DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.04.012

一种稳定、易于操作的噬菌体随机肽库载体的构建

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: 拟将噬菌粒 pCOMB3改建为更为稳定、高拷贝且易于操作的噬菌体随机肽库载体。方法: 对常用噬菌体抗体库呈现载体 pCOMB3序列进行点矩阵作图分析(Dot-Plot分析),切除其中重复区,纠正其多代培养后自删除特性。原克隆位点 63bp的填充序列增加到 1 435 bp以便于酶切鉴定和电泳回收。结果: 构建了命名为 pTMB2的噬菌粒载体。结论: pTMB2的噬菌粒载体更为稳定且易于操作。

关键词 噬菌粒随机肽库; pCOMB3; Dot-Plot分析

中图法分类号 R373.9; R394-3

噬菌体显示库技术是通过在丝状噬菌体表面呈现多样化的多肽,经过筛选获得与特定配基结合的肽类的一种新兴技术。此技术已广泛用于新药开发和蛋白质结构与功能等研究领域[1-3]。pCOMB3是 Barbas 等[4]于 1991年构建的噬菌体抗体库显示载体,其含有 Amp^R 基因和丝状噬菌体小衣壳蛋白 geneⅢ C末端序列,具有高拷贝数(> 200拷贝/细胞)且易于操作。但此噬菌粒多代培养后易出现外源 DNA片段和载体 600~ 800 bp的自删除[5,6],并且其填充序列较短不便于证实限制性内切酶酶切结果和电泳回收。本研究采用 Dot-Plot方法分析 pCOMB3序列[7,8],推测其自删除突变机制,并对 pCOMB3进行相应地改造,为进一步构建丝状噬菌体随机肽库奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Escherichia coli XL1-Blue [F' proAB, lacI^q Z△M15, Tn19 (tet^r)]和 pCOMB3分别由本校微生物教研室万泽生博士和本校免疫教研室王喜良博士惠赠。

1.2 主要试剂

XbaⅠ EcoRI和 HindⅢ购于华美生物工程公司, NheⅠ购与 New England Biolabs 公司, T_4 连接酶购于 Boehrinoer Mannheim公司。λ-DNA/HindⅢ+ EcoRI核酶分子量标准构自华美公司(DNA片段大小依此为: 21 226, 5 148, 4 973, 4 268, 3 530, 2 027, 1 904, 1 584, 1 375, 947, 831和 564 bp),小分子量核酶分子量标准购自复华公司(DNA片段大小依此为: 501/498, 404, 331, 242, 190, 147和 111/110 bp)。DNA操作参照文献和公司产品指导进行[9]。

1.3 多代培养自删除突变检测

构建的 pTMB2噬菌粒转化细菌后,挑单菌落接种培养(LB培养基, 37℃, 16 h),稀释后涂布平板(含氨苄青霉素),随机选取 20个克隆抽提 DNA, HindⅢ和 EcoRI酶切鉴定是否出现外源片段的自删除突变。重复培养、随机选取和酶切鉴定 20代。将带有 862 bp xho2+ spe2外源片段的 $PCOMB_3$ 作为对照,同上鉴定外源片段的自删除突变。

1.4 Dot-Plot序列分析软件

Microsoft ANTHEPROT V2.9g由 Gilbert Deleage (France)开发,通过匿名 FTP下载。

2 结果

2.1 Microsoft ANTHEPROT V2.9g分析结果

利用 ANTHEPROT V2.9g的 Dot-Plot分析模块对 pCOMB3和 pTMB1全序列进行点矩阵作图分析。采用单位矩阵打分,即相同为 1,不相同为 0。采用窗口过滤技术减弱背景噪音,窗值设为 11,阈值设为 9,超过阈值的窗口在其中间核苷酸位置打点,结果见图 1。图 1A中横坐标和纵坐标均为 pCOMB3,图 1B中横坐标和纵坐标均为 pTMB1.我们发现 pCOMB3中有两对序列相同的重复区域: 一个 82 bp(nt 24~ 105和 1037~ 1118),一个 148 bp(nt 871~ 1017和 3809~ 3952),图中以与对角线平行斜线示之,而构建的 pTMB1无明显的重复序列。

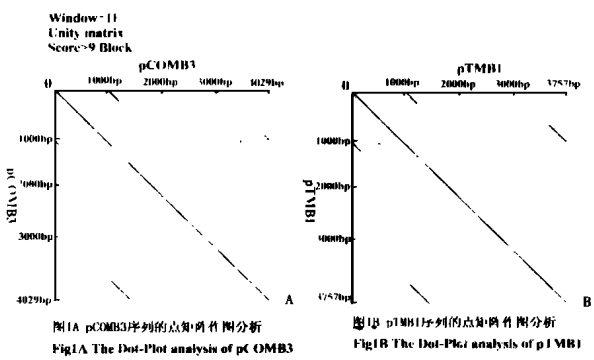


图1A pCOMB3序列的点矩阵作图分析 图1B pTMB1序列的点矩阵作图分析

Fig1A The Dot-Plot analysis of pCOMB3 Fig1B The Dot-Plot analysis of pTMB1

图 1 点矩阵作图分析

A: pCOMB3序列 B pTMB1序列

Fig 1 The Dot-Plot analysis

A: pCOMB3 B pTMB1

* 万 瑛 男, 27岁,助教,硕士研究生

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

2.2　pTMB2的构建

NheI和 XbaI分别位于 pCOMB3的 859 bp和 1 131 bp,故双酶切噬菌粒可切下长约 272 bp的 DNA片段。低熔点琼脂糖法回收 pCOMB3剩余片段,由于 XbaI NheI酶切后产生互补的粘性末端,自连即得称之为 pTMB1的噬菌粒,其 XbaI NheI酶切位点消失,可采用 XbaI和 NheI酶切鉴定重组子。将 λ噬菌体 1 375 bp的 HindⅢ、EcoRI酶切片段定向克隆进 pTMB1的克隆位点,增加其填充序列的长度,所得噬菌粒称之为 pTMB2,见图 2.3

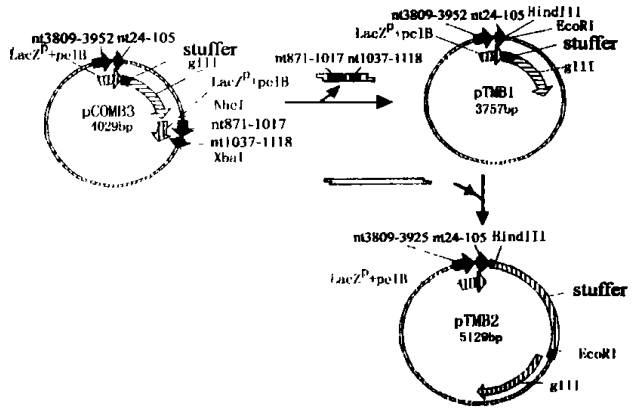


图 **2**　噬菌粒 **pTMB2**的构建

Fig 2　Construction of plasmid pTMB2

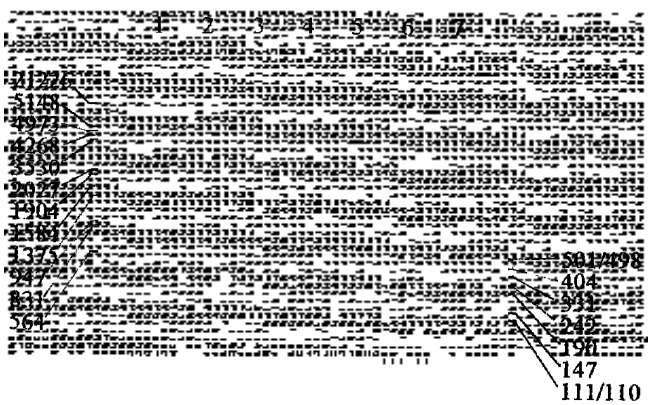


图 **3**　噬菌粒 **pTMB2**的酶切鉴定

1:核酸分子量标准 λ HindⅢ, EcoRI 2 pTMB2 EcoRI, HindⅢ双酶切 3:pTMB2 HindⅢ单酶切 4:pTMB1 HindⅢ单酶切 5 pCOMB3 NheI, XbeI双酶切 6 pCOMB3 HindⅢ单酶切 7:复华公司小片段核酸分子量标准

Fig 3　Restriction analysis of phagmid pTMB2

Lane 1 λ DNA cleaved with HindⅢ and EcoRI as the molecular weight marker; Lane 2 pTMB2 digested with EcoRI and HindⅢ; Lane 3: pTMB2 digested with HindⅢ; Lane 4: pTMB1 digested with HindⅢ; Lane 5 pCOMB3 digested with NheI and XbaI; Lane 6 pCOMB3 digested HindⅢ; Lane 7 Molecular weight marker from Corp FuHua

2.3　多代培养自删除突变的检测

pTMB2经 20代培养,每代随机挑选 20个菌落检测,400个菌落中均未发现自删除突变。而作为对照含有 λ噬菌体 1 375 bp HindⅢ、EcoRI酶切片段的 pCOMB3经五代培养后,即在 20随机挑选的菌落中发现有两个菌落出现自删除突变。

3　讨论

随机丝状噬菌体肽库的构建首先需要合适的载体,现常用的以小衣壳蛋白为目标的载体系统有两种,一种是直接在丝状噬菌体 geneⅢ序列引入克隆位点,另一种则是在利用噬菌粒表达肽与 geneⅢ蛋白 C末端的融合蛋白。前者虽然较易于操作,但却存在不能引入较长的多肽和感染率下降等缺点。故为了下一步构建 20肽的随机肽库,我们选择噬菌粒 pCOMB3 pCOMB3是 Barbas等[4]于 1991年构建的噬菌体抗体库呈现载体。为同时表达抗体的轻链和重链,pCOMB3拥有两个 *lacZ*的启动子和引导序列 *pelB*,见图 3。近年在 pCOMB3构建的抗体库筛选中,常有报道此噬菌粒多代(3~5代)培养后易出现外源 DNA片段和载体 600~800 bp的自删除突变[5,6]。采用 ANTHEPROT V2.9g的 Dot-Plot分析模块对 pCOMB3全序列进行点矩阵作图分析,发现 pCOMB3中有两对序列相同的重复区域:一个 82 bp(nt24~105和 nt1 037~1 118),一个 148 bp(nt871~1 017和 nt3 809~3 952)。我们认为上经重复区的存在与噬菌粒 pCOMB3在复制中发生遗传重组有关,导致其出现自删除突变。XbaI和 NheI双酶切切除 272 bp片段(nt859~1 131),其中包含 2个重复区(nt871~1 017, nt1 037~1 118),见图 2,多代培养自删除突变的检测显示所得噬菌粒 pTMB2更为稳定。为便于证实限制性内切酶酶切结果和电泳回收,我们将 λ噬菌体 1375 bp的 HindⅢ、EcoRI酶切片段定向克隆进 pTMB1的克隆位点,增加其填充序列的长度。这样我们就得到较 pCOMB3更为稳定且易于操作的噬菌体随机肽库载体 pTMB2,进一步构建丝状噬菌体随机肽库奠定了基础。

参考文献

1　McGregor D. Selection of proteins and peptides from libraries displayed on filamentous bacteriophage. Mol biotechol, 1996, 6(2): 155

2　Gho Y S. Development of antiangiogenin peptide using a phage-displayed peptide library. Cancer Res, 1997, 57(17): 3 733

3　Fack F. Epitope mapping by phage display: random versus gene-fragment libraries. J Immunol Methods, 1997, 206(1~2): 43

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

4 Barbas Ⅲ C F, Kang A S, Lerner R A. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene Ⅲ site. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(21): 7 978
5 Barbas Ⅲ C F, Lerner R A. Combinatorial immunoglobulin libraries on the surface of phage (Phabs): rapid selection of antigen-specific Fabs. Method Companion Methods Enzymol, 1991, 2(1): 119
6 张广发, 王 琰, 王雅明, 等. 噬菌体抗体库的构建及抗肿瘤单抗的筛选. 中国肿瘤杂志, 1995, 17(4): 258
7 McDonnell M T, Colwell R R. Dot-matrix analysis of nucleic acid sequences: an interactive microcomputer program. J Microbiol Meth, 1985, 3(1): 247
8 王槐春. 蛋白质与核酸序列分析基础. 北京: 人民科学出版社, 1994. 45~58
9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 第 2版. 北京: 科学出版社, 1992. 34~69

(收稿: 1998-09-15; 修回: 1999-01-22)
(编辑 汪勤俭)

Establishment of a stable and easily manipulated vector for macrophage random peptide library

Wan Ying, Dai Jiaping, Wang Yan (Department of Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To modify a combinational library display vector, pCOMB3 and to provide a stable, easily manipulated and highly copied vector for the display of a random peptide library. **Methods**: According to Dot-Plot analysis of pCOMB3 nucleic acid sequences, the phagmid pCOMB3 was modified to eliminate the propensity of accumulated deletions in the region of cloning site. Furthermore, a 1375 bp DNA fragment from phage was cloned in the small 63 bp stuffer at the cloning site. **Results**: A 5129 vector named pTMB2 was produced. **Conclusion**: pTMB2 holds the appropriate characteristics for random peptide phage display with improved stability and ease of manipulation.

Key words phage random peptide library; pCOMB3; Dot-Plot analysis

(上接 255页)

溃疡, 其中一个溃疡愈合, 另一个溃疡缩小 > 1/2者为有效。溃疡缩小 < 1/2或无变化者为无效。

2 结果

2.1 临床疗效

胃镜复查 60 mg组 10例中, 治疗前后无腹痛 1例, 显效 9例(90%), 胃镜复查 30 mg组 10例中, 显效 9例(90%), 有效 1例(10%), 非胃镜复查组 31例中, 显效 21例(67.7%), 有效 8例(25.8%), 无效 2例(6.5%)。3组患者治疗前后消化道症状缓解各组内比较差异显著($P < 0.01$), 各组间差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 溃疡愈合情况

胃镜复查 60 mg组溃疡痊愈 5例, 显效 5例。胃镜复查 30 mg组溃疡痊愈 5例, 显效 2例, 有效 1例, 无效 2例。两组间愈合率及总有效率相比差异不显著。

2.3 药物副反应

51例中药物副反应 14例(27.5%)。症状轻微, 依次为口干、头晕、失眠、稀便、便秘。

3 讨论

消化性溃疡为临床常见病症之一。其治疗以抗酸抑酸、抑制蛋白酶的分泌和抗幽门螺杆菌感染治疗为主[1,2], 且复发率较高。欣洛维是从乳猪胸腺中提取的一组蛋白类活性物质, 是一种新型的治疗溃疡药物。实验研究表明, 它能通过营养局部受损粘膜, 促进表皮细胞、成纤维细胞的修复和 DNA合成而使溃疡愈合。

本组四周疗法治疗十二指肠溃疡 51例, 其中胃镜复查 60 mg组和 30 mg组各 10例, 溃疡愈合率和有效率分别为 100%、70%和 100%、80%。非胃镜复查 30 mg组 31例, 每组内治疗前后疼痛缓解积分非常显著, 3组腹痛缓解率分别为 90%、90%和 77.4%。甲、乙两组疼痛缓解率相同, 但均较丙组高, 可能与甲、乙两组病例少有关。

本组 51例中, 药物副反应 14例(27.5%), 有口干、头晕、乏力、失眠、稀便和便秘, 患者症状轻微均可耐受。

从本组资料表明, 欣洛维治疗十二指肠溃疡疗效较好, 值得推广应用。

关键词 欣洛维; 十二指肠溃疡; 疗效分析
中图法分类号 R573.1

参考文献

1 张尚志. 消化性溃疡的药物治疗及某些值得探讨的问题. 中华消化杂志, 1993, 13(1): 1
2 Soll A H. Medical treatment of peptic ulcer disease pratice quidelines. JAMA, 1996, 275(8): 622

(收稿: 1998-09-30; 修回: 1999-03-05)
(编辑 汪勤俭)

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