

# 鸡球虫病免疫防治研究进展

李艳琴, 王振海, 秦建华\*, 李覃清

(1 河北农业大学动物科技学院, 河北保定071001; 2. 保定市畜牧水产局, 河北保定071000)

**摘要** 从鸡球虫强毒疫苗、弱毒疫苗、重组抗原苗、单克隆抗体以及单链抗体等方面, 阐述了鸡球虫病免疫预防的发展过程及鸡球虫病免疫防治的发展方向。

**关键词** 鸡; 球虫病; 免疫预防

**中图分类号** S858.31 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)13-05438-03

鸡球虫病是一种严重危害养鸡业的寄生虫疾病之一, 主要是由艾美耳属的肠道原生寄生虫引起的。几乎所有养鸡的地方都发生过球虫病, 特别是在发展规模化、集约化养鸡业的今天, 球虫病对家禽的影响已经相当严重。若不能有效控制球虫病, 鸡的发病率可达50%~70%, 死亡率达20%~30%, 严重时达80%<sup>[1]</sup>。球虫病已经成为阻碍集约化养鸡生产发展的全球性疾病。据Bhogal等<sup>[2]</sup>报道全世界每年因鸡球虫病造成的损失超过20亿美元。而鸡球虫病给我国养鸡业造成的直接损失每年约30亿元人民币, 严重制约了我国养鸡业及其产品的出口。随着集约化养鸡业的兴起和磺胺类化学药物的出现, 化学药物成为防治鸡球虫的首选, 但药物的长期使用, 不可避免地导致了耐药虫株的产生, 并且造成食品中抗球虫药物的残留, 目前球虫对许多药物都有一定的耐药性。由于人们对绿色食品的要求越来越高, 从免疫的角度预防该病已成为国际上的共识。

## 1 鸡球虫强毒疫苗的应用

鸡球虫的疫苗预防始于强毒疫苗的研制。1948~1959年Dickinson等将5种球虫卵囊混于鸡饲料中, 结果产生良好的群体免疫力。随后Edgar创造了另一种免疫方法, 即通过饮水或饲料给4~10日龄的鸡接种少量含有8种鸡球虫的混合孢子化卵囊, 通过鸡体繁殖的子代卵囊播散在垫料上, 使鸡群反复感染、不断增强免疫力。加拿大的李荣丰提出了另一种独创性的凝胶接种体系, 将疫苗均匀分布于凝胶后接种鸡, 此即为含有各种主要虫种的鸡球虫苗Immucox<sup>[3]</sup>。以后相继研究出藻酸盐颗粒强毒苗。但强毒苗具有一定的缺点, 因其毒力较强, 容易引发球虫病; 球虫卵囊在水中沉降较快, 易造成免疫不均匀, 必须有较好的悬浮剂才能使用; 此外, 也可能将强毒球虫引入新鸡场。因此人们开始转向用致弱苗来预防鸡球虫病。

## 2 鸡球虫弱毒苗的应用

鸡球虫弱毒苗有鸡胚传代致弱株、选育的早熟弱毒株、理化处理的致弱株等多种。Long<sup>[4]</sup>首次用鸡胚传代的方法培育出柔嫩艾美耳球虫的致弱虫株, 致弱株对雏鸡的致病力减弱, 但能使雏鸡抵抗强毒虫的攻击。我国的张勤、杨振中也用鸡胚培养出柔嫩艾美耳球虫致弱株。1974年, Jeffers首次证实了柔嫩艾美耳球虫早熟虫系在发育周期缩短的同时, 致病力也下降, 但仍具有免疫原性。1992年英国豪顿研究所研制出世界上

第一个由7种早熟弱毒虫株组成的球虫苗Paracox。国内王江清等<sup>[5]</sup>、秦建华等<sup>[6]</sup>、段嘉树等<sup>[7]</sup>分别选育出*E. maxima*、*E. acervulina*、*E. tenella*的早熟株, 并成功研制了三价早熟弱毒苗。Jenkins等<sup>[8]</sup>用15Krad X射线和12Krad $\gamma$ 射线处理堆型和巨型艾美耳球虫卵囊, 发现卵囊毒力明显下降, 但它仍可以使宿主产生保护性免疫反应。吴兆敏等<sup>[9]</sup>用化学诱变剂NTG处理柔嫩艾美耳球虫卵囊, 结果发现在毒力下降的同时卵囊繁殖力也下降。弱毒苗的使用在鸡球虫病的免疫预防中发挥了重要的作用。但弱毒苗不能对所有种类鸡球虫产生完全的保护性免疫, 对同一种类的不同虫株也仅能产生部分保护性免疫, 且鸡胚传代适应弱毒株活虫苗使用时, 有致病力恢复的现象, 早熟虫株、理化处理株存在卵囊产量低、容易返祖等现象, 这些都限制了其在生产中的应用。20世纪80年代以来, 随着细胞生物学、分子生物学、基因工程的发展以及鸡球虫的抗原变异机理不断被揭示, 保护性抗原分离取得前所未有的突破, 出现了鸡球虫的重组抗原苗。

## 3 鸡球虫抗重组抗原苗的应用

鸡球虫抗原基因的克隆始于1987年, 报道的第一个球虫抗原基因是5401基因。5401基因是BMC4基因序列的一部分, 编码BtMC4蛋白的C末端区域。Darforth用重组大肠杆菌生产了柔嫩艾美耳球虫的重组抗原5401基因, 将其注入鸡体内, 发现5401基因重组抗原苗对柔嫩艾美耳球虫经口攻击感染产生了部分保护。李安兴等<sup>[10-11]</sup>成功地克隆出柔嫩艾美耳球虫北京株重要抗原SO7基因, 并在大肠杆菌上得到高效表达, 100 $\mu$ g SO7重组抗原免疫鸡获得了部分保护力。蒋建林等<sup>[12]</sup>成功地克隆了柔嫩艾美耳球虫北京株第2代裂殖子的BMC2基因, 将测序结果与Tonley等<sup>[13]</sup>报道的从孢子克隆出的BMC2基因序列进行了比较, 说明此基因具有高度保守性, 因此, BtMC2基因的表达蛋白是一种理想的疫苗候选抗原。李安兴等<sup>[14]</sup>成功地克隆了*E. tenella* BJ株的TA4基因。潘晓亮等<sup>[15]</sup>用*E. tenella* BJ株的BMC和ta4 2种基因的表达产物免疫鸡, 然后用柔嫩艾美耳球虫攻击免疫鸡, 通过观察免疫鸡的增重量和卵囊产量, 发现2种重组表达产物对柔嫩艾美耳球虫均具有一定的免疫保护作用。鸡球虫的基因组庞大, 如柔嫩艾美耳球虫至少有14条染色体, 且大多数染色体的大小在 $3.5 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6$  bp, 基因组DNA约为 $5.5 \times 10^7 \sim 6.0 \times 10^7$  bp<sup>[16]</sup>。同一球虫不同的发育阶段存在各自特异性抗原和共同的特异性抗原, 球虫的基因在不同发育阶段的表达情况很复杂, 到目前为止, 只有部分基因或基因片段被克隆出来, 并证实一些已克隆出的鸡球虫

作者简介 李艳琴(1963-), 女, 河北深州人, 副教授, 从事畜牧兽医研究。\* 通讯作者。

收稿日期 2008-03-03

基因表达的蛋白只具有部分保护性<sup>[17-19]</sup>。因此,鸡球虫抗重组抗原苗有待进一步完善。

#### 4 鸡球虫单克隆抗体的应用

自20世纪70年代德国学者 Kohler 和英国学者 Milstein 利用细胞融合技术首次成功地制备出单克隆抗体以来<sup>[20]</sup>,单克隆抗体在疾病的诊断、治疗、预防领域显示出重要作用。国内外已经建立了多株针对堆型艾美耳球虫的单克隆抗体细胞株<sup>[21-24]</sup>,并用单克隆抗体对已建立的表达性 DNA 文库或 cDNA 文库进行筛选球虫基因,利用这种方法已经筛选出很多基因如堆型艾美耳球虫的 9S4<sup>[25]</sup>、6S2<sup>[26]</sup>、Eala<sup>[27]</sup>、MA<sup>[28]</sup>、EAMZp30-40<sup>[29]</sup>、MA16<sup>[30]</sup>等。但单克隆抗体有许多难以克服的问题。首先,在体内代谢快,特异性较差;其次,许多特异性抗体在体内并不完全发挥其凝集活性;再次,用杂交瘤细胞技术筛选的单克隆抗体一般只能保持其天然抗体的活性,制备工作异常繁琐和费时,挑选的抗体不具有中和抗原生物活性的能力,许多优良抗体株在传代过程中易丢失<sup>[31]</sup>。基因工程抗体在理论上不仅弥补了杂交瘤细胞技术和本质上的不足,而且极大地充实和发展了单克隆抗体的内涵。

#### 5 单链抗体的应用

目前所用的疫苗大多数只有部分保护性免疫,这是因为不同种或同种不同株鸡球虫的免疫原性差异所致,虽然这些结果在抗球虫方面取得一些成果,但完善的适合不同虫种及虫株的鸡球虫苗的研制有必要进一步发展,然而全部抗原的克隆比较困难,而且需要采取合理的抗原呈递系统,于是有特异性单链抗体的诞生<sup>[32-33]</sup>。单链抗体是一种新型基因工程抗体,免疫原性低,但能较好地保持对抗原的亲合活性,它的诞生解决了诸多问题,但目前所用的单链抗体是由特异性的单克隆抗体为基础制备的<sup>[34-35]</sup>,它虽具有一定的特异性,但制备比较复杂。20世纪90年代发展出了噬菌体抗体库技术,可以绕过杂交瘤甚至绕过免疫途径直接得到特异性抗体基因,弥补了传统单克隆抗体制备繁琐、抗原性强、穿透力弱等不足,具有简便、快速、筛选容量大等优势,被誉为抗体制备的革命性进展,在导向治疗中有潜在的临床应用价值。

噬菌体展示技术其核心在于利用 PCR 方法从淋巴细胞中获得抗体重链和轻链基因,并将这些基因随机重新组合,克隆到噬菌体表达载体中,使之与噬菌体表面蛋白的基因相融合,然后以融合的形式与噬菌体的外壳蛋白共同表达于噬菌体表面,以利于配体的识别和结合,而插入的 DNA 片段对噬菌体的生物学特性无多大影响<sup>[36]</sup>。

在构建噬菌体展示系统应用最广泛的丝状噬菌体(M13, Fd)中,外壳蛋白编码基因 P<sub>3</sub> 和 P<sub>8</sub> 的信号肽序列与编码成熟蛋白序列之间插入外源基因,并不影响其表达系统<sup>[37]</sup>。P<sub>3</sub> 有2个位点可供外源 DNA 插入,即 N 端和近 N 端可伸曲臂,当外源蛋白融合到 P<sub>3</sub> 的 N 端时,噬菌体仍具感染能力。P<sub>8</sub> 展示与 P<sub>3</sub> 类似,但是噬菌体上 P<sub>8</sub> 递呈的外源蛋白分子数目远远多于 P<sub>3</sub>,且形成多价抗体,而噬菌体表面却只表达3~5个 P<sub>8</sub> 分子,同时 P<sub>8</sub> 易被蛋白水解酶水解,在辅助噬菌体超感染时, P<sub>3</sub> 蛋白和 P<sub>8</sub> 融合蛋白的竞争表达可以使每个噬菌体表面平均显示不到一个融合蛋白,形成所谓的“单价”噬菌体。由于 P<sub>3</sub> 单价表面展示体系可消除多价

形成亲和力的作用,有利于在免疫富集筛选过程中获得高亲和力克隆,所以,该系统主要用于抗体库的构建,适宜于筛选亲和力较高的抗体<sup>[38]</sup>。噬菌体抗体的筛选,抗体 ScFv 在噬菌体表面表达即为噬菌体抗体,它既有识别抗原的能力,又具有感染寄主菌进行扩增的能力。这种性质为快速筛选及富集特异性抗体提供了简便而高效的操作系统<sup>[39]</sup>。

自从 Kohler 和 Milstein<sup>[40]</sup> 开创脾细胞与骨髓瘤细胞融合建立的杂交瘤技术以产生单克隆抗体以来,使体外制备针对某一特定抗原的高亲合性抗体成为可能。虽然杂交瘤技术制备的单克隆抗体纯度均一、特异性强、亲合性高,但是也存在一些难以克服的缺点,由于 B 细胞克隆激活的限制使高亲合性且多样性单克隆抗体的筛选遇到困难。理论上讲,由脾细胞高度多样性的 mRNA 制备的噬菌体抗体库能与各种抗原特异性结合,噬菌体抗体库中的抗原特异性噬菌体抗体可经特异性抗原的亲合吸附筛选而富集<sup>[41-42]</sup>。Hogenboom 等首次构建成功 ScFv 合成抗体库,从中筛选得到了针对多种半抗原的抗体。1985年 Smith 首先将外源多肽基因与丝状噬菌体 Fd-Tet 基因相连接,表达出有多肽活性的合蛋白,进而发展了一种噬菌体表面表达呈现系统(Phage Surface Display System)。1990年,Writer 实验室的 McCafferty 等报道将抗溶菌酶鼠 mAb 的 VH 和 VL 基因用基因 Linker 连接,形成 ScFv 基因,克隆入 Fd 噬菌体载体 FdCAT1 中,使 ScFv 基因与噬菌体小外壳蛋白基因 G 连接,表达的 ScFv 与 G 的基因产物 Cp 的 N 末端融合,可呈现在噬菌体表面,故称为噬菌体抗体。同时,他们将表达 ScFv 抗体的噬菌体和不表达抗体的噬菌体以一定比例混合,用亲和层析柱吸附,洗脱后感染细菌,证明表达 ScFv 抗体的噬菌体富集了1000倍,这为噬菌体抗体库技术奠定了基础。随后 Hogenboom 等报道用组合感染法在噬菌体表面表达了 Fab 抗体。Kang 等将抗 NPN 的 Fab 抗体基因和噬菌体主要衣壳蛋白 Cp 的基因 G 融合,即以 pComb8 为载体构建了噬菌体抗体库,使噬菌体表面可表达多价 Fab 抗体。1991年 Writer 小组成功地应用该系统组建了抗半抗原 phOX 抗体库, Lerner 小组则应用新构建的 pComb3 噬粒及 M13 噬菌体组建了抗破伤风毒素抗体库。他们将抗体轻、重链基因随机组合形成的 ScFv 或 Fab 基因片段插入 Fd DOG 或 pComb3g3 先导序列紧下游,形成抗体片段与外壳蛋白亚基的融合蛋白,借助 G3P 信号肽穿膜作用,进入宿主菌外周基质,在正确折叠后被包装于噬菌体尾部,随噬菌体穿出胞外。利用固相化抗原经多轮结合-洗脱-繁殖,筛选出目的克隆,其富集倍数可达 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>。BnZhou 等<sup>[43]</sup> 以枯草杆菌 IFO3336 孢子筛选出9个 ScFv 噬菌体抗体克隆,利用消减法进一步构建 Fab 链替换次级抗体库,筛选出人源性炭疽杆菌孢子抗体,可用于炭疽孢子检测。到目前为止,利用噬菌体抗体库技术已经获得大量针对病原微生物的抗体<sup>[44-45]</sup>,具有临床诊断和治疗的应用前景。但以鸡球虫裂殖子为抗原的噬菌体抗体库目前尚未见文献报道。

#### 6 展望

编码抗体可变区的基因结构极为复杂,由于基因重排的多变性, B 淋巴细胞本身还具有多种编码抗体的胚系基因以及重、轻链配对, CDR3 这个高变区的缺失、插入与体细胞突

变等因素,决定了抗体库的多样性。因而,从B淋巴细胞将编码全套抗体蛋白的基因插入编码噬菌体外壳蛋白的基因中,抗体就会和外壳蛋白相融合表达在噬菌体表面,形成噬菌体抗体库,从而被特异的抗原筛选出来。通过构建以裂殖子为抗原的鸡球虫噬菌体抗体库,再将鸡球虫裂殖子抗原与噬菌体表面抗体反应,筛选出抗鸡堆型艾美耳球虫裂殖子特异性单链抗体。这一技术的研究与应用将为进一步认识鸡球虫的各个发育阶段的免疫机制提供理论依据,为鸡球虫病的免疫预防研究提供新的工具。

#### 参考文献

- [1] BIGGS P M. The world disease of poultry disease [J]. *Avian Pathology*, 1982 (11): 281 - 300.
- [2] BHOGAL B S. Potential of recombinant antigen as a prophylactic vaccine for one-day-old broiler chickens against *E. acervulina* and *E. tenella* infections [J]. *Vet Immun Immunopath*, 1992(31): 323 - 335.
- [3] SHIRLEY M W. Research on avian coccidia: An update in control of coccidiosis [J]. *British Veterinary Journal*, 1992, 148: 6.
- [4] 刘美丽, 闫永平, 郑明学. 鸡球虫苗的研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2002, 23(5): 4 - 6.
- [5] 王江清, 李德昌, 张勤, 等. 巨型艾美耳球虫早熟减毒株的选育 [J]. *兽医大学学报*, 1991(3): 266.
- [6] 秦建华, 李德昌, 张勤, 等. 堆型艾美耳球虫早熟减毒株的选育 [J]. *兽医大学学报*, 1992(2): 174.
- [7] 翟军. 柔嫩毒素艾美耳球虫早熟弱毒株致病性和完善疫苗原性研究初报 [J]. *当代畜牧*, 1994.
- [8] JENKINS MC, SEFERIAN P C, AUGUSTINE P C, et al. Protective immunity against coccidiosis elicited by radiation attenuated *Eimeria maxima* sporozoites that are incapable of asexual development [J]. *Avian Disease*, 1993, 37: 74 - 82.
- [9] 吴兆敏, 戴一洪. 鸡球虫免疫预防研究: NIG 处理柔嫩艾美耳球虫诱导雏鸡保护性免疫的研究 [J]. *中国畜禽传染病*, 1991(4): 14 - 16.
- [10] 李安兴, 蒋金书, 刘群. 柔嫩艾美耳球虫 BJ 株 SO7 基因的克隆与序列分析 [J]. *中国农业大学学报*, 1999, 32(1): 79 - 84.
- [11] 李安兴, 蒋金书. 柔嫩艾美耳球虫 BJ 株 SO7 基因在大肠杆菌中的表达 [J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(5): 469 - 474.
- [12] 蒋建林, 蒋金书. 柔嫩艾美耳球虫第二代裂殖子中的 *HMIC2* 基因克隆及测序 [J]. *中国兽医杂志*, 2002, 38(3): 7 - 10.
- [13] TOMLEY F M, BUMSIEAD J M, BILLINGTON K J, et al. Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (*HMIC2*) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1996, 79(2): 195 - 206.
- [14] 李安兴, 秦泽荣, 张欣萍, 等. 柔嫩艾美耳球虫 BJ 株 TA4 基因的克隆和序列分析 [J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 1999, 6(3): 146 - 152.
- [15] 潘晓亮, 丁熙成. TA4 和 *HMIC2* 表达产物免疫后对感染柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) 鸡增重和盲肠卵囊数的影响 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2002(8): 6 - 7.
- [16] SHIRLEY M W. *Eimeria* spp. from the chicken: occurrence, identification and genetics [J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 1997, 45(3): 331 - 347.
- [17] LILLEHOJ HYUN S, JENKINS MC, BACON L D. Effects of major histocompatibility genes and antigen delivery on induction of protective mucosal immunity to *E. acervulina* following immunization with a recombinant sporozoite antigen [J]. *Immunology*, 1990, 71: 127 - 132.
- [18] KIMKI S, JENKINS MC, LILLEHOJ HS. Immunization of chickens with live *Escherichia coli* expressing *Eimeria acervulina* sporozoite recombinant antigen induces partial protection against coccidiosis [J]. *Infection and Immunity*, 1989, 57(8): 2434 - 2440.
- [19] JENKINS MARK C, LILLEHOJ HS. Immunization of chicken with recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing *Eimeria acervulina* antigen elicits partial protection against coccidiosis [J]. *Poultry Science*, 1993, 70: 50.
- [20] KOHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256: 495.
- [21] 王承民, 秦建华, 赵月兰, 等. 堆型艾美耳球虫单克隆抗体细胞株的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(1): 26 - 28.
- [22] LILLEHOJ HS, SASA K, MAISUDA H. Development and characterization of chicken B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies that detect sporozoite and merozoite antigens of *Eimeria* [J]. *Poult Sci*, 1994, 73: 1685 - 1693.
- [23] SASA K, LILLEHOJ HS, MAISUDA H, et al. Characterization of a chicken monoclonal antibody that recognizes the apical complex of *Eimeria acervulina* sporozoites and partially inhibits sporozoite invasion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in vitro [J]. *J Parasitol*, 1996, 82: 82 - 87.
- [24] 秦建华, 冯雪颖, 赵月兰, 等. 堆型艾美耳球虫单克隆抗体细胞株的鉴定 [J]. *中国动物检疫*, 2003, 20(6): 25 - 26.
- [25] LAURENT F B. Cloning and expression of cDNA encoding an *Eimeria acervulina* 70Kda sporozoite protein which is related to the 70Kda heat-shock protein family [J]. *Molecular and Biochem Parasitology*, 1994, 66: 349 - 352.
- [26] LAURENT, FABRICE, BOURDEU C, et al. Cloning and characterization of an *Eimeria acervulina* sporozoite gene homologous to aspartyl proteinases [J]. *Molecular and Biochem Parasitology*, 1993, 62: 303 - 312.
- [27] VERMEULEN A N, KOKJ J, BOOGAAT P V D, et al. *Eimeria* refractile bodies proteins contain two potentially functional characteristics transhydrogenase and carbohydrate transport [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 2: 223 - 230.
- [28] JENKINS MC, DANFORTH H D, LILLEHOJ HS, et al. cDNA encoding an immunogenic region of a 22 kilodalton surface protein of *Eimeria acervulina* sporozoites [J]. *Molecular and Biochem Parasitology*, 1989, 32: 153 - 162.
- [29] JENKINS MC. *Eimeria acervulina*: cloning of a cDNA encoding an immunogenic region of several related merozoite surface and rhoptry proteins [J]. *Experimental Parasitology*, 1990, 70: 353 - 362.
- [30] CASILE MD. Characterization of a recombinant *Eimeria acervulina* antigen expressed in sporozoite and merozoite developmental stages [J]. *The Journal of Parasitology*, 1991, 77(3): 384 - 390.
- [31] NISHIKAWA S, AKIBA H, NAKAMURA M. Two chicken B cell lines resistant to ouabain for the production of chicken monoclonal antibodies [J]. *J Vet Med Sci*, 1996, 58: 1053 - 1056.
- [32] FUJANG L I, ROBERT AITKEN. Cloning of porcine ScFv antibodies by phage display and expression in *Escherichia coli* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2004, 97(1/2): 39 - 51.
- [33] RHYNER C, WEICHEL M, HUBNER P, et al. Phage display of human antibodies from a patient suffering from cardiac disease and selection of isotype-specific ScFv against gliadin [J]. *Immunology*, 2003, 110(2): 269 - 274.
- [34] KIM MJ K, MIN W, LILLEHOJ HS, et al. Generation and characterization of recombinant ScFv antibodies detecting *Eimeria acervulina* surface antigens [J]. *Hybridoma*, 2001, 20(3): 175 - 181.
- [35] MIN W, KIM MJ K, LILLEHOJ HS, et al. Characterization of recombinant scfv antibody reactive with an apical antigen of *Eimeria acervulina* [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(12): 949 - 955.
- [36] MCCAFFERTY J, GRIFITHS A D. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains [J]. *Nature*, 1990, 348: 552 - 554.
- [37] BARBAS C K, KANG A S. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surface the gene site [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 7978 - 7982.
- [38] DEKUF J. New perspectives on recombinant human antibody [J]. *Immunology Today*, 1996, 17(10): 453.
- [39] 杜桂鑫, 于长明, 毛春生, 等. 人噬菌体抗体库的构建和甲肝抗体的筛选 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20(1): 49 - 52.
- [40] KOHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256: 49 - 51.
- [41] BARRA C F, KANG A S, LERNER R A, et al. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surface: The gene site [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 78 - 79.
- [42] MARKS J D, HOOGENBOOM H R, BONNERT T P, et al. Bypassing immunization: Human antibodies from V gene libraries displayed on phage [J]. *J Mol Biol*, 1991, 222: 581.
- [43] ZHOU B, PETER W, KIM D J. Human antibodies against spores of the genus *Bacillus*: A model study for detection of an outbreak against anthrax and the bioterrorist threat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 5241 - 5246.
- [44] ZHANG Z C, HUX J, YANG Q. Generation of high affinity human single-chain antibody against Hc-S1 of hepatitis B virus from immune phage display antibody library [J]. *Hepatology*, 2004, 3(1): 77 - 81.
- [45] 王学, 王海涛, 陈万荣, 等. 人抗体组合文库的构建和抗 HBsAg 噬菌体抗体的筛选 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 1997(29): 183 - 191.

(上接第5350页)

- [4] 沈学善, 朱云集, 郭天财, 等. 施硫对‘豫麦50’籽粒灌浆特性和产量的影响 [J]. *西北植物学报*, 2007, 27(6): 1265 - 1269.
- [5] THOMAS S, HOUSLEY L. Dry matter accumulation in soft red winter wheat seeds [J]. *Crop Sci*, 1982, 22: 290 - 294.
- [6] 周竹青, 朱旭彤. 不同粒重小麦品种(系)籽粒灌浆特性分析 [J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(2): 107 - 110.
- [7] 冯伟, 郭天财, 李晓, 等. 不同降雨年型下水分处理对大穗型小麦品种籽粒灌浆及产量的影响 [J]. *水土保持学报*, 2005, 19(1): 192 - 195, 199.