

# 南 开 大 学

## 本 科 生 毕 业 论 文（设 计）

中文题目：应用噬菌体展示技术筛选构象固化的非天然结合肽

外文题目：Application of phage display technology for screening  
of conformation-fixed unnatural binding peptides

学 号：1010989

姓 名：范金爽

年 级：2010 级

专 业：生物科学

系 别：生物化学与分子生物学系

学 院：生命科学学院

指导教师：洪章勇 教授

完成日期：2014 年 5 月

## 关于南开大学本科生毕业论文（设计）的声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在指导教师指导下，进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本学位论文的研究成果不包含任何他人创作的、已公开发表或没有公开发表的作品内容。对本论文所涉及的研究工作做出贡献的其他个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本学位论文原创性声明的法律责任由本人承担。

学位论文作者签名：

年 月 日

本人声明：该学位论文是本人指导学生完成的研究成果，已经审阅过论文的全部内容，并能够保证题目、关键词、摘要部分中英文内容的一致性和准确性。

学位论文指导教师签名：

年 月 日

## 摘 要

与小分子相比，多肽药物因其生物活性高、选择性高、生物化学多样性高和潜在的毒副作用低而备受关注。然而，稳定性差、膜通透性差、口服生物利用率低等缺点限制了多肽药物的发展。近年来研究表明化学合成的非天然多肽库能改善多肽的众多缺点，环状多肽在一定程度上提高了其稳定性、延长半衰期，一些环状多肽甚至能够穿过细胞膜，因此环状多肽具有广阔的发展前景。但是通过化学方法合成多肽库工作量大、操作复杂阻碍了该项技术的发展。本次实验拟通过噬菌体展示技术从 Ph.D.<sup>TM</sup> 噬菌体肽库中筛选出能与乙肝表面抗原特异性结合的环状多肽。经过三轮亲和淘洗，获得 ACAFKSPSGCGGG 氨基酸序列，将该序列噬菌体进行竞争性实验和结合力检测，初步确定该序列的多肽能乙肝表面抗原特异性结合。将来本实验室拟利用噬菌体展示技术筛选更多具有药用价值的高活性多肽，并通过化学方法将多肽库进行人工改造，使其更加稳定；同时，本实验室将尝试构建高通量的噬菌体随机肽库，将来采用构建的肽库完成筛选实验。

**关键词：**噬菌体展示；淘洗；乙肝表面抗原

## **Abstract**

Researchers have been paying attention to peptide drugs because of their high potency, high selectivity, high chemical and biological diversity, potentially lower toxicity than small molecules. However, many disadvantages such as poor metabolic stability, poor membrane permeability, poor oral bioavailability limit the development of peptide drugs. Recent studies showed that chemically synthesized unnatural peptides have no such disadvantages compared to natural peptides. Cyclization improves stability, half-life, permeability of peptides, thus cyclized peptides have the potential to be used widely in the future. However, it is hard for researchers to synthesize a peptide library chemically. We reported an easier phage display method to select peptides that are specific to the surface antigen of HBV (HbsAg) using commercially available cyclized Ph.D. Phage Display Library (NEB). After three rounds of biopanning, we obtained a peptide sequence ACAFKSPSGCGGG. Competition and ELISA assay showed that the peptide had the ability to bind with HbsAg. In the future, we plan to select more highly active peptides that have the potential to be used clinically using phage display technology. We will also try to modify the peptide chemically to make it more stable. At the meantime, we will construct a novel phage display library for more experiments.

**Keywords:** phage display; panning; HbsAg

## 目 录

摘 要 .....	I
Abstract.....	I
一、前言和文献综述 .....	1
(一) 多肽药物 .....	1
(二) 噬菌体展示 .....	2
(三) 研究目的及意义 .....	3
二、材料和方法 .....	5
(一) 实验材料与试剂 .....	5
1. 实验材料 .....	5
2. 主要仪器 .....	5
3. 常用试剂配制 .....	5
(二) 实验方法 .....	8
1. 实验流程图 .....	8
2. ER2738 菌株的培养 .....	8
3.噬菌体扩增与纯化 .....	8
4. 噬菌体滴度测定 .....	9
5. 噬菌体肽库的淘筛 .....	9
6. 单个噬菌体扩增 .....	10
7. 噬菌体单链 DNA 制备.....	11
8. 琼脂糖凝胶电泳 .....	11

9. 噬菌体-抗体竞争性实验 .....	11
10. ELISA 检测多肽结合能力 .....	12
三、实验数据与结果 .....	13
四、讨论与分析 .....	17
参考文献 .....	20
致 谢 .....	22

## 一、前言和文献综述

### （一）多肽药物

肽是由  $\alpha$ -氨基酸经过脱水缩合反应形成的有机化合物,多肽一般是指氨基酸残基数少于 50 的肽,多条肽链通过  $\alpha$ -螺旋等形式形成具有一定构型构象的蛋白质<sup>[1]</sup>。生物体很多重要的生命活动调节都是经过蛋白间相互作用实现的,如细胞增殖生长与分化、细胞凋亡、免疫等,活性多肽是人体自身分泌的物质,能调节新陈代谢、促进细胞分裂、保证基因表达等<sup>[1,2]</sup>。因此,一些生理活性的多肽备受关注,并通过研发而作为治疗肿瘤、免疫等疾病的药物<sup>[1]</sup>。多肽药物的制备方法主要包括两种,即生物表达和人工合成。多肽药物具有广阔的研究范围,包括多肽类激素、细胞生长因子等<sup>[3]</sup>。多肽药物分子一般是通过与细胞表面受体结合,进而激活与受体相连的效应器,活化的效应器产生“第二信使”来传递信息,从而发挥药理作用<sup>[4]</sup>。

多肽药物相较于传统小分子药物和蛋白类药物具有其特有的优点。多肽药物与传统小分子药物相比,应用范围广并且疗效显著;生物活性高、生物化学多样性高<sup>[1,4]</sup>;毒副作用低,不会在体内蓄积;靶点选择性高<sup>[1,5]</sup>。而与蛋白质药物相比,多肽药物纯度较高、稳定性好、合成成本低;多肽分子比蛋白质小,容易根据需求进行改造;针对性强、易合成、研究周期短等<sup>[1,5]</sup>。由于多肽药物具有不可替代的优势,近年来,合成多肽或肽类衍生物成为药物研发的一个重要领域。目前,已被 FDA 批准上市的多肽类药物非常多,如降血糖药物 GLP-1、抗 HIV 药物 T20、重组人红细胞生成素等<sup>[3]</sup>。

但是传统的多肽药物存在许多不足之处,如稳定性差易被降解、在体内半衰期短、容易被蛋白酶水解、不能穿过细胞膜、给药途径不完善等<sup>[1~7]</sup>。针对这些不足,科学研究通过改善给药途径以提高药物的利用率和化学方法优化蛋白质多肽,如通过注射给药能够在一定程度上避免口服给药的低吸收率和在肠胃易降解的问题;采用聚合体和脂类的给药系统能够减少给药次数并且在一定程度上使药物的长效性增加;通过采取像定点突变、酰基化修饰、糖基化修饰等手段来延长多肽药物在体内的半衰期<sup>[6]</sup>。最近的一些研究表明,一些具有  $\alpha$  螺旋结构的正电荷丰富的多肽能够穿过生物膜的屏障进入细胞发挥作用,而线性多肽易被水解、膜通透性差,且构象不稳定,这种线性多肽与靶标蛋白质的结合能力弱,经过研

究将其设计成具有稳定  $\alpha$  螺旋结构的装订肽<sup>[2]</sup>。所谓装订肽技术是利用共价键如二硫键、碳碳键将线性多肽的不同部分耦连在一起形成环状多肽，这种环状多肽没有游离的氨基末端和羧基末端，这使得其对体内酶的敏感性降低从而延长多肽的半衰期；环状多肽构象得以固定，与受体结合紧密，大多数环状多肽具有较特殊的生物活性，如抗肿瘤、抗病毒等<sup>[2,8]</sup>。但是装订肽技术形成环状肽的过程，需要通过化学合成的方式形成非天然的多肽化合物库，进而才能进行后期药物筛选和药物评价工作。而全化学合成的方式操作过程繁琐、工作量大、生产成本高、实现困难。因此，通过开发生物的方法构建非天然的多肽库来进而实现多肽药物的筛选等工作，这成为众多研究领域备受关注的课题。

## （二）噬菌体展示

噬菌体展示技术（phage display technology）是由 Smith 在 1985 年首次提出，近年来快速发展逐步成熟<sup>[9]</sup>。噬菌体展示技术的基本原理是在噬菌体衣壳蛋白的基因中插入编码随机多肽的基因，使得噬菌体颗粒在表面展示该基因编码的蛋白<sup>[10-12]</sup>，从而为表型和基因型间提供了直接联系。利用该方法，构建重组噬菌体随机肽库，然后利用外源蛋白与目标蛋白的亲和力，使用亲和筛选的方式从噬菌体随机肽库中筛选出特异性噬菌体，通过测定所得到噬菌体多肽的序列来确定其结构，进而研究蛋白质间的相互作用<sup>[12,13]</sup>。噬菌体展示技术的主要内容涉及将外源基因插入噬菌体衣壳蛋白基因中，在其表面表达融合蛋白；应用亲和淘洗的方法筛选出目的重组噬菌体；在噬菌体表面表达的外源多肽或蛋白质的基因序列可通过 DNA 测序获得等（如图 1）<sup>[12,14]</sup>。噬菌体展示技术应用了噬菌体基因的生活周期特性（如基因复制、转录、蛋白表达、侵染等）与基因重组技术巧妙结合而实现<sup>[15]</sup>。近年来，随着生物技术的发展，噬菌体展示技术突飞猛进，现已成功构建了多样性的丝状噬菌体呈现随机肽库，并广泛应用于抗体模拟表位筛选、活性多肽的研究工作中<sup>[16]</sup>。由于在噬菌体表面融合表达的多肽或蛋白质具有与天然蛋白质相似的结构和功能，因此通过靶标蛋白的筛选，能够得到与靶分子特异性结合的多肽或蛋白，得到的多肽或蛋白与靶分子具有较强的亲和力，这对于多肽药物的研发是一项很大的突破<sup>[17]</sup>。根据文献报导显示，应用噬菌体展示技术，已经得到与人类免疫缺陷病毒特异性结合的多肽，其对病毒与 CD4 的结合有抑制作用；与 IgG Fc 段特异性结合的多肽能同几种天然蛋白质结合<sup>[16]</sup>。由此



可以看出，这种噬菌体肽库在心脑血管病、艾滋病、肿瘤等方面的药物研究中有不可估量的价值<sup>[17,18]</sup>。

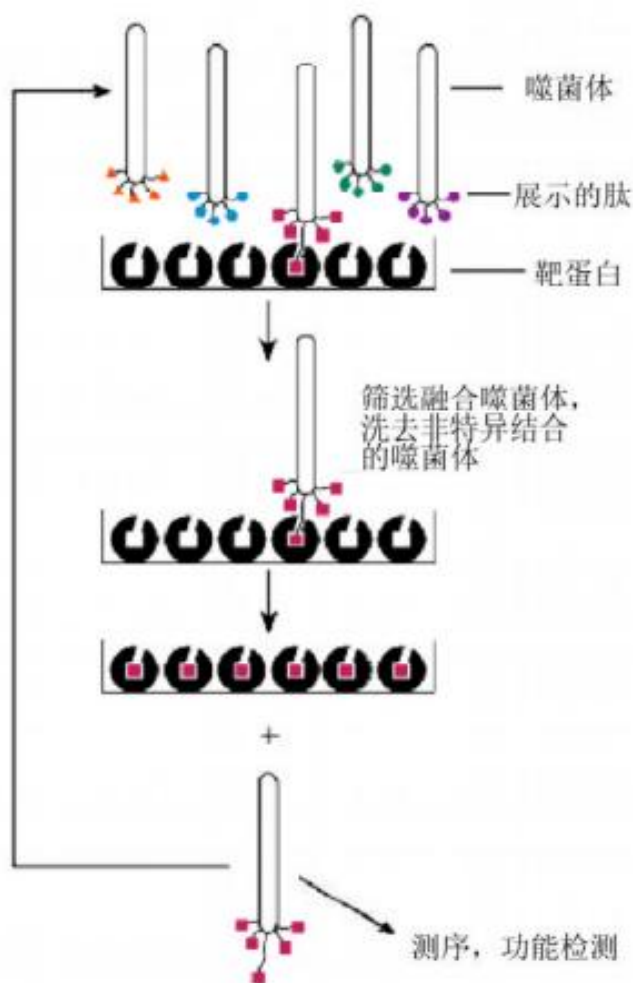


图 1. 噬菌体展示技术流程图<sup>[14,19]</sup>

### （三）研究目的及意义

通过噬菌体展示技术能够实现对蛋白质构型构象的控制改造，进而获得所需的理想产物。随着生物技术的发展，其应用范围越来越广，并在多肽药物发展研究中发挥着不可取代的作用<sup>[12]</sup>。近年来通过该方式已成功定位了乙肝病毒表面抗原、丙肝病毒表面抗原等疾病的抗原表位等<sup>[13,15]</sup>。但是通过这种噬菌体展示技术筛选出的多肽多为线性的，其稳定性较差，并且只能用来构建天然肽库。因此，我们实验室关键技术是在未来实现对噬菌体肽库进行化学操作，变成非天然肽库。首先，尝试构建含二硫键的环状肽库，并对多肽进行筛选；当这一项技术成熟后，再构建其他形式的非天然多肽库，如在外源融合肽的两端插入半胱氨酸，

当噬菌体外膜蛋白表达时两个半胱氨酸上巯基通过二硫键使外源融合肽形成构象稳定的环状多肽。此种环形肽可显著增加多肽在体内的稳定性，大大提高了在体内发挥作用的效率。

此次实验首先尝试应用 Ph.D.<sup>TM</sup> 噬菌体肽库对乙肝表面抗原具有超强结合能力的肽进行高通量的筛选。乙肝表面抗原是乙肝病毒感染的标志，它使得 HBV 靶向宿主细胞并且决定 HBV 最初的侵染过程<sup>[15,19]</sup>。用噬菌体展示技术筛选出的乙肝表面抗原结合肽能特异性的与乙肝表面抗原的免疫显性区域结合，从而抑制病毒与宿主的相互作用，阻止乙肝病毒进入细胞，促进免疫应答反应溶解感染细胞；另一方面，可以利用这种筛选出的多肽进行靶向，使治疗药物能准确地作用于感染细胞，从而提高药物的治疗效果并降低药物的副作用<sup>[20,21]</sup>。

## 二、材料和方法

### （一）实验材料与试剂

#### 1. 实验材料

材料名称	来源
M13 噬菌体肽库	New England Biolabs (NEB)公司
E.coli ER2738	New England Biolabs (NEB)公司
重组人乙肝表面抗原 (HbsAg)	上海森润生物科技有限公司
HRP 联结的抗 M13 抗体	北京义翘神州生物技术有限公司 (Sino Biological Inc)
人乙肝表面抗原抗体 (包被)	上海将来试剂科技有限公司
TMB liquid-1 component	Amresco
Tetracycline hydrochloride	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
X-gal	生工生物工程 (上海) 股份有限公司

#### 2. 主要仪器

- (1) Eppendorf Centrifuge 5810R 离心机
- (2) Thermo scientific Legend Micro 17R 离心机
- (3) Thermo scientific 酶标仪
- (4) Boxun Hpx-9250 MBE 培养箱: 上海博迅实业有限公司医疗设备厂
- (5) ZhiCheng ZWY-211C 恒温培养振荡器: 上海智程分析仪器制造有限公司
- (6) Hirayama HV-85 灭菌器: 广州华粤行仪器有限公司

#### 3. 常用试剂配制

##### (1) LB 培养基:

NaCl	5 g
胰蛋白胨	10 g
酵母粉	5 g
加入 ddH <sub>2</sub> O 定容至	1 L

用 NaOH 调节 pH 7.0-7.5

琼脂粉（若配制固体培养基） 15 g

0.05 MPa 灭菌 20 min

（2）IPTG/X-gal 溶液：

IPTG 1.25 g

X-gal 1 g

二甲基甲酰胺 25 mL

保存条件 -20℃避光保存

（3）Lodide 缓冲液：

Tris-HCl 10 mmol/L

EDTA 1 mmol/L

NaI 4 mol/L

用 NaOH 调节 pH 至 8.0

保存条件 室温避光保存

（4）LB/IPTG/X-gal 培养板：

已灭菌的 LB 固体培养基冷却至 70℃以下，加入 1 mL IPTG/X-gal 溶液（1 L LB 固体培养基）。

（5）顶层琼脂：

NaCl 5 g

胰蛋白胨 10 g

酵母浸出粉 5 g

琼脂粉 7 g

加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L

用 NaOH 溶液调节 pH 至 7.4

0.05 MPa 灭菌 20 min

（6）TBS 缓冲液：

Tris-HCl 50 mmol/L

NaCl 150 mmol/L

用 NaOH 调节 pH 至 7.5

(7) PEG/NaCl:

PEG-8000 20% (w/v)

NaCl 2.5 mol/L

0.05 MPa 灭菌 20 min

(8) Gly-HCl:

甘氨酸 0.1 mol/L

用 HCl 调节 pH 至 2.2

0.05 MPa 灭菌 20 min

(9) Tris-HCl:

Tris-HCl 1 mol/L

用 NaOH 调节 pH 至 9.0

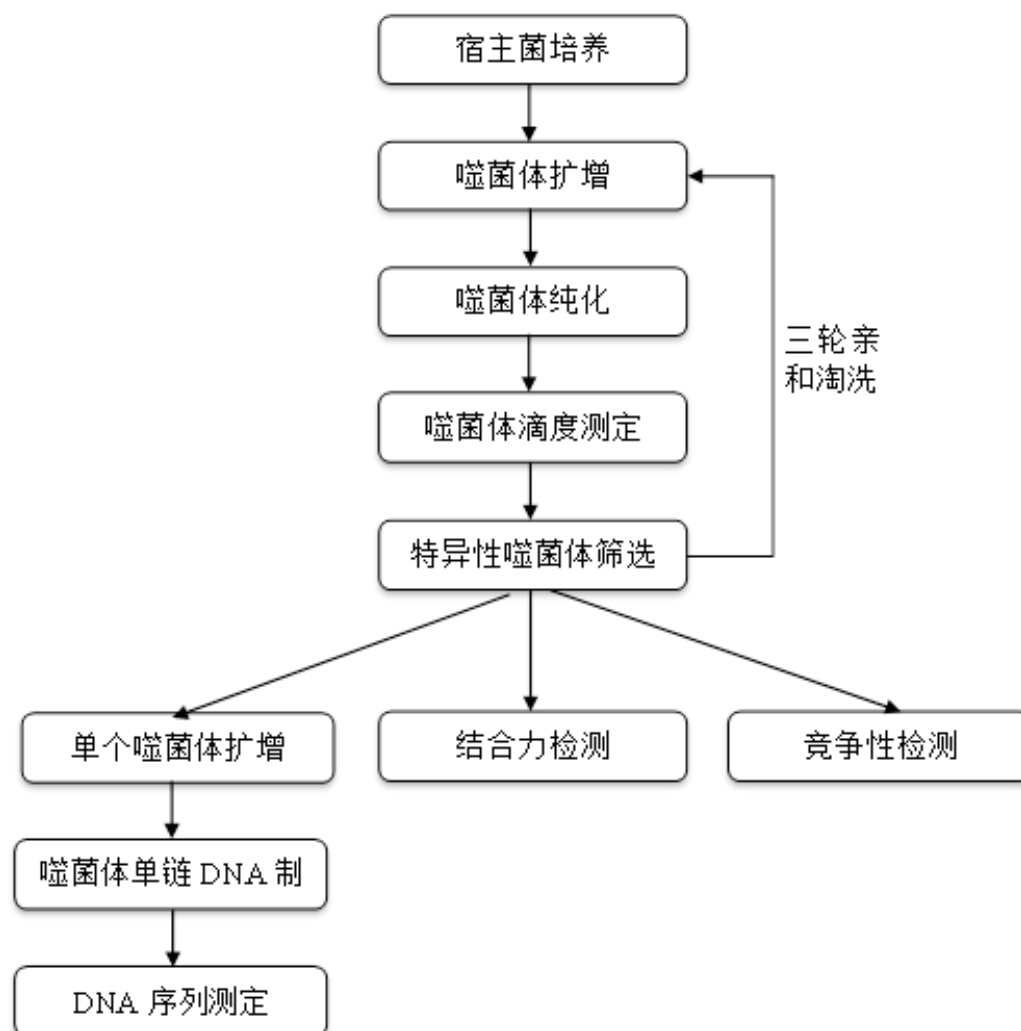
0.05 MPa 灭菌 20 min

(10) TBST:

在灭菌后的 TBS 缓冲液中加入 0.05% (v/v) Tween-20。

## (二) 实验方法

### 1. 实验流程图



### 2. ER2738 菌株的培养

- (1) 取 1  $\mu\text{L}$  NEB 原装的 ER2738 甘油菌与 10  $\mu\text{L}$  LB 液体培养基混合后,涂四环素抗性的 LB 平板,置于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱过夜;
- (2) 第二天取出平板,封口并用锡箔纸包被后置于 4 $^{\circ}\text{C}$  避光保存备用。

### 3. 噬菌体扩增与纯化<sup>[22,23]</sup>

- (1) 从四环素抗性平板上挑取 ER2738 单克隆接种到 20 mL LB 液体培养基,

- 加入 100  $\mu\text{L}$  待扩增的噬菌体, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 250 r/min 振荡培养 5-6 h;
- (2) 将培养后的菌液转入离心管中, 放入已预冷离心机于 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10 000 r/min 离心 10 min;
  - (3) 取出上清, 加入 1/6 上清体积的 PEG/NaCl 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$  沉淀过夜;
  - (4) 取出过夜沉淀的液体置于预冷离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清;
  - (5) 用 1 mL TBS 溶液将沉淀溶解, 转入 1.5 mL EP 管, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10 000 r/min 离心 10 min, 将残余细胞去除;
  - (6) 将上清转入新的 EP 管中, 加入 1/6 上清体积的 PEG/NaCl, 充分混合后于冰上放置 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清;
  - (7) 用 100  $\mu\text{L}$  TBS 重悬沉淀, 短暂离心后, 将上清转移至新 EP 管中, 即为扩增噬菌体, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 4. 噬菌体滴度测定<sup>[23,24]</sup>

- (1) 从四环素抗性平板上挑取 ER2738 单克隆接种到 3 mL LB 液体培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$  摇床至对数生长期 ( $OD_{600} \approx 0.5$ );
- (2) 将融化的顶层琼脂分装 4 mL/管, 于 45 $^{\circ}\text{C}$  水浴保温备用;
- (3) 用 TBS 缓冲液将扩增(洗脱)后的噬菌体进行 10 倍系列稀释, 即将 10  $\mu\text{L}$  噬菌体加入 990  $\mu\text{L}$  中;
- (4) 取已稀释的噬菌体 10  $\mu\text{L}$  与 200  $\mu\text{L}$  对数生长期的宿主菌液中, 混合均匀后, 于室温放置 5 min;
- (5) 在 45 $^{\circ}\text{C}$  保温的顶层琼脂中加入上述感染菌液中, 快速混匀, 倾注于 LB/IPTG/X-gal 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜;
- (6) 选择长有 100 左右蓝色菌斑的平板计数, 用该数乘以对应的稀释倍数后再乘以 100 即为可获得噬菌体的滴度 (pfu/mL);

#### 5. 噬菌体文库的淘筛<sup>[25]</sup>

- (1) 设计以下三组实验:

① 配置 5  $\mu\text{g/mL}$  的 HbsAg 溶液, 溶剂为 TBS, 将其加入到微孔板中 (100  $\mu\text{L}$

- /孔), 共做了 8 个孔
- ② 配置 5  $\mu\text{g/mL}$  的 BSA 溶液, 溶剂为 TBS, 将其加入到微孔板中 (100  $\mu\text{L}$ /孔), 共做了 8 个孔
- ③ 8 个微孔不作处理
- (2) 包被: 将 ELISA 板用保鲜膜包好后, 置于 27 $^{\circ}\text{C}$  摇床 180 r/min 振荡 1 h , 然后置于 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜;
- (3) 洗涤: 倒掉 ELISA 板中的液体, 并保证孔内无残留, 用 TBST 清洗 6 次;
- (4) 封闭: 向每孔内加入 200  $\mu\text{L}$  Blocking Buffer 置于室温条件下 ( $\sim 27^{\circ}\text{C}$ ) 振荡 2 h;
- (5) 洗涤: 倒掉 ELISA 板中的液体, 并保证孔内无残留, 用 TBST 清洗 6 次
- (6) 结合: 向每个微孔中加入 110  $\mu\text{L}$  用 TBS 稀释后的噬菌体 (稀释后滴度为  $1.0 \times 10^{11}$  pfu/mL), 置于摇床上 27 $^{\circ}\text{C}$  180 r/min 振荡 1 h , 弃上清;
- (7) 清洗: 向每孔内加入适量的 0.05% TBST 清洗 10 次, 移去未结合的噬菌体;
- (8) 洗脱: 向清洗好的孔中分别加入 120  $\mu\text{L}$  的 Glycine-HCl 后, 充分混合 5 min;
- (9) 中和: 将上清收集至 1.5 mL EP 管中, 加入 15  $\mu\text{L}$ /孔 Tris-HCl, 混匀后备用;
- (10) 重复步骤 (8) - (9), 并将三次洗脱噬菌体充分混合, 将洗脱下的噬菌体置于 4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用;
- (11) 将洗脱的特异性噬菌体进行滴度测定。

## 6. 单个噬菌体扩增<sup>[23]</sup>

- (1) 从四环素抗性平板上挑取 ER2738 单克隆接种于 1 mL LB 培养基, 每个待扩增的噬菌体克隆一管;
- (2) 用无菌牙签挑取单个蓝色噬菌斑, 加入到已接种 ER2738 宿主菌的 LB 培养基中, 置于摇床 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 5-6 h;
- (3) 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10 000 r/min 将培养物离心 5 min 后, 将上清转移至 1.5 mL EP 管中, 4 $^{\circ}\text{C}$  存放备用。



## 7. 噬菌体单链 DNA 制备<sup>[22,23]</sup>

- (1) 取噬菌体克隆的扩增贮液，加适量 PEG/NaCl（每 500  $\mu\text{L}$  噬菌体中加入 200  $\mu\text{L}$  PEG/NaCl），混合均匀，室温放置 10 min；
- (2) 4℃，10 000 r/min，离心 10 min，弃上清；
- (3) 用适量 Lodide Buffer 将沉淀重悬中，充分溶解后，加入适量无水乙醇（每 500  $\mu\text{L}$  噬菌体加入 100  $\mu\text{L}$  Lodide Buffer，250  $\mu\text{L}$  无水乙醇），充分混合，室温放置 10 min；
- (4) 4℃ 10 000 r/min，离心 10 min，去上清；
- (5) 用等量 70%乙醇洗涤沉淀 2 次，在吸弃上清时注意不要吸到沉淀，倒置晾干；
- (6) 15  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液溶解沉淀中，置于-20℃保存备用。

## 8. 琼脂糖凝胶电泳

- (1) 配制 0.8%的琼脂糖凝胶（添加 EB）；
- (2) 取适量冻存噬菌体单链 DNA（2-5  $\mu\text{L}$ ）点样进行琼脂糖凝胶电泳。

## 9. 噬菌体-抗体竞争性实验<sup>[15,24]</sup>

- (1) 用 TBS 将 HbsAg 稀释到 3  $\mu\text{g/mL}$ ，并加入到微孔板中，每孔 100  $\mu\text{L}$ ；
- (2) 将 ELISA 板用保鲜膜包好后，置于 25℃摇床 180 r/min 振荡 1 h，然后置于 4℃过夜；
- (3) 将包被 HbsAg 的 ELISA 板取出后，倒掉 ELISA 板中的液体，并保证孔内无残留，用 TBST 清洗 6 次；
- (4) 加入 200  $\mu\text{L}$  Blocking Buffer，25℃，180 r/min 振荡 2 h ；
- (5) 倒掉 ELISA 板中的液体，并保证孔内无残留，用 TBST 清洗 6 次；
- (6) 用 100  $\mu\text{L}$  PBS（含 10 mg/mL BSA，0.1%NaN<sub>3</sub> pH 7.4）溶解 anti-HbsAg antibody（100  $\mu\text{g}$ ）；
- (7) 将 anti-HbsAg antibody 按 1:1000 稀释后，取若干份每份 50  $\mu\text{L}$ ，与 50  $\mu\text{L}$  不同滴度的噬菌体混合；
- (8) 将混合物加入到包被了 HbsAg 的 ELISA 孔中，每种 3 个复孔；

- (9) 同时分别取 50  $\mu\text{L}$  TBS 与 50  $\mu\text{L}$  噬菌体混合，混匀后同样加入到包被 HbsAg 的 ELISA 板中，作为对照组；
- (10) 将 ELISA 板包上保鲜膜置于 27 $^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min 孵育 1 h；
- (11) 用适量的 0.05% TBST 洗去未结合的噬菌体 10 次；
- (12) 在每个孔内加入 120  $\mu\text{L}$  Gly-HCl Buffer 洗脱结合的噬菌体，每次洗脱后每孔加入 15  $\mu\text{L}$  Tris-HCl (pH 9.0)；
- (13) 将洗脱下的噬菌体进行 10 倍梯度稀释，选择原液、 $10^2$  稀释液、 $10^4$  稀释液进行蓝白斑检测。

#### 10. ELISA 检测噬菌体结合能力<sup>[26]</sup>

- (1) 将靶标蛋白 HbsAg 进行两倍梯度稀释（如：16  $\mu\text{g/mL}$ 、8  $\mu\text{g/mL}$ 、4  $\mu\text{g/mL}$ 、2  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、0.25  $\mu\text{g/mL}$ ）后包被微孔板。A 排中加入最高浓度，从 B 排到 G 排浓度依次降低。H 排不要加入靶标溶液，以作为对照来测定噬菌体的非特异性结合；
- (2) 在单独的一个非黏性微孔板中，将噬菌体在 TBS 中进行十倍梯度稀释，使得第 1 道中噬菌体浓度最高，第 2 道至第 12 道浓度依次降低；
- (3) 倒出并控干步骤（1）中包被过的微孔板中的洗涤缓冲液，将 100  $\mu\text{L}$  稀释后的噬菌体溶液直接加入固定了靶标的微孔板中；
- (4) 用保鲜膜包好微孔板，在室温下放置 60 min；
- (5) 吸取微孔板中的溶液，用 0.05%TBST 洗涤 10 次；
- (6) 加入用 TBS 稀释 1000 倍后 HRP 联结的抗 M13 抗体，每孔 100  $\mu\text{L}$ ，在室温下反应 20 min，吸去微孔板内的液体，洗涤 8 次，倒出并控干洗涤缓冲液；
- (7) 加入 100  $\mu\text{L}$  TBS 显色液（预先在室温下平衡），在摇床上避光充分振荡 10 min；
- (8) 立即加入 100  $\mu\text{L}$  2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液终止显色反应，充分振荡 30 s 后用酶标仪读取 450 nm 处 ( $A_{450}$ ) 的吸光度值

### 三、实验数据与结果

#### （一）Ph.D.<sup>TM</sup> 噬菌体肽库扩增后提取的单链 DNA

将 Ph.D.<sup>TM</sup> 噬菌体随机肽库进行扩增纯化，并测定滴度；在对应的平板上挑取单个噬菌体克隆培养一段时间，离心后提取上清中噬菌体单链 DNA，然后用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳，结果如图 2 所示。

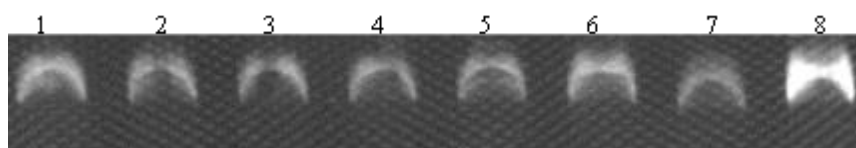


图 2. 噬菌体肽库扩增后单链 DNA 提取泳道 1-8 为噬菌体肽库扩增后提取的不同单个噬菌斑单链 DNA，DNA 片段长度为 7222 bp

#### （二）以 HbsAg 为靶标，筛选结合噬菌体

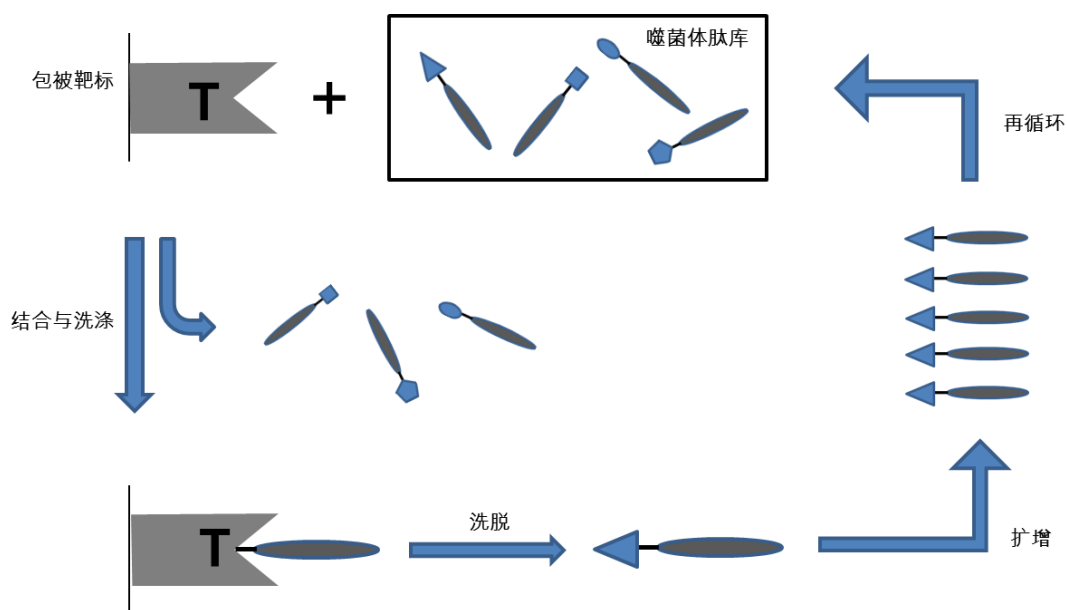


图 3. 特异性噬菌体淘洗示意图<sup>[15]</sup>

在微孔板中分别包被稀释的靶标分子 HbsAg、BSA 以及设计空白对照，在 4℃ 包被过夜；Blocking Buffer 封闭液封闭；加入噬菌体孵育；用 TBST 洗脱未结合噬菌体，低 pH 缓冲液洗脱结合噬菌体，加入 Tris-HCl 中和后，将洗脱噬菌体扩增，再进行新一轮筛选，按照“吸附-洗脱-扩增”循环式进行 3 轮淘洗，噬菌体淘洗示意图如图 3，每轮筛选的噬菌体富集程度如图 4 所示。在每轮淘洗蓝

白斑测定噬菌体滴度后，从包被 HbsAg 的平板上挑取若干个单克隆噬菌斑，扩增后提取噬菌体单链 DNA，进行琼脂糖凝胶电泳，电泳结果图如图 5 所示。将经琼脂糖凝胶电泳检测后的噬菌体单链 DNA 进行测序，每一轮测序结果如表 1 所示。

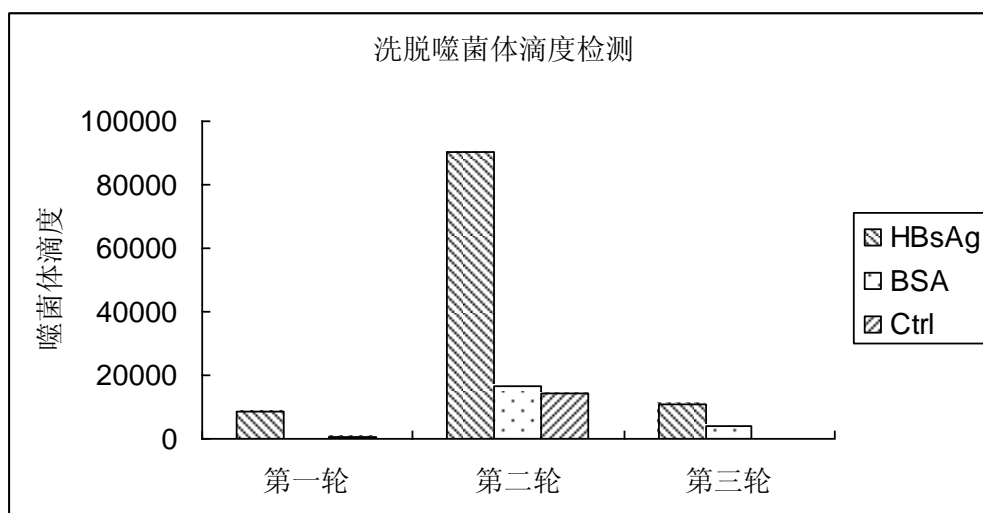


图 4. 各轮淘洗与乙肝表面抗原特异性结合噬菌体的富集

图中显示的分别是以 HbsAg 为靶标，在噬菌体文库中筛选特异性结合噬菌体的第一、二、三轮淘洗结果。每一轮都在微孔板上包被 HbsAg 并以包被同浓度 BSA 和空白微孔板作为对照

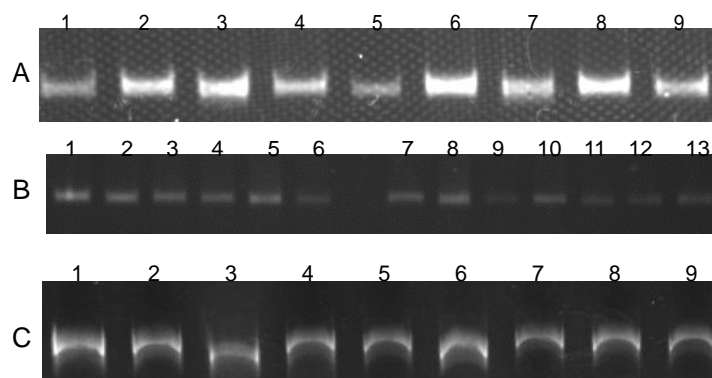


图 5. 各轮淘洗后提取单克隆噬菌体单链 DNA

第一、二、三轮淘洗后在包被 HbsAg 对应的平板上随机挑取单克隆的噬菌斑，扩增后提取噬菌体单链 DNA。A、B、C 分别为第一、二、三轮淘洗提取的噬菌体单链 DNA，提取 DNA 序列的大小为 7222 bp

表 1 每轮洗脱噬菌体测序结果

洗脱的次数	氨基酸序列
第一轮洗脱	ACPENKPRLCGGG
	ACGPLKSMMCGGG
第三轮洗脱	ACAFKSPSGCGGG

### (三) 噬菌体-抗体竞争性试验

在微孔板上包被稀释的 HbsAg, 4℃ 包被过夜, Blocking Buffer 封闭液封闭; 将 anti-HbsAg 抗体稀释, 并取 50  $\mu$ L 与同体积的稀释噬菌体混合加入到包被 HbsAg 的微孔板中, 同时将 50  $\mu$ L TBS 与同样噬菌体混合加入微孔板作为对照, 实验组和对照组同时孵育一定时间; 用 TBST 洗去未结合噬菌体, 用酸性缓冲液洗脱结合噬菌体, 然后应用蓝白斑检测的方式测定滴度。滴度测定结果如图 6。

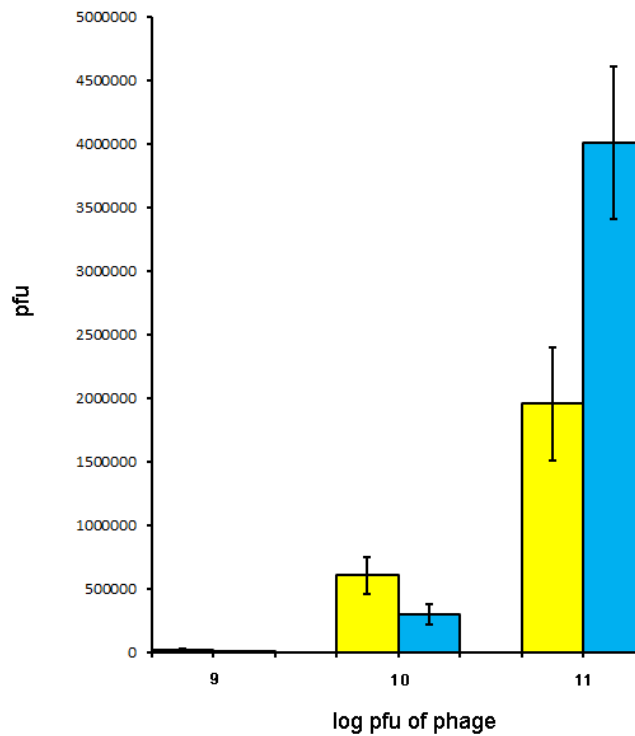


图 6. 噬菌体-抗体竞争结果

噬菌体-抗体竞争结果图。图中黄色部分为对照组, 即未加入 anti-HbsAg 抗体, 用 TBS 与噬菌体混合; 蓝色部分为实验组, 即加入 anti-HbsAg 抗体, 用稀释抗体与噬菌体混合

#### (四) ELISA 检测多肽结合力

将 HbsAg 进行 2 倍梯度稀释加入微孔板包被过夜；用 Blocking Buffer 封闭液封闭；将 10 倍梯度稀释第三轮洗脱噬菌体单克隆加入到微孔板中，同时加入未经淘洗的单克隆噬菌体和未包被 HbsAg 而加入噬菌体作为对照，共同孵育；加入适量 1000 倍稀释的 HRP 联结的抗 M13 抗体，孵育 20 min；加入 TMB 显色液，避光振荡 10 min；加入  $H_2SO_4$  溶液终止反应，用酶标仪读取 450 nm 处吸收光度后。将吸收光度值已测定的结合噬菌体的量对噬菌体滴度（与每个被包被的靶标的浓度相对应）作图，可以得到噬菌体结合力曲线，如图 7 所示。

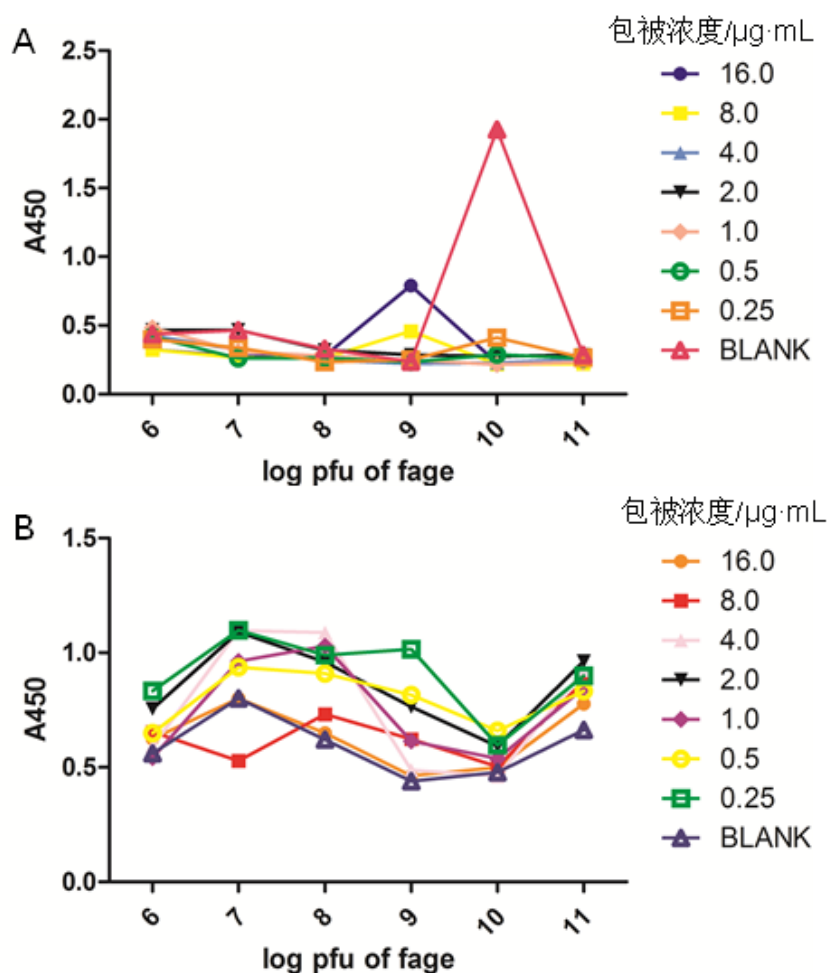


图 7. ELISA 检测噬菌体结合力

ELISA 检测噬菌体结合力，将不同浓度靶标 HbsAg 包被在微孔板上后，用不同滴度噬菌体进行实验。图中(A)对照组，即用非特异性噬菌体单克隆进行实验；(B)实验组，即用第三轮淘洗后的噬菌体单克隆扩增后进行检测。其中 BLANK 组不包被 HbsAg

#### 四、讨论与分析

M13 噬菌体能够侵染带有 F 因子的雄性大肠杆菌，感染宿主细胞后，直接分泌出噬菌体，并不裂解宿主细胞，被感染的细胞仍能进行增殖。而 M13 噬菌体扩增后的滴度测定是通过蓝白斑检测进行的。M13 噬菌体的宿主细胞大肠杆菌 ER2738 菌株中由于缺少编码  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) 的调控序列，使得  $\beta$ -半乳糖苷酶 N 端缺少一段 146 个氨基酸的肽段 ( $\alpha$  肽链)，从而无法作用于 X-gal 产生蓝色物质。然而 M13 噬菌体含有一段被称为 *lacZ $\alpha$*  的基因，其包含  $\beta$ -半乳糖苷酶启动子和编码  $\alpha$  肽链的基因。当 M13 噬菌体侵染 ER2738 菌株时，噬菌体 *lacZ $\alpha$*  基因编码的  $\alpha$  肽链与 ER2738 菌株表达的无  $\alpha$  肽链形成  $\alpha$  互补，而具有与完整  $\beta$ -半乳糖苷酶相同的作用，IPTG 会激活 *lacZ $\alpha$*  中的  $\beta$ -半乳糖苷酶的启动子，使得 X-gal 产生蓝色物质 5-溴-4-靛蓝<sup>[27]</sup>。因此 M13 噬菌体侵染 ER2738 大肠杆菌时能够应用蓝白斑检测来进行噬菌体滴度测定。M13 噬菌体的遗传物质为环状单链 DNA，结构图如图 8 所示。

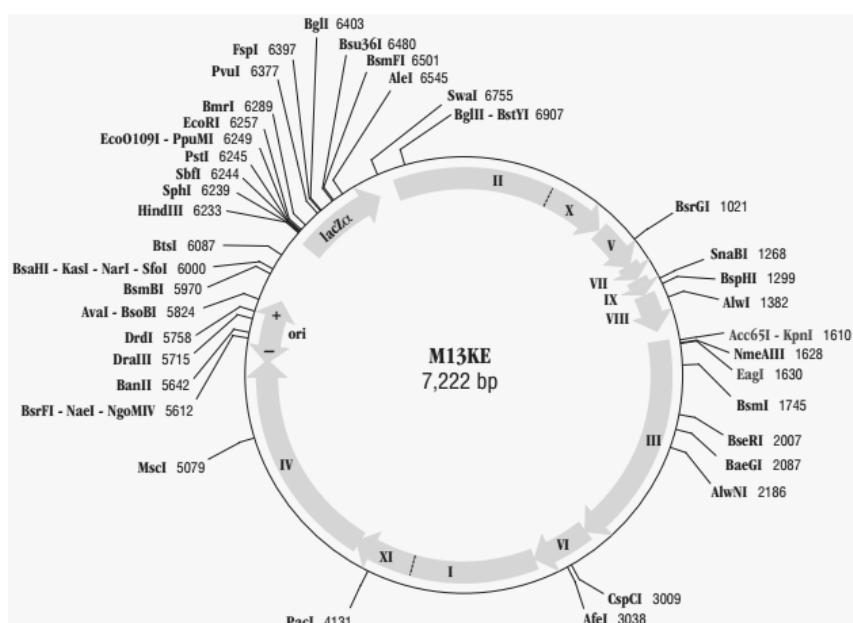


图 8. M13 噬菌体环状单链 DNA 示意图

从噬菌体随机肽库中筛选目的多肽主要是通过亲和筛选的方法来进行,在经过每一轮淘洗过程中阳性噬菌体克隆得到富集,然而根据文献报道,在经过 3 轮以上淘洗时,噬菌体的富集程度基本不变甚至会有所下降,因此,在此次实验时进行三轮淘洗,并且在每一轮都设计了包被 HbsAg、BSA 和空白三组实验。噬菌体淘洗实验的对比结果如图 4 所示,经过第一、二轮淘洗,阳性噬菌体克隆

得到富集,在第二轮淘洗中包被 HbsAg 筛选的噬菌体的富集程度是包被 BSA 和空白对照组噬菌体富集程度的 9 倍左右,这充分表明筛选的阳性噬菌体克隆与 HbsAg 有一定的结合能力,而在第三轮淘洗时测定的滴度偏低,表明与 HbsAg 结合的噬菌体并未得到富集。在亲和淘洗实验中会有许多因素影响噬菌体的富集,如靶标分子的用量或浓度、洗脱时间、洗脱液的 pH、噬菌体的存放时间等。通过分析猜测在第三轮洗脱中并未达到预期实验结果的原因可能是因为噬菌体存放时间过长或包被的 HbsAg 失效导致。今后在实验过程中会逐渐优化噬菌体存放条件,进一步探讨最优靶标分子浓度和洗脱时间等。

对每一轮淘洗噬菌体进行随机挑取单克隆噬菌体提取 DNA 后测序,以确定与靶标分子结合噬菌体多肽的氨基酸序列,经测定第一轮淘洗氨基酸序列为 ACPENKPRLCGGG 和 ACGPLKSMMC GGG 两种,而测得第三轮淘洗氨基酸序列为 ACAFKSPSGCGGG(该序列化学结构示意图如图 9 所示)一种,这说明第三轮淘洗中这种序列的比例较高,在随机挑取单克隆噬菌体提取 DNA 时,选择的均为这一序列。在淘洗过程中,特异性噬菌体逐渐富集,而亲和淘洗并不能完全排除非特异性噬菌体克隆的存在,因此进一步挑取单克隆噬菌体确定其与靶标分子的特异性吸附和亲和力是必要的实验操作,一般应用酶联免疫分析(ELISA)的方法检测其亲和力<sup>[22]</sup>。

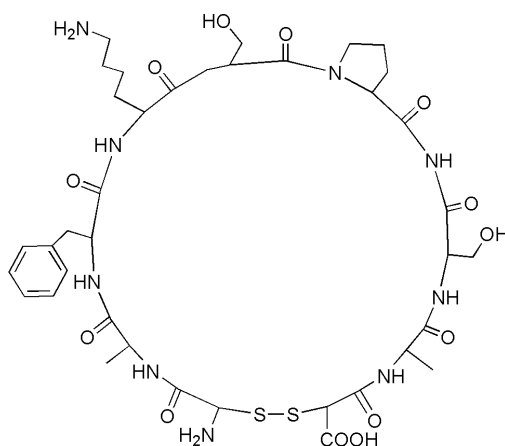


图 9. 氨基酸序列化学结构示意图

该氨基酸是经三轮淘洗后获得的单克隆噬菌体多肽,经测序分析得到这个氨基酸序列为 CAFKSPSGC。经实验检测,初步认为,该序列多肽在筛选过程中会在一定程度上得到富集,而且经检测这种多肽对 HbsAg 有一定的结合能力。

为确定筛选出的噬菌体与靶标分子 HbsAg 具有结合力,进行噬菌体-抗体竞



争实验。该实验主要应用第三轮洗脱噬菌体与 anti-HbsAg 抗体混合加入包被 HbsAg 微孔板中，以 TBS 与相同噬菌体混合为对照组，而后通过测定结合噬菌体的滴度来对比实验组与对照组的差异。竞争性实验结果如图 6 所示。anti-HbsAg 抗体的加入会同噬菌体竞争的与 HbsAg 结合，使得噬菌体与靶标分子 HbsAg 的结合减少，进而测定的结合噬菌体的滴度会有所下降，而不加入 anti-HbsAg 抗体的对照组，所有 HbsAg 靶标分子均与噬菌体结合，因而测得的洗脱噬菌体的浓度会偏高。然而图 6 结果显示，噬菌体滴度为  $10^{11}$  pfu/mL 时，实验组的滴度高于对照组滴度，这可能是在记录过程中出现标记错误或者实验操作失误导致。由于一些资料显示，此方法具有实验可变因素过多、实验数据不准确、可重复性差等缺点，因此在后期实验中并未重复进行此实验已确定预期结果的正确性，而是采用了其他方式来替代。

通过 ELISA 的方法检测噬菌体结合力能够准确的表明噬菌体与靶标分子的亲和力。将靶标蛋白 HbsAg 进行 2 倍梯度稀释与第三轮淘洗后不同滴度单克隆噬菌体结合一段时间，以非特异性单克隆噬菌体作为对照；加入 HRP 联结抗 M13 抗体反应一定时间；加入 TMB 显色液振荡 10 min；加入  $H_2SO_4$  终止显色反应后用酶标仪测定在 450 nm 处吸光光度。用已测定吸光光度值的结合噬菌体的量，对每个监测的靶标包被浓度相对应的不同噬菌体样品作图，如图 7。图 7A 显示对照组，即非特异性噬菌体对靶标 HbsAg 亲和力的结果，从图中可以看出非特异性噬菌体对靶标蛋白 HbsAg 的结合力基本相同；而图 7B 显示噬菌体滴度为  $10^{10}$  pfu/mL 时，噬菌体与靶标蛋白 HbsAg 结合力明显上升，但可能因为包被噬菌体滴度较低，不能检测到滴度在  $10^{11}$  pfu/mL 之上的结合力。因此，由此实验只能看出淘洗的噬菌体与靶标蛋白 HbsAg 有一定的结合力，而结合力的大小并未检测出，也并未检测出与噬菌体结合的最低靶标蛋白浓度。后期实验将继续进行结合力检测，以确定最低的靶标蛋白 HbsAg 浓度，使得噬菌体饱和度为 50% 时能与靶标蛋白结合产生 1.2 左右的信号强度。然后，在知道最低靶标蛋白浓度的情况下，为每一个单克隆噬菌体生成结合力检测曲线，进而计算出单克隆噬菌体在饱和度为 50% 的情况下与靶标结合的最佳滴度<sup>[26]</sup>。

## 参考文献

- [1] 张伟, 宋竞婧, 张邦治, 等. 多肽新药研发策略研究进展. 中国科学: 化学, 2013, 43(08):941-952.
- [2] 高帅, 郭叶, 李海燕, 等. 订书肽的合成与应用. 化学进展, 2013, 29(01): 100-109.
- [3] 姚金凤, 白露, 宋亚芳, 等. 多肽类药物代谢研究进展. 中国药理学通报, 2013, 29(7): 895-899.
- [4] 陈康庆, 梅丽琴, 林塘焕, 等. 多肽药物研究进展. 中国药学会、天津市人民政府. 2010年中国药学会大会暨第十届中国药师周论文集. 中国药学会、天津市人民政府, 2010:8.
- [5] Sato A K, Viswanathan M, Kent R B, *et al.* Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Current opinion in biotechnology*, 2006, 17(6): 638-642.
- [6] 傅一鸣, 王清明, 安利国. 蛋白质和多肽药物长效性研究进展. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2008, 20(2): 258-262.
- [7] 白海娇, 王亚敏, 丁一. 多肽类药物有关物质研究的探讨. 天津药学, 2013 (1): 9-11.
- [8] 吕德官, 陈临溪. 人体内环肽功能的研究进展. 国际病理科学与临床杂志, 2013 (4):343-350.
- [9] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317.
- [10] 何光志, 田维毅, 高英, 等. 抗乙肝病毒人源噬菌体单链抗体库的构建及筛选. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 4(7): 9-12.
- [11] 贾球锋, 李丽芳, 张映. 噬菌体展示技术. 动物医学进展, 2006, 27(2): 101-103.
- [12] 李珣, 任珍珍, 钟国华. 噬菌体展示技术在蛋白质研究中的应用. 生命的化学, 2009, 29(004): 588-594.
- [13] 黄丽群, 郑捷. 从噬菌体肽库中筛选抗原模拟表位的研究进展. 国外医学: 皮肤性病学分册, 2004 30(6): 390-392.
- [14] Majumdar S, Hajducski A, Mendez A S, *et al.* Phage display of functional, full-length human and viral membrane proteins[J]. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2008, 18(22): 5937-5940.
- [15] 邵宁生, 杨光, 房涛. 生物文库技术——噬菌体展示与 SELEX 技术. 军事医学科学出版社, 2011.
- [16] 万瑛, 吴玉章. 人源多克隆抗血清识别的 HBsAg 模拟表位筛选. 第三军医大学学报, 2000, 22(10): 924-926.
- [17] 刘相叶, 邓洪宽, 吴秀萍, 等. 噬菌体展示技术及其应用. 动物医学进展, 2008, 29(1): 60-63.
- [18] 李婧炜. 噬菌体展示技术筛选脑靶向功能肽及其修饰纳米粒的脑内递药研究: [博士学位论文]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [19] Jestin J L. Functional cloning by phage display. *Biochimie*, 2008, 90(9): 1273-1278.
- [20] 裴彦祯. 乙肝表面抗原在乙肝相关疾病进展过程中的变化: [硕士学位论文]. 天津: 医科大学, 2012.
- [21] Muhamad A, Ho K L, Rahman A, *et al.* Solution Structure and In Silico Binding of a Cyclic Peptide with Hepatitis B Surface Antigen. *Chemical biology & drug design*, 2013, 81(6): 784-794.
- [22] 沈抒殚. 从噬菌体展示随机肽库中淘选多肽药物: [本科学位论文]. 北京: 北京大学, 2002.

- [23] 田旺. 应用噬菌体随机肽库技术研究干扰素- $\alpha 2b$  的模拟肽和拮抗肽: [博士学位论文]. 天津: 南开大学, 2006.
- [24] 罗红. 利用噬菌体随机肽库筛选类风湿关节炎相关多肽及诊断价值: [硕士学位论文]. 大连 :医科大学, 2004.
- [25] Tan W S, Tan G H, Yusoff K, *et al.* A phage-displayed cyclic peptide that interacts tightly with the immunodominant region of hepatitis B surface antigen. *Journal of clinical virology*, 2005, 34(1): 35-41.
- [26] Tim Clackson, Henry B. Lowman. 噬菌体展示: 通用实验指南. 马岚, 卢帅, 李铭, 等. 化学工业出版社: 69~70.
- [27] 周玉亭, 曹建斌.  $\alpha$ -互补与蓝白斑筛选机制的探究. 生物技术通报, 2010 (8): 218-221.

## 致 谢

四年大学时光转瞬即逝，又到一年毕业的时节。这一路走来有喜悦，有悲伤，有挫折。非常感谢身边的亲人朋友，一直以来对我的鼓励和支持，让我能顺利完成学业。

首先，要感谢我的导师洪章勇教授，在他的帮助指导下，我才能顺利完成毕业设计。也感谢洪老师能够接受我为他的学生，让我能在这里继续我的梦想。第一次找到老师，洪老师非常热情的给我讲解他的研究兴趣和方向，让我感受到生物医学的魅力，也让我坚定想要留在这里，学到更多生物医学的知识。洪老师在学术中精益求精，严谨务实，对学生非常热情和蔼，对每一个想要来实验室的本科生都非常欢迎，并耐心讲解生物学前沿知识，并支持锻炼本科生的动手能力和创新科研能力，在这衷心感谢老师给我的帮助和支持。

然后，要感谢生物站 C203 的师兄师姐们，让在实验室有家一般的感觉。感谢孔秀琪师姐和李明洁师姐在我来实验室之初，带我了解实验室的结构和基本实验操作技术，并耐心培养我良好的实验操作习惯。感谢何明皓师兄，他耐心给我讲解实验原理操作方面的知识，在他的指导帮助下，不仅让我顺利的完成毕业设计，也学到了许多有用的实验技术，为我今后的科研道路奠定了坚实的基础。

最后，我想感谢一下 18 宿 417 的亲人们，谢谢她们在我遇到困难时给予我无私的帮助，也谢谢她们理解我在毕业这段时间偶尔的小脾气。谢谢我的舍友们在人生最美好的时光陪伴着我，一起欢笑，一起成长。

由衷的感谢人生道路上遇到的每一个人，感谢每一个帮助我支持关心我的人！

