

噬菌体展示技术及其在天牛防治中的应用展望

陈敏¹, 张志毅¹, 卢孟柱²

(1 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: 本文综述了噬菌体展示技术的研究现状和发展趋势, 着重描述了噬菌体展示技术的筛选方法及其在生命科学研究领域的广泛应用, 结合目前我国天牛防治存在的问题, 分析了噬菌体展示技术在天牛防治技术研究中的应用潜力。

关键词: 噬菌体展示; 天牛; 防治方法

中图分类号: S763.306.4

文献标识码: A

噬菌体展示技术(phage display)是一种将外源的多肽或蛋白质与特定噬菌体衣壳蛋白融合并展示于噬菌体表面的技术^[1]。把展示于噬菌体上的多肽或蛋白质作为配体,通过“吸附-洗脱-扩增”的重复过程,可从噬菌体展示库中筛选出与给定受体特异结合的多肽或蛋白质。这项技术的突出优点是^[2]:(1)能使特异结合的噬菌体通过多轮筛选得到富集;(2)通过测定噬菌体的DNA序列对融合表达的多肽或蛋白质进行鉴定。利用随机噬菌体展示技术即可对一般的受体如抗体、酶、激素、凝聚素及非蛋白分子等进行筛选,也可对细胞,甚至对生物活体的某一组织或器官(癌组织、肾、心脏)进行筛选^[2-4]。这一技术也为天牛的防治提供了新的思路,如果能够从随机噬菌体展示库中筛选出与天牛肠道表皮细胞或消化酶专一性结合并能干扰其正常消化功能的多肽,可将这些多肽制成生物杀虫剂或将其相应的DNA片段转入林木树种,获得抗虫转基因植株,从而为控制天牛提供新的途径。

1 噬菌体展示技术的原理、产生与发展

这项技术的原理主要是将编码蛋白质或多肽的DNA片段插入到噬菌体外壳蛋白基因的适当位置上,外源基因将随着外壳蛋白的表达而表达,这样在成熟噬菌体的表面就携带了外源DNA片段所编码的多肽或蛋白质^[1]。

丝状噬菌体展示系统是研究最早、发展最完善的展示系统^[5]。丝状噬菌体中的Ff类噬菌体是最常用的噬菌体展示载体,如f1、fd和M13^[6,7]。丝状噬菌体的基因组编码10个蛋白,与噬菌体展示有关的主要是次要外壳蛋白pIII、pVI和主要外壳蛋白pVIII^[8,9]。pII可在N端、近N端或C端融合外源多肽或蛋白质,而pVIII一般是在N端和近N端融合外源序列。T4噬菌体和λ噬菌体也可作为噬菌体展示的载体^[5,10,11]。但目前这两套系统本身还不太完善,有待进一步研究。

收稿日期: 2001-11-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(39900116)

作者简介: 陈敏(1973),女,四川宜宾人,博士研究生。

1985年,Smith^[7]首次报道了将外源多肽掺入到丝状噬菌体的次要外壳蛋白 p III 的方法,同时证明表达在噬菌体表面的多肽能够通过抗体识别而进行亲和筛选。Pamley 和 Smith^[12]用生物素标记的配体对噬菌体外源多肽进行了淘选,并利用链霉亲和素捕获配体与噬菌体复合物。Scott 等^[13-15]三个研究小组分别成功构建了自己的随机六肽噬菌体库。Bass^[16]等在噬菌体展示中引入了噬菌粒,简化了 DNA 重组操作。从此,这一研究领域便得到迅速的发展,并广泛应用于生命科学的不同领域,如抗原决定簇的定位、人工制备抗体、确定激素或受体的结合序列或酶的底物序列、筛选受体的激活剂或拮抗剂或酶的抑制剂,开发多肽药物^[17-20],甚至可用于筛选非多肽结合蛋白(如链霉亲和素)或非蛋白分子(如 DNA)的多肽结合序列^[21];该技术在诊断试剂和疫苗设计等领域也有着潜在的应用价值^[17]。

2 噬菌体展示库及其筛选方法

2.1 噬菌体展示库

噬菌体展示实验可概括为建库和筛选两步^[2]。首先,通过人工合成、cDNA 法、DNaseI 随机水解法等来制备各种序列不一的核苷酸片段,将其克隆于载体(噬菌体或噬菌粒)中,然后通过感染大肠杆菌,使其分泌出融合表达外源片段的噬菌体,称为建库。由随机合成、序列各异的外源 DNA 片段重组到不同的噬菌粒中,便形成随机多肽噬菌体库(RPL, random peptide library)。一般的 RPL 可展示 6-38 个氨基酸的肽^[22]。目前,可以从许多生物试剂公司购买到各种随机多肽噬菌体库,如 Biolabs 公司销售 7 或 12 个氨基酸的随机多肽噬菌体库。依据外源融合多肽的构象是否被限定,多肽噬菌体展示库可分为两类^[23],即构象限定的多肽噬菌体展示库,和构象不限定的多肽噬菌体展示库。由于外源融合多肽是以单拷贝或多拷贝形式表达于噬菌体外壳上,所以可相应地分为单价多肽噬菌体展示和多价多肽噬菌体展示。将用来筛选各种生物分子配体的多肽噬菌体展示库称为配体噬菌体展示库^[5]。这些配体包括抗体、凝集素、酶、核酸、受体等。用于研究酶的底物专一性的噬菌体展示称为底物噬菌体展示^[19]。

2.2 筛选方法

从随机噬菌体库中筛选出与受体结合的噬菌体多肽,称为筛库。噬菌体展示技术最初只用于体外筛选。Pasqualini 等^[3]首次报道了将随机多肽噬菌体库注入小鼠循环系统获得了专一结合心、肝等器官的多肽。Arap^[4]报道了直接从小鼠活体内筛选出专一与癌组织微血管结合的多肽,提供了直接将药物投至癌组织的方法,增加疗效的同时,降低了药物的副作用。这些研究成果显示了该技术直接用于体内筛选的巨大潜力。

体外筛选时,首先把受体包被到固体或液体的支持物上,然后将噬菌体展示库与固定化的受体作用,冲洗除去未吸附的噬菌体,再用洗脱液分离出被吸附的噬菌体。洗脱的噬菌体通过侵染宿主细胞进行扩增。重复 3-4 轮上述筛选过程,便可获得与受体特异结合的噬菌体多肽^[1]。体内筛选则通过静脉注射或取食等方法使噬菌体展示库与生物体的某一器官或组织作用。筛选、扩增程序与体外筛选相同。

无论采取何种筛选方法,都是根据噬菌体多肽与受体的亲和吸附而进行的。一般情况下,被筛选的噬菌体只是原噬菌体展示库的很小一部分,为了尽可能筛选出与受体有亲和性的多肽或蛋白,必须确保最初用于筛选的噬菌体库含有足够多的随机多肽。

3 噬菌体展示技术的应用

3.1 单克隆抗体的生产

噬菌体展示技术建立之初是用于抗体的生产^[24]。噬菌体抗体库的优点除了筛选简便外,更在于它避开了抗原免疫途径,可直接利用已知抗原筛选出含相应抗体基因的噬菌体。这在抗原分子量小、免疫原性差及抗原量少的抗体生产中具有明显的优点。这一技术也为人源性单克隆抗体的制备提供了有效的手段^[25],国内已经开展这方面的研究^[26, 27]。

3.2 抗原表位图谱及模拟

尽管人们已建立了许多抗原决定簇定位的方法,如免疫复合物的X射线衍射、重组蛋白质的表达、聚合酶链式反应(PCR)、同源基因扫描和亲和基因表达等等^[17]。但噬菌体展示为研究抗原决定簇图谱提供简便而廉价的方法^[13, 28]。由于该方法只须进行简单的微生物实验程序,因此比需要对配体的多肽片段进行化学分析的图谱方法简便得多。

3.3 蛋白质结合特性的研究

噬菌体展示技术可用于筛选蛋白质或酶的抑制剂、拮抗剂或调节剂等,对新型药物的设计具有重要的意义。许正平等^[5]运用该技术研究了蛋白酶CAPK的底物序列并筛选出它的抑制剂。底物噬菌体展示库已成功的用于研究多种酶的底物专一性。Mathews等^[19, 20]利用单价噬菌体展示库研究了枯草杆菌蛋白酶和弗林蛋白酶的底物专一性。Westendorf等^[29]利用随机十五肽库研究了M期蛋白激酶的底物专一性。

3.4 非蛋白质物质的研究

噬菌体展示技术也为非蛋白质物质的功能研究提供了可能^[30]。碳水化合物的化学合成较困难,这影响了对其功能的研究,而噬菌体展示技术可模仿非肽类的物质,观察其功能结构。YenChoo^[31]从随机多肽库中筛选出与DNA模板结合的多肽(锌指的某一区域),并对其结合特性和调控功能进行了观察。

从上可见,噬菌体展示技术虽然还处在不断完善的研究阶段,但它的优越性已在分子生物学、蛋白质化学和免疫学中得到明显的体现,在未来的理论研究与应用开发中有着巨大的潜力。

4 噬菌体展示技术用于天牛防治技术研究的可行性分析

天牛(*Anoplophora* spp.)是我国林木的主要蛀干害虫,广泛分布于我国辽宁、河北、河南、山东、山西、陕西、甘肃等24个省市自治区^[32]。在防治方法上,已形成了一套以营林技术措施为基础,物理机械防治、化学防治、生物防治、抗虫育种等多种措施配合使用的综合管理系统^[33-38]。这些防治方法长期以来在天牛的控制中起着积极作用,但均具有一定的局限性^[34]。随着生物技术的兴起,人们已通过基因工程手段将外源抗虫基因导入植物获得抗虫林木品种,但目前由于没有高效抗天牛的基因作为外源基因,导致抗天牛基因工程没有太大进展。改进和开发新的防治策略已成为林业科技工作者当前最重要的任务之一。

根据对数种有代表性的天牛幼虫消化道纤维素酶的研究,发现幼虫消化道内均有完整的纤维素酶体系,包括外切 β -1,4-葡萄糖酶(C_1 酶)、内切 β -1,4-葡萄糖酶(C_x 酶)和 β -1,4-葡萄糖苷酶,而且这些纤维素酶均为其自身分泌的内源性酶^[39-42]。因此,如果能够找到与天牛肠道

上皮细胞或纤维素消化酶专一性结合的多肽,就可为天牛的控制提供如下的途径:(1)多肽本身即为消化道上皮细胞的毒性物质,例如,与细胞表面的受体结合后干扰了细胞正常的信号传导;(2)多肽为纤维素消化酶高效结合的抑制剂,抑制天牛的消化功能;(3)大量的多肽或经修饰后的多肽与大分子蛋白质复合物可以封闭消化道表面,干扰其正常功能;(4)多肽作为“向导”,与酶抑制剂相连使之更有效地找到靶部位。上述多肽可制成生物制剂或将其相应的DNA片段作为外源基因转入栽培树种,在天牛成虫期喷洒制剂或孵化的幼虫取食转基因树种时被杀死。实现上述途径的关键是如何筛选出这样的多肽。噬菌体展示系统为筛选这类多肽提供了非常有效的手段。

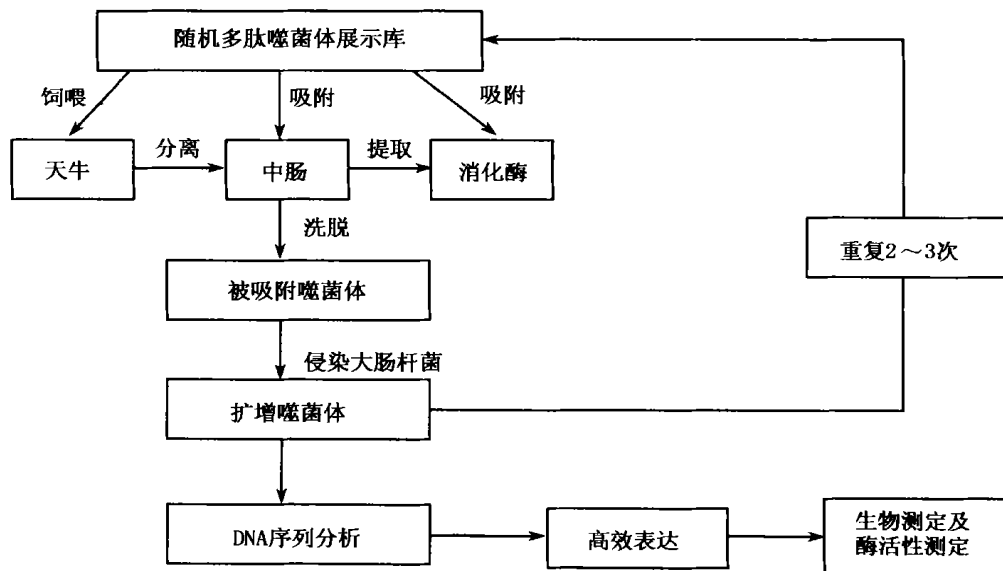


图1 用随机多肽噬菌体展示库筛选天牛肠道结合短肽流程图

图1以天牛活体、离体中肠以及消化酶3种形式的受体为材料,建立随机短肽噬菌体库筛选系统。经过2~3轮重复筛选,使特异结合的多肽噬菌体得到大量富集。对筛选出的噬菌体进行DNA序列测定,鉴定结合多肽的氨基酸序列,进而在大肠杆菌表达系统中进行表达以鉴定这些多肽的功能,研究其中肠的结合特性、对天牛生长发育的影响及其对消化酶活性的抑制作用等。

中国林业科学研究院林业研究所生物技术室已经用随机七肽噬菌体库对天牛活体进行了初步的筛选。在富集的噬菌体中发现了初步的特征氨基酸序列,目前正在做进一步的鉴定。消化酶的随机多肽噬菌体筛选也在进行中。最终将特异结合的多肽制成生物杀虫剂或将其相应的DNA片段作为外源基因转入树种以获得抗虫转基因植株。高效抗天牛制剂和抗虫品种的应用,为天牛的综合管理提供新的手段。

参考文献:

[1] Smith G P, Petrenko V A. Phage display[J]. Chem Rev, 1997, 97(2): 391-410

[2] 唐为钢, 甘人宝, 王克夷. 多肽噬菌体展示[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(3): 203-207

- [3] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries[J]. *Nature*, 1996, 380(28): 364-366
- [4] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model[J]. *Science*, 1998, 279(16): 377-380
- [5] 许正平, 李伯良. 噬菌体展示系统的研究进展[J]. *生命的化学*, 1996, 16(3): 9-34
- [6] 王丽. 用丝状噬菌体主要外壳蛋白展示外源多肽的研究[J]. *科学通报*, 1998, 43(12): 1242-1246
- [7] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the surface of the virion[J]. *Science*, 1985, 228: 1315-1317
- [8] Jespers L S, Messens J H, Dekeyser A, et al. Surface expression and ligand based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene[J]. *Bir Technology*, 1995, 13: 378-382
- [9] 田波, 李传昭. 分子进化工程[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 7-14
- [10] Efimov V P, Nepluev I V, Mesyazhinov V V. Bacteriophage T4 as a surface display vector[J]. *Virus Genes*, 1995, 10: 173-177
- [11] Steberg N, Hoess R H. Display of peptide and proteins on the surface of bacteriophage λ [J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1995, 92: 1609-1613
- [12] Pamlly S F, Smith G P. Antibody selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes[J]. *Gene*, 1988, 73: 305-318
- [13] Scott J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library[J]. *Science*, 1990, 249: 386-390
- [14] Cwirla S E, Peters E A, Barrett R W, et al. Peptide on phage: a vast library of peptides for identifying ligands[J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1990, 87: 6378-6382
- [15] Devlin J J, Panganiban L C, Devlin P E. Random peptide libraries: a source of specific binding molecules[J]. *Science*, 1990, 249: 404-405
- [16] Bass S, Greene R, Wells J A. Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties[J]. *Protein*, 1990, 8: 309-314
- [17] 王林发, 郁萌. 利用丝状噬菌体展示技术进行抗原决定簇图谱及其基因工程的研究[J]. *生物工程学报*, 1996, 12(3): 235-246
- [18] Hoogenboom H R, de Bruine A P, Hufton S E, et al. Antibody phage display technology and its applications[J]. *Immuno Technology*, 1998, 4: 1-20
- [19] Matthews D J, Wells J A. Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display[J]. *Science*, 1993, 260(21): 1113-1117
- [20] Matthews D J, Goodman L J, Goman C M, et al. A source of furin substrate specificity using substrate phage display protein[J]. *Science*, 1994, 3: 1197-1205
- [21] Krook M, Mosbach C. Selection of peptides with affinity for single stranded DNA using a phage display library[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 204(2): 849-854
- [22] Wilson D R, Finlay B B. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology[J]. *Can J Microbiol*, 1998, 44: 313-329
- [23] Burritt J B, Bond C W, Doss K W, et al. Filamentous phage display of oligopeptide libraries[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 238: 1-13
- [24] McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains[J]. *Nature*, 1990, 348: 552-554
- [25] Vaughan T J, Osbourn J K, Tempest P R. Human antibodies by design[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 535-539
- [26] 赵云峰, 王海涛, 王全立, 等. 噬菌体抗体文库的构建及人源抗 HIV-gp160 抗体的筛选[J]. *中国生物化学与分子生物学报*. 1998, 14(1) 20-23
- [27] 宋宏彬, 毛春生. 人源抗 HBSAg 噬菌体的筛选及其重链基因结构分析[J]. *第四军医大学学报*, 1998, 19(5): 481-483
- [28] Stephen C W, Lane D P. Mutant conformation of P⁵³ Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library[J]. *J Mol Bio*, 1992, 225: 577-582
- [29] Westendorf J M, Rao P N, Greace L. Cloning of cDNAs for M¹ phage phosphoproteins recognized by the MPM2 clonal antibody and de

- mination of the phosphorylated tope[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 714-718
- [30] Koscielska K, Kiczak L, Kasztura M, et al. Phage display of proteins[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 1998, 45(3): 705-720
- [31] Yen Choo, Klug A. Toward a code for the interactions of Zinc fingers with DNA: Selection of randomized fingers displayed on phage. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 11163-11167
- [32] 萧刚柔. 中国森林昆虫(第2版)[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992. 455-457
- [33] 张世权. 华北天牛及其防治[M]. 北京: 中国林业出版社, 1994. 150-261
- [34] 骆有庆, 李建光. 杨树灾害控制的应用技术和基础研究策略[J]. *北京林业大学学报*, 1999, 21(4): 6-12
- [35] 李文杰, 邬承先. 杨树天牛综合管理[M]. 北京: 中国林业出版社, 1993. 147-267
- [36] 黄竞方, 骆有庆. 我国杨树蛀干害虫的现状[J]. *森林病虫通讯*, 1991, (1): 29-33
- [37] 黄竞方, 骆有庆, 周章义. 中国光肩星天牛研究新进展[J]. *陕西林业科技*, 1992, (2): 57-62
- [38] 熊善松. 三北防护林地区天牛发生的危害特点及其防治对策[J]. *森林病虫通讯*, 1995, (1): 20-22
- [39] 蒋书楠, 殷幼平, 王中康. 几种天牛纤维素酶的来源[J]. *林业科学*, 1996, 32(5): 441-446
- [40] 殷幼平, 程金秋, 蒋书楠. 桑粒肩天牛纤维素酶的性质研究[J]. *林业科学*, 1996, 32(5): 454-459
- [41] Bian X, Shaw B D. Midgut proteinase activities in larvae of *anoplhora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) and their interaction with proteinase inhibitors[J]. *Arch Insh Bioche Physiol*, 1996, 31: 23-37
- [42] 殷幼平, 曹月青, 何正波, 等. 桑粒肩天牛3种纤维素消化酶的分布[J]. *林业科学*, 2000, 36(6): 82-85

The Prospects of the Phage Display Technique in the Control of Longicorn Beetles

CHEN Min¹, ZHANG Zhi-yi¹, LU Meng-zhu²

(1. Faculty of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: The current status and development of phage display technique are described and the potential application of this technique to control longhorn beetles is outlined based on the analysis of the constraints in the pest management at present in China.

Key words: phage display; longicorn beetles; control methods