· 基础论著 ·

与汉坦病毒 β3 整合素受体结合的高亲和性多肽的筛选

杨栋强　于海涛　蒋伟　潘蕾　张野　李彧　王伟　白露　苏雯静　杜虹　王珏　白雪帆

【摘要】 **目的**　从噬菌体七肽展示库中筛选与 β3 整合素结合的多肽序列,并进行鉴定。**方法**　以 β3 整合素为靶分子对噬菌体七肽展示库进行 8 轮亲和筛选,获得与 β3 整合素结合的噬菌体克隆,挑选结合力强的克隆进行 DNA 测序,推导出呈现的多肽序列,应用生物信息学软件进行多肽序列分析和同源性分析。**结果**　经 8 轮亲和筛选从噬菌体展示七肽库中挑选 80 个克隆进行 DNA 序列测序及生物信息学分析,发现 TGVKGPG、LPLTPLP、KLTSSPT、SPVGPLP 和 DHRNHLV 肽段有较高的重复机率,与汉坦病毒囊膜糖蛋白氨基酸序列有较高的同源性。**结论**　通过对噬菌体展示肽库的淘筛,获得与 β3 整合素结合的高亲和性多肽,为进一步设计和获取高活性的抗汉坦病毒短肽提供参考资料。

【关键词】 噬菌体呈现文库;汉坦病毒;β3 整合素

Screening of the high affinity peptides binding to β3 integrin receptor of hantavirus from phage display random peptide library of hantavirus receptor

YANG Dong-qiang, YU Hai-tao, JIANG Wei, PAN Lei, ZHANG Ye, LI Yu, WANG Wei, BAI Lu, SU Wen-jing, DU Hong, WANG Jue, BAI Xue-fan. Center of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

Corresponding author: BAI Xue-fan, Email: xfbai@fmmu.edu.cn

【**Abstract**】 **Objective**　To screen and identify peptides with high affinity to β3 integrin receptor of hantavirus from phage display random peptide library. **Methods**　β3 integrin receptor was taken as a ligand, phage clones that bond to β3 integrin receptor were screened from phage display random 7-mer peptide library through 8 rounds of biopanning. The phage clones containing high affinity peptides to β3 integrin receptor were selected and amplified. The DNAs were extracted for sequencing. The coding peptide sequences were deduced from the DNA sequences and analyzed for bioinformatics, including homology analysis through blasting. **Results**　Five peptides (TGVKGPG, LPLTPLP, KLTSSPT, SPVGPLP and DHRNHLV) revealed high repetition rate. The comparison of the amino acid sequences with hantanvirus glycoprotein showed high homology. **Conclusions**　Peptides with high affinity to β3 integrin were obtained from phage display random peptide library, which provide new data for further experiments to get the highly active anti-hantaviral peptides.

【**Key words**】 Phage display library; hantanvirus; β3 integrin

病毒感染靶细胞的第一步是病毒进入细胞质内,通常需要病毒吸附蛋白或表位与靶细胞的特定受体结合[1]。近年研究表明,β3 整合素是汉坦病毒的关键受体,本实验室既往研究也证实,β3 整合素是致病汉坦型病毒国内代表株 A9 株的关键受体[1]。因此,封闭或阻断 β3 整合素已成为抗汉坦病毒治疗研究的重要策略[2-3]。本研究拟以 β3 整合素为靶分子,通过对噬菌体七肽展示库(Ph. D-7 肽库)的淘筛,获得高亲和力的噬菌体肽段。通过 DNA 序列的测定,分析并确定这些高亲和力肽段的生物学信息,同时与汉坦型病毒国内代表株的囊膜糖蛋白 M 基因序列比对,分析其同源性,为进一步应用这些短肽进行体外抗汉坦病毒功能学实验奠定基础。

材料与方法

一、主要试剂

噬菌体随机七肽库、宿主菌 *E. coli* ER 2738、测序引物-96 gⅢ 5'-HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'(100 pmol/μl,1 pmol/μl 均购自 New England

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.01.005

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872215、81071370)

作者单位:710038　西安市,第四军医大学唐都医院全军感染病中心

通讯作者:白雪帆,Email:xfbai@fmmu.edu.cn

Biolabs 公司,肽库滴度为 2×10^{13} PFU/ml,复杂度为 2.8×10^{9} 种转化子;αvβ3 整合素购自 Chemicon International 公司(Temecula,CA,USA),PEG-8000 等为 Amresco 公司产品。

二、噬菌体肽库的亲和筛选

参照试剂说明书,共筛选 8 轮,每轮筛选条件如表 1 所示。

表 1 以 β3 整合素为靶分子对噬菌体七肽库进行 8 轮淘筛的条件

筛选轮数	靶分子浓度(μg/ml)	结合时间(min)	洗脱时间(min)	Tween-20 浓度(%)
1	100	90	15	0.1
2	100	90	15	0.3
3	50	60	30	0.5
4	10	60	30	0.5
5	5	60	30	0.5
6	5	60	30	0.5
7	5	60	30	0.5
8	5	60	30	0.5

三、噬菌体滴度测定

取 ER2738 单菌落至 5 ~ 10 ml LB 培养基中,于 37℃恒温摇床(摇床转速 225 rpm)培养至对数中期(OD_{600}: 0.5)。细菌生长时,微波炉融化上层琼脂,分成每 3 ml 等份于灭菌试管中,每个噬菌体稀释度(稀释范围:$10^{8} \sim 10^{11}$)1 管。保存于 45℃水浴锅中备用。同时 37℃预温 LB/IPTG/Xgal 平板,每个噬菌体稀释度取 1 个平板备用。在 LB 中准备 10 倍系列稀释的噬菌体。当菌体培养物达对数中期,分成 200 μl 等份于 EP 管中,每个噬菌体稀释度 1 管。每管加入 10 μl 不同稀释度的噬菌体,快速震荡混匀,室温温育 5 min。将上述混合液加入 45℃预温的上层琼脂培养管中,每次 1 管,快速混匀,立即倾注于 37℃预温的LB/IPTG/Xgal平板上。适当倾斜平板将上层琼脂均匀铺开。平板冷却 5 min 后,倒置于 37℃培养过夜。次日观察培养板,选择蓝斑数少于 100 的培养板,蓝斑数再乘以稀释倍数即为噬菌体滴度(pfu/ml)。

四、噬菌斑的扩增

将 ER2738 菌过夜培养物按 1∶100 稀释接种于 LB 培养基,分 1 ml 至培养管中。每个需要鉴定的克隆 1 管。挑出 1 个蓝色噬菌斑到上述 1 ml 培养管中。37℃摇床培养 4.5 ~ 5 h。培养物转入微量离心管中,离心 30 s。上清转入新管中,再瞬间离心。用移液器将 80% 的上清转入新鲜离心管,此即为扩增噬菌体贮液。

五、噬菌体克隆单链 DNA 的提取

按上述方法进行噬菌斑扩增,在第一步离心后,将 500 μl 含噬菌体上清转入 1 支新鲜离心管。加 200 μl PEG/NaCl,颠倒混匀,室温放置 10 min。离心 10 min,弃上清液。离心瞬间,小心吸去残余上清。沉淀物彻底重悬于 100 μl NaI 缓冲液中,加入 250 μl 无水乙醇。室温温育 10 min 后离心 10 min,弃上清。用 70% 的乙醇洗沉淀,短暂真空干燥。加入 30 μl TE 缓冲液悬浮沉淀。

六、阳性噬菌体克隆的 DNA 测序

试剂盒提供测序引物(-96 gIII) 5'-HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3', 100 pmol/μl, 1 pmol/μl,序列测定由上海生物工程公司完成。

七、对获取序列的生物信息学处理分析

使用 DNAstar 软件分析获取的序列,结合 NCBI 上的 BLAST 寻找最匹配的短序列。

结　果

一、噬菌体七肽库的筛选与富集

根据每轮筛选前加入的噬菌体量与洗脱后的噬菌体量计算回收率。经过 8 轮的亲和筛选,噬菌体克隆回收率从 2.15×10^{-9} 增加到 4×10^{-2},目标噬菌体克隆得到了有效富集(表 2)。

表 2 Ph. D-7 肽库 8 轮筛选富集情况

筛选轮数	投入量(pfu/ml)	产出量(pfu/ml)	回收率
1	2×10^{11}	4.3×10^{2}	2.15×10^{-9}
2	2×10^{11}	1.0×10^{4}	0.5×10^{-7}
3	2×10^{11}	3.0×10^{5}	1.5×10^{-6}
4	2×10^{11}	4.6×10^{6}	2.3×10^{-5}
5	2×10^{11}	1.5×10^{7}	0.75×10^{-4}
6	2×10^{11}	3.2×10^{8}	1.6×10^{-3}
7	2×10^{11}	5.0×10^{9}	2.5×10^{-2}
8	2×10^{11}	8.0×10^{9}	4.0×10^{-2}

二、单链噬菌体 DNA 的提取

噬菌体 DNA 抽提效果较好,基本为单一条带,可用于后续研究(图 1)。

三、噬菌体 DNA 测序结果

七肽库噬菌体克隆 DNA 测序结果归纳如下,GTT TCG GCC GAA CCT CCA CCYYYYYYYYYYYYYYYYYYAGA GTG AGA ATA GAA AGG TA,Y 部分为外源融合肽 DNA 序列。

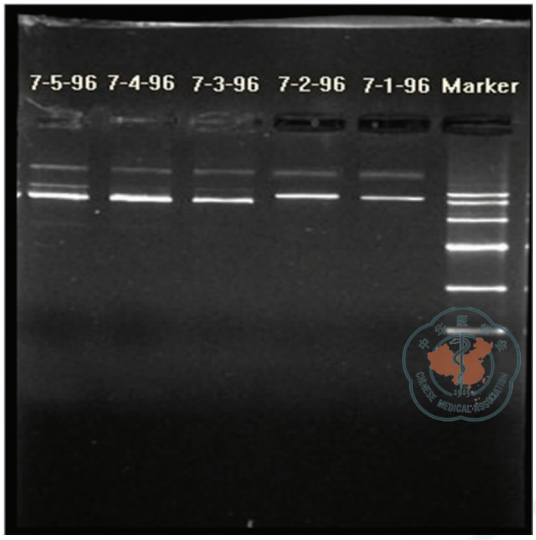

图 1 单链噬菌体 DNA

四、提取出插入 DNA 序列归纳

随机挑取 80 个克隆,测序后发现 4 个有重叠现象,可能是挑克隆时污染所致,故实际挑取的具有单一多样性的克隆数目为 76 个。

表 3 噬菌体克隆 DNA 序列和多肽序列

DNA 序列 (5'-3')	推导的氨基酸序列 (N-端→C-端)	出现频次
ACCCGGACCCTTCACCCCAGT	TGVKGPG	32
CGGAAGCGGAGTCAACGGCAG	LPLTPLP	14
CGTAGGAGAACTAGTCAGCTT	KLTSSPT	11
CGGCAGAGGCCCCACAGGAGA	SPVGPLP	8
CACCAACTGATTACGATGATC	DHRNHLV	7
AAAAAGCGGCACATCCTGATT	NQDVPLF	1
AAGCGGCGCACGAGTCTCCCC	GETRAPL	1
AGCCCGAGACGGAGTATTACC	GNTPSRA	1
ATAATCAGGAGGACTAGACTG	QSSPPDY	1

五、P7 肽生物信息学分析

通过比较淘选获得的亲和性噬菌体外源插入肽的编码 DNA 序列,发现 TGVKGPG、LPLTPLP、KLTSSPT、SPVGPLP 和 DHRNHLV 肽段有较高的重复机率,经与汉坦病毒囊膜糖蛋白氨基酸的 M 基因序列比较发现,两者存在一定的同源序列。比对结果如下。

1. TGVKGPG: BLAST (basic local alignment search tool)结果发现完全匹配的蛋白有 30 个,这些蛋白除了 stomatin 蛋白和 band 7 蛋白家族外,其他均未知功能。经软件计算 P7 肽的理论分子量为 614.70 Da,7 个氨基酸中有 1 个碱性氨基酸,1 个中性氨基酸,5 个非极性疏水氨基酸,等电点为 8.41。与汉坦型病毒囊膜糖蛋白 1(glycoprotein 1, G1)的 TGVLIEG 同源,同源模式 TGV × × × G,而且 TGVLIEG二级结构分析是 G1 蛋白的螺旋与环的连接区域并紧邻环区,同样具有 1 个中性氨基酸,5 个非极性疏水氨基酸。

2. LPLTPLP:BLAST 检索发现完全匹配的蛋白有 75 个,这些蛋白除了铁或铁硫结合蛋白、wnt 信号系统有关蛋白、AES(groucho/TLE 蛋白家族)、动力蛋白、锚定蛋白、糖基转移酶和通透蛋白外,其他均未知功能。经软件计算 P7 肽的理论分子量749.95 Da,7 个氨基酸中有 6 个疏水性氨基酸,1 个中性氨基酸,等电点为 5.52,该分子具有典型的疏水性。与汉坦型病毒 G1 的 LPPVPLA 同源,同源模式 LP × × PL × ,并且 LPPVPLA 与 LPLTPLP 在氨基酸组成上非常相似,均为 6 个疏水性氨基酸和 1 个中性氨基酸,等电点也是 5.52,同样具有典型的疏水性。LPPVPLA 位于 G1 的螺旋-环-螺旋的 1 个螺旋。

3. KLTSSPT:BlAST 结果发现完全匹配的蛋白有 18 个,这些蛋白已知功能的有驱动蛋白和铁联氢化酶大亚基等。软件计算 P7 肽的理论分子量 732.83 Da;7 个氨基酸中有 1 个碱性氨基酸,2 个极性中性氨基酸,4 个非极性氨基酸,等电点是 8.75。与汉坦型病毒 G1 的 ILTSSTE / SLTSSSK 同源,同源模式 × LTSS × × ,SLTSSSK 包含 1 个碱性氨基酸,4 个极性中性氨基酸,2 个非极性氨基酸,KLTSSPT 和 SLTSSSK 等电点一样,故两者性质更为相近,而 ILTSSTE 的 7 个氨基酸中有 1 个酸性氨基酸,其余相同,但 KLTSSPT 和 ILTSSTE 等电点差异较大。ILTSSTE/SLTSSSK 二者皆位于汉坦型病毒 G1 的转角区域。

4. SPVGPLP:BLAST 结果发现完全匹配的蛋白有 23 个,这些蛋白除酰基转移酶、酰胺酶、组蛋白酶和 T-box 家族蛋白外,其余均未知功能。软件计算 P7 肽的理论分子量 665.79 Da,7 个氨基酸中有 2 个极性中性氨基酸,5 个非极性氨基酸,等电点是 5.24。与汉坦型病毒 G1 的 SIVGPAN 同源,同源模式 S × VGP × × ,并且 SIVGPAN 与 SPVGPLP 的性质及等电点完全相同。SIVGPAN 位于汉坦型病毒 G1 的螺旋区。

5. DHRNHLV:BLAST 未发现与之完全匹配的蛋白。经软件计算 P7 肽的理论分子量 889.97 Da,7 个氨基酸中有 3 个碱性氨基酸,1 个酸性氨基酸,3 个中性氨基酸,等电点为 6.92。与汉坦型病毒 G2 的 DHINILV 同源,同源模式 DH × N × LV,二级结构位于汉坦型病毒 G2 的螺旋区。

讨　论

肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome,HFRS)是由汉坦病毒(hantavirus)引起的自然疫源性疾病,目前全世界每年仍有 3 ~ 5 万 HFRS 和汉坦病毒肺综合征(hantavirus pulmonary syndrome,HPS)病例发生,病死率为 0.1% ~40%,因感染的病毒型别而异,其中 HPS 最高[4-6]。我国是世界上受 HFRS 危害最为严重的国家,建国后至 2010 年末,已报告 HFRS 发病累计近 160 万人,占同期世界总病例数 83.75% 以上[4]。美国 FDA 至今仍未批准包括利巴韦林等任何针对汉坦病毒相关疾病如 HFRS 和 HPS 的特效治疗药物[4]。因此,探讨汉坦病毒感染致病的分子机理,寻找有效的抗病毒治疗药物仍是当前及今后 HFRS 防治的重要任务。

抗微生物肽是近年发现的新型生物活性分子。短肽或寡肽类分子具有分子量小、穿透力强、抗原性弱、活性强、易于制备且容易与靶分子结合等优点,是当前肿瘤和感染疾病等治疗极好的靶向药剂。功能性多肽的筛选工作量十分浩大,需要高通量的筛选技术,而噬菌体展示技术恰可满足该项工作的需要。噬菌体展示技术是一项选择技术,其使大量随机多肽与其 DNA 编码序列之间建立了直接联系,使得各种靶分子(抗体、酶、细胞表面受体等)的多肽配体通过一种被称为淘选(biopanning)的体外选择程序得以快速鉴定。由于噬菌体表面展示的多肽能够与靶分子结合,因而可以通过亲和筛选从噬菌体多肽库中筛选出与靶分子特异性结合的多肽,即让多肽模拟配体的结合部位与靶分子结合,测得配体与受体的结合位点,多肽序列则可以通过测定噬菌体所插入的外源 DNA 序列而得知[4-7]。

Larson 等[2]应用 αvβ3 分子对展示环状九肽的噬菌体肽库进行淘筛,发现了 70 个可与 β3 整合素结合的九肽,这些肽可以不同程度地减少汉坦病毒属中的辛诺柏型病毒(Sin Nombre virus,SNV)和汉坦型病毒(hantaan virus,HTNV)的空斑形成数。经比较证实,其中 8 个短肽与 SNV 的囊膜糖蛋白具有较高的同源性。本研究合成了其中 4 个肽段,证明部分肽段的组合可提高阻断 SNV 病毒感染的效果,为进一步设计和获取更高活性的抗汉坦病毒短肽提供了重要资料[4]。

本研究运用噬菌体展示技术通过亲和富集法对噬菌体 7 肽库进行 8 轮筛选,以 β3 整合素为靶分子,每轮都不断减少 β3 整合素用量及缩短与肽库的结合时间,同时不断增加 Tween-20 的淘洗浓度,从而能够筛选得到高亲和力、特异性强的噬菌体克隆多肽。结果显示每轮淘洗噬菌体数量都有较高的富集。淘筛过程中通过用不同浓度梯度的 β3 整合素靶分子来改变选择强度,在经过 8 轮淘筛后,本研究筛选到与 β3 整合素结合的高亲和力的短肽。随机挑取 80 个克隆(因 4 个克隆重叠,实际为 76 个克隆),经过 DNA 测序,得到 5 条重复率较高编码不同的寡肽序列,分别为 TGVKGPG、LPLTPLP、KLTSSPT、SPVGPLP 和 DHRNHLV。把上述多肽序列与汉坦型及汉坦型病毒囊膜糖蛋白氨基酸的 M 基因序列比对,经比较证实 5 条短肽与汉坦病毒的囊膜糖蛋白具有较高的同源性。运用生物信息学手段分析这些短肽,发现其具有与同源序列相同的等电点和典型的疏水性,从而验证了本筛选技术是有效可行的,实验设计是较为严谨的。

在后续研究中,本研究拟合成这几条多肽并改构优化后进行体外抗病毒活性实验,并进一步观察其对感染汉坦病毒小鼠的保护作用,为研制新型抗汉坦病毒多肽类药物提供实验数据。

参　考　文　献

1 Smith AE, Helenius A. How viruses enter animal cells. Science, 2004,304(5668):237-242.

2 Mou DL, Wang YP, Huang CX, et al. Cellular entry of Hantaan virus A9 strain: specific interactions with beta3 integrins and a novel 70kDa protein. Biochem Biophys Res Commun,2006,339(2):611-617.

3 Larson RS, Brown DC, Ye C, et al. Peptide antagonists that inhibit Sin Nombre virus and hantaan virus entry through the beta3-integrin receptor. J Virol,2005,79(12):7319-7326.

4 Song JW, Song KJ, Baek LJ, et al. In vivo characterization of the integrin beta3 as a receptor for Hantaan virus cellular entry. Exp Mol Med,2005,37(2):121-127.

5 Guzman GP, Tapia EO, Villaseca HM, et al. Morphological findings in fatal cases of hantavirus cardiopulmonary syndrome. Report of 7 autopsies. Rev Chilena Infectol,2010,27(5):398-405.

6 Abel BorgesA, Figueiredo LT. Mechanisms of shock in hantavirus pulmonary syndrome. Curr Opin Infect Dis,2008,21(3):293-297.

7 Lapinsky SE. Epidemic viral pneumonia. Curr Opin Infect Dis, 2010,23(2):139-144.

8 Gui XE, Ho M, Cohen MS, et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome: treatment with recombinant alpha interferon. J Infect Dis, 1987,155(5):1047-1051.

9 Jonsson CB, Milligan BG, Arterburn JB. Potential importance of error catastrophe to the development of antiviral strategies for hantaviruses. Virus Res,2005,107(2):195-205.

10 Baneyx F, Schwartz DT. Selection and analysis of solid-binding peptides. Curr Opin Biotechnol,2007,18(4):312-317.

11 Habich C, Kempe K, van der Zee R, et al. Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. J Immunol,2005,174(3): 1298-1305.

12 Wood KC, Azarin SM, Arap W, et al. Tumor-targeted gene delivery

using molecularly engineered hybrid polymers functionalized with a tumor-homing peptide. Bioconjug Chem, 2008, 19(2): 403-405.
13 Daniels DA, Lane DP. Phage Peptide Libraries. Methods, 1996, 9(3): 494-507.
14 Hall PR, Malone L, Sillerud LO, et al, Characterization and NMR solution structure of a novel cyclic pentapeptide inhibitor of pathogenic hantaviruses. Chem Biol Drug Des, 2007, 69(3): 180-190.

(收稿日期:2011-11-22)
(本文编辑:孙荣华)

杨栋强,于海涛,蒋伟,等. 与汉坦病毒 β3 整合素受体结合的高亲和性多肽的筛选[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(2):104-108.