论著

文章编号:1000-5404(2007)07-0582-03

# 应用噬菌体肽库筛选 Endoglin 的结合肽

毕仙民,梁志清,侍立峰 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

**提 要:目的** 利用噬菌体12肽库筛选可与Endoglin结合的活性小分子肽。**方法** 以rhEndoglin为靶分子,对噬菌体12肽库进行亲和筛选。经过3轮筛选,随机挑取16个克隆,双夹心ELISA法鉴定其亲和性,测定亲和力高的阳性噬菌体克隆的DNA序列,推断出与噬菌体外壳蛋白融合的氨基酸序列,竞争抑制实验检测优势克隆的特异性。**结果** 竞争性ELISA显示6个噬菌体克隆与rhEndoglin有较强的结合活性,经测序获得5种不同的多肽序列,其中2个克隆的氨基酸序列为:AHKHVHHVPVRL。**结论** 噬菌体随机肽库技术可以获得Endoglin结合肽的蛋白质序列。

**关键词:** 噬菌体随机肽库;Endoglin;结合肽

**中图法分类号:** Q503; Q513.2; Q591.2 **文献标识码:** A

# Screening of conjugated peptides of Endoglin from phage display peptide library

BI Xian-min, LIANG Zhi-qing, SHI Li-feng (Department of Gynaecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To screen rhEndoglin-binding peptides from phage displayed 12-peptide library. Methods The rhEndoglin was used as target protein for biopanning of phage-displayed 12-peptide library. After three rounds of screening, 16 phage clones were randomly selected and identified by sandwich ELISA. The positive phage clones were sequenced, and the fuse peptides were deduced by the DNA sequence. Further we identified the affinity and speciality by competitive inhibition test. Results Six of 16 phage clones were identified as positive clones by competent ELISA which could bind to rhEndoglin. Five sequences were obtained, and the amino acid sequence in two of these five was AHKHVHHVPVRL. Conclusion The rhEndoglin-binding peptides can be obtained by screening phage random peptide library. It could play an important role in early diagnosis of ovarian cancer.

**Key words:** phage-displayed random peptide library; Endoglin; conjugated eptide

Endoglin(CD105)是内皮细胞膜表面的糖蛋白,在正常的组织和血管内不表达,仅在处于增殖状态的肿瘤血管内皮上强表达[1,2],与肿瘤的进展相关,是卵巢癌等恶性肿瘤早期诊断和治疗的理想分子靶位。

噬菌体随机肽库技术是将编码外源肽的DNA序列插入噬菌体表面编码外壳蛋白的基因中,使大量的随机肽段以融合形式表达在噬菌体的表面[3]。通过分析筛选出来的多肽,以探求蛋白质分子之间的相互作用[4-6]。近年来研究表明Endoglin的单克隆抗体在动物的肿瘤治疗中具有重要作用[7],本研究以rhEndoglin为靶点,应用噬菌体12肽库技术筛选出可与Endoglin特异性结合的多肽,以期为卵巢癌的早期诊断和疗效判断提供新的载体。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

噬菌体12肽库(Ph. D-12. TM Phage Display Peptide Library)购自New England Biolabs公司,库浓度为$6.00\times10^{12}$ pfu/ml,受体菌为*E. coli* 2738,-28gⅢ手工测序引物、-96gⅢ自动测序引物;rhEndoglin蛋白(#1097-EN)购自R&D公司。主要试剂:HRP抗M13单抗(#27-9421-01,1∶5 000稀释工作浓度)购自Amersham Biosciences公司;ABTS(#A0400,22 mg ABTS溶于50 mmol/L柠檬酸钠100 ml中,pH 4.0,过滤除菌)、PEG-8000(#PT1788)均购于Sangon公司。超速离心机(Beckman JA-30.50;Eppendorf 5417R、5840R),Bio-Rad凝胶呈像仪,Bio-Rad M500自动读板仪。

基金项目:国家自然科学基金(30271360)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30271360)

作者简介:毕仙民(1977-),女,山西省运城市人,硕士研究生,医师,主要从事妇产科肿瘤方面的研究。电话:13372632797,E-mail:xianmin_bi@163.com

收稿日期:2006-05-30;修回日期:2006-07-17

### 1.2　方法

1.2.1　噬菌体肽库的筛选　　将 Endoglin 蛋白用 0.1 mol/L $NaHCO_3$（pH 8.6）包被缓冲液稀释至 10 μg/ml，每孔 100 μl 包被 96 孔酶标板，4℃轻微震荡，孵育过夜。倒掉包被液，每孔加满封阻液（0.1 mol/L $NaHCO_3$，5 mg/ml BSA，0.02% 的 $NaN_3$），4 ℃封阻 1 h；用 TBST（50 mmol/L Tris-HCl，150 mmol/L NaCl，0.1% Tween-20）快速洗板 6 次，每孔加入 $6.00 \times 10^{12}$ 的噬菌体，室温轻摇震荡 60 min；弃去未结合噬菌体液，用 TBST 洗板 10 次，每孔加入甘氨酸洗脱液（0.2 mol/L pH 2.2 Glycine-HCl，1 mg/ml BSA）100 μl，室温轻摇 10 min，洗脱特异性结合的噬菌体；收集洗脱液于微量离心管，加入中和缓冲液；留取 10 μl 用于滴度测定，剩余洗脱物进行扩增，用于下一轮筛选。同样的方法进行第 2、3 轮筛选，包被的 Endoglin 蛋白分别为 5.0、1.0 μg/ml，洗脱液 TBST 的浓度依次递增为 0.3%、0.5%。随机挑取第 3 轮分隔良好的蓝色噬斑，培养后进行 ELISA 分析及 DNA 序列测定。

1.2.2　噬菌体滴度的测定　　用 LB 培养基对洗脱液进行倍比稀释，分别取各稀释度的噬菌体加入到制备好的对数生长期的 ER2738 菌液中，室温温育后加入到 Agarose Top 中混匀，均匀铺于平皿上，培养过夜。记数平皿上蓝斑个数。噬菌体滴度 = 平皿中蓝斑个数 × 稀释倍数，即每 10 μl 的噬菌体形成单位。

1.2.3　双夹心 ELISA 鉴定　　用包被缓冲液稀释 Endoglin 蛋白，每孔 100 μl 包被 96 孔酶标板，密封湿盒中 4 ℃过夜。弃包被液，每孔加满封阻液，4 ℃封阻 2 h。0.5% TBST 洗板 6 次，横向每孔分别加入 10 倍系列稀释的噬菌体克隆并用 TBST 稀释至 200 μl（纵向为不同的噬菌体克隆及相应的封阻缓冲液对照），室温震荡作用 2 h，0.5% TBST 洗板 6 次，加入 1∶5 000 稀释的 HRP conjugate anti-M13 抗体，室温孵育 1 h，洗板后加 ABTS 底物显色液（200 μl/孔），室温作用 10 ~ 60 min 显色，酶标仪 450 nm 处读数。

1.2.4　提取单链 DNA 测序　　将鉴定阳性克隆的噬菌体扩增液 500 μl，加入 200 μl PEG/ NaCl，混匀，室温放置 10 min；10 000 r/min，离心 10 min，弃上清，加 100 μl 碘化物缓冲液和 250 μl 无水乙醇悬浮沉淀，室温温育 10 min；10 000 r/min，离心 10 min，弃上清，用 70% 的乙醇 500 μl 洗沉淀，真空抽干，TE 缓冲液 30 μl 悬浮即可。琼脂糖凝胶电泳鉴定。用肽库自带测序引物送上海生物工程技术有限公司测序。

1.2.5　竞争抑制试验　　用 0.1 μg/ml rhEndoglin 包被酶标板（50 μl/孔），4 ℃孵育过夜，封阻缓冲液 4 ℃封阻 2 h。0.5% TBST 洗板 6 次；依据测序结果，将 rhEndoglin 依次稀释至 4、2、1、0.5、0.25、0.125 μg/ml 后各取 25 μl 与优势噬菌体原种上清 25 μl 混匀，室温作用 2 h；混匀物加入酶标孔内，室温震荡 2 h，0.5% TBST 洗板 6 次，加入 HRP-抗 M13（1∶5 000）单抗，孵育 1 h，再用 TBST 洗板 6 次，加 200 μl ABTS，室温培养 10 ~ 60 min 显色，测定 $D$（450）值。

## 2　结果

### 2.1　3 轮筛选的富集效果

以 rhEndoglin 为靶分子对噬菌体 12 肽库进行了 3 轮亲和筛选。通过每轮逐步提高洗脱液浓度（即 TBST：0.1%、0.3%、0.5%）来增加选择的严格性。回收率（洗脱液滴度/筛选前滴度 × 100%）经 3 轮筛选后逐步提高，特异性噬菌体克隆得到有效富集（表 1）。

**表 1　噬菌体 12 肽库对 rhEndoglin 结合短肽的 3 轮筛选富集效果**

| 筛选轮数 | 筛选前滴度（pfu） | 洗脱液滴度（pfu） | 富集效果 |
|---|---|---|---|
| 1 | $6.000 \times 10^{10}$ | $1.118 \times 10^{5}$ | $1.863 \times 10^{-6}$ |
| 2 | $1.945 \times 10^{11}$ | $1.010 \times 10^{8}$ | $5.190 \times 10^{-4}$ |
| 3 | $4.055 \times 10^{10}$ | $2.963 \times 10^{8}$ | $7.310 \times 10^{-3}$ |

### 2.2　噬菌体克隆与 rhEndoglin 的结合实验

取第 3 轮筛选后洗脱下来的噬菌体感染宿主菌 *E. coli*. ER2738 后，挑取 16 个分隔良好的蓝色噬斑，制备噬菌体原种。ELISA 检测其与 rhEndoglin 的反应性，以 $D$（450）值高于阴性对照 2.1 倍作为阳性克隆，其中有 6 个克隆显示与 rhEndoglin 的结合较强（图 1）。

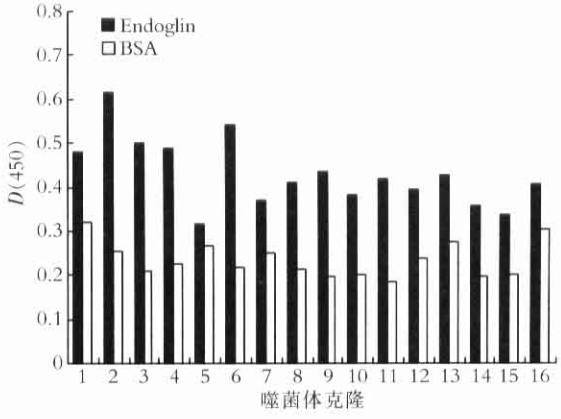



**图 1　随机噬菌体克隆与 rhEndoglin 结合结果**

### 2.3　噬菌体克隆 DNA 序列测定及分析

对鉴定出的 6 个阳性克隆进行 DNA 序列测定并推导其相应的氨基酸序列。结果显示 5 种序列，6 个克隆的外源多肽中均含有组氨酸-组氨酸（HH）序列，见表 2。

**表 2　噬菌体克隆展示肽测序结果**

| 序列 | 氨基酸序列 |
|---|---|
| 2,6 | AHKHVHHVPVRL |
| 3 | AHRHHSTLTMGP |
| 11 | AVKHHHHLHAIR |
| 4 | HYHTHHTKVRTP |
| 9 | HTHKHHIYVPSV |

对于多肽的可溶性及稳定性，我们可以从其疏水性残基的多少及氨基酸的极性等方面来加以分析。就疏水性残基所占的比例（表 2 从上至下）而言依次为：41.67%、16.67%、41.67%、8.3%、25%；5 条多肽序列均为碱性氨基酸，所带的电荷分别为：+6、+4、+7、+6、+5。通常疏水性残基 > 50% 难于溶解，而肽链的极性越高越有可能溶于水。综上分析，5 条阳

性多肽的稳定性及可溶性均相差不大，结合表2，综合图1，选取具有相对较高的亲和力的优势序列1作进一步鉴定。

### 2.4 可溶性 Endoglin 对噬菌体多肽与包被 Endoglin 结合的抑制

用 rhEndoglin 包被酶标板，预先将优势噬菌体克隆2的原种与 rhEndoglin 作用使其两者结合，将混合物加到 Endoglin 包被的酶标孔内。固相表面的 rhEndoglin 与液相中的 rhEndoglin 竞争与噬菌体多肽的结合。结果表明，随着液相中游离 rhEndoglin 浓度的降低，其对固相包被 rhEndoglin 与噬菌体多肽结合的竞争抑制率[竞争抑制率 = 未抑制 $D(450)$ - 抑制后 $D(450)$/未抑制 $D(450)\times100\%$]亦逐渐降低(图2)，进一步说明筛选的优势噬菌体克隆能够模拟 rhEndoglin 受体或抗体上的结合表位与 rhEndoglin 结合。

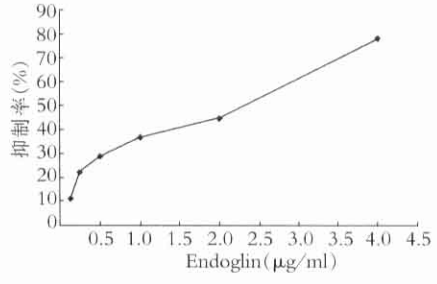



**图2 可溶性 rhEndoglin 对噬菌体克隆与包被 Endoglin 结合的抑制**

## 3 讨论

卵巢癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤，由于缺乏有效的早期诊断，其病死率已居女性生殖系统恶性肿瘤之首，活性小分子肽作为靶向载体的应用为卵巢癌的早期诊断和筛查提供了新的途径，噬菌体表面呈现肽库技术为筛选活性小分子肽提供了一种有效工具。

Endoglin(CD105)是内皮细胞表面与增殖相关的膜抗原，是一种跨膜糖蛋白，其胞外区部分有4个活性位点，在有活性血管生成区域及肿瘤组织中特异性高表达[8]，在正常组织中无表达，是肿瘤治疗理想的分子靶位[9-11]。卵巢癌是一高度血管化肿瘤，其生长迅速依赖于其有丰富的血管生成及其供给的营养物质，研究表明即使在卵巢癌的早期(Ⅰ期)就有显著的新生微血管生成，其记数明显较良性或低度恶性肿瘤高。Endoglin 结合肽可望成为卵巢癌特异性、高表达的靶向载体提高卵巢癌的早期诊断率。

本研究以 rhEndoglin 蛋白为靶分子，对噬菌体随机12肽库进行筛选。经过3轮筛选，每轮的投入/产出比率逐渐升高，特异性噬菌体克隆得到了有效富集。从第3轮筛选洗脱物中随机挑取16个噬菌体克隆，竞争性 ELISA 鉴定其中6个为阳性克隆，经 DNA 测序分析，得到5种不同的氨基酸序列。结合其理化特性及相对优势原则，我们选择优势噬菌体克隆(AHKHVHHVPVRL)进行研究。通过竞争抑制实验进一步证实噬菌体克隆能够模拟可与 Endoglin 结合的受体或抗体的结合表位。

一般而言，利用噬菌体展示肽库筛选出来的噬菌体融合肽与靶分子的结合位点只有位于 Endoglin 的活性位点上，或是小分子肽能够代表不连续表位的有效构象，噬菌体克隆才有可能代表 Endoglin 抗体或受体的结合表位；而且噬菌体呈现肽并不一定能代表合成多肽的性质，都有待于我们在后续的工作中对合成短肽的进一步研究。

## 参考文献：

[1] Wikstrom P, Lissbrant I F, Stattin P, *et al*. Endoglin(CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer[J]. Prostate, 2002, 51(4): 268-275.

[2] Seon B K, Matsuno F, Haruta Y, *et al*. Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(7): 1031-1044.

[3] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. Science, 1985, 228(4705): 1315-1317.

[4] Smith G P, Petrenko V A. Phage display[J]. Chem Rev, 1997, 97(2): 391-410.

[5] DeLeo F R, Yu L, Burritt J B, *et al*. Mapping sites of interaction of p49-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(15): 7110-7114.

[6] Eda K, Eda S, Sherman I W. Identification of peptides targeting the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes using a phage display peptide library[J]. Am J Trop Med Hyg, 2004, 71(2): 190-195.

[7] Shiozaki K, Harada N, Greco W R, *et al*. Antiangiogenic chimeric anti-endoglin(CD105) antibody: pharmacokinetics and immunogenicity in nonhuman primates and effects of doxorubicin[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(2): 140-150.

[8] Miller D W, Graulich W, Karges B, *et al*. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells[J]. Int J Cancer, 1999, 81(4): 568-572.

[9] Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra M R, *et al*. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels[J]. Oncogene, 2003, 22(42): 6557-6563.

[10] Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer[J]. J Transl Med, 2004, 2(1): 18.

[11] Saad R S, Liu Y L, Nathan G, *et al*. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer [J]. Mod Pathol, 2004, 17(3): 197-203.

(编辑 龙 亮)