

用于库-库筛选体系的抗原表达载体的构建*

高荣凯** 王 琰

(海军总医院中心实验科, 北京 100037)

摘要 选择感染性噬菌体 (SIP) 技术是研究蛋白质相互作用的良好手段, 体内 SIP 技术在理论上适于库-库筛选, 而双载体共包装聚合噬菌体方式是一条有效途径. 为构建适合库-库筛选的抗原表达载体, 选用 TG10 载体作为基本载体进行改造, 首先克隆噬菌体 M13 基因间隔区的序列插入 TG10 中得到质粒 pTMI, 克隆基因Ⅲ的 N1N2 区序列, 并在其 3' 端加上一段 G4T 柔性多肽, 将 N1N2 插入到 pTMI 载体中 Lac 启动子的下游得到 pTMIN, 化学合成 Ptrc 启动子序列替换 pTMIN 中的 Lac 启动子及部分功能基因序列, 构建成抗原表达载体 pTTMIN, 化学合成 c-myc 的十肽表位插入到 G4S 后进行融合表达, 采用 ELISA 和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测抗原的表达, 结果显示抗原得到了融合表达. 用抗体呈现载体对 pTTMIN 性能进行鉴定, 结果表明抗原表达载体可以与抗体呈现载体高效的共包装. 综合以上结果说明抗原表达载体构建成功, 可望用于库-库筛选体系.

关键词 库-库筛选, 抗原, 表达载体, 选择感染性噬菌体
学科分类号 Q7

选择感染性噬菌体(selectively infective phage, SIP) 技术是在传统噬菌体表面展示体系的基础上发展而来, 它将噬菌体感染力的恢复与蛋白质间的相互作用偶联起来, 从而有效地降低了本底, 提高了筛选效率, 为研究蛋白质间的相互作用提供了便利^[1]. 根据蛋白质作用环境可分为体外法和体内法, 在体外 SIP 策略中^[2~5], 饵蛋白可以与蛋白质Ⅲ的 N 端序列融合表达或化学偶联形成衔接子(adapter), 而备筛的蛋白质则呈现在无野生蛋白Ⅲ的噬菌体表面, 通过体外温育, 只有当两蛋白质发生特异结合时噬菌体才恢复感染力, 这样就可以一步筛选到靶标, 而不必像传统噬菌体展示技术那样需几轮的淘筛过程. 在体内 SIP 策略中, 饵蛋白与 PⅢ的 N 端序列融合表达, 与展示的蛋白质在同一载体上表达或不同载体上进行共表达^[6~9], 蛋白质间相互作用发生在细菌的周质腔, 当两蛋白质可以特异结合时就产生了有感染力的噬菌体, 其优势是不需要进行蛋白质的表达纯化, 只要有基因就可以筛选出来. 两蛋白质表达在同一载体上时直接就获得了相互作用蛋白质对的遗传信息, 在不同载体上表达时需共包装成聚合噬菌体才能获得蛋白质对的遗传信息. 如果将饵蛋白也变成饵蛋白库, 就成了库-库的筛选, 这在理论上是可行的. 同一载体上的表达

在理论上虽然可行, 但在实际操作上难度很大, 而双载体共包装方式是一条简便易行途径. 本文的目的就是构建一个抗原表达载体, 它可以与抗体呈现载体相容并能共包装, 通过抗原-抗体的相互作用而恢复无感染力的抗体-噬菌体颗粒的感染能力.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌、毒株和质粒. *E.coli* XL1-Blue 为本实验室保存菌株; 辅助病毒 VCSM13 为 Stratagen 公司产品; 质粒 TG10 带有 p15A 复制起始和氯霉素抗性基因, 由美国引进; 质粒 p3MHBB3 为抗乙肝病毒表面抗原 Fab 呈现载体^[10], 由本室构建.

1.1.2 工具酶和化学试剂. 限制性内切酶 *Cla* I、*Hind* III、*Pst* I、*Sma* I、*Kpn* I 等以及 T4 DNA 连接酶为 New England Biolab 公司产品; pfu DNA 聚合酶为美国 Promega 公司产品; 琼脂糖、IPTG 及其他有关化学试剂均为进口或国产分析纯.

1.1.3 试剂盒. pGEM-T 试剂盒为 Promega 公司产品, 用于 PCR 产物的克隆.

*国家自然科学基金资助项目(30200156).

** 通讯联系人. Tel: 010-66958240, E-mail: Gaork68@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-09-28, 接受日期: 2005-11-08

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成. 参照 M13 噬菌体的基因组序列^[10], 设计用于扩增病毒基因间隔区的一对引物: MI-5' GGATCGATGCCCTGTAGCGGCGC-ATT, MI-3' GGATCGATATTGTAAACGTTAA-T, 引物中均引入 *Cla* I 酶切位点, 以便于插入质粒 TG10 的相应位点. 设计用于扩增基因 III N1N1 区的一对引物: pMN TCCCCCGGGATGAA-AAAATTATTATTC, 上游加有 *Sma* I 酶切位点, 从信号肽起, pMNL CGCTGCAGTTAGGTACC-GCCGCCGCCAGCATTGAC, 止于蛋白 III 的第 219 位氨基酸残基, 后面加上一段 G4T 连接肽, 最后的甘氨酸与苏氨酸形成 *Kpn* I 酶切点, 下游带有终止密码子和 *Pst* I 酶切点.

参照 pTrc99A 序列设计合成 Ptrc 启动子序列:

trc1 5' TCGAC TGTTGACAAT TAATCAT-CCG GCTCGTATAA TGTGTGGAAT TGTGAGC-GGA TAACAATTTT ACACAGGAAA GGATCCC 3', trc2 5' GGGATCCTTTTCCTGTGTGAAATTG-TTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAG-CCGGATGATTAATTGTCAACAG 3'.

1.2.2 基因工程操作. 基因的 PCR 扩增、连接、酶切等基因操作按常规方法进行.

1.2.3 噬粒载体的包装. 参照常规方法进行, 将带有噬粒载体的细菌培养至 A_{600} 到 0.4~0.6, 加入适量辅助病毒进行拯救, 37℃ 培养过夜, 离心收集上清即可.

1.2.4 酶联免疫吸附分析(ELISA). 对抗原表达的检测采用竞争抑制 ELISA 法, 参照常规方法进行操作. 以交联有 BSA 的化学合成 c-myc 十肽包被酶标板, 3% 的 BSA 封闭. 取诱导表达的培养上清先与 9E10 单抗室温作用 20 min, 再加到酶标板孔内, 37℃ 湿盒内放置 2 h, PBS 洗涤 3 次, 用辣根过氧化物标记的羊抗小鼠抗体作为二抗进行检测, 并以含空载体的细菌培养上清作为对照, 来计算竞争抑制率.

1.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE). 对抗原的融合表达采用 SDS-PAGE 进行检测, 参照常规方法进行操作.

1.2.6 双噬粒载体的共包装. 用制备含抗原载体的噬菌颗粒, 感染新鲜制备的带有抗体呈现载体的宿主菌, 室温 20 min, 涂布含氯霉素的平板, 37℃ 培养过夜, 挑取单克隆接种含双抗的 LB 培养基, 37℃ 振荡培养, 用辅助病毒拯救, 培养过夜制备噬

菌颗粒, 用其感染活化的 XL1-Blue 菌, 分别涂布含氨苄青霉素、氨苄青霉素加氯霉素的 LB 培养基平板, 37℃ 培养过夜, 计算其中双抗性的比例.

2 结 果

2.1 M13 噬菌体基因间隔区的克隆

以 puc119 为模板, 用 MI-5' 和 MI-3' 为引物进行 PCR 扩增(图 1), 用 pGEM-T 直接克隆 PCR 产物, 经 *Cla* I 酶切鉴定正确, 将该基因间隔区序列插入到载体 TG10 的 *Cla* I 位点间, 电穿孔转化细菌, 37℃ 温浴 1 h 后, 加入氯霉素继续振荡培养 4 h, 加入 VCSM13 辅助病毒继续培养 4 h 进行拯救, 插入有病毒基因间隔区的重组子可以被包装成噬菌颗粒. 离心收集上清, 经适度稀释后感染新鲜制备的 XL1-Blue 菌, 涂布氯霉素平板, 重组子能长成集落, 提取质粒, 经酶切鉴定正确(图 2), 命名为 pTMI.

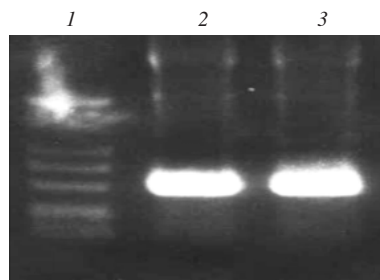


Fig. 1 PCR to amplify interval region

1: DL2000 marker; 2,3: PCR product.

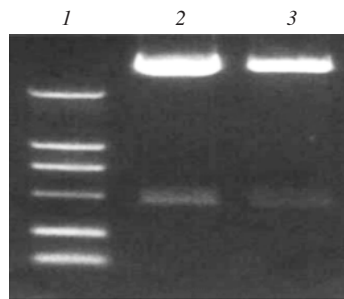


Fig. 2 Digestion analysis of pTMI

1: DL2000 marker; 2,3: pTMI/*Cla* I.

2.2 抗原融合表达载体的构建

PCR 扩增病毒基因 III 的 N1N2 区序列(图 3), 用 pGEM-T 载体克隆 PCR 产物, 经 PCR 法鉴定后, 将该片段插入到 pTMI 的 lac 启动子后即构建载体 pTMIN. 化学合成 trc 启动子序列及互补链序列, 退火后插入到 *Sal* I 和 *Sma* I 位点间替换掉 lac 启动子及部分功能基因片段, 构建成抗原融合表达载体 pTTMIN, 经酶切鉴定正确(图 4). 抗原融

合表达载体如图 5 所示。

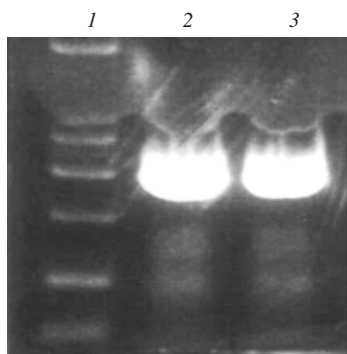


Fig. 3 PCR amplification of N1N1

1: DL2000 marker; 2,3: PCR product.

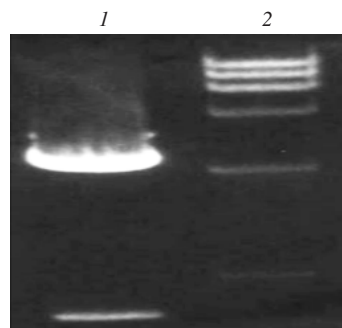


Fig. 4 Digestion analysis of pTTMIN

1: pTTMIN/Sal I + Pst I; 2: DL15000 marker.

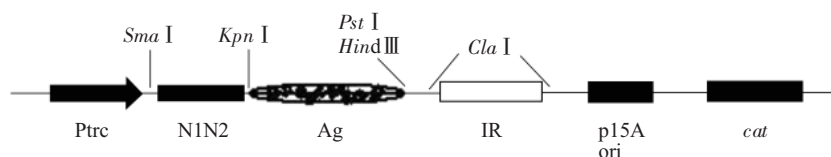


Fig. 5 Sketch map of antigen expression vector pTTMINAg

2.3 载体 pTTMIN 对抗原的表达

分别化学合成 c-myc 十肽表位的编码链和其互补链^[12], 并在两端加上相应的酶切点接头, 退火后插入到 pTTMIN 中, 经 IPTG 诱导表达后, 采用竞争抑制 ELISA 法检测 c-myc 的表达, 结果抑制率可达 33%, 表明抗原得到了活性表达. 分别取经不同时间 (0, 0.5, 1, 2, 3, 4 h) 诱导表达的全菌体作 SDS-PAGE, 结果如图 6 所示, 在 20.4 ku 和 31 ku 之间有一明显诱导表达条带, 与推导的融合蛋白分子质量为 25.5 ku 相符, 说明抗原得到了融合表达. 综合上述结果表明载体 pTTMIN 能用于抗原的融合表达.

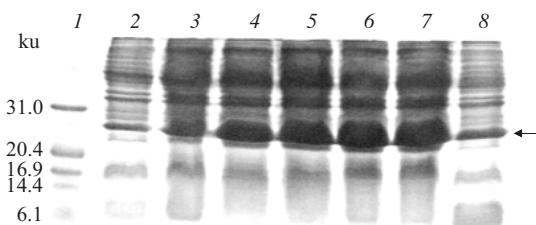


Fig. 6 SDS-PAGE of N1N2-C-myc fusion expression

1: Molecular mass marker; 2~7: Induction expression of 0/0.5/1/2/3/4 h; 8: XL1-Blue (pTMI) control.

2.4 载体 pTTMIN 与抗体呈现载体的共包装

用含 pTTMIN 的噬菌颗粒感染带有抗体呈现载体 p3MHHB3 的细菌, 涂布氯霉素平板, 挑取单集落接种到含氯霉素、氨苄青霉素的 SB 培养基中, 振荡培养至 A_{600} 在 0.4 到 0.6 之间, 加入辅助病毒进行拯救, 离心收集上清, 经适度稀释后感染新鲜制备的 XL1-Blue 菌, 分别涂布含氯霉素、青霉素、氯霉素 + 青霉素的平板, 计数各自集落形成, 并计算双抗性集落占抗体集落数的比例, 结果双抗性占抗体集落数的 0.3% 到 55%, 表明载体 pTTMIN 能与抗体呈现载体进行共包装.

3 讨 论

对于丝状噬菌体的细致研究发现, 蛋白 III 在噬菌体对细菌的感染中起关键作用, 其 N 端的 N1 区能与细菌的 f 纤毛结合从而介导对细菌的感染, 而 C 端的 CT 区则参与噬菌体颗粒的包装, SIP 技术正是基于此而产生, 展示有外源蛋白的重组噬菌体颗粒由于没有野生蛋白 III 的存在而失去感染力, 其感染力的恢复是通过融合有蛋白 III N1 区的蛋白质与展示蛋白的相互作用来实现, 从而有效降低了本底, 提高了筛选效率. 特别是体内 SIP 技术在理论

上适合于库-库筛选, 而双载体的共包装是一条可行的途径^[8]. 要实现这个目标, 必须解决以下的问题: a. 两个载体的相容性. 一般认为当两个载体的复制起始一样时, 由于相互间的竞争造成在后代中的分配不一致, 双载体不能稳定遗传, 称之不相容, 而两个载体的复制起始不同时则互不影响, 称之为相容. 一般抗体呈现载体的复制起始是 Col E, 为此选择带有 p15A 复制起始的 TG10 载体作为基本载体进行改造. b. 共包装噬菌颗粒的筛选. 选用不同的抗性来解决, 一般抗体呈现载体为青霉素抗性, 而 TG10 带有氯霉素抗性基因, 通过双抗性筛选可得到共包装体. c. 共包装效率. 虽然普通质粒也能与呈现载体进行共包装, 但水平太低, 为此克隆了含有包装信号的基因间隔区序列插入抗原表达载体中以提高效率, 结果显示, 共包装效率达到 0.3% 到 55%, 能够满足需要. d. 能提供恢复感染力的 N 端序列. 为此克隆了基因 III 的 N1N2 区序列, 使之与抗原进行融合表达, 同时为确保抗原的功能性表达, 中间又加上了一段 G4T 柔性多肽. 由于原始载体中 Lac 启动子后有一段可用于 α 互补的半乳糖苷酶序列, 故用化学合成的 Trc 启动子序列来替代, 对抗原表达的检测结果表明, 该载体能实现抗原的融合表达. 综合上述结果, 推论抗原表达载体构建成功, 有望用于库-库筛选体系.

参 考 文 献

- 1 Jung S, Arndt K M, Muller K M, et al. Selectively infective phage (SIP) technology: scope and limitations. *J Immunol Methods*, 1999, **231** (1~2): 93~104
- 2 Duenas M, Borrebaeck C A. Clonal selection and amplification of phage displayed antibodies by linking antigen recognition and replication. *Biotechnology*, 1994, **12** (10): 999~1002
- 3 Duenas M, Malmberg A C, Casalvilla R, et al. Selection of phage displayed antibodies based on kinetic constants. *Mol Immunol*, 1996, **33** (3): 279~285
- 4 Gao C S, Lin C H, Lo C H L, et al. Making chemistry selectable by linking it to infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (22): 11777~11782
- 5 Hennecke F, Krebber C, Pluckthun A. Non-repetitive single-chain Fv linkers selected by selectively infective phage (SIP) technology. *Protein Eng*, 1998, **11**(5): 405~410
- 6 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
- 7 Spada S, Honegger A, Pluckthun A. Reproducing the natural evolution of protein structural features with the selectively infective phage (SIP) technology. The kink in the first strand of antibody kappa domains. *J Mol Biol*, 1998, **283** (2): 395~407
- 8 Rudert F, Woltering C, Frisch C, et al. A phage-based system to select multiple protein-protein interactions simultaneously from combinatorial libraries. *FEBS Lett*, 1998, **440** (1~2): 135~140
- 9 Hertveldt K, Robben J, Volckaert G. *In vivo* selectively infective phage as a tool to detect protein interactions: evaluation of a novel vector system with yeast Ste7p-Fus3p interacting proteins. *Yeast*, 2002, **19** (6): 499~508
- 10 王 琰, 王欲晓, 陈晓穗, 等. 用于大容量噬菌体抗体库的表达载体的构建及鉴定. *中国免疫学杂志*, 2003, **19** (2): 93~96
Wang Y, Wang Y X, Chen X S, et al. *Chin J Immunol*, 2003, **19** (2): 93~96
- 11 Wezenbeek P, Hulsebos T, Schoenmakers J. Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd. *Gene*, 1980, **11** (1~2): 129~148
- 12 高荣凯, 王 琰, 刘群英, 等. 抗乙肝病毒表面抗原单链抗体在大肠杆菌中的高效表达. *中国免疫学杂志*, 1999, **15** (3): 122~123
Gao R K, Wang Y, Liu Q Y, et al. *Chin J Immunol*, 1999, **15**(3): 122~123

Construction of The Antigen Expression Vector Used for Library-library Screening*

GAO Rong-Kai**, WANG Yan

(Central Laboratory, General Hospital of Navy, Beijing 100037, China)

Abstract Selectively infective phage (SIP) technology was developed for screening interacting protein-protein pairs. The *in vivo* SIP strategy would in principle be suitable for “library-library” selections, and the co-packaged polyphage may be a suitable approach. In order to construct the antigen expression vector which can be co-packaged into polyphage with phage displaying vectors, plasmid TG10 was chosen as the basic vector which is compatible with antibody display vector. The interval sequence of phage genome was amplified with PCR and cloned into TG10 to provide the packaging signal. It was named pTMI and it can be packaged into phage particles in 10^{11} level. The N1N2 region of gene III was amplified and cloned into pTMI under the control of lac promoter to give pTMIN. Promoter *trc* was synthesized and replaced the lac promoter to give pTTMIN which permits the fusion expression of antigen with N1N2. To test its ability for fusion expression, gene code for ten-peptide of c-myc was synthesized and inserted into pTTMIN downstream to N1N2. After induction expression, the results of ELISA and SDS-PAGE showed that it has been expressed successfully. When pTTMIN was transfected into cell carrying antibody display vector p3MHBB3, it was copackaged into phage particles in 0.3% to 55% after rescuing with helper phage VCSM13. From the results it can be concluded that the antigen expression vector was constructed successfully and it can be used for library-library screening in theory.

Key words library-library screening, antigen, expression vector, selectively-infective phage (SIP)

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30200156).

**Corresponding author . Tel: 86-10-66958240, E-mail: Gaork68@yahoo.com.cn

Received: September 28, 2005 Accepted: November 18, 2005