

路少鹏, 岳敏, 张欣欣, 等. 抗利巴韦林单链抗体基因构建及其结构分析 [J]. 福建农业学报, 2021, 36 (8): 909-916.

LU S P, YUE M, ZHANG X X, et al. Construction and Structure of Anti-ribavirin Single-chain Antibody Gene [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36 (8): 909-916.

抗利巴韦林单链抗体基因构建及其结构分析

路少鹏^{1,2}, 岳敏², 张欣欣², 李丹², 王文魁^{1*}, 齐永华^{2*}

(1. 山西农业大学动物医学学院, 山西 太谷 030801; 2. 新乡学院动物疫病分子
诊断河南省工程实验室, 河南 新乡 453000)

摘要:【目的】克隆构建利巴韦林 (RBV) 单链抗体 (scFv) 基因, 对其理化特性进行分析并对蛋白质结构进行模拟, 为后期检测方法的建立及分子改造提供参考依据。【方法】以分泌利巴韦林抗体的杂交瘤细胞株总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 技术扩增抗体的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 然后以柔性连接短肽 (Gly₄Ser)₃ 为接头拼接完整的 scFv-RBV。利用生物信息学方法对 scFv-RBV 的理化性质及蛋白结构功能进行预测分析。【结果】构建的 scFv 基因编码 240 个氨基酸, 相对分子质量为 26 162.27 Da, 理论等电点 (pI) 为 8.57。在二级结构中, β -折叠 (39.17%) 和无规卷曲 (45.41%) 占主导地位, α -螺旋 (5.42%) 和 β -转角 (10%) 相对较少。在三级结构中, VH 和 VL 区域被 Linker 相互牵拉靠近, 形成典型的口袋样形状的空间构象, 符合单链抗体的结构特征, 理论上可以与 RBV 抗原特异性结合。【结论】成功构建 scFv-RBV 基因, 并利用生物信息学方法预测分析 scFv 的二级、三级结构, 该结果可为后期进行单链抗体的表达、纯化及定向进化提供理论支撑。

关键词: 利巴韦林 (RBV); 单链抗体 (scFv); 生物信息学; 结构预测

中图分类号: S 859.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2021) 08-0909-08

Construction and Structure of Anti-ribavirin Single-chain Antibody Gene

LU Shaopeng^{1,2}, YUE Min², ZHANG Xinxin², LI Dan², WANG Wenkui^{1*}, QI Yonghua^{2*}

(1. College of Animal Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 2. Henan Engineering
Laboratory for Molecular Diagnosis of Animal Diseases, Xinxiang University, Xinxiang, Henan 453000, China)

Abstract: 【Objective】The ribavirin (RBV) single-chain antibody (scFv) gene was constructed, cloned, and physiochemically analyzed to establish a model for the detection method development and molecular modification.

【Method】Using the total RNA of the hybridoma cell line secreting RBV antibody as a template, both heavy-chain (VH) and light-chain variable (VL) regions of the antibody were amplified by RT-PCR. Then the short peptide (Gly₄Ser)₃ was employed as the splicing joint to construct the complete scFv-RBV. Bioinformatics methods were applied to predict and analyze the physiochemical properties, protein structure, and functions of the gene. 【Results】The constructed scFv-RBV encoded 240 amino acids with a relative molecular mass of 26,162.27 Da and a theoretical isoelectric point of 8.57. The secondary structure of the protein consisted of 39.17% β -sheets, 45.41% random coils, 5.42% α -helices, and 10% β -turns. In the tertiary structure, the VH and VL regions were pulled close by Linker, forming a typical pocket-like spatial configuration that conforms to the structural characteristics of a single-chain antibody. Theoretically, it could bind specifically to RBV antigens.

【Conclusion】The successfully constructed scFv-RBV in this study afforded the utilization of bioinformatics methods to predict and analyze the secondary and tertiary structures of scFv gene paving the way for further studies on the expression, purification, and directed evolution of the single-chain antibodies.

Key words: ribavirin (RBV); single chain antibody fragment (scFv); bioinformatics; protein structure

收稿日期: 2021-03-10 初稿; 2021-07-12 修改稿

作者简介: 路少鹏 (1995-), 男, 硕士研究生, 主要从事药物代谢与药效研究 (E-mail: 1309909741@qq.com)

* 通信作者: 王文魁 (1962-), 男, 博士, 教授, 主要从事畜禽细胞因子研究 (E-mail: wenkui2009@yeah.net); 齐永华 (1977-), 男, 博士, 教授, 主要从事细菌耐药性及新药开发研究 (E-mail: qyh@xxu.edu.cn)

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1602900)

0 引言

【研究意义】利巴韦林（Ribavirin, RBV）是一种广谱抗病毒药物，在畜牧业中被广泛用于治疗禽流感、口蹄疫、流行性腹泻、狂犬症等疾病^[1-2]。长期使用或滥用可导致动物机体对病毒抵抗力降低，同时也会残留于动物性食品中，因此，我国禁止在畜禽养殖过程中使用 RBV^[3-4]。免疫学检测技术作为小分子化合物检测的主要手段之一，其核心试剂是高适应性的检测抗体。单链抗体（single chain antibody fragment, scFv）是从单克隆抗体衍生而来的一种基因重组抗体，大小仅有完整抗体的六分之一，但具有与亲本抗体完全相同的抗原结合位点^[5]。通过分子生物学方法可以将单克隆抗体的 *VH* 和 *VL* 基因通过柔性连接肽进行拼接，拼接而成的重组蛋白具有分子质量小、特异性及穿透力强等优点，而且可以在分子水平上对其进行定向改造，以便提高其亲和力和特异性，从而更加便捷高效地为体外快速检测小分子化合物残留检测方法的建立提供所需的核心试剂^[6]。生物信息学作为一门综合计算机科学、信息技术的学科之一，在蛋白质结构预测、药物设计等方面发挥了重要作用^[7-8]。采用生物信息学技术对单链抗体序列进行结构功能分析，后期通过定向改造有望获得高亲和力和灵敏度的单链抗体。【前人研究进展】目前针对利巴韦林药物残留检测方法主要有高效液相色谱法（HPLC）、毛细管电泳法、分光光度法及比色法等，这些方法可有效检测血清^[9]、血浆^[10]、红细胞^[11]、白龙散等中药散剂^[12]中的利巴韦林残留。【本研究切入点】目前关于利用利巴韦林单链抗体检测药物残留的相关报道较少，针对利巴韦林

单链抗体结构的解析及功能研究的报道更是少之又少。【拟解决的关键问题】本研究在获得分泌利巴韦林抗体的杂交瘤细胞株基础上，利用 PCR 技术扩增出抗体的 *VH* 基因和 *VL* 基因，然后拼接成 *scFv-RBV*，进行重组质粒构建。后续利用生物信息学方法，预测分析 *scFv-RBV* 的理化性质及二级结构，并利用同源建模模拟其三级结构。该研究结果可为后期进行利巴韦林单链抗体的亲和力和成熟、抗体蛋白表达及纯化提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

抗 scFv-RBV 单克隆抗体杂交瘤细胞株由新乡学院动物疫病分子诊断河南省工程实验室提供；核酸蛋白分析仪购自美国 Beckman-Coulter 公司；梯度 PCR 反应仪和高速低温离心机购自美国 Thermo Fisher 公司；胶回收试剂盒购自美国 OMEGA 公司；总 RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、HS DNA Polymerase、T₄ DNA 连接酶及大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞均购自大连 Takara 公司；限制性内切酶 *Not* I 和 *Sfi* I 购自 New England Biolabs 公司；其他相关试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计

按照文献^[13]设计扩增 *VH* 及 *VL* 基因的引物，并引入合适的酶切位点 *Sfi* I 和 *Not* I，Linker 选择较常用的（Gly₄Ser）₃ 形式^[14]；具体引物序列设计如表 1 所示（引物序列由上海生工生物工程有限公司合成）。

1.3 杂交瘤细胞的复苏

为防止细胞在活化复苏时被污染，迅速从液氮罐中取出本实验室保存的可分泌利巴韦林抗体的杂

表 1 扩增 *scFv-RBV* 基因的引物序列
Table 1 Primer sequence for amplifying *scFv-RBV*

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')
VH-F	AGG TSM ARC TGC AGS AGT TWGG
VH-B	TGA GGA GAC GGT GAC TGT GGT TCC TTG GCC CC
VL-F	GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCC
VL-B	ACG TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC
VH-linker-For	TTT <u>TGGCCCA</u> GC <u>CGGCC</u> CGAGGTGAAGCTGGTGGA
VH-linker-Back	<u>TCCACCGCCAGAACCTCCGCCACCAGAACCTCCACCGCC</u> TGAGGAGACTGTGAGAGT
VL-linker-For	<u>GGTGGCGGAGGTTCTGGCGGTGGAGGTT</u> CG GA TA TCCAGA TGACACAGT
VL-linker-Back	TTT <u>GCGGCCG</u> CTTA GGA TACAGTTGGTGCAG

注：VH-linker-For中的划线处为*Sfi* I 酶切位点；VL-linker-Back划线处为*Not* I 酶切位点；VH-linker-Back和VL-linker-For划线处为Linker序列。
Note: The underline in VH-linker-For is the *Sfi* I restriction site; the underline in VL-linker-Back is the *Not* I restriction site;The underlined VH-linker-Back and VL-linker-For are the Linker sequence.

交瘤细胞株，并迅速置于 37 ℃ 恒温水浴锅中缓慢晃动使其迅速解冻。将解冻后的杂交瘤细胞用 10 mL DMEM 完全培养基进行稀释，1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min，弃去上清液，保留沉淀。然后重新加入 10 mL DMEM 完全培养基重悬细胞沉淀，置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养细胞（5% CO₂），并隔天对细胞进行传代以保证细胞活力。当细胞数量生长到 8 × 10⁶ 个·瓶⁻¹，选取生长状态良好的细胞提取总 RNA。

1.4 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

为避免外界环境污染而降解 RNA，因此，在超净工作台中按照 RNA 提取试剂盒说明书提取杂交瘤细胞总 RNA，然后将其反转录为 cDNA（表 2）。

表 2 反转录 cDNA 的反应体系
Table 2 Reaction system of cDNA's reverse transcription

试剂 Reagent	体积 Volume/μL
5 × PrimeScript RT master mix	4
Total RNA	10
ddH ₂ O	6

注：反应条件：37 ℃ 15 min；85 ℃ 5 s；4 ℃ 保存。
Note: Eaction conditions: 37 ℃ for 15 min; 85 ℃ for 5 s; Storage at 4 ℃.

1.5 VH 和 VL 基因的扩增

以 cDNA 为模板，表 1 的 VH 和 VL 的上下游引物，利用 PCR 技术分别扩增抗体的 VH 和 VL 基因（表 3）。扩增结束后，使用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果，然后回收纯化符合目的大小片段的 VH 和 VL 基因，纯化后的产物于-20 ℃ 保存备用。

表 3 PCR 扩增 VH 和 VL 基因
Table 3 Amplification of VH and VL genes by PCR

样品 Sample	体积 Volume/μL
2 × Taq master mix	10
cDNA	1
VH-F/VL-F	1
VH-R/VL-R	1
ddH ₂ O	7

注：反应条件：96 ℃ 5 min；96 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，30 个循环；72 ℃ 10 min；4 ℃ 保存。
Note: Reaction conditions: 96 ℃ for 5 min; 96 ℃ for 30 s, 55 ℃ for 30 s, 30 cycles; 72 ℃ for 10 min; Storage at 4 ℃.

1.6 scFv-RBV 基因的构建

分别以 VH 和 VL 基因片段为模板，通过重叠延伸 PCR 技术扩增 VH-linker 和 VL-linker（表 4）；扩增结束后，以上述反应产物混合液为模板，表 1 中的 VH-linker-For 和 VL-linker-Back 为引物，扩增

scFv-RBV 基因（表 5），然后使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

表 4 scFv 基因 PCR 反应体系（step1）
Table 4 PCR reaction system for scFv gene (step 1)

样品 Sample	体积 Volume/μL
2 × phanta max buffer	25
dNTP mixture	1
HS DNA polymerase	1
VH	1
VH-linker-For	1
VH-linker-Back	1
ddH ₂ O	20

注：PCR 扩增程序：96 ℃ 90 s；96 ℃ 30 s，63 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，10 个循环；72 ℃ 10 min；4 ℃ 保存。
Note: PCR amplification program: 96 ℃ 90 s; 96 ℃ 30 s, 63 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 10 cycles; 72 ℃ 10 min; store at 4 ℃.

表 5 scFv 基因 PCR 反应体系（step 2）
Table 5 PCR reaction system for scFv gene (step 2)

样品 Sample	体积 Volume/μL
2 × phanta max buffer	25
dNTP	1
HS DNA polymerase	1
上述反应产物 Among all above	10
VH-linker-For	1
VL-linker-Back	1
ddH ₂ O	11

注：PCR 扩增程序同表 4。
Note: The PCR amplification procedure is the same as table 4.

1.7 重组质粒 pCANTAB-5E-scFv 的构建与鉴定

利用 Sfi I 和 Not I 内切酶将 scFv-RBV 基因和 pCANTAB-5E 质粒进行双酶切，然后使用 T₄ DNA 连接酶将酶切后的 scFv 与 pCANTAB-5E 质粒进行连接（表 6），从而构建重组质粒 pCANTAB-5E-scFv。采用电转化法将重组质粒转入 DH5α 感受态细胞，然后均匀涂布到含氨苄青霉素（AMP）抗性的 LB 固体培养基，置于 37 ℃ 恒温箱培养 14~16 h。次日挑取 3 个单菌落进行菌液 PCR 鉴定，然后将阳性菌进行基因测序。

1.8 scFv-RBV 蛋白质结构预测

利用 DANMAN 软件将测序得到的 scFv-RBV 核苷酸序列翻译成氨基酸序列，然后使用 NCBI 分析氨基酸序列的同源性和 IgG 结构域。采用 ExPASy ProtParam（<https://web.expasy.org/protparam/>）计算其

表 6 *scFv* 基因与 pCANTAB-5E 载体连接体系
Table 6 *scFv* gene linked with pCANTAB-5E vector

样品Sample	体积Volume/ μ L
T ₄ Ligation buffer (10 $\times$)	2
T ₄ DNA连接酶 T4 DNA ligase	1
scFv酶切纯化产物 scFv enzyme digestion purified product	1
pCANTAB-5E酶切纯化产物 pCANTAB-5E enzyme digestion purified product	3
ddH ₂ O	13

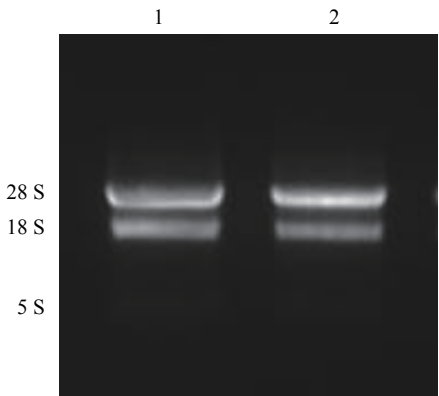
注：连接条件：16 ℃过夜。
Note: Connection conditions: 16 ℃ overnight.

蛋白分子量、等电点、氨基酸组成等参数^[15]，并以 SOPMA 程序 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测分析 scFv-RBV 的二级结构。在 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 中输入 scFv-RBV 的氨基酸序列，推测 scFv-RBV 蛋白的三级结构并进行同源建模。

2 结果与分析

2.1 *scFv* 可变区基因的扩增结果

按照 RNA 提取试剂盒说明书提取杂交瘤细胞总 RNA，结果如图 1 所示。RNA 的条带从上到下分别为 28、18 和 5 S，电泳条带无拖尾现象，表明 RNA 较完整。以反转录后的 cDNA 为模板，分别扩增抗体的 *VH* 和 *VL* 基因，图 2 结果表明，扩增的 *VH* 和 *VL* 片段大小均在 350 bp 左右，且扩增得到的条带单一，与预期结果相符。



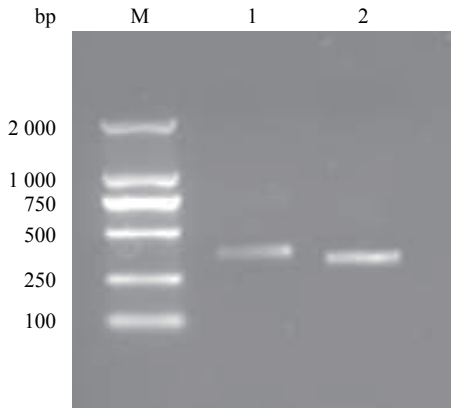
注：泳道 1~2：RNA。
Note: Swim lane 1-2: RNA.

图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

2.2 重组质粒 pCANTAB-5E-scFv 的构建及序列鉴定结果

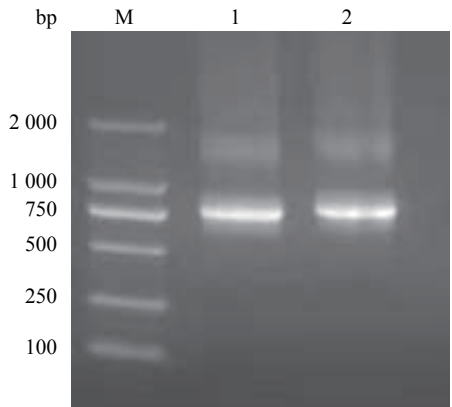
将 *VH* 和 *VL* 基因等摩尔浓度混匀，采用重叠延



注：M：DL 2 000 DNA marker；泳道 1：扩增的 *VH* 基因；泳道 2：扩增的 *VL* 基因。
Note: M: DL 2 000 DNA marker; Swim lane 1: Amplified *VH* gene; Swim lane 2: Amplified *VL* gene.

图 2 *VH* 和 *VL* 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 2 PCR amplifications of *VH* and *VL* genes

伸 PCR 构建 *scFv-RBV* 基因 (*VH*-Linker-*VL*)。图 3 结果表明，扩增的条带在 750 bp 左右有明显的目的条带。构建的重组质粒 pCANTAB-5E-scFv 电击转化进 DH5 α 感受态细胞后，菌液 PCR 鉴定结果表明 (图 4)，在 750 bp 左右有明显的目的条带，初步表明重组质粒构建成功。将阳性菌液送去基因测序，测序结果正确的菌液加终浓度为 40% 的甘油进行保菌，-80 ℃ 保存。



注：M：DL2 000 DNA marker；泳道 1~2：拼接的 *scFv* 基因。
Note: M: DL 2 000 DNA marker; Swim lane 1-2: Spliced *scFv* gene.

图 3 *scFv* 基因的琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of *scFv* gene

2.3 *scFv*-RBV 氨基酸序列分析

利用 DANMAN 软件将测序结果得到的核苷酸序列翻译成氨基酸，经 IMGT 划分得知 (图 5)，*VH* 和 *VL* 序列中均有 3 个互补决定区 (CDR) 和 4 个框架区 (FR)，且序列内无终止密码子。其中，*VH* 基因编码 118 个氨基酸，位于 Linker 上游；*VL* 基因编码 107 个氨基酸，位于 Linker 下游。*VH* 和 *VL* 依靠

和 VL 主要由无规卷曲折叠形成, 连接肽 Linker 使两者牵拉靠近, 形成一个有利于抗原结合的凹槽结构, 理论上具有良好的抗原结合活性。

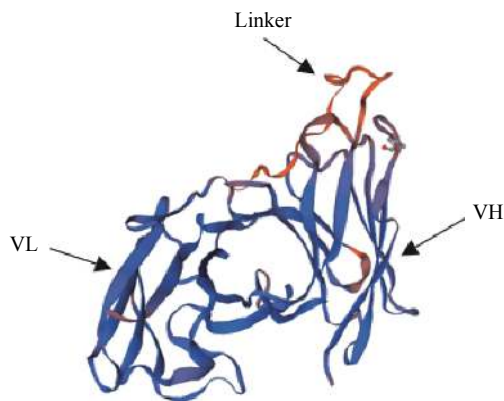


图 7 scFv-RBV 蛋白质三级结构同源建模

Fig. 7 Homologous modeling of tertiary structure of scFv-RBV

3 讨论

利巴韦林自 1972 年合成后, 在临床上得到了长期广泛的应用, 后因其导致动物中毒、免疫抑制、药物残留等危害而被国家禁用^[16]。但由于其价格低廉, 治疗效果好等原因, 部分不法分子依然在动物养殖过程中违规使用。因此, 开发便捷、高效、灵敏的检测方法迫在眉睫。在众多药物残留检测方法中, 基于抗原抗体特异性结合建立的免疫分析法, 由于操作简单、结果呈现快速、通量高, 目前已成为检测动物源性食品中药物残留的重要手段之一, 其中抗体是免疫分析的核心试剂^[17]。

抗体是免疫诊断方法的基础, 也是病原体检测的一个重要手段^[18]。早在 19 世纪末期, KÖHLER 等^[19]便利用基因工程方法制备了单克隆抗体, 该制备技术的出现使规模化制备高特异性、均质性抗体成为可能, 不仅为生物学和医学研究打开了新世界的大门, 同时也为疾病诊断与治疗提供新工具。然而由于单克隆抗体制备过程复杂, 且市场价格高昂, 在一定程度上限制了其临床使用。随着基因工程抗体技术的不断发展, 单链抗体以单克隆抗体衍生物的身份走进人们的视野。与传统单克隆抗体相比, 单链抗体不仅保留着与亲本抗体相同的特定抗原结合特性, 而且成本低、产率高、易与其他蛋白质融合形成有预期功能的抗体分子, 目前已在医疗诊断、治疗和小分子化合物检测等方面推广应用^[20-21]。李彤彤等^[22]以抗犬细小病毒 (CPV) 的杂交瘤细胞株为基础, 构建的重组单链抗体具有与亲本抗体相同的免疫活性, 免疫效价为 1:20; 陈倩等^[23]基于咪

唑啉酮单链抗体建立了咪唑啉酮快速检测法, 相较于亲本咪唑啉酮单克隆抗体有更广的检测范围和更高的特异性和稳定性, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 值为 $13.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检出限为 $1.28 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。此外, 伴随着分子生物学和生物信息学技术的不断发展, 蛋白质结构预测及理化性质的详细分析也变得越来越容易。其中, 同源建模法是目前用于蛋白质结构预测的常用方法之一, 主要是通过与 PDB 数据库中目前已知序列的 X 射线晶体衍射做对比, 而从中选取与模板具有高度保守性的氨基酸序列来构建模型。在对蛋白质三维结构进行同源建模时, 要求序列的一致性至少大于 30%, 且序列相似度越高, 结构和功能越相似^[24]。而基于抗体的氨基酸序列和预测结构, 对一些特定位置的氨基酸进行定向突变可用于提高抗体亲和力和特异性。张雪等^[25]根据羊口疮病毒 (ORFV) 单克隆抗体构建出 scFv 基因, 成功对抗体结构进行预测分析, 并进一步了解和验证互补决定区 (CDR) 与 ORFV 的 B 细胞抗原表位的特异性结合的分子识别机制; 曹子健等^[26]通过分析构建的沙拉沙星单链抗体的序列及结构, 成功构建出抗体的三维模型, 并与喹诺酮类药物进行分子对接, 发现色氨酸和酪氨酸是抗体与药物小分子有相互作用的关键氨基酸; 谢三磊等^[27]对构建的金刚烷胺单链抗体进行序列分析、模型建立和分子对接后, 将关键氨基酸甘氨酸定向突变为苯丙氨酸, 抗体的灵敏度较突变前提高了 3.9 倍; 段长飞等^[28]从能分泌抗阿莫西林单链抗体的杂交瘤细胞入手构建了单链抗体, 通过采用生物信息学方法分析抗体序列后, 将轻链互补决定区 (CDR) L3 的关键氨基酸丝氨酸定向突变为天冬酰胺和谷氨酸, 结果表明较突变前灵敏度分别提高了 2.2 倍和 2.5 倍。综上所述, 为进一步提高抗体的亲和力和灵敏度, 可以从生物信息学方法入手, 通过对抗体的序列进行分析, 然后对抗体进行进一步的表达和纯化及进化。从侧面反应生物信息学的理论和实验的结合可以帮助研究者更加深入的了解蛋白质的结构, 为进一步明确该抗体的结构与功能的关系及其生物学活性奠定了理论基础。

4 结论

本研究成功构建抗 scFv-RBV 基因。理化性质分析结果显示, scFv 基因编码 240 个氨基酸, 相对分子质量为 26 406.57 Da, 理论等电点 (pI) 为 8.76; 在二级结构中, β -折叠 (39.17%) 和无规卷曲 (45.41%) 占主导地位, α -螺旋 (5.42%) 和 β -转角 (10%) 相对较少。在三级结构中, VH 和 VL 区域相互牵拉靠

近,形成典型的口袋样形状的空间构象,Linker游离于此结构之外,符合scFv的结构特点,理论上具有良好的抗原结合活性。该结果可为后续进行scFv-RBV基因的表达、纯化提供重要的参考依据,同时也为进一步进行利巴韦林单链抗体的体外进化,建立利巴韦林残留免疫快速检测方法提供强有力的理论支撑。

致谢：新乡学院动物疫病分子诊断河南省工程实验室提供实验平台,郭东光、潘鹏涛等老师对本研究予以悉心指导,李梦阳、孙梦月、李文明、李红、张艳芳、蒋力维等同学给予相关帮助,谨此致谢!

参考文献:

- [1] 周剑,王敏,杨梦瑞,等. 抗病毒药物利巴韦林检测技术的研究进展[J]. 化学试剂, 2016, 38 (1): 1-6, 33.
ZHOU J, WANG M, YANG M R, et al. Progress of detection technology for antiviral drug ribavirin [J]. *Chemical Reagents*, 2016, 38 (1): 1-6, 33. (in Chinese)
- [2] 徐俊,郭磊,赖艳,等. UPLC-MS/MS法定利巴韦林及主要代谢物在肉鸡组织中的残留[J]. 中国家禽, 2020, 42 (10): 73-80.
XU J, WU L, LAI Y, et al. UPLC-MS/MS determination of ribavirin and main metabolites residues in broiler chickens [J]. *China Poultry*, 2020, 42 (10): 73-80. (in Chinese)
- [3] WANG Z P, YU X Z, MA L C, et al. Preparation of high affinity antibody for ribavirin with new haptens and residue analysis in chicken muscle, eggs and duck muscle [J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2018, 35 (7): 1247-1256.
- [4] 魏法山,巩阿娜,盖圣美,等. 利巴韦林在畜禽体内的代谢规律与检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7 (10): 3966-3972.
WEI F S, GONG A N, GAI S M, et al. Progress on metabolic regularity and detection technique of ribavirin in livestock and poultry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2016, 7 (10): 3966-3972. (in Chinese)
- [5] 崔锡平. 抗甘氨酸的重组单链抗体制备与免疫分析方法研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2018.
CUI X P. Preparation of recombinant single-chain antibody against GCA and studies on immunoassay[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2018. (in Chinese)
- [6] BUSTAMANTE-CÓRDOVA L, MELGOZA-GONZÁLEZ E A, HERNÁNDEZ J. Recombinant antibodies in veterinary medicine: An update [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5: 175.
- [7] 王欣凯,王硕. 探究生物信息学的研究进展[J]. 科技资讯, 2020, 18 (14): 228-229.
WANG X K, WANG S. Exploring the research progress of bioinformatics [J]. *Science & Technology Information*, 2020, 18 (14): 228-229. (in Chinese)
- [8] 李洪东,朱晓姝,王建新. 生物信息学研究进展[J]. 玉林师范学院学报, 2018, 39 (5): 2-6.
- LI H D, ZHU X S, WANG J X. Recent research progress in bioinformatics [J]. *Journal of Yulin Normal University*, 2018, 39 (5): 2-6. (in Chinese)
- [9] AUSTIN R K, TREFTS P E, HINTZ M, et al. Sensitive radioimmunoassay for the broad-spectrum antiviral agent ribavirin [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1983, 24 (5): 696-701.
- [10] BREADMORE M C, THEURILLAT R, THORMANN W. Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis [J]. *ELECTROPHORESIS*, 2004, 25 (1011): 1615-1622.
- [11] YEH L T, NGUYEN M, DADGOSTARI S, et al. LC-MS/MS method for simultaneous determination of viramidine and ribavirin levels in monkey red blood cells [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43 (3): 1057-1064.
- [12] 李树纲,金录胜,汪洋,等. HPLC法定兽用中药散剂中非法添加利巴韦林的方法研究[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46 (6): 30-33, 37.
LI S G, JIN L S, WANG Y, et al. Method study on determination of illegally added ribavirin in veterinary Chinese materia Medica powders by HPLC [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2012, 46 (6): 30-33, 37. (in Chinese)
- [13] 司艳芳. 天然鼠源噬菌体单链抗体库的构建及抗西马特罗单链抗体的筛选与特性研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
SI Y F. Establishment of non-immunized murine phage single-chain antibody library and screening of anti-cimatrol single-chain antibody[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2020. (in Chinese)
- [14] HUSTON J S, LEVINSON D, MUDGETT-HUNTER M, et al. Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* [J]. *PNAS*, 1988, 85 (16): 5879-5883.
- [15] BAZIN I, TRIA S A, HAYAT A, et al. New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 87: 285-298.
- [16] SONG M Y, LYU C, DUAN N, et al. The isolation of high-affinity ssDNA aptamer for the detection of ribavirin in chicken [J]. *Analytical Methods*, 2021.
- [17] 张振宇,李明,柴磊. 动物源性食品中非法使用药物残留检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11 (10): 3228-3232.
ZHANG Z Y, LI M, CHAI L. Research progress in detection methods of illegal drug residues in animal derived foods [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11 (10): 3228-3232. (in Chinese)
- [18] 赵笑,张冬梅. 单克隆抗体和基因工程抗体在感染性疾病病原体检测中的应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11 (8): 3-6.
ZHAO X, ZHANG D M. Use of monoclonal antibodies and genetically engineered antibodies to detect pathogens that cause infectious diseases [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2016, 11 (8): 3-6. (in Chinese)
- [19] KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256 (5517): 495-497.

- [20] LUO Y H, XIA Y X. Selection of single-chain variable fragment antibodies against fenitrothion by ribosome display [J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 421 (1): 130–137.
- [21] 柴小龙, 袁毅君, 马玉凤, 等. 单链抗体的开发与应用 [J]. *天水师范学院学报*, 2018, 38 (5): 98–102.
- CHAI X L, YUAN Y J, MA Y F, et al. Development and application of single chain antibody [J]. *Journal of Tianshui Normal University*, 2018, 38 (5): 98–102. (in Chinese)
- [22] 李彤彤, 宋彩玲, 杨凯越, 等. 抗犬细小病毒 VP2 蛋白单链抗体的制备与中和活性研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40 (4): 10–16.
- LI T T, SONG C L, YANG K Y, et al. Preparation and neutralization activity of anti-canine parvovirus VP₂ protein single-chain antibody [J]. *China Biotechnology*, 2020, 40 (4): 10–16. (in Chinese)
- [23] 陈倩, 陈荫楠, 陈东海, 等. 基于单链抗体的呋喃唑酮酶联免疫检测方法的建立 [J]. *食品科学*, 2017, 38 (20): 242–247.
- CHEN Q, CHEN Y N, CHEN D H, et al. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay method for detecting furazolidone based on single chain fragment antibody [J]. *Food Science*, 2017, 38 (20): 242–247. (in Chinese)
- [24] BASYUNI M, WATI R, SULISTIYONO N, et al. Protein modelling of triterpene synthase genes from mangrove plants using Phyre2 and Swiss-model [J]. *Journal of Physics: Conference Series*, 2018, 978: 012095.
- [25] 张雪, 谭强, 赵文博, 等. 羊口疮病毒单抗可变区氨基酸序列及同源建模分析 [J]. *中国兽医学报*, 2018, 38 (5): 863–870.
- ZHANG X, TAN Q, ZHAO W B, et al. Amine acid sequences and homology modeling of antibody variable domains of an Orf virus-specific monoclonal antibody [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38 (5): 863–870. (in Chinese)
- [26] 曹子健, 何欣, 王建平, 等. 抗沙拉沙星 ScFv 同源模拟及分子结合机制 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018 (1): 47–51, 250.
- CAO Z J, HE X, WANG J P, et al. Homology modeling of anti-Salafloxacin ScFv antibody and the mechanism of molecular binding [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018 (1): 47–51, 250. (in Chinese)
- [27] XIE S L, WANG J Y, YU X Z, et al. Site-directed mutations of anti-amantadine scFv antibody by molecular dynamics simulation: Prediction and validation [J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2020, 26 (3): 1–9.
- [28] 段长飞. 阿莫西林单链抗体的定向进化[D]. 保定: 河北农业大学, 2017.
- DUAN C F. Directed evolution of amoxicillin single-chain antibody[D]. Baoding, China: Hebei Agricultural University, 2017. (in Chinese)

(责任编辑: 吴宇琳)