

## 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

王林发<sup>1,2</sup>

郁萌<sup>1</sup>

(澳大利亚 CSIRO 动物健康研究所)<sup>1</sup> (华东师范大学生物系 上海 200062)<sup>2</sup>

**摘要** 噬菌体展示是 90 年代初发展起来的一种新型表达技术。其主要特点是得到表达的蛋白或肽段能够被展示在病毒粒子的表面,从而使得大规模的专一性选择成为可能。目前此技术已被广泛用于生命科学研究的不同领域。比较突出的有抗体工程的研究,随机抗原决定簇库的研究,以及随机肽在新药开发中的研究。本文将集中回顾一下噬菌体展示技术在抗原决定簇定位研究中的应用,及其在新型诊断试剂和疫苗开发中的潜在前景。

**关键词** 丝状噬菌体,噬菌体展示,抗原决定簇,诊断,疫苗

抗体,尤其是单克隆抗体,无论在生物学基础研究还是在生物工程研究或疾病诊断和预防方面都发挥着重要的作用。确定抗体与抗原结合位点,能使其作为诊断试剂能更合理地应用于许多方面;另外,在分析许多重要的生物学过程时,经常也需要了解抗体结合位点如研究病毒的中和反应和病毒与受体的结合等。

尽管免疫复合物的 X-射线衍射研究是阐明抗原抗体相互作用最有效的方法<sup>(1)</sup>,实际上只有很少抗原决定簇是用这种方法来确定的。为此,人们还建立了许多其它抗原决定簇定位的方法,随着重组 DNA 技术的发展,重组蛋白质和肽的表达成为绘制抗原决定簇图谱较为受宠的方法。例如,通过表达一系列截短基因片断的缺失图谱是绘制线性抗原决定簇图谱的一个简单方法<sup>(2)</sup>。许多技术,如聚合酶链式反应 (PCR),只要通过简单的体外表达就使抗原决定簇定位成为可能<sup>(3)</sup>。在研究构象性抗原决定簇时可以应用一些比较复杂的技术,如同源基因扫描或杂合基因表达<sup>(4,5)</sup>。另外,对诱变的重组蛋白抗原性的研究也能提供有关抗原决定簇的位置以及抗原决定簇中的必需残基等有用的信息<sup>(6)</sup>。

利用噬菌体表面展示技术研究抗原决定簇图谱<sup>(7)</sup>,近年来已引起了很大的关注。这项技术首先将随机合成任意顺序多肽的寡核苷酸插入噬菌体表面蛋白基因中,使其表达的多肽可以展示在丝状噬菌体的表面,并能与抗体或其它连接物相互作用,一般将抗体固定在固体支持物上,通过亲和纯化过程将与抗体结合的噬菌体筛选出来,这种方法称为“淘金法”(panning)<sup>(7,8)</sup>。能与抗体结合并展示在噬菌体表面的肽段,可通过直接测序鉴定插入重组噬菌体基因组中的编码序列,随机抗原决定簇展示技术的潜在优点表现在:(1)可确定一个抗原决定簇中的必需残基;(2)能提供模拟抗原决定簇,即模拟不连续抗原决定簇结构的多肽。

我们研究小组发展了一种稍有不同的展示技术,称为靶基因抗原决定簇展示。在这

种展示技术中,随机肽顺序来自于 DNA 酶 I 部分降解特定基因或基因组所产生的 DNA 小片段<sup>[9]</sup>,尽管单一的靶基因抗原决定族库不能对来源不同的抗原决定族进行定位,但是这种方法对于一个特定的基因或基因组在绘制其抗原决定族图谱时具有很高的成功率,而且展示于重组噬菌体表面的自身抗原决定族片段的开发以噬菌体为基础的诊断试剂和(或)疫苗方面还有其他优越性(详见下述)。

本文将回顾一下有关丝状噬菌体表面展示技术的最近进展,主要集中在抗原决定族定位和抗原决定族工程方面。本篇综述将分成 3 个部分:不同的噬菌体表面展示技术;表面展示有抗原决定族的重组噬菌体在诊断上的潜在应用;以及噬菌体表面技术在疫苗开发中的作用。

## 1 噬菌体展示技术和抗原决定族库

在病毒表面展示外源抗原决定族或肽的这一概念是在 1982 年首次被提出的<sup>[10]</sup>。1985 年,George Smith<sup>[11]</sup>第一次证实丝状噬菌体 fd 的基因组能通过基因工程手段将外源抗原决定族与其次要外壳蛋白融合并同时展示在噬菌体表面,几年后,Smith 小组又证明被表达在噬菌体外壳上的抗原决定族能够被特异性抗体所识别<sup>[12]</sup>。因此用这些特异性抗体可以通过亲和富集或淘金法来分离抗原片段。在这个过程中,噬菌体展示的特异性抗原决定族与固定的固体支持物上的相应抗体分子相结合,洗去没有结合的噬菌体,特异结合的噬菌体随后用低 pH 洗脱液洗脱下来,并在大肠杆菌中繁殖。这些最初的研究激发人们进一步去探索,使得噬菌体展示技术发展到了鼎盛时期。现在这种技术被广泛应用于各个领域<sup>[13~16]</sup>,其中最具吸引力的是抗体工程领域<sup>[17]</sup>。目前已能产生复杂度达 10 的 12 次方的抗体表达噬菌体库。可以相信将来制备抗体已无须免疫动物,不同的抗体可以从抗体表达噬菌体库中钓出来<sup>[18]</sup>。应用噬菌体展示技术的另一个十分活跃的领域是筛选用于治疗的新肽或新药<sup>[19]</sup>,但这篇综述中我们不讨论这些方面的研究内容。

### 1.1 丝状噬菌体的主要特征

丝状噬菌体中的 Ff 类噬菌体都属于单链 DNA 病毒,包括 f1, fd 和 M13,这类噬菌体只能感染含 F 因子的大肠杆菌,但是没有 F 因子的大肠杆菌如通过转染引入噬菌体基因组仍然能够产生有感染能力的噬菌体粒子<sup>[20]</sup>,被感染的细胞并不被杀死,它们能继续进行细胞分裂并释放噬菌体粒子,但这类细胞生长缓慢。野生型的 fd 噬菌体基因组大小是固定的,共 6408 个碱基对,但丝状噬菌体的长度可以随着插入的 DNA 片段大小的不同而发生变化,这是与其他常用的病毒载体如  $\lambda$  噬菌体的不同之处。由于这种噬菌体具有大小的可塑性和产生易于分离的单链 DNA,因此 Ff 噬菌体早已成为 DAN 测序和寡核苷酸直接诱变的标准载体,噬菌体基因组的复制型是双链 DNA。这也是这类噬菌体的又一重要特性,由于复制型双链 DNA 能象用于重组 DNA 技术中的任何其它双链 DNA 质粒一样易于分离和操作,因此将外源片段克隆进噬菌体基因组是比较容易操作的。

Ff 噬菌体颗粒同时也具有很好的免疫原性,产生抗 M13 的抗体无须使用任何佐剂<sup>[21]</sup>。如果将展示抗原决定族的噬菌体用作疫苗候选者时,那么这个特征是非常重要的,丝状噬菌体的基因组编码十种蛋白质,这些蛋白质在分子量与拷贝数上有很大差别<sup>[20]</sup>。与噬菌体表面展示技术最密切相关的是两种不同的结构蛋白,一种是次要外壳蛋白 p III

(每个病毒含 5 个拷贝), 另一种是主要外壳蛋白 pⅧ (每个病毒含约 3000 拷贝)。

## 1.2 不同的噬菌体展示策略

自从第一次证实外源肽或蛋白质可以通过与次要外壳蛋白 pⅢ 的 N-末端进行蛋白质融合而被展示在噬菌体表面以后<sup>[11]</sup>, 相继也有报道用主要外壳蛋白 pⅧ 作载体将外源肽或蛋白展示在噬菌体表面<sup>[22,23]</sup>。就目前常用的几种不同展示技术作个简要的比较。

**1.2.1 pⅢ 融合和 pⅧ 融合的比较:**在基因克隆操作上, pⅢ 和 pⅧ 融合基本是相同的, 在信号肽与成熟蛋白编码区之间设置单一的克隆位点以便外源顺序的插入, 插入此位点的 DNA 片段以融合蛋白的形式被表达, 并分泌到周质空间, 去除 N-端的信号肽后, 融合蛋白就组装在成熟的病毒粒子表面并释放进入培养基中, 融合在其 N-末端的外源肽将被展示在病毒粒子的外表面。

大多数研究小组采用 pⅢ 融合来展示外源序列, 这是由于下列几个原因。首先 pⅢ 蛋白在容纳不同大小的外源序列时比较灵活, 例如分子量高达 50kDa 大小的外源蛋白已通过 pⅢ 融合而获得了成功的展示<sup>[19,24]</sup>。其次, 每个病毒粒子只含有少数几个拷贝 (不超过 5 个) 的 pⅢ 蛋白。这对分离高亲和力的抗原决定簇很有好处<sup>[16,25]</sup>。

另一方面, 高拷贝数的 pVⅢ 蛋白因其在疫苗开发中具有潜在的应用价值, 因此也成为较具吸引力的展示肽融合对象。但小分子量的 pVⅢ 蛋白不能容纳多于 6 个氨基酸残基的外源肽, 使外源肽与 pVⅢ 的融合受到限制<sup>[26]</sup>。为了成功地展示较大的肽或蛋白质, 必须构建杂合噬菌体。这种噬菌体可通过野生型 pVⅢ 和融合型 pVⅢ 蛋白的共同表达来实现其病毒粒子的组装。而且被修饰的融合外壳蛋白散置于野生型的蛋白亚单位中 (见后面的讨论)。

**1.2.2 载体的选择 (噬菌体与噬菌体质粒的比较):**用于噬菌体展示的表达载体, 一般分成两种主要类型, 噬菌体载体和噬菌体质粒 (phagemid) 载体。噬菌体载体, 如由 Smith 及其同事首先发展起来的 fUSE 噬菌体载体 (看图 1-A)<sup>[8,11,12]</sup>, 含有完成其生命周期的全部遗传成份, 包括噬菌体的感染, DNA 的复制和噬菌体的组装等。另外, 大多数的噬菌体载体也带有一个抗生素的选择标记, 这种重组噬菌体能象大多数质粒一样通过抗生素抗性而被选择出来, 噬菌体载体可进一步分成两类: 野生型和裂解细胞缺陷突变型。裂解宿主细胞是野生型丝状噬菌体的特点。但是这种裂解作用只有当细胞内的噬菌体 DNA 和/或蛋白质积累到一个很高的水平时才发生<sup>[8]</sup>。而在裂解细胞缺陷突变型中原负链合成起始的位点插入了一个四环素抗性基因, 这样使得病毒粒子的组装被阻断或者是由于基因Ⅲ 或基因Ⅷ 的融合而使这种组装效率比较低时, 噬菌体 DNA 就不会积累到很高的水平。这种裂解细胞缺陷型载体由于其病毒粒子低效率的释放和/或组装以至造成融合外壳蛋白积累, 因此在表面肽和蛋白质方面特别有用<sup>[8]</sup>。

噬菌体质粒 (图 1-B) 是噬菌体和质粒的杂合体。这种质粒包含有丝状噬菌体基因间区, 而这个区域是单链 DNA 基因组的生产和包装所不可缺少的<sup>[27]</sup>。在展示技术中所用的噬菌体质粒同样也包含至少一个外壳蛋白的编码序列 (pⅢ 或 pⅧ), 与噬菌体载体不同, 噬菌体质粒不含有病毒组装和复制所必须的全部遗传信息, 因此它需要利用辅助噬菌体来生产其单链基因组和组装成具有感染力的噬菌体质粒。辅助噬菌体, 如常用的 M13K07<sup>[28]</sup> 和 R408<sup>[29]</sup>, 是抗干扰的突变型噬菌体, 当辅助噬菌体与带有野生型噬菌体基

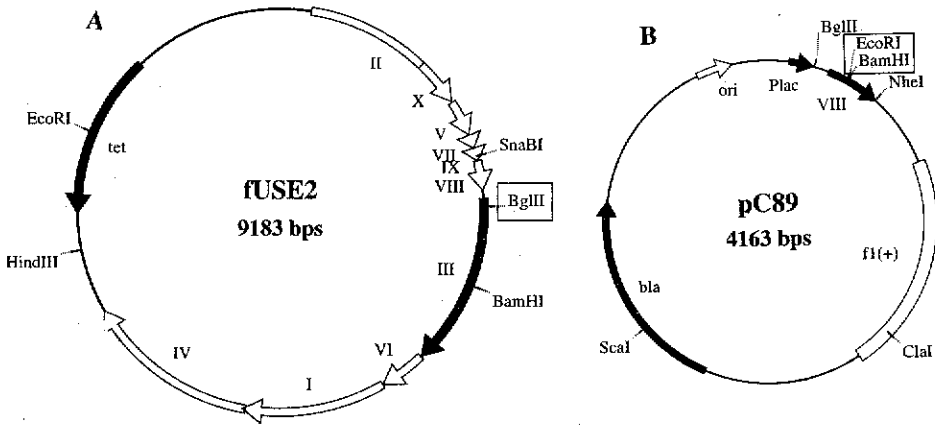


图1 两种不同展示载体基本结构图的比较

Fig. 1 Representative maps illustrating the basic structures for two different types of display vectors

(A) Phage vector fUSE2<sup>(22)</sup>. In addition to all ten phage-encoded proteins, the vector also carries the gene coding for tetracycline resistance. The unique cloning site, Bgl I, in green is boxed. (B) Phagemid vector-pC89<sup>(27)</sup>. This is a hybrid of a plasmid carrying its own replication origin (ori) and the intergenic region, f1 (+), from filamentous phage f1. In addition, a modified gene VII is also included for insertion of random DNA fragments into the cloning sites EcoR I and BamH I (boxed). This vector must be used with a helper phage to provide wild type phage proteins including the wild type pVII.

因区间序列的噬菌体质粒共存于一个细胞内时，噬菌体质粒基因组的包装优先于辅助噬菌体。

噬菌体质粒和噬菌体这两类载体均被广泛应用于噬菌体展示各个方面。噬菌体载体由于其不需要辅助噬菌体，所以操作较方便。另外裂解细胞缺陷型载体，如 fUSE 载体<sup>(6)</sup>，比较稳定，使用噬菌体载体的主要缺点是它们有相当大的基因组（大约 9~10kb），及其 DNA 产量低，所以从噬菌体中获得高质量的载体 DNA 要比大噬菌体质粒中获到更困难，且其转化或电穿孔效率随着 DNA 分子的增大而降低。与之相比，大多数由 pUC 载体衍生出来的噬菌体质粒载体具有很高的质粒拷贝数，通常噬菌体质粒的 DNA 要小得多（3~4kb）。噬菌体质粒系统的主要缺点是它需要使用辅助噬菌体，这在某些情况下可引起不稳定等问题。

### 1.3 用于研究抗原决定簇图谱的两种抗原决定簇库

按照抗原决定簇编码序列的来源，噬菌体抗原决定簇库可分为两种不同的类型，即：合成型抗原决定簇库和靶基因型抗原决定簇库，两者各有利弊。

**1.3.1 合成型抗原决定簇库：**如图 2 所示，合成型抗原决定簇库由统一尺寸的一小段 DNA 片段构成。位于中间的是随机序列编码区，一侧是编码不变氨基酸残基的核苷酸序列，另一侧是便于克隆的核苷酸序列。中间可变区的每一个氨基酸是由一个简并密码子 NNN（N 代表 4 种核苷酸中的一种）随机编码。为了降低终止密码子在编码区中出现的概率，因此在抗原决定簇库的构建中更常用的简并密码子是 NNN（K=G 和 T）或 NNS（S=G 和 C）<sup>(15)</sup>。所有 20 种氨基酸和一个终止密码子（TAG）由 32 种不同的 NNK 或

NNS 密码子所编码。一个抗原决定簇库中全部不同噬菌体的克隆数是衡量此库质量与可利用性的关键指标。一个含有任意序列的 6 氨基酸的库可拥有 6400 万克隆 (20 的 6 次方) 大约由 10 亿个 (32 个 6 次方) 不同的 6 价密码子编码。由于目前噬菌体库其上限大约是 10 的 9 次方, 假设这个库中包含所有任意序列的话, 那么 6 个氨基酸残基是此库所编码的随机多肽的最大长度。另一个提高库复杂性的方法是增加随机肽编码区的大小。在克隆数相同的条件下, 一个带有更长随机编码区的库与带有 6 个氨基酸残基编码区的库相比较, 前者将包含有数量更多的六肽结构。因为大多数情况下一个抗原决定簇中只有几个主要的残基在结合上占优势, 一个含有 10 亿个克隆的 15 单位库中它们代表的短肽具有更大的多样性, 因此它比小单位库在克隆数相同情况下更有效。

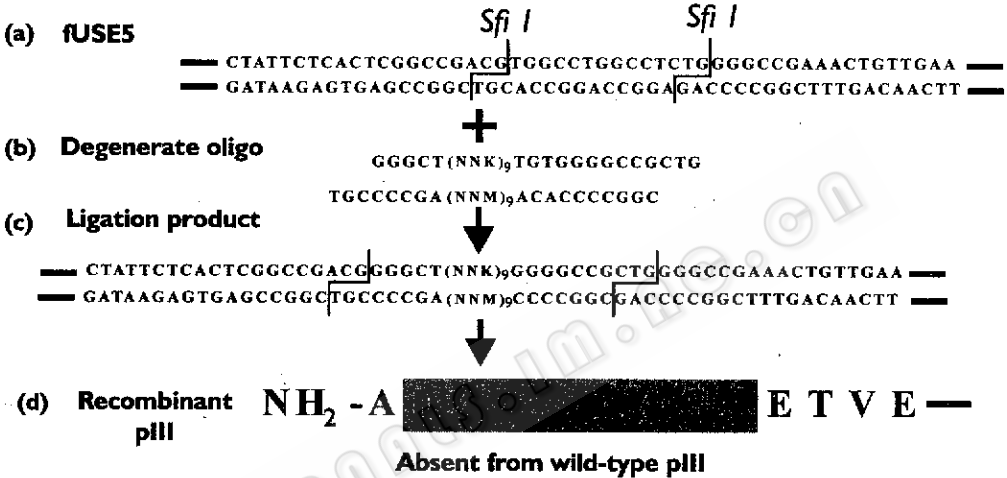


图 2 构建 p<sup>III</sup>-融合型人工合成抗原决定簇库的示意图

Fig. 2 Scheme for the construction of a p<sup>III</sup>-fusion synthetic epitope library

(a) The dsDNA RF vector fUSE5 is digested with Sfi I and after removal of the small central fragment is ligated with a similarly cleaved, double-stranded oligonucleotide bearing degenerate NNK codons (b) to form the ligated product (c). The deduced amino acid sequence for the recombinant fusion p<sup>III</sup> protein is shown in (d), starting at the N-terminus. The 9-aa-random peptide sequence is flanked by two Cys (C) residues, indicating it is a constrained library. Modified from (8).

另一种用于构建合成随机抗原决定簇库的方法是在随机编码区附近插入两个半胱氨酸残基<sup>[30]</sup>。可以相信由两个半胱氨酸残基形成的二硫键使位于随机区的肽更稳定。这种称为“约束型库”在用一些靶分子去筛选结合肽或抗原决定簇时被证明更有效<sup>[21,30,31]</sup>。表 1-1 显示了用合成的抗原决定簇库确定抗原抗原决定簇图谱的一些例子, 这些资料来源于已发表数据以及我们实验室的研究工作。最后几个例子显示用靶分子筛选出来的多肽其共有序列并不总是同能结合于靶分子的天然蛋白分子的序列完全相同。在这种情况下, 要准确地绘制抗原决定簇图谱就不很容易, 值得一提的是, 尽管多克隆抗体也可作为筛选合成抗原决定簇库的靶分子<sup>[32,33]</sup>, 但是仍然存在有技术上的困难而且成功率也低, 与此相比, 下面将要介绍的靶基因抗原决定簇库在利用多抗来研究抗原决定簇时更为有效。

1.3.2 靶基因抗原决定簇库: 用合成抗原决定簇库来研究蛋白质的相互作用是一个非常有效的方法。它不仅确定与抗体结合的抗原决定簇, 也可以用于其它一般性的

结合肽,例如,受体结合肽<sup>[34]</sup>,链球菌亲和素结合肽<sup>[35]</sup>以及特异与 DNA 结合的锌指结构<sup>[36]</sup>。但是这种方法并不是对所有试验过的每一个抗体分子都有效,成功率大约在 50% 左右<sup>[49]</sup>,结果未发表。而且在某些情况下,对一个已知的抗原序列描绘出准确的抗原决定簇图谱是不可能的,尽管事实上能从全部显示特异性结合靶分子抗体的不同噬菌体克隆中推断出一个共有的肽图谱(见表 1,未发表结果)。这些共有序列代表着不同的模拟抗原决定簇,其结构与抗体结合位点相关<sup>[37]</sup>。但是其一级结构顺序与原始抗原决定簇很少有同源性。

基于这些原因,我们研究小组发展了一种与此稍有不同的方法,此方法称为靶基因噬菌体抗原决定簇库<sup>[9]</sup>。此库构建和展示的基本构思和操作过程与合成抗原决定簇库相似。只是用 DNA 酶 I 降解一个特定的基因片段所产生的随机 DNA 片段替代了合成库中随机合成的 DNA 片段,因此命名为“靶基因”抗原决定簇库。靶基因经 DNA I 酶消化后并电泳,将酶降解形成的具有特定大小的基因片段群(如 100~300bp)纯化出来。这样大小片段的库能减小库的复杂性并增加库的筛选有效性。用末端修饰酶对 DNA 酶 I 酶解的片段进行适当处理,形成的平头末端片段能与含有平头末端克隆位点的展示载体直接连接。例如 Smith 小组构建的 fUSE1 载体<sup>[8]</sup>。为了提高连接效率,还可以在各自的平头末端处接上人工接头后再与载体 DNA 分子连接<sup>[9]</sup>。

用一个抗原决定簇中所需独立克隆的最小数量可根据公式  $N = \ln(1-P) / \ln(1-1/n)$  来计算<sup>[38]</sup>。这里  $N$  = 所需克隆数,  $p$  = 概率系数(常为 0.99)  $1/n$  = 靶序列占总序列的比值。在起初试验中,我们以 4380bp 的 cDNA 作为 DNA 酶 I 消化的起始物,从降解物中选择出平均长度大约为 150bp 的片段作为插入 DNA,这时  $N = \ln(1-0.99) / \ln(1-0.034) = 131$ 。这个数与合成抗原决定簇库的平均克隆数(10 的 7 次方到 10 的 9 次方)相比要小得多。噬菌体展示技术实际是个数字游戏,库愈大,从中“钓出”能结合靶分子的特异性抗原决定簇的机会就愈大。对靶基因库来说,在实际应用中有一万到一百万个单独的克隆就已经足够了。这样从技术角度上看,靶基因库比合成抗原决定簇库更容易获得。

由于这个克隆技术是用 DNA 酶 I 消化产生的随机顺序片段,因此从理论上讲顺序信息对靶基因技术是不必要的,很明显靶基因组随机抗原决定簇库应用于研究新的或了解甚少的病毒蛋白的抗原性有很大的优越性。我们正在构建一个最近发现的新的病毒 EMV (equine morbillivirus) 的靶基因组抗原决定簇库,这种病毒是 1994 年 9 月在澳大利亚昆士兰新发现的,它能引起人马共患的致死性疾病<sup>[39]</sup>。建立这样一个噬菌体库在快速鉴定重要抗原决定簇并用诊断和重组疫苗发展上是非常有用的。

在起先的实验中我们选择平均大小为 150bp 的插入片段构建抗原决定簇库<sup>[9]</sup>,当然这可根据应用而选择不同的片段。如对抗原决定簇进行准确定位时,宜采用较小的插入片段,较大的插入片段在噬菌体表面展示也比较难。因为插入片段越大,在病毒感染时外源肽有可能干扰蛋白的分泌,病毒组装以及/ (或) p III 功能,尽管已有文献报道了人生长激素,碱性磷酸酶以及其它相对大的蛋白质的表面展示<sup>[40]</sup>。插入片段大小的限制可通过杂合噬菌体来放宽,这种杂合噬菌体能同时表达野生型和重组噬菌体的外壳蛋白。当重组噬菌体展示的免疫优势抗原决定簇以诊断或疫苗为目的时,那么包含有大片段插入

表 1 抗体从合成抗原决定簇库中筛选得到的肽片段顺序

Table 1 Antibody selected peptides form synthetic epitope libraries

Antibody <sup>①</sup>	Antigen	Selected peptides <sup>②</sup>	Reference
PAb 240	Myohemerythrin	DEFLKI DFLEq1 DFLEm1 DFLEw1 DFLEf1 DFLvq1 DFmEw1 ceFLEc crFLEc	(7)
D11/F10	Bluetongue virus VP7	QYPALT Qffpa1 QYPsL1 QYPvL1 QwPAL1	This group
4-9D4	Classical swine fever virus gp55	KNKYEPRDSYF srtapYwEPgDrarr evpyrdYYEPRhSi sdYYEPRlrllspsr vreYhEPReaiarl vreYhEPReaiarl nptrpeihptrsYYEP	This group
RFHS6	HBsAg	GPCRTCTTPAQGTSMY CRTCTlatgcc CRTCTrveacc CRTCTgassna CRTCgdvsgia paCkTCTsa hrCRTCTss CITCTscAple CvTCTdPptyy CfTCTnsgQ	(14)
Human serum	HBsAg	CKTCTTPAQGN CrTCahPgeha	(32)
30G4	Bluetongue virus NS2	???????????????? vpyg SPSrqLLg YFn SPSsllLYFslPay staSpgLLaYFasPl	This group
Human serum	HBsAg	????????? CGPFfLSptsc CGPFyLSAqqC CGPFfLaAsvC	(32)

①Except for two cases using human sera as indicated, all of the others are mAbs. ②The top sequence given in bold upper case letters is the authentic epitope sequence. Question marks indicate unknown epitope sequences. Matched or consensus amino acid residues in the selected peptide sequences are indicated by normal upper case letters while unmatched residues indicated by lower case letters.

的随机抗原决定族库可能是很有利的(看后面讨论)。大的抗原决定族片段能在噬菌体表面可形成较好的折叠。而且在所展示的肽中,可能包含部分或全部不连续抗原决定族的顺序,这就有可能对构型抗原决定族进行定位。

最后应该强调的是靶基因抗原决定族库同样可用于多抗原抗原决定族进行定位的研究(待发表)。因为用小鼠单抗进行的抗原决定族定位并不能始终代表靶动物识别的真正的免疫优势决定族。因此预期这种技术是非常有用的。

图3概括了一个用靶基因抗原决定族库

研究抗原决定族图谱的例子。靶抗原是非洲猪瘟疫病毒的一个含有646个氨基酸残基的主要核心蛋白p72<sup>(4)</sup>。从这个特殊定位实验中我们得到了一些有意义的发展:第一,p72的N-末端似乎比分子的其余部分更具免疫性。这对确定p72蛋白在病毒组装粒子时的拓扑图是很有意义的;第二,ELISA中猪的多抗能识别展示在噬菌体克隆A-9表面上的抗原决定族,但在Western blot中却没有此反应。这表明此抗原决定族是构象依赖性的;第三,被噬菌体克隆A-10与A-11识别的抗原区中有7个氨基酸是与抗p72的小鼠单抗的结合位点相重叠(Yu等,未发表)。另外,重组噬菌体A-10和A-11的p $\Phi$ 融合蛋白也能与抗p72多克隆血清反应。结果表明这个抗原决定族区不仅对猪有免疫原性,同样对鼠和兔也具免疫原性;第四,克隆A-11包含有一个杂合肽插入片段。这个插入片段来自于p72蛋白的两个不同部分。位于p72 C-末端的肽A-11a通过随机连接融合进肽A-11b N-末端的阅读框中并一同插入载体。另外一个

研究小组用已知识别一个构象抗原决定族的小鼠单抗从轮状病毒外壳蛋白的靶基因抗原决定族库也分离到一个三部分杂合的抗原决定族片段(J. Huang私人通信)。目前,还不清楚来自于这样一个杂合插入片段的每个原始肽片段是否具有抗原性。但是可以设想,如果库足够大,那么就有可能鉴定和分离出包含有一个不连续抗原决定族中不同决定族的杂合肽。

## 2 发展新型的诊断试剂

利用噬菌体展示技术快速鉴定病原体特异的抗原决定族或模拟抗原决定族有可能导致新的诊断试剂的发展。下面将讨论在诊断方面可以开拓的几个有潜力的领域。

### 2.1 重组噬菌体作为诊断抗原

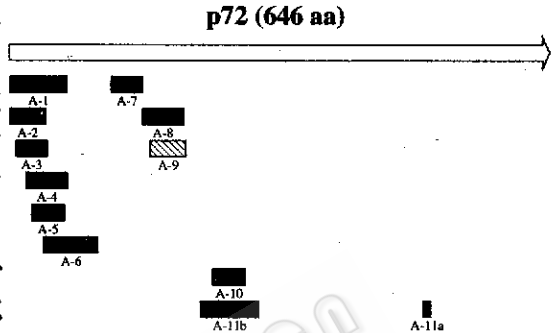


图3 利用靶基因抗原决定族库对非洲猪瘟主要核心蛋白p72进行抗原决定族定位的研究结果

Fig. 3 Summary of epitope mapping results derived from a gene-targeted epitope library of African swine fever virus (ASFV) major capsid protein p72

The epitope coding region from each phage clone is indicated by boxes beneath the p72 protein (646 aa in length). Clone A-9 contained a conformational epitope displayed on phage surface which reacted with pig antibodies in ELISA, but not in Western blot. Clone A-11 is composed of two unlinked peptides. The C-terminus of peptide A-11a, which is derived from aa. 496-503 of the p72 protein, was fused to the N-terminus of peptide A-11b, derived from aa. 227-297. This product fused, in turn, to the mature p $\Phi$  protein via its C-terminus



利用噬菌体展示技术进行抗原决定簇定位的优点之一是定位过程与克隆过程是结合在一起的。一个重组噬菌体所展示的特异性抗原决定簇只要被鉴定, 那么此噬菌体就可以成为血清学分析中的一个无限的抗原来源。与其它用于诊断的重组抗原相比, 噬菌体抗原有以下一些优点: (1) 噬菌体粒子易生产并且价廉。因为丝状噬菌体无需裂解寄主细胞而能分泌到培养液中, 这样其下游的纯化过程与大多数其它重组表达系统比较也要简单得多, 从而大大降低了生产成本; (2) 噬菌体粒子稳定且保存期相当长; (3) 理论上, 每个病毒粒子的抗原决定簇拷贝数可经过改造而满足特殊需要, 因而成为一种理想的诊断试剂; (4) 我们已经成功地构建出能同时展示来自两个不同动物病毒的免疫优势抗原决定簇的噬菌体粒子 (未发表), 有可能设计同时诊断出一种以上疾病的诊断抗原。

## 2.2 模拟抗原决定簇作为诊断试剂

至少有两个研究小组已证实利用多克隆抗血清从合成抗原决定簇库中筛选出疾病专一的模拟抗原决定簇是可能的<sup>[32, 33, 42, 43]</sup>。这种方法在预先不知道靶抗原是蛋白质或是任何其它的抗原分子的情况下就可进行。这种新的诊断方法的关键做法是: 从一个大的合成抗原决定簇库中筛选出展示特异性模拟抗原决定簇的噬菌体, 这种特异性噬菌体只能与病人血清反应而不与正常血清反应。因此它可以作为特异试剂用于疾病诊断。这些模拟抗原决定簇的序列是否与原始抗原分子相似都不会影响它应用于诊断。这种方法在诊断自身免疫病或新出现的疾病方面是特别有用的。在这些情况下, 我们可能几乎或根本就不知道与疾病有关的抗原。

## 2.3 重组噬菌体用于血清型分类

模拟抗原决定簇的方法同样适合发展用于血清分型的诊断试剂。在这里, 我们用不同血清型特异性的血清来替代疾病特异性血清和正常血清来“钓出”仅与一种血清型发生反应而不与其他型血清反应的模拟抗原决定簇。模拟抗原决定簇技术的主要缺陷是用多克隆抗血清来筛选合成抗原决定簇库时仍存在有技术上的困难。由于多克隆抗血清的特征与复杂性将造成高背景结合 (非特异性结合), 使得对复杂性高的库进行直接筛选变得很困难。从实验出发, 靶基因技术是较为可行的, 例如从澳大利亚分离到有 8 种不同蓝舌病毒 (BTV) 的血清型。已知其外壳蛋白质 VP2 是特异性血清型的主要决定簇。现在如果要确定血清中抗-BTV 的抗体特异性, 那么需要 8 个不同的中和试验, 如果血清中还存在着 16 种外来的 BTV 血清型的一种或更多种血清型的话, 那么中和试验次数更多, 最近我们用 BTV-1 作为模型构建了 VP2 靶基因抗原决定簇库试图分离出 BTV-1 特异的抗原决定簇。表达这种特异性血清型抗原决定簇的重组噬菌体可以用来发展测定特异性抗体的 ELISA。

# 3 利用噬菌体展示技术开发新型疫苗

尽管噬菌体展示技术仍处在发展的早期阶段, 但是从事此方面研究工作的人们深信它将在新的重组疫苗的发展中发挥重要作用。此技术至少有三方面可能对未来疫苗的发展产生较大影响。

## 3.1 中和抗原决定簇的快速鉴定和测试

如上所述, 许多已发表的例子足以证明噬菌体展示技术在快速鉴定抗原决定簇方面

的能力值得强调的是这种技术不仅能用来鉴定线性抗原决定族,而且可以用来鉴定构象型抗原决定族<sup>[30,42]</sup>和 T 细胞抗原决定族<sup>[44]</sup>。来自我们研究小组和其它小组<sup>[32,33]</sup>的数据表明此技术还可以直接用多抗来鉴定抗原决定族,如动物或人的血清。

在过去,中和抗原决定族的鉴定是一个费时且困难的任务,通常需要单克隆抗体。靶基因抗原决定族库和与疾病相关的多克隆血清的结合使用,为我们提供了一种快速鉴定免疫优势中和抗原决定族的前所未有的方法。如上面讨论过的,直接用缩主的与疾病相关的多克隆抗体来鉴定免疫优势抗原决定族是可能的。例如,乙型肝炎病人血清<sup>[32]</sup>,非洲猪瘟和经典猪瘟病毒的猪血清(未发表结果)。利用来自各个病人或被感染动物的血清通过依次淘金来鉴定真实的免疫优势抗原决定族可能的。一旦这样的免疫优势抗原决定族被鉴定出来,那么它潜在的中和活性就可以用下面的两种方法中的一种来验测。

带有特异性外源抗原决定族的噬菌体粒子可作为亲和介质从多克隆抗血清中纯化抗原决定族特异性抗体。Barrett 等<sup>[4]</sup>介绍了利用差速离心法可以把与噬菌体粒子特异结合的抗体从未结合的抗体中分离出来。结合在粒子上的抗体可通过低 pH 洗脱后离心获得。我们则利用了另一种不同的过滤纯化方案。目前市场上已能购得截留分子量为 300kDa, 500kDa, 1000kDa 的滤膜。大多数蛋白质,包括抗体分子在内,能够通过滤膜,而噬菌体被留在膜上,冲洗滤膜后,结合在噬菌体上的抗体用低 pH 液洗脱离心收集所需抗体分子。这样纯化得到的“寡克隆抗体”能直接用于中和反应。从这些方法得到阳性结果表明从特殊的噬菌体克隆中鉴定出的抗原决定族可能在中和反应中起作用。

第二个方法是用带有特异性抗原决定族的噬菌体粒子直接免疫动物。接着检测免疫血清的中和反应活性和/或(或)用与带有致病因子的动物进行直接攻毒试验。尽管这试验要花费时间,但是它比较完善,而且在证实展示特异性抗原决定族的噬菌体粒子作为疫苗候选者应用潜能上是非常有效的。与经典的定位方法和测试合成肽的疫苗抗原候选者相比,这种噬菌体方法仍要有效和方便得多。

### 3.2 模拟抗原决定族疫苗

模拟抗原决定族疫苗被认为是未来疫苗发展最为活跃的一个领域。其原理与模拟抗原决定族诊断试剂的开发非常相似。利用合成抗原决定族库“钓出”噬菌体抗原决定族(phagotopes,即展示在噬菌体表面的模拟抗原决定族),而无需考虑靶抗原是否已知<sup>[13]</sup>。只要这样的噬菌体抗原决定族是疾病特异性的和带有中和抗原决定族(B 细胞抗原决定族或 T 细胞抗原决定族),那么它们就能被用于发展成特异性疫苗。这概念在原理上与抗体技术相似,噬菌体抗原决定族(象抗体)能诱导产生抗体(抗抗体的抗体)特异地与被第一抗体所识别的抗原结合。然而与抗体不同的是噬菌体抗原决定族极易被确定和移植到不同的载体分子。目前,至少有两个研究小组报道了他们利用这种方法在 HIV<sup>[46]</sup>和 HBV<sup>[32,43]</sup>的研究中得到初步成功。

### 3.3 噬菌体作为疫苗供给的载体

已知丝状噬菌体具有免疫原性<sup>[21,47]</sup>,产生抗噬菌体的抗体无需佐剂。这些特征使得噬菌体表面展示系统在免疫试验中成为提供外源抗原决定族或候选疫苗抗原决定族的理想方法。在最后一篇文章中 Di Marzo Veronese 等<sup>[23]</sup>表明噬菌体展示的 HIV-1MN 病毒蛋白 gp120 的 V3 的 12 个氨基酸肽能引起针对 gp120-MN 的体液反应,同时也能与

另两个 HIV-1 毒株的 gp120 发生反应。而且, 这种免疫反应可通过同时注射另一个展示已知特性的 gp120 T-细胞抗原决定簇的噬菌体而得到明显的加强, 另一篇文章报道<sup>[48]</sup>噬菌体表面可以展示白细胞介素分子, 且保持它们与相应受体的反应能力。

现在, 我们有可能构建许多种包含有 B-细胞, T-细胞抗原决定簇以及免疫刺激因子的噬菌体, 这在技术上是可行的。利用噬菌体表达技术比其它任何已知的系统更易取得这种多因子的同时表达, 在我们的实验室中, 已能利用常规方法产生双展示噬菌体, 我们正在发展其它方法使两种以上的不同抗原决定簇或蛋白质在同一个噬菌体粒子上同时展示。

## 4 结 论

尽管噬菌体展示技术仍处于萌芽阶段, 但它在各个领域中的应用已经证实了其巨大的潜力, 这可以从这一领域迅速发展的发展论文数量得到体现。我们相信在这篇综述中所举例子已能显示出它的力量以及在抗原决定簇的研究和发展中它所带来的革命。我们实验室中的研究结果显示把合成库与靶基因库或靶基因组库两者相结合, 将会进一步增强此项新技术的成功率。

**致 谢** 我们感谢哥伦比亚-密苏里大学 G. P. SMITH 教授为我们提供 fUSE 表达系统以及对王林博士参观的友好接待。感谢意大利 IRBM 的 P. Monaci 和 R. Cortese 博士提供约束抗原决定簇库关于噬菌体质粒载体 pC89 的详细资料。本文从刊登在澳大利亚微生物学会出版的《Recent Advances in Microbiology》(第三卷) 上的英文原文节选修订形成, 由华东师范大学生物系的乔生军译成中文, 并由戚蓓静和钱冥校对, 在此一并致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Davies D, Padlan E, Sheriff S. *Annu Rev Biochem*, 1990, **59**: 439~473.
- [2] Lenstra J, Kusters J, van der Zeijst B. *Arch Virol*, 1990, **110**: 1~24.
- [3] Burch H, Nagy E, Kain K *et al.* *J Immunol Methods*, 1993, **158**: 123~130.
- [4] Wang L, Hertzog P, Galanis M *et al.* *J Immunol*, 1994, **152**: 705~715.
- [5] Wang L, Scanlon D, Kattenbelt J *et al.* *Virology*, 1994, **204**: 811~814.
- [6] Jin L, Fendly B, Wells J. *J Mol Biol*, 1992, **226**: 851~865.
- [7] Scott J, Smith G. *Science*, 1990, **240**: 386~390.
- [8] Smith G, Scott J. *Methods Enzymol*, 1993, **217**: 288~257.
- [9] Wang L, Du Plessis D, White J *et al.* *J Immunol Methods*, 1995, **178**: 1~2.
- [10] Dulbecco R. US Patent No. 4593002, 1986.
- [11] Smith G. *Science*. 1985, **228**: 1315~1317.
- [12] Parmley S, Smith G. *Gene*, 1988, **73**: 305~318.
- [13] Cortese R, Felici F, Galfre G *et al.* *Trends Biotechnol*, 1994, **12**: 262~267.
- [14] Cortese R, Monaci P, Nicosia A *et al.* *Curr Opin Biotechnol*, 1995, **6**: 73~80.
- [15] Scott J, Craig L. *Curr Opin Biotechnol*, 1994, **5**: 40~48.
- [16] Wells J, Lowman H. *Curr Opinion Biotechnol*, 1992, **3**: 355~362.
- [17] McCafferty J, Wells J, Griffiths A, Winter G *et al.* *Nature*, 1990, **348**: 552~554.
- [18] Griffiths A, Williams S, Hartley O *et al.* *EMBO J*, 1994, **13**: 3245~3264.
- [19] Clackson T, Wells J. *Trends Biotechnol*, 1994, **12**: 173~184.
- [20] Rasched I, Obrer E. *Microbiol Rev*, 1986, **50**: 401~427.
- [21] Hoess R. *Curr Opin Struct Biol*, 1993, **3**: 572~579.
- [22] Ilyichev A, Minenkiva O, Tatkov S *et al.* *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 1989, **307**: 481~483.

- [23] Di Marzo Veronese F, Willis A, Boyer-Thompson C *et al.* J Mol Biol, 1994, 243: 167~483.
- [24] Soumillion P, Jespers L, Bouchet M *et al.* Appl Biochem Biotechnol, 1994, 47: 175~190.
- [25] Lowman H, Bass S, Simpson N *et al.* Biochemistry, 1991, 30: 10832~10838.
- [26] Greenwood J, Willis A, Perham R. J Mol Biol, 1991, 220: 821~827.
- [27] Felici F, Castagnoli I, Musacchio A *et al.* J Mol Biol, 1991, 222: 301~310.
- [28] Vieira J, Messing J. Meth Enzymol, 1987, 153: 3~11.
- [29] Russel M, Kidd S, Kelley M. Gene, 1986, 45: 333~338.
- [30] Luzago A, Felici F, Tramontano A *et al.* Gene, 1993, 128: 51~57.
- [31] Zhong G, Smith G, Berry J *et al.* J Biol Chem, 1994, 269: 24183~24188.
- [32] Folgori A, Tafi R, Meola A *et al.* EMBO J, 1994, 13: 2236~2243.
- [33] Sioud M, Dybwad A, Jespersen L *et al.* Clin Exp Immunol, 1994, 98: 520~525.
- [34] Hart S, Knight A, Harbottle R *et al.* J Biol Chem, 1994, 269: 12468~12474.
- [35] Devlin J, Panganiban L, Devlin P. Science, 1990, 249: 404~406.
- [36] Cho Y, Klug A. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 11163~11167.
- [37] Geysen H, Rodda S, Mason T. Mol Immunol, 1986, 23: 709~715.
- [38] Sambrood J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory manu Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [39] Murray K, Selleck P, Hooper P *et al.* Science 1995, 268: 94~97.
- [40] Lane D, Stephen C. Curr Opin Immunol, 1993, 5: 268~271.
- [41] Lopez-Otin C, Freije J, Parra F *et al.* Virology, 1990, 175: 477~484.
- [42] Balass M, Heldman Y, Cabilly S *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 10638~10642.
- [43] Morti C, Nuzzo M, Meola A *et al.* Gene, 1994, 146: 191~198.
- [44] Hammer J, Takacs B, Sinigaglia F. J Exp Med, 1992, 176: 1007~1013.
- [45] Barrett R, Cwirla S, Ackerman M *et al.* Anal Biochem, 1992, 204: 357~364.
- [46] Keller P, Arnold B, Shaw A *et al.* Virology, 1993, 193: 709~716.
- [47] Willis A, Perham R, Wraith D. Gene, 1993, 128: 79~83.
- [48] Gram H, Strittmatter U, Lorenz M *et al.* J Immunol Methods, 1993, 161: 169.

## Application of Filamentous Phage Display Technology to the Mapping and Engineering of Epitopes

Wang Linfa<sup>1,2</sup> Yu Meng<sup>1</sup>

(Australian Animal Health Laboratory, P. O. BAG 24, Geelong, Vic., 3220)<sup>1</sup>

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062)<sup>2</sup>

**Abstract** Phage display is a novel expression technology developed in the early 1990's. The major advantage of phage display expression is that the expressed proteins of peptides are displayed on the virus surface, which makes large scale specific selection possible. This new technology is currently being used in many different biological research fields, the major ones being antibody engineering, random epitope libraries, and development of new drugs using random peptide libraries. This review will focus on the application of phage display technology in epitope studies and its potential application in the development of novel diagnostic reagents and vaccines.

**Key words** Filamentous phage, phage display, epitope, diagnosis, vaccine