

[通 讯]

## 用于识别不同细胞蛋白质组的噬菌体抗体芯片\*

洪 龙<sup>1</sup> 廖 玮<sup>2</sup> 魏 芳<sup>2</sup> 赵新生<sup>2</sup> 朱圣庚<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 北京大学生命科学学院; <sup>2</sup> 分子动态与稳态结构国家重点实验室,  
北京大学化学与分子工程学院化学生物学系, 北京 100871)

**摘要** 将 4 个鼠源噬菌体抗体克隆和 1 个人源噬菌体抗体克隆偶联到羧基终止的硅片表面, 制成分析型模型芯片. 挑选健康人体淋巴细胞为正常细胞的代表, HeLa 细胞为肿瘤细胞的代表, 提取细胞的全部蛋白质并用荧光染料 Cy3 标记, 与制成的分析芯片反应, 得到了不同的结合图谱. 实验结果表明, 以噬菌体抗体为分子感受器的分析芯片可用于识别不同细胞的蛋白质组.

**关键词:** 噬菌体抗体库, 生物传感器, 噬菌体抗体芯片, 蛋白质组

**中图分类号:** Q51, Q67

由于长期分子进化的结果, 抗体获得了识别各种生物分子的能力, 并且具有高灵敏度、高特异性和识别范围广的特点, 是分析型芯片最常用的分子感受器<sup>[1-2]</sup>. 然而目前已商品化的抗体种类有限, 其中相当部分只针对几类蛋白质(如细胞因子). 通过动物免疫或杂交瘤途径产生抗体不仅耗时、费力, 还难以获得某些抗原(如自身抗原、毒性蛋白或低免疫原蛋白)的抗体<sup>[3]</sup>. 因此, 发展蛋白质芯片首先面临的问题是如何高通量地获得各种抗体分子<sup>[4-5]</sup>. 另外, 与 DNA 分子的结构相比, 蛋白质有着较为复杂的空间结构特征, 将蛋白质偶联到芯片上有可能破坏蛋白质的空间结构, 使蛋白质丧失活性. 特别对于分子量较大( $> 10^5$  Dalton)、结构较复杂的抗体, 偶联到芯片后能否保持活性也是制备抗体芯片所要考虑的问题.

我们认为利用噬菌体抗体制备生物芯片有可能解决上述两个问题. 从噬菌体抗体库中可以方便获得各种噬菌体抗体, 并且只需分离克隆就能得到纯的展示抗体. 此外, 由于噬菌体是一个丝状体, 总会有一半以上展示在噬菌体上的单链抗体既不会受到化学修饰, 也不会与芯片基底发生疏水相互作用, 从而最大限度地保护了单链抗体的活性. 迄今为止, 用抗体制备蛋白质芯片已有许多的实

例, 但还未有直接用噬菌体抗体制备芯片的报导. 本文首次将噬菌体抗体芯片的思想从实验上给予实现. 我们从噬菌体抗体库中挑选了几个克隆, 经测序验证为正确的单链抗体后, 偶联到羧基终止的硅片上, 制成一个简单的分析型蛋白质芯片, 并证实它具有识别不同蛋白质(组)的能力.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

鼠源及人源噬菌体抗体库为本实验室构建. Cy3 荧光标记试剂盒购自 Pharmacia 公司.

### 1.2 实验步骤

(1) 噬菌体抗体的制备: 从鼠源和人源噬菌体抗体库中分别挑选 4 个和 1 个重组噬菌体克隆, 经扩增后由博亚公司(Bioasia Co.)测定其单链抗体的核苷酸序列, 根据 Kabat 规则, 定义各 CDR(互补决定区域). 将上述抗体克隆分别培养至对数生长期, 加入辅助噬菌体 M13KO7 进行超感染. 菌体用 2YT-AK 液体培养基于 30 °C 振荡培养过夜. 经两次 PEG(聚乙二醇)/NaCl 沉淀和一次乙酸沉淀分离重组噬菌体, PBS(pH = 7.4, 磷酸缓冲溶液)溶解后经 0.45 μm 滤膜过滤除菌. 测定重组噬菌体的滴度, 用 PBS 将滴度调整为  $10^{12}$  cfu(菌落形成单

2004-07-07 收到初稿, 2004-07-30 收到修改稿. 联系人: 赵新生(E-mail: zhaoxs@pku.edu.cn; Tel: 010-62751727; Fax: 010-62751708); 朱圣庚(E-mail: zhushg@pku.edu.cn; Tel: 010-62755453; Fax: 010-62751526). \* 国家自然科学基金(29973003, 20333010)和国家重点基础研究发展规划(G1999075305)资助项目

位). 偶联前, 向各噬菌体抗体溶液中加入 10% (体积浓度) 活化试剂 ( $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDC(碳二亚胺) 和  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NHS(*N*-乙酰琥珀碱)).

(2) 噬菌体抗体芯片的制备: 噬菌体抗体芯片所用硅基底均按已发表方法处理<sup>[6]</sup>. 将表面覆盖有自然氧化硅的硅片先腐蚀成 Si-H 表面, 然后与 10-十一碳烯酸甲酯在紫外光引发下反应, 使硅片表面形成酯基终止的致密有机膜. 最后通过酸化, 形成羧基终止的有机覆盖膜.

将处理好的硅片置于手动点样仪(MicroCASTer, S&S co. ltd, Germany)上, 通过接触式点样, 蘸取已活化的重组噬菌体抗体溶液到羧基终止的芯片表面,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  偶联过夜. 用原子力显微镜 Nano IIIa(DI company, USA) 观察噬菌体固定在芯片上的表面形貌. 检测前使用  $0.1\%$  PBST(含  $0.1\%$  体积吐温 20 的 PBS)清洗硅片.

(3) 细胞蛋白质的提取及标记: 用密度梯度离心法分离健康人体外周血中的淋巴细胞, 用尖嘴滴管吸出位于界面的淋巴细胞. HeLa 细胞按常规方法在 OMEM + 10% (体积浓度) 胎牛血清的培养基中培养与传代. 胰蛋白酶消化后,  $300 \text{ g}$  离心  $10 \text{ min}$  收集细胞.

使用  $1\%$  (体积浓度) Triton-100 悬浮细胞, 经  $600 \text{ g}$  离心  $10 \text{ min}$ , 收集上清液. 将上清液转移到新的离心管,  $5000 \text{ g}$  离心  $10 \text{ min}$ . 同样将上清液转移到新的离心管,  $8000 \text{ g}$  离心  $10 \text{ min}$ . 再将上清液  $10000 \text{ g}$  离心  $60 \text{ min}$ , 获得的上清液即为细胞的全蛋白溶液.

按照试剂盒的说明对全蛋白进行荧光标记, 并与游离的荧光染料分离.

(4) 分析芯片对不同细胞全蛋白的检测: 用  $2\%$  PBSM(含  $2\%$  体积脱脂奶粉的 PBS) 将偶联有噬菌体抗体的蛋白质芯片在  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  封闭  $1 \text{ h}$ . 同时用等体积的  $4\%$  PBSM 封闭 Cy3 标记的全蛋白, 后用  $0.1\%$  PBST 洗涤芯片三次. 将芯片置于细胞培养板中, 用 Cy3 标记的全蛋白没过芯片,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  反应  $2 \text{ h}$ . 用  $0.1\%$  PBST 洗涤芯片三次.

通过激光共聚焦扫描系统 (ScanArray Express, Perkin-elmer Inc., USA) 检测荧光信号.

## 2 结果

### 2.1 利用原子力显微镜 (AFM) 观察噬菌体与硅片的偶联

噬菌体覆盖的硅片, 用 AFM 对其表面形貌进行了纳米尺度的表征. 扫描采用单晶硅针尖, Tapping 模式, 以减少由于针尖与表面接触而导致的形貌的破坏. 整个图像的尺寸为  $2 \mu\text{m}$ . 图 1 显示表面固定噬菌体的形貌, 我们发现共价连接的噬菌体能保持其正常生理条件下的细丝状形态, 噬菌体呈致密排布, 并具有基本相同的取向, 这样的固定有利于保持噬菌体的生物活性.

### 2.2 激光共聚焦扫描系统检测芯片与不同细胞全蛋白结合的荧光信号

芯片表面荧光成像的工作由灵敏度最高的激光共聚焦扫描仪完成, 扫描的空间分辨率为  $10 \mu\text{m}$ , 扫描的结果由扫描软件自动合成出图 2 所示的荧光点阵图像, 斑点的亮度与该点实际的荧光强度成正比, 所以该图像可以给出非常直观的点阵图像的对比.

### 2.3 检测分析芯片与不同细胞全蛋白结合的荧光信号

为进行精确的数据比较, 我们分别对图 2 中代表不同噬菌体结合蛋白强度的荧光圆点用芯片统计软件 GenePix Pro 5.0 进行了统计, 统计所得平均值以及标准偏差绘成图 3.

## 3 讨论

与传统的研究方法相比, 蛋白质芯片具有较多优点: 它可以对细胞蛋白质样品实现高通量分析; 可以检测出样品中微量蛋白质的存在, 检测水平可达纳克级; 操作简单, 易分析, 可以立即获得结

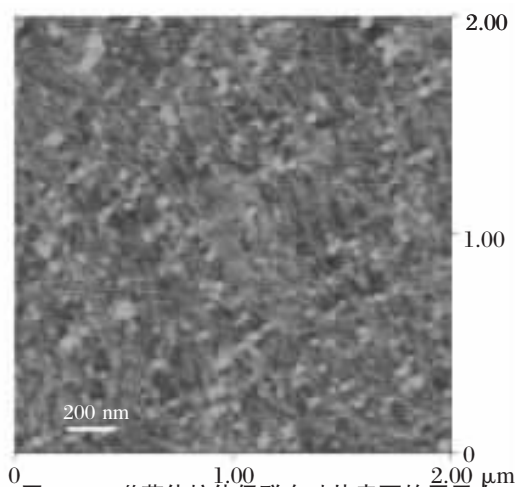


图 1 噬菌体抗体偶联在硅片表面的原子力显微镜照片

Fig. 1 AFM image of phage immobilized silicon surface

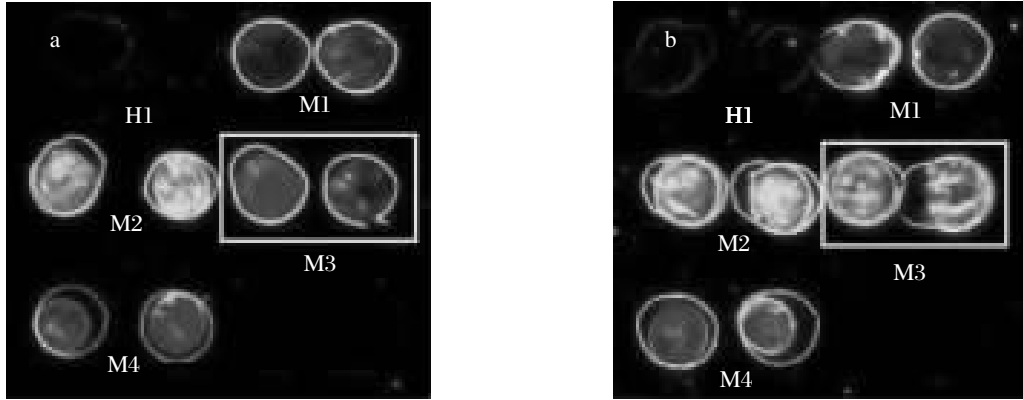


图2 细胞全蛋白与分析芯片的反应图谱

Fig. 2 Recognition patterns of different proteomes by phage antibody chip

a) Lymphocyte; b) HeLa cell. On the chip M1, M2, M3 and M4 are phages displaying monoclonal antibodies from mouse, and H1 from human.

果。因此可以广泛用于生物学和医学的研究与实践。

通过传统免疫或杂交瘤等途径获得抗体费时、费力，只适用于生产低密度的抗体芯片，无法满足制备高密度蛋白质芯片的要求。而噬菌体抗体是将抗体片段以融合蛋白的形式展示在噬菌体的表面，保持了抗体相对独立的结构和功能，是极有希望应用于分析芯片的分子感受器。通过噬菌体抗体技术可以建立快速、廉价、高通量地获得抗体克隆的方法，有望解决制约蛋白质芯片发展的瓶颈难题<sup>[7-10]</sup>。目前噬菌体抗体库的容量可达到  $10^{10}$  cfu<sup>[11-12]</sup>，已超过体内 B 细胞的数目。因此，从理论上说，如果分离到细胞中的各种蛋白质，就能够分别以这些蛋白质为抗原对噬菌体抗体库进行淘选，获得它们的特异单链抗体，以这些单链抗体制备的抗体芯片就可以获得整个蛋白质组的表达图谱。

事实上，为了检测细胞蛋白质，无需获得各蛋白质抗原一一对应的抗体。选择适当数量（例如

500 个抗体探针）有代表性的抗体制备芯片，蛋白质组的差别即可从芯片图谱上反映出来<sup>[13-15]</sup>。我们用 5 个噬菌体抗体克隆制备简单的芯片作为模型，与两种细胞全蛋白反应，结果如图 3 所示。从图中可以看出，各噬菌体抗体克隆反应的信号不同，两种细胞蛋白质组得到了不同的图谱。通过这个图谱，我们可以清晰地分辨出正常淋巴细胞和癌变 HeLa 细胞。在后续的工作中，我们将筛选出更多的展示了抗体的噬菌体，制作成更大规模的点阵芯片，这样将更加确切地得到不同细胞间的差别图谱。

由于胚胎时期自身抗体克隆的消除，外周血中已无针对自身抗原的淋巴细胞克隆，这可能是鼠源噬菌体抗体与两种人源细胞全蛋白反应信号高于人源噬菌体抗体的原因，其中以 M3 反应差异最大。通过这个结果，我们证明利用这种方法，可以进行更高通量地筛选针对某种细胞有高选择性的噬菌体抗体。本文仅以 5 种噬菌体抗体克隆制成芯片，代表性不够，但从方法学上看，已初步得到肯定的结果，证实了噬菌体抗体芯片思想的可行性。

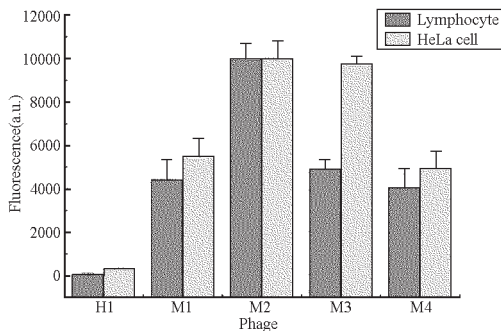


图3 噬菌体抗体芯片与不同细胞全蛋白反应的结果

Fig. 3 Fluorescent intensity of each phage antibodies reacted with different proteomes

H1, M1, M2, M3, M4 same as Fig. 1

## References

- Huang, R. P. *J. Immunol. Methods*, **2001**, *255* (1-2): 1
- Lueking, A.; Horn, M.; Eickhoff, H.; Bussow, K.; Lehrach, H.; Walter, G. *Anal. Biochem.*, **1999**, *270*(1): 103
- Smith, G. P. *Science*, **1985**, *228*: 1315
- Walter, G.; Bussow, K.; Lueking, A.; Glokler, J. *Trends. Mol. Med.*, **2002**, *8*(6): 250
- Hayhurst, A.; Georgiou, G. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, *5*(6): 683
- Liao, W.; Wei, F.; Qian, M. X.; Zhao, X. S. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2004**, *101*(3): 361
- Liu, B.; Huang, L.; Sihlbom, C.; Burlingame, A.; Marks,

- J. D. *J. Mol. Biol.*, **2002**, **315**(5): 1063
- 8 Wingren, C.; Ingvarsson, J.; Lindstedt, M.; Borrebaeck, C. A. K. *Nat. Biotechnol.*, **2003**, **21**(3): 223
- 9 Liu, B.; Marks, J. D. *Anal. Biochem.*, **2000**, **286** (1): 119
- 10 Palzkill, T.; Huang, W. Z.; Weinstock, G. M. *Gene.*, **1998**, **221**(1): 79
- 11 Belov, L.; de la Vega, O.; dos Remedios, C. G.; Mulligan, S. P.; Christopherson, R. I. *Cancer Res.*, **2001**, **61**(11): 4483
- 12 Sreekumar, A.; Nyati, M. K.; Varambally, S.; Barrette, T. R.; Ghosh, D.; Lawrence, T. S.; Chinnaiyan, A. M. *Cancer Res.*, **2001**, **61**(20): 7585
- 13 Senior, K. *Mol. Med. Today*, **1999**, **5**(8): 326
- 14 Sheets, M. D.; Amersdorfer, P.; Finnern, R.; Sargent, P.; Lindqvist, E.; Schier, R.; Hemingsen, G.; Wong, C.; Gerhart, J. C.; Marks, J. D. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, **95** (11): 6157
- 15 Geoffroy, F.; Sodoyer, R.; Aujame, L. *Gene.*, **1994**, **151** (1-2): 109

## Phage Antibody Chip for Discriminating Proteomes from Different Cells\*

Hong Long<sup>1</sup>      Liao Wei<sup>2</sup>      Wei Fang<sup>2</sup>      Zhao Xin-Sheng<sup>2</sup>      Zhu Sheng-Geng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>*School of Life Science*, <sup>2</sup>*State Key Laboratory of Molecular Dynamic and Stable Structures, and Department of Chemical Biology, College of Chemistry, Peking University, Beijing 100871*)

**Abstract** A model analytical chip was prepared by coupling 4 phage antibody clones from mouse and 1 clone from human to the surface of carboxyl-terminated silicon. The lymphocytes from healthy donors were selected as normal cells, while HeLa cells were selected as tumor cell. The whole proteins were labeled by fluorescent dye Cy3 after isolation from lymphocytes and HeLa cells, and then reacted with the analytical chip. A different binding pattern was obtained. Our results showed that the protein chip made of phage antibodies was able to recognize the proteome from different cells.

**Keywords:** Phage antibody library, Biosensors, Phage antibody chip, Proteome