

用噬菌体展示筛选Gal- α -1, 3-Gal 的模拟肽*

张 晖 詹金彪**

(浙江大学医学院生物化学教研室, 杭州 310006)

许林海 严志焜

(浙江省人民医院, 杭州 310014)

王克夷

(中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 猪心移植是解决心脏移植供体少的有效方法。由于猪心血管内皮细胞表面抗原半乳糖- α -1, 3-半乳糖 (Gal- α -1, 3-Gal), 能与人体内预存的天然抗体结合产生超急性排斥反应 (HAR), 而无法应用于临床。为了解决这一难题, 应用噬菌体展示技术, 筛选出一个能与抗 B 型血单克隆抗体 (mAB anti-B) 特异性结合的阳性噬菌体克隆。应用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和竞争性 ELISA 结果表明, 所获得的阳性噬菌体克隆能特异性地与 mAB anti-B 结合, 并且这种结合可被蜜二糖 (具有 Gal- α -1, 6-Glc 的结构) 所竞争抑制。由此推测, 筛选到的噬菌体阳性克隆很可能就结合在蜜二糖与 mAB anti-B 结合的位点。同时, 进行了阳性噬菌体克隆的抑制猪红细胞凝集活性试验, 试验结果表明, 此阳性克隆不仅可抑制 Gal- α -1, 3-Gal 与抗体的结合, 也可抑制 Gal- α -1, 3-Gal 与西非单叶豆凝集素 (GS-I-B4) 的结合。此噬菌体阳性克隆测序后, 得小肽序列为 CCWLLROPVRFVRSIRS。鉴于以上的结果, 认为此小肽可以作为 Gal- α -1, 3-Gal 的模拟肽, 同时有望开发成抗猪器官异种移植超急性排斥反应的新药。

关键词 噬菌体展示, 超急性排斥反应, 猪红细胞凝集试验, 西非单叶豆凝集素 (GS-I-B4)

学科分类号 Q78

解决人类器官短缺的有效方法是寻找异种器官的替代品, 由于猪的脏器与人类器官的解剖和生理结构接近, 猪成为异种器官移植的首选动物。但是由于猪心血管内皮细胞表面抗原 Gal- α -1, 3-Gal 可与人体内预存的天然抗体结合, 引发超急性排斥反应 (hyperacute rejection, HAR) 而导致移植失败^[1]。阻断天然抗体与猪细胞表面抗原 Gal- α -1, 3-Gal 的结合是避免 HAR 发生的有效方法。我们采用噬菌体展示技术, 在 XCX15 肽库中筛选出了能与抗 B 型血单克隆抗体 (mAB anti-B, 因目前还无法得到并纯化人体天然抗体, 而 mAB anti-B 可与 Gal- α -1, 3-Gal 特异性地结合^[2], 故从理论上可认为两者功能相似) 特异性结合的阳性噬菌体克隆, 随后进行了阳性噬菌体酶联免疫吸附反应试验 (ELISA), 阳性噬菌体与洗脱剂蜜二糖的竞争性抑制 ELISA 试验和阳性噬菌体克隆的抑制猪红细胞凝集活性试验, 并测出插入在噬菌体内的寡核苷酸序列。

1 材料与方法

1.1 材料

噬菌体 M13 随机 17 肽库 (XCX15, 库容量为 1×10^9 , 具有抗四环素活性)^[3]、*E. coli* kank91 宿主菌 (具有抗卡那霉素的活性) 以及 HRP-兔抗 M13 抗体由中国科学院上海生物化学与细胞生物

学研究所王克夷研究员及李家大博士惠赠。抗 B 型血单克隆抗体 (mAB anti-B 滴度 1:128) 由长春生物制品研究所博德公司购入。蜜二糖 (melibiose)、西非单叶豆凝集素 (GS-I-B4) 为 Sigma 公司产品。聚乙二醇 (PEG8000) 为上海生物工程技术有限公司的产品。

1.2 方法

1.2.1 用噬菌体展示亲和筛选法筛选 mAB anti-B: 以 mAB anti-B 包被 96 孔酶标板, 4℃ 过夜。BSA 封闭后, 用 TBST 洗板 3 次, 加入适当稀释的肽库扩增液与 mAB anti-B 结合 1 h。用 TBST 洗板数次。每孔加入 100 μ l 的 100 g/L 蜜二糖洗脱液, 室温洗脱 1 h。收集这 100 μ l 洗脱液, 从中取出 10 μ l, 用 LB 培养基适当稀释后转染感受态 kank91, 涂 LB 平板。培养后计算菌落数来测定洗脱液中噬菌体的滴度 (output)。其余 90 μ l 洗脱液转染感受态 kank91 后投入 LB 培养液中, 振荡扩增过夜, 经离心, 沉淀, 纯化后用于下一轮的筛选。同时, 投入进行筛选的原始噬菌体肽库也通过

* 浙江省人民医院“抗移植排斥新药”课题资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-87217154, E-mail: jzhan2k@emm.zju.edu.cn

收稿日期: 2002-12-11, 接受日期: 2003-01-28

稀释、转染, 涂板法测定出滴度 (input). 用 output/input 就可以计算出特异性结合噬菌体的产出. 按上述步骤筛选 4 个循环. 从第 4 次筛选出的噬菌体 LB 平板中随机挑取分隔清晰的噬菌斑, 制备噬菌体原液, 用于 ELISA 的检测.

1.2.2 ELISA 鉴定噬菌体阳性克隆: 用 100 μ l/孔的 mAB anti-B (滴度 1:128) 包被 96 孔酶标板, 4℃过夜. 50 g/L BSA 室温封闭 2 h, 用 5 mmol/L 的 TBS 缓冲液洗板 3 次后, 加入 50 μ l 噬菌体原液和 50 μ l TBS 缓冲液的混合液 (同时以仅加入 100 μ l TBS 缓冲液作为空白对照), 室温下, 脱色摇床 50 r/min 结合 1 h. 用 0.1% TBST 洗板 3 次后, 加入 100 μ l/孔的 HRP-兔抗 M13 抗体, 室温下, 脱色摇床 50 r/min 结合 1 h. 用 TBST 洗板 10 次, TBS 洗板 2 次后, 立即加入 TMB 显色剂显色, 于 450 nm 读取吸光度值 (A_{450}).

1.2.3 蜜二糖的竞争抑制 ELISA 实验: 用 100 μ l/孔的 mAB anti-B (滴度 1:128) 包被 96 孔酶标板, 4℃过夜. 50 g/L BSA 室温封闭 2 h, 用 5 mmol/L 的 TBS 缓冲液洗板 3 次后, 加入的 ELISA 液为不同浓度蜜二糖与噬菌体原液的混合液 100 μ l. 以下步骤同前. 计算出抑制率 = $(A_{450} - A'_{450}) / A_{450} \times 100\%$. A_{450} 为未加蜜二糖的吸光度, A'_{450} 为加入蜜二糖的吸光度.

1.2.4 阳性克隆抑制 A 型人血清与猪红细胞的凝集反应: 先把制备好的 2% 新鲜 (压积比) 红细胞悬浮在 pH = 7.4 的磷酸缓冲液中备用. 在血凝板上, 40 μ l 阳性克隆用磷酸缓冲液依次逐孔倍比稀释后, 每孔分别加入 40 μ l 适当稀释的 A 型血人血清和 40 μ l 2% 的猪红细胞. 然后将此 120 μ l 混合液在室温下先用振荡器振荡 1 min, 再静置 1 h 后观察凝集结果. 如果红细胞沉淀到孔的底部, 呈一边缘光滑的圆点, 则为没有凝集. 如果红细胞形成一网络, 并不下沉到孔底呈一边缘光滑的圆点, 则为出现凝集. 试验需设空白、阳性及阴性对照.

1.2.5 阳性克隆抑制 GS-I-B4 与猪红细胞的凝集反应: 操作上同试验 1.2.4, 唯一不同处是由人血清替换为 2 mg/L 的 GS-I-B4.

1.2.6 阳性克隆测序: 挑选 ELISA 结果最好的 4 个阳性克隆, 感染宿主菌. 37℃振荡培养后, 按《分子克隆》的方法用酚抽提出 M13 噬菌体的单链 DNA, 进行全自动测序.

2 结 果

2.1 mAB anti-B 的筛选结果

总共筛选了 4 轮, 其中 1, 2 两轮用 0.1% (吐温与 TBS 溶液的体积比) TBST 洗板, 3, 4 两轮分别用 0.2% 和 0.5% TBST 洗板. 筛选结果显示, 虽然洗板的强度在逐渐加大, 但淘洗后的噬菌体产率反有逐渐上升的趋势. 可见与 mAB anti-B 结合的噬菌体已被从原始肽库中筛选出来了.

2.2 噬菌体阳性克隆的鉴定

从第 4 轮洗脱下来的噬菌体转染 *E. coli* kank91 宿主菌后, 稀释后涂 LB 平板, 从平板中随机挑选了 50 个分隔良好的噬菌斑, 制备噬菌体原液, 用 ELISA 法测定. 由于仪器限制, 50 个克隆只能分批完成. 为了排除各批次 ELISA 实验的偶然误差, 使结果有可比性, 挑出 ELISA 结果最好的 5 个克隆又重新转染 *E. coli* kank91, 扩增后制备成新鲜原液进行 ELISA. 结果见图 1 (空白对照 A_{450} 为 0).

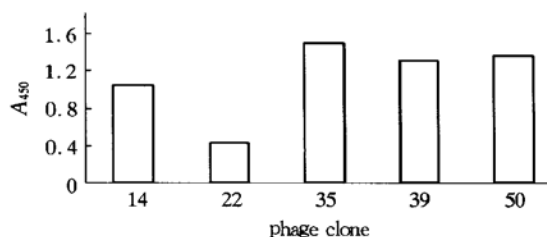


Fig. 1 Identification of 5 bacteriophage clones

从以上的结果可知, 筛选出的阳性克隆 A_{450} 均大于 0.4, 特别是 35 号噬菌体的 A_{450} 约为 1.5, 明确提示能与 mAB anti-B 特异性地结合.

2.3 蜜二糖竞争抑制 ELISA 实验

为了进一步鉴定阳性克隆是否特异性地结合在蜜二糖和 mAB anti-B 结合的位点, 挑取出结果最好的 35 号阳性克隆 (以下血凝试验均用此阳性克隆) 做了 6 个蜜二糖浓度竞争抑制实验. 为了减少随机误差, 每个蜜二糖浓度做了 5 个对照, 平均抑制率与浓度关系见图 2.

从图 2 可见, 蜜二糖能非常好地抑制 mAB anti-B 与阳性克隆的结合, 低至 0.003 mmol/L 的浓度就可以看出作用, 这说明了阳性克隆很可能就结合在蜜二糖与 mAB anti-B 结合的位点. 而蜜二糖已被确认能与人预存的天然抗体结合 (图 3 B,

C), 故此阳性克隆活性区域的空间构象亦可能具有与蜜二糖结构相似的功能。

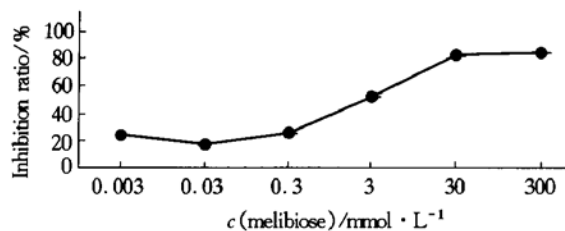


Fig. 2 Melibiose competitive inhibition of peptide binding to anti-B antibody

2.4 阳性克隆抑制人血清与猪红细胞的凝集反应

为了进一步验证此阳性克隆是否真正具有生物学活性, 我们作了阳性克隆抑制 A 型人血清与猪红细胞的凝集反应。在图 3 中, A1~A3 为空白对照, 用 40 μL 猪红细胞和磷酸缓冲液混匀后静置 1 h, 红细胞沉于底部, 聚集于一点, 此结果为未出现凝集。A4~A6 为阳性对照, 用 40 μL 磷酸缓冲液稀释 60 倍的 A 型人血清和 40 μL 猪红细胞混匀后静置 1 h, 红细胞形成一网络, 没有下沉到孔底呈一边缘光滑的圆点, 此结果为出现凝集。B, C 两条均为蜜二糖抑制猪红细胞凝集的试验结果, 即 1~6 孔分别用磷酸缓冲液倍比稀释蜜二糖, 使蜜二糖的浓度形成 600 mmol/L, 300 mmol/L, 150 mmol/L, 75.5 mmol/L, 37.75 mmol/L, 18.875 mmol/L 的梯度, 然后每孔分别各加入 40 μL 磷酸缓冲液稀释 60 倍的 A 型人血清和 40 μL 猪红细胞混匀后静置 1 h。从中可见低达 18.875 mmol/L 浓度的蜜二糖就能够抑制猪红细胞凝集。D, E 两条均为阳性克隆抑制猪红细胞凝集的试验结果, 即 1~6 孔分别用磷酸缓冲液倍比稀释一定浓度的阳性克隆, 然后每孔分别各加入 40 μL 磷酸缓冲液稀释 60 倍的 A 型人血清和 40 μL 2% 猪红细胞混匀后静置 1 h, 前三孔能抑制红细胞的凝集, 后三孔由于浓度稀释对红细胞的凝集抑制作用不完全。F, G 两条均为阴性克隆不能抑制猪红细胞凝集的试验结果, 1~6 孔分别用磷酸缓冲液倍比稀释一定浓度的此阴性克隆, 然后每孔分别各加入 40 μL 磷酸缓冲液稀释 60 倍的 A 型人血清和 40 μL 2% 猪红细胞混匀后静置 1 h, 阴性克隆不能抑制 A 型血人血清对猪红细胞的凝集。综合以上的结果认为: 此阳性克隆预先能与 A 型人血清中的抗 Gal- α -1, 3-Gal 抗体结合, 并使之失活。这样抗体就不能再与猪红细胞上的 Gal- α -1, 3-

Gal 抗原结合, 从而使猪红细胞凝集起来。这表明, 此阳性克隆可作为人天然抗体的阻断剂, 预防异种器官移植时的超急性排斥反应。

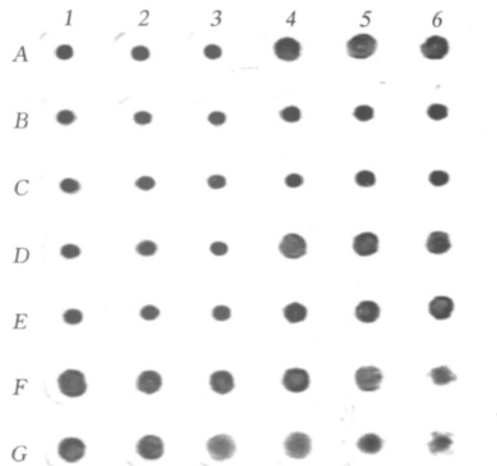


Fig. 3 RBC agglutination inhibition assay (human serum)

2.5 阳性克隆抑制 GS-I-B4 与猪红细胞的凝集反应

GS-I-B4 亦能与 Gal- α -1, 3-Gal 特异性地结合^[1], 为进一步验证阳性克隆是特异性结合在天然抗体与猪抗原结合的部位, 而不是由于结合在天然抗体的其余部位产生变构效应得到的结果, 同时也为了排除试验 2.4 结果的偶然性, 我们又加做了阳性克隆抑制 GS-I-B4 与猪红细胞的凝集反应。在图 4 中, A1, A2 两孔为空白对照, A3, A4 两孔为阳性对照, 操作分别同图 3 的 A1~A3 和 A4~A6。图 4 的 B~G 各条在操作上与图 3 的 B~G 各条相对应, 唯一不同处是由人血清替换为 2 mg/L 的 GS-I-B4。分析结果可见, 此阳性克隆不

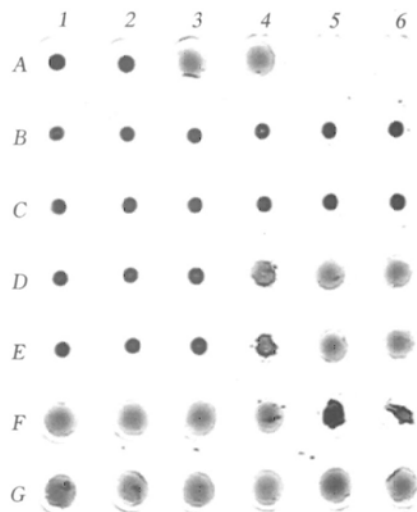


Fig. 4 RBC agglutination inhibition assay (GS-I-B4)

仅可抑制猪抗原Gal- α 1, 3-Gal与天然抗体的结合, 也可抑制猪抗原表位Gal- α 1, 3-Gal与凝集素GS-FB4的结合. 说明阳性克隆能特异性结合在天然抗体与猪抗原表位结合的部位, 而起到竞争性抑制猪红细胞凝集的作用.

2.6 阳性克隆测序分析

上述35号阳性克隆测序后, 得到插入小肽序列为CCWLLRQPVRFRSIRS, 即为半胱氨酸-半胱氨酸-色氨酸-亮氨酸-亮氨酸-精氨酸-谷氨酸-脯氨酸-缬氨酸-精氨酸-丝氨酸-异亮氨酸-精氨酸-丝氨酸. 同时我们又测了图1中A₄₅₀结果较好的另外3个克隆, 序列分别为SCVINSSTNZRLCNQLT, DCPWALAWSRASCWNKP, KCRSLGPKRQLTARARD. 此4个克隆中, 有3个具有二硫键结构. 我们考虑这是由于二硫键能极大地加强此小肽空间结构的稳固性. 由于测序个数有限, 所以序列之间的同源性相对不明显.

3 讨 论

噬菌体展示技术是近几年发展起来用丝状噬菌体展示外源肽的一项新技术. 具体是利用基因工程手段, 将合成的一组一定长度的随机序列寡核苷酸片段克隆到特定表达载体中, 使其表达产物以融合蛋白的形式呈现在丝状噬菌体表面. 由于肽库中包含了该长度多肽的所有可能的氨基酸序列或其中的绝大部分, 每一个噬菌体呈现其中的一种肽段, 因而库容量极大, 易于筛选和扩增. 用此噬菌体肽库(噬菌体的个数必须大于 10^9 , 才有筛选意义)与靶蛋白混合后, 洗板. 如果噬菌体上的外壳蛋白能与靶蛋白结合, 就不会被洗掉. 最后用酸或亲和洗脱液把噬菌体洗脱下来. 连续这样筛3~4轮, 就能筛出与靶蛋白结合力较强的噬菌体, 测此噬菌体的DNA序列可得到重组寡核苷酸的序列, 亦知道了相应多肽的序列. 以后用基因工程或组合化学就可大量扩增. 此方法可探索受体与配体之间相互作用的结合位点, 寻求高亲和生物学活性的配体分子, 以及探索未知蛋白质空间结构表位, 因而在蛋白质分子相互作用的研究, 新型疫苗的研制, 以及药物的开发等领域具有广泛的应用前景. 目前已经广泛用于癌症^[4]、解毒^[5]、抗过敏^[6]、爱滋病、心血管病、移植等领域的药物筛选和开发, 并已筛

选出大量的受体拮抗剂、酶抑制剂. 一些很有希望的药物先导化合物已经进入临床前期研究, 不久将进入临床试验^[7].

本研究中, 应用ELISA和竞争性ELISA检测结果显示, 经过四轮亲和筛选所获的噬菌体能特异性地与mAb anti-B结合, 并且这种结合可被蜜二糖所竞争抑制, 抑制率高达86.9%. 由此推测, 筛选到的噬菌体很可能就结合在蜜二糖与mAb anti-B结合的位点. 同时, 我们进行了阳性噬菌体克隆的抑制猪红细胞凝集活性试验, 试验结果表明此阳性克隆不仅可抑制Gal- α 1, 3-Gal与抗体的结合, 也可抑制Gal- α 1, 3-Gal与凝集素GS-FB4的结合. 鉴于以上的结果, 我们认为此阳性克隆能特异性结合在人血清天然抗体与猪细胞抗原表位结合的部位, 可以作为除去人血清中天然抗体的良好试剂, 同时有望开发成抗猪器官异种移植超急性排斥反应的新药.

由于噬菌体克隆的结果并不一定能代表合成小肽的结果, 所以我们下一步的工作拟合成相应的小肽及进行相应合成肽的生物学活性鉴定, 进一步探讨将小肽发展成为抗猪心移植排斥反应药物的可能性.

参 考 文 献

- 1 Kooyman D L, McClellan S B, Parker W, *et al.* Identification and characterization of a galactosyl peptide mimetic. *Transplantation*, 1996, **61** (6): 851~855
- 2 胡维弘. 免疫生物学. 厦门: 厦门大学出版社, 1989. 331~332
Hu W H. *Immunol/Lunobiology*. Xiamen: Xiamen University Press, 1989. 331~332
- 3 Bonnycastle L C, Mehroke J S, Rashed M, *et al.* Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J Mol Biol*, 1996, **258** (5): 747~762
- 4 Wong C, Waibel R, Sheets M, *et al.* Human scFv antibody fragments specific for the epithelial tumour marker MUC-1, selected by phage display on living cells. *Cancer Immunol Immunother*, 2001, **50** (2): 93~101
- 5 Zdanovsky A G, Karassina, Simpson D, *et al.* Peptide phage display library as source for inhibitors of clostridial neurotoxins. *J Protein Chem*, 2001, **20** (1): 73~80
- 6 Suphioglu C, Schappi G, Kenrick J, *et al.* Novel grass pollen allergen mimotope identified by phage display peptide library inhibits allergen-human IgE antibody interaction. *FEBS Lett*, 2001, **502** (1): 46~52
- 7 Sidhu S. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11** (6): 610~616

Identification of Gal α -1, 3-Gal Peptide Mimetic by Phage Display^{*}

ZHANG Hui, ZHAN Jin-Biao^{**}

(Department of Biochemistry, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

XU Lin-Hai, YAN Zhi-Kun

(Department of Surgery, People's Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310014, China)

WANG Ke-Yi

(Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract The obstacle for pig-to-human transplantation is hyperacute rejection (HAR) triggered by the interaction between human natural antibodies and the antigenic epitope Gal α -1, 3-Gal. The α -Gal structure is considered to be the major xenoantigenic epitopes present on porcine tissues. A phage-displayed peptide library is used to identify a 17-amino-acid peptide CCWLLRQPVRVFVRSIRS that binds to the mAb anti-B (anti-B monoclonal antibody which binds the carbohydrate Gal α -1, 3 Gal). The melibiose competes with the binding of mAb anti-B to the peptide, suggesting that they may bind the same site. Using a pig RBC agglutination assay, it is shown that this peptide can inhibit the agglutination of pig RBCs by human serum or GS-FB4.

Key words phage display, hyperacute rejection (HAR), pig RBC agglutination assay, GS-FB4

^{*} This work was supported by People's Hospital of Zhejiang Province.

^{**} Corresponding author. Tel: 86-571-87217154, E-mail: jzhan2k@cmm.zju.edu.cn

Received: December 11, 2002 Accepted: January 28, 2003