

分子文库展示技术

邹媛 詹金彪*

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

摘要 分子文库展示技术是一系列广泛应用于多肽、蛋白质及药物筛选和研究蛋白质间相互作用的有效的生物学技术。它将组合成的具有一定长度的随机序列寡核苷酸片段(或 cDNA)克隆到特定表达载体中, 使其表达产物(多肽片段或蛋白质结构域)以融合蛋白的形式展示在活的噬菌体或细胞表面。根据其蛋白质表达是否依赖于宿主表达系统, 分为体内表达展示系统和无细胞展示系统(体外表达展示系统)。就其展示的部位不同又可分为噬菌体展示技术、细胞表面展示技术、核糖体展示技术、mRNA 展示技术等。现对各种展示技术的基本原理及相关应用做简要综述。

关键词 分子文库展示技术; 噬菌体展示技术; 细胞表面展示技术; 核糖体展示技术; mRNA 展示技术

分子文库展示技术, 是一种利用基因工程技术, 将组合成的具有一定长度的随机序列寡核苷酸片段(或 cDNA)克隆到特定表达载体中, 使其表达产物(多肽片段或蛋白质结构域)以融合蛋白的形式展示在活的噬菌体或细胞表面。由于肽库或蛋白质文库中包含了该长度多肽的所有或绝大多数可能的氨基酸序列, 而每个噬菌体或细胞表面呈现其中的一种, 因而形成的文库容量很大, 对于各种筛选技术的发展具有深远的影响。然而, 依赖于体内基因表达的展示系统, 其文库的大小和多样性受到转化效率、宿主表达环境等多方面的影响; 为了克服体内表达展示系统的不足, 体外表达展示系统, 即无细胞展示系统得到了大量的尝试与运用; 分子文库展示技术的概念也因此得到了补充和发展。现就各种展示技术的原理及应用作一综述。

1 体内表达展示系统

1.1 噬菌体展示技术

1.1.1 丝状噬菌体展示系统 噬菌体展示技术是一项较早发展起来的用于研究蛋白质及其相应配体间相互作用的新技术。1985 年, Smith^[1]描述了外源肽段在丝状噬菌体 fd 表面的展示结果。这项展示技术能将外源肽段表达并伸展到噬菌体的表面, 通过亲和筛选的方法将表达能与固定着的配体相互作用结合的特异肽序列的噬菌体筛选出来, 并通过测定噬菌体 DNA 序列得到其所表达的肽段的氨基酸序列(图 1)。丝状噬菌体主要包括大肠杆菌(*E. coli*)丝状噬菌体 M13、fd、f1 等, 是仅能感染具有 F 纤毛细菌的

一组噬菌体。它能容纳外源基因克隆在特定表达载体上, 如: 编码衣壳蛋白的基因 g III、g VIII 等, 使目的基因产物与衣壳蛋白融合, 展示在丝状噬菌体的表面, 便可直接检测表达产物的一些特性。尽管 5 种衣壳蛋白(p III、p VI、p VII、p VIII、p IX)都曾用于展示外源多肽和蛋白质, 但是 p III 和 p VIII 是至今为止最常用的^[2]。一般而言, 一个有活力的野生型噬菌体能够表达 2 700 左右拷贝的 p VIII 和 3~5 拷贝的 p III^[3], 外源基因可以插入其中, 表达产物以融合蛋白的形式连接在 p III 和 p VIII 的 N 端, 而并不影响噬菌体的完整性和活性。

噬菌体展示文库的构建, 除了可以将编码 p III 和 p VIII 的基因(g III 和 g VIII)作为载体外, 还可以使用噬菌粒^[2,3]作为表达载体。所谓的噬菌粒, 实质上就是噬菌体和质粒载体的杂合体。在大肠杆菌表达质粒载体中引入丝状噬菌体的复制起点(fl ori)时, 该质粒能以单链 DNA 的形式包装在噬菌体衣壳之中, 该单链质粒 DNA 就是噬菌粒。噬菌粒具有来自噬菌体和 *E. coli* 的两个复制起点, 以 g III 和 g VIII 作为融合结构, 并具有多个克隆位点和一个抗生素耐受基因^[2]。但是, 它缺少形成完整噬菌体所需的编码结构和非结构蛋白的一些基因, 因而其复制、包装等有关功能需要辅助噬菌体的帮助; 该辅助噬菌体提供所有噬菌体组装所需的成分。

1.1.2 丝状噬菌体与其他噬菌体展示系统的区别

收稿日期: 2006-09-19 接受日期: 2006-12-20

国家自然科学基金资助项目(No.30470369)

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-88208273, E-mail: jzhan2k@zju.edu.cn

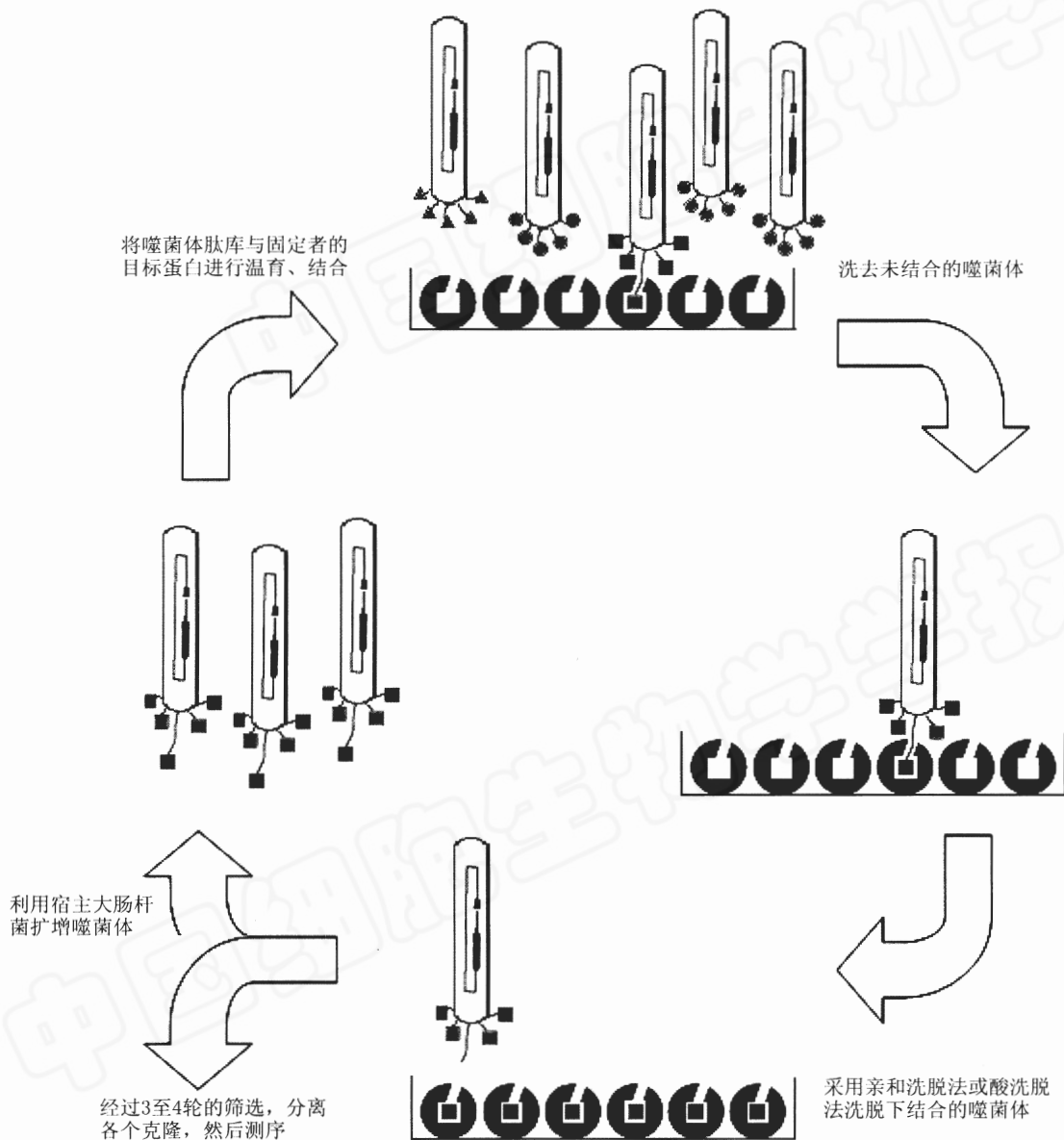


图1 噬菌体筛选技术的简要流程

丝状噬菌体是一种分泌型噬菌体, 它与溶源性噬菌体的不同之处在于它的组装过程在宿主细胞质膜上完成, 然后释放至胞外, 宿主细胞本身并不裂解^[2]。而溶源性噬菌体(T4, T7, λ 和 P4)则不同, 它们具有溶源生活周期, 衣壳蛋白的组装和折叠是在细胞质中完成的, 并通过宿主细胞的裂解释放到胞外^[1]。正是因为丝状噬菌体的生活周期特征, 限制了具有融合蛋白的衣壳蛋白正确无误地跨过细菌细胞膜中的脂质双分子层而展示出来^[4]; 一些具有细菌细胞毒性的蛋白质或多肽也无法得以展示。而 λ 噬菌体等展示系统不存在跨膜分泌的问题, 可以缓和毒性问题带来的限制。溶源噬菌体展示系统的发展为噬菌体展示

技术的应用带来了新的思路。

1.1.3 噬菌体展示cDNA文库 一般而言, 噬菌体展示文库构建时, 外源蛋白都与丝状噬菌体基因g III和g VIII产物的N末端相融合。但是这种方式并不适用于展示完整cDNA编码的蛋白质, 因为插入载体中的完整cDNA具有终止密码子。因此, 大多数cDNA片段的文库都是构建在其他噬菌体展示系统中, 如将cDNAs融合到噬菌体VI基因的C末端, 而对噬菌体的包装, 成熟和繁殖没有影响, cDNA文库得以展示和应用。此外, 基于c-fos/c-jun亮氨酸拉链结构为载体^[5], cDNA文库编码的产物也可展示在噬菌体的表面。c-fos/c-jun亮氨酸拉链蛋白具有高度的亲和连

接作用,在这一展示系统中,Jun 亮氨酸拉链蛋白融合到 p III 衣壳蛋白的 N 端,Jun 蛋白便可展示在噬菌体的表面;而 cDNA 编码的产物则融合到 Fos 亮氨酸拉链蛋白的 C 端,通过 p III 衣壳蛋白锚定着的 Jun 蛋白与可溶性的 Fos 蛋白的连接作用,cDNA 编码的产物便间接地与 p III 蛋白连接在了一起^[5]。

1.1.4 应用及局限性 从噬菌体肽库问世至今,该展示技术得到了多方面的应用与发展,用于筛选的靶物质包括抗体、膜受体、酶及其他功能蛋白、培养细胞、血清样品,甚至是活体器官和整个动物。总的来说,主要有以下几个方面^[2,6]:(1)用单克隆抗体确定抗原表位及疫苗的研究;(2)抗体的筛选、生产及优化^[7];(3)确定纯化蛋白质及其他分子的结合表位;(4)分析蛋白质之间相互作用界面关键位点的图谱;(5)筛选大型功能蛋白的小分子模拟肽;(6)分离鉴定疾病特异抗原的模拟肽及抑制病毒复制的多肽;(7)筛选细胞和器官的特异肽;(8)酶作用底物分析及蛋白酶抑制剂的筛选^[8]。

本实验室利用噬菌体展示技术筛选抗原表位模拟肽,在阻断天然抗体,促进异种器官移植研究方面做了一定的工作。我们实验室^[9,10]采用该技术,分别在 XCX₁₅ 肽库、线性 7 肽库和 C7C 环肽库中,筛选到了 Gal- α 1,3-Gal 的模拟肽。Gal- α 1,3-Gal 是一种存在于猪器官表面的异种反应抗原表位,能与人体内预存的天然抗体结合,触发超急性排斥反应,成为异种器官移植的阻碍。通过利用西非单叶豆凝集素 BS-I-B4 或抗 B 型血单克隆抗体,筛选得到的 Gal- α 1,3-Gal 模拟肽,已经证实,在体外可以阻断人体内预存天然抗体所引起的猪红细胞凝集反应^[9,10]。

尽管噬菌体展示技术有相当大的功能,但其依赖于细胞表达系统的特征,使其面临一定的限制性。首先,编码肽的基因有一定的偏爱性,使肽库的多样性受到了限制。其次,大肠杆菌转化效率的限制,使肽库序列的数量只能达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 。此外,真正得以展示的多肽序列数量还可能因为其他原因而减少,如:未正确折叠的蛋白质的降解,在宿主细胞中的限量表达,融合蛋白无法正确装配,无法在宿主细胞周质空间的氧化环境下折叠,及基因产物的毒性对宿主细胞的影响等^[6,11]。

1.2 细胞表面展示技术

细胞表面是衔接细胞内外环境的功能界面,许多细胞表面蛋白横跨原生质膜,而其他则通过共价或非共价的形式与细胞表面成分相连接。*E.coli* 和酵母

菌是常用的两种宿主。细胞表面锚定着的特异蛋白质由于一定的限制机制而展示其特殊的结构域在细胞表面。细胞表面展示系统将肽段或蛋白质与锚定模体相融合而展示出来。融合的方式可分为:N 端融合,C 端融合及夹心融合。载体蛋白、展示蛋白和宿主细胞的特性及融合的方式等都将影响蛋白质展示的效率^[12]。

1.2.1 载体蛋白(锚定模体)和靶蛋白(展示蛋白) 20 世纪 90 年代期间,许多不同的载体蛋白被用于表面展示技术,使用不同的载体对宿主细胞的生理影响不同。因此,成功的载体必须具备下述 4 个要求:①具有功能的信号肽或能传递信号使未成熟的融合蛋白穿过细胞内膜;②具有牢固的锚定结构使融合蛋白展示在细胞表面而不脱落;③可以容纳外源序列的插入与融合,而不引起自身的不稳定;④能够抵抗来自周质空间或媒介中的蛋白酶的 attack。不同的载体有各自的特征,选择使用可达到不同的应用效果;如细菌菌毛、S 层蛋白、冰核蛋白(INP)和一些外膜蛋白(如:*E.coli* TraT)都是作用于免疫刺激的有效载体^[13,14],所以特别用于重组疫苗的发展研究。

肽段或蛋白质的插入融合位点也很重要,这不仅关系到展示蛋白的融合效率和稳定性,还影响其特异活性和翻译前修饰作用。新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)S 层蛋白有 11 个允许插入的潜在位点,当这 11 个位点都融合了外源蛋白,展示后发现,有 9 个融合蛋白被水解了^[15]。此外,展示的蛋白质必须面向周围介质,故必须确认载体蛋白是暴露在细胞表面的,鉴定方法参考文献^[16]。

展示蛋白的特性对蛋白质的运输过程具有重要影响。外膜的周质间隙内,展示蛋白的折叠结构,如:二硫键,会影响蛋白质的转移^[17]。此外,插入蛋白的氨基酸序列若含有许多带电荷的残基或疏水残基,会导致其在细菌细胞中的低分泌。像带有 4 个苯丙氨酸残基的蛋白质因不能分泌而无法展示在细胞表面^[12]。

1.2.2 宿主菌种 宿主菌种的选择对蛋白质展示也是一个不可忽视的因素。好的宿主必须能容纳展示的蛋白质,易于培养;细胞壁相关的蛋白酶及细胞外蛋白酶的活性较低。革兰氏阴性菌(如 *E.coli*)尽管外膜较脆弱,但仍然是个受瞩目的宿主。其各种遗传物质、突变种属及高效的转化率都使其成为大分子多肽或蛋白质展示筛选的理想宿主选择。而革兰氏阳性细菌,由于其刚性的细胞壁结构,似乎更适合

于整个细胞的催化和吸附应用[杆菌属(*Bacillus*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)常用于此],作为细胞表面展示的应用很少报道^[12]。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一个非常好的用于细胞表面展示的宿主,与其他细菌相比有许多优势:①具有公认的安全性,允许应用于食品和制药行业;②其蛋白质折叠和分泌方式与哺乳动物相似,展示哺乳类蛋白优于细菌系统;③具有众所周知的发酵特性;④展示的蛋白质可通过糖基磷脂酰基醇(GPI)锚定或二硫键绑定在细胞壁上^[12],许多酵母细胞表面展示系统都是依赖于 GPI 锚定而构建的。

1.2.3 融合方式 革兰氏阴性菌具有复杂的细胞壁结构,包含外膜、细胞周质和细胞质膜。这意味着融合蛋白随着表面锚定模体必须通过质膜、细胞周质和外膜才得以展示。在不同的展示应用中,各种载体蛋白的对象和锚定机制不同,因而要考虑各种基因融合策略使展示效果达到最好。N 端融合方式的载体蛋白通常其 C 端具有直接锚定的模体。免疫球蛋白 A(IgA)蛋白酶家族成员的 C 端有自动运输结构,能够促进 N 端展示的蛋白质结构域穿过外膜^[17]。在外膜上 C 端结构域形成类似 porin 的 β 桶通道,方便 N 端蛋白质结构域的转运。一些外膜蛋白的 N 端有靶向序列,适合作为 C 端融合方式的载体蛋白。如 Lpp-OmpA 嵌合体就是个典型代表。它由一条信号序列,成熟 *E.coli* 脂蛋白 N 端的最初 9 个肽序列和 *E.coli* 外膜蛋白 A 的 46~159 或 44~66 位残基所组成。Lpp 部分是定位于外膜蛋白所必需的, OmpA 部分则负责 C 端融合的外源蛋白跨外膜运输^[12]。除了 Lpp-OmpA 嵌合体,冰核蛋白(INP)是另一种稳定而有效的以 C 端融合方式使用的锚定蛋白,此载体可展示分子量至 60 kDa 的蛋白质。由于该蛋白质内部具有重复的结构域,并且这一重复序列的长度是可以调整的,因此可选择不同长度的 INP 作为载体蛋白,从而更大程度地避免了展示蛋白间的空间位阻效应^[12]。夹心融合是革兰氏阴性菌表面展示中最常用的方法,常用的三类载体分别为外膜蛋白(OMPs)、细胞外附器蛋白亚单位和 S 层蛋白。以 OMPs 为例,它以 β 桶结构横跨外膜。 β 桶结构由反向平行的 β 折叠片所构成,并通过周质间隙中的短环和细胞外部的长环相连接。外部的环状结构保守性较差,能够容忍一定程度的改造,如取代、插入及剔除等。这些外部的长环结构可用于外源蛋白的展示。不过 OMPs 中的长环只能承受 70 甚至更少的氨基酸残基的插入^[12]。

1.2.4 应用及存在的问题 细胞表面展示技术有个很大的优势就是可以利用荧光激活细胞分选法(fluorescence-activated cell sorter, FACS)作为检测手段来进行筛选,该方法每秒可筛选至少 50 000 个样本^[18]。细菌细胞表面展示技术具有广泛的生物工程和工业用途,包括:(1)活疫苗的发展——暴露异源抗原表位在人类共生物的表面或削弱致病的细菌细胞,以引起抗原特异的抗体反应^[13];(2)细胞表面展示文库用于一般的筛选工作^[19];(3)生产抗体——在动物中表达表面抗原以提高多克隆抗体的产生^[12];(4)生物吸附剂——去除有害的化学物质及重金属^[20];(5)生物催化剂——将酶展示在细胞表面,将整个细胞作为催化剂^[21];(6)生物传感器——细胞表面锚定酶、受体或其他信号敏感成分,用于诊断、工业及环境工程^[22];(7)随机突变后,检测靶分子中单个氨基酸的变化^[23]。

尽管各种细胞表面展示系统得到了发展,但是仍有问题需要解决和改进。如展示系统在表达水平上对某些氨基酸的偏爱,引起展示文库的多样性有所欠缺。整个展示细胞作为生物催化剂使用时发现展示的酶活性下降,如:与它们的自由状态相比,锚定的 α 乳糖酶、脂肪酶、角质酶及 β 内酰胺酶的活性明显下降。除此以外,由于细胞壁的疏水性引起的空间位阻效应,蛋白质展示不完全,未折叠或结构的错误折叠、底物排斥等也是个问题^[12]。

2 体外展示系统(无细胞展示系统)

上文可知,不管是噬菌体展示还是细胞表面展示,都存在相同的局限性问题:筛选环境必须与细胞生长环境相似;表达的毒蛋白对宿主的影响;融合蛋白活性的下降及动力学范围的缩小;转化效率低限制了肽库的多样性等。随着 20 世纪 60 年代体外翻译体系的初步发展,利用细胞提取物合成蛋白质的方法日趋成熟。各种无细胞展示技术利用这一方法克服了体内展示系统存在的诸多问题。它们的优势在于去除转化和克隆步骤,无需依靠细胞进行转化与扩增,使展示文库容量更大($>10^{12}$)(*E.coli* 展示系统文库容量为 $10^9 \sim 10^{10}$,而酵母展示系统文库容量只有 $10^6 \sim 10^7$);所展示的序列片段更大。此外,筛选过程可在更加严苛的条件下进行——无天然氨基酸,极度的 pH 值和温度条件,非生理环境等,只要表型和基因型间的连接足够牢固,在这种恶劣环境下不被干扰。更重要的是通过反复的随机突变和选择,还可使蛋白质进行进化^[24]。

2.1 核糖体展示技术

核糖体展示技术实质上就是将表型(表达的蛋白质)与基因型(相应的遗传物质)通过非共价作用连接起来, 分子文库的表型用于筛选及其他活性实验, 筛选出来的表型利用与其相连的基因型进行扩增, 然后进入下一轮筛选。其大体流程如下: 首先在体外转录 DNA 编码的分子文库, 形成缺少终止密码子的 mRNA 链; 随后 mRNA 进行翻译, 形成蛋白质-核糖体-mRNA 复合物(PRM), 该复合物可与固相上的相应配体结合而进行筛选; 将筛选得到的产物经 EDTA 处理, mRNA 从核糖体上解离下来; mRNA 经 RT-PCR 技术得以扩增(图 2A)。

核糖体展示技术无转化步骤, 兔网织红细胞裂解液、麦芽胚及 *E.coli* S30 提取物是常用的 3 个展示体系^[25, 26], 其文库规模仅受到系统环境中功能的核糖体和 mRNA 浓度的影响。该技术的关键步骤是 PRM 的形成, 由于核糖体的停止使初生蛋白与相应 mRNA 相连接^[25]。使核糖体在 mRNA 上停止的方法有: (1)在系统中加入抗生素, 如利福平和氯霉素(作用于原核核糖体)或放线菌酮(作用于真核核糖体), 使翻译过程随机地停止^[26]; (2)删除终止密码子——通常, 释放因子识别终止密码子, 引起核糖体的解离和初生蛋白的释放。删除终止密码子便可使核糖体停留在 mRNA 的 3' 端, 连接 mRNA 与相应产物^[25]。

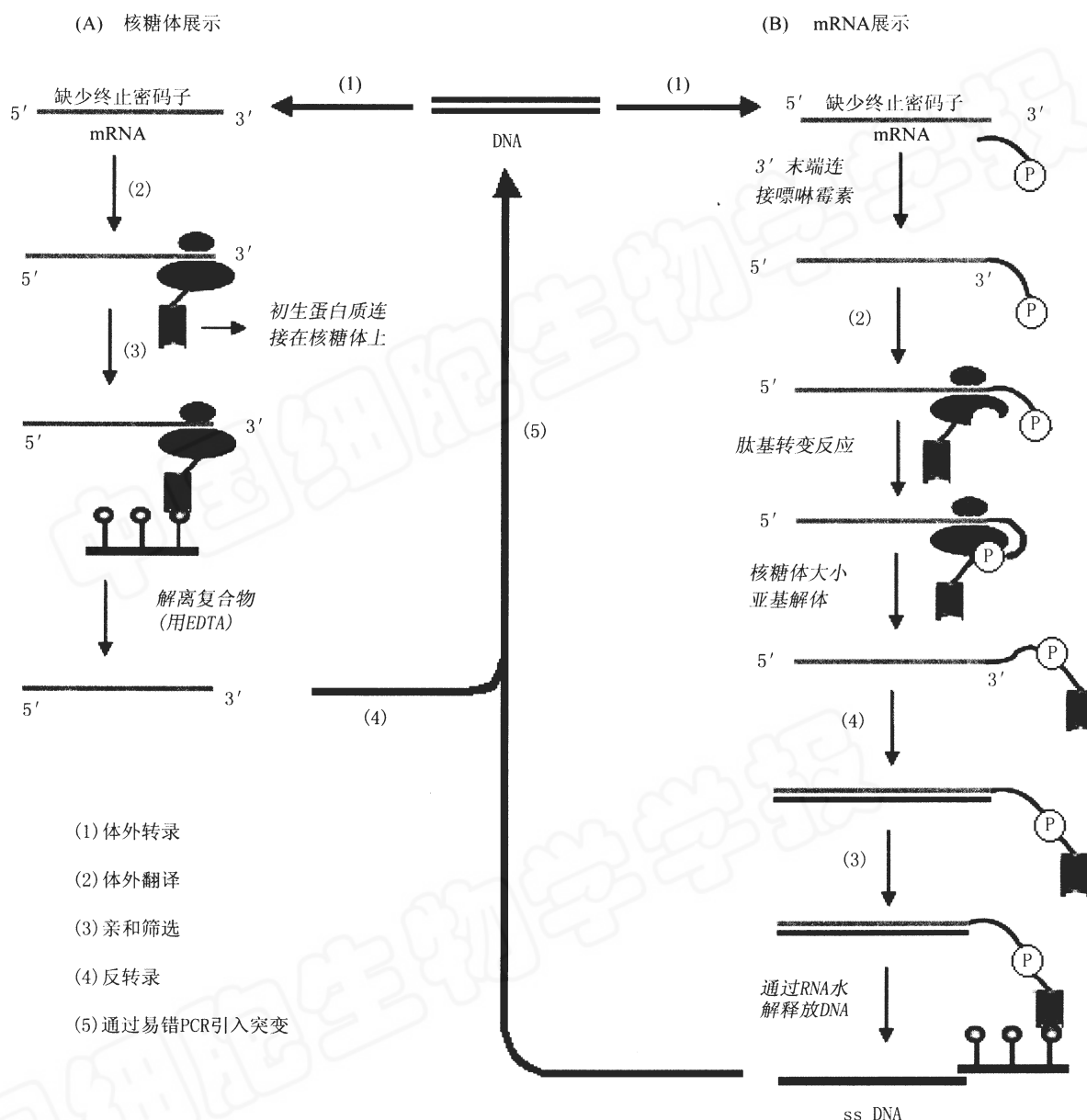


图2 核糖体展示技术和 mRNA 展示技术的比较

斜体部分为两者不同之处; (1)~(5)为两者相同之处。

2.1.1 展示蛋白的功能性及复合物的稳定性 一般而言,核糖体展示文库构建时需要包括一个启动子(T7, SP6 或 T3)和一个翻译起始信号,如 Shine-Dalagarno(原核)或 Kozak(真核)^[27]。为确保完整的初生蛋白能够展示出来,并折叠成正确的三维结构,通常在蛋白质的 C 端融入栓链(tether)或间隔物(spacer)^[28],这种间隔物结构域至少要 23~30 个氨基酸的长度,它具有非常好的弹性,占据大小核糖体间的通道,使初生蛋白完全从核糖体“通道”中展现出来。被作为间隔物使用的蛋白质有很多,包括免疫球蛋白 κ 链的恒定结构域(C κ),丝状噬菌体 M13 基因 III^[25],人类 IgM 的 C_H3 结构^[29]等。此外,在翻译体系中加入一些参与蛋白质折叠的蛋白质如分子伴侣等,以助于蛋白质的正确折叠。

PRM 的稳定性是个很重要的问题。一般,在合适的实验条件下,PRM 都是很稳定的,保持时间可大于 10 天^[28]。在低温及高 Mg^{2+} 浓度条件下,PRM 的稳定性增强。此外,在反应体系中加入反义寡核苷酸^[25],可以将有助于多肽从核糖体上释放的物质如 10Sa RNA, SsrA 或 tmRNA 等滴定去除^[28]。

2.1.2 应用及待解决的问题 核糖体展示技术的应用范围较广,除了用于筛选高亲和力的特异配体和单链抗体片段外,还用于体外抗体的进化和蛋白质组学的研究。在核糖体展示系统中,经常引入突变。如在 DNA 扩增时使用低保真性的 DNA 聚合酶,使扩增后 DNA 更加多样化;PCR 过程中采用易错 PCR,移码突变或突变位点的直接组合等。这些都应用到体外蛋白质进化过程中,使筛选得到的抗体或配体亲和力更高,特异性更强。此外,该技术还应用于结构方面的研究如抗体模拟物,合成具有重复序列的蛋白质等^[28]。如今, Ihara 等^[30]又首次利用核糖体展示技术筛选到了锌指 DNA 结合蛋白,为特异 DNA 结合功能蛋白的筛选及进化提供了有力的工具。

核糖体展示技术的应用与发展相当显著,但仍有机制上的问题尚未解决。如前所述,为使展示的蛋白质正确折叠,在其 C 端融入了间隔物。但是几乎所有的核糖体都很少能进行全长翻译。因此,相当一部分展示的片段分子都不具有完整的全长序列。这种片段很可能不折叠,随后的结合也是非特异性的,这反过来会影响阳性克隆的富集。在筛选前可对全长分子进行最大化,直接改进或提高翻译效率似乎更有优势,它能增加全长序列分子的总量^[28]。

2.2 mRNA 展示技术

mRNA 展示系统与核糖体展示技术相似,主要的区别在表型与基因型连接的性质上。核糖体展示技术是利用核糖体进行非共价但稳定的连接,mRNA 展示技术实际上是将多肽或蛋白质与编码它们的 mRNA 通过一个小分子共价连接,形成 mRNA- 嘌呤霉素-蛋白质复合物。当文库中 DNA 转录成 mRNA 后,合成的 DNA- 嘌呤霉素寡核苷酸链连接到 mRNA 的 3' 端。嘌呤霉素是一种核糖体抑制剂,当核糖体从 5' 到 3' 合成蛋白质过程中遇到进入核糖体的嘌呤霉素时,通过转酰胺作用将初生蛋白的 C 端与嘌呤霉素通过肽键相连,形成蛋白质-嘌呤霉素-mRNA 复合物^[24](图 2B)。

2.2.1 应用 mRNA 展示技术已经用于筛选高亲和力的反应物、抗体单链结构域的模拟肽^[31]、各种抗体重链结构域及与 ATP、RNA、链亲和素及蛋白质等特异结合的多肽^[11]。而且还从蛋白质组文库中,筛选到了结合特异信号蛋白及小分子药物的细胞多肽, v-abl 激酶的多肽底物^[28]等。此外, mRNA 展示技术具有其独特的应用范畴:自我组装蛋白质芯片和用非天然氨基酸和化学修饰多肽构建文库。

Weng 等^[32]证明通过 DNA 与 mRNA-蛋白质复合物的杂交,可将标准 DNA 芯片转变成蛋白质芯片。编码 MYC、FLAG 或 HA11 表位的 mRNA-蛋白质复合物合成后与一 DNA 芯片共同温育,在这个芯片中固定着的 DNA 或者与复合物 mRNA 上的特异序列(MYC、FLAG 或 HA11)互补,或者与共有的 5' 或 3' 端序列互补。通过互补序列的结合杂交, mRNA-蛋白质复合物自动组装形成蛋白质芯片。在这一实验中,芯片上展示的蛋白质的功能仍然得以保留。

2.2.2 存在问题 在 mRNA 展示中,蛋白质-嘌呤霉素-mRNA 复合物从核糖体上释放出来过程中出现了一个拓扑学难题。翻译结束后,初生蛋白在核糖体通道一端折叠成球状结构域,与蛋白质相连的嘌呤霉素-mRNA 则在核糖体的另一端。当然,在获取纯的复合物步骤中,反应的体系是希望核糖体能够从复合物上游离出来,但是并没有直接的证据证明核糖体通道“打开”了。可能的解释有两个:mRNA 穿过了核糖体通道或者蛋白质变性后穿过通道。如果获取纯的复合物要求展示的蛋白质经过这样的变性, mRNA 展示技术的应用可能会受到限制^[28]。

3 小结

分子文库展示系统从最初的噬菌体展示技术的

问世到现在, 已经得到了充分的利用与发展; 文库的构建便宜, 方法简单, 潜在的应用领域广泛使得该技术系统具有明显的优势, 并得到了许多院校及工业实验室的青睐。

体内表达展示系统虽然受到宿主细胞表达系统的影响, 具有自身难以克服的局限性, 但是其技术的成熟性和应用价值不可忽视。至今, 噬菌体展示系统是得到最好建立的技术, 利用该技术生产出的第一批抗体已经得到美国食品与药物管理局(FDA)的审核认可^[33]; 一些基于噬菌体展示技术筛选出来的蛋白质药物已经上市, 更多的多肽药仍利用该技术在大量肽库中进行筛选。近年来噬菌体展示还应用到了一个非常特殊的领域——半导体纳米和微米颗粒的研究^[34]。Mao等^[35]在生产用于半导体纳米颗粒自我组装的多肽序列方面做了许多工作。Chan^[34]等也投入了大量的精力研究如何使用生物分子构建和自我组装金属纳米丝。而细胞表面展示技术在生物转化、生物催化及生物吸附等方面的应用是不可取代的, 特别是在环境污染治理方面的应用, 有其特别的意义。

体外无细胞展示系统与体内展示系统相比, 除了不受宿主细胞的限制, 文库构建方便快捷, 容量更大、更加多样化外, 还可在每一轮筛选循环过程中引入突变, 使功能蛋白在体外实现突变与进化。基于表型与基因型相连接进行体外筛选及生物分子进化方法的考虑, 除 mRNA 与核糖体展示技术外, 新技术与方法逐渐地发展起来, 如: 体外房室化(*in vitro compartmentalization*, IVC)^[36]。它是利用油包水形式(*water-in-oil*, w/o)的乳剂, 形成一个可供体外翻译反应的亲水内核。基因和其编码的蛋白质被封闭在其中而得到关联。如今, 这种技术是唯一一种进行直接体外筛选酶活性的方法^[18]。至今已有一些采用该方法进行酶进化研究的实验报道^[37]。并且, Matsuura等^[18]已经着手研究用脂质体形成体外微小反应空间体系的可能性; 他们相信脂质体具有结合更多功能的潜质, 如: 利用结合孔道蛋白或改变脂质成分来选择脂质体的渗透性等。

总之, 随着各种筛选技术的补充与发展, 分子文库展示技术会更加成熟, 得到更多更广的应用。

参考文献(References)

- [1] Smith GP. *Science*, 1985, **228**: 1315
- [2] Mullen LM et al. *Trends Microbiol*, 2006, **14**: 141
- [3] Azzazy HM et al. *Clin Biochem*, 2002, **35**: 425
- [4] Castagnoli L et al. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2001, **4**: 121
- [5] Cramer R et al. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2001, **4**: 145
- [6] 张晖等. *中国药理学通报*, 2003, **19**: 375
- [7] Dufner P et al. *Trends Biotechnol*, 2006, **24**: 523
- [8] Burns KL et al. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, **797**: 175
- [9] 张晖等. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**: 641
- [10] Lang J et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **344**: 214
- [11] Takahashi TT et al. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28**: 159
- [12] Lee SY et al. *Trends Biotechnol*, 2003, **21**: 45
- [13] Lee JS et al. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 645
- [14] Chang H et al. *J Biotechnol*, 2000, **78**: 115
- [15] Bingle WH et al. *Mol Microbiol*, 1997, **26**: 277
- [16] Xu Z et al. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 5142
- [17] Jose J et al. *Gene*, 1996, **178**: 107
- [18] Matsuura T et al. *J Biosci Bioeng*, 2006, **101**: 449
- [19] Boder ET et al. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**: 553
- [20] Bae W et al. *J Inorg Biochem*, 2002, **88**: 223
- [21] Richins et al. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**: 984
- [22] Shibasaki S et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 528
- [23] Aoki T et al. *Anal Biochem*, 2002, **300**: 103
- [24] Leemhuis H et al. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, **15**: 472
- [25] Hanes J et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 4937
- [26] Gersuk GM et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **232**: 578
- [27] Schaffitzel C et al. *J Immunol Methods*, 1999, **231**: 119
- [28] Lipovseka D et al. *J Immunol Methods*, 2004, **290**: 51
- [29] Irving RA et al. *J Immunol Methods*, 2001, **248**: 31
- [30] Ihara H et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **345**: 1149
- [31] Xu L et al. *Chem Biol*, 2002, **9**: 933
- [32] Weng S et al. *Proteomics*, 2002, **2**: 48
- [33] Yan X et al. *Drug Discov Today*, 2006, **11**: 911
- [34] Chan P et al. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16**: 5261
- [35] Mao C et al. *Science*, 2004, **303**: 213
- [36] Bernath K et al. *J Mol Biol*, 2005, **345**: 1015
- [37] Griffiths AD et al. *EMBO J*, 2003, **22**: 24

The Display Technologies of Molecular Libraries

Yuan Zou, Jin-Biao Zhan*

(Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Display technologies are the newly-developed methodology for functional genomics study. Display systems are used for the selection of coding elements (DNA or RNA) from libraries in which the individual peptide or protein as phenotype is physically associated with their genetic materials. Several methods have been devised and validated, both cell based, such as phage display and cell surface display, and cell-free, such as ribosome display, and mRNA display. The success of display selection relies on the ability to retrieve the genetic information along with the functional proteins. They are widely used in various ranges of applications, including: screening and identifying protein-ligand interactions, live vaccine development, epitope mapping, antibody engineering, biosensors development for diagnostic, industrial and environmental purposes and so on. This review briefly describes the principle of each display technology, and their applications.

Key words display technologies; phage display; cell surface display; ribosome display; mRNA display

Received: September 19, 2006

Accepted: December 20, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470369)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-88208273, E-mail: jzhan2k@zju.edu.cn