噬菌体展示技术发展

罗扬拓[1] 朱承睿[1] 武 元[1] 李 骢[2△]

(1 中国医科大学 七年制 92 期 辽宁 沈阳 110001；2 大连医科大学基础医学院 辽宁 大连 116044)

摘要：噬菌体表面展示技术是一种将外源蛋白或抗体可变区与噬菌体表面特定蛋白质融合并展示于其表面，构建蛋白质或抗体库，并从中筛选特异蛋白质或抗体的基因工程技术。随着该项技术的不断完善和发展，噬菌体展示技术已被广泛应用于生命科学研究的不同领域，并显示了良好的应用前景。

关键词：噬菌体展示技术；原理；应用

中图分类号：Q782 文献标识码：A 文章编号：1673-6273(2011)12-2389-02

Progress in Phage Display Techniques

LUO Yang-tuo[1], ZHU Cheng-rui[1], WU yuan[1], LI Cong[2△]

(1Seven-Year System Program of Clinical Medicine 92 K, China Medical University, Shenyang 110001, China;

2 The College of Basic Medical Sciences of Dalian Medical University, Dalian,116044, China)

ABSTRACT: Phage display is a genetic engineering technique that combines the exogenous protein or alternative segment of antibody with the specific surface protein of phage to form peptide or antibody libraries for screening the specific proteins or antibodies. With the development and improvement of this technology, Phage display technique has been widely applied to many fields of life science and has exhibited favorable application prospect.

Key words: Phage display technique; Principle; Application

Chinese Library Classification: Q782 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)12-2389-02

噬菌体表面展示技术(Phage display)，将特异性多肽与噬菌体衣壳蛋白融合表达于噬菌体表面，被展示的多肽能保持相对独立的空间结构，该技术结合体外筛选实现了对于蛋白质结构及性质高效率的识别和优化，从而提供了高通量高效率的筛选系统。在过去的 25 年里，噬菌体展示技术得到了迅速发展，其应用领域已扩展至抗原表位筛选[1]、肿瘤的早期诊断[2]、靶向治疗[3]、肿瘤疫苗的研制[4]、药物靶点的筛选[5]等。同时在构建噬菌体抗体展示文库方面的广泛应用，使抗体库技术进入了新的时代[6]。本文就噬菌体展示技术的研究进展及应用做一综述。

1 噬菌体展示技术原理

噬菌体(Bacteriophage)是一系列具有感染原核细胞以完成自身复制的病毒。基于其基因和结构的单一性，噬菌体自被发现以来便广泛服务于生命科学领域[7]。噬菌体展示技术(Phage display)是在噬菌体颗粒表面表达外源性多肽，从而获得能与配体结合的特异性分子表位。具体方法是将外源 DNA 插入编码噬菌体衣壳蛋白的基因组中并表达，使目的多肽片段与噬菌体衣壳蛋白形成融合蛋白，分布在噬菌体表面。在此过程中衣壳蛋白只是发挥对展示肽段的锚定作用，而对其结构无影响；反之，外源多肽的表达同样不干扰噬菌体感染和扩增的能力。最终实现了特异性分子在同一噬菌体颗粒内基因型与表型的统一。以此为基础，结合基因重组技术，可收集大量由噬菌体展示的 cDNA 编码蛋白或多肽从而构建噬菌体展示文库。再采用与固定配体相互作用的亲和筛选方法，可以富集得到能表达某种特异肽序列的噬菌体。

2 传统噬菌体展示技术

最早关于在噬菌体表面表达外源多肽的报道由 Smith.GP 等人于 1985 年发表[8]。噬菌体作为一种表达载体将多肽展示于噬菌体外壳。基本原理是通过将外源 DNA 克隆到噬菌体的基因组中，使外源 DNA 编码的肽段与噬菌体外壳蛋白形成融合蛋白，从而伸展到噬菌体表面。噬菌体(phage)和噬粒(phagemid)都可作为表达载体来展示抗体或其他蛋白。与较小的衣壳蛋白 p3 (g III基因表达产物) 共同表达的融合蛋白通过丝状噬菌体构建肽库(p3 方案)，噬粒携带表达 g III外壳的基因、克隆位点及噬菌体包装信号，并由辅助噬菌体提供完成包装所需的结构蛋白产生可溶性蛋白，展示大量重组蛋白质，同时自身不易受异源基因影响，因此成为构建噬菌体抗体库的主要手段[9]。

与 p3 相比，p8 (g VIII基因表达产物) 同样可作为目的蛋白的载体，两者最显著的差异在于衣壳蛋白不同的展示效价：在每个噬菌体表面与 p3 融合展示的多肽最多可达到 5 个，而 p8 则支持数百甚至数千多肽的表达。另外，p8 方案允许较大蛋白的展示。所以通过 p8 展示系统能够实现极大量的表达，但值得强调的是，由于受到亲合力效应的影响，高密度的多肽 -p8 融合体迫使部分被展示多肽的构象改变，在从高效价展示库筛选目的配体时无法维持原有的结合力。故 p8 方案仅应用于特殊情况，如全部噬菌体颗粒均作为配体[10]。

3 备择噬菌体展示技术

作者简介：罗扬拓(1987-)，男，硕士研究生。电话：13840164081，E-mail：lotoisjason@126.com

△通讯作者：李骢，E-mail：goodluck_licong@163.com

(收稿日期：2010-12-10 接受日期：2010-12-31)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以上展示技术中，多肽均需与 p3 或 p8 的 N- 末端融合表达。然而，壳蛋白 p3 和 p8 在 N- 末端有引导肽序列，且融合体必需正确的嵌入引导肽与成熟壳蛋白间阅读框架。这就造成了展示文库构建的效率不高。对于某些情况，游离的 C- 末端可以与特异性的靶蛋白相互作用。Crameri 和 Suter 报道了特异性的 3+3 展示系统，编码两种融合蛋白的噬粒载体 pJuFo 允许分别与 N- 和 C- 末端亮氨酸拉链结构域融合展示的蛋白。这一方案解决了原始文库低效表达的问题，但所需的过程却更加繁琐[11]。Sidhu 将变异或合成的非必需衣壳蛋白混入野生型噬菌体颗粒表面结构蛋白中，开发出了更加有效的多肽展示系统[12]。

丝状噬菌体载体的主要缺陷在于病毒装配时某些融合蛋白无法穿过细胞膜，因而不能在衣壳表面表达。而 T7，T4，λ 噬菌体在被感染的细菌内装配并随细菌裂解释放子代颗粒。λ 噬菌体展示系统和 T4 噬菌展示体系统容量较大，不易筛选高亲和力配体；T7 噬菌体展示系统是是目前最为理想的展示系统，因其载体容量大，插入片段稳定，洗涤条件灵活，生长周期短而被广泛使用。Krumpe 报道了对比丝状噬菌体展示系统运用 T7 噬菌体在构建同等复杂程度的随机多肽文库时被展示序列误差明显减少[13]。

用带有噬菌体复制起始点的质粒载体。融合体必需嵌入引导肽与成熟壳蛋白间正确的阅读框架。噬粒载体同时具备质粒和噬菌体的特征，通常是高拷贝的，并带有一个含有噬菌体 DNA 合成起始和结束及噬菌体颗粒形态发生基因间区。噬菌粒需要辅助噬菌体 (helper phage) 来提供复制和包装所需的蛋白酶和外壳蛋白。噬粒载体实现了中高分子量蛋白在丝状噬菌体表面的展示，辅助噬菌体参与重组噬菌粒的超感染转化细胞，从而获得展示外源 DNA 片段编码的氨基酸序列的杂和噬菌体颗粒[14]。同时提供天然和重组的 p3 或 p8 的噬粒载体，由于它们较差的基因稳定性，常导致部分 DNA 的丢失，即便可以大大简化病毒的扩增过程但仍然很少被应用[15]。

4 疏水性蛋白的展示

一般认为只有可溶性蛋白可以被噬菌体有效地展示。Olszewski 运用 p8 展示系统成功表达了疏水性的 HIV-1 否定因子 Nef (negative factor)，并且经过特异性抗体证实展示的蛋白具有 Nef 的全部生物学功能[16]。尽管使用细菌生产真核生物膜蛋白的尝试往往是失败的，但近期的报道叙述了完整的人类小窝蛋白 caveolin-1 和 HIV 跨膜蛋白 gp41 在噬菌体表面的成功展示[17]。

5 运用无机材料的亲和筛选

大量复制的蛋白粘附于用来固定目标的支持物常常造成了筛选的失败。Khoo 运用钛合金完成了大量重组多肽的淘洗，使含有 KHK 重复序列的特异性多肽吸附于钛合金表面[18]。另外，有研究发现个别多肽作为特异性细胞结合识别序列时，可使细胞粘附于有磷灰石碱基的无机物表面，这种材料一般用于制作固定骨组织的支架，另外，这些多肽介导细胞的粘附并最终使细胞分化为骨样组织[19]。

6 纳米晶体

纳米晶体是现代电子设备的重要组成部分。经观察发现生物大分子可以指导无机纳米晶体的形成，目前多项研究证实利用蛋白作为工具可以从溶液中完成纳米结构材料的组装，并且改变蛋白的浓度能够控制纳米晶体的形态[20]。Belcher 报道了调整基因结构使丝状噬菌体自行组装成为微电极，将装配成的病毒膜片溶解于钴的氯化物溶液中，利用钴的成核作用在噬菌体衣壳表面形成氧化钴纳米晶体，从而作为微电池的阳极材料[21]。

噬菌体展示技术简便、有效、易于控制的特点及基因型与表型统一的优势使其具有较大应用潜力。被越来越广泛地应用于研究蛋白质的相互作用、疫苗及新药的开发等方面。尽管仍然有许多问题限制其广泛应用，如库容量的限制，较长的外源肽段易随机折叠，氨基酸的修饰受宿主菌限制失等等。随着噬菌体展示技术研究的不断深入，这些问题将逐一被解决并将它的应用推向新的高峰。

参考文献(References)

[1] H aubner R, Wester H J. Radio labeled tracers for imaging of tumor angiogenes is an d evaluation of anti-angiogenic therapies [J]. Curr Pharm, 2004, 10 (13): 1439-1455

[2] Zhong L, Coe S P, Stromberg A J, et al. Profiling tumor associated antibodies for early detection of non-small cell lung cancer [J]. J ou rnal of Thoracic Oncology, 2006, 1(6): 513-519

[3] Zanuy D, Flores-Ortega A, Casanovas J, et al. Energy landscape of a selective tumor-homing pentapeptide [J]. Phys Chem B, 2008, 112 (29): 8692-8700

[4] Ferrara N, Hillan K J, Novotny W. Bevacizumas (Avastin): a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 333 (2): 328-335

[5] Rodi DJ, Janes RW, Sanganee Hitesh J, et al. Screening of a library of phage-displayed peptides identifies human Bcl-2 as a taxol-binding protein[J]. J Mo Biol, 1999, 285: 197- 203

[6] Mat sumoto S E, Yamashit a M, Kat akur e Y, et al. A rapid and efficient strategy to generate antigen specific human monoclonal antibody by in vitro immunization and the phage display method[J]. Journ al of Immu nological Methods, 2008, 332: 2-9

[7] Pennazio S. The origin of phage virology [J]. Riv Biol, 2006, 99: 103-129

[8] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expressiovectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. Science, 1985, 228: 1315-1317

[9] Smith GP, Petrenko VA. Phage display [J]. Chem Rev, 1997, 97: 391-410

[10] Nanduri V, Sorokulova IB. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption [J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22:986-992

[11] Crameri R, Suter M. Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production [J]. Gene, 1993, 137:69-75

[12] Sidhu SS, Feld BK, Weiss GA. M13 bacteriophage coat proteins engineered for improved phage display [J]. Methods Mol Biol, 2007, 352:205-219

(下转第 2349 页)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HUANG Wu,LIU you-shuo.Diagnosis and point of treatment in senile osteoporosis [J].Chinese Journal of Geriatrics, 2005,24(12):939-941 (In Chinese)

[2] 应桂英,贾勇,宋彬,等. 四川崇州市不明原因骨关节病临床表现及 x 线量化评价 [J]. 中国修复重建外科杂志,2007,21(03):289-294

YING Gui-ying,JIA Yong,SONG Bin,et al. Clinical manifestation and quantitative analysis on roentgenography of unknown-etiology osteoarthritic disease in chongzhou city of Sichuan province [J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2007,21(03):289-294(In Chinese)

[3] 邵敏,刘庆思. 绝经后骨质疏松症生存质量的调查研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2000,6(03):58-60

SHAO Min,LIU Qing-si. Quality of life in parents with postmenopausal osteoporosis [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2000,6(03):58-60

[4] Tauchmanova L,Nuzzo V,Del Puente A,et a1.Reduced bone mass detected by bone quantitative uhrasonometry and DEXA in pre-and postmenopausal women with endogenous subclinical hyperthyroidism [J]. Maturitas,2004,48(3):299-306

[5] Wear K A.Ultrasonic attenuation in human calcaneus from 0.2 to 1.7 MHz[J].IEEE Trans Ultrason Ferroelect Freq Contr,2001,48:602-608

[6] Njeh CF,Boivin CM,Langton CM.The role of ultrasound in the assessment of osteoporosis:a review[J].Osteoporosis Int,1997,7:7-15

[7] Limiewski J,Nowicki A,Sawicki A.Detection of bone disease with ultra-sound comparison with bone densitometry [J].Ultrasonics, 2000,38:693-697

[8] Fukunaga M,Sone T,Yoshikawa K.Dxa.Qus and radiogram[J].Nippon Rinsho,2006,64(9):1615-1620

[9] Langon CM,Njeh CF,Hodgskinson R,Currey JD.Prediction of mechanical properties of the human calcaneus by broadband ultrasonic attenuation[J].Bone.1996,18:495-503

[10] Tavakoli MB and Evans JA.Dependence of the velocity and attenuation of ultrasound in bone on the mineral content[J].Phys Med Biol,1991,36:1529-1537

[11] Bossy E,Talmant M,Peyrin F,et al. An invitro study of the ultrasonic axial transmission technique at the radius 1-MHZ velocity measurements are sensitive to both mineralization and intracorical porosity[J].J Bone Miner Res,2004,19(9):1548-1556

[12] Harris S,Pallal G,Dawson-Hughes B. Influence of body weight on rates of change in bone density of the spine,hip and radius in postmenopausal women[J].Calcif Tiss Int,1992,50:19

[13] Felson DT,Yuqing Zhang,Hanman MT,et al.Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women:The Framingham study[J].Bone Mineral Res,l992,7:55

[14] Mazess RB,Barden HS,Bisek JP,et al.Dual-energy X-ray and soft-tissue composition[J].Am J Clin Nutr,l990,5l:l106

[15] Harris S,Glauber,William M,et a1.Body weight versus body fat distribution,adiposity and frame size as predictors of bone density[J]. Clin Endocrinol Metab,1995,80:l118

[16] Albala C,Yanez M,Devoto E,et al.Obesity as a protective fac-tor for postmenopausal osteoporosis [J].Int J Obes Relat Metab Disord, 1996,20(11):1027-1032

[17] Styrkarsdottir U,Halldorsson BV Gretarsdottir S,et a1.Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures [J].N Engl J Med 2008;358(22)2355-2365

[18] Haiat G,Padilla F,Cleveland RO,et a1.Efects of frequency-dependent attenuation and velocity dispersion Oil in vitro ultrasound velocity measurements in intact human femur specimens [J].IEEE Trans Uhrason Ferroeleet Freq Contr.2006,53:39-51.

[19] Black D,Johnston J rcc,Palmero Leta1.A proposal to stablish comparable diagnostic categories for bone densitometry based on hip fracture risk among white women over age 65 years [J].J bone Miner Res,2001,16:342

(上接第 2390 页)

[13] Krumpe LR, Atkinson AJ. T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries [J]. Proteomics , 2006, 6:4210-4222

[14] Soltes G, Hust M ,Bansal A. On t he influence of vector design on antibody phage display [J]. Journal of Biotechnology , 2007, 127 : 2626-2637

[15] Chasteen L, Ayriss J, Pavlik P. Bradbury AR Eliminating helper phage from phage display [J]. Nucleic Acids Res ,2006, 34:e145.

[16] Olszewski A, Sato K, Aron ZD, et al. Guanidine alkaloid analogs as inhibitors of HIV-1 Nef interactions with p53, actin, and p56lck [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101:14079-14084

[17] Majumdar S, Hajduczki A, Mendez AS, et al. Phage display of functional, full-length human and viral membrane proteins [J]. Bioorg Med Chem Lett , 2008, 18:5937-5940

[18] Khoo X, Hamilton P, O'Toole GA, et al. Directed assembly of PEGylated-peptide coatings for infection-resistant titanium metal [J]. J Am Chem Soc ,2009, 131:10992-10997

[19] Segvich SJ, Smith HC, Kohn DH. The adsorption of preferential binding peptides to apatite-based materials [J]. Biomaterials,2009, 30: 1287-1298

[20] Tomczak MM, Gupta MK, Drummy LF, et al. Morphological control and assembly of zinc oxide using a biotemplate [J]. Acta Biomater, 2009, 5:876-882

[21] Nam KT, Wartena R, Yoo PJ, et al. Stamped microbattery electrodes based on self-assembled M13 viruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105:17227-17231

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net