

## Ni<sup>2+</sup> 高效结合肽的筛选与作用研究

易卓林, 佟 鑫, 马春燕, 黄敬双, 茆灿泉\*

(西南交通大学生物工程学院 成都 610031)

**摘 要** 利用噬菌体随机十二肽库和金属亲和层析对重金属 Ni<sup>2+</sup> 进行结合肽筛选。经 4 轮生物淘洗、噬菌体扩增和 DNA 测序, 获得一组多肽序列。GenBank Blast 分析未发现同源序列, Clustal W 多重序列比对也未找到 Ni<sup>2+</sup> 金属结合肽结合基序, 但可能含有多聚组氨酸 (His)<sub>3-5</sub>。噬菌体单克隆金属离子螯合树脂的亲和力测定和反筛、抑菌解毒试验表明: 展示有金属结合肽的噬菌体不仅对 Ni<sup>2+</sup> 具有高亲和力, 而且对其它金属离子也有作用。Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 等金属离子对金属结合肽的亲和力显著高于 Cd<sup>2+</sup> 和 Cr<sup>2+</sup>, 展示金属结合肽的噬菌体对重金属 Ni<sup>2+</sup> 具有一定的耐受和解毒作用。显微形态学观察也显示金属结合肽与金属螯合树脂的作用。对于了解重金属与多肽的相互作用机理以及环境重金属修复等均具有重要意义和价值。

**关键词**: 金属结合肽, 噬菌体展示技术, 亲和层析, 筛选

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)05-0745-04

重金属元素如 Hg、Cd、Pb、Cr、As 等通常对生物有较高毒性, 甚至某些生物所必需的痕量元素如 Cu、Zn、Ni 等在较高浓度时也能对生物体产生明显的毒性效应。研究发现, 在多种微生物、动物和植物细胞内普遍存在对金属离子具有亲和能力的多肽或蛋白质。目前国内外有许多关于金属结合多肽(蛋白质)的研究报道<sup>[1-3]</sup>, 但主要是集中在自然界原有的多肽(蛋白质), 如植物螯合素(PCs)和金属硫蛋白(MTs)等<sup>[4-6]</sup>, 关于筛选得到的金属结合多肽的专门报道则相对较少。本研究利用噬菌体随机十二肽库筛选并研究 Ni<sup>2+</sup> 高效金属结合肽对重金属的结合和解毒作用, 对于环境重金属的生物修复以及金属-多肽相互作用机理研究等均具有重要意义和价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 树脂和菌株**: Ni-NTA Agarose 树脂, 美国 Invitrogen 公司; Hitrap Chelating Sepharose 树脂, 美国 Pharmacia Biotech 公司; 噬菌体随机十二肽库: 滴度  $1.5 \times 10^{13}$  pfu/mL, 宿主细菌 *E. coli* ER2738 (F'*lacI'* Δ(*lacZ*)M15 *proA*<sup>+</sup> *B*<sup>+</sup> /*zzf*: :Tn10(*Tet*<sup>R</sup>)/*fluA2 supE thi* Δ(*lac-proAB*) Δ(*hsdMS-mcrB*)5 (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup> *m<sub>k</sub>*<sup>-</sup>)

*McrBC*<sup>-</sup>), New England Biolabs (Cat. 8110) 公司。

**1.1.2 试剂和仪器**: 蛋白胨、酵母提取物: OXOID Ltd; PEG8000: AMRESCO 分装; 其它化学试剂: 分析纯以上或能购买的最高级。

### 1.2 树脂处理

**1.2.1 Ni-NTA Agarose 处理**: 吸取等体积 20% 乙醇悬浮的 Ni-NTA Agarose 树脂, 分装于两支离心管中, 用 TBS (150mmol/L Tris·Cl, 150mmol/L NaCl) 洗树脂两遍, 在一支离心管中加入 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 洗两次, 去除 Ni<sup>2+</sup> (树脂由蓝色变为无色), 再用 0.1% TBS (TBS 0.1% Tween-20) 洗 3 次, 最后加入等体积的 0.1% TBST 混匀、分装为 100μL/管 4℃ 保存。EDTA 处理和未处理的树脂分别命名为 M<sup>-</sup> 和 M<sup>+</sup>, M 表示 Ni<sup>2+</sup>。

**1.2.2 Hitrap Chelating Sepharose 处理**: 方法与 Ni-NTA 树脂处理相似, 不同的是前者未加载金属离子。吸取等体积, 分别加载足够量和浓度的各种重金属离子 (Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>), 离心, TBS 和 0.1% TBST 洗涤, 分装和 4℃ 保存。加载重金属离子记为 M<sup>+</sup>, 未加载为 M<sup>-</sup>, 各种重金属化合物均在分析纯以上纯度。

### 1.3 噬菌体随机十二肽库

噬菌体的培养、滴度测定、扩增以及 DNA 单链模板制备见 Biolab Phage 12-peptide Library 手册<sup>△</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金(30270041); 西南交通大学科学研究基金(2005B17); 国家中医药局(04-05ZL19) 立项

\* 通讯作者。Tel 86-28-87634296; Fax 86-28-87600185; E-mail: maocq@swjtu.edu.cn

作者简介: 易卓林(1982-) 男, 成都人, 硕士研究生, 研究方向为生物文库与分子进化。E-mail: yiqinxu@163.com。佟鑫同为第一作者。

其他作者: 除 柳, 谢明德

收稿日期: 2005-12-19; 接受日期: 2006-03-15; 修回日期: 2006-06-19

△ Ph. D. - 12 Phage display peptide library kit. instruction manual, New England Biolabs, version 2.7

### 1.4 Ni<sup>2+</sup> 金属结合肽的噬菌体随机肽库筛选

取 M<sup>+</sup>、M<sup>-</sup> 树脂 Ep 管各一支,加入 BSA, 25℃、150r/min 振荡培养 1h, 2000r/min 离心 20s, 弃上清, 加入  $5 \times 10^{10}$  pfu 的噬菌体随机十二肽库, 25℃、150r/min 振荡培养 1h, 离心, 弃上清, 依次用 0.1% TBST 洗 2 遍, 20mmol/L IID (咪唑) 洗 2 遍, 0.1% TBST 洗 5 遍, 最后用 200mmol/L ID, 25℃、200r/min 洗脱 10min, 重复一次, 合并两次洗脱液 (600 $\mu$ L), 用于噬菌体滴度测定和扩增, 计算噬菌体滴度和 P/N 值, 进入下一轮筛选。共 4 轮。P/N 值 = 金属离子螯合树脂噬菌体洗脱滴度/未加载金属离子螯合树脂的噬菌体洗脱滴度。

### 1.5 金属结合肽对金属螯合树脂的亲和力测定

方法与步骤 1.4 相似, 不同的是加入到金属螯合树脂中的是经扩增展示有金属结合肽的噬菌体克隆。滴度和 P/N 值测定与前同。

### 1.6 序列测定

制备噬菌体单链 DNA 模板, 送交上海博亚生物技术有限公司 3730 DNA 自动测序仪测定。

### 1.7 序列分析

采用 EBI 的 CLUSTAL W (1.82) 进行多重序列比对, 序列查询采用 NCBI 的 Blast 分析。

### 1.8 金属结合肽的抑菌解毒实验

预实验确定噬菌体稀释倍数, 使在 LB 平板上噬菌体克隆数在 500 ~ 1000 之间, 制备噬菌体培养 LB 平板, 加入预先打孔和高压灭菌的滤纸圆片 (每平板 3 个滤纸片 (13mm)), 在滤纸片上滴加 10 $\mu$ L 一定浓度 (Ni: 250, 500, 750mmol/L; Cd: 100, 200, 500mmol/L) 的重金属离子, 10min 后倒置过夜培养 ( $\geq 10$ h), 测定抑菌圈直径, 确定抑菌能力大小。抑菌能力 ( $S_n$ ) =  $D_n$  (抑菌圈直径) -  $D_0$  (滤纸片直径),  $n$  噬菌体的克隆号。

### 1.9 金属结合肽树脂的显微镜观察

载玻片上滴加 50 $\mu$ L 待观察的树脂和/或树脂-噬菌体, 铺匀, 盖上盖玻片, 防止气泡产生, 调节倒置显微镜至合适放大倍数, 照相记录。

## 2 结果

### 2.1 噬菌体重金属结合肽富集筛选

对噬菌体随机十二肽库共进行了 6 轮的 Ni<sup>2+</sup> 噬菌体结合肽筛选 (图 1)。可见噬菌体克隆呈现极强的富集能力, 在第二轮 P/N 值即达到 8000 倍。并且从第一轮 1.4 倍剧增到第四轮的 49700 倍。

### 2.2 噬菌体单克隆测序

分别挑取各轮噬菌体单克隆, 经扩增、制得单链

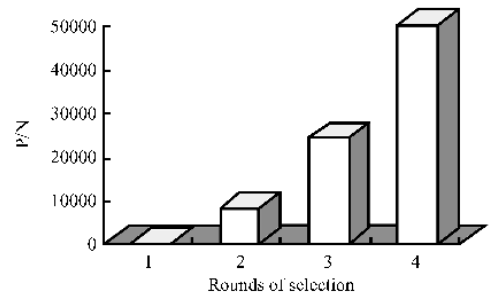


图 1 噬菌体随机十二肽库的 Ni<sup>2+</sup> 结合肽筛选

Fig. 1 Enrichment of phage during heavy metal binding-peptide screening.

DNA 琼脂糖凝胶电泳鉴定, DNA 测序, 获得的 DNA 序列翻译为氨基酸序列的结果见表 1。

表 1 Ni<sup>2+</sup> 结合肽序列

Clone Number	Sequence	Round
C1	MRLPHHHHYQIT	3
C2	HFKSHHTHAPPV	3
C3	HTHHTHKHTHTAP	4
C4	HRDSPHHHPPS	4
C5	HASNRVHHHHLV	2

### 2.3 多重序列比对与生物信息分析

对获得的 Ni<sup>2+</sup> 结合肽序列进行 NCBI 的 GenBank blast 搜寻, 未发现任何生物体存在的同源序列, Clustal W 多重序列比对所获得序列结果为: *HFKSHHTHAPPV*; *H-RDSPHHHPPS*; *HTHHTHKHTHTAP*; *MRLPHHHHYQIT*; *HASNRVHHHHLV*。未发现模体序列, 但显示了特征序列中多聚 His 的特性。

### 2.4 金属结合肽的亲和测定

展示有金属结合肽的各噬菌体单克隆, 在分别扩增后, 对不同重金属 (Ni, Cd, Co, Cu, Cr, Zn) 离子螯合的树脂分别测定 P/N 值 (图 2)。

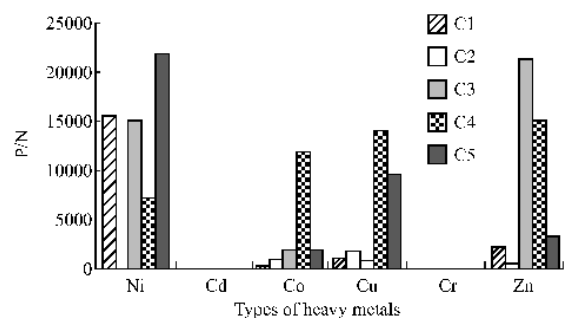


图 2 金属结合肽对不同重金属离子的亲和力

Fig. 2 Affinities of metal binding-peptide displayed phages for heavy metals.

### 2.5 金属结合肽抑菌解毒试验

将 5 个噬菌体单克隆 C1-5 和阴性对照 M13 噬菌体、宿主菌 ER2738 分别在不同浓度的重金属 Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> 处理下培养, 分别测得其抑菌圈直径  $D_n$  值, 计算抑菌能力大小 (表 2)。

表 2 金属结合肽对重金属抑菌的解毒作用

Table 2 Detoxification of heavy metals for ER2738 by metal-binding peptides

Metal concentration	Clone Number							Si (mm)
	C1	C2	C3	C4	C5	M13	ER2738	
250 mmol/L Ni	0	2.7	0.7	2.5	1	2.5	4	
500 mmol/L Ni	2.7	5.7	3.2	5.2	5.5	6.7	8.5	
750 mmol/L Ni	5	6	4.7	7.5	7.5	8.2	10.5	
100 mmol/L Cd	3	1	3.7	2.5	2	1.7	5.5	
200 mmol/L Cd	4	4.5	5.5	3.5	4.7	5.7	12	
500 mmol/L Cd	8	7	10	9	10	11.5	16.5	

## 2.6 金属结合肽-树脂的显微镜观察

阴性对照 M13 噬菌体与 Ni-NTA 树脂混合物、空白对照 Ni-NTA 树脂、展示有金属结合肽的噬菌体

克隆 C5 与 Ni-NTA 树脂混合物在显微镜下的形态见图 3, 可见结合了金属结合肽噬菌体的树脂与空白树脂相比粘稠性降低, 树脂更分散。

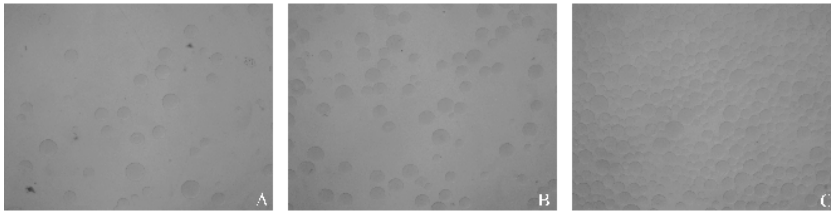


图 3 噬菌体-NTA 树脂的显微镜观察(40 ×)

Fig. 3 Microscope of metal-binding peptide displayed phages and Ni-NTA resins(40 ×).

A: M13-Ni-NTA Agarose; B: Phage clone C5-Ni-NTA Agarose; C: Ni-NTA Agarose.

## 3 讨论

自从 Smith 于 1985 年首次在《Science》提出噬菌体展示至今<sup>[7]</sup>, 生物文库技术, 包括噬菌体随机肽库和展示技术在内的微生物展示技术作为一种技术平台已日趋成熟。不仅在肽库构建、抗原表位筛选等方面取得巨大成功, 而且在分子间相互作用研究, 尤其是金属结合肽的研究领域也有重要的利用价值。国外较早地开展了这方面的工作, 但在金属结合肽与金属离子间的相互作用领域仍少有报道。

实验利用商品化的噬菌体随机十二肽库和金属亲和色谱技术对 Ni<sup>2+</sup> 结合肽与金属离子的结合特性进行了研究。经 4 轮生物淘洗和筛选, 噬菌体得到了高度富集, P/N 值从第二轮开始即剧增, 这与之前开展的 Co<sup>2+</sup> 结合肽筛选相类似, 但 Ni<sup>2+</sup> 的 P/N 值增加更快。共获得 5 条不同的多肽序列, 均富含 His, 每条序列含有至少 4 个 His, 以 (His)<sub>2-5</sub> 形式存在, 认为 Ni<sup>2+</sup> 与金属结合肽的结合是通过肽链上的 His 等氨基酸残基与金属离子配位结合实现的。这与 Meja're 等<sup>[8]</sup>用 Zn<sup>2+</sup> 螯合树脂从随机六肽库中通过噬菌体展示技术筛出的六肽富含高比例的 His 结果相一致。众所周知, 生物体重要的金属结合蛋白(肽或酶)如植物络合素(PCs)、金属硫蛋白(MTs)、基质金属蛋白酶(MMPs)以及转录调控因子锌指结构等均含有高比例的 His, 并且, 采用 6 × His 标签用于蛋白质或多肽的纯化已是分离纯化蛋白常用的重要手段。实验筛选结果一方面显示了噬菌体

文库筛选技术在重金属结合肽获得方面的重要价值, 同时也体现了 His 在金属结合肽中的重要作用<sup>[9]</sup>。Blast 分析未发现生物体中同源序列, Clust W 也未找到模体序列, 这也是可以理解的, 一方面蛋白质结构域序列不需要太长的氨基酸组成, 模体序列特征可能不一定是连续的氨基酸序列, 不连续的氨基酸序列很难找到同源序列。并且已有文献报道的金属结合肽也未发现同源序列和不存在模体序列。

不仅 Ni<sup>2+</sup> 结合肽对 Ni<sup>2+</sup> 具有高的亲和力, 而且对其它过渡态重金属离子(Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>)也具有强的亲和力, 但与其它两种重金属离子(Cd<sup>2+</sup> 和 Cr<sup>3+</sup>)的亲和力则低得多。并且, 不同的 Ni<sup>2+</sup> 结合肽具有不同的金属离子结合能力, 这与预先推测的结果也相吻合。Co、Ni、Cu、Zn 共处于第四周期的 4 个连续元素, 性质相近; 而 Cr 属于 VIB 族(第四周期), Cd 则是第五周期的 II B 族元素。Zn 与 Cd 虽同 II B 族, 但 Cd 离子半径比 Zn 离子大, 故在 His 等空间位阻大的多肽中, Cd 与多肽结合能力比 Zn 弱。这与在金属硫蛋白 MT-III 的 β-结构域中, 较大离子半径的 Cd<sup>2+</sup> 不能等量地替换 Zn<sup>2+</sup> 是同样的机理<sup>[10]</sup>。从生物毒性来看, Cd 和 Cr 的毒性也比 Co、Ni、Cu、Zn 大得多。

金属结合肽抑菌解毒实验结果进一步证明了金属结合肽展示的有效性和其在重金属离子毒性解毒中的作用, 显微镜观察结果又从形态上确认了金属结合肽与金属螯合树脂的这种亲和作用。展示有金属结合肽噬菌体的 ER2738 细菌在各 Ni 处理浓度下

比对照( M13 噬菌体感染的 ER2738 细菌 )的抑菌圈要小 ,比未含任何噬菌体的 *E. coli* 的抑菌圈更小 ,表明所获得的金属结合肽确实可有效地降低  $\text{Ni}^{2+}$  对细菌的毒性 ,展示了金属多肽的细菌可以耐受更高金属离子的浓度影响 ,令人兴奋的是获得的  $\text{Ni}^{2+}$  结合肽在 Cd 的抑菌解毒作用中也有重要的能力 :除在 100mmol/L 浓度下作用效果不显著外 ,在高浓度( 200 ,500mmol/L )下均显示了显著的差异。

## 4 结语

噬菌体文库与展示技术为重金属高效结合肽的获得 ,金属与多肽( 蛋白质 )相互作用关系的研究提供了方便而有效的手段和方法。金属结合肽的获得及进一步地研究金属与蛋白结构与功能的关系 ,筛选高效和专一性的金属结合肽 ,不仅在金属与多肽作用机理研究领域具有重要的意义和价值 ,而且在重金属污染的修复等方面也具有重要作用。

致谢 :感谢军事医学科学院薛沿宁副研究员主持项目 ICGB/CRP/CHN00-04 的支助。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 徐 柳 宋 琴 茆 灿 泉 ,等 . 金属结合蛋白( 肽 )与环境重金属生物修复 . 中国生物工程杂志 , 2004 **24**( 4 ) 39 - 42 .
- [ 2 ] Kjaergaard K , Sorensen JK , Schembri MA , *et al.* . Sequestration of zinc oxide by fimbrial designer chelators . *Appl Environ Microbiol* ,

2000 **66**( 1 ) :10 - 14 .

- [ 3 ] Kotrba P , Dolecková L , de Lorenzo V , *et al.* . Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides . *Applied and Environmental Microbiology* , 1999 **65**( 3 ) :1092 - 1098 .
- [ 4 ] Matsumoto S , Shiraki K , Tsuji N , *et al.* . Functional analysis of phytochelatin synthase from *Arabidopsis thaliana* and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* . *Science and Technology of Advanced Materials* , 2004 **5** 377 - 381 .
- [ 5 ] Sandrine Sauge-Merle , Stéphan Cuiné , Patrick Carrier , *et al.* . Enhanced toxic metal accumulation in engineered bacterial cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase . *Appl Environ Microbiol* 2003 **69**( 1 ) :490 - 494 .
- [ 6 ] Sousa C , Kotrba P , Ruml T , *et al.* . Metalloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB . *J Bacteriol* , 1998 , **180**( 9 ) : 2280 - 2284 .
- [ 7 ] Sachdev S . Sidhu Engineering M13 for phage display . *Biomolecular Engineering* 2001 **18** 57 - 63 .
- [ 8 ] Mejare M , Ljung S , Bulow L . Selection of cadmium specific hexapeptides and their expression as OmpA fusion proteins in *Escherichia coli* . *Protein Engineering* , 1998 , **11** 489 - 494 .
- [ 9 ] Myari A , Malandrinis G , Deligiannakis Y , *et al.* . Interaction of Cu with His-Val-His and of Zn with His-Val-Gly-Asp , two peptides surrounding metal ions in Cu , Zn-superoxide dismutase enzyme . *Journal of Inorganic Biochemistry* 2001 **85** 253 - 261 .
- [ 10 ] Giralt M , Carrasco J , Penkowa M , *et al.* . Astrocyte-targeted expression of interleukin-3 and interferon-3 cause region specific changes in metallothionein expression in the brain . *Exp Neurol* , 2001 , **168** :334 - 346 .

## Selection and interaction of $\text{Ni}^{2+}$ metal-binding peptides

YI Zhuo-lin , TONG Xin , MA Chun-yan , HUANG Jing-shuang , MAO Can-quan\*  
( College of Bioengineering , Southwest Jiaotong University , Chengdu 610031 , China )

**Abstract** :  $\text{Ni}^{2+}$  binding peptides were selected from phage random dodecapeptide library by metal affinity chromatography. After four rounds of biopanning , phage amplification and DNA sequencing , a group of peptide sequences were obtained. GenBank blast found no homogenous sequences , Clustal W analysis showed no motifs but they were really riched in histidines and contained di- or more histidines( his )<sup>3-5</sup> . Affinity assays of selected metal-binding phages for various metal-charged NTA resins and the experiments of *E. coli* suppression and detoxification gave positive results for  $\text{Ni}^{2+}$  binding peptides : strong affinities for  $\text{Ni}^{2+}$  were found for  $\text{Ni}^{2+}$  binding peptide displayed phages , as well as for other metals(  $\text{Cu}^{2+}$  ,  $\text{Co}^{2+}$  ,  $\text{Zn}^{2+}$  ,  $\text{Cr}^{2+}$  ,  $\text{Cd}^{2+}$  ) ; affinities of the binding peptides for  $\text{Cu}^{2+}$  ,  $\text{Ni}^{2+}$  ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  were much higher than that of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{2+}$  ; in addition ,  $\text{Ni}^{2+}$  binding peptides displayed phages had effects on *E. coli* as to enhance the tolerance and detoxification of *E. coli* for heavy metals when exposed to  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  . The interactions of meal binding peptides for heavy metals were also disclosed by microscopic observation. The research offered great values for the study of the interaction between metals and peptides , as well as in other areas such as heavy metal bioremediation.

**Keywords** : Metal binding peptide ; Phage display technology ; Affinity chromatography ; Selection

Foundation item : National Natural Science Foundation of China( 30270041 ) ; Southwest Jiaotong University Science Fund( 2005B17 ) ; National Administration for Chinese Medicine( 04-05ZL19 )

\* Corresponding author . Tel : 86-28-87634296 ; Fax : 86-28-87600185 ; E-mail : maocq@swjtu.edu.cn

Other authors : XU Liu , XIE Ming-de

Received : 19 December 2005 / Accepted : 15 March 2006 / Revised : 19 June 2006

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