵敏度 (对于低浓度病毒的检 测可能在疾病早期阶段无法及时检测到病毒存在), 操作复杂性 (样品处理步骤和长时间的试验操作) 和资源依赖性方面 (需要昂贵的仪器设备, 一些资 源匮乏的地方不足以支持) 存在一些缺点。相比之 下, 噬菌体展示技术具有更高的特异性、灵敏度和简 便性, 通过在噬菌体表面展示特定的抗体或蛋白, 可 以精确识别目标病原微生物或其相关抗原, 避免了传 统方法中可能存在的交叉反应或误判。这种高度特异 性和灵敏性的优势使得噬菌体展示技术既能够有效地 区分不同种类或亚型的细菌, 为疾病的准确诊断提供 了有力支持, 又能够检测到极低浓度的微生物, 使其 即使在疾病早期阶段也能够及时发现病原微生物的 存在。

3 噬菌体展示技术特点分析和前景展望

噬菌体展示技术凭借其高库容量、高效、低成 本、灵活筛选、能够模拟天然表位的功能以及 作为表体载体具有很好的免疫原性等特点, 已成为目 前诸多领域的研究重点^[53]。它在药物筛选、功能性 蛋白配对的鉴定、新型疫苗开发等方面发挥着重要 作用, 并在动物食品安全、病原微生物和动物病毒性疾

病等研究领域具有广阔的发展前景。在制备抗体方面，噬菌体展示技术相较于传统技术，不仅可以提高制备抗体的能力，还可以对抗体进行改造，以满足亲和力和免疫原性等抗体质量方面的要求，获得高亲和性抗体^[54]；在药物制备方面，噬菌体展示技术可以用于筛选肿瘤靶向肽，为癌症的靶向治疗提供新思路。

虽然噬菌体展示技术有诸多优点，但在实际应用中利用噬菌体展示技术建立的检测方法仍然相对较少，这主要是因为该技术在现实中存在一些挑战。第一，该技术虽然具有高度特异性和灵敏度，但外源基因的表达受到噬菌体系统对序列的识别和表达效率的影响，可能导致部分基因无法有效地转录和翻译成蛋白质。即使外源蛋白成功表达，其正确的折叠也是关键因素，复杂的蛋白结构（例如多域蛋白或含有多个二级结构元素的蛋白质）可能在异源表达系统中难以正确折叠，这些都会影响外源蛋白在噬菌体表面稳定地展示。第二，在构建噬菌体展示文库时，若外源 DNA 片段插入不均匀，会导致只有少部分噬菌体携带靶向多肽；另外，在生物筛选过程中，只有能与目标结合能力较强的噬菌体被筛选出来，而其他噬菌体被丢弃，这都会导致靶向多肽与目标靶点结合的效率降低，影响噬菌体展示技术的应用。第三，所展示的抗体并不能完全代表整个抗体文库，这可能是由于提取的 RNA 质量不佳或者后续扩增过程中丢失了关键基因等原因，这会影响到抗体序列的完整性和准确性，导致展示的抗体在与目标的结合能力、亲和力等方面出现偏差，从而限制了噬菌体展示技术的应用范围和效果^[55]。因此，噬菌体展示技术虽然在人类医学领域已经取得了较为成熟的结果，但在动物医学领域的研究相对较少，尤其是在畜禽疾病诊断领域的研究，该技术从初步了解、开发到广泛投入使用仍需一定的时间与推广。

尽管噬菌体展示技术具有潜力，但要实现其在动物生命科学领域的广泛应用还需要解决技术本身的局限性和优化策略，进一步提高分子的质量和可应用性。未来的研究重点可以放在噬菌体展示的表达条件上，努力在不影响噬菌体正常功能的前提下，缩小重组噬菌体的分子量，提高工作效率；同时可以在已有的研究基础上，针对畜禽开展深入研究和分析，以期研发出快速有效的诊疗手段和新型疫苗，促进动物医学的发展，提高畜牧业的经济效益。相信随着对噬菌体展示技术研究的更加深入，噬菌体展示肽库的构建将不断更新和改进，该技术会更好地应用在动物医学领域，并为动物健康和畜牧业的可持续发展做出贡献。

参考文献：

- [1] MITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228 (4705): 1315-1317.
- [2] BURROWES B, HARPER D R, ANDERSON J, et al. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic - resistant pathogens [J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2011, 9 (9): 775-785.
- [3] 文英, 谭俊, 马梦真, 等. 噬菌体治疗在畜牧业中的应用 [J]. *动物医学进展*, 2023, 44 (12): 118-122.
- [4] 铭赫, 李巧玲, 李林姣, 等. 噬菌体展示技术及其在单克隆抗体制备中的应用 [J]. *中国兽药杂志*, 2022, 56 (12): 82-89.
- [5] 朱有葱, 曾焱华. 噬菌体展示技术在疫苗研究中的应用进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2014, 42 (1): 51-55.
- [6] 武荣飞, 杨溢, 王鹏志, 等. 单克隆抗体制备技术最新研究进展 [J]. *中国预防兽医学报*, 2022, 44 (3): 333-337.
- [7] 吕雪峰, 任锐, 穆国东, 等. 噬菌体展示文库技术及在疫苗研制中的应用现状 [J]. *吉林畜牧兽医*, 2010, 31 (1): 14-16.
- [8] 沈慰芳. 噬菌体 M13 及其应用 [J]. *生命的化学 (中国生物化学学会通讯)*, 1982 (5): 30-34.
- [9] 刘铭赫, 李巧玲, 李林姣, 等. 噬菌体展示技术及其在单克隆抗体制备中的应用 [J]. *中国兽药杂志*, 2022, 56 (12): 82-89.
- [10] 姜浩, 张静, 吕雪飞. 噬菌体展示技术及其在生物医学检测中的应用 [J]. *生命科学仪器*, 2019, 17 (6): 32-39.
- [11] 何泊宁. 牛多杀性巴氏杆菌分离鉴定及应用噬菌体展示技术筛选 TbpA 蛋白抗原表位 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- [12] BASS, GREENE R, WELLS J A. Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties [J]. *Proteins*, 1990, 8 (4): 309-314.
- [13] 王金良. 噬菌体展示技术在动物病毒抗原表位筛选中的应用 [C]. 中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第八届全国会员代表大会暨第十五次学术研讨会, 大连, 2013.
- [14] 张国华, 吕思文, 金振华, 等. 牛病毒性腹泻-黏膜病的研究进展 [J]. *现代畜牧兽医*, 2022 (7): 69-72.
- [15] 曹伟峰. 猪病毒性腹泻病的诊治 [J]. *中国畜牧业*, 2023 (19): 89-90.
- [16] 陈鑫焯. 牛病毒性腹泻病毒抗原表位的筛选及其单克隆抗体的制备 [D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- [17] BASHIR S, PAESHUYSE J. Construction of antibody phage libraries and their application in veterinary immunovirology [J]. *Antibodies*, 2020, 9 (2): 21.
- [18] SUKYOJ, JOO H A, JIN K M, et al. Phage display screening of bovine antibodies to foot-and-mouth disease virus and their application in a competitive ELISA for serodiagnosis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (9): 4328.
- [19] JAMALIH, BARKEMA H W, JACQUES M, et al. Invited review: incidencerisk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101 (6): 4729-4746.

- [20] ROCHES D B DA, LUSSERT A, FAURE M, et al. Dairy cows under experimentally-induced *Escherichia coli* mastitis show negative emotional states assessed through qualitative behaviour assessment [J]. *Applied Animal Behaviour Science*, 2018, 206: 1-11.
- [21] DELUYKER H A, VAN OYE S N, BOUCHER J F, et al. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of sub-clinical mastitis in lactating cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88 (2): 604-614.
- [22] WANG M, WANG T, GUAN Y, et al. The preparation and therapeutic roles of scFv-Fc antibody against *Staphylococcus aureus* infection to control bovine mastitis [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103 (4): 1703-1712.
- [23] 李小龙, 石亚楠, 鲍显伟, 等. 牛冠状病毒病诊断及防治的研究进展 [J]. *现代畜牧兽医*, 2023 (7): 78-83.
- [24] 王梦娇, 蒋倩, 马学军, 等. 新疆地区牛冠状病毒的分子流行病学调查 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (12): 5125-5133.
- [25] 肖丽荣. 牛冠状病毒单链抗体的筛选与鉴定 [D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2020.
- [26] 陈建飞, 石达, 时洪艳, 等. 猪主要病毒性腹泻防控技术与应用 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2023, 53 (12): 1754-1766.
- [27] CHEN J, LIU X, SHI D, et al. Detection and molecular diversity of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus in China [J]. *Viruses*, 2013, 5 (10): 2601-2613.
- [28] 王天宇, 李志伟, 杨婷, 等. 猪流行性腹泻病毒S蛋白纳米抗体的筛选与鉴定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52 (9): 2589-2598.
- [29] 张华莹, 符乐, 王晓芳, 等. 非洲猪瘟诊断技术研究进展 [J]. *北方牧业*, 2023 (20): 15-16.
- [30] 张振江, 孙恩成, 朱远茂, 等. 中国非洲猪瘟研究进展 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2023, 53 (12): 1767-1779.
- [31] ZHAO Y, YANG J, NIL Q, et al. Identification and characterization of nanobodies from a phage display library and their application in an immunoassay for the sensitive detection of African swine fever virus [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2023, 61 (6): e0119722.
- [32] 边亚娟, 林长水, 王玉玲, 等. 抗猪轮状病毒VP6单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *东北农业大学学报*, 2006 (4): 489-491.
- [33] 任晓峰, 秦昭恒, 曹丽艳, 等. 猪轮状病毒VP7蛋白模拟表位的噬菌体展示技术筛选与鉴定 [J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46 (2): 11-17.
- [34] 吴君英, 韦林. 规模化猪场猪繁殖与呼吸综合症的诊断与防控 [J]. *北方牧业*, 2023 (6): 39-40.
- [35] 侯凤香, 刘珂, 李培德, 等. 噬菌体肽库技术筛选抗PRRSV肽及其应用 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2012, 33 (3): 23-25.
- [36] 王文波. 猪链球菌病常见症状和防控策略 [J]. *北方牧业*, 2023 (23): 40.
- [37] 刘发东. 规模猪场猪链球菌病的综合防控 [J]. *北方牧业*, 2023 (22): 31.
- [38] 黄明珠, 林世泽. 一起猪链球菌病的诊断和防治 [J]. *福建畜牧兽医*, 2023, 45 (6): 101.
- [39] 杨宝玲. 2型猪链球菌SSU05-0474蛋白的单克隆抗体制备及抗原表位鉴定 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- [40] 岳红艳. 鸡传染性支气管炎的流行特点、诊断及防控 [J]. *甘肃畜牧兽医*, 2023, 53 (6): 40-42.
- [41] 安焯, 王宏俊, 张培君. 利用噬菌体展示肽库筛选鸡传染性支气管炎病毒模拟抗原表位 [J]. *生物技术通讯*, 2007 (6): 931-934.
- [42] ZOU N, XIA J, WANG F, et al. Two novel neutralizing antigenic epitopes of the s1 subunit protein of a QX-like avian infectious bronchitis virus strain Sczy3 as revealed using a phage display peptide library [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2015, 168 (1/2): 49-55.
- [43] BLAGODATSKI A, TRUTNEVA K, GLAZOVA O, et al. Avian influenza in wild birds and poultry: dissemination pathways, monitoring methods, and virus ecology [J]. *Pathogens*, 2021, 10 (5): 630.
- [44] PITAKSAJJAKUL P, LEKCHAROENSUK P, UPGRAGARIN N, et al. FabMAbs specific to HA of influenza virus with H5N1 neutralizing activity selected from immunized chicken phage library [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 395 (4): 496-501.
- [45] 张旭知, 孙彩宜, 徐少珠, 等. 鸡传染性法氏囊病疫苗的研究进展 [J]. *广东畜牧兽医科技*, 2023, 48 (5): 27-32.
- [46] 蒲兴, 党海斌, 陈露. 当前我国鸡群传染性法氏囊病感染情况调查 [J]. *家禽科学*, 2023, 45 (10): 1-5.
- [47] 李罡. 鸡传染性法氏囊病的诊断与防治 [J]. *中国畜牧业*, 2023 (17): 104-105.
- [48] LUO J, ZHANG H, TENG M, et al. Surface IgM on DT40 cells may be a component of the putative receptor complex responsible for the binding of infectious bursal disease virus [J]. *Avian Pathology*, 2010, 39 (5): 359-365.
- [49] 陈静, 廖波, 聂海波, 等. 鸭病毒性肝炎防治 [J]. *四川畜牧兽医*, 2023, 50 (10): 59.
- [50] 郭晶莹, 高丽娜. 鸭病毒性肝炎的概况与鉴别治疗研究 [J]. *农业开发与装备*, 2023 (8): 192-193.
- [51] 刘晖. 鸭病毒性肝炎的科学防控 [J]. *养殖与饲料*, 2023, 22 (8): 82-84.
- [52] WANG Y, CUI P, ZHU S, et al. Preparation of single-chain antibody against VP3 protein of duck hepatitis virus type 1 by phage display technology [J]. *Journal of Virological Methods*, 2018, 257: 73-78.
- [53] 高顺平, 吴国华, 张强. 噬菌体展示技术及其在动物病毒学中的应用 [J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38 (12): 79-83.
- [54] 邵碧英. 抗体制备方法的研究进展 [J]. *植物检疫*, 2003 (5): 292-294.
- [55] 侯伟. 噬菌体展示系统的构建及其在疾病防控领域应用研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49 (5): 1688-1696.