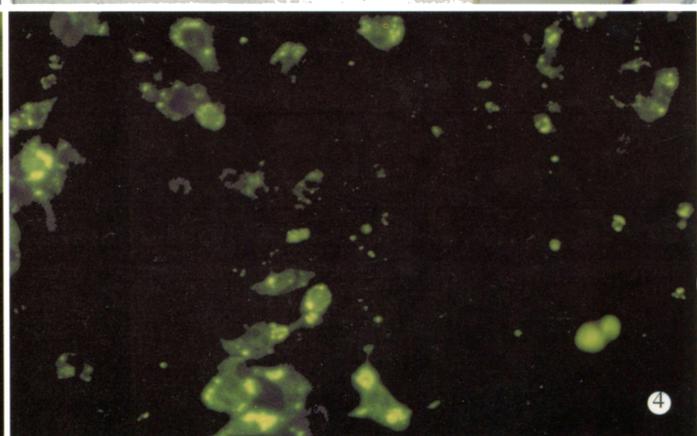
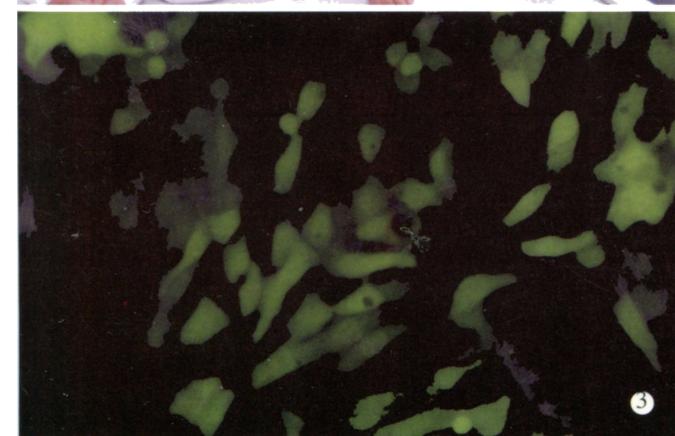


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年4月15日 第11卷 第4期 (Volume 11 Number 4)



4/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

目次

2003年4月15日 第11卷 第4期(总第108期)

述评	373 新基因结构与功能研究的策略 成军
病毒性肝炎	378 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析 成军,李克,陆荫英,王琳,刘妍
	385 酵母双杂交技术筛选Hcbp6结合的肝细胞蛋白编码基因 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟
	389 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体 钟彦伟,成军,张忠东,孙敏,李强,李克,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅
	394 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析 刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军
	399 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活的相关基因 牟劲松,刘妍,王刚,成军,段惠娟,李克,陆荫英,王琳,王惠芬
肝癌	404 单克隆抗体3A5-复方中药安迪偶联物的肝癌导向治疗 梁军,孙纪元,谢艳华,栗燕,闫露,王四旺
	408 树突状细胞内外对肝癌细胞的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英,吕同德
	411 肝癌组织中survivin蛋白表达的意义 陈涛,贾玉容,田伏洲,蔡忠红,李广阔
	415 热休克蛋白70与IL-2对小鼠肝癌移植模型的治疗比较 傅庆国,沈晓东,孟凡东,郭仁宣
	419 肝癌DC疫苗活化的CTL对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英
基础研究	422 HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆 陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞
	426 酵母双杂交技术筛选HBeAg肝细胞结合蛋白基因 陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞
	430 大鼠肝卵圆细胞的生物学特征 陈耀凯,王宇明,李俊刚,郎松
	434 肝硬变大鼠肝部分切除术后残肝TGF- α 、HGF、PCNA和IGFBP-1s mRNA的变化 陈平,李昆,董家鸿,韩本立
	438 细菌内同源重组法构建HBV S区和C区基因非复制型腺病毒载体及其体外表达 黄呈辉,欧阳玲,马会慧,汤正好,李刚,姚集鲁
	442 大鼠肠巨噬细胞TNF α 表达及复方大承气汤的影响 陈海龙,王辉,李文利,范琦
	446 家兔回肠淋巴管铸型的扫描电镜研究 滕诚毅,王晓平,魏双艳,王广友,汤凤彩
焦点论坛	450 酵母单杂交技术的原理及应用 马守东,洪源,成军
	451 酵母双杂交系统的原理及应用 陈天艳,成军,张树林
	456 抑制性消减杂交技术原理及应用 杨倩,成军,刘妍,王建军,张树林
	459 噬菌体展示技术的原理及应用 张忠东,成军,张树林
	461 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用 刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英
	464 丙型肝炎病毒与JAK-STAT信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	466 丙型肝炎病毒与MAPK信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	469 肿瘤抑制因子p21/waf1与肝炎病毒复制与表达的调节研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	472 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	474 生物信息学技术与新基因的研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
研究快报	478 中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层B细胞及IL-12的影响 王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明
	481 细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系 褚传莲,李延青,张燕,李文婕,赵宪邨

研究快报	483 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究 李保森,游绍莉,赵志海,辛绍杰,赵景民,王松山 486 鼠肝移植对胃黏膜损伤的实验研究 褚延魁,马庆久,鲁建国,刘维,何显力,杜锡林,乔庆,王胜智
临床经验	488 重叠丙型肝炎病毒感染在慢性乙型肝炎患者肝脏病变中的作用 商庆华,于建国,徐传镇,肖德明,尹燕明,陈崇兴,张光曙 491 正常人胃左静脉的声象图及血流动力学特征 夏建国,董胜翔,李凤华 494 手术与非手术治疗重症急性胰腺炎 120 例 金世龙,候庆福,顾红光,王仁云,廖维健
消息	388 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 393 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 398 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 403 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 407 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 414 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 418 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 425 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 433 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 437 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊 477 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊
征文通知	429 第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事 480 全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会征文通知
电子版	2003 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm 2002 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm 2001 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm 2003 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm 2002 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm 2001 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm
读者来信	493
封面故事	377 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所、基因治疗研究中心

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-04-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀	张金哲
黄象谦	张学庸
黄志强	赵东海
黎介寿	周殿元
刘耕陶	社长总编辑 马连生
裘法祖	中文编辑 潘伯荣
汤钊猷	王瑾晖
王宝恩	英文编辑 任师颜
危北海	排版 李少华
吴孟超	校对 李天华
吴咸中	

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail: wjgd@wjgnet.com
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wjgd @ wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话 (010)85381892
传真 (010)85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话:(010)85381892
传真:(010)85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录
美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志()》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明
本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点,除非特别声明.本刊如有印装质量问题,请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期 24.00 元 全年 288.00 元	1401004000050

COMMENTARY

Strategy in study the structure and function of novel gene
Cheng J 373

VIRAL HEPATITIS

Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene and protein

Cheng J, Li K, Lu YY, Wang L, Liu Y 378

Screening of gene encoding of hepatic proteins interacting with Hcbp6 via yeast two hybridization

Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Zhang J, Chen TY, Hong Y, Liu Y, Wang G, Zhong YW 385

Screen for human single chain variable region in antibody against human hepatitis C virus core protein binding protein 6

Zhong YW, Cheng J, Zhang ZD, Sun M, Li Q, Li K, Wang L, Li L, Zhang LX, Chen JM 389

Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene

Liu Y, Cheng J, Li K, Yang Q, Lu YY, Wang L, Wang JJ 394

Cloning of genes transactivated by NS3 protein of HCV with suppressive and subtractive hybridization

Mu JS, Liu Y, Wang G, Cheng J, Duan HJ, Li K, Lu YY, Wang L, Wang HF 399

LIVER CANCER

Effect of monoclonal antibody 3A5 coupled with Chinese medicine compound Andi in targeted treatment of hepatocellular carcinoma

Liang J, Sun JY, Xie YH, Li Y, Yan L, Wang SW 404

Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*

Guo JW, Qin LW, Cai MY, Lu TD 408

Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis.

Chen T, Jia YR, Tian FZ, Cai ZH, Li GK 411

Comparison of therapeutic efficacy between tumor-derived heat shock protein 70 and interleukine-2

Fu QG, Shen XD, Meng FD, Guo RX 415

Cytotoxic lymphocytes primed by DC based hepatocellular carcinoma vaccine against growth of carcinoma xenograft on nude mice

Guo JW, Qin LW, Cai MY 419

BASIC RESEARCH

Screening and cloning of gene encoding HBcAg interacting protein in hepatocytes

Lu YY, Wang L, Li K, Cheng J, Liu Y, Zhang LX 422

Screening of HBcAg interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique

Lu YY, Wang L, Li K, Liu Y, Cheng J, Zhang LX 426

Biological characteristics of rat hepatic oval cells

Chen YK, Wang YM, Li JG, Lang S 430

Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver

Chen P, Li K, Dong JH, Han BL 434

Construction of replication-deficient recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*

Huang CH, Ou-Yang L, Ma HH, Tang ZH, Li G, Yao JL 438

TNF α expression and effects of Dachengqi Decoction compound in gut macrophages

Chen HL, Wang H, Li WL, Fan Q 442

Lymphatic corrosion casts in rabbit ileum: scanning electronmicroscopic studies

Teng CY, Wang XP, Wei SY, Wang GY, Tang FC 446

FOCUSED FORUM

Principle and applications of yeast single hybridization

Ma SD, Hong Y, Cheng J 450

Principle of yeast two hybridization and its applications

Chen TY, Cheng J, Zhang SL 451

Principle and applications of suppressive and subtractive hybridization technique

Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ, Wang SL 456

Principle of phage display technique and its application

Zhang ZD, Cheng J, Zhong YW, Zhang SL 459

Gene chip technique in the pathogenesis of viral hepatitis

Liu Y, Cheng J, Wang JJ, Yang Q, Lu YY 461

Hepatitis C virus and signal transduction system of JAK-STAT

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 464

Hepatitis C virus and signal transduction system of MAPK

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 466

Tumor inhibitive factor p21/waf1 and regulation of replication and expression of hepatitis virus

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 469

Effect of Hepatitis B virus on cellular signal transduction

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 472

Study on Bioinformatics and new gene

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 474

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi \$

World Chinese Journal of Digestology
Monthly \$ \$

Founded on 15th January, 1993

Renamed on 25th January, 1998

Publication date 15th April, 2003

Honorary - Editor - in - Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor - in - Chief

Lian-Sheng Ma

ISSN 1009-3079 **CN1** 4-1260/R

Edited by Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology
P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

77, Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Overseas Distributor China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China **Code No.**M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

噬菌体展示技术的原理及应用

张忠东, 成军, 张树林

张忠东, 成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-18

张忠东, 成军, 张树林. 噬菌体展示技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003; 11(4): 459-461
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/459.htm>

0 引言

1985年Smith^[1]首次证实丝状噬菌体fd基因组能通过基因工程的手段进行改造, 将EcoR^I内切酶的部分基因片段(171 bp和132 bp)与p₃基因融合, 获得的重组噬菌体可在体外稳定增生, 表达产物能被抗EcoR^I内切酶抗体所识别. 1988年Parmley et al^[2]将已知抗原决定簇与p₃的N端融合呈现在表面, 可特异性地被抗体选择出来, 并提出通过构建随机肽库可以了解抗体识别的抗原决定簇表位的设想. 1990年McCafferty et al^[3]也报道了用噬菌体展示技术筛选溶菌酶的单链抗体的方法, 从而开始了这项技术的广泛应用的新时代.

1 噬菌体的基本特征

噬菌体属于单链DNA病毒, 包括f1、fd和M13三类. 噬菌体DNA在细菌内滚环复制, 细菌不被裂解, 但生长速度减慢, 而且可分泌出大量成熟的噬菌体颗粒. 噬菌体的单链DNA长约7 000 bp, 不同类型噬菌体其一级结构极为相似, 基因组编码11种蛋白质, 其中5种为结构蛋白, 与噬菌体展示密切相关的是二种不同的结构蛋白p₃和p₈. 噬菌体单链DNA被包裹在大约2 700-3 000个主要衣壳蛋白p₃分子组成的管状结构中, 另外次要衣壳蛋白p₆通过与大肠杆菌的F菌毛结合而引起感染, 是噬菌体感染宿主所必需的. p₃前体由73个氨基酸残基组成, 其中信号肽为23个氨基酸残基, 根据构成外壳的功能可分为四个区, 6-24氨基酸残基区域占据噬菌体表面的大部分, 25-35氨基酸残基区域高度疏水性, C端(35-50氨基酸残基区域)与DNA相结合, 构成完整的内壁, N端(1-5氨基酸残基区域)为可活动的、外露在噬菌体表面的肽段, 是插入外源基因的最佳位置. p₃前体由424个氨基酸残基组成, 形成3-5个拷贝, 位于噬菌体的尾部, 他由四个功能区组成, 信号肽区(18个氨基酸残基)引导p₃至细菌胞间质, 在p₃分泌后被细菌蛋白酶水解, 其后的穿膜区与噬菌体的侵入有关, 受体结合区负责结合F菌毛, 而C端的疏水区组装前黏附在细菌内膜

上, 组装后这段氨基酸序列锚在噬菌体外壳上, 穿膜区是最外露的区域, 因而成为插入外源基因的理想位置.

2 噬菌体展示技术的基本原理

噬菌体展示技术是一种基因表达产物和亲和选择相结合的技术, 他以改构的噬菌体为载体, 把待选基因片段定向插入噬菌体外壳蛋白质基因区, 使外源多肽或蛋白质表达并展示于噬菌体表面, 进而通过亲和富集法表达有特异肽或蛋白质的噬菌体. 其建立基于三个原因: (1)在p₃和p₈衣壳蛋白的N端插入外源基因, 形成的融合蛋白表达在噬菌体颗粒的表面, 不影响和干扰噬菌体的生活周期, 同时保持的外源基因天然构象, 也能被相应的抗体或受体所识别; (2)利用固定与固相支持物的靶分子, 采用适当的淘洗(panning)方法, 洗去非特异结合的噬菌体, 筛选出目的噬菌体; (3)外源多肽或蛋白质表达在噬菌体的表面, 而其编码基因作为病毒基因组中的一部分可通过分泌型噬菌体的单链DNA测序推导出来. 该技术实现了基因型和表型的转换.

噬菌体结构蛋白p₃和p₈均可作为载体来展示外源多肽或蛋白质, 在基因操作上, 他们基本相同. 在信号肽与成熟蛋白质编码区之间有单一的克隆位点便于插入, 插入的外源多肽或蛋白质以融合的形式表达出来并分泌到胞间质内, 当宿主蛋白酶切除信号肽后, 融合蛋白组装成熟, 呈现在病毒粒子的表面, 新的N端位置正是外源蛋白或多肽的插入点. 与p₃基因融合时拷贝数低(不超过5个), 这可以减少多价结合, 利于选择高亲和力的配体分子, 可容许插入大的片段. 与p₈基因融合时, 拷贝数高(2 700个), 当将属于多肽的表位用作免疫源时可产生良好的免疫应答, 具有反应优势, 故在疫苗开发上具有潜在的应用价值.

亲和筛选可用直接法和间接法. 直接法是将蛋白质分子耦联到固相支持物上, 文库噬菌体与固相支持物温育, 洗去未结合的噬菌体, 既获得亲和噬菌体; 间接法是将生物素标记的蛋白质分子与文库噬菌体温育后铺在结合有链亲和素的平皿上, 洗去未结合的噬菌体, 保留的就是结合状态的噬菌体, 再洗脱结合的噬菌体, 用这部分噬菌体感染细菌, 扩增噬菌体, 开始新一轮的筛选, 通过几次这样的亲和纯化反应, 就能选择性地富集并特异性扩增结合这种蛋白质或DNA分子的噬菌体. 筛选出的噬菌体的结合特性可以进一步验证并从DNA序列推导出来, 分析各个克隆间编码短肽的一致序列, 以确证筛选的特异性. 最后, 利用化学合成含一致序列的氨基酸短肽, 研究他们的亲和特性并推测可能配体的生物学活性和结合或游离状态的结构特点.

3 噬菌体展示技术的应用

3.1 噬菌体随机多肽文库 肽库是感染性噬菌体的集合, 其中每个病毒粒子的衣壳表面都含有以融合蛋白形式显露的唯一的核苷酸顺序编码寡肽, 通过选择步骤可以富集与靶分子结合的噬菌体. 构建随机多肽文库一般先

体外合成编码短肽的随机 DNA 片段,经 PCR 扩增或杂交使其形成携带适当酶切位点的基因片段,或经 PCR 扩增某特定基因后再用 DNase 酶解,使其形成长短不一的小基因片段.随机肽库的应用范围依采用的筛选分子而言,这些筛选分子包括抗体、小分子、细胞表面受体类、细胞分子类、完整细胞等,这些分子称为受体类.筛选出的结合该类受体的目的分子称为配体.用纯化的单克隆抗体作受体,进行抗体的表位分析应用最广泛也最成熟,筛选出的配体通常表明了抗原抗体的结合部位. Blond-Elguindi et al^[4]采用甲胎蛋白(AFP)洗脱的策略筛选出 Bip 结合短肽的共有序列,阐明 Bip 识别和蛋白质折叠的机制.用细胞表面的天然受体作筛选分子是筛选技术的一大进步, Doorbar et al^[5]采用竞争洗脱的方法筛选出细胞表面受体特异性结合的短肽, Pasqualini et al^[6]成功地筛选出肠和胃组织特异性的短肽,预示有可能用于体内基因的定向转移.噬菌体展示技术也可以用于病毒的诊断、治疗和疫苗的发展, Folgari et al^[7]以乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)为模型,用乙型肝炎患者特异性血清筛选肽库,用免疫印迹鉴定噬菌体表位,用正常人血清反向筛选,最终得到的短肽可模拟 HBsAg 并由竞争结合试验验证. Motti et al^[8]在对 HBV 的研究中,用抗病毒单克隆抗体筛选出模拟表位,免疫后可引起机体特异性的对 HBsAg 的机体免疫,提示模拟短肽可用于疫苗的发展. Arnon et al^[9]用八肽随机肽库筛选曼氏血吸虫的模拟表位,认为模拟表位可以作为多肽疫苗的重要成分.利用肽库技术确定了沙眼衣原体主要外壳蛋白的表位^[10]、HCV 核心抗原表位^[11]、HIV gp 120 蛋白和 HCV 核心蛋白的表位^[12].利用噬菌体肽库技术已经确定了许多蛋白分子的相互作用位点,包括组成的 SH3 与酪氨酸蛋白激酶的结合位点^[13]、胞质蛋白 p47phox 与细胞色素 b558 的结合位点^[14].用亲和纯化的 HLA-DR13 从噬菌体肽库中钓出与之结合的多肽,通过 MHC 与多肽的结合基序分析 MHC-I 分子的结合特点^[15]. Wrighton et al^[16]筛选到具有促红细胞生成素(EPO)功能活性的由二键连接的环形短肽.他用重组可溶性红细胞生成素受体(EPO-R)先筛选与 gp120 融合表达的构象约束型噬菌体八肽库,得到与 EPO-R 特异性结合,且不与牛血清白蛋白(BSA)、肿瘤坏死因子受体(TNFR)的胞外区、神经生长因子受体(NGF-R)、白介素-2 受体(IL-2R)的 α 和 β 亚基以及 E 选择素结合的环肽^[16].

3.2 噬菌体抗体库 噬菌体抗体库技术利用丝状噬菌体载体构建抗体文库,通过已知抗原筛选特异性高亲和性抗体的技术. McCaffery et al^[9]首先证明,完整的抗体可变区可表达于噬菌体的表面,通过亲和筛选获得了与已知抗原特异性结合的单链抗体片段, Hogrefe et al^[17]又从构建的 Fab 文库筛选到特异的 Fab 片段.

每种抗体的可变区由超变区和骨架区(FR)组成,超变区又称互补决定区(CDR)决定抗原的结合位点,其氨基酸序列变异较大,而连接超变区的骨架区很保守.噬

菌体抗体库运用了三项实验技术:(1)逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术,用一种引物克隆出全套免疫球蛋白可变区基因;(2)采用大肠杆菌分泌表达具有生物活性的抗体功能片段;(3)噬菌体表面展示技术的建立,其主要技术流程是,从免疫或不经免疫的人和小鼠的脾淋巴细胞中提取 mRNA,反转录成 cDNA,使用与抗体可变区基因两侧保守区互补的引物,通过多聚酶链反应(PCR)分别扩增抗体可变区的重链(VH)和轻链(VL)基因,构建文库.插入噬菌体载体后有二种表达模式,即表达 scFv 单链抗体或 Fab 抗体,scFv 由 VH 和 VL 之间通过人工接头相连;而 Fab 片段的 VH+CH1 和 VL+CL 分别插入不同的噬菌体载体,二种重组噬菌体超感染同一宿主菌,VL+CL 就可与 VH+CH1 片段通过二硫键结合形成 Fab 片段.将噬菌体抗体文库通过特异性抗原的筛选,就可以得到含特异性抗体片段的噬菌体.

噬菌体抗体库技术模拟了机体免疫系统的选择作用,呈现在噬菌体表面的抗体能够在体外用固相化抗原进行筛选,同时由于噬菌体对大肠杆菌的感染性,噬菌体抗体库技术能够以淘筛的方式,为快速选择特异性抗体提供简便而高效的操作系统,具体的步骤:(1)噬菌体黏附靶抗原.(2)反复洗涤去除非特异性结合,洗脱并收集与抗原结合的噬菌体.(3)再次感染大肠杆菌,使特异的噬菌体抗体淘筛.除此之外,也有用固相淘筛、捕获淘筛、完整细胞淘筛、组织淘筛及器官淘筛等方法获得结合抗体成功的报道,但各有侧重,为噬菌体抗体的淘筛增添新的途径^[18]. Clackson et al^[19]首先把他用到 scFv 的表达中来.他使用基因工程改造噬菌体载体,再在辅助者(Helper)噬菌体的帮助下,结果使 scFv 在噬菌体的衣壳蛋白 G3P 的顶部表达.这种 scFv 已具有结合活性,因此能很方便地从一个库中筛选出需要的 scFv 噬菌粒(phagemid)来.1996年, Tang et al^[20]用噬菌体展示技术的方法,对一个连接肽库作了筛选,结果得到很多结合能力较强的 scFv 的连接肽.

3.3 蛋白质的定向改造 蛋白质的定向改造指的是用盒式突变、错误倾向 PCR 等方法来突变蛋白质或结构域的某一特定编码序列,产生蛋白质或结构域的突变文库呈现在噬菌体表面,通过亲和筛选获得所需的已定向改变的噬菌体克隆,他们的一级结构可以从 DNA 的序列中推导出来.可用来筛选具有更强受体结合能力的细胞因子、新的酶抑制剂、转录因子的 DNA 结合新位点、新的细胞因子拮抗剂、新型酶和增强生物学活性的蛋白质等.

3.4 cDNA 文库的表达筛选 cDNA 文库的表达筛选系统除利用噬菌体、酵母双杂交系统外,噬菌体表面展示技术也可达到同样的目的^[21-23].cDNA 编码的所有蛋白质融合在 fos 结构域 C 末端,与 Jun-g 或 Jun-g 结构域相互作用;也可将 cDNA 直接融合在 p 的 C 末端;另外是直接利用蛋白质之间的相互作用来选择 cDNA,将目的蛋白和 cDNA 文库分别与 g 的 C 末端

和N端融合,如果目的蛋白与某一个cDNA的蛋白相互作用,g蛋白的二个功能域将彼此互补导致有感染性的病毒产生.噬菌体展示技术引出了分子文库的概念,根据文库呈现的部位不同,有噬菌体表面展示文库、细菌表面展示文库、质粒展示文库和核糖体文库,也可以是用化学方法合成的肽库或小分子化合物库.其中噬菌体表面展示技术比较成熟,根据文库内分子的性质可以分为cDNA文库、随机肽库、抗体文库、蛋白质文库等.目前已越来越广泛地用于抗原表位分析、蛋白质-蛋白质相互作用位点分析、酶作用底物的分析、寻找具有生物功能的蛋白的模拟肽、先导化合物的发现、分离与鉴定疾病特异性抗原模拟肽、筛选细胞和器官特异性结合肽、研究蛋白质与核酸结合特性、定位信号转导途径等.该技术迅速发展的原因是他有效地实现了基因型和表型的转换,在分子克隆的基础上,实现蛋白质构想的体外控制,从而可获得具有生物学活性的表达产物.若将蛋白质三维结构预测、分子模拟技术及噬菌体表面展示技术完美融合,对分子相互作用、分子识别、受体作用、酶学机制以及疫苗的研究进程将起极大的推动作用.

4 参考文献

- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315-1317
- Parmley SF, Smith GP. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 1988;73:305-318
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552-554
- Blond-Elguindi S, Cwirla SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, Gething MJ. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* 1993;75:717-728
- Doorbar J, Winter G. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J Mol Biol* 1994;244:361-369
- Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364-366
- Folgori A, Tafi R, Meola A, Felici F, Gafre G, Cortese R, Monaci P, Nicosia A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J* 1994;13:2236-2243
- Motti C, Nuzzo M, Meola A, Galfre G, Felici F, Cortese R, Nicosia A, Monaci P. Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene* 1994; 146:191-198
- Arnon R, Tarrab-Hazdai R, Steward M. A mimotope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and immunology. *Immunology* 2000;101:555-562
- Zhong G, Smith GP, Berry J, Brunham RC. Conformational mimicry of a chlamydial neutralization epitope on filamentous phage. *J Biol Chem* 1994;269:24183-24188
- Rodriguez-Lopez M, Riezu-Boj JI, Ruiz M, Berasain C, Civeira MP, Prieto J, Borrás-Cuesta F. Immunogenicity of variable regions of hepatitis C virus proteins: selection and modification of peptide epitopes to assess hepatitis C virus genotypes by ELISA. *J Gen Virol* 1999;80:727-738
- Grihalde ND, Cheny CJ, Golden A, Gubbins E, Mandecki W. Epitope mapping of anti-HIV and anti-HCV monoclonal antibodies and characterization of epitope mimics using a filamentous phage peptide library. *Gene* 1995;166:187-195
- Sparks AB, Quilliam LA, Thorn JM, Der CJ, Kay BK. Identifica-

- tion and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries. *J Biol Chem* 1994;269:23853-23856
- Deleo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ, Quinn MT. Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7110-7114
- Davenport MP, Quinn CL, Valsasint P, Sinigaglia F, Hill AV, Bell JI. Analysis of peptide-binding motifs for two disease associated HLA-DR13 alleles using an M13 phage display library. *Immunology* 1996; 88:482-486
- Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, Rashyp AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson OL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* 1996; 273:458-464
- Hogrefe HH, Mullinax RL, Lovejoy AE, Hay BN, Sorge JA. A bacteriophage lambda vector for the cloning and expression of immunoglobulin Fab fragments on the surface of filamentous phage. *Gene* 1993;128:119-126
- Breitling F, Dubel S, Seehaus T, Klewinghaus I, Little M. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 1991;104:147-153
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991; 352:624-628
- Tang Y, Jiang N, Parakh C, Hilvert D. Selection of linkers for a catalytic single chain antibody using phage display technology. *J Biol Chem* 1996;271:15682-15686
- Rhyner C, Kodzius R, Cramer R. Direct selection of cDNAs from filamentous phage surface display libraries: potential and limitations. *Curr Pharm* 2002;3:13-21
- Cramer R, Walter G. Selective enrichment and high-throughput screening of phage surface-displayed cDNA libraries from complex allergenic systems. *Comb Chem High Throug Screen* 1999;2: 63-72
- Cramer R, Kodzius R. The powerful combination of phage surface display of cDNA libraries and high throughput screening. *Comb Chem High Througput Screen* 2001; 4:145-155

基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用

刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英

刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心,全军病毒性肝炎研究重点实验室 北京市 100039 国家自然科学基金资助项目, No. C39970674, C03011402
项目负责人:成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话:010-66933391 传真:010-63801283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11(4):461-463
<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/461.htm>

0 引言

基因芯片(gene chip)也称为 DNA 微距阵(DNA microarray)、DNA 芯片(DNA chip)等,是近年发展起来的一项前沿生物技术.他是指将大量靶基因或寡核苷酸片段有序地高密度地排列固定于玻片、硅片等固相载体上,然后与



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

