



利用噬菌体肽库筛选可结合TNF- α 的短肽序列

肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是一类重要的免疫应答细胞因子, 在机体抗感染免疫及介导炎症反应中发挥重要作用, TNF- α 通过与细胞膜上表达的55-kDa和75-kDa两种受体相结合而发挥其生物学活性[1][2]。

针对感染性休克、类风湿性关节炎及其他炎症过程中TNF- α 过量所产生的致死性作用及恶液质, 人们进行了TNF- α 拮抗药物及制剂的研制、开发与应用的种种尝试。现有的TNF- α 阻断剂如TNF- α 抗体、重组TNF- α 受体等已证明其临床疗效肯定, 但其应用因表达、纯化及价格等方面的原因受到了一定的限制。1993年Banner[3]等对可溶性55-kDa TNF受体与TNF- β 形成的晶体结构进行了研究, 发现TNF- β 与受体相互结合时具有较大的接触面积, 进一步的研究却发现, 在接触面中受体胞外区仅有3个残基在与相应的TNF- β 亚单位的结合中发挥重要作用, 这些残基即所谓的关键性残基。此发现提示, 如果配体与受体之间相互作用仅需几个残基, 则设计、合成细胞因子受体激动剂或拮抗剂小分子药物先导化合物具有极大的可能性。

本研究在前期筛选TNF- α 模拟短肽的基础上, 利用噬菌体肽库技术筛选可结合并封闭TNF- α 活性表位的短肽, 旨在探讨TNF- α 结合序列与结构的特点, 为研制易于合成、可口服的小分子TNF- α 拮抗药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

噬菌体环七肽库(库容 2×10^{13} pfu/ml)、受体菌ER2738、测序引物5' - HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3' 购自New England BioLabs公司; rhTNF α 购自PerproTech EC公司; HRP-抗M13单抗(Pharmacia产品, 1:5 000稀释工作浓度)。

1.2 TNF α 对噬菌体环七肽库的筛选

采用亲和富集法: 以包被缓冲液稀释rhTNF α 至100 μ g/ml, 50 μ l/孔包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C过夜; 3%BSA封闭37 $^{\circ}$ C、2 h; 0.1%TBS-Tween20(TBST)洗板5次; 加入5 μ l噬菌体环七肽库(2×10^{13} pfu/ml)和45 μ l TBS, 室温缓慢振荡1 h; 0.1%TBST洗板15次, 洗去未结合的噬菌体; 加入50 μ l洗脱液(pH2.2, 0.2 mol/L甘氨酸-盐酸缓冲液), 室温作用10 min并不时振荡, 洗脱结合于固相化rhTNF- α 的噬菌体, 以此噬菌体侵染宿主菌ER2738, 测定滴度、扩增, 用于第二轮筛选。第二轮、第三轮筛选保持原包被浓度, 加入上一轮扩增纯化的噬菌体5 μ l, 洗涤液为0.5%TBST, 以前述方法洗脱扩增噬菌体; 第三轮洗脱产物铺板, 在IPTG/X gal琼脂板上挑取单个噬菌体斑制备噬菌体原种进行鉴定。

1.3 可结合TNF- α 噬菌体克隆的鉴定

1.3.1 双夹心ELISA 50 μ l/孔rhTNF- α (1 mg/ml)包被酶联板, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 5%脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C封闭1 h, 加50 μ l噬菌体原种上清, 37 $^{\circ}$ C作用1 h。0.5%TBST洗板, 加1:5 000 HRP-抗M13单抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育1 h, OPD底物显色2 min, 2 mol/L硫酸终止反应, 于490 nm波长处测定D(λ)值, 以D(λ)值高于阴性对照3倍以上为阳性结果。

1.3.2 TNF α 竞争抑制试验 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rhTNF- α 50 μl /孔包被酶联板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 5%脱脂奶粉37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h, 0.5%TBST洗板; 将rhTNF- α 依次稀释至80、40、20、10、5、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后各取25 μl 与噬菌体原种上清25 μl 混匀, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min; 将混匀物加入孔内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 0.5%TBST洗板, 加1:5 000 HRP-抗M13单抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h, OPD底物显色2 min, 2 mol/L硫酸终止反应, 测定 D_{490} 值, 计算抑制率。

1.4 DNA序列测定

扩增阳性噬菌体克隆, 以PEG/NaCl纯化噬菌体克隆, 碘化钠溶解抽提噬菌体单链DNA, 琼脂糖电泳鉴定。使用商品肽库自带测序引物由中山医科大学达安公司测定。

表1 从噬菌体环七肽库对 TNF α 结合短肽的 3 轮亲和筛选结果

Tab.1 Affinity selection of TNF- α -binding peptides from c7c phage library

Round of screening	Input phage (pfu)	Output phage (pfu)	Recovery (%)
1	2.00×10^{12}	2.00×10^6	1.00×10^{-4}
2	2.00×10^{12}	1.00×10^7	0.50×10^{-3}
3	2.00×10^{12}	1.50×10^8	0.75×10^{-2}

2 结果 2.1 噬菌体环七肽库的筛选结果

以rhTNF- α 为靶对噬菌体环七肽库进行了3轮筛选, 在3轮筛选中, 保持包被rhTNF- α 的浓度以提高筛选的富集率。噬菌体的回收率结果提示富集效果明显(表1)。

2.2 噬菌体克隆与rhTNF- α 的结合

将第3轮洗脱下来的噬菌体侵染宿主菌ER2738并铺板过夜, 随机挑取IPTG/X gal琼脂板上的23个噬斑。经ELISA鉴定, 其中11个噬菌体克隆显示其与rhTNF α 的结合较强(图1)。

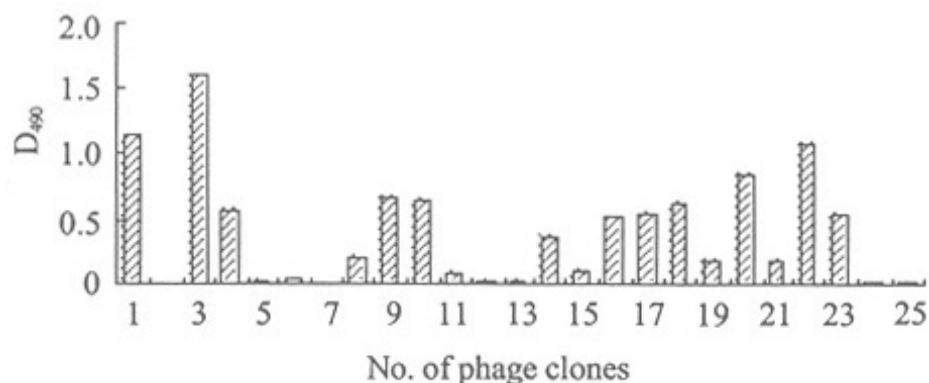


图1 噬菌体克隆与rhTNF α 的结合结果

Fig.1 Result of the binding of phage clones and recombinant human TNF- α
No.1-23: Phage clones were screened with TNF- α as target; No.24: Unrelated phage clone; No.25: c7c peptide library clone

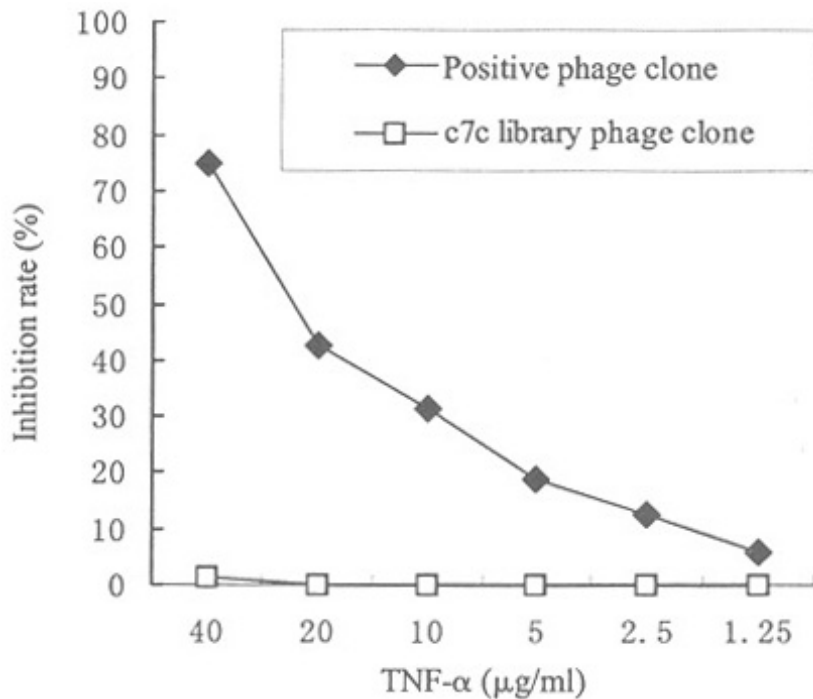


图2 可溶性TNF- α 对噬菌体克隆与包被TNF- α 结合的抑制

Fig.2 Inhibition of binding between phage clone and coated TNF- α by soluble TNF- α

2.3 可溶性rhTNF- α 对噬菌体克隆与包被TNF- α 结合的抑制

将噬菌体克隆预先与rhTNF- α 作用使其两者相互结合，然后将混合物加入到rhTNF- α 包被的酶标孔内，固相表面的rhTNF- α 与液相中的rhTNF- α 竞争与噬菌体克隆结合，以此来鉴定噬菌体克隆是否模拟rhTNF- α 受体的识别表位并与rhTNF- α 结合(图2)。

结果显示，随着液相中游离rhTNF- α 浓度逐渐降低，其对固相包被rhTNF- α 与噬菌体克隆结合的抑制作用亦随之降低，提示噬菌体克隆能够模拟TNF- α 受体或抗体上的结合表位与rhTNF- α 结合。

2.4 噬菌体克隆DNA序列测定

对鉴定出的11个阳性噬菌体克隆进行DNA序列测定以推断其相应的肽序列。结果显示11个阳性克隆中，两个克隆的氨基酸序列为：c-ALWHWWH-c，另外9个克隆序列为：c-(T/S)WLHWWA-c。

3 讨论

细胞因子拮抗剂的作用主要有以下两种：(1)与细胞因子直接结合以抑制或阻断其结合受体，如抗体或可溶性受体[4][5]；(2)与细胞因子竞争以达到与受体的结合，即模拟细胞因子与受体作用的表位[6]。

噬菌体肽库技术的出现，为研制通过上述两种方式发挥作用的小分子细胞因子拮抗肽提供了有效的工具。Chirinos-Rojas等[7]以重组TNF- α 为靶分子筛选15肽库得到氨基酸序列为DFLPHYKNTSLGHRP的短肽，该短肽虽与已知的TNF- α 两种受体胞外区一级结构均无同源性，但在体外剂量依赖实验中能够阻断人和鼠TNF- α 介导的细胞毒作用。

本研究以rhTNF- α 为靶筛选噬菌体环七肽库，其优势在于：(1)环肽较线性肽具有一定的空间构象，在液相中更稳定，有利于进一步研究TNF- α 与其配基作用的空间构象。(2)构象限制型肽库可在空间上模拟真实的分子间相互结合作用，有利于对配体和受体相互结合的空间结构及关键性位点进行研究分析。

本研究根据该筛选与鉴定系统的具体情况制定筛选条件，主要特点在于既保持了靶蛋白包被量不变，使富集率得以提高，同时在洗脱方式上采用了酸洗脱。

目前常用的方法为酸洗脱法和竞争性洗脱法，酸洗脱法即利用pH值低于2.2的酸性缓冲液来洗脱与靶分子

结合的噬菌体。竞争洗脱则是用一个已知的可溶性靶分子或配基分子去竞争与筛选靶分子结合的噬菌体。相比之下，竞争性洗脱有利于提高特异性，但要获得高亲合力的噬菌体就必须提高可溶性靶分子浓度，因此本研究只能选择酸洗脱。经过3轮筛选后，从第3轮筛选洗脱产物中挑取的23个克隆经ELISA鉴定有11个克隆能够与靶蛋白rhTNF- α 特异性结合。此结果证明了酸洗脱方式同样可以获得较高的筛选阳性率。这可能也与作为筛选靶分子纯度高有关，本研究室在用纯化的LPS单抗筛选肽库时亦有相同的经验[8]。对筛选获得的阳性克隆进一步的竞争抑制试验证明噬菌体克隆能够模拟TNF- α 抗体或者受体的结合活性，而这种结合活性正是能否具拮抗作用所必需的基本条件；但其结合位点是否TNF- α 的活性位点及能否抑制TNF- α 活性则有待于后续工作中合成短肽进行实验。

将11个阳性克隆进行DNA序列测定，得出对应的氨基酸序列为c-ALWHWWH-c和c-(T/S)WLHWWA-c，可见其中保守残基为WHWW。将上述两序列提交GENE BANK数据库与TNFR一级序列相比较，结果显示一级结构上并不具有同源性。究其原因在于噬菌体环七肽库展示肽为非线性肽，因此得到的短肽序列应该是与TNF- α 在空间构象上形成互补结合的序列。这一结果为我们从空间构象上分析及模拟TNF- α 与相应受体间作用奠定了基础，对制备小分子TNF- α 拮抗肽先导化合物具有重要的参考价值。

参考文献：

- [1] Balkwill FR, Burke F. The cytokine network[J]. Immunol Today, 1989, 10: 299.
- [2] Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, et al. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(8): 3127-31.
- [3] Banner DW, D'Arcy A, James W, et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF-beta complex: implications for TNF receptor activation[J]. Cell, 1993, 73(3): 431-5.
- [4] Feldmann M, Bondeson J, Brennan FM, et al. The rationale for the current boom anti-TNF alpha treatment. Is there an effective means to define therapeutic targets for drugs that provide all the benefits of anti-TNF alpha and minimise hazards[J]? Ann Rheum Dis, 1999, 58(Suppl 1): 127-31.
- [5] Mohler KM, Torrance DS, Smith CA. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists [J]. J Immunol, 1993, 151(3): 1548-53.
- [6] Akesson AL, Woods CW, Hsieh LC, et al. AF12198, a novel low molecular weight antagonist, selectively binds the human type I inter leukin (IL)-1 receptor and blocks in vivo response to IL-1[J]. J Biol Chem, 1996, 271(48): 30517-23.
- [7] Chirionos-Rojas CL, Steward MW, Partidos CD, et al. A peptido- mimetic antagonist of TNF-alpha-mediated cytotoxicity identified from a phage- displayed random peptide library[J]. J Immunol, 1998, 161(10): 5621-6.
- [8] 文维延, 韩强涛, 富宁. 脂多糖保守表位模拟肽的筛选与鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(2): 222-6.
- Wen WY, Han QT, Fu N. Screening and identification of mimotopes for lipopolysaccharide conservative epitope from random phage display peptide library[J]. Prog Biochem Biophys, 2001, 28(2): 222-6.

参考文献：

- [1] Balkwill FR, Burke F. The cytokine network[J]. Immunol Today, 1989, 10: 299.
- [2] Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, et al. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies[J]. Proc Natl

Acad Sci USA, 1990, 87(8): 3127-31.

[3] Banner DW, D'Arcy A, James W, et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF-beta complex: implications for TNF receptor activation[J]. Cell, 1993, 73(3): 431-5.

[4] Feldmann M, Bondeson J, Brennan FM, et al. The rationale for the current boom anti-TNF alpha treatment. Is there an effective means to define therapeutic targets for drugs that provide all the benefits of anti-TNF alpha and minimise hazards[J]? Ann Rheum Dis, 1999, 58(Suppl 1): 127-31.

[5] Mohler KM, Torrance DS, Smith CA. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists [J]. J Immunol, 1993, 151(3): 1548-53.

[6] Akeson AL, Woods CW, Hsieh LC, et al. AF12198, a novel low molecular weight antagonist, selectively binds the human type I interleukin (IL)-1 receptor and blocks in vivo response to IL-1[J]. J Biol Chem, 1996, 271(48): 30517-23.

[7] Chirionos-Rojas CL, Steward MW, Partidos CD, et al. A peptido-mimetic antagonist of TNF-alpha-mediated cytotoxicity identified from a phage-displayed random peptide library[J]. J Immunol, 1998, 161(10): 5621-6.

[8] 文维延, 韩强涛, 富宁. 脂多糖保守表位模拟肽的筛选与鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(2): 222-6.

Wen WY, Han QT, Fu N. Screening and identification of mimotopes for lipopolysaccharide conservative epitope from random phage display peptide library[J]. Prog Biochem Biophys, 2001, 28(2): 222-6.

[回结果列表](#)