

· 论著 ·

文章编号: 1007- 8738(2006) 05- 0664- 04

噬菌体抗体库固相筛选条件的初步研究

王明桥, 罗文新*, 陈瑛炜, 袁 权, 王 晋, 张 军, 夏宁邵

(福建省医学分子病毒学研究中心 厦门大学教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室, 福建 厦门 361005)

Preliminary study on the conditions of solid-phase screening phage antibody library

WANG Ming-qiao, LUO Wen-xin*, CHEN Ying-wei

YUAN Quan, WANG Jin, ZHANG Jun, XIAN Ning-shao

The Fujian Province Research Center for Molecular Virology, The Key Laboratory for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] **AM:** To explore the conditions of solid-phase screening phage antibody library and to provide the experimental basis for the design of screening project**METHODS** Diverse antibodies including HEV NE2-specific and non-specific humanized phage antibodies were used to study the screening conditions such as the binding time of phage antibodies to antigen, the concentration of coating antigen, the washing times and elution method**RESULTS** The best binding time of positive phage antibody to antigen was 1 min. The highest positive rate of screening was obtained under the conditions of washing for 20 to 30 times and pH value of the washing solution being 5. The concentration of the coating antigen had no obvious influence on the positive rate of screening. Higher positive rate was obtained by using 10 mg/L antigen to competitively elute for 1 h.**CONCLUSION:** Solid-phase screening of the phage antibody library is a very complex process, in which there are close relationship between the conditions, therefore appropriate readjustment should be made for screening conditions according to concrete conditions**[Keywords]** phage antibody library, solid-phase screening screening condition**[摘要]** 目的: 探讨噬菌体抗体库的固相筛选条件, 为筛选

收稿日期: 2005- 06- 03; 接受日期: 2005- 07- 28

基金项目: 福建省科技重大项目 (2002F013); 国家“十五”创新药物博士基金 (2003AA2Z3539); 福建省自然科学基金 (C0310005)

作者简介: 王明桥 (1981-), 男, 辽宁沈阳人, 硕士生

* Corresponding author. Tel: 0592- 2184110

E-mail: wxh10@jingxian.xmu.edu.cn

方案的设计提供实验依据。方法: 利用多种针对 HEV NE2 蛋白的特异性噬菌体人源抗体和非特异性噬菌体人源抗体, 对噬菌体抗体与抗原的结合时间、抗原包被的浓度、洗涤强度和洗脱方式等多种筛选的条件进行初步探索。结果: 阳性噬菌体抗体与抗原反应 1 min, 就可较好结合, 洗涤次数为 20~30 次、洗涤液的 pH 为 5 时, 筛选得到的阳性率最高。包被抗原的浓度对筛选的阳性率没有明显影响, 用 10 mg/L 抗原竞争洗脱 60 min, 可得到较高的阳性率。结论: 噬菌体抗体库的筛选是一个非常复杂的过程, 其中的各个条件之间有着密切的联系, 应该根据具体情况进行调整。

[关键词] 噬菌体抗体库; 固相筛选; 筛选条件

[中图分类号] Q782 [文献标识码] B

噬菌体抗体库技术一经应用, 就得到广泛的重视并飞速发展, 随之出现许多筛选策略: 如正负筛选、以功能筛选及以噬菌体感染力筛选等。虽然筛选策略很多, 筛选过程中抗体的富集效应也明显, 但阳性克隆的筛出率不高, 仍存在许多因素影响筛选的结果。如富集时非特异结合较多, 所获克隆只含轻链或重链可变区基因, 含有完整抗体可变区基因的克隆所占比例逐轮下降等^[1-2]。就这些问题经查阅国内外文献, 都没有发现好的解决办法。

我们在固相筛选过程中也遇到了类似的问题。通过用自己构建的天然人源噬菌体抗体库针对 HEV NE2 蛋白进行筛选, 得到 2 株特异性的噬菌体抗体和 15 株非特异性的噬菌体抗体。这些非特异性的噬菌体抗体都已经过序列分析, 其中包括重链可变区缺失的序列和轻链可变区缺失的序列, 他们的共同点是与抗原 NE2 的结合能力很强。

本研究试图利用这些噬菌体抗体, 对固相筛选过程中噬菌体抗体与抗原的反应时间、抗原包被的浓度、洗涤次数和洗脱条件进行选择优化, 以为今后的筛选方案的设计提供一些实验依据, 提高筛选的效率。

1 材料和方法

1.1 材料 *E. coli* TG1、质粒载体 pCANTAB-5E、辅助噬菌体 M13K07 及 HRP 标记的羊抗 M13 抗体, 均购自 Pharmacia 公司。筛选用抗原为本实验室自行表达纯化的戊肝病毒表面膜

粒蛋白 NE2^[3]。天然人源噬菌体抗体库自行构建。检测用已包被抗原 NE2 的板条、不相关抗原 sAg 的板条及封闭液板条 (不含抗原) 以及 HRP 底物 (联苯胺) 显色液, 均由北京万泰生物技术公司提供。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体抗体的制备 在自行构建的天然人源噬菌体抗体库中, 针对 NE2 蛋白筛选而得到 2 株特异性噬菌体抗体 H5Q、H52 和 15 株非特异性噬菌体抗体, 将它们单独使用或混合使用进行筛选条件的优化。这些噬菌体抗体的共同点是与抗原 NE2 的结合能力很强 (包括阳性克隆、缺失轻链或重链基因的克隆、载体片段完整却是非特异吸附的克隆)。挑单个克隆于含 6 mL 2×YT-AG 培养基的试管中, 于 37℃ 培养 6 h, 加入辅助噬菌体 M13K07, 于 37℃ 再培养 1 h, 离心收集菌体, 加 6 mL 2×YT-AK 重悬后, 于 25℃ 培养过夜。离心取上清以 PEG/NaCl 进行沉淀, 再用 TE 重悬沉淀, 即得到噬菌体抗体。

1.2.2 抗原、抗体结合时间的选择 在包被 1 μg NE2 的 ELISA 板孔中, 分别加入抗 NE2 的噬菌体抗体 (H50 和 H52) 及 15 株非特异性的噬菌体抗体, 结合时间分别为 1、10、20、30、45 min 及 1、1.5、2 h, 用 PBST 洗涤 5 次后, 加入 1:5 000 HRP-羊抗 M13 抗体, 再以 PBST 洗涤 5 次, 加 HRP 底物显色液显色并终止后, 于波长 450/620 nm 测定 A 值。

1.2.3 洗涤条件的选择 在包被 1 μg NE2 的 ELISA 板孔中, 分别加入上述类型的噬菌体抗体, 反应 2 h 后, 采用不同洗涤条件进行洗涤, 即以 PBST 洗 5 次, 以 PBS 和 PBST 各洗 5 次, 以 PBS 洗 5 次后再以 PBST 洗 10 次, 以 PBS 和 PBST 各洗 10 次, 之后同上进行噬菌体抗体的 ELISA 检测。

1.2.4 缓冲液的 pH 的选择 在包被 1 μg NE2 的 ELISA 板孔中, 分别加入上述类型的噬菌体抗体, 于 37℃ 温育 2 h, 分别采用 pH 3、4、5、6 的醋酸/醋酸钠缓冲液洗涤 10 min 后, 同上进行噬菌体抗体的 ELISA 检测。

1.2.5 抗原包被浓度对筛选结果的影响 用浓度分别为 1、2、4、6 及 8 mg/L 的 NE2 抗原包被, 加入 100 μL 混合的噬菌体抗体, 于 37℃ 温育 2 h, 然后以 PBST 和 PBS 各洗板 20 次, 加入 100 μL *E. coli* TG1, 37℃ 温育 1 h, 然后稀释 10⁵ 后涂板, 置 30℃ 培养过夜。从不同筛选条件所得的平板上各挑 96 个单菌落, 进行噬菌体抗体的竞争 ELISA 检测。

1.2.6 洗涤次数和 pH 对筛选结果的影响 在包被 1 μg NE2 的 ELISA 板孔中, 加入 100 μL 混合的噬菌体抗体, 于 37℃ 温育 2 h, 然后一组采用 PBST 和 PBS 缓冲液进行洗板, 分别以 PBST 5 次, 以 PBST 和 PBS 各 5 次; 以 PBST 和 PBS 各 10 次, 以 PBST 和 PBS 各 15 次, 以 PBST 和 PBS 各 20 次; 另一组采用 pH 分别为 2、3、4、5 和 6 的醋酸/醋酸钠缓冲液进行洗板, 每次加入板孔中静置 10 min, 扣干, 重复 3 次, 最后再用 PBS 洗涤 3 次。两组洗涤后均将孔板扣干, 加入 100 μL *E. coli* TG1 混合, 于 37℃ 温育 1 h, 然后做 10⁵ 稀释分别涂板, 置 30℃ 培养过夜。从上述两组共 10 种条件筛选后所涂的板中, 各挑 96 个单菌落, 进行噬菌体抗体的竞争 ELISA 检测。

1.2.7 抗原竞争洗脱法中抗原浓度及竞争时间对筛选结果

的影响 在包被 1 μg NE2 的 ELISA 板孔中, 每孔加入 100 μL 混合的噬菌体抗体, 于 37℃ 温育 2 h, 以 PBST 洗板 5 次, 分别加入 100 μL 浓度为 1、2、5、10 mg/L 的抗原溶液, 然后分别在 30 min、45 min 及 1 h 时, 吸出抗原和噬菌体抗体混合液, 与 100 μL *E. coli* TG1 混合, 于 37℃ 温育 1 h, 然后做 10⁵ 稀释分别涂板, 置 30℃ 培养过夜。从上述交叉共 12 种条件筛选后所涂的板中, 各挑 96 个单菌落, 进行噬菌体抗体竞争 ELISA 检测。

1.2.8 噬菌体抗体的竞争 ELISA 法检测 噬菌体抗体上清与等体积 MPBS (含 40 mL/L 牛奶的 PBS) 混合, 室温静置 30 min, 同样, 将样品与等体积含 10 mg/L NE2 抗原的 MPBS 混合, 室温静置 30 min, 各取 100 μL 加入到包被 NE2 抗原的板中反应 1 h, 以 PBST 洗涤 5 次。加入 1:5 000 HRP-羊抗 M13 抗体, 于 37℃ 孵育 1 h, 同上洗涤后, 加 HRP 底物显色液显色 15 min, 以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应后, 于波长 450/620 nm 测定 A 值。抗原竞争达到 50% 以上的克隆视为阳性, 即有抗原竞争的 A 值为无抗原竞争的 A 值 50% 以下的克隆即为阳性。

2 结果

2.1 噬菌体抗体与 NE2 抗原的结合 在包被了 NE2 的 ELISA 板中, 分别加入各种类型的噬菌体抗体, 测定 NE2 抗原与噬菌体抗体结合的时间。由表 1 可知, 随着温育时间的延长, 结合的噬菌体抗体的量逐渐增加。其中阳性噬菌体克隆 H5Q、H52 与 NE2 结合的速度很快, 1 min 时 A 值就分别达到 1.243 和 0.726。H89、NE60 及 NE61 与 NE2 的结合也较快, NE60 在 10 min 时, 即与阳性噬菌体克隆的结合不相上下, 而 H89 和 NE61 噬菌体抗体需 1 h 以上才能与阳性噬菌体克隆 H5Q、H52 有相近的 A 值。

表 1 噬菌体抗体与 NE2 抗原结合的时间依赖性

Tab 1 Time dependence of binding of phage antibodies to NE2

| Phage antibody | Binding time (min) | | | | | | | | (A _{450/620} value) |
|----------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------------|
| | 1 | 10 | 20 | 30 | 45 | 60 | 90 | 120 | |
| A36 | 0.025 | 0.143 | 0.39 | 0.467 | 0.856 | 1.117 | 2.154 | 2.795 | |
| H50 | 1.243 | 1.283 | 1.947 | 2.637 | 3.073 | 3.148 | 3.177 | 3.169 | |
| H52 | 0.726 | 0.708 | 1.157 | 1.667 | 1.866 | 1.925 | 2.670 | 2.965 | |
| H59 | 0.079 | 0.157 | 0.230 | 0.492 | 0.480 | 0.723 | 0.701 | 1.040 | |
| H85 | 0.029 | 0.089 | 0.226 | 0.469 | 0.607 | 1.071 | 1.252 | 2.002 | |
| H87 | 0.062 | 0.122 | 0.185 | 0.246 | 0.352 | 0.407 | 0.741 | 0.937 | |
| H88 | 0.051 | 0.089 | 0.282 | 0.371 | 0.406 | 0.935 | 0.890 | 1.159 | |
| H89 | 0.055 | 0.214 | 0.836 | 1.024 | 1.561 | 1.653 | 2.403 | 2.500 | |
| H94 | 0.090 | 0.173 | 0.202 | 0.283 | 0.323 | 0.448 | 0.606 | 0.757 | |
| H97 | 0.085 | 0.138 | 0.249 | 0.389 | 0.484 | 0.657 | 0.763 | 1.263 | |
| NE60 | 0.113 | 0.968 | 1.617 | 2.111 | 2.565 | 2.843 | 3.264 | 3.284 | |
| NE61 | 0.028 | 0.290 | 0.719 | 1.075 | 1.647 | 1.838 | 2.177 | 3.155 | |
| 0 | 0.041 | 0.109 | 0.387 | 0.372 | 0.705 | 0.751 | 1.393 | 2.607 | |
| 2 | 0.028 | 0.089 | 0.116 | 0.052 | 0.082 | 0.139 | 0.199 | 0.329 | |
| 3 | 0.174 | 0.229 | 0.268 | 0.341 | 0.486 | 0.722 | 0.843 | 1.540 | |

2.2 PBS/PBST 洗涤次数对筛选的影响 用单个的噬菌体抗体分别与 NE2 结合 2 h 后, 用 PBS/PBST 洗涤 5~20 次。随着洗涤次数的增加, 各种噬菌体抗体的 A 值都下降, 其中噬菌体抗体 H5Q、H59、A36 和 NE60 的 A 值下降幅度尤为显著

(表 2)。将混合的噬菌体抗体库与 NE2 结合 2 h 后, 将洗涤次数从 5 次增加至 40 次后, 分别感染 *E. coli* TG1, 用竞争 ELISA 法检测阳性噬菌体克隆的比例。结果表明, 当洗涤次数增加到 20~30 次时, 筛选的阳性率逐步升高, 而洗涤达到 40 次时, 阳性率则明显下降, 说明过多的洗涤可将特异性吸附的噬菌体抗体洗脱下来, 反而影响筛选的效果 (图 1)。

表 2 洗涤次数对噬菌体抗体与抗原结合的影响

Tab 2 The effect of washing times on the binding of phage antibody to antigen

| Phage antibody | Washing times | | | |
|----------------|---------------|-------|-------|-------|
| | 5 | 10 | 15 | 20 |
| A22 | 0.410 | 0.280 | 0.247 | 0.113 |
| A36 | 1.978 | 0.554 | 0.459 | 0.263 |
| H50 | 3.444 | 2.314 | 0.984 | 0.718 |
| H52 | 3.398 | 2.408 | 2.091 | 1.707 |
| H59 | 3.027 | 1.305 | 0.903 | 0.762 |
| H85 | 1.371 | 1.019 | 0.918 | 0.918 |
| H87 | 1.065 | 0.542 | 0.522 | 0.542 |
| H88 | 1.686 | 0.862 | 0.754 | 0.708 |
| H94 | 0.963 | 0.283 | 0.244 | 0.121 |
| H97 | 0.964 | 0.709 | 0.598 | 0.535 |
| NE60 | 3.093 | 1.554 | 1.267 | 0.825 |
| NE61 | 0.826 | 0.538 | 0.420 | 0.210 |
| 0 | 1.459 | 1.096 | 0.908 | 0.336 |
| 2 | 0.583 | 0.493 | 0.374 | 0.306 |
| 3 | 1.085 | 0.444 | 0.334 | 0.241 |

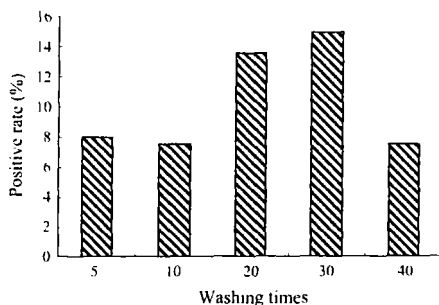


图 1 洗涤次数对筛选的阳性率的影响

Fig 1 The effect of washing times on the positive rate of screening

2.3 洗涤缓冲液 pH 对筛选的影响

用单个的噬菌体抗体分别与 NE2 结合后, 用不同 pH 的洗涤缓冲液分别洗涤 3 次。结果表明, 随着洗涤缓冲液的 pH 降低, 检测的 A 值也降低。阳性噬菌体克隆 H50 和 H52 在以 pH 5 或 pH 6 的洗涤缓冲液洗涤后, 仍然能检测到很高的 A 值, 说明此种洗涤条件对抗原抗体的解离影响不大; 而当洗涤缓冲液的 pH 降低到 4 或 3 时, 两种阳性噬菌体抗体也被大量的洗脱下来。此外, NE60 与 NE2 的非特异结合能力很强, 用 pH 4~6 的洗涤缓冲液洗涤时, 对 A 值几乎没有影响, pH 3 的洗涤缓冲液的洗涤效果也不佳 (表 3)。混合的噬菌体抗体库与 NE2 结合后, 检测洗涤缓冲液的 pH 对筛选阳性率的影响。结果表明, 洗涤缓冲液的 pH 为 5 时, 检测的阳性率最高, pH 为 6 时次之, pH 为

3 和 4 时较低。因此, 用过酸性的缓冲液洗涤时, 不能将特异性噬菌体抗体筛选出来。

2.4 抗原竞争法中抗原浓度及静置时间对筛选阳性率的影响

在包被了 $1 \mu\text{g}$ NE2 的 ELISA 板中, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 混合的噬菌体抗体, 于 37°C 温育 2 h, 以 PBST 洗涤后, 加入不同浓度的抗原溶液, 分别静置 30、45、60 min, 吸出噬菌体抗体与抗原的混合液, 感染 *E. coli* TG1 并铺板培养。各种抗原浓度及静置时间筛选所铺的板中, 分别挑取单个菌落进行噬菌体抗体的竞争 ELISA 法检测。图 2 表明, 当抗原浓度为 1 mg/L 时, 静置时间的延长对检出的阳性率没有影响; 而当抗原浓度提高时, 随着静置时间的延长, 检出的阳性率呈上升趋势, 其中抗原浓度为 10 mg/L 时, 各静置时间的阳性率均最高。

表 3 不同 pH 洗涤对噬菌体抗体与抗原结合的影响

Tab 3 The effect of washing pH on the binding of phage antibody to antigen

| Phage antibody | Washing times | | | |
|----------------|---------------|-------|-------|-------|
| | 6 | 5 | 4 | 3 |
| A22 | 0.137 | 0.096 | 0.080 | 0.075 |
| A36 | 1.432 | 1.259 | 0.767 | 0.369 |
| H50 | 3.299 | 2.924 | 0.935 | 0.200 |
| H52 | 3.279 | 2.604 | 0.820 | 0.217 |
| H59 | 2.396 | 1.623 | 1.345 | 0.909 |
| H85 | 0.866 | 0.582 | 0.444 | 0.227 |
| H87 | 1.065 | 0.45 | 0.449 | 0.360 |
| H88 | 1.578 | 1.146 | 0.841 | 0.500 |
| H94 | 0.453 | 0.36 | 0.300 | 0.229 |
| H97 | 0.652 | 0.473 | 0.328 | 0.216 |
| NE60 | 2.928 | 2.922 | 2.950 | 2.288 |
| NE61 | 1.341 | 1.292 | 1.257 | 0.530 |
| 0 | 1.189 | 0.875 | 0.786 | 0.392 |
| 2 | 0.186 | 0.164 | 0.096 | 0.099 |
| 3 | 0.700 | 0.661 | 0.330 | 0.200 |

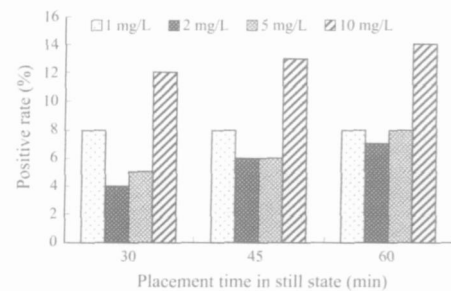


图 2 抗原浓度及静置时间对筛选阳性率的影响

Fig 2 The effect of antigen concentration and placement time in still state on positive rate

2.5 包被抗原的浓度对筛选阳性率的影响

用不同浓度的 NE2 抗原包板, 各加入 $100 \mu\text{L}$ 混合的噬菌体抗体, 于 37°C 温育 2 h 后, 用 PBST 和 PBS 各洗板 20 次, 感染 *E. coli* TG1。竞争 ELISA 法检测的结果表明, 包被抗原的浓度对筛选的阳性率没有明显的影响。

3 讨论

筛选过程中,大都将噬菌体抗体库与抗原的结合的时间定为 2 h^[4,5]。但从本研究的结果可以看出,阳性噬菌体抗体与 NE2 抗原作用仅仅 1 min, 就能达到较高的 A 值, 而且非特异的噬菌体抗体与 NE2 抗原的结合很少。但随着结合时间的延长, 就很难区分特异性和非特异性噬菌体抗体。因此, 在筛选的各轮中, 噬菌体抗体与抗原的结合时间应有所不同, 第 1 轮筛选时结合的时间应为 2 h, 第 2、3 轮筛选则可逐渐减少结合的时间, 这样便可避免一些非特异性的吸附, 从而大大提高筛选的效率。Katakura 等^[6]建立的动力学模型也表明, 阳性抗体与相应抗原结合 1 min, 就能够从抗体库中筛选出来。

洗涤是筛选过程中非常重要的一个步骤^[7]。根据噬菌体抗体库的容量和不同的筛选目的, 选择适当严谨度的筛选条件, 对筛选的效率至关重要。严谨度过高, 可使一些表达较低的克隆被筛掉, 而这些克隆中可能含有亲和性极高的目的噬菌体; 严谨度过低, 又可导致噬菌体的富集过程太慢, 筛选轮数增加^[8]。魏华等^[9]在研究中采用独特的 5 轮筛选法(逐渐降低抗原包被量, 严格洗涤条件), 得到了目的噬菌体抗体。本研究的结果表明, 随着洗涤次数的不断增多, 阳性噬菌体克隆的筛出率随之增加。但过多的洗涤反而会导致阳性率下降, 这一点与 Katakura 等^[6]的结论一致。侯云霞等^[1]也是通过降低洗涤强度(PBS 洗涤液中不加吐温), 最后才筛选出阳性克隆。

筛选过程中抗原浓度的确定也很重要。现在普遍认为, 低浓度的抗原应优先用于筛选高亲和力的抗体, 而高浓度的抗原则有利于低亲和力抗体的筛选^[10]。从我们的结果来看, 包被抗原的浓度对筛选的阳性率没有明显影响, 说明两个阳性克隆的亲合力都比较高, 所以用低浓度的抗原和高浓度的抗原都能将他们筛选出来。另外, 有一点需要注意的是, 筛选用的抗原存在一个有效的浓度, 不是所有用于包被的抗原都能有效的用于筛选, 抗原的有效浓度必须要达到一定的值。但有效抗原浓度又不能高于 10^{-6} mol/L, 此时反而会使特异性抗体的富集效果下降^[11]。

许多文献都介绍了一些新颖的筛选方法, 如采用交替洗提法^[7]、正负筛选轮流进行^[12]及用两种含有不同抗原表位的抗原轮流筛选等。我们也尝试了一种通过抗原竞争洗脱来筛选阳性噬菌体抗体的方法。此种方法的基本原理是, 通过抗原抗体反应吸附解离的动态平衡, 使那些可与抗原特异性结合的

抗体, 与板孔中的抗原及溶液中的抗原进行竞争结合, 从而达到去除大部分非特异性抗体的目的。本研究的结果表明, 竞争抗原的浓度较高时, 可提高阳性克隆的筛出率。

总之, 噬菌体抗体的筛选是一个非常复杂的过程, 各个因素之间是有着密切的联系, 如果其中一个条件变化了, 其他的条件也可能随之发生变化, 因此, 很难确定一个固定的筛选模式。例如, 如果用低浓度的抗原来进行筛选, 那么在洗涤时就应该选择一个比较弱的洗涤条件。已有研究者试图从动力学的角度出发, 分析抗原抗体反应的动态平衡过程, 并由此建立一种筛选模式, 来解决筛选效率不高的问题^[10,11]。

参考文献:

- [1] 侯云霞, 董文其, 王萍. 噬菌体抗体库技术应用中的几个问题及其对策 [J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(4): 366-368
- [2] 王琰, 刘群英, 化冰, 等. 从半合成抗体库克隆抗 TNF- α 人单链抗体 [J]. 免疫学杂志, 1999, 15(2): 87-89
- [3] Zhang JZ, Ni X, Ni NS, et al. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein [J]. *J Med Virol*, 2001, 64: 125-132
- [4] Kjaer S, Stausbol G, Ron B, Wind T, et al. Glycerol diversifies phage repertoire selections and lowers non-specific phage absorption [J]. *FEBS Lett*, 1998, 431: 448-452
- [5] Hegmans JP, Radosevic K, Voerman JS, et al. A model system for optimizing 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
- [6] Katakura Y, Zhuang GQ, Nakanishi T, et al. A practical kinetic model for efficient isolation of useful antibodies from phage display libraries [J]. *Mol Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 28: 191-200
- [7] Yu H, Dong XY, Sun Y. An alternating elution strategy for screening high affinity peptides from a phage display peptide library [J]. *Biochem Eng J*, 2004, 18: 169-175
- [8] 薛国柱, 窦科峰. 噬菌体抗体库筛选技术研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(1): 58-59
- [9] 魏华, 张建琼, 吕海芹, 等. 抗戊型肝炎病毒噬菌体抗体库的构建与筛选 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(5): 473-475
- [10] Duenas M, Mahborg AC, Ohlin M, et al. Selection of phage display antibody based on kinetic constants [J]. *Mol Immunol*, 1996, 33(3): 279-285
- [11] Xu Y, Ramsland PA, Davies M, et al. Two monoclonal antibodies to precisely the same epitope of type II collagen select non-crossreactive phage clones by phage display: implications for autoimmunity and molecular mimicry [J]. *Mol Immunol*, 2004, 41(4): 411-419
- [12] Lu J, Sloan SR. An alternating selection strategy for cloning phage display antibodies [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 228: 109-119