

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(1):127-133; 4 January 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

利用噬菌体随机肽库筛选可结合猪繁殖与呼吸综合症病毒的多肽序列

徐海, 王继春, 于轍, 吕芳, 侯继波*

江苏省农业科学院, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014

摘要:【目的】采用完整的猪繁殖与呼吸综合症病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)颗粒筛选噬菌体肽库,以获得能高亲和力结合并能抑制该病毒复制的特异性多肽。【方法】用纯化的病毒粒子包被ELISA板,再用M13噬菌体随机12肽库进行筛选。经过3轮淘筛,ELISA鉴定噬菌体单克隆与PRRSV的亲和力,选取与PRRSV具有高亲和力的噬菌体单克隆进行DNA测序,据此推导多肽的氨基酸序列。通过TCID₅₀检测其抗病毒复制能力,同时人工合成FITC标记的展示肽用于PRRSV的检测。【结果】经筛选和鉴定得到17个阳性噬菌体克隆能与PRRSV呈高亲和力结合,DNA测序发现各克隆之间有部分共有基序,其中2个克隆体外能明显抑制PRRSV的复制,使TCID₅₀由 $10^{-7.3}/0.1$ mL分别降至 $10^{-3.2}$ 、 $10^{-3.6}/0.1$ mL,而FITC标记该展示肽能够在5 mg/L工作浓度检测PRRSV。【结论】通过噬菌体肽库能够筛选到具有抗病毒作用的阳性噬菌体克隆,为进一步开发高效PRRSV的诊断和治疗试剂奠定基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合症病毒,噬菌体展示肽库,序列,免疫荧光

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)01-0127-07

猪繁殖与呼吸综合征是由猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)引起猪的一种传染性疾病,其症状主要特点为怀孕母猪发生流产、早产、死胎或木乃伊胎等严重的繁殖障碍,仔猪与育肥猪出现呼吸道症状^[1-3]。我国于1995年底暴发此病,目前此病已成为危害我国养猪业的最主要疫病。本病的防治主要依靠接种疫苗,尚无特效治疗药物,在临床上只能采取防止继发感染和降温及补充能量与营养等辅助治疗。筛选特异性抗PRRSV的药物用于该病的临床治疗将有广阔的应用前景。

噬菌体展示技术是一种用于筛选功能性多肽的生物技术。Smith于1985年首次成功将外源基因通

过基因工程手段插入丝状噬菌体基因组中,使表达的外源肽或蛋白与噬菌体外壳蛋白一起展示在噬菌体表面,从而建立了噬菌体展示技术^[4]。利用抗原去淘洗抗体库或随机多肽库,根据抗原-抗体反应原理,可以将与抗原紧密结合的抗体或多肽片段筛选出来^[5]。由于多肽能有效地结合到靶蛋白的活性位点而发挥生物学效应,其小分子量的结构容易被机体吸收而不收到破坏,因此在新药筛选中扮演重要角色。日前尚未见用完整的PRRSV病毒颗粒来筛选抗病毒多肽的报道。本研究拟用完整的PRRSV病毒颗粒来筛选噬菌体肽库,以获得能抑制该病毒感染的高亲和力的多肽,而这些特异性抗

基金项目:江苏省农业科学院基金资助项目(6110819)

* 通信作者。Tel: +86-25-84392008; E-mail: houjibo@jaas.ac.cn

作者简介:徐海(1982-),江苏扬州人,主要从事预防兽医学方面的研究。E-mail: hai_x@126.com

收稿日期: 2010-06-21; **修回日期:** 2010-09-01

PRRSV 病毒的多肽有望单独或配伍起来制成检测试剂或治疗剂用于该病的临床检测与防治。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、菌株与肽库:PRRSV 株系 JX-A1 株, 宿主细胞 Marc-145 细胞株, 由国家兽用生物制品工程技术研究中心保存。野生型噬菌体、噬菌体随机 12 肽库 Ph. D. -12™、宿主菌 ER2738, 购自美国 New England Biolabs 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器:DMEM 培养基购置美国 Gibco 公司; 兔抗 M13 抗体购置美国 Affinity bioreagents 公司; HRP 标记的羊抗兔抗体购置北京博奥森公司。超高速离心机购置美国 Beck-man 公司; 酶标仪、洗板机购置美国 Awareness 公司; 荧光显微镜购自德国蔡司公司; 紫外分光光度计购置美国 GE 公司。

1.2 PRRSV 培养、分离、浓缩与鉴定

Marc-145 细胞生长至约 70% 时, 加入 PRRSV 上清, 用 2% FCS 的 DMEM 培养液在 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 出现典型病变时, 将培养病毒 -20℃ 冻存。将冻存的 PRRSV 培养细胞反复冻融 3 次, 1500 × g 离心 10 min 取上清。上清中加入 10% PEG-8000 4℃ 过夜。10000 × g 离心 20 min 沉淀 PRRSV。沉淀悬于 NTE 缓冲液 (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.5) -80℃ 保存。用 NTE 缓冲液制备蔗糖梯度 (30%、45%、60%), 将 PRRSV 悬液缓慢加入梯度上面, 30000 × g, 4℃ 离心 2 h, 吸取 45% 至 60% 之间的可见区带, -80℃ 速冻保存。蔗糖梯度离心所得的 PRRSV 悬液, 用 NTE 缓冲液稀释 10 倍, 缓慢加入超滤离心管 (Ultrafree-15, 美国 Millipore), 4℃, 8000 × g 离心 20 min。将离心滤过后的 PRRSV 悬液吸出, 此即 PRRSV 浓缩液。紫外分光光度计, 测定样品蛋白浓度。

1.3 肽库筛选

取 10 μL 纯化的 PRRSV (3 g/L) 用 100 μL NaHCO₃ (1 mol/L, pH8.6) 包被微孔板, 4℃ 过夜。在装有 400 μL TBST (TBS + 0.1% [v/v] Tween-20) 的 EP 管中加入 10 μL Marc-145 细胞冻融上清 (3 g/L) 和 10 μL (2 × 10¹¹ PFU) 的噬菌体, 混合均匀, 37℃ 孵育 1 h, 使噬菌体与病毒培养体系中的蛋

白进行吸附。将经过孵育的噬菌体加入洗涤过的板孔, 37℃ 孵育 1 h; 用 TBST 洗涤 10 次, 用非特异性缓冲液 0.2 mol/L Glycine-HCl (pH2.2) 洗脱 8 min, 洗脱液吸入另一干净微量离心管中用 15 μL 1mol/L Tris-HCl (pH9.1) 中和, 取 10 μL 洗脱液进行滴度测定。将剩余洗脱液加入生长至对数早期的 ER2738 培液, 37℃ 振荡 5 h; 将培养液 10000 × g 离心 10 min 取上清, 加入 1/6 体积的 PEG-NaCl 沉淀噬菌体。测定扩增噬菌体的滴度, 重复上述步骤, 进行 3 轮筛选。每轮筛选逐轮降低病毒包被量, 同时增加 TBST 中 Tween-20 浓度, 以获得高亲和力噬菌体。

1.4 ELISA 鉴定、测序和多肽合成

取 10 μL PRRSV (3 g/L) 和 10 μL Marc-145 细胞冻融上清 (3 g/L) 用 100 μL NaHCO₃ (1 mol/L, pH8.6) 分别包被 96 孔 ELISA 板 (Corning), 4℃ 过夜。PBST (PBS + 0.5% (v/v) Tween-20) 洗板 3 次, 200 μL 1% BSA 于 37℃ 封闭 3 h。PBST 洗板 3 次, 每孔加 100 μL (1.0 × 10¹¹ PFU/mL) 噬菌体单克隆, 37℃ 孵育 1 h, PBST 洗板 5 次。每孔加 100 μL 封闭液 1:8000 稀释的兔抗 M13 抗体, 37℃ 孵育 1 h, PBST 洗板 5 次。每孔加 100 μL 封闭液 1:3000 稀释 HRP 标记的羊抗兔抗体, 37℃ 孵育 1 h, PBST 洗板 5 次。此后洗涤、显色、终止按常规方法进行, 酶标仪读取 450 nm 处 OD 值。将 PRRSV 包被孔中的 OD 值设为 P、Marc-145 细胞冻融上清包被孔中的 OD 值设为 N, 选取检测值 P/N > 3 的噬菌体单克隆扩增、甘油保种并委托北京六合华大基因科技股份有限公司测序。分析测序结果, 翻译成相应的 12 肽, 委托上海吉泰生物科技有限公司进行人工合成。

1.5 阳性噬菌体克隆抗病毒复制能力的测定

病毒引起细胞病变的滴度以 TCID₅₀ 表示, 即使 50% 细胞出现病变效应的最高病毒稀释度。在测定 PRRSV 滴度时分别加入 1.0 × 10¹¹ PFU 的阳性和野生型噬菌体颗粒共同培养, 同时设置 PRRSV 对照, 以观察噬菌体对病毒复制的影响。具体实验方法参照有关文献^[6]。

1.6 直接免疫荧光检测 PRRSV

Marc-145 细胞在 24 孔细胞培养板 (Corning) 上以 5.0 × 10⁶ 细胞/孔铺板, 24 h 长成单层细胞后将其中 6 个孔中接入 200 个 TCID₅₀ 的 PRRSV 病毒, 另 6 个孔作为细胞对照, 继续培养 48 h 至出现病变。弃掉培养液用 PBS 冲洗 3 次, 多聚甲醛固定 10 min,

PBS 冲洗 3 次。0.3% Triton 裂解 5 min,PBS 冲洗 3 次,每孔加入 100 μL FITC 标记的多肽(50、5、0.5 mg/L)于 37℃ 孵育 1 h,PBS 冲洗 3 次,荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 PRRSV 的纯化

用于噬菌体展示系统筛选的靶分子,其纯净性直接影响筛选的效率。本研究采用简单有效的方法来纯化 PRRSV,在获得纯净病毒同时尽量保持其完整的结构。使用 PEG-NaCl 方法能使病毒颗粒进行交联而有效沉降,经过离心去除大部分可溶性细胞杂蛋白。重悬后的 PRRSV 经过蔗糖垫进行病毒粒子浓缩,不但去除伴随病毒粒子沉降的大分子蛋白,又进一步富集了病毒粒子,而蔗糖垫可有效保护病毒粒子免受超速离心力的破坏。将获得的病毒粒子经分光光度计测定蛋白含量,调整浓度为 3 g/L 用

于后续的筛选。
2.2 与 PRRSV 特异性结合 12 肽的筛选

利用完整的 PRRSV 粒子作为靶分子,使噬菌体表面展示的随机多肽与之结合。表 1 显示,筛选时靶分子的用量逐轮降低,第一轮靶蛋白为 30 μg/孔,第二轮为 15 μg/孔,第三轮为 1 μg/孔,这样有利于淘选到高亲和力的结合肽。经过筛选的噬菌体二、三级文库容量较起始文库分别富集了 16 和 580 倍。从第三轮筛选产物中随机挑取 120 个噬菌体克隆进行 ELISA 检测,共筛选到 39 个阳性克隆,将其调整到相同的噬斑数再次进行 ELISA 检测,筛选到 17 个克隆与 PRRSV 高亲和力结合,其 P/N 值 >3。图 1 显示,1 到 17 号噬菌体在 Marc-145 裂解上清中被孔中的 OD₄₅₀ 均小于 0.2,而在 PRRSV 包被孔中的 OD₄₅₀ 值均大于 0.6。野生型噬菌体对照 C 在 Marc-145 裂解上清和 PRRSV 包被孔中的 OD₄₅₀ 值均小于 0.2。

表 1 筛选过程中噬菌体的选择性富集
Table 1 Selected enrichment of phages by biopanning

Round	PRRSV/μg	phage input/PFU	phage output/PFU	output/input
1 st	30	7.5 × 10 ¹⁰	8.0 × 10 ⁴	1.06 × 10 ⁻⁶
2 nd	15	1.5 × 10 ¹¹	2.4 × 10 ⁶	1.60 × 10 ⁻⁵
3 rd	1	1.5 × 10 ¹¹	8.7 × 10 ⁷	5.80 × 10 ⁻⁴

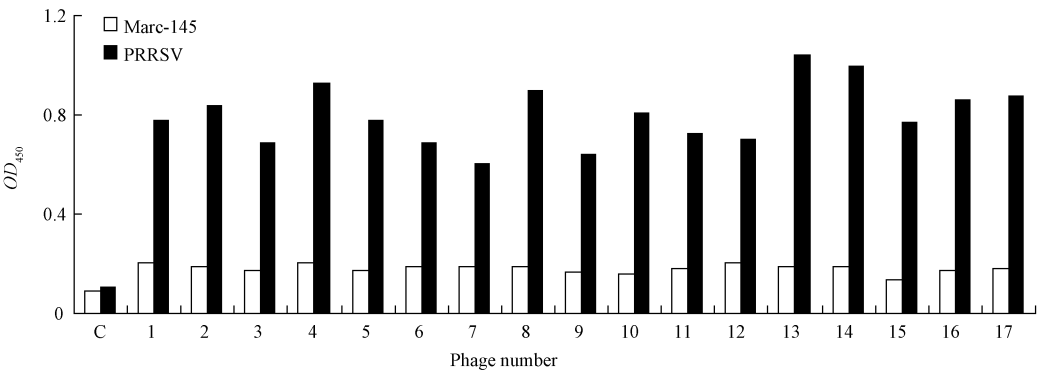


图 1 单克隆噬菌体 ELISA 值

Fig.1 ELISA value of monoclonal phage. C,Wide type phage control;1 - 17,Phage clone of 3rd round of biopanning.

2.3 特异性多肽的序列分析

将 17 个亲和力高的克隆提取噬菌体 DNA,进行核苷酸序列测定,并推导出相应的氨基酸序列,其序列分析见表 2。其中 4、8、13、14 号多肽的氨基酸序列一致,与 6、7、9、10、12 号多肽共有序列 HWW/GWW,与 3、5 号多肽共有序列 QSS;1、16、

17 号多肽的氨基酸序列一致,与 11、15 号肽共有序列 SLT,与 2 号肽共有序列 THYHRT。表 2 结果显示,各条多肽没有明显较高的同源性,只是富含色氨酸的序列所占的比例较高。在 NCBI 上进行序列 Blast 比对均没有发现其同源序列,说明其是一类新的多肽。

表 2 多肽氨基酸序列分析

Table 2 Amino acid sequence analysis of peptides

Phage clone	Phage displayed peptide sequence	Consensus sequence	Frequency
9/12	S H W W W W D M R G Y D	HW	2/17
10	H T W N H W W Q P Y M Y	HW	1/17
6	H G W W T P W M A P S T	GW	1/17
7	H L G W W K W S S Y A N	GW	1/17
4/8/13/14	H W W S W P S Y T Q S S	GW/QS	4/17
5	W R S N S Q S S S R V E	QS	1/17
3	H Q S S F S G C W S R W	QS	1/17
15	F N M H A S L T H Y P R	SLT/R	1/17
11	S L T L G Q R T T N F P P	SLT/R	1/17
1/16/17	S L T H Y H R T P H T P	SLT/R	3/17
2	T H Y H R T H S H N S P	THYHRT	1/17

2.4 噬菌体克隆的抗病毒复制能力

检测 11 个展示不同多肽序列的噬菌体克隆对 PRRSV 复制能力(TCID₅₀)的影响,发现噬菌体克隆 2、4 体外能明显抑制 PRRSV 的复制,使 TCID₅₀ 由 10^{-7.2}/0.1 mL 分别降至 10^{-3.6}、10^{-3.2}/0.1 mL;其余克隆能够抑制病毒复制,但抗病毒效果不明显,结果见表 3。

表 3 阳性克隆 ELSIA 值与抗病毒结果

Table 3 The values of ELISA and TCID₅₀ of positive phage clones

Groups	Values by ELISA	TCID ₅₀
PRRSV control	0.027	10 ^{-7.3}
Wide type phage	0.106	10 ^{-7.4}
Positive phage clones		
1/16/17	0.778/0.864/0.876	10 ^{-4.6}
2 *	0.834	10 ^{-3.6}
3	0.685	10 ^{-6.0}
4/8/13/14 *	0.932/0.897/1.038/0.094	10 ^{-3.2}
5	0.605	10 ^{-4.6}
6	0.686	10 ^{-5.5}
7	0.774	10 ^{-4.9}
9/12	0.638/0.699	10 ^{-7.0}
10	0.805	10 ^{-6.4}
11	0.725	10 ^{-6.2}
15	0.773	10 ^{-6.8}

* The clones with high affinity and anti-viral ability

2.5 直接免疫荧光检测 PRRSV

阳性噬菌体 pⅢ 展示的多肽能够与 PRRSV 特异性结合,但人工合成该多肽是否同样具有较高的亲和力有待试验证明。将 4 号克隆展示的多肽进行化学合成并用 FITC 标记,为了保证多肽具有游离的氨基端,合成序列为:H W W S W P S Y T Q S S-FITC。该多肽在 5mg/L 工作浓度时就能在 Marc-145 细胞对 PRRSV 进行检测。图 2-A 可见细胞表面有荧光信号,由于细胞固定后经 Triton 处理其细胞膜结构被破坏,多肽分子可以渗透到细胞内部与病毒蛋白结合,故在细胞内部也有可见的荧光信号;图 2-B 为细胞对照,没有可见荧光。

3 讨论

从噬菌体随机肽库中筛选与完整病毒粒子结合的多肽,此方法是以病毒结构中具有特异性亲和性的氨基酸残基为靶分子,通过受体与配体结合的特性,从噬菌体随机肽库中筛选出能与病毒抗原结合的多肽,所筛选出的多肽与抗体意义相同,并与免疫血清中天然抗体有高度同源性。Krichevsky 等^[7]筛选到与 HIV-1Tat 蛋白的核定位信号作用的噬菌体,并可抑制 Ta-NLS 介导的人核转运,细胞培养表明该序列的短肽抑制 HIV-1 复制约 50%。包士中等^[8]从随机噬菌体 12 肽库中筛选出 27 个能和志贺毒素结合的克隆,其中的 A6 克隆表现出剂量依赖性的中和活性。Tan 等^[9]建立了一个针对乙型肝炎核心

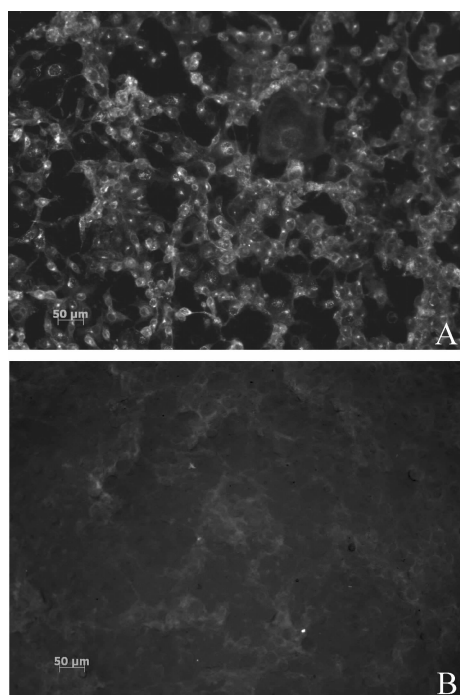


图2 直接免疫荧光检测 PRRSV

Fig.2 Detection of PRRSV by direct immunofluorescence. A: PRRSV infected cells; B: Cell control.

抗原(HBcAg)的 ScFv 抗体库,从中筛选出 1 株克隆,可用于检测血清样本中的 HBcAg。利用噬菌体展示肽库技术筛选治疗剂、诊断试剂还处于起步阶段,但亦可以预见其广阔的应用前景。

噬菌体肽库筛选的对象多为纯化的蛋白分子,近年来亦有用完整的病毒、细胞甚至体内器官筛选获得成功的报道^[10-12]。肽库筛选时,一般要求用于筛选的靶分子相当纯净,从而避免筛选到非特异性的噬菌体。Marc-145 细胞扩繁的 PRRSV,体系中除病毒粒子以外的杂蛋白组份非常复杂,在进行 PRRSV 纯化时同时采用 PEG 沉淀和蔗糖密度梯度离心的方法,最大限度的保证了病毒粒子的纯净性。另外,在筛选过程中先用 Marc-145 细胞裂解液与噬菌体肽库反应,然后再加到包被了 PRRSV 的固相载体中,通过裂解液逆向封闭噬菌体肽库,从而降低了筛选过程非特异性噬菌体的富集,提高了 ELISA 的阳性检出率。本研究通过 3 轮噬菌体筛选,将产出、投入比从 10^{-6} 提高到 10^{-4} 量级,最后得到 17 个噬菌体阳性克隆能与 PRRSV 高亲和力结合,其中 2 个体外显示较强的抑制病毒复制能力,表明针对完整病毒进行肽库筛选这一方法的可行性。

本研究发现,阳性克隆展示多肽与 PRRSV 的亲

和力及其抑制病毒复制能力不完全呈平行关系,噬菌体克隆 5 与 PRRSV 的亲和力不及噬菌体克隆 10,但却表现出更强的抗病毒能力。这可能是不同的噬菌体展示的多肽结合在 PRRSV 的不同位点,而该位点恰是 PRRSV 粘附和复制功能区。亲和力是抗病毒能力的保证,太低的亲和力也不可能发挥抗病毒作用。在鉴定过程中需要的是既能与 PRRSV 高亲和力结合,又能有效抑制 PRRSV 复制的阳性克隆。这些多肽的作用机理同抗体抗病毒作用类似,当多肽与病毒结合后能模拟病毒的中和抗体,封闭病毒表面的抗原决定簇,甚至改变病毒表面蛋白质的空间结构,形成空间位阻,阻断某些促感染蛋白质发挥作用。

直 PRRSV 在猪肺泡巨噬细胞 (porcine alveolar macrophages, PAM) 上鉴定的受体有 3 种:即硫酸乙酰肝素 (heparin sulfate, HS)、唾液酸粘附素 (sialoadhesin, Sn) 和 CD163。硫酸乙酰肝素在病毒的侵入过程中起吸附作用;唾液酸粘附素既可以吸附病毒又可以介导病毒的内吞;CD163 可能起协助 Sn 内吞、病毒脱衣壳和病毒基因组释放到细胞浆的作用^[13-15]。临床上 PRRSV 的感染通常从病毒入侵 PAM 开始,如何封闭病毒在 PAM 上的受体将是防止疫病发生的有效手段。本研究筛选到的噬菌体能够与 PRRSV 特异性结合,克隆 2、4 在 Marc-145 细胞表现出抑制病毒复制的能力,可能与病毒受体的封闭有关,而 Marc-145 细胞上的受体与 PAM 不同,这从另一方面解释了亲和力与抗病毒能力之间的不平行关系,同时也提醒我们只有在 PAM 上能够抑制病毒复制的多肽才能有望进一步开发成治疗剂用于临床。

M13 噬菌体在头部有 5 个拷贝的多肽展示,多肽在这种 5 价形式下与靶分子结合的亲和力要比单价时强 1000 倍^[16],本研究中人工合成克隆 4 展示的多肽序列,并用 FITC 进行标记,通过直接免疫荧光可以看出当多肽还原成单价形式时仍然能够与 PRRSV 高亲和力结合。细胞经过 Triton 处理,细胞膜结构被破坏非常适合小分子的多肽标记物进入,从而更加有效的与病毒粒子结合,提高检测的灵敏度。

本研究通过噬菌体随机库筛选获得了具有抗病毒作用阳性克隆,为研制高效抗病毒分子药物和诊断试剂奠定了基础。

参考文献

- [1] Elizabeth Brown, Steven Lawson, Craig Welbon, Josephine Gnanandarajah, Juan Li, Murtaugh MP, Nelson EA, Molina RM, Zimmerman JJ, Rowland RR, and Ying Fang . Antibody Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Nonstructural Proteins and Implications for Diagnostic Detection and Differentiation of PRRSV Types I and II. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, 2009, 5: 628-635.
- [2] 童光志, 周艳君, 郝晓芳, 田志军, 仇华吉, 彭金美, 安同庆. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析. *中国预防兽医学报* (Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine), 2007, 29 (5): 323-326.
- [3] Lopez OJ, Oliveira MF, Alvarez Garcia E, Kwon BJ, Doster A, and Osorio FA. Protection against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Infection through Passive Transfer of PRRSV-Neutralizing Antibodies Is Dose Dependent. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 3: 269-275.
- [4] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228: 1315-1317.
- [5] Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, 249: 386-390.
- [6] 杜平. 医学病毒学实验技术. 第二版. 北京: 人民军医出版社, 1993, 167.
- [7] Krichevsky A, Rusnati M, Bugatti A. The fd phage and a peptide derived from its p8 coat protein interact with the HIV-1 Tat-NLS and inhibit its biological functions. *Antiviral Research*, 2005, 66 (1): 67-78.
- [8] 包士中, 王慧, 荫俊, 杨惠盈, 史晶. 利用噬菌体随机肽库筛选可结合志贺毒素 B 亚单位的短肽序列. *微生物学报* (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46 (5): 749-752.
- [9] Van den Brink EN, Ter Meulen J, Cox F, Alexandra Thijssse, Mark Throsby, Marissen WE, Gelderblom HR, Martina BE, Wolfgang Preiser, Doerr HW, Kruif JD, and Jaap Goudsmit. Molecular and biological characterization of human monoclonal antibodies binding to the spike and nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology*, 2005, 79 (3): 1635-1644.
- [10] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, 1998, 279 (5349): 377-380.
- [11] Gough KC, Cockburn W, Whitelam GC. Selection of phage display peptides that bind to cucumber mosaic virus coat protein. *Journal of virological methods*, 1999, 79: 169-180.
- [12] Ludtke JJ, Solovoff AV. In Vivo Selection and Validation of Liver-Specific Ligands Using a New T7 Phage Peptide Display System. *Drug Delivery*, 14: 357-369, 2007.
- [13] Vanderheijden N, Delputte PL, Favoreel HW, Vandekerckhove J, Van Damme J, van Woensel PA, and Nauwynck HJ. Effects of heparin on the entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into alveolar macrophages. *Advances in experimental medicine and biology*, 2001, 494: 683-689.
- [14] Van Gorp H, Van Breedam W, Delputte PL, Nauwynck HJ. The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection. *Archives of Virology*, 2009, 154: 1939-1943.
- [15] Delputte PL, Costers S, Nauwynck HJ. Analysis of porcine reproductive and respiratory Syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *Journal of General Virology*. 2005, 86 (Pt 5): 1441-1445.
- [16] Helms BA, Reulen SWA, Sebastiaan Nijhuis, Maarten Merckx and Meijer E. W. High-Affinity Peptide-Based Collagen Targeting Using Synthetic Phage Mimics: From Phage Display to Dendrimer Display. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131: 11683-11685.

Screening of polypeptides binding to porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display library

Hai Xu, Jichun Wang, Zhe Yu, Fang Lv, Jibo Hou *

National Veterinary Biological Medicine Engineering Research Center, Nanjing 210014, China

Abstract: [**Objective**] To find specific polypeptides that bind porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) with high affinity and inhibit replication of PRRSV, we screened ligands on intact PRRSV virion by phage display library. [**Methods**] The purified PRRSV was coated and then reacted with random peptide library displaying 12 amino acids fused on protein III of M13 phage. The selected peptides for target binding were assayed by ELISA after 3 rounds of biopanning and measured by 50% tissue culture infection dose. The positive clones with high affinity were used for automated sequencing, and the amino acid sequence of polypeptide displayed on phage was deduced. Synthesis of fluorescein isothiocyanate labelled polypeptide and establish a method for detection of PRRSV. [**Results**] The enrichment was shown by ELISA after 3 rounds of biopanning and 17 positive clones bound to PRRSV with high affinity. Sequencing of the genes encoding these peptides in positive clones show some of conserved motifs. Two positive clones inhibited the replication of PRRSV in Marc-145 cells *in vitro* and decreased PRRSV TCID₅₀ from $10^{-7.3}/0.1$ mL to $10^{-3.2}$, $10^{-3.6}/0.1$ mL respectively. The fluorescein isothiocyanate labelled peptide was able to detect PRRSV at the concentration of 5 mg/L. [**Conclusion**] Positive clones against PRRSV can be selected from phage display peptide library and so provide a potential tool for highly sensitive diagnostic kits and novel antiviral agents.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus, phage display peptide library, sequence, immunofluorescence

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Scientific Funds of Jiangsu Academy of Agricultural Sciences (6110819)

Corresponding author. Tel: +86-25-84392008; E-mail: houjibo@jaas.ac.cn

Received: 21 June 2010/ Revised: 1 September 2010