

利用噬菌体肽库筛选可结合 TNF-琢的短肽序列

郭海萍 罗海波 袁艳君 袁平 袁宁 第一军医大学免疫学教研室 广东 广州 510515

摘要目的 对噬菌体环七肽库进行筛选寻求可拮抗肿瘤坏死因子 α TNF-琢活性的小分子短肽遥方法 以 rhTNF-琢为靶筛选噬菌体环七肽库袁夹心 ELISA 鉴定阳性克隆遥结果 ELISA 鉴定随机挑选经 3 轮筛选后所得 23 个噬菌体克隆发现袁其中 11 个克隆显示与 TNF-琢有较强的结合袁DNA 测序发现其中两个克隆的氨基酸序列为院-ALWHWWH-c袁另 9 个克隆序列为院-(T/S)WLHWWA-c遥结论 噬菌体克隆展示肽能够模拟 TNF-琢受体或抗体的结合表位袁为 TNF琢结合肽遥

关键词 肿瘤坏死因子 噬菌体 免疫学技术

中图分类号 R392.33 文献标识码 B 文章编号院000-2588渊002冤7-0597-03

Screening of tumor necrosis factor-琢binding peptides by phage display peptide library

GUOHai-ping, LUOHai-bo, LIUYan-jun, ZhuPing, FUNing

Department of Immunology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To identify and characterize tumor necrosis factor (TNF)-琢binding peptides from a 7c phage display peptide library, in an attempt to find short peptides that can be used as an antagonist of TNF-琢. Methods The TNF-琢binding peptides were screened from a 7c phage display peptide library by using rhTNF-琢 as a target protein and identified by sandwich ELISA. Results After 3 rounds of screening, 11 of 23 phage clones were identified as positive clones which can bind to rhTNF-琢. The amino acid sequence in two of these 11 clones is -ALWHWWH-c, and that in the others is -(T/S)WLHWWA-c. Conclusion These phage display peptides are TNF-琢binding peptides.

Key words: tumor necrosis factor; bacteriophages; immunologic techniques

肿瘤坏死因子 α TNF-琢是一类重要的免疫应答细胞因子袁在机体抗感染免疫及介导炎症反应中发挥重要作用袁TNF-琢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遥

针对感染性休克 类风湿性关节炎及其他炎症过程中 TNF-琢过量所产生的致死性作用及恶液质袁人们进行了 TNF-琢拮抗药物及制剂的研制尧开发与应用的种种尝试遥现有的 TNF-琢阻断剂如 TNF-琢抗体 重组 TNF-琢受体等已证明其临床疗效肯定袁但其应用因表达 尧纯化及价格等方面的原因受到了一定的限制遥 1993 年 Banner 等对可溶性 55-kDa TNF 受体与 TNF-茁形成的晶体结构进行了研究袁发现 TNF-茁与受体相互结合时具有较大的接触面积袁进一步的研究却发现袁在接触面中受体胞外区仅有 3 个残基在与相应的 TNF-茁亚单位的结合中发挥重要作用袁这些残基即所谓的关键性残基遥此发现提示袁如果配体与受体之间相互作用仅需几个残基袁设计 尧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遥

本研究在前期筛选 TNF-琢模拟短肽的基础上袁

利用噬菌体肽库技术筛选可结合并封闭 TNF-琢活性表位的短肽袁旨在探讨 TNF-琢结合序列与结构的特点袁为研制易于合成 尧口服的小分子 TNF-琢拮抗药物提供实验依据遥

1 材料与方法

1.1 主要试剂

噬菌体环七肽库 渊容量 2伊10¹³ pfu/ml冤受体菌 ER2738 尧测序引物 5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' 购自 New England BioLabs 公司 院 rhTNF琢 购自 PerproTech EC 公司 院 RRP- 抗 M13 单抗 渊harmacia 产品冤:5000 稀释工作浓度 院

1.2 TNF琢对噬菌体环七肽库的筛选

采用亲和富集法 院以包被缓冲液稀释 rhTNF琢至 100 滋/ml 袁0 滋/孔包被酶标板袁 益过夜 3% BSA 封闭 37 益尧 1 h 院 0.1% TBS-Tween 20 渊BST冤洗板 5 次 院加入 5 滋 噬菌体环七肽库 渊伊10¹³ pfu/ml冤 院 45 滋 TBS 袁室温缓慢振荡 1 h 院 0.1% TBST 洗板 15 次袁洗去未结合的噬菌体 院加入 50 滋 洗脱液 渊H2.2 袁 2 mol/L 甘氨酸 - 盐酸缓冲液冤 袁室温作用 10 min 并不时振荡袁洗脱结合于固相化 rhTNF-琢的噬菌体袁以此噬菌体侵染宿主菌 ER2738 袁测定滴度 尧扩增袁用于第二轮筛选 院第二轮 尧第三轮筛选保持原包被浓度 院加入上一轮扩增纯化的噬菌体 5 滋 尧洗液为 0.5% TBST 袁以前

收稿日期 院002-02-06

基金项目 院国家自然科学基金 渊9800126冤

作者简介 院郭海萍 972- 袁女 袁硕士 袁现任广州医学院微生物免疫学教研室助教

述方法洗脱扩增噬菌体曰第三轮洗脱产物铺板袁在IPTG/Xgal 琼脂板上挑取单个噬菌体斑制备噬菌体原种进行鉴定遥

1.3 可结合 TNF-琢噬菌体克隆的鉴定

1.3.1 双夹心 ELISA 50 滋/孔 rhTNF-琢 1mg/ml 噬菌体包被酶联板袁 益孵育过夜袁%脱脂奶粉 37 益封闭 1 h袁加 50 滋 噬菌体原种上清袁7 益作用 1 h遥0.5%TBST 洗板袁加 1:5000HRP- 抗 M13 单抗袁7 益孵育 1 h袁OPD 底物显色 2min袁mol/L 硫酸终止反应袁于 490 nm 波长处测定 D(姿值袁以 D(姿值高于阴性对照 3 倍以上为阳性结果遥

1.3.2 TNF琢竞争抑制试验 1 滋/mlrhTNF-琢50 滋/孔包被酶联板袁 益孵育过夜袁%脱脂奶粉 37 益封闭 1 h袁.5%TBST 洗板曰将 rhTNF-琢依次稀释至 80尧0尧20尧0尧0尧0.5 滋/ml 后各取 25 滋 与噬菌体原种上清 25 滋 混匀袁置于 37 益孵育 30min曰将混匀物加入孔内袁7 益孵育 30 min袁.5%TBST 洗板袁加 1:5 000 HRP- 抗 M13 单抗袁7 益尧 h袁OPD 底物显色 2min袁mol/L 硫酸终止反应袁测定 D₄₉₀ 值袁计算抑制率遥

1.4 DNA 序列测定

扩增阳性噬菌体克隆袁以 PEG/NaCl 纯化噬菌体克隆袁氯化钠溶解抽提噬菌体单链 DNA袁琼脂糖电泳鉴定遥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遥

2 结果

2.1 噬菌体环七肽库的筛选结果

以 rhTNF-琢为靶对噬菌体环七肽库进行了 3 轮筛选袁在 3 轮筛选中袁保持包被 rhTNF-琢的浓度以提高筛选的富集率遥噬菌体的回收率结果提示富集效果明显渊表 1 冤遥

表 1 从噬菌体环七肽库对 TNF琢结合短肽的 3 轮亲和筛选结果
Tab.1 Affinity selection of TNF-琢binding peptides from c7c phage library

Round of screening	Input phage (pfu)	Output phage (pfu)	Recovery (%)
1	2.00伊10 ²	2.00伊10 ⁶	1.00伊10 ⁻⁴
2	2.00伊10 ²	1.00伊10 ⁷	0.50伊10 ⁻³
3	2.00伊10 ²	1.50伊10 ⁸	0.75伊10 ⁻²

2.2 噬菌体克隆与 rhTNF-琢的结合

将第 3 轮洗脱下来的噬菌体侵染宿主菌 ER2738 并铺板过夜袁随机挑取 IPTG/Xgal 琼脂板上的 23 个噬斑遥经 ELISA 鉴定袁其中 11 个噬菌体克隆显示其与 rhTNF琢的结合较强渊图 1 冤遥

2.3 可溶性 rhTNF-琢对噬菌体克隆与包被 TNF-琢结合的抑制

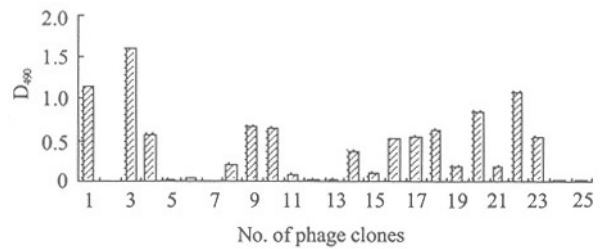


图 1 噬菌体克隆与 rhTNF琢的结合结果
Fig.1 Result of the binding of phage clones and recombinant human TNF-琢

No.1-23:Phage clones were screened with TNF琢 as target; No.24:Unrelated phage clone; No.25:c7c peptide library clone

将噬菌体克隆预先与 rhTNF-琢作用使其两者相互结合袁然后将混合物加入到 rhTNF-琢包被的酶标孔内袁固相表面的 rhTNF-琢与液相中的 rhTNF-琢竞争与噬菌体克隆结合袁以此来鉴定噬菌体克隆是否模拟 rhTNF-琢受体的识别表位并与 rhTNF-琢结合渊图 2 冤遥

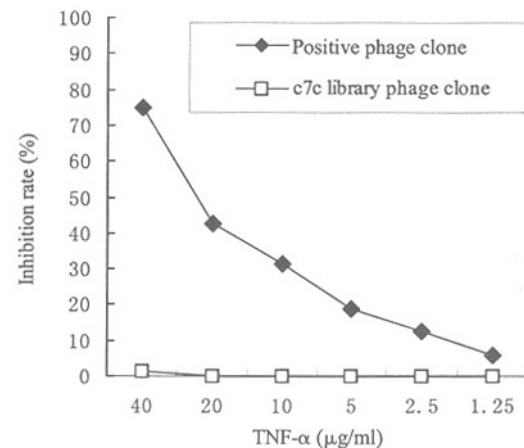


图 2 可溶性 TNF-琢对噬菌体克隆与包被 TNF-琢结合的抑制

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

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

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遥结果显示 11 个阳性克隆中袁两个克隆的氨基酸序列为院-ALWHWWH-c袁另外 9 个克隆序列为院-(T/S)WLHWWA-c遥

3 讨论

细胞因子拮抗剂的作用主要有以下两种渊渊冤遥

细胞因子直接结合以抑制或阻断其结合受体或抗体或可溶性受体与细胞因子竞争以达到与受体的结合模拟细胞因子与受体作用的表位

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。其优势在于噬菌体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。噬菌体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。竞争性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。但要获得高亲和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。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)WLH-WWA-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

- Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today*, 1989, 10: 299.
- Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, et al. Identification of two types of tumor necrosis factor receptor on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(8): 3127-31.
- 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. *Cell*, 1993, 73(3): 431-5.
- Feldmann M, Bondeson J, Brennan FM, et al. The rationale for the current boom in 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 minimize hazards. *Ann Rheum Dis*, 1999, 58(Suppl 1): 127-31.
- 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. *Immunol*, 1993, 151(3): 1548-53.
- 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. *Biol Chem*, 1996, 271(48): 30517-23.
- Chirinos-Rojas CL, Steward MW, Partidos CD, et al. A peptide-mimetic antagonist of TNF-alpha-mediated cytotoxicity identified from phage-displayed random peptide library. *J Immunol*, 1998, 161(10): 5621-6.
- 文维延, 韩强涛, 富宁. 脂多糖保守表位模拟肽的筛选与鉴定. *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. *Prog Biochem Biophys*, 2001, 28(2): 222-6.