

表位九肽库的构建及人Ⅳ型胶原酶 特异结合肽的筛选

李传昭 杨文定 刘玉乐[#] 王大伟 赵爱民^{*} 田 波

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 将人工合成的编码九肽的随机序列 DNA 片段克隆进丝状噬菌体表达载体 fUSE5, 经多次电击转化和表达, 获得肽段与噬菌体 pⅢ蛋白融合并展示在噬菌体表面的随机序列九肽表位肽库。库容量达 10^{10} 个克隆。以Ⅳ型胶原酶为靶蛋白, 采用亲和纯化筛选模式, 从中筛选出Ⅳ型胶原酶结合肽。进一步 ELISA 检测筛选出与Ⅳ型胶原酶特异结合的 20 个阳性克隆。序列分析发现一组肽含有 WDXD 的共同序列, 一组含有 WVGXXR 的共同序列。其中 WDXD 的序列与Ⅳ型胶原酶单链抗体可变区序列同源。结果表明, 多肽库是筛选蛋白特异结合肽的有力工具, 表位九肽库的构建和筛选方法的建立为进一步应用筛选具有高亲和力的特异结合肽奠定了基础。

关键词 表位肽库, 九肽, Ⅳ型胶原酶, 亲和筛选

学科分类号 Q753

随机序列表位多肽库(Surface display random peptide library)是近几年来发展起来的一项新技术^[1]。它利用基因工程手段将合成的一组一定长度的随机序列寡核苷酸片段克隆到特定表达载体中, 使其表达产物以融合蛋白的形式呈现在活的噬菌体^[2]、细菌细胞^[3]和质粒表面^[4]。目前该技术已应用于研究抗原-抗体反应^[5], 蛋白质间分子识别及相互作用, 酶反应底物分析^[6], 酶抑制剂^[7]、疫苗及小分子药物设计等, 已成为基础研究和药物筛选的重要手段。

Ⅳ型胶原酶是恶性肿瘤侵袭周围组织和转移的关键酶之一^[8]。恶性肿瘤组织内Ⅳ型胶原酶含量与活性的显著增加, 使得基底膜的主要成分—Ⅳ型胶原蛋白被过度降解, 肿瘤细胞得以穿过基底膜进入毛细血管随血液转移、扩散。研究表明, 抑制Ⅳ型胶原酶活性的物质如抗体等均能有效地抑制或减轻肿瘤的转移^[9], Ⅳ型胶原酶抑制剂的研制已成为抗肿瘤药物研究的策略之一。

本文采用丝状噬菌体表达载体 fUSE5^[5], 将合成的编码九肽的随机序列 DNA 片段克隆表达, 构建成九肽表位随机序列肽库。以人Ⅳ型胶原酶为靶蛋白, 采用亲和纯化筛选模式, 从肽库中筛选其特异结合肽, 为抗肿瘤多肽药物的研制提供启示。

中科院九五预演项目及华北制药集团新药研究开发中心资助。

^{*} 现在中国生物工程开发中心工作。

[#] 通讯作者。

收稿日期:1997-06-24, 修回日期:1998-03-17。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体与菌株:噬菌体表达载体 fUSE5 和大肠杆菌菌株 K802、K91Kan(Kan^r)由美国 Missouri 大学 G. P. Smith 教授赠送, 菌株 K91、MC1061(Str^r)由美国 Affymax 研究所 W. J. Dower 教授赠送。

1.1.2 酶、试剂与耗材:Sfi I、Bgl I 购自 Promega 公司, PWO DNA 聚合酶、氯化铯购自 Boehringer Mannheim 公司, Streptavidin、Streptavidin-agarose 购自 Gibco BRL 公司, 人 IV 型胶原酶、ABTS、Dialyzed BSA 购自 Sigma 公司, NHS-LC-Biotin 购自 Pierce 公司, T7 DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia Biotech, [³⁵S]dATP 为 Dupont 公司产品, 一般试剂为市售分析纯(A. R.), 35mm 聚苯乙烯培养皿购自 Co-star 公司, 96 孔酶标板购自 Nunc 公司, Centricon-30kDa 微量浓缩器购自 Amicon 公司。

1.1.3 编码九肽的随机序列 DNA 片段、PCR 引物和序列分析引物编码九肽的 DNA 片段为 5'-HO-CTATTCTCACTCGGCCGACGGGGCT (NNK)₉GGGGCCGCTGGGGCCGAACTGTTGAA-3', 其中 N 为等量的 A、G、T、C, K 为等量的 T、G, (NNK)₉ 编码随机序列九肽, 两侧为酶切位点及保护序列。通过 PCR 方法获得双链 DNA 产物 5'端引物: 5'-Bio-CTATTCTCACTCGGCCGACG 和 3'端引物 5'-Bio-TTCAACAGTTTCG-GCCCCAG, 其中 Bio 为生物素标记, 用以除去酶切后两端小片段, 序列分析引物 5'-HO-TGAATTTTCTGTATGAGG, 以上 DNA 片段及引物由美国 Bio-Synthesis 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 插入片段制备:以编码九肽的随机序列 DNA 片段为模板, 5'端引物与 3'端引物为引物, 反应条件为 95℃ 2.5min, 42℃ 4min, 72℃ 4.5min, 6 个循环, 最后 72℃ 延伸 5min。反应体系为 1ml, 分装 10 个 0.5ml 小管反应。全部产物收集后, Bgl I 酶切消化, 酶切产物经 Streptavidin-agarose 处理, 去除两端标记有生物素的小片段, 真空干燥浓缩后备用。

1.2.2 载体的制备与连接:参见文献[10], 方法如一般分子克隆方法, 但基于库容量需要, 反应量大。取培养至对数后期感染有 fUSE5(Tet^r)的 K802 菌 IL 培养液收集菌体, 大量提取噬菌体复制形式的双链 DNA(RF DNA), 经溴化乙锭-氯化铯密度梯度离心纯化、Sfi I 酶切、去除 Sfi I 两位点间小片段, 即为双链线状载体。线状载体与插入片段 16℃ 连接过夜。产物用于转化。

1.2.3 感受态细胞制备、电击转化、噬菌体制备与纯化:在营养培养基(蛋白胨 32g, 酵母提取物 20g, 氯化钠 5g/L, pH7.5)中, 逐步放大培养 MC1061 IL 至 OD₆₀₀ 0.3~0.5, 菌体经等体积冰预冷的 1×HEPES 洗 2 次, 50ml 10% 甘油洗 1 次, 悬浮于 3ml 10% 甘油中, 每管 50μl 分装, -70℃ 保存备用。每次转化取连接产物 5μl(约 25ng)加入到融化的 50μl 感受态细胞中, 轻弹混匀, 冰上置 30s, 吸入电击杯中电击, 条件为 2.5kV, 200Ω, 25μF, 持续时间 8~9.5ms。电击后立即往电击杯加入 2ml SOC 培养液(含 0.2μg/ml Tet), 混匀, 移到 15ml 试管中 37℃ 摇床培养 1h。全部转化分 50 次完成, 每 10 次转化物在 SOC 中摇 1h 后, 转入到 200ml LB(Tet 20μg/ml)继续摇 16~20h 至终止期以扩增噬菌体, 分别吸取

100 μ l 作扩增培养后滴度分析。扩增菌液去除菌体后,上清经两次 PEG(终浓度 3%)沉淀溶于 TBS(50mmol/L Tris·HCl(pH 7.5), 0.15mol/L NaCl), 然后经氯化铯密度梯度离心纯化浓缩即为噬菌体库原库。

1.2.4 IV型胶原酶结合肽的筛选: 参见文献[1]。

1.2.5 ELISA 鉴定与序列分析: 用第三轮筛选得到的噬菌体侵染 K91Kan 后涂 LB 平板, 分别挑取单菌落接种 2ml LB 液体, 37℃ 摇床培养至静止期, 去除菌体后, 上清经两次 PEG 沉淀后溶解在 110 μ l 0.15mol/L NaCl, 加入 11 μ l 1mol/L 乙酸, 4℃ 或冰上沉淀 0.5h 离心, 沉淀溶解在 500 μ l TBS, 用作分析, 取 80 μ l 噬菌体, 于 0.1mol/L NaHCO₃ (pH8.6) 4℃ 过夜包被 96 孔酶标板, 加入生物素标记IV型胶原酶, 4℃ 过夜, 用过氧化物酶标记的亲合素为二抗, 显色底物为 ABTS, 读取 OD₄₁₀, 取野生型噬菌体 fd 作阴性对照。取 200 μ l 噬菌体, 苯酚、氯仿/异戊醇, 各抽提一次, 上清加入 200 μ l TE [10mmol/L Tris·HCl (pH8.0), 1mmol/L EDTA(用 NaOH 将 pH 调到 8.0)], 40 μ l 3mol/L NaOAc, 1ml 乙醇, -20℃ 过夜沉淀, 离心后沉淀溶于 10 μ l 水中, 按 T7 DNA 序列分析试剂盒说明书进行序列分析。

2 结 果

2.1 PCR 产物及酶切得到的插入片段

插入片段制备与建库的过程如图 1、图 2。此处的 PCR 反应与通常的 PCR 扩增反应目的不同, 该 PCR 反应中模板为合成的含有编码随机序列九肽的单链 DNA 片段, 模板量大, 目的是通过 PCR 反应获得双链 DNA 片段, 当然不可避免地存在一定程度的扩增, 正是这种扩增能够避免在后续的一系列操作中因损失而导致随机序列多样性的降低。扩增产物纯化

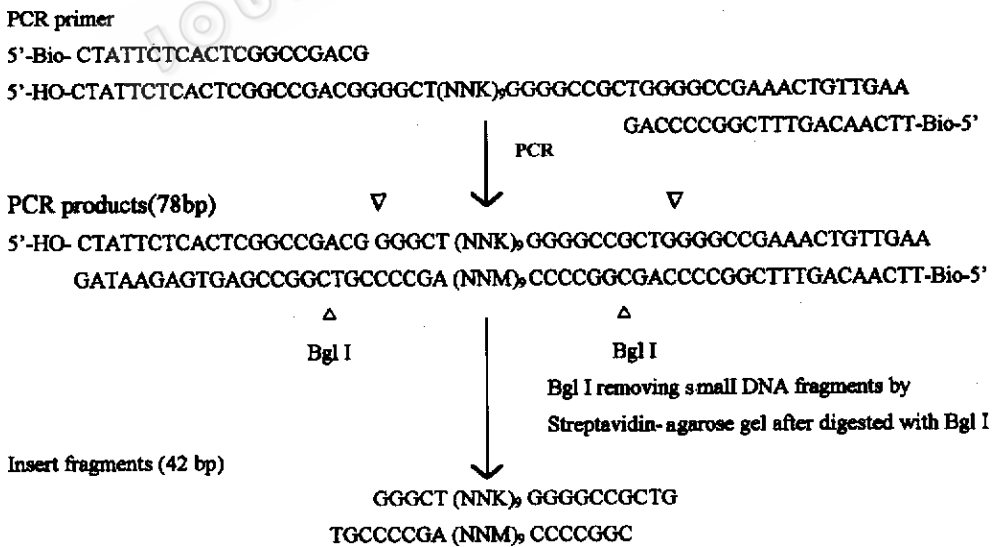


图 1 插入片段的制备

Fig. 1 Preparation of the insert DNA fragments

Note: N = A, G, T or C K = T or G M = A or C

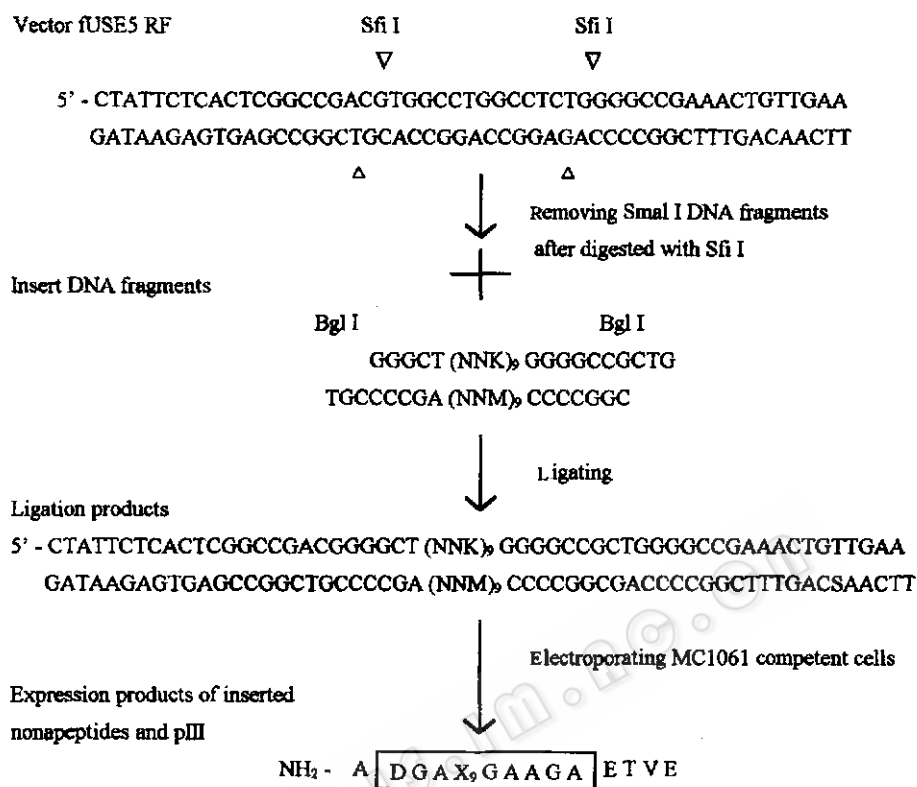


图 2 表位九肽随机序列肽库的构建

Fig. 2 Construction of the phage display nonapeptide library

Note: N = A, G, T or C K = T or G M = A or C

后经 Bgl I 酶切和 Streptavidin-agarosep 处理, 得到粘端的 42bp 插入片段(图 3)。

2.2 连接转化与表位九肽库的构建

将双链线性的丝状噬菌体表达载体 fUSE5(图 4)与插入片段连接, 连接物电击转化 MC1061 感受态细胞, 转化混合物在 SOC 培养液摇床培养 1h 后, 涂板检测, 每次转化可以获得 3.8×10^8 个独立克隆, 实验共转化 50 次, 得克隆 1.9×10^{10} 个。转化物转至 LB 中继续培养 16~20h, 提取噬菌体作为九肽库原库(共 10ml 溶液中), 经滴度分析, 噬菌体总量达 10^{13} 。

2.3 IV 型胶原酶结合肽的筛选

以 IV 型胶原酶为靶蛋白, 从肽库中筛选与 IV 型胶原酶紧密结合的噬菌体展示肽。共进行三轮筛选, 第一轮筛选加入的噬菌体为原库噬菌体(200 μ l)。第二轮筛选加入的噬菌体系第一轮筛选洗脱得到的噬菌体扩增后的纯化产物。第三轮筛选加入的噬菌体系第二轮筛选后洗脱得到的噬菌体扩增后的纯化产物。经过三轮“吸附-洗脱-扩增”筛选, 得到与 IV 型胶原酶紧密结合的噬菌体克隆达 6.1×10^8 (表 1)。

2.4 ELISA 鉴定与序列分析

共扩增纯化单个噬菌体克隆 198 个, 从中得到显阳性克隆 36 个, 其中结果高于阴性对照 10 倍以上的克隆 22 个, 对这 22 个克隆进行 DNA 序列分析。DNA 序列翻译成氨基

酸后比较发现,一组肽含有 WDXXD 的共同序列,一组含有 WVGXXR 的共同序列(表 2)。

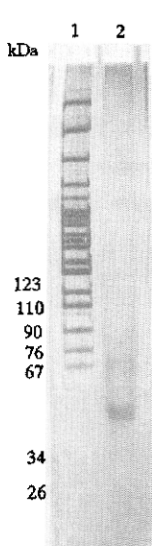


图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测插入片段

Fig.3 PAGE analysis of Bgl I -digested insert DNA fragments

1. pBR322 DNA/Msp I marker
2. Insert DNA fragments

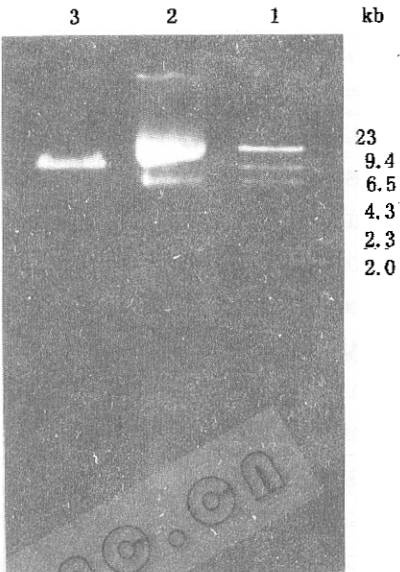


图 4 琼脂糖电泳检测载体 DNA

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of vector DNA

1. λ DNA/Hind III Marker
2. Complete vector DNA
3. Bgl I digested linear vector

表 1 表位库中Ⅳ型胶原酶特异结合肽的筛选

Table 1 The screening of human type Ⅳ collagenase binding peptides from the nonapeptide library		
Screening	Numbers of phage input	Numbers of phage output
Round 1	$10^{11}/200\mu\text{l}$	4.2×10^3
Round 2	$10^{12}/200\mu\text{l}$	8.0×10^6
Round 3	$10^{12}/200\mu\text{l}$	6.1×10^8

3 讨 论

随机序列肽库的最大优点是含有该长度肽的所有可能的氨基酸排列顺序,库容量极大。库容量与多样性是决定库优劣的两个基本要素。理论上,一个九肽库,编码随机序列九肽的寡核苷酸片段约 3.5×10^{13} 种不同排列顺序,九肽肽段有约 5×10^{11} 种不同的排列顺序^[12]。实际上,由于大肠杆菌转化效率的限制,理论库容量是难以实现的。目前,转化效率最高的电击转化法一般达 10^9 克隆/ μg DNA,我们采用多次转化,电击 50 次,才获得 10^{10} 个克隆。但考虑到氨基酸密码子的兼并性,以及蛋白质与蛋白质相互作用的关键残基一般仅为少数几个氨基酸,如 3~5 个氨基酸起作用,库中几个氨基酸固定的肽段存在

表 2 人Ⅳ型胶原酶特异结合肽及其比较

Table 2 Comparison of the amino acid sequences of type Ⅳ collagenase binding peptide

Amino acid sequence	ELISA(OD ₄₁₀)	Repeating times	Consensus sequence
LEWDCDLR	0.29	4	WDXXD
WDRFDSLRS	0.36	2	
SLRDLEDWS	0.45	2	
SWDFTDSLRL	0.25	2	
DSLRLWDCYD	0.16	1	
ENWDRADAY	0.29	1	
GSWDVADTY	0.10	1	
SCDFTDSLRL	0.18	1	WVGXXR
LWVGGRNA	0.12	2	
PWVGGRNA	0.23	1	
WWVGGRNA	0.18	1	
LWLGSARTS	0.09	1	
LRPWN-ARTS	0.14	1	

的概率是很大的,所以尽管实际中达不到理论上的库容量,仍不影响肽库的应用。

建库过程中,PCR、酶切、连接、转化,每部操作都难免损失,最大限度地减少损失,提高效率,是保证库容量与多样性的关键。

在Ⅳ型胶原酶结合肽的三轮筛选过程中,随着筛选轮数的增多,洗脱回收量呈千倍增加,表明随着每一轮“吸附-洗脱-扩增”,大量非特异结合的噬菌体被冲洗掉,具有亲和力的噬菌体则保存下来。最后洗脱得到的噬菌体一定存在着许多重复,这在测序结果中得到印证,可见,第二、三轮筛选是第一轮筛选后的扩增与优化,有无特异结合,第一轮筛选是关键。

Ⅳ型胶原酶是基质金属蛋白酶的一种,大小为 72kDa,酶催位点有一个 Zn

原子,它以潜在的形式分泌到胞外基质中,负责切割Ⅳ型和Ⅴ型胶原的三螺旋区,对变性胶原和纤连蛋白也有高的活性^[13]。一般认为其血色素结合蛋白区域行使如特异抑制^[14]和细胞表面受体^[15]的结合功能。其结合肽的共同序列不只一组,表明Ⅳ型胶原酶与其它蛋白作用的结合位点不止一个。TIMP(Tissue inhibitor of metalloproteinase)-2 是Ⅳ型胶原酶的抑制剂^[16],将其一级结构与结合肽的共同序列比较,其中也含有两处 DXXD 的结构,另外,Ⅳ型胶原酶单链抗体(ScFv)重链可变区中也含有 DXXD(待发表资料),表明Ⅳ型胶原酶的作用位点可能主要是 WDXXD。如小肽的结合能够封闭Ⅳ型胶原酶的结合位点,或将小肽偶联其他毒素制成靶向毒素,可望成为抗肿瘤的肽类药物。

随机序列多肽库的建立及应用近几年发展很快,新的建库方法不断出现,应用涉及免疫学、结构生物学、酶学以及药物筛选与设计等诸多领域。我们在筛选Ⅳ型胶原酶结合肽的基础上,拟进一步优化,以便有益于抗肿瘤药物的研究。

参 考 文 献

- 1 Scott J K, Craig L. Current Opinion in Biotechnology, 1994, 5: 40~48
- 2 Scott J K, Smith G P, Science, 1990, 249: 386~390
- 3 Charbit A, Boulain J C, Ryter A *et al.* EMBO J., 1986, 5: 3029~3037
- 4 Cull M G, Miller J F, Schatz P J, Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 1865~1869
- 5 Devlin J J, Panganiban L C, Devlin P E. Science, 1990, 249: 404~406
- 6 Schatz P J. Bio/Technology, 1993, 11: 1138~1143

- 7 Roberts B L, Markland W M, Ley A C *et al*. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1992, **89**, 2429~2433
- 8 Stetler-Stevenson W G. *Cancer Metastasis Res*, 1990, **9**:289
- 9 Sceenath T *et al*. *Cancer Res*, 1992, **55**:4942
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition
- 11 Parmley S F, Smith G P. *Gene*, 1988, **73**:305
- 12 李传昭, 杨文定, 刘玉乐等. *微生物学报*, 1995, **35**(3):216~218
- 13 Bergmann U, Tuuttila A, Stetler-Stevenson W G *et al*. *Biochemistry* 1995, **34**:2819~2825
- 14 Nguyen O, Willenbrock F, Cockett M I. *Biochemistry*, 1994, **33**:2089~2095
- 15 Strongin A Y, Marmer B L, Grant G A. *J Biol Chem*, 1993, **268**:14033~14039
- 16 Stetler-Stevenson W G, Kruttsch H C, Liotta L A. *J Biol Chem*, 1989, **264**(29):17374~17378

Construction of Phage Display Random Nonapeptide Library and Selection of Peptide Ligands for the Human Type IV Collagenase

Li Chuanzhao Yang Wending Liu Yule Wang Dawei Zhao Aimin Tien Po

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Science, Beijing 100080)

Abstract The synthesized random oligonucleotides which encode nonapeptides are cloned into the filamentous bacteriophage vector fUSE5, and transformed into the competent *E. coli* MC1061 by multielectroporation, 10^{10} clones are obtained in which each peptide expressed as a fusion to the minor coat protein pIII and displayed on the surface of the phage. Affinity selection has been used to identify potent ligands for the human type IV collagenase and a family of collagenase binding bacteriophage ligands was obtained. ELISA results showed 20 positive clones that could bind the type IV collagenase specifically. Sequences showed two relatively short conserved subsequences: WDXXD and WVGXXR, the sequence WDXXD is homologous to the ScFv variable region of the type IV collagenase. It is showed that the peptide library is a powerful tool for the selection of the potent peptide ligands for proteins. The construction and screening of the nonapeptide library forms the bases for the further application.

Key words Phage display, nonapeptide, human type IV collagenase