

DOI:10. 3724/SP. J. 1008. 2009. 00783

· 论 著 ·

从噬菌体展示肽库中筛选 PreS1 抗原的结合肽

陈青青,郑慧敏,郭葆玉*

第二军医大学药学院生化药学教研室,上海 200433

[摘要] **目的:**从噬菌体随机七肽库中筛选能与 PreS1 抗原特异性结合的多肽。**方法:**利用噬菌体展示技术,以 PreS1 抗原为靶分子,从随机七肽库中进行生物亲和筛选,ELISA 鉴定阳性克隆。**结果:**对肽库进行 3 轮筛选后,通过 ELISA 和竞争抑制 ELISA,获得了特异性的结合肽,测序结果显示噬菌体上的短肽有共同序列。**结论:**利用噬菌体展示技术成功筛选到了 PreS1 抗原的结合肽,为乙肝的治疗和诊断探索新的途径。

[关键词] PreS1 抗原;噬菌体展示肽库;结合肽;乙型肝炎

[中图分类号] R 373. 21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)07-0783-03

Selection of peptides bind to PreS1 antigen from a phage-displayed peptide library

CHEN Qing-qing,ZHENG Hui-min,GUO Bao-yu*

Department of Biochemical Pharmacology,School of Pharmacy,Second Military Medical University,Shanghai 200433,China

[ABSTRACT] **Objective:**To screen for peptides that specifically bind to PreS1 antigen from a phage-displayed peptide library.
Methods: The PreS1 antigen was used as the target molecule to screen the binding peptide from the Ph. D. -7 peptide library with phage display technique,and the positive clones were identified by ELISA. **Results:** After three rounds of biopanning,the binding peptides were screened from the peptide library by ELISA and competitive inhibiting ELISA. Sequencing result showed that the binding peptides had high affinity and specificity. **Conclusion:** A peptide binding PreS1 antigen has been successfully obtained by screening the phage display library,which paves a way for the diagnosis and treatment of hepatitis B infection.

[KEY WORDS] PreS1 antigen; phage display peptide library; binding peptide; hepatitis B

[Acad J Sec Mil Med Univ,2009,30(7):783-785]

前 S1 抗原(PreS1 antigen)是乙型肝炎病毒(HBV)外膜蛋白重要组成部分,由 108~119 个氨基酸组成^[1]。研究发现,PreS1 抗原可结合肝细胞膜,其中 PreS1 (21~47 AA)是与肝细胞膜的结合位点,在 HBV 附着、入侵肝细胞的过程起重要作用^[2]。此外,PreS1 在机体免疫应答和 HBV 复制等方面也起着十分重要的作用。由此可见,PreS1 是 HBV 感染、复制和乙肝患者诊断、治疗和预后的一个重要标志物^[3-4]。

我国为乙型肝炎的高发区,人群感染率高,约有 10%的人口是乙肝病毒的携带者。目前抗病毒治疗是临床上最主要的措施,常用药是干扰素和一些核苷类似物,起抑制病毒复制的作用,但不能彻底清除 HBV。本研究旨在运用噬菌体展示技术,筛选与 PreS1 抗原有特异性结合的噬菌体克隆,为乙肝患者的治疗研究和免疫诊断探索新的途径。

1 材料和方法

1.1 实验材料 噬菌体随机 7 肽库(Ph. D. -7TM Phage Display Peptide Library Kit)购于美国 New England Biolabs 公司,宿主菌为大肠杆菌(*E. coli* ER2738);PreS1 (21~47 AA)抗原为合成多肽,由本实验室合成;辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗 M13 单克隆抗体购自 Pharmacia 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 肽库的生物筛选 以 100 μg/ml 的 PreS1 抗原溶液 150 μl (溶于 0.1 mol/L pH 8.6 的 NaHCO₃)包被 96 孔酶标板,4℃孵育过夜。弃包被液,加满 1% BSA 封阻液,4℃作用 2 h。用 TBS 缓冲液快速洗板 6 次。用 100 μl 的 TBST [Tris-HCl 缓冲液+0.1% (V/V)Tween-20]缓冲液稀释 2×10¹¹ pfu 的噬菌体,然后加到已包被好的孔中,室温温和摇动 60 min。

[收稿日期] 2008-11-10 [接受日期] 2009-02-12
[作者简介] 陈青青,硕士生. E-mail:qqc00707@sina.com
* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81871330,E-mail:byguo1632000@yahoo.com.cn

TBST 缓冲液洗板 10 次,然后加入 0.2 mol/L Glycine-HCl (pH 2.2)洗脱 15 min,再用 1 mmol/L Tris-HCl 15 μ l (pH 9.1)中和上述洗脱液,即第 1 轮特异性结合噬菌体。把第 1 轮筛选物进行扩增和纯化,然后依次进行第 2 次和第 3 次亲和筛选。每次加入的噬菌体量都为 2×10^{11} pfu,第 2、3 轮筛选包被的抗原量分别为 10、1 μ g/ml, TBST 中 Tween-20 的浓度增至 0.5%(V/V),其余步骤与第一轮筛选相同。

1.3 特异性噬菌体的扩增和纯化 接种 *E. coli* ER2738 单菌落于 20 ml LB 培养基中,摇床培养至对数前期。加入未扩增洗脱物。37℃剧烈摇动培养 4.5 h。然后 4℃, 10 000 $\times g$ 离心 10 min。取上清 10 000 $\times g$ 离心。将上清的上部 80%转入一新鲜管中,加入 1/6 PEG/NaCl。噬菌体 4℃沉淀过夜。4℃, 10 000 $\times g$ 离心 15 min。弃上清再短暂离心。沉淀物重悬于 1 ml TBS 中,4℃离心 5 min 使残余细胞沉淀。取上清,用 1/6 体积的 PEG/NaCl 再沉淀。冰上孵育 60 min。4℃ 10 000 $\times g$ 离心 10 min,弃上清。沉淀物重悬于 200 μ l TBS,0.02% NaN₃中。10 000 $\times g$ 离心 1 min,取上清,此即为扩增后的洗脱物。

1.4 噬菌体滴度的测定和挑取蓝色噬菌斑 接种 ER2738 单菌落于 10 ml LB 培养基中,摇床培养至对数中期。分成 200 μ l 等份于微量离心管中,每管加入 10 μ l 不同稀释度的噬菌体,快速震荡混匀,室温温育 3 min。将感染细胞加入 45℃预温的上层琼脂培养管中,每次 1 管,快速混匀,立即倾注于 37℃预温的 LB/IPTG/X-gal 平板上,37℃培养过夜。次日计算噬菌体滴度。从第 3 轮筛选后的洗脱产物测定滴度后,用灭菌牙签在总量不到 100 个噬菌斑的平板上随机挑选 20 个蓝色噬菌斑,分别置 1 ml 接种了处于对数生长前期的 *E. coli* ER2738 的 LB 培养液中进行扩增和纯化并测定滴度。

1.5 ELISA 鉴定特异性结合的阳性噬菌体克隆 用 100 μ l 100 μ g/ml 的 PreS1 抗原(溶于 0.1 mol/L pH 8.6 NaHCO₃中)包被 ELISA 板,4℃包被过夜。弃包被液,加满 1% BSA 封阻液,4℃作用 1 h。TBST 洗板 6 次,加入 TBST 系列稀释的扩增噬菌体,100 μ l/孔。室温震荡作用 1 h。TBST 洗板 6 次,加入 HRP 标记的抗-M13 抗体,200 μ l/孔,室温震荡作用 1 h。TBST 洗板 6 次,加入 TMB 显色液显色,2 mol/L H₂SO₄终止显色,测定 450 nm 处的光密度(*D*)值。用肽库中的噬菌体作阴性对照, TBST 作空白对照。

1.6 阳性噬菌体克隆单链 DNA 的提取和测序 将 500 μ l 含噬菌体上清转入一新鲜离心管。加 200 μ l

PEG/NaCl,颠倒混匀,室温放置 10 min。10 000 $\times g$ 离心 10 min,弃上清液。沉淀物彻底重悬于 100 μ l 碘化物缓冲液中,加入 250 μ l 乙醇。室温温育 10 min。离心 10 min,弃上清。用 70%的乙醇洗沉淀,短暂真空干燥。沉淀重悬于 30 μ l TE [10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),1 mmol/L EDTA]中。5 μ l 的上述模板溶液进行染料标记的自动循环双脱氧测序,—96 gIII 测序引物为 5'-³²P-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'。

1.7 竞争 ELISA 检测噬菌体阳性克隆特异性 用包被液稀释的 PreS1 抗原 (100 μ g/ml)包被酶标板 4℃过夜,4℃封闭 1 h 后,加 50 μ l(10^{11} pfu/ml)噬菌体溶液与 50 μ l 不同浓度 (50、25、12.5、6.25 μ g/ml)的 PreS1 抗原混合液,37℃孵育 1 h, TBST[Tris-HCl 缓冲液+0.5%(V/V) Tween-20]洗涤,再加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记的抗-M13 抗体 100 μ l/孔,37℃孵育 1 h,以 TMB 显色 10 min 后,2 mol/L H₂SO₄终止显色,酶标仪读取 *D* 值(波长 450 nm)。

2 结 果

2.1 噬菌体富集 本实验进行了 3 轮筛选,为了提高筛选的严格程度,每轮包被的抗原量逐渐减少,洗脱强度逐渐加大,结果显示每轮亲和筛选后投入和产出比逐渐增大,表明所筛选的噬菌体得到了选择性富集。

表 1 亲和筛选噬菌体的产率

Tab 1 Recovery of washed phages by biopanning

Round	PreS1 $\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$	TBST (%)	Input phage (pfu)	Output phage (pfu)	Recovery (%)
1	100	0.1	2×10^{11}	2.0×10^4	1.0×10^{-7}
2	10	0.5	2.9×10^{11}	1.8×10^5	6.2×10^{-7}
3	1	0.5	2.5×10^{11}	2.3×10^6	9.2×10^{-6}

2.2 ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆 以各噬菌体克隆的 *D* 值大于阴性对照 *D* 值的 2.5 倍作为阳性克隆标准。图 1 表明挑取的 20 个克隆中,ELISA 的结果全部呈阳性。

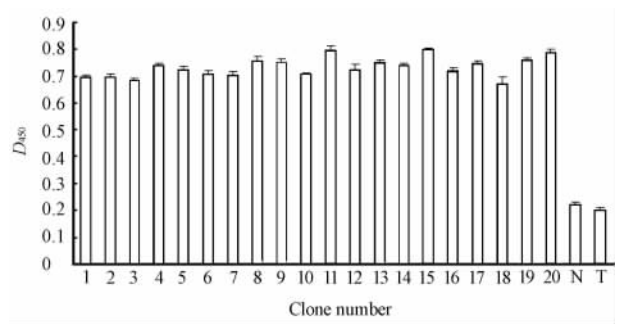


图 1 噬菌体克隆与抗原结合力

Fig 1 Binding force of phage clones to antigen

1-20: Clones; N: Negative control; T: TBST. *n*=3, $\bar{x}\pm s$

2.3 噬菌体阳性克隆的序列测定 挑选 *D* 值最大的 10 个克隆菌株进行 DNA 序列测定,并推导所编码的氨基酸残基,即为噬菌体递呈的 7 肽序列(表 2)。结果显示有 2 个克隆的序列完全一样(图 2)。

表 2 阳性克隆的 DNA 和氨基酸序列

Positive phage clone	Number of duplicate	DNA sequence (5'-3')	Peptide sequence
4	1	ATC ATA ATA CCG CAG CAA GAG	IIPQQE
8	1	CAT CAG CAT TCT CCG CGT AAG	HQHSPRK
9	1	CAT GCT GAT CAG AAG CCG CAT	HPDQKRH
11,19	2	CAT CGT TCT CAA ACT ACT TAT	HRSQTTY
13	1	GCT TCT AAT AAT ATT ATG TCG	ASNNIMS
14	1	CGC ATC TTC TGC GTG CCG CAC	RIFCVPH
15	1	CAT CAG CAT CAT AGG ACT GAG	HQHHRTE
17	1	TAC TCC TAA TAC GCA GCC GCT	TPNTQPL
20	1	GCT ATT CCT CAT TAT GCT ATG	AIPHYGM

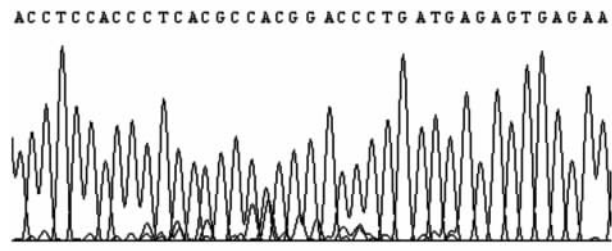


图 2 含共有序列的噬菌体结合肽 DNA 序列测定图

Fig 2 Map of DNA sequence containing common sequence

2.4 竞争抑制实验结果 用包被的 PreS1 抗原与阳性噬菌体(含共有序列)及不同浓度游离的 PreS1 抗原之间进行了竞争抑制实验(图 3),结果显示,随着游离 PreS1 抗原浓度的逐渐降低其阻断噬菌体和包被的 PreS1 抗原结合的作用亦随之降低,结合的噬菌体克隆量逐渐增加,证明 PreS1 抗原与筛选得到的噬菌体展示肽是特异性结合的。

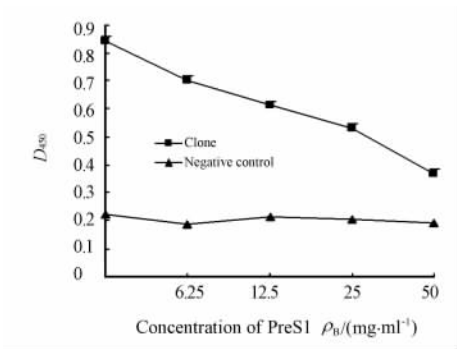


图 3 阳性噬菌体竞争抑制实验结果

Fig 3 Results of positive phage with competitive ELISA

3 讨论

噬菌体随机七肽库就是将七肽融合表达在 M13 噬菌体 pⅢ 衣壳蛋白的 N 末端^[5],因此能够保持相对独立的空间结构和生物活性。噬菌体展示肽库含有大约 2.8×10^9 个的转化序列,因其具有容量大、拷贝数高、易于筛选和扩增等特点^[6],目前不仅在确定抗原表位、寻找小分子模拟肽、疫苗开发等研究领域有着非常广泛的应用,而且在筛选多肽类活性药物方面也成为了重要工具。

噬菌体肽库技术高效、方便的特点使其在多肽类药物的寻找过程中表现出了很大的应用价值。目前已筛选到了许多具有天然配体活性的多肽,但这些小肽也具有其固有的缺点,如易降解、半衰期短、柔曲性强,我们可以进行必要的结构设计和化学修饰来充分发挥其优点。研究^[7]发现 PreS1(21~47 AA)产生的抗体具有中和病毒的作用。因此,本实验筛选获得的多肽将有可能与 PreS1 抗体具有相似作用,为进一步研究中和乙肝病毒,阻止病毒感染,开发高效的抗病毒多肽药物奠定了一定的物质基础。

目前,噬菌体展示技术已在甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎等特异性病毒抗原表位的筛选研究中得到了广泛的应用。且相关研究表明,这些模拟表位可以作为诊断抗原。现在,PreS1 抗原的检测主要采用双抗体夹心 ELISA 法^[8],由于多肽易合成且产量较高,所以该特异性短肽在替代抗体检测 PreS1 抗原上有一定的应用价值和实际意义。

[参考文献]

[1] 何 华,张大志.乙型肝炎病毒前 S1 抗原的研究进展[J].中华肝脏病杂志,2004,12:765-766.

[2] Dash S, Rao K V, Panda S K. Receptor for Pre-S1(21-47) component of hepatitis B virus on the liver cell;role in virus cell interaction[J]. J Med Virol,1992,37:116-121.

[3] 闵福援,孙桂珍,王 健,辛永梅.前 S1 蛋白在乙型肝炎诊断及判断预后中的作用[J].中华检验医学杂志,2004,27:224-226.

[4] 徐 蓓,姚光弼.血清乙型肝炎病毒前 S1 抗原检测及其与病毒复制的关系[J].中华实验和临床病毒学杂志,1997,11:117-112.

[5] 沈倍奋.分子文库[M].北京:科学出版社,2001:24-25.

[6] Kay B K, Kasanov J, Yamabhai M. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries[J]. Methods,2001,24:240-246.

[7] Alberti A ,Cavalletto D,Chemello L,Belussi F,Fattovich G,Pontisso P,et al. Fine specificity of human antibody response to the PreS1 doman of hepatitis B virus[J]. Hepatology,1990,12:199-203.

[8] 王 健,闵福援.乙肝病毒血清标志物的检测方法及其临床意义[J].中华检验医学杂志,2005,28:113-115.