维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)03-0232-04

Endoglin 特异性结合短肽筛选及功能分析

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)

【摘 要】目的:对噬菌体随机 12 肽库进行筛选,寻求可与 Endoglin 结合的小分子短肽并测定其亲和常数。方法:经过 3 轮"吸附 - 洗脱 - 扩增"后,随机挑取 16 个克隆,双夹心 ELISA 法鉴定其亲和性,测定阳性克隆的 DNA 序列,竞争抑制实验检测优势克隆的特异性,非竞争法 ELISA 固相法计算阳性噬菌体融合肽的亲和常数。结果:三轮生物筛选,噬菌体得到有效富集,竞争性 ELISA 显示 6 个阳性噬菌体克隆与 rhEndoglin 有较强的结合活性,测序获得 5 种多肽序列,优势序列为:AHKHVHHVPVRL,竞争抑制实验显示阳性噬菌体克隆与 Endoglin 有良好的亲和性,其亲和常数为:$(1.431 \pm 0.293) \times 10^7$ mol/L。结论:利用噬菌体肽库技术可以获得亲和力较强的 Endoglin 的结合肽,为今后进一步研究 Endoglin 在卵巢癌的早期诊断方面的作用奠定基础。

【关键词】Endoglin;噬菌体随机肽库;结合肽;筛选

【中国图书分类法分类号】R771-75 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-08

Screening and function analysis of targeted short binding peptides of Endoglin

BI Xianmin, et al

(*Department of Gynaecology and Obstetrics, the Southwest Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To do screening in phage displayed 12-peptide library to seek short peptides capable of binding Endoglin detect their affinity constants. *Methods*: After three rounds of screening, 16 phage clones were randomly selected and their affinity was identified by sandwich ELISA. The DNA sequence of positive phage clones was determined, and their speciality was identified by competitive inhibition test. We finally calculated out the affinity constants of those positive phage binding peptides by non-competitive ELISA method. *Result*: After three rounds of screening, the enriched phage clones were identified. 6 of 16 phage clones were identified positive by competitive ELISA, which had comparatively strong binding activity to rhEndoglin. Five sequences were obtained, and the predominant sequence was AHKHVHHVPVRL. Competitive inhibition test showed that positive phage clones had good affinity to Endoglin, with the affinity constant as $(1.431 \pm 0.293) \times 10^7$ mol/L. *Conclusion*: The rhEndoglin-binding peptides with high affinity to Endoglin can be obtained through the screening of phage random peptide library, which is beneficial to the further studies on the function of Endoglin in the early diagnosis of ovarian cancer.

【Key words】Endoglin; Phage-displayed random peptide library; Binding peptide; Screening

Endoglin 又名 CD105,是内皮细胞表面与增殖相关的膜抗原,在有活性血管生成区域及肿瘤组织中特异性高表达[1],在正常组织中无表达,与肿瘤血管生成及肿瘤的浸润、转移密切相关,是卵巢癌等恶性肿瘤早期诊断和治疗的理想的分子靶位[2-4]。

噬菌体展示随机肽库技术使用了模拟多肽的思想,可以在对筛选的配体或受体的结构和功能了解甚少的情况下获得其模拟多肽[5,6]。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[7-9]。本研究以 rhEndoglin 为靶点,应用噬菌体展示技术筛选出可与 Endoglin 特异性结合的短肽序列,以期为卵巢癌的早期诊断和疗效判断提供潜在的靶向载体。

1 材料与方法

1.1 材料

rhEndoglin 蛋白(R&D #1097-EN);噬菌体十二肽库(Ph.D-12.TM Phage Display Peptide Library)库浓度为 6.00×10^{12}pfu/ml,宿主菌为 E.coli2738,-28gIII 手工测序引物、-96gIII 自动测序引,均购自 New England Biolabs 公司。主要

作者介绍:毕仙民(1977-),女,硕士,医师,主要研究方向:妇产科肿瘤方面的研究。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30271360)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

试剂:HRP 抗 M13 单抗(#27-9421-01,1:5000 稀释工作浓度)购自 Amersham Biosciences 公司;ABTS(#A0400,22mgABTS 溶于 50mM 柠檬酸钠 100ml 中,pH4.0,过滤除菌)购于 sangon 公司;PEG-8000(sangon#PT1788);封阻缓冲液、碘化物缓冲液、TBST、TBS、0.2M Glycine-HCl (pH2.2,含 1mg/ml 的 BSA)、TE 缓冲液 (10Mm Tris-HCl pH8.0,1Mm EDTA)均为本室自配。主要仪器:恒温培养箱 HZQ-X100(哈尔滨市东明医疗仪器厂)、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。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体肽库的筛选 将 Endoglin 蛋白用 0.1mol/L $NaHCO_3$(pH 8.6)包被缓冲液稀释至 10μg/ml,每孔 100μl 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 (0.1mol/L $NaHCO_3$,5mg/mlBSA,0.02% 的 NaN_3),4℃封阻 1h; 用 TBST (50mmol/l Tris-HCl,150mmol/l NaCl,0.1%Tween-20)快速洗板 6 次,每孔加入 6.00×10^{12} 的噬菌体,室温轻摇震荡 60min;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 (0.2mol/L pH2.2 Glycine-HCl,1mg/mlBSA)100μl,室温轻摇 10min,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 10μl 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、1.0μg/ml, 洗脱液 TBST 的浓度依次递增为 0.3%、0.5%。

1.2.2 噬菌体滴度的测定 用 LB 培养基对洗脱液进行 10 倍系列稀释,分别取各稀释度的噬菌体 10μl 加入到制备好的对数生长期的 ER2738 菌液 200μl 中, 快速震荡混匀,室温温育 5min,加入到 3ml 已融化的 45℃保温的 Agarose Top 中混匀,立即倾注于 37℃预热的 LB/IPTG/Xgal 平皿上,均匀铺开。冷却 10min 后,37℃倒置平皿培养过夜。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 10μl 的噬菌体形成单位。

1.2.3 扩增 将 ER2738 的过夜培养物 1:100 稀释于 20mlLB 培养基中,盛装于 250ml 的锥形瓶内,然后加入剩余的洗脱物,37℃剧烈震荡培养 4.5h。倒入离心管,4℃,10000r/min 离心 10min, 收集 80%的上清液加入 1/6 体积的 PEG/NaCl,4℃,10000r/min,15min 离心,弃上清,用 1ml TBS 悬浮沉淀,4℃,10000r/min,离心 5min,去除沉渣,上清中再加入 1/6 体积的 PEG/NaCl,冰上沉淀 60min,4℃,10000r/min,离心 10min,弃上清,用 200μl TBS,0.02% NaN_3 悬浮沉淀物,即为扩增的噬菌体。

1.2.4 双夹心 ELISA 鉴定 用包被缓冲液稀释 Endoglin 蛋白,每孔 100μl 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 2h。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 200μl(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 2h,0.5%TBST 洗板 6 次, 加入 1:5000 稀释的 HRP conjugate anti-M13 抗体,室温孵育 1h,再用 TBST 洗板 6 次,加 ABTS 底物显色液(200μl/孔),室温作用 10~60min 显色,酶标仪 450nm 处读数。

1.2.5 提取单链 DNA 测序 将鉴定阳性克隆的噬菌体扩增液 500μl,加入 200μl PEG/NaCl,混匀,室温放置 10min;10000r/min,离心 10min,弃上清,加 100μl 碘化物缓冲液和 250 μl 无水乙醇悬浮沉淀,室温温育 10min;10000r/min,离心 10 min,弃上清,用 70%的乙醇 500μl 洗沉淀,真空抽干,TE 缓冲液 30μl 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。

1.2.6 竞争抑制实验 用 0.1μg/ml rhEndoglin 包被酶标板(50μl/孔),4℃孵育过夜, 封阻缓冲液 4℃封阻 2h。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、0.125μg/ml 后各取 25μl 与优势噬菌体原种上清 25μl 混匀,室温作用 2h;混匀物加入酶标孔内,室温震荡 2h,0.5%TBST 洗板 6 次,加入 HRP- 抗 M13(1:5000)单抗,孵育 1h,再用 TBST 洗板 6 次,加 200μl ABTS,室温培养 10~60min 显色,测定 OD450 值。

1.2.7 测定不同浓度 Endoglin 包板条件下阳性噬菌体融合肽结合反应曲线 以 PBSN 包板液将 Endoglin 稀释为 10、5、2.5、1.25mg/ml 4 个浓度后依次加入微孔板中,每孔 50μl,每浓度 2 孔(设内对照),同时以封阻液及 PBS 作对照(阳性对照及阴性对照)。洗板及封闭后将 1000、500、250、125、62.5、31.25μg/ml 的阳性噬菌体融合肽(根据分子量转换)加入包被的抗原孔中,每孔 100μl,每浓度 2 孔,室温孵育 16h,同时 200r/min 震荡;其后的显色过程同 1.2.4。

2 结 果

2.1 3 轮筛选的富集率

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)。

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,随机挑取 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 A450 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)。

2.3 噬菌体克隆 DNA 序列测定

维普资讯 http://www.cqvip.com

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

筛选轮数	筛选前滴度 pfu)	洗脱液滴度(pfu)	富集率(%)
1	6.000×10^{10}	1.118×10^{5}	1.863×10^{-6}
2	1.945×10^{11}	1.010×10^{8}	5.190×10^{-4}
3	4.055×10^{10}	2.963×10^{8}	7.310×10^{-3}



图 1 随机噬菌体克隆与 rhEndoglin 的结合结果

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,综合图 1,优势序列 1 与 rhEndoglin 具有相对较高的亲和力。

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,结果见图 2。

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[(未抑制 A450nm- 抑制后 A450nm)/未抑制 A450nm × 100%]亦逐渐降低,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。

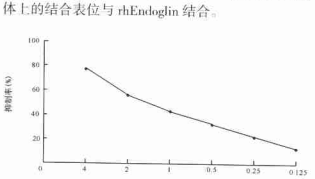


图 2 可溶性 rhEndoglin 对噬菌体克隆与包被 Endoglin 结合的抑制

2.5 测定 4 个倍比 Endoglin 浓度包板条件下阳性噬菌体融合肽结合反应曲线

以 5% 递减法确定出 A、B、C、D 四条曲线右侧的结合反应平台期(A、B、C、D 分别代表以 10、5、2.5、1.25 μg/ml 浓度 Endoglin 包板,四者浓度之比为 8:4:2:1),通过作图法取其最大 OD 值一半(即 OD50%)处对应的抗体浓度(分别对应图中 1、2、3、4 四个点)。融合多肽在 1 处浓度为 450 μg/ml、2 处浓度为 480 μg/ml、3 处浓度为 500 μg/ml、4 处浓度为 410 μg/ml(图 3)。

2.6 功能性亲和常数的计算

由经典的质量作用定律方程 K=[AgAb]/[Ag]×[Ab] 我们可以推导出 $K=(n-1)/([n\mathrm{Ab}']_{\text{总}}-[\mathrm{Ab}]_{\text{总}})$,其中[Ag]、[Ab]为反应达平衡时的游离抗原、抗体浓度;n 为加入多肽的浓度比值;$[\mathrm{Ab}']_{\text{总}}$、$[\mathrm{Ab}]_{\text{总}}$为不同反应体系的总抗体浓度[10]。根据上述公式计算出噬菌体融合多肽(分子量 7222kD)的功能性亲和常数为 $(1.431\pm0.293)\times10^{7}\mathrm{mol/L}$。

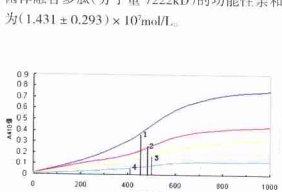


图 3 噬菌体融合肽与 Endoglin 结合曲线

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

卵巢恶性肿瘤是女性生殖道常见的三大恶性肿瘤之一,由于缺乏有效的早期诊断技术及浸润性生长和转移迅速的特点,其死亡率已居女性生殖系统恶性肿瘤之首。活性小分子肽具有结构简单,分子量小,特异性高,穿透性好,不易在体内诱发免疫应答等优点,可作为良好的靶向载体,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。

近年来研究发现 Endoglin 的单克隆抗体在动物的肿瘤治疗中具有重要作用[11],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。

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。我们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。

Beatty 及 Loomans 等从理论和实验上均证明了非竞争法 ELISA 测定多肽的亲和常数操作简便易行,结果可靠。本实验通过非竞争法 ELISA 检测阳性噬菌体多肽的功能性亲和常数为 $(1.431 \pm 0.293) \times 10^7 mol/L$,说明其与靶分子具有较好的亲和活性。但噬菌体呈现肽的特性并不一定能代表合成多肽的性质,我们将通过分子结构的模拟优化和多肽合成进一步研究其生物学活性。

(通讯作者:梁志清,电话(023)68754409)

参 考 文 献

[1] Miler DW, Graulich W, Karges B, et al. Elevated expression of CD105, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor CD105 cells[J]. Int J Cancer, 1999; 81(4): 568-572.

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

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

[4] Saad RS, Liu YL, Nathan G, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer [J]. Mod Pathol, 2004; 2(1): 197-203.

[5] Dale JC, Elizabeth BG. Phage display for target-based antibacterial drug discovery[J]. Drug Discovery Today, 2001; 6(7): 721-727.

[6] Vasily VI, Franco F, Anil GM. Targeted delivery of multivalent phage display vectors into mammalian cells[J]. Biochem Biophys Acta, 1999; 1448(3): 463-472.

[7] Smith G P, Petrenko VA. Phage display [J]. Chem Rew, 1997; 97 (2): 391-410.

[8] Deleo FR, Yu L, Burritt JB, et al. Mapping sites of interaction of p49-phox and flavocytochromeb with random-sequence peptide phage display libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995; 92: 7110-7114.

[9] Eda K, Eda S, Sherman IW. Identification of peptides targeting the surface of plasmodium falciparum-infected eryth rocytes using a phage display peptide library[J]. Am J Trop Med Hyg, 2004; 71(2): 190-195.

[10] Beatty JD, Betty GB. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay [J]. Immunol Methods, 1987; 100(1-2): 173-179.

[11] Shiozaki K, Harada N. Antiangiogenic chimeric anti-endoglin (CD105) antibody: pharmacokinetics and immunogenicity in nonhuman primates and effects of doxorubicin [J]. Cancer Immunology, Immuno therahy, 2006; 2(55): 140-150.

(上接第 231 页)

杂志, 2006; 14: 346-349.

[6] 余慧锋, 刘 杞. hALR 在毕赤酵母菌 GS115 中表达和体外活性检测[J]. 中华肝脏病杂志, 2003; 11: 421-423.

[7] 陈 莉, 孙红柳, 安 威. 重组人肝刺激因子的促增殖和抗损伤作用[J]. 解剖学报, 2003; 34: 155-158.

[8] 邓建川, 刘 杞, 陈 曜, 等. 利用 5'-RACE 技术进行人肝再生增强因子相互作用肽 cDNA5'末端快速扩增及序列分析[J]. 重庆医科大学学报, 2006; 31: 463-465.

[9] Marchuk D, Drumm M, Saulino A, et al. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products[J]. Nucleic Acids Res, 1991; 19: 1154.

[10] Dabrowski S, Kur J. Cloning and expression in Escherichia coli of the recombination His-tagged DNA polymerases from pyrococcus furiosus and pyrococcus woesei[J]. Protein Expression and Purification, 1998; 14: 131-138.