

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01113

噬菌体展示技术系统发展进展

孟繁梅, 张朝辉, 艾云灿

中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275

摘要: 噬菌体展示技术(Phage display technology, PDT)是一种特殊的基因工程重组表达技术, 噬菌体展示技术系统(Phage display system, PDS)是指包括经过遗传改造后的系列噬菌体、辅助噬菌体、宿主细菌等集成平台(含试剂盒)。文章从噬菌体分子遗传学及其基因(基因组)遗传工程改良角度, 基于噬菌体 M13、 λ 、T4 和 T7 等 4 大类典型噬菌体展示技术系统的发展进展进行了综述。重点强调不同展示系统中的核心部件及其基因工程改造的分子遗传学原理、不同展示锚定位点的技术特征、相关试剂盒的研制状况及选择依据。

关键词: 噬菌体; 噬菌体展示; 蛋白质表达; 基因工程; 基因组工程

Advances of development of phage display systems

MENG Fan-Mei, ZHANG Chao-Hui, AI Yun-Can

State Key Lab for Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: The phage display technology (PDT) was unique in genetic engineering and recombinant expression. The phage display systems (PDS) were platforms (kits) composed of genetic modified phages, helper phages, and host bacteria. This review concisely summarized the development of four types of PDS, based on M13, λ , T4, and T7 phages, in terms of phage molecular genetics and genetic (gene or genome) engineering. We addressed on the key components and their genetic (genomic) engineering for modifications, the technical features of different anchors, and the development progress and selection reference of those different kits.

Keywords: phage; phage display; protein expression; genetic engineering; genomic engineering

噬菌体展示技术(Phage display technology, PDT)是一种针对单基因操作的体外克隆和重组表达技术^[1], 已经发展成为可以操作多基因(基因簇、基因组)的体外克隆及体内克隆和重组表达的噬菌体展示技术系统(Phage display system, PDS), 由经过分子遗传改造后的噬菌体、辅助噬菌体、宿主细菌等组份集成构成^[2]。M13 和 T7 噬菌体展示系统已经开发出商品试剂盒。应用该技术将外源多肽(蛋白质)编码序列整

合到噬菌体基因组中并以融合蛋白的形式展示在噬菌体表面^[3], 通过亲和筛选开展综合性功能鉴定, 显著特点是形成“基因型与表现型偶联”, 将重组蛋白质筛选与基因筛选合二为一^[4]。与酵母双杂交技术相比, 它提高了鉴别未知肽结合位点的能力、效率和敏感度^[4], 在广泛领域得到应用并取得显著进展。各种应用环境的新要求和新挑战也不断促进其改良和更新, 先后出现了基于噬菌体 M13^[1]、 λ ^[5]、

收稿日期: 2011-05-04; 修回日期: 2011-07-31

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号: 2006AA09Z420), 广东省科技计划重点项目(编号: 2005B20501001)资助

作者简介: 孟繁梅, 讲师, 研究方向: 微生物学。E-mail: mengfm@mail.sysu.edu.cn

通讯作者: 艾云灿, 教授, 研究方向: 微生物学。E-mail: Lssayc@mail.sysu.edu.cn

网络出版时间: 2011-9-13 9:10:45

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110913.0910.003.html>

T4^[6]和T7^[7]的展示技术系统。改良发展的重点脉络在于采用什么噬菌体、采用什么展示位点和锚定蛋白、要求定位展示在噬菌体表面上的锚定蛋白之N端或C端。本综述旨在深刻理解典型噬菌体展示技术系统的核心发展历程和技术特征,做到知其然知其所以然,明确适用范围和选择依据,增强选择能力和应用效果,避免盲目性和提高有效性,启发新思路和发展改良新系统。

1 M13 噬菌体展示技术系统

M13 噬菌体^[2]是*E. coli*专一性丝状噬菌体,通过接触菌毛而感染*E. coli*。由蛋白质外壳及其包被的环状单链DNA组成。全基因组包含 11 个基因,其中 5 个编码衣壳蛋白即p3、p6、p7、p8 和p9 蛋白。

1.1 p3 蛋白介导的展示

p3 蛋白位于噬菌体的一端,5 个拷贝,球形或线形,406 个氨基酸残基,分为 3 个结构域N1、N2 和 CT, p3 蛋白介导噬菌体感染过程起始于p3 蛋白之N2 结构域先结合到菌毛顶端,随后N1 结构域与宿主细菌细胞周质空间的TolA蛋白相结合^[8]。在p3 蛋白的两个位点(N1 结构域和CT结构域)上均可实现外源蛋白的融合展示。

1.1.1 p3 蛋白介导的噬菌体展示

以噬菌体(phage)为载体,由M13 噬菌体全部基因组组成,编码噬菌体复制和组装所需要的全部蛋白质。将外源基因直接与p3 蛋白的编码基因之 5'端融合,在噬菌体装配过程中展示在噬菌体表面,产生与p3 蛋白融合后的外源蛋白质。p3 蛋白介导的噬菌体展示有 3~5 个拷贝^[9],是多价展示,由于存在多个结合位点,不容易筛选到高亲合力的展示噬菌体,还极大影响噬菌体的感染力,为此又建立了单价噬菌体展示系统,即噬菌粒(phagemid)展示系统。

1.1.2 p3 蛋白介导的噬菌粒展示

以噬菌粒(phagemid)为载体(人工载体)^[10],含有噬菌体的包装序列、复制子及质粒复制子、克隆位点、标记基因等,包括 78 个碱基的特别信号,能使噬菌粒基因组以ssDNA形式被包装形成噬菌体颗粒。同时需要辅助噬菌体提供包装完整噬菌体所需要的其他蛋白质(因为噬菌粒基因组中缺失)。

1.1.3 辅助噬菌体及“噬菌体营救”

“噬菌体营救(phage rescue)”是指由辅助噬菌体提供复制及包装过程所需要的酶及结构蛋白质,形成有活性的完整噬菌体颗粒。结果产生两种不同的子代噬菌体:包含噬菌粒基因组的子代和包含辅助噬菌体基因组的子代。后者不含目的外源基因,可通过采用带有复制缺陷和包装信号基因的辅助噬菌体来排除,从而将子代中包装了辅助噬菌体基因组的概率降低到千分之一^[11]。目前使用的辅助噬菌体^[12]主要是 M13KO7、M13Δ3.2、R408d3、KM13、Hyper-phage、Ex-phage、Phaberge、VCSM13、CT-Phage。

1.1.4 M13 噬菌体展示技术系统(试剂盒)

目前是由p3 蛋白之N端介导的展示^[13]。该系统的主要构成是pCANTAB 5E载体、M13KO7 辅助噬菌体、*E. coli* TG1 菌株、*E. coli* HB2151 菌株。遗传学特征包括:(1)pCANTAB 5E载体:含有乳糖启动子、M13 噬菌体的p3 蛋白信号肽、融合蛋白质标签 E-tag、琥珀终止密码子(AUG)、M13 噬菌体的p3 蛋白基因、克隆酶切位点(5'端Sfi I, 3'端Not I)、M13 噬菌体DNA复制原点(产生单链DNA)、细菌DNA复制原点(产生双链DNA)、Amp抗性;(2)*E. coli* TG1 菌株:宿主细菌。可以部分抑制琥珀终止密码子,抑制效率为 20%,产生展示在噬菌体表面的蛋白质,无Amp抗性;(3)*E. coli* HB2151 菌株:宿主细菌。无抑制琥珀终止密码子的功能,琥珀终止密码子正常作用,产生可溶性蛋白质。筛选标记为萘啶酮酸(nalidixic acid)抗性;(4)辅助噬菌体M13KO7:复制原点经过了改造,当它与噬菌粒共感染时,自身基因组的复制受抑制,为重组噬菌体的组装提供相关的产物支持。筛选标记为Kan抗性。

1.1.5 p3 蛋白介导的 C 端展示

根据p3 蛋白之C端埋进噬菌体颗粒内部来推测C端融合的外源蛋白质也会隐藏在噬菌体衣壳内部。C端融合的噬菌体展示技术则需要借助采用有高亲和力和相互作用的Jun和Fos亮氨酸拉链蛋白。将Jun亮氨酸拉链蛋白质融合到p3 蛋白之N端,而将cDNA产物与Fos亮氨酸拉链蛋白质之C端融合,构建文库。p3 蛋白融合了Jun蛋白,与周围胞浆中的可溶性Fos融合蛋白质亲和结合,从而使外源cDNA片段编码的蛋白质展示在噬菌体衣壳蛋白上。还可以通过在

p3 蛋白之C端加接头来实现在C端展示外源蛋白质^[14]。起连接作用的氨基酸链接头对氨基酸的序列无严格要求, 但是对其长度要求则很苛刻, 当氨基酸链为 8~10 个残基时, C端展示可达到与N端展示相近的数量水平, 而且所表达的蛋白质能够更好的与配体结合^[14]。

1.2 p8 蛋白介导的展示

p8 蛋白是M13 噬菌体的主要衣壳蛋白^[2], 约 2 700 个拷贝, 50 个氨基酸残基。X射线结构研究表明, p8 蛋白之N端暴露在颗粒表面而C端则埋藏在核心。

p8 蛋白介导的N端展示是将外源蛋白质融合展示在p8 蛋白之N端, 拷贝数可达到 2 700 个, 但是p8 蛋白不能与多于 6~8 个氨基酸的多肽融合, 因为较长的多肽融合会影响噬菌体本身的包装及感染性。采用蛋白质工程手段突变p8 蛋白之后, 可使得p8 蛋白在高拷贝下表达更长多肽(如 22 kDa人生长激素和 50 kDa链霉素亲和素)^[15]。

在p8 蛋白与外源蛋白质之间加一个较短的氨基酸链接头, 可实现在p8 蛋白之C端展示^[16]。这个接头对氨基酸残基数目有严格要求, 实验验证当残基数为 8 时, 可筛选到最多的重组噬菌体^[17]。在C端展示具有优势^[14]: (1)在噬菌体包装之前, p8 蛋白跨越大肠杆菌内膜, N端处在细胞周质空间, C端则处在细胞质内。N端展示的外源蛋白必须通过宿主分泌机制并且在细胞周质空间中完成折叠, 而C端展示的外源蛋白则绕开了分泌途径可在细胞质内完成折叠; (2)蛋白质与蛋白质之间的相互作用一般需要有游离的C末端, 只有采用p8 蛋白之C端展示的外源蛋白质才能够实现相互作用; (3)在构建cDNA展示文库时, 终止密码子将终止开放阅读框从而终止在N端展示, 但是不影响在C端展示。

1.3 p7、p9 和 p6 蛋白介导的展示

p7 蛋白和p9 蛋白定位在M13 噬菌体的相同末端, 而p3 蛋白和p6 蛋白则共同定位在另一末端, 4 种都是次要衣壳蛋白, 都有 5 个拷贝^[18]。p7、p9 和p6 蛋白都可用来展示外源蛋白质, 可在p7、p9 蛋白之N端融合^[19]或在p6 蛋白之C端融合^[20], 但是展示水平比p3 蛋白之N端展示的情形要低 100 倍。

2 λ 噬菌体展示技术系统

λ噬菌体^[21]有 20 面体头部及尾部结构, 基因组

(48.5 kb)是线状双链DNA, 有 46 个基因。噬菌体头部是由E蛋白(415 拷贝, E基因编码)六聚体(顶点处为五聚体)及D蛋白(135~140 拷贝, D基因编码)三聚体组成的稳定结构^[21]。λ噬菌体展示技术系统采用D 蛋白和V蛋白(V基因编码)介导展示^[2]。

2.1 D 蛋白介导的展示

D蛋白在头部空间结构中比较突出, 容易与配体结合, 可将外源蛋白质融合在D蛋白上^[21]。

2.1.1 体外包装途径(*in vitro* packaging)

早期用于构建 cDNA文库的λ噬菌体体外包装试剂盒, 可以发展成为λ噬菌体展示文库试剂盒。首先, 在λ噬菌体基因组中D基因之 5'端或 3'端引入多个酶切位点。然后, 将外源目的基因整合到λ噬菌体基因组中, 使之与D蛋白之N端或C端融合, 可以展示在λ噬菌体表面。已成功展示的例子有D-β-半乳糖苷酶四聚体和β-内酰胺酶-D^[22]。

2.1.2 体外组装途径(*in vitro* assemble)

将外源蛋白质(如血管紧张素AII)编码基因与D 基因融合, 构建重组质粒pRH800(AII-D), 再转化宿主细菌*E. coli*细胞, D融合蛋白在宿主细菌中高效表达后被分离出来, 再加入到λD⁺噬菌体颗粒(缺失D蛋白)中, 经过体外组装过程展示在λD⁺噬菌体表面^[23]。

2.1.3 体内包装途径(*in vivo* packaging)

首先, 将重组质粒转化含有噬菌体λD⁺的*E. coli* 溶源性菌株(NS3762); 然后, 通过热诱导产生重组噬菌体, 使得与D蛋白之N端融合后的外源蛋白质展示在噬菌体表面。不过, 由于D融合基因未能整合到噬菌体基因组中, 在噬菌体进一步繁殖过程中, 重组表达的融合蛋白可能会消失^[23]。

2.1.4 体内位点特异性插入整合重组途径(*in vivo* site-specific integration recombination)

利用噬菌体P1 的Cre-LoxP位点特异性重组系统, 将外源基因插入整合到λ噬菌体基因组中^[23]。例如, 在D蛋白之N端展示文库, 将含有与D基因融合后的外源目的基因重组质粒(带有loxP序列)转化宿主*E. coli*细菌(提供重组酶Cre), 同时, 将带有loxP位点的λD⁺噬菌体共感染该宿主细菌, 在宿主细菌体内发生插入整合重组, 产生新的重组噬菌体, 可用Amp 抗性作为筛选标记。经过热诱导后释放出自由的重

组噬菌体粒子,与D蛋白融合后的目的蛋白质就被展示在重组噬菌体的表面^[23]。

2.1.5 体内位点特异性插入整合与切除重组途径(*in vivo* site-specific integration and excision recombination)

采用改进的 $loxP$ 位点,将外源目的基因插入在质粒中 D 基因之3'端。在含有 D 融合基因和Amp标记质粒(供体质粒)中引入 $loxP_{wt}$ 和 $loxP_{511}$ 位点,转化到能表达位点特异性重组酶(Cre)的宿主细菌中。再用 λ 噬菌体(D 基因带有琥珀突变)感染该宿主细菌,噬菌体携带侧翼中含有 $loxP_{wt}$ 和 $loxP_{511}$ 位点的填充DNA片段。在位点特异性重组酶Cre作用下发生体内插入整合(在 $loxP$ 位点处),形成带有Amp的分子间单交联和分子内双交联的嵌合体,进一步形成新的重组噬菌体,将D融合蛋白展示在噬菌体表面。这里采用了两个互不兼容的 lox 重组序列 $loxP_{wt}$ 和 $loxP_{511}$ ^[24],它们分别以相反方向存在于质粒和噬菌体基因组中,所形成的嵌合体中含有两个 $loxP_{wt}$ 位点,方便切除整合质粒。因为重组发生在宿主细菌细胞内,所以不必要分离 λ 基因组、插入酶切位点、克隆外源片段及在体外包装 λ 噬菌体重组子^[24]。在质粒水平和噬菌体水平(嵌合体)上重组子频率大于90%,而直接在 λ 展示载体里克隆的频率仅约3%~5%。

2.2 V蛋白介导的展示

V蛋白空间位阻较小,C端不是必需的,可在V蛋白的C端展示外源蛋白质。例如在 λ foo载体^[5,25]中,将外源 β -半乳糖苷酶基因放置在V蛋白之C端,可融合展示在噬菌体表面,展示的 β -半乳糖苷酶有酶活性,且以四聚体形式存在^[5,25]。

3 T4噬菌体展示技术系统

T4噬菌体是烈性噬菌体^[2],基因组是线状双链DNA,衣壳是扁长的二十面体。在衣壳表面还有两种附属的外壳蛋白HOC(40 kDa, 155拷贝)和SOC(9 kDa, 870拷贝),它们在T4噬菌体衣壳组装后结合到衣壳外表面^[26]。因为HOC和SOC是噬菌体结构和生活中非必需的附属蛋白,它的存在与否都不影响T4的生存和繁殖^[27],所以HOC和SOC成为了T4噬菌体展示技术系统中可以进行遗传操作的关键组份^[2]。可将一种或两种外源多肽(蛋白质)分别与SOC的C端融合和/或与HOC的N端融合后展示在T4噬菌体

表面^[28],但不影响T4噬菌体正常活性^[6,28]。

3.1 SOC位点展示

体外组装途径(*in vitro* assemble):首先,将外源基因 x 与 soc 基因融合,转化宿主细菌 $E. coli$ 细胞,SOC融合蛋白在宿主细菌中高效表达;然后,分离该融合蛋白,再加入至 soc 噬菌体颗粒(缺失SOC蛋白)中,组装过程可展示在表面^[29]。

体内同源重组途径(*in vivo* homologous recombination):首先,构建T4噬菌体SOC位点的重组质粒。将外源基因 x 插入含有 soc 基因的载体pE-S II上,使之与 soc 基因的3'端融合,形成 $soc-x$ 融合表达载体pSX,经过酶切得到 $soc-x$ 基因。连接到T4整合载体pRH中得到整合载体pRHsx。pRH是T4噬菌体SOC位点的重组质粒,在外源基因插入位点之处的左右两侧是T4噬菌体同源基因 e' 和 $denv'$ 。其次,将重组质粒通过体内重组整合到噬菌体基因组中。先转化 $E. coli$,再采用T4-Zh⁻感染,完成体内同源重组过程。其原理是因T4-Zh⁻噬菌体中缺失了溶菌酶的部分基因,表现为溶菌酶依赖型噬菌体,必须在有溶菌酶存在的情况下才能够生长;而整合载体pRH上含有溶菌酶基因,在 $E. coli$ 细胞内能够与T4-Zh⁻发生体内同源重组,使其恢复溶菌酶活性,在噬菌体T7启动子调控下表达 $soc-x$ 融合基因。第三,挑选经过重组之后恢复了溶菌酶的表现型,即为生长不依赖性的噬菌体,从而将目的蛋白质展示在T4噬菌体表面的SOC位点上^[30]。

3.2 HOC蛋白位点展示

通过体外组装方法实现在HOC位点上N端融合展示外源蛋白质。首先,将外源基因(保护抗原)与 hoc 基因之5'端连接构建 $x-hoc$ 表达载体,随后转化宿主细菌 $E. coli$ 细胞。然后,在IPTG诱导下表达HOC融合蛋白(如PA-HOC, 130kDa和p24-HOC, 66 kDa)。最后,将分离得到的HOC融合蛋白加入到纯化的 hoc^+soc^- T4噬菌体突变株(缺失HOC蛋白和SOC蛋白)中,在体外孵育,即可将HOC融合蛋白组装到衣壳表面的HOC位点上,从而在HOC位点上展示外源蛋白质^[31,32]。

3.3 SOC位点和HOC位点双展示

T4噬菌体双展示,是指同时在衣壳表面的SOC和HOC位点上展示外源蛋白质。

3.3.1 体内同源重组(单展示)与体内包装(双展示)的复合途径

例如, 先体内同源重组单展示SOC-mE2, 再体内包装双展示SOC-mE2/E2-HOC。首先, 将mE2(26 kDa)和E2(53 kDa)的编码基因分别连接到T4 整合载体pRH中。然后, 采用重组质粒pSoc-mE2 转化*E. coli* CR63, 再用T4 Z^h-感染, 以溶菌酶活性为标记筛选重组噬菌体T4-Soc-mE2。第三, 采用重组质粒pHocE2 转化*E. coli* BL21(DE3), 经过IPTG诱导产生融合蛋白E2-HOC, 再将重组噬菌体T4-Soc-mE2 共感染*E. coli* BL21(DE3), 得到T4-Soc-mE2/E2-Hoc双展示^[30]。

3.3.2 体内同源重组途径

以随机多肽为代表性事例。首先, 构建重组质粒pRHsoc'(soc'-NNK)。其次, 构建重组质粒pRHsoc'-hoc(soc'-NNK/NNK'-hoc)。第三, 采用体内同源重组过程, 获得重组噬菌体T4-Z soc'-hoc(soc'-NNK/NNK'-hoc)。最后, 挑选经过重组之后恢复了溶菌酶的表现型, 即为生长不依赖性的噬菌体, 从而将目的蛋白质展示在T4 噬菌体表面的SOC位点之C端和HOC位点之N端^[33]。

4 T7 噬菌体展示技术系统

T7 噬菌体是烈性噬菌体, 基因组是线状双链DNA。头部为二十面体, 主要由基因 10 编码的 10 蛋白(415 个拷贝)单体聚合构成的六聚体和五聚体组成。同一个基因 10 可编码 10A及 10B蛋白, 在 10A 第 341 个氨基酸处发生翻译移码后产生 10B蛋白^[2]。正常T7 噬菌体的头部中 10A与 10B蛋白的比例是 9 : 1^[34]。在特殊情况下, 这两种蛋白的比例可以不同, 即使全部都是同一种蛋白, 也能保持T7 噬菌体颗粒的活性^[7]。

4.1 10B 蛋白介导的展示

T7 噬菌体展示系统多采用 10B蛋白的C端融合展示外源蛋白质^[7]。有两个好处: (1)C端空间位阻不大; (2)C端蛋白较晚被翻译, 即使是外源蛋白质的编码基因中含有终止密码, 也不影响与其N端融合的 10B蛋白的完整表达。可高拷贝数(每个噬菌体有 415 个)展示 50 个氨基酸长度的多肽(称为T7 选择型 415-1 载体); 可低拷贝数(每个噬菌体有 0.1~1 个)

展示 900~1200 个氨基酸的多肽(蛋白质)(称为T7 选择型 1-1 和 1-2 载体); 可中拷贝数(每个噬菌体有 5~15 个)展示 900~1200 个氨基酸的多肽(蛋白质)(称为T7 选择型 10-3 载体)^[2]。所有载体中都删除了衣壳蛋白基因中的天然翻译移码位点, 并且在 10B 蛋白第 348 个残基之后还插入了系列多克隆位点^[2]。

4.2 T7 噬菌体展示技术系统(试剂盒)

T7 噬菌体展示技术系统目前已有T7 Select[®] System系列试剂盒^[7], 改造了 10 蛋白基因中启动子及起始序列, 在 10 蛋白基因的下游可链接上外源目的基因, 可表达与 10B蛋白融合的外源目的蛋白质。该系列试剂盒提供了系列载体质粒、宿主细菌、标记物和淘选试剂等^[8], 解决了两个方面的问题:

(1)解决拷贝数控制及高、低亲和力筛选问题。首先, T7 选择型 415-1 载体由强的噬菌体启动子(10)控制衣壳蛋白表达, 与野生型的翻译起点(S10)相同, 在感染宿主细菌过程中, 产生大量外源多肽(蛋白质)与衣壳蛋白的融合蛋白质, 在噬菌体表面展示 415 个拷贝的外源多肽(蛋白质), 是高拷贝数表达, 有利于那些低亲和力筛选^[7]。其次, 试剂盒还提供低拷贝数展示的载体系列。例如, T7 选择型载体 1-1 不携带衣壳基因启动子, 且翻译起点不同, 该基因上游远处的噬菌体启动子产生衣壳 10B蛋白, 但是产量却极大减少。在感染特殊宿主细菌(BLT5403, BLT5615 内含可表达 10A蛋白的质粒)细胞后, 融合展示的蛋白质拷贝数少约 0.1~1 个, 有利于高亲和力筛选, 而表达不足的 10A衣壳蛋白之空缺则由宿主菌内特殊质粒来表达弥补^[7]。

(2)提高展示效率和操作实效性。系列试剂盒^[8]采用噬菌体体外包装技术, 提供T7 噬菌体体外包装所需要的各种原件的混合溶液, 可以将融合之后的大片段DNA(含有包装信号序列)在体外环境中包装形成形态完整且有功能的T7 噬菌体颗粒, 体外包装效率是λ噬菌体cDNA克隆试剂盒中包装系统的包装效率的 10~50 倍^[7]。

5 噬菌体展示技术系统的典型应用

噬菌体展示技术系统在研究蛋白质相互作用^[35]、酶的特异性及其抑制剂^[36]、抗体工程与抗原表位^[37]、受体结构与功能^[38]等领域发挥着不可替代的作用。表 1 简要概括了构建cDNA展示文库、制造基因工

表 1 噬菌体展示技术系统的典型应用举例

噬菌体展示技术系统类别	典型应用事例
M13 噬菌体展示技术系统 (Amersham 试剂盒)	p3 蛋白之N端展示蛋白酶抑制剂 ^[41] 、神经末梢结合多肽 ^[39] 、抗白色念球菌短肽 ^[40] 、重组抗体 ^[41,42] 、抗体特异性Notch受体蛋白 ^[43] 、识别MBP的sABs ^[44] 、p3 蛋白之C端展示研究蛋白质相互作用 ^[45] 、p6 蛋白之C端构建cDNA展示文库 ^[46] 、p7 蛋白之N端展示多肽标签 ^[48] 、p8 蛋白之N端展示治疗性人源单克隆抗体 ^[49] 、p8 蛋白之C端展示研究蛋白质相互作用 ^[50] 、p9 蛋白之N端展示多肽文库 ^[47]
λ 噬菌体展示技术系统 (实验室阶段)	在λ噬菌体D蛋白之C端构建全基因组展示文库研究新型肺炎支原体抗原 ^[51] 、抗体 ^[52] 、研究蛋白质相互作用 ^[53] 、D蛋白之C端或N端展示研究酶特异性及抑制剂 ^[25,54]
T4 噬菌体展示技术系统 (实验室阶段)	SOC蛋白之C端和N端高拷贝展示炭疽热毒素 ^[29] 、HOC蛋白之N端展示炭疽热保护抗原 ^[31] 、HOC蛋白之C端和N端展示HIV病毒p24 蛋白 ^[32] 、在HOC蛋白之N端和SOC蛋白之C端双位点展示猪瘟疫苗 ^[30] 、随机肽库分析gp17 和gp55 相互作用 ^[33]
T7 噬菌体展示技术系统 (Novagen 系列试剂盒)	10B蛋白之C端构建随机肽展示文库 ^[55] 、ORFs cDNA展示文库及筛选磷脂酰丝氨酸结合蛋白 ^[38]

程抗体、设计研发疫苗、研究受体与配体之间相互作用、检测及控制病原体、开发新型药物等典型事例，重点强调了被展示的目的蛋白在不同噬菌体、不同表面展示位点及锚定蛋白、不同锚定蛋白之 N 端或 C 端位置等技术细节，这些范例对于设计变化多端的实际应用方案都有参考价值。

6 结语与展望

噬菌体展示技术系统在功能基因组学和基因组工程研究中将发挥不可替代的作用。目前从实际应用角度看，主要难点问题是如何根据不同研究目标和目的基因特征来考虑采用什么噬菌体？采用什么展示位点和锚定蛋白？设计定位展示在噬菌体表面上的锚定蛋白之 N 端或 C 端？这些环节都依赖于对各个不同噬菌体展示系统发展的遗传学原理及其基因(组)工程操作细节的精确理解。从技术系统发展角度看，不断研究和改良不同噬菌体，发展不同展示位点及其不同锚定蛋白之 N 端或 C 端融合的新策略，研究开发出适应不同研究目标需求的新型试剂盒系统，都是未来重点发展的新趋势。

参考文献(References):

- [1] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228(4705): 1315–1317. DOI
- [2] MK 沃尔德, DI 弗里德曼, SL 阿迪亚主编, 艾云灿, 孟繁梅译. 噬菌体——在细菌致病机理及生物技术中的作用. 北京: 科学出版社, 2007: 409–422. DOI
- [3] Pande J, Szweczyk MM, Grover AK. Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(6): 849–858. DOI
- [4] Zani ML, Moreau T. Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors. *Biochimie*, 2010, 92(11): 1689–1704. DOI
- [5] Maruyama IN, Maruyama HI, Brenner S. Lambda foo: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(17): 8273–8277. DOI
- [6] Ren ZJ, Black LW, Lewis GK, Wingfield PT, Locke EG, Steven AC, Black LW. Phage display of intact domains at high copy number: a system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4. *Protein Sci*, 1996, 5(9): 1833–1843. DOI
- [7] Rosenberg A, Griffin K, Studier FW, McCormick M, Berg J, Novy R, Mierendorf R. T7 Select® Phage Display System: A powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *Innovations*, 1996, (6): 1–6. DOI
- [8] Riechmann L, Holliger P. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell*, 1997, 90(2): 351–360. DOI
- [9] Devlin JJ, Panganiban LC, Devlin PE. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science*, 1990, 249(4967): 404–406. DOI
- [10] Barbas CR 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(18): 7978–7982. DOI
- [11] Russel M. Moving through the membrane with filamentous phages. *Trends Microbiol*, 1995, 3(6): 223–228. DOI
- [12] Paschke M. Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(1): 2–11. DOI
- [13] Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(16): 6378–6382. DOI
- [14] Fuh G, Sidhu SS. Efficient phage display of polypeptides

- fused to the carboxy-terminus of the M13 gene-3 minor coat protein. *FEBS Lett*, 2000, 480(2–3): 231–234. [DOI](#)
- [15] Sidhu SS, Weiss GA, Wells JA. High copy display of large proteins on phage for functional selections. *J Mol Biol*, 2000, 296(2): 487–495. [DOI](#)
- [16] Weiss GA, Sidhu SS. Design and evolution of artificial M13 coat proteins. *J Mol Biol*, 2000, 300(1): 213–219. [DOI](#)
- [17] Fuh G, Pisabarro MT, Li Y, Quan C, Lasky LA, Sidhu SS. Analysis of PDZ domain-ligand interactions using carboxyl-terminal phage display. *J Biol Chem*, 2000, 275(28): 21486–21491. [DOI](#)
- [18] Wang KC, Wang XW, Zhong PY, Luo PP. Adapter-directed display: a modular design for shuttling display on phage surfaces. *J Mol Biol*, 2010, 395(5): 1088–1101. [DOI](#)
- [19] Gao CS, Mao SL, Lo CHL, Wirsching P, Lerner RA, Janda KD. Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(11): 6025–6030. [DOI](#)
- [20] Hufton SE, Moerkerk PT, Meulemans EV, de Bruijne A, Arends JW, Hoogenboom HR. Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *J Immunol Methods*, 1999, 231(1–2): 39–51. [DOI](#)
- [21] Yang F, Forrer P, Dauter Z, Conway JF, Cheng N, Cerritelli ME, Steven AC, Plückthun A, Wlodawer A. Novel fold and capsid-binding properties of the lambda-phage display platform protein gpD. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(3): 230–237. [DOI](#)
- [22] Mikawa YG, Maruyama IN, Brenner S. Surface display of proteins on bacteriophage λ heads. *J Mol Biol*, 1996, 262(1): 21–30. [DOI](#)
- [23] Sternberg N, Hoess RH. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(5): 1609–1613. [DOI](#)
- [24] Gupta A, Onda M, Pastan I, Adhya S, Chaudhary VK. High-density functional display of proteins on bacteriophage lambda. *J Mol Biol*, 2003, 334(2): 241–254. [DOI](#)
- [25] Dunn IS. Assembly of functional bacteriophage lambda virions incorporating C-terminal peptide or protein fusions with the major tail protein. *J Mol Biol*, 1995, 248(3): 497–506. [DOI](#)
- [26] Qin L, Fokine A, O'Donnell E, Rao VB, Rossmann MG. Structure of the small outer capsid protein, Soc: a clamp for stabilizing capsids of T4-like phages. *J Mol Biol*, 2010, 395(4): 728–741. [DOI](#)
- [27] Rao VB, Black LW. Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Viol J*, 2010, 7(1): 356. [DOI](#)
- [28] Ren ZJ, Black LW. Phage T4 SOC and HOC display of biologically active, full-length proteins on the viral capsid. *Gene*, 1998, 215(2): 439–444. [DOI](#)
- [29] Li Q, Shivachandra SB, Zhang ZH, Rao VB. Assembly of the small outer capsid protein, Soc, on bacteriophage T4: a novel system for high density display of multiple large anthrax toxins and foreign proteins on phage capsid. *J Mol Biol*, 2007, 370(5): 1006–1019. [DOI](#)
- [30] Wu JM, Tu CC, Yu XL, Zhang ML, Zhang NZ, Zhao MY, Nie WX, Ren ZJ. Bacteriophage T4 nanoparticle capsid surface SOC and HOC bipartite display with enhanced classical swine fever virus immunogenicity: a powerful immunological approach. *J Virol Methods*, 2007, 139(1): 50–60. [DOI](#)
- [31] Shivachandra SB, Rao M, Janosi L, Sathaliyawala T, Matyas GR, Alving CR, Leppla SH, Rao VB. *In vitro* binding of anthrax protective antigen on bacteriophage T4 capsid surface through Hoc-capsid interactions: a strategy for efficient display of large full-length proteins. *Virology*, 2006, 345(1): 190–198. [DOI](#)
- [32] Sathaliyawala T, Rao M, Maclean DM, Birx DL, Alving CR, Rao VB. Assembly of human immunodeficiency virus (HIV) antigens on bacteriophage T4: a novel in vitro approach to construct multicomponent HIV vaccines. *J Virol*, 2006, 80(15): 7688–7698. [DOI](#)
- [33] Malys N, Chang DY, Baumann RG, Xie D, Black LW. A bipartite bacteriophage T4 SOC and HOC randomized peptide display library: detection and analysis of phage T4 terminase (gp17) and late σ factor (gp55) interaction. *J Mol Biol*, 2002, 319(2): 289–304. [DOI](#)
- [34] Condron BG, Atkins JF, Gesteland RF. Frameshifting in gene 10 of bacteriophage T7. *J Bacteriol*, 1991, 173(21): 6998–7003. [DOI](#)
- [35] Guntas G, Purbeck C, Kuhlman B. Engineering a protein-protein interface using a computationally designed library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(45): 19296–19301. [DOI](#)
- [36] Bugg TD, Braddick D, Dowson CG, Roper DI. Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(4): 167–173. [DOI](#)
- [37] Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, 249(4967): 386–390. [DOI](#)
- [38] Caberoy NB, Zhou YX, Alvarado G, Fan XQ, Li W. Efficient identification of phosphatidylserine-binding proteins by ORF phage display. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(1): 197–201. [DOI](#)
- [39] Whitney MA, Crisp JL, Nguyen LT, Friedman B, Gross LA, Steinbach P, Tsien RY, Nguyen QT. Fluorescent peptides highlight peripheral nerves during surgery in mice.

- Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 352–356. [DOI](#)
- [40] Anandakumar S, Boosi KN, Bugatha H, Padmanabhan B, Sadhale PP. Phage displayed short peptides against cells of *Candida albicans* demonstrate presence of species, morphology and region specific carbohydrate epitopes. *PLoS ONE*, 2011, 6(2): e16868. [DOI](#)
- [41] Mao HY, Graziano JJ, Chase TMA, Bentley CA, Bazirgan OA, Reddy NP, Song BD, Smider VV. Spatially addressed combinatorial protein libraries for recombinant antibody discovery and optimization. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(11): 1195–1202. [DOI](#)
- [42] Sørensen MD, Kristensen P. Selection of antibodies against a single rare cell present in a heterogeneous population using phage display. *Nat Protoc*, 2011, 6(4): 509–522. [DOI](#)
- [43] Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, de Leon GP, Chen YM, Finkle D, Venook R, Wu XM, Ridgway J, Schahin-Reed D, Dow GJ, Shelton A, Stawicki S, Watts RJ, Zhang J, Choy R, Howard P, Kadyk L, Yan MH, Zha JP, Callahan CA, Hymowitz SG, Siebel CW. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature*, 2010, 464(7291): 1052–1122. [DOI](#)
- [44] Rizk SS, Paduch M, Heithaus JH, Duguid EM, Sandstrom A, Kossiakoff AA. Allosteric control of ligand-binding affinity using engineered conformation-specific effector proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(4): 437–442. [DOI](#)
- [45] Luck K, Trave G. Phage display can select over-hydrophobic sequences that may impair prediction of natural domain-peptide interactions. *Bioinformatics*, 2011, 27(7): 899–902. [DOI](#)
- [46] Govarts C, Somers K, Stinissen P, Somers V. Frameshifting in the p6 cDNA phage display system. *Molecules*, 2010, 15(12): 9380–9390. [DOI](#)
- [47] Løset GÅ, Roos N, Bogen B, Sandlie I. Expanding the versatility of phage display II: improved affinity selection of folded domains on protein VII and IX of the filamentous phage. *PLoS ONE*, 2011, 6(2): e17433. [DOI](#)
- [48] Løset GÅ, Bogen B, Sandlie I. Expanding the versatility of phage display I: efficient display of peptide-tags on protein VII of the filamentous phage. *PLoS ONE*, 2011, 6(2): e14702. [DOI](#)
- [49] Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(10): 767–774. [DOI](#)
- [50] Ernst A, Gfeller D, Kan ZY, Seshagiri S, Kim PM, Bader GD, Sidhu SS. Coevolution of PDZ domain-ligand interactions analyzed by high-throughput phage display and deep sequencing. *Mol Biosyst*, 2010, 6(10): 1782–1790. [DOI](#)
- [51] Beghetto E, De Paolis F, Montagnani F, Cellesi C, Gargano N. Discovery of new *Mycoplasma pneumoniae* antigens by use of a whole-genome lambda display library. *Microbes Infect*, 2009, 11(1): 66–73. [DOI](#)
- [52] Bradbury ARM, Sidhu S, Dübel S, McCafferty J. Beyond natural antibodies: the power of *in vitro* display technologies. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(3): 245–254. [DOI](#)
- [53] Tong AHY, Drees B, Nardelli G, Bader GD, Brannetti B, Castagnoli L, Evangelista M, Ferracuti S, Nelson B, Paoluzi S, Quondam M, Zucconi A, Hogue CWV, Fields S, Boone C, Cesareni G. A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science*, 2002, 295(5553): 321–324. [DOI](#)
- [54] Fogg PCM, Rigden DJ, Saunders JR, McCarthy AJ, Allison HE. Characterization of the relationship between integrase, excisionase and antirepressor activities associated with a superinfecting Shiga toxin encoding bacteriophage. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(6): 2116–2129. [DOI](#)
- [55] van Dorst B, Mehta J, Rouah-Martin E, De Coen W, Blust R, Robbens J. The identification of cellular targets of 17 β estradiol using a lytic (T7) cDNA phage display approach. *Toxicol in Vitro*, 2011, 25(1): 388–393. [DOI](#)