

## 水蛭素在噬菌体表面的展示\*

周 育 秦华夏 徐劲松 黄仪秀 朱圣庚

( 北京大学生命科学学院 北京 100871 )

**摘 要** 水蛭素是凝血酶强有力的天然抑制剂。通过改造噬菌质粒并构建水蛭素表达载体 pCANTAB 5G8-Hir,使水蛭素基因通过接头与噬菌体 M13 的 gp3(197~406)基因片段融合。表达产物在 gp8 信号肽的引导下到达大肠杆菌周质,在辅助噬菌体 M13KO7 的帮助下组装到丝状噬菌体外壳上。展示在噬菌体表面的水蛭素仍然具有与凝血酶结合并抑制酶活性的作用,说明展示的水蛭素保持了正确的空间构象和生物学活性。水蛭素在噬菌体表面的成功展示为进一步开展其实验定向进化以及结构与功能关系的研究打下基础。

**关键词** 水蛭素,噬菌体展示,融合蛋白,重组噬菌体,凝血酶活性的抑制

**分类号** 939.48 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0035-40

噬菌体表面展示是一种新的生物技术,它使表达的外源蛋白或多肽以融合蛋白的形式展现在噬菌体表面,并可保持相对独立的空间构象和生物活性。大肠杆菌丝状噬菌体 M13 的主要外壳蛋白 gp8 和少数外壳蛋白 gp3 分别以 C 端附着在噬菌体颗粒上,而其 N 端则暴露在外。因此,外源蛋白或多肽可以与 gp8 或 gp3 蛋白的 N 端融合,经信号肽引导至周质并组装到噬菌体颗粒上<sup>[1~4]</sup>。gp3 蛋白因其序列中含有 SGGG 或 SGGGG 的重复而具有空间结构的灵活性,因此更适于在 N 端展现大的多肽链而不影响其空间结构。gp3 位于丝状噬菌体尾端,具有识别和吸附大肠杆菌性菌毛的功能,为解决 gp3 融合蛋白没有感染力这一问题,可引入双拷贝 gp3 基因,其中一个拷贝融合有外源基因,另一个拷贝为野生型,在噬菌体颗粒组装时,二者竞争结合,平均不超过 10% 的噬菌体颗粒外壳有一个融合的外源蛋白,其余几个拷贝为野生 gp3 蛋白<sup>[5,6]</sup>。利用这一展示系统,可以从多肽库中通过特定配体选择得到与之相结合的多肽,实现特定功能多肽分子的快速选择<sup>[7]</sup>。如果构建一个蛋白质突变体库,通过多轮诱变、扩增和选择就能实现蛋白质的定向进化<sup>[8,9]</sup>。

我们采用噬菌质粒 pCANTAB 5V 展示系统,将水蛭素基因重组到 gp8 信号肽序列与 gp3(197~406)基因片段之间,通过 gp8 信号肽将融合蛋白引导至周质,使之参与噬菌体 M13 的组装而在其表面展示。水蛭素重组噬菌体仍可检测到抑制凝血酶的活性,为进一步从水蛭素突变体库中选择改进性能分子并研究其结构与功能的关系提供了有力的手段。

\* 国家自然科学基金(39580016)及博士学科点专项科研基金资助项目。

收稿日期:1997-02-17,修回日期:1998-07-15。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 质粒与菌株：**含 OmpA 信号肽的 A3 质粒,含水蛭素基因的 A3-Hir 质粒由本实验室提供。噬菌质粒 pCANTAB 5 为 Pharmacia 公司产品。辅助噬菌体 M13KO7,大肠杆菌 TG1 由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂：**T4 DNA 连接酶,银染测序试剂盒为 Promega 公司产品;凝血酶底物 Chromzym TH 购自 Boehringer Mannheim 公司。Taq plusII 为上海生工公司产品,寡聚核苷酸引物由上海生工公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 pCANTAB 5G8-Hir 的构建：**为在展示载体 pCANTAB 5 噬菌质粒中引入多克隆位点,将该噬菌质粒经 *Hind*III 酶切补平再用 *Bam*HI 酶切,得到大片段,使其与 A3 质粒<sup>[10]</sup>的 *Xba*I 酶切补平再用 *Bam*HI 酶切的小片段连接,*Xba*I 位点得到恢复。所获得含 OmpA 信号肽及多克隆位点的展示载体 pCANTAB 5V,用 *Xba*I/*Bam*HI 双酶切鉴定。pCANTAB 5V 经 *Xba*I/*Bam*HI 酶切得到大片段。以 M13mp18 为模板,5'引物 GCTC-TAGATAATGGAACTTCCTCAT 和 3'引物 AGCGAAGCTTAGCATCGGAACGAGGGT 经 PCR 扩增得到 gp8 信号肽序列,并在 3'端通过简并密码子突变引入 *Hind*III 位点,5'端引入 *Xba*I 位点。以 A3-Hir 为模板,5'引物 TGCTAAGCTTCGCTATTACTTACACTGAT TGT 和 3'引物 CGCGGATCCGAGCCACCACCTTGTAATATTCTTCTGG 经 PCR 扩增得到水蛭素基因,5'端引入 *Hind*III 位点,3'引入 GGGS 连接区和 *Bam*HI 位点。以上片段经两端酶切并连接得到重组噬菌质粒 pCANTAB 5G8-Hir,它含 gp8 信号肽和水蛭素基因、接头及 gp3 蛋白 197~406 基因片段(见图 1)。用 *Xba*I/*Bam*HI 双酶切和 PCR 银染测序进行鉴定。

**1.2.2 水蛭素-gp3(197~406)融合蛋白的制备与鉴定：**重组噬菌质粒在大肠杆菌 TG1 中培养,1mL 培养液 10 000r/min 离心 2min,收集菌体,重悬于 100 $\mu$ L 的周质提取液(1mg/mL 溶菌酶,20%蔗糖,1mmol/L EDTA(pH8.0),30mmol/L Tris-Cl(pH8.0)),冰上放置 10min,10000r/min 离心 5min,上清为周质蛋白混合液,可直接测定其抑制凝血酶活性<sup>[11]</sup>及进行电泳分析。

将两份周质样品与加样液等体积混合于 37 $^{\circ}$ C 保温 30min,采用 5V/cm 的电压降进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。一份样品凝胶进行银染,显示周质蛋白组分与分子量标准,另一份转移至硝酸纤维素膜,与生物素标记的凝血酶杂交显色。

**1.2.3 水蛭素重组噬菌体的制备与鉴定：**重组噬菌质粒在大肠杆菌 TG1 中培养,经辅助噬菌体 M13KO7 包装成噬菌体颗粒<sup>[9]</sup>,经 2 次 PEG 沉淀,纯化浓缩至 10<sup>14</sup>cfu/mL 左右。取 10<sup>10</sup>cfu 噬菌体点样于硝酸纤维素膜上,与生物素标记的凝血酶杂交显色。

**1.2.4 水蛭素、水蛭素-gp3(197~406)融合蛋白与水蛭素重组噬菌体抑制凝血酶活性的测定：**分别取不同体积载体 pCANTAB 5V 与重组噬菌质粒 pCANTAB 5G8-Hir 的周质蛋白以及重组噬菌体(10<sup>14</sup>cfu/mL),测定其抑制凝血酶的活性,以 A<sub>405</sub>表示,参考标准水蛭素的抑制曲线,换算出抗凝血酶单位(ATU),并可推导出每个噬菌体上水蛭素的近似

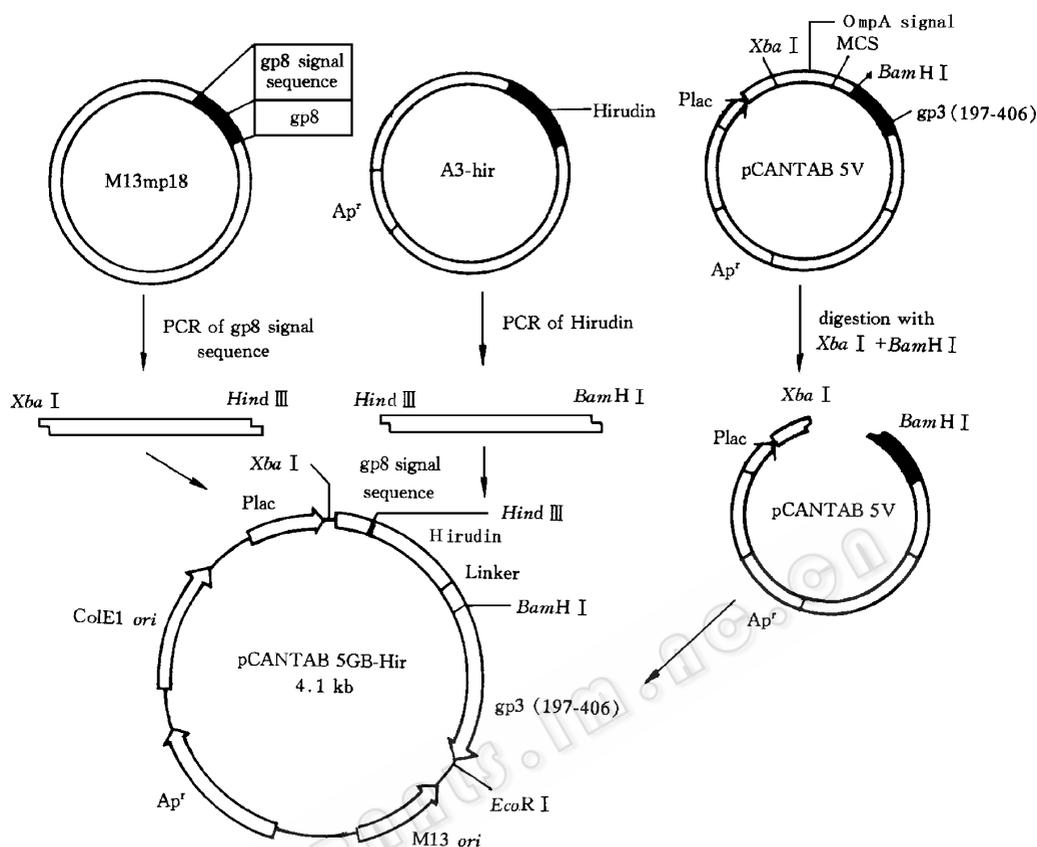


图 1 噬菌质粒 pCANTAB 5G8-Hir 的构建

Fig.1 Construction of phagemid pCANTAB 5G8-Hir

拷贝数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 水蛭素展示载体的构建

原展示载体 pCANTAB 5 用于构建抗体库,其信号肽与外源基因插入位点之间有多余的序列,因其可能影响水蛭素的空间构象,所以我们加以改造,构建含 gp8 信号肽的重组噬菌质粒(图 1)。

在信号肽序列的尾部引入酶切位点 *Hind*III,使外源基因可以与信号肽序列正确连接并不含多余氨基酸序列。不仅如此,我们将 gp3 蛋白的 1~196 片段去掉,只保留了 197~406 区域,而 197 位恰好有一个 *Bam*HI 位点。这样构建的载体可方便地插入外源基因(图 2)。

### 2.2 重组噬菌质粒 pCANTAB 5G8-Hir 的鉴定

2.2.1 PCR 反应分别扩增 gp8 信号肽基因片段、水蛭素基因及两者的重组片段(图 3),它们分别为 93bp、229bp 和 308bp,与预期结果一致。

2.2.2 *Bam*HI/*Hind*III 双酶切鉴定重组噬菌质粒 pCANTAB 5G8-Hir。载体

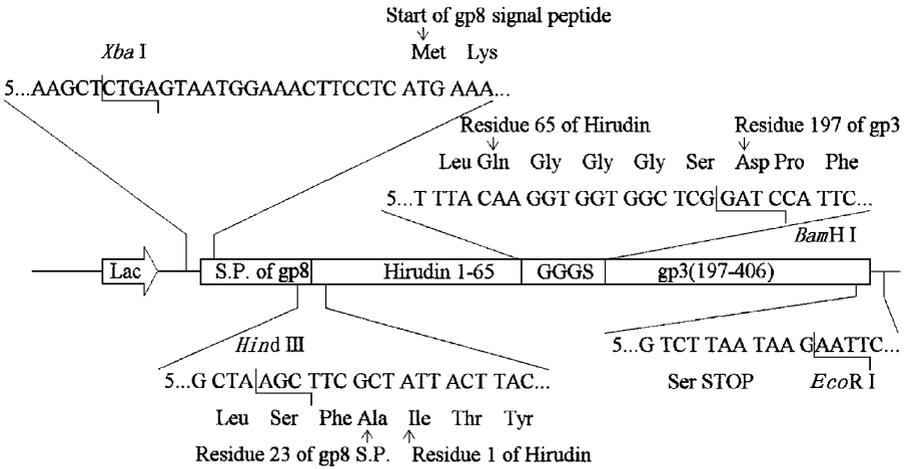


图 2 pCANTAB 5G8-Hir 的局部 DNA 序列

Fig. 2 Schematic representation of the DNA fragment encoding the hirudin-gp3 fusion protein

pCANTAB 5V 切出 112bp 片段, 重组质粒 pCANTAB 5G8-Hir 切出 301bp 片段, 其中包含 gp8 信号肽序列和水蛭素基因(实验结果未列出)。

2.2.3 pCANTAB 5G8-Hir 用银染测序, 结果与预期一致, 水蛭素基因与 gp8 信号肽, 以及与 gp3(197~406) 片段均连接正确。

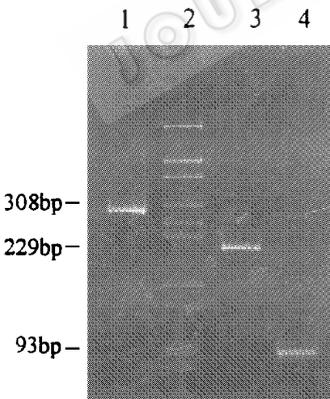


图 3 PCR 产物的电泳分析

Fig. 3 PAGE analysis of PCR products

- 1. PCR amplified gp8 signal peptide/Hir
- 2. pGEM7z(+) / Hae III
- 3. PCR amplified gp8 signal sequence
- 4. PCR amplified hirudin gene

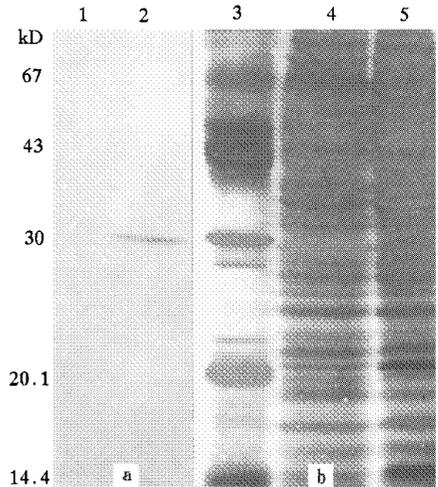


图 4 融合蛋白的电泳与酶标定位分析

Fig. 4 PAGE and Blotting analysis of Hir-gp3(197~406)

- fusion protein with biotin-thrombin
- a. Blotting analysis ; b. Silver staining
- 1 4. pCANTAB 5V ; 3. Molecular standard
- 2 5. pCANTAB 5G8-Hir

### 2.3 水蛭素-gp3 融合蛋白及水蛭素重组噬菌体的鉴定

#### 2.3.1 酶标定位测定融合蛋白的分子量

生物素标记的凝血酶检测出水蛭素与 gp3(197~406)融合蛋白的条带位置对应于分子量标准 30kD 左右(图 4),与二者分子量的加和基本一致。

#### 2.3.2 重组噬菌体的检测

水蛭素重组噬菌体与生物素标记的凝血酶结合而呈阳性结果(图 5),表明噬菌体表面展示的水蛭素与凝血酶仍有相互作用。

### 2.4 水蛭素-gp3 融合蛋白及水蛭素重组噬菌体的抑制凝血酶活性测定

分别测定 pCANTAB 5V, pCANTAB 5G8-Hir 在大肠杆菌 TG1 中表达的周质及噬菌体上清抑制凝血酶的活性(表 1, 2)。

周质中的融合蛋白对凝血酶的抑制作用随融合蛋白的增加而增强并趋于平衡,结果换算,1mL 培养液的周质抑制活性约为 2.5ATU。

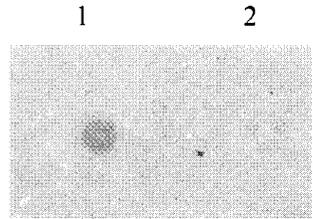


图 5 水蛭素重组噬菌体标点杂交分析

Fig.5 Dot blotting analysis of hirudin-phage with biotin-thrombin

- 1. Phage with pCANTAB 5G8-Hir
- 2. Phage with pCANTAB 5V

表 1 周质蛋白抑制凝血酶活性比较

Table 1 Antithrombin activity of periplasmic protein

| V(μL)                      | 0     | 10    | 20    | 30    | 40    | 50    |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A <sub>405</sub> (5G8-Hir) | 0.464 | 0.393 | 0.295 | 0.256 | 0.243 | 0.221 |
| A <sub>405</sub> (5V)      | 0.477 | 0.531 | 0.524 | 0.527 | 0.536 | 0.527 |
| ΔA <sub>405</sub>          | 0.013 | 0.138 | 0.229 | 0.271 | 0.293 | 0.306 |

注:ΔA<sub>405</sub> = A<sub>405</sub>(5G8-Hir) - A<sub>405</sub>(5V),5G8-Hir 代表重组噬菌质粒 pCANTAB 5G8-Hir,5V 代表噬菌质粒 pCANTAB 5V。

表 2 噬菌体抑制凝血酶活性比较

Table 2 Antithrombin activity of Hirudin phage

| Titer(cfu)                 | 1 × 10 <sup>12</sup> | 2 × 10 <sup>12</sup> | 3.5 × 10 <sup>12</sup> |
|----------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| A <sub>405</sub> (5G8-Hir) | 0.408                | 0.361                | 0.384                  |
| A <sub>405</sub> (5V)      | 0.525                | 0.525                | 0.612                  |
| ΔA <sub>405</sub>          | 0.117                | 0.164                | 0.228                  |

### 2.5 讨论

水蛭素的 N 端 1~48 肽段由 3 对二硫键形成紧密的结构,C 端 55~65 肽段为伸展的富含酸性氨基酸肽段,二者通过 49~54 连接区连接,它们分别与凝血酶的非极性结合位点,催化位点和阴离子结合位点结合,形成紧密的复合物。水蛭素的 N 端 3 个氨基酸对其与凝血酶的结合起着重要作用,因而在构建 pCANTAB 5G8-Hir 时,选择 gp8 的信号

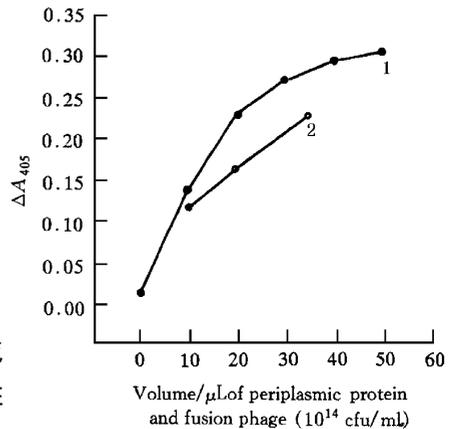


图 6 水蛭素融合蛋白与重组噬菌体对凝血酶的抑制曲线

Fig.6 Inhibition curve of thrombin

- 1. hir-gp3(197-406)
- 2. hirudin phage

肽,一方面考虑到它可能有利于融合蛋白的组装,另一方面在信号肽的尾部通过简并密码子突变产生 HindIII 酶切位点,使外源基因与信号肽基因重组而无多余的核苷酸。水蛭素的 C 端为伸展构象,与 gp3 的连接区为柔性 GGGS,因而融合蛋白中的水蛭素部分可以保持相对独立的空间构象,从而维持了对凝血酶的抑制活性。周质中的融合蛋白对凝血酶的抑制曲线(图 6)显示,抑制作用随融合蛋白的增加而增强并趋于平衡,重组噬菌体对凝血酶的抑制作用也随噬菌体量的增加而增强。这些结果表明,以融合蛋白形成在噬菌体表面展示的水蛭素仍然维持其相对独立的构象与抑制凝血酶的活性。

水蛭素在噬菌体表面的成功展示为进一步开展其实验定向进化和结构与功能关系的研究打下基础,也为其它蛋白在噬菌体表面的展示提供了方便的载体。

### 参 考 文 献

- [1] G. P. Smith. *Science*, 1985, **228**: 1315~1317.
- [2] J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter *et al.* *Nature*, 1990, **348**: 552~554.
- [3] J. K. Scott, G. P. Smith. *Science*, 1990, **249**: 386~390.
- [4] J. J. Devlin, L. C. Panganiban, P. E. Devlin. *Science*, 1991, **249**: 404~406.
- [5] D. R. Corey, A. K. Shiau, Q. Yang *et al.* *Gene*, 1993, **128**: 129~134.
- [6] H. B. Lownam, S. H. Bass, N. Simpson *et al.* *Biochemistry*, 1991, **30**: 10832~10838.
- [7] J. A. Wells, H. B. Lowman. *Current Opinon in Biotechnology*, 1992, **3**: 355~362.
- [8] B. L. Roberts, W. Markland, A. C. Ley *et al.* *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**: 2429~2433.
- [9] C. Wang, Q. Yang, C. S. Craik, J. *Biol. Chem.*, 1995, **270**: 12250~12256.
- [10] 黄仪秀, 陈杰鹏, 毕群等. 生物化学杂志, 1995, **11**(6): 642~644.
- [11] 毕群, 黄仪秀, 朱圣庚. 北京大学学报(自然科学版), 1997, **33**(6): 737~742.

## Hirudin Display on the Surface of Bacteriophage M13\*

Zhou Yu, Qin Huaxia, Xu Jinsong, Huang Yixiu, Zhu Shenggen  
(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract** Hirudin was fused to the N terminus of M13 minor protein gp3(197~406) through a linker GGGS by inserting both the hirudin gene and the gp8 signal sequence into the modified phagemid vector pCANTAB 5V to construct pCANTAB 5G8-Hir. The expressed fusion protein was directed by gp8 signal peptide into the periplasm and assembled to the phage particle to form the hirudin-phage. The fusion protein and fusion phage were detected with biotin-thrombin by Western-blotting analysis. Antithrombin activity analysis confirmed that the fusion protein and fusion phage bear the similar conformation to the native hirudin. The successful display of hirudin on the surface of M13 phage laid a sound foundation for the further study on directed evolution of antithrombotic proteins with altered properties.

**Key words** Hirudin, phage display, fusion protein, fusion phage

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39580016).