

# 脑膜炎大肠杆菌 IbeA 蛋白结合肽序列的亲筛选\*

曹虹<sup>1,3</sup> 林琳<sup>1</sup> 刘北一<sup>2</sup> 陈丽丹<sup>1</sup> 杨军<sup>1</sup>

(南方医科大学公共卫生与热带医学学院微生物学教研室 广州 510515)<sup>1</sup>

(南方医科大学基础医学院免疫学教研室 广州 510515)<sup>2</sup> (南方医科大学生物技术学院 广州 510515)<sup>3</sup>

**摘要:** 应用噬菌体展示肽库技术, 以重组的脑膜炎大肠杆菌致病蛋白 IbeA 作为靶分子, 经过吸附-洗脱-扩增-再吸附的亲筛选, 随机挑选亲和力和强的噬菌体克隆, 进行 ELISA、竞争抑制实验和序列测定。结果显示, 经 3 轮淘选后, 间接 ELISA 鉴定得到高亲和性结合 IbeA 蛋白的 15 个阳性克隆。竞争抑制实验结果表明, 游离 IbeA 蛋白能竞争抑制噬菌体结合肽克隆与固相包被的 IbeA 蛋白的结合, 其抑制作用随游离 IbeA 蛋白浓度的降低而减弱。测序结果得到 5 种阳性噬菌体克隆展示肽序列。上述结果提示以脑膜炎大肠杆菌 IbeA 蛋白为靶筛选所获得的噬菌体 12 肽克隆, 具有特异性, 其结合肽序列呈现相对保守性。建立的从噬菌体随机肽库筛选 IbeA 蛋白结合肽的方法具有方便、灵活和高效可行的特点。

**关键词:** 噬菌体展示肽库, 脑膜炎大肠杆菌 IbeA 蛋白, 结合肽, 亲和筛选

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2006) 05-0101-06

## Screening of Peptides Binding to IbeA Protein of Meningitic *E. coli*\*

CAO Hong<sup>1,3\*\*</sup> LIN Lin<sup>1</sup> LIU Bei-Yi<sup>2</sup> CHEN Li-Dan<sup>1</sup> YANG Jun<sup>1</sup>

(Department of Microbiology, School of Public Health and Tropical Medicine,  
Southern Medical University, Guangzhou 510515)<sup>1</sup>

(Department of Immunology, School of Basic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515)<sup>2</sup>

(School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515)<sup>3</sup>

**Abstract:** The recombinant meningitic *E. coli* IbeA protein was used as a target to screen specific IbeA binding-peptide from 12-mer phage display peptide library for three rounds of biopanning. The affinity and specificity of selected polypeptide were evaluated by ELISA, competitive inhibition assay and DNA sequencing. 15 of positive phage clones were of high affinity and specific to target protein. The competitive inhibition assay result showed that the soluble IbeA could block the binding between phage display peptide clone and solid phase IbeA protein, and the competitive inhibition rate dropped gradually as the concentration of IbeA protein fell. Sequence analysis showed relatively conservative and diverse sequences in the phage display peptide. These results suggest that the successful selection of IbeA binding-peptide phage clones could provide a convenient, flexible and high throughput screening for binding epitope from phage random display peptide library.

**Key words:** Phage display peptide library, Meningitic *E. coli* IbeA protein, Binding-peptide, Affinity screening

噬菌体随机肽库 (Phage display peptide library) 是近年来新兴的一门用于筛选功能性多肽的生物技术, 其基本原理是将随机肽段插入噬菌体衣壳蛋白上形成融合蛋白而呈现出来, 并利用噬菌体能大量复制的特点, 得到多拷贝的不同重组噬菌体, 为研究

\* 广东省自然科学基金重点项目 (No. C020094)

其他作者: 贡德基<sup>1</sup> 李明<sup>3</sup>

通讯作者 Tel: 020-62789123, E-mail: gzhcao@fimmu.com

收稿日期: 2005-12-28, 修回日期: 2006-06-06

提供有用的工具。目前此项技术在研究蛋白质间相互作用、寻找酶和受体的激动剂和拮抗剂<sup>[1-4]</sup>、研制新型诊断试剂<sup>[5, 6]</sup>和疫苗<sup>[7]</sup>以及寻找抗感染治疗新方法等研究<sup>[8]</sup>中都得到广泛应用。本文以在脑膜炎大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 穿透血脑屏障中起重要作用的 IbeA 蛋白作为靶分子亲和筛选噬菌体线性 12 肽库, 以期获得能够与 IbeA 蛋白结合的噬菌体 12 肽克隆展示肽。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

亲和筛选用 IbeA 重组蛋白<sup>[9]</sup>由黄胜和教授(美国南加利福尼亚大学洛杉矶儿童医院)惠赠, 鉴定用 IbeA 重组蛋白由本室制备, 经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定其生物活性, 置-20℃保存备用。噬菌体随机 12 肽库试剂盒(Ph. D-12 phage display peptide library)为美国 New England Biolabs 公司产品, 肽库滴度为  $1.5 \times 10^{13}$  pfu / mL, 随机多样性为  $2.7 \times 10^9$ , 受体菌为 ER2738; 测序引物为 5' - <sup>14</sup>C CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'。辣根过氧化物酶标记的抗 M13 抗体购自北京鼎国生物技术公司(Pharmacia 公司产品), 噬菌体单链 DNA 提取试剂盒为北京百泰克生物制品公司产品。其他均为国产分析纯试剂。

### 1.2 噬菌体 12 肽库的亲和筛选

**1.2.1 淘选 (panning):** IbeA 蛋白按 10 μg/mL 稀释, 体积为 100 μL, 4℃ 孵育过夜。用封闭液 [0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> (pH8.6), 5 mg/mL BSA] 加满每孔, 4℃ 封闭 60 min。用 TBST [0.1% (v/v) Tween20, TBS] 快速洗涤 6 次。每孔加 10 μL 噬菌体肽库 ( $1.5 \times 10^{11}$  pfu/mL) 和 100 mL TBST, 于室温静置 60 min。去掉未结合的噬菌体, 用 TBST 洗涤 5 次, 每孔加入 100 μL 甘氨酸溶液 (0.2 mol/L 甘氨酸-盐酸 (pH2.2), 1 mg/mL BSA), 轻摇 8 min, 取洗脱液至微量离心管中, 再加 1 mol/L Tris-HCl (pH9.1) 15 μL 中和。取 1 μL 洗脱物用于噬菌体扩增和滴度测定。第 2、3 轮淘选保持靶分子投入量不变, TBST 中 Tween20 的含量增加至 0.5%, 其余步骤同第 1 轮筛选。

**1.2.2 噬菌体滴度测定:** 用 LB 对筛选的洗脱液做  $10^2$ 、 $10^4$ 、 $10^6$  稀释后, 取稀释液 10 μL 与 200 μL 过夜培养的 ER2738 宿主菌 ( $OD_{600}$  为 0.8) 混匀, 室温感染 5 min, 转入含 3 mL 预先加热融化的顶层琼脂中, 快速混匀后倒入含 50 μg/mL 四环素的 IPTG/X-gal LB 琼脂板中, 37℃ 培养过夜。计数噬菌斑和噬菌体滴度。噬菌体滴度 (pfu/mL) = 噬斑数  $\times 10^2 \times$  稀释倍数。

### 1.3 阳性克隆的鉴定

采用间接 ELISA 法进行阳性克隆的鉴定: 将 IbeA 重组蛋白用 pH 9.6 的碳酸钠缓冲液稀释为 10 μg/mL, 每孔 50 μL, 4℃ 孵育过夜。同时设立空白对照和阴性对照(肽库原库)。用 0.1% PBST 稀释的 10% 小牛血清封闭 2h; 加入 1:2 稀释的噬菌斑扩增液(滴度约  $10^{11}$  pfu/mL), 37℃ 孵育 1h; 加入 50 μL HRP-抗 M13 抗体 (1:5000 稀释), 37℃ 孵育 30 min; 加入底物邻苯二胺 (*o*-PD) 溶液, 充分显色后用 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。在 ELISA 检测仪上读取 490 nm 波段的吸光度值 (A 值), 大于参考阴性 A 值 3 倍的克隆判为阳性。

### 1.4 竞争抑制实验

以 IbeA 重组蛋白 (10~20 μg/mL) 50 μL/孔包被固相板, 4℃ 过夜, 5% BSA 封闭

0.5 h, 0.5% TBST 洗板 5 次; 将游离 IbeA 蛋白系列稀释为 100 μg/mL、10 μg/mL、1 μg/mL、0.1 μg/mL 和 0.01 μg/mL 各取 25 μL 与 25 μL 噬菌体培养上清 37°C 预先作用 1 h 后, 并以 0.25% 的 BSA-PBS 为无抑制物对照, 再加入包被好的固相板中, 37°C 作用 30 min, TBST 洗板, 依次加入抗 M13 单克隆抗体、HRP-羊抗鼠单抗, 每步均 37°C 作用 30 min, TMB 显色, 测定  $A_{450\text{nm}}$ , 计算抑制率。

### 1.5 阳性噬菌体克隆 DNA 的提取

挑取 A 值较高的 15 个阳性噬菌体克隆按试剂盒说明书方法提取 DNA。扩增阳性噬菌体克隆, 取 200 μL 含噬菌体上清, 加 200 μL PEG / NaCl, 充分混匀, 室温静置 10 min, 离心 10 min, 去上清; 沉淀重悬于 100 μL 碘化物缓冲液中, 加入 250 μL 乙醇, 室温温育 10 min, 离心 10 min, 去上清, 70% 乙醇洗涤, 真空干燥后重悬于 30 μL TE 缓冲液中, 取 5 μL 用 0.7% 琼脂糖电泳观察纯化效果。

### 1.6 阳性噬菌体克隆 DNA 序列测定

取 10 μL DNA 测序模板送大连宝生物公司全自动测序, -96 g III 测序引物: 5' -<sup>32</sup>P-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'。根据 DNA 序列用 DNASTar 软件推导其所编码的氨基酸序列, 并对所得的氨基酸序列在基因库中进行广义的相似性比对和氨基酸成分分析。

## 2 结果

### 2.1 十二肽阳性噬菌体克隆的筛选

在 3 轮筛选中, 我们保持包被的 IbeA 蛋白浓度及噬菌体投入量, 目的是最大限度地捕获结合的噬菌体克隆, 然而从筛选的结果来看, 第 3 轮筛选的富集效果并不明显(表 1), 推测与筛选压力较低有关。

表 1 亲和筛选中 12 肽噬菌体克隆的富集

Biopanning round	Input phages (pfu)	Output phages (pfu)	Recovery (%)
1	$2 \times 10^{11}$	$1.1 \times 10^5$	$5.5 \times 10^{-7}$
2	$2 \times 10^{11}$	$2.5 \times 10^6$	$1.3 \times 10^{-5}$
3	$2 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^{-5}$

### 2.2 阳性克隆的 ELISA 检测

第 3 轮筛选结束后, 从滴定 IPTG/X-gal LB 平皿上随机挑取分隔良好的蓝色噬菌斑, 经 ER2738 扩增后, 收集重组噬菌体上清, 制备噬菌体原种。以噬菌体原库为阴性

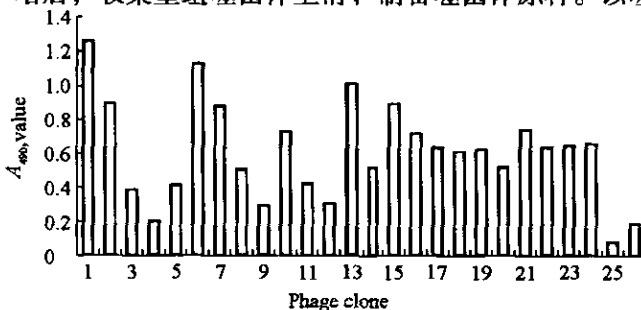


图 1 12 肽阳性噬菌体克隆与 IbeA 的结合的 ELISA 检测

1 ~ 24 Phage clones, 25 Unrelated phage clone as negative control, 26 12-mer peptide library

对照, 进行间接 ELISA 检测。以 HRP-抗 M13 作为显色系统, 结果显示 24 个克隆中有 15 个克隆呈阳性反应, 筛选的阳性率为 62.5%, 多克隆噬菌体展示多肽与 IbeA 蛋白的结合活性随着每轮淘选而逐步提高, 各轮筛选到的噬菌体克隆与 IbeA 蛋白的结合活性明显优于阴性对照的噬菌体原库与 IbeA 反应活性 (图 1)。说明经 3 轮淘选后, 已获得特异性结合 IbeA 的噬菌体展示多肽。

### 2.3 游离 IbeA 蛋白竞争抑制实验

将游离 IbeA 蛋白预先和噬菌体 12 肽克隆作用后, 再与固相板中包被 IbeA 蛋白反应。游离 IbeA 蛋白可竞争抑制噬菌体 12 肽克隆和包被 IbeA 蛋白的结合, 以此鉴定阳性噬菌体克隆展示肽结合 IbeA 的特异性。结果表明, 随着游离 IbeA 浓度降低, 其抑制阳性噬菌体和包被 IbeA 结合的作用也随之降低 (图 2), 而与包被 IbeA 结合的阳性噬菌体量逐渐增加, 其 IC<sub>50</sub> 约为 10mg/L, 说明此噬菌体克隆可与游离 IbeA 竞争结合固相 IbeA 蛋白, 因此推测筛选所得的短肽可以模拟 IbeA 受体表位结构。

### 2.4 阳性噬菌体克隆单链 DNA 的纯化

随机挑取 24 个阳性噬菌体克隆, 扩增后提取噬菌体单链 DNA, 提取的 DNA 用琼脂糖电泳鉴定, 结果显示其 DNA 分子量大小约为 6,000bp, 与预期结果一致 (图 3)。

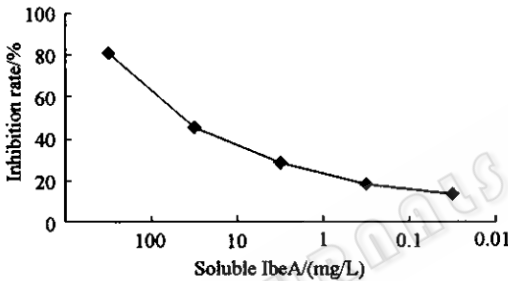


图 2 游离 IbeA 竞争抑制 IbeA 结合肽克隆结合固相 IbeA

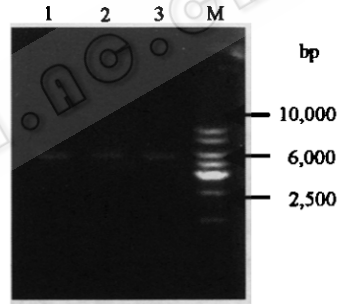


图 3 噬菌体单链 DNA 的琼脂糖凝胶电泳鉴定  
1-3 Phage single-stranded DNA,  
M DNA marker DL 10000

### 2.5 阳性噬菌体克隆 DNA 序列测定及编码氨基酸序列分析

对亲和力较高的 15 个阳性噬菌体克隆进行 DNA 序列测定, 根据对阳性克隆 DNA 测序结果推导这些 DNA 序列编码的氨基酸残基, 即为噬菌体展示 12 肽序列。测序结果显示 15 个阳性克隆有 5 种展示多肽序列, 其中 8 个克隆展示多肽含有相同的氨基酸序列 HWDPFSL SAYFP (命名为 HP12), 占测序克隆数的 53.3%, 经 BLAST 软件短肽序列比对, 首次发现 HP12 第 5~11 位氨基酸与小鼠和人的双特异性蛋白磷酸化酶 (Dual specificity protein phosphatase 3, DUS3) 的第 96~102 位氨基酸的同源性都是 85%; HP12 第 7~12 位和第 7~10 位氨基酸分别与大肠杆菌的多药物抗性蛋白 (Multidrug resistance protein, mdmF) 的第 313~318 位和第 799~802 氨基酸的同源性都为 100%; 并且此序列与补体经典激活通路的启动分子 C1q 结合肽的 12 个氨基酸序列完全一致, 说明存在于多种蛋白中的此序列相当保守。另外 4 个克隆也得到了相同的展示肽序列 TSNVLT SKWLAT, 占测序克隆数的 26.7%, 其它 3 个克隆的序列分别是 ASPPQSKWT-KIP、ATWSHLLSAGL 和 NPWTSERLPLPQ。这些阳性克隆的短肽序列中均含有较多的 S (X) 序列和 S、P、和 L 残基 (表 2), 说明这些序列和残基可能是构成 IbeA 蛋白结

合表位骨架结构最基本的序列模体和残基。

表2 阳性噬菌体克隆12肽氨基酸成分分析

Sequence	Isoelectric point	Charge at pH7	Acidic amino acid	Polar amino acid	Hydrphobic amino acid
HWDPF <u>S</u> LSAYFP	5.09	-0.92	1	5	7
T <u>S</u> NVLT <u>S</u> KWLAT	6.24	-0.09	0	7	5
A <u>S</u> PPQ <u>S</u> KWTKIP	10.01	1.907	0	6	6
ATW <u>S</u> HHI <u>S</u> SAGL	7.32	0.24	0	6	6
NPWT <u>S</u> ERLPLPQ	6.24	-0.09	1	6	6

### 3 讨论

1985年Smith<sup>[10]</sup>在对丝状噬菌体的分子生物学研究基础上首次建立了的噬菌体展示技术。噬菌体随机肽库<sup>[11]</sup>是由大量带有不同肽段的单个噬菌体组成的重组噬菌体库,通过目标分子来筛选与其相互作用的噬菌体多肽,并分析所筛选到的多肽序列和结构,为蛋白质分子之间的相互作用机制提供理论依据。在噬菌体展示肽库的筛选中,目前应用最为广泛的是表位确定以了解分子与分子之间的作用关系<sup>[2]</sup>。传统的表位研究大都通过物理化学降解方法筛选,费时费力,且成本昂贵。噬菌体肽库技术的引入大大简化了这一过程,并且在疾病诊断试剂、分子药物和疫苗的研制中展现出巨大的应用潜力。Thompson等<sup>[12]</sup>用此技术筛选到与HIV-1包膜蛋白gp120结合的噬菌体多肽,且此多肽能抑制gp120与CD4受体的结合。脑膜炎*E. Coli* K1株致病蛋白IbeA在介导细菌侵入血脑屏障引起细菌性脑膜炎中起关键作用。研究表明<sup>[13,14]</sup>,IbeA能与人脑微血管内皮细胞(BMEC)表面受体结合进入BMEC,其中受体参与了IbeA介导的信号传导和脑膜炎*E. coli*侵入血脑屏障。因此,研究能够与致病蛋白IbeA结合的分子结构或受体表位结构,无论对于理解其致病机制,还是寻找潜在的拮抗剂都具有重要价值。

本文以IbeA蛋白为靶亲和筛选噬菌体线性12肽库。在筛选分子的选择上,我们利用原核表达载体pET28a表达的带有6个连续组氨酸标签的融合蛋白,不仅使目的蛋白易于纯化,且由于融合片段小,对目的蛋白结构和功能影响较小,因而较适合筛选随机肽库。在筛选过程中,第2和第3轮加大洗脱液中吐温的浓度,以减少非特异性吸附和亲和力低的克隆,可获得高亲和力的噬菌体克隆。经3轮噬菌体线性12肽库筛选,间接ELISA鉴定噬菌体展示肽的结合活性,共获得15个与IbeA蛋白结合活性较高的阳性克隆。利用游离IbeA蛋白进行竞争抑制实验的结果提示噬菌体克隆展示肽能特异性结合IbeA蛋白,且结合位点可能与IbeA受体表位结构具有相似性。阳性克隆测序结果表明,15个阳性克隆得到5种展示多肽序列,这些序列呈现出相对保守性和多样性,其多样性可能反映IbeA受体功能多样性,而相对保守的序列则可能是与IbeA结合的特异性的保证。其中8个克隆得到完全一致的氨基酸序列HWDPFSLSAYFP,此序列与天然蛋白(小鼠和人的双特异性蛋白磷酸化酶及大肠杆菌的多药物抗性蛋白)有高度同源序列,并且与补体经典激活途径的始动分子C1q结合肽序列的12个氨基酸残基序列完全相同<sup>[15]</sup>,提示补体系统(尤其是C1qR)可能参与了IbeA的致病过程。

总之,本研究应用噬菌体展示随机肽库技术筛选到与脑膜炎大肠杆菌IbeA蛋白结合的12肽噬菌体克隆,其结合肽具有特异性,从而为后续研究奠定了基础,此筛选方法具有方便、灵活和高效可行的特点。

致谢 衷心感谢本校基础部免疫学教研室富 宁主任和刘北一老师在肽库筛选方面给予的指导和帮助!

### 参 考 文 献

- [1] Pillutla R C, Hsiao K C, Beasley J R, *et al.* J Biol Chem, 2002, 277 (25): 22590 ~ 22594.
- [2] Hsiao K C, Brissette R E, Wang P, *et al.* Proteome Sci, 2003, 1 (1): 1 ~ 10.
- [3] 张小光, 药力波, 刘新平, 等. 生物化学和生物物理学报, 2000, 32 (5): 475 ~ 479.
- [4] 刘艳军, 罗海波, 朱 平, 等. 生物化学和生物物理进展, 2005, 32 (6): 523 ~ 528.
- [5] 王 慧, 荫 俊. 微生物学通报, 2005, 32 (1): 22 ~ 25.
- [6] 王 慧, 史 晶, 孟露露, 等. 微生物学通报, 2005, 32 (4): 11 ~ 14.
- [7] Manoutcharian K, Gevorkian G, Cano A, *et al.* Biotechnol, 2001, 2 (3): 217 ~ 223.
- [8] Barbas C F, Kang A S, Lerner R A. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88 (18): 7978 ~ 7982.
- [9] Huang S H, Wan Z S, Chen Y H, *et al.* J Infect Dis, 2001, 183: 1071 ~ 1078.
- [10] Smith G P. Science, 1985, 228 (4705): 1315 ~ 1317.
- [11] Smith G P. Method in Enzymology, 1993, 217: 228 ~ 257.
- [12] Thompson J, Pope T, Tung J S, *et al.* J Virol, 1999, 73: 5795 ~ 5802.
- [13] Cossart P. Trends Microbiol, 2001, 9: 105 ~ 107.
- [14] Prasadarao N V, Wass C A, Stins M F, *et al.* Infect Immun, 1999, 67: 577 ~ 583.
- [15] 李文君, 谭 艳, 陈政良. 免疫学杂志, 2004, 20 (6): 420 ~ 423.