

抗破伤风杆菌信息菌素 Ph-CT 的构建及其抗菌活性的初步研究

于 焕, 左越文, 丘小庆[△]

四川大学华西医院 生物膜及膜蛋白实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 构建和纯化抗破伤风杆菌信息菌素(Ph-CT),并初步检测其抗菌活性。**方法** 从分泌针对破伤风杆菌表面抗原的单克隆抗体的杂交瘤细胞中扩增出抗体可变区基因序列,利用双联寡核苷酸点突变技术将抗体模拟物与大肠菌素 Ia 融合构建 Ph-CT,经离子交换柱纯化后,通过菌落培养加入不同剂量信息菌素 Ph-CT(终浓度 2、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$),观察 Ph-CT 的体外抗菌活性。通过培养液中接种破伤风杆菌,并加入不同剂量的 Ph-CT(终浓度 4、16 $\mu\text{g/mL}$),厌氧培养 16 h 后取滤液及菌液行小鼠腹腔注射,观察 Ph-CT 的体内抗菌活性。**结果** 成功构建抗破伤风杆菌 Ph-CT。体外实验结果显示,涂布加入 Ph-CT 2、4 $\mu\text{g/mL}$ 孵育菌液的固体培养基上仍见破伤风菌落生长,而涂布加入 Ph-CT 8、16 $\mu\text{g/mL}$ 孵育菌液的培养基上均无菌落生长;体内实验结果显示,滤液和菌液组中对照组小鼠 1 d 内均全部死亡,滤液组 Ph-CT 4、16 $\mu\text{g/mL}$ 组小鼠 3 d 内全部存活,菌液组中 Ph-CT 4 $\mu\text{g/mL}$ 组小鼠 3 d 内存活 3 只(50%),Ph-CT 16 $\mu\text{g/mL}$ 组小鼠 3 d 内全部存活。**结论** 构建的 Ph-CT 在体内和体外都表现出对破伤风杆菌有抗菌活性,为临床治疗破伤风提供了新思路和新途径,具有应用于临床的潜在价值。

【关键词】 信息菌素 抗破伤风杆菌信息菌素 抗菌活性

Bactericidal Activity of Constructed Recombinant Fusion Protein Pheromonicin-CT YU Huan, ZUO Yue-wen, QIU Xiao-qing[△]. Laboratory of Biomembrane and Membrane Protein, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: qiuxiaoqing54@sina.com

【Abstract】 Objective To construct engineering peptide pheromonicin-*Clostridium tetani* (Ph-CT), and to test its bactericidal activity. **Methods** We amplified the gene of variable regions from hybridoma cells which secreted monoclonal antibody (mAb) against antigen in the membrane of *Clostridium tetani* and linked the small antibody mimetic to the channel-forming domain of colicin Ia to create Ph-CT. The Ph-CT was purified by CM sepharose ion-exchange column. Its *in vitro* antibacterial activity was evaluated by colony culture with different doses of Ph-CT (final concentration 2, 4, 8, and 16 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Then we inoculated culture medium with CT strains and different doses of Ph-CT (final concentration of 4 and 16 $\mu\text{g/mL}$). The *in vivo* antibacterial activity of Ph-CT was evaluated by cumulative survival of mice. After 16 hours' anaerobic culture, the mice was treated with filtered CT medium or CT medium. **Results** We constructed Ph-CT successfully. CT colonies appeared in the CT medium treated with Ph-CT (2, 4 $\mu\text{g/mL}$), while no colony appeared in the CT medium treated with Ph-CT (8, 16 $\mu\text{g/mL}$). All mice survived when they were injected with filtered CT medium treated with Ph-CT (4, 16 $\mu\text{g/mL}$) and CT medium treated with Ph-CT (16 $\mu\text{g/mL}$). Three (50%) mice survived when they were injected with CT medium treated with Ph-CT (4 $\mu\text{g/mL}$). All mice in the control groups died after CT infections. **Conclusion** Ph-CT may be of value as antibiotics against *Clostridium tetani*.

【Key words】 Pheromonicin Pheromonicin-*Clostridium tetani* Antibacterial activity

破伤风杆菌(*Clostridium tetani*)是临床上造成患者死亡尤其是新生儿死亡的重要致病菌之一^[1]。破伤风杆菌可分泌痉挛毒素引起全身肌肉强直性痉挛^[2],严重者可导致患者喉肌痉挛而窒息或并发严重呼吸道感染死亡^[3]。破伤风抗毒素(TAT)虽可预防破伤风^[4],但TAT是马血清制品,属异种蛋白,

注射时发生过敏性休克的可能性较大^[5],且破伤风临床治疗困难,一旦发病,病死率很高,重症患者病死率更是可达70%^[6],寻找破伤风的有效治疗手段迫在眉睫。而在现有抗生素中,至今还未发现任何一种抗生素能够有效治疗破伤风,因此,开发可有效攻击破伤风杆菌的新型抗生素,将为破伤风的治疗开辟新思路和新途径,具有十分重要的意义。

大肠菌素 Ia 是 E1 族大肠杆菌分泌的一种多肽

[△] 通讯作者, E-mail: qiuxiaoqing54@sina.com

类细菌素,它可识别同种异株的大肠杆菌,并在细菌内膜上形成致死性的离子通道,使靶细菌内容物在短时间内大量泄漏而死亡^[7,8]。Qiu 等^[9]曾在大肠菌素 Ia 的羧基(C-)端人为地连接一段由金黄色葡萄球菌分泌的具有自主导向特性的信息素 AgrD1,成功改变了大肠菌素的靶向性。经证实,将信息素 AgrD1 作为诱导物与大肠菌素 Ia 的 C-端相连构建的抗菌多肽 pheromonicin-*Staphylococcus aureus* (Ph-SA)可识别并特异性杀伤金黄色葡萄菌^[9]。Ph-SA 的成功构建表明利用细菌分泌的信息素作为诱导物,以实现大肠菌素 Ia 攻击细菌的模式是可行的。但使用细菌信息素作为大肠菌素 Ia 的靶向诱导物却存在两个缺陷:①信息素的识别范围狭窄,其往往只能识别分泌该信息素的细菌;②已发现的肽类信息素较少,众多致病菌的信息素尚未找到。所以寻找新的靶向诱导物非常重要。

抗体可视为一种识别范围广泛的靶向诱导物,只需变动 Fab 段中重链和轻链的 6 个抗原结合区中氨基酸残基的一级结构,就可以让抗体转而识别另一种抗原。在分析比较抗体重链及轻链 6 个抗原结合区(CDR)的空间关系后,Qiu 等^[10]将重链抗原结合区 1(CDR1)和轻链抗原结合区 3 (CDR3)两个抗原结合区作为识别结构域,重链骨架区 2(FR2)为支撑结构,从而设计出一个 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 结构的小抗体模拟物。此抗体模拟物对抗原的亲和力只有母抗体的 1/10~1/100,但保留了其基本的特异性识别功能^[4]。与只识别/攻击大肠杆菌的野生型大肠菌素 Ia 不同,将抗体模拟物与大肠菌素 Ia 的 C-端相连构建的信息素素可识别/攻击其表面携带有抗体模拟物可识别抗原的细菌。循此思路,本研究中我们将破伤风杆菌表面糖抗原免疫小鼠,筛选出可特异性识别该抗原的单克隆抗体。再根据 V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 结构,利用该单克隆抗体的 V_HCDR1 和 V_LCDR3 设计小抗体模拟物,并将其与大肠菌素 Ia 的 C-端相连构建抗破伤风杆菌信息素素(pheromonicin-*Clostridium tetani*, Ph-CT)。从生物学角度,初步探求能有效攻击破伤风杆菌的新途径。

本研究目的旨在从能稳定分泌鼠源性、针对破伤风杆菌表面糖抗原的单克隆抗体的杂交瘤细胞株中获取其单克隆抗体重链及轻链的可变区序列,然后选取 V_HCDR1 的 5 个氨基酸、V_LCDR3 的 8 个氨基酸,及 FR2 的 14 个氨基酸连接组成 27-肽抗体模拟物,将该抗体模拟物与大肠菌素 Ia 融合构建 Ph-

CT,经离子交换柱纯化后,初步分析其抗菌活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 单克隆抗体细胞株 2F2 是由破伤风杆菌表面糖抗原免疫 BALB/c 小鼠后将小鼠脾 B 细胞与骨髓瘤细胞通过细胞融合技术制备并筛选后得到的杂交瘤细胞株(北京京天成公司)。此细胞株能稳定分泌鼠源性的、针对破伤风杆菌表面糖抗原的特异性单克隆抗体(mAb)。将此杂交瘤细胞置于 37℃、5%CO₂培养箱中培养(DMEM,10%FBS)至密度约 10⁷/mL 时收集待用。

1.1.2 主要试剂 5'-full RACE 试剂盒及 TRIZOL 试剂购自大连宝生物公司,点突变试剂盒购自 STRATAGENE 公司,pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司,PCR 产物纯化试剂盒及胶提取试剂盒购自 OMEGE 公司,CM Sepharose 离子交换柱购自 Pharmacia 公司,透析袋 Snake Skin Pleated Dialysis Tubing 购自 Pierce 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自百泰克公司,引物由华大基因公司合成,插入了大肠菌素 Ia 基因的质粒 PET-15b 为本实验室保存。

1.1.3 细菌及培养基 破伤风杆菌 CMCC(B) 64067 购自中国药品生物制品检定所(China medical culture collection, CMCC),MH 肉汤培养基购自英国 OXIOD 公司。

1.1.4 动物 昆明小鼠 36 只,7~8 周龄,体质量为 18~22 g,雌雄各半。由四川大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 用 TRIZOL 试剂,按照说明提取杂交瘤细胞 2F2 总 RNA。

1.2.2 可变区基因的扩增 分别根据小鼠单克隆抗体 IgG 和 IgM 轻链和重链恒定区 CH-1 区基因序列设计基因特异性外内引物如下:κ 型轻链外引物 κL-GSP outer ACTGGATGGTGGGAAGATG G^[11];λ 型轻链外引物 λL-GSP outer TACACACC AGTGTGGCCTTGTT;γ 型重链外引物 γH-GSP outer GTCACCGAGGAGCCAGTTGTATCTCC;μ 型重链外引物 μH-GSP outer AGCCCATGGCC ACCAGATTCTTAT;κ 型轻链内引物 κL-GSP inner GGGGAAGATGGATACAGTTGGTGCAG C^[6];λ 型轻链内引物 λL-GSP inner GAAACA GGGTGACTGATGGCGAAG;γ 型重链内引物

γ H-GSP inner GATAGACCGATGGGGCTGTTG TTTT; μ 型重链内引物 μ H-GSP inner AGGGGA AGGCATTGGAAGGACT;参考 TaKaRa 公司 5'-full RACE 试剂盒说明书,采用套式 PCR 方法扩增出单克隆抗体可变区基因序列。

1.2.3 可变区基因的克隆 将上述 PCR 扩增产物经 2.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳后切胶,通过胶回收试剂盒回收后连接到 pMD19-T 载体中,将重组质粒转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞并涂布于含氨苄青霉素(AMP 100 μ g/mL)的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养后,提取阳性克隆质粒送华大基因测序。

1.2.4 可变区基因序列分析 参考文献方法^[6],将所测得的单克隆抗体轻链和重链可变区基因序列进行分析,登入 GenBank 对测序结果进行比对分析(BLAST)。根据 Kabat 法则对单克隆抗体可变区基因序列进行分析,确定轻链和重链的抗原结合区(CDR)和框架区(FR)。

1.2.5 信息菌素 Ph-CT 的构建 根据 1.2.4 分析所得的抗体重链和轻链的 CDR 和 FR 序列,以插入了大肠菌素基因的 PET-15b 质粒为模板,利用双链寡核苷酸点突变技术将重链抗原结合区 1(V_H CDR1)、重链框架区 2(V_H FR2)、轻链抗原结合区 3(V_L CDR3)基因序列依次引入大肠菌素基因的 626 位点后制备重组质粒,将重组质粒转化入大肠杆菌 XL-gold10 感受态细胞中表达信息菌素 Ph-CT。

1.2.6 信息菌素 Ph-CT 的制备及蛋白浓度测定 参考文献^[3]的方法进行 Ph-CT 的制备与纯化,以 SDS-PAGE 凝胶电泳进行 Ph-CT 的鉴定,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定 Ph-CT 的浓度。

1.2.7 信息菌素 Ph-CT 的体外抗菌活性的测定 用接种环挑取破伤风杆菌菌落 3~5 个,接种于 MH 肉汤培养基中,35 $^{\circ}$ C,厌氧孵育 2~3 h 后用 MH 肉汤校正浓度至 0.5 麦氏比浊标准,适当稀释后备用。在 2 mL MH 肉汤培养基中接种破伤风杆菌,使菌液终浓度为 10^6 CFU/mL,分别加入不同剂量的 Ph-CT,使各管内药物浓度分别为 2、4、8、16 μ g/mL,并设立空白对照。35 $^{\circ}$ C,震荡厌氧培养 16 h 后,测定各管内菌液浊度(595 nm)。继之取上述菌液 40 μ L 均匀涂布于固体培养基(90 mm Petri dish),再次厌氧培养后观察菌落生长。

1.2.8 信息菌素 Ph-CT 的体内保护作用 取无菌试管 3 只,各加入 2 mL MH 肉汤培养基,并接种破伤风杆菌,使菌液终浓度为 10^6 CFU/mL,分别加入

不同剂量的 Ph-CT,使管内 Ph-CT 浓度分别为 4、16 μ g/mL,第 3 管为不加药物的空白对照。35 $^{\circ}$ C,震荡厌氧培养 16 h 后取滤液及菌液备用。滤液为上述孵育 16 h 后的菌液部分经 0.22 μ m 直径的过滤器过滤除菌。取昆明小鼠 36 只,适应性喂养 3 d 后进行实验。分为滤液和菌液两个实验组进行。实验前 18 h,小鼠禁食禁饮,每个实验组随机分为 3 组,即空白对照组、Ph-CT 4 μ g/mL 组、Ph-CT 16 μ g/mL 组,每组 6 只小鼠。每只老鼠分别腹腔注射 300 μ L 滤液或菌液后,每间隔 1 h 观察小鼠变化及生存情况。记录 3 d 内小鼠存活数。

2 结果

2.1 抗体重链和轻链可变区基因的扩增

用 κ 型、 λ 型轻链内外特异性引物、 γ 、 μ 型重链内外特异性引物,经套式 PCR 分别扩增出抗体轻链和重链可变区基因。图 1 显示,轻链为 κ 型,重链为 γ 型(即针对破伤风表面抗原的单克隆抗体为 IgG 型抗体),长度均约为 450 bp。

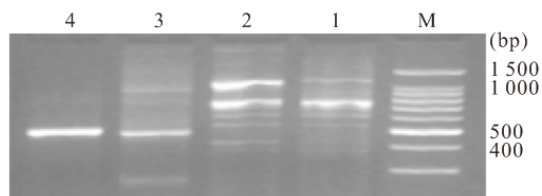


图 1 抗体轻链和重链可变区基因琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 PCR products electrophoreses of light chain variable region (VL) and heavy chain variable region (VH)

M: DNA marker; 1-4: PCR products amplified by μ H-GSP outer and μ H-GSP inner; λ L-GSP outer and λ L-GSP inner; γ H-GSP outer and γ H-GSP inner; κ L-GSP outer and κ L-GSP inner

2.2 抗体轻链和重链可变区基因序列的分析

结果显示,重链和轻链可变区基因序列全长 432 bp,编码 144 个氨基酸残基(图 2)。分析比对(BLAST)结果显示其序列为针对破伤风表面抗原的单克隆抗体轻链和重链可变区序列,而非其他基因序列。根据 Kabat 法则,分别确定了抗体轻链和重链的信号肽、3 个 CDR 及 4 个 FR。见表 1。

2.3 Ph-CT 的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果

Ph-CT 蛋白电泳图谱显示,样品在相对分子质量约 70×10^3 处有一清晰的条带(图 3),与理论上的 Ph-CT 相对分子质量大小吻合。

2.4 Ph-CT 体外抗菌活性

见图 4。厌氧孵育 16 h 后,空白对照和各加入 Ph-CT 2、4、8、16 μ g/mL 的培养管菌液浊度

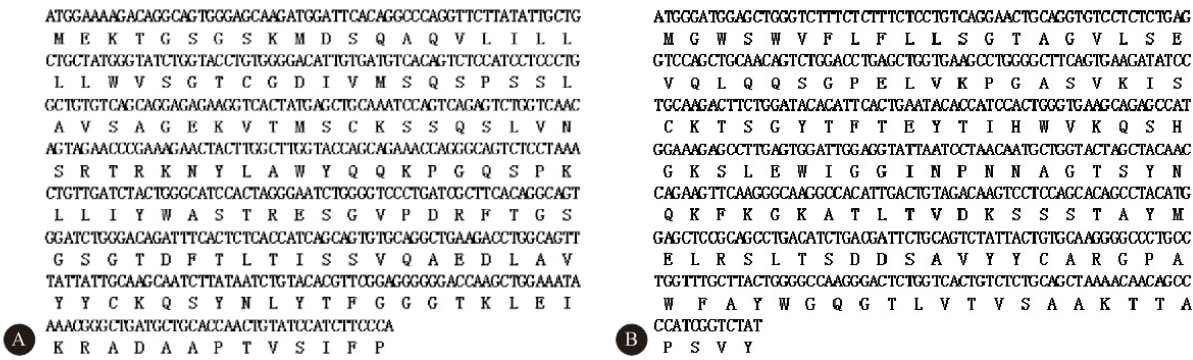


图 2 抗体轻链和重链可变区的基因序列与氨基酸序列

Fig 2 Gene sequence and amino acid sequence of light chain variable region (VL) and heavy chain variable region (VH)

A: Gene sequence and amino acid sequence of VL; B: Gene sequence and amino acid sequence of VH

表 1 抗体轻链和重链可变区氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequence of VH and VL

Name	Light chain	Heavy chain
Signal peptide	MDSQAQVLILLLVVSGTCG	MGWSWVFLFLLSGTAGVLS
FR1	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSC	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTS
CDR1	KSSQSLVNSRTRKNYLA	GYTFTEYTIH
FR2	WYQQKPGQSPKLLIY	WVKQSHGKSLEWIG
CD2	WASTRES	GINPNNAGTSYNQKFKG
FR3	GVPDRFTGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYC	KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSDDSAVYYCAR
CD3	KQSYNLYT	GPWFAY
FR4	FGGGTKLEIKRADAAPTVSIFF	WGQGTLVTVSAAKTTAPSVY

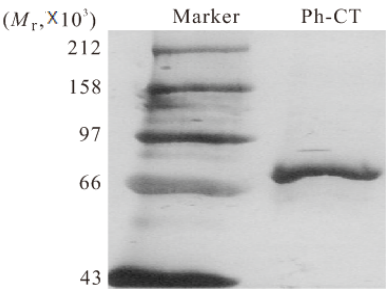


图 3 Ph-CT 的 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱

Fig 3 SDS-polyacrylamide gel of Ph-CT after purification

(595 nm) 分别为: 0. 199, 0. 174, 0. 149, 0. 099,

0. 085。取上述各管菌液 40 μ L 均匀涂布于固体培养基(90 mm)再次厌氧培养后,结果显示涂布加入 Ph-CT 2、4 μ g/mL 孵育菌液的固体培养基上仍见破伤风菌落生长,而涂布加入 Ph-CT 8、16 μ g/mL 孵育菌液的培养基上均无菌落生长,提示 ≥ 8 μ g/mL 的 Ph-CT 可有效抑制破伤风杆菌的生长。

2.5 Ph-CT 的体内保护作用

结果显示滤液组中对照组 6 只小鼠在 1 d 内全部死亡;Ph-CT 4、16 μ g/mL 组小鼠 3 d 内全部存活,存活率为 100%。菌液组中对照组 6 只小鼠在 1 d 内全部死亡;Ph-CT 4 μ g/mL 组小鼠 3 d 内存活

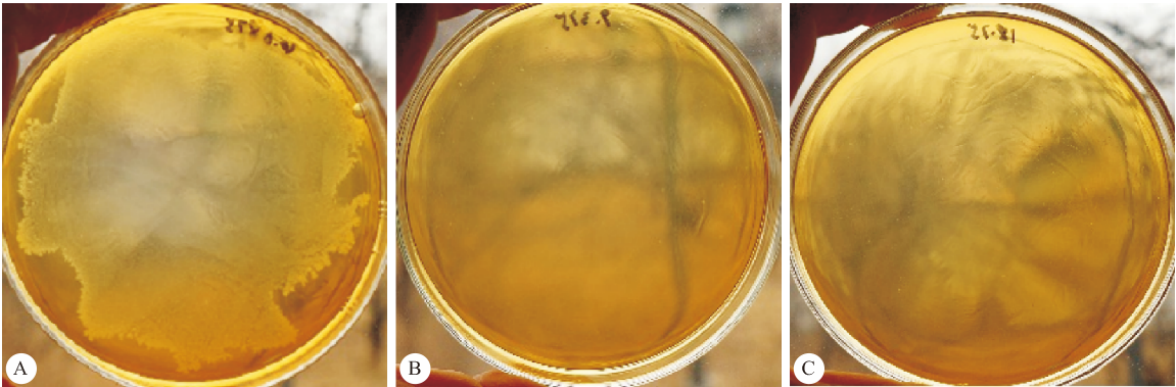


图 4 不同浓度 Ph-CT 对破伤风杆菌 CMCC(B)64067 的抑菌作用

Fig 4 Bactericidal effect of different doses of Ph-CT against CT CMCC(B)64067

A-C: Colony forming unit of CT medium treated with Ph-CT 4 μ g/mL (A), 8 μ g/mL (B) and 16 μ g/mL (C) for 16 h, respectively

3 只,存活率为 50%;Ph-CT 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组小鼠 3 d 内全部存活,存活率为 100%。

3 讨论

本课题设想通过寻找一种更为有效的杀菌途径来达到防治破伤风的目的。而本次实验所构建的 Ph-CT 即是延续了以往信息菌素的抗菌思路,通过在大肠菌素 Ia 羧基端人为的连接一个可以与破伤风杆菌表面抗原相结合的抗体模拟物,从而改变大肠菌素 Ia 的靶向性,使大肠菌素 Ia 攻击其本身不能识别的破伤风杆菌,从而达到快速杀灭破伤风杆菌的效果。

体外实验初步表明:Ph-CT 对破伤风杆菌有抗菌活性,其抗菌活性与作用浓度呈正相关性趋势,且结果初步显示浓度在 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上的 Ph-CT 能有效抑制破伤风杆菌的生长。而在体内实验中,Ph-CT 浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其滤液组和菌液组小鼠 3 d 存活率均为 100%。这提示 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ph-CT (>8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 在体外可完全抑制破伤风杆菌的生长,进而有效减少破伤风毒素的产生,从而使 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ph-CT 处理后的破伤风杆菌菌液及滤液均不再造成小鼠死亡。值得注意的是,Ph-CT 浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,滤液组小鼠的 3 d 存活率为 100%,而菌液组小鼠的 3 d 存活率仅为 50%。我们分析:4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ph-CT 可通过抑制破伤风杆菌的生长使其处理后的破伤风杆菌菌液中破伤风杆菌及毒素的含量均降低,使得 300 μL 滤液中所含的破伤风毒素的量低于致小鼠死亡的最小剂量,因此滤液组小鼠在 3 d 内全部存活。但 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ph-CT (<8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 只能部分抑菌,因此 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ph-CT 处理后的菌液中还含有部分活菌,这些活菌可在小鼠体内继续繁殖并释放破伤风毒素,致使菌液组一半小鼠死亡。体内实验表明,Ph-CT 可通过抑制破伤风杆菌的生长,进而减少破伤风毒素的分泌,从而起到体内保护作用。但由于破伤风杆菌致病特殊性,Ph-CT 的体内保护作用有待进一步评价与研究。

上述结果初步显示 Ph-CT 能够攻击破伤风杆菌。因此推测:我们在杂交瘤细胞中所获得抗体序列的基础上所构建的小抗体模拟物能够识别破伤风杆菌表面糖抗原并与之结合,使得大肠菌素 Ia 的通道结构域接触细菌胞膜表面亲疏水作用力区(距膜

表面 1~2 个原子直径距离)的概率大大增加,在范德华力作用下大肠菌素 Ia 迅速插膜并形成致死性离子通道,达到了杀死破伤风杆菌的目的。

下一步我们拟对 Ph-CT 与其他现有抗生素的抗菌活性进行比较,进一步评价 Ph-CT 的抗菌作用的灵敏性及特异性。

综上所述,Ph-CT 是对破伤风杆菌有抗菌作用的信息菌素,其可通过抑制破伤风杆菌的生长,进而减少破伤风毒素的分泌,从而起到保护作用。而且 Ph-CT 的抗菌机制及特点与以往抗生素均不同,鉴于还未发现任何抗生素能够有效治疗破伤风,抗破伤风杆菌信息菌素 Ph-CT 的开发可能为破伤风的临床防治提供新思路和新方向,具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Dietz V, Milstein JB, van Loon F, *et al.* Performance and potency of tetanus toxoid; implications for eliminating neonatal tetanus. *Bull World Health Organ*, 1996; 74(6): 619-528.
- 2 Kefer MP. Tetanus. *Am J Emerg Med*, 1992; 10(5): 445-448.
- 3 Farrar JJ, Yen LM, Cook T, *et al.* Tetanus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2000; 69(3): 292-301.
- 4 Miranda-Filho Dde B, Ximenes RA, Barone AA, *et al.* Randomised controlled trial of tetanus treatment with antitetanus immunoglobulin by the intrathecal or intramuscular route. *Brit Med J*, 2004; 328 (7440): 615. Epub 2004 Mar 5.
- 5 杨海芳. 破伤风抗毒素过敏试验的临床观察与实践. *现代中西医结合杂志*, 2007; 16(14): 1951-1952.
- 6 陈所贤. 破伤风研究进展. *中国热带医学*, 2003; 3(1): 57-58.
- 7 Qiu XQ, Jakes KS, Kienker PK, *et al.* Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. *J Gen Physiol*, 1996; 107(3): 313-328.
- 8 Slatin SL, Qiu XQ, Jakes KS, *et al.* Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature*, 1994; 371(6493): 158-161.
- 9 Qiu XQ, Wang H, Lu XF, *et al.* Anengineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria. *Nat Biotechnol*, 2003; 21 (12): 1480-1485.
- 10 Qiu XQ, Wang H, Cai B, *et al.* Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting. *Nat Biotechnol*, 2007; 25 (8): 921-929.
- 11 王 鑫, 张 莹, 何金生. β 淀粉样肽单克隆抗体可变区基因的 5'RACE 扩增及序列分析. *生物技术通讯*, 2010; 3(2): 192-195.

(2015 - 05 - 07 收稿, 2015 - 09 - 02 修回)

编辑 沈 进