论著

文章编号:1000-5404(2008)08-0694-04

应用 DNA shuffling 及 T7 噬菌体展示技术定向进化并筛选鉴定 sCD74 突变体

臧家涛,李淑慧,李 鹏,陈 安,胡川闽 (第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 利用 DNA shuffling 技术,结合 T7 噬菌体表面展示技术,定向进化 MIF 受体 sCD74,以获得高亲和力突变体基因。**方法** 定点突变的牛、小鼠、人 CD74 胞外同源区基因以 DNase Ⅰ消化,回收 25~50 bp 片段进行 DNA shuffling;将 500 bp shuffling 产物经限制性酶切后与 T7 噬菌体 DNA 连接,与 T7 package extracts 组建噬菌体文库;采用竞争淘洗方法进行 5 轮筛选,富集得到高亲和力结合 MIF 的噬菌体;挑取 20 株噬菌体单克隆进行基因克隆并测序,对测序结果进行生物信息学分析,同时以竞争 ELISA 初步鉴定进化效果。**结果** 20 株噬菌体单克隆具有相同的 sCD74 突变基因,为相同克隆,将此克隆命名为 sHCD74m,其基因命名为 sHCD74mD;竞争性 ELISA 分析显示其 MIF 结合力提高。**结论** 得到了与 MIF 高亲和力结合的 sCD74 突变体基因 sHCD74mD。

关键词: DNA shuffling;巨噬细胞移动抑制因子;CD74;噬菌体展示技术;MHC Ⅱ恒定链

中图法分类号: Q513;Q939.48;R394-33 **文献标识码:** A

Committed differentiation, screening and verification of an sCD74 mutant by DNA shuffling and T7 phage display

ZANG Jia-tao, LI Shu-hui, LI Peng, CHEN An, HU Chuan-min (Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To prepare a mutant DNA of sCD74, the receptor of MIF, by the technique of DNA shuffling and T7 phage display. Methods Mutated homologous genes of bovine, mouse and human were digested with DNase Ⅰ, and DNA about 20 – 50 bp was extracted from the gel. These DNA fragments were used for DNA shuffling, and mutants about 500 bp were obtained. After digested with restriction enzyme, the mutants about 500 bp were ligated to T7 phage vector, the product of which was packaged with a T7 packaging extracts. Recombinant phage library was amplified and screened by competitive bio-panning method. After 5 rounds of panning, high MIF-binding phages were enriched. Plaques were made and 20 single clones were chosen to be sequenced. The result of sequencing was analyzed by bio-informatics software. The competitive ELISA was carried out to check whether the affinity of phage to MIF had been improved. Results Twenty positive single phage clones have a single consistent sequence, indicating that they are derived from a single clone. This clone is named sHCD74m, while its gene is named sHCD74mD. The result of competitive ELISA showed that sHCD74m prevents natural sCD74 from binding MIF. Conclusion sHCD74mD, the gene of sCD74 mutant that binds MIF with high affinity, has been made.

Key words: DNA shuffling; MIF; CD74; T7 phage display; MHC Ⅱ invariant chain

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种重要的炎症相关因子,是脓毒症发生的重要因素[1]。近期研究表明,MIF 参与免疫调节,与自身性免疫疾病高度相关,并在肿瘤演化过程中起重要作用[2,3]。有研究证实,阻断 MIF 将有助于治疗相关疾病[4,5],这预示着 MIF 阻断剂在治疗相关人源性疾病方面的广阔前景。2003 年 Leng 等[6]提出 MHC Ⅱ分子恒定链胞外区(sCD74)是 MIF 在体内

基金项目: 重庆市自然科学基金(2007BB5069);第三军医大学青年研究基金(XG200512)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5069) and the Research Funds for the Young Scholars by Third Military Medical University (XG200512)

作者简介: 臧家涛,男,山东省临沂市人,硕士研究生,主要从事 MIF 阻断剂方面的研究。电话:(023)68752313,E-mail: john_993039@163.com

通信作者: 陈 安,电话:(023)68752313,E-mail: chenan7281@yahoo.com
胡川闽,电话:(023)68753761,E-mail:chuminhu@163.com

收稿日期: 2007-11-06;**修回日期:** 2008-01-21

的天然受体的观点。本研究通过 DNA shuffling 技术制备人 MHC Ⅱ分子恒定链胞外区(sHCD74)分子的突变体,竞争性阻断 MIF 与 CD74 的结合,旨在为相关研究提供一种有力的工具。

1　材料与方法

1.1　材料

Taq 酶为 Promega 公司产品,ATP(10 mmol/L)、Trizol 购自北京鼎国,小片段 DNA 凝胶回收试剂盒购自博大泰克公司,MIF、sCD74 为本实验室自备, DNase Ⅰ购自华美生物工程公司, *Eco*RⅠ、*Hind* Ⅲ限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶购自 TOYOBO 公司, T7 select 10-3 cloning kit、T7 select packaging kit 购自 Novagen 公司,鼠抗人 CD74 单克隆抗体(LN-2)、羊抗鼠 IgG 单克隆抗体购自中杉金桥,引物合成、测序委托 Invitrogen 公司进行。

1.2　方法

1.2.1　sCD74 同源序列的克隆　　GenBank 查询牛(bovine, B)、小鼠(mouse, B)、人(human, H) sCD74 编码基因,序列号分别为 BT021489、NM_010545、BT019505。设计胞外同源区(73~232 aa)引物,引物序列分别为:BCD74 正义链 5′-CAGCAGCAGGGCCGGCT-3′, BCD74 反义链 5′-TTACACCCCCAGCCCAGATGA-3′; MCD74 正义链 5′-CAGCAACAGGGCCGCCTAG-3′, MCD74 反义链 5′-TCACGAGGTGACTTGACCCAG-3′; HCD74 正义链 5′-CAGCAGCAGGGCCGGCTGGAC-3′, HCD74 反义链 5′-CTACATGGGGACTGGGCCCAGATCC-3′。将牛、小鼠、人外周血反复冻融裂解红细胞,收集白细胞,Trizol 裂解加酚-氯仿抽提制备总 RNA,逆转录得 cDNA 作为模板。分别以 46、53、54 ℃退火扩增牛、小鼠、人同源区序列,TA 克隆后测序。

1.2.2　CD74 同源序列的定点突变　　T7 select 10-3b vector arms 是经 *Eco*RⅠ、*Hind* Ⅲ预酶切的断裂 DNA,牛、小鼠、人 CD74 胞外同源区基因内 71 bp 处有 *Hind* Ⅲ酶切位点(AAGCTT),必须进行同义突变。采用交错延伸法,设计定点突变引物,以 *Taq* 酶将其突变为 AAGCTG。突变的基因上游和下游序列交错延伸即获得全长定点突变序列,TA 克隆后测序。

1.2.3　DNaseⅠ消化 sCD74 同源基因制备小片段 DNA　　牛、小鼠、人胞外同源区(sCD74)基因按物质的量的比混合,调节浓度为 0.5 μg/μl。20 μl 体积反应体系,Mg^{2+} 缓冲液,DNA 总量 5 μg,DNaseⅠ 0.01 U,37 ℃反应 25 min 后 94 ℃ 10 min 终止反应。2% 琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果,以试剂盒回收 20~50 bp 大小片段。

1.2.4　DNA shuffling 定向进化 sHCD74[7,8]　　首先进行有性 PCR,反应体系: 消化回收 DNA 0.5 μg, Mg^{2+} 5 μl, dNTP(10 mmol/L)2.5 μl, *Taq* 酶 0.6 μl,总体系 50 μl。反应条件为 94 ℃ 40 s,47 ℃ 40 s, 72 ℃ 40 s,25 循环。加入特异性引物,进行有引物 PCR,引物序列分别为: sHCD74 正义链 5′-CAGGAATTCTCAGCAGCAGGGCCGG-3′, sHCD74 反义链 5′-CCCAAGCTTCTACATGGGGACTGGGCC-3′。反应体系:有性 PCR 产物 5 μl, Mg^{2+} 2.5 μl, dNTP(10 mmol/L)2.5 μl, *Taq* 酶 0.6 μl,引物各 1 μl。反应条件为 94 ℃ 40 s, 42 ℃ 40 s,72 ℃ 30 s,20 循环。0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析结果,回收 500 bp 大小 DNA。

1.2.5　改组 CD74 与 T7 噬菌体基因的连接　　改组 CD74 DNA 经 *Eco*RⅠ、*Hind* Ⅲ酶切过夜后回收,按照下列反应体系与 T7 噬菌体 vector arms 16 ℃连接过夜:T_4 DNA 连接酶 1 μl, 10×Ligase buffer 1 μl, T7 vector arms 1 μl, CD74 DNA 0.05 μg, ATP 0.5 μl,总体系 5 μl。

1.2.6　噬菌体的组装与容量鉴定　　5 μl 连接产物加入到 25 μl T7 packaging extracts 中,室温连接 2 h,加入 270 μl LB 培养基终止反应。取 10 μl 进行 10^{-6}~10^{-2} 梯度稀释,平板法计数噬菌斑菌落形成单位(plague-forming unit, PFU)。按公式(PFU = 噬菌斑数×稀释倍数/样品体积分数)计算库容。

1.2.7　高亲合力噬菌体的筛选　　MIF 5 μg/孔包被 96 孔 ELISA 平板,5% 脱脂奶粉封闭,计算淘洗所需噬菌体扩增液体积($V = PFU_{原} \times 100/PFU_{扩}$)。第 1 轮淘洗,2 复孔每孔各加原始噬菌体扩增液 100 μl,室温作用 1 h;弃孔内液体,1×TBST 洗 5 次,各加 100 μl T7 洗脱缓冲液室温洗脱 30 min;吸出孔内液体,1 孔 PFU 计数,1 孔扩增后计数。第 2 轮淘洗,先用 100 μl sHCD74 封闭 1 h,其他操作同第 1 轮。第 3 轮淘洗将噬菌体量减少为 1 μl,并用 5×TBST 稀释为 100 μl,竞争结合时间减少为 10 min。第 4 轮淘洗用 sHCD74 封闭 30 min 后向其中加入 0.5 μl 噬菌体扩增液,30 min 后弃孔内液体,以 10×TBST 洗涤 5 次,每次 5 min,再以洗脱液洗涤 5 次。第 5 轮将洗脱液洗涤时间延长为 3 min。建立第 5 轮淘洗扩增产物噬菌斑平板,选择约 100 个噬斑/板的平板随机挑取 20 个噬菌体单克隆,扩增后用试剂盒提供多克隆区引物扩增展示区编码基因,回收后进行 TA 克隆,挑取阳性克隆测序。DNAstar 分析测序结果。

1.2.8　竞争性 ELISA　　MIF 5 μg/孔包被 96 孔 ELISA 平板,4 ℃封闭过夜。阴性孔(-)加普通亲和力噬菌体 100 μl;质控孔(C)加噬菌体 5 次淘洗扩增产物 100 μl,测定 HCD74 抗体与噬菌体有无交叉反应;阳性孔(+)、样品孔各加 sHCD74 100 μl;室温孵育 1 h,弃孔内液,洗涤拍干。阴性孔加 100 μl sHCD74;质控孔、阳性孔各加 H_2O 100 μl;样品孔分别加 1∶1、1∶2、1∶3比例混合的 5 轮淘洗噬菌体扩增液与 sHCD74 混合物;室温孵育 1 h,弃孔内液,洗涤拍干。先后以抗鼠抗人 CD74 抗体 1∶1 000 浓度及羊抗鼠 IgG 单克隆抗体 1∶2 000 浓度作用 1 h,OPD 显色终止后,酶标仪 450 nm 波长处测定结果。共进行 5 次重复测定。

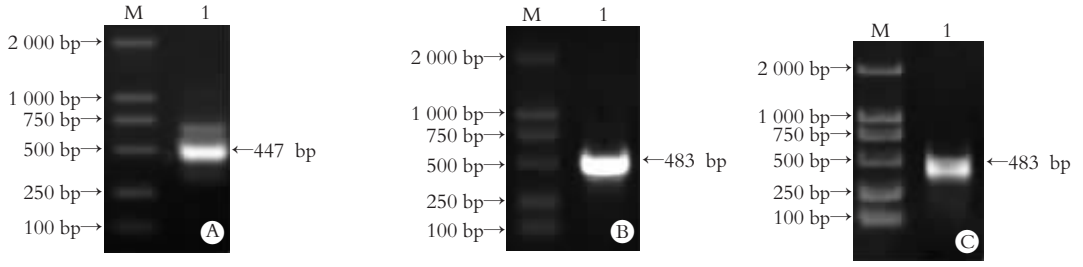
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件,对竞争性 ELISA 数据进行单因素方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　CD74 同源基因的克隆

牛、小鼠、人 CD74 胞外同源区分别为 447、483、483 bp,见图 1。经过 30 循环的 PCR 扩增,得到了与之大小相符的基因,测序结果表明,克隆得到的序列与 GenBank 收录的序列一致。



A：人；B：小鼠；C：牛；M：DNA 标准(DL 2000)；1：PCR 产物

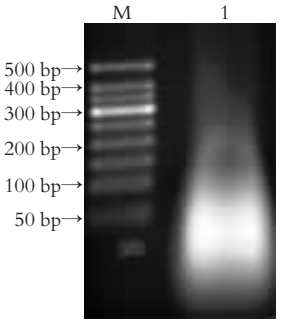
图 1 PCR 扩增 CD74 同源基因琼脂糖凝胶电泳图

2.2 定点突变 *Hind*Ⅲ酶切位点

用含有定点突变基因的引物分段突变，基因上游和下游突变序列交错延伸即获得全长定点突变序列。测序结果表明，3种同源基因内部 *Hind*Ⅲ酶切位点已由 AAGCTT 定点突变为 AAGCTG。

2.3 DNase Ⅰ消化结果

牛、小鼠、人3种 sCD74 同源序列按等物质的量的比例混合，消化 30 min 后切下 20～50 bp 大小的 DNA 片段回收，见图2。

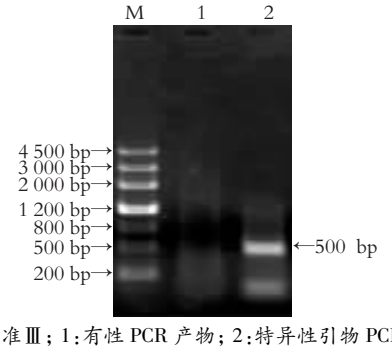


M：标准；1：消化产物

图 2 DNase Ⅰ消化 CD74 同源基因琼脂糖凝胶电泳图

2.4 DNA shuffling 定向进化 CD74

首先进行有性 PCR，小片段互相配对延伸，然后以有性 PCR 产物为模板，以含有酶切位点、保护碱基的特异性引物扩增 500 bp 大小的片段，见图3。



M：DNA 标准Ⅲ；1：有性 PCR 产物；2：特异性引物 PCR 扩增产物

图 3 DNA shuffling 定向进化 sHCD74 琼脂糖凝胶电泳图

2.5 改组噬菌体文库的筛选

原始噬菌体组装产物取 10 μl，采用 10^{-6}～10^{-2} 梯度稀释，建立噬菌斑平板，取 10^5 稀释噬菌斑的平板计算 PFU(图4)，本次建立原始文库容量为 $80\times10^5\times30=2.4\times10^8$，以满足筛选要求。该文库扩增后 PFU 为 $3\times10^{13}\,ml^{-1}$。对此文库进行5轮筛选，筛选前后 PFU 变化情况见表1。

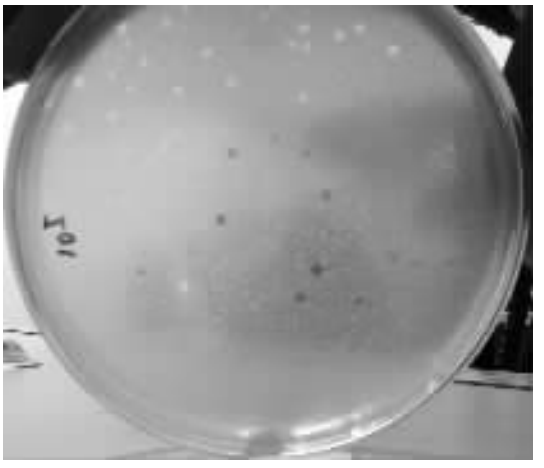


图 4 sHCD74 重组 T7 噬菌体原始文库噬菌斑平板

表 1 各轮淘洗扩增前后 PFU 统计表

淘洗轮数	未扩增	扩增后	富集值
原始	2.4×10^8	3.0×10^{13}	-
第1轮	6.0×10^6	1.2×10^{16}	2.0×10^{-7}
第2轮	8.0×10^5	8.0×10^{15}	6.7×10^{-11}
第3轮	9.0×10^4	5.0×10^{15}	1.1×10^{-11}
第4轮	8.0×10^1	6.0×10^{13}	1.6×10^{-14}
第5轮	2.0×10^2	8.0×10^{15}	3.3×10^{-13}

2.6 噬菌体单克隆鉴定

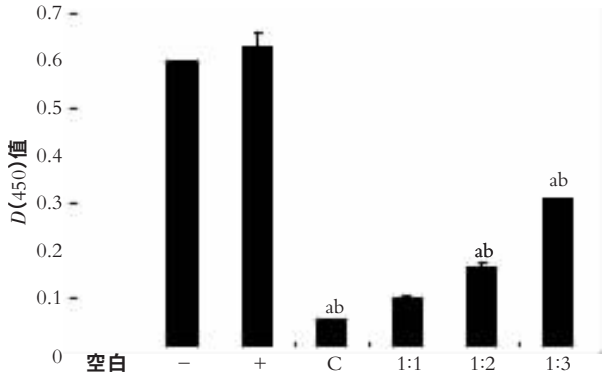
建立第5轮筛选噬菌斑平板，挑取 20 个单克隆，克隆鉴定阳性率并克隆所含改组基因。20 个噬菌体单克隆都是阳性克隆，阳性率为 100%。阳性克隆结果显示筛选 20 个单克隆具有相同的突变体基因，将此单克隆噬菌体命名为 sHCD74m，其 DNA 序列命名为 sHCD74mD，以 DNAstar 分析此序列的突变情况，发现第 124 位及 130 位碱基处发生突变，见表2。

表 2 sHCD74m 与天然 sHCD74 比对分析表

序列	基因序列
sHCD74	5′-CTGATGCAG-3′
sHCD74m	5′-CgGATGtAG-3′

注：突变位点以小写表示

竞争性 ELISA 测定 sHCD74m 阻断 sCD74 的作用,sHCD74m 与 sHCD74 以 1∶1、1∶2、1∶3比例混合的样品测定结果与阴性对照(“ - ”,普通亲和力噬菌体)及阳性对照(“ + ”,sHCD74)相比,具有显著性差异($P<0.01$),见图 5。



“ - ”为普通亲和力噬菌体,“ + ”为 sHCD74,“C”为 sHCD74m,1∶1、1∶2、1∶3为不同比例 sHCD74m 与 sHCD74 混合物

a:$P<0.01$,与“ + ”比较;b:$P<0.01$,与“ - ”比较

图 5　高亲合力噬菌体单克隆竞争性抑制 sCD74 与 MIF 结合的 ELISA 结果

3　讨论

MIF 是与脓毒症、肿瘤、自身免疫疾病高度相关的因子,并可拮抗糖皮质激素的作用[9],因此 MIF 阻断剂研究具有重要意义。作为最直接的 MIF 阻断剂,鼠源 MIF 单克隆抗体在脓毒症、肿瘤、自身免疫疾病的小鼠模型显示有效[4,5],然而鼠源抗体的人源化改造需要大量经费投入。从受体角度出发,采用进化效率较高的 DNA shuffling 技术对 MIF 受体 CD74 胞外区进行定向进化,有望获得高亲和力结合 MIF 的突变体,经费投入较少;且突变体有可能仅几个位点产生突变,从而保持其免疫原性不变,有利于后续研究的开展。

DNA shuffling 技术是建立在同源重组理论基础上的高效进化方法,进化成功与否,除了受分子本身的性质影响以外,还受到有性 PCR 产生的分子多样性以及展示载体展示效率的影响[10]。对于有性 PCR 来说,基因小片段长度应该在全长基因的 1/20 ~ 1/10,退火温度在 40 ~ 60 ℃。

对于文库的筛选方法,应因目的而异[11]。对于表位鉴定、配体的捕获等,我们可以采用浓度逐步提高的 TBST,足以将非特异结合的噬菌体洗涤、富集成一致序列;而对于高亲和力突变体的筛选,我们可以采用高浓度 TBST 洗涤、竞争性结合、SDS 等严格的特异洗涤相结合的方案,既可保护多样性又可保证有效富集,有利于筛选到最高亲和力的突变体[12]。另外,本研究采用的 T7 噬菌体展示平台是多拷贝展示外源蛋白的,这对于空间结构比较复杂的配体分子筛选是有利的,但同时也对表达提出了更高的要求。

本研究通过 DNA shuffling 技术结合 T7 噬菌体展示,通过竞争性淘洗法筛选得到 sCD74 突变体噬菌体单克隆,克隆了单克隆突变体基因,并测序得到了基因序列,为下一步研究奠定了基础。另外我们还观察到 CD74 分子的 73 ~ 124 aa 对结合 MIF 有重要作用,至于 CD74 胞外区中哪些区域对结合 MIF 起关键性作用,尚需要进一步研究。

参考文献:

[1] Leng L, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor[J]. Crit Care Med, 2005, 33(12 Suppl): S475 - S477.

[2] Abe R, Peng T, Sailors J, *et al*. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor[J]. J Immunol, 2001, 166(2): 747 - 753.

[3] Bucala R, Donnelly S C. Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer[J]. Immunity, 2007, 26(3): 281 - 285.

[4] Solomon A, Dursun D, Liu Z. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(10): 2283 - 2292.

[5] Denkinger C M, Metz C, Fingerle-Rowson G, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2004, 52(6): 389 - 400.

[6] Leng L, Metz C N, Fang Y, *et al*. MIF signal transduction initiated by binding to CD74[J]. J Exp Med, 2003, 197(11): 1467 - 1476.

[7] Stutzman-Engwall K, Conlon S, Fedechko R, *et al*. Semi-synthetic DNA shuffling of aveC leads to improved industrial scale production of doramectin by Streptomyces avermitilis[J]. Metab Eng, 2005, 7(1): 27 - 37.

[8] Locher C P, Paidhungat M, Whalen R G, *et al*. DNA shuffling and screening strategies for improving vaccine efficacy[J]. DNA Cell Biol, 2005, 24(4): 256 - 263.

[9] Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, *et al*. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity[J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(6): 1267 - 1280.

[10] Bacher J M, Reiss B D, Ellington A D. Anticipatory evolution and DNA shuffling[J]. Genome Biol, 2002, 3 (8): REVIEWS1021.

[11] 侍立峰, 梁志清. 利用噬菌体肽库技术筛选卵巢持异的 VEGFR 3 亲和肽. 第三军医大学学报, 2006, 28(4): 308 - 310.

[12] 张　林, 刘　杞, 孙　航. 利用噬菌体表面展示技术构建人肝癌细胞的 cDNA 表达文库[J]. 重庆医科大学学报, 2005, 30(3): 329 - 332, 397.

(编辑　郭建秀)