

噬菌体展示随机环八肽库的构建*

叶长烂, 周霞, 谢浩然, 马金魁, 张宏斌[△]

(南部战区总医院医学实验科, 广东广州 510010)

摘要:目的 构建表达于噬菌体表面的随机环八肽库。方法 通过自行设计, 人工合成编码随机环八肽的寡核苷酸片段, 通过延伸引物扩增获得编码随机环八肽的基因片段。将编码基因片段和 M13KE 噬菌体载体经过 *Eag* I 和 *Kpn* I 限制性内切酶双酶切后进行连接, 重组产物电转入大肠杆菌 ER2738 感受态细胞获得噬菌体展示随机环八肽库, 噬斑及测序检测库容和多样性。结果 构建的环八肽库库容超过 7.5×10^9 , 重组阳性率为 92.5%, 不同率为 97.3%。结论 成功构建了库容量与多样性都满足筛选要求的噬菌体展示随机环八肽库。

关键词:噬菌体展示; 环八肽; 构建

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.14.002

中图法分类号:R730.2

文章编号:1673-4130(2019)14-1670-04

文献标识码:A

Construction of a phage display library with random loop-constrained octapeptide*

YE Zhanglean, ZHOU Xia, XIE Haoran, MA Jinkui, ZHANG Hongbin[△]

(Department of Medical Research, General Hospital of Southern Theater Command, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

Abstract: Objective Construct a random loop-constrained octapeptide library expressed on the surface of phage with phage display system. **Methods** The oligonucleotide fragments encoding random loop-constrained octapeptides were designed and synthesized. The gene fragments amplified by the extension primers and M13KE phage vectors were digested by the restriction endonucleases of *Eag* I and *Kpn* I, then ligated. The recombinant products were electronically transferred into E. coli ER2738 competent cells to obtain a phage display library with random loop-constrained octapeptide. The capacity and complexities of the library were detected by plaques counting method and sequencing. **Results** The capacity of constructed loop-constrained octapeptide library was up to 7.5×10^9 . The positive rate of recombinant was 92.5% and the diversity rate of peptide was 97.3%. **Conclusion** The phage display library with random loop-constrained octapeptide is constructed successfully, whose capacity and diversity meet the screening requirements.

Key words: phage display; loop-constrained octapeptide; construction

噬菌体展示技术(PDT)于上世纪八十年代末提出并建立,以噬菌体或噬菌粒为载体,是重组蛋白、单链抗体、酶、脂蛋白及短肽的一种表达系统^[1]。由此衍生的多种噬菌体展示文库,已广泛用于研究蛋白质之间或蛋白与非蛋白、生物分子与其他物质之间的相互作用,结合物或模拟表位筛选等^[2-7]。然而,应用噬菌体展示库筛选获得的靶分子结合物,其亲和力等生物活性均较天然配体低。构建并筛选次级噬菌体库即突变库是将初筛序列变为理想序列的有效途径之一。突变文库是对初次筛选所获序列中的某些位点或片段(特异或随机位点)在 DNA 水平上进行突变,

再以噬菌体或噬菌粒为载体构建次级文库以获得更高亲和力的序列。多肽因具有易制备、便于改造、免疫原性低等优点,在药物筛选和治疗上的重要性越来越受到研究者的重视。多肽根据肽键的结构分为直链肽和环肽,其中直链肽的研究最为广泛和深入,常用的噬菌体随机肽库中插入的基因经噬菌体表达后往往也是以线性直链肽的形式展示在噬菌体表面,但直链肽进入体内后容易在各类酶的作用下发生快速降解,而经过调整后的环肽在二硫键或其他结合键的作用下会形成固定构象,不但代谢稳定性和生物利用度会极大提高,而且更符合受体-配体(抗体-抗原)构

* 基金项目:广州市科技计划项目资助(201604020106)。

作者简介:叶长烂,女,主管技师,主要从事遗传检验研究。 [△] 通信作者, E-mail: zhangwater@tom.com。

本文引用格式:叶长烂,周霞,谢浩然,等.噬菌体展示随机环八肽库的构建[J].国际检验医学杂志,2019,40(14):1670-1673.

象的结合要求。

噬菌体展示随机肽库因其构建、改造及筛选的易操作优势使其最受关注。其中以随机七肽、十二肽和环七肽库的应用最为广泛^[8-11]。随机线性七肽、十二肽肽库结构简单,适合模拟表位的筛选。随机环七肽库,具有环行结构可用于结合域筛选,但受到多样性和环形结构大小的限制,由于目标结合域的不同,特别是尿酸和农药类分子,目前的商品化噬菌体展示随机肽库无法满足很多研究的需求。基于此原因,本研究构建了噬菌体展示非天然随机环八肽库以满足不同分子,特别是小分子结合物筛选的需要。

1 材料与方法

1.1 材料 Ph. D. Peptide Display Cloning System、大肠杆菌 ER2738、Eag I -HF 和 Kpn I -HF 限制性内切酶为美国 NEB 公司产品;四环素为 SIGMA 公司产品;T4 连接酶、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、聚合酶链反应(PCR)产物纯化试剂盒、Taq DNA 聚合酶等为德国 QIAGEN 公司产品;随机八肽寡核苷酸引物由上海生工生物技术有限公司合成;其他生化试剂均为国产分析纯。

1.2 随机八肽寡核苷酸引物的合成 编码随机八肽核苷酸片段的设计策略是采用(NNK)8 编码方式,其中编码随机八肽核苷酸序列中密码子的前两个核苷酸为任意核苷酸 N(A 或 T 或 C 或 G),最后一个核苷酸根据密码子的简并性设计为 K(T 或 G),K 对应的反义链配对核苷酸为 M(A 或 C)。编码正链序列:5'-GCT TGT (NNK)8 TGC GGT GGA GGT-3';对应肽链:Ala Cys (Xxx)8 Cys Gly Gly Gly。根据载体及 Eag I 和 Kpn I 限制性内切酶酶切位点序列在引物中带入相应的核苷酸序列,延伸引物采用通用的序列。其中延伸引物序列(S):5'-CAT GCC CGG GTA CCT TTC TAT TCT C-3';编码随机八肽的寡核苷酸序列(AS):3'-GG GCC CAT GGA AAG ATA AGA GTG AGA CGA ACA (NNM)8 ACG CCA CCT CCA AGC CGG CTT TGT AC-5',其中阴影标注碱基分别为 Kpn I 和 Eag I 酶切位点;测序引物序列:3'-GCA ATG CGA TTG ATA CTC CC-5'。

1.3 环八肽库 DNA 片段的聚合和酶切 将 5 μ g 合成的编码环八肽库的寡核苷酸模板与等摩尔的通用延伸引物在 50 μ L 含有 100 mmol/L NaCl 的 Tris-EDTA 缓冲液(TE)中混合,95 $^{\circ}$ C 水浴中热变性 1 min,水浴中自然降温至 37 $^{\circ}$ C 以下形成退火混合物,按反应体系 1:水 119 μ L、10 $\times$ 缓冲液 2 20 μ L、退火混合物 50 μ L、10 mmol/L dNTPs 8 μ L、Klenow 酶 3 μ L,总体积 200 μ L,混匀后瞬时离心,37 $^{\circ}$ C 10 min,65 $^{\circ}$ C 15 min 延伸退火产物合成编码环八肽库的双链 DNA 片段。随后,将合成的双链 DNA 按照反应体系

2 进行双酶切:水 154 μ L、延伸合成的双链 DNA 196 μ L、10 $\times$ 缓冲液 4 40 μ L、10 U/ μ L 的 Eag I -HF 和 Kpn I -HF 限制性内切酶各 5 μ L,总体积 400 μ L,混匀后瞬时离心,37 $^{\circ}$ C 5 h 进行双酶切,酶切产物琼脂糖凝胶电泳分离目的条带,琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化酶切产物。

1.4 载体的酶切与纯化 将 10 μ g 载体 M13KE 加水至 196 μ L 取代反应体系 2 中的双链 DNA,按照反应体系 3 进行双酶切:水 144 μ L、载体 M13KE 196 μ L、10 $\times$ 缓冲液 4 40 μ L、10 U/ μ L 的 Eag I -HF 和 Kpn I -HF 限制性内切酶各 10 μ L,总体积 400 μ L,混匀后瞬时离心,37 $^{\circ}$ C 5 h 进行双酶切,酶切产物琼脂糖凝胶电泳分离目的条带,琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化酶切产物。

1.5 甘油法感受态细胞的制备 挑 ER2738 新涂的四环素抗性平板(LB/Tet)单克隆接种于 10 mL LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 250 r/min 摇床培养过夜,按 1:100 的比例扩大培养,37 $^{\circ}$ C 250 r/min 摇床培养至对数生长期(A_{600} 0.5~1.0)。冰浴 30 min,4 $^{\circ}$ C 5 000 $\times$ g 离心 15 min,弃上清,重悬于预冷的无菌水中,同样离心弃上清,重复一次重悬于预冷的无菌水中离心弃上清。重悬于 10%的预冷无菌甘油的水溶液中,4 $^{\circ}$ C 8 000 $\times$ g 离心 10 min 弃干净上清,重悬于 10% 冰预冷的甘油溶液。每管 100 μ L 分装,-80 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.6 连接与转化 双酶切载体分别按摩尔比例 1:3、1:5、1:10 与双酶切的环八肽库 DNA 片段进行小量连接转化。连接反应按照反应体系 4:双酶切载体 M13KE 100 ng、双酶切肽库 DNA (分别 3、5、10 ng)、10 $\times$ 连接缓冲液 2 μ L、T4 连接酶 1 μ L、补加水至总体积 20 μ L,混匀后瞬时离心,16 $^{\circ}$ C 水浴中孵育过夜进行连接。65 $^{\circ}$ C 15 min 热终止连接反应。取各连接反应产物各 1、2、3 μ L 分别加至 100 μ L 分装的电转化细胞中电转(Bio-Rad Gene-Pulser: 25 μ F,200 Ω ,2.5 kV),立即各加入 1 mL SOC 培养液,37 $^{\circ}$ C 150 r/min 摇床培养 30 min。融化每管 3 mL 分装的顶层琼脂糖于 45 $^{\circ}$ C 水浴中保温,每管加入 200 μ L 对数生长期的 ER2738 菌作为测试管,分别按 1:10、1:100、1:1 000 倍比稀释电转化培养物,分别取 10 μ L 各稀释物加至的含顶层琼脂糖和 ER2738 的测试管中,混匀后分别铺于 LB/IPTG/Xgal 培养板,待顶层琼脂糖凝固后,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。进行蓝斑计数计算滴度。根据结果,确定最佳连接比例为 1:5,连接产物用量 2 μ L。

1.7 随机环八肽库的构建和鉴定 根据确定的最佳比例,2.5 μ g 双酶切载体按照反应体系 4 扩大连接反应,连接反应后纯化连接产物,分别取 2 μ L 纯化连接产物加至 100 μ L 电转化细胞中电转,同时做 25 个电

转化,立即各加入 1 mL SOC 培养液,37 ℃ 150 r/min 摇床培养 30 min。合并各管,混匀留取 20 μL 进行蓝斑计数计算滴度,其余转化产物进行扩增培养。从测滴度平板上随机挑取 40 个单菌落,送测序公司测序,鉴定随机环八肽库的多样性。

1.8 随机环八肽库的收获 将电转化培养物按 1 : 50 扩大加至对数生长早期($A_{600}<0.5$)的 ER2738 菌中,37 ℃ 250 r/min 摇床培养 5 h。4 ℃ 5 000×g 离心 20 min 收集上清,加入 1/6 体积的 PEG/NaCl 4 ℃ 过夜沉淀噬菌体。4 ℃ 5 000×g 离心 20 min 弃上清,沉淀重悬于 Tris 盐缓冲液(TBS),4 ℃ 5 000×g 离心 10 min 去除残余细胞,上清加入 1/6 体积的 PEG/NaCl 4 ℃ 沉淀噬菌体,同法离心弃上清,沉淀重悬于 TBS,加入等体积无菌甘油-20 ℃ 长期保存。

1.9 随机环八肽库库容量的检测 取 2 μL 收获的随机环八肽库,按 10 倍比梯度稀释,分别取 $10^5\sim10^9$ 倍比稀释物各 10 μL 加至 45 ℃ 水浴中保温的含顶层琼脂糖和 ER2738 的测试管中,混匀后分别铺于 LB/IPTG/Xgal 培养板,待顶层琼脂糖凝固后,37 ℃ 倒置培养过夜。进行蓝斑计数,依据蓝斑数和稀释倍数计算库容量。

2 结 果

2.1 肽库的多样性 肽库的多样性受插入目的序列的重组阳性率和插入目的序列的不同率两个因素的影响。选取 40 个重组克隆进行序列测定分析,部分结果见图 1,其中重组阳性率为 92.5%(37/40),除去 3 个为无正确片段插入;插入序列不同率达 97.3%(36/37),除去插入序列有 1 个为重复序列。重组阳性克隆插入的核苷酸序列碱基数目及其对应的氨基酸均正确,且编码随机八肽的 DNA 序列及对应的氨基酸均互不相同,部分插入序列及对应随机八肽如下:GGG GCG GGT TCT TCG TAT CCG TAT(G A G S S Y P Y);GGG ACT ACG TGG CTG TCT CCG AGT(G T T W L S P S);CAG GTG CCG GCT CTG AAT CCG TCG(Q V P A L N P S);ACG TTG GGT CAG ACG ATT CAT ATG(T L G Q T I H M);TTG TTG CAT TCT AAT AAT CTG TCG(L L H S N N L S);CGG CCT GAT CAT CCT AGT TTT TCT(R P D H P S F S)。碱基分布情况分析见表 1,4 种核苷酸的出现情况与预先设计的 NNK 模式相符,第一、第二核苷酸分别为 A/T/C/G 中的任一种,其中每一种核苷酸和出现的频率的理论值为 25%,第三位核苷酸为 G/T 中的任一种,G 或 T 的出现频率为 50%。由于样本量的原因实际值与理论值不是完全一致。

2.2 库容量 LB/IPTG/Xgal 培养板进行噬菌体滴度测量的原理是每个噬菌斑代表 1 个噬菌体,白斑代

表是野生噬菌体,蓝斑代表是重组噬菌体。依据库容检测平板上的蓝色噬菌斑数约 7.5×10^9 (即库容量),结合重组的阳性率 92.5%和插入序列的不同率 97.3%。参照计算公式:实际库容量=平板总蓝色噬菌斑数×重组阳性率×序列的不同率,确定所构建的随机环八肽库的库容量,其实际库容量(多样性)为 6.75×10^9 克隆。结果表明,所构建的噬菌体呈现随机环八肽库的框架结构、库容及多样性符合设计要求。

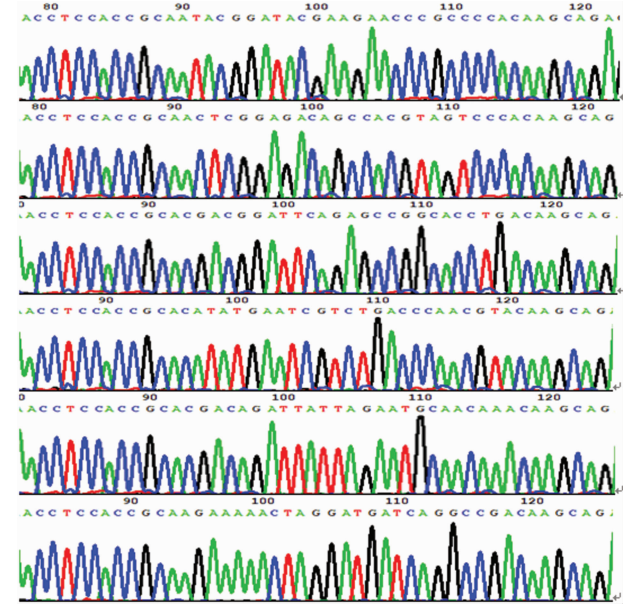


图 1 肽库挑克隆测序部分结果

表 1 肽库挑克隆不同位置核苷酸比例(%)

编码位置	A	T	G	C
1	25.0	30.0	20.0	25.0
2	22.5	22.5	25.0	30.0
3	0.0	52.5	47.5	0.0

3 讨 论

多肽的长短和构象决定构建的肽库的应用价值,曾有学者设想构建 15~100 个氨基酸残基片段的肽库,以期肽链中自然形成含有天然表位中的一些二级结构。但由于噬菌体展示肽库的构建过程中需要 DNA 转化,目前最有效的电转化率也很难超过 10^{10} ,而且对于多样性超过 10^{12} 的肽库,由于重复拷贝太低很难从中富集到需要的随机肽段。因此,构建噬菌体展示随机肽库研究的重点从追求延长氨基酸残基片段的长度逐步转向了设计随机氨基酸残基序列,人为让其形成具有二硫键的环状结构即噬菌体展示环肽库。因此,噬菌体展示环肽库的构建及应用也随之更受研究者的偏重,而且噬菌体展示环肽库在模拟物的筛选及在检测和诊断方面的应用已取得了很多进展^[12-15]。

目前应用最广泛的环肽库是商品化的噬菌体展

示环七肽库,但由于受环状结构大小和库容的限制不能满足多种筛选的需要。本研究在前期商品化随机七肽、十二肽和的环七肽库筛选的基础上,基于尿酸等小分子化合物的特点构建了噬菌体展示随机环八肽库,增加了库容的多样性和肽环的大小。另外,本研究所选用的载体 M13KE 来源于 M13mp19,仅包含一个 gⅢ 的单拷贝,更适合发现高亲和力的配体。同时与以前所用的噬菌粒载体不同,其不需要抗菌药物筛选和辅助噬菌体超感染。

本项目所构建的噬菌体展示随机环八肽库和目前商品化肽库具有不同的氨基酸序列和环状结合域,不但可为尿酸等医学相关小分子化合物的结合物筛选提供一种新的选择,而且可能更适合某些分子的结合,这些将有望在相关分子的临床检测和治疗研究中有所突破。同时,所构建的噬菌体展示随机环八肽库可弥补目前商品化市场的不足,为今后开展肽库的相关研究与应用,特别是多肽类药物和检测试剂的筛选奠定了基础。

4 结 论

本研究针对小分子化合物的特点,采用人工合成的方法成功构建了库容量与多样性都满足筛选要求的噬菌体展示非天然随机环八肽库,并有望为多肽类制剂筛选的研究提供一种新的选择。

参考文献

- [1] PARMLEY S F, SMITH G P. Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1989, 251(1): 215-218.
- [2] PARMLEY S F, SMITH G P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes[J]. *Gene*, 1988, 73(2): 305-318.
- [3] VETTER S W. Phage display selection of peptides that target calcium-binding proteins[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 963(1): 215-235.
- [4] KOKOSZKA M E, KALL S L, KHOSLA S, et al. Identification of two distinct peptide-binding pockets in the SH3 domain of human mixed-lineage kinase 3[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(35): 13553-13565.
- [5] ALAM M K, ZHENG L, LIU R, et al. Synthetic antigen-binding fragments (Fabs) against *S. mutans* and *S. sobri-*

- nus inhibit caries formation*[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10173.
- [6] WINDSOR I W, RAINES R T. A substrate selected by phage display exhibits enhanced side-chain hydrogen bonding to HIV-1 protease[J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2018, 74(7): 690-694.
- [7] KIGUCHI Y, OYAMA H, MORITA I, et al. Antibodies and engineered antibody fragments against m13 filamentous phage to facilitate phage-display-based molecular breeding[J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(7): 1062-1070.
- [8] LIU X, PENG J, HE J, et al. Selection and identification of novel peptides specifically targeting human cervical cancer[J]. *Amino Acids*, 2018, 50(5): 577-592.
- [9] NAKAZAWA H, SETA Y, HIROSE T, et al. Use of a phage-display method to identify peptides that bind to a tin oxide nanosheets[J]. *Protein Pept Lett*, 2018, 25(1): 68-75.
- [10] HOU P, ZHAO G, HE C, et al. Biopanning of polypeptides binding to bovine ephemeral fever virus G1 protein from phage display peptide library[J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1): 3.
- [11] LIANG Y K, BIAN L J. Voltage-dependent anion channel-1, a possible ligand of plasminogen kringle 5[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164834.
- [12] HU Y F, ZHAO D, YU X L, et al. Identification of bacterial surface antigens by screening peptide phage libraries using whole bacteria cell-purified antisera[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8(1): 82.
- [13] PHAM V H, MAAROUFI H, LEVESQUE R C, et al. Cyclic peptides identified by phage display are competitive inhibitors of the tRNA-dependent amidotransferase of *Helicobacter pylori*[J]. *Peptides*, 2016, 79(1): 8-15.
- [14] LIU X, XU Y, HE Q H, et al. Application of mimotope peptides of fumonisins B1 in peptide ELISA[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(20): 4765-4770.
- [15] HEO C K, HWANG H M, RUEM A, et al. Identification of a mimotope for circulating anti-cytokeratin 8/18 antibody and its usage for the diagnosis of breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(1): 65-74.

(收稿日期:2018-11-20 修回日期:2019-02-21)

(上接第 1669 页)

- [19] PAVŠIĆ J, ŽEL J, MILAVEC M. Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(1): 67-75.
- [20] WHALE A S, HUGGETT J F, TZONEV S. Fundamentals of multiplexing with digital PCR[J]. *Biomol Detect Quantif*, 2016(10): 15-23.
- [21] AU A K, HUYNH W, HOROWITZ L F, et al. 3D-Printed Microfluidics[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(12): 3862-3881.
- [22] SREEJITH K R, OOI C H, JIN J, et al. Digital polymerase chain reaction technology - recent advances and future perspectives[J]. *Lab Chip*, 2018, 18(24): 3717-3732.

(收稿日期:2018-08-27 修回日期:2018-12-16)