

基于同源建模与分子对接技术构建抗 Bt Cry1 类毒素单链抗体定点饱和突变库

焦凌霞^{1,2}, 徐茜茜², 刘媛¹, 张霄¹, 刘贝贝¹, 梁颖¹, 刘贤金¹

(1. 江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所/江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地/农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室, 江苏南京 210014)

(2. 河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003)

摘要: 转基因食品中苏云金芽胞杆菌 (Bt) Cry 毒素种类较多, 对生态环境和食品安全等造成的潜在风险日益受到关注, 制备针对多种 Cry 毒素的高效广谱抗体, 进而建立广谱性快速检测方法, 是对转 Bt 基因作物进行监管并确保生态环境和食品安全的基础。本研究利用基因工程抗体易于定向修饰及 Cry 毒素具有相似结构的特点, 以实验室前期获得的人源化抗苏云金芽胞杆菌 (Bt) Cry1Ac 毒素单链抗体为材料, 通过同源建模模拟单链抗体及五种 Cry1 类毒素的三维结构并利用分子对接技术分析单链抗体与 Cry1 类毒素结合的关键氨基酸位点; 在此基础上利用重叠延伸 PCR 技术对关键氨基酸位点及其邻近位点进行定向改造, 以构建定点饱和突变库, 为筛选检测多种 Cry1 类毒素的广谱特异性抗体提供实验材料。

关键词: Cry1 毒素; 单链抗体; 同源建模; 分子对接; 重叠延伸 PCR; 定点饱和突变

文章编号: 1673-9078(2016)3-12-17

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.003

Site-directed Saturation Mutagenesis Library of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Toxin-specific Single-chain Antibody Fragment by Homology Modeling and Molecular Docking

JIAO Ling-xia^{1,2}, XU Xi-xi², LIU Yuan¹, ZHANG Xiao¹, LIU Bei-bei¹, LIANG Ying¹, LIU Xian-jin¹

(1. Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Science/Key Laboratory of Food Quality and Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base/Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China) (2. School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: There is a growing concern regarding potential risks to the ecology and food safety due to various Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* (Bt) present in transgenic food. Identification of highly efficient broad-spectrum antibodies against multiple Cry toxins and development of rapid-detection methods are the basis for monitoring Bt transgenic crops to ensure food safety and protection of the ecological environment. Additionally, genetically engineered antibodies can easily undergo site-directed modification and can assume a structure similar to that of Cry toxins. Therefore, the three-dimensional structures of scFv and Cry1 toxins were analyzed via homology modelling, using human single-chain antibody fragment (scFv) against Bt Cry1Ac toxin previously developed by our group. Additionally, the key amino acid binding sites between scFv and Cry1 toxins were analyzed using molecular docking technique. Subsequently, site-directed modifications of the key amino acid binding sites and their adjacent sites using overlap-extension polymerase chain reaction (PCR) was carried out to construct a site-directed saturation mutagenesis library, to provide material for screening broad-spectrum antibodies to detect multiple Cry1 toxins.

Key words: Cry1 toxin; single-chain antibody fragment; homology modeling; molecular docking; overlap extension polymerase chain reaction; site-directed saturation mutagenesis

收稿日期: 2015-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371778, 31201535); 江苏省博士后科研资助计划 (1401016A); 江苏省农业自主创新项目 (CX (13) 3087)

作者简介: 焦凌霞 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 刘贤金 (1963-), 男, 博士, 研究员

单链抗体 (single chain Fv, scFv) 是利用基因工程方法通过 5-25 个氨基酸 (Linker) 将抗体重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 首尾拼接而形成的基因工程抗体, 因其分子量小, 免疫原性低, 制备简单, 可在原核细胞系统表达等优点, 已广泛应用于生物医学及食品卫生检验等领域。

随着生物技术发展, 转苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) Cry 基因抗虫性作物大面积推广种植, 产生了显著的经济效益, 但同时也存在潜在的食品安全隐患^[1], 越来越多的国家要求对转基因产品实行标签制度。目前, 对转基因产品毒素蛋白检测大多采用特异抗体检测, 这种方法需要针对不同毒素制备相应的抗体, 时间长、成本高, 难以满足快速筛查检测的要求。因此, Bt Cry 毒素广谱抗体筛选和制备成为转基因检测技术研究的热点领域。据报道大约 90% 的单克隆抗体针对具有共性结构的抗原都存在一定的交叉反应^[2], 而针对某一种 Bt 毒素检测的单、多克隆抗体或单链抗体对于其他同源性较高的毒素也具有一定的交叉反应^[3], 虽然不同的 Cry 毒素蛋白的氨基酸序列有差异, 但均具有十分相似的三维结构, 研究表明 Cry1Aa、Cry2Aa、Cry3Aa 和 Cry4Aa 四类具有代表性毒素三级结构中的结构域 I 几乎完全相同^[4]。这种结构相似性是广谱抗体制备的理论基础, 通过同源建模, 模拟 Bt Cry 毒素及其单链抗体的三维结构, 利用分子对接技术探寻单链抗体与 Cry 毒素结合区域的共同关键氨基酸结合位点, 为利用基因工程手段定向改造单链抗体提供理论依据。近年来最突出的进展是利用计算机模拟“抗原-抗体”互作过程, 通过虚拟突变预测抗原抗体结合的关键氨基酸位点, 利用定点饱和突变技术可以在短时间内获得靶位氨基酸分别被其他 19 种天然氨基酸所代替的突变子。

本实验在利用噬菌体展示技术从人源化噬菌体单链抗体库中筛选获得抗 Cry1Ac 类毒素的单链抗体 (scFv) 的基础上, 根据 Bt Cry 毒素三维构象相似的特点, 利用同源建模结合分子对接技术探寻单链抗体与多种 Cry1 毒素的关键氨基酸结合位点, 利用重叠延伸 PCR 技术构建定点饱和突变抗体库, 为筛选和制备出具有较强广谱性的抗体材料, 建立 Bt Cry 毒素广谱检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒

抗 Bt Cry1AC 毒素单链抗体: 本实验室从

Tomlinson J 库筛选得到。

pIT2 质粒, *E.coli* TG1: 属于琥珀突变抑制型, 用于噬菌体的扩增, 英国 MRC Human Genome Mapping Project Resource Centre 惠赠。

1.1.2 培养基

2×TY 培养基: 在 900 mL 双蒸水中加入 16 g 胰化蛋白胨, 10 g 酵母提取物和 5 g NaCl, 搅拌混匀, 定容到 1 L, 高压灭菌备用。

TYE 固体培养基: 在 900 mL 双蒸水中加入 10 g 胰化蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 8 g NaCl 和 15 g 琼脂粉, 搅拌混匀, 定容到 1 L, 高压灭菌备用。

1.1.3 试剂

AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒: 购自康宁生命科学 (吴江) 有限公司; 2×Taq PCR Master Mix: 上海星汉生物科技有限公司; PrimeSTAR HS DNA Polymerase: Takara 公司, 大连; Taq DNA 聚合酶、NcoI、NotI 内切酶、T4 DNA 连接酶: 购自 NEB 公司, 美国; Pfu DNA Polymerase, 2×Taq PCR Master Mix: 均购自 Promega 公司; 构建突变体引物: 由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

1.1.4 仪器设备

PCR 仪: Bio-Rad 公司, 美国; 电转仪: Bio-Rad 公司, 美国; SW-CJ-1F 超净工作台: 苏州净化设备厂; 数显恒温水浴锅 HH-2: 国华电器有限公司; 恒温摇床: 太仓市华利达实验设备有限公司; DYY-6C 型稳压稳流电泳仪: 北京六一仪器厂; TS-680D 全自动凝胶成像分析仪: 上海培清科技有限公司; 低温高速离心机: Eppendorf 公司, 德国。

1.2 实验方法

1.2.1 同源建模及模型评价

分别从 PDB 数据库中 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索到已知三维结构的单链抗体和 Bt Cry 毒素蛋白作为模板蛋白, 通过 SWISS-MODEL 网站 (<http://www.swissmodel.expasy.org/>) 建立抗 Cry1Ac 单链抗体和五种 Cry1 类毒素蛋白 (Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1E, Cry1F) 的分子模拟结构。建模结构采用 Procheck^[5] 程序的 Ramachandran plot 以及 verify3D^[6] 进行打分, 评价三维结构与其一级序列的兼容性。

1.2.2 分子对接及氨基酸结合热点预测

利用 ZDOCK Server 网站

(<http://zdock.umassmed.edu/>) 进行抗体与毒素蛋白的对接, 获取抗原-抗体复合体结构, 再利用 Hotpoint 网站和 SPDB-Viewer 软件 (版本 4.10) 预测抗原-抗

体共同关键氨基酸结合热点。

1.2.3 重叠延伸 PCR 定点突变试验

1.2.3.1 饱和突变引物设计

根据重叠延伸 PCR 定点突变技术的原理设计三对引物，其中 F 和 R 为侧翼引物，用来扩增单链抗体全长基因，其 5' 末端分别带有 NcoI 和 NotI 酶切位点。

另外两对引物 Fzm 和 Rzm，Fm 和 Rm 为两条完全反向互补的引物且在靶位点附近有一定程度重叠。Fzm 和 Rzm 引物在单链抗体 105 位引入终止子突变，Fm 和 Rm 引物在突变靶位点处（104、105、107 位氨基酸）设计成 NNN（N 代表 4 种核苷酸等比例混合）。

表 1 突变试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

突变位点	引物	引物序列 (5'to 3')
104	F	CATG <u>CCATGG</u> CCGAGGTGCAGCTGTT
105	Fzm	GAAATCTGGTGCTTATTAGGACTACTGGGGCCAGGAAC
107	Rzm	GTCCCTGGCCCCAGTAGTCCTAATAAGCACCAGATTTC
	Fm	GAAATCTGGTGCTNNNNNNGACNNNTGGGGCCAGGAAC
	Rm	GTCCCTGGCCCCANNNNGTCNNNNNNAGCACCAGATTTC
	R	ATAAGAATGCGGCCGCCCGTTTGATTTC

1.2.3.2 重叠延伸 PCR

首先向抗体基因引入终止突变。分别利用 F 和 Rzm、Fzm 和 R 扩增单链抗体的上游片段和下游片段，然后切胶回收上下游片段的 PCR 产物，等比例混合后作为模板，用基因的全长序列引物 F 和 R 进行第三次扩增，使上下游片段在靶位点处交错，互为模板重叠延伸成引入终止突变的单链抗体基因。

然后以含有终止突变的单链抗体基因为模板，分别利用 F 和 Rm、Fm 和 R、F 和 R 再次进行重叠延伸 PCR 拼接成完整的含有随机突变的单链抗体基因。

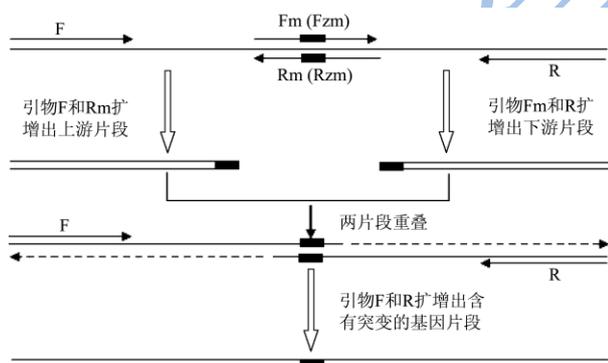


图 1 重叠延伸 PCR 法定点突变试验（黑色区域表示突变位点）

Fig.1 Site-directed mutagenesis by overlap extension PCR

1.2.4 电转化构建饱和突变库

1% 琼脂糖凝胶回收重叠延伸 PCR 产物并进行 NcoI、NotI 双酶切后回收片段，同时将 PIT2 载体同样用 NcoI 和 NotI 进行双酶切，回收大片段，将两次回收的单链抗体基因片段和 PIT2 载体加入 T4 DNA 连接酶进行过夜连接。连接产物电穿孔电转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞。电转化条件为 200 Ω，25 μFd，2.0 kV。电转化结束后，迅速向电击杯中加入 1 mL 经 37 °C 预热的 2×TY 培养基重悬细胞，然后转移至 1.5

mL 离心管中于 37 °C、250 r/min 培养条件下复苏 1 h 后，取 10 μL 转化菌进行梯度稀释后涂布 TYE-Amp⁺ 平板，37 °C 培养过夜，随机挑取平板上的阳性克隆为模板，选用 Tomlinson 抗体库中提供的上游引物 LMB3-CAGGAAACAGCTATGAC 和下游引物 PHEN-CATTGCGGCCCCATTCA 进行菌落 PCR 扩增及双酶切验证、测序验证。同时计算库容，测定转化效率。剩余菌液于 5000 r/min 条件下离心 5 min 后全部涂布于 TYE-Amp⁺ 平板，37 °C 培养过夜后，向平板中加入 2×TY 培养液 2 mL，用无菌涂布棒刮取平板上的菌苔转移至 1.5 mL 离心管中，加入甘油（终浓度 15%）混匀，即为饱和突变库，冻存于 -80 °C 备用。

2 结果与分析

2.1 同源建模及分子对接

将目标蛋白和模板进行序列比对，发现抗体和模板蛋白的序列一致性在 52%~93% 之间，Cry 毒素和模板蛋白的序列一致性在 49%~99% 之间，同源性很高。选用综合打分最高的为模板（单链抗体模板 PDB 编号为 2GHWB，Cry1Ac，Cry1B，Cry1C，Cry1E，Cry1F 毒素蛋白的模板 PDB 编号分别为 4ARYA，3EB7A，1CIYA，1DLCA，4W8JA）分别对抗 Cry1Ac 毒素的单链抗体和五种 Cry1 类毒素进行同源建模获取其三维结构，经过能量优化和模型评估后得到了合理的三维结构模型。使用 Procheck 程序对所得三维结构主链构型的 Φ-Ψ 二面角的分布进行检查。Ramachandran plot 检测图显示（图 2），建模蛋白 86.6% 残基的 Φ 和 Ψ 角落在核心区，11.9% 的残基落入最大允许区，仅 0.5% 残基落在不允许区，说明建模结构的氨基酸二面

角是非常合理的。运用 verify3D 方法对该模拟结构进行打分, 结果显示 99.16% 的残基 3D-1D 兼容性分值 >0.2, 表明该模型一级序列与三级结构的相容性较好。综合 Procheck 和 verify3D 方法的评价结果, 表明模建所得到的 scFv 的三维结构合理可信。

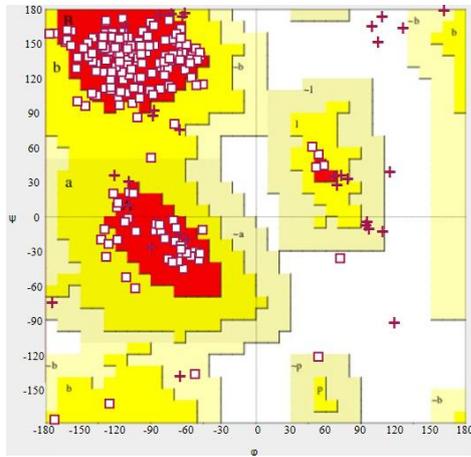


图 2 scFv 抗体的 Ramachandran 图

Fig. 2 Ramachandran plot of scFv

在同源建模得到的 scFv 和毒素蛋白结构的基础上, 以 Cry1 类毒素为受体, 抗 Cry1Ac 毒素的 scFv 为配体进行计算机模拟分子对接, 获得抗原-抗体对接复合体, 如图 3 所示。

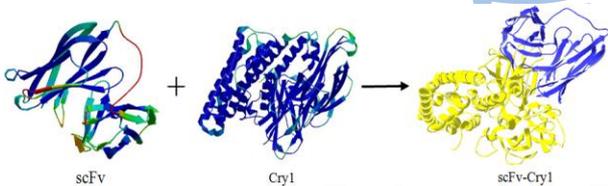


图 3 抗 Cry1Ac 毒素的单链抗体 (scFv) 与 Cry1 类毒素的三维结构模拟及分子对接

Fig.3 Three-dimensional structure modeling of scFv against Cry1Ac, Cry1Ac, and Cry1 toxins and molecular docking

2.2 关键氨基酸结合热点分析

利用 ZDOCK Server 网站 (<http://zdock.umassmed.edu/>) 将抗 Cry1Ac 毒素的单链抗体与 Cry1 类毒素进行分子对接后, 再分别利用 Hotpoint 网站和 PDB Viewer 软件预测氨基酸结合热点, 获取了抗 Cry1Ac 毒素单链抗体与五种 Cry1 类毒素蛋白的共同氨基酸结合位点分别是单链抗体的 104 位的酪氨酸、105 位的苯丙氨酸和 107 位的酪氨酸 (表 2)。

2.3 重叠延伸 PCR 结果

重叠延伸 PCR 技术是经典的定点突变方法, 能方便地对基因中间的靶位点进行饱和突变。三次 PCR 的

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 成功获取了单链抗体基因的上游和下游片段, 经重叠延伸 PCR 后获得了完整的单链抗体基因全长片段 750 bp。将此片段连接到 PIT2 质粒, 转化涂板挑取阳性克隆, 进行菌落 PCR 鉴定。

表 2 单链抗体与五种 Cry1 类毒素蛋白的共同氨基酸结合位点

Cry1 toxins			
分子对接	共同氨基酸结合位点		
scFv-Cry1Ac(Hotpoint)	104	105	107
scFv-Cry1Ac(PDB Viewer)		105	
scFv-Cry1B(Hotpoint)	104		
scFv-Cry1B(PDB Viewer)	104	105	
scFv-Cry1C(Hotpoint)	104	105	107
scFv-Cry1C(PDB Viewer)			
scFv-Cry1E(Hotpoint)	104	105	
scFv-Cry1E(PDB Viewer)			
scFv-Cry1F(Hotpoint)	104	105	107
scFv-Cry1F(PDB Viewer)	104	105	107

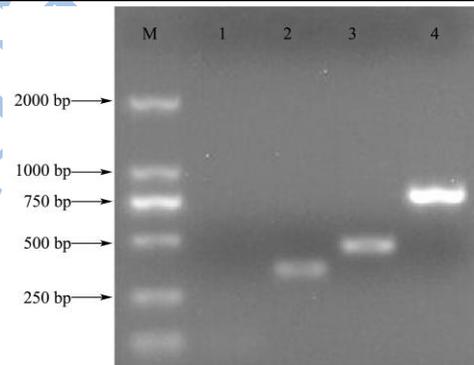


图 4 重叠延伸 PCR 产物的电泳检测

Fig.4 Analysis of overlap extension PCR product by agarose gel electrophoresis

注: M. DNA marker DL2000, 1. 阴性对照, 2. 抗体基因上游片段 3. 抗体基因下游片段 4. 重叠延伸 PCR 产物。

2.4 阳性克隆菌落 PCR 验证

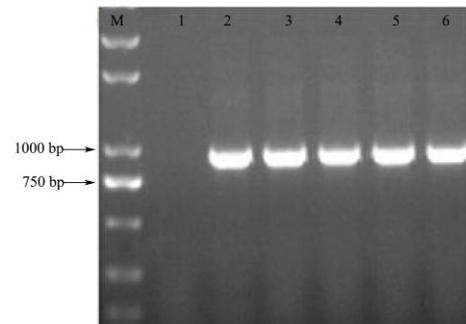


图 5 重组子菌落 PCR 验证

Fig.5 Analysis of recombinant colonies by PCR

注: M. DNA marker DL2000, 1. 阴性对照, 2-6. 重组子菌落PCR产物。

随机挑取 5 个单菌落, 以 Tomlinson 抗体库中提供的上游引物 LMB3 和下游引物 PHEN 进行菌落 PCR 验证 (图 5), 在 1000 bp 处出现清晰条带, 和单链抗体片段 (935 bp) 大小一致。

2.5 重组子双酶切验证

选取第 2 泳道的阳性克隆提取 PIT2 重组质粒进行 NcoI 和 NotI 双酶切验证, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳出现两条带: 约 5000 bp 的 PIT2 载体片段和 935 bp 单链抗体插入片段 (图 6), 说明目标片段已插入载体且酶切位点正确。

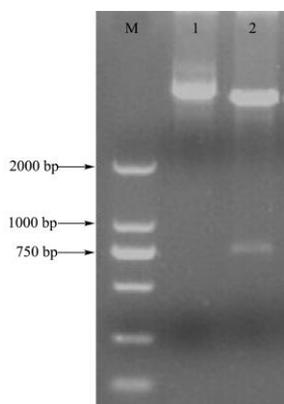


图 6 PIT2 重组质粒酶切验证

Fig.6 Analysis of double-enzyme digestion product of the recombinant PIT2 plasmid by agarose gel electrophoresis

注: M. DNA marker DL2000, 1. 未酶切, 2. 双酶切产物。

2.6 突变库构建及鉴定

将突变后的基因克隆到 PIT2 载体上中, 电转化构建饱和突变库, 经测定, 库容为 8×10^6 。随机挑选 10 个阳性克隆测序, 获得了 7 种不同的基因序列。测序结果表明, 插入的序列为完整的单链抗体基因, 目标位点的氨基酸均有突变, 成功实现了三个关键氨基酸结合位点的协同突变。

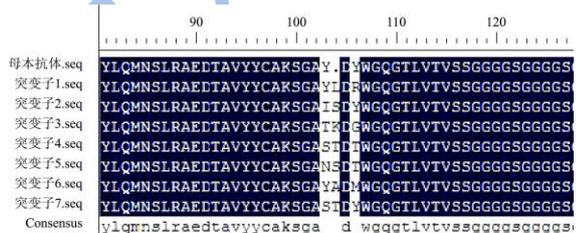


图 7 突变抗体和母本抗体序列比对分析

Fig.7 Sequence alignment and mutation analysis of mutated antibody and maternal antibody

3 结论

3.1 常见的蛋白质结合情况分析方法是 X-射线蛋白质结晶, 但该方法需要耗费大量的人力物力。同源模型虽然存在一定的偏差, 但随着蛋白质结构-功能关系研究的深入、分子建模软件算法科学性的增强, 同源模型与晶体结构间的差异将越来越小。特别是同源模型具有可操作性高和成本低的优势, 使得利用同源模型来确定靶位点的方法越来越普及。

3.2 在体内, 体细胞高频突变更多的发生在能够与抗原直接接触的抗体可变区的突变热点或者临近的氨基酸。针对这些突变热点引入突变, 相比突变热点之外的区域更有可能得到性能优化的突变抗体。通过同源建模及计算机模拟对接, 根据对接结构及形成复合体的对接能量计算, 来预测参与抗原-抗体结合的关键氨基酸位点, 为抗体的分子改造提供理论依据。Barderas 等^[7]利用 3D 结构模型辅助预测抗原结合部位的关键氨基酸结合位点, 采用互补决定区 (CDR) 步行法将胃泌激素单链抗体的亲和力提高了 454 倍。

3.3 定点突变是随着对抗体结构和功能关系的认识不断加深, 借助计算机模拟技术进行抗体改造, 可以在限定范围内有目的的引入突变。与抗原直接接触的决定互补区 (complementarity-determining region, CDR) 是常见的突变位点^[8]。这些突变位点对抗体 CDR 区一些结构产生微小的变化, 使得抗体和抗原结合区的互补性更趋完善^[9]。单链抗体共有 6 个 CDR 区, 其中重链 CDR3 区被认为是对抗原抗体结合贡献最大的^[10]。Park 等^[11]仅对一株单链抗体的重链 CDR3 区进行了随机突变, 就筛选获得了亲和力提高近 40 倍的突变抗体。研究表明, 多点突变能引入正向的协同作用, 造成蛋白空间构象的变化, 从而比定点突变或全基因随机突变能更有效地获取突变子^[12]。但如果采用单点突变的方法进行协同突变, 可能会面临巨大的计算模拟和试验工作量。重叠延伸 PCR 技术适用于 DNA 片段中间区域的碱基改变, 戴灿等^[13]通过三次 PCR 成功地将 CDCA8 启动子上的一个 NFY 结合位点进行了突变, 相比传统的体外突变技术及试剂盒法更加简便和经济。

3.4 为消除直接以亲代抗体基因为基础引入突变所导致的亲代抗体的过表达, 采用以引入终止密码子的突变抗体为母本材料进行饱和突变, 构建饱和突变抗体库, 以降低亲代抗体基因表达对抗体库筛选的干扰。对于突变子的筛选, 单点饱和突变很容易筛选到全部突变子, 对筛选策略并无太高要求。对于多点

协同饱和突变,目前已建立多种高通量筛选方法,如噬菌体表面展示技术、细菌表面展示技术、核糖体展示技术、酵母表面展示技术、酵母双杂交技术。本实验室依托噬菌体展示技术,已从噬菌体抗体库中成功筛选出一系列 Bt Cry 毒素的单链抗体并建立了相应的酶联免疫检测方法^[3,14]。针对广谱特异性抗体的筛选方法包括多靶标物的共性结构域包被或多种抗原交替筛选等方法,根据筛选目标制定高效的库筛选策略可以确保高亲和力、广谱抗体株成功分离。

3.5 在本实验中,利用同源建模和分子对接技术对抗 Cry1Ac 毒素单链抗体和 Cry1 类毒素的共同氨基酸结合位点进行了分析,预测到其共同关键氨基酸结合位点为单链抗体重链互补决定簇区 3(VH-CDR3)的 104 位酪氨酸,105 位苯丙氨酸及 107 位的酪氨酸。单链抗体的重链互补决定簇区 3(VH-CDR3)是识别抗原表位的关键位点,针对这些位点引入突变,更有可能得到高亲和力广谱抗体。鉴于三个共同关键氨基酸位点位置临近且处于单链抗体基因的中间部位,选用重叠延伸 PCR 技术进行点饱和突变,成功地对单链抗体的 CDR3 区进行了三点协同饱和突变,成功构建了库容为 8×10^6 的多点协同饱和和突变库,为进一步利用噬菌体表面展示技术筛选针对 Cry1 类毒素的高亲和力广谱识别抗体奠定材料基础。

参考文献

- [1] 陈小洁.转 Cry 1Ab 抗虫基因玉米的分子生物学研究[D].新乡:河南师范大学,2013
CHEN Xiao-jie. Tum cry1Ab insect-resistant genes of maize of molecular biology research [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2013
- [2] Eteshola E. Isolation of scFv fragments specific for monokine induced by interferon-gamma (MIG) using phage display [J]. Journal of Immunological Methods, 2010, 358(1-2): 104-110
- [3] Zhang, X, Liu Y, Zhang C Z, et al. Rapid isolation of single-chain antibodies from a human synthetic phage display library for detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1B toxin [J]. Ecotoxicology and Environment Safety, 2012, 81: 84-90
- [4] Bravo A, Likitvivanavong S, Gill S S, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41(7): 423-431
- [5] Laskowski R A, Rullmann J A, MacArthur M W, et al. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR [J]. Journal of Biomolecular NMR, 1996, 8: 477-486
- [6] Bowie J U, Lüthy R, Eisenberg D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure [J]. Science, 1991, 253(5016):164-70
- [7] Barderas R, Desmte J, Timmerman P, et al. Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2008, 105(26): 9029-9034
- [8] Steidl S, Ratsch O, Brocks B, et al. In vitro affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification [J]. Molecular Immunology, 2008, 46(1): 135-144
- [9] Cauerhff A, Goldbaum F A, Braden B C. Structural mechanism for affinity maturation of an anti-lysozyme antibody [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2004, 101(10): 3539-3544
- [10] Arnaout R, Lee W, Cahill L P, et al. High-resolution description of antibody heavy-chain repertoires in humans [J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22365
- [11] Park S G, Jung Y J, Lee Y Y, et al. Improvement of neutralizing activity of human scFv antibodies against hepatitis B virus binding using CDR3 V(H) mutant library [J]. Viral Immunology, 2006, 19(1): 115-123
- [12] Bloom J D, Meyer M M, Meinhold P, et al. Evolving strategies for enzyme engineering [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2005, 15(4): 447-452
- [13] 戴灿,苗聪秀,卢光琇.基于重叠延伸 PCR 法的定点突变技术[J].现代生物医学进展,2010,10(3):411-412
DAI Can, MIAO Cong-xiu, LU Guang-xiu. Site-directed mutagenesis based on overlap extension PCR [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(3): 411-412
- [14] Zhang X, Xu C X, Zhang C Z, et al. Established a new double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ab toxin based single-chain variable fragments from a naive mouse phage displayed library [J]. Toxicon, 2014, 81: 13-22