

· 论著 ·

文章编号: 1007 - 8738(2006)06 - 0786 - 05

多样性人源天然噬菌体抗体库的构建及初步应用

王 晋, 罗文新*, 李利峰, 陈瑛炜, 王明桥, 张 军, 夏宁邵

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

Construction and preliminary application of a human natural phage antibody library with diversity

WANG Jin, LUO Wen-xin*, LI Li-feng, CHEN Ying-wei, WANG Ming-qiao, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

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

[Abstract] **AM:** To construct a human natural phage single-chain antibody (scFv) library with diversity. **METHODS:** V_H and V_L genes were amplified by RT-PCR and hemi-PCR from peripheral blood lymphocytes of healthy persons. The V genes were assembled to form scFv by overlap PCR and cloned into phagemid pCANTAB-5E, and then transformed into E. coli TG1 by electroporation to construct a human natural phage scFv library. The diversity and gene family of antibody gene were analysed by sequencing and the specific antibodies against various antigens were screened through bio-panning. **RESULTS:** A human natural phage scFv library with diversity and 2×10^8 sink size was constructed successfully. The specific human scFvs against 5 antigens were obtained by bio-panning. **CONCLUSION:** A human natural phage scFv library with diversity is constructed successfully and can be applied to human antibody preparation.

[Keywords] human natural phage antibody library; scFv; diversity

[摘要] **目的:** 构建多样性良好的人源天然噬菌体抗体库。**方法:** 从正常人外周血中分离淋巴细胞, 以 RT-PCR 和半巢式 PCR 扩增重链可变区 V_H 基因和轻链可变区 V_L 基因, 以重叠延伸 PCR 将 V_H 、 V_L 组装成 scFv 基因, 并将其克隆入噬菌

收稿日期: 2005 - 11 - 21; 接受日期: 2006 - 03 - 17

基金项目: 福建省科技重大项目 (2002F013); 国家“十五”创新药物博士基金资助项目 (2003AA2Z3539); 福建省自然科学基金资助项目 (C031005); 厦门市科技计划项目 (3502220055002)

作者简介: 王 晋 (1978 -), 男, 浙江新昌人, 硕士

* Corresponding author, E-mail: wxluo@jingxian.xmu.edu.cn

粒载体 pCANTAB-5E 中。以 pCANTAB-5E 电转化大肠杆菌 TG1, 构建人源天然噬菌体抗体库, 测序分析抗体基因的家庭信息和多样性, 并用多种抗原对其进行筛选。结果: 获得了库容为 2×10^8 的人源天然噬菌体抗体库。分别用 5 种抗原对其进行筛选, 均可获得特异性噬菌体抗体的富集。结论: 成功地构建了一个多样性良好的人源天然噬菌体抗体库, 可用于制备具有应用前景的人源抗体。

[关键词] 人源天然噬菌体抗体库; 单链抗体; 多样性

[中图分类号] Q782 **[文献标识码]** A

库容量和多样性是衡量抗体库质量的两个重要参数。库容越大, 从中筛选得到抗体的可能性越大, 而且库容的大小与所获抗体的亲和力成正比^[1]。在抗体库的构建过程中, 大多数研究者都力求构建大库容的抗体库^[2, 3], 但是对衡量抗体库质量的另一个重要指标——抗体库多样性的关注相对较少, 抗体库多样性方面的专门报道也较少。本研究力求在抗体库的多样性方面有所突破, 即以未经免疫的健康人外周血为基因来源, 以一套被证明能扩增出所有抗体基因的 PCR 引物及自行设计的引物扩增获取全套抗体可变区基因, 从而构建了一个多样性相对良好的人源天然噬菌体抗体库, 为以后筛选各类病毒、毒素、肿瘤特异性抗原及自身免疫疾病相关抗原等, 获得特异性的人源治疗性单克隆抗体 (mAb) 奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 TG1 和 HB2151、辅助噬菌体 M13K07 及 *Not I/Sfi I* 预处理的噬菌粒载体 pCANTAB-5E, 均购自 Pharmacia 公司。淋巴细胞分离液为上海恒信化学试剂有限公司产品。Trizol 试剂购自 Roche 公司。AMV 和 RNasin 等反转录系统购自 Promega 公司。mRNA Purification Kit 购自 Amersham 公司。随机六聚体、*Not I/Sfi I* 等限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶及 DL 2 000 DNA marker, 均购自 TaKaRa 公司。T4 DNA 连接酶购自华美生物工程有限公司。TG1 Electroporation-Competent Cells 购自 Stratagene 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。Expression Module/RPAS 和 HRP-anti-M13 mAb 均为 Amersham 公司产品。HTLV ENV166^[4]、HM ENV18、TP17、sAg、NE2 等 5 种抗原^[5-8],

由本实验室表达并纯化。寡核苷酸引物由上海博亚公司合成。

1.2 方法

1.2.1 人淋巴细胞 cDNA 的合成 抽取 20 例未经免疫健康人的外周血, 用淋巴细胞分离液常规分离其淋巴细胞, 共获得 1×10^9 个细胞。按 Trizol 说明书所述提取总 RNA, mRNA 的分离纯化按 Amersham mRNA Purification kit 所述操作, 最后以得到的 mRNA 为模板, 以随机六聚体为引物反转录合成第 1 链 cDNA。

表 1 半巢式 PCR 引物 Tab 1 The primers for hemi-nest PCR

Primer	Sequences of primers	Remarks
hIgG1R	5'-ggA TCC TCT AgA TTT ACC Cgg AgA Cag g-3	Primers of amplifying C _H gene of human IgG1
hIgG2R	5'-TC _H TATCCACgA gggTCC-3	Primers of amplifying C _H gene of human IgG2
hIgG3R	5'-CTCTCTTgTCCACCTTgT-3	Primers of amplifying C _H gene of human IgG3
hKCR	5'-ggA TCC TCT AgA ACA CTC TCC CCT gTT g-3	Primers of amplifying human C _K gene
hLCR	5'-CATTCATgAgACACACCT-3	Primers of amplifying human C gene

1.2.3 V_H 和 V_L 基因的 PCR 扩增 (1) 直接 PCR 扩增 V_H 和 V_L 基因: 以第 1 链 cDNA 为模板, 将 V_H 基因的 5 端引物和 V_H 基因的 3 端引物两两配对, 共组成 42 个引物对, 将 V 和 V 基因分别组成 12 对和 18 对引物进行扩增。扩增条件为: 94 1 min, 55 1 min, 72 1 min, 共 33 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后回收纯化。(2) 半巢式 PCR 扩增 V_H 和 V_L 基因: 将扩增 C_H 基因的引物 (hIgG1R、hIgG2R 和 hIgG3R) 等摩尔比混合, 作为 1 条下游引物使用。然后分别以扩增 V_H 基因 5 端的 7 条引物与之配对, 以第 1 链 cDNA 为模板, 扩增 V_H 基因。再以扩增产物为模板, 以相应的扩增 V_H 基因 5 端的引物和 6 条扩增 V_H 基因 3 端的引物组成的引物对, 进行第 2 次 PCR 扩增。同样, 对 V 和 V 基因也进行半巢式 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 条件为: 94 5 min, 94 1 min, 50 1 min, 72 1 min, 共 30 个循环。第 2 轮 PCR 的复性温度改为 55, 其余与第 1 轮 PCR 的条件相同。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后回收纯化。

1.2.4 噬菌体抗体库的构建与鉴定 (1) 抗体库的构建: 将所有回收的 V_H 基因片段混合即得到 V_H 基因库, 同样将回收的 V 和 V 基因片段混合后即得到 V_L 基因库, 然后用重叠延伸 PCR 法, 分别在 V_H 基因的 3 端、V_L 基因的 5 端加上连接体 (Linker), 形成 V_H-linker 基因片段和 V_L-linker 基因片段, 再将这两个基因库等摩尔混合, 互为引物及模板, 在新的 PCR 系统中进行重叠延伸, 即得到完整的 scFv 基因片段。然后以完整的 scFv 基因片段为模板, 进行 PCR 大量扩增, 即得到 scFv 基因库。将回收纯化的 scFv 基因产物经 *Not I*/*Sfi I* 双酶切后克隆入噬菌粒载体 pCANTAB-5E 中, 并以连接产物电转化大肠杆菌 TGI。将转化菌涂布于含 50 mg/L 氨苄青霉素 (A) 和 20 g/L 葡萄糖 (G) 的 2 ×YT-AG 平皿上, 于 30 培养过夜, 次日, 用含 100 mL/L 甘油的 2 ×YT 液体培养基收集菌体, 保存于 -80。取 10 μL 转化产物适度稀释后, 涂布于 2 ×YT-AG 平皿上, 于 30 培养过夜, 次日根据长出的菌

1.2.2 引物设计 采用 Bradbury 等^[9]报道的扩增人抗体可变区基因的引物序列, 其中扩增 V_H 基因 5 端的引物 7 条, 扩增 V_H 基因 3 端的引物 6 条, 扩增 V 基因 5 端的引物 4 条, 扩增 V 基因 3 端的引物 3 条, 扩增 V 基因 5 端的引物 9 条, 扩增 V 基因 3 端的引物 2 条。在扩增 V_H 基因 5 端引物中加入 *Sfi* 酶切位点, 在扩增 V 基因和 V 基因 3 端引物中加入 *Not* 酶切位点。在此基础上, 另外设计了 5 条半巢式 PCR 引物 (表 1)。

落数目计算库容。(3) 抗体库的重组率鉴定: 随机挑取 20 个单菌落, 培养后提取质粒, 经 *Hind III*/*Not I* 双酶切后, 进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 scFv 基因的插入率。(4) 抗体基因多样性的检测: 随机挑取 10 个单菌落, 进行 PCR 扩增并回收 scFv 基因片段。然后用 *Bst*NI 酶切, 酶切产物进行 120 g/L 的 PAGE, 分析其多样性。随机挑选 60 个正确插入的单菌落进行测序, 用 DNASTAR 软件包里的 Editseq 软件分析、翻译所得序列, 用 Blastp 分析序列的同源性, 并与 VBASE2 数据库 (<http://www.dnaplot.de/vbase2/>) 和 MGT-VQUEST 数据库 (<http://imgt.cines.fr/>) 比对, 以获取抗体基因的家系信息。

1.2.5 噬菌体抗体库的筛选 取适量抗体库菌液加入到 500 mL 的 2 ×YT-AG 培养基中, 于 37 振荡培养至 A₆₀₀ = 0.5 时, 用 M13K07 辅助噬菌体感染, 于 37 振荡 1 h, 然后离心收集菌体, 用 500 mL 2 ×YT-AK (含 50 mg/L 氨苄青霉素和 100 mg/L 卡那霉素) 重悬沉淀, 于 25 培养过夜。离心收集菌体, 将上清以 PEG/NaCl 沉淀后, 再用 50 mL TE 重悬沉淀, 经孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤, 测定其 CFU, 即得到人源噬菌体抗体库。将噬菌体抗体库与等体积 MPBS (40 g/L 脱脂奶粉溶于 PBS) 等体积混合, 室温下静置 30 min。将混合液加入到包被有 10 mg/L 纯化抗原的 ELISA 板中, 每孔 100 μL, 于 37 放置 2 h, 用 PBST (pH 7.2) 洗板 9 次, 再用无菌 PBS 洗 3 次。每孔加入 100 μL 对数生长期的 *E. coli* TGI, 于 37 温育 1 h, 回收已感染噬菌体的 *E. coli* TGI, 涂布于 2 ×YT-AG 平板上, 于 30 培养至形成可见菌落。刮取平板上的菌落再次培养, 进行下一轮的筛选。在第 2~3 轮筛选时, 抗原的包被浓度由 10 mg/L 逐渐降低为 5 mg/L 及 2 mg/L, 同时 PBST 和 PBS 的洗涤次数逐渐增加, 其余操作相同。如此经过 3 或 4 轮吸附洗脱扩增的筛选过程, 便可富集到特异性噬菌体抗体。

1.2.6 噬菌体抗体的 ELISA 检测 取每轮筛选后得到的噬菌体培养上清, 等体积加入 ELISA 封闭液, 混匀, 室温静置 30 min。取 100 μL 加入到已包被相应抗原的 ELISA 板条中, 于 37 孵育 2 h, 以 PBST 洗涤 5 次。加入 1 8 000 的 HRP 抗

M13抗体,于37℃孵育1h,同上洗涤后,加底物TMB溶液显色15min,以2mol/L H₂SO₄终止反应,测定A_{450/630}值。

2 结果

2.1 抗体V区基因的扩增 从20个健康人PBMC获得20份第1链cDNA为模板,对每1份cDNA模板分别进行抗体V区基因的扩增。将扩增V_H基因5'端的引物和3'端的引物两两配对,共组成42个引物对,将V_H和V_L基因分别组成12对和18对引物,分别进行直接PCR。结果发现,以来自不同个体的cDNA为模板,扩增的12个V_H基因的产物令人满意;而对于V_H和V_L基因而言,以不同cDNA为模板得到的扩增产物有所差异,在总共60对引物中,直接PCR累计不重复有56对引物PCR扩增到目的基因,另外4对引物始终未得到目的基因片段。其中有一部分反应得到的目的基因片段的机率很高,而有一部分反应得到的目的基因片段的机率较低。图1显示的是部分经直接PCR扩增的人抗体V区基因,V_H基因片段为350bp左右,V_L和V_κ基因片段约为320bp左右。为了提高抗体V区基因的扩增效率,尤其是保证稀有基因的获得,我们进一步采用半巢式PCR,即以扩增V区基因5'端的引物与位于3'端的C区基因的引物进行第1次扩增,再以其产物为模板,以扩增V区基因5'端和3'端的引物进行第2次扩增。结果累计以72对引物进行的半巢式PCR全部为阳性。由图2可知,与直接PCR相比,在半巢式PCR中,第8、9、19及24号引物对的扩增频率分别由0%提高到了20%、20%、60%及80%。另外,有18对引物在半巢式PCR中的扩增频率明显高于直接PCR。其中,第36号引物对的扩增频率由20%提高到100%(增加了5倍);第23和32对引物的扩增频率由40%提高到80%(增加了2倍)。

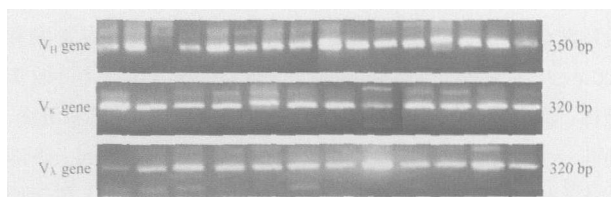


图1 人抗体V基因的部分直接PCR扩增产物

Fig 1 Direct PCR products of V genes of human antibody

2.2 scFv基因的组装和扩增 采用SOE-PCR法将V_H和V_L基因组装成scFv基因,V_H和V_L基因之间以(GGGG)₃基因序列连接。SOE-PCR的好处在于可将重组过程放在体外进行,不但实验过程大大简化,能更好的监控组装的成功率,同时也能使抗体V_H和V_L基因的组装产生scFv基因的多样性最大化。用PCR法分别在V_H基因的3'端和V_L基因的5'端加上连接体(linker),形成V_H-linker基因片段和V_L-linker基因片段。再将这两个基因库等摩尔混合,互为引物及模板,在新的PCR系统中进行重叠延伸,即得到完整的scFv基因片段。然后以完整scFv片段为模板,进行PCR大量扩增,最终得到约750bp的scFv基因片段,同预期的结果相符。

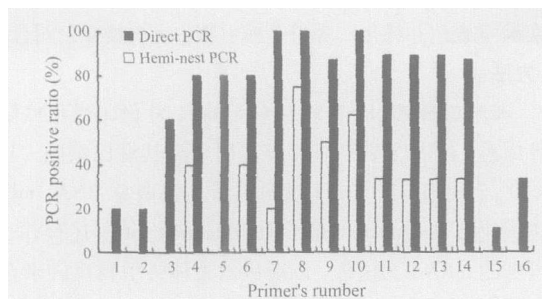


图2 直接PCR与半巢式PCR扩增效果的比较

Fig 2 Comparison of amplification efficiency between the direct PCR and the hemi-nest PCR

1: hVH5F/hVH4/5R; 2: hVH5F/hVH3R; 3: hVH10F/hVH1/2R; 4: hVH10F/hIgM R; 5: hVH10F/hIgG R; 6: hVH14F/hVH4/5R; 7: hVH14F/hIgG R; 8: hVK1F/hVK2/4R; 9: hVK1F/hVK5R; 10: hVK9F/hVK5R; 11: hVL1F/hVL1/2R; 12: hVL38F/hVL1/2R; 13: hVK9F/hVL1/2R; 14: hVL15F/hVL1/2R; 15: hVL7/8F/hVL7R; 16: hVL11F/hVL7R. Positive rate of PCR: amplified times of target genes/total amplified times

2.3 抗体库的构建和鉴定 将最终得到的scFv基因片段经Sfi I/Not I双酶切,胶回收纯化及定量后,连接至经Sfi I/Not I预处理的噬菌粒载体pCANTAB-5E中,电转化E. coli TG1,构建抗体库。自制电感受态效率在1×10⁹~1×10¹⁰转化子/μg超螺旋质粒DNA之间,连接物的转化效率保持在10⁷转化子/μg连接物,累计经过近百次电转,所获抗体库的库容为2×10⁸。随机挑取20个单菌落提取质粒,以Hind III/Not I双酶切鉴定重组率,结果有19个质粒插入scFv基因片段,抗体库的重组率为95%。随机挑选10个质粒,将以PCR扩增的scFv基因回收后,经BstN I酶切后,进行120g/L的PAGE分析表明,所挑选的10个质粒的酶切图谱各不相同,说明抗体库的基因多样性良好(图3)。

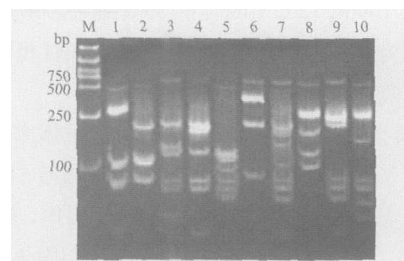


图3 scFv基因的BstN I酶切鉴定

Fig 3 BstN I digestion analysis of scFv gene

M: DNA DL 2 000 marker; 1 - 10: Randomly chosen 10 recombinant plasmids

2.4 抗体基因的序列分析 从库中随机挑取若干单个菌落进行测序,最终得到了61条基因序列。这些序列的BLAST结果表明,它们都是由人抗体V区基因组成的scFv基因序列。DNASTAR分析结果表明,其中有46条为翻译完全正确的scFv序列,占所测得序列的75.4%。将这些序列与MGTVQUEST数据库比对,以获得抗体基因家族的信息(V gene family),结果如图4所示。所获重链基因包含了IGHV1~

IGHV6家系、IGHD1~IGHD6家系及IGHJ1~IGHJ6家系,轻链基因家族包含了IGKV1~IGKV6家系、IGKJ1~IGKJ5家系、IGLV1~IGLV3、IGLV6、IGLV8家系及IGLJ1、IGLJ3家系。

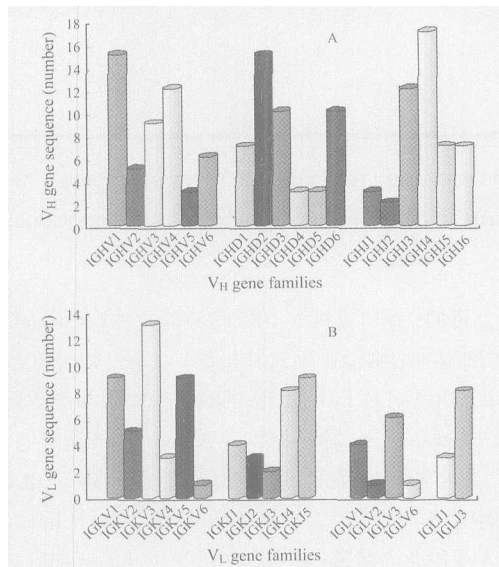


图 4 构建的天然人源噬菌体抗体库中基因家族的分布

Fig 4 Distribution of V gene families in the constructed natural human phage antibody library

A: Gene families of IGHV, IGHJ and IGHG segments; B: Gene families of IGKV, IGLV, IGKJ and IGLJ segments

2.5 天然人源噬菌体抗体库的初步应用 为了进一步验证抗体库的质量,采用固相筛选法,针对本实验室制备的5种抗原进行特异性人源噬菌体抗体的初步筛选。经3或4轮筛选,噬菌体抗体的收获率呈明显增加的趋势。随着筛选轮数的增加,噬菌体抗体的ELISA活性也呈逐步上升趋势(图5)。

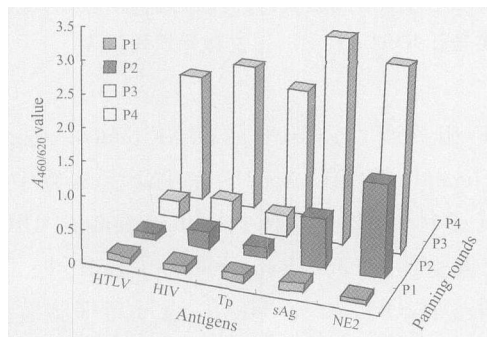


图 5 以 5 种抗原对噬菌体抗体库筛选结果的 ELISA 检测

Fig 5 Detection of results of phage antibody library screened with 5 antigens by ELISA

3 讨论

抗体库的多样性是衡量抗体库质量的一个重要指标,与抗体基因的来源、扩增引物、抗体基因的PCR及抗体组装方式等因素直接相关。天然人源噬菌体抗体库的基因源自人天然抗体基因,由于很难得到完全不经免疫的个体,而且不同个体的初始B

细胞的种类及数量也不一样。为了消除人个体的差异,尽可能获得最大的抗体遗传信息,样本的来源需要有一定的代表性。我们在参考国外同类型研究的基础上(国外一般是2~4人,最多可达43人)^[10],以20位未经免疫的健康人的外周血作为人天然抗体基因的来源。此外,一个B细胞克隆含有一种抗体基因,而且不同的B细胞克隆表达的mRNA的丰度也不相同。本研究获得的PBMC达10⁹个,这样既提高了抗体基因的多样性,又增加了抗体mRNA的相对丰度,为构建一个高质量的天然抗体库奠定了基础。

PCR引物与抗体库的多样性密切相关,引物设计不当就可能某个或某些抗体家族的基因的丢失,从而大大降低库的多样性。在实验中我们发现,仅使用直接PCR法扩增抗体基因的效果并不尽如人意。在72对引物中,有一部分反应得到的目的基因片段的机率很高;而有一部分反应得到的目的基因片段的机率较低,有4对引物始终未得到目的基因片段。而半巢式PCR的引入则可大大增加获得抗体家族V区基因机率,结果累计72对引物的半巢式PCR全部为阳性,其中有18对引物在半巢式PCR中的扩增频率明显高于直接PCR,这可能是因为某些抗体的mRNA量太少以至一次直接PCR难以成功。考虑到半巢式PCR的局限性——有可能导致抗体多样性的减少,我们采用了直接PCR和半巢式PCR相结合的方式共同扩增抗体V区基因,使获得的抗体基因在质量和数量上都得到保证。虽然PCR扩增出的基因片段十分明显,也不代表能扩增出所有的V基因。我们从抗体库中随机挑取的若干个单菌落的测序结果与VBASE2数据库和MGT-VQUEST数据库比对,发现这些序列几乎涵盖了现有已知所有重链基因家族和大部分轻链基因家族,使抗体基因的多样性得到保证。不同抗体家族所获序列数目的不一致,一方面反映了抗体基因的使用频率的差异,另一方面也可能是受到PCR过程的影响。

用5种不同的抗原对该抗体库进行筛选,经3或4轮筛选之后,用ELISA法检测噬菌体抗体的多样性得到显著提高,说明针对每一种抗原的噬菌体抗体都得到了特异性富集。本研究成功地构建了一个多样性良好人源天然噬菌体抗体库。

天然抗体库的优点在于所获抗体基因都在体内经过重排,100%的具有活性^[1]。本研究中构建的天然人源噬菌体抗体库,虽然受到抗体基因获取方法

(下转 793页)

究发现,其可诱导肿瘤细胞凋亡使肿瘤消退,激活细胞内的 caspase、NF B 和 JNK/p38 等^[10,11],并与化疗药物具有协同作用,与 TRAL 具有相似的生物学活性及信号传导机制。caspase 8 的抑制剂可显著抑制 mAb mDRA-6 诱导的 Jurkat 细胞凋亡,提示 mAb mDRA-6 可能具有类似 TRAL-8 的作用和机制。与 rhTRAL 相比较,TRA-8 对正常肝细胞无毒性,可能具有比 rhTRAL 更好的抗肿瘤应用前景。

以上表明,mDRA-6 是一种具有诱导肿瘤细胞凋亡活性的抗人 DR5 的功能性 mAb,将其人源化改造后可有效地用于肿瘤的治疗,为 TRAL/DR5 系统的抗肿瘤应用提供一种新的生物治疗制剂。另外,对其空间构象的研究可用于探讨 DR5 的功能结构域,进一步阐明 DR5 与 TRAL 相互作用的分子机制。

参考文献:

- [1] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. *Immunity*, 1995, 3(6): 673 - 682.
- [2] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al The receptor for the cytotoxic ligand TRAL[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 111 - 113.
- [3] LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAL and its death and decoy receptors [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(1): 66 - 75.

- [4] Ichikawa K, Liu W, Zhao L, et al Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocytotoxicity[J]. *Nat Med*, 2001, 7(8): 954 - 960.
- [5] Truneh A, Sharma S, Silverman C, et al Temperature-sensitive differential affinity of TRAL for its receptors DR5 is the highest affinity receptor[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 23319 - 23325.
- [6] Lawrence D, Shahrokhi Z, Marsters S, et al Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAL versions[J]. *Nat Med*, 2001, 7(4): 383 - 385.
- [7] 林菊生. 现代细胞分子生物学技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 973 - 974.
- [8] Lee HW, Lee SH, Lee YW, et al homomeric and heteromeric interactions of the extracellular domains of death receptors and death decoy receptors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(4): 1205 - 1212.
- [9] Takeda K, Yamaguchi N, Akiba H, et al Induction of tumor-specific T cell immunity by anti-DR5 antibody therapy[J]. *J Exp Med*, 2004, 199(4): 437 - 448.
- [10] Choi C, Kutsch O, Park J, et al Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces caspase-dependent interleukin-8 expression and apoptosis in human astrogloma cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(3): 724 - 736.
- [11] Ohtsuka T, Buchsbaum D, Oliver P, et al Synergistic induction of tumor cell apoptosis by death receptor antibody and chemotherapy agent through JNK/p38 and mitochondrial death pathway[J]. *Oncogene*, 2003, 22(13): 2034 - 2044.

(上接 789 页)

及组装过程的影响,但正确组装及翻译的序列所占比例为 75.4%,说明功能性抗体的比例较高。近來有研究者利用 Cre/loxP 定位重组系统^[11],通过细胞内重组,有效地避开了转化效率的制约,成功地解决了抗体容量的难题。目前,我们正在做这方面的尝试,即在保证库多样性的基础上再扩大库容,以期获得更为理想的超大容量的抗体库。

参考文献:

- [1] Sheets MD, Amersdorfer P, Finnem R, et al Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6157 - 6162.
- [2] Zhang MY, Shu Y, Phogat S, et al Broadly cross-reactive HIV neutralizing human monoclonal antibody Fab selected by sequential antigen panning of phage display library[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 283: 17 - 25.
- [3] Hust M, Dubel S. Mating antibody phage display with proteomics[J]. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(1): 8 - 14.
- [4] 张军,王颖彬,徐颖潇,等. 中国 HTLV-I env 基因的克隆及 I

I 型嵌合基因的原核表达与抗原活性的检测 [J]. *病毒学报*, 2001, 17(1): 38 - 42.

- [5] Zhang JZ, Ng M, Xia 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.
- [6] Le SW, Zhang J, Xia NS, et al The Study of Aggregate of the ORF2 Peptide of Hepatitis E Virus Expressed in *Escherichia coli*[J]. *Chin J Biotechnol*, 2002, 18: 463 - 467.
- [7] In SW, Zhang JZ, Zhuang H, et al A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus [J]. *J Vaccine*, 2001, 19: 3726 - 3732.
- [8] Ge SX, Zhang J, Xia NS, et al The immunoprotect study of a hepatitis E virus ORF2 peptide expressed in *E. coli*[J]. *Acta Microbiol Sinica*, 2003, 43: 35 - 42.
- [9] Sblattero D, Bradbury A. A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions[J]. *Immunotechnology*, 1998, 3: 271 - 278.
- [10] Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, et al Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library[J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 309 - 314.
- [11] 赵爱志,彭建强,曹晖,等. 抗人 SARS 病毒单链抗体库的构建 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(4): 449 - 455.