噬菌体抗体库筛选技术

高 鹏[1] 胡立勇[1] 钱 钰[2] 徐 晨[3△]

(1 广东药学院基础学院 广东 广州 510006；
2 中国药科大学药学院 江苏 南京 210009；3 北京三元基因工程有限公司 北京 102600)

摘要：在过去的 20 年中，噬菌体抗体库筛选技术被广泛的应用于抗体筛选、疾病治疗，临床诊断以及基础研究之中。在该技术的应用过程中，快速有效的筛选出最适合的单克隆抗体并进行可靠和高效的数据管理和分析是十分重要的。文中总结了近年来噬菌体抗体库的高通量筛选方法并且对数据管理做了简要介绍。

关键词：噬菌体展示；抗体库；筛选技术；数据管理

中图分类号：Q75，Q78，Q81 文献标识码：A 文章编号：1673-6273(2012)23-4577-07

Screening Isolates from Antibody Phage-display Libraries

GAO Peng[1], HU Li-yong[1], QIAN Yu[2], XU Chen[3△]

(1 School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2 School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3 Beijing Tri-Prime Genetic Engineering Co.Ltd, Beijing 102600, China)

ABSTRACT: For almost 20 years, phage display antibody (Ab) libraries screening have been widely used in antibody screen, clinical diagnostic, treatment of disease and basic research areas. Rapid identification of the autofit monoclonal antibody, and reliable and efficient data management and analysis are very important in the application of this technology. This review described reported methods for high-throughput screening of antibody phage-display libraries and further more gave a brief introduction to data management.

Key words: Phage display; Antibody library; Screening technology; Data management

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78, Q81 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)23-4577-07

噬菌体展示技术于 1985 年由 Smith 提出[1]，McCafferty 等人在此基础上发展出噬菌体抗体展示技术[2]，即将编码抗体分子片段的基因与噬菌体外壳蛋白基因末端融合，使表达的抗体展示在噬菌体颗粒表面，再经过抗原抗体的特异性结合筛选，最后从抗体库中钓取得到目的噬菌体抗体克隆。挑选出来的克隆同时包含了编码该抗体的基因，可以进行 DNA 测序。噬菌体抗体库技术从根本上改变了传统的单抗制备流程，第一个利用噬菌体抗体库技术生产的抗体药物阿达木单抗（Humira）已通过美国食品与药品管理局（FDA，2002 年）及欧洲医药管理局（EMEA，2003 年）批准上市。如今，全世界上百家研究机构正致力于将抗体库技术应用于制备全人源抗体，癌症治疗，微生物学以及蛋白组学等领域的研究当中[3]。

抗体库技术的成功应用离不开抗体库筛选技术。总的来说噬菌体抗体库的筛选包括 2 个部分：第一部分是淘洗（Panning），即从库中经过几轮吸附、洗脱、扩增后富集到与抗原特异性结合的携带抗体基因的菌株；第二部分是筛选（Screening），即从上一步获得的菌株中挑选单克隆进行特异性和亲和力的鉴定，以期获得高特异性单克隆。整个筛选过程耗时、工作量巨大。鉴于此，实现噬菌体抗体库的高通量筛选至关重要。而抗体库筛选的最终目的是快速的找出目的克隆，这依赖于建立可信的数据管理以及分析方法。因此本文将对目前出现的噬菌体抗体库筛选和数据管理方法做出总结和简要介绍。

1 噬菌体抗体库的淘洗

1.1 固相淘洗

自从噬菌体抗体库问世以来，固相淘洗已成为一项常规技术（图 1）。最早的办法是用酶标板包被抗原，后经改进利用免疫管可显著增加包被抗原的面积，增加抗原抗体接触的机会[4,5]。Han 等人利用固相淘洗，经过 4 轮，筛选得到了抗 EGFRv III 的特异性噬菌体单链抗体[6]。

通过降低抗原包被密度，增强洗脱强度可以得到高亲和力的抗体；相反，采用高密度的抗原包被，降低洗脱强度可以保证低拷贝数的抗体不丢失[8]。另外为了提高淘洗效率，还可以对传统的固相淘洗方法进行改进，例如 Bracci 等人用纯化的烟碱乙酰胆碱受体与噬菌体抗体竞争性结合金环蛇毒素 α，筛选出抗蛇毒的 scFv 抗体[9]。选择感染性噬菌体技术（SIP），利用宿主细胞洗脱噬菌体，将噬菌体感染力的恢复与蛋白间的相互作用偶联起来，简化了筛选过程，降低了本底，有效提高了筛选效率[10]。Raats 等人为了检测体内的半抗原，用抗皮质醇抗体作为抗原，筛选出在体内可以与皮质醇抗体结合的噬菌体抗体[11]。

固相淘洗是目前最简单也是最经典的淘洗方法，但是这种淘洗方法需要大量的纯化或重组抗原，因此在某些方面其应用受到限制。

1.2 液相淘洗

与固相淘洗相比，液相淘洗使得抗原与抗体的接触更加充分。液相淘洗在液相反应体系中进行，可以先将抗原与生物素

作者简介：高鹏，男，硕士，主要研究方向：基因工程抗体研究；E-mail：federer_gp@163.com

△通讯作者：徐晨，博士，E-mail：xuchen@triprime.com

(收稿日期：2011-12-06 接受日期：2011-12-31)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

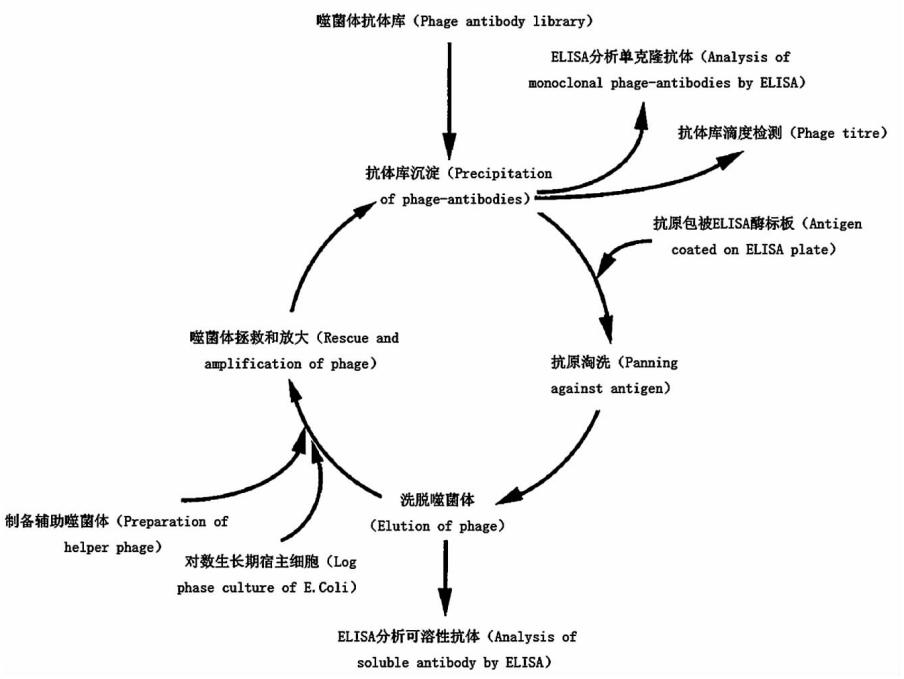

图 1 固相淘洗基本流程[7]

Fig. 1 Methods of the solid phase panning protocol

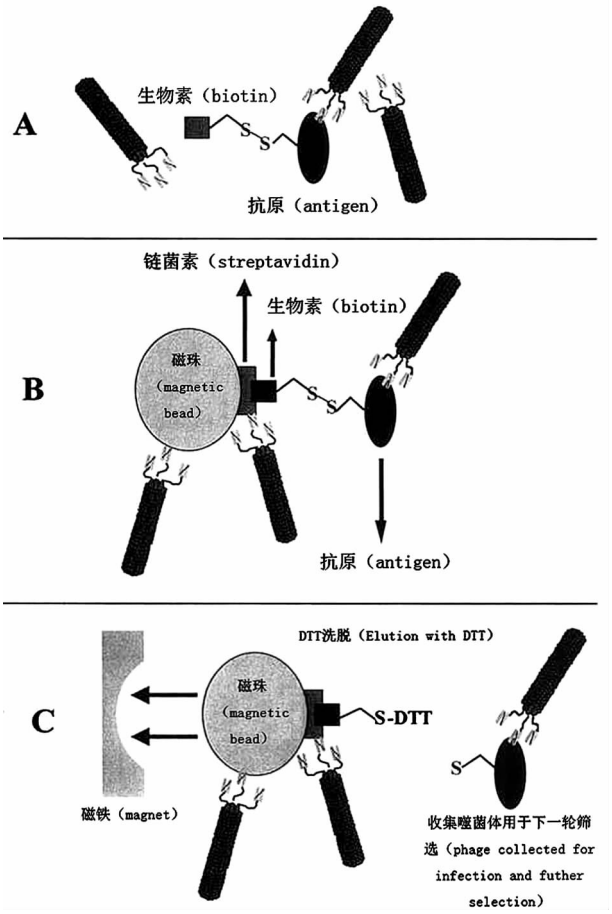

图 2 用链亲和素的磁珠和生物素化的抗原进行抗体库的淘洗[3]

Fig. 2 Panning of a phage antibody library using streptavidin magnetic beads and biotinylated antigen

相连，再将其固定在包被有链亲和素的磁珠上，然后对噬菌体抗体库进行洗脱[3](图 2)。或者将生物素化的抗原先与噬菌体抗体库相互作用，然后加入偶联有链亲和素的磁珠，富集能与抗原结合的噬菌体抗体。液相淘洗同样可以通过递减包被抗原的浓度筛选得到亲和力较高的抗体，也可以根据抗原抗体结合的动力学原理，生物素化抗原与抗体库中的特异性噬菌体抗体结合充分并达到饱和后，用数十至数百倍的未生物素化的游离抗原将亲和力较低的抗体解离下来，从而获得亲和力高的抗体[12]。对于在液相中不稳定的膜蛋白抗原，例如 CXCR4，Xu 等人将其包被在磁珠表面，再在其外面裹被一个脂质双分子层，形成蛋白脂质体，保证其天然构象。通过这样的方法，他们从天然人源抗体库中筛选出来一系列 CXCR4 抗体，用于 CXCR4 抗原的异质性以及功能性的研究[13]。

1.3 基于细胞的淘洗

当抗原的表达量低，免疫原性弱时，用固定化抗原的淘洗方法难以胜任。而且固相淘洗中包被的抗原不能保持天然构象，因而不适于对膜抗原或细胞表面抗原的淘洗，而用表达这些抗原的完整细胞进行淘洗则可以避免构象改变引起的问题。除完整细胞外，细胞膜制备物以及组织切片上的抗原蛋白都可以维持天然构象，因此，这些材料也可以作为淘洗细胞表面抗原的靶材料[14]。

对于在细胞培养板上生长的贴壁细胞，噬菌体抗体库的结合、洗涤和洗脱与常规的固相淘洗相似。对于悬浮细胞的分选，则可以将噬菌体与待淘洗的细胞混合孵育，经低速或差速离心将结合有噬菌体的细胞分离到有机相回收。对于标记了的靶细胞，还可以同时加入负选择细胞来淘洗，经流式细胞仪（FACS）[15]或磁激活细胞分离术（MACS）[16]的方法把标记了的靶细胞分选出来。在对噬菌体 Fab 抗体库淘洗时，可以用传统的嗜菌斑转移（plaque lift assay）或改良的捕获转移方法（capture lift）[17]进行淘洗和鉴定，这类基于硝酸纤维素膜的淘洗方法操作简单，无需富集过程，可一次完成，但受平板上克隆密度的限制，每个

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

100mm 培养皿的分辨力为 500pfu，因此用这种方法淘洗大容量抗体库难度很大，也无法控制淘洗过程的严谨性，更适合用于经淘洗后的筛选。

目前已有文献报道利用细胞淘洗得到与细胞表面受体结合的噬菌体抗体[18]，但细胞淘洗确实存在一定难度，主要表现为非特异性大、背景值高、淘洗过程中特异性配体损失等问题。由于细胞膜表面成分极其复杂，有许多蛋白、糖类、脂类结构，非特异性噬菌体抗体结合到细胞的几率大，且膜表面抗原密度很低，给抗体筛选带来了一定困难，很难获得针对某一抗原的单链抗体。与纯化抗原的固相淘洗相比，细胞淘洗富集较慢，但如果淘洗轮次过多，又很容易丢失稀有的特异性噬菌体抗体。针对以上问题，Sui 等人联合应用探针筛选法（Pathfinder）和回步筛选法（Step-back），成功的从天然人源抗体库中筛选得到了 CXCR4 抗体[19]。尽管这样，提高细胞淘洗的特异性和选择性依然是亟待解决的问题。

1.4 动物体内的淘洗

由于许多活体细胞难以在体外培养，而且体外培养可能改变细胞的膜分子特性，体外观察到的噬菌体抗体的特异性在体内可能就不明显或者不存在，因此体内淘洗具有特殊的意义。

完整的单克隆抗体因为分子量较大，并且容易引起免疫反应，所以不适用于体内淘洗。最常用的方法是通过尾静脉注射小分子噬菌体抗体库[20]，依靠血液循环将抗体传递至全身，经一段时间循环后，非特异结合的分子会逐渐随循环被稀释而最终清除，分离不同的组织器官的血管上皮组织，洗脱噬菌体后扩增即可获得组织特异性的抗体。Johns 等在小鼠胸腺内筛选出针对内皮细胞的特异性噬菌体抗体[21]。

因为淘洗在体内进行，所以无法对非特异位点进行封闭，此外，血液流动对噬菌体与血管上皮细胞的结合与贮留影响复杂，对某些特定的器官而言，抗体库的结合时间过短，多样性优势不能充分体现，导致结果的随意性强。Valadon P 等人先以分离的上皮细胞免疫小鼠，构建免疫抗体库后，再以固定化细胞膜的方法对抗体库进行淘洗，集成了体内免疫和体外筛选的优点，既可以借助负选择对噬菌体库进行预清除，也可以通过优化孵育和洗涤条件来提高选择的特异性[22]。

1.5 功能性抗体的淘洗

在抗体库的淘洗过程中，如果能够引入功能性筛选，使获得的噬菌体抗体同时具有很高的特异性和生物活性，将大大提高抗体库的筛选效率。抗体库的功能性筛选需要根据不同目标，体设计不同的筛选策略。一般选择细胞裂解物、固定化细胞或者活细胞作为抗原材料。例如筛选可内化的噬菌体抗体，Poul 等人利用细胞淘洗的方法，在保证噬菌体感染能力的同时让细胞吞噬特异性噬菌体颗粒，收集细胞，再释放出噬菌体颗粒。利用这种功能性淘洗的方法可以避免不可内化的噬菌体颗粒干扰[23]。在筛选针对某一功能表位的抗体时，首先要对该表位进行充分的考察，最好能够得到纯化的位点多肽作为抗原，进行抗体库筛选。Huang 等人利用纯化的 LFA-1 结构域 I 高亲和力构象（HA）作为抗原进行筛选，得到能够结合 HA，但不能结合 LA，具有阻断 LFA-1 介导的粘附作用的抗体 AL-57[24]。

1.6 双特异性抗体的淘洗

双特异性抗体含有两个不同的特异性抗原结合位点，它能在靶细胞与功能分子（细胞）之间架起桥梁，产生导向性的效应功能。McGuinness 等人最先应用噬菌体抗体库技术获得了双特异性抗体，他们先将 phOx 抗体基因的可变区与 Dig 抗体基因的可变区整合，构建了双特异性抗体库，再用 phOx 抗原和 Dig 抗原对抗体库进行筛选，最后得到高亲和力的 phOx/Dig 抗体[25]。Korn 等人利用固相淘洗技术，从双特异性抗体库中筛选得到了抗 CEA 和 S11 的双特异性抗体[26]。

2 噬菌体抗体库的筛选

目的克隆通过几轮淘洗过后得到富集。接下来的工作是从中挑取高亲和力的克隆。我们将这一步工作称为抗体库的筛选。要从成千上万的克隆中找到高特异性，高活性的目的克隆，需要我们控制筛选的轮数（2-3 轮）以及采用高通量的筛选方法。目前高通量筛选方法可以大致分为三类：ELISA 筛选，基于膜的筛选，微阵列筛选。

2.1 ELISA 筛选

自 70 年代初，Engvall 等人建立酶联免疫吸附分析方法（Enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）以来[27]，ELISA 方法已被广泛地应用于医学检测与基础研究之中。目前，被人们所熟悉的 " 标准 ELISA"，它基本未逃离经典的模式。80 年代以来，学着们致力于提高 ELISA 敏感性的研究。例如将碱性磷酸酶（AP）[28]或者绿色荧光蛋白（GFP）[29]与酶或荧光底物结合代替传统的酶 - 抗体复合物，显示出比标准 ELISA 更好的检测效果，敏感度可以提高 1000 倍[30]。

在抗体库筛选中，ELISA 筛选方法是过去十几年中最经典的克隆筛选方法。经过 2-4 轮的抗原选择，1000 个克隆中通常有 20-40%的概率筛选到目的克隆[31]。该方法适合于初步的抗体亲和性筛选[32]。Sidhu 等人将抗体库与 100nM 的 VEGF 抗原孵育，用标记过的 VEGF 抗原竞争性与噬菌体结合，当噬菌体抗体与抗原结合能力较强时会产生较弱的检测信号。利用这种竞争性 ELISA 筛选，他们从 68 株单克隆中筛选得到 5 株亲和力较强的抗 VEGF scFv 抗体克隆[33]。

2.2 基于膜的筛选

膜依赖的单克隆筛选方法最早由 Milstein 等人应用于杂交瘤的筛选[34]，后来经 Skerra 实验室[35]以及 Watkins 等人[36]得到发展。其基本方法是：抗原包被硝酸纤维素膜，噬菌体感染宿主菌平板，将处理过的硝酸纤维素膜覆盖在平板上，用标记过的抗原与膜孵育显示目标抗体，同时用其他抗原孵育检测交叉反应，对照平板相应位置挑取目的克隆[37]（图 3）。

目前该技术得到较多的应用。de Wildt 等人利用该技术通过一轮筛选，从 8000 个单克隆中得到目的 scFv 片段[38]。在利用细胞表面抗原筛选目标抗体中，Wu 等人利用膜筛选技术从人源噬菌体抗体库中筛选得到抗肿瘤的特异性抗体[39]。Giovannoni 等人从大容量抗体库中（大于 108）利用膜筛选技术，经反复筛选，最后得到一株高亲和力的单克隆菌株[40]。

2.3 微阵列筛选（Microarray screening）

微阵列技术同样适用于抗体库的筛选。噬菌体抗体微阵列技术是基于蛋白质微阵列技术基础之上发展起来的一项新的抗体高通量筛选技术。将噬菌体按特定序列固定到芯片表面，

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

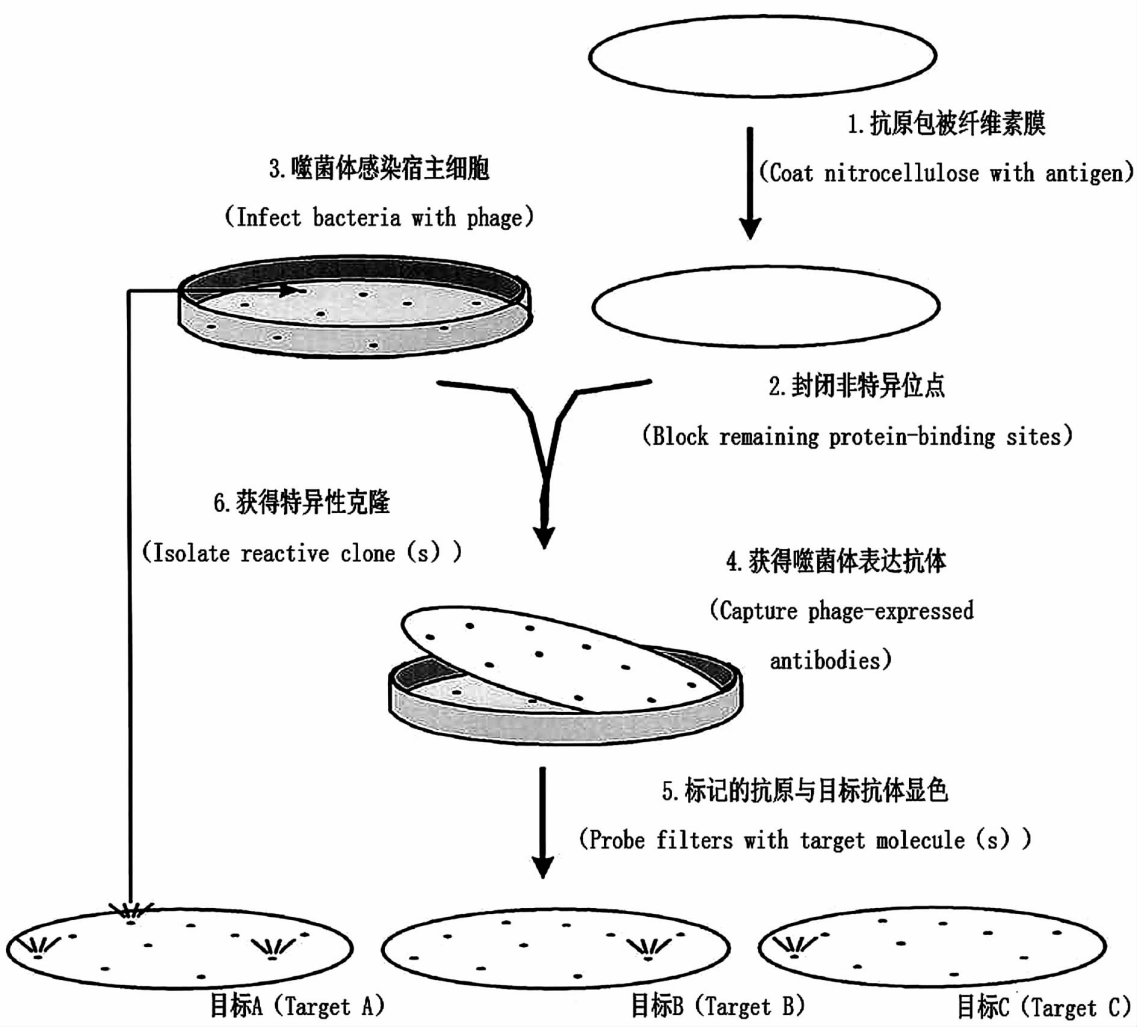

图 3 基于膜的筛选方法[37]

Fig. 3 Capture-lift screening procedure

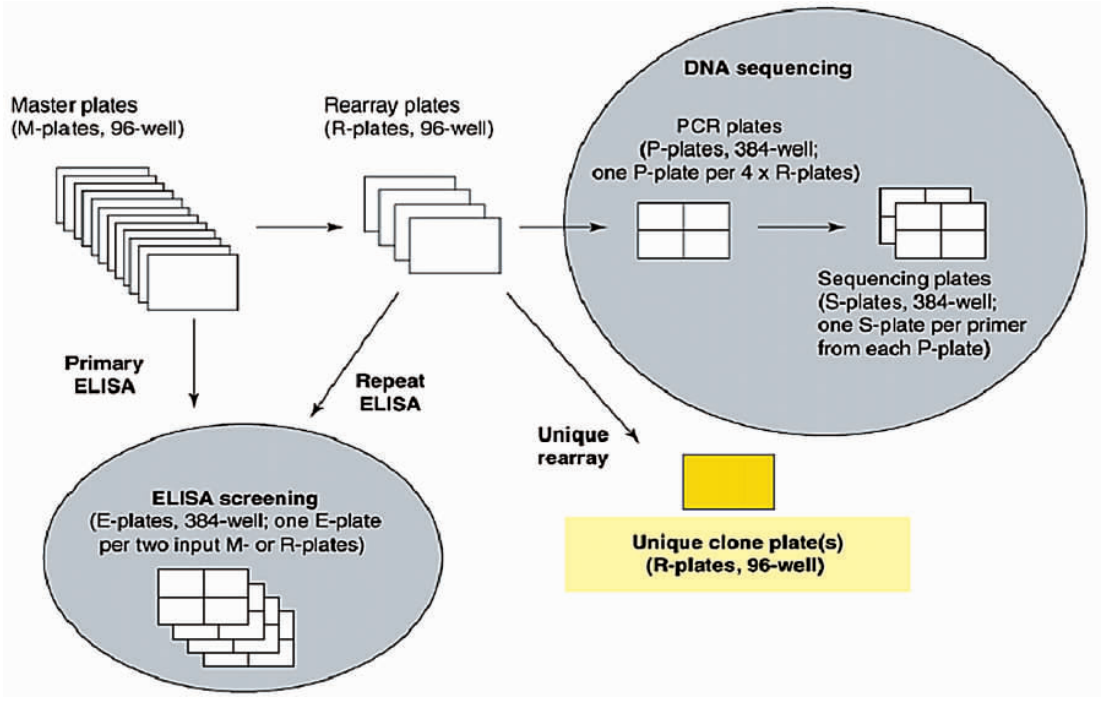

图 4 噬菌体抗体库筛选流程图[51]

Fig. 4 Antibody library phage screening work flow

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用微量点样仪将标记过的抗原与噬菌体抗体库结合发出特定的信号，用相应的照相技术或激光扫面技术对信号进行检测，最后通过相关软件分析挑选出目的克隆[41]。与传统的 ELISA 或免疫印迹技术相比，微阵列技术具有高通量、使用样品少、重复性好、可定量的特点[42]。Mendoza 等人最早成功的将微阵列技术应用于蛋白质的筛选，他们用 4 个 6*6 微量点样头点样，生成包括 144 个元素的阵列。这一新的处理方法允许对不同的样品针对每一阵列进行多重筛选[43]。Pavlickova 等人利用微阵列技术建立了一种快速简单的抗体筛选方法，这种方法不需要抗体纯化以及修饰，可以直接从大肠杆菌表达的产物中筛选得到目的克隆[44]。Angenendt 等人在此基础上发展出多重点样技术（MIST），在一块芯片上实现多重分析。他们将此技术应用于噬菌体抗体库的筛选，敏感度与 ELISA 方法不相上下，但步骤相比 ELISA 简化很多[45]。Poetz 等人利用蛋白质微阵列技术可以同时分析抗体亲和活性和表达水平，这种方法可以以惊人的速度从大肠杆菌表达产物中筛选出目的抗体[46]。

尽管将蛋白质微阵列技术应用于噬菌体抗体库的筛选拥有诸多优势，但其目前仍有许多技术问题还没有解决，例如携带抗体的噬菌体在芯片基质表面固定的问题等。筛选适合的噬菌体，并对其进行适当改造，使其更适于微阵列筛选条件，是一种解决办法。

3 提高筛选灵敏度的方法

提高筛选和鉴定的灵敏度可以更有效的筛选出特异性强的噬菌体抗体。例如将表面等离子共振(SPR)应用于抗原抗体结合反应的检测，可以将筛选过程与检测过程结合起来，不仅适用于微量的微阵列筛选[47]，也适用于大量的大肠杆菌表达粗产物的高通量连续检测[48]。新的检测手段不断出现，例如基于微臂（microcantelever）绑定的检测[49]，将特异性的生物分子绑定在微臂表面，当分子间产生纳米作用力时，微臂发生弯曲，可以通过光学信号进行分析。由于微臂的变动源于分子间自由能的改变，因此这种技术可以用于蛋白质间结合反应的高通量检测；声磁共振技术[50]，通过无线遥感系统反应生物分子间的结合反应，可以用于蛋白质间的特异性结合反应的分析。这些技术有希望在不久的将来应用于噬菌体抗体库的筛选。

4 数据管理

当我们需要从噬菌体抗体库中筛选多种抗体时，如何管理在筛选过程中出现的大量数据是我们面临的挑战。虽然关于数据管理方面的文献报道极其有限，但 Buckler DR 在 Dyax 公司工作时的一些经验给我们提供了一些帮助[51]。

4.1 样品 ID

从平板中挑选的单克隆接种于 96 孔板上，称为 M 板（Master plates）。确定板上每一个克隆的名称，例如可以用 96 孔板名称 + 克隆所在板中的位置（M0001-A01）作为克隆的 ID，这样可以跟踪每个克隆的去向。接下来挑取单克隆进行扩增，进行 ELISA 检测亲和试验以及选择高亲和力的克隆进行 DNA 测序，所有 ELISA 和 DNA 测序产生的数据都应建立联系，并与源克隆相对应（图 4）。

表 5 序列差异分析表

Table 5 Segment diversity analysis

Segment diversity analysis for Fabs against five protein targets[a]									
Target ID #	V_HV_L	V_H	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	V_L	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
27	76	76	71	71	71	74	53	33	69
28	36	34	32	32	32	34	22	22	28
29	254	252	185	243	200	167	122	90	138
30	39	38	38	38	37	39	39	32	39
31	94	94	93	91	92	94	36	62	82

4.2 筛选数据的管理

噬菌体抗体库筛选过程中产生的数据需要一个信息管理系统进行保存和分析。需要记录的数据包括数据产生的时间以及类型等。例如，从平板中挑取的单克隆，需要记录它来源的抗体库，筛选次数，吸附及洗脱条件，筛选效率。通过对以上数据的分析，可以针对预筛选结果对筛选方法进行改进。数据库通过比较目标信号强度与背景信号强度，可以从上千株克隆中快速的挑选出目的克隆，进行下一轮筛选或者 DNA 测序。

4.3 测序数据的管理

获得 DNA 测序结果后，可以用 Phred 和 Phrap[52]分析程序对抗体片段的重链以及轻链序列进行分析。对于没有达到预期分数的序列做出标记，对于符合标准的序列自动上传到数据库中。同时可以人工校对不符合标准的序列。核酸序列还可以被翻译成氨基酸序列，进行框架区以及互补决定区（CDR）的分析。例如，将具有相同序列片段的克隆分在一组，每出现一个新的序列建立一个新的组，对于筛选出来的目的克隆序列片段单独分为一组，这样就可以很容易的分析克隆的特异性。筛选出来的序列还可以与抗体序列数据库进行比较，确定抗体所属家族。

4.4 数据分析

数据管理的目的是方便数据分析。从抗体库中筛选出来的大量克隆，我们很想知道他们的序列差异性。例如图 5 中，Target ID 代表不同目的蛋白编号，表中数字代表存在差异的序列个数（来源于前面的序列分组）。从表中可以看出，VHVL 组共有 499 个序列存在差异。平均有 92%（VL/VHVL）的克隆 VL 片段与其他成员不同，有 91%（H-CDR3/VHVL）的克隆 H-CDR3 片段与其他成员不同。

5 结语

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

抗体库筛选的方法多种多样，关于淘洗，需要针对不同抗原的特性选择合适的淘洗方式。膜筛选和微阵列筛选是高通量的筛选方法，而 ELISA 筛选具有稳定，方便的优点。数据管理在抗体库筛选中非常重要，可以帮助我们从成千上万的克隆中挑选出基因型和表型都符合要求的目的菌株。越来越多的药物通过抗体库筛选的方法获得，筛选方法的不断改进和数据分析软件的开发为快速、准确的获得目标抗体提供了保障。

参 考 文 献 (References)

[1] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. Science, 1985, 228 (4705):1315-1317

[2] McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains [J]. Nature, 1990,348(6301):552-554

[3] Pini A, Ricci C, Bracci L. Phage display and colony filter screening for high-throughput selection of antibody libraries [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2002,5(7):503-510

[4] Aujame L, Geoffroy F, Sodoyer R. High affinity human antibodies by phage display[J]. Hum Antibodies,1997,8(4):155-168

[5] Griffiths A D, Duncan A R. Strategies for selection of antibodies by phage display[J]. Curr Opin Biotechnol,1998,9(1):102-108

[6] Han D G, Duan X Y, Guo Y M, et al. Construction of a phage antibody library and screening of anti-epidermal growth factor receptor variant iii single chain antibody[J]. Journal of Southern Medical University,2 010,30(1):25-29

[7] Coomber D W. Panning of antibody phage-display libraries. Standard protocols[J]. Methods Mol Biol,2002,178:133-145

[8] Marks J D, Griffiths A D, Malmqvist M, et al. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling[J]. Biotechnology (N Y),1992,10(7):779-783

[9] Bracci L, Pini A, Lozzi L, et al. Mimicking the nicotinic receptor binding site by a single chain fv selected by competitive panning from a synthetic phage library[J]. J Neurochem,2001,78(1):24-31

[10] Jung S, Arndt K M, Muller K M, et al. Selectively infective phage (sip) technology: scope and limitations[J]. J Immunol Methods,1999, 231(1-2):93-104

[11] Raats J, van Bree N, van Woezik J, et al. Generating recombinant anti-idiotypic antibodies for the detection of haptens in solution [J]. J Immunoassay Immunochem,2003,24(2):115-146

[12] Neri D, Pini A, Nissim A. Antibodies from phage display libraries as immunochemical reagents[J]. Methods Mol Biol,1998,80:475-500

[13] Xu C, Sui J, Tao H et al. Human anti-cxcr4 antibodies undergo vh replacement, exhibit functional v-region sulfation, and define cxcr4 antigenic heterogeneity[J]. J Immunol,2007,179(4):2408-2418

[14] Hegmans J P, Radosevic K, Voerman J S, et al. A model system for optimising the selection of membrane antigen-specific human antibodies on intact cells using phage antibody display technology[J]. J Immunol Methods,2002,262(1-2):191-204

[15] de Kruif J, Terstappen L, Boel E, et al. Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1995,92(9): 3938-3942

[16] Mutuberria R, Hoogenboom H R, van der Linden E, et al. Model systems to study the parameters determining the success of phage antibody selections on complex antigens [J]. J Immunol Methods,199 9,231(1-2):65-81

[17] Watkins J D, Beuerlein G, Wu H, et al. Discovery of human antibodies to cell surface antigens by capture lift screening of phage-expressed antibody libraries[J]. Anal Biochem,1998,256(2):169-177

[18] Korn T, Nettelbeck D M, Volkel T, et al. Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to cea-expressing tumour cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scfv[J]. J Gene Med,2004,6(6):642-651

[19] Sui J, Bai J, St C T A, et al. Identification of cd4 and transferrin receptor antibodies by cxcr4 antibody-guided pathfinder selection[J]. Eur J Biochem,2003,270(22):4497-4506

[20] Schnitzer J E. Vascular targeting as a strategy for cancer therapy[J]. N Engl J Med,1998,339(7):472-474

[21] Johns M, George A J, Ritter M A. In vivo selection of sfv from phage display libraries[J]. J Immunol Methods,2000,239(1-2):137-151

[22] Valadon P, Garnett J D, Testa J E, et al. Screening phage display libraries for organ-specific vascular immunotargeting in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(2):407-412

[23] Poul M A, Becerril B, Nielsen U B, et al. Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries[J]. J Mol Biol, 2000,301(5):1149-1161

[24] Huang L, Shimaoka M, Rondon I J, et al. Identification and characterization of a human monoclonal antagonistic antibody al-57 that preferentially binds the high-affinity form of lymphocyte function-associated antigen-1[J]. J Leukoc Biol,2006,80(4):905-914

[25] McGuinness B T, Walter G, FitzGerald K, et al. Phage diabody repertoires for selection of large numbers of bispecific antibody fragments[J]. Nat Biotechnol,1996,14(9):1149-1154

[26] Korn T, Nettelbeck D M, Volkel T, et al. Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to cea-expressing tumour cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scfv[J]. J Gene Med,2004,6(6):642-651

[27] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). Quantitative assay of immunoglobuling [J]. Immunochemistry, 1971, 8(9):871-874

[28] Martin C D, Rojas G, Mitchell J N, et al. A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies[J]. BMC Biotechnol,2006,6:46

[29] Casey J L, Coley A M, Tilley L M, et al. Green fluorescent antibodies: novel in vitro tools[J]. Protein Eng,2000,13(6):445-452

[30] Schweitzer B, Wiltshire S, Lambert J, et al. Immunoassays with rolling circle dna amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97 (18): 10113-10119

[31] Edwards B M, Barash S C, Main S H, et al. The remarkable flexibility of the human antibody repertoire; Isolation of over one thousand diff- erent antibodies to a single protein, blys[J]. J Mol Biol, 2003,334(1):103-118

[32] Watkins J D, Beuerlein G, Pecht G, et al. Determination of the relative affinities of antibody fragments expressed in escherichia coli

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Anal Biochem,1997,253 (1):37-45

[33] Sidhu S S, Li B, Chen Y, et al. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions[J]. J Mol Biol,2004,338(2):299-310

[34] Gherardi E, Pannell R, Milstein C. A single-step procedure for cloning and selection of antibody-secreting hybridomas [J]. J Immunol Methods, 1990, 126(1):61-68

[35] Skerra A, Dreher M L, Winter G. Filter screening of antibody fab fragments secreted from individual bacterial colonies: specific detection of antigen binding with a two-membrane system [J]. Anal Biochem,1991,196(1):151-155

[36] Watkins J D, Beuerlein G, Wu H, et al. Discovery of human antibodies to cell surface antigens by capture lift screening of phage-expressed antibody libraries[J]. Anal Biochem,1998,256(2):169-177

[37] Watkins J D. Screening of phage-expressed antibody libraries by capture lift[J]. Methods Mol Biol, 2002,178:187-193

[38] de Wildt R M, Mundy C R, Gorick B D, et al. Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions [J]. Nat Biotechnol,2000,18(9):989-994

[39] Wu H, Pancook J D, Beuerlein G, et al. Cloning, isolation and characterization of human tumor in situ monoclonal antibodies [J]. Cancer Immunol Immunother,2002,51(2):79-90

[40] Giovannoni L, Viti F, Zardi L, et al. Isolation of anti-angiogenesis antibodies from a large combinatorial repertoire by colony filter screening[J]. Nucleic Acids Res,2001,29(5):E27

[41] Ling M M, Ricks C, Lea P. Multiplexing molecular diagnostics and immunoassays using emerging microarray technologies [J]. Expert Rev Mol Diagn,2007,7(1):87-98

[42] Ekins R P. Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays[J]. Clin Chem,1998,44(9):2015-2030

[43] Mendoza L G, McQuary P, Mongan A, et al. High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (elisa)[J]. Biotechniques, 1999,27(4):778-780,782-786,788

[44] Pavlickova P, Knappik A, Kambhampati D, et al. Microarray of recombinant antibodies using a streptavidin sensor surface self-assembled onto a gold layer[J]. Biotechniques,2003,34(1):124-130

[45] Angenendt P, Wilde J, Kijanka G, et al. Seeing better through a mist: evaluation of monoclonal recombinant antibody fragments on microarrays[J]. Anal Chem,2004,76(10):2916-2921

[46] Poetz O, Ostendorp R, Brocks B, et al. Protein microarrays for antibody profiling: specificity and affinity determination on a chip[J]. Proteomics,2005,5(9):2402-2411

[47] Wassaf D, Kuang G, Kopacz K, et al. High-throughput affinity ranking of antibodies using surface plasmon resonance microarrays [J]. Anal Biochem,2006,351(2):241-253

[48] Steukers M, Schaus J M, van Gool R, et al. Rapid kinetic-based screening of human fab fragments [J]. J Immunol Methods,2006,310 (1-2):126-135

[49] Wu G, Datar R H, Hansen K M, et al. Bioassay of prostate-specific antigen (psa) using microcantilevers [J]. Nat Biotechnol,2001,19(9): 856-860

[50] Araya-Kleinsteuber B, Roque A C, Kioupritzi E, et al. Magnetic acoustic resonance immunoassay (maria): a multifrequency acoustic approach for the non-labelled detection of biomolecular interactions [J]. J Mol Recognit,2006,19(4): 379-385

[51] Buckler D R, Park A, Viswanathan M, et al. Screening isolates from antibody phage-display libraries[J]. Drug Discov Today,2008,13(7-8): 318-324

[52] Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. Ii. Error probabilities[J]. Genome Res,1998,8(3):186-194

(上接第 4520 页)

[4] 张学森, 丁惠强. 退变颈椎间盘组织中细胞凋亡及相关蛋白 Caspase-8,Caspase-9 的表达 [J]. 宁夏医学杂志, 2008, 30(4): 295-297

Zhang Xue-sen, Ding Hui-qiang. Degenerative cervical disc tissue apoptosis and related protein Caspase-8, Caspase-9 expression [J]. Ningxia Medical Journal,2008,30(4):295-297

[5] Gruber HE, Hanley EN Jr. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of. surgical specimens with normal controls[J]. Spine,1998,23(7):751-757

[6] Park SJ, Wa CLL, Cordon JD, et al. taxal induces caspase-10 dependent Spoptosis[J]. J Biol Chem,2004,279(49):51057-51067

[7] Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, et al. Deregulation of capase-8 and -10 expression in pedialrie,tumors and cell lines [J]. Cancer Res, 2002,62:5897-5901

[8] 崔长富, 王玲, 李园等. 大肠癌中 Caspase-8 和 Caspase-10 的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(01): 56-58

Cui Chang-fu, Wang Ling, Li Yuang, et al. Colorectal caspase-8 and Caspase-10 expression and its relationship to apoptosis [J]. Journal of Experimental Surgery,2010,27(01):56-58

[9] 刘达恩, 黎洪棉, 梁自乾,等. TNF-aR1 mRNA 和 Caspase-10 mRNA 在增殖期增生性瘢痕组织中的表达及意义[J]. 广西医学, 2010, 32 (1):4-7

Liu Da-en, Li Hong-mian, Liang Zi-qian, et al. TNF-aR1 mRNA and Caspase-10 mRNA in proliferative scar tissue and its significance[J]. Guangxi Medicine,2010,32 (1): 4-7

[10] 蔡卫林. 外伤性癫痫与凋亡基因 bcl-2, caspase-10 相关性的研究 [硕士学位论文]. 广东:中山大学,2009

Cai Wei-lin. Traumatic epilepsy and apoptosis gene bcl-2, caspase-10 Correlation[D]. Guangdong: Zhongshan University,2009

[11] Cibellini D, Carla R M, ponti C, et al. HIV-1 tal protein concomitantly Down-regulates apical caspase-10 and up-regulates c-FLIP in lymphoid T Cell; a potential molecular mechanism to escape TRAIL cytotoxicity[J]. J Cell physiol,2004,203(3):547-556

[12] 王瑞霞, 王平章, 王欣. Caspase-10 研究进展[J]. 医学分子生物学杂志, 2006,3(1):40-43

Wang Rui-xia, Wang Ping-zhang, Wang Xin. Caspase-10 Research[J]. Medical Molecular Biology,2006,3 (1):40-43

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net