

- [2] Karsner HT, et al. ,1925, *Am. J. Pathol.* **1**: 351 - 371.
- [3] Petersen RO, et al. ,1965, *Exp. Cell Res.* **40**: 340 - 352.
- [4] Morkin E, et al. ,1968, *Am. J. Physiol.* **215**: 1409 - 1413.
- [5] 张颖清,1985,全息生物学概论,济南:山东大学出版社. 1 - 21.
- [6] Kajstura J, et al. ,1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 8801 - 8805.
- [7] Anversa P, et al. ,1998, *Circ. Res.* **83**: 1 - 14.
- [8] Kajstura J, et al. ,2000, *Am. J. Pathol.* **156**: 813 - 819.
- [9] Leri A, et al. ,2000, *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**: 385 - 390.
- [10] Ottaviani G, et al. ,1999, *Eur. J. Histochem.* **43**: 7 - 14.
- [11] Cormier Regard S, et al. ,1997, *Mol. Cell Biochem.* **172**: 111 - 120.
- [12] Poolman RA, et al. ,1998, *Int. J. Cardiol.* **67**: 133 - 142.
- [13] Brooks G, et al. ,1998, *Cardiovasc. Res.* **39**: 301 - 311.
- [14] Reiss K, et al. ,1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 8630 - 8635.
- [15] Heikh F, et al. ,1997, *Mol. Cell Biochem.* **176**: 89 - 97.
- [16] Atkins DL, et al. ,1997, *Pediatr. Res.* **41**: 832 - 841.
- [17] Georgescu SP, et al. ,1997, *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**: 929 - 937.
- [18] Kochilas LK, et al. ,1999, *Pediatr. Res.* **45** (5 Pt 1): 635 - 642.
- [19] Zhao YY, et al. ,1998, *J. Biol. Chem.* **273**: 10261 - 10269.
- [20] Inada T, et al. ,1999, *J. Am. Coll. Cardiol.* **33**: 565 - 571.
- [21] Iacono JA, et al. ,1998, *J. Surg. Res.* **76**: 111 - 116.
- [22] O'Connell TD, et al. ,1997, *Am. J. Physiol.* **272**(4 Pt 2): H1751 - 1758.
- [23] Morrison J, et al,1999, *Cell* **96**: 737 - 749.
- [24] Oberpriller JO et al. ,1995, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **752**: 30 - 46.

肽文库在 T 细胞和 B 细胞表位中的应用

高学良 钱 昊

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

王海珍

(上海师范大学生物学系 上海 200234)

肽文库技术是从 20 世纪 80 年代发展起来的一种分子生物学技术。根据构建肽库的方法可分为化学合成肽库和噬菌体肽库两大类。所谓肽文库是指一定长度的随机序列肽的组合, 如一个包含所有 15 个氨基酸长度的肽文库理论上其分子多样性要达到 20^{15} 。当然由于技术上的原因目前分子多样性最多只能达到 10^{8-9} 。肽文库技术就是用目标分子通过亲和筛选从库中得到与其相结合的肽分子, 测序后得到其编码序列。当前肽文库技术在基础理论研究和实际应用开发中都有着广泛的用途, 例如用于研究大分子间相互作用的分子基础、筛选某些物质的特异性结合肽、寻找酶的抑制剂以及与受体结合的配体等。

化学合成肽库^[1]是利用多种化学合成的方法构建的含有大量不同短肽的肽库。特点是

构成肽库的组分除 L-氨基酸外, 还可以应用 D-氨基酸或 L-与 D-氨基酸的混合物, 合成中还可以引入非天然氨基酸和其他小分子, 大大扩大了肽库的应用范围, 为基础研究和药物筛选提供了强有力的工具。噬菌体肽库技术^[2]是将大量随机合成的肽段与噬菌体外壳蛋白融合表达而展示于噬菌体表面, 从而组成了每个噬菌体表面都表达有一种外源肽段的随机肽文库。通过亲和淘选(panning), 得到与特定靶分子结合的噬菌体肽, 具有快速、有效、操作简便等特点, 大大简化了蛋白质表达的筛选和鉴定。表达肽库的长度也已由最初的 6 肽发展到 12 肽, 甚至 38 肽。

肽文库技术最早是用于筛选单克隆抗体高亲和力的肽段。近年来, 利用肽文库技术对 MHC(主要组织相容性复合体, major histocom-

patibility complex)结合的肽序列以及对 T 细胞表面结构的研究都取得了突破性进展。对 T 细胞表面结构的认识及其结合肽的确定,将有助于设计新的疫苗及从免疫学上寻找治疗肿瘤的新途径。目前,肽文库技术在免疫学研究领域的应用主要有四个方面:首先,用于确定与抗体、B 细胞以及 T 细胞高亲和性结合的抗原表位;其次,可确定与疫苗免疫性相关的碱基序列;第三,能够进一步地了解 TCR(T 细胞受体, T cell receptor)与 MHC 的相互作用;第四,能够找到新的免疫识别规律。

一、肽文库技术用于确定抗原表位

对抗原表位的定位(epitope mapping)原先大都是通过对抗原先进行物理化学的降解和修饰,或者通过合成一系列不同长度的抗原肽段,再与相关抗体结合后筛选出活性片段,最后测序得到的。这些方法非常费时费力。肽文库技术的使用大大简化了这个过程。

1. 肽文库技术用于研究蛋白质抗原的表位

1986 年 Geysen 等^[3]用针头法构建了八肽文库,研究抗口蹄疫病毒单克隆抗体识别的抗原表位结构。从中筛选出了一个能与该抗体特异性结合的八肽,发现它们与天然的抗原表位序列不同,是天然抗原表位的类似物,他将此八肽称为抗原的模拟表位或表位模拟物。1991 年 Lam^[4]构建了“一珠一肽”(one-bead, one-peptide)的肽文库, Lam 将该方法首次运用于测定抗 β -内啡肽单克隆抗体识别的抗原表位,从中筛选出了几种与该单克隆抗体有很高亲和力的含肽树脂珠。这些实验证明固相合成的肽库能够快速制备大量随机肽,并有效地筛选到目标肽。

1991 年 Houghten^[5]利用重复方法构建液相肽库:将固相合成的肽库从连接的固体支持物上解离出来,在溶液中进行筛选。这样建立的肽库不受空间位阻的限制,因而适用于所有的待测序列。并筛选出一系列抑制效果不同的

流感病毒血凝素单抗 19B10 的模拟表位,这进一步表明合成肽库用于抗原表位分析的精细程度和有效性。

1996 年 Appel^[6]构建了多样性为 5×10^7 的六肽库,用一种抗乙肝病毒的单抗对该库进行筛选,从中筛选出了两个与该单抗高亲和性结合的六肽,当把这两个肽段合并成一个后,发现其亲和力要比天然蛋白质抗原高 50 倍。1997 年另一位科学家 Kramer^[7]通过点合成法(spot synthesis)建立了肽文库,从中找到五个都能被单抗 CB4-1(识别 HIV-1 的 p²⁴)所识别的肽,这五个肽的氨基酸序列完全不相关。运用 X-射线晶体衍射技术对抗体表面进行扫描,发现这些肽段与抗体结合在同一个部位。Park^[8]从患有 Graves' 疾病的病人身上分离出一个特异性 IgG 抗体,他从建立的六肽文库中筛选到了能抑制该 IgG 抗体结合的六肽。进一步的结果表明,该六肽与抗体结合后能够抑制由 IgG 引发的 cAMP 合成的作用,这进一步说明单克隆抗体能与不同结构的序列结合。

利用噬菌体表面展示技术构建的随机肽库也可以应用于抗体识别的抗原表位(antigen epitopes)的定位。用结合配体的抗体替代天然受体分子作为筛选分子,有其特殊应用价值。对碱性纤维母细胞生长因子(bFGF)研究表明用噬菌体随机肽库技术筛选特异性抗体与抗原、受体与配体的结合部位是完全可能的。

2. 肽文库技术用于研究非蛋白质抗原的表位

肽文库技术能否模拟非蛋白质抗原的结构仍然不很清楚。免疫学家们猜想发生交叉反应的抗原应具有相似的结构,因为它们都能为抗体识别。应用噬菌体展示技术,发现抗糖类抗体的几个基序(motifs)大部分由芳香族残基构成,这些区域通常只有较低的亲和力和较小的专一性^[9]。最新研究表明,Pinilla^[10]从一个由 D-氨基酸构成的六肽文库中筛选出具有较高亲和力($K_a = 40 \mu\text{m}$)的 N-乙酰葡萄糖胺的模拟物。筛选出来的序列 yryyg(小写字母代表 D-

氨基酸)与糖类抗原只有较小的同源性。这说明这个六肽与单抗发生的反应是不同于天然抗原与单抗的反应。从该六肽与单抗作用的位点分析来看,3位上的酪氨酸具有高度特异性,它是糖中羟基的模拟物。另外肽段模拟物中高度特异性的精氨酸与单抗重链可变区的CDR2区的天冬氨酸能发生盐桥反应。

肽文库技术在研究抗体的特殊序列方面具有两大优点:第一,不必预先知道该序列的有关信息;第二,同一个肽文库适用于研究任何单克隆抗体,包括不同亲和力的一系列单抗,甚至一种单抗的不同序列。

二、肽文库技术用于 MHC 分子结构的研究

MHC 分子既能在细胞内与不同来源的肽段结合,也能在细胞质膜上与这些肽段结合,形成 MHC 复合物。MHC 复合物是 T 淋巴细胞表面 TCR 的特异性配体。MHC I 类分子由两个亚单位构成(重链和轻链),它与蛋白质抗原的结合位点在重链上,一般结合的肽段有 8-10 个氨基酸,结合区域通常是闭合的,这样可以阻止更长的肽段与该区域的结合;而 MHC II 类分子可与 10-25 个氨基酸长度的肽段相结合。肽段与 MHC 分子结合的机理对开发新的疫苗以及研究 T 细胞介导的免疫治疗有重大的意义。目前已经利用肽文库技术对不同的 MHC 分子进行了研究。1997 年 Davenport^[11] 从随机肽文库中筛选出了可结合 HLA-A2,-B8,-B53 重链的合成肽段,与自然结合的多肽进行比较,发现两者的氨基酸顺序并不完全一样,这可能与自然结合的多肽需经过转运和加工过程,从而导致某些氨基酸顺序发生改变有关。在对小鼠 MHC I 类分子的研究中发现^[12],人工合成的多肽与自然结合的多肽有相似的氨基酸残基。对人的 MHC II 类分子(如:DRB*0101 分子;HLA-DR1)的结构最早是由 Fleckenstein 运用肽库技术弄清楚的,他从构建的十一肽库中筛选到 HLA-DR1 的最适配体。

运用肽文库技术研究 MHC II 类分子的最大优点就在于库中合成肽段的长度和浓度是确定的,而天然结合的肽段由于与 II 类分子结合的长度不同,使得对结合肽的筛选工作变得很复杂。

三、肽文库技术用于 T 细胞表位的研究

T 细胞肩负着细胞免疫的功能,在过去的二十年中,免疫学家们极想了解 T 细胞识别抗原的机理。研究表明,T 细胞在识别上有极大地灵活性(同一个 TCR 可与多个氨基酸序列相配)^[13],尽管对 T 细胞的研究取得了一些成就,但许多问题仍有待解决,例如,传染病疫苗的开发、各种肿瘤细胞以及自身免疫病靶抗原的研究,如何降低自体免疫中的免疫反应以及如何如何在肿瘤治疗中加强免疫反应等等,这些问题的解决都有待于对 T 细胞识别进行更深入地研究。

原先一直认为 T 细胞识别是特异性的,它只识别一个特定的抗原肽。运用肽文库技术证明这种严格的搭配观点并不正确^[14]。在 T 细胞识别过程中,最大的限制因素是抗原肽必须有一个合适的 MHC 分子与之相结合,以便形成一个能与 TCR 分子相结合的双分子复合物即配体。起初,运用生化分析的方法,采用高压液相色谱技术(HPLC)从分子中洗脱出与 MHC 结合的多肽序列,再运用微量测序技术分析肽段构成。这种方法对实验仪器的要求特别高,由于仪器问题,很容易出现偏差。肽文库技术的产生克服了这些缺点。至今为止,已利用肽文库技术确定了大量的 T 细胞表位。T 细胞激活以后出现分化增殖,其中一类为识别 MHC I 类分子呈递的内源性抗原的 T 细胞(MHC I 类限制性的 T 细胞),由于具有较高的抗原亲和力,且 MHC I 类分子结合区域只结合较短的多肽(8-10 个氨基酸),因此研究 I 类限制性的 T 细胞不需要构建很复杂的肽文库,在此基础上,1999 年 Munz^[15] 进行了改

进,根据从 HLA-A2,-A3 分离出的肽段资料,合成了一个只与位点结合的肽文库,大大降低了肽文库的复杂性。这种方法建立起来的肽文库只含有 25 000-35 000 个肽段,从中筛选出目标肽段的概率要高得多。总的来讲,对于具有高亲和性的 MHC I 类限制性的细胞,肽文库技术是一个非常有用的工具。另一类为识别 MHC II 类分子呈递的外源性抗原的 T 细胞(MHC II 类限制性 T 细胞)。应用肽文库技术研究这类 T 细胞有些困难。主要有两个原因:第一,II 类限制性 T 细胞的亲和力比 I 类限制性 T 细胞要小得多;第二,与 II 类分子结合的肽段要长得多。这样,一方面,随着肽文库中肽段长度的增加,库中总的肽段数量也大大增加,这就降低了单个肽段的浓度,也就增加了肽段与 T 细胞结合的难度;另一方面,较低的亲和力也使得结合更为困难。尽管如此,近来仍有不少科学家利用肽文库技术对 II 类限制性 T 细胞做了研究。1997 年 Hiemstra 首先使用肽文库技术对 II 类限制性 T 细胞克隆进行了研究。他采用珠连法 (bead-bound),建立了十四肽文库,从中找到了目标肽段,确定了其表位抗原。1998 年 Hiemstra^[16]利用合成肽文库技术模拟 T 细胞表位识别肽,最终找到了 3 个既是 II 类限制性的肽段,又是 T 细胞特异性识别的模拟抗原肽。而 Hemmer 等人则运用随机合成十一肽文库的方法,得到了这种 II 类限制性的模拟肽抗原。

四、小 结

肽文库技术在确定抗体和 T 细胞高亲和性配体方面的成功应用说明,肽文库技术是分析免疫物质、免疫发生部位等问题的非常有效的工具。使用肽文库技术筛选未知的与疾病有关的抗体、MCH 分子、TCR 的配体是设计治疗传染性疫苗的关键步骤。对新抗原的确定不仅有助于了解疾病的发生过程,而且有助于

对这些疾病进行早期诊断、治疗及预防。虽然肽文库技术目前还很不成熟,但这项技术进一步的研究将有助于对免疫物质结构更深入的了解,在研究细胞生物学、新药开发方面有着巨大的应用潜力。

摘 要

对于抗体和 T 细胞结构及其配体的认识是研究免疫反应机理以及预防人类疾病必不可少的条件,同时还有助于疫苗的研究以及治疗各种传染性疾病和肿瘤。近几年来,随着肽文库技术的应用,对 B 细胞和 T 细胞精细结构的认识取得了突破性进展。肽文库技术包括合成肽库和噬菌体库技术,两者各有特点,已成为研究免疫活性分子精细结构非常有力的工具。

参 考 文 献

- [1] Geysen HM, et al., 1984, *Proc of the National Academy of Science, USA*, **81**:3998.
- [2] Smith GP, 1985, *Science*, **228**:1315-1317.
- [3] Geysen HM, et al., 1986, *Mol Immunol*, **23**:709-715.
- [4] Lam KS, et al., 1991, *Nature*, **354**:82-83.
- [5] Houghten RA, et al., 1991, *Nature*, **354**:84.
- [6] Appel JR, et al., 1996, *Pept Res*, **9**:174-182.
- [7] Kramer A, Keitel T, 1997, *Cell*, **91**:799-809.
- [8] Park JY, Kim IJ, 1997, *Endocrinology*, **138**:617-626.
- [9] Zwick MB, Shen JQ, 1998, *Curr Opin Biotechnol*, **19**:427-436.
- [10] Pinilla C, Appel JR, 1998, *J Mol Biol*, **283**:1013-1025.
- [11] Davenport MP, Smith KJ, 1997, *J Exp med*, **185**:367-371.
- [12] Stevens J, et al., 1998, *J Biol Chem*, **273**:2874-2884.
- [13] Ding YH, Smith KJ, 1998, *Immunity*, **8**:403-411.
- [14] Garcia KC, Degano M, 1998, *Science*, **279**:1166-1172.
- [15] Munz C, Obst R, 1999, *J Immunol*, **162**:25-34.
- [16] Hiemstra HS, et al., 1998, *J Immunol*, **161**(8):4078-4082.