

# 应用噬菌体展示技术筛选兔出血症病毒抗原模拟表位

杨廷亚<sup>1,2</sup>, 王芳<sup>1\*</sup>, 姜平<sup>2</sup>, 胡波<sup>1</sup>, 范志宇<sup>1</sup>, 魏后军<sup>1</sup>, 薛家宾<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014; 2. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

**摘要:** 以抗兔出血症病毒(RHDV)的单克隆抗体 A3c 作为靶物质, 应用噬菌体展示技术筛选 RHDV 抗原表位。将纯化的单抗 A3c 包被固相载体, 经 3 轮亲和筛选后, 挑取 25 株噬菌体单克隆并扩增, 用 ELISA 测定后, 提取阳性克隆单链 DNA 并测序, 用阳性噬菌体克隆免疫小鼠制备高免血清, 检测筛选抗原表位的免疫原性。结果表明: 3 轮亲和筛选后, 特异性噬菌体克隆得到了有效富集, 25 株噬菌体单克隆中有 19 株为阳性克隆; 测序结果表明, 获得了与抗原高度同源的序列 GTDDMDPGTTAA, 即抗原的模拟表位, 其中, 氨基酸基序 DXXDP 为表位中的核心氨基酸; 制备的小鼠高免血清与抗原具有较好的反应性, 阳性噬菌体克隆与兔 RHDV 高免血清也具有较好的反应性。因此, 该表位具有良好的免疫原性和反应原性。该研究为 RHDV 抗原表位的研究和新型疫苗的探索积累了资料。

**关键词:** 兔出血症病毒; 单克隆抗体; 噬菌体展示技术; 模拟表位

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)08-1281-06

## Screening of Antigen Mimotopes of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Phage Display Technology

YANG Ting-ya<sup>1,2</sup>, WANG Fang<sup>1\*</sup>, JIANG Ping<sup>2</sup>, HU Bo<sup>1</sup>,

FAN Zhi-yu<sup>1</sup>, WEI Hou-jun<sup>1</sup>, XUE Jia-bin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology of Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The monoclonal antibody (McAb) A3c against rabbit hemorrhagic disease virus had been used as solid-phase selective molecule to screen the epitope of RHDV by phage display technology. McAb A3c was coated on the solid-phase and then three rounds of biopanning were carried out; 25 phages were selected and amplified to be identified by ELISA, and the positives were sequenced; the serum of mice immunized three times was prepared to determine the immunogenicity of the epitope. The results showed that the specific phages were enriched effectively after three rounds of biopanning; 19 of 25 phages were positive. The sequence analysis of the positive clones showed that highly homogenous sequence (GTDDMDPGTTAA) comparing to antigen was got, which is the antigen mimotopes of RHDV. The sequence DXXDP was the core amino acids in the epitope. In addition, the serum of mice reacted with antigen well and so did positive phages with hyper-immune serum of rabbit against RHDV, which indicated that the epitope had good im-

收稿日期: 2012-02-08

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-44)

作者简介: 杨廷亚(1985-), 男, 山东枣庄人, 硕士, 主要从事畜禽传染病防治研究, E-mail: yangtingya1234@126.com

\* 通讯作者: 王芳(1972-), 女, 博士, 研究员, Tel: 025-84390337, E-mail: rwangfang@126.com, Fax: 025-84390330

munogenicity and reactionogenicity. This study provide theoretical basis for studying the epitope of RHDV and new vaccines.

**Key words:** rabbit hemorrhagic disease virus; monoclonal antibody; phage display technology; mimotopes

兔出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)俗称兔瘟,是一种重要的家兔疾病,其给养兔业造成了巨大的经济损失。病原兔出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)是一种嵌杯状病毒。研究发现该病毒主要结构蛋白 VP60 在诱导抗病毒感染的免疫反应中起重要作用,是病毒免疫保护性抗原<sup>[1]</sup>。

噬菌体展示技术是 Smith 在 1985 最先提出来的,其将外源基因插入丝状噬菌体 f1 的基因 III,使目的基因编码的多肽能以融合蛋白的形式展示在噬菌体表面。该技术被广泛应用到多个领域,比如抗原表位研究、疾病检测、研制新型疫苗、多肽药物筛选等<sup>[2-7]</sup>。在抗原表位的研究方面,其简化了表位的定位过程,只需要以抗原的特异性单抗对肽库进行筛选,并对所筛选的重组噬菌体肽序列与抗原序列比较,找到存在于抗原肽段上的同源序列即可认为是抗原表位<sup>[8]</sup>。

作者应用噬菌体展示技术对 RHDV 抗原表位进行研究。使用兔出血症病毒结构蛋白 VP60 单抗 A3c 作为靶物质,拟经过亲和筛选获得与单抗特异性结合的噬菌体,从而获得抗原表位的氨基酸序列。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 肽库及抗体 Ph. D. -12 噬菌体展示肽库试剂盒,购自 New England Biolabs 公司,库浓度为  $1 \times 10^{13}$  pfu · ml<sup>-1</sup>, 随机多样性为  $2.7 \times 10^9$ , 受体菌为 *E. coli* ER2738; 抗 RHDV 衣壳蛋白 VP60 单克隆抗体 A3c 杂交瘤细胞系,本实验室保存;兔抗 M13 噬菌体多抗,由国家兽用生物制品工程技术研究中心惠赠;兔 RHDV 高免血清、SPF 兔血清,本实验室保存;羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP 购自博士德公司。

1.1.2 主要试剂 牛血清白蛋白(BSA)购自生物晶美公司;聚乙二醇-8000 购自 AMRESCO 公司;IPTG、X-Gal 购自武汉博亚生物技术有限责任公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验动物 BALB/c 小鼠(6 周龄、雌

性)、ICR 小鼠(6 周龄、雄性)均购自扬州大学比较医学中心。

### 1.2 方法

1.2.1 单抗的制备与纯化 单抗 A3c 杂交瘤细胞系按照常规方法复苏,制备腹水型单抗。腹水用辛酸-硫酸铵方法进行纯化<sup>[9]</sup>,用 SDS-PAGE 测定单抗的纯度,同时测定单抗的浓度,包被 RHDV 重组蛋白 VP60 测定其间接 ELISA 效价<sup>[10]</sup>和抗原的亲和常数<sup>[11]</sup>,分装后 -20 °C 保存备用。

1.2.2 亲和筛选 参照噬菌体展示肽库试剂盒提供的说明书,稍作修改:封闭条件修改为 37 °C 封闭 2 h,其中抗体的包被浓度为  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。共进行 3 轮亲和筛选,其中第 2 轮和第 3 轮加入的噬菌体分别为上一轮扩增后的洗脱液,与第 1 轮加入的噬菌体量保持不变。不同之处是洗涤液中 Tween-20 的浓度分别为 0.1%、0.3% 和 0.5%。

1.2.3 噬菌体滴度测定 用 LB 液体培养基将噬菌体按 10 倍比稀释成不同梯度,取 10  $\mu\text{L}$  不同梯度的噬菌体稀释液分别与 200  $\mu\text{L}$  对数生长期的 ER2738 菌液混匀后加入 3 mL 融化的顶层琼脂中,涡旋混匀,立即在 37 °C 预热的 LB/IPTG/Xgal 平板上铺板,37 °C 倒置培养过夜,计算其克隆数及噬菌体滴度(用 pfu · mL<sup>-1</sup> 表示)。每轮筛选都测定产出投入比。

1.2.4 噬菌体的扩增 参照噬菌体展示肽库试剂盒提供的说明书。

1.2.5 ELISA 检测特异性噬菌体富集效果 包被单抗 A3c,  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 4 °C 过夜;封闭缓冲液( $5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  BSA) 37 °C 封闭 2 h;将 3 轮亲和筛选的洗脱液扩增后稀释成  $10^{12}$  pfu · mL<sup>-1</sup>, 加入到酶标板中,  $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ , 37 °C 作用 1 h;加兔抗 M13 多抗,作用 1 h;加 HRP-羊抗兔 IgG, 37 °C 作用 1 h, TBST 洗涤后加 TMBS 显色液,显色 5 min 后用  $2 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,测定 OD<sub>450 nm</sub>。

1.2.6 双夹心 ELISA 鉴定噬菌体单克隆 第 3 轮筛选后随机挑取 25 个噬菌体单克隆,扩增后置 4 °C 保存。包被单抗 A3c,  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 另外每个噬菌体均做一个空包被孔作为空白对照,4 °C 过夜,以

下步骤参照 1.2.5。

**1.2.7 测序** 双夹心 ELISA 鉴定为阳性的噬菌体克隆进行扩增后提取单链 DNA,送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序,测序引物为 5'-CCCTCAT-AGTTAGCGTAACG-3',根据测序结果推断出相应的氨基酸序列。

**1.2.8 竞争 ELISA 检测噬菌体克隆的特异性**

包被单抗 A3c,  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜;封闭缓冲液( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  BSA)  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  封闭 2 h;用 TBST 对重组 VP60 蛋白进行 2 倍比稀释,从 1:10 稀释到 1:640 倍,然后依次加入到酶标板中,每孔  $100 \mu\text{L}$ ,共 7 孔,第 8 孔不加 VP60,每个样品一排;稀释好的噬菌体样品加入到酶标板中,每孔  $100 \mu\text{L}$ , $37 \text{ }^\circ\text{C}$  作用 1 h;以下步骤参照 1.2.5。

**1.2.9 阳性噬菌体克隆小鼠高免血清的制备和检测** 将 6 周龄雄性 ICR 小鼠分 4 组,每组 6 只,第 1 组免疫序列 S1 中噬菌体克隆 K1,第 2 组免疫序列 S2 中噬菌体克隆 K7,第 3 组免疫 RHDV VP60 亚单位灭活疫苗,第 4 组免疫 TBS。免疫前采血,免疫途径为腹腔注射,免疫剂量为每只  $10^{12}$  pfu,2 周免疫 1 次,共免 3 次;其中,二免前、三免后一周断尾采血、三免后 2 周眼球动脉采血,分离血清备检。包被重组蛋白 VP60 用间接 ELISA 方法对小鼠血清进行检测,其中,小鼠血清 1:40 倍稀释。

**1.2.10 阳性噬菌体克隆与兔 RHDV 高免血清的反应性** 常规 ELISA 方法检测阳性噬菌体克隆与兔 RHDV 高免血清的反应性:分别包被噬菌体克隆 K1、K7,BSA 封闭后分别加入稀释好的兔 RHDV 高免血清,以 SPF 兔血清和单抗 A3c 作为阴、阳性对照;作用后加入酶标二抗,底物显色后终止反应,测定  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 。

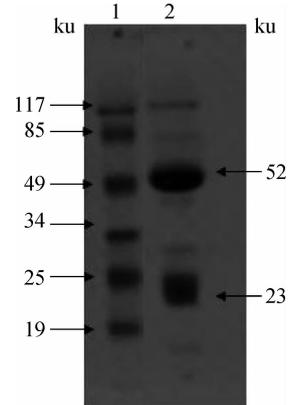
## 2 结果

### 2.1 纯化后单抗的鉴定

**2.1.1 单抗的纯度、浓度和 ELISA 效价** 辛酸-硫酸铵方法纯化后,单抗 A3c 用 12% SDS-PAGE 电泳鉴定(图 1),纯度在 85% 以上。核酸蛋白分析仪测定抗体蛋白的浓度为  $5.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,间接 ELISA 测定纯化后单抗的效价为 1:81 920。

**2.1.2 单抗与重组蛋白 VP60 的亲合常数** 包被重组蛋白 VP60 利用间接 ELISA 方法测定单抗的亲合常数。以抗体浓度的对数作为横坐标, $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$

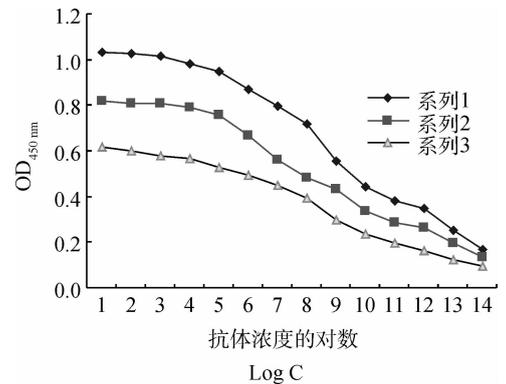
作为纵坐标,绘制反应曲线(图 2)。分别推导出不同浓度抗原包被的 50%  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  对应的单抗的浓度,最后根据 Beatty 推导公式<sup>[11]</sup>:  $K_{\text{aff}} = (n-1)/2(n[Ab']-[Ab])$ (其中,  $n = [Ag]/[Ag']$ ;  $[Ab']$ 、 $[Ab]$  分别代表抗原浓度分别为  $[Ag']$ 、 $[Ag]$  时 50%  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  对应的抗体浓度),计算出单抗 A3c 的亲合常数为  $K_{\text{aff}} = 3.5 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。



1. 蛋白质相对分子质量标准;2. 单抗 A3c  
1. Protein marker;2. McAb A3c

图 1 SDS-PAGE 测定单抗 A3c 纯度

Fig. 1 The purity of McAb A3c measured by SDS-PAGE



系列 1、2、3: 抗原稀释度分别为 1:100、1:200 和 1:400

Serial 1,2 and 3: The dilutions of antigen were 1:100, 1:200 and 1:400 separately

图 2 单抗 A3c 与抗原的结合曲线

Fig. 2 The curve of McAb A3c binding to antigen

### 2.2 亲和筛选

**2.2.1 噬菌体的回收率** 进行 3 轮亲和筛选,每轮噬菌体的回收率见表 1,从表中可见第 2 轮和第 3 轮的回收率比第 1 轮高很多,约 100 倍,表明能与单抗特异性结合的噬菌体得到了有效富集。

表 1 生物筛选的产出投入比

Table 1 The ratio of output/input of biopanning

筛选次数 Round	Tween-20	投入噬菌体/pfu Input Phage (pfu)	获得噬菌体/pfu Output phage (pfu)	回收率 Recovery
1 <sup>st</sup>	0.1%	$1 \times 10^{11}$	$1.2 \times 10^5$	$1.2 \times 10^{-6}$
2 <sup>nd</sup>	0.3%	$1 \times 10^{11}$	$2.2 \times 10^7$	$2.2 \times 10^{-4}$
3 <sup>rd</sup>	0.5%	$1 \times 10^{11}$	$4.6 \times 10^7$	$4.6 \times 10^{-4}$

Pfu. 噬菌体空斑形成单位

Pfu. Plaque forming units

2.2.2 ELISA 检测噬菌体富集效果 将等量噬菌体的各轮洗脱液加入到酶标板中,与靶物质作用。随着筛选轮数的增加,洗脱液中与靶物质结合的噬菌体的量有明显增高,亦说明噬菌体克隆得到了有效富集。

### 2.3 双夹心 ELISA 鉴定噬菌体单克隆

挑取 25 个单克隆,扩增后用双夹心 ELISA 方法检测(图 3),结果表明,共有 19 个阳性克隆,阳性率为 76%。

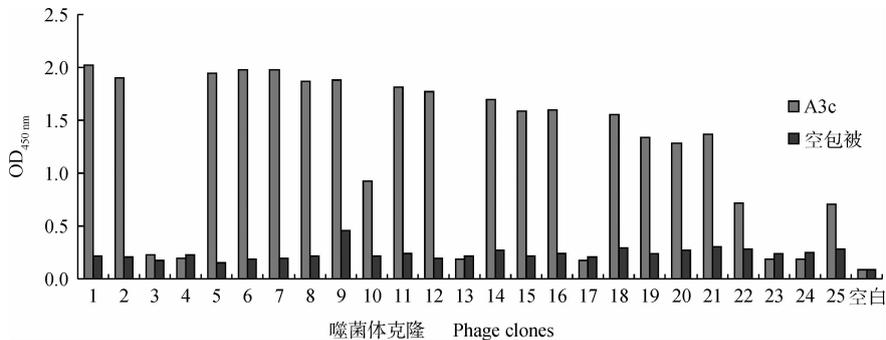


图 3 ELISA 测定噬菌体单克隆与单抗 A3c 的结合

Fig. 3 The binding of phage clones to McAb A3c detected by ELISA

### 2.4 测序

提取阳性噬菌体克隆单链 DNA 并测序,将其序列与 RHDV 衣壳蛋白 VP60 的氨基酸序列进行比对,结果如表 2。

表 2 3 种氨基酸序列与 VP60 氨基酸序列的比较

Table 2 Comparison of the three peptide sequences to that of VP60

序列名称 Sequence name	克隆数 Clone number	氨基酸序列 Sequence
VP60 部分 N 端 25-38 位:		G T T T <b>D</b> G M <b>D P</b> G V V A A
S1	17	G ----T <b>D</b> D M <b>D P</b> G T T A A
S2	1	F <b>D</b> L N <b>D P</b> A T V F D F
S3	1	K I S N F W T <b>D</b> M I <b>D P</b>

经测序,19 株阳性噬菌体克隆共出现 3 种序

列,分别命名为 S1、S2 和 S3,其中序列 S1 有 17 株,表明筛选得到的噬菌体克隆具有较高的纯度;与 RHDV 的衣壳蛋白 VP60 的氨基酸序列比对后,发现 S1 与 VP60 的氨基酸序列具有极高的相似性,12 个展示肽中有 9 个相同,集中在 VP60 的 N 端的 25 位到 38;而 S2 和 S3 与 VP60 的相似性较低,但它们与 S1 在上述位置均有 1 个相同的氨基酸基序 DXXDP。

### 2.5 噬菌体克隆的特异性

以融合蛋白 VP60 作为抑制物进行竞争 ELISA,检测噬菌体克隆的特异性(图 4)。K1、K7 和 K3 分别为序列 S1、S2 中的噬菌体克隆和阴性克隆。可以看出,随着 VP60 稀释倍数的增加,即浓度逐渐降低,噬菌体克隆与包被的单抗结合程度逐步增强。说明一定浓度的 VP60 可有效抑制噬菌体与单抗的结合,并且 VP60 的稀释倍数在 1 : 160 时,其抑制程度即达到最大,这说明了筛选得到的阳性噬菌体克隆是特异性的。

### 2.6 阳性噬菌体小鼠高免血清检测的结果

用间接 ELISA 检测小鼠高免血清(图 5),结果

表明首免 2 周后,除了阳性对照 RHDV VP60 亚单位灭活疫苗组外,其它各组均未产生阳性抗体;而三免后 1 周和 2 周,除了 TBS 对照组未产生阳性抗体外,其它 3 组均有较高水平的抗体产生,但是试验组 K1 和 K7 的抗体水平比阳性对照免疫组的抗体水平要低,试验组的抗体水平在三免后 1 周最高。以上结果表明,筛选得到的抗原表位具有较好的免疫原性。

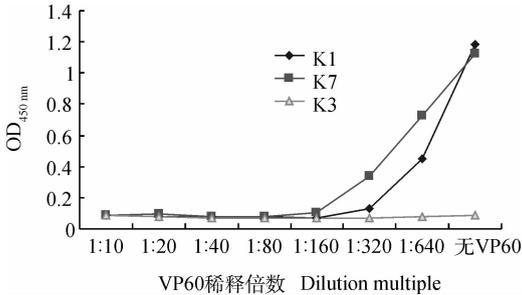


图 4 噬菌体克隆与单抗 A3c 的特异性结合  
Fig. 4 Specific binding of phages to McAb A3c

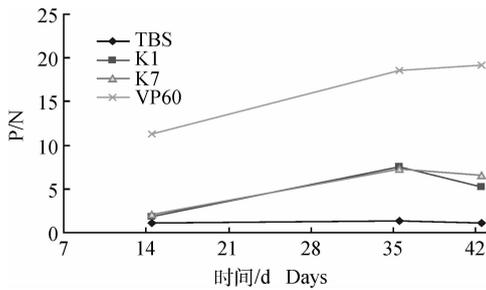


图 5 小鼠血清抗体水平  
Fig. 5 Antibody level of mice serum

## 2.7 阳性噬菌体克隆与兔 RHDV 高免血清的反应性

分别包被噬菌体克隆 K1、K7, ELISA 检测其与兔 RHDV 高免血清反应性,以加入样品种类为横坐标, OD<sub>450 nm</sub> 为纵坐标绘制柱形图(图 6)。由图可以看出阳性噬菌体克隆与兔 RHDV 高免血清具有较好的反应性,而与兔 SPF 血清无反应性。

## 3 讨论

兔出血症病毒衣壳上具有 2 个主要抗原区域,分别位于 VP60 蛋白 N 端的第 31 位到第 250 位氨基酸之间和 C 端的第 477 位到第 579 位氨基酸之间,但最主要的抗原区可能位于 VP60 蛋白 N 端<sup>[12]</sup>。其他研究者们推测病毒 VP60 蛋白羧基端的抗原结构主要是依赖于构象决定簇的 B 细胞位点;而蛋白的氨基端则是线性的抗原决定簇,在病毒

感染和灭活疫苗的免疫中诱导机体产生免疫应答<sup>[13]</sup>。本研究应用噬菌体展示技术筛选兔出血症病毒的抗原表位,为进一步了解该病原的抗原表位和探索新型疫苗奠定了基础。

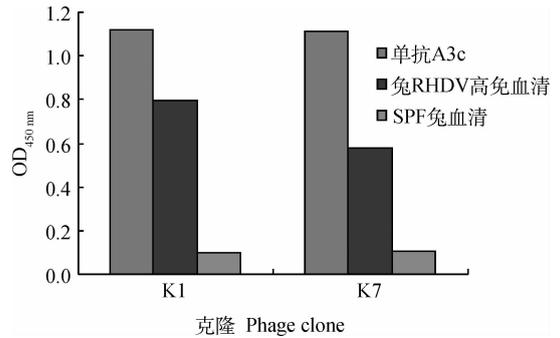


图 6 噬菌体克隆与单抗和兔血清的反应性  
Fig. 6 Reactivity of phage clones to McAb and serum

噬菌体展示技术是新发展起来的一项技术,其发展快速,应用广泛,在抗原表位研究上已有大量报道。噬菌体展示技术的应用中,靶物质的活性和纯度对于实验的成败具有很大影响。因此,本研究首先对靶物质单克隆抗体 A3c 进行纯化和鉴定。本研究使用了 2 种方法对单抗进行纯化,辛酸硫酸铵方法和饱和硫酸铵两步沉淀法,结果表明辛酸硫酸铵方法具有较好的效果,其提纯的单抗回收率高、纯度高,纯度可以达到 85% 以上。单抗 A3c 亚型为 IgG1 型,有资料表明辛酸硫酸铵方法对 IgG 蛋白的纯化具有较好的效果<sup>[14]</sup>。对纯化的单抗进行鉴定,结果表明该单抗具有较高的效价,ELISA 效价为 1 : 81 920。亲和力测定结果表明单抗也具有较高的亲和力,亲和常数为  $K_{aff} = 3.5 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。资料表明,抗体的亲和常数高于  $10^7$ ,亲和常数高;低于  $10^7$ ,亲和常数低<sup>[15]</sup>。因此本试验纯化的单抗可以用来作为靶物质,应用噬菌体展示技术筛选抗原表位。

噬菌体筛选中有多种筛选方法,比如固相载体亲和筛选、亲和磁珠捕获物液态筛选、固液相结合筛选等。本试验应用直接包被固相载体的方法进行亲和筛选,其优点是简便、快速。在筛选过程中,控制筛选的强度具有重要的意义。首轮筛选,为了避免特异性的噬菌体克隆被意外筛除,筛选强度应该相对小一些,这样可以使特异的噬菌体克隆得到较好的富集。在后面的二、三轮筛选中,为了使筛选的噬菌体克隆中含有更多特异性的克隆,因此,需要逐步加强筛选的强度。加强筛选强度的方法有多种,比如增加洗涤剂中吐温浓度,将更多的非特异性结合的噬菌体洗去;或是逐步降低靶物质的包被浓度,增

加特异性噬菌体克隆的富集。本试验中使用了第1种方法,即逐步提高洗涤液中吐温浓度的办法。经过3轮亲和筛选作者挑取25株噬菌体单克隆进行鉴定,结果表明有19株为阳性克隆,阳性率较高,表明特异性噬菌体克隆得到有效富集。

对阳性克隆进行测序,结果中含有3种不同的序列,其中序列S1含有噬菌体克隆17株,说明筛选的噬菌体具有极高的纯度,该序列与抗原VP60具有极高的相似性,表明该表位为一个线性表位。序列S2和S3含有的噬菌体均为1株,其氨基酸序列与抗原VP60比较,相似性并不高。但是,这2种序列中含有1个相同的氨基酸基序(DXXDP),并且该基序也存在于第1种氨基酸序列和VP60的氨基酸序列中,因此,推测该氨基酸基序为VP60序列中抗原表位的一个核心序列,其在该表位中发挥关键的作用。序列S1由于与VP60的氨基酸具有极高的相似性,但是又不完全相同。因此,作者推论,序列S1(GTTTDDGMDPGVVAA)模拟了抗原RHDV的一个线性表位,其中基序(DXXDP)为该表位的核心氨基酸,发挥重要作用。在VP60与噬菌体克隆的竞争试验中也证实了该结论。与VP60氨基酸序列的比较中可以看出,模拟表位的序列与VP60序列的N端第25位到第38位相对应,其中核心氨基酸基序位于N端第29位到第33位。有研究表明,在VP60蛋白N端的第31位到第250位氨基酸之间可能是一个主要抗原区域<sup>[12]</sup>,两者之间有相互重叠的区域,而且模拟表位的核心氨基酸的大部分位于上述区域,因此,本研究在一定程度上支持了上述观点。该表位为线性的观点与Viaplana等<sup>[13]</sup>认为VP60蛋白的N端是线形的抗原决定簇,其在病毒感染和灭活疫苗的免疫中诱导机体产生免疫应答的观点相符。

为研究筛选模拟抗原表位的免疫原性,本研究用筛选的噬菌体克隆进行了动物免疫试验。由于噬菌体载体本身具有较高的免疫原性,因此免疫时可以不加佐剂。小鼠三免后,试验组K1和K7及VP60蛋白组均有较高水平产生,其中三免后1周抗体水平最高,说明筛选得到的抗原表位具有较高免疫原性。噬菌体克隆K1和K7组产生的抗体水平比VP60蛋白组低,可能是由于检测时包被物为重组蛋白VP60,噬菌体克隆免疫产生的抗体相对比较单一,而VP60蛋白免疫产生的抗体种类较多而导致整体抗体水平较高。阳性噬菌体克隆与兔RHDV高免血清具有较好的反应性,说明了该表位具有较好的反应原性。

## 参考文献:

- [1] 张玉颖,刘光清,吴润.兔出血症病毒分子生物学研究进展[J].动物医学进展,2006,27(3):9-13.
- [2] 张晴晴,张晓,程罗根,等.采用噬菌体展示技术筛选玉米赤霉醇的单链抗体[J].免疫学杂志,2009,25(6):718-721.
- [3] KELLER P M,ARNOLD B A. Identification of HIV-1 vaccine candidate peptides by screening random phage epitope library [J]. *Virology*,1993,193:709-716.
- [4] OSMANY G L,RAIZA M,FRANK C,et al. Identification of hepatitis A virus mimotopes by phage display, antigenicity and immunogenicity [J]. *J Virol Methods*,2007(140):49-58.
- [5] HERRMANN S, LESHEM B, LOBEL L, et al. T7 phage display of Ep15 peptide for the detection of WNV IgG [J]. *J Virol Methods*,2007(141):133-140.
- [6] KELLY K A, ALLPORT J R, TSOURKAS A, et al. Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle [J]. *Circ Res*, 2005,96(3):327-336.
- [7] 黄玉芳,金坚,肖君华,等.应用噬菌体展示技术筛选中药的药物靶点蛋白研究进展[J].南京中医药大学学报,2008,24(1):68-70.
- [8] 王欣之,傅志.噬菌体展示随机肽库及其在抗原表位研究上的应用[J].中国兽医寄生虫病,2005,13(1):42-45.
- [9] BHANUSHALI J K, GILBERT J M, MCDUGALD L R. Simple method to purify chicken immunoglobulin G [J]. *Point Sci*,1994,73(7):1158-1161.
- [10] 李超美,王芳,蔡少平,等.检测兔出血症病毒抗体间接ELISA方法的建立[J].江苏农业学报,2010,26(3):546-550.
- [11] BEATTY J D, BEATTY B. D, VLAHOS W. G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay [J]. *J Immunol Methods*,100(1987):173-179.
- [12] TORRECUADRAN M J L, CORTES E, VELA C, et al. Antigenic structure of the capsid protein of rabbit hemorrhagic disease virus [J]. *J Gen Virol*, 1998,79(8):1901-1909.
- [13] VIAPLANA E, PLANA J, VILLAVARDE Z. Antigenicity of VP60 structural protein of rabbit hemorrhagic disease virus [J]. *Aich Virol*,1997,142(9):1843-1848.
- [14] 刘秀梵.单克隆抗体在农业上的应用[M].合肥:安徽科学技术出版社,1994:45-46.
- [15] 林月霞,段涛.抗氯霉素单克隆抗体4D10的特性鉴定[J].广东药学院学报,2010,26(4):420-422.