

## 知识介绍

# 噬菌体展示技术在纳米材料合成中的应用

郭亚平<sup>1</sup>, 谢练武<sup>2</sup>

(1. 中南林业科技大学, 湖南 长沙 410004; 2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

**摘要:**建立在化学、生物学和材料学等交叉学科基础上的噬菌体展示技术,为合成、组装新颖纳米材料提供了一条新的途径。噬菌体作为一种信息载体,能模拟自然进化过程产生特异性多肽,从而在分子水平上识别靶材料并进行自组装。噬菌体的单分散性和长杆状外形,造就了特定的识别部位,使各种纳米材料有序地组装成规则的层次结构。通过噬菌体展示技术筛选出来的特异性识别肽,可以指导多肽介导的矿化过程,从而合成具有应用价值的一系列无机和有机纳米材料,进一步制成的纳米装置将应用于电子、光学、生物技术和医学领域。

**关键词:**噬菌体展示技术; 纳米材料; 合成

**中图分类号:** Q939.48; O614

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-4320(2008)05-0089-02

## Application of phage display techniques in synthesis of nanomaterials

GUO Ya-ping<sup>1</sup>, XIE Lian-wu<sup>2</sup>

(1. Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China;

2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** Phage display techniques (PDT) provide unprecedented approaches to synthesize and assemble novel nanomaterials by combining chemistry, biology and materials science principles. Through simulating the evolution process in nature, some phage is used as an information-carrier to identify specific peptide that can recognize target materials at the molecular level. The monodispersity and long rod shape of the phage enable the organization of various nanomaterials into regularly ordered hierarchies. The specific recognition peptides of the phage screened by PDT can direct peptide-mediated mineralization processes to create many useful inorganic and organic nanomaterials, which could be useful for electronic, optical, biotechnological and medical application in the future.

**Key words:** phage display techniques; nanomaterial; synthesis

纳米材料日益需要同时满足 2 个要求:一是与传统材料相比性能更加卓越,二是要能被组装成非常精细的结构<sup>[1]</sup>。通过对结构、组成和尺寸加以精巧设计,许多无机或有机合成纳米材料具有非常独特的性质(如超导体、光散射、数据储存与门控开关),但是要将它们组装成大规模的装置却难度较大。自然界生物在数百万年的进化过程中产生出大量的纳米材料,并得到不断完善<sup>[2]</sup>,如玻璃海绵(光纤)、软体动物外壳和脊椎动物骨骼等。近年来研究人员利用不同噬菌体展示出不同的多肽库,通过筛选识别肽,成功阐明了合成半导体、金属和有色金属高技术材料的特定功能基因簇<sup>[3-4]</sup>。本文主要介绍噬菌体展示技术用于功能纳米材料合成的研究以及其应用前景。

## 1 噬菌体展示技术的基本原理

噬菌体展示技术(phage display techniques, PDT)

产生于 1985 年,Smith<sup>[5]</sup>第一次将外源基因插入丝状噬菌体 f1 的基因 III 中,使目的基因编码的多肽以融合蛋白形式展示在噬菌体表面,从而创建了噬菌体展示技术。噬菌体展示技术简言之就是将多肽或蛋白质的编码基因或目的基因片段克隆到噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置,在阅读框正确且不影响其他外壳蛋白正常功能的情况下,使外源多肽或蛋白与外壳蛋白融合表达,融合蛋白随子代噬菌体的重新组装而展示在噬菌体表面。

该技术的主要特点是将特定分子的基因型和表型统一在同一病毒颗粒内,即在噬菌体表面展示特定蛋白质,而在噬菌体核心 DNA 中则含有编码该蛋白的结构基因。另外这项技术将基因表达产物与亲和筛选加以结合,利用适当的靶蛋白将目标蛋白或多肽筛选出来。到目前为止,已开发出了单链丝状噬菌体展示系统、λ 噬菌体展示系统、T4 噬菌体展示系统等几种噬菌体展示系统。

其技术原理可用 M13 单链丝状噬菌体展示系统为例说明。M13 噬菌体是一种被多种外壳蛋白包裹的单链 DNA 组成的细菌病毒。它呈长杆丝状,长约 880 nm,宽约 6.6 nm<sup>[6]</sup>。病毒的主要外壳蛋白由螺旋型排列的 2 700 个拷贝的 pⅢ蛋白组成,而极少量的 5~7 拷贝的 pⅤ、pⅥ、pⅨ和 pⅦ蛋白分列于杆状两端。分别对这些蛋白进行基因改造,在噬菌体不同部位展示出较短的多肽序列(10 余个氨基酸片段)。通过在噬菌体基因组特定部位随即插入 DNA 片段,就会在病毒颗粒表面展示出高度多样性的多肽库(最多 10<sup>11</sup>个随机序列)<sup>[7]</sup>。

被展示的多肽或蛋白可以保持相对独立的空间结构和生物活性,以利于靶分子的识别和结合。多肽库与固相上的靶蛋白分子经过一定时间孵育后,用适当的洗脱剂,洗去未结合的游离噬菌体,然后以竞争受体或酸洗脱与靶分子结合吸附的噬菌体,洗脱下来的噬菌体感染宿主细胞(如 *E. coli*)后经繁殖扩增,进行下一轮洗脱,经过 3~5 轮的“吸附-洗脱-扩增”后,与靶分子特异结合的噬菌体得到高度富集<sup>[8]</sup>。得到的噬菌体制剂可用来做进一步富集有特异结合性能的目标噬菌体。最后通过噬菌体基因组 DNA 分析确定优势结合多肽序列。

过去这种技术主要用于确定蛋白抗原决定簇、寻找小型抗体和研究蛋白质的相互作用<sup>[9]</sup>,近来已经用于鉴别与各种无机材料(如半导体、磁体、金属和光学材料等)具有亲和作用的蛋白序列<sup>[10-13]</sup>。

## 2 展示筛选出的噬菌体指导纳米材料合成

用来阐明噬菌体外壳黏性多肽的晶体结构和化学特异性的方法很多。譬如采用 X 衍射光谱仪和荧光显微镜分析噬菌体黏性多肽时,发现噬菌体可以与痕量的纳米颗粒(Au、CdS 和荧光标记材料等)相互结合,并且可以用第二抗体打上标记<sup>[14]</sup>。用表面探针显微镜可以对合成多肽的黏性力进行定量分析<sup>[13]</sup>。如果氨基酸侧链碱性越强(带正电荷越多,如精氨酸、组氨酸、赖氨酸),作用底物的电负性越大,则黏性蛋白与底物间的亲和力就越大。

从噬菌体展示库中筛选出具有特定识别功能的多肽,可以作为纳米材料合成的模板,在模板上生长出各种无机晶体和纳米材料。Flynn 等<sup>[14]</sup>找到了与各种 II-IV 型半导体材料(如 ZnS、CdS、PbS 等)具有高亲和力的黏性蛋白,将它用于多种无机晶体的相转移矿化过程,以控制材料组装的性状与形态,如线型和分支型的 ZnS 结合蛋白分别指导合成立方晶核和

六棱型晶核的 ZnS 纳米晶体。

如果将各种晶体成核性蛋白融合到各种噬菌体外壳蛋白中,就能构建出不同的纳米材料和纳米装置。世界上已报道了通过基因改造的 5 种类型工程噬菌体。如果仅仅修饰 pⅢ外壳蛋白,即可在噬菌体头部合成 ZnS 和 CdS 纳米粒<sup>[1]</sup>;Nam 等<sup>[15]</sup>用 6 个 His 和 HPQ(His-Pro-Gln)抗生物素蛋白链菌素(streptavidin)黏性蛋白部位修饰噬菌体两端的外壳蛋白 pⅢ和 pⅨ,得到的噬菌体可以作为合成纳米环的模板;利用噬菌体质粒载体在主要外壳蛋白 pⅢ上表达半导体和金属结合的蛋白,就可在噬菌体模板上合成平面多晶半导体、磁体和纳米线;同时修饰外壳蛋白 pⅢ和 pⅦ,就可获得各种以噬菌体为模板的阵列结构<sup>[16]</sup>;如果将两端和中间的外壳蛋白同时进行修饰,得到的噬菌体可以执行多种程序行为,有可能在电路中作为电子元件或连接器件,实现微电子器件的自我连接。

## 3 噬菌体展示技术在新材料领域的应用前景

通过噬菌体展示技术筛选和适当的基因改造,噬菌体将在 2 个领域上有一定的应用前景。一是在医学领域,可以作为人体组织工程化和创伤愈合的模板材料。这种模板首先必须能模拟自然状态下的细胞外基质环境,这个环境由孔状结构的纤维蛋白组成(支撑细胞),并受化学信号指导进行方向性排列。在外壳蛋白经过基因改造的基础上,噬菌体颗粒上可以获得各种化学信号的空间排列,使细胞活性按要求得到控制<sup>[17]</sup>。另外,要想获得大量单分散性的噬菌体模板,最简单最有效的方法就是在大肠杆菌中大量复制噬菌体。最终,噬菌体自我组装成具有方向性的结构网络,在生物组织中为细胞提供物理支撑和方向性指导。二是在寻找与新材料具有特异性高亲和力多肽方面,噬菌体的外壳蛋白可以作为有机物和无机物间的连接器件。假如对某种功能材料具有高亲和力的一种多肽可以与另一种自组装多肽能相互结合,就会为纳米材料的自组装和纳米级高密度电路的组装开辟出新的途径<sup>[18]</sup>。这种纳米材料或装置有可能在光学计算、数据储存、传感器和光电池等领域得到应用。

## 参考文献

- [1] Lee S W, Mao C, Flynn C E, et al. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses[J]. Science, 2002, 296: 892-895.

(下转第 94 页)

应。他们从 18 万多种候选物质中挑选出比较适合的 72 种。随后, 研究组在实验室合成了这些酶候选物。32 种酶可以催化反应, 被命名为 retro-醛缩酶; 其中一些可以将反应速度提高 4 个数量级。研究人员用 X 射线衍射确认了合成酶的结构与他们设计的结构一致。

通常, 在生物学上常用的 retro-醛缩酶将  $\beta$ -羰基化合物分解成 2 种羰基衍生物。另外, 研究组选择一种未在生物学体系发现的物质, 即 4-羟基-4-(6-甲氧基-2-萘基)-1-丁酮作为底物。

因为 retro-aldol 反应包含了许多不同转换状态的反应步骤, 所以研究组为酶设计了一个活性点, 使其在每层上实现所有转换。Jiang 和 Althoff 解释说, 该设计将催化剂残留物准确地放在所有关键步骤, 同时也说明了构象的变化。

C&EN, 2008, 86(10): 13

### 芳香族氯捕捉剂

为了捕捉阴离子, 有机主体分子通常将强氢键给体, 如 N—H 键或 C—H 键, 连接在阳离子中心上。目前, 印第安那大学(Indiana University)的化学家们表示, 一种只带有弱的芳香族 C—H 键的中性多环化合物可以用与强氢键物质类

似的吸引力捕捉氯离子。

Amar H. Flood 和 Yongjun Li 用“点击化学”和其他反应, 创造了一种中性多环化合物, 它由 4 个苯环和 4 个三唑三氮杂茂交替组成。这 8 个环中的每一个都能提供一个捕捉氯的 C—H 键。

Flood 和 Li 将多环化合物对氯离子优良的吸引作用归结于三唑部分强烈的偶极作用和适合阴离子尺寸的中间空洞。Flood 说, 基于点击化学的合成使其可以方便地制造一系列类似的多环化合物, 用来螯合其他阴离子。

C&EN, 2008, 86(9): 7

### 不利用氧化还原反应机理的传感器

科学家们致力于开发寻找过氧化物基爆炸物(比如 2005 年伦敦地铁爆炸时所用的炸药)的简便、低成本感应器, 它可以选择性地探测过氧化氢蒸气。除用于反恐领域, 这类装置还能用来探测工业设备中的  $H_2O_2$ , 暴露在化学品中的设备是一个很重要的健康问题。

这种新型  $H_2O_2$  探测器的关键检测组分是金属酞菁。探测过氧化物基炸药的设设备用  $H_2O_2$  作前驱体, 因为过氧化物炸弹通常含有微量的这种化学成分。加

利福尼亚圣地亚哥分校(University of California, San Diego) William C. Trogler、Andrew C. Kummel 和 Ivan K. Schuller 领导的小组发明了一种火柴盒大小的感应器, 它可以探测十亿分之几范围的  $H_2O_2$  蒸气。据研究人员所说, 这种廉价、简便的设备是在检测  $H_2O_2$  标准方法基础上进行改进得到的, 标准方法需要复杂且昂贵的设备。

该装置采用金属酞菁薄膜作为它的关键感应组分。这些膜是化敏电阻器, 它们暴露在不同的化学物中, 其传导性将会改变。Trogler 解释说: “对金属酞菁来说, 氧化物通常在电流上有增加, 然而还原基团则起到相反的作用”。

然而, 在氧化剂  $H_2O_2$  的存在下, 金属酞菁的表现形式有所不同。钴酞菁在电流上减小, 但其他的金属酞菁(如铜或镍)则在电流上增加。因此, 排列了钴和铜酞菁的感应器对  $H_2O_2$  显示出独特的性质。

亚利桑那州立大学的化学工程教授 Joseph Wang 宣称, 它是检测过氧化氢蒸气的一种有效途径。他还补充道, 这种通过选择酞菁特殊的金属中心来调整感应的方法, 极有可能用于更多的检测领域。

C&EN, 2008, 86(11): 10

(上接第 90 页)

- [2] Smith B L, Shaffer T E, Viani M, *et al.* Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites[J]. *Nature*, 1999, 399: 761 - 763.
- [3] Mao C, Solis D J, Reiss B D, *et al.* Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires[J]. *Science*, 2004, 303: 213 - 217.
- [4] Dai H, Choe W S, Thai C K, *et al.* Nonequilibrium synthesis and assembly of hybrid inorganic-protein nanostructures using an engineered DNA binding protein[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 15637 - 15643.
- [5] Smith G P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 288 (4705): 1315 - 1317.
- [6] Smith G P, Petrenko V A. Phage display [J]. *Chem Rev*, 1997, 97: 391 - 410.
- [7] Petrenko V A, Smith G P, Gong X, *et al.* A library of organic landscapes on filamentous phage [J]. *Protein Eng*, 1996, 9: 797 - 801.
- [8] Greenwood J, Willis A E, Perham R N. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage: Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens [J]. *Mol Biol*, 1991, 220 (4): 821 - 827.
- [9] Presta L G. Selection, design, and engineering of therapeutic antibodies [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116: 731 - 736.
- [10] Whaley S R, English D S, Hu E L, *et al.* Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly [J]. *Nature*, 2000, 405: 665 - 668.
- [11] Wang S, Humphreys E S, Chung S, *et al.* Peptides with selective affinity for carbon nanotubes [J]. *Nat Mater*, 2003, 2: 196 - 200.
- [12] Kulp J L III, Shiba K, Evans J S. Probing the conformational features of a phage display polypeptide sequence directed against single-walled carbon nanohorn surfaces [J]. *Langmuir*, 2005, 21: 11907 - 11914.
- [13] Goede K, Busch P, Grundmann M. Binding specificity of a peptide on semiconductor surfaces [J]. *Nano Lett*, 2004, 4: 2115 - 2120.
- [14] Flynn C E, Lee S W, Peele B R, *et al.* Viruses as vehicles for growth, organization and assembly of materials [J]. *Acta Materialia*, 2003, 51: 5867 - 5880.
- [15] Nam K, Beau R P, Lee S W, *et al.* Genetically driven assembly of nanorings based on the M13 virus [J]. *Nano Lett*, 2004, 4: 23 - 27.
- [16] Huang Y, Chiang C Y, Lee S K, *et al.* Programmable assembly of nanoarchitectures using genetically engineered viruses [J]. *Nano Lett*, 2005, 5: 1429 - 1434.
- [17] Petrenko V A, Smith G P, Gong X, *et al.* A library of organic landscapes on filamentous phage [J]. *Protein Eng*, 1996, 9: 797 - 801.
- [18] Silva G A, Czeisler C, Niece K L, *et al.* Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers [J]. *Science*, 2004, 303: 1352 - 1355. ■