

以表位模拟肽为亲和靶标的肉毒毒素受体 结合抑制剂的筛选及鉴定

史 晶,王 慧*, 蒯 俊,侯晓军

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

摘 要 :以设计合成的 A 型肉毒毒素表位模拟肽为亲和靶标,对噬菌体随机肽库进行筛选,寻找能与 A 型肉毒毒素表位模拟肽特异结合并能拮抗毒素毒性效应的分子,通过 ELISA 鉴定阳性克隆,并对鉴定的阳性克隆进行特异性分析及 DNA 测序。氨基酸序列同源性分析发现,针对 P4、P5 表位模拟肽获得了两条特异的结合序列,并通过动物保护实验在噬菌体展示肽水平对特异结合分子的毒素毒性拮抗效应进行了初步研究,初步证明结合肽对 A 型肉毒毒素有一定的保护作用。

关键词 :A 型肉毒毒素;表位;噬菌体;肽文库

中图分类号 :Q81 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)01-0136-03

肉毒毒素(BotNT)是由肉毒梭状芽孢杆菌在厌氧环境中产生的外毒素,能引起严重的弛缓性的神经麻痹^[1]。临床研究表明,在肉毒毒素的 7 个血清型(A~G)中,A 型肉毒毒素可以产生更严重的症状和导致更高的死亡率。目前抗毒素是肉毒中毒临床急救治疗最有效的手段,但现用的抗肉毒马血清存在副作用大等许多问题^[2]。因此肉毒毒素治疗药物已经从传统制备马血清抗毒素转向新型基因工程拮抗药物的研究^[3-6]。其是否能有效地中和生物毒素,取决于它结合生物毒素中和表位的能力。结构功能研究表明,肉毒毒素重链 C 端(BotNTaHc)是毒素的保护性抗原^[7,8]。P4、P5 是我们运用生物信息学结合 A 型肉毒毒素三维晶体结构并通过体内外免疫学实验筛选鉴定获得的 2 条 A 型肉毒毒素的表位模拟肽^[9]。本研究在表位模拟肽筛选鉴定的基础上,以表位模拟肽为亲和靶标进行肽库的筛选,获得特异性拮抗毒素的基因序列,并通过动物保护实验在噬菌体展示肽水平对特异结合分子的毒素毒性拮抗效应进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

噬菌体随机展示 12 肽库(库容 2.1×10^{11} pfu/mL)购自 New England Biolabs 公司,受体菌 ER2738 和 HRP-抗 M13 单抗为 Pharmacia 产品,BSA(牛血清白蛋白组分 V)为 GIBCO 公司产品。表位模拟肽(P4、P5),由北京 301 医院多肽合成室合成并纯化,纯度 > 85%。实验动物:Balb/c 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心。

1.2 以表位模拟肽为亲和靶标进行肽库筛选

采用亲和富集法,以每孔 $50 \mu\text{g}$ 的表位肽(溶于 0.1 mol/L pH8.6 NaHCO_3) 4°C 过夜包被酶标板,弃包被液,加满封闭液(0.1 mol/L , pH8.6 的 NaHCO_3 , 3% BSA), 4°C 封闭 2h, 0.1%

TBST (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH7.5, 0.1% Tween20)洗板 6 次,然后加入 TBS 缓冲液稀释的肽库原液 $100 \mu\text{L}$ 后,室温缓慢振荡 1h。 0.1% TBST 缓冲液洗板 10 次,洗去未结合的噬菌体,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 洗脱液(pH2.2 0.2 mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液)室温缓慢振荡 10min 洗脱结合于固相化表位肽的噬菌体,加入约 $15 \mu\text{L}$ 中和液(pH9.1, 1 mol/L Tris-HCl)中和洗脱液。以此侵染宿主菌 ER2738,测定滴度、扩增,用于下一轮的筛选。共进行 4 轮筛选,在筛选过程中逐轮增加洗脱压力。

1.3 噬菌体结合子结合活性分析

1.3.1 ELISA 鉴定噬菌体克隆的结合活性 : $10 \mu\text{g}/\text{孔}$ 表位肽(pH8.6 0.1 mol/L NaHCO_3 $150 \mu\text{L}$)包被酶联板, 4°C 孵育过夜。3% BSA 4°C 封闭 2h,用 TBST(0.05% Tween20)洗板 6 次。将扩增的噬菌体上清各 $200 \mu\text{L}$ 分别加入孔中,同时设空白对照和 BSA 包被的阴性对照及 A 型肉毒毒素类毒素为阳性对照,室温下作用 2h, 0.05% TBST 洗板 6 次,每孔中加入 HRP-抗 M13 单抗 $100 \mu\text{L}$ ($1:5000$ 稀释), 37°C 孵育 1h, 0.05% TBST 洗板 6 次,加入底物,室温显色 3~5min,用 2 mol/L 硫酸终止反应。 OD_{450} 观察结果,并记录筛选出的阳性克隆数。

1.3.2 ELISA 鉴定噬菌体克隆的特异性 :从筛选获得的噬菌体克隆中,分别选择 3 个 OD_{450} 较高的克隆进行结合特异性的鉴定。 $10 \mu\text{g}/\text{孔}$,分别用 A 型肉毒毒素类毒素、破伤风毒素类毒素包被酶联板,ELISA 检测克隆的结合活性。

1.4 阳性噬菌体克隆插入肽段的 PCR 扩增及测序

根据基因序列设计引物,上游引物 5'-GCAATTCCTTTA GTGGTACC-3';下游引物 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'。引物由博亚公司合成。以阳性噬菌体克隆培养上清为模板进行 PCR, $50 \mu\text{L}$ 反应体系经 95°C 预变性 5min,再按 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 50s,共 30 个循环,最后 72°C 延伸 7min。扩增

基金项目:国家自然科学基金(30470102)

* 通讯作者。Tel 86-10-66948532 E-mail :gen0109@vip.sina.com

作者简介:史 晶(1979-),男,山西太原人,博士研究生,研究方向为分子微生物学。E-mail :sjshijing@126.com

收稿日期 2005-06-20 接受日期 2005-07-18,修回日期 2005-08-03

产物进行琼脂糖凝胶电泳,以标准分子质量 DL2000(TaKaRa)确定产物大小。以 PCR 产物为模板进行测序,96g III 为测序引物。DNA 测序后推导出呈现的随机肽氨基酸序列,比较其各位点氨基酸的同源程度。

1.5 噬菌体阳性克隆的体内中和活性的初步分析

Balb/c 小鼠 30 只,分为 4 组:攻毒组 10 只,以致死剂量 MLD_{100} 的 A 型肉毒毒素与生理盐水 $300\mu\text{L}$ 37°C 温育 1h,治疗组 10 只,以致死剂量 MLD_{100} 的 A 型肉毒毒素与阳性噬菌体上清 $(300\mu\text{L})$ 37°C 温育 1h;同时设立治疗对照组和无关对照组,各 5 只,治疗对照组 A 型肉毒毒素与抗肉毒马血清 37°C 温育,无关对照组 A 型肉毒毒素与无关的噬菌体上清 37°C 温育,腹腔注射动物,进行观察。

2 结果

2.1 筛选对噬菌体的富集

用设计合成的两条 A 型肉毒毒素表位模拟肽 P4、P5 为亲和靶标分别对噬菌体肽库进行了四轮筛选,记录每轮筛选中投入的噬菌体克隆数和产出克隆数,按照公式:产出率 = 产出数/投入数,计算每轮筛选获得噬菌体克隆的产出率(表 1、2),从表 1 和 2 数据可以看出,随着筛选轮数的增加,产出率逐渐增加,表明筛选实现了噬菌体克隆的富集。

表 1 噬菌体肽库对表位模拟肽 P4 富集筛选的产出率

Table 1 Affinity selection of P4-binding peptides

Rounds of screening	Phages input (pfu)	Phages output (pfu)	Yield/%
1	2.1×10^{11}	1.8×10^5	8.6×10^{-7}
2	4.6×10^{10}	2.0×10^5	4.3×10^{-6}
3	2.3×10^{10}	1.7×10^5	7.4×10^{-6}
4	1.7×10^{10}	7.6×10^5	4.5×10^{-5}

表 2 噬菌体肽库对表位模拟肽 P5 富集筛选的产出率

Table 2 Affinity selection of P5-binding peptides

Rounds of screening	Phages input (pfu)	Phages output (pfu)	Yield/%
1	2.1×10^{11}	3.2×10^5	1.5×10^{-6}
2	1.6×10^{10}	3.7×10^5	2.3×10^{-5}
3	2.4×10^{10}	2.9×10^5	1.2×10^{-5}
4	3.0×10^9	5.0×10^4	1.7×10^{-4}

2.2 噬菌体结合子结合活性分析

2.2.1 噬菌体克隆的抗原结合活性 将第 4 轮洗脱下来的噬菌体侵染宿主菌 ER2738 并铺板过夜,分别随机挑取 IPTG/Xgal 平板上 20 个噬菌斑进行噬菌体上清制备,检测其与抗原表位肽的结合活性。经 ELISA 鉴定,针对 P4 的 20 个噬菌体克隆,其中有 9 个阳性克隆(图 1-A),阳性率为 9/20,而针对 P5 的噬菌体克隆中存在 12 个阳性克隆(图 1-B),阳性率为 12/20。

2.2.2 噬菌体阳性克隆的结合特异性 选取 OD_{450} 较高的阳性克隆进行特异性鉴定(图 2),结果显示筛选获得的噬菌体阳性克隆与 A 型肉毒毒素有较强的结合($OD_{450} > 0.6$),而与破伤风类毒素略有结合($OD_{450} < 0.2$),与 BSA 基本没有结合,显示出良好的特异结合活性。

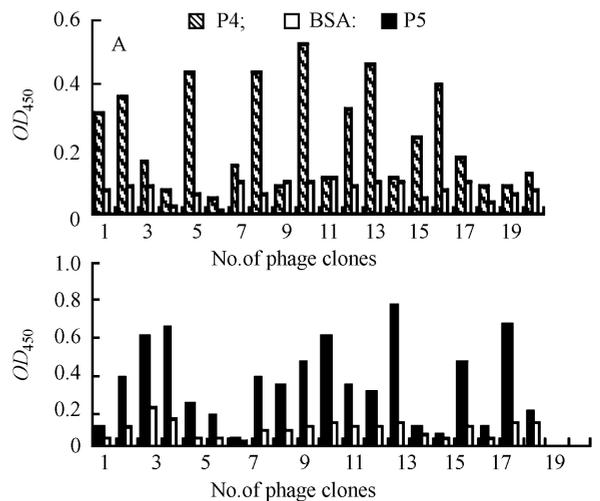


图 1 噬菌体克隆与 P4(A)和 P5(B)的结合结果

Fig. 1 The result of the binding of phage clones and P4(A) and P5(B)

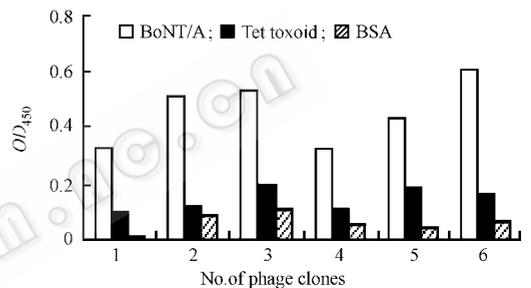


图 2 噬菌体阳性克隆鉴定

Fig. 2 Identify specific phage clones

No. 1 ~ 3: Phage clones screened with P4 as target; No. 4 ~ 5: Phage clones screened with P5 as target.

2.3 噬菌体的 DNA 序列测定及编码氨基酸序列分析

分别对鉴定的噬菌体阳性克隆进行 DNA 序列测定以推断其相应的肽序列,并对氨基酸序列同源性进行分析,结果显示针对 P4、P5 两条表位模拟肽获得两条特异的结合序列,其中针对 P4 的 9 个噬菌体阳性克隆中氨基酸序列同源性达到 66.7%(6/9),其保守残基为 Q5、P7、Q9、P11 和 K12,命名为 4ASK。而针对 P5 的噬菌体阳性克隆的氨基酸序列同源性为 75%(9/12),其保守残基为 T1、S3、S8 和 S11,命名为 5ATV。

2.4 噬菌体阳性克隆体内中和活性实验结果的初步分析

攻毒组 10 只,12h 内存活 4 只,24h 内全部死亡,治疗组 10 只,12h 内全部存活,24h 内存活 4 只,48h 存活 1 只,而后死亡,治疗组小鼠平均死亡时间长于攻毒组动物,延缓死亡时间达 10h。而抗肉毒马血清可以完全中和毒素活性,小鼠全部存活,无关对照组没有保护作用,12h 内全部死亡。初步实验结果显示筛选获得的噬菌体阳性克隆对 A 型肉毒毒素有一定的保护作用。

3 讨论

肉毒毒素(BoNT)具有强的神经毒性,其中毒剂量小,发病潜伏期短,所导致的高死亡率为食物中毒之首。结构研究表明,重链是结合神经细胞的毒素受体,是毒素结合和进入细胞必需的。体内外的研究证实,肉毒毒素重链 C 端约

50kDa (BoNTaHc) 是毒素的保护性抗原^[7,8]。目前针对肉毒毒素防治药物的研究都是围绕这个区域展开的。我们在前期的工作中建立了基于生物信息学的表位绘图及优势表位鉴定技术平台,并且成功运用生物信息学技术对 BoNTaHc 进行分析,结合表位形成相关性质(二级结构、表面可及性、亲水性及片段的可活动性)及 BoNT/A 三维晶体结构,通过主被动免疫实验鉴定获得了 A 型肉毒毒素的部分优势表位模拟肽^[9]。

在本项研究中我们以设计合成的表位模拟肽为亲和靶标,通过噬菌体肽库的筛选,希望能够获得针对中和表位的特异性高亲和力小分子拮抗毒素基因。筛选结果显示,针对 P4、P5 的筛选的克隆有较高的阳性率(9/20、12/20),阳性克隆 DNA 测序分析,结果显示针对 P4、P5 两条表位模拟肽获得两条特异的结合序列,其中针对 P4 筛选获得的噬菌体阳性克隆的氨基酸序列同源性较高,达到 66.7%(6/9),存在保守性氨基酸残基为 Q5、P7、Q9、P11 和 K12,命名为 4ASK。而针对 P5 的噬菌体阳性克隆的氨基酸序列同源性为 75%(9/12),其保守氨基酸残基为 T1、S3、S8 和 S11,命名为 5ATV。表位模拟肽筛选阳性克隆的序列同源性较高,一方面表明通过筛选阳性克隆达到有效的富集,一方面也可以推测表位模拟肽各含有 1 个表位。对 4ASK 和 5ATV 的氨基酸序列分析,发现 4ASK 为极性分子,推测其相互结合作用是通过与 P4 表面高暴露的极性集团的相互作用;5ATV 的疏水性使其易与结合表位模拟肽 P5 的非极性集团。对特异的噬菌体阳性克隆进行体内中和活性实验,初步分析发现,筛选获得的阳性克隆对 A 型肉毒毒素有一定的保护作用,但是不能提供完全的保护作用,推测可能因为单个结合肽对于单个表位的封闭不完全,一个位点的封闭不能达到完全保护^[10]。对于本研究得到的克隆序列与表位模拟肽的精确作用模式,还需要进一步的实验阐明,目前正在进行结合肽的修饰与合成,下一步工作将进行多肽体外竞争肉毒毒素抗血清及体内抑制毒素毒性的剂量效应研究,在这个工作基础上对 4ASK 和 5ATV 进行配伍和叠加分析,以此来验证多表位封闭的保护作用。

Screening of Botulinum Neurotoxin type A-binding peptides by phage display peptide library

SHI Jing, WANG Hui*, YIN Jun, HOU Xiao-jun

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: To seek effective inhibitor against BoNT/A, in this study, BoNT/A-binding peptides were screened from phage display peptide library using synthesized and identified mimicry peptides that contained antigenic epitopes as targets. According to the homology of the amino acid sequences of displayed peptides, most had same motifs respectively. ELISA assay confirmed that identified positive clones respectively against P4 and P5 could specifically bind BoNT/A. The mice assay showed the specific BoNT/A-binding peptides could partially protect against challenge of BoNT/A. The results from the study may aid in the future identification of more potent small molecule inhibitors against BoNT/A.

Keywords: Botulinum neurotoxin type A; Epitope; Bacteriophages; Peptide library

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation(30470102)

* Corresponding author. Tel 86-10-66948532; E-mail: geno0109@vip.sina.com

Received: 20 June 2005/Accepted: 18 July 2005/Revised: 3 August 2005

参 考 文 献

- [1] Atassi MZ, Oshima M. Structure, activity, and immune (T and B cell) recognition of botulinum neurotoxins. *Crit Rev Immunol*, 1999, **19**(3): 219–260.
- [2] Peter A, Cindy W, Steven CH, et al. Molecular characterization of murine humoral immune response to botulinum neurotoxin type A binding domain as assessed by using phage antibody libraries. *Infect Immun*, 1997, **65**(9): 3743–3752.
- [3] Andrade EV, Albuquerque FC, Moraes LM, et al. Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG I tag: construction, Pichia pastoris expression and antigen binding characterization. *J Biochem (Tokyo)*, 2000, **128**(6): 891–895.
- [4] Emanuel PA, Dang J, Gebhardt JS, et al. Recombinant antibodies: a new reagent for biological agent detection. *Biosens Bioelectron*, 2000, **14**(10): 751–759.
- [5] Pless DD, Torres ER, Reinke EK, et al. High-affinity, protective antibodies to the binding domain of botulinum neurotoxin type A. *Infect Immun*, 2001, **69**(1): 570–574.
- [6] Amersdorfer P, Wong C, Smith T, et al. Genetic and immunological comparison of anti-botulinum type A antibodies from immune and non-immune human phage libraries. *Vaccine*, 2002, **20**(11): 1640–1648.
- [7] Dertzbaugh MT, West MW. Mapping of protective and cross-reactive domains of the type A neurotoxin of *Clostridium botulinum*. *Vaccine*, 1996, **14**(16): 1538–1544.
- [8] Clayton MA, Clayton JM, Brown DR, et al. Protective vaccination with a recombinant fragment of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1995, **63**(4): 2738–2742.
- [9] 史晶, 荫俊, 王慧. A型肉毒毒素 Hc 片段 B 细胞表位预测. *生命科学研究*, 2004, **2**(2): 139–142.
- [10] Mullaney BP, Pallavicini MG. Epitope mapping of neutralizing botulinum neurotoxin A antibodies by display. *Infection and Immunity*, 2001, **69**(10): 6511–6514.