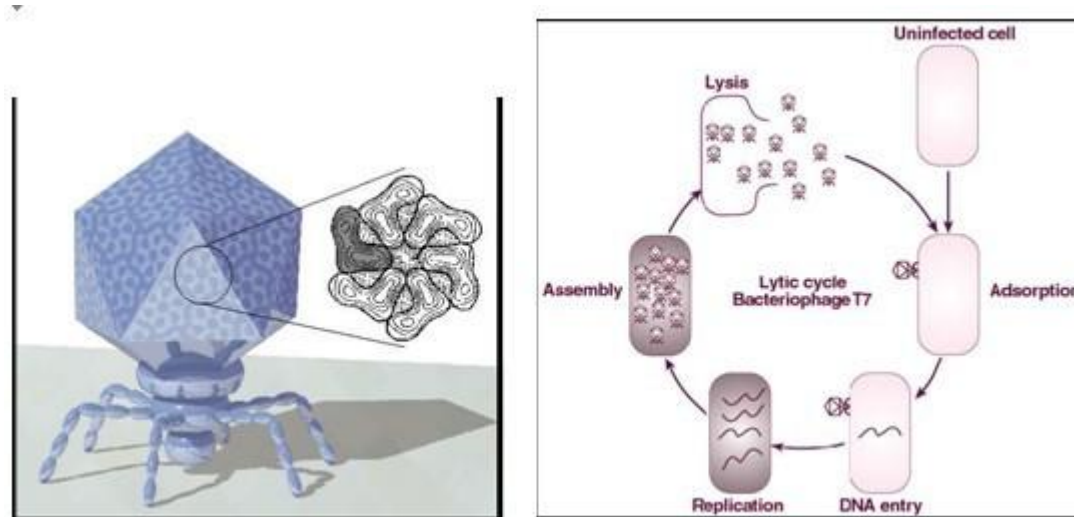


噬菌体展示技术及其在小分子 抗体展示中的应用



phage display

授课大纲

- 噬菌体展示技术的原理及特点；
- 噬菌体抗体库构建的流程；
- 噬菌体抗体库的特点及优点；
- 噬菌体抗体库技术的进展

1. 噬菌体



- 噬菌体是感染细菌、支原体、螺旋体、放线菌以及蓝细菌等的一类病毒，亦称**细菌病毒**。

噬菌体的结构简单，基因数较少，已成为分子生物学研究的重要工具；因其还可作基因的载体，故又被广泛应用于遗传工程的研究。

噬菌体的生活周期

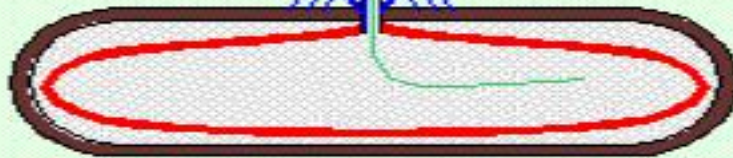
Lytic development

1) Infection



Phage attaches to bacterium

2) DNA injection



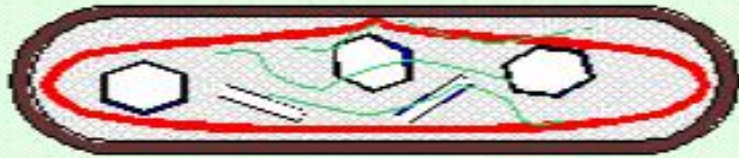
Phage injects DNA into bacterium

3) Early infection



Phage DNA replication starts

4) Late infection



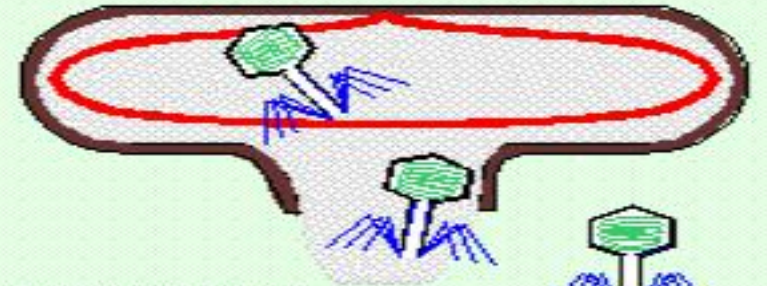
Heads, tails and fibres are made

5) Phage assembly

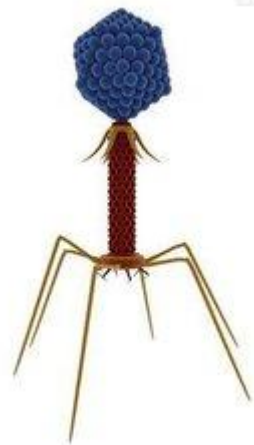


DNA is packaged into heads. Tails become attached

6) Lysis



Cell broken and progeny released

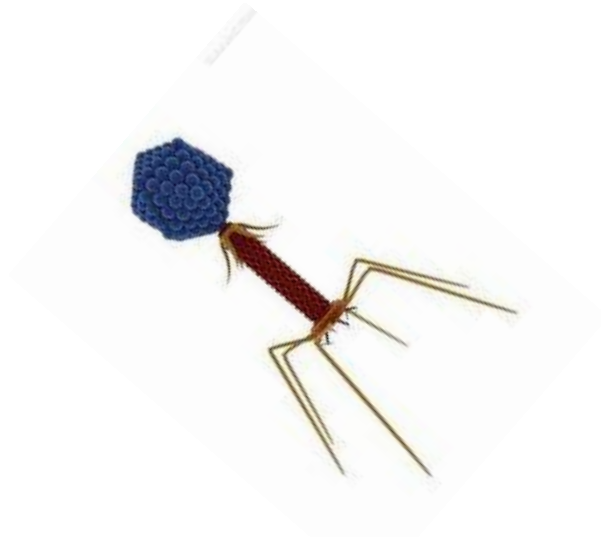


噬菌体

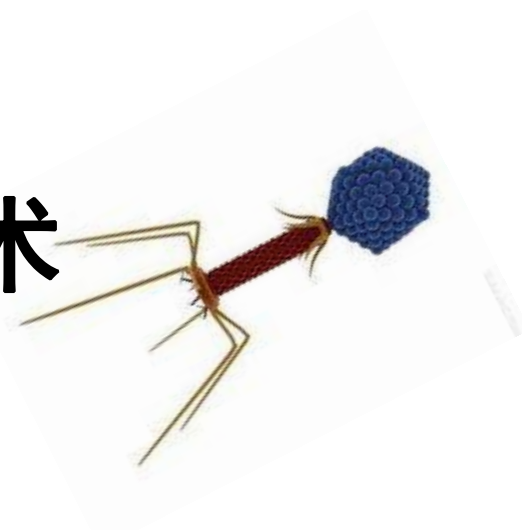
?



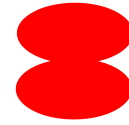
噬菌体展示技术



抗体库技术



1. 噬菌体展示技术的原理

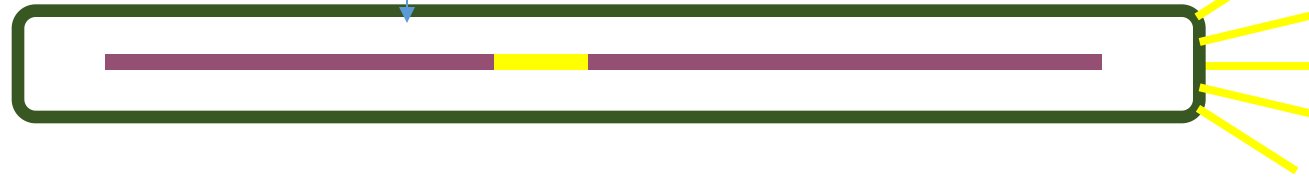


融合蛋白

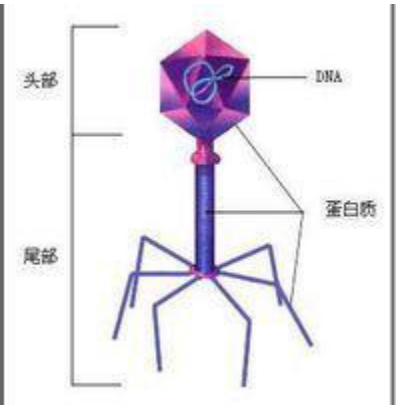


基因型

表达型

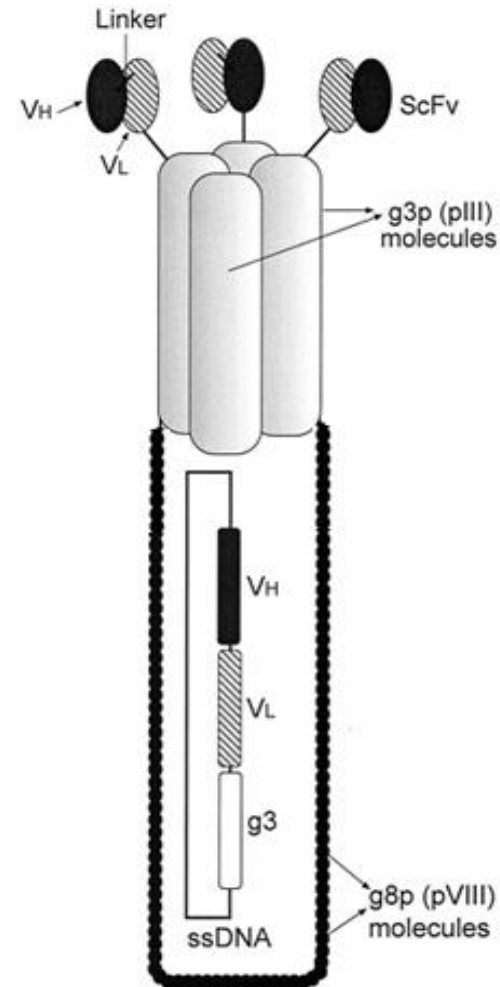


PIII



1.1 噬菌体抗体展示

- 因此，噬菌体展示技术堪称**表型与基因型的统一**。外源蛋白或多肽的表型和基因型被统一在了同一噬菌体颗粒内，通过表型筛选就可以获得其编码基因。



抗体基因插入噬菌体基因组

抗体蛋白在噬菌体表面表达

噬菌体表面抗体与抗原结合

可获得高亲和力抗体基因

1.2 噬菌体展示的定义

- 噬菌体展示：将外源肽或蛋白与特定噬菌体衣壳蛋白融合并展示于噬菌体表面，进而通过免疫筛选表达有目的肽或蛋白质的噬菌体，得到大量富集，然后通过DNA序列测定进行定性后进行下一步大规模的生产。

噬菌体表面展示系统 (phage surface display system)

1988年, Smith

1990年Mc Cafferty等成功地建立了噬菌体表面展示系统, 通过将抗溶菌酶单链抗体基因克隆于fd噬菌体基因3的下游, 使ScFv以融合蛋白的形式展示于噬菌体表面, 利用亲和层析, 两轮富集达 10^6 倍。该技术的成功给抗体基因的筛选工作带来了革命性的变革。

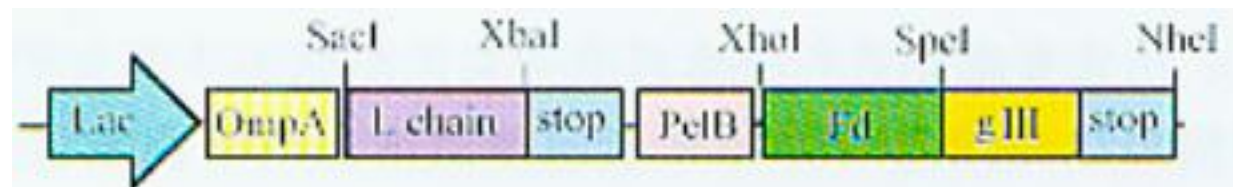
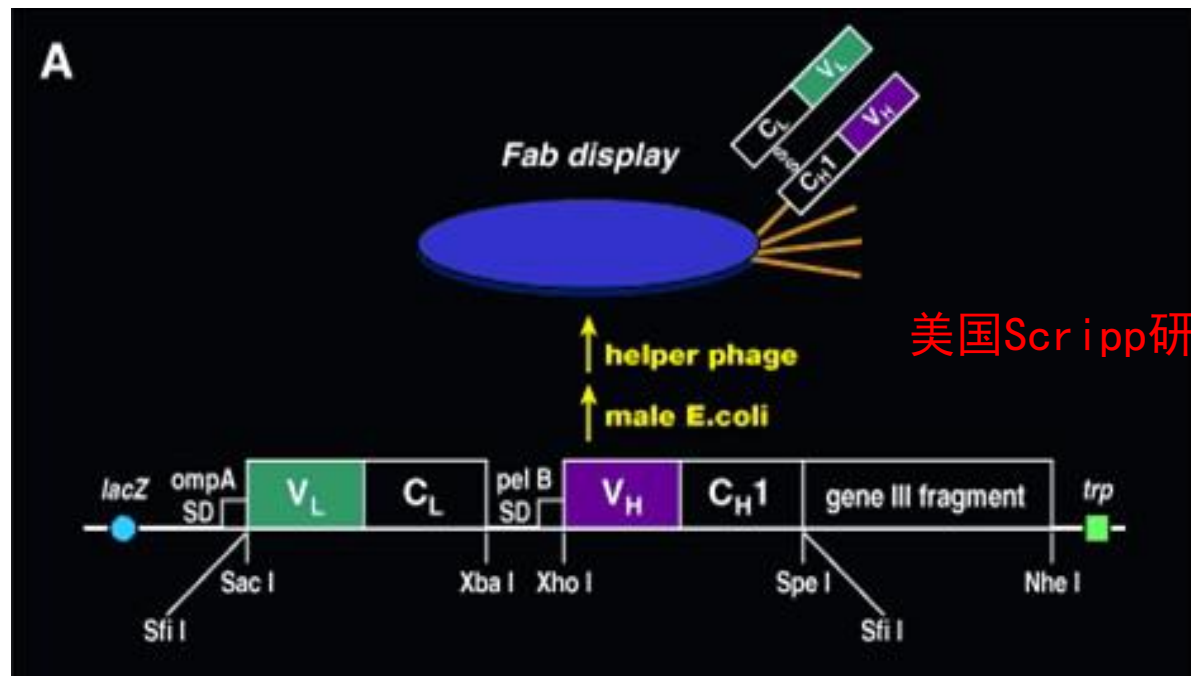
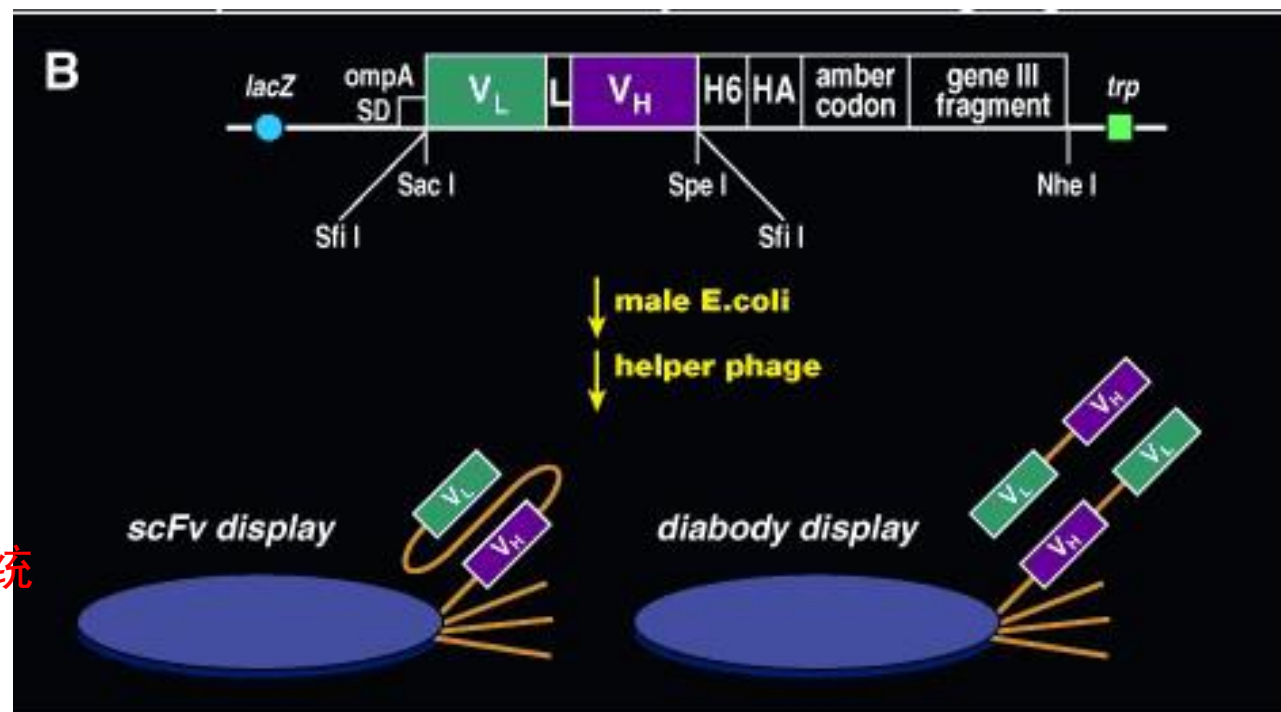


图 5-3 噬菌体抗体表达载体 pCOMB3

抗体库两大主力系统



美国Sc r i pp研究所创建的Fab系统



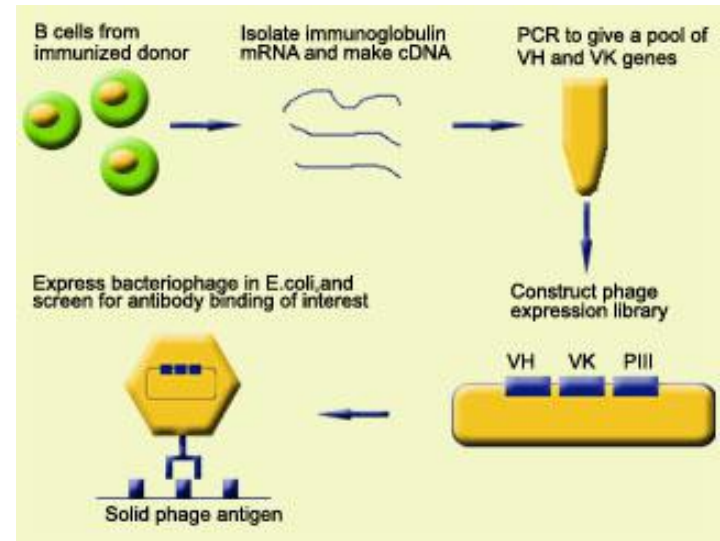
剑桥大学的scFV系统

1.3 噬菌体抗体库

- 将抗体全套可变区基因组装到噬菌体载体，并表达于噬菌体表面，所得到的多样性噬菌体抗体的集合，称为噬菌体抗体库。
- ◎ 利用噬菌体呈现技术，筛选并富集特异性抗体的过程，称为噬菌体抗体库展示技术。

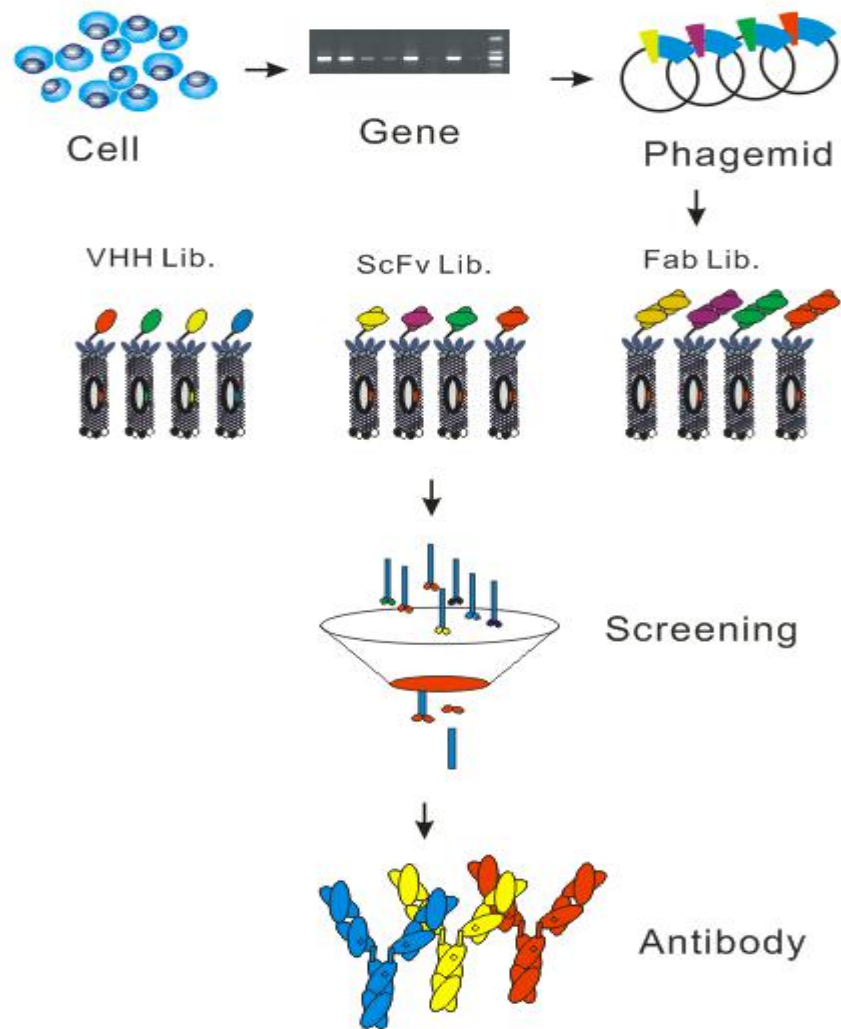
2. 噬菌体抗体库产生的三项技术基础

- ◆ RT-PCR：能够克隆全套抗体可变区基因
- ◆ 抗体基因片段在大肠杆菌的功能性表达
- ◆ 噬菌体展示技术 (phage display)：有效筛选和扩增

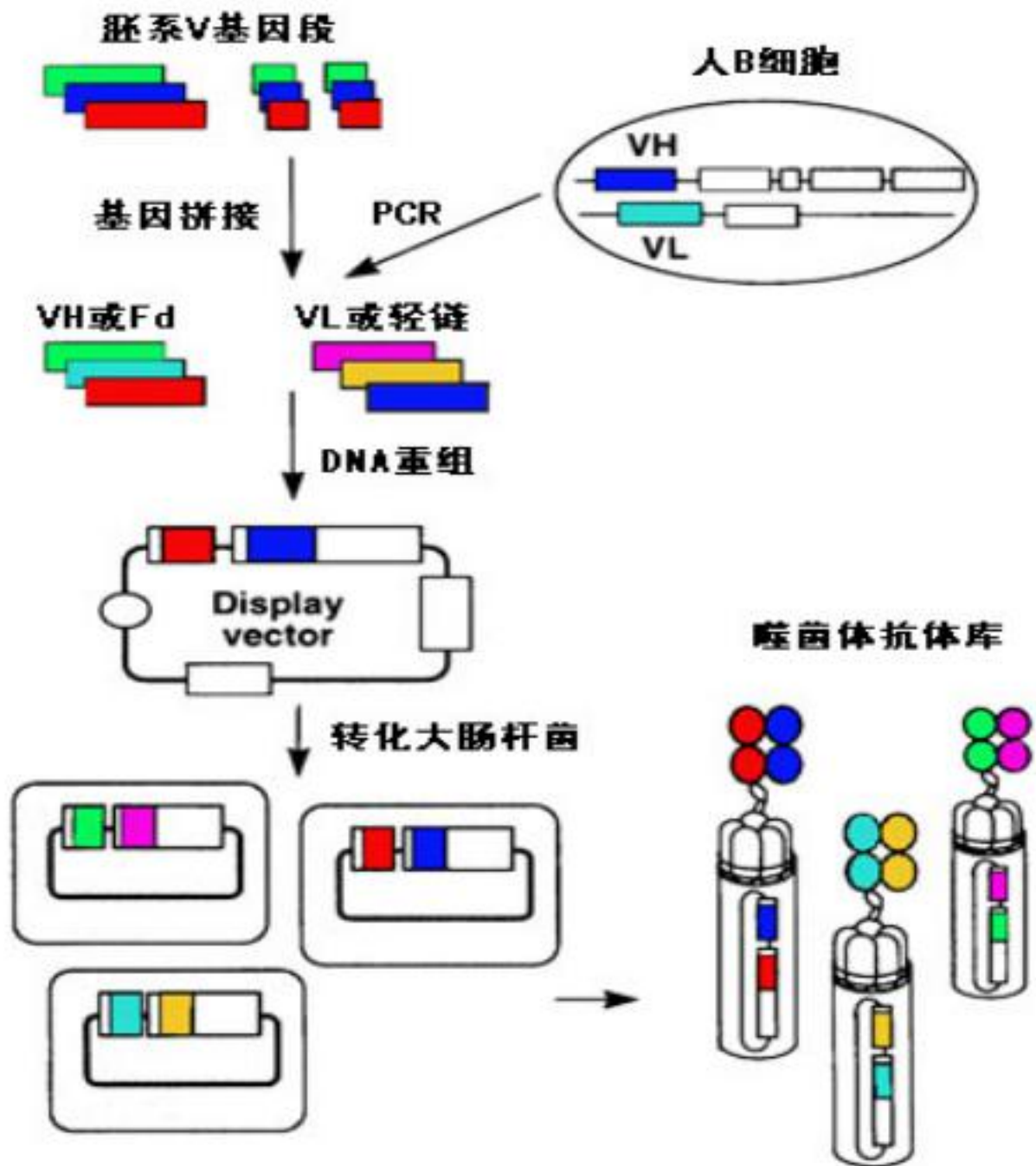


2. 噬菌体抗体库的构建

- 基因的获取
- 载体的构建、连接
- 表达、淘选
- 扩增、筛选
- 鉴定、分析



抗体
库构
建流
程图
(1)



噬菌体抗体库流程图 (2)

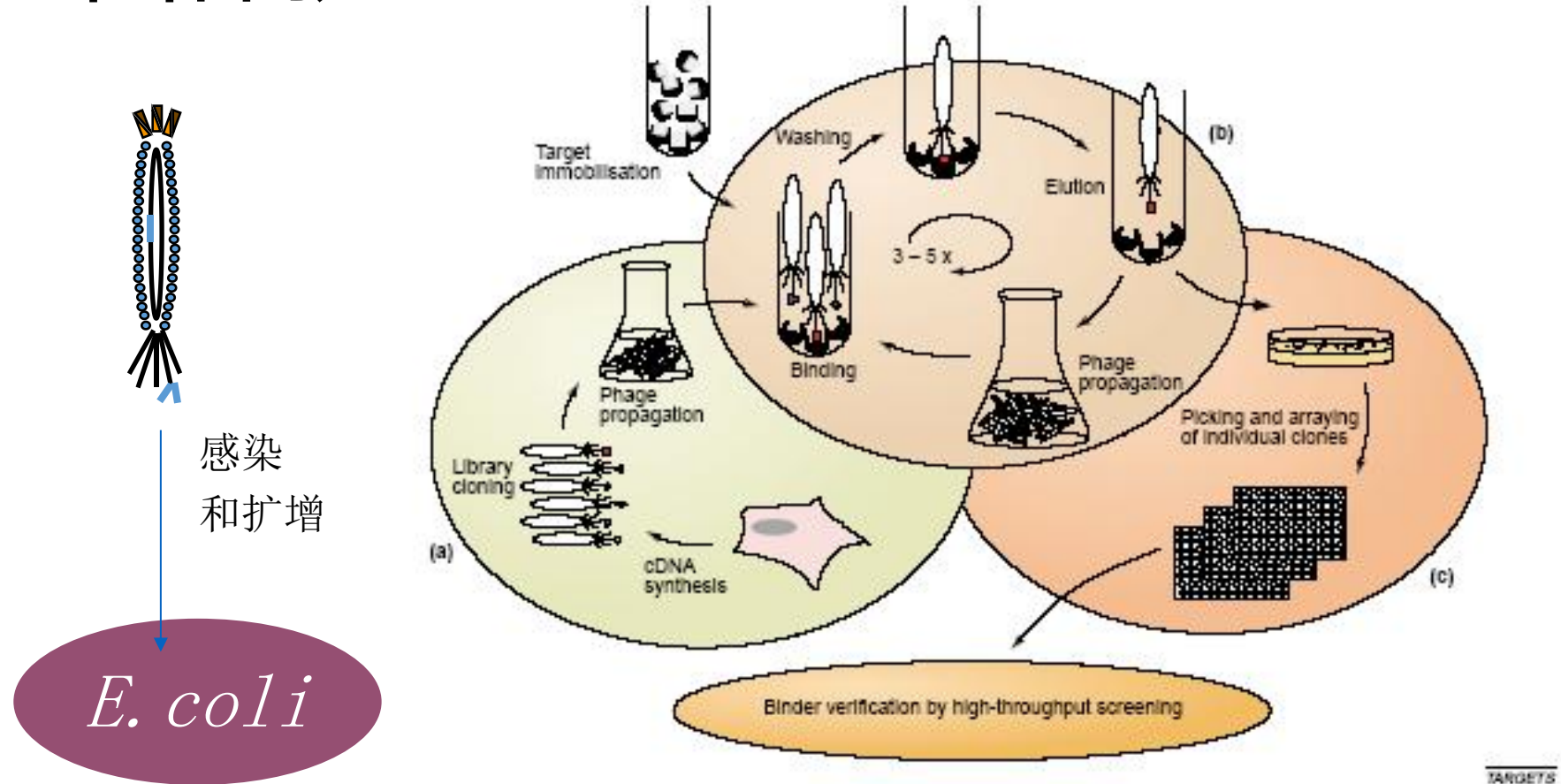
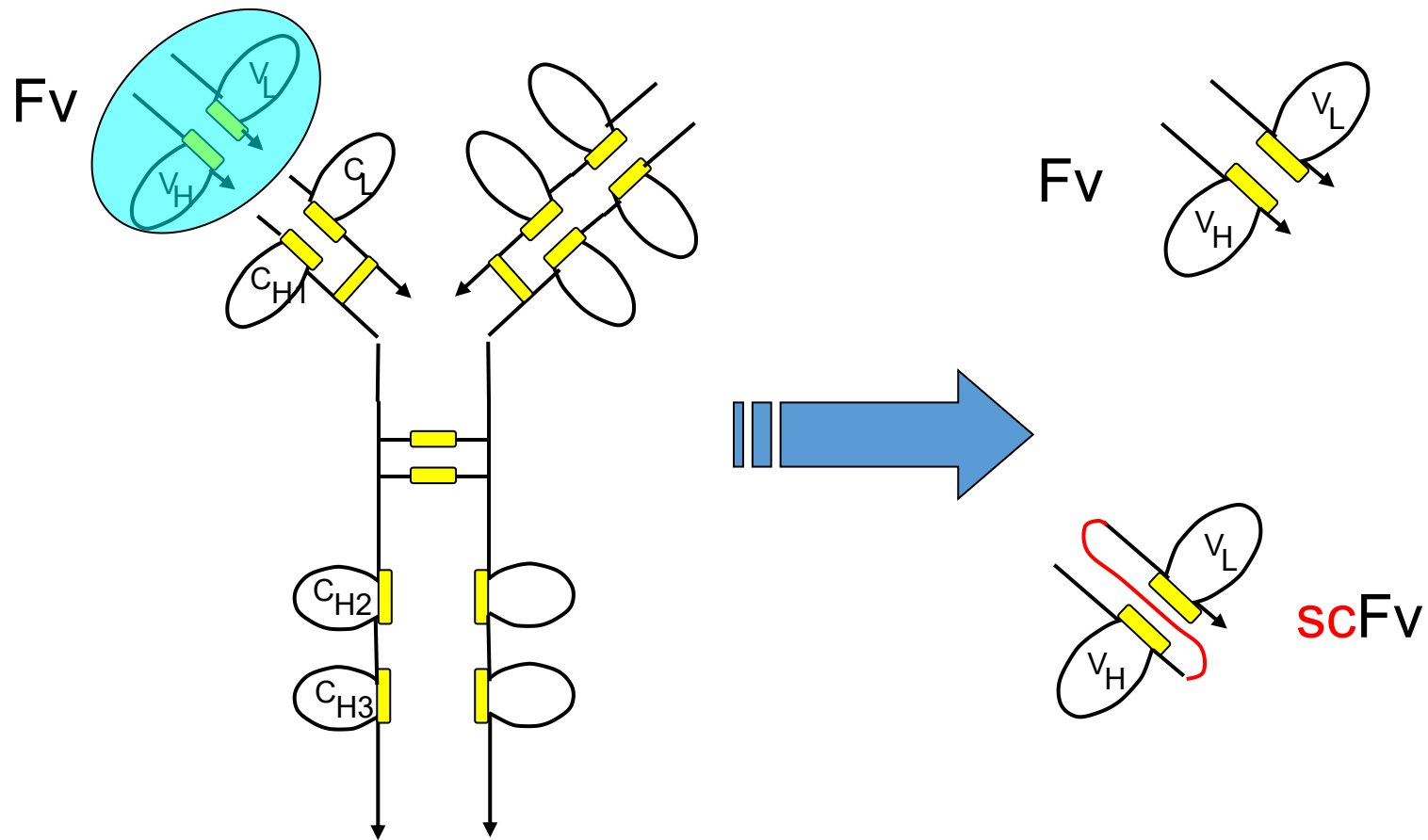


Figure 2. General selection scheme for cDNA expression-products displayed on phage surface. (a) Generation of a phage display library by mRNA extraction, cDNA cloning into phagemid vector and phage propagation. (b) Affinity-driven enrichment of target-specific binders in several rounds of biopanning. (c) Generation of arrayed target-specific libraries suitable for high-throughput screening by picking and arraying individual clones into microtitre plates.

2.1、基因的获取

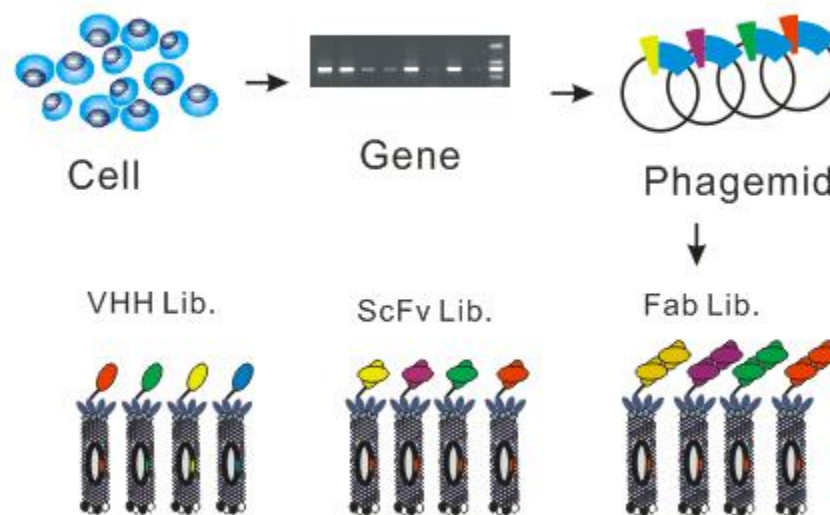


2.1 抗体可变区基因的获得

- **基因来源：**杂交瘤细胞、免疫脾细胞、淋巴结细胞、外周血淋巴细胞、甚至体外免疫的细胞

- 获得可变区基因的途径：

- (1) 从基因文库中**钓取**可变区基因
- (2) 用PCR法扩增Ig的VH和VL基因

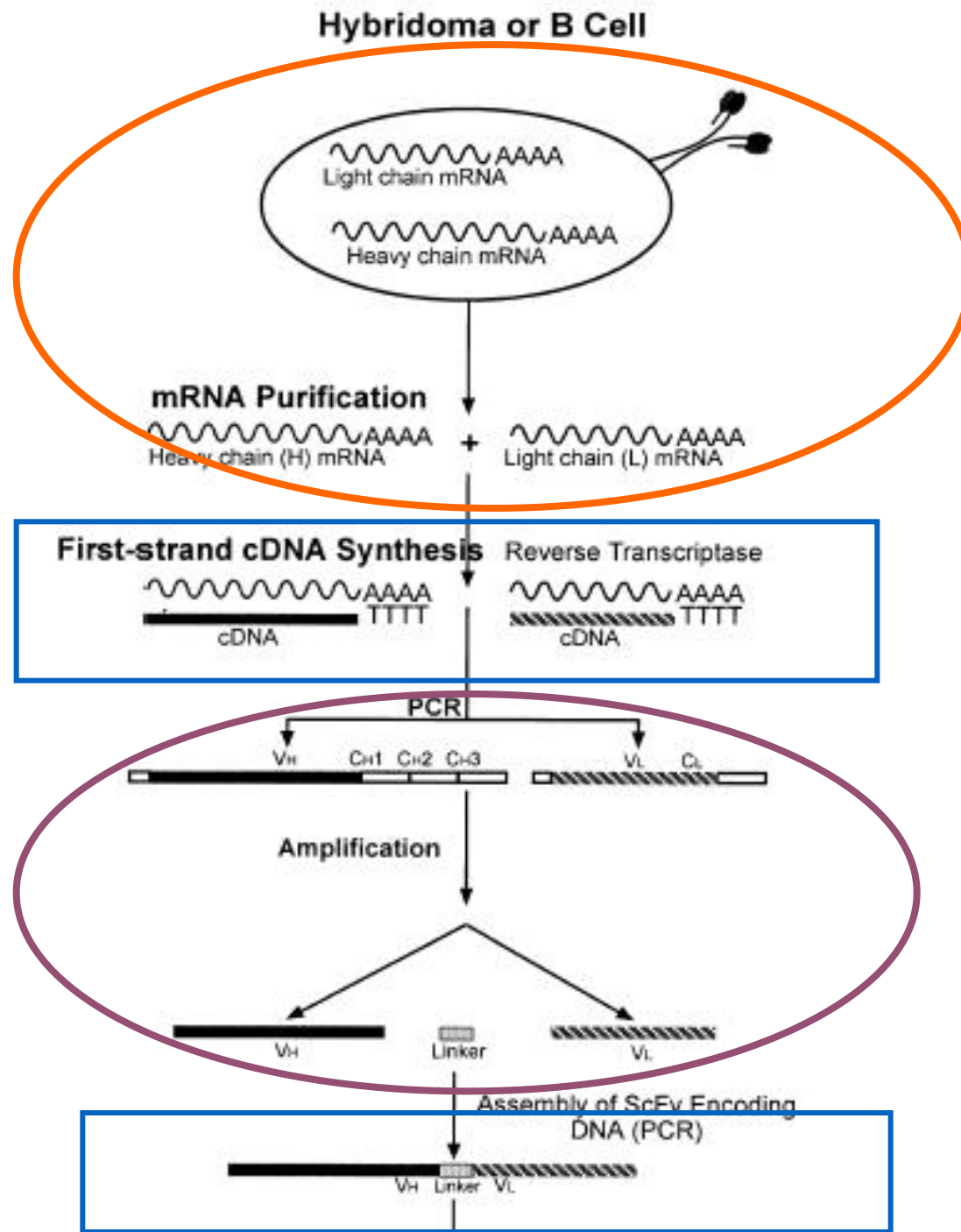


“通用引物”的设计

要求：

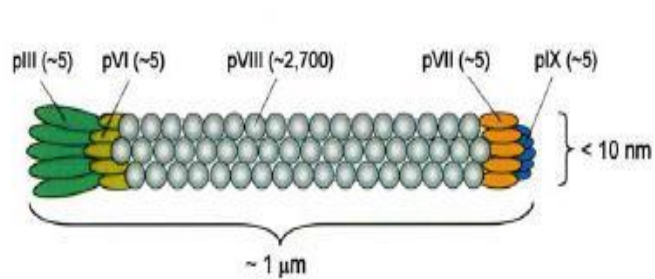
- 一是得到的产物必须是正确的目的基因，要有**可靠性**；
- 二是要获得尽可能多种类的目的基因，即有**多样性**；
- 三是要求能够结合各种VH及VL基因片段中的任何一个，即引物的**通用性**。

抗体可变区基因的获得

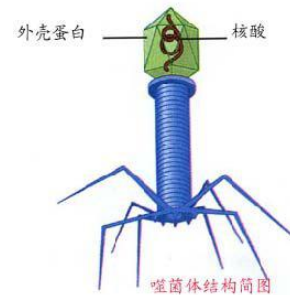


2.2 载体及表达系统的改进

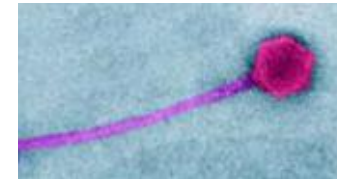
- 根据所用噬菌体类型的不同，又可以分为丝状噬菌体 (M13, fd, f1) 展示系统、 λ 噬菌体展示系统、T4噬菌体展示系统、T7噬菌体展示系统等。



■ 丝状噬菌体



■ T4噬菌体



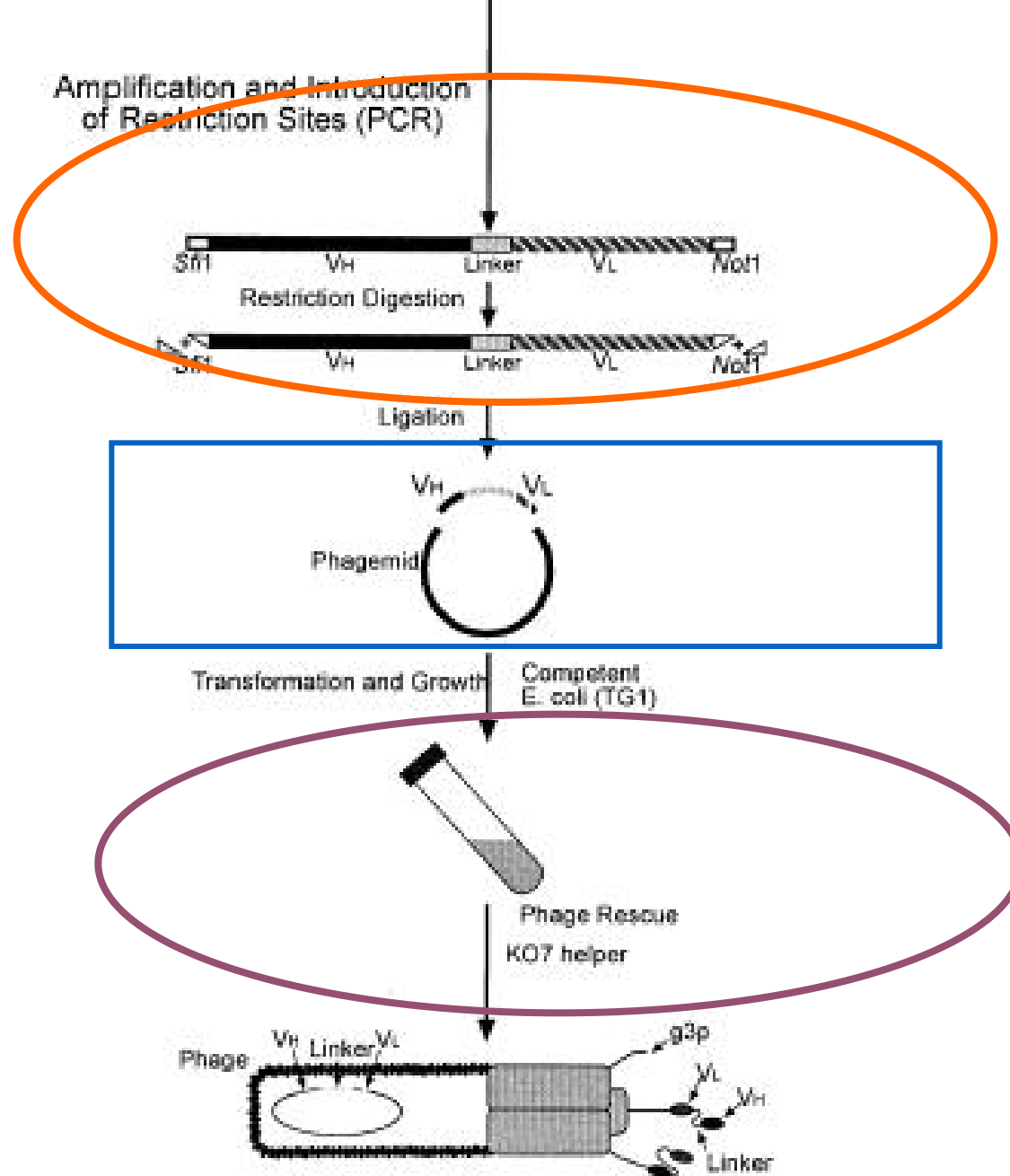
■ λ 噬菌体

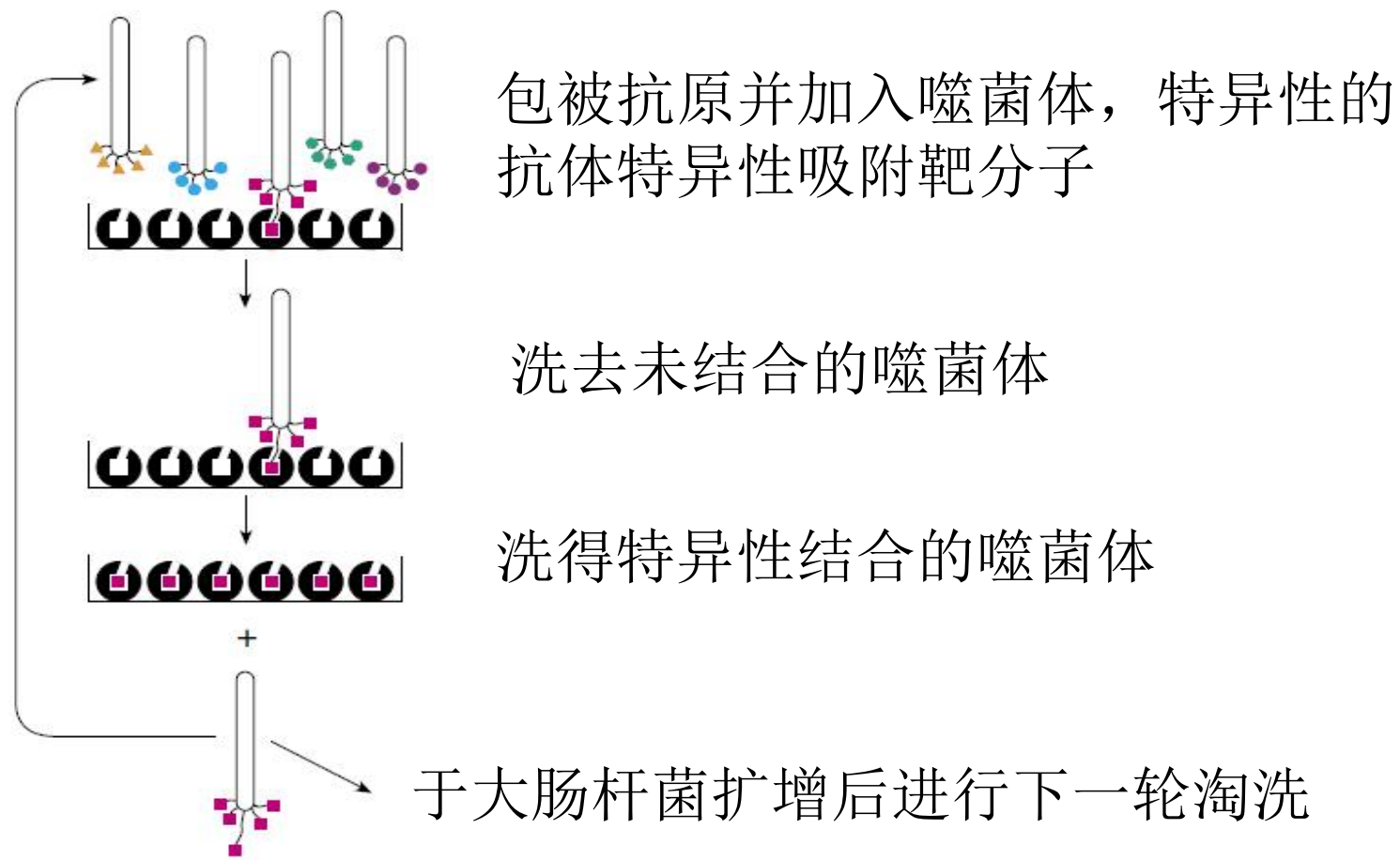
载体及表达系统的改进

三大表达系统

- **单链丝状噬菌体展示系统**：突出优点是模拟了自然免疫选择系统。
- **λ噬菌体展示系统**：pV展示系统可以展示难以分泌的肽或蛋白质；D蛋白展示系统的特点：因为是在病毒细胞内完成组装，无需将外源肽或蛋白分泌到细菌细胞膜，可以展示对细胞有毒性的蛋白。
- **T4噬菌体展示系统**：容量大（至少35KD的蛋白质）、拷贝数高，尤其适用于展示那些不能被E. coli分泌的复杂蛋白质。

外源基因的装载与转染





Ph. D. 生物淘洗程序示意图

● 谢谢!

噬菌体抗体库淘选系统

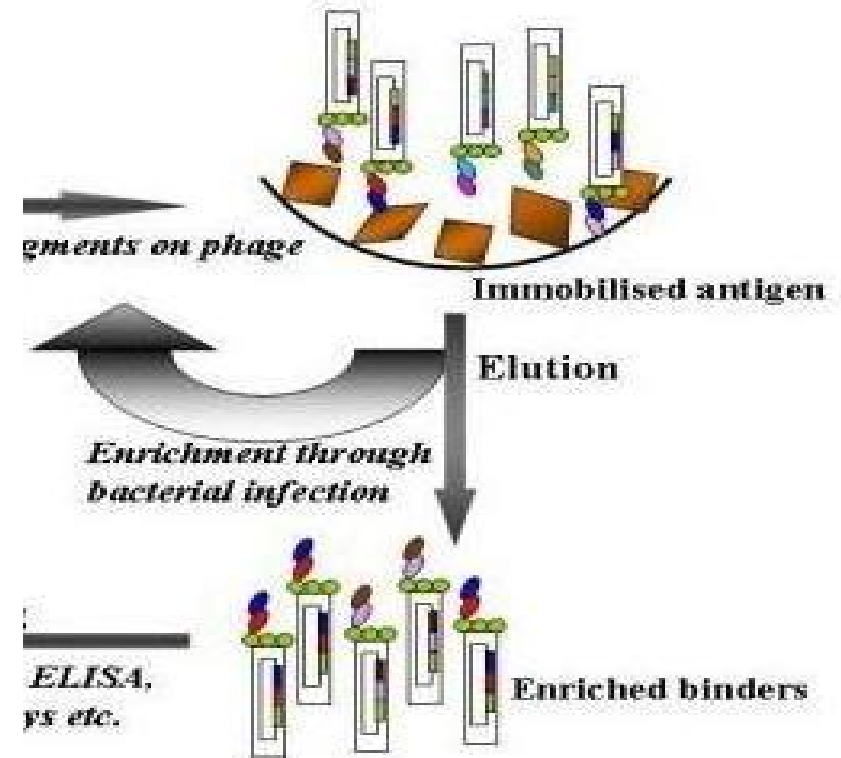
高效淘选系统的建立

- 淘选系统

- ※抗原（固相 or 液相）

- ※完整细胞

- ※组织，器官



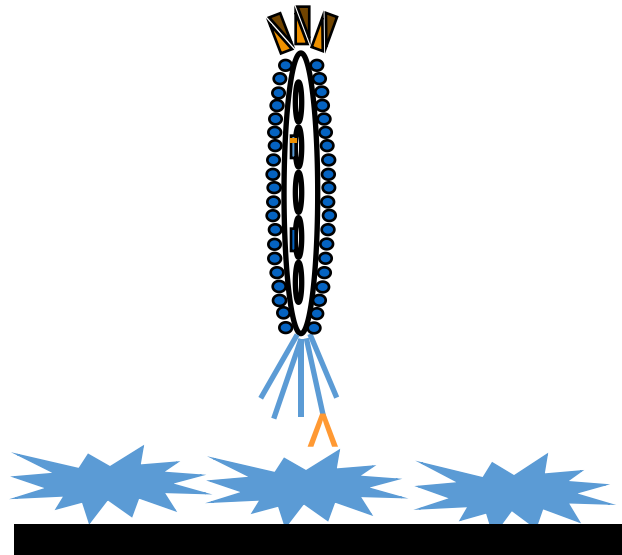
1. Solid phase selection with immunotubes

固相筛选

Immunotube

coated with

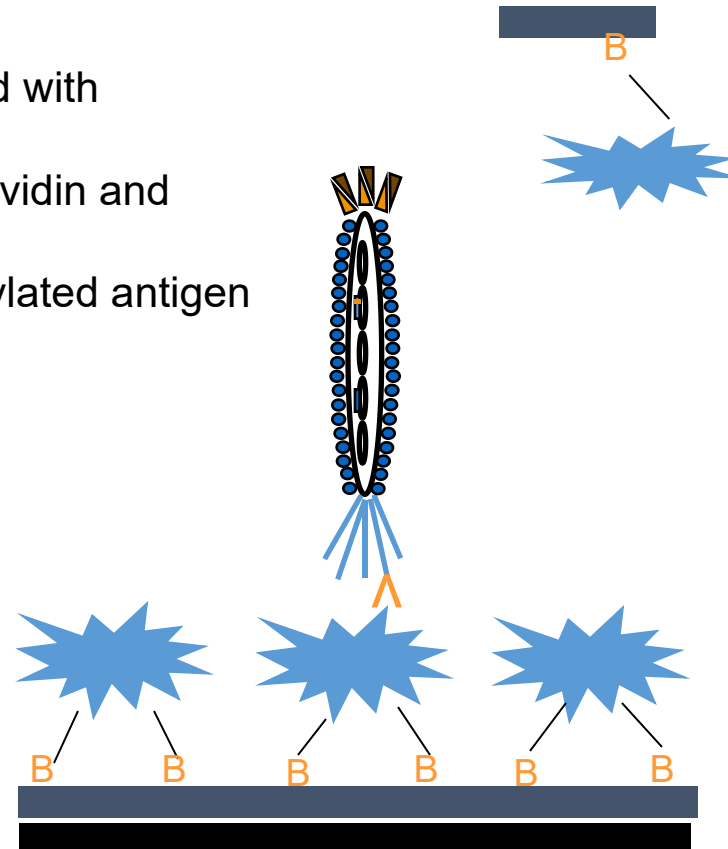
antigen



coated with

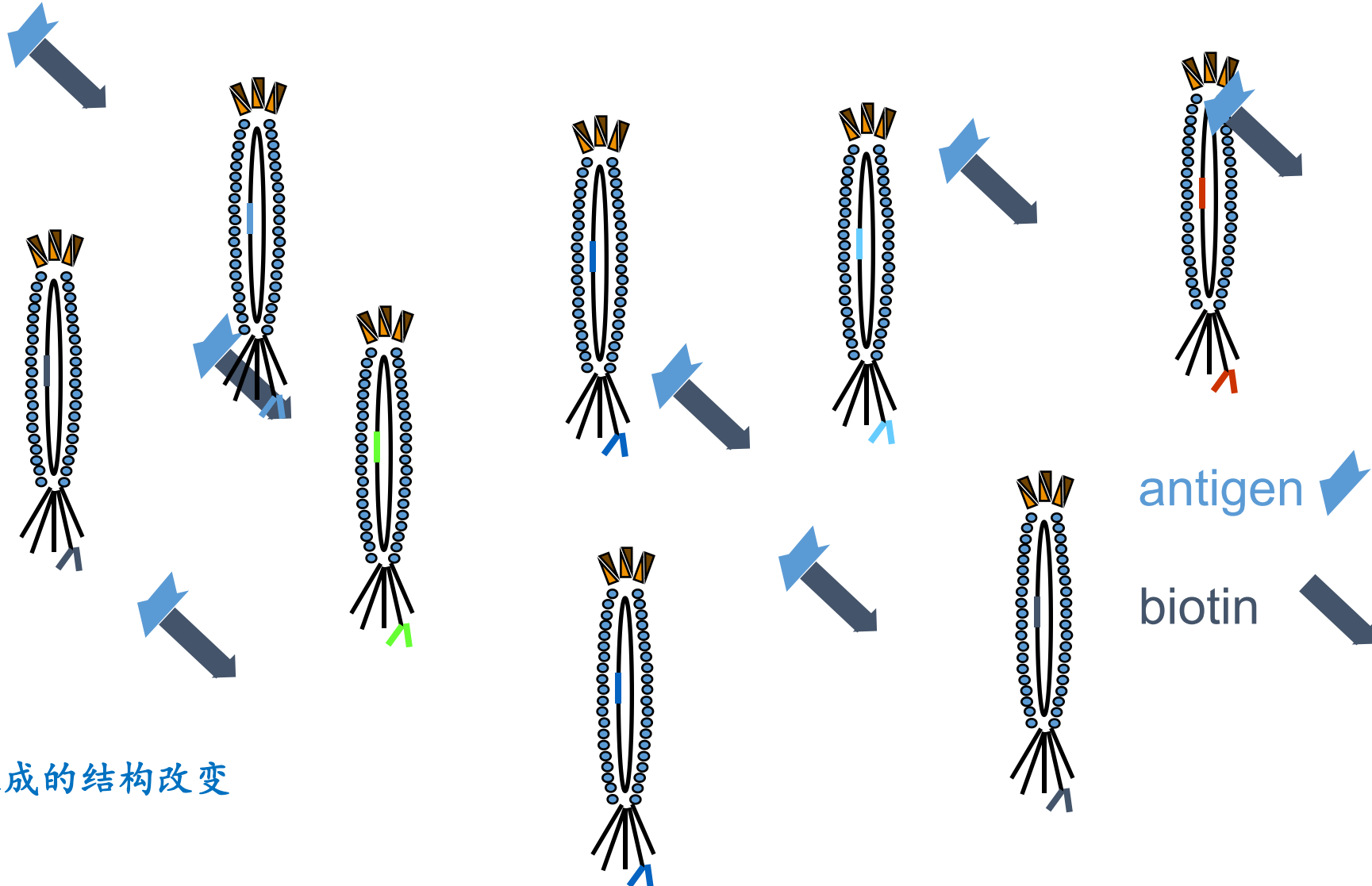
streptavidin and

biotinylated antigen



2. Solution phase selection with biotinylated antigen

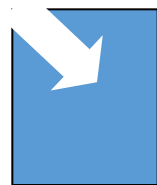
用生物素连接的可溶性筛选



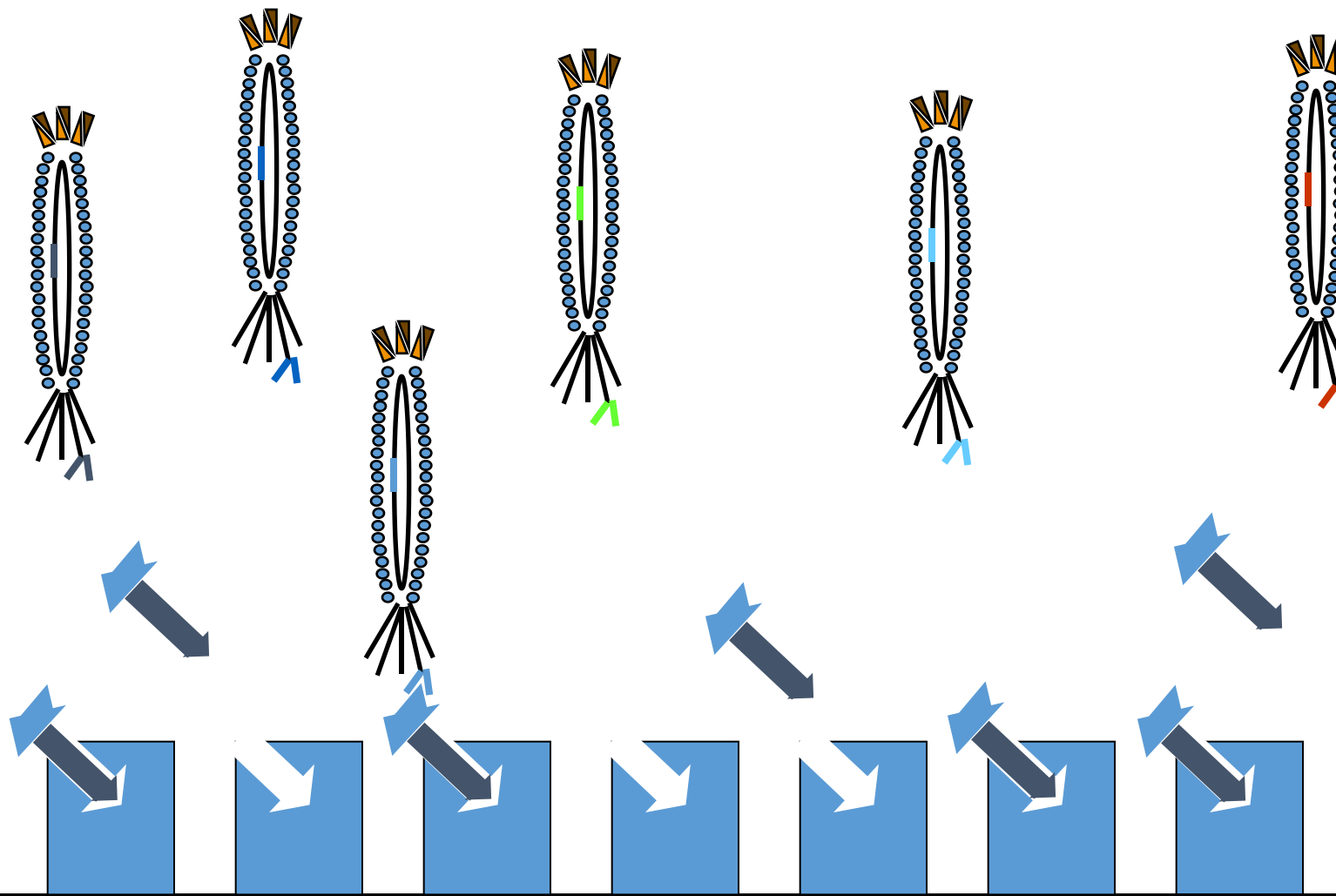
避免固化抗原造成的结构改变

Bind to Streptavidin

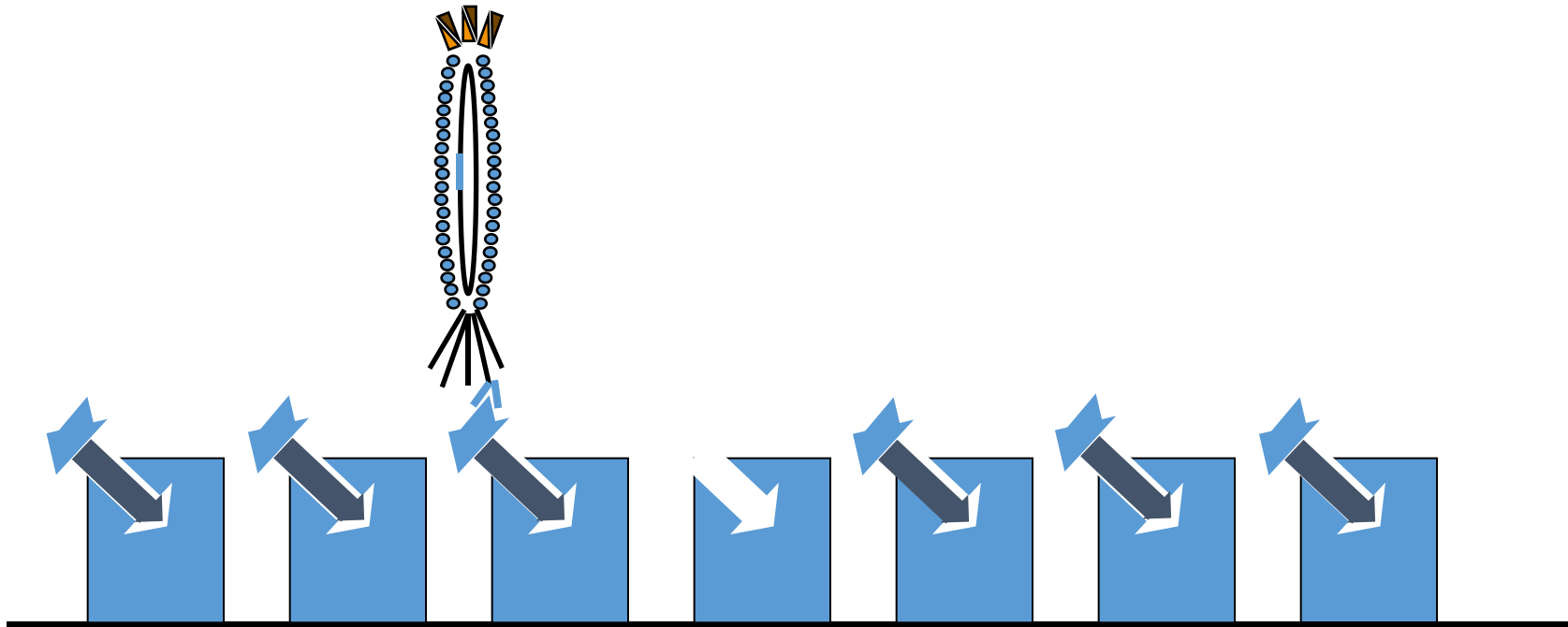
结合链霉素



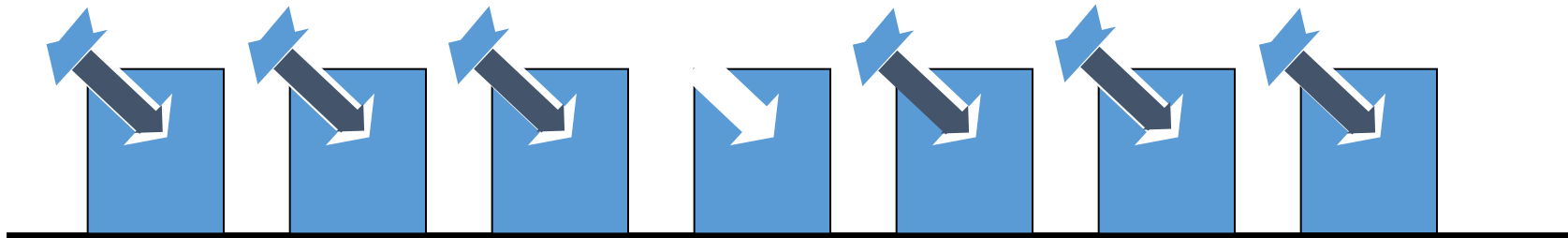
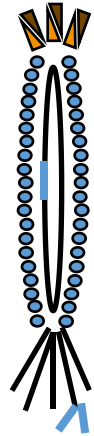
coated microtitre wells



Wash to remove unbound phage particles



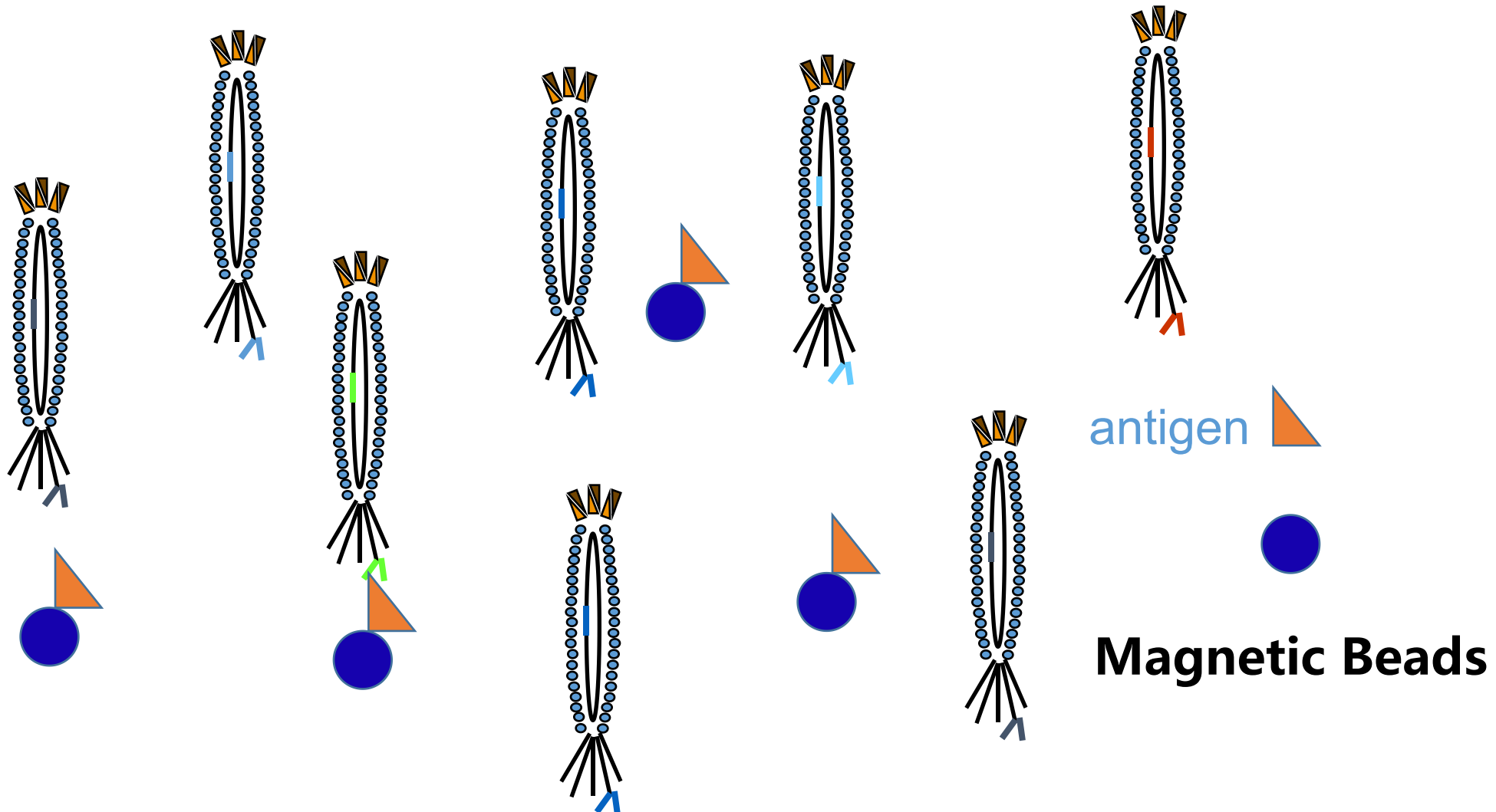
Elute bound phage



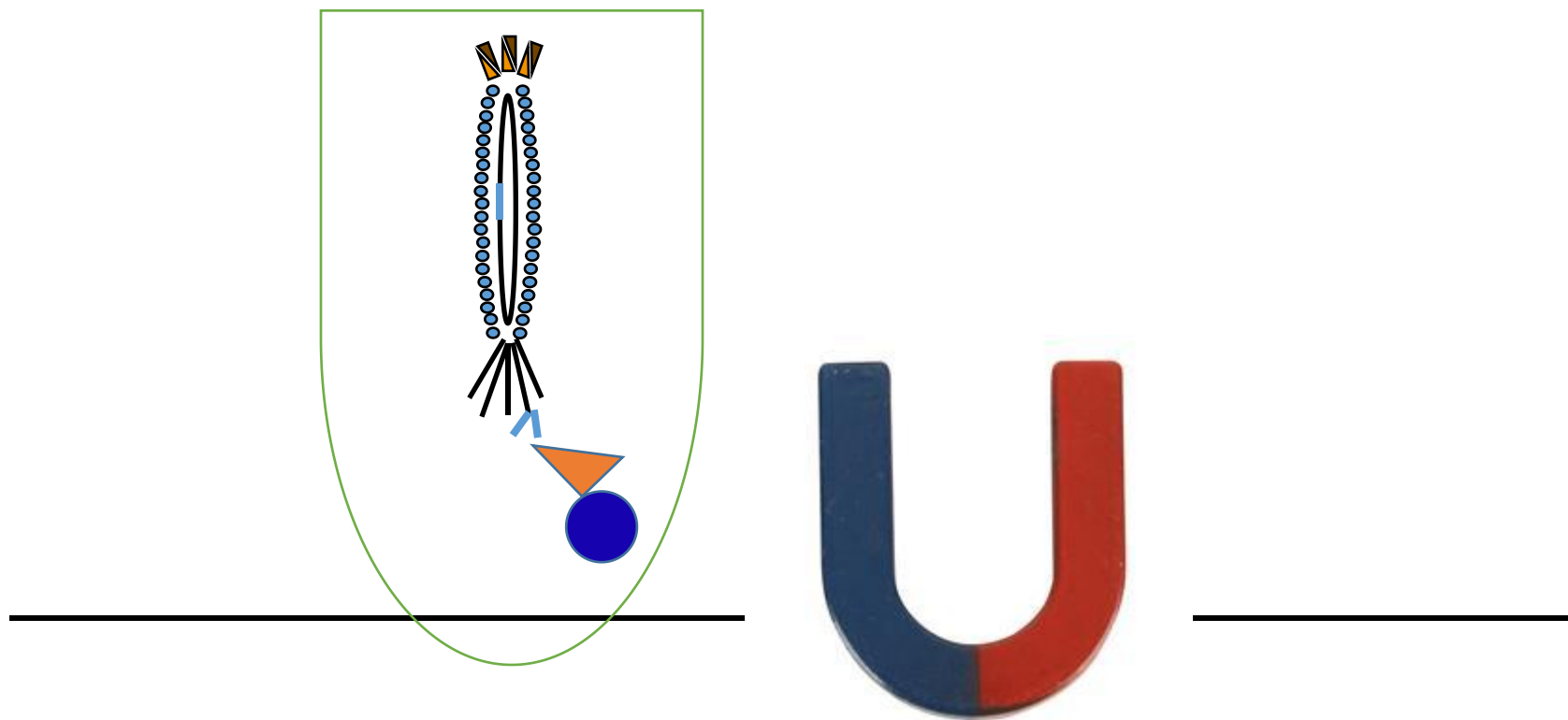
3. Solution phase selection with Magnetic Beads

用磁珠连接的筛选

避免固化抗原造成的结构改变



捕获噬菌体



磁珠收集后，可以直接进行生物学实验

4. Solution phase selection with Mouse

动物体内筛选

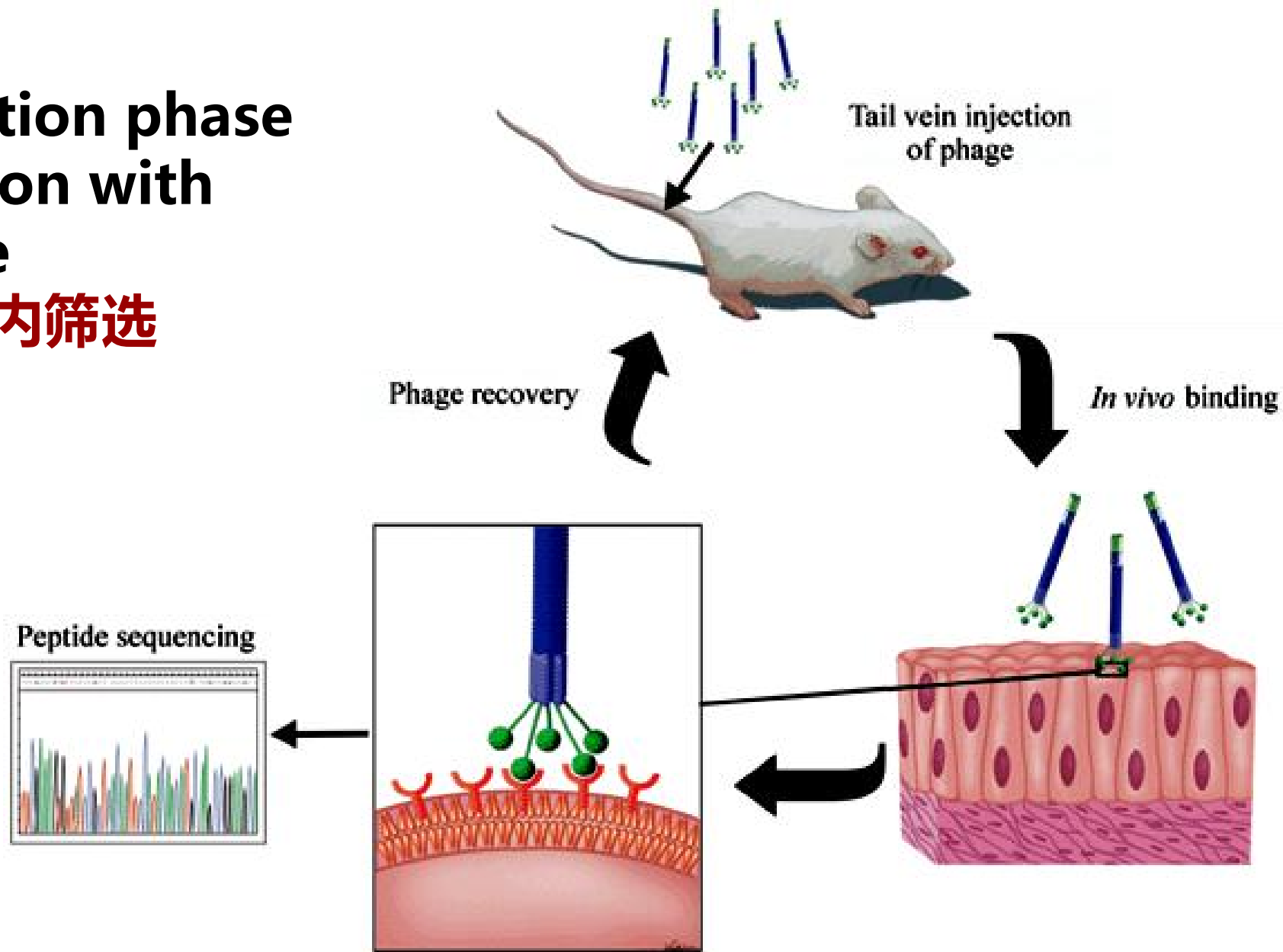
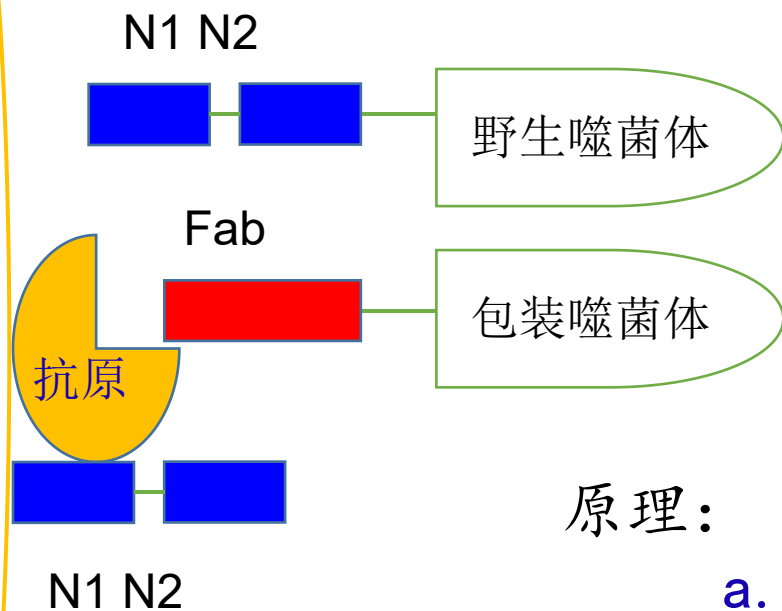


Figure 2 - *In vivo* use of phage libraries. Initially the phage library is injected in the circulation. Next, phage is allowed to circulate for minutes or hours (in this case when internalized phages are to be recovered). Finally , after deep anesthesia, mice are euthanized and the organs are dissected for phage recovery and peptide sequencing.

5.功能性筛选

- 原理：利用抗原抗体结合后所引发的**生物学效应**来进行筛选
- 目标：受体交联、信号传导、内吞、转基因、催化、中和抗体等
- 例：携带绿色荧光蛋白（GFP）报告基因的噬菌体内吞后，流式细胞仪分选GFP阳性细胞

5.1 选择性感染筛选 (selectively infective phage, SIP)



1) 以噬菌体感染能力的恢复与否来筛选

原理:

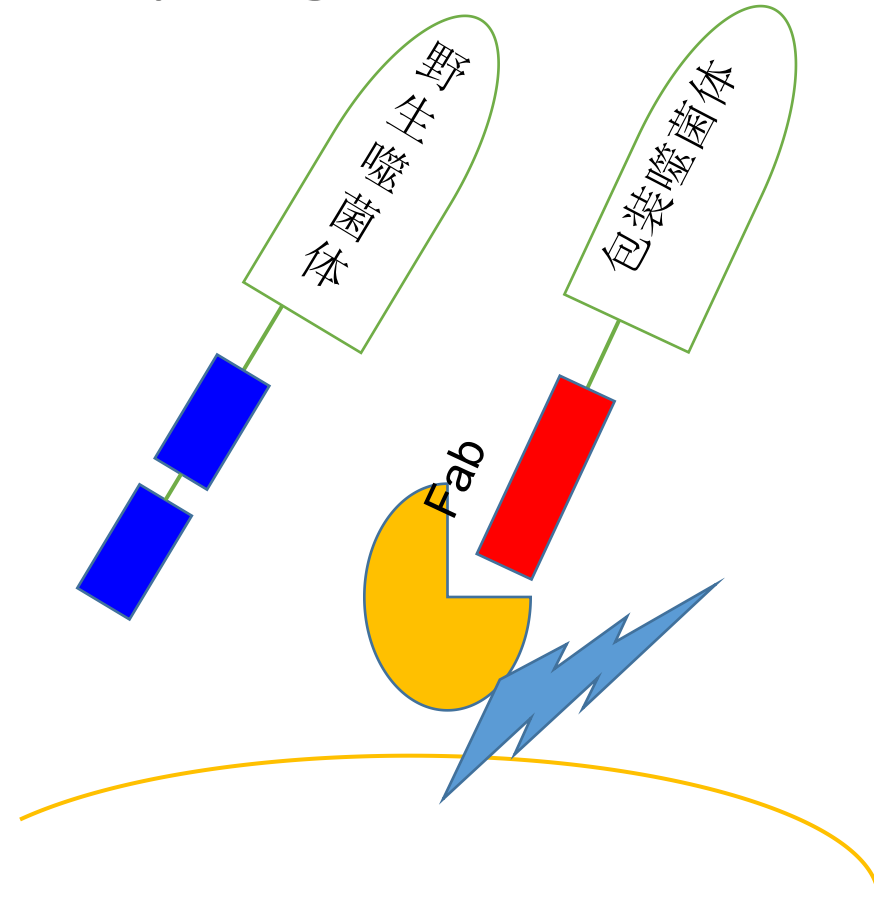
a. 将抗体蛋白代替噬菌体外壳蛋白P3的N1、N2端结合区域，使噬菌体丧失感染能力。而抗原与P3蛋白N端相连；只有抗原抗体结合的时候，噬菌体才能获得感染力。

(噬菌体+宿主)

5.1 选择性感染筛选 (selectively infective phage, SIP)

- 以噬菌体感染能力的恢复与否来筛选

b. 将抗原融合在大肠杆菌（感染宿主）的性纤毛上，使性纤毛失去正常的介导能力。仅当所显示的抗体与特异性抗原结合后，才能使噬菌体恢复感染能力，进入宿主细胞内增殖。（宿主）



5.2 延迟感染筛选 (delayed infectivity panning, DIP)

- 将细菌表面展示技术与噬菌体展示技术相结合
- 原理：
 - (1) 抗原与细菌外膜蛋白A的融合表达；
 - (2) 低温下，将细菌和噬菌体孵育 (F^+ *E. Coli*在低温下不表达F纤毛；而纤毛对与噬菌体感染是必要的)
 - (3) 低温洗脱未结合的噬菌体
 - (4) 当噬菌体被捕获及淘选后，细菌被转移入 37°C 培养环境，使F纤毛表达，噬菌体恢复感染能力。

排除抗原抗体结合以外的非特异性结合

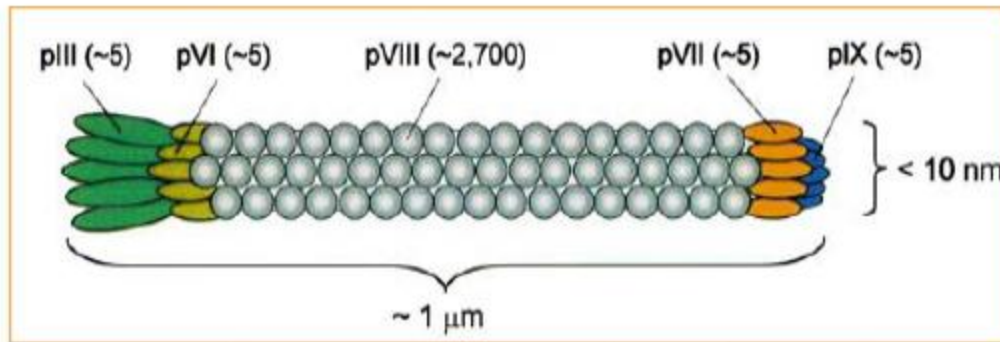
SIP和DIP优点

- 筛选的细菌和噬菌体繁殖的环境相同，筛选和扩增可在同一批细菌上进行（不需要收集噬菌体再感染宿主菌进行克隆和表达）
- 通过细菌外膜蛋白 A展示的抗原与噬菌体抗体结合的能力较直接将抗原包于固相表面好（更天然的构象易于显示天然表位）
- DIP中所用的抗原或配体的浓度相对较低，适于稀有克隆在大文库中的筛选
- 不必经过亲和筛选与洗脱

丝状噬菌体抗体展示系统的构建

1. 丝状噬菌体生物学

- ☛ 丝状噬菌体：M13、f1和fd。
- ☛ 单链DNA病毒，6407bp。
- ☛ 基因组编码11种蛋白质，其中5种为结构蛋白质。与展示密切相关的有两种结构蛋白质。
- ☛ DNA在细菌内滚环复制，细菌不被裂解，但生长速度减慢，并且分泌大量噬菌体颗粒



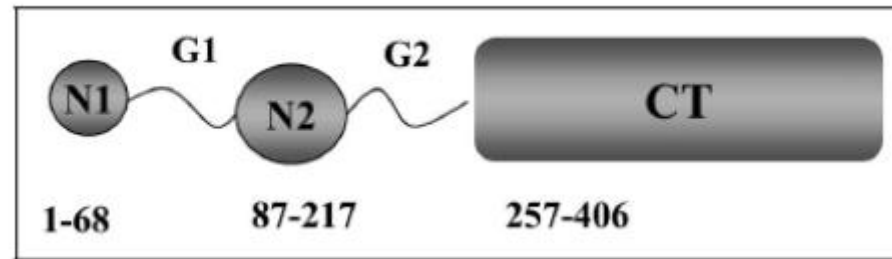
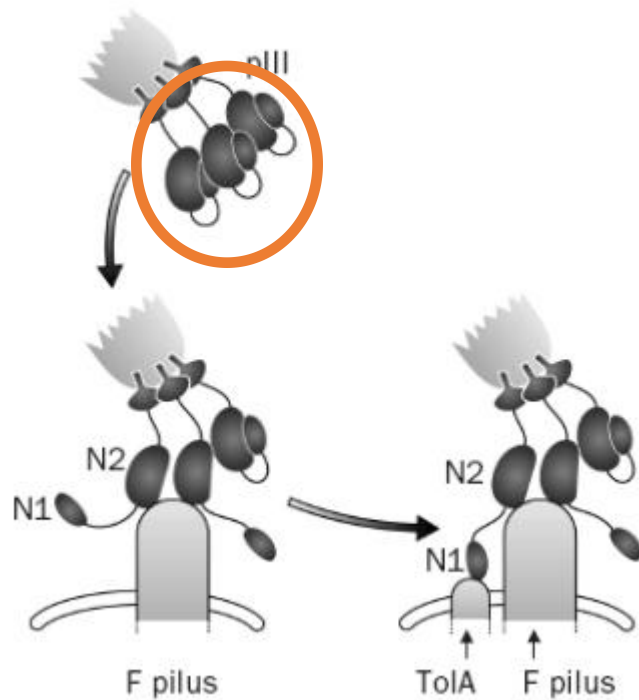
Schematic representation of M13 Phage

Protein	Number of amino acids	Molecular weight	Copies per phage	Type of display
P3	406	42,500	~5	N or C
P6	112	12,300	~5	C
P7	33	3,600	~5	N
P8	50	5,200	~2,700	N or C
P9	32	3,600	~5	N

1.1 噬菌体展示所使用的衣壳蛋白

次要衣壳蛋白pIII

MARJORIE RUSSEL ET AL.



- 406aa组成，5个拷贝，位于噬菌体的尾部。
- 伸出噬菌体表面，不影响抗体的构成
- 一般一个噬菌体只能有一两个COPY的外源抗体，所以与抗原单价结合，能够与抗原结合的，都是亲和力很高的抗体。
- 用于筛选单价高亲和力抗体。

主要衣壳蛋白pVIII

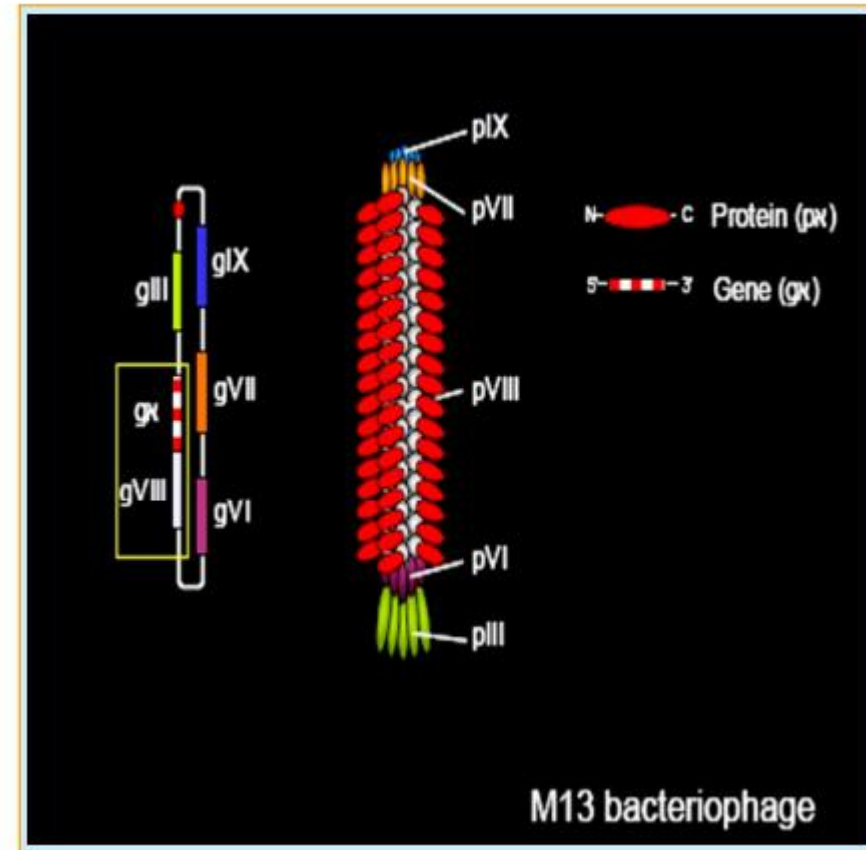
基于噬菌体gVIII蛋白的载体

pVIII为主要的壳蛋白

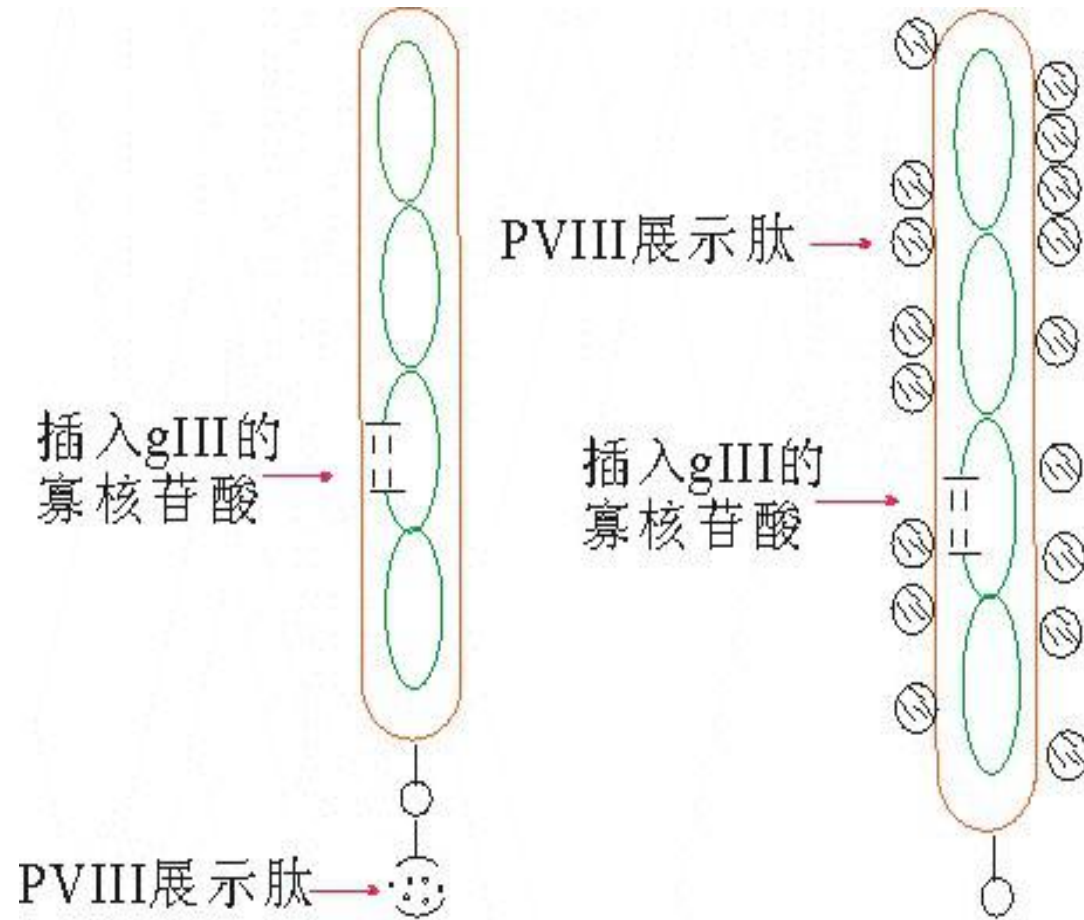
表面可以有2700个copy

因此抗体与抗原的结合类似于
多体多价抗体与抗原的结合。

筛选出的抗体为多价抗体，一
般为低亲和力抗体（IgM）。

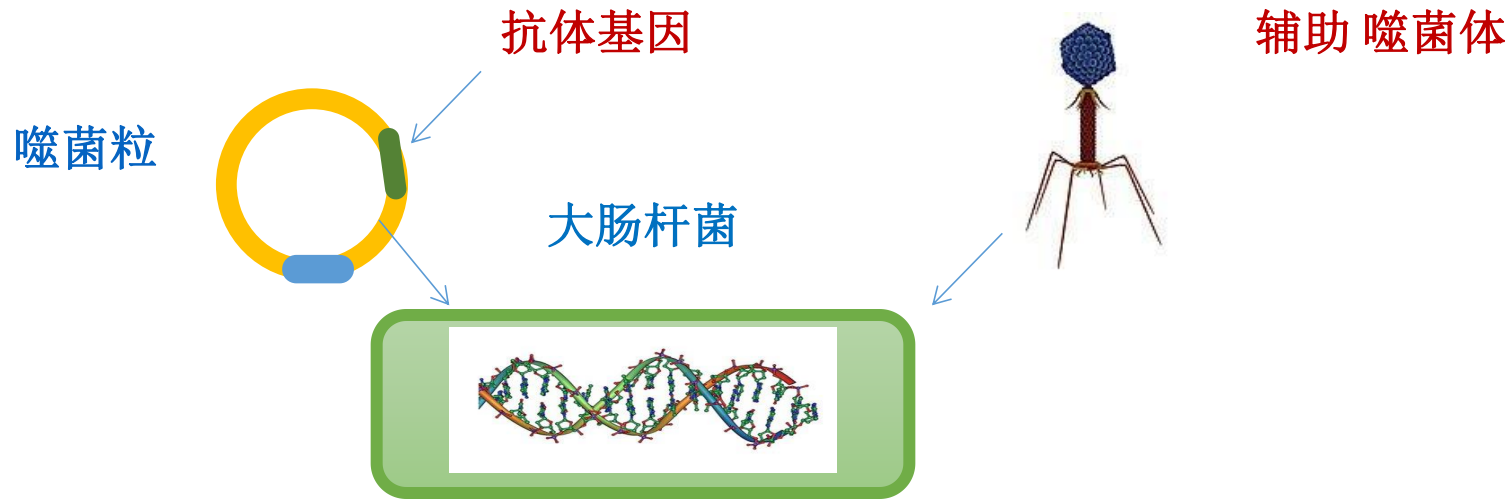


M13噬菌体pIII和pVIII的展示



pIII与pVIII展示模式

2. 噬菌体表达载体的构建和连接



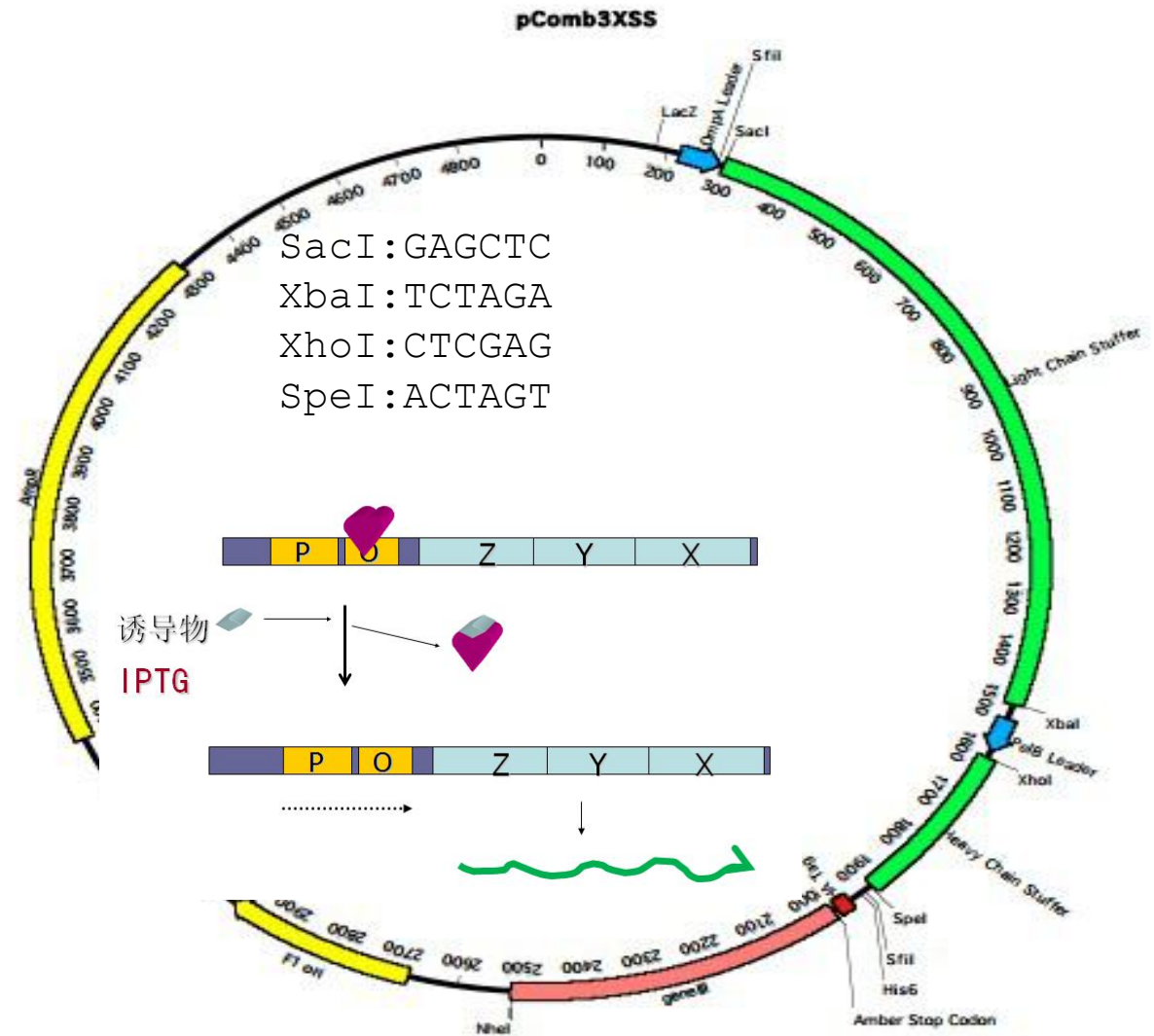
- 噬菌粒 (phagemid) : 是含有丝状噬菌体基因间隔区的质粒载体。
- 本身不含有噬菌体编码蛋白基因，在宿主中不产生子代噬菌体，但在辅助噬菌体超感染下，可包装成成熟颗粒，并释放、感染新的宿主。
- 若在phagemid中克隆入抗体基因，可得到噬菌体抗体。
- Phagemid在DNA重组操作上比较简单，且所建库容量大。

2.1 噬菌粒与辅助噬菌体

通常用于噬菌体展示的载体有两类：
即噬菌体载体和噬菌粒载体。

噬菌粒具有一下令人瞩目的特征：
1. 双链DNA既稳定又高产，具有常规质粒的特征；
2. 免除了将外源DNA片段从质粒亚克隆于噬菌体载体这一繁琐又费时的步骤；
3. 由于载体足够小，故可得到长达10kb的外源DNA区段的单链。

噬菌粒包含一个gII基因的1G区



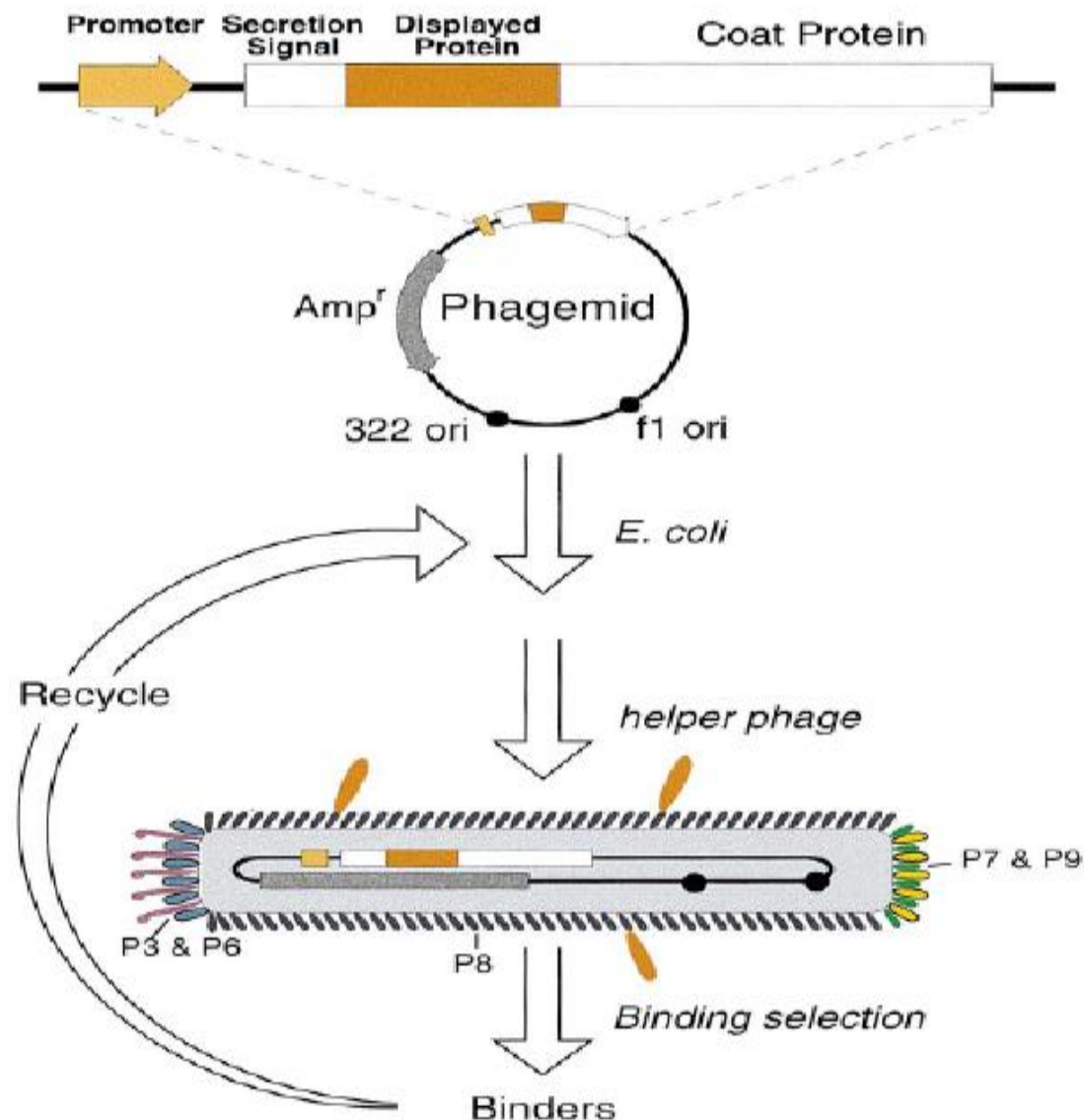
2.2 Helperphage

Helperphage: 提供噬菌体质粒复制、合成ssDNA和病毒包装所需要的所有蛋白和酶（除了gII的1G区）。

如果没有Helperphage，噬菌粒就像质粒一样进行扩增。

有了Helperphage，包装后的噬菌体含有两种不同来源的成分：
噬菌体质粒和Helperphage。

当有噬菌质粒时，由于噬菌质粒含有野生型M13或者f1复制起始点，因此，单链噬菌质粒的DNA会被优先包装并分泌。



常用的噬菌粒载体

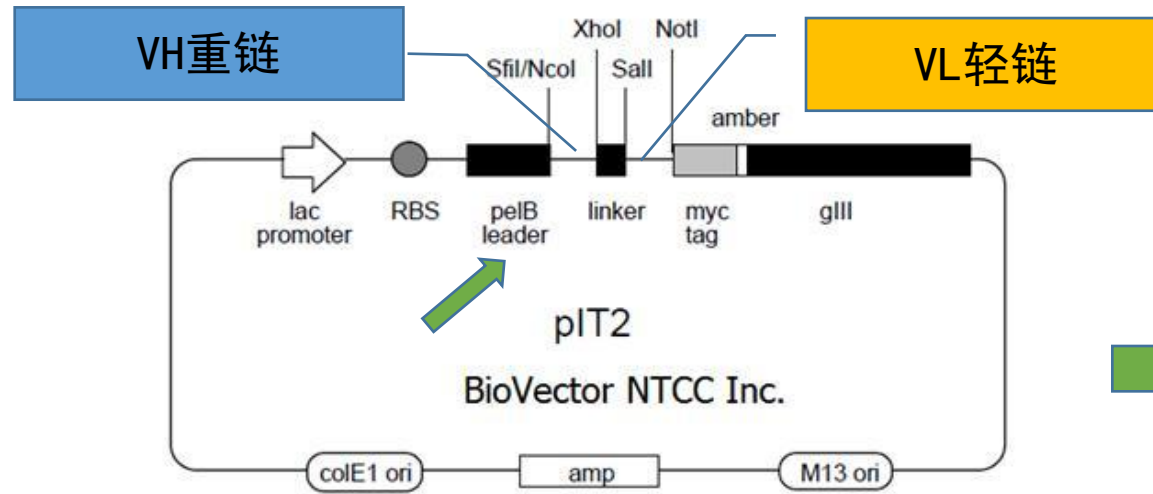
背景载体	phagemid
λ ZAPII	SurfZAP
pBluescript	pComb3、 pComb8、 pCBAK8
pUC	pHEN1、 pCANTAB
pDS31-1	PSEX
pUC、 PGC1	pTac cp
pSW1	pEXmide3

3. 噬菌体抗体库的构建

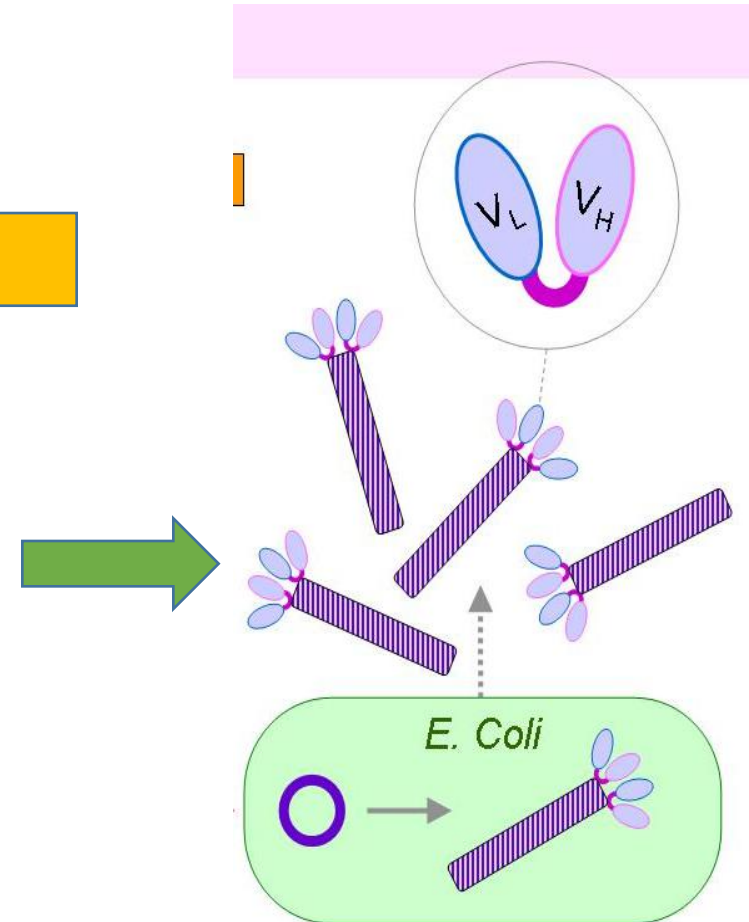
- 因为抗体是由轻链和重链组合组成，因此抗体库中轻链和重链的正确组合尤其重要。
 - Fab抗体库
 - ScFV抗体库
 - 组合感染抗体库

噬菌体抗体库构建模式

(ScFv抗体库的构建)

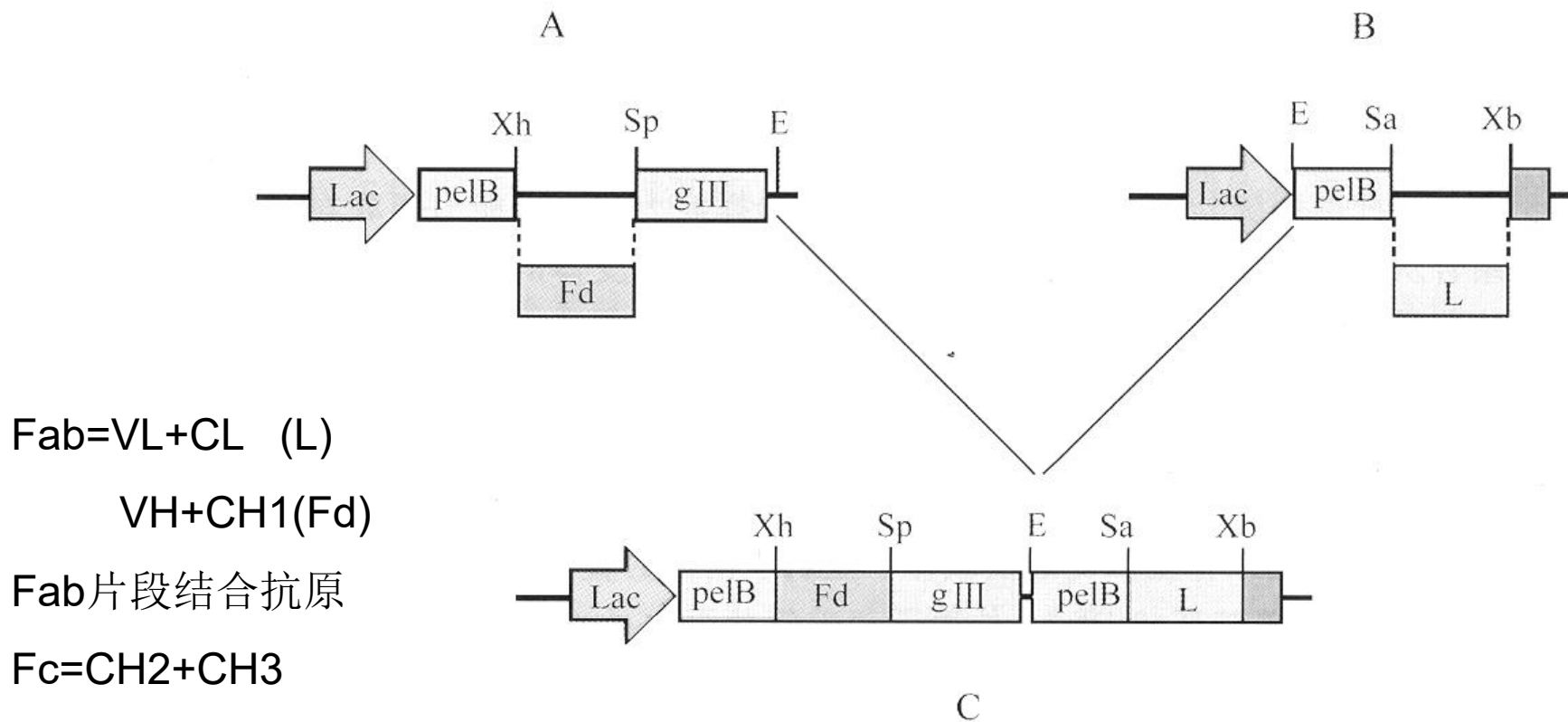


PeIB前导序列有助于将抗体引导到细胞外周质腔进行折叠，有助于产生活性产物，并且避免细胞内毒性。



噬菌体抗体库构建模式

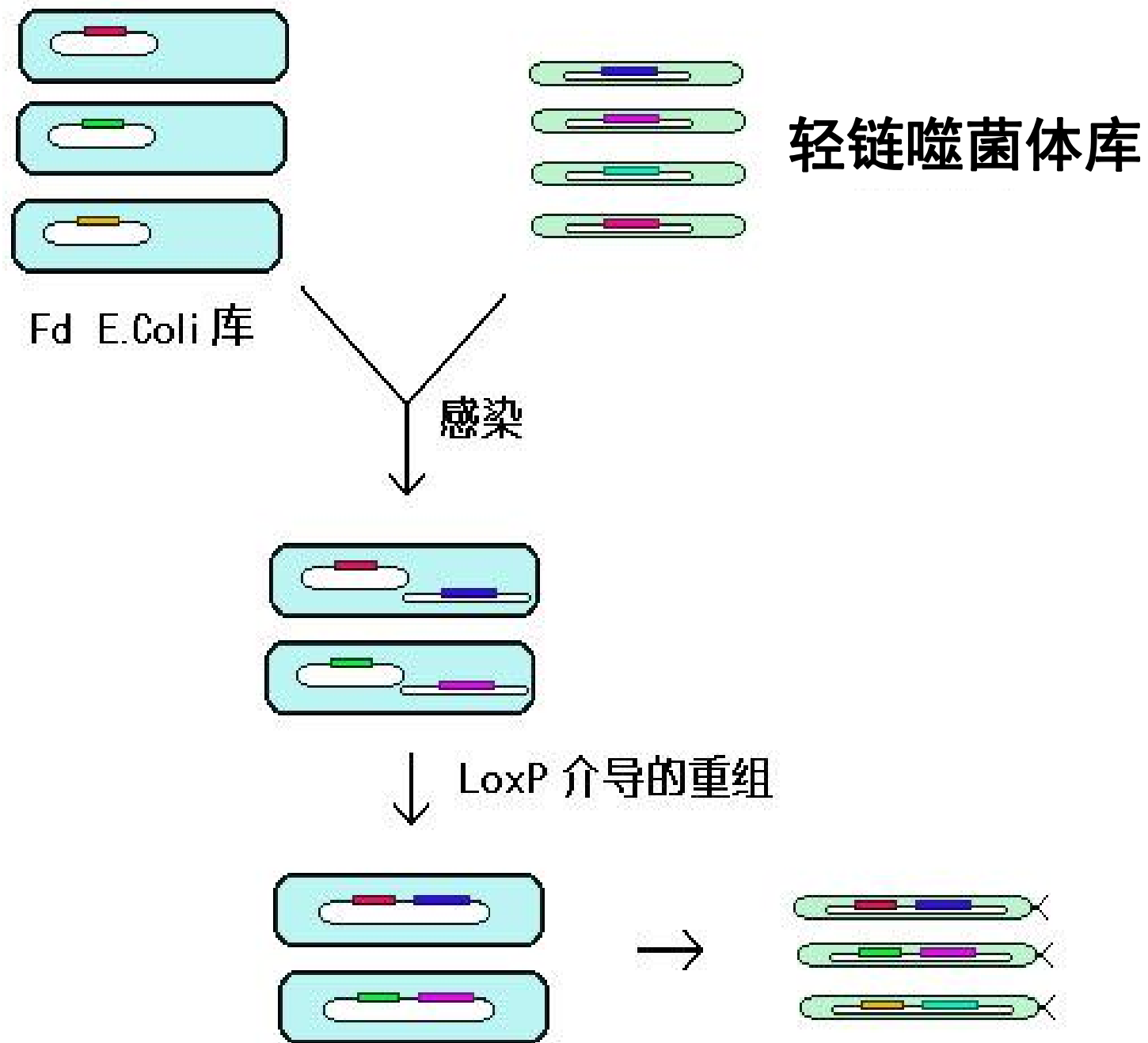
(Fab抗体库的构建)



组合抗体库的表达载体

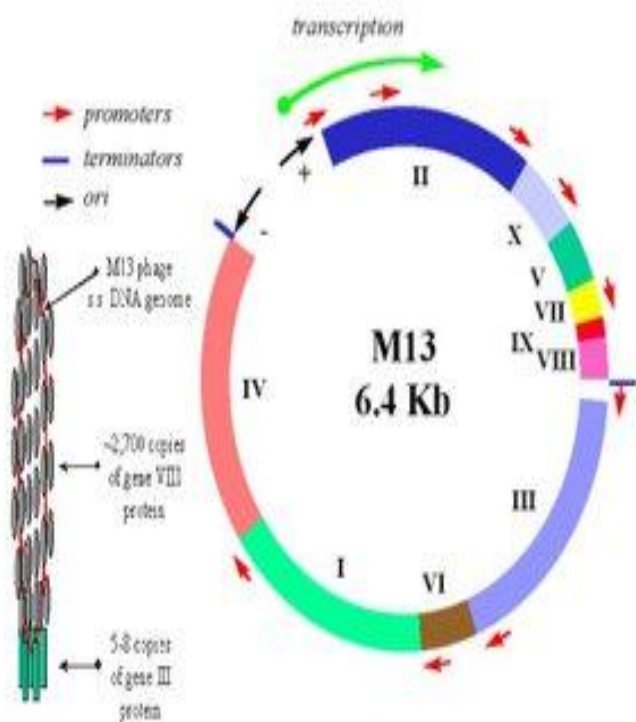
A: 重链载体 B: 轻链载体 C: 组合后的Fab段表达载体

组合感染法构建抗体库



4. 噬菌体抗体的表达

除了呈现在噬菌体表面进行抗体的筛选，噬菌体库还可以进行可溶性表达。



改变融合表达状态

抗体基因

PIII

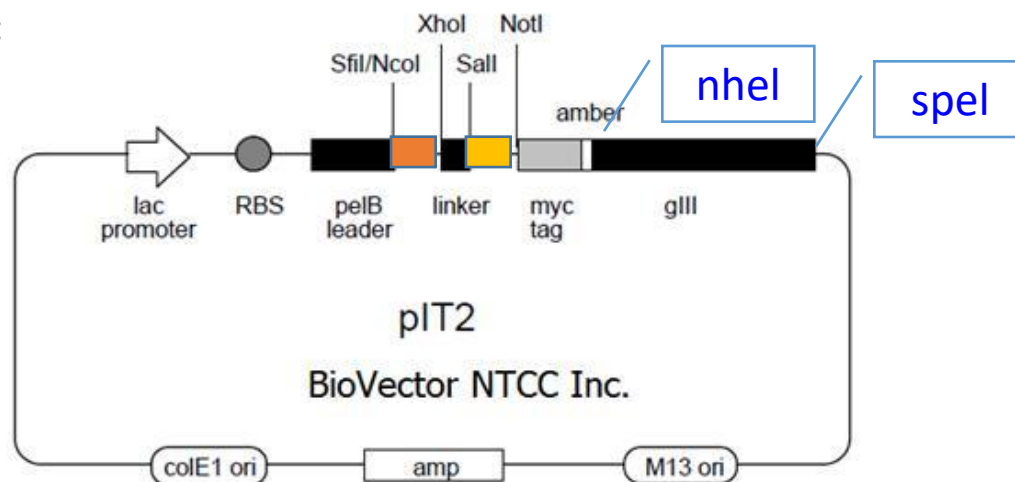
PVIII

去除噬菌体外壳展示蛋白

4. 噬菌体抗体的表达

- 除了呈现在噬菌体表面进行抗体的筛选，噬菌体库还可以进行可溶性表达。

思路1:

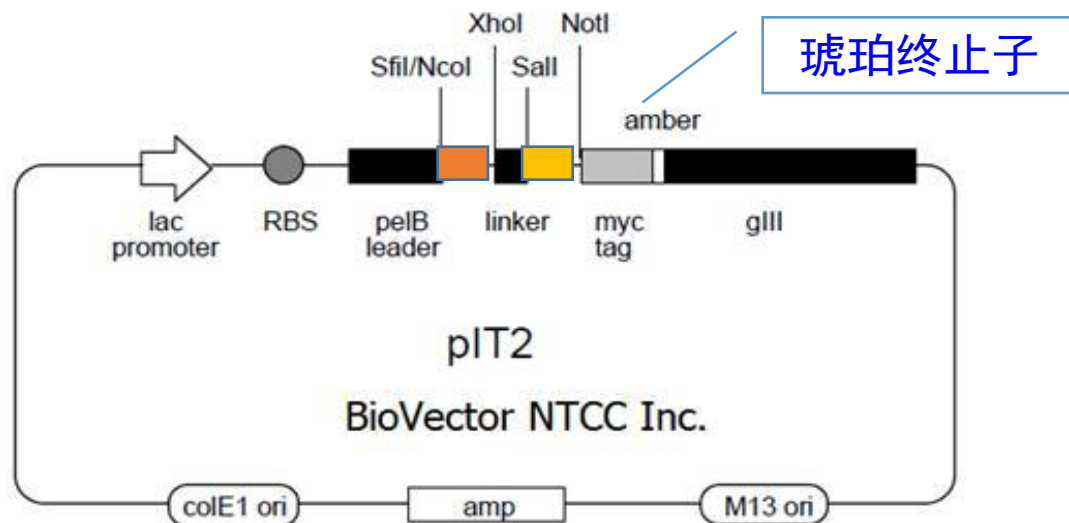


对噬菌粒进行表达载体样改造，包括启动子，核糖体结合位点等等表达原件

将噬菌体外壳蛋白的两段设计了 **speI** 和 **nheI** 两个酶切位点，通过内切酶即可将外壳基因切除，利用切除之后产生的粘性末端，可以重新自连成为环形质粒，该质粒进入大肠杆菌之后，即可进行抗体的单独表达。

噬菌体抗体的表达

图 2.



在抗体基因的末端设置琥珀终止子。

进行抗体淘选的时候：

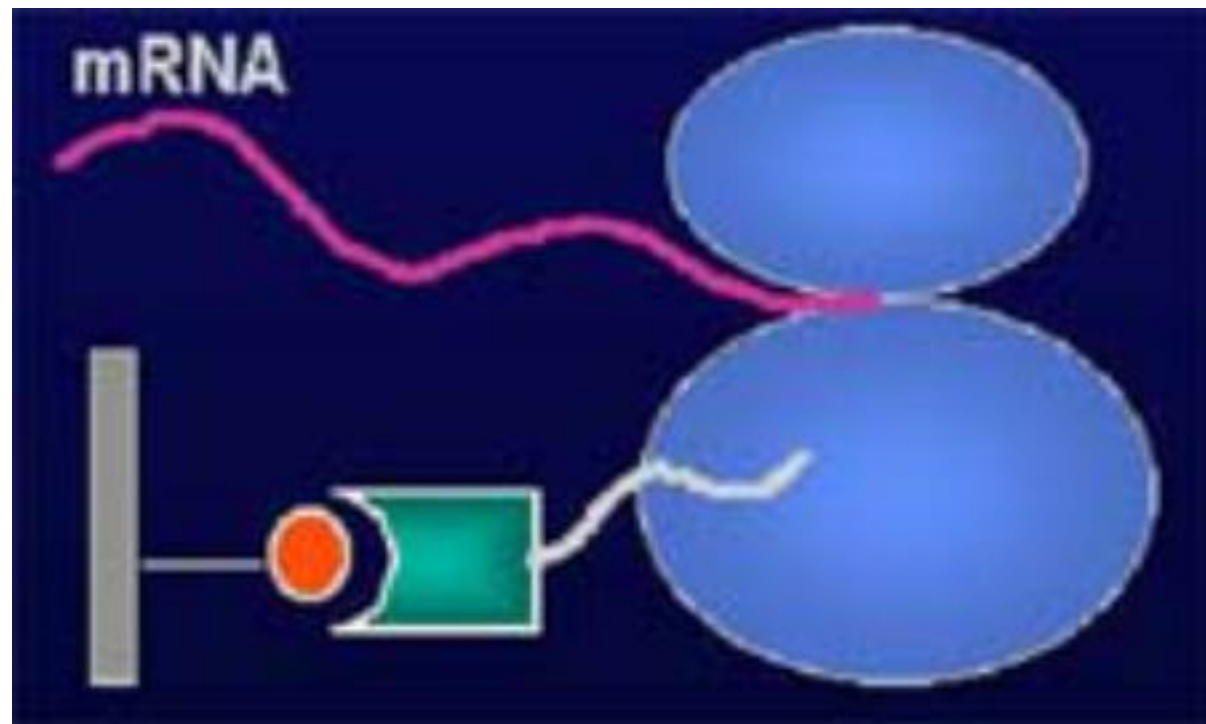
使用不带有琥珀抑制基因XLBlue的宿主菌：**抗体和GIII串联融合表达**

抗体表达的时候：

使用琥珀抑制基因XLBlue+的宿主菌：抗体表达，GIII不表达

● 谢谢！

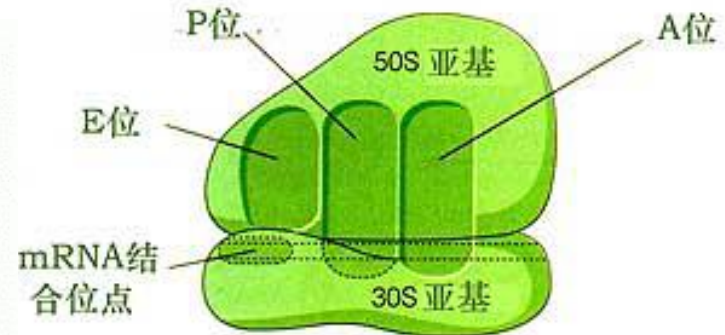
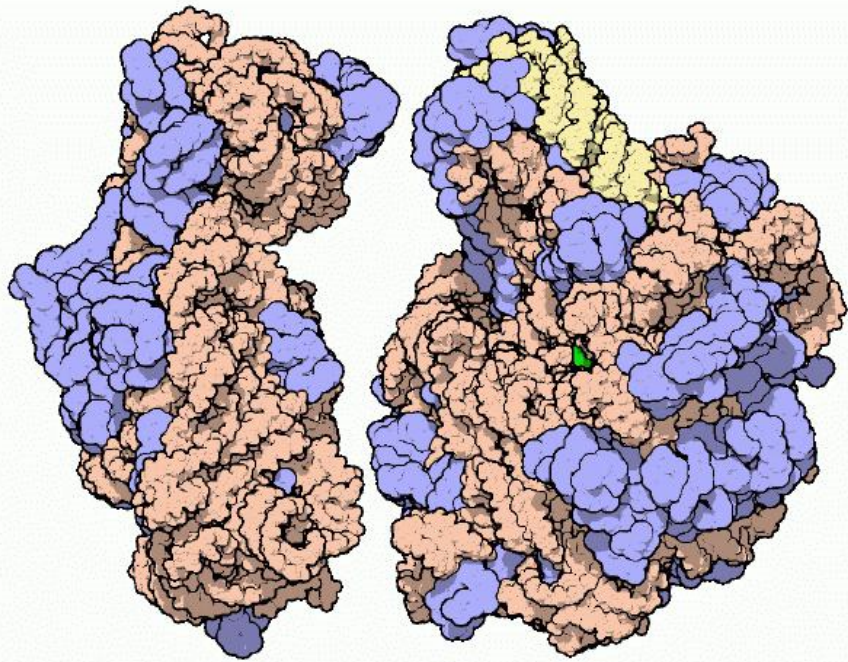
核糖体展示抗体库技术



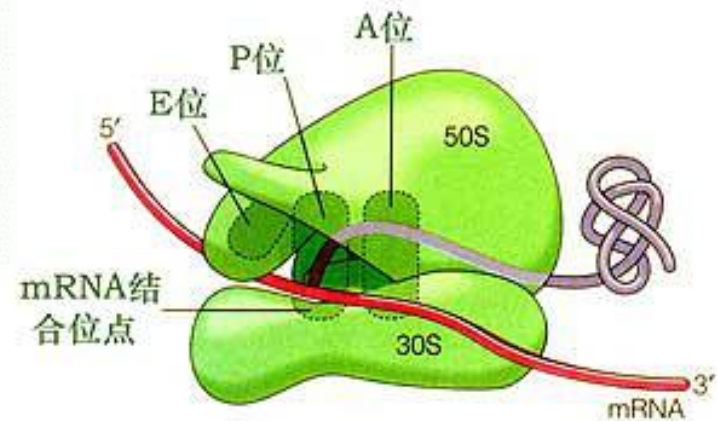
第四节 核糖体展示抗体库技术

- 以噬菌体展示抗体库技术和SIP抗体库技术为代表的体内筛选抗体库技术具有一些共同缺点：
- 在构建抗体库时，由于必须经过细菌转化的步骤，抗体库的容量将受到转化效率的限制（一般不超过 10^{10} ）； Pmol级
- 某些候选抗体分子的表达会抑制宿主菌 (*E. coli*) 的生长，甚至具有毒性，这样在进行亲和筛选之前，这些候选抗体分子的克隆即已经丢失；
- 在进行噬菌体展示的亲和筛选时，具有极高亲和力 (picomolar级) 的抗体分子与抗原结合后，很难被洗脱下而丢失；
- 在进行抗体分子定向进化时，除了受到库容量的限制之外，基因突变与表型筛选之间的转换也很烦琐。

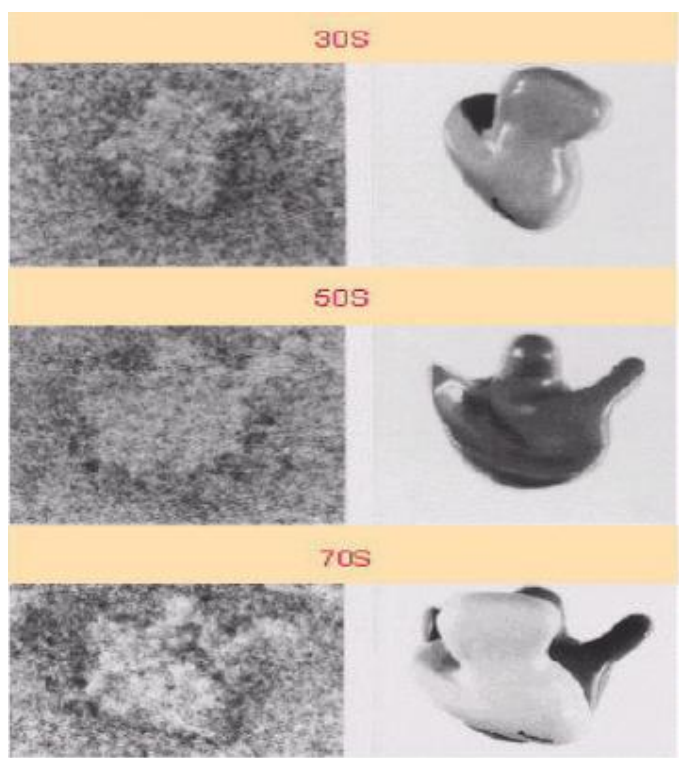
核糖体——蛋白质合成场所



(a)



(b)

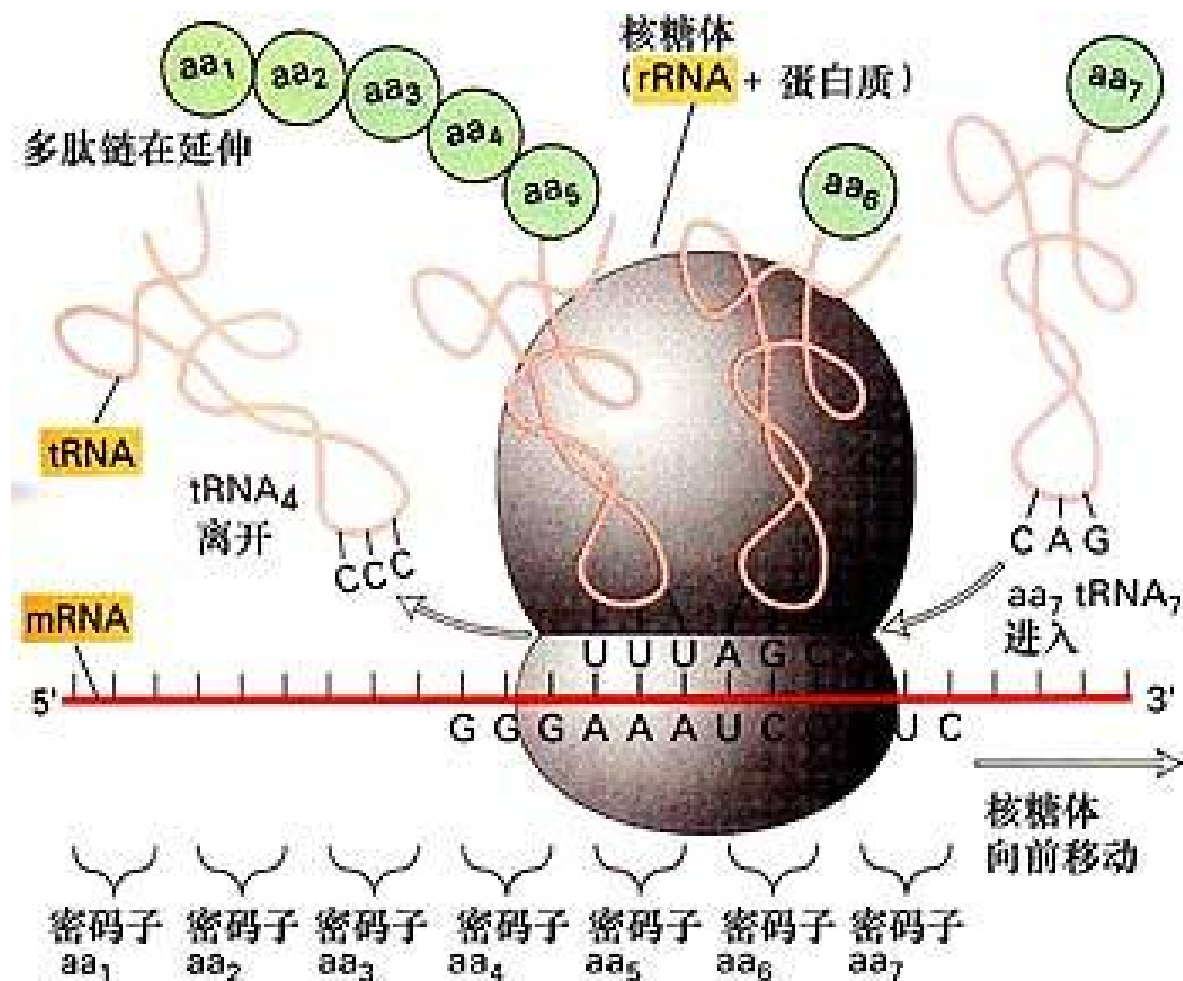


核糖体	tRNA	蛋白质
细菌 50S 30S 70S 质量 2.5 MDa 66% RNA	23S = 2904 bp 5S = 120 bp 16S = 1542 bp	31 21
真核生物 60S 40S 80S 质量 4.2 MDa 60% RNA	28S = 4718 bp 5.8S = 160 bp 5S = 120 bp 18S = 1874 bp	49 33

蛋白质合成的基本过程

- 起始
- 延长
- 终止

在翻译的时候，核糖体—蛋白质—mRNA有三位一体的时候



核糖体展示的定义及原理

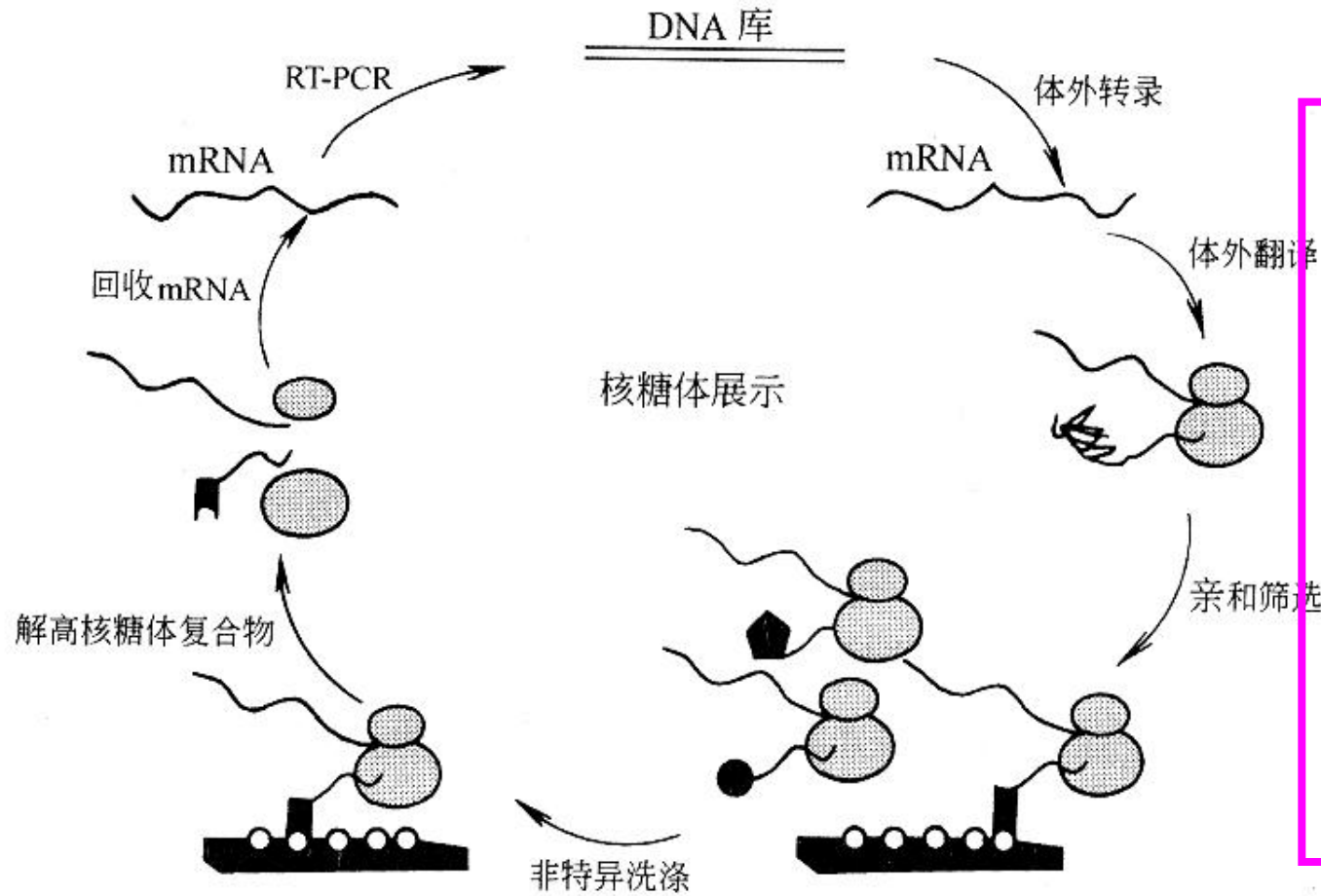
核糖体展示技术(Ribosome Display Technology, RDT)

是一种利用功能性蛋白相互作用进行筛选的新技术，它将正确折叠的蛋白及其 mRNA 同时结合在核糖体上，形成 mRNA-核糖体-蛋白质三聚体，使目的蛋白的基因型和表型联系起来，可用于抗体及蛋白质文库选择、蛋白质体外改造等。运用此技术已成功筛选到一些与靶分子特异结合的高亲和力蛋白质，包括抗体、多肽、酶等，是蛋白质筛选的重要工具。

核糖体展示技术的技术思路

1. 将编码蛋白的DNA在体外进行转录与翻译；
2. 并对DNA进行特殊的加工与修饰（去除核糖体蛋白质和mRNA解离的能力），从而形成蛋白质-核糖体-mRNA 三聚体；
3. 然后通过靶蛋白的特异性结合筛选出，对筛选分离得到的复合物进行分解；
4. 释放出的mRNA 进行逆转录酶链聚合反应(RT-PCR)， PCR产物进入下一轮循环，经过多次循环，最终使目标蛋白和其编码的基因序列得到富集和分离。

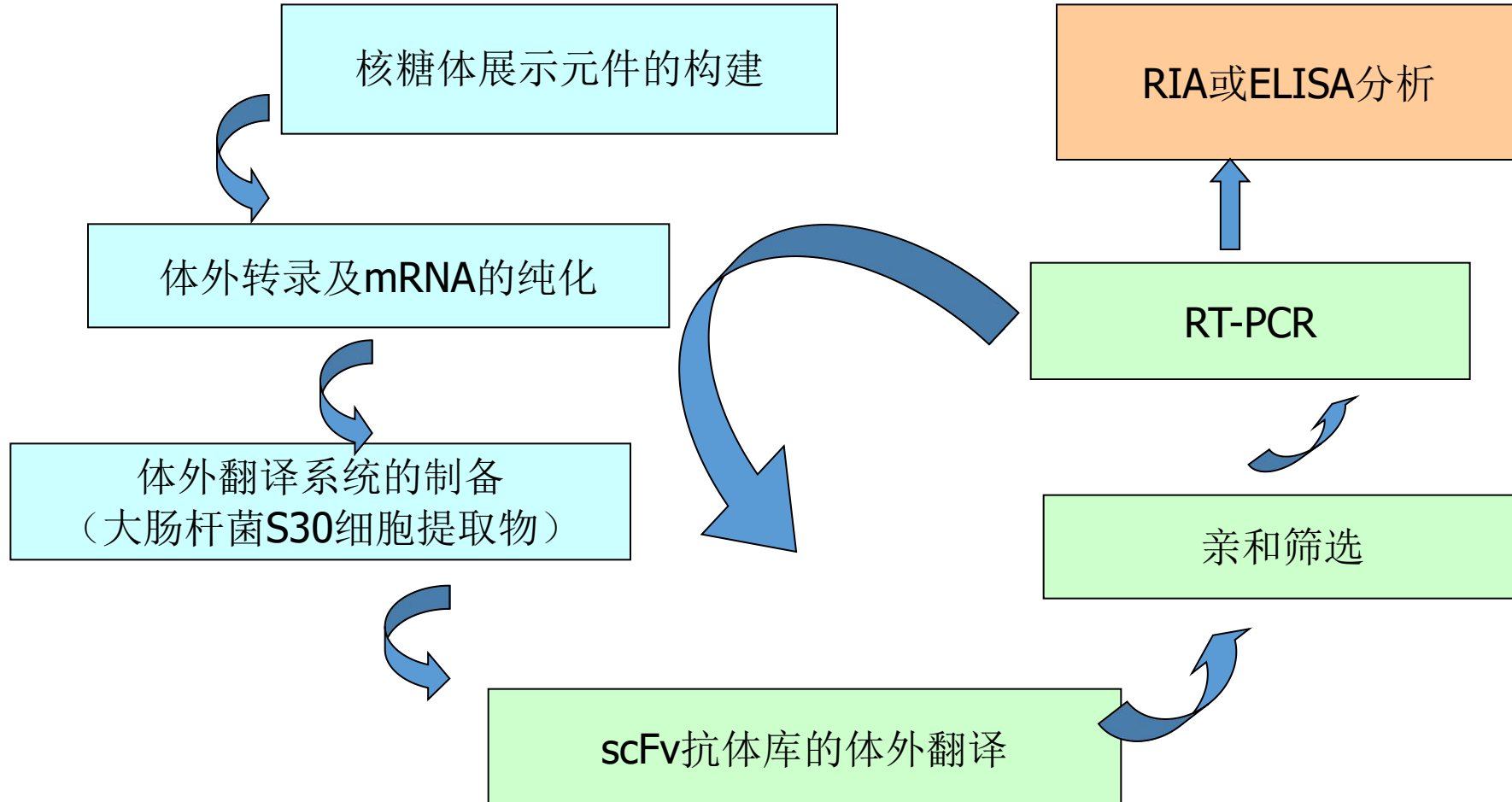
核糖体展示技术的基本原理



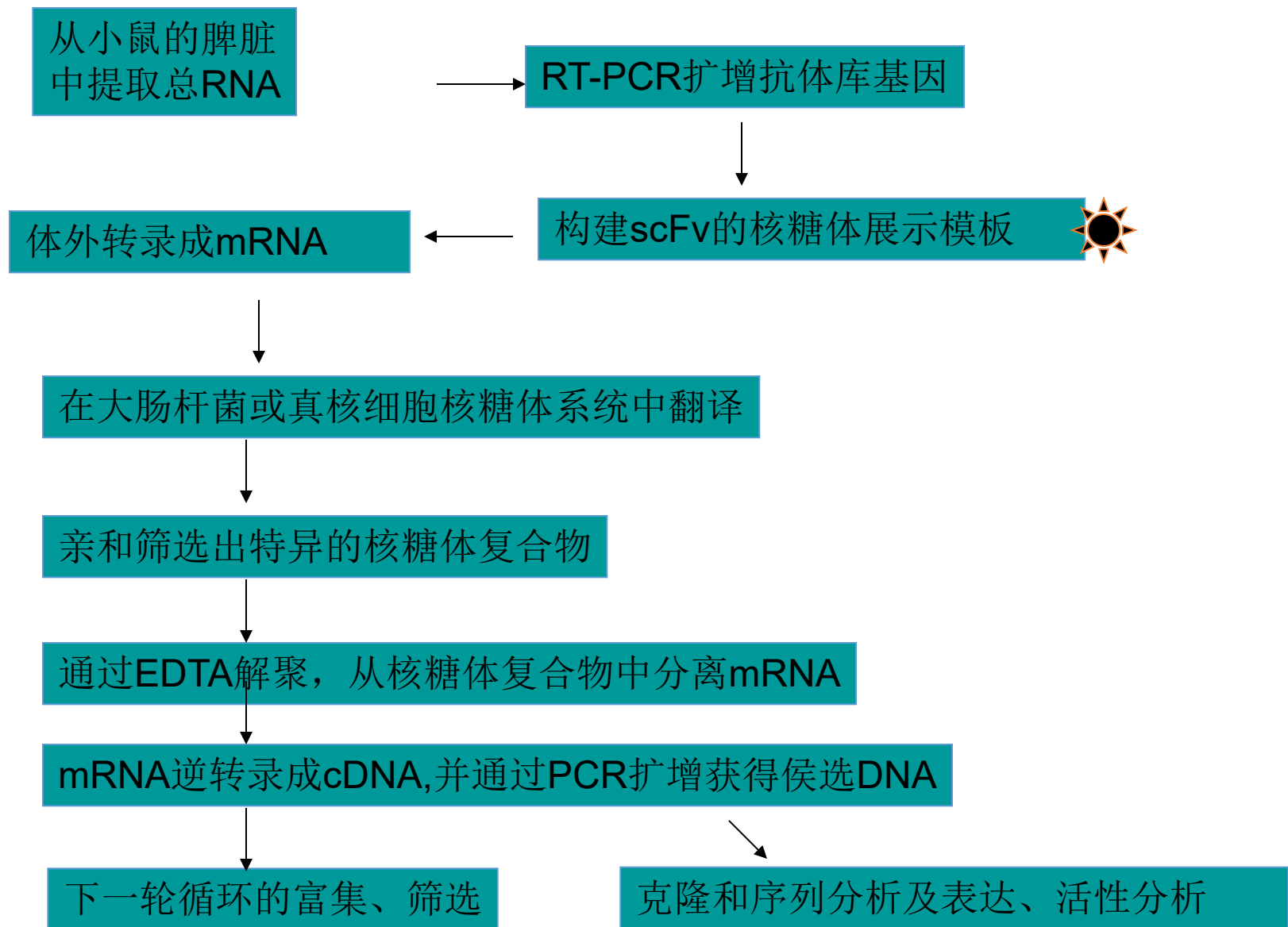
1. 体外转录
2. 体外翻译
3. 复合物筛选
4. 洗脱
5. 扩增

蛋白质-核糖体-mRNA 三聚体

3、RD展示技术操作步骤



核糖体展示技术构建及表达scFv基本步骤



技术方法

- 1) 基因片段的改造

为了使基因片段能有效转录和翻译, 5' 端应接上T7启动子序列和SD序列, 去掉3' 端的终止密码子, 从而成功地使核糖体停留在mRNA3' 末端, 将蛋白质和mRNA连接在一起。

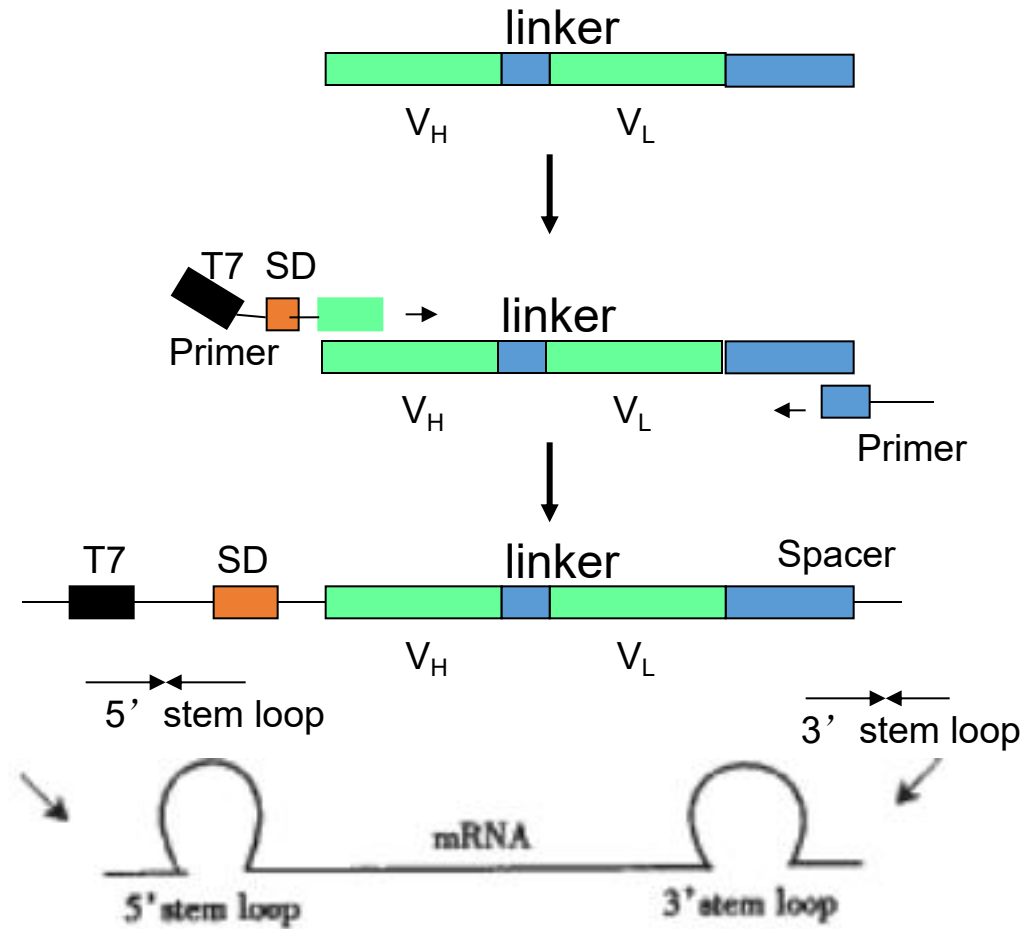
从而形成蛋白质-核糖体-mRNA 三聚体

3.1 主要构建元件的构建

- 在DNA水平，T7启动子，增强体外转录；
- 在mRNA水平，翻译调控序列，如SD；真核中增强子和Kozak保守序列。
- 可读框：要展示的蛋白质（文库）序列；
- 间隔序列：连接、折叠、相互作用；
- 终止密码子的去除：保持复合体；
- 茎环结构(loop):稳定mRNA,防止RNase的降解；
- 10Sa-RNA去除；

- 通过连接或装配PCR方法

scFv的核糖体展示模板构建示意图



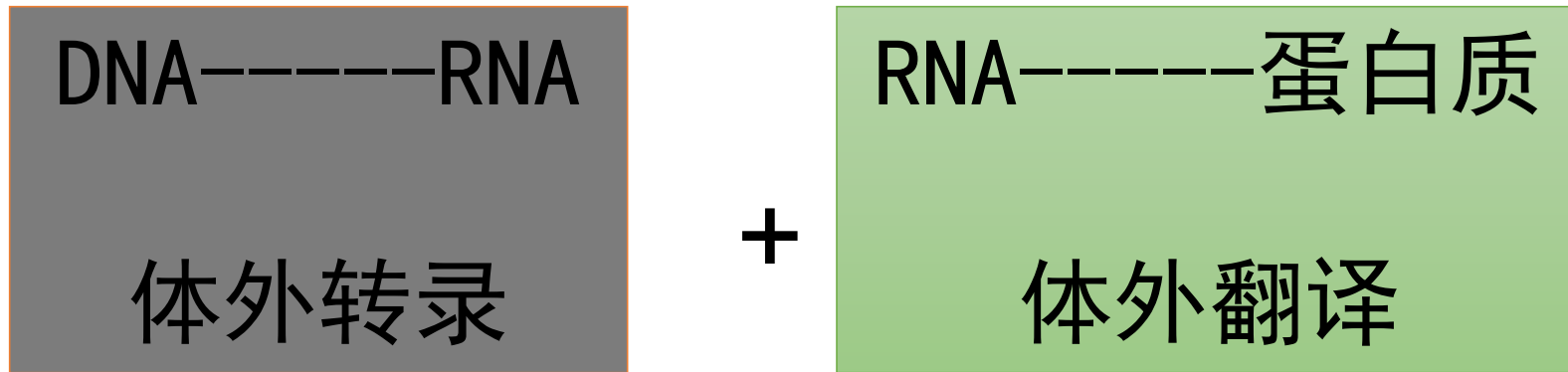
T7: T7 启动子; SD: 核糖体结合位点; V_H 和 V_L 分别为 scFv 片段的可变区; Linker: 接头; spacer: 将折叠的 scFv 连接到核糖体上的间隔序列; stem loop: 指两端的茎环结构; 箭头表明转录起始位点

强调C端的间隔区作用

- 1. 能够将合成的蛋白质连在核糖体上
- 起到ankyrin（锚定）的作用
- 2. 其编码的非结构部分可以使合成的多肽通过核糖体隧道进行正确折叠，并与配体相互作用。

起到形成正确抗体结构的作用

3.2 体外翻译



体外转录与体外翻译可以偶联进行,也可以分别进行.

以DNA为模板的体外表达系统: 偶联表达

以DNA转录为RNA后为模板的体外表达系统: 非偶联表达

3.2 体外翻译

ScFv的体外翻译：

转录时，T7 RNA聚合酶要求具还原性的 β -巯基乙醇维持其稳定性。

翻译时，含有二硫桥的蛋白质要在氧化条件下才能正确折叠。

对于含二硫桥的ScFv抗体和其他蛋白质，转录和翻译应分别进行

3.2 体外翻译

◎翻译系统：

- 大肠杆菌S30细胞提取物
- 兔网织红细胞
- 麦胚

通过大肠杆菌细胞抽提物的酶，加上氨基酸，T7RNA聚合酶，能量物质等等组成的翻译系统，也称为大肠杆菌无细胞蛋白质合成系统

3.2 体外翻译

◎ 翻译条件选择

- 耦联或非耦联：耦联操作简单，但产量偏低；非耦连反之。
- 温度：37°C比较适合
- **时间**：蛋白质合成在30min达到平台期；mRNA的半衰期约为5-10min，大肠杆菌S30系统的最佳时间为7min。
- 影响翻译效率的因素：稳定剂（VRC）能够有效抑制核酸酶，提高展示效率；放线菌酮能够有效终止翻译反应，稳定核糖体复合物；蛋白质二硫化物异构酶PDI能够催化二硫键的形成，增加有功能抗体的合成；

3.3 亲和筛选

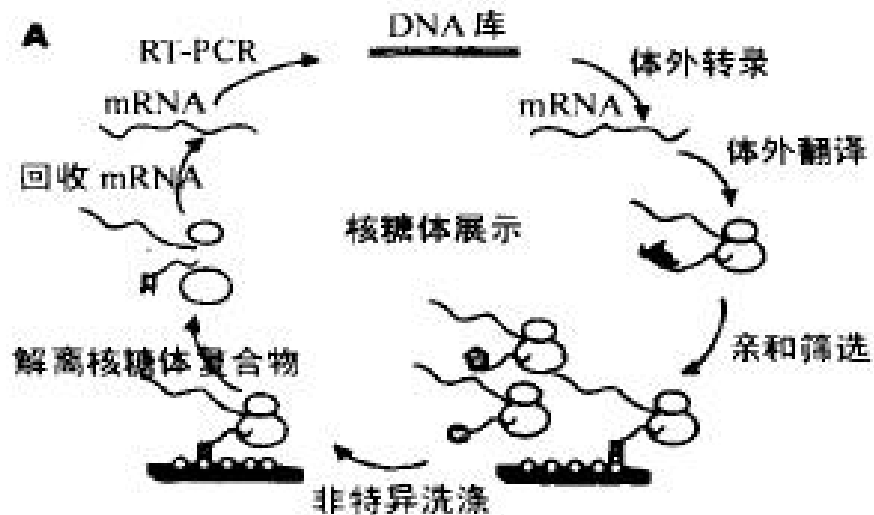
- 固相：
 - ◎风险：靶蛋白在固相表面的部分变性，使筛选获得的抗体不能识别靶蛋白的天然构象
- 液相：将配基用生物素进行标记，再用包被了链亲和素的磁珠进行捕获
- 减少非特异性结合的策略：加入稀释的无菌奶粉或肝素

3.4 洗脱

- 用含镁离子的洗涤液数轮洗涤，除去未结合或弱结合的核糖体复合物
- 再用含EDTA的缓冲液解离复合物，回收复合物中的mRNA
- 也可利用游离的配基竞争洗脱、回收

3.5 扩增

- 分离纯化的mRNA进行RT-PCR, 扩增的DNA作为下一轮筛选模板
- 如果筛选用的是磁珠, RT-PCR可在洗脱后的磁珠上直接进行



数次淘选之后, 可以达到高亲和力抗体基因的富集

3.6 分析、鉴定

- 测序分析（基因）
- ELISA分析（蛋白质，亲和力）
- WB分析（特异性）

核糖体展示技术特点

- 整个过程均在细胞外进行，不需要转化细胞，因此可获得大容量库（ $10^{11}\sim 10^{13}$ ）；
- 避免了细胞内、外操作的频繁转换，大大缩短筛选周期，简化了操作。
- a. 建库不要转化细菌，包装病毒。（仅需要对RT-PCR产物进行修饰即可）
- b. 淘选的过程不需要转染宿主细胞，直接进行RT-PCR就可以了。

核糖体展示技术特点

- 与体外突变方法的耦联，如结合定点突变技术、DNA shuffling 等，可短时间内实现功能蛋白的体外亲和力成熟)或筛选出具有新功能的高活性蛋白。
- 在淘选的过程中，不断通过PCR的方式将定点突变技术、DNA shuffling等技术应用于扩大库容，进行人为的亲和力成熟。

为什么会有如此大的优点??

- 不再受细菌转化效率的限制
- PCR方案的多样性
- 易错PCR
- 实用低保真Taq酶

将一次PCR扩增得到的有用突变基因作为下一次PCR扩增的模板，连续反复地进行随机诱变。

核糖体展示的限制性

如何进一步地提高该系统的稳定性？

特别是如何防止mRNA的降解和形成稳固的蛋白质-核糖体-mRNA三聚体无疑是该技术的关键问题；

如何提高大分子蛋白质在核糖体上的展示也是未来研究需要关注的问题。

谢谢！