

综 述

噬菌体展示技术的原理和方法

戴和平 高 宏 赵新颜

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY PRINCIPLE AND METHODS

DAI He ping, GAO Hong and ZHAO Xin yan

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 噬菌体; 展示; 文库

Key words: Phage; Display; Library

中图分类号: Q939.48 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)04-400-10

噬菌体展示(Phage display)最早是由 George 开始于 1985 年^[1]。最先构建的噬菌体多肽或抗体展示文库则始于 1990 年^[2, 3]。由此, 噬菌体展示技术进入了一个飞速发展的时期。噬菌体展示的基本概念是将外源蛋白质或多肽的基因表达产物与噬菌体衣壳蛋白融合, 并在其表面展示, 同时将其遗传密码信息整合到个体噬菌体的基因组中。这个技术的最大优点是直接将可现的表达型与其基因型联系在一起, 再利用其配体的特异性亲和力, 将所感兴趣的蛋白质或多肽挑选出来。由此建立的噬菌体文库的滴度可达到 10^6 — 10^{12} 。10 年来, 噬菌体展示技术被用于抗体的制备、多肽及蛋白质和酶的制备。特别是近几年来, 该技术被作为一种新工具用于多肽和蛋白质药物的发现与研制、蛋白质-蛋白质的相互作用及蛋白质-DNA 相互作用的研究、蛋白质结构和功能的研究以及基因治疗药物的定向传递等多方面的研究。

随着噬菌体展示技术的进一步发展, 其优越性被越来越多的实验室所认识, 使得该技术的使用范围不断扩展, 也使该技术得以不断的完善和发展。在噬菌体表面展示技术的基础上, 目前已衍生出杆状病毒和一些动物病毒表面展示技术, 酵母表面展示技术等。最近又报道一种新的、不依赖于宿主细胞, 完全在体外展示的技术。从 Medline 收录的论文

收稿日期: 2001-05-10; 修订日期: 2001-06-14

基金项目: 中国科学院择优特别支持费[Stz98-3-05]; 国家自然科学基金[30050003H]; [30170727]资助

作者简介: 戴和平(1955—)女, 武汉市人; 博士, 研究员; 研究方向是将噬菌体展示技术应用于水产病毒病的防治

摘要可以看到,以“Phage”和“Display”为关键词搜索到的论文的篇数从90年代初到本世纪初呈指数上升的趋势。本文将较详细地介绍噬菌体展示技术的基本原理和方法,将该技术的优点尽可能多的展示给读者。

1 基本原理与扩展

早期的基因表达文库属非展示系统,是将DNA片段连接于噬菌体或质粒表达载体上,然后转入大肠杆菌中,通过对大量的菌落或噬菌斑的筛选,将能产生具有生物活性蛋白的单个菌落或噬菌斑分离出来。用这种方法构建的文库局限在 10^6 个重组子以下,且因受细胞培养皿大小和数量的局限,需要大量的人力物力去获得足够的单克隆。有别于非展示系统,展示系统是将所克隆的基因与其所编码的蛋白质以某种方式有机的结合在一起,并使其基因表达产物在表面展示。由此建立的展示文库可通过淘选(Panning)而不是筛选(Screening)过程,将所需要的重组基因分离出来。所谓淘选,是将展示文库作为流动相,而将与欲选择的重组基因产物有特异性亲和力的靶分子固定在一个固相载体上,洗去不能与固定相特异结合的文库的大部分成员,将特异结合的成员洗脱下来,再进一步扩增,进入下一轮淘选。由于与固定相有特异结合力的蛋白质与其编码基因是结合在一起的,如此反复数轮淘选,即可将无用的基因去掉而将有用的基因富集并分离出来。噬菌体展示技术是目前应用得最为广泛的分子展示技术,是利用细菌的病毒,如丝状噬菌体M13作为载体,将基因和基因产物有机的结合起来。由此衍生的其他展示系统的基本原理都是一样的,只是载体和宿主细胞不同而已,分别介绍如下。

2 噬菌体展示系统

2.1 单链丝状噬菌体展示系统

单链丝状噬菌体展示系统是利用了M13噬菌体独特的生命周期及其所表达的几个噬菌体蛋白质。丝状噬菌体M13大约895nm长,9nm直径。它的单键DNA基因组由6407个核苷酸残基组成,编码10种不同的蛋白质,并被包装于约有2700—3000个拷贝数的基因8蛋白(g8p)的蛋白衣壳内。M13的尾部有一种3—5个拷贝的蛋白,其编码基因为基因3,称其为g3p。

不像其他大多数的噬菌体,M13在感染大肠杆菌后,并不引起宿主细胞的裂解,而是使宿主细胞稳定地分泌出噬菌体颗粒。当M13的g3p接触到雄性大肠杆菌的F纤毛时而引发感染。当噬菌体进入细胞时,衣壳蛋白被除去,并存留在内膜上。宿主DNA复制系统将噬菌体的单链DNA转变为质粒状的双链DNA,这种双链DNA基因组被复制,然后进入环状复制形式而产生可包装于噬菌体颗粒中的单链DNA。质粒状的双链DNA也可以作为模板,转录成噬菌体蛋白的mRNA。g8p和g3p的引导序列将这些蛋白直接运输到细菌的细胞内膜。新合成的单链噬菌体DNA在穿过内膜时被包装为成熟的噬菌体颗粒。成熟的噬菌体在穿过宿主细胞壁时并不引起宿主细胞的裂解,因此M13噬菌体可被不断地产生,直到对细胞有害的g3p产物大量积累以及细胞本身的废物累积过多而引起细胞死亡为止。将外源基因与噬菌体的g3p或g8p基因融合,在g3p或g8p表达和噬菌体包装的过程中,使外源基因产物在噬菌体表面展示,通过和固相化的靶分子的相互作用,将所

要的基因分离出来。由于 g3p 或 g8p 的拷贝数不同, 可根据需要, 将外源基因与 g3p 或 g8p 的基因融合, 获得 1—5(与 g3p 融合) 或超过 100(与 g8p 融合) 个拷贝数的表面展示融合蛋白, 但与 g8p 融合的蛋白分子量不能太大。当展示在噬菌体 g3p 的外源基因产物与固相化的靶分子特异性结合时, 也同时使噬菌体结合在一起, 因此可以将噬菌体上含有的大量拷贝的 g8p 的酶标抗体作为检测工具。

将噬菌体和质粒载体的优点结合在一起的杂交载体为噬菌粒。噬菌粒带有 M13(单链) 和质粒(双链) 的复制起始位点, 能像质粒一样复制, 或者在辅助噬菌体如 M13K07 的帮助下, 装配成重组噬菌体颗粒。虽然噬菌粒带有 M13 的复制起始位点, 但它缺乏噬菌体蛋白的基因而难以产生完整的噬菌体。而辅助噬菌体能提供将单链噬菌体 DNA 复制并包装成完整噬菌体颗粒所需的蛋白质。由于 M13K07 辅助噬菌体含有一个低效的复制起始点, 噬菌粒 DNA 能更有效地复制, 因此新产生的大量的噬菌体 DNA 为噬菌粒 DNA, 在缺乏噬菌粒竞争的条件下, K07 起始复制子也能复制辅助噬菌体的基因组。噬菌粒含有氨苄抗性基因, 而 M13K07 含有卡那霉素抗性基因, 使被感染的细胞能从未被感染的细胞中挑选出来。被辅助噬菌体 M13K07 感染后的宿主细胞能在含有氨苄和卡那霉素的培养基中生长, 噬菌体展示系统就是基于噬菌粒和 M13K07 的相互作用之上的。

2.2 λ 噬菌体展示系统

λ 噬菌体是最早使用的克隆载体, 此后它在分子克隆中始终起着重要的作用。 λ 噬菌体展示系统是将外源肽或蛋白质与 λ 噬菌体的主要尾部蛋白 PV 或 λ 噬菌体头部组装的必需蛋白 D 蛋白融合而被展示的^[4]。 λ 噬菌体的基因组是一长度约 50kb 的双链 DNA 分子。在 λ 噬菌体颗粒内, 该 DNA 为一线形双链分子, 其末端为长 12 个核苷酸的互补单链(粘端)。当 λ 噬菌体进入宿主细胞后, 其粘端通过碱基配对而结合, 形成环状分子。宿主体内的 DNA 连接酶很快将其切口封闭而形成闭环 DNA, 在感染早期充当转录模板。在裂解性生长过程中, 环状病毒 DNA 分子被复制了许多倍, λ 噬菌体基因产物大量合成, 并组装成子代 λ 噬菌体颗粒。最终宿主细胞裂解, 释放出许多感染性病毒颗粒。在溶源性生长过程中, λ 噬菌体基因组通过位点专一重组整合入宿主 DNA 分子中, 随宿主细胞 DNA 复制并转入子代。与丝状噬菌体比较而言, λ 噬菌体是在宿主细胞内组装而不必通过分泌途径, 因此它可展示的肽或蛋白质范围较广, 尤其适合展示那些不能被 *E. coli* 分泌的复杂蛋白质。成熟的 λ 噬菌体颗粒是两个结构单位, 即头部和尾部组成。D 蛋白是 λ 噬菌体头部组装必需的蛋白, 也称装饰蛋白, 分子量为 11KD, 有 405 个拷贝。在 λ 噬菌体头部组装过程中, 当 DNA 进入头部以后, D 蛋白附着于衣壳外侧, 将噬菌体头部固定。当噬菌体基因组小于野生型基因组的 82% 时, 它可以在缺少 D 蛋白的情况下完成组装, 故 D 蛋白可作为外源序列融合的载体, 这种展示一般为 N 端展示。D 蛋白展示的体外组装途径是将 D 融合蛋白结合到 λD^- 噬菌体表面。体内组装途径是将含 D 融合基因的质粒转化入 λD^- 溶源的 *E. coli* 菌株中, 从而弥补溶源菌所缺的 D 蛋白, 通过热诱导被组装, 或利用噬菌体 P1 的 Cre-LoxP 定点重组系统将外源基因整合到 λ 噬菌体基因组中。这种方法是在具有 Cre 重组酶的 *E. coli* 细胞中导入含 D 融合基因和 LoxP 重组位点的质粒, 然后用含 LoxP 位点的 λD^- 噬菌体感染。在感染过程中, Cre 重组酶使质粒的 LoxP 位点与噬菌体基因组的 LoxP 位点重组, 从而使质粒 DNA 整合, 并表达相应的蛋白质进行装配。 λ 噬菌

体的主要尾部蛋白 PV 也可以供外源序列的插入。 λ 噬菌体基因 V 编码的主要尾部蛋白形成管状结构, 由 32 个盘状结构组成, 每个盘状结构又由 6 个 PV 亚单位组成。PV 分子量为 25.8KD, 由 246 个氨基酸残基组成, 在衣壳表面有 192 个拷贝。PV 有两个折叠区, C 端的折叠区是病毒的非功能区, 可供外源序列插入或替换。

2.3 T4 噬菌体展示系统

T4 噬菌体展示系统是将外源肽或蛋白质与 T4 噬菌体的小衣壳蛋白 SOC 的 C 端融合而被展示^[5]。T4 噬菌体的基因组为双链 DNA, 分子量为 1.2×10^8 。完整的 T4 噬菌体由头部, 尾部和尾纤毛三部分组成。与 λ 噬菌体一样, T4 噬菌体也有裂解生长过程和溶源生长过程。SOC 是一个分子量为 9KD 的小蛋白, 是 T4 衣壳组装非必需的, 而且不论是在体内还是体外, 它都具有与成熟的衣壳表面特定位点高亲和力的专一结合的能力, 其拷贝数约为 960/ 衣壳或 10^4 / 多聚头部。利用一个阳性选择载体将融合有外源序列的 SOC 融合基因同源整合入缺失 SOC 的 T4 基因组中, 选择恢复溶菌酶生长不依赖性的噬菌体, 即可将外源肽或蛋白质展示于噬菌体表面。该系统容量大(至少 35KD 的蛋白质), 拷贝数高, 故在完整结构域或蛋白质的免疫学展示、蛋白质与蛋白质相互作用的研究与生物工程学等方面有相当大的应用潜力, 其缺点是高价展示不适合高亲和力配体筛选。也有将外源蛋白与 T4 噬菌体的次要纤维蛋白(Fibritin)的 C 末端融合而被展示的报道。

3 真核细胞病毒展示系统

3.1 杆状病毒展示系统

杆状病毒是一种带有囊膜的动物病毒, 它主要致病于无脊椎动物和昆虫。杆状病毒具有一个大环状双链 DNA 基因组, 其分子量在 80kb 至 180kb 范围内, 其转录、DNA 复制以及核衣壳的装配都是在宿主细胞内进行的。根据感染周期的差异, 可将杆状病毒分为两种表现型: 第一种表现型的感染周期为出芽病毒(BV), BV 形成于核衣壳穿过质膜进入细胞外空间时。第二种表现型的感染周期为包涵体病毒(ODV, occlusion derived virus), ODV 发生于感染后期, 当核衣壳在细胞核内被囊膜包被时。虽然 BV 和 ODV 的核衣壳结构看上去一样, 但它们的囊膜的来源和组成是不同的。BV 感染宿主细胞依赖于其主要囊膜蛋白 GP64EFP。已知 *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) 被广泛应用于在昆虫细胞中表达外源蛋白质。该病毒全基因组序列已被测定, 是杆状病毒家族中的一员, 属于 BV 表现型。AcMNPV 囊膜的主要蛋白是一种糖蛋白, GP64。GP64 的基因编码一种 I 型具有一 N 端信号肽序列和 C 端穿膜区域的膜融合糖蛋白。GP64 蛋白在病毒颗粒表面是以二硫键相连, 似一三聚体, 由酸启动调节膜的融合, 负责病毒进入细胞。GP64 的编码基因由早期和晚期启动子调节, 这使得 GP64 在感染的早期和晚期都出现在细胞膜上。当核衣壳组装好以后, 就会在 GP64 集中的细胞质膜处穿膜出芽, 完成最后的囊膜包装。通过对 GP64 蛋白结构的了解, 可将 GP64 分为与其单聚体构象有关的区域和与膜融合有关的区域。这个结构特点使得 GP64 可发展成为一个很好的真核病毒展示系统^[6]。Mottershead 等人是第一次成功地将荧光蛋白 GFP 等外源蛋白在杆状病毒囊膜表面展示的研究小组。他们将外源蛋白基因插入到带有 GP64 基因的表达质粒中, 使其与 GP64 N 端融合, 然后将其与野生型 AcMNPV 线形 DNA 共转移进宿主细胞, 使它们能同源

重组。这种同源重组病毒具有两种 GP64 的编码序列: 一种是野生型的 GP64, 是病毒感染所必需的; 另一种是融合蛋白的 GP64, 受 Polyhedrin 基因启动子的控制, 这种展示系统可发展为真核展示文库、以及使杆状病毒具有感染新的宿主细胞的能力。

3.2 其他真核细胞病毒展示系统

杆状病毒并不是惟一用于外源多肽或蛋白质的真核展示系统, 还有其他一些真核细胞病毒也用于多肽或蛋白质的展示, 如脊髓灰质炎病毒^[7], 鼻病毒^[8], *sindbis* 病毒^[9], 反转录病毒^[10], 以及植物病毒如烟草花叶病毒^[11]和豆花叶病毒^[12]。这里主要介绍反转录病毒展示系统。

反转录病毒是一类很大的性质相似的病毒群, 也称 RNA 肿瘤病毒, 可以在许多动物中引起肿瘤。反转录病毒的基因组为双倍体, 由两条 RNA 正链构成。该类病毒粒子的结构类似, 其 RNA, gag 蛋白和反转录酶位于病毒粒子核心, 外面包以被膜糖蛋白。C 型鼠白血病病毒(*MuLV*)是反转录病毒家族中的一员, 具有囊膜结构。它的囊膜结构上含有一种球状能与细胞受体结合的表面蛋白 SU 和另一种具有 N 端融合区的跨膜蛋白 TM。它们以多肽单链的形式合成, 再经蛋白水解成为成熟的囊膜复合体。*MuLV* SU 的 N 端具有一保守的折叠区, 是与受体结合的活性位点。SU 的 C 端具有一高度可变的区域, 这一区域的缺失或插入外源多肽或蛋白质都不会影响病毒的感染周期, 将这个区域作为外源多肽或蛋白质的插入位点已成功地实现了外源蛋白在 *MuLV* 的表面展示^[12]。

4 细菌表面展示系统

对属革兰氏阴性菌的大肠杆菌膜表面的蛋白结构及功能的研究结果表明, 与肽聚糖相关的脂蛋白的 N 末端, 外膜脂蛋白和外膜蛋白 A(OMPA)以及 Tolq 蛋白都具有表面展示外源多肽或蛋白的潜力, 并有成功的报道^[13]。

对葡萄球菌、链球菌和肠球菌等各种革兰氏阳性菌的研究表明, 其细菌表面受体的 C 端区可以融合外源序列, 如葡萄球菌 A 蛋白(SpA), 链球菌 M6 蛋白和纤维结合素结合蛋白。与大肠杆菌表面展示系统一样, 革兰氏阳性菌的表面展示系统也是将插入有外源序列的融合蛋白通过表达质粒载体来实现。

革兰氏阳性细菌表面展示系统比革兰氏阴性细菌展示系统有更大的优越性: 第一, 革兰氏阳性细菌表面受体比革兰氏阴性细菌更能接受外源序列的插入。第二, 革兰氏阴性细菌表面展示系统的表面要穿过整个细胞质膜, 需要膜上正确整合过程, 而革兰氏阳性细菌展示系统只需穿过单层膜就可实现理想的展示。第三, 以细菌全细胞作为诊断或淘选, 实验操作中, 因为革兰氏阳性细菌有较厚的细胞壁, 不易在各种实验操作中发生细胞裂解。

细菌表面展示系统可以用于“全细胞抗体”的形成, 进行各种诊断实验, 还可替代噬菌体表面展示技术, 从文库中淘选特异性多肽或抗体。也可以发展成生物滤器, 将某些化合物的特异性配体展示在细菌表面来实现对所需化合物的特异性捕获, 还可将酶展示在细菌表面来发展新的微生物催化剂, 用于特异性去毒, 如废水处理等。

5 酵母表面展示系统

与原核细胞 *E. coli* 不同, 酵母 *S. cerevisiae* 是真核细胞生物, 它具有与哺乳动物相同

的蛋白质折叠和分泌系统。然而酵母与 *E. coli* 也有共同之处, 即非常易于培养, 其简单的遗传单位比哺乳动物细胞更易于文库的建立和操作。因此, 酵母作为一个表面展示的宿主细胞, 用于大量融合蛋白或多肽的展示, 具有噬菌体展示系统和原核细胞展示系统无可比拟的优点。

选用酵母粘性受体蛋白作为表面展示的支架, 用流动细胞计数器进行筛选, 已成功地获得表面展示单链抗体的酵母^[14]。酵母具有两种有关的细胞表面受体蛋白, 一种为 α 凝集素, 另一种为 α 凝集素。它们的功能是通过具有 α 和 α 单倍体细胞之间的粘性的调节, 使其融合为双倍体。 α 凝集素的 C 端与细胞壁葡聚糖共价连结, 而 α 凝集素的 C 端被用作外源序列的插入区域。 α 凝集素具有两个亚基, Aga1p 亚基有 725 个氨基酸残基, 与细胞壁 β 葡聚糖共价连结, 而 Aga2p 亚基有 69 个氨基酸残基, 通过两个二硫键与 Aga1p 亚基连结。天然 α 凝集素的结合活力位于 Aga2p 亚基的 C 端, 这为外源蛋白在细胞外表面的展示提供了一个有用的插入位点。其方法是先将外源序列插入 PCR 扩增的 Aga2p C 端片段中, 再装入一个酵母穿梭质粒, 酶切使其成为线形 DNA, 然后通过同源重组, 将插入序列整合到酵母基因组中。

6 体外展示技术

噬菌体展示技术的核心是将展示蛋白质的表现型与其基因型有机的结合起来。之后发展起来的其他展示技术都是以此为基础的, 但它们都受限于载体本身和宿主细胞以及基因转移的效率。近几年来, 一些体外展示技术发展起来, 它们不需要将 DNA 转入细胞内, 其限制因素仅在于 DNA 文库的质量, 它能加入到无细胞蛋白合成系统中, 这使得所构建的文库在分子展示上的容量大大超过完整细胞和病毒, 往往可以达到 $10^{14} - 10^{15}$ ^[15]。这是目前单位最小而容量又最大的展示系统。

共价展示技术是一种体外展示文库技术, 它避免了由其他展示系统所具有的许多问题和局限性。共价展示技术利用了 *E. coli* 的噬菌体 P2 的一个复制起始点蛋白的不寻常的特点^[16]。这个蛋白是由噬菌体的 A 基因所编码, 称为 P2A, 是一个核酸内切酶。它通过结合到噬菌体的起动子而启动其滚环式复制过程, 并在 DNA 上形成一个单链切口 (Nick)。在宿主细胞的复制机制下, 由 P2A 在 DNA 链形成的 3' - OH, 被用作新生 DNA 链合成的引物, 而切口所暴露的另一端, 5' - 磷酸基团是发展共价展示技术的关键, 因为它可以与 P2A 活性中心的酪氨酸共价结合。P2A 的另一个性质是它所共价结合的 DNA 正是编码它本身的基因。将多肽库的基因与 P2A 基因融合, 并在体外合成, 其产物也就与编码自己的 DNA 序列结合在一起。共价展示技术的操作如下: 制备一个 DNA 文库, 每个 DNA 分子含有 P2A 的编码序列, 并与一外源多肽的编码序列融合在一起。这个 DNA 库在体外 *E. coli*S30 的细胞裂解液中进行转录与翻译。由于 P2A 的特性, 每个 DNA 分子都与自己编码的基因产物共价连接。这个 DNA- 蛋白复合物的选择可以像噬菌体展示技术一样, 利用固相化的靶分子的亲和力, 洗去不能结合的分子, 然后将能结合的 DNA- 蛋白复合物洗脱下来。下一步可通过 PCR 进行扩增, 或将其克隆到细菌宿主细胞中。

另外一种体外展示技术是多聚体展示技术^[17], 这个系统是以 DNA 为模板转录和翻译, 在一定的控制条件下, 使稳定的 mRNA - 核糖体 - 多肽复合物能够分离出来, 利用固

相化的靶分子将具有特异性亲和力的多聚体复合物选择出来, 再利用 EDTA 将复合物中的 mRNA 解离下来, 经过反转录 PCR 扩增, 进入下一轮淘选。

还有一种体外展示技术是 RNA- 多肽融合系统^[18], 这个展示系统是利用嘌呤霉素分子将 mRNA 分子和其所编码的多肽共价结合起来。嘌呤霉素是一种抗生素, 它可以模仿 tRNA 氨酰末端进入核糖体的 A 位点, 与通过核糖体翻译生成的多肽形成一种酰胺键。在 RNA- 多肽融合系统中, 嘌呤霉素与单链 DNA 连接物的 3' 端连结, 然后这个 DNA 连接物再与文库编码的 mRNA 3' 端连结。当 mRNA 在体外翻译时, 核糖体到达 mRNA 和 DNA 的结合点并稳定下来, 嘌呤霉素进入核糖体 A 位点, 并与所编码的多肽形成稳定的酰胺键。一个 mRNA- DNA- 嘌呤霉素分子文库可在体外翻译, 然后用固相化的靶分子将纯化的 RNA- 多肽复合物淘选出来, 像多聚体展示系统那样, 这个复合体可通过反转录 PCR 得到进一步的扩增。

7 文库修饰与淘选方法的设计

在展示技术的实际操作中, 有时会出现分离不到可结合的噬菌体或只得到低亲和力的噬菌体的问题, 这可以通过修饰原噬菌体展示文库, 构建第二文库的方式得以解决^[19-21]。如果问题是因为亲和力很低, 但是又发现它具有一段保守序列, 可将这一段序列固定, 而将周围的核苷酸重排。另一种方法是, 如果只得到一个亲和力很低的多肽, 可根据这个多肽的基因序列, 在合成寡核苷酸链, 按序加入每个核苷酸时, 加入少量的另外三种核苷酸, 这样就可获得每种只有一个氨基酸残基不同的多肽库。在更严格的条件下, 可从这种多肽库中找到亲和力很强的多肽。还有一种改善亲和力的方法是使这个多肽或蛋白具有多价性, 如将一个 6 肽以 5 个重复连成一体, 获得一个 6 肽的多价体。也有人将 8 肽与噬菌体的每个 g8p 衣壳蛋白融合, 获得一个高密度表达的多肽库^[22]。

与构建高滴度文库同样重要的是设计一个更巧妙的筛选方法。在一般情况下, 可通过非常简单的固相化靶分子来进行淘选。但是也有如下缺点: 1. 靶分子必须是纯化的; 2. 一些抗体不能与天然状态的蛋白抗原结合; 3. 由于功能性亲合力(Avidity)因素, 很难得到高亲合力的克隆; 4. 很难区分具有同样亲和力的克隆。围绕上述问题, 也发展出了一些新的筛选方法^[23]。在纯化有困难时, 如细胞膜蛋白是很难表达和纯化的一类蛋白, 可用完整细胞对多肽库进行淘选, 如尿激酶血纤维蛋白溶酶原活化受体的多肽拮抗剂, MG-1 的配体等的分离鉴定^[24]。在以同样的方法分离凝血酶受体的配体时, 是用人血小板细胞进行淘选, 用已知的凝血酶受体的一个激动剂将结合的噬菌体洗脱下来。其中一个噬菌体可从细胞膜抽提液中将凝血酶受体免疫沉淀下来, 其上所展示的多肽可抑制该受体凝集血小板的活力^[25]。

在不需了解完整细胞有关受体的任何信息时, 多肽库也可对细胞的结合和吸收进行筛选。这种筛选可用于那些细胞表面蛋白组成复杂并经常改变的一类细胞, 如癌细胞。用这种方法分离到一个 20 肽, 它不仅可与成纤维细胞结合, 还可进入细胞内^[26]。丝状噬菌体衣壳蛋白 g8p 有 150—300 个拷贝数, 而尾部蛋白 g3p 只有 3—5 个拷贝数。将多肽或蛋白与 g3p 融合展示时, 往往观察到这种噬菌体被细胞吸收进去的现象。而当将多肽或蛋白与 g8p 蛋白融合时, 可观察到 10 倍数量的噬菌体被吸收进细胞。用这种方法已筛选

到人嗜中性(PMN)细胞、Hep 2 人Larynaed癌细胞和ECV304内皮细胞等特异结合多肽^[27-29]。

另外还可对整个器官进行筛选,选择能特异结合的噬菌体。将两组噬菌体多肽库注射到小鼠血管中,几分钟后,杀死小鼠,将其肾和脑分离,匀浆,其中的噬菌体再去感染*E. coli*,并得到扩增。经过几轮如此筛选,可得到一些有特异结合活性的多肽^[30],如与脑特异结合的多肽,其与脑的结合大于与肾结合的4—9倍,反过来也一样。其中一个与脑特异结合的多肽经合成后,发现其能阻止脑细胞对与之相应的噬菌体的吸收,这说明是噬菌体上所展示的多肽有特异结合的选择性,而不是噬菌体本身。用这种方法分离到了其他一些器官的特异结合多肽,如肺、皮肤、胰腺、肠、子宫、肾上腺和视网膜^[31]。最近用这种方法筛选到了专一识别肿瘤维管结构(Vasenlatne)的噬菌体^[32],将其所展示的多肽与细胞毒素或能引起细胞程序死亡的多肽KLAKLAKKLAKLAK连接在一起,可以减小肿瘤并使其消失。最近报道了一种筛选进入细胞的噬菌体的新方法,将报告基因,如绿荧光蛋白(GFP)和β-半乳糖苷酶基因插入到噬菌体表达载体上,在细胞胞大病毒启动子控制下,通过分析报告基因的表达,确定噬菌体是否进入了细胞^[33]。

还有一种独特的筛选方法是以DNA为基础,改进噬菌体展示的特异性和灵敏度^[34]。这个过程包括DNA的正、负筛选,将多肽库分别对两种不同的细胞库进行筛选。经过一轮淘选,从细胞A库中分离出一组单链DNA,而从细胞B库中分离出反向的具有生物素片段的单链DNA,将这两组单链DNA进行杂交,再用固相化的链亲合素纯化。在正筛选中,将库A中杂交上的单链DNA洗脱下来,进入下一轮筛选;在负筛选中,将杂交上的DNA去掉,而将不能结合上的库A单链DNA进行下一轮淘选。目前这种方法还未得到广泛的应用。用选择性感染噬菌体技术(SIP)^[35],可以从非固相化靶抗原中选到所要的单链抗体。该技术是将M13噬菌体感染必需的蛋白g3p分成两段N端和C端,使其丧失感染活力。将C端片段与单链抗体融合,这样产生的抗体无感染活力。将g3p的N端片段与可溶性抗原融合,并与带C端融合抗体的噬菌体混合,一旦有抗体-抗原结合反应发生,噬菌体就恢复了感染的活力。这种方式的优点是在可溶性状态下,筛选到高亲和力的抗体。

参考文献:

- [1] Smith G P. Filamentous Fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the viron surface [J]. *Science*, 1985, **228**: 1315—1317
- [2] Scott J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library [J]. *Science*. 1990, **246**: 386—390
- [3] McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains [J]. *Nature*. 1990, **348**: 552—554
- [4] 许正平和李伯良. 噬菌体展示系统的研究进展[J]. 生命的化学, 1996, **16**: 29—34
- [5] Efimov V P. Bacteriophage T4 as a surface display vector [J]. *Virus Genes*. 1995, **10**: 173—177
- [6] Mottershead D, Vander Linden I, Bonsdorff G H, et al. Baculoviral display of the green fluorescent protein and rubella virus envelope proteins [J]. *Biochem Biophys Res. Commun.* 1997, **238**: 717—722
- [7] Rose C, Andrews W, Ferguson M, et al. The construction and characterization of poliovirus antigen chimeras presenting defined regions of the human T lymphocyte marker CD4 [J]. *J. Gen. Virol.* 1994, **75**(Pt 5): 969—977
- [8] Resnick D A, Smith A D, Geisler S C, et al. Chimeras from a human rhinovirus 14-human immunodeficiency virus type 1

- (HIV-1) V3 loop seroprevalence library induce neutralizing responses against HIV-1 [J]. *J. Virol.* 1995, **69**: 2406—11
- [9] Ohno K, Sawai K, Li jima Y, et al. Cell specific targeting of *sindbis virus* vectors displaying IgG binding domains of protein A [J]. *Nat. Biotechnol.* 1997, **15**: 763—767
- [10] Kayman S C, Park H, Saxon M, et al. The hypervariable domain of the *murine leukemia virus* surface protein tolerates large insertions and deletions, enabling development of a retroviral particle display system [J]. *J. Virol.* 1999, **73**: 1802—1808
- [11] Porta C, Spall V E, Loveland J, et al. Development of *coupea mosaic virus* as a high yielding system for the presentation of foreign peptides [J]. *Virology*. 1994, **202**: 949—955
- [12] Turpen T H, Reinal S J, Charonenvit Y, et al. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant *tobacco mosaic virus* [J]. *Bio. technology*. 1995, **13**: 53—57
- [13] Francisco J A, Campbell R, Iverson B L et al. Production and fluorescence activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993, **90**: 10444—10448
- [14] Boder E T, Wittup K D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries [J]. *Nat. Biotechnol.* 1997, **15**: 553—557
- [15] Fitzgerald K. In vitro display technologies new tools for drug discovery [J]. *Drug. Discov. Today*. 2000, **5**: 253—258
- [16] Liu Y, Haggard-Lungquist E. Studies of *bacteriophage P2* DNA replication: Localization of the cleavage site of the A protein [J]. *Nucleic Acids Res.* 1994, **22**: 5204—5210
- [17] Schaffitzel C, Liu Y. Ribosome display: in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries [J]. *J. Immunol. Methods*. 1999, **231**: 119—135
- [18] Roberts R W, Szostak J W. RNA-peptide fusion for the in vitro selection of peptides and proteins [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, **94**: 12297—12302
- [19] Schier R, Balint R F, McCall A, et al. Identification of functional and structural amino acid residues by parsimonious mutagenesis [J]. *Gene* [J]. 1996, **169**: 147—155
- [20] Glasser S M, Yelton D E, Huse W D. Antibody engineering by codon based mutagenesis in a filamentous phage system [J]. *J. Immunol* [J]. 1992, **149**: 3903—3913
- [21] Virnekes B, Gre L, Pluckthun A, et al. Trinucleotides for random mutagenesis: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis [J]. *Nucleic Acids Res.* 1994, **22**: 5600—5607
- [22] Iannolo G, Minenkov O, Gonibni S, et al. construction, exploitation and evolution of a new peptide library displayed at high density by fusion to major coat protein of filamentous phage [J]. *Biol. Chem.* 1997, **378**: 517—521
- [23] Brown K C. New approaches for cell specific targeting: identification of cell selective peptides from combinatorial libraries [J]. *Current Opin. Chem. Biol.* 2000, **4**: 16—21
- [24] Szardenings M, Tomroth S, Mutilis F, et al. Phage display selection on whole cells yields a peptide specific for melanocortin receptor [J]. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**: 27943—27948
- [25] Doolan J, Winter G. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display [J]. *J. Mol. Bio.* 1994, **244**: 361—369
- [26] Barry M A, Dower E J, Johnston S A. Toward cell targeting gene therapy vector: selection of cell binding peptides from random peptide presenting phage libraries [J]. *Nat. Med* [J]. 1996, **2**: 299—305
- [27] Mazzucchelli L, Burrit J B, Jesaitis A J, et al. cell specific peptide binding by human neutrophils [J]. *Blood*. 1999, **93**: 1738—1748
- [28] Ivanenkov V, V, felice F, Menon A G. Uptakes and intracellular fate of phage display vectors into mammalian cells [J]. *Biochem Biophys. Acta*. 1999, **1448**: 450—462
- [29] Ivanenkov V V, felice F, Menon A G. targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells [J]. *Biochem Biophys. Acta*. 1999, **1448**: 463—472
- [30] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries [J]. *Nature*. 1996, **380**: 364—366
- [31] Rajott D, Arap W, Hagerdorn M, et al. molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display [J]. *J. clin. Invest.* 1998, **102**: 430—437

- [32] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model [J]. *Science*. 1998, **279**: 377—380
- [33] Larocca D, Witte A, Johnson W, et al. Targeting bacteriophage to mammalian cell surface receptors for gene delivery [J]. *Hum. Gene Ther.*. 1998, **9**: 2393—2399
- [34] Bartoli F, Nuzzo M, Urbanelli L, et al. DNA-based selection and screening of peptide ligands [J]. *Nat. Biotechnol.*. 1998, **16**: 1068—1073
- [35] Pedrazzi G, Schwesinger F, Honegger A, et al. Affinity and folding properties both influence the selection of antibodies with the selectively infective phage(SIP)methodology [J]. *FEBS letters*. 1997, **415**: 289—293

2001 年前 10 位中文生物学期刊引证报告表

位次	刊名	影响因子	总被引频次	基金论文比	发表时滞
1	植物学报	0.823	1918	0.84	8.45
2	生物化学与生物物理学报	0.814	632	0.78	5.07
3	植物生理学报	0.774	848	0.92	7.07
4	植物生态学报	0.634	643	0.93	9.73
5	昆虫学报	0.613	937	0.65	14.73
6	遗传学报	0.605	703	0.80	11.14
7	水生生物学报	0.566	503	0.79	16.97
8	微生物学报	0.479	426	0.65	11.58
9	生物工程学报	0.476	368	0.50	4.51
10	遗传	0.461	378	0.66	7.02

注: 摘自 2001 年版《中国科技期刊引进报告》