

抗恩诺沙星噬菌体单链抗体库的构建及鉴定

温凯 沈建忠 孟辉 吴聪明 王战辉 张素霞*

(中国农业大学 动物医学,北京 100193)

摘要 本研究以兽药恩诺沙星为对象,构建噬菌体抗体库,为低成本、快速制备目的抗体提供新的途径。以恩诺沙星-鸡卵清蛋白(ENR-OVA)为免疫原对 Balb/c 小鼠进行免疫,取其脾细胞提取总 RNA,并分别扩增全套抗体轻、重链基因,通过重叠延伸 PCR 技术,以编码柔性多肽(Gly₃Ser)₄ 的基因为接头,将轻重链基因组装为完整的 scFv 基因,将之克隆入 pCANTAB5E 载体,转化大肠杆菌 XL1-Blue,以辅助噬菌体 M13KO7 对其进行超感染,构建噬菌体抗体库并进行富集、筛选和鉴定;构建了库容量约为 2.2×10^6 的抗恩诺沙星噬菌体单链抗体库,并筛选出 26 株阳性克隆,为表达单链抗体、建立免疫检测方法奠定基础。

关键词 兽药; 恩诺沙星; 单链抗体; 噬菌体展示技术; 半抗原

中图分类号 S 859.84

文章编号 1007-4333(2011)02-0118-07

文献标志码 A

Construction and identification of anti-ENR phage display scFv libraries

WEN Kai, SHEN Jian-zhong, MENG Hui, WANG Zhan-hui, ZHANG Su-xia*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract This study focuses on construction and identification of immunized phage display library from splenocytes of hyperimmunized BALB/C mice for screening and isolation of scFv fragment against ENR, an alternative method to produce antibodies for veterinary drug residues detection. The total RNA was isolated from splenocytes of a BALB/C mouse hyperimmunized with the Enrofloxacin conjugated to chicken OVA. Variable light and heavy domains of the immunoglobulin genes were amplified by PCR and assembled to produce full-length single-chain Fv(scFV) by overlap extension PCR using a linker primer containing flexible polypeptide-(Gly₃Ser)₄. The scFv DNA fragment was ligated into phagemid vector pCANTAB5E and electroporated into *E. coli* XL1-Blue cells. The transformed cells were rescued by M13KO7 helper phage and phage libraries were constructed. The size of antibody libraries is 2.2×10^6 . Following the construction of phage display scFv libraries, the recombinant phage displaying scFv were enriched and identified. There are 26 clones against ENR generated in this study.

Key words veterinary drug; enrofloxacin; single chain antibody; phage display techniques; hapten

作为食品安全和公共卫生的重要方面,动物性食品中兽药残留问题已经受到了全世界的广泛关注。近年来,兽药的种类和应用规模剧增,使得兽药残留分析与监测难度大大增加,亟待高效快速监测手段的发展。免疫学检测技术凭借其操作简便、特异性强、仪器化程度和分析成本低等特点,已被广泛应用于实际生产中现场监控以及大规模筛选检测。如量子点荧光探针技术、化学发光免疫检测技术等,

使免疫检测的灵敏度和选择性得到了进一步提高。但免疫学检测的核心试剂——抗体仍是决定方法灵敏度等性能指标的关键因素。抗体制备技术在经历了多克隆和单克隆抗体 2 个重要阶段后,已发展到第三代基因重组抗体阶段。

20 世纪 80 年代,随着分子生物学技术的飞速发展和抗体基因结构的阐明,产生了基因重组抗体以及抗体库技术。该技术主要原理为在体外扩增获

收稿日期: 2010-07-21

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30830082); 国家“863”计划项目(2008AA10Z423)

第一作者: 温凯,博士研究生,E-mail:wenkai.vet@gmail.com

通讯作者: 张素霞,教授,主要从事兽医药理学与毒理学研究,E-mail:sxz@cau.edu.cn

取全套抗体基因, 对其进行表达并获得“抗体蛋白-抗体基因”偶联物, 通过对抗体蛋白进行功能筛选来模拟动物体内的克隆选择过程, 最终获得具有免疫学功能的基因克隆及抗体蛋白^[1]。该技术在降低抗体生产成本、缩短生产周期的同时, 还能够在基因水平上对抗体进行体外进化, 从而提高其亲和力、改良其特异性, 并能够赋予其新的免疫学特性, 如多价抗体和双特异性抗体^[2], 使之更适用于免疫检测技术的多种需求。

近年来, 有关重组抗体在农、兽药残留和环境污染检测领域的应用研究国内外均有报道。Kramer等^[3]制备了抗阿特拉津的基因重组抗体, 并通过定点突变技术对该抗体库进行优化、改善, 使重组抗体对阿特拉津的敏感性提高了25倍。Li等^[4]用甲胺磷模拟物对BALB/C小鼠进行免疫, 构建免疫倾向性噬菌体抗体库, 最终得到特异性较强的单链抗体, 并建立了相应的检测方法; Korpimaki^[5-6]利用噬菌体抗体库技术制备的基因重组抗体对13种磺胺类药物的交叉反应率明显优于传统单克隆抗体, 随后又对其进行体外进化; 应用改良基因重组抗体建立了能对18种磺胺类药物进行多残留检测的荧光免疫分析方法^[7]。潘科等^[8]利用噬菌体展示技术在杂交瘤细胞基础上制备出克伦特罗单链抗体并建立了免疫检测方法, 其检测性能优于亲本代单克隆抗体。在此基础上, 王宏等^[9]对该克伦特罗单链抗体的可溶性表达进行了进一步优化。雷红涛等^[10]利用该

抗体建立了高灵敏度的时间分辨荧光免疫检测方法。

本研究选择应用广泛的第三代喹诺酮类药物——恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)为对象, 利用噬菌体表面展示技术, 构建了抗ENR单链抗体库, 并对其进行了筛选和鉴定, 旨在为进一步获取新型抗体、建立相应的免疫检测技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Balb/c小鼠, 雄性, 6周龄。由本实验室实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂

免疫原ERN-BSA、包被原ERN-BSA均由本实验室合成并保存; 弗氏佐剂购于美国Sigma公司; TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司; AMV反转录酶、随机引物Oligo(dt)₁₅、rTaq酶购自日本Takara公司; 限制性内切酶、M13KO7辅助噬菌体购自美国NEB公司; T4 DNA连接酶购自美国Promega公司; DNA凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; XL1-Blue感受态细胞购自中国Transgen公司; 蛋白胨、酵母提取物购自英国Oxoid公司; pCANTAB5E载体由军事医学科学院生物工程研究所惠赠。

1.1.3 引物合成

由美国Invitrogen公司合成下列引物(表1)。

表1 引物序列
Table 1 Primers

| 引物名称 | 核苷酸序列 |
|-----------|---|
| VH for: | 5'-GCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTYCAGCTKCAG CAGTCTGGA-3' 5'-GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAKGTRCAGCTTCAGGAGTARGGA-3' 5'-GCGGCCAGCCGGCCATGGCCGARGTGAAGCTGGTGGARTCTGGR-3' 5'-GCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTCCARCTGCAGSARYCTGGR-3' |
| VH back | 5'-TCCAGAACCGCCACCGCCGCTACCGCCGCCACCTGMRGAGACDGTGASCAGRGTGTC-3' 5'-TCCAGAACCGCCACCGCCGCTACCGCCGCCACCTGMRGAGACDGTGASTGARGTT-3' |
| VL for | 5'-AGCGGCGGTGGCGGTTCTGGAGGCGGCGGTTCTGAYATGCAGATGACMCAGWC-3' 5'-AGCGGCGGTGGCGGTTCTGGAGGCGGCGGTTCTRAMATTGTGMTGACCCAATC-3' |
| VL back | 5'-ACTAGTCGCGGCCGCGTCGACAGCMCGTTTTCAGYTCCARYTT-3' 5'-ACTAGTCGCGGCCGCGTCGACAGCMCGTTTBAKYTCTATCTTTGT-3' |
| scFv for | 5'-CGCAATTCCTTTAGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCC-3' |
| scFv back | 5'-GGTTCCAGCGGATCCGGATACGGCACCGGACTAGTCGCGGCCGCGTCGAC-3' |

注: * VH for中下划线处为Sfi I酶切位点, VLback中下划线处为Not I酶切位点; VHback及VL for中下划线部分为(Gly4Ser)₃序列; 序列中简并碱基符号为W=A/T; S=G/C; M=A/C; R=A/G。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫及脾细胞总 RNA 提取

免疫原 ENR-OVA 与弗氏完全佐剂按体积比 1:1 混合,对小鼠进行初次免疫,随后换为弗氏不完全佐剂,隔 2 周加强免疫 1 次,共 3 次,在取小鼠脾脏前 3 d 加强免疫 1 次。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定抗体效价,取免疫效果较好的小鼠,分离脾细胞,以 TRIzol 法进行 RNA 提取,产物进行紫外分光光度计检测及琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 小鼠轻链(V_L)、重链(V_H)基因的扩增与鉴定

以所得总 RNA 为模板,反转录合成 cDNA 第一链,使用 V_L 、 V_H 引物扩增全套抗体基因。反应条件如下:94 °C 预变性 5 min,94 °C 45 s,58 °C 1 min,72 °C 45 s,共进行 30 个循环,72 °C 延伸 10 min。反应产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后,回收目的片段。

1.2.3 全长单链抗体(scFv)基因的组装

以编码柔性肽(Gly_4Ser_3)的基因序列为接头,通过重叠延伸 PCR 技术将 V_L 、 V_H 基因组装成为含有酶切位点的全长 scFv 基因。PCR 程序如下:首先在常规 PCR 反应体系(50 μ L)中加入等摩尔 V_L 、 V_H 基因,94 °C 预变性 5 min,94 °C 45 s,68 °C 1 min,72 °C 45 s,共进行 10 个循环,72 °C 延伸 10 min;以此产物为模板,以引物 scFv for 和 scFv back 进行二次 PCR,94 °C 预变性 5 min,94 °C 45 s,60 °C 1 min,72 °C 45 s,共进行 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。反应产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后,回收目的片段,进行测序以及序列比对分析。

1.2.4 噬菌体单链抗体表面展示文库的构建及鉴定

分别对 scFv 基因和 pCANTAB5E 噬菌粒载体进行 *Sfi* I、*Not* I 双酶切并连接,转化 XL1-Blue 感受态细胞并涂板,37 °C 过夜培养后进行菌落计数,估算库容量;随机挑取单菌落进行 PCR 鉴定、*Bst*N I 酶切鉴定,并提取噬菌粒进行 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切鉴定;将剩余转化菌液扩大培养,加入 M13KO7 辅助噬菌体 37 °C 静置感染 30 min 后,离心沉淀菌体细胞,用 2 \times YT-AK 培养基重悬,37 °C 震荡培养过夜,离心取上清液,加入 PEG/NaCl 冰浴 1 h,离心并重悬沉淀,经 0.45 μ m 滤膜过滤后所得即为初级噬菌体抗体库。

1.2.5 噬菌体单链抗体库的亲亲和富集与免疫筛选

将所得初级噬菌体抗体库加入至 ENR-BSA 包被的 96 孔板中,37 °C 静置孵育 1 h,洗涤,100

mmol/L 三乙胺洗脱与抗原吸附的噬菌体,随后立即加入 1 mol/L Tris(pH8.5)进行中和,以此感染对数生长期 XL1-Blue,经培养后收集菌体细胞,再次加入 M13KO7 辅助噬菌体进行感染,重复上述富集程序 3~4 次,挑取单菌落扩大培养,进行菌液 PCR 鉴定和单克隆 Phage-ELISA 鉴定。

2 结果与分析

2.1 小鼠脾脏细胞总 RNA 的提取及鉴定

小鼠脾脏细胞总 RNA 的提取鉴定结果良好(图 1),总 RNA 较为完整,而紫外吸收 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.90,表明其纯度良好,可应用于后续试验。

1~4 为脾脏总 RNA

图 1 脾脏总 RNA 的电泳鉴定

Fig. 1 Electrophoresis identification of total RNA from splenocytes

2.2 V_L 、 V_H 基因的扩增与单链抗体(scFv)基因的组装及鉴定

V_L 、 V_H 和 scFv 基因的扩增鉴定结果见图 2, V_L 基因大小约为 320 bp,而 V_H 基因比 V_L 略大,约为 340 bp 左右,而全长 scFv 基因大小约为 760 bp,均与预期大小相符。测序结果表明所得序列具有正确的表达阅读框,经 NCBI Ig BLAST 比对确为抗体可变区基因,由此初步判定 scFv 基因的扩增与构建是成功的。

1 为 V_L ;2 为 V_H ;3 为 scFv;M 为 DNA Marker。

图 2 V_L 、 V_H 、scFv 基因扩增

Fig. 2 Amplification of V_L 、 V_H 、scFv genes

2.3 噬菌体单链抗体表面展示文库的构建及鉴定

scFv-pCANTAB5E 噬菌粒转化菌涂板培养后,菌落计数为 2.2×10^6 (即为初级库库容量)。随机挑取 19 株单菌落进行菌液 PCR 鉴定(图 3),其中 14 株菌落能够扩增出 1 kb 目的片段,阳性率约为 74%。选取经 PCR 鉴定为阳性的 42 株单菌落进行 scFv 基因 *Bst*NI 酶切鉴定,结果如图 4 所示,约 80%单菌落具有独特的 scFv 基因型,说明多样性良好。噬菌粒 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切鉴定结

果见图 5,酶切后分别得到 2.2 和 3.1 kb 2 个片段,分别为含有 scFv 基因的片段及 pCANTAB5E 噬菌粒(4.5 kb)的骨架片段,上述结果表明,已成功将 scFv 基因克隆入 pCANTAB5E 噬菌粒载体,构建了多样性良好的噬菌体单链抗体库。

M 为 DNA Marker,1~19 为随机挑选的单菌落。

图 3 富集前重组噬菌粒的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of recombinant phagemids before panning

1~42 为单克隆菌株

图 4 scFv 基因的 *Bst*NI 酶切鉴定

Fig. 4 *Bst*NI digestion of scFv genes

M 为 DNA Marker,1~11 为单克隆菌株。

图 5 重组噬菌粒的双酶切鉴定

Fig. 5 Double enzyme digestion of recombinant phagemids

2.4 噬菌体单链抗体库的亲富集及筛选

对噬菌体单链抗体库共进行了 3 轮“亲和吸附-洗脱-扩增”的亲富集,富集后的抗体库菌液 PCR 鉴定结果见图 6。相比于未经富集的抗体库,富集后抗体库的 PCR 鉴定阳性率大幅提高。富集后抗体库滴度比初级抗体库提高了约 800 倍,结果见表 2,这说明特异性重组噬菌体得到了有效的富集。

M 为 DNA Marker,1~18 为随机挑选的单菌落。

图 6 富集前重组噬菌粒的 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR identification of recombinant phagemids before panning

表 2 噬菌体抗体库的免疫亲和富集

Table 2 Enrichment of phagedisplay library

| 包被原 | 富集轮次 | 输入噬菌体量 | 输出噬菌体量 | 输出/输入比率 | 富集倍数 | 总体富集倍数 |
|---------|------|----------------------|-------------------|----------------------|------|--------|
| ENR-BSA | 1 | 1.8×10^{12} | 3.5×10^4 | 1.9×10^{-8} | 1 | |
| | 2 | 2.3×10^{12} | 8.1×10^5 | 3.5×10^{-6} | 18 | 840 |
| | 3 | 2.1×10^{12} | 3.4×10^7 | 1.6×10^{-5} | 47 | |

随机选取 40 株单克隆菌落进行单克隆 phage-ELISA 筛选,检测结果见表 3 及图 7。其中,26 株

菌对 ENR-BSA 包被原的 ELISA 信号大于 BSA 阴性对照的 2.1 倍,可判定为阳性,阳性率为 65%。

表3 单克隆 phage-ELISA 筛选

Table 3 Monoclonal phage-ELISA selection

| 包被原 | 克隆序号 | | | | | | | | | |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| BSA | 0.241 | 0.199 | 0.132 | 0.091 | 0.253 | 0.228 | 0.237 | 0.075 | 0.213 | 0.193 |
| ENR-BSA | 1.242 | 0.413 | 1.127 | 2.285 | 0.485 | 1.907 | 1.258 | 0.108 | 1.416 | 0.318 |
| 包被原 | 克隆序号 | | | | | | | | | |
| | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| BSA | 0.198 | 0.136 | 0.077 | 0.218 | 0.423 | 0.137 | 0.052 | 0.152 | 0.180 | 0.062 |
| ENR-BSA | 0.313 | 1.027 | 1.376 | 2.613 | 0.578 | 0.962 | 0.804 | 1.075 | 0.198 | 1.589 |
| 包被原 | 克隆序号 | | | | | | | | | |
| | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| BSA | 0.110 | 0.173 | 0.081 | 0.082 | 0.135 | 0.106 | 0.379 | 0.172 | 0.348 | 0.172 |
| ENR-BSA | 2.525 | 0.301 | 1.354 | 0.407 | 0.245 | 0.563 | 0.775 | 0.161 | 0.659 | 1.500 |
| 包被原 | 克隆序号 | | | | | | | | | |
| | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| BSA | 0.059 | 0.198 | 0.227 | 0.151 | 0.145 | 0.133 | 0.207 | 0.321 | 0.055 | 0.154 |
| ENR-BSA | 1.926 | 2.335 | 0.349 | 1.135 | 1.833 | 1.903 | 1.726 | 0.577 | 0.881 | 1.559 |

注:单克隆 Phage-ELISA 筛选以 $OD_{450\text{ nm}}$ 值为筛选依据,黑体字为阳性克隆。

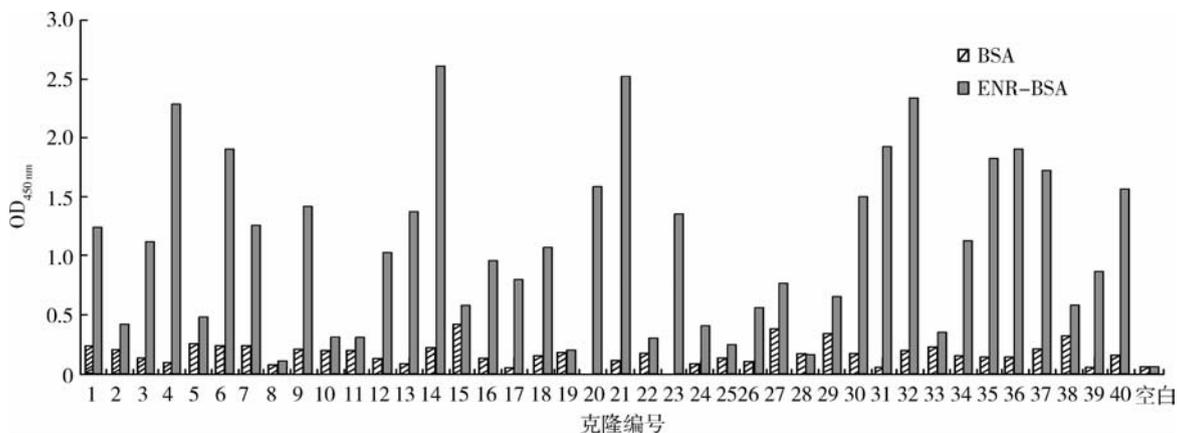


图7 单克隆 phage-ELISA 筛选

Fig. 7 Monoclonal phage-ELISA selection

2.5 阳性克隆的测序及分析

随机选取筛选得到的阳性 scFv 克隆进行测序,图 8 为 scFv 基因序列以及推导得到的氨基酸序列。经 IMGT 以及 Vbase 2 数据库比对,结果表明, V_H 基因长 363 bp, 编码 121 个氨基酸, 由 IgHV5、IgHD2 和 IgHJ3 3 个亚族(型)段胚系基因重排形成; V_L 基因长 315 bp, 编码 105 个氨基酸, 由

IgKV10 和 IgKJ1 亚族(型)胚系基因组装而成。在所得到的 scFv 中, V_H 、 V_L 基因拼接正确, 为一个开放阅读框, 内部无终止密码子, 具有正确的 FR 和 CDR 区域以及 $(G_4S)_3$ 连接肽, 分别在 22、96 位和 23、87 位(灰色标注的氨基酸残基)编码特征性的半胱氨酸, 这对于抗体蛋白形成链内二硫键, 保持蛋白立体构象具有重要作用。

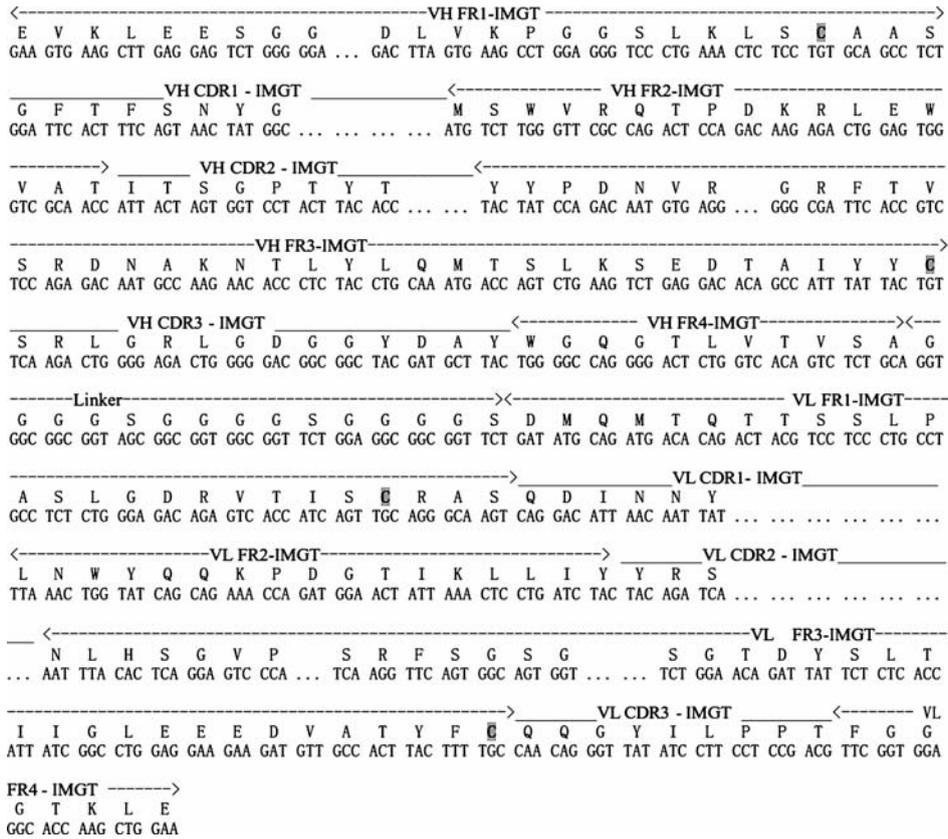


图 8 scFv 序列分析

Fig. 8 Analysis of scFv sequence

3 讨论

本研究利用 RT-PCR 及 SOE-PCR 技术,直接以小鼠脾脏为基因来源构建了噬菌体单链抗体库,绕过了杂交瘤制备、筛选这一复杂过程,为进一步高效、快速的制备小分子抗体奠定基础。

3.1 scFv 基因的构建

对于构建抗体库而言,全套抗体可变区基因的获取极为关键。抗体基因是生物界中最具多样性和不均一性的基因家族,这不仅包括基因组水平的多样性,还包括基因重排、V 区碱基插入和高亲和力突变。因此,全套抗体可变区基因的扩增对于引物的要求相对较高。

抗体轻、重链可变区基因引物的设计主要以抗体序列的相应保守区域 FR1、FR4 为参照。为保证所得抗体基因的多样性,可增加引物的简并性,但同时也会增加非特异性扩增的风险。本研究的引物设计主要参照 Sepulveda [11] 和 Rohatgi [12] 报道的引物序列和设计方法,在保证特异性的同时,适当增加了引物的简并性,并且在 scFv 引物中的酶切位点外

设计了较多的保护碱基,以提高酶切效率,降低 scFv 基因多样性的损失[13]。在 scFv 基因组设计上,采取了 5'-V_H-Linker-V_L-3' 的连接模式,尽管这种模式所产生的 scFv 表达量较低,但更易获得具有较高免疫活性的抗体[14];而 Linker 则选择应用最为广泛的编码柔性片段(Gly₄Ser)₃ 的基因序列,这一连接肽序列能够提供一定的柔韧性和亲水性,并且能够显著提高 scFv 抗体的稳定性[15]。

3.2 抗体库的容量

库容量是影响抗体库质量的关键因素之一,与所获得抗体的亲和力大体成正比。库容 10⁷~10⁸ 的抗体库可筛选出亲和力为 10⁻⁶~10⁻⁷ mol/L 的抗体,当库容量提高至 10⁸~10⁹ 时,则可获得 10⁻⁸~10⁻⁹ mol/L 的高亲和力抗体[1]。而制约其库容量的关键因素则是宿主菌——大肠杆菌的转化效率。为了保证较高的转化效率,提高抗体库的库容,本研究采用了电穿孔技术将 svFv-pCANTAB5E 转化进入宿主菌 XL1-BLUE 细胞。最终获得了容量约为 2.2×10⁶ 的抗体库,与理论库容量[8] 有一定差距。但是,该库为免疫抗体库,抗体基因在动物体内已经

发生了有效的重排,对 ENR 有较大的抗原偏向性,因此,库容量对该免疫抗体库的影响并不明显,经过多次富集后,得到了高滴度的特异性重组噬菌体库。

3.3 抗体库的筛选策略

与建库有着同等重要的是对抗体库的筛选。噬菌体抗体库技术能够得到迅速发展,重要的一点在于它具有高效率的筛选能力。噬菌体抗体的筛选,是从大量过剩的、非特异性的克隆中连续的富集特异性抗体,这需要经过多轮的吸附-洗脱-富集的过程。筛选方法目前有多种,可根据筛选的目的不同而进行选择组合。采取恰当的抗体库筛选策略可以极大的提高 scFv 抗体的制备效率。

本研究采用了固相免疫亲和富集方法对抗体库进行富集和筛选。在众多富集方法中,该方法最为简便、快速,同时其操作条件与后期 scFv 抗体的实际应用(ELISA)最为接近,更利于筛选出应用性能良好的抗体。在抗体库的富集筛选中,展示有 scFv 抗体片段的噬菌体颗粒会特异性识别包被抗原,从而结合在微孔中,随后可以采用多种洗脱方式来收集这些噬菌体进行后续的富集。本研究采用了三乙胺高 pH 值非特异性洗脱方法,该法能够使结合在酶标板微孔中的噬菌体颗粒得到较为完全的解离。其不足之处在于洗脱产物中存在一定比例的非特异性噬菌体。特异性洗脱方法主要包括使用单克隆抗体^[16]或游离半抗原^[17]竞争洗脱 2 种方法。游离半抗原可以特异性的洗脱高亲和力抗体克隆,但高浓度的半抗原(例如抗生素)可能会影响后续的噬菌体感染大肠杆菌。而采用抗体竞争洗脱所得噬菌体克隆只能产生低于单克隆抗体亲和力的 scFv,需要进一步的体外进化才能够获得更好的亲和力^[18]。

本研究最终获得了 26 株反应性良好的 scFv 克隆,为下一步可溶性 scFv 抗体的表达纯化及免疫检测方法的建立奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 沈倍奋,陈志南,刘民培. 重组抗体[M]. 北京:科学出版社, 2005:18-97
- [2] Stone E, Hiram T, Tanha J, et al. The assembly of single domain antibodies into bispecific decavalent molecules[J]. J Immunol Methods, 2007, 318(1-2): 88-94
- [3] Kramer K. Evolutionary affinity and selectivity optimization of a pesticide-selective antibody utilizing a hapten-selective immunoglobulin repertoire[J]. Environ Sci Technol, 2002, 36(22): 4892-4898
- [4] Li T, Zhang Qi, Liu Yan, et al. Production of recombinant ScFv antibodies against methamidophos from a phage-display library of a hyperimmunized mouse[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(24): 9085-9091
- [5] Korpimäki T, Rosenber J, Virtanen P, et al. Improving broad specificity hapten recognition with protein engineering[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 4194-4201
- [6] Korpimäki T, Rosenberg J, Virtanen P, et al. Further improvement of broad specificity hapten recognition with protein engineering[J]. Protein Eng, 2003, 16(1): 37-46
- [7] Korpimäki T, Hagren V, Brockmann E C, et al. Generic lanthanide fluoroimmunoassay for the simultaneous screening of 18 sulfonamides using an engineered antibody. [J]. Anal Chem, 2004, 76(11): 3091-3098
- [8] 潘科,王弘,张宏斌,等. 抗克伦特罗噬菌体单链抗体库的构建、筛选及鉴定[J]. 华南理工大学学报:自然科学版, 2005, 33(11): 51-54
- [9] 王弘,潘科,杨金易,等. 抗克伦特罗单链抗体可溶性表达及特性鉴定[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 332-335
- [10] 雷红涛,高秀洁,潘科,等. 盐酸克伦特罗时间分辨荧光免疫检测方法的建立[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 6-10
- [11] Sepulveda J, Shoemaker C B. Design and testing of PCR primers for the construction of scFv libraries representing the immunoglobulin repertoire of rats[J]. J Immunol Methods, 2008, 332(1-2): 92-102
- [12] Rohatgi S, Ganju P, Sehgal D. Systematic design and testing of nested (RT-)PCR primers for specific amplification of mouse rearranged/expressed immunoglobulin variable region genes from small number of B cells[J]. J Immunol Methods, 2008, 339(2): 205-219
- [13] Okamoto T, Mukai Y, Yoshioka Y, et al. Optimal construction of non-immune scFv phage display libraries from mouse bone marrow and spleen established to select specific scFvs efficiently binding to antigen [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(2): 583-591
- [14] Narayanan A, Sellers B D, Jacobson M P. Energy-based analysis and prediction of the orientation between light- and heavy-chain antibody variable domains[J]. J Mol Biol, 2009, 388: 941-953
- [15] Xin Gu, Xiaoling Jia, Jiannan Feng, et al. Molecular modeling and affinity determination of scFv antibody: proper linker peptide enhances its activity[J]. Ann Biomed Eng, 2010, 38(2): 537-549
- [16] Susanna S J, Leong A, Wei Ning-chen. Preparing recombinant single chain antibodies[J]. Chem Eng Sci, 2008, 63(6): 1401-1414
- [17] Conroy P J, Hearty S, Leonard P. Antibody production, design and use for biosensor-based applications[J]. Semin Cell Dev Biol, 2009, 20(1): 10-26
- [18] Persson H, Lantto J, Ohlin M. A focused antibody library for improved hapten recognition[J]. J Mol Biol, 2006, 357(2): 607-620