

综述

## 抗体库的起源、发展及应用前景

戴和平

中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

**摘要:** 抗体是高等动物特异性免疫应答反应所产生的免疫球蛋白, 负责特异抗原的识别和清除。抗体不仅是机体抵抗病原体入侵的强大武器, 也是基础科学研究中用于特异性分子识别的专用工具。抗体分子的多样性导致了抗体库概念的产生, 让我们认识到每个高等生物个体都是一个天然的抗体库。在后基因组时代, 为了适应各种“组学”研究, 特别是为了蛋白质组学研究的高通量技术需求, 在噬菌体展示技术平台的基础上, 构建了各种基因工程抗体库和抗体替代物库。但现在越来越多的其他展示技术如核糖体展示、mRNA 展示等体外展示技术也被用于抗体库的研究, 而且表现出了相比于噬菌体展示更多的优势。以下根据目前最新发表的有关综述文章和学术论文, 对抗体库的起源、发展及应用前景给予粗略的描述, 为读者提供最新的参考文献, 通过分析目前存在的问题, 论述了抗体库技术的应用前景和发展趋势。

**关键词:** 抗体库, 噬菌体展示, 蛋白质组学, 高通量, 框架蛋白

## Genesis, development and application prospect of antibody library: a review

Heping Dai

State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

**Abstract:** Antibodies are immunoglobulins specifically introduced by immunity response of high animals, with the responsibility for recognising and cleaning out specific antigens. Antibody is not only a powerful weapon against pathogen invasion in the organism, but also a tool for specific molecular recognition used in basic scientific research. The diversity of antibody molecules resulted in the concept of antibody library; each individual animal is a natural antibody library. In the post-genome era, in order to fit various “omics”, especially for proteomics requirement of high throughput technology, some gene engineering antibody libraries and antibody alternative libraries have been constructed based on phage display technology. Yet, more and more *in vitro* display systems such as ribosome display, mRNA display have been used for antibody library study, and that present more advantages than phage display. This mini review outlines the genesis, development and application prospect of antibody libraries according to the published reviews and research articles, and offers up to date development and application prospect of antibody library technology.

**Received:** December 22, 2010; **Accepted:** March 16, 2011

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 20977108, 21037004).

**Corresponding author:** Heping Dai. Tel: +86-27-68780716; E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 20977108, 21037004) 资助。

**Keywords:** antibody library, phage display, proteomics, high throughput, scaffold

## 1 抗体库的起源及抗体库技术的发展

自从 Susumu Tonegawa<sup>[1]</sup> (利根川进, 日本学者) 阐明了产生抗体多样性的分子机制, 获得了 1987 年的诺贝尔医学奖后, 人们逐渐意识到每个高等生物个体实际上就是一个抗体库。一般哺乳动物的抗体基本单体结构是由两条重链和两条轻链组成, 每条重链或轻链又是由可变区和恒定区组成。编码抗体可变区的 V 基因和恒定区的 C 基因位于染色体 DNA 中的不同区域, 在淋巴细胞的分化过程中, 这些抗体基因片段能在染色体基因组内进行重排, 形成各种各样的抗体重链或轻链基因, 然后转录并翻译成完整的抗体重链和轻链。据估计, 在小鼠中, 经由基因重排、随机组合和体细胞突变所产生的抗体多样性可以达到  $10^9 \sim 10^{11}$ 。这些多样性的抗体组合存在于每一个个体中, 这就是抗体库最基本的来源<sup>[2]</sup>。

每一种 B 淋巴细胞只携带一种抗体基因, 没有经历特异抗原刺激的 B 淋巴细胞处于静息状态。只有当外源抗原与特异性 B 细胞受体相互结合, 启动一系列信号传导和代谢变化后, 才能导致特异性 B 细胞增殖和分化, 产生分泌型 B 细胞, 分泌特异抗体, 同时也产生记忆 B 细胞, 持续保留, 以备在二次免疫应答时, 快速产生特异性抗体。

传统的多克隆抗体的制备技术, 是将动物个体作为现成的抗体库, 通过纯化的抗原, 诱导特异性 B 淋巴细胞的增殖, 产生大量的特异识别抗原的特异性抗体。由于一个抗原可能存在不止一个抗原决定簇 (4~6 个氨基酸组成一个抗原决定簇), 因此该抗原所诱导的特异性 B 细胞可能是由不同种类的 B 细胞组成的细胞群, 所产生的抗体可能不是一种, 而是多种可以识别该抗原上不同抗原决定簇的多种抗体, 所以这种抗体称为多克隆抗体。

单克隆抗体的制备技术, 是将特异抗原免疫后的小鼠 B 淋巴细胞从动物体内取出来, 再与人类肿

瘤细胞融合, 然后分离单细胞株, 用 ELISA 方法鉴定分泌特异结合抗体的单克隆杂交瘤细胞, 从而获得单克隆抗体细胞株。单克隆抗体技术的优势是将抗体库从动物体内取出, 在离体状态下操作, 是现代抗体库技术的前奏。

基因工程抗体库的构建, 是在 1985 年噬菌体展示技术<sup>[3]</sup>建立之后的 1990 年开始的<sup>[4]</sup>。噬菌体展示技术的最大优点是将外源蛋白的基因型和表达型有机地结合在一个噬菌体上, 使得目的蛋白及其基因可以通过与固相化的配体相互作用而得到选择, 通过再次感染大肠杆菌而得以扩增。目前噬菌体展示技术已成功地应用于各种抗体库的构建, 该技术可以不经动物免疫, 直接从动物的脾脏、外周血和骨髓中提取淋巴细胞的 mRNA, 转录成 cDNA, 再用专门设计的引物, 利用 PCR 技术, 将编码抗体的可变部分的基因扩增出来, 与编码噬菌体外壳蛋白 P3 的基因偶联, 以融合蛋白质的形式在噬菌体表面展示, 如此而构建高容量的噬菌体展示抗体文库。其特异抗体的选择模拟了自然免疫系统, 用固相化的抗原从噬菌体展示抗体文库中选择特异性亲和吸附的噬菌体抗体, 然后将特异性吸附的噬菌体再感染大肠杆菌, 得以扩增。这样, 经过几轮吸附-洗脱-扩增的亲选择和吸附的噬菌体抗体就会得到大大的富集, 达到从抗体库中分离出来的目的。噬菌体展示抗体库技术明显优于单克隆抗体杂交瘤技术, 使特异性单克隆抗体的获取更方便、更省时省力; 可被高通量自动化操作, 也可被工厂化生产, 被认为是最具有发展潜力的、可与蛋白质组学配套、为抗体芯片制备提供充足抗体资源的技术。噬菌体展示技术现在已扩展到细胞表面展示技术, 如细菌、酵母、人细胞等的表面展示。还有最小单位的展示系统, 如 mRNA 展示、DNA 展示系统等, 都是将一个蛋白的基因型和表达型直接地连为一体。由于这类展示系统靠体外转录和翻译系统

进行蛋白表达,靠 PCR 技术对目的抗体基因进行扩增,不需要宿主细胞,所以克服了宿主细胞的局限性,可以使抗体库的多样性达到  $10^{12}\sim 10^{14}$ 。这些不同的展示系统可以统称为分子展示,在 Gröwall 和 Ståhl 综述<sup>[5]</sup>中有较详细的描述,本文不再赘述。表 1 是对目前主要用于抗体库构建的各种分子展示系统的简单归纳,并没有完全包括所有的展示系统。

表 1 各种分子展示系统

Table 1 Various molecular display system

Molecular display systems	Expressing hosts	References
Phage display	<i>Escherichia coli</i>	[6]
<i>Escherichia coli</i> surface display	<i>Escherichia coli</i>	[7]
Staphylococcal surface display	<i>Staphylococcus</i>	[8]
Yeast display	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[9]
Human cell display	HEK 293T cell	[10]
Ribosomal display	Cell free system	[11]
mRNA display	Cell free system	[12], [13]
DNA display	Cell free system	[14]
Covalent DNA display	Cell free system	[15]
Microbead display	Artificial synthetics	[16], [17]

还有一种类似于酵母双杂交模式的抗体库技术,称为胞内抗体库,其抗体的表达和筛选在细胞内进行。首先通过基因操作,将目的抗原与一种蛋白的 DNA 结合域融合,将其 cDNA 转入酵母细胞中,以此作为钓饵;另一方面,将这种蛋白的激活域与抗体库的单链抗体融合,将其 cDNA 也转入酵母细胞中。当抗体库中某个抗体可以与目标抗原相结合时,就会导致该细胞成活,进而导致该特异性识别抗体得到表达和纯化。因为胞内抗体 (Intrabody) 的筛选是在细胞内进行的,所以保证了所获得的抗体都具有生物功能<sup>[18]</sup>。

## 2 抗体库的种类

在临床大量使用的多克隆抗体和单克隆抗体多为免疫球蛋白 IgG1 形式,其完整天然抗体是由 2 条重链和 2 条轻链所组成,分子量约为 150 kDa。由于

分子量较大,在一些方面的应用受到了限制,如较低的组织穿透性(肿瘤),或者无法与某些小裂隙中的分子表面结合(HIV 包膜糖蛋白)等。抗体的可变部分是特异识别抗原的结构域,只占完整抗体的一小部分,抗体工程就是利用基因工程技术,将编码抗体的这一小部分基因克隆,其优势之一是可以制造小分子量的抗体,以解决天然抗体无法解决的问题。目前分子展示抗体库的类型主要是由鼠源、人源或骆驼等其他动物来源的抗体片段组成,如单链抗体(Single chain fragment of variable, ScFv),是由一个柔软的小肽连接重链和轻链的可变区,组成一个单链多肽,分子量约在 28 kDa 左右;再就是 Fab 抗体,主要由重链和轻链的可变区和部分恒定区组成,分子量约 54 kDa 左右;还有单独重链或单独轻链的可变区,分子量约 15 kDa 等等。这些抗体片段具有与天然抗体一样的抗原识别特异性,一样的亲合力(Affinity),但是由于它们都是单价位与抗原结合,因此它们与抗原的亲合结合力(Avidity)比天然抗体弱。通过基因工程技术,实现了两价至多价的小抗体片段组合体;或将抗体的恒定区 Fc 片段与小分子抗体可变区片段连接,使鼠源的抗体人源化,恢复其协同体内其他免疫分子和细胞清除外源抗原的能力,并提高其稳定性,这方面的研究综述可参考文献[19]和[20]。

有的抗体库来源于经特异抗原免疫过的动物,这样的抗体库中具有大量已经诱导的特异性抗体,可有效地针对目的抗原选择高亲和力的特异性抗体。但是其局限性也是显而易见的,这样的抗体库的应用范围比较窄,必须针对不同的抗原构建不同的抗体库。为了扩大抗体库的使用范围,有的抗体库来源于非免疫过的动物。一般而言,构建天然抗体库需要从未经特异性免疫过动物的骨髓干细胞、外周血淋巴细胞和脾脏 B 细胞中获取抗体可变区的 mRNA<sup>[21]</sup>。因为在骨髓中分化成熟的 B 淋巴细胞在进入外周血前,已经通过某种机制,将能识别自身抗原的 B 淋巴细胞杀死,从而避免自身免疫疾病的

发生<sup>[2]</sup>。为了提供抗体的多样性,避免某些抗体的过量存在,必须选用未免疫过的动物,并将其骨髓中的 B 淋巴细胞也要提取出来,才能保证抗体的多样性。天然抗体库的库容量需要达到  $10^9 \sim 10^{10}$  以上,才能保证抗体的多样性在理论意义上满足各种抗原特异性抗体的淘选,因此天然抗体库构建的工作量很大,但是应用范围较广泛。大容量天然抗体库特别适用于一些用传统多克隆和单克隆抗体技术无法获取的抗体,比如识别高度物种保守的蛋白序列的抗体,或识别有毒抗原的抗体,或仅识别不同连接键、而氨基酸序列完全相同的抗原结合位点,等等。大容量天然抗体库结合高通量技术,在蛋白质组学研究领域具有强大的应用前景<sup>[22]</sup>。抗体-抗原结合的特异性取决于结合区域的空间构象,主要与抗体重链和轻链的可变区中的 3 个互补决定区 (Complementarity determining region, CDR) 环状结构的氨基酸序列有关。将 CDR 区的编码基因序列进行计算机设计,对其进行随机突变,但是保留 CDR 区外的框架结构不变,可以大大提高抗体库的多样性,这种通过人工操作增加抗体多样性所构建的抗体库称为人工合成抗体库<sup>[20,23]</sup>。

目前,出现了各种各样非免疫球蛋白的抗体替代物。这些抗体替代物在一级结构上与抗体分子完全不同,但在框架结构上与抗体可变区有相似结构特点。通过计算机设计,在保证框架结构不变的基础上,对某一特定的蛋白分子表面区域的氨基酸组成进行随机化组合,从而构建类似于抗体库的框架蛋白 (Scaffold proteins) 文库<sup>[24]</sup>,并将其展示在噬菌体表面,用于筛选特异性识别各种抗原的蛋白结合体。这些框架蛋白来源广泛,有的来自原核细菌,有的来自人类,虽然它们的一级结构完全不同,但它们通常都具有以下特点: 1) 蛋白稳定性高,能耐受高温和高浓度变性剂的影响,室温中长期保存不变性; 2) 蛋白分子小,具有很好的渗透性和迁移性; 3) 蛋白可溶性高,能够在大肠杆菌中以高产量表达,造价低廉。框架蛋白文库的研究在欧美发展迅

速,特别是在欧洲,几十种框架蛋白文库已被成功构建。一些特异识别癌细胞的框架蛋白从框架蛋白文库中得到了成功地分离,并通过了临床实验,应用于癌症的诊断和药物导航,有的已经实现了商品化。但在中国,新型框架蛋白文库的构建几乎为零。表 2 列举了一些框架蛋白。综述文献<sup>[24-26]</sup>对框架蛋白有较为详细的叙述。

表 2 框架蛋白举例

Table 2 Examples of protein scaffolds

Name	Scaffolds/resources	Amino acid numbers	References/companies
Adnectin	Fibronectin/human	94	[26-27]/Adnexus herapeutics
Affibody	ProteinA/bacterial	58	[28]/Affibody AB
Anticalin	Lipocalin (BBP)/human/insect	160-180	[29]/Pieris Proteolab
Aptamer	ThioredoxA/bacterial	108	[30]/Aptanomics
Avimer	A-domain/human	$n < 40$	[31]/Amgen
Darpin	Ankyrin repeat/designed	$67 + n \times 33$	[32]/Molecular Partners
Kunitz domain	APPI/human	58	[33-34]/Dyax
PDZ	Ras-binding AF-6	<100	[35-36]/BioTech Studio LLC
Knottin	EETI-II, AGRP/human/plant	30	[38-39]/NascaCell
Affilin	$\gamma$ B-crystallin/ubiquitin/human	198	[40]/Scil Proteins

另外一种抗体替代物是 RNA/DNA 适配子 (Aptamer)<sup>[41]</sup>。这是一种人工合成的 RNA 或 DNA 随机序列片段,这些随机序列可以形成无数种构象, RNA/DNA 适配子文库的多样性可以达到  $10^{15}$ 。RNA/DNA 适配子库可以展示在微珠上,对小分子化合物和大分子蛋白质等其他分子可以通过反复的吸附、洗脱、PCR 扩增过程,从文库中筛选到特异识别的适配子。与蛋白类抗体库技术相比,适配子库有更多的优点。首先,适配子与抗体一样具有特异性识别分子的能力和高亲和力,但它的选择和分离完全不需要生物宿主;适配子的选择和生产完全是在体外操作和化学合成,不受生物条件限制,因此结果的重复性更好;最后,适配子比抗体耐高温,因此稳定性更好。有关适配子的应用在

文献综述<sup>[41-42]</sup>中有详细的叙述,可以参考。

### 3 抗体库的应用现状和问题

抗体库技术模拟并简化了天然抗体库的特异性抗体的产生过程,使得抗体选择可以根据人类的需要,在体外操作,通过特异性抗体选择策略的不断优化和抗体工程设计,赋予了抗体在天然状态下不可能具备的新功能。分子展示抗体库或抗体替代文库主要应用于如下一些方面:1)作为分子诊断工具,应用于微生物病原体、癌症生物标志物的检测,生命科学中的分子识别。2)组成微阵列芯片,更新了免疫诊断的模式,使诊断水平上升到蛋白质组学的高度;3)作为特异性亲合吸附的分子工具,将其与细胞毒性药物或标识物偶联,应用于药物导航和体内示踪诊断;4)作为空间构象的识别体,应用于稳定或区别不同构象的目的蛋白;5)作为具有中和病原体和毒素效应的抗体,应用于治疗病毒感染和解毒;6)将小分子的抗体引入细胞内(Intrabody),发挥分子调节的功能,应用于HIV、癌症、神经退化性疾病和器官移植等治疗中;7)作为亲合吸附材料,偶联在层析柱上,用于分离和纯化目的蛋白;等等。这些应用领域都在相关综述<sup>[43-47]</sup>中得到了详细地叙述,供读者参考。

从上述对抗体库应用的简述中可以看到,抗体库技术结合抗体工程,有多种灵活机动的应用技巧和广泛的应用范围,但到目前为止,抗体库技术的应用潜力还远远没有发挥出来。比如,抗体库最大的特点就是它的多样性和它的高通量,而目前大多数的应用是将单个抗原从高容量的抗体库中淘选特异性结合抗体。实际上,自然情况下的动物个体的免疫系统是同时对环境出现的多种抗原作出平行反应的,生物体有自己一套高效率的机制,可以同时从抗体库中选择、扩增相应B细胞,制备出各种识别外源物的抗体。而当用人工方法模拟这种高通量选择方法时,困难还是很大的。因为目前的分子展示抗体库的分离和选择过程涉及到抗原的固相化、

抗体-抗原结合、洗脱、扩增、鉴定等步骤,涉及到大量的克隆子,需要进行平行操作。如何将多抗原同时、平行地从抗体库中选择各自的特异性抗体,是目前所面临的挑战。已有一些实验室在这方面作出了开创性的工作<sup>[48-49]</sup>。一般采取两种策略,一是将各种抗原固相化在96孔板、NC膜,或芯片上,借助自动化平行操作平台,对抗体库进行淘选;另一种策略是,将各种抗原分别固相化在小磁珠上,借助流式细胞仪对抗体库进行淘选。这方面的研究进展可参考文献<sup>[25,50-52]</sup>。

### 4 抗体库的应用前景和展望

随着后基因组时代的发展,人们对生命现象的了解已经不能满足于对一个生物分子的单独研究,而是希望对生物整体的分子变化和响应进行研究,因此将抗体库与蛋白质组建立一一对应的镜像关系,发挥其高通量分子识别的作用越来越重要,由此提出了亲和力蛋白质组学的概念<sup>[53]</sup>。所谓亲和力蛋白质组学,是以亲和力为基础的抗体或抗体替代物,作为工具应用于基础研究和药物开发以及诊断学,主要包括蛋白质组学层面的蛋白质的高效纯化方法,蛋白质表达谱的高通量检测以及蛋白质相互作用网络的探测方法等。

但是目前抗体库对高通量抗原的筛选技术的发展困难很大。到目前为止,还只能是用几个抗原对抗体库进行平行筛选<sup>[54-55]</sup>,远远没有解决将成百上千个抗原同时对抗体库平行筛选的问题。这是因为依赖于生物宿主的抗体库分子展示系统存在诸多影响因素,比如宿主细胞个体存在生长速度的差异性,蛋白质相互作用的非特异性结合,选择压力的偏向性等都会使得筛选过程的阳性克隆鉴定面临海量的单克隆个体,超出了目前高通量自动化操作平台的能力。一般而言,一个抗原对抗体库的筛选将导致200~1000个单克隆子的平行鉴定。作者认为,解决抗体库高通量筛选的技术瓶颈的首要问题是解决生物宿主的问题。生物宿主具有生命,受很多因素的

限制, 因此最好的办法就是绕开它。目前, 无细胞分子展示抗体库和 DNA/RNA 适配子库因为不依赖于细胞生长, 应该是重点选择的对象, 而 DNA/RNA 适配子库完全是化学合成的, 结合目前已经比较成熟的 DNA 高通量测序技术, 有可能是解决上述瓶颈问题的突破口<sup>[56]</sup>。

在我国, 目前还没有一个具有自主创新的抗体库构建成功的报道, 对分子展示抗体库的应用与先进国家相比差距也较大。作者个人认为, 一种新型抗体库的构建是要基于非常深厚的研究积累和条件的, 而目前各种抗体库的种类已经够多的了, 我们国家没有必要再花金钱和人力去新添一种抗体库, 而是应该将精力放在应用技术的创新上。比如, 抗体库筛选的高通量、自动化操作平台的改进或创新, 还有很大的发展空间<sup>[57]</sup>, 通过我国生物学、化学和物理学科技人员的合作和努力, 应该可以取得创新性成果; 另外, 抗体库目前应用较多的是医疗领域, 特别突出的是癌症的生物标志物的检测和体内示踪, 而在环境污染的健康风险评估方面却应用得很少, 而这个研究领域也是需要对环境暴露的生物和人体的整体分子响应进行高通量分析, 抗体库应该在这个领域大有作为。总之, 抗体库的优势和潜力要靠应用而发挥, 抗体库的技术问题也要靠应用而得到解决。

## REFERENCES

- [1] Newmark P. Nobel prize for Japanese immunologist. *Nature*, 1987, 329(6140): 570.
- [2] Liu JX, Zheng CX. *Current Immunology—Elements of Immune Cells and Molecules*. Beijing: Tsinghua University Press, 2002.  
刘建欣, 郑昌学. *现代免疫学——免疫的细胞和分子基础*. 北京: 清华大学出版社, 2002.
- [3] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the viron surface. *Science*, 1985, 228(4705): 1315–1317.
- [4] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990, 348(6301): 552–554.
- [5] Gröwall C, Ståhl S. Engineered affinity proteins—generation and applications. *J Biotechnol*, 2009, 140(3/4): 254–269.
- [6] Barbas CF III, Burton DR, Scott JK, et al. *Phage Display: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [7] Daugherty PS. Protein engineering with bacterial display. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(4): 474–480.
- [8] Löfblom J, Sandberg J, Wernérus H, et al. Evaluation of staphylococcal cell surface display and flow cytometry for postselectional characterization of affinity proteins in combinatorial protein engineering applications. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(21): 6714–6721.
- [9] Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(6): 553–557.
- [10] Ho M, Nagata S, Pastan I. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(25): 9637–9642.
- [11] Hanes J, Plückthun A. *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(10): 4937–4942.
- [12] Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Husimi Y, et al. *In vitro* virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome *in vitro*. *FEBS Lett*, 1997, 414(2): 405–408.
- [13] Roberts RW, Szostak JW. RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(23): 12297–12302.
- [14] Tabuchi I, Soramoto S, Nemoto N, et al. An *in vitro* DNA virus for *in vitro* protein evolution. *FEBS Lett*, 2001, 508(3): 309–312.
- [15] Bertschinger J, Grabulovski D, Neri D. Selection of single domain binding proteins by covalent DNA display. *Protein Eng Des Sel*, 2007, 20(2): 57–68.
- [16] Sepp A, Tawfik DS, Griffiths AD. Microbead display by *in vitro* compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry. *FEBS Lett*, 2002, 532(3): 455–458.
- [17] Nord O, Uhlén M, Nygren P. Microbead display of proteins by cell-free expression of anchored DNA. *J Biotechnol*, 2003, 106(1): 1–13.
- [18] Visintina M, Melib GA, Cannistracia I, et al. Intracellular antibodies for proteomics. *J Immunol Methods*, 2004,

- 290(1/2): 135–153.
- [19] Bradbury A, Velappan N, Verzillo V, et al. Antibodies in proteomics I: generating antibodies. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(6): 275–281.
- [20] Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9): 1126–1136.
- [21] Somnavilla R, Lovato V, Villa A, et al. Design and construction of a naïve mouse antibody phage display library. *J Immunol Methods*, 2010, 353(1/2): 31–43
- [22] Pansri P, Jaruseranee N, Rangnoi K, et al. A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC Biotechnol*, 2009, 9: 6.
- [23] Filpula D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomol Eng*, 2007, 24(2): 201–215.
- [24] Hey T, Fiedler E, Rudolph R, et al. Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(10): 514–522.
- [25] Tomizaki K, Usui K, Mihara H. Protein-protein interactions and selection: array-based techniques for screening disease-associated biomarkers in predictive/early diagnosis. *FEBS J*, 2010, 277(9): 1996–2005.
- [26] Hosse RJ, Rothe A, Power BE. A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition. *Protein Sci*, 2006, 15(1): 14–27.
- [27] Koide A, Bailey CW, Huang XL, et al. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol*, 1998, 284(4): 1141–1151.
- [28] Xu LH, Aha P, Gu K, et al. Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chem Biol*, 2002, 9(8): 933–942.
- [29] Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, et al. Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(8): 772–777.
- [30] Beste G, Schmidt FS, Stibora T, et al. Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 1898–1903.
- [31] Borghouts C, Kunz C, Groner B. Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5(6): 783–797.
- [32] Silverman J, Liu Q, Bakker A, et al. Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1556–1561.
- [33] Binz HK, Amstutz P, Plückthun A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(10): 1257–1268.
- [34] Dennis MS, Lazarus RA. Kunitz domain inhibitors of tissue factor-factor VIIa. I. Potent inhibitors selected from libraries by phage display. *J Biol Chem*, 1994, 269(35): 22129–22136.
- [35] Williams A, Baird LG. DX-88 and HAE: a developmental perspective. *Transfus Apher Sci*, 2003, 29(3): 255–258.
- [36] Schneider S, Buchert M, Georgiev O, et al. Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(2): 170–175.
- [37] Ferrer M, Maiolo J, Kratz P, et al. Directed evolution of PDZ variants to generate high-affinity detection reagents. *Protein Eng Des Sel*, 2005, 18(4): 165–173.
- [38] Smith GP, Patel SU, Windass JD, et al. Small binding proteins selected from a combinatorial repertoire of knottins displayed on phage. *Mol Biol*, 1998, 277(2): 317–332.
- [39] Lehtiö J, Teeri TT, Nygren PÅ. Alpha-amylase inhibitors selected from a combinatorial library of a cellulose binding domain scaffold. *Proteins*, 2000, 41(3): 316–322.
- [40] Hey T, Fiedler E, Rudolph R, et al. Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(10): 514–522.
- [41] Collett JR, Cho EJ, Ellington AD. Production and processing of aptamer microarrays. *Methods*, 2005, 37(1): 4–15.
- [42] Torres-Chavolla E, Alocilja EC. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(11): 3175–3182.
- [43] Brennan DJ, O'Connor DP, Rexhepaj E, et al. Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(9): 605–617.
- [44] Cheng AKH, Sen D, Yu HZ. Design and testing of aptamer-based electrochemical biosensors for proteins and small molecules. *Bioelectrochemistry*, 2009, 77(1): 1–12.
- [45] Bratkovič T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(5): 749–767.
- [46] Manjappa AS, Chaudhari KR, Venkataraju MP, et al. Antibody derivatization and conjugation strategies:

- application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor. *J Control Release*, 2011, 150(1): 2–22.
- [47] Friedman M, Ståhl S. Engineered affinity proteins for tumour-targeting applications. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 53(1): 1–29.
- [48] Lo ASY, Zhu Q, Marasco WA. Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential. *Handb Exp Pharmacol*, 2008, 181: 343–373.
- [49] Bradbury A, Velappan N, Verzillo V, et al. Antibodies in proteomics II: screening, high-throughput characterization and downstream applications. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(7): 312–317.
- [50] Yang L, Nolan JP. High-throughput screening and characterization of clones selected from phage display libraries. *Cytometry A*, 2007, 71(8): 625–631.
- [51] Turunen L, Takkinen K, Söderlund H, et al. Automated panning and screening procedure on microplates for antibody generation from phage display libraries. *J Biomol Screen*, 2009, 14(3): 282–293.
- [52] Sepp A, Tawfik DS, Griffiths AD. Microbead display by *in vitro* compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry. *FEBS Lett*, 2002, 532(3): 455–458.
- [53] Uhlén M. Affinity as a tool in life science. *Biotechniques*, 2008, 44(5): 649–654.
- [54] Walter G, Büsow K, Lueking A, et al. High-throughput protein arrays: prospects for molecular diagnostics. *Trends Mol Med*, 2002, 8(6): 250–253.
- [55] Liu Y, Adams JD, Turner K, et al. Controlling the selection stringency of phage display using a microfluidic device. *Lab Chip*, 2009, 9(8): 1033–1036.
- [56] Brody EN, Gold L, Lawn RM, et al. High-content affinity-based proteomics: unlocking protein biomarker discovery. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10(8): 1013–1022.
- [57] Mayr LM, Fuerst P. The future of high-throughput screening. *J Biomol Screen*, 2008, 13(6): 443–448.

## 《生物工程学报》创刊以来全部论文数据库上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 《生物工程学报》对 1985 年创刊以来的全部论文进行了数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库。检索或浏览我刊已发表的论文请从我刊首页 (<http://journals.im.ac.cn/cjbcn>) “过刊检索”进入, 可以按照题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息检索, 欢迎浏览下载。