

1994, **91**: 11953~ 11957

16 Ma J J, Bhat M B, Zhao J Y. Rectification of skeletal muscle ryanodine receptor mediated by FK506 binding protein. *Biophys J*, 1995, **69**: 2398~ 2404

17 Griffith J P, Kim J L, Kim E E *et al.* X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, 1995, **82**: 507~ 522

18 Hain J, Onoue H, Mayrleitner M *et al.* Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 2074~ 2081

19 Collins J H. Sequence analysis of the RyRec: possible association with a 12 k, FK506-binding immunophilin/PKC inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **178**: 1288 ~ 1290

20 Timmerman A P, Wiederrecht G, Marcy A *et al.* Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP-ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 2451~ 2459

Modulation of Calcium Release Channels by FK506-binding Protein. SUN Junhui. ZHU Peihong (*Shanghai Institute of Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract As an important messenger, intracellular free calcium can modulate many cellular functions. Calcium stores, endoplasmic reticulum and sarcoplasmic reticulum, play important functions in controlling the level of intracellular calcium. The activities of calcium release channel on these calcium stores, ryanodine receptor and inositol trisphosphate receptor, are affected by several factors. FK506, an immunosuppressive drug, can specifically bind to a cytosolic receptor with molecular weight of about 12 ku, namely, FK506-binding protein (FKBP12). *In vivo*, FKBP12 maintains a tight association with calcium release channel and forms a complex. This interaction plays important roles in modulating calcium release channels.

Key words cytosolic free calcium, calcium release channel, FK506, FK506-binding protein, cellular signal transduction

微生物表面呈现技术及应用*

王雨田 胡家露 陈苏民¹⁾

(第四军医大学全军消化疾病研究所, 西安 710033)

杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘要 微生物表面呈现技术以其广泛的应用前景, 日益引起关注. 文章就细菌和酵母微生物表面呈现系统的构建及其应用进行了较为全面的综述.

关键词 微生物, 表面呈现, 表达载体

微生物表面呈现是用基因重组方法将外源性蛋白质功能性地表达于微生物表面. 90年代初, 由 McCafferty^[1] 构建成功的噬菌体表面呈现系统大大地简化了抗体库构建及单链抗体筛选过程, 也激发了人们构建新型表面呈现系统的热情. 目前, 微生物表面呈现系统有四类, 分别为: 细菌呈现系统^[2~4]、酵母呈现

系统^[5]、噬菌体^[6,7]及病毒^[8]呈现系统. 由于细菌、酵母系统具有更广泛的应用性, 已成为竞相研究的热点, 本文就其研究进展进行综述.

* 国家自然科学基金 (39470785) 及全军医药卫生青年基金 (96Q078) 联合资助.

¹⁾ 第四军医大学生物化学教研室, 西安 710032.

收稿日期: 1996-10-03, 修回日期: 1997-01-20

1 细菌呈现系统

细菌分为革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌。由于革兰氏阳性菌胞膜外覆有很厚的细胞壁,膜蛋白不易显露,基因转化效率低,故细菌表面呈现系统多用革兰氏阴性菌。革兰氏阴性菌的细胞质由两层胞膜包裹,称为内膜和外膜,两者间为外周质,肽聚糖层附于内膜外侧。外膜是特殊的生物膜,由磷脂内层和脂多糖外层构成,是蛋白质出入细胞的重要屏障。脂蛋白(Lpp)附于磷脂内层和肽聚糖层之间,部分Lpp与两者共价相连,称为与肽聚糖相连的脂蛋白(PAL)。革兰氏阴性菌的分泌过程复杂,分泌蛋白需穿越内膜,外周质及外膜,除少数分泌性酶,多数分泌蛋白由特定的分泌系统辅助完成,其间有多种辅助因子参与。

细菌表面呈现系统多是细胞外膜蛋白与外源性多肽的融合表达系统。常用的外膜蛋白大致可分三类: a. 完整的外膜蛋白,如LamB、OmpA、PhoE等结构均相似,均以一系列 β 折叠跨膜,故此类蛋白质均有多个面向胞外的裸肽区; b. 细菌的附属结构,包括菌毛、鞭毛,系由菌毛蛋白或鞭毛蛋白构成; c. 分泌性蛋白,如IgA蛋白酶、支链淀粉酶等,可暂时性或部分地定位于外膜。研究证实外膜蛋白的某些胞外肽段属于高变区,此区中插入外源性序列或被替换多不影响蛋白质的总体构形,且能表达功能性外源蛋白。

1.1 LamB

属于大肠杆菌外膜蛋白Porin家族的成员,在亲水性通道形成中起重要作用,同时它是几种噬菌体(如 λ 和TP1)的受体,参与麦芽糖和麦芽糖糊精的转运。成熟的LamB含421个氨基酸,15次跨膜。研究显示其第153号氨基酸凸出外膜表面,在此处插入的外源性多肽(60个氨基酸左右),虽亲水性不同但均能在细菌表面获得功能性表达。将 β 1、 β 2肾上腺素受体与LamB N端前279个氨基酸基因融合,可在大肠杆菌表面获得功能性的人 β 1、 β 2肾上腺素受体

1.2 PhoE

同属Porin家族成员,其合成和表达受磷酸盐调节,多以三聚体形成跨膜通道供可溶性分子(分子质量<500 u)自由通过,此蛋白是噬菌体Tc45的受体,以 β 折叠跨膜16次,有8个面向胞外的裸肽区。将大小为30~50个氨基酸的外源性序列插入这些裸肽区,可在细菌表面功能性表达外源多肽。

1.3 OmpA

是大肠杆菌主要的外膜蛋白,每个细胞约有100 000个拷贝,由325个氨基酸组成,8次跨膜。研究显示21个氨基酸的血细胞凝集素从第70或第154位氨基酸处插入裸肽区可获得细菌表面功能性表达。由于OmpA正确定位与折叠的功能序列在C端,故一段时间将外源蛋白融合表达于OmpA C端的尝试一直不成功。Francisco等^[9,10]利用Lpp胞膜定位及功能表达的信息主要位于N端的特点,将Lpp信号序列及其N端9个氨基酸与OmpA第46~159区肽段融合,构建成功Lpp-OmpA-外源蛋白表达载体,用此载体可将分子质量为50 ku的大分子蛋白质呈现于细菌表面,目前此载体已成功地表达了 β -内酰胺酶、抗地高辛单链抗体及纤维素结合蛋白等。

1.4 PAL与Lpp

一般推测Lpp位于外膜内侧,面向周质腔,不能跨外膜表达于细胞表面。研究表明Lpp、PAL均可独自成为表面呈现系统的载体蛋白。PAL与抗溶菌酶单链抗体融合可表达于细菌表面,值得注意的是此表达系统将单链抗体重组于PAL的N端,除去了PAL的N端脂质连接位点,这与理论上PAL通过N端连接的脂质整合于外膜不符,具体原因尚待探讨。Lpp的信号肽及其N端9个氨基酸也能与单链抗体融合表达于细菌表面。新近Cornells等^[11]报道用绿脓杆菌脂蛋白基因opr1构建成功新型融合蛋白表面呈现载体,用此载体已表达成功非洲猪热病毒(AsFv)壳蛋白Vp72及利什曼原虫主要糖蛋白gp63,同时证实与HBV S2b区16个氨基酸的融合表达蛋白可刺

激抗原提呈细胞激发细胞免疫和体液免疫。

1.5 IgA 蛋白酶

是革兰氏阴性菌分泌性酶。其前体分子质量为 169 ku, N 端含有特异性辅助其穿越内膜的信号肽, C 端 45 ku 的肽段称 Iga_{β} 区, 能特异性整合于细菌外膜, 并形成跨膜通道供中部酶分子通过, IgA 蛋白酶穿膜后自动酶解与 Iga_{β} 区分离, Iga_{β} 则停留于外膜成为 $\beta 45$ 蛋白。Klauser 等^[12]利用 IgA 蛋白酶特殊的分泌机制, 用 12 ku 的霍乱弧菌毒素 B 亚单位 (CtxB) 替换 IgA 蛋白酶, 将 CtxB 融合于信号肽与 Iga_{β} 之间, 由于 CtxB 无蛋白酶功能, 故通过 Iga_{β} 跨膜通道后不能自动酶解与 Iga_{β} 分离, 而以 Iga_{β} -CtxB 融合蛋白表达于细菌表面。

1.6 支链淀粉酶

在其分泌过程中可暂时“锚”于细菌外膜, 当细胞进入静止期时脱落。Kornacher 等 (1990 年) 将 β -内酰胺酶与支链淀粉酶 N 端 834 个氨基酸融合, 可将支链淀粉酶- β -内酰胺酶融合蛋白暂时表达于细胞表面。

1.7 鞭毛和菌毛

鞭毛由鞭毛蛋白构成, 菌株 SJW1103 的鞭毛蛋白由 489 个氨基酸组成, 分子质量为 51 ku, 其 N 端、C 端分别含有高度保守性序列, 可能与鞭毛丝的装配相关, 分子结构的中部有多个可变区, 用外源蛋白替代或插入, 均不影响功能性鞭毛的形成。籍此人们将霍乱毒素 B 亚基及乙型肝炎病毒蛋白片段插入可变区, 获得功能性表面表达。Lu 等^[13]将硫氧蛋白 (thioredoxin) 插入鞭毛蛋白可变区成功构建一种新型表达载体, 此载体用于 12 肽库的构建, 可将 IL-1、M-CSF、IL-12 等多种细胞因子功能性表达于细菌表面。

菌毛由菌毛蛋白和少量特异性粘附素组成, 每个细菌表面均有大量线性菌毛, 每根菌毛上常有 1 000 个菌毛蛋白拷贝。菌毛蛋白由 128 个氨基酸残基组成, 其中含两个高变区, 凸出表达于细菌表面, 将 18 个氨基酸的外源性多肽插入 P 菌毛蛋白的高变区可进行细菌表面表达。相同的方法, 已应用于 K88 菌毛及

4 型菌毛等。

2 酵母表面呈现系统

酵母是一种真核生物, 具有无毒性、易生长的特点, 被称为 GRAS 生物 (generally regarded as safe)^[5]。酵母细胞壁由外层的甘露糖蛋白和内层的葡聚糖组成。葡聚糖由 β -1, 3 和 β -1, 6-葡萄糖构成, 通常与壳多糖形成络合物维持细胞壁的高强度, 甘露糖蛋白常过度糖基化, 其特性决定细胞表面特征。 α 凝集素、絮片蛋白 (floculin) 是两种重要的甘露糖蛋白。 α 凝集素在酵母交配型 α 与交配型 a 两性吸附中起重要作用, 絮片蛋白与细胞间粘附相关。它们的生物学特征相似, 均牢固地“锚”于细胞壁。整个分子大致可分为两部分, N 端的一半游离于细胞壁表面, C 端的一半 (α 凝集素约 320 个氨基酸、絮片蛋白约 598 个氨基酸) 富含 Ser、Thr 氨基酸残基, 呈柱状插入细胞壁葡聚糖层中, 与之共价相连, 末端疏水性部分, 称为 GPI “锚” (glycosylphosphatidylinositol) 信号序列。研究显示用外源性蛋白替换 α 凝集素或絮片蛋白 N 端部分, 可将外源性蛋白功能性地表达于细胞表面。用此方法已成功表达了 α 半乳糖苷酶、HBsAg 片段、脂肪酶、角质酶和单链抗体片段等。

3 表面呈现系统的应用

3.1 重组活疫苗

构建重组活疫苗是微生物表面呈现技术的最初研究动因, 基本原理是将病原体上具有免疫原性的多肽表达于减毒或无毒的微生物 (细菌、酵母) 表面, 经口服, 重组微生物在肠道局限性地与其他野生菌长期共生, 从而引起持续的免疫反应及肠粘膜保护性免疫反应。与抗原胞内表达疫苗相比, 抗原表面呈现疫苗使抗原更易于被免疫系统识别, 且活细菌的外膜脂多糖是强免疫原, 恰好成为表面呈现抗原的免疫佐剂。现多种病原性抗原已获得细菌或酵母表面表达, 动物免疫实验显示重组细胞均能诱导高滴度的中和抗体, 如 Schrender 等^[14]报道

将乙型肝炎病毒的两个主要亲水性区表达于酵母细胞表面, 用此进行小鼠腹膜下免疫可激发小鼠体内产生抗-HBsAb. 目前有关研究尚属实验室阶段, 推测以酵母为载体的活疫苗, 安全性好, 可能首先为人们接受. 新近有报道 HIV-1 V₃ 环状序列与昆虫 FHV 壳膜嵌合表达, 其产物诱导豚鼠体内产生高滴度中和抗体, 提示一种新型病毒疫苗的可能^[15].

3.2 抗体库和肽库

90 年代初发展起来的噬菌体呈现技术大大简化了特殊配基、抗原和抗体的筛选, 取得了巨大的经济和社会效益. 近年来, 人们发现细菌表面呈现系统也可用于多肽库、抗体库的构建及重组抗体的筛选, 且较噬菌体呈现系统有许多明显优势: a. 噬菌体呈现系统离不开细菌环境; b. 外源性基因与噬菌体壳蛋白基因 (尤其是基因 III) 融合后, 会妨碍噬菌体感染细菌; c. 噬菌体呈现系统的抗体筛选过程存在许多问题, 如固体支持物的物理性状、粘附与洗脱时的流体动力学条件及最易增殖株优先增殖的控制等; d. 细菌呈现系统除避免了上述问题外, 尚具有独特的操作优势, 如用流式细胞仪 (FACS) 大规模进行阳性克隆的筛选. Francisca 等^[10]证实用 FACS 筛选三轮, 可将阳性克隆从 1: 100 000 中富集到 79% 以上. Badbury 等^[16]将噬菌体呈现系统与细菌表达系统联合应用, 用细菌表面抗原筛选噬菌体抗体库三次可将阳性克隆从 1: 10⁹ 中 100% 选出.

3.3 新型的生物催化剂——微生物酶

新型的微生物酶较传统概念的酶有多种优势: a. 易再生、易恢复. 通常酶在催化过程中不可避免会失活或发生不可逆性活性抑制, 而微生物酶将酶表达于活细胞表面, 由于活细胞不断分裂、增殖及代谢, 就可能在表面酶失活后迅速再生. Hg²⁺ 是 α 半乳糖苷酶的一种不可逆性强抑制剂, 表达 α 半乳糖苷酶- α 凝集素融合蛋白的酵母细胞具有 α 半乳糖苷酶的活性, 研究显示对数生长期的酵母与 Hg²⁺ 共同孵育时, Hg²⁺ 对酵母的 α 半乳糖苷酶活性无影响^[4]. b. 新型微生物酶使用更加方便, 也更有

效率. 一些细菌胞内含有特殊的酶或辅助因子, 但受限于细菌内膜和外膜的屏障, 不能到达胞外发挥酶的活性, 因此常要求化学处理, 破坏细胞膜使酶扩散, 但此过程很容易造成酶失活. 微生物酶表达于微生物表面则无上述问题. c. 可大量廉价获得.

3.4 新型的生物吸附剂

微生物作为生物吸附剂, 早就有认识, 如酵母可结合金属元素, 能用于水源的净化, 金黄色葡萄球菌 A 蛋白能结合免疫球蛋白 Fc 段, 可用于抗体的纯化等. 用表面呈现技术将特殊用途的抗体、蛋白质受体及金属结合蛋白表达于细胞表面, 构建的新型生物吸附剂, 由于其价值低廉、功能多样, 将具有广泛的应用前景, 特别可用于化学物质的分离纯化、毒物、放射性元素的水源净化.

3.5 受体配基的初筛

人类细胞膜受体多分子质量巨大, 将这些受体分子完整地表达于微生物表面一直是生物工程研究的挑战性课题. 近年来, 这项研究已取得很大进展. Strosberg 等成功地将一类 G 蛋白偶联受体^[17], 如 β_1 、 β_2 肾上腺受体、5-HT_{1A} 受体、M₁ 乙酰胆碱受体及 A₁ 腺苷受体等表达于细菌或酵母细胞膜上, 研究显示重组的微生物膜受体的亲和力和选择性与表达于哺乳动物细胞或组织上的相同, 且此类受体成本低廉、操作方便、易于保存、易于使用. 由于此重组受体是微生物膜唯一的人类细胞受体, 故反应本底很低, 是极好的受体配基初筛的工具. 其缺陷是微生物胞内多缺少或无受体信号传导蛋白, 因此此类受体多不能进行信号传导分析, 但另一方面, 这又为真核细胞信号传导系统模拟重建研究提供了很好的模型. Jocker 等^[18]将 G 蛋白基因与人或牛 A₁ 腺苷受体共表达于大肠杆菌, 证实菌膜表达的 A₁ 腺苷受体和 G 蛋白的偶联方式与人类细胞的正常偶联方式相同, 且此结合方式有种种的差异.

4 结 语

微生物表面呈现系统在生物医学多个领域

显示出巨大的应用前景, 其研究工作也取得了瞩目的成就, 但人们尚不得不承认外源蛋白质的表面呈现依然是一种经验性的方法, 表面呈现的蛋白质多是小分子蛋白质, 完整的大分子蛋白质微生物表达与呈现仍然是研究的难题, 有证据表明蛋白质插入大肠杆菌外膜需要分子伴侣的参与^[19], 分子伴侣能帮助抗体片段在噬菌体表面呈现^[20]. 显然问题的解决有待于人们对蛋白质合成、折叠及分泌机制的更深入的认识.

参 考 文 献

- McCafferty J, Griffiths A D, Winter G *et al.* Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990, **348**: 552~ 554
- Little M, Fuchs P, Breiting F *et al.* Bacterial surface presentation of proteins and peptides: an alternative to phage technology? *TIB Tech*, 1993, **11** (1) : 3~ 5
- Georgiou G, Poetschke H L, Stathopoulos C *et al.* Practical applications of engineering Gram-negative bacterial cell surfaces. *TIB Tech*, 1993, **11** (1) : 6~ 10
- Hockney R C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *TIB Tech*, 1994, **12** (11) : 456~ 463
- Schreuder M P, Mooren A T A, Toschka H Y *et al.* Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *TIB Tech*, 1996, **14** (2) : 115~ 120
- 许正平, 李伯泉. 噬菌体展示系统的研究进展. *生命的化学*, 1996, **16** (3) : 29~ 34
- 陈苏民. 丝状噬菌体表面呈现技术. *国外医学分子生物学分册*, 1994, **16** (5) : 193~ 197
- Boulik Y, Bonito P D, Jones I M. Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnology*, 1995, **13** (10) : 1079~ 1084
- Francisco J A, Stathopoulos C, Warren R A J *et al.* Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Biotechnology*, 1993, **11** (4) : 491~ 495
- Francisco J A, Campbell R, Iverson B L *et al.* Production and fluorescence: activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 10444 ~ 10448
- Cornells P, Sierra J C, Jr A L *et al.* Development of new cloning vectors for the production of immunogenic outer membrane fusion proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 1996, **14** (2) : 203~ 208
- Klauser T, Pohlner J, Meyer T F. Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of Neisseria IgA-mediated outer membrane transport. *EMBO J*, 1992, **11** (6) : 2327~ 2335
- Lu Z, Murray K S, Cleave V V *et al.* Expression of thioredoxin random peptide libraries on the *Escherichia coli* cell surface as functional fusions to flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions. *Biotechnology*, 1995, **13** (4) : 366~ 372
- Schreuder M P, Deen C, Boersma W J A *et al.* Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. *Vaccine*, 1996, **14** (5) : 383~ 388
- Scodeller E A, Tisminetzky S G, Porro F *et al.* A new epitope presenting system displays a HIV-1 V₃ loop sequence and induces neutralizing antibodies. *Vaccine*, 1995, **13** (13) : 1233~ 1239
- Bradbury A, Persic L, Werge T *et al.* Use of living columns to select specific phage antibodies. *Biotechnology*, 1993, **11** (12) : 1565~ 1569
- Strosberg A D, Marullo S. Functional expression of receptors in microorganisms. *TIPS*, 1992, **13** (3) : 95~ 98
- Jocker R, Linder M E, Hohenegger M *et al.* Species difference in the G protein selectivity of the human and bovine A1-adenosine receptor. *J Biol Chem*, 1994, **269** (51) : 32077 ~ 32084
- Hardie K R, Lory S, Pugsley A P. Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone like protein. *EMBO J*, 1996, **15** (5) : 978~ 988
- Soderlind E, Lagerkvist A C S, Duenas M *et al.* Chaperonin assisted phage display of antibody fragments on filamentous bacteriophages. *Biotechnology*, 1993, **11** (4) : 503~ 507

Practical Applications of Functional Expression of Heterologous Proteins on Microbial Cell Surfaces. WANG Yutian, HU Jialu (*Institute of Digestive Disease, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China*); CHEN Sumin (*Department of Biochemistry, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*); YANG Shengli (*Shanghai Bioengineering Investigation Center, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China*).

Abstract The recent development of systems for the expression of heterologous proteins on the surface of microorganism has stimulated considerable interest in practical applications. A comprehensive description is given on the construction of expressive vector for surface presentation on microorganisms which include bacteria and yeast, and the applications of these systems.

Key words microorganism, surface presentation, expressive vector