利用噬菌体随机肽库筛选抗柯萨奇病毒 B3 多肽的研究

刘 念[1]，李 凡[1**]，远 航[2]

（1.吉林大学基础医学院病原生物教研室，吉林长春，130021；2.吉林大学第二医院肾病内科，吉林长春，130041）

Anti-CVB3 Polypeptides Selected from A Phage Display Random Peptide Library

LIU Nian[1]，LI Fan[1**]，YUAN Hang[2]

（1. Dept.of Pathogenobiology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Dept. of Nephrology, No. 2 Hospital, Jilin University, Changchun 130041，China）

Abstract：CVB3 was propagated in Hep-2 cells and purified by sucrose gradient centrifugation. The purified CVB3 reacted with random peptides library displaying 9 amino acids. After 3 rounds of screening, the capability of phage peptides in the inhibition of CVB3 replication was determined. DNA was extracted from the positive phage clones, sequenced and the amion acid sequence was deduced. The results showed that 3 phage positive peptides were identified and bound to CVB3 with high affinity. The binding of the peptide to CVB3 was shown to inhibit replication substantially. The TCID50 of progeny virus was reduced from $10^{-7.5}$SFU/mL to $10^{-5.25}$, 10^{-6}, $10^{-5.5}$SFU/mL by the three peptides, respectively. The data demonstrate that peptides against CVB3 can be selected from phage peptide library and may prove useful as antiviral peptides agents.

Keywords：CVB3 ; Phage peptide libray ; Antivirus peptides

摘要：本实验将柯萨奇病毒 B3 型（CVB3）大量扩增，应用蔗糖密度梯度离心法纯化病毒。利用噬菌体随机 9 肽库进行筛选，3 轮淘洗后，测定噬菌体克隆抗病毒复制能力。提取阳性克隆 DNA 并进行测序，推导外源多肽的氨基酸序列。结果表明：3 个具有明显抗病毒复制能力的噬菌体阳性克隆被筛选出来，使 TCID50 由 $10^{-7.5}$SFU/mL 分别降至 $10^{-5.25}$、10^{-6}、$10^{-5.5}$SFU/mL，由此证明可以应用噬菌体肽库来筛选具有抗病毒作用的多肽，本研究为抗病毒多肽制剂的研究奠定了基础。

关键词：柯萨奇病毒 B3；噬菌体肽库；抗病毒多肽

中图分类号：R373 **文献识码**：A **文章编号**：1003-5125(2006)03-0281-03

柯萨奇病毒 B3 型（*Coxsackievirus* B3，CVB3）是引起病毒性心肌炎（Viral myocarditis，VMC）最常见的病原体。不但可以引起急性 VMC，在慢性心肌疾病的发生、发展过程中也起重要作用[1]。与许多病毒感染性疾病一样，由于缺乏特异性抗病毒药物，CVB3 感染引起的 VMC 无法得到有效和及时的治疗。

噬菌体展示技术（phage display techniques）是近年发展起来的一项新的分子生物学技术，已被广泛的应用于抗原表位的确定[2]、蛋白分子的相互作用位点的分析[3]、药物的设计与开发[4]、疫苗的研究[5]等。近年来，在特异性抗病毒多肽的筛选上也取得了成功。本研究应用噬菌体展示技术，旨从完整的 CVB3 病毒

收稿日期：2005-10-26，修回日期：2006-01-20
作者简介：刘 念（1976-），女，硕士研究生，主要研究方向：分子病毒学
** 通讯作者. Corresponding anthor. Tel: 0431-5612747, E-mail：liunianer76@ yahoo.com.cn

颗粒中筛选出具有特异性抗病毒作用的多肽。

1 材料与方法

1.1 病毒、宿主细胞与肽库

CVB3 株由吉林大学病原生物教研室提供；Hep-2 细胞为人喉癌上皮细胞，由吉林大学病原生

收稿日期：2005-10-26，修回日期：2006-01-20
作者（第一）简介：刘念（1976-），女，硕士研究生，主要研究方向：分子病毒学
通讯作者：李凡，女，教授，博士生导师，从事微生物学研究
联系电话：0431-5612747，E-mail：liunianer76@ yahoo.com.cn

物教研室提供；噬菌体随机 9 肽库（滴度为 1.5×10^{13}PFU/mL）与宿主菌 BL21 购自美国 Novagen 公司。

1.2 CVB3 的培养及扩增

80％以上 Hep-2 细胞呈贴壁生长时，接种 CVB3 病毒液，培养 24~48 h 观察结果，显微镜下观察细胞 80%以上发生细胞病变效应（CPE）时，收获病毒液-80℃冻存。待收获的病毒液量为 1L 时，反复冻融 4 次，5 000r/min 4℃离心 15min，取上清。在混合后的病毒悬液中加入 8％PEG/2.5 mol/L NaCl，反复振荡，4℃静止过夜；10 000r/min 4℃离心 15min，沉淀重悬于无菌生理盐水，4℃10 000r/min 离心 1min，取上清。

1.3 CVB3 的纯化和鉴定

制备蔗糖密度梯度介质（30％、40％、50％、60％），将病毒抽提物小心铺加于梯度介质上，45000r/min，4℃离心 5h，分部收集各带。将少量回收样品，分别加入长满 Hep-2 细胞的 96 孔板中，观察 CPE，鉴定病毒的梯度离心效果。将病毒回收液在透析液中进行透析，4h 换液 1 次，透析 24h。取透析后的病毒液，加入 PEG/NaCl，混匀后 4℃过夜，8 000r/min 离心 30min，沉淀重悬于 0.1mol/L $NaHCO_3$ 溶液，10000r/min 离心 15min，留取上清置于-20℃保存。

1.4 肽库筛选

将 CVB3 病毒液 100μL 加入 96 板孔；封闭液封闭非特异性结合位点，TBST 快速洗板 6 次；加入噬菌体肽库液 5μL（浓度为 2.0×10^{12}pfu），室温缓慢振荡 1h，TBST 洗板 10 次；每孔加入 100μL 0.2 mol/L 甘氨酸一盐酸 (pH2.2，1 mg/mL BSA 轻摇不超过 10min；用 15μL 1mol/L Tris-HCl (PH9.1)中和，此为第一轮阳性噬菌体洗脱液；取 1μL 测定噬菌体滴度，剩余洗脱液加入对数生长期的 BL21 菌液中进行扩增，37℃250r/min 振荡培养 3h，将培养液 4℃，10 000 r/min 离心 10min，抽取 80％上清加入 1/6 体积的 20％PEG/NaCl 沉淀噬菌体, 进行噬菌体肽库滴度测定；重复上述步骤，调整投入噬菌体量为 1.0×10^{12}PFU，共进行 3 轮筛选后，计算噬菌体的产率。

1.5 阳性噬菌体克隆抗病毒复制能力检测

在铺满 Hep-2 细胞的 96 孔培养板中，加入递比稀释的 CVB3(10^{-1}~10^{-10})50μL 和阳性噬菌体 5μL（滴度均为 5×10^{10}），37℃混合培养，同时设立病毒对照组（只加入 50μL CVB3，不加噬菌体），定时观察，72 h 后综合检测结果，并按 Reed-Muench 法计算各组 $TCID_{50}$，挑选具有抗病毒活性的噬菌体克隆。

1.6 阳性克隆 DNA 测序

提取具有抗病毒能力的重组噬菌体 DNA，进行测序，测序引物为：5’-GGAGCTGTCGTATTCC AGTC-OH-3’。

2 结果

2.1 病毒培养及纯化鉴定

正常 Hep-2 细胞呈梭形，将 CVB3 接种于 Hep-2 细胞后 24～48h 出现明显的 CPE，细胞变圆、融合、脱落。经过蔗糖密度梯度离心，回收样品中，只有在 40%～50%蔗糖介质中的区带（病毒颗粒的沉降系数为 1.23g/mL 现了明显的 CPE，其余各样品均无 CPE。

2.2 肽库筛选

经过三轮筛选，分别计算噬菌体的投入量、产出量和回收率，结果如下，可见回收率不断提高，说明阳性噬菌体不断富集。

表 1 筛选噬菌体的回收率

Table 1 Yield of washed phages by biopanning

Round	Input (PFU/mL)	Output (PFU/mL)	Yield (output/input)
1	2.0×10^{12}	3.7×10^{6}	1.85×10^{-6}
2	1.0×10^{12}	1.2×10^{7}	1.2×10^{-5}
3	1.0×10^{12}	1.7×10^{8}	1.7×10^{-4}

2.3 三轮筛选后噬菌体克隆抗病毒实验

随机挑取 14 个噬菌体克隆，检测噬菌体单克隆对 CVB3 复制能力的抑制作用，以半数组织感染剂量（$TCID_{50}$）为观察指标。表 2 显示 3 个噬菌体克隆具有较明显抑制 CVB3 复制的作用，使 $TCID_{50}$ 由 $10^{-7.5}$SFU/mL 分别降至 $10^{-5.25}$、10^{-6}、$10^{-5.5}$SFU/mL。

表 2 各组噬菌体克隆的抗病毒实验结果

Table 2 The antivirus results of each phage clones

Groups	$TCID_{50}$(SFU/mL)
Viral control	$10^{-7.5}$
1	$10^{-7.25}$

2	$10^{-7.75}$
3	$10^{-7.5}$
4	$10^{-7.25}$
5[a]	$10^{-5.25}$
6	$10^{-7.75}$
7	$10^{-7.25}$
8	$10^{-7.0}$
9	$10^{-7.75}$
10 [a]	$10^{-6.0}$
11	$10^{-7.25}$
12 [a]	$10^{-5.5}$
13	$10^{-6.75}$
14	$10^{-7.0}$

[a]The clones had strong antiviral ability

2.4 噬菌体克隆 DNA 的提取、DNA 测序

分别提取 5、10、12 组阳性噬菌体克隆，根据 DNA 测序结果，推导氨基酸序列如表 3。这些多肽即为具有抗病毒活性的阳性噬菌体呈现多肽。

表 3 阳性噬菌体随机多肽序列

Table 3 Amimo acid sequences of positive clones phage

Clone No.	Polypeptide sequence
5	Pro-Gly-Ala-Ser-Pro-Lys-Val-Gly-Asp
10	Thr-Gly-Arg-Glu-Pro-Gln-Gly-Arg-Arg
12	Phe-Thr-Gly-Arg-Gln-Val-Gln-Gly-Arg

3 讨论

长期以来，由于缺乏特异性的治疗药物，给病毒感染性疾病的治疗带来了极大地困难。利用完整病毒颗粒作为靶分子，通过生物淘洗技术，能够筛选到与病毒相互作用的噬菌体多肽。Pulli 等用纯化埃可病毒 22(EV22)作为靶分子，筛选的多肽能部分阻止埃可病毒感染人 A549 肺癌细胞系[6]。Heiskanen 等研究发现,与汉坦病毒特异性结合的噬菌体多肽也能抑制该病毒对培养细胞的感染[7]。Ramanujam 等应用完整的新城疫病毒（NDV）颗粒筛选到多条具有抑制病毒活性的噬菌体多肽[8]。王冰等从随机噬菌体 9 肽库中筛选出 6 个能够有效抑制病毒在 CIK 细胞中的复制的克隆[9]。利用相同方法，获得了呼吸道合胞病毒（RSV）的抑制性多肽[10]。

为了提高阳性噬菌体的回收率，在第一轮筛选时加入了较大量的噬菌体肽库，以保证肽库中的每一种噬菌体克隆都含有较高的拷贝数。经过 3 轮筛选，结果显示每轮筛选所得的噬菌体回收率逐步升高，说明每轮筛选所得的特异性噬菌体多肽在不断的富集。在随机挑取的 14 个噬菌体克隆中，发现 3 个具有抑制病毒复制作用的噬菌体多肽。本试验期望获得具有抗 CVB3 作用的同源序列，但在 DNA 测序结果中没有发现明显的同源序列。分析其原因，一方面可能由于具有抗病毒活性的样本数量较少，另外一方面可能是由于 CVB3 表面含有较多的抗原结合表位所致。

本实验应用噬菌体肽库技术筛选获得了具有抗病毒作用的特异性多肽，为研制高效小分子抗病毒药物奠定了基础。

Referenes

[1] Bowles N E, Ni T, Kearney D J, *et al*. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction [J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 6 (42) : 473-476.

[2] Apostolopoulos V, Lofthouse S A, Popovski V, *et al*. Peptide mimics of a tumor antigen induce functional cytotoxic T cells [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(3):276-280

[3] Han Z Z，Su G F，Huang C F，(韩照中，苏国富，黄翠芬) *et al*. Screening of Cellulose Binding Motif(CBM)from Phage Library [J]. Acta Biochimica et Biophy Sinica (生物化学与生物物理学报), 1998, 30 (3) : 263-266.

[4] Ferrer M, Harrison S C, *et al*. Peptide ligands to human immunodeficiency virus type1 gp120 identified from phage display libraries [J]. Virology. 1999, 73 (7) : 5795-5802.

[5] Berger M, Shankar V, Vafai A, *et al*. Therapeutic applications of moloclonal antibodies [J]. Am J Med Sci, 2002, 324 (1) : 14-30.

[6] Pulli T, Koivunen E, Hypia T. Cell surface interactions of echovirus22 [J]. Biol Chem, 1997, 272 (34) : 21176-21180.

[7] Heiskanen T, Ludkvist A, Vaheri A, *et al*. Phage displayed peptide targeting on the Puumala Hanta virus neutralization site [J]. Virology, 1997, 71 (5) : 3879-3885.

[8] Ramanujam P, Tan WS, Nathan S, *et al*. Novel peptides that inhibit the propagation of Newcastle disease virus [J]. Arch Virol, 2002, 147 (5) : 981-993.

[9] Wang B，Ke L H，Jiang H，(王　冰，柯丽华，江　红) *et al*. The Screen of Inhibitors of Grass Carp Hemorrhage Virus from a Phage Display Random Peptide Library [J]. Virological Sinica (中国病毒学), 1998, 13 (4) : 351-357.

[10] Lai K F, Huang H L, Zhong N S, (赖克方，黄海鹭，钟南山) *et al*. Anti RSV polypeptides selected from a phage display random peptide library [J]. Clin J Microbiol Immunol (中华微生物学和免疫学杂志), 2002, 22 (6) : 670-674.