

高密度噬菌体抗体芯片对细胞表面蛋白的识别

岑晓东¹ 王文娟² 赵新生^{2*} 汪玄³ 沈悌³
谭涛超¹ 毕群¹ 朱圣庚^{1,*}

(¹北京大学生命科学学院, 北京 100871; ²北京大学化学与分子工程学院化学生物学系, 分子动态与稳态结构国家重点实验室, 北京 100871; ³北京协和医院, 北京 100730)

摘要 采用正常人和白血病患者的白细胞对人源噬菌体抗体库进行淘选, 以获得对两种细胞表面蛋白特异的抗体. 通过 pVIII 展示系统, 使抗体以多价展示于重组噬菌体颗粒表面, 从上述两组中各挑选出 48 个克隆分别固定于环氧基片上, 并以空白噬菌体和牛血清白蛋白作为对照, 制成高密度噬菌体抗体芯片. 取来自 3 名正常人和 3 名白血病患者的白细胞裂解物样品, 用荧光染料 Cy3 标记, 与噬菌体抗体芯片反应, 对微阵共聚焦扫描得到的荧光图谱进行分析. 在白血病白细胞表面蛋白的识别图谱中有 8 组斑点显著不同于正常图谱. 由此表明, 噬菌体抗体芯片可用于识别细胞表面蛋白.

关键词: 噬菌体抗体库, pVIII 展示系统, 高密度噬菌体抗体芯片, 白血病, 白细胞表面蛋白
中图分类号: O647, Q51

Recognition of Cell Surface Proteins by High-density Phage Antibody Chip

CEN, Xiao-Dong¹ WANG, Wen-Juan² ZHAO, Xin-Sheng^{2,*} WANG, Xuan³
SHEN, Ti³ TAN, Tao-Chao¹ BI, Qun¹ ZHU, Sheng-Geng^{1,*}

(¹College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, P. R. China; ²State Key Laboratory for Structural Chemistry of Unstable and Stable Species, Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Chemical Engineering, Peking University, Beijing 100871, P. R. China; ³Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, P. R. China)

Abstract A large human phage antibody library was subjected for panning with leukocytes from healthy donors and leukemia patients to select for specific antibodies against leukocytic surface proteins. Recombinant phage particles displaying multiple antibody fragments *via* pVIII display system were used to prepare high-density phage antibody chips. Leukocyte lysate samples from 3 healthy donors and 3 leukemia patients were labeled with Cy3 fluorescence dye and reacted with the microarrays on the epoxy substrates. Eight sets of specific spots were found to have significantly distinct fluorescence intensities between the two groups of fluorescence profiles. It was demonstrated that phage antibody chips could be used for the recognition of cellular surface proteins.

Keywords: Phage antibody library, pVIII display system, High-density phage antibody chip, Leukemia, Leukocytic surface protein

蛋白质芯片技术为蛋白质组学的研究提供了有力手段, 它能够以高通量的形式检测蛋白质-蛋白

质、蛋白质-其它分子的相互作用, 从而为诠释生命活动、寻找病因、诊断疾病、开发药物提供大量有用

Received: December 29, 2005; Revised: February 23, 2006. *Correspondent, E-mail: zhug@pku.edu.cn; Tel: 010-62755453; Fax: 010-62751526; E-mail: zhaogs@pku.edu.cn; Tel: 010-62751727; Fax: 010-62751708.

国家自然科学基金(20333010)资助项目

信息^[1-3]. 以单克隆抗体作为捕捉分子的分析芯片具有较高精确度和灵敏度, 但是单抗来源的局限性势必也会限制抗体芯片的发展^[4-8].

噬菌体抗体芯片是本实验室研制成功的一种新型蛋白质芯片. 使用噬菌体抗体尤其是在 pVIII 平台上展示抗体片段的重组噬菌体颗粒替代传统单抗具有很多优势^[9-11], 主要体现在以下三个方面: ①可以通过亲和淘选由噬菌体抗体库获得针对各种抗原的噬菌体抗体, 无需免疫动物; ②可以通过单克隆扩增的方法来获得纯的噬菌体抗体, 避免了纯化单抗所必需的繁琐步骤; ③重组噬菌体颗粒将抗体片段展示在表面, 充分暴露抗体片段的互补决定区, 从而避免了芯片表面的干扰.

我们制作了用于检测白血病的高密度噬菌体抗体芯片, 并将正常人和白血病患者白细胞裂解物样品用荧光染料标记, 与芯片反应. 比较正常人和白血病患者白细胞裂解物样品的识别图谱, 找到了显示差异的白细胞表面蛋白抗体, 证明芯片可用于识别细胞表面蛋白.

1 实验部分

1.1 实验材料

大型人源单链抗体片段(scFv)合成库由本实验室自行构建. 正常人外周血样品由北京大学校医院检验科提供. 白血病患者骨髓样品由协和医院血液科提供. 每次由 1 mL 正常人外周血样品或 0.5 mL 白血病患者骨髓样品通过沉降法分离白细胞.

1.2 实验步骤

(1) 噬菌体抗体库的淘选: 用正常人白细胞对噬菌体抗体库进行五轮细胞淘选, 获得针对白细胞表面共同抗原的噬菌体抗体. 再用白血病患者白细胞对经过正常人白细胞扣除后的噬菌体抗体库进行三轮淘选, 获得针对白血病特异抗原的噬菌体抗体^[12]. 每次使用的白细胞来自不同的正常人和白血病患者, 且白血病患者都确诊为急性髓细胞白血病.

(2) 噬菌体抗体芯片的制作: 将淘选得到的抗体基因由 pIII 展示平台转移至 pVIII 展示平台. 由两组实验各挑取 48 个单克隆以制备重组噬菌体颗粒, 作为噬菌体抗体微阵的探针. 将噬菌体悬浮液的浓度调至约 10^{12} cfu $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (cfu: 菌落形成单位), 并在点样前添加十二烷基硫酸钠(SDS)至终浓度 0.2%(w, 下同). 将作为探针的 96 份噬菌体悬浮液和作为阴性对照的 2 份辅助噬菌体 M13KO7 悬浮液及 2 份

2%牛血清清蛋白(BSA)溶液置于 384 孔板中, 固定到工作站中. 使用微阵点样仪 ArrayIt™ SpotBot^R Personal Microarray Robot (TeleChem International Inc.)将噬菌体抗体克隆点到环氧基玻片 CapitalBio^R EpoxySlide™(CapitalBio Corporation)上. 每个微阵由 300 个点组成, 即每种探针点有 3 个点. 将芯片于 37 °C 固定过夜.

(3) 白细胞裂解物样品的标记: 将来自 3 名正常人和 3 名白血病(急性髓细胞白血病)患者的白细胞在 100 μL 含 1% Triton-100 的磷酸盐缓冲液(PBS; PBST)中裂解. 对通过离心得到的裂解物上清液用 Cy3 荧光染料(Cy3 Mono-reactive dye pack, Amersham Biosciences)标记, 并用凝胶过滤柱(FluoroLink™ -Ab Cy3 labelling kit, Amersham Biosciences)纯化.

(4) 白细胞裂解物样品与噬菌体抗体芯片的反应和检测: 将噬菌体抗体芯片用 2% 普通 BSA(Roche; 溶于 PBS)于 37 °C 封闭 30 min, 然后用 2% 乙酰化 BSA (Promega; 溶于 PBS)于 37 °C 再封闭 30 min. 向每个样品池中加入 40 μL Cy3 标记的白细胞裂解物样品, 并将芯片于 37 °C 保温 1 h. 将芯片用 0.1% PBST 清洗 3 次, 用 PBS 清洗 1 次, 每次 5 min. 最后, 使用微阵共聚焦扫描仪 ScanArray express microarray scanner(Perking Elmer)检测 Cy3 荧光.

2 结果

2.1 噬菌体抗体芯片对白细胞裂解物样品的识别

将 3 份正常人样品和 3 份白血病样品与噬菌体抗体芯片反应, 对得到的 6 份识别图谱进行汇总和比较. 其中, 噬菌体微阵中作为阴性对照的辅助噬菌体 M13KO7 和 BSA 与两类样品都没有反应. 探针 N01-N48 来自用正常人白细胞对噬菌体抗体库进行的细胞淘选, 是针对白细胞表面共同抗原的噬菌体抗体探针, 它们与 6 份样品反应的荧光图谱基本相同. 探针 L01-L48 来自用正常人和白血病患者白细胞对噬菌体抗体库进行的减法淘选, 是针对白血病特异抗原的噬菌体抗体探针, 它们与 6 份样品反应的荧光图谱差异较大, 有的白血病患者样品的信号明显比正常人样品的信号强. 我们找出了其中差异比较明显的 8 组斑点: L06、L09、L12、L17、L21、L24、L43、L46, 与这些探针对应的斑点在 3 份白血病样品的检测图谱中都有很强的信号, 而在 3 份正常人样品的检测图谱中信号都很弱.

2.2 荧光信号的定量比较

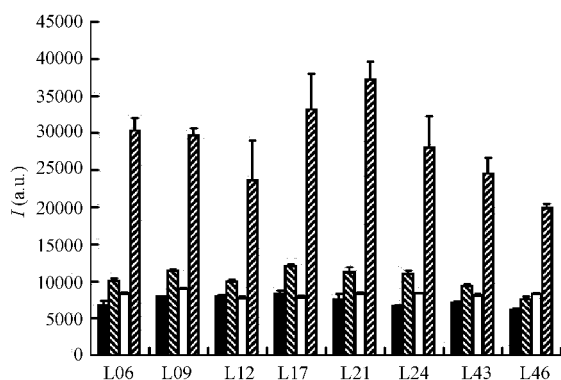


图 1 不同样品与噬菌体抗体微阵反应的荧光强度

Fig.1 Fluorescence intensities of the different samples

■ Background of healthy lymphocyte, ▨ signal of healthy lymphocyte, □ background of leukemia lymphocyte, ▩ signal of leukemia lymphocyte

对 6 份荧光图谱进行了全面的定量数据采集. 图 1 显示了第 1 份正常人样品和第 2 份白血病样品与上述 8 个探针反应的荧光强度. 在第 1 份正常人样品与噬菌体抗体微阵反应的荧光图谱中, 与这 8 个探针对应的斑点荧光强度中值只是略高于背景中值(平均值高 1.4 倍);而在第 2 份白血病样品与噬菌体抗体微阵反应的荧光图谱中, 与这 8 个探针对应的斑点荧光强度中值显著高于背景中值(平均值高 3.4 倍). 横向比较, 两份样品与噬菌体抗体微阵反应的背景较为接近, 前者这 24 个斑点的平均背景中值是 7377, 后者这 24 个斑点的平均背景中值是 8319 (是前者的 1.13 倍);但是两份样品与噬菌体抗体微阵反应的信号差异显著, 前者这 24 个斑点的平均信号中值是 10393, 后者这 24 个斑点的平均信号中值是 28320 (是前者的 2.72 倍). 也就是说, 在背景较为接近的情况下, 这 8 个探针在与正常人样品和白血病样品反应的荧光图谱中得到了较为显著的差异显示.

3 讨论

在丝状噬菌体外壳蛋白 pIII 只有 3~5 个拷贝, pVIII 有 2700 个拷贝. 因此将外源蛋白通过 pIII 展示, 有利于淘选高亲和力的噬菌体抗体; 在 pVIII 上展示有利于制备高信噪比的噬菌体抗体芯片. 在用白细胞淘选到共同和特异的噬菌体抗体后, 随即将 pIII 展示系统转变为 pVIII 展示系统, 以便增强芯片信号.

为了适应蛋白质组学研究的需要, 已经在蛋白质二维电泳的基础上开发了针对整个蛋白质组的高

通量淘选方法^[13]. 由此制成的针对整个或部分蛋白质组的噬菌体抗体芯片可用于检测蛋白质组表达谱. 在临床上, 如果将针对疾病相关抗原的大量噬菌体抗体制成微阵, 根据临床样品的反应图谱不但能够诊断疾病, 甚至同时能够找到病因, 或许还能筛选有效药物. 用正常人和白血病白细胞淘选噬菌体抗体库, 获得了针对白细胞表面抗原的噬菌体抗体克隆, 以此作为探针制作了用于检测白血病的噬菌体抗体芯片. 在噬菌体抗体微阵对正常人和白血病白细胞裂解物样品进行识别后, 8 个探针在 3 份正常人样品和 3 份白血病样品的荧光图谱中显示差异, 尽管这一结果还有待更多样品的检验, 但是这种方法为疾病诊断提供了新的途径.

References

- Mah, A. S.; Elia, A. E.; Devgan, G.; Ptacek, J.; Schutkowski, M.; Snyder, M.; Yaffe, M. B.; Deshaies, R. J. *BMC Biochem.*, **2005**, **6**: 22
- Zhong, L.; Hidalgo, G. E.; Stromberg, A. J.; Khattar, N. H.; Jett, J. R.; Hirschowitz, E. A. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2005**, **172** (10): 1308
- Lee, Y.; Kang, D. K.; Chang, S. I.; Han, M. H.; Kang, I. C. *J. Biomol. Screen.*, **2004**, **9**(8): 687
- Knecht, B. G.; Strasser, A.; Dietrich, R.; Martlbauer, E.; Niessner, R.; Weller, M. G. *Anal. Chem.*, **2004**, **76**(3): 646
- Rucker, V. C.; Havenstrite, K. L.; Herr, A. E. *Anal. Biochem.*, **2005**, **339**(2): 262
- Miller, J. C.; Zhou, H.; Kwekel, J.; Cavallo, R.; Burke, J.; Butler, E. B.; Teh, B. S.; Haab, B. B. *Proteomics*, **2003**, **3**: 56
- Belov, L.; Huang, P.; Chrisp, J. S.; Mulligan, S. P.; Christopherson, R. I. *J. Immunol. Methods*, **2005**, **305**(1): 10
- Hudelist, G.; Pacher-Zavisin, M.; Singer, C. F.; Holper, T.; Kubista, E.; Schreiber, M.; Manavi, M.; Bilban, M.; Czerwenka, K. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2004**, **86**(3): 281
- Arnaud, M. C.; Gazarian, T.; Rodriguez, Y. P.; Gazarian, K.; Sakanyan, V. *Proteomics*, **2004**, **4**: 1959
- Cekaite, L.; Haug, O.; Myklebost, O.; Aldrin, M.; Ostenstad, B.; Holden, M.; Frigessi, A.; Hovig, E.; Sioud, M. *Proteomics*, **2004**, **4**: 2572
- Liao, W.; Hong, L.; Wei, F.; Zhu, S. G.; Zhao, X. S. *Acta Phys.-Chim. Sin.*, **2005**, **21**(5): 508 [廖 玮, 洪 龙, 魏 芳, 朱圣庚, 赵新生. 物理化学学报(*Wuli Huaxue Xuebao*), **2005**, **21**(5): 508]
- Shadidi, M.; Sioud, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, **280**: 548
- Liu, B.; Huang, L.; Sihlbom, C.; Burlingame, A.; Marks, J. D. *J. Mol. Biol.*, **2002**, **315**(5): 1063