

doi: 10.11920/xnmzdk.2025.04.004

抗牛A群轮状病毒VP7蛋白单链抗体原核表达及活性鉴定

许博阳, 陈曦, 汤承, 岳华

(西南民族大学动物医学四川省高等学校重点实验室, 四川成都610041)

摘要:旨在制备靶向牛A群轮状病毒(Group A Bovine Rotavirus, BRVA) VP7蛋白的单链抗体(single-chain fragment variable, scFv)。以项目组前期实验制备的BRVA VP7蛋白鼠源单克隆抗体C8杂交瘤细胞为模板,通过高通量测序获得其抗体可变区(variable region, V区)基因序列,并使用 $(\text{Gly}_4\text{Ser})^3$ 作为linker构建scFv基因片段,并将其克隆至pET28a(+)载体,转化至大肠杆菌BL21(DE3)中表达。结果显示,C8-scFv在大肠杆菌BL21(DE3)中以包涵体形式表达,其相对分子质量约为26 kDa。免疫荧光试验结果表明,C8-scFv能够特异性识别BRVA,具有良好的反应活性。研究成功制备了靶向BRVA VP7蛋白的scFv,为开发基于免疫学的BRVA检测技术奠定了基础。

关键词:牛A群轮状病毒;单链抗体;VP7蛋白;单克隆抗体;原核表达;活性鉴定

中图分类号:S858.23

文献标志码:A

文章编号:2095-4271(2025)04-0379-06

Prokaryotic expression and activity identification of single-chain antibody against bovine group A rotavirus VP7 protein

XU Boyang, CHEN Xi, TANG Cheng, YUE Hua

(Sichuan Provincial Higher Educational Institutions Key Laboratory of Animal Medicine,
Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: This study aimed to generate an scFv targeting the VP7 protein of Group A Bovine Rotavirus (BRVA). The VH and VL gene sequences of the mouse-derived monoclonal antibody hybridoma cell strain C8, which was previously generated against BRVA VP7 protein, were amplified via PCR. The $(\text{Gly}_4\text{Ser})^3$ linker was employed to connect the VH and VL domains, forming the scFv gene fragment, which was then cloned into the pET28a(+) expression vector and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) cells for protein expression. The results showed that C8-scFv was expressed as inclusion bodies in *e. coli*, and a high-purity C8-scFv protein was obtained with a molecular weight of approximately 26 kDa. Immunofluorescence assays confirmed that C8-scFv could specifically recognize BRVA, demonstrating good reactivity. This work successfully developed an scFv targeting BRVA VP7 and provided a foundation for the development of immunological diagnostic technologies for BRVA.

Keywords: group A bovine rotavirus; single-chain antibody; VP7 protein; monoclonal antibody; prokaryotic expression; activity identification

单链抗体是一种基因工程抗体,由抗体重链可变区(variable domain of heavy chains, VH)和轻链可变区(variable domain of light chains, VL)通过一个连接肽

(linker)连接而成,分子量约为25 kDa,是具有抗体活性且分子量最小的功能完整结构单位之一^[1]。VH和VL区域分别由骨架区(Framework Region, FR)和抗

收稿日期:2024-11-28

通信作者:岳华(1963-),女,教授,博士,研究方向:动物病原分子生物学.E-mail:yhua900@163.com

基金项目:“十四五”国家重点研发计划项目(2023YFD180250402)

体互补决定区(Complementarity-Determining Region, CDR)组成,其中抗体序列的多样性主要集中在 3 个 CDR 区域^[2].scFv 的连接方式主要分为两种:VH-Linker-VL 或 VL-Linker-VH.两种连接方向的差异通常不影响抗体的生物学活性,但可能对其亲和力和表达量有一定影响.连接肽通常由 15~20 个氨基酸组成,常用重复的甘氨酸-丝氨酸短肽(Gly₄Ser)作为 linker.这种设计可以增强 scFv 的柔性和亲水性,同时维持其特定的空间结构^[3].由于针对病毒抗原的 scFv 具有特异性识别病毒的能力,它广泛应用于病毒的检测中^[4].与单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)的制备相比,scFv 能够在大肠杆菌等原核表达系统中实现低成本、高产量的制备^[5].这一优势使其在快速诊断试剂的开发中展现出广阔的应用前景,尤其是可以替代生产成本较高的传统抗体^[6].

牛 A 群轮状病毒(Group A Bovine Rotavirus, BRVA)是一种引发犊牛腹泻的主要病原,尤其在新生犊牛中可导致严重感染,造成一定的经济损失^[7].目前,BRVA 的检测方法主要包括病毒分离、RT-PCR 和免疫荧光等技术^[8].基于单克隆抗体的免疫学方法已广泛应用于 BRVA 抗原的检测^[9-12],但尚未有报道使用基因工程抗体对 BRVA 进行检测.项目组前期基于 BRVA VP7 蛋白制备了一株具有良好特异反应性的单克隆抗体杂交瘤细胞株 C8.本研究旨在获得 C8 抗体的 VL 和 VH 基因序列,并构建其 scFv 原核表达载体,优化其表达条件,为开发 BRVA 快速诊断试剂奠定基础.

1 材料与方法

1.1 主要材料

大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞、pET-28a(+)载体均购自天根生化科技(北京)有限公司;兔抗 His 标签抗体与羊抗兔 HRP-IgG 购自于 Abbkine 公司;KCM 溶液由本实验配置;BRVA VP7 C8 杂交瘤细胞株由西南民族大学畜牧兽医学院实验室制备.

1.2 主要试剂

HisCap 6FF 镍离子纯化柱购自于常州天地人和生物科技有限公司;FITC 购自于德国 Bio froxx 公司;SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒与 DMSO 购自于博士德(武汉)生物工程有限公

司;DL5000 DNA Marker 与 PageRuler 预染蛋白 Marker 购自于 Thermo Fisher Scientific 公司;异丙基硫代半乳糖苷 IPTG 购自于 Sigma 公司;Binding Buffer、Wash buffer、Elution Buffer、透析液、标记缓冲液等由实验室配制.

1.3 抗体基因的测序及 scFv 的设计

按 TRizol 法提取杂交瘤细胞 C8 的总 RNA,根据反转录试剂说明书,用 Random primers/Oligo(dT)反转录成 cDNA,送至派森诺公司进行宏基因组测序.通过抗体可变区分析网站(<http://www.vbase2.org/>)分析 C8 抗体的基因序列来获得 VH 和 VL 基因.选择(Gly₄Ser)³作为串联 VH 和 VL 的 Linker 构建 C8-scFv 抗体基因序列.

1.4 C8-scFv 抗体基因序列分析及同源建模

使用 IMG(T(<https://www.imgt.org/>))的工具分析构建的 C8-scFv 的核苷酸序列及氨基酸序列,验证其是否包含完整的结构域及关键氨基酸.而后经 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)同源模拟构建 scFv 三维模型,并使用 UCLA-DOE LAB-SAVES(<https://saves.mbi.ucla.edu/>)对模型进行评估.

1.5 C8-scFv 抗体基因原核表达及鉴定

1.5.1 C8-scFv 抗体基因原核表达载体的构建

通过 Sango gene optimization platform 对 scFv 基因序列进行优化,调整其密码子使用偏差以适应在大肠杆菌中的高效表达;在其 5'端增加酶切位点 Nco I,3'端增加酶切位点 Xho I,优化调整的序列送生工生物工程(上海)股份有限公司合成,将合成的序列与经过 Nco I 和 Xho I 双酶切的 pET-28a(+)载体连接,构建重组质粒 pET28a-scFv.

1.5.2 重组质粒 pET28a-scFv 的转化

在冰上融化 BL21(DE3)感受态细胞后,将 10 μL KCM、10 μL 重组质粒 pET28a-scFv 和 50 μL 细胞混合,并补加 30 μL ddH₂O 至 100 μL,混匀后冰浴 20 min,室温放置 10 min.加入 1 mL 无抗 LB 培养液,37 °C 摇床培养 1 h,离心后重悬 50 μL LB 液体,涂布于含卡那霉素的琼脂平板,37 °C 过夜培养.挑取单克隆菌落,PCR 鉴定后送测序,同时设立空载体对照.

1.5.3 C8-scFv 重组蛋白表达

转化成功的阳性菌接种至含卡那霉素的 LB 培养基,37 °C、180 r/min 培养 2~3 h 后按 1:100 比例接种

培养基,培养至 OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8。加入终浓度 1 mmol/L IPTG, 37 °C、180 r/min 诱导 3~5 h。收集菌液, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 取沉淀,用 PBS 重悬后加入 5×SDS 上样缓冲液制样,进行 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色,同时使用 HRP 标记的兔抗 His 抗体(1:2 000 稀释)通过 Western blot 检测 scFv 的表达。

1.5.4 C8-scFv 蛋白诱导表达条件的优化

鉴定表达成功后,将上述转化成功的 BL21 (DE3)感受态细胞初步培养扩繁后分为两组,一组在 37 °C 180 r/min 条件下培养,另一组在 16 °C 180 r/min 条件下培养,每一组分为 5 个 IPTG 浓度对照管,分别使用终浓度为 0.1、0.3、0.5、0.8、1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达,每隔 4 h 收取菌液用于鉴定。分别取菌体超声破碎后的上清液以及包涵体制样后,进行 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝显色,分析 C8-scFv 蛋白的表达情况。

1.5.5 C8-scFv 蛋白的纯化与浓度测定

验证完成后将粗蛋白使用 5 mL HisCap 6FF 镍离子纯化柱进行纯化,将收集到的所有流出液体经 SDA-PAGE 检测,将纯度高呈单一目的条带的流出

液,使用透析袋透析除去小分子杂质后使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

1.6 免疫荧光试验鉴定 C8-scFv 蛋白活性

采用透析法将 scFv 与 FITC 进行偶联备用;将 BRVA 病毒接种至 24 孔板,同时设不接毒阴性对照,观察到细胞病变时,弃上清液;加入 80%丙酮固定 10 min,用 PBS 洗涤 3 次;每孔加入 1%BSA 浓度的 PBS,室温孵育 30 min 后洗涤;加入 FITC 标记的 scFv, 37 °C 孵育 1 h;再次洗涤后通过荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 获得的 C8 杂交瘤细胞抗体基因及设计的 scFv

得到 C8 杂交瘤细胞宏基因组测序数据后,经序列拼接比对分析获得 C8 抗体基因序列,确定 C8 单抗为 IgG1 型抗体。通过抗体可变区分析得到其 VH 和 VL(表 1),VH 和 VL 均存在 CDR1、CDR2 和 CDR3 高变区以及 FR1、FR2、FR3 和 FR4 骨架区,符合小鼠抗体重链和轻链可变区序列特征,并用于 scFv 构建,顺序为 VH-Linker-VL,见表 1。

表 1 VL 和 VH 的氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequences of VL and VH

项目	序列(N'→C')
VL	QSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYAINWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTHDNDFKGRFAFSSETSASTAYLQINLNKEDTATYFC TRGGRGPYFLYWGQGLTVTSA
VH	QSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQVLVYNAKTLPEGVPSRFSASGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGNPF TFGSGTKLEIKRA
C8-scFv	QSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYAINWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTHDNDFKGRFAFSSETSASTAYLQINLNKEDTATYFC CTRGGRGYFLYWGQGLTVTSAAGGGGSGGGGSGGGGSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQVLVYNAKTLPE GVPSRFSASGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGNPFTFGSGTKLEIKRA

2.2 C8-scFv 序列分析及同源结构模拟

经 IMGT 和 SWISS-MODEL 分析结果显示, C8-scFv 与其对应的模板序列的相似性为 66.81%, 满足同源建模要求。UCLA-DOE LAB SAVES 的质量评估结果显示,该模型的 ERRAT 评分高于 92 分, VERIFLY3D 得分 93.01%, 表明该结构具有良好的稳定性(图 1)。

2.3 构建的 C8-scFv 原核表达质粒

通过 *Nco* I 及 *Xho* I 限制性内切酶分别对 pET28a-scFv 质粒双酶切鉴定结果显示,在约 710 bp 与 5 200 bp 出现一暗一亮 2 个条带(图 2A),片段大小与预期一致,测序结果显示抗体基因序列正确插入

pET-28a(+), 重组质粒 pET28a-scFv 构建成功。

2.4 C8-scFv 的原核表达的纯化及鉴定

将重组质粒 pET28a-scFv 转化至大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中,用 IPTG 诱导表达,菌体蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果显示,与空载体转化菌相比,表达的 scFv 分子量为 26 kDa,与预期相符(图 2B)。Western blot 分析显示,表达的 C8-scFv 与 HRP-抗 His 标签的兔抗体发生特异性反应(图 2C)。以上结果表明, C8-scFv 蛋白成功表达。进行表达条件的优化后,经 SDS-PAGE 结果显示,在 37 °C, IPTG 终浓度为 0.5 mM 时,诱导 16 h 后表达效果最好。超声破碎后进行表达形式的验证,结果显示 C8-scFv 蛋白以包涵体形

式表达(图 2D);通过将包涵体蛋白用 8 M 尿素经变性处理,纯化后复性处理.

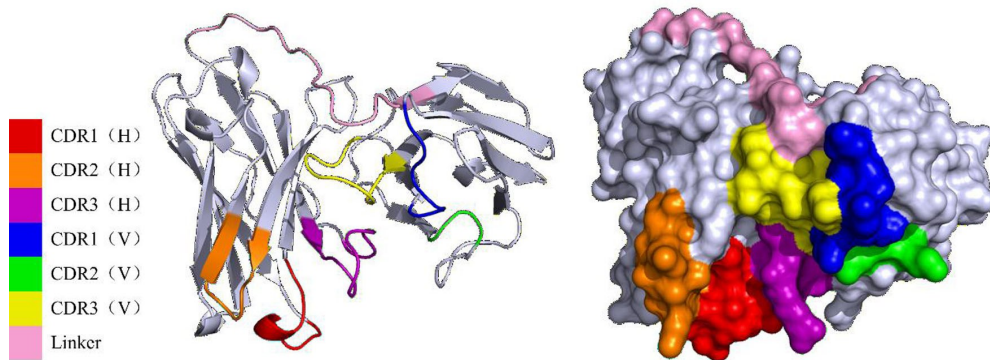


图 1 C8-scFv 同源结构模拟示意

Fig.1 Schematic diagram of C8-scFv homology structure

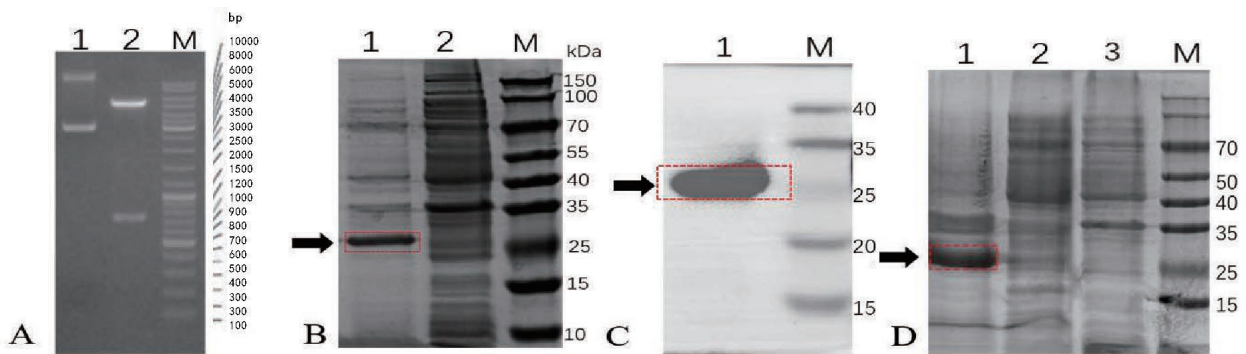


图 2 C8-scFv 的原核表达的鉴定及纯化

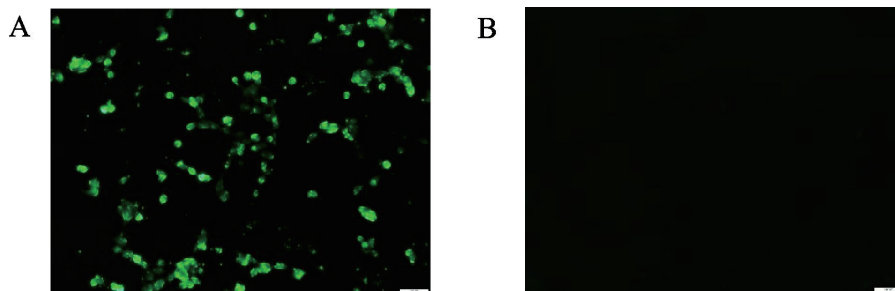
Fig.2 Identification and purification of prokaryotic expression of C8-scFv

- A. *Nco* I 及 *Xho* I 限制性内切酶分别对 pET28a-scFv 质粒双酶切 PCR 产物.1:原始质粒电泳;2:重组质粒电泳;M:Marker
- B. SDS-PAGE 鉴定 C8-scFv 的表达.1:C8-scFv 重组菌电泳;2:空载体转化菌电泳;M:Marker
- C. Western blot 鉴定 C8-scFv 的表达.1:抗 his 抗体特异性结合;M:Marker
- D. SDS-PAGE 鉴定 C8-scFv 蛋白的表达形式.1:超声破碎后的沉淀;2:超声破碎后的上清液;3:空载体转化菌的对照;M:Marker

2.5 免疫荧光鉴定 scFv 活性

BRVA 接种 MA104 细胞,48 h 培养后,将细胞固定,与 FITC 标记的 scFv 反应,同步设定正常细胞作为对照组.结果显示,FITC 标记的 scFv 与 BRVA 感染

的 MA104 细胞特异性结合(图 3A),未接种 BRVA 的 MA104 细胞无特异性荧光显色反应图(图 3B),证明 C8-scFv 蛋白能与 BRVA 病毒发生特异性反应.



A. C8-scFv 与接种 48 h 后产生病变的 MA104 细胞中的 BRVA 结合;B. 阴性对照

图 3 BRVA 免疫荧光试验

Fig.3 BRVA immunofluorescence assay

3 讨论

单克隆抗体(McAb)已广泛应用于病原微生物感染的诊断与治疗^[13-14].由McAb衍生的scFv保留了完整抗体的抗原结合能力,同时具备特异性与亲和力.但由于其缺乏完整抗体的其他结构域,因此在某些情况下相较于传统抗体,其检测灵敏度更高^[15-18].目前,尚未见有针对BRVA的scFv相关研究报道.基于实验室已制备的靶向BRVA VP7蛋白的特异性强且反应活性好的鼠源单克隆抗体C8,采用宏基因组测序技术成功获得C8单克隆抗体的完整基因序列,并进一步确认其为IgG1型抗体,丰富了针对BRVA的抗体信息.scFv的结构域顺序可为VH-linker-VL或VL-linker-VH,前者通常具有较强的抗原亲和力^[19-20].采用VH-linker-VL结构域顺序,并通过大肠杆菌表达系统成功表达了BRVA C8-scFv.免疫荧光试验结果表明,该抗体具有与BRVA特异性结合的性质.

本研究成功制备了靶向BRVA VP7蛋白的scFv,为进一步开发BRVA的快速免疫学诊断方法奠定了坚实的抗体分子基础,在轮状病毒检测领域具有良好的应用前景.目前,获得McAb基因的常用方法主要包括抗体基因扩增和宏基因组测序技术^[21-22].抗体基因扩增通常通过RT-PCR技术以杂交瘤细胞的mRNA为模板获取VH和VL序列,这一方法操作简便、成本较低,且应用较为成熟.然而,由于高变区序列的复杂性和多样性,特异性引物的设计面临一定困难,因此扩增的成功率和准确性受到限制^[23].近年来,随着宏基因组测序技术的迅速发展及其成本的逐步降低,该技术已被广泛应用于基因组学、病原鉴定以及抗体基因获取等领域^[22,24-25].与传统抗体基因扩增方法相比,宏基因组测序技术无需特异性引物即可快速准确地获得完整的McAb基因序列,避免了引物设计困难及序列扩增不完整的问题,成为高效获取抗体基因的可靠选择.

scFv可以在原核或真核表达系统中进行表达,目前各种宿主生产的scFv各有优劣,原核表达系统最为常用且经济高效^[26-27].近年来,原核表达系统生产的定制重组scFv抗体已成为“常规”免疫诊断试剂的潜在替代品^[28],这些表达生产的scFv被广泛应用于各种病毒的检测及相应疫病的治疗,其中大肠杆菌原

核表达系统的发展最为成熟、应用最为广泛^[29-32].与真核细胞相比,大肠杆菌遗传学和分子生物学背景清晰简单,能够快速繁殖,在短时间内可以大量表达蛋白,便于纯化和改造,生产成本低,故成为最常使用的表达系统^[33].大肠杆菌无法对完整抗体进行糖基化修饰故最后很难表达出有活性的蛋白,但单链抗体不包含完整抗体的恒定区片段,不需要表达系统对其进行糖基化修饰,故使用大肠杆菌表达单链抗体不会对其活性造成影响^[34],可以应用于基因工程诊断抗体的生产.

4 小结

构建了靶向BRVA VP7蛋白的scFv的原核表达系统,表达的scFv能与BRVA特异性结合,为开发BRVA的快速诊断试剂奠定了基础.

参考文献

- [1] CHANG C Y, WANG Y S, WU J F, et al. Generation and characterization of a spike glycoprotein domain A-specific neutralizing single-chain variable fragment against porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Vaccines*, 2021, 9(8): 833.
- [2] IGAWA T, TSUNODA H, KIKUCHI Y, et al. VH/VL interface engineering to promote selective expression and inhibit conformational isomerization of thrombopoietin receptor agonist single-chain diabody[J]. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2010, 23(8): 667-677.
- [3] LEISY D J, LEWIS T D, LEONG J C, et al. Transduction of cultured fish cells with recombinant baculoviruses[J]. *Journal of General Virology*, 2003, 84(Pt 5): 1173-1178.
- [4] 刘兵, 史俊岩, 王舰, 等. 双单链抗体夹心法诊断汉坦病毒感染的初步研究[J]. *临床检验杂志*, 2009, 27(4): 265-266.
- [5] WANG Y, YUAN W J, GUO S Q, et al. A 33-residue peptide tag increases solubility and stability of Escherichia coli produced single-chain antibody fragments[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 4614.
- [6] 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.
- [7] LIU X Y, YAN N, YUE H, et al. Detection and molecular characteristics of bovine rotavirus A in dairy calves in China[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2021, 22(5): 69.
- [8] 周芳, 岳华, 张斌, 等. 牦牛轮状病毒VP6基因序列分析及RT-PCR检测方法的建立与应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(7): 1465-1473.
- [9] 李木子, 刘佳丽, 王瑞翀, 等. 牛轮状病毒VP6蛋白单克隆抗体的制备及双抗体夹心ELISA方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(11): 1352-1357.

- [10] VAN ZAANE D, IJZERMAN J. Monoclonal antibodies against bovine immunoglobulins and their use in isotype-specific ELISAs for rotavirus antibody[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1984, 72(2): 427-441.
- [11] THORNS C J, BELL M M, CHASEY D, et al. Development of monoclonal antibody ELISA for simultaneous detection of bovine coronavirus, rotavirus serogroup A, and *Escherichia coli* K99 antigen in feces of calves[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1992, 53(1): 36-43.
- [12] LEE J, BABIUK L A, YOO D. A neutralizing monoclonal antibody to bovine rotavirus VP8 neutralizes rotavirus infection without inhibiting virus attachment to MA-104 cells[J]. *Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 1998, 62(1): 63-67.
- [13] MAHMUDA A, BANDE F, ABDULHALEEM N, et al. Monoclonal antibodies in immunodiagnostic assays: A review of recent applications[J]. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 2017, 15(1): 1-10.
- [14] ALEJANDRA W P, MIRIAM IRENE J P, FABIO ANTONIO G S, et al. Production of monoclonal antibodies for therapeutic purposes: A review[J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 120: 110376.
- [15] HUSTON J S, GEORGE A J, ADAMS G P, et al. Single-chain Fv radioimmunotargeting[J]. *The quarterly journal of nuclear medicine: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)*, 1996, 40(3): 320-333.
- [16] DANA JONES S, MARASCO W A. Antibodies for targeted gene therapy: Extracellular gene targeting and intracellular expression[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, 31(1-2): 153-170.
- [17] COLCHER D, PAVLINKOVA G, BERESFORD G, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies[J]. *The quarterly journal of nuclear medicine: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)*, 1998, 42(4): 225-241.
- [18] BATRA S K, JAIN M, WITTEL U A, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(6): 603-608.
- [19] DAI K S, ZHU H P, RUAN C G. Generation and characterization of recombinant single chain Fv antibody that recognizes platelet glycoprotein Iba α [J]. *Thrombosis Research*, 2003, 109(2-3): 137-144.
- [20] LUO D, MAH N, KRANTZ M, et al. VI-linker-Vh orientation-dependent expression of single chain Fv-containing an engineered disulfide-stabilized bond in the framework regions[J]. *Journal of Biochemistry*, 1995, 118(4): 825-831.
- [21] 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.
- [22] GADALA-MARIA D, YAARI G, UDUMAN M, et al. Automated analysis of high-throughput B-cell sequencing data reveals a high frequency of novel immunoglobulin V gene segment alleles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(8): 862-870.
- [23] LI H J, GUO C Y, SUN J Y, et al. Nested polymerase chain reaction amplification and sequencing analysis of the light-chain and heavy-chain variable regions in the influenza A H1N1 virus hemagglutinin monoclonal antibody gene[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(2): 4372-4379.
- [24] SUMINDA G G D, BHANDARI S, WON Y, et al. High-throughput sequencing technologies in the detection of livestock pathogens, diagnosis, and zoonotic surveillance[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2022, 20: 5378-5392.
- [25] PAROLA C, NEUMEIER D, REDDY S T. Integrating high-throughput screening and sequencing for monoclonal antibody discovery and engineering[J]. *Immunology*, 2018, 153(1): 31-41.
- [26] VERMA R, BOLETI E, GEORGE A J T. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1998, 216(1-2): 165-181.
- [27] BANEYX F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(5): 411-421.
- [28] CHOWDHURY P S, WU H. Tailor-made antibody therapeutics[J]. *Methods*, 2005, 36(1): 11-24.
- [29] ZHONG Y W, CHENG J, SHI S S, et al. Screening and application of human-derived HBsAg bacteriophage single chain antibody in clinical diagnosis[J]. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingdudue Zazhi*, 2002, 16(3): 223-225.
- [30] CHEN Y P, QIAO Y Y, ZHAO X H, et al. Rapid detection of hepatitis B virus surface antigen by an agglutination assay mediated by a bispecific diabody against both human erythrocytes and hepatitis B virus surface antigen[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14(6): 720-725.
- [31] 刘兵. 人源抗汉坦病毒核衣壳蛋白单链抗体研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2007.
- [32] FOORD A J, MULLER J D, YU M, et al. Production and application of recombinant antibodies to foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3ABC[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2007, 321(1-2): 142-151.
- [33] SINGH A, UPADHYAY V, UPADHYAY A K, et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 41.
- [34] SKERRA A. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1994, 151(1-2): 131-135.