论著

文章编号:1000-5404(2005)13-1332-03

噬菌体随机肽库筛选MUC1抗原模拟表位

杨清浩[1],王祥卫[1],金 燕[1],张立新[2] ([1]第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037;[2]北京军事医学科学院附属307医院肿瘤分子室,北京 100850)

提 要:目的 噬菌体随机多肽文库筛选及鉴定MUC1抗原的模拟表位。**方法** 利用纯化获得的BC2抗体筛选噬菌体随机7肽库,通过夹心ELISA分析噬菌体克隆,测定阳性克隆DNA序列并进行同源性及氨基酸分析,竞争性抑制实验鉴定噬菌体克隆。**结果** 经3轮筛选,获得了30个阳性克隆,DNA序列分析并推导出氨基酸序列:TAPDLRP、SAPDLRP、AAPDSRP及LAPDFRP。鉴定结果表明:4个噬菌体展示肽克隆抑制率均在50%以上。**结论** 所得序列TAPDLRP、SAPDLRP、AAPDSRP及LAPDFRP模拟MUC1抗原表位。

关键词: MUC1抗原;模拟表位;噬菌体随机7肽库;抗体
中图法分类号: R373.9; R392.11; R394.3 **文献标识码:** A

Identification and screening of mimic epitope of MUC1

YANG Qing-hao, WANG Xiang-wei, JIN Yan, ZHANG Li-xin ([1]Renal Diseases Research Center, Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Oncology and Molecule, No.307 Hospital, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To identify and characterize the mimic epitope of MUC1 from random phage display peptide library. **Methods** The purified BC2 Ab was used to screen in phage random 7 peptide library. The positive clones were identified by sandwich ELISA and competitive inhibition assay. The homologous comparison of amino acid sequences of positive clones was conducted through searching the protein sequence databank on Internet. The digestion analysis of amino acid sequences was also conducted by a software. **Results** Thirty positive clones were acquired after 3 rounds of screening. Amino acid sequences deduced from DNA sequences showed four different sequences as TAPDLRP, SAPDLRP, AAPDSRP and LAPDFRP. The inhibitory assay showed that the 4 mimic epitope peptides displaying on the phage surface could effectively inhibit the combination of antibody with antigen and the inhibitory rates of each mimic epitope were 50% higher than the control. **Conclusion** The results indicated that TAPDLRP, SAPDLRP, AAPDSRP and LAPDFRP are the mimotopes that can imitate the epitope of MUC1.

Key words: Mucin 1; mimic epitope; phage display random 7 peptide library; antibody

近年来,人粘蛋白基因相继被克隆,目前已明确的有7种,命名为MUC1~7,分别编码粘蛋白MUC1~7的蛋白骨架。各粘蛋白核心肽的单抗或多抗亦相继制备成功,这为研究这些粘蛋白前体核心肽在人正常组织中的分布及肿瘤发生中异常表达的意义奠定了基础。其中MUC1基因克隆最早,其编码一种大而复杂、高度糖基化的分子,是7种粘蛋白中惟一的跨膜分子,与肿瘤细胞表型的变化、细胞粘附、免疫识别、肿瘤的转移和预后有密切关系[1~2]。MUC1几乎在所有上皮细胞癌都表达,如膀胱癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌等[3]。MUC1粘蛋白可以非MHC限制性和MHC限制性两种方式活化CTL,杀伤HLA类型不同患者的肿瘤细胞。本研究拟通过噬菌体随机肽库的筛选,获得MUC1抗原模拟表位,为将来研制人上皮来源性肿瘤疫苗奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

噬菌体随机肽库Ph.D.-7™(NEW ENGLAND Biolabs)为展示在噬菌体pⅢ蛋白N端的7肽库,库滴度为4×10^{12} pfu/ml,随机多样性(complexity)为1.28×10^{9},所用受体菌为XL1-blue (tet^r),均由北京军事医学科学院肿瘤分子生物室张立新博士惠赠。-96 gⅢ测序引物 5′-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3′,由大连TaKaRa公司合成。HRP/AntiM13单抗为amercham pharmacia biotech产品;MUC1抗体BC2由本室纯化制备;4D抗体为正常组织MUC1抗体(张立新博士惠赠)。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体滴度的测定 接种一单菌落XL1-blue于3 ml

基金项目:国家"863"课题基金资助项目(2002AA214111)
Supported by the National Natural Science Foundation of China ("863" Projects, 2002AA214111)
作者简介:杨清浩(1965-),男,四川省蓬溪县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事膀胱肿瘤和肾移植方面的研究。电话:(023)68774924
收稿日期:2005-02-03;修回日期:2005-04-12

LB(10 μg/ml Tet)中，37 ℃，250 r/min 培养至 $D(600)$约为 0.5。用 LB 将待测噬菌体按下述梯度稀释：扩增后的噬菌体培养上清：$10^8 \sim 10^{11}$；未扩增的淘洗液：$10^1 \sim 10^4$。将 XL1-blue 菌分成 200 μl/管，将 10 μl 稀释后的噬菌体加入、轻弹混匀，每个稀释度用 1 管，室温放置 1～5 min 后，加入到含 3 ml 45 ℃顶层琼脂的试管中，快速混匀，立即铺于 LB/IPTG/X-gal 板，室温放置 5 min 使凝结，倒置于 37 ℃过夜。第 2 天取含 < 100 pfu 的平板计蓝斑数目，计算噬菌体滴度。

噬菌体滴度 = 蓝斑数 × 稀释度 × 10^2 (pfu/ml)

1.2.2　Ph.D.-7 肽库的生物淘洗(Biopanning)　第 1 轮：用包被液将 BC2 抗体浓度调为 100 μg/ml，每孔加入 150 μl 抗原液，4 ℃湿盒中过夜。弃掉包被液，纸巾上用力拍掉残留液，每孔加满封闭液，4 ℃放置 1 h。弃掉封闭液，TBST[TBS + 0.1%(V/V) Tween-20]快速洗 6 次。每次拍掉残留液，不要使孔干燥。用 100 μl TBST 稀释 10 μl (4×10^{10} pfu)噬菌体库液，加入一孔中，RT 轻摇 60 min。弃掉未结合的噬菌体液，纸巾上拍掉残留液。TBST 洗 10 次，每次 6 min，并剧烈的用吸管上下吹打。加入 100 μl 洗脱液，RT，8 min，将洗脱液移到 1.5 ml 离心管中，立即加入 30 μl 中和液，混匀。取 10 μl 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}稀释的洗脱液测滴度。剩余洗脱液进行扩增，方法同上。第 2～3 轮：方法同第 1 轮，BC2 浓度调为 10 μg/ml，加入 2×10^{11} pfu 扩增噬菌体，TBST 中 Tween-20 的浓度提高到 0.5%(V/V)。

1.2.3　噬菌斑的扩增　取过夜培养的 XL1-blue 菌，1∶100 稀释于 LB(含 10 μg/ml Tet)，每个试管中加入 1 ml，用枪头挑取单个第 3 轮扩增后测定滴度后的蓝斑，接种上述培养基，37 ℃，260 r/min，4.5 h。培养液 4 ℃，10 000 r/min，30 s，取上清重复离心 1 次，取 80% 上清，4 ℃保存或加入甘油至终浓度 50% 后，－20 ℃ 保存。

1.2.4　夹心 ELISA 分析获得的噬菌体克隆　将 BC2 抗体用包被液稀释成 10 μg/ml，包被双条可拆酶标板，100 μl/孔，平行两孔，4 ℃过夜。弃掉包被液，每孔加满封闭液，37 ℃，1 h。TBST(含 0.5%Tween-20，下同)洗 6 次，取扩增后的噬菌体每个克隆取 50 μl + 150 μl TBST，混匀，加入板孔中，同时取 2 μl 原库 + 200 μl TBST 作为对照，RT，1 h，TBST 洗 8 次，每孔加入用封闭液(含 1 mg/ml BSA) 1∶5 000稀释的 HRP/AntiM13 单抗 100 μl，RT，1 h，TBST 洗 8 次。每孔加入 100 μl TMB 显色液，37 ℃，10～15 min，加入 50 μl 2 mol/L H_2SO_4 终止显色，测定 D (450)值。

1.2.5　测序模板的快速纯化及 DNA 测序　按上述方法扩增噬菌斑。第 1 步离心后，取 500 μl 移入一新的离心管中。加入 200 μl PEG/NaCl，颠倒混匀，RT 10min。离心 10 min，弃上清。再次离心片刻，吸掉剩余上清。沉淀重悬于 100 μl Iodine Buffer 中，加入 250 μl 乙醇，室温放置 10 min(短时间室温放置可选择性沉淀单链噬菌体 DNA，而大多数噬菌体蛋白留于上清中)。离心 10 min，弃上清。70% 乙醇洗涤，真空干燥片刻。沉淀重悬于 30 μl TE，测序。

1.2.6　竞争抑制实验　将人 MUC1 蛋白包被微孔，BSA 封闭，阳性噬菌体克隆与 BC2 抗体室温共孵育 2 h 后，加入微孔，37 ℃孵育 1 h 后，缓冲液洗涤，加入 HRP 标记的羊抗鼠抗体，TMB 显色。测 D(450)值。

计算抑制率：抑制率 = [抑制前 D(450) － 抑制后 D(450)]/抑制前 D(450) × 100%

2　结果

2.1　Ph.D.-7 肽库的生物淘洗

按方法所述进行 3 轮生物淘洗，结果表明，噬菌体克隆获得有效的富集。富集达 250 倍。

2.2　噬菌体克隆的 ELISA 分析

分别从 3 轮筛选后测定滴度的平板上随机挑取 40 个蓝斑进行扩增，取 50 μl 扩增液与 150 μl TBST(含 0.5% Tween-20)混合，加入到酶联板中进行 ELISA 分析。从上述筛选获得的噬菌体克隆中挑选 MUC1 $D(450)/D(450) > 2.5$ 者，ELISA 分析结果，共获得 30 个阳性克隆。

2.3　噬菌体阳性克隆的 DNA 序列测定及核心序列分析

挑选从上述筛选获得的噬菌体克隆，扩增后提取噬菌体 ssDNA，进行插入肽的 DNA 序列测定。根据测序结果的比较，将其分为两种类型，第一类为相同序列模式：TAPDLRP(×19)及 SAPDLRP(×9)；第二类为单一序列模式：AAPDSRP(×1)及 LAPDFRP(×1)。根据插入区的核酸序列推导出外源多肽的氨基酸序列；比较所获得的多肽氨基酸序列，寻找比较保守的核心序列。一般而言，如果大部分多肽中含有 3 个以上很相似的序列，则可以认定为该序列是这些多肽中的一个核心序列。依据其氨基酸序列同源程度，获得其同源性基序：XAPDXRP。

2.4　噬菌体克隆的竞争抑制实验

与 BC2 特异性结合的噬菌体克隆做竞争抑制实验，结果显示 4 个噬菌体展示肽克隆抑制率均在 50% 以上，能较大程度地特异性抑制抗原抗体结合，提示这些阳性克隆的外源肽具有一定的 MUC1 抗原模拟功能。

3　讨论

确定蛋白质分子与特异性抗体结合的抗原表位(epitope，或称抗原决定簇)，无论在免疫学基础研究还是在疾病的诊断和预防方面都有重要意义。研究抗原表位的方法有多种，经典的方法是将抗原分解，以融合蛋白的方式体外重组表达重叠的多肽片段，或人工合成重叠的寡聚肽段，让抗体与这些肽段反应，并据此分析抗原表位[4,5]。也可对免疫复合物进行 X 线衍射分析，来确定抗原-抗体相互作用的部位[6]。但这些方法在实际应用中受到限制。近年来，噬菌体文库展示技术因其简单方便已在研究抗原决定簇中得到广泛应用[7,8]。

本研究所选用的噬菌体肽库为 7 肽库，含有 1.28×10^9 个随机 7 肽序列，这些序列通过 Gly-Gly-Gly-Ser 与 M13 噬菌体外壳 PⅢ蛋白融合，由于构建肽库所用的载体 M13KE 是一种噬菌体载体，而不是噬菌粒载体，因此，噬菌体表面所有 5 个拷贝 PⅢ蛋白上都展示有随机多肽。多肽与 PⅢ蛋白而不是与 PⅧ蛋白融合，有利于筛选到高亲和力的结合肽。一般认为，表达在 PⅧ衣壳蛋白表面的肽库噬菌体表面的拷贝数多，因而在配体配基结合力较弱时比较容易筛选到阳性克

隆;而表达在PⅢ衣壳蛋白表面的肽库较容易筛选到亲和力较强的结合位点。

特异性的噬菌体克隆在每轮筛选及扩增中得到选择性富集,是筛库成功的关键。在阳性克隆的富集过程中,有两个因素需要着重加以考虑,即:富集效果和筛选强度。随着噬菌体展示技术的发展,检测富集效果的方法逐渐增多,如富集指数、ELISA、Dot-blot、DNA测序等[8~11]。本研究在每一轮的筛选中均以富集指数作为监测指标,观察噬菌体克隆的富集情况,对不同的实验条件进行摸索,最后获得了较理想的结果:经3轮淘洗,噬菌体克隆富集达250倍。本研究在筛选过程中逐轮降低靶蛋白(BC2抗体)用量和增加洗涤强度,取得了较好的效果。通过降低靶蛋白用量,来增加筛选的强度,以增加噬菌体之间的竞争力,使得只有结合力强的噬菌体能与靶蛋白结合,淘汰结合力不太强的噬菌体。而逐渐增加洗涤强度也同样可以保证结合力较弱的克隆逐渐被淘汰而保留结合力强的噬菌体。两种方法结合起来,充分保证第1轮筛选最大限度地得到具有结合活性的阳性噬菌体,而在以后的筛选中逐渐淘筛出结合力最强的噬菌体。

亲和筛选中,即使经过多轮筛选,也不能排除非特异性噬菌体克隆的存在,因而进一步挑取单个克隆,确定它与筛选配基的特异性吸附是实验必不可少的步骤。通常采用的确定阳性克隆的方法有:micropanning、ELISA、噬斑分析及膜印实验等[12~14]。其中,ELISA能半定量测定筛选配基与噬菌体克隆间的结合常数,是最为常用的方法。实验中,我们应用该方法筛选阳性克隆,采用不相关抗体4D作为阴性对照,以BC2 D(450)/4D D(450)>2.5作为阳性结果判定标准,避免了由于噬菌体用量过大所可能造成的假阳性,所获得的实验结果较为可靠。

我们应用识别MUC1抗原表位的BC2单抗筛选噬菌体随机7肽库,挑选从筛选获得的噬菌体克隆,扩增后提取噬菌体ssDNA,进行插入肽的DNA序列测定。根据测序结果的比较,将其分为两种类型,第一类为相同序列模式:TAPDLRP(×19)及SAPDLRP(×9);第二类为单一序列模式:AAPDSRP(×1)及LAPDFRP(×1)。根据插入区的核酸序列推导出外源多肽的氨基酸序列,比较所获得的多肽氨基酸序列,寻找比较保守的核心序列。依据其氨基酸序列同源程度,获得其同源性基序:XAPDXRP。同时获得了展示在噬菌体表面的4个MUC1抗原模拟表位,竞争抑制试验结果显示4个噬菌体展示肽克隆抑制率均在50%以上,能较大程度地特异性抑制抗原抗体结合,提示这些阳性克隆的外源肽具有一定的MUC1抗原模拟功能。MUC1蛋白是一种高分子质量糖蛋白,在人膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌等均有表达。MUC1可作为免疫治疗的靶点是基于以下特点:①肿瘤细胞表达量增高,为正常的100倍以上;②肿瘤细胞MUC1广泛分布,而正常细胞MUC1呈极性分布;③糖链的糖基化不全,导致正常情况下隐蔽的肽链表位暴露。MUC1的免疫原性区域主要位于该蛋白分子胞外段的20个氨基酸重复序列区域(VNTR)。MUC1能引起T细胞免疫应答,通过T细胞受体直接识别,不受主要组织相容性复合体限制。MUC1还能引起B细胞免疫应答产生抗体。本研究通过噬菌体随机肽库的筛选,获得了MUC1抗原模拟表位,为将来研制人上皮来源性肿瘤疫苗奠定了实验基础。

参考文献:

[1] Sagara M, Yonezawa S, Nagata K, *et al*. Expression of mucin 1 (MUC1) in esophageal squamous-cell carcinoma: its relationship with prognosis[J]. Int J Cancer, 1999, 84(3): 251-257.

[2] Moniaux N, Escande F, Porchet N, *et al*. Structural organization and classification of the human mucin genes[J]. Front Biosci, 2001, 6: D1192-D1206.

[3] Silverman H S, Parry S, Sutton Smith M, *et al*. *In vivo* glycosylation of mucin tandem repeats[J]. Glycobiology, 2001, 11(6): 459-471.

[4] Van Regenmortel M H. Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity[J]. Immunol Today, 1989, 10(8): 266-272.

[5] Lenstra J A, Kusters J G, van der Zeijst B A. Mapping of viral epitopes with prokaryotic expression products[J]. Arch Virol, 1990, 110(1-2): 1-24.

[6] Sem D S, Baker B L, Victoria E J, *et al*. Structural characterization and optimization of antibody-selected phage library mimotopes of an antigen associated with autoimmune recurrent thrombosis[J]. Biochemistry, 1998, 37(46): 16069-16081.

[7] Tang S S, Tan W S, Devi S, *et al*. Mimotopes of the Vi antigen of Salmonella enterica serovar typhi identified from phage display peptide library[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(6): 1078-1084.

[8] El Mousawi M, Tchistiakova L, Yurchenko L, *et al*. A vascular endothelial growth factor high affinity receptor 1-specific peptide with antiangiogenic activity identified using a phage display peptide library[J]. J Biol Chem, 2003, 278(47): 46681-46691.

[9] de Koster H S, Amons R, Benckhuijsen W E, *et al*. The use of dedicated peptide libraries permits the discovery of high affinity binding peptides[J]. J Immunol Methods, 1995, 187(1): 179-188.

[10] Germaschewski V, Murray K. Identification of polyclonal serum specificities with phage-display libraries[J]. J Virol Methods, 1996, 58(1-2): 21-32.

[11] Zhong G, Smith G P, Berry J, *et al*. Conformational mimicry of a chlamydial neutralization epitope on filamentous phage[J]. J Biol Chem, 1994, 269(39): 24183-24188.

[12] Dente L, Cesareni G, Micheli G, *et al*. Monoclonal antibodies that recognise filamentous phage: tools for phage display technology[J]. Gene, 1994, 148(1): 7-13.

[13] Kola A, Baensch M, Bautsch W, *et al*. Epitope mapping of a C5a neutralizing mAb using a combined approach of phage display, synthetic peptides and site-directed mutagenesis[J]. Immunotechnology, 1996, 2(2): 115-126.

[14] Cook A D, Davies J M, Myers M A, *et al*. Mimotopes identified by phage display for the monoclonal antibody CII-C1 to type II collagen[J]. J Autoimmun, 1998, 11(3): 205-211.

(编辑 周 芳)