

人类天然抗 α -Gal 抗体抑制肽的筛选*

张旭¹⁾ 詹金彪^{2)**} 许林海³⁾ 严士焜³⁾ 王克夷⁴⁾

(¹⁾ 宁波大学卫生技术学院, 宁波 315100; (²⁾ 浙江大学医学院生物化学教研室, 杭州 310006;

(³⁾ 浙江省人民医院, 杭州 310014; (⁴⁾ 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 人类天然抗体可以与猪细胞抗原表位 Gal α 1,3-Gal 结合, 触发超急性排斥反应 (HAR), HAR 是猪器官移植至人体时的首要障碍。阻断人的天然抗体, 阻止其与猪细胞表面特异性抗原的结合, 是防止超急性排斥的有效措施。利用噬菌体展示技术, 从 XCX₁₅ 随机肽库中筛选与西非单叶豆凝集素 (GS-IB₄) 特异性结合的噬菌体展示肽, 得到一个小肽序列为 SCTALSFPFAFLARGT, 其与人血清中天然抗体的结合可以被蜜二糖 (melibiose) 竞争性地抑制, 同时该小肽还能抑制人类天然抗体介导的猪红细胞的凝集反应。因此, 筛选到的小肽能作为人天然抗 α -Gal 抗体的抑制肽。

关键词 噬菌体展示, GS-IB₄, Gal α 1,3-Gal, 抗超急性排斥, 抗 α -Gal 抗体

学科分类号 Q78

目前, 器官移植领域中的转基因动物、克隆技术和组织工程中解决供器官不足的可能途径中, 以猪到人的异种移植最具吸引力。但是, 人的天然抗体与猪细胞抗原表位 Gal α 1,3-Gal 结合, 可发生超急性排斥反应 (HAR)^[1], HAR 是猪器官移植至人体时的首要障碍。阻断人的天然抗体与猪器官特异性表面抗原的结合, 是防止超急性排斥的有效措施^[2]。本文应用噬菌体展示技术, 以西非单叶豆凝集素 (GS-IB₄) 为靶分子, 试图从 XCX₁₅ 随机肽库中筛选与之特异性结合的噬菌体肽^[3], 用此小肽去封闭人天然抗 α -Gal 抗体, 有效地抑制猪器官移植至人时超急性排斥的发生。

1 材料与方 法

1.1 材料

XCX₁₅ 随机肽库、*E. coli* Kank91 菌和兔抗 M13 抗体由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所王克夷研究员及李家大博士惠赠。西非单叶豆凝集素 (GS-IB₄) 与蜜二糖 (melibiose) 购自 Sigma 公司。聚乙二醇 (PEG8000)、四甲基联苯胺 (TMB) 均为 AMRESCO 分装。

1.2 方法

1.2.1 亲和筛选: 用亲和筛选法, 以 GS-IB₄ 为靶蛋白直接包被, 经 BSA 封闭 2 h 后, TBS 洗板, 用扩增好的原始 XCX₁₅ 文库筛选, 0.1% TBST 洗板, 去除非特异性噬菌体, 再用蜜二糖亲和洗脱特异性噬菌体, 再扩增此筛选出的噬菌体, 投入到下

一轮筛选。这样连续筛三轮。第二、三轮分别用 0.2% 和 0.5% TBST 洗板。

1.2.2 用 ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆: 从第三轮筛选出的噬菌体转染 kank91 菌培养的 LB 平板上, 挑选 60 个间隔良好的噬菌体做 ELISA。用每孔 100 μ l 的 10 μ g/L GS-IB₄ 包被, 50 g/L 的 BSA 封闭 2 h, 加筛选出的噬菌体液, 孵育 1 h, 洗板, 加兔抗 M13 抗体, 洗板, 再加羊抗兔 M13-HRP, TBST 洗板数次, 测 A₄₅₀ 值。

1.2.3 蜜二糖竞争性 ELISA: 用不同浓度的蜜二糖^[4]与阳性噬菌体肽竞争, 并与人血清中天然抗体结合, 方法同 ELISA, 只是把加噬菌体液改为加蜜二糖和噬菌体液的混合液, 测 A₄₅₀ 值, 并计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{450} - A'_{450}) / A_{450} \times 100\%$$

(A₄₅₀ 表示未加蜜二糖的 450 nm 吸光度, A'₄₅₀ 表示加入蜜二糖的 450 nm 吸光度)

1.2.4 噬菌体肽的序列测定: 按分子克隆实验指南的方法^[4]抽提阳性噬菌体单链 DNA, 引物序列为 5' AGTAGCAGAAGCCTGAAGA 3', 测得序列。

1.2.5 抗猪红细胞凝集试验: 用 PBS 洗涤过的 2.5% (压积比) 猪红细胞, 分别加入倍比稀释的阳性克隆噬菌体液和等量稀释的人 A 型血清, 三者混匀, 静置 1 h, 与阴性和阳性对照观察是否

* 浙江省人民医院“抗移植排斥新药”课题资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-87217154, E-mail: jzhan2k@cmm.zju.edu.cn

收稿日期: 2004-02-16, 接受日期: 2004-03-31

出现红细胞凝集反应.

2 结 果

2.1 亲和筛选

用亲和筛选, 以蜜二糖亲和洗脱. 经过三轮吸附-洗脱-扩增的淘选, 噬菌体的回收率(即生产与投入比值)明显提高. 第三轮产出比第一轮高出 4.80×10^2 倍. 特异性噬菌体明显富集(表 1).

Table 1 Recovery rate of phage clones during panning			
Round	Phage (input)	Phage (output)	Rate
1	2.9×10^9	5.0×10^4	1.72×10^{-5}
2	4.9×10^9	1.1×10^6	2.24×10^{-4}
3	1.6×10^8	1.32×10^6	8.25×10^{-3}

2.2 阳性噬菌体的鉴定

从 LB 平板上随机挑选的克隆噬菌体, 经扩增后, 进行 ELISA 检测. 因实验条件限制, 采用分批做 ELISA, 每次只测 9 个克隆. 再从每批中挑选 A 值较高的噬菌体克隆集中做一次 ELISA. 从中挑选 12 个克隆的噬菌体, 以空白对照调零, A_{450} 均在 1.0 以上, 阳性明显(图 1). 说明这些噬菌体肽与 GS-I-B₄ 有较强亲和力.

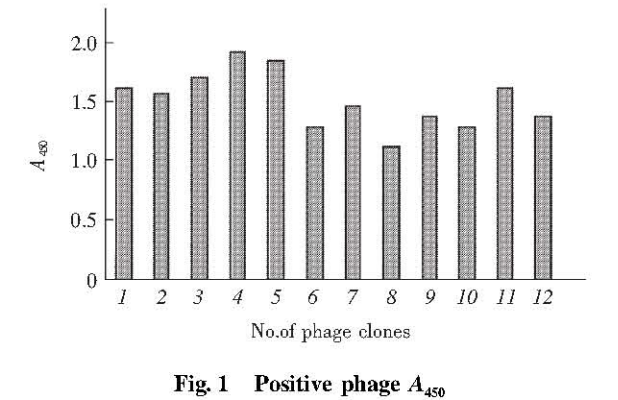


Fig. 1 Positive phage A₄₅₀

2.3 Melibiose 竞争性 ELISA

从强阳性的 12 个噬菌体克隆中挑选显色较深的 1 号克隆, 做蜜二糖竞争性抑制试验. 从图 2 可以看出, 随着蜜二糖浓度从 0.000 1 ~ 1 mol/L 逐渐增大, 抑制作用也逐渐递增, 但是达到 0.1 mol/L 浓度及以上时, 抑制效应不再增加. 整条曲线近似“S”型, 表明蜜二糖能与阳性噬菌体肽竞争并和血清中的天然抗 α -Gal 抗体结合. 提示此噬菌体小肽可能正好结合在蜜二糖与 GS-I-B₄ 结合的部位.

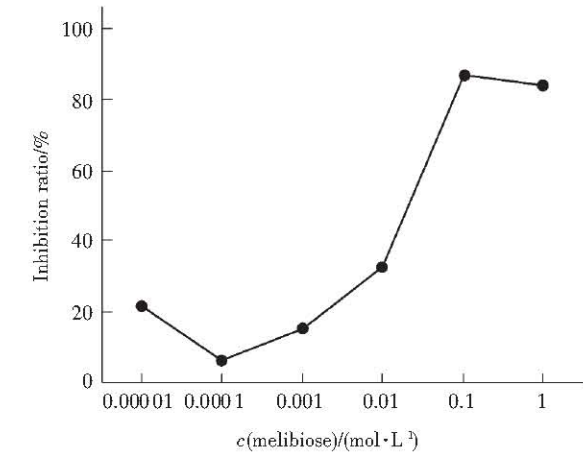


Fig. 2 Competitive inhibition of binding between positive phage and human serum

2.4 阳性噬菌体的序列测定

用单向引物, 反向测定噬菌体肽单链 DNA 的序列为: 5' AGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAA-GAAAGCGGAAGGAGCGGGCGCCGTGT 3', 则氨基酸序列为: SCTALSFPSFAFLARGT.

2.5 阳性克隆噬菌体抑制猪红细胞凝集试验

为了进一步验证阳性克隆是否真正具有生物学活性, 我们作了阳性克隆噬菌体抑制 A 型人血清与猪红细胞的凝集反应(图 3). D 为倍比稀释的

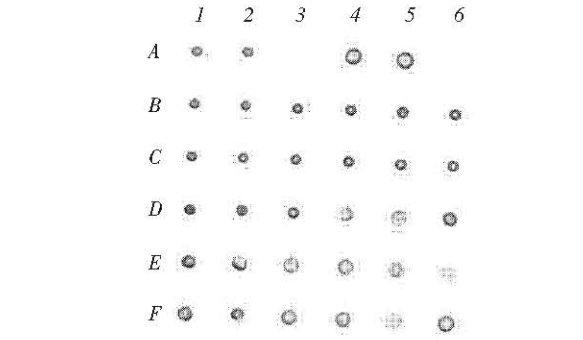


Fig. 3 Inhibition of pig RBC agglutination

AI, 2: PBS control, no agglutination; A4, 5: positive control, agglutination; BI ~ 6, CI ~ 6: concentration range of melibiose from 800 mmol/L to 25 mmol/L with twice dilution one by one. No agglutination was observed in each well; DI ~ 3: Phage bearing peptide with 1:1, 1:2 and 1:4 dilution. RBC agglutination was inhibited in each well; D4 ~ 6: Phage bearing peptide with 1:8, 1:16 and 1:32 dilution. RBC agglutination was observed in each well; EI ~ 6, FI ~ 6: Negative phage preparation with different dilutions (from 1:1 ~ 1:32 dilution) showed no inhibition to the RBC agglutination by the human serum.

噬菌体液, 前三孔分别稀释 1 倍、2 倍和 4 倍, 出现抑制效应, 即在噬菌体肽存在下, 猪红细胞遇人血清中的抗体不凝集, 与蜜二糖抑制人血清与猪红细胞凝集反应的效果一样. 后三孔可能由于噬菌体肽稀释的浓度太低, 对红细胞的凝集抑制作用不完全, 没能起到明显的抑制效应. 而加同样稀释倍数的阴性克隆噬菌体却没有这种抑制效应.

3 讨 论

噬菌体展示肽库技术作为研究生物分子间相互作用快捷而有效的工具, 广泛适用于抗原抗体系统, 细胞因子与受体的作用, 及酶学等领域. 可以用来快速确定蛋白质与蛋白质的交互作用, 广泛地用于模拟抗原表位, 研究疫苗, 设计多肽、抗体和其他可用于诊断和治疗的蛋白质^[5].

本文利用噬菌体展示技术从 XCX₁₅ 随机肽库中筛选人抗猪器官血管内皮细胞表面 Gal- α -1,3-Gal 抗原的抑制肽. GS-I-B₄ 被认为可特异性地结合 Gal- α -1,3-Gal, 可以模拟人的天然抗 α -Gal 抗体, 我们以它为靶分子, 采用直接包被的形式, 从肽库中筛选人天然抗 α -Gal 抗体的抑制肽. 本实验首先用随机肽库对 GS-I-B₄ 进行三轮亲和筛选, 为减少非特异性噬菌体, 我们在后两轮的筛选时, 加强洗板的力度, 分别用 0.2% 和 0.5% 的 TBST 洗板, 但淘洗后的噬菌体产出率反而上升, 说明特异性噬菌体已富集. 噬菌体阳性克隆的 ELISA 鉴定则说明筛选出的噬菌体肽能与 GS-I-B₄ 结合. 蜜二糖竞争性抑制实验中, 蜜二糖能竞争性地抑制阳性克隆噬菌体肽并与人血清中抗体的结合, 这说明了阳性噬菌体展示的模拟肽很可能就结合在蜜二糖与 GS-I-B₄ 结合的位点. 为进一步验证此噬菌体肽是结合在猪器官细胞表面的 α -Gal 位点, 而非其他位点, 我们又做了乳糖竞争性抑制试验 (乳糖为 Gal- β 1,4-Glc, 因含的是 β -Gal, 非 α -Gal, 如果噬菌体肽与人的天然抗体是结合在 α -Gal 位, 理论上

推断乳糖是不能抑制这种结合的). 实验结果发现与蜜二糖同样浓度的乳糖几乎没有抑制效应, 只是在 1 mol/L 时有一个约 50% 的抑制作用, 估计为非特异性效应. 此模拟肽抑制人血清与猪红细胞的凝集反应, 则直接地说明了噬菌体表达的小肽可望阻断天然抗体与 α -Gal 抗原表位结合而触发的 HAR.

我们把实验中得到的噬菌体肽的氨基酸序列与国外报道的用生物素化的 GS-I-B₄ 为靶分子, 从六肽库中筛选到的 SSLRGF^[6] 比较发现: a. 疏水氨基酸的比例均很高, 两个序列含疏水氨基酸的比例分别为 50%^[6]、52.94%; b. 丝氨酸的含量几乎一致, 每个序列至少含 2 个丝氨酸. c. 从中找到了一个同源序列模式: S/X A/X R G. 但是, 噬菌体肽的实验结果并不一定代表合成小肽的结果, 而且此噬菌体肽能封闭的是 α -Gal 表位, 人天然抗体可能含有针对不同表位的结构, 在实际应用中封闭效果可能会有所差异, 所以我们下一步将合成小肽, 以进一步确定其生物学活性, 并探讨其是否具有开发成防止猪器官移植时排斥反应的先导性药物的可能性.

参 考 文 献

- 1 Galili U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with α -galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today*, 1993, **14** (10): 180~182
- 2 Lawson J H, Platt J L. Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation*, 1996, **62** (3): 303~306
- 3 Scott J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, **249** (4967): 386~390
- 4 萨姆布鲁克等著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南 (上册). 第3版. 北京: 科学出版社, 2002, **8**: 272~275
Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. Beijing: Science Press, 2002, **8**: 272~275
- 5 Smothers J F, Henikoff S, Carter P, *et al.* Affinity selection from biological libraries. *Science*, 2002, **298** (5593): 621~622
- 6 Kooyman D L, McClellan S B, Parker W, *et al.* Identification and characterization of a galactosyl peptide mimetic. *Transplantation*, 1996, **61** (6): 851~855

Screening of Inhibitory Peptides of Human Natural Antibodies From Phage Displayed Library*

ZHANG Xu¹⁾

(¹⁾ Health Technical Institute of Ningbo University, Ningbo 315100, China)

ZHAN Jin-Biao²⁾ **

(²⁾ Department of Biochemistry, Zhejiang University Medical School, Hangzhou 310006, China)

XU Lin-Hai, YAN Shi-Kun³⁾

(³⁾ Department of Surgery, People's Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310014, China)

WANG Ke-Yi⁴⁾

(⁴⁾ Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract The initial barrier to the transplantation of pig organs to human is hyperacute rejection (HAR). HAR was initiated by the conjugation of human natural antibodies (XNA) with the Gal- α 1,3-Gal which is thought to be the major xenoantigenic epitope present on pig tissues. Removal of antibodies directly against that structure may be critical to the success of pig to human xenotransplantation. The lectin GS-I-B₄ was used to screen phage-displayed peptide library XCX₁₅ and identified a peptide mimetic of Gal- α 1,3-Gal. A phage bearing the peptide SCTALSFPSFAFLARGT has been identified to bind human natural antibody strongly. This binding reaction can be competitively inhibited by melibiose. The peptide can also inhibit the human natural antibody-mediated agglutination of pig RBCs.

Key words phage display, GS-I-B₄, Gal- α 1, 3-Gal, hyperacute rejection, human natural antibodies

* This work was supported by a grant from The People's Hospital of Zhejiang Province.

** Corresponding author. Tel: 86-571-87217154, E-mail: jzhan2k@emmm.zju.edu.cn

Received: February 16, 2004 Accepted: March 31, 2004



动物细胞培养技术与应用

王捷 主编

化学工业出版社 2004 年 5 月出版

ISBN 7-5025-5404-1, 16 开, 215 页, 334 千字

定价: 32 元

本书作为《实用生物技术丛书》(共 7 册, 已出版 5 册)中的一册, 全面系统地介绍了动物细胞培养技术的最新理论和应用。主要内容包括: 动物细胞培养的基本过程和放大技术, 动物细胞在单克隆抗体制备、疫苗生产、基因重组蛋白药物生产、组织工程、SARS 研究中的应用, 外源基因在动物细胞中的表达与产物纯化, 树突状细胞的制备技术。全书内容紧密结合实际, 具有较高的学术价值。是从事动物细胞工程技术研究、生产和管理人员的重要参考书, 也可供科研单位、高等院校生物技术专业的师生使用。

本书在全国各大新华书店均有销售, 也可邮购(加收 10% 邮寄费)。

邮购地址: 北京市朝阳区惠新里 3 号 邮编: 100029 收款人: 化学工业出版社发行部

邮购电话: 010-64918013 电子信箱: fxb@cip.com.cn (欢迎加入“化学工业出版社读者俱乐部”, 可免收邮费并享受其他购书优惠, 详情请致电: 010-64982530, 了解更多信息请登录 www.cip.com.cn)