

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.12.11

噬菌体展示技术及其在单克隆抗体制备中的应用

刘铭赫,李巧玲,李林姣,程君生,李俊平,张媛,彭小微,王楠*

(中国兽医药品监察所 国家/OIE 布鲁氏菌病参考实验室,北京 102600)

[收稿日期] 2022-06-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 12-0082-08 [中图分类号] Q78

[摘要] 噬菌体展示技术是一种强大的高通量多肽筛选技术,常用于确定靶标蛋白的亲合力与结合位点,并广泛应用于单克隆抗体的制备。下一代测序和微流控技术的出现及发展使噬菌体展示技术成为制备单克隆抗体更为强大和常用的工具。对噬菌体展示技术的历史发展与分类、噬菌体展示技术制备单克隆抗体的过程及其在制备单克隆抗体上的应用进行了论述,以期为相关研究人员提供参考。

[关键词] 噬菌体展示;抗体库;单克隆抗体;噬菌体;下一代测序

Phage Display Technology and Its Application in Monoclonal Antibody Preparation

LIU Ming-he, LI Qiao-ling, LI Lin-jiao, CHENG Jun-sheng, LI Jun-ping,
ZHANG Yuan, PENG Xiao-wei, WANG Nan*

(National/OIE Reference Laboratory for Brucellosis, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 102600, China)

Corresponding author: WANG Nan, E-mail: 15120089648@163.com

Abstract: Phage display technology is a high-throughput peptide screening technique. This method is often used to determine target protein affinity and binding locations. It is also widely used in the preparation of monoclonal antibodies. Phage display technology has become a more potent and popular method for the manufacture of monoclonal antibodies since the introduction of next-generation sequencing and microfluidics. This article discusses the historical development of phage display technology, the classification of phages, the process of preparing monoclonal antibodies by phage display technology, and its application to the preparation of monoclonal antibodies, in order to provide a reference for related researchers.

Key words: phage display; antibody library; monoclonal antibody; phage; next-generation sequencing

基金项目: 中国兽医药品监察所“兽药行业公益性重点专项”(GY202016)

作者简介: 刘铭赫,硕士研究生,从事重要人畜共患病防控技术研究。

通讯作者: 王楠。E-mail:15120089648@163.com

噬菌体展示技术于 1985 年由 George Smith 首次提出^[1],1990 年 McCafferty 成功将该技术应用在重组抗体的生产中^[2]。自此,基于噬菌体展示的单克隆抗体技术逐步广泛应用于生物医药的多个领域,如单克隆抗体靶向药物、免疫检测等,该技术通过一个噬菌体颗粒将抗体的表型与基因型联系在一起,可以相对简单快速地分离针对特定靶抗原的理想抗体分子。相较于其它单克隆抗体的制备技术,噬菌体展示技术筛选单克隆抗体的周期短、操作简单、应用范围广、制备数量多。

1 噬菌体展示技术

1.1 噬菌体展示技术的原理 噬菌体展示技术是将外源蛋白质、多肽的编码基因或目的基因通过基因工程技术插入到编码噬菌体外壳蛋白的基因序列的适当位置。在阅读框正确且不影响噬菌体正常功能的情况下,使外源蛋白质或多肽与噬菌体外壳蛋白融合形成融合蛋白,并随子代噬菌体的重新组装表达在噬菌体表面。融合蛋白保有独立的空间结构和生物活性,能与靶分子进行识别和结合。噬菌体展示技术的最大特点就是通过噬菌体将目的蛋白与基因的克隆偶联在一起,也在筛选过程中将重组蛋白质的筛选与基因的筛选合二为一。

1.2 噬菌体展示技术的发展 1985 年,George Smith 将外源蛋白片段成功地展示在噬菌体表面,并将这一方法称为噬菌体展示技术^[1]。1989 年,Lerner 将噬菌体展示技术与抗体工程相结合,将鼠源抗体的抗原结合片段(Fab)的 DNA 序列克隆进了噬菌体的衣壳蛋白基因中,在噬菌体表面展示了该抗体的 Fab 区域^[3]。1990 年,McCafferty 和 Winter 通过在噬菌体表面展示免疫球蛋白轻链和重链可变区基因的单链抗体(ScFV)的方法,筛选出了一株高特异性的噬菌体抗体^[2]。在接下来的两年里,Lerner 和 Winter 又成功地利用噬菌体展示技术展示了人类抗体片段^[4-5]。Adalimumab 是第一个依靠噬菌体展示技术研发的单克隆抗体,于 2002 年被美国食品和药物管理局(FDA)批准用于治疗类风湿关节炎^[6]。2018 年,Winter 和 Smith 教授因在“多肽及抗体的噬菌体展示(The

phage display of peptides and antibodies)”技术方面的开创性工作与应用获得诺贝尔化学奖^[7]。

1.3 噬菌体展示系统的分类

1.3.1 丝状噬菌体展示系统 丝状噬菌体主要指具有感染革兰氏阴性菌能力的 M13、Fd 和 F1 噬菌体,其中 M13 噬菌体在噬菌体展示技术中应用最广泛^[8]。M13 噬菌体为一个丝状长管结构,一个环状单链 DNA 基因组编码 5 个外壳蛋白(pIII、pVIII、pVI、pVII 和 pIX)以及 6 个组装和复制蛋白^[9]。大多数噬菌体展示系统基于外壳蛋白 pIII 蛋白与 pVIII 蛋白。pVIII 是 M13 噬菌体上主要的外壳蛋白,可与 6~7 个氨基酸大小的外源蛋白融合表达。而 pIII 的拷贝数较低但可作为表达复杂结构的较大蛋白载体。由于丝状噬菌体的增殖为非裂解增殖,在增殖期间不会裂解宿主菌,因此该噬菌体在实验淘选过程中简化了噬菌体纯化的步骤,减少了实验所需时间。但由于丝状噬菌体的所有成分均需宿主细胞内膜分泌转运,会对表达蛋白的长度、序列和折叠特性有所影响^[10]。

1.3.2 T4 噬菌体展示系统 T4 噬菌体是肌病毒科(*Myoviridae*)的一种烈性噬菌体。T4 噬菌体的结构相较于丝状噬菌体更为复杂,其由头部、尾部和尾部纤维组成。T4 噬菌体的头部由一个细长二十面体衣壳包裹着双链 DNA 组成^[11]。头部与尾部之间通过颈部相连,尾部的蛋白质外壳为中空 of 的长管,外面包有可收缩的尾鞘,尾部还有六根长尾纤维(LTF)和六根短尾纤维(STF)分别连接到六角形底座上并折叠在底板下方^[12]。T4 噬菌体常用于融合展示外源蛋白的主要有高度外衣壳蛋白 HOC、小外衣壳蛋白 SOC、衣壳蛋白 gp23、顶端蛋白 gp24、门户蛋白 gp20。其中 HOC 和 SOC 两种蛋白具有很强的抗原性,且这两种蛋白发生改变也对 T4 噬菌体的感染性以及活性没有太大影响,因此这两种蛋白最常被用于融合展示外源蛋白。T4 噬菌体展示系统的一大优势就是其可以在 SOC 和 HOC 两个位点上展示双重外源抗原,从而筛选出双特异性抗体^[13]。

1.3.3 T7 噬菌体展示系统 T7 噬菌体是短尾病

毒科(*Podoviridae*)的一种烈性噬菌体。T7 噬菌体的头部由一个二十面体的头部包裹着双链 DNA 基因组组成。头部和尾部之间有一个环状连接器,尾部为带有六根纤维的短圆柱形。T7 噬菌体由主要衣壳蛋白 gp10A、次级衣壳蛋白 gp10B、连接蛋白 gp8、尾部蛋白 gp11 和 gp12 以及尾纤蛋白 gp17 六种主要蛋白质组成^[14]。在 T7 噬菌体展示系统中,用于展示多肽和蛋白的衣壳蛋白主要是 gp10A 和 gp10B。该展示系统可以很好地适应多肽或蛋白质序列的变化,以高拷贝数展示多肽或蛋白质,但随着插入序列大小的增加,拷贝数有逐渐降低的趋势。此外,T7 噬菌体的比起丝状噬菌体的增殖速度更快,可节省克隆和筛选的时间^[15]。

1.3.4 λ 噬菌体展示系统 λ 噬菌体是长尾病毒科(*Siphoviridae*)的一种温和噬菌体。λ 噬菌体是双链 DNA 噬菌体,有一个二十面体的头部和一个可弯曲的尾部。λ 噬菌体中的 GPD 蛋白和 PV 尾蛋白常被用来展示多肽或蛋白^[16]。与 PV 蛋白相比,GPD 蛋白上的拷贝数更多,可展示更复杂的大蛋白,且在其上展示蛋白对噬菌体增殖的干扰更小,因此通常使用 GPD 蛋白的 N-端或 C-端作为展示位点。此外,一些在丝状噬菌体展示系统中很难通过膜分泌的多肽也可以在 λ 噬菌体表面展示。但 λ 噬菌体具有裂解性,增殖过程中滴度较低,较难增殖。此外,λ 噬菌体的基因组大,使遗传操作变得更加复杂困难^[10]。

2 噬菌体展示技术制备单克隆抗体

使用噬菌体展示技术制备单克隆抗体的基本步骤包括:①创建包含抗体 DNA 序列的噬菌体文库,并评估文库的克隆多样性;②通过淘选,筛去非特异结合的噬菌体,筛选出目标噬菌体;③由于外源多肽和蛋白质表达在噬菌体表面,其编码基因可通过分泌型噬菌体的单链 DNA 测序推导出来。

2.1 噬菌体展示抗体库的建立 噬菌体展示抗体库可根据抗体基因序列的来源分为免疫文库、天然文库、半合成文库及合成文库。免疫文库是利用病原感染者或疫苗接种者体内产生的 IgG-mRNA 构建而来。从同一免疫文库中可分离出针对不同表

位、具有不同特异性的抗体,且分离出的抗体特异性强,更易于识别某些靶点或抗原^[17]。除此之外,免疫文库还可用于分离针对低免疫原性区域的抗体^[18]。天然文库通常是利用未免疫者体内 IgM-mRNA 构建而成的,该文库可用于分离针对所有类型抗原的抗体^[19],从天然文库中分离出的抗体亲和力和主要取决于文库的多样性。在新型病原体突然出现或耐药菌株紧急爆发的情况下,构建天然文库可以满足在短时间内分离出单克隆抗体的需求^[20]。合成抗体库及半合成抗体库分别是由合成序列、合成序列及天然序列的混合物构成的。抗体识别抗原的特异性主要基于抗体重链和轻链基因的 CDR 区。在所有 CDR 区域中,CDRH3 在组成和长度上更加多样化^[21],故其在抗原结合位点和抗原识别中起着重要作用。在合成文库中,CDR 区域被随机插入到完全合成的框架序列中^[22]。在半合成文库中,则是在重链的 CDR3 中进行有限数量的随机化^[23]。合成与半合成的文库一般是用来淘选针对自身抗原的抗体,且由于合成文库具有较高的多样性,还可用于分离针对其他抗原靶标的高亲和力抗体。

2.2 噬菌体的淘选 创建文库后,就可使用固定或标记抗原进行抗原特异性噬菌体抗体的富集^[24],这一步被称为噬菌体淘选。淘选首先需将抗原固定在固相载体上,加入噬菌体颗粒后,使得表达特异性抗体的噬菌体与抗原结合。抗原分子一般是通过亲水或疏水的非共价作用力被动吸附在活化表面上的,这一作用力可以保证抗原分子在整个淘选过程中被牢牢吸附。而一些分子量低的抗原需要借助载体蛋白的连接吸附在活化表面上。在固定过程中,抗原结构可能会出现一定程度的改变,从而导致针对被动吸附抗原所分离的抗体不能识别溶液中游离抗原的情况^[18]。另一种常见的固定方法是先将靶抗原与生物素偶联,再通过与已固定在活化表面的链霉亲和素的相互作用将抗原固定在表面上^[25]。除此之外,还可以将表达表面抗原的整个细胞作为淘洗过程中的抗原,*Mutuberria* 就使用固定的哺乳动物细胞进行淘选^[26],Palmer 则是应用活细胞原位淘选靶抗原^[27]。

加入噬菌体文库与抗原进行孵育后,需要使用洗涤缓冲液洗掉未结合的噬菌体,一般会使用处于生理 pH 下、含有吐温-20 的非离子洗涤剂。洗涤的严格性与噬菌体同抗原的孵化时间、洗涤剂的浓度、洗涤缓冲液的 pH 值以及目标抗原的浓度等条件相关^[28]。严格的洗涤条件更有利于展示高亲和力抗体的噬菌体富集,但多轮次淘选过程会使一些亲和力较低的噬菌体被去除,从而导致淘选后的克隆多样性差。在淘选过程中需获得的不仅是亲和力高的抗体,有时更需要分离出与特定表位结合或具有所需特定功能的抗体。故在最初几轮淘选中,洗涤条件不应设置的过于严格,而是应随着淘选循环的进行不断提升。

洗去未结合的噬菌体后,需要洗脱与抗原结合的高亲和力噬菌体。最常用的是例如甘氨酸、柠檬酸等酸性或碱性缓冲液^[29]。但需注意要把洗脱噬菌体的 pH 值中和到 8 左右,以避免噬菌体降解或失去感染性。高亲和力的噬菌体也可通过与过量游离的抗原进行竞争达到洗脱的目的^[30],但若用于竞争的游离抗原浓度或亲和力不够高,则可能会出现洗脱偏向风险。Rothe 使用 CysDisplay 技术洗脱高亲和力噬菌体,该技术是通过二硫键将抗体片段连接到 PIII 上,再通过添加二硫苏糖醇以减少二硫键,从而将噬菌体从固定的抗原中释放出来^[31]。

经过几轮淘选后,在分离出的噬菌体池中进行 ELISA 检测,以确定在池中是否有针对特定抗原的噬菌体的富集。通过 ELISA 确定的阳性克隆可通过测序直接识别抗体基因,也可继续进行下游基因工程改造。随着下一代测序(NGS)技术、生物信息学的不断发展,利用高通量筛选抗体的方法也不断涌现。Lyndon 使用了一种名为 PhageXpress 的方法,通过利用电流体力学方法快速选择单链抗体序列,并通过对包含噬菌体文库颗粒的溶液进行操纵来增强其与靶标的结合^[32]。

3 噬菌体展示技术制备单克隆抗体的优缺点

相比起传统的杂交瘤技术,以及后续逐渐发展的嵌合抗体、人源化抗体,噬菌体展示技术制备单克隆抗体具有几个明显的优势。首先是其极大的

提高了抗体库容量,使其能进行高通量的筛选,从杂交瘤技术只能筛选几千个克隆提升到了 10^6 个克隆。其次噬菌体展示技术的操作相比起来较为简便,且效率较高,可以大规模工业化的生产单克隆抗体。同时,噬菌体展示技术可以直接得到抗体基因,便于进一步构建各种基因工程抗体,还可用于一些难于制备的抗体,如针对弱免疫原、毒性抗原的抗体。除此之外,重组噬菌体的纯化步骤简单,不需昂贵的试剂与设备,在一般的实验室条件下就可以完成。

噬菌体展示技术也存在一些不足。其一是目前所建的抗体库容量有限,构建大片段的肽库很困难,且噬菌体展示文库一旦建成,就很难再进行有效的体外突变和重组,进而限制了文库中分子遗传的多样性,所以现在提高抗体库的库容及多样性是该技术亟待解决的问题。其二,不是所有的多肽与蛋白质都能成功地展示在噬菌体表面,可能由于其疏水性强或影响外膜蛋白的折叠等原因无法展示。此外,需持续优化筛选方法以获得高亲和力的抗体,且克服淘选中容易出现阳性克隆丢失及出现假阳性克隆也是迫切需要解决的问题。

4 噬菌体展示技术制备单克隆抗体及应用

利用噬菌体展示技术开发针对传染病病原的单克隆抗体的过程是十分快速的。Schofield 使用甲型肝炎病毒 HM-175 株的完整衣壳蛋白,从黑猩猩骨髓的 cDNA 文库中进行筛选,制备出了四株对甲型肝炎病毒衣壳的单克隆抗体^[33]。而 Lillo 等从针对鼠疫耶尔森菌 A1122 株的单链抗体库中获取了一株对鼠疫杆菌 F1 抗原具有强中和、抗感染作用的单克隆抗体^[34]。而将针对同一病原不同亚型的免疫文库进行多样化组合形成组合库,还可以分离出针对多种亚型所具有的共同保守表位的单克隆抗体^[35]。通过该方法,Kashyap 从 5 名 H5N1 感染康复者所共同构建的抗体库中获取了近 300 种针对 H5N1 病毒的单克隆抗体,其中有几株具有广泛的中和活性^[36]。近年来,新型冠状病毒肺炎(COVID-19)在全世界范围内广泛流行,对全世界公共卫生安全构成了严重威胁。利用噬菌体展示

技术制备单克隆抗体是获得针对 SARS - CoV2 单抗的一种快速有效的方法。目前,全球范围内有许多研究小组正在采用噬菌体展示技术筛选针对该病的单克隆抗体,以用于疫苗的开发与评估^[37]。Kim 通过噬菌体展示技术开发了针对核衣壳蛋白的抗体,并将其应用于 COVID - 19 的诊断^[38]。Wrapp 使用经冠状病毒刺突蛋白免疫的美洲驼构建了噬菌体肽库,并从中淘选出了对 SARS - CoV2 具有中和能力的 VH - 72 抗体^[39]。Huo 使用 SARS - CoV2 的受体结合域(RBD)作为噬菌体淘选的抗原,从一个天然的骆驼单域抗体库中分离出单克隆抗体 H11 - D4,并通过改进 H11 - D4 的亲合力成熟,得到了高亲和力的突变体 H11 - H4^[40]。Pan 使用来源于 8 名 COVID - 19 康复期患者的外周血单核细胞(PBMCs)构建了两个噬菌体免疫文库,并从中获取了具有高中和能力的单克隆抗体 2B11^[41]。

通过噬菌体展示技术筛选单克隆抗体的过程省略了细胞融合过程中繁琐的步骤,也避免了因为杂交瘤细胞的不稳定性而需要进行反复亚克隆的过程。使得噬菌体展示成为了快速制备单克隆抗体的一个不二选择。虽然从特定疾病的免疫抗体库中分离出的单克隆抗体相较之下具有更好的特异性,但由于技术和成本的影响,目前大多针对传染病的单克隆抗体仍然是通过天然抗体库分离而来。从实用性看,天然文库的无偏性更好,几乎可以分离出针对所有靶分子的单克隆抗体。且可以重复利用于多种疾病的单克隆抗体的开发,不必为每个新疾病都重新建立免疫抗体库。尽管来源于天然文库的单克隆抗体特异性稍差,但相较时间和成本,其还是成为了目前使用噬菌体展示技术筛选单克隆抗体的一个普遍选择。

5 下一代测序技术与噬菌体展示技术的结合

下一代测序技术(Next - generation sequencing technology, NGS)又称为高通量测序技术(High - throughput sequencing),可以一次同时对大量核酸分子进行平行序列测定。通过 NGS 技术得到的大量测序数据非常适合于像抗体库这样拥有多样化

基因片段的复杂集合的全面分析。通常,应用传统噬菌体展示技术获得噬菌体阳性克隆,需要经过三轮淘选后,通过 ELISA 方法先对数百至数千个克隆进行鉴定,再使用 Sanger 测序确定 ELISA 阳性克隆的序列。但由于噬菌体在大肠杆菌培养增殖过程中的传播偏差^[42],使得一些克隆在一二轮的淘选过程中没有被富集,导致在后续鉴定过程中因出现频率较低而被忽略。而基于 NGS 技术的抗体克隆重建可以避免重复识别具有生长优势的高频率克隆,并且可以识别和恢复许多在噬菌体淘选中低频率存在的独特克隆^[43]。

Fischer 首先在噬菌体展示技术筛选单克隆抗体的过程中使用了 NGS 技术^[42]。他们使用 Illumina 平台在一个多框架合成单链抗体库中测序抗体的互补决定区 H3(CDRH3),并采用 NGS 评估文库质量,跟踪三轮筛选过程中重链种系和 CDRH3 长度分布的变化。并使用同样的方法对半合成单链抗体文库的 CDRH3 区进行测序,在噬菌体淘选输出中获取罕见的单链抗体克隆^[44-45]。Lerner 使用 Roche's 454 对天然 scFv 文库中噬菌体选择输出的 VH 区域进行了测序^[46]。而 Stark 同样使用 Roche's 454 对合成 Fab/scFv 文库的 VH 和 VL 区域进行测序,并通过 NGS 技术评估了文库多样性^[22]。Lopez 利用 MiSeq 平台在合成的 Fab 文库中对输出的 CDRH2 - CDRH3 区域进行测序并使用 CDRH3 信息分析氨基酸组成,监测富集过程,通过片段组装检索稀有克隆^[47]。Chung 利用 Illumina 平台分析了原始文库和每轮淘选后的 CDRH3 序列,并通过两步连接法 PCR 确定整个 scFv 基因^[48]。Kris 利用 Ion Torrent 测序平台测序噬菌体 Fab 库中所有多样化的 CDRs,将 NGS 测序得到的信息转换为 Fab 克隆。并使用 NGS 辅助 Fab 重建方法从噬菌体淘选中获得罕见的稀有克隆^[49]。Nannini 利用单分子实时(SMRT)测序与发夹接头环相连接,以获得全长的 scFv 序列,使得在淘选后可以快速分离和检测从噬菌体展示文库中富集的 scFv 抗体,从而获得在传统淘选中被忽略的阳性克隆^[50]。

NGS 技术能一次同时对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,覆盖了天然、免疫以及合成库的全部库容,解决了传统噬菌体文库筛选中更易筛选到高频率克隆,出现筛选偏差的问题。使用高通量测序技术对筛选前后的噬菌体进行测序,并通过对淘选前后的抗体序列富集情况的判断,可以更加方便地获取抗体基因序列。NGS 技术的加入不仅使通过噬菌体展示获得单克隆抗体的过程变得更加简单快速,还能获得更多在传统淘选的过程中被忽略的阳性克隆。而随着高通量测序技术的不断更新也将推动着噬菌体展示技术的进一步发展。

6 展 望

通过噬菌体展示技术筛选单克隆抗体的应用近几年显著增加。由于候选肽和抗体对靶标的亲和力对于单克隆抗体的发现至关重要,因此构造高亲和力、高多样性的噬菌体展示文库是亟需解决的问题。对于这一点,例如免疫文库等定制的噬菌体展示文库,可能是下一步的主要研究方向。同时,更有效的选择策略也能进一步地推动噬菌体展示技术的发展。下一代测序技术因其对库的多样性的评估以及对低频率克隆的拯救,加速了在噬菌体展示技术中发现和开发单克隆抗体的进程。且随着测序技术的不断进步,测序的深度和读数长度也在不断提高:例如,PacBio Sequel 系统产生的序列大约是以前的 RS II 系统的 7 倍,而纳米孔系统提供了实时 DNA 测序与超长读数相结合的可能。随着 NGS 技术不断快速发展,其在噬菌体抗体展示库中的应用可能会愈发重要。

参考文献:

- [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.
- [3] Huse W, Sastry L, Iverson S, *et al.* Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda[J]. Biotechnology, 1989, 246(4935): 1275–1281.
- [4] Barbas C F, Kang A S, Lerner R A, *et al.* Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88(18): 7978–7982.
- [5] Hoogenboom H R, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*[J]. Journal of Molecular Biology, 1992, 227(2): 381–388.
- [6] Frenzel A, Schirrmann T, Hust M. Phage display – derived human antibodies in clinical development and therapy[J]. Mabs, 2016; 1177–1194.
- [7] 曲戈, 张锐, 蒋迎迎, 等. 2018 诺贝尔化学奖:酶定向进化与噬菌体展示技术[J]. 生物学杂志, 2019(1): 1–6, 19. Qu G, Zhang K, Jiang Y Y, *et al.* The nobel prize in chemistry 2018: the directed evolution of enzymes and the phage display technologies[J]. Journal of Biology, 2019(1): 1–6, 19.
- [8] Rohovie M J, Nagasawa M, Swartz J R. Virus – like particles: next – generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery [J]. Bioengineering & Translational Medicine, 2016, 2(1): 43–57.
- [9] Jasna, Rakonjac, Nicholas J, *et al.* Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. [J]. Current Issues In Molecular Biology, 2011, 13(2): 51–76.
- [10] Bao Q, Li X, Han G, *et al.* Phage – based vaccines [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2019, 145: 40–56.
- [11] Gamkrelidze, Dabrowska. T4 bacteriophage as a phage display platform [J]. Archives of microbiology, 2014, 196(7): 473–479.
- [12] Yap M L, Rossmann M G. Structure and function of bacteriophage T4[J]. Future Microbiology, 2014, 9(12): 1319–1327.
- [13] Wu J, Tu C, Yu X, *et al.* Bacteriophage T4 nanoparticle capsid surface SOC and HOC bipartite display with enhanced classical swine fever virus immunogenicity: A powerful immunological approach[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 139(1): 50–60.
- [14] Deng X, Wang L, You X, *et al.* Advances in the T7 phage display system (Review) [J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(1): 714–720.
- [15] Wei L, Caberoy N B. New perspective for phage display as an efficient and versatile technology of functional proteomics [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(4): 909–919.
- [16] Chaudhary V K, Gupta A, Adhya S, *et al.* Lambda phage display system and the process; US, US0741080/B2[P]. 2003 –

05 – 20.

- [17] Lim B N, Tye G J, Choong Y S, *et al.* Principles and application of antibody libraries for infectious diseases [J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(12): 2381 – 2392.
- [18] Azzazy H M, Highsmith W E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations [J]. *Clinical Biochemistry*, 2002, 35(6): 425 – 445.
- [19] Kumar R, Parrray H A, Shrivastava T, *et al.* Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 135: 907 – 918.
- [20] Chan C, Chan A, Lim A, *et al.* Comparison of the efficiency of antibody selection from semi – synthetic scFv and non – immune Fab phage display libraries against protein targets for rapid development of diagnostic immunoassays [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2011, 373(1/2): 79 – 88.
- [21] Ponsel D, Neugebauer J, Ladetzki – Baehs K, *et al.* High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation [J]. *Molecules*, 2011, 16(5): 3675 – 3700.
- [22] Tiller T, Schuster I, Deppe D, *et al.* A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties [J]. *MAbs*. 2013, 5(3): 445 – 470.
- [23] Pini A, Viti F, Santucci A, *et al.* Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two – dimensional gel [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(34): 21769 – 21776.
- [24] Di N R, Ana – Marija S, Flavio M, *et al.* Rapid interactome profiling by massive sequencing [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(9): e110.
- [25] Chapman – Smith A, Cronan J E. The enzymatic biotinylation of proteins: a post – translational modification of exceptional specificity [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(9): 359 – 363.
- [26] Mutuberria R, Hoogenboom H R, Linden E V D, *et al.* Model systems to study the parameters determining the success of phage antibody selections on complex antigens [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1999, 231(1/2): 65 – 81.
- [27] Palmer D B, George A, Ritter M A. Selection of antibodies to cell surface determinants on mouse thymic epithelial cells using a phage display library [J]. *Immunology*, 2010, 91(3): 473 – 478.
- [28] Bratkovi T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications [J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2010, 67(5): 749 – 767.
- [29] Haque A, Tonks N K. The use of phage display to generate conformation – sensor recombinant antibodies [J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(12): 2127 – 2143.
- [30] Meulemans E V, Slobbe R, Wastervall P, *et al.* Selection of phage – displayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 244(4): 353 – 360.
- [31] Rothe C, Urlinger S, LoHning C, *et al.* The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high – affinity antibodies [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 376(4): 1182 – 1200.
- [32] Raftery L J, Howard C B, Grewal Y S, *et al.* Retooling phage display with electrohydrodynamic nanomixing and nanopore sequencing [J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(24): 4083 – 4092.
- [33] Schofield D J, Satterfield W, Emerson S U, *et al.* Four chimpanzee monoclonal antibodies isolated by phage display neutralize hepatitis A virus [J]. *Virology*, 2002, 292(1): 127 – 136.
- [34] Lillo A M, Velappan N, Kelliher J M, *et al.* Development of anti – yersinia pestis human antibodies with features required for diagnostic and therapeutic applications [J]. *Immunotargets and Therapy*, 2020, 9: 299 – 316.
- [35] Yan Z H, Zhao B, Pang Y, *et al.* Generation of mycobacterial lipoarabinomannan – specific monoclonal antibodies and their ability to identify mycobacterium isolates [J]. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 2021, 54(3): 437 – 446.
- [36] Jing Yi Lai, Theam Soon Lim. Infectious disease antibodies for biomedical applications: a mini review of immune antibody phage library repertoire [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 640 – 648
- [37] Kashyap A K, Steel J, Oner A F, *et al.* Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5 N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(16): 5986 – 5991.
- [38] Kim Y, Lee H, Park K, *et al.* Selection and characterization of monoclonal antibodies targeting middle east respiratory syndrome coronavirus through a human synthetic Fab phage display library

- panning[J]. *Antibodies*, 2019, 8(3): 42.
- [39] Wrapp D, Vlioger D D, Corbett K S, *et al.* Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single – domain camelid antibodies[J]. *Cell*, 2020, 181(5):1004 – 1015.
- [40] Huo J, Zhao Y, Ren J, *et al.* Neutralization of SARS – CoV – 2 by destruction of the prefusion spike[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(3):445 – 454.
- [41] Pan Y, Du J, Liu J, *et al.* Screening of potent neutralizing antibodies against SARS – CoV – 2 using convalescent patients – derived phage – display libraries[J]. *Cell Discovery*, 2021, 7(1): 57.
- [42] Ravn U, Gueneau F, Baerlocher L, *et al.* By – passing *in vitro* screening – – next generation sequencing technologies applied to antibody display and *in silico* candidate selection[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010(21): e193.
- [43] Panavas T, Lu J, Naso M F. Deep sequencing approaches to antibody discovery[J]. *Current Drug Discovery Technologies*, 2014, 11(1): 85 – 95.
- [44] Ravn U, Didelot G, Venet S, *et al.* Deep sequencing of phage display libraries to support antibody discovery [J]. *Methods*, 2013, 60(1): 99 – 110.
- [45] Venet S, Ravn U, Buatois V, *et al.* Transferring the characteristics of naturally occurring and biased antibody repertoires to human antibody libraries by trapping CDRH3 sequences[J]. *Plos One*, 2012, 7(8): e43471.
- [46] Zhang H, Torkamani A, Jones T M, *et al.* Phenotype – information – phenotype cycle for deconvolution of combinatorial antibody libraries selected against complex systems [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(33):13456 – 13461.
- [47] Lopez T, Nam D H, Kaihara E, *et al.* Identification of highly selective MMP – 14 inhibitory Fabs by deep sequencing [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(6):1140 – 1150.
- [48] Yang W, Yoon A, Lee S, *et al.* Next – generation sequencing enables the discovery of more diverse positive clones from a phage – displayed antibody library [J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 2017, 49(3): e308.
- [49] Barreto K, Maruthachalam B V, Hill W, *et al.* Next – generation sequencing – guided identification and reconstruction of antibody CDR combinations from phage selection outputs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(9): e50.
- [50] Nannini F, Senicar L, Parekh F, *et al.* Combining phage display with SMRTbell next – generation sequencing for the rapid discovery of functional scFv fragments [J]. *MAbs*, 2021, 13(1): 1864084.

(编辑:李文平)