

应用噬菌体肽库筛选能封阻霍乱噬菌体 VP1 转染菌细胞的寡肽

王多春 阚 飙* 高守一 刘延清

(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 卫生部医学分子细菌学重点实验室 北京 102206)

关键词 噬菌体随机肽库,分型噬菌体,纯化实验

中图分类号 :Q785 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2003)04-0509-05

噬菌体感染细菌首先要吸附于细菌表面受体,从目前报道的细菌与噬菌体相互作用的研究中发现,这些受体包括细菌细胞外膜上的蛋白、糖脂结构和鞭毛等。

霍乱弧菌是霍乱的病原体,高守一等(副霍乱资料汇编,1984,237~245.)从国内分离并选择出 5 株噬菌体(VP1~VP5),根据霍乱弧菌菌株对噬菌体的敏感性不同,将埃尔托型霍乱弧菌分为 32 个噬菌体型。结合生物学分型方法,可区分埃尔托型霍乱弧菌的两类不同菌株(流行株和非流行株)和不同菌型。对各种来源的菌株进行分型,可作为一种追溯传染来源、传播途径和分析流行形式的流行病学研究工具。噬菌体对宿主菌的裂解表明宿主菌细胞的表面存在噬菌体的受体,研究霍乱弧菌分型噬菌体的受体,能够了解霍乱弧菌噬菌体分型方法中,不同噬菌体对不同细菌裂解差异的分子生物学基础。

噬菌体展示技术^[1]是研究受体与配体结合位点、寻求高亲和力生物活性的配体分子和探索未知蛋白空间结构表位的有力工具^[2,3],它由上亿种与噬菌体外壳蛋白以融合的形式呈现在噬菌体表面的多肽组成,库中上亿种多肽分别呈现在上亿个噬菌体表面,众多重组型噬菌体便组成了噬菌体随机肽库。本研究利用噬菌体展示随机多肽,通过与分型噬菌体 VP1 的亲合与淘洗,筛选出了一些能够与 VP1 结合的七肽克隆子,并通过噬菌体感染纯化实验,从这些克隆子中初步筛选到一个能够结合和阻止 VP1 噬菌体再感染霍乱弧菌的肽片段克隆。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和噬菌体:分型噬菌体 VP1 及其敏感菌霍乱弧菌 N53 由本室保存。噬菌体随机 7 肽库(Ph.D-7TM)为 New England BioLabs 产品,滴度为 2×10^{13} pfu/mL,随机多样性 2.8×10^9 pfu/mL,受体菌 ER2738 为四环素抗性的菌毛阳性大肠杆菌。

1.1.2 培养基:LB 培养基,半固体 LB 为 LB 中加 0.7% 琼脂粉。

1.1.3 单抗和化学试剂:HRP-M13 单克隆抗体为 Amersham Pharmacia Biotech INC 产品;分型噬菌体储存液(SM 液)为 1L 单蒸水中含 5.8 g NaCl、2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、50mL 1mol/L Tris-HCl(pH 7.5)和 20g 明胶;洗涤液(TBST)为 50mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)、150mmol/L NaCl 和 1% Tween20;洗脱液为 0.2mol/L 甘氨酸

基金项目:国家“863 计划”(2001AA215191-2)

* 通讯作者。Tel 86-10-61739458; Fax 86-10-61730233; E-mail:biaokan@hotmail.com

作者简介:王多春(1969-)男,甘肃武威人,在读博士,从事病原生物学受体的研究。E-mail:wangduochun@yahoo.com.cn

收稿日期:2002-09-26,修回日期:2003-04-07

(pH2.2);中和液为 Tris-HCl (pH9.1);PEG8000/NaCl 沉淀液为 20% PEG8000 和 2.5mol/L NaCl;IPTG 和 Xgal 购自宝生物工程(大连)有限公司。其它化学试剂均为分析纯,购自北京化学试剂公司。

1.1.4 酶标仪 Model 550 型,Bio-Rad 公司产品。

1.2 分型噬菌体 VP1 的培养和纯化

1.2.1 VP1 的培养 将 VP1 与其宿主菌 N53 按一定比例混入 45℃ 半固体 LB,混匀后倒入含固体 LB 的平皿,置 37℃ 培养,待宿主菌被噬菌体裂解完全后加入 5mL SM 液,4℃ 溶 2h,回收 SM 液,56℃ 杀菌 30min,离心取上清。

1.2.2 VP1 的纯化 将培养好的噬菌体用 PEG8000/NaCl 沉淀液沉淀后溶于 SM,再经 CsCl₂ 梯度离心,36000r/min,4h,回收噬菌体带,测定 VP1 滴度。

1.3 噬菌体滴度的测定

VP1 与肽库噬菌体滴度的测定方法相同,将待测噬菌体稀释成不同滴度,感染宿主菌后分别铺于 90mm 平皿 37℃ 培养 8~10h。待噬斑清晰可见时,选择密度合适的平皿,计噬斑数。平皿噬斑数除以该平皿噬菌体的稀释倍数即为噬菌体的滴度。

1.4 噬菌体肽库的筛选

按 Ph.D-7™ 试剂盒(New England BioLabs)说明书操作。将纯化好的 VP1 用包被液稀释后取 100μL 包被酶联板 4℃ 过夜,3 轮所用 VP1 的滴度分别为 2×10^{11} pfu、 2×10^{10} pfu 和 2×10^9 pfu。TBST 洗涤 3 次,3% BSA 封闭 4℃ 过夜,TBST 洗涤 6 次,每孔加入用 TBS 稀释的肽库 100μL(滴度 2×10^{11} pfu/mL),37℃ 缓慢震荡 1h,未结合的噬菌体测滴度(投入)后用 TBST 洗涤 10 次,第 10 次洗涤后再测滴度(洗涤),结合的噬菌体用 100μL 洗脱液 37℃ 洗脱 10min,15μL 中和液中和洗脱液。洗脱下的噬菌体(产出)测滴度后,将其余洗脱液加入 20mL 含 *Escherichia coli* ER2738 的 LB 培养液中($OD_{600} \approx 0.5$),37℃ 250r/min 震荡 4.5h,4℃ 离心 10min(10000r/min)取上清,加入 20% 体积的 PEG8000/NaCl 沉淀液,冰浴 1h,4℃ 离心 15min(10000r/min),沉淀经 TBS 溶解即为扩增的噬菌体,测其滴度,用于下一轮筛选。

1.5 富集效果检测

采用投入产出比和假阳性率。投入产出比 = 产出的滴度(TU)/投入的滴度(TU),假阳性率 = 最后一次洗涤的滴度(TU)/产出的滴度(TU)。

1.6 特异克隆的鉴定

1.6.1 噬菌体原种的制备 将第 3 轮筛选获得的噬菌体经滴度测定并稀释后取 10μL 加入过夜培养的 *E. coli* ER2738 中,摇匀后在室温下静止 15min,转入含 3mL 顶层琼脂的试管中,混匀后倒入 LB/IPTG/Xgal 平皿,37℃ 培养 12h,随机挑取独立的蓝色噬斑共 360 个。按筛选噬菌体随机肽库中的方法,分别扩增并纯化单个噬菌体克隆,制备成噬菌体原种。

1.6.2 ELISA 法 VP1 用包被液稀释成 2×10^9 ,100μL/孔包被过夜,TBST 洗涤 3 次,3% BSA 封闭,依次加肽库噬菌体克隆、HRP-M13 单克隆抗体,每次都用 TBST 洗涤 3 次,邻苯二氨(OPD)显色,2mol/L H₂SO₄ 终止,酶标仪测 OD_{490} 值。用原始肽库包被作为阴性对照。按测试样品 OD 值与参考阴性 OD 值的比值(P/N) ≥ 2.0 判为阳性。

1.6.3 噬菌体感染钝化实验^[4] 取 ELISA 检测阳性噬菌体原种与 VP1 混合 37℃ 作用 1h,阴性对照为 SM + VP1,测定混合物中 VP1 的滴度。当 VP1 的受体结合部位不被封闭时,其转染率为 100%,如果噬菌体原种与 VP1 发生不可逆结合,则 VP1 再不能够感染宿主菌,此时测得的 VP1 的滴度将会下降,既 VP1 转染宿主菌的转染率下降。

1.7 DNA 序列的测定和分析

噬菌体原种 ssDNA 的提取 取钝化实验阳性噬菌体原种,同时随机挑取 4 个钝化实验阴性而 ELISA 检测强阳性的噬菌体原种,按参考文献[5]提取 ssDNA。由上海牛丁生物工程技术有限公司测序,测

序引物为 5'-^{HO}CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'。

2 结果

2.1 筛选富集效果检测

经 3 轮筛选,噬菌体的投入产出比逐轮上升,而假阳性率有所下降。说明筛选中所获得的特异性噬菌体克隆有较高程度的富集,第 3 轮噬菌体的投入产出比第 1 轮高 140 多倍(表 1)。

表 1 筛选的投入产出比与假阳性率

筛选轮次	噬菌体滴度(PFU/mL)				
	投入	洗涤	产出	投入产出比	假阳性率
1	1.9 × 10 ¹¹	2.6 × 10 ³	1.6 × 10 ⁴	8.4 × 10 ⁻⁸	1.6 × 10 ⁻¹
2	2.4 × 10 ¹¹	2.2 × 10 ³	8.6 × 10 ⁴	3.6 × 10 ⁻⁷	5.4 × 10 ⁻²
3	1.7 × 10 ¹¹	6.9 × 10 ³	2.0 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁻⁵	2.3 × 10 ⁻²

2.2 特异性克隆的鉴定

从第 3 轮筛选后共随机挑取独立的 360 个单克隆噬菌体扩增,ELISA 检测其与 VP1 的特异性结合,其中 312 个克隆(86.7%)经 ELISA 检测为阳性。取 ELISA 阳性克隆原种与 VP1 做钝化实验,其中一个噬菌体克隆(p245)钝化实验阳性。如图 1 所示,VP1 + p55 与 VP1 + p245 转染率的比较,P < 0.01,两者差异显著。

2.3 DNA 序列分析

取钝化实验阳性噬菌体克隆(p245),随机选取 4 个钝化实验阴性、ELISA 检测阳性的克隆原种进行展示肽 DNA 序列的测定(表 2)。测序结果中存在 3 种展示肽序列形式。p245 和其它所测定的展示肽序列有所不同。

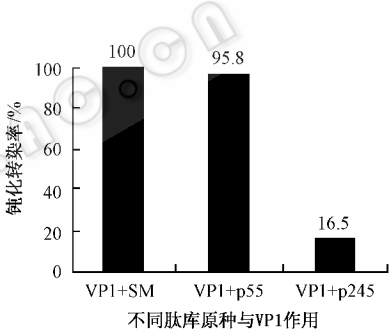


图 1 不同肽库原种对 VP1 的钝化转染率
VP1 + SM 对照;VP1 + p55 ELISA 检测阳性,钝化实验阴性;VP1 + p245 ELISA 检测阳性,钝化实验阳性。

表 2 肽库克隆的展示肽序列和推导的相应氨基酸序列

肽库克隆	展示肽序列	推导的相应氨基酸序列
p245	CTT CAG CAG AAA CAT CTG CTG	LeuGlnGlnLysHisLeuLeu
p40	CAA CTT ATA ATG ATA AGA CAT	GlnLeulleMetIleArgHis
p55	CAA CTT ATA ATG ATA AGA CAT	GlnLeulleMetIleArgHis
p69	ATC ACT CCG CGT AAC AGG AGC	IleThrProArgAsnArgSer
p247	ATC ACT CCG CGT AAC AGG AGC	IleThrProArgAsnArgSer

3 讨论

噬菌体-生物分型将埃尔托型霍乱弧菌分成具有流行潜力和致病能力的流行株以及不具有流行潜力的非流行株。研究分型噬菌体的受体表位相关多肽,以及噬菌体和受体表位的结合特性,对进一步从

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

分子水平揭示噬菌体-生物分型的机理提供参考。

噬菌体感染细菌过程的第一个关键步骤是噬菌体与被感染细菌表面的受体结合,这种结合导致噬菌体吸附在细菌表面,最终导致噬菌体的繁殖和复制。吸附分为两个过程:第一过程是可逆吸附,第二过程是不可逆吸附。只有当发生不可逆吸附,噬菌体才能继续感染该细菌。研究表明,霍乱弧菌的 5 株分型噬菌体其受体有所不同,VP1 的受体是菌细胞的外膜蛋白,VP1 为无尾噬菌体,它感染细菌的过程与ΦX174 类似,首先以 2~3 个刺突吸附于细菌的外膜蛋白上,形成不可逆的吸附,然后将 DNA 注入细菌。

研究受体表位的方法很多,各种方法都有一定的局限。噬菌体肽库技术可以提供大量的含有各种不同序列的短肽,从噬菌体肽库中不仅能获得目的短肽的模拟表位(Minotope),而且这些模拟表位不必完全类同于天然抗原也具有免疫原性和结合特性。Wu 等^[6]用肉毒杆菌神经毒素(BTx-A)的单克隆抗体筛选噬菌体随机肽库,获得了针对 BTx-A 的抗原表位 Asp-Pro-Leu,据此合成的短肽免疫小鼠后可刺激产生明显的抗 BTx-A 的免疫反应;Luo 等^[7]用人肌细胞乙酰胆碱受体(AchR)的单抗 MAb192 筛选噬菌体多肽库,获得模拟 AchR 的噬菌体表位 MG15, MG15 能够选择性封阻 MAb192 与 AchR 的结合。上述结果表明用多抗直接筛选随机肽库是获得功能表位的有效策略。本研究采用该技术路线,尝试用霍乱弧菌分型噬菌体 VP1 筛选随机 7 肽库,经 3 轮筛选后,肽库噬菌体的投入产出比明显提高,而假阳性率下降,说明与 VP1 有高亲和性的肽库噬菌体得以富集。ELISA 检测表明,86.7%(312/360)的肽库噬菌体克隆能够与 VP1 特异性结合,在 312 个 ELISA 检测阳性的噬菌体克隆中,有一个克隆子(p245)能够在钝化实验中封闭 VP1 的受体结合部位,竞争其与霍乱弧菌受体的结合,从而导致不可逆的结合,阻止 VP1 对霍乱弧菌的转染。通过对亲和筛选获得的短肽进行序列分析,发现富集后的肽库中存在至少 3 种序列不同的短肽,有些展示肽虽然模拟了 VP1 的受体表位,但仅是与 VP1 可逆地结合(如和 VP1 头部结合),而 p245 模拟的展示肽在 VP1 转染霍乱弧菌中起重要作用的表位肽。这种能够阻止 VP1 再感染的模拟表位肽可能还有其它形式,本研究中 p245 模拟的展示肽是其中的一种。通过对分型噬菌体受体表位的筛选,为进一步确定这些表位的结构,探讨分型噬菌体对霍乱菌的裂解机理奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985 **228**:1315~1317.
- [2] Atwell S, Ultsch M, De Vos AM, *et al.* Structural plasticity in a remodeled protein-protein interface. *Science*, 1997 **278**:1125~1128.
- [3] Smith G P. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Method in Enzymology*.1993 **217**:228~257.
- [4] 李燕萍, 阚 飙, 祁国明, 等. 噬菌体感染钝化实验研究埃托型霍乱弧菌分型噬菌体 VP4 的受体. 中国预防医学杂志 2001 **2**(Suppl):334~336.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 佛里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993. 220.
- [6] Wu H C, Yeh C T, Huang Y L, *et al.* Characterization of neutralizing antibodies and identification of neutralizing epitope mimics on the Clostridium botulinum neurotoxin type A. *Appl Environ Microbiol*, 2001 **67**(7):3201~3207.
- [7] Luo G X, Victor K, Chong K, *et al.* Identification of a peptide that protects the human acetylcholine receptor against antigenic modulation. *J Immunol Methods*, 2001 **251**:177~186.

Screening for the Peptides Blocking Cholera Phage VP1 Transfection to Host Cell by Phage Random Amino Acid Peptide Library

Wang Duochun Kan Biao* Gao Shouyi Liu Yanqing

(The Key Laboratory of Medical Molecular Bacteriology of the Ministry of Health, Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: Use *Vibrio cholerae* El Tor Typing Phage VP1 as ligand to screen phage-display random 7 amino acid peptide library, ELISA and inactivation experiment were used to identify positive clone. The ratio of output to input was increased after three rounds of screening. Pseudo-positive was decreased stepwise. It indicated the efficient enrichment. After three rounds of screening, 312 out of 360 phage clones were positive in ELISA, 1 clone shows blocking VP1 adsorbs to *Vibrio cholerae* by inactivation experiment. Sequencing result indicate that amino acid sequences are p245: LeuGlnGlnLysHisLeuLeu; p40, p55: GlnLeulleMetlleArgHis; p69, p274 IleThrProArgAsnArgSer. Getting some peptides can mimick the VP1 receptor epitopes, one peptide can block VP1 transfection to host cell, it was a clue to study receptor's structure and phage infectious mechanism to host cell.

Key words: Phage random peptide library, Typing Phage, Inactivation experiment

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA215191-2)

* Corresponding author. Tel 86-10-61739458 Fax 86-10-61730233; E-mail biaoan@hotmail.com

Received date: 09-26-2002

2004 年《菌物系统》更名为《菌物学报》 欢迎投稿和订阅

《菌物系统》(MYCOSYSTEMA)的前身为《真菌学报》,是我国菌物学(真菌、粘菌、卵菌)领域高级学术期刊,专门报道该领域的最新研究进展和具创造性或较高学术水平的论文和简报。该刊已在国内外学术界享有较高的声誉,对繁荣和发展我国菌物科学并与国际接轨作出了积极贡献。

《菌物系统》是一个国际性的学术刊物,其编辑委员会是由国内外著名真菌学家所组成,是国际真菌学界信赖的刊物之一。已被国际上著名的检索刊物收录,即:CA(美国“化学文摘”);Abstracts of Mycology(美国“真菌学文摘”);Index of Fungi(英国“菌物索引”);Review of Plant Pathology(英国“植物病理学文摘”);Bibliography of Systematic Mycology(英国“系统真菌学文献目录”);Bibliographie der Pflanzenschutz-literatur(德国“植物保护文献目录”);Dictionary of the Fungi(英国“真菌学字典”);中国科技信息研究所数据库(CJCR);中科院文献情报中心《中国科学引文数据库》(CSCI);《中国学术期刊文摘》;《中国农业文摘》;《中国生物学文摘》;《中国药学文摘》;北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》等。

《菌物系统》近年来国际影响不断扩大,涉及本学科的研究领域也大大拓宽,经主办单位和《菌物系统》编辑委员会研究并上报主管部门批准自 2004 年始将原刊名更名为《菌物学报》。望广大读者注意订阅。当地邮局订阅或直接与编辑部联系。

邮发代号 2-499 全年定价 160 元

地址 100080 北京海淀中关村中科院微生物所内

电话 (010) 62555146 e-mail: jwxt@sun.im.ac.cn http://www.im.ac.cn/journals