

噬菌体展示重组人淋巴毒素 突变体库及受体亲和筛选*

沈毅珺^{1,2)} 潘卫^{1)**} 许燕²⁾ 王征²⁾ 杨彤²⁾
谭靖伟²⁾ 吴劲松²⁾ 吴芳²⁾ 曹峰²⁾ 刘彦君^{2)**}

(¹⁾第二军医大学基础医学部微生物学教研室, 上海 200433; ²⁾上海复旦张江生物医药股份有限公司, 上海 201203)

摘要 淋巴毒素(lymphotoxin, LT)通过 TNFR1 受体传递凋亡信号, 从而发挥抗肿瘤活性. 对 LT 的受体结合区域进行多点随机突变, 利用噬菌体展示重组人淋巴毒素(rhLT) R46, S106, L130 三点随机突变组合文库和 S106~F110 区域随机突变体库. 噬菌体库与固相化 TNFR1 受体进行亲和筛选, 富集了能与 TNFR1 受体结合的 rhLT 突变体. 随机挑选 20 个单克隆噬菌体进行 ELISA 受体结合鉴定, 其中 80% 的克隆与 TNFR1 受体特异性结合, 有 4 个克隆与 TNFR1 受体的结合能力高于野生型序列的 rhLT. 将这 4 个结合力高的突变体克隆于 pET32a(+)载体, 经过大肠杆菌表达和纯化操作后, 检测这些突变体蛋白与 TNFR1 受体的结合活性和对 L929 细胞的杀伤活性, 发现 3 个克隆的受体结合性质与其展示于噬菌体上时基本吻合, 其中 C199 克隆与 TNFR1 的结合活性比野生型序列的 rhLT 提高了近 30%, 且其对 L929 细胞的杀伤活性提高了近 90%. 应用噬菌体展示技术对淋巴毒素进行体外进化研究的尝试, 为下一步的蛋白质结构和功能研究提供了思路, 可成为大分子药物开发的有效工具.

关键词 淋巴毒素, 随机突变, 噬菌体展示, 亲和筛选

学科分类号 Q78

淋巴毒素(lymphotoxin, LT)是肿瘤坏死因子(TNF)家族的一个重要成员, 在多种肿瘤细胞株的体内和体外抑瘤实验中, 有报道发现 LT 与 TNF 一样都具有抗癌活性, 但 LT 在小鼠中的毒性却比 TNF 小, 且 LT 在体内的半衰期比 TNF 长^[1]. 如同大部分 TNF 超家族成员一样, LT 在生理状态下形成三聚体结构存在, 其三聚体的结构主要通过疏水作用和芳香族侧链的相互作用而得到稳定^[2], 有实验证实 LT 三聚体比 TNF 三聚体更稳定^[3]. LT 与 TNF 能竞争性结合相同受体 TNFR1 和 TNFR2, 发挥生物学活性时, 1 个 LT 或 TNF 三聚体同时结合 3 个受体分子^[4], 而受体的聚合则激活了下游的信号通路, 在不同的细胞中可产生活化、增殖、分化、抑制和杀伤等不同的生物学活性^[5], LT 和 TNF 在体内还具有免疫调节功能, 参与发热和炎症的发生^[6]. 信号传导研究表明, TNFR1 是传递凋亡信号的主要受体^[7,8], LT 与 TNFR1 的复合物晶体结构分析表明, 一个受体分子同时与一个 LT 亚单位表面 DE 环路区的 N48~D50 和另一个 LT 亚单位表面 AA 环路区的 S105~P109 相互作用^[9]. 我们选择不同的 LT 受体结合部位进行随机突变, 分别构建了 R46, S106, L130 同时突变的三点随机突

变组合文库^[9]和 S106~F110 区域随机突变文库, 并将突变体库展示于噬菌体表面, 通过与 TNFR1 受体的亲和筛选寻找提高受体亲和力的 LT 突变体, 以获得提高抗肿瘤活性的新型淋巴毒素.

1 材料和方法

1.1 载体和细胞株

pMD-18T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司, pCANTAB5S 噬菌粒载体为第二军医大学构建保存^[10], pET32a (+) 载体购自 Novagen 公司, rhLT/pMD-18T 质粒和 rhLT/pCANTAB5S 噬菌粒都克隆有 N 端缺失 23 个氨基酸的重组人淋巴毒素 rhLT 基因, 其表达框为成熟人 LT 氨基酸序列 (GenBank 号为 BAA00064) 的第 24 位至 171 位, 由上海复旦张江生物医药股份有限公司构建保存.

E.coli TG1 和 *E.coli* BL21 (DE3) 为上海复旦张江生物医药股份有限公司保存. *E.coli* TOP10F' 购

* 国家高技术“863”研究发展计划资助项目(2001AA215051, 2002AA2Z3309).

** 通讯联系人.

潘卫. Tel: 021-25074371, E-mail: pwpanwei@yahoo.com.cn

刘彦君. Tel: 021-58953355, E-mail: yanjunl@yahoo.com

收稿日期: 2004-08-10, 接受日期: 2004-09-28

自 Invitrogen 公司, L929 细胞株购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所. 辅助噬菌体 M13KO7 为大肠杆菌丝状噬菌体, 购自 Amersham Pharmacia 公司.

1.2 受体和抗体

TNFR1:Fc 受体购自 R&D 公司. 鼠抗噬菌体酶联单抗 mouse Anti-M13-HRP monoclonal conjugate 购自 Amersham Pharmacia 公司, 兔抗 LT 酶联多抗为上海复旦张江生物医药股份有限公司制备.

1.3 淋巴毒素突变文库

LT 三点随机突变组合文库 rhLT (R46m+S106m+L130m) 已经通过定点突变和酶切拼接获得. 为构建 LT 区域随机突变文库 rhLT (S106m-F110m), 设计含随机核苷酸的 PCR 引物, 序列见表 1. 以 rhLT/pMD-18T 质粒为模板, 先分别以 (106~110)m-U2、(106~110)m-U4、(106~110)m-U5 和 LT-D 匹配扩增含 2 个、4 个、5 个氨基酸突变的片段 I 2、I 4、I 5, 以 (106~110)m-D 和 LT-U 匹配扩增含有与片段 I 序列互补的片段 II, 再将片段 I 2、I 4、I 5 和片段 II 以 3:3:3:1 的比例

混合后为模板, 以 LT-U 和 LT-D 匹配扩增含 S106 至 F110 位 5 个氨基酸随机突变的 rhLT (S106m~F110m) 片段, PCR 产物纯化后克隆于 pMD-18T 载体, 转化 *E.coli* TOP10F', 随机挑取若干转化子委托上海生工生物技术有限公司进行序列测定. 将 rhLT(R46m+S106m+L130m) 和 rhLT (S106m~F110m) 片段分别用限制酶 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切下, 与同样酶切的 pCANTAB5S 噬菌粒载体连接后转化 *E.coli* TOP10F'. 提取重组噬菌粒转化 *E.coli* TG1, 10 ml 转化后的细菌在含氨苄青霉素 100 mg/L 的 2×YTG 中培养至 A_{600} 约 0.5 时, 加入滴度为 1×10^{10} TU 的辅助噬菌体 M13KO7, 37°C 培养 1 h 后于 1 000 g 离心 10 min, 沉淀复悬于 50 ml 含 100 mg/L 氨苄青霉素和 15 mg/L 卡那霉素的 2×YT 中 37°C 培养过夜. 1 000 g 离心 10 min 取过夜培养物上清, 在上清中加入 1/5 体积的 PEG8000/NaCl 溶液, 冰浴 1 h 后 10 000 g 离心 20 min. 将沉淀复悬于 10 ml 2YT 中, 即获得了展示 LT 三点随机突变组合文库和区域随机突变文库的重组噬菌体, 噬菌体的滴度测定见文献[11].

Table 1 rhLT primers for random mutagenesis

Name	Description(amino acid position in LT)	Sequence(5'→3')
LT-U	Sense terminal primer of rhLT(H24~P29)	<i>TCT AGA* CAT ATG* CAC TCT ACC CTG AAA CCG</i>
LT-D	Antisense terminal primer of rhLT(F166~L171)	<i>GGA TCC* GGT ACC* CAG AGC GAA GGC TCC AAA</i>
(106~110)m-U2	Sense mutation primer with 2 amino acids mutated (V101~S117)	<i>GTC CAG CTG TTC TCC TCC <u>NNS*</u> TAC <u>NNS</u> TTC CAT GTG CCT CTC CTC AGC TCC</i>
(106~110)m-U4	Sense mutation primer with 4 amino acids mutated (V101~S117)	<i>GTC CAG CTG TTC TCC <u>NNS</u> <u>NNS</u> TAC <u>NNS</u> <u>NNS</u> CAT GTG CCT CTC CTC AGC TCC</i>
(106~110)m-U5	Sense mutation primer with 5 amino acids mutated (V101~S117)	<i>GTC CAG CTG TTC TCC <u>NNS</u> <u>NNS</u> <u>NNS</u> <u>NNS</u> <u>NNS</u> CAT GTG CCT CTC CTC AGC TCC</i>
(106~110)m-D	Antisense mutation primer(A98~S105)	<i>GGA GAA CAG CTG GAC CTC ATG GGC</i>

*Clone sites are in italic; **the mutation sites are underlined (N=A/T/C/G, S=G/C).

1.4 亲和筛选

将 TNFR1:Fc 受体蛋白以 200 ng 每孔包被 ELISA 板条, 板条用含 10% 脱脂奶粉, 0.01% NaN_3 , 0.1% TritonX-100 的 PBS 封闭液室温封闭 1 h 后用 PBS 洗涤 3 次. 取 1×10^{12} TU 1:1 混合的 LT 三点随机突变组合文库和区域随机突变文库加入 TNFR1:Fc 板条, 37°C 放置 2 h, 用含 0.05% Tween-20 的 PB 洗涤 (第一轮洗涤 5 次, 第二轮洗涤 10 次, 第三轮洗涤 25 次, 第四轮洗涤 50 次). 每孔加入 100 μl 生长至对数生长期的 *E.coli* TG1,

37°C 培养 1 h, 收集菌液, 取 10 μl 测定滴度, 其余菌液扩增至 50 ml 2×YT(含 100 mg/L 氨苄青霉素)培养基, 37°C 培养 1 h 后加入 10^{10} TU 的辅助噬菌体 M13KO7, 再培养 1 h 后, 加入卡那霉素至 15 mg/L, 37°C 培养过夜. 噬菌体沉淀和收集方法同 1.3.

1.5 单克隆噬菌体的制备及 ELISA 鉴定

取经过 TNFR1:Fc 筛选的噬菌体感染 *E.coli* TG1 后, 划 LB(含氨苄青霉素 100 mg/L) 平板, 37°C 过夜培养. 随机挑取 20 个菌落接种于 10 ml

2×YT(含 100 mg/L 氨苄青霉素)培养基, 37°C 培养 1 h 后, 加入 10^{10} TU 的辅助噬菌体 M13KO7, 再培养 1 h 后加入卡那霉素至 15 mg/L, 37°C 培养过夜. PEG 沉淀的噬菌体复悬于 2 ml 2YT 中, 分别测定单克隆噬菌体的滴度. rhLT 噬菌体和 pCANTAB5S 噬菌体分别采用取 rhLT/pCANTAB5S 重组噬菌粒, 和 pCANTAB5S 空白噬菌粒载体转化 *E.coli* TG1 的制备方法. 将待检测的噬菌体都稀释至 10^{13} TU/ml 后, 各取 100 μ l 加入 TNFR1:Fc 包被的 ELISA 板条中, 37°C 放置 2 h 后, 用 PBST 洗 5 次, 加入鼠抗噬菌体酶联单抗结合, TMB 显色后读取 A_{490} 数值.

1.6 原核表达和蛋白质纯化

提取经 ELISA 鉴定的噬菌体噬菌粒, 利用 *Nde* I 和 *Eco*R I 限制酶切位点克隆至 pET32a(+) 表达载体上, 转化 *E.coli* BL21(DE3) 受体菌. 转化子在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 500 ml LB 中培养至 A_{600} 约 0.5 时, 加入 IPTG 至 0.5 μ mol/L, 诱导 3 h. 取部分菌液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定目的蛋白的表达, 表达的目的蛋白为成熟 LT 的第 24 位至 171 位, 且在第 24 位前含有 Met, 共含 149 个氨基酸, 理论分子质量为 16 428. 随后收集菌体沉淀, 超声破碎后用 Tris 缓冲液洗涤, 再用 8 mol/L 尿素溶解, 取上清液用 Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech 公司) 离子交换柱层析纯化.

1.7 突变体蛋白的受体结合 ELISA 鉴定

将待测的 LT 突变体蛋白稀释至 1 mg/L 后, 各取 100 μ l 加入 TNFR1:Fc 包被的 ELISA 板条中, 37°C 放置 2 h 后, 用 PBST 洗 5 次, 加入兔抗 LT 酶联多抗结合, 以 TMB 显色, 读取 A_{490} 数值, 将测得的突变体读数分别与 rhLT 的读数比较, 获得结合力比值. 每个样品测定 3 次.

1.8 细胞毒活性测定

取对数生长期的 L929 细胞, 胰蛋白酶消化调整细胞密度至 1.5×10^5 /ml, 将细胞悬液接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l. 37°C, 5% CO₂ 通气培养过夜, 镜检细胞贴满孔底 80% 以上面积(约 18~24 h). 在接种 L929 细胞的 96 孔板中加入样品稀释液以及阴性、空白对照、细胞对照的培养液, 每孔 0.1 ml, 每个测量点设 2 个复孔. 37°C、5% 二氧化碳培养箱中培养 18~24 h. 用结晶紫染色法检测细胞存活情况, 读取 A_{570} 数值. 分别将结果与 LT 国际标准品比较, 获得突变体的活性单位, 并与 rhLT 的活性单位比较, 获得细胞毒活性比值.

2 结 果

2.1 突变体库的构建和鉴定

在构建含 S106 至 F110 位 5 个氨基酸随机突变的 LT 区域突变体库时, 分别设计了 3 种不同的突变引物, 并通过 Overlap PCR 法获得了 rhLT (S106m~F110m) 片段. 将该 DNA 片段克隆于 pMD-18T 载体, 经检测获得的 LT 区域随机突变体库的库容量为 5×10^6 . 对 20 个 LT 区域随机突变体库中的重组子进行序列测定, 证实被突变的氨基酸位点为 S106~F110, 测序结果见表 2. 其中 5 个氨基酸都发生突变的克隆有 2 个, 含 4 到 1 个氨基酸突变的克隆分别有 9 个、4 个、4 个和 1 个, 可见大多数的克隆有 2~4 个氨基酸发生了突变.

Table 2 Sequencing result of samples of the library

Clone	Amino acid sequence				
	S106	Q107	Y108	P109	F110
rhLT _M -1	S	<u>T</u>	Y	<u>L</u>	F
rhLT _M -2	S	<u>V</u>	Y	<u>I</u>	<u>I</u>
rhLT _M -3	S	<u>M</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>I</u>
rhLT _M -4	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	Q
rhLT _M -5	S	Q	Y	<u>L</u>	F
rhLT _M -6	S	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>N</u>
rhLT _M -7	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>M</u>
rhLT _M -8	S	<u>H</u>	Y	<u>L</u>	F
rhLT _M -9	S	<u>A</u>	Y	<u>G</u>	F
rhLT _M -10	<u>G</u>	<u>K</u>	Y	<u>R</u>	<u>K</u>
rhLT _M -11	<u>M</u>	<u>V</u>	Y	<u>D</u>	<u>V</u>
rhLT _M -12	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>M</u>	<u>F</u>	<u>I</u>
rhLT _M -13	<u>M</u>	<u>W</u>	<u>R</u>	P	<u>V</u>
rhLT _M -14	<u>W</u>	Q	<u>S</u>	P	<u>H</u>
rhLT _M -15	<u>R</u>	:	Y	P	<u>T</u>
rhLT _M -16	S	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>V</u>
rhLT _M -17	S	<u>I</u>	Y	<u>G</u>	F
rhLT _M -18	<u>G</u>	<u>M</u>	Y	P	<u>V</u>
rhLT _M -19	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	F
rhLT _M -20	<u>A</u>	Q	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>C</u>

The mutated amino acids are underlined.

2.2 噬菌体库的构建和亲和筛选

分别将克隆于 pMD-18T 载体上的 LT 三点随机突变组合文库, 和 LT 区域随机突变体库用限制酶 *Xba* I 和 *Kpn* I 克隆至 pCANTAB5S 噬菌粒载体, 经转化、辅助噬菌体拯救, 收集上清获得了展示 LT 三点随机突变组合文库和区域随机突变文库的重组噬菌体, 噬菌体的滴度分别达到了 $4.5 \times$

10^{13} TU/ml 和 2.8×10^{14} TU/ml. 以固相化的 TNFR1 对两种噬菌体的混合库进行 4 轮亲和筛选, 随着筛选轮次的增加, 洗脱下来的噬菌体滴度逐渐增加, 能与受体结合的突变体得到了富集, 结果见表 3.

Table3 Enrichment of phage library by biopanning

Rounds	Phage input /TU	Phage output /TU	Ratio/% (Out/Input)
1	1×10^{12}	3.7×10^5	3.7×10^{-5}
2	1×10^{12}	4.7×10^5	4.7×10^{-5}
3	1×10^{12}	7.3×10^5	7.3×10^{-5}
4	1×10^{12}	8.9×10^5	8.9×10^{-5}

2.3 筛选后噬菌体的鉴定

LT 噬菌体库经过与 TNFR1 的亲和筛选后, 从中随机挑取 20 个克隆, 制备单克隆噬菌体, 用 ELISA 法测定噬菌体上清与 TNFR1 的结合活性, 结果见图 1.80% 的克隆为阳性, 4 个克隆与 TNFR1 的结合活性高于野生型序列的 rhLT.

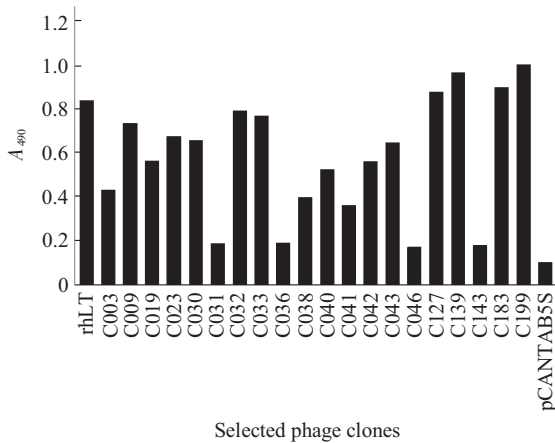


Fig.1 Selected phage clones binding to TNFR1 by ELISA

2.4 LT 突变体的表达和纯化

从筛选获得的阳性克隆中挑取 4 株 TNFR1 结合活性较高的突变体, 通过限制酶 *Nde* I 和 *EcoR* I 克隆至 pET32a(+) 表达载体上, 经测序、转化、表达、纯化获得了这些突变体的蛋白质. 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 这些突变体蛋白与野生型序列的 rhLT 分子质量相同, 且蛋白质表达量都达到 20% 以上(图 2a). 经纯化后 LT 突变体蛋白的纯度达到 90% 以上(图 2b), 且蛋白质浓度达到 1g/L 以上.

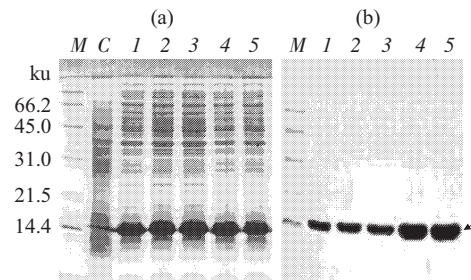


Fig.2 Analysis by SDS-PAGE of LT mutants before (a) and after (b) purification

M: protein marker; C:BL21 (DE3); L: rhLT; 2~5:C127, C139, C183, C199 mutants.

2.5 突变体蛋白的活性鉴定

对纯化后的突变体分别进行了受体结合活性的测定和细胞毒活性的测定, 结果见表 4. LT 突变体经纯化后其受体结合活性与展示于噬菌体表面时并不完全吻合, 其中 C183 与受体的结合力很低且无杀伤活性, C127 和 C139 与受体的结合比野生型序列的 rhLT 略有降低, 仅 C199 的受体结合活性提高了 28% 左右, 对 L929 细胞的杀伤活性则提高了 88% 左右, 符合筛选的要求.

Table 4 Sequence and activity of rhLT mutants

Mutant	Amino acid sequence	Receptor binding/%		Cytotoxicity /%
		Displayed on phage/ %	Protein after purification/ %	
rhLT	Wild type	100	100	100
C127	R46K,S106K	104.28	84.80	88.50
C139	S106K,L130T	114.37	80.11	49.90
C183	S106G,Y108H	106.14	0.04	0.01
C199	S106M	118.53	128.15	187.98

3 讨 论

20 世纪 90 年代以来国内外一些实验室对 LT 进行了一系列的研究, 他们主要通过对 LT 进行定点突变或缺失以提高其抗肿瘤作用, 如对 LT 的 C 端进行缺失突变发现至少 C 端的 10 个氨基酸残基是杀伤活性所必需的^[12]; 而 N 端缺失 25 至 27 个氨基酸残基不仅提高了 LT 在大肠杆菌中的表达量, 且比活性也比野生型提高^[13]; 缺失 84-89 位氨基酸的 LT 突变体在人 WiDr 细胞中活性提高了 1 000

倍^[4]. 定点突变研究发现, LT 的受体结合区内氨基酸的变化易产生不稳定或失活的分子, 但 Goh 等^[15]将 46 位的 Arg 突变为保守的 His 或 Lys 后 LT 的比活性增加了 2~3 倍. 这些 LT 结构与功能的研究结果提示我们, 如对 LT 的受体结合区内的多个氨基酸同时进行随机突变, 构建高容量的 LT 突变体分子库, 再利用噬菌体展示与受体亲和筛选的分子进化工程手段, 将有可能筛选到活性更高的分子. 由于 LT 的细胞毒活性是由 TNFR1 受体介导的, 我们设计 LT 噬菌体库与固相化的 TNFR1 进行亲和筛选, 从中筛选阳性克隆进行活性分析.

我们所构建的 LT S106~F110 位区域随机突变体库的库容量为 5×10^6 , 基本能包括 5 个氨基酸随机突变的组合. 在考虑到 Y108 对于 LT 的活性是必需的, 且过多的氨基酸同时突变对 LT 分子结构的影响太大, 将不利于获得活性提高的分子, 因此在设计引物时, 我们除了合成 5 个氨基酸随机突变的引物之外, 还合成了保留 Y108 不变和保留 S106、Y108、F110 不变的两种引物. 对用 3 种引物混合扩增得到的 LT 突变体库中的克隆进行序列分析, 证实 85% 的突变体含有 2~4 个氨基酸突变, 50% 的突变体保留 Y108 不变, 此外, 氨基酸突变的随机性较好, 因此该区域库符合我们的设计要求.

噬菌体库经过与 TNFR1 受体的 4 轮筛选, 从每轮筛选后检测的产出 / 投入比结果来看(表 3), 能与 TNFR1 结合的噬菌体逐轮被富集. 当用 ELISA 法鉴定筛选后的单克隆噬菌体的受体结合力时, 发现 80% 为阳性克隆(图 1), 说明噬菌体展示亲和筛选是有效的. LT 发挥生物学活性时需以三聚体形式存在, 噬菌体筛选过程体现特异结合, 存在以下的可能: a. 噬菌体展示的 LT 分子形成三聚体. 在利用 pIII 外壳蛋白与外源蛋白融合的 3+3 展示方式^[16]构建 LT 噬菌体库的过程中, 我们投入的 M13KO7 野生型噬菌体为常规量的 30% 左右, 这样使每个噬菌体颗粒上展示多个 LT 分子的机会增加^[17]. 如果单个噬菌体的 5 个 pIII 外壳蛋白中有 3 个展示 LT 单体, 或者展示 2 个 LT 单体的噬菌体和展示 1 个 LT 单体的噬菌体互相靠近, 以及 3 个展示 1 个 LT 单体的噬菌体互相靠近, 都有可能形成三聚体. pIII 蛋白本身就有较高的自由度, 另外, 我们在构建噬菌粒时在 pIII 和 LT 之间增加了(G4S)3 接头, 有利于展示噬菌体表面的 LT 单体在空间结构上自由活动形成三聚体. 实验结果表明, 至少纯化后 3/4 的突变体有明显的生物学活性, 提示

LT 分子在噬菌体表面形成三聚体的可能性是存在的. b. LT 单体与受体结合. 有研究发现, LT 单体对 L929 表面的受体有一定的亲和力^[18], 因此我们不排除展示 1 个或 2 个 LT 单体的噬菌体与受体分子存在较弱的相互作用的可能. c. 噬菌体与受体非特异性结合. 如 C183 (S106G, Y108H) 纯化后与 TNFR1 受体几乎是不结合的, 也无杀伤活性, 实际上已有实验证实在 TNF 家族中, 保守的 Y108 突变会造成 LT 活性的丧失. 这种突变体蛋白实际性质与其重组噬菌体的差异, 可能源于结合反应体系中存在的试剂和杂蛋白干扰, 而亲和筛选过程中的洗涤条件还不理想, 无法完全排除这种非特异性的结合.

我们通过筛选所获得的 C199 (S106M) 与 TNFR1 的结合力, 和对 L929 细胞的杀伤活性都得到了提高, 与我们的筛选要求相符.

本研究对利用噬菌体展示淋巴毒素突变体库并进行受体亲和筛选进行了初步探索, 得到了活性提高的 LT 突变体. 虽然筛选过程中还存在一些干扰因素, 仍需要改进筛选受体特异性结合突变体的方法, 但这种通过体外分子进化研究大分子蛋白质的手段, 为进一步探讨其结构和功能提供了思路 and 材料.

参 考 文 献

- 1 Qin Z, van Tits L J, Buurman W A, *et al.* Human lymphotoxin has at least equal antitumor activity in comparison to human tumor necrosis factor but is less toxic in mice. *Blood*, 1995, **85** (10): 2779~2785
- 2 Eck M J, Ultsch M, Rinderknecht E, *et al.* The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-Å resolution. *J Biol Chem*, 1992, **267** (4): 2119~2122
- 3 Schuchmann M, Hess S, Bufler P, *et al.* Functional discrepancies between tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha explained by trimer stability and distinct receptor interactions. *Eur J Immunol*, 1995, **25** (8): 2183~2189
- 4 Crowe P D, VanArsdale T L, Walter B N, *et al.* A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science*, 1994, **264** (5159): 707~710
- 5 Medvedev A E, Espevik T, Ranges G, *et al.* Distinct roles of the two tumor necrosis factor (TNF) receptors in modulating TNF and lymphotoxin alpha effects. *J Biol Chem*, 1996, **271** (16): 9778~9784
- 6 Kuprash D V, Alimzhanov M B, Tumanov A V, *et al.* Redundancy in tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) signaling *in vivo*: mice with inactivation of the entire TNF/LT locus versus single-knockout mice. *Mol Cell Biol*, 2002, **22** (24): 8626~8634
- 7 Wallach D, Varfolomeev E E, Malinin N L, *et al.* Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*,

- 1999, **17**: 331~367
- 8 Schwandner R, Wiegmann K, Bernardo K, *et al.* TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J Biol Chem*, 1998, **273** (10): 5916~5922
- 9 沈毅珺, 潘卫, 徐容, 等. 重组人淋巴毒素随机点突变组合文库的构建. *生物工程学报*, 2004, **20** (1): 43~48
Shen Y J, Pan W, Xu R, *et al.* *Chin J Biotechnology*, 2001, **20** (1): 43~48
- 10 徐容, 潘卫, 沈毅珺. 新型噬菌体展示载体 pCANTAB5S 的构建. *安徽医科大学学报*, 2004, **399** (2): 83~86
Xu R, Pan W, Shen Y J. *Acta Univ Med Anhui*, 2004, **399** (2): 83~86
- 11 沈毅珺, 潘卫, 易进华, 等. 新型噬菌体展示载体 pCANTAB5L 的构建. *第二军医大学学报*, 2003, **24** (3): 298~302
Shen Y J, Pan W, Yi J H, *et al.* *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2003, **24** (3): 298~302
- 12 Kobayashi Y, Miyamoto D, Asada M, *et al.* Cloning and expression of human lymphotoxin mRNA derived from a human T cell hybridoma. *J Biochem*, 1986, **100** (3): 727~733
- 13 Nishikawa S, Matsuo N, Isaka Y, *et al.* 27 amino acid residues can be deleted from the N-terminus of human lymphotoxin without impairment of its cytotoxic activity. *J Mol Recognit*, 1990, **3** (2): 94~99
- 14 Wakabayashi T, Asada M, Nagasu T, *et al.* Deletion of lysine 84 to lysine 89 enhances the cytotoxicity and the receptor binding affinity of human lymphotoxin. *J Biol Chem*, 1990, **265** (13): 7604~7609
- 15 Goh C R, Loh C S, Porter A G. Aspartic acid 50 and tyrosine 108 are essential for receptor binding and cytotoxic activity of tumour necrosis factor beta (lymphotoxin). *Protein Eng*, 1991, **4** (7): 785~791
- 16 Rodi D J, Makowski L. Phage-display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10** (1): 87~93
- 17 Lowman H B, Bass S H, Simpson N, *et al.* Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry*, 1991, **30** (45): 10832~10838
- 18 Hass PE, Hotchkiss A, Mohler M, *et al.* Characterization of specific high affinity receptors for human tumor necrosis factor on mouse fibroblasts. *J Biol Chem*, 1985, **260** (22): 12214~12218

Phage Display of Recombinant Human Lymphotoxin Mutation Libraries and Receptor Affinity Screening*

SHEN Yi-Jun^{1,2}, PAN Wei^{1**}, XU Yan², WANG Zheng², YANG Tong², TAN Jing-Wei², WU Jin-Song², WU Fang², CAO Feng², LIU Yan-Jun^{2**}

¹Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

²Shanghai Fudan-Zhangjiang Biopharmaceutical Co. Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract Lymphotoxin(LT) delivers the signal of apoptosis by TNFR1, sequentially develops anti-tumor activity. Several receptor binding sites of LT were mutated randomly, then the R46, S106, L130 combined site-directed random mutation library and S106~F110 region random mutation library were displayed on a filamentous phage surface. By using TNFR1 as solid phase molecule, the phage libraries were biopanned and positive mutant clones were enriched. 20 monoclonal phages were picked randomly to detect receptor binding by ELISA assay, 80% of them can bound TNFR1 specifically, and TNFR1 binding ability of 4 clones was higher than rhLT with wild type sequence. 4 mutants with high binding ability were subcloned to pET32a(+) vector, after expression in *E.coli* and purification process, the binding ability and the cytotoxicity in L929 mouse fibroblast cells of these mutants were examined. 3 mutants were having similar binding ability compared with monoclonal phage, the binding ability to TNFR1 and the cytotoxicity to L929 of C199 clone have been enhanced near 30% and 90% respectively. The effort to proceed molecular evolution study of lymphotoxin *in vitro* by phage display not only can be very useful for the following research involved in the relation between structure and function, but also provides potent tool for macromolecule drug development.

Key words lymphotoxin, random mutation, phage display, biopanning

*This work was supported by a grant from The State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA215051, 2002AA2Z3309).

**Corresponding author.

PAN Wei. Tel: 86-21-58953355, E-mail: pwpnwei@yahoo.com.cn

LIU Yan-Jun. Tel: 86-21-58953355, E-mail: yanjunl@yahoo.com

Received: August 10, 2004 Accepted: September 28, 2004