

## 噬菌体展示

噬菌体展示技术(phage display technology)的本质是一种筛选技术。将不同的外源基因分别插入噬菌体载体中，随着噬菌体的传代，外源蛋白会展现在噬菌体表面，形成噬菌体文库。随后用特定蛋白对噬菌体文库进行筛选，便可快速的得到与该蛋白具有高度亲和力的抗体。筛选出的抗体可以进一步用于生物学功能研究。

### 噬菌体展示技术原理

噬菌体展示技术的原理，是将一段外源基因插入到噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置，在阅读框正常且不影响外壳蛋白正常功能的情况下，外源基因会随着外壳蛋白的表达而表达，从而使多肽或蛋白以融合蛋白的形式展现在噬菌体表面。

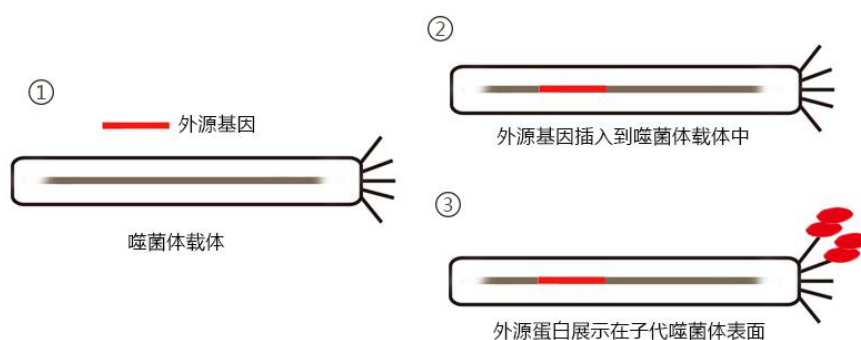


图 1.噬菌体展示原理

被展示的蛋白可以保持相对独立的空间结构和生物活性，有利于靶蛋白的结合，因而可以利用靶蛋白快速的进行噬菌体展示文库的筛选。在展示文库构建完成后，以靶蛋白为固定相，和展示文库共同孵育一段时间，洗去未结合噬菌体，再以竞争受体洗脱吸附的噬菌体。洗脱得到的噬菌体感染宿主菌繁殖扩增，然后进行下一轮洗脱。经过 3~5 轮的“吸附-洗脱-扩增”后（对于某些亲和力弱的抗体需经过更多轮的洗脱），便可以得到能与靶蛋白特异性结合的噬菌体的高度富集。

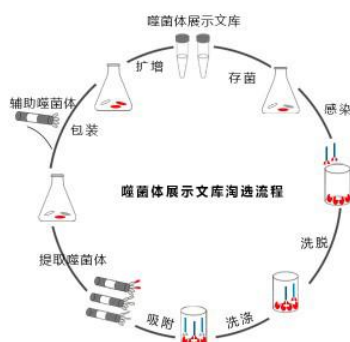


图 2. 生物淘洗法筛选噬菌体展示文库

筛选得到的高度亲和力的噬菌体集合中可能含有多个克隆，可以利用 ELISA 或 Westen Blot 进一步对得到的外源蛋白进行筛选，或对蛋白进行铺盘分离单克隆菌株，从而得到特异性的单克隆抗体，进而进行生物学方面研究。

## 噬菌体展示技术与其他抗体制备方法对比

|       | 免疫血清  | 杂交瘤技术       | 噬菌体展示技术               |
|-------|-------|-------------|-----------------------|
| 抗体形式  | 多克隆抗体 | 单克隆抗体       | 单克隆基因重组抗体             |
| 宿主细胞  | N/A   | 杂交瘤         | 细菌                    |
| 筛选范围  | N/A   | $\sim 10^3$ | $10^7$ - $10^9$ (免疫库) |
| 操作    | 简单    | 复杂          | 相对简单                  |
| 免疫    | 必须    | 必须          | 可避免                   |
| 时间    | 数月    | 数月          | 几周                    |
| 人源化抗体 | 否     | 否           | 是                     |
| 生产量   | 有限    | 有限          | 无限                    |
| 基因获取  | N/A   | 再克隆         | 直接获取                  |
| 应用前景  | 有限    | 有限          | 广阔                    |

表 1. 不同抗体制备方法比较

## 噬菌体展示系统

### 单链丝状噬菌体 (M13) 展示系统

丝状噬菌体是一种能够感染阴性细菌的病毒大家族。他们都含有单链 DNA 基因组，其衣壳蛋白为管状，通常由几千个拷贝的主要衣壳蛋白 (PⅧ) 和位于尾端的次要衣壳蛋白 (PⅢ) 组成。

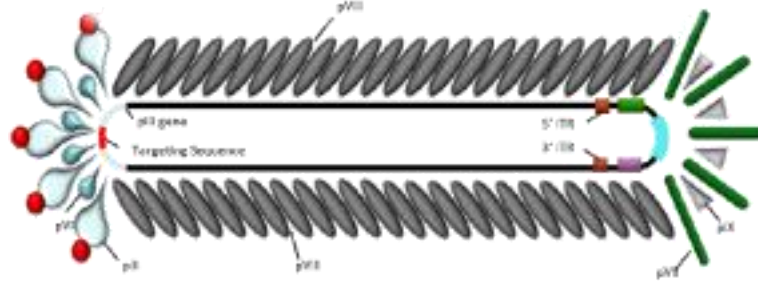


图 3. 丝状噬菌体结构

**PⅢ展示系统**：PⅢ是丝状噬菌体的次要外壳蛋白，位于病毒颗粒的尾端，是噬菌体感染大肠埃希菌所必须的。每个病毒颗粒都有 3 个~5 个拷贝 PⅢ蛋白，其在结构上可分为 N1、N2 和 CT 3 个功能区域，这 3 个功能区域由两段富含甘氨酸的连接肽 G1 和 G2 连接。其中 N1 作用于 E.coli 细胞膜上的 TolA 蛋白，与噬菌体入侵有关；N2 为受体结合区，负责结合 F 菌毛；CT 疏水区在组装前粘附在细菌内膜上，与噬菌体组装中止有关。PⅢ有 2 个位点可供外源序列插入，当外源的多肽或蛋白质融合于 PⅢ蛋白的信号肽(SgⅢ)和 N1 之间时，该系统保留了完整的 PⅢ蛋白，噬菌体仍有感染性；但若外源多肽或蛋白直接与 PⅢ蛋白的 CT 结构域相连，则噬菌体丧失感染性，这时重组噬菌体的感染性由辅助噬菌体表达的完整 PⅢ蛋白来提供。PⅢ蛋白很容易被蛋白水解酶水解，所以有辅助噬菌体超感染时，可以使每个噬菌体平均展示不到一个融合蛋白，即所谓“单价”噬菌体。

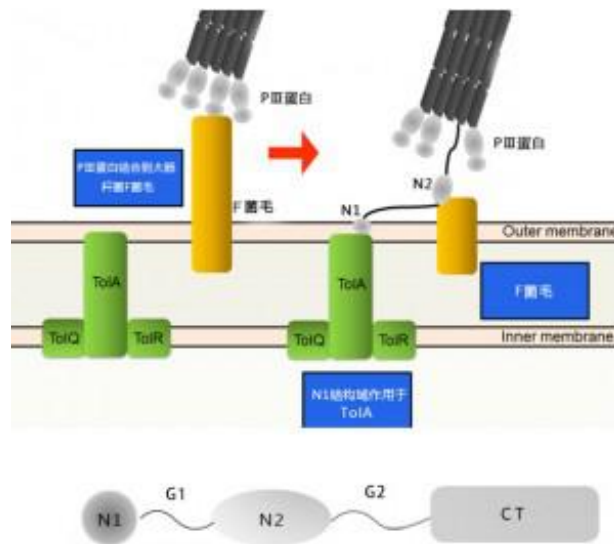


图 2. PⅢ蛋白结构域及其功能

**PⅧ展示系统**：PⅧ是丝状噬菌体的主要外壳蛋白，位于噬菌体外侧，C 端与 DNA 结合，N 端伸出噬菌体外，每个病毒颗粒有 2 700 个左右 PⅧ拷贝。PⅧ的 N 端附近可融合五肽，但不能融合更长的肽链，因为较大的多肽或蛋白

会造成空间障碍，影响噬菌体装配，使其失去感染力。但有辅助噬菌体参与时，可提供野生型 PⅧ蛋白，降低价数，此时可融合多肽甚至抗体片段。

|        | PⅢ                               | PⅧ        |
|--------|----------------------------------|-----------|
| 拷贝数    | 少                                | 多         |
| 展示蛋白   | 单价展示                             | 多价展示      |
| 多肽片断大小 | 大                                | <10 个氨基酸  |
| 亲和力    | 高                                | 低         |
| 适用范围   | 常用于展示有 cDNA 和基因组<br>序列编码的多肽，范围较广 | 展示小肽，范围较窄 |

表 2. PⅢ展示系统与 PⅧ展示系统比较

## λ噬菌体展示系统

**PV 展示系统：**λ噬菌体的 PV 蛋白构成了它的尾部管状部分，该管状结构由 32 个盘状结构组成，每个盘又由 6 个 PV 亚基组成。PV 有两个折叠区域，C 端的折叠结构域（非功能区）可供外源序列插入或替换。λ噬菌体的装配在细胞内进行，故可以展示难以分泌的肽或蛋白质。该系统展示的外源蛋白质的拷贝数为平均 1 个分子/噬菌体，这表明外源蛋白质或多肽可能干扰了λ噬菌体的尾部装配。

**D 蛋白展示系统：**D 蛋白的分子质量为 11 ku，参与野生型λ噬菌体头部的装配。低温电镜分析表明，D 蛋白以三聚体的形式突出在壳粒表面。当突变型噬菌体基因组小于野生型基因组的 82%时，可以在缺少 D 蛋白的情况下完成组装，故 D 蛋白可作为外源序列融合的载体，而且展示的外源多肽在空间上是可以接近的。病毒颗粒的组装可以在体内也可以在体外，体外组装即是 D 融合蛋白结合到λD-噬菌体表面，而体内组装是将含 D 融合基因的质粒转化入λD-溶源的大肠埃希菌菌种中，从而补偿溶源菌所缺的 D 蛋白，通过热诱导而组装。该系统有一个很好的特点，噬菌体上融合蛋白和 D 蛋白的比例可以由宿主的抑制 tRNA 活性加以控制，这对于展示那些可以对噬菌体装配造成损害的蛋白质时特别有用。

## T4 噬菌体展示系统

T4 噬菌体展示系统的显著特点是能够将两种性质完全不同的外源多肽或蛋白质，分别与 T4 衣壳表面上的外壳蛋白 SOC ( 9 ku ) 和 HOC ( 40 ku ) 融合而直接展示于 T4 噬菌体的表面，因此它表达的蛋白不需要复杂的蛋白纯化，避免了因纯化而引起的蛋白质变性和丢失。T4 噬菌体是在宿主细胞内装配，不需通过分泌途径，因而可展示各种大小的多肽或蛋白质，很少受到限制。同时，SOC 与 HOC 蛋白的存在与否，并不影响 T4 的生存和繁殖。SOC 和 HOC 在噬菌体组装时可优于 DNA 的包装而装配于衣壳的表面，事实上，在 DNA 包装被抑制时，T4 是双股 DNA 噬菌体中唯一能够在体内产生空衣壳的噬菌体 ( SOC 和 HOC 也同时组装 )。因此，在用重组 T4 做疫苗时，它能在空衣壳表面展示目的抗原，这种缺乏 DNA 的空衣壳苗，在生物安全性方面具有十分光明的前景。

## T7 噬菌体展示系统

T7 噬菌体是 20 世纪 90 年代末期建立的一种新型噬菌体展示技术。T7 噬菌体是一种含有双链丝状 DNA 的烈性噬菌体，其衣壳蛋白一般又 10A 和 10B 两种形式。外源基因插入的位置一般位于 10B 蛋白的 C 端，这样好处有两点，一方面 C 端结合空间位阻小；另外一方面，C 端的蛋白较晚被翻译，即使是外源蛋白质的编码基因中含有终止密码子，也不影响与其 N 端融合的 10B 蛋白的完整表达。与 M13 系统相比，T7 噬菌体直接使宿主菌进行裂解，因而不需经过分泌过程。因此，对于那些对分泌过程有抑制作用的蛋白和多肽，在 M13 系统不能很好的展示，但是可以在 T7 系统中展示。除此之外，T7 噬菌体优势有：

- 生产非常迅速，在固体培养基上形成噬菌体只需 3h，在菌液中从感染到裂解只需 1~2h，可以节省大量的时间；对于 >50 个氨基酸的多肽，T7 噬菌体可以在不需要辅助噬菌体的情况下进行包装。
- 可高拷贝数展示约 50 个氨基酸的多肽片段 ( 450/噬菌体 )，可中拷贝数展示 900~1200 个多肽片段 ( 5~15/噬菌体 )，可低拷贝数展示 900~1200 个氨基酸的多肽片段 ( 0.1~1/噬菌体 )
- T7 噬菌体在高 PH 值、高盐、变性剂 ( 100 mmol/L DTT ) 等条件下十分稳定，可根据不同需要采用多种条件进行筛选，并能在筛选后仍然保持很高的筛选活性。

## 噬菌体展示应用

噬菌体展示技术拥有诸多优势，它实现了蛋白/多肽基因型与表型的统一，在蛋白质与其遗传基因之间建立了直接的物理联系；可以快速的筛选得到所需抗体；通过这项技术不仅可以筛选到一般抗原的特异性抗体，也可以产生非免疫原性或毒性抗原的抗体，能够产生具有识别功能的人抗体，如 scFv、Fab、双功能抗体，及三价四价抗体等。所得到的抗体可以是 Fab、scFv，也可以进行抗体工程改造，转变成其他形式的小分子抗体、免疫毒素、靶向细胞

因子或全抗体等，应用广泛；相较于免疫动物生产单克隆抗体，利用噬菌体展示技术生产单克隆抗体，生产快速，操作简便，效率更高，且可以进行人源化抗体的生产，具有更高的利用价值。

经过多年的研究与发展，噬菌体展示技术已成为一门综合了多个学科理论、方法及策略的前沿技术，在免疫学、分子生物学、基因功能组学和新药研究等领域发挥着不可替代的作用。下面列出了各个噬菌体展示系统的一些应用案例：

| 噬菌体展示系统     | 应用案例   |
|-------------|--|
| M13 噬菌体展示系统 | <p>PⅢ蛋白：N 端展示蛋白酶抑制剂、神经末梢集合多肽、抗白色念球菌短肽，抗体特异性 Notch 受体蛋白、识别 MBP 的 sAHs 等，C 端展示研究蛋白相互作用。</p> <p>PⅧ蛋白：C 端展示研究分子间相互作用</p> |
| λ噬菌体展示系统    | <p>D 蛋白：C 端构建全基因组展示文库研究新型肺炎支原体抗体、抗原、研究蛋白质相互作用。</p> <p>SOC 蛋白：C 端和 N 端高拷贝展示炭疽热毒素。</p>                                 |
| T4 噬菌体展示系统  | <p>HOC 蛋白：碳端和 N 端展示 HIV 病毒 p24 蛋白。</p> <p>在 HOC 的 N 端和 SOC 的 C 端双位点展示猪痘疫苗、随机肽库分析 gp17 和 gp55 相互作用</p>                |
| T7 噬菌体展示系统  | <p>10B 蛋白：C 端构建随机肽展示文库、ORFs cDNA 展示文库及筛选磷脂酰丝氨酸结合蛋白</p>   |

表 3. 各个噬菌体展示系统的应用案例

## 相关阅读

[噬菌体抗体库制备流程与噬菌体展示文库筛选流程](#)

[噬菌粒及辅助噬菌体介绍](#)

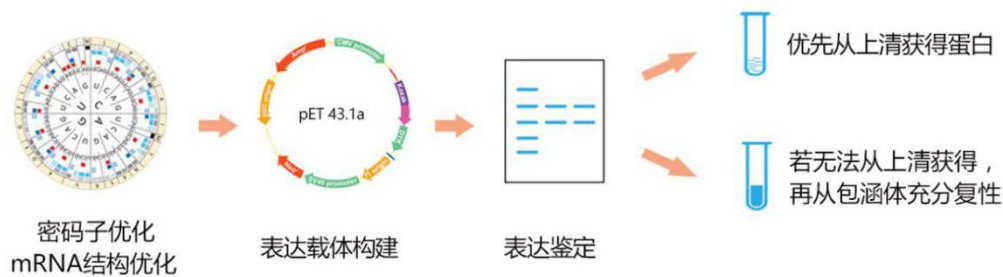


## 南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

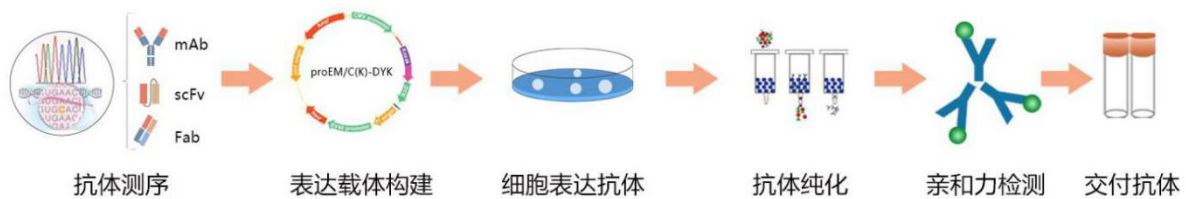
### 一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



### 二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



### 三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



### 四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

