

357
11
Q754
S 341 411
从随机噬菌体肽库中筛选抗草鱼
出血病病毒多肽的研究*王冰¹ 柯丽华¹ 江红¹ 田波² 李传昭²¹(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)²(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 从随机噬菌体九肽表位库中筛选出抑制草鱼出血病病毒(Grass Carp Hemorrhage Virus, GCHV₈₇₃)感染的多肽分子。采用完整、生物素化的草鱼出血病病毒颗粒作为受体, 与以融合蛋白形式在丝状噬菌体 fUSE5 的外壳蛋白 III 的 N-端表达的随机九肽库作用。经三轮体外亲和筛选(Biopanning)及 ELISA 法检测后, 从肽库中筛选出 16 个与病毒高亲和力结合的噬菌体克隆, 其中六个阳性克隆能有效地抑制病毒在 CIK 细胞中的复制, 并使病毒的半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)下降五个数量级。表明噬菌体肽库技术完全能够应用于抗病毒研究, 为研制抗病毒短肽制剂打基础。

关键词 随机噬菌体九肽库, 体外亲和筛选, 草鱼出血病病毒(GCHV)873, 抗病毒多肽

长期以来, 人们试图筛选出像抗生素那样有效的抗病毒制剂, 但迄今收效甚少。根据蛋白质之间相互作用特异性和亲合力主要决定于局部肽段中的少数几个关键残基; 而含有关键残基的短肽能够模拟蛋白质上的决定簇, 主导蛋白质之间的识别和相互作用。近年来, 国外学者采用化学合成法或基因工程法构建随机肽库, 研究蛋白质之间的分子识别、酶与底物的结合、抗原与抗体的相互作用, 并使之成为一门新的快速有效、潜力巨大的技术, 广泛应用于与分子识别有关的领域^[1], 如: 抗生素筛选^[2]、酶抑制剂筛选^[3]、小分子药物设计^[4]、重组疫苗设计^[5,6]及病毒高亲和力的抗体^[7,8]、肿瘤治疗^[9]及免疫治疗^[10], 由于肽库技术具有如此重要的理论价值和应用前景, 作为一项具有极大潜力的抗病毒新策略, 越来越受到重视, 但在我国尚属空白。本文报道了从随机肽库中筛选出与草鱼出血病病毒颗粒特异性结合的短肽分子, 并能有效地中和病毒、阻止病毒感染。这一新的途径提示了应用肽库技术在体外筛选抗病毒制剂的可能性, 并为高效抗病毒短肽制剂的设计打下基础。

材料与amp;方法

1 病毒 草鱼出血病病毒(GCHV₈₇₃)来源于湖南省邵阳地区, 属于呼肠孤病毒科的新成员^[11,12]。由本实验室提供。

收稿日期: 1997-09-11, 修回日期: 1998-03-27

* 本文获 SCBA 第七届国际学术大会(加拿大, 多伦多, 1997)资助。在专题会上宣读过

2 病毒的增殖、提取及纯化 本实验采用草鱼肾组织细胞(CIK)^[13],体外细胞培养按本实验室方法进行^[14]。病毒的提取与纯化参见文献^[15]。经差速离心,氯化铯不连续梯度离心(30%、40%、50%、60%,W/V;13 000 g,10 ℃,4 h)收集病毒区带(病毒颗粒的沉降系数为1.38 g/mL),经TM液(100 mmol/L Tris-HCl pH8.0,10 mmol/L MgCl₂)透析后,获得纯化的病毒颗粒样品。

3 病毒样品的电镜观察及定量测定 纯化的病毒制备用2%磷钨酸(PTA,pH 6.9)负染,在JEM-100C型电子显微镜下观察完整病毒颗粒的形态,见图1。用分光光度计(Shimadzu,UV-300)分别在光波260 nm和280 nm处的光密度值测病毒样品,按公式^[16]计算出病毒蛋白质的含量。

4 GCHV₈₇₃的生物素标记 参照文献[17]进行,操作步骤如下:在硅化的离心管中,加入19.6 μL病毒悬液(约含病毒3.72 μg)与4.4 μL 1 mol/L NaHCO₃(pH8~8)充分混合;立刻加入2 mL 2 mmol/L NaAC(pH6.0)(含NHS-LC-Biotin 0.5 mg/mL),室温静置2 h;加入500 μL 1 mol/L ethanolamine (pH 9.0),室温下再静置2 h;加入20 μL 50 mg/mL dialysed BSA及1 mL 1×TBS充分混匀,总体积为3.5 mL;然后在超滤膜(30-kDa Centricon ultrafilter)上浓缩,先后用1×TBS及TBS/azid各洗涤一次,终体积为160 μL。浓缩后,生物素化病毒的终浓度为85.75 μg/mL。

5 噬菌体及菌株 丝状单链DNA噬菌体φUSE5(Tc^r)为载体构建随机噬菌体多肽库,大肠杆菌K91(K^r)为受体菌。

6 随机肽库体外亲和筛选 随机噬菌体多肽的构建参照J. K. Scott, G. P. Smith的方法进行^[18],本实验所采用的随机噬菌体九肽表位肽库承蒙李传昭博士构建并提供^[19]。我们采用三次体外生物淘金方法(Biopanning)来纯化噬菌体,以获得高结合力的噬菌体克隆。步骤参见文献[20, 21]。1. GCHV₈₇₃颗粒生物素化预处理;2. 第一,二,三次体外生物淘金亲和筛选,逐步降低病毒的量,以获得高结合力的噬菌体;3. 酸洗脱;4. 转化大肠杆菌K91,扩增噬菌体克隆;5. 噬菌体克隆的分离与纯化,采用PEG沉淀法沉淀两次^[22]。

7 ELISA法鉴定高结合力的噬菌体克隆 1. 在LB平板(含Tc 40 μg/mL, Kan 50 μg/mL)上,用无菌牙签挑选经过三轮筛选后噬菌体转化的单个菌落,转至含3 mL LB(Tc 40 μg/mL; Kan 100 μg/mL)的试管中。37 ℃条件下摇床培养24 h; 2. 将1.5 mL培养液倒入1.5 mL离心管中,离心1 min,将上清液1.2 mL移至另一离心管中; 3. 加入16% (V/V)的PEG/NaCl,充分混匀,4 ℃静置过夜。4. 离心(12 000 r/min, 10 min),去上清。重复一次直至完全除去上清液; 5. 将沉淀溶解于1 mL TBS中,待其完全溶解后,离心(1 min),除去不溶物; 6. 吸取上清液1 mL,并移至另一离心管中,加入16% (V/V)的PEG/NaCl,充分混匀后,4 ℃静置过夜; 7. 离心(12 000 r/min, 10 min),吸出上清液,得到噬菌体沉淀; 8. 将沉淀完全溶解于110 μL 0.15 mol/L NaCl,离心(12 000 r/min, 1 min); 9. 取上清液移至另一离心管中,加入10% (V/V) 1 mol/L 醋酸 12.2 μL,冰浴10 min,离心(12 000 r/min, 10 min); 10. 沉淀溶解于400 μL 1×TBS,4 ℃放置,终浓度为5×10¹¹ particles/mL,准备下一步ELISA实验; 11. 在96孔Costar板上,每孔中加入90 μL纯化的噬菌体颗粒(5×10¹⁰ particles)及10 μL包被液(10×),4 ℃放置过夜; 12. 将Costar板各孔,用TBS/Tween(0.1%)冲洗三次,TBS冲洗一次; 13. 各孔中加入现配的封闭液350 μL,37 ℃放置2 h。用TBS/Tween(0.1%)冲洗三次,TBS冲洗一次; 14. 各孔加入100 μL稀释的BioGCHV(5 μg/mL)。4 ℃放置过夜; 15. 再用TBS/Tween(0.1%)冲洗三次,TBS冲洗一次。加入100 μL亲和素-过氧化物酶混合物。37 ℃放置2 h; 16. 用TBS/Tween(0.1%)冲洗Costar板各孔三次,TBS冲洗一次; 17. 各孔加入现配的100 μL ABTS显色液; 18. 室温暗处放置1 h,阳性克隆孔显蓝色,用酶联检测仪测定A₄₁₀及A₄₉₅值。

8 阳性噬菌体克隆抗病毒复制能力的测定 实验分组见表1,实验步骤如下:在基本铺满CIK细胞的96孔Costar培养板各孔中,加入6 μL上述实验组的噬菌体。28 ℃水浴中保温30 min(保证病毒与特异性配体的结合)。吸出Costar板各孔中的10% MEM培养基。加入各组不同稀释度的病毒及噬菌体,并在室温下吸附30 min。分别吸收各孔中的病毒及噬菌体克隆。各孔用无血清的MEM(pH7.0)洗涤一遍后,加入2% MEM细胞维持液,0.2 ml/孔。28 ℃,培养,定时观察,48 h后检测结果,并按Reed and Munch公式计算各组的TCID₅₀^[23]。

表1 抗病毒试验分组
Table 1 The different groups of anti-viral test

病毒 Virus	病毒稀释度 Concentration of GCHV	病毒接种量/孔 Dose of GCHV/well(μ L)	噬菌体/孔 Phages/well
单纯病毒感染组 GCHV ₈₇₃ control	$10^0 \sim 10^{-10}$	50	
单纯野生型 PHAGE Wild-type phage control	$10^0 \sim 10^{-10}$	50	6 μ L (4.5×10^{10} particles)
阳性克隆组(16个) Positive clones	$10^0 \sim 10^{-10}$	50	6 μ L (4.5×10^{10} particles)

注:本实验噬菌体每孔 6 μ L, 相当于三轮筛选后做 ELISA 时噬菌体的量, $4 \sim 5 \times 10^{10}$ 噬菌体颗粒/孔。各稀释度接种 6 孔。

Note: The dose of phages in a well is 6 μ L, that is equal in dose of ELISA test, $4 \sim 5 \times 10^{10}$ phages particles/well. Every concentration have 6 wells.

结 果

我们用氯化铯梯度离心纯化的草鱼出血病病毒颗粒作为受体,使噬菌体表面展示的随机序列短肽与生物素标记的病毒颗粒在体外结合,经过三轮亲和筛选,检测噬菌体每一轮回收率,并不断地降低与噬菌体结合的病毒浓度,以获得高亲和力的噬菌体克隆。表2表明:在病毒量不断下降的同时,每一轮噬菌体的回收率(0.22%、1.10%、2.5%)却在逐步上升,结果说明每轮筛选所获得的特异性噬菌体在不断地富集。三轮亲和筛选后,在96孔 Costar 板上用酶联免疫方法(ELISA)反复测定噬菌体与病毒颗粒的结合能力,最终从随机噬菌体九肽库中筛选出16个与病毒颗粒稳定、高度亲和结合的特异性噬菌体克隆,结果如图1及表3。

表2 每一轮筛选中病毒加入量及噬菌体回收率
Table 2 The added dose GCHV₈₇₃ in 1st, 2nd, 3rd round and the particles yield ratio of phage after 1st, 2nd, 3rd round of biopanning

筛选轮数 Round	病毒用量 Bio-GCHV 100 μ L (μ g)	酸洗脱下的噬菌体 Phage eluted in acid particles/mL	扩增后的噬菌体 After amplification in K91 particles/mL	噬菌体回收率 Yield ratio %
第一轮 1st	8.60	2.14×10^9	5.0×10^{11}	0.22
第二轮 2nd	0.86	5.50×10^8	2.4×10^{10}	1.10
第三轮 3rd	0.43	6.00×10^6	4.0×10^{10}	2.50

注:原始随机噬菌体九肽库的浓度: 1×10^{12} particles/mL

Note: The original library concentration: 1×10^{12} particles/mL.

在体外培养草鱼肾组织细胞(CIK cells),繁殖病毒,用终点法测定草鱼出血病病毒的半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)。筛选出来的噬菌体克隆中有六个阳性克隆能使病毒的 TCID₅₀ 下降至少5个数量级,见表3。从表中我们不难发现,与病毒结合力最高的噬菌体克隆并非就是我们期望的阳性克隆,关键在于噬菌体展示的多肽结合在 GCHV₈₇₃ 颗粒表面的什么部位,该部位是否与 GCHV₈₇₃ 的侵染及复制功能有关。我们需要的是既能与 GCHV₈₇₃ 高度结合,又能抑制 GCHV₈₇₃ 增殖的阳性克隆。

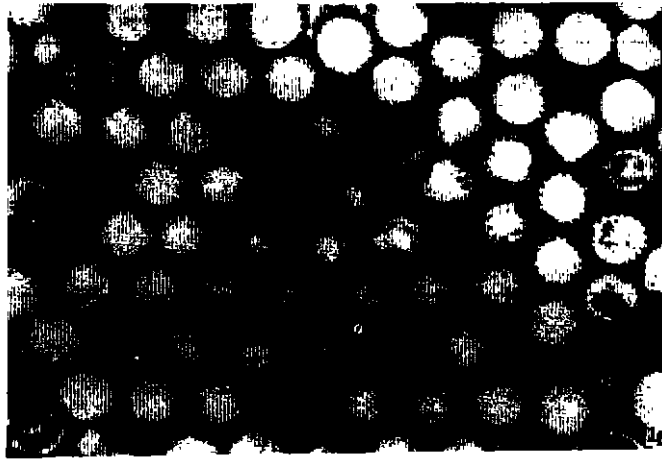
图 1 草鱼出血病病毒的负染电镜观察(100 000 \times)Fig. 1 Electron micrographs of negative stained of GCHV₈₇₃(100 000 \times)

表 3 三轮筛选后噬菌体克隆 ELISA 检测及抗病毒实验结果

Table. 3 The O. D. and TCID₅₀ of different groups

分组 Group	ELISA 的 O. D. 值 ELISA test after 3 round (A ₄₁₀ - A ₄₉₅ × 10 ³)	病毒的 TCID ₅₀ TCID ₅₀ of GCHV ₈₇₃
病毒对照组 GCHV ₈₇₃ control	0.00	10 ⁻¹⁰
野生型噬菌体对照组 Wild-type phage control	0.00	10 ^{-9.8}
阳性克隆组 Positive clone group		
53 #	550	* 10 ^{-6.0}
55 #	410	10 ^{-6.2}
56 #	690	* 10 ^{-6.0}
57 #	450	10 ^{-7.9}
58 #	530	10 ^{-7.0}
59 #	470	10 ^{-7.9}
61 #	670	* 10 ^{-6.0}
65 #	380	10 ^{-7.0}
193 #	660	10 ^{-6.7}
194 #	510	* 10 ^{-5.6}
195 #	520	* 10 ^{-5.6}
198 #	530	10 ^{-7.2}
199 #	450	10 ^{-6.2}
201 #	350	10 ^{-7.0}
202 #	670	* 10 ^{-5.7}
203 #	650	10 ^{-6.4}

注: # - 筛选得到的克隆编号 * - 亲和力高, 且抗病毒性强的阳性克隆

Note: # - The number of positive clones * - The clones with high affinity and strong anti-viral ability

讨 论

在抗动物病毒研究中,抗双链 RNA 病毒的基因工程研究甚少,草鱼出血病病毒(GCHV₈₇₃)至今仍冠以“中国特产病毒”的称号,为呼肠孤病毒科之新属、新种,国外尚无草鱼出血病的研究报道。因此,研究以其为代表的双链 RNA 病毒有特殊的意义。

随机肽库技术是国际上近年发展的一项潜力极大的新技术,逐步地用于与分子识别有关的领域,为小分子药物设计、重组疫苗设计、抗病毒制剂筛选带来希望。虽然该技术在筛选抗病毒短肽分子方面的研究刚刚起步,但是它作为一项抗病毒新策略越来越受到重视,在我国尚未见报道。Dyson, M. R. 和 Murray, K. (1995)^[24]等曾经以纯化的乙肝病毒 HBcAg 为受体,从噬菌体 fUSE 六肽库中获得能抑制该病毒装配的特异性六肽,提示了用肽库技术抗病毒的可能性。Thompson, J. 等(1996)^[7]用该技术获得抗 HIV 第三高变区的高亲和力的特异性短肽。但是上述研究均没有采用纯化的完整病毒颗粒去筛选抗病毒的多肽,目前,也没有文献报道用完整的病毒颗粒去筛选抗病毒的短肽。本研究设计方案与以往的肽库筛选实验不同,我们采用生物素化完整的 GCHV₈₇₃病毒颗粒来筛选噬菌体库,获得针对该病毒颗粒表面生物活性单位的高亲和力多肽。与其它方法相比,其创新之处是:(1)用纯化的完整 GCHV₈₇₃作为受体,筛选能抑制该病毒复制的特异性短肽,既不需要了解详细的病毒的核酸及蛋白质结构,也不需要分离、纯化病毒某一抗原。只要选出的短肽能与病毒感染相关的重要靶位点结合,就能起到阻断病毒侵染细胞的效果,达到抑制 GCHV₈₇₃在细胞中复制的目的;(2)与以往用病毒单一抗原分子筛选出的多肽比较,用完整的草鱼出血病病毒颗粒筛选出的多肽能够更广泛地封闭病毒表面的活性位点,更好地抑制病毒复制;(3)由于抗病毒的多肽表达在噬菌体表面,而不是来源于动物血清或异体血清,且分子量小,故不会引起受体的免疫应答。

这些多肽的作用机理同抗体与病毒中和反应相类似,当某一多肽与该病毒颗粒结合后,不仅能模拟病毒的抗体,封闭病毒表面抗原决定簇,还可能改变病毒表面蛋白质的结构,阻止某些蛋白质在病毒感染过程中发挥作用。与其他抗病毒策略如核酶和反义 RNA 等技术相比较,本实验采用随机肽库技术来筛选抗病毒短肽,不需要了解病毒的核酸及蛋白质结构,从肽库中筛选出的特异性短肽能直接与病毒感染相关的靶位点结合,抑制该病毒在 CIK 细胞中的增殖。因此,用肽库技术筛选抗 GCHV₈₇₃复制的多肽具有重要的理论价值和广泛的应用前景。

实验结果揭示,肽库技术完全能够应用于抗病毒方面的研究。本实验不仅获得了抑制 GCHV₈₇₃复制的特异性短肽,并在此基础上,为研制高效抗病毒感染的短肽制剂及小分子抗病毒药物的设计奠定基础。

参 考 文 献

- 1 Scott J K, Craig L. Random peptide libraries. *Current Opinion in Biotechnology*, 1994, 5: 40 - 48
- 2 Houghten R A, Pinilla C, Blondelle S E *et al*. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature*, 1991, 354: 84 - 86

- 3 Vanmeijer M, Roelofs Y, Neels J *et al.* Selective screening of a large phage display library of plasminogen-activator inhibitor-I mutants to localize interaction sites with either thrombin or the variable region-1 of tissue type plasminogen-activator. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 7423 - 7428
- 4 Houghten R A. The broad utility of soluble peptide libraries for drug discovery. *Gene*, 1993, 137: 7 - 11
- 5 Keller P M, Arnold B A, Shaw A R *et al.* Identification of HIV vaccine candidate peptide by screening random phage epitope libraries. *Virology*, 1993, 193: 709 - 716
- 6 Perham R N, Thrny T D, Willis AE *et al.* Engineering a peptide epitope display system on filamentous bacteriophage. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, 17: 25 - 31
- 7 Thompson J, Pope T, Tung J S *et al.* Affinity maturation of a high-affinity human monoclonal-antibody against the 3RD hyper-variable loop of human-immunodeficiency virus - Use of phage display to improve affinity and broaden strain reactivity. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 256: 77 - 88
- 8 Wisniewski A, Cavacini L, Posner M *et al.* Human-antibody variable region gene usage in HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology*, 1996, 11: 31 - 38
- 9 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature*, 1996, 380: 364 - 366
- 10 Andersen P S, Stryhn A, Hansen B E *et al.* A recombinant antibody with the antigenspecific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T-cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1820 - 1824
- 11 柯丽华, 方勤, 蔡宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性. *水生生物学报*, 1990, 14: 153 - 159
- 12 王伟, 蔡宜权, 柯丽华等. 草鱼出血病病毒多肽的基因定位. *中国病毒学*, 1994, 9: 356 - 361
- 13 左文功. 草鱼肾组织细胞系(CIK)的建立. *淡水渔业*, 1984, 118: 38
- 14 方勤, 柯丽华, 蔡宜权. 草鱼出血病病毒的生长特性及高滴价培养. *病毒学杂志*, 1989, 3: 315 - 319
- 15 王伟, 陈延, 柯丽华等. 草鱼出血病病毒武汉南湖株的精细结构与基因组及多肽的研究. *病毒学报*, 1990, 6: 44 - 49
- 16 周润琦著. *生物化学基础* 第1版. 北京: 化学工业出版社, 1992. 12 - 14
- 17 Oldenberg K R, Loganathan D, Goldstein I J *et al.* Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5393 - 5397
- 18 Scott J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, 249: 386 - 390
- 19 李传昭. 随机噬菌体九肽表位库的构建及筛选. [博士学位论文]. 北京: 中国科学院微生物研究所. 1997
- 20 Daniel D A, Lane D P. The characterisation of p35 binding phage isolated from phage peptide display libraries. *J Mol Biol*, 1994, 243: 639 - 652
- 21 Sanna P P, Williamson R A, Logu A D *et al.* Directed selection of recombinant human monoclonal antibodies to herpes simplex virus glycoproteins from phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 6439 - 6443
- 22 Cwirla S E, Peter E A, Barrett R W *et al.* Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 6378 - 6382
- 23 杨复华著. *病毒学*. 第1版. 长沙: 湖南科学出版社, 1992, 107 - 108
- 24 Dyson M R, Murray K. Selection of peptide inhibitors of interactions involved in complex protein assemblies: Association of the core and surface antigens of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2194 - 2198

The Screen of Inhibitors of Grass Carp Hemorrhage Virus from a Phage Displayed Random Peptide Library

Wang Bing¹ Ke Lihua¹ Jiang Hong¹ Tien Po² Li Chuanzhao²

¹(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

²(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Screening inhibitors of GCHV₈₇₃ (Grass Carp Hemorrhage Virus) to inhibit its replication in CIK cells *in vitro*, the biotinylated intact virion of GCHV was used to react on a random sequenced peptide library of 9 amino acids fused on protein III of filamentous phage *fUSE5*. After 3 rounds of affinity selection, immuno-screening and ELISA, 16 positive clones were selected using CsCl gradient purified-virus particles, 6 of them inhibited the replication of GCHV in CIK cells *in vitro* and decreased the TCID₅₀ of GCHV from 10⁻¹⁰ to 10⁻⁵. These findings open possibility of identifying virus proteins or epitopes as targets for antiviral agents.

Key words Random peptide library, Biopanning *in vitro*, Grass Carp Hemorrhage Virus, Antiviral peptides