

利用大肠杆菌鞭毛展示的随机肽库筛选 TNF- α 拮抗肽

李 朝* 周艳荣 程度胜 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘 要 TNF- α 是一种在机体抗感染、抗肿瘤过程中发挥重要作用的细胞因子,其对机体具有保护和损伤两方面的作用,为了探讨新的抑制 TNF- α 所致炎症损伤等反应的手段,构建了细菌鞭毛递呈的随机肽库,利用构建得到的肽库,进行 TNF- α 特异性结合肽的筛选工作。经过 5 轮筛选及 DNA 测序,共得到 6 条小肽编码序列。其中 2 条序列中含有一 V--N-WG 的相同序列框架。进行 6 条序列与 TNF- α 结合力的确证后,选择了其中的 4 条肽序列进行人工化学合成、纯化及鉴定。利用 L929 细胞及 MTT 法对 4 条小肽进行活性测定,检测其对 TNF- α 的抑制活性。结果表明,在 TNF- α 对 L929 细胞毒性为 30% 左右时,含同源序列框架的 2 条肽可抑制 90% 左右的 TNF- α 活性。

关键词 TNF- α , 随机肽库, 拮抗肽

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0556-05

TNF- α 是一种由活化的单核/巨噬细胞系统产生,在机体抗感染、抗肿瘤过程中发挥重要作用的细胞因子^[1,2],其对机体具有保护和损伤两方面的作用。在生理浓度下它具有提高机体免疫力、抗肿瘤和促进组织愈合等作用,而在其过量表达时则可引起发热、白细胞功能活化以及多器官组织的损伤等,经研究认为这些主要源自于 TNF- α 的促炎症作用。由于 TNF- α 在炎症等病理反应中所起的作用,它也很自然地被看作是对这些疾病治疗方面一个首选靶蛋白^[3]。可以针对 TNF- α 的产生、调控以及作用的特异性途径,将其阻断,达到控制炎症、持续缓解病情的目的。TNF- α 的活性形式为通过非共价键结合而形成的同源三聚体结构,该结构与 TNF- α 受体相互作用,引发一系列胞内反应^[4]。因此,拮抗 TNF- α 作用的途径大致有两种:1)影响 TNF- α 三聚体的形成;2)影响 TNF- α 与受体的结合。

研究证实,抗 TNF- α 抗体和其受体胞外区结构可影响 TNF- α 的作用。在对抗 TNF- α 过量产生引起的炎症、损伤等方面,这些分子都具有一定的效果,但由于免疫原性等原因,它们在实际临床应用中又都受到了一些限制^[5]。由于肽化学技术的迅速发展,目前在寻找小分子活性肽的过程中,随机肽库已

经成为一种简便易行且功能强大的工具,利用它可以在预先不知道任何肽类信息的情况下,筛选得到具有预期功能的活性肽段^[6],这种小分子肽与传统的大分子基因工程产物相比,具有如下优势:(1)分子量较小,通常小于 5kD,可以避免在使用过程中产生免疫原性,从而增加安全性;(2)由于分子量较小,结构相对简单,因而其功能较为明确,可以在很大程度上降低副作用的产生;(3)可以采用多肽化学合成方法制备,生产工艺简单,从而降低生产成本;(4)在应用过程中,其给药途径可以更加多样化。

为了探讨新的抑制 TNF- α 所引发的促炎症等反应的手段,我们构建了 *E. coli* 鞭毛展示的随机肽库,并从中筛选到了 2 条 TNF- α 的拮抗肽。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

筛选用 *E. coli* 鞭毛展示的随机 10 肽库为本研究所构建,多样性约为 10^6 ,库容量约为 10^7 。其中用到的宿主菌 G1826 和外源序列载体 pFliTrx 均购自 Invitrogen 公司。L929 细胞,由本所三室周晓巍博士惠赠。

收稿日期 2002-03-25,修回日期 2002-06-19。

基金项目 军事医学科学院科研启动基金资助(No. 991108)。

* 通讯作者。 Tel 86-10-66948831, E-mail lichao@nic.bmi.ac.cn

1.2 TNF- α 结合肽筛选^[7,9]

取随机肽库菌液 1mL 接种于 15mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 IMC 培养基(无色氨酸),25 $^{\circ}$ C,220 r/min 培养 15h。同时用 50 μ g/mL 的 TNF- α 的 0.1 mol/L 碳酸钠(pH8.6)缓冲液包被一 35mm 塑料平皿 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。取 0.4mL 培养过夜菌至 20mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素及 100 μ g/mL 的 L-色氨酸的 IMC 培养基中,25 $^{\circ}$ C,150r/min 继续培养 6h。培养同时,以无菌水冲洗包被有 TNF- α 的平皿,水弃去后加 4mL 封闭液,50r/min 缓慢摇动 1h。细菌培养结束前,取一离心管,加入 0.1g BSA,300 μ L 5mmol/L 的 NaCl 以及 500 μ L 20% α -甲基甘露糖苷。细菌培养结束后,取 10mL 菌液加入离心管中,旋转混匀。弃去平皿中封闭液,加入 3mL 上述诱导菌液。50r/min 轻摇 1min,室温放置 1h。弃去菌液,加入清洗液,100 r/min 轻摇 5min,进行清洗。重复 4 次。第 5 次清洗后,弃去清洗液,将平皿置于旋涡振荡器振荡 30s,以将结合细菌洗脱至平皿中的残留液中。加入 5mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 IMC 培养基(无色氨酸)中,25 $^{\circ}$ C,220r/min 培养 15h,重复上述筛选步骤 5 次,后几轮清洗时摇床转速适当提高,以逐步增大清洗力度。第 5 次筛选后,加入 5mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素无色氨酸的 IMC 培养基培养过夜,取菌液系列稀释后涂 RMG 平板,30 $^{\circ}$ C 培养。

1.3 TNF- α 吸附富集效果检测

以 TNF- α 和 BSA 同时包被 35mm 平皿,4 $^{\circ}$ C 过夜,用无菌水冲洗后,加上上述封闭液封闭 2h,弃去封闭液,冲洗。同时按方法 1.2 培养菌体,并用 L-色氨酸诱导鞭毛产生。细菌培养结束前,取一离心管,加入 0.1g BSA,300 μ L 5mmol/L 的 NaCl 以及 500 μ L 20% α -甲基甘露糖苷。细菌培养结束后,取 10mL 菌液加入离心管中,旋转混匀,分别等体积加入 TNF- α 和 BSA 包被的平皿中,50r/min 轻摇 1min,室温放置 1h。弃去菌液,加入清洗液,100r/min 轻摇 5min,进行清洗。重复 4 次。第 5 次清洗后,弃去清洗液,分别加入 0.1mL IMC 培养基,同时将平皿置于旋涡振荡器振荡 30s,洗脱细菌,洗脱菌液进行系列稀释后涂 RMG 平板,30 $^{\circ}$ C 培养过夜。比较 2 种平板上所长出的菌落数是否有差异,用以说明该菌液对 TNF- α 的特异性吸附是否高于对 BSA 的吸附。

1.4 DNA 测序

培养转化有重组质粒的 GI826 菌体,按质粒提取试剂盒说明提取质粒,在本所仪器中心进行 DNA 序列测定,测序引物为 ATT CAC CTG ACT CAC

GAC。

1.5 肽合成、纯化与鉴定

利用 ABI 433A 型多肽合成仪(Perkin Elmer 公司)进行多肽的固相合成。合成后的粗肽经过脱盐后进行反相 HPLC 纯化。得到的肽纯品通过质谱分析测定分子量。

1.6 MTT(四甲基偶氮唑盐)法测定肽对 TNF- α 的拮抗活性^[8]

TNF- α 对 L-929 的细胞毒性利用常规的 MTT 法检测。MTT 被活细胞氧化后的产物在 495nm 处有吸收峰,故可以检测 495nm 处的光吸收值用来表示细胞的存活情况,而以无吸收峰的 630nm 波长作对照。TNF- α 对 L929 细胞毒性计算公式为 $(OD_{\text{对照}} - OD_{T1}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{T0})$,其中 T1 和 T0 分别为检测的 TNF- α 样品浓度和对 L929 达最大杀伤毒性的 TNF- α 浓度。小肽对 TNF- α 抑制活性检测过程如下:一定浓度的 TNF- α 10 μ L 与系列稀释的 TNF- α 结合肽 5 μ L 混合,加入 96 孔板,并加入 45 μ L 含终浓度 1 μ g/mL 放线菌素 D 的 RP1640 培养基(含 10% 小牛血清),对照孔为无 TNF- α 及肽的正常培养细胞。37 $^{\circ}$ C 培养箱放置 2h。L929 细胞计数后稀释至 2×10^5 /mL,以每孔 50 μ L 的量加入 96 孔板各样品孔中,每一样品设 3 个平行孔。置 37 $^{\circ}$ C,5% 二氧化碳培养箱培养 18h 后取出,各孔加入 10 μ L MTT,重新放回培养箱。6h 后取出,吸出孔中培养液,加入 100 μ L 二甲基亚砷,充分振荡混匀后,以 630nm 波长作对照,检测 495nm 处的光吸收值。小肽对 TNF- α 抑制活性计算公式为 $(OD_{\text{肽}} - OD_{\text{TNF}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{TNF}})$ 。

2 结 果

2.1 TNF- α 拮抗肽筛选

按方法 1.2 所述,进行 5 轮筛选,按方法 1.3 检测筛选过程对肽库的富集效果,对 TNF- α 的特异结合能力较筛选前提高了 8 倍,表明随机肽库得到了较大程度的富集。富集后的肽库涂平板,随机挑 12 个单菌落,提取质粒后进行 DNA 测序,经过转换后共得到 6 条小肽序列,分别命名为 TBP1 ~ 6,序列如下(括号中数字表示重复的克隆数)。其中 TBP2 和 3 的序列中含有一个 Val-X-X-Asn-X-Trp-Gly 的保守序列框架:

TBP 1 Gly-Trp-Arg-Asn-Gln-Leu-Lys-Trp-Ser-Pro (5)

TBP 2 Leu-Asp-Leu-Arg-Val-Gln-Asp-Asn-Ser-Trp(-Gly) (3)

TBP 3 Val-Asn-Ala-Ala-Asn-Glu-Trp-Gly-Pro-Tyr (1)

TBP 4 Ala-Val-His-Leu-Phe-Thr-Arg-Asn-Val-Ile (1)

TBP 5 Gln-His-Pro-Arg-Leu-Lys-Leu-Leu-Lys-Leu (1)

TBP 6 Tyr-Phe-Phe-Ser-Leu-Lys-Cys-Asn-Cys-Gly (1)

为了减少肽合成的工作量,进行了6条肽所对应的菌株对 TNF- α 的特异性吸附能力的检测,结果表明 TBP2、3、6 具有较强的 TNF- α 结合能力。故决定合成该3条序列以及 TBP1,并且在两端加上若干肽库中的侧翼氨基酸序列,最后确定合成的序列如下:

TBP1: His-Ser-Gly-Trp-Arg-Asn-Gln-Leu-Lys-Trp-Ser-Pro-Gly-Thr

TBP2: His-Ser-Leu-Asp-Leu-Arg-Val-Gln-Asp-Asn-Ser-Trp-Gly-Thr

TBP3: Cys-Val-Asn-Ala-Ala-Asn-Glu-Trp-Gly-Pro-Tyr

TBP6: Ser-Tyr-Phe-Phe-Ser-Leu-Lys-Cys-Asn-Cys-Gly-Gly-Thr

2.2 肽合成、纯化与鉴定

应用 ABI 433A 型多肽合成仪,选用 Fmoc/HOBT/DCC 0.10 mmol 模式进行多肽合成,肽粗品脱盐后进行 RP-HPLC 纯化,均得到单一峰(图 1、2、3、4)。

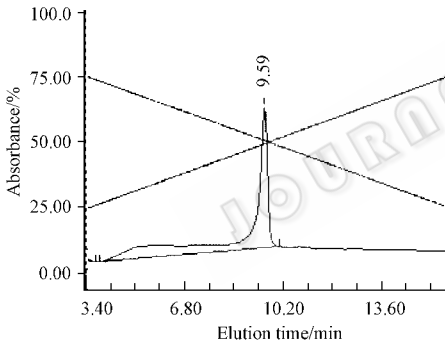


图 1 TBP1 进行 RP-HPLC 纯度分析结果

Fig.1 Purity analysis result of TBP1 with RP-HPLC

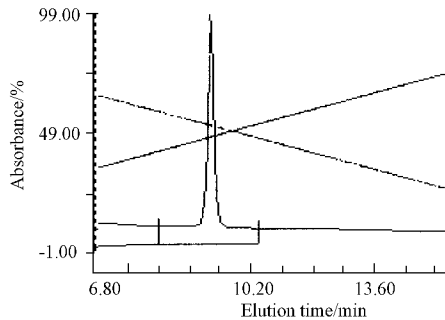


图 2 TBP2 进行 RP-HPLC 纯度分析结果

Fig.2 Purity analysis result of TBP2 with RP-HPLC

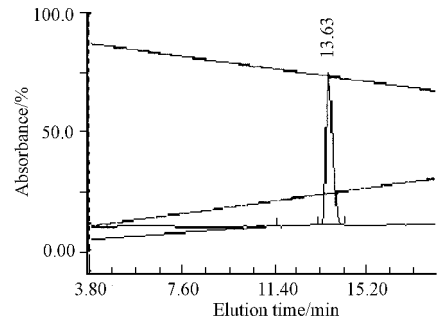


图 3 TBP3 进行 RP-HPLC 纯度分析结果

Fig.3 Purity analysis result of TBP3 with RP-HPLC

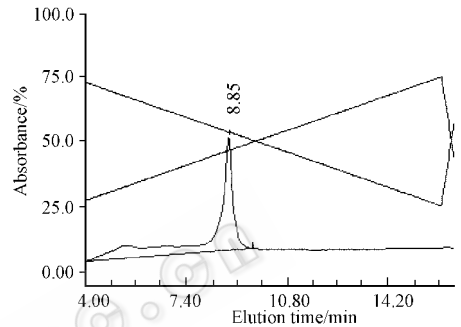


图 4 TBP6 进行 RP-HPLC 纯度分析结果

Fig.4 Purity analysis result of TBP6 with RP-HPLC

经过对以上各肽进行质谱分析,实际检测的分子量与理论分子量误差均在 1% 以内(表 1)。

表 1 肽纯品进行质谱分析结果

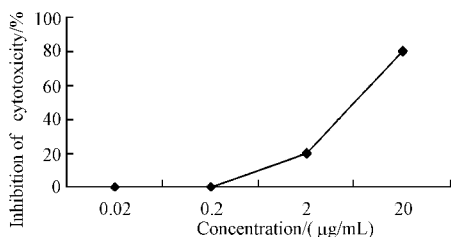
Table 1 Analysis results of the peptides with mass spectroscopy

	TBP1	TBP2	TBP3	TBP6
Calculated mass/D	1653.53	1627.94	1224.19	1416.81
Measured mass/D	1653.80	1627.87	1223.38	1416.40

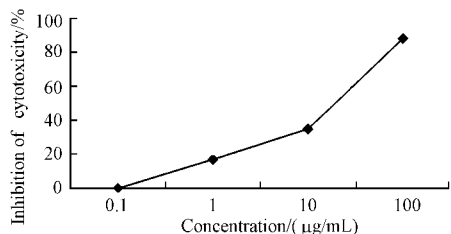
至此,我们已经通过化学合成的方法,得到了4种候选的 TNF- α 结合肽,其纯度均达到 HPLC 单峰水平,质谱测定结果正确。

2.3 肽对 TNF- α 的拮抗活性检测

按方法 1.6 进行活性检测,TBP2 和 TBP3 均具有抑制 TNF- α 的活性,而且该活性随肽浓度加大而提高。其中,TBP2 在作用浓度为 20 μ g/mL、TNF- α 的细胞毒性为 28% 时,可抑制 80% 的 TNF- α 活性;TBP3 在作用浓度为 100 μ g/mL、TNF- α 的细胞毒性 34% 时,可抑制 90% 的 TNF- α 活性(图 5、6)。而 TBP1 和 TBP6 则未检测到明显的抑制 TNF- α 活性。

图 5 TBP2 对 TNF- α 的抑制活性曲线Fig.5 Inhibitory effect of TBP2 on TNF- α

TNF- α was used at a concentration giving 28% cytotoxicity

图 6 TBP3 对 TNF- α 的抑制活性曲线Fig.6 Inhibitory effect of TBP3 on TNF- α

TNF- α was used at a concentration giving 34% cytotoxicity

3 讨 论

随机生物肽库技术凭借其简单易行、节省时间、筛选容量大等优点,已经在蛋白质工程、肽化学、免疫学、药学等基础及临床研究领域中得到日益广泛的应用,逐渐成为研究蛋白质分子间相互作用机制、确定蛋白活性位点以及新型小肽类药物开发的有用工具。在本研究中,为了寻找具有 TNF- α 拮抗活性的肽,我们利用细菌鞭毛展示的随机十肽库,以重组人 TNF- α 为靶蛋白,对所构建的随机十肽库进行了筛选工作。由于所使用的是细菌鞭毛展示的肽库,因此在一些筛选方法上不同于对噬菌体肽库的筛选。相对于噬菌体肽库,细菌鞭毛肽库在前期的筛选工作上要简单一些,比如免去了对噬菌体的培养等操作以及肽库亲和吸附靶蛋白后可以直接通过漩涡振荡的方式洗脱吸附的菌体等;但使用细菌肽库也有一个弱点,那就是在后期的活性验证方面,即它不能象噬菌体肽库那样直接进行活性测定。因此,在这部分工作中,我们对筛选前后的肽库进行了吸附对比实验,即在相同的条件下包被特异性靶蛋白(重组人 TNF- α)和牛血清白蛋白(BSA)经过菌液吸附、洗脱、涂布氨苄青霉素抗性平板、菌落计数等步骤后,即可看出经过筛选的肽库对 TNF- α 的特异性亲和力是否得到了提高。从而作为对筛选效果的评价指标。

在筛选过程中,由于使用的肽库为自己构建所

得,受各种条件限制,其容量稍小于一般的商业肽库,因此尽量减少阳性序列损失就成为筛选成功与否的关键问题之一。解决这一问题的一种方法就是使筛选条件逐渐严谨化,即在首轮筛选中尽可能将与 TNF- α 结合的序列都留下,而在以后的筛选中逐渐提高筛选条件,使其中亲和力高的序列得到更大富集。为了达到这一要求,我们把焦点集中在细菌对平皿吸附后的清洗这一步骤上,即在第一轮的清洗过程中,条件尽量温和,清洗转速设定在 90 r/min,而且只洗 3 次,这样做的目的主要是为了尽量少的损失能与 TNF- α 结合的序列;在随后的几轮筛选中,清洗转速依次提高直至 150r/min,通过这一过程,可以使 TNF- α 吸附性较强的序列在最大程度上得以富集。

经过 5 轮筛选,共得到 6 条小肽序列,其中 TBP2、3 含有一 V--N-WG 的相同序列框。经化学合成及纯化等手段得到了 TBP1、2、3、6 的纯品,进行了这些小肽对 TNF- α 抑制活性的测定,TBP2、3 具有拮抗 TNF- α 的活性,另外两条肽则未检测到活性,分析可能是由于它们是与 TNF- α 的非活性位点结合,因此不对其活性产生影响。下一步拟借助计算机建模等手段进行这些肽序列与 TNF- α 的结合状况分析。本工作筛选得到的小分子肽一方面可通过改构和修饰后作为小肽药物;另一方面还可作为先导物为新型药物的研制提供结构信息。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Gray P W , Aggarwal B B , Benton C V *et al.* Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin , a lymphokine with tumor necrosis activity. *Nature* , 1984 , **312** (5996) : 721 ~ 724
- [2] Kettelhut I C , Fiers W , Goldberg A L *et al.* The toxic effects of tumor necrosis factor *in vivo* and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1987 , **84** (12) : 4273 ~ 4277
- [3] Beutler B A . The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol* , 1999 , **26** (suppl 57) : 16 ~ 21
- [4] Smith R A , Baglioni C . The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* , 1987 , **262** (15) : 6951 ~ 6954
- [5] Keystone E C . The role of tumor necrosis factor antagonist in clinical practice. *J Rheumatol* , 1999 , **26** (suppl 57) : 22 ~ 28
- [6] Scott J K , Smith G P . Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* , 1990 , **249** (4967) : 386 ~ 390
- [7] Blond E S , Cwirla S E , Dower W J *et al.* Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* , 1993 , **75** (4) : 717 ~ 728
- [8] LI S Y (李淑云) , LIU Y X (刘瑜宣) , HUANG H (黄浩) *et al.* Detection of the cell-growth supporting ability of calf serum by MIT

1997, **10**(2): 94 ~ 97

[9] Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. Isolation of a highly specific li-

gand for the alpha 5 beta 1 integrin from a phage display library. *J*

Cell Biol, 1994, **124**(3): 373 ~ 380

Screening of TNF- α Antagonist Peptides from a Random Peptide Library Displayed with *Escherichia coli* Flagellar

LI Chao* ZHOU Yan-Rong CHENG Du-Sheng HUANG Pei-Tang

(*Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China*)

Abstract Tumor necrosis factor (TNF- α) plays an important role in the process of anti-infection and anti-cancer. It can both protect and make damage to the host. In order to find new way of inhibiting its host-damaging activity, an *E. coli* flagella displayed random peptide library was constructed and TNF- α antagonist peptides were screened using the peptide library. After 5 rounds of panning and DNA sequencing, six peptide sequences were obtained. Two of them (TBP2, TBP3) have the same sequence frame of V--N-WG. After primary comparison of TNF- α binding ability, four peptides were synthesised and purified with RP-HPLC. The activity of inhibiting TNF- α was detected with L929 cell and MTT method. The data show that TBP2 and TBP3 can inhibit 90% of TNF- α activity when TNF- α gives about 30% cell toxicity on L929. The two sequences have not been reported.

Key words TNF- α , random peptide library, antagonist peptide

Received: 03-25-2002

This work was supported by the Initiation Fund of the Academy of Military Medical Science (No. 991108).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948831; E-mail: lichao@nic.bmi.ac.cn. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>