

噬菌体展示技术体内筛选小鼠肾脏特异性多肽

阳艳丽¹, 王自正²

(1. 东南大学附属中大医院, 江苏南京 210009; 2. 南京医科大学附属南京市第一医院, 江苏南京 210006)

[摘要] 目的 利用噬菌体随机多肽文库对小鼠进行体内筛选, 获得小鼠肾脏血管特异性多肽。方法 将噬菌体多肽文库经尾静脉注射入小鼠体内, 循环10 min后进行心脏灌注, 收获小鼠肾脏, 经过洗涤研磨后得到与肾脏血管特异性结合的噬菌体, 该噬菌体体外扩增后被用于下一轮筛选, 三轮筛选后随机挑取24个阳性噬菌体克隆送测序, 并分析这些序列之间的共同序列。结果 经过三轮筛选, 特异性结合于小鼠肾脏血管的噬菌体得到富集, 测序结果显示多肽序列VSASYHR出现的概率最大(62.5%), 其次为GQWGARG(25.0%)。结论 利用噬菌体多肽文库对小鼠进行体内筛选可以得到小鼠肾脏血管特异性多肽。

[关键词] 噬菌体体内展示; 肾脏特异性多肽; 多肽筛选; 随机多肽文库

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2008)04-0248-04

Selecting kidney specific peptides of mice by phage display in vivo.

YANG Yan-li¹, WANG Zi-zheng² (1. Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu, China; 2. Nanjing Clinical Nuclear Medicine Center, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective** Selecting kidney vascular specific peptides of mice in vivo with phage peptide libraries. **Methods** After phage peptide library was injected in mouse by intravenous injection and heart perfusion was carried out after 10 minutes, kidney was harvested. Kidney vascular specific peptides which were used in the next screening were obtained after washing, grinding and amplification in vitro. After three circulations, DNAs were extracted from 24 single clones and were sequenced. Sequences were analysed to determine the collective sequence. **Results** After three circulations, phages specific to kidney vascular were enriched. The result of sequencing revealed that VSASYHR was most frequent (62.5%). Next was GQWGARG (25.0%). **Conclusion** It is feasible to obtain kidney specific peptides with phage display in vivo.

[Key words] Phage display in vivo; Kidney specific peptides; Peptide screening; Random peptide libraries

噬菌体展示技术最早是在1985年由Smith等人提出, 它是一项将外源的重组肽、蛋白质包括抗体片段融合到噬菌体衣壳蛋白上的基因技术。到目前为止, 利用噬菌体体内展示策略已经成功筛选到结合于小鼠正常组织^[1-2]、肿瘤异种移植植物^[3]甚至是人类组织^[4]血管特异性靶向分子。本研究旨在利用噬菌体展示体内筛选技术获得小鼠肾脏血管特异性多肽,

为肾脏病的靶向诊断和治疗提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂 6~8周龄健康雌性SPF级Balb/c小鼠, 购自南通大学医学院。噬菌体多肽文库试剂盒Ph. D. -C7CTM及受体菌(ER2738)购自美国New England Biolabs公司。蛋白酶抑制剂(protein inhibitor, PI); 抑蛋白酶肽(aprotinin)、亮抑制肽(leupeptin)及苯甲基磺酰氟(PMSF), 购自Amresco公司。异丙基-β-D-硫代半乳糖(IPTG), 5'-

作者简介: 阳艳丽(1982-), 女, 湖南株洲人, 医学硕士, 从事临床检验工作。

溴-4'-氯-3'-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)购自 Amresco 公司。M13 单克隆抗体购自 General Electric 公司。辣根过氧化物酶连接的羊抗鼠 IgG 抗体(HRP-IgG)购自 SantaCruz 公司。

1.2 小鼠的体内筛选 将 2×10^{11} pfu (plaque forming units) 的噬菌体原始文库经尾静脉注射入乙醚麻醉的 Balb/c 小鼠,循环 10 min 后,心脏灌注 50 ml TBS,收获其肾脏。用含有 aprotinin、leupeptin 和 PMSF 的 TBS 研磨,研磨后的组织匀浆用含有 50 g/L BSA 的噬菌体洗涤液洗涤,4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 rpm 离心 10 min,小心弃掉上清液,沉淀的组织再洗涤,重复三次后重悬于 TBS 中,此即为噬菌体洗脱液。将上述洗脱液一部分直接用于滴度测定,一部分在受体菌中进行扩增。

1.3 噬菌体滴度测定 噬菌体洗脱液在 LB 培养基中进行 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 稀释,每个稀释度取 10 μl 加入 200 μl 对数中期的 ER2738 中($A_{600\text{nm}} = 0.5$),静置 5 min 后分别加入 5 ml 45 $^{\circ}\text{C}$ 预热的顶层琼脂,立即倾入预热的 LB/IPTG/X-gal 平板,冷却 5 min 后倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日检查平板,计数不到 100 个噬菌斑的平板上的斑数,用此数目乘以稀释因子即得到每 10 μl 噬菌体的空斑形成单位(pfu)滴度。扩增后的噬菌体洗脱液也要进行滴度测定,以计算相应于 2×10^{11} pfu 的加入量进行第二轮筛选。

1.4 噬菌斑的扩增 筛选结束后,将受体菌过夜培养物按 1:100 稀释接种于 LB 培养基,分成 2 ml/管,从总量不到 100 个噬菌斑的平板上挑取蓝色噬菌斑(单克隆)分别置于上述 2 ml 培养管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 4.5 h。将培养物转入微量离心管瞬时离心 30 s,上清转入一新离心管中再短暂离心,用移液器将 80% 上清转入新离心管,此即为扩增的噬菌体贮液。

1.5 测序模板的纯化和序列测定 将 500 μl 含噬

菌体上清液转入另一新鲜离心管。加入 200 μl 聚乙二醇/氯化钠(PEG/NaCl,每升含 20% PEG-8000, 2.5 M NaCl),颠倒混匀后室温静置 10 min,10 000 rpm 离心 10 min 弃上清,沉淀物彻底重悬于 100 μl 碘化物缓冲液(每升含 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 4 M NaI)中,加入 250 μl 无水乙醇,室温温育 10 min,10 000 rpm 离心 10 min 弃上清,用 70% 的乙醇洗沉淀,短暂真空干燥,沉淀物重悬于 6 μl TE (Tris-HCl, EDTA)缓冲液中。随机挑取第三轮的 24 个蓝色单克隆,提取其 DNA,利用文库自带的 -96 g III 引物进行染料标记的自动循环双脱氧测序。

1.6 免疫组化染色分析 按照噬菌体体内筛选相同的步骤,将含有共同序列的噬菌体注射入 Balb/c 小鼠体内,相同条件下循环 10 min,再次麻醉小鼠,用 50 ml TBS 进行心脏灌注,同时收获其肾脏、肝脏、心脏、脑和肺,将上述脏器洗涤后立即制成冰冻切片,依次与 M13 单克隆抗体和辣根过氧化物酶连接的羊抗鼠 IgG 抗体反应,随后加入新鲜配置的 DAB 液显色,苏木素复染后树胶封片观察。

2 结果

2.1 噬菌体体内筛选 为了获得肾脏血管特异性噬菌体,我们将 2×10^{11} pfu 的 C7C 噬菌体多肽文库经尾静脉注射入小鼠体内,收集与小鼠肾脏结合的噬菌体,经受体菌 ER2738 扩增后用于下一轮筛选。由于扩增后噬菌体滴度较低,因此接下来的两轮筛选注射入小鼠尾静脉的噬菌体滴度只有 10^{10} pfu。各轮筛选结束后回收的噬菌体滴度以每克组织回收的噬菌体数量来计算。经过三轮体内筛选,从小鼠肾脏回收的噬菌体数呈明显的增加趋势,回收率逐轮升高,说明每一轮筛选结束后与小鼠肾脏特异性结合的噬菌体得到了有效的富集,总的富集倍数达到 1 485 倍(表 1)。

表 1 三轮筛选后噬菌体的富集倍数

筛选轮	肾脏重量 (g)	噬菌体注射量 (pfu)	噬菌体回收量 (pfu/g tissue)	回收率 (%)	富集倍数
1	0.249 8	2×10^{11}	7.50×10^6	3.75×10^{-2}	
2	0.376 8	1×10^{10}	4.05×10^7	4.05×10^{-1}	135
3	0.340 7	1×10^{10}	4.50×10^8	4.50	11

2.2 测序模板的序列测定和分析 共测序 24 个序列,获得 4 个单一的多肽序列(表 2),其中出现频率最多序列为 VSASYHR (62.5%),其次为 GQWGARG (25.0%),结果还显示存在一个缺失克隆。

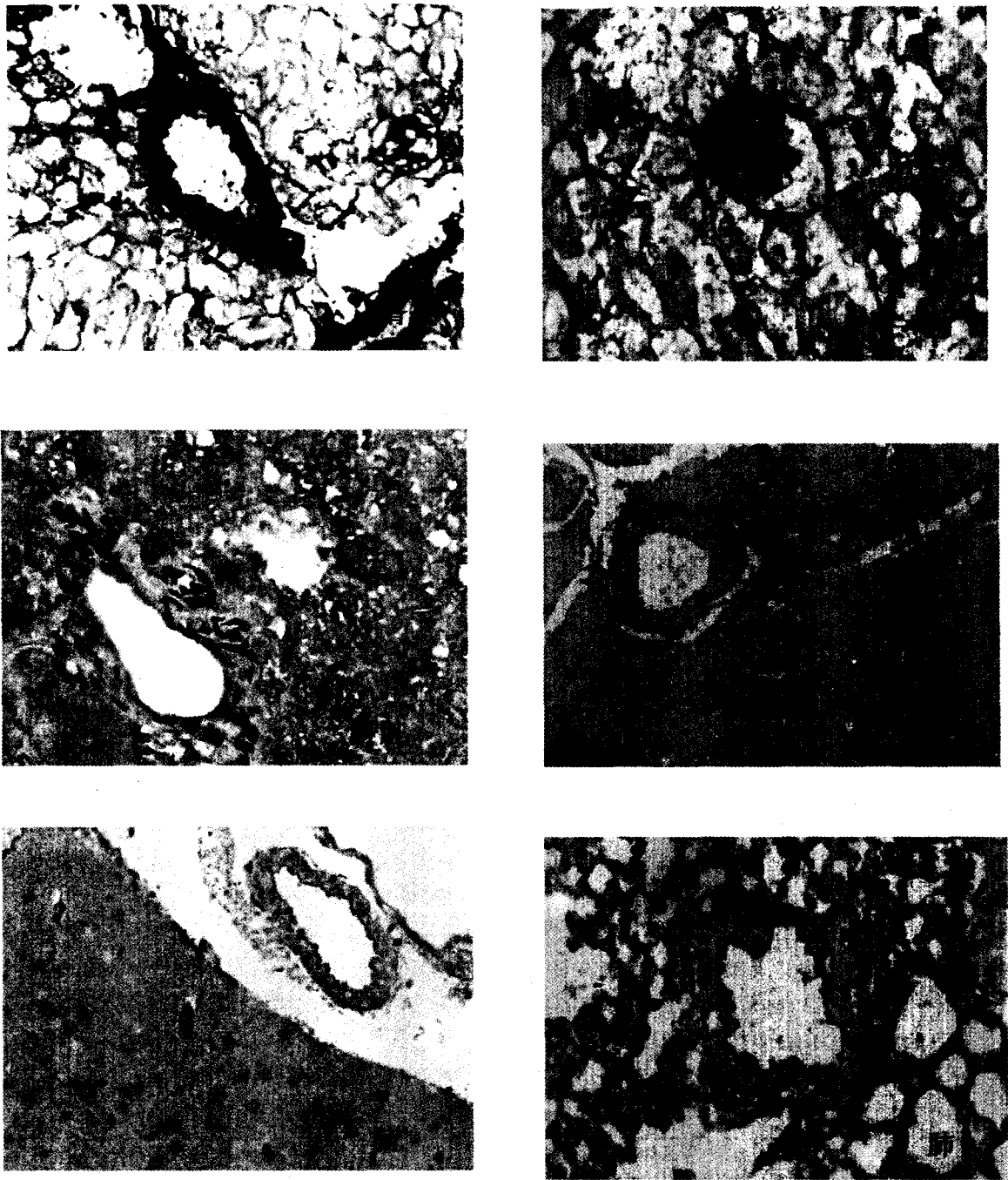
2.3 免疫组化染色分析 免疫组化染色显示,展示 VSASYHR 的噬菌体富集于小鼠肾脏,并在肾脏的

表 2 肾脏回收噬菌体的插入序列

克隆数	序列	频率(%)
15	VSASYHR	62.5
6	GQWGARG	25.0
1	NKAHTVM	4.2
1	PPMPHSS	4.2
1	缺失	4.2

血管内皮有明显分布,而且区域广泛;肝组织中有阳性

分布,但在脑、心脏、肺中噬菌体表达为阴性(图 2)。



肾 1 ($\times 100$); 肾 2, 肝脏, 心脏, 脑, 肺 ($\times 200$)

图 2 鼠不同器官中展示 VSASYHR 肽序列的噬菌体的免疫组化染色

3 讨论

实验研究显示不同组织或器官的血管存在异质性,即不同器官或者某一特定器官不同部位的血管,甚至是同一器官同一血管中相邻两个血管内皮细胞的结构和功能都不尽相同。虽然人们在生物医药研

究上的进展已经为靶向诊断和治疗提供了某些药物^[5],但如何将这些用于显像或治疗的药物或者基因在复杂的体内环境中足量、有效地输送至靶组织对我们来说仍然是个问题。值得欣慰的是血管内皮细胞表面分子异质性理论为器官或组织的靶向性诊断与治疗提供了新的依据,而噬菌体体内展示技术

又恰恰为之提供了机会。在过去的10年中,研究者已经利用噬菌体体内展示技术筛选了与小鼠正常组织、肿瘤异种移植体特异性结合的多肽,因此本研究希望利用噬菌体体内展示技术获得肾脏血管特异性多肽,为肾脏的靶向诊断和治疗提供新的途径。

本研究选用的C7C随机多肽文库,与New England Biolabs公司其它展示肽库不同,所展示的随机多肽两侧各有一个半胱氨酸,在非还原条件下,这两个半胱氨酸自发地形成一个二硫键,使展示的多肽环化,这种结构更利于多肽的暴露,促进多肽与靶分子的相互作用,以提高多肽的亲合力^[6]。该文库多样性丰富,含 1.2×10^9 个电转化序列,约含有 1.28×10^9 个七肽序列,且第一轮筛选所投入的噬菌体文库达到 2.0×10^{11} pfu,以保证在数以万计的多肽序列中包含有能够高亲和力结合于靶器官的多肽。由于噬菌体可以外渗到内皮下组织,为了筛选到可与血管内皮细胞特异性结合的噬菌体,筛选中要控制噬菌体的外渗,排除因渗透作用进入组织并与之结合的噬菌体。研究显示噬菌体在小鼠体内循环数分钟,一般不会渗透到组织内^[7]。研究者先前进行的体内筛选,循环时间最短为3 min,最长的有15 min,考虑到噬菌体外渗的可能,我们选择了10 min作为体内循环时间。循环10 min分钟后,进行活体心脏灌注,这种全身灌注有助于将非特异性结合于靶组织的噬菌体洗脱下来,增加筛选到高亲和力噬菌体多肽的可能性^[8]。另外我们在研磨液中加入了蛋白酶抑制剂aprotinin、leupeptin、PMSF和蛋白稳定剂BSA,以避免展示在噬菌体上的多肽在研磨过程中被降解。一般来说,噬菌体筛选的次数在3~5次,筛选次数过少目的克隆富集程度可能不够,次数过多文库噬菌体可能会发生突变。为了能获得高亲和力的噬菌体多肽又避免文库发生突变,我们选择进行三轮体内筛选。

经过三轮筛选,随机挑取了24个阳性克隆进行测序,其中出现频率最高的序列为VSASYHR(62.5%),其次为GQWGARG(25.0%),经过三轮体内筛选特异性结合于小鼠肾脏的噬菌体多肽在经过三轮体内筛选后得到了有效富集。值得注意的是结果还显示存在一个缺失克隆,这可能是由于噬菌体随机肽库在使用一段时间后少量噬菌体发生突变,使原来插入的短肽序列消失造成的。免疫组化染色显示展示VSASYHR的噬菌体在肾脏的血管内皮有明显分布,而且区域广泛,肾小球因为含有丰富

的毛细血管而有大量的噬菌体浓集。肝组织中有阳性分布,这可能是因为肝脏等网状内皮系统含有大量吞噬细胞,能非特异性吸附噬菌体。

目前,已经有研究者利用噬菌体体内展示技术筛选到组织靶向性多肽分子,并将其作为载体,成功地将某些药物、基因等定向输送至靶组织,进行组织的显像和治疗。例如将抗CD30的scFv片段与假单胞菌外毒素融合,在小鼠模型上治疗霍奇金淋巴瘤,观察到很好的抗肿瘤疗效^[9]。本研究就是循着这个思路,利用噬菌体体内展示技术筛选小鼠肾脏并得到了肾脏血管特异性多肽序列VSASYHR,接下来将进一步合成该多肽分子并耦联上放射性核素或者药物观察其体内显像和治疗效果,为肾脏疾病的诊断和治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Nowakowski GS, Dooner MS, Valinski HM, et al. A specific heptapeptide from a phage display peptide library homes to bone marrow and binds to primitive hematopoietic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(6): 1030-1038.
- [2] Yao VJ, Ozawa MG, Trepel M, et al. Targeting pancreatic islets with phage display assisted by laser pressure catapult microdissection [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(2): 625-636.
- [3] Bockmann M, Drosten M, Putzer BM. Discovery of targeting peptides for selective therapy of medullary thyroid carcinoma [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(2): 179-188.
- [4] Krag DN, Shukla GS, Shen GP, et al. Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7724-7733.
- [5] Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(5): 545-580.
- [6] Koivunen E, Arap W, Rajotte D, et al. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries [J]. *J Nucl Med*, 1999, 40(5): 883-888.
- [7] Yip YL, Hawkins NJ, Smith G, et al. Biodistribution of filamentous phage fab in nude mice [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 225(1-2): 171-178.
- [8] Smith J, Kontermann RE, Embleton J, et al. Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis [J]. *FASEB J*, 2005, 19(3): 331-341.
- [9] Barth S, Huhn M, Matthey B, et al. Ki-4(scFv)-ETA, a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice [J]. *Blood*, 2000, 95(12): 3909-3914.

(收稿日期: 2008-06-05)

(本文编辑: 潘雪飞; 英文编辑: 王建东)