

文章编号: 1000- 0615(2004) 03- 0329- 05

• 综述 •

噬菌体抗体库技术及其在水产养殖的应用前景

章晋勇, 吴英松, 汪建国

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

关键词: 噬菌体抗体库; 应用; 前景; 水产养殖

中图分类号: Q782; S917 文献标识码: A

Progress of phage antibody library technique and its application prospect in aquaculture

ZHANG Jin-yong, WU Ying-song, WANG Jian-guo

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Phage display antibody library has been proven to be a powerful technique used in development of antibodies. Since it was established in 1990, the technology has made enormous improvement and played more and more important role in basic research of biology, immunology, oncology, protein engineering, ligand-receptor studies and proteomics among others in last two decades while there is no report about the application of it in aquaculture so far. It is a success implication of phage display technique in antibody engineering in which antibodies or antibody fragments are displayed on the surface of filamentous bacteriophage by genetic fusion to a coat protein of phage. Cooperating with the effective screening technique, affinity panning, these form the principle of phage display antibody library. The most characteristic of it is a direct physical link between phenotype and genotype. So, the technology makes it practicable to improve characteristic of selected antibodies by genetic manipulation. In the present work, the background, principle and advantages of the powerful tool over traditional hybridoma technology are summarized. In addition, several key problems possible to face in the course of application of the technology, including improving the diversity of library, augmentation of library size, generation of high affinity antibody and effective screening of specific antibody were dissertated. At last the possible implication prospect of phage display antibody technique in aquaculture was discussed, especially in elucidating the immune system of fish and producing large amount antibodies with important diagnostic and therapeutic value in fish diseases.

Key words: phage antibody library; application; prospect; aquaculture

近十多年来,随着分子生物学(包括基因工程、蛋白质工程)的飞速发展及人们对生物免疫系统认识的不断深入,

抗体技术已从细胞工程抗体(杂交瘤技术)进入了分子重组抗体即基因工程抗体时代。噬菌体抗体库(phage display

收稿日期: 2003-03-28

资助项目: 国家自然科学基金资助项目(30271028)和中国科学院知识创新工程课题(KSCX 2- 1- 04)

作者简介: 章晋勇(1980-), 男, 江西临川人, 硕士, 主要从事鱼类病原体分子生物学及免疫学研究

通讯作者: 汪建国(1948-), 男, 湖北黄梅人, 研究员, 博士生导师, 主要从事鱼类寄生原生动物学、鱼病学研究。Tel: 027- 87647720, E-

mail: wangjg@ihb. ac. cn

antibody library technique) 作为现今最流行的体外筛选功能性抗体分子技术, 它的出现被誉为功能抗体研究史上伟大的变革, 抗体工程的研究成为现代生命科学、生物医学领域的一大热点, 被认为是 21 世纪的阳光产业^[1]。事实上, 噬菌体抗体库技术已作为一个技术平台在基础理论研究、医学、病害检测和药物生产等方面发挥越来越重要的作用, 引起了众多国内外学者及生物技术公司的极大重视^[2-4]。

众所周知, 鼠源单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb) 在水产动物病害检测与防治等方面具有重要的作用。另外, 鱼类尤其是软骨鱼类, 作为生物进化史中最早具备较完全免疫功能的有颌类动物, 对阐明哺乳动物的免疫系统进化有十分重要的意义, 历来作为重要模型材料受到免疫进化学者的高度重视^[5,6]。因此, 阐明鱼类免疫系统结构及其功能有十分重要的理论价值, 而单克隆抗体是人们认识免疫系统及其功能, 尤其是在分子水平上的重要工具。故而, 作者认为噬菌体抗体技术应用于水产领域将对认识鱼类乃至整个有颌类生物免疫系统的发生、发展及功能等方面将产生积极的推动作用, 在另一方面, 其有利于大量制备 (筛选) 大量在水产动物病害检测与防治中具有重要价值的抗体或抗体分子, 以满足生产实践及基础研究。本文综述了近十几年来国内外噬菌体抗体库及相关技术研究, 并展望了噬菌体抗体库技术在水产领域的应用前景。

1 技术原理

噬菌体抗体库技术的发展得益于噬菌体表面展示技术 (phage display techniques)^[7,8] 的发展及人们对动物及人体免疫系统认识的逐步深入, 尤其是对免疫球蛋白编码基因的组成、结构、分化等的了解^[9], 使得人们可以设计出可扩增全套免疫球蛋白基因的通用引物 (universal primers)。简单的说, 噬菌体抗体库技术其实质就是将分子克隆技术引入抗体工程再加上一套行之有效的筛选系统, 即通过“亲和-吸附-洗脱”的方式筛选特异性抗体或抗体分子的技术, 是噬菌体表面呈现技术在基因工程领域的成功应用。表面展示技术 (surface display) 是一项利用分子重组技术将外源分子编码基因与展示体外膜蛋白编码基因重组并融合表达以达到将外源分子展示于展示体外膜的技术^[7]。迄今, 人们已发展了多种体外展示系统, 如细菌展示系统、酵母细胞展示系统、核糖体展示系统、噬菌体展示系统等^[10], 从理论上说, 只要能将外源基因与展示体跨膜蛋白融合表达, 并维持外源分子的正确空间构象都可以作为展示载体。单就噬菌体展示系统而言就有 M13 噬菌体展示系统、MS2 噬菌体展示系统、P4 噬菌体展示系统、λ 噬菌体展示系统、T7 噬菌体展示系统、T4 噬菌体展示系统的多种展示系统^[11]。目前, 在噬菌体抗体库的构建中使用的较多的 M13 噬菌体展示系统即单链丝状噬菌体展示系统。

成熟的免疫系统中前 B 细胞群在分化中, 免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 编码基因将发生多种重排组合而形成

有巨大潜在多样性的初级全套免疫球蛋白基因库 (Ig Repertoire), 在抗原的选择压力下, 部分 B 细胞克隆在一系列精细调节 (fine-tuned) 作用下发生亲和力成熟及体细胞突变而产生针对某一特异抗原决定簇的抗体分泌细胞库。免疫球蛋白编码基因的 5' 端前导序列 (5'-Leader sequence), 可变区框架区 (FR1, FR2, FR3, FR4), 绞链区 (J), 恒定区 (C) 存在一定的保守性。正是基于对免疫系统的深刻认识为噬菌体抗体库技术的发展奠定了理论基础^[8]。噬菌体抗体库的构建就是将编码抗体的全套基因插入噬菌体编码外壳蛋白基因, 抗体基因与噬菌体外壳蛋白基因连接后以融合蛋白形式表达于噬菌体表面, 再利用抗原与抗体相互作用, 通过亲和筛选 (affinity screening) 得到特异性抗体分子或片断。迄今已有数以千计的完整抗体分子、单链抗体 (single chain variable fragment, scfv)、Fab、单域抗体等从构建的天然抗体文库 (native antibody library) 或免疫抗体文库 (immunized antibody library) 中成功筛选出^[12,13]。M13 噬菌体有五种外壳蛋白, 包括次要外壳蛋白 PIII, PVI, PVI, PVI 和主要外壳蛋白 PVIII, 它们在噬菌体抗体库的构建中各有优势, 但较常用的是 PIII, PVIII。PIII 拷贝数少 (平均每个噬菌体只有五个拷贝) 而有利于分离高亲和力的抗体, 而 PVIII 含量丰富 (平均每个噬菌体拷贝数达 2700~3000), 故有利于表达高效价抗体, 但有实验证实通过 PVIII 多价展示 Fab 片断并非普遍存在, 对于某些抗体基因不能实现多价展示^[15]。

2 噬菌体抗体库的构建及筛选

噬菌体抗体库构建的实质是表达文库的构建。这里以噬粒 (phagemid) 为载体构建单链噬菌体抗体文库 (single chain antibody phage display library) 为例, 详细介绍噬菌体抗体库的构建及筛选流程。与构建其它文库一样, 首先需要从靶细胞分离出全套抗体基因, 模板来源主要有杂交瘤细胞、体外免疫的细胞、致敏及非致敏的 B 淋巴细胞 (包括骨髓、外周血、病灶局部引流淋巴结、扁桃体或经过免疫的脾细胞等) 及未经免疫的动物淋巴细胞^[1]。目前普遍采用从靶细胞分离总 RNA, 纯化 mRNA, 利用 RT-PCR 技术得到一个免疫球蛋白编码基因的 cDNA 文库 (repertoire), 再用互补于抗体编码基因重链 (VH) 和轻链 (VL) 保守区的特异性引物, PCR 扩增出全套抗体相应区基因^[8]。需要指出的是, 要真正扩增所有抗体编码基因并非易事。直到 1989 年才由 Orlandi 等首次设计出用于扩增全套抗体可变区基因的“通用引物” (universal primers)^[14], 而这组引物只能扩增出 90% 左右的抗体基因。目前, 人们已根据积累的物种免疫球蛋白编码基因设计出一系列的引物用于扩增相应物种的抗体基因, 现已发展有多个不同物种的抗体及其编码基因的数据库供设计所需, 使用得最多的是 Kabat 数据库。然后, 将重链可变区产物和轻链可变区产物用一连接肽编码基因通过重叠延伸拼接法 (gene splicing by overlap extension,

SOE)^[16]组装成单链抗体(single chain antibody, scfv),纯化后的单链抗体基因经限制性内切酶酶切后插入经同样酶切的适当噬粒,再将重组的表达载体导入宿主菌,经辅助噬菌体感染离心取上清,加入PEG沉淀并收集噬菌体颗粒,即构建出原始的噬菌体单链抗体库。用固相化的抗原经几轮“吸附-洗脱-富集”就可以得到表达有针对筛选抗原的特异性单链抗体的噬菌体。由于噬粒载体本身在抗体基因与衣壳蛋白基因之间插入了一个琥珀(amber)突变密码子TAG,这样使得单链抗体能在琥珀抑制型宿主菌以融合蛋白形式表达,而在非琥珀抑制型宿主菌内表达分泌型抗体。另外,在抗体基因末端引入了筛选标志,使表达的抗体能得到有效的分离纯化。目前用于噬菌体抗体库构建的表达载体已十分丰富,人们可以根据自身情况自由选择。由于噬粒兼具噬菌体与质粒的双重功能,是噬菌体抗体库构建的首选载体。目前,使用较多的噬粒包括:Winter小组开发的PIT2载体,该载体本身已携带连接肽编码基因,从而克服了在VH与VL装配时由于多轮PCR而产生的文库偏向性,并有利于在亲和力改造中如链更替等类似的操作^[17];张卫国等^[18]设计的噬粒也是采用这种方式。但作者认为如此这样需要多次酶切、连接、转化,而在不能保证酶切及连接效率的情况下对构建大容量库容的抗体库是不利的;另外还有Dübel等^[19]开发的pSEX系列家族表达噬粒,美国Scripps研究所开发的pComb3噬粒系列^[20]。商业化的噬粒有Amersham pharmacia的pCANTAB5E, Stratagene的SurfZAP噬粒系列等。

3 噬菌体抗体库的特点

噬菌体抗体库技术自诞生之日起,就受到广泛关注,显示出无可比拟的优势。主要体现在以下方面:(1)绕过了动物免疫,可模拟天然抗体库,不但使得人们能够获得一些机体无法产生的抗体,如毒物抗体、自身抗体等,而且避免了有关人道主义问题;解决了单克隆抗体生产中细胞系单一而只能产生少数几种起源的单克隆抗体的问题;(2)与杂交瘤技术相比,简单易行,事实上只是常规分子操作,将抗体作为一种蛋白进行高效表达并有效筛选的过程;绕过了细胞融合这一费时费力的过程;克服了杂交瘤细胞的不稳定性,并克服了随机组合文库的随机性强、库容量大、筛选效率低的缺点;(3)由噬菌体抗体得到的小分子抗体如scfv、Fab等具有通透性好,易于达到靶部位,在体内循环的半衰期短、易清除等特点,是靶向治疗的良好载体;(4)抗体表型和基因型一致,筛出特异性抗体后,通过测定插入到噬菌体基因序列,可以直接推导出抗体的氨基酸序列,这对于研究抗体空间构象有重要的意义;另外得到的抗体基因序列可以为实现原核高效表达、真核表达等提供基因来源,有利于抗体的大规模工业化生产;并且可以利用分子操作使抗体基因与其它功能性分子编码基因重组而表达出具有多功能或多价的功能性分子,也可对抗体基因进行改造,如基因突

变(gene mutation)或链交换(chain shuffling)以增加抗体的特异性、亲和力等。总之,噬菌体抗体库技术将单克隆抗体的生产引入了基因工程时代,这本身就是一个飞跃,我们认为分子克隆技术引入抗体工程这一设计事实上只受想象及能够产生正确折叠蛋白产物的表达系统的限制。

4 噬菌体抗体库应用中的几个重要问题

4.1 影响抗体库多样性的因素

从理论上说,从未经免疫的动物的淋巴细胞构建的“天然抗体库”应该能筛选出针对任一种抗原的特异性抗体,但在实际上所得到的多样性远远低于理论值。抗体库多样性受引物设计、酶切位点的选择、酶切效率、连接效率、转化效率等因素的影响。目前,已有多组引物组合用于鼠源或人源噬菌体抗体库的构建。Winter研究组近年来设计的扩增鼠源抗体可变区基因引物能扩增出绝大部分抗体基因,其组成包括4对恒定区互补引物,15对重链FR1区互补引物,4对重链J区互补引物,8对kappa轻链FR1互补引物,3对轻链J区互补引物,1对lambda轻链FR1区互补引物和2对lamada轻链J区引物^[17]。Welschof等^[21]从免疫球蛋白的氨基酸序列入手设计出了一套更全面的扩增人抗体可变区的引物。引物中引入的酶切位点必须是所有免疫球蛋白编码基因中缺乏的或罕见的,并要有足够的保护碱基,以减少酶切时切断抗体基因而降低库的多样性,提高酶切效率;酶切时要适当加大用量以最大限度的提高酶切效率。重组载体的转化,应尽可能使用电转化,提高转化效率。此外PCR偏向性的存在对扩增低丰度的基因也是一个亟需克服的问题。所幸的是,一些更先进技术的应用为最大限度的增加库容和多样性提供了条件,Soderlind等^[22]将伴侣蛋白和噬菌体载体共表达的方法可提高噬菌体的包装效率达2个数量级。Tsurushita^[23]等利用轻、重链在胞内定点重组技术构建了一超大容量抗体库。此外,体外基因突变、链更替法、错配PCR技术等都有助于提高库容,增大库的多样性。

4.2 高亲和力抗体的获得

建库目的是为了筛选出特异性、高亲和力的抗体,而抗体亲和力的大小是决定能否成功筛选的关键,这在筛选天然抗体库中尤为突出。据统计,大库容筛选出的亲和力要比小库容高很多,库容与亲和力存在一定的比例关系。由于未经免疫的淋巴细胞未经历抗体亲和力成熟和体细胞突变等过程,得到的只是一个原始“库”(repertoire),筛出的抗体亲和力较低。体外对抗原决定簇(complementary determined region, CDR)及附近框架区的某些位点进行定点突变和随机突变或链更替(chain shuffling)可以达到体外提高抗体亲和力的目的^[24-26]。张卫国等^[18]另辟蹊径途径,在建库时利用经设计的特异性引物直接以靶细胞基因组DNA为模板,扩增得到全套抗体可变区基因,建立了鼠源天然抗体库。这一方法避免了繁琐的RNA抽提及RT-PCR过程而大大简化了建库过程。但作者认为,由于

mRNA 水平上的剪切与修饰对抗体亲和力的成熟有着重要的意义, 故此法对于筛选高亲和力抗体并不适用。

4.3 特异性抗体的筛选

目前, 使用最多的是固相化的酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 通过将抗原固相吸附到酶标板上, 几轮“吸附-洗脱-富集”过程可使噬菌体富集 10^4 左右^[27]。然而由于噬菌体密度过高导致噬菌体悬液粘度增大等原因, 淘选(biopanning)过程中的噬菌体分散等, 实际筛选过程中并不顺利。Rondot等^[28]发展了一新的被称为超级噬菌体(hyperphage)的辅助噬菌体, 它是一种具备野生型 PIII蛋白表型, 但缺乏功能性的 PIII蛋白编码基因的特殊噬菌体, 这意味着与抗体融合表达的 PIII蛋白是噬菌体包装中的唯一 PIII蛋白, 从而大大减少了辅助噬菌体 PIII蛋白的“污染”, 提高了抗体分子在单一噬菌体表面的展示效价, 从而大大提高了筛选成功率。此外, 比 ELISA 更为敏感的技术也应用到了噬菌体抗体库的筛选, 如微平衡传感系统(microbalance sensor system, MSS), 表面等离子共振技术(surface plasmon resonance methods, SPR)的应用使得人们能用更低浓度的抗原筛选出特异性的抗体^[29], 为抗稀有抗原的单克隆抗体制备奠定了基础。与此同时, 人们通过特定的富集抗原浓度的方法进行噬菌体抗体库的筛选, 如先将用生物素标记的抗原在液体中反应, 再向反应体系中加入带有抗生物素化蛋白的免疫磁珠, 通过生物素与磁珠聚合而提高抗原的相对浓度而达到有效筛选的目的^[30]。近年来, 有学者创立了一种更加方便快捷的噬菌体抗体库筛选系统即抗体介导感染系统^[31](antibody mediated infection), 该系统利用目标抗原与噬菌体抗体结合, 介导噬菌体感染大肠杆菌, 不能结合靶抗原的噬菌体不具有感染力, 因而经过培养菌液中的噬菌体绝大部分是与抗原相结合的, 从而达到有效富集的目的。

5 噬菌体抗体库技术在养殖领域的应用

噬菌体抗体库技术以无可比拟的技术优势和良好的应用前景已在基础理论研究、病害防治、新型药物筛选等领域得到了极为广泛的应用。但和任何一项新技术一样, 由于水产领域的研究相对滞后, 新技术应用到该领域总要经过一个漫长的过程。结合水产领域的研究与实际需要, 尤其是对水产动物免疫系统的认识及水产动物病害检测、防治面临的具体情况, 作者认为噬菌体抗体库技术的引入将在以下几个方面产生重要影响或起到积极的推动作用。(1) 对阐明鱼类甚至整个高等脊椎动物免疫系统及其进化的意义。我们知道软骨鱼类是脊椎动物的早期分支, 是最古老的拥有真正意义的免疫球蛋白和 T 细胞受体(T-cell receptor, TCR)分子的现存有颌类脊椎动物, 最早出现获得性免疫反应(adaptive immune response), 其在高等动物的免疫系统发育研究中具有重要的意义^[5,6]。研究表明, 鱼类的免疫球蛋白超家族基因(immunoglobulin superfamily,

IgSF)与高等动物包括人有着一一定的同源性, 如 Ig 折叠、重排机制、基因序列及组成等, 而单克隆抗体技术作为研究免疫相关因子的重要手段发挥着无可替代的作用^[32], 但以前我们大部分用的是通过杂交瘤技术制得的鼠源抗体, 这不仅限制了大量鱼源单抗的获得, 而且要得到其编码基因用于比较分析研究还需通过其它途径。噬菌体抗体库技术的兴起, 可使我们直接高通量的获得鱼源单抗(亲和力可以通过分子操作进行体外改造), 可以预见其在阐明鱼类自身免疫系统的组成、发育及功能方面有重要意义, 进而为探索更高等动物免疫系统提供依据^[33]。针对免疫相关细胞表面受体的鱼源单抗不仅使得我们能在基因水平上加深对鱼类免疫球蛋白编码基因组成及重排机制的认识, 也有利于我们在鱼类发育过程中发现免疫球蛋白分泌细胞(Ig-bearing cell)及 T 细胞等淋巴细胞的在鱼体的分布, 阐明鱼类免疫细胞及器官的发育。此外, 由于不同种鱼类免疫球蛋白相差较远, 针对不同种养殖鱼类免疫球蛋白的抗体缺乏已成为研究鱼类免疫系统面临的重要难题。众所周知, 用杂交瘤技术制备针对现有的鱼类抗体的单抗是不现实的, 噬菌体抗体库技术无疑在这方面有着巨大的应用前景。

(2) 对阐明“寄生虫”-寄主的相互关系的意义。高密度水产养殖的发展使得细菌、病毒、寄生虫等病原生物成为水产养殖业日益突出的问题。人们在对“寄生虫”与寄主免疫系统的关系, 如“寄生虫”逃避寄主的免疫监视甚至引起寄主的免疫耐受等还缺乏足够的认识。而利用噬菌体抗体库技术, 我们能获得大量针对“寄生虫-寄主”接触界面(interface)及寄生虫表面膜蛋白等抗原表位的抗体, 利用这些抗体我们能分析接触界面物质的起源, 是来自鱼体还是“寄生虫”, 及“寄生虫”如何通过改变表面蛋白或模拟宿主自身物质而逃避宿主的免疫系统等机制。(3) 对水产动物病害检测、防治研究的重大意义。单克隆抗体在水产动物病害检测、防治中已得到广泛应用。但作者认为, 鼠源单抗在水产动物保护性方面同样存在一个免疫原性的问题, 但水产动物自身起源细胞系的缺乏使得人们无法用杂交瘤技术生产无免疫原性单抗, 而且杂交瘤技术的自身缺陷也不能满足大量水产动物病害防治所需。噬菌体抗体库的出现, 绕过了细胞系的建立, 为大量生产具有检测及保护性作用的水产动物自身起源的单抗奠定了条件。另外, 小分子抗体的优势不论是作为携带靶向药物的“弹头”还是本身在保护性方面的作用都是鼠源完全单抗所不能做到的。

总之, 噬菌体抗体库技术作为一项新兴的技术, 必将在水产动物的基础研究及实际应用中产生深远的影响。

参考文献:

- [1] Winter G, Griffiths A D, Hawkins R E, *et al.* Making antibody by phage display technology[J]. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12, 433-435.
- [2] Gao C S, Mao S, Lo C H, *et al.* Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays[J].

Proc Natl Acad Sci, 1999, 96: 6025- 6030.

- [3] Itoh K, Suzuki K, Ishiwata S, *et al.* Application of recombinant of target antigen by an inhibition ELISA system [J]. J Immunol Methods, 1999, 227: 107- 114.
- [4] H Schlebusch, S Reinartz, R Kaiser, *et al.* Production of a single-chain fragment of the murine anti-idiotypic antibody ACA 125 as phage-displayed and soluble antibody by recombinant phage antibody technique [J]. Hydroma, 1997, 16(1): 47- 52.
- [5] Hsu E. The variation in immunoglobulin heavy chain constant regions in evolution. [J]. Semin Immunol, 1994, 6(6): 383- 389.
- [6] Rast J P, Haire R N, Litman R T, *et al.* Identification and characterization for T-cell antigen receptor-related genes in phylogenetically diverse vertebrate species. [J]. Immunogenetics, 1995, 42(3): 204- 212.
- [7] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. Science, 1985, 228, 1315- 1316.
- [8] McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, *et al.* Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains [J]. Nature, 1990, 348: 552- 554.
- [9] Lin X Y, Zhang L. Modern cellular and molecular immunology [M]. Beijing: Science Press, 1999. [林学颜, 张玲. 现代细胞与分子免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 1999.]
- [10] Itai Benhar, Biotechnological applications of phage and cell display [J]. Biotechnology Advances, 2001, 19: 1- 33.
- [11] Wang C J. Advance of phage surface display technology [J]. Foreign Medicine (Immunology), 2001, 24(4): 215- 218. [王长军. 噬菌体表面展示技术进展 [J]. 国外医学免疫学分册, 2001, 24(4): 215- 218.]
- [12] Tordsson J M, Ohlsson L G, Abrahamson L G, *et al.* Phage-selected primate antibodies fused to superantigen for immunotherapy of malignant melanoma [J]. Cancer Immuno Immunother, 2000, 48: 691- 697.
- [13] Den W, Sompuram S R, Serantopoulos S, *et al.* A bi-directional phage display vector for the selection and mass transfer of polyclonal antibody libraries [J]. J Immunol Methods, 1999, 19(1): 38- 44.
- [14] Orlandi R, Gussow D H, Jones P T, *et al.* Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(10): 3833- 3837.
- [15] Liu X L, Wang Y, Wang G. Display of antibody molecular on the surface protein VIII of phage [J]. J Navy Total Hospital, 2002, 15(2): 71- 74. [刘晓琳, 王琰, 王刚. 抗体分子在噬菌体表面蛋白 VIII 上的展示 [J]. 海军总医院学报, 2002, 15(2): 71- 74.]
- [16] Horton R M, Hunt H D, Ho S N, *et al.* Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension [J]. Gene, 1989, 7: 61- 64.
- [17] Holt J L, Enever C, Tomlinson I M, *et al.* The use of recombinant antibody proteomics [J]. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11: 445- 449.
- [18] Zhang W G, Liu X H, Huang H L, *et al.* Construction of mouse native phage antibody library [J]. Acta Genetic Sinic, 1999, 26(2): 99- 106. [张卫国, 刘喜富, 黄华梁, 等. 噬菌体展示单链抗体表达载体及小鼠非特异性抗体库的构建 [J]. 遗传学报, 1999, 26(2): 99- 106.]
- [19] Dübél S, Breitling F, Fuchs P, *et al.* A family of vectors for surface display and production of antibodies [J]. Gene, 1993, 128(1): 97- 101.
- [20] Huse W D, Sastry L, Levenson S A, *et al.* Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda [J]. Science, 1989, 240: 1275- 1281.
- [21] Welschof M, Terness P, Kolbinger F, *et al.* Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes [J]. J Immunol Meth, 1995, 179: 203- 214.
- [22] Soderlind E, Lagerkvist A C, Duenas M, *et al.* Chaperonin assisted phage display of antibody fragments on filamentous bacteriophages [J]. Bio Technol, 1993, 11(4): 503- 507.
- [23] Tsurushita N, Fu H, Warren C. Phage display vectors for *in vivo* recombination of immunoglobulin heavy and light chain genes to make large combinatorial libraries [J]. Gene, 1996, 172: 59- 63.
- [24] Gram H, Marconi L A, Basbas C F, *et al.* *In vivo* selection and affinity maturation of antibodies from a native combinatorial immunoglobulin library [J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89(8): 3576- 3580.
- [25] Kang A S, Jones T M, Burton C F, *et al.* Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin [J]. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88: 11120- 11123.
- [26] Jirholt P, Ohlin M, Borregaard C A K, *et al.* Exploiting sequence space: shuffling *in vivo* formed complementary determining regions into a master framework [J]. Gene, 1998, 215(2): 471- 476.
- [27] Xu W W. Construction of phage display antibody library against *Plasmodium falciparum*, screening, expression, purification and primary application of anti-HRP II phage antibody [D]. Doctoral thesis, 1997. [徐伟文. 抗恶性疟原虫红内期噬菌体抗体库的构建及抗 HRP II 抗体的筛选、表达、纯化和初步应用 [D]. 1999, 博士论文.]
- [28] Rondot S, Koch J, Breitling F, *et al.* A helper phage to improve single chain antibody presentation in phage display [J]. Nature Biotech, 2001, 19: 75- 78.
- [29] Hengerer A, Kösslinger, Decker J, *et al.* Determination of phage antibody affinities to antigen by a microbalance sensor system [J]. Biotech, 1999, 26: 956- 964.
- [30] Balass M, Morag E, Bayer E A, *et al.* Recovery of high affinity phage from a nitrostreptavidin matrix in phage display technology [J]. Anal Biochem, 1996, 243(2): 264- 269.
- [31] Rondot S, Anthony K G, Dubel M, *et al.* Epitopes fused to F-pilin are incorporated into functional recombinant pili [J]. J Mol Biol, 1998, 279(3): 589- 593.
- [32] Hawke N A, Yoder J A, Litman G W. Expanding our understanding of immunoglobulin, T-cell antigen receptor, and novel immune-type receptor genes: a subset of the immunoglobulin gene superfamily [J]. Immunogenetics, 1999, 50: 124- 133.
- [33] Picchiotti S, Terribili F R, Mastrolia L, *et al.* Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. Anat Embryol, 1997, 196: 457- 463.