噬菌体展示文库筛选技术的研究进展

夏慧卿, 邓洪宽, 孙 磊, 崔国祯, 刘相叶, 于艳玲,
吴秀萍, 王学林, 刘明远*

(吉林大学 畜牧兽医学院, 中国吉林 长春 130062)

摘 要: 噬菌体展示技术是将编码外源蛋白或多肽的基因片段定向插入到噬菌体的外壳蛋白基因区, 使外源蛋白或多肽通过与噬菌体外壳蛋白融合而表达并展示于噬菌体表面, 进而筛选表达特异蛋白或多肽的噬菌体, 已发展成为生物学后基因组时代一个强有力的实验技术. 噬菌体展示文库的筛选是其关键环节. 为了提高筛选效率, 许多研究者对传统的筛选技术进行了改进, 如选择性感染噬菌体、迟延感染性噬菌体、以 DNA 为基础的筛选方法、亲合力捕获和反复筛选和封闭筛选法等, 用于筛选的靶标也越来越具有多样性, 使得这一技术有了更加广阔的发展前景.

关键词: 噬菌体展示; 文库; 筛选
中图分类号: S852.73 **文献标识码**: A **文章编号**: 1007-7847(2007)S1-0087-04

Advances in the Biopanning Techniques of Phage Display Libraries

XIA Hui-qing, DENG Hong-kuan, SUN Lei, CUI Guo-zhen, LIU Xiang-ye,
YU Yan-ling, WU Xiu-ping, WANG Xue-lin, LIU Ming-yuan*

(Department of Zootechnics and Veterinary, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China)

Abstract: Phage display technique involves the introduction of exogenous peptide or protein sequences into a location in the genome of the phage capsid proteins. The encoded peptides are displayed on the phage surface as a fusion product with one of the phage coat proteins. And then it was used for biopanning phages which contains expressed proteins or peptides. This technique has been becoming a biology postgenome powerful experiment technique. It 's key step is biopanning of phage display libraries. In order to enhance the efficiency of biopanning, improvement have been made to traditional biopanning techniques. Various targets are used, for example, selectively-infection phage, delayed infectively panning, DNA-based selection, selection by avidity capture, interactive panning and blocking, and so on, which make the techniques have a broader development prospects.

Key words: phage display; library; biopanning

(Life Science Research, 2007, 11(4) S1:087~090)

噬菌体展示技术是由美国 Missouri 大学 Smith G P 等[1]于 1985 年首先建立起来的一种新的生物技术. 它是以噬菌体为载体, 将编码外源蛋白或多肽的基因片段定向插入到噬菌体的外壳蛋白基因区, 使外源蛋白或多肽通过与噬菌体外壳蛋白融合而表达并展示于噬菌体表面, 被展示的蛋白或多肽可保持相对独立的空间结构和生物活性, 进而通过亲和富集等方法筛选表达特异蛋白或多肽的噬菌体. 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

收稿日期: 2007-02-02; **修回日期**: 2007-07-11
基金项目: 06 "十一五 "863 计划生物和医药技术领域 2006 年专题(2003AA02Z451)
作者简介: 夏慧卿(1977-), 女, 山东潍坊人, 硕士, 主要从事人兽共患病分子生物学研究.Tel:0431-87836719, E-mail: xiahuiqing001@163.com
© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

噬菌体展示系统和 T7 噬菌体展示系统. 目前该技术已发展成为生物学后基因组时代一个强有力的实验技术, 在生命科学的不同研究领域得到广泛应用. 构建一个高质量的噬菌体展示文库以后, 更为重要的是对该文库的筛选或淘洗过程, 为了提高筛选效率, 许多研究者对传统的筛选技术进行了改进, 而且用于筛选的靶标也越来越具有多样性, 使得这一技术有了更加广阔的发展前景.

1 以单一蛋白质为靶标的筛选法

以蛋白质为靶标筛选, 能直接反映出相互作用的两个蛋白质之间氨基酸残基的特性, 是一种最为常见的筛选方式. 如利用特异性的单抗为筛选靶标[2], 筛选多肽或蛋白质的应用已经相当成熟, 为在未知条件下分离与靶标结合的多肽或蛋白质提供了广泛的应用前景. 其他的功能蛋白也可以作为筛选靶标[3], 如以受体蛋白分子作为靶标, 筛选出特异性配体等, 由于这种蛋白在体内能与多种蛋白质相互作用, 因此能筛选到多种与之结合的多肽序列, 为研究蛋白质之间的相互作用提供了有效手段.

2 以复合分子为靶标的筛选法

以纯化的分子为筛选靶标, 虽然具有直接、简便的优势, 但当筛选对象所处环境复杂、纯化困难时, 则只能利用复合分子(如某些疾病的血清)作为靶标进行筛选. Ozawa M 等以新城疫抗血清作为筛选靶标, 筛选出了 3 个特异性目标多肽[4]. 但以复合分子作为靶标, 其主要缺点是由于其成分复杂, 很难筛选到特异性强的目标多肽或抗体.

3 以细胞为靶标的筛选法

细胞表面是一个复杂的生物体系, 分布着大量的信号分子, 这些信号分子反映了细胞的特性及所处的功能状态. 人们固然可以纯化这些分子以作为筛选靶标, 但对纯化困难或表达量少的受体等分子, 这种方法就显得力不从心. 而且许多受体需要完整的细胞膜, 或与细胞膜上的其他亚单位形成复合物才能发挥作用. 因此, 为了真实地模拟体内环境, 全细胞筛选应运而生, 并且得到了广泛应用. 这种筛选方式无须事先知道有关受体的信息, 这对表面经常发生改变的肿瘤细胞的筛选更为有利. Mazzuccbelli L 筛选到一些能与中性粒细胞(PMN)特异性结合的短肽, 这些短肽能诱导 PMN 内钙的增加, 将对研究信号转导途径有一定的帮助[5]. Kassner P D 等在研究中描述了另一种筛选细胞配体的方法, 它是建立在受体介导的内吞作用基础上, 在巨细胞病毒启动子的控制下, 将报告基因如 GFP, β半乳糖苷酶插到噬菌体载体中, 通过基因的表达来筛选配体[6].

4 以组织或器官为靶标的筛选法

以分子或细胞为靶标进行的筛选都是体外筛选. Pasqualini R 等首次报道了在体内进行的针对靶器官进行的噬菌体展示肽的筛选[7]. 他们将噬菌体展示肽库注射到小鼠的尾静脉, 数分钟后处死小鼠, 收集各器官的噬菌体, 在体外扩增后, 再注射给小鼠, 以进行下一轮筛选, 采用这种体内淘洗筛选的方法, 筛选到脑组织和肾组织特异性的靶向肽, 将脑组织特异的靶向肽与红细胞交联, 能使这种红细胞定向到脑组织. 此后, Akita N 等将展示文库注射入患有胃癌的小鼠腹腔内, 筛选出可用于治疗胃癌的 KLP 基序(SWKLPPS)[8]. 这种体内筛选的模式对研究组织特异性给药系统具有潜在的应用价值.

5 以 DNA 为基础的筛选法

以往的噬菌体展示文库筛选方法都是建立在抗原-抗体反应即蛋白质相互作用的基础上的, 它们的敏感性和特异性会影响筛选的结果[9]. 为提高筛选的敏感性和特异性, Bartoli F 等在他们的研究中建立了一种以 DNA 为基础的筛选机制[10], 其依据是在噬菌体展示系统中每一种蛋白都与其编码的核苷酸序列有关, 而且每一个噬菌体中的核苷酸序列都是唯一的. 因此, 可以通过鉴定核苷酸序列来得到特异的短肽结合序列, 从而提高筛选的敏感性和特异性, 提高了临床诊断的特异性和灵敏度.

6 反复淘洗和封闭筛选法

这种方法是在传统淘洗方法的基础上, 用多种不同的肽库反复淘洗, 在每种肽库淘洗得到一个固有序列后, 即用含有该序列的已知蛋白分子将结合位点封闭, 再用另一种肽库进行筛选. Messmer B T 利用 7 肽库、12 肽库和环 7 肽库对脐血血清进行筛选, 得到 3 种特异性结合的短肽, 其中一个是纤维蛋白的结合序列, 另两个是补体结合序列[11]. 该法常用于多表位筛选, 但局限性在

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

于每轮筛选后需事先确定一种封闭蛋白才能进行下一轮筛选.

7 选择性感染噬菌体筛选法

传统的筛选系统中基因重组的噬菌体仍有野生型的 geneIII 蛋白存在, 因此, 重组噬菌体具有感染能力. 这导致了在筛选后的扩增时, 特异性和非特异性的噬菌体均可以进入宿主菌增殖. 选择性感染噬菌体筛选系统以噬菌体感染宿主菌的机理为基础. 噬菌体感染 E.coli 细胞是通过 Fpilus(伞毛)介导, 噬菌体外壳 pIII 蛋白 N 端参与噬菌体穿过细胞膜和同 F pilus 的结合, 两者在感染过程中缺一不可. 选择性感染噬菌体筛选系统把筛选和扩增合并为一步, 只有特异性的噬菌体才能感染宿主菌扩增, 而非特异性噬菌体却不能, 这样不仅简化了筛选步骤, 而且大幅度地提高了筛选效率[12].

8 延迟感染性筛选法

Benhar I 等将细菌表面展示技术与噬菌体表面展示技术相结合, 并利用前者展现在大肠埃希菌细胞膜上的抗原或目的蛋白, 用于捕获展示于噬菌体上的抗体或多肽, 这种筛选方法就是延迟感染性筛选法[13]. 这一新方法利用细菌表面展示系统中细菌外膜蛋白 A 的多用性的优点, 将目的蛋白的编码序列融合到杂交的外膜蛋白 A 来实现表面展示. 它的优点是筛选的细菌与噬菌体繁殖的环境相同, 即噬菌体识别曾用来产生噬菌体的细菌表面抗原位点, 并与之结合, 完成了噬菌体的繁殖与筛选, 并且延迟感染性筛选适合于稀有克隆在文库中的有效筛选.

9 双层膜筛选法

在构建重组噬菌体时, 在外源 DNA 与噬菌体 gIII 的结合处插入一个终止子, 当转入含校正基因菌株时, 终止子被读通, 产生融合蛋白, 而当转入不含校正基因菌株时, 表达可溶性外源蛋白于细胞膜间隙, 最终进入培养基质中. 针对后者, Skerra A 等建立了双层膜筛选系统. 第一种膜为亲水性多孔膜, 这种膜对蛋白质的结合能力很小, 孔径能让蛋白质分子自由通过, 但细胞不能通过; 第二种膜为憎水性膜, 膜表面包被目标蛋白(抗体或抗原). 两种膜分别覆盖在固体培养基上, 细胞在第一种膜上培养一段时间后, 将这层膜转移至第二层膜上培养, 分泌的可溶性蛋白透过第一层膜, 与第二层膜上的目标蛋白结合, 然后再用已知的抗原或抗体筛选. 这种方法避免了筛选可溶性蛋白通常遇到的细胞碎片的干扰, 提高了筛选效率, 但该法仅适用于较小的抗体库(不大于 100 000 克隆)[12].

10 亲和力捕获筛选法

这是 Ruud M T 等报道的一种结合噬菌体展示和点阵扫描技术的高效筛选方法, 其主要原理是基于多价相互作用形成的稳定复合物之间的高亲和力[14]. 主要用于受体-配体对的亲和筛选. 在这种方法中, 将受体多价展示在噬菌体表面, 而其配体则以一种多聚体融合蛋白的形式共表达. 因此, 共价结合的受体-配体对在噬菌体表面形成了多价的高亲和力反应复合体. 这样, 包含有这个复合体的噬菌体通过其 GST 部位被捕获至固相支持物上, 被筛选的噬菌体通过铺平板和进行双抗筛选后, 再进行点阵分析, 共价结合的受体-配体对就可以检测出来.

11 去筛选法

该方法筛选过程是先在制备的重组噬菌体溶液中加入具有交叉反应的另一种抗原, 对抗体库中具有强烈交叉反应的抗体进行封闭, 随后再用目的抗原对封闭后的抗体库进行富集, 从而极大地提高了从抗体库中筛选出高特异性抗体的效率. 该法在筛选高特异性抗体时被广泛应用[15].

12 宿主菌直接洗脱的筛选法

经典筛选过程中, 亲和性结合的噬菌体先洗脱于溶液中再感染宿主, 洗脱一般利用 pH 的变化在酸性或碱性溶液中进行, 这可能对噬菌体造成损害, 洗脱时间也受到限制. 利用噬菌体与宿主之间的亲和性可以直接用宿主菌洗脱, 以避免对筛选的不利影响, 并且将洗脱与感染合并为一步[16]. Wind T 等用对数生长期的宿主菌直接洗脱的方法, 从半合成的 scFv 文库中筛选出了 7 种目标噬菌体, 随后又与化学洗脱法做平行比较, 结果显示宿主菌直接洗脱法效果优于化学洗脱法[17].

噬菌体展示技术将特定分子的基因型和表型统一在同一噬菌体颗粒中, 再利用其配体的特异亲和力, 将表达有特定蛋白质或多肽的噬菌体挑选出来进行进一步研究, 而这一技术的关键是最

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

大限度的减少非特异性噬菌体结合，筛选出高特异性的噬菌体，因而筛选方法的改进是该技术发展的限速步骤和动力，目前选择性感染噬菌体筛选法、以细胞和 DNA 为基础的筛选方法不断走向完善是该技术发展的方向.

参考文献(References):

[1] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. Science, 1985, 228 (4705): 1315-1317.

[2] FUKUDA M N. Screening of peptide-displaying phage libraries to identify short peptides mimicking carbohydrates[J]. Methods Enzymol, 2006, 416: 51-60.

[3] KERESZTESSY Z, CSOSZ E, HARSFALVI J, et al. Phage display selection of efficient glutamine-donor substrate peptides for transglutaminase 2[J]. Protein Sci, 2006, 15 (11): 2466-2480.

[4] OZAWA M, OHASHI K, ONUMA M. Identification and characterization of peptides binding to newcastle disease virus by phage display[J]. J Vet Med Sci, 2005, 67(12): 1237-1241.

[5] MZAAUCCBELLI L, BURRITL B, JESAITIS A J, et al. Cell-specific peptide binding by human neutrophils[J]. Blood, 1999, 93 (5): 1738-1748.

[6] KASSNER P D, BURG M A, BAIRD A, et al. Genetic selection of phage engineered for receptor-mediated gene transfer to mammalian cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 264 (3): 921-928.

[7] PASQULINI R, RUOSLAHTI E Organ. Targeting in vivo using phage display peptide libraries[J]. Nature, 1996, 380 (6572): 364-366.

[8] AKITA N, MARUTA F, SEVMOUR L W, et al. Identification of oligo peptides binding to peritoneal tumors of gastric cancer[J]. Cancer Sci, 2006, 97 (10): 1075-1081.

[9] DEROO S, MULLER C P. Antigenic and immunogenic phage displayed mimotopes as substitute antigens: applications and limitations[J]. Combin Chem High throughput Screen, 2001, 4 (1): 75-110.

[10] BARTOLI F, NUZZO M, URBANLLI T. DNA-based selection and screening of peptide ligands[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16 (14): 1068-1073.

[11] MESSMER B T, BENHAM C J, THALER, D S. Sequential determination of ligands binding to discrete components in heterogeneous mixtures by iteractive panning and blocking (IPAB)[J]. J Mol Biol, 2000, 296(3): 821-832.

[12] 魏东芝，赖敏. 噬菌体抗体库筛选技术[J]. 生命科学，2000, 12 (3): 134-137.

[13] BENHAR I, AZRIEL R, NAHARY L, et al. Highly efficient selection of phage antibodies mediated by display antigen expression as LPP-OmpA primer fusions on live bacteria[J]. J Mol Biol, 2000, 301(4): 893-904.

[14] RUUD M T, de WILDT Ian M Tomlinson, JENNIFER L Ong, et al. Isolation of receptor-ligand pairs by capture of long-lived multivalent interaction complexes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (13): 8530-8535.

[15] 刘志刚，俞炜源. 新型噬菌体表面呈现载体的构建[J]. 生物技术通讯，2002，13 (1): 50-53.

[16] MARCO Antonio Arap. Phage display technology-Applications and innovations[J]. Genetics and Molecular Biology, 2005, 28 (1): 1-9.

[17] WIND T, STAUSBOL G B, KJAER S, et al. Retrieval of phage displayed scFv fragments using direct bacterial elution [J]. J Immunol Methods, 1997, 209 (1): 75-83.

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