

- 90:537-539.
- [17] Yahata N et al., 1998, *J. Nat. Cancer Inst.*, **90**:684-690.
- [18] Kyo S et al., 1998, *Int. J. Cancer (Pred Oncol)*, **79**:66-70.
- [19] Kyo S et al., 1998, *Clinical Cancer Research*, **4**:399-406.
- [20] Hoos A et al., 1998, *Int. J. Cancer (Pred Oncol)*, **79**:8-12.
- [21] Hiyama E et al., 1995, *Cancer Res.*, **55**:3258-3262.
- [22] Tahara E et al., 1996, *Semin. Oncol.*, **23**:307-315.
- [23] Hiyama E et al., 1995, *Nature Medicine*, **1**:249-255.
- [24] Nakarani K et al., 1997, *Cancer*, **80**:471-476.
- [25] Horikawa I et al., 1998, *Mol. Carcinogenesis*, **22**:65-72.
- [26] Kondo S et al., 1998, *FASEB*, **12**:801-811.

噬菌体肽库技术

朱忠玉

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

80年代中期,George P. Smith^[1]在前人对丝状噬菌体分子生物学研究的基础上首先提出了噬菌体展示技术(Phage Display),其核心就是将蛋白质分子的表型和基因型巧妙地结合于丝状噬菌体这样一个便于对其进行一系列生化与遗传操作的载体上,从而大大简化了蛋白质分子表达库的筛选和鉴定。基于这一优点,噬菌体库技术从出现到目前已经在现代生物学的诸多领域中得到非常广泛的应用。

噬菌体肽库技术作为噬菌体展示技术的一个非常重要的分支,其原理就是通过把大量的随机肽段与丝状噬菌体的外壳蛋白(PVIII或PIII)融合表达而被组装展示于噬菌体颗粒的表面,从而组成每个噬菌体都带有一个不同肽段的重组噬菌体库,然后用目标蛋白来筛选与之相互作用的噬菌体肽,通过分析所筛到的噬菌体肽的结构和序列,为蛋白质分子之间(如抗原与抗体,受体与配体,酶与底物)的相互作用机理提供依据,因而,这一技术在免疫学、细胞生物学和药物开发等领域中越来越受到重视。

一、噬菌体肽库技术在免疫学中的应用

噬菌体肽库技术最初在免疫学中的应用是被用于抗原决定簇的定位(Epitope mapping),

而此前对抗原决定簇的定位研究大都通过测定经过对抗原进行物理化学的降解修饰所得片段或合成的一系列来源于抗原的肽段与相关抗体的结合活性而得到的。显然,这些方法都比较费时费力。噬菌体肽库技术的引入则大大简化了这一过程。具体而言就是通过将抗原的基因片段进行随机降解然后与丝状噬菌体的外壳蛋白基因融合表达而构成一个展示于噬菌体表面的表位库(Epitope library),继而用抗原特异的抗体来进行筛选,然后分析所得的能与特异抗体结合的噬菌体肽的序列,再经过与抗原序列相比较也就得到了抗原决定簇的定位。如Wang^[4]等人成功地利用这一方法对蓝舌病毒的外壳蛋白VP5的抗原决定簇进行了定位研究。然而,在很多情况下,人们并不知道疾病的致病原,而且,也很难得到病原体特异的单克隆抗体,这也就限制了这一技术的应用。Folgori^[17,21]等人首先提出应用病人的阳性血清中的多抗就可以从噬菌体随机肽库中分离得到病原特异的噬菌体模拟肽,而且他们利用受乙肝病毒感染的病人的阳性血清中的多抗成功地验证了这一方法的可行性。同样在这一工作中,他们将得到的能与阳性血清特异结合的噬菌体肽免疫小鼠后所得的抗体与血清中抗体有交叉反应,同时也证实了这些噬菌体肽具有用作疫苗

的潜在价值。Lundin^[7]等人也从噬菌体肽库中分离到能够诱发针对 HIV-1 的免疫反应的噬菌体肽,在研究抗 HIV 疫苗方面作了初步的尝试,尽管 HIV 在逃避人体免疫系统的监控方面有其特殊的一套机制,使得在对其疫苗的研制过程中仍然存在一定的困难,但这一方法在研制其他的疫苗的过程中仍然不失为一条很好的途径。

另一方面,在人们对某一病原体一无所知的情况下,利用病人的阳性血清从噬菌体肽库中分离到的能与阳性血清中的多抗特异结合的噬菌体肽,就可以用作对这一疾病的免疫诊断试剂,这一点也在 Prezzi 等人^[18]对 HCV 的工作中得到验证,而且,利用所得的噬菌体肽来开发诊断 HCV 感染的试剂盒的工作正在进行之中。

另外,受这一思路的启发,已经有人开始利用这一技术开展对许多不明机理的免疫相关疾病的研究。如 Cortese 等人^[9]利用这一方法对多发性硬化症(multiple sclerosis)的致病机理进行了初步的探索,而 Mennuni 等人^[16]则成功地利用糖尿病病人的血清从噬菌体肽库中分离到新型的 I 型糖尿病特异的抗原决定簇。

二、噬菌体肽库技术在细胞生物学的应用

现代细胞生物学发展到今天,很多的问题都要上升到分子水平亦即从本质上来对其进行阐述。信号传导作为当今细胞生物学的一个重要的研究内容,越来越受到重视。而噬菌体肽库技术作为一个研究蛋白质分子相互作用的重要工具,在这一领域中也得到了很好的应用。当然,所谓的酵母双杂交系统及一些经典的生化方法在研究信号通路中各个元件的相互作用时已经很成功,然而这些方法只能定性描述这些信号元件的相互作用关系,而噬菌体肽库技术在用来对信号元件相互作用进行精细结构分析时,则有其独特的优越性。如 Sparks 等

人^[3,2,8,11]成功地应用这一技术对许多信号分子如 Src, Yes, Abl, P53bp2, Plcgamma, Crk 等上的 SH3 结构域的配体的结构特点进行了精确的鉴定。Gram 等人^[15]也很好利用噬菌体肽库技术对 Grb2 上的 SH2 的结合配基的结构特征进行了研究。

另外磷酸化与去磷酸化作为细胞内部尤其在信号传递过程中许多分子事件的一种极为重要的调控方式,其重要性也已成为细胞生物学研究的热点。不难想象,如果能够从分子水平对磷酸化与去磷酸化过程中的酶与底物相互作用的结构特点及其专一性进行阐明,必将使人们对许多复杂的细胞学行为有一个更深层次的理解。Dentel 等人^[14]成功地应用噬菌体肽库技术对磷酸化酶的底物的结构特点及其专一性进行了研究。

很显然,这一系列的分子水平的研究都将从本质上逐步阐明细胞生物学的重要问题,从而为人类最终揭示生命的奥秘奠定基础。

三、噬菌体肽库技术与药物设计

目前,许多细胞因子、生长激素的生物学功能已经被阐明,而且这些细胞因子在用于对相关疾病的治疗上已经取得了非常好的效果。然而,许多细胞因子的大量获得仍然存在许多困难,这也就限制了这些研究成果的推广应用。Wrighton 等人^[22]成功地从噬菌体肽库中分离出能与促红细胞生成素 EPO 的受体相结合并且具有类似于 EPO 的生物学活性的噬菌体肽。可想而知,这一结构简单而且易于获得的肽具有极大的潜在的药物应用价值。另外,噬菌体肽库技术在药物载体的筛选中也有成功的应用。Arap 等人^[13]用噬菌体肽库在活体裸鼠内筛到了能够与肿瘤细胞特异结合的噬菌体肽,而且利用所筛到的肽作为药物的载体对接种在裸鼠体内的肿瘤进行导向治疗取得了很好的效果。利用同样的原理,从噬菌体肽库中分离到的噬菌体肽也可以用作一些细胞因子、激素或酶的

底物的拮抗剂^[5,10,12],同时也就具有了潜在的医用价值。

四、噬菌体肽库技术的局限及展望

虽然噬菌体肽库技术已经得到极为广泛的应用,然而这一技术在纷繁复杂的现代生物学研究课题面前仍然有其局限性。

首先,噬菌体肽库中肽的多样性并不是完全意义上的随机。其主要原因来源于如下几点。

其一,丝状噬菌体仍然是依靠原核生物(细菌)作为宿主来进行复制和组装,因此任何一个肽库的构建都首先要经历原核生物细胞内的层层筛选,也就是说最后展示在噬菌体表面的肽不能对宿主细胞有毒害作用,而且也不能影响噬菌体的组装和穿膜成熟过程。这一“自然”的筛选过程也就降低了库的多样性。

其二,噬菌体肽库的建库过程仍然依赖于DNA的转化,而目前最为有效的电转化效率也只能达到 $10^9-10^{10}/\mu\text{g DNA}$ 。

其三,本身噬菌体库的筛选过程也有一个灵敏度问题,对于多样性高于 10^{12} 的库,是很难从中富集所要的噬菌体肽的^[20]。

针对这一点,George P. Smith^[19]提出了利用亲和力成熟这一过程来弥补这一缺陷。所谓的亲和力成熟是借用免疫学中的一个术语,即通过模拟多次免疫反应过程中发生的体细胞突变和克隆选择的过程来达到分离高特异性和高亲和力噬菌体肽的目的。其基本原理就是在体外通过对经过筛选得到的低亲和力的一个或多个肽的序列中引入突变而构成一个突变体库,然后用同样的目标蛋白对突变体库进行另外一轮的筛选,这样多次的交替进行之后,最终得到高亲和力的噬菌体肽。

其次,肽本身结构的单一性也限制了它在研究复杂的蛋白质分子之间相互作用的应用。可以想象,单一的线性肽段是很难模拟结构复杂的构象的。基于这一点,许多研究者通过加长

肽的长度^[25],从而增加其结构的复杂性,或者将肽段固定于一定的结构域内而赋予肽以一定的构象,在一定程度上缓解了这一技术的局限性^[23,24]。

噬菌体展示技术最为成功的一点也就在于找到了丝状噬菌体这样一个相对稳定而且便于对其进行一系列的遗传和生化操作的遗传载体。受这一思想的启发,许多研究者已经开始尝试用其他的一些系统来代替丝状噬菌体作为载体,希望能够超越目前的这一体系。例如: λ 噬菌体的组装成熟过程并不是通过跨膜装配进行的,而是通过体内包装,然后裂解细菌而释放的,因而对外源插入的蛋白质分子的耐受性要优于丝状噬菌体,目前已有有人尝试用 λ 噬菌体来取代丝状噬菌体作为载体^[6]。另外,也有人尝试用酵母的结构蛋白作为外源蛋白的插入载体而构成重组酵母库,从而赋予表达的蛋白以真核生物表达产物的特点。尽管这一些思路值得探索和改进,但噬菌体肽库技术本身不断的发展和完善,在生物学的诸多研究领域中都会产生更为广泛的影响。

参 考 文 献

- [1] Smith, G. P. 1985, *Science*, **288**: 1315 - 1317.
- [2] Rickles, R. J. et al., 1994, *EMBO J*, **13**: 5598-5604.
- [3] Sparks, A. B. et al., 1994, *J. Biol. Chem.* **269**: 23853-23856.
- [4] Wang, L-F et al., 1995, *J. Immunol. Methods*, **178**: 1-12.
- [5] Yayon, A. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 10643-10647.
- [6] Dunn IS 1996, *Gene*, **183**(1-2): 15-21.
- [7] Lundin K, et al., 1996, *Immunology* **89**(4): 579-586.
- [8] Hoffman NG, et al., 1996, *Mol. Divers.* **2**(1-2): 5-12.
- [9] Cortese I, et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**(20): 11063-11067.
- [10] Fang R, et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**(1): 53-56.
- [11] Sparks AB, et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**(4): 1540-1544.
- [12] Adey NB, et al., 1996, *Gene*. **169**(1): 133-134.
- [13] Arap W, et al., 1998, *Science* **279**(5439):

- 377-380.
- [14] Dente L, et al., 1997, *J. Mol. Biol.* **269**(5): 694-703.
- [15] Cram H, et al., 1997 *Eur. J. Biochem.* **246** (3):633-637.
- [16] Mennuni C, et al., 1997 *J. Mol. Biol.* **268** (3):599-606.
- [17] Folgori, A., et al., 1994 *EMBO. J.* **13**:2236-2243.
- [18] Prezzi, C, et al., 1996 *J. Immunology.* **156**: 4504-4513.
- [19] Yu J and Smith G. P., 1996 *Methods Enzymol.* **267**:3-27.
- [20] Cortese, R et al., 1996, *Current Opinion in Biotechnology.* **7**:616-621.
- [21] Meola, A, et al., 1995, *J. Immunology* **154**: 3162-3166.
- [22] Wrighton, N. C. et al., 1998, *Science* **273**: 458-463.
- [23] Felici, F et al., 1993, *Gene* **128**:21-27.
- [24] McConnell, S. J, et al., 1995, *J. Mol. Biol.* **250**:460-470.
- [25] McConnell, S. J, et al., 1996, *Mol. Divers.* **1** (3):165-167.

胚胎神经细胞的培养方法及应用

郝晶 高英茂 管英俊* 李盛芳

(山东医科大学组织胚胎学教研室 济南 250012)

在发育神经生物学中,神经细胞的增殖、生长和分化一直是该领域中的研究热点。原代培养的胚胎神经细胞在生长发育方面与体内非常相似,所以体外培养方法研究细胞因子等因素对神经细胞的增殖、突起生长、识别、突触建立和递质表型的影响日益受到重视。近些年来,培养方法也在不断改进之中,例如无血清培养、条件培养和联合培养等^[1]。

自1907年Harrison^[2]首先成功地用悬浮培养方法在淋巴血凝块上培养了蛙胚神经管以来,人们又采用悬液、旋转、集落、环流、旋面和分散单层等方法进行培养都获得成功。但现在最常用的还是分散单层培养方法。虽然在神经管细胞培养中,用BrdU免疫荧光方法可检测到神经上皮细胞有一定分裂增生能力^[3],但是大部分神经上皮细胞在离体后就开始进入分化状态,取自胚胎晚期及出生后的神经元不再出现有丝分裂,因此神经元的体外培养只能是原代培养(primary culture)。要使神经元在体外存活并维持一段时间,所要求的培养条件和技术非常严格。

一、早期神经管细胞的分离和纯化

神经细胞分离纯化的方法主要有:机械分

离、酶消化、密度梯度离心、细胞差速贴壁、核酸合成拮抗和加入特异性生长因子等方法。材料来源于9-10天胎龄的胎鼠,此时胚胎发育处于神经管闭合期,神经管容易分离。

1. 机械和酶消化分离法^[3,4]

在无菌条件下取出小鼠妊娠子宫,用无Ca²⁺-Mg²⁺ Hanks液反复冲洗,在解剖显微镜下剪开子宫壁,获得胚胎,而后用尖镊仔细剥离,去除胎膜、视泡、心脏、肢芽,使神经管与周围组织完全分离。也可先用0.1%的胶原酶消化15min,使神经管与周围间充质分开,这样可使剥离更容易些。将剥离好的神经管剪成1mm³大小的组织块,贴壁培养。或是加入培养液用1ml吸管反复吹打制成细胞悬液进行培养,上述为机械分离法。酶消化法就是将剥离好的神经管收集入离心管中,加入5ml 0.25%胰蛋白酶中,37℃消化15-30min,用1ml吸管轻轻吹打20次,吹打过程中应避免气泡产生。尔后加入同等体积培养液终止消化,离心1000转/分,10min,用双层镜头纸或200目尼龙网过滤,并以台盼蓝检测死活细胞比例,将活细胞浓度调至(5-10)×10⁵个/ml,加入培养瓶或培养皿,5%CO₂和95%湿度的37℃培养箱中培

*潍坊医学院组织胚胎学教研室。