

应用 T7 噬菌体展示技术筛选与 sLRIG1 亲和结合蛋白

朱锡群 易 伟

摘 要 **目的** 用 T7 噬菌体展示技术 (phage - displayed technique, PDT) 筛选与可溶性多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白 1 (soluble leucine - rich repeats and immunoglobulin - like domains 1, sLRIG1) 相互作用的蛋白, 为进一步研究 sLRIG1 作用于人脑胶质瘤的机制找到突破点。**方法** 利用 BacPAK6 杆状病毒蛋白表达系统 (baculovirus expression system, BEVS) 获得人 sLRIG1 重组蛋白, 以该蛋白为靶标, 采用亲和淘洗方法经 6 轮筛选人肝细胞 cDNA T7 噬菌体展示文库; 随机挑选 96 个筛选到的噬菌体行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳回收 DNA 片段并送测序。**结果** 经过 6 轮筛选, 噬菌体投入和产出量比达 1.85×10^6 PFU, 趋于稳定。回收的 DNA 片段多在 250 ~ 750bp, 纯化回收后得到 35 个克隆样本, 送测序后得到 35 条有效表达序列标签, 对其行同源性搜索及功能预测等生物信息学分析, 最终获得 12 个可能与 sLRIG1 蛋白有相互作用的蛋白或多肽, 这些蛋白大多与肿瘤相关。**结论** 通过 PDT 可获得与 sLRIG1 蛋白相互结合的蛋白, 这些结果为下一步研究 sLRIG1 的生物功能及其对人脑胶质瘤的作用及机制奠定了基础。

关键词 T7 噬菌体 可溶性多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白 1 胶质瘤 相互作用蛋白

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.11.011

Screening of Proteins Interacting with Soluble Leucine - rich Repeats and Immunoglobulin - like Domains 1 from T7 - phage Display Library. Zhu Xiqun, Yi Wei. Department of Neurosurgery, Hubei Cancer Hospital, Hubei 430079, China

Abstract **Objective** To screen proteins who interact with the ectodomains of leucine - rich repeats and immunoglobulin - like domains 1 (LRIG1) (soluble LRIG1, sLRIG1) in human cells and to discover new cues for the mechanism researches on sLRIG1 and glioma cells. **Methods** Method of T7 - phage display system was used to find out the proteins that have high affinity to the sLRIG1 protein. A recombination protein of sLRIG1 was used as the target protein, which was obtained from the baculovirus expression system (BEVS). **Results** After six rounds of T7 - phage screening, the ratio of input and output reached 1.85×10^6 PFU, 96 specific phages were obtained. Thirty - five of these phages were identified to be available by PCR amplification and DNA sequencing. Lengths of these DNA fragments were among 250 - 750bp. After homological, functional and other biological information analysis, 12 proteins or peptides were finally selected that supposed to interact with sLRIG1. **Conclusion** T7 - phage display system is an effective method to obtain proteins that interact with sLRIG1. Obtaining these proteins is important for further sLRIG1 researches on its biological functions and therapeutic effects in human glioma.

Key words T7 - phage; Soluble leucine - rich repeats and immunoglobulin - like domains 1 ; Human glioma; Interacting proteins

可溶性多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白 1 (soluble leucine - rich repeats and immunoglobulin - like domains 1, sLRIG1) 是多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白 1 (LRIG1) 的胞外段。先前研究表明 LRIG1 是多个酪氨酸激酶受体 (receptor tyrosine kinase, RTK) 的内源性抑制因子, 在人类脑胶质瘤或其他肿瘤治疗中具有广泛的前景^[1]。sLRIG1 可识别并结合这些受体的胞外段, 包括表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)^[2]。然而, Xu 等^[3]

通过蛋白晶体实验对 sLRIG1 与 EGFR 的结合和作用提出了疑问。目前对于 sLRIG1 或 LRIG1 的生理作用机制仍然知之甚少, 甚至 sLRIG1 或 LRIG1 与多 RTK 是否直接结合, 都有待进一步研究。因此, 筛选出与 LRIG1 或 sLRIG1 直接结合的蛋白至关重要。T7 噬菌体展示技术 (phage - displayed technique, PDT) 是筛查与靶蛋白亲和力高、有可能直接结合的蛋白的有效方法。本研究以靶蛋白 (sLRIG1) 为诱饵, 通过 PDT 技术, 经过结合、洗脱、扩增 3 个步骤, 筛选噬菌体 Complementary DNA (cDNA) 文库, 从而获得与靶蛋白相互作用的蛋白。

材料与方法

1. 材料: 重组 sLRIG1 蛋白, 为课题组前期使用杆

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973073, 81172402)

作者单位: 430079 武汉, 湖北省肿瘤医院 (朱锡群); 430060

武汉大学人民医院 (易伟)

通讯作者: 易伟, 电子信箱: yiwei920714@163.com

状病毒表达系统制备,蛋白浓度 160 μ g/ml、纯度 95% 以上,SDS - PAGE 和免疫印迹鉴定正确^[4]。T7 肝细胞 cDNA 文库和 BLT5615 购自美国 Novagen 公司。DNA 聚合酶 Extag 购自宝生物(日本 TaKaRa)公司。ELISA 酶标板购自美国 Dynatech 公司。Brandford 蛋白浓度检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司。ECL 超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司。DNA marker 购自武汉天源生物技术公司(Ruibio 分装)。琼脂糖凝胶 DNA 快速纯化回收试剂盒购自原平皓生物技术有限公司。

2. ELISA 酶标板的 sLRIG1 蛋白包被:用去离子水 250 μ l 轻轻清洗 ELISA 酶标板 5 次,每次 5min,轻拍去除水分。1 $\times$ TBS 稀释重组 sLRIG1 蛋白 10 μ g/ml,加 100 微升/孔到 ELISA 酶标板,封口膜封口,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;然后倒出 sLRIG1 蛋白,每孔 300 微升 1 $\times$ TBS 洗 5 次,每次 5min,以洗去未结合的蛋白;每孔加 5% 脱脂牛奶 200 微升室温封闭 1h 后,双蒸水 300 微升/孔洗板 5 次,每次 5min;最后每孔加 200 微升双蒸水,封口膜封口,4 $^{\circ}$ C 储备备用。

3. 筛选和洗脱:将噬菌体文库以 100 微升/孔置于包被有 sLRIG1 蛋白的 ELISA 酶标板内,室温放置 1h 后 TBS 洗 5 次,加入 10% SDS 洗脱液 200 微升/孔,室温放置 30min;反复吹打后吸出洗脱液,此即为筛选的噬菌体;取 10 μ l 测定所筛选噬菌体的滴度,余收集于 EP 管中 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

4. 噬菌体的扩增:取 LB 液体培养基 50ml,加入 200mg/ml 的 Amp 及活化的 BLT5615 细菌各 50 μ l;置于 37 $^{\circ}$ C、240r/min 摇菌培养 2.5h;加 IPTG (1mol/L) 50 μ l 继续恒温摇菌培养 30min。之后加入经 sLRIG1 蛋白筛选的噬菌体洗脱液感染 BLT5615 菌,继续摇菌 2.5h 至菌体裂解。将菌液转移至无菌离心管 8000 $\times g$ 离心 10min,将上清转移至另一无菌管,4 $^{\circ}$ C 储存。反复 3~5 轮筛选直到噬菌体效价稳定,最后挑取单个噬菌斑进行 PCR 测定。

5. PCR 测定:用 10 μ l 灭菌微量加液器挑取单个噬菌斑(只挑取顶层培养基部分),加到心管 EDTA 液体中,每挑取一个噬菌斑更换一个微量加液器;短暂震荡混悬后 65 $^{\circ}$ C 水浴加热 10min;室温冷却,12000 $\times g$ 5min 高速离心;取 2 μ l 作为模板用 Taq 聚合酶进行 PCR 反应。所用引物:T7 上游引物:5' - GGAGCT-GTCGTATTCCAGTC - 3', T7 下游引物:5' - AAC-CCCTCAAGACCCGTTTA - 3'。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 4min;94 $^{\circ}$ C 50s;50 $^{\circ}$ C 1min;72 $^{\circ}$ C 1min;35 个循环;72 $^{\circ}$ C

延伸 10min。琼脂糖电泳照相后按照原平皓生物公司琼脂糖凝胶 DNA 快速纯化试剂盒说明书纯化回收 NDA,送 Invitrogen 公司测序,到 NCBI 的 EST 数据库对测得的核苷酸序列进行比对,将结果进行聚类分析、同源性搜索与功能预测等生物信息学分析,得到和 sLRIG1 蛋白有相互作用的蛋白或多肽的信息。

结 果

1. 筛选 T7 人类肝细胞 cDNA 的结果:经过 6 轮的筛选,第 3 轮至第 6 轮噬菌体的洗脱量达到 10⁶ PFU,噬菌体的投入量、产出量及投入/产出比见表 1。T7 噬菌体投入/产出比随筛选次数增加先是降低,然后趋于稳定,这就表明后来的噬菌体富集程度已趋于饱和,大多数噬菌体都可以和 sLRIG1 蛋白相结合。

表 1 筛选时不同轮次噬菌体的投入量和产出量(PFU)

筛选轮次	噬菌体投入量	噬菌体产出量	投入/产出
1	2.0 $\times 10^{12}$	1.6 $\times 10^6$	1.25 $\times 10^6$
2	6.0 $\times 10^9$	2.4 $\times 10^6$	2.50 $\times 10^3$
3	9.0 $\times 10^{11}$	6.6 $\times 10^6$	1.36 $\times 10^5$
4	3.0 $\times 10^{13}$	1.0 $\times 10^7$	3.00 $\times 10^6$
5	6.0 $\times 10^{13}$	7.4 $\times 10^6$	8.11 $\times 10^6$
6	2.4 $\times 10^{13}$	1.3 $\times 10^7$	1.85 $\times 10^6$

2. 利用特异性 PCR 引物扩增插入片段,回收产物:共送 96 个样本到 Invitrogen 公司测序,将测序结果进行较读。将得到的 35 个序列分别在 NCBI 的 EST 数据库按照人类核苷酸序列进行 BLAST 比对,得到 12 个编码蛋白的序列,详见表 2。

表 2 BLAST 后得到的 12 个蛋白

编号	蛋白名称
1	酮戊二酸脱氢酶样蛋白(oxoglutarate dehydrogenase-like, OGDHL)
2	真核细胞翻译起始因子 2C1(eukaryotic translation initiation factor 2C, 1, EIF2C1)
3	细胞周期蛋白 M3(cyclin M3, CNM3)
4	白蛋白(albumin, ALB)
5	载脂蛋白 C3(apolipoprotein C-III, APOC3)
6	可溶性凝集素半乳糖苷 8(lectin, galactoside-binding, soluble, 8, LGALS8)
7	特异性双磷酸酶 6(dual specificity phosphatase 6, DUSP6)
8	乙醇脱氢酶 1B(alcohol dehydrogenase 1B, beta polypeptide, ADH1B)
9	胞质动力蛋白轻链(dynein, light chain, LC8-type 2, DYN-LL2)
10	玻连蛋白(vitronectin, VTN)
11	高迁移率组蛋白(high-mobility group nucleosomal binding domain 2, HMG2)
12	节点调节蛋白 2(NODAL modulator 2, NOM2)

讨 论

当前,蛋白质组学越来越成为生物医学研究的热门。其中应用于研究蛋白质间相互作用的技术主要是酵母双杂交系统和噬菌体展示技术,与酵母双杂交系统相比,噬菌体展示技术更简单、方便、高通量。结合本研究目的及实验条件,选择了噬菌体展示技术。同时因为 sLRIG1 蛋白在肝细胞表达较高,所以选用肝细胞 T7 噬菌体展示文库作为原始文库。通过 sf9 昆虫表达出重组的 sLRIG1 蛋白,经过高效亲和层析纯化,经 SDS-PAGE 鉴定纯度达到 95% 以上,经过 Western blot 法检测表达正确,具有生物学活性,为有效筛选出特异性结合的蛋白打下了坚实的基础。

用纯化的 sLRIG1 蛋白为靶蛋白,筛选人肝细胞 T7 噬菌体文库,一共进行了 6 轮筛选,第 3~6 轮噬菌体的洗脱量达到 10^6 PFU,投入产出的比例先减小,后趋稳定,表明后来的噬菌体富集程度已趋于饱和。富集的大多数噬菌体可以和 sLRIG1 蛋白相结合。3~5 轮富集程度达到稳定,和文献报道的筛选轮次相一致^[5]。为了进一步提高筛选的特异性,本研究增加了一轮筛选。蚀斑实验可以计数噬菌体滴度,是评估噬菌体富集的基础。在最后一次筛选出的噬菌体测滴度的同时在较高稀释度的蚀斑实验培养皿中可以分离噬菌体克隆,以便测序分析。在挑取噬菌斑时挑取相对较大的噬菌斑,较大的噬菌斑提示噬菌体感染力强。还是有数个噬菌体扩增出 2~3 条条带,可能是几个噬菌斑融合在了一起,形成了混合噬菌体克隆。经过纯化回收 PCR 产物再送测序保证了 DNA 的纯度,保证了测序免受杂质的干扰,保证了测序的准确性和可靠性。这样从 96 个噬菌斑得到 96 份 PCR 产物,经 T7 下游引物测序,测序结果到 NCBI 的

EST 数据库比对,得出的 35 份报告有 5 个序列为染色体读码框,其余有多个序列相互重复,最终得到 12 个编码蛋白质的序列(表 2)。这只是初步的筛选,还有待于今后进一步论证。

噬菌体展示系统最大的优势就是将基因型和表型相结合,与靶蛋白亲和的噬菌体展示蛋白与其基因共同位于同一体系,经过蚀斑实验分离,在经 PCR 扩增基因 DNA 后测序鉴定基因型,再从基因型就可以推导出靶蛋白的相互作用目的蛋白,同时表明插入的部分序列对应的肽段就很可能是该蛋白与靶蛋白相结合的靶位点,为后续 sLRIG1 的作用机制研究提供了重要线索。既往研究表明 sLRIG1 与多 RTK 有关,但是本研究中没有筛选到 RTK 蛋白,而是筛选到其他 12 个新的蛋白,正如 Xu 等^[3]的研究中并没有发现 sLRIG1 与 EGFR 有直接的结合,这表明 sLRIG1 的作用机制还需要进一步研究。

参考文献

- 1 Ledda F, Bieraugel O, Fard SS, *et al.* Lrig1 is an endogenous inhibitor of Ret receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF[J]. *J Neurosci*, 2008, 28:39-49
- 2 Gur G, Rubin C, Katz M, *et al.* LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation[J]. *EMBO J*, 2004, 23(16): 3270-3281
- 3 Xu Y, Soo P, Walker F, *et al.* LRIG1 extracellular domain: structure and function analysis[J]. *J Mol Biol*, 2015, 427(10):1934-1948
- 4 柯应兵,卢祖能,易伟. 杆状病毒蛋白表达系统制备可溶性 LRIG1 蛋白及其鉴定[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17(8):476-478
- 5 Lu H, Zheng YF, Jin DD. Application of laser capture microdissection in screening phage-display peptide library from osteosarcoma tissues[J]. *Diyijunyi Daxue Xuebao*, 2002, 22(12): 1079-1080

(收稿日期:2018-01-15)

(修回日期:2018-01-17)

血清血浆对成骨细胞增殖和分化的影响

贺自克 王上增 薛 艳 郑昱新 丁道芳

摘 要 目的 观察大鼠血清和血浆对大鼠成骨细胞的增殖和分化的影响。**方法** 取出生 24h SD 大鼠头颅骨, I 型胶原酶多次消化后获得成骨细胞, DMEM 加 10% FBS 进行常规培养, 同时细胞免疫荧光鉴定 Col1a1 的表达, 传代后分别用 10% 血清

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81073114, 81072830)

作者单位:450002 郑州, 河南省中医院(贺自克、王上增); 201203 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心(薛艳、郑昱新、丁道芳); 201203 上海市中医药研究院骨伤科研究所(薛艳、郑昱新、丁道芳)

通讯作者:丁道芳, 副研究员, 电子信箱:d.wilhel@qq.com