

技术与方法

随机十肽库的构建及血管形成素结合肽的筛选

杨 辉 张英起 颜 真 韩 苇

(第四军医大学生物技术中心, 西安 710032)

药立波 苏成芝

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 将合成的含有随机序列 (NNK)₁₀ 的寡核苷酸片段, 克隆入噬菌体呈现载体噬菌粒 pCANTAB5E 的 *Sfi* I, *Not* I 位点, 即 cp III 蛋白信号肽与成熟肽之间, 电转化 *E. coli* TG1, 构建了噬菌体表面呈现的十肽库, 实际库容为 3.53×10^7 , 插入率为 66.7%。经辅助噬菌体 M13KO7 超感染后, 获得滴度为 4.8×10^{11} pfu/ml 的噬菌体上清。经过两轮 panning 筛选和富集, 从构建的随机十肽库中筛选到 26 个具有血管形成素结合活性的重组噬菌体克隆, 对其中 12 个阳性噬菌体克隆的短肽序列进行了分析, ELISA 检测结果显示 12 个阳性噬菌体克隆都能够与血管形成素特异性结合。

关键词 噬菌体表面呈现, 随机短肽库, 血管形成素

学科分类号 Q74

噬菌体表面呈现技术 (phage surface display) 最初由 Smith 博士^[1]于 1985 年提出, 是外源蛋白或肽在丝状噬菌体表面表达或呈现的一种技术。不同序列的随机寡核苷酸插入噬菌体表面的蛋白质基因中, 在每一个噬菌体颗粒表面呈现不同的短肽, 组成一个含有多种短肽的库, 利用不同的配体从中筛选出具有特异性亲和力或活性的肽。文献报道, 从五肽、六肽、七肽及九肽库中筛选到的整合素结合小肽, 已用于抑制肿瘤的浸润与血小板的凝聚^[2]。利用 EPO 受体从短肽库中筛选到的小肽, 体内外一系列实验证实能有效模拟 EPO 的功能^[3]。噬菌体表面呈现技术近年来得到迅速发展, 从噬菌体短肽库中筛选到的有生物活性的小肽, 为设计蛋白质小分子模拟物提供信息, 开辟一条新的药物设计途径。血管形成素是从肿瘤细胞分离的具有血管形成活性的蛋白质, 与肿瘤血管的形成密切相关^[4]。已证实血管形成素的拮抗剂在体内外能够有效地抑制肿瘤细胞的生长^[5,6]。本研究构建了噬菌体表面呈现的随机十肽库, 并从中筛选到与血管形成素有结合活性的小肽。为进一步分析其与血管形成素的结合特性和设计小分子量拮抗剂打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: *E. coli* TG1 基因型为 *sup* E, *hsd* Δ 5, *thi* Δ (*lac*-proAB) F' [*tra*D36, *pro*AB, *lac*Iq, *lacZ* Δ M15]。

1.1.2 辅助噬菌体: M13KO7, M13 噬菌体衍生株, 噬菌粒 pCANTAB5, Pharmacia 公司产品。

1.1.3 随机引物的设计: P1: 5' CCT TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG (NNK)₁₀ GCG GCC GCA GGT GCG CCG GTG CCG TAT C 3', NNK 为随机核苷酸密码, 其中 N 代表 A 或 T 或 G 或 C, K 代表 G 或 T, 5' 端含有 *Sfi* I 酶切位点, 3' 端含有 *Not* I 酶切位点, 在 *Sfi* I 酶切位点与 (NNK)₁₀ 之间有信号肽酶的切割位点, GCG CAG。P2: 5' G ATA CGG CAC CGG CGC ACC 3' 与引物 1 的 3' 端 19 个核苷酸序列完全互补。

1.1.4 酶和试剂: 限制性内切酶 *Sfi* I, *Not* I, 修饰酶克列诺片段 (Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I)、T4 DNA 连接酶购自 GIBCO 公司和 MBI 公司, Detection Module Recombinant Phage Antibody System 购自 Pharmacia 公司。

1.2 方法

1.2.1 双链随机寡核苷酸插段合成: P1 和 P2 等摩尔数混合退火, Klenow 延伸合成双链寡核苷酸片段。依次经 *Sfi* I、*Not* I 消化, 20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, V 型槽回收双酶切片段。

1.2.2 寡核苷酸片段的克隆: 回收的双酶切片段与 *Sfi* I、*Not* I 消化的载体 pCANTAB5E 连接,

Tel: (029) 3374516-16, E-mail: bio707@fmmu.edu.cn

收稿日期: 1999-10-22, 修回日期: 2000-03-13

电穿孔转化电感受态宿主细胞 TG1, 铺于含有氨苄、葡萄糖的 $2 \times \text{YT}$ 细菌固体培养基 ($2 \times \text{YTAG}$) 平板上, 30°C 培养过夜, 随机挑选 12 个克隆, 提取质粒, *Sfi* I / *Not* I 双酶切, 检测转化效率, 收集其余全部转化细菌保存在 10 ml 含 15% 甘油的 $2 \times \text{YTAG}$ 中, 分装成小份, 贮存于 -70°C .

1.2.3 随机短肽库的构建: 冻存的甘油菌复苏后, 经辅助噬菌体 M13K07 超感染, 30°C 培养过夜, 收集上清, 以终浓度为 3%-PEG 及 4%-NaCl 沉出噬菌体, PBS 悬浮噬菌体沉淀, 即为噬菌体表面呈现的原始十肽库.

1.2.4 血管形成素结合小肽的筛选: 100 ng ANG 包被 ELISA 板, 阴性对照孔用 0.5% BSA 包被. 每孔加入滴度为 4.8×10^{10} pfu/ml 的重组噬菌体上清 100 μl , 25°C 孵育 2 h, TBS-0.05% Tween 洗孔 10 次, 然后加入 100 μl 100 mmol/L 甘氨酸·HCl (pH 2.0) 洗脱特异性结合的噬菌体, 加 3 μl 2 mol/L Tris·HCl (pH 7.5) 中和洗脱液, 与 TG1 孵育 30 min, 取 3 μl 铺于 $2 \times \text{YTAG}$ 平板上, 用以计数, 余下铺于 $2 \times \text{YTAG}$ 平板上, 30°C 培养过夜, 完成一轮 panning 筛选. 收集细菌克隆, M13K07 超感染, 进入第二轮 panning 筛选. 两轮 panning 结束后, 按 1: 10, 1: 100, 1: 1000 原液将重组噬菌体感染的 TG1 铺于 $2 \times \text{YTAG}$ 平板上.

1.2.5 ELISA 法检测单个噬菌体克隆的结合活性: 两轮筛选结束后, 随机挑选 94 个分隔良好的单菌落, 30°C 培养过夜, 次日取部分加入含 M13K07 的 $2 \times \text{YTAG}$ 中, 37°C 振荡培养 2 h, 离心后, 用 $2 \times \text{YTAK}$ 重悬细菌, 30°C 振荡培养过夜, 离心后, 上清即为单个克隆的重组噬菌体. 利用 Pharmacia 公司产品 Detection Module Recombinant Phage Antibody System 通过 ELISA 检测单个重组噬菌体与 ANG 的结合活性.

1.2.6 血管形成素结合小肽的序列测定: ELISA 检测的阳性克隆, 挑取其中的 14 个克隆提取质粒, 用 PE 公司 310 型自动测序仪测序.

1.2.7 ELISA 法检测噬菌体表面呈现小肽的结合活性: 14 个阳性克隆按上述方法获取单个重组噬菌体上清, 即为待检小肽. 用血管形成素 (ANG) 包被 ELISA 板 15 个实验孔 (ANG 的浓度为 1 mg/L, 每孔加入 100 μl), 用 0.5% BSA 包被 15 个对照孔, 分别与 14 个噬菌体上清和 $2 \times \text{YTAK}$ 孵育后, 加入 HRP/鼠抗 M13 噬菌体抗体, ABTS

[2, 2' 连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸)] 显色, 410 nm 处测实验孔和对照孔吸光值.

2 结 果

2.1 双链寡核苷酸插段生成

两条寡核苷酸引物, 经退火补平后的双链片段为 91 bp, *Sfi* I、*Not* I 单酶切的片段分别为 73 bp、72 bp, 双酶切的片段为 54 bp.

2.2 寡核苷酸插段的克隆及噬菌体文库的构建

双酶切的寡核苷酸片段, 回收、纯化后克隆入 pCANTAB5E 载体中, 电转化宿主细胞 TG1, 37°C 振荡培养 1 h, 铺 $2 \times \text{YTAG}$ 平板, 同时取 0.5 μl 、0.05 μl 、0.005 μl 铺板, 计数. 次日见 0.005 μl 、0.05 μl 平板分别长出 5 个、53 个克隆, 故随机十肽库的库容为 5.3×10^6 . 随机挑取 12 个克隆, *Sfi* I / *Not* I 酶切鉴定, 3% 琼脂糖凝胶电泳分析结果见图 1, 其中 8 个含有大小为 54 bp 的插段, 故克隆效率为 66.7%, 随机十肽库实际库容为 $5.3 \times 10^6 \times 66.7\% = 3.53 \times 10^6$. 合并十次电转化产物, 所得随机十肽库的库容为 3.53×10^7 .

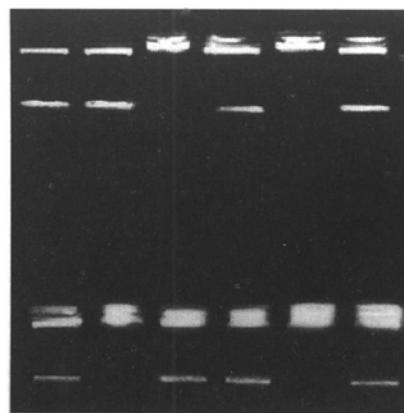


图 1 肽库中随机挑取的 12 个重组质粒的 *Sfi* I + *Not* I 酶切鉴定

2.3 随机十肽在噬菌体表面呈现

取 10 μl 贮存于 -70°C 的原始噬菌体文库, 经 M13K07 辅助噬菌体超感染后, 产生的重组噬菌体颗粒释放于细菌培养上清中, 生成滴度为 4.8×10^{10} pfu/ml 的噬菌体表面呈现随机十肽库.

2.4 血管形成素结合小肽的筛选

以 ANG 包被的 96 孔板, 对噬菌体表面呈现的随机十肽库 panning, 两轮 panning 后的菌液按一定稀释度铺于 $2 \times \text{YTAG}$ 平板上, 30°C 培养过夜, 1: 1000、1: 100、1: 10 和原液四个稀释度平皿上分别长出 47、300、3 000、30 000 个以上克隆.

2.5 ELISA 检测单个噬菌体克隆的 ANG 结合活性

从上述培养板上随机挑选 94 个分隔良好的细菌克隆, 制备单个克隆的重组噬菌体与 ANG 包被的 96 孔板孵育, 同时设立阴性与阳性对照孔. 通过 HRP/鼠抗 M13 抗体来检测重组噬菌体与 ANG 的结合活性, ABTS 显色后发现, 共有 26 个克隆呈现阳性反应 (图 2). Bio-Rad 公司的酶标仪测每孔 A_{410} 的读数, 阳性对照孔为 0.535, 阴性对照孔为 0.045, 其余各阴性孔为 0.045~0.083, 表明检测系统可靠. 26 个阳性孔 A_{410} 读数见表 1, 以其所在的孔号命名所筛得阳性克隆.

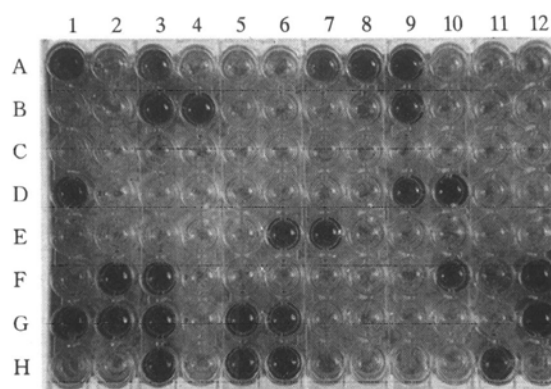


图 2 ELISA 检测单个噬菌体克隆的结合活性
A1: 阳性对照; H12 阴性对照; A2~H11: panning 筛选的噬菌体克隆.

表 1 ANG 结合反应阳性噬菌体克隆 ELISA 显色的光吸收值

阳性克隆	A3	A7	A8	A9	B3	B4	B9
A_{410}	0.296	0.220	0.328	0.639	0.436	0.380	0.414
阳性克隆	D1	D9	D10	E6	E7	F2	F3
A_{410}	0.472	0.334	0.535	0.311	0.377	0.354	0.220
阳性克隆	F10	F12	G1	G2	G3	G5	G6
A_{410}	0.335	0.336	0.309	0.238	0.229	0.322	0.196
阳性克隆	G12	H3	H5	H6	H11		
A_{410}	0.428	0.296	0.287	0.345	0.173		

2.6 血管形成素结合小肽核苷酸的序列测定

26 个阳性克隆中的 21 个克隆, 扩增后提取质粒, *Sfi* I / *Not* I 双酶切, 3% 琼脂糖凝胶电泳分析, 均具有插段 (图 3). 对其中 12 个进行 DNA 序列分析, 并推导出外源短肽的氨基酸序列 (图 4), 结果: 其中 5 个有 W X W 的序列, 4 个有 L L 的序列, 3 个有 W P 的序列, F10 和 G1 号克隆序列完全相同.

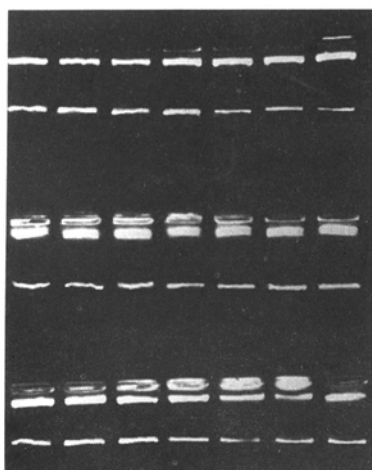


图 3 ELISA 检测的阳性克隆的 *Sfi* I + *Not* I 酶切鉴定

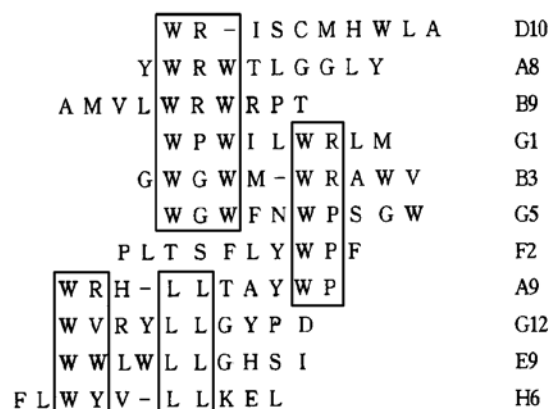


图 4 血管形成素结合小肽的氨基酸序列

2.7 ELISA 检测噬菌体表面呈现十肽结合活性

获得的 12 个阳性克隆分别经 M13K07 超感染后, 收集重组噬菌体的上清, 进行 ELISA 检测 (图 5), 实验中设置了阴性抗原 (BSA) 对照组. 结果显示, 12 个阳性克隆均可以与 ANG 特异性结合, 而与包被的 BSA 无结合反应.

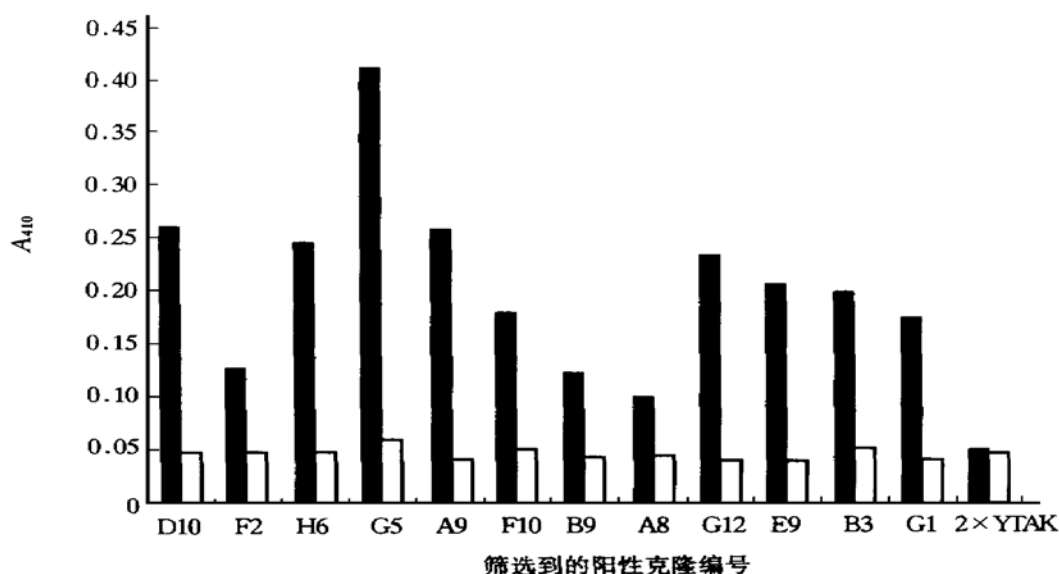


图5 ELISA 检测阳性噬菌体克隆的结合活性

■: ANG; □: BSA.

3 讨 论

噬菌体表面呈现短肽库技术近年来不断地完善, 现已广泛地用于蛋白质的表型确定, 蛋白质与蛋白质之间相互作用及蛋白质与其他物质之间相互作用的研究, 为多肽类药物的设计、多肽疫苗的研制提供重要的方法^[7,8]. 随机短肽库中全部不同噬菌体的克隆数和重组率是衡量肽库质量与利用性的关键指标. 文献报道噬菌体短肽库的库容一般在 $10^6 \sim 10^8$ cfu 之间^[9], 我们应用 pCANTAB5E 载体构建的十肽库, 重组率 66.7%, 实际库容为 3.52×10^7 , 基本满足筛选要求, 且在同样库容的条件下, 十肽库比六肽库包含更多的信息, 即包含更多的随机序列. 我们以 96 孔板包被的血管形成素对十肽库进行筛选, 获得 26 个阳性克隆, 对其中 12 个克隆进行序列分析, 并推导出氨基酸序列, 其中 5 个 W-X-W, 4 个 L-L, 3 个 W-P 的序列. Gho 等^[5] 根据血管形成素受体结合位点的反义 RNA 的序列, 合成两个血管形成素的拮抗剂, 并体外实验证实, 能够中和 PC3 细胞分泌的血管形成素, 抑制其诱导的血管形成作用, 而不影响胚胎的新生血管形成和已存在的血管, 因而有可能在临床上用于治疗各种分泌血管形成素的肿瘤. 其中一个小肽的序列为: L-L-F-P-L-G-V-S-L-L-D-S, 含有 2 个 L-L 序列, 我们筛选到的 12 个阳性克隆中 4 个具有 L-L 的重复序列, 提示 L-L 的重复结构可能竞争性抑制血管形成素与相应受体的结合. 其他

序列虽与文献报道的血管形成素结合小肽的序列无同源性, 但 ELISA 证实也能够特异性地和血管形成素结合, 但这种结合是否能够抑制血管形成素的活性, 或者还有其他意义尚有待于进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Smith G P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigen on the surface of the virion. *Science*, 1985, **228** (4705): 1315~ 1317
- 2 D'Souza S E, Ginsberg M H, Burke T A, *et al.* Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science*, 1988, **242** (4875): 91~ 93
- 3 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
- 4 Fett J W, Stryom D J, Lobb R R, *et al.* Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*, 1985, **24** (20): 5480~ 5486
- 5 Gho Y S, Chae C B. Anti-angiogenin activity of the peptides complementary to the receptor-binding site of angiogenin. *J Biol Chem*, 1997, **272** (39): 24294~ 24299
- 6 Gho Y S, Lee J E, Seuk K, *et al.* Development of anti-angiogenin peptide using a phage-displayed peptide library. *Cancer Res*, 1997, **57** (17): 3733~ 3740
- 7 Cortese R, Monaci P, Luzzago A, *et al.* Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. *Curr Opin in Biotech*, 1996, **7** (6): 616~ 621
- 8 Lowman H B. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1997, **26**: 401~ 424
- 9 Burritt J B, Bond C W, Doss K W, *et al.* Filamentous phage Display of Oligopeptide libraries. *Analytical Biochemistry*, 1996, **238** (1): 1~ 13

Construction of Random Decapeptide Library and Screening Identification of Angiogenin-binding Peptides.

YANG Hui¹⁾, ZHANG Ying-Qi¹⁾, HAN Wei¹⁾, YAN Zhen¹⁾, YAO Li-Bo²⁾, SU Cheng-Zhi²⁾
(¹⁾Biotechnology Center, The Fourth Military Medical University; ²⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China).

Abstract A random decapeptide library was constructed by using phage-surface display. The oligonucleotide sequence (NNK) was digested with *Sfi* I and *Not* I and ligated into the phagemid pCANTAB5E. The recombinant DNA was introduced into *E. coli* TG1 by electroporation, and

5.3×10^7 phage was harvested. The insert was present in 66.7% of phage, thus the random decapeptide library had a complexity of 3.53×10^7 . The titer of phage supernatant was 4.8×10^{11} after the helper phage M13KO7 super-infection. This library was screened using angiogenin protein. 26 ANG-binding clones were indentified from 94 enriched individual phagemid clones after two rounds of panning. The nucleotide sequences encoding peptide recombined in 12 positive phagemid clones were determined. ELISA showed that all of them could specifically bind to ANG.

Key words phage-display, random peptide library, angiogenin

中枢神经蛋白质组分析中双向电泳技术的建立*

赵从建¹⁾ 贾宇峰¹⁾ 丁勤学¹⁾ 阙海萍 刘少君²⁾

郭尧君²⁾

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 建立和优化了中枢神经组织蛋白质组分析所需的双向电泳及相关技术。由于中枢神经组织结构的特殊性, 样品处理非常困难。对样品液组成、样品处理、上样方式、上样量、IPG 胶条和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色方法和保存等相关技术进行了比较研究和条件优化后, 以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向和 SDS 均一胶 ($T = 12.5\%$) 的水平电泳为第二向, 成功地得到了神经组织双向电泳图谱。

关键词 蛋白质组, 双向电泳, PC12 细胞, 中枢神经组织

学科分类号 Q51

随着后基因时代的来临, 研究生命活动的直接执行体——蛋白质的科学——蛋白质组学 (proteomics) 应运而生^[1~3]。双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 作为蛋白质组研究的开门技术, 得到生物医学界的充分关注^[4,5]。

双向电泳是目前分析组分复杂蛋白质分辨率最高的工具之一。2-DE 技术的第一向等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 是基于蛋白质等电点不同而将其分离; 第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 是基于蛋白质亚基分子质量不同将一向分离后的蛋白质进一步分离。双向电泳后, 将 2-DE 凝胶染色, 然后扫描; 再用专业分析软件包对 2-DE 图谱进行分析、比较。

由于双向电泳的分辨率涉及蛋白质样品处理、IEF、SDS-PAGE、染色等技术, 操作有一定难度。特别是由于神经组织结构的特殊性, 对神经组织, 尤其是中枢神经组织进行双向电泳, 更有其难度。迄今为止, 仅见 Klose 等^[6~8]三篇神经组织双向电泳报告。我们采用固相 pH 梯度 (immobiline pH gradients, IPG) 等电聚焦作一向, 采用水平 SDS-PAGE 为第二向, 对大鼠中枢神经系统 (脑、脊

* 国家自然科学基金 (39928015) 资助项目。

¹⁾ 作者对本文有同等贡献。

²⁾ 通讯联系人。

刘少君 Tel: (010) 66932379 (L), 66931304 (O);

E-mail: liusj@nic.bmi.ac.cn

郭尧君 Tel: (010) 64888562, E-mail: yaojun@263.net

收稿日期: 2000-02-29, 修回日期: 2000-05-10