

趋化因子受体 CCR5 亲和短肽的筛选

王芳宇 张添元 罗进贤* 李瑞芳 甘菁菁 官文俊 肖 凡

(中山大学基因工程教育部重点实验室, 广州 510275)

摘要 趋化因子受体 5 (CCR5) 是 HIV-1 与宿主细胞结合的辅助因子之一, 其功能缺失或被 CCR5 拮抗剂封闭则会阻止 HIV-1 感染细胞. 为得到与 CCR5 特异结合的肽类拮抗剂, 采用噬菌体展示技术, 以稳定表达 CCR5 的 CHO 细胞 (CHO/CCR5) 作为靶标, 通过噬菌体随机 12 肽库筛选与 CCR5 特异结合的多肽; 经过四轮筛选后, 挑选 20 个阳性噬菌体克隆进行测序, 从中得到 11 个含有 AFDWTFVPSLIL 序列的小分子肽. 含该序列的噬菌体能与抗人 CCR5 单抗 (2D7) 竞争性结合 CCR5, 且合成肽 AFDWTFVPSLIL 对趋化因子 RANTES 与 CHO/CCR5 的结合具有明显的抑制作用, 初步证明该小肽与 CCR5 具有特异性结合作用.

关键词 噬菌体展示, 肽, 筛选, 人趋化因子受体 5 (CCR5), CHO 细胞

学科分类号 Q78

趋化因子受体 5 (CC chemokine receptor 5, CCR5) 是趋化因子 MIP (macrophage inflammatory protein) 1 α 、MIP 1 β 和 RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) 的特异性受体. CCR5 基因位于 3p21.3 上, 长 1.9 kb, 编码 352 个氨基酸, 组成与 G 蛋白偶联的跨膜蛋白. CCR5 具有 G 蛋白偶联受体家族 (G protein coupled receptors, GPCRs) 所特有的 7 个跨膜区, 呈 α 螺旋结构. 已有的研究表明, HIV-1 的感染不仅需要与 CD4 结合, 而且也需要靶细胞表面的辅助受体 (如 CCR5、CXCR4 等) 参与^[1,2], 封闭 HIV 辅助受体, 将阻止 HIV 与宿主细胞的结合, 从而抑制 HIV 的感染. 而 HIV 辅助受体功能的缺失似乎并不会对人体产生很大的影响^[3]. 业已证明, 几乎所有的 HIV-1 病毒株都使用 CCR5 或 CXCR4 或同时使用两者来侵入细胞, 因此 CCR5 和 CXCR4 的研究成了 HIV 辅助受体研究的突破口. 另外还发现, HIV-1 在感染一个新的个体时, 通常是 R5 嗜性的^[4] (即以 CCR5 作为辅助受体), 因此通过降低或缺失 CCR5 的作用从而抑制 HIV-1 的感染将是非常有效的方法.

近几年来, 越来越多的人群调查和实验研究结果表明, CCR5- Δ 32 缺失的个体拥有正常的免疫功能和炎症反应, 并且对 HIV-1 的感染表现出显著的抵御能力^[5-7]. 此外, 以 CCR5 为靶点的 HIV 受体拮抗剂近年来倍受关注, 这些拮抗剂因其与 CCR5 的特异性结合作用, 从而抑制经由 CCR5 的 HIV 的感染^[8-12].

本文以稳定表达人 CCR5 的中国仓鼠卵细胞 (CHO) 为靶细胞, 应用噬菌体展示技术, 从噬菌体 12 肽库中筛选出与 CCR5 特异性结合的小肽, 以期得到能拮抗 CCR5 功能的小分子多肽.

1 材料和方法

1.1 材料

中国仓鼠卵细胞 (CHO) (ATCC 保藏) 由广东省农业科学院曹汉威研究员惠赠. 噬菌体 12 肽库和 *E.coli* ER2738 宿主菌为 NEB 公司产品, 肽库滴度 1.5×10^{13} pfu/ml, 复杂性 2.7×10^9 . DH5 α 细菌、pcDNA-ccr5、pSP72、pBBS242 质粒均为本室保存. *Xba* I、*Bam* H I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶购自华美生物公司. 胶回收试剂盒 (Gel Extraction Mini Kit) 为上海华舜生物工程有限公司产品. 转染试剂 (Polyfect Transfection Reagent) 为美国 QIAGEN 公司产品. DMEM 细胞培养基 (高糖) 为美国 GIBCO-BRL 公司产品. 胎牛血清为杭州四季青产品. 潮霉素 B (Hygromycin B) 为德国 Calbiochem 公司产品. 藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 标记的抗人 CCR5 单抗 3A9 (N 端 mAb) 和 2D7 (第二外环 mAb) 为美国 R&D Systems 公司产品. 辣根过氧化物酶结合的抗 M13 噬菌体抗体及其底物 ABTS 为 Amersham Bioscience 公司产品.

* 通讯联系人.

Tel: 020-84112397, E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

收稿日期: 2005-01-10, 接受日期: 2005-03-15

1.2 方法

1.2.1 构建表达人 CCR5 的 CHO 细胞系.

a. 含人 *ccr5* 基因重组质粒的构建: 用 *Bam*H I + *Xba* I 从 pcDNA-*ccr5* 上切下 *ccr5* 基因, 切开 pSP72 质粒并分别回收, 用 T4 DNA 连接酶将切开的 pSP72 与 *ccr5* 基因连接成 pSP72-*ccr5*. 将 pSP72-*ccr5* 中的 *ccr5* 基因用 *Bam*H I + *Hind* III 切下、并切开 pBBS242 质粒, 分别回收后用 T4 DNA 连接酶连接, 构成重组表达质粒 pBBS242-*ccr5*.

b. 转染 (按试剂盒的使用说明操作): 取待转染的 pBBS242-*ccr5* 质粒 1.5 μ g、转染试剂 10 μ l, 转染 CHO 细胞 (6 孔板, 4×10^5 孔), 加入适量 DMEM 培养基 (10% 胎牛血清), 于 37℃、5% CO₂ 下培养.

c. 转染 CHO 细胞的筛选: 转染后的 CHO 细胞培养 24 ~ 48 h 后更换为含潮霉素 B (300 mg/L) 的培养液, 于 37℃、5% CO₂ 下继续培养, 每 3 天更换一次培养液; 至第 18 天, 未转染的对照组 CHO 细胞全部死亡, 而转染的 CHO 细胞生长良好.

d. CCR5 稳定表达的 CHO 细胞 (CHO/CCR5) 的检测: 取在含潮霉素 B 的培养液中生长良好的 CHO 细胞 (1×10^5 细胞), 0.25% 胰酶消化, PBS 缓冲液洗 3 次, 加入 PE 标记的抗人 CCR5 单抗 3A9 10 μ l, 于 2 ~ 8℃ 反应 40 min, PBS 缓冲液洗 2 次, 然后细胞用 500 μ l PBS 缓冲液悬浮, 并用流式细胞仪 (BD FACS Vantage SE) 观察 CCR5 的表达.

1.2.2 亲和筛选. 参照 Nicklin^[13] 和 van Ewijk^[14] 的方法并稍加改动. CHO 细胞经 0.25% 胰酶消化, PBS 缓冲液洗 1 次, 1×10^7 细胞被悬浮于 1 ml PBS、1% BSA 中, 于其中加入 10 μ l 噬菌体文库液 (约 1.5×10^{11} 噬菌体), 4℃、缓慢摇动 2 h; 1 500 r/min 微量离心机离心 1 min, 上清加到 10^6 个 CHO/CCR5 细胞中; 4℃、继续慢摇 2 h, 1 500 r/min 离心 1 min, CHO/CCR5 细胞用冷的 PBS、1% BSA 和 0.1% Tween-20 洗 5 次; 细胞结合的噬菌体用 1.0 ml 0.2 mol/L Glycine-HCl (pH 2.2)、1 g/L BSA 在冰上洗脱 10 min, 1 500 r/min 离心 1 min, 噬菌体上清用 150 μ l 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.1) 中和; 测噬菌体滴度, 并将此洗脱噬菌体扩增, 然后投入到下一轮筛选. 这样连续筛选四轮, 第三、四轮洗脱时 Tween-20 的浓度提高到 0.2%.

1.2.3 ELISA 分析. 从第四轮筛选出的噬菌体转染 *E.coli* ER2738 菌培养的 LB 平板上, 随机挑选 20

个间隔良好的蓝色噬菌斑, 分别进行噬菌体扩增. 指数生长的 CHO、CHO/CCR5 细胞转移到 96 孔板 (3×10^5 个 / 孔), 扩增的噬菌体先与封闭液 (含 2% 脱脂奶粉的 PBS) 结合 30 min, 然后分别加到 96 孔板 (2×10^{12} TU / 孔); 室温反应 2 h, 1 500 r/min 离心 2 min; 接着用含 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液洗细胞 5 次; 每孔分别加入 200 μ l 辣根过氧化物酶结合的抗 M13 噬菌体抗体, 室温反应 1 h; 洗板 6 次, 加入显色底物 ABTS 200 μ l, 测 A_{405} 值 ($A_{405} \geq 0.2$ 判定为阳性). 阴性对照为辅助噬菌体 M13KO7.

1.2.4 DNA 测序和氨基酸序列分析. DNA 测序由上海生工生物工程技术有限公司完成, 测序引物为 5' CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG 3'. 根据 DNA 序列推导出相应的氨基酸序列, 并通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/> 进行多序列比较和与趋化因子进行同源性分析.

1.2.5 阳性噬菌体对 2D7 与 CHO/CCR5 细胞结合的抑制作用. CHO/CCR5 细胞 500 g 离心 5 min, 并用 PBS (含 0.5% BSA) 缓冲液洗 3 次, 以除去存留于细胞培养液中的生长因子; 细胞被悬浮于相同的 PBS 液中 (4×10^6 个 / ml), 取 25 μ l 细胞液 (1×10^5 个) 转移至 5 ml FACS 管中; 1.5×10^{11} 噬菌体加入到 FACS 管中, 4℃ 孵育 30 min; 然后每管加入 10 μ l PE 标记的 2D7, 并于 4℃ 孵育 40 min; PBS 液洗细胞 2 次以除去未结合的抗体, 细胞被重新悬浮于 500 μ l PBS 液中; 流式细胞仪观察.

1.2.6 多肽合成. 多肽由上海生工生物工程技术有限公司采用固相法合成, 经 HPLC 纯化, 并经质谱确认.

1.2.7 合成肽生物活性的初步鉴定. 5 mg 多肽溶于 500 μ l 50% 的醋酸中, 然后用 PBS 配成 1 g/L 溶液, 采用 Quantikine Human RANTES Kit (R&D Systems, USA) 检测不同浓度的多肽对 RANTES 结合 CCR5 的抑制作用 (根据操作手册进行). 用 Logistic 方法计算出 IC_{50} 值^[15], 推算合成肽与 CCR5 的 K_d 值, 即亲和力^[16].

2 结 果

2.1 CCR5 在 CHO 细胞的稳定表达

转染 pBBS242-*ccr5* 质粒的 CHO 细胞, 在含潮霉素 B 的细胞培养基中, 能很好地生长和分裂, 而未转染的 CHO 细胞在潮霉素 B 的选择压力下, 经过 18 天后则会全部死亡. 采用 PE 标记的 3A9 单

抗与转染的 CHO 细胞反应，3A9 单抗能与表达在 CHO 细胞表面的 CCR5 的 N 端特异结合，用流式细胞仪能检测到较强的荧光信号，图 1 (c) 显示转染的 CHO 细胞结合单抗后检测到的荧光信号，而对照的未转染的 CHO 细胞 (b) 则未检测到荧光信号，说明 CCR5 已在转染的 CHO 细胞进行了稳定的表达。

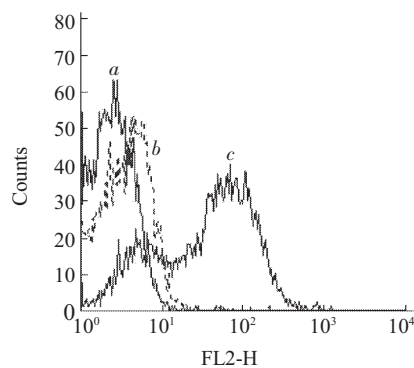


Fig.1 FACS analysis of CCR5 expression

The histogram shows the fluorescence intensity of CHO/CCR5 cells in the absence (a) or presence (c) of PE-conjugated 3A9, and CHO cells in the presence of PE-conjugated 3A9 (b).

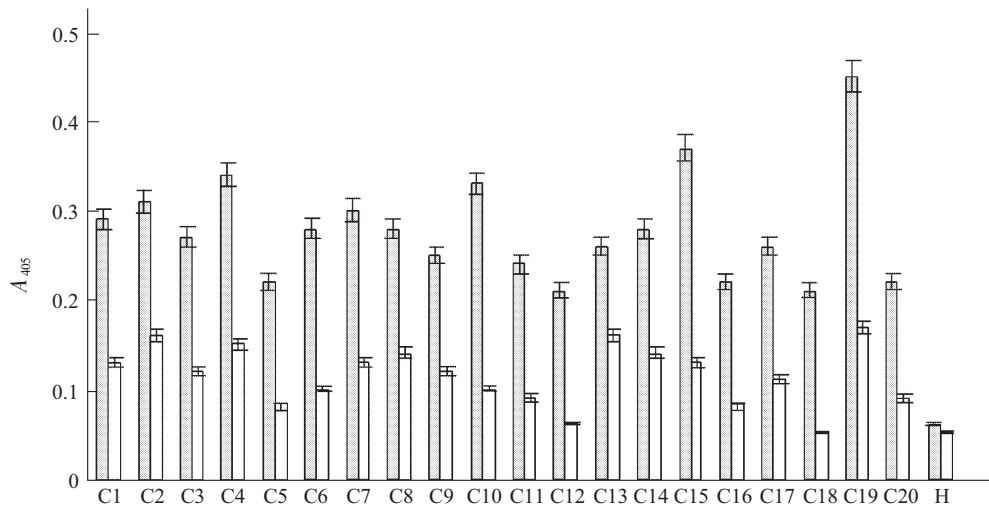


Fig.2 Identification of binding phage clones after four rounds of selection by ELISA

Phage clones binding to CHO/CCR5 cells (■) and CHO cells (□) were detected by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-M13 phage antibody. H: M13KO7 (negative control), C1~C20: phage clones. Average values from three independent experiments are shown.

2.4 阳性克隆的序列分析

测定 20 个与 CHO/CCR5 细胞具亲和力的阳性噬菌体克隆的外源基因序列，推导出相应的氨基酸

2.2 亲和筛选与 CCR5 特异结合的噬菌体

经过四轮筛选，噬菌体投入产出比逐渐升高，说明与 CCR5 亲和的噬菌体富集明显 (表 1)。从表 1 可以看出前三轮筛选产出率明显提高，第二轮比第一轮高 1.78×10^2 倍，第三轮比第二轮高 4.1×10^2 倍，而第四轮与第三轮相比则没有明显提高。

Table 1 Recovery rate of phage clones during panning

Rounds	Selected phages /TU*(Input)	Eluted phages /TU(Output)	Ratio (Out/input)
1	1.5×10^{11}	3.4×10^3	2.3×10^{-8}
2	1.5×10^{11}	6.2×10^5	4.1×10^{-6}
3	1.5×10^{11}	2.5×10^8	1.7×10^{-3}
4	1.5×10^{11}	3.0×10^8	2.0×10^{-3}

*TU: transducing unit.

2.3 结合噬菌体的 ELISA 鉴定

从第四轮筛选出的噬菌体中随机挑选 20 个克隆，扩增后进行 ELISA 检测，结果表明 20 个克隆均为阳性克隆，对 CHO/CCR5 细胞具有很强的亲和力，而对照的辅助噬菌体 M13KO7 则没有亲和性 (图 2)，说明筛选使与 CHO/CCR5 特异性结合的噬菌体得到了有效富集。

序列 (表 2)。其中 AFDWTFVPSLIL 多肽序列在 20 个克隆中占了 11 个，表明特异性克隆得到了富集。将得到的多肽序列通过 GenBank 进行在线分析，

Table 2 Exogenous amino acid sequences of positive phage clones selected from 12-mer peptide library

Clone	Amino acid sequence	Frequency
C3	AFDWTFVPSLIL	11
C12	GPFINKSLGSSP	2
C1	WSSNLRVLPNSP	1
C2	SLYVAPWWDDPP	1
C5	QLVIFPWNVTVS	1
C8	LDVRPWYVTPLP	1
C10	SLDWSHVPLLVL	1
C16	STPASTMVPPWT	1
C20	NFTNPAPLIFDG	1

未发现与已知的蛋白质具有同源性, 可能该多肽是通过模拟 CC 亚族趋化因子(如 RANTES, MIP-1 α , MIP 1 β 等)的表位而与细胞膜表面的 CCR5 结合.

2.5 阳性噬菌体克隆与 CHO/CCR5 细胞的结合
挑选含 AFDWTFVPSLIL 序列的噬菌体克隆 C3, 进一步验证其与 CHO/CCR5 细胞的特异性结合能力. 通过分别加入 PE 标记的抗人 CCR5 单抗 3A9 和 2D7, 经流式细胞仪观察并采用 CellQuest 软件分析. 如图 3 所示, C3 噬菌体克隆对 2D7 与 CHO/CCR5 的结合具有明显的抑制作用(图 3d 与 e 比较), 而对 3A9 则没有(图 3b 与 c 比较), 提示 C3 噬菌体克隆中的多肽序列是与细胞膜表面 CCR5 的第二外环特异性结合, 与 N 端则没有亲和性.

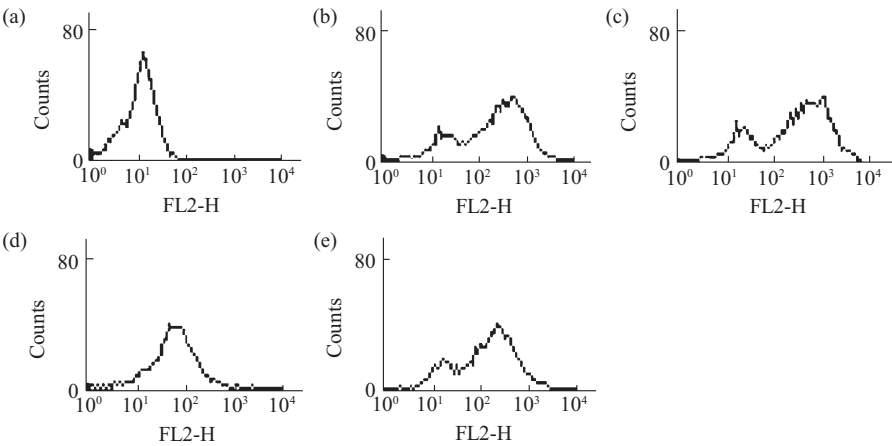


Fig.3 Effects of C3 phage clone on 2D7 binding to CHO/CCR5 cells

(a) Negative control (no antibody); (b) 5 mg/L 3A9 + C3; (c) 5 mg/L 3A9; (d) 5 mg/L 2D7 + C3; (e) 5 mg/L 2D7. The results are representative of one of three independent experiments.

2.6 合成肽的生物活性鉴定

根据筛选获得的 9 个克隆中频率出现最高的克隆序列合成多肽 AFDWTFVPSLIL. 采用不同浓度的合成肽与 RANTES 竞争性结合 CHO/CCR5 细胞, 结果表明, 随着多肽浓度的提高, RANTES 与 CHO/CCR5 细胞的结合率降低, 且呈剂量依赖性, 说明该多肽对趋化因子 RANTES 与 CHO/CCR5 的结合具有明显的抑制作用(图 4), 其 IC_{50} 约为 3.6 mg/L (2.56 μ mol/L), 即合成肽与 CCR5 的亲合力 (K_d) 约为 2.56 μ mol/L. 此外, 合成肽也能抑制抗人 CCR5 单抗 2D7 与 CHO/CCR5 细胞的结合(图 5), 10 mg/L 时其抑制作用可达 40%.

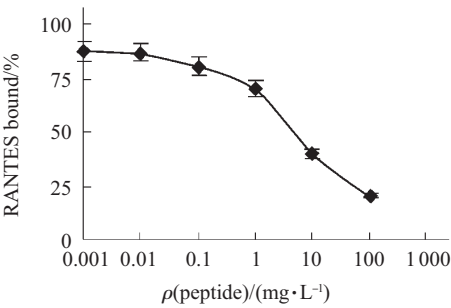


Fig.4 Inhibition of synthetic peptide to RANTES binding to CHO/CCR5 cells

The data points represent the $\bar{x} \pm s$ from three experiments.

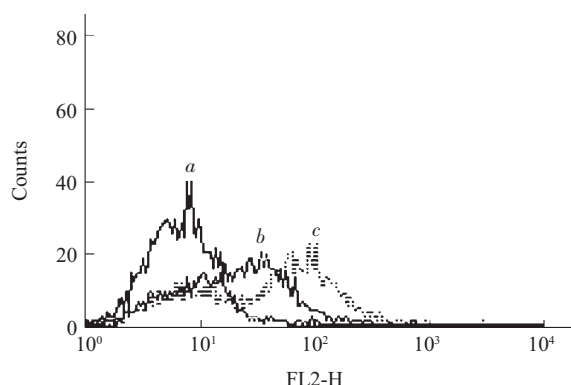


Fig.5 Synthetic peptide AFDWTFVPSLIL antagonizes 2D7 binding to CHO/CCR5 cells

a: control; b: peptide (10 mg/L)+2D7 (5 mg/L); c: 2D7 (5 mg/L).

3 讨 论

噬菌体表面展示技术 (phage display techniques, PDT) 近年来在蛋白质结构研究、抗原表位分析、分子识别、细胞间信号传导、药物设计、疫苗研制、诊断试剂等方面应用广泛^[17]. 在以往的研究中, 我们进行过抗原表位^[18]和血管受损内皮细胞的筛选^[19].

CCR5 胞外有 4 个部分: 游离的 N 端, 第一、二、三外环. 趋化因子 RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 等主要是与 CCR5 的胞外部分结合, 而且这种结合抑制了经由 CCR5 的 HIV-1 感染^[20], 因此我们的筛选也是以表达于 CHO 细胞表面 CCR5 的膜外部分为靶点. 在研究艾滋病毒 HIV-1 感染人体的过程时发现, R5 嗜性的 HIV-1 主要是通过其膜蛋白 gp120 与细胞表面的辅助受体 CCR5 的 N 端和膜外第二环 (extracellular loop2, ECL2) 相互作用^[21], 从而介导 HIV-1 进入细胞内, 因而我们也就以筛选到能与 CCR5 的 N 端和第二外环结合的阳性噬菌体作为目标.

由于 CCR5 具有七次跨膜结构, 因而难以在体外纯化而不影响它的四级结构和结合特性, 因此我们将 ccr5 基因转染进 CHO 细胞并使它稳定表达, 然后以稳定表达 CCR5 的 CHO 细胞作为筛选的靶标. 在筛选过程中, 为了减少 CHO 细胞表面其他成分对噬菌体的非特异性结合, 在每一轮筛选之前, 我们都将噬菌体肽库先与 CHO 细胞孵育 2 h, 以去除与 CHO 细胞结合的噬菌体, 然后再将未结合的噬菌体与 CHO/CCR5 细胞进行筛选. 同时, 为了降低噬菌体与 CHO/CCR5 细胞的非特异性结合, 和避免与噬菌体结合后 CCR5 发生内吞作用, 因此

将筛选的温度置于在 4℃ 进行.

在本实验中, 我们从四轮筛选后的噬菌体中挑选 20 个噬菌体克隆进行测序, 得到了 11 个具有相同插入序列的小肽 AFDWTFVPSLIL, 采用含该序列的噬菌体克隆 C3 进行 CHO/CCR5 细胞结合实验, 初步证明该序列与 CCR5 的第二外环 (ECL2) 具有特异性结合作用. 同时, 合成肽 AFDWTFVPSLIL 对趋化因子 RANTES 与 CHO/CCR5 的结合具有明显的抑制作用, 其 IC_{50} 为 2.56 μ mol/L, 显示合成肽与 CCR5 具有良好的结合能力. 在下一步的实验中, 我们将进一步检测合成肽能否抑制 HIV-1 对细胞的感染作用.

参 考 文 献

- Horuk R. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol Today*, 1999, **20** (2): 89-94
- Doms R W, Peiper S C. Unwelcomed guests with master keys: How HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology*, 1997, **235** (2): 179-190
- Littman D R. Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis?. *Cell*, 1998, **93** (5): 677-680
- Berger E A, Murphy P M, Farber J M. Chemokine receptors as HIV-1 co-receptors: roles in viral, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*, 1999, **17** (1): 657-700
- Samson M, Libert F, Doranz B J, *et al.* Resistance to HIV-1 infection caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene. *Nature*, 1996, **382** (6593): 722-725
- Dean M, Carrington M, Winkler C, *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. *Science*, 1996, **273** (5283): 1856-1862
- Liu R, Paxton W A, Choe S, *et al.* Homozygous defect in HIV-1 co-receptor accounts of resistance for some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 1996, **86** (3): 367-377
- Simmons G, Clapham P R, Picard L, *et al.* Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science*, 1997, **276** (5310): 276-279
- Dragic T, Trkola A, Thompson D A, *et al.* A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (10): 5639-5644
- Lee B, Sharron M, Blanpain C, *et al.* Epitope mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and distinct but overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function. *J Biol Chem*, 1999, **274** (14): 9617-9626
- Farzan M, Vasilieva N, Schnitzler C E, *et al.* A tyrosine-sulfated peptide based on the N terminus of CCR5 interacts with a CD4-enhanced epitope of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein and inhibits HIV-1 entry. *J Biol Chem*, 2000, **275** (43): 33516-33521
- Trizki J M, Xu S, Wagner N E, *et al.* SCH-C (SCH 351125), an

- orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (22): 12718~12723
- 13 Nicklin S A, White S J, Watkins S J, *et al.* Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display. Circulation, 2000, **102** (2): 231~237
- 14 van Ewijk W, de Kruif J, Germeaad W T, *et al.* Subtractive isolation of phage-displayed single-chain antibodies to thymic stromal cells by using intact thymic fragments. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (8): 3903~3908
- 15 Delean A, Munson P J, Rodbard D. Simultaneous analysis of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. Am J Physiol, 1978, **235** (2): E97~102
- 16 Wrighton N C, Farrell F X, Chang R, *et al.* Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. Science, 1996, **273** (5274): 458~463
- 17 Smothers J F, Henikoff S, Carter P, *et al.* Affinity selection from biological libraries. Science, 2002, **298** (5593): 621~622
- 18 王芳宇, 宋 岚, 何淑雅, 等. 噬菌体随机肽库在确定单抗识别表位中的应用. 南华大学学报·医学版, 2001, **29** (1): 1~3
Wang F Y, Song L, He S Y, *et al.* J Nanhua University (Medical Edition), 2001, **29** (1): 1~3
- 19 郭 玉, 王芳宇, 唐圣松, 等. 噬菌体随机肽库中与受损内皮细胞特异性结合短肽的筛选. 南华大学学报·医学版, 2001, **29** (6): 535~538
Guo Y, Wang F Y, Tang S S, *et al.* J Nanhua University (Medical Edition), 2001, **29** (6): 535~538
- 20 Cocchi F, DeVico A L, Garzino-Demo A, *et al.* Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. Science, 1995, **270** (5243): 1811~1815
- 21 Dragic T. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. J Gen Virol, 2001, **82**: 1807~1814

Screening of Peptide Specific for Human Chemokine Receptor-5 From Phage Displayed Library

WANG Fang-Yu, ZHANG Tian-Yuan, LUO Jin-Xian*, LI Rui-Fang,
GAN Jing-Jing, GUAN Wen-Jun, XIAO Fan

(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Chemokine receptor-5 (CCR5) serves as a co-receptor necessary for the binding of HIV-1 to the host cells, the defective CCR5 function and the blocking of CCR5 sites by CCR5 antagonists will suppress the entry of HIV-1 to target cells. To acquire the peptide antagonists specifically binding CCR5, CHO cells stably expressing human CCR5 (CHO/CCR5) were used to select CCR5-binding peptides from a phage displayed 12-mer peptide library. After four rounds of selection, eleven out of the 20-phage clones shared the amino acid motif AFDWTFVPSLIL. The motif-containing phages could competitively bind to CHO/CCR5 cells with anti-human CCR5 mAb, and the synthetic peptide AFDWTFVPSLIL could inhibit RANTES binding to CHO/CCR5. These results suggest that the peptide could specifically bind CCR5 molecules.

Key words phage display, peptide, screening, human chemokine receptor-5 (CCR5), CHO cells

* Corresponding author . Tel: 86-20-84112397, E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

Received: January 10, 2005 Accepted: March 15, 2005