DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.023
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)01-0061-03

论著

酵母双杂交随机肽库的设计及构建

胡承香[1],徐 祥[1],梁华平[1],吕凤林[1],王付龙[2],王正国[3] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]第一研究室,[3]第四研究室,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400042;[2]河北省邯郸市解放军第285医院外一科,邯郸 056001)

提 要:目的 构建一个含16个氨基酸的酵母双杂交随机肽库。方法 设计合成编码16肽的随机DNA片段,PCR扩增随机DNA片段,经限制性内切酶*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ酶切后克隆入酵母表达质粒pGADT7 GH,构建酵母双杂交随机肽库质粒pGADT7 GH-RP并检验其库容。结果 扩增获得编码16肽的随机DNA片段,并成功将随机DNA片段克隆入酵母表达质粒pGADT7 GH,与GAL4AD形成融合蛋白,其库容为1.28×10^7。结论 成功地构建了酵母双杂交随机肽库。

关键词:随机肽库;酵母双杂交;pGADT7 GH
中图法分类号:Q516;Q503 文献标识码:A

Design and construction of a random peptide library with yeast two hybrid system

HU Cheng-xiang[1], XU Xiang[1], LIANG Hua-ping[1], LU Feng-lin[1], WANG Fu-long[2], WANG Zheng-guo[3] ([1]Department 1, [3]Department 4, Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Department of General Surgery, No. 285 Hospital of PLA, Handan 056001, China)

Abstract: Objective To construct a peptide library composed of 16 random amino acids with yeast two hybrid system. Methods Random oligonucleotides encoded with 16 peptides were designed and artificially synthesized, and were amplified by PCR. The amplified products after being digested with *Bam*HⅠ and *Eco*RⅠ were cloned into plasmid pGADT7GH to construct the library plasmids pGADT7GH-RP. Results The random oligonucleotides encoded with 16 peptides were obtained and inserted into pGADT7GH, and became fusion protein with GAL4AD. Conclusion The random peptide library with 1.28×10^7 different recombinant clones has been successfully constructed.

Key words: random peptide library; yeast two hybrid system; pGADT7 GH

酵母双杂交系统是一个用于探测蛋白-蛋白间相互作用的杂交系统。本系统既可用于与已知靶蛋白相互作用的新型蛋白编码基因的文库筛选,也可用于检测两个已知蛋白间的相互作用。酵母双杂交随机肽库技术是以随机肽库为筛选对象的酵母双杂交筛选系统,其可应用于开发新型多肽药物和诊断试剂及研究蛋白质结构与功能[1,2]。酵母双杂交分析系统是基于这样的原理,即很多真核转录活化因子是由两个物理上分开、功能上独立的结构域组成,即DNA结合域(DNA-BD)和转录活化域(AD)。前者可识别靶基因启动子内特异的核苷酸序列(UAS),并与之结合,而后者则激活下游靶基因的转录。采用分子生物学技术将两个结构域分开而又在同一宿主细胞中表达,则不能激活应答基因转录。如果将两种可发生相互作用的蛋白分别与这两个结构域融合,并在酵母中一起表达,则可启动报告基因(Lac Z和His3)转录和表达,使得蛋白相互作用的表型可以通过报告基因的表达而被检测[3]。本实验室为了筛选靶向NF-κB的抗炎多肽。首先拟以酵母双杂交载体pGADT7 GH为载体构建16肽的随机肽库pGADT7GH-RP。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

E. coli HB101supE44, hsdS20(rB-mB-), recA13, ara 14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi-1由第三军医大学基础医学部分子遗传教研室保存。

1.2 主要试剂

限制性内切酶*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ,T4连接酶,*Taq*酶均购自Takara公司。小分子量核酸标准购自Promega公司,片段大小依次为:501/498,404,331,242,190,147,111/110和73。

1.3 编码16肽的随机DNA片段的合成、扩增及PAGE纯化

编码16肽的随机DNA片段5′ CTAGTGGATCCC(NNK)

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054203);国家自然科学基金资助项目(30080009);重庆市科委基金资助项目(2000-6319)
Supported by the Projects of National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects)(G1999054203), the National Natural Science Foundation of China (30080009), and the Sci & Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2000-6319)
作者简介:胡承香(1965-),女,重庆市石柱县人,实验师,主要从事创伤感染与免疫方面的研究。电话:(023)68757471,E-mail:xiangxiangyue@Yahoo.com.cn
收稿日期:2003-07-16;修回日期:2003-09-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

16TAAGAATTCGGCCGC-3′，由上海生物有限公司合成，PAGE 纯化。N 代表 A、T、G、C 4 种脱氧核苷，K 代表 G、T 2 种脱氧核苷。16 肽上下两侧的序列中分别包含有 *Bam*HⅠ 和 *Eco*RⅠ 限制性酶切位点。于 *Bam*HⅠ 限制性酶切位点之后加一个 C，使得随机 16 肽的读码框与载体 GAL4AD 的读码框一致。为了终止随机 16 肽的翻译，于随机 16 肽之后设计 TAA 终止密码子。为了扩增 16 肽的随机 DNA 片段，另外设计了一条与随机 DNA 片段 3′互补的引物 5′-GCGGCCGAATTCTT-3′，由上海生物有限公司合成，PAGE 纯化。扩增随机 16 肽 DNA 片断方法：将随机 DNA 片段和引物各 6 nmol 加入含 200 μmol/L dNTP 的反应缓冲液[10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)，50 mmol/L KCl，0.1% TritonX-100，2 mmol/L $MgCl_2$](总体积 100 μl)，95 ℃加热 10 min 后加 20 U *Taq* 酶，95 ℃变性 30 s，45 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 10 min，30 个循环。扩增产物 PAGE 纯化参照文献[4]。

1.4 随机 16 肽库酵母双杂交载体的构建

1.4.1 随机 DNA 片断酶切与连接 延伸的随机片断经 BamHI 和 EcoRI 双酶切后 PAGE 纯化，与同样酶切回收 pGADT7GH 按摩尔比 1∶1 混合，经 T4 连接酶 16 ℃连接 16 h(总体积 100 μl)，后经酚/氯仿抽提、无水乙醇沉淀，重溶于 10 μl TE 缓冲液。

1.4.2 连接产物的电转化及库容检验 10 μl 连接产物电转化 100 μl 预冷的电转化感受态菌，转化后的细胞加 2 ml LB 培养液，37 ℃培养 1 h，取 1 μl 进行梯度稀释后，涂布于含有 100 μg/ml 氨苄青霉素的平板，检查随机肽库的库容。其余 LB 培养物以 100 μl/平板(150 mm)将菌液涂布于含有 100 μg/ml 氨苄青霉素的平板，过夜培养。用 LB 将平版上所有菌落洗脱下来，加入 250 ml/L 甘油，－70 ℃保存。另外随机挑取一个菌落，扩增培养，抽提质粒并以 T7 引物进行测序。

2 结果

2.1 编码 16 肽的随机 DNA 片段的扩增及克隆

随机 DNA 片段的扩增及克隆原理见图 1，两条寡核苷酸单链在 *Taq* 酶作用下互补延伸成双链，采用 8% 聚丙稀酰氨凝胶电泳，可见扩增片段位于 75 bp 左右，大小与实际相符(图 2)。经 PAGE 切胶回收 75 bp 的扩增片段，*Bam*HⅠ 和 *Eco*RⅠ 双酶切后回收片段，并将酶切片段插入 pGADT7 GH 载体。

5′-CTAGTGGATCCC(NNK)$_{16}$TAAGAATTCGGCCGC-3′

← 3′-TTCTTAAGCCGGCG-5′

↓ *Taq*

5′-CTAGTGGATCCC (NNK)$_{16}$ TAAGAATTCGGCCGC-3′

3′-GATCACCTAGGG (NNK)$_{16}$ ATTCTTAAGCCGGCG-5′

↓ *Bam*HⅠ ＋ *Eco*RⅠ

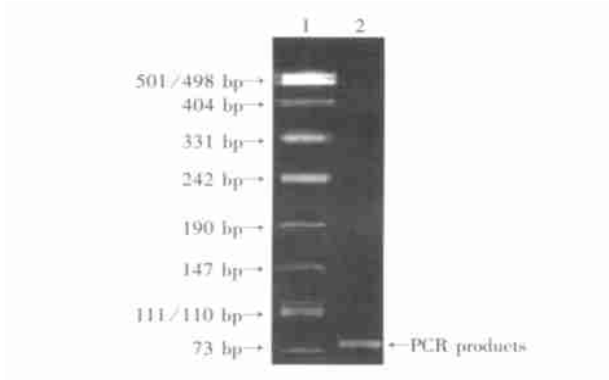
5′-CTAGTGGATCCC (NNK)$_{16}$ TAAGAATTCGGCCGC-3′

3′-GATCACCTAGGG (NNK)$_{16}$ ATTCTTAAGCCGGCG-5′

N= C, G, A, T; K= G, T

图 1 随机片段的扩增及扩增产物的酶切

Fig 1 Amplification of the amplified products of the random DNA fragment



1: Molecular weight markers; 2: Amplified products

图 2 扩增片段 8%聚丙稀酰氨凝胶电泳

Fig 2 Gel electrophoresis of the amplified products with 8% polyacrylamide

2.2 酵母双杂交随机肽库的库容检验

连接产物电转化感受态菌 HB101 后，37 ℃培养 1 h，取 1 μl 培养液梯度稀释后，涂布于氨苄青霉素的平板，根据菌落数可推算随机肽库的库容为 1.28×10^7。而同样浓度的载体 DNA 自连形成的菌落为 1×10^2。

2.3 肽库质粒的随机测序结果

随机挑选的 1 个菌落，经扩增后提取质粒 DNA 进行测序。测序结果与设计相符，随机 16 肽与 GAL4AD 形成融合蛋白，于随机 16 肽之后出现一个终止密码子 TAA。

3 讨论

酵母双杂交随机肽库是酵母双杂交肽库筛选技术的重要组成部分，通过将随机 DNA 片断与 GAL4AD 融合构建酵母表达载体，而构成了一个可筛选、扩增的肽库。与其它筛选体系如噬菌体随机多肽库、噬菌体抗体库、质粒肽库和核糖体展示肽库相比，具有以下优点[5]：①酵母双杂交随机肽库不需要纯化靶蛋白；②具有很高的灵敏度，能检测微弱而短暂的相互作用；③由于酵母细胞属真核细胞，与原核细胞相比，其更接近哺乳细胞的生理状态，更能保持靶蛋白的天然构象和功能；④酵母双杂交系统的筛选发生于酵母细胞内，对胞内蛋白而言，应用此系统更能保持靶蛋白的天然构象和功能，如此筛选获得的多肽具有生物活性的可能性更大。此技术已逐渐被应用于筛选新型的肽类药物、诊断试剂和功能多肽。

酵母双杂交随机肽库的构建是肽库技术的一个重要部分。本实验首先设计合成一条可编码 16 个氨基酸的随机寡核苷酸链，后设计一条与寡核苷酸链 3′互补的引物链，通过 *Taq* 酶扩增延伸两条合成的寡核苷酸链，获得随机编码 16 个氨基酸的核苷酸链。将编码区设计成 NNK(N 为 G、C、A、T)，如 K 为 G、C、A、T，密

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

码子总数为 64 个, 其中 2 个氨基酸各有 1 个密码子, 9 种氨基酸各有 2 个密码子, 1 种氨基酸各有 3 个密码子, 5 种氨基酸各有 4 个密码子, 3 种氨基酸各有 6 个密码子, 而终止密码子有 3 个(TAG、TAA、TGA)。为了减少终止密码子的出现, 也可设计 K 为 G、C、T, 密码子总数为 48 个, 其中 5 个氨基酸各有 1 个密码子, 7 种氨基酸各有 2 个密码子, 5 种氨基酸各有 3 个密码子, 2 种氨基酸各有 4 个密码子, 1 种氨基酸各有 5 个密码子, 而终止密码子有 1 个(TAG)。但值得注意的是, 按这两种方案进行设计, 结果将导致 20 种氨基酸出现频数有明显的差异(0.104/0.021), 氨基酸分布极不均衡, 密码子最多的为 5、6 个, 最少的则为 1 个。而本实验将 K 设计为 G 和 T, 如此设计密码子总数仅为 32 个, 其中 12 个氨基酸各有一个密码子, 5 种氨基酸各有 2 个密码子, 3 种氨基酸各有 3 个密码子, 这样可使氨基酸分布较均衡, 氨基酸出现频数的差异较小, 同时终止密码子只有一个(TAG), 且此终止密码子可被宿主菌的琥珀酸突变抑制, 这样就克服了由于终止密码子的出现而使融合蛋白不能完全表达的现象。

库容是衡量随机肽库主要指标, 理论上设计的编码区将具有约 1×10^{29} 种核酸序列, 1×10^{21} 种多肽序列, 而构建的随机肽库的库容为 1.28×10^{7}, 其库容小于理论值的原因主要来源于转化方法的限制, 目前建库采用转化效率最高的电转化方法, 最高达到 $10^{9}\sim 10^{10}/\mu g$。这样的库容及复杂度在理论上包括 5～7 个氨基酸长度的肽的所有可能的排列顺序。更长的肽库都将是不完全的, 然而这并不影响它的应用。一方面由于不完整的大库中包括一系列框架移动的完整的小库。另一方面, 对于大多数蛋白质相互作用界面, 仅 3～5 个关键残基已能够保证充分的作用稳定性, 而库中可能出现这一系列的克隆的几率很大。而且肽段越长, 越有利于发现有亲和作用的表位序列, 特别对那些关键氨基酸并不是连续的靶分子的结合表位的筛选。本实验的完成为进行酵母双杂交随机肽库筛选靶蛋白相互作用多肽奠定了基础。

参考文献:

[1] 徐　祥, 梁华平, 刘　昕, 等. p65 DNA 结合域的克隆、表达及其酵母双杂交自身激活作用检测[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(2), 123－126.

[2] Yang M, Wu Z, Fields S. Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(7): 1152－1156.

[3] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340(6230): 245－246.

[4] 颜子颖, 王海林 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 121－132.

[5] Cloas P, Brent R. The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(8): 355－363.

(编辑　张大春)

(上接 60 页)

2　结果

例 1 于＋18 d 粒系植入, ＋33 d 血小板植入。例 2 于＋13 d 粒系植入, ＋35 d 血小板植入。细胞因子的应用可以加速造血重建, 例 1 于＋30 d DNA 指纹图示骨髓全部为供者型, 移植后 2 个月外周血 T 细胞亚群恢复正常。随访 10 个月, 患者各项检查正常, 未发生急、慢性 GVHD。例 2 于＋33 d 外周血性染色体分析证明为供者型, 于＋7 d, 发生急性Ⅱ度 GVHD, 用激素后控制, 无并发症。

3　讨论

儿童全身照射(TBI)后, 生长激素的分泌受到限制, 且对性发育及生殖功能有重要影响。BU/CY 方案具有较强的抗白血病及免疫抑制作用, 对于 20 岁以下的白血病患者具有较高的植入率及较低的复发率, 尤其对于急性髓性白血病及慢粒患者效果较好[2], 文献[3]报道儿童白血病移植后的相关病死率增加。2 例患儿预处理时经给予美那斯、强迫利尿及保肝治疗后, 均无出血性膀胱炎及肝动脉血管闭塞症(VOD)等并发症, 且移植后植入时间早, 至今无病生存, 提示 BU/CY 方案对儿童白血病安全有效。

目前在造血干细胞移植的预处理方案中, 常规使用放疗、化疗。我们在常规化疗预处理前, 用物理方法按留取患儿含有肿瘤细胞骨髓, 确能起到减少肿瘤负荷作用。同时使患儿骨髓细胞龛腾空, 以利造血干细胞的植入。并且不用放疗, 避免对患儿骨髓的抑制作用, 以促进移植成功, 减少复发。该方案可取代常规预处理方案, 但作为新的去髓预处理方案在临床中应用, 需要进一步积累临床资料。

关键词: 造血干细胞移植; 白血病; 儿童
中图法分类号: R733.71　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Will A M. Umbilical cord blood transplantation[J]. Arch Dis Child, 1999, 80(1): 3－5.

[2] Sahebi F, Copelan E, Crlley P, *et al*. Unrelated allogeneic bone marrow transplantation using high-dose busulfan and cyclophosphamide(BU-CY) for the preparative regimen[J]. Bone Marrow Transplant, 1996, 17(3): 685－687.

[3] Davies S M, Ramsay N K C, Klein J P, *et al*. Comparison of preparative regimes in transplantations for childhood acute leukemia[J]. J Clin Onco, 2000, 18(2): 340－343.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net