

噬菌体展示技术及其应用的研究进展*

秘勇建 马志奎 赵炜疆[△]

(汕头大学医学院 神经科学中心 广东 汕头 515041)

摘要 噬菌体展示技术因其高效、实用、便捷的优势现已广泛应用于抗原表位分析、抗体制备、药物筛选、疫苗研制以及免疫学疾病诊断、治疗等多方面的科学研究领域。现将近年来 PDT 的发展现状及其在生物科学领域中的应用进展综述如下。

关键词 噬菌体展示技术 原理 分类 应用

中图分类号 Q81 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)14-2766-03

Progress for Phage Display Technique and Its Application*

MI Yong-jian, MA Zhi-kui, ZHAO Wei-jiang[△]

(Center for Neuroscience, Shantou university medical college, Shantou 515041, China)

ABSTRACT : Phage display technique has a broadened application range because of its highly efficient, practical and convenient advantages. It has been maturely applied to epitope mapping analysis, antibody identification, pharmaceutical screening, vaccine development, diagnosis and treatment of immunological diseases. This review summarized the recent achievements in its development and application status.

Key words: PDT Technical principle; Classification; Application

Chinese Library Classification(CLC): Q81, Q78 **Document code**: A

Article ID:1673-6273(2012)14-2766-03

噬菌体展示技术(Phage Display Technique, PDT)是一种能快速筛选出与靶分子特异性结合配体的高通量选择技术。自1985年 Smith 首次报道利用基因工程技术发明噬菌体展示技术到1990年 Scott 等首次将随机序列肽与丝状噬菌体表面 G 蛋白融合展示,建立噬菌体展示随机肽库。至今,此项技术发展较为成熟,已广泛应用于抗原表位的分析、单克隆抗体的制备、药物筛选、疫苗研制以及免疫学疾病诊断、治疗等多方面的科学研究领域^[1]。

现将近年来 PDT 的发展现状,以及此项技术在生物科学各领域的应用状况综述如下。

1 PDT 的原理

PDT 是一种以噬菌体为载体,将外源基因插入到噬菌体衣壳蛋白(pIII或pVIII等)基因中,并组装出具有扩增能力且在噬菌体表面无缺损表达这一外源性蛋白质或多肽的融合噬菌体的选择技术。融合基因产物保持了相对独立的空间构象和生物学活性。在展示过程中又可将展示的外源多肽或蛋白的遗传密码信息整合到个体噬菌体的基因组中,使表达蛋白(表达型)与其编码 DNA 序列(基因型)之间建立直接联系、完美结合,再通过适当的淘选方法(亲和→洗脱→扩增→亲和,步骤依次循环),最终可使靶分子的多肽配体可结合序列得以快速鉴定,为生物科学各领域的相关研究提供高效实用的便捷手段^[2]。

2 噬菌体展示系统的分类

根据研制方法和应用目的,可将噬菌体展示系统分为:肽库、抗体库和 cDNA 库。按展示系统的载体来看,常用的噬菌体展示系统主要有丝状噬菌体展示系统、λ 噬菌体展示系统、T4 噬菌体展示系统和 T7 噬菌体展示系统。

2.1 丝状噬菌体展示系统

丝状噬菌体表面展示系统主要包括大肠杆菌丝状噬菌体 M13、fd、fl 等,它们只有环状单链 DNA 结构,可编码 10 个蛋白,衣壳蛋白 pVIII、pIII 为主要展示蛋白。pVIII 位于噬菌体颗粒的两端,多在 N 末端或近 N 末端融合外源性序列,其拷贝数较多,但分子较小,若展示肽段太大则会影响外壳的组装,使其失去感染力。pIII 位于噬菌体颗粒的一端,有 3~5 个拷贝,可在 N 末端、近 N 末端或 N 末端与 C 末端的柔性联合区融合外源序列,对所展示外源性片段的大小无严格限制。但其拷贝数较少,若所展示肽段过大(>100 氨基酸),则会影响到 pIII 与大肠杆菌性纤毛的相互作用,使感染效率下降^[3]。

2.2 λ 噬菌体展示系统

λ 噬菌体是具有线性双链 DNA 结构的克隆载体,外源序列可被插入到其头部 gpD 蛋白的 N 末端或 C 末端,或尾部 gpV 蛋白羧基端的折叠区。λ 噬菌体在宿主细胞内完成组装,无需将外源性多肽或蛋白分泌到细菌胞膜外,并且可展示一些有活性的大分子蛋白(>100 kDa)、以及对宿主细胞有毒性作用的蛋白。此外,λ 噬菌体的 gpD 蛋白可作为某些外源展示蛋白的分子伴侣来保证融合蛋白在原核细胞中的正确折叠,故 λ 噬菌体可显著提高真核蛋白的表达水平^[4]。

* 基金项目 国家自然科学基金项目(81171139)

作者简介 秘勇建(1983-),男,硕士研究生,研究方向 神经系统疾病及神经生物学,E-mail:younger9520@126.com

△ 通讯作者 赵炜疆,副研究员,研究方向 神经内分泌及神经损伤与再生,E-mail:neuromancn@yahoo.com.cn

(收稿日期:2011-10-19 接受日期:2011-11-15)

2.3 T4 噬菌体展示系统

T4 噬菌体基因组由线性双链 DNA 组成, SOC (Small outer capsid protein) 和 HOC (Highly antigenic outer capsid protein) 是 T4 噬菌体表面的两个非必需衣壳蛋白, 对称分布于噬菌体二十面体的表面, 拷贝数高, 系统容量大。外源性多肽或蛋白可分别与 SOC 位点的 C 末端和 HOC 位点的 N 末端融合而展示于噬菌体的表面。T4 噬菌体在宿主细胞内组装, 无需通过分泌途径, 因而可展示的多肽或蛋白质的范围广, 尤其包括那些不易被大肠杆菌分泌的蛋白。此外, SOC 具有与噬菌体表面专一结合的能力, 还可用体外组装的方法实现展示, 但由于其采用的是 C 末端融合, 影响了对蛋白质 N 末端功能的研究, 故在某些蛋白质的生物化学研究中受到限制^[5]。

2.4 T7 噬菌体展示系统

T7 噬菌体基因组为线性的双链 DNA 结构, 衣壳蛋白通常有两种形式, 10A 和 10B。10B 是在 10A 的氨基酸翻译框中产生的, 约占衣壳蛋白的十分之一。噬菌体的功能性衣壳区可单独由 10A, 10B, 或由两者以一定比例构成存在于噬菌体的表面, 可容纳多种展示蛋白的变异体, 即使插入片段中含有终止密码子, 同样也可被展示表达。此外, T7 噬菌体表面可以低、中、高拷贝来表达不同分子量的各种蛋白质, 高拷贝数展示适用于低亲和力结合域, 低拷贝数展示则适用于高亲和力结合域。与丝状噬菌体、λ 噬菌体展示系统相比, 本系统具有稳定性高、复制周期短、克隆效率高、操作和储存方便等优点^[6]。

3 噬菌体展示系统的应用

根据不同的研究目的, 选择优化性的 PDT, 目前已被广泛应用于多种研究领域。

3.1 抗原表位分析

目前多以单克隆抗体或能特异性识别蛋白某一表位的抗体替代物作为包被筛选的靶分子, 加入噬菌体随机多肽文库充分孵育结合, 经 3~4 轮的循环筛选后, 将感染宿主菌的噬菌体经亲和性 ELISA 检测, 对所筛选的阳性克隆通过 DNA 测序分析, 鉴定噬菌体所携带的外源肽序列, 从而得知该单克隆抗体或抗体替代物所结合或模拟的抗原表位。

运用此项技术特异性鉴别信号分子配体的表位或模拟表位, 对于分析蛋白-蛋白间的相互作用、细胞间信号转导、酶的特异性等方面的相关研究有重要意义^[7]。现已成功实现了诸如对人类免疫缺陷病毒 gp120 蛋白的模拟表位序列、人类嗜 T 淋巴细胞病毒 I 相关脊髓病脑脊液中免疫球蛋白 G 的抗原表位的分析研究等^[8-9]。

3.2 药物筛选

噬菌体展示随机肽库可有效鉴定或模拟出某些有特异性作用蛋白的多肽序列, 为研制针对某些疾病有特异性治疗作用的生物新药提供了重要理论支持;

利用改进型 PDT 筛选出的全人源性单克隆药物 Adalimumab (Humira), 去除了异类种属的免疫原性, 可定向作用于人类 TNF- α (tumor necrosis factor- α), 阻断其参与炎症效应, 目前已作为特异性药物广泛应用于临床中、重度风湿性关节炎, 关节型幼年特发性关节炎, 克罗恩病, 斑块型银屑病, 强直性脊柱炎等疾病^[10]。抗癌药物 Panitumumab (Vectibix), 可特异性作用于

人表皮生长因子受体 IgG2 (anti-human epidermal growth factor receptor IgG2), 在癌症临床治疗中发挥重要作用^[11]。血浆缓激肽释放酶抑制剂 Ecallantide (DX-88), 在治疗遗传性血管水肿, 阻止开放体外循环心胸手术时的血液流失具有重要价值^[12]。

3.3 抗体制备

抗体制备的原理是将抗体或抗体片段 (Fab、Fv 或 scFv) 基因通过与噬菌体衣壳蛋白基因连接, 以融合蛋白的形式展示于噬菌体的表面。产物抗体既具有识别抗原的能力, 又改进了天然抗体亲和力低的弊端。利用 PDT 获得的特异性、高亲和性人源性抗狂犬病毒单链抗体的 Fab 片段可顺利通过血脑屏障, 克服了免疫球蛋白等其他被动免疫制剂引起过敏反应和传播血液性疾病的危险, 为特异性抗体的制备奠定基础^[13]。抗 HIV-1 包膜糖蛋白的单链抗体可专一性作用于被 HIV-1 感染并表达有 gp120 的淋巴细胞, 对 HIV 的临床防治意义重大^[8]。

3.4 疫苗的制备

PDT 凭借多种优势已在多个领域的疫苗研制工程中得到展现。PDT 载体可展示具有多个保护作用的抗原决定簇, 易于构建多价疫苗, 展示产物具有生物体自身的天然构象, 易于被免疫系统识别, 诱导抗原-抗体免疫反应, 疫苗纯化简便、经济性好。利用肽库特异性识别的乙肝病毒包膜蛋白的模拟表位 (HBVsAg) 在鼠的实验中证实了其免疫原性, 这为后期其他病毒性疫苗相关疫苗的研制与应用提供重要的可行性策略^[14]。

3.5 疾病诊断与治疗

噬菌体展示抗体拥有与天然抗体一样特异性识别抗原的能力, 又比天然抗体具有较高的亲和性, 且热稳定性更佳, 使得其在疾病的免疫学诊断与治疗中拥有广泛应用前景。此外, 展示抗体还可通过生物素化标记技术的融合表达, 直接展示出抗体-生物素、抗体-荧光蛋白、抗体-酶或抗体-MBD (Metal Binding Domain, MBD, 金属离子结合域) 等, 有效避免了化学物质标记对抗体本身活性的损害。其中, 抗体-MBD 既便于纯化, 又可定量标记多种金属离子, 这在免疫影像学诊断中具有较高的实用价值^[15]。

随着 PDT 以及其他各项生物技术的发展, 靶向性生物制剂对疾病的鉴定和治疗具有潜在广泛的应用价值。在肿瘤疾病的诊断与治疗中, 抗体靶向治疗日趋扮演不可或缺的角色。利用传统单抗技术制备的鼠源性单抗存在分子量大、穿透性差、亲和性低以及可能引起异源性免疫反应等弊端, 而运用 PDT 易于构建 scFv 基因, 能大量生产高亲和性的人源性单抗, 拓展了临床应用的局限性^[16]。在神经系统疾病 Parkinson 病的研究中, 利用 PDT 筛选获得的两种不同 scFvs 片段的抗体, 可特异性识别并阻断 Lewy body 中 α -synuclein 的聚合, 为该疾病的早期诊断与治疗提供帮助^[17]。此外, 利用 PDT 筛选的多聚唾液酸 (PSA) 的模拟糖蛋白在促进小鼠脊髓损伤后的功能恢复中有较高的潜在价值^[18]。

3.6 生物信息的传递

在研究蛋白-蛋白间的相互作用时, PDT 作为合成多肽或蛋白的一种特殊工具, 其构建的文库滴度可达 10^{12} , 可对千万种蛋白同时进行分析。此外, PDT 结合运用蛋白质的水解作用可筛选出既含有稳定折叠区域, 又能与靶分子有特异结合能力的多肽或蛋白片段, 理论上适用于任何蛋白。应用这种方法已

经成功鉴定出多个重要大分子,如生长激素受体、胰岛素受体、胰岛素样生长因子受体和 TNF- α 受体的激动剂和拮抗剂等^[19]。

在蛋白-DNA 的研究中,运用 PDT 可筛选出一种具有某特定结构域的蛋白,这种结构域能与 DNA 相结合,使得蛋白-DNA 间建立直接的信号联系。Cys2/His2 锌指环就是一种常见的可识别、结合 DNA 序列的特殊结构域,这种含锌的小肽结构物具有基因调控性,可与蛋白的转录调控区域结合,调控相关基因表达。现已利用 PDT 筛选出了多种可被特殊 DNA 序列识别结合的结构域,构建了许多含有“锌指环”结构的多肽文库,并以此来设计、调控某特定基因的表达^[20]。可见,PDT 筛选 DNA 模拟肽,为探索 DNA 结合蛋白的研究提供强大实用工具。

4 结语

自发明 25 年以来,PDT 以其独特的实用性优势极大地推动了生物医学研究的进步发展,特别是在对蛋白质的研究与应用方面显示了强大的实用价值。PDT 有效实现了基因型和表达型的体外转换,使研究者在基因表达与分子克隆的平台中,较准确地实现对蛋白质空间构象的体外控制,从而可获得具有良好生物学活性的表达产物。

随着该项技术的逐步改进与创新,以及与其他生物信息技术、生物芯片技术的有机结合,势必将在生物学研究领域得到更广阔的开拓、发展与应用。

参考文献 (References)

- [1] Bratkovic T. Progress in phage display evolution of the technique and its application[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(5):749-767
- [2] 刘相叶,邓洪宽,吴秀萍,等.噬菌体展示技术及其应用[J]. 动物医学进展,2008,29(1):60-63
Liu Xiang-ye, Deng Hong-kuan, Wu Xiu-ping, et al. Phage Display Technology and Its Application [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008,29(1):60-63(In Chinese)
- [3] Ma A Z, Hu Q, Bai Z H, et al. Functional display of fungal cellulases from *Trichoderma reesei* on Phage M13[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24(10):2003-2009
- [4] Chaudhary V K, Gupta A, Adhya S, et al. Lambda phage display system and the process[J]. USA, US Patent No.:7, 410, 801 B2.2008
- [5] Rao V B, Black Lw. Structure and assembly of bacteriophage T4 head [J]. Virol J, 2010, 7:356-369
- [6] Sharma S C, Memic A, Rupasinghe Cn, et al. T7 phage display as a method of peptide ligand discovery for PDZ domain proteins[J]. Biopolymers, 2009, 92(3): 183-193
- [7] 李珣,任珍珍,钟国华.噬菌体展示技术在蛋白质研究中的应用[J]. 生命的化学, 2009, 29(4):588-594
Li Xun, Ren Zhen-zhen, Zhong Guo-hua. Application Of Phage Display Technology In Protein Researches [J]. Chemistry of Life, 2009, 29(4): 588-594(In Chinese)
- [8] Bowley D R, Labrijn A F, Zwick M B, et al. Antigen selection from an HIV-1 immune antibody library displayed on yeast yields many novel antibodies compared to selection from the same library displayed on phage[J]. Protein Eng Des Sel, 2007, 20(2):81-90
- [9] Fujimori J, Nakashima I, Fujihara K, et al. Epitope analysis of the cerebrospinal fluid IgG in HTLV-I associated myelopathy patients using phage display method[J]. J Neuroimmunol, 2004, 152(1-2):140-146
- [10] Jespers L S, Roberts A, Mahler Sm, et al. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen[J]. Biotechnology (NY), 1994, 12(9):899-903
- [11] Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms[J]. Curr Opin Immunol, 2008, 20(4):450-459
- [12] Lehmann A. Ecallantide (DX-88), a plasma kallikrein inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and the prevention of blood loss in on-pump cardiothoracic surgery[J]. Expert Opin Biol Ther, 2008, 8(8):1187-1199
- [13] Cheung S C, Dietzschold B, Koprowski H, et al. A recombinant human Fab expressed in *Escherichia coli* neutralizes rabies virus [J]. J Virol, 1992, 66(11):6714-6720
- [14] 黄英,张君,何茂锐,等.用 T7 噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒 PreS1 相互作用蛋白[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(4):340-343
Huang Ying, Zhang Jun, He Mao-rui, et al. Screening of Proteins Interacting With The Hepatitis B Virus PreS1 Protein From T7-Phage Display Library[J]. Journal Of Chongqing Medical University, 2007, 32(4):340-343(In Chinese)
- [15] Rau D, Kramer K, Hock B. Single-chain Fv antibody-alkaline phosphatase fusion proteins produced by one-step cloning as rapid detection tools for ELISA[J]. J Immunoassay Immunochem, 2002, 23(2):129-143
- [16] Shaw D M, Embleton M J, Westwater C, et al. Isolation of a high affinity scFv from a monoclonal antibody recognising the oncofetal antigen 5T4[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1524(2-3):238-246
- [17] Emadi S, Barkhordarian H, Wang M S, et al. Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity[J]. J Mol Biol, 2007, 368(4):1132-1144
- [18] Mehanna A, Jakovcevski I, Acar A, et al. Polysialic Acid Glyconimetic Promotes Functional Recovery and Plasticity After Spinal Cord Injury in Mice[J]. Mol Ther, 2010, 18(1):34-43
- [19] Bair C L, Oppenheim A, Trostel A, et al. A phage display system designed to detect and study protein-protein interactions[J]. Mol Microbiol, 2008, 67(4):719-728
- [20] Tomczak M M, Gupta M K, Drummy L F, et al. Morphological control and assembly of zinc oxide using a biotemplate[J]. Acta Biomater, 2009, 5(3):876-882