

Cd²⁺ 结合肽的筛选及与重金属离子的亲和作用*

黄敬双 马春燕** 佟鑫 易卓林 徐柳 茆灿泉***

(西南交通大学生物工程学院 成都 610031)

摘要: 利用噬菌体随机十二肽库和亲和层析技术对重金属 Cd 进行亲和筛选, 共获得两条 Cd 结合肽序列。将展示有 Cd²⁺ 结合肽的噬菌体单克隆扩增物对不同重金属离子 (Cd²⁺、Cr²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺) 整合的树脂进行亲和测定, 结果表明 Cu²⁺、Co²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺ 对结合肽的亲合力高于 Cd²⁺ 和 Cr²⁺。抑菌解毒试验进一步确认了 Cd²⁺ 结合肽对大肠杆菌重金属的解毒作用。显微观察可见金属结合肽与金属螯合树脂混合后分散度发生改变。

关键词: 金属结合肽, 噬菌体随机肽库, 亲和层析, 筛选, Cd²⁺

中图分类号: Q7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0070-05

Selection of Cd²⁺ Binding-peptides and Their Affinities for Heavy Metal Ions*

HUANG Jing-Shuang MA Chun-Yan** TONG Xin

YI Zhuo-Lin XU Liu MAO Can-Quan***

(College of Bioengineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031)

Abstract: Selection and affinities of Cd binding peptides were assayed by phage random dodecapeptide library and affinity chromatography. Two Cd binding peptides were obtained, it was found that the affinities of Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ for Cd binding peptides were higher than that of Cd²⁺ and Cr²⁺ after detection of the amplified Cd binding peptides displayed phages to different heavy metal-charged resins; the detoxification of *E. coli* to Ni²⁺ and Cd²⁺ was enhanced when infected by Cd binding peptide displayed phages as compared with those of the control. The interaction of Cd binding peptide displayed phages with heavy metals charged resins was also observed under microscope. The work would be of great value and consequences for the study of interaction between heavy metals and proteins (peptides), as well as the detoxification and bioremediation of heavy metals.

Key words: Metal binding-peptide, Phage random peptide library, Affinity chromatography, Selection, Cd²⁺

金属结合肽、金属蛋白(酶)等金属蛋白(肽)的研究不仅始终是生物无机化学关注的主题之一,也是当今国际生命科学研究的热点^[1]。目前用于研究的金属结合肽、金属蛋白(酶)主要来自生物体、人工合成和生物文库筛选等途径。本工作利用噬菌体随机肽库和展示技术^[2]、金属亲和层析等方法对 Cd²⁺ 结合肽进行筛选和重金属离子亲和作用研究。

1 材料与方法

1.1 噬菌体随机十二肽原库

滴度: 1.5 × 10¹³ pfu/mL, 宿主细菌 ER2738, 购自 New England Biolabs 公司。噬菌

* 国家自然科学基金 (No. 30270041)

西南交通大学科学研究基金 (No. 2005B17)

国家中医药管理局项目 (No. 04-05ZL19)

** 马春燕同为第 1 作者

*** 通讯作者 Tel: 028-87634296, Fax: 028-87600185, E-mail: maocq@swjtu.edu.cn

收稿日期: 2005-12-26, 修回日期: 2006-01-23

体的培养、滴度测定、扩增以及 DNA 单链模板制备见 Biolab Phage 12-peptide Library 手册^[3]。

1.2 树脂

1.2.1 Ni-NTA 树脂的去 Ni²⁺ 处理: 吸取等体积的 Ni-NTA Agarose 树脂 (美国 Invitrogen 公司), 用 TBS (150 mmol/L Tris · Cl, 150 mmol/L NaCl) 洗树脂 2 次, 加入 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 洗 2 次, 最后用 0.1% TBST (TBS, 0.1% Tween-20) 洗 3 次, 分装 Ep 管, 4℃ 保存。

1.2.2 去 Ni²⁺ 的 Ni-NTA 树脂的 Cd²⁺ 加载: 取装有去 Ni²⁺ 的 Ni-NTA 树脂的 Ep 离心管 1 支, 加入 Cd²⁺ 处理过夜, 离心, TBS、0.1% TBST 依次洗 3 次。分装, 4℃ 保存。Cd²⁺ 处理和未处理的树脂分别命名为 M⁺ 和 M⁻, M 表示 Cd²⁺。

1.2.3 Hitrap Chelating 树脂处理: 方法与 Ni-NTA 树脂处理相似。吸取等体积 Hitrap Chelating 树脂 (美国 Pharmacia Biotech 公司), 分别加载足够量和浓度的各种重金属离子 (Cd²⁺, Cr²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺) 过夜, 离心, TBS 和 0.1% TBST 洗涤, 分装, 4℃ 保存。加载重金属离子记为 M⁺, 未加载为 M⁻, 各种重金属化合物均为分析纯以上纯度。

1.3 Cd²⁺ 结合肽的噬菌体随机肽库筛选

1.3.1 咪唑 ID 洗脱法: 取 M⁺ 和 M⁻ Ep 管各一支, BSA (1mg/mL) 150r/min 封闭 1h, 2000r/min、离心 20s, 加入 5 × 10¹⁰ pfu 的噬菌体随机十二肽原库, 150r/min 孵育 1h, 离心, 依次用 0.1% TBST、20mmol/L ID 各洗 2 次, 0.1% TBST 洗 5 次, 最后用 300μL, 200mmol/L 的 ID 洗脱, 重复 1 次。合并两次洗脱液。噬菌体滴度测定或扩增, 计算噬菌体滴度和 P/N 值, 进入下一轮筛选。

$P/N \text{ 值} = M^+ \text{ 树脂噬菌体洗脱滴度} / M^- \text{ 树脂的噬菌体洗脱滴度}。$

1.3.2 甘氨酸 pH 梯度洗脱法: 与 1.3.1 相似, 不同的是用 0.2 mol/L 的甘氨酸 (pH 2.2) 作为洗脱液。

1.4 Cd²⁺ 结合肽对不同金属螯合树脂的亲和力测定

步骤同 1.3, 不同的是将加入的噬菌体原库替代为筛选获得的 Cd 结合肽展示噬菌体单克隆扩增物。

1.5 DNA 序列测定

由上海博亚生物技术有限公司 3730 自动测序仪测定。

1.6 Cd²⁺ 结合肽的抑菌解毒测定

预实验确定噬菌体稀释倍数, 使 LB 平板上噬菌体克隆数在 500 ~ 1,000 之间。制备噬菌体培养 LB 平板, 加入预先打孔和高压灭菌的滤纸圆片 (每平板 3 个滤纸片, 直径 13mm), 在滤纸片上滴加 10μL 一定浓度 Ni²⁺ 或 Cd²⁺, 10min 后倒置培养过夜, 测定抑菌圈直径, 确定抑菌能力, 揭示解毒作用。

$S_n \text{ (抑菌能力)} = D_n \text{ (抑菌圈直径)} - 13, n: \text{噬菌体的克隆号}。$

1.7 金属结合肽-树脂的显微观察

载玻片上滴加 50μL 待观察的金属螯合树脂和/或树脂-噬菌体, 倒置显微镜观察并照相记录。

2 结果

2.1 Cd^{2+} 结合肽的噬菌体随机肽库筛选

以 ID 和 Gly 为洗脱液分别经过 5 和 4 轮筛选, 洗脱物滴度测定结果见图 1。可见无论是用 ID 还是 Gly 洗脱, 尽管存在差异, 但随着筛选轮数的增加噬菌体均得到富集。

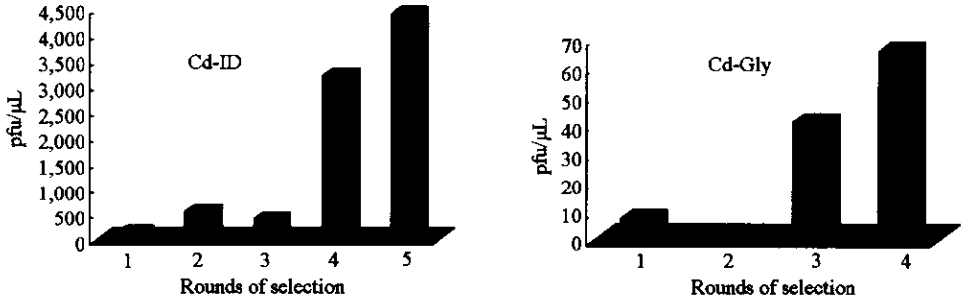


图 1 噬菌体在 Cd^{2+} 结合肽筛选中的富集

Cd-ID: 咪唑洗脱法, Cd-Gly: 甘氨酸洗脱

2.2 Cd^{2+} 结合肽序列测定

分别挑取 Cd-ID 筛选第 4、5 轮和 Cd-Gly 筛选第 3、4 轮共 10 个噬菌体单克隆, 经扩增、制得单链 DNA, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, DNA 测序, 共得到 9 条序列。获得的 DNA 序列翻译为氨基酸序列后的结果见表 1。

表 1 金属结合肽的测序

Number	Sequence	Round	Repeats in every round
1	KSLSRHDHIIHHH	4, 5 (Cd-ID)	4
2	IFMESLPRLGMMH	5 (Cd-ID)	1
3	KSLSRHDHIIHHH	3, 4 (Cd-Gly)	4

2.3 Cd^{2+} 结合肽亲和测定

将展示有 Cd^{2+} 结合肽的噬菌体单克隆扩增物对不同重金属离子 (Cd^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+}) 螯合的树脂进行亲和测定, 结果见图 2。可见 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 等金属离子与 Cd^{2+} 结合肽的亲和力相对较高, 而 Cd^{2+} 结合肽对 Cd^{2+} 和 Cr^{3+} 的亲和力则较低, 并且 1 (3) 号序列的克隆对各种金属螯合树脂的亲合能力显著高于 2 号。

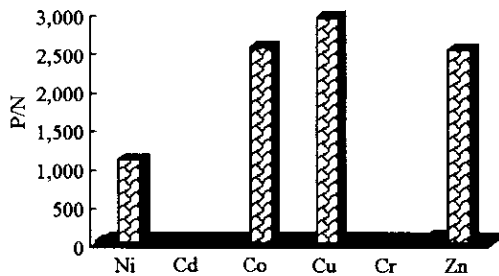


图 2 金属结合肽展示噬菌体克隆对不同金属螯合树脂的亲亲和测定

■ No. 2, ▨ No. 1 (3)

2.4 Cd²⁺ 结合肽对重金属抑菌效应的解毒作用

以 M13 噬菌体和大肠杆菌 ER2738 为对照, 采用抑菌圈实验法测定 Cd²⁺ 结合肽展示噬菌体对重金属抑菌效应的解毒作用。将抑菌圈直径 (D_n) 减去滤纸片直径 (13mm), 所得结果见图 3。可见装载有 Cd²⁺ 结合肽的噬菌体比装载空白 M13 的 *E. coli* 在梯度浓度 Ni²⁺/Cd²⁺ 处理下抑菌圈要小, 比空白 *E. coli* 的抑菌圈更小, 显示了在一定重金属浓度下的解毒能力。

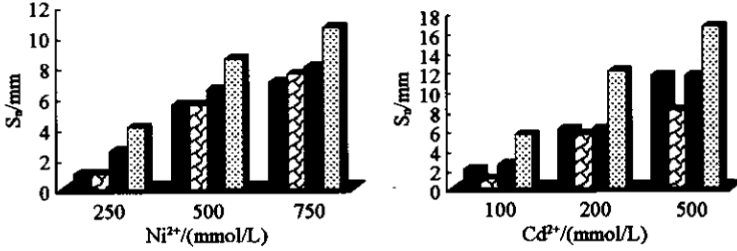


图3 金属结合肽对重金属抑菌效应的解毒作用

■ No. 2, ▨ No. 1 (3), ■ M13, ▩ ER2738

2.5 噬菌体-树脂结合形态的显微观察

在分辨率 0.26 μm 的显微镜下观察放大 100 倍的 Cd²⁺ 结合肽展示噬菌体-树脂的形态, 以结合 M13 噬菌体的树脂和空白金属螯合树脂作为对照, 见图 4。可见 Cd²⁺ 结合肽展示噬菌体-树脂与对照树脂相比更分散。

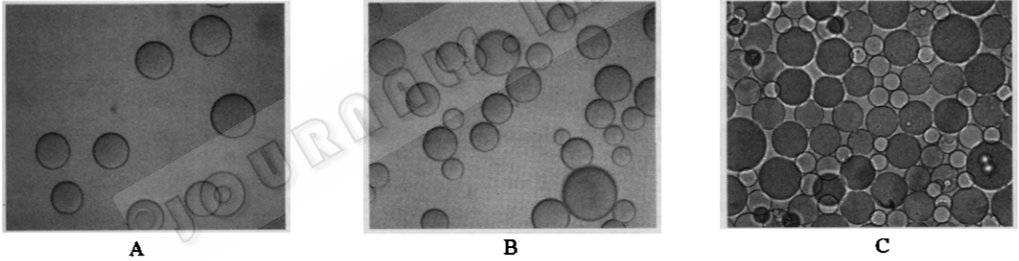


图4 结合 M13 噬菌体树脂的显微观察 (100 ×)

A M13-树脂, B Cd²⁺ 结合肽展示噬菌体-树脂, C 树脂

3 讨论

利用噬菌体随机肽库和展示技术筛选高亲和力金属结合肽并用于各种研究, 国外自 90 年中期有多篇研究报道^[4]。但 Cd²⁺ 高效结合肽的获得以及其与金属离子的相互作用研究, 则少有报道。国内工作也刚开始几年。从筛选结果来看, 获得的一条 Cd²⁺ 结合肽序列 No. 1 (3), 其不仅重复出现频率极高 (分别为 4/5 和 4/4), 并且该序列之前获得的一条 Ni²⁺ 结合肽序列完全相同 (共重复 10 次)。需要指出的是, 与以前曾获得的 Ni²⁺, Co²⁺ 等金属结合肽类似, 该序列也富含多个 His。这是非常可以理解的, 众所周知, His 是金属蛋白 (酶) 中金属结合结构域的重要氨基酸之一, 多篇研究报道证实了在金属结合肽中富含 His^[5-7], 并且, 六聚 His 标签早已被用于蛋白质的分离和纯化。

从表 1 可以发现, 序列 1 (3) 含有 5 个 His, 序列 2 只含有 1 个 His, 序列 1 (3) 的克隆与金属离子 (Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺) 的亲和力高于序列 2 克隆, 这一结果也与 1975 年 Porath 发现的含有 4 个 His 的多肽对于 Zn²⁺ 有强的亲和力, 5 个或 6 个 His

亲和力则更强的结论相符合^[8]。值得注意的是无论是 Ni、Co 金属离子的筛选, 还是获得的 Cd²⁺ 结合肽, 在获得的多肽序列组成中均未发现 Cys。众所周知, 在重要的金属蛋白如锌指结构和金属硫蛋白 (MTs) 中, Cys 发挥着重要的作用。这可能与筛选条件下 Cys 残基难以存在有关。

在元素周期表中, Zn、Cu、Ni 和 Co 共处于第四周期, 位置相连, 性质相近, 因此序列 1 (3) 和序列 2 的克隆对该四种金属离子均表现较高的亲和力, 而 Cd 和 Cr 分别是第五周期 II B 族 48 号和第四周期 VI B 族 24 号元素, 与前 4 种元素在元素周期表上相差较远, 实验结果也与之相符, 表现为低的亲和力。

这与推测一致, 重金属抑菌解毒试验和显微观察显示了金属结合肽与金属离子的亲和作用, 展示有金属结合肽的噬菌体确实可以降低重金属离子对大肠杆菌的毒性, 表现为抑菌圈的显著减小。

4 结语

获得高效金属结合肽, 尤其是 Cd 等微量而高毒性的重金属结合肽意义非常重大。本工作作为尝试, 开展了 Cd²⁺ 高效结合肽筛选和亲和作用的研究工作, 相信对于相关领域工作的开展, 金属结合肽的亲和分析, 金属与多肽的相互作用关系的理论探索以及重金属污染的修复, 均具有一定的意义和价值。

参 考 文 献

- [1] Stanley J O, Tara M D, Gianluigi V. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, **6**: 217 ~ 223.
- [2] Benhar I. *Biotechnology Advances*, 2001, **19** (1): 1 ~ 33.
- [3] Ph. D. -12 Phage display peptide library kit, instruction manual, New England Biolabs, version 2.7.
- [4] 徐 柳, 宋 琴, 茹灿泉. *中国生物工程杂志*, 2004, **24** (4): 39 ~ 42.
- [5] Chen Y, Pasquinelli R, Ataa M, *et al.* *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1999, **76**: 211 ~ 220.
- [6] Mejare M, Ljung S, Low L B. *Protein Engineering*, 1998, **11** (6): 489 ~ 494.
- [7] Marios M, Artur K, John C. *Journal of Molecular Liquids*, 2005, **118**: 119 ~ 129.
- [8] Porath P, Carlsson J O. *Nature*, 1975, **258**: 598 ~ 599.