

噬菌体展示 protein A 及 protein L Ig 结合单结构域随机组合文库及 Ig 亲和筛选*

徐 容²⁾ 沈毅珺¹⁾ 邓松华²⁾ 蔡春晓²⁾

陈秋莉¹⁾ 贾建安¹⁾ 王锦红¹⁾ 潘 欣¹⁾ 潘 卫^{1)**}

(¹⁾第二军医大学基础医学部微生物学教研室, 上海 200433;

²⁾安徽医科大学病理生理学教研室, 合肥 230032)

摘要 Protein A 和 protein L 是细菌产生的两种结构和功能均不同的免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 结合分子, 在细菌的致病中起重要作用. 用含 Sac I 位点的特定引物 PCR 分别扩增制备 protein A 的 A、B、C、D 抗体结合结构域和 protein L 的 B3 抗体结合结构域, 各结构域 DNA 片段经 Sac I 酶切后, 再随机连接形成各种不同长度的分子组合文库, 将该文库呈现在噬菌体表面构建了噬菌体展示 Ig 结合分子单结构域随机组合文库, 所建组合文库容量为 2.3×10^6 个菌落形成单位, 滴度为 4.1×10^{11} TU/ml, 包含各种单结构域片段, 并以随机方式连接. 用人 Ig 对该文库进行 4 轮亲和筛选, 随机挑选 36 个代表性的阳性克隆进行序列测定分析表明, 亲和筛选获得了多种非天然形式存在的新的 Ig 结合分子结构, 其中 32 个克隆具有由 protein L 的单结构域和 protein A 的单结构域间隔重复排列而成的特征性 (MDPL-MDPA)_n 结构. 对噬菌体展示 Ig 结合分子单结构域随机组合文库的体外分子进化研究的尝试, 为 Ig 结合分子的结构和功能研究提供了一新的途径, 也为 Ig 结合分子的定向改造打下基础.

关键词 噬菌体展示, 分子进化, 结构域, 组合文库, protein A, protein L

学科分类号 Q78

Protein A (金黄色葡萄球菌蛋白 A) 和 protein L (厌氧菌大消化链球菌属蛋白 L) 是两种免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 结合活性的细菌表面蛋白, 是细菌重要的致病因子之一^[1]. Protein A 可与 IgG 的 Fc 段恒定区结合, 其抗体结合活性区域由 4 个或 5 个序列高度同源的结构域 (D、A、B、C 和 E) 串联而成^[2]; protein L 可与各种类型的 Ig 结合, 其 Ig 结合区由 5 个序列高度同源的 B 结构域串联而成 (B1~B5)^[3], 每个 B 结构域都可结合 Ig 的 Fab 段 κ 轻链可变区而不影响抗原结合位点的作用^[4]. Protein A 的 Ig 结合单结构域空间构型呈由 3 股 α 螺旋束反向平行排列而成的 Z 型构架. Protein L 的 B 结构域则与 protein A 的 Ig 结合单结构域空间构型完全不同, 由单个 α 螺旋和其外围包绕的 4 股反向 β 片层组成, 且 α 螺旋几乎与 β 片层平行.

有研究表明, protein L 和 protein A 的单个结构域本身就具有 Ig 结合活性, 是分子中 Ig 结合的最小功能单位. 瑞典学者将 protein L 的 4 个结合 Ig κ 轻链的结构域分别与 protein A 4 个结合 IgG Fc 段的结构域及 protein G 的 Ig 结合结构域直接融合, 构建了新型融合蛋白 Protein LA^[5]和融合蛋白 LG^[6]. 经改造后的融合分子具有比其母体更广泛的

结合特性, 并形成了对某些种类 Ig 结合能力的协同性增加, 但该类分子的主要结合特性只是两种来源分子特性的总和, 未产生普遍的协同作用, 分子的组合形式也只是简单将两种分子拼接而成. 本研究以 protein L 和 protein A 的单个结构域为基本功能单位, 构建由 protein A 的 A、B、C、D 单结构域和 protein L 的 B3 结构域随机重组的分子组合文库, 展示于噬菌体表面, 并应用人 Ig 亲和筛选对该文库进行体外进化研究, 得到了天然蛋白质中所不具有的新 Ig 结合分子结构, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 质粒、载体和菌株

噬菌粒 pCANTAB5S 展示载体^[7,8]、含葡萄球菌 A 蛋白的 5 个抗体结合结构域 (A²-E)、长 1 080 bp (360 个氨基酸) 的 Mu-protein A 基因的 Mu-protein A/pGEM-T easy 质粒, 由第二军医大学微生物学教

*国家自然科学基金资助项目(30472050).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2005-01-26, 接受日期: 2005-03-28

研究室构建保存. 大肠杆菌 Top10F⁺、TG1 为第二军医大学微生物学教研室保存. 大消化链球菌菌株购自美国 ATCC (number 27337). pMD-18T 载体试剂盒购自 TAKARA 公司. 超感受态细菌制备试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司.

1.2 引物序列

从 Mu-protein A/pGEM-T easy 质粒上扩增 protein A 的 A、B、C、D 结构域和 protein L B3 结构域的引物序列见表 1, 均引入 *Sac* I (-GAGCTC-) 酶切位点. 用于 PCR 扩增克隆于 pMD18-T 载体上的 Ig 结合结构域和进行序列测定的上游引物 RV-M 为 5' AGCGGATAACAATTTACACAGG3',

下游引物 M13-47 为 5' CGCCAGGGTTTTCCC AGTCACGAC 3'. 用于 PCR 扩增克隆于噬菌粒 pCANTAB5S 载体上 Ig 结合分子的上游引物 pCANTAB5-S1 为 5' CAACGTGAAAAAATTATTA TTCGC 3', 下游引物 pCANTAB5-NOT1 为 5' GCCAGCCGGCC 3'. 用于克隆于噬菌粒 pCANTAB5S 载体上 Ig 结合分子序列测定的上游引物为 pCANTAB5-S1, 下游测序引物 pCANTAB5-S6 为 5' GTAAATGAATTTTCTGTAT GAGG 3'. 上述引物均由上海生工生物技术服务有限公司合成.

Table 1 Primers for PCR amplification of mono-domain of protein A and protein L

Name	Description	Sequence(5'~3')
PA-uA	Sense terminal primer of protein A-A domain	CAC <u>GAGCTC</u> *GCTGACAACAATTTCAAC
PA-uBC	Sense terminal primer of proteinA-B or C domain	CGC <u>GAGCTC</u> GCGGATAACAAATTC AAC
PA-uD	Sense terminal primer of proteinA-D domain	TCCGAGCTCGTGATGCGCAACAAAAT
PA-dBC	Anti-sense terminal primer of proteinA-B or C domain	TCTGAGCTCTTTTGGTGCTTGTGCATC
PA-dAD	Anti-sense terminal primer of proteinA-A or D domain	TCTGAGCTCTTTTCGGTGCTTGAGATTC
pL-u	Sense terminal primer of protein L-B3 domain	ACG <u>GAGCTC</u> AAAGAAAAACCCCGGAA
pL-d	Anti-sense terminal primer of protein L-B3 domain	TGCGAGCTCACCAGCGAATTTGATGTT

* The *Sac* I recognition sequence are underlined.

1.3 工具酶及酶标单抗

Taq 酶、限制性内切酶、碱性磷酸酶和 DL2000 DNA Marker 为 TAKARA 公司产品. T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司. 辣根过氧化物酶标记鼠抗 M13 噬菌体单克隆抗体 (anti-M13-HRP monoclonal conjugate) 购自 Amersham Pharmacia 公司.

1.4 各单结构域片段的 PCR 扩增与克隆

以 Mu-protein A/ pGEM-T easy 质粒为模板分别用引物 PA-uA 和 PA-dAD PCR 扩增 protein A 的 A 结构域 DNA, PA-uBC 和 PA-dBC 扩增 B 和 C 结构域, PA-uD 和 PA-dAD 扩增 D 结构域; 以大消化链球菌液为模板, 用 pL-u 和 pL-d 为引物 PCR 扩增 protein L B3 结构域片段. 各片段 PCR 产物纯化后分别克隆于 pMD-18T 载体, 分别提取重组质粒送至上海申能博彩生物技术服务有限公司测序.

1.5 噬菌体展示组合文库的构建

抽提 pCANTAB5S 质粒, *Sac* I 酶切过夜, 回收载体, 碱性磷酸酶 (CIAP) 去磷酸化, 试剂盒

胶回收. 以测序正确的 PL/pMD-18T、PA-A/pMD-18T、PA-D/pMD-18T、PA-B/pMD-18T 和 PA-C/pMD-18T 为模板, 用 RV-M 和 M13-47 为引物, PCR 扩增带有两侧 T 载体部分序列的各结构域片段 (PA-A-T, PA-BC-T, PA-D-T 及 PL-T 片段). 各片段纯化后分别用 *Sac* I 酶切, 试剂盒胶回收 PA-A、PA-B、PA-C、PA-D 片段及 PL 片段. 取 protein A 各结构域片段与 protein L B3 结构域片段等量混合, 用 T4 DNA 连接酶 16℃ 分别连接 30 min、1 h、2 h、4 h、24 h, 再将不同时间的连接产物混合起来, 用于 Ig 结合结构域随机组合文库的构建.

1.6 组合文库的噬菌体展示及滴度测定

超感受态细菌制备试剂盒制备感受态细胞. 取去磷酸化 pCANTAB5S 载体与上述连接产物按 1:3 摩尔比 16℃ 连接过夜后转化 TG1 感受态细胞, 转化体积均为 10 ml, 2×YTG 活化培养 1 h, 分别取 10 μl、1 μl、0.1 μl 涂 LB (含 Amp 100 mg/L) 平板 37℃ 过夜培养计数. 其余培养液加入 1 ml

4×10^{10} TU/ml 的 M13KO7 辅助噬菌体拯救, 37°C , 250 r/min 振荡培养 1 h, $1\,000\text{ g}$ 离心 10 min, 细菌沉淀用 10 ml $2 \times \text{YT}$ (含 Amp 100 mg/L 和 Kana 50 mg/L) 悬浮, 37°C , 250 r/min 振荡培养过夜. 培养物 $1\,000\text{ g}$ 离心 10 min, 上清经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 获得原代重组噬菌体组合文库 (PALn/phage). 同时制备展示天然 protein A 的重组噬菌体 (PA/phage) 用作阳性对照, 展示人 LT 的重组噬菌体 (LT/phage) 用作阴性对照. 取 $1\text{ }\mu\text{l}$ 重组噬菌体 10 倍系列稀释, 感染对数生长期的大肠杆菌 TG1, 37°C 培养 1 h 后涂 Amp 抗性 LB 平板培养计数测定噬菌体滴度.

1.7 重组噬菌体文库的 IgG 亲和筛选

人 Ig 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 $200\text{ }\mu\text{l}$ 包被 (浓度为 10 mg/L) 于排条板上, 用含 10% 脱脂奶粉, 0.01% NaN_3 , 0.1% Triton X-100 的 PBS 封闭液室温封闭 1 h 后, 用 PBS 洗涤 5 次. 排条板上每孔先加 $100\text{ }\mu\text{l}$ 封闭液, 再加 $100\text{ }\mu\text{l}$ PLn/phage 噬菌体文库, 37°C 孵育 3 h 后洗涤 50 次. 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{l}$ 生长至对数生长期的 *E. coli* TG1, 37°C 培养 1 h, 收集菌液, 取 $10\text{ }\mu\text{l}$ 、 $1\text{ }\mu\text{l}$ 、 $0.1\text{ }\mu\text{l}$ 涂布于 Amp 抗性平皿计数, 测定噬菌体的 Ig 结合情况. 其余菌液扩增至 $50\text{ ml } 2 \times \text{YT}$ (含氨苄青霉素 100 mg/L) 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. 培养液上清经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 即为 IgG 亲和筛选后的 PALn 噬菌体库. 设阳性对照 PA/phage、阴性对照 LT/phage 和空白对照 (不加 phage) 作同步筛选. 上述筛选过程重复 4 轮.

1.8 各筛选轮次噬菌体组合文库所展示插入片段的鉴定

从原始噬菌体文库噬菌粒转化平皿及每一轮噬菌体中的 Ig 结合试验平皿 (见方法 1.6) 上挑取 48

个单克隆, 用克隆位点上下游引物 pCANTAB5-S1 和 pCANTAB5-NOT1 进行 PCR 扩增, 扩增条件为 94°C 30 s; 53°C 30 s; 72°C 45 s; 35 个循环. 设阳性对照 LT/pCANTAB5S, 阴性对照 pCANTAB5S. 琼脂糖电泳测定 PCR 产物的大小, 以分析插入片段由几个单结构域连接而成. 阳性克隆 PCR 产物纯化后用 *Sac* I 酶切鉴定.

1.9 阳性克隆的序列分析

随机挑取第 3 轮和第 4 轮筛选阳性的单克隆, 用 DNA 抽提试剂盒纯化重组噬菌粒, 委托上海中能博彩公司分别由上游测序引物 pCANTAB5-S1 及下游测序引物 pCANTAB5-S6 进行正、反向序列测定, 测序结果用 DNASTAR 软件分析.

1.10 代表性单克隆噬菌体的 Ig 结合活性测定

将含展示代表性序列的单克隆噬菌体的 TG1 菌种接种于 $10\text{ ml } 2 \times \text{YT}$ (含氨苄青霉素 100 mg/L) 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 $2\text{ ml } 2 \times \text{YT}$ 中, 分别测定单克隆噬菌体的滴度. pCANTAB5S 噬菌体采用 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^{12} TU/ml 后各取 $100\text{ }\mu\text{l}$ 加入人 Ig 包被的 ELISA 板条中, 37°C 放置 2 h 后用 PBST 洗 5 次, 加入 HRP 标记抗噬菌体单抗结合, TMB 显色后读取 A_{490} 数值.

2 结 果

2.1 各单结构域片段的 PCR 扩增与克隆

构建以 protein A 和 protein L 的 Ig 单结构域为基础的随机组合文库策略, 是用 PCR 扩增的方法制备各单结构域片段, 并在两侧加上 *Sac* I 克隆位点. 图 1 显示 PCR 扩增的构建文库各单结构域片段,

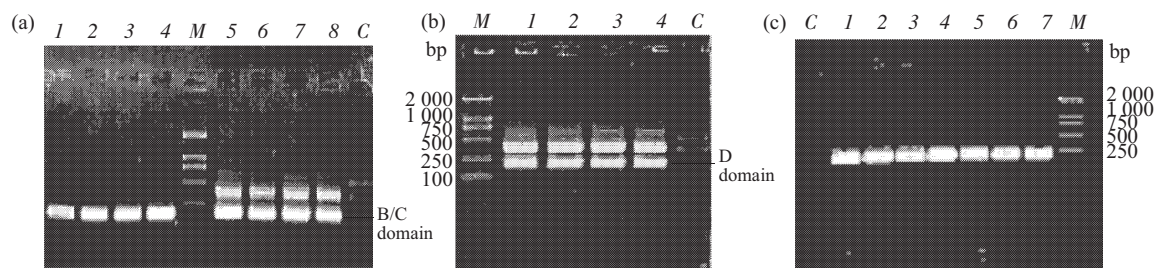


Fig.1 PCR amplification for A,B,C,D domain of protein A and B3 of domain protein L

(a) PCR amplification of protein A A,B and C domain. M: DL2000 marker; 1~4: PCR products of protein A A domain; 5,6: PCR products of B domain; 7,8: PCR products of C domain; C:blank control. (b) PCR amplification of protein A D domain. M: DL2000 marker; 1~4: PCR products of protein A D domain; C:blank control. (c) PCR amplification of protein L B3 domain. M:DL2000 marker; 1~7: PCR products of protein L B3 domain; C:blank control.

其中 protein A 的 A、B、C、D 片段和 protein L 的 B3 结构域片段理论值分别为 192 bp、192 bp、192 bp、201 bp 和 234 bp, 电泳检测显示各扩增片段均与理论值相符(图 1). 将上述各片段分别克隆于 pMD-18T 载体上, 重组质粒测序结果证实各插入片段与相应单结构域序列一致.

2.2 噬菌体展示组合文库的构建

2.2.1 单结构域片段的制备与连接. 用上述测序正确的各单结构域 pMD-18T 载体的重组质粒为模板, 和克隆位点上下游引物 RV-M 和 M13-47 分别 PCR 扩增得到两侧带有 T 载体部分序列的各单结构域片段, 其中含有 protein A A domain 的片段为 347 bp, 含 B、C domain 的片段为 347 bp, 含 D domain 的片段为 356 bp, 含有 protein L B3 domain 片段 389 bp, 电泳检测显示各扩增片段大小均与理论值相符(图 2). 由于带有 T 载体部分序列, 上述的片段经 *Sac* I 酶切后会明显小于 PCR 扩增产物(图 2), 这样能制备出 *Sac* I 酶切完全的各结构域片段, 保证随机组合文库构建的效率. 回收上述 5 种单结构域片段, 用 T4 DNA 连接酶分别连接 30 min、1 h、2 h、4 h 和 24 h 制备随机组合分子文库, 电泳检测发现连接片段 >250 bp, 并向上散开, 连接 4h 即可获得大于 1 000 bp 的片段(图 3).

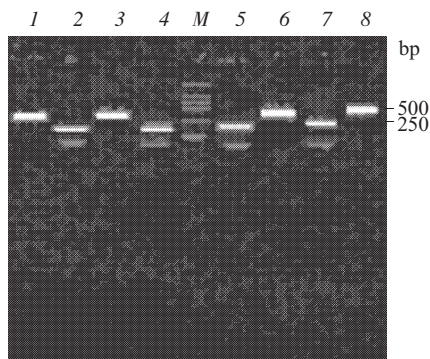


Fig.2 Preparation of *Sac* I digested DNA fragments of PCR products of A, B, C, D domain of protein A and B3 domain of protein L

M: DL2000 marker; 1: PCR product of protein A A domain; 2: *Sac* I digestion of PCR product of protein A A domain; 3: PCR product of protein A B and C domain; 4: *Sac* I digestion of PCR product of protein A B and C domain; 5: *Sac* I digestion of PCR product of protein A D domain; 6: PCR product of protein A D domain; 7: *Sac* I digestion of PCR product of protein L B3 domain; 8: PCR product of protein L B3 domain;

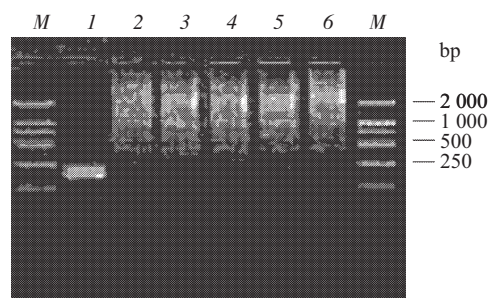


Fig.3 Ligation of mono-domain of protein A and protein L
M: DL2000 marker; 1: before ligation; 2: ligation for 30 min; 3: ligation for 1 h; 4: ligation for 2 h; 5: ligation for 4 h; 6: ligation for 24 h.

2.2.2 组合文库的噬菌体展示及滴度测定. 各片段连接产物与去磷酸化 pCANTAB5S 噬菌粒载体连接, 转化大肠杆菌 TG1, 在 10 ml 的转化培养液中分别取 10 μ l、1 μ l、0.1 μ l 涂 LB 平板, 长出的菌落数分别为大于 500 个、230 个、26 个, 如按 1 μ l 的量计算, 该文库的库容为 2.3×10^6 个不同的克隆. 相同条件下阳性对照 PA-pCANTAB5L 转化效率为 1.6×10^7 . 转化菌用辅助噬菌体 M13KO7 拯救, 获得 PALn 重组噬菌体文库(原代), 其滴度为 4.1×10^{11} TU/ml. PA 重组噬菌体库(原代)的滴度为 5.0×10^{11} TU/ml.

2.3 重组噬菌体文库的 Ig 亲和筛选

用人 Ig 对 PALn/phage 进行了 4 轮亲和筛选, 每轮筛选中均设阳性对照 PA/phage, 阴性对照 LT/phage. 为了能动态筛选效果, 我们对每轮富集文库的 Ig 结合菌落计数、噬菌体滴度、各种大小插入片段在文库中的组成情况进行动态监测. 由表 2 可见, 噬菌体滴度在 1.5×10^{10} 到 2.0×10^{12} 之间变化, 无明显的规律; Ig 结合菌落计数虽有随筛选轮次增加而增加的趋势, 但波动很大. 对每轮次文库, 我们随机挑取 48 个单克隆进行 PCR 扩增, 检测各种大小插入片段(由不同数目的单结构域连接而成)在文库中的组成情况(图 4、表 3 和图 5), 很明显地看到: 随着筛选轮次增加, 阳性克隆和大片段克隆(≥ 2 个 domain)所占的比例持续稳定地增加, 阴性克隆(为载体自连, 无插入片段)及单个结构域克隆所占的比例不断降低.

2.4 阳性克隆插入片段的酶切鉴定

为了证实筛选阳性的克隆确实是由各 Ig 结合单结构域由 *Sac* I 位点连接而成, 我们取 16 个第 3 代、第 4 代大于 2 个结构域的单克隆 PCR 产物进行 *Sac* I 酶切分析, 结果是不同大小的 PCR 产物, 经 *Sac* I 酶切后均得到 200 bp 左右大小的单结构域片段(图 6).

Table 2 The Ig-binding assay and titer assay of original library and selected libraries of every round

		Number of infected TG1 clones			Titer
		10 μl	1 μl	0.1 μl	
First round	LT/phage	5	0	0	1.5×10 ¹⁰
	PA/phage	F	F	73	4.0×10 ¹⁰
	PALn/phage	F	F	49	5.4×10 ¹¹
Second round	LT/phage	1	0	0	1.5×10 ¹⁰
	PA/phage	F	F	151	2.1×10 ¹¹
	PALn/phage	F	91	6	9.0×10 ¹¹
Third round	LT/phage	2	0	0	1.5×10 ¹⁰
	PA/phage	F	F	312	2.0×10 ¹²
	PALn/phage	F	F	51	1.1×10 ¹²
Fourth round	LT/phage	5	0	0	1.5×10 ¹⁰
	PA/phage	F	F	122	2.0×10 ¹²
	PALn/phage	F	31	5	1.6×10 ¹¹

F represents the number of infected TG1 clones is more than 300.

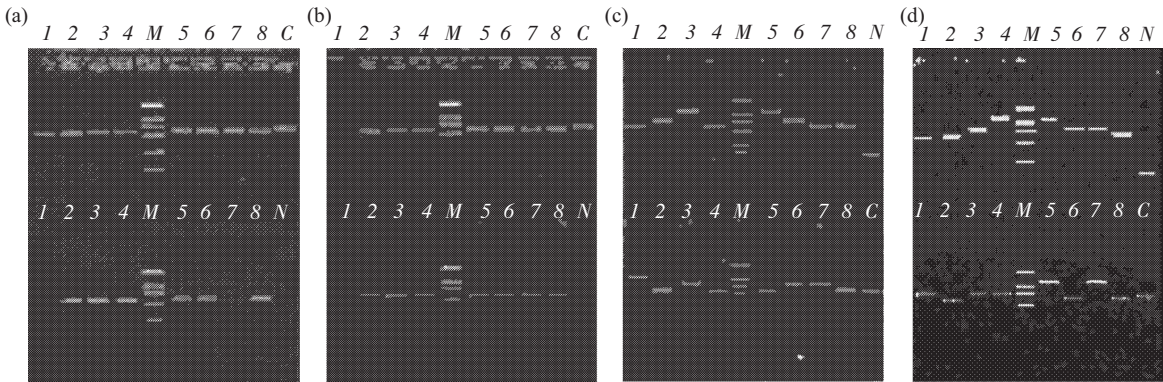


Fig.4 Displayed fragments analysis in the library of 1~4 round selection by PCR amplification

1~8:different clones; C: positive control (LT/pCANTAB5L); M:DL2000 marker; N: negative control (pCANTAB5S). (a) first round selection. (b) second round selection. (c) third round selection. (d) forth round selection.

Table 3 Phage displayed fragments analysis of every round Ig affinity selection of combinatory molecular library

Displayed fragments	Original round	First round	Second round	Third round	Fourth round
0 domain	8	8	8	5	4
1 domain	5	5	2	1	0
2 domain	35	35	37	26	23
3 domain	0	0	1	7	12
>3 domain	0	0	0	9	9

classified by the numbers of domains.

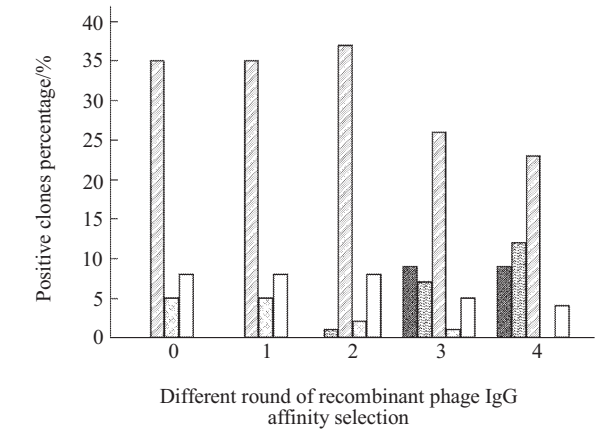


Fig.5 The dynamic of distribution of various displayed fragments in the library during the Ig affinity selection

□: negative; ▨: 1 domain; ▤: 2 domain; ▩: 3 domain; ■: >3 domain.

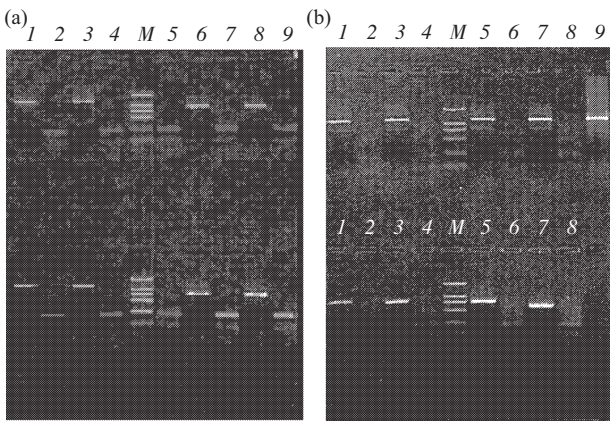


Fig.6 Restriction digestion analysis of PCR products of Ig affinity selection positive clones in 3, 4 round selection library

M:DL2000 marker; 1,3,6,8: PCR products of various positive clones; 2, 4,5,7: the PCR products digested with *Sac* I ; 9: positive control of protein L B3 domain.(a) third round selection. (b) fourth round selection.

2.5 阳性克隆的序列分析

从 Ig 亲和筛选第 3 轮文库和第 4 轮文库中各选择 18 个不同大小的阳性克隆进行 DNA 序列测定, 分析阳性克隆中单 Ig 结合结构域的组成情况, 同时在原代文库中随机挑选 12 个克隆作为对照 (表 4). 结果可见, 在原始文库中存在各种 Ig 结合结构域, 其连接以随机方式进行, 在 15 个测定的单结构域中有 7 个是反向连接. 在第 3 轮、第 4 轮文库阳性克隆中, 所有单结构域的连接均为正向连接. 特别值得注意的是, 绝大部分的克隆 (36 个测定克隆中的 32 个) 均包含以 protein L B3 结构域为起始的, 由 protein L 和 protein A 单结构域间隔重复排列的特征性新结构, 如以 MDPL (mono-domain of protein L) 代表 protein L 的单结构域, MDPA (mono-domain of protein A) 代表 protein A 的单结构域, 上述特殊的结构形式可总结为 (MDPL-MDPA)_n, 此结构形式在天然蛋白质中不存在, 是从重组文库中筛选得到的新的 Ig 结合分子结构形式, 32 个克隆中有 24 个则完全以该形式存在.

Table 4 Sequence analysis of phage displayed fragments of Ig affinity selection of combinatorial molecular library

The original library		The third round selection			The fourth round selection		
1domain	2 domain	2 domain	3 domain	>3 domain	2 domain	3 domain	>3 domain
3# A	7# A-Lr	4# A-D	6# B-A-L	3# <u>L-D-L-A</u>	1# L-L	3# <u>L-D-L</u>	4# <u>L-D-L-D-L</u>
8# L	9# L-Dr	7# <u>L-A</u>	26# <u>L-D-L</u>	9# <u>L-A-L-D-L</u>	8# <u>L-A</u>	6# <u>L-D-L</u>	5# <u>L-C-L-D-L</u>
10# Br	11# Lr-L	8# B-L	31# <u>L-C-L</u>	27# <u>L-D-L-D-L</u>	10# B-L	9# A-D-L	13# <u>L-D-L-C</u>
14# Lr	18# Br-L	19# D-L	34# A-B-L	35# <u>A-D-L-B-L</u>	21# <u>L-C</u>	19# <u>L-C-L</u>	26# <u>L-A-L-B</u>
40# D	23# A-D	33# <u>L-C</u>	38# <u>L-D-L</u>	36# <u>L-A-L-B</u>	25# L-L	29# <u>L-B-D</u>	33# <u>L-D-L-D-L</u>
未测出	33# Lr-C	42# L-L	40# A-D-L	44# <u>L-D-L-D-L</u>	37# A-L	37# A-B-L	41# <u>A-D-L-D-L</u>

A,B,C,D represent the A,B,C,D domain of protein A respectively. L represents B3 domain of protein L. “#” is the number of different clone of original library and third and fourth round Ig affinity selection library. “r” represents arrange in reverse. Underlined represents clones containing (MDPL-MDPA)_n structure.

2.6 代表性单克隆噬菌体的 Ig 结合活性测定

由表 4 可见, L-L 结构形式在第 3 轮及第 4 轮的筛选文库中 3 次出现, 而且是同一个细菌 Ig 分子(protein L)单结构域的重复; L-D-L 和 L-D-L-D-L 结构形式包含了 L-D 形式及其完全相同重复, 该形式是筛选文库中(MDPL-MDPA)_n 结构最典型的代表. 我们选择这 3 种噬菌体 (每种噬菌体各挑 3 个克隆) 以 pCANTAB5S 噬菌体作阴性对照检测其与人 Ig 的结合活性 (图 7), 结果显示: 展示 L-D-L 和 L-D-L-D-L 单克隆噬菌体与人 Ig 的结合活性远高于展示 L-L 单克隆噬菌体, 而具有 2 个 L-D 重

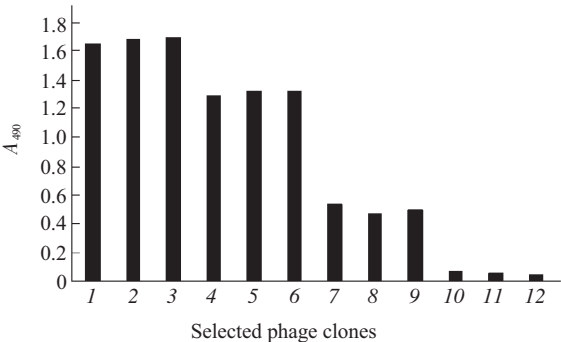


Fig.7 Selected phage clones binding to human Ig by ELISA

LD5: L-D-L-D-L;LD3: L-D-L; 5S:pCANTAB5S. 1: LD5-1; 2: LD5-2; 3: LD5-3; 4: LD3-1; 5: LD3-2; 6: LD3-3; 7: L-L-1; 8: L-L-2; 9: L-L-3; 10: 5S-1; 11: 5S-2; 12: 5S-3.

复结构 L-D-L-D-L 的结合活性要比 1 个 L-D 结构的 L-D-L 要略高一点。

3 讨 论

免疫球蛋白结合分子 protein A 和 protein L 具有完全不同的分子结构及与免疫球蛋白结合特征, 有学者直接将 protein L 的 4 个结合 Ig κ 轻链的结构域与 protein A 4 个结合 IgG Fc 段的结构域直接融合构建了新型融合蛋白 protein LA, 其与免疫球蛋白结合虽然得到加强, 但基本上是 2 种蛋白质结合能力的相加, 未能出现新的结合特征, 如协同性的结合. 由于上述分子间只是一种简单的直接相连, 而免疫球蛋白结合分子的基本功能单元是其单结构域, 因此, 在本研究中我们选择 protein A 的 4 个单结构域 (A~D) 和 protein L 的 B3 单结构域作为结构单位, 构建其随机组合的分子文库, 并展示在噬菌体表面, 通过人 Ig 体外亲和筛选, 通过分析与人 Ig 结合功能的分子结构, 来进一步研究免疫球蛋白结合分子的结构与功能特性。

在文库的构建过程中, 我们将 PCR 扩增的各单结构域片段先克隆到 T 载体上, 再用 T 载体通用引物 PCR 扩增制备各单结构域片段进行 Sac I 酶切. 这样各单结构域片段长度增加, 同时 Sac I 酶位点两侧的保护序列也增加, 这样能保证 Sac I 酶切效果, 同时酶切片段相对更小, 更易准确分离, 从而更好地保证文库的构建效率. 从各片段的连接效果可以看到(图 3), 连接 30 min 即可出现 750 bp 以上的片段, 随着时间延长, 小片段减少, 大片段密度增加. 将不同时间的连接产物混合起来, 得到多样性好、具多种排列组合的 Ig 结合单结构域组合分子文库。

上述的分子组合文库被克隆到噬菌粒展示载体 pCANTAB5S^[7,8]上, 进行 III + III 形式的噬菌体展示. 良好的展示载体是分子进化研究取得成功最重要的因素之一, 该研究所用的载体是我室所改建的新型噬菌体展示载体, 其最主要的特点是在被展示分子与噬菌体 PIII 之间增加了柔性接头(G4S)₃, 更有利于被展示蛋白和噬菌体 PIII 蛋白天然构象的形成和功能的维持, 我们应用该载体成功地展示多种天然蛋白及分子文库^[9-11]. 应用该载体所构建的分子文库库容为 2.3×10^6 , 重组噬菌体滴度为 4.1×10^{11} . 用于构建的分子文库单结构域有 5 种, 每个单结构域有正反两种方式插入, 如果要满足最大的分子由 6 个单结构域随机连接而成, 所需的库容为 $10 + 10^2 +$

$10^3 + 10^4 + 10^5 + 10^6$ 即 1.1111×10^6 , 因此, 我们构建的组合文库能满足由 1 个到 6 个单结构域任意随机连接的要求, 而每种重组噬菌体的拷贝数可达到 10^5 , 因而能很好地满足 Ig 分子进化筛选的要求。

对上述噬菌体文库用人 Ig 进行了 4 轮体外亲和和力进化筛选. 由于目前尚无公认的明确有效的检测指标能很好地评价每轮的筛选效果, 在本实验中, 我们选用的 Ig 结合菌落计数、噬菌体库滴度和各种大小插入片段的组成比例 3 种指标来评价筛选的效果. 结果表明(表 2), 噬菌体滴度在筛选过程中未有明显的变化, Ig 结合菌落计数随筛选轮次增加出现增加的趋势, 但波动很大, 可能的原因是我们所用的测定方法本身不易精确定量. 然而, 令我们惊喜的是, 各筛选轮次文库中的阳性克隆和大片段克隆比例随着筛选轮次的增加而明显地增加(图 4、表 3 和图 5), 显示出是一个很好的监测指标, 原因可能是大片段克隆含有更多的 Ig 结合结构域, 这些结构域之间的协同作用增强了噬菌体与 Ig 的结合活性, 使之在筛选过程中获得优势. 该指标在我们对新构建的 Ig 结合分子单结构域随机组合文库所进行的进化筛选中也显示出很敏感的变化(结果未示)。

与原始文库相比, 第 3 轮、第 4 轮筛选文库的单克隆序列测定结果显示, 筛选后文库中消除了原始随机文库中出现的单结构域反向排列, 此外, 阳性克隆中 Ig 结合结构域的组成也显示出明显的特征, 可分为 3 类, a. 间隔排列型: 在绝大部分的克隆中 (36 个测定克隆中的 32 个) 出现了特征性的由 protein L 和 protein A 单结构域间隔重复排列的结构(MDPL-MDPA)_n, 其中有 24 个完全以该形式出现. 该结构形式不存在于天然蛋白质中, 是一种全新的 Ig 结合分子的结构形式, 国内外尚未见报道. b. 单独型: 最少, 共 4 个, 由同一种 Ig 结合分子的单结构域排列而成, 均为 2 个结构域大小. 其中 1 个由 protein A 的单结构域排列形成, 3 个为 2 个的重复 LB3 结构域形成, 即 2L 序列. c. 混合排列型, 共 8 个, 兼有单独型和间隔排列型的特点。

Protein A 单结构域由呈 Z 型的 3 个螺旋束组成, 以其螺旋 1, 2 与 IgG 的 Fc 段呈高亲和力的结合^[12], 此外, 其还与 Ig 重链的 VH3 结合^[13]. Protein L 的结构域由单个 α 螺旋和其外围包绕的 4 股反向平行的 β 片层组成, 结合 Ig κ 轻链^[14]. 我们用的筛选诱饵是人的 Ig, 其中包含了 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE 多种类型的 Ig 分子, 如此复杂的

分子组合作筛选诱饵可能是得到了多种不同结构重组 Ig 结合分子形式的原因. 其中由 protein A 的单结构域排列组成的单独型结构对于 IgG Fc 段具有结合优势, 而 IgG 是 Ig 中最主要的组分, 由 protein L 的单结构域重复组成的 2L 序列虽然与 Ig κ 轻链的结合能力不如 protein A 单结构域与 Fc 的结合, 但 Ig κ 轻链存在于所有类型的 Ig 分子中, 因此也形成了一定的结合优势而被筛选得到, 而特征为 protein L 和 protein A 单结构域间隔重复排列结构(MDPL-MDPA)_n 形成优势的原因, 推测为该结构可能有利于其在 Ig 的可变区 (Fab) 分别由 protein L 和 protein A 单结构域同时实现与 Ig κ 轻链及 Ig 重链 VH3 的双重结合, 形成结合互补而大大提高其亲和力获得筛选优势, 此外, 该结构还保留了 protein A 的单结构域与 IgG Fc 的结合. 代表性单克隆噬菌体的 Ig 结合活性检测结果显示(图 7), 展示 L-D-L 和 L-D-L-D-L 单克隆噬菌体与人 Ig 的结合活性远高于展示 L-L 单克隆噬菌体, 而具有重复 L-D 结构 L-D-L-D-L 的结合活性仅略高于 L-D-L. 此外, 我们原核表达纯化的 L-D-L 与 Ig 的结合能力也远高于 L-L, 并能完全抑制 L-L 与 Ig 的结合, 相反 L-L 对 L-D-L 与 Ig 的结合则无任何抑制 (结果未示), 这些结果支持了(MDPL-MDPA)_n 结构与 Ig 重链的 VH3 及 Ig κ 轻链双重结合的推论.

本研究首次构建了由 2 种不同 Ig 结合蛋白 protein A 和 protein L 的单结构域随机组合分子噬菌体展示文库, 经体外定向进化筛选获得了全新的 Ig 结合序列, 为进一步深入研究 Ig 结合分子的结构与功能提供了一新的途径, 同时也为 Ig 结合分子的定向改造打下基础. 目前, 研究组已成功地表达了多个新的 Ig 结合分子, 完成了部分 Ig 结合活性测定, 进一步的 Ig 结合特性分析正在进行之中, 其结果将后续整理报道.

参 考 文 献

- 1 Tashiro M, Montelione G T. Structures of bacterial immunoglobulin-binding domains and their complexes with immunoglobulins. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, **5** (4): 471~481
- 2 Ibrahim S. Immunoglobulin binding specificities of the homology regions (domains) of protein A. *Scand J Immunol*, 1993, **38**(4): 368~374
- 3 Kastern W, Sjobring U, Bjorck L. Structure of peptostreptococcal protein L and identification of a repeated immunoglobulin light chain-binding domain. *J Biol Chem*, 1992, **267** (18): 12820~12825
- 4 Housden N G, Harrison S, Roberts S E, *et al.* Immunoglobulin-binding domains: Protein L from *Peptostreptococcus magnus*. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31** (3): 716~718
- 5 Svensson H G, Hoogenboom H R, Sjobring U. Protein LA, a novel hybrid protein with unique single-chain Fv antibody- and Fab-binding properties. *Eur J Biochem*, 1998, **258** (2): 890~896
- 6 Kihlberg B M, Sjobring U, Kastern W, *et al.* Protein LG: A hybrid molecule with unique immunoglobulin binding properties. *J Biol Chem*, 1992, **267** (35): 24483~25588
- 7 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 Universitatis Medicinalis Anhui*, 2004, **399** (2): 83~86
- 8 沈毅珺, 潘 卫, 易进华, 等. 新型噬菌粒展示载体 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
- 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.* *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, **20** (1): 43~48
- 10 潘 卫, 戚中田, 吴晓兰, 等. 从 HCV 核心蛋白噬菌体随机展示肽库中筛选抗原表位. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, **17**(1): 20~23
Pan W, Qi Z T, Wu X L, *et al.* *J Cell Mol Immunol*, 2001, **17**(1): 20~23
- 11 沈毅珺, 潘 卫, 许 燕, 等. 噬菌体展示重组人淋巴毒素突变体库及受体亲和筛选. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (1): 75~80
Shen Y J, Pan W, Xu R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32** (1): 75~80
- 12 Tashiro M, Tejero R, Zimmerman D E, *et al.* High resolution solution NMR structure of the Z domain of staphylococcal protein A. *J Mol Biol*, 1997, **272** (4): 573~590
- 13 Roben P W, Salem A N, Silverman G J. VH3 family antibodies bind domain D of staphylococcal protein A. *J Immunol*, 1995, **154** (12): 6437~6445
- 14 Ramirez-Alvarado M, Serrano L. Conformational analysis of peptides corresponding to all the secondary structure elements of protein L B1 domain: secondary structure propensities are not conserved in proteins with the same fold. *Protein Science*, 1997, **6** (1): 162~174

Phage Display of Random Combinatorial Libraries of Ig-binding Mono-domains of Protein A and Protein L and Ig Affinity Screening*

XU Rong²⁾, SHEN Yi-Jun¹⁾, DENG Song-Hua²⁾, CAI Chun-Xiao²⁾, CHEN Qiu-Li¹⁾,

JIA Jian-An¹⁾, WANG Jin-Hong¹⁾, PAN Xin¹⁾, PAN Wei^{1)**}

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

⁽²⁾Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract Protein A and protein L are bacterial cell wall proteins of importance in pathogenesis which have different crystal structures and bind different sites of host immunoglobulin (Ig). A pair of primers containing *Sac* I sequence were synthesized to amplify A,B,C,D domain of protein A and B3 domain of protein L by PCR respectively. After digestion with restriction enzyme *Sac* I, these PCR prepared Ig-binding domains were ligated randomly with each other to come into being a combinatorial molecular library. The library was displayed on phage surface by cloning into *Sac* I site of phagemid pCANTAB5S. The capacity of the phage library were calculated as 3.4×10^7 clones, and the titer was 6.2×10^{10} TU/ml. The sequence analysis showed that the displayed DNA fragments in the library comprise of various Ig-binding domains ligated in random. After three or four rounds affinity selection with human Ig, 36 positive clones were sequenced at random to analyze structure of the recombinant molecules. The sequence analysis showed 3 kinds of new molecular structures existed in the selected molecules which were totally different from its natural molecules. The characteristic structure of (MDPL-MDPA)_n which consists of the repetition of mono-domain of protein A (MDPA) and mono-domain of protein L (MDPL) existed predominantly in 32 of 36 positive clones. The effort to proceed molecular evolution study of Ig-binding domains combinatorial molecular library by phage display not only provides potent approach for research involved in the relationship between structure and function of Ig-binding molecules, but also a basis for Ig-binding molecules rebuilding.

Key words phage display, molecular evolution, Ig-binding domain, combinatorial library, protein A, protein L

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30472050).

**Corresponding author. Tel: 86-21-25074371, E-mail: pwpanwei@yahoo.com.cn

Received: January 26, 2005 Accepted: March 28, 2005