

HPV 58 型 E7 蛋白特异结合多肽的筛选及分析^{* 1}

范久松^{1,2}, 赵洪彬³, 林浩³, 马岚²

(1. 清华大学 生命科学学院, 北京 100084; 2. 清华大学 深圳研究生院 生命与健康学部, 广东 深圳 518055;
3. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650091)

摘要: 利用 M13 噬菌体展示技术筛选 HPV 58 型 E7 蛋白特异性结合 12 肽, 对这些多肽的序列比对分析得出其共有序列, 同时通过 BLASTP 序列对比分析获得能与 E7 结合的内源蛋白. 利用 GST-E7 融合表达蛋白为正筛靶分子, GST 蛋白为负筛靶分子进行 4 轮的正负亲和筛选, 经过 ELISA 活性鉴定获得 71 株阳性克隆, 通过 DNA 测序和序列分析, 得到 2 个能与 E7 蛋白发生特异性结合的共有序列 NHXXANPQQXPQ 和 TMGFTAPRF-PHY. 通过 BLASTP 分析所有 71 个多肽在体内的同源蛋白, 它们能为对 E7 蛋白的致癌机理研究提供方向.

关键词: 噬菌体展示; E7 蛋白; 多肽

中图分类号: Q 786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2011)05-0620-06

研究证实, 宫颈癌的发生与 HPV 有着直接的相关性^[1]. HPV 58 型属于高危型 HPV, 较世界范围内最常见的 HPV 16 型和 HPV 18 型少见, 它在世界范围内的宫颈癌患者中的阳性率仅为 2% 左右, 而在亚洲国家的阳性率却高达 6%~30%. 中国是 HPV 58 型的高发区之一, 目前有很多研究发现中国宫颈癌患者组织中 HPV 58 型的发现率仅次于 HPV 16 型, 甚至在特定地方高于所有其他高危型的发现率.

HPV E7 蛋白是 HPV 重要的致癌因子. E7 蛋白产物结合于 pRB, 使其被磷酸化失去活性, 对 E2F-1 细胞周期蛋白的结合能力降低, 游离的 E2F-1 蛋白因为暴露了转录激活位点而促使细胞 S 期蛋白基因激活而表达出大量 S 期相关蛋白, 使 HPV 感染的细胞进入 S 期而导致细胞转化和肿瘤发生^[2].

鉴于 HPV 58 型的特殊性和 E7 蛋白在宫颈癌形成中的重要作用, 试验选择利用噬菌体展示技术筛选跟 HPV 58 型 E7 蛋白特异性结合的多肽. 本研究的目的首先是获得与 E7 蛋白特异性结合的 12 肽, 并通过对这些多肽的序列比对分析得出其

共有序列, 这些多肽将可以用于 E7 蛋白体内标记和 HPV 检测研究; 其次是要通过对获得的特异结合的多肽的 BLASTP 序列对比分析获得能与 E7 结合的内源蛋白, 为对 E7 蛋白的致癌机理研究提供方向.

1 材料与方法

1.1 材料 Ph. D. -12TM 噬菌体 12 肽展示库购自 New England BioLabs; HRP 标记的鼠抗 M13 单克隆抗体(1:5000)购自 GE Healthcare 公司; 免疫管购自 NUNC; 胰蛋白酶和酵母提取物购自 OX-OID; IPTG/Xgal 购自 BBI; 其它试剂为国产分析纯.

用于正筛的 GST-E7 融合蛋白的对应质量浓度为 654.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 用于负筛的 GST 蛋白的质量浓度为 750.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

1.2 方法

1.2.1 宿主菌 ER2738 的保存和活化 进行平板(含 1% 四环素)划线活化宿主菌, 挑取单克隆菌落于 5 mL LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 220 r/min 培养过夜. 培养物放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱.

* 收稿日期: 2011-05-24

基金项目: 云南大学理(工)科校级科研项目资助(2009C13R).

作者简介: 范久松(1987-), 男, 河南人, 硕士, 主要从事蛋白筛选方面的研究.

通讯作者: 马岚(1965-), 云南人, 副教授, 主要从事宫颈癌抗体药物及治疗性疫苗等研究.

1.2.2 靶蛋白的包被和免疫管的封闭 用于正负筛选的靶蛋白在同一轮筛选中的质量浓度相同,4轮的E7蛋白包被质量浓度依次为100,80,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和60 $\mu\text{g}/\text{mL}$,GST包被质量浓度恒定为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.以0.1 mol/L的 NaHCO_3 (pH 8.6)缓冲液配制靶蛋白溶液至1 mL后包被于免疫管4 $^\circ\text{C}$ 过夜,次日用1% BSA封闭液37 $^\circ\text{C}$ 孵育1 h,洗涤液为含特定含量Tween-20的TBST溶液,4轮中Tween-20的体积分数依次为0.1%,0.25%,0.5%和0.5%.

1.2.3 噬菌体文库的筛选 在每轮的筛选过程分为以下5个步骤进行^[3-6]:

(1) 先进行正向筛选,于包被融合蛋白GST-E7的免疫管中加入1 mL含Tween-20的TBST,再加入噬菌体文库10 μL ,吹匀后室温摇床上温和摇动50 min(在后3轮筛选中是加入扩增后的噬菌体 1×10^{11} pfu),然后回收未结合的噬菌体.

(2) 再进行负向筛选,将回收的未结合的噬菌体液加入到包被GST蛋白的免疫管中封口后室温摇床上温和摇动50 min,然后倒去未结合噬菌体,下面的步骤将回收结合的噬菌体.

(3) 用TBST缓冲液洗管10次,拍干.

(4) 洗脱:加入1.6 mL洗脱液,封口后用手来回振摇10 min.

(5) 中和:将洗脱液转移至2 mL离心管中,加入300 μL 中和缓冲液,吹匀即获得当轮筛选的洗脱物.

在每轮的筛选过程中都应取10 μL 的未结合噬菌体上清和10 μL 的洗脱物进行滴度测定,以更好地监测噬菌体的结合情况.

1.2.4 噬菌体洗脱液的扩增和纯化 剩余噬菌体洗脱液加到装有20 mL LB的250 mL三角瓶中,加入过夜培养的宿主菌200 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 220 r/min扩增培养4.5~5 h,然后4 $^\circ\text{C}$ 12 000 r/min离心17 min,将全部上清转入一新鲜离心管中,加入1/6体积的PEG/NaCl,4 $^\circ\text{C}$ 过夜沉淀,次日4 $^\circ\text{C}$ 12 000 r/min离心17 min,沉淀物重悬于1 mL TBS,然后转入微量离心管,室温10 000 r/min离心7 min,上清转入离心管,用PEG/NaCl再沉淀,冰上孵育40 min,室温离心17 min,弃上清,沉淀物重悬于200 μL TBS中,10 000 r/min离心1 min,上清转入新鲜管中,此即为扩增后的洗脱物.

1.2.5 噬菌体滴度的测定 取装5 mL LB的试管,加入50 μL 的过夜培养菌液,摇床37 $^\circ\text{C}$ 220 r/min培养1.5 h.取待测噬菌体液1 μL ,用LB液体培养基作10倍系列稀释,建议的稀释范围:如果是扩增后的噬菌体纯化产物是 $10^8, 10^9, 10^{10}$,而未扩增的筛选洗脱物则为 $10^1, 10^2, 10^3$.取这3个稀释度的噬菌体液感染200 μL 宿主菌的对数期培养物,混合均匀后静置10 min,然后加入到顶层琼脂培养基中,充分混匀,铺板于LB/Xgal/IPTG固体培养基上,每次滴度需要2~3个平行组,37 $^\circ\text{C}$ 培养过夜.次日记录噬菌斑数,计算待测噬菌体液的滴度.

1.2.6 ELISA鉴定阳性克隆与DNA测序 挑取第4轮铺板的噬菌斑,加入5 mL LB的试管中,同时加入1%的过夜培养宿主菌,37 $^\circ\text{C}$,220 r/min培养4.5 h后,离心90 s,取80%上清,即为单克隆贮液,保存于-20 $^\circ\text{C}$.将2种靶蛋白稀释于pH 8.6的包被缓冲液中,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,分别包被一个96孔酶标板(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$),4 $^\circ\text{C}$ 过夜包被.次日,用单克隆贮液(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$)进行常规ELISA检测,以包被GST蛋白的孔为阴性对照,包被融合蛋白的孔吸光度值大于其阴性值0.1以上者为阳性克隆.

阳性克隆DNA纯化按照操作手册的方法进行,序列测定由Invitrogen公司完成.

2 结果与分析

2.1 4轮亲和筛选噬菌体富集情况 从表1可以看出,虽然靶蛋白包被量降低,但是回收率却在逐轮上升,最终富集倍数为430.

通过图1分析得知未与负筛蛋白GST结合的噬菌体以对数趋势升高,进入每轮正筛中的噬菌体数越来越多,负筛的效果非常显著.

通过图2得知与正筛蛋白E7结合的噬菌体以指数趋势升高,但是由于包被蛋白量及其空间结合位点的限制,噬菌体的结合量是有限的.在富集率超过300时可以停止正筛.

2.2 各轮噬菌体洗脱物的总体ELISA测定 利用每轮正筛后的洗脱物进行的总体ELISA可以给试验进度提供可靠的指导.如图3所示,在4轮筛选过程中,洗脱噬菌体跟E7和GST亲和力的差距逐渐增加,在第4轮时达到富集效果,停止筛选.

表 1 4 轮亲和筛选噬菌体富集情况

Tab. 1 Enrichment of phages for each round of selection

轮次	φ (TBST)/%	投入噬菌体/体积	负筛后滴度/ (10^7 pfu)	正筛后滴度/ (10^2 pfu)	产出量/ pfu	回收率
1	0.10	1×10^{11}	22	2	3.8×10^4	3.8×10^{-7}
2	0.25	1×10^{11}	61	47	8.93×10^5	8.93×10^{-6}
3	0.50	1×10^{11}	90	180	3.42×10^6	3.42×10^{-5}
4	0.50	1×10^{11}	97	860	1.63×10^7	1.63×10^{-4}

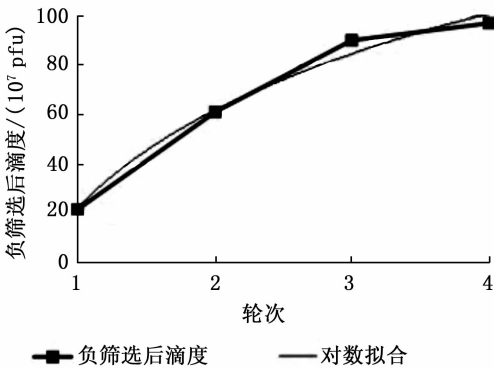


图 1 每轮负筛后的滴度变化

Fig. 1 Phage titer's change after each round of negative selection

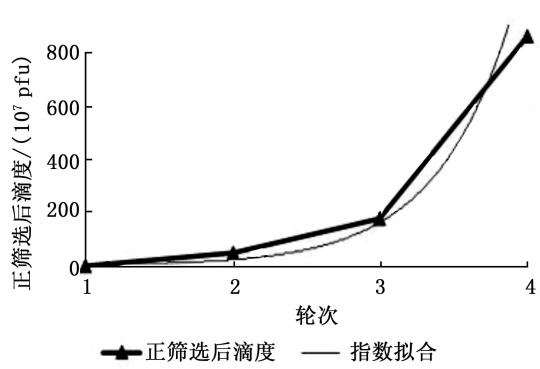


图 2 每轮正筛后滴度变化

Fig. 2 Phage titer's change after each round of positive selection

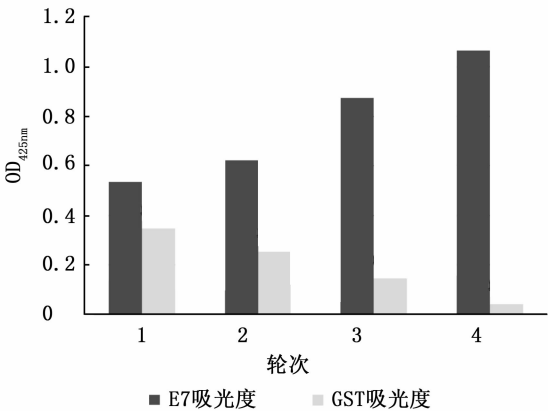


图 3 4 轮噬菌体总体 ELISA 变化

Fig. 3 ELISA results for each round of selection using total phages

2.3 阳性克隆的 DNA 序列和相应的噬菌体多肽亲和力分析 用第 4 轮筛选所得噬菌体洗脱物进行铺板,从中随机挑选了 240 个蓝色噬菌斑进行扩增、纯化和 ELISA 检测,得到 71 个阳性克隆,其中强阳性克隆 30 个,列于表 2. 表中的排序是按照共

有序列有无和 OD 值降序排列.

2.4 特异性结合多肽的共有序列分析 通过序列比对可以得出共有基序为 NHXXANPQQXPQ,另一个共有基序是 TMGFTAPRFPHY. 两者的平均 OD 值分别为 0.3 和 0.5, OD 值最大的 3 个克隆 66、71、59 在挑斑中并未出现重复序列,推断它们属于复制能力较差的克隆,虽然亲和力很强,但拷贝数较少.

3 讨论

噬菌体展示技术用途广泛,针对不同的需求需要进行相应的改进. 本试验采用正负筛选这种改进措施进行亲和性多肽筛选. 另外筛选的轮数不是越多越好,因为每种噬菌体由于携带的插入基因组不同,导致在宿主菌中的增殖能力有差异,经过太多轮筛选扩增会导致能高特异性结合但增殖能力低的噬菌体种类丢失,而增殖性强的序列富集明显,导致噬菌体序列单一. 在试验中,利用测定各轮噬菌体洗脱物总体 ELISA 的方法对过程进行控制,达到了很好的效果.

表 2 强阳性克隆 DNA 序列和多肽序列

Tab. 2 DNA sequences and amino acid sequences of strong positive clones

编号	DNA 序列	12 肽序列	OD 值
17	AATAATCATTATGCTAATCCTCATGAGAATCCTCAG	NNHYANPHENPQ	0.395
21	AATCATTATAAGGCGAATCCTCAGGAGCATCCTCAG	NHYKANPQEHPQ	0.342
27	AATCATAATCATCCTAATCCTCAGGAGCCTCCTCAG	NHNHPNPQEPPQ	0.327
19	AATCATCAGCAGCCGAATCCTCAGCAGCAGCCTCAG	NHQQPNPQQQPQ	0.321
13	AATCATCATCATCCTAATCCTCATCAGCATCCTCAG	NHHHPNPHQHPQ	0.300
14	AATCATAATAAGGCGAATCCTAAGCAGCAGCCTCAG	NHNKANPKQQPQ	0.297
16	AATCTTCTGAAGGCTAATCCTCAGCAGGATCCTCAG	NLLKANPQQDPQ	0.290
28	AATAATCAGCATACTAATCCTAAGGAGCCTCCTCAG	NNQHTNPKEPPQ	0.239
15	AATCATTATAATGCGAATCCTAAGGAGGAGCCTCAG	NHYNANPKEEPQ	0.237
11	ACTATGGGTTTTACGGCTCCGCGGTTTTCCGCATTAT	TMGFTAPRFPHY	0.554
40	ACTATGGGTTTTACGGCTCCGCGGTTTTCCGCATTAT	TMGFTAPRFPHY	0.529
32	ACTATGGGTTTTACGGCTCCGCGGTTTTCCGCATTAT	TMGFTAPRFPHY	0.482
44	ACTATGGGTTTTACGGCTCCGCGGTTTTCCGCATTAT	TMGFTAPRFPHY	0.456
61	ACTATGGGTTTTACGGCTCCGCGGTTTTCCGCATTAT	TMGFTAPRFPHY	0.440
33	ACTATGGGTTTTACGGCTCCGCGGTTTTCCGCATTAT	TMGFTAPRFPHY	0.401
66	TATACTTCTCCGCTCTTCGACTCCGTGGCAGCGTCTG	YTSPSPWPQRL	1.444
71	TCTGCTCAGTTTTCCGCTTCTGAAGTTTCTGTTTTT	SAQFSLKFPVF	1.167
59	ATGGGGATGCAGCTGAGTGTTCAGCCTCAGGCTACT	MGMQLSVQPQAT	1.050
36	GCGTCGAATCAGATGCTTTTGTATGATGCCGCTATT	ASNQMLLMPRI	0.625
60	TCTTATCAGTTGTGACGCATAGGTGGCCGCTGCAT	SYQLSTHRWPLH	0.624
64	TTGATGTGGCCTGCTCATGTTGAGTCTGTGTCTCCT	LMWPAHVESVSP	0.567
39	GCGACGTGGTCTCATCATCTGAGTTCTGCGGGTTTG	ATWSSHLSAGL	0.552
67	CAGGGGCTGCTGCTTTCTAGGACGACTACGGGTGG	QGLLSRTTTGW	0.544
2	GCCGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAATCCCAT	AETVESCLAKSH	0.511
30	CTGGCTCCTTTGTCTTATCCTTCTATGCCGTTGGCCG	LAPLSYPSMRWP	0.499
45	ATGGAGGGTCAGTATAAGAGTAATCTGCTGTTTACG	MEGQYKSNLLFT	0.499
23	AATCCGCCGCCGCCCTCCTCCGCAGCCTCCTCAG	NPPPPPPQPPQ	0.477
43	TATACGACTAGTAATACGCTTCAGGTTATTGCTCGG	YTTSNLQVIAR	0.469
12	ATGAATGTTACGGTGTCTGGGCGTCTTAGTGGGCCT	MNVTVSGRLSGP	0.430
29	CTGACGACGAAGCTGAGGACTCCTTCTCCTCCTTTG	LTTKLRTSPPL	0.422

我们通过使用 ProtParam tool 对所获得的 71 个多肽进行了生物信息学分析得知:在这些多肽中,碱性多肽的比例高达 50% 以上,大部分多肽带正电荷,且多数为疏水性氨基酸, Ser, Thr 和 Pro 的含量明显高于其他种类的氨基酸. 在蛋白质的配体结合位点,通常都具有比平均量高很多的暴露的疏水性表面积,在这些位点,多肽可能通过与 E7 蛋白活性位点或相近位点的基团通过电荷相互作用和残基间疏水作用及电荷作用,从而达到高亲和力特异性结合.

此外采用分析工具 NCBI BLASTP 对所获得的全部 71 个多肽进行了同源蛋白分析^[7],在每个多肽的比对结果中取得分最高的 5 个同源蛋白作为结果,最后对所有获得结果进行统计,得出多种最可能与 E7 结合的体内同源蛋白,如 NAD(P)H 脱氢酶、TATA 结合蛋白 TBP、组蛋白脱乙酰酶、肿瘤坏死因子 TNF、动力蛋白、人类白细胞抗原及 Notch 通路蛋白等,目前已经有研究证明显示 E7 蛋白能跟部分同源性分析得到的蛋白相互作用^[8-13]. 另外在对多肽序列进行同源性分析还得到很多现在研究很少或者基本没有研究的蛋白,根据 E7 蛋白的癌基因特性和同源蛋白出现机率,认为以下蛋白具有很大的研究意义:丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶及蛋白激酶 B PKB、磷脂酶、人类雄性激素受体、谷氨酰胺合成酶和乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶、细胞色素 c 和细胞色素 450、人体绒毛膜促性腺激素 hCG、Ran 相关蛋白及细胞因子 YY1.

经鉴定的 E7 特异性结合多肽和预测的同源蛋白可以为 HPV 检测及 E7 致细胞癌变的机理研究提供很好的手段与借鉴. 例如在 HPV 16 型的一项研究表明,利用噬菌体展示技术筛选出来的 7 肽能在 HPV 阳性细胞内促进 E7 蛋白自身的降解,恢复受感染细胞内 p53 蛋白及 p21 的含量引起细胞的凋亡,达到抗癌效果^[14]. 跟 HPV 58 型 E7 蛋白特异性结合多肽的同源蛋白分析信息也显示出 E7 蛋白的致癌性主要来自对细胞周期和细胞增殖的调控,E7 蛋白可能通过与以上分析得到的同源蛋白相互作用从而引发癌变.

本研究获得的与 E7 特异性结合的 12 肽序列,下一步将进行合成,通过本实验室正在研究的量子点标记的方法导入到肿瘤细胞系中,研究 E7 蛋白的细胞内定位和 HPV 的检测,相比传统的抗体检测定位方法,多肽量子点标记后用于检测的方法具

有毒性小、实时监测和可以在活体细胞中进行的优点. 同时研究得到的可能与 HPV E7 发生相互作用同源蛋白也将用来指导实验室对 HPV 致癌机理的研究工作.

参考文献:

- [1] 朱晓亮,曾抗. 人乳头瘤病毒与宫颈癌关系研究进展[J]. 广东医学,2003,24(12):1282-1283.
- [2] 王平,彭芝兰,王和,等. 宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型 E7 蛋白致癌机理初探[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2000,14(2):117-120.
- [3] SMITH G P, SCOTT J K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage [J]. *Methods in Enzymology*, 1993, 217:228-257.
- [4] 单祥年,张建琼,张雪萍,等. 人源抗丙型肝炎病毒噬菌体抗体库的构建、筛选与表达[J]. 云南大学学报:自然科学版,1999,21:332-333.
- [5] HUANG P Y, CARBONELL R G. Affinity purification of proteins using ligands derived from peptide libraries [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 47(3):288-297.
- [6] 韩炯,张晓光,刘新平,等. 从噬菌体展示随机 12 肽库中筛选与 IRS-1PH 结构域相结合的多肽模体[J]. 生物技术通讯,2004,15(5):437-440.
- [7] 杨海捷,段光杰,刘友生,等. 运用噬菌体展示随机肽库筛选与内毒素结合的高亲和性多肽[J]. 第三军医大学学报,2008,30(24):2262-2266.
- [8] SHIMADA T, MORIUCHI R, MORI T, et al. Identification of NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 5 capable to transform murine fibroblasts and overexpressed in human cervical carcinoma cell lines[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 339(3):852-857.
- [9] MALDONADO E, CABREJOS M E, BANKS L, et al. Human papillomavirus - 16 E7 protein inhibits the DNA interaction of the TATA binding transcription factor[J]. *J Cell Biochem*, 2002, 85(4):663-669.
- [10] DARVAS K, ROSENBERGER S, BRENNER D, et al. Histone deacetylase inhibitor - induced sensitization to TNF alpha/TRAIL - mediated apoptosis in cervical carcinoma cells is dependent on HPV oncogene expression [J]. *International Journal of Cancer*, 2010, 127(6):1384-1392.
- [11] BOCCARDO E, Manzini Baldi C V, CARVALHO A F, et al. Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor - alpha [J]. *Carcinogen-*

esis,2010,31(3):521-531.

- [12] NGUYEN C L, McLaughlin - Drubin M E, MÜNGER K. Delocalization of the microtubule motor Dynein from mitotic spindles by the human papillomavirus E7 oncoprotein is not sufficient for induction of multipolar mitoses[J]. *Cancer Res*,2008,68(21):8 715-8 722.
- [13] NAIR P, SOMASUNDARAM K, KRISHNA S. Activated Notch1 inhibits p53 - induced apoptosis and sustains

transformation by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes through a PI3K - PKB/Akt - dependent pathway[J]. *J Virol*,2003,77(12):7 106-7 112.

- [14] NAUENBURG S, ZWERSCHKE W, Jansen - Durr P. Induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by peptide aptamers that bind to the HPV - 16 E7 oncoprotein[J]. *FASEB Journal*,2001,15(3):592-594.

Screening and analysis peptides that bind specifically to HPV 58 E7 protein

FAN Jiu-song^{1,2}, ZHAO Hong-bin³, LIN Jie³, MA Lan²

(1. School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Division of Life Science & Health, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China;

3. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: By using M13 phage display techniques, 12 - mer peptide ligands that bind specifically to HPV 58 E7 protein were isolated, and then we compared all the sequences to get consensus sequences, moreover, through BLASTP endogenous proteins which probably interact with E7 protein were found. Using GET - E7 fusion protein as a positive screening target and GST protein as a negative one, we took four rounds of negative - positive selection, after that, 71 positive clones were selected. By DNA sequencing and sequence analysis, we got two consensus sequences: NHXXANPQQXPQ and TMGFTAPRFPHY. We analyzed the homologous proteins of the 71 peptides by BLASTP, which will be very helpful in the study of E7 carcinogenesis.

Key words: phage display; HPV E7; peptides

(上接第 614 页)

Abstract: We investigated the endophytic diversity, the factors affecting isolation and cultivation of endophytes in *Juglans regia* and *Toddalia asiatica*, such as seasons, areas, age of trees and sampling sites. In the end of Spring and the beginning of Summer, it was easier to obtain more species of endophytes when the hosts with an old tree - age. The five different disinfectants were tested with different concentrations and time, and the optimum condition of the isolation and cultivation of endophytes were screened out in the present study. It was showed that the approaches disinfecting samples got good effect, with 3.0% H₂O₂ for 30—120 s, 0.5% KMnO₄ for 30—120 s, 75% ethanol for 60—120 s and 4% bleaching powder for 30—120 s. This attempt was also to provide the basic data for the further development and utilization of endophytes in medicinal plant.

Key words: plant endophyte; *Juglans regia* L.; *Toddalia asiatica* (L.) Lam.; surface sterilization; influence factors