

# 利用噬菌体随机肽库筛选可结合志贺毒素 B 亚单位的短肽序列

包士中, 王 慧\*, 荫 俊, 杨慧盈, 史 晶

(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:** 以制备的重组志贺毒素 B 亚单位(*StxB*)为靶标, 利用噬菌体展示亲和淘选技术, 经 4 轮筛选, 从随机十二肽库中筛选到与 *StxB* 结合的一批噬菌体克隆, 对特异结合活性较高的 27 个噬菌体克隆的表面展示肽进行序列测定, 其中 A6 序列出现 16 次, A9 和 A3 序列分别出现 2 次和 3 次。为评价筛选克隆中和毒素毒性的能力, 将展示肽出现频率最高的 A6 噬菌体克隆, 体外与志贺毒素孵育进行动物试验, 动物存活率达 33.3%, 表明毒素的毒性得到部分抑制, A6 短肽可能发展成为志贺毒素的拮抗剂。

**关键词:** 志贺毒素 B 亚单位, 噬菌体展示技术, 淘选, 毒性中和试验

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2006)05-0749-04

痢疾志贺菌为革兰氏阴性兼性细胞内致病菌, 临床上可引起痢疾, 每年有数以亿计的人发病, 其中死亡人数 95% 在发展中国家, 尤其对一些贫困地区威胁更大<sup>[1]</sup>。痢疾志贺菌主要毒力因子志贺毒素是一种烈性蛋白质毒素, 全毒素分子由 1 个 A 亚单位( $M_r = 32225$ )和 5 个 B 亚单位( $M_r = 7691$ )以非共价键结合形成, 兼具神经毒性、细胞毒性和肠毒性 3 种生物学活性。作用机制是 B 亚单位介导毒素与真核细胞表面糖鞘脂受体 Gb3 结合; A 亚单位通过切断 28S rRNA 4324 位核苷酸腺嘌呤上糖苷键, 具有阻断蛋白质合成的生物化学活性<sup>[2,3]</sup>。

目前痢疾志贺菌的治疗主要使用抗生素, 但由于细菌对各种抗生素抗性的日益增强, 而且抗生素有可能刺激志贺毒素的释放, 应该谨慎应用<sup>[4]</sup>。通过筛选毒素受体类似物, 结合游离毒素阻止其穿越粘膜, 或利用免疫球蛋白直接中和毒素的细胞毒效应, 近年来引起人们的兴趣<sup>[5]</sup>。

噬菌体展示是一项快速筛选技术, 该筛选简单方便, 可得到一些自然界不存在, 但可与靶分子高亲和的活性小肽, 利用其筛选功能药物, 愈来愈受到广泛关注<sup>[6]</sup>。本文利用噬菌体展示技术, 以重组 *StxB* 为靶标, 从随机十二肽库中筛选出一批与 *StxB* 特异结合的噬菌体克隆。通过动物试验, 观察它们中和毒素毒性的能力, 评价其作为志贺毒素抑制剂的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和试验动物:** 产毒菌 51054 购自中国药品生物制品检定所, 噬菌体宿主菌 *ER2738* 购自纽英伦(北京)公司, 重组工程菌 *pBV220-stxb/DH5 $\alpha$*  和 *StxB* 抗体由本室保存。Balb/C 小鼠由军事医学科学院动物中心提供。

**1.1.2 试剂和仪器:** *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, 随机线性十二肽库和 HRP-M13 抗体购自纽英伦(北京)公司, 蛋白质分子量标准购自北京索莱宝公司, PCR 引物 P1: 5'-GCAATTCCTTTAGTGGTACC-3', P2: 5'-CCCTCA TAGTTAGCGTAACG-3' 由英俊公司合成, 文中所用培养基均为 LB 培养基。美国 PE 公司 2400 型 PCR 仪, Kodak 公司凝胶成像系统, 日立公司 CR22E 冷冻离心机。

### 1.2 *StxB* 的制备

37℃ 摇床培养重组工程菌 *pBV220-stxb/DH5 $\alpha$* , 待菌体浓度  $A_{600}$  为 0.8 ~ 1.0 时, 转至 41℃ 温控诱导表达 *StxB* 5h, 分离纯化方法参照文献[7]。

### 1.3 *Stx* 粗纯化产物的制备及致死剂量的测定

志贺痢疾菌 51054 37℃ 摇床培养, 待菌体生长至  $A_{600}$  为 3.0 ~ 3.5 时, 8000r/min 离心 10min, 以 30mmol/L PBS (pH 7.2) 悬浮沉淀, 超声裂解 30min 后 5000r/min 离心 20min, 上清 60% 硫酸铵盐析, 再 8000r/min 离心 20min, 沉淀以 PBS 复溶透析, 透析物

基金项目: 国家科技攻关计划项目(2003BA712A02)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-66948532; E-mail: geno0109@vip.sina.com

作者简介: 包士中(1980-)男, 安徽池州人, 硕士研究生, 主要研究方向为感染免疫和分子微生物学。E-mail: baoshizhong@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-11-22; 接受日期: 2006-02-13; 修回日期: 2006-04-03

即粗纯化毒素。分别以 37.5 $\mu$ L、50 $\mu$ L、62.5 $\mu$ L 和 75 $\mu$ L 梯度的粗纯化的 Stx 对 7~8 周龄 Balb/C 小鼠攻毒,观察小鼠 3 日内存活情况,以生理盐水为对照。

#### 1.4 StxB 结合多肽的亲筛

**1.4.1 原始肽库的扩增** :原始肽库 3 $\mu$ L 感染 20mL 对数初期的 ER2738 4.5h 后,10000r/min 离心 10min,上清加入 1/5 体积 20% (W/V) PEG-8000-2.5 mol/L NaCl 4 $^{\circ}$ C 过夜,10000r/min 离心 10min,沉淀溶于 1mL PBS,加入 1/5 体积的 20% (W/V) PEG-8000-2.5mol/L NaCl,冰浴 15~60min,10000r/min 离心 10min,沉淀溶于 200 $\mu$ L PBS,即扩增产物。测扩增产物的滴度,按纽英伦公司噬菌体展示肽库试剂盒说明进行。

**1.4.2 StxB 结合多肽的亲筛** :以制备的 StxB 为靶标包被酶联板孔,每孔 30 $\mu$ g,4 $^{\circ}$ C 过夜;吸去包被液,以 0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub>(pH8.6)-5mg/mL BSA 4 $^{\circ}$ C 封闭 1h;PBS-0.05% Tween 充分洗涤,加入原始肽库的扩增产物,37 $^{\circ}$ C 结合 1h 后吸去液体,PBS-0.05% Tween 充分洗涤,加入 100 $\mu$ L 0.2mol/L Glycine-HCl (pH2.2)-1mg/mL BSA 洗脱液,轻轻振荡 10min,以 1mol/L Tris-HCl (pH 9.1)中和至 pH7.5,即获得的淘选产物,测定滴度。经再感染、扩增、淘选,共进行 4 轮筛选。

#### 1.5 噬菌体与 StxB 的体外结合分析

以 StxB 包被酶联板为包被原,随机挑取第 4 轮筛选出的噬菌体克隆为一抗,M13 抗体为二抗,通过 ELISA 法检测噬菌体与 StxB 的结合活性,以 BSA 作阴性对照。

#### 1.6 噬菌体展示肽序列测定

根据随机线性十二肽库的噬菌体序列设计两条引物(P1、P2)扩增展示肽核苷酸片段,反应体系为 Taq 酶 0.125U,Buffer 2.5 $\mu$ L,dNTP(各 2.5mmol/L)4 $\mu$ L,引物各加 0.5 $\mu$ L,挑取与 StxB 结合较强的噬菌体克隆为模板,补加水至体积为 25 $\mu$ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,54 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,进行 30 循环,最后 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增产物送军事医学科学院生物工程研究所测序。

#### 1.7 噬菌体体外中和志贺毒素毒性试验

根据测序结果,将展示肽频率出现最高的克隆,按肽库扩增方法进行制备。以不同剂量噬菌体体外与绝对致死剂量毒素 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育后,腹腔注射 7~8 周龄 Balb/C 小鼠,观察 3 日内不同剂量组的小鼠存活情况。以 StxB 抗体孵育作阳性对照,以 ELISA

分析为阴性的噬菌体克隆孵育作阴性对照,另设单独噬菌体组和毒素组。

## 2 结果

#### 2.1 StxB 结合短肽的筛选

**2.1.1 重组 StxB 的制备** :通过温控诱导表达重组 StxB,按文献报道方法制备重组 StxB,SDS-PAGE 检测结果表明,其大小与预期相符,为 7.7kDa,经薄层扫描纯度达到 95% 以上(图 1)。

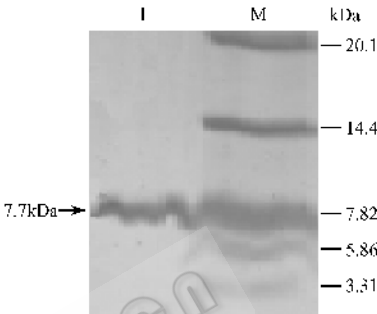


图 1 重组制备的 StxB 电泳图  
Fig.1 Analysis of purified StxB by SDS-PAGE. 1. StxB; M. Marker.

**2.1.2 StxB 结合短肽的筛选** :以制备的 StxB 为靶标经 4 轮噬菌体展示亲和淘选,检查每一轮筛选的回收率(表 1)结果显示,经 4 轮筛选噬菌体产出率明显提高,重组 StxB 对随机肽库中相应的噬菌体进行选择性的富集。

表 1 筛选噬菌体随机肽库的回收率			
Table 1 Recovery of washed phages by biopanning			
No. of biopanning	Phage added	Phage washed	Yield/%
1	$2.6 \times 10^{11}$	$4.51 \times 10^4$	$1.73 \times 10^{-7}$
2	$1.5 \times 10^{11}$	$7.19 \times 10^5$	$4.79 \times 10^{-6}$
3	$1.0 \times 10^{11}$	$6.13 \times 10^6$	$6.13 \times 10^{-5}$
4	$1.0 \times 10^{11}$	$8.03 \times 10^7$	$8.03 \times 10^{-4}$

**2.1.3 筛选克隆与 StxB 体外结合分析** :经 4 轮筛选,随机挑取 30 个噬菌体克隆 ELISA 法检测体外结合 StxB 能力,原始肽库作为阴性对照。27 个与 StxB 特异结合,阳性率达到 90%(图 2)。

**2.1.4 噬菌体展示肽测序** :对 ELISA 检测特异结合的克隆进行测序,分析噬菌体展示肽的氨基酸序列。其中,A6 序列出现频率为 16 次,A9 序列出现频率 2 次,A3 序列出现频率 3 次。通过 4 轮亲和淘选,富集纯化到一批与重组 StxB 特异结合的噬菌体克隆。

#### 2.2 噬菌体体外中和志贺毒素毒性试验

**2.2.1 志贺毒素致死剂量的测定** :以粗纯化的 Stx 攻击 Balb/C 小鼠,小鼠可抵抗 50 $\mu$ L 以下剂量毒素的攻击,50 $\mu$ L 剂量毒素攻击后,72h 内全部死亡。

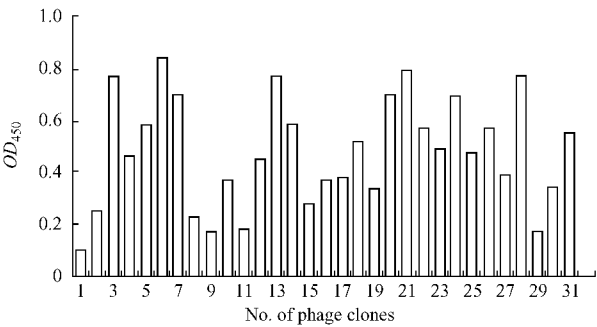


图2 噬菌体克隆体外结合活性检测( ELISA 法 )

Fig.2 Detection of binding activity of phages clones by ELISA.  
1. Negative control ; 2 ~ 31. Phage clones of the 4th round of biopanning.

2.2.2 毒素毒性体外中和试验 :单独以 StxB 抗体或噬菌体腹腔注射的 Balb/C 小鼠 ,在观察期内均无死亡发生 ,动物模型的建立可行。阳性对照组中 ,以 StxB 抗体孵育的毒素生存状态良好 ,无死亡发生 ,阴性对照组中 ,体外结合阴性的噬菌体克隆孵育的毒素攻击的小鼠 72h 内均全部死亡。A6 噬菌体克隆体外孵育毒素后对小鼠攻毒 ,各组小鼠对不同剂量噬菌体孵育的毒素出现不同程度的抵抗性。在观察期内 ,动物发病延迟 ,噬菌体浓度达到  $6.1 \times 10^4 / \mu\text{L}$  可获得最大毒性中和作用 ,攻毒的 12 只小鼠有 4 只存活 ,小鼠存活率 33.3%。实验结果见图 3 和表 2。

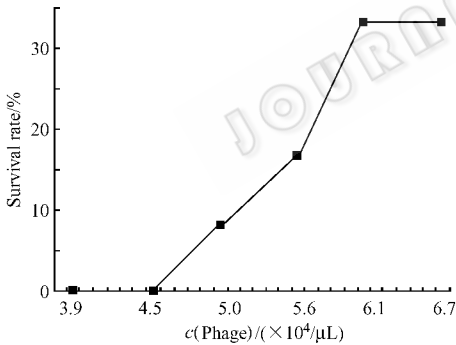


图3 毒素中和效应与噬菌体浓度关系曲线

Fig.3 Relationship between phage of different concentration and neutralization of the toxic activity.

表2 A6 噬菌体中和志贺毒素毒性试验结果

Table 2 Result of the neutralization of the toxic activity of Stx with A6 phage

Group	Total No. of mice	No. of survival	Survival rate
Stx + Negative phage	12	0	0
Stx + A6 phage with top neutralization effect	12	4	33.3%
Stx + Antibodies against StxB	12	12	100%
Stx	12	0	0

3 讨论

1985 年 ,Smith 将外源基因插入丝状噬菌体 f1 的基因 III ,使目的基因编码的多肽能以融合蛋白的形式展示在噬菌体表面 ,创建了噬菌体展示技术<sup>[8]</sup>。由于噬菌体文库容量大、筛选方法简单快速、易于扩增等优点 ,从建立到现在 ,该技术在生命科学研究的诸多领域受到广泛应用 ,尤其是在抗原的表位分析和抗体的筛选中取得了很多令人满意的研究成果。

志贺毒素是一种烈性蛋白质毒素 ,可引起多种疾病的发生 ,包括出血性结肠炎( HC )、溶血性尿毒综合症( HUS )和出血性痢疾等<sup>[9,10]</sup> ,发病死亡率较高。长期以来 ,人们一直尝试研制出志贺毒素的高效抑制剂 ,用于与其相关疾病的临床治疗 ,但至今未见成功的报道。最近提出筛选毒素结合受体类似物结合游离毒素 ,从而阻断毒素与细胞的结合 ,是一种可能的手段。

本研究首先重组表达并制备了高纯度 StxB ,已经证实其具有较好的抗原性。考虑到肽段的化学合成工艺 ,选用随机线性十二肽库筛选与 StxB 靶标特异结合的克隆。经过 4 轮吸附-洗涤-洗脱的筛选富集过程 ,从肽库中筛选出一批阳性噬菌体克隆。分析这些能结合靶标的噬菌体展示肽 ,发现一条短肽序列出现频率最高 ,该序列富含疏水性氨基酸 ,推测与靶标的结合位点应靠近 StxB 的非极性区域 ,结合是基于疏水性相互作用。另有两条出现频率较高的序列 ,也具有这种疏水特性。有人报道其他序列的疏水性短肽 ,认为结合可能位于 StxB 五聚体的非极性孔腔<sup>[6]</sup> ,具体精确的作用模式有待进一步阐明。

为研究筛选出的短肽中和志贺毒素毒性的能力 ,将含该短肽序列的噬菌体克隆体外与志贺毒素孵育 ,经动物试验证实 ,在噬菌体克隆达到一定浓度时 ,受试小鼠存活率可达 33.3%。据此推测 ,该短肽经体外与毒素孵育结合 ,毒素的毒性可被部分中和 ,该短肽或其修饰体可能发展成为志贺毒素的拮抗剂。该肽段的化学合成已经完成 ,脱离于噬菌体 PIII 蛋白的独立肽段的毒性中和效应如何正在实验探讨中。此外 ,由于筛选出的多肽高度疏水 ,对肽段进行必要的改造使其更好与毒素作用、增加稳定性、以及有利于化学合成正作进一步研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Sansonetti PI , Shigella plays dangerous games . *ASM News* , 1999 , **65** :611 – 617 .
- [ 2 ] Donohue-Rolfe A , Jacewicz M , Keusch GT . Isolation and characterization of functional Shiga Toxin subunits and renatured holotoxin . *Molecular Microbiology* , 1989 **3** ( 9 ) :1231 – 1236 .
- [ 3 ] Kongmuang U , Honda T , Miwatan T . Enzyme-linked immunosorbent assay to detect Shiga Toxin of *Shigella dysenteriae* and related toxins . *Journal of Clinical Microbiology* , 1987 **25** ( 1 ) :115 – 118 .
- [ 4 ] 陈宁庆主编 . 实用生物毒素学 . 北京 : 中国科学技术出版社 , 2001 :113 .
- [ 5 ] 曾 明 . 志贺样毒素的研究进展 . 卫生研究 , 1998 **27** :4 – 7 .
- [ 6 ] 韩照中 , 苏国富 , 黄翠芬 . 从噬菌体表面展示肽库中筛选志贺毒素受体结合抑制剂 . 中国科学( C 辑 ) , 1999 **29** ( 2 ) :151 – 156 .
- [ 7 ] Austin PR , Hovde CJ . Purification of recombinant Shiga-like Toxin Type I B Subunit . *Protein Expression and Purification* , 1995 **6** :771 – 779 .
- [ 8 ] Bartel DP , Szostak JK . Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences . *Science* , 1993 **261** :1411 – 1468 .
- [ 9 ] McEwen J , Leitner M , Hariri I , *et al.* Expression of Shiga Toxin epitopes in *E. coli* immunological characterization . *Immunology Letters* , 1989 **21** :157 – 164 .
- [ 10 ] Nakao H , Kataoka C , Kiyokawa J , *et al.* Monoclonal antibody to Shiga Toxin 1 , which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity . *Microbiol Immunol* , 2002 **46** ( 11 ) :777 – 780 .

## Screening of short peptides binding to StxB by phage-display library

BAO Shi-zhong , WANG Hui\* , YIN Jun , YANG Hui-ying , SHI Jing

( State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity , Academy of Military Medical Science , Beijing 100071 , China )

**Abstract** : Under induction with 41 °C , *pBV220-stxb*/DH5 $\alpha$  expressed the recombinant protein Shiga Toxin B Subunit ( StxB ) , which was purified by centrifugation , salting out and ion exchange chromatography . As a target , the purified-protein-coated ELISA plate was used to screen phages able to bind onto it from a random 12-mer peptide library . After 4 rounds of affinity screening , a group of clones were isolated from the peptide library . ELISA assay detected their binding activity with the target . 27 clones showed the specific binding activity . The peptide sequences of these positive phage clones were analyzed . 16 of them had the same sequence named A6 , 2 clones had the A9 sequence , and 3 clones had the A3 sequence . To evaluate the neutralization effect of A6 phage , animal test was carried out . The Shiga Toxin was incubated with A6 phage clone , then used to attack the Balb/C mice . As a control , the toxin was incubated with negative phage . In the control group , no mice survived . Comparing with it , the survival rate of the mice in neutralization group could reach to a level of 33.3% . It showed that the toxicity of Shiga Toxin was partly inhibited . The A6 peptide could be developed as an inhibitor of Shiga Toxin to cure the diseases caused by Shiga Toxin .

**Keywords** : Shiga Toxin B Subunit ; Phage display ; Biopanning ; Neutralization of the toxicity of Shiga Toxin