

## 大分子量重组蛋白在丝状噬菌体表面的展示表达及其与小分子相互作用的初步研究

# Large Recombinant Protein Displayed on Filamentous Phage Surface and its Interaction with Small Molecule

孔 波<sup>1,3</sup>, 刘 惠<sup>2</sup>, 杨胜利<sup>2</sup>, 马维骏<sup>1,2\*</sup>

KONG Bo<sup>1,3</sup>, LIU Hui<sup>2</sup>, YANG Sheng-Li<sup>2</sup> and MA Wei-Jun<sup>1,2\*</sup>

1 中国科学院上海生命科学研究院/上海交通大学医学院 健康科学研究所, 上海 200025

2 中国科学院上海生命科学研究院上海生物工程研究中心, 上海 200233

3 中国科学院研究生院, 北京 100039

1 Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences & Medical School of Shanghai Jiao Tong University, 225 South Chongqing Road, Shanghai 200025, China

2 Research Center of Biotechnology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China

3 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

**摘 要** 利用 pHEN1-KM13 噬菌粒系统表达融合蛋白, 进而确定大分子量重组蛋白在丝状噬菌体表达的部位及其表达后的生物活性。通过蛋白酶切处理前后噬菌体侵染细菌能力的变化快速地检测大分子蛋白质能否在噬菌体表面展示表达, 比较了谷胱甘肽 S 转移酶及其与三个不同长度连接臂融合的外源蛋白在噬菌体表面的表达和组装, 确定了不大于 40kD 的重组蛋白分子能展示表达在丝状噬菌体表面, 并利用已知的小分子化合物与蛋白质的相互作用证明了组装在噬菌体表面的谷胱甘肽 S 转移酶重组蛋白仍保持其天然的结合活性, 为利用噬菌体展示系统研究蛋白质与小分子化合物的相互作用建立了基础。

**关键词** 噬菌体, 表面展示, 蛋白质与小分子相互作用, 蛋白质表达, 活性检测

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)01-0019-07

**Abstract** Recombinant proteins were expressed as fusions with the phagemid system of pHEN-KM13 and the characteristics and activities of the fusion proteins displayed on the surface of filamentous phage were studied. The altered titer of rescued phages from the phagemid system after trypsin treatment indicated the relative quantity of the phages displaying fusion proteins. The rescued phages displayed foreign proteins could keep the bacterial infection ability, while the bald phage without foreign protein displayed on its surface was sensitive to trypsin treatment and lost the bacterial infection ability. To determine the upper limit for filamentous phage display, four recombinant proteins, glutathione-S-transferase and glutathione-S-transferase fused with three various size peptide linkers, were fused to N terminus of capsid protein gp3 and rescued by helper phage KM13. The rescued phages which displayed fused protein with the size of 40kD or less maintain the infection ability. To assay the activity of the phage displayed protein, the known small molecule probe was used in the interaction study with protein incorporated on phage surface. Results showed that the glutathione-S-transferase on phage surface still bound to glutathione specifically. It indicated that the glutathione-S-transferase displayed on phage surface was correctly folded and functionally active. The results

Received: July 7, 2005; Accepted: August 31, 2005.

This work was supported by Grants from Major Fundamental Project of Shanghai Municipal Commission of Science and Technology (No. 02DJ14007) and Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences.

\* Corresponding author. Tel: 86-21-63852596; E-mail: wjma@sibs.ac.cn

上海市科委基础研究重大项目基金(No. 02DJ14007)和中国科学院知识创新项目资助。© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

demonstrated that it was feasible to use small molecule probes to interact with the protein displayed on phage surface. In turn, the method described here also demonstrated that phage display system could be utilized to investigate the interactions between protein and small molecules.

**Key words** phage, surface display, protein-small molecule interaction, protein expression, activity assay

随着人类基因组测序的完成和大量新技术新方法在基因组研究中的应用,许多功能未知的蛋白质和潜在的药物靶点蛋白质被发现,基因功能的研究及其相关的新药物发现成为后基因组时代研究的主要内容。研究蛋白质与小分子化合物的相互作用,一方面可以利用小分子作为探针研究未知蛋白质的功能,另一方面可以利用已知蛋白质筛选小分子化合物,作为新药发现的先导化合物<sup>[1,2]</sup>。

噬菌体展示技术(phage display technology)自从1985年由Smith建立以后<sup>[3]</sup>,因其具有筛选效率高和适合于体外筛选等优点,成为研究蛋白质与蛋白质之间相互作用的有力工具<sup>[4,5]</sup>。在一系列的丝状噬菌体展示系统中,应用最广泛的是噬菌粒系统<sup>[6,7]</sup>。但由于表达的外源蛋白需要分泌透膜才有可能被组装在噬菌体表面,并且在组装过程中需要辅助噬菌体(helper phage)进行超感染,造成一些较大以及较难分泌的蛋白质无法组装在噬菌体表面,获得的噬菌体中全部或大部分是无外源蛋白组装的“光头”噬菌体(bald phage)<sup>[6,8]</sup>,这些大量存在的“光头”噬菌体所造成的背景一方面将干扰外源蛋白能否在噬菌体表面展示的检测,另一方面将降低筛选到特异性结合配体的效率,因此降低“光头”噬菌体所带来的高背景将提高检测的灵敏度和筛选的效率。而建立快速检测外源蛋白在噬菌体表面的展示表达及其活性的体系和方法,是噬菌体展示系统应用于蛋白质与小分子相互作用研究的前提和关键。

本研究通过构建不同大小连接臂与谷胱甘肽S转移酶蛋白(GST)融合的噬菌粒,表达不同大小的外源蛋白,用来研究外源大分子蛋白质在噬菌体表面展示组装情况,确定所能组装的蛋白质大小的大致范围,并且利用蛋白质与小分子的相互作用对组装于噬菌体表面的蛋白质活性进行分析,为构建噬菌体表面展示蛋白质与小分子相互作用体系打下良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大肠杆菌 TG1 购自 Invitrogen 公司;噬菌粒 pHEN1 和辅助噬菌体 KM13 由英国剑桥医学研究委员会(MRC)分子生物学实验室 Greg Winter 博士惠

赠<sup>[8]</sup>;连接臂片段来自于 pcDNA3.1-hPPAR $\gamma$ 2 质粒(由日本大阪大学 Hitoshi Nishizawa 博士惠赠)的 PPAR $\gamma$ 2 基因<sup>[9]</sup>。

PCR 扩增引物由上海申友生物工程公司合成;pfu 酶为上海申能博采公司产品;限制酶和 T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品;兔抗 GST 多克隆抗体由分离纯化的 GST 蛋白免疫兔子所得;HRP-羊抗兔 IgG 为 Calbiochem 公司产品;Glutathione Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司;Trypsin (1:250, >250u/mg)购自 Amresco 公司。

### 1.2 融合蛋白噬菌粒的构建

合成下列引物,下画线部分为酶切位点。

GST\_For:

5'-CATG CCATGG CCATGTCCCCTATACTAGGT-3'(NcoI)

GST\_Rev:

5'-TAGGATCCACGCGGAACCAG-3'(BamHI)

PP<sub>300</sub>\_For:

5'-AG GGATCC GTGGGGATGCTCATAATGC-3'(BamHI)

PP<sub>200</sub>\_For:

5'-AGGGATCCGCCATCCGCATCTTTCAG-3'(BamHI)

PP<sub>100</sub>\_For:

5'-CGGGATCCGCACTGGAATTAGATGAC-3'(BamHI)

PP-Rev:

5'-ACGCGTCGACGTACAAGTCCTTGTAGAT-3'(SalI)

利用 PCR 两步构建不同大小的多肽连接臂和 GST 融合的噬菌粒。第一步,用 GST\_For 和 GST\_Rev 引物,以质粒 pGEX-2T 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 NcoI 和 BamHI 双酶切后与 pHEN1 噬菌粒连接,得到融合有 GST 的噬菌粒 pHGST。第二步,分别用 PP<sub>300</sub>\_For、PP<sub>200</sub>\_For、PP<sub>100</sub>\_For 引物和 PP\_Rev 引物,以 pcDNA3.1-hPPAR $\gamma$ 2 质粒为模板进行 PCR 扩增,得到的三个不同大小的 PCR 片段,经 BamHI 和 SalI 双酶切后与 pHGST 连接,得到不同长度连接臂与 GST 融合的噬菌粒 pHGST<sub>300</sub>、pHGST<sub>200</sub> 和 pHGST<sub>100</sub>。

### 1.3 融合蛋白噬菌体扩增、纯化和滴度测定

噬菌体扩增、纯化和滴度测定参考文献[10]。噬菌体 trypsin 处理参考文献[11]。

1.4 噬菌体展示蛋白 ELISA 检测

于酶标板中每孔加入 100μL CBS 包被液和 1 × 10<sup>9</sup>待测噬菌体 4℃包被过夜,无噬菌体包被的孔作为空白对照。PBS 清洗后,2% BSA 37℃封闭 2h,加入 1:1000 稀释的兔抗 GST 多抗,37℃温育 1h, PBST( PBS,含 0.1% Tween-20 )充分洗涤,加入 1:10000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 37℃温育 1h,充分洗涤后,TMB 显色,15min 后 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,测定 A<sub>450</sub> 值。取 3 次测定值扣除空白对照值后的平均值为 ELISA 检测值,并以 mean ± S.E.表示。

1.5 噬菌体表面展示蛋白与小分子的结合

噬菌粒 pHGST 和 pHEN1 分别转化 TG1,利用 KM13 超感染扩增噬菌体,用 PBS 稀释到 1 × 10<sup>8</sup>/mL。pHGST 噬菌体分别与 10μL( 50% 悬浮液 )Glutathione

Sepharose 4B 和 Sepharose 4B 树脂混合 4℃轻微振荡 1h。离心沉淀的树脂用 0.5mL PBS 清洗 2 次后,用 0.5mL 100μmol/L 还原型谷胱甘肽( GSH 溶解于 PBS 溶液中 )竞争性洗脱 30min,分别测定洗脱溶液中 trypsin 酶切处理后的噬菌体滴度。同时,以相同数目的 pHEN1 噬菌体与 Glutathione Sepharose 4B 和 Sepharose 4B 树脂混合作为对照。每个样品测定 2 次,取其平均值并进行统计学分析。

2 结果

2.1 谷胱甘肽 S 转移酶融合蛋白及其与不同大小连接臂融合蛋白噬菌粒的构建

通过两步克隆构建 GST 及其与不同大小连接臂的融合蛋白噬菌粒( 图 1 )。第一步构建噬菌粒

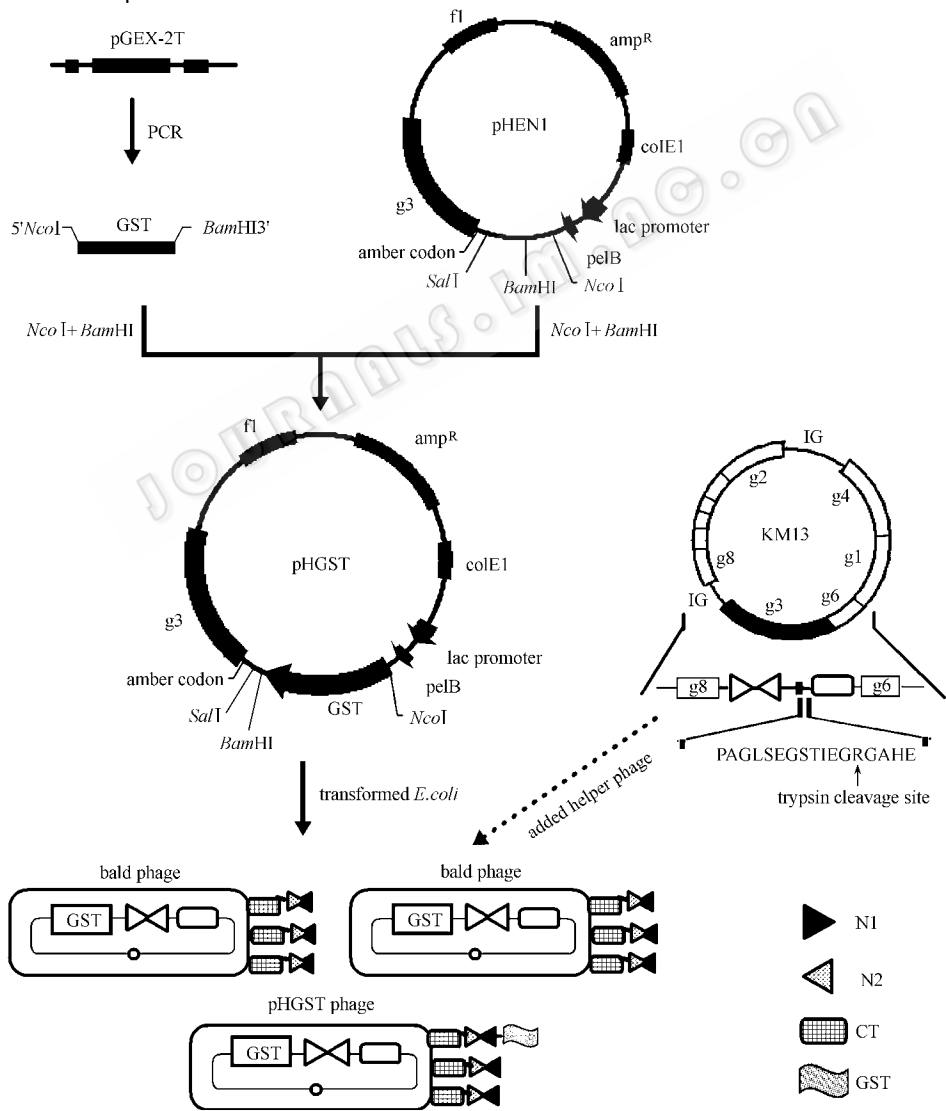


图 1 噬菌粒 pHGST 构建图

Fig. 1 The construction of phagemid pHGST

The PCR fragment of GST was cloned into the 5' terminus of g3 of phagemid pHEN1. The phage particles, including pHGST phage and bald phage, were rescued by the protease sensitive helper phage KM13.

pHGST PCR 克隆 pGEX-2T 中的 GST 基因 ,连接到噬菌粒 pHEN1 ,第二步构建 GST 与不同大小连接臂融合表达的噬菌粒 pHGST<sub>300</sub>、pHGST<sub>200</sub> 和 pHGST<sub>100</sub> ,PCR 扩增得到 PPAR $\gamma$ 2 基因 3 个长度约为 900bp、600bp 和 300bp 的片段 ,与 pHGST 连接后构建噬菌粒 pHGST<sub>300</sub>、pHGST<sub>200</sub> 和 pHGST<sub>100</sub>。3 个大小为 307、202 和 104 个氨基酸的连接臂与 GST 蛋白( 27kD) 融合表达后生成的蛋白质为 GST<sub>300</sub>、GST<sub>200</sub> 和 GST<sub>100</sub> ,分子量大小分别约为 61kD、49kD 和 38kD。在所有构建的噬菌粒中 ,外源蛋白基因都是融合在 pHEN1 噬菌粒的 *g3* 基因 5' 端 ,与 *g3* 基因编码的全长序列的 gp3 蛋白形成融合蛋白 ,gp3 蛋白由 N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub> 和 CT 三个结构域构成<sup>[11]</sup>。用于超感染的辅助噬菌体 KM13 的 gp3 在 N1-N2 与 CT 结构域之间引入了 trypsin 酶切位点 ,这种 gp3 蛋白与来源于噬菌粒融合有外源蛋白的 gp3 竞争组装进入噬菌体。gp3 蛋白的完整性是噬菌体保持侵染能力所必须的 ,改造的 gp3 蛋白一旦被 trypsin 酶切降解 ,不带有融合外源蛋白 gp3 的噬菌体将丧失对大肠杆菌的侵染能力<sup>[11]</sup>。

2.2 谷胱甘肽 S 转移酶能被丝状噬菌体组装并表达于 gp3 末端

为了确定谷胱甘肽 S 转移酶能否组装到噬菌体表面 ,首先检测 gp3 中特定的 trypsin 位点酶切处理后对噬菌体侵染能力的影响。直接扩增辅助噬菌体 VCSM13、KM13 和用 KM13 超感染扩增 pHGST 噬菌体 ,然后比较获得的噬菌体 trypsin 处理前后克隆形成单位( cfu) 的变化。图 2 分别显示的是  $1 \times 10^3$  个噬菌体在 trypsin 酶切处理前侵染宿主菌形成的克隆数( 平皿左边) 和  $1 \times 10^3$  VCSM13、 $1 \times 10^7$  KM13 和  $1 \times 10^7$  pHGST 酶切处理后的形成的克隆数( 平皿右边) 。从图中可看出 VCSM13( A) 处理前后的 cfu 相

差不多 ,其侵染能力基本不受 trypsin 酶切作用的影响 ,说明未被改造的 gp3 不能被 trypsin 酶切 ;KM13 ( B) 经酶切处理后的 cfu 只有酶切处理前的  $1( 10^6 \sim 10^7 )$  ,下降明显 ,因为 KM13 与 VCSM13 的唯一差别就是前者在 gp3 蛋白中引入了 trypsin 位点 ,这结果说明 gp3 蛋白中存在的 trypsin 位点能充分被 trypsin 酶切而丧失侵染能力 ,pHGST 噬菌体( C) 由辅助噬菌体 KM13 超感染后包装而来 ,结果显示其酶切处理后的 cfu 为酶切处理前的  $1/10^4 \sim 1/10^5$  ,尽管酶切后 cfu 下降明显 ,但仍有相当部分噬菌体具有侵染能力 ,对 trypsin 不敏感的噬菌体形成的克隆数要比 KM13 高  $10^2 \sim 10^3$  倍 ,这部分噬菌体的 gp3 蛋白应该是来源于噬菌粒 pHGST 且融合有外源蛋白 GST 的 gp3 ,这结果说明 GST 蛋白能被组装到丝状噬菌体中。

2.3 外源蛋白 GST 和 GST<sub>100</sub> 能表达并组装到噬菌体中

为了确定大分子蛋白质能否组装到丝状噬菌体表面 ,以及大致确定所能组装的蛋白质大小范围 ,分别构建了不同大小的连接臂与谷胱甘肽 S 转移酶融合的噬菌粒 ,利用 KM13 超感染扩增获得噬菌体 ,分别测定各种噬菌体 trypsin 酶切处理前后的 cfu ,并计算酶切处理后噬菌体 cfu 与酶切处理前噬菌体 cfu 的比例( 图 3) ,同时以辅助噬菌体 VCSM13 和 KM13 作为对照。从图 3 结果可以看出 VCSM13 酶切处理后 cfu 为酶切处理前的 98% ,这个比例说明噬菌体 VCSM13 对酶切不敏感 ,酶切前后 cfu 基本一样 ;KM13 的比例为  $3.2 \times 10^{-7}$  ,酶切作用显著 ,处理前后 cfu 相差 6 ~ 7 个数量级 ,说明 trypsin 作用于噬菌体 KM13 的 gp3 酶切位点后能极大地降低背景 ;

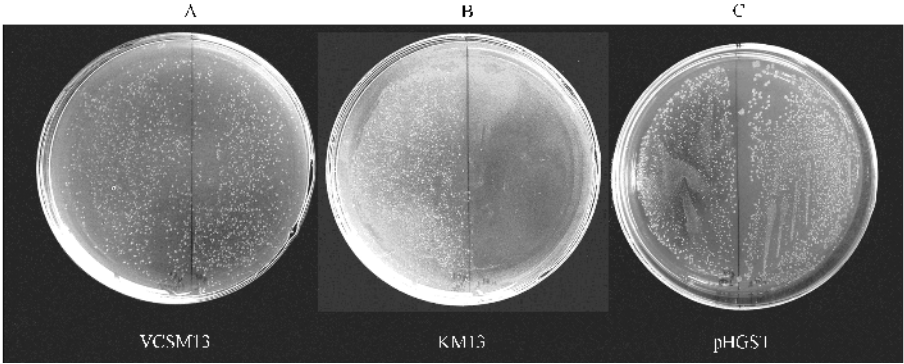


图2 噬菌体 VCSM13( A) KM13( B) 和 pHGST( C) 在蛋白酶 trypsin 处理前( 平皿左半边) 和处理后( 平皿右半边) 侵染宿主菌能力的比较  
Fig. 2 The comparison of colony forming ability before( left of the plate) and after trypsin treatment( right of the plate) between VCSM13( A) , KM13( B) and pHGST( C)

The trypsin digestion resistance of pHGST indicated GST had incorporated into pHGST phage. The phages VCSM13 and KM13 were used as positive and negative control , respectively.

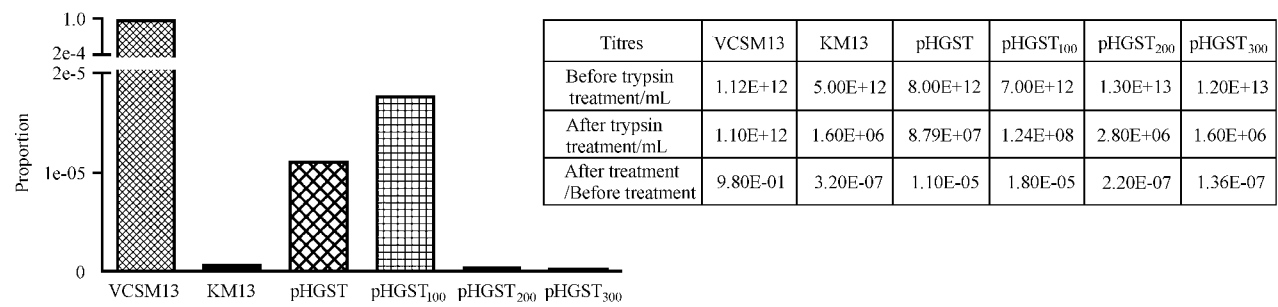


图 3 谷胱甘肽 S 转移酶及其与不同大小连接臂构建的噬菌粒经 KM13 超感染获得的各种噬菌体在 trypsin 酶处理前后的克隆形成单位( cfu )分析  
( 分别以噬菌体 VCSM13 和 KM13 作为阳性对照和阴性对照 )

Fig. 3 The proportion of phage titers that could resist trypsin digestion  
The phages VCSM13 and KM13 were used as positive control and negative control , respectively.

pHGST 和 pHGST<sub>100</sub> 噬菌体的比例分别为  $1.1 \times 10^{-5}$  和  $1.8 \times 10^{-5}$  酶切后 cfu 下降了 4 ~ 5 个数量级 , 这部分酶切敏感的噬菌体是“ 光头 ”噬菌体 , 其 gp3 来自辅助噬菌体 KM13 , 但两者的比例仍然比噬菌体 KM13 至少高两个数量级 , 表示存在对酶切不敏感的噬菌体 , 其 gp3 应该来源于噬菌粒上的 g3 基因 , 并且在 N 端表达了外源蛋白 , 由此可以判断 GST ( 27kD ) 以及 GST<sub>100</sub>( 38kD ) 能够组装并表达在噬菌体的表面 ; 图 3 结果同时还显示 pHGST<sub>200</sub> 噬菌体和 pHGST<sub>300</sub> 噬菌体的比例为  $2.2 \times 10^{-7}$  和  $1.3 \times 10^{-7}$  , 该比例与辅助噬菌体 KM13 的比例(  $3.2 \times 10^{-7}$  ) 处于同一个数量级 , 说明所得到的噬菌体绝大部分是未组装融合蛋白的“ 光头 ”噬菌体 , 其上的 gp3 蛋白都来源于辅助噬菌体 KM13 , 因此两个较大的外源蛋白 GST<sub>200</sub>( 49kD ) 和 GST<sub>300</sub>( 61kD ) 较难展示在噬菌体的表面。从以上结果可以分析得出分子量不大于 40kD 的蛋白质有可能组装到噬菌体表面 , 而大于 40kD 的蛋白质则可能较难被组装。

2.4 谷胱甘肽 S 转移酶及 GST<sub>100</sub> 外源蛋白表达在噬菌体表面

用 ELISA 分析外源蛋白在各种待测噬菌体表面的表达情况。pHGST 噬菌体和 pHGST<sub>100</sub> 噬菌体的 ELISA 检测值( 分别为 0.31 和 0.30 ) 大约是阴性对照噬菌体 KM13( 检测值为 0.12 ) 的 2 倍( 图 4 ) , 说明 GST 和 GST<sub>100</sub> 组装并表达在噬菌体表面。而 pHGST<sub>200</sub> 和 pHGST<sub>300</sub> 的检测值( 分别为 0.15 和 0.14 ) 与阴性对照噬菌体 KM13 相差不大 , 说明 GST<sub>200</sub> 及 GST<sub>300</sub> 外源蛋白可能较难展示表达在噬菌体表面 , 该结果与上面 trypsin 酶切滴度分析的结果相吻合。

2.5 噬菌体展示蛋白与小分子特异结合

谷胱甘肽 S 转移酶( GST ) 能与其天然底物小分

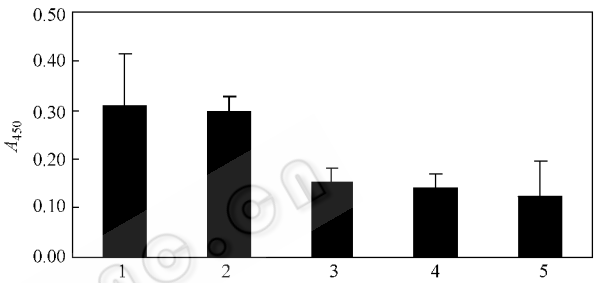


图 4 ELISA 分析验证 GST 及 GST<sub>100</sub> 外源蛋白组装表达于噬菌体表面。利用抗 GST 抗体检测包被在酶标板上的待测噬菌体。KM13 为阴性对照

Fig. 4 ELISA assay indicated that protein GST and GST<sub>100</sub> could display on phage surface

The ELISA with anti-GST antibody was performed on the plate coated with various phages. KM13 was used as negative control .

子谷胱甘肽( glutathione ) 特异性结合。利用辅助噬菌体 KM13 超感染获得的 pHGST 噬菌体中 , 大部分是无外源蛋白组装的“ 光头 ”噬菌体 , 其 gp3 蛋白来源于辅助噬菌体 KM13 ; 另外一小部分是组装有外源蛋白 GST 的噬菌体 , 其部分 gp3 蛋白来源于噬菌粒 pHGST , N 末端连接有 GST 外源蛋白。亲和树脂 Glutathione Sepharose 4B 是由基质 Sepharose 4B 及其固定的小分子 glutathione 两部分组成。当 pHGST 噬菌体与亲和树脂 Glutathione Sepharose 4B 混合时 , 可能存在多种方式的相互接触。图 5 结果显示 , 无外源蛋白展示的 pHEN1 噬菌体与树脂基质 Sepharose 4B 之间( PS , 407 ± 170 ) 以及与亲和树脂 Glutathione Sepharose 4B 之间( PG , 360 ± 120 ) 的结合很弱 , 而 pHGST 噬菌体与亲和树脂 Glutathione Sepharose 4B 显示有很强烈的结合( GG , 10583 ± 640 ) , pHGST 噬菌体与 pHEN1 噬菌体的差别仅在于前者的部分噬菌体组装有 GST 外源蛋白 , 说明这种强烈的结合主要来源于组装的 GST 蛋白与 Glutathione Sepharose 4B 之间 , 而其余的“ 光头 ”噬菌体与亲和树脂的结合很

弱图 5 结果同时显示 pHGST 噬菌体与 Glutathione Sepharose 4B 的结合( GG )远强于 pHGST 噬菌体与 Sepharose 4B 的结合( GS  $2237 \pm 311$  ),说明前者的强烈结合主要来源于 pHGST 噬菌体与 Glutathione Sepharose 4B 亲和树脂上的 glutathione 配基之间。综合以上结果可以得出,当 pHGST 噬菌体与 Glutathione Sepharose 4B 混合时,主要的结合来自于组装在噬菌体表面的 GST 蛋白与亲和树脂上的 glutathione 配基之间,两者之间的结合是特异结合,从而说明表达在噬菌体表面的 GST 蛋白仍然保持其原来的结构,具有结合谷胱甘肽的活性。

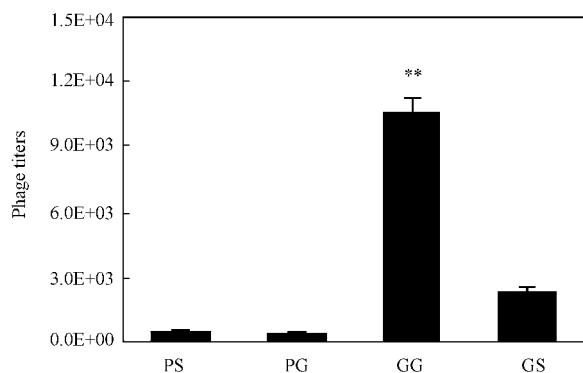


图 5 噬菌体表面展示的 GST 与小分子 glutathione 之间存在特异结合

Fig. 5 The interaction between displayed GST and glutathione was specific

Phage pHEN1 or pHGST was mixed with Glutathione Sepharose 4B or Sepharose 4B. The titers of eluted phage from beads by glutathione competition were determined after trypsin treatment.

\*\* indicated the difference was significant for GG versus the other PS, GG and PG ( $P < 0.01$ ).

### 3 讨论

噬菌粒展示系统最主要的缺陷是获得的噬菌体中大部分是无外源蛋白组装的“光头”噬菌体( $gp3$  蛋白来源于辅助噬菌体),而组装有外源蛋白的噬菌体只占很小一部分( $gp3$  来源于噬菌粒, N 端融合有外源蛋白)。通常大分子量的蛋白质在丝状噬菌体中的展示受到一定的限制,造成这种结果的原因包括两个方面,一方面是融合的外源蛋白可能影响  $gp3$  蛋白的透膜分泌,另一方面是外源蛋白影响  $gp3$  蛋白组装到噬菌体中,因此这两方面的因素往往影响外源蛋白在噬菌体表面的展示。从我们的实验结果看出,组装有外源蛋白的噬菌体只占全部噬菌体的  $1/10^5$ ,并且随着外源蛋白增大,分子量分别为 49kD 和 61kD 的 GST<sub>200</sub> 和 GST<sub>300</sub> 难于组装在噬菌体表面。通过 GST 与不同长度连接臂连接的外源蛋白的表达水平,确定了不大于 40kD 的外源蛋白能表

达并组装在丝状噬菌体表面。

虽然已有报道一些较大的蛋白质如细胞因子、生长激素、病毒外壳蛋白、酶等被成功展示于噬菌体的表面<sup>[5,12,13]</sup>,但不同的蛋白质之间表现出不同的特性,因此需要一种快速简单的判断蛋白质在丝状噬菌体表面能否展示及其展示水平的方法,通常的 ELISA 和 Western blot 检测都需要较高质量的专一抗体,并且可能受检测灵敏度的限制。从 ELISA 分析结果(图 4)可以看出,针对 pHGST 噬菌体和 pHGST<sub>100</sub> 噬菌体所展示的谷胱甘肽 S 转移酶检测的信号只比阴性对照高 1 倍,而作为阴性对照的辅助噬菌体 KM13 也有较大的背景信号,这结果与组装有外源蛋白的噬菌体占总噬菌体的数量少,以及抗 GST 多克隆抗体与 KM13 噬菌体有非特异性反应密切相关。而在 pHEN1-KM13 系统中,可以通过酶切降低“光头”噬菌体所造成的背景,只需比较酶切前后噬菌体侵染能力的变化来判断外源蛋白是否与  $gp3$  蛋白融合表达并组装到噬菌体中。组装有外源蛋白的噬菌体形成的 cfu 比阴性对照至少强 100 倍(图 3),因此可以很确定地判断外源蛋白 GST 和 GST<sub>100</sub> 能组装到噬菌体中。因此该系统提供了一种简单灵敏地检测蛋白质在噬菌体表面表达及其表达丰度的方法。

要将噬菌体展示系统应用于蛋白质功能研究和配体筛选,除了需要解决外源蛋白能否在噬菌体表面表达及其表达部位之外,更重要的问题是组装在噬菌体外表面的外源蛋白仍能保持其活性。本研究以 GST 与其底物小分子 glutathione 的结合为模型,确定了展示在噬菌体表面的 GST 蛋白仍然能特异地与 glutathione 结合,说明重组蛋白组装到噬菌体表面后仍然保持其天然的结构特性,同时也表明通过已知小分子配体与蛋白质的相互作用来检测噬菌体表面展示的重组蛋白活性是完全可行的。因此也完全有可能利用该噬菌体展示系统,用已知功能的蛋白质筛选与其结合的小分子化合物,为进一步分析在噬菌体表面展示的重组蛋白活性和研究噬菌体展示蛋白质与小分子的相互作用筛选模型建立了基础。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Meisner NC, Hintersteiner M, Uhl V *et al.* The chemical hunt for the identification of drugable targets. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(4): 424-431
- [2] Hung DT, Jamison TF, Schreiber SL. Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chem Biol*, 1996,

- [ 3 ] Smith GP. Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* , 1985 , **228** ( 4705 ) : 1315 – 1317
- [ 4 ] Smith GP , Petrenko VA. Phage Display. *Chem Rev* , 1997 , **97** ( 2 ) : 391 – 410
- [ 5 ] Corey DR , Shiau AK , Yang Q *et al.* Trypsin display on the surface of bacteriophage. *Gene* , 1993 , **128** ( 1 ) : 129 – 134
- [ 6 ] Hoogenboom HR. Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol* , 2002 , **178** : 1 – 37
- [ 7 ] Winter G , Griffiths AD , Hawkins RE *et al.* Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* , 1994 , **12** : 433 – 455
- [ 8 ] Hoogenboom HR , Griffiths AD , Johnson KS *et al.* Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage : methodologies for displaying antibody ( Fab ) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* , 1991 , **19** ( 15 ) : 4133 – 4137
- [ 9 ] Nishizawa H , Yamagata K , Shimomura I *et al.* Small heterodimer partner , an orphan nuclear receptor , augments peroxisome proliferator-activated receptor gamma transactivation. *J Biol Chem* , 2002 , **277** ( 2 ) : 1586 – 1592
- [ 10 ] Kay B K , Winter J , McCafferty J. *Phage Display of Peptides and Proteins : A Laboratory Manual* . 1st ed , San Diego , CA : Academic Press , 1996
- [ 11 ] Kristensen P , Winter G. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Folding & Design* , 1998 , **3** ( 5 ) : 321 ~ 328
- [ 12 ] Atwell S , Wells JA. Selection for improved subtiligases by phage display. *Proc Natl Acad Sci , U S A* , 1999 , **96** ( 17 ) : 9497 – 9502
- [ 13 ] Lobel LI , Rausch P , Trakht I *et al.* Filamentous phage displaying the extracellular domain of the hLH/CG receptor bind hCG specifically. *Endocrinology* , 1997 , **138** ( 3 ) : 1232 – 1239