

文章编号: 1000-0615(2016)01-0128-07

DOI: 10.11964/jfc.20150910079

# 病毒性出血性败血症病毒单链抗体的原核表达及其功能鉴定

王宏华<sup>1</sup>, 侯竹美<sup>2</sup>, 张全启<sup>1\*</sup>, 于海洋<sup>1</sup>, 王志刚<sup>1</sup>, 齐洁<sup>1</sup>, 王旭波<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东青岛 266003;

2. 青岛农业大学海洋科学与工程学院, 山东青岛 266109)

**摘要:** 为制备病毒性出血性败血症病毒(VHSV)单链抗体(single chain variable fragment antibody, ScFv)并鉴定其生物学功能, 本研究提取抗VHSV单抗1G5的杂交瘤细胞株总RNA并反转录获得cDNA模板, 通过PCR扩增VHSV抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)编码序列, 将其拼接成单链抗体ScFv基因后插入载体pET28a中, 构建原核表达重组质粒并在大肠杆菌中诱导表达。结果表明, 单链抗体主要以可溶性形式表达, 分子量约28 ku, 能特异性识别VHSV病毒的G蛋白并对VHSV病毒具有体外中和活性, 其对VHSV病毒的G蛋白亲和力(KD)达到 $1.4 \times 10^{-8}$  M。单链抗体ScFv的制备为进一步研究VHSV的治疗性抗体、快速诊断试剂奠定了基础。

**关键词:** 鱼; 病毒性出血性败血症病毒; 单链抗体

**中图分类号:** Q 785; S 941

**文献标志码:** A

病毒性出血性败血症(viral hemorrhagic septicemia, VHS)是由病毒性出血性败血症病毒(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)引起的一种以暴发性流行为主的传染病, 常引起多种养殖鱼类如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等发病, 死亡率高达90%<sup>[1]</sup>。由于该病在水产养殖中危害巨大, 世界动物卫生组织(Office International Des Epizooties, OIE)将其列入水生动物疫病名录, 我国将其列为二类动物疫病, 均明确为必须申报的疫病<sup>[2]</sup>。该病最早流行于欧洲一些国家<sup>[3]</sup>, 1999年扩散至北美洲<sup>[4]</sup>, 2000年后扩散至亚太地区, 日本<sup>[5]</sup>、韩国<sup>[6]</sup>和中国<sup>[7]</sup>均有该病确诊的报道。随着我国水产贸易的比重在国际上的快速增加, 病毒性出血性败血症已对我国渔业生产形成巨大威胁。

病毒性出血性败血症病毒(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)属弹状病毒科(Rhabdoviridae), 直径65~80 nm, 有囊膜, 基因组为一段负义链的单链RNA, 长度约12 kb, 从

3'端至5'端依次包含N-P(M1)-M2-G-NV-L 6个基因, 分别编码病毒的核蛋白、磷蛋白、基质蛋白、糖蛋白、非结构蛋白和聚合酶蛋白。由于尚缺乏相应的抗体, 国内对VHSV病毒进行快速检测的免疫学技术及预防监测方面的研究非常缺乏, 国标方法仍为细胞培养分离病毒结合中和实验进行确诊<sup>[8]</sup>, 相对来说检测周期长且灵敏度不高。本实验室在前期研究中通过杂交瘤技术获得一株单抗1G5, 可与VHSV病毒的所有基因型(I、II、III和IV)反应, 且对VHSV病毒有中和作用, 极具研究和应用价值。本研究克隆获得了单抗1G5的单链抗体基因, 并实现了其原核表达, 为下一步的抗体改造、诊断试剂开发等提供了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

VHSV病毒、CHSE-214细胞、VHSV中和单抗细胞株1G5、质粒pET28a(+), *E. coli* DH5 $\alpha$ 和

收稿日期: 2015-09-16 修回日期: 2015-11-03

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2011AA10A402)

通信作者: 张全启, E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

*E. coli* BL21(DE3)为本实验室保存; 杆状病毒表达截短的VHSV病毒G蛋白(分子量49 ku)由山东省出入境检验检疫中心孙涛博士惠赠; pMD18-T载体、Taq DNA聚合酶、T<sub>4</sub> DNA连接酶、限制性内切酶*Bam*H I、*Hind* III购自大连宝生物工程有限公司; RNA提取试剂盒、cDNA合成试剂盒、质粒提取及回收试剂盒为天根公司产品; HRP标记抗His单克隆抗体为北京华大蛋白公司产品; PCR引物合成与序列测定由南京金斯瑞生物工程有限公司完成。

## 1.2 RNA的抽提与cDNA的合成

将VHSV中和单抗1G5杂交瘤细胞培养至最佳生长状态, 用RNA提取试剂盒提取细胞总RNA, 以总RNA为模板, 随机引物为反转录引物, 反转录合成第一链cDNA, 冻存备用。

## 1.3 VH和VL基因的扩增

根据鼠源单克隆抗体重链和轻链可变区基因的特点, 结合苗向阳等<sup>[9]</sup>的方法, 设计如下扩增引物, 其中VH-F引物加入*Bam*H I酶切位点, VL-R引物加入*Hind* III酶切位点(表1)。

表1 单抗可变区基因PCR引物  
Tab. 1 Primers for mAbs V gene

引物 primer	核酸序列 nucleotide sequence
VH-F	cgcGGATCCsaggtsmagctgcagsagtcwgg
VH-R	cgagccgccacctccagaccacctccgctgaggagacggtagctgg
VL-F	ggcggaggtggctctgaggtggcggctcggayattgmgtsacmcarwctmca
VL-R	cggAAGCTTtatttgattccagcttgg

Notes: S = G/C, R = G/A, M = A/C, Y = C/T, W = A/T, V = A/C/G

以杂交瘤细胞cDNA为模板, 分别进行抗体*VL*、*VH*基因的扩增。PCR反应体系为50 μL, 模板cDNA 4 μL, 10×Taq buffer 5 μL, dNTP 4 μL, H<sub>2</sub>O 34 μL, 正/反向引物各1 μL, Taq DNA聚合酶1 μL。PCR程序: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 30个循环; 最后72 °C延伸10 min。琼脂糖电泳鉴定PCR产物并回收。

## 1.4 单链抗体ScFv的拼接与扩增

采用重叠延伸PCR(splicing by overlap extension PCR, SOE-PCR)法, 将回收的含有

linker的*VL*、*VH*基因进行拼接。PCR反应体系为50 μL, 10×Taq buffer 5 μL, dNTP 4 μL, H<sub>2</sub>O 36 μL, Taq DNA聚合酶1 μL, 回收的*VL*、*VH*基因按1:1比例各加入2 μL。PCR程序: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 10个循环。PCR结束后, 体系中补加引物VH-F和VL-R各1 μL, 扩增全长ScFv, PCR反应条件: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 30个循环; 最后72 °C延伸10 min。琼脂糖电泳鉴定PCR产物。将PCR产物连入pMD18-T载体并转入*E. coli* DH5α, 阳性克隆菌株送南京金斯瑞生物工程有限公司测序。

## 1.5 单链抗体ScFv原核表达与纯化

将测序正确的抗VHSV单链抗体基因用*Bam*H I和*Hind* III双酶切连入pET28a(+)载体, 转化表达菌株*E. coli* BL21(DE3), 筛选阳性克隆。阳性克隆转入少量含卡那霉素的LB液体培养基中, 37 °C培养过夜作为种子液。种子液按1%比例接种于LB培养基(含卡那霉素)中, 37 °C培养至对数生长期, 加入终浓度1 mM的IPTG进行诱导表达, 并将重组菌体超声破碎后用镍离子螯合柱纯化, 获得抗VHSV单链抗体, 灰度扫描法计算蛋白纯度, Bradford法测定蛋白浓度, -20 °C保存备用。

## 1.6 单链抗体ScFv的Western-Blot鉴定

SDS-PAGE电泳重组VHSV病毒G蛋白, 电泳结束后转硝酸纤维素膜, 转移结束后将膜用含5%脱脂乳的PBST 4 °C封闭过夜。用PBST洗膜1次, 加入500倍稀释的抗VHSV单链抗体作为一抗, 于37 °C摇床温育1 h, PBST洗涤3次, 加入5 000倍稀释的HRP标记抗His单克隆抗体作为二抗, 于37 °C摇床温育1 h, PBST洗涤2次, 再用PBS洗涤2次, 加入DAB底物显色液显色, 鉴定抗VHSV单链抗体的结合活性。

## 1.7 单链抗体ScFv的体外中和活性

参考Zhou等<sup>[10]</sup>方法, 将抗VHSV单链抗体进行2倍倍比稀释(0.625、1.25、2.5、5、10 ng/μL), 分别与10TCID<sub>50</sub>的VHSV等体积混合, 18 °C作用1 h。取单链抗体-VHSV病毒混合液200 μL, 加入在96孔板中新鲜制备的单层CHSE-214细胞, 18 °C培养, 同时设立单抗

1G5组、VHSV攻毒组和正常培养组作为对照,观察细胞病变。

### 1.8 单链抗体ScFv的亲和力测定

采用表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR)测定单链抗体的亲和力。将VHSV病毒G蛋白固定在BIAcore3000仪器的CM5芯片上,流速设为10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,单链抗体ScFv设7个浓度梯度(0、10、20、40、80、160、320 nM),反应700 s。每个稀释度反应后用10 mM Glycine (pH 3.0)再生180 s。BIAcore3000仪器自带软件计算ScFv的亲和力常数。

## 2 结果

### 2.1 单链抗体ScFv的获得

以VHSV中和单抗1G5的cDNA基因序列为模板,PCR扩增出VL、VH抗体基因,并通过SOE-PCR拼接获得其ScFv基因,结果显示,VH基因片段约为342 bp、VL基因片段约为333 bp、ScFv基因片段约为705 bp,与预期基因片段大小相符(图1, 2)。将ScFv基因测序后在GenBank数据库中核苷酸同源性比较,结果表明所扩增序列与GenBank中鼠的免疫球蛋白可变区基因同源性最高,符合鼠源抗体可变区的基因排序,证明克隆获得的是VHSV中和单抗1G5的单链抗体基因。

### 2.2 单链抗体ScFv的原核表达与纯化

构建原核表达载体pET28a-ScFv并进行诱导表达,从SDS-PAGE电泳图可以看出,重组菌株

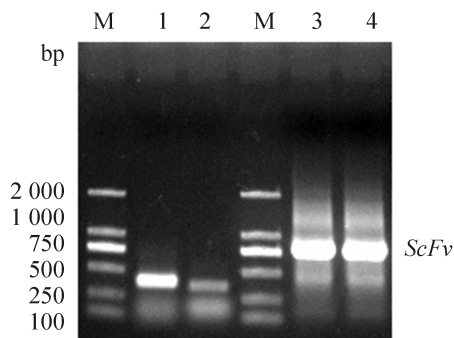


图1 SOE-PCR法扩增的ScFv基因电泳图

M. DNA分子质量标准; 1. VH基因; 2. VL基因; 3. ScFv基因; 4. ScFv基因

Fig. 1 ScFv gene amplified by SOE-PCR

M. DL2000; 1. VH; 2. VL; 3. ScFv; 4. ScFv

在28 ku处有一产物条带,与推算的ScFv蛋白大小相符,表达量约占菌体总蛋白的20%。镍柱纯化后ScFv蛋白纯度在90%以上(图3)。

### 2.3 单链抗体ScFv的Western blot鉴定

Western blot结果表明,在分子量大小40~55 ku处可见特异色带,由于重组VHSV病毒的G蛋白分子量约为49 ku,说明所表达的单链抗体ScFv与VHSV病毒的G蛋白有结合活性(图4)。

### 2.4 单链抗体ScFv的体外中和活性

细胞中和实验表明,重组表达的抗VHSV单链抗体具有较高的中和活性,2.5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的ScFv就可以保护CHSE-214细胞免受VHSV病毒攻击,与原始毒株相比差别不大(表2)。

### 2.5 抗VHSV单链抗体的亲和力

BIAcore3000检测VHSV病毒单链抗体的亲和力。纯化后的单链抗体ScFv对重组VHSV病毒G蛋白的结合速率( $k_a$ )为 $6.9 \times 10^4$  1/Ms,解离速率( $k_d$ )为 $9.9 \times 10^{-4}$  1/s,亲和力(KD)达到 $1.4 \times 10^{-8}$  M。根据BIAcore3000仪器说明,强的抗原抗体的亲和力为 $10^{-8} \sim 10^{-10}$  M,说明纯化后的单链抗体ScFv对重组VHSV病毒G蛋白具有较高亲和力,但低于原始单抗1G5的亲和力( $1.8 \times 10^{-9}$  M,表3)。

## 3 讨论

VHSV可感染虹鳟、牙鲈、大菱鲆等80多种淡水和海水鱼类,且在欧洲、北美洲、东亚均已发现其存在<sup>[11]</sup>。基于VHSV病毒的N基因或G基因序列的进化树分析表明,VHSV病毒分为4个基因型(I、II、III、IV),其中I型又分为Ia、Ib、Ic、Id和Ie 5个亚型,IV型又分为IVa、IVb和IVc 3个亚型<sup>[12]</sup>。由于VHSV病毒拥有较多的基因型且可在多个种属鱼类中携带,建立快速、准确的VHSV病毒检测方法无疑对阻止其在全球范围内传播具有重要意义。

VHSV病毒检测方法在国外的研究较早,大致可分为分子生物学方法和免疫学方法两大类。其中分子生物学方法主要包括反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)<sup>[13]</sup>、实时荧光定量PCR(Real-time PCR)<sup>[14]</sup>和逆转录环介导等温扩增技术(RT-LAMP)<sup>[15]</sup>等;免疫学方法主要包括中和实验、免疫荧光、免疫组化、酶联免疫法(ELISA)<sup>[16]</sup>等。基于血清学检测的酶联免疫法(ELISA)在VHSV病

```

          10      20      30      40      50      60
1      GAGGTCAAGCTGCAGGAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGGAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG
1      E V K L O E S G A E L V R P G A S V K L
      VH Sequence →
          70      80      90      100     110     120
61     TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTCCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTAAAGCAGAGG
21     S C K A S G Y T F T S Y W M N W V K Q R

          130     140     150     160     170     180
121    CCTGAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTACGATAGTAAAACCTCACTAC
41     P E Q G L E W I G R I D P Y D S E T H Y

          190     200     210     220     230     240
181    AATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC
61     N Q K F K D K A I L T V D K S S S T A Y

          250     260     270     280     290     300
241    ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACCGTCAAGGCAGTAT
81     M Q L S S L T S E D S A V Y Y R A R Q Y

          310     320     330     340     350     360
301    GGAAACTACCGGGCCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGA
101    G N Y R G Q G T T V T V S S G G G G S G
      Lingker Sequence
          370     380     390     400     410     420
361    GGTGGCGGCTCGGACATTGTGCTCACCCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGG
121    G G G S D I V L T T Q S P A S L A V S L G
      VL Sequence →
          430     440     450     460     470     480
421    CAGAGTGTACCATCTCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTGAATATTATGGCACTGGTTTA
141    Q S V T I S C R A S E S V E Y Y G T G L

          490     500     510     520     530     540
481    ATGCGGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGGTGCATCC
161    M R W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y G A S

          550     560     570     580     590     600
541    AACGTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGC
181    N V E S G V P A R F S G S G S G T D F S

          610     620     630     640     650     660
601    CTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGATGATATTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGG
201    L N I H P V E E D D I A M Y F C Q Q S R

          670     680     690     700
661    AAGTTCCTTCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA
221    K V P S T F G G G T K L E I K

```

图 2 ScFv抗体基因序列

Fig. 2 Gene sequence of ScFv antibody

毒检测中具有快速、准确和操作简单等特点, 备受国内外关注。ELSIA方法需要高特异性和敏感性的抗体, 而国内对VHSV病毒的抗体研究相对比较缺乏, 仅见景宏丽<sup>[7]</sup>等少量报道, 且未见进行下一步功能性鉴定的数据。

本实验室用超速纯化的VHSV病毒免疫小鼠后筛选获得一株单抗1G5, 其为VHSV病毒特异性抗体, 与鲤(*Cyprinus carpio*)春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)、传染性造血组织器官坏死病毒(infectious hematopoietic

necrosis virus, IHNV)均无交叉反应。单链抗体(ScFv)是将抗体的重链可变区(VH)与轻链可变区(VL)用Lingker连接起来获得的一种基因工程抗体, 它保留了完整抗体的特异性, 在血液内更容易被清除, 组织穿透力更强, 且可以通过计算机结构模拟和氨基酸替换等方法提高其抗体活性。本研究利用实验室保存的VHSV病毒单抗1G5的杂交瘤细胞株, 通过PCR方法扩增了其单链抗体ScFv基因全长, 约705 bp。VH、VL基因片段符合鼠源抗体可变区的排列结构, Blast比对表

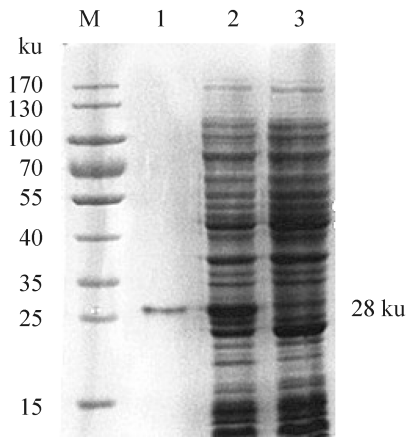


图3 单链抗体ScFv的原核表达与纯化的SDS-PAGE检测

M. 预染的蛋白质分子质量标准; 1. 纯化的单链抗体蛋白; 2. 单链抗体基因在大肠杆菌BL21(DE3)中的表达产物; 3. pET28a 空载体在大肠杆菌BL21(DE3)中的表达产物

Fig. 3 SDS-PAGE of the expression and purification of ScFv protein

M. prestained Pr; 1. purified ScFv protein; 2. the expression product of ScFv gene recombinant in BL21(DE3); 3. the expression product of pET28a vector in BL21(DE3)

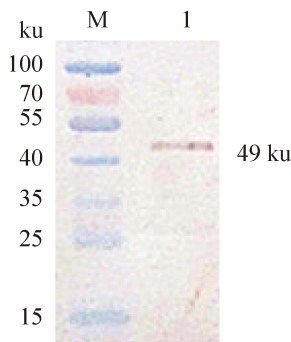


图4 ScFv原核表达产物的Western-blot分析

M. 预染的蛋白质分子质量标准; 1. 单链抗体蛋白

Fig. 4 Western-blot analysis of the expression product of recombinant ScFv gene in BL21(DE3)

M. prestained Pr; 1. ScFv

明同源性与鼠源单链抗体基因最高。原核表达的抗VHSV单链抗体可以中和VHSV病毒对CHSE-214细胞的攻击, 与杆状病毒表达的VHSV病毒G蛋白有免疫印迹反应, 且与VHSV病毒G蛋白的亲合力(KD)高达 $1.4 \times 10^{-8}$  M, 证明本研究获得的单链抗体确实为VHSV病毒的功能性抗体。本研究获得的单链抗体与原始单抗1G5具有相似的生物学活性, 但其制造成本更低、更利于长期保存, 且便于进一步改造获得效价和特异性更高

表2 ScFv对VHSV病毒的体外中和活性

Tab. 2 The neutralizing activity of ScFv against VHSV

病变率/ percent of CPE	ScFv 浓度/(ng/μL) ScFv concentration				
	10	5	2.5	1.25	0.625
1G5	0	0	0	0	50
ScFv	0	0	0	50	100
VHSV对照 VHSV control	100	100	100	100	100
正常对照 normal control	0	0	0	0	0

表3 ScFv与纯化的VHSV病毒G蛋白结合的动力学参数

Tab. 3 Kinetics parameters of ScFv proteins binding to G protein of VHSV

	ka/(1/Ms)	kd/(1/s)	KD/(M)
单抗 1G5 MAb 1G5	$3.3 \times 10^5$	$5.9 \times 10^{-4}$	$1.8 \times 10^{-9}$
单链抗体1G5 ScFv 1G5	$6.9 \times 10^4$	$9.9 \times 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-8}$

的基因工程抗体。

目前鱼类病毒的单链抗体研究较少, 本研究的开展一方面为VHSV病毒的诊断试剂开发、基因工程抗体改造提供了物质基础, 同时也为其他鱼类疾病的研究提供了借鉴。

参考文献:

[1] Brudeseth B E, Evensen O. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in wild marine fish species in the coastal regions of Norway [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 52(1): 21-28.

[2] 景宏丽, 王静波, 曹欢, 等. 病毒性出血性败血症病毒单克隆抗体的制备及其特性分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(4): 400-402.

Jing H L, Wang J B, Cao H, *et al.* Preparation and characterization of monoclonal antibodies against viral hemorrhagic septicemia virus [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2013, 29(4): 400-402 (in Chinese).

[3] Mortensen H F, Heuer O E, Lorenzen N, *et al.* Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea [J]. Virus Research, 1999, 63(1-2): 95-106.

[4] Hedrick R P, Batts W N, Yun S, *et al.* Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus [J]. Diseases

- of Aquatic Organisms, 2003, 55(3): 211–220.
- [ 5 ] Takano R, Nishizawa T, Aritmoto M, *et al.* Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 2000, 20(5): 186–192.
- [ 6 ] Kim S M, Lee J I, Hong M J, *et al.* Genetic relationship of the VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea [J]. Journal of Fish Pathology, 2003, 16(1): 1–12.
- [ 7 ] Zhu R L, Zhang Q Y. Determination and analysis of the complete genome sequence of *Paralichthys olivaceus* rhabdovirus (PORV) [J]. Archives of Virology, 2014, 159(4): 817–820.
- [ 8 ] 翁善钢. 病毒性出血性败血症的流行与诊断[J]. 水产养殖, 2014(2): 49–50.
- Wong S G. Prevalence and diagnosis of viral hemorrhagic septicaemia [J]. Journal of Aquaculture, 2014(2): 49–50 (in Chinese).
- [ 9 ] 苗向阳, 邵建军, 朱瑞良, 等. 天然鼠源噬菌体抗体库的构建及抗羊抑制素基因工程单抗的筛选[J]. 中国农业科学, 2009, 42(1): 299–303.
- Miao X Y, Shao J J, Zhu R L, *et al.* Construction of naive mouse phage antibody library and screening of monoclonal antibodies specific for sheep inhibin [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(1): 299–303 (in Chinese).
- [10] Zhou Y, Xie Z G. High throughput screening of scFv antibodies against viral hemorrhagic septicaemia virus by flow cytometry [J]. Journal of Virological Methods, 2015, 219: 18–22.
- [11] He M, Yan X C, Liang Y, *et al.* Evolution of the viral hemorrhagic septicemia virus: Divergence, selection and origin [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2014, 77: 34–40.
- [12] Einer J K, Ahrens P, Forsberg R, *et al.* Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus [J]. Journal of General Virology, 2004, 85(5): 1167–1179.
- [13] Knüsel R, Bergmann S M, Einer J K, *et al.* Virus isolation vs RT-PCR: Which method is more successful in detecting VHSV and IHNV in fish tissue sampled under field conditions? [J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(9): 559–568.
- [14] Kim J O, Kim W S, Kim S W, *et al.* Development and application of quantitative detection method for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genogroup IVa [J]. Viruses, 2014, 6(5): 2204–2213.
- [15] Soliman H, El M M. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS) [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 114(3–4): 205–213.
- [16] Encinasa P, Gomez C E, Estepa A, *et al.* An ELISA for detection of trout antibodies to viral haemorrhagic septicemia virus using recombinant fragments of their viral G protein [J]. Journal of Virological Methods, 2011, 176(1–2): 14–23.

## Prokaryotic expression and functional verification of ScFv antibody against viral hemorrhagic septicemia virus

WANG Honghua<sup>1</sup>, HOU Zhumei<sup>2</sup>, ZHANG Quanqi<sup>1\*</sup>, YU Haiyang<sup>1</sup>,  
WANG Zhigang<sup>1</sup>, QI Jie<sup>1</sup>, WANG Xubo<sup>1</sup>

(1. College of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** The aim of this study is to prepare the ScFv antibody (single chain variable fragment antibody) against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and analyze the biological properties. The variable heavy (VH) and the variable light (VL) chain gene fragments were derived from mAb 1G5 hybridoma cells against VHSV. The VH and the VL DNA fragments were assembled through a flexible linker DNA to generate ScFv DNA that was cloned subsequently in the pET28a vector to express ScFv protein in *E. coli* cells. The expressed ScFv protein, with a relative molecular mass of about 28 ku, existed in a form of soluble expression in cytoplasm. The ScFv protein could specifically identify VHSV glycoprotein (G), and neutralize viral virulence of VHSV in vitro. The ScFv protein showed good affinity for VHSV glycoprotein (G) antigen, as indicated by KD values of  $1.4 \times 10^{-8}$  M. ScFv protein preparation has laid a foundation for further study of VHSV therapeutic antibodies as well as rapid diagnostic reagent.

**Key words:** fish; viral hemorrhagic septicemia virus; ScFv antibody

**Corresponding author:** Zhang Quanqi. E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

**Funding projects:** National High Technology Development Plans (2011AA10A402)