

单链抗体的研究进展

秦海艳 毛晓燕 乔玉玲 李晓进 赵红[△]

(兰州生物制品研究所 甘肃 兰州 730046)

摘要:单链抗体即单链抗体可变区片段(single-chain antibody variable fragment, or ScFv)是由抗体重链可变区和轻链可变区通过一段 10-25 个氨基酸的连接肽连接而成,其分子质量小,穿透力强,特异性好,免疫原性低,在免疫学和医学方面得到了广泛应用。本文就单链抗体的结构设计、展示系统、表达和应用方面做一综述。

关键词:单链抗体;展示系统

中图分类号:R392.11 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)04-795-03

Progress in Single-Chain Antibody

QIN Hai-yan, Mao Xiao-yan, QIAO Yu-ling, Li Xiao-Jin, ZHAO Hong[△]

(Lanzhou Institute of Biological Products 730046 china)

ABSTRACT: The single-chain antibody (single-chain antibody variable fragment, or ScFv) is made up of the variable region of the heavy and light chains, which are connected together by a polypeptide linker of typically 10-25 amino acid residues in length. The advantages of ScFv are the small size of molecular mass, higher affinity for target antigens, and imposing minimal antigenicity in recipient hosts. So the single-chain antibody had been widely applied in immunology and medical field. In this paper, the molecular design of single-chain antibodies, display systems, expression, and applications were reviewed.

Key words: Single-chain antibody or ScFv; Display system

Chinese Library Classification (CLC): R392.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011) 04-795-03

单链抗体由抗体重链可变区和轻链可变区通过一段连接肽连接而成,易于构建和表达、分子质量小、穿透力强、特异性好、免疫原性低,是目前报道最多的基因工程抗体。本文就单链抗体的结构设计、展示系统、表达以及在细胞内抗体和构建单链抗体融合蛋白方面的应用做一综述。

1 单链抗体的结构设计

单链抗体(Single-chain antibody)即单链抗体可变区片段(Single-chain antibody variable fragment, or ScFv)由抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)通过一段连接肽(Linker)连接而成^[1],分子量为 27000-30000Da,是亲代抗体全部抗原结合特异性的最小功能结构单位。VH 和 VL 的取向既可以是 VH-Linker-VL 也可以是 VL-Linker-VH,两种方式都不影响 ScFv 的特异性,但 VH-Linker-VL 比 VL-Linker-VH 的亲合力高 10 倍以上,而 VL-Linker-VH 比 VH-Linker-VL 的表达量高 20 倍。Linker 的设计至关重要,不能干扰 VH 和 VL 的空间构象,不能对抗原结合部位造成阻碍,不引起分子动力学改变,尽可能减少蛋白酶攻击及防止 ScFv 聚集^[2],通常为 10-25 个氨基酸残基组成,最广泛应用的 Linker 为重复出现的四个甘氨酸和一个丝氨酸^[3]。但是一般情况下重链可变区和轻链可变区用一段 Linker 连接后,抗体的构象会受到影响,特异性有所改变。

2 单链抗体的展示系统

单链抗体的制备可以通过多种展示系统来实现,利用噬菌

体展示,核糖体展示,酵母表面展示等展示方法都可以得到理想的单链抗体。

2.1 噬菌体展示

噬菌体展示(Phase display)是应用最广泛的单链抗体选择方法,其原理是将单链抗体的基因片段插入丝状噬菌体基因组,使之与丝状噬菌体外壳蛋白编码基因相融合,从而将功能性单链抗体表达于噬菌体颗粒的表面^[4],然后通过固相或液相筛选法进行筛选。固相筛选法是噬菌体抗体与固相化的抗原一起孵育,表达有靶抗原单链抗体的噬菌体颗粒就会结合于固相,洗去未结合的游离噬菌体颗粒,将结合于固相的噬菌体分离下来,感染宿主菌进行扩增,然后再重复这一"吸附-洗涤-洗脱-扩增"的富集过程,可以使特异性的噬菌体得到千倍乃至 109 倍的富集^[5]。固相筛选法可靠易行,所获抗体特异性高,但是固相化抗原过程可能会导致抗原构象的改变,使某些自身抗原决定簇消失和一些新抗原决定簇产生,并且筛选过程中抗原消耗量较大。液相筛选法是将抗原标记生物素后在液相中利用链亲和素磁珠借助磁场的作用进行噬菌体单链抗体筛选,液相筛选法可更好地保持抗原的天然构象,可通过精确调节抗原的浓度筛选到高亲和力的单链抗体,但是液相筛选法对抗原有较高的要求,无法应用于抗原不确定或抗原纯度不高等状况,获得的抗体特异性不够理想。噬菌体展示单链抗体中最常用的噬菌体为 M13 和 fd^[6],因为受到细菌转化效率的影响,噬菌体展示单链抗体库的库容一般仅为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{11}$ 。

2.2 核糖体展示

核糖体展示(Ribosome display)是一种无细胞的体外选择单链抗体的有效方法,将每个新生的单链抗体和其 mRNA 连接起来形成单链抗体-核糖体-mRNA 的复合物,随后与固相化的抗原分子相互作用,与抗原有高亲和力单链抗体的 mRNA 得到富集,此 mRNA 通过反转录 PCR 就可以得到扩增^[7]。在核

作者简介:秦海艳(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向:基因工程抗体,电话:13893637020, E-mail: qinhy04@lzu.cn

[△]通讯作者:赵红 E-mail: hzhao20020105@sina.com

(收稿日期:2010-08-25 接受日期:2010-10-11)

糖体展示中,如果 PCR 中用没有读码校正功能的 DNA 多聚酶时就会产生基因突变,筛选过程就可以增加蛋白质的多样性。因为核糖体展示不受细菌转化效率的制约,其库容可以达到 $1 \times 10^{11} - 1 \times 10^{13}$,且亲和力成熟容易,展示速度快,可以合成对体内表达系统有毒的分子,体外转录、翻译和筛选易行,大大缩短了实验周期,具有省时省力、方便快速的特点^[8]。

2.3 酵母表面展示

将表达的重组蛋白连接到酵母细胞壁上的方法叫做酵母表面展示(Yeast surface display, YSD)。酵母表面展示是筛选和工程化抗体以增加抗体特异性和亲和力的有力工具。酵母表面展示可以对抗体亲和力进行鉴定,也可以使抗体亲和力得到极大提高,并且能使单链抗体亲和突变。展示的蛋白可以在酵母细胞的内质网中得到正确的折叠,可以更好地利用内质网伴侣分子和质量控制体系。酵母展示系统被广泛应用在细胞表面抗原的筛选、基因定位、cDNA 库的筛选、细胞黏附分子工程化等方面。但是酵母转化效率低,仅为细菌的 1/10000,酵母表面展示的库容只有 $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$,产量也会相应的降低,因而筛选到抗体的种类会受到限制。

3 单链抗体的表达

功能性单链抗体的表达依赖于有效的转录、翻译和正确的折叠和重折叠,这依赖于单链抗体的内在的属性和单链抗体与表达系统的相互作用。目前单链抗体应用的限制性因素是无法制备大量的活性蛋白,没有一种万能的表达系统可以表达所有的单链抗体,所以表达系统的选择尤为重要,要基于每一种单链抗体的分子结构来选择一种合适的表达宿主。

3.1 单链抗体在大肠杆菌中的表达

单链抗体最常用的表达受体为大肠杆菌,因为大肠杆菌作为表达受体表达具有生长速度快,易于操作,转化和转导效率高,可以在短时间内大规模的生产单链抗体,便于纯化分析和应用^[9,10]。虽然大肠杆菌缺乏糖基化功能,但这并不影响单链抗体的表达,因为单链抗体分子没有抗体的恒定区片段,不需要糖基化来增加它的生物活性。

单链抗体在大肠杆菌中的表达有四种方式,第一种是细胞质内的包涵体表达^[11],这种表达方式产量高,但是包涵体形式的分子要通过后续的体外重折叠来形成有生物活性的分子,重折叠中变性和复性损失很大。如果所要表达的单链抗体对大肠杆菌有毒性或者对蛋白水解酶不稳定则使用包涵体表达方式较好。第二种是细胞质内的可溶性表达^[12],细胞质是还原性的细胞微环境,单链抗体直接表达在细胞质内导致形成不溶性的包涵体,但是通过分子生物学的手段如在基因水平进行操作^[13],增加适当的折叠伴侣或者改变细菌细胞质内物理化学环境,单链抗体就可以在细胞质内的还原性环境中形成正确折叠的蛋白。第三种是分泌到大肠杆菌的周质空间^[14],使用适当的信号肽使单链抗体分泌到周质空间,常用的信号肽一般为来自 *E. coli* 的外膜蛋白 A(ompA)、周质腔蛋白如碱性磷酸酶(phoA)以及果胶酸盐裂解酶(pelB)等,周质空间具有氧化性的细胞微环境,对二硫键的形成具有很大的帮助,周质空间表达的单链抗体通过渗透压休克等方式破坏细胞的外膜就可以得到分离,且因为杂蛋白较少所以纯化比较容易。但是周质空间分泌不能总是保证得到可溶且有功能的产物,当表达量超过周质腔处理能力时,仍以包涵体形式表达,需要建立更高效的溶解性表达系

统。第四种是分泌到胞外培养基中^[15],通过外膜的泄漏或者由于长时间的培养细胞膜的通透性增加直接把周质空间的单链抗体分泌到培养基中^[16],这样可以减少蛋白水解酶的降解作用,培养基中的单链抗体比周质腔中的更加容易分离而且可以得到快速的检测和纯化,但并不是所有的单链抗体均可通过该机制分泌到胞外。

3.2 单链抗体在酵母中的表达

酵母表达系统结合了大肠杆菌和哺乳动物细胞的优点,产量高,目标蛋白中消除了大肠杆菌表达系统中的毒性热源质以及哺乳动物细胞表达系统中的潜在致癌性和病毒核酸的污染^[17]。酵母可以将单链抗体直接分泌到细胞质内或者分泌到胞外培养基中。酵母表达系统已经建立起来了高细胞密度的发酵技术,优化发酵条件比如培养基的组成、通气量、诱导组分、温度来提高单链抗体的产量和质量^[18]。进行密码子优化也可以提高单链抗体在酵母中的表达量。酵母表达系统中最常用的是毕赤酵母和啤酒酵母。毕赤酵母是一个甲醇营养型的酵母,可以利用甲醇作为唯一的碳源来表达单链抗体^[19]。它有一个强的,严谨型调节启动子醇氧化酶 1(AOX1)^[20],偏爱氧化性生长条件,这相对于啤酒酵母来说是一个生理状态优势,可以高密度的培养。毕赤酵母相对于啤酒酵母而言显示出了低的糖基化水平,然而这并不影响它产生功能性单链抗体的效率。

3.3 单链抗体在哺乳动物细胞中的表达

单链抗体的 DNA 序列可以通过病毒载体或者特定的哺乳动物表达载体转化到哺乳动物细胞内^[21]。哺乳动物细胞拥有完整的转录、翻译、翻译后修饰功能^[22],可以对抗体进行一系列复杂的加工过程;哺乳动物细胞的内质网为抗体分子二硫键的形成提供了氧化性的微环境,表达的抗体通常具有正确的折叠和空间构象;哺乳动物细胞有完整的分泌途径,在单链抗体的 DNA 序列框架区添加一个适当的定位信号,抗体就直接可以运输到细胞的特定部位如细胞核、内质网、细胞质或者直接分泌到胞外,从而实现抗体的分泌表达,为抗体的纯化提供了便利。但是哺乳动物表达体系构建周期长,操作繁琐表达量相对低,费用高,具有潜在的致癌性和病毒污染的危险,目前大规模生产还受到限制。

4 单链抗体在生物医学中的应用

4.1 细胞内抗体

细胞内抗体是一种主要以单链抗体的形式在细胞内表达并且定位于亚细胞区室如细胞核、细胞质或某些细胞器中,通过靶向作用目标蛋白而发挥抑制功能^[23]。细胞内抗体抑制的机制主要有干扰蛋白质与蛋白质相互作用或蛋白质与 DNA 相互作用,将蛋白质从其原来的位置转移,与酶或其亚基的活性位点相互作用。细胞内抗体主要应用有三个方面的(1)抑制病毒复制特别是 HIV-1 的复制^[24],HIV-1 有很多调节基因,这些基因编码相应的调节蛋白,如 Tat, Rev, Nef, Vpr 等,他们在 RNA 转录,蛋白质翻译,以及病毒颗粒从细胞膜释放等过程中发挥调节作用,目前已经构建成功了细胞内抗 Tat 的单链抗体(anti-Tat-ScFv)、抗 Rev 单链抗体、抗 HIV-1gp120 的单链抗体,这些细胞内单链抗体在抑制 HIV 病毒复制方面效果显著。(2)肿瘤基因治疗,是将含抗癌相关蛋白的抗体基因转染细胞,细胞表达的单链抗体与癌相关蛋白作用,间接抑制肿瘤的生长。(3)表型敲除,在细胞内表达特定单链抗体分子阻断某内源蛋白的

活性,用于研究靶蛋白的生物学功能,目前应用较多的是阻断细胞表面特定受体的表达,阻断的部位多在粗面内质网,这是由于抗体片段在粗面内质网比较稳定,且内质网的定位表达方法比较明确。

4.2 构建单链抗体融合蛋白

通过重组 DNA 技术将单链抗体基因与其它效应蛋白基因融合在一起,经表达后可以得到具有单链抗体特性和所融合的效应蛋白活性的单链抗体融合蛋白^[25]。融合蛋白的应用主要有四个方面:(1)单链抗体融合蛋白在诊断方面的应用,单链抗体分子量小,能穿透血管壁进入组织中,不在肾脏积累,携带大剂量放射核素在疾病的显像过程中比完整抗体效果好^[26],因此多用于临床诊断。(2)单链抗体融合蛋白在治疗方面的应用,单链抗体无抗体的 Fc 段,不能与靶细胞的 Fc 受体相结合,减少了抗体的非特异性结合更集中到达肿瘤等部位,因而被视为导向药物的理想载体,目前已经广泛应用在肿瘤细胞、血栓溶解等临床疾病的治疗中。通过重组技术将抗肿瘤相关的单链抗体与毒性蛋白或细胞因子融合形成的重组毒素或免疫毒素可将细胞杀伤效应引导到肿瘤部位。绿脓杆菌外毒素(PE)、蓖麻毒素、白喉毒素及白介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子(TNF)和干扰素(INF)等是常用的毒素及细胞因子。(3)单链抗体融合蛋白在提高单链抗体稳定性方面有一定作用^[27],单链抗体仅为完整抗体的 1/6,分子小于肾清除率的阈值,上皮细胞内吞后被溶酶体降解,所以血清半衰期较短。共价连接 PEG 或者连接在天然存在的半衰期较长的血清白蛋白或抗体恒定区片段都可以延长单链抗体的半衰期。(4)单链抗体融合蛋白在提高单链抗体可溶性表达方面也有一定作用^[28],这种融合蛋白能促进二硫键的形成,促进单链抗体蛋白定位在氧化性的周质空间,增加产物的稳定性避免降解,或者融合蛋白起到分子伴侣的作用。在大肠杆菌表达系统中普遍使用的融合蛋白有谷胱甘肽-S-转移酶(GST),硫氧还蛋白(TRX),麦芽糖结合蛋白(MBP)^[29]。在酵母表达系统中,绿色荧光蛋白(GFP)是一个普遍的融合配体,除了提高可溶性外,GFP 内在的标签功能可以快速的检测和鉴定单链抗体^[30]。在哺乳动物系统表达单链抗体时,融合细胞表面信号分子有利于在细胞表面表达有活性的单链抗体。融合蛋白的选择要考虑多方面的因素,要兼顾下游的纯化和最终的使用。

5 单链抗体的不足与展望

单链抗体技术经过了 20 多年的发展,取得了巨大的成就,但是在应用中仍然存在一些问题,如亲和力较低,稳定性较差,半衰期短等。(1)单链抗体相对于其亲本单克隆抗体,亲和力低了 10-1000 倍,这成为它在免疫分析等应用中的一个制约因素,可以通过亲和力成熟对单链抗体的亲和力进行改进,或者通过构建多价抗体来增加抗体的功能亲和性。(2)单链抗体稳定性差,常常显示聚集倾向,尤其在 37℃ 时稳定性较差,可以引入二硫键模拟天然状态来稳定其结构,可使 VH 和 VL 形成稳定的异聚体 dsFv,再用相应载体系统进行构建。或者也可以将 ScFv 转化为 Fab 做进一步的分析。(3)单链抗体分子量小,体内清除速度快,有时候达不到治疗或诊断的时间。针对这一缺点,可以从多方面对 ScFv 进行改造,增加其抗原结合力,提高其亲和力,其中 ScFv 多聚体是其改进形式之一,是通过将 ScFv 连接肽缩短至 12 个氨基酸以下构成的一种新型小分子

抗体,在体内应用时具有很多优势,克服了 ScFv 在体内清除过快的不足。但是,随着分子生物学、分子免疫学、单链抗体展示、表达技术研究的深入,获得各种目的的单链抗体指日可待。

参考文献(reference)

- [1] D blazek,V Celer.The Production and Application of Single-Chain Antibody Fragments [J]. Folia Microbiol, 2003,48 (5), 687-698
- [2] Takkinen K, Laukkanen M.L, Sizmman D, et al. An active single-chain antibody containing a cellulose linker domain is secreted by Escherichia coli [J]. Protein Engineering, 2007,4: 837-841
- [3] Anke Krebber, Susanne Bornhauser, Jorg Burmester, et al. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system [J].Journal of Immunological Methods, 1997,201: 35-55
- [4] Philippa M.O'Brien, Robert Aitken. Antibody Phage Display Methods and Protocols [M]. 2002 Humana Press Inc.999 Riverview Drive, Suite 208 Totowa, New Jersey 07512
- [5] Heyue Zhou, Bin Zhou, Sabine Pellett, et al. Selection and Characterization of a Human Monoclonal Neutralizing Antibody for Clostridium Botulinum Neurotoxin Serotype B [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(3): 662-664
- [6] Andrew R.M. Bradbury, James D. Marks.Antibodies from phage antibody libraries [J]. Journal of Immunological Methods, 2004,290:29-49
- [7] Jozef Hanes, Lutz Jermutuse.Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135
- [8] Lei zhou, wei-ping Mao.Selection of scFvs specific for the HepG2 cell line using ribosome display [J]. Biosci, 2009,34(2)221-226
- [9] Lauren R. Pepper², Yong Ku Cho¹, et al. A decade of yeast surface display technology: Where are we now? [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2008,11(2): 127-134
- [10] Luis Angel Fernandez. Prokaryotic expression of antibodies and affibodies [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2004, 15:364-373
- [11] Hairong Xiong, Shuyi Li, Zhanqiu Yang ,et al. E. coli expression of a soluble, active single-chain antibody variable fragment containing a nuclear localization signal [J]. Protein Expression and Purification, 2009, 66:172-180
- [12] Helen E Chadd, Steven M Chamow. Therapeutic antibody expression technology [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12:188-194
- [13] Paola Jurado, Daniel Ritz, Jon Beckwith, et al. Production of Functional Single-Chain Fv Antibodies in the Cytoplasm of Escherichia coli [J]. Mol. Biol,2002, 320, 1-10
- [14] Wu, S.C.,Yeung, J.C., Duan,Y,et al. Functional production and characterization of a fibrin-specific single chain antibody-fragment from Bacillus subtilis: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 68: 3261-3269
- [15] Ward, E.S., Gussow D., Griffiths, et al. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli [J]. Nature,2001, 341, 544-546
- [16] Knappik, A., Pluckthun, A. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding [J]. Protein Engineering, 1995,8, 81-89
- [17] Lauren R. Pepper, Yong Ku Cho¹, Eric T. Boder, et al. A decade of yeast surface display technology: Where are we now? [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2008,11(2): 127-134

(下转第 771 页)

- [4] 徐蓓, 邵健. 甲钴胺的临床应用. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(7): 972-973
Xu Bei, Shao Jian. Clinical application of Mecobalamin. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine 2006, 15 (7): 972-973
- [5] 祁凤娥, 谢明星, 钱慧. 依达拉奉抗氧化治疗带状疱疹 30 例疗效观察 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2009, 23(09): 661-662
Qi Feng-e, Xie Ming-xing, Qian Hui. Clinical Study of Edaravone on Treatment of 30 Cases with Herpes Zoster [J]. The Chinese Journal of Dermatovenereology, 2009, 23 (09): 661-662(In Chinese)
- [6] Schmader KE, Johnson GR, Saddier P, et al. Effect of a zoster vaccine on herpes zoster-related interference with functional status and health-related quality-of-life measures in older adults. J Am Geriatr Soc, 2010, 58(9):1634-1641
- [7] Schmader K. Postherpetic neuralgia in immunocompetent elderly people. Vaccine, 1998, 16(18):1768-1770
- [8] Fabian VA, Wood B, Crowley P, et al. Herpes zoster brachial plexus neuritis[J]. Clin Neuropathol, 1997, 16(2): 61- 64
- [9] 李彩霞. 带状疱疹疼痛的心理护理. 湖南中医药导报, 2003, 9(11): 42-43
Li Cai-xia. Psychological Nursing for the Ache of Herpes Zoster. Hunan Guiding Journal of TCM, 2003, 9(11):42-43
- [10] Ross EL. The evolving role of antiepileptic drugs in treating neuropathic Pain [J]. Neurology, 2000, 55 (5 Suppl 1):S41
- [11] 林向, 唐毅. 甲钴胺联合灯盏细辛治疗带状疱疹后神经痛的疗效观察[J]. 广东医学, 2009, 30(12):1912-1913
Lin Xiang, Tang Yi. Clinical effect observation of methylcobalamin combined with Erigeron breviscapus on treating Postherpetic neuralgia [J]. Guangdong Medical Journal, 2009, 30(12):1912-1913(In Chinese)
- [12] 朱小蔚. 甲钴胺辅助治疗高龄老人带状疱疹神经痛 55 例[J]. 东南国防医药, 2009, 11(05):437-438
Zhu Xiao-wei. 55 cases about methylcobalamin adjuvant treatment of postherpetic neuralgia in old people [J]. Military Medical Journal of Southeast China, 2009, 11(05):1912-1913(In Chinese)
- [13] 夏磊, 李传斌, 牛兴荣, 等. 甲钴胺联合黛力新治疗带状疱疹后神经痛临床观察[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009, 12(01):41-42
Xia Lei, Li Chuan-bin, Niu Xing-rong, et al. Clinical observation on mecobalamin combined deanxit treating postherpetic neuralgia [J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2009, 12 (01):41-42(In Chinese)
- [14] 鲍丽霞. 中西医结合治疗带状疱疹后遗神经痛疗效观察[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5):687-688.
Bao Li-xia. Clinical effect observation of methylcobalamin combined with Chinese Traditional Medicine on treating Postherpetic neuralgia
- [15] 黄晓春, 李泽兵, 顾莹, 等. 甲钴胺局部封闭治疗软组织疼痛. 中国康复, 1999, 14(3):152-155
Huang Xiao-chun, Li Ze-bing, Gu Ying, et al. Clinical observation of Soft Tissue Pain by Local methylcobalamin Block Therapy. Zhong Guo Kang Fu, 1999, 14(3):152-155
- [16] 薛明喜, 熊源长, 王景阳. 带状疱疹后神经痛的机制和临床进展[J]. 国外医学: 麻醉学与复苏分册, 2001, 22(02): 99-102
Xue Xi-ming, Xiong Yuan-chang, Wang Jing-yang. The mechanisms of postherpetic neuralgia and clinical progress [J]. Foreign Medicine: Anesthesiology and Resuscitation, 2001, 22(02): 99-102(In Chinese)
- [17] 张娟, 胡佳, 杨莉佳. 半导体激光联合甲钴胺片治疗带状疱疹后遗神经痛临床观察[J]. 医学信息, 2009, 22(12):2776-2777
Zhang Juan, Hu Jia, Yang Li-jia. Clinical effect observation of methylcobalamin combined with semiconductor laser on treating Postherpetic neuralgia. Medical Information, 2009, 22(12):2776-2777

(上接第 797 页)

- [18] Diethard Mattanovich, Brigitte Gasser, Hubertus Hohenblum, et al. Stress in recombinant protein producing yeasts [J]. Journal of Biotechnology, 2004, 3: 121-135
- [19] Siyi Hu, Liangwei Li, Jingjuan Qiao, et al. Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2006:249-257
- [20] Fatemeh Rahbarizadeh, Mohammad J. Rasaei, Mehdi Forouzandeh, et al. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris* [J]. Molecular Immunology, 2006, 43: 426-435
- [21] Lars Norderhaug, Tove Olafsen, Terje E. Michaelsen, et al. Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells [J]. Journal of Immunological Methods, 1997, 204:77-87
- [22] J. Hobson-Peters, J. Shana, I. R.A. Hallb, et al. Mammalian expression of functional autologous red cell agglutination reagents for use in diagnostic assays [J]. Journal of Virological Methods, 2010, 168: 177-190
- [23] Martin R. Stocks. Intrabodies: production and promise [J]. DDT, 2004, 9
- [24] Martin Stocks. Intrabodies as drug discovery tools and therapeutics [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2005, 9:359-365
- [25] David Filpula. Antibody engineering and modification technologies [J]. International Engineering, 2007, 24:201-215
- [26] Ada Funaro, Alberto L. Horenstein, Piera Santoro, et al. Monoclonal antibodies and therapy of human cancers [J]. Iotechnology Advances, 2000, 18:385-401
- [27] John R Murphy. Protein engineering and design for drug delivery, John R Murphy [J]. Current Opinion in Structural Biology, 1996, 6: 541-545
- [28] Zheng, L., Baumann, U., Eymond, J. Production of a functional catalytic antibody ScFv-NusA fusion protein in bacterial cytoplasm [J]. Journal of Biochemistry (Tokyo), 2003, 133, 577-581
- [29] Ideno, A., Furutani, M., Iwabuchi, et al. T. Expression of foreign proteins in *Escherichia coli* by fusing with an archaeal FK506 binding protein [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64, 99-105
- [30] Huang, D., Shusta, E.V. A yeast platform for the production of single-chain antibody-green fluorescent protein fusions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72, 7748-7759