DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.024

文章编号: 1000-5404(1999)11-0837-03

丝状噬菌体随机呈现肽库的构建与鉴定

万 瑛,代佳平,王 燕,刘 昕 (第三军医大学基础医学部分子生物学教研室,重庆 400038)

【提要】 目的: 构建一个随机 20个氨基酸的丝状噬菌体肽库。方法: 扩增随机合成 DNA模板,经限制性内切酶 *Xho*I + *Spe*I 酶切后克隆进噬菌粒 pTMB2,构建随机丝状噬菌体肽库并检验其库容及随机性。结果: 完成丝状噬菌体随机肽库的构建,其库容为 2.1×10^{8},其氨基酸分布于理论频数无显著差异。结论: 丝状噬菌体随机肽库被成功构建。

关键词 丝状噬菌体;随机肽库; pTMB2
中图法分类号 R373.9; R341.43 文献标识码 A

丝状噬菌体随机肽库技术作为一种新兴技术已广泛用于新药开发、蛋白质结构与功能等研究领域[1-3]。现构建的丝状噬菌体肽库载体多为改造的 M13噬菌体,外源的肽段与丝状噬菌体 pIII蛋白融合表达,呈现于噬菌体颗粒表面。由于 pIII蛋白介导丝状噬菌体对 F^{+} 大肠杆菌的感染,外源随机肽段的长度一般仅有 6~15个随机氨基酸[4-6]。考虑到构建更长的随机肽库将提供更为丰富的备选个体且具有更为复杂的空间结构,我们以噬菌粒 pTMB2[7]为载体构建了 20氨基酸的随机肽库。在这个噬菌体呈现系统,噬菌体颗粒表面即包含外源的肽段与丝状噬菌体 pIII的融合蛋白,也拥有完整的野生型 pIII蛋白质,故较长的外源肽段并不影响噬菌体的感染能力。本研究随机合成编码 20个氨基酸的 DNA片段克隆进 pTMB2,完成了丝状噬菌体随机肽库的构建,并检验了此 20氨基酸随机肽库的库容和随机性,证实其满足肽库构建要求,为下一步筛选特异性多肽奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Escherichia coli XL1-Blue [F' pro AB, lac I^{q} Z⊿M15, Tn10 (tet^{r})]和辅助噬菌体 VASM13分别由本校微生物学教研室万泽生博士和本校免疫学教研室王希良博士惠赠。pTMB2[7]为我室改建。

1.2 主要试剂

XhoI, T_4 连接酶 (Boehrinoer Mannheim 公司), SpeI (Promega公司), Taq酶 (Sangon公司)。DNA测序试剂盒 (Promega公司)。小分子量核酸标准 (复华公司)(DNA)片段大小依此为: 501/498, 404, 331, 242, 190, 147, 111/110和 73 bp)。

1.3 编码 20肽的随机 DNA片段的合成、扩增及 PAGE纯化

编码 20肽的随机 DNA片段分为两个部分: 5′GGCTC-GAG(NNB)$_{10}$CCAGGT 3′, 5′GGACTAGT(VNN)$_{10}$ACCTGG 3′,由上海细胞生物所合成。两个 3′端互补的 DNA片段扩增方法: PAGE纯化的两条寡核苷酸链各 6μg加入含有 200μmol/L dNTP的反应缓冲溶液 [10 mmol/L Tris HCl (pH8.0), 50 mmol/L KCl, 0.1% TritonX-100, 2 mmol/L $MgCl_2$](总体积 100μl), 95℃加热 10 min后加 20 unit Taq酶, 72℃ 30 s, 30℃ 30 s, 60个循环伸。扩增产物 PAGE纯化参照文献 [8]完成。

1.4 感受态菌的制备和电转化

电转化使用 Bio-Rad Gene PulserII System,采用 0.2 mm电穿孔杯,参数为: 脉冲电压为 2 500 V,电容为 25μF,并行电阻为 200Ω。

1.5 编码 20肽随机 DNA片段的克隆

延伸的随机片段经 XhoI SpeI酶切后 PAGE纯化 (约 1μg),与同样酶切回收 pTMB2(约 4μg) 16℃连接 16 h(总体积 100μl),经酚/氯仿抽提、无水乙醇沉淀,重溶于 10μl三蒸水。

1.6 丝状噬菌体随机肽库构建及库容检验

10μl连接产物电转化 100μl预冷的电传化感受菌,转化后的细菌加 2 ml SOC培养液, 37℃培养 1 h取 1μl进行梯度稀释后,涂布含有 50μg/ml氨苄青霉素的平板,检查随机肽库的库容。其余 SOC培养物加入 100 ml含有 50μg/ml氨苄青霉素和 10μg/ml四环素的 SB培养液, 37℃培养 2 h后,加入 10^{12} 噬斑形成单位 (pfu)的辅助噬菌体 VSCM13,继续培养 2 h。5 000 rpm离心 15 min,弃上清后,再次加入 100 ml含有 50μg/ml氨苄青霉素和 10μg/ml四环素的 SB培养液, 37℃培养过夜。次日 5 000 rpm离心 15 min收集上清,加入 PEG 8 000至 4%, NaCl至 3%,冰浴 30 min后, 9 000 rpm离心弃上清。用 2 ml含 1% BSA的 PBS溶液重溶沉淀, 10 000 rpm离心 5 min弃不溶物,收集上清即为丝状噬菌体随机肽库。

1.7 丝状噬菌体随机肽库的随机性检验

取 1μl丝状噬菌体随机肽库按一定比例稀释至滴度约为 100个噬斑形成单位 (pfu),取五份稀释液分别加入 100μl OD=1.0的 F^{-} XL1-blue菌液,室温放置 15 min,铺于 5块氨苄青霉素培养板, 37℃培养过夜。次日计算噬斑形成单位 (pfu),并在每一块氨苄青霉素培养板上挑取一个分离良好的菌斑扩增培养,抽提单链模板测定外源序列,分析肽库的随机性。

作者简介: 万 瑛,男, 27岁,助教,硕士研究生
收稿日期: 1999-02-08;修回日期: 1999-07-20
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 编码 20肽随机 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%聚丙烯酰氨凝胶电泳,可见扩增片段主要位于 82 bp左右,见图 2 经 PAGE切胶回收 82 bp的扩增片段,采用 XhoI和 SpeI酶切此片段,然后将酶切后的回收片段克隆进 pTMB2载体。

5 GGCTCGAG (NNB)$_{10}$CCAGGT 3
3 GGTCCA (NNV)$_{10}$TGATCAGG 5

↓ Taq酶延伸

5 GGCTCGAG (NNB)$_{10}$CCAGGT (NNB)$_{10}$ACTAGTCC 3
3 CCGAGCTC (NNV)$_{10}$GGTCCA (NNV)$_{10}$TGATCAGG 5

↓ SepI+ XhoI酶切

5 CTCGAG (NNV)$_{10}$CCAGGT (NNB)$_{10}$A 3
3 C (NNB)$_{10}$GGTCCA (NNV)$_{10}$TGATCA 5

B= C, G, T, NOT A. V= A, C, G, NOT T.

图 1 随机片段的扩增及扩增产物的酶切

Fig 1 Amplication and digestion of randon DNA fragment

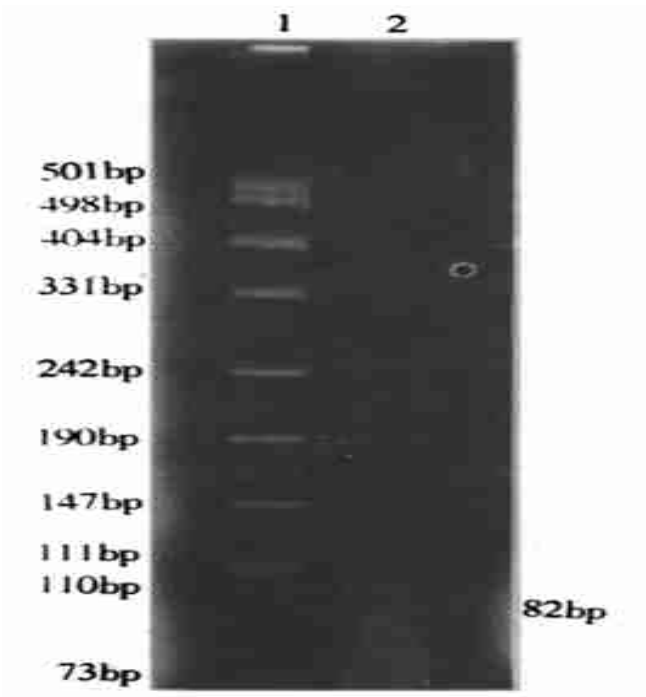


图 2 扩增片段 8%聚丙烯酰氨凝胶电泳

Fig 2 Gel electrophoresis of amplified products(8% PAGE)

Lane 1: Molecular weight markers Lane2 Amplified products

2.2 丝状噬菌体随机肽库的库容检验

连接产物电转化感受菌 XL1-Blue后经 37℃恢复培养 1 h,取 1μl培养菌梯度稀释后,涂布氨苄青霉素平板,根据菌落可推算随机肽库的库容为 2.1× 10^8,而同样溶度的载体 DNA自连形成的菌落为 10^2。其余培养物在辅助噬菌体 VSCM13的帮助下扩增培养,最后培养获得的丝状噬菌体随机肽库含有 4× 10^{11}个噬斑形成单位。

2.3 丝状噬菌体随机肽库的随机性检验

随机挑选的 5个菌斑,经扩增后提取 ssDNA进行测序,结果见表 1 将获得的核酸序列翻译成蛋白质序列,计算每种氨基酸的出现实际频率(某种氨基酸的出现数/总的氨基酸个数)和理论频率(某种氨基酸的密码子个数/总的密码子数),U检验证明实际频数与理论频数差异不显著,结果见表 2

表 1 随机肽库中不同克隆的序列

Tab 1 Sequences of clones in random peptides library

Clones	Seqnence of the insert
PT-W1	5 GAG AAC CAC TTG TGG CTC CAG CCT TCG TTC CCA GGT AAG E N H L W L Q P S F P G K AGG GAT GTT GAA TAC ACC AGT CCC TTG 3 R D V E Y T S A L
PT-W2	5 AGG CCG ATG TGG CGC GGG GAT CCG CGT GCC CCA GGT AGC R P M W R G D P R A P G S TCT AAC TAC AGT ACC CCT AGG GGT GAT 3 S N Y S T P R G D
PT-W3	5 TTG ATT GGC ACC GAT ACT GTG CGC ACG GCT CCA GGT AAT L I G T D T V R T A P G N GTT CAG TCT GAG CAG TAT CCT AGG GTT 3 V Q S E Q Y P R V
PT-W4	5 GCC AAG GAC CTT AAT ATT AAT CCT TCG CGC CCA GGT TCT A K D L N I N P S R P G S TTC TAG CGG GTT CTT TGC TGC ACT ATG 3 P – R V L C C P M
PT-W5	5 ATC TCT TCT CAC TCT GGC GAC ATC AGT TAC CCA GGT GCC I S S H S G D I S Y P G A CAT GCT TTC GAG GCT TGT CTG AGG CAG 3 H A P E G C L R Q

表 2 在随机肽库中氨基酸组成的理论频数与实际频数对照表

Tab 2 Amino acid distribution of the random peptide library

Amino Acid	Expected frequency	Elserved frequency	U test
Ala, A	0.063	0.06	$U_0 < U_{0.99}$
Cys, C	0.042	0.03	$U_0 < U_{0.99}$
Asp, D	0.042	0.06	$U_0 < U_{0.99}$
Glu, E	0.021	0.03	$U_0 < U_{0.99}$
Phe, F	0.042	0.04	$U_0 < U_{0.99}$
Gly, G	0.063	0.05	$U_0 < U_{0.99}$
His, H	0.042	0.03	$U_0 < U_{0.99}$
Ile, I	0.042	0.04	$U_0 < U_{0.99}$
Lys, K	0.021	0.03	$U_0 < U_{0.99}$
Leu, L	0.083	0.07	$U_0 < U_{0.99}$
Met, M	0.021	0.02	$U_0 < U_{0.99}$
Asn· N	0.042	0.05	$U_0 < U_{0.99}$
Pro. P	0.063	0.07	$U_0 < U_{0.99}$
Gln, Q	0.021	0.04	$U_0 < U_{0.99}$
Arg, R	0.083	0.10	$U_0 < U_{0.99}$
Ser, S	0.104	0.12	$U_0 < U_{0.99}$
Thr, T	0.063	0.05	$U_0 < U_{0.99}$
Val, V	0.063	0.05	$U_0 < U_{0.99}$
Trp, W	0.021	0.02	$U_0 < U_{0.99}$
Tyr, Y	0.042	0.04	$U_0 < U_{0.99}$
STOP	0.021	0.01	$U_0 < U_{0.99}$

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

3 讨论

丝状噬菌体随机肽库是噬菌体呈现技术的重要组成部分,它通过将随机 DNA片段与丝状噬菌体衣壳蛋白融合表达与噬菌体表面,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抗体库相比,噬菌体随机多肽库提供更多的备选个体,可能在筛选过程中获得新型特异性多肽,这就使这项技术在新型的肽类药物、诊断试剂和功能多肽的筛选等方面具有较大的潜力。

丝状噬菌体随机肽库的构建是肽库技术的一个重要部分,在构建肽库之前我们改造获得了稳定、易于操作的噬菌粒 pTMB2[7]。通过 Taq酶扩增延伸两条合成的寡核苷酸链,得到随机编码 20个氨基酸的核苷酸链,编码区设计成 NNB(B是 C, G, T),这样密码子总数仅为 48个,而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突变所抑制,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整表达的现象。

库容和随机性是衡量随机肽库主要指标,理论上设计的编码区将具有 4^{60}(约 10^{35})种核酸序列,20^{30}(约 10^{25})种多肽序列,而构建的随机肽库的库容为 2.1× 10^{8},其库容小于理论值的原因主要来源于转化方法的子限制 (电转化的转化效率现平均为 10^{8} μg)。为衡量随机肽库的随机性,随机挑选 5个菌斑测序,发现其含有不同的多肽序列,设计的寡核苷酸链连接区编码的 PG也均存在 (表 1中下划线部分),U检验证明氨基酸的出现实际频率和理论频率差异不显著,证实构建的丝状噬菌体随机肽库具有较好的随机性,能够满足对此肽库的筛选要求,为下一步筛选特异性多肽奠定了基础。

参考文献

[1] Jensen-jarolim E, Leitner-A, Kalchhauser-H, *et al*. Peptide mimotopes displayed by phage inhibit antibody binding to bet v1, the major birch pollen allergen, and induce specific IgGresponse in mice[J]. FASEB J, 1998, 12(15): 1635- 1642.

[2] Gardsvoll H, Van-Zonneveld-A J, Holm-A, *et al*. Selection of peptides that bind to plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) using random peptide phage-display libraries[J]. FEBS Lett, 1998, 431(2): 170- 174.

[3] Naidu B R, Ngeow Y F, Wang L F, *et al*. An immunogenic epitope of Chlamydia pneumoniae from a random phage display peptide library is reactive with both monoclonal antibody and patients sera[J]. Immunol Lett, 1998, 62(2): 111- 115.

[4] DeGraaf M E, Miceli R M, Mott J E, *et al*. Biochemical diversity in a phage display library of random decapeptides [J]. Gene, 1993, 128(1): 13- 17.

[5] Smith G P, Scott J K. Libraries of peptides and proteins displayes on filamentous phage[J]. Methods Enzymol, 1993, 217: 228- 257.

[6] 张　英,李爱民,侯云德.噬菌体 6肽随机肽库的构建[J].病毒学报, 1996, 12(3): 267- 271.

[7] 万　瑛,代佳产,王　燕,等.一种稳定易于操作的噬菌体随机肽库的构建[J].第三军医大学学报, 1999, 21(4): 256- 260.

[8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M].第 2版.北京: 科学出版社, 1992. 330- 333.

(编辑　汪勤俭)

Construction and identification of a random peptide library with displaying filamentaous phage

WAN Ying, DAI Jia-ping, WANG Yan, LIU Xin (Department of Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To construct a library of M13 PIII-fusion displaying peptides composed of 20 random amino acids. Methods: Random oligonucleotides encoded with 20 peptides were amplified and the amplified products after digested with *Xho*I and *Spe*I were cloned into plasmid pTMB2 to construct the library. Then the number of different recombinants and the randomness of the library were identified. Results: A random peptide library with 2.1× 10^{8} different recombinant clones was obtained. No significant differnece was found between te amino acid distribution of the peptide library and the expected frequency. Conclusion: The random peptide library has been successfully constructed.

Key words filamentous phage; random peptide library; pTMB2

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