

文章编号: 1000-7423(2005)-06-0388-04

【论著】

恶性疟原虫感染的红细胞膜表面蛋白 1 模拟肽的筛选及鉴定

郝文波, 李明, 徐伟文, 王萍, 陈白虹

【摘要】 目的 筛选恶性疟原虫感染的红细胞膜表面蛋白 1(PfEMP-1)的噬菌体表位模拟肽。方法 细胞间粘附分子 ICAM-1 模拟 12 肽(KLYLIAEGSVAA)能模拟 ICAM-1 分子与疟原虫感染红细胞结合的功能,以展示该短肽的噬菌体为靶,采用差减筛选法(subtraction method)对噬菌体环 7 肽库进行 3 轮筛选,通过 ELISA、竞争抑制试验鉴定获得的噬菌体短肽与 ICAM-1 之间的结合特性。对阳性克隆进行 DNA 及氨基酸序列分析与 PfEMP-1 氨基酸序列进行同源性比较。结果 ELISA 筛选 22 个克隆有 3 个为阳性克隆,氨基酸序列分析显示 2 个克隆的展示的短肽序列为 C-ITAVPVR-C,另 1 为 C-DIMGYN-C。同源性分析未发现 2 短肽序列与野生型 MC 株恶性疟原虫 PfEMP-1 的氨基酸序列有同源性。但竞争抑制试验显示 3 个阳性克隆均可与 15.2 单抗间互相竞争抑制与 ICAM-1 分子的结合。结论 获得 2 种 PfEMP-1 噬菌体构象表位模拟肽,两短肽能与 ICAM-1 分子特异性结合。

【关键词】 恶性疟原虫;红细胞膜表面蛋白 1;噬菌体随机肽库;表位模拟肽

中图分类号: R382.312

文献标识码: A

Screening and Preliminary Identification of Mimetic Peptides of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocyte Membrane Surface Protein 1

HAO Wen-bo, LI Ming, XU Wei-wen, WANG Ping, CHEN Bai-hong

(Tropical Disease Department, the Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To screen and identify mimetic peptides of Plasmodium falciparum-infected erythrocyte membrane surface protein 1 in order to explore anti-adhesive agent against cerebral malaria. Methods Phage-borne peptide KLYLIAEGSVAA was used as panning targets to select target binders in a disulfide-constrained heptapeptides library. Three rounds of biopanning were carried out and then ELISA and competitive ELISA were used to evaluate the binding character between phage-borne peptides and ICAM-1. The insert DNA sequences of positive clones were determined and their amino acid sequences were deduced. Results After three-round panning, 22 clones were randomly chosen from the third panning and analyzed. Three clones showed positive interaction with ICAM-1, and two of them possessed the amino acid sequence C-ITAVPVR-C, the other one was C-DIMGYN-C. These peptides specifically inhibited the binding of 15.2 antibody to ICAM-1 detected by competitive ELISA. Conclusion Two kinds of mimetic peptides of PfEMP-1 have been obtained, which can bind with ICAM-1 specifically.

【Key words】 Plasmodium falciparum; Erythrocyte membrane surface protein 1; Phage-displayed random peptide library; Mimetic peptide

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30200238)

恶性疟原虫感染的红细胞膜表面蛋白 1(PfEMP-1)是由疟原虫 var 基因家族表达的一种大分子变异蛋白,自虫体分泌后即定位于红细胞膜表面,作为疟原虫粘附蛋白或配体与血管内皮细胞上的粘附受体(如 CD36、细胞间粘附分子 ICAM-1、TSP 等)结合来介导恶性疟原虫(P.f)感染红细胞(PRBC)与血管内皮细胞

的粘附^[13]。尽管 PfEMP-1 是一种变异蛋白,但其与相应配体的结合位点是相对保守的。鉴定这些保守位点,对于研制以 PfEMP-1 为基础的疫苗和抗粘附阻断剂具有重要价值。噬菌体随机肽库技术是鉴定 PfEMP-1 与 ICAM-1 结合位点的一种行之有效的方法。本研究利用前期获得的能与 PRBC 结合的噬菌体展示 ICAM-1 模拟肽 KLYLIAEGSVAA(P1)为靶,从噬菌体环 7 肽库中筛选出 PfEMP-1 的模拟肽并进行了初步鉴定。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30200238)

作者单位:南方医科大学生物技术学院,广州 510515

材料与方法

1 主要试剂

噬菌体环 7 肽库 Ph.D.-C7C™ 为美国 New England Biolabs 公司产品, 由免疫教研室富宁教授惠赠, 库容 2×10^{13} pfu/ml, 随机多样性为 1.2×10^9 。展示 ICAM-1 表位模拟肽的噬菌体 KLYLIAEGSVAA 为本室制备。针对 ICAM-1 结构域 1 的特异性单抗 15.2、ICAM-1 蛋白购自深圳晶美生物工程有限公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗野生型丝状噬菌体 M13 的抗血清及 HRP 标记的亲毒素为美国 Pharmacia 公司产品。

2 噬菌体展示 ICAM-1 模拟肽对噬菌体环 7 肽库的筛选

按照文献^[4]方法, 取 1×10^{10} 展示噬菌体 P1 及野生型 M13 噬菌体分别包被于 96 孔 ELISA 板, 取 10^{11} 环 7 肽库噬菌体加入野生型 M13 噬菌体包被孔, 室温孵育 1 h。将消减的肽库转移至 P1 包被孔, 同时加入 1×10^{10} 野生型 M13 噬菌体, 室温孵育 1.5 h。吸去肽库, 磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤, 0.1 mol/L 甘氨酸-HCl(pH 2.2)洗脱, 1.5 mol/L Tris(pH 8.8)中和。取 1 μ l 测定噬菌体滴度, 其余洗脱液投入宿主菌 ER2738 中扩大培养, 聚乙二醇(PEG)沉淀法纯化噬菌体。按上述步骤共进行 3 轮筛选。15.2 单抗(McAb)10 μ g/ml 包被 ELISA 板, 5% 脱脂奶封闭, 加入第 3 轮筛选获得的洗脱液, 室温孵育 2 h 后小心吸出, 4 $^{\circ}$ C 保存。取适量适当稀释后感染宿主菌 ER2738, 铺制平板, 随机挑取单个噬斑, 接种于 1 ml LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 250 r/min 培养 4.5 h, 离心取上清即为噬菌体原种。

3 ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆

ICAM-1 分子、HRP-II 蛋白及 15.2 单抗 1 μ g/ml 同时包被 ELISA 板, 5% 脱脂奶封闭, 每孔加入 50 μ l 样品稀释液[含 1% 牛血清白蛋白(BSA)、1% Tween20 的 Tris-HCl 缓冲液]及 50 μ l 噬菌体原种(同时设噬菌体库为阴性对照、宿主菌 ER2738 培养上清为空白对照), 室温振荡 1 h。5% TBST 洗板, 加 1:5 000 HRP-抗 M13 抗体, 室温振荡 1 h。2, 2'-连氧-双(3-乙基苯噻唑林-6-磺酸盐)(ABTS)底物显色 5 min, 测定吸光度(A_{405} 值)。以 A_{405} 值高于空白对照和阴性对照 2.1 倍以上者定为阳性克隆。

4 噬菌体单链 DNA 的制备及测序

ELISA 阳性噬菌体单克隆扩增后, 取 500 μ l 上清聚乙二醇法沉淀后用 Lodide 缓冲液[10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 4 mol/L 碘化钠(NaI)]溶解, 再用无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 最后沉淀用 30 μ l TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA)溶解。取 10 μ l 单链 DNA(ss-DNA)测序模板送上海申友生物技术有限责任公司测序。测序引物为 5'- HO CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'。

5 15.2 单抗对阳性噬菌体与 ICAM-1 结合的竞争抑制试验

以 ICAM-1 分子(1 μ g/ml)100 μ l 包被 ELISA 板, 3% BSA 封闭, 加入 50 μ l 噬菌体(10^9)与不同浓度(分别为 0.1、0.5、1、2、5 μ g/ml)的 15.2 单抗 50 μ l 混合液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 再加 HRP-抗 M13 抗血清(1:5 000)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 3, 3', 5, 5' 四甲基联苯胺(TMB)显色, 测定 A_{405} , 检测与 ICAM-1 分子结合的噬菌体量。抑制率 = [(未加单抗 A 值 - 加单抗 A 值) / 未加单抗 A 值] \times 100%

6 阳性噬菌体对 15.2 单抗与 ICAM-1 结合的竞争抑制试验

以 ICAM-1 分子(1 μ g/ml)100 μ l 包板, 3% BSA 封闭, 分别加入 50 μ l 生物素化 15.2 单抗(0.1 μ g/ml)及 10 倍系列稀释的噬菌体(10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12}), 室温振荡 1 h, 再加 HRP-亲和素(1:5 000 稀释), TMB 显色, 测定 A_{405} , 观察阳性噬菌体展示肽对 ICAM-1 与 15.2 单抗结合的抑制情况。

结 果

1 肽库的筛选

用噬菌体展示 ICAM-1 模拟肽对环 7 肽库进行 3 轮筛选。投入噬菌体量均为 1.0×10^{11} , 回收噬菌体量分别为 3.8×10^6 、 1.7×10^7 、 3.6×10^7 。3 轮筛选的回收率依次为 3.8×10^{-5} 、 1.7×10^{-6} 、 3.6×10^{-6} 。在 3 轮筛选获得的中和洗脱液进行扩增前, 均与野生型 M13 噬菌体孵育, 同时投入噬菌体时也加入 M13 噬菌体, 以去除能与野生型 M13 结合的噬菌体。从噬菌体的回收率看, 富集效果并不明显。

2 ELISA 筛选阳性噬菌体克隆

第 3 轮筛选获得的中和洗脱液与 15.2 单抗孵育, 去除被洗脱的包被噬菌体。消减后的洗脱液适当稀释后铺制琼脂板, 随机挑选 22 个噬菌体单克隆制备噬

表 1 ELISA 筛选的 3 个阳性克隆的吸光度(A₄₀₅ 值)
Table 1 Absorbance of three positive phage clones(A₄₀₅ value)

包被抗原 Coated antigen	克隆序号 Code of clone			阴性对照 Negative control	空白对照 Blank control
	3	7	19		
细胞间粘附分子 1 (ICAM-1)	0.428	0.394	0.252	0.036	0.019
富组氨酸蛋白 II (HRP- II)	0.042	0.036	0.044	0.028	0.000
单抗 15.2 (McAb 15.2)	0.038	0.049	0.041	0.026	0.028

菌体原种。ICAM-1 分子包被进行噬菌体夹心 ELISA 试验, 同时以 HRP- II 包被作空白对照, 以 15.2 单抗包被以排除噬菌体 P1。对 ICAM-1 反应阳性、HRP- II 及 15.2 单抗反应阴性的克隆定为阳性克隆。本次 22 个克隆中有 3 个克隆阳性, 其 A₄₀₅ 值见表 1。

3 噬菌体 ssDNA 的制备及 DNA、氨基酸序列分析

按试剂盒说明书方法, 提取 3 个 ELISA 筛选阳性噬菌体克隆的 ssDNA, 经琼脂糖凝胶电泳显示获得了单一 DNA 条带。3 个克隆的 ssDNA 送“上海申友生物技术有限责任公司”测序, 克隆 3、7 展示相同 DNA 序列, 推导其氨基酸序列为 C-ITAVPVR-C, 克隆 19 展示的氨基酸序列为 C-DIMGGYN-C。将两展示肽序列与淋巴细胞功能相关抗原 1(LFA-1)及 MC 株 PfEMP-1 进行同源性分析, 未见同源性序列。

4 15.2 单抗对阳性噬菌体与 ICAM-1 结合的竞争抑制试验

ELISA 阳性克隆扩增后, 取 5×10⁹ 噬菌体进行竞争性试验。结果阳性噬菌体克隆 3、7 及 19 与 ICAM-1 分子间的结合均可被 15.2 单抗有效阻断, 且随 15.2 单抗浓度的增加而加强。表明这些噬菌体克隆展示的

环 7 肽表位能模拟 15.2 单抗的表位构象与 ICAM-1 结合, 并能被 15.2 单抗竞争抑制(图 1)。

5 阳性噬菌体对 15.2 单抗与 ICAM-1 结合的竞争抑制试验

阳性噬菌体克隆 3、7 及 19 扩增后, 自 10¹² pfu/ml 浓度始, 按 1/10 倍系列稀释至浓度 10⁵ pfu/ml, 进行竞争性 ELISA 试验。以相同浓度的野生型 M13 噬菌体为阴性对照, 观察不同浓度噬菌体展示肽对 15.2 抗体与 ICAM-1 分子结合的抑制作用(图 2)。当 15.2 抗体浓度为 0.1 μg/ml 时, 几个克隆的展示肽均能竞争性抑制 15.2 抗体与 ICAM-1 分子结合, 且随噬菌体浓度升高抑制作用增加, 其中克隆 3 和 7 的抑制程度相似, 均高于克隆 19, 野生型 M13 则不具有相应的抑制作用。进一步表明获得的阳性噬菌体展示肽能很好地模拟 15.2 单抗的表位构象。

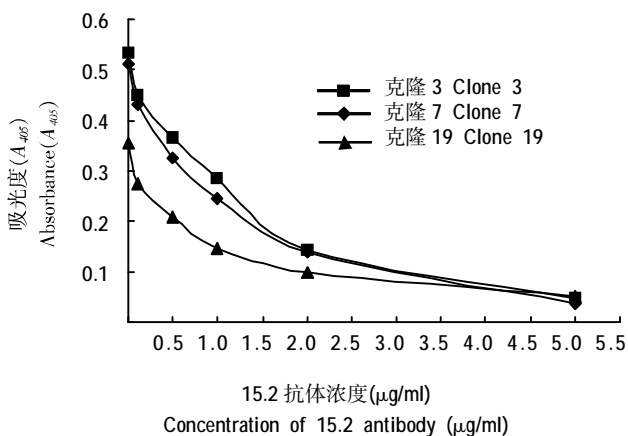


图 1 15.2 单抗对阳性噬菌体与 ICAM-1 结合的竞争抑制作用
Fig.1 Competitive inhibition of positive phage clones binding to ICAM-1 by 15.2

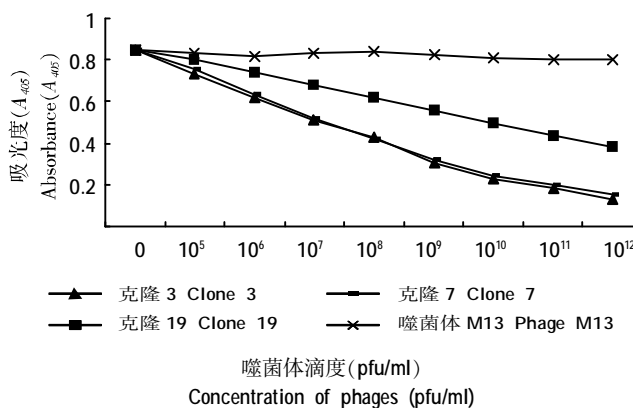


图 2 阳性噬菌体对 15.2 单抗与 ICAM-1 结合的竞争抑制
Fig.2 Competitive inhibition of 15.2 binding to ICAM-1 by positive phages

讨 论

在选择筛选靶抗原时, 应首先考虑 ICAM-1 是一个高分子蛋白, 能与包括 LFA-1、恶性疟原虫感染的红细胞 (PRBC)、鼻病毒、人类免疫缺陷病毒 (HIV)、

纤维蛋白原 (fibrinogen) 等多个配体结合^[5]。若以 ICAM-1 整个分子为靶, 将获得较多的结合克隆, 难以确定特异性模拟 PfEMP-1 的结合肽。作者已经用抗 ICAM-1 15.2 抗体筛选获得了 ICAM-1 的模拟肽, 由于 15.2 单抗能阻断 PRBC 与 ICAM-1 的结合, 表明该短肽模拟了 ICAM-1 与 PRBC 结合的位点^[6]; 若以此模拟肽为靶进行筛选, 获得的结合肽可能特异地反映 PfEMP-1 上结合位点的信息。而化学合成的 12 肽则因分子量小, 不能吸附于固相载体, 与 BSA 交联后, 没有很好的纯化, 也不适合作为肽库筛选的靶分子。从亲和力及活性鉴定结果看, 噬菌体展示的短肽较合成的短肽具有更好的亲和力和生物活性。因此, 作者以表达在噬菌体表面的短肽为靶进行了筛选。另一个优点是噬菌体本身还可以作为一个大分子支架, 有利于固相载体中的吸附。

在实验中, 多种因素可引起筛选的非特异性, 作者分别采取了措施予以克服。噬菌体表面有 9 种蛋白, 本研究目的短肽只有 12 个氨基酸, 所以筛选获得的噬菌体结合肽有可能是与噬菌体本身的蛋白结合的。针对这种可能性, 作者采用差减筛选法, 即先用 M13 噬菌体对环 7 肽库进行吸附, 除去与野生型 M13 噬菌体结合的克隆。再用吸附后的文库加野生型噬菌体对噬菌体 P1 进行筛选, 得到只与 12 肽结合、不与噬菌体自身蛋白结合的克隆。鉴定阳性克隆时, 以纯化 ICAM-1 分子为靶, 而不用 P1 噬菌体, 进一步排除了与噬菌体结合的克隆。另外, 在酸洗脱过程中, 作为包被噬菌体的 P1 可能被洗脱下来而增加鉴定阳性克隆的难度。因此, 在最后一轮洗脱后, 先用 15.2 抗体从洗脱液中将 P1 噬菌体吸附出来, 再用剩下的洗脱液铺板, 挑取单克隆进行鉴定。ELISA 鉴定, 分别用 3 种蛋白 (ICAM-1、无关蛋白 HRP-II、15.2 单抗) 包被, 对噬菌体克隆进行筛选, 选取只与 ICAM-1 结合的阳性噬菌体克隆。由于筛选时用环 7 肽库, 而包被噬菌体 P1 为 12 肽, 通过阳性噬菌体克隆 DNA 序列分析, 很容易鉴定其是否为目的克隆。

本实验存在一定的非特异现象, 进行鉴定的 22 个噬菌体克隆, 只有 3 个能与 ICAM-1 结合, 阳性率远低于纯化 ICAM-1 对噬菌体 12 肽库筛选的结果。有 10 个克隆能与 15.2 抗体反应, 说明有一部分包被噬菌体已被洗脱、未在铺板前被 15.2 抗体吸附。作者认为, 通过优化噬菌体包被条件, 如延长包被时间、采用吸附性能好的 ELISA 板等, 有可能使噬菌体牢固的吸附于固相载体上, 最大程度的减少“被洗脱”。DNA 及氨基酸序列分析显示, 噬菌体 3 个阳性克隆含有两个序列, 两个序列间未见明显的共同序列。但 3 个克隆均能与 ICAM-1 分子特异性结合, 并能与 15.2 单抗及 ICAM-1 模拟肽 P1 互相竞争抑制彼此的反应。可能这两个序列与其两侧的半胱氨酸形成一定的空间结构后, 都能部分模拟 15.2 单抗与 ICAM-1 分子结合位点的构象。下一步研究需筛选鉴定更多的阳性克隆, 分析阳性克隆间的共同序列, 鉴定 PfEMP-1 与 ICAM-1 的结合位点, 为进一步研制预防和治疗脑型疟的肽类药物和疫苗提供参考。

参考文献

- [1] Su XZ, Heatwole V, Wertheimer SP, et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes[J]. Cell, 1995, 82:89-100.
- [2] Baruch DI, Gormley JA, Ma C, et al. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:3497-3502.
- [3] Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, et al. Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes [J]. Cell, 1995, 82:101-110.
- [4] Castillo J, Goodson B, Winter J. T7 displayed peptides as targets for selecting peptide specific scFvs from M13 scFv display libraries[J]. J Immunol Methods, 2001, 257:117-122.
- [5] Craig AG, Berendt AR. The role of ICAM-1 as a receptor for rhinovirus and malaria[J]. Chem Immunol, 1991, 50:116-134.
- [6] 郝文波, 徐伟文, 李明, 等. 细胞间粘附因子-1 与恶性疟原虫感染红细胞结合位点的鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20:129-132.

(收稿日期:2004-11-29 编辑:富秀兰)

欢迎订阅《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》
欢迎寄生虫病科研、防治、教育工作者投稿!