

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(2):270-277; 4 February 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

囊素与杂交瘤细胞的结合及结合肽的鉴定

王臣^{1,2}, 赵战勤¹, 牛明福^{1*}, 张春杰¹, 程相朝¹, 陈溥言²

(¹ 河南科技大学动物传染病与微生物实验室, 洛阳 471003)

(² 南京农业大学农业部动物疫病与诊断重点实验室, 南京 210095)

摘要:【目的】囊素(BS)是禽类和哺乳动物中具有重要免疫调节功能的多肽,能有效促进杂交瘤细胞抗体的分泌,为探讨杂交瘤细胞是否有BS受体分子的表达。【方法和结果】本研究采用荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜和流式细胞仪分析的方法,检测BS与杂交瘤细胞的结合特性。实验结果证实BS与杂交瘤细胞的结合具有特异性、趋饱和性和可逆性。为进一步分析BS与杂交瘤细胞的结合位点,实验中以BS分子作为靶标,对噬菌体随机12肽库进行了4轮亲和筛选,ELISA和竞争抑制试验显示2个噬菌体克隆能特异性与BS结合。对阳性噬菌体克隆进行序列测定分析表明,其插入的12肽分别为:ACTKHLCLLQPL、MSCNDTLCLLPN,保守序列为LCLL。体外实验表明,2个人工合成的12肽都能在一定程度上抑制BS与杂交瘤细胞的特异性结合。【结论】本研究表明杂交瘤细胞具有BS结合的受体,这为进一步研究BS促杂交瘤细胞抗体分泌的信号传导通路奠定了基础。

关键词: 囊素;杂交瘤细胞;受体;结合肽;肽库

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0270-08

许多具有生物学功能的多肽,多是通过与细胞膜受体相互作用,或者通过受体介导而发挥生物学效应,胸腺素 α 原(ProT α)是一种在哺乳动物细胞中广泛分布、结构保守的酸性小分子蛋白,是胸腺素 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$)的前体蛋白。目前在细胞内和细胞外均已发现了ProT α 。在胞内,ProT α 作为一种核蛋白,参与对细胞周期的调节,促进细胞增殖;在胞外,ProT α 通过潜在的膜受体调节免疫应答,促进等细胞因子的产生,进而增强细胞和体液免疫应答^[5]。TGF- β 是一类多功能的细胞调控肽,在哺乳动物体内有3种亚型,分别称为TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$, TGF- $\beta 3$ 。有一种Ⅲ型受体,是一种膜上的被称为 β 聚糖的糖蛋白,可与所有的3种TGF- β 亚型结合,其主要功能

是增加细胞表面上TGF2 β 的结合,并将其提供给Ⅰ型和Ⅱ型受体^[1-2]。此外速激肽、神经肽Y、血管肠肽等都是与细胞膜G蛋白偶联的受体相互作用来发挥生物学效应。

囊素(Bursin, BS)是从法氏囊提取物中分离出来的一种氨基酸组成为Lys-His-Gly-NH₂的三肽,具有诱导B淋巴细胞分化、促进抗体生成和增强机体免疫功能等多种生物活性。囊素发挥其生物活性的信号是如何转导的呢? Audya等^[3]发现,BS可引起B细胞内的cAMP和cGMP水平显著升高,提示BS对B细胞的作用可能与第二信使cAMP和cGMP的变化有关。已有的研究报道表明,BS可直接作用于抗体分泌细胞杂交瘤细胞,并能明显促进其抗体的

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170702);河南科技大学博士基金项目(09001397)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-379-65803896; E-mail: mingfuniu2004@yahoo.com.cn

作者简介: 王臣(1979-),男,安徽霍丘人,博士,副教授,主要从事动物分子病原学与免疫学教学与科研。E-mail: wangchen2001@126.com

收稿日期: 2009-09-11; **修回日期:** 2009-11-24

合成和分泌。但 BS 促杂交瘤细胞抗体分泌的信号途径仍不是很清楚,BS 是否与其它多肽如生长因子、胸腺五肽 TP5 一样存在膜受体以及是否通过受体介导而发挥生物学效应^[4-6],国内外至今未见任何报道。因此研究 BS 与杂瘤细胞作用的胞外受体分子,对于全面阐明 BS 促杂交瘤细胞抗体分泌的信号传导通路尤为重要。本研究分析了 BS 与杂交瘤细胞的结合特性,旨在探讨杂交瘤细胞是否有 BS 受体分子的表达,为进一步研究 BS 促进杂交瘤细胞抗体分泌的细胞信号通路奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及其他:杂交瘤细胞 E8 分泌的单克隆抗体为抗人 IgG 抗体,其类型为 IgG1,由河南省农业科学院提供^[7]。以丝状噬菌体 M13 为载体构建的噬菌体展示的随机 12 肽库试剂盒为美国 New England Biolabs 公司产品。100 μ L, 1.5×10^{13} pfu / mL。-28 gIII 和 -96 gIII 测序引物和 E. coli ER2738 大肠杆菌宿主菌。HRP-抗 M13 mAb 为 Pharmacia 公司产品。TRX(硫氧还蛋白)、TRX-BS 融和蛋白由笔者制备保存^[8]。多肽 BS 和 G-G-G-G-S 五肽、带有荧光标记的 FITC-BS 和 FITC-GGGGS、阳性噬菌体克隆所插入的 12 肽 P3-12、P5-12 均由西安华辰有限公司采用固相合成法合成,纯度 95% 以上。

1.1.2 主要试剂和仪器:1640 细胞培养基、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司(New York, USA),聚乙二醇(PEG8000),四甲基联苯胺(TMB)购自 Sigma 公司,其它试剂均为国产或进口分析纯。m277531 荧光显微镜(北京中西远大科技有限公司)本实验室保存,Radiance2100 激光扫描共聚焦显微镜(美国 BIO-RAD 公司)为南京农业大学大豆国家重点实验室仪器,LSR II 型流式细胞仪(美国 BIO-RAD 公司)为南京鼓楼医院科研部仪器。

1.2 显微镜观察 BS 与杂交瘤细胞的结合

将杂交瘤细胞约 2×10^6 细胞离心回收,用冷 0.1 mol/L PBS 洗 2 次,离心回收,每次 5 min,细胞悬浮于 0.1 mol/L PBS 中,平均分为 2 管,第 1 管加 20 μ g 的 FITC-BS,第 2 管加 20 μ g 的 FITC-GGGGS 作为阴性对照,4 $^{\circ}$ C 反应 10 min,反应后离心回收用冷 PBS 洗 2 次,离心细胞重悬于 PBS 1mL 中取少许细胞用台盼蓝检测存活率,进行荧光显微镜及激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning

Confocal Microscope, LSCM)观察摄影记录。FITC 激发波长选用 488 nm。

1.3 流式细胞仪分析 FITC-BS 与杂交瘤细胞的结合特性

将杂交瘤细胞约 2×10^6 细胞离心回收,用冷 0.1 mol/L PBS 洗 2 次,离心回收,每次 5 min,细胞悬浮于 0.1 mol/L PBS 中,平均分为 4 管,第 1 管加 100 μ L 的 FITC-GGGGS(200 μ g /mL),其余 3 管分别加入 100 μ L 不同浓度(200、400、600 μ g /mL)的 FITC-BS,4 $^{\circ}$ C 反应 10 min,反应后离心回收用冷 PBS 洗 2 次,离心细胞重悬于 PBS 1mL 中,用流式细胞仪分析 FITC-BS 与杂交瘤细胞的结合率。同时,另取同样处理的悬浮于 0.1 mol/L PBS 的杂交瘤细胞 4 管,每管先加入 100 μ L 浓度 600 μ g/mL 的 FITC-BS,每管再分别加入 100 μ L 不同浓度(200、400、600、800、1000 μ g /mL)的 BS。4 $^{\circ}$ C 反应 30 min,反应后离心回收用冷 PBS 洗 2 次,离心细胞重悬于 PBS 1mL 后,用流式细胞仪分析人工合成的 BS 抑制 FITC-BS 与杂交瘤细胞的结合情况。

1.4 噬菌体 12 肽库的亲亲和筛选

将 TRX-BS 以 TBS 稀释为 10 μ g /mL,并按与 TRX-BS 相同的稀释倍数稀释空质粒表达产物 TRX,分别取稀释后的 TRX-BS 和空质粒表达产物 TRX 包被酶标板,100 μ L/孔,放置湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜;次日倾弃包被液,加入含 0.05% Tween20 的 TBST 洗涤 3 次,扣干,然后以含 3% BSA 的 TBS 按 100 μ L/孔加入各孔,置湿盒中 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时;倾弃封闭液,以含 0.05% Tween20 的 TBST 溶液洗涤 3 次(每次静置 3 min),将包被好的酶标板封口,于 4 $^{\circ}$ C 保存待用。以 TBST 稀释原始文库至 1×10^{11} pfu /mL,取稀释后的文库液 100 μ L 加入到预先包被空质粒表达产物 TRX 的酶标板微孔内,于湿盒中 37 $^{\circ}$ C 放置 2 h,吸出孔内液体,并用 100 μ L TBS 清洗微孔一次,合并吸出的孔内液和清洗液为预筛选液。将 100 μ L 的预筛选液加入到预先包被 TRX-BS 的酶标板微孔内,放置湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜,弃孔内液体,并用 TBST 清洗 10 次,向微孔中加入 100 μ L 0.2 mol/L Glycine-HCl (pH 2.2),于室温温和摇动 <10 min,洗脱液吸入另一干净微量离心管中。然后再用 15 μ L 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.1)中和上述洗脱液。洗脱液即为第一轮噬菌体 12 肽库的噬菌体筛选物。参照噬菌体 12 肽库实验手册,重复以上步骤进行 4 轮筛选。

1.5 噬菌体阳性克隆的 ELISA 鉴定

用 100 μL 100 μg /mL 的靶分子 TRX-BS (溶于 0.1 mol/L pH 8.6 NaHCO₃ 中)包被 ELISA 板的每个孔,并设 TRX 蛋白对照。在密封的湿盒中 4℃ 包被过夜。经封闭液,4℃ 封闭 1 h 后,PBST 洗涤 3 次,加入 100 μL 单个克隆的噬菌体上清液(滴度稀释至:10¹¹ pfu /mL),室温反应 1 h。PBST 洗涤 3 次,加入稀释至工作浓度的 HRP-抗 M13 mAb,室温反应 1 h。PBST 充分洗涤,加入 TMB 底物显色溶液,室温 30 min,后加 50 μL 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应,测 A₄₅₀ 值。

1.6 噬菌体阳性克隆的竞争抑制试验

靶分子 TRX-BS 的包被、封闭(方法同上),加入 100 μL 不同浓度(25、50、100、150、200 μg /mL)的人工合成的 BS 肽与阳性单克隆噬菌体上清(滴度稀释至:10¹¹ pfu /mL)等体积混合,室温作用 10 min,每孔 100 μL,室温轻摇孵育 1 h。PBST 洗 3 次,加 HRP-抗 M13 mAb,室温轻摇孵育 1 h ,PBST 洗 6 次,加 TMB 底物显色,酶标仪上测 A₄₅₀ 值。抑制率(%)=(未抑制 A₄₅₀ -抑制后 A₄₅₀)/未抑制 A₄₅₀ × 100% 。

1.7 阳性噬菌体克隆 DNA 序列测定

提取阳性噬菌体克隆单链 DNA,用 -96 gIII 测序引物交由上海英俊生物有限公司测序。并推导其

插入的 12 肽的氨基酸序列。

1.8 人工合成的结合肽 P3-12、P5-12 抑制 BS 与杂交瘤细胞的特异性结合

将杂交瘤细胞约 2 × 10⁶ 细胞离心回收,用冷 0.1 mol/L PBS 洗 2 次,离心回收,每次 5 min,细胞悬浮于 0.1 mol/L PBS 中,每管加入 100 μL 浓度 600 μg /mL 的 FITC-BS,同时分别加入 100 μL 不同浓度(200、400、600、800、1000 μg/ mL)的 12 肽 P3-12、P5-12,同时设不加结合肽以及 G-G-G-G- S 五肽组对照,4℃ 反应 30 min,反应后离心回收用冷 PBS 洗 2 次,离心细胞重悬于 PBS 1mL 后,用流式细胞仪分析人工合成的结合肽 P3-12、P5-12 抑制 BS 与杂交瘤细胞的结合情况。

2 结果

2.1 显微镜观察

当 FITC-BS 与杂交瘤细胞作用后,处理的杂交瘤细胞在荧光显微镜观察前经台盼蓝染色检测细胞存活,杂交瘤细胞圆而亮,表明细胞状态良好,荧光显微镜观察结果显示,经 FITC-BS 处理的杂交瘤细胞明显的被荧光染色(图 1-A),经阴性对照 FITC-GGGGS 作用的杂交瘤细胞没检测到荧光(图 1-B)。激光扫描共聚焦显微镜观察结果显示,经 FITC-BS 处理的杂交瘤细胞膜附有大量荧光,实验结果表明 BS 能特异结合在杂交瘤细胞膜上(图 1-C)。

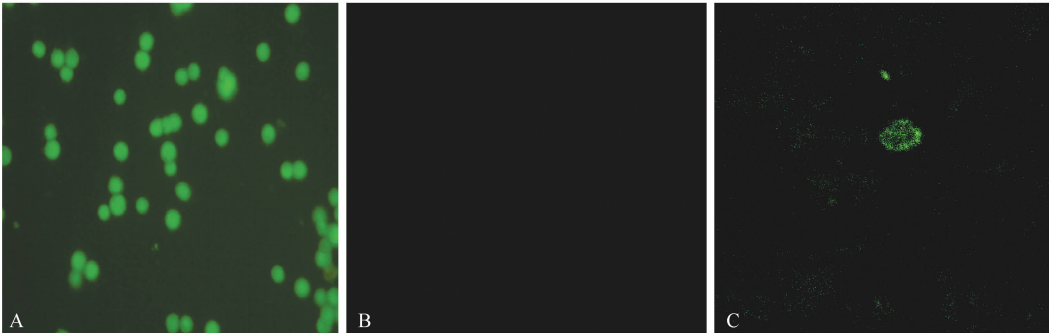


图 1 荧光显微镜及激光扫描共聚焦显微镜观察 BS 与杂交瘤细胞的结合

Fig. 1 The interaction between BS and hybridoma cell was observed by Fluorescence microscopy and Laser Scanning Confocal Microscope. A: hybridoma cells incubated in the presence of FITC-BS (20 μg) (A) or (B) of FITC- GGGGS (20 μg) for 10 min at 4℃ were observed by Fluorescence microscopy; B: hybridoma cells incubated with FITC-BS (20 μg) for 10 min at 4℃ were observed by Laser Scanning Confocal Microscope.

2.2 流式细胞仪分析 FITC-BS 与杂交瘤细胞的结合特性

流式细胞仪分析结果显示,FITC-BS 与杂交瘤细胞的结合率随 FITC-BS 的量增加而增高,当 FITC-BS 在 400 μg /mL、600 μg /mL 浓度时结合率达到最高(图 2)。结合率分别为 51.0%、50.6%。但二者的结合率无显著差异(P < 0.05)。表明二者

结合具有趋饱和性。当将杂交瘤细胞先用 600 μg /mL 的 FITC-BS 处理后,再分别加入 100 μL 不同浓度(400 μg /mL、600 μg /mL、800 μg /mL)的未加荧光素标记的 BS,流式细胞仪分析结果表明,人工合成的 BS 在高于 400 μg /mL 浓度时能明显抑制 FITC-BS 与杂交瘤细胞的结合,抑制率呈显著差异(P < 0.05)(图 3)

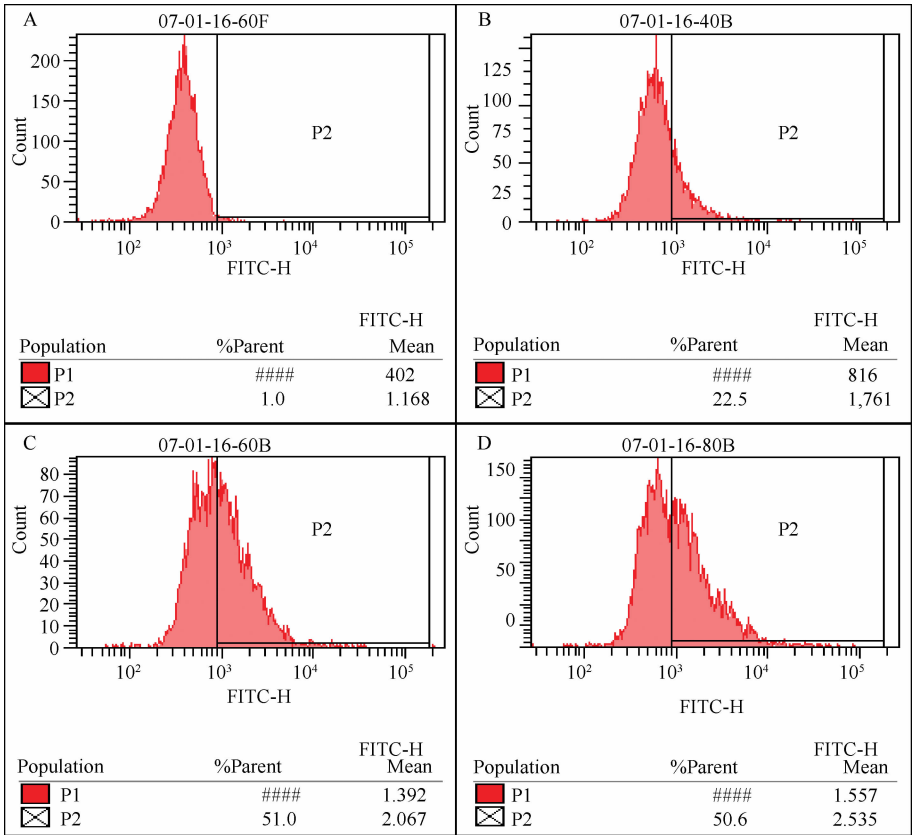


图 2 FACS 分析 BS 与杂交瘤细胞的结合率

Fig. 2 The binding rate of FITC-BS to hybridoma cell was analyzed by FACS. A; hybridoma cells were incubated with 100 μ L FITC-GGGGS (200 μ g /mL), the binding rate of FITC-GGGGS to hybridoma cell was 1%; B; hybridoma cells were incubated with 100 μ L FITC-BS (200 μ g /mL), the binding rate of FITC-BS to hybridoma cell was 22.5%; C; hybridoma cells were incubated with 100 μ L FITC-BS (400 μ g /mL), the binding rate was 51%; D; hybridoma cells were incubated with 100 μ L FITC-BS (600 μ g /mL), the binding rate of was 50.6%, which was not significantly difference with 50.6% ($P > 0.05$).

2.3 噬菌体 12 肽库筛选的富集效应

在筛选过程中,将每轮投入筛选的噬菌体量记为 Input、洗脱得到的噬菌体量记为 output,分析比较每轮产出/投入比 (Input/Output) 情况,来反映特异性结合噬菌体的富集程度。经过 4 轮筛选发现:从产出/投入比来看,筛选结果回收率逐轮提高 (表 1),显示较好的富集效果。

2.4 噬菌体阳性克隆的 ELISA 鉴定

为了获得是与 BS 而不是与 TRX 蛋白结合的噬菌体克隆,从第 3 轮和第 4 轮筛选后随机挑选了 20 个单个噬菌体克隆,以 TRX-BS 融合蛋白和 TRX 包被酶联板做间接 ELISA 试验,ELISA 鉴定结果显示其中 10 个噬菌体克隆显示较强的与 BS 结合的特性 (图 4)。分别将 10 个阳性噬菌体克隆命名为 P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7、P8、P9、P10。

2.5 噬菌体阳性克隆特异性的竞争 ELISA 实验

为进一步鉴定所筛选的噬菌体展示肽是否特异

性地与 BS 蛋白结合,将上述 10 个克隆,做竞争 ELISA 实验,以人工合成的 BS 阻断噬菌体阳性克隆与 BS 结合,竞争 ELISA 实验结果显示,人工合成的 BS 对噬菌体阳性克隆 P3、P5 与 BS 结合具有一定的阻断作用。表明噬菌体阳性克隆 P3、P5 能特异性与 BS 结合 (图 5)。

2.6 人工合成的结合肽 P3-12、P5-12 抑制 BS 与杂交瘤细胞的特异性结合

将上述 2 个阳性噬菌体克隆 DNA 测序,以推测其相应的肽序列,序列测定结果显示,噬菌体阳性克隆 P3、P5 所插入的 12 肽分别如下, P3-12: ACTKHLCLLQPL; P5-12: MSCNDTLCLLPN; 其中保守序列为 LCLL。通过流式细胞仪分析人工合成的结合肽 P3-12、P5-12 抑制 BS 与杂交瘤细胞的特异性结合情况。流式细胞仪分析结果显示, P3-12 肽在高于 400 μ g/mL 浓度时能明显抑制 BS 与杂交瘤细胞的结合,抑制率呈显著差异 ($P < 0.05$)。而 P5-

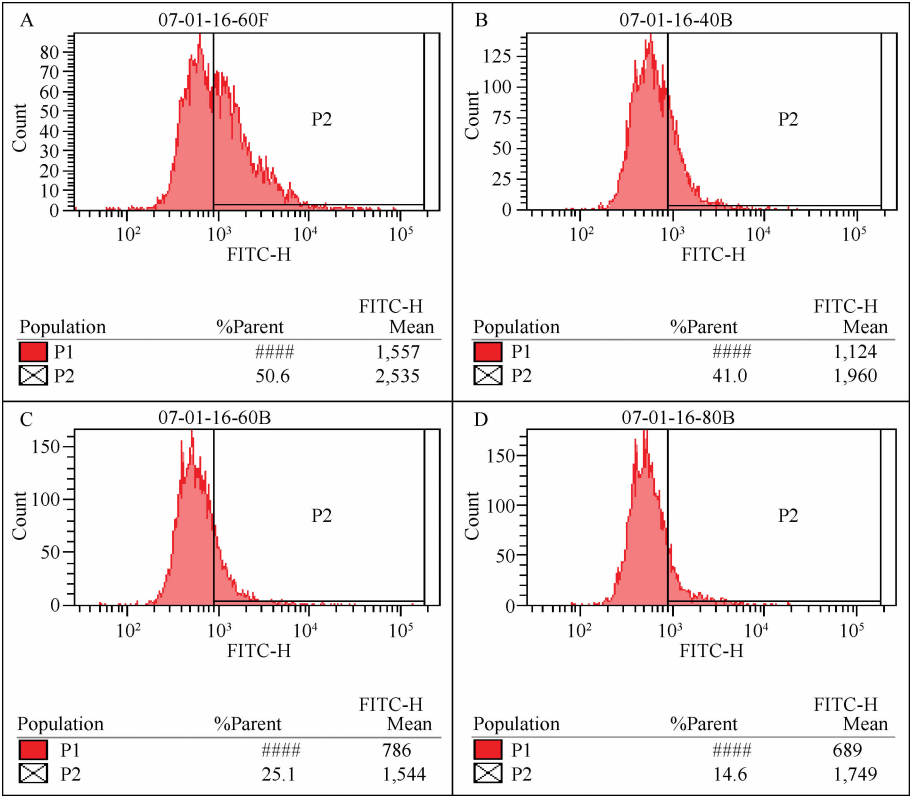


图 3 FACS 分析人工合成 BS 抑制 FITC-BS 与杂交瘤细胞的结合

Fig. 3 Inhibition of FITC-BS binding to hybridoma cell was analyzed by FACS. A: hybridoma cells were incubated with 100 μ L FITC-BS(600 μ g /mL) in the absence of BS, the binding rate was 50.6% ; B: hybridoma cells were incubated with 100 μ L FITC-BS(600 μ g /mL) in the presence of BS (400 μ g /mL) ,the binding rate was 41.0% , (P < 0. 05) ; C: hybridoma cells were incubated with 100 μ L FITC-BS(600 μ g /mL) in the presence of BS (600 μ g /mL) ,the binding rate was 25.1% , (P < 0. 01) ; D: hybridoma cells were incubated with 100 μ L FITC-BS(600 μ g /mL) in the presence of BS (800 μ g /mL) ,the binding rate was 14.6% , (P < 0. 01) .

12 肽高于 800 μ g /mL 浓度时能抑制 BS 与杂交瘤细胞的结合,抑制率呈显著差异 (P < 0. 05) (图 6) 。而 G-G-G-G-S 五肽对照肽在各个浓度对 BS 与杂交瘤细胞结合率没有明显变化。表明结合肽 P3-12、P5-12 在不同程度能特异性抑制 BS 与杂交瘤细胞的结合。

表 1 四轮亲和筛选对噬菌体的富集

Rounds of panning	Input Pfu	Output Pfu	Relative yield
1	1×10^{12}	2×10^4	$2/10^8$
2	1×10^{12}	4×10^4	$4/10^8$
3	1×10^{12}	2×10^5	$2/10^7$
4	1×10^{12}	3×10^6	$3/10^6$

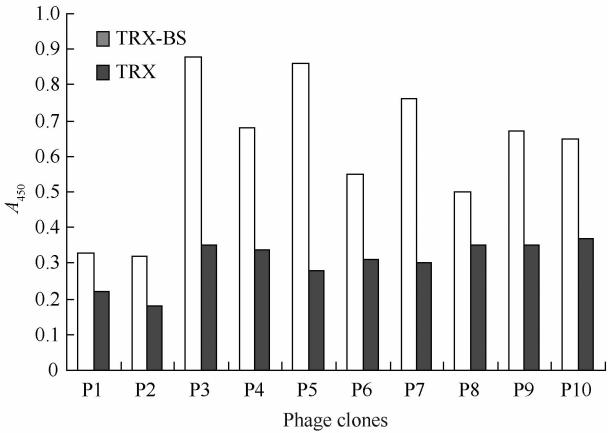


图 4 ELISA 鉴定与 BS 结合的阳性噬菌体克隆

Fig . 4 The positive phage clones binding to BS were identified by ELISA.

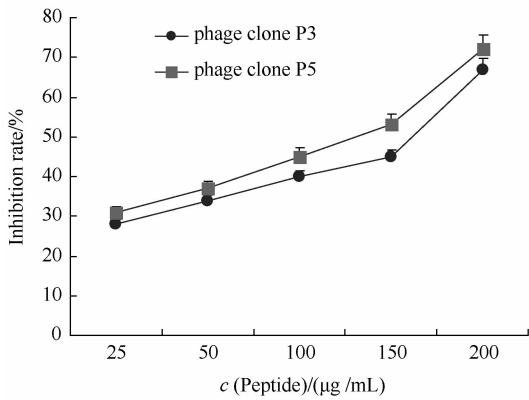


图5 噬菌体阳性克隆 P3、P5 竞争抑制 ELISA 结果

Fig. 5 The results of competitive ELISA for the positive phage clones P3、P5.

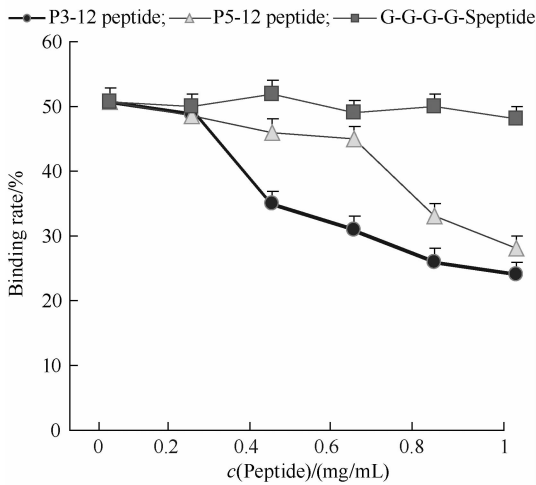


图6 P3-12、P5-12 肽抑制 BS 与杂交瘤细胞的结合

Fig. 6 Inhibition of the binding of FITC-BS to hybridoma cell by P3-12 peptide and P5-12 peptide. The binding of FITC-BS (600 μg/mL) to hybridoma cell was inhibited by increasing the concentrations of each tested compound. ■, P3-12 peptide; △, P5-12 peptide; ●, G-G-G-G-S peptide.

3 讨论

BS 作为从法氏囊提取物中分离出来的第 1 个化学结构明确的生物活性小肽,最初来源于鸡的法氏囊,但其不仅对禽类具有免疫调节功能,而且对哺乳动物及人类淋巴细胞也具有明显的免疫学及生理学活性。1990 年, Audhya 等^[9]用免疫学方法检测证实 BS 不仅存在于鸟类的 BF 上皮中,还存在与哺乳动物胎儿骨髓和肝脏内胆管上皮细胞中。他们又于 1991 年报道^[10],从牛骨髓和肝脏分离出的前囊素 (probrusin),其氨基酸组成顺序为 Phe-Phe-Trp-

Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Lys-His-Gly-Arg-Arg, 其中第 9-11 个氨基酸恰好是 BS。经检测亦具有与 BS 相同的生物学特性。因此 BS 的生物学意义不仅局限与禽类,对于哺乳动物也具有研究价值。BS 自 1986 年被首次报道以来,目前,对于 BS 的总体的研究显得相当缓慢,国内外学者对于 BS 的研究主要偏向于其免疫功能的应用,但对于其免疫调节机制的机理研究报道很少。BS 是否与其它多肽一样存在膜受体以及是否通过受体介导而发挥生物学效应? 目前国内外还未见相关文献报道。这都极大的限制了其作为具有生物学功能的多肽的研究进展。

本研究旨在探讨杂交瘤细胞是否有 BS 受体分子的表达,选用杂交瘤细胞作为 BS 的靶细胞是考虑到 BS 对杂交瘤细胞抗体的分泌有明显的促进作用。当前,国内外学者在对 BS 促高水平抗体产生的机理进行了大量研究^[11-13]。姜秀丽在体外实验中,通过细胞计数,初步断定抗体效价的升高与单纯的细胞数量增加没有直接关系,从而表明 BS 提高杂交瘤细胞抗体的分泌不是通过促进细胞增殖实现的,而可能是诱发细胞的一系列复杂的生化变化过程来完成的^[14]。缪德年^[7,15]研究了 BS 对杂交瘤细胞增殖和抗体分泌的影响,也发现 BS 可直接作用于杂交瘤细胞,促进其抗体的分泌,而这种作用与细胞增殖无关。其最后推测 BS 促杂瘤细胞抗体分泌的信号传导通路可能主要有 Gs-cAMP-PKA 和 RTK-Ras- ERK1/2 两条,这两条信号通路协同作用,共同调节抗体基因的表达。

杂交瘤细胞是否有 BS 受体分子的表达,首要的是检测 BS 与杂交瘤细胞的结合特性,本研究采用了荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜和流式细胞仪分析的方法,普通荧光显微镜下,许多来自焦平面以外的荧光使观察到的图像反差和分辨率降低,而共焦点激光扫描显微镜则大大减少了这种焦平面以外的光,而且由于改变焦点可获得一系列细胞不同切面上的图像,使得其在研究亚细胞结构与组分等方面的应用越来越广泛。本研究中使用荧光显微镜仅能观察到 BS 与杂交瘤细胞的结合,但不能说明结合的部位是位于细胞的具体部位。激光扫描共聚焦显微镜观察结果显示,杂交瘤细胞膜附有大量荧光,说明 BS 与杂交瘤细胞特异结合的部位位于细胞膜上。细胞表面受体的生物学特性一般应具有受体与配体结合的特异性,这种结合力极强,具有高亲和性,细胞表面受体的数目有限,故细胞外低浓度的配体与受体结合即可使受体处于饱和状态。流式细胞仪分析结果显示,以 FITC 标记的 BS 为探针,与杂交瘤细胞的结合率不具有剂量效应关系,加入 FITC-BS 在 400 μg/mL、600 μg/mL 浓度时

结合率达到最高。结合率分别为 51.0%、50.6%，二者的结合率无显著差异 ($P < 0.05$)。表明 BS 与杂瘤细胞的结合具有趋饱和性。受体与配体呈非共价结合，其结合一般具有可逆性。实验中以人工合成的 BS 作为配体竞争物时，BS 在高于 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时能明显抑制 FITC-BS 与杂交瘤细胞的结合，抑制率呈显著差异 ($P < 0.05$)，表明 BS 与杂交瘤细胞的结合也具有可逆性。结合显微镜的观察结果，我们推测杂交瘤细胞膜上存在着 BS 特异的结合蛋白，该蛋白很可能是 BS 的受体，参与了囊素促杂交瘤细胞抗体分泌过程。

噬菌体随机肽库技术是将编码外源肽的 DNA 序列插入噬菌体表面编码外壳蛋白的基因中，使大量的随机肽段以融合形式表达在噬菌体的表面。噬菌体展示技术自产生以来，以其快速、简便、高效，且表型和基因型相一致等特点，越来越广泛地被分子生物学一般实验室采用，近年来，噬菌体随机肽库已成为探索受体与配体之间相互作用结合位点、寻求高亲和力生物活性的配体分子、探测未知蛋白空间结构表位的有利工具，其在蛋白质的相互作用方面具有广泛的应用前景。蛋白质分子的结构与功能紧密相连，由于噬菌体呈现的多肽能与靶分子结合，因而通过亲和筛选可以从噬菌体随机肽库中筛选与靶分子结合的多肽，即让多肽模拟天然配体的结合部位与靶分子结合，直接测得配体与受体的结合位点。目前，利用噬菌体肽库技术已经确定了许多蛋白分子的相互作用位点，如胞浆蛋白 p47-phox 与细胞色素 b558 的结合位点^[16]、甲病毒属 E2 糖蛋白的血细胞凝集素激活区域^[17]、蛋白酶抑制剂巨球蛋白与细胞膜受体的结合位点^[18]等。

利用噬菌体随机肽库亲和筛选，选择合适的靶标分子很关键，由于人工合成的 BS 分子量较小，仅 3 个氨基酸，包被效果很差，因而笔者在前期研究时，曾使用 KLH-BS 做靶蛋白筛选，利用 KLH 载体大蛋白能有效的包被 ELISA 板，可是筛选结果很不理想，很难筛选到能特异与 BS 结合的克隆，分析原因这可能是由于 BS 与 KLH 载体大蛋白分子量相比较差异太大，即使噬菌体随机肽库中有与 BS 结合的克隆，在严格的筛选过程中也很难竞争性保存，考虑到这一点，本文选用了重组的 TRX-BS 融合蛋白作为靶蛋白，TRX-BS 融合蛋白含有 10 个拷贝的 BS 序列，大大提高了筛选机率。同时并在每轮筛选时首先进行 TRX 预筛选，以去除 TRX 蛋白干扰实验结果。保证的筛选结果的特异性。经过 4 轮筛选，随机挑取 20 个克隆，ELISA 法鉴定其亲和性，结果筛选得 10 个能与 BS 较强结合的噬菌体克隆，竞争抑制试验证实其中 2 个噬菌体克隆能特异性与 BS

结合。对阳性噬菌体克隆进行序列测定分析表明，其插入的 12 肽分别为：ACTKHLCLLQPL；MSCNDTLCLLPN；其保守序列为 LCLL。体外实验表明，2 个人工合成的 12 肽均能在一定程度上抑制 BS 与杂交瘤细胞的特异性结合，这也进一步证实杂交瘤细胞具有 BS 结合的受体，同时也提示，“LCLL”保守基序很可能是 BS 杂交瘤细胞膜受体结合位点。

参考文献

- [1] Singh J, Ling LE, Sawyer JS, et al. Transforming the TGF- β pathway: convergence of distinct lead generation strategies on a novel kinase pharmacophore for T β R I (ALK5). *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 2004, 7 (4):437-445.
- [2] Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 1997, 390 (6659):465-471.
- [3] Audhya T, Kron D, Heavrler G, et al. Tripeptide structure of bursa, a selective B cell differentiating hormone of the bursa of Fabricius. *Science*, 1986, 231: 997-999.
- [4] Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Turning off the signal desensitization of beta adrenergic receptor function. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1990, 4:2881-2889.
- [5] Palczewski K, Benovic JL. G protein coupled receptor kinases. *Trends Biochem Sci*, 1991, 16:387-391.
- [6] Schleicher S, Boekhoff I, Arriza J, et al. A beta adrenergic receptor kinase like enzyme is involved in olfactory signal termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1993, 90:1420-1424.
- [7] 缪德年, 苏小运, 姚惠娟, 等. 信号转导抑制剂对囊素刺激杂交瘤细胞抗体分泌及其 mRNA 表达的影响. *南京农业大学学报 (Journal of Nanjing Agricultural University)*, 2003, 26 (4):10-13.
- [8] Wang C, Wen WY, Su CX, et al. Bursin as an adjuvant is a potent enhancer of immune response in mice immunized with the JEV subunit vaccine. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2008, 122: 265-274.
- [9] Audhya T, Viamontes G, Babu U, et al. Bursin localization in mammalian bone marrow and epithelial cell of intrahepatic bile ducts. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1990, 31(2): 199-204.
- [10] Audhya T, King R, Goldstein G, et al. Bovine probursin tetradecapeptide contains amino acid sequence from somatostatin, tuftsin and bursin. *Life Science*, 1991, 48(8): 773-780.
- [11] Baba T, Kita M. Effect of extracts of the bursa of fabricius on IgG anti-body production in hormonally

- bursectomized chicken. *Immunology*, 1977, 32: 271-274.
- [12] Olli Lassila, John D, Lambris, Roland HG. A role for Lys-His-Gly-NH₂ in avian and murine B cell development. *Cellular Immunology*, 1989, 122: 319-328.
- [13] 侯艳红, 钱建飞, 张焕玲, 等. 法氏囊活性肽对兔瘟灭活疫苗免疫效果影响的研究. 中国养兔杂志 (*Chinese Journal of Rabbit Farming*), 2002 (2): 16-19.
- [14] 姜秀丽. 囊素三肽的定量测定及其体外生物学活性检测模型的建立. 南京农业大学硕士毕业论文, 2000.
- [15] 缪德年, 陈溥言, 张德明, 等. 囊素和法氏囊超滤物对杂交瘤细胞抗体分泌的影响. 上海农业学报 (*Acta Agriculturae Shanghai*), 2002, 18 (3): 92-95.
- [16] Deleo FR, Yu L, Burritt JB, et al. Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1995, 92(15): 7110-7115.
- [17] KuZ'micheva GA, Kuvshnov VN, Razumov IV, et al. Localization of a group specific hemagglutinating epitope of alpha virus glycoprotein E2 using a phage library. *Doklady Akademii Nauk*, 1997, 352(1): 113-116.
- [18] Birkenmeier G, Osmam AA, Kopperschlager G, et al. Epitope mapping by screening of phage display libraries of a monoclonal antibody directed against the receptor binding domain of human alpha2-macroglobulin. *FEBS Letters*, 1997, 416(2): 193-196.

Expression of bursin receptor on membranes of hybridoma cell and Identification of binding peptide of bursin from 12-merrandom phage display peptide library

Chen Wang^{1,2}, Zhanqin Zhao¹, Mingfu Niu^{1*}, Chunjie Zhang¹, Xiangchao Cheng¹, Puyan Chen²

(¹Lab of Veterinary Microbiology, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

(² Key Lab of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objective] Bursin (BS) could greatly promote the production of monoclonal antibody in hybridoma cell. We studied the interaction between BS and hybridoma cell. [Methods] Fluorescence microscopy, Laser Scanning Confocal Microscope (LSCM) and fluorescence activated cell sorter (FACS) were used. [Results] Fluorescence microscopy revealed specific binding of FITC-BS to hybridoma cell. FACS analysis demonstrated that the binding was specific, saturable and reversibility. BS was used as target protein to screen its binding peptides from 12-mer random phage display peptide library. After four rounds of biopanning, 20 phage clones were randomly selected and identified. ELISA and competitive inhibition test results indicated that 2 phage clones were identified as positive clones. The amino acid sequences analysis shown that the sequences were ACTKHLCLLQPL or MSCNDTLCLLPN, which sharing a conservative sequence LCLL. In vitro experiments suggested that the two binding peptides can inhibit BS specific binding to hybridoma cell. [Conclusion] These results confirmed that existence of BS receptor in the membrane of hybridoma cell, which involved in hybridoma cell secreting monoclonal antibody signal pathway.

Keywords: bursin; hybridoma cell; receptor; binding peptide; peptide library

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Doctor Foundation of Henan University of Science and Technology (090001397) and the National Natural Science Foundation of China (30170702)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-379-65803896; E-mail: mingfuniu@yahoo.com.cn

Received: 11 September 2009/Revised: 24 November 2009