

# 噬菌体展示随机十肽库的构建及抗 WSSV 单链抗体 A1 的模拟抗原表位的淘选和鉴定\*

袁 丽<sup>1,2</sup>, 王玉珍<sup>1,2</sup>, 肖 因<sup>1,2</sup>, 张晓华<sup>1</sup>, 戴和平<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 湖北武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

## Construction of a Phage Display Random Decapeptide Library and Panning for Mimic Antigen Epitope of ScFv A1 Against WSSV

YUAN Li<sup>1,2</sup>, WANG Yu-zhen<sup>1,2</sup>, XIAO Nan<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-hua<sup>1</sup>, DAI He-ping<sup>1\*\*</sup>

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** A phage display random decapeptide library with high titer was constructed using *pCANTAB 5 E* as vector and used to select and identify antigen epitopes. ScFv A1, which specifically binds the shrimp's *White spot syndrome virus* (WSSV), was used to pan against the decapeptide library and a random 15mer library, respectively. A series of positive clones that bind specifically to scFv A1 were obtained. The amino acid sequences of the positive peptides were compared with WSSV388 fragment, which is the antigen of scFv A1. We found that most of the sequences of the positive peptides were similar to a fragment, K••••R••R•Q, located on C-terminal of WSSV388 fragment. We deduced that the mimic antigen epitopes of scFv A1 were conformational epitopes structured by the discontinuous amino acid fragment, but not by a linear amino acid fragment. These results show that phage display peptide library technology is a powerful method for analyzing the structure of antigen epitopes, which is helpful to further explore conformation and function of the structural proteins of WSSV, and the mechanisms of interactions of the virus with the antiviral antibodies and host cells.

**Key words:** *White spot syndrome virus* (WSSV); Phage display random peptide library; Single chain Fragment variable (scFv); Panning; Mimic antigen epitope

**摘要:** 本实验以 *pCANTAB 5 E* 噬菌粒为载体, 成功构建了较高容量的噬菌体展示随机十肽库, 并将其应用于抗原模拟表位的淘选和鉴定。将一种特异识别对虾白斑综合症病毒 (*White spot syndrome virus*, WSSV) 的单链抗体 A1 对十肽库和十五肽库分别进行淘选, 结果得到一系列能与单链抗体 A1 特异性结合的阳性克隆。将这些阳性克隆所编码的多肽氨基酸序列与已知的单链抗体 A1 的抗原 WSSV388 片段氨基酸序列做比对, 发现多数阳性多肽序列都与 WSSV388 片段序列的 C 端一处 K••••R••R•QS 的氨基酸片段相似, 由此推论单链抗体 A1 的模拟抗原表位可能是由该不连续氨基酸片段所构成的构象表位, 而非线性表位。研究结果表明, 噬菌体展示随机肽库技术是一种用于研究抗原表位结构的有效方法, 有助于进一步探讨 WSSV 的结构蛋白的构象及功能, 以及相应单链抗体与细胞受体相互作用的机理。

**关键词:** 对虾白斑综合症病毒 (WSSV); 噬菌体展示随机肽库; 单链抗体 (scFv); 淘选; 模拟抗原表位

中图分类号: S956

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0614-05

收稿日期: 2006-05-31, 修回日期: 2006-10-10

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (30471339)

作者简介: 袁 丽 (1979-), 女, 湖北十堰籍, 博士研究生, 主要从事噬菌体展示技术方面的研究。

\*\* 通讯作者: 戴和平 (1955-), 女, 湖北武汉籍, 研究员, 主要从事噬菌体展示技术方面的研究。

Corresponding author. Tel: 027-68780716, E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

噬菌体作为一种研究蛋白质之间相互作用的方便快捷的方法,展示技术自 1985 年首先被 Smith<sup>[1]</sup> 成功应用以来,迅速被运用到各个相关的研究领域中。基于噬菌体展示技术发展起来的噬菌体展示随机肽库技术在研究配体-受体的相互作用方面具有多优点,尤其适合应用于筛选病原体抗原模拟表位的研究。该技术的基本原理是将化学合成的随机寡核苷酸序列与噬菌体的表面蛋白基因融合,在噬菌体表面表达出各种氨基酸组合的随机序列短肽,通过与特定的靶标蛋白反应,将展示有能与靶标蛋白特异性结合的肽段的噬菌体从噬菌体随机序列肽库中淘选出来,通过感染大肠杆菌,使淘选出来的噬菌体扩增。经过几轮淘选后,用 ELISA 确定阳性克隆,并将其进行序列测定,从而获得相应的结构和功能信息。

对虾白斑综合症自 1992 年爆发<sup>[2]</sup>以来,对全球的对虾养殖业造成了毁灭性的打击。到目前为止对于该病的病原、病理、感染途径、流行特点等方面的相关研究已较为深入。随着该病病原体-对虾白斑综合症病毒(WSSV)的全基因组序列的成功测定<sup>[3]</sup>,该病毒的主要结构蛋白及功能蛋白相继被克隆鉴定。但在对虾白斑综合症的防治上,至今尚缺乏有效的措施。为此,本研究小组为了研究该病毒的表面抗原的结构和特性,以及病毒与宿主细胞之间的相互作用,构建了抗 WSSV 的噬菌体抗体展示文库,并成功获得一系列能特异识别 WSSV 的单链抗体。其中编号为 A1 的单链抗体表现出较强的亲和力<sup>[8]</sup>,为此本研究小组对 A1 的性质和其所结合的病毒抗原蛋白和结合位点开展了研究。

本研究以 *pCANTAB 5 E* 噬菌粒为载体构建了较高容量的噬菌体展示随机十肽库,并用单链抗体 A1 对该十肽库和 Smith 实验室馈赠的十五肽库进行了淘选,以期获得相应的抗原模拟表位,对进一步研究 WSSV 与对应抗体及细胞受体相互作用的研究提供实验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 试剂 T4 DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司; *Sfi* I 和 *Not* I 核酸内切酶购自 NEB 公司;丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺购自 Fluka 公司; CIAP 和 T4 DNA Ligase 购自晶美生物公司; E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit 购自 Omega 公司; HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate, HRP/Anti-E tag Conjugate 和 RPAS 亲合纯化试剂盒(anti-Etag)购自 Amersham 公司;

Ampicillin Na Salt 购自 Amresco 公司; IPTG 购自 Viogene 公司

1.1.2 载体及菌株: 构建随机十肽库的载体为 *pCAN-OTAB 5 E* 噬菌粒; 构建随机十肽库的宿主菌: *E. coli NM 522*; 淘选过程中所用的受体菌: *E. coli TG1*。

1.1.3 随机肽库: 随机十肽库为本实验所构建,随机十五肽库及受体菌 *E.coli K91BluKan* 由美国 Messouri 大学 George P. Smith 教授惠赠。

### 1.2 噬菌体展示随机十肽库的构建

1.2.1 随机十肽核苷酸的合成: 编码随机十肽核苷酸片段的设计策略是依据 Christian 等<sup>[4]</sup>描述的方法,在长链 DNA 合成时设计核苷酸回文序列,其中编码随机十肽核苷酸序列的前两个核苷酸为任意核苷酸 N(A/T/C/G),最后一个核苷酸根据密码子的简并性设计为 K(G/T)。本实验合成的编码随机十肽核苷酸序列为: 5'-CGCTGGCCCAGCCGGC C(NNK)<sub>10</sub> GCGGCCGCCACGTAATACACGTGGGCGGCC GC-3', 共 80 个碱基。3'端的回文结构可为 DNA 聚合酶提供引物,引导 3'至 5'端的 DNA 合成,使 (NNK)<sub>10</sub> 获得与之互补的核苷酸序列,也使最后合成的双链 DNA 的 5'端和 3'端具有完整的 *Sfi* I 和 *Not* I 核酸内切酶位点。DNA 序列合成由上海生工生物技术服务有限公司完成。用灭菌去离子水将合成的 DNA 干粉溶解,得到浓度为 0.5μg/μL 的溶液,分装后于 -20℃ 冻存。

1.2.2 十肽 DNA 片段的聚合和酶切: 将 5μL 合成的编码随机十肽的核苷酸片段溶液与 1μL 10×T4 DNA Polymerase Buffer, 1μL 0.1% BSA, 1μL 10mmol/L dNTP Mixture 和 1μL 灭菌去离子水混合,并加矿物油封顶,在 94℃ 水浴中保温 5min,使 DNA 完全解链,然后移入室温放置 5min,使回文结构形成。加入 1μL T4 DNA Polymerase,用取样器轻轻混匀,放入 37℃ 水浴中保温 5min,以 (NNK)<sub>10</sub> 作为模板,在 T4 DNA Polymerase 的作用下使与之互补的核苷酸链延伸,从而得到双链 DNA。然后剧烈振荡使酶失活,并放置于冰上,待下一步酶切。将聚合好的核苷酸链在 50℃ 水浴中用 *Sfi* I 酶切 4hr 后,加入添加 Buffer 和 *Not* I,在 37℃ 水浴中酶切 4hr。双酶切产物在 12% 的聚丙烯酰胺凝胶中于 250V 电泳 25-30min 后,切下 40bp 大小的条带,用自制快速高效电洗脱法<sup>[5]</sup>回收,并定量,分装后于 -20℃ 冻存。

1.2.3 *pCANTAB 5 E* 噬菌粒载体的制备和酶切: 用 SDS 碱裂解法<sup>[6]</sup>从宿主细胞大肠杆菌中提取 *pCAN-TAB 5 E* 噬菌粒,经 RNA 酶消化,在 50℃ 水浴中

用 *Sfi* I 酶切 4hr 时后, 加入添加 Buffer 和 *Not* I 在 37°C 水浴中酶切 4hr。双酶切产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中于 120V 电泳 20-30min 后, 切下双酶切后的载体条带, 用 glassmilk 试剂盒回收后, 用 CIAP 去磷酸化, 再在 1.2% 的琼脂糖凝胶中于 120V 电泳 20-30min。切下目的条带, 用 glassmilk 试剂盒回收, 定量, 分装后于 -20°C 冻存。

1.2.4 十肽 DNA 片段与噬菌粒载体的连接和转化: 将双酶切十肽 DNA 片段和双酶切并去磷酸化的噬菌粒载体按摩尔数 1:3、1:2、1:1、2:1、3:1 的比例做一次小量连接和电转化, 选效率最高的比例进行大量连接。连接产物必须经过去离子纯化处理。本实验采用 Omega 公司的 E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit 进行纯化。纯化后连接产物体积为 30 $\mu$ L。取 3 $\mu$ L 纯化连接产物与 100 $\mu$ L 感受态细胞混匀后加入预冷的 0.2cm 电转化杯 (Biorad) 并在冰上放置 10-30min, 然后在 Biorad 电转化仪上进行电转化: 2.5kv, 200 $\Omega$ , 25 $\mu$ F。电击后立即于室温下加入 1mL 2YT 培养液, 如此转化十次, 最后将各次转化产物合并, 在 37°C 中轻摇 (150r/min) 1hr 使细胞复苏, 然后将菌液涂布在十个 SOBAG 平板 (含有 100 $\mu$ g/mL Amp 和 2% 葡萄糖的 SOB 平板) 上。将平板倒置于 30°C 恒温培养箱中培养过夜。次日将菌落用 2YT-AG (2YT+100 $\mu$ g/mL Amp+2% 葡萄糖) 培养液刮下来, 加入甘油, 分装后冻存于 -70°C 中。

高质量的感受态细胞对于构建高容量文库至关重要。本实验选用 *E. coli* NM522 作为感受态细胞菌株。接种 *E. coli* NM522 单菌落至 5mL 2YT 培养液中于 37°C 振荡过夜, 次日将 3mL 过夜培养的菌液加至 300mL 2YT 培养液中, 于 37°C 振荡 1.5-2hr 至 OD<sub>590nm</sub> 达到 0.3-0.5。将菌液冰浴 30min 后, 在预冷的离心机中于 4°C 以 4000g 离心 15min, 用 300mL 预冷的灭菌去离子水于冰水中轻柔重悬沉淀, 至沉淀细胞完全均匀地分散于水中 (该过程需要 30-60min, 切勿剧烈振荡或用移液器吹打) 后, 在预冷的离心机中于 4°C 以 4000g 离心 15min, 再依次用 150mL 预冷的灭菌去离子水和 30mL 预冷的 10% 的甘油 (用灭菌去离子水配制) 如上所述洗涤细胞两次, 最后将细胞重悬于 1mL 预冷的 10% 的甘油中, 置于冰上立即使用或分装后冻存于 -70°C 中待用。

1.2.5 随机十肽库的容量测定和多样性鉴定: 为测定随机十肽库的容量, 在建库的过程中, 转化并复苏细胞后, 取少量菌液从 10<sup>-1</sup> 到 10<sup>-6</sup> 做 10 倍系列稀释, 分别涂布于 SOBAG 平板上, 次日根据单菌落数以确定库容量。为鉴定随机十肽库的多样性,

从上述平板上随机挑取 10 个单菌落送去进行 DNA 序列测定 (上海生工生物技术有限公司)。

### 1.3 用单链抗体 A1 对随机十肽库和十五肽库进行淘选

单链抗体 A1 的表达和制备, 以及 RPAS 亲和纯化的方法参见张晓华等<sup>[7]</sup>文中的描述。用 50~100 $\mu$ g 纯化的单链抗体 A1 包被免疫管 (NUNC), 按 Dai 等<sup>[8]</sup>文中的方法, 对随机十肽库进行 3 轮淘选。在进行淘选之前, 先将一种与 WSSV 无关的单链抗体 H3 与随机十肽库于 37°C 预保温 1h, 以屏蔽非抗原表位的蛋白结合位点, 再将其加入包被有单链抗体 A1 的免疫管中进行淘选。

对随机十五肽库的淘选方法: 将 50~100 $\mu$ g 纯化的单链抗体 A1 加入免疫管 (NUNC) 中, 于 4°C 包被过夜。次日用 PBS 洗管 5 次后, 加入 10% PBSM (PBS 中溶解 10% 的脱脂奶粉), 于室温下封闭免疫管 1hr。再用 PBS 洗管 3 次后, 加入与 H3 预保温了的随机 15 肽库, 于 37°C 放置 1h。然后用 PBST (含 0.1% Tween-20 的 PBS) 和 PBS 各洗 20 次, 将制备好的 *E. coli* K91BlueKan 细胞 5mL 加入免疫管中, 于 37°C 放置 1h 进行细胞原位洗脱。将免疫管中的洗脱液加入到 15mL 含 0.2 $\mu$ g/mL 的四环素的 LB 培养液中, 于 37°C 中振荡培养 30-60min 后, 加入四环素至终浓度为 20 $\mu$ g/mL, 于 37°C 中振荡培养过夜。将过夜培养物离心, 向上清液中加入 1/5 倍体积的 PEG/NaCl (16.6%/3.3mol/L), 置于冰上至少 4h 以沉淀噬菌体。然后离心收集噬菌体, 进入下一轮淘选, 如此淘选 4 轮。

### 1.4 阳性克隆的鉴定

从单链抗体 A1 对随机十肽库第 3 轮淘选以及对随机十五肽库第 3 轮和第 4 轮淘选的平板上随机挑取单克隆, 做 ELISA 进行阳性克隆鉴定。将纯化单链抗体 A1 以 0.5 $\mu$ g/孔的量加入 ELISA 板, 于 4°C 包被过夜。次日用 PBS 洗 3 次后, 用 4% PBSM 封闭, 然后分别加入制备好的展示有十肽或十五肽的单克隆噬菌体上清, 于 37°C 保温 1h, 用 PBST 和 PBS 各洗 3 次后, 加入 HRP/ Anti-M13 Monoclonal Conjugate 二抗 (1:5000 稀释), 于 37°C 保温 1h, 再用 PBST 和 PBS 各洗 3 次。最后加入 100 $\mu$ L TMB 底物溶液 [2.5mL 1mol/L 的醋酸钠溶液 (pH6.0), 22.5mL H<sub>2</sub>O, 250 $\mu$ L 60mg/mL TMB, 10 $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], 显色 10min 后, 每孔加入 25 $\mu$ L 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液终止反应, 测定 OD<sub>450nm</sub> 值。

## 2 结果

2.1 随机十肽库和随机十五肽库的容量测定和多样性鉴定

随机十肽库的库容量根据转化后在 Amp 抗性的平板上的菌落数确定,其容量为  $2.09 \times 10^8$  个克隆。随机十五肽库是以改造过的丝状噬菌体 FUSE5 为载体,其容量测定是根据其库中的噬菌体在含有四环素抗性的平板上的噬菌斑数量确定的,其原始库容量为  $2 \times 10^8$  个克隆。获赠时不是原始文库,而是扩增过的文库,滴度为  $3.2 \times 10^{11}$  TU/mL。在本实验室扩增后滴度为  $1.1 \times 10^{12}$  TU/mL。分别从这两个库中随机挑选 10 个克隆进行 DNA 序列测定,结果表明随机挑选的克隆的插入片段没有移码或缺失现象,其所编码的十肽和十五肽的序列完全不同,这从一定程度上证明了这两个库的多样性。

2.2 淘选结果

用纯化的单链抗体 A1 分别对随机十肽库和十五肽库进行了淘选。对十肽库的淘选从第二轮开始出现明显的富集,对十五肽库的淘选到第四轮开始出现明显的富集(表 1)。

表 1 单链抗体 A1 对十肽库和十五肽库的淘选结果

Table1 Results of panning from 10mer and 15mer phage libraries with scFv A1

Phage library	Round of panning	Input phage	Output phage	Yield (%)
10mer	1	$1.5 \times 10^{12}$	$1.0 \times 10^7$	0.00067
	2	$3.3 \times 10^9$	$1.7 \times 10^5$	0.00520
	3	$5.0 \times 10^9$	$2.3 \times 10^5$	0.00460
15mer	1	$1.1 \times 10^{12}$	$5.2 \times 10^6$	0.00047
	2	$3.0 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^6$	0.00067
	3	$1.0 \times 10^{12}$	$5.0 \times 10^6$	0.00050
	4	$1.0 \times 10^{11}$	$2.4 \times 10^6$	0.00240

2.3 阳性克隆的鉴定及其编码氨基酸的序列分析

从单链抗体 A1 对十肽库第 3 轮淘选后的平板上随机挑选 2 板 96 孔板单菌落,制备其单克隆噬菌体,

ELISA 鉴定阳性克隆,其中编号为 1B2、1E7、2D6 的克隆 ELISA 值较高(图 1)。从单链抗体 A1 对十五肽库的第 3 轮和第 4 轮淘选后的平板上分别随机挑选 2 板 96 孔板单菌落,制备其单克隆噬菌体,ELISA 鉴定阳性克隆,其中从第 3 轮淘选产物中挑的 2 板中没有明显的阳性克隆,第 4 轮淘选产物中编号为 B1、C5、C11 的克隆 ELISA 值较高(图 1)。

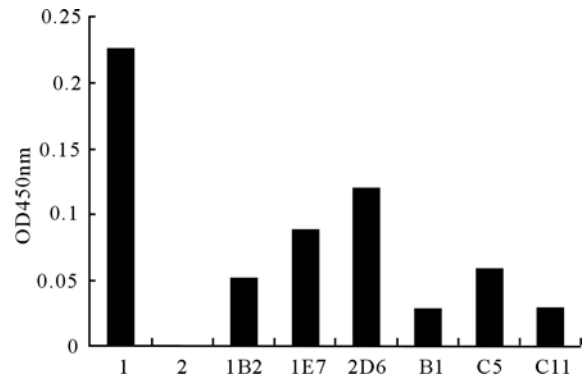


图 1 阳性克隆的 ELISA 值

Fig. 1 The ELISA value of the positive phage

1, Positive control: Microplates were coated with purified scFv A1, and then blocked with 4% PBSM. The E-tag was detected with HRP/Anti-E tag Conjugate. Color development was measured at 450 nm. 2. Negative control: Microplates were coated with purified scFv A1, and then blocked with 4% PBSM. M13K07 phages were added to wells, and then the bound phages were detected with HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate. Color development was measured at 450 nm. 1B2/1E7/2D6/B1/C5/C11. Microplates were coated with purified scFv A1, and then blocked with 4% PBSM. The single clone phages named as above number were added to the wells respectively, and then the bound phages were detected with HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate. Color development was measured at 450 nm.

选取这些阳性克隆进行 DNA 序列测定。根据所测得的 DNA 序列推测出其所编码的氨基酸序列,并将其与本实验室已获得的单链抗体 A1 的抗原 WSSV388<sup>[9]</sup>的氨基酸序列进行序列相似性比对,发现所得到的阳性多肽片段与 WSSV388 片段的 C 端附近的一个区域具有较高的相似性(图 2),并且是不连续的氨基酸片段: K••••R••R•QS。

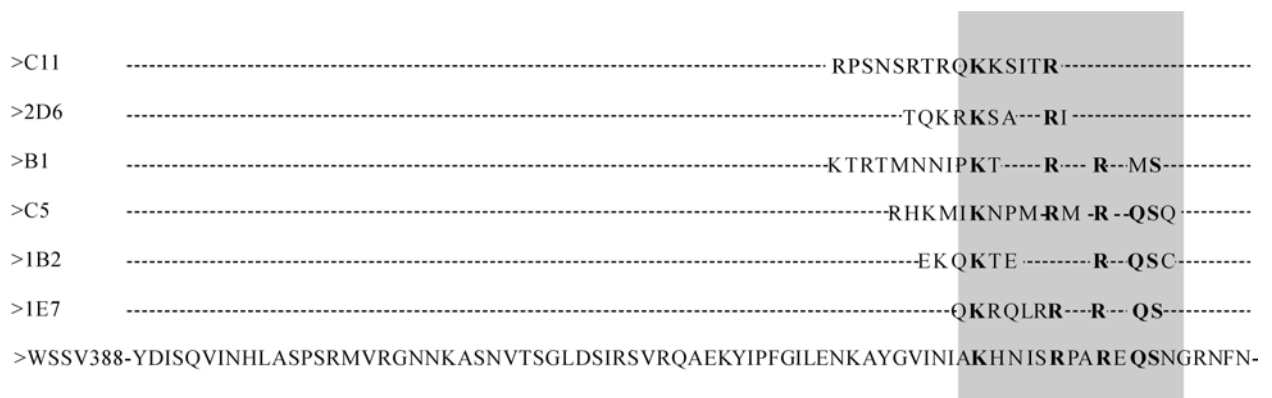


图 2 阳性克隆编码的多肽与 WSSV388 片段氨基酸序列比对

Fig. 2 Sequences comparison of the positive peptides and WSSV388 fragment

### 3 讨论

本实验根据 Christian 等<sup>[4]</sup>的方法以 *pCANTAB 5 E* 噬菌粒为载体, 构建了噬菌体展示随机十肽库, 由于连接过程中外源片段与载体的比例把握得当, 感受态细胞制备效率高, 因此得到了较高的库容量。

在本实验室以前的研究中发现单链抗体 A1 与天然状态的 WSSV 具有较高的亲和力, 一旦 WSSV 经过 SDS-PAGE 变性后, 单链抗体 A1 就不能与其结合。由此可见单链抗体 A1 与 WSSV 的结合位点不是线性表位, 该位点是依赖氨基酸序列的空间构象与单链抗体 A1 特异性相互作用的。传统的蛋白质抗原表位分析主要是通过化学或生物学方法处理抗原分子以获得多肽碎片, 再利用单克隆抗体筛选能与之起阳性反应的片段, 并对之进行氨基酸序列的分析。但这种方法工作量大, 效率低, 成本高; 更主要的是, 完整蛋白质的抗原表位中, 90% 的是构象型表位, 仅 10% 为线性表位。而合成的序列肽仅模拟蛋白质的线性表位, 这无疑会失去众多的构象表位。噬菌体展示随机肽库技术则既可以筛选出与原始抗原序列完全相同的线性表位抗原, 又可以筛选出与原始抗原序列不完全相同但功能相似的构象表位抗原, 即模拟表位抗原。在本实验中我们用单链抗体 A1 对十肽库和十五肽库进行淘选, 得到了一系列能与单链抗体 A1 特异性结合的阳性克隆。根据这些阳性克隆的 DNA 序列推断出其短肽氨基酸序列, 发现这些短肽都与 WSSV388 的 C 端一段不连续氨基酸片段具有一定程度的相似性, 由此推断单链抗体 A1 的模拟抗原表位可能是由该不连续氨基酸片段所编码的构象表位。在后续研究中, 我们将对其他抗 WSSV 的单链抗体的抗原表位开展研究, 这将有助于进一步探讨 WSSV 的结构蛋白的构象及功能, WSSV 与对应的单链抗体及细胞

受体相互作用的机理。该实验结果对深入研究具有中和作用的单链抗体所对应的模拟抗原表位提供了方法基础和经验。

### References

- [1] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228: 1315-1317.
- [2] Chou H Y, Huang C Y, Wang C H, *et al.* Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan [J]. *Dis Aqua Organ*, 1995, 23: 165-173.
- [3] Yang F, He J, Lin X H, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [J]. *J Virol*, 2001, 75: 11811-11820.
- [4] Christian R B, Zuckermann R N, Kerr J M, *et al.* Simplified methods for construction, assessment and Rapid screening of peptide libraries in bacteriophage [J]. *J Mol Biol*, 1992, 227: 711-718.
- [5] Lu S D (卢圣栋). *Modern Molecular Biology Experimental Technology (现代分子生物学实验技术)* [M]. Beijing: Higher Education Press. 1993.129-130.
- [6] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3<sup>rd</sup> edition)* [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.27-35.
- [7] Zhang X H, Dai L F, Dai H P (张晓华, 戴玲芬, 戴和平). Studies on expression and biochemical characteristics of single chain fragment variable A1 against white spot syndrome virus of shrimp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica (水生生物学报)*, 2006, 30: 141-145.
- [8] Dai H, Gao H, Zhao X, *et al.* Construction and Characterization of a Novel Recombinant Single-Chain Variable Fragment Antibody Against White Spot Syndrome Virus from Shrimp [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 279: 267-275.
- [9] Xiao N, Zhang X, Dai L, *et al.* Isolation of a novel WSSV nucleocapsid protein by cDNA phage display using an scFv antibody, [J]. *J Virol Methods*, 2006, 137: 272-279.