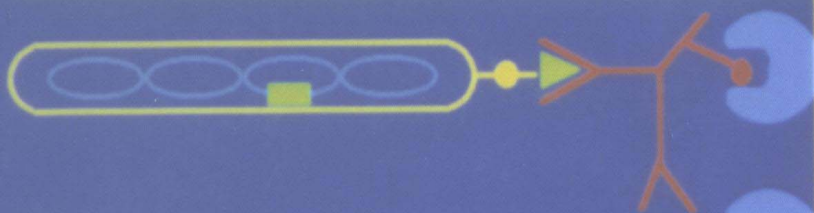


田波 李传昭 编著
孙仑泉 王学

分子进化工程



科学出版社

分子进化工程

MOLECULAR EVOLUTION ENGINEERING

田 波 李传昭 孙仑泉 王 学 编著

Po Tien Li Chuanzhao Sun Lunquan Wang Xue

科学出版社

1999

内 容 简 介

本书系统介绍了分子进化工程原理、随机肽库、人基因工程抗体库、小蛋白质库、组合化学库、随机 RNA 库、核酶和切割 RNA 的 DNA 酶分子的体外进化以及分子进化技术在各方面的应用。

读者对象为从事分子生物学和生物工程等相关专业的研究人员、教师和学生。

图书在版编目 (CIP) 数据

分子进化工程/田波等编著. -北京:科学出版社,1999.7

ISBN 7-03-007064-X

I. 分… II. 田… III. 分子进化 IV. Q75

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 31639 号

YS1 / 05 / 121

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717

科 地 亚 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1999 年 7 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16
1999 年 7 月第一次印刷 印张: 11 1/2
印数: 1—2 000 字数: 255 000

定价: 26.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(新欣))

作者和通讯地址

田 波 中国科学院微生物研究所分子病毒学与生物工程研究室主任、研究员、中国科学院院士。北京海淀区中关村中国科学院微生物研究所。Tel: 62554247; Fax: 62560912; E-mail: tienpo@sun.im.ac.cn; 邮政编码: 100080。

李传昭 中国科学院微生物研究所分子病毒与生物工程研究室博士, 现为美国宾州大学医学院博士后 (Univ. Penn. Medical School, Rheumatology Division, 914 Stellar-Chance Labs, 422 Curie Blvd., Philadelphia, PA 19104 - 6100, USA)。E-mail: chli@mail.med.upenn.edu。

孙仑泉 博士、高级研究员, 澳大利亚强生研究室 DNAzyme 技术组 (DNAzyme Technology, Johnson and Johnson Research Laboratories, GPO Box 3331, Sydney 2001, Australia)。Tel: 61-2-9360 9377; Fax: 61-2-9360 9813; E-mail: sun@angis.org.au。

王 学 中国科学院微生物研究所分子病毒与生物工程研究室博士后, 美国北卡大学免疫学与微生物学系博士后 (Department of Immunology and Microbiology, University of North Carolina, NC, USA)。E-mail: Xue-Wang@med.unc.edu。

前 言

分子进化是达尔文进化论思想在分子水平上的延伸。DNA、RNA、蛋白质和糖等生命大分子的突变和选择成为生物表现型性状进化的基础。分子进化也是研究生命起源的重要内容。分子进化研究不仅可以了解自然界生物进化的分子机理,推动生命科学的理论研究,还可发展成为应用研究的一个新方向——分子进化工程。根据达尔文的进化论思想发展起来的分子进化工程是从人工设计的含所有变异可能性的分子库中,通过特异的筛选模式,获得所需要的生物活性物质,如新型的药物、特异亲合剂、催化剂和抑制剂等,这方面的研究有可能成为药物筛选与设计的新手段。诺贝尔奖获得者 M. Eigen 曾预言:“试管中进化是生物工程的未来”(Eigen & Rigler, 1994)。

随机肽库是分子进化工程中最先发展的领域。根据欲建肽库的多肽长度,合成相应长度的随机序列寡核苷酸,克隆到特定表达载体中,建成所谓“生物肽库”。从理论上它具有多肽的所有可能的序列,例如一个九肽库含有 5×10^{11} 种九肽。生物肽库已在基础研究和应用方面取得可喜进展,例如利用单克隆抗体已在肽库中筛选到与之高度结合的肽配体,用以确定抗原决定簇的结构 (Roberts et al., 1993; Blond-Elguindi et al., 1993)。肽库用于药物筛选正在蓬勃发展,从六肽库中筛选到鸦片受体抗体,对戒毒有重要意义 (王夔, 1994),我们从九肽库中筛选到的高度抑制草鱼出血病毒复制的多肽 (王冰、田波等, 1998),特别有趣的是从环状肽库中获得与促红细胞素 (EPO) 受体结合的环状肽,其结合活性比 EPO 高数倍 (Wrighton et al., 1996)。开辟了受体结合药物的新途径。用化学方法直接构建的肽库有利于杀菌肽的筛选。

随机肽库技术已应用于人抗体库的构建并取得良好效果,在所谓半合成抗体库 (semi-synthetic antibody library) 构建时,抗体重链可变区基因片段中的 CDR1 和 CDR2 来自于人胚系 49 种 V_H 片段,而 CDR3 中插入一个人工合成的随机肽库,使其库容量扩大。

由 DNA 序列重排而产生的蛋白质和 RNA 进化的研究正在兴起,为研制有特殊生物活性的蛋白质或 RNA 创造了条件。在 RNA 分子进化方面应特别指出的是特异切割核酸的酶的研究,即切割 RNA 的核酶 (ribozyme) 和特异切割 DNA 的 DNA 酶 (DNAzyme)。通过核酶分子进化工程的研究已获得高底物结合力和高催化活性的核酶 (Tsang et al., 1994)。

随着技术上的完善,分子进化工程作为新药研制的手段是最具吸引力的。传统的药物筛选费用昂贵,美国一种新药研制费用约 3 亿美元,年投资达 1 000 亿美元,仅次于军费开支。我国长期以来药物以仿制为主,1990 年生产的 783 种药物,仿制品占 97.44%,创制的仅 20 种。在很有限的投资条件下研制新药,定向的或理性的筛选将更为有效。在这方面分子进化工程结合借助电脑的分子设计将是定向筛选药物研制的很有前景的手段。

全书稿件的电脑输入以及图表制作是由庄蔚华女士完成的,文稿校对是由周巍和刘

· v ·

智林同学完成的，特此一并致谢。

限于作者水平，文内不妥和错误之处，请读者指正。

本书由中共中央统战部“华夏英才基金”支持出版，特致衷心感谢。

田 波

一九九八年九月于北京

目 录

前言

第一章 分子进化工程	李传昭 田 波 (1)
第一节 分子进化工程的产生与发展	(1)
第二节 分子进化工程的特点	(2)
第三节 组合库的种类与不同水平上的分子进化	(3)
第四节 分子进化工程的应用	(5)
第二章 随机序列多肽库	李传昭 田 波 (7)
第一节 噬菌体表位随机肽库	(8)
第二节 噬菌体表位随机肽库筛选	(18)
第三节 噬菌体以外的其他方式展示肽库	(23)
第四节 噬菌体表位随机肽库的应用	(28)
第三章 蛋白质水平的分子进化	李传昭 (42)
第一节 噬菌体展示蛋白	(43)
第二节 噬菌体展示蛋白构架	(48)
第三节 缩微蛋白	(54)
第四章 基因工程抗体和人源化抗体库	王 学 田 波 (60)
第一节 抗体分子的结构和功能	(60)
第二节 鼠源抗体的人源化改造	(68)
第三节 小分子抗体	(74)
第四节 抗体库技术	(81)
第五节 抗体基因的表达	(97)
第六节 利用转基因小鼠制备人源抗体	(100)
第五章 化学合成组合库	李传昭 (104)
第一节 多肽合成	(105)
第二节 合成肽库的构建	(106)
第三节 肽段的结构分析	(114)
第四节 筛选策略	(118)
第五节 库合成方法的选择与设计	(119)
第六节 非肽寡聚体和非寡聚小分子库	(120)
第七节 化学合成组合库的应用	(135)
第六章 随机 RNA 库	田 波 (151)
第一节 引言	(151)
第二节 RNA 库技术的发展	(151)

第三节	RNA 库的构建、转录和筛选	(152)
第四节	随机 RNA 库的应用	(154)
第七章	核酶的体外进化与选择	孙仑泉 (156)
第一节	天然存在的核酶	(156)
第二节	核酶的体外选择	(157)
第三节	体外选择产生的新核酶	(160)
第八章	切割 RNA 的 DNA 分子的体外进化	孙仑泉 (164)
第一节	蛋白质、RNA 及 DNA 为基础的酶催化机制	(164)
第二节	脱氧核酶的体外选择	(166)
第三节	脱氧核酶的应用前景	(169)

Contents

Preface	Po Tien
Chapter 1 Molecular Evolution Engineering	Li Chuanzhao and Po Tien
Chapter 2 Random Peptide Library	Li Chuanzhao and Po Tien
Chapter 3 Protein Molecular Evolution	Li Chuanzhao
Chapter 4 Humanized Genetic Antibody Library	Wang Xue and Po Tien
Chapter 5 Chemical Combinatorial Library	Li Chuanzhao
Chapter 6 Random RNA Library	Po Tien
Chapter 7 In Vitro Evolution of Ribozyme	Sun Lunquan
Chapter 8 In Vitro Evolution of DNA zyme	Sun Lunquan

第一章 分子进化工程

李传昭 田 波

所谓分子进化工程 (Molecular Evolution Engineering), 就是在试管中进行的“分子进化”, 是达尔文的进化论思想在核酸、肽或蛋白质以及其他有机物分子等分子水平上的延伸和应用。它通过人工合成或借助于生物表达的手段, 人为制造大量突变, 然后按照特定的需要和目的, 给予选择压力, 将满足要求的、适合特定目的分子筛选出来, 从而实现试管中分子水平上的模拟进化。

第一节 分子进化工程的产生与发展

分子进化工程是一个崭新的领域, 它的产生和发展归功于固相化学的成就以及组合思想在化学和分子生物学中的应用和发展。1963 年 Merrifield 首次提出固相合成的概念, 克服了传统的液相合成的种种弊端, 为合成化学带来了生机。60 和 70 年代, 固相合成化学稳步发展, 特别是肽化学, 由于生物体内 20 种天然氨基酸结构相似但又有区别, 而且容易获取, 是理想的固相合成构件, 并且很多天然小肽有生物活性, 在很多生理及药理过程中起重要作用, 所以肽的合成化学很早受到重视, 渐渐发展成熟。80 年代中期, 出现了“针头法”和“茶装法”的肽库的合成, 拉开了肽库及其他组合库即组合化学的序幕 (Gallop et al., 1994)。

开始, 利用化学合成的方法合成随机序列组合肽库, 构建并筛选含有大量异质性的短肽库, 除用 20 种天然氨基酸作为构件外, 还可以引进 D-氨基酸等非天然氨基酸, 近年来, 还利用大量有机小分子作为构件, 合成具有特定结构和功能的小分子库。建库方法越来越多, 先后出现了分离合成法、光导平行合成法、一珠一化合物法、重复解旋法等新的方法和技术以及 DiversomerTM等自动化合成仪器。化学合成组合库技术渐趋成熟, 应用也越来越广泛。

1985 年, Smith, G. P. 利用基因工程手段将一段外源肽序列展示在丝状噬菌体的表面。1988 年他们又将合成的随机序列寡核苷酸片段克隆到丝状噬菌体, 表达后每个丝状噬菌体粒子表面展示一种肽段, 所有这些展示不同肽段的噬菌体构成噬菌体展示肽库。通过亲合筛选, 得到与特定蛋白结合的结合肽。并且由于表达的肽与编码基因直接关联, 活的噬菌体繁殖扩增后极易分析目的克隆的结构 (Scott & Smith, 1990)。噬菌体展示技术迅速被越来越多的分子生物学家所采用。方法上也有很大进展, 除用丝状噬菌体表达载体外, 噬菌粒、核糖体等都用来展示外源片段。不仅能够展示小的肽段, 抗体以及小的蛋白质片段或结构域等大量分子在噬菌体表面获得展示。展示库成为分子进化工程的重要部分。表 1-1 列出了分子进化工程的发展历程。

表 1-1 分子进化工程的发展历程

年 份	里 程 碑	参 考 文 献
1984	多针法合成有限肽库	(Geysen et al., 1984)
1985	茶装法合成有限肽库	(Houghten, 1985)
1986	重复方法构建筛选多针系统固相合成的肽库	(Geysen et al., 1986)
1986—1990	多聚核苷酸库的研制开发	(Horwitz & Loeb, 1986; Oliphant et al., 1986; Joyce, 1989; Blackwell & Weintraub, 1990; Ellington & Szostak, 1990; Pollock & Treisman, 1990)
1988	分离合成法液相合成有限肽库	(Furka et al., 1988a, b)
1988	噬菌体展示肽库的构建筛选	(Smith et al., 1988)
1990	光导平行合成法合成肽库	(Fodor et al., 1991)
1990	丝状噬菌体展示肽库的构建和应用	(Cwirla et al., 1990; Devlin et al., 1990; Scott & Smith, 1990)
1991	一珠一化合物肽库的合成与筛选	(Lan et al., 1991)
1991	重复方法液相肽库的合成及应用	(Houghten et al., 1991)
1992	基于苯丙二氮杂草的有限小分子库的合成	(Buin & Ellman, 1992)
1992—1993	一珠一化合物非肽库的编码方法的研制开发	(Brenner & Lerner, 1992; Kerr et al., 1993; Needles et al., 1993; Nicolai et al., 1993; Ohlmeyer et al., 1993)
1992—1993	主要制药集团试验性开发介入	
1994—1995	世界范围内的广泛兴趣,大量资金的投入与开发	(Brown, 1996)

第二节 分子进化工程的特点

分子进化工程的显著特点是分子多样性。这一特点是由组合化学的方法决定的。

组合化学是数学上的排列组合思想与合成化学的有机结合。合成某一大分子,需要多步反应,每一步反应加入一种构件,如果选用结构类似但又不完全相同的构件,那么这些构件不同的顺序的排列组合将得到不同的分子。生物大分子核酸和蛋白质的基本构成单位核苷酸和氨基酸就是这样的结构类似而又不完全相同的分子构件,核酸和蛋白质的分子多样性实际上也就是在一级结构上就存在着构件的大量不同顺序的排列组合。如果将一定长度上这些构件的所有可能顺序的排列组合都合成出来,那么将得到这一长度上所有可能的排列顺序分子,这些所有可能的分子全体就组成了该长度的随机序列组合库。由此可见,理论上组合库中分子数目是相当巨大的。假定每步反应可以应用的构件为 X 种,库中每个分子含有 Y 个构件,那么库中随机序列组合的分子总数 $N = X^Y$ 。如用四种碱基合成的编码六肽(18个碱基)的寡核苷酸库中 DNA 种类数 $N = 4^{18} (69 \times 10^9)$ 。根据 DNA 兼并密码子的性质,其中含有的基因数为 $(4 \times 4 \times 2)^6$ 即为 1.07×10^9 。20 种天然氨基酸合成的六肽库中六肽数目为 $20^6 (6.4 \times 10^7)$ 。

合成化学和分子生物学的发展已能将这些随机构件如核苷酸、氨基酸或其他有机小分子，通过一定的方法系统地连接在一起，构建含有一大套不同结构的随机组合分子库。

组合库中囊括的一定长度上所有构件的排列顺序，也就是这一长度的所有可能的突变，这些突变可能是自然界中已经发生过的或正在存在或已经淘汰的，也可能是自然界中尚未存在或即将发生或很久以后才会发生的。自然突变需要经历一个漫长的过程，突变后的性状，按照“适者生存，不适者淘汰”的自然筛选法则也需要几万年，几百万年甚至更长的筛选过程。而利用组合化学手段，可以在短短几周内创造出在自然条件下漫长的历史过程中才能创造的大量突变，然后根据特定的目的和需要，施加选择压力，从中筛选出或具有一定亲和力、或具有一定活性的目的分子，这种模拟进化，不仅能够提供一定活性、特性的功能分子，用作研究试剂和药物先导化合物，而且有助于研究分子水平上核酸、蛋白质及其他有机分子相互识别与作用的分子机理以及分子水平上的进化机理。

Stoddard 在论述组合化学时，提出了三大特点 (Ellman et al., 1997): (1) 组成库自身的分子类型。组合库由完全随机序列的氨基酸或寡核苷酸组成，也可以说由随机的、特定点蛋白或寡核苷酸点突变体组成，即由起始分子的众多突变体组成，有机小分子组合库可以通过许多合成方法合成，然后筛选出某一特定的可以用作药物的小分子。任何组合库中，不管它是何种分子类型，所有化合物都相互关联。它们来自同一套化学构件，每一个分子都是这些共同构件组成的独特的组合序列，根据库分子类型和应用的合成策略，所有分子具有共同的结构中心或合成键。(2) 实验上能够达到足够的分子多样性并分析其结构。遗传编码库都会达到 10^6 — 10^9 个独立相关分子，如重组 DNA 方法构建的人生长激素 (hGH) 组合库，达 10^7 突变体，每个突变体展示在不同病毒颗粒表面。因为每个克隆都含有表达该突变体的编码基因的单种病毒包装，一旦得到符合要求的单拷贝，便可精确地确定其序列和结构。对于人工合成的化学组合库，可以通过直接微量测序或分析其编码序列，推导出目的分子的结构。(3) 组合实验中库的筛选过程。方法多种多样，包括从库的所有成员中亲和筛选特定结合分子以及空间分离系统中分析单个化合物的酶抑制活性等。通过高通量的筛选，逐步进化，最终得到具有一定功能或活性的目的分子。

因而，分子进化工程技术上包括三个方面：(1) 将各种构件随机组合起来构建大容量的组合库；(2) 某一特定生物活性的高流通量筛选方法；(3) 活性成分的分析鉴定，如直接化学分析、解旋方法和编码途径等。每种建库方法都有其筛选与结构分析方法。

第三节 组合库的种类与不同水平上的分子进化

根据建库方法，组合库分为分子生物学库和化学合成库两大类。分子生物学库是通过人工合成随机序列的 DNA 片段，基因工程手段克隆表达、主要以噬菌体展示库为代表，包括肽库、抗体库、小蛋白库。化学合成库是用多种化学合成的方法构建和筛选组

合库，如肽库、寡核苷酸（特别是 RNA 库）、有机小分子库等。图 1-1 列出了各种各样的组合库。



图 1-1 组合库的种类

采用不同的构件构建不同类型的组合库决定了在不同的水平上所进行的分子进化。根据库的构件不同，组合库可以分为肽库、抗体库、蛋白库、核酸库和有机小分子库等，因而可以进行各种水平上的分子进化。

(1) 多肽进化 通过噬菌体展示肽库和化学合成肽库的构建和筛选来完成。从随机序列肽库中筛选蛋白或其他分子的特异结合肽、配体肽，用于抗原-抗体反应分析、酶作用底物分析、抗菌肽以及酶抑制剂的开发。

(2) 抗体进化 利用噬菌体展示抗体、抗体片段、单链抗体等构建和筛选各种类型的抗体库，从中筛选所需要的抗体，用作研究、医疗诊断和药用试剂及药物。

(3) 蛋白质水平上的分子进化 利用噬菌体展示蛋白，将蛋白的某一功能区引入突变或随机序列，构建容量巨大的随机分子库，从中筛选具有特定结构和功能的新型蛋白。

(4) 核酸进化 通过化学合成和（或）PCR 方法构建容量巨大的随机序列单链寡核苷酸（DNA 或 RNA）库，从中筛选许多靶分子，包括核酸结合蛋白如聚合酶、转录因子等以及有机小分子如 ATP、茶碱等的高亲和配体。这一技术还称为 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)，可以构建多样性达 10^{15} 的寡核苷酸库。筛选的高亲和寡核苷酸结合配体可以用于基础研究试剂以及诊断与治疗药物 (Gold, 1995)。

五、有机小分子进化 利用化学合成的方法构建和筛选非肽寡聚体和非寡聚小分子库。这些有机小分子具有分子量低、蛋白酶解抗性、或本身就是芳环结构等适于用作药物的结构和分子、是理想的药物筛选源。许多公司投入巨资构建和筛选有机小分子库，已广泛用于受体拮抗剂、酶抑制剂的筛选、研制与开发。

第四节 分子进化工程的应用

传统的药物筛选，依照特定的生物功能从动物、植物、微生物发酵液或大量合成化合物等复杂混合物中提取，这种纯化和活性成分的鉴定过程常常需要几年的时间，耗资巨大。而采用分子进化工程技术则会大大加速这一过程。根据所需要的药物特性，选用适当的方法构建含有大量异质性分子的组合库，用靶分子进行筛选，先确定药物先导化合物；然后进一步优化药物先导分子，最终确定出药物分子的结构。研究表明，分子进化工程手段是快速而有效的。现在几乎所有大的制药集团都成立了分子进化工程或称组合化学研究开发小组，还成立了许多以分子进化工程技术为依托的新公司。分子进化工程被公认为是近年来药物化学领域的最重要进展。专门创办了这一新领域的专业期刊（如《分子多样性》Molecular Diversity）。几乎每一期的 Tetrahedron Letters、Journal Medicinal Chemistry、Journal of the American Chemical Society 和 Journal of Organic Chemistry 等都出现该领域的论文及文献。过去的五六年里，至少发表了 1 000 篇论文，新的方法尚在不断出现，这一崭新的领域正在快速发展。

在基础研究方面，从肽库中筛选特异结合肽，从抗体库中筛选亲和力强的单链抗体或其他类型的抗体，从核苷酸库中筛选高亲和力的寡核苷酸，蛋白质库中筛选特定功能的目的蛋白。分子进化工程技术已成为抗原-抗体反应、蛋白质相互作用、蛋白质-核酸相互作用等重要的分析手段。

众多公司的参与和大量资金的投入，目的是利用分子进化技术加速药物筛选过程。分子进化工程已经广泛用于治疗癌症、艾滋病、心血管病、神经性疾病等的药物的筛选与开发，已经筛选出大量的受体拮抗剂、酶抑制剂，一些很有希望的药物先导化合物已进入临床前期研究，不久将进入临床试验（Lam, 1997）。可以预料，分子进化工程将极大地推动生物工程和药物化学的发展，为预防和治疗各种疾病，作出巨大贡献。

参 考 文 献

- [1] Blackwell T K. Weintraub H. . Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. Science, 250, 818: 1990
- [2] Brown D. . Future pathways for combinatorial chemistry, Molecular Diversity, 2, 217: 1996
- [3] Bunin B. A. . Ellman J. A. . A general and expedient method for the solid phase synthesis of 1, 4-benzodiazepine derivatives, Journal of the American Chemistry Society, 114, 10997: 1992
- [4] Brenner S. . Lerner R. A. . Encoded combinatorial chemistry, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 89, 5381: 1992

- [5] Ellington A. D., Szostak J. W., In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346, 1104: 1990
- [6] Ellman J. A., Stoddard B., Wells J. A., Combinatorial thinking in chemistry and biology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2779: 1997
- [7] Fodor S. P. A., Read J. L., Pirrung M. C. et al., Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science*, 251, 767: 1991
- [8] Furka A., Sebastyen F., Asgedom M. et al., Cornucopia of peptide by synthesis, Abstracts of the 14th International Congress of Biochemistry, Prague, July 10—15: 1988a
- [9] Furka A., Sebastyen F., Asgedom M. et al., More peptides by less labor, Abstracts of the Xth International Symposium on Medicinal Chemistry, Budapest, Aug. 15—19: 1988b
- [10] Gallop M. A., Barrett R. W., Dower W. J., Applications of combinatorial technologies to drug discovery, 1. Background and peptide combinatorial libraries, *Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 1233: 1994
- [11] Geysen H. M., Melven R. H., Barteling S. J., Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 81, 3998: 1984
- [12] Geysen H. M., Rodda S. J., Mason T. J., A priori delineation of a peptide which mimic a discontinuous antigenic determinant, *Molecular Immunology*, 23, 709: 1986
- [13] Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O. et al., Diversity of oligonucleotide functions, *Annual Review of Biochemistry*, 64, 763: 1995
- [14] Houghten R. A., Pinilla C., Blondelle S. E. et al., Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery, *Nature*, 354, 84: 1991
- [15] Horwitz M. S. Z., Loeb L. A., Promoters selected from random DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7405: 1986
- [16] Joyce G. F., Amplification, mutation, and selection of catalytic RNA, *Gene*, 82, 83: 1989
- [17] Kerr J. M., Banville S. C., Zuckermann R. N., Encoded combinatorial peptide libraries containing non-natural amino acids, *Journal of the American Chemical Society*, 115, 2529: 1993
- [18] Lam K. S., Salmon S. E., Hersh E. M. et al. One-bead, one-peptide: a new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, *Nature*, 354, 82: 1991
- [19] Lam K. S., Application of combinatorial library methods in cancer research and drug discovery, *Anti-Cancer Drug Design*, 12, 145: 1997
- [20] Oliphant A. R., Nussbaum A. L., Struhl K., Cloning of random-sequence oligodeoxynucleotides, *Gene*, 44, 177: 1986
- [21] Parmley S. F., Smith G. P., Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes, *Gene*, 73, 305: 1988
- [22] Pollock R., Treisman R., A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities, *Nucleic Acids Research*, 18, 6197: 1990
- [23] Nicolaiev V., Stierandova A., Krchnak V. et al., Peptide-encoding for structure determination of nonsequenceable polymers within libraries synthesized and tested on solid phase supports, *Peptide Research*, 6, 161: 1993
- [24] Ohlmeyer M. H. J., Swanson R. N., Dillard L. W. et al., Complex synthetic chemical libraries indexed with molecular tags, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10922: 1993
- [25] Needels M. C., Jones D. G., Tate E. H. et al., Generation and screening of an oligonucleotide-encoded synthetic peptide library, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10700: 1993

第二章 随机序列多肽库

李传昭 田 波

引 言

传统的药物筛选是从自然界的动物、植物、微生物中分离天然的具有特定药理作用的化学物质或结构，然后直接应用或据此作为药物化学的先导化合物，再进一步设计、加工、合成、筛选有效的功能药物。现有的绝大多数药物是通过这种途径发现的。但该方法具有很大的盲目性，往往筛选过程周期长，费用昂贵（王夔，1994）。

近年来，在分子生物学飞速发展的基础上，引入组合策略和模拟进化思想，建立起一种从噬菌体表位随机序列多肽库（phage display random peptide library）中筛选药物先导化合物的新方法（Smith, 1985; Gallop, 1994）。利用基因工程手段将合成的一组一定长度的随机序列寡核苷酸片段克隆到特定表达载体中，使其表达产物以融合蛋白的形式呈现在活的丝状噬菌体表面。由于肽库中包含了该长度多肽的所有可能的氨基酸排列顺序或其中的绝大部分，每一个噬菌体和细胞呈现其中的一种肽段，因而库容量极大，易于筛选和扩增。通过亲和筛选，可以得到具有较高特异性和亲和力的理想的目的肽段。通过这种方法，可以快速筛选生物活性肽、蛋白质、受体、其他化合物等新型药物或先导化合物。这一方法具有传统的药物筛选无法比拟的优越性。在基础理论研究和实际应用中都有广泛的用途，将对生命科学的多个领域产生深远影响。

肽库技术的形成基于两方面的进展。早在1986年 Geysen 认为：（1）含有关键残基的短肽能够模拟蛋白质上的决定簇。（2）多数情况下，几个关键残基与它的结合分子所形成的非共价键构成了全部结合的主要部分，即蛋白质之间的相互作用或识别是通过局部肽段间的相互作用来实现的（Geysen, 1986）。上述两点为肽库的提出奠定了理论基础。

1982年，Dulbecco 提出将病原体的免疫原与 λ 噬菌体和其他病毒的衣壳蛋白融合，便可产生能够用作疫苗的表面展示外来多肽的病毒颗粒（Dulbecco, 1986）。1985年 Smith 描述了外源肽段在丝状噬菌体 fd 表面的展示结果（Smith, 1985）。1988年，他们建立了一种新的表达载体：可选择抗体的丝状噬菌体 fd 载体（antibody-selectable filamentous fd phage vector），它能将外源短肽表达并伸展到噬菌体的表面，可以用亲和筛选法筛选表达特异肽序列的噬菌体，通过测定噬菌体的 DNA 序列，就可以知道所表达的肽段的氨基酸序列（Parmley, 1988）。这一进展为肽库的提出提供了技术保障。

第一节 噬菌体表位随机肽库

噬菌体表位随机肽库是将外源肽段与丝状噬菌体 pⅢ 或 pⅦ 等蛋白融合, 将外源肽展示在丝状噬菌体表面。在仍然保持噬菌体功能的情况下, 丝状噬菌体自身的特点适于用来构建多肽库 (Cortese, 1994)。

(1) 它能够接受在 pⅢ 和 pⅦ 衣壳蛋白的 N-端插入外源多肽, 并将外源多肽表达后展示在病毒颗粒表面, 便于被相应的蛋白受体或抗体识别 (Smith, G. P., 1991)。

(2) 即使外源序列干扰病毒的生活周期, 也能通过“双基因”或噬菌粒系统将多肽表达于表面, 产生携带野生型和重组衣壳蛋白的嵌合噬菌体。

(3) 易于扩增, 重组后的噬菌体能够通过感染大肠杆菌得到扩增, 对于筛选得到的能够特异结合某一靶分子的多肽的噬菌体, 也能够再感染大肠杆菌, 扩增后测序分析 DNA 序列。

(4) 另外, 噬菌体颗粒在各种洗脱 (如低 pH 值) 下仍然稳定, 可以感染形成很高的滴度 (一般达 10^{12}), 这样高的滴度足以代表库中所有克隆。

丝状噬菌体表面展示技术是在对丝状噬菌体的结构、基因组及生活周期的深入认识基础上建立、发展起来的。

丝状噬菌体的形态结构

丝状噬菌体 (filamentous phage) 主要包括大肠杆菌 (*E. coli*) 丝状噬菌体 M13、fd、f1 等, 是仅能感染具有 F 纤毛革兰氏阳性细菌的一组噬菌体。它们之间亲缘关系十分密切, 基因组都是一单链环状 DNA, 同源性高达 98% 以上。噬菌体颗粒呈柔性长丝状, 由外壳蛋白包裹 DNA 构成, 直径约 6.5nm, 长度 900nm。

(一) 丝状噬菌体的基因组

丝状噬菌体的基因组是一单链环状 DNA, 全序列已测出, 长 6 000 条核苷酸, 共有 10 个基因, 分别编码 10 种蛋白质。主要外壳蛋白是基因 Ⅷ (g8) 编码的 pⅦ 蛋白质, 在野生型噬菌体中约合 2 700 个拷贝, 围绕基因组 DNA 呈螺旋对称排列, 构成圆管形的噬菌体外壳。其他 4 种少量外壳蛋白是基因 Ⅲ、Ⅵ、Ⅶ 和 Ⅸ (gⅢ, gⅥ, gⅦ 和 gⅨ) 编码的 pⅢ、pⅥ 和 pⅨ, 在外壳中各有约 5 个拷贝。pⅦ 和 pⅨ 是高度疏水性的多肽, 分别由 33 和 32 个氨基酸组成, 在噬菌体组装开始时, pⅦ 与 pⅥ、pⅨ 及 DNA 的发卡结构结合成为组装起始信号, 组装后 pⅥ 和 pⅨ 成为噬菌体圆管形外壳顶端的“塞子”, pⅢ 和 pⅥ 蛋白位于噬菌体外壳的尾端, pⅥ 由 112 个氨基酸组成, 位于形成圆桶形壳的 pⅦ 和 pⅢ 之间, pⅢ 在噬菌体的最尾端, 结构可变, 在电镜下可呈球形或线状, 具有识别结合 F 纤毛的功能, 是噬菌体感染大肠杆菌所必需 (图 2-1)。