

**Abstract** CL analysis technology were rapidly developed in recent years. It is widely used in the fields of free radicle analysis, chemiluminescence, ultra-weak CL in live system, CL immunoassay, bioluminescence. Principle of ultra-weak chemilumi-

nescence analysis is introduced. Research and practice that was processed by chemiluminescence analysis were explained with several investigation results.

**Key words** luminescence analysis, ultra-weak chemiluminescence

## 选择感染性噬菌体 (SIP) 技术: 一种新的相互作用分子筛选技术

隋建华 宋增璇

(中国医学科学院血液学研究所, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)  
(中国协和医科大学)

**摘要** 选择感染性噬菌体 (SIP) 技术是利用丝状噬菌体次要衣壳蛋白 P III 的分子结构组件, 并以噬菌体展示技术为基础发展而来. SIP 的技术关键在于使没有感染性的噬菌体颗粒必须严格依赖分子间的相互作用、结合而重获感染性, 已有的研究表明 SIP 技术可望成为一项获得相互作用分子对的极其有效和高度特异性的新技术, 具有广阔的应用前景.

**关键词** 选择感染性噬菌体, 分子间相互作用, 技术

**学科分类号** Q7-1

分子间的相互作用, 尤其是蛋白质间的相互作用几乎涉及全部的生命过程, 其重要的理论和应用价值推动着新技术的不断出现和发展. 噬菌体展示技术是其中之一, 该技术以其筛选体系的快速、简便已远非常规的筛选表达性基因文库 (如  $\lambda$ gt11) 所能比拟, 而在此基础上, Plückthun 领导的研究小组近几年来致力于选择感染性噬菌体 (selectively infective phage, SIP) 技术的开发、改进和完善<sup>[1~7]</sup>, 使得筛选过程更为快速有效, 较噬菌体展示又具明显的优点. SIP 技术的核心在于: 缺失 P III 分子一定结构组件后丧失感染性的噬菌体颗粒, 重获其感染能力必须使 P III 分子结构组件恢复完整, 而这一过程必须依赖相互作用分子间发生特异性结合. 因而这项技术对于研究分子间相互作用及从大量文库筛选相互作用的分子对 (如蛋白质-配基, 抗原-抗体) 等工作具有很好的应用价值, 现仅就 SIP 技术的建立和研究现状作一简要介绍.

### 1 SIP 技术的建立

丝状噬菌体是仅能感染具有 F 纤毛的革兰氏阴性菌的一组单链噬菌体, 其次要衣壳蛋白 P III 位

于尾端, 为噬菌体感染 *E. coli* 所必需. 目前在噬菌体展示技术中最常用的就是 P III 展示, 即将外源蛋白或多肽与 P III 的 N 端融合, 从而使它们展示于噬菌体的表面, 再利用其与特定配基亲和结合的性质进行筛选, 一般需经过 3~5 轮亲和结合-洗涤-洗脱-增殖 (洗脱下来的噬菌体, 因为它保留感染性, 能在细菌细胞繁殖) 的富集过程 (panning), 才能从  $10^9 \sim 10^{10}$  的文库中筛到携目的基因的克隆.

P III 分子是噬菌体展示技术中关键的“工具”分子, 其分子质量为 42 ku, 共 406 个氨基酸残基 (aa), 由三个结构域组成. 氨基端结构域 (NT), N1 (68aa) 和 N2 (131aa) 以及羧基端结构域 (CT), 150aa. 中间分别由两个富含甘氨酸的连接肽 (18aa 的 G1 和 39aa 的 G2) 相连. 深入研究这些结构组件的功能特点表明: N1 参与穿细菌细胞膜, 对于噬菌体感染必不可少; N2 参与吸附 F 纤毛; CT 则与噬菌体颗粒从细菌胞内的释放、成熟有关; G1 和 G2 可增强噬菌体的感染性.

在上述研究基础上, 为了使筛选更有效快速, 人们设计并实现了首先使噬菌体颗粒失去感染性,

然后只有严格依赖特异性分子间相互作用才能使其重获感染性的构想: 将 P III 的 NT 与 CT 分离, 然后它们分别与两个分子融合, 其中一个分子与 CT 基因融合而展示于噬菌体的表面, 另一个分子与 NT 基因融合或化学偶联组成衔接子 (adapter), 只有当这两个分子发生特异性结合, P III 的 NT 和 CT 重新相连, 结构恢复完整, 才能使噬菌体颗粒重获感染性, 此即 SIP 技术的核心内容 (图 1). 这种技术只要一步就可获得相互作用分子的基因, 无需噬菌体展示中的噬菌体固相结合和洗脱过程, 可避免非特异性吸附并且其感染背景很低.

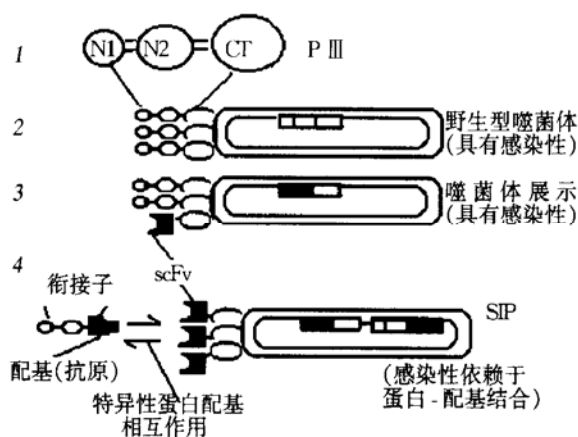


图 1 SIP 与噬菌体展示比较示意图

1: P III 的三个结构域 (N1, N2 and CT); 2: 野生型噬菌体颗粒 (wild type, wt phage); 3: 噬菌体展示 (display phage); 4: 选择感染性噬菌体 (SIP).

## 2 SIP 的类型

SIP 可以在体内 (*in vivo*) 或体外 (*in vitro*) 进行: 前者是两个相互作用的分子 (如抗原-抗体) 都由噬菌体或噬菌粒同一载体所编码, 蛋白质间相互作用发生在细菌的周质腔, 直接从细菌细胞获得带有所需遗传信息具有感染性的噬菌体颗粒, 其最大的优点是设计简单, 在某种程度上可以弥补其缺乏如浓度、温育时间和感染过程本身等实验参数对照的缺点, 这种体内 SIP 有望用于同时筛选两个相互作用文库, 成为分离相互作用分子对最强有力的技术<sup>[2,3]</sup>. 而上述参数在体外 SIP 具可控制性, 配基分子可单独制备, 如从大肠杆菌培养物提取周质可溶性部分、从包涵体复性获得或化学合成, 这大大地扩展了 SIP 的应用范围, 除将多肽类抗原基因与 P III 的 NT 基因融合外, 还可以化学偶联非多肽类抗原 (如有机小分子、糖等), 此配基分子然后与没有感染性的噬菌体文库温育, 再感染细菌可获得有感染性的噬菌体颗粒<sup>[1,4-6]</sup>.

## 3 SIP 的影响因素及应用实例

SIP 建立以后, 有关其影响因素、详细作用机制的解析以及应用实例的研究结果相继报道, 苏黎士大学生物化学研究所 Plückthun 等研究人员在这方面作了许多卓有成效的工作, 使得该技术得以不断发展和趋向完善.

### 3.1 P III 结构域不同组合方式对 SIP 的影响

研究发现存在两条可能的感染途径: 一种是 N2 可缺失, 只保留 N1, 但感染效率较低, 需要高浓度的  $\text{Ca}^{2+}$ , N1 直接与细菌表面结合而不需 F 纤毛; 另一种是 N1、N2 都存在, 无需  $\text{Ca}^{2+}$ , N2 与 F 纤毛吸附导致感染. 这两条途径都能用于 SIP, 但第二条更为有效, 也研究得更多.

在一个荧光素/抗荧光素单链抗体 (single chain Fv, scFv) 的模型系统中, 把纯化的 N1 和 N1~N2 分别与荧光素抗原 (Flu. Ag) 化学偶联成 N1-Flu. Ag 和 N1-N2-Flu. Ag, 再与相应缺失 N1 或 N1-N2 结构域但分别连有 scFv 文库的噬菌体混合, 以重建在相应位置被破坏的野生型的 P III (wild type P III, wt P III), 结果表明 N1-N2-Flu. Ag 比 N1-Flu. Ag 更易使噬菌体重获感染性. 在两种情况下, 感染性随衔接分子的浓度不同而不同, N1-N2-Flu. Ag 抑制 wt 噬菌体进入细胞的半抑制浓度比 N1-Flu. Ag 低两个数量级. 在低 N1-N2-Ag 浓度下, 抗原-抗体分子相互作用不能完全饱和噬菌体以介导 SIP 筛选时的感染, 而在高浓度下细菌被饱和也会阻断感染, 因此该系统更适于筛选高亲和力分子, 且只需很低的 N1-N2-Ag 浓度; 在使用 N1-Ag 时, 必须用高浓度以克服该系统的低感染性的特点, 可用于筛选低亲和力的分子. 两种情况下若缺乏偶连抗原则都完全没有感染性, 也证明感染性的恢复必须严格依赖分子间相互作用<sup>[4]</sup>.

### 3.2 其他影响因素对 SIP 的影响

Graziella 等也以荧光素抗原-抗体为模型系统, 根据其三维结构模型分析出 11 个可能的抗原结合位点, 分别定点突变为丙氨酸, 造成 11 种结合常数各不相同的突变体, 由竞争 SIP 检测感染性, 经过三轮筛选以后, 高亲和力的分子仍可被筛选到, 而多数低亲和力的分子第一轮即被丢失, 同时实验表明亲和力间差异小的高亲和力分子也可通过一轮以上的筛选获得分离. 另外, 亲和力不是唯一影响 SIP 筛选结果和效率的因素, 蛋白质的折叠效率、

稳定性以及展示蛋白对噬菌体的毒性作用等都会有不同程度的影响, 而 SIP 筛选到的一定是在这些方面都最佳化的分子<sup>[5]</sup>.

### 3.3 SIP 技术的应用实例

目前, SIP 应用的实例已不少见. 1996 年、1997 年国外有两篇综述可供参考<sup>[8,9]</sup>. 值得一提的是最近发表的两篇文章, 其中之一是应用 SIP 技术获得一组由非重复序列组成的 scFv 连接肽. 连接肽的改造、优化是抗体工程中的一项重要工作, 而在用 PCR 构建目前应用最广泛的由重复序列 (Gly4Ser)<sub>3</sub> 组成的连接肽的过程中常因同源序列间退火, 存在一定的掺错率, SIP 在此方面的应用给我们以新的启发<sup>[6]</sup>. 另外一篇讨论了应用 SIP 技术再现蛋白质结构特征的天然进化过程, 表明 SIP 可用于通过模拟进化的手段优化蛋白的结构特征, 也颇为引人注目<sup>[7]</sup>.

## 4 SIP 技术存在的问题

如上所述, SIP 尤适于筛选高亲和力、稳定性好、折叠有效的分子. 这一系统有待于进一步阐明和解决的问题有: 对恢复感染性所需的最小亲和力, 分子间结合的动力学参数、结合复合物的尺寸、折叠速率、稳定性等参数范围的确定, 以及同样存在于噬菌体展示技术中展示蛋白的毒性问题等.

## 5 展 望

SIP 技术以其简便高效为研究相互作用分子, 尤其是蛋白质-配基的相互作用提供了新的手段, 且体内 SIP 可望用于同时筛选两个相互作用的文库, 这将会使 SIP 技术成为该领域目前最有前景的一项新技术. 再者 SIP 的设计思路可运用到真核系统, 使基因治疗病毒载体只有当存在外源衔接子时, 病毒才获得感染性, 从而为基因治疗具有体内可控制性提供新的方法.

### 参 考 文 献

- 1 Duenas M, Borrebaeck C A K. Clonal selection and amplification of phage displayed antibodies by linking antigen recognition and phage replication. *Bio/Technology*, 1994, **12**: 999~ 1002
- 2 Gramatikoff K, Georgiev O, Schaffner W. Direct interaction rescue, a novel filamentous phage technique to study protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (25): 5761~ 5762
- 3 Krebber C, Spada S, Desplancq D, *et al.* Co-selection of cognate antibody-antigen pairs by selectively-/infective phages. *FEBS Lett*, 1995, **377** (2): 277~ 281
- 4 Krebber C, Spada S, Desplancq D, *et al.* Selectively-infective phage (SIP): A mechanistic dissection of a novel *in vivo* for protein-ligand interactions. *J Mol Biol*, 1997, **268** (3): 607~ 618
- 5 Pedrazzi G, Schwesinger F, Honegger A, *et al.* Affinity and folding properties both influence the selection of antibodies with the selectively infective phage (SIP) methodology. *FEBS Lett*, 1997, **415** (3): 289~ 293
- 6 Hennecke F, Krebber C, Plückthun A. Non-repetitive single-chain Fv linkers selected by selectively infective phage (SIP) technology. *Protein Eng*, 1998, **11** (5): 405~ 410
- 7 Spada S, Honegger A, Plückthun A. Reproducing the natural evolution of protein structural features with the selectively infective phage (SIP) technology. *J Mol Biol*, 1998, **283** (2): 395~ 407
- 8 Spada S, Plückthun A. Selectively infective phage (SIP) technology: A novel method for *in vivo* selection or interacting protein-ligand pairs. *Nature Med*, 1997, **3** (6): 694~ 696
- 9 Spada S, Krebber C, Plückthun A. Selectively infective phage. *Biol Chem*, 1997, **378** (6): 445~ 456

**Selectively Infective Phage (SIP) Technology: A Novel Technique for Selection of Interacting Molecular Pairs.** SUI Jiar-Hua, SONG Zeng-Xuan (*Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China*).

**Abstract** The SIP technology is achieved by exploring the modular structure of minor coat protein III of filamentous phage, and based on the technique of phage display. In SIP, the infectivity of an otherwise non-infective phage particle is restored strictly upon the binding occurrence between interacting molecular partners. Some mechanistic dissection studies showed that SIP is a novel extremely effective and highly specific technique for identifying interacting molecular pairs, and it is very promising.

**Key words** selectively infective phage, molecular interaction, technique